

令和元年6月16日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H03776

研究課題名(和文) ナノサイズ空孔型反応場を活用した高反応性アミノ酸誘導体モデルの開発

研究課題名(英文) Development of model systems for highly reactive amino-acid derivatives by taking advantage of nano-sized molecular cavities

研究代表者

後藤 敬 (Goto, Kei)

東京工業大学・理学院・教授

研究者番号：70262144

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：酵素の活性部位の構造的特性を採り入れた巨大分子キャビティを構築し、活性中間体の保護空間"クレードル"として活用することで、内部に高反応性アミノ酸部位を導入した酵素活性部位モデルを開発した。これにより、従来不安定性のために合成困難であった生体反応活性中間体を安定化し、その構造および反応性を直接的に解明することを目的として検討した。高反応性アミノ酸およびペプチドを導入した新規モデル系を活用することで、重要な抗酸化酵素であるグルタチオンペルオキシダーゼ等の含セレン酵素の触媒機構について、これまで仮説に留まってきた反応過程を実験的に証明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

セレンは生体必須超微量元素でありppbオーダーの含有量で高い生理活性を示すが、その機能を司る含セレン酵素の作用機序については、活性中間体の不安定性のために間接的な情報しか得られず、解明が困難であった。本研究で明らかになった活性中間体の化学的挙動に関する実験的エビデンスは、抗酸化酵素などの作用機序の化学的解明、引いては老化や細胞死などの機構研究の基盤になると期待される。

研究成果の概要(英文)：At the active site of enzymes, reactive species that are very unstable in artificial systems sometimes play crucial roles in chemical transformations. Such fabulous features of enzymatic reactions are highly associated with the geometrically isolated environments at the active sites. For modeling such an isolated environment of enzymes with synthetic systems, novel nano-sized molecular cavities incorporating highly reactive amino-acid derivatives have been developed and applied to stabilization of reactive intermediates of biological reactions. By utilizing the novel model system, chemical processes that have been proposed for the catalytic mechanism of selenoenzymes such as glutathione peroxidase have been demonstrated experimentally.

研究分野：有機元素化学

キーワード：有機化学 酵素モデル 活性中間体 アミノ酸 合成化学 セレノシステイン セレネン酸 ヨウ化セレンニル

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

レドックス制御、シグナル伝達をはじめとする細胞の様々な機能において、セレノシステイン残基と活性酸素種および活性窒素種との反応が重要な役割を果たしていることは広く知られている。しかし、これらの反応で想定されている中間体は、人工系では極度に不安定であるものが多く、酵素反応の活性中間体には存在自体が実験的に確認されていないものもある。たとえば、最も重要な抗酸化酵素の一つであるグルタチオンペルオキシダーゼ (GPx) の作用機序において、セレノシステイン由来セレネン酸 (Sec-SeOH) は活性中間体とする反応機構が広く受け入れられているが、Sec-SeOH は極めて不安定であるためにいまだに観測例すら報告されておらず、実験的にはその存在が確認されていない。この事実が象徴的に示すように、いくつかの重要な生体反応中間体に関しては、入手できる化学的情報がごく限られているため、多くの研究が間接証拠に頼らざるを得ない状況にある。生化学の分野で仮説として提案されてきた様々な想定反応機構を実験的に検証し、より化学的根拠に基づいた機構を確立するためには、反応中間体を生体内と同様に安定化できる人工モデル系の構築が必要とされている。

### 2. 研究の目的

酵素の活性部位の構造的特性を採り入れた新規なナノサイズの反応場として、 dendritic 骨格に基づく巨大分子キャビティを開発する。このキャビティを保護空間“クレードル”として活用し、内部に高反応性アミノ酸部位を導入した酵素活性部位モデル (“クレードルドアミノ酸”) を構築することで、従来不安定性のために合成困難であった生体反応活性中間体を手に取れる形に安定化し、その構造および反応性を直接的に解明する。それにより、これまで紙上の反応式に過ぎなかった生体反応の想定機構を、化学的に検証する。特に、セレノシステイン残基を触媒部位にもつ含セレン酵素の触媒反応機構の解明を目指す。

