

低分子から生体高分子までを標的とする触媒反応開発

東京大学・大学院薬学系研究科

金井 求

1. はじめに

タンパク質や核酸といった生体高分子も低分子と同じ有機化合物であり、これらを反応基質として化学的に構造変換する触媒概念の創出は、新たな分子・生命機能の創造につながると考えている。その実現のためには、安定分子の活性化、化学・位置・標的選択性、保護基の問題、穏和な反応条件、毒性、といった最先端の基礎化学や有機合成化学の課題の克服が必要である。我々は、人工触媒反応を生体内に組み込むことで、生体の化学秩序に合成的かつ積極的に介入して疾病を治療する「**触媒医療**」の実現に向けて研究をおこなっている。この観点から、安定分子を活性化するためのエネルギー源として、光や酸素といった地球環境因子を利用することが適当であると考えている。また翻って、触媒医療を実現する化学反応は、複雑な構造を有する医薬品等の多官能基性低分子の効率的合成法の進歩に必ずや貢献するものと確信している。今回の講演では、酸化的なタンパク質の構造修飾反応の開発と病態治療への応用可能性について議論したい。

2. トリプトファン選択的タンパク質構造修飾反応

天然型アミノ酸残基を標的とするタンパク質の化学的な構造修飾反応は、生命現象の解析、生体適合性材料の創製、酵素機能の改変、新たな治療法の開発など、様々な応用領域を開拓し得るツールとして有望視されている。タンパク質構造修飾反応の例として、リジン（アミノ基）やシステイン（チオール基）などの高反応性側鎖を標的とする反応条件が知られている。しかし、タンパク質表面上には一般的に非常に数多くのリジン残基が存在するため、反応位置や修飾数の制御が困難である。また、システイン側鎖は多くの場合、高次構造保持に寄与するジスルフィド結合として存在するため、チオール基を露出させる還元処理により、タンパク質の高次構造に影響を与え得る。タンパク質表面への露出数が少ない低反応性天然型アミノ酸残基を標的とし得る構造修飾反応は、これらの問題点を解決し得る。しかし、トリプトファンやチロシンなどを標的としたタンパク質構造修飾反応は限られ、多くの場合有毒な重金属触媒や生体に適合し得ない反応条件を必要とする。また、共に電子豊富な芳香環側鎖を有するトリプトファンとチロシンの間の選択性発現は一般に困難である。

我々はセリン選択的酸化的タンパク質切断反応の研究過程^{1,2}において、トリプトファン含有ペプチドを基質とした時、セリン残基で切断された生成物に加え、ペプチドへの keto-ABNO **3a**³ 付加体が相当量得られることを見出していた。反応が比較的高収率であったこと、keto-ABNO のカルボニル部位は試薬誘導化の足がかりとして有効であることなどから、本知見に基づくトリプトファン選択的タンパク質構造修飾反応の開発に着手した。

モデル基質を用いて反応条件の最適化を行った結果、重金属を用いることなく、トリプトファン残基からピロロインドリン骨格を有する生成物 **2** が定量的に得られ

る条件を確立した。すなわち、1 mM の基質 **1** に対して 1 当量の keto-ABNO **3a** と 0.6 当量の亜硝酸ナトリウムを、弱酸性水溶液中、室温、空气中で 30 分間反応させることで、高い収率とトリプトファン選択性で keto-ABNO 複合体 **2** が生成した (Figure 1)。酸化されやすい官能基を有するペプチド **1a-1f** や生物活性ペプチド **1g-1k** を基質として、目的物が高収率で得られた。アルツハイマー病に関連したアミロイドペプチド β 誘導体 **1k** を基質とした場合、生成物の高い凝集性から正確な収率を求めることができなかったが (entry 11)、ESI-MS 測定からはほぼ定量的に目的物が得られたことが示唆されている。

