

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月13日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H03287

研究課題名(和文)新規遷移金属触媒アミド化反応による疾患治療

研究課題名(英文)Therapeutic In Vivo Synthetic Chemistry by Transition Metal Catalyzed Amidation

研究代表者

田中 克典(Tanaka, Katsunori)

国立研究開発法人理化学研究所・開拓研究本部・主任研究員

研究者番号：00403098

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,600,000円

研究成果の概要(和文)：体内の狙った臓器で選択的に金属触媒反応を起こすには、二つの問題を解決しなければならない。一つ目は、どのように体内で不安定な金属触媒を短時間で臓器に運ぶかという問題である。二つ目は、体内にさまざまな分子が存在する中で、どのような金属触媒反応を選択的に進行させるかという問題である。報告者らは、アルブミン糖鎖クラスターを「遷移金属触媒の運び屋」として活用することにより、哺乳動物内での金属触媒反応に初めて成功した。マウス内の望む臓器で選択的に金属触媒反応を行うとともに、蛍光標識や分子の「現地合成」を実現した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

報告者らが開発した方法を用いて狙った臓器で選択的に金属触媒反応を起こせば、がんなどの疾患部位で、直接、薬などの生理活性分子を合成できると期待できる。さまざまな金属触媒反応に展開できると考えられ、体内で薬の合成が可能となる。その結果、薬が疾患部位以外で作用して起きる副作用の問題、あるいはペプチドなど不安定な薬の体内での安定性の問題を解決できると期待できる。過去、ドロップアウトしてきた薬理活性分子を生体内で直接見直す新戦略であり、創薬化学やプロドラッグ、あるいはドラッグデリバリーシステムにおける「分子機能のルネッサンス」となる。

研究成果の概要(英文)：If we could synthesize these drug candidates at the disease tissue directly in vivo, potential benefits are that side effects to other organs may be lessened and the therapeutic window of drug activity can be prolonged before decomposition. We referred to this new clinical approach as "Therapeutic In Vivo Synthetic Chemistry".

One promising strategy is to use transition metal catalyzed reaction in vivo. We developed new metal-catalyzed (or mediated) transformations in biologically relevant media. To perform this reaction selectively in vivo at targeted organs, we designed a strategy that conjugates transition metal catalysts to glycoclusters, which quickly and selectively accumulate to target organs. Following injection of these metal conjugated glycoclusters into mice, we then injected the reagents to label or synthesizing the molecules at the targeted organs in mice. Our strategy led to the first example of organ selective metal catalyzed reactions.

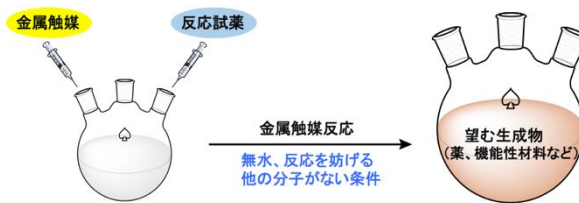
研究分野：生体合成化学

キーワード：化学合成 生体分子 蛋白質 糖鎖 生体内合成化学治療

1. 研究開始当初の背景

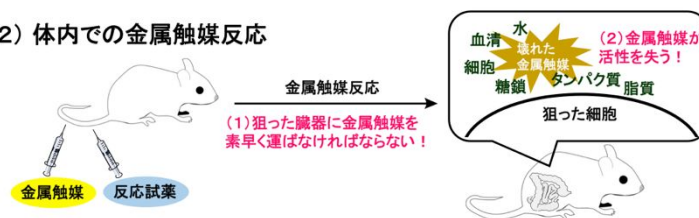
有機合成化学の分野では、薬などさまざまな分子を自在に合成するために、これまでに多くの金属触媒が開発されてきた。近年、金属触媒のなかでも遷移金属（周期表で第4族から第12族までに属する元素）触媒を用いた新しい有機合成反応が盛んに研究されている。例えば、ルテニウム（Ru）触媒を用いた野依良治博士らの不斉還元反応やロバート・グラブス教授（米国カルフォルニア工科大学）らのメタセシス反応、あるいはパラジウム（Pd）触媒を用いた鈴木章博士、宮浦憲夫博士の鈴木・宮浦カップリング反応はノーベル化学賞を受賞した。これらの金属触媒の開発により、複雑な構造を持つ薬や機能性材料を簡便かつ自在に合成することが可能となっている。

