

MAIT 細胞の機能制御リガンド創出のための
有機化学的基礎研究

2 0 2 3

松岡 巧朗

目次

序論	1
第一章 MAIT 細胞の機能を制御するリガンドの創製研究	10
第一節 微生物代謝物由来 5-OP-RU の構造活性相関研究	10
第一項 研究背景	10
第二項 5-OP-RU 誘導体の合成と化学安定性の評価	12
第三項 5-OP-RU 誘導体の活性評価	14
第四項 5-OP-RU 誘導体の相互作用解析	16
第五項 小括	18
第二節 MR1 の細胞表面発現量を指標とするリガンドスクリーニング法の開発と MAIT 細胞制御分子の同定	20
第一項 研究背景	20
第二項 スクリーニング系の構築	20
第三項 Coniferyl aldehyde の構造活性相関研究及び機能解析	26
第四項 Coniferyl aldehyde の相互作用解析	31
第五項 小括	34
実験項	36
参考文献	56
第二章 MAIT 細胞の創薬利用・機能解明を見据えた基盤的研究	61
第一節 可視光レドックス触媒を利用した糖誘導体からの alditol 構造の構築	61
第一項 研究背景	61
第二項 モデル基質を用いた初期検討	64
第三項 基質の再設計と光反応の最適化	66
第四項 (+)-polyoxamic acid の合成への応用	68
第五項 小括	69
第二節 細胞環境下での近接依存的カルボン酸ラベル化を指向した可視光応答性光触媒反応の開発	70
第一項 研究背景	70
第二項 Tetrazole の触媒的光分解における反応性の検討	74
第三項 基質適用範囲の調査	76
第四項 タンパク質に対するラベル化反応の検討	77
第五項 小括	81
実験項	82

参考文献	96
総括	100
論文目録	102
謝辞	103

序論

ヒトを含む脊椎動物の生体防御機構では、病原体に共通する成分を感知して素早く病原体を排除する仕組み（自然免疫）と、惹起に時間はかかるものの、病原体を特異的に排除する仕組み（獲得免疫）が協調して機能している。自然免疫を担う細胞としては、樹状細胞やマクロファージが知られており、Toll 様受容体を介したり多糖の認識などにより、炎症性サイトカインの産生や抗原特異的ヘルパーT細胞の増殖を誘導する（**Figure 1a**）^{1,2}。一方で獲得免疫系は、B細胞やT細胞が中心となって機能する。このうち、T細胞はT細胞受容体（TCR）を用いて、抗原提示細胞（APC）上の主要組織適合性複合体（MHC）が提示する病原体やがん由来のペプチド抗原を認識し、免疫応答の調節や感染細胞・がん細胞の排除を担う（**Figure 1b**）³。生体内には、 10^{11} を超える多様性のTCRが存在すると考えられており、獲得免疫系はヒトが生涯を通じて遭遇しうる多様な異物に対応することができる⁴。

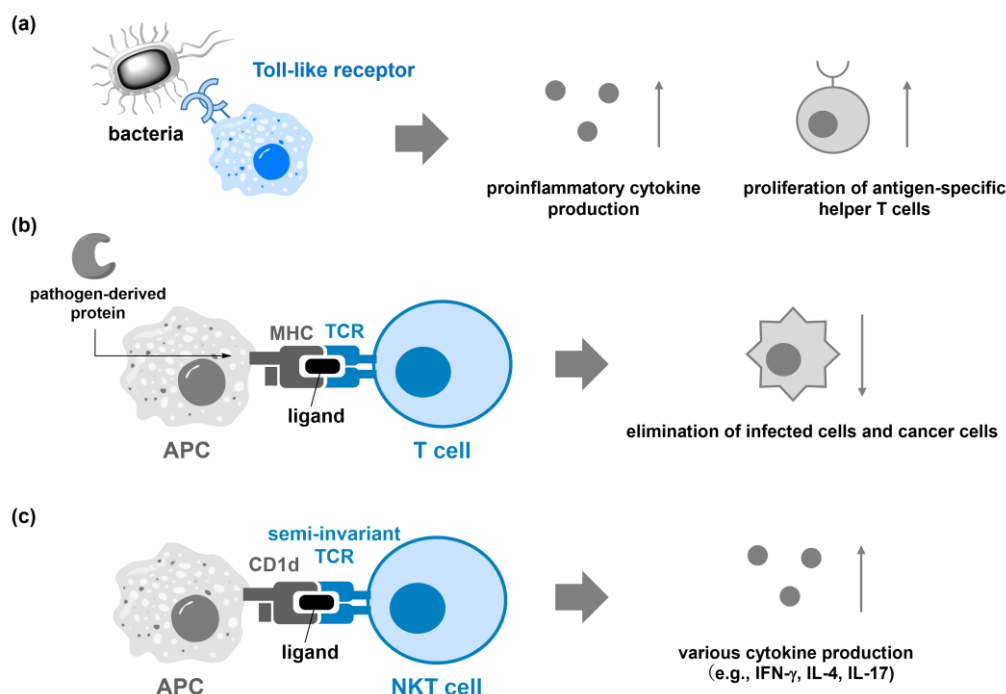


Figure 1. (a) Representative innate immune response. (b) Representative acquired immune response. (c) Immune response by NKT cells.

一方で、近年、自然免疫と獲得免疫の中間の性質を有する「自然免疫様 T 細胞」も免疫系を構成する重要な細胞集団として認識され始めている^{5,6}。自然免疫様 T 細胞は、T 細胞受容体を介した機構により、抗原提示細胞から提示される抗原を認識して活性化する点では、獲得免疫系細胞に似た活性化様式を持つ。一方で、一般的な T 細胞と異なり TCR の多様性は乏しく、病原体由来の特定の抗原のみを認識する（**Figure 2**）。また、免疫応答の速さの観点から比較すると、獲得免疫では惹起に数日から数週間かかるのに対し、自然免疫様 T 細胞は数時間から数日で応答を示す。つまり、自然免疫様 T 細胞は、T 細胞でありながら、自然免疫系細胞に近い性質を持つ。さらに、各 T 細胞への抗原提示を担う MHC にも大きな違いがある。獲得免疫を担う T 細胞へ抗原提示を行う古典的 MHC は多型性を有し、個人によって抗原提示できる抗原の構造に違いがある一方で、自然免疫様 T

細胞への抗原提示を担う非古典的 MHC は多型性をほとんど持たず、ほぼ全ての人が同様の抗原を提示する。

代表的な自然免疫様 T 細胞としては、NKT 細胞が知られている。NKT 細胞は、非古典的 MHC クラス I 分子の一つである CD1d によって抗原提示された糖脂質リガンドを認識して活性化される細胞であり、活性化すると様々なサイトカイン (IFN- γ , IL-4, IL-17 など) を産生する (Figure 1c)。これにより、免疫系は賦活化され、病原体の排除に関わる⁷。そのため、NKT 細胞活性化リガンドをワクチンアジュバントとして利用する試みも近年盛んに行われている。また、生体防御における NKT 細胞の重要性は様々な実験で確かめられており、インフルエンザウイルスやマラリアをはじめとする種々感染症から身を守る上で、必要不可欠な存在として位置づけられている。

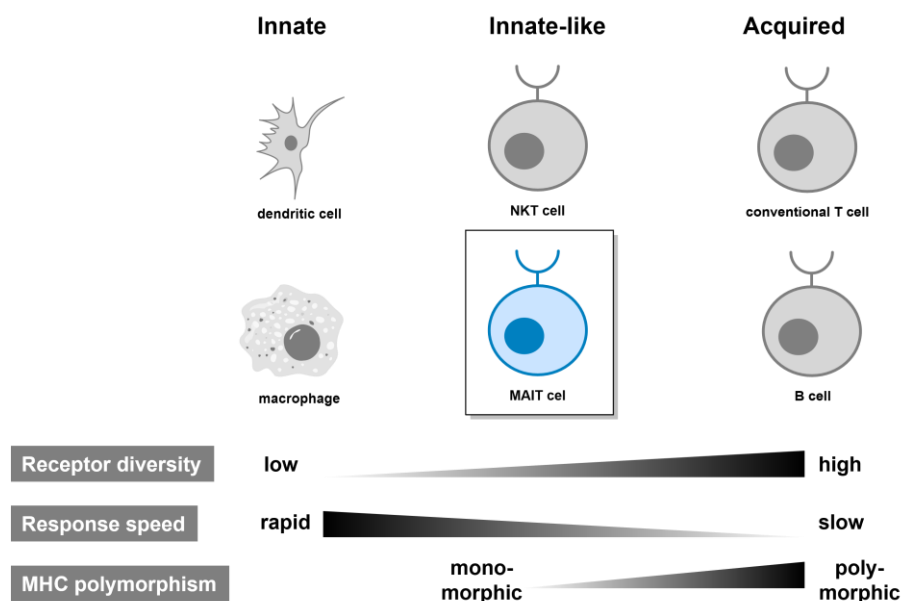


Figure 2. Characteristics of innate-like T cells.

本研究において著者は、NKT 細胞と並んで近年注目を集めている自然免疫様 T 細胞である mucosal-associated invariant T (MAIT) 細胞に着目した (Figure 3)^{8,9}。MAIT 細胞は、ヒトの末梢組織に豊富に存在することが知られており、特に腸管、肝臓、末梢血において存在量が多い。生体内のほとんどの T 細胞は、 α 鎖と β 鎖から成る TCR を有する $\alpha\beta$ T 細胞であるが、肝臓中の $\alpha\beta$ T 細胞のうち 45%、末梢血中の $\alpha\beta$ T 細胞のうち 10%、腸管の $\alpha\beta$ T 細胞のうち 3% が MAIT 細胞であると見積もられている (Figure 3a)^{10,11}。その存在量は NKT 細胞と比較してもはるかに多く¹²、ヒト最大の T 細胞亜集団として広く認知されている。

MAIT 細胞は以下のようにして活性化されることが明らかとなっている。低分子化合物が非古典的 MHC クラス I 分子の一つである MHC class-I related protein 1 (MR1) によって提示され、MAIT 細胞は TCR を介してその低分子化合物を認識し、活性化される^{8,9}。MAIT 細胞が発現する TCR はほぼすべてのヒトで保存されており、TCR を構成する α 鎖と β 鎖のうち、 α 鎖の変領域は主に TRAV1-2 と TRAJ33 遺伝子からなる構造に限定されている。 β 鎖においても、変領域は TRBV6 や TRBV20 遺伝子などいくつかのバリエーションが存在するものの、その種類は数種類に限定されている。また、活性化した MAIT 細胞は、IFN- γ や IL-17 などのサイトカインを産生する他、CD40L の細胞表面

発現量を上昇させ、樹状細胞の成熟を促すことができる。すなわち、MAIT 細胞は NKT 細胞同様、自然免疫系・獲得免疫系の活性化を誘導し、間接的に病原体感染細胞やがん細胞の排除をサポートしている (Figure 3b)。

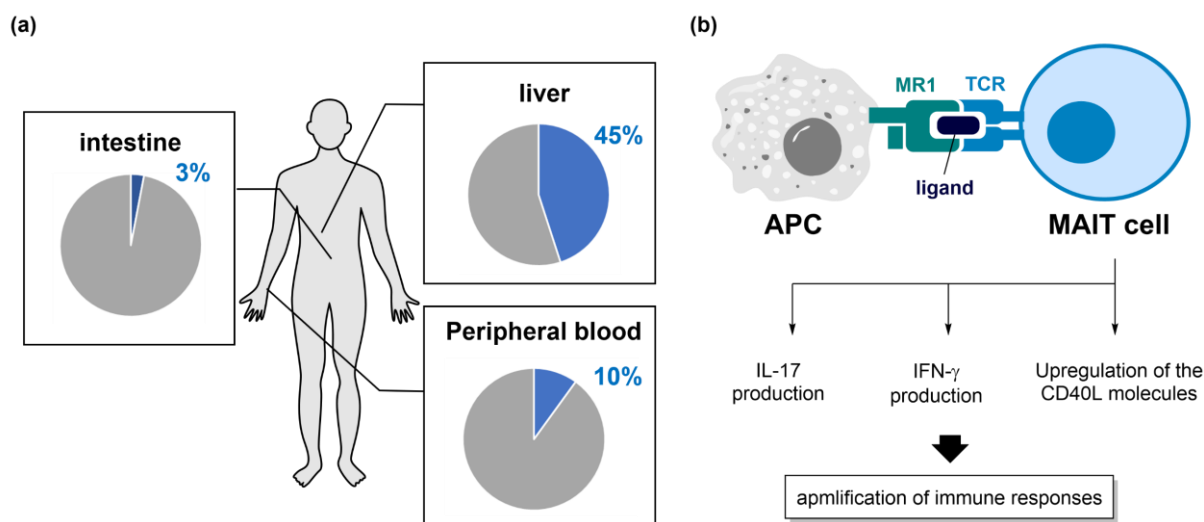


Figure 3. (a) Localization and (b) function of MAIT cells.

MR1 から MAIT 細胞へ提示される抗原については、ここ 10 年の間に様々な低分子化合物が発見された¹³⁻¹⁶。獲得免疫系細胞への抗原提示を担う古典的 MHC がペプチドを抗原として提示するのに対して、MR1 は低分子芳香族化合物を抗原として提示する傾向がある。MR1 に提示される抗原 (MR1 リガンド) としては、微生物代謝物や薬物に由来する分子が多く報告されている (Figure 4)。その代表的な例として、リボフラビン (ビタミン B₂) の生合成中間体に由来する 5-(2-oxopropylideneamino)-6-D-ribitylaminouracil (5-OP-RU)、6,7-dimethyl-8-D-ribityllumazine (RL-6,7-diMe)、7-hydroxy-6-methyl-8-D-ribityllumazine (RL-6-Me-7-OH)、および 6-hydroxymethyl-8-D-ribityllumazine (rRL-6-CH₂OH) が知られており、これらは MAIT 細胞活性化作用 (アゴニスト作用) を有することが報告されている^{13,14}。また、葉酸 (ビタミン B₉) の光分解に由来する 6-formylpterin (6-FP) 及びその構造類縁体 (Ac-6-FP、i6-FP) は、MAIT 細胞活性化作用を持たないものの、MR1 に強く結合し、5-OP-RU などによる MAIT 細胞の活性化を阻害 (アンタゴニストとして機能) する^{13,15,16}。薬物及びその関連分子に関しては、dichlofenac や 5-formylsalicylic acid (5-F-SA) が、それぞれアゴニスト、アンタゴニストとして作用することが報告されている¹⁷。さらに、最近では、食事成分に由来する vanillin や、ウラシル環を持つ DB-28 がアンタゴニスト作用を持つ MR1 リガンドとして見出されている^{18,19}。これらの MAIT 細胞制御リガンドを創薬へ応用する試みも現在進められており、Pankhurst らは、MAIT 細胞活性化剤である 5-OP-RU がワクチンアジュバントとして有用であることを示している²⁰⁻²²。また、MAIT 細胞活性化阻害作用を有する 6-FP の構造類縁体 i6-FP は、自己免疫疾患の症状の一つであるループスの改善に有効であることも報告されている¹⁶。

一方、様々な実験結果から、未知 MR1 リガンドの存在が示唆されている。前述の通り、微生物代謝物や薬物に由来する分子が MR1 リガンドとして報告されているものの、無菌マウスにおいても胸腺における MAIT 細胞のセレクションが行われることが確認されていることから、微生物代謝物に由来しない内因性化合物が MR1 リガンドとして存在するのではないかと考えられている²³。また、

リボフラビン生合成に由来しない微生物代謝物や、がん由来する MR1 リガンドが存在することを示唆するデータも示されている²⁴⁻²⁶。さらに、これまでに報告されている MR1 リガンドの構造多様性を踏まえると、上記以外にも未同定の内因性・外因性 MR1 リガンドが多数存在すると考えられる。したがって、このような未知 MR1 リガンドの同定のための効率的リガンド探索法の開発が望まれている。

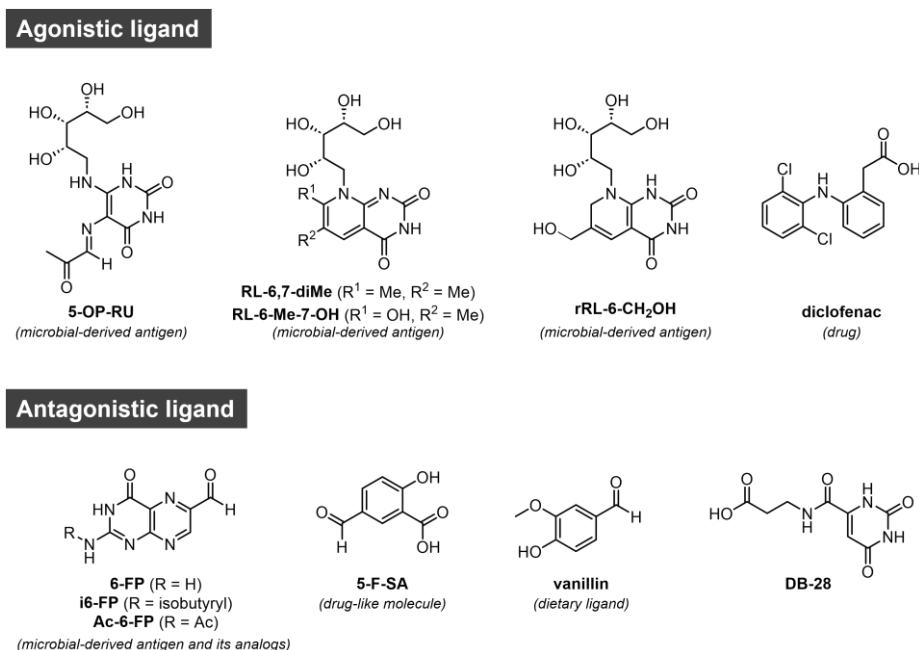


Figure 4. Representative MR1 ligands.

MAIT 細胞以外でも、MR1 に提示される抗原を認識し活性化する T 細胞 (MR1T 細胞) の存在が知られているが、それらに関する理解は進んでいない²⁷。これまでの研究から、MR1T 細胞は、① MAIT 細胞、② non-canonical MAIT 細胞、③ atypical MR1T 細胞の 3 種類に分類することができる (Figure 5)。Non-canonical MAIT 細胞は、MAIT 細胞と表現型が類似する一方で、異なる TCR を有しており、リガンドに対する応答の様式が異なる。また、atypical MR1T 細胞は MAIT 細胞と表現型も TCR の種類も異なる細胞群である。これらの細胞は、ヒト生体内の存在量が MAIT 細胞に比べてはるかに少ないことが知られているものの、特徴的なリガンド応答を示すため、近年興味を持たれている。例えば、Ac-6-FP は MAIT 細胞に対して活性化作用を示さないが、いくつかの non-canonical MAIT 細胞、atypical MR1T 細胞を活性化することが報告されている²⁸。また、がん治療に応用できる可能性のある MR1T 細胞や *Streptococcus pyogenes* 由来の抗原を認識して活性化する MR1T 細胞も見出されている²⁴⁻²⁶。一方で、既存の MR1T 細胞検出法は、抗原/MR1 複合体とある程度強く相互作用する T 細胞しか検出できないか、検出に数週間の時間を要するなど、網羅性・迅速性の観点で課題が残っている。したがって、それらを解消するような MR1T 細胞検出法を開発できれば、MR1T 細胞の理解に貢献できると考えられる。

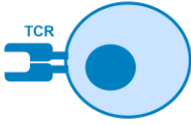
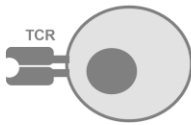
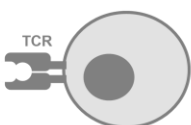
	Population in human blood (%)	phenotype	Response to each ligand			
			5-OP-RU	Ac-6-FP	mammalian tumor derived antigen	<i>Streptococcus pyogenes</i> derived antigen
 MAIT cell	1-10	■ PLZF ⁺ ■ CD161 ⁺ ■ IL-18R ⁺	activation	inhibition	no activation	weak activation
 non-canonical MAIT cell	0.001-0.01	■ PLZF ⁺ ■ CD161 ⁺ ■ IL-18R ⁺	activation (some) ^a	activation (some) ^a	-	activation (some) ^a
 atypical MR1T cell	up to 0.04	■ PLZF ⁻	activation (some) ^a	activation (some) ^a	activation (some) ^a	activation (some) ^a

Figure 5. Characteristics of MR1T cells. ^aSome specific T cells in this category are activated.

以上を踏まえ、著者は、MAIT 細胞の創薬利用を見据えた機能制御リガンドの探索・構造活性相関研究（第一章）、及び創薬利用・機能解明に資する基盤的研究（第二章）を実施した。

第一章第一節では、MAIT 細胞活性化リガンドの一つである、5-OP-RU の構造活性相関研究について記述する（**Figure 6a**）。MR1/5-OP-RU/TCR の三者複合体の X 線結晶構造は既に報告されているものの、MAIT 細胞の活性化に重要な相互作用は明らかにされていない。そこで、5-OP-RU の構造をベースとした創薬展開を見据え、5-OP-RU の構造活性相関研究を実施した結果、活性発現に重要な部分構造を同定することに成功した。

第一章第二節では、MR1 リガンドのスクリーニング法の確立について記述する（**Figure 6b**）。現在、未同定の MR1 リガンドの存在が示唆されている一方で、それらを効率的に探索する方法は確立されていない。そこで、抗原提示を担う MR1 の性質を利用して、スループット性の高いスクリーニング系を開発した。また、本スクリーニング系を利用することによって、生薬や食用植物に含まれる成分を MR1 リガンドとして見出すことに成功した。

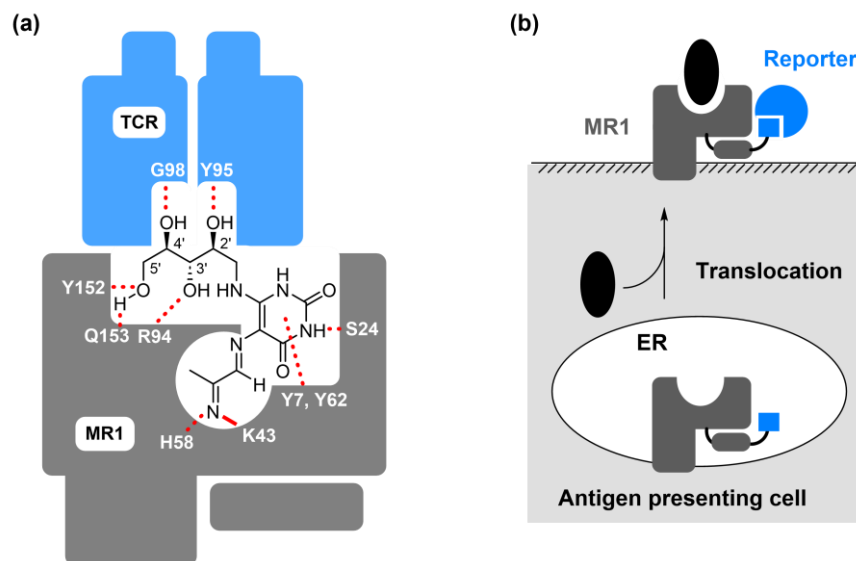


Figure 6. Overview of Chapter 1. (a) Section 1. (b) Section 2.

第二章第一節では、5-OP-RUをはじめとする、様々な生物活性天然物の鍵構造に誘導可能な、alditol 構造を構築する反応の開発について記述する (**Figure 7a**)。不斉中心を持つ極性官能基が連続する alditol 型の直鎖構造は天然物にしばしば見られ、受容体との相互作用において重要な役割を担うことが多い。その一方で、立体異性体を含む構造類縁体を網羅的に構築することは未だ困難である。著者は、可視光レドックス触媒を用いることで、各種ヒドロキシ基を保護した hexose 誘導体を出発物質として、様々な構造類縁体に変換可能な alditol 構造を構築する方法を開発した。

第二章第二節では、MR1^{hi} 細胞を網羅的かつ迅速に検出する方法を確立することを目的として、触媒的 nitrile imine 形成反応の開発を行った (**Figure 7b**)。前述の通り、既存の MR1^{hi} 細胞検出法は、網羅性・迅速性の点で課題が残る。そこで、著者は、新たなラベル化ツールとして、MR1 テトラマー/光触媒コンジュゲートを用いて、近接依存的に標的細胞上の官能基を修飾する戦略を立案した。それを実現するために、生理的条件下において、光触媒によってカルボン酸をラベル化する手法の開発に取り組んだ。

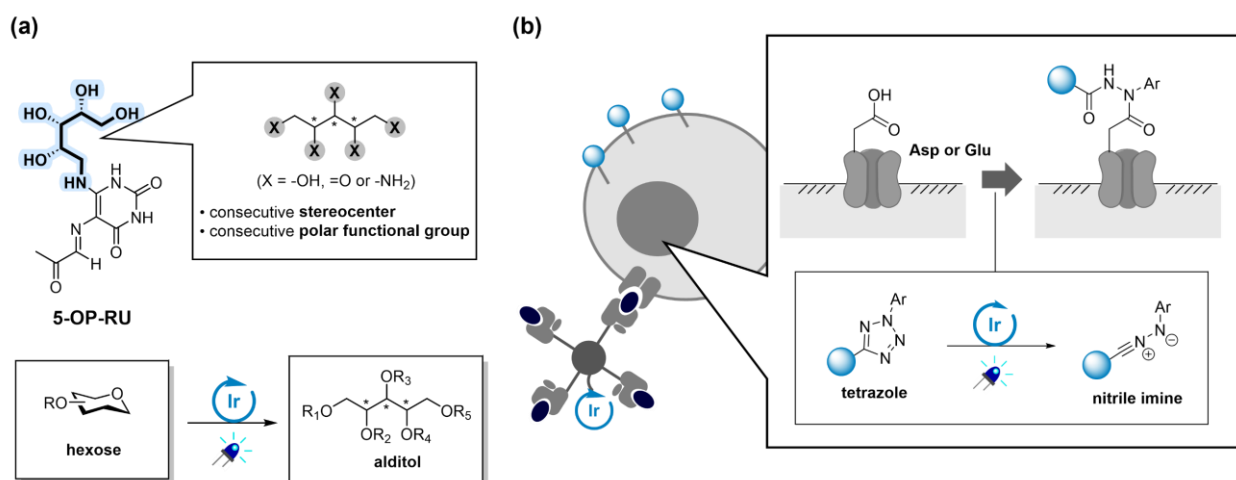


Figure 7. Overview of Chapter 2. (a) Section 1. (b) Section 2.

参考文献

- (1) Medzhitov, R. Recognition of Microorganisms and Activation of the Immune Response. *Nature* **2007**, *449*, 819–826.
- (2) Akira, S.; Uematsu, S.; Takeuchi, O. Pathogen Recognition and Innate Immunity. *Cell* **2006**, *124*, 783–801.
- (3) Bonilla, F. A.; Oettgen, H. C. Adaptive Immunity. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2010**, *125*, S33–S40.
- (4) Robins, H. S.; Srivastava, S. K.; Campregher, P. V.; Turtle, C.; Andriesen, J.; Riddell, S. R.; Carlson, C. S.; Warren, E. H. Overlap and Effective Size of the Human CD8⁺ T Cell Receptor Repertoire. *Sci. Transl. Med.* **2010**, *2*, 1–9.
- (5) Godfrey, D. I.; Uldrich, A. P.; McCluskey, J.; Rossjohn, J.; Moody, D. B. The Burgeoning Family of Unconventional T Cell. *Nat. Immunol.* **2015**, *16*, 1114–1124.
- (6) Ruf, B.; Greten, T. F.; Korangy, F. Innate Lymphoid Cell and Innate-Like T Cell in Cancer — at the Crossroads of Innate and Adaptive Immunity. *Nat. Rev. Cancer* **2023**, *23*, 351–371.
- (7) Salio, M.; Silk, J. D.; Jones, E. Y.; Cerundolo, V. Biology of CD1- and MR1-Restricted T Cells. *Annu. Rev. Immunol.* **2014**, *32*, 323–366.
- (8) Mak, J. Y. W.; Liu, L.; Fairlie, D. P. Chemical Modulators of Mucosal Associated Invariant T Cells. *Acc. Chem. Res.* **2021**, *54*, 3462–3475.
- (9) Godfrey, D. I.; Koay, H.-F.; McCluskey, J.; Gherardin, N. A. The Biology and Functional Importance of MAIT Cells. *Nat. Immunol.* **2019**, *20*, 1110–1128.
- (10) Dusseaux, M.; Martin, E.; Serriari, N.; Péguillet, I.; Premel, V.; Louis, D.; Milder, M.; Le Bourhis, L.; Soudais, C.; Treiner, E.; Lantz, O. Human MAIT Cells Are Xenobiotic-Resistant, Tissue-Targeted, CD161hi IL-17-Secreting T Cells. *Blood* **2011**, *117*, 1250–1259.
- (11) Gherardin, N. A.; Souter, M. N.; Koay, H.-F.; Mangas, K. M.; Seemann, T.; Stinear, T. P.; Eckle, S. B. G.; d’Udekem, Y.; Konstantinov, I. E.; Fairlie, D. P.; Ritchie, D. S.; Neeson, P. J.; Pellicci, D. G.; Uldrich, A. P.; McCluskey, J.; Godfrey, D. I. Human Blood MAIT Cell Subsets Defined Using MR1 Tetramers. *Immunol. Cell Biol.* **2018**, *96*, 507–525.
- (12) ヒトの血液中における NKT 細胞の存在量は、0.001%–0.5%程度であると見積もられている。
Liao, C.-M.; Zimmer, M. I.; Wang, C.-R. The Function of Type I and Type II Natural Killer T Cells in Inflammatory Bowel Diseases. *Inflamm. Bowel Dis.* **2013**, *19*, 1330–1338.
- (13) Kjer-Nielsen, L.; Patel, O.; Corbett, A. J.; Le Nours, J.; Meehan, B.; Liu, L.; Bhati, M.; Chen, Z.; Kostenko, L.; Reantragoon, R.; Williamson, N. A.; Purcell, A. W.; Dudek, N. L.; McConville, M. J.; O’Hair, R. A. J.; Khairallah, G. N.; Godfrey, D. I.; Fairlie, D. P.; Rossjohn, J.; McCluskey, J. MR1 Presents Microbial Vitamin B Metabolites to MAIT Cells. *Nature* **2012**, *491*, 717–723.
- (14) Corbett, A. J.; Eckle, S. B. G.; Birkinshaw, R. W.; Liu, L.; Patel, O.; Mahony, J.; Chen, Z.; Reantragoon, R.; Meehan, B.; Cao, H.; Williamson, N. A.; Strugnell, R. A.; Sinderen, D. V.; Mak, J. Y. W.; Fairlie, D. P.; Kjer-Nielsen, L.; Rossjohn, J.; McCluskey, J. T-Cell Activation by Transitory Neo-Antigens Derived from Distinct Microbial Pathways. *Nature* **2014**, *509*, 361–365.
- (15) Eckle, S. B. G.; Birkinshaw, R. W.; Kostenko, L.; Corbett, A. J.; McWilliam, H. E. G.; Reantragoon, R.;

- Chen, Z.; Gherardin, N. A.; Beddoe, T.; Liu, L.; Patel, O.; Meehan, B.; Fairlie, D. P.; Villadangos, J. A.; Godfrey, D. I.; Kjer-Nielsen, L.; McCluskey, J.; Rossjohn, J. A Molecular Basis Underpinning the T Cell Receptor Heterogeneity of Mucosal-Associated Invariant T Cells. *J. Exp. Med.* **2014**, *211*, 1585–1600.
- (16) Murayama, G.; Chiba, A.; Suzuki, H.; Nomura, A.; Mizuno, T.; Kuga, T.; Nakamura, S.; Amano, H.; Hirose, S.; Yamaji, K.; Suzuki, Y.; Tamura, N.; Miyake, S. A Critical Role for Mucosal-Associated Invariant T Cells as Regulators and Therapeutic Targets in Systemic Lupus Erythematosus. *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 2681.
- (17) Keller, A. N.; Eckle, S. B. G.; Xu, W.; Liu, L.; Hughes, V. A.; Mak, J. Y. W.; Meehan, B. S.; Pediongco, T.; Birkinshaw, R. W.; Chen, Z.; Wang, H.; D'Souza, C.; Kjer-Nielsen, L.; Gherardin, N. A.; Godfrey, D. I.; Kostenko, L.; Corbett, A. J.; Purcell, A. W.; Fairlie, D. P.; McCluskey, J.; Rossjohn, J. Drugs and Drug-Like Molecules Can Modulate the Function of Mucosal-Associated Invariant T Cells. *Nat. Immunol.* **2017**, *18*, 402–411.
- (18) Wang, C. J. H.; Awad, W.; Liu, L.; Mak, J. Y. W.; Veerapen, N.; Illing, P. T.; Purcell, A. W.; Eckle, S. B. G.; McCluskey, J.; Besra, G. S.; Fairlie, D. P.; Rossjohn, J.; Le Nours, J. Quantitative Affinity Measurement of Small Molecule Ligand Binding to Major Histocompatibility Complex Class-I Related Protein 1 MR1. *J. Biol. Chem.* **2022**, *298*, 102714.
- (19) Salio, M.; Awad, W.; Veerapen, N.; Cerundolo, V. Ligand-Dependent Downregulation of MR1 Cell Surface Expression. *Prod. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2020**, *117*, 10465–10475.
- (20) Pankhurst, T. E.; Buick, K. H.; Lange, J. L.; Marshall, A. J.; Button, K. R.; Palmer, O. R.; Farrand, K. J.; Stewart, I. F. N.; Bird, T.; Mason, N. C.; Compton, B. J.; Comoletti, D.; Salio, M.; Cerundolo, V.; Painter, G. F.; Hermans, I. F.; Connor, L. M. MAIT Cells Activate Dendritic Cells to Promote T Follicular Helper Cell Differentiation and Humoral Immunity. *Cell Rep.* **2023**, *42*, 112310.
- (21) Toubal, A.; Nel, I.; Lotersztajn, S.; Lehuen, A. Mucosal-Associated Invariant T Cells and Disease. *Nat. Rev. Immunol.* **2019**, *19*, 643–657.
- (22) Molgora, M.; Colonna, M. Innate-Like T Cells: A Promising Asset in Anti-Cancer Immunity. *Cancer Cell* **2022**, *40*, 714–716.
- (23) Koay, H.-F.; Gherardin, N. A.; Enders, A.; Loh, L.; Mackay, L. K.; Almeida, C. F.; Russ, B. E.; Nold-Petry, C. A.; Nold, M. F.; Bedoui, S.; Chen, Z.; Corbett, A. J.; Eckle, S. B. G.; Meehan, B.; d'Udekem, Y.; Konstantinov, I. E.; Lappas, M.; Liu, L.; Goodnow, C. C.; Fairlie, D. P.; Rossjohn, J.; Chong, M. M.; Kedzierska, K.; Berzins, S. P.; Belz, G. T.; McCluskey, J.; Uldrich, A. P.; Godfrey, D. I.; Pellicci, D. G. A Three-Stage Intrathymic Development Pathway for the Mucosal-Associated Invariant T Cell Lineage. *Nat. Immunol.* **2016**, *17*, 1300–1312.
- (24) Meermeier, E. W.; Laugel, B. F.; Sewell, A. K.; Corbett, A. J.; Rossjohn, J.; McCluskey, J.; Harrieff, M. J.; Franks, T.; Gold, M. C.; Lewinsohn, D. M. Human TRAV1-2-Negative MR1-Restricted T Cells Detect *S. pyogenes* and Alternatives to MAIT Riboflavin-Based Antigens. *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 12506.
- (25) Crowther, M. D.; Dolton, G.; Legut, M.; Cailaud, M. E.; Lloyd, A.; Attaf, M.; Galloway, S. A. E.; Rius, C.; Farrell, C. P.; Szomolay, B.; Ager, A.; Parker, A. L.; Fuller, A.; Donia, M.; McCluskey, J.; Rossjohn, J.; Svane, I. M.; Phillips, J. D.; Sewell, A. K. Genome-Wide CRISPR-Cas9 Screening Reveals Ubiquitous T

- Cell Cancer Targeting via the Monomorphic MHC Class I-Related Protein MR1. *Nat. Immunol.* **2020**, *21*, 178–185.
- (26) Lepore, M.; Kalinichenko, A.; Calogero, S.; Kumar, P.; Paleja, B.; Schmalzer, M.; Narang, V.; Zolezzi, F.; Poidinger, M.; Mori, L.; Libero, G. D. Functionally Diverse Human T Cell Recognize Non-Microbial Antigens Presented by MR1. *eLife* **2017**, *6*, e24476.
- (27) McWilliam, H. E. G.; Villadangos, J. A. MR1 Antigen Presentation to MAIT Cells and Other MR1-Restricted T Cells. *Nat. Rev. Immunol.* **2023**, *Latest Reviews and Analysis*.
- (28) Gherardin, N. A.; Keller, A. N.; Woolley, R. E.; McCluskey, J.; Godfrey, D. I.; Rossjohn, J. Diversity of T Cells Restricted by the MHC Class I-Related Molecule MR1 Facilitates Differential Antigen Recognition. *Immunity* **2016**, *44*, 32–45.

第一章 MAIT 細胞の機能を制御するリガンドの創製研究

第一節 微生物代謝物由来 5-OP-RU の構造活性相関研究

第一項 研究背景

MAIT 細胞は、抗原提示細胞上の抗原/MR1 複合体を、TCR を介して認識し、活性化する細胞である。これまでに報告されている MR1 リガンドの中で、最も強力に MAIT 細胞を活性化する化合物は、微生物代謝物に由来する 5-OP-RU (1) である (Figure 1-1)¹。5-OP-RU は、4 つのヒドロキシ基からなる「リビチル基」、中心骨格である「ウラシル環」、求電子部位である「イミノカルボニル部位」という 3 つの部分構造から成る低分子化合物である。

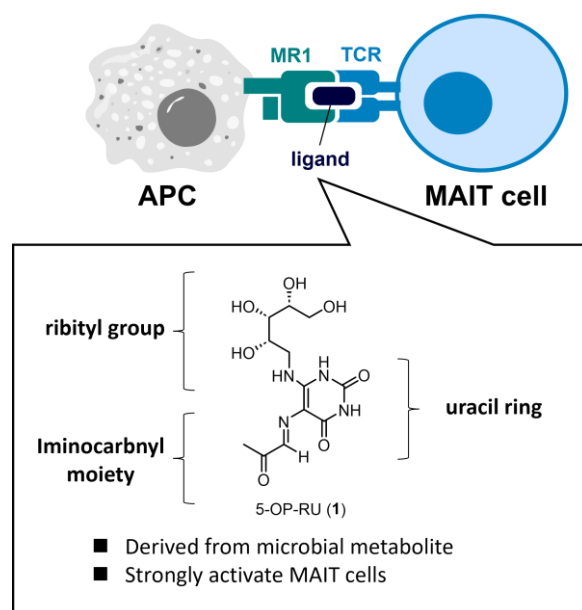


Figure 1-1. Structural features of 5-OP-RU.

5-OP-RU は、微生物のリボフラビン生合成中間体である 5-amino-6-D-ribitylaminouracil (5-A-RU, 2) と、主に哺乳類の解糖系などに由来するメチルグリオキサールが、生体内で非酵素縮合することで産生される化合物である (Figure 1-2)。また、5-OP-RU は水系溶媒中において不安定であることが報告されている (水中半減期: 約 1.5 時間)。これは、イミノカルボニル部位が加水分解を受けやすいことに加え、容易に *cis*-5-OP-RU に異性化し、分子内の 2 級アミンからの求核攻撃を受けて、7-methyl-8-D-ribityllumazine (RL-7-Me, 3) へ変換されることに起因する²。

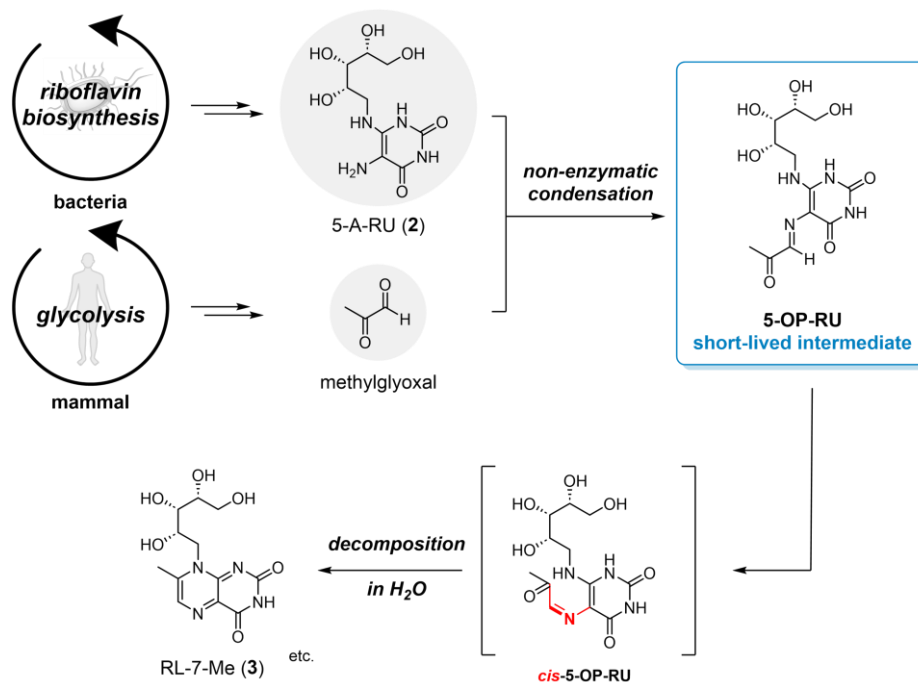


Figure 1-2. Biosynthesis of 5-OP-RU.

