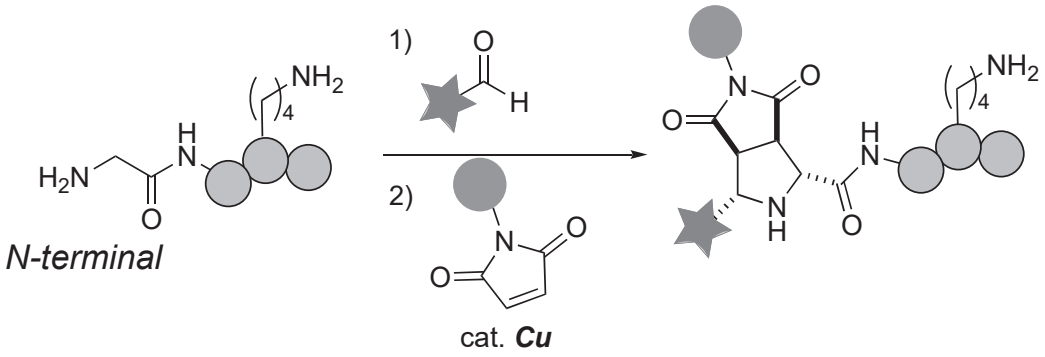
101　均質な機能性ペプチドの創製を可能にする選択的修飾法	金本　和也

【目的】ペプチドに対して蛍光分子などの機能性分子を導入する手法は、生命科学研究において有用であるため精力的に研究が行われている。一方で、通常、ペプチドにはリシンのε-アミノ基や水素結合など、反応点や相互作用が多いため、選択的に分子を結合させて均一な生成物を得ることは容易ではない。これに対して近年、ペプチド内において1カ所しか存在せず、分子が新たに結合した場合にも立体構造に影響を与え難いN末端に対して、選択的に分子を導入する手法が注目を集めている。一方で、これらの手法には、反応が平衡的であるため生成物が一部解離してしまう点などの課題が残されていた。このような背景から、強固な結合を形成し、生成物の平衡的な解離を伴わない手法の開発が求められている。

【方法】上記の課題に対して、今回我々は、1,3-双極子であるアゾメチンイリドの構造的な発生要件に着目した、ペプチドN末端修飾法を着想した。すなわち、アゾメチンイリドが発生するためには、無保護のアミノ基の同一炭素上にカルボニル基などの電子求引基が存在する必要があるため、要件を満たすN末端ではアゾメチンイリドが発生するのに対して、リシンのε-アミノ基や内部ペプチドからはアゾメチンイリドが発生しないため、N末端のみで分子連結が行えるのではないかと考えた。このような考えのもとで、ペプチドのN末端で発生させたアゾメチンイリドとマレイミドを用いる1,3-双極子環化付加反応の検討を行った。

【結果】検討の結果、銅触媒を用いることで、ペプチドのN末端での1,3-双極子環化付加反応が、高収率かつ完全なジアステレオ選択性で進行することが明らかとなった。本反応は、目論見通り、リシン側鎖のアミノ基が共存する場合にもN末端選択的に進行することも明らかとなった。また、幅広い構造のイミノペプチドやマレイミド誘導体に利用できるのみならず、様々なケミカルバイオロジーツールの存在下でも利用できたことから、様々な機能性分子の導入に利用できると期待される。加えて、イミン形成および1,3-双極子環化付加反応をワンポットで行う手法の確立にも成功した。本手法により、不安定で単離精製に課題のあるイミンを事前に合成・精製することなく、簡便かつ迅速に修飾することが可能となった。また、ワンポット反応により、2つの機能性部位をペプチドに対して一挙に導入することが可能となった。本手法は、オリゴペプチドを利用した場合にも、簡便かつ高い収率で、2官能基化された目的物を与えた。

