

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390024

研究課題名(和文)スルホクリックの展開による生体系への多様な機能分子導入と応用

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

研究代表者

畑中 保丸(Hatanaka, Yasumaru)

富山大学・事務局・理事・副学長

研究者番号：30111181

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,200,000円、(間接経費) 4,260,000円

研究成果の概要(和文)：本事業では、スルホクリック関連反応のケミカルバイオロジーへの展開を実施した。本事業においてスルホクリックの反応性を検討中に、新規クリック反応を発見した。通常のスルホクリックは、チオカルボン酸とスルホニルアジドからアシルスルホンアミドを生成する。一方で新規反応は、チオアミドとスルホニルアジドからアミジン生成物を与える。新規反応について詳細に検討したところ、この反応が室温・水中・無触媒で効率良く進行する反応であることがわかった。そこでスルホクリックに加えて新規クリック反応も利用して、糖、アミノ酸、薬物などを母骨格とするさまざまな生体関連化合物を開発した。

研究成果の概要(英文)：The chemical biology of sulfo-click type reactions was examined in this project. During the course of project, a novel click type reaction was discovered. The common sulfo-click reaction couples a thioacid to a sulfonyl azide to give a sulfonamide, whereas the new reaction is able to couple a thioamide to a sulfonyl azide under mild conditions resulting an amidine product. Since the reaction proceeds smoothly in water without catalysts or promoters, the application of this reaction was also examined. Using two sulfo-click type reactions, various derivatives of bioactive compounds such as sugars, amino acids, and medicines were developed.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・創薬化学

キーワード：クリック反応 ケミカルバイオロジー チオカルボン酸 チオアミド スルホニルアジド

### 1. 研究開始当初の背景

新しい生体解析法として盛んに応用されるようになったクリックケミストリーは、生体系をきたまま修飾する画期的な化学的方法であるが、本事業開始当初最も効果的とされる Huisgen 反応においても、生体に有害な銅触媒を用いる反応条件やひずみを有する特殊なアルキン試薬を要する点で、さらに改良が求められていた。2003 年に登場したスルホクリックは銅触媒が不要で、スルホニルアジドとチオカルボン酸が室温下に結合するため、Huisgen 反応と比較してより生体系に緩和な反応として注目されており、イメージング試薬の開発が報告されるなど、応用研究の世界的競争が始まってきた。

### 2. 研究の目的

生きた生体系の解析法として革新をもたらしたクリックケミストリーの中で、スルホクリックは緩和かつ効率の良い方法として最近登場した。しかし、その生体系に負荷が少ない長所の応用研究はまだ未開拓であり、本課題ではその生体応用を集中的に展開して新方法論を確立する。本研究は、まだ黎明期にあるスルホクリックの応用研究と、研究代表者の生体分子解析での先駆的経験とが、スルホクリックの化学で交差する絶好の位置づけを活かし、注目されるスルホクリックの展開研究を世界に先駆けて推進するのが目的である。クリックケミストリーは、生体系を直裁的に制御する強力な方法であるが、用いる反応系の制約から主としてイメージングを中心とする応用に留まっている。本課題では、より緩和な生体応用がスルホクリックで実現できる可能性に着目し、この分野での世界的競争に先んじて開拓しようとするものである。

### 3. 研究の方法

(1) 「スルホクリック反応を利用した生体分子プローブの開発とタンパク質機能部位解析への応用検討」

研究初年度はまず、研究計画調書に沿って、スルホクリック反応を利用した生体系応用の第一歩として、次の各項目に関して検討を進めた。

- ①生体分子プローブの開発
- ②タンパク質の機能部位解析への応用検討
- ③新薬リード化合物の探索

(2) 「スルホクリック反応の有機化学的側面からの調査」

スルホクリック反応について、生体分子への応用と並行して、その導入法や反応性などの基礎的知見を得るために、有機化学的側面も詳細に検討した。具体的には、反応基質となるチオカルボキシ基と類縁官能基について

種々の誘導体を合成し、それらの反応性を検討した。

(3) 「実施に伴う新たな展開：チオアミド型新規クリック反応の詳細検討と生体系への展開」

研究初年度において実施した(2)の検討の中で、チオアミド基がスルホクリック反応の基質となる新知見を見出した。この成果により、チオアミド基を用いることでアミジン骨格の一段階クリック形成が温和な条件で可能となる新しい可能性が開けた。そこで当初計画のチオカルボキシ基にチオアミド基を加え、次の3項目について具体的に実験・検討を実施した。

- ①チオアミド型クリック反応の詳細な検討と応用展開
- ②チオアミド型クリック反応の創薬的応用展開
- ③タンパク質のクリック修飾を指向した生体直交性バイオ技術への応用展開
- ④両クリック反応を利用したバイオ・新薬基礎技術の集約

