

令和 4 年 5 月 16 日現在

機関番号：37303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06995

研究課題名(和文) 光レドックス反応を基盤とするタンパク質へのN-結合型糖鎖導入反応の開発

研究課題名(英文) Development of N-linked glycan introduction reaction into protein based on photoredox reaction

研究代表者

山田 耕平 (Yamada, Kohei)

長崎国際大学・薬学部・准教授

研究者番号：40583232

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)：N-結合型糖鎖はタンパク質の生化学的・物理化学的特性を様々に制御している。有機合成的手法を用いてN-結合型糖タンパク質と同じ結合様式で糖鎖を導入する手法は開発されていないため、光レドックス触媒によるC-S結合開裂・カルバモイル化反応による糖鎖導入反応の開発を行った。種々検討した結果、直接的カルバモイル化は達成し得なかったが、C-S結合開裂は進行しC-B結合を形成する反応条件を見出した。C-B結合は、鈴木宮浦カップリングをはじめとする多種多様な反応に適用可能であるため、今後これを足掛かりにGlcNAcを有するアスパラギン側鎖の構築を目指す。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖鎖の機能解明や抗体医薬品などのタンパク質製剤の改良のために、有機合成的手法を用いてN-結合型糖タンパク質と同じ結合様式で糖鎖を導入する手法の開発が望まれている。特定の官能基の特異的な反応性を利用した種々のバイオコンジュゲーション法を用いた糖鎖導入が為されているが、非天然の結合様式は糖タンパク質の機能に影響を与える可能性があり、また、医薬品としての利用を考えるならば、この結合が抗原抗体反応のリスクとなることが懸念される。本研究の成果により、天然と同様の形式にてN-結合型糖鎖を任意のタンパク質に導入することが可能になるので、新たなタンパク質製剤の開発のためのツールとなり得る。

研究成果の概要(英文)：N-linked glycans control various biochemical and physicochemical properties of proteins. Since a method for introducing a sugar chain in the same manner as an N-linked glycoprotein by the organic synthetic method has not been developed, we tried the development of a sugar chain introduction reaction by a photoredox-catalyzed C-S bond cleavage/carbamoylation reaction.

As a result, direct carbamoylation could not be achieved, but C-S bond cleavage and concomitant C-B bond-forming reaction have been developed. Since C-B bonds can be applied to a wide variety of reactions such as Suzuki-Miyaura coupling, we aim to construct an asparagine side chain with GlcNAc, in the future.

