

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05461

研究課題名(和文) 保護基フリー液相セグメント連結法によるADPリボシル化ペプチド高効率合成

研究課題名(英文) Highly Efficient Synthesis of ADP-Ribosylated Peptides by Protecting Group Free Segment Coupling Methods

研究代表者

田中 秀則 (Tanaka, Hidenori)

岐阜大学・糖鎖生命コア研究所・助教

研究者番号：20725064

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ADPリボシル化はタンパク質の翻訳後修飾の一つであり、NAD⁺からADPリボースをタンパク質に転移させる反応である。本翻訳後修飾は、DNA修復、転写制御など、様々な細胞プロセスに重要である。生物学的重要性は明らかになってきたが、ADPリボシル化の詳細な機能については未だ解明されていない。分子レベルでの機能解明研究の妨げとなっている主な問題点として、構造均一なADPリボシル化分子の供給の難しさが挙げられる。そこで本研究では、ADPリボシル化分子の高効率合成法の開発を目的とした。リン酸クロスカップリング反応による無保護ピロリン酸結合形成を確立し、モノ及びジADPリボースの化学合成に応用した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ADPリボシル化の分子レベル機能解明研究のボトルネックは、構造均一な分子の量的供給であった。本研究では、リン酸クロスカップリング反応でピロリン酸結合を効率的に形成できることを実証し、ADPリボシル化分子の高効率合成法の開発の糸口を見出した。合成基盤の確立は分子の量的供給が可能とするため、ADPリボシル化の機能だけでなく、生物学的意義の解明に今後大きく貢献することが期待できる。

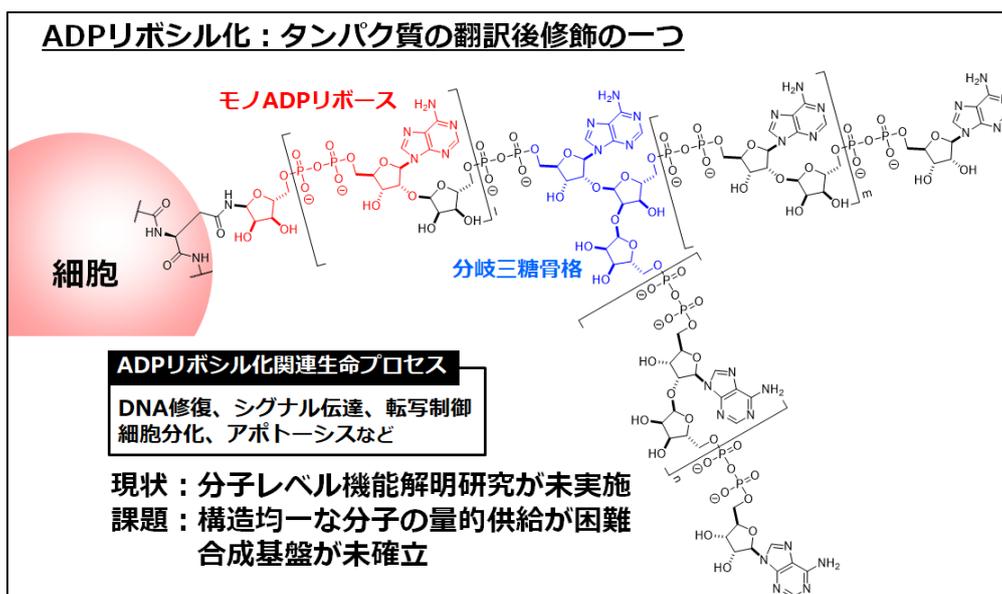
研究成果の概要(英文)：ADP ribosylation, one of post-translational modifications, is a reaction that transfers ADP ribose from nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺) to proteins and plays an important role in a variety of cellular processes including DNA repair and transcriptional regulation. Its biological importance has widely been investigated but detailed functions of ADP ribosylation remain poorly understood. The main difficulty in the molecular level research is to obtain homogeneous ADP ribosylated molecules. In this study, we develop a highly efficient method for synthesis of ADP ribosyl molecules. We established protecting-free pyrophosphate formation by phosphate cross-coupling reaction and applied it to chemical synthesis of mono- and di-ADP riboses.

