



タンパク質・核酸分子の機能調節スイッチとして働く人工加水分解酵素の開発

(課題番号 12470506)

平成 12 年度～平成 14 年度科学研究費補助金 (基盤研究(B)(2)) 研究成果報告書

平成 15 年 3 月

研究代表者 小池透
(広島大学 大学院 医歯薬学総合研究科教授)





は し が き

生体分子を加水分解する酵素と同様の機能をもつ低分子化合物は、生体機能の人工的な制御や、外来性タンパク質の除去などに関連して、現在世界的に注目され、早期開発が期待されている機能性分子の一つである。本研究では、生理条件下で水酸化物イオンを捕捉し、強い求核剤となる部分構造と、弱酸性分子（チオールやフェノールなど）をアニオンとして強く捕捉する部分構造を併せもつ分子を開発し、特定のアミノ酸や核酸分子を認識し、かつその近傍の化学結合を加水分解する人工加水分解酵素を開発することを目的とした。それらのデザイン・合成に必要な反応場（酵素活性中心類似の環境）の性質を調べる目的で亜鉛のルイス酸としての性質を検討できる数種類の亜鉛酵素モデルを合成した。新たに合成した人工亜鉛酵素モデルの溶液内構造を、pH滴定法、NMR測定などにより調べた。それらの水溶液中での安定性、加水分解触媒としての活性や基質であるペプチドや核酸分子との相互作用をNMR測定により検討した。その結果、生理条件下で特定の核酸塩基配列を認識し、核酸分子の二重らせん構造を解離させることのできる新規低分子亜鉛化合物を作り出すことに成功し、効率的な遺伝子多形分析システムを開発した。さらに、亜鉛酵素モデルとチオールやリン酸化物質との錯体の安定性についても検討を行った。実用的な生体分子加水分解触媒はまだ得られていないが、本研究成果により新規の人工機能性分子（遺伝子情報制御分子、自己集積型の水溶性超分子、フォスフォプロテオーム解析試薬など）を開発することができた。

研究組織

研究代表者：小池 透（広島大学 大学院 医歯薬学総合研究科教授）

研究分担者：大谷 和弘（広島大学 大学院 医歯薬学総合研究科助教授）

交付決定額（配分額）

（金額単位：千円）

	直接経費	間接経費	合計
平成 12 年度	2,600	0	2,600
平成 13 年度	3,900	0	3,900
平成 14 年度	1,500	0	1,500
総 計	8,000	0	8,000

研究発表

（1）学会誌等

- T. Koike, T. Abe, M. Takahashi, K. Ohtani, E. Kimura, and M. Shiro
Synthesis and characterization of the zinc(II)-fluorophore, 5-dimethylamino-naphthalene-1-sulfonic acid [2-(1,5,9-triazacyclododec-1-yl)-ethyl]-amide and its zinc(II) complex
J. Chem. Soc. Dalton Trans., **2002**, 1764-1768
- E. Kinoshita-Kikuta, E. Kinoshita, and T. Koike
A novel procedure for simple and efficient genotyping of single nucleotide polymorphisms by using the Zn-cyclen complex
Nucleic Acids Research, **2002**, 30, e126(1-6)

- E. Kimura, H. Kitamura, K. Ohtani, and T. Koike
Elaboration of Selective and Efficient Recognition of Tyamine Base in Dinucleotides, Single-stranded and Double-stranded DNA by Zn(II)-Acrydinylcyclen
J. Am. Chem. Soc., **2000**, 122, 4668-4677
- E. Kimura, N. Katsube, T. Koike, M. Shiro, and S. Aoki
Effects of bis(aromatic) pendant on recognition of nucleobase thymine by Zn(II)-cyclen
Supramolecular Chemistry, **2002**, 14, 95-102
- E. Kikuta, R. Matsubara, N. Katsube, T. Koike, and E. Kimura
Selective recognition of consecutive G sequence in double-stranded DNA by Zinc(II)-macrocyclic tetraamine complex appended with an anthraquinone
J. Inorg. Biochem., **2000**, 82, 239-249
- S. Aoki, M. Shiro, T. Koike, and E. Kimura
Three-Dimensional Supramolecular Assembled from a Tris(Zn-cyclen) Complexand Di- and Trianionic Cyanulic Acid in Aqueous Solution
J. Am. Chem. Soc., **2000**, 122, 576-584

(2) 学会発表

- 阿部倫子, 大谷和弘, 小池 透
環状ポリアミン骨格を有する新規蛍光プローブの開発
日本薬学会第122年会, 千葉, 2002. 3
- E. Kimura, E. Kinoshita, and T. Koike
"Macrocyclic Zinc(II)-Fluorophores Signaling Apoptosis"
XXVIIth International Symposium on Macrocyclic Chemistry, USA 2002. 8
- 川崎昭彦, 南則雄, 竹田宏紀, 小池 透
フォスタグを利用したリン酸化蛋白質の新規な分析法
日本質量分析学会, つくば, 2003. 5

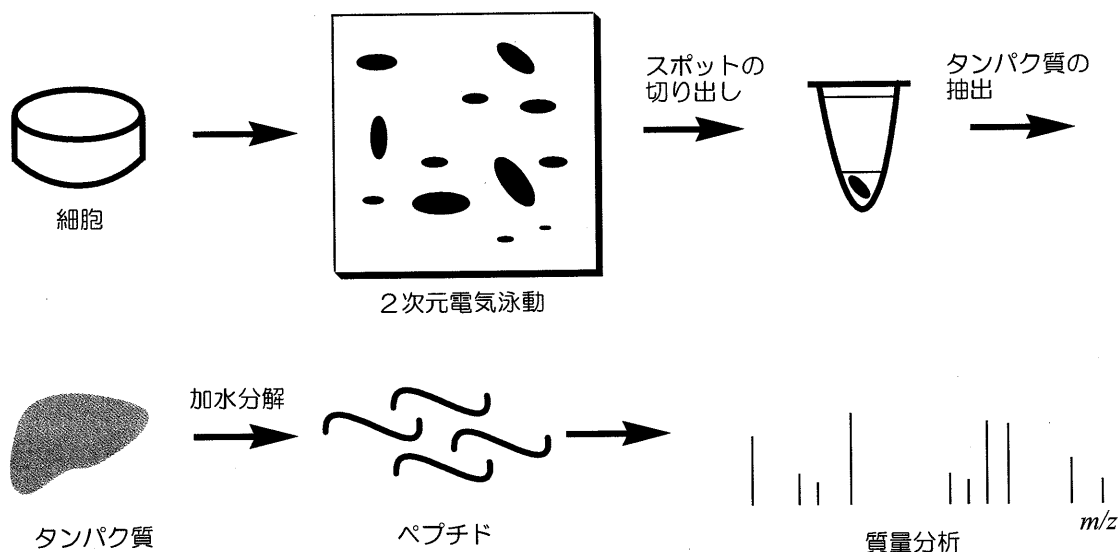
亜鉛の特性を利用したリン酸化プロテオーム解析試薬の開発

Ⅰ 序論

タンパク質のリン酸化・脱リン酸化は細胞の分化、増殖、細胞死に至るまでさまざまな細胞活動に関与している。¹⁾特にセリン・トレオニン・チロシンをリン酸化するキナーゼや脱リン酸化するホスファターゼはこれまで多くの研究が行われてきた。²⁾しかし、これらリン酸化に関する研究は、ある特定のタンパク質に焦点を当てたピンポイント型の研究であった。現在では、タンパク質のリン酸化によって調節されている生命現象の全体像を知るために、より多くのリン酸化情報の獲得が望まれている。

近年、細胞内タンパク質を網羅的に研究すること(プロテオーム解析)に不可欠なリン酸化タンパク質の分析方法が注目を集めている。プロテオーム解析は、ある条件における細胞内の全タンパク質を同定・解析することと定義される(リン酸化タンパク質に焦点をあてたプロテオーム解析を特にリン酸化プロテオーム解析と呼ぶ)。その手法は、一般的には興味ある細胞の抽出液を二次元電気泳動で個々のタンパク質スポットに分離し、それを特異的な酵素で消化した後、生じたペプチドを質量分析することで元のタンパク質を同定するという流れで行われる(図1)。^{3), 4)}条件ごと(例えばレセプター刺激の前後)のプロテオームを比較すれば、そこに関連するタンパク質変動を解析できる。⁵⁾個々のタンパク質はMS-MS法によるシーケンス解析なども行われ、リン酸化部位の決定など翻訳後修飾の解析も同時に行うことができる。⁶⁾

図1 プロテオーム解析



また、プロテオーム解析の手法は、疾患マーカーの探索や、薬物の毒性の評価に対する新しいアプローチ方法として製薬会社、病院などで広く利用され始めている。たとえば、タンパクチップシステムはプロテオーム解析をより簡易・迅速化した手法である。⁷⁾血液などから採取したサンプルをさまざまなアフィニティー特性を持つチップ上に導入し、保持されたタンパク質を TOF/MS でスクリーニング分析する。患者と健常者など、異なるサンプル間のタンパク質発現を比較することで、疾患特異的なマーカー分子の探索などが行われる。⁸⁾

リン酸化の生理的な役割を評価するために、個々のタンパクのリン酸化部位の確定やリン酸化反応を行うキナーゼやホスファターゼの同定、タンパク質間相互作用の解明が必要である。しかし、これらリン酸化タンパク質の解析には共通かつ重要な問題点がある。それは、細胞内におけるリン酸化タンパク質の物質量の低さ、またはリン酸化の化学量論の低さである。そのため、その他の非リン酸化タンパク質のバックグラウンドに紛れるなどして、リン酸化タンパク質の検出・分析が困難になる場合がある。よって、近年リン酸化分子を効率的に分析するためのさまざまな方法が開発されている。

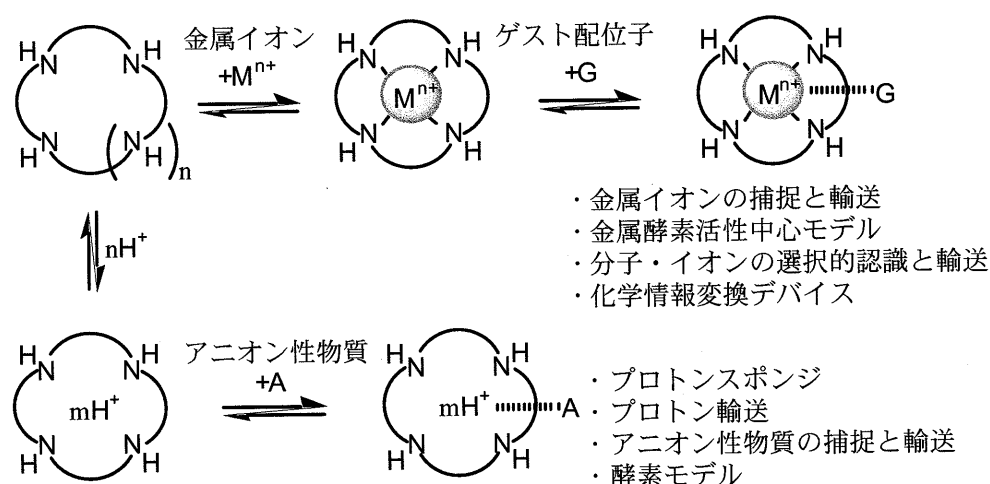
³²P による同位体標識は、リン酸化物質の分析の一般的な方法である。⁹⁾この方法は高感度であり、リン酸化分子の特異的な標識、定量性、可視化の容易さなどの特徴も持つ。しかし、この ³²P 標識はすべての細胞に一樣ではなく、一般に動物細胞では標識効率が低下してしまうことが大きな欠点である。このため、分析に足る十分な量の標識タンパクを得られないことがある。また、この方法は放射性物質を使用するため、特別な施設を必要とし、身体への危険もある。

また、リン酸化タンパク質のみを分離、精製することで、分析を妨げる他の分子種を排除する方法も用いられている。例えば、金属固定化アフィニティークロマトグラフィー (IMAC)、抗原抗体反応による免疫沈降を利用した基質の精製、化学修飾によるアフィニータグの付加を利用したクロマトグラフィーなどが知られている。IMAC は、Fe^{III}や Ga^{III}のような金属イオンを含んだ担体をカラム固定相に用い、親和性のあるリン酸基を持つタンパク質を特異的に精製する方法である。^{10), 11)}しかし、酸性アミノ酸も IMAC に対して親和性をもつこと、また、担体自身に非特異的に結合するペプチドもあることから、リン酸化分子のみを精製することは容易ではない。抗体を用いた方法は、抗リン酸化チロシン抗体との免疫沈降反応によりリン酸化チロシン残基をもつタンパク質のみを精製することを目的としている。¹²⁾しかし、リン酸化セリン、リン酸化トレオニンの特異抗体はまだ利用できない。化学修飾法¹³⁾は、数段階の反応を必要とする場合が多く、操作の煩雑さや、サンプルのロスの懸念がある。また、リン酸化チロシンに対する修飾が困難な場合が多い。

近年、我々の研究室では、機能性分子として知られている環状ポリアミンの亜鉛化合物をリン酸化生体分子の捕捉剤として利用した、まったく新しいリン酸化プロテオーム解析法の開発を行っている。今回、私はリン酸化分子を捕捉する機能をもつ新規亜鉛化合物の合成を行った。そして、この化合物の特性を利用し、質量分析においてリン酸化分子の効率的な検出を可能にする添加剤の開発を行った。

環状ポリアミンは、1975年頃までは遷移金属イオンの多座キレート剤として一部の錯体化学者の研究対象でしかなかった。しかし、その後、新しいタイプの機能性分子として各方面から注目を集め、環状ポリアミンの新しい機能が数多く見出されてきた。^{14), 15)}環状ポリアミンは、機能性分子としてすでに確立されているクラウンエーテル(環状ポリエーテル)の酸素原子を窒素原子に置き換えたホモログにすぎないが、クラウンエーテルとは大きく異なり、ポルフィリン、ペプチド、ポリアミンアルカロイドなどの含窒素生体分子と共通する様々な機能を持っている。環状ポリアミンの一般的な機能を図2に示す。

図2 環状ポリアミンの機能



環状ポリアミンのアニオン性物質の捕捉機能には高い注目が集まっており、これまでにリン酸イオンをはじめ様々なアニオン性物質のホスト分子が開発されてきた。^{16), 17)}その中でリン酸化合物を効率的に捕捉するホスト分子がいくつか報告された。例えば、多重にプロトン化したポリアミン化合物^{18), 19), 20), 21)}、四級アンモニウム化合物、グアニジウム化合物^{22), 23)}、ポルフィリン類似のサフィリン化合物²⁴⁾などである(図3)。これらの化合物は、ゲスト分子と水素結合やクーロン引力を介して相互作用する。その水溶液中の結合安定度定数はおよそ $\log K_{\text{aff}} = 2-6$ であった。また、近年、環状ポリアミンの亜鉛錯体もアニオンホスト分子の1つとして知られるようになってきた(図4)。これらは、ルイス酸性の亜鉛イオンを持ち、リン酸アニオンなどのルイス塩基性化合物と配位結合を形成することにより結びつく。例えば、 Zn^{II} -cyclen²⁵⁾、 m -bis(Zn^{II} -cyclen)²⁶⁾、tris(Zn^{II} -cyclen)²⁷⁾であり、4-nitrophenylphosphate²⁻との結合安定度定数はそれぞれ $\log K_{\text{aff}} = 3.3, 4.0, 5.8$ であった。

