

令和 4 年 5 月 31 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K15957

研究課題名(和文)空間制御を基盤とした新規タンパク質修飾法の開発と応用

研究課題名(英文)Development and Application of New Chemical Modification of Proteins Based on Spatial Control

研究代表者

寄立 麻琴(Yoritate, Makoto)

九州大学・薬学研究院・助教

研究者番号：70843788

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文):タンパク質の位置選択的修飾法は、近年注目されている抗体薬物複合体(ADC)やPROTACなどを含む、プロテインエンジニアリングにおいて重要な技術である。タンパク質に含まれるアミノ酸残基の中で、修飾法が最も多く報告されているのは、高反応性のシステインである。一方、システインよりも多くタンパク質に含まれており、システインの次に求核力が高いとされているリジンを標的としたタンパク質の位置選択的修飾法は、多く報告されているものの、その位置選択的修飾法には未だに課題があった。そこで、キノメチドを活性中間体とする新たな可逆的リジン修飾反応の開発に取り組んだ。今後さらなる反応性の調整を行う計画である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

タンパク質の位置選択的修飾法は、近年注目されている抗体薬物複合体(ADC)やPROTACなどを含む、プロテインエンジニアリングにおいて重要な技術である。特に、近年認可されたADC薬であるエンハーツは今後のがん治療を担う医薬品として注目されている。さらに薬効が高く均質なADCを作るためには、抗体-薬物比を高く・均一に保つことが求められる。本研究が完成すれば、医薬品の開発に貢献することが期待される。

研究成果の概要(英文):Regioselective modification methods of proteins are an important technology in protein engineering, including antibody-drug conjugates (ADCs) and PROTACs, which have attracted much attention in recent years. Due to its high nucleophilicity, cysteine selective protein modification with Michael acceptors is the most reliable method. On the other hand, lysine-selective modification is not easy because lysines on the surface of proteins are more abundant than cysteine. Therefore, we have been working on the development of a new reversible lysine-selective modification using quinone methides as active intermediates. Further optimization of the reactivity will be performed in the future.

研究分野：有機合成化学

キーワード：タンパク質修飾 抗体薬物複合体 C-グリコシド

1. 研究開始当初の背景

広義に、タンパク質の化学修飾法は、蛍光ラベリングによるタンパク質の動態解析、PEG化による物性の改変、抗体-薬物複合体(ADC)、抗体やタンパク質の固定化などに用いられている。これまでに知られている天然タンパク質の修飾法はシステインを標的とするマレイミド法(*Chem. Eur. J.* 2019, 25, 43.)、 α -ハロアミド法(*Nature* 2016, 534, 570.)、SuFEx 反応(*ACIE* 2014, 53, 9430.) などがある。しかしこれらは単一の官能基を選択的に修飾する方法であり、結合数および結合位置の制御が困難であった。選択性発現のために、タンパク質のポケットと強い相互作用を示す構造を組み込み、近傍のシステインなどを修飾するアフィニティーラベリングが用いられる。例えば近年、J. Taunton らはアフィニティーラベリングを利用したプロテインキナーゼの位置特異的な共有結合形成によるキナーゼ阻害剤を報告した(*JACS* 2017, 139, 680.)。一方、人工タンパク質を用いる手法は人工的に導入したアジド基やアルキンを標的とする Huisgen 反応 (*Top. Curr. Chem.* 2016, 374, 16.) が有名である。しかし人工タンパク質の製造コストは非常に高いため、真に実用的とは言えない。従って、アフィニティー法や非天然アミノ酸に頼らない、タンパク質を位置選択的に修飾することができる新たな手法の開発が望まれている。

2. 研究の目的

本研究提案では、タンパク質中に多数存在するリジン残基を二点で認識する新たな反応剤の設計と開発を目的とした。設計した反応剤は、可逆的にリジンと共有結合を形成する2つの官能基が、リンカーを介して連結した構造を持つ。2つの官能基が同時に共有結合を形成したときのみ速度論的に反応剤がタンパク質上に残り、異なる位置に結合した反応剤はタンパク質から解離する分子設計である。本研究では、適切な反応速度を持つ新たな反応基の開発と、実際のタンパク質の修飾を目的とした。