### 3. 研究の方法

生体反応活性中間体の失活を効果的に抑制しつつ、注目する反応性は損なわない新規なアミノ酸モデル系を創製するために、酵素の活性部位の構造的特性を模倣した巨大キャビティ型反応場 (“クレードル”) を構築する。分子全体の構造から、中心アミノ酸残基上の活性種の二量化や自己縮合などを効果的に抑制するために、主骨格としてサイズが 2 nm を越す巨大なフェニレン dendritic 骨格を活用する。その内部にセレノシステインユニットを導入した “クレードルセレノシステイン” (図1) を開発し、これを用いることでセレノシステインと活性酸素種等の反応剤との反応で生成する活性中間体を安定に合成するとともに、その構造および物性を明らかにする。得られた化合物を用いることにより、生化学の分野で仮説として提案されてきた反応機構を幅広い実験手段により直接的に検証する。また、アミノ酸由来活性種の参照化合物として、同様のキャビティ型骨格をもつ第一級アルキル誘導体を活用した検討も行う。

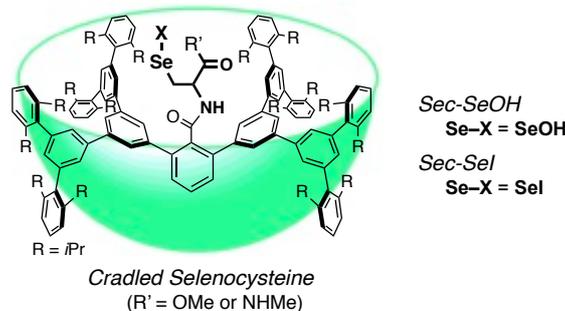


図1 “クレードルセレノシステイン”モデル系

### 4. 研究成果

#### (1) セレノシステインヨウ化セレネニルの安定化

セレノシステインヨウ化セレネニル (Sec-SeI) は、甲状腺ホルモン活性化酵素の触媒サイクルにおける重要な中間体として注目を集めている化学種であるが、セレノシステイン由来のヨウ化セレネニルについてはこれまで観測例すら報告されていない。アミノ酸モデルの開発に先立ち、化学種の基本的な性質について知見を得るための標準物質の合成について検討し、キャビティ型骨格をもつセレノールの酸化的ヨウ素化により、第一級アルキル置換ヨウ化セレネニルを安定に合成・単離することに成功した。これを用いて、酵素作用機序に含まれる反応過程として提唱されているがこれまで実証例がない、ヨウ化セレネニルの加水分解によるセレネン酸の生成を実験的に示すことに成功した。次に、“クレードルセレノシステイン”骨格をもつセレノールを、セレノシステイン誘導体をキャビティ内に導入する経路により合成した。このセレノールの酸化的ヨウ素化により、セレノシステイン由来ヨウ化セレネニルの合成・単離に初めて成功するとともに、その反応性を検証した。

#### (2) グルタチオンペルオキシダーゼ触媒反応機構のモデル研究

内部にセレンシステインユニットを有する“クレードルセレンシステイン”を活用することで、重要な抗酸化酵素であるグルタチオンペルオキシダーゼの活性中間体に関するモデル研究を行った。GPx の触媒サイクルについては、セレンシステインセレン酸 (Sec-SeOH) を中間体とする機構が広く受け入れられているが、Sec-SeOH を直接観測した例は未だに報告されていない。今回、“クレードルセレンシステイン”骨格をもち、C 末端側がメチルエステル部をもつセレンール Sec-SeH の酸化による Sec-SeOH の生成について検討した。Sec-SeOH の過酸化水素による酸化について反応条件を精査した結果、塩基性条件下、低温で酸化反応を行うことにより、Sec-SeOH を良好な収率で生成させ、<sup>77</sup>Se NMR で観測することに成功した。これは、生体系および合成系を問わず、Sec-SeOH を直接観測した初めての例であり、GPx の触媒機構を化学的に解明する上で重要な知見といえる。前年度、第一級アルキル置換モデルを活用することで、ヨウ化セレンニルの加水分解によるセレン酸の生成を実験的に示すことにはじめて成功しているが、この発生法による検討も行った。対応するセレンシステインヨウ化セレンニル Sec-SeI のアルカリ加水分解を低温で行ったところ、Sec-SeH の酸化で得られたものと同じ Sec-SeOH が高収率で生成し、<sup>77</sup>Se NMR で観測された。

