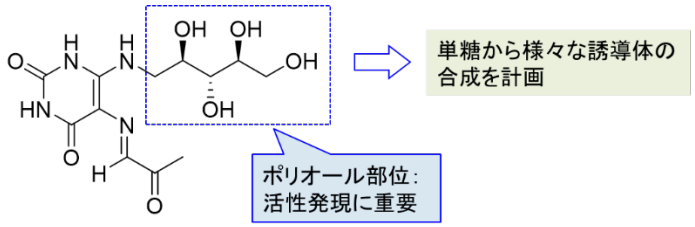
106　自然リンパ球を制御するリガンドの探索と合成研究	井貫　晋輔

【目的】自然リンパ球は、自然免疫と獲得免疫の橋渡しを行い、免疫の初期応答において重要な役割を担う免疫細胞である。抗原認識受容体の有無で二つのグループに分類され、抗原認識受容体を有するグループとしては、mucosal-associated invariant T（MAIT）細胞などが知られている。MAIT 細胞は、T 細胞受容体を介して、抗原提示細胞上の MR1 タンパク質とリガンドの複合体を認識して活性化され、サイトカイン誘導を介して、細菌感染からの生体防御など様々な免疫応答を示すとされている。しかしながら、リガンドとなる化合物が不明であったため、その機能解析や分子レベルでの理解が遅れていた。最近、微生物によるビタミン B2 合成の代謝産物である 5-(2-oxopropylideneamino)-6-D-ribitylaminouracil（5-OP-RU）などが MR1 タンパク質と結合し、MAIT 細胞を活性化することが報告された。我々は、MAIT 細胞活性化に関わる MR1 や MAIT-TCR のリガンド認識機構の詳細を解明するために、MAIT 細胞の活性化に大きく寄与するとされる 5-OP-RU のポリオール部位の構造展開を計画した。特に本研究では、穏和な条件下、可視光エネルギーを電子移動に基づいた分子変換反応に利用可能である光酸化還元触媒反応を鍵としたポリオール構造の合成法の開発を検討した。

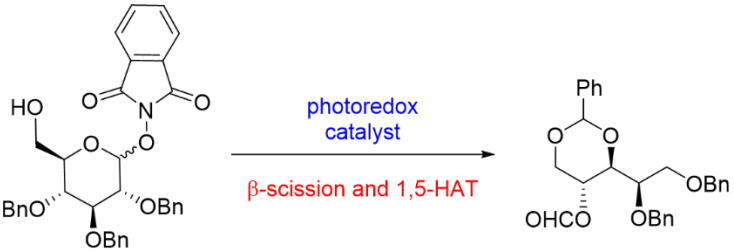
【方法】本研究では、光酸化還元触媒反応を用いて *N*-ヒドロキシフタルイミドを有する単糖誘導体からアルコキラジカルの発生に続く β 位の C-C 結合開裂によってポリオール構造を合成することを計画した。

【結果】様々な反応条件、基質を用いた検討を行った結果、1 位に *N*-ヒドロキシフタルイミド、6 位に無保護のヒドロキシ基を有するグルコース誘導体を用いて反応を行うと、望みの β 開裂反応に続いて 1,5-hydrogen atom transfer （1,5-HAT）が進行して、ベンジリデンアセタールを有するポリオール誘導体を得ることができた。本手法を様々な単糖誘導体に適応すれば、多種多様なポリオール構造の合成が可能となる。現在、本反応を活用して、5-OP-RU のポリオール部位の構造展開を検討している。

