

|                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
|------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title            | 一時的配向基を用いた遷移金属触媒反応によるタンパク質ペプチド結合の化学修飾                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| Sub Title        | Chemical modification of polypeptides via metal-mediated reaction                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| Author           | 花屋, 賢悟(Hanaya, Kengo)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| Publisher        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| Publication year | 2024                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| Jtitle           | 科学研究費補助金研究成果報告書 (2023. )                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| JaLC DOI         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| Abstract         | <p>創薬などの分野で、タンパク質の中の特定の位置のアミノ酸に薬物などの人工分子を結合する方法（化学修飾法）が必要とされている。本研究では、タンパク質のN末端アミノ酸のアミノ基を利用して、その近傍のアミノ酸を化学修飾する手法の開発を目指した。研究の結果、銅イオンを用いるアルドール反応を活用した、タンパク質のN末端アミノ酸の化学修飾法を新たに開発した。本法は、抗体-薬物複合体の調製にも応用可能であった。</p> <p>Bioconjugation reactions that enable the incorporation of artificial molecules, such as drugs, into specific amino acids within proteins have been continuously developed to fulfill the growing demand for applications in both industrial settings and fundamental chemical biology research. This study aimed to develop a method for chemically modifying neighboring amino acids using the N-terminal amino group of the protein. As a result of the research, a new chemical modification method for N-terminal amino acids of proteins utilizing a copper ion-mediated aldol reaction was successfully developed. This method was applicable to the preparation of antibody-drug conjugates.</p> |
| Notes            | 研究種目：基盤研究 (C) (一般)<br>研究期間：2021～2023<br>課題番号：21K06482<br>研究分野：有機化学                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| Genre            | Research Paper                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| URL              | <a href="https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_21K06482seika">https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_21K06482seika</a>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |

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 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：3 2 6 1 2

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：2 1 K 0 6 4 8 2

研究課題名（和文）一時的配向基を用いた遷移金属触媒反応によるタンパク質ペプチド結合の化学修飾

研究課題名（英文）Chemical modification of polypeptides via metal-mediated reaction

研究代表者

花屋 賢悟（Hanaya, Kengo）

慶應義塾大学・薬学部（芝共立）・講師

研究者番号：5 0 6 3 7 2 6 2

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）：創薬などの分野で、タンパク質の中の特定の位置のアミノ酸に薬物などの人工分子を結合する方法（化学修飾法）が必要とされている。本研究では、タンパク質のN末端アミノ酸のアミノ基を利用して、その近傍のアミノ酸を化学修飾する手法の開発を目指した。研究の結果、銅イオンを用いるアルドール反応を活用した、タンパク質のN末端アミノ酸の化学修飾法を新たに開発した。本法は、抗体-薬物複合体の調製にも応用可能であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、タンパク質中のシステインを標的にした化学修飾法が広く利用されている。しかし、この手法は対象のタンパク質がシステインを持たない場合に適用できない。逆に、同一アミノ酸を複数個含む場合、特定の1箇所のみを化学修飾するのは困難である。一方、N末端アミノ酸はタンパク質に必ず1箇所存在する。そのため、本研究で開発したN末端アミノ酸の化学修飾法は、広範なタンパク質の化学修飾に応用できる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Bioconjugation reactions that enable the incorporation of artificial molecules, such as drugs, into specific amino acids within proteins have been continuously developed to fulfill the growing demand for applications in both industrial settings and fundamental chemical biology research. This study aimed to develop a method for chemically modifying neighboring amino acids using the N-terminal amino group of the protein. As a result of the research, a new chemical modification method for N-terminal amino acids of proteins utilizing a copper ion-mediated aldol reaction was successfully developed. This method was applicable to the preparation of antibody-drug conjugates.

