

博士論文（要約）

有機ラジカルを用いた生体共役反応の開発

関 陽平

## 【背景】

化学的手法（人工触媒あるいは反応促進剤）によ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。また、抗体に小分子医薬を結合させて機能向上を図った抗体—薬物複合体に代表される「化学修飾型タンパク質製剤」が次世代型医薬群として現在有望視されており、その進展にも寄与することが期待される。化学修飾によって得られるタンパクの機能・応用をより精密なものとするためには、化学修飾法の精度を高めることが鍵となる。しかしながら、タンパク質には類似性が高い官能基が多数含まれるため、それらを区別しつつ修飾数と修飾位置を制御して化学修飾を行える手法、つまり「化学選択的なタンパク質修飾反応の開発」は、依然として挑戦的なテーマである。

生体内在官能基を標的とする生体共役反応としては、リジンのアミノ基、システインのチオール基などの高反応性側鎖を標的とした反応が従来より広く用いられてきた<sup>1</sup>。しかしながら、リジン法ではタンパク質表面の反応点が多く修飾数と修飾位置の制御が困難であり均質性の低い混合修飾体を与えてしまう点、システイン法ではチオール基を露出させるジスルフィド結合還元過程でタンパク質の高次構造に影響を与えてタンパク機能を損ないうる点で問題がある(Scheme 1)。

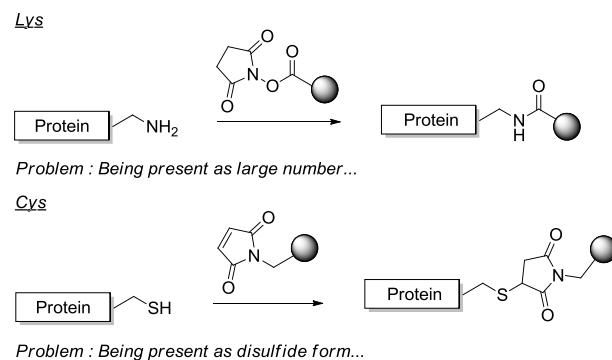
一方で、タンパク質表面の露出が少數に留まるトリプトファンやチロシンなどの低反応性アミノ酸残基を標的とする反応は、これらの問題解決に寄与しうる。しかしながら、これらのアミノ酸は側鎖の反応性が乏しいために、既報の変換例ではしばしば有毒な重金属触媒や非生体適合の激しい条件を必要とする<sup>1</sup>。また、両残基それぞれが有する電子豊富芳香環側鎖（インドールとフェノール）を区別しての選択性反応は現在でも困難である。そこで私は、有機ラジカル種が有する特異な反応性・高い官能基許容性・水系溶媒への耐性に着目し、この問題解決を目指すことにした。

## 【結果】

### トリプトファン選択性生体共役反応の開発<sup>2</sup>

本学修士課程において、私は、配位性官能基存在下・水系溶媒でも反応が進行する Cu/keto-ABNO (3a)<sup>3</sup>/NO<sub>x</sub>/O<sub>2</sub> 系を用いた、実用的かつ一般性の高いセリン選択性のタンパク質切断反応の確立に成功した<sup>4,5</sup>。本研究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時、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ていた。反応系が比較的綺麗であったこと、3a のカルボニル部位は試薬誘導化の足がかりとして有効であることなどから、本反応に基づくトリプトファン選択性生体共役反応の開発に着手した。

Scheme 1. Conventional bioconjugation targeting Lys and Cys

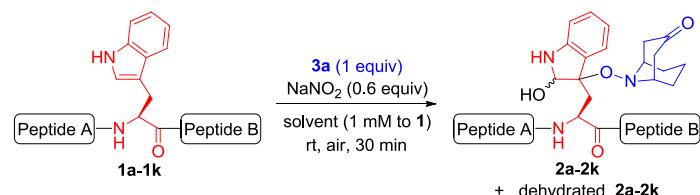


モデル基質(Fmoc-Gly-Ser-Asn-Trp-Gly-OH: **1a**)を用いて反応条件の最適化を行った結果、重金属を用いることなく **3a** 付加生成物(**2a**)生成物が高収率にて得られる条件を確立した(Table 1, entry 1)。