図3 リン酸化分子を捕捉する化合物

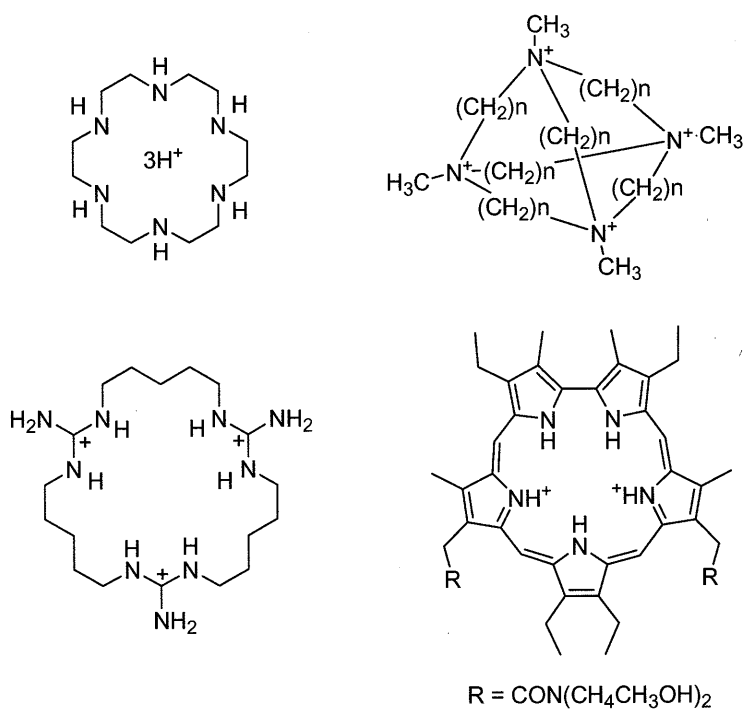
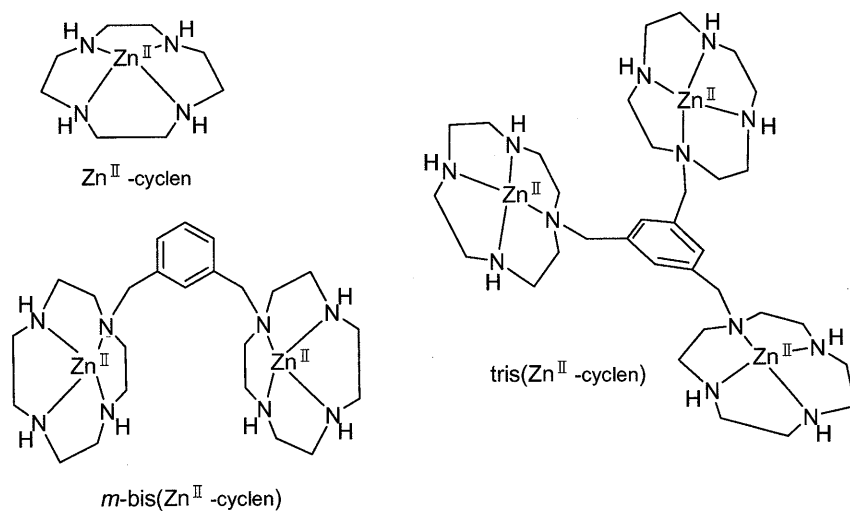


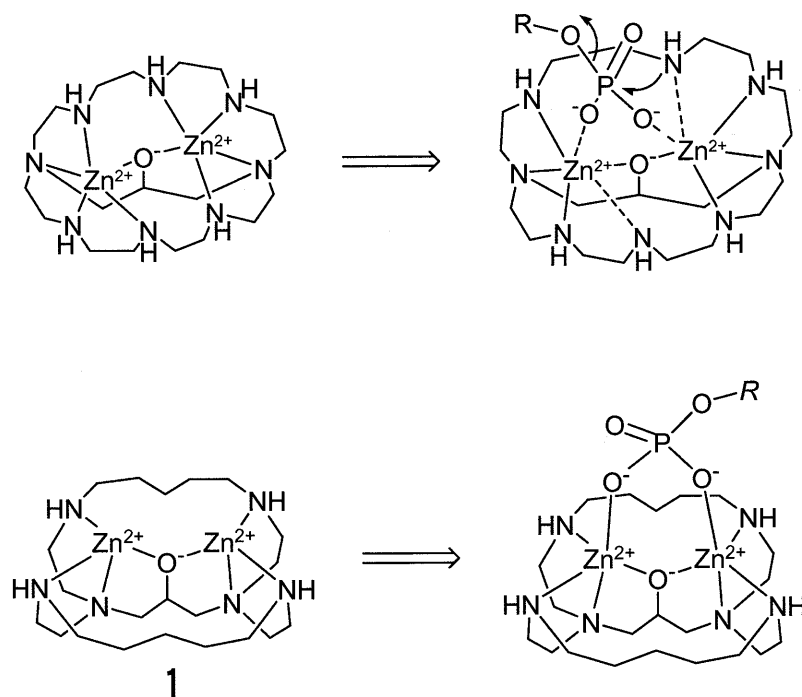
図4 亜鉛イオンを有するリン酸イオン捕捉分子



また、環状ポリアミン亜鉛錯体は、亜鉛含有酵素の活性中心モデルとしての研究も盛んに行われている。²⁸⁾その中で、図5の化合物が、2価のリン酸モノエステルジアニオンに対し特異的に作用し、そのリン酸エステルを分解する機能を有することが報告された。²⁹⁾その中で、この基質特異性には、2つの亜鉛イオンの協力的な作用による、2価のリン酸アニオンとの強い相互作用の形成が重要だと示された。リン酸基の転移により生成したホスホアミド体の X 線結晶構造解析によれば、リン酸基は、その2つの酸素原子とアルコキシドで架橋された2つの亜鉛イオン(イオン間距離 3.4 Å)との配位結合により結びついていた。そこで、本研究では、この化合物の構造から求核性の窒素置換基を除いた化合物 **1** を、新規のリン酸化分

子の捕捉剤として開発することにした。2価のリン酸アニオンは、2つの亜鉛イオンの空いた第5配位座に配位し、**1**と強く結びつくことが予想される。

図5 酵素モデル化合物によるリン酸基転移反応



II 実験項

II-1 リガンド、亜鉛錯体の合成

リガンド (L) の合成

1,3-diamino-2-propanol-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid (25 g, 78 mmol) を dry.EtOH (150 mL) に懸濁し、氷冷下スターラーで攪拌しながら塩化チオニル (23 mL, 320 mmol) を1時間かけて滴下した。滴下後、室温で1時間攪拌、さらにオイルバス上で終夜 reflux した。反応終了後、溶媒をエバポレーターで減圧留去した。残渣をジクロロメタン (100 mL) に溶解した後、飽和炭酸ナトリウム水溶液 (100 mL) で中和、pH を 9-10 とし、ジクロロメタン (200 mL) で4回抽出した。有機層を集め、無水硫酸ナトリウムで脱水し、溶媒をエバポレーターで減圧留去したところ、ほぼ単一に 1,3-diamino-2-propanol-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid tetraethyl ester が淡黄色のオイル状物質として得られた (73% yield)。数%の [2-oxo-6-(aminomethyl)-morpholy]-*N,N',N'*-triacetic acid triethyl ester を含んでいた (¹H NMR のシグナル強度比で確認した)。

TLC (eluent : AcOEt/Hexane = 1:1) $R_f = 0.58$.

¹H NMR (CD₃OD): δ 1.26 (12H, *t*, $J = 7.1$ Hz, COOCH₂CH₃), 2.64 (2H, *dd*, $J = 8.5$ and 13.5 Hz, NCH₂CH(OH)CH₂N), 2.89 (2H, *dd*, $J = 3.4$ and 13.5 Hz, NCH₂CH(OH)CH₂N), 3.55 and 3.61 (each 8H, *d*, $J = 17.6$ Hz, NCH₂COO), 3.74 (1H, *m*, NCH₂CH(OH)CH₂N), 4.06 (1H, *s*, OH), 4.16 (8H, *q*, $J = 7.1$ Hz, COOCH₂CH₃).

Tetraethyl ester 体 (13 g, 30 mmol) と 1,5-diaminopentane (6.1 g, 60 mmol) をメタノール (2 L) 中に溶解し6日間 reflux した。反応溶液をエバポレーターで減圧留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (FL100D, eluent : CH₂Cl₂/MeOH/28% NH₃_{aq} = 15:1:0.1) で分離精製した。流出液をオイル状になるまで濃縮し、アセトニトリルを加えて攪拌し放置すると、26-hydroxy-2,6,14,18-tetraoxo-1,4,7,13,16,19-hexaazabicyclo[11,11,3]-heptacosane·3H₂O を無色のプリズム結晶として得た (4.1 g, 8.1 mmol, 27% yield)。

TLC (eluent : CH₂Cl₂/MeOH/28% NH₃_{aq} = 5:1:0.2) $R_f = 0.65$.

IR ν_{\max} (KBr pellet) cm⁻¹ 3356, 3265, 3087, 2929, 2852, 1670, 1643, 1552, 1444, 1356, 1325, 1303, 1280, 1267, 1213, 1173, 1155, 1136, 1101, 1053, 966, 744, 586.

¹H NMR (CD₃OD): δ 1.46 (4H, *m*, NCH₂CH₂CH₂CH₂CH₂N), 1.58 (8H, *m*, NCH₂CH₂CH₂CH₂CH₂N), 2.33 (2H, *dd*, $J = 10.7$ and 13.5 Hz, NCH₂CH(OH)CH₂N), 2.68 (2H, *dd*, $J = 2.3$ and 13.5 Hz, NCH₂CH(OH)CH₂N), 3.29 and 3.44 (each 8H, *d*, $J = 17.6$ Hz, NCH₂COO), 3.35 (8H, *t*, $J = 4.9$ Hz, NCH₂CH₂CH₂CH₂CH₂N), 3.63 (1H, *t*, $J = 10.7$ Hz, NCH₂CH(OH)CH₂N).

^{13}C NMR (CD_3OD): δ 25.5, 30.3, 40.0, 61.6, 62.0, 67.6, 174.3.

Anal. ($\text{C}_{21}\text{H}_{38}\text{N}_6$) C, H, N: calcd, 49.6, 8.7, 16.5; found, 50.0, 8.8, 16.4.

Tetraoxo 体 (4.5 g, 8.9 mmol) を dry THF (30 mL) に懸濁し、氷冷下攪拌しながら 1 M BH_3 -THF の THF 溶液 (210 mL, 210 mmol) を加えた。氷冷下 1 時間攪拌した後、室温でさらに 1 時間攪拌、その後 60°C で 5 日間攪拌した。反応終了後、反応溶液を氷冷し、よく攪拌しながら水を少しずつ加えていき、過剰のジボランを壊した。溶媒をエバポレーターで減圧留去し、6 M HCl_{aq} (180 mL) を加え、60°C で 3 時間攪拌した。余分な有機物を除くため、反応溶液を室温まで戻して分液ろうとに移し、ジクロロメタン (60 mL) で 2 回洗浄した。水層を取り出し、エバポレーターで溶媒を減圧留去した後、ホウ酸を除くため残渣を陰イオン交換カラムクロマトグラフィーで精製した。得られた水溶液をエバポレートし、残渣を濃塩酸で強酸性とし、MeOH を加えていったところ、塩酸塩の結晶を得た。この塩酸塩を 150 mL の蒸留水に溶解し、OH 型に再生した陰イオン交換樹脂を少しずつ加えていき、pH を 5.0 に調整した。この溶液をグラスフィルターでろ過した後、エバポレーターで溶媒を減圧留去したところ、白色残渣を得た。この残渣を MeOH に溶解し、EtOH を徐々に加えていったところ、26-hydroxy-1,4,7,13,16,19-hexaazabicyclo[11,11,3]heptacosane \cdot 4HCl \cdot 0.5H $_2$ O が無色針状結晶として得られた。(2.1 g, 3.7 mmol, 42% yield)。

TLC (eluent : $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/28\% \text{NH}_{3aq} = 2:2:1$) $R_f = 0.33$.

IR ν_{\max} (KBr pellet) cm^{-1} 3201, 2947, 2837, 2783, 2405, 1577, 1468, 1423, 1330, 1273, 1159, 1092, 1064, 1051, 843, 806, 756, 601, 580.

^1H NMR (D_2O): δ 1.48–1.72 (4H, *m*, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 1.76–1.92 (8H, *m*, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 2.56 (2H, *dd*, $J = 10.7$ and 14.8 Hz, $\text{NCH}_{a2}\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_{a2}\text{N}$), 2.65 (2H, *dd*, $J = 2.4$ and 14.8 Hz, $\text{NCH}_{b2}\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_{b2}\text{N}$), 2.89 (4H, *dt*, $J = 4.4$ and 14.7 Hz, $\text{NCH}_2\text{CH}_{a2}\text{N}(\text{CH}_2)\text{CH}_2$), 3.04 (4H, *m*, $\text{NCH}_2\text{CH}_{b2}\text{N}(\text{CH}_2)\text{CH}_2$), 3.17 (4H, *m*, $\text{NCH}_{a2}\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2)\text{CH}_2$), 3.22 (8H, *m*, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 3.33 (4H, *m*, $\text{NCH}_{b2}\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2)\text{CH}_2$), 3.80 (1H, *t*, $J = 10.6$ Hz, $\text{NCH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{N}$).

^{13}C NMR (D_2O): δ 25.3, 26.7, 47.4, 49.2, 54.8, 59.5, 72.7.

Anal. ($\text{C}_{21}\text{H}_{38}\text{N}_6$) C, H, N: calcd, 45.6, 9.3, 15.2; found, 45.4, 9.5, 15.3.

酢酸イオン-亜鉛錯体の合成

L \cdot 4HCl (1.0 g, 1.9 mmol) をイオン交換カラムクロマトグラフィーでフリーにした。得られた水溶液 (30 mL) に $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ (0.87 g, 3.9 mmol) の H_2O (10 mL) 溶解液を加え、50°C で加温しながらスターラーで 1 時間攪拌した。つづいて 10 M NaOH_{aq} (1.0 eq) を加え、50°C で加温しながらスターラーで 15 分攪拌した。室温に戻し、沈殿物をひだ折ろ紙でろ過した後、1 M NaClO_{4aq} (5.7 mL) を加えた。この水溶液をエバポレーターで濃縮していくと、無色透明のプリズム結晶として $[\text{Zn}_2\text{L}(\text{CH}_3\text{COO}^-)]_2\text{ClO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ が得られた (1.4 g, 1.7 mmol, 90%)。

IR ν_{\max} (KBr pellet) cm^{-1} 3435, 3265, 3124, 2949, 2910, 2871, 2819, 1577, 1460, 1429, 1373, 1308, 1144, 1120, 1099, 1016, 991, 931, 881, 823, 681, 625, 544, 519.

^1H NMR (D_2O , 5 mM): δ 0.81–0.89, 1.10–1.16, 1.25–1.31 and 1.93–2.01 (4H, *m*, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 1.39–1.45, 1.52–1.61 and 1.68–1.78 (8H, *m*, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 1.90 and 2.06 (3H, *s*, CH_3COO^-), 2.41–3.10 (28H, *m*), 3.97 (1H, *t*, $J = 10.4$ Hz, $\text{NCH}_2\text{CH}(\text{O}^-)\text{CH}_2\text{N}$).

