

Title	ボロン酸を用いるクロスカップリング反応を基盤としたタンパク質化学修飾法の開発
Sub Title	Development of metal-mediated cross-coupling reactions for protein modification
Author	花屋, 賢悟(Hanaya, Kengo)
Publisher	
Publication year	2021
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2020.)
JaLC DOI	
Abstract	<p>ペプチドやタンパク質は約20種類のアミノ酸が連結してできたポリマーである。本研究では、銅イオンを利用したクロスカップリング反応でチロシン残基に人工分子を結合する手法（化学修飾法）を開発した。しかし反応条件は過酷でタンパク質中のチロシン残基の化学修飾には応用できなかった。</p> <p>上記研究と並行して、申請者が以前報告したシステインの化学修飾法を基にニッケルイオンを用いて炭素-硫黄結合を形成する有機合成反応を開発した。弱塩基性、空气中、室温という温和な条件で種々のスルフィドが合成できた。</p> <p>A peptide and a protein are polymers consisting of ca. 20 kinds of natural amino acids. In this study, we have developed the reaction for incorporating an artificial molecule to tyrosine (chemical modification method) by the cross-coupling reaction using copper ions. However, the optimized reaction conditions were harsh to apply to the chemical modification of tyrosine residues in proteins.</p> <p>In parallel with the above research, we developed Ni(II)-mediated C-S cross-coupling based on the chemical modification method of cysteine previously reported. The reaction offers an extremely mild and operationally convenient method to access a wide variety of alkyl aryl sulfides and diaryl sulfides without using expensive transition metals nor specialized and expensive ligands.</p>
Notes	研究種目：若手研究 研究期間：2019～2020 課題番号：19K16321 研究分野：有機化学
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_19K16321seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16321

研究課題名（和文）ボロン酸を用いるクロスカップリング反応を基盤としたタンパク質化学修飾法の開発

研究課題名（英文）Development of metal-mediated cross-coupling reactions for protein modification

研究代表者

花屋 賢悟（Kengo, Hanaya）

慶應義塾大学・薬学部（芝共立）・講師

研究者番号：50637262

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）：ペプチドやタンパク質は約20種類のアミノ酸が連結してできたポリマーである。本研究では、銅イオンを利用したクロスカップリング反応でチロシン残基に人工分子を結合する手法（化学修飾法）を開発した。しかし反応条件は過酷でタンパク質中のチロシン残基の化学修飾には応用できなかった。上記研究と並行して、申請者が以前報告したシステインの化学修飾法を基にニッケルイオンを用いて炭素-硫黄結合を形成する有機合成反応を開発した。弱塩基性、空气中、室温という温和な条件で種々のスルフィドが合成できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ペプチドやタンパク質は多数のアミノ酸が連結してできたポリマーである。同じアミノ酸が複数含まれるだけでなく、似た性質のアミノ酸も存在するため、特定の箇所のみ人工分子を結合させること（化学修飾）は難しい。化学修飾は、化学や生物の基礎研究だけでなく、創薬など産業的にも広く利用されている。これまで、システインが化学修飾に利用されてきたが、システインを含有しない場合、他のアミノ酸を化学修飾する必要がある。本研究成果は反応条件の改善が必要ではあるものの、チロシンを化学修飾する手法として有望である。

研究成果の概要（英文）：A peptide and a protein are polymers consisting of ca. 20 kinds of natural amino acids. In this study, we have developed the reaction for incorporating an artificial molecule to tyrosine (chemical modification method) by the cross-coupling reaction using copper ions. However, the optimized reaction conditions were harsh to apply to the chemical modification of tyrosine residues in proteins. In parallel with the above research, we developed Ni(II)-mediated C-S cross-coupling based on the chemical modification method of cysteine previously reported. The reaction offers an extremely mild and operationally convenient method to access a wide variety of alkyl aryl sulfides and diaryl sulfides without using expensive transition metals nor specialized and expensive ligands.

研究分野：有機化学

キーワード：ペプチド タンパク質 化学修飾 クロスカップリング ボロン酸 銅 ニッケル

1. 研究開始当初の背景

タンパク質を有効成分とするバイオ医薬品は、従来の低分子医薬品では十分に解決できなかった疾患への効果が期待されている。近年、バイオ医薬品の有効性や効果の持続性を高めるために、タンパク質の表面に薬物分子やポリエチレングリコール (PEG) 鎖などの有機化合物を結合した機能性バイオ医薬品の開発研究が盛んである。その際、機能性バイオ医薬品の品質の均一性を担保するために、タンパク質の特定のアミノ酸残基上に有機化合物を選択的に結合させる技術 (化学修飾) が欠かせない。しかし、タンパク質は約 20 種類のアミノ酸が連結してできた巨大分子で、その構造中には似た性質を示す官能基をもつアミノ酸が多数配置されている。そのため、特定のアミノ酸残基の選択的な化学修飾は本質的に難しい。その上、化学修飾反応は、通常、タンパク質が変性しないよう室温～50℃、pH5～9 程度の水溶液中、有機合成よりも 100～1000 倍程度低い濃度 (サブ mM) で実施するため、利用できる反応または試薬が限定される。