N末端選択的な1,3-双極子環化付加反応



101. 均質な機能性ペプチドの創製を可能にする選択的修飾法

金本　和也

東北大学 大学院薬学研究科

Key words：ペプチド修飾，N 末端修飾，1,3-双極子環化付加反応，銅触媒，ワンポット反応

緒　言

ペプチドはタンパク質を構成する構造であり、生命科学分野において重要な役割を果たしている。そのため、近年、複数のペプチドを繋げた中分子ライブラリーの構築や、改変タンパク質の治療薬への利用、蛍光分子を導入したプローブによる生命現象の解明、ドラッグデリバリーなどの目的で、ペプチド修飾技術の開発が精力的に行われている。

特に、タンパク質や抗体の修飾位置や個数の違いが、薬効、代謝、毒性などに大きな影響を与えることが明らかにされるなど、選択的な修飾が喫緊の課題となっている。しかし、一般にペプチドには、リシンのε-アミノ基や水素結合など反応点や相互作用が多いため、選択的に分子を結合させ、均一な生成物を得ることは難しく、課題とされてきた（図 1a）。

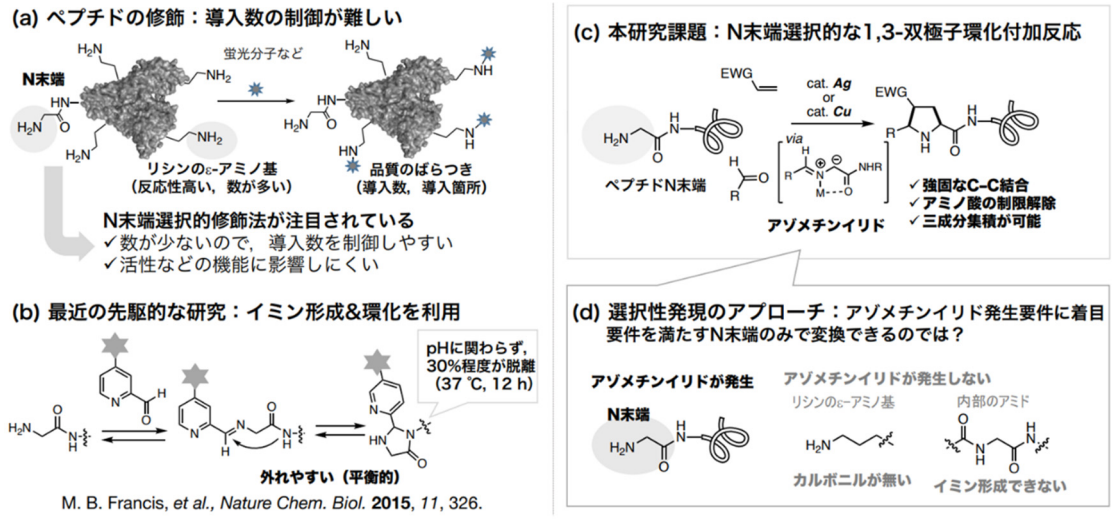


図 1. 本研究の背景

a）ペプチド修飾の背景。　b）最近報告された手法。

c）本研究課題。　d）選択性発現のアプローチ。

これに対して近年、ペプチド内において 1 カ所しか存在せず、分子が新たに結合した場合にも立体構造に影響を与えにくい N 末端に対して、選択的に分子を導入する手法が注目を集めている［1］。一方で、これらの手法には、反応が平衡的であるため生成物が一部解離してしまう点などの課題が残されていた（図 1b）。