1) これまでの一般的な金属触媒反応



もし金属触媒反応を体内で行うことができれば、患者の体内の狙った臓器で速やかに薬を合成することが可能になり、副作用を軽減できる可能性がある。また、これまで体内で不安定だった薬が、狙った疾患部位で安定な化合物として合成できるかもしれない。これは疾患を直接、有機反応で治すことにつながり、従来の創薬研究の問題点を解決する治療戦略となると期待されている。

2) 体内での金属触媒反応



体の中の狙った位置で金属触媒反応を行うことはこれまでに不可能であった！

これまで金属触媒反応は、無水かつ反応を妨げる分子がない条件のフラスコ内で行われてきた。しかし、体内では、水、血清、細胞、タンパク質、糖鎖、脂質などさまざまな分子が混在するため、金属触媒はその活性を失い、特定の部位で効率的に金属触媒反応を進行させることは不可能だと考えられてきた。

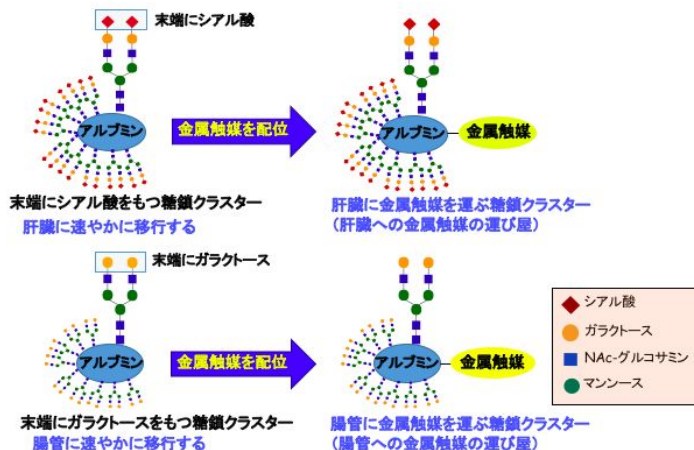
2. 研究の目的

体内の特定の場所で自在に金属触媒反応を実現するために、(1)ある特定の時間に試薬や原料を体内の標的の臓器や細胞に迅速に運ぶ、さらに(2)生体内の様々な物質が存在する中で自在に使える金属触媒反応を開発することを目的とした。

3. 研究の方法

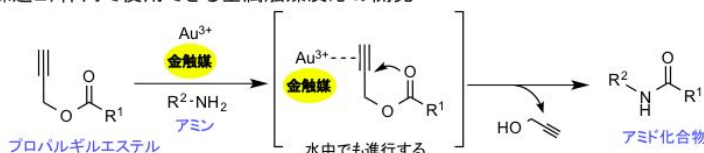
上記に述べたように、体内の狙った臓器で選択的に金属触媒反応を起こすには、二つの問題を解決しなければならない。一つ目は、どのように体内で不安定な金属触媒を短時間で臓器に運ぶかという問題である。抗体に金属触媒を結合して運ぶ方法が考えられるが、抗体は巨大分子（分子量：約15万）のため、目的の臓器に到達するには1日程度を要し、血液中を巡る間に金属触媒が壊れてしまう。二つ目は、体内にさまざまな分子が存在する中で、どのような金属触媒反応を選択的に進行させるかという問題である。

課題1) 金属触媒を短時間で目的臓器に運ぶキャリアの開発



一つ目の問題に対して報告者らは最近、可溶性タンパク質のアルブミン上で独自に開発した「理研クリック反応」を駆使し、アスパラギン結合型糖タンパク質糖鎖（N-結合型糖鎖）をクラスター化した。このクラスターが可能とする初めての「糖鎖パターン認識機構」により、マウス体内での糖鎖の排出経路を

