

審 査 の 結 果 の 要 旨

氏 名 関 陽平

関 陽平 は、「有機ラジカルを用いた生体共役反応の開発」というタイトルで、以下の二種類の研究を行った。

1. トリプトファン選択的タンパク質生体

共役反応の開発

化学反応を基盤とするタンパク質改変法の拡張は、未知の生命現象を解明するためのケミカルバイオロジーツールのみに留まらず、その生理機能の人工制御という観点からも重要である。しかしながらリジン・システイン側鎖を主たる変換標的とする従来法は精密応用を見据えた際に様々な問題を抱えている。トリプトファンやチロシンなどの低反応性アミノ酸側鎖を標的とする反応は、これらの問題解決に寄与しうるが、開発難度の高さゆえにこれまで大きな進展を見せていない。

当研究室で開発された Cu/keto-ABNO (3a)/NO<sub>x</sub>/O<sub>2</sub>系を用いたセリン選択的タンパク質切断反応の開発過程において、トリプトファン含有ペプチドを基質とした際、副生成物としてペプチドへの 3a 付加生成物が相当量得られることを見出した。このセレンディピティ的発見を元に、関はトリプトファン選択的生体共役反応の開発に取り組み、これを達成した。

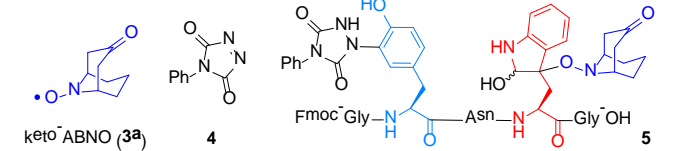
モデルペプチド基質 (Fmoc-Gly-Ser-Asn-Trp-Gly-OH: 1a)を用いて

反応条件の最適化を行った結果、3a/NaNO<sub>2</sub>/AcOH 系を用いた際にトリプトファン選択的に 3a の付加反応が起こり、ペプチドおよびタンパク質付加体 2a-2q が高収率にて得られることを見いだした(Table1, 2)。3a のケトン基を足がかりに蛍光団、ビオチン、抗ガン剤などを担持した試薬を創製し、それらをタンパク質にトリプトファン選択的に結合できることも実証した。付加体の原子構造はリゾチーム反応物の X 線結晶構造解析を行なうことで明らかとし、この場合では主な修飾位置が Trp62 であることも突き止めた。反応前後でタンパク質の三次元構造に大きな差が生じないこと、溶媒接触度の高いトリプトファンが優先的に反応していることから、本反応はタンパク質の主鎖構造に影響を与えず進行することが示唆された。

本系を用いることで、抗原認識能を保持した抗アミロイドβ(Aβ)抗体-蛍光分子複合体の合成が可能

Table 1<sup>a</sup> Transition metal-free Trp-selective bioconjugation of peptides

Entry	Substrate	Yield [%]
1 <sup>a</sup>	Fmoc-Gly-Ser-Asn-Trp-Gly-OH (1a)	95
2 <sup>a</sup>	Fmoc-Gly-Lys-Asn-Trp-Gly-OH (1b)	85
3 <sup>a</sup>	Fmoc-Gly-His-Asn-Trp-Gly-OH (1c)	90
4 <sup>a</sup>	Fmoc-Gly-Tyr-Asn-Trp-Gly-OH (1d)	95
5 <sup>a</sup>	Fmoc-Gly-Met-Asn-Trp-Gly-OH (1e)	96
6 <sup>a</sup>	Fmoc-Cys-Gly-Trp-Arg-Ala-Cys-Gly-OH (1f)	84
7 <sup>b</sup>	Neurotrophin B: Ala-Asn-Leu-Trp-Ala-Thr-Gly-His-Phe-Met-NH <sub>2</sub> (1g)	84
8 <sup>b</sup>	LH-RH: Tyr-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH <sub>2</sub> (1h)	91
9 <sup>b</sup>	DSIP: Trp-Ala-Gly-Gly-Asp-Ala-Ser-Gly-Glu-OH (1i)	84
10 <sup>b</sup>	Kisspeptin 10: Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg-Phe-NH <sub>2</sub> (1j)	83
11 <sup>c</sup>	N-Ac-Trp-(26-O-acyl-isoAβ <sub>1-42</sub> )-OH (1k)	ND <sup>f</sup>
12 <sup>d</sup>	Fmoc-Gly-Tyr-Asn-Trp-Gly-OH (1d)	54 <sup>g</sup>
13 <sup>e</sup>	Fmoc-Gly-Tyr-Asn-Trp-Gly-OH (1d)	52 <sup>g</sup>



[a] CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O/AcOH (500/500/1) was used as the solvent. HPLC yield was combined yield of 2 and dehydrated 2 based on the starting peptide. [b] H<sub>2</sub>O/AcOH (1000/1) was used as the solvent. HPLC yield was determined at 250 nm absorbance. [c] 1 in CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O/AcOH (333/333/1), 3a (1.5 equiv) and NaNO<sub>2</sub> (0.9 equiv) were used. [d] A one pot sequential double modification protocol for Trp and Tyr (ref. 6) was applied to generate 5. [e] The modification sequence was reversed from entry 12 to generate 5. [f] ESI-MS and HPLC analyses suggested almost quantitative conversion from 1k to 2k. The yield was not determined (ND) on account of the aggregation of 2k. [g] HPLC yield of 5 after two steps.