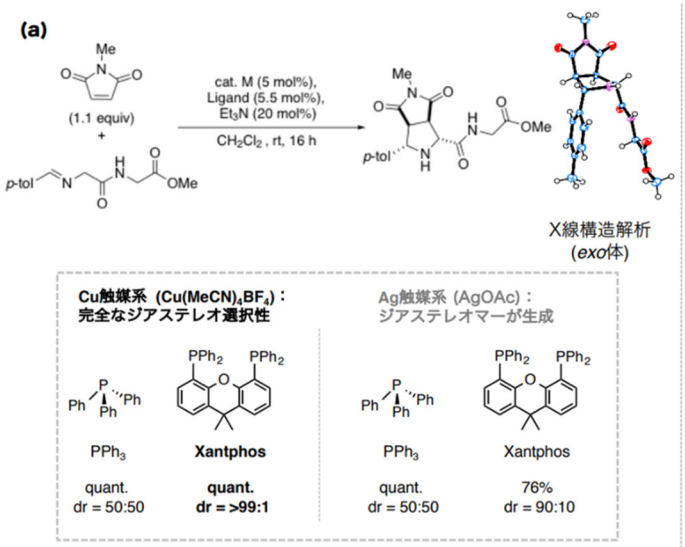
これらの課題に対して本研究課題では、アミノ酸誘導体から容易に発生可能な 1,3-双極子であるアゾメチンイリドが発生するための構造的な要件に着目した、N 末端選択的な修飾法を着想した（図 1c）。すなわち、アゾメチンイリドが発生するためには、無保護のアミノ基の同一炭素上にカルボニル基などの電子求引基が存在する必要があるため、要件を満たす N 末端ではアゾメチンイリドが発生するのに対して、リシンのε-アミノ基や内部ペプチドからはアゾメチンイリドが発生しないため、N 末端のみで分子連結が行えるのではないかと考えた（図 1d）。このような方法を用いて、

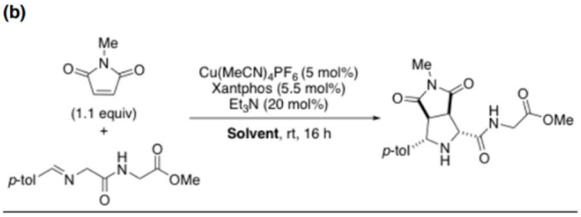
N 末端選択的にペプチドを修飾する基盤を確立することで、幅広く生命科学研究に貢献することを目指し本研究に着手した。

方法および結果

1. N 末端 1、3-双極子環化付加反応の反応条件検討

上記の作業仮説をもとに、N 末端で効率的に 1,3-双極子環化付加反応条件を進行させる反応条件を検討した。その結果、イミノペプチドとマレイミドを用いる反応が、Cu/Xantphos 触媒系で円滑に進行し、定量的かつ完全なジアステレオ選択性で目的物を与えることが明らかとなった（図 2a）。得られた生成物は、単結晶 X 線構造解析の結果 *exo* 体であることが明らかとなった。Ag 触媒を用いる場合にも反応は円滑に進行するものの、ジアステレオ選択性が大きく低下する結果となった。また、溶媒検討の結果、多彩な溶媒中で反応が進行したことから、化合物の性質に合わせて多彩な溶媒中で連結反応を行えると期待できる。特に、水を添加した場合にも円滑に反応が進行した。





entry	solvent	dr	yield (%)
1	MeCN	>99:1	quant.
2	MeCN (5% H_2O)	>99:1	88
3	MeCN (10% H_2O)	>99:1	84 (10 mol% cat)
4	THF	>99:1	96
5	acetone	>99:1	97
6	DMSO	>99:1	93
7	CH_2Cl_2	>99:1	97

図 2. 反応条件の検討

a) 金属触媒と配位子の検討。

b) 溶媒の検討。

2. 基質適用範囲の検討

反応が円滑に進行する反応条件を見出したことから、次に、本反応の構造的要件について精査した。その結果、様々な置換基を有するアルデヒドを用いてイミノペプチドを形成した場合にも非常によく進行することが明らかとなった（図 3a）。加えて、マレイミド部位にも多彩な置換基を導入することが可能であった（図 3b）。特にアルキンなどのさらなる変換に利用できる部位を有する場合にも利用することができた。また、本反応は、様々なケミカルバイオロジーツール（エノン、クマリン、アルキン、アジド、BODIPY、テトラジンなど）の存在下でも定量的に反応が進行し、これらのツールの回収もできることがわかった。これらの結果から、様々な機能性分子をイミン部位やマレイミド部位に載せることで、ペプチドに導入することが可能であると期待される。