^{13}C NMR (D_2O , 5 mM): δ 24.4, 27.8, 28.0, 29.1, 44.9, 48.4, 51.1, 52.2, 52.4, 53.4, 60.3, 65.1. 酢酸アニオンのカルボニル炭素のシグナルは検出できなかった。これは、測定条件において、アセテートアニオンが亜鉛錯体に配位したものとフリーな状態の平衡にあるため、シグナルがブロードニングしているためだと考えられる。

Anal. ($\text{C}_{23}\text{H}_{50}\text{N}_6$) C, H, N: calcd, 34.3, 6.3, 10.5; found, 34.5, 6.4, 10.4.

フェニルリン酸ジアニオン-亜鉛錯体の合成

$\text{L}\cdot 4\text{HCl}$ (75 mg, 0.14 mmol) をビーカーに量りとり、 H_2O (30 mL) に溶解した。ここに 0.1 M $\text{Zn}(\text{ClO}_4)_{2\text{aq}}$ (2.8 mL)、つづいて 0.1 M NaOH_{aq} (5.0 eq) を加え、45°C で加温しながらスターラーで1時間攪拌した。室温に戻し、phenyl phosphate disodium salt (38 mg, 0.15 mmol) を加えた。pH メーターで pH を確認しながら 0.1 M NaOH_{aq} を徐々に加えていき、pH を 7.0 に合わせた。減圧下、溶液を徐々に濃縮していくと、 $[\text{Zn}_2\text{L}(\text{phenyl phosphate}^{2-})]\text{ClO}_4\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ が無色透明の板状結晶として得られた。(85 mg, 97 μmol , 72% yield)

IR ν_{\max} (KBr pellet) cm^{-1} 3461, 3305, 3278, 3246, 3113, 2916, 2864, 2812, 1676, 1595, 1489, 1464, 1375, 1354, 1306, 1288, 1234, 1157, 1105, 1030, 997, 931, 877, 825, 762, 731, 692, 673, 625, 552.

^1H NMR (D_2O) δ 1.21–1.98 (12H, *m*, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 2.41–3.07 (28H, *m*), 3.97 (1H, *t*, $J = 10.5$ Hz, $\text{NCH}_2\text{CH}(\text{O}^-)\text{CH}_2\text{N}$), 7.11 (1H, *t*, $J = 7.4$ Hz, ph), 7.21 (2H, *d*, $J = 8.3$ Hz, ph), 7.36 (2H, *dd*, $J = 7.4$ and 8.3 Hz, ph).

Anal. ($\text{C}_{27}\text{H}_{58}\text{N}_6$) C, H, N: calcd, 37.2, 6.7, 9.6; found, 37.5, 6.7, 9.7.

4-ニトロフェニルリン酸ジアニオン-亜鉛錯体の合成

$\text{L}\cdot 4\text{HCl}$ (75 mg, 0.14 mmol) をビーカーに量りとり、 H_2O (30 mL) に溶解した。ここに 0.1 M $\text{Zn}(\text{ClO}_4)_{2\text{aq}}$ (2.8 mL)、つづいて 0.1 M NaOH_{aq} (5.0 eq) を加え、45°C で加温しながらスターラーで1時間攪拌した。室温に戻し、4-nitrophenyl phosphate disodium salt (55 mg, 0.15 mmol) を加えた。pH メーターで pH を確認しながら 0.1 M NaOH_{aq} を徐々に加えていき、pH を 7.0 に合わせた。KOH を入れたデシケーターに静置し、減圧下溶液を徐々に濃縮していくと、 $[\text{Zn}_2\text{L}(4\text{-nitrophenyl phosphate}^{2-})]\text{ClO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ が無色透明の針状結晶として得られた。(82 mg, 94 μmol , 69% yield)

IR ν_{\max} (KBr pellet) cm^{-1} 3500, 3404, 3305, 3253, 3109, 2922, 2864, 1603, 1589, 1512,

1493, 1464, 1340, 1265, 1173, 1111, 1030, 1001, 876, 825, 756, 733, 675, 650, 623, 567.
 $^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6): δ 1.03–2.08 (12H, *m*, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 2.26–3.02 (28H, *m*),
3.62 (1H, *s*, $\text{NCH}_2\text{CH}(\text{O}^-)\text{CH}_2\text{N}$), 3.78 (2H, *s*, NH), 4.11–4.18 (2H, *m*, NH), 7.33 (1H, *d*, $J=$
5.1 Hz, Ph), 7.35 (1H, *d*, $J= 5.1$ Hz, Ph), 8.10 (1H, *d*, $J= 4.2$ Hz, Ph), 8.12 (1H, *d*, $J= 4.2$
Hz, Ph).

Anal. ($\text{C}_{27}\text{H}_{53}\text{N}_7$) C, H, N: calcd, 36.8, 6.1, 11.1; found, 37.1, 6.1, 11.2.

(参考) OH-亜鉛錯体の合成

$\text{L}\cdot 4\text{HCl}$ (1.0 g, 1.8 mmol) をイオン交換カラムクロマトグラフィーでフリーにし、エバポレー
ターで溶媒を留去した。得られた残渣を EtOH (30 mL) に溶解し、1 M $\text{Zn}(\text{ClO}_4)_2\text{aq}$ (3.6
mL) を加え、50°C で加温しながらスターラーで 30 分攪拌した。つづいて 10 M NaOH_{aq}
(0.18 mL) を加え振り混ぜた後、エバポレーターで溶媒を留去した。残渣を H_2O に溶解し
(完全には溶けない)、0.1 M NaOH_{aq} を徐々に加え pH を 8.0 に調整した。メンブランフィルタ
ーで不溶物をろ過し、エバポレーターで溶液を濃縮していくと、無色透明の結晶を得た。こ
れを H_2O に溶かし、減圧下、溶媒を徐々に留去させていくと $[\text{Zn}_2\text{L}(\text{OH})(\text{H}_2\text{O})]2\text{ClO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$
が無色透明のプリズム結晶として得られた (0.79 g, 0.99 mmol, 55%)。

IR ν_{max} (KBr pellet) cm^{-1} 3450, 3280, 3140, 2916, 2868, 2359, 1630, 1468, 1354, 1307,
1261, 1202, 1144, 1119, 1089, 1016, 989, 932, 879, 824, 668, 625, 590.

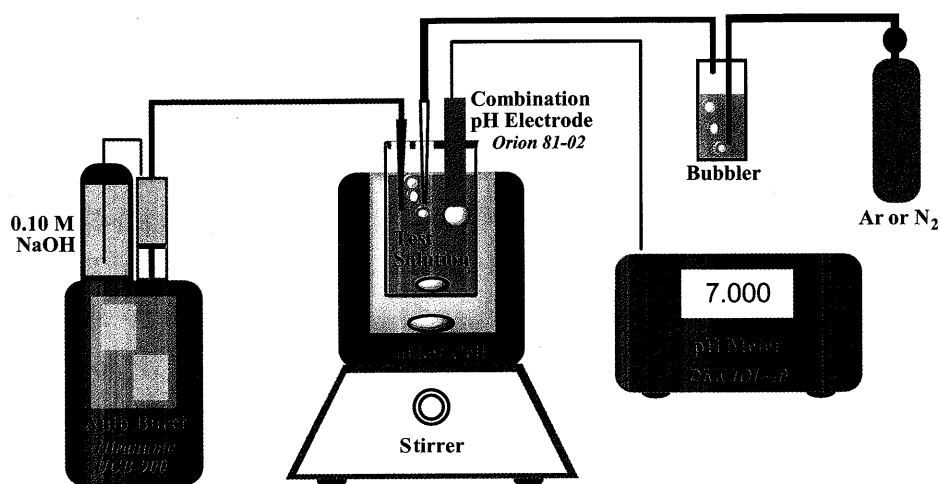
$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6): δ 0.98–2.10 (12H, *m*, $\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 2.31–3.11 (28H, *m*),
3.51, 3.77, 4.22.

$^{13}\text{C NMR}$ (DMSO- d_6): δ 22.2, 22.8, 25.6, 25.8, 40.6, 44.3, 44.6, 46.6, 48.8, 49.4, 50.4,
57.1, 61.3.

Anal. ($\text{C}_{23}\text{H}_{50}\text{N}_6$) C, H, N: calcd, 31.6, 6.6, 10.5; found, 31.3, 6.7, 10.2.

II - 2 pH 滴定法

新規リガンドの酸解離反応や、それら酸解離反応に影響を与える化学平衡反応(金属や他の物質との錯体形成反応など)について pH 滴定法により検討した。酸解離平衡反応を定義するプロトン化定数 (K_a) および錯体生成定数は、滴定解析プログラム(BEST program など)や溶液内マスバランスの式を用いて算出した。本研究で用いた pH 滴定装置を下図に示す。



pH 滴定装置

- pH メータ: 電気化学計器(株) DKK IOL-40
- pH 電極: Orion Research, Inc. Ross Combination pH Electrode 81-02
- オートビュレット: 平沼(株) UCB-900, 0.10 M NaOH 滴定液
- ジャケットセル: ビードレックス社製, 100mL ガラスセル
- 恒温水循環装置: Advantec TE-200 Cool Mate
- マグネティックスターラー: Corning PC-410
- ミクロ天秤: Mettler Toledo AG245
- 不活性ガス: 99.999% 窒素ガス

(a) 可変容量ピペットの補正と4mM HCl 基準溶液の調整

可変容量ピペット(ピペットマンなど: 1mL)の目盛り補正には、長時間一定温度に放置した蒸留水を用いる。使用する水の温度と密度から水1mLの質量と可変容量ピペットで量り取った水の質量を比較し、正確に1.00 mLが計り取れるように可変目盛りを調整する。可変容量ピペットを使用して常に一定量の溶液を計り取るためには、可変ピペットの傾きや液面からチップの先までの距離が常に一定になるように心掛ける。温度の測定は、基準温度計を使用する。pHメーターの補正に使用する基準溶液には、0.100 Mの塩酸水溶液(20°C, $f =$

1.000)を用いる。室温が 20°Cと大きく異なる場合、正確な量の塩酸を計り取るためには、水の温度と密度との関係を考慮してさらに可変容量ピペットの補正が必要である。溶液のイオン強度を一定にするために加えるアルカリ金属の強酸塩(NaCl など)には、滴定を行う物質の溶液と同じ化合物を使用する。まず初めに、50 mL のメスフラスコに 1.00 M NaCl 水溶液を 5.00 mL 可変容量ピペットを用い加えた後、蒸留水で 50 mL にメスアップする(できるだけ測定温度と同じ温度で行う)。その溶液を滴定容器(50 mL の溶液が入るガラスセルなど)に移した後、先程調整した1mL を正確に量り取れる可変ピペットを2回使用して 2.00 mL を取り除き 48 mL とする。次に、0.100 M の塩酸水溶液 2.00 mL を同じ可変ピペットを2回使用して測定溶液に加える。得られた 50 mL の溶液は、イオン強度が 0.10 であり、塩酸濃度は 4.00 mM である(pH 測定用基準溶液)。

(b) pH メーターの調整

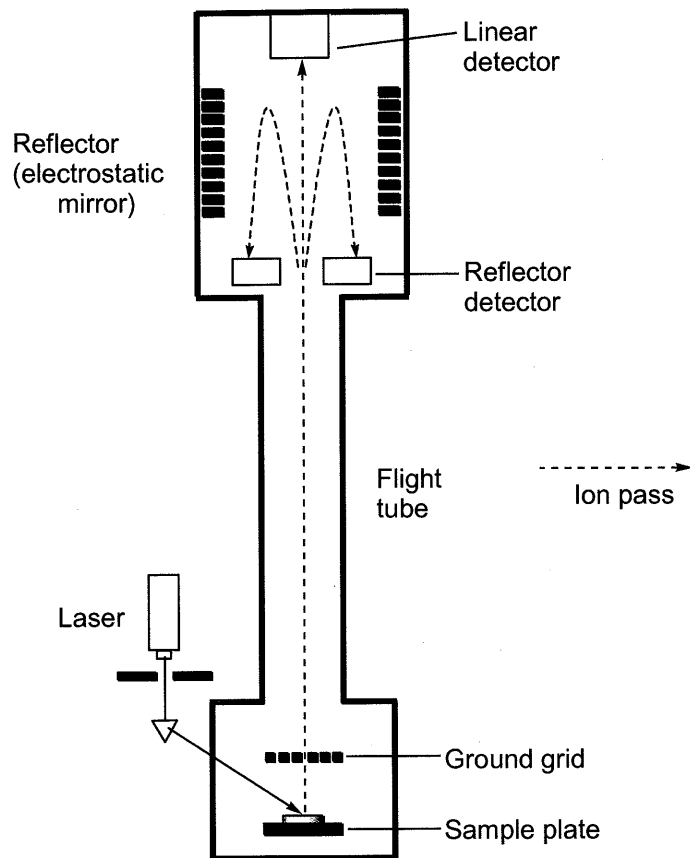
pH メーターに表示される値は、水素イオンの活量の逆数の対数值($-\log a_{\text{H}^+}$)である。したがって、測定溶液内の各種化学種(水素イオンなど)の物質量を求めるためには、水のイオン積(pK_{w})、水素イオンや水酸化物イオンの活量係数(f_{H^+} , f_{OH^-})が必要となる。本実験条件であるイオン強度 0.10 におけるそれらの値として、25°Cでは $pK_{\text{w}} = 13.997$, $f_{\text{H}^+} = 0.825$, $f_{\text{OH}^-} = 0.761$ を用いた(Critical Atability Constants ed. by R. M. Smith and A. E. Martell, Plenum Press, Vol. 4, 1976)。pH メーターの調整は、上記の4mM 塩酸水溶液(50 mL, 25.0 ±0.1°C, $I = 0.10$ (NaCl))を窒素気流下、0.10 M NaOH 水溶液で滴定する方法により行った。滴定液を加える前の理論的な pH = 2.481, 4mL (2当量)の滴定液を加えた時の理論的な pH = 11.448 を2点補正值として使用して、pH メーターの補正を行った。上記の方法による pH メーターの調整により、pH が3~11 の範囲であれば±0.02 の精度の pH 測定が可能となる。

II - 3 MALDI-TOF/MS 分析

1980年代後半のMALDI (matrix assisted laser desorption ionization) 、ESI (electron spray ionization) 法の導入は、質量分析法に大きなインパクトを与えた。これら2つのソフトなイオン化法の利用により、測定できる質量範囲は飛躍的に拡大し、これまで困難であったタンパク質、核酸、炭水化物などの生体高分子の質量分析が容易に行えるようになった。その後も、分解能の向上など改良が続き、質量分析法は生体高分子の分析法として注目を集めるようになった。また、質量分析法は、検出が非常に高感度であり、微量サンプルの分析にも適していること、分析に要する時間が短く短時間に多数の試料を分析できること、比較的操作が容易であることなどの特徴を持っている。このような背景から、質量分析法はタンパク質の同定手段として利用されはじめ、特に大規模なタンパク質のスクリーニング分析を要するプロテオーム解析においては必須のツールとなっている。