研究分野：有機合成化学

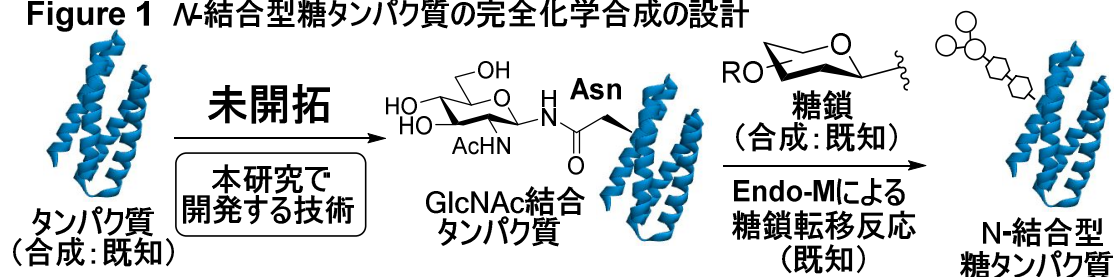
キーワード：N-結合型糖鎖 光レドックス反応

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

N-結合型糖鎖は、アスパラギン側鎖室素上に β -グリコシド結合を介して N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) が結合した構造を有しており、GlcNAc に結合する糖鎖構造の違いにより、タンパク質の生化学的・物理化学的特性を様々に制御している。糖鎖の機能解明や抗体医薬品などのタンパク質製剤の改良のために、遺伝的生化学的手法でタンパク質に糖鎖の導入が行われているが、有機合成的手法を用いて N-結合型糖タンパク質と同じ結合様式で糖鎖を導入する手法は開発されていない。特定の官能基の特異的な反応性を利用した種々のバイオコンジュゲーション法を用いた糖鎖導入が為されているが、非天然の結合様式は糖タンパク質の機能に影響を与える可能性があり、また、医薬品としての利用を考えるならば、この結合が抗原抗体反応のリスクとなることが懸念される。タンパク質と糖鎖それぞれの合成・調製は、有機合成的、生化学的手法が確立しており、さらに糖転移酵素 Endo-M を用いた GlcNAc を足掛かりとする N-結合型糖鎖の導入法も開発されている。唯一、GlcNAc の有機化学的導入法のみが開発されておらず、糖タンパク質の完全化学合成達成への最後のピースと言える。しかし、アスパラギン側鎖のアミド室素原子は求核性が他の官能基よりも乏しいため、生合成を模倣した有機化学的糖鎖導入法の開発は困難であり、全く異なるアプローチが必要である。

Figure 1 N-結合型糖タンパク質の完全化学合成の設計



著者はこれまで、トリアジニルアンモニウム塩の光レドックス触媒を用いた窒素-炭素結合のラジカル開裂法の開発を行っており、電子不足なトリアジニルアンモニウム塩が一電子還元を受けるとベンジル位に当たる窒素-炭素結合が開裂し、炭素ラジカルが発生することを見出している。このことから、電子不足芳香環で修飾されたヘテロ原子-炭素結合も同様に開裂可能であると考へた。中でもシステイン残基は、選択的修飾法が多く報告されており、硫黄-炭素結合をラジカル開裂できれば一炭素増炭を経て GlcNAc を有するアスパラギン側鎖を構築できると着想した。

2. 研究の目的

システイン残基をアスパラギン残基へと変換しながら N-結合型糖鎖を導入する手法の開発を行う。このために、以下の事柄について研究する。

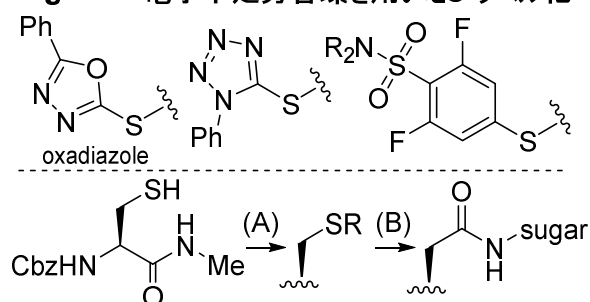
- ・システイン選択的ラベル化剤の選定・開発
- ・光レドックス触媒による C-S 結合開裂・カルバモイル化反応による糖鎖導入反応の開発
- ・Native Chemical Ligation と組み合わせた N-結合型糖タンパク質の実用的化学合成

3. 研究の方法

【(1) システイン残基の選択修飾の選定】

システインの選択的ラベル化は様々なものが知られている。電子不足芳香環によるラベル化に着目して、本反応に適したラベル化剤を選定する。例えば oxadiazole 化合物の場合、還元電位は -1.7 V 程度であるため、汎用される光レドックス触媒である $\text{Ir}(\text{ppy})_3$ で還元できるが、より温和な条件で速やかに反応を行うために置換基のチューニングを行う。

Figure 2 電子不足芳香環を用いた S-ラベル化



【(2) 光レドックス触媒による C-S 結合開裂とカルバモイル化反応による糖鎖導入反応】

修飾されたシステイン誘導体を用いた C-S 結合開裂反応の検討

多くの光レドックス触媒が開発されており、酸化還元電位などシステイン修飾基との相性に合わせて可視光、水中で行えることを前提に選定する。レドックスニュートラルな反応系であるが、状況に応じて還元剤、酸化剤の添加も検討する。

チオールに対する直接的 C-S 結合開裂反応の検討

光レドックス触媒とホスフィンを用いたシステインの炭素ラジカルを経由したアラニンへの直接的還元反応が報告されている。水素源は他のチオール水素であると報告されているが、過剰量の GlcNAc イソニトリルによる捕捉が十分に速ければ本研究に適用可能であるので検討する。