5-OP-RU の構造と光酸化還元触媒を用いたポリオール誘導体の合成



5-OP-RU：MAIT細胞活性化リガンド



光酸化還元触媒を用いたβ開裂と1,5-HAT反応によるポリオール誘導体の合成

106. 自然リンパ球を制御するリガンドの探索と合成研究

井貫　晋輔

京都大学 大学院薬学研究科 ケモゲノミクス・薬品有機製造学分野

Key words：自然免疫，MAIT 細胞，光酸化還元触媒，β開裂反応，1,5-HAT

緒　言

自然リンパ球は、自然免疫と獲得免疫の橋渡しを行い、免疫の初期応答において重要な役割を担う免疫細胞である。抗原認識受容体の有無で二つのグループに分類され、抗原認識受容体を有するグループとしては、mucosal-associated invariant T（MAIT）細胞などが知られている。MAIT 細胞は、ヒト末梢血において数%を占めるヒト最大の T 細胞亜集団であり、細菌感染からの生体防御において重要な役割を担うとされている［1］。MAIT 細胞は、T 細胞受容体（TCR）を介して、抗原提示細胞上の MR1 タンパク質とリガンドの複合体を認識して活性化され、様々な免疫応答を示す。しかしながら、MAIT 細胞の活性化を担うリガンド分子が長らく未解明であったため、その機能解析や分子レベルでの理解が遅れていた。一方で最近、ビタミン B2 合成の代謝産物 5-(2-oxopropylideneamino)-6-D-ribitylaminouracil（5-OP-RU）が MAIT 細胞を強力に活性化することが報告された（図 1）［2］。5-OP-RU は微生物のリボフラビン生合成経路に由来するビタミン前駆体である 5-amino-6-D-ribityluracil（5-A-RU）が、哺乳類の解糖系や微生物の代謝に由来するメチルグリオキサールと非酵素縮合することで一時的に生成する化合物である。近年、この 5-OP-RU をリード化合物として様々なアプローチで構造活性相関研究が展開されており、その化学構造と機能の関係が徐々に解明されつつある［3，4］。このような背景のもと、我々は、MAIT 細胞活性化に関わる MR1 や MAIT-TCR のリガンド認識機構の詳細を解明するために、MAIT 細胞の活性化に大きく寄与するとされる 5-OP-RU のポリオール部位の構造展開を計画した。特に本研究では、光酸化還元触媒反応を鍵としたポリオール構造の合成法の開発検討を行った。

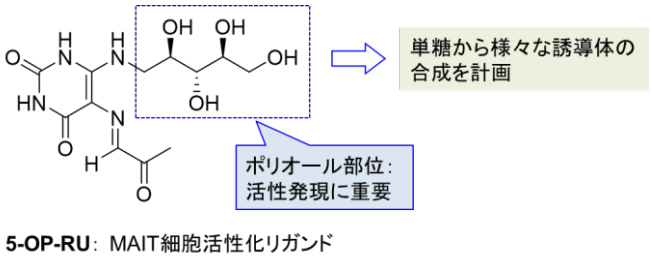


図 1．5-OP-RU（MAIT 細胞活性化リガンド）の構造

近年、可視光エネルギーを利用した可視光レドックス触媒反応が盛んに研究されている。本反応は、$[Ru(bpy)_3]_2^+$や $Ir(ppy)_3$をはじめとした可視光増感剤を用いる触媒反応で、穏和な条件下、可視光エネルギーを電子移動に基づいた分子変換反応に利用することが可能である。

我々は、これまでに免疫系を制御する複合脂質や糖質に着目し、合成と構造展開を行ってきた［5，6］。また、光酸化還元触媒を用いた反応の開発にも携わり、それらを応用した糖誘導体の合成に関わってきた［7］。一方、2001 年に Suárez らは、*N*-ヒドロキシフタルイミド含有糖誘導体に対して、加熱条件下、スズ試薬と AIBN を用いたアルコキシラジカルの発生を介したβ開裂反応を行うことでポリオール構造を合成することを報告している［8］。また、2015 年に Chen らは光酸化還元触媒と Hantzsch ester を用いた穏和な条件下での *N*-ヒドロキシフタルイミド

からのアルコキシラジカルの発生を達成している［9］。このような背景のもと、本研究では、光酸化還元触媒反応を用いて *N*-ヒドロキシフタルイミド含有単糖誘導体 **1** からアルコキシラジカル **A** を発生させ、続く β 位の C-C 結合開裂によってポリオール構造を合成することを計画した（図 2）。また、本反応の開発過程において、β 位の C-C 結合開裂に続いて、1,5-hydrogen atom transfer（1,5-HAT）が進行することも見出したので、併せて報告する。さらに本光反応をフロー反応に適用した。