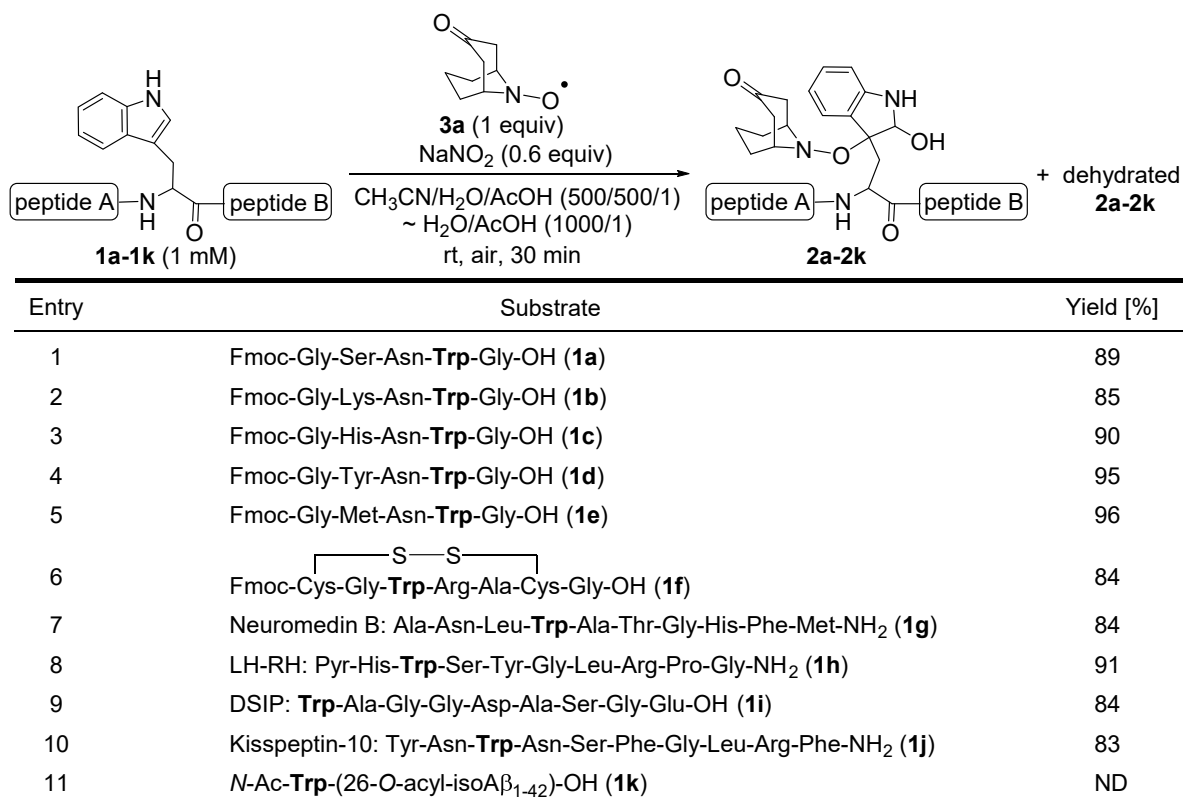


Figure 1. Trp-Selective Bioconjugation of keto-ABNO with Peptides

このトリプトファン選択的構造修飾の反応機構を、Figure 2 のように想定している。実際の反応活性種は、酸性条件下で亜硝酸ナトリウムから生成する NO₂ が **3a** を一電子酸化して生じるオキソアンモニウムカチオン **4** であると考えられる。高い求電子性を有する **4** に対してトリプトファンの側鎖インドール 3 位が Friedel-Crafts 反応をおこし、生じるイミンを溶媒の水がトラップすることで **2** が生成する。

続いて、keto-ABNO/NaNO₂/AcOH 系を種々のタンパク質に適用したところ、トリプトファン側鎖選択的に keto-ABNO の付加反応が起こり、付加体が位置選択的かつ高収率にて得られることを見出した (Figure 3)。keto-ABNO のケトン残基をオキシムへと変換することで修飾の足がかりとし、様々な機能性原子団 (蛍光分子、ビオチン、抗がん剤) を結合させることにも成功した。Concanavalin A (entry 3) や Subtilisin Carlsberg (entry 5) は、通常反応条件では低収率であったが、0.1 M の希塩酸水溶液中で前処理することでタンパク質を変性させ、トリプトファン側鎖をタンパク質表面に露出させると反応が進行した (Figure 3, カッコ内の収率)。また、 β ₂-Microglobulin