3. 研究の方法

本研究提案では、タンパク質中に多数存在するリジン残基を二点で認識する新たな反応剤の設計と開発を目的とした。設計した反応剤は、可逆的にリジンと共有結合を形成する2つの反応基が、リンカーを介して連結した構造を持つ (Fig. 1)。2つの官能基が同時に共有結合を形成したときのみ速度論的に反応剤がタンパク質上に残り、異なる位置に結合した反応剤はタンパク質から解離する分子設計である。本研究では、適切な反応速度を持つ新たな反応剤の開発と、実際のタンパク質の修飾を目的とした。申請時にはキノンメチド前駆体とシアノアクリレートを持つ化合物 **1** を設計した。しかし、五員環の開環閉環平衡は閉環方向に大きく偏っており、アミンで修飾することは困難であった。

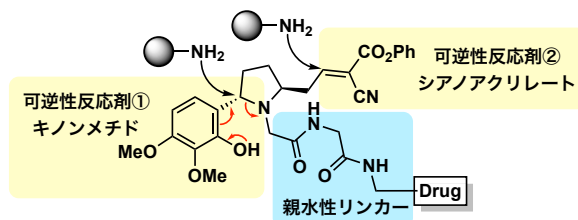


Figure 1. 申請当時の分子設計

そこで、新たな分子設計として、同種の可逆性反応基をリンカーにより連結する分子設計に変更した (Fig. 2)。また、このとき脱離基を「水」とすることで、生体内環境で可逆的に反応する反応基になると考えた。化合物 **1** はベンジルアルコールの水酸基を放出することでキノンメチドを生成する。化合物 **2** は既存の可逆性リジン修飾基である芳香族ポロアルデヒドである。化合物 **3** は、芳香環との共鳴によりイミニウムイオンが安定化されるベンジル-N,O-アセタール構造を持つ。反応基の活性種を変更することで、系統的な反応性のスクリーニングを行う計画である。

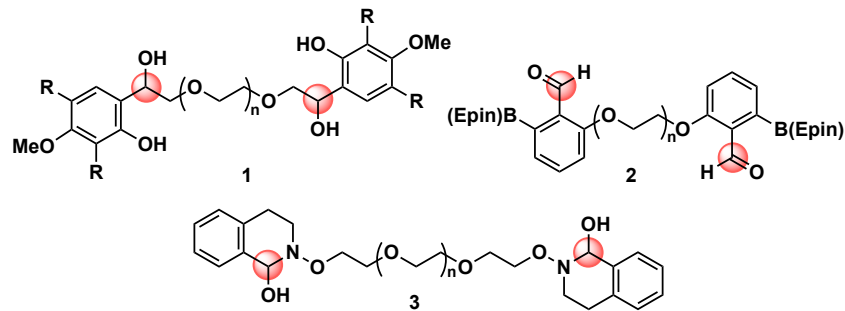


Figure 2. 新たな多点認識型リジン修飾剤の設計

また、いずれの分子もポリエチレングリコールリンカーにより 2 つの反応基が連結しているが、リンカー中心には薬剤などを連結するためのハブ構造が必要である。そこで、多数の水酸基を有する糖類を親水性ハブとして利用することとした (Fig. 3)。最も平易な構造として考えられるのはグリセロールである (化合物 4)。グリセロールには特別な分子認識能はないと考えられるが、例えば α -ガラクトースは細胞表面のタンパク質 (レクチンなど) に認識され、その取り込みを制御している。つまり、糖の連結により、ADC が局在する臓器をコントロールすることができる考えた。この目的のために、我々が得意とする、加水分解酵素で分解しない糖鎖である C-グリコシドを利用することとした (化合物 5)。

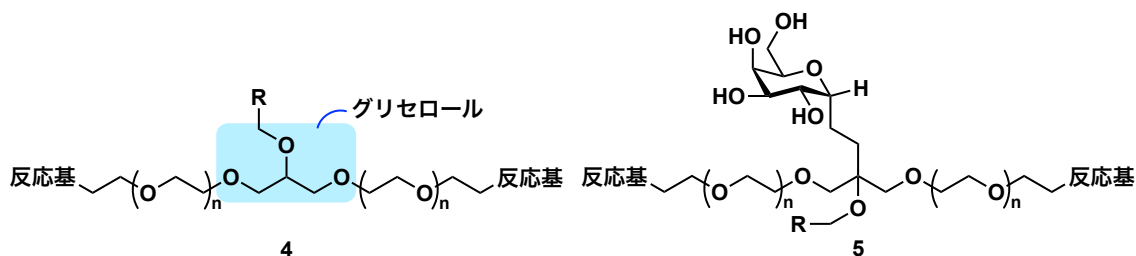


Figure 3. 糖鎖をハブ構造としたリンカーの設計

4. 研究成果

文献既知の手法に従い、フェネチルアミンの窒素原子をアルキル化または酸化し、ヒドロキシルアミンを合成し、*N*-ホルミル化することでベンジル-*N,O*-アセタール構造を構築した (Fig. 4)。今後は、他の反応基も合成し、アミンとの反応性について検証する。