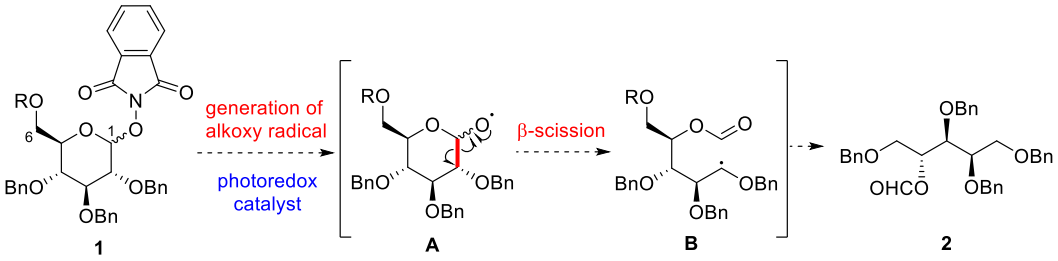
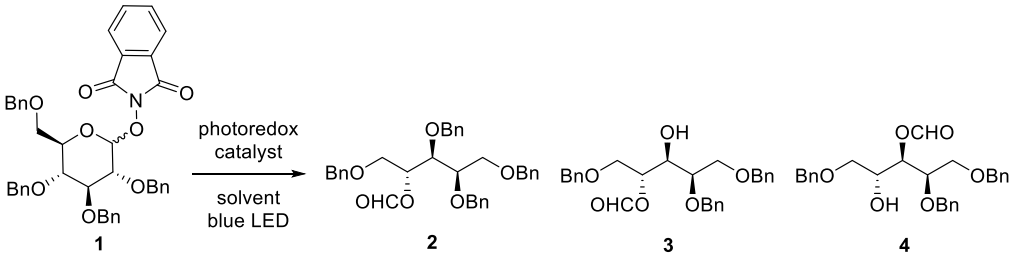


図 2. 光酸化還元触媒を用いた単糖誘導体からの β 開裂反応

方法および結果

1. 光酸化還元触媒を用いた *N*-ヒドロキシフタルイミド基を有する単糖誘導体（1）の β 開裂反応の検討

表 1. 光酸化還元触媒を用いた *N*-ヒドロキシフタルイミド含有単糖誘導体 **1** の β 開裂反応の検討



entry	photoredox catalyst (4 mol%)	additive (3 eq.)	solvent (30 mM)	product (% yield)[a]
1	$Ir(ppy)_3$	Hantzsch ester	1,4-dioxane	**2** (34)
2	$Ir(ppy)_3$	-	1,4-dioxane	no reaction
3	$Ir(ppy)_3$	-	MeCN	**4**+**5** (30)[b]
4	$Ir(ppy)_3$	-	DMSO	**4**+**5** (40)[b]
5	$Ir(ppy)_3$	-	DMF	**4**+**5** (51)[b]
6	$Ir(ppy)_3$	-	NMP	**4**+**5** (61)[b]
7	$Ir(ppy)_3$	-	cyclohexane	no reaction
8	$Ir(ppy)_3$	-	CH_2Cl_2	no reaction
9	$Ir(Fppy)_3$	-	NMP	**4**+**5** (28)[b]
10	$Ir(bpy)(ppy)_2PF_6$	-	NMP	**4**+**5** (<58)[b]
11	$Ru(bpy)_3Cl_2{\cdot}6H_2O$	-	NMP	no reaction
12	Mes-Acr^+	-	NMP	**4**+**5** (43)[b]

[a] いずれも収率はカラムクロマトグラフィーにより単離した生成物の質量から算出した。[b] **3** : **4** = 65 : 35。
Hantzsch ester = diethyl 1,4-dihydro-2,6-dimethyl-3,5-pyridinedicarboxylate. ppy = 2-phenylpyridine. Fppy = 2-(4,6-difluorophenyl)pyridine. bpy = 2,2'-bipyridine. Mes-Acr^+ = 9-mesityl-10-methylacridinium perchlorate.

まず、我々は 1 位に *N*-ヒドロキシフタルイミドを有し、それ以外のヒドロキシ基をベンジル基で保護したグルコース誘導体 **1** を用いて反応の検討を行った。**1** を青色 LED 照射下 1,4-dioxane 中で、光酸化還元触媒として 4 mol %の $Ir(ppy)_3$、3 当量の Hantzsch ester と反応させた（表 1）。その結果、目的のβ開裂反応が進行し、化合物 **2** を 34%収率で得ることに成功した（entry 1）。種々反応条件を検討したが、**2** の収率を改善することはできなかった。一方で、溶媒検討の過程において MeCN 中、Hantzsch ester を用いずに反応を行うと Bn 基が一つ外れた **3** と **4** の混合物が　合わせて 30%で得られた（entry 3）。さらに溶媒の検討を行ったところ、様々な非プロトン性極性溶媒で反応が進行し、いずれも中程度の収率で **3** と **4** の混合物が得られた。特に NMP を溶媒として用いると、収率 61%で **3** と **4** の混合物が得られた（entries 4～6）。一方で、シクロヘキサンや CH_2Cl_2 を用いた場合、反応は進行しなかった（entries 7、8）。また、$Ir(ppy)_3$ 以外の光酸化還元触媒を検討したが収率は向上しなかった（entries 9～12）。