は (entry 6)、有機溶媒の入った反応溶媒を用いるとヘム鉄の脱離が問題となったが、水-AcOH 溶媒を用いることでこの副反応を抑えることができた。

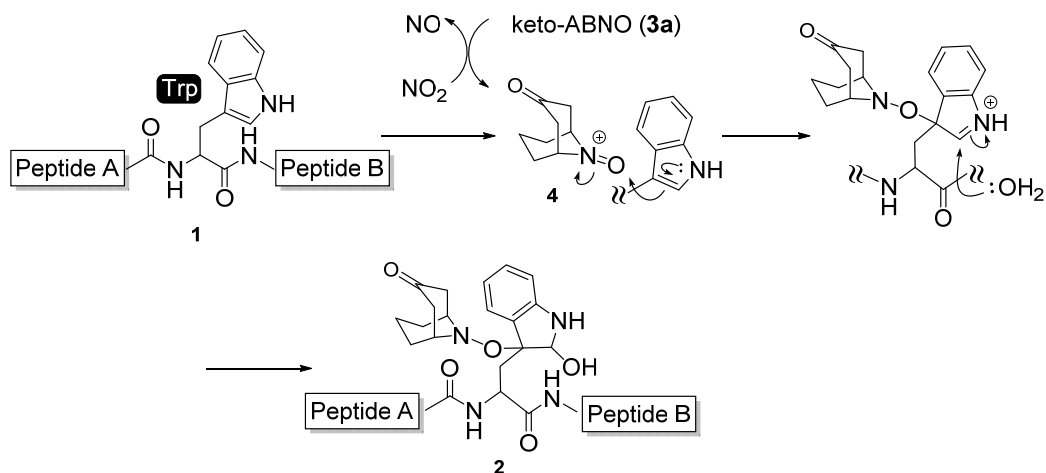


Figure 2. Plausible Reaction Mechanism

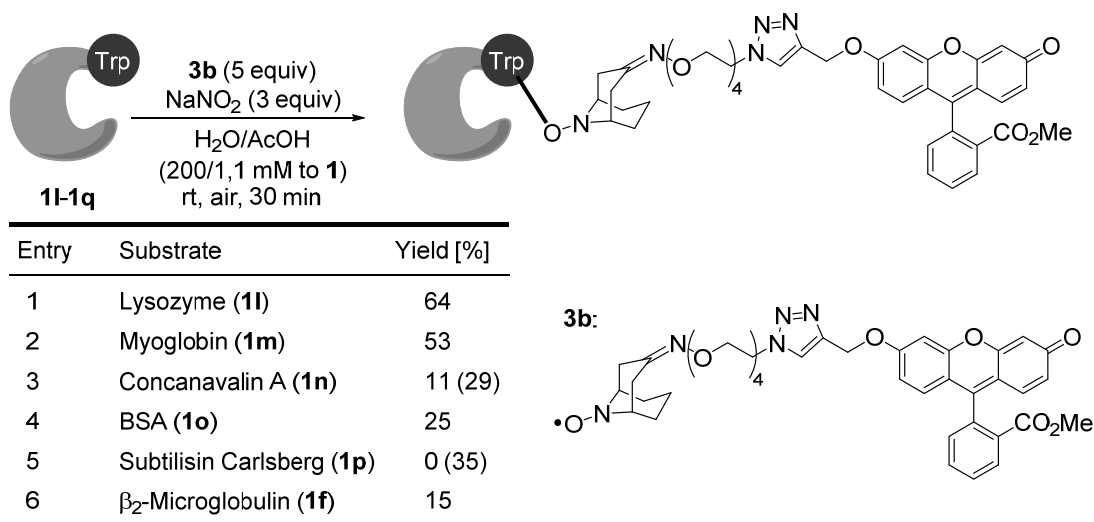


Figure 3. Trp-Selective Bioconjugation of Proteins

本反応は、基本的にはタンパク質の高次構造に影響を与えることなく実施が可能であった。例えば、本法で構造修飾したリゾチームの X 線結晶構造解析に成功し、タンパク質の三次構造は修飾前とほぼ変わらないことを確認している。この特徴は、抗体への低分子医薬複合反応への展開を目指したときに優位に働く。

本研究成果は、遷移金属フリーの温和な条件下、迅速且つ高化学選択的に進行する世界初のトリプトファン選択的修飾反応であり、タンパク質関連研究及び創薬研究において新たなケミカルバイオロジーツールとなることが期待される⁴。また、疾患に関わるタンパク質を人工的な化学反応で積極的に改変し、その機能改変を通じて病態治療につなげることを目指した研究の一步としても意義深い。