MR1/5-OP-RU/TCR の三者複合体の X 線結晶構造解析により、MR1 や TCR に対する 5-OP-RU の相互作用様式は、おおむね理解されている (**Figure 1-3**)¹。MR1 との相互作用において、特に重要と考えられているのは、5-OP-RU 構造中のイミノカルボニル構造と MR1 構造中の Lys43 の間で形成される Schiff 塩基であり、これにより 5-OP-RU は MR1 と安定な複合体を形成する。一方で、TCR との相互作用に関しては、リビチル基が重要な役割を担っていると考えられている。しかし、本研究の開始当初において、構造活性相関研究は報告されておらず、具体的にどの相互作用が MAIT 細胞を活性化する上で重要なのかに関しては明らかにされていなかった。

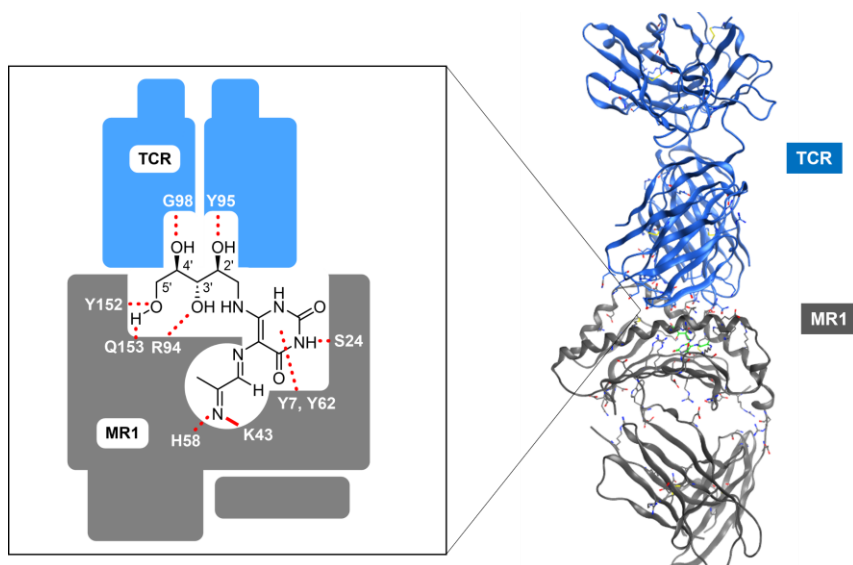


Figure 1-3. Binding mode of 5-OP-RU (green) to hMR1 (gray) and MAIT-TCR (blue) (PDB ID: 4NQC).

こうした背景のもと、著者は 5-OP-RU の構造を起点とした創薬展開を見据え、5-OP-RU の構造活性相関研究を実施した。特に、TCR との相互作用において重要なリビチル基に着目し、その全立体異性体の生物活性を網羅的に評価した (**Figure 1-4**)。また、構造活性相関研究で得られた活性評価のデータと、各誘導体の結合モードの解析から、MAIT 細胞を活性化する上で重要な相互作用の同定を試みた。

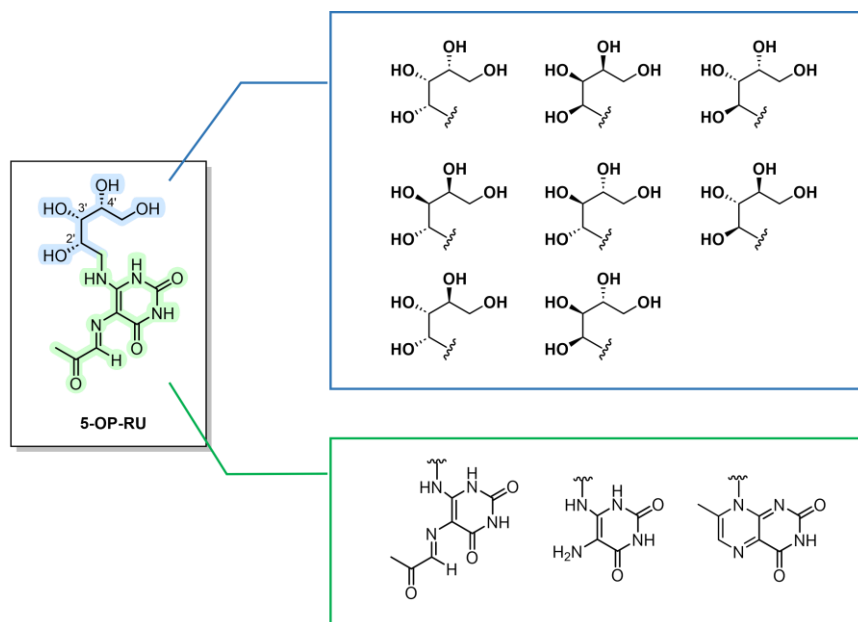
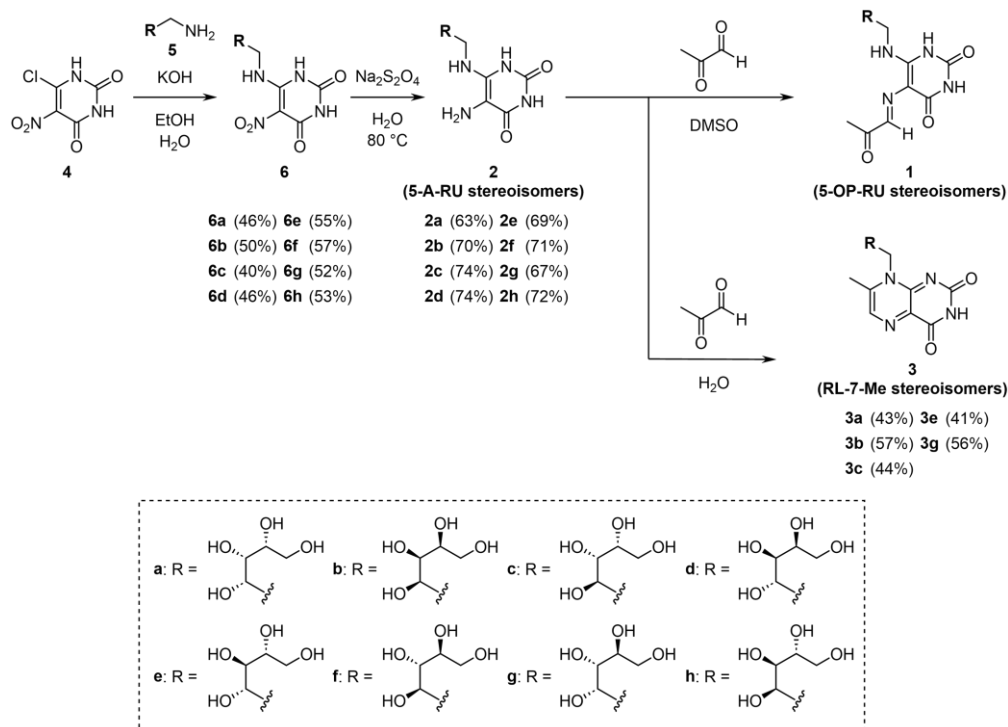


Figure 1-4. Overview of structure-activity relationship study of 5-OP-RU.

第二項 5-OP-RU 誘導体の合成と化学安定性の評価

まず、過去に報告されている論文を参考に、5-A-RU の全ての立体異性体 **2a-h** を合成することとした (**Scheme 1-1**)^{3,4}。はじめに、既知の方法に従って合成した 6-chloro-5-nitrouracil (**4**) を、様々な立体化学を有するアミノアルコール **5a-h** と塩基性条件下反応させることで、**6a-h** を合成した⁵。次いで、各ニトロウラシル **6a-h** を、 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ を用いて還元することで、5-A-RU とその立体異性体 **2a-h** を取得した。5-OP-RU の各立体異性体 **1a-h** は、その不安定性のために長期保存が不可能であるため、活性評価に際しては前駆体 **2** とメチルグリオキサールを混合することで用時調製した^{6,7}。また、水系溶媒中において、5-OP-RU の各立体異性体が分子内環化を引き起こすことで生成する **3a-c**、**3e**、**3g** も併せて合成した^{2,8}。



Scheme 1-1. Synthesis of 5-A-RU and RL-7-Me stereoisomers.

不安定な 5-OP-RU の分解機構を考慮すると、その立体異性体も同様に不安定であると予想される。しかし、活性評価する異性体間で安定性に差がある場合、正確に異性体間の活性を相対比較することができない。実際に、Awad らは、ヒドロキシ基の除去など、リビチル基の構造変化が安定性に大きく影響することを報告している^{9,10}。そこで我々は、各立体異性体の活性評価に先立って、化学安定性を確認することとした。互いにエナンチオマーの関係にない 4 つの異性体 **2a**、**2c**、**2e**、**2g** を D₂O とメチルグリオキサール存在下インキュベートし、¹H NMR により 5-OP-RU の異性体 **1** 及び RL-7-Me の異性体 **3** の溶液中存在量の経時変化を追跡した (**Figure 1-5**)。その結果、いずれの異性体 **1** もほぼ同じ速度で分解し、2 時間後には系中からほとんど消失することが明らかとなった (**Figure 1-5a**)。また、いずれの異性体もほぼ同じ速度で **3** へ変換されることが確認された (**Figure 1-5b**)。これらの結果から、リビチル基の立体化学は **1** の形成と **3** への変換速度に影響を与えないことが明らかとなった。

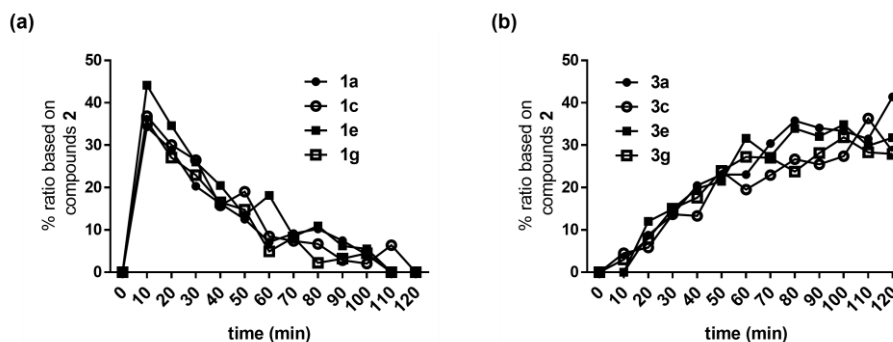


Figure 1-5. Formation kinetics of the 5-OP-RU and RL-7-Me stereoisomers. (a) Formation and degradation of **1a** and its stereoisomers **1c**, **1e** and **1g**. (b) Formation of **3a** and its stereoisomers **3c**, **3e** and **3g**. Product formation was monitored by ^1H NMR analysis every 10 min after methylglyoxal (40% aqueous solution; 58 μL , 0.33 mmol) was added to a solution of each precursor **2a**, **2c**, **2e** and **2g** (5.0 mg, 0.013 mmol) in D_2O (730 μL).

第三項 5-OP-RU 誘導体の活性評価

5-OP-RU を含む MR1 リガンドは、抗原提示細胞中の MR1 に結合した後、リガンド/MR1 複合体として MAIT 細胞の TCR に認識されることで、MAIT 細胞を活性化することができる¹¹。それを踏まえ、human MR1 を安定発現させた HeLa 細胞 (HeLa.hMR1 細胞) と MAIT 細胞の TCR (α -chain : TRAV1-2, TRAJ33 遺伝子、 β -chain ; TRBV6-1 遺伝子) を遺伝子導入した TG40 細胞 (TG40.MAIT-TCR 細胞) の共培養系を用いて、各異性体の T 細胞活性化能を評価した。上記 2 種類の細胞をリガンド存在下 24 時間インキュベートした後、T 細胞の活性化マーカーである CD69 の細胞表面発現量をフローサイトメトリーにより定量した (Figure 1-6a)¹²。さらに、培地中に分泌された IL-2 の量を ELISA 法により測定した (Figure 1-6b)。フローサイトメトリー、ELISA いずれの活性評価においても、**1b-f**、**1h** はほとんど活性を示さなかった。一方で、4'-OH エピマーである **1g** は 5-OP-RU (**1a**) と同等の活性を有し、濃度依存的に MAIT 細胞を活性化することが明らかとなった。先行研究において、Awad らも、リビチル基の各ヒドロキシ基のデオキシ体を用いて、同様の結果を取得している。彼らは、4'-OH デオキシ体が 5-OP-RU と同等の MAIT 細胞活性化作用を示す一方で、2'-OH デオキシ体や 3'-OH デオキシ体では活性が大きく減弱することを報告している¹⁰。以上のことから、リビチル基中の 2'-OH や 3'-OH は MAIT 細胞を活性化する上で重要な役割を担っているのに対し、4'-OH は MAIT 細胞活性化にほとんど寄与していないことが示唆された。

最近 Braganza らは、マウス由来の MR1 と MAIT-TCR を用いて、リビチル基の一部立体異性体を含めた様々な 5-OP-RU 誘導体を活性評価し、立体異性体間で活性にほとんど差がないことを報告している¹³。それに対し、著者の実験系では、ヒト由来の MR1 と MAIT-TCR を用いて活性評価を行い、上記の通り、特定の立体化学を有する 5-OP-RU 誘導体のみ活性を有することを明らかにしている。以上のことから、MAIT-TCR のリガンド認識には種差があることが示唆された^{14,15}。

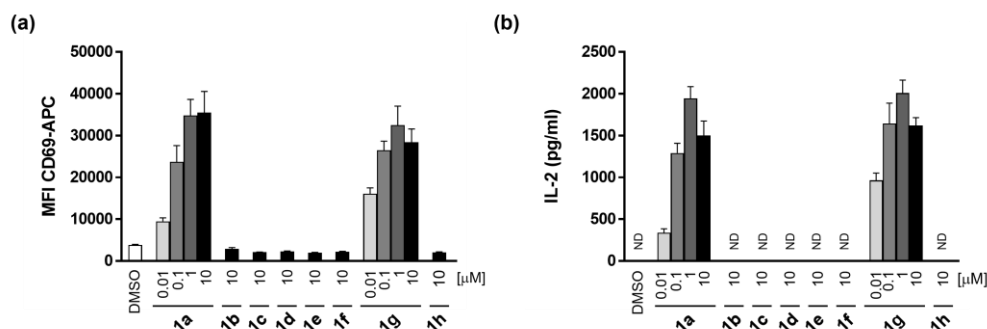


Figure 1-6. MAIT cell activation by the 5-OP-RU stereoisomers. (a) CD69 surface expression on TG40.MAIT-TCR cells was evaluated using flow cytometry after 24 h incubation in co-culture with HeLa.hMR1 cells in the presence of each ligand. (b) IL-2 production in the supernatant was measured by ELISA. The graphs show the mean $\pm$ SD of triplicate measurements, and the results shown are representative of at least three independent experiments. ND = not detected. APC = allophycocyanin.

一般に、MR1 は小胞体内で、種々の分子シャペロンと会合した状態で存在していると考えられている。しかし、特定のリガンドと複合体を形成することによって、コンフォメーションが変化し、細胞表面上に移動する。また、MAIT 細胞の TCR が認識するのは、MR1 リガンド単体ではなく、抗原提示細胞上に提示されたリガンド/MR1 複合体である。以上から、MAIT 細胞に対する活性は、TCR と MR1 リガンド間のアフィニティーだけでなく、細胞表面における MR1 リガンド/MR1 複体の細胞表面存在量にも依存すると予想される¹⁶。そこで、MAIT 細胞活性化作用を持つ誘導体と持たない誘導体の間で、細胞表面上の複合体の存在量、すなわち抗原提示の量に違いがあるのか検討することとした。

HeLa.hMR1 細胞を各リガンド存在下 8 時間インキュベートし、細胞上の MR1 の表面発現量をフローサイトメトリーにより確認した。その結果、**1a**、**1b**、**1g** を用いた場合、他の立体異性体と比較して、MR1 の細胞表面発現量を上昇させることが確認された (**Figure 1-7**)。1a、及び 1g は先の活性評価において、MAIT 細胞活性化作用を有することが示された誘導体である。したがって、MAIT 細胞の活性化には、MR1 の表面発現量の上昇が部分的に寄与している可能性があることが示唆された。また、1b は MR1 の細胞表面発現量を上昇させる一方で、MAIT 細胞を活性化しない MR1 リガンドであることが明らかとなった。

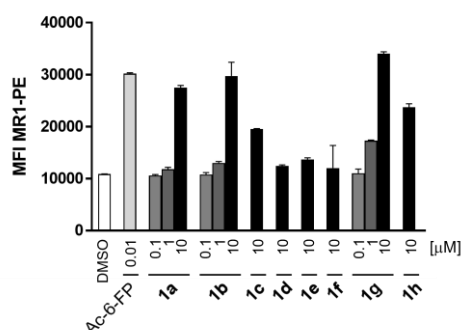


Figure 1-7. Upregulation of cell-surface MR1 on HeLa.hMR1 cells in response to 5-OP-RU stereoisomers. MR1 expression on HeLa.MR1 was assessed by using flow cytometry after 8 h incubation with ligands. The graph shows the mean $\pm$ SD of triplicate measurements, and the results shown are representative of at least three independent experiments. PE = phycoerythrin.

Figure 1-5 に示した通り、5-OP-RU の異性体 **1** は、イミノカルボニル構造の加水分解により一部が 5-A-RU の異性体 **2** へと分解することに加えて、分子内環化により熱力学的に安定な RL-7-Me の異性体 **3** へ変換される。そのため、**1** の活性評価において、系内には、**1** 以外に化合物 **2** 及び **3** が共存する²。そこで、これらの化合物が MAIT 細胞活性化に与える影響を調査するため、**2** 及び **3** の活性評価を行うこととした (**Figure 1-8**)。活性評価は、**1** と同様、CD69 の細胞表面発現量、及び IL-2 産生量を指標に実施した。評価の結果、5-A-RU の構造活性相関は 5-OP-RU の構造活性相関と同様の結果になった。すなわち、(2'S,3'S,4'R) タイプのリビチル基を有する **2a**、及び (2'S,3'S,4'S) タイプのリビチル基を有する **2g** のみが CD69 の表面発現量及び IL-2 の産生を上昇させた。一方で、他の立体異性体はほとんど活性を示さなかった (**Figure 1-8a, c**)。さらに、一部の RL-7-Me の異性体 **3a-c**、**3e**、**3g** に対しても MAIT 細胞活性化能を調査した結果、(2'S,3'S,4'R)、及び (2'S,3'S,4'S) タイプのリビチル基を有する **3a** と **3g** のみが濃度依存的に MAIT 細胞を活性化した (**Figure 1-8b, d**)。以上の実験から、(2'S,3'S) の立体化学を有する全てのリガンド **1-3a**、**1-3g** が MAIT 細胞を活性化する機能を有するものの、**2** および **3** の活性は **1** よりも低いことが明らかとなった。これらの結果は、MAIT 細胞の活性化には特定の立体配置のリビチル基を持つことが必要不可欠である一方で、ウラシル骨格は他の構造に代替可能であることを示唆している。したがって、適切な立体配置を有するリビチル基と最適な骨格を組み合わせることにより、活性が高く安定性の高い MAIT 細胞活性化剤が創製可能であることが明らかとなった。

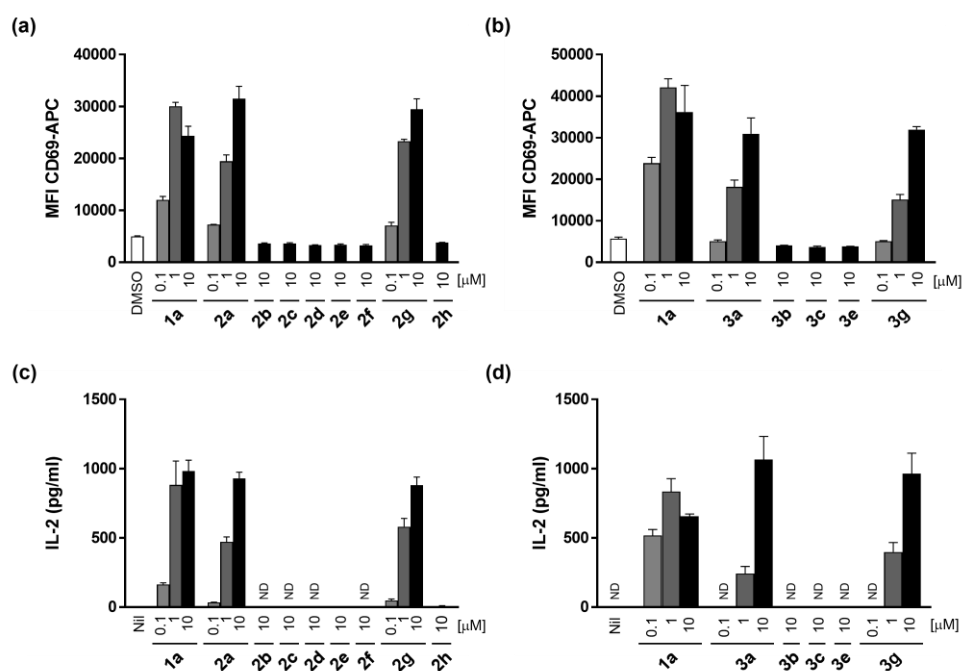


Figure 1-8. MAIT-cell activation by 5-A-RU and RL-7-Me stereoisomers. (a), (b) TG40.MAIT-TCR cell activation was detected as CD69 surface expression using flow cytometry. (c), (d) IL-2 production was detected by ELISA after 24 h of incubation in co-culture with HeLa.hMR1 cells. The graphs show the mean $\pm$ SD of triplicate measurements, and the results shown are representative of at least three independent experiments. ND = not detected. APC = allophycocyanin.

第四項 5-OP-RU 誘導体の相互作用解析

リガンド **1a** 及び **1g** は短寿命であり、それぞれ速やかに **3a** 及び **3g** に変換されるにも関わらず、

3a や **3g** 単体より強力な MAIT 細胞活性化能を有する (**Figure 1-8b, d**)。これは、**1a** 及び **1g** が分解される前に MR1 と複合体を形成することにより、安定化されるためであると考えられる。そこで、実際に **1a** 及び **1g** が速やかに MR1 と複合体を形成していることを確認するため、培地交換実験を行った (**Figure 1-9**)。HeLa.hMR1 細胞を **1a** 存在下 1 時間インキュベートし、その後培地を除去して、23 時間リガンド非存在下、TG40.MAIT-TCR と共培養した。また、コントロール実験として、HeLa.hMR1 を **1a** 存在下 1 時間インキュベートし、培地を除去せずに、TG40.MAIT-TCR を添加して、さらに 23 時間インキュベートした (**Figure 1-9a**)。2 つの異なる条件で培養した TG40 細胞における CD69 の表面発現量を確認したところ、培地交換の有無によって、ほとんど活性は変化しなかった (**Figure 1-9b**)。これは、5-OP-RU が 1 時間以内に MR1 と複合体を形成すること、及びその複合体は共有結合などを介して結合していることを示唆している。一方で、**3a** に対して同様の実験を行ったところ、培地の交換により、活性は大きく減弱した (**Figure 1-9b**)。**3a** は **1a** とは異なり MR1 と共有結合するためのカルボニル基を有していないことを踏まえると、5-OP-RU 内のイミノカルボニル構造と MR1 上の Lys43 との間の共有結合的な Schiff 塩基の形成が、MR1 との複合体形成に大きく寄与していることが示唆された。

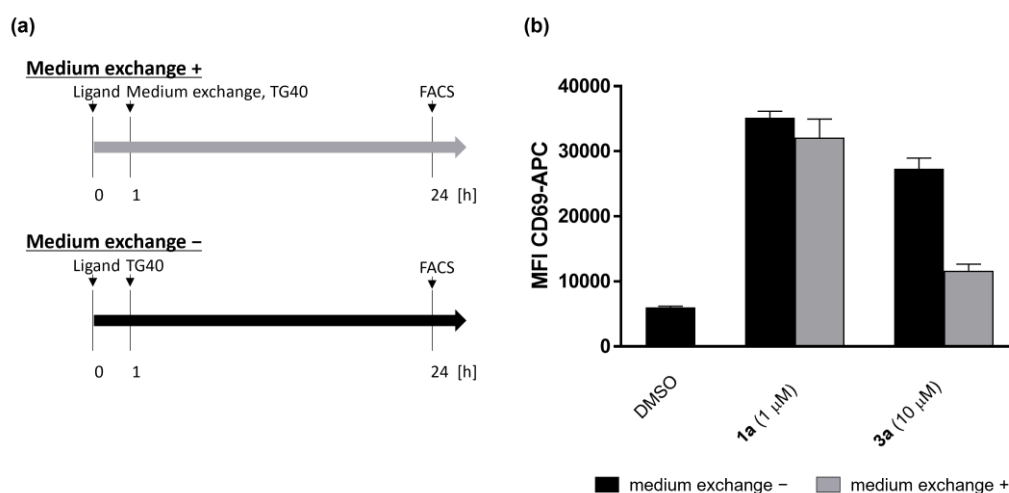


Figure 1-9. Medium-exchange experiments. (a) Experimental scheme. (b) T cell activation by ligand treatment. CD69 expression was monitored by flow cytometry after 24 h of incubation with or without medium-exchange. The graphs show the mean $\pm$ SD of triplicate measurements, and the results shown are representative of at least three independent experiments. APC = allophycocyanin.

最後に、Molecular Operating Environment (MOE) を用いて、5-OP-RU、MR1、MAIT-TCR の三者複合体の結合モードの解析を行った (**Figure 1-10**)。既に報告されている MR1-リガンド-TCR の複合体の X 線結晶構造 (PDB: 4L4V) をテンプレートとして解析を行ったところ、全ての立体異性体において、ウラシル環及びイミノカルボニル構造は、同様のコンフォメーションを取りながら、MR1 の結合ポケット内に収まっていた。一方で、リビチル基に関しては異性体間でコンフォメーションが大きく異なっていた。高活性異性体 (**1a**, **1g**) の 2' 位及び 3' 位のヒドロキシ基は、それぞれ同様の配向で TCR の Tyr95 及び MR1 の Arg94 と相互作用していた。それに対し、他の立体異性体では、この位置のヒドロキシ基が異なる方向に配向しているために、TCR の Tyr95、MR1 の Arg94 のうち、少なくとも一方とは水素結合を形成していなかった。さらに、**1a** と **1g** で異なる立体配置を有する 4'

位の水素結合に着目すると、**1a** が MR1 の Arg94 と相互作用しているのに対し、**1g** は TCR の Gly98 と相互作用していることが明らかとなった。以上の解析から、TCR の Tyr95 と MR1 の Arg94 との水素結合が MAIT 細胞を活性化する上で重要であることが示唆された。

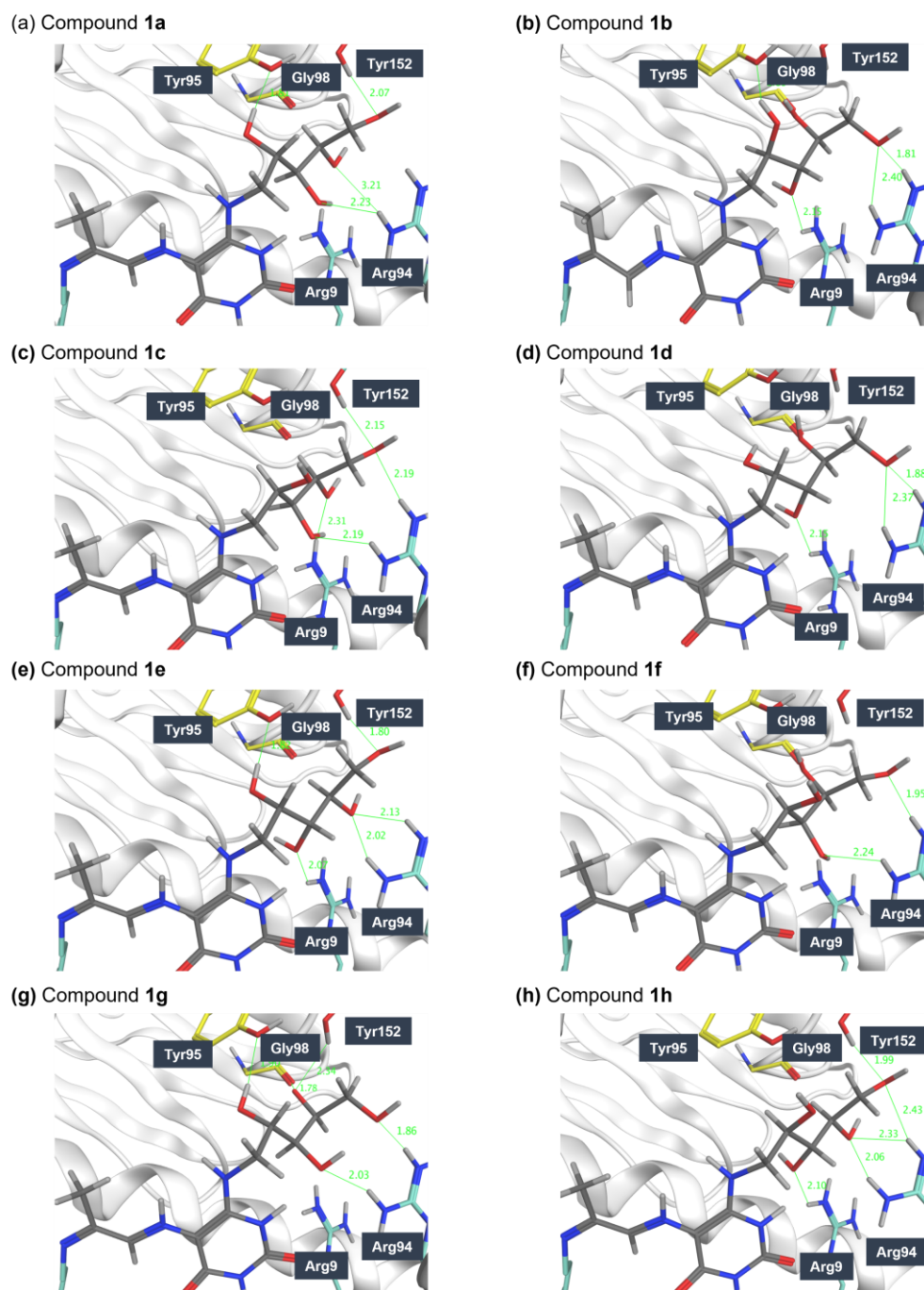


Figure 1-10. Binding mode analysis of **1a** and its stereoisomer **1b–h** with the MR1-ligand-TCR ternary complexes (PDB ID: 4L4V) as a template. Interactions between MAIT-TCR (yellow), MR1 (pale green) and each ligand (gray) are shown with the distance (green).

第五項 小括

著者は、5-OP-RU の全立体異性体、及びその関連化合物を合成し、その活性を網羅的に評価した。その結果、MAIT 細胞によるリガンド認識において、2'位及び3'位の水素結合が重要な役割を担

っていることを見出した (**Figure 1-11**)。また、結合モードの解析を行うことによって、MAIT 細胞を活性化する上で重要な相互作用を同定した。

本研究で得られたものと同様の知見を、最近 Awad らが報告している¹⁰。しかし、Awad らの研究は 5-OP-RU の各ヒドロキシ基のデオキシ体を用いたものであり、そのような誘導体では化学安定性を含む物理化学的性質が誘導体間で大きく異なる。一方で、著者が合成した立体異性体は、少なくとも化学安定性がほとんど同じであることが確かめられており、物理化学的性質の違いを排除して、MR1 と TCR に対する作用の違いを比較することに成功している。

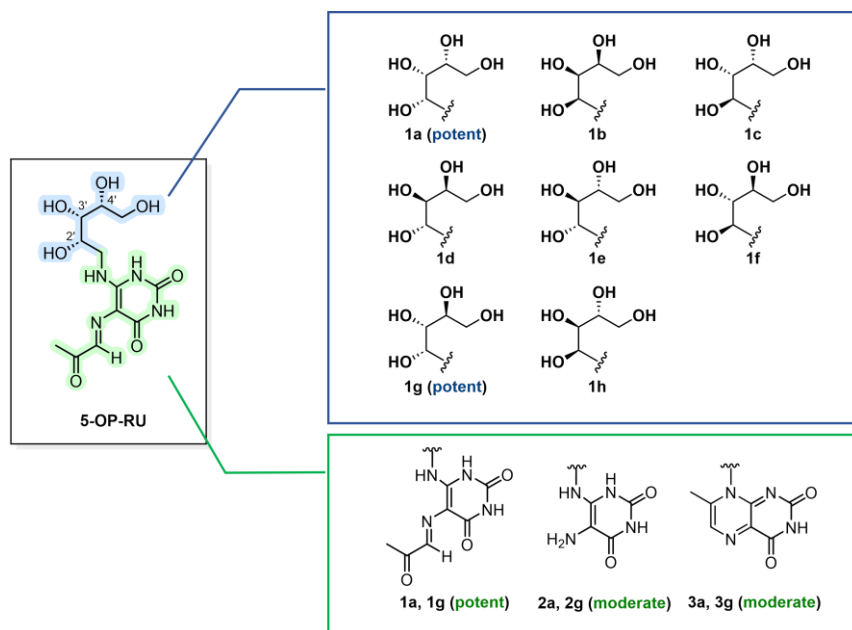


Figure 1-11. Summary of Section 1, Chapter 1.

第二節 MR1 の細胞表面発現量を指標とするリガンドスクリーニング法の開発と MAIT 細胞制御分子の同定

第一項 研究背景

獲得免疫系細胞への抗原提示を担う古典的 MHC の結合ポケットは親水性アミノ酸残基が多く、ペプチドと結合するのに有利な構造を持つのに対し、MR1 は結合ポケットのサイズが小さく、ポケット内に芳香族アミノ酸が多いため、低分子芳香族化合物と結合するのに有利な構造となっている¹⁷。また、比較的柔軟な結合ポケットを有しているため、5-OP-RU をはじめとする微生物代謝物の他に、薬物及び薬物関連分子 (diclofenac 等) などを含めた多様な低分子芳香族化合物が MR1 に認識され、MAIT 細胞の機能制御に関わることが報告されている (Figure 1-12)^{1,17-22}。

しかし、これまでに見出されてきた MR1 リガンドの構造多様性を考慮すると、未知の内因性・外因性の MR1 リガンドが多数存在すると考えられている。実際に、構造は同定されていないものの、がん由来する抗原や、*Streptococcus pyogenes* に由来する抗原が MR1 に認識されることが報告されている²³⁻²⁵。このような背景から、MAIT 細胞を含む MR1T 細胞の多彩な生理機能を解明するために、それら未同定の MR1 リガンドを効率的に探索する手法の開発が望まれている。

そこで、著者は抗原提示を担う MR1 の性質を利用したスループット性の高いスクリーニング系を新たに確立することを計画した^{26,27}。さらに、本スクリーニング系を利用することで、植物由来する coniferyl aldehyde を MR1 リガンドとして同定し、その機能解析、及び相互作用解析についても併せて検討を行った。

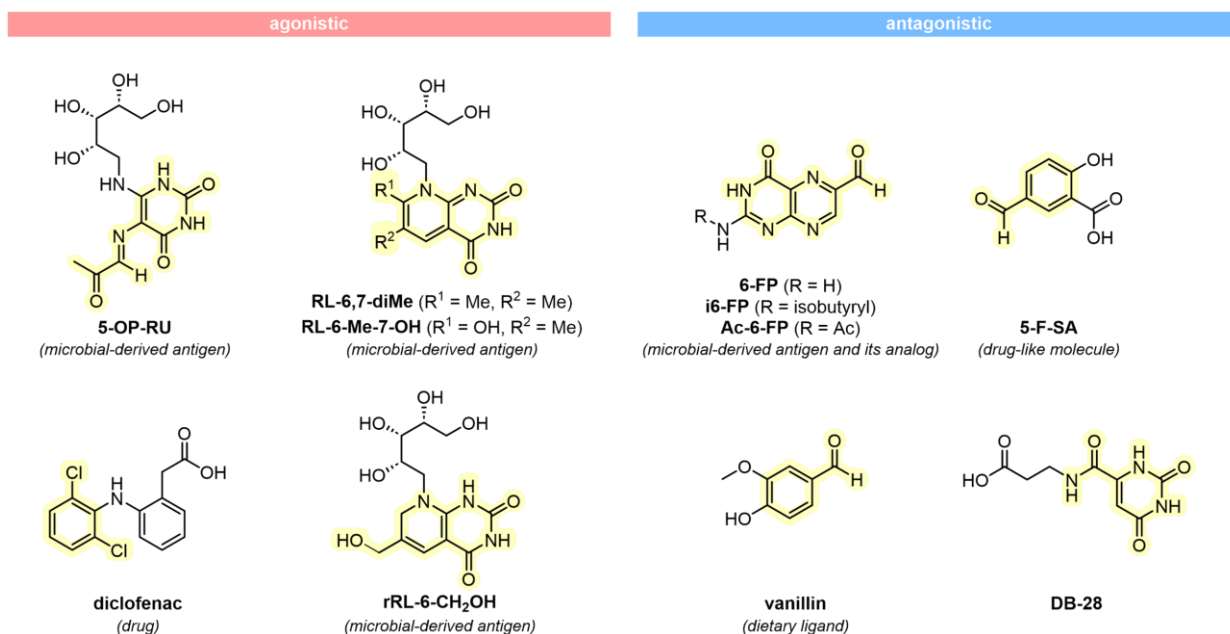


Figure 1-12. Structures of reported MAIT cell modulators.

第二項 スクリーニング系の構築

MR1 は、リガンド非結合時は分子シャペロンによって安定化された状態で小胞体に局在している²⁷。一方、リガンドと複合体を形成すると、一部の例外を除いて、小胞体から細胞表面に移動するこ

とが知られている²⁶。例えば、MR1 発現細胞を、MR1 リガンドとして知られている Ac-6-FP や 5-F-SA 存在下インキュベートすると、MR1 の細胞表面発現量が上昇する^{18,19}。

著者はこの MR1 の性質に着目し、MR1 の細胞表面発現量を指標とするリガンドスクリーニング法を確立することを計画した。すなわち、MR1 発現細胞を化合物存在下インキュベートし、MR1 の細胞表面発現量の上昇を確認することで、MR1 リガンドであるか否かを評価できるのではないかと考えた。しかし、一般に、MR1 の細胞表面発現量を評価する場合、蛍光標識した抗 MR1 抗体により細胞を標識しフローサイトメトリーによって確認する方法がとられる (Figure 1-13a)¹⁰。この方法は、数種類の化合物の作用を評価する場合には優れた方法であるものの、スループット性が低いいため、スクリーニングに適しているとは言い難い。そこで著者は、MR1 の細胞表面量の検出に、HiBiT-LgBiT スプリットルシフェラーゼシステムを活用することとした。本システムは、*Oplophorus gracilirostris* に由来するルシフェラーゼ (NanoLuc) のスプリット断片である、HiBiT ペプチド (11 アミノ酸から成るペプチド) とそれと相補的に相互作用する LgBiT タンパク質 (細胞膜非透過性のタンパク質) を利用する評価系である。HiBiT ペプチドは LgBiT タンパク質に強く結合 ($K_d < 700$ pM) し、発光基質である furimazine 存在下において、強い発光を示す³⁰。したがって、細胞外ドメインに HiBiT タグを付けた MR1 を発現する細胞を作製することができれば、細胞表面の MR1 発現レベルを発光強度として検出でき、MR1 リガンドのスクリーニングが可能になると考えられる (Figure 1-13b)。本手法は、化合物存在下細胞をインキュベートした後、LgBiT と furimazine を添加するだけで評価できるホモジニアスアッセイである。つまり、前述の抗体を用いる方法と比較して洗浄工程が全く必要ないため、細胞環境下におけるリガンドと MR1 の複合体形成を簡便かつ迅速に評価することができる。また、これまでに報告されているスクリーニング系が MR1 とリガンド間の結合親和性に基づくものに限定されている²¹ことを踏まえると、本評価系は細胞に作用する (細胞に内在化された後、MR1 と結合し、その表面発現を誘導する) 分子を取得できる点で魅力的な評価系である。さらに、本スクリーニング系は、MR1 に作用する分子を見出す評価系であるため、MAIT 細胞に対してアゴニスト作用を持つ MR1 リガンドも、アンタゴニスト作用を持つ MR1 リガンドも取得できるものと考えられる。

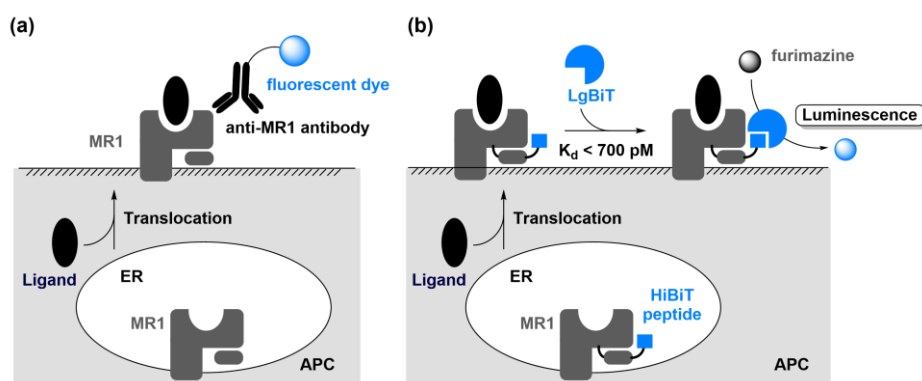


Figure 1-13. (a) Conventional approach to evaluate the cell surface levels of MR1. (b) MR1 presentation reporter screening system using split luciferase (HiBiT-LgBiT).