Hantzsch ester 非存在下において生成物 **3** と **4** が得られたのは、図 3 に示すような機構で反応が進行したためと考えられる。化合物 **1** が励起された光酸化還元触媒により還元されてアルコキシラジカル **C** を生成した後、β開裂の進行によって炭素ラジカル **D** を生成する。Hantzsch ester 存在下では、ラジカル **D** が水素を受け取り、元々想定していた化合物 **2** を生成する。一方で、炭素ラジカルをトラップする Hantzsch ester が存在しない場合は、1,5-HAT が進行して、安定なベンジルラジカル **E** を生成すると考えられる。この中間体は光酸化還元触媒によって酸化されてベンジルカチオン **F** となり H_2O と反応してベンズベンズアルデヒドを生成するものと考えられる。実際反応液を GC-MS で分析するとベンズアルデヒドが検出された。生成した化合物 **3** のホルミル基は、隣接するヒドロキシ基に、5 員環中間体を経由して容易に転位し、**4** を与えるものと考えられる。

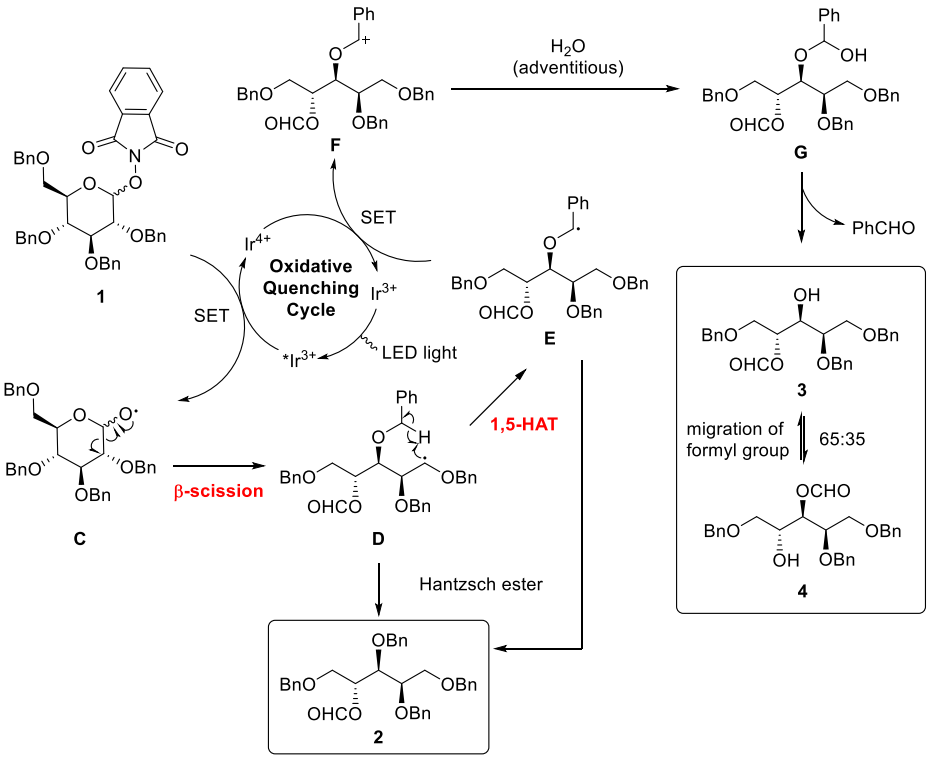


図 3.　生成物 **3** と **4** を与える推定反応機構

2.　光酸化還元触媒を用いた単糖誘導体（5）のβ開裂反応の検討

上記の検討で得られた位置異性体 **3** と **4** は、分離を行っても容易に異性化することから、単一の生成物を得るために新たな基質 **5** をデザインした（図 4）。すなわち、1,5-HAT の後に生じたベンジルカチオン **H** を分子内でトラップするために、6 位に無保護のヒドロキシ基を有する基質 **5** を用いれば、生成物を **6** に収束させることができるのではないか

