

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：33919

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07007

研究課題名(和文) テンプレート効果を利用するアミド近傍ヒドロキシ基選択的化学修飾法の開発

研究課題名(英文) Metal-template-driven chemical modification of alpha- and beta-hydroxyl groups in amides

研究代表者

西川 泰弘 (Nishikawa, Yasuhiro)

名城大学・薬学部・助教

研究者番号：20633580

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：糖やペプチドに含まれる部分構造である α -ヒドロキシアミドおよび β -ヒドロキシアミドへの選択的アシル化反応を開発した。考案した特殊なアシル化剤とルイス酸および配位性の基質の複合体形成を鍵とするテンプレート効果を利用することが本研究の要である。糖ペプチドのセリン残基選択的アシル化反応は高選択的に進行し、LCMSと2DNMRにて確認した。また、多糖類に含まれるN-グリコシル構造のアシル化モデルとして、二糖類への位置選択的アシル化を検討し、8つのヒドロキシ基が存在する中、目的の1つのヒドロキシ基のみを選択的にアシル化することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、新たな生理活性物質の創製研究において、複雑化合物への機能付与を目的とした選択的修飾法が注目を集めている。しかし、有機合成的手法で、複数存在する同一官能基の中から特定の部分のみを選択的に反応させることは困難を極める。本研究課題では、糖やペプチドに含まれる、 α -ヒドロキシアミドおよび β -ヒドロキシアミドを認識し、その他ヒドロキシ基と区別してアシル化するための汎用的手法を開発した。このような選択的反応開発は生体高分子のみならず、生物活性中分子や低分子の修飾や合成手法としても活用が見込まれ、創薬研究を推進することが期待される。

研究成果の概要(英文)：We developed site-selective modification reactions of α - and β -hydroxyamide in polyols. Central to the success of this modification is the metal-template-driven acylation using pyridine oxime esters as acylating reagents in combination with Lewis acids. The established method for α -hydroxyamide was applied to site-selective modification of a Ser residue in a model glycopeptide. High site-selectivity in this reaction was verified by LCMS analysis of the reaction mixture followed by 2D NMR analysis. Toward a site-selective modification of polysaccharides, our method was further examined in site-selective acylation of disaccharide containing N-glycolylneuraminic acid. Acylation of the β -hydroxyl group in the N-glycolyl moiety in the presence of eight hydroxyl groups proceeded in highly selective manner.

研究分野：有機合成化学

キーワード：化学修飾 アシル化 ペプチド 糖 テンプレート効果 ヒドロキシアミド

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

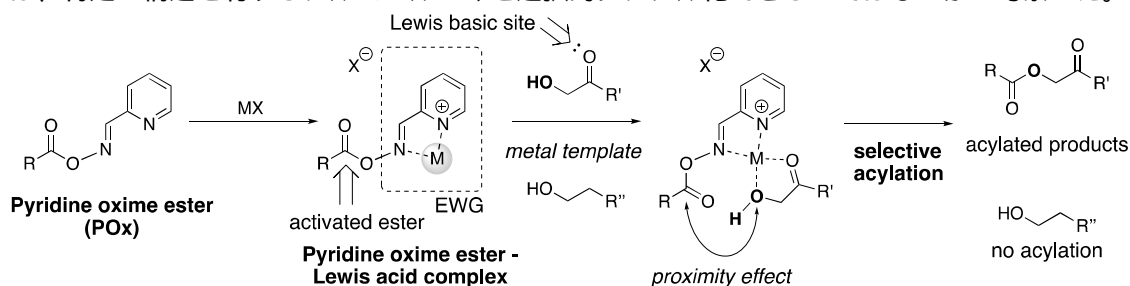
近年、新たな生理活性物質の創製研究において、合成低分子から生体高分子に至るまで、複雑化合物への機能付与を目的とした選択的修飾法が注目を集めている。これは、生体内分子の修飾によって、生命現象を分子レベルから解明を目指す動きが活発化していることや、生体由来の高分子化合物である抗体と低分子医薬とのハイブリッドである抗体薬物複合体 (Antibody-Drug Conjugate, ADC) が顕著な効果をあげているという背景と関連している。複雑化合物の修飾反応は、生体内で普遍的に見られ、酵素による制御によって達成される。例えば、タンパク質の翻訳後修飾の一つであるセリン残基への糖付加は、UDP-GalNAc を糖供与体とし、基質に含まれる全てのヒドロキシ基が無保護で存在する中で、GalNAc トランスフェラーゼによって触媒される。一方、同様の反応を人工的に行うことは、同一官能基間での競合反応を抑制し、周辺官能基を認識して選択性を発現する必要がある、極めて困難である。