研究分野：有機化学

キーワード：化学修飾 N末端アミノ酸 タンパク質 アルドール反応 銅イオン

## 1. 研究開始当初の背景

抗体—薬物複合体などのバイオ医薬品創薬やケミカルバイオロジーの基礎研究において、薬物や蛍光分子などの人工分子をタンパク質の特定の位置に選択的に結合する技術（化学修飾法）が欠かせない。化学修飾法に用いる有機反応は、水溶液中、温和な反応条件（4-50℃、pH5-9程度、など）下で進行することが求められる。2000年以降、化学修飾法の研究は進展し、システイン、チロシン、トリプトファン、メチオニンなどの特徴的な反応性を利用した付加反応、酸化還元反応などによる化学修飾が報告された。しかし、これらの手法は対象のタンパク質が上記アミノ酸を持たない場合には適用できない。逆に、同一アミノ酸を複数個含む場合、特定の1箇所のみを化学修飾するのは困難である。これらの問題を解決する手法として、各タンパク質に必ず1箇所存在するN末端アミノ基を標的とした化学修飾が考えられる。しかし、タンパク質中のリシン残基も同じくアミノ基を有するため、それらとの区別が必要である。申請者は、N末端にイミン形成を介して一時的に結合した配向基と遷移金属の錯体形成を利用したカップリング反応で、N末端アミノ酸と隣のアミノ酸の間のペプチド結合を選択的に化学修飾できれば、上記問題を解決できると考えた。

## 2. 研究の目的

本研究では、ペプチド、タンパク質のアミノ酸配列に依らず立体構造を保持したまま、N末端アミノ酸と隣のアミノ酸の間のペプチド結合を化学修飾する方法の開発を目指した（図1中、1→2）。N末端アミノ基は各タンパク質に必ず1箇所だけ存在し、約80%のタンパク質において表面に露出しており、酸性度が高い（ $pK_a$  6-8）。そのため、中性水溶液中でも配向基を一時的に導入するのに十分な高い求核性を保持していると考えられる。

導入した配向基（DG）は、N末端アミノ酸と隣のアミノ酸間のペプチド結合と協働して遷移金属と結合し錯体Ⅰを形成する。この金属錯体に対し、種々の反応試薬を反応させればカップリング反応が進行し（Ⅰ→Ⅱ）、ペプチド結合上に人工分子を導入できると考えた。リシン残基のアミノ基にも配向基が結合するが、近傍にペプチド結合が存在しないため化学修飾されない。反応終了後にヒドロキシルアミン誘導体とキレート剤を添加して、配向基と金属イオンを除去すればN末端アミノ酸のみが化学修飾されたペプチドまたはタンパク質2が得られる。

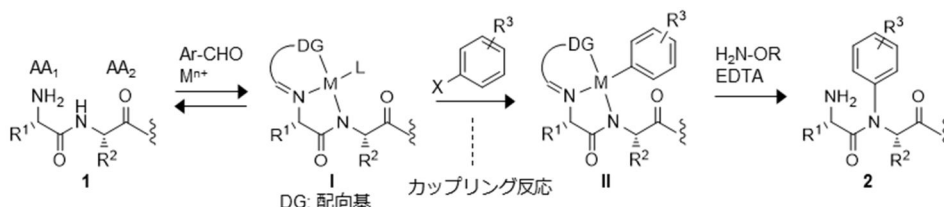


図1. N末端アミノ酸に結合した配向基を利用するペプチド結合の化学修飾

## 3. 研究の方法

市販の生理活性ペプチド、タンパク質を基質とし、一時的配向基、遷移金属イオン、カップリング反応試薬、pH、反応温度を種々変更し、カップリング反応を検討した。一時的配向基はイミンを介して、N末端アミノ基に結合させた。ペプチドの化学修飾は、MALDI-TOF MS、LC-MS、HPLCで生成物の構造および収率を分析した。タンパク質の化学修飾はLC-MS、MALDI-TOF MS、電気泳動により修飾効率、結合した数および位置を分析した。