と考えた。

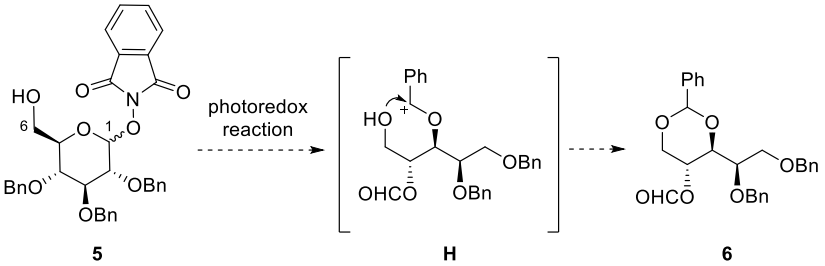
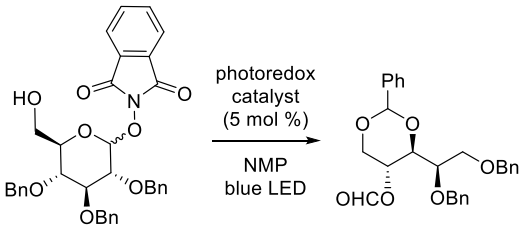


図 4. 基質 **5** を用いる新たな合成戦略

表 1 の最適条件を用いて、基質 **5** に反応を行ったところ（表 2）、63%収率で目的の **6** を得ることに成功した（entry 1）。この結果は、本反応の中間体にベンジルカチオンが生成していることを示唆している。さらに、他の光触媒を検討したが収率の向上は見られなかった（entries 2, 3）。続いて、本反応をフロー反応へ適用した（図 5）。反応溶液を青色 LED 照射下、3 ml の容量のフローリアクターを用いて反応させたところ、2h の residence time で目的物を 63%収率で得ることができた（entry 4）。

表 2. 光酸化還元触媒を用いた *N*-ヒドロキシフタルイミド基を有する単糖誘導体 **5** の β 開裂反応の検討



5 **6**

entry	photoredox catalyst (5 mol%)	yield (%)[a]
1	$Ir(ppy)_3$	63
2	$Ir(bpy)(ppy)_2PF_6$	57
3	Mes-Acr^+	12
4[b]	$Ir(ppy)_3$	63

[a] いずれも収率はカラムクロマトグラフィーにより単離した生成物の質量から算出した。

[b] 光フローリアクターを用いて residence time = 2 hours で反応を行った。

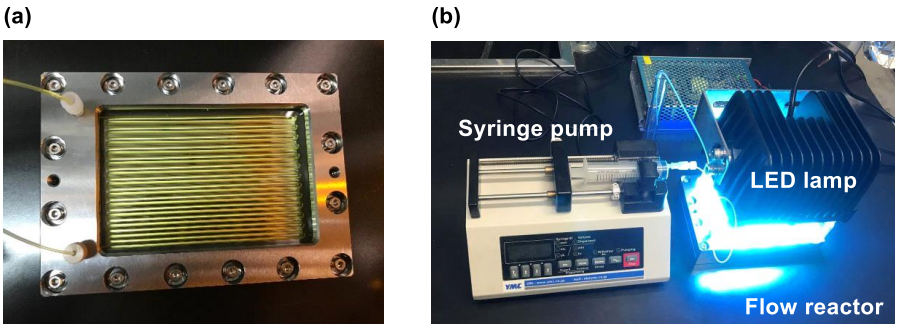


図 5. 光フロー反応の概要

a）光フロー反応装置：2 mm width、0.5 mm depth、3 m length、MiChS Co, Ltd.。

b）光フロー反応の概要。

考　察

以上のように、光酸化還元触媒反応を用いて *N*-ヒドロキシフタルイミドを有する単糖誘導体からアルコキラジカルを発生に続く β 開裂反応と 1,5-HAT によってポリオール誘導体を合成する手法を開発した。本手法を様々な単糖誘導体に適応すれば、多種多様なポリオール構造の合成が可能となる。また、本反応の生成物は選択的な保護基の除去ができるため、様々な変換を行うことが可能である。現在、本反応を利用して、MAIT 細胞リガンドである 5-OP-RU のポリオール部位に関する構造展開の実施を検討している。