3. 修飾位置選択性の検討

本反応は、N 末端選択性に大きな特徴を有すると期待されることから、この選択性について精査した（図 4）。分子間の競争実験を行うと、目論見通り N 末端のイミンのみが変換され、リシン由来のε-アミノ基部分のイミンは全く変換されないことが明らかになった（図 4 a）。また、分子内にリシン部位を有するペプチドを用いた場合にも、N 末端選

択的に反応が進行し、リシン由来のε-アミノ基は残存した（図 4b）。反応終了時にはε-アミノ基部分はイミンとなっており、単離が困難であったが、ヒドロキシアミンを用いるトランスイミノ化によって、アミノ基として単離する手法を確立した。

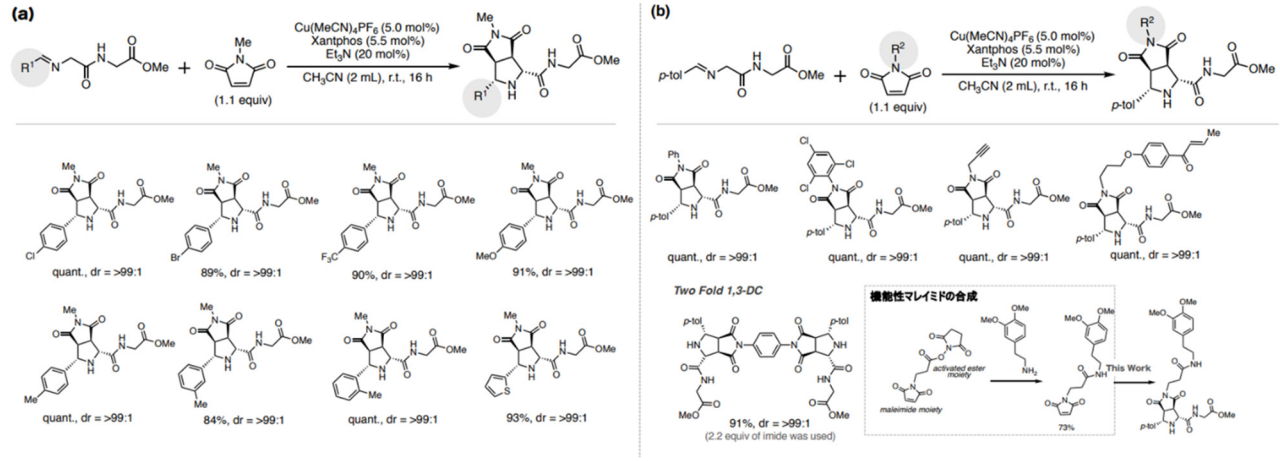


図 3. 基質適用範囲の検討

a）イミン部位の検討。 b）マレイミド誘導体の検討。

また、分子間の競争実験の際に本反応の N 末端グリシン選択性が示唆された（図 4c）。N 末端グリシン構造は、酵素による処理などによって容易に発生させることができるため、N 末端グリシン選択的な手法は、広範に利用できる便利な手法として期待されるが、特定の配列を有する例を除くとほとんど知られておらず [2]、本知見は有望な結果であるといえる。実際に、本反応をグリシン以外の置換基を N 末端に有するペプチドで行ったところ、反応が進行しないことが明らかとなった（図 4c）。ただし、Et_3N を過剰量用いる別条件によって、置換基を有する末端残基にも適用することができた。また、いくつかの末端残基を有するペプチドの混合物において反応を行った場合にも、N 末端グリシンのみで反応が進行し、反応の干渉は起こらないことが明らかとなった（図 4d）。この結果は、多数のペプチドから選択的に N 末端グリシン構造を見分けてタグを導入することで、選択的にラベリングや精製を行えることを示唆しており有望な結果であるといえる。