プロテオーム解析においてMALDI-TOF/MSは、タンパク質やタンパク質を酵素消化して生じるペプチドの質量分析に利用される。MALDI-TOF/MSの基本原理を以下に示す(次ページ図参照)。³⁰⁾サンプルは、マトリックスと呼ばれるエネルギー吸収分子と混合される(マトリックスは通常、揮発性有機溶媒に溶解しており、試料の1000倍過剰加えられる)。この試料をプレート上にアプライし、溶媒を揮発させサンプルとマトリックスの共結晶を形成させる。プレートを高真空下の質量分析装置に挿入し、サンプルに近紫外部のパルスレーザーを照射する。電磁波ははじめマトリックス分子によって吸収される。吸収されたエネルギーは熱となって放散し、周りのマトリックス分子やサンプル分子の気化を引き起こす。イオン化はプロトン化や Na^+ 、 K^+ などカチオンの付加・脱離、酸化還元などで生じる。生じたイオンは、電場で加速され分析部へと引き出され、ここで質量電荷比(m/z)によって分離され、検出部で記録される。MALDI法では主に1価イオンが検出され、ESI法では2価以上の多価イオンも検出される。

参考図 MALDI-TOF/MS



タンパク質は主にセリン、トレオニン、チロシン残基でリン酸化され、生じたリン酸モノエステルは、生理条件下では -2 の電荷を持つ。リン酸化ペプチドの質量分析スペクトルは亜鉛錯体の添加によりどのような変化を示すだろうか。この項では、市販のペプチドを用い、新規亜鉛錯体と混合した試料について MALDI-TOF/MS 分析を行い、リン酸化ペプチドの質量分析スペクトルに与える亜鉛錯体の影響を調べた。

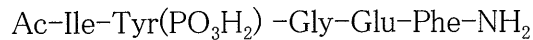
● 試料溶液

酢酸イオン-亜鉛錯体

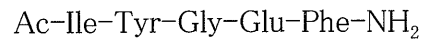
蒸留水に溶解し、1 mM 水溶液とした。

ペプチド

- p60^{c-src} Substrate II, phosphorylate (CALBIOCHEM): 蒸留水に溶解し、1 mM 溶液とした。



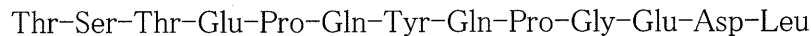
- p60^{c-src} Substrate II (CALBIOCHEM): 10 mM Tris-H₃BO₃ (pH 8.0) に溶解し 1 mM 溶液とした。



- p60^{c-src} Peptide 521-533, phosphorylated (CALBIOCHEM): 蒸留水に溶解し、1 mM 溶液とした。



- p60^{c-src} Peptide 521-533 (CALBIOCHEM): 蒸留水に溶解し、1 mM 溶液とした。

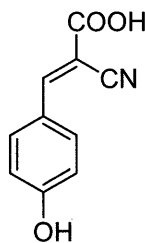


緩衝液

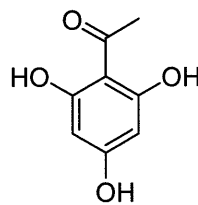
Tris-H₃BO₃ 10 mM (pH 8.0)

マトリックス

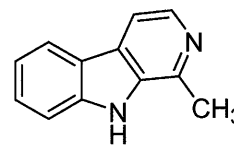
- CHCA: α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (Aldrich)
CH₃CN + EtOH + 10%トリフルオロ酢酸 (45:45:10, v/v)に溶解した(10 mg/mL)。
- THAP: 2,4,6-trihydroxyacetophenone (Aldrich)
CH₃CN に溶解した(40 mg/mL)。
- Harmane: 1-methyl-9H-pyrido[3,4-b]indole (Aldrich)
アセトンに溶解した(15 mg/mL)。



α -CHCA



THAP



Harmane

2 MALDI-TOF/MS 測定用サンプルの調製

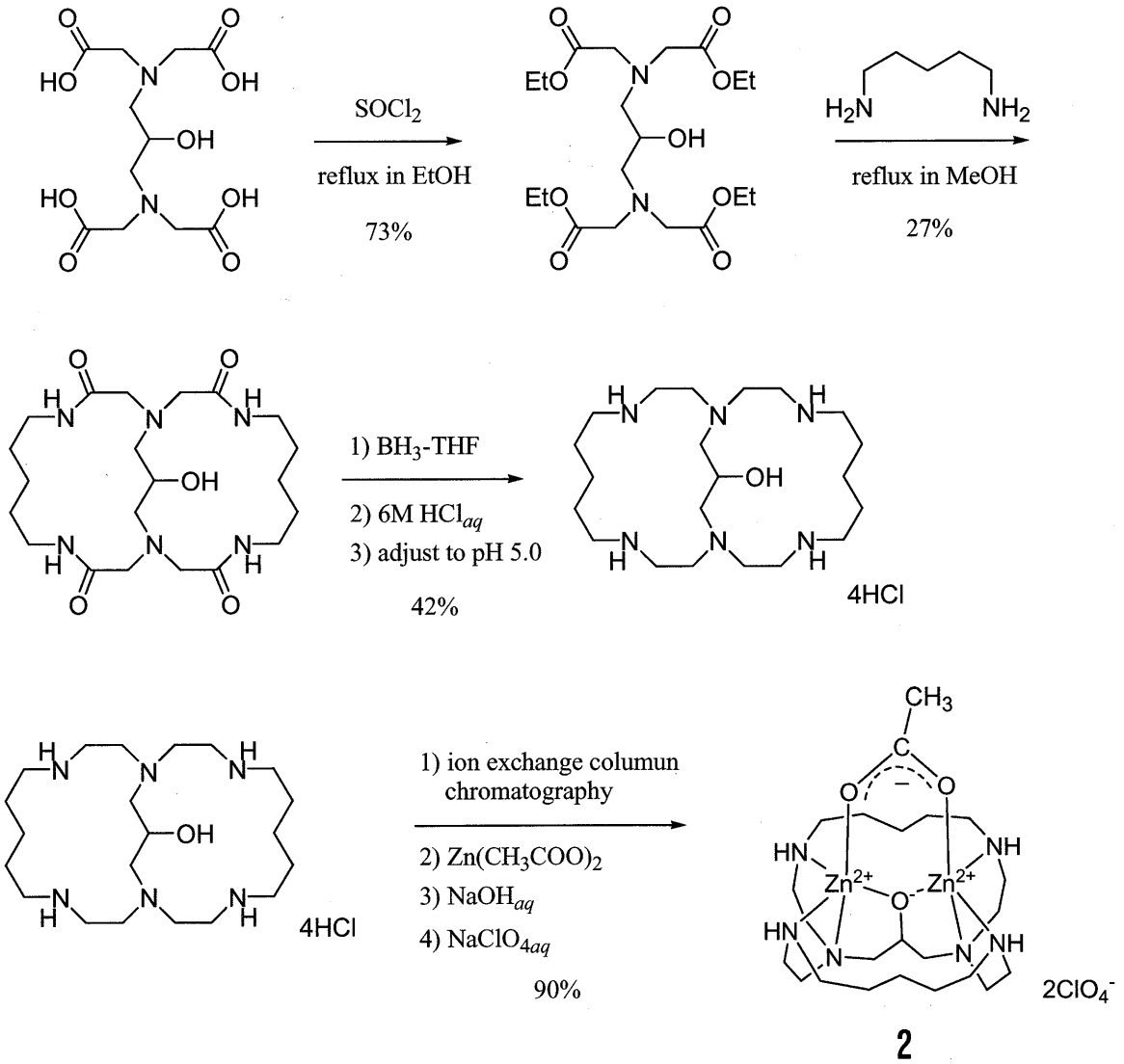
- ① エッペンドルフチューブに酢酸イオン-亜鉛錯体、ペプチドの試料溶液を必要量とる。
- ② バッファーを加えて濃度を調整し(すべてのサンプルにおいてこのときのペプチド濃度を 100 μM とする)、チューブを数回指ではじいて溶液を混合する
- ③ ②の試料溶液 (0.5 μL) をピペットマンでサンプルプレート (アプライド) のウェルにアプライする。
- ④ 有機溶媒に溶解したマトリックス化合物 (0.5 μL) を、ピペットマンを用いて先ほどの試料溶液の液滴上にアプライする。
- ⑤ 溶媒を風乾させ、結晶を生成させる。

MALDI-TOF/MS 測定は、PerSeptive Biosystems Voyager-DE-RP time of flight (TOF) mass spectrometer (N_2 pulse laser: 337 nm) で行った。測定はすべてリフレクトロンモードで行い、delayed extraction time (50 ns)、加速電圧 (20000 V)、グリッド電圧 (11500 V) を共通条件とした。積算回数はすべての測定において 100 回以上とした。スペクトルのデータ処理ソフトは GRAMS を使用した。

III 結果と考察

III-1 リガンド、亜鉛錯体の合成

リガンド、亜鉛錯体の合成経路を以下に示す。



III - 2 溶液内化学種の検討

リガンドのプロトン化定数 (K_b : 酸解離定数の逆数) を, pH 滴定法を用いて決定した。測定は, 35°C, イオン強度 0.10 M (NaNO_3), 配位子初期濃度 1.0 mM の水溶液を用いて行った。得られた滴定曲線を, 図1a に示す。リガンドの酸解離平衡反応は, 独立した一塩基酸として取り扱えたので, 以下に示す溶液内マスバランスの式により K_b を算出した。その場合, 計算に使用する滴定データは, アルカリ溶液 0.1 当量から 0.9 当量の間の pH と滴定液の当量数を用いて, 個々の測定点からもとまる K_b 値の平均を最終値とした。

酸解離平衡反応: $\text{L}(\text{配位子}) + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{HL}^+$

$$K_b = [\text{HL}^+]/([\text{L}] \times a_{\text{H}^+})$$

(i) Proton Mass Balance

$$\text{AL} = \text{EQ} \times \text{CL} - [\text{OH}^-] = [\text{L}]$$

"EQ" is titrant (added NaOH) equivalent value at every titration point.

"CL" is total ligand concentration at every titration point.

(ii) Ligand Mass Balance

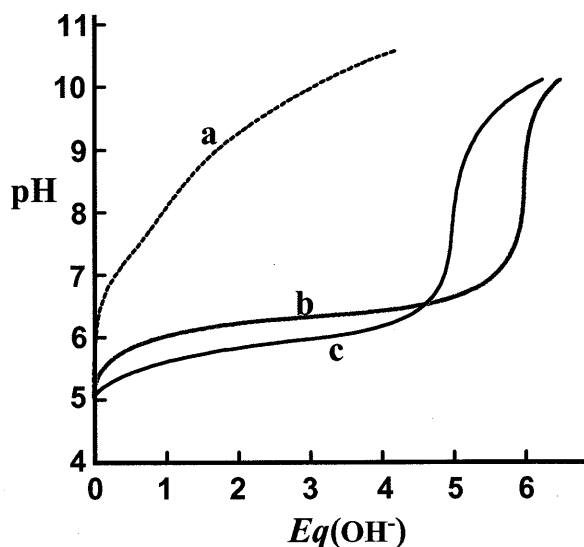
$$\text{CL} = [\text{L}] + [\text{HL}^+] = [\text{L}] \times (1 + K_b \times a_{\text{H}^+})$$

From the above two equations one can derive following equations.

$$\text{CL} = \text{AL} \times (1 + K_a \times a_{\text{H}^+})$$

$$K_b = (\text{CL} - \text{AL})/(\text{AL} \times a_{\text{H}^+})$$

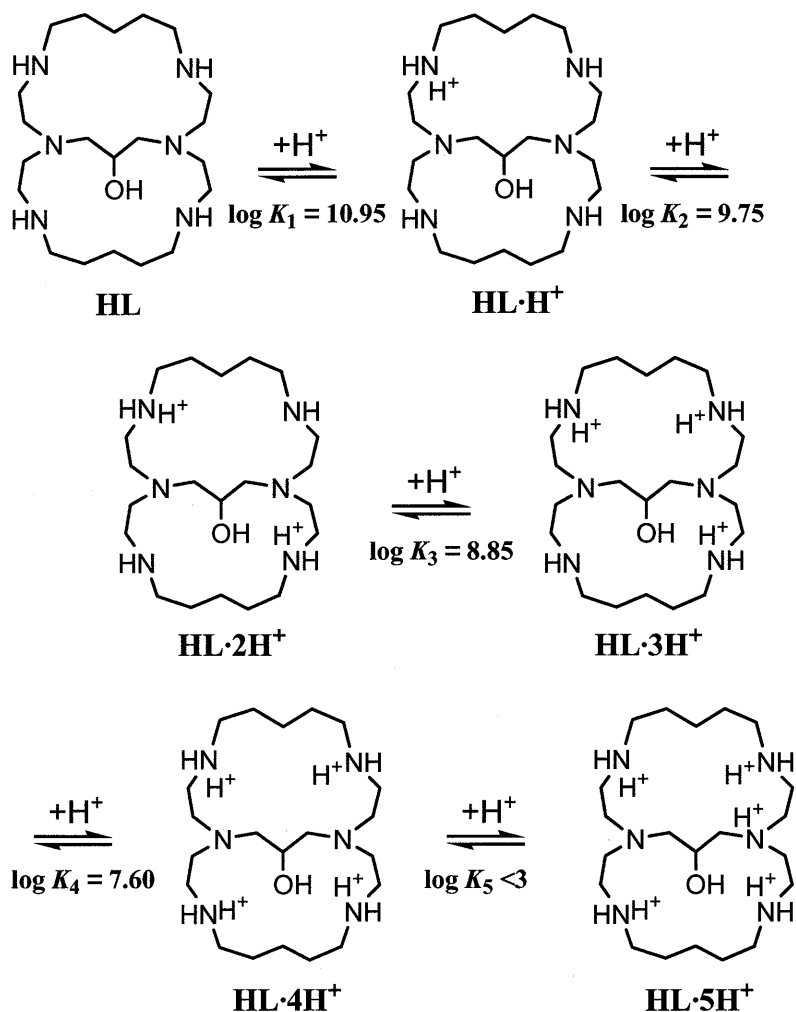
図1 pH 滴定曲線



Potentiometric pH titration curves for HL at 35 °C with $I = 0.10$ (NaNO_3):
 (a) 1 mM HL·4HCl; (b) a + 2 mM $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$; (c) b + 1 mM phenyl phosphate disodium salt. $\text{Eq}(\text{OH}^-)$ is the number of equivalents of base added.

また、決定したプロトン化定数および酸塩基平衡式を図2に示す。

図2 リガンドの酸塩基平衡式

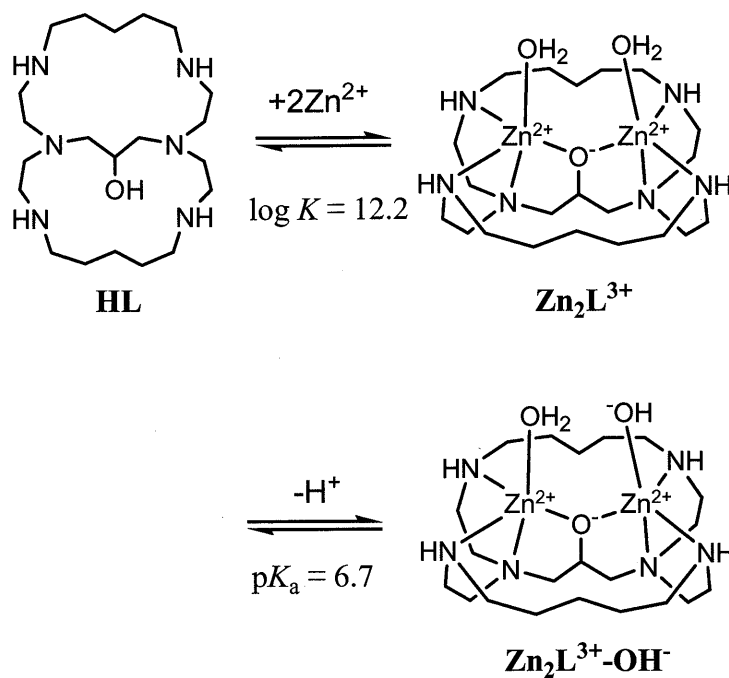


Protonation equilibria of HL in aqueous solution at 35 °C with $I = 0.10$ (NaNO₃).