課題2) 体内で使用できる金属触媒反応の開発



制御したり、臓器選択的な集積を迅速・厳密に制御できることを明らかにした。特に、末端にシアル酸を持つ糖鎖クラスターは肝臓に、末端にガラクトースを持つ糖鎖クラスターは腸管に速やかに到達することを見出している。

一方で報告者らは、プロパルギルエステルが3価の金触媒 ( $\text{Au}^{3+}$ ) の存在下で活性化され、生体内のさまざまなアミンと反応(金触媒アミド化反応)して30分以内でアミド化合物が生成されることを見出した。そこでこれらの知見をもとに、糖鎖クラスターを金触媒を狙った臓器へ運ぶ「運び屋(デリバリーシステム)」として利用し、臓器で選択的に金触媒アミド化反応を行うことを計画した。

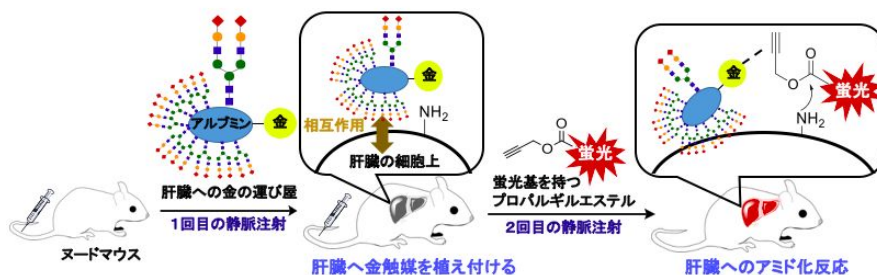
#### 4. 研究成果

まず末端にシアル酸、あるいはガラクトースを持つ糖鎖クラスターに金触媒を導入した「金の運び屋」をヌードマウスの静脈から導入したところ、体内で金触媒の活性を落とすことなく、30分以内で肝臓または腸管に金触媒を植え付けることができた。さらにその後、蛍光基を持つプロパルギルエステルを静脈注射したところ、それぞれ肝臓と腸管部位で選択的に蛍光標識されることが被侵襲的な蛍光イメージングにより判明した。これは、プロパルギルエステルが血液中を巡った後、肝臓、腸管に到達した時に、先に植え付けていた金触媒と反応して臓器表面にあるリジン残基などのアミノ基との間で金触媒アミド化反応が起きた結果である。さらに、実験に使用したヌードマウスから蛍光標識した肝臓を取り出し、組織切片を蛍光顕微鏡で確認した結果、蛍光標識は金の運び屋として使った糖鎖クラスターが認識する受容体が発現している中心静脈周辺で起きていることが分かった。

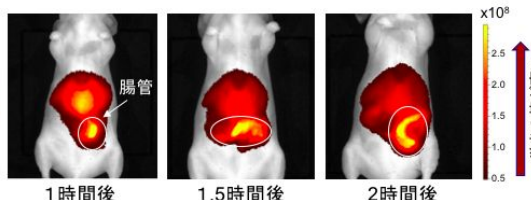
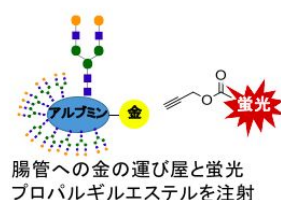
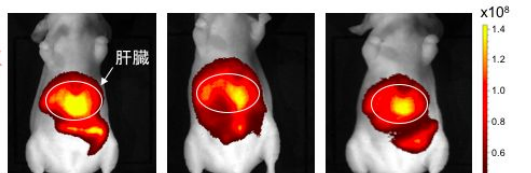
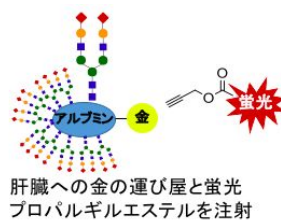
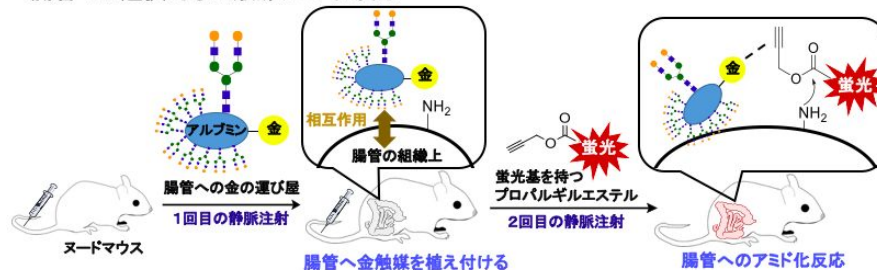
以上の結果から、金の運び屋(デリバリーシステム)として使った糖鎖クラスターの種類により、選択的に肝臓や腸管が蛍光標識できることが明らかとなった。このように、生きている動物体内の狙った臓器で選択的な金属触媒反応を起こすことに初めて成功した。