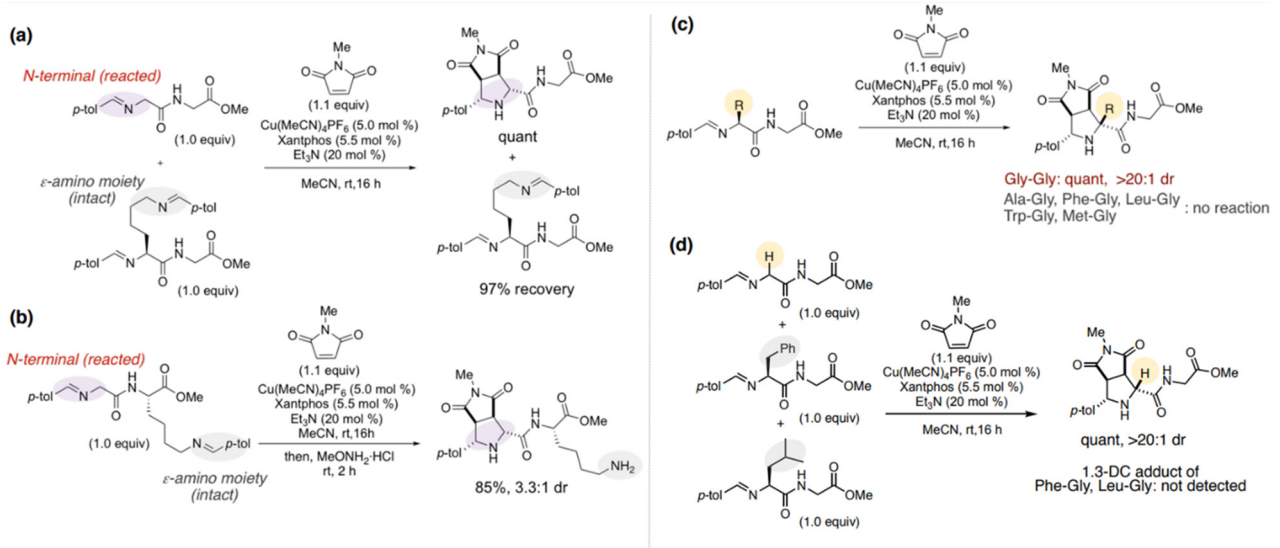


図 4. N 末端グリシン選択性の検討

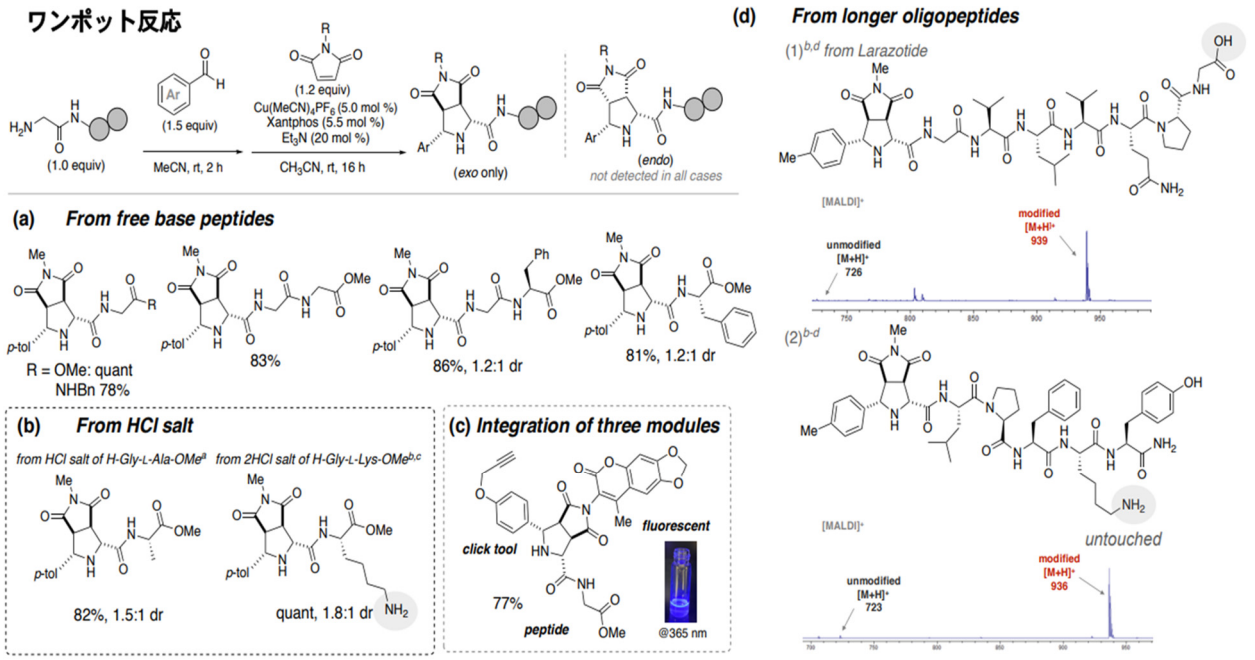
a）N 末端選択性（分子間）の確認。b）N 末端選択性（分子内）の確認。

c）N 末端グリシン選択性の確認。d）混合物からの N 末端グリシンのみの変換。

4. ワンポット反応への展開

これまでの検討から、本手法は、高い収率で様々なペプチド修飾を行える点で極めて有望であるといえる。一方で、不安定で単離精製に課題のあるイミンを、事前に合成・精製する必要があった。そのため、より複雑なペプチドであっても簡便かつ迅速に行うことができ、さらに一挙に 2 つの機能性分子をペプチドに導入できる手法としてワンポット反応の検討に取り組んだ。

検討の結果、フリー体の 2〜3 残基のペプチドにおいて、ワンポット反応が円滑に進行することが明らかとなった（図 5a）。また、固相合成からの酸での切り出しなどを考慮して、塩酸塩からの反応を検討したところ、Et_3N の添加量を増やすことで円滑に進行することがわかった（図 5b）。また、ワンポット反応によって三成分を迅速に連結できる特徴を活かして、2 つの機能性分子を一挙に導入することができた（図 5c）。さらには、本手法は、より長鎖のオリゴペプチドに適用することができた（図 5d）。特に、リシン残基を有する場合にも、N 末端のみでかつ定量的に反応が進行したことは特筆に値すると考えている（図 5d-2）。