研究分野：生物有機化学

キーワード：ADPリボース 無保護合成 ピロリン酸

1. 研究開始当初の背景

ADP リボシル化はタンパク質の翻訳後修飾の一つであり、酸化型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NAD⁺) から ADP リボースをタンパク質に転移させる反応である。本翻訳後修飾は、DNA 修復、シグナル伝達、転写制御、細胞分化、アポトーシスなど、様々な細胞プロセスに重要である。生物学的重要性は明らかになってきたが、ADP リボシル化の詳細な機能については未だ解明されていない。分子レベルでの機能解明研究の妨げとなっている主な問題点として、構造均一な ADP リボシル化分子の供給の難しさが挙げられる。モノ及びオリゴ ADP リボース転移酵素 (ARTs・PARPs) を利用した酵素合成による分子供給は一つの選択肢であるが、入手できる酵素が限られていることに加え、PARPs では ADP リボース鎖長の制御が出来ない。このため、化学合成による分子供給が望まれている。これまでにホスホロアミダイト法を利用した ADP リボシル化分子の固相合成 [Filippov et al. JACS 2010; ACIE 2016] が達成されているが、貴重なビルディングブロックの大過剰使用や多段階に及ぶ保護・脱保護工程など、解決すべき合成上の課題



は多い。

2. 研究の目的

本研究では、構造均一な ADP リボシル化分子の量的供給を可能にするため、既知法の合成効率を遥かに凌ぐ、革新的なモノ及びオリゴ ADP リボシル化ペプチドの高効率合成法の開発を目的とする。本研究目的を達成するため、保護基を用いない液相セグメント連結反応を開発・活用する。

3. 研究の方法

革新的な ADP リボシル化分子の高効率合成法の開発を目的とし、以下の研究項目に取り組む。

- ① 効率的な無保護ピロリン酸結合形成を達成する新規リン酸活性化剤の開発
 - A. 対陰イオンの交換による ImIm 塩の加水分解耐性の変化
 - B. 置換基導入による ImIm 塩の加水分解耐性の変化
 - C. 置換基導入型 ImIm 塩を利用したモノ ADP リボースの無保護合成
- ② オリゴ ADP リボース鎖の化学合成
- ③ ペプチド鎖の直接的かつ立体選択的保護基フリー ADP リボシル化法の開発

4. 研究成果

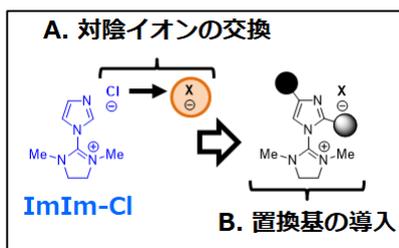
- ① 効率的な無保護ピロリン酸結合形成を達成する新規リン酸活性化剤の開発

研究代表者は独自に開発したリン酸活性化剤 ImIm-Cl (2-(*N*-imidazolyl)-1,3-dimethylimidazolium chloride) を用いることで、無保護リン酸基を有する二つの基質の連結 (クロスカップリング) でピロリン酸結合を形成できることを過去に報告した [Tanaka et al. ACIE 2012]。しかしながら、ImIm-Cl が不安定であることに加え、ピロリン酸結合形成効率が低いことが課題であった。そこで、ImIm 塩の安定性や反応性を改善するため、次の項目に取り組む

んだ。

A. 対陰イオンの交換による ImIm 塩の加水分解耐性の変化

対陰イオンの交換により ImIm 塩の加水分解耐性の向上を狙い、ヘキサフルオロリン酸イオンに交換した ImIm-PF₆ を調製した。重水存在下、プロトン NMR で ImIm-PF₆ の加水分解を追跡した結果、予想に反し、ImIm-Cl よりも加水分解されやすいことが明らかとなった。したがって、続く検討では塩化物イオンを対陰イオンとして選択した。