さらに報告者らは、(1)これまで実現が難しいと考えられてきた哺乳動物体内での金属触媒反応が、なぜこの実験系では効率的に進行したのか、そして(2)この反応がどのような機構で進行しているのかを、改めて詳しく調べた。当初は専ら、3価の金触媒がプロパルギルエステルのπ-親和性部位であるアセチレンに配位することで、エステル部分の電子密度が低下し、臓器表面上にあるアミノ基の求核攻撃が促進されてアミド化反応が起こると考えていた。そこで、さまざまな3価の金触媒を用いて、プロパルギルエステルとアミノ基とのアミド化反応をフラスコ内で検討した。その結果、配位子を持たない3価の金触媒を使った場合にはアミド化反応がゆっくりと進行したのに対して、2-ベンゾイルピリジンを配位子として持つ3価の金触媒を用いたときにはアミド化反応が著しく促進された。

##### 肝臓での選択的な金触媒アミド化反応

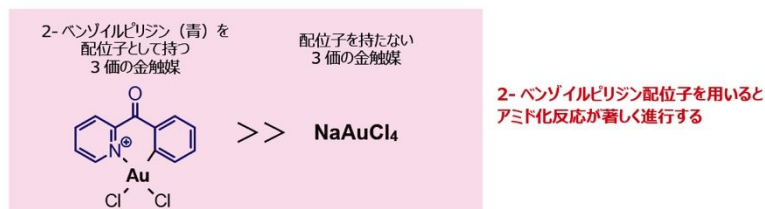
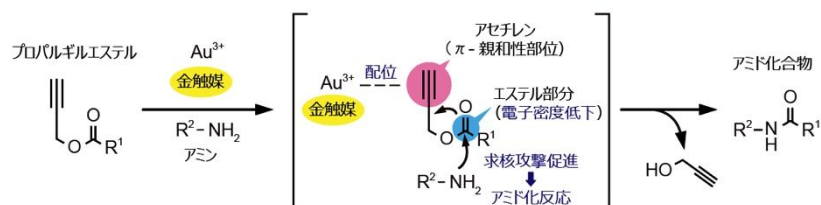


##### 腸管での選択的な金触媒アミド化反応

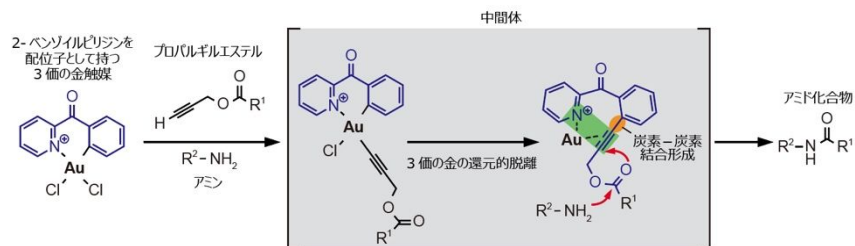


さらに報告者らは、(1)これまで実現が難しいと考えられてきた哺乳動物体内での金属触媒反応が、なぜこの実験系では効率的に進行したのか、そして(2)この反応がどのような機構で進行しているのかを、改めて詳しく調べた。当初は専ら、3価の金触媒がプロパルギルエステルのπ-親和性部位であるアセチレンに配位することで、エステル部分の電子密度が低下し、臓器表面上にあるアミノ基の求核攻撃が促進されてアミド化反応が起こると考えていた。そこで、さまざまな3価の金触媒を用いて、プロパルギルエステルとアミノ基とのアミド化反応をフラスコ内で検討した。その結果、配位子を持たない3価の金触媒を使った場合にはアミド化反応がゆっくりと進行したのに対して、2-ベンゾイルピリジンを配位子として持つ3価の金触媒を用いたときにはアミド化反応が著しく促進された。