[a]Et_3N (1st step: 1.0 equiv, 2nd step: 5.0 equiv), [b]Et_3N (1st step: 2.0 equiv, 2nd step: 10 equiv)
[c]The reaction mixture was treated with $MeONH_2$·HCl in MeOH. [d]10 mol % of $Cu(MeCN)_4PF_6$ and 11 mol % of Xantphos in DMF.

図 5. ワンポット反応への展開
a）ペプチドフリーアミンの反応。b）ペプチド塩酸塩の反応。
c） 三つのモジュールの集積化。d）オリゴペプチドへの適用。

5. デヒドロアラニンを用いる[3+2]環化付加反応の開発

デヒドロアラニン構造は、システイン残基から発生させられる電子不足オレフィンとして、近年注目を集めている。その一方で、これを用いる連結反応は十分でないことから、ペプチドーペプチド連結（ペプチドから発生させたデヒドロアラニン部位とペプチドの N 末端で発生させたアゾメチンイリドの連結）について検討を行うこととした。ジペプチドから発生させたデヒドロアラニンと、ジペプチドから発生させたアゾメチンイリドの反応を試みた。検討の結果、本反応は円滑に進行し、高収率かつ高ジアステレオ選択的に目的物を与えることが明らかとなった。本反応は、ワンポット反応で実施することができ、様々なアルデヒド試薬やペプチドと反応することが明らかになった（図 6）。本反応は、塩を用いて行うことができることも明らかになったが、塩酸塩などのハロゲン化物の塩は銀触媒と反応して不溶性の銀ハロゲン化物を生じるため使用できないことも明らかになった。