3. アミロイドβ光酸素化触媒反応

タンパク質はフォールディングすることにより固有の立体構造を形成して生命機能を担う一方、タンパク質の種類によってはミスフォールディングを起こしアミロイド凝集体とよばれるオリゴマーや線維の凝集体を形成する。アミロイド凝集体の高次構造はクロスβシートとよばれ、一次構造によらず共通してβシート構造の特異な積み重なりを特徴とする。また、これらアミロイド凝集体は細胞傷害性を呈することで様々な疾患を引き起こす。アルツハイマー病におけるアミロイドβ (Aβ) はその代表例である。

アルツハイマー病は、認知機能の低下を主症状とする神経変性疾患の1つであり、日本国内の患者数は、2025年には466万人、2060年には約600-800万人に達すると予想されている。全世界の患者数は2015年には約4680万人と推定され、2050年には約1億3150万人に増加すると予想されている。社会的コストも膨大であり、日本における2014年の認知症全体の社会的コストは14兆5140億円と推定されている。その根治治療薬は現在のところ存在せず、対症療法薬の範疇に入る市販のアルツハイマー病薬も、他疾患に対する薬と比較すると治療満足度・薬剤貢献度ともに低くなっている。

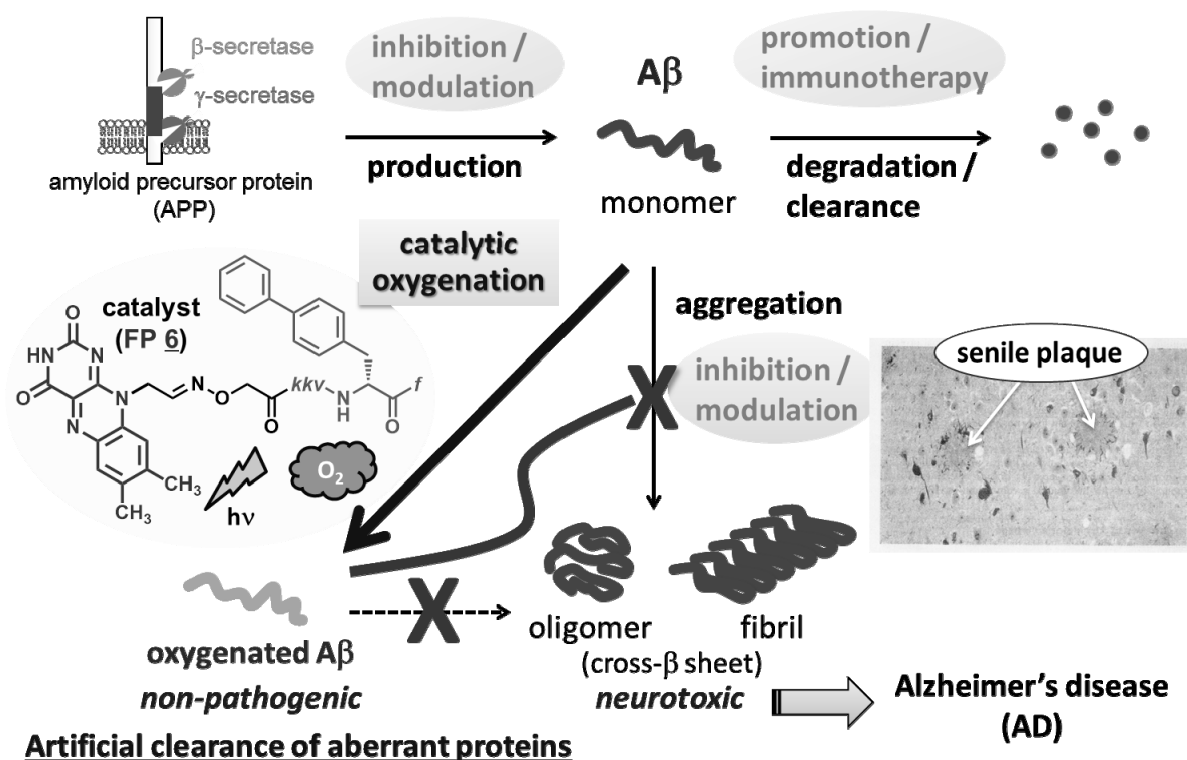


Figure 4. Artificial Photooxygenation of Aβ as a Potential Therapeutic Strategy to Treat Alzheimer Disease