### 4. 研究成果

(1) 「スルホクリック反応を利用した生体分子プローブの開発とタンパク質機能部位解析への応用検討」

(1)-①「生体分子プローブの開発」では、当初の計画通りシアル酸カルボキシ基をチオカルボキシ基へ変換する諸条件を検討し、効率よく変換できる合成条件を見出した。チオカルボキシ基はそのままでは不安定で長期保存が難しく扱いにくかったため、保護基を利用することで打開した。この成果を元に、スルホクリック反応を利用したシアル酸型のバイオプローブの設計・合成を行った。また同様の合成をアスパラギン酸誘導体にも適用することで、その光アフィニティープローブを合成することに成功した(図1)。

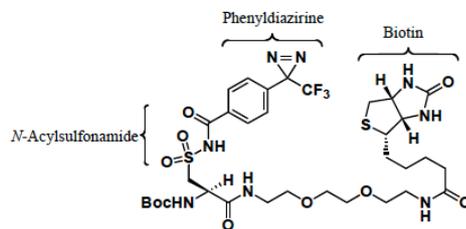


図1. 合成したアスパラギン酸プローブの化学構造

(1)-②「タンパク質の機能部位解析への応用検討」では、(1)-①で合成したアスパラギン酸誘導体の光アフィニティープローブを用いて、GDH、GOT、GSyn などのグルタミン酸結合タンパク質に対する親和性を評価した。この成果については、国際学会の招待講

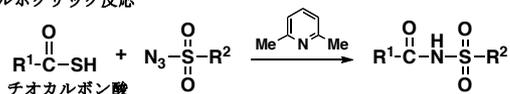
演にて発表した(学会発表9参照)。さらに、標的タンパク質を解析する段階を効率化するため、蛍光検出を利用した新しい方法論を確立した。その成果は、英国化学雑誌に論文発表した(雑誌論文2参照)。

(1)-③「新薬リード化合物の探索」では、(1)-①で合成したチオカルボキシ基をもつシアル酸遷移状態アナログをスルホクリック基質として、種々のスルホニルアジド誘導体とクリック反応させることで、新薬候補化合物を作成した。また、合成したこれらの化合物のノイラミダーゼへの結合を評価するために、スルホクリックを利用して光プローブも合成した。結合評価の詳細は、(3)-④「両クリック反応を利用したバイオ・新薬基礎技術の集約」にて詳述する。新薬につながる可能性がある新規化合物をいくつか得ることができたため、特許出願した(産業財産権1参照)。

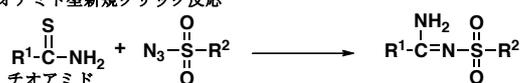
(2) 「スルホクリック反応の有機化学的側面からの調査」

スルホクリックの反応性を検討するために、スルホクリックの反応基質であるチオカルボキシ基の類縁官能基を準備した。具体的には、ジチオカルボキシ基、チオノカルボキシ基、チオアミド基を別途準備した。それぞれをクリック反応条件に付したところ、チオアミド基が新規なクリック反応の基質となる新知見を得ることができた(スキーム1)。このため、検討対象にチオアミド基質を追加して調査し、この反応が緩和な条件で収率良く進行することを確認した。この知見により、チオカルボキシ基に加えてチオアミド基がクリック基質として利用できることになり、初年度にして、次年度以降に繋がる価値ある成果を得ることができた。当初計画を変更してこの新規クリック反応の詳細を検討する必要が生じたため、初年度研究費の一部を次年度へ繰り越ししつつ、(3)-①「チオアミド型クリック反応の詳細な検討と応用展開」にて新規反応を追求することにした。

スルホクリック反応



チオアミド型新規クリック反応

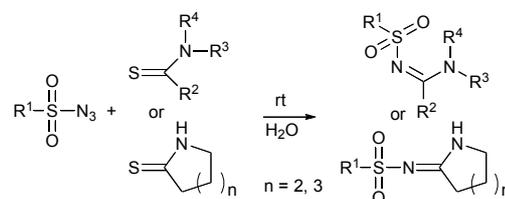


スキーム1. チオカルボン酸を用いるスルホクリック反応(上段)とチオアミドを用いる新規クリック反応(下段)

(3) 「実施に伴う新たな展開：チオアミド型新規クリック反応の詳細検討と生体系への展開」

(3)-①「チオアミド型クリック反応の詳細な検討と応用展開」では、新規クリック反応の scope & limitation に関して詳細に検討した。反応は室温、水中の緩和な条件で進行し、また脂肪族、芳香族、環状骨格など広範な置換基に対応できることを確認した(表1)。汎用性が高く、バイオへの応用展開が期待できる成果が得られたため、本反応の特許を出願するとともに(産業財産権2参照)、論文として発表した(雑誌論文1参照)。