## 4. 研究成果

(1) アルドール反応による、N末端アミノ酸選択的なタンパク質の化学修飾（引用文献）

市販の生理活性ペプチドであるアンジオテンシンⅡを基質として、種々の芳香族アルデヒドを一時的配向基として用いるカップリング反応を試みた。目的のカップリング反応は進行しなかったが、銅イオン存在下、2-ピリジンカルボキシルアルデヒド（2-PC, 4）を作用させると、2-PCが二分子結合した6が生成することを見出した（図2）。6は以下のように生成すると考察した。N末端アミノ酸がイミンⅢを形成した後、脱プロトン化して生成したエノラートⅣがもう一分子の2-PC4とアルドール反応し中間体Ⅴが生成する。Ⅴのアミド窒素がイミンに分子内求核付加しⅥが生じる。金属イオンをエチレンジアミン四酢酸（EDTA）で捕捉すると6が遊離する。アンジオテンシンⅡ以外のポリペプチドを用いても同様の反応が進行したが、基質によっては5のみ、または5と6の混合物が生じた。反応条件を種々検討したが、生成物5と6の比率の制御は困難であった。

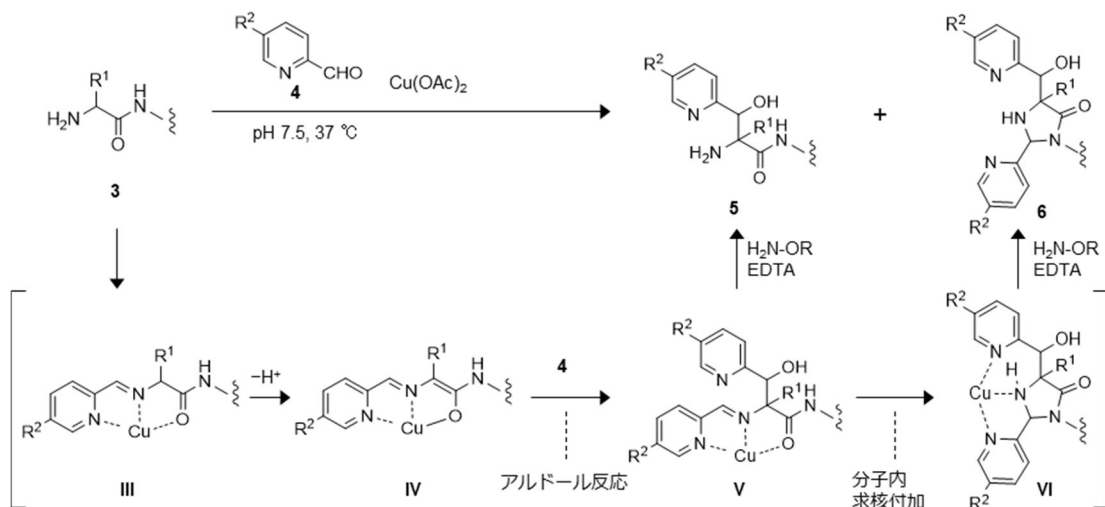


図2. 銅イオンを利用したアルドール反応による N 末端アミノ酸の化学修飾

本反応を用いて、市販の抗体医薬品であるトラスツズマブの N 末端アミノ酸上にトポイソメラーゼ阻害薬である SN38 を結合した抗体 - 薬物複合体 (ADC) を調製した。この ADC は、HER2 を細胞膜上に過剰発現するがん細胞に特異的に結合し、元のトラスツズマブを上回る細胞毒性を示した。N 末端アミノ酸はトラスツズマブの表面に露出しており、化学修飾してもトラスツズマブの立体構造に対する影響が小さく、元の抗原認識能を維持していたと推測している。

現在、生成物 5 と 6 の生成比率を制御する方法について検討している。さらに、アルドール反応により構築される 5 の特徴的な部分構造を活用して、もう一種類の人工分子を結合する手法の開発にも取り組んでいる。タンパク質の特定の箇所に 2 種類の人工分子を導入できれば、治療と診断が同時に可能なセラノスティクスへの応用が期待できる。

