

※[]内はスライド番号

➤ Azide, Phosphine 以外の bioorthogonal reaction (function group)

アルケンに対してアジド/テトラジン (インバースディールスアルダー) /1,3-双極子付加 / メタセシス(Ru) などを反応させるものが有ります。また、ジスルフィド結合を作る反応や鈴木宮浦クロスカップリングなどをタンパク質に対して行っている例もあります。しかし、これらはまだ細胞アッセイできる段階まで進んでおらず、bioorthogonal reaction と呼んでよいのか現時点では疑問です。(そうした理由からセミナー中では Staudinger ligation と Click chemistry に絞りました)

➤ Bioorthogonal な反応は狙って作れるものなのか

➤ このような Bioorthogonal reaction は今後新たに別のものが見つかると思うか? 見つかりそうならどのようなもの (何と何をくっつけるもの) が考えられるか? また、見つからないとしたらどのような理由からか。探すにあたって何が一番難しいか。

2点まとめてお答えします。今回取り上げた Staudinger ligation は、(元々の Staudinger reaction があったにせよ) 最初から bioorthogonal 的応用を目指して反応開発されてきたと私自身は推測しており、その点ではこのように「狙って」反応を作るのは可能であると思います。その一方、今回調べている過程で「bioorthogonal になりそうでまだなっていない」と言えるような反応が無数に見つかっています。これらの反応は「温和な条件でタンパク質に対して反応をかけているが、bioorthogonality が低く、選択性が低そうである」「bioorthogonality は担保されていそうだが、生体への応用性が難しそうである (ex. クロスカップリング etc.)」の大体どちらかに分類されます。Bioorthogonal 化への一番の困難さはこれら両方を同時にクリアすることにあると考えられます。しかし、candidate は沢山あるのでアジド-ホスフィン (アルキン) の組み合わせに匹敵するようなものがいつかは見つかるのではないのでしょうか。個人的には、メタセシスかカップリングが案外いいところまでいくのではないかと考えています。

➤ Bioorthogonal reaction の問題点や克服すべき課題は何か。今ある反応を如何に応用していくかを考えればいいのか、それとも新たな反応を開発する必要があるのか  
基本的には、今回お示したように既にある反応を応用しているケースが多いですし、新たな反応を開発するよりは既存の反応を利用して基質の導入法と生体への許容性を改善するほうが効率的であるように思います。(新たな反応を開発しても結局この2つを optimize ことになると思うので。) 問題点としては、metabolic pathway で導入できる分子骨格には限りがあるということがやはり最大の問題として挙げられます。

➤ 反応生成物は最終的に生体内にとどまり続けるのか？それとも代謝されて排出されるのか？とどまり続けた場合の長期的な毒性は？

調べた限りではそこまでやっている系は見当たりませんでした。割と直ぐ解剖してしまっているので、長期的なことについても分かりません。推測ですが、標識して直ぐに解剖することが前提の系なのでそういう観点からの研究はしてないのではないかと思います。

➤ ガン細胞などへのイメージングの応用はあるのか

この系ではまだ実現されていませんが、企図されてはいます。

Ref)

Saxon E. ; Bertozzi C. R. *Science*, **2000**, *287*, 2007.

Bertozzi C. R. *et al.* *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, *121*, 4278.

➤ non-native な官能基を標的とする今回のシステムと、native な官能基を標的とするシステムと比べてどちらが有効なのか。

Bioorthogonality 自体は前者のほうが高いと思いますが、生体許容性や反応性等ひっくるめるとケースバイケースだと思うので一概には言えないと思います。

➤ Bertozzi はこれからこの手法をどういうことに応用していこうとしているのか。最終的に何を目標しているのか。

➤ Cell surface のイメージングをして何ができるのか

Staudinger ligation の細胞応用を発表した paper で、Bertozzi は

Applications of this reaction include the chemical construction of new glycosylation patterns on cells, new approaches to tumor cell targeting, and novel receptors for facilitating viral-mediated gene transfer.