表1 チオアミドを用いる新規クリック型反応



Entry	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	R <sup>4</sup>	n	time, h	yield, %
1	Me	Me	H	H	-	15	97
2	Ph	Me	H	H	-	13	98
3	Me	Me	Ph	H	-	5	94
4	Ph	Me	Ph	H	-	4	97
5	Me	Me	Ph	Me	-	8	87
6	Ph	Me	Ph	Me	-	6	99
7	Me	Me	Ph	Ph	-	15	83
8	Ph	Me	Ph	Ph	-	15	99
9	Ph	-	-	-	2	1	99
10	Ph	-	-	-	3	15	95

(3)-②「チオアミド型クリック反応の創薬的応用展開」では、社会的要請が高い抗インフルエンザ薬を念頭に、まずはシアル酸誘導体を優先してリード化合物の探索を開始した。まず、チオアミド基を有するシアル酸遷移状態アナログを合成した。チオアミド型誘導体の合成は多段階となったが、収率よく作成できた。続いてチオアミド型の新規クリック反応を行うことで、新薬候補ライブラリーを作成した。ここでも新薬につながる可能性がある新規化合物をまとめて得られたため、特許出願した(産業財産権1参照)。得られた化合物の結合評価の詳細は、(3)-④「両クリック反応を利用したバイオ・新薬基礎技術の集約」にて詳述する。また、抗ヒスタミン薬やグルコシダーゼ阻害薬を念頭に、ヒスチジンやノジリマイシンの誘導化も行い、チオアミド型

クリック反応の応用を多角的に推進する基盤を樹立した。

(3)-③「タンパク質のクリック修飾による生体直交性バイオ技術の応用展開」では、アミノ基や水酸基などの生体内に存在する官能基に対して、チオアミド型クリック反応が生体直交性を有することを確認した。またタンパクを直接クリック誘導する場合、低濃度条件が必要となる。しかしながら低濃度にてチオアミド型のクリック反応を試行すると、反応効率が極端に低下してしまった。そこで反応条件を検討したところ、反応基質にフッ素を導入すると、低濃度においても反応効率が劇的に高まることを見いだした。本事業終了時点においてタンパク質を直接クリック修飾する段階を試行するには至らなかったが、今後フッ素を導入した改良型の反応を適用することで、世界に先駆けてチオアミド型クリック反応の生体系への応用を達成できると考えている。

(3)-④「両クリック反応を利用したバイオ・新薬基礎技術の集約」では、(1)-③「新薬リード化合物の探索」や(3)-②「チオアミド型クリック反応の創薬的応用展開」で作成したシアル酸ライブラリーから、阻害活性を持つ有用化合物をピックアップする独自の評価系を確立した。評価系には光アフィニティープローブが必要であるため、そのプローブもスルホクリックならびにチオアミド型新規クリック反応にて作成した。これらのプローブを利用して、化学発光を指標とした簡単な1次スクリーニング法を開発した。

以上のように本事業では、始めにスルホクリック反応の生体系への応用を展開した。スルホクリック反応そのものは、生体解析用のプローブや新薬候補ライブラリーの作成に有用であり、タンパク質の機能部位解析やその効率化、そして新薬開発に対して活用できることがわかった。またスルホクリックと類似の反応として、チオアミド型のクリック反応を本事業で新たに見いだすことに成功した。そこで当初計画を変更して、チオアミド型の新規クリック反応の詳細を検討した。この反応は、水中・室温にて非常に緩和な反応条件にて効率よく進行することがわかった。また毒性が強い金属触媒などを一切必要とせず、脂肪族、芳香族、環状骨格など広範な置換基に対応できることを確認した。そこで、スルホクリックとチオアミド型新規反応両方を利用して、新規シアル酸誘導体を開発するとともに、その誘導体の酵素活性評価系を独自に樹立した。この点は、本事業の当初計画を超えて達成できた特筆すべき点である。以上の結果は、学術論文2報と特許出願2件、また招待講演を含めた学会発表多数にて報告し、本事業による学術的成果を積極的に発信した。さらに、当初のスルホクリックによ

る生体応用に加え、この新規反応がもたらす創薬への可能性も検討するため、タンパク質への直接修飾に取り組むとともに、ファモチジンやノジリマイシンなどの誘導化も検討した。本事業により、スルホクリック反応に加えてチオアミド型クリック反応を創薬へ展開する基礎技術を確立することが出来たといえる。また当初目的の、タンパク質や細胞そのものへの直接修飾に最適な基礎技術として、本事業の成果が活用されることも期待できる。本事業で得られた成果を今後継続的に発展させることで、将来的には新たなバイオ技術の創成に繋がる基礎技術としての展開、また、インフルエンザなど実生活に直結する新薬の創出が期待できる。本事業の成果は、医療分野に広く貢献できる技術として優れたポテンシャルを有すると考えられる。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計2件)