また、セレン酸については化学的捕捉に関する知見がほとんどないために、GPx の作用機序における Sec-SeOH の存在を実験的に示すことが従来困難であった。そこで、前年度までに合成したキャビティ型セレン酸を活用することで、捕捉剤の探索について検討した結果、アセチルアセトンをはじめとする数種類の化合物がセレン酸の捕捉に有用であることを見出した。この知見に基づき、スペクトル観測に成功した Sec-SeOH とアセチルアセトン等との反応について検討し、これらの捕捉剤が Sec-SeOH の捕捉にも有効であることを明らかにした。さらに、酵素の活性部位の環境により近い部分構造をもつ新たなモデル系として、C 末端側にアミド部をもつ“クレードルセレンシステイン”を新たに開発した。このモデル系を用いて、Sec-SeI を安定な化合物として合成・単離することに成功した。また、内部セレンシステインモデルの Sec-SeOH についても、対応するセレンールの酸化により良好な収率で発生させスペクトル観測を行うとともに、アセチルアセトン等との反応による捕捉体への変換を確認した。これらの結果は、直接観測はおろか化学的捕捉の例さえ報告されていない GPx 由来 Sec-SeOH の挙動を解明する上で基盤となる重要な知見と考えられる。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

1. Sase, S.; Kakimoto, R.; Kimura, R.; Goto, K. "Synthesis of a Stable Primary-Alkyl-Substituted Selenenyl Iodide and Its Hydrolytic Conversion to the Corresponding Selenenic Acid" *Molecules* **2015**, *20* (12), 21415-21420. 査読有.  
DOI: 10.3390/molecules201219773
2. Sano, T.; Shimada, K.; Aoki, Y.; Kawashima, T.; Sase, S.; Goto, K. "Modeling of the Bioactivation of an Organic Nitrate by a Thiol to Form a Thionitrate Intermediate" *Molecules* **2017**, *22* (1), 19-21. 査読有.  
DOI: 10.3390/molecules22010019
3. Sneed, E.; Hackett, M.; Cotelesage, J.; Prince, R.; Barney, M.; Goto, K.; Block, E.; Pickering, I.; George, G. "Photochemically-Generated Thiol Free Radicals Observed by X-ray Absorption Spectroscopy" *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139* (33), 11519-11526. 査読有. 国際共著.  
DOI: 10.1021/jacs.7b05116
4. Block, E.; Dethier, B.; Bechand, B.; Cotelesage, J. J.H.; George, G. N.; Goto, K.; Rengifo, E. M.; Pickering, I. J.; Sheridan, R.; Sneed, E.; Vogt, L. "Ajothiolanes: 3,4-Dimethylthiolane Natural Products from Garlic (*Allium sativum*)" *J. Agric. Food Chem.* **2018**, *66* (39), 10193-10204. 査読有. 国際共著.  
DOI: 10.1021/acs.jafc.8b03638
5. Sase, S.; Kimura, R.; Masuda, R.; Goto, K. " Model study on trapping of protein selenenic acids by utilizing a stable synthetic congener" *New J. Chem.* **2019**, *43* (18), 6817-7170. 査読有.  
DOI: 10.1039/c9nj01072f

[学会発表] (計 42 件)