まず、スクリーニングに先立って、HiBiT タグをつけた human MR1 を発現する HEK293 細胞 (HEK293.HiBiT-hMR1 細胞) を作製し、その機能評価を行うこととした。HiBiT-hMR1 の発現に使

用したコンストラクトを **Figure 1-14a** に示す。MR1 は生体内において、MR1 α 鎖と β_2m という 2 つの成分が会合した状態で存在するが、系を単純化するため本細胞においては融合タンパク質として発現させた²⁵。また、HiBiT タグは、MR1/リガンド間相互作用への干渉を最小限に抑えるために、MR1 結合ポケットから離れた β_2m の N 末端に導入した。

まず、既知の MR1 リガンド (Ac-6-FP) で処理した場合に、細胞表面の HiBiT-hMR1 に由来する発光が観察されるかを調査した。Ac-6-FP (10 μ M) の存在下で HEK293.HiBiT-hMR1 細胞をインキュベートした後、LgBiT および furimazine を添加したところ、Ac-6-FP 存在下において顕著な発光強度の上昇が確認された (**Figure 1-14b**)。また、本細胞を様々な既知 MR1 リガンド (Ac-6-FP、5-F-SA、5-OP-RU) で処理すると、濃度依存的に発光強度が上昇した (**Figure 1-14c**)。これらの結果は、本評価系を用いることで、リガンド依存的な MR1 の細胞表面発現レベルの上昇を検出できることを明確に示している。

次に、HiBiT タグの導入が MR1 の機能に影響を与えるか検証することとした (**Figure 1-14d**)。まず、内因性 MR1 のみを発現する HEK293 細胞と、内因性 MR1 に加えて HiBiT タグ付き MR1 も発現する HEK293.HiBiT-hMR1 細胞のリガンド応答を比較することとした。2 種類の細胞を様々な MR1 リガンド存在下インキュベートし、抗 MR1 抗体を用いてその細胞表面量を比較したところ、同様の傾向で細胞表面発現量の上昇が確認された (Ac-6-FP $\gg$ 5-F-SA、5-OP-RU、**Figure 1-14d**)。つまり、内因性の MR1 と外因性の MR1 (HiBiT-hMR1) で、細胞表面発現の応答性は同様であることが示された。続いて、HiBiT-hMR1 とリガンドの複合体が MAIT 細胞を活性化できるか確認することとした。HEK293.HiBiT-hMR1 細胞と TG40.MAIT-TCR 細胞を、Ac-6-FP、または 5-OP-RU 存在下インキュベートし、TG40.MAIT-TCR 細胞上の CD69 の表面発現量をフローサイトメトリーにより定量した。その結果、5-OP-RU 存在下では TG40.MAIT-TCR 細胞が活性化されたのに対し、Ac-6-FP 存在下では活性化されなかった (**Figure 1-14e**)。この結果は、先行研究にて報告されているリガンドの特性と一致している^{1,19}。また、内因性 MR1 のみを発現する HEK293 細胞と比較して、HEK293.HiBiT-hMR1 細胞と共培養した方が、5-OP-RU 存在下での TG40.MAIT-TCR 細胞における CD69 の表面発現量が大幅に増加していた (**Figure 1-14e**)。この結果は、5-OP-RU が HiBiT-hMR1 に結合し、その結果生じる複合体が TG40.MAIT-TCR 細胞を活性化できることを示唆している。以上の実験から、HiBiT タグ付き MR1 は MR1 の本来の機能を損なうことなくリガンドに結合することが明らかになり、HEK293.HiBiT-hMR1 細胞は、MR1 リガンドのスクリーニングに利用可能であることが示された。

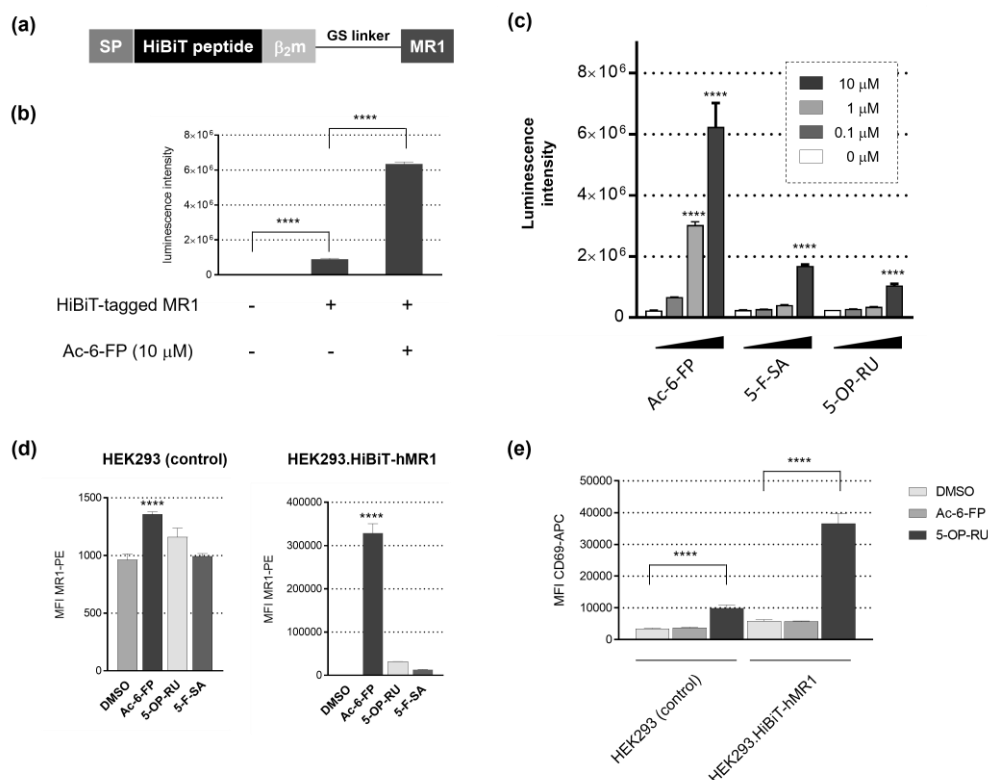


Figure 1-14. Establishment of the screening system. (a) Construct used for the expression of HiBiT-tagged MR1. SP = signal peptide. (b) Confirmation of luminescence intensity derived from the HiBiT tag in the presence of a known MR1 ligand. Luminescence intensity derived from cell surface MR1 on HEK293.HiBiT-hMR1 cells was detected after incubation at 37 °C in the presence or absence of Ac-6-FP (10 μ M), followed by the addition of LgBiT and furimazine. (c) Confirmation of the response of HEK293.HiBiT-hMR1 cells to known MR1 ligands. Luminescence intensity derived from cell-surface MR1 on HEK293.HiBiT-hMR1 cells was detected after 8 h incubation at 37 °C in the presence of Ac-6-FP, 5-F-SA and 5-OP-RU, followed by the addition of LgBiT and furimazine. (d) Response to known MR1 ligands of HEK293.HiBiT-hMR1 cells. The cell surface levels of MR1 on HEK293 cells or HEK293.HiBiT-hMR1 cells were analyzed by flow cytometry after 8 h incubation at 37 °C in the presence of Ac-6-FP, 5-OP-RU, or 5-F-SA (10 μ M), followed by labeling with a PE-conjugated anti-hMR1 antibody. (e) Investigation of the ability to activate the MAIT cells. Upregulation of cell surface CD69 on TG40.MAIT-TCR cells was analyzed by flow cytometry after 24 h incubation at 37 °C in co-culture with HEK293 cells or HEK293.HiBiT-hMR1 cells in the presence of Ac-6-FP (10 μ M) or 5-OP-RU (1 μ M), followed by labeling with an APC-conjugated anti-CD69 antibody. The graphs show the mean $\pm$ SD of triplicate measurements, and the results shown are representative of at least two independent experiments. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA and Tukey's multiple comparison test. ****P < 0.0001 (b) or one-way ANOVA and Dunnett's multiple comparison test. *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001; ****P < 0.0001 compared to DMSO control. (c, d and e). PE = phycoerythrin. APC = allophycocyanin.

次に、スクリーニング条件に関する検討を実施した。まず、 Z' -factor を指標として、インキュベーション時間が MR1 の細胞表面発現量に及ぼす影響を調査した。 Z' -factor は評価系の質を表すパラメーターである。 $Z' = 1 - 3 [(\text{ポジティブコントロールの SD}) + (\text{ネガティブコントロールの SD})] / [(\text{ポジティブコントロールの平均}) - (\text{ネガティブコントロールの平均})]$ で定義され、一般に、 $Z' > 0.5$ を満たすと、スクリーニングに適していると評価される。Ac-6-FP 存在下、5-F-SA 存在下、リガンド非存在下での、様々なインキュベーション時間における発光強度を確認したところ、Ac-6-FP 存在下において発光強度は 4 時間で最大となり、 Z' -factor は 8 時間で最高の値となった (Figure 1-15a)。そこで、8 時間を最適インキュベーション時間として設定した。続いて、より効率的にスクリーニング

を実施するために、この評価系の 384 well プレートへの適用可能性を調査した。384 well プレート上の様々な位置に配置した、ネガティブコントロール (DMSO) とポジティブコントロール (Ac-6-FP) の活性値を収集し、 Z' を計算することにより、データのばらつきを評価した。その結果、 Z' -factor は 0.748 であり、384well プレートを用いたスクリーニングが可能であることが示された (Figure 1-15b)。

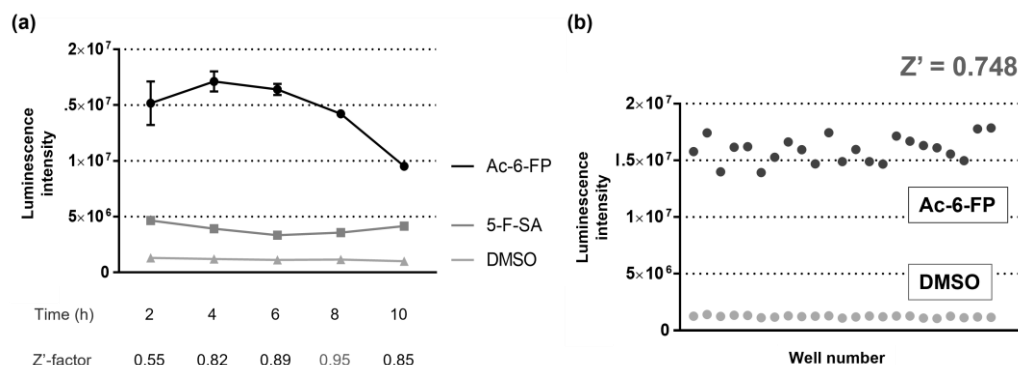


Figure 1-15. Optimization of the screening conditions. (a) Changes in luminescence intensity and Z' -factor over time. Luminescence intensity derived from cell surface MR1 on HEK293.HiBiT-hMR1 cells was detected after 2–10 h incubation at 37 °C in the presence of Ac-6-FP or 5-F-SA (10 μ M), followed by the addition of LgBiT and furimazine. The graphs show the mean $\pm$ SD of triplicate measurements. (b) Investigation of data dispersion based on the Z' -factor. Luminescence intensity derived from cell surface MR1 on HEK293.HiBiT-hMR1 cells was detected after 8 h incubation at 37 °C in the presence or absence of Ac-6-FP (10 μ M) in a 384-well plate, followed by the addition of LgBiT and furimazine. The Z' -factor was calculated based on these data ($n = 23$).

上記最適化した条件を用いて、様々なスキャホールドを有する生物活性化合物からなる市販の化合物ライブラリー (LOPAC1280, 1280 化合物) に対し、スクリーニングを実施した (Figure 1-16a)。しかし、いずれの化合物でも発光強度の有意な増加は観測されなかった。そこで、MR1 リガンドとして機能する可能性が高いと思われる化合物に絞ってスクリーニングを行うこととした。これまでに同定されているほとんどの MR1 リガンド (5-OP-RU, 6-FP, Ac-6-FP, 5-F-SA) は、MR1 中の Lys 残基と Schiff 塩基を形成できるようなカルボニル基を有している^{1,17–19,29,31}。それを踏まえ、所属研究室が保有する低分子芳香族化合物から成るライブラリーから、カルボニル基を含む 495 個の化合物を選択し、スクリーニングを行った (Figure 1-16b)。10 μ M での発光強度が Ac-6-FP (10 μ M) の活性値の 5%より大きいものをヒット化合物としたところ、7 つの芳香族化合物 **7–13** が MR1 リガンドとして同定された (Figure 1-16c)。

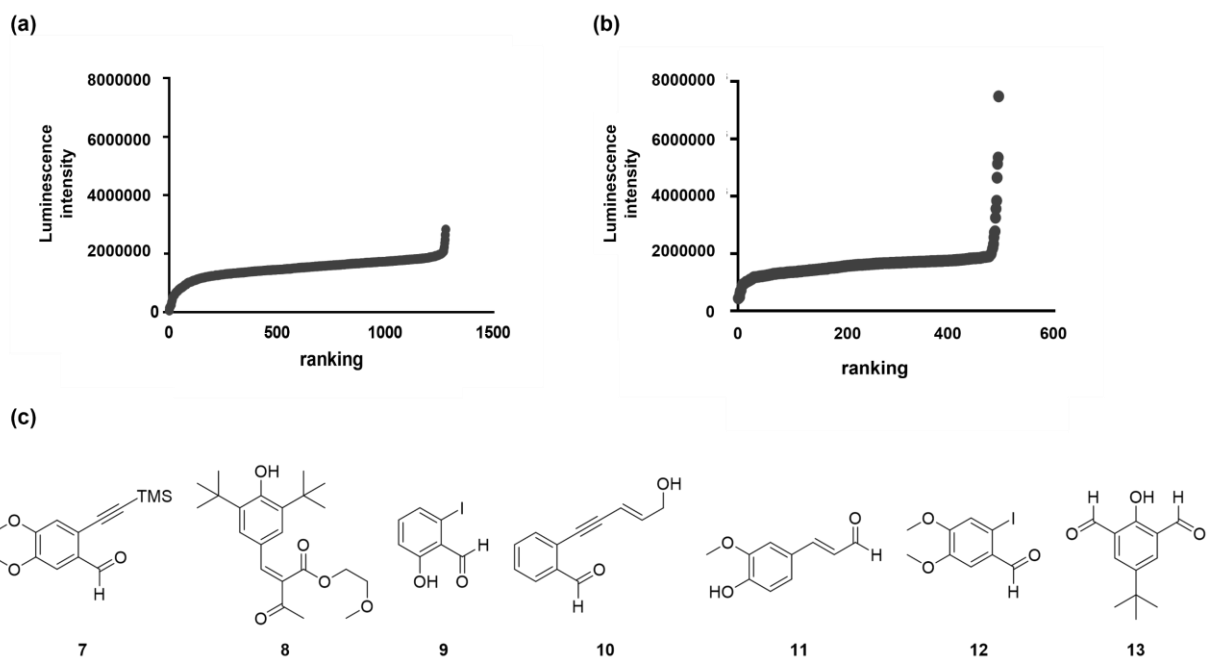


Figure 1-16. Screening results. (a) Using LOPAC1280. (b) Using compounds with a carbonyl group. The cell surface levels of MR1 on HEK293.HiBiT-hMR1 cells were detected as luminescence intensity after 8 h incubation at 37 °C in the presence of each compound (10 μ M), followed by the addition of LgBiT and furimazine. (c) Structures of hit compounds obtained from the screening of an in-house compound library.

続いて、ヒット化合物が実際に MR1 リガンドとして機能するのか確認すべく、種々実験を行った。まず、各ヒット化合物 **7-13** 存在下で HEK293.HiBiT-hMR1 細胞をインキュベートし、HiBiT タグに由来する発光強度を改めて調査したところ、すべての化合物で濃度依存的な発光強度の上昇が確認された (**Figure 1-17a**)。次に、HiBiT タグが付いていない通常の MR1 を用いた場合でも同様に活性を示すか調査した。Human MR1 を安定発現させた HeLa.hMR1 細胞を各化合物存在下インキュベートし、MR1 の細胞表面発現量をフローサイトメトリー分析によって調査した (**Figure 1-17b**)。その結果、**Figure 1-17a** 同様、全ての化合物で MR1 の細胞表面発現量の上昇が確認された。最後に、各化合物の存在下で HeLa.hMR1 細胞と TG40.MAIT-TCR 細胞を共培養して、MAIT 細胞活性化能を有するか調査した。その結果、いずれの化合物も TG40.MAIT-TCR 細胞を活性化しなかった (**Figure 1-17c**)。この結果は、5-OP-RU に含まれるリビチル基のような構造の存在が MAIT 細胞の活性化に必須であることを報告しているこれまでの研究を踏まえると、妥当な結果であると考えられる^{30,32}。

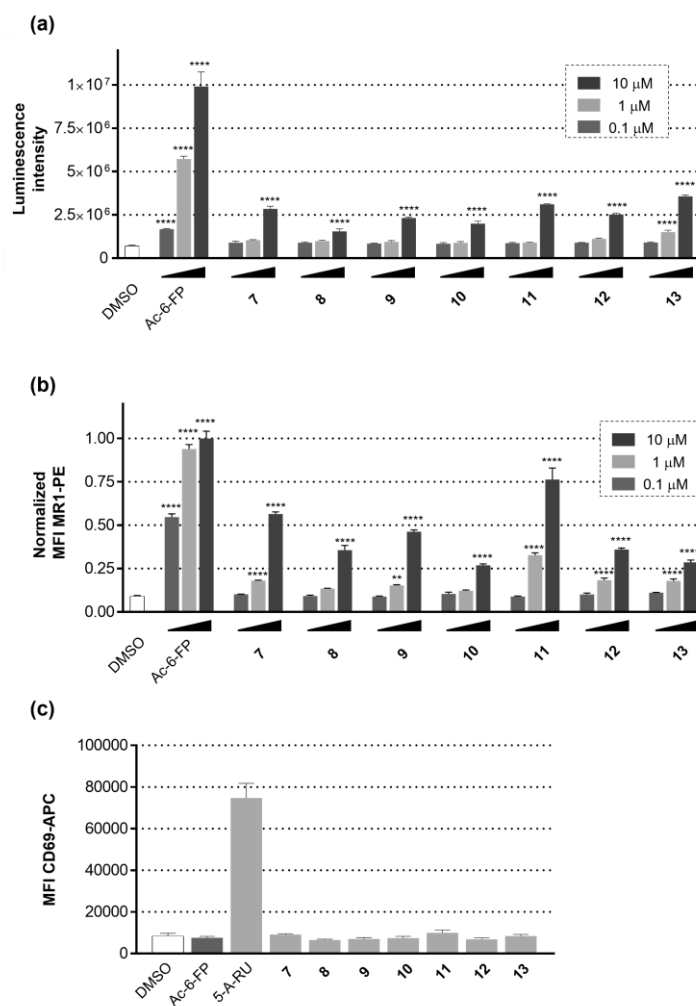


Figure 1-17. Validation of hit compounds. (a) Confirmation of the dose-dependency. The cell surface levels of MR1 on HEK293.HiBiT-hMR1 cells were detected as luminescence intensity after 8 h incubation at 37 °C in the presence of **7–13**, followed by the addition of LgBiT and furimazine. (b) Flow cytometry analysis of cell-surface MR1 using HeLa.hMR1 cells expressing HiBiT-untagged hMR1. The cell surface levels of MR1 on HeLa.hMR1 cells were analyzed by flow cytometry after 8 h incubation at 37 °C in the presence of **7–13**, followed by labeling with a PE-conjugated anti-hMR1 antibody. (c) Investigation of the ability to activate MAIT cells. Upregulation of cell surface levels of CD69, a T cell activation marker, on TG40.MAIT-TCR cells was analyzed by flow cytometry after 24 h incubation at 37 °C in co-culture with HeLa.hMR1 cells in the presence of **7–13** (10 μM), followed by labeling with an APC-conjugated anti-CD69 antibody. The graphs show the mean ± SD of triplicate measurements. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA and Dunnett's multiple comparison test. *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001; ****P < 0.0001 compared to DMSO control. PE = phycoerythrin. APC = allophycocyanin.

第三項 Coniferyl aldehyde の構造活性相関研究及び機能解析

続いて著者は、スクリーニングで得られたヒット化合物の中でも、特に MR1 の細胞表面発現量の上昇を強く誘導した coniferyl aldehyde (**11**) に着目した。Coniferyl aldehyde は、*Cinnamomum cassia* などの抗炎症作用を持つ生薬や、黒ゴマなどの食物成分に含まれる化合物である^{33–35}。Coniferyl aldehyde のような抗炎症作用を持つフェニルプロパノイドは生薬や食用植物に一般的に見られるため、著者は coniferyl aldehyde 類縁天然物の中に、MAIT 細胞の機能制御を介して抗炎症作用を示す化合物が存在するのではないかと考えた。そこで、生薬や食用植物に由来する coniferyl aldehyde 類縁

天然物を合成し (Schemes 1-S1-S5)、HeLa.hMR1 細胞を用いたフローサイトメトリー分析によって MR1 の細胞表面発現量を上昇させる作用の強さを評価した (Figure 1-18a, b)。ベンゼン環上の電子供与性置換基が 0 または 1 つの類縁体 14-21 には活性が確認されなかった一方で、電子供与性置換基を 2 つ持つ類縁体 22 および 23 は、MR1 の細胞表面発現量の上昇を強く誘導した。化合物 22 は、炎症や痛みを軽減する効果を持つとして東南アジアを中心に利用されている *Andrographis Panulata* に含まれる化合物である³⁶。化合物 23 は有毒な植物である *Phytolacca americana* に含まれていることが知られている³⁷。また、ベンゼン環上の置換基を交換した類縁体 (24) や 3 位にプレニル基を導入した類縁体 (25) では、活性は大幅に低下した。また、3 位と 5 位にメトキシ基を持つ類縁体 (26)、やジオキソールを持つ類縁体 (27, 28) もほとんど活性を示さなかった。

次に、MR1 の細胞表面発現量を上昇させる上で重要な部分構造を同定するため、非天然の coniferyl aldehyde 誘導体を合成し (Scheme 1-S6-S11)、更なる構造活性相関の調査を行った (Figure 1-18a, c)。二重結合を還元した誘導体 29、及び 2 炭素減炭/増炭させた誘導体 (30, 31) には活性が確認されなかった。また、ホルミル基の代わりに、アセチル基 (32)、カルボキシ基 (33)、シアノ基 (34) を有する誘導体は、ほとんど活性がなかった。したがって、11 のホルミル基は細胞表面への移行に必須であり、この官能基が Ac-6FP や 5-F-SA など他の MR1 リガンドと同様、Lys43 と Schiff 塩基を形成する可能性があることが示唆された。続いて、11 のベンゼン環上の置換基について構造活性相関研究を実施した。フェノール性水酸基を除去 (35)、または置換位置を 4 位から 2 位に変更 (36) すると、活性は大幅に減少した。メトキシ基の代わりにジメチルアミノ基を導入した誘導体 (37) も、MR1 の細胞表面発現量上昇は確認されなかった。2,5-ジメトキシ誘導体 (38) は、3,5-ジメトキシ誘導体 (26) よりも大幅に MR1 の細胞表面発現量を上昇させた。ピリドン骨格を持つ誘導体 (39) と二環式誘導体 (40) には活性はほとんどなかった。以上の構造活性相関研究から、 α,β -不飽和アルデヒド構造と 4 位のフェノール性水酸基が、MR1 を細胞表面へ誘導するのに重要な部分構造であることが明らかとなった。

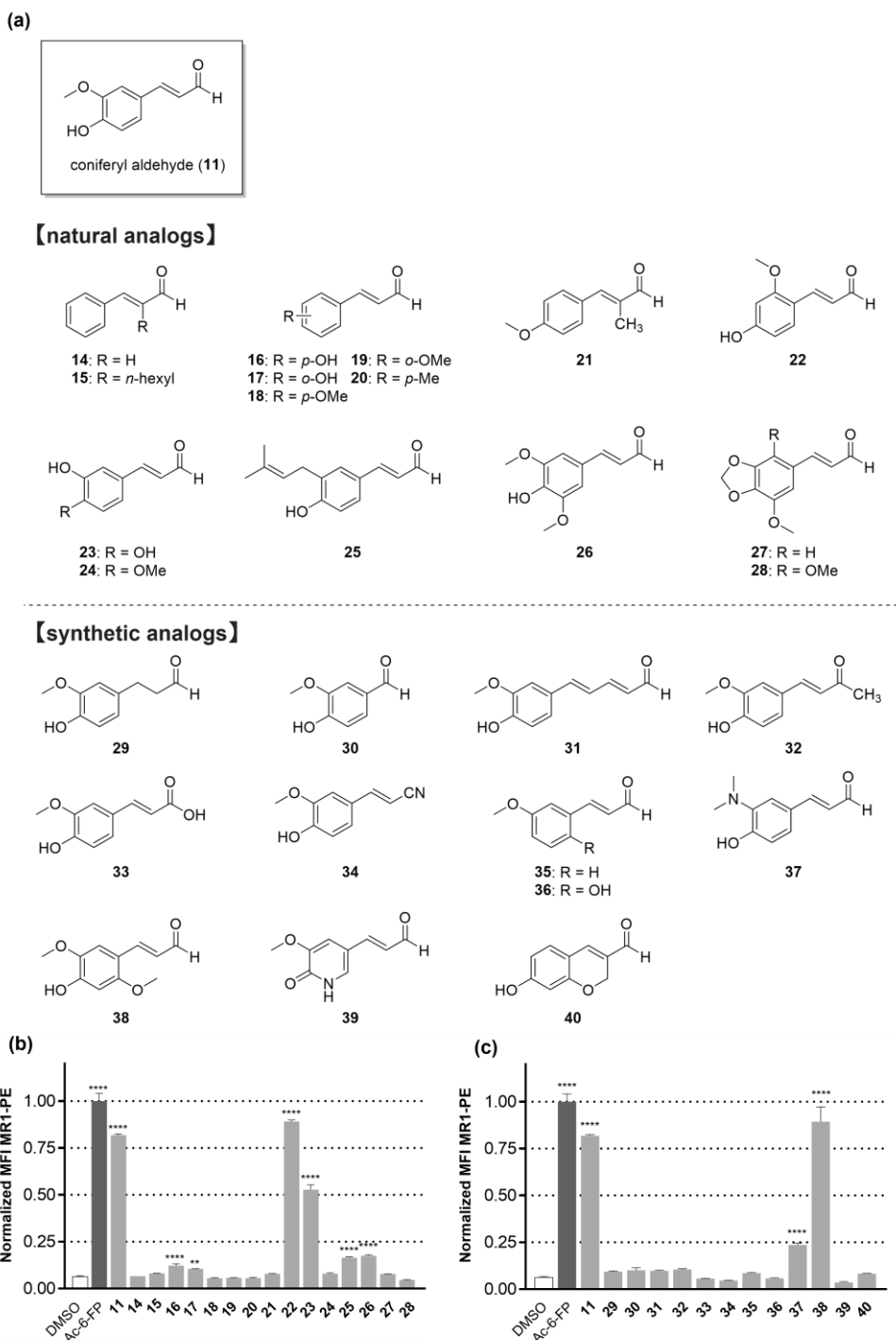


Figure 1-18. Evaluation of coniferyl aldehyde analogs. (a) Structures of the tested compounds. The cell surface levels of MR1 on HeLa.hMR1 cells were analyzed by flow cytometry after 8 h incubation at 37 °C in the presence of (b) natural analogs (**14–28**) (10 μ M) or (c) synthetic analogs (**29–40**) (10 μ M), followed by labeling with a PE-conjugated anti-hMR1 antibody. The graphs show the mean $\pm$ SD of triplicate measurements, and the results shown are representative of at least three independent experiments. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA and Dunnett's multiple comparison test. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$ compared to DMSO control. PE = phycoerythrin.

次に、MR1 を細胞表面に発現する作用を有していた誘導体 **11**、**22**、**23**、**38** について詳細な機能評価を行った。まず、MR1 を細胞表面に移動させる作用について濃度依存性を確認するとともに、EC

EC_{50} を算出した。**Figure 1-19a**に示すように、既知のMR1リガンドであるAc-6-FP、及び6-FPの EC_{50} は、それぞれ0.153 μ Mおよび1.63 μ Mであった。Coniferyl aldehyde誘導体**11**、**22**、**23**、**38**は、それら既知MR1リガンドより弱いものの、中程度の強さ(2.58–9.03 μ M)でMR1を細胞表面に移動させた。また、カテコール類縁体**23**は、6-FPと同様、他の誘導体よりも活性の最大値が低いことが分かった。次に、HeLa.hMR1細胞およびTG40.MAIT-TCR細胞の共培養系を用いて、これら誘導体のMAIT細胞活性化能を評価した(**Figure 1-19b**)。TG40.MAIT-TCR細胞上のT細胞活性化マーカーであるCD69の細胞表面発現量を指標として、coniferyl aldehyde誘導体**11**、**22**、**23**、**38**の活性を確認したところ、いずれの化合物でもMAIT細胞活性化作用は確認されなかった。これは、これらの誘導体がMAIT細胞のTCRと相互作用しうる部分構造を有していないためと考えられる。次に、これらの誘導体が、MAIT細胞の活性化を阻害する作用を持つか調査した。MAIT細胞活性化剤である5-OP-RUと各リガンド存在下HeLa.hMR1細胞とTG40.MAIT-TCR細胞を共培養したところ、Ac-6-FPを含むすべての化合物が5-OP-RUによるMAIT細胞の活性化を抑制することが明らかとなった(**Figure 1-19c**)。これは、これらの化合物が、6-FPやAc-6-FPと同じようにMR1の結合ポケットに結合し、5-OP-RUと競合することを示唆している。つまり、これらの化合物は、アンタゴニスト作用を有するMR1リガンドであることが明らかとなった。

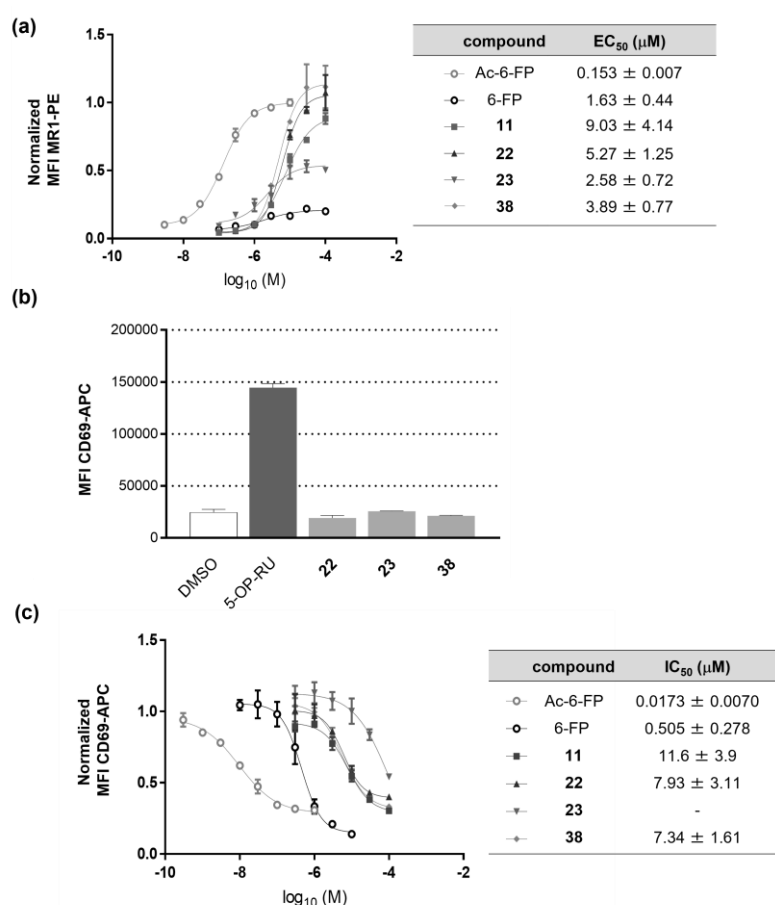


Figure 1-19. Functional analysis of the coniferyl aldehyde analogs. (a) Confirmation of dose-dependency on MR1 cell surface translocation ability. The cell surface levels of MR1 on HeLa.hMR1 cells were analyzed by flow cytometry after 8 h incubation at 37 °C in the presence of coniferyl aldehyde (**11**) or its analogs, followed by labeling with a PE-conjugated anti-hMR1 antibody. (b) Investigation of the ability of coniferyl aldehyde analogs to activate MAIT cells. Upregulation of cell surface levels of CD69 on TG40.MAIT-TCR cells was analyzed by flow cytometry after 24 h incubation at 37 °C in co-culture with HeLa.hMR1 cells in the presence of coniferyl aldehyde (**11**) or its analogs (10 μM), followed by labeling with an APC-conjugated anti-CD69 antibody. (c) Investigation of the dose-dependent inhibitory activity of MAIT cell activation. Upregulation of cell surface levels of CD69 on TG40.MAIT-TCR cells was analyzed by flow cytometry after 24 h incubation at 37 °C in co-culture with HeLa.hMR1 cells in the presence of coniferyl aldehyde (**11**) or its analogs and 5-OP-RU (0.1 nM), followed by labeling with an APC-conjugated anti-CD69 antibody. The graphs show the mean ± SD of triplicate measurements, and the results shown are representative of at least three independent experiments. PE = phycoerythrin. APC = allophycocyanin.

続いて、MTS アッセイを用いて、coniferyl aldehyde 誘導体が細胞生存率に及ぼす影響を調査した (Figure 1-20a, b, c)。HeLa.hMR1 細胞に対しては、8 時間インキュベートした場合でも、24 時間インキュベートした場合でも、3–100 μM の濃度範囲で細胞生存率に影響を与えなかった (Figure 1-20a, b)。TG40.MAIT-TCR 細胞に対しては、3 または 10 μM の濃度では細胞毒性が確認されなかったが、一部の類縁体はより高い濃度範囲 (30 μM、100 μM) において細胞生存率に影響を与えた (Figure 1-20c)。これらの結果は、EC₅₀ または IC₅₀ 付近の濃度では、HeLa.MR1 細胞、TG40.MAIT-TCR 細胞の生存率にほとんど影響を及ぼさないことを示している。最後に、MR1 の細胞表面発現量の上昇という現象が、MR1 特異的なものであるか調査した (Figure 1-20d)。各 coniferyl aldehyde 誘導体存在下

HeLa.hMR1 細胞をインキュベートし、古典的 MHC クラス I 分子である HLA-A/B/C の細胞表面発現量を確認した。その結果、いずれのリガンドで処理した場合でも、HLA-A/B/C の細胞表面発現量はほとんど変化しなかった。これらの結果から、coniferyl aldehyde は、非特異的にエキソサイトーシスを誘導するのではなく、MR1 に特異的に作用して、その細胞表面への発現を誘導する分子であることが示唆された。

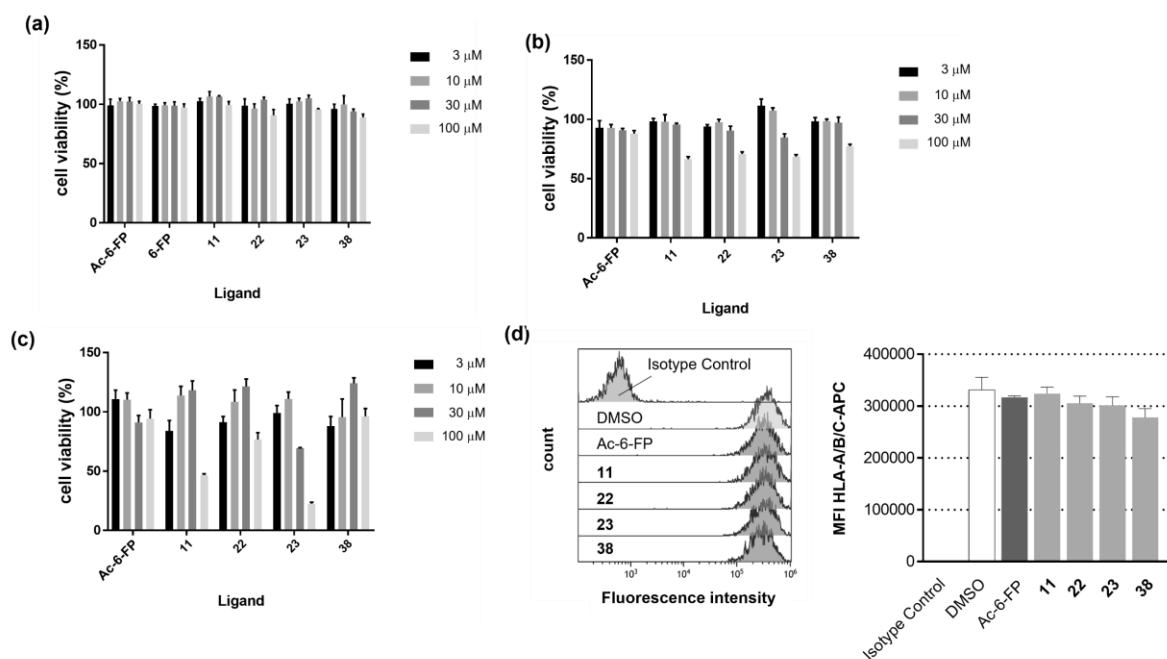


Figure 1-20. Functional analysis of the coniferyl aldehyde analogs. (a) The cell viability of HeLa.hMR1 cells after 8 h incubation at 37 °C in the presence of Ac-6-FP, 6-FP and coniferyl aldehyde analogs. (b) The cell viability of HeLa.hMR1 cells after 24 h incubation at 37 °C in the presence of Ac-6-FP and coniferyl aldehyde analogs. (c) The cell viability of TG40.MAIT-TCR cells after 24 h incubation at 37 °C in the presence of Ac-6-FP and coniferyl aldehyde analogs. The cell viability was evaluated using MTS assay. (d) Effects of coniferyl aldehyde (5) and its analogs on the cell surface levels of HLA-A/B/C. The cell surface levels of HLA-A/B/C on HeLa.hMR1 cells were analyzed by flow cytometry after 8 h incubation at 37 °C in the presence of coniferyl aldehyde (5) or its analogs, followed by labeling with an APC-conjugated anti-HLA-A/B/C antibody. The graphs show the mean $\pm$ SD of triplicate measurements, and the results shown are representative of at least two independent experiments. APC = allophycocyanin.