2. 研究の目的

以上の背景を鑑み、複数存在する同一官能基の中から特定の部分のみを選択的に反応させる手法の開発によって、生命科学や創薬科学に貢献できるのではないかと推察した。本研究課題では、ペプチド中の Ser/Thr 残基に含まれる、アミド位に存在するヒドロキシ基を認識し、その他ヒドロキシ基と区別してアシル化およびグリコシル化するための汎用的手法の開発を目指した。このような選択的反応開発は生体高分子のみならず、生物活性中分子や低分子の修飾や合成手法としても活用が見込まれる他、その反応機構を詳細に解析することにより、未解明な部分の多い酵素反応の理解につながるなど、広範な分野への波及を期待した。

3. 研究の方法

位置選択的修飾を達成するための必要条件として、1) 弱い求電子剤を用いることにより、望まない位置での反応を抑制すること、2) 求核剤であるアルコールとその他官能基を有する部位を特異的に認識すること、3) 弱い求電子剤と反応に関わるアルコールを選択的に近接させること、の三点を達成すれば副反応を抑制し、望みの反応を行うことができると考察した。我々は、これまでカチオン性有機分子の電子求引性を利用する反応開発を行っており、その際に得られた知見を応用し、ピリジンオキシムエステル (POx) が位置選択的アシル化に有効なアシル化剤として利用できるのではないかと推察した (式 1)。すなわち、POx そのものはアルコールのアシル化剤としては非常に弱いものであるが、適切なルイス酸 MX を用いることにより生じるカチオン性複素環が電子求引基として働き、オキシム部分を介してエステルカルボニル基を適度に活性化すると予想した。さらに、金属を雛型とするテンプレート効果によってアルコールとルイス塩基性部位を有する基質が優先的に配位することにより、反応点を近接させることができれば、特定の構造を有するアルコールのみを選択的にアシル化できるのではないかと考察した。



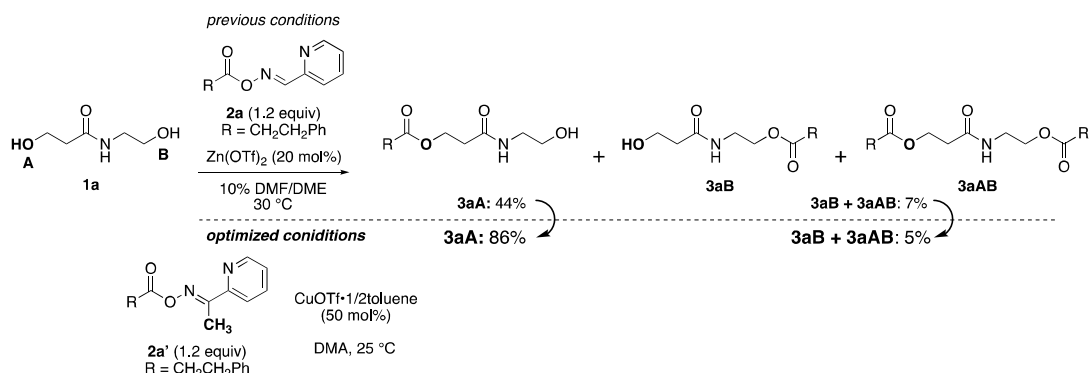
式 1 カチオン性複素環の電子求引性およびテンプレート効果を利用する位置選択的アシル化反応

4. 研究成果

(1) β -ヒドロキシアミド選択的アシル化反応の開発

β -ヒドロキシアミド構造はペプチド中の Ser/Thr 残基に含まれる部分構造であり、ペプチドの化学修飾のターゲットとなり得る。我々は、これまでに類似基質である β -ヒドロキシアミド選択的アシル化反応の開発に取り組み、上記金属テンプレート効果が想定通り作動することを見出している。すなわち、触媒量の Zn(OTf)₂ 存在下、DMF と DME の混合溶媒中にてアシル化剤としてピリジンオキシムエステル (2a) を用いることにより、アミド位に位置するヒドロキシ基を選択的にアシル化することに成功した。本手法を β -ヒドロキシ基を有するモデル基質 1a に適用したところ、目的のヒドロキシ基 A がアシル化された化合物 3aA の収率は 44%にとどまり、副生成物も観測された (式 2)。5 員環の金属錯体を形成する β -ヒドロキシアミドと比べて β -ヒドロキシアミドは 6 員環の金属錯体を形成するため、その形成速度は遅いと考えられる。結果として位置選択性に寄与する錯体形成が起こりにくいために、以前の結果と比べて低収率・低位

