

令和 2 年 6 月 13 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08363

研究課題名(和文)チオアミドクリック反応による多様な機能分子導入と生体系への展開

研究課題名(英文)Development and biological application of thioamide-click type reactions

研究代表者

千葉 順哉 (CHIBA, Junya)

富山大学・学術研究部薬学・和漢系・准教授

研究者番号：50436789

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：創薬研究に貢献できる新しい化学反応を開発し、その適用範囲を精査することは重要である。本研究では、我々が最近開発した化学反応(チオアミドクリック反応)に関して、(1)生体分子が関与する水中における化学反応に適用可能であること、そして(2)阻害剤候補の効率的な探索に利用することが適していることを明らかにした。これらの成果は、国内特許出願2件、国際PCT出願1件、学術論文4件にまとめて報告した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新しい化学反応の開発は、創薬をはじめとする「ものづくり」の可能性を飛躍的に向上させる。本研究では我々が開発した新しい化学反応に関して、特に生体系への展開を念頭に精査した。これにより、本反応を生かす方向性を特長づけることができた学術的意義は大きい。またその中でも特に、本化学反応を阻害剤候補化合物の効率的な合成に展開できた点は、社会的観点からも重要な意義を持つと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We recently developed a new chemical reaction. In this research, we revealed that the reaction can be applied to biomolecules in water and can use as an efficient click-type reaction for in situ, target-guided synthesis of important inhibitors.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：クリックケミストリー 薬学 生体分子 有機化学 チオアミド スルホニルアジド

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

生体系を生きのまま化学修飾できる画期的な方法として登場したクリックケミストリーは、現在でも新しい生体解析法へ盛んに応用されている。しかし研究開始当初時点で最も汎用されていた Huisgen 反応においても、有害な銅触媒を用いる点や、その改良に特殊なひずみ型の高額なアルキン試薬が必要な点が、欠点として指摘されていた。そのため、金属触媒などの添加剤が不要なクリック型の反応が注目を集め、応用展開の世界的な競争が急速に展開されつつあった。そのような国際的背景の中、我々は水中で効率よく進行する添加剤不要の新規なクリック型の反応の開発に成功した。この化学反応は、チオアミドとスルホニルアジドの選択的なクリック型の反応であった。金属触媒や酸・塩基などの添加剤が一切不要で、有機溶媒中でも水中でも副反応なく反応が進行し、水中で最も効率よく進行する生体直交型の反応として、研究開始直前に報告したばかりであった。

### 2. 研究の目的

本研究では、開発したばかりの上記クリック型反応を、生体系へ展開することを目的とした。そのために必要な要素として、

- (1) 反応効率の向上を目指した取り組み
- (2) チオアミド基やスルホニルアジド基の生体分子への導入
- (3) 生体分子への応用展開

を設定し、順次検討することとした。

さらに、生体系へ応用できる可能性がある新たなクリック型の反応として、

- (4) チオアミドの類縁体を用いた新規クリック型反応の開発
- も設定し、クリック型反応のさらなる拡充を目指した。

### 3. 研究の方法

#### (1) 反応効率の向上を目指した取り組み

生体系への展開を見据えた場合、低濃度でも反応が効率よく進行する必要がある。そこで次の3法を設定し、反応効率の向上を検討した。

- ① スルホニルアジド誘導体への置換基の導入・・・電子求引性の置換基を利用してスルホニルアジドの反応性を高めることで、反応効率の向上を検討した。
- ② 光化学反応の利用・・・アジド化合物は光照射により反応が促進するため、我々のスルホニルアジド化合物についても光による反応促進を検討した。
- ③ 触媒などの添加物の利用・・・様々な金属イオン、酸、塩基を添加剤として、反応を促進する触媒を探索した。