1. Kei Goto, Ryo Kakimoto, and Shohei Sase, "Self-catalyzed  $\beta$ -dehydration of a Primary-alkyl-substituted Selenenic Acid to Form a Stable Selenoaldehyde", The 11th International Conference on Heteroatom Chemistry, Caen, France, 2015.
2. Kei Goto, Ryo Kakimoto, Ryutaro Kimura, and Shohei Sase, "Synthesis of a stable selenoaldehyde by unprecedented C=Se double bond formation through  $\beta$ -dehydration", The 2015 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (Pacifichem 2015), Honolulu, USA, 2015.
3. Kei Goto, Michihiro Ishihara, Noriaki Abe, and Shohei Sase, "Synthesis, structure, and reactivity of a primary-alkyl-substituted sulfenic acid and its anion", The 2015

International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (Pacifichem 2015), Honolulu, USA, 2015.

4. 後藤 敬, 柿本 涼, 木村龍太郎, 佐瀬祥平 “巨大分子キャビティを活用した含セレン高反応性化学種の安定化と新規反応性の開拓” 第 13 回ホスト・ゲスト化学シンポジウム, 仙台, 2015.
5. 木村龍太郎, 柿本 涼, 佐瀬祥平, 後藤 敬 “キャビティ型分子骨格を活用した安定な第一級アルキル置換ヨウ化セレンニルの合成” 第 18 回ヨウ素学会シンポジウム, 千葉, 2015.
6. 木村龍太郎, 佐瀬祥平, 後藤 敬 “デンドリマー型分子骨格を有する第一級アルキル置換含セレン化学種を活用した生体反応過程に関するモデル研究” 第 26 回基礎有機化学討論会, 松山, 2015.
7. 唐崎貴史, 佐瀬祥平, 後藤 敬 “巨大分子キャビティを活用した甲状腺ホルモン活性化酵素触媒部位モデルの開発” 第 26 回基礎有機化学討論会, 松山, 2015.
8. 唐崎貴史, 佐瀬祥平, 後藤 敬 “クレードルドセレノシステインを活用した安定なセレノシステインヨウ化セレンニルの合成” 第 42 回有機典型元素化学討論会, 名古屋, 2015.
9. 木村龍太郎, 佐瀬祥平, 後藤 敬 “巨大分子キャビティを活用した第一級アルキル置換セレン酸の反応性の解明” 日本化学会第 96 春季年会, 京田辺, 2016.
10. 唐崎貴史, 佐瀬祥平, 布施新一郎, 田中浩士, 後藤 敬 “「クレードルドセレノシステイン」を活用した抗酸化酵素反応過程のモデル研究” 日本化学会第 96 春季年会, 京田辺, 2016.
11. Kei Goto, Tsukasa Sano, Nozomu Watanabe, and Shohei Sase, “Modeling of Cysteine-Derived Reactive Intermediates by Taking Advantage of Cavity-Shaped Molecular Cradles”, The 70th Fujihara Seminar, Fukuoka, Japan, 2016.
12. Kei Goto, Takafumi Karasaki, and Shohei Sase, “Modeling of Reactive Intermediates Derived from Selenocysteines by Utilizing Cavity-Shaped Molecular Cradles”, 13th International Conference on the Chemistry of Selenium and Tellurium (ICCST-13), Gifu, Japan, 2016.