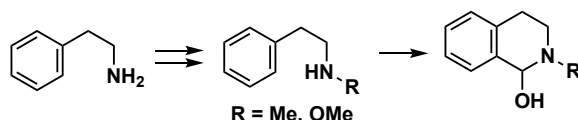


Figure 4. ベンジル-*N,O*-アセタールの合成

アルキル-C-グリコシドを直接的に構築する手法の開発にこれまでに実用的な手法が報告されていなかったため、新たな反応の開発に取り組んだ (Fig. 5)。ビニル-C-グリコシドを合成し、水素添加によりアルキル-C-グリコシドを合成する計画である。実際に、開発したグリコシルボロン酸誘導体およびブロモ糖に対する photoredox カップリング反応により、様々なアリール、ビニル-C-グリコシドが合成可能であった。

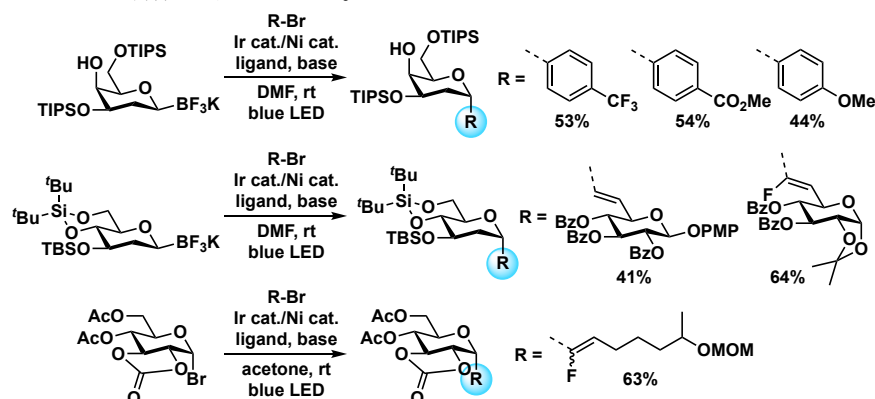


Figure 5. 開発した C-グリコシル化反応による様々なアルキル-C-グリコシドの合成

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 1件）

1. 著者名 Hidaka Yu, Kiya Noriaki, Yoritata Makoto, Usui Kazuteru, Hirai Go	4. 巻 56
2. 論文標題 Synthesis of CH ₂ -linked β -galactosylceramide and its glucose analogues through glycosyl radical-mediated direct C-glycosylation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chemical Communications	6. 最初と最後の頁 4712 ~ 4715
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d0cc00785d	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 Yoritata Makoto	4. 巻 78
2. 論文標題 Quinonemethide in Chemical Biology	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Synthetic Organic Chemistry, Japan	6. 最初と最後の頁 728 ~ 729
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5059/yukigoseikyokaishi.78.728	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Soda Yasuki, Sugiyama Yasukazu, Yoritata Makoto, Tajima Hayato, Shibuya Kana, Ogihara Chisato, Oishi Takeshi, Sato Takaaki, Chida Noritaka	4. 巻 22
2. 論文標題 Unified Total Synthesis of Pentacyclic Stemoamide-type Alkaloids	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Organic Letters	6. 最初と最後の頁 7502 ~ 7507
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.orglett.0c02697	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 Yoritata Makoto, Morita Yuki, Gemander Manuel, Morita Masaki, Yamashita Tomohiro, Sodeoka Mikiko, Hirai Go	4. 巻 22
2. 論文標題 Synthesis of DFGH-Ring Derivatives of Physalins via One-Pot Construction of GH-Ring and Evaluation of Their NF- κ B-Inhibitory Activity	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Organic Letters	6. 最初と最後の頁 8877 ~ 8881
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.orglett.0c03255	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 Takeda Daiki, Yoritake Makoto, Yasutomi Hiroki, Chiba Suzuka, Moriyama Takahiro, Yokoo Atsushi, Usui Kazuteru, Hirai Go	4. 巻 23
2. 論文標題 -Glycosyl Trifluoroborates as Precursors for Direct -C-Glycosylation: Synthesis of 2-Deoxy- -C-glycosides	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Organic Letters	6. 最初と最後の頁 1940 ~ 1944
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.orglett.1c00402	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20件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 木室佑亮、土井 一毅、寄立 麻琴、平井 剛
2. 発表標題 糖鎖分解の基質特性追跡： -グルコシダーゼに対する概念実証
3. 学会等名 第62回天然有機化合物討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 寄立麻琴、日高悠、木谷憲昭、臼井一晃、平井剛