第四項 Coniferyl aldehyde の相互作用解析

最後に、MR1 結合ポケット中での coniferyl aldehyde の分子認識について知見を得るべく、MD シミュレーションを用いて結合モードを解析した。過去の報告に基づいて、coniferyl aldehyde 中のホルミル基は MR1 の Lys43 と Schiff 塩基を介して共有結合を形成していると仮定し、既知リガンド/MR1 の X 線結晶構造 (PDB ID: 4GUP) をテンプレートとして、ドッキング計算によって coniferyl aldehyde と hMR1 の複合体構造をモデリングした^{1,17-19,29,31}。その後、取得したポーズを用いて、coniferyl aldehyde とその誘導体に対し、50 ns の MD シミュレーションを実施した。**Figure 1-21a** は、coniferyl aldehyde 誘導体/hMR1 複合体の MD シミュレーションにおける平均構造、**Figure 1-21b** は MD シミュレーションにおいて観測された coniferyl aldehyde と hMR1 構造中の各アミノ酸残基との相互作用の割合を示す。これらの解析結果から、hMR1 の Tyr7 を中心に、Arg9、Ser24、Tyr62、Leu66、Trp69

がリガンド認識に関与することが示唆された。また、解析を行った誘導体の中でも、**38** は他と異なる相互作用パターンを示し、MR1 との結合位置が他のリガンドと少しずれている可能性があることが示唆された。一方で、*coniferyl aldehyde* 誘導体の構造活性相関研究において 4 位フェノール性水酸基が活性発現に重要であることが明らかになっているにも関わらず、本解析において、4 位フェノール性水酸基と hMR1 の間で直接的な相互作用はほとんど確認されなかった。

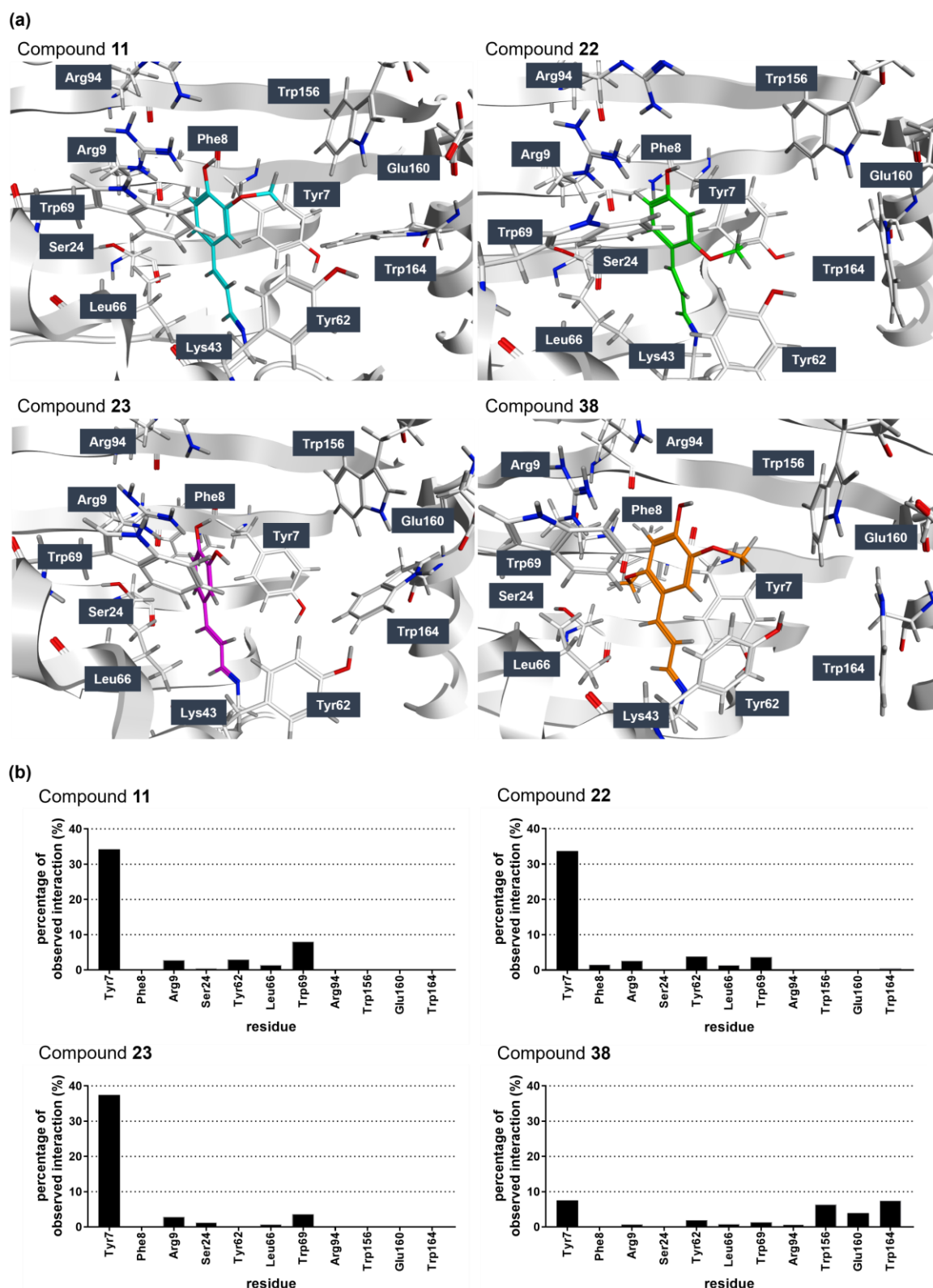


Figure 1-21. Structure models of hMR1 in complex with coniferyl aldehyde and its analogs predicted by molecular docking and MD simulation. The crystal structure of hMR1 in complex with 6-FP (PDB ID: 4GUP) was used as a template. (a) Binding modes of compound **11**, **22**, **23**, and **38**. The mean structures of each ligand and hMR1 residues located within 4.5 Å from the ligand, generated by 50 ns MD simulations, are represented by colored and gray sticks, respectively. (b) Observed percentages of interactions between each ligand and hMR1 residues during the MD simulation.

そこで、水分子を介して、フェノール性水酸基と hMR1 が相互作用している可能性を考え、水分子の解析ツールである 3D-RISM を用いて、結合ポケット内の水分子の位置を予測した (Figure 1-22a)³⁸。シミュレーションの結果、フェノール性水酸基と Arg9 及び Arg94 の間に水分子の存在を示唆する結果を得た。そこで、MD シミュレーション中における、水分子を介したフェノール性水酸基と MR1 の間の相互作用の存在割合を調査した。その結果、全てのリガンドにおいて一定の割合 (Arg9: 1–18%; Arg94: 13–49%) で相互作用が観察された (Figure 1-22b)。特に、Arg94 と 11 および 23 のフェノール性水酸基の間で観察された相互作用の割合は 30% 以上であり、これらの相互作用が hMR1 のリガンド認識に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

また、既知の MR1 リガンドである Ac-6-FP や 6-FP は、X 線結晶構造解析から、Arg9 および Arg94 と直接水素結合を形成していることが報告されている^{14,18}。以上のことから、Arg9 や Arg94 との相互作用は MR1 を細胞表面へ誘導するために重要である可能性が高く、coniferyl aldehyde では、水分子を介して Arg9 や Arg94 と相互作用を形成していることが示唆された。

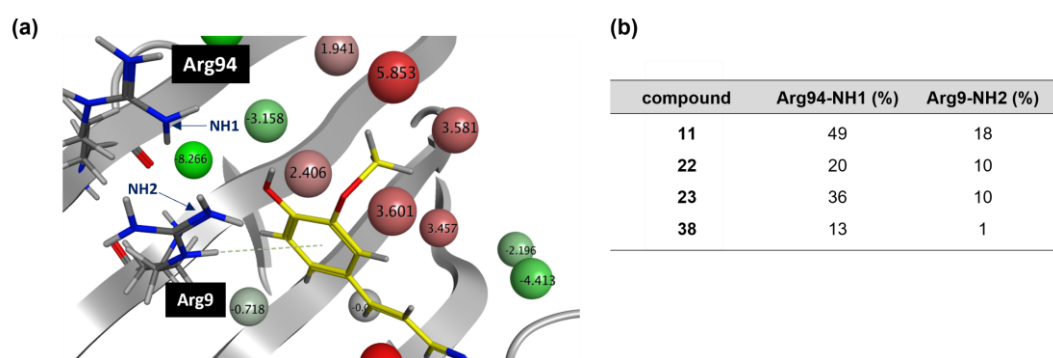


Figure 1-22. Distribution of water molecules in the binding pocket predicted by using 3D-RISM. (a) Water molecule positions in the ligand binding pocket of hMR1 in complex with the coniferyl aldehyde. 3D-RISM implemented in MOE was used to predict the positions of water molecules. The hydration sites are drawn as colored spheres, where each value represents a change in the Gibbs free energy when a water molecule is placed at the corresponding position from bulk water. (b) Observed percentages of water molecule-mediated interactions between Arg94/Arg9 and the phenolic hydroxy groups of each ligand during the MD simulation.

第五項 小括

著者は、効率的な MR1 リガンドの同定を可能にすべく、MR1 の細胞表面量を指標とするスループット性の高いスクリーニング系を確立した。本研究にて開発したスクリーニング系は、今後、内因性・外因性抗原を含む幅広い MR1 リガンドの同定に貢献し、MAIT 細胞の機能解明にも寄与することが期待される。さらに、本スクリーニング系を利用することによって、植物に由来する coniferyl aldehyde を MR1 リガンドとして見出した。Coniferyl aldehyde は、これまでに同定されてきたリガンドと異なり、フェニルプロパノイド骨格を有する。また、MAIT 細胞が腸管をはじめとする粘膜組織に豊富に存在することを踏まえると、coniferyl aldehyde のような、食用植物や生薬に由来する化合物が MR1 リガンドとして機能することは非常に興味深い。今後、本化合物が *in vivo* でも MAIT 細胞の機能制御に関与するか調査する必要がある。さらに、coniferyl aldehyde とその誘導体の結合モードの解析から、MR1 から抗原提示を受ける上で重要な相互作用を同定した (Figure 1-23)。

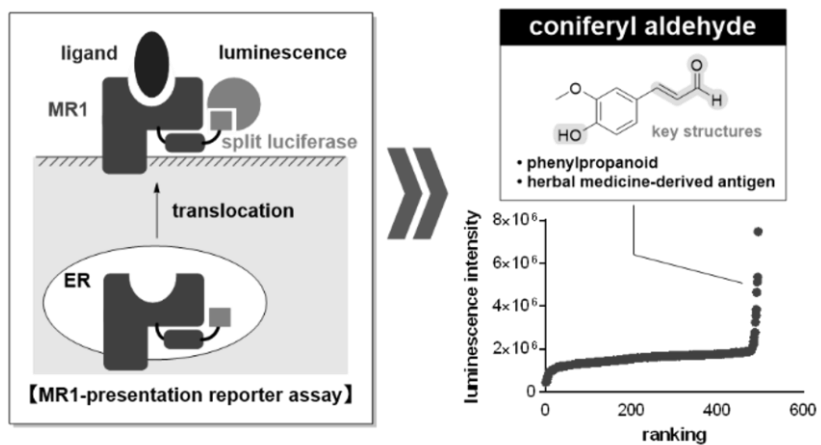


Figure 1-23. Summary of Section 2, Chapter 1.

実験項

Experiments in section 1

General information

^1H NMR spectra were recorded using a JEOL ECA-500 spectrometer at 500 MHz frequency. Chemical shifts are reported in δ (ppm) relative to Me_4Si (in $\text{DMSO}-d_6$) and residual H_2O (in D_2O) as internal standard. ^{13}C NMR spectra were recorded using a JEOL ECA-500 or JEOL ECZ600R and referenced to the residual DMSO signal (in $\text{DMSO}-d_6$) and MeCN (in D_2O). ^1H and ^{13}C NMR spectra using D_2O as solvent were recorded at 25 °C. Exact mass (HRMS) spectra were recorded on a Shimadzu LC-ESI-IT-TOF-MS equipment (ESI). Optical rotations were measured with a JASCO P-1020 polarimeter. IR spectra were obtained on a JASCO FT/IR-4100 spectrometer.

General procedure for synthesis of compounds **6a–h**

The compounds **6a–h** were prepared according to the published method (the compounds **6a–c**, **6e** and **6g** are the known compounds¹³).⁴ The known nitouracil **4** and amines **5a–h** were prepared according to the published method.^{4,5} Representative synthetic protocol is as follows. To a solution of **5a** (576 mg, 3.81 mmol) in water (2.2 mL) was added the solution of **4** (364 mg, 1.90 mmol) in EtOH (5.60 mL). Then, 2 M KOH aq. (1.9 mL) was added dropwise at room temperature. After being stirred for 16 h at this temperature, the precipitate was filtered and washed with EtOH to give a yellow solid (498 mg). The 20.1 mg of crude material was purified using an HPLC system equipped with a Cosmosil PBr 20 $\times$ 250 mm column [flow rate: 8 mL/min; 5% MeCN– H_2O isocratic solution containing 0.1% (v/v) TFA]. The product was collected, followed by lyophilization to afford **6a** (10.8 mg, 46% yield).

6a: white amorphous solid; ^1H NMR (500 MHz, D_2O) δ 3.67–3.72 (m, 1H), 3.75–3.78 (m, 2H), 3.82–3.87 (m, 3H), 4.14–4.16 (m, 1H).

6b: white amorphous solid; ^1H NMR (500 MHz, D_2O) δ 3.68–3.70 (m, 1H), 3.72–3.79 (m, 2H), 3.82–3.88 (m, 3H), 4.13–4.15 (m, 1H).

6c: white amorphous solid; ^1H NMR (500 MHz, D_2O) δ 3.61 (dd, J = 8.6, 1.7 Hz, 1H), 3.69 (dd, J = 11.7, 6.0 Hz, 1H), 3.77–3.79 (m, 3H), 3.87 (dd, J = 11.5, 2.9 Hz, 1H), 4.24–4.26 (m, 1H).

6d: white amorphous solid; $[\alpha]_{\text{D}}^{26} +1.5$ (c 0.51, DMSO); ^1H NMR (500 MHz, D_2O) δ 3.61 (dd, J = 8.6, 1.7 Hz, 1H), 3.69 (dd, J = 11.7, 6.0 Hz, 1H), 3.72–3.80 (m, 3H), 3.87 (dd, J = 11.5, 2.9 Hz, 1H), 4.24–4.26 (m, 1H); $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 46.3, 63.3, 67.7, 71.1, 71.7, 109.1, 147.9, 153.6, 156.4; IR (neat cm^{-1}): 3394, 1727, 1636, 1544, 1418; HRMS (ESI-TOF) m/z : $[\text{M} + \text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_9\text{H}_{15}\text{N}_4\text{O}_8$, 307.0884; found, 307.0882.

6e: white amorphous solid; ^1H NMR (500 MHz, D_2O) δ 3.67 (dd, J = 11.7, 6.6 Hz, 1H), 3.72–3.74 (m, 3H),

3.80 (dd, $J = 14.3, 4.0$ Hz, 1H), 3.86–3.87 (m, 1H), 4.10–4.13 (m, 1H).

6f: white amorphous solid; $[\alpha]_{\text{D}}^{26} -1.4$ (c 0.73, DMSO); ^1H NMR (500 MHz, D_2O) δ 3.66 (dd, $J = 11.7, 6.6$ Hz, 1H), 3.71–3.75 (m, 3H), 3.80 (dd, $J = 14.3, 4.0$ Hz, 1H), 3.86–3.87 (m, 1H), 4.10–4.11 (m, 1H); $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 45.7, 62.4, 69.5, 71.56, 71.59, 109.1, 147.9, 153.6, 156.4; IR (neat cm^{-1}): 3378, 1730, 1634, 1543, 1415; HRMS (ESI-TOF) m/z : $[\text{M} + \text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_9\text{H}_{15}\text{N}_4\text{O}_8$, 307.0884; found, 307.0882.

6g: white amorphous solid; ^1H NMR (500 MHz, D_2O) δ 3.62–3.63 (m, 1H), 3.69–3.70 (m, 2H), 3.76 (dd, $J = 14.3, 6.9$ Hz, 1H), 3.91 (dd, $J = 14.3, 3.4$ Hz, 1H), 3.95–3.96 (m, 1H), 4.05–4.09 (m, 1H).

6h: white amorphous solid; $[\alpha]_{\text{D}}^{26} +2.8$ (c 0.51, DMSO); ^1H NMR (500 MHz, D_2O) δ 3.58–3.60 (m, 1H), 3.69–3.70 (m, 2H), 3.76 (dd, $J = 14.3, 6.9$ Hz, 1H), 3.89 (dd, $J = 14.3, 3.4$ Hz, 1H), 3.95–3.96 (m, 1H), 4.02–4.04 (m, 1H); $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 46.2, 62.6, 68.1, 69.7, 70.6, 109.2, 147.9, 153.8, 156.4; IR (neat cm^{-1}): 3262, 1723, 1636, 1542, 1400; HRMS (ESI-TOF) m/z : $[\text{M} + \text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_9\text{H}_{15}\text{N}_4\text{O}_8$, 307.0884; found, 307.0882.

General procedure for synthesis of compounds 2a–h

The compounds **2a–h** were prepared by modifications to a literature procedure (the compounds **2a–c**, **2e** and **2g** are the known compounds¹³).² Representative synthetic protocol is as follows. To a stirred solution of **2a** (45.2 mg, 0.148 mmol) in H_2O (1.1 mL) was added $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ (199 mg, 1.14 mmol) at 80 °C under argon. After being stirred for 2 h at this temperature, the mixture was purified using an HPLC system equipped with a Cosmosil PBr 20 $\times$ 250 mm column [flow rate: 8 mL/min; H_2O containing 0.1% (v/v) TFA]. The product was collected, followed by lyophilization to afford **2a** as a TFA salt (39.6 mg, 69% yield).

2a: pink amorphous solid; ^1H NMR (500 MHz, D_2O) δ 3.57 (dd, $J = 14.9, 7.4$ Hz, 1H), 3.67–3.70 (m, 2H), 3.74–3.75 (m, 1H), 3.80–3.85 (m, 2H), 4.01–4.03 (m, 1H); Purity: 97% (LC-MS).

2b: pink amorphous solid; ^1H NMR (500 MHz, D_2O) δ 3.57 (dd, $J = 14.9, 7.4$ Hz, 1H), 3.67–3.70 (m, 2H), 3.74–3.75 (m, 1H), 3.80–3.86 (m, 2H), 4.00–4.03 (m, 1H); Purity: 99% (LC-MS).

2c: pink amorphous solid; ^1H NMR (500 MHz, D_2O) δ 3.53–3.59 (m, 3H), 3.69 (dd, $J = 11.7, 6.0$ Hz, 1H), 3.76–3.79 (m, 1H), 3.86 (dd, $J = 12.0, 2.9$ Hz, 1H), 4.11–4.12 (m, 1H); Purity: 99% (LC-MS).

2d: pink amorphous solid; $[\alpha]_{\text{D}}^{26} +9.8$ (c 0.71, H_2O); ^1H NMR (500 MHz, D_2O) δ 3.53–3.62 (m, 3H), 3.69 (dd, $J = 11.7, 6.0$ Hz, 1H), 3.77–3.79 (m, 1H), 3.86 (dd, $J = 12.0, 2.9$ Hz, 1H), 4.10–4.13 (m, 1H); $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (150 MHz, D_2O) δ 46.1, 63.4, 69.3, 71.3, 71.4, 83.9, 150.9, 151.6, 161.7; IR (neat cm^{-1}): 3201, 1705, 1654; HRMS (ESI-TOF) m/z : $[\text{M} + \text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_9\text{H}_{17}\text{N}_4\text{O}_6$, 277.1143; found, 277.1145; Purity: 98% (LC-MS).

2e: pink amorphous solid; ^1H NMR (500 MHz, D_2O) δ 3.54–3.58 (m, 2H), 3.63–3.67 (m, 2H), 3.73 (dd, J = 11.7, 4.3 Hz, 1H), 3.83–3.85 (m, 1H), 3.97–4.00 (m, 1H); Purity: 97% (LC-MS).

2f: pink amorphous solid; $[\alpha]_{\text{D}}^{26} +7.6$ (c 0.49, H_2O); ^1H NMR (500 MHz, D_2O) δ 3.56–3.61 (m, 2H), 3.65–3.68 (m, 2H), 3.74 (dd, J = 11.7, 4.3 Hz, 1H), 3.85–3.86 (m, 1H), 3.98–4.01 (m, 1H); $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (125 MHz, D_2O) δ 45.8, 63.0, 70.8, 71.7, 72.5, 83.7, 151.0, 151.5, 161.7; IR (neat cm^{-1}): 3308, 1708, 1643; HRMS (ESI-TOF) m/z : $[\text{M} + \text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_9\text{H}_{17}\text{N}_4\text{O}_6$, 277.1143; found, 277.1143; Purity: >99% (LC-MS).

2g: pink amorphous solid; ^1H NMR (500 MHz, D_2O) δ 3.57–3.61 (m, 2H), 3.68–3.70 (m, 2H), 3.74 (dd, J = 14.9, 2.9 Hz, 1H), 3.94–3.95 (m, 2H); Purity: 99% (LC-MS).

2h: pink amorphous solid; $[\alpha]_{\text{D}}^{25} +2.1$ (c 0.76, H_2O); ^1H NMR (500 MHz, D_2O) δ 3.57–3.62 (m, 2H), 3.68–3.69 (m, 2H), 3.74 (dd, J = 14.9, 2.9 Hz, 1H), 3.94–3.96 (m, 2H); $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (125 MHz, D_2O) δ 46.1, 63.5, 69.9, 70.4, 71.5, 83.3, 151.2, 151.5, 161.7; IR (neat cm^{-1}): 3202, 1704, 1637; HRMS (ESI-TOF) m/z : $[\text{M} + \text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_9\text{H}_{17}\text{N}_4\text{O}_6$, 277.1143; found, 277.1143; Purity: >99% (LC-MS).

General procedure for synthesis of compounds **3a**, **3b**, **3c**, **3e** and **3g**

The compounds **3a**, **3b**, **3c**, **3e** and **3g** were prepared by modifications to a literature procedure (the compound **3a** is the known compound²).² Representative synthetic protocol is as follows. To a stirred solution of **2a** (19.7 mg, 0.0500 mmol) in H_2O (2.3 mL) was added methyl glyoxal (40% aqueous solution; 27.3 μL , 0.153 mmol) at room temperature under argon. After being stirred for 24 h at this temperature, the mixture was purified using an HPLC system equipped with a Cosmosil PBr 20 $\times$ 250 mm column [flow rate: 8 mL/min; 7% MeCN– H_2O isocratic solution containing 0.1% (v/v) TFA]. The product was collected, followed by lyophilization to afford **3a** (6.9 mg, 43% yield).

3a: yellow amorphous solid; ^1H NMR (500 MHz, $\text{D}_2\text{O}:\text{CD}_3\text{OD} = 9:1$) δ 2.85 (s, 3H), 3.68 (dd, J = 12.0, 6.9 Hz, 1H), 3.82–3.84 (m, 2H), 3.88–3.90 (m, 1H), 4.42–4.44 (m, 1H), 4.57 (dd, J = 10.3, 10.3 Hz, 1H), 4.92–4.95 (m, 1H), 8.32 (s, 1H); Purity: 98% (LC-MS).

3b: yellow amorphous solid; $[\alpha]_{\text{D}}^{25} -207.7$ (c 0.31, H_2O); ^1H NMR (500 MHz, $\text{D}_2\text{O}:\text{CD}_3\text{OD} = 9:1$) δ 2.84 (s, 3H), 3.68 (dd, J = 12.0, 6.9 Hz, 1H), 3.81–3.84 (m, 2H), 3.88–3.90 (m, 1H), 4.40–4.42 (m, 1H), 4.57 (dd, J = 10.3, 10.3 Hz, 1H), 4.93 (dd, J = 13.7, 2.3 Hz, 1H), 8.31 (s, 1H); $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (125 MHz, $\text{D}_2\text{O}:\text{CD}_3\text{OD} = 9:1$) δ 19.5, 51.8, 63.2, 69.4, 72.6, 74.0, 133.9, 136.3, 152.3, 153.2, 158.6, 163.5; IR (neat cm^{-1}): 3342, 1706, 1625; HRMS (ESI-TOF) m/z : $[\text{M} + \text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{N}_4\text{O}_6$, 313.1143; found, 313.1144; Purity: 91% (LC-MS).

3c: yellow amorphous solid; $[\alpha]_{\text{D}}^{26} +285.0$ (c 0.81, H_2O); ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 2.70 (s, 3H), 3.30–3.32 (m, 1H), 3.43–3.52 (m, 2H), 3.64 (dd, J = 10.9, 2.3 Hz, 1H), 4.29 (dd, J = 11.5, 11.5 Hz, 1H), 4.35–4.37 (m, 1H), 4.51 (dd, J = 12.6, 3.4 Hz, 1H), 8.11 (s, 1H), 11.15 (s, 1H); $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (125 MHz,

DMSO-*d*₆) δ 18.6, 51.0, 63.6, 65.4, 71.0, 71.4, 132.0, 134.0, 149.5, 152.0, 155.3, 160.7; IR (neat cm⁻¹): 3328, 1705, 1636; HRMS (ESI-TOF) *m/z*: [M + H]⁺ calcd for C₁₂H₁₇N₄O₆, 313.1143; found, 313.1141; Purity: 99% (LC-MS).

3e: yellow amorphous solid; [α]_D²⁶ -276.0 (*c* 0.40, H₂O); ¹H NMR (500 MHz, D₂O:CD₃OD = 9:1) δ 2.85 (s, 3H), 3.65 (dd, *J* = 12.0, 6.3 Hz, 1H), 3.71 (dd, *J* = 11.7, 4.3 Hz, 1H), 3.80 (dd, *J* = 5.2, 3.4 Hz, 1H), 3.88–3.91 (m, 1H), 4.38–4.39 (m, 1H), 4.60 (dd, *J* = 13.2, 9.7 Hz, 1H), 4.81–4.84 (m, 1H), 8.31 (s, 1H); ¹³C{¹H} NMR (125 MHz, D₂O:CD₃OD = 9:1) δ 19.5, 52.5, 63.0, 68.9, 72.1, 72.7, 133.9, 136.2, 152.4, 153.1, 158.6, 163.5; IR (neat cm⁻¹): 3396, 1706, 1648; HRMS (ESI-TOF) *m/z*: [M + H]⁺ calcd for C₁₂H₁₇N₄O₆, 313.1143; found, 313.1141; Purity: 90% (LC-MS).

3g: yellow amorphous solid; [α]_D²⁶ -165.1 (*c* 0.58, H₂O); ¹H NMR (500 MHz, D₂O:CD₃OD = 9:1) δ 2.84 (s, 3H), 3.69–3.71 (m, 3H), 3.93–3.95 (m, 1H), 4.31–4.35 (m, 1H), 4.53 (dd, *J* = 13.2, 9.7 Hz, 1H), 5.03 (dd, *J* = 13.7, 2.3 Hz, 1H), 8.31 (s, 1H); ¹³C{¹H} NMR (125 MHz, D₂O:CD₃OD = 9:1) δ 19.5, 52.9, 63.4, 68.6, 70.8, 73.1, 133.8, 136.2, 152.4, 153.3, 158.6, 163.5; IR (neat cm⁻¹): 3355, 1706, 1631; HRMS (ESI-TOF) *m/z*: [M + Na]⁺ calcd for C₁₂H₁₆N₄NaO₆, 335.0962; found, 335.0962; Purity: 95% (LC-MS).

Materials

5-A-RU, RL-7-Me and their derivatives were prepared by the reported procedures. 5-OP-RU and its stereoisomers were freshly prepared before each experiment by combining 10 mM of 5-A-RU or its stereoisomers with a 40% aqueous solution of methylglyoxal (see: T Cell activation assay). Acetyl-6-formylpterin (Ac-6-FP) was purchased from Cayman Chemical Company.

Cell line and cell culture

A human MR1-overexpressing HeLa cell line was established by retroviral gene transduction of human MR1 and human CD8 α as described previously.³⁹ A MAIT cell line was generated by retroviral gene transduction of MAIT- $\alpha\beta$ TCRs into the murine thymoma TG40 (negative for TCR), as described previously.⁴⁰ HeLa cells were cultured in DMEM (Sigma) supplemented with 10% FBS (Sigma), 1% penicillin/streptomycin (Wako).

TG40 cells were cultured in RPMI-1640 medium (nacalai) supplemented with 10% FBS, 1% penicillin/streptomycin. During the T cell activation assay and MR1 upregulation assay, both cells were cultured in RPMI-1640 medium without folic acid, and with 10% FBS, 1% penicillin/streptomycin. All cell lines were grown at 37°C in a humidified 5% CO₂ atmosphere.

Stability analysis

The stability analysis was carried out by modifications to a literature procedure.² To a solution of each precursor **2a**, **2c**, **2e** and **2g** (5.0 mg, 0.013 mmol) in D₂O (730 μ L) was added methylglyoxal (40% aqueous solution; 58 μ L, 0.33 mmol). Then, the amount of 5-OP-RU derivatives **1** and the RL-7-Me derivatives **3** were monitored using ¹H NMR with their characteristic signals every 10 min until 120 min.

T cell activation assay

Briefly, HeLa.hMR1 cells (4.5×10^4 cells) were co-incubated with TG40.MAIT-TCR cells (9.0×10^4 cells) for 24 h in 200 μ L medium (RPMI 1640 without folic acid) with various ligands. Of the ligands, 5-OP-RU and its stereoisomers (final concentration: 10 μ M) were freshly prepared before each experiment by the addition of 5-A-RU or its stereoisomers (10 mM solution in DMSO; 4 μ L), and a methylglyoxal (1 mM solution in the medium; 1 mL) to the medium (1 mL). Then, each ligand solution (100 μ L) was added to the cell suspension (100 μ L), followed by incubation. The cells were subsequently stained with PE-conjugated anti-mouse CD3 (BioLegend), APC-conjugated anti-mouse CD69 (BioLegend) and propidium iodide (PI), followed by Gallios flow cytometric analysis (Beckman Coulter). Data were analyzed with Kaluza software (Beckman Coulter, v2.1). The activation of TG40 cells was measured by an increase in the cell-surface CD69 expression. The supernatant was collected from the abovementioned incubation, and the level of IL-2 was measured using an ELISA kit (BioLegend), in accordance with the recommended protocol. The absorbance at 450 nm was read using an iMark microplate reader (Bio-Rad).

MR1 upregulation assay

Briefly, HeLa.hMR1 cells (1.5×10^5 cells) were incubated for 8 h in 200 μ L medium (RPMI 1640 without folic acid) with various ligands. The cells were subsequently stained with PE-conjugated anti-human MR1 (Biolegend) and PI, followed by Gallios flow cytometric analysis (Beckman Coulter). Data were analyzed with Kaluza software (Beckman Coulter, v2.1).

Medium-exchange experiment

HeLa.hMR1 cells (4.5×10^4 cells) were incubated in 150 μ L medium (RPMI 1640 without folic acid) with **1a** or **3a** for 1 h. After washing with PBS(–) and the addition of 200 μ L medium (RPMI 1640 without folic acid) including TG40.MAIT-TCR cells (9.0×10^4 cells), the mixture was co-incubated in the absence of the derivatives for 23 h. The activation of TG40 cells was measured by a procedure identical with the T cell activation assay described above.

As a control experiment, HeLa.hMR1 cells (4.5×10^4 cells) were incubated in 150 μ L medium (RPMI 1640 without folic acid) with **1a** or **3a** for 1 h, followed by the addition of 50 μ L medium (RPMI 1640 without folic acid) including TG40.MAIT-TCR cells (9.0×10^4 cells). Then, the mixture was co-incubated with the derivatives for 23 h. Subsequently, the activation of TG40 cells was measured by a procedure identical with the T cell activation assay described above.

Binding mode study

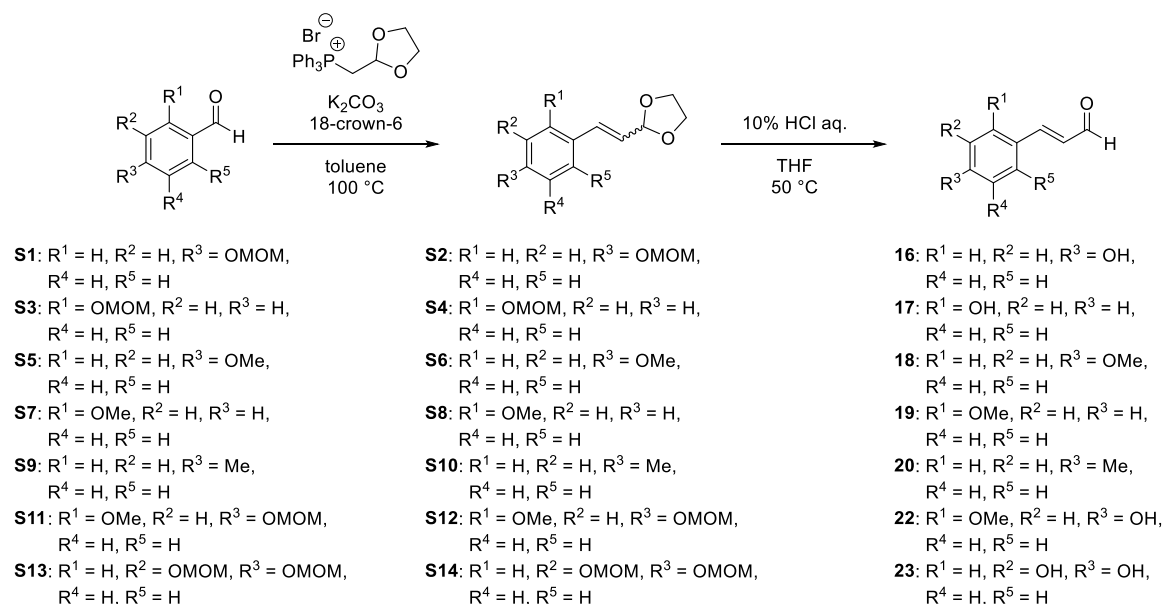
The binding mode of the MR1 ligand (5-OP-RU derivative, **1**)-TCR ternary complexes was analyzed using MOE with the X-ray crystal structure of MR1-ligand (7-hydroxy-6-methyl-8-d-ribityllumazine)-TCR ternary complex (PDB ID: 4L4V) as a template. The protein structure was preprocessed and optimized using the MOE QuickPrep command with the default settings. After modifying the ligand structure to 5-OP-RU or its

stereoisomers, energy minimization calculations of the complex structures were performed with the Amber10:EHT force field. The minimization process of the residues within 8 Å around the ligand was carried out to predict the binding mode. In the optimized ternary complexes, the distances between the ligands and the close residues in MR1 and TCR were measured to elucidate the significant interactions underpinning the MAIT cell activation.

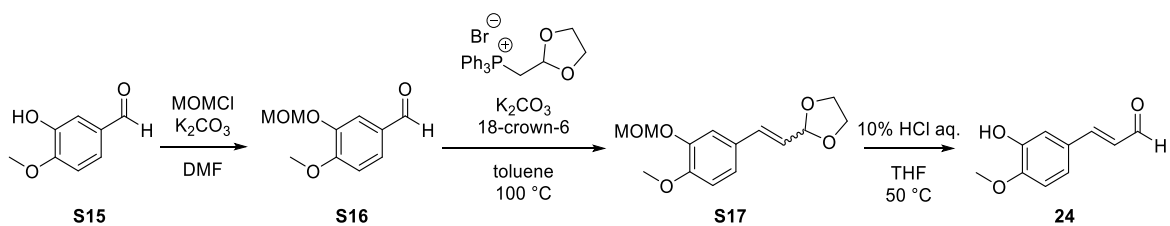
Experiments in section 2

General information

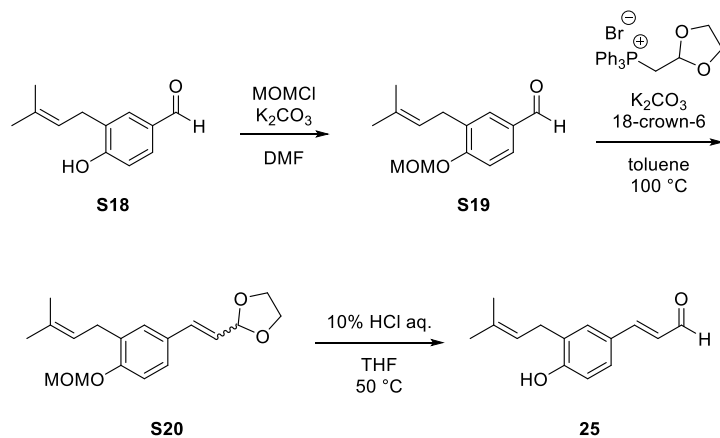
^1H NMR spectra were recorded using a JEOL ECA-500 or JEOL ECZ600R spectrometer. Chemical shifts are reported in δ (ppm) relative to Me_4Si (in CDCl_3 or $\text{DMSO}-d_6$) as internal standard. ^{13}C NMR spectra were recorded using a JEOL ECA-500 or JEOL ECZ600R and referenced to the residual CHCl_3 signal (in CDCl_3) and the residual DMSO signal (in $\text{DMSO}-d_6$). Exact mass (HRMS) spectra were recorded on a Shimadzu LC-ESI-IT-TOF-MS equipment (ESI). IR spectra were obtained on a JASCO FT/IR-4100 spectrometer. Synthetic method for compounds **11**⁴¹, **21**⁴², **29**⁴³, **34**⁴⁴, **40**⁴⁵, **S1**⁴⁶, **S3**⁴⁶, **S11**⁴⁷, **S13**⁴⁸, **S18**⁴⁹, **S21**⁵⁰, **S23**⁵¹, **S25**⁵², **S27**⁵³, **S31**⁵⁴, **S33**⁵⁵, **S37**⁵⁶ and **S41**⁵⁷ are reported. Compounds **14**, **15**, **30**, **33**, **S5**, **S7**, **S9**, **S15** and **S29** are commercially available. Structures of **S1**–**S45** are shown in Schemes S1–S12. All tested compounds have a purity of > 95% determined by HPLC. The purity was assessed by reverse phase HPLC using Shimadzu LC-20AT and SPD-20A with a gradient of 10–90% acetonitrile in water (with 0.1% formic acid) and monitored by diode array ultraviolet detection at 254 nm.



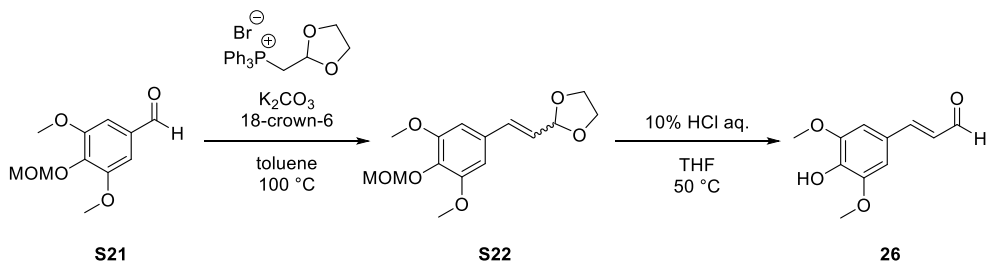
Scheme 1-S1. Preparation of natural analogs **16**–**20**, **22** and **23**.



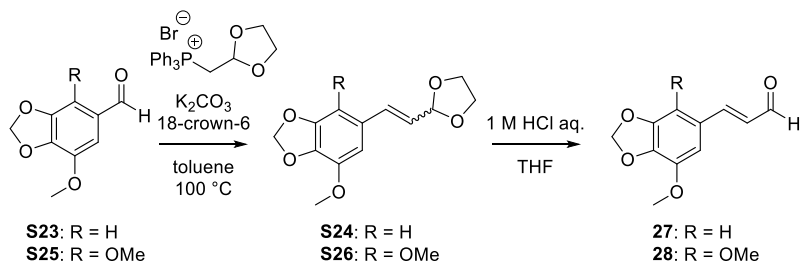
Scheme 1-S2. Preparation of natural analog **24**.



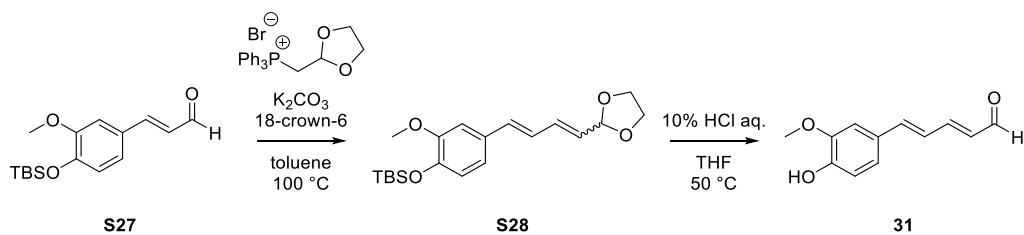
Scheme 1-S3. Preparation of natural analog **25**.