13. Ryutaro Kimura, Shohei Sase, and Kei Goto, “Synthesis and Reactivity of a Primary-Alkyl-Substituted Selenenic Acid Stabilized by a Large Cavity-Shaped Molecular Framework”, 13th International Conference on the Chemistry of Selenium and Tellurium (ICCST-13), Gifu, Japan, 2016.
14. Kei Goto, “Syntheses and Reacivity of Cysteine- and Selenocysteine-Derived Reactive Species by Utilizing Cavity-Shaped Molecular Cradles”, The 7th Heron Island Conference on Reactive Intermediates and Unusual Molecules, Heron Island, Great Barrier Reef, Queensland, Australia, 2016.
15. Kei Goto, Tsukasa Sano, Nozomu Watanabe, and Shohei Sase, “Syntheses of Cysteine-Derived Reactive Intermediates by Taking Advantage of Cradled Cysteines”, 27th International Symposium on Organic Chemistry of Sulfur, Jena, Germany, 2016.
16. Shohei Sase, Michihiro Ishihara, Noriaki Abe, Ryutaro Kimura, and Kei Goto, “Stabilization of a Primary-alkyl-substituted Sulfenic Scid and Its Anion by Utilizing a Cavity-shaped Molecular Framework”, 27th International Symposium on Organic Chemistry of Sulfur, Jena, Germany, 2016.
17. 佐瀬祥平, 佐野 司, 唐崎貴史, 後藤 敬 “クレードルドシステインおよびセレノシステインを活用した生体反応モデル系の構築” 第 14 回ホスト・ゲスト化学シンポジウム, 高知, 2016.
18. 木村龍太郎, 佐瀬祥平, 後藤 敬 “巨大分子キャビティを活用した第一級アルキル置換セレン酸の反応性の解明” 第 14 回ホスト・ゲスト化学シンポジウム, 高知, 2016.
19. 渡邊 望, 佐瀬祥平, 後藤 敬 “巨大キャビティ型分子骨格を活用した内部システイン由来スルフェン酸モデル化合物の合成と反応” 第 14 回ホスト・ゲスト化学シンポジウム, 高知, 2016.
20. 佐瀬祥平, 佐野 司, 唐崎貴史, 後藤 敬 “クレードルドシステインおよびセレノシステインの開発と生体反応過程のモデル化への応用” 第 109 回有機合成シンポジウム, 東京, 2016.
21. 佐瀬祥平, 佐野 司, 唐崎貴史, 渡邊 望, 木村龍太郎, 後藤 敬 “アミノ酸部位を内包した巨大分子キャビティの開発と生体反応活性種モデル化への応用” 第 27 回基礎有機化学討論会, 広島, 2016.
22. 後藤 敬, 木村龍太郎, 唐崎貴史, 佐瀬祥平 “巨大分子キャビティを活用した甲状腺ホルモン活性化酵素中間体のモデル化合物の開発” 第 19 回ヨウ素学会シンポジウム, 千葉, 2016.
23. 後藤 敬 “巨大分子空孔を活用した生体反応活性種のモデル研究” 第 3 回次世代の有機化学・広島シンポジウム, 東広島, 2016.
24. 渡邊 望, 佐瀬祥平, 後藤 敬 “巨大分子キャビティを活用した含硫黄ペプチドモデル化合物の開発” 第 43 回有機典型元素化学討論会, 仙台, 2016.
25. 木村龍太郎, 唐崎貴史, 佐瀬祥平, 後藤 敬 “巨大分子キャビティを活用したセレノシス