#### (2) チオアミド基やスルホニルアジド基の生体分子への導入

本クリック型反応を生体系で利用するためには、チオアミド基やスルホニルアジド基を糖・核酸・アミノ酸などの生体分子に導入する必要がある。そこでまず、生体分子中のアミノ基の直接的なチオアミド化を検討した。また、我々が開発して既に市販されている汎用性が高い二官能性のチオアミドやスルホニルアジド試薬を利用して、生体分子中のアミノ基、カルボキシ基などを誘導化しつつ、チオアミドやスルホニルアジドの生体分子への導入を検討した。

#### (3) 生体分子への応用展開

糖、核酸、アミノ酸それぞれを用いて、水中における本クリック反応の反応性を検討した。そして本クリック反応の特長を生かした応用展開として、次の2つの取り組みを推進した。

- ① クリック反応を利用したグルコシダーゼ阻害薬候補の効率的合成・・・本クリック反応を利用して、チオアミド化したグルコース誘導体と各種スルホニルアジド誘導体から、 $\alpha$ - および  $\beta$ - グルコシダーゼに対する様々な阻害薬候補を効率的に合成した。そして得られた阻害薬候補のそれぞれのグルコシダーゼに対する阻害能を、阻害定数  $K_i$  を求めることで評価した。
- ② 標的誘導型合成を利用した抗インフルエンザ薬候補の効率的合成・・・本クリック反応を *in situ* クリック反応へと展開し、たんぱく質を鋳型として創薬リード化合物を合成する手法へと展開した。ノイラミニダーゼの活性中心に結合する糖誘導体をチオアミド化し、その活性中止近傍の別のポケットに結合する化合物をスルホニルアジド化して、標的誘導合成を展開した。

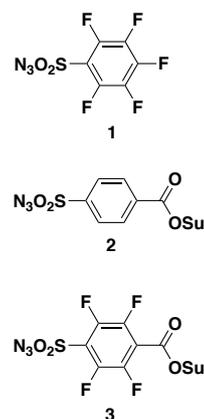
#### (4) チオアミドの類縁体を用いた新規クリック型反応の開発

本クリック反応(チオアミドとスルホニルアジド)と類似の反応として、スルホクリック反応(チオ酸とスルホニルアジド)が知られている。これら2つのクリック反応は、含硫黄官能基が関与する類似の反応機構で進行する。そこで、スルホニルアジドと組み合わせる他の含硫黄官能基として、チオエステル、チオノエステル、ジチオエステル、チオウレアなどを選定し、新たなクリック型反応の開発を展開した。

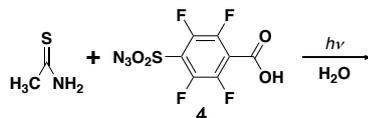
#### 4. 研究成果

##### (1) 反応効率の向上を目指した取り組み

- ① スルホニルアジド誘導体への置換基の導入・・・本研究の開始当初、スルホニルアジド誘導体に電子求引性の置換基を導入すると反応性が向上する予備的な知見が得られていた。そこで、様々な電子求引性の置換基を導入したスルホニルアジド誘導体を用いて反応性を検討したところ、化合物 **1** の反応性が最も高いことが判明した。我々は以前、汎用性が高い二官能性のスルホニルアジド試薬 **2** を開発した。この試薬は、既に国内試薬会社から市販されている。そこで化合物 **2** にフッ素を導入した化合物 **3** を、「(2) チオアミド基やスルホニルアジド基の生体分子への導入法の開拓」において開発する新たな汎用試薬の1つとすることにした。



- ② 光化学反応の利用・・・アジド化合物は光照射により反応が促進するため、我々のスルホニルアジド化合物についても光による反応促進を検討した。チオアミドとスルホニルアジドのクリック反応では、反応の進行に伴い窒素ガスと硫黄固体が生成する。次の式に示すクリック反応において、光照射をした場合と照射しない場合とで、原料化合物の消費と硫黄固体の生成の速度が明らかに異なったため、光照射によりクリック反応が促進されたのではないかと考えた。しかしながら種々の調査の結果、化合物 **4** が光増感材として作用することで一重項酸素が生成し、チオアミドの脱硫反応が促進された可能性が高いことが明らかとなった。当初目指したクリック型反応の促進は見られなかったものの、一重項酸素の発生効率が優れていたため、光線力学療法（フォトダイナミックセラピー：PDT）における新たな光増感材の部分骨格として、現在展開している。