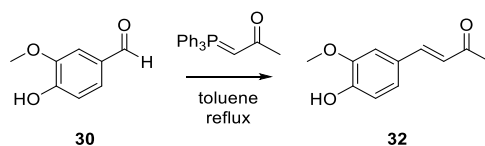
Scheme 1-S4. Preparation of natural analog **26**.



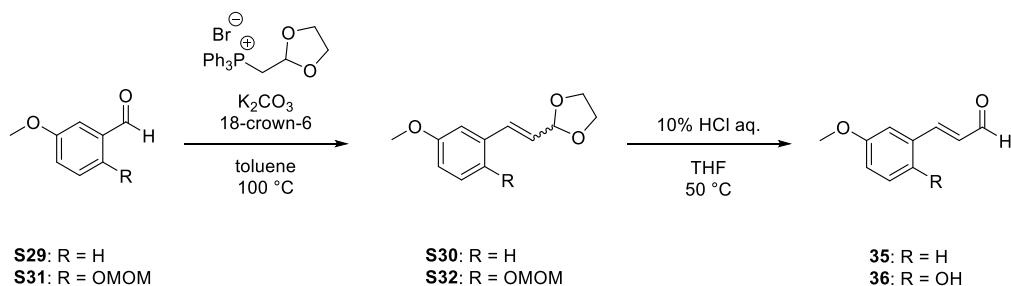
Scheme 1-S5. Preparation of natural analogs **27** and **28**.



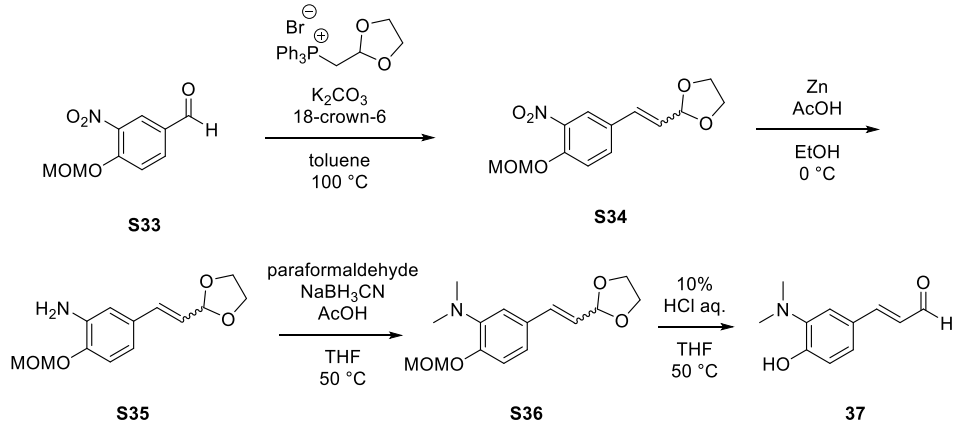
Scheme 1-S6. Preparation of synthetic analog **31**.



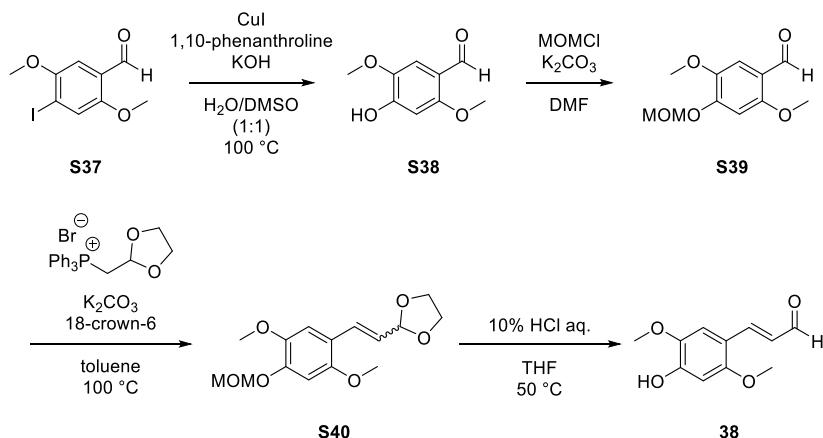
Scheme 1-S7. Preparation of synthetic analog **32**.



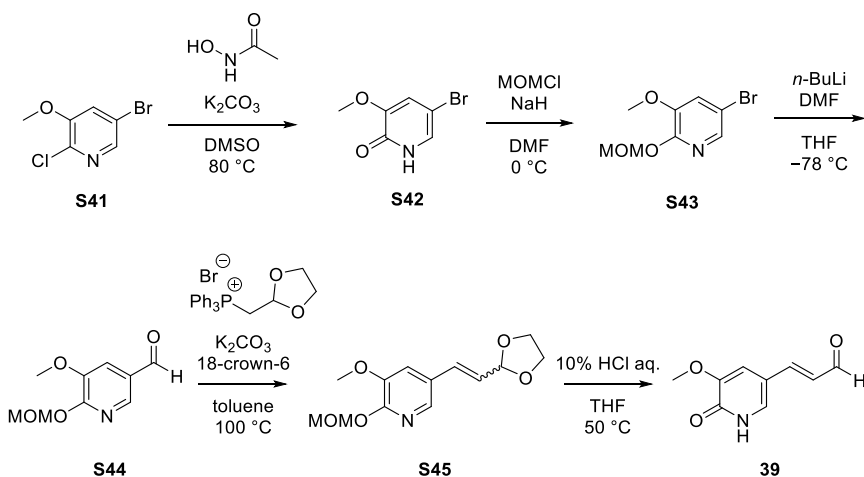
Scheme 1-S8. Preparation of synthetic analogs **35** and **36**.



Scheme 1-S9. Preparation of synthetic analog **37**.



Scheme 1-S10. Preparation of synthetic analog **38**.



Scheme 1-S11. Preparation of synthetic analog **39**.

(*E*)-3-(4-Hydroxyphenyl)acrylaldehyde (**16**).

The mixture of **S1** (169 mg, 1.02 mmol), (1,3-dioxolan-2-yl)methyltriphenylphosphonium bromide 651 mg, 1.52 mmol), K₂CO₃ (208 mg, 1.50 mmol) and 18-crown-6 (6.38 mg, 0.0241 mmol) in toluene (10.0 mL) was stirred at 100 °C. After being stirred for 21 h at this temperature under Ar, the mixture was diluted with EtOAc. The whole was washed with H₂O and brine, and dried over MgSO₄. After concentration *in vacuo*, the residue was purified by flash chromatography over NH₂ silica gel with *n*-hexane–EtOAc (5:1) to give a crude **S2** (193 mg), which was used without further purification. Then, to a stirred solution of **S2** (118 mg) in THF (14.3 mL) was added aqueous solution of HCl (10%; 7.14 mL). After being stirred for 2 h at 50 °C, the mixture was diluted with saturated aqueous solution of NaHCO₃. The whole was extracted with EtOAc, washed with H₂O and brine, and dried over MgSO₄. After concentration *in vacuo*, the residue was purified by flash chromatography over silica gel with a gradient of 6% to 40% EtOAc in *n*-hexane to afford **16** (57.2 mg, 62%, 2 steps): pale yellow solid; mp 144–145 °C; IR (neat cm⁻¹): 1642 (C=O); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 5.69 (s, 1H), 6.62 (dd, *J* = 15.5, 8.0 Hz, 1H), 6.89–6.92 (m, 2H), 7.44 (d, *J* = 15.5 Hz, 1H), 7.47–7.51 (m, 2H), 9.65 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H); ¹³C{¹H} NMR (150 MHz, CDCl₃) δ 116.1 (2C), 126.4, 127.0, 130.7 (2C), 153.1, 158.7, 194.1; HRMS (ESI-

TOF) m/z : $[M - H]^-$ calcd for $C_9H_7O_2$, 147.0452; found, 147.0453. The purity of **10** was >99% as determined by HPLC.

(*E*)-3-(2-Hydroxyphenyl)acrylaldehyde (**17**)

By a procedure identical with that described for synthesis of **S2** from **S1**, the benzaldehyde **S3** (82.9 mg, 0.499 mmol) was converted into a crude **S4** (58.7 mg), which was used without further purification. Then, by a procedure similar to that described for synthesis of **16** from **S2**, the crude acetal **S4** (46.8 mg) was converted into the aldehyde **17** (16.1 mg, 27% yield, 2 steps). Column chromatography: silica gel (gradient 6% to 30% EtOAc in *n*-hexane): pale yellow solid; mp 131–133 °C; IR (neat cm^{-1}): 3212 (OH), 1658 (C=O); 1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 5.74 (s, 1H), 6.84–6.86 (m, 1H), 6.92 (dd, J = 16.0, 8.0 Hz, 1H), 6.98–7.01 (m, 1H), 7.30–7.33 (m, 1H), 7.53 (dd, J = 7.7, 1.4 Hz, 1H), 7.80 (d, J = 16.0 Hz, 1H), 9.70 (d, J = 8.0 Hz, 1H); $^{13}C\{^1H\}$ NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ 116.5, 121.0, 121.3, 129.2, 130.2, 132.7, 149.9, 155.7, 195.9; HRMS (ESI-TOF) m/z : $[M + H]^+$ calcd for $C_9H_9O_2$, 149.0597; found, 149.0597. The purity of **17** was 98% as determined by HPLC.

(*E*)-3-(4-Methoxyphenyl)acrylaldehyde (**18**)

By a procedure identical with that described for synthesis of **S2** from **S1**, the benzaldehyde **S5** (136 mg, 1.00 mmol) was converted into a crude **S6** (89.2 mg), which was used without further purification. Then, by a procedure similar to that described for synthesis of **16** from **S2**, the crude acetal **S6** (59.8 mg) was converted into the aldehyde **18** (37.6 mg, 35% yield, 2 steps). Column chromatography: silica gel (gradient 4% to 25% EtOAc in *n*-hexane): white solid; mp 54–56 °C; IR (neat cm^{-1}): 1672 (C=O); 1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 3.87 (s, 3H), 6.62 (dd, J = 15.8, 7.7 Hz, 1H), 6.94–6.97 (m, 2H), 7.43 (d, J = 15.8 Hz, 1H), 7.52–7.55 (m, 2H), 9.66 (d, J = 7.7 Hz, 1H); $^{13}C\{^1H\}$ NMR (150 MHz, $CDCl_3$): δ 55.4, 114.5 (2C), 126.5, 126.7, 130.4 (2C), 152.8, 162.2, 193.8; HRMS (ESI-TOF) m/z : $[M + H]^+$ calcd for $C_{10}H_{11}O_2$, 163.0754; found, 163.0755. The purity of **18** was 96% as determined by HPLC.

(*E*)-3-(2-Methoxyphenyl)acrylaldehyde (**19**)

By a procedure identical with that described for synthesis of **S2** from **S1**, the benzaldehyde **S7** (137 mg, 1.01 mmol) was converted into a crude **S8** (227 mg), which was used without further purification. Then, by a procedure similar to that described for synthesis of **16** from **S2**, the crude acetal **S8** (42.3 mg) was converted into the aldehyde **19** (65.5 mg, 89% yield, 2 steps). Column chromatography: silica gel (gradient 6% to 26% EtOAc in *n*-hexane): colorless oil; IR (neat cm^{-1}): 1671 (C=O); 1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 3.92 (s, 3H), 6.80 (dd, J = 16.0, 8.0 Hz, 1H), 6.95–6.96 (m, 1H), 6.99–7.05 (m, 1H), 7.40–7.44 (m, 1H), 7.56 (dd, J = 7.4, 1.7 Hz, 1H), 7.85 (d, J = 16.0 Hz, 1H), 9.70 (d, J = 8.0 Hz, 1H); $^{13}C\{^1H\}$ NMR (150 MHz, $CDCl_3$): δ 55.5, 111.2, 120.8, 122.9, 128.8, 129.1, 132.7, 148.3, 158.2, 194.6; HRMS (ESI-TOF) m/z : $[M + H]^+$ calcd for $C_{10}H_{11}O_2$, 163.0754; found, 163.0752. The purity of **19** was 99% as determined by HPLC.

(*E*)-3-(*p*-Tolyl)acrylaldehyde (**20**)

By a procedure identical with that described for synthesis of **S2** from **S1**, the benzaldehyde **S9** (60.1 mg, 0.500

mmol) was converted into a crude **S10** (58.1 mg), which was used without further purification. Then, by a procedure similar to that described for synthesis of **16** from **S2**, the crude acetal **S10** (58.1 mg) was converted into the aldehyde **20** (35.0 mg, 39% yield, 2 steps). Column chromatography: silica gel (gradient 4% to 17% EtOAc in *n*-hexane): white amorphous; IR (neat cm^{-1}): 1682 (C=O); ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 2.40 (s, 3H), 6.69 (dd, J = 16.0, 7.8 Hz, 1H), 7.24 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 7.44–7.51 (m, 3H), 9.69 (d, J = 7.8 Hz, 1H); $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (150 MHz, CDCl_3): δ 21.5, 127.6, 128.4 (2C), 129.8 (2C), 131.2, 141.9, 153.0, 193.8; HRMS (ESI-TOF) m/z : $[\text{M} + \text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{O}$, 147.0804; found, 147.0798. The purity of **20** was 98% as determined by HPLC.

(*E*)-3-(4-Hydroxy-2-methoxyphenyl)acrylaldehyde (**22**)

By a procedure identical with that described for synthesis of **S2** from **S1**, the benzaldehyde **S11** (98.1 mg, 0.500 mmol) was converted into a crude **S12** (32.8 mg), which was used without further purification. Then, by a procedure similar to that described for synthesis of **16** from **S2**, the crude acetal **S12** (25.3 mg) was converted into the aldehyde **22** (15.0 mg, 22% yield, 2 steps). Column chromatography: silica gel (gradient 12% to 55% EtOAc in *n*-hexane): pale yellow solid; mp 143–144 °C; IR (neat cm^{-1}): 1658 (C=O); ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 3.89 (s, 3H), 5.34 (s, 1H), 6.45–6.48 (m, 2H), 6.70 (dd, J = 15.8, 8.0 Hz, 1H), 7.45 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.74 (d, J = 15.8 Hz, 1H), 9.63 (d, J = 8.0 Hz, 1H); $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (150 MHz, CDCl_3) δ 55.6, 99.1, 108.2, 116.0, 126.5, 130.8, 149.2, 160.3, 160.4, 195.1; HRMS (ESI-TOF) m/z : $[\text{M} + \text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{O}_3$, 179.0703; found, 179.0703. The purity of **22** was >99% as determined by HPLC.

(*E*)-3-(3,4-Dihydroxyphenyl)acrylaldehyde (**23**)

By a procedure identical with that described for synthesis of **S2** from **S1**, the benzaldehyde **S13** (228 mg, 1.01 mmol) was converted into a crude **S14** (151 mg), which was used without further purification. Then, by a procedure similar to that described for synthesis of **16** from **S2**, the crude acetal **S14** (151 mg) was converted into the aldehyde **23** (33.4 mg, 20% yield, 2 steps). Column chromatography: silica gel (gradient 12% to 80% EtOAc in *n*-hexane): white solid; mp 198–200 °C; IR (neat cm^{-1}): 1685 (C=O); ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 6.53 (dd, J = 16.0, 8.0 Hz, 1H), 6.81 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 7.06–7.10 (m, 2H), 7.55 (d, J = 16.0 Hz, 1H), 9.56 (d, J = 8.0 Hz, 1H); $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (150 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 115.3, 115.9, 122.1, 125.3, 125.6, 145.7, 149.3, 154.3, 194.0; HRMS (ESI-TOF) m/z : $[\text{M} - \text{H}]^-$ calcd for $\text{C}_9\text{H}_7\text{O}_3$, 163.0401; found, 163.0401. The purity of **23** was 99% as determined by HPLC.

4-Methoxy-3-(methoxymethoxy)benzaldehyde (**S16**)

To a solution of **S15** (763 mg, 5.01 mmol) and K_2CO_3 (2.81 g, 20.3 mmol) in DMF (2.94 mL) was added MOMCl (570 μL , 7.50 mmol). After being stirred for 5.5 h at room temperature under Ar, the mixture was diluted with H_2O . The whole was extracted with Et_2O , washed with H_2O and brine, and dried over MgSO_4 . After concentration *in vacuo*, the residue was purified by flash chromatography over silica gel with a gradient of 6% to 40% EtOAc in *n*-hexane to give **S16** (887 mg, 90% yield): white amorphous; IR (neat cm^{-1}): 1687 (C=O); ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 3.53 (s, 3H), 3.98 (s, 3H), 5.29 (s, 2H), 7.02 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.55 (dd, J =

8.0, 1.7 Hz, 1H), 7.67 (d, J = 1.7 Hz, 1H), 9.86 (s, 1H); $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (150 MHz, CDCl_3) δ 56.2, 56.4, 95.3, 111.0, 115.2, 126.8, 130.1, 146.9, 155.0, 190.8; HRMS (ESI-TOF) m/z : $[\text{M} + \text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{O}_4$, 197.0808; found, 197.0812.

(*E*)-3-(3-Hydroxy-4-methoxyphenyl)acrylaldehyde (24)

By a procedure identical with that described for synthesis of **S2** from **S1**, the benzaldehyde **S16** (201 mg, 1.02 mmol) was converted into a crude **S17** (90.0 mg), which was used without further purification. Then, by a procedure similar to that described for synthesis of **16** from **S2**, the crude acetal **S17** (41.8 mg) was converted into the aldehyde **24** (13.4 mg, 16% yield, 2 steps). Column chromatography: silica gel (gradient 6% to 40% EtOAc in *n*-hexane): yellow solid; mp 149–150 °C; IR (neat cm^{-1}): 1660 (C=O); ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ 3.96 (s, 3H), 5.67 (s, 1H), 6.59 (dd, J = 16.0, 7.4 Hz, 1H), 6.89 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 7.10 (dd, J = 8.6, 2.3 Hz, 1H), 7.17 (d, J = 2.3 Hz, 1H), 7.38 (d, J = 16.0 Hz, 1H), 9.66 (d, J = 7.4 Hz, 1H); $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ 56.1, 110.6, 113.4, 122.5, 127.0, 127.7, 146.0, 149.3, 153.0, 193.8; HRMS (ESI-TOF) m/z : $[\text{M} + \text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{O}_3$, 179.0703; found, 179.0708. The purity of **24** was >99% as determined by HPLC.

4-(Methoxymethoxy)-3-(3-methylbut-2-en-1-yl)benzaldehyde (S19)

By a procedure identical with that described for synthesis of **S16** from **S15**, the phenol **S18** (146 mg, 0.767 mmol) was converted into **S19** (120 mg, 67% yield). Column chromatography: silica gel (gradient 4% to 18% EtOAc in *n*-hexane): colorless oil; IR (neat cm^{-1}): 1689 (C=O); ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ 1.73 (s, 3H), 1.76 (s, 3H), 3.38 (d, J = 7.4 Hz, 2H), 3.49 (s, 3H), 5.26–5.32 (m, 3H), 7.17 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.68–7.71 (m, 2H), 9.87 (s, 1H); $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (125 MHz, CDCl_3): δ 17.8, 25.8, 28.5, 56.3, 94.0, 113.2, 121.4, 130.2, 130.4, 130.6, 131.6, 133.4, 160.0, 191.3; HRMS (ESI-TOF) m/z : $[\text{M} + \text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{O}_3$, 235.1329; found, 235.1330.

(*E*)-3-[4-Hydroxy-3-(3-methylbut-2-en-1-yl)phenyl]acrylaldehyde (25)

By a procedure identical with that described for synthesis of **S2** from **S1**, the benzaldehyde **S19** (118 mg, 0.504 mmol) was converted into a crude **S20** (52.0 mg), which was used without further purification. Then, by a procedure similar to that described for synthesis of **16** from **S2**, the crude acetal **S20** (52.0 mg) was converted into the aldehyde **25** (26.7 mg, 24% yield, 2 steps). Column chromatography: silica gel (gradient 6% to 35% EtOAc in *n*-hexane): pale yellow solid; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 1.793–1.804 (m, 6H), 3.39 (d, J = 6.9 Hz, 2H), 5.30–5.33 (m, 1H), 5.53 (s, 1H), 6.60 (dd, J = 16.0, 8.0 Hz, 1H), 6.85 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.34–7.37 (m, 2H), 7.40 (d, J = 16.0 Hz, 1H), 9.64 (d, J = 8.0 Hz, 1H); $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (150 MHz, CDCl_3): δ 17.9, 25.8, 29.2, 116.3, 120.9, 125.9, 126.6, 128.0, 128.6, 130.6, 135.4, 154.0, 157.7, 194.3; HRMS (ESI-TOF) m/z : $[\text{M} + \text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{17}\text{O}_2$, 217.1223; found, 217.1227. The purity of **25** was 96% as determined by HPLC.

(*E*)-3-(4-Hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl)acrylaldehyde (26)

By a procedure identical with that described for synthesis of **S2** from **S1**, the benzaldehyde **S21** (223 mg, 0.986 mmol) was converted into a crude **S22** (306 mg), which was used without further purification. Then, by a

procedure similar to that described for synthesis of **16** from **S2**, the crude acetal **S22** (148 mg) was converted into the aldehyde **26** (104 mg, quant, 2 steps). Column chromatography: silica gel (gradient 12% to 75% EtOAc in *n*-hexane): yellow oil; IR (neat cm^{-1}): 3357 (OH), 1669 (C=O); ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ 3.95 (s, 6H), 5.89 (s, 1H), 6.61 (dd, $J = 15.8, 7.8$ Hz, 1H), 6.82 (s, 2H), 7.39 (d, $J = 15.8$ Hz, 1H), 9.66 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H); $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (150 MHz, CDCl_3): δ 56.3 (2C), 105.5 (2C), 125.5, 126.7, 138.0, 147.3 (2C), 153.2, 193.5; HRMS (ESI-TOF) m/z : $[\text{M} - \text{H}]^-$ calcd for $\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{O}_4$, 207.0663; found, 207.0667. The purity of **26** was >99% as determined by HPLC.

(E)-3-(7-Methoxybenzo[d][1,3]dioxol-5-yl)acrylaldehyde (27).

By a procedure identical with that described for synthesis of **S2** from **S1**, the benzaldehyde **S23** (85.2 mg, 0.473 mmol) was converted into a crude **S24** (101 mg), which was used without further purification. Then, to a stirred solution of **S24** (25.3 mg) in THF (0.180 mL) was added aqueous solution of HCl (1 M; 0.300 mL). After being stirred for 1.5 h at room temperature, the mixture was diluted with saturated aqueous solution of NaHCO_3 . The whole was extracted with EtOAc, washed with H_2O and brine, dried over MgSO_4 , and filtered. The filtrate was concentrated *in vacuo* to give **27** (20.8 mg, 86% yield, 2 steps): pale yellow solid; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 3.95 (s, 3H), 6.06 (s, 2H), 6.57 (dd, $J = 15.5, 7.7$ Hz, 1H), 6.75 (d, $J = 1.7$ Hz, 1H), 6.79 (d, $J = 1.7$ Hz, 1H), 7.35 (d, $J = 15.5$ Hz, 1H), 9.66 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H); $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (150 MHz, CDCl_3) δ 56.7, 101.8, 102.2, 109.6, 127.3, 128.8, 138.2, 143.8, 149.5, 152.6, 193.5; HRMS (ESI-TOF) m/z : $[\text{M} + \text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{O}_4$, 207.0652; found, 207.0655. The purity of **27** was >99% as determined by HPLC.

(E)-3-(4,7-Dimethoxybenzo[d][1,3]dioxol-5-yl)acrylaldehyde (28).

By a procedure identical with that described for synthesis of **S2** from **S1**, the benzaldehyde **S25** (106 mg, 0.504 mmol) was converted into a crude **S26** (79.8 mg), which was used without further purification. Then, by a procedure similar to that described for synthesis of **27** from **S24**, the crude acetal **S26** (57.1 mg) was converted into the aldehyde **28** (29.5 mg, 34% yield, 2 steps). Column chromatography: silica gel (gradient 6% to 25% EtOAc in *n*-hexane): white solid; mp 142–143 $^\circ\text{C}$; IR (neat cm^{-1}): 1682 (C=O); ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 3.89 (s, 3H), 4.01 (s, 3H), 6.06 (s, 2H), 6.65 (dd, $J = 16.0, 7.7$ Hz, 1H), 6.75 (s, 1H), 7.72 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H), 9.66 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H); $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (150 MHz, CDCl_3) δ 56.7, 60.3, 102.4, 106.5, 119.9, 127.6, 138.1, 138.5, 139.5, 140.1, 147.5, 194.2; HRMS (ESI-TOF) m/z : $[\text{M} + \text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{O}_5$, 237.0757; found, 237.0753. The purity of **22** was >99% as determined by HPLC.

(2E,4E)-5-(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)penta-2,4-dienal (31)

By a procedure identical with that described for synthesis of **S2** from **S1**, the benzaldehyde **S27** (292 mg, 1.00 mmol) was converted into a crude **S28** (225 mg), which was used without further purification. Then, by a procedure similar to that described for synthesis of **16** from **S2**, the crude acetal **S28** (109 mg) was converted into the aldehyde **31** (70.6 mg, 71% yield, 2 steps). Column chromatography: silica gel (gradient 6% to 40% EtOAc in *n*-hexane): yellow oil; IR (neat cm^{-1}): 3357 (OH), 1671 (C=O); ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 3.95 (s, 3H), 5.96 (s, 1H), 6.24 (dd, $J = 15.2, 8.0$ Hz, 1H), 6.86 (dd, $J = 15.2, 11.2$ Hz, 1H), 6.91–6.97 (m, 2H), 7.02–

7.05 (m, 2H), 7.23–7.28 (m, 1H), 9.59 (d, J = 8.0 Hz, 1H); $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (150 MHz, CDCl_3) δ 56.0, 108.6, 114.8, 122.6, 124.0, 128.3, 130.6, 142.7, 146.8, 147.5, 152.7, 193.7; HRMS (ESI-TOF) m/z : $[\text{M} + \text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{O}_3$, 205.0859; found, 205.0856. The purity of **31** was 99% as determined by HPLC.

(E)-4-(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)but-3-en-2-one (32)

The solution of **30** (157 mg, 1.03 mmol) and (acetylmethylene)triphenylphosphorane (770 mg, 2.42 mmol) in toluene (2.00 mL) was refluxed for 1 h under Ar. After concentration *in vacuo*, the residue was purified by flash chromatography over silica gel with a gradient of 10% to 95% EtOAc in *n*-hexane to afford **32** (192 mg, 62% yield): white solid; mp 127–128 °C; IR (neat cm^{-1}): 3340 (OH), 1664 (C=O); ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 2.37 (s, 3H), 3.93 (s, 3H), 6.15 (s, 1H), 6.59 (d, J = 16.0 Hz, 1H), 6.93 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.06 (d, J = 2.3 Hz, 1H), 7.09 (dd, J = 8.0, 2.0 Hz, 1H), 7.45 (d, J = 16.0 Hz, 1H); $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (150 MHz, CDCl_3): δ 27.1, 55.8, 109.3, 114.8, 123.4, 124.7, 126.6, 144.0, 146.9, 149.3, 198.7; HRMS (ESI-TOF) m/z : $[\text{M} - \text{H}]^-$ calcd for $\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{O}_3$, 191.0714; found, 191.0716. The purity of **32** was >99% as determined by HPLC.

(E)-3-(3-Methoxyphenyl)acrylaldehyde (35)

By a procedure identical with that described for synthesis of **S2** from **S1**, the benzaldehyde **S29** (136 mg, 1.00 mmol) was converted into a crude **S30** (230 mg), which was used without further purification. Then, by a procedure similar to that described for synthesis of **16** from **S2**, the crude acetal **S30** (49.0 mg) was converted into the aldehyde **35** (34.9 mg, quant, 2 steps). Column chromatography: silica gel (gradient 6% to 35% EtOAc in *n*-hexane): colorless oil; IR (neat cm^{-1}): 3357 (OH), 1676 (C=O); ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 3.85 (s, 3H), 6.71 (dd, J = 16.0, 8.0 Hz, 1H), 6.99–7.01 (m, 1H), 7.08–7.09 (m, 1H), 7.16–7.18 (m, 1H), 7.36 (dd, J = 8.0 Hz, 1H), 7.46 (d, J = 16.0 Hz, 1H), 9.71 (d, J = 8.0 Hz, 1H); $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (150 MHz, CDCl_3) δ 55.3, 113.2, 117.1, 121.2, 128.8, 130.1, 135.3, 152.7, 159.9, 193.7; HRMS (ESI-TOF) m/z : $[\text{M} + \text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{NaO}_2$, 185.0573; found, 185.0576. The purity of **35** was >99% as determined by HPLC.

(E)-3-(2-Hydroxy-5-methoxyphenyl)acrylaldehyde (36)

By a procedure identical with that described for synthesis of **S2** from **S1**, the benzaldehyde **S31** (189 mg, 0.963 mmol) was converted into a crude **S32** (205 mg), which was used without further purification. Then, by a procedure similar to that described for synthesis of **16** from **S2**, the crude acetal **S32** (81.4 mg) was converted into the aldehyde **36** (32.9 mg, 48% yield, 2 steps). Column chromatography: silica gel (gradient 12% to 35% EtOAc in *n*-hexane): yellow solid; mp 124–125 °C; IR (neat cm^{-1}): 3281 (OH), 1657 (C=O); ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ 3.80 (s, 3H), 5.46 (s, 1H), 6.79 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 6.85 (dd, J = 16.0, 8.0 Hz, 1H), 6.90 (dd, J = 8.6, 2.9 Hz, 1H), 7.02 (d, J = 2.9 Hz, 1H), 7.80 (d, J = 16.0 Hz, 1H), 9.70 (d, J = 8.0 Hz, 1H); $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (125 MHz, CDCl_3): δ 55.8, 112.8, 117.4, 119.4, 121.6, 129.0, 149.0, 149.7, 153.6, 195.3; HRMS (ESI-TOF) m/z : $[\text{M} + \text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{O}_3$, 179.0703; found, 179.0700. The purity of **36** was 99% as determined by HPLC.

2-[4-(Methoxymethoxy)-3-nitrostyryl]-1,3-dioxolane (S34)

By a procedure identical with that described for synthesis of **S2** from **S1**, the benzaldehyde **S33** (1.68 g, 7.96 mmol) was converted into **S34** (2.31 g, quant) as an isomeric mixture (*E:Z* = 55:45). Column chromatography: amine silica gel (*n*-hexane:EtOAc = 3:1), followed by silica gel (*n*-hexane:EtOAc = 3:1): pale yellow amorphous; IR (neat cm^{-1}): 1532, 1358 (NO_2); ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 3.52–3.53 (m, 3H), 3.92–3.98 (m, 2H), 4.05–4.10 (m, 2H), 5.29–5.31 (m, 2H), 5.42–5.47 (m, 1H), 5.79 (dd, *J* = 11.7, 7.2 Hz, 0.45H), 6.14 (dd, *J* = 16.0, 5.7 Hz, 0.55H), 6.70–6.73 (m, 1H), 7.28–7.31 (m, 1H), 7.53–7.56 (m, 1H), 7.85–7.87 (m, 1H); $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (150 MHz, CDCl_3): δ 56.8 (2C), 65.2 (2C), 65.3 (2C), 95.19, 95.24, 99.3, 103.3, 116.9, 117.3, 123.6, 125.6, 126.5, 129.2, 129.5, 129.9, 131.86, 131.90, 132.7, 134.3, 140.5, 140.6, 149.7, 150.1; HRMS (ESI-TOF) *m/z*: $[\text{M} + \text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{NO}_6$, 282.0972; found, 282.0977.

(*E*)-3-[3-(Dimethylamino)-4-hydroxyphenyl]acrylaldehyde (**37**)

To a stirred solution of **S34** (434 mg, 1.54 mmol) in EtOH (59.1 mL) were added AcOH (5.91 mL) and zinc dust (1.03 g, 15.7 mmol) successively at 0 °C. After being stirred for 1 h at 0 °C under Ar, the mixture was filtered through cerite and washed with EtOAc. The filtrate was diluted with aqueous solution of 2 M NaOH. The whole was extracted with EtOAc, washed with saturated aqueous solution of NaHCO_3 , and dried over MgSO_4 . After concentration *in vacuo*, the residue was purified by flash chromatography over silica gel with a gradient of 12% to 65% EtOAc in *n*-hexane to give a crude **S35** as a yellow oil (211 mg), which was used without further purification. Then, to a stirred solution of **S35** (49.5 mg), paraformaldehyde (32.3 mg, 1.08 mmol) and NaBH_3CN (67.9 mg, 1.08 mmol) in THF (813 μL) was slowly added AcOH (61.8 μL). After being stirred for 4 h at 50 °C under Ar, the mixture was neutralized with aqueous solution of NaHCO_3 , diluted with Et_2O , washed with saturated aqueous solution of NaHCO_3 and dried over MgSO_4 . After concentration *in vacuo*, the residue was purified by flash chromatography over silica gel with a gradient of 6% to 40% EtOAc in *n*-hexane to afford **S36** as a colorless oil (14.4 mg), which was used without further purification. Then, by a procedure similar to that described for synthesis of **16** from **S2**, the crude acetal **S36** (14.4 mg) was converted into the aldehyde **37** (8.40 mg, 12% yield, 3 steps). Column chromatography: silica gel (gradient 12% to 50% EtOAc in *n*-hexane): yellow oil; IR (neat cm^{-1}): 3299 (OH), 1666 (C=O); ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 2.69 (s, 6H), 6.60 (dd, *J* = 16.0, 8.0 Hz, 1H), 6.99 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 7.31 (dd, *J* = 8.6, 2.0 Hz, 1H), 7.38–7.41 (m, 2H), 9.65 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H); $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 45.1 (2C), 114.7, 121.0, 126.2, 126.4, 127.7, 141.3, 153.1, 154.6, 193.7; HRMS (ESI-TOF) *m/z*: $[\text{M} + \text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{NO}_2$, 192.1019; found, 192.1017. The purity of **37** was 99% as determined by HPLC.

2,5-Dimethoxy-4-(methoxymethoxy)benzaldehyde (**S39**)

The solution of **S37** (818 mg, 2.80 mmol), CuI (56.1 mg, 0.295 mmol), 1,10-phenanthroline (101 mg, 0.560 mmol) and KOH (616 mg, 9.33 mmol) in $\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}$ (1:1; 4.48 mL) was purged with Ar. After being stirred for 10 min at room temperature, the reaction mixture was stirred for 11 h at 100 °C. Then, the mixture was acidified with aqueous solution of 1 M HCl, diluted with EtOAc, filtered through Kiriya funnel and washed with EtOAc. The filtrate was washed with H_2O and brine, and dried over MgSO_4 . After concentration *in vacuo*, the residue was purified by flash chromatography over silica gel with a gradient of 6% to 40% EtOAc in *n*-

hexane to give **S38** (89.6 mg). Then, by a procedure identical with that described for synthesis of **S16** from **S15**, the phenol **S38** (76.1 mg, 0.418 mmol) was converted into **S39** (47.1 mg, 45% yield, 2 steps). Column chromatography: silica gel (gradient 5% to 35% EtOAc in *n*-hexane), followed by silica gel (*n*-hexane:EtOAc = 5:1): pale yellow solid; mp 72–73 °C; IR (neat cm⁻¹): 1672 (C=O); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 3.54 (s, 3H), 3.89 (s, 3H), 3.90 (s, 3H), 5.33 (s, 2H), 6.85 (s, 1H), 7.36 (s, 1H), 10.34 (s, 1H); ¹³C{¹H} NMR (150 MHz, CDCl₃) δ 56.2, 56.3, 56.6, 95.2, 99.8, 109.5, 118.4, 143.9, 153.4, 158.2, 188.3; HRMS (ESI-TOF) *m/z*: [M + H]⁺ calcd for C₁₁H₁₅O₅, 227.0914; found, 227.0912.

(*E*)-3-(4-Hydroxy-2,5-dimethoxyphenyl)acrylaldehyde (**38**)

By a procedure identical with that described for synthesis of **S2** from **S1**, the benzaldehyde **S39** (33.4 mg, 0.148 mmol) was converted into a crude **S40** (42.3 mg), which was used without further purification. Then, by a procedure similar to that described for synthesis of **16** from **S2**, the crude acetal **S40** (42.3 mg) was converted into the aldehyde **38** (33.6 mg, quant, 2 steps). Column chromatography: silica gel (gradient 12% to 45% EtOAc in *n*-hexane): yellow solid; mp 115–116 °C; IR (neat cm⁻¹): 3299 (OH), 1663 (C=O); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 3.86 (s, 3H), 3.90 (s, 3H), 6.03 (s, 1H), 6.59 (s, 1H), 6.63 (dd, *J* = 15.5, 7.7 Hz, 1H), 7.02 (s, 1H), 7.81 (d, *J* = 15.5 Hz, 1H), 9.64 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H); ¹³C{¹H} NMR (150 MHz, CDCl₃) δ 56.1, 56.4, 99.3, 109.7, 114.3, 126.2, 140.9, 148.1, 150.3, 154.5, 194.4; HRMS (ESI-TOF) *m/z*: [M + H]⁺ calcd for C₁₁H₁₃O₄, 209.0808; found, 209.0806. The purity of **38** was >99% as determined by HPLC.

5-Bromo-3-methoxy-2-(methoxymethoxy)pyridine (**S43**)

The mixture of **S41** (512 mg, 2.30 mmol), acetohydroxamic acid (540 mg, 7.19 mmol) and K₂CO₃ (1.61 g, 11.6 mmol) in DMSO was stirred at 80 °C under Ar. After being stirred for 15.5 h at this temperature under Ar, the mixture was neutralized with aqueous solution of HCl (2 M), diluted with EtOAc, washed with H₂O and brine, and dried over MgSO₄. After concentration *in vacuo*, the residue was purified by flash chromatography over silica gel with CHCl₃–MeOH (15:1) to afford **S42** (248 mg), which was used without further purification. To a stirred solution of **S42** (205 mg) in DMF (10.0 mL) were added NaH (160 mg, 4.00 mmol) and MOMCl (304 μL, 4.00 mmol) successively. After being stirred for 4 h at 0 °C under Ar, the mixture was diluted with saturated aqueous solution of NH₄Cl. The whole was extracted with EtOAc, washed with H₂O and brine, and dried over MgSO₄. After concentration *in vacuo*, the residue was purified by flash chromatography over silica gel with a gradient of 10% to 75% EtOAc in *n*-hexane to give **S43** (91.8 mg, 19% yield, 2 steps): white solid; mp 56–57 °C; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 3.54 (s, 3H), 3.89 (s, 3H), 5.57 (s, 2H), 7.20 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H), 7.80 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H); ¹³C{¹H} NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 56.0, 57.3, 92.1, 112.0, 121.1, 137.5, 144.6, 151.8; HRMS (ESI-TOF) *m/z*: [M + H]⁺ calcd for C₈H₁₁BrNO₃, 247.9917; found, 247.9917.

5-Methoxy-6-(methoxymethoxy)nicotinaldehyde (**S44**)

To a stirred solution of **S43** (205 mg, 0.826 mmol) in THF (2.37 mL) at –78 °C was added *n*-BuLi (1.32 M; 657 μL, 0.867 mmol). After the mixture was stirred for 1 h at –78 °C, DMF (128 μL, 1.65 mmol) was added and the stirring was continued for 1.5 h at –78 °C. The mixture was quenched with saturated aqueous solution of

NaHCO₃. The whole was extracted with EtOAc, washed with H₂O and brine, and dried over MgSO₄. After concentration *in vacuo*, the residue was purified by flash chromatography over silica gel with a gradient of 6% to 40% EtOAc in *n*-hexane to give **S44** (126 mg, 77% yield). Column chromatography: silica gel (gradient 6% to 40% EtOAc in *n*-hexane): white amorphous; IR (neat cm⁻¹): 1690 (C=O); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 3.59 (s, 3H), 3.95 (s, 3H), 5.69 (s, 2H), 7.54 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H), 8.22 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H), 9.95 (s, 1H); ¹³C{¹H} NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 56.0, 57.7, 92.8, 113.7, 128.0, 144.2, 144.9, 157.0, 189.6; HRMS (ESI-TOF) *m/z*: [M + H]⁺ calcd for C₉H₁₂NO₄, 198.0761; found, 198.0763.