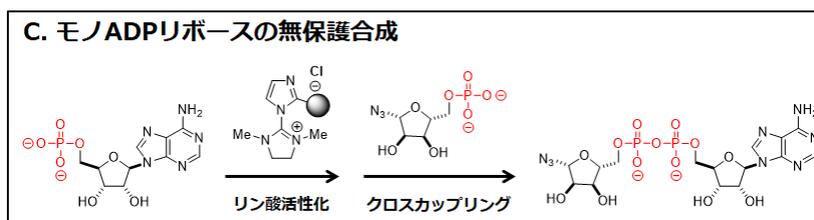


B. 置換基導入による ImIm 塩の加水分解耐性の変化

リン酸基に脱離基として組み込まれるイミダゾール部の 2 位または 4 位にアルキル置換基を導入した ImIm-Cl を各種調製した。加水分解追跡実験を実施したところ、無置換の ImIm-Cl と比較して、2 位置換基導入型 ImIm-Cl は加水分解耐性が著しく向上することを見出した。一方、4 位に置換基を導入すると無置換体より早く加水分解することが明らかになった。

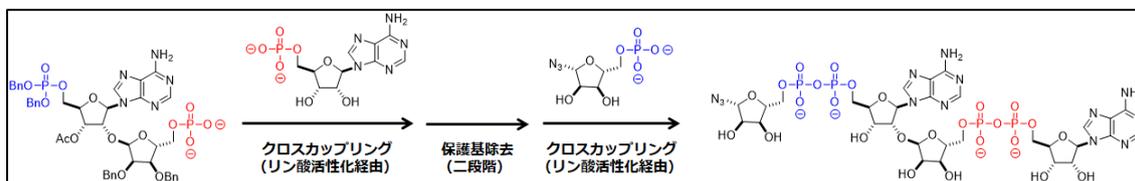
C. 置換基導入型 ImIm 塩を利用したモノ ADP リボースの無保護合成

上述で見出した置換基導入型 ImIm-Cl を利用し、モノ ADP リボースの無保護合成を試みた。すなわち、置換基導入型 ImIm-Cl で AMP 無保護体のリン酸基を活性化し（リン酸基へのイミダゾール脱離基の導入）、続く 5 位リン酸化リボース無保護体とのリン酸クロスカップリング反応でピロリン酸結合を形成し、モノ ADP リボースを無保護合成する。まず、高濃度 (2.0 M) 条件下、重水中でクロスカップリング反応（両基質の対陽イオン：ナトリウムイオン）に付したところ、望みとするピロリン酸結合形成は円滑に進行したが、目的物であるモノ ADP リボースの HPLC 収率は 38% に留まった。そこで、反応濃度を 100 mM、反応溶媒を DMF、両基質の対陽イオンをトリエチルアンモニウムイオンに変更したところ、収率の改善が確認された。更に添加剤として塩化マグネシウムを用いることで、収率が 84% まで大幅に向上した。なお、目的生成物の分析・分取には、親水性相互作用クロマトグラフィー (HILIC) 用カラムを使用した。



② オリゴADPリボース鎖の化学合成

オリゴADPリボース鎖合成の鍵ビルディングブロックである 5', 5''-ジリン酸化リボシルアデノシンを立体選択的な *o*-リボシル化反応とアデニン塩基の *N*-グリコシド化反応により構築した。次に、本ビルディングブロックを用いて、ジADPリボースの化学合成に挑戦した。①で最適化した反応条件でAMPとのリン酸クロスカップリングに付したところ、目的とする5''位でピロリン酸結合形成が進行したAMP-ADPリボースユニットを単離収率61%で得た。続いて、5'位リン酸基の保護基を除去し、5位リン酸化リボース無保護体とのリン酸クロスカップリング反応でジADPリボース無保護体の合成を試みた。AMP-ADPリボースユニットの反応溶媒DMFに対する難溶解性が原因でピロリン酸結合形成効率が低下し、目的生成物は低収率でしか得られなかったが、鍵ビルディングブロックから短工程でジADPリボース無保護体を化学合成することに成功した。基質のDMFに対する溶解性向上が今後の課題である。