$K_n (= [\text{HL}\cdot n\text{H}^+]/[\text{HL}\cdot(n-1)\text{H}^+]a_{\text{H}^+})$ is the protonation constants of HL.

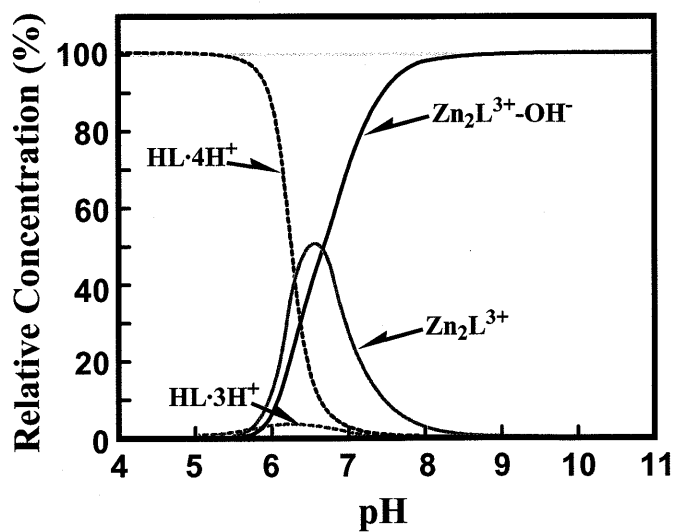
次に、2当量の亜鉛イオン存在下における滴定曲線を図1bに示す。その結果リガンドは、pH 5.5 以上でアルコールのプロトン解離を伴い亜鉛イオンと安定な錯体を形成することが明らかになった。亜鉛イオンとの錯生成定数 ($\log K = 12.2$) をこの結果から求めた。6当量目の中和点は、亜鉛イオンに配位した水分子の脱プロトン化によるものと考えられる ($\text{p}K_a = 6.7$)。6当量以上アルカリを加えても Zn(OH)₂ の沈殿や脱プロトンは見られず、pH10~11でもこの亜鉛錯体は安定に存在していることが分かった。2当量の亜鉛イオン存在下における水溶液内平衡反応式を図3に示す。また、図4に溶液内化学種濃度の pH 依存性を示した。

図3 亜鉛イオン存在下における溶液内平衡式



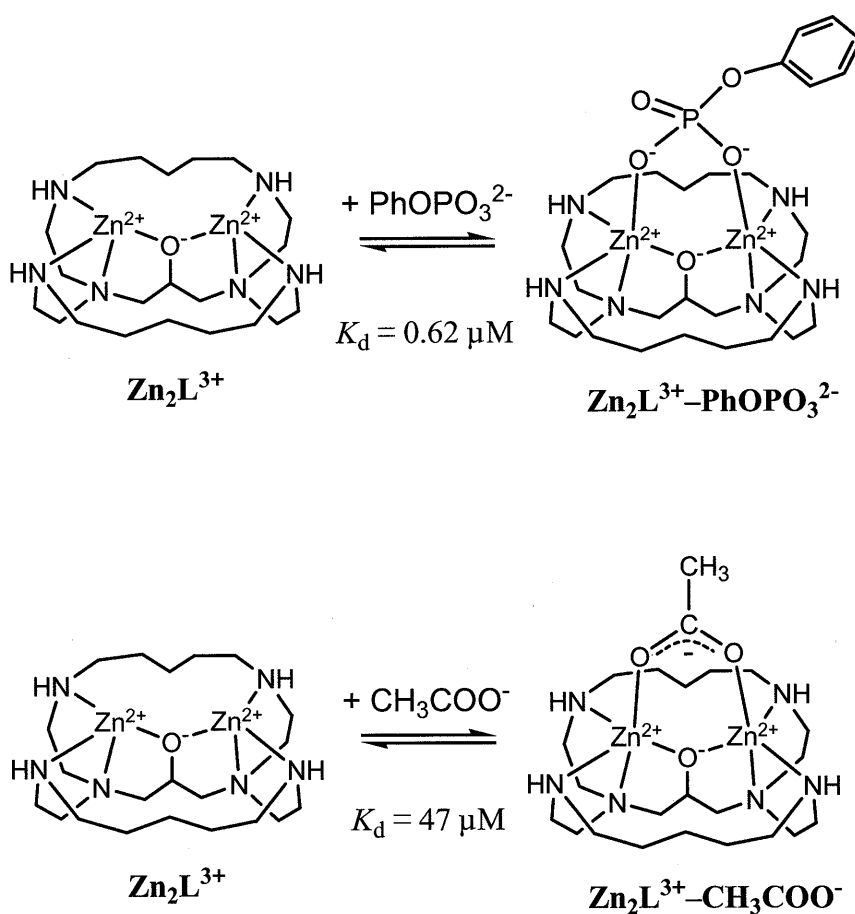
Zinc(II) complex formation equilibria of HL in aqueous solution at 35 °C with $I = 0.10$ (NaNO_3): $K = [\text{Zn}_2\text{L}^{3+}]a_{\text{H}^+}/[\text{HL}][\text{Zn}^{2+}]^2 \text{ M}^{-1}$.

図4 溶液内化学種濃度の pH 依存性



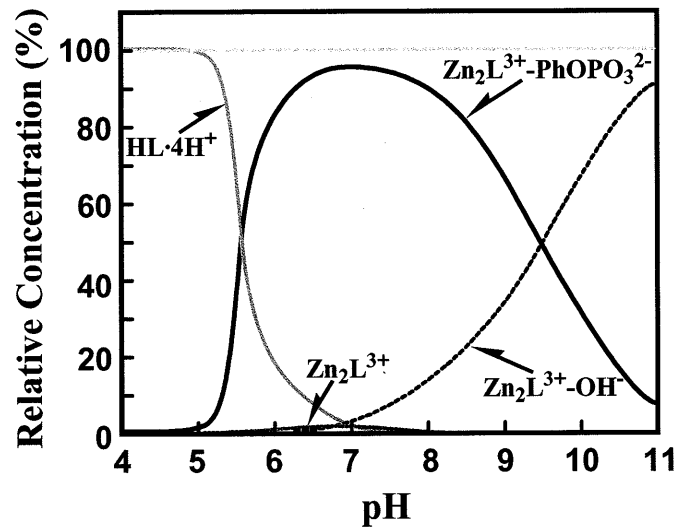
Species distribution that results from an aqueous solution of 1 mM HL in the presence of 2 mM Zn^{2+} ion at 35 °C with $I = 0.10$ (NaNO_3)

次に、2当量の亜鉛イオン、および1当量のフェニルリン酸二ナトリウム存在下における滴定曲線を図1c に示す。5当量目に pH の上昇がみられる。これは、リン酸アニオンが亜鉛イオンに配位することで、水分子の亜鉛への配位が妨げられ、そのプロトン解離が生じにくくなっていることを示している。この結果から、フェニルリン酸ジアニオンと亜鉛錯体の結合解離常数、 $K_d = 0.62 \mu\text{M}$ を求めた。また、同様にカルボキシル基を有する酢酸アニオンと亜鉛錯体の結合解離常数、 $K_d = 47 \mu\text{M}$ を求めた。新規亜鉛錯体は、カルボキシレートアニオンと比べてフェニルリン酸ジアニオンと約 80 倍強く結合することが明らかになった。また、図5にフェニルリン酸存在下における溶液内化学種の pH 依存性を示した。



Anion complex formation equilibria of HL in aqueous solution at 35 °C with $I = 0.10$ (NaNO_3): $K_d = [\text{Zn}_2\text{L}^{3+}][\text{Anion}]/[\text{Zn}_2\text{L}^{3+}\text{-PhOPO}_3^{2-}]$ M.

図5 フェニルリン酸存在下における溶液内化学種の pH 依存性



Species distribution that results from an aqueous solution of 1 mM HL in the presence of 2 mM Zn^{2+} ion and 1 mM phenyl phosphate at 35 °C with $I = 0.10$ (NaNO_3)

III - 3 アニオンが結合した亜鉛錯体の X 線結晶構造解析

酢酸イオン-亜鉛錯体

酢酸イオン-亜鉛錯体の合成を行った。水溶液中のフリーのリガンドに2当量の酢酸亜鉛、1当量の NaOH を混合し、錯生成反応を行った。過塩素酸ナトリウム存在下でこの水溶液を濃縮していくと、 $[\text{Zn}_2\text{L}(\text{CH}_3\text{COO}^-)]_2\text{ClO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ が 90% の収率で得られた。IR、 ^1H NMR、元素分析等により構造解析を行った。

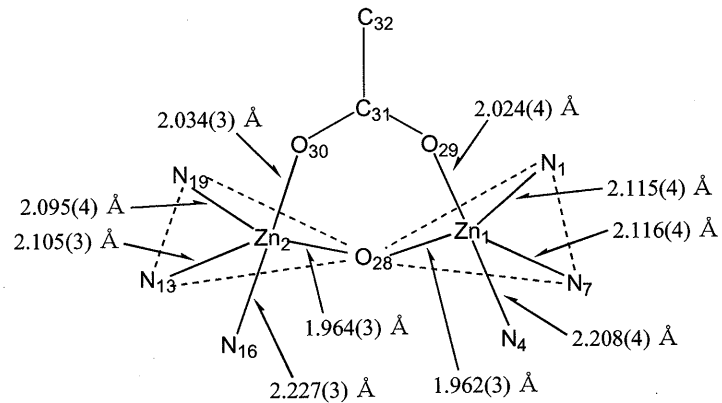
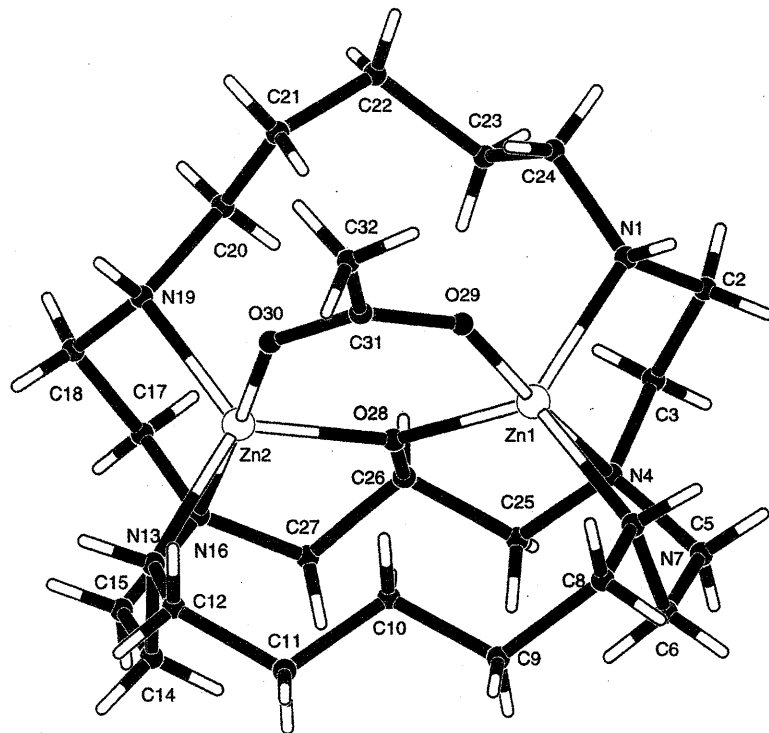
酢酸イオン-亜鉛錯体の X 線結晶構造解析を行った。分子構造を図1に示す。亜鉛錯体は酢酸イオンと1:1の complex を形成していることが明らかになった。アルコールで架橋された2つの亜鉛イオンはほぼ同じ配位環境にあり、その距離は 3.5 Å であった。それぞれの亜鉛イオン Zn1 (or Zn2) は2つの2級アミン N1(or N19)と N7(or N13)、アルコール O⁻をエカトリアル位ドナーとし、3級アミン N4(or N16)と酢酸イオンの O29(or O30)を頂点のドナーとする歪んだ三方両錐形の5配位環境の中心にあることが明らかになった。Zn1 (or Zn2) はエカトリアル位の3つのドナー原子あるいはイオンが作る三角平面のすぐ近くにあり、また、結合角 O29-Zn1-N4、O30-Zn2-N16 はそれぞれ 176.3(1)°、178.2(1)° であった。これらのことは、亜鉛イオンの周りには強い歪みがないことを示しており、この錯体の安定性を示唆している。酢酸イオンと亜鉛イオンの結合距離 Zn1-O29、Zn2-O30 はそれぞれ 2.024(4) Å、2.034(3) Å であった。

フェニルリン酸ジアニオン-亜鉛錯体

L·4HCl を H₂O に溶解し、2当量の Zn(ClO₄)₂、5当量の NaOH を加えて加温混合した後、1当量のフェニルリン酸二ナトリウムを加え、pH を7に調整した。この水溶液を徐々に濃縮していくと、 $[\text{Zn}_2\text{L}(\text{phenyl phosphate}^{2-})]\text{ClO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ が 72% の収率で得られた。IR、 ^1H NMR、元素分析等により構造解析を行った。

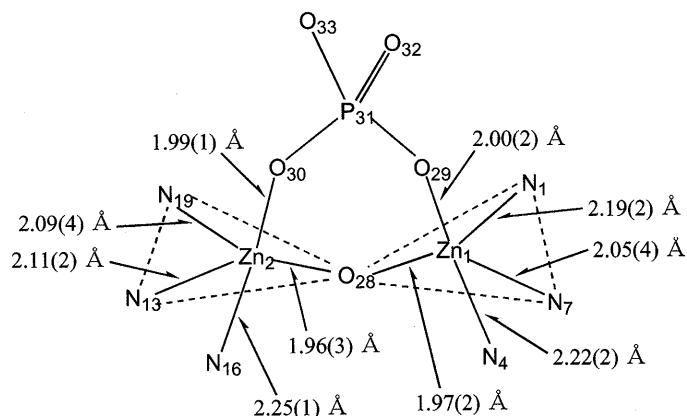
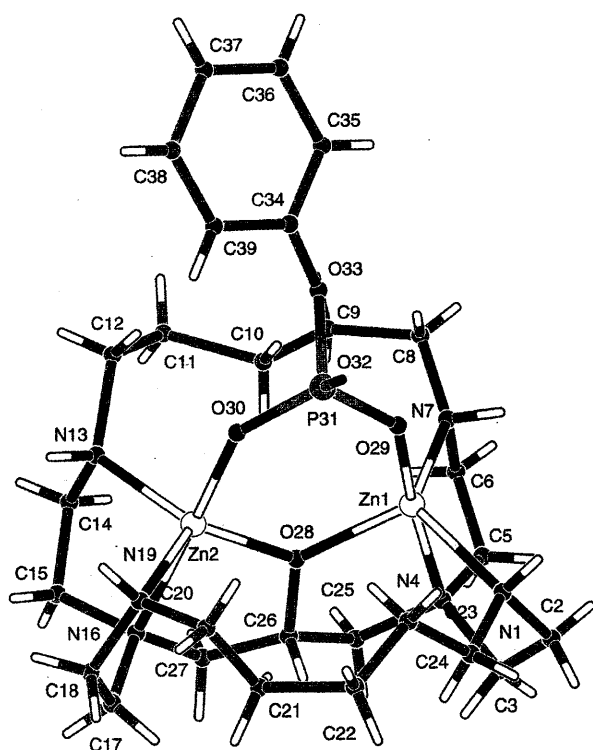
フェニルリン酸ジアニオン-亜鉛錯体の X 線結晶構造解析を行った。分子構造を図2に示す。亜鉛錯体はフェニルリン酸ジアニオンと1:1の complex を形成していることが明らかになった。アルコールで架橋された2つの亜鉛イオンはほぼ同じ配位環境にあり、その距離は 3.5 Å であった。その他の亜鉛イオンの周りの配位環境(配位結合距離、結合角)は酢酸イオン-亜鉛錯体とほぼ同じであり、強い歪みはみられなかった。このことは、この亜鉛錯体が、カルボキシレートイオンと同様にリン酸イオンを効率的に捕捉するのに有利な構造をしていることを示唆している。亜鉛イオンとリン酸基の酸素アニオンの配位結合距離は、2.00(2) Å、1.99(1) Å であった。これは酢酸イオン-亜鉛錯体の Zn-O(acetate)結合距離よりも短く、よってこの Zn-O(phosphate)結合がより強いものであることが示唆される。おそらく2価であるフェニルリン酸アニオンが1価である酢酸イオンと比べて亜鉛イオンとより強く相互作用するためであろう。