であり、A $\beta$ を蛍光検出可能な抗体を作成することにも成功した。この成果は次世代医薬として有望視される抗体-薬物複合体の新規製造法としての展開も期待できる。さらに、透析アミロイドシスの病因とされ、高い凝集性を有する $\beta_2$ -ミクログロブリンに本反応を付すとその凝集抑制効果が見られた。

以上の成果は、毒性が懸念される重金属を用いることなくトリプトファン選択的にタンパク質を修飾可能であり、かつタンパク質の高次構造を維持したまま実施可能な条件としては世界初の事例である。また、医薬や疾患に関連するタンパク質の機能改変を通じた病態治療への応用が期待できる一歩としても意義深い。本研究は世界的にも高く評価され、関を第一著者とする原著論文はアメリカ化学会誌に受理された (Seki, Y.; Ishiyama, T.; Sasaki, D.; Abe, J.; Sohma, Y.; Oisaki, K.; Kanai, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, 138, 10798-10801)。

## 2. チロシン選択的タンパク質生体共役反応の開発

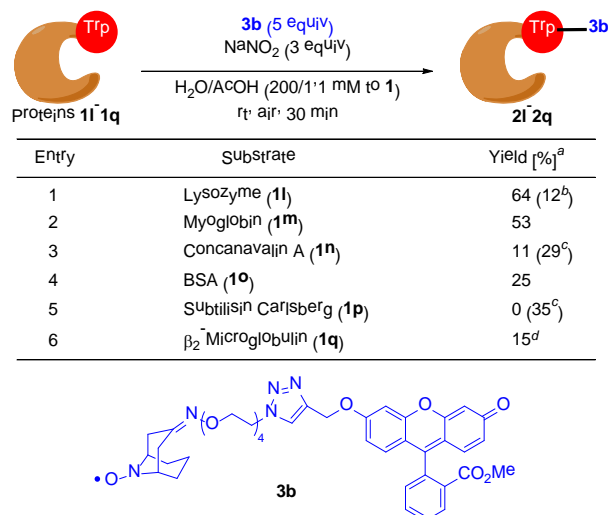
立体的に嵩高いオキシムの一電子酸化から生じるイミノキシルラジカルは、プロトン性極性溶媒中でも安定なラジカル種として存在する。*p*-クレゾールのパラ位にイミノキシルラジカルが酸化的付加する反応例が報告されているものの、本化学種の合成的活用例はこれまでほとんど存在しない。関はイミノキシルラジカル構造展開により、チロシン側鎖（フェノール）を標的とした生体共役反応の開発に取り組んだ。

モデル基質 (Fmoc-Gly-Tyr-Asn-Trp-Gly-OH: **1d**)を用いてオキシムの構造最適化を行った結果、親水性置換基を有し、反応中心であるオキシム周りの立体障害が大きいオキシム(**8**)が最良の結果を与えた。

**8**/CAN 系をアセトニトリル/水混合溶媒系にて種々のペプチドに適用したところ、チロシン選択的に **8** の付加反応が起こり、**7a-7g** が位置選択的に得られた (Table 3)。さらに、本系をリゾチームに適用したところ、**8** の付加生成物が確認された。現在は有機共溶媒の使用撤廃とさらなる高反応性の実現を目指し、試薬構造の改変を共同研究者とともに進めている。

以上の業績は、広汎な人工的構造改変が現在でも困難を極めるタンパク質の構造多様性・機能・応用性を根底から拡張することに寄与するものである。博士（薬科学）の学位論文として合格と認められる。

Table 2. Transition metal-free Trp-selective bioconjugation of proteins



[a] Assuming that the product was the mono-**3b** adduct, the yield was calculated from the fluorescence intensity of SDS-PAGE bands based on a calibration curve. [b] **11** in H<sub>2</sub>O/AcOH (1000/1), **3b** (1 equiv), and NaNO<sub>2</sub> (0.6 equiv) were used. [c] 0.1 M aqueous HCl was used as the solvent. [d] H<sub>2</sub>O/AcOH (2000/1; 0.1 mM with respect to **1**) was used as the solvent.

Table 3. Tyr-selective bioconjugation of peptides

Entry	Substrate	X	Yield [%]
1 <sup>a</sup>	Fmoc-Gly-Tyr-Asn-Trp-Gly-OH ( <b>1d</b> )	3	78
2 <sup>a</sup>	Fmoc-Gly-Lys-Asn-Tyr-Gly-OH ( <b>6a</b> )	10	75
3 <sup>a</sup>	Fmoc-Gly-His-Asn-Tyr-Gly-OH ( <b>6b</b> )	10	75
4 <sup>a</sup>	Fmoc-Gly-Met-Asn-Tyr-Gly-OH ( <b>6c</b> )	3	74
5 <sup>a</sup>	Fmoc-Gly-Cys-Asn-Tyr-Gly-OH ( <b>6e</b> )	3	48
6 <sup>a</sup>	Fmoc-Gly-Ser-Asn-Tyr-Gly-OH ( <b>6f</b> )	10	74
7	(26-O-acyl-isoA $\beta$ <sub>1-42</sub> )-OH ( <b>6g</b> )	10	ND <sup>b</sup>

[a] Yields were calculated from the absorbance at 301 nm (the maximum absorbance of Fmoc group) using LC-MS analysis. [b] ESI-MS and HPLC analyses suggested quite high conversion from **6g** to **7g**. The yield was not determined (ND) on account of the aggregation of **7g**.