特定の官能基を有する二つの有機化合物を結合させる反応を「クロスカップリング反応」と呼ぶ。遷移金属触媒を用いたクロスカップリング反応は、一般に官能基選択性が高く、水溶液中で進行するため、タンパク質中の特定のアミノ酸の選択的化學修飾法として注目されている。遷移金属触媒は、既存のタンパク質化學修飾試薬に不活性であった官能基の化學修飾を可能にする と期待される。貴金属 (パラジウム、金) の有機金属試薬を用いたクロスカップリング反応によるタンパク質の化學修飾が数例報告されていたが、有機金属試薬を特殊な条件下 (無水、無酸素) で調製しなければならないことが応用上の制約になっていた。したがって、特殊な操作、試薬が不要なカップリング反応によるタンパク質の化學修飾法の開発は、ケミカルバイオロジーの基礎研究のみならずバイオ医薬品の創製研究の進展に必要であった。

2. 研究の目的

本研究では、ボロン酸を用いるクロスカップリング反応を基盤としたタンパク質の化學修飾法を開発することを目的とした。ボロン酸 (構造式: $R-B(OH)_2$) は 1000 種類以上の誘導体が市販されており、一般に水溶性が高く、タンパク質の化學修飾試薬として適していると考えた (図 1)。ボロン酸と銅やニッケルを用いて炭素-ヘテロ原子結合形成するクロスカップリング反応は、Chan-Lam カップリングと呼ばれている。これまでに有機合成の分野で、アミン、チオール、アミド、フェノール、イミダゾール、インドールなど、さまざまな官能基のアリール化またはアルキル化が報告されている。反応は室温、空気中で進行し、水を溶媒として用いる例も報告されている。以上の特徴からタンパク質の化學修飾反応への応用が期待される。申請者は、*o*-ニトロフェニルボロン酸とニッケルを用いたシステイン選択的 *S*-アリール化を発見した。反応溶液の pH を変化させて同様の反応を行うと、ヒスチジンに隣接したピログルタミンのアミド N-H がアリール化された。申請者は、各種試薬の組み合わせ、および反応条件をさらに変更することにより他のアミノ酸の化學修飾にも応用できると考えた。

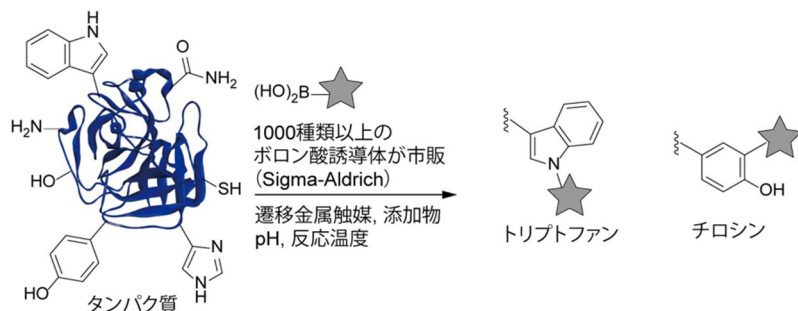


図1. 本研究の目的: ボロン酸を用いるクロスカップリング反応を基盤としたタンパク質の化學修飾法の開発

3. 研究の方法

本研究では、以下の(1)～(3)の研究を行った。

(1) ボロン酸と銅イオンから生じるラジカル分子を利用したクロスカップリングによるチロシンの化學修飾

ボロン酸から効率的にラジカル分子を発生させるには銅イオンと相互作用する部分構造が必要であると考え、分子内にアミノ基を有するボロン酸を複数設計した。これらのボロン酸を銅イオン存在下、種々のペプチドに作用させ、その反応液を HPLC および MALDI-TOF MS で分析、評価した。反応温度、反応 pH、緩衝液の成分などの反応条件を検討した。

(2) 光触媒存在下、ボロン酸に光照射すると生じるラジカル分子を利用したトリプトファンの化學修飾

ペプチド、ボロン酸、光触媒であるイリジウム錯体の混合溶液に光照射し、その反応液を HPLC および MALDI TOF-MS で分析、評価した。光照射時間、反応溶液の組成、ボロン酸の構造など様々に変更し、反応を試みた。