## (2) 超原子価ヨウ素種を活用した、ポリペプチド中のトリプトファンの化学修飾 (引用文献)

上記研究の過程で、超原子価ヨウ素種を用いたトリプトファンの化学修飾法を発見した。トリプトファンは側鎖にインドール環を有しており、カチオン- $\pi$ 相互作用や水素結合を介して、ポリペプチドの立体構造維持や生体分子同士の相互作用に寄与している。生理活性ペプチド 7 に酸性水溶液中、ヨウ化カリウム、ヨウ素酸カリウム、アゾールを作用させると、トリプトファン側鎖のインドール 2 位にアゾールが結合した生成物 8 が得られた。あらかじめアゾールをペプチドの N 末端に結合させた 9 を用いて本反応を行うと分子内で架橋された環状ペプチド 10 が生成した (図 3)。

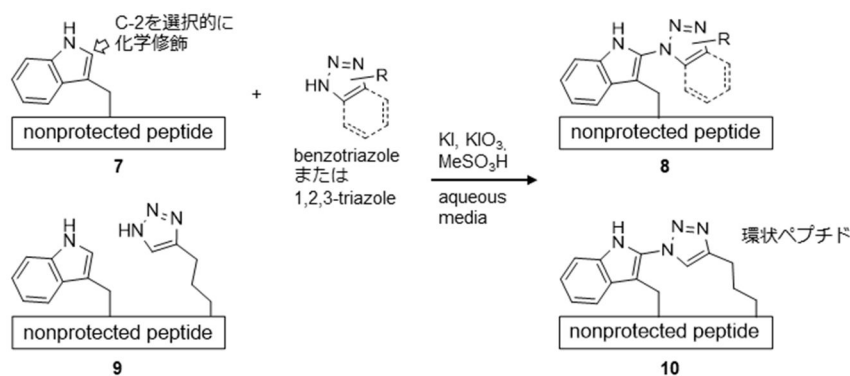


図3. 超原子価ヨウ素種を活用したトリプトファン選択的化学修飾

## <引用文献>

K. Hanaya, K. Yamoto, K. Taguchi, K. Matsumoto, S. Higashibayashi, T. Sugai, *Chem. Eur. J.* **2022**, *28*, e202201677.

S. Watanabe, Y. Wada, M. Kawano, S. Higashibayashi, T. Sugai, and K. Hanaya, *Chem. Commun.*, **2023**, *59*, 13026-13029.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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<br>Hanaya Kengo, Yamoto Kaho, Taguchi Kazuaki, Matsumoto Kazuaki, Higashibayashi Shuhei, Sugai Takeshi            | 4. 巻<br>28               |
| 2. 論文標題<br>Single - Step N - Terminal Modification of Proteins via a Bio - Inspired Copper(II) - Mediated Aldol Reaction | 5. 発行年<br>2022年          |
| 3. 雑誌名<br>Chemistry A European Journal                                                                                   | 6. 最初と最後の頁<br>e202201677 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1002/chem.202201677                                                                        | 査読の有無<br>有               |
| オープンアクセス<br>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<br>-                |

|                                                                                                                                                             |                             |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------|
| 1. 著者名<br>Watanabe Shunsuke, Wada Yuki, Kawano Masaki, Higashibayashi Shuhei, Sugai Takeshi, Hanaya Kengo                                                   | 4. 巻<br>59                  |
| 2. 論文標題<br>Selective modification of tryptophan in polypeptides via C-N coupling with azoles using in situ-generated iodine-based oxidants in aqueous media | 5. 発行年<br>2023年             |
| 3. 雑誌名<br>Chemical Communications                                                                                                                           | 6. 最初と最後の頁<br>13026 ~ 13029 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1039/d3cc03731b                                                                                                               | 査読の有無<br>有                  |
| オープンアクセス<br>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<br>-                   |