2. 発表標題 代謝安定型Glc-CerおよびGal-Cerアナログの合成研究
3. 学会等名 第30回万有福岡シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 上蘭 慶也、寄立麻琴、平井剛
2. 発表標題 新規シアリダーゼ阻害剤の効率的合成を志向したシアリ酸 3 位修飾法の開発
3. 学会等名 第117回有機合成シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 ○森山貴博、木谷憲昭、小野俊介、寄立誠、加藤直樹、高橋俊二、平井剛
2. 発表標題 新規炭素連結型イソマルトースアナログの合成研究
3. 学会等名 第117回有機合成シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 ○竹田大樹、安富弘樹、千馬鈴華、横尾淳、白井一晃、寄立麻琴、平井剛
2. 発表標題 B-グリコシドの合成とカップリング反応によるC-グリコシドの合成
3. 学会等名 第117回有機合成シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小野俊介、長門石正孝、森山貴博、白井一晃、寄立麻琴、平井剛
2. 発表標題 還元的光クロスカップリング反応を用いたC-グリコシド誘導体の合成研究
3. 学会等名 第117回有機合成シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 ○竹田大樹、安富弘樹、千馬鈴華、横尾淳、白井一晃、寄立麻琴、平井剛
2. 発表標題 グリコシルボロン酸を用いた炭素連結型糖鎖の新規合成法の開発
3. 学会等名 反応と合成の進歩2020特別企画シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yoritata, M.; Morita, Y.; Morita, M; Yamashita, T.; Sodeoka, M.; Hirai, G.
2. 発表標題 Development of New Synthetic Method of the DFGH-ring of Physalin-Type Natural Products and SAR Study of the Pseudo- Natural Products
3. 学会等名 日本化学会第101春季年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 ○竹田大樹、安富弘樹、千馬鈴華、寄立麻琴、平井剛
2. 発表標題 -グリコシルポロン酸を用いた炭素連結型糖鎖の合成
3. 学会等名 日本化学会第101春季年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小野俊介、寄立麻琴、森山貴博、長門石正孝、臼井一晃、平井剛
2. 発表標題 還元的光クロスカップリング反応を用いたKRN7000アナログの合成
3. 学会等名 日本化学会第101春季年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 織田 旺紀、寄立 麻琴、平井 剛
2. 発表標題 ユニークな3次元構造をもつ糖 アミノ酸ハイブリッド骨格の構築
3. 学会等名 日本化学会第101春季年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 ○山口昂太、木室佑亮、寄立麻琴、平井剛
2. 発表標題 2-エキソメチレン型UDP-グルコースの合成研究
3. 学会等名 日本化学会第101春季年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 土井一毅、木室佑亮、寄立麻琴、平井剛
2. 発表標題 基質 - 遷移状態ハイブリッドアナログ型 α -glucosidase阻害剤の開発
3. 学会等名 日本化学会第101春季年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 ○安富弘樹、竹田大樹、千葉鈴華、寄立麻琴、平井剛
2. 発表標題 -グリコシルボロン酸を用いた立体保持型C-グリコシル化の検討
3. 学会等名 日本化学会第101春季年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 ○水井健太、上園慶也、寄立麻琴、平井剛
2. 発表標題 3-エキソメチレンシアル酸誘導体の合成研究
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 寄立 麻琴、森田 友己、森田 昌樹、山下 智大、袖岡 幹子、平井 剛
2. 発表標題 Physalin類が有するDFGH環の新規合成法の開発
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 ○森山貴博、木谷憲昭、小野俊介、寄立誠、加藤直樹、高橋俊二、平井剛
2. 発表標題 コンフォメーション制御を志向したC-グリコシドアナログの開発
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 ○木谷憲昭、寄立麻琴、平井剛
2. 発表標題 C-グリコシドを基盤とした新規二糖アナログの合成と活性研究
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 上園慶也、寄立麻琴、平井剛
2. 発表標題 酸化的カップリング反応を利用したシアル酸3位修飾法の開発
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤井優衣、寄立麻琴、平井剛
2. 発表標題 C-H酸化によるコレステロールの仮想的酸化代謝物ライブラリー構築
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021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
---------	---------