

令和 2 年 6 月 23 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K17902

研究課題名(和文)低～高分子までの生理活性化合物の精密合成を実現する水中反応の開発

研究課題名(英文)Development of chemical reactions for realizing precise synthesis of low to high molecular weight bioactive compounds in aqueous solutions

研究代表者

渡邊 賢司(Watanabe, Kenji)

国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター・研究員

研究者番号：90631937

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：タンパク質の化学修飾を行う上で必要な水中反応について研究を行った。インドールを骨格に持つアルコール化合物が、弱酸性緩衝水溶液中において、システイン残基に含まれるチオール基と脱水酸基を伴いながら官能基選択的に共有結合を形成することを報告した(Chem. Eur. J. 2018, 24, 3959-3964)。また、有機溶媒中において進行するチオールおよびボロン酸の介在する関連反応について研究を行った。最終年度においては、最新のチオールの関与する生体共役反応や共有結合形成反応についての文献調査を行い、レビュー論文として発表を行った(有機合成化学協会誌, 2019, 77, 841-842)。

研究成果の学術的意義や社会的意義

タンパク質などの生体由来の分子と生物活性を示す有機化合物を結びつける化学反応についての研究を行った。これまでに用いられてきた化学反応は、タンパク質のチオール基の空気酸化や反応性の高いアミノ基が関与する望まない副反応が起こり、問題となることがあったが、これらを克服した弱酸性条件で進行する新たな化学反応の開発を行った。これらの成果は、医薬品や生命機能を解明するための分子を合成するために役立つと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we developed chemical reactions and related transformations for precise chemical modification of biomolecules such as proteins, peptides, and amino acids. We reported alcohol compounds having an indole skeleton selectively form a stable C-S bond with a thiol group via dehydroxylation of the hydroxy group in a weakly acidic (pH 4.5-6.4) aqueous buffered solutions (Chem. Eur. J. 2018, 24, 3959-3964). We also investigated a related transformation involving thiol and boronic acid that proceeds in organic solvents. In the final year, we conducted a comparative study between the latest bioconjugation reactions and covalent bond formation reactions involving thiols, and published a review (J. Synth. Org. Chem. Jpn. 2019, 77, 841-842).

研究分野：生体機能関連化学

キーワード：水中反応 チオール タンパク質 ペプチド インドール

## 1. 研究開始当初の背景

天然物や医薬品化合物、ペプチド、タンパク質などに代表される低分子から高分子までの生物活性分子は多様な官能基、骨格及び三次元的に広がった化学空間を有する重要な資源である。これらの分子を有効活用することによって、新規に複雑な化合物を効率的に合成する手法が確立できれば、創薬研究、ライブラリー構築、機能性分子及び材料科学の諸研究分野に大きな波及効果が期待できる。生理活性分子の多くは、高極性のアミノ基、カルボキシ基、水酸基及びチオール基などの官能基を有しているため、合成に際してはこれらの反応性の高い官能基を保護し、有機溶媒中で反応を行うことが主流である。一方、官能基の保護・脱保護を経る合成プロセスは、合成ステップ数の増加、脱保護過程における廃棄物の生成及び分離・精製作業が伴うため、ステップエコノミーとアトムエコノミーの観点で改善の余地を残す。また、タンパク質やペプチドなどの生体高分子の修飾を行う場合には、保護基の使用が現実的には難しく、水素結合により高度に構築された三次構造を変化しない穏和かつ選択的な反応が求められる。

このような背景から、望みの特定の官能基を選択的に活性化し、多様な官能基が存在する中で目的の反応を穏和な条件で進行させる手法が開発できれば、望みの低～高分子の様々な広範囲の生物活性分子の効率的な合成・修飾を行うことが可能となり、創薬化学のみならず有機合成化学に大きな飛躍をもたらすと考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究では水中で進行するベンジリック位チオ化反応を基盤とした、保護基を用いない低～高分子の生物活性化合物の効率的な合成法の開発を行う。タンパク質やペプチドなどの生体分子の直接的な修飾・機能化のための生体共役反応の開発が研究目的である。