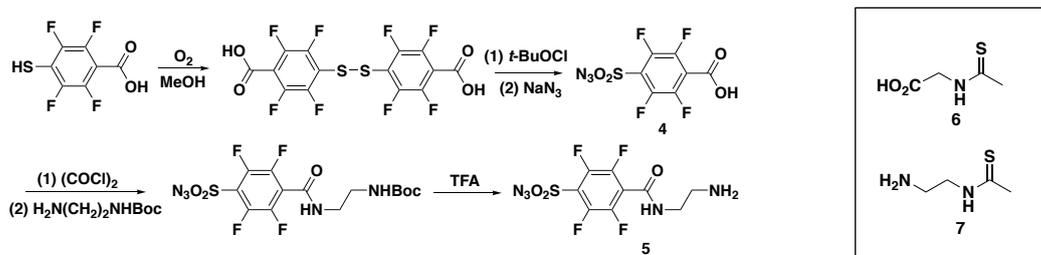


- ③ 触媒などの添加物の利用・・・様々な金属イオン、酸、塩基を添加剤として、反応を促進する触媒を探索した。40 種類以上の金属化合物と 20 種類以上の酸・塩基化合物をスクリーニングしたが、残念ながらクリック反応を促進する添加剤はヒットしなかった。光反応や添加剤によるクリック型反応の促進が望めないことが判明したため、直接的な官能基変換や化合物 **3** のような導入試薬の開発を進め、チオアミドやスルホニルアジドを生体分子へと導入することとした。

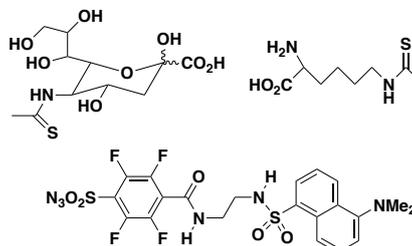
##### (2) チオアミド基やスルホニルアジド基の生体分子への導入法の開拓

「(1) 反応効率の向上を目指した取り組み」における種々の検討結果から、チオアミドやスルホニルアジドを生体分子へと導入するには有機化学的な官能基化試薬の利用が好ましく、また、スルホニルアジドにはフッ素置換基を導入することで反応が効率化することが示唆された。そこで、生体分子に多く存在するアミノ基やカルボキシ基への連結を念頭に、スルホニルアジド誘導体としては化合物 **4, 5** を新規に開発し、またチオアミド誘導体としては我々が以前に開発した化合物 **6, 7** (**6** は市販されている) を利用することにした。さらに、生体分子のアミノ基を直接チオアミド化する試薬として、市販の  $\text{MeC(=S)SEt}$  も利用することにした。

汎用性が高い新規な二官能性のスルホニルアジド誘導体 **4, 5** は、次のスキームに従って収率よく合成した。これらの化合物については国内特許出願（特願 2017-146208）と国際 PCT 出願（PCT/JP2018/027782）をそれぞれ済ませた。



これらの化合物を利用して、チオアミドやスルホニルアジドを生体分子（糖、核酸、アミノ酸）に導入した。それらのうちのいくつかの構造を右図に示した。また蛍光分子（ダンシル）を連結したスルホニルアジドも合成し、「(3) 生体分子への応用展開」における水中でのクリック反応の検討に用いた。



