

## 有機ラジカルを用いるタンパク質側鎖構造多様化法

東京大学大学院薬学系研究科 有機合成化学教室

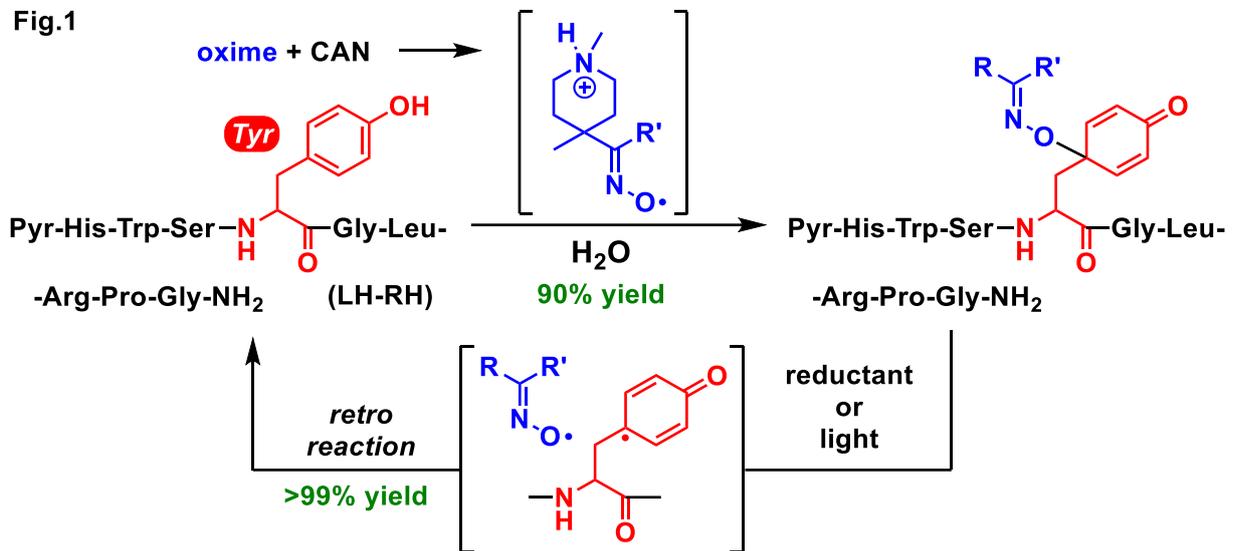
生長 幸之助

タンパク質の化学構造を加工し、様々な人工機能を付与する手法は、物質生産・生命の解析/制御・生体適合材料や新規治療法への応用など、様々な学際研究領域を進展させるツールとして広く探求されている。中でもタンパク質構成アミノ酸 (proteinogenic amino acid) を標的とする生体共役反応は、遺伝子操作に頼る現代的手法では得がたい生体調和型機能性物質を与える手法として有望である。とくに近年では、非天然アミノ酸もしくはLys/Cysを標的とする従来型汎用法に内包される課題解決を意図し、低反応性アミノ酸 (Trp, Tyr, Met, Hisなど) を標的とする修飾法の開発が、合成化学研究にインスパイアされながら進展を見せている。

チロシン (Tyr) は一次配列中存在比 (3-4%) ・表面露出度 ともに中程度にあるタンパク質構成アミノ酸である。生体共役反応の標的として汎用されるLysに比べて露出度は低く、しばしば構造中に埋もれているため、反応標的として適切な残基と捉えられている。加えてTyrは翻訳後修飾起点としても機能し、特徴的な水素結合・ $\pi$ 相互作用・レドックス能を介してタンパク質-タンパク質相互作用のホットスポットや電子伝達系の一部を担うことも多い。ゆえにTyr側鎖を人工的に加工することができれば、タンパク質の生化学的機能に大きく影響を与え操作する手法になることが期待される。過去に様々な研究者によってTyr選択的なタンパク質修飾反応が報告されているが、重金属試薬や非生体適合条件を必要としていたり、他アミノ酸残基との交差反応性が進行してしまうなどを課題としていた。加えて多くは試薬の構造展開も難しいため、反応性の精密な調節や、発展的アプローチへ導くことも困難である。