図1 酢酸イオン-亜鉛錯体の分子構造



主な原子間の結合距離を上を示した。主な結合角(deg) : Zn(1) - O(28) - Zn(2) 126.1(1), O(28) - Zn(1) - O(29) 97.9(1), O(29) - Zn(1) - N(1) 94.8(2), O(29) - Zn(1) - N(7) 100.8(1), O(28) - Zn(1) - N(1) 118.0(1), O(28) - Zn(1) - N(7) 122.4(1), O(28) - Zn(1) - N(4) 81.8(1), N(1) - Zn(1) - N(4) 82.2(2), N(1) - Zn(1) - N(7) 114.0(1), N(4) - Zn(1) - N(7) 82.5(1), O(28) - Zn(2) - O(30) 100.0(1), O(30) - Zn(2) - N(13) 96.6(1), O(30) - Zn(2) - N(19) 97.4(1), O(28) - Zn(2) - N(13) 120.7(1), O(28) - Zn(2) - N(16) 81.7(1), O(28) - Zn(2) - N(19) 115.5(1), N(13) - Zn(2) - N(16) 81.9(1), N(13) - Zn(2) - N(19) 118.1(1), N(16) - Zn(2) - N(19) 82.3(1)

図2 フェニルリン酸ジアニオン-亜鉛錯体の分子構造

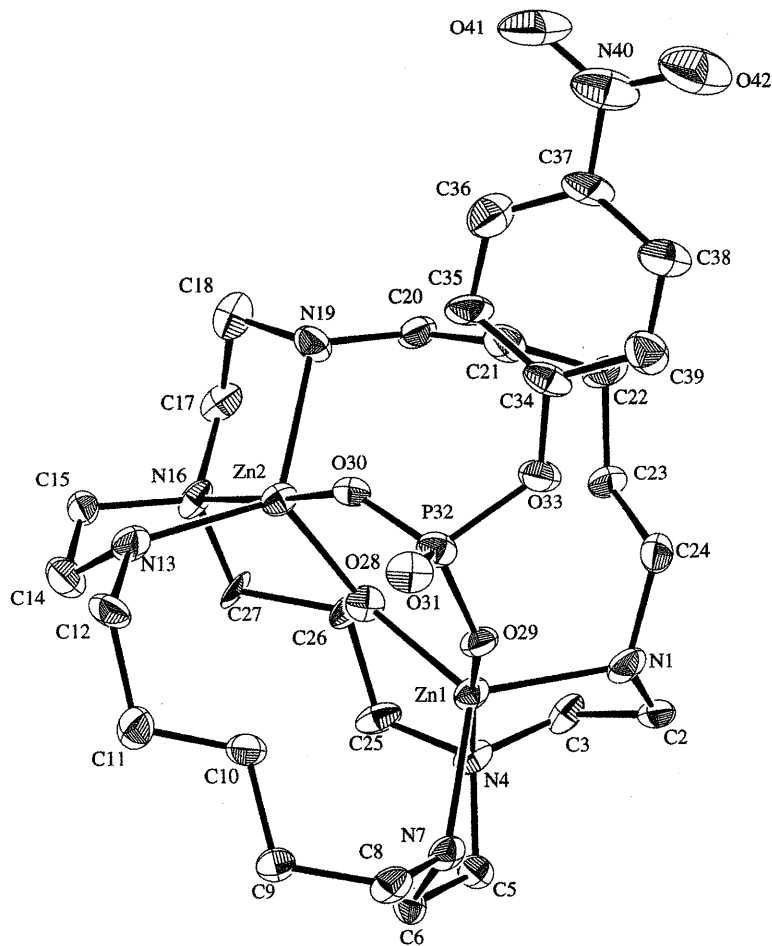


主な原子間の結合距離を上を示した。主な結合角(deg): Zn(1) - O(28) - Zn(2) 126.3(8), O(28) - Zn(1) - O(29) 101(1), O(29) - Zn(1) - N(1) 95(1), O(29) - Zn(1) - N(7) 100.8(9), O(28) - Zn(1) - N(1) 110(1), O(28) - Zn(1) - N(7) 117(1), O(28) - Zn(1) - N(4) 82.3(7), N(1) - Zn(1) - N(4) 78.0(8), N(1) - Zn(1) - N(7) 123(1), N(4) - Zn(1) - N(7) 81(1), O(28) - Zn(2) - O(30) 103.3(7), O(30) - Zn(2) - N(13) 99.6(5), O(30) - Zn(2) - N(19) 95(1), O(28) - Zn(2) - N(13) 118(1), O(28) - Zn(2) - N(16) 80.9(8), O(28) - Zn(2) - N(19) 122.4(8), N(13) - Zn(2) - N(16) 80.8(5), N(13) - Zn(2) - N(19) 110(1), N(16) - Zn(2) - N(19) 79.8(10)

(c) 4-ニトロフェニルリン酸ジアニオン-亜鉛錯体

L·4HClをH₂Oに溶解し、2当量のZn(ClO₄)₂、5当量のNaOHを加えて加温混合した後、1当量の4-ニトロフェニルリン酸二ナトリウムを加え、pHを7に調整した。この水溶液を徐々に濃縮していくと、[Zn₂L(4-nitrophenyl phosphate²⁻)]ClO₄⁻·2H₂Oを69%の収率で得た。IR、¹H NMR、元素分析等により構造解析を行った。

4-ニトロフェニルリン酸ジアニオン-亜鉛錯体のX線結晶構造解析を行った。分子構造を下に示す。亜鉛錯体は4-ニトロフェニルリン酸ジアニオンと1:1のcomplexを形成していることが明らかになった。亜鉛イオンの配位環境は上記2つの錯体と同様であった。亜鉛イオンとリン酸基の酸素原子との間の配位結合距離は1.978、2.005 Åであった。



III - 4 亜鉛錯体によるリン酸アニオンの ^{31}P NMR 変化

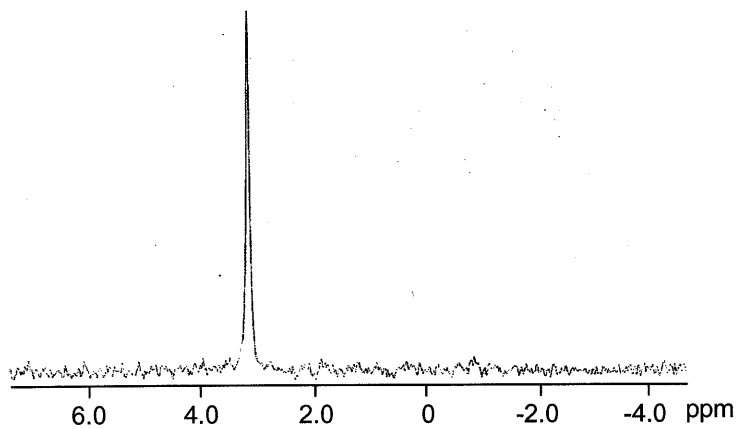
亜鉛錯体とリン酸アニオンの相互作用を調べるために ^{31}P NMR 解析を行った。解析はフェニルリン酸二ナトリウムを用いて行った。フェニルリン酸二ナトリウムの濃度は 4 mM とし、測定は D_2O (pD 7.8) 中 35°C で行った。ケミカルシフト値 (ppm) は 80% H_3PO_4 のピークを外部標準 (0 ppm) として決定した。

結果を次ページに示す。フェニルリン酸イオンに対して半当量の亜鉛錯体 **3** 存在下 (b) では、積分値がほぼ同等の2本のピーク (-0.3, 3.1 ppm) がみられた。3.1 ppm のピークは、コントロール(a)のピークのケミカルシフトと一致していた。1.0 当量の亜鉛錯体 **3** 存在下では、3.1 ppm のピークはかなり小さくなり、ほぼ -0.3 ppm 付近の一本のピークのみとなった。1.5、2.0 当量存在下で同様の実験を行ったが、bのチャートとほぼ同じでケミカルシフトに変化はなく、他のピークも見られなかった。1.5、2.0 当量存在下ではどちらのチャートも 3.1 ppm のピークは完全に消失している。

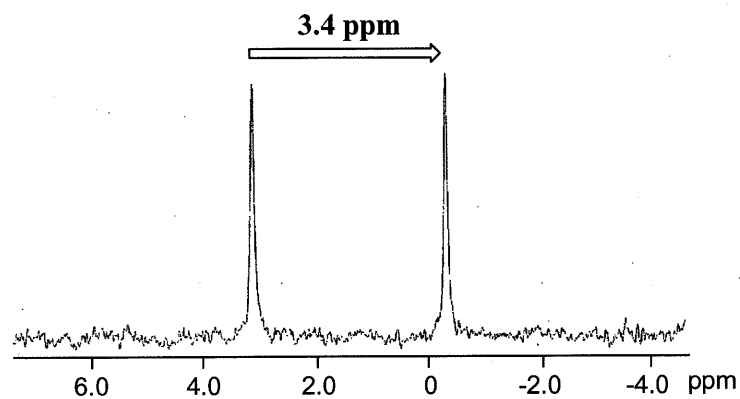
これらの結果から、実験条件下フェニルリン酸イオンは、アセテートアニオンあるいは溶媒分子 (H_2O , OH^-) とほぼ定量的に置換し、亜鉛錯体と 1:1 で相互作用することが明らかになった。また、相互作用の形成によりフェニルリン酸イオンの ^{31}P ケミカルシフトは 3.4 ppm 高磁場にシフトした。これは、亜鉛イオンの大きな電子雲によりリン原子が遮蔽効果を受けているためであると考えられる。

図 亜鉛錯体によるフェニルリン酸の ^{31}P NMR ケミカルシフト変化

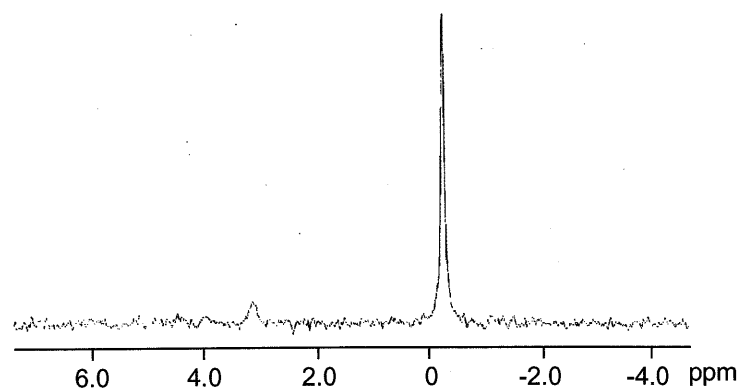
(a) 4 mM phenylphosphate



(b) 4 mM phenylphosphate
+ 0.5 eq $\text{Zn}_2\text{L}^{3+}\text{-CH}_3\text{COO}^-$



(c) 4 mM phenylphosphate
+ 1.0 eq $\text{Zn}_2\text{L}^{3+}\text{-CH}_3\text{COO}^-$



III - 4 アニオンが結合した亜鉛錯体の MALDI-TOF/MS 分析

プロテオーム解析では、質量分析により、タンパク質の同定、ペプチドのシーケンス解析、翻訳後修飾部位の解析などが行われる。リン酸化プロテオーム解析の場合、細胞内のリン酸化タンパク質の存在量の少なさ、あるいはリン酸化の化学量論の低さが研究の問題点になっていることを前述した。質量分析では、一般的にリン酸化ペプチドなどのリン酸化分子は、非リン酸化分子に比べて検出感度が低いため、分析が困難になることがある。たとえば、タンパク質の消化物をそのまま分析するような場合、リン酸化ペプチドは、一般的により感度の高い非リン酸化ペプチドのバックグラウンドに紛れてしまい、存在が見失われることがある。

今回合成した亜鉛錯体は、カルボキシレートアニオンと比べ2価のリン酸アニオンと選択的に高い親和性で相互作用し、1:1複合体を形成することが明らかになった。リン酸化タンパク質あるいはリン酸化ペプチドも生理条件下で2価のリン酸エステルである。リン酸化物質の質量分析スペクトルに亜鉛錯体はどのように影響するだろうか。質量分析において、亜鉛錯体がリン酸化分子のより効率的な分析に利用できるのではないかと考え、本実験を行った。

質量分析は MALDI-TOF/MS で行った。MALDI-MS による分析では、使用するマトリックスの種類、pH、結晶化の方法といったサンプルの調製条件の選択が重要である。³¹⁾たとえば、ペプチドの分析では、CHCA (α -cyano-4-hydroxycinnamic acid) や 2,5-dihydroxybenzoic acid が主にマトリックスとして用いられ、タンパク質の分析では、sinapinic acid や 2,5-dihydroxybenzoic acid がよく利用される。また、CHCA を用いたペプチドの分析では、トリフルオロ酢酸などの酸を加え、pH を3以下で測定するのが望ましいとの報告がある。³²⁾

最初に、リン酸化ペプチド-亜鉛錯体複合体の検出を検討した。ペプチドは、アミノ酸5残基からなる p60^{c-src} Substrate II (Ac-IY(PO₃H₂)GEF-NH₂) を用いた。プローブ分子として酢酸イオン-亜鉛錯体 **2** を用いた。図1にリン酸化ペプチド(コントロール)のスペクトルを示した。図2にリン酸化ペプチドに亜鉛錯体を混合した条件のスペクトルを示す。亜鉛錯体存在下の測定は THAP (2,4,6-trihydroxyacetophenone) をマトリックスとして用いた。この結果、*m/z* 1275 付近に亜鉛錯体とリン酸化ペプチドの1:1複合体に相当するピークのみが見られた(ピークの分裂は亜鉛の同位体によるものであるが、分裂の仕方は理論値とよく一致していた)(図2)。他に、例えば亜鉛錯体とリン酸化ペプチドの1:1複合体にさらに1分子の亜鉛錯体が結合した(おそらくグルタミン酸のカルボキシル基部分に結合すると考えられる)ピークなどは見られなかった。しかし、マトリックスに CHCA (α -cyano-4-hydroxycinnamic acid) を用いた場合、この複合体のピークは見られなかった。これはおそらく、CHCA を用いた場合、サンプルは酸性条件となり、亜鉛錯体が不安定になるためだと考えられる(THAPにTFAを加えて酸性にした試料でも複合体のピークは得られなかった)。