そこで、2-ベンゾイルピリジン配位子として持つ3個の金触媒の反応機構について、中間体を検出し、アミド化反応が起こる過程を詳しく調べた。その結果、単純に3個の金触媒がプロパルギルエステルのアセチレンに配位して、エステル部分を活性化する触媒的な反応機構に加えて、触媒的な反応ではないものの、炭素-炭素結合形成を含む機構も経ていることが示唆された。



すなわち、2-ベンゾイルピリジン配位子として持つ3個の金触媒とプロパルギルエステルが反応すると、まず3個の金の還元的脱離の過程を経て、2-ベンゾイルピリジンのベンゼンとプロパルギルエステルのアセチレンとの間で炭素-炭素結合が形成される。この中間体では、金がピリジンの窒素原子とプロパルギルエステルのアセチレンとの間で挟まれている。このように、金がより強くπ-親和性部位であるアセチレンに配位することで、アミノ基によるプロパルギルエステルへの求核置換反応が促進されると考えられた。このような新しいプロパルギルエステルの活性化機構が、生体内でもアミド化反応が効率的に進むことを可能にしていると考えられる。



さらに報告者らは、ここで明らかにした反応機構をもとにして、2-ベンゾイルピリジン配位子として持つ金触媒を利用して、さまざまなタンパク質のアミノ基に対するプロパルギルエステルのアミド化反応を検討し、新しい標識技術として確立した。

以上のように本研究では、独自の糖鎖クラスターを基盤とした触媒デリバリーシステムや金属触媒の配位子を検討することで、従来フラスコや細胞を対象としていた金属触媒によるカップリング反応が、生体内の特定の臓器上でも実施できることを示した。

生体内で有機合成を行って治療しようとする試みは現在、次世代のライフサイエンス研究として最も興味を持たれている課題の一つであり、生体内の「現地」で特定の有機合成反応を実施する試みが世界中で開始されている。しかし現状では、細胞表面、または細胞内で単なるアジドとアセチレンとのクリック反応、あるいは金属ポリマー粒子を使った金属触媒反応が行われているだけである。哺乳類に静脈注射して求める臓器上で反応を起こさせる研究にはほど遠い。上記の糖鎖アルブミンを基盤とした「触媒の運び屋」(キャタリストデリバリーシステム)の偶然の発見により、哺乳類での臓器選択的な金属触媒反応を実現したのは報告者らのグループだけである。今回開発した方法を用いて狙った臓器で選択的に有機反応を起こせば、がんなどの疾患部位で、直接、薬などの生理活性分子を合成できると期待できる。金触媒だけではなく、さまざまな金属触媒反応にも展開できると考えられ、体内での薬の合成が可能となる。その結果、薬が疾患部位以外で作用して起きる副作用の問題、あるいはペプチドなど不安定な薬の体内での安定性の問題を解決できると期待できる。実際に報告者らは、上記で確立した方法を駆使して生体内で様々な分子を合成し、がんを治療することに成功した。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計45件)

(1) K. Nakamura, K. Tsubokura, A. Kurbangalieva, Y. Nakao, T. Murase, T. Shimoda, K. Tanaka, Efficient route to RIKEN click probes for glycoconjugation, J. Carbohydr. Chem., 38, 127-138 (2019). (査読有)

(2) 小椋章弘, 田中克典, 生体内でのパターン認識を可能とする次世代糖鎖クラスター, 有機合成化学協会誌, 77, 163-172 (2019). (査読有)