- テイン由来セレネン酸および関連化学種の反応性に関するモデル研究”第43回有機典型元素化学討論会, 仙台, 2016.
26. 渡邊 望, 佐瀬祥平, 後藤 敬 “巨大分子キャビティを活用した Cys-Ser ジペプチド由来高反応性化学種のモデル研究” 日本化学会第 97 春季年会, 横浜, 2017.
  27. 木村龍太郎, 佐瀬祥平, 後藤 敬 “巨大分子キャビティを活用したセレノシステイン由来セレネン酸の安定性および反応性の解明” 日本化学会第 97 春季年会, 横浜, 2017.
  28. Kei Goto, Nozomu Watanabe, Ryutaro Kimura, and Shohei Sase, “Elucidation of Biological Reaction Processes Involving Cysteine Sulfenic Acids and Related Species by Utilizing Cavity-Shaped Model Systems”, The 2nd International Symposium on Stimuli-responsive Chemical Species for the Creation of Functional Molecules, Higashi-Hiroshima, Japan, 2017.
  29. Kei Goto, Nozomu Watanabe, Ryutaro Kimura, Tsukasa Sano, and Shohei Sase, “Modeling of Biological Reaction Processes Involving Cysteine Sulfenic Acids and Related Species by Utilizing Nano-sized Molecular Cavities”, The 12th International Conference on Heteroatom Chemistry, Vancouver, Canada, 2017.
  30. 後藤 敬 “セレノシステイン由来酵素反応活性中間体の合成モデル研究” 第 3 回日本セレネン研究会, 東京, 2017.
  31. 佐瀬祥平, 木村龍太郎, 唐崎貴史, 後藤 敬 “巨大分子キャビティを活用したセレノシステイン由来セレネン酸に関するモデル研究” 第 15 回ホスト・ゲスト化学シンポジウム, 草津, 2017.
  32. 佐瀬祥平, 佐野 司, 唐崎貴史, 渡邊 望, 木村龍太郎, 後藤 敬 “分子クレードルに包まれたセレノシステインセレネン酸の直接観測” 第 28 回基礎有機化学討論会, 福岡, 2017.
  33. 増田涼介, 佐瀬祥平, 後藤 敬 “内部セレノシステインモデルを活用したセレノシステイン由来セレネン酸の観測および反応性に関する検討” 日本化学会第 98 春季年会, 船橋, 2018.
  34. 増田涼介, 佐瀬祥平, 後藤 敬 “クレードルドセレノシステインを活用した内部セレノシステイン由来セレネン酸の反応性に関するモデル研究” 第 16 回ホスト・ゲスト化学シンポジウム, 野田, 2018.
  35. Ryosuke Masuda, Shohei Sase, and Kei Goto, “Model Study of a GPx-derived Selenenic Acid with Thiols by Utilizing a Cradled Selenocysteine”, 28th International Symposium on Organic Chemistry of Sulfur, Tokyo, Japan, 2018.
  36. Kei Goto, Ryutaro Kimura, Ryosuke Masuda, Takafumi Karasaki, and Shohei Sase, “Modeling of Selenoprotein-derived Reactive Intermediates by Utilizing Cradled Selenocysteins”, The 7th International Selenium Conference (Se2018), Otsu, Japan, 2018.
  37. Kei Goto, Ryosuke Masuda, Ryutaro Kimura, Takafumi Karasaki, and Shohei Sase, “Modeling of Reactive Intermediates of Selenoenzymes by Utilizing Nano-sized Molecular Cavities”, International Congress on Pure & Applied October 30-November 2, 2018.
  38. 佐瀬祥平, 増田涼介, 木村龍太郎, 後藤 敬 “巨大分子キャビティを活用したセレノシステインセレネン酸に関するモデル研究” 第 29 回基礎有機化学討論会, 東京, 2018.
  39. 増田涼介, 木村龍太郎, 唐崎貴史, 佐瀬祥平, 後藤 敬 “セレノシステイン含有ペプチドモデル系を活用した GPx 由来セレネン酸の反応性に関するモデル研究” 第 45 回有機典型元素化学討論会, 新潟, 2018.
  40. 佐藤有理紗, 佐瀬祥平, 後藤 敬 “分子キャビティを活用した安定なペルチオスルフェン酸 (R-SSOH) の合成” 第 45 回有機典型元素化学討論会, 新潟, 2018.
  41. 増田涼介, 佐瀬祥平, 後藤 敬 “セレノペプチド含有分子クレードルを活用した GPx 由来セレネン酸失活抑制機構のモデル研究” 日本化学会第 99 春季年会, 神戸, 2019.
  42. 山口美涼, 佐瀬祥平, 後藤 敬 “分子クレードルを活用したシステイン由来 N-ヒドロキシスルフェンアミドの合成研究” 日本化学会第 99 春季年会, 神戸, 2019.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

## 6. 研究組織

(1) 研究分担者

該当無し

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：Eric Block

ローマ字氏名：エリック・ブロック

研究協力者氏名：Graham George

ローマ字氏名：グラハム・ジョージ

※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。