(3) 生体分子の化学修飾反応を基にした C-S カップリング反応の開発

申請者がシステインの化学修飾で見出したニッケルを用いた S-アリアル化を、一般的な有機合成へ応用すべく、反応条件（試薬、溶媒、温度、反応時間）を検討した。最適化した反応条件で、種々のチオールとボロン酸の C-S カップリングを試みた。

4. 研究成果

(1) ボロン酸と銅イオンから生じるラジカル分子を利用したクロスカップリングによるチロシンの化学修飾

分子内にアミノ基を有するボロン酸を複数合成した。これらを銅イオン存在下、pH 10 のホウ酸緩衝液中、75 °C でペプチドと反応させると、化学修飾されたペプチドが得られた。これより低温では反応は進行しなかった。銅イオンの代わりに亜鉛イオンを用いた場合にも、同様に化学修飾されたペプチドが観測されたことから、ラジカル反応ではない反応機構の存在も示唆された。実験に用いた複数種のペプチドのアミノ酸配列の比較から、当初期待した通り、チロシンが化学修飾されたと結論した。しかし、化学修飾の様式については明らかにできなかった。

遷移金属イオンとして亜鉛イオンを用いて pH 10、75 °C で、アジド基を導入したボロン酸を用いてチロシン含有ペプチドを化学修飾した。その後、アジドとアルキンの特異的な反応（クリックケミストリー）を利用して、ピオチンラベルしたペプチドの創製に成功した。反応条件の過酷さゆえに、タンパク質の化学修飾には応用できなかった。

(2) 光触媒存在下、ボロン酸に光照射すると生じるラジカル分子を利用したトリプトファンの化学修飾

より温和な反応条件で進行する化学修飾を検討すべく、光触媒に注目した。室温下、紫外または可視光照射により励起されると、共存する有機化合物を酸化または還元しフリーラジカルが発生する。ペプチド、ボロン酸、光触媒であるイリジウム錯体の混合溶液に光照射すると、ボロン酸が分解してフリーラジカルが発生し、トリプトファンの側鎖インドール環と反応することを期待した。しかし、光照射するとボロン酸の有無にかかわらずペプチドが分解してしまい、生成物は得られなかった。

(1)、(2) で検討した反応はタンパク質の化学修飾に応用できなかったが、研究の過程である種のアルデヒドと金属イオンを作用させるとペプチドの特定の箇所が化学修飾されることを見出した。現在、この反応について研究を進めている。

(3) 生体分子の化学修飾反応を基にした C-S カップリング反応の開発

反応条件を種々検討した結果、アセトニトリルと DMF の混合溶媒中、塩化ニッケルを用いると空气中、室温、弱塩基性条件下、アリアルボロン酸とアルキルまたはアリアルチオールの C-S カップリングが進行することを明らかにした。反応溶媒中、塩化ニッケルから速やかに生成する $[\text{NiCl}_2(\text{DMF})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ が活性前駆体であった。アリアルボロン酸は o-位に配位性の電子求引性置換基が必要であった一方、チオールについてはエステルやニトリルなど種々の官能基を有するアルキル、アリアルチオール適用可能であった。

「1. 研究開始当初の背景」で述べたとおり、ペプチドやタンパク質上には多くの官能基が密集している。そのため、これらは温和な条件下、化学選択性が高い反応の開発に最適なプラットフォームとなりうる。本研究成果はそれを示す良い例である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Hanaya Kengo, Ohtsu Hiroyoshi, Kawano Masaki, Higashibayashi Shuhei, Sugai Takeshi	4. 巻 10
2. 論文標題 Nickel(II) Mediated C-S Cross Coupling Between Thiols and ortho Substituted Arylboronic Acid	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Asian Journal of Organic Chemistry	6. 最初と最後の頁 582 ~ 587
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/ajoc.202000724	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 Kengo Hanaya, Mary K. Miller, Jun Ohata, Alicia E. Mangubat-Medina, and Zachary T. Ball
2. 発表標題 Nickel(II)-mediated rapid protein modification with arylboronic acid
3. 学会等名 15th International Symposium on Applied Bioinorganic Chemistry (ISABC15) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hiroyuki Deguchi, Kengo Hanaya, Takeshi Sugai, Shuhei Higashibayashi,
2. 発表標題 Synthetic study on tetrapetalne A by a intramolecular oxidative phenol-alkene coupling reaction
3. 学会等名 日本化学会第100春季年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中原正貴, 花屋賢悟, 須貝威, 東林修平
2. 発表標題 3-カルバモイル-2,4-ジニトロフェニルピリジニウムのDiels-Alder反応に関する計算化学的考察
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
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
---------	---------