1. Muhammad Aswad, Junya Chiba, Takenori Tomohiro and Yasumaru Hatanaka, "Coupling reaction of thioamides with sulfonyl azides: An efficient catalyst-free click-type ligation under mild conditions", *Chem. Commun.*, **49**, 10242-10244 (2013), 査読有り, DOI: 10.1039/C3CC46055J
2. Shota Morimoto, Takenori Tomohiro, Nobuyuki Maruyama and Yasumaru Hatanaka, "Photoaffinity casting of a coumarin flag for rapid identification of ligand-binding sites within protein", *Chem. Commun.*, **49**, 1811-1813 (2013), 査読有り, DOI: 10.1039/c3cc38594a

[学会発表] (計18件)

1. 畑中 保丸、「光アフィニティーラベリングの画期的高速化と生命科学上のブレークスルーへの応用」(学会賞受賞講演)、日本薬学会第134回年会、2014年3月27-30日、熊本市
2. 中山 純、橋田 まみ、志村 みさき、千葉 順哉、友廣 岳則、畑中 保丸、「C1位カルボキシ基の誘導化によるシアル酸アナログの開発」、日本薬学会第134回年会、2014年3月27-30日、熊本市
3. 千葉 順哉、畑中 保丸、「チオアミドを利用した水中での無触媒クリック型反応」、平成25年度中部地区医療・バイオ系シーズ発表会、2013年12月12日、名古屋市
4. 畑中 保丸、「多機能光アフィニティープローブによるタンパク質機能構造の効率的解析」(学会賞受賞講演)、第35回日本光医学・光生物学会、2013年7月12-13日、浜松市
5. Muhammad Aswad、加藤 日奈、中山 純、千葉 順哉、友廣 岳則、畑中 保丸、「A Mild Coupling of Thioamide and Sulfonylazide as a Novel Click Reaction

- without Activation Additives」、日本ケミカルバイオロジー学会第8回年会、2013年6月19-21日、文京区
6. Takenori Tomohiro, Shota Morimoto and Yasumaru Hatanaka, "Photochemical Casting of a Fluorophore Concomitant with a Cleavable Photoaffinity Cross-Liking", The 23<sup>rd</sup> French-Japanese Symposium on Medicinal and Fine Chemistry, 2013, 5, 12-15, Nagasaki
  7. 友廣 岳則、森本 正大、畑中 保丸、「発蛍光性クロスリンカーを利用したターゲットタンパク質の選択的精製と構造解析への応用」、第34回日本光医学・光生物学学会、2012年7月27-28日、神戸市
  8. 星野 直人、山根 まどか、友廣 岳則、畑中 保丸、「N-アセチルノイラミン酸のアニオン部位近傍に光反応基を有する光プローブの開発」、第30回日本糖質学会年会、2011年7月11-13日、長岡市
  9. Junya Chiba, Hitomi An-yo and Yasumaru Hatanaka, "Bioisosteric approach for development of multifunctional bio-probes", IUPAC 7<sup>th</sup> International Conference on Novel Materials and Synthesis, 2011, 10, 16-21, Shanghai (China).
  10. Takenori Tomohiro and Yasumaru Hatanaka, "Synthesis of multifunctional diazirine probes and their application in the chemical biology", The 5<sup>th</sup> International Symposium on Aliphatic Compounds, 2011, 6, 6-7, St. Petersburg (Russia).

[産業財産権]

○出願状況 (計2件)

1. 名称:2-デオキシ-2,3-ジデヒドロシアル酸誘導体およびその製造法  
発明者:畑中 保丸、千葉 順哉、友廣 岳則、中山 純  
権利者:富山大学  
種類:特許  
番号:特願 2013-236357  
出願年月日:2013年11月15日  
国内外の別:国内
2. 名称:スルホニルアジド誘導体およびアシルスルホンアミド誘導体の製造方法並びにそれらの利用  
発明者:畑中 保丸、千葉 順哉、友廣 岳則  
権利者:富山大学  
種類:特許  
番号:特願 2013-089114  
出願年月日:2013年4月22日  
国内外の別:国内

[その他]

ホームページ等

<http://www.pha.u-toyama.ac.jp/laboratory/anachem/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

畑中 保丸 (HATANAKA, Yasumaru)  
富山大学・事務局・理事・副学長  
研究者番号:30111181

(2) 研究分担者

千葉 順哉 (CHIBA, Junya)  
富山大学・大学院医学薬学研究部(薬学)・助教  
研究者番号:50436789