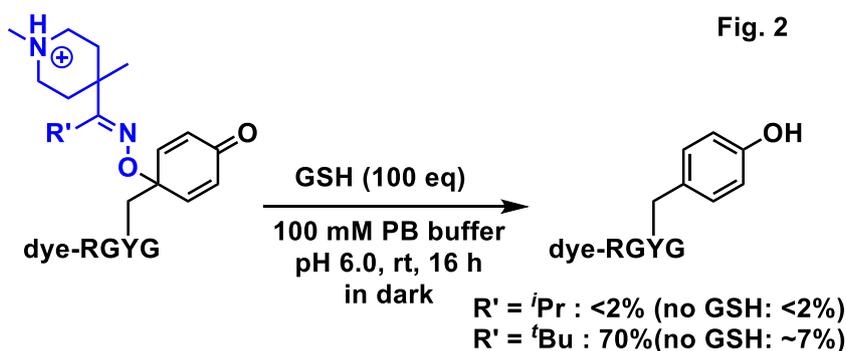
我々は本助成金の申請前に、下記に示す予備的知見を得ていた。嵩高いイミノキシルラジカルがフェノール化合物と反応する先例 [Mendenhall, *JOC* **1986**, *51*, 5390] に基づき、これをTyr含有ペプチドと反応させる検討を行なった。その結果、Tyr側鎖へのイミノキシルラジカル付加体 (ジエノン構造) が高収率・高いTyr選択性にて得られることが判明した。酸化敏感な他アミノ酸残基との交差反応は見られず、過剰付加反応も進行しない。毒性が懸念される重金属触媒も不要である。しかしながらこの第一世代法はイミノキシルラジカルの低水溶性のため、有機溶媒中での実施が必須だった。そこで幅広いペプチド基質に対して適用可能とすべく、試薬の水溶性を高める構造展開を行い、含アミン骨格を有するイミノキシルラジカルを見だし、水中もしくは緩衝液中で実施可能な第二世代条件へと改良できた (Fig. 1上)。しかしながら、イミノキシルラジカル付加体が光照射・還元条件で開裂し、もとのフェノール側鎖構造へと戻る逆反応が起きるといふ予想外の事実も併せて明らかとなった (Fig. 1下)。この逆反応はイミノキシルラジカルの安定性が高く均等開裂が起こりやすいために進行すると考えられた。そこで下記2点についての改善を目指す研究課題を設定し、実施した。

Fig.1



### ① Tyr-イミノキシラジカル付加体の結合安定化

本Tyr修飾法で生じる化学結合を安定化して可逆性を喪失させ、実用的な生体共役反応へと繋げて行くための検討を行った。イミノキシラジカル種の安定性を下げる方策がこの合理的なアプローチとなる。ラジカルの安定性は、置換基の立体障害の大きさと相関することが知られている[Ingold, *JACS* **1973**, 95, 8610]ため、試薬の立体障害を小さくする方向で検討を進めた。検討の結果、第二世代法で見いだしていたオキシム構造の置換基R'='Bu基を<sup>t</sup>Pr基に変更したオキシムを用いることで、付加体の安定性を劇的に改善できることが判明した。実際にモデルペプチド (dye = クマリン) のラジカル付加体に、過剰量のグルタチオン (GSH) を添加して還元条件に対する安定性評価を行ったところ、<sup>t</sup>Pr置換体はほとんど逆反応を示さない一方で、<sup>t</sup>Bu置換体は速やかにもとのペプチド構造を復元することが明らかとなった。一方で還元剤を添加しない暗所放置では、いずれももとのペプチド構造へ復元されなかった (Fig. 2)。これらの実験から、実用上、十分な安定性を示すオキシム構造を同定するとともに、試薬構造のメチル基1つという僅かな差異が可逆性に大きな影響を与えうる興味深い事実を見いだすことに成功した。



### ② Tyr-イミノキシラジカル付加体を起点とする構造多様化

本反応は、Tyr側鎖の選択的変換によって得られる反応性構造 (ジエノン or チロキシラジカル等価体) をタンパク質表面に創り出す反応と捉えることができる。つまり本付加体を適切な活性種捕捉反応に付すことができれば、より安定な化学結合を持つ構造や、多様な非天然型側鎖構造へ導けると考えた。ジエノン化合物の穏和な変換法は、天然物合成化学および超原子価ヨウ素化学の文脈から多く開発されている。これらをペプチド向けに修正しつつ適用することで、多様性付与反応の開発を検討した。

我々は申請前の予備的検討から、Tyr-ラジカル付加体とヒドラジンを縮合させ、光応

答性のアゾベンゼン構造へ変換可能である事実を既に見いだしていた。これを水中条件へ改良することを目的に、既報のヒドラゾン形成触媒[Kool *JOC* **2013**, *78*, 1184; *OL* **2015**, *17*, 274]を用いて検討を行った。その結果、収率にまだ改善の余地は残すものの、側鎖無保護ペプチド化合物(dye=メチレンブルー)を標的に所望の水中反応を進行させることができた (Fig 3-a)。さらに、いまだ水中条件へと展開することは叶っていないが、有機溶媒中ではさらに多様な変換を実施可能である事も見いだしている。いくつか抜粋すると、Tyr主鎖構造の巻き込みによる配座固定 (Fig. 3-b)、ホスフィンオキシドの直接導入 (Fig. 3-c)、Hauser-Kraus環化による $\pi$ 共役系の拡張 (Fig. 3-d) などが可能である。今後はより多彩な反応を対象とした適用可能性を調査するとともに、水中でも実施可能な条件への改良、各種化学条件に敏感なペプチド基質・タンパク質基質などを対象とした温和な側鎖変換法の開発などを目指し、検討を続けていく予定である。