## 3. 研究の方法

### (1) 低分子合成

まず、低分子化合物の合成にベンジリック位チオ化反応を活用することを考えた。チエニル基のベンジリック位に水酸基を持つ 3-(メチルアミノ)-1-(2-チエニル)-1-プロパノール (1) を基質に用いて、各種チオールとのベンジリック位置置換反応を検討した (Figure 1)。1 M 塩酸水溶液中で本反応を行うと、定量的にチオール置換生成物 2-4 が得られることが分かった。フェニルメルカプタン、2-ピリジルメルカプタンおよびベンジルメルカプタンが本反応に適用可能であった。一方、本反応は pH 7.4 のリン酸ナトリウム緩衝水溶液中では進行せず、強酸性条件が必要であることが分かった。また、pH 5.4 のリン酸ナトリウム緩衝水溶液に 1 当量のボロン酸を添加しても収率は向上しなかった。本反応では、アミンやピリジンなどの窒素求核剤が共存でき、これらを保護する必要がなかった。本反応を用いて共通のベンジリックアルコールから種々のチオール置換生成物が得られるため、ライブラリー化合物の合成などに適していると考えられる。一方、強酸性条件では不安定な多官能基化された化合物やタンパク質、ペプチドなどの生体高分子を基質に用いる場合は、より中性に近い穏和な反応条件を適用する必要があった。

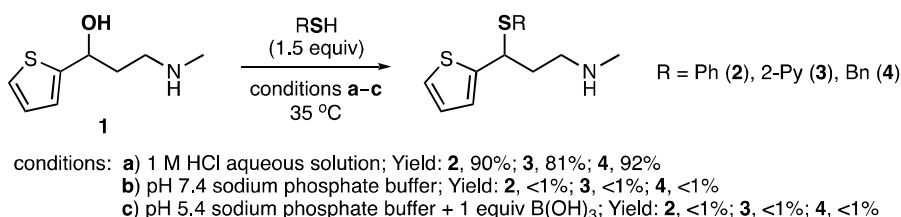


Figure 1. ベンジリック位チオ化反応を用いたアミン存在下での低分子化合物の合成

### (2) アミノ酸、ペプチド修飾への応用

つぎに、反応に用いるベンジリックアルコールをキサンチドロール (5) に変え、アミノ酸やペプチドとの反応を検討した (Figure 2)。アルコール 5 は水酸基の脱離によってキサンチリウムカチオン 6 を生成し、チオール置換生成物 7, 8 を与えた。種々のボロン酸の添加効果を検討したものの、ボロン酸の有無が反応に有意な差を与えないことが明らかとなった。本反応は塩酸などの強酸を添加する必要がなく、アミノ基やカルボキシ基が共存する無保護の L-システインやグルタチオンといったチオール含有アミノ酸やペプチドに適用可能であった。また、チオール付加生成物 7, 8 は反応終了後、水溶液から析出するため、濾取のみで容易に精製が可能であった。