また、当初計画していなかったポリADPリボース鎖に存在する分岐構造の三糖骨格構築法も開発した。詳細は割愛するが、既知合成法の段階数を半減できただけでなく、総収率も大幅に改善した新たな三糖骨格構築法を確立した (論文投稿準備中)。

③ ペプチド鎖の直接的かつ立体選択的保護基フリーADPリボシル化法の開発

本研究項目は研究期間中に実施出来なかった。モノ及びオリゴADPリボースペプチドの化学合成を達成すべく、ADPリボース無保護体を直接ペプチド鎖に立体選択的に導入する手法の研究開発を継続する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5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 Yagami Nahoko, Vibhute Amol M., Tanaka Hide-Nori, Komura Naoko, Imamura Akihiro, Ishida Hideharu, Ando Hiromune	4. 巻 85
2. 論文標題 Stereoselective Synthesis of Diglycosyl Diacylglycerols with Glycosyl Donors Bearing a Stereodirecting 2,3-Naphthalenedimethyl Protecting Group	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Organic Chemistry	6. 最初と最後の頁 16166 ~ 16181
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.joc.0c02121	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 Shirasaki Junya, Tanaka Hide-Nori, Konishi Miku, Hirose Yuya, Imamura Akihiro, Ishida Hideharu, Kiso Makoto, Ando Hiromune	4. 巻 61
2. 論文標題 Systematic strategy utilizing 1,5-lactamization for the synthesis of the trisialylated galactose unit of c-series gangliosides	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Tetrahedron Letters	6. 最初と最後の頁 151759 ~ 151759
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tetlet.2020.151759	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 Goto Kenta, Tamai Hideki, Takeda Yoh, Tanaka Hide-Nori, Mizuno Takashi, Imamura Akihiro, Ishida Hideharu, Kiso Makoto, Ando Hiromune	4. 巻 21
2. 論文標題 Total Synthesis of Sialyl Inositol Phosphosphingolipids CJP-2, CJP-3, and CJP-4 Isolated from Feather Star Comanthus japonica	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Organic Letters	6. 最初と最後の頁 4054 ~ 4057
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.orglett.9b01229	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 Komura Naoko, Kato Keiichi, Udagawa Taro, Asano Sachi, Tanaka Hide-Nori, Imamura Akihiro, Ishida Hideharu, Kiso Makoto, Ando Hiromune	4. 巻 364
2. 論文標題 Constrained sialic acid donors enable selective synthesis of -glycosides	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Science	6. 最初と最後の頁 677 ~ 680
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/science.aaw4866	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 Asano Sachi, Tanaka Hide-Nori, Imamura Akihiro, Ishida Hideharu, Ando Hiromune	4. 巻 21
2. 論文標題 p-tert-Butyl Groups Improve the Utility of Aromatic Protecting Groups in Carbohydrate Synthesis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Organic Letters	6. 最初と最後の頁 4197 ~ 4200
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.orglett.9b01372	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 萩野瑠衣、河村奈緒子、安藤弘宗、田中秀則
2. 発表標題 リン酸クロスカップリング反応を鍵としたADPリボースclickable分子の高効率合成
3. 学会等名 2021年度日本農芸化学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 茂崎恵太、萩野瑠衣、河村奈緒子、安藤弘宗、田中秀則
2. 発表標題 ポリADPリボース分岐構造の合成研究
3. 学会等名 2021年度日本農芸化学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 浅野剛志、宇田川太郎、河村奈緒子、安藤弘宗、田中秀則
2. 発表標題 2位N-イミドイル保護グルコース供与体を用いた高 選択的グリコシル化反応
3. 学会等名 2021年度日本農芸化学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 秋野瑠衣、茂崎恵太、石田秀治、安藤弘宗、 田中秀則
2. 発表標題 ポリ ADPリボース合成に向けた実用的リボシルアデノシンユニット構築法の開発
3. 学会等名 2020年度日本農芸化学会
4. 発表年 2020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

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