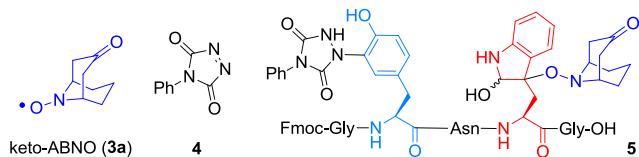
この **3a**/NaNO<sub>2</sub>/AcOH 系を種々のペプチドに適用したところ、トリプトファン選択的に **3a** の付加反応が起こり、**2a-2k** が高収率にて得られた(Table 1, entry 1-11)。交差反応性が懸念される官能基を含む様々なペンタペプチド(**1a-1f**)、生理活性ペプチド(**1g-1j**)、また、N 末端にトリプトファンを導入したアミロイドβペプチド(Aβ, 一次配列にトリプトファンを含まない)前駆体(**1k**)にも適用可能であった。さらに、本反応と既報のチロシン選択的反応<sup>6</sup>との直交性も確認された(Table 1, entry 12-13)。

続いて、**3a** のケトン基を足がかりに蛍光団を付与した **3b** を用い、本系を種々の天然タンパク質に適用したところ、**2l-2q** が同様に得られた(Table 2, entry 1-6)。そして、リゾチーム-**3a** 付加体(**2l'**)の結晶化および X 線結晶構造解析に成功し、その主な修飾位置が Trp62 であることが確認された(figure 1)。**1l** と **2l'** の三次元構造に大きな差がないこと、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ることなく進行することが示唆された。また、本系を用いることで抗原認識能を保持した抗 Aβ 抗体(6E10)-**3b** 複合体の合成が可能であり、Aβ の蛍光検出が可能であった。さらに、透析アミロイドーシスの病因とされ、高い凝集性を有する **1q** に本反応を付

**Table 1.** Transition metal-free Trp-selective bioconjugation of peptides

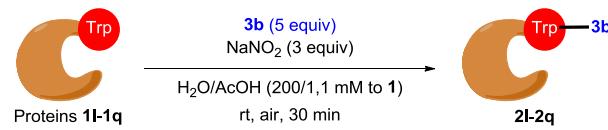


Entry	Substrate	Yield [%]
1 <sup>a</sup>	Fmoc-Gly-Ser-Asn-Trp-Gly-OH ( <b>1a</b> )	95
2 <sup>a</sup>	Fmoc-Gly-Lys-Asn-Trp-Gly-OH ( <b>1b</b> )	85
3 <sup>a</sup>	Fmoc-Gly-His-Asn-Trp-Gly-OH ( <b>1c</b> )	90
4 <sup>a</sup>	Fmoc-Gly-Tyr-Asn-Trp-Gly-OH ( <b>1d</b> )	95
5 <sup>a</sup>	Fmoc-Gly-Met-Asn-Trp-Gly-OH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

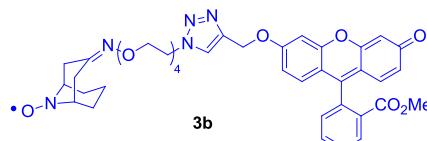


[a] CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O/AcOH (500/500/1) was used as the solvent. HPLC yield was combined yield of **2** and dehydrated **2** based on the starting peptide, determined at 301 nm absorbance derived from the Fmoc group. [b] H<sub>2</sub>O/AcOH (1000/1) was used as the solvent. HPLC yield was 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.