図1 質量分析スペクトル (リン酸化ペプチド) Matrix: CHCA

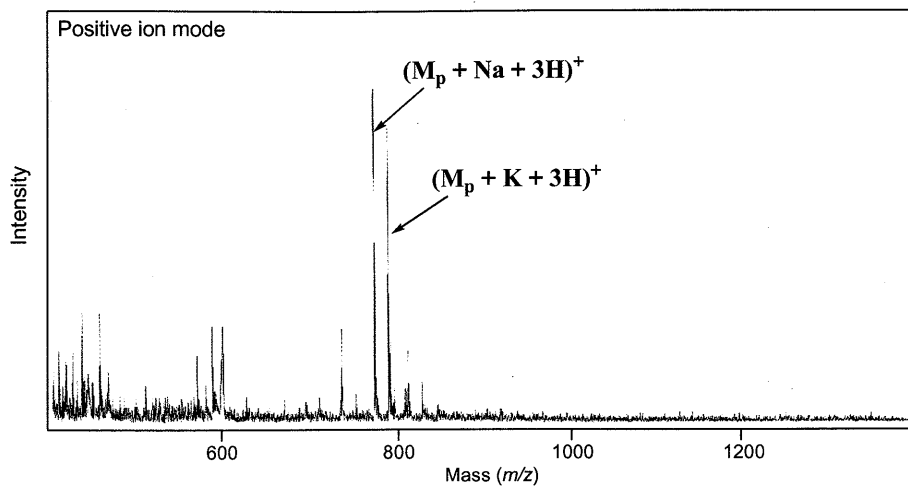
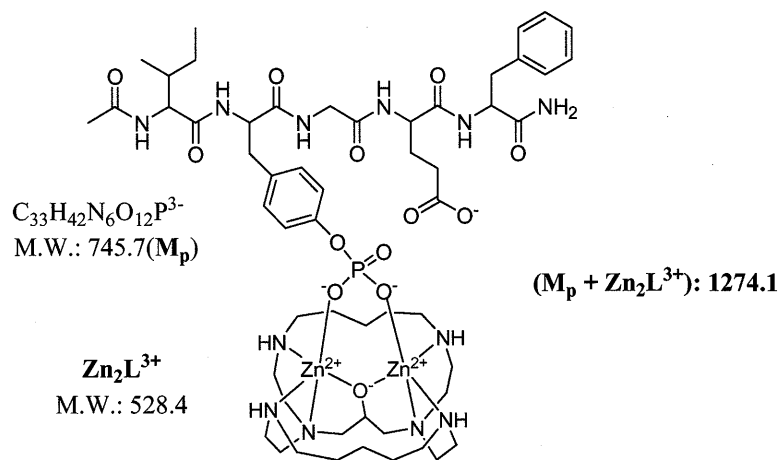
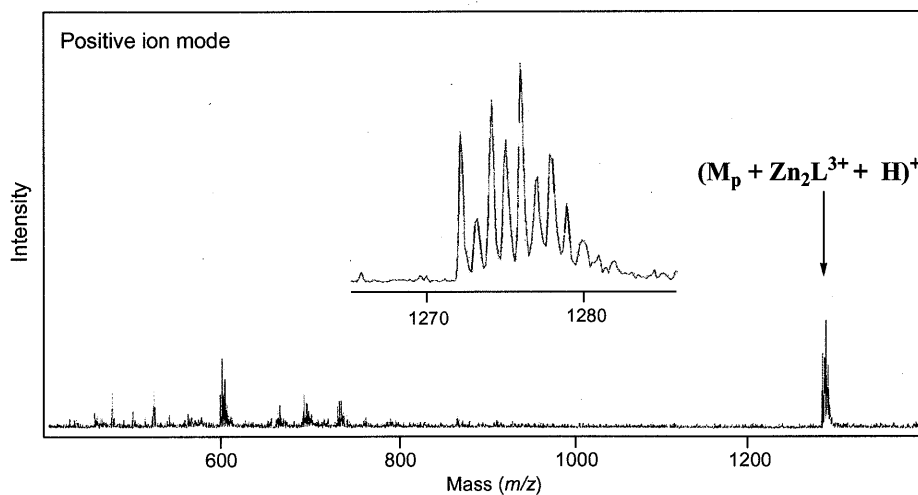


図2 質量分析スペクトル (亜鉛錯体 + リン酸化ペプチド) Matrix: THAP



次にリン酸化ペプチドと非リン酸化ペプチドの混合物に亜鉛錯体を加えた場合を検討した。図3に、リン酸化ペプチドとその非リン酸化型ペプチドの等量混合物のスペクトルを示す。図4に、さらに亜鉛錯体を加えた条件のスペクトルを示す(これらの物質質量比は、亜鉛錯体:リン酸化ペプチド:非リン酸化ペプチド=1:2:2である)。亜鉛錯体存在下の測定は THAP をマトリックスとして用いている。結果、亜鉛錯体存在下では、 m/z 1195と1275付近にピークがみられた。これらはそれぞれ非リン酸化型とリン酸化型のペプチドと亜鉛錯体の1:1複合体のピークと考えられる。しかし2つのピークを比較すると後者の方が明らかにその強度は大きかった。これは、溶液内平衡から予想されるように、亜鉛錯体がリン酸基をもつリン酸化ペプチドと選択的に相互作用しているためだと考えられる。 m/z 1195のイオンの構造として2種類考えられる。1つは亜鉛錯体がカルボキシル基に結合した形、もう1つはチロシン残基のフェノール部位に結合した形である(m/z 700付近にみられるピークが、亜鉛錯体とTHAPの複合体であることから予想される)。また、これらの他にピークは見られず、CHCA条件下の測定でも複合体のピークは得られなかった。

図3 質量分析スペクトル

(リン酸化ペプチド：非リン酸化ペプチド = 1 : 1) Matrix: CHCA

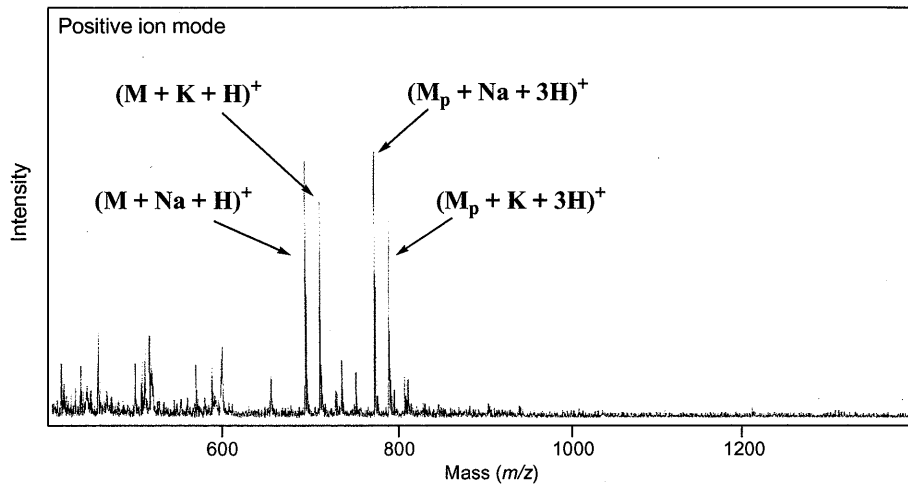
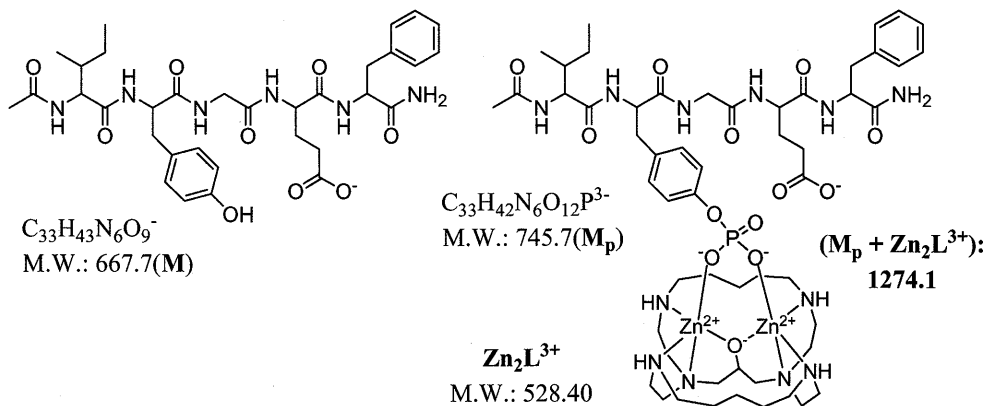
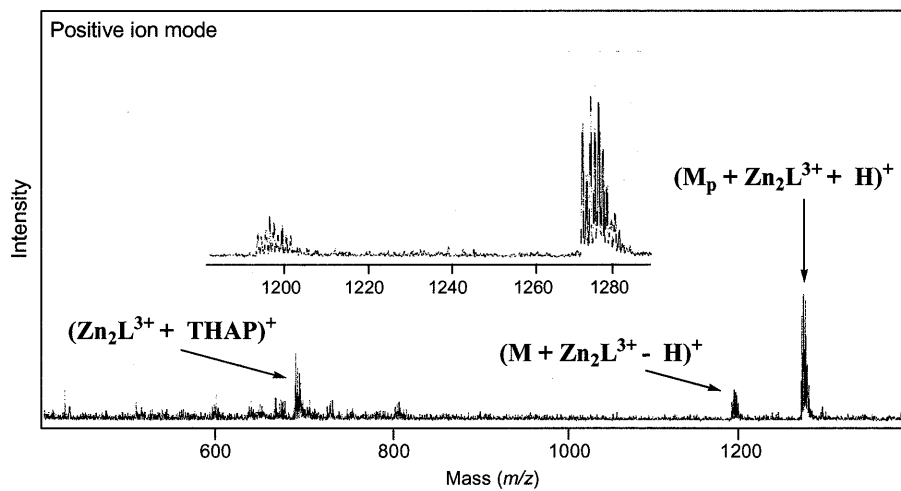


図4 質量分析スペクトル

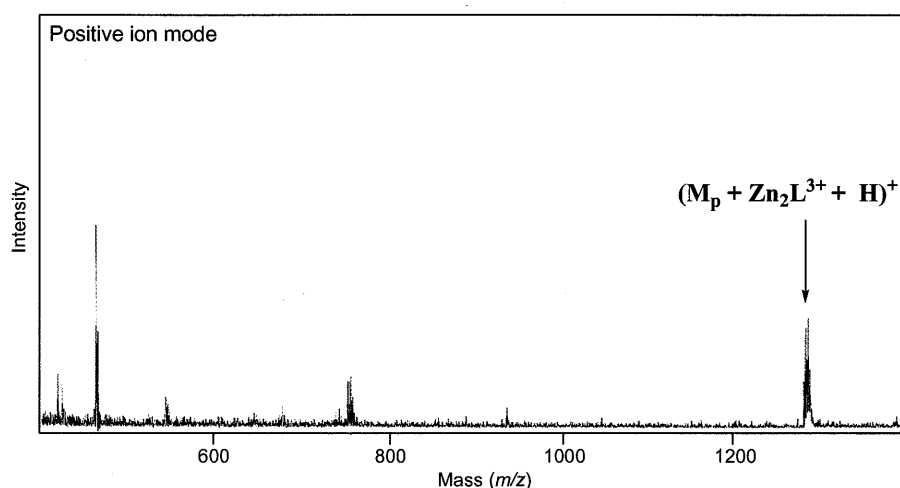
(亜鉛錯体：リン酸化ペプチド：非リン酸化ペプチド = 1 : 2 : 2) Matrix: THAP



また、亜鉛錯体:リン酸化ペプチド:非リン酸化ペプチド = 1:2:2でマトリックスを弱塩基性化合物の Harmane で測定した結果を図5に示す。この条件では、ほぼ亜鉛錯体-リン酸化ペプチドの複合体のピークのみが検出され、非リン酸化ペプチドとの複合体のピークは僅かに見える程度だった。これは、THAP を用いた中性条件と比べて Harmane を用いた弱塩基性条件では、亜鉛錯体とカルボキシレートアニオンとの親和性が低下しているためだと考えられる。よって、この条件では非リン酸化ペプチドとの複合体よりもリン酸化ペプチドとの複合体が相対的に多量になると考えられる。

図5 質量分析スペクトル Matrix: Harmane

(亜鉛錯体 : リン酸化ペプチド : 非リン酸化ペプチド = 1 : 2 : 2)



次に、アミノ酸13残基からなる p60^{c-src} Peptide 521-533 について検討した。図6にリン酸化型と非リン酸化型の等量混合物のスペクトルを示した。図7に、さらに亜鉛錯体を加えた条件のスペクトルを示す(マトリックスはTHAPを用いている。これらの物質質量比は、亜鉛錯体:リン酸化ペプチド:非リン酸化ペプチド = 1:2:2 である)。結果、亜鉛錯体存在下では、*m/z* 1990 と 2070 付近にピークがみられた。これらはそれぞれ非リン酸化型とリン酸化型のペプチドと亜鉛錯体の1:1複合体のピークと考えられる。前述した p60^{c-src} Substrate II ペプチドの場合とは異なり2つのピークの強度はほぼ等しかった。また、同様に亜鉛錯体:リン酸化ペプチド:非リン酸化ペプチド = 1:2:2 でマトリックスを弱塩基性化合物の Harman で測定した結果を図8に示す。この条件でも非リン酸化型ペプチドとの複合体のピークが相対的に増加していた。これらの結果は、p60^{c-src} Peptide 521-533 がカルボキシル基を多く持っているため、亜鉛錯体がリン酸化ペプチドのリン酸基と相互作用を形成する割合が減少しているためと考えられる。また、CHCA 条件下の測定ではこれら複合体のピークは得られなかった。

図6 質量分析スペクトル Matrix: CHCA
(リン酸化ペプチド:非リン酸化ペプチド = 1:1)