(E)-3-(5-Methoxy-6-oxo-1,6-dihydropyridin-3-yl)acrylaldehyde (39)

By a procedure identical with that described for synthesis of **S2** from **S1**, the benzaldehyde **S44** (116 mg, 0.588 mmol) was converted into a crude **S45** (130 mg), which was used without further purification. Then, by a procedure similar to that described for synthesis of **16** from **S2**, the crude acetal **S45** (51.4 mg) was converted into the aldehyde **39** (23.2 mg, 56% yield, 2 steps): white solid; mp 294–295 °C; IR (neat cm⁻¹): 1739 (C=O); ¹H NMR (600 MHz, DMSO) δ 3.77 (s, 3H), 6.70 (dd, *J* = 15.5, 7.5 Hz, 1H), 7.20 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H), 7.51–7.53 (m, 1H), 9.54 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H); ¹³C{¹H} NMR (150 MHz, CD₃OD): δ 55.7, 109.8, 113.6, 125.2, 131.4, 149.5, 150.3, 157.4, 193.6; HRMS (ESI-TOF) *m/z*: [M + H]⁺ calcd for C₉H₉NO₃, 180.0655; found, 180.0652. The purity of **39** was 98% as determined by HPLC.

Materials

All tested compounds were dissolved in DMSO and kept as stock solution, which was then diluted with buffer for the biological assay. The 5-OP-RU in DMSO (10 mM) was freshly prepared by the incubation of a mixture of 5-A-RU in DMSO (20 mM) and methylglyoxal in DMSO (50 mM) for 18 h. Then, 5-OP-RU was added to the cells within 5 minutes of dilution with buffer. Acetyl-6-formylpterin (Ac-6-FP) was purchased from Cayman Chemical, Michigan, USA. LOPAC1280 used for screening was purchased from Sigma-Aldrich, which consisted of approximately 20% natural and 80% synthetic compounds. The range of molecular weight and ClogP is approximately 70–900 and –4–11, respectively.

Cell lines and cell culture

Human MR1-overexpressing HeLa cell line was established by the retroviral gene transduction of human MR1 and human CD8α as described previously.³⁹ A MAIT cell line was generated by the retroviral gene transduction of MAIT-αβTCRs into a murine thymoma TG40 (negative for TCR), as described previously.⁴⁰ HeLa cells and HEK293 cells were cultured in DMEM medium (Sigma-Aldrich) supplemented with 10% FBS (Sigma-Aldrich) and 1% penicillin/streptomycin (Wako Pure Chemical Industries). TG40 cells were cultured in RPMI-1640 medium (nacalai tesque) supplemented with 10% FBS and 1% penicillin/streptomycin. In the T cell activation assay, MR1 translocation assay and MR1 specificity assay, both cell lines were cultured in RPMI-1640 medium without folic acid, and with 10% FBS and 1% penicillin/streptomycin (assay medium). All cell lines were maintained at 37 °C in a humidified 5% CO₂ atmosphere.

HEK293 cells expressing HiBiT-tagged human MR1

cDNAs corresponding to human β_2m and human MR1, linked through a glycine-serine flexible linker, were cloned in frame with an N-terminal HiBiT tag and a His tag into the pCAG-Hyg PA tag (Wako Pure Chemical Industries). HEK293 cells were transfected by lipofection using ScreenFect A (Wako Pure Chemical Industries) and selected by blasticidin S. Sequence of the construct used for expression of HiBiT-tagged MR1 in HEK293 cell line is as follows.

MYRMQLLSIALSLALVTNSHHHHHHVSGWRLFKKISGGGGSIQRTPKIQVYSRHPAENGKSNFLNC
YVSGFHPSDIEVDLLKNGERIEKVEHSDLSFSKDWSFYLLYTEFTPTEKDEYACRVNHVTL SQPKIVK
WDRDMGGGGSGGGSGGGGSRTHSLRYFRLGVSDPIHGVPEFISVGYVDSHPITTYDSVTRQKEPRA
PWMAENLAPDHWERYTQLLRGWQQMFKVELKRLQRHYNHSGSHTYQRMIGCELLEDGSTTGFLQY
AYDGQDFLIFNKDTLSWLAVDNVAHTIKQAWEANQHELLYQKNWLEEECIAWLKRFLEYGKDTLQR
TEPPLVRVNRKETFPGV TALFCKAHGFYPPEIYMTWMKNGEEIVQEIDYGDILPSGDGTYQAWASIEL
DPQSSNLYSCHVEHCGVHMLVQVPQESETIPLVMKAVSGSIVLVIVLAGVGVLVWRRRPREQNGAIYL
PTPDRGVAMPGAEDDVV

Screening with Nano-Glo[®] HiBiT technology

HEK.HiBiT-hMR1 cells (3.0×10^4 cells) were incubated for 3 h in 20 μ L medium (DMEM without phenol red, and with 2% FBS and 1% penicillin/streptomycin) in 384-well plates. Then, each compound was added, followed by 8 h incubation at 37 °C. After plates were cooled to room temperature, LgBiT and a luminescent substrate (Promega) were added. After incubation for 10 min at room temperature, epiluminescence was measured using the EnVision plate reader (PerkinElmer).

T cell activation assay

HeLa.hMR1 cells (4.5×10^4 cells) were co-incubated with TG40.MAIT-TCR cells (1.8×10^5 cells) for 24 h in 200 μ L assay medium with various ligands at 37 °C. The cells were subsequently labeled with PE-conjugated anti-mouse CD3 (BioLegend), APC-conjugated anti-mouse CD69 (BioLegend) and propidium iodide (PI), followed by Gallios flow cytometry analysis (Beckman Coulter, California, USA). Data were analyzed with Kaluza software (Beckman Coulter, v2.1). The activation of TG40 cells was evaluated by an increase in the cell surface levels of CD69.

MR1 translocation assay

HeLa.hMR1 cells (1.5×10^5 cells) were incubated for 8 h in 200 μ L assay medium with various ligands at 37 °C. The cells were subsequently labeled with PE-conjugated anti-human MR1 (BioLegend) and PI, followed by Gallios flow cytometry analysis (Beckman Coulter). Data were analyzed with Kaluza software (Beckman Coulter, v2.1).

Competition assay

HeLa.hMR1 cells (4.5×10^4 cells) were incubated for 30 min in 100 μ L medium (RPMI-1640 without folic acid)

with various ligands (10 μ M) at 37 °C. Then, freshly prepared 5-OP-RU (0.1 nM) and TG40.MAIT-TCR cells (1.8×10^5 cells) were added. After 24 h incubation at 37 °C, the cells were labeled with PE-conjugated anti-mouse CD3 (BioLegend, California, USA), APC-conjugated anti-mouse CD69 (BioLegend) and propidium iodide (PI), followed by Gallios flow cytometry analysis (Beckman Coulter, California, USA). Data were analyzed with Kaluza software (Beckman Coulter, v2.1). The activation of TG40 cells was evaluated by an increase in the cell surface levels of CD69.

MR1 specificity assay

HeLa.hMR1 cells (1.5×10^5 cells) were incubated for 8 h in 200 μ L assay medium with various ligands at 37 °C. The cells were subsequently labeled with PE-conjugated anti-human MR1 (BioLegend), APC-conjugated anti-HLA-A/B/C antibody (Biolegend) and PI, followed by Gallios flow cytometry analysis (Beckman Coulter). Data were analyzed with Kaluza software (Beckman Coulter, v2.1).

MTS assay on HeLa.hMR1 cells and TG40.MAIT-TCR cells

HeLa.hMR1 cells (5.0×10^3 cells for 8 h incubation, 2.5×10^3 cells for 24 h incubation) or TG40.MAIT-TCR cells (2.5×10^3 cells) were incubated for 8 h or 24 h in 100 μ L assay medium with various ligands at 37 °C in 96-well plates. Then, the medium was exchanged with phenol red-free medium, and 20 μ L per well of CellTiter 96® AQueous One Solution Reagent (Promega) was added. After 4 h incubation at 37 °C, the absorbance was measured at 490 nm with a microplate reader.

Statistical analysis

The statistical analysis of the experiment was performed using Prism (Version 7.0, GraphPad Software Inc.).

Ligand binding mode prediction using molecular docking and MD simulation

Molecular docking of coniferyl aldehyde **11** towards hMR1 was performed using the genetic algorithm-docking software GOLD 2021.2.0. The standard default settings for the genetic algorithm were used. The initial structural data of the protein was obtained from the crystal structure of hMR1 complex with a known ligand, 6FP (PDBID: 4GUP), and the structures of disordered loops and flexible side chains were modeled using the structure preparation module in the MOE. The N- and C-termini of the protein model were capped with acetyl and N-methyl groups, respectively. The dominant protonation state at pH 7.0 was assigned for titratable residues. The ligand binding site in hMR1 was defined to include all atoms within 15 Å of the midpoint of Lys43 N ζ and Trp156 N ϵ 1 atoms, and coniferyl aldehyde **11** was docked into this site with positional restraint to place its formyl moiety at the position in the crystal structure of the hMR1-6FP complex. The top-ranked docking pose was extracted and used as the initial structure of following MD simulations of hMR1 in complex with coniferyl aldehyde **11**. The structures of analogs **22**, **23**, and **38** bound in hMR1 were modeled based on the docking pose of coniferyl aldehyde **11**. A 50 ns MD simulation was performed for each hMR1-ligand complex using the AMBER 18 package⁵⁸. Amber10:EHT force field was used for the protein. The system was solvated in a TIP3P⁵⁹ water box extending 10 Å beyond the protein, and the system was relaxed using the default relaxation protocol

implemented in MOE. Molecular dynamics simulations were performed in the NPT ensemble at 300K and 100 kPa using the default settings described in MOE, described briefly below. The temperature and pressure were controlled using a Langevin thermostat and a Monte Carlo barostat, respectively. Van der Waals and short range electrostatic interactions were cut off at 8 Å and smooth particle mesh Ewald (PME) method⁶⁰ was employed for calculation of long range electrostatic interactions. Interactions between each ligand and MR1 residues were analyzed using the PLIF analysis module implemented in MOE. Positions of water molecules in the binding pocket of MD-relaxed hMR1 in complex with coniferyl aldehyde were predicted using the 3D-RISM³⁸ module implemented in MOE.

参考文献

- (1) Corbett, A. J.; Eckle, S. B. G.; Birkinshaw, R. W.; Liu, L.; Patel, O.; Mahony, J.; Chen, Z.; Reantragoon, R.; Meehan, B.; Cao, H.; Williamson, N. A.; Strugnell, R. A.; Sinderen, D. V.; Mak, J. Y. W.; Fairlie, D. P.; Kjer-Nielsen, L.; Rossjohn, J.; McCluskey, J. T-Cell Activation by Transitory Neo-Antigens Derived from Distinct Microbial Pathways. *Nature* **2014**, *509*, 361–365.
- (2) Mak, J. Y. W.; Xu, W.; Reid, R. C.; Corbett, A. J.; Meehan, B. S.; Wang, H.; Chen, Z.; Rossjohn, J.; McCluskey, J.; Liu, L.; Fairlie, D. P. Stabilizing Short-Lived Schiff Base Derivatives of 5-Aminouracils that Activate Mucosal-Associated Invariant T Cells. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 14599.
- (3) Although the analogs of 5-A-RU (**2b**, **2c**, **2e** and **2g**) have been synthesized previously,¹³ MAIT cell activation assays for these analogs have not been conducted.
- (4) Li, K.; Vorkas, C. K.; Chaudhry, A.; Bell, D. L.; Willis, R. A.; Rudensky, A.; Altman, J. D.; Glickman, M. S.; Aubé, J. Synthesis, Stabilization, and Characterization of the MR1 Ligand Precursor 5-Amino-6-D-Ribitylaminouracil (5-A-RU). *PLoS ONE* **2018**, *13*. e0191837.
- (5) Peterson, K. E.; Cinelli, M. A.; Morrell, A. E.; Mehta, A.; Dexheimer, T. S.; Agama, K.; Antony, S.; Pommier, Y.; Cushman, M. Alcohol-, Diol-, and Carbohydrate-Substituted Indenoisoquinolines as Topoisomerase I Inhibitors: Investigating the Relationships Involving Stereochemistry, Hydrogen Bonding, and Biological Activity. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 4937–4953.
- (6) The analogs of 5-OP-RU (**1b**, **1c**, **1e** and **1g**) have been synthesized previously and evaluated using mouse MR1 and mouse MAIT-TCR.¹³
- (7) Mak *et al.* reported the other preparation method where, after mixing the precursor (5-A-RU) and methylglyoxal in DMSO, the resulting product (5-OP-RU) was purified by chromatography.² Although we have confirmed that 5-OP-RU isomers were produced in acceptable yields, the differences in the preparation methods could have influence on the activity values.
- (8) The 7-methyl-8-d-ribityllumazine (**3a**) has been synthesized and evaluated with human MR1 and human MAIT-TCR.¹⁰
- (9) Ler, G. J. M.; Xu, W.; Mak, J. Y. W.; Liu, L.; Bernhardt, P. V.; Fairlie, D. P. Computer Modelling and Synthesis of Deoxy and Monohydroxy Analogues of a Ribitylaminouracil Bacterial Metabolite That Potently Activates Human T Cells. *Chem. Eur. J.* **2019**, *25*, 15594–15608.
- (10) Awad, W.; Ler, G. J. M.; Xu, W.; Keller, A. N.; Mak, J. Y. W.; Lim, X. Y.; Liu, L.; Eckle, S. B. G.; Le Nours, J.; McCluskey, J.; Corbett, A. J.; Fairlie, D. P.; Rossjohn, J. The Molecular Basis Underpinning the Potency and Specificity of MAIT Cell Antigens. *Nat. Immunol.* **2020**, *21*, 400–411.
- (11) Godfrey, D. I.; Koay, H.-F.; McCluskey, J.; Gherardin, N. A. The Biology and Functional Importance of MAIT Cells. *Nat. Immunol.* **2019**, *20*, 1110–1128.
- (12) Several cell surface markers (e. g. CD25, CD40 L, CD69, CD137, OX40 etc.) can be commonly used for evaluation of T cell activation, which are not considered to have essential differences. The measurements of IL-2 secretion are also used to investigate T cell activation.
- (13) Braganza, C. D.; Shibata, K.; Fujiwara, A.; Motozono, C.; Sonoda, K.; Yamasaki, S.; Stocker, B. L.; Timmer, M. S. M. The Effect of MR1 Ligand Glyco-Analogs on Mucosal-Associated Invariant T (MAIT)

Cell Activation. *Org. Biomol. Chem.* **2019**, *17*, 8992–9000.

- (14) Eckle, S. B. G.; Birkinshaw, R. W.; Kostenko, L.; Corbett, A. J.; McWilliam, H. E. G.; Reantragoon, R.; Chen, Z.; Gherardin, N. A.; Beddoe, T.; Liu, L.; Patel, O.; Meehan, B.; Fairlie, D. P.; Villadangos, J. A.; Godfrey, D. I.; Kjer-Nielsen, L.; McCluskey, J.; Rossjohn, J. A. Molecular Basis Underpinning the T Cell Receptor Heterogeneity of Mucosal-Associated Invariant T Cells. *J. Exp. Med.* **2014**, *211*, 1585–1600.
- (15) Koay, H.-F.; Gherardin, N. A.; Xu, C.; Seneviratna, R.; Zhao, Z.; Chen, Z.; Fairlie, D. P.; McCluskey, J.; Pellicci, D. G.; Uldrich, A. P.; Godfrey, D. I. Diverse MR1-Restricted T Cells in Mice and Humans. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 2243.
- (16) Eckle, S. B. G.; Corbett, A. J.; Keller, A. N.; Chen, Z.; Godfrey, D. I.; Liu, L.; Mak, J. Y. W.; Fairlie, D. P.; Rossjohn, J.; McCluskey, J. Recognition of Vitamin B Precursors and Byproducts by Mucosal Associated Invariant T Cells. *J. Biol. Chem.* **2015**, *290*, 30204–30211.
- (17) Kjer-Nielsen, L.; Patel, O.; Corbett, A. J.; Le Nours, J.; Meehan, B.; Liu, L.; Bhati, M.; Chen, Z.; Kostenko, L.; Reantragoon, R.; Williamson, N. A.; Purcell, A. W.; Dudek, N. L.; McConville, M. J.; O’Hair, R. A. J.; Khairallah, G. N.; Godfrey, D. I.; Fairlie, D. P.; Rossjohn, J.; McCluskey, J. MR1 Presents Microbial Vitamin B Metabolites to MAIT Cells. *Nature* **2012**, *491*, 717–723.
- (18) Keller, A. N.; Eckle, S. B. G.; Xu, W.; Liu, L.; Hughes, V. A.; Mak, J. Y. W.; Meehan, B. S.; Pediongco, T.; Birkinshaw, R. W.; Chen, Z.; Wang, H.; D’Souza, C.; Kjer-Nielsen, L.; Gherardin, N. A.; Godfrey, D. I.; Kostenko, L.; Corbett, A. J.; Purcell, A. W.; Fairlie, D. P.; McCluskey, J.; Rossjohn, J. Drugs and Drug-Like Molecules Can Modulate the Function of Mucosal-Associated Invariant T Cells. *Nat. Immunol.* **2017**, *18*, 402–411.
- (19) Eckle, S. B. G.; Birkinshaw, R. W.; Kostenko, L.; Corbett, A. J.; McWilliam, H. E. G.; Reantragoon, R.; Chen, Z.; Gherardin, N. A.; Beddoe, T.; Liu, L.; Patel, O.; Meehan, B.; Fairlie, D. P.; Villadangos, J. A.; Godfrey, D. I.; Kjer-Nielsen, L.; McCluskey, J.; Rossjohn, J. A Molecular Basis Underpinning the T Cell Receptor Heterogeneity of Mucosal-Associated Invariant T Cells. *J. Exp. Med.* **2014**, *211*, 1585–1600.
- (20) Murayama, G.; Chiba, A.; Suzuki, H.; Nomura, A.; Mizuno, T.; Kuga, T.; Nakamura, S.; Amano, H.; Hirose, S.; Yamaji, K.; Suzuki, Y.; Tamura, N.; Miyake, S. A Critical Role for Mucosal-Associated Invariant T Cells as Regulators and Therapeutic Targets in Systemic Lupus Erythematosus. *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 2681.
- (21) Wang, C. J. H.; Awad, W.; Liu, L.; Mak, J. Y. W.; Veerapen, N.; Illing, P. T.; Purcell, A. W.; Eckle, S. B. G.; McCluskey, J.; Besra, G. S.; Fairlie, D. P.; Rossjohn, J.; Le Nours, J. Quantitative Affinity Measurement of Small Molecule Ligand Binding to Major Histocompatibility Complex Class-I Related Protein 1 MR1. *J. Biol. Chem.* **2022**, *298*, 102714.
- (22) Salio, M.; Awad, W.; Veerapen, N.; Cerundolo, V. Ligand-Dependent Downregulation of MR1 Cell Surface Expression. *Prod. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2020**, *117*, 10465–10475.
- (23) Meermeier, E. W.; Laugel, B. F.; Sewell, A. K.; Corbett, A. J.; Rossjohn, J.; McCluskey, J.; Harrieff, M. J.; Franks, T.; Gold, M. C.; Lewinsohn, D. M. Human TRAV1-2-Negative MR1-Restricted T Cells Detect *S. pyogenes* and Alternatives to MAIT Riboflavin-Based Antigens. *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 12506.
- (24) Crowther, M. D.; Dolton, G.; Legut, M.; Cailaud, M. E.; Lloyd, A.; Attaf, M.; Galloway, S. A. E.; Rius, C.;

- Farrell, C. P.; Szomolay, B.; Ager, A.; Parker, A. L.; Fuller, A.; Donia, M.; McCluskey, J.; Rossjohn, J.; Svane, I. M.; Phillips, J. D.; Sewell, A. K. Genome-Wide CRISPR-Cas9 Screening Reveals Ubiquitous T Cell Cancer Targeting via the Monomorphic MHC Class I-Related Protein MR1. *Nat. Immunol.* **2020**, *21*, 178–185.
- (25) Lepore, M.; Kalinichenko, A.; Calogero, S.; Kumar, P.; Paleja, B.; Schmalzer, M.; Narang, V.; Zolezzi, F.; Poidinger, M.; Mori, L.; Libero, G. D. Functionally Diverse Human T Cell Recognize Non-Microbial Antigens Presented by MR1. *eLife* **2017**, *6*, e24476.
- (26) McWilliam, H. E. G.; Eckle, S. B. G.; Theodossis, A.; Liu, L.; Chen, Z.; Wubben, J. M.; Fairlie, D. P.; Strugnell, R. A.; Minter, J. D.; McCluskey, J.; Rossjohn, J.; Villadangos, J. A. The Intracellular Pathway for the Presentation of Vitamin B-Related Antigens by the Antigen-Presenting Molecule MR1. *Nat. Immunol.* **2016**, *17*, 531–537.
- (27) McWilliam, H. E. G.; Mak, J. Y. W.; Awad, W.; Zorkau, M.; Cruz-Gomez, C.; Lim, H. J.; Yan, Y.; Wormald, S.; Dagley, L. F.; Eckle, S. B. G.; Corbett, A. J.; Liu, H.; Li, S.; Reddiex, S. J. J.; Minter, J. D.; Liu, L.; McCluskey, J.; Rossjohn, J.; Fairlie, D. P.; Villadangos, J. A. Endoplasmic Reticulum Chaperones Stabilize Ligand-Receptive MR1 Molecules for Efficient Presentation of Metabolite Antigens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2020**, *117*, 24974–24985.
- (28) McShan, A. C.; Devlin, C. A.; Papadaki, G. F.; Sun, Y.; Green, A. I.; Morozov, G. I.; Burslem, G. M.; Procko, E.; Sgourakis, N. G. TAPBPR Employs a Ligand-Independent Docking Mechanism to Chaperone MR1 Molecules. *Nat. Chem. Biol.* **2022**, *18*, 859–868.
- (29) Patel, O.; Kjer-Nielsen, L.; Le Nours, J.; Eckle, S. B. G.; Birkinshaw, R.; Beddoe, T.; Corbett, A. J.; Liu, L.; Miles, J. J.; Meehan, B.; Reantragoon, R.; Sandoval-Romero, M. L.; Sullivan, L. C.; Brooks, A. G.; Chen, Z.; Fairlie, D. P.; McCluskey, J.; Rossjohn, J. Recognition of Vitamin B Metabolites by Mucosal-Associated Invariant T Cells. *Nat. Commun.* **2013**, *4*, 2142.
- (30) Boursier, M. E.; Levin, S.; Zimmerman, K.; Kirkland, T. A.; Wood, K. V.; Ohana, R. F. The Luminescent HiBiT Peptide Enables Selective Quantitation of G Protein-Coupled Receptor Ligand Engagement and Internalization in Living Cells. *J. Biol. Chem.* **2020**, *295*, 5124–5135.
- (31) McWilliam, H. E. G.; Villadangos, J. A. How MR1 Presents a Pathogen Metabolic Signature to Mucosal-Associated Invariant T (MAIT) Cells. *Trends Immunol.* **2017**, *38*, 679.
- (32) Matsuoka, T.; Motozono, C.; Hattori, A.; Kakeya, H.; Yamasaki, S.; Oishi, S.; Ohno, H.; Inuki, S. The Effects of 5-OP-RU Stereochemistry on Its Stability and MAIT–MR1 Axis. *ChemBioChem* **2021**, *22*, 672–678.
- (33) Jeong, Y.-J.; Jung, M. G.; Son, Y.; Jang, J.-H.; Lee, Y.-J.; Kim, S.-H.; Ko, Y.-G.; Lee, Y.-S.; Lee, H.-J. Coniferyl Aldehyde Attenuates Radiation Enteropathy by Inhibiting Cell Death and Promoting Endothelial Cell Function. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0128552.
- (34) Wang, D.; Zhang, L.; Huang, X.; Wang, X.; Yang, R.; Mao, J.; Wang, X.; Wang, X.; Zhang, Q.; Li, P. Identification of Nutritional Components in Black Sesame Determined by Widely Targeted Metabolomics and Traditional Chinese Medicines. *Molecules* **2018**, *23*, 1180.
- (35) Wang, Y.; Gao, Y.; Li, X.; Sun, X.; Wang, Z.; Wang, H.; Nie, R.; Yu, W.; Zhou, Y. Coniferyl Aldehyde

- Inhibits the Inflammatory Effects of Leptomeningeal Cells by Suppressing the JAK2 Signaling. *BioMed. Res. Int.* **2020**, *2020*, 4616308.
- (36) Liaqat, H. *Andrographis paniculata*: A Review of its Anti-Cancer Potential. *Medicinal & Aromatic Plants* **2021**, *10*, 1–9.
- (37) Woo, W. S.; Kang, S. S. A New Phenolic Aldehyde from the Seeds of *Phytolacca americana*. *Kor. J. Pharmacog.* **1979**, *10*, 83–84.
- (38) Kovalenko, A.; Hirata, F. Self-Consistent Description of a Metal-Water Interface by the Kohn–Sham Density Functional Theory and the Three-dimensional Reference Interaction Site Model. *J. Chem. Phys.* **1999**, *110*, 10095–10112.
- (39) Kitamura, T. New Experimental Approaches in Retrovirus-Mediated Expression Screening. *Int. J. Hematol.* **1998**, *67*, 351–359.
- (40) Yokosuka, T.; Takase, K.; Suzuki, M.; Nakagawa, Y.; Taki, S.; Takahashi, H.; Fujisawa, T.; Arase, H.; Saito, T. Predominant Role of T Cell Receptor (TCR)- α Chain in Forming Preimmune TCR Repertoire Revealed by Clonal TCR Reconstitution System. *J. Exp. Med.* **2002**, *195*, 991–1001.
- (41) Luo, D.; Sharma, H.; Yedlapudi, D.; Antonio, T.; Reith, M. E. A.; Dutta, A. K. Novel Multifunctional Dopamine D2/D3 Receptors Agonists with Potential Neuroprotection and Anti-alpha Synuclein Protein Aggregation Properties. *Bioorg. Med. Chem.* **2016**, *24*, 5088–5102.
- (42) Zhang, X.-L.; Pan, G.-F.; Zhu, X.-Q.; Guo, R.-L.; Gao, Y.-R.; Wang, Y.-Q. Dehydrogenative β -Arylation of Saturated Aldehydes Using Transient Directing Groups. *Org. Lett.* **2019**, *21*, 2731–2735.
- (43) Choi, S.-K.; Mun, G.-I.; Choi, E.; Kim, S.-Y.; Kwon, Y.; Na, Y.; Lee, Y.-S. The Conjugated Double Bond of Coniferyl Aldehyde Is Essential for Heat Shock Factor 1 Mediated Cytotoprotection. *J. Nat. Prod.* **2017**, *80*, 2379–2383.
- (44) DiBiase, S. A.; Lipisko, B. A.; Haag, A.; Wolak, R. A.; Gokel, G. W. Direct Synthesis of α,β -Unsaturated Nitriles from Acetonitrile and Carbonyl Compounds: Survey, Crown Effects, and Experimental Conditions. *J. Org. Chem.* **1979**, *44*, 4640–4649.
- (45) Kapeller, D. C.; Bräse, S. Versatile Solid-Phase Synthesis of Chromenes Resembling Classical Cannabinoids. *ACS Chem. Biol.* **2011**, *13*, 554–561.
- (46) Flaherty, D. P.; Kiyota, T.; Dong, Y.; Ikezu, T.; Vennerstrom, J. L. Phenolic Bis-styrylbenzenes as β -Amyloid Binding Ligands and Free Radical Scavengers. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 7992–7999.
- (47) Sasaki, S.; Kitamura, S.; Negoro, N.; Suzuki, M.; Tsujihata, Y.; Suzuki, N.; Santou, T.; Kanzaki, N.; Harada, M.; Tanaka, Y.; Kobayashi, M.; Tada, N.; Funami, M.; Tanaka, T.; Yamamoto, Y.; Fukatsu, K.; Yasuma, T.; Momose, Y. Design, Synthesis, and Biological Activity of Potent and Orally Available G Protein-Coupled Receptor 40 Agonists. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 1365–1378.
- (48) Yang, L. X.; Huang, K. X.; Li, H. B.; Gong, J. X.; Wang, F.; Feng, Y. B.; Tao, Q. F.; Wu, Y. H.; Li, X. K.; Wu, X. M.; Zeng, S.; Spencer, S.; Zhao, Y.; Qu, J. Design, Synthesis, and Examination of Neuron Protective Properties of Alkenylated and Amidated Dehydro-Silybin Derivatives. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 7732–7752.
- (49) Moriarty, R. M.; Grubjesic, S.; Surve, B. C.; Chandrasekera, S. N.; Prakash, O.; Naithani, R. Synthesis of Abyssinone II and Related Compounds as Potential Chemopreventive Agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2006**,

41, 263–267.

- (50) Ieda, N.; Nakagawa, H.; Horinouchi, T.; Peng, T.; Yang, D.; Tsumoto, H.; Suzuki, T.; Fukuhara, K.; Miyata, N. Peroxynitrite Generation from a NO-Releasing Nitrobenzene Derivative in Response to Photoirradiation. *Chem. Commun.* **2011**, 47, 6449–6451.
- (51) Varró, G.; Hegedűs, L.; Simon, A.; Balogh, A.; Grün, A.; Leveles, I.; Vértessy, B. G.; Kádas, I. The First Enantioselective Total Synthesis of (–)-*trans*-Dihydronarciclasine. *J. Nat. Prod.* **2017**, 80, 1909–1917.
- (52) Newson, H. L.; Wild, D. A.; Yeung, S. Y.; Skelton, B. W.; Flematti, G. R.; Allan, J. E.; Piggott, M. J. Access to 1,2,3,4-Tetraoxygenated Benzenes via a Double Baeyer-Villiger Reaction of Quinizarin Dimethyl Ether: Application to the Synthesis of Bioactive Natural Products from *Antrodia camphorata*. *J. Org. Chem.* **2016**, 81, 3127–3135.
- (53) Xu, T.-T.; Jiang, T.-S.; Han, X.-L.; Xu, Y.-H.; Qiao, J.-P. Modular Synthesis of (*E*)-Cinnamaldehydes Directly from Allylarenes via a Metal-Free DDQ-Mediated Oxidative Process. *Org. Biomol. Chem.* **2018**, 16, 5350–5358.
- (54) Ge, P.; Russell, R. A. The Synthesis of Bisanthraquinone Derivatives as DNA Bisintercalating Agents. *Tetrahedron* **1997**, 53, 17477–17488.
- (55) Schmidtchen, F. P. Probing the Design of a Novel Ditopic Anion Receptor. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, 108, 8249–8255.
- (56) Kaliyaperumal, S. A.; Banerjee, S.; Kumar, U. K. S. Palladium Mediated Intramolecular Multiple C-X/C-H Cross Coupling and C-H Activation: Synthesis of Carbazole Alkaloids Calothrixin B and Murrayaquinone A. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, 12, 6105–6113.
- (57) Bauman, J. D.; Patel, D.; Baker, S. F.; Vijayan, R. S. K.; Xiang, A.; Parhi, A. K.; Martínez-Sobrido, L.; LaVoie, E. J.; Das, K.; Arnold, E. Crystallographic Fragment Screening and Structure-Based Optimization Yields a New Class of Influenza Endonuclease Inhibitors. *ACS Chem. Biol.* **2013**, 8, 2501–2508.
- (58) Case, D. A.; Ben-Shalom, I. Y.; Brozell, S. R.; Cerutti, D. S.; Cheatham, III, T. E.; Cruzeiro, V. W. D.; Darden, T. A.; Duke, R. E.; Ghoreishi, D.; Gilson, M. K.; Gohlke, H.; Goetz, A. W.; Greene, D.; Harris, R.; Homeyer, N.; Huang, Y.; Izadi, S.; Kovalenko, A.; Kurtzman, T.; Lee, T. S.; LeGrand, S.; Li, P.; Lin, C.; Liu, J.; Luchko, T.; Luo, R.; Mermelstein, D. J.; Merz, K. M.; Miao, Y.; Monard, G.; Nguyen, C.; Nguyen, H.; Omelyan, I.; Onufriev, A.; Pan, F.; Qi, R.; Roe, D. R.; Roitberg, A.; Sagui, C.; Schott-Verdugo, S.; Shen, J.; Simmerling, C. L.; Smith, J.; SalomonFerrer, R.; Swails, J.; Walker, R. C.; Wang, J.; Wei, H.; Wolf, R. M.; Wu, X.; Xiao, L.; York, D.M.; Kollman, P.A. (2018), AMBER 2018, University of California, San Francisco.
- (59) Jorgensen, W. L.; Chandrasekhar, J.; Madura, J. D.; Impey, R. W.; Klein, M. L. Comparison of Simple Potential Functions for Simulating Liquid Water. *J. Chem. Phys.* **1983**, 79, 926–935.
- (60) Darden, T.; York, D.; Pedersen, L. Particle Mesh Ewald: An $N \cdot \log(N)$ Method for Ewald Sums in Large Systems. *J. Chem. Phys.* **1993**, 98, 10089–10092.

第二章 MAIT 細胞の創薬利用・機能解明を見据えた基盤的研究

第一節 可視光レドックス触媒を利用した糖誘導体からの alditol 構造の構築

第一項 研究背景

強力な MAIT 細胞活性化剤である 5-OP-RU 構造中のリビチル基に代表されるように、天然には、極性官能基が連続的に配置された直鎖構造がしばしば見られる (Figure 2-1)¹⁻³。これらの構造は、複数の水素結合受容体/供与体を持つことから、標的タンパク質との特異的な相互作用に関与し、生物活性を示す上で重要な働きをしていることが多い。そのため、これら構造の極性官能基の一部の立体配置を変換・除去するアプローチは、標的タンパク質からの 3 次元認識を変化させることで、活性や各種選択性に影響を与える場合が多く、構造活性相関研究の重要なアプローチの一つとして位置づけられている。

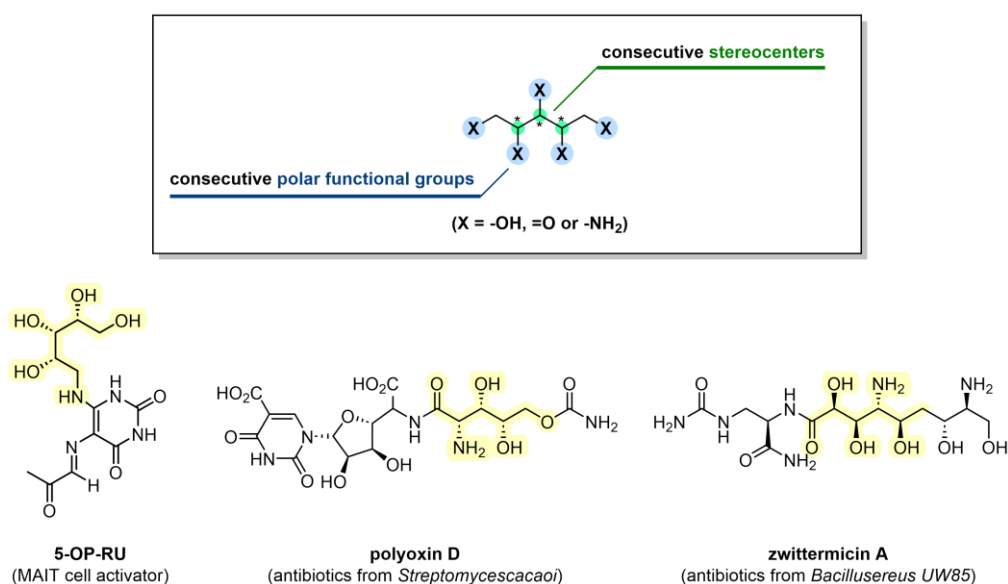
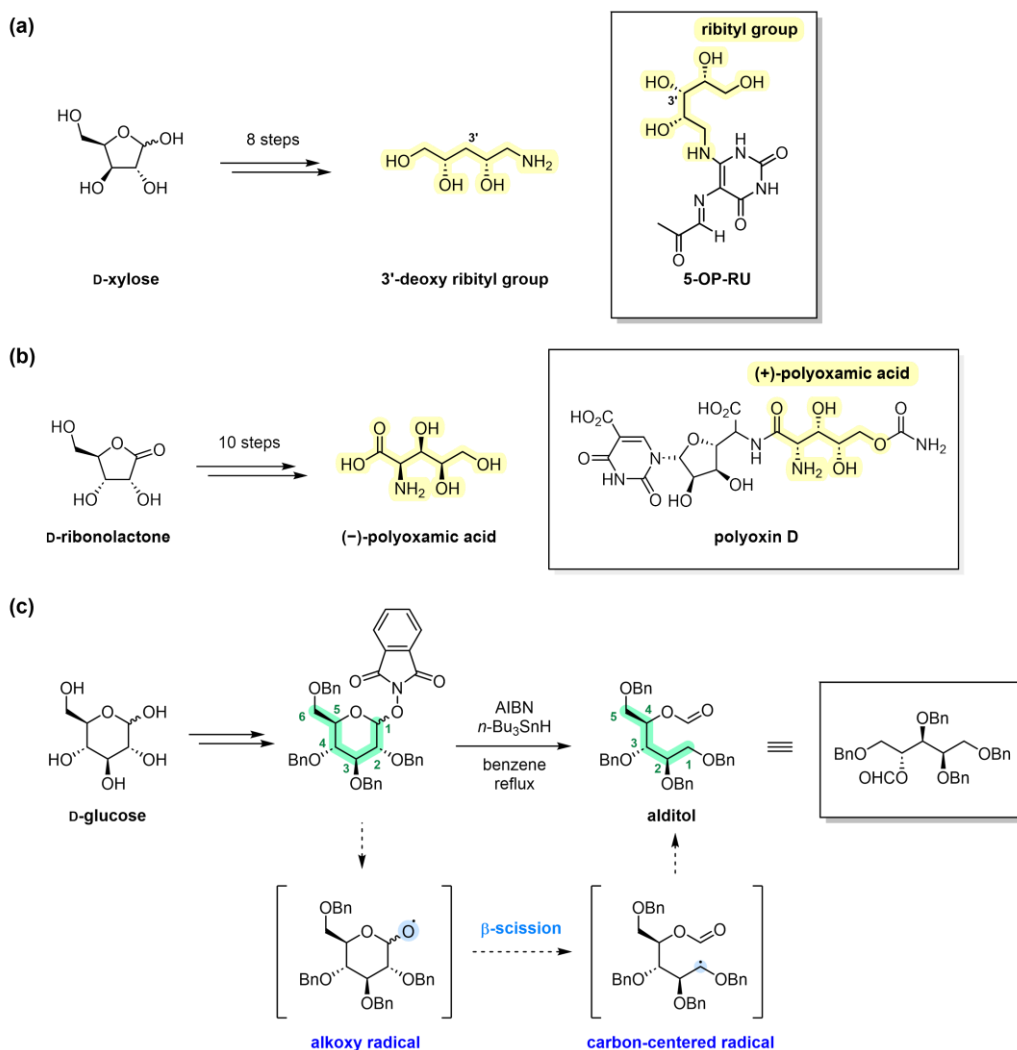


Figure 2-1. Natural products containing a linear structure with consecutive polar functional groups.