Aβの凝集がアルツハイマー病発症の引き金であるとする「アミロイド仮説」が、広く受け入れられている。Aβは40残基前後のペプチドであり、そのアミロイド凝集体は、アルツハイマー病患者脳内において特徴的に見られる老人斑を構成する。これまで、本仮説に基づきAβを標的とした予防・治療法の開発研究が精力的に進められているが、なかなか成功に至っていない。そこで我々は、Aβの選択的な代謝経

路を、人工触媒を用いて作り出すことができないかと考えた。

この着想の下に我々は、光触媒であるリボフラビン **5** を用いた酸素化反応を利用することによって、 $A\beta$ 1-42 の凝集性および神経毒性を軽減できることを報告した⁵。特に、フラビン分子に $A\beta$ 親和性ペプチドである D-[KLVF(4-phenyl)F]⁶ を結合した触媒 **6** は、細胞存在下においても $A\beta$ を酸素化し、その毒性を低減することができた (Figure 4)。さらに、光酸素化によって生じた酸素化 $A\beta$ 1-42 は、酸素化を受けていない $A\beta$ 1-42 の凝集を阻害することを見出した。従って、 $A\beta$ の酸素化が部分的にでも進行すれば、毒性のある $A\beta$ 凝集体の濃度を大幅に低減できる可能性がある。しかしながら、触媒 **5** や **6** は照射下では常に酸化活性を有するため、*in vivo* において生体分子への非特異的な反応とそれに起因する毒性発現が否めないと考えられる。そこで、病原性の凝集 $A\beta$ 1-42 に対して選択的に酸素化活性を発現する新たな光触媒の開発を目指した。

我々は、蛍光色素であるチオフラビン T (**7**, ThT, Figure 5) が、クロス β シート構造からなるアミロイド凝集体を特異的に検知し、蛍光を発することに着目した。**7** は、電子受容性のベンゾチアゾール部位と電子供与性の *N,N*-ジメチルアニリン部位が炭素-炭素単結合で連結した、ドナー/アクセプター型の色素である。クロス β シート構造を有する凝集 $A\beta$ が存在しないときは、**7** を光励起してもこの単結合が回転して、励起状態は無放射過程で基底状態に戻り、蛍光を発しない。一方、クロス β シート構造が存在すると、**7** はこれに結合することでドナー/アクセプター間の単結合の回転自由度が低下し、その結果、励起状態の長寿命化がおり、蛍光を放出しながら励起状態から基底状態に緩和する。この蛍光発光機構に基づき、クロス β シート構造に結合したときのみ酸素化触媒活性が発現する、新しい触媒 **8** を設計した。

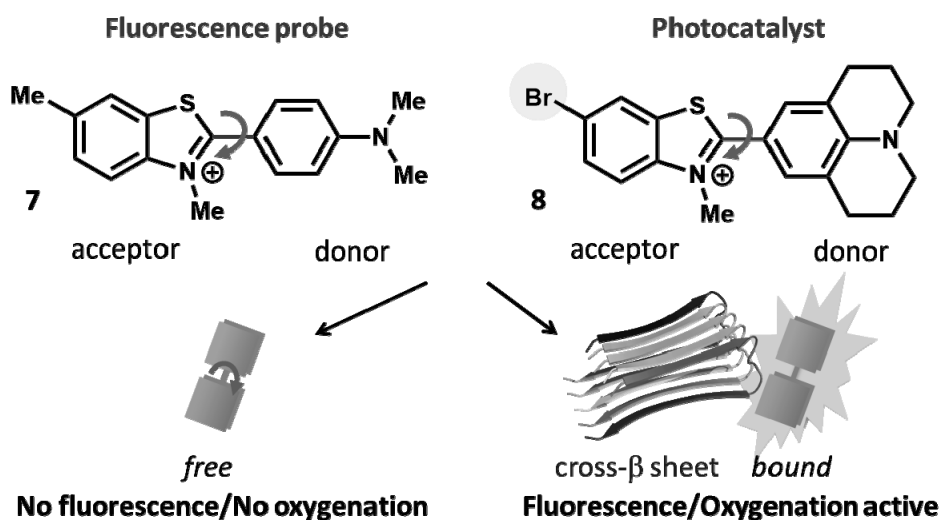


Figure 5. Target-Sensing Fluorescence Probe **7** and Catalyst **8**

すなわち、蛍光分子 **7** を光酸化触媒 **8** へと改変するために、項間交差を促進する重原子である臭素原子をアクセプター側に導入した。また、細胞毒性の少ない長波長の光で励起できるよう、HOMO/LUMO 間のエネルギー差を低下させるべく、ドナー性の高いジメチルアミノ部位を導入した。**7** と同様に、クロス β シート構造が存在しないときに触媒 **8** を光励起しても、ドナー/アクセプター間の単結合の回転により緩和がおり、光酸化触媒活性は発現しない。一方で、**8** が凝集 $A\beta$ のクロス β シー