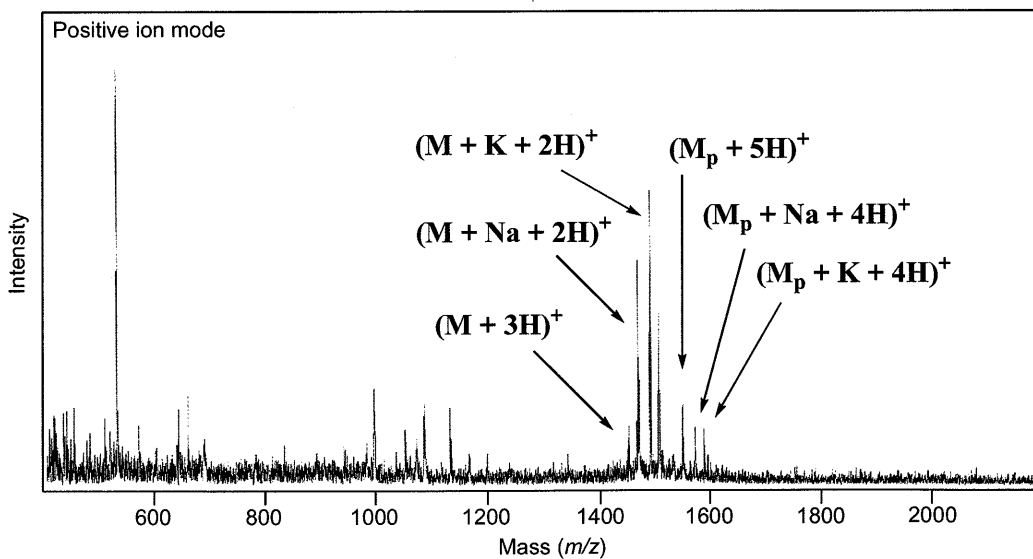
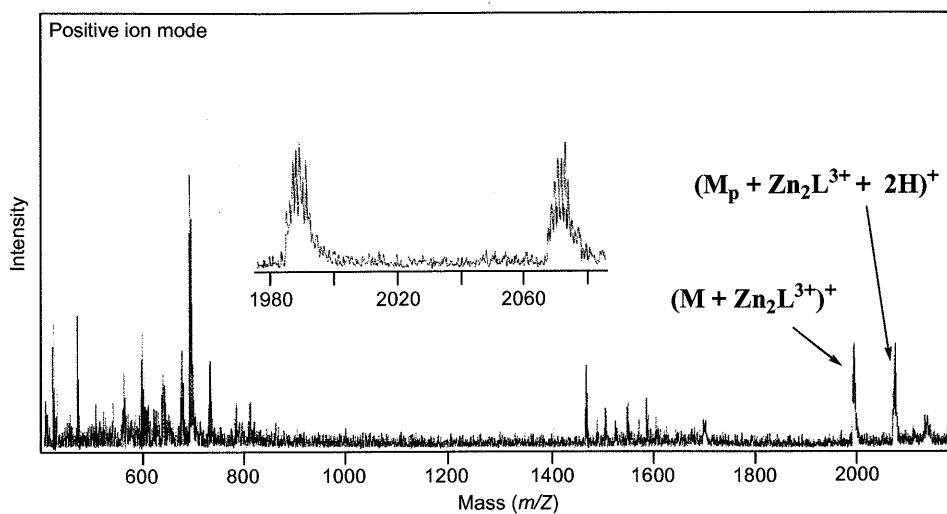
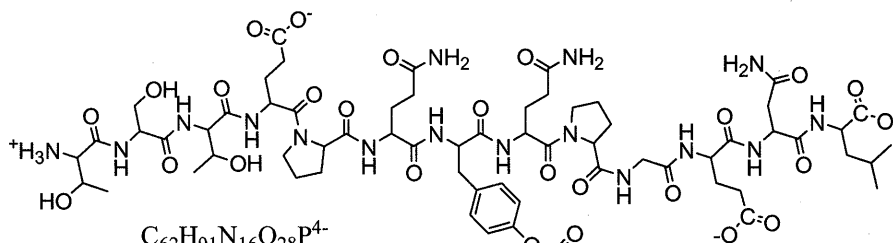
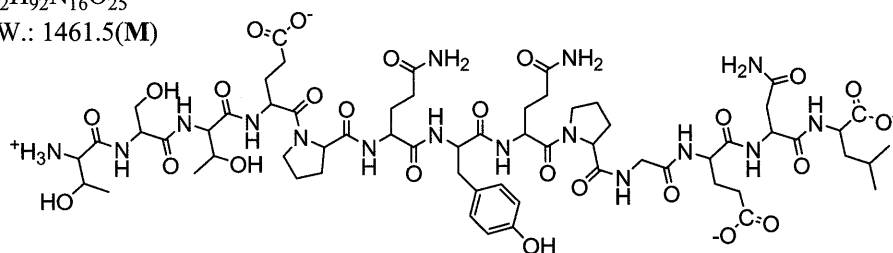


図7 質量分析スペクトル Matrix: THAP

(亜鉛錯体 : リン酸化ペプチド : 非リン酸化ペプチド = 1 : 2 : 2)

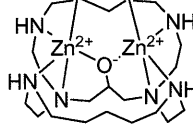


$C_{62}H_{92}N_{16}O_{25}^{2-}$
M. W.: 1461.5(M)



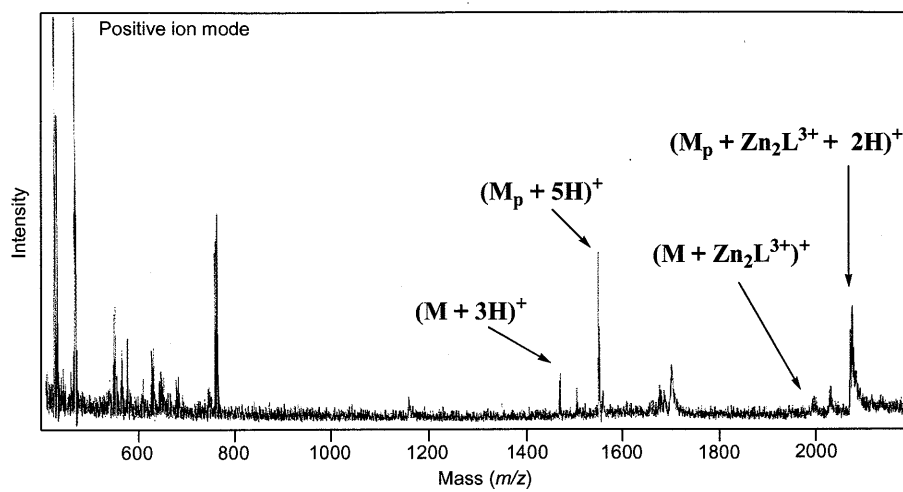
$C_{62}H_{91}N_{16}O_{28}P^4-$
M. W.: 1539.5(M_p)

Zn_2L^{3+}
M.W.: 528.4



$(M_p + Zn_2L^{3+}): 2067.9$

図 8 質量分析スペクトル Matrix: Harmane
(亜鉛錯体 : リン酸化ペプチド : 非リン酸化ペプチド = 1 : 2 : 2)



IV 結論

今回私は、新規に合成したポリアミン二核亜鉛錯体の特性を利用し、質量分析の添加剤の開発を行った。

新規亜鉛化合物の特性として、生理条件下水溶液中で2価のフェニルリン酸アニオンと強く相互作用することが明らかになった ($K_d = 0.62 \mu\text{M}$)。この相互作用はカルボキシレートアニオンをもつ酢酸イオンとの相互作用よりも約 80 倍強かった。また、リン酸化分子と亜鉛錯体を含む水溶液から得た結晶の X 線結晶構造解析を行い、リン酸化分子と亜鉛錯体の複合体の構造について知見を得た。リン酸アニオンの 2 つのマイナス酸素原子とアルコールで架橋された 2 つの亜鉛イオンとの結合の形成が明らかになった。リン酸化ペプチドと非リン酸化ペプチドを含む試料に新規亜鉛錯体を混合して MALDI-TOF/MS 分析を行ったところ、THAP や Harmane をマトリックスとして用いた条件で、亜鉛錯体とリン酸化ペプチドの 1:1 複合体のピークが選択的に検出されることが明らかになった。

今回の結果から、例えば、リン酸化ペプチドと非リン酸化ペプチドが混合したような試料の分析を行う場合(タンパク質の酵素消化物の分析でよくみられる)、亜鉛錯体を添加し、今回示した条件で測定することで、リン酸化ペプチドのシグナルを効率的に検出することが可能になると考えられる。この条件では、非リン酸化分子の検出感度は低下するので、リン酸化ペプチド(複合体として)の、他のペプチド分子との相対ピーク強度比は通常条件での測定より大きくなると予想される。

以上のことから、新規亜鉛化合物は、リン酸化分子をより効率的に検出・分析することを可能とする質量分析の添加剤として利用できると考えられる。今後、亜鉛の同位体の中で最も豊富な Zn^{64} のモノアイソトープ亜鉛錯体の合成を検討している。この時、最大ピークは理論的には現在の亜鉛錯体のもより3倍弱大きくなるので、リン酸化分子(亜鉛化合物複合体として)をより高感度で検出できるようになる可能性がある。また、亜鉛錯体を利用した測定では生理条件に近い pH で分析を行えるという利点がある。

以上、本研究では、亜鉛錯体の特性を利用して質量分析の添加剤の開発を行った。今後も、亜鉛化合物の特性を利用することでリン酸化生体分子のあらたな分析法の開発が期待される。

参考文献

- 1 Jonathan D. Graves; Edwin G. Krebs, *Pharmacol. Ther.*, **1999**, *82*, 111-121
- 2 T. Hunter, *Cell*, 2000, *100*, 113
- 3 S. R. Pennington; M. j. Dunn; 磯辺俊明(監訳), プロテオミクス, メディカル・サイエンス・インターナショナル, **2001**
- 4 A. Shevchenko; O. N. Jensen; A. V. Podtelejnikov; F. Sagliocco; M. Wilm; O. Vorm; P. Mortensen; A. Shevchenko; H. Boucherie; M. Mann, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **1996**, *93*, 14440-14445
- 5 Y. Oda; K. Huang; F. R. Cross; D. Cowburn; B. T. Chait, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **1999**, *96*, 6591-6596
- 6 K. N. Bennett; A. Stensballe; A. V. Podtelejnikov; M. Moniatte; O.N. Jensen, *J. Mass Spectrom.*, **2002**, *37*, 179-190
- 7 H. J. Issaq; T. D. Veenstra; T. P. Conrads; D. Felschow, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2002**, *292*, 587-592
- 8 F. V. Eggeling; K. Junker; W. Fiedler; V. Wollscheid; M. Dürst; U. Claussen; G. Ernst, *Electrophoresis*, **2001**, *22*, 2898-2902
- 9 E. Hildebrandt; V. A. Fried, *Anal. Biochem.*, **1989**, *177*, 407-412
- 10 W. Zhou; B. A. Merrick; M. G. Khaledi, *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.*, **2000**, *11*, 273-282
- 11 M. C. Posewitz; P. Tempst, *Anal. Chem.*, **1999**, *71*, 2883-2892
- 12 A. Pandey; A. V. Podtelejnikov; B. Blagoev; X. R. Bustelo; M. Mann; H. F. Lodish, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **2000**, *97*, 179-184
- 13 Y. Oda; T. Nagasu; B. T. Chait, *Nat. Biotechnol.*, **2001**, *19*, 379-382
- 14 E. Kimura, *Top. Curr. Chem.*, **1985**, *128*, 113-141
- 15 木村榮一, 薬学雑誌, **1996**, *116*, 587-605
- 16 M. W. Hosseini; J. M. Lehn, *Helv. Chim. Acta.*, **1988**, *71*, 749-756
- 17 J. L. Sessler; V. Král; V. Lynch, *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, *118*, 5140-5141
- 18 M. W. Hosseini; J. M. Lehn; M. P. Mertes. *Helv. Chim. Acta*, **1983**, *66*, 2454-2466
- 19 M. W. Hosseini; A. J. Blacker; J. M. Lehn, *J. Am. Chem. Soc.*, **1990**, *112*, 3896-3904
- 20 Y. Umezawa; M. Kataoka; W. Takami; E. Kimura; T. Koike; H. Nada, *Anal. Chem.*, **1988**, *60*, 2392-2396
- 21 E. Kimura; M. Kodama; T. Yatsunami, *J. Am. Chem. Soc.*, **1982**, *104*, 3182-3187
- 22 V. Jubian; A. Veronese; R. P. Dixon; A. D. Hamilton, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1995**, *34*, 1237-1239
- 23 B. Dietrich; D. L. Fyles; T. M. Fyles; J. M. Lehn, *Helv. Chim. Acta*, **1979**, *62*, 2763-2787

- 24 V. Král; H. Furuta; K. Shreder; V. Lynch; J. L. Sessler, *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, *118*, 1595-1607
- 25 T. Koike; S. Kajitani; I. Nakamura; E. Kimura; M. Shiro, *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, *117*, 1210-1219
- 26 H. Fujioka; T. Koike; N. Yamada; E. Kimura, *Heterocycles*, **1996**, *42*, 775-787
- 27 E. Kimura; S. Aoki; T. Koike; M. Shiro, *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, *119*, 3068-3076
- 28 E. Kimura, *Progress in Organic Chemistry*, **1994**, *41*, 443-491
- 29 T. Koike; M. Inoue; E. Kimura; M. Shiro, *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, *118*, 3091-3099
- 30 マススペクトロメトリーってなあに, 日本質量分析学会, **2001**
- 31 J. R. Chapman, *Mass Spectrometry of Proteins and Peptides*, **2000**, HUMANA PRESS
- 32 S. L. Cohen; B. T. Chait, *Anal. Chem.*, **1996**, *68*, 31-37

試薬および機器分析装置の概要

使用試薬および溶媒

実験に用いた試薬および溶媒は, THF, EtOH, MeOH を除いて市販の一級または特級のもをそのまま使用した。THF, EtOH は金属ナトリウム存在下で, MeOH は乾燥剤なしでそれぞれ蒸留したものをを用いた。また, 全ての実験を通して ADVANTEC aquarius GS-20A により蒸留した精製水を使用した。

Acetonitrile (CH ₃ CN) 特級	:Yoneyama
28% ammonia solution 一級	:Yoneyama
Boric Acid 特級	:ナカライ
Borane-tetrahydrofuran complex	
1.0 M solution in tetrahydrofuran	:Aldrich
1,5-Diaminopentane	:東京化成
1,3-Diamino-2-propanol-	
<i>N,N,N',N'</i> -tetraacetic acid	:東京化成
Dichloromethane(CH ₂ Cl ₂) 一級	:Yoneyama
Ethanol (EtOH) 一級	:日本アルコール販売
Ethyl Acetate (AcOEt) 一級	:Yoneyama

n-Hexane 一級	:Yoneyama
36% hydrochloric acid (conc.HCl) 一級	:Yoneyama
Ion exchange resin (Amberlite IRA400-Cl)	:Organo
Methanol (MeOH) 一級	:Yoneyama
4-nitrophenylphosphoric acid disodium salt hexahydrate	:ナカライ
Phenylphosphoric acid disodium salt dehydrate	:ナカライ
Potassium Bromide (KBr)	:Yoneyama
Sea Sand (30-50mesh) 一級	:Yoneyama
Sodium carbonate (Na ₂ CO ₃) 一級	:Yoneyama
Sodium perchlorate monohydrate	:MERK
Disodium sulfate anhydrous 一級	:Yoneyama
Tetrahydrofuran (THF) 一級	:Yoneyama
TLC plate MERCK Art.5554 (silica gel)	:MERCK
Thionyl chloride (SOCl ₂) 特級	:関東化学
Tris(hydroxymethyl)aminomethane	:SIGMA
Zinc acetate dehydrate 一級	:Yoneyama
Zinc perchlorate hexahydrate	:添川
カラムクロマト用シリカゲル Fuji Silysia Chemical FL-100D	:Fuji Silysia

機器類

ロータリーエバポレーター	EYELA Vacuum controller NVC-1100
赤外線分光分析	HORIBA FT-710
核磁気共鳴スペクトル分析	JEOL delta 500 FT NMR spectrometer
CHN 元素分析	Perkin Elmer CHN Analyzer 2400
pH メーター	HORIBA F-12