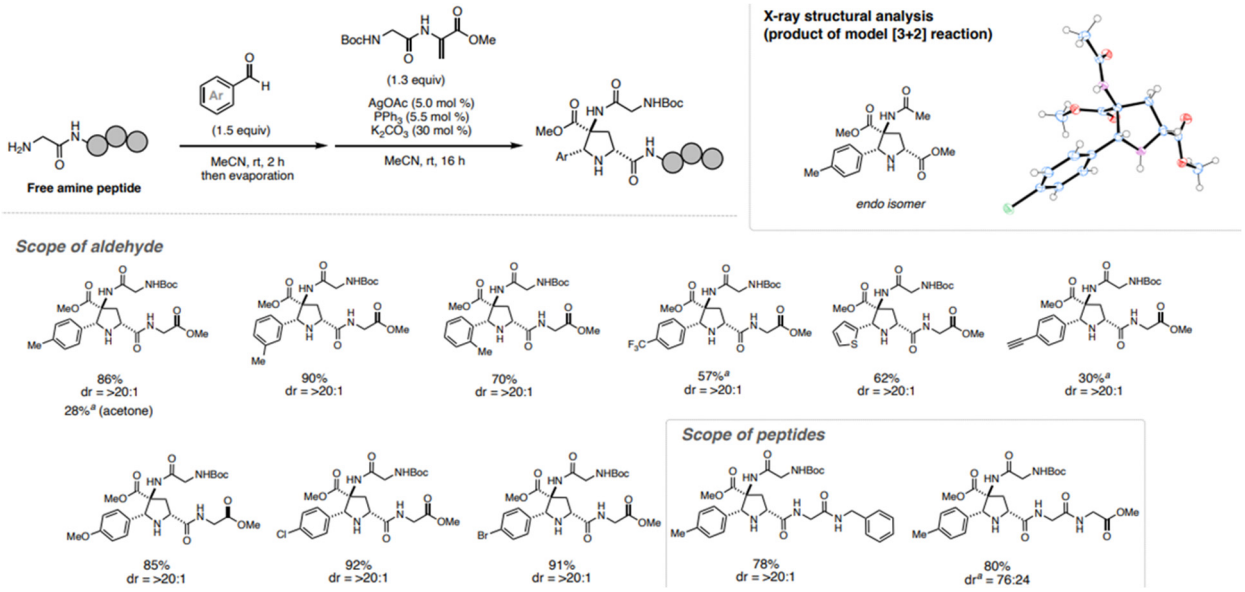


図 6. デヒドロアラニンンを用いる 1,3-双極子環化付加反応

以上のように、本研究課題では、N 末端で活性種のアゾメチンイリドを選択的に発生させることができ、これが効率的なペプチド修飾に利用できることを明らかにした［3］。具体的には、N 末端グリシン選択的な 1,3-双極子環化付加反応が、位置選択的かつ完全な *exo* 選択性で進行することを明らかにした。さらに、イミン形成と 1,3-双極子環化付加反応をワンポットで行うことで、イミンの煩雑な単離精製を挟むことなく迅速に三成分を連結できる手法へと展開した。また、本手法は、Ag 触媒を用いることで、システイン部位から容易に発生可能なデヒドロアラニン構造に対して利用できる萌芽的な知見を得た。これらの一連の手法は、より複雑なペプチドを用いる多重連結法への展開が期待される。

文　献

1） MacDonald J I, Munch H K, Moore T, Francis M B. One-step site-specific modification of native proteins with 2-pyridinecarboxyaldehydes, Nat Chem Biol. 2015 May;11(5):326-31. Epub 2015 Mar 30. PMID: 25822913 DOI: 10.1038/nchembio.1792

2） Purushottam L, Adusumalli S R, Singh U, Unnikrishnan V B, Rawale D G, Gujrati M, Mishra R K, Rai V. Single-site glycine-specific labeling of proteins, Nat Commun. 2019 Jun 10;10(1):2539. PMID: 31182711 DOI: 10.1038/s41467-019-10503-7

3） Machida H, Kanemoto K, Fuwa H. N-Terminal-selective Cu-catalyzed [3+2] cycloaddition for irreversible assembly of two modules with a peptide. ChemRxiv DOI: 0.26434/chemrxiv-2023-sxw2w