一般に、このような構造の合成法として、*de novo* 合成とキラルプール法が知られている。*de novo* 合成とは、シンプルな出発原料に対して、立体選択的な反応を繰り返し用いる方法である。この方法は、出発原料に依存せずに様々な立体異性体を作り分けることができる反面、多工程を要する場合が多い。また、立体選択性が完全ではない場合に、異性体を分離精製する困難が伴う⁴。そのような理由から、様々な天然物の誘導体合成において、キラルプール法が有効な合成戦略として重宝されている。キラルプール法は、糖などの入手容易な光学活性化合物から変換を行う合成経路である。本手法は、立体選択的な反応を繰り返すことなく、所望の立体化学の構造を取得することができる。

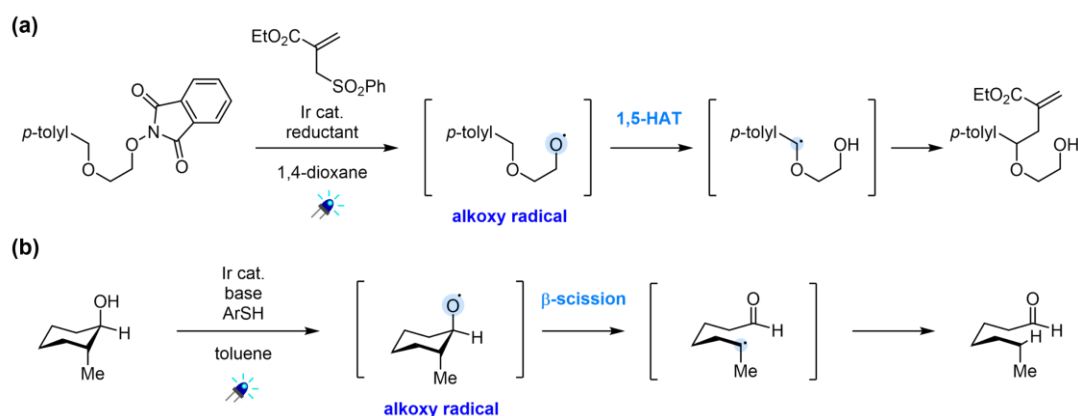
キラルプール法を用いて、極性官能基が連続的に配置された直鎖構造の構築を達成した先行研究を以下に示す。Fairlie らは 5-OP-RU のリビチル基の脱ヒドロキシ基誘導体の合成に、D-xylose を出発原料として利用し、立体選択的な反応を経ることなく、その合成を達成している (Scheme 2-1a)⁵。また、Dodd らは、polyoxin D に含まれる (+)-polyoxamic acid の立体異性体を合成するために、D-

ribonolactone を出発原料とした合成経路を開発している (**Scheme 2-1b**)⁶。このように、5つの炭素上に連続した極性官能基を持つ構造を構築する場合、キラルプール法では、5炭糖またはその関連化合物を出発物質とすることが多い。一方、S        らは6炭糖を出発物質とする興味深い反応を報告している^{7,8}。この反応は、アノマー位にヒドロキシフタルイミドを有する糖誘導体を還元剤存在下、ラジカル反応に付すことで、アノマー位にアルコキシラジカルを発生させ、  開裂反応と続く還元によって、ヒドロキシ基が連続的に配置された直鎖構造 (alditol) を与える (**Scheme 2-1c**)⁸。  開裂反応が起こる際に、アノマー位炭素はホルミル基に変換されるため、得られる alditol は1炭素減炭した化合物となる。キラルプール法では一般に、出発物質である入手可能な5炭糖に限りがあるため、合成しやすい構造に制約がある。一方、S        らが開発した本反応は、様々な6炭糖を減炭しながら直鎖構造に変換できるため、5炭糖のキラルプールを起点とする保護・脱保護戦略からでは合成しにくい誘導体への変換が容易になると考えられる。しかし、本反応は、高温条件下で反応を行う必要があることに加え、毒性の高いスズ化合物を用いる必要がある点に改善の余地があると考えられる。



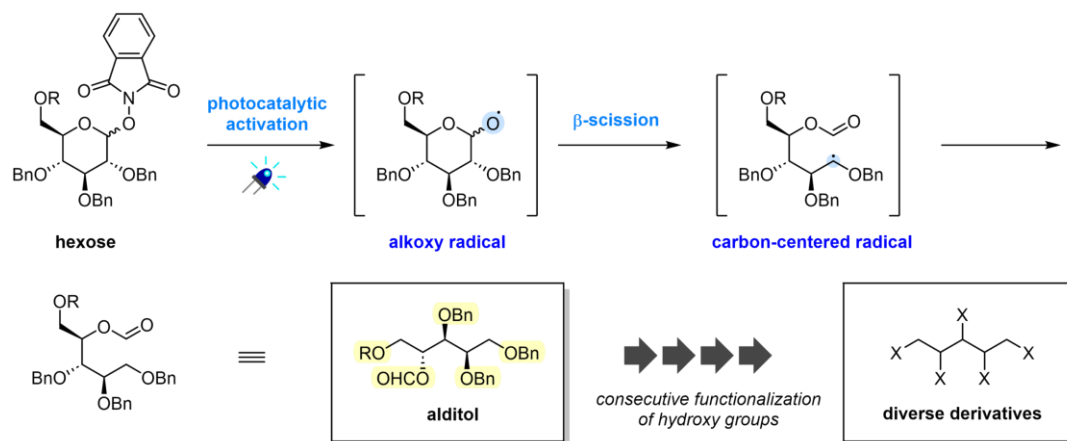
Scheme 2-1. Precedent research on construction of linear structures with consecutive polar functional groups using the chiral pool method. (a) Synthetic study on 3'-deoxy ribityl group. (b) Synthetic study on (-)-polyoxamic acid. (c) Construction of an alditol using   -scission of anomeric alkoxy radical.

そこで、この反応をより穏和かつ毒性試薬を用いない方法で達成することができれば、キラルブール法で合成しやすい構造の範囲を拡張できるのではないかと考え、著者は可視光レドックス触媒反応を利用することを計画した。可視光レドックス触媒反応は、可視光によって励起された触媒が、系内で一電子還元と一電子酸化を連続的に起こすことを利用する⁹⁻¹¹。Chen らは、ヒドロキシフタルイミドを持つ基質に対して、可視光レドックス触媒存在下、光照射することによってアルコキシラジカルを発生させ、1,5-水素原子移動 (1,5-HAT) と、続くアルキル化を経て、位置選択的な C(sp³)-H 官能基化を達成している (Scheme 2-2a)¹²。また、Knowles らは、塩基性条件下で種々シクロアルコールを可視光レドックス触媒と反応させることによって、無保護ヒドロキシ基からアルコキシラジカルを生成し、β 開裂反応と続く還元を経て、レドックスニュートラルな開環反応を達成している (Scheme 2-2b)¹³。



Scheme 2-2. (a) Photocatalytic generation of alkoxy radicals from *N*-alkoxyphthalimides. (b) Photocatalytic generation of alkoxy radical via proton-coupled electron transfer.

以上の背景から、著者は 1 位にヒドロキシフタルイミドを有する 6 炭糖に可視光レドックス触媒を作用させることで、アルコキシラジカルの生成と β 開裂反応、続く還元を経て、所望の 1 炭素減炭した alditol へ変換する反応を開発することを計画した (Scheme 2-3)。その際、6 位のヒドロキシ基を選択的に脱保護可能な保護基であらかじめ保護しておけば、続く構造変換によって様々な類縁構造に変換できると考えた。著者は本合成戦略の有用性を示すために、天然のアミノ酸である (+)-polyoxamic acid の合成についても併せて検討を行った。



Scheme 2-3. Synthetic strategy for the construction of alditol via photocatalytic activation of hexose derivative.

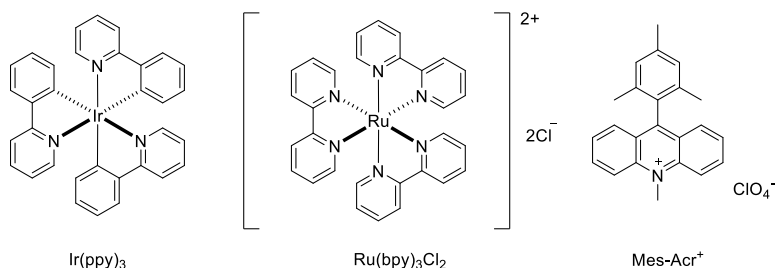
第二項 モデル基質を用いた初期検討

まず、Suárez らの報告をもとに、1 位をヒドロキシフタルイミド、2,3,4,6 位をベンジル基で保護したグルコース誘導体 **41** をモデル化合物として検討を行った (Table 2-1)⁸。青色 LED 照射下、可視光レドックス触媒として 4 mol% の Ir(ppy)₃、還元剤として 3 当量の Hantzsch ester、溶媒として 1,4-dioxane を用いた条件で **41** を反応に付すと、目的の化合物 **42** が 17% 収率で得られた (entry 1)。1,4-Dioxane 中において、Hantzsch ester 非存在下では目的の反応は進行しなかった (entry 2)。一方で、MeCN 中 Hantzsch ester 非存在下で反応を行うと、**42** の代わりに、アルコール **43** と **44** の混合物が合わせて 30% 収率で得られた (entry 3)。**43** と **44** は精製後、容易にホルミル基の分子内転移により 65:35 の平衡混合物となるため、分離することができなかった。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中で反応の進行が確認され、いずれも中程度の収率で **43** と **44** の混合物が得られた (entries 4–6)。特に NMP を溶媒として用いたときには 59% の収率で **43** と **44** の混合物が得られた。一方で、シクロヘキサンのような無極性溶媒下では反応の進行は確認できなかった (entry 7)。また、光触媒の検討の結果、目的の反応を進行させるには、Ir(ppy)₃ が最適であることが明らかとなった (entries 8–10)。

Table 2-1. Photoredox reaction using substrate **41**.

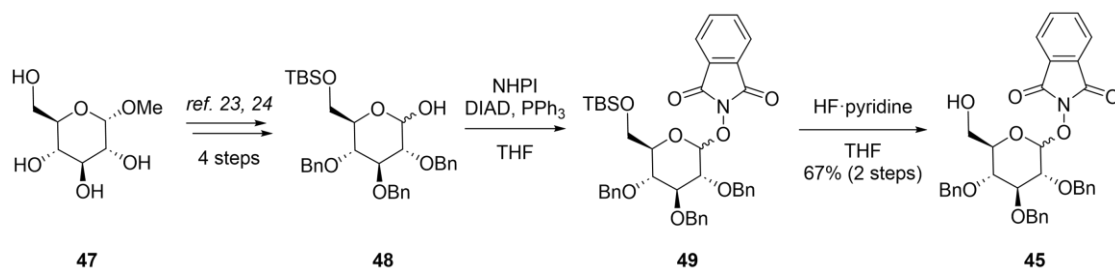
	41	42	43: R ¹ = CHO, R ² = H 44: R ¹ = H, R ² = CHO
entry ^a	photoredox catalyst	solvent	product (% yield) ^b
1 ^c	Ir(ppy) ₃	1,4-dioxane	42 (17)

2	Ir(ppy) ₃	1,4-dioxane	ND
3	Ir(ppy) ₃	MeCN	43 + 44 (30) ^d
4	Ir(ppy) ₃	DMSO	43 + 44 (40) ^d
5	Ir(ppy) ₃	DMF	43 + 44 (51) ^d
6	Ir(ppy) ₃	NMP	43 + 44 (59) ^d
7	Ir(ppy) ₃	cyclohexane	ND
8	Ir(Fppy) ₃	NMP	43 + 44 (28) ^d
9	Ru(bpy) ₃ Cl ₂ ·6H ₂ O	NMP	ND
10	Mes-Acr ⁺	NMP	43 + 44 (43) ^d



^a Reaction conditions: The solution of the substrate (0.038 mmol) and photoredox catalyst (4 mol%) in the solvent (1.3 mL) was irradiated with two 40 W blue LED lights for 24 h. ^b Isolated yields. ^c Hantzsch ester (3 eq.) was added. ^d The ratio of **43**:**44** is 65:35. ND = Not detected; 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.

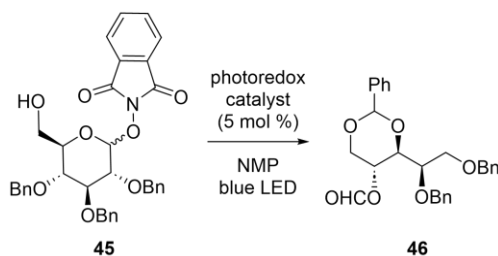
ここまでの検討を踏まえ、**42**、及び **43** と **44** の混合物を与える反応機構を以下のように推定した (Scheme 2-4)。基質 **41** が励起状態の Ir(III)により一電子還元されてアルコキシラジカル **A** を生成した後、β 開裂が起こり sp³ 炭素ラジカル **B** を与える¹⁴⁻¹⁷。その後、**B** は 1,5-HAT により、ベンジルラジカル **C** に変換される¹⁸⁻²¹。この変換は、sp³ 炭素間の 1,5 水素移動であり、一般的に起こりにくい反応とされているが、本反応系においては、ラジカル **C** は Ph 基の π 共役系への非局在化で安定化されているために、円滑に進行したものと考えられる²²。その後、Hantzsch ester などの水素原子ドナー存在下ではラジカル **B** や **C** は **42** に変換される。一方で、非存在下では、ラジカル **C** は Ir(IV) による酸化を受けてベンジルカチオン **D** に変換されると考えられる¹⁴。続いて、外来の H₂O との反応、及びベンズアルデヒドの脱離を経て、アルコール **43** が生成する。反応系中でベンズアルデヒドが生成することは、反応液を GC-MS 解析することによって確認している。最後に、**43** のホルミル基が 5 員環中間体を經由して、容易に隣接する無保護ヒドロキシ基に転移するため、分離困難な混合物として、**43** と **44** が得られたと考えられる。



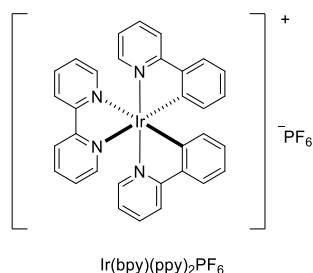
Scheme 2-6. Synthesis of substrate **45** (NHPI = *N*-hydroxyphthalimide).

モデル基質 **41** を用いた際の最適条件 (**Table 2-1**, entry 6) を用いて、グリコシド **45** を光反応に付したところ、63%収率で予想された alditol 保護体 **46** が得られた (**Table 2-2**, entry 1)。その際、単離可能な副生成物は得られなかった。この結果は、先に示した推定反応機構の妥当性を支持している。次に、 Ir(ppy)_3 の他に、いくつか光触媒の検討を試みたが、収率の改善には至らなかった (entries 2, 3)。また、光を照射しない条件では本反応は進行しなかった (entry 4)。続いて、本反応をフロー反応へと適用した (**Figure 2-2**)。光反応をフロー反応に適用することのメリットは単位容積当たりの LED 照射効率を維持したままスケールアップできることにある。これにより、通常のバッチ反応に比べ、反応時間の短縮とともに、副生成物の抑制につながると考えられる^{25,26}。青色 LED 照射下フローリアクターに反応溶液を流し、基質 **45** を滞留時間 1 h で反応させたところ、目的物 **46** を 63% 収率で与えた (entry 5)。また、フロー反応条件下では、触媒量を 5 mol % から 2 mol % まで低減した場合でも収率は維持された (entry 6)。

Table 2-2. Photoredox reaction using substrate **45**.



entry ^a	photoredox catalyst	yield (%) ^b
1	Ir(ppy)_3	63
2	$\text{Ir(bpy)(ppy)}_2\text{PF}_6$	57
3	Mes-Acr^+	12
4 ^c	Ir(ppy)_3	ND
5 ^d	Ir(ppy)_3	63
6 ^d	Ir(ppy)_3 ^e	65



^a Reaction conditions: The solution of the substrate (0.1 mmol), photoredox catalyst (5 mol%) in NMP (2 mL) was irradiated with two 40 W blue LED lights for 24 h. ^b Isolated yields. ^c Reaction was conducted without blue LED lights. ^d Reaction was conducted using continuous flow reactor in 1 h residence time. ^e 2 mol% catalyst was used. ND = Not detected.

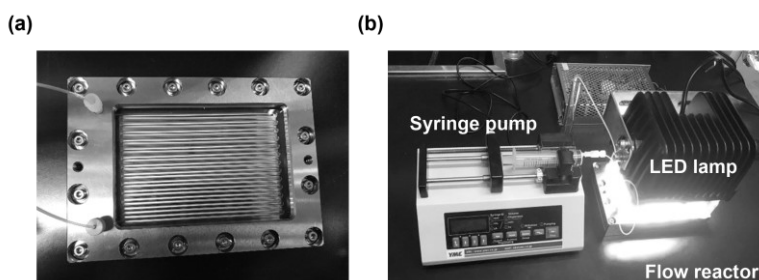
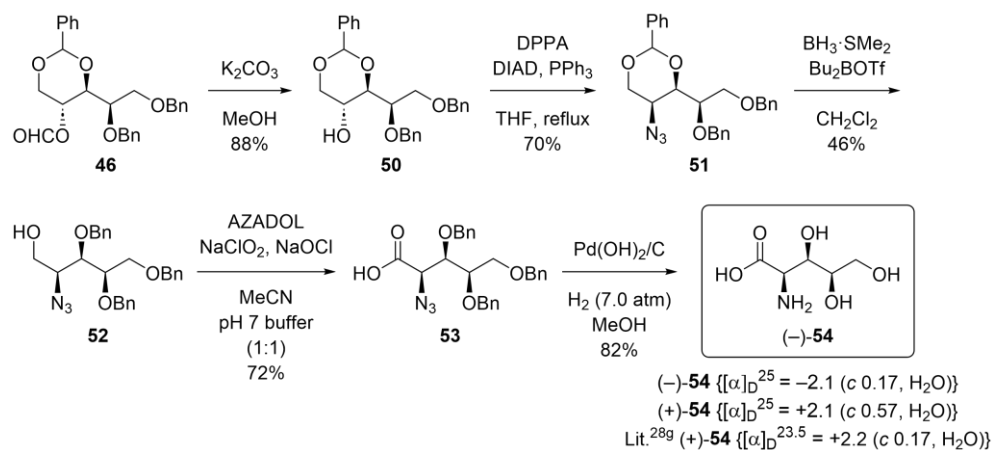


Figure 2-2. Setup of a flow reaction. (a) Flow reactor for photoredox reactions (2 mm width, 0.5 mm depth, 3 m length, MiChS Co., Ltd.). (b) Flow reactor setup for the visible-light-mediated β -scission and 1,5-HAT.

第四項 (+)-Polyoxamic acid の合成への応用

最後に、得られた alditol 保護体 **46** の有用性を実証すべく、極性官能基が連続的に配置された直鎖構造である、(-)-polyoxamic acid、及び(+)-polyoxamic acid の合成を試みることにした (Scheme 2-7)。(+)-Polyoxamic acid は 3 つの連続不斉中心を有する α アミノ酸であり、polyoxin などの生物活性天然物に含まれる構造である²⁷。Polyoxin はペプチジルヌクレオシド系抗生物質であり、その生物活性において、polyoxamic acid 構造が重要な役割を担っていることが知られている²⁸。

まず、**46** から(-)-polyoxamic acid への誘導化を検討した。塩基性条件下でのホルミル基の脱保護、及び光延反応によりアジド **51** を合成した。続いて、ルイス酸条件下ボランで還元することで、ベンジリデンアセタールを 1 級アルコール選択的に脱保護し、アルコール **52** を取得した^{29,30}。最後に、**52** を AZADO 酸化と、それに続く接触還元に付すことによって、目的の(-)-polyoxamic acid [(-)-**54**] を合成することに成功した。また、全く同様のスキームで L-Glc から(+)-polyoxamic acid を合成することにも成功した (Scheme 2-S1)^{23,24,31}。今回合成した化合物(+)-**54** および(-)-**54** の旋光度は、先行研究にて報告されている旋光度と一致していた^{28g}。



Scheme 2-7. Total synthesis of polyoxamic acid.

第五項 小括

著者は、可視光レドックス触媒による糖誘導体のβ開裂・1,5-HAT連続反応を利用して、穏和な条件下、alditol骨格を構築することに成功した(**Figure 2-3**)。本手法により構築したalditolは各ヒドロキシ基の連続的な官能基化により様々な誘導体へ変換することができる。実際に、本研究においてpolyoxamic acidへ誘導化できることが確認された。これらの研究成果は、5-OP-RUのように極性官能基が連続的に配置された構造を有する化合物の構造活性相関研究の推進に貢献するものと期待される。

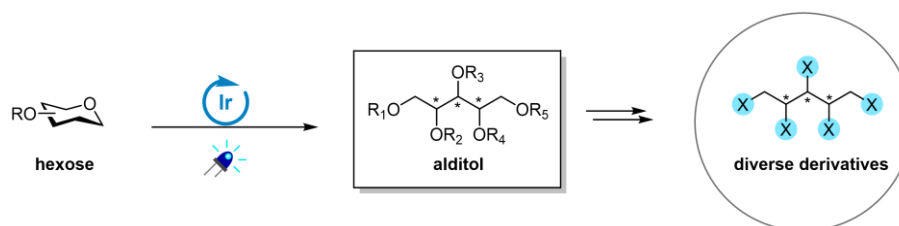


Figure 2-3. Summary of Section 1, Chapter 2.

第二節 細胞環境下での近接依存的カルボン酸ラベル化を指向した可視光応答性光触媒反応の開発

第一項 研究背景

これまでに、MR1T 細胞として、通常の MAIT 細胞と T 細胞受容体の構造が異なるものの、MR1 によって提示された抗原を認識し活性化するものがいくつか報告されている。それらは主に、以下 2 通りの方法で検出・同定されている。最もよく使われる方法は、蛍光標識した MR1 テトラマーを用いる手法である (**Figure 2-4a**)。MR1 テトラマーとは、抗原/MR1 複合体を、ストレプトアビジンを足掛かりに四量体化させたものである。ここに蛍光色素を付加することで、抗原/MR1 複合体と相互作用する T 細胞を蛍光標識することができる³²。抗原/MR1 複合体と TCR 間の相互作用は一般に弱い (μM オーダー程度) ため、四量体化することでアビディティを高めている。また、別の方法として、特定の抗原存在下で増殖・活性化した細胞を解析することによって MR1T 細胞が同定されている (**Figure 2-4b**)。本手法は、複数の細胞集団が混在するサンプルに対して、特定の抗原刺激を与え、それに伴って増殖した細胞を解析するというものである。実際に、Sewell らは、がん細胞株である A549 細胞存在下で、ヒト末梢血単核細胞 (PBMC) を培養し、がん細胞により提示された抗原を認識して活性化される MR1T 細胞を見出している³³。これらの方法は、MR1 に限らず、様々な MHC に提示された抗原を認識する T 細胞を検出する一般的な方法としても知られている一方で、デメリットも存在する。MR1 テトラマーを用いる方法では、それ自身に蛍光色素が付いているという設計上、ある程度強い親和性で細胞と相互作用する必要がある。そのため、抗原/MR1 複合体との相互作用が弱い T 細胞については検出が困難であると予想される。また、特定の抗原存在下で増殖・活性化した細胞を解析する手法では、各抗原提示分子の阻害剤を用いて、MR1 に提示された抗原を認識することを別途確認する必要がある。さらに、標的細胞が十分量増殖するのに時間がかかるというデメリットもあり、実際に Sewell らの論文では 2 週間の培養が必要となっている。

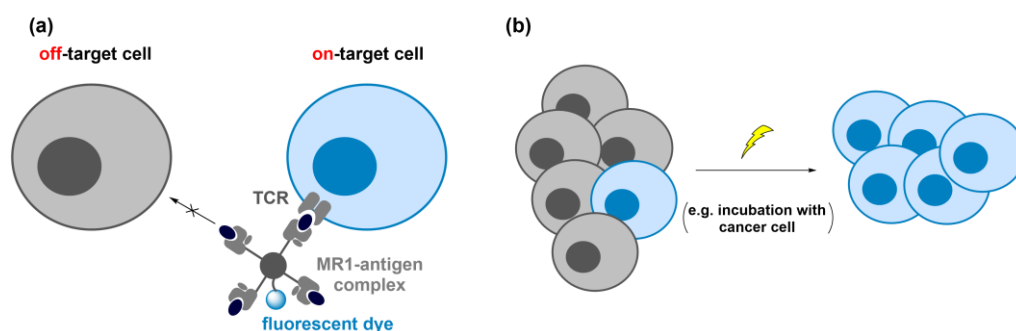


Figure 2-4. Existing methods for MR1T cell detection. (a) MR1T cell detection using fluorescent dye-conjugated MR1 tetramer. (b) Cell proliferation in the presence of specific antigen.

以上を踏まえて著者は、より網羅的かつ迅速に MR1T 細胞を検出する方法として、近接依存性標識に着目した。近接依存性標識とは、特定の細胞表面上あるいはオルガネラ中に酵素などの触媒を配置し、短寿命ラベル化剤を生成することで、その触媒に近い位置に存在するタンパク質などの生体分子を選択的にラベル化する方法である (**Figure 2-5**)³⁴。一般に、ラベル化剤には蛍光色素やビオチンタグが付けられ、標的分子や標的細胞を追跡・濃縮することが可能になる。

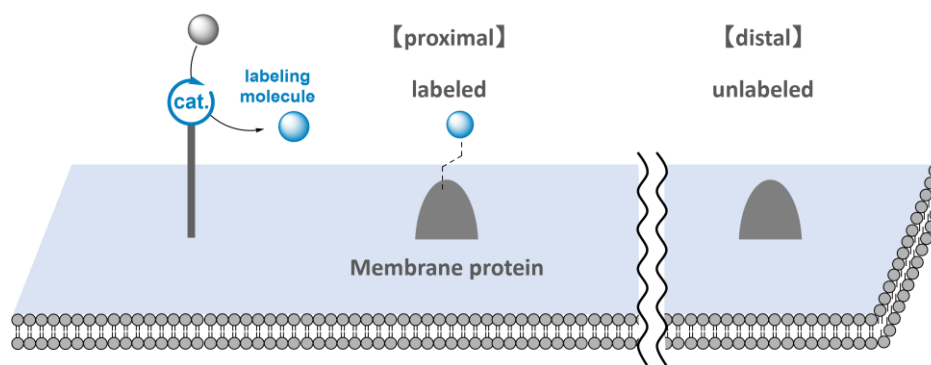


Figure 2-5. Proximity labeling.

これまでに、近接依存性標識を細胞の修飾に利用した例が多数報告されている。特に最近では、簡便性や汎用性の高さから、可視光応答性光触媒（PC）と抗体をコンジュゲートした分子を利用した近接依存性標識の開発が進んでいる。これらは、遺伝子導入などを介さずに、触媒を細胞上の特定に位置に配置し、光照射時のみ触媒周辺をラベル化する手法であり、ラベル化の時空間制御が可能である。そこで著者は、上記のような可視光応答性光触媒を用いた近接依存性標識を、MR1T 細胞の検出にも応用できるのではないかと考えた。すなわち、MR1 テトラマーに蛍光色素の代わりに光触媒をコンジュゲートした分子を作製することで、MR1 テトラマーと相互作用する細胞上のタンパク質を選択的に標識できることを期待した（Figure 2-6）。MR1 テトラマー/蛍光色素コンジュゲートを利用する方法と比較して、MR1 テトラマー/光触媒コンジュゲートを用いる本手法は、T 細胞自体を修飾する方法であるため、一時的に抗原/MR1 複合体と相互作用した T 細胞であっても、「相互作用していた」という情報を永続的に残すことが可能である。つまり、抗原/MR1 複合体との相互作用が弱い T 細胞をも検出することができるため、本手法は従来法に代わる効率的な MR1T 細胞検出法となりうる。

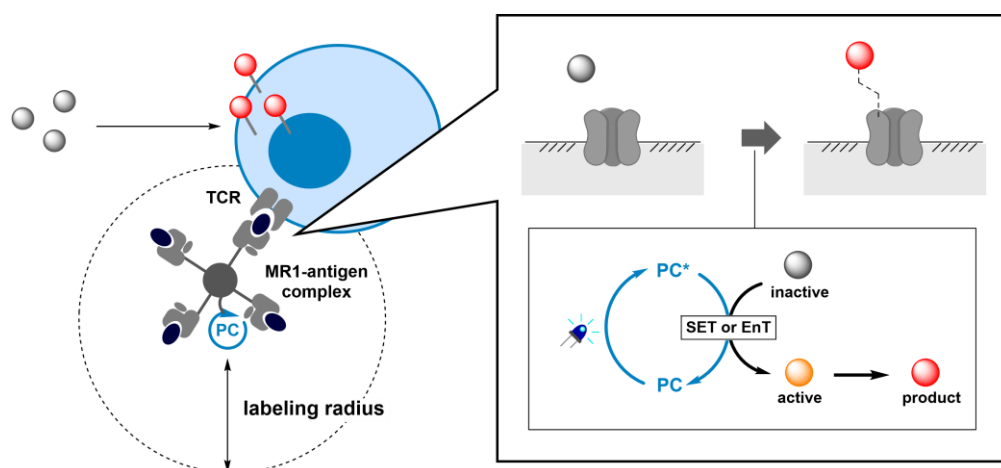


Figure 2-6. Detection tools using proximity labeling.

最近、同様の目的で、光触媒を用いた近接依存性標識により細胞上のタンパク質をラベル化する方法が数例報告されている。MacMillan らは、抗体にコンジュゲートした光触媒を用いて、ジアジリ

ンからカルベンを生成する手法を開発している (**Figure 2-7a**)³⁵。カルベンは高い求電子性を持つ化学種であるため、生体分子中の C-H 結合に挿入することが可能であるが、水系溶媒中では、 H_2O とも容易に反応するため、非常に寿命が短い。MacMillan らは、この寿命の短さを利用して、抗体の標的タンパク質周辺に局在するタンパク質を選択的に標識することに成功している。しかし、本手法ではカルベンの寿命が短すぎるがゆえに、細胞をラベル化するには効率が悪いと考えられている。また、Fadeyi らは、抗体にコンジュゲートした光触媒を用いて、フェノールからフェノキシラジカルを生成する手法を開発している (**Figure 2-7b**)³⁶。フェノキシラジカルは電子不足な化学種であるため、Tyr 残基のような電子豊富な芳香環とカップリングすることが知られている。一方、 H_2O に対しては反応性が低いため、この適度な寿命の長さを利用して、相互作用している細胞上のタンパク質を効率的に標識することに成功している。しかし、この手法には反応の進行に伴って、毒性のある H_2O_2 が生成するというデメリットが存在する。

そうした背景を踏まえ、著者は MR1 テトラマー/光触媒コンジュゲートによる生細胞ラベル化に適した、新たな可視光応答性光触媒反応を開発することを計画した。

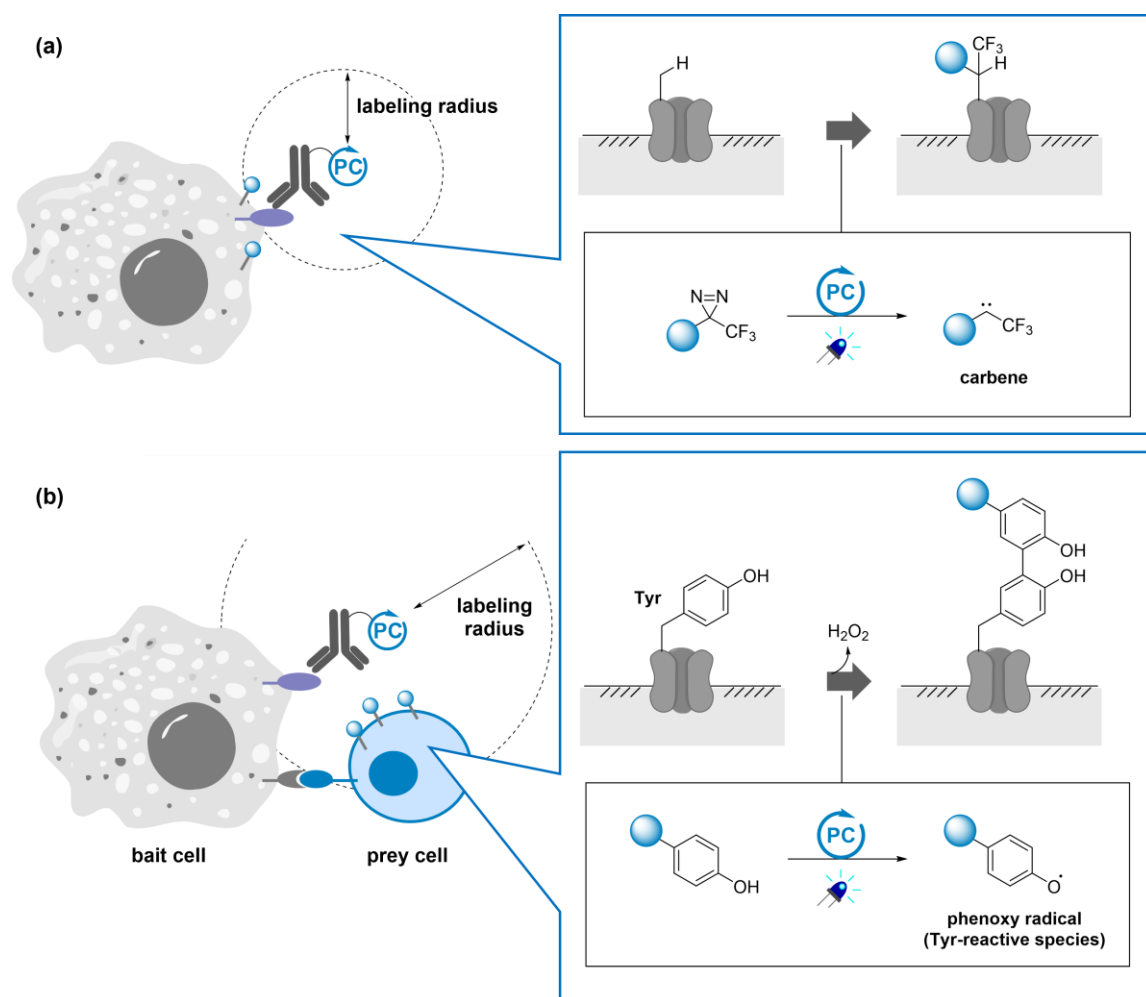


Figure 2-7. Precedent research of photocatalyst-based proximity labeling. (a) Labeling with photocatalytically generated carbene. (b) Labeling with photocatalytically generated phenoxy radical.

そこで著者は、tetrazole の非触媒的な光分解反応に着目した。本反応は、UV 照射によって励起された tetrazole が、窒素の脱離を伴って、nitrile imine に変換される反応である (**Figure 2-8**)^{37,38}。Nitrile

imine は、1,3-双極子としても知られている化合物であるが、生理的条件下においては、主にカルボン酸からの求核攻撃を受けた後、1,5-アシルシフトを経ることで、hydrazide に変換される³⁹。また、nitrile imine は水系溶媒中で短寿命な活性種であるため、最近、薬物に tetrazole を付加することによって、photoaffinity labeling へ応用できることも確認されている⁴⁰。

著者は、UV 照射ではなく、光触媒からの energy transfer により tetrazole を励起することができれば、優れた近接依存的ラベル化剤になるのではないかと考えた。Energy transfer とは、光照射によって三重項状態に励起された光触媒が、自身が基底状態に戻る際に基質にエネルギーを渡して、基質を三重項状態に励起する反応である⁴¹。先行研究にて、tetrazole から nitrile imine へ変換される際には、三重項励起状態を経ることが既に明らかになっているため、energy transfer によって tetrazole を三重項励起状態に誘導することができれば、自発的に nitrile imine へ変換されると考えられる^{42,43}。また、nitrile imine は生理的条件下において短寿命な活性種であるため、上記メカニズムに従って光触媒依存的に nitrile imine を生成することができれば、光触媒周辺のみ nitrile imine が存在することになる。したがって、MR1 テトラマーと光触媒をコンジュゲートした分子を作製すれば、抗原/MR1 複合体と相互作用する細胞上のタンパク質に含まれる Glu 側鎖や Asp 側鎖のカルボン酸を選択的にラベル化すると考えられる (Figure 2-9)。Glu や Asp はタンパク質中の存在量が多く、かつこれらアミノ酸残基に含まれる側鎖カルボン酸はタンパク質表面に露出していることが多いため、効率的に細胞のラベル化が進行するものと期待される。

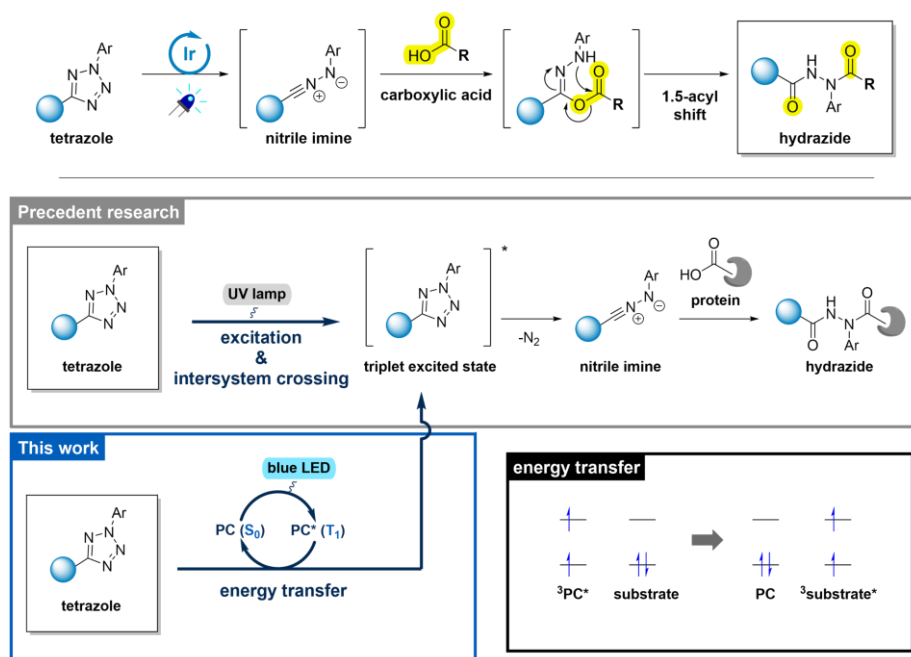


Figure 2-8. Photodegradation of tetrazoles.

Nitrile imine を利用する本手法は、カルベンを用いる方法と比較して、ラベル化剤の寿命が十分に長いこと、効率的に細胞をラベル化できると考えられる。また、フェノキシラジカルを用いる方法と比較すると、本手法は、毒性の低い窒素のみが副生する反応であるため、より生体適合性が高い手法になりうる。一方で、光照射のみでは nitrile imine が発生せず、光触媒依存的に nitrile imine を生成するような条件はこれまでに確立されていない。それを踏まえた上で、著者は、tetrazole を光触媒

依存的に nitrile imine へ変換する反応の開発に取り組んだ。

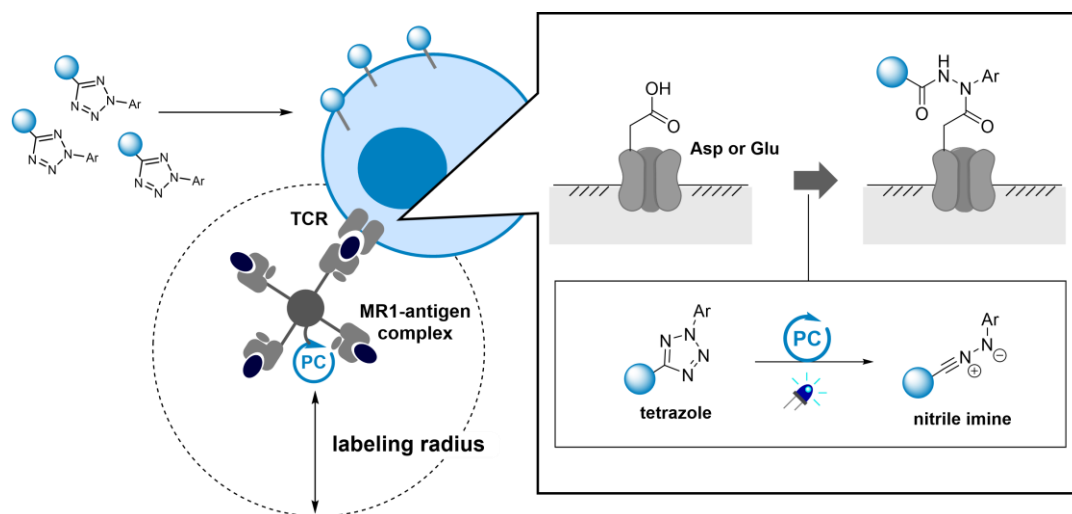


Figure 2-9. Labeling strategy using photocatalytically generated nitrile imine.

第二項 Tetrazole の触媒的光分解における反応性の検討

最初に、光触媒からの energy transfer を受けて、nitrile imine へ変換される tetrazole 誘導体を探索することとした。10 当量の 3-phenyl propionic acid、及び 2 mol% の $\text{Ir}[\text{dF}(\text{CF}_3)\text{ppy}]_2(\text{dtbpy})\text{PF}_6$ 存在下、様々な 2,5 二置換 tetrazole に対して光照射を行った (Table 2-3)。まず、2 位と 5 位にフェニル基を有する tetrazole **55a** を用いた際には、目的の化合物の生成は確認されなかった。続いて、UV 照射により光分解することが知られている **55b** に対し光反応を試みたところ、37% の収率で目的のカルボン酸付加体を取得することができた³⁹。本反応を光触媒非存在下で行ったところ、目的の化合物の生成は全く確認されなかったことから、光触媒依存的に反応が進行していることが明らかになった。

続いて、より効率的にカルボン酸と反応する tetrazole 誘導体の探索を行った。一般に、energy transfer を円滑に進行させるためには、エネルギー移動を受ける基質の三重項励起エネルギーが、供与体である光触媒の三重項励起エネルギーよりも十分に低いことが重要な要素の一つであると知られている⁴¹。また、過去の研究にて、2 位の置換基の共役系を拡張することによって、tetrazole の三重項励起エネルギーが低下することが報告されている³⁸。そこで、共役系を拡張させた様々な tetrazole **55c-g** を合成し、その反応性を調査した。まず、2 位に 1-ナフチル基を有する tetrazole **55c** を用いると、70% 収率で所望のカルボン酸付加体 **57c** を与えた。また、1-ナフチル基の代わりに、2 位に 5-イソキノリニル基を有する tetrazole **55d** でも同等の収率で目的の化合物 **57d** が得られた。一方で、これらの基質に対し、光触媒非存在下で光照射しても、目的物はほとんど得られなかった。また、2 位に 8-キノリニル基を有する tetrazole **55e** や、5 位のフェニル基をアミドに変換した tetrazole **55f** では大きく収率が低下した。2 位ではなく、5 位の置換基の共役系を拡張させた tetrazole **55g** でも、目的の化合物は得られなかった。

以上の結果から、2 位に 1-ナフチル基または 5-イソキノリニル基、5 位にフェニル基を有する tetrazole は、光触媒依存的に効率的にカルボン酸と反応することが明らかとなった。

Table 2-3. Exploration of tetrazoles that photodegrade in the presence of photocatalyst under blue LED irradiation.