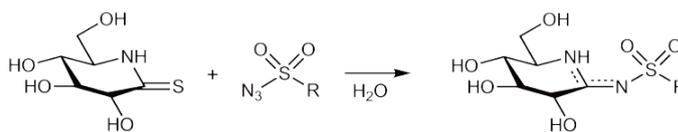
### (3) 生体分子への応用展開

「(2) チオアミド基やスルホニルアジド基の生体分子への導入法の開拓」にて合成した化合物を用いて、水中においてクリック反応を行なった。リシンの側鎖をチオアミド化した化合物と、ダンシル蛍光基を連結したスルホニルアジドの組み合わせでは、濃度が 1 mM、37 度においては、クリック反応が問題なく進行した。しかしながら 100 μM まで濃度を低下させると、反応の進行が極端に遅くなった。このことから、本クリック型反応の生体系への展開では、反応を活性化しうるフッ素導入型のスルホニルアジド誘導体を用いるとクリック反応は進行するものの、残念ながら既存のクリック反応を凌駕するほどの反応効率は見られなかった。

そこで本クリック反応の生体系への活用を阻害剤候補の開発に絞り込み、次の2つについて検討した。

#### ① クリック反応を利用したグルコシダーゼ阻害薬候補の効率的合成

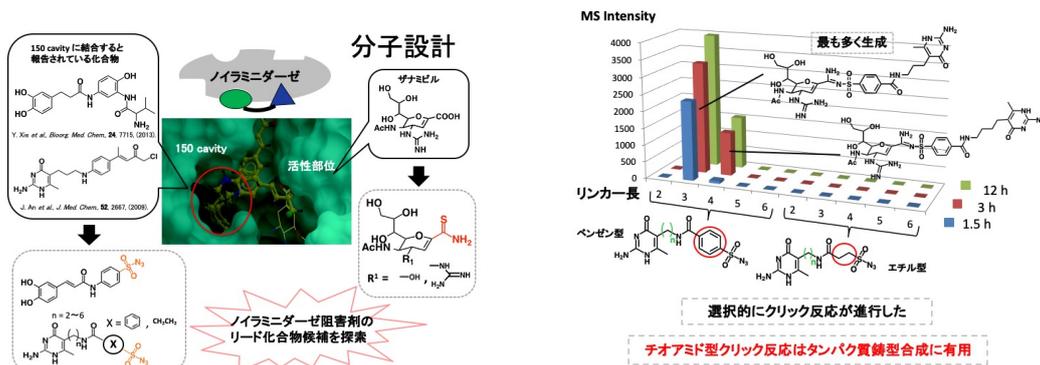
グルコシダーゼ阻害薬は、糖尿病をはじめとする様々な病気に対して重要であり、今尚開発が進んでいる。その中でも、イミノ糖類は以前から着目されている。そこでグルコースのイミノ糖骨格に着目し、これをチオアミド誘導体へと変換した。そして下記のスキームに従って各種スルホニルアジド体と水中でクリック反応することで、効率よくグルコシダーゼ阻害薬の候補を合成した。合成した阻害剤候補の α- および β-グルコシダーゼに対する阻害定数 (K<sub>i</sub>) を求めたところ、単純なフェニル基を導入した阻害剤 1 が、デオキシノジリマイシンよりも効果的にグルコシダーゼを阻害することが判明した。この成果は論文にまとめて報告した。



阻害剤	K <sub>i</sub> for α-グルコシダーゼ (μM)	K <sub>i</sub> for β-グルコシダーゼ (μM)
 1	13.9	8.2
 2	>1000	764

#### ② 標的誘導型合成を利用した抗インフルエンザ薬候補の効率的合成

濃度が低下すると本クリック反応の効率が低下したことから、反応剤の局所濃度が高まる標的誘導型合成に本反応を展開した。標的誘導型合成は、タンパク質を鋳型として、タンパク質表面に存在する2つの結合ポケットを利用する合成法である(下図左)。それぞれのポケットに結合する化合物にクリック反応基を導入しておくことでタンパク質上においてクリック反応が進行し、結合力がより大きな新たな阻害剤が得られる手法である。リンカーの長さを変えたり化学構造にアレンジを加えたりすることで、強く結合する構造体をタンパク質自身に選ばせる効果的な合成法である。今回はタンパク質にノイラミニダーゼを選定し、抗インフルエンザ薬候補の効率的合成を検討した。