と述べています。Bioorthogonal reaction という chemistry の手法を用いることで、人工的細胞修飾・疾患への新たなアプローチを開拓すること、などを目指しているように読めます。

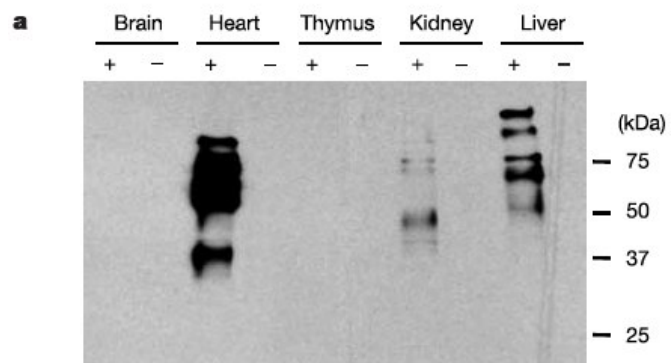
Saxon E. ; Bertozzi C. R. *Science*, **2000**, *287*, 2007.

➤ 蛍光パーツ (FITC など) は細胞に影響ないのか

「影響ない」の定義が難しいところですが、細胞生物学的には live imaging も含めて割と汎用性のある手法なので比較的影響がないと言えると思います。

➤ マンノサミンはどんな細胞に特異的にくっつくのか

細胞一般にある、細胞表面の糖鎖合成経路に取り込まれるので、多寡はあれマンノサミン自体はどの細胞の表面にもあります。しかし、Ac<sub>4</sub>ManAz は肝臓で代謝されること、また腎臓と心臓は UDP-Glc Nac 2-epimerase (Ac<sub>4</sub>ManAz と競合する糖である ManNAc を分泌する)が少ないこと、これらの理由により心臓・腎臓・肝臓のみで選択的にラベルされます。



**Figure 3** Analysis of SiaNAz on cells and in tissues. **a**, Western blot analysis of tissue lysates from Es1<sup>0</sup>/Es1<sup>0</sup> mice administered Ac<sub>4</sub>ManNAz (+) or vehicle alone (-). The same patterns of labelling were apparent in several experiments.

Bertozzi C. R. et al. *Nature*, **2004**, *430*, 873.

- DIFO と BARAC の効果のメカニズム
- BARAC>DIFO となる理由

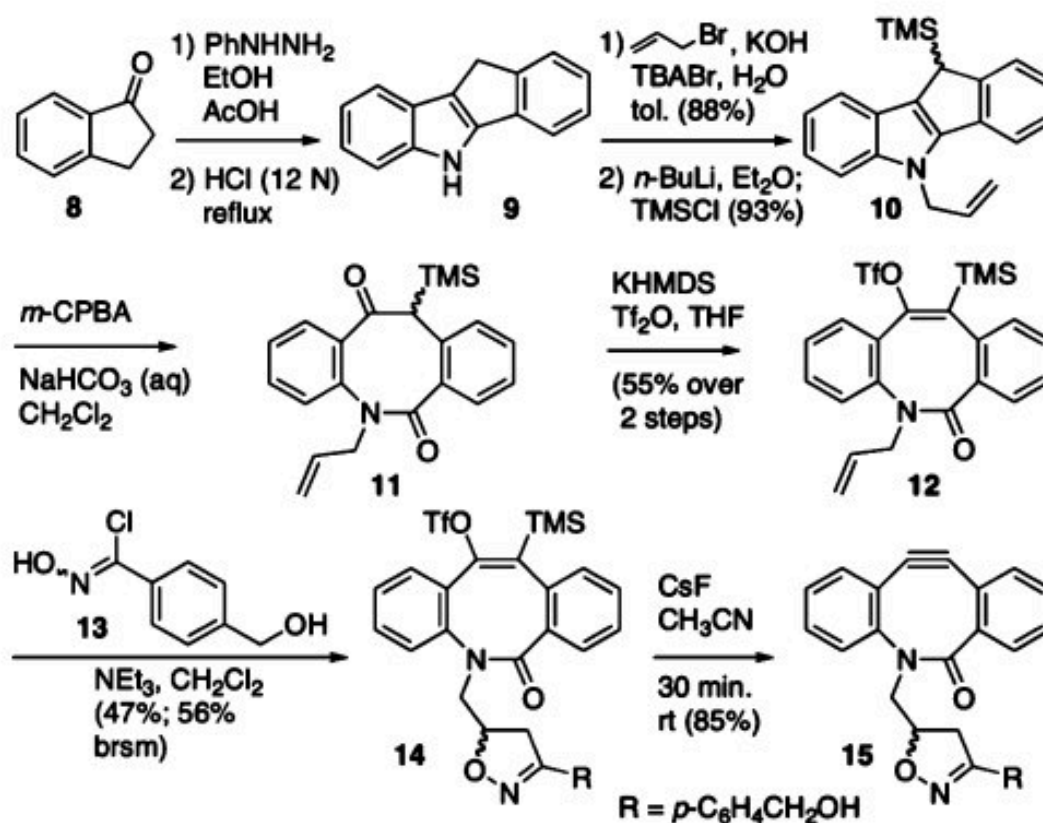
発表スライドの Appendix (37 ページ以降) に載せたので詳しくはそちらをご参照ください。DIFO はフッ素基を導入することで電子的要因から HOMO のエネルギー準位が高く LUMO のエネルギー準位が低くなっており、そのため活性化エネルギーが少ない、という説明がなされています。また、BARAC はシクロオクチンの歪み角が要因となって反応速度が上がっています。電子的要因よりも歪み角の立体的な要因が勝った結果、BARAC のほうが速くなると考えられます。