4. 研究成果

【(1) システイン残基の選択修飾の選定】

選定した数種の電子不足芳香環をシステインに対して、導入し、目的物を得た。

【(2) 光レドックス触媒による C-S 結合開裂とカルバモイル化反応による糖鎖導入反応】

修飾されたシステイン誘導体を用いた C-S 結合開裂反応の検討

以下の条件を組み合わせて反応検討を行った。

- ・ 10 種類の光レドックス触媒
- ・ 8 種類の溶媒
- ・ 10 種類の添加剤 (酸化剤・還元剤を含む)

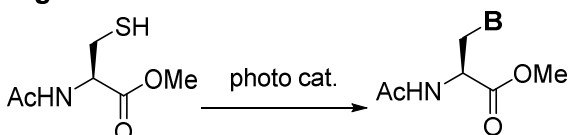
しかしながら、多くの反応条件で反応は進行せず、何らかの反応が進行する系においても、目的物は得られなかった。

チオールに対する直接的 C-S 結合開裂反応の検討

種々検討を行ったが、生じたチールラジカルによるリン試薬との反応よりも早く共存させたイソニトリルとの反応が速く、目的物を得るに至らなかった。

一方で、イソニトリル以外の反応剤との反応を試みたところ、C-S 結合開裂は進行し、C-B 結合を形成する反応条件を見出した。反応条件 (光レドックス触媒、溶媒、温度、添加剤、など) を詳細に検討した結果、実用に耐えうる収率で目的物を得ることができた。また、基質として官能基を多数有するオリゴペプチドを用いても選択的に反応が進行することが分かった。C-B 結合は、鈴木宮浦カップリングをはじめとする多種多様な反応に適用可能であるため。今後、これを足掛かりに GlcNAc を有するアスパラギン側鎖の構築を目指す。

Figure 3.



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 Yamada Kohei, Lee Jeongsu, Kota Mika, Karuo Yukiko, Kitamura Masanori, Kunishima Munetaka	4. 巻 69
2. 論文標題 <i>N</i>-Acyltriazinedione; a Novel Acylating Reagent Synthesized from a Triazinone-Type Condensing Reagent	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Chemical and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 498 ~ 502
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/cpb.c20-00952	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 Yamada Kohei, Hirozawa Shota, Xia Junqing, Kunishima Munetaka	4. 巻 68
2. 論文標題 Development of Hydrophilic Polyacrylamide Gel-Based Condensing Reagents Comprised of Chlorotriazine	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chemical and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 534 ~ 537
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/cpb.c20-00074	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 Hikaru Fujita, Rina Yamashita, Takanori Fujii, Kohei Yamada, Masanori Kitamura, Munetaka Kunishima	4. 巻 2019
2. 論文標題 Preparation of Alkyl Ethers with Diallyltriazinedione-Type Alkylating Agents (ATTACKs-R) Under Acid Catalysis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Eur. J. Org. Chem.	6. 最初と最後の頁 4436-4446
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ejoc.201900607	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 3.Kohei Yamada, Mika Kota, Kensuke Takahashi, Hikaru Fujita, Masanori Kitamura, Munetaka Kunishima	4. 巻 84
2. 論文標題 Development of triazinone-based condensing reagents for amide formation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J. Org. Chem.	6. 最初と最後の頁 15042-15051
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.joc.9b01261	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 2. Masanori Kitamura, Sayaka Komine, Kohei Yamada, Munetaka Kunishima	4. 巻 76
2. 論文標題 Triazine-Based Dehydrative Condensation Reagents Bearing Carbon-Substituents	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Tetrahedron	6. 最初と最後の頁 130900
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tet.2019.130900	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3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Masanori Kitamura, Sayaka Komine, Kohei Yamada and Munetaka Kunishima
2. 発表標題 Triazine-Based Dehydrative Condensing Reagents Bearing Carbon-Substituents
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 小林葉月、山田耕平、国嶋崇隆
2. 発表標題 光レドックス触媒によるトリアジニルアンモニウム塩のC-N結合開裂反応の開発
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 前田愛香、松本穂菜美、野中遥、山田耕平、山口泰史
2. 発表標題 脱硫黄的水素素化を基盤とするシステイン変換反応の開発
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022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
---------	---------