共同研究者・謝辞

本研究は、京都大学大学院薬学研究科におきまして大野浩章教授のご指導のもと、大石真也准教授、服部明准教授、松岡巧朗氏にご協力を賜りながら進めて参りました。また、上原記念生命科学財団には多大なご支援を賜りました。この紙面をお借りいたしまして、心より感謝を申し上げます。

文　献

1) Toubal A, Nel I, Lotersztajn S, Lehuen A. Mucosal- associated invariant T cells and disease. Nat. Rev. Immunol. 2019 Oct; 19(10):643-57. PMID: 31308521 DOI: 10.1038/s41577-019-0191-y.

2) Corbett AJ, Eckle SB, Birkinshaw RW, Liu L, Patel O, Mahony J, Chen Z, Reantragoon R, Meehan B, Cao H, Williamson NA, Strugnell RA, Van Sinderen D, Mak JY, Fairlie DP, Kjer-Nielsen L, Rossjohn J, McCluskey J. T-cell activation by transitory neo-antigens derived from distinct microbial pathways. Nature. 2014 May 15;509(7500):361-5. Epub 2014 Apr 2. PMID: 24695216 DOI: 10.1038/nature13160.

3) Braganza CD, Shibata K, Fujiwara A, Motozono C, Sonoda KH, Yamasaki S, Stocker BL, Timmer MSM. The effect of MR1 ligand glyco-analogues on mucosal-associated invariant T (MAIT) cell activation. Org Biomol Chem. 2019 Oct 28;17(40):8992-9000. Epub 2019 Sep 9. PMID: 31497838 DOI: 10.1039/c9ob01436e.

4) Awad W, Ler GJM, Xu W, Keller AN, Mak JYW, Lim XY, Liu L, Eckle SBG, Le Nours J, McCluskey J, Corbett AJ, Fairlie DP, Rossjohn J. The molecular basis underpinning the potency and specificity of MAIT cell antigens. Nat Immunol. 2020 Apr;21(4):400-411. Epub 2020 Mar 2. PMID: 32123373 DOI: 10.1038/s41590-020-0616-6.

5) Inuki S, Aiba T, Hirata N, Ichihara O, Yoshidome D, Kita S, Maenaka K, Fukase K, Fujimoto Y. Isolated Polar Amino Acid Residues Modulate Lipid Binding in the Large Hydrophobic Cavity of CD1d. ACS Chem Biol. 2016 Nov 18;11(11):3132-3139. Epub 2016 Oct 4. PMID: 27648599 DOI: 10.1021/acschembio.6b00674.

6) Inuki S, Kashiwabara E, Hirata N, Kishi J, Nabika E, Fujimoto Y. Potent Th2 Cytokine Bias of Natural Killer T Cell by CD1d Glycolipid Ligands: Anchoring Effect of Polar Groups in the Lipid Component. Angew Chem Int Ed Engl. 2018 Jul 26;57(31):9655-9659. Epub 2018 Jun 29. PMID: 29863807 DOI: 10.1002/anie.201802983.

7) Inuki S, Sato K, Fukuyama T, Ryu I, Fujimoto Y. Formal Total Synthesis of l-Ossamine via Decarboxylative Functionalization Using Visible-Light-Mediated Photoredox Catalysis in a Flow System. J Org Chem. 2017 Jan 20;82(2):1248-1253. Epub 2017 Jan 5. PMID: 27997795 DOI: 10.1021/acs.joc.6b02531.

8) Francisco CG1, León EI, Martín A, Moreno P, Rodríguez MS, Suárez E. Reductive fragmentation of carbohydrate anomeric alkoxy radicals. Synthesis of alditols with potential utility as chiral synthons. J Org Chem. 2001 Oct 19;66(21):6967-76. PMID: 11597215 DOI: 10.1021/jo0156565.

9) Zhang J, Li Y, Zhang F, Hu C, Chen Y. Generation of Alkoxyl Radicals by Photoredox Catalysis Enables Selective C(sp^3)-H Functionalization under Mild Reaction Conditions. Angew Chem Int Ed Engl. 2016 Jan 26;55(5):1872-5. Epub 2015 Dec 17. PMID: 26680274 DOI: 10.1002/anie.201510014.