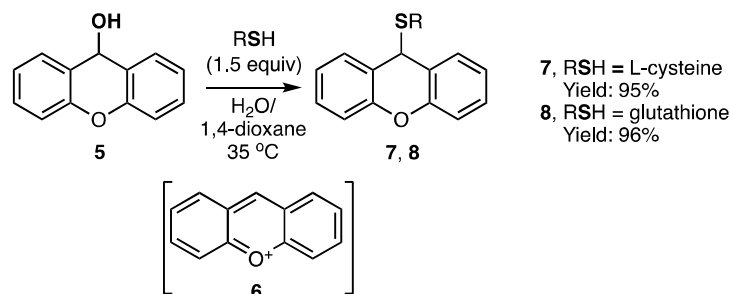


Figure 2. キサンチドールを用いたチオール基選択的なアミノ酸、ペプチドの化学修飾

### (3) アリールボロン酸を用いた触媒反応

つぎに、アリールボロン酸が触媒するインドール、グリオキシル酸およびチオール化合物の三成分連結反応の検討を行った (Figure 3)。種々のボロン酸誘導体を用いて検討を行なった結果、ペンタフルオロフェニルボロン酸が 1,4-ジオキササン中において、 $\alpha$ -ヒドロキアセテート中間体 12 の水酸基のチオール基への置換を効果的に促進することが分かった。しかし、本反応は少量の水の存在で著しく反応効率が低下することが分かった。

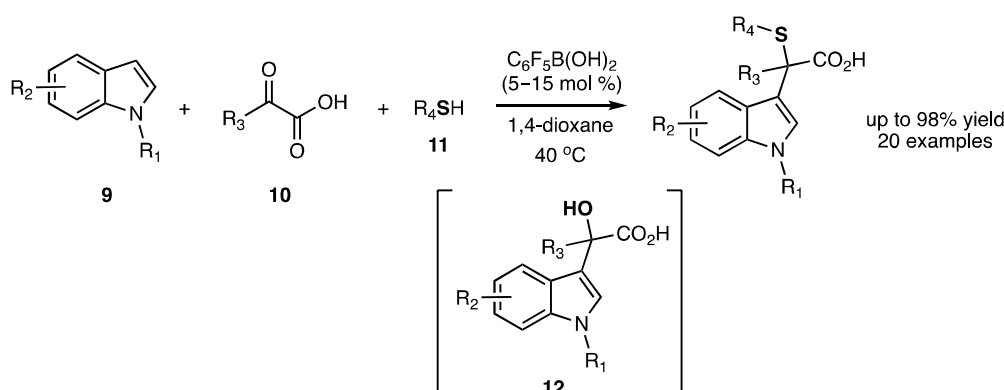
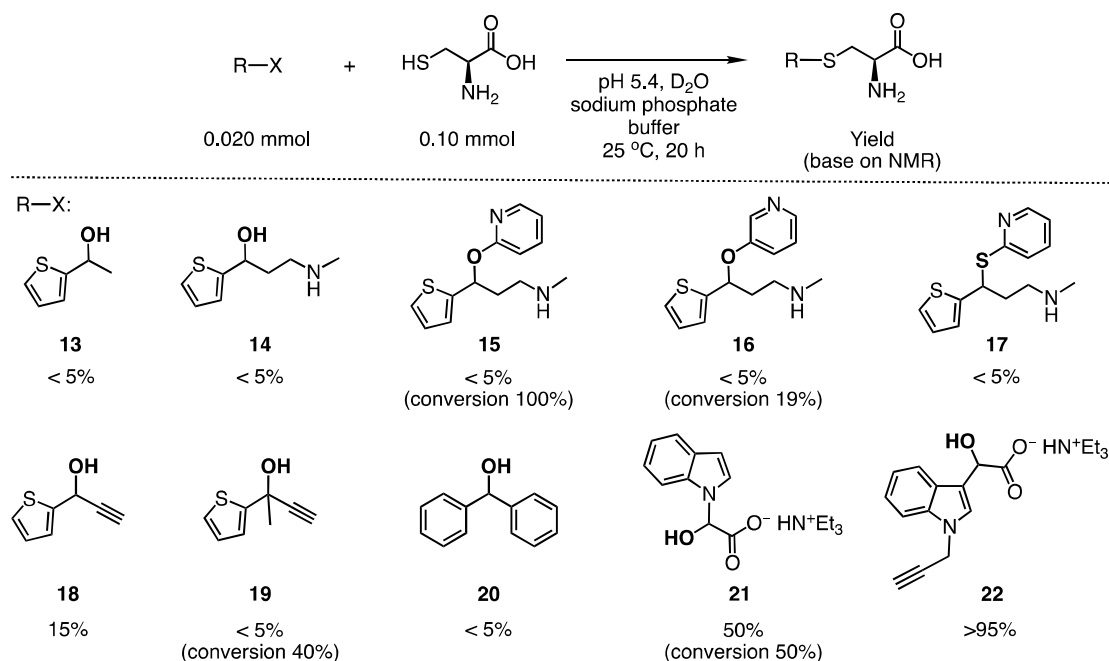