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

|                                                       |
|-------------------------------------------------------|
| 1. 発表者名<br>花屋賢悟・森見優希・田口和明・松元一明・和田雄貴・河野正規・東林修平・須貝威     |
| 2. 発表標題<br>金属イオンを用いたアルドール反応によるペプチド・タンパク質のN末端アミノ酸の化学修飾 |
| 3. 学会等名<br>第16回バイオ関連化学シンポジウム                          |
| 4. 発表年<br>2022年                                       |

|                                            |
|--------------------------------------------|
| 1. 発表者名<br>花屋賢悟・森見優希・田口和明・松元一明・東林修平・須貝威    |
| 2. 発表標題<br>金属イオンを用いたアルドール反応によるN末端アミノ酸の化学修飾 |
| 3. 学会等名<br>第48回反応と合成の進歩シンポジウム              |
| 4. 発表年<br>2022年                            |

|                                          |
|------------------------------------------|
| 1．発表者名<br>花屋賢悟・森見優希・田口和明・松元一明・東林修平・須貝威   |
| 2．発表標題<br>タンパク質N末端アミノ酸に複数の人工分子を導入する手法の開発 |
| 3．学会等名<br>日本薬学会第143年会                    |
| 4．発表年<br>2023年                           |

|                                                    |
|----------------------------------------------------|
| 1．発表者名<br>花屋賢悟、八本果歩、東林修平、須貝威                       |
| 2．発表標題<br>銅(II)イオンを用いたアルドール反応によるN末端アミノ酸選択的化学修飾法の開発 |
| 3．学会等名<br>第15回バイオ関連化学シンポジウム                        |
| 4．発表年<br>2021年                                     |

|                                            |
|--------------------------------------------|
| 1．発表者名<br>花屋賢悟、八本果歩、田口和明、松元一明、東林修平、須貝威     |
| 2．発表標題<br>タンパク質N末端に対するアルドール反応を活用した化学修飾法の開発 |
| 3．学会等名<br>日本薬学会第142年会                      |
| 4．発表年<br>2022年                             |

|                                    |
|------------------------------------|
| 1．発表者名<br>八本果歩、花屋賢悟、東林修平、須貝威       |
| 2．発表標題<br>銅(II)を用いたペプチドN末端化学修飾法の開拓 |
| 3．学会等名<br>第65回日本薬学会関東支部大会          |
| 4．発表年<br>2021年                     |

|                                                       |
|-------------------------------------------------------|
| 1．発表者名<br>渡邊俊佑、東林修平、須貝威、花屋賢悟                          |
| 2．発表標題<br>ヨウ素を酸化剤とする炭素 - 窒素結合形成反応を利用したトリプトファン化学修飾法の開拓 |
| 3．学会等名<br>第65回日本薬学会関東支部大会                             |
| 4．発表年<br>2021年                                        |

|                                             |
|---------------------------------------------|
| 1．発表者名<br>花屋賢悟、渡邊俊佑、東林修平、須貝威                |
| 2．発表標題<br>酸化的カップリング反応による トリプトファン含有ペプチドの化学修飾 |
| 3．学会等名<br>第67回日本薬学会関東支部大会                   |
| 4．発表年<br>2023年                              |

|                                                                |
|----------------------------------------------------------------|
| 1．発表者名<br>花屋 賢悟、渡邊 俊佑、和田雄貴、 河野正規、東林 修平、須貝威                     |
| 2．発表標題<br>超原子価ヨウ素試薬を用いた、 水中での酸化的カップリング反応による トリプトファン含有ペプチドの化学修飾 |
| 3．学会等名<br>日本薬学会第144年会                                          |
| 4．発表年<br>2024年                                                 |

|                                             |
|---------------------------------------------|
| 1．発表者名<br>花屋賢悟、和田雄貴、河野正規、田口和明、松元一明、東林修平、須貝威 |
| 2．発表標題<br>アルドール反応を用いたN末端アミノ酸の化学修飾           |
| 3．学会等名<br>日本化学会第104春季年会                     |
| 4．発表年<br>2024年                              |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|  | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(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 |
|---------|---------|
|---------|---------|