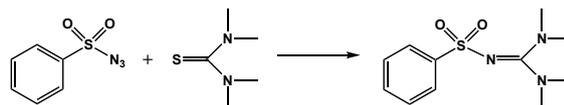


まず、ノイラミニダーゼの活性部位に結合する既存の阻害薬であるザナミビルを母骨格として、チオアミドを導入した誘導体を化学合成した（チオアミドを赤で示した）。次に、活性部位に隣接する 150 cavity に結合する化合物の構造を基にして、スルホニルアジドを導入した（スルホニルアジドをオレンジで示した）。その際、リンカーとなるメチレン鎖を変化させ、リンカー長や部分構造が異なる一連のスルホニルアジド群を準備した（前ページ右図の横軸に構造を図示した）。これらをノイラミニダーゼ存在下、水中で混合して標的誘導型合成を行った。LC-MS 解析により、ベンゼン骨格を持つリンカー長が 3 ないし 4 のスルホニル化合物の場合にのみ、クリック型反応が進行した。このことから、本クリック型反応が、標的誘導型合成に有用であることが示唆された。

以上の結果をはじめとする「(3) 生体分子への応用展開」で得られた研究成果は、国内特許出願 1 件と関連学術論文 3 件にまとめて報告した。

#### (4) チオアミドの類縁体を用いた新規クリック型反応の開発

クリック反応のさらなる展開の 1 つとして、新たなクリック反応の開発を検討した。本クリック反応で用いるチオアミドに変わる含硫黄官能基として、チオエステル、チオノエステル、ジチオエステル、チオウレアなどを選定し、クリック反応の進行を確認した。ジチオエステルとチオウレアの場合に反応の進行が確認されたが、ジチオエステルは反応効率が低かったため、スキームに示したチオウレアの反応について詳細に検討した。



チオウレアは 4 置換型のテトラメチル体を用いることで、またスルホニルアジドはこれまでと同様に電子求引性置換基を導入することで、クリック型の反応効率が上がることを示唆された。この成果は新規クリック型反応として、学術論文にて成果報告した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Aswad Muhammad, Chiba Junya, Tomohiro Takenori, Hatanaka Yasumaru	4. 巻 14
2. 論文標題 Simple Synthesis of Sulfonyl Amidine-Containing Glucosidase Inhibitors by a Chemoselective Coupling Reaction Between D-Gluconothiolactam and Sulfonyl Azides	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 International Research Journal of Pure and Applied Chemistry	6. 最初と最後の頁 1~8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.9734/IRJPAC/2017/34259	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 該当する
1. 著者名 Yutaro Oda, Junya Chiba, Fumihiro Kurosaki, Yusuke Yamade, Masahiko Inouye	4. 巻 20
2. 論文標題 Additive-Free Enzymatic Phosphorylation and Ligation of Artificial Oligonucleotides with C-nucleosides at the Reaction points	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ChemBioChem	6. 最初と最後の頁 1945-1952
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cbic.201900217	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 Muhammad Aswad, Junya Chiba, Yasumaru Hatanaka, Takenori Tomohiro	4. 巻 60
2. 論文標題 Novel coupling reaction between sulfonyl azide and N,N,N',N7-tetramethylthiourea	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Tetrahedron Letters	6. 最初と最後の頁 1611-1613
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tetlet.2019.05.029	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 該当する
1. 著者名 Fumihiro Kurosaki, Junya Chiba, Yutaro Oda, Airi Hino, Masahiko Inouye	4. 巻 85
2. 論文標題 2-Aminopyridine as a Nucleobase Substitute for Adenine in DNA-like Architectures: Synthesis of Alkynyl C-Nucleotides and Their Hybridization Characteristics	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Organic Chemistry	6. 最初と最後の頁 2666-2671
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1012/acs.joc.9b02750	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10件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 5件）