置選択性になったと推察した。

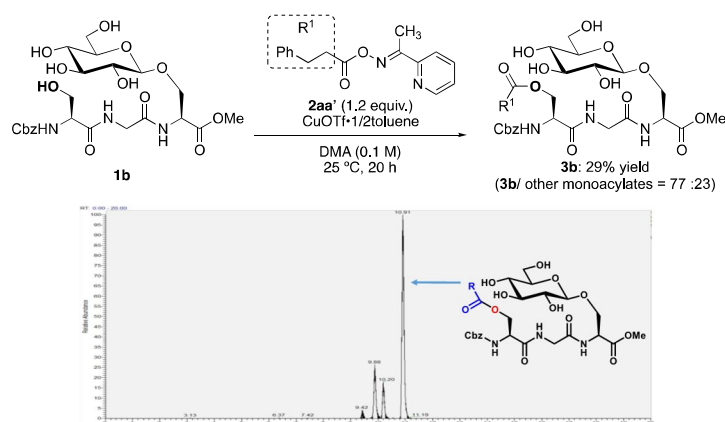


式2 -ヒドロキシアミドの位置選択的アシル化反応

この結果をうけて、反応条件の最適化を行った。アシル化剤の構造やそれを活性化する金属塩の種類、溶媒を主に検討した結果、アシル化剤としてケトキシムエステルである 2a' を、金属塩として CuOTf·1/2toluene を 50 mol%、溶媒として極性溶媒であるジメチルアセトアミド (DMA) を用いて反応を行うことで、目的の 3aA を収率 86% にて得るとともに、副生成物 (3aB+3aAB) を 5% まで抑制することに成功した。

(2) モデル糖ペプチドの Ser 残基選択的アシル化反応

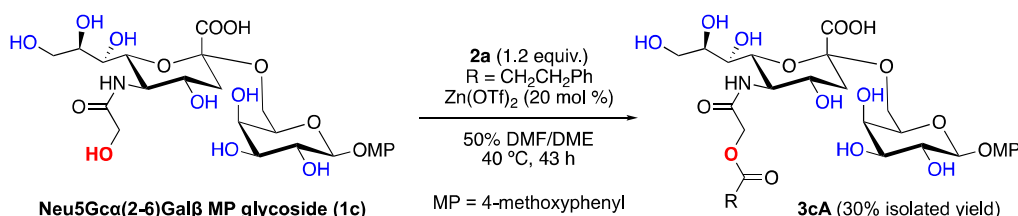
確立した -ヒドロキシアミド選択的アシル化法をセリン残基含有モデル糖ペプチド 1b へ適用した。1b はヒドロキシ基を 5 つ有し、この 5 つのヒドロキシ基のうち、いくつが反応し、その位置はどこなのかを特定しなければならない。この解析には、LCMS が非常に有効であった (式 3)。すなわち、反応後の混合物の LCMS 分析を行い、そのイオンクロマトグラムからモノアシル化体の分子イオン ($[M+Na]^+$ m/z 714.2481) を誤差 3ppm 以内で抽出することによって、モノアシル化体の保持時間および種類を調査した。その結果、モノアシル化体は主に 3 種類生成しており、中でも一つが優先的に生成していることが明らかとなった。同様の解析によって、本反応ではジアシル化体、トリアシル化体はほとんど生成していないことも確認している。次に、LCMS 分析と同一条件にて分取 HPLC にて主生成物を単離精製後 (収率 29%) 得られた物質を 2D NMR にて解析することにより、セリン残基がアシル化された糖ペプチド 3b であることが判明した。



式3 モデル糖ペプチドの位置選択的アシル化 (上) および反応混合物の抽出イオンクロマトグラム (下)

(3) 二糖類への位置選択的アシル化反応

本手法を、より実用的な方法へと開発する上で、天然に存在するオリゴ糖、多糖への反応から得られる知見は重要である。また、ある種の糖に含まれるアミド位に位置するヒドロキシ基 (N-グリコシル構造) は、人体による抗原認識や細菌の薬剤耐性など様々な生物活性と密接に関連していることが明らかとなっている。そこで、N-グリコシルノイラミン酸を含む二糖を用いて、本手法の有用性を検証した (式 4)。



式4 シアル酸含有二糖への位置選択的アシル化反応

1c は非常に極性が高く、既存の反応条件では溶解しなかったため、反応溶媒を検討した結果、DMF を多く用いることにより、アシル化反応が低収率ながら進行した。LCMS 解析によって本反応は高位置選択的に進行していることが明らかとなった。すなわち、分子内に含まれる 1,2,3-ト