ト構造に結合すると、ドナー／アクセプター間の単結合の回転が阻害されるために励起状態の寿命が延長し、その結果、光酸素化活性が発現する。この機構 (Target-Sensing Catalyst Activation : TaSCAc) により、凝集 A β に対する高い反応選択性の実現できるものと期待した。

実際、**8** は A β の凝集が進むにつれて、高い酸素化活性を発現することが実験的に確かめられた (Figure 6)。対象として TaSCAc スイッチを備えていないリボフラビン **5** では、A β の凝集が進むにつれて酸素化活性は低下した。TaSCAc スイッチの存在により **8** は、非アミロイド性のペプチド基質に対してはほとんど酸素化活性を示さず、極めて高い選択性を発現した⁷。以上の知見を踏まえて、現在、アルツハイマー病モデルマウスの脳における A β の光酸素化反応とこの反応による治療効果について検討を行っている。

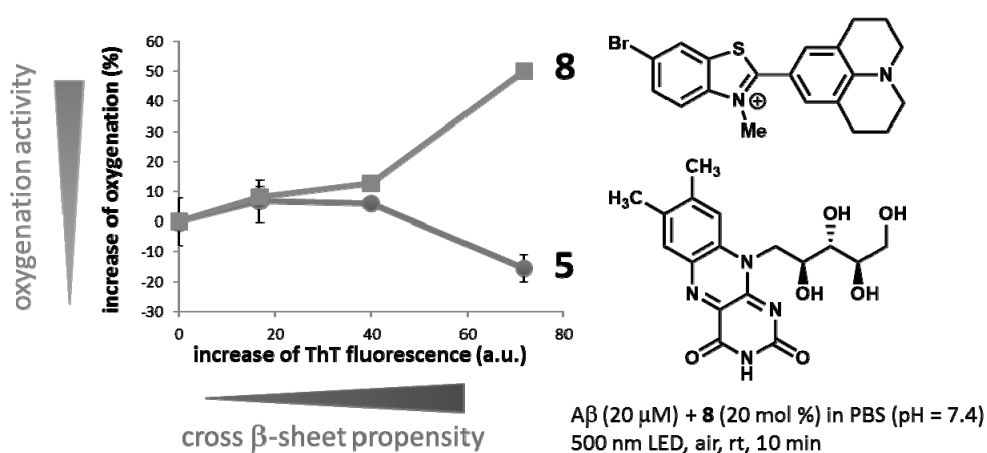


Figure 6. Comparison of Oxygenation Activity Relative to Cross β -Sheet Propensity of A β between Catalyst **8** with TaSCAc Switch and **5** without the Switch

参考文献

1. Seki, Y.; Tanabe, K.; Sasaki, D.; Sohma, Y.; Oisaki, K.; Kanai, M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 6501.
2. (a) 我々が開発した他の残基 (Asn) を標的としたペプチド切断反応 : Tanabe, K.; Taniguchi, A.; Matsumoto, T.; Oisaki, K.; Sohma, Y.; Kanai, M. *Chem. Sci.* **2014**, *5*, 2747. (b) 総説 : Ni, J.; Kanai, M. *Top. Curr. Chem.* **2016**, *372*, 103.
3. Sonobe, T.; Oisaki, K.; Kanai, M. *Chem. Sci.* **2012**, *3*, 3249.
4. Seki, Y.; Ishiyama, T.; Sasaki, D.; Abe, J.; Sohma, Y.; Oisaki, K.; Kanai, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 10798.
5. Taniguchi, A.; Sasaki, D.; Shiohara, A.; Iwatsubo, T.; Tomita, T.; Sohma, Y.; Kanai, M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 1382.
6. Arai, T.; Araya, T.; Sasaki, D.; Taniguchi, A.; Sato, T.; Sohma, Y.; Kanai, M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 8236.
7. Taniguchi, A.; Shimizu, Y.; Oisaki, K.; Sohma, Y.; Kanai, M. *Nat. Chem.* **2016**, *8*, 974.