1. 発表者名 M. Aswad, J. Chiba, Subehan, Habibie, S. Sukamoto, Mamada, Y. Hatanaka, T. Tomohiro
2. 発表標題 Gluconoamidinylsulfone as a new promising anti diabetic agent: a comprehensive study based on the click-type reaction of thioamide and sulfonyl azide.
3. 学会等名 The Third International Symposium on Toyama-Asia-Africa Pharmaceutical Network (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 R. Hayashi, S. Morimoto, J. Chiba, Y. Hatanaka, T. Tomohiro
2. 発表標題 Improvement of target protein analysis with a photoprobe possessing N-acylsulfonamide as a cleavable linkage.
3. 学会等名 The Third International Symposium on Toyama-Asia-Africa Pharmaceutical Network (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 林 龍二、森本 正大、千葉 順哉、畑中 保丸、友廣 岳則
2. 発表標題 アシルスルホンアミド型光反応基による標的タンパク質解析の効率化
3. 学会等名 日本薬学会北陸支部第130回例会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 林 龍二、森本 正大、千葉 順哉、畑中 保丸、友廣 岳則
2. 発表標題 スルホクリック反応を利用した光反応性プローブの簡便合成と標的タンパク質同定の効率化
3. 学会等名 日本プロテオーム学会 2017年大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Takenori Tomohiro, Reona Yamaguchi, Shota Morimoto, Junya Chiba, Yasumaru Hatanaka
2. 発表標題 PAL-based fluorogenic tagging for structural analysis of ligand binding state within target protein
3. 学会等名 26th French-Japanese Symposium on Medicinal&Fine Chemistry (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Junya Chiba, Shun Aoki, Masahiko Inouye
2. 発表標題 Distance Dependence of the Electron-Transfer Rate of Electrode-Bound Duplex DNAs Modified with a Distal Redox Unit
3. 学会等名 The 6th International Symposium "Dynamical ordering of biomolecular systems for creation of integrated functions" (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 篠崎 友希, 千葉 順哉, 友廣 岳則
2. 発表標題 アジド導入ペプチドを用いた新規クリック反応の開発
3. 学会等名 日本薬学会北陸支部第131回例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 萩原 智, 森本 正大, 千葉 順哉, 友廣 岳則
2. 発表標題 脂肪酸代謝関連酵素プロファイリングを目的とした光ラベル法の開発
3. 学会等名 日本薬学会北陸支部第131回例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takenori Tomohiro, Tsukasa Kaneko, Yusuke Hotta, Junya Chiba, Yasumaru Hatanaka
2. 発表標題 PeT-regulated tagging method for PAL-based identification of interacting protein
3. 学会等名 27th French-Japanese Symposium on Medicinal&Fine Chemistry (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 黒崎 史大, 千葉 順哉, 井上 将彦
2. 発表標題 完全人工アルキニルRNA の構築とその物性評価
3. 学会等名 日本化学会第100春季年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計3件

産業財産権の名称 スルホニルアジド安息香酸誘導体およびその反応性誘導体	発明者 千葉順哉、友廣岳 則、畑中保丸	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2017-146208	出願年 2017年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 人工核酸	発明者 千葉順哉、井上将彦、 黒崎史大	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-36320	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 スルホニルアジド安息香酸誘導体およびその反応性誘導体	発明者 千葉順哉、友廣岳 則、畑中保丸	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2018/027782	出願年 2018年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔その他〕

富山大学薬学部 生体認識化学研究室  
<http://www.pha.u-toyama.ac.jp/anachem/anachem/homu.html>  
富山大学薬学部 生体認識化学研究室  
<http://www.pha.u-toyama.ac.jp/anachem/anachem/homu.html>

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
--	---------------------------	-----------------------	----