リオール構造やカルボキシ基、1,2-cis-ジオール構造共存下においても -ヒドロキシ基選択的にアシル化可能であることが実証できた。

以上、 -ヒドロキシアミドおよび -ヒドロキシアミド選択的アシル化反応を開発し、より複雑な糖ペプチド、二糖類へ応用することができた。一方で、 -ヒドロキシアミドに対する選択性が低いことや、反応機構に対する知見がまだ不十分であることなど、問題点が残されている。今後は以上の問題点の改善に加え、本手法が適用する基質範囲をより広く調査することで、実用的な化学修飾法への道筋を見出したいと考えている。また、本反応コンセプトを基に、位置選択的グリコシル化反応にも取り組んでおり、成果がまとまり次第公表したい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Nishikawa Yasuhiro, Toda Shione, Matsui Takami, Takada Hanae, Takemoto Kohei, Hara Osamu	4. 巻 23
2. 論文標題 Site-Selective Acylations of - and -Hydroxyamides in Complex Molecules: Application of Template-Driven Acylation to Disaccharides and a Glycopeptide	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Organic Letters	6. 最初と最後の頁 2715 ~ 2719
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.orglett.1c00612	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 Nishikawa Yasuhiro	4. 巻 140
2. 論文標題 Site-selective and Stereoselective Syntheses Controlled by the Electron-withdrawing Properties of Cationic Heterocycles	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 YAKUGAKU ZASSHI	6. 最初と最後の頁 1225 ~ 1233
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/yakushi.20-00133	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 Takemoto Kohei, Nishikawa Yasuhiro, Moriguchi Shohei, Hori Yuna, Kamezawa Yuki, Matsui Takami, Hara Osamu	4. 巻 21
2. 論文標題 Site-Selective Esterifications of Polyol -Hydroxyamides and Applications to Serine-Selective Glycopeptide Modifications	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Organic Letters	6. 最初と最後の頁 7534 ~ 7538
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.orglett.9b02809	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11件（うち招待講演 1件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 高田華苗枝、西川泰弘、戸田汐音、松井孝美、竹本昂平、原 脩
2. 発表標題 テンプレート効果を利用する位置選択的アシル化反応に影響を与える官能基の調査
3. 学会等名 第65回日本薬学会東海支部大会（静岡）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 安藤桃花、西川泰弘、天野薫帆、細井碧、森大器、豊田万祐子、原 脩
2. 発表標題 エステル共存下におけるカルバメート型アルコール保護基の化学選択的加水分解反応
3. 学会等名 第50回複素環化学討論会（静岡）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岸未紀、西川泰弘、松井孝美、高田華苗枝、高羽瑠奈、服部暖、原 脩
2. 発表標題 N-アセチルアミノ糖への位置選択的アシル化反応の開発研究
3. 学会等名 日本薬学会第142年会（名古屋）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 百瀬真梨、西川泰弘、天野薫帆、細井碧、安藤桃花、森大器、豊田万祐子、原 脩
2. 発表標題 N-アシルヒドラソンの化学選択的加水分解反応とアルコール保護基への応用
3. 学会等名 日本薬学会第142年会（名古屋）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 西川泰弘、戸田汐音、松井孝美、竹本昂平、高田華苗枝、原脩
2. 発表標題 テンプレート効果を利用する位置選択的アシル化反応の二糖類、糖ペプチドへの応用
3. 学会等名 日本薬学会第141年会（広島）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西川泰弘
2. 発表標題 カチオン性複素環の電子伝達によって制御する位置及び立体選択的合成手法の開発
3. 学会等名 第65回日本薬学会東海支部大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 豊田万祐子, 西川泰弘, 森大器, 天野薫帆, 細井碧, 竹本昂平, 原 脩
2. 発表標題 ヒドラジド誘導体の化学選択的加水分解反応を利用する新規保護基の開発研究
3. 学会等名 第65回日本薬学会東海支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kohei Takemoto, Yasuhiro Nishikawa, Syohei Moriguchi, Yuna Hori, Yuki Kamezawa, Takami Matsui, Satomi Katabe, and Osamu Hara
2. 発表標題 Site-Selective Esterification of α -Hydroxyamides in Polyols by Metal Template Strategy
3. 学会等名 27th International Society of Heterocyclic Chemistry Congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西川泰弘, 森大器, 豊田万祐子, 天野薫帆, 細井碧, 竹本昂平, 原 脩
2. 発表標題 ヒドラジド誘導体の化学選択的加水分解反応を利用する新規アミド型保護基の開発
3. 学会等名 第45回反応と合成の進歩シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 竹本昂平, 西川泰弘, 森口翔平, 堀裕奈, 亀澤友紀, 松井孝美, 形部智実, 原 脩
2. 発表標題 -ヒドロキシアミド選択的アシル化反応を基盤とするセリン/トレオニン選択的な糖ペプチド修飾反応の開発
3. 学会等名 第116回有機合成シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 天野薫帆, 西川泰弘, 細井碧, 森大器, 豊田万祐子, 竹本昂平, 原 脩
2. 発表標題 化学選択的加水分解反応を利用するカルバメート型アルコール保護基の開発研究
3. 学会等名 日本薬学会 第140年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

名城大学薬学部機能分子化学研究室ホームページ http://www-yaku.meijo-u.ac.jp/kenkyu/functional/

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
研究協力者	原 脩 (Hara Osamu)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------