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



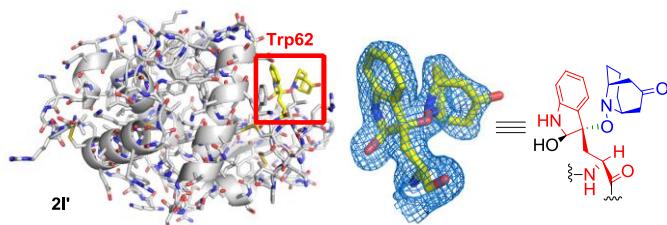
Entry	Substrate	Yield [%] <sup>a</sup>
1	Lysozyme ( <b>1l</b> )	64 (12 <sup>b</sup> )
2	Myoglobin ( <b>1m</b> )	53
3	Concanavalin A ( <b>1n</b> )	11 (29 <sup>c</sup> )
4	BSA ( <b>1o</b> )	25
5	Subtilisin Carlsberg ( <b>1p</b> )	0 (35 <sup>c</sup> )
6	β <sub>2</sub> -Microglobulin ( <b>1q</b> )	15 <sup>d</sup>



[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] **1l** 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.

すとその凝集抑制効果が見られた。これは疾患に関わるタンパク質を人工的に改変し、機能改変を通じた病態治療への応用を見据えた研究の一歩としても意義深い成果である。

**Figure 1.** The crystal structure of **2I'** and the 2Fo-Fc electron density map (contoured at the 0.7 σ level) of **3a**-conjugated Trp62 in **2I'**



### チロシン選択性的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リラジカルは、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リ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<sup>7</sup>、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。私はイミノキシリラジカルの構造展開により、官能基密集型化合物であるタンパク質の変換も可能になると想え、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着手した。

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(**9**)が最良の結果を与えた。

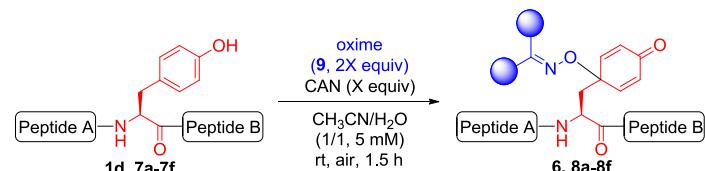
**9/CAN**系をアセトニトリル/水混合溶媒系にて種々のペプチドに適用したところ、チロシン選択的に**9**の付加反応が起こり、**6, 8a-8f**が位置選択的に得られた(**Table 3, entry 1-7**)。交差反応性が懸念される官能基を含む様々なペントapeptid (**1d, 7a-7e**)およびAβ前駆体(**7f**, 一次配列にチロシンを1つ含む)に適用可能であった。さらに、本系をリゾチーム(**1I**)に適用したところ、**9**の付加生成物が確認された。

今後は、種々の天然タンパク質への適用を見据え、水溶媒のみで実施可能な条件を目指したオキシムの構造展開を進めていく予定である。

### 【参考文献】

- (1) Koniev, O.; Wagner, A. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 5495-5551. (2) Seki, Y.; Ishiyama, T.; Sasaki, D.; Abe, J.; Sohma, Y.; Oisaki, K.; Kanai, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 10798-10801. (3) Sonobe, T.; Oisaki, K.; Kanai, M. *Chem. Sci.* **2012**, *3*, 3249-3255. (4) Seki, Y.; Tanabe, K.; Sasaki, D.; Sohma, Y.; Oisaki, K.; Kanai, M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 6501-6505. (5) Seki, Y.; Oisaki, K.; Kanai, M. *Tetrahedron Lett.* **2014**, *55*, 3738-3746. (6) Ban, H.; Gavrilyuk, J.; Barbas, C. F., III. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 1523-1525. (7) Ngo, M.; Larson, K. R.; Mendenhall, G. D. *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 5390-5393.

**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>7a</b> )	10	75
3 <sup>a</sup>	Fmoc-Gly-His-Asn-Tyr-Gly-OH ( <b>7b</b> )	10	75
4 <sup>a</sup>	Fmoc-Gly-Met-Asn-Tyr-Gly-OH ( <b>7c</b> )	3	74
5 <sup>a</sup>	Fmoc-Gly-Cys-Asn-Tyr-Gly-OH ( <b>7d</b> )	3	48
6 <sup>a</sup>	Fmoc-Gly-Ser-Asn-Tyr-Gly-OH ( <b>7e</b> )	10	74
7	(26-O-acyl-IsoAβ <sub>1-42</sub> )-OH ( <b>7f</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 **7f** to **8f**. The yield was not determined (ND) on account of the aggregation of **8f**.