Ess, D. H. ; Jones, G. O. ; Houk, K. N. *Org. Lett.*, **2008**, *10*, 1633.

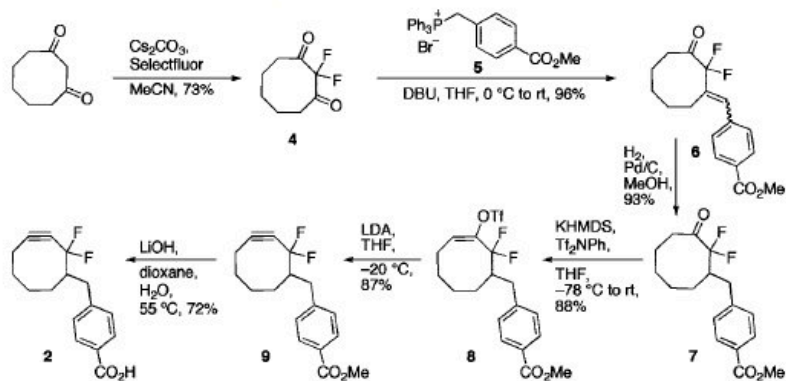
Gordon, C. G. ; Bertozzi, C. R. *et al. J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 9199.

- DIFO, BARAC の合成経路

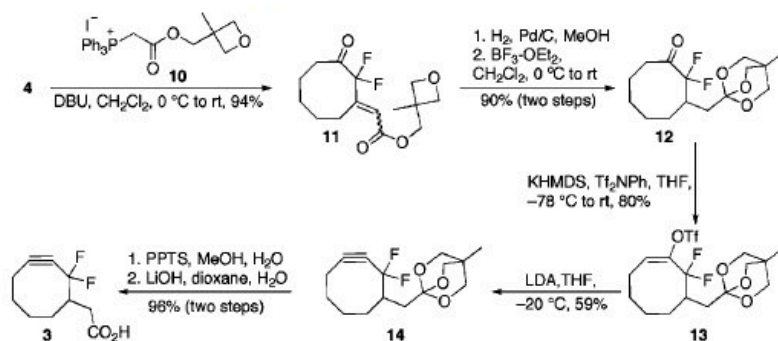
### Scheme 2. Synthesis of BARAC (15)



**Scheme 1.** Synthesis of Second-Generation DIFO Reagent **2**



**Scheme 2.** Synthesis of Second-Generation DIFO Reagent **3**



Jewett, J. C. ; Sletten, E. M.; Bertozzi, C. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 3688.  
 Codelli, J. A. Bertozzi, C. R. *et al. J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 11486.

➤ Cu(I)の毒性を下げて生体に応用している例はないのか

リガンドを開発することで毒性を下げ、細胞へ応用している例があります。代表的なものを以下に示します。

Ref)

Hong, V.; Steinmetz, N. F.; Manchester, M.; Finn, M. G., *Bioconjugate Chem.* **2010**, *21*, 1912.

Soriano del Amo, D.; Wang, W.; Jiang, H.; Besanceney, C.; Yan, A. C.; Levy, M.; Liu, Y.; Marlow, F. L.; Wu, P. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 16893.

- [24] DIFO  $k=0.076$  /M sec より反応速度の大きいアルキンは他にもあるが、何故 DIFO がその後の研究（スライド 25 以降）に用いられたのか  
詳細な記述は見当たりませんが、溶解性や毒性などの反応性以外のファクターがあったのではないかと推測されます。
  
- [27] Fig. I-N 中央の矢印の意味  
ゴルジ体表面に取り込まれた蛍光分子の発光の様子を示しています。