<https://doi.org/10.5059/yukigoseikyokaiishi.77.163>

(3) K. Fujiki, Y. Kanayama, S. Yano, N. Sato, T. Yokokita, P. Ahmadi, Y. Watanabe, H. Haba, K. Tanaka, 211At-Labeled immunoconjugate via a one-pot three-component double click strategy: Practical access to α-emission cancer radiotherapeutics, Chem. Sci., 10, 1936-1944 (2019). (査読有)

DOI: 10.1039/C8SC04747B

(4) A. Ogura, S. Urano, T. Tahara, S. Nozaki, R. Sibgatullina, K. Vong, T. Suzuki, N. Dohmae, A. Kurbangaliev, Y. Watanabe, K. Tanaka, Viable strategy for screening the effects of glycan heterogeneity on target organ adhesion and biodistribution in live mice, *Chem. Commun.*, 54, 8693-8696 (2018). (査読有)

<http://dx.doi.org/10.1039/C8CC01544A>

(5) Y. Lin, K. Vong, K. Matsuoka, K. Tanaka, 2-Benzoylpyridine ligand complexation with gold critical for propargyl ester-based protein labeling, *Chem. Eur. J.*, 24, 10595-10600 (2018). (査読有)

<https://doi.org/10.1002/chem.201802058>

(6) R. Sibgatullina, K. Fujiki, T. Murase, T. Yamamoto, T. Shimoda, A. Kurbangaliev, K. Tanaka, Highly reactive “RIKEN click” probe for glycoconjugation on lysines, *Tetrahedron Lett.*, 58, 1929-1933 (2017). (査読有)

DOI: 10.1016/j.tetlet.2017.03.081

(7) K. Tsubokura, K. K. H. Vong, A. R. Pradipta, A. Ogura, S. Urano, T. Tahara, S. Nozaki, H. Onoe, Y. Nakao, R. Sibgatullina, A. Kurbangaliev, Y. Watanabe, K. Tanaka, In vivo gold complex catalysis within live mice, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 56, 3579-3584 (2017). (査読有)

DOI: 10.1002/anie.201610273

(8) L. Latypova, R. Sibgatullina, A. Ogura, K. Fujiki, A. Khabibrakhmanova, T. Tahara, S. Nozaki, S. Urano, K. Tsubokura, H. Onoe, Y. Watanabe, A. Kurbangaliev, K. Tanaka, Sequential double “clicks” toward structurally well-defined heterogeneous N-glycoclusters: The importance of cluster heterogeneity on pattern recognition in vivo, *Adv. Sci.*, 4, 1600394 (2017). (査読有)

DOI: 10.1002/adv.201600394

(9) K. Tanaka, Chemically synthesized glycoconjugates on proteins: Effects of multivalency and glycoform in vivo, *Org. Biomol. Chem.*, 14, 7610-7621 (2016). (査読有)

DOI: 10.1039/C60B00788K

(10) A. Tsutsui, A. Ogura, T. Tahara, S. Nozaki, S. Urano, M. Hara, S. Kojima, A. Kurbangaliev, H. Onoe, Y. Watanabe, N. Taniguchi, K. Tanaka, In Vivo Imaging of Advanced Glycation End Products (AGEs) of Albumin: First Observations of Significantly Reduced Clearance and Liver Deposition Properties in Mice, *Org. Biomol. Chem.*, 14, 5755-5760 (2016). (査読有)