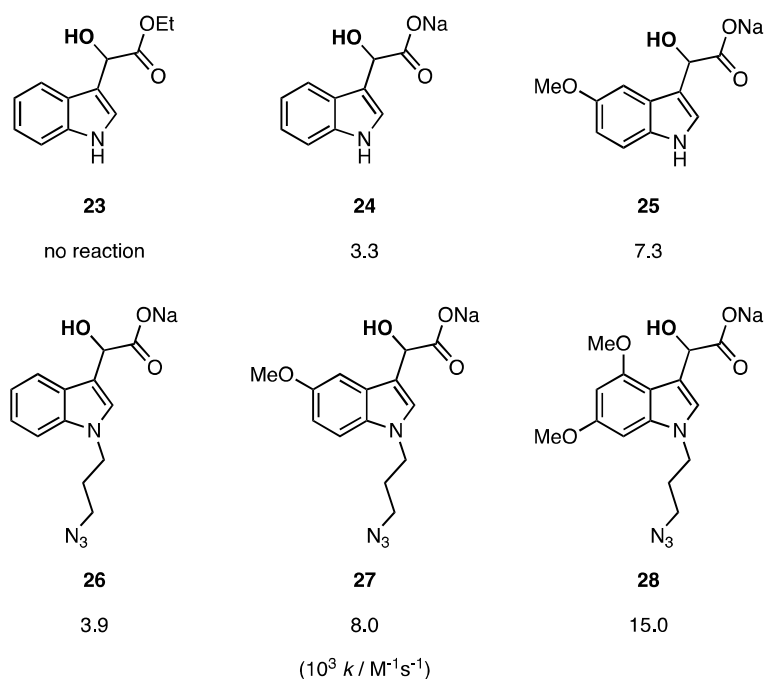
Figure 3. アリールボロン酸触媒インドール、グリオキシル酸、チオール三成分連結反応

### (4) チオール基選択的な生体共役反応の開発

ここまで得た基礎的な知見から、水溶液の pH や基質に用いるベンジリックアルコールの種類によっては、水中においてベンジリック位チオール化反応が円滑に進行することが分かった。そこで、弱酸性 pH (pH 4.5-6.4) において、チオール基に対して官能基選択的に進行する生体共役反応の開発を行った。弱酸性 pH で反応を行う利点は、チオールのジスルフィドへの空気酸化が中性や塩基性条件と比べて起こりにくい点、アミンやイミダゾールなど他の窒素求核剤との競合反応が起こりにくい点が考えられた。また、本反応は従来のチオールを標的とする八口アルカンの  $S_N2$  求核置換 (反応条件: pH 7.5-9.0) やマイケル付加 (反応条件: pH 6.5-7.4) などといった生体共役反応と比べ、反応の至適 pH が異なることから、これらと相補的な反応になりうると考えた。まず、ベンジリック位に種々の脱離基を持つ基質を合成し、pH 5.4 のリン酸緩衝水溶液中における L-システインとの反応を検討した (Figure 4)。なお、iii) で用いたキサンチドールは、疎水性および平面性が高く、水溶液中での溶解性が低いため、本検討から除外した。種々の検討の結果、3-インドリル(ヒドロキシ)アセテート誘導体 22 がチオール基を持つ L-システインに対して特に高い反応性を持つことが分かった。そこで、より反応性に優れた生体分子修飾素子の開発を目指し、化合物 22 の誘導体を種々合成展開した (Figure 5)。その結果、エステル 23 は反応性を示さないものの、基質 24-28 はチオール基を持つペプチドであるグルタチオンと定量的に反応することが分かった。この結果から、カルボン酸が電子豊富な芳香族複素環のベンジリック位水酸基に対して分子内酸触媒として働くことが示唆される。特に、基質 27 については、チオール非存在下においても、アミノ基、イミダゾール基、水酸基、カルボキシ基およびリン酸アニオンとは反応しないことを確かめた。これらのことから、基質 27 がチオール基に対して官能基選択的な生体共役反応の素子として利用できることが分かった。一般に、有機溶媒中で進行するベンジリック位水酸基の置換反応は、カルボカチオン中間体の生成が律速となり  $S_N1$  型の 1 次反応を示すことが知られている。興味深いことに、本反応の反応次数を解析した所、基質のベンジリックアルコールとチオールの両方に 1 次の反応次数が観測され、2 次反応であることが分かった。これは、水酸基が脱離して生成するイミニウムカチオン中間体と溶媒中に大過剰に存在する水分子との平衡が反応次数に影響を及ぼすと考察される。また、各基質の反応速度定数 ( $k$ ) の検討を行なったところ、インドール環の電子密度の増加に伴い、反応速度定数が上昇することが分かった (Figure 5)。