DOI: 10.1039/C60B00098C

#### 〔学会発表〕(計 154 件)

- (1) 田中克典、生体内合成化学医療：創薬候補分子のルネッサンス、大日本住友製薬講演会、2019.3.4、大日本住友製薬株式会社大阪研究所（大阪府大阪市）
- (2) 田中克典、生体内合成化学医療、第 42 回白金シンポジウム、2019.2.26、北里大学大村記念ホール（東京都港区）
- (3) 田中克典、生体内合成化学治療、第 36 回メディシナルケミストリーシンポジウム、2018.11.29、京都テルサ（京都府京都市）
- (4) 田中克典、生体内合成化学治療！～哺乳動物内の精密有機合成化学が導く未来の創薬・医療～、化学が先導するライフ・イノベーション ～医療・創薬研究の最前線～、2018.9.21、日本化学会 7 階ホール（東京都千代田区）
- (5) Katsunori Tanaka, Therapeutic in vivo synthetic chemistry, 29th International Carbohydrate Symposium, 2018.7.17, Universidade de Lisboa(Lisbon, Portugal)
- (6) Katsunori Tanaka, Therapeutic in vivo synthetic chemistry, 54th International Conference on Medicinal Chemistry, 2018.7.6, STRASBOURG CONVENTION & EXHIBITION CENTRE (Strasbourg, France)
- (7) 田中克典、次世代の創薬戦略・生体内合成化学治療、第 55 回薬剤学懇談会研究会、2018.6.15、シーサイドホテル舞子ピラ神戸（兵庫県神戸市）
- (8) 田中克典、生きている動物内での創薬研究・生体内合成化学治療、平成 30 年度前期（春季）有機合成化学講習会、2018.6.13、日本薬学会長井記念ホール（東京都渋谷区）
- (9) Katsunori Tanaka, Therapeutic In Vivo Synthetic Chemistry, 2017.3.1, Max Planck Institute of Colloids and Interfaces, (Potsdam, Germany)

#### 〔図書〕(計 4 件)

- (1) K. Vong, K. Tanaka, Influence of Glycosylation Pattern on Protein Biodistribution and Kinetics In Vivo Within Mice, In *Kinetic Control in Synthesis and Self-Assembly*, M. Numata, S. Yagi and T. Hamura (eds), Elsevier, 127-161 (2018).
- (2) K. Tanaka, Glycan Molecular Technology for Highly Selective In Vivo Recognition, In *Molecular Technology, Life Innovation, Volume 2*, H. Yamamoto and T. Kato (eds), Wiley-VCH, 131-163 (2018).

(3) K. Fujiki, K. Tanaka, RIKEN click reagent for protein labeling, e-ROS Encyclopedia of reagents for organic synthesis, doi: 10.1002/047084289x.rm02050, (2018).

(4) 田中克典, ラベル化糖鎖を用いた診断とイメージング, 未来を創るグライコサイエンスー我が国のロードマップー, 日本糖質科学コンソーシアム, 189-191 (2018).

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称: ホルミルデヒドロピペリジン構造を含む化合物の検出方法及び検出キット

発明者: 田中克典

権利者: 田中克典

種類: 特許

番号: PCT/JP2016/190085

出願年: 2016

国内外の別: 国内

〔その他〕

**ホームページ**

田中生体機能合成化学研究室

[http://www.riken.jp/research/labs/associate/biofunct\\_synth\\_chem/](http://www.riken.jp/research/labs/associate/biofunct_synth_chem/)

田中生体機能合成化学研究室オリジナルホームページ

<http://www.riken.jp/nori-tanaka-lab/>

**プレスリリース**

マウス内で金属触媒によるカップリング反応 - 副作用のない薬の実現へ -

[http://www.riken.jp/pr/press/2018/20180628\\_1/](http://www.riken.jp/pr/press/2018/20180628_1/)

狙った臓器で金属触媒反応を実現 - 体内の疾患部分で薬を直接作る研究に大きな一歩 -

[http://www.riken.jp/pr/press/2017/20170215\\_1/](http://www.riken.jp/pr/press/2017/20170215_1/)

糖鎖は不均一であることが重要 - 糖鎖特有の分子認識機構をマウスで解明 -

[http://www.riken.jp/pr/press/2016/20161128\\_1/](http://www.riken.jp/pr/press/2016/20161128_1/)

生体内部を高度に認識できる糖鎖複合体 - 糖鎖を用いた創薬や診断分子の開発に大きな手がかり -

[http://www.riken.jp/pr/press/2016/20160223\\_3/](http://www.riken.jp/pr/press/2016/20160223_3/)

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名:

ローマ字氏名:

所属研究機関名:

部局名:

職名:

研究者番号 (8 桁):

### (2)研究協力者

研究協力者氏名:

ローマ字氏名:

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。