**Figure 4.** pH 5.4 リン酸緩衝水溶液中における L-システインとアルコール化合物との反応



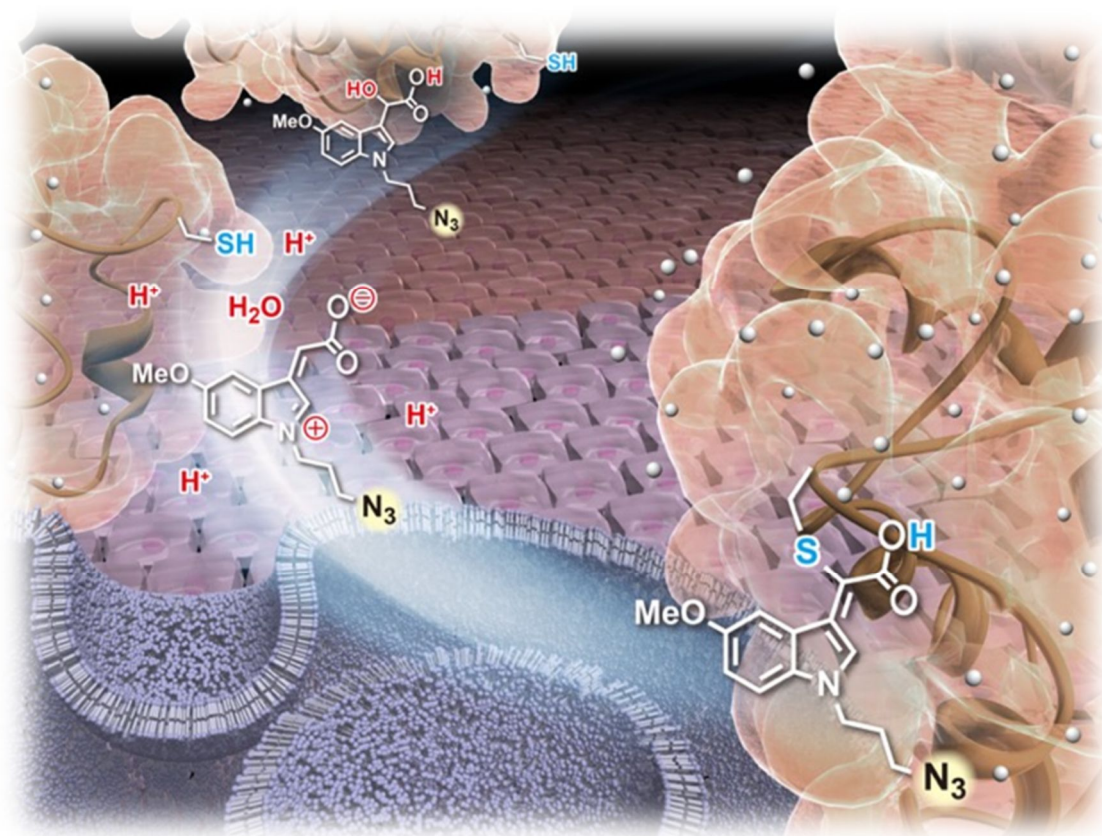
**Figure 5.** グルタチオンと各基質との反応速度定数

条件：基質(100 μM), グルタチオン(1.5 当量), pH 5.4 リン酸緩衝水溶液, 37 °C

つぎに、化合物 **27** が実際にインスリン (5.8 kDa)、リゾチーム (14.3 kDa)、トリプシン (23.3 kDa) およびウシ血清アルブミン (66.4 kDa) などの種々な分子量のタンパク質のチオール基の修飾に応用できることを明らかとした。インスリンおよびトリプシンは塩基性水溶液には不溶または自己加水分解により不安定である。本反応は、これらのタンパク質が安定な弱酸性水溶液中において化学修飾を行えることが利点である。また、化合物 **27** に導入したアジド基を介して、タンパク質への機能性分子の導入を行うことにも成功した。さらに、細菌壁の多糖類を加水分解するリゾチームの酵素活性を損なうことなく、タンパク質を化学修飾することにも成功した。

#### 4. 研究成果

本研究成果は、査読付き国際論文誌にて公開されるとともに、カバーアートに採択された (*Chem. Eur. J.* **2018**, *24*(16), 3959–3964)。最終年度の2019年度においては、他グループより報告された、最新のチオール関与する生体共役反応や共有結合形成反応についての文献調査を行い、自身がこれまでに取り組んできた反応開発との比較研究を行い、ミニレビューとして論文投稿を行った (*有機合成化学協会誌* **2019**, *77*(8), 841–842)。これらの研究を通じて、生体分子の特定の官能基と速やかに安定な共有結合を形成する生体共役反応の重要性についての知見を深めるとともに、任意のタイミングで結合を解離し、化合物を放出する事の有用性についての理解を深めた。現在では、結合形成および切断を自在に行うことのできる生体分子の化学修飾ツールの開発とその応用に向けた研究を進めている。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kenji Watanabe and Takashi Oshima	4. 巻 24
2. 論文標題 Bioconjugation with Thiols by Benzylic Substitution	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Chemistry A European Journal	6. 最初と最後の頁 3959-3964
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/chem.201706149	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 渡辺賢司	4. 巻 77
2. 論文標題 芳香族ニトロ化合物の生体分子との共有結合形成反応	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 有機合成化学協会誌	6. 最初と最後の頁 841-842
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) <a href="https://doi.org/10.5059/yukigoseikyokaishi.77.841">https://doi.org/10.5059/yukigoseikyokaishi.77.841</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 渡辺 賢司
2. 発表標題 ベンジリック位チオ化による生体共役反応の開発
3. 学会等名 第13回六甲有機合成研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 渡辺賢司、大嶋孝志
2. 発表標題 ベンジル位チオール化反応を用いたpH応答性生体共役反応
3. 学会等名 第35回メディシナルケミストリーシンポジウム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 渡辺賢司、大嶋孝志
2. 発表標題 ベンジル位チオール化反応を用いたpH応答性生体共役反応
3. 学会等名 第43回反応と合成の進歩シンポジウム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kenji Watanabe, Takashi Niwa, Takamitsu Hosoya
2. 発表標題 Development of On-Demand Bioconjugation/Deconjugation Platforms
3. 学会等名 27th International Society of Heterocyclic Chemistry Congress
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考