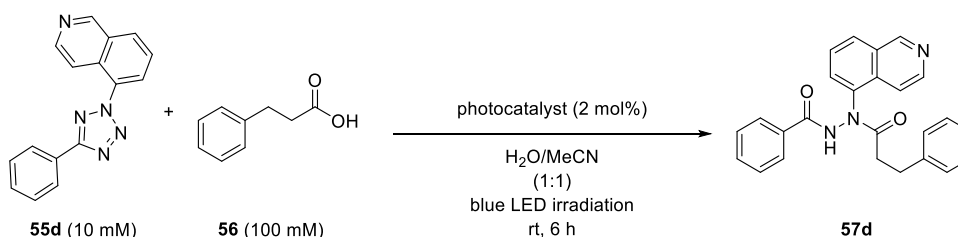
55 (10 mM)	56 (100 mM)		57
compound ^a	R	Ar	yield (%) ^{b, c}
55a			ND
55b			37 (ND)
55c			70 (trace)
55d ^d			73 (trace)
55e			trace
55f ^d			ca. 26
55g			trace
Ir[dF(CF₃)ppy]₂(dtbpy)PF₆			

^a Reaction conditions: The mixture of substrate (0.200 mmol), 3-phenylpropionic acid (2.00 mmol) and Ir[dF(CF₃)ppy]₂(dtbpy)PF₆ (2 mol%) in H₂O/MeCN (1:1, 20.0 mL) was irradiated with two 40 W blue LED lights for 6 h. ^b Isolated yields. ^c Results in the absence of photocatalyst are shown in parentheses. ^d Reaction was conducted for 4.5 h. ND = Not detected; ppy = 2-phenylpyridine; dtbpy = 4,4'-di-*tert*-butyl-2,2'-bipyridyl.

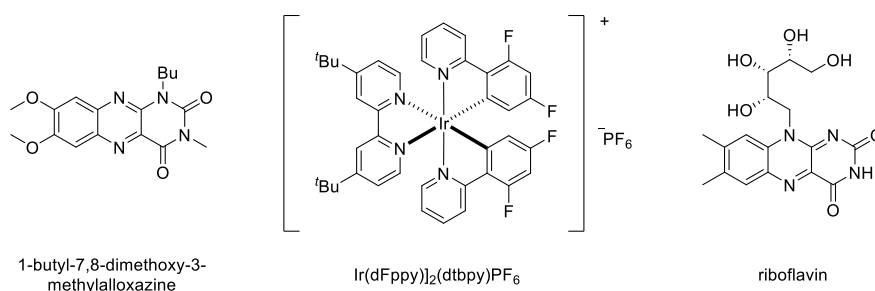
続いて、光触媒の検討を行った (Table 2-4)。65.1 kcal/mol から 46.0 kcal/mol まで様々な三重項励

起エネルギーを有する光触媒存在下、tetrazole **55d** と 3-phenyl propionic acid の反応を試みた。まず、Ir[dF(CF₃)ppy]₂(dtbpy)PF₆ よりも高い三重項励起エネルギーを有する 1-butyl-7,8-dimethoxy-3-methylalloxazine を用いて光反応を行ったところ、目的の化合物はほとんど得られなかった (entry 2)。続いて、Ir[dF(CF₃)ppy]₂(dtbpy)PF₆ より低い 55.4 kcal/mol の三重項励起エネルギーを有する Ir(dFppy)₂(dtbpy)PF₆ を用いて光反応を行ったところ、60%の収率で **57d** の生成が確認された (entry 3)。一方で、より低い三重項励起エネルギーを有する riboflavin や Ru(bpy)₃Cl₂ では目的の化合物は得られなかった (entries 4,5)。以上の検討から、光触媒として Ir[dF(CF₃)ppy]₂(dtbpy)PF₆ を用いる条件を最適とすることにした。

Table 2-4. Investigation of optimal condition for the photocatalyst dependent photodegradation.



entry ^a	photocatalyst	E _T (kcal/mol)	yield (%)
1	Ir[dF(CF ₃)ppy] ₂ (dtbpy)PF ₆	60.1	73
2	1-butyl-7,8-dimethoxy-3-methylalloxazine	65.1	trace
3	Ir(dFppy) ₂ (dtbpy)PF ₆	55.4	60
4	riboflavin	50.0	trace
5	Ru(bpy) ₃ Cl ₂	46.0	ND



^a Reaction conditions: The solution of substrate (0.200 mmol), 3-phenylpropionic acid (2.00 mmol) and photocatalyst (2 mol%) in 20.0 mL H₂O/MeCN (1:1) was irradiated with two 40 W blue LED lights for 6 h. ND = Not detected; ppy = 2-phenylpyridine; dtbpy = 4,4'-di-*tert*-butyl-2,2'-bipyridyl; bpy = 2,2'-bipyridine.

第三項 基質適用範囲の検討

続いて、上記最適条件を用いて、nitrile imine が付加するカルボン酸基質の適用範囲を検討した (Figure 2-10)。中程度の長さの飽和脂肪酸との反応では良好な収率で目的の化合物 **59a** が得られた。立体的にかさ高い pivalic acid を用いた場合には、収率は低下したものの目的のカルボン酸付加体 **59b**

が得られた。続いて、芳香族カルボン酸とのカップリングを試みた。*p*-toluic acid をカルボン酸として用いた場合には、中程度の収率で目的物 **59c** を与えた一方で、4-methoxy benzoic acid やニコチン酸を用いた場合には収率は大きく低下した (**59d,e**)。

次いで、いくつかの天然アミノ酸誘導体に含まれるカルボン酸の反応を検討した。まず、無保護の側鎖カルボン酸を有するグルタミン酸誘導体やアスパラギン酸誘導体を用いて光反応を行ったところ、中程度から良好な収率で目的の化合物 **59f,g** が得られた。しかし、無保護のアミノ基を有する β -アラニンカルボン酸として用いた場合には、複雑な混合物となり、目的の化合物がわずかに検出されるのみであった (**59h**)。これは、アミノ基と nitrile imine の間で副反応が進行したためと考えている⁴⁴。

以上の検討から、本反応によりカップリングできるカルボン酸の構造には一定の制限があることがわかった。一方で、適切に保護されたグルタミン酸やアスパラギン酸の側鎖カルボン酸とは効率的に反応できることから、タンパク質の標識に利用できる可能性が高いことが示された。

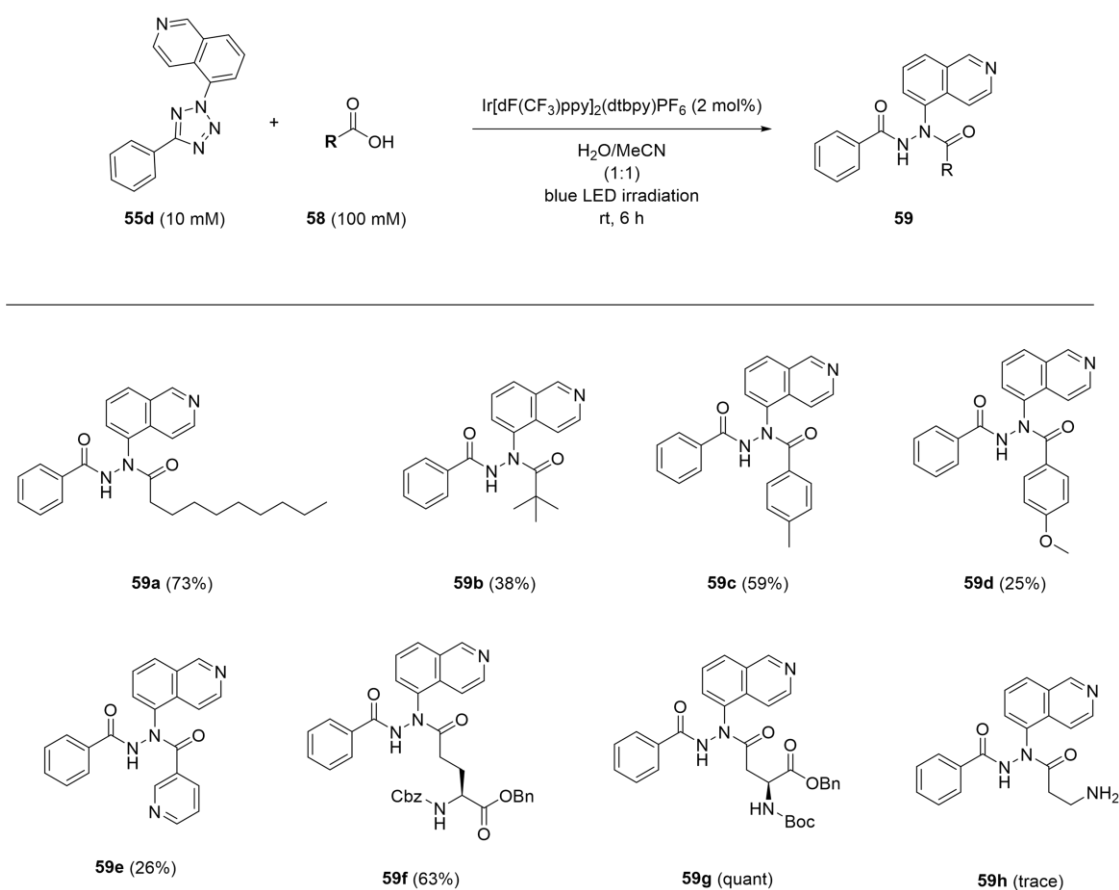


Figure 2-10. Scope of carboxylic acids.

第四項 タンパク質に対するラベル化反応の検討

最後に、本反応をタンパク質の標識に応用できるか検討した。まず、タンパク質の標識に先立って、希薄条件下でも効率的に光分解し、カルボン酸と反応できるか調査することとした (**Figure 2-11**)。100 μM の tetrazole **55d**、10 mM の 3-phenylpropionic acid、10 μM の $\text{Ir}[\text{dF}(\text{CF}_3)\text{ppy}]_2(\text{dtbbpy})\text{PF}_6$ を用いて光反応を行った。その結果、30 分で反応はほぼ完結し、目的の化合物が 46% の HPLC 収率で

得られた (**Figure 2-11a**)。一方で、光触媒非存在下では、目的の反応は進行しなかった (**Figure 2-11b**)。以上の実験から、本反応は希薄条件下でも効率よく進行し、所望のカルボン酸付加体が得られることが明らかとなった。

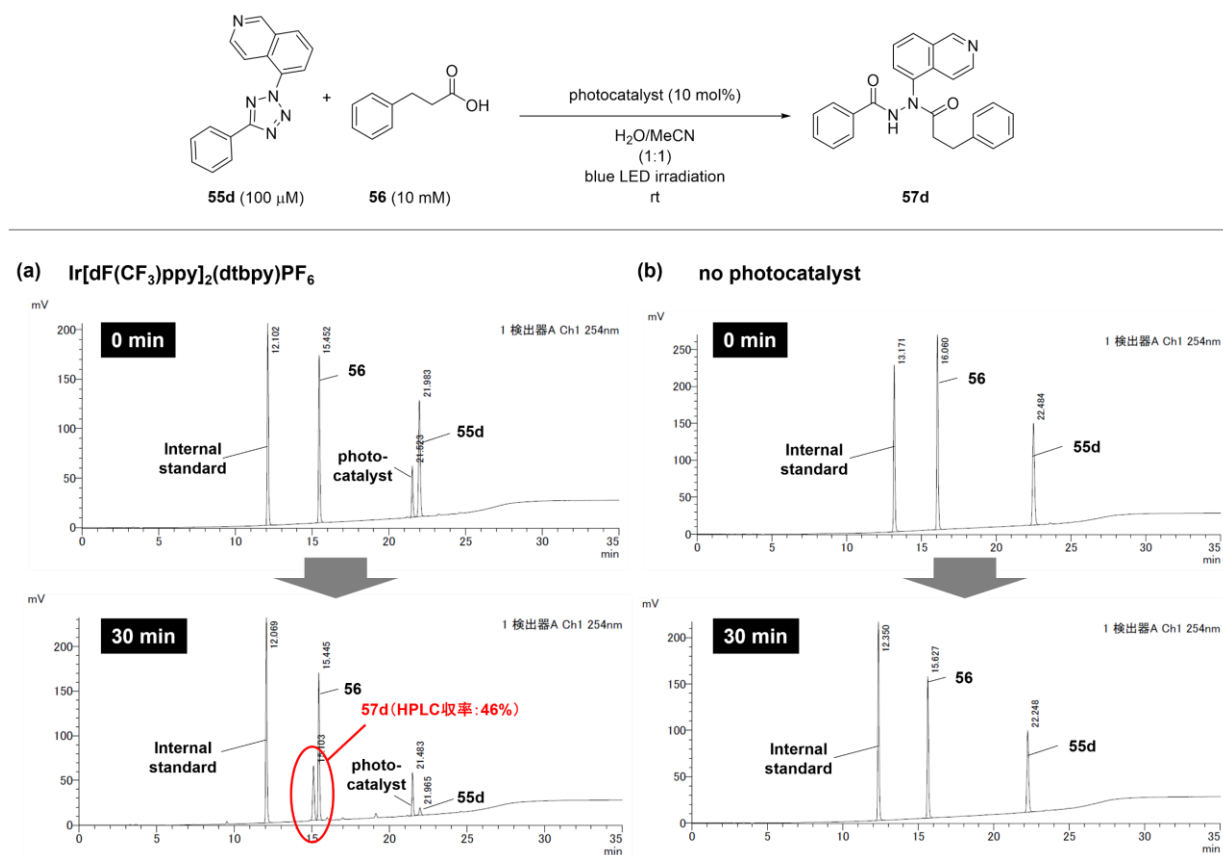


Figure 2-11. Photocatalyst-dependent labeling of carboxylic acid in the dilute aqueous solution. Internal standard: *p*-toluamide.

続いて、タンパク質への標識を試みることにした。光触媒存在下、14 個の酸性アミノ酸（アスパラギン酸とグルタミン酸）を有する chymotrypsinogen A (25 kDa) に対して、ビオチンと連結した tetrazole **60** を用いて標識し、その標識量をウエスタンブロッティングにより評価した (**Figure 2-12**)。その結果、光触媒非存在下では反応が進行していないのに対して、光触媒存在下においてラベル化反応が十分に進行していることが確認された。

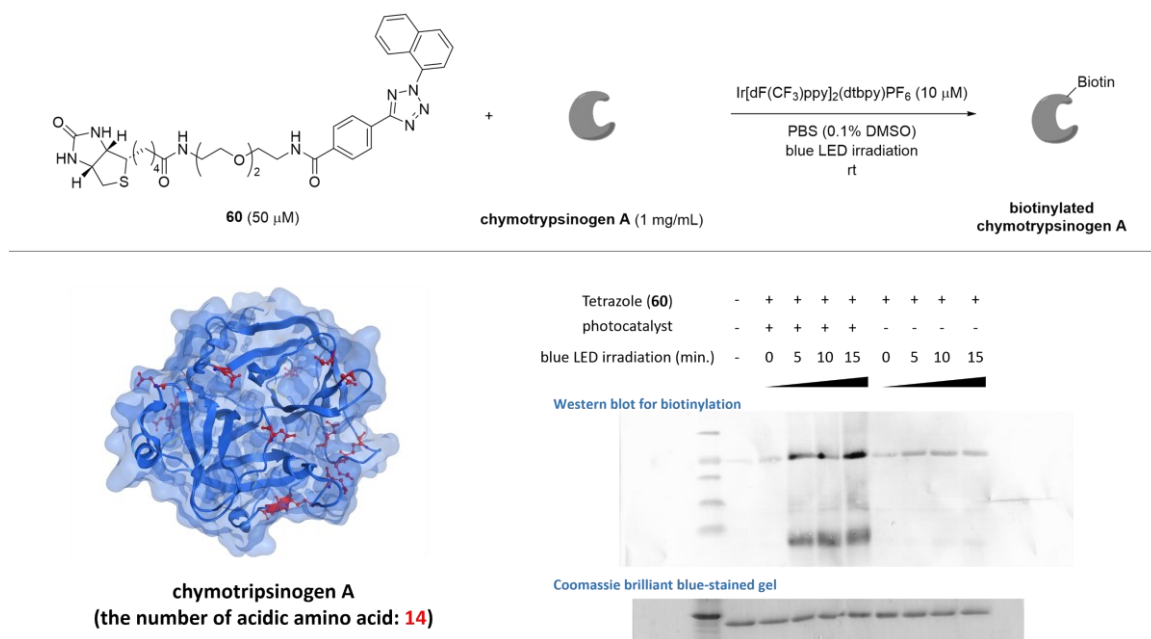


Figure 2-12. Photocatalytic labeling of chymotrypsinogen A (PDB ID: 1EX3).

最後に、同様の反応条件を用いて、分子量や酸性アミノ酸の数が異なる他のタンパク質も標識できるか調査した。光触媒、tetrazole **60** 存在下、GST、aldolase、BSA の3種類のタンパク質に対し光照射を行ったところ、いずれのタンパク質でも、照射時間依存的にラベル化反応の進行が確認された (**Figure 2-13**)。以上より、本反応は様々なタンパク質を標識できることが明らかになった。

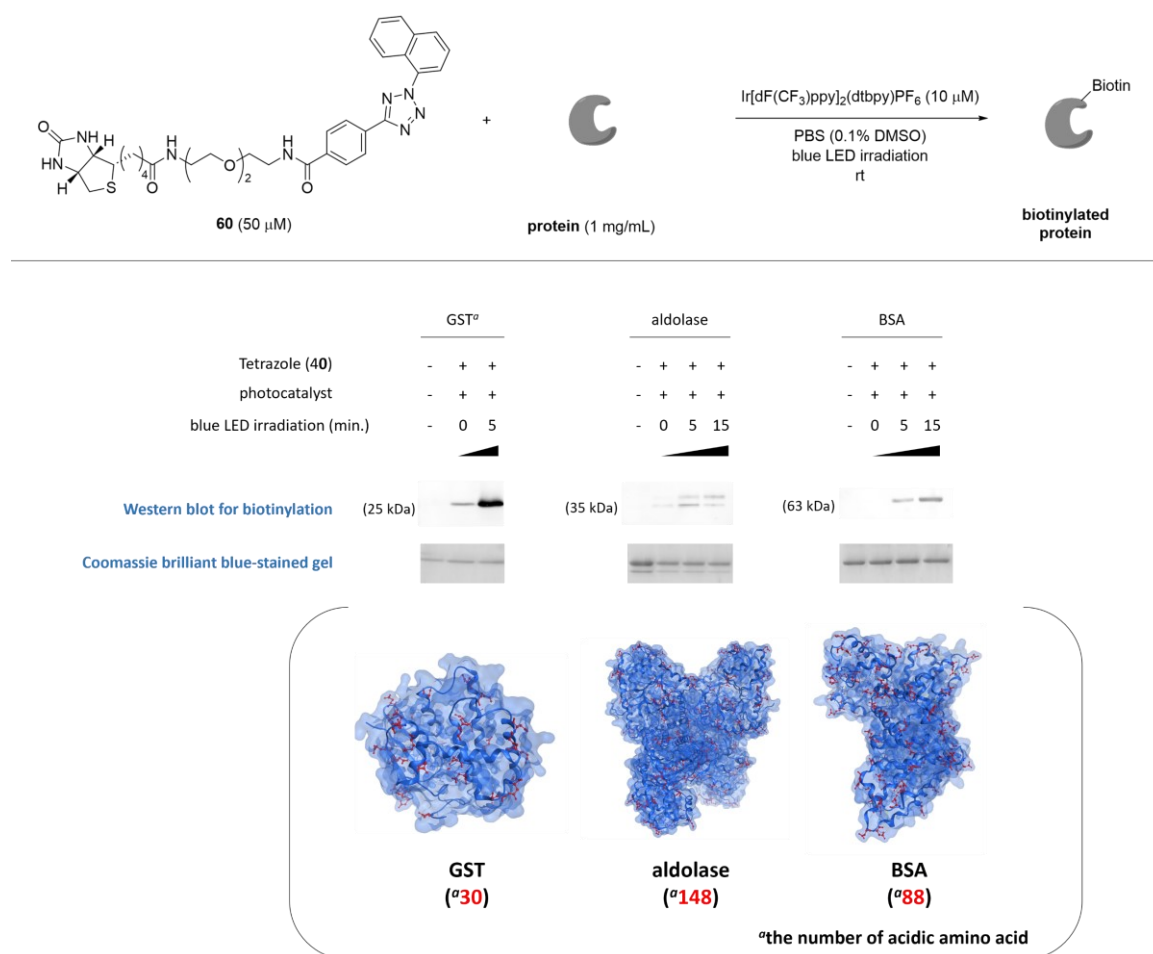


Figure 2-13. Photocatalytic labeling of GST (PDB ID: 1EX3), aldolase (PDB ID: 7KA4), BSA (PDB ID: 4F5S).
^aProtein concentration: 0.275 mg/mL.

第五項 小括

著者は、新規 MR1T 細胞検出法の開発を見据えて、可視光応答性光触媒反応の開発を行った。検討の結果、ある種の **tetrazole** が光触媒依存的に **nitrile imine** へ変換され、種々のカルボン酸と反応して **hydrazide** を形成できることが明らかとなった (**Figure 2-14**)。また、本反応は様々なタンパク質の標識にも応用可能であることが示された。本反応は短時間で進行するとともに、毒性化合物を副生しないため、従来法と比較して、より生体適合性の高い手法となることが期待される。

一方で、本反応を用いて細胞上に発現しているタンパク質をラベル化できるか、また MR1 テトラマー/光触媒コンジュゲートを用いて標的細胞選択的にラベル化できるか（生理的条件下適度な寿命を持つか）については、今後検討の必要がある。本反応が、MR1T 細胞の新たな検出法として応用され、MR1T 細胞の理解に貢献することが期待される。

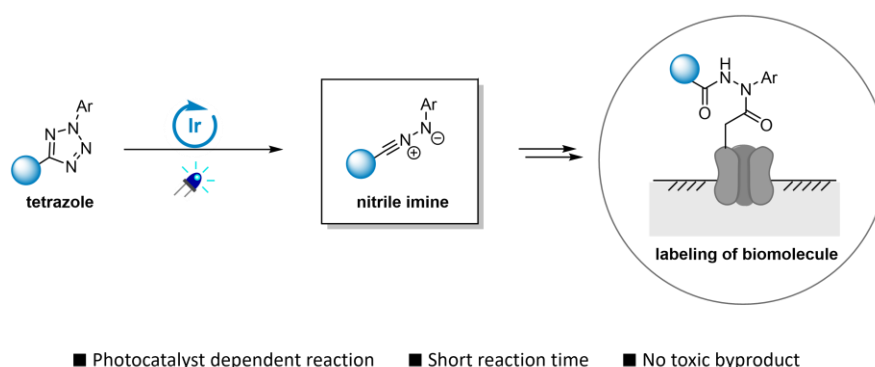


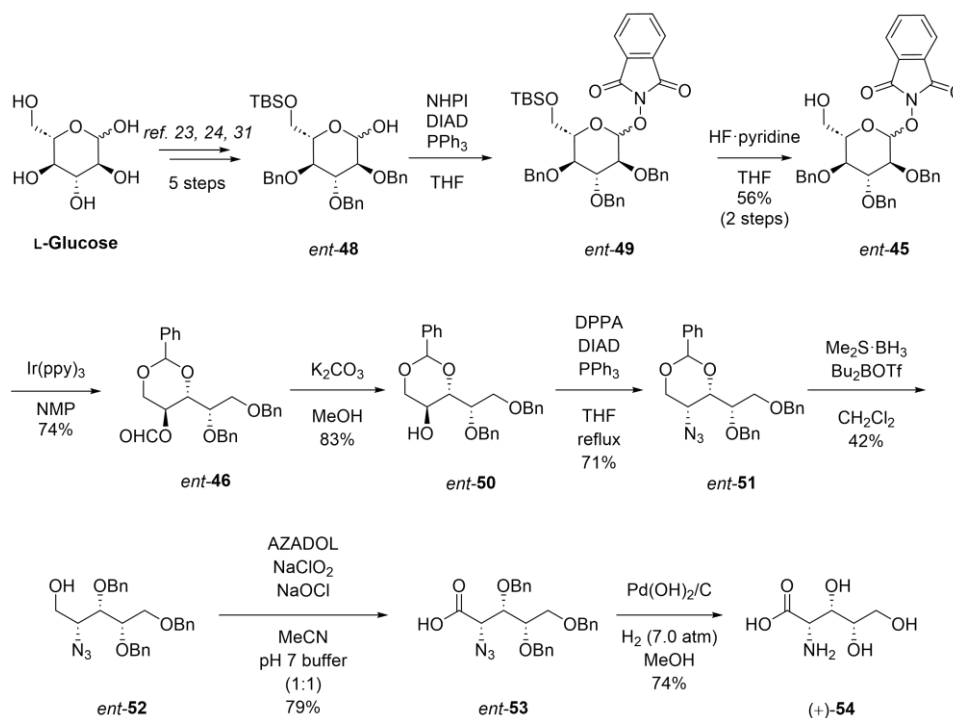
Figure 2-14. Summary of Section 2, Chapter 2.

実験項

Experiments in section 1

General information

^1H NMR spectra were recorded using a JEOL ECA-500 spectrometer at 500 MHz frequency. Chemical shifts are reported in δ (ppm) relative to Me_4Si (in CDCl_3) and residual H_2O (in D_2O) as internal standard. ^{13}C NMR spectra were recorded using a JEOL ECA-500 and referenced to the residual CHCl_3 signal (in CDCl_3) and MeCN (in D_2O). ^1H and ^{13}C NMR spectra using D_2O as solvent were recorded at 25 °C. IR spectra were obtained on a JASCO FT/IR-4100 spectrometer. Exact mass (HRMS) spectra were recorded on a Shimadzu LC-ESI-IT-TOF-MS equipment (ESI). Optical rotations were measured with a JASCO P-1020 polarimeter. Column chromatography was performed using flash chromatography on a Wakogel C-300E (Wako) or Biotage Isolera flash purification system on Sfar Silica D (Biotage). For thin layer chromatography, silica gel 70 F₂₅₄ plate was employed. An oil bath was used for conventional heating. For photoredox reaction in batch manner, A160WE Tuna Blue (40W, Kessil) was utilized. Microflow photoredox reactions were carried out by using a photoreactor, MiChS L (2 mm width, 0.5 mm depth, 3m length, MiChS Co., Ltd.) and light source, lek-042-b (100W, Artpro Co., Ltd.). Compounds **41**⁸, **42**⁸, **48**²⁴ were known. The compound **47** is commercially available.



Scheme 2-S1. Synthesis of (+)-polyoxamic acid.

(2*R*,3*S*,4*R*)-1,4,5-Tris(benzyloxy)-3-hydroxypentan-2-yl Formate (**43**) and (2*R*,3*R*,4*R*)-1,2,5-Tris(benzyloxy)-4-hydroxypentan-3-yl Formate (**44**)

The solution of **41** (26.9 mg, 0.0392 mmol) and Ir(ppy)₃ (1.0 mg, 0.0015 mmol) in NMP (1.3 mL) was stirred under Ar and irradiated with two blue LED lamps (Kessil) 5 cm away from the reaction vessel at room

temperature. After being stirred for 23 h at this temperature, the mixture was diluted with H₂O. The whole was extracted with Et₂O, washed with brine and dried over MgSO₄. After concentration *in vacuo*, the residue was purified by thin-layer chromatography over silica gel with toluene–EtOAc (7:1) to give the mixture of **43** and **44** (10.5 mg, 59% yield, **43**:**44** = 65:35): yellow oil; IR (neat cm⁻¹): 3464 (OH), 1725 (C=O); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 2.68–2.74 (m, 1H), 3.47 (dd, *J* = 5.7, 9.7 Hz, 0.35H), 3.51–3.57 (m, 0.7H), 3.62 (dd, *J* = 5.7, 9.7 Hz, 0.35H), 3.68–3.82 (m, 3.25H), 3.95–3.99 (m, 0.65H), 4.06–4.11 (m, 0.7H), 4.49–4.58 (m, 4.65H), 4.64 (d, *J* = 11.5 Hz, 0.35H), 4.71 (d, *J* = 10.9 Hz, 0.65H), 4.74 (d, *J* = 11.5 Hz, 0.35H), 5.15–5.17 (m, 0.65H), 5.23 (dd, *J* = 8.0, 1.7 Hz, 0.35H), 7.23–7.37 (m, 15H), 7.98 (s, 0.65H), 8.03 (s, 0.35H); ¹³C{¹H} NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 68.6, 68.7, 69.4, 70.1, 70.3, 70.4, 72.1, 72.4, 72.8, 73.3, 73.48, 73.51, 73.55, 73.6, 75.0, 75.8, 127.6–128.4, 137.57, 137.62, 137.71, 137.74, 137.78, 137.81, 160.31, 160.34; HRMS (ESI-TOF) *m/z*: [M + Na]⁺ calcd for C₂₇H₃₀NaO₆, 473.1935; found, 473.1932.

2-{[(3*R*,4*S*,5*R*,6*R*)-3,4,5-Tris(benzyloxy)-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl]oxy}isoindoline-1,3-dione (**45**)

To a stirred solution of **48** (4.16 g, 7.37 mmol), NHPI (4.81 g, 29.5 mmol) and PPh₃ (7.73 g, 29.5 mmol) in THF (73.7 mL) was slowly added DIAD (1.9 M solution in toluene; 16 mL, 30 mmol) at 0 °C under argon. After being stirred for 22 h at room temperature, the mixture was concentrated *in vacuo* to give a residue, which was purified by flash chromatography over silica gel with *n*-hexane–EtOAc (8:1) to give crude **49** containing inseparable mixtures (5.14 g), which was used without further purification. To a stirred solution of **49** (4.67 g) in THF (132 mL) was added HF·pyridine (7.9 mL, 0.28 mol) at 0 °C under argon. After being stirred for 4.5 h at room temperature, the mixture was diluted with saturated aqueous NaHCO₃. The whole was extracted with Et₂O, washed with brine and dried over MgSO₄. After concentration *in vacuo*, the residue was purified by flash chromatography over silica gel with *n*-hexane–EtOAc (2:1) to give **45** (2.68 g, 67% yield from **48**, α:β = 1:3 anomeric mixture): white amorphous; IR (neat cm⁻¹): 3520 (OH), 1607 (C=O); ¹H NMR (500MHz, CDCl₃): δ 1.48 (dd, *J* = 8.0, 4.0 Hz, 0.25H), 2.65 (dd, *J* = 6.9, 6.9 Hz, 0.75H), 3.53–3.55 (m, 0.75H), 3.62 (dd, *J* = 9.7, 9.7 Hz, 0.25H), 3.70–3.85 (m, 4.75H), 4.15 (dd, *J* = 9.7, 9.7 Hz, 0.25H), 4.66–4.72 (m, 2H), 4.77 (d, *J* = 11.5 Hz, 0.75H), 4.80–4.88 (m, 1.25H), 4.91–4.94 (m, 1H), 5.04 (d, *J* = 10.9 Hz, 0.25H), 5.09–5.15 (m, 1.5H), 5.54 (d, *J* = 4.0 Hz, 0.25H), 7.26–7.38 (m, 13H), 7.48 (d, *J* = 6.9 Hz, 1.5H), 7.54 (d, *J* = 6.9 Hz, 0.5H), 7.76–7.81 (m, 2H), 7.85–7.91 (m, 2H); ¹³C{¹H} NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 61.1, 61.7, 72.6, 73.0, 74.5, 74.9, 75.0, 75.2, 75.8, 76.0, 76.2, 77.2, 78.6, 80.0, 81.1, 93.5, 102.3, 108.1, 123.5, 123.7, 127.6–128.6, 134.5, 134.6, 137.4, 137.69, 137.73, 138.0, 138.2, 138.5, 163.2, 163.3; HRMS (ESI-TOF) *m/z*: [M + Na]⁺ calcd for C₃₅H₃₃NNaO₈, 618.2098; found, 618.2102.

2-{[(3*S*,4*R*,5*S*,6*S*)-3,4,5-Tris(benzyloxy)-6-(hydroxymethyl)tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl]oxy}isoindoline-1,3-dione (*ent*-**45**)

By a procedure identical with that described for synthesis of **45** from **48**, the glycoside *ent*-**48** (1.56 g, 2.76 mmol) was converted into *ent*-**45** (923 mg, 56% yield from *ent*-**48**, α:β = 1:3 anomeric mixture): white amorphous; ¹H NMR (500MHz, CDCl₃): δ 1.48 (dd, *J* = 8.0, 4.0 Hz, 0.25H), 2.70 (dd, *J* = 6.9, 6.9 Hz, 0.75H),

3.53–3.54 (m, 0.75H), 3.62 (dd, $J = 9.7, 9.7$ Hz, 0.25H), 3.71–3.84 (m, 4.75H), 4.14 (dd, $J = 9.7, 9.7$ Hz, 0.25H), 4.66–4.72 (m, 2H), 4.77 (d, $J = 11.5$ Hz, 0.75H), 4.82–4.86 (m, 1.25H), 4.91–4.93 (m, 1H), 5.04 (d, $J = 10.9$ Hz, 0.25H), 5.09–5.15 (m, 1.5H), 5.54 (d, $J = 4.0$ Hz, 0.25H), 7.28–7.38 (m, 13H), 7.48 (d, $J = 6.9$ Hz, 1.5H), 7.54 (d, $J = 6.9$ Hz, 0.5H), 7.76–7.81 (m, 2H), 7.85–7.90 (m, 2H); HRMS (ESI-TOF) m/z : $[M + Na]^+$ calcd for $C_{35}H_{33}NNaO_8$, 618.2098; found, 618.2100.

(4*S*,5*R*)-4-[(*R*)-1,2-Bis(benzyloxy)ethyl]-2-phenyl-1,3-dioxan-5-yl Formate (46)

The solution of **45** (60.1 mg, 0.101 mmol) and Ir(ppy)₃ (3.3 mg, 0.0050 mmol) in NMP (2.0 mL) was stirred under Ar and irradiated with two blue LED lamps (Kessil) 5 cm away from the reaction vessel at room temperature. After being stirred for 24 h at this temperature, the mixture was diluted with H₂O. The whole was extracted with Et₂O, washed with brine and dried over MgSO₄. After concentration *in vacuo*, the residue was purified by flash chromatography over silica gel with *n*-hexane–EtOAc (7:1) to give **46** (28.4 mg, 63% yield): white solid; mp 60–61 °C; $[\alpha]_D^{24} -68.5$ (c 0.58, CHCl₃); IR (neat cm⁻¹): 1719 (C=O); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 3.59 (dd, $J = 9.7, 9.7$ Hz, 1H), 3.73–3.85 (m, 3H), 4.00 (dd, $J = 9.7, 1.7$ Hz, 1H), 4.48–4.55 (m, 3H), 4.59 (d, $J = 12.0$ Hz, 1H), 4.72 (d, $J = 11.5$ Hz, 1H), 5.21 (ddd, $J = 9.7, 9.7, 5.1$ Hz, 1H), 5.46 (s, 1H), 7.26–7.37 (m, 13H), 7.40–7.44 (m, 2H), 7.75 (s, 1H); ¹³C {¹H} NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 62.6, 67.7, 68.2, 72.7, 73.45, 73.48, 78.0, 101.5, 126.2–128.9, 137.1, 137.8, 138.0, 159.4; HRMS (ESI-TOF) m/z : $[M + Na]^+$ calcd for $C_{27}H_{28}NaO_6$, 471.1778; found, 471.1780.

(4*R*,5*S*)-4-[(*S*)-1,2-Bis(benzyloxy)ethyl]-2-phenyl-1,3-dioxan-5-yl Formate (*ent*-46)

By a procedure identical with that described for synthesis of **46** from **45**, the glycoside *ent*-**45** (788 mg, 1.32 mmol) was converted into *ent*-**46** (437 mg, 74% yield): white solid; $[\alpha]_D^{26} +70.4$ (c 0.16, CHCl₃); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 3.61 (dd, $J = 9.7, 9.7$ Hz, 1H), 3.76–3.83 (m, 3H), 4.00 (dd, $J = 9.7, 1.7$ Hz, 1H), 4.49–4.54 (m, 3H), 4.59 (d, $J = 12.0$ Hz, 1H), 4.72 (d, $J = 11.5$ Hz, 1H), 5.21 (ddd, $J = 9.7, 9.7, 5.1$ Hz, 1H), 5.47 (s, 1H), 7.27–7.36 (m, 13H), 7.42–7.43 (m, 2H), 7.75 (s, 1H); HRMS (ESI-TOF) m/z : $[M + Na]^+$ calcd for $C_{27}H_{28}NaO_6$, 471.1778; found, 471.1780.

General Procedure for Visible-Light-Mediated Photocatalytic β -Scission and 1,5-Hydrogen Atom Transfer Using a Flow System

To a solution of **45** (339 mg, 0.569 mmol) in NMP (11.4 mL) was added Ir(ppy)₃ (7.46 mg, 0.0114 mmol) under Ar. The mixture was pumped into a flow reactor (2 mm width, 0.5 mm depth, 3 m length, MiChS Co., Ltd.) at room temperature by a syringe pump at a flow rate 3.0 mL/h (residence time: 1.0 h) and irradiated with blue LED lamp (Artpro) 5 cm away from the reaction vessel. The product was collected into a Graduated cylinder. The mixture was collected for 4.0 mL in total, and diluted with H₂O. The whole was extracted with Et₂O, washed with brine and dried over MgSO₄. After concentration *in vacuo*, the residue was purified by flash chromatography over silica gel with gradient 8 to 40% EtOAc in *n*-hexane to give **46** as a white solid (58.3 mg, 65% yield).

(4*R*,5*R*)-4-[(*R*)-1,2-Bis(benzyloxy)ethyl]-2-phenyl-1,3-dioxan-5-ol (50**)**

To a stirred solution of **46** (373 mg, 0.832 mmol) in MeOH (11 mL) was added K₂CO₃ (230 mg, 1.66 mmol) at room temperature. After being stirred for 30 min at this temperature, the mixture was diluted with 1M HCl. The whole was extracted with Et₂O, washed with brine and dried over MgSO₄. After concentration *in vacuo*, the residue was purified by flash chromatography over silica gel with *n*-hexane–EtOAc (5:1) to give **50** (308 mg, 88% yield): white solid; mp 80–81 °C; [α]_D²⁴ –25.7 (*c* 0.99, CHCl₃); IR (neat cm^{–1}): 3450 (OH); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 2.83 (d, *J* = 2.9 Hz, 1H), 3.56 (dd, *J* = 10.3, 10.3 Hz, 1H), 3.76–3.79 (m, 1H), 3.81 (dd, *J* = 10.3, 5.7 Hz, 1H), 3.86–3.93 (m, 2H), 3.95 (dd, *J* = 9.2, 4.6 Hz, 1H), 4.27 (dd, *J* = 10.3, 5.7 Hz, 1H), 4.56 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H), 4.60 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H), 4.67 (d, *J* = 11.5 Hz, 1H), 4.83 (d, *J* = 11.5 Hz, 1H), 5.44 (s, 1H), 7.28–7.38 (m, 13H), δ 7.42–7.44 (m, 2H); ¹³C {¹H} NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 62.4, 69.4, 70.8, 73.1, 73.5, 77.1, 80.8, 101.0, 126.1–128.9, 137.5, 137.8, 138.0; HRMS (ESI-TOF) *m/z*: [M + H]⁺ calcd for C₂₆H₂₉O₅, 421.2010; found, 421.2009.

(4*S*,5*S*)-4-[(*S*)-1,2-Bis(benzyloxy)ethyl]-2-phenyl-1,3-dioxan-5-ol (*ent*-50**)**

By a procedure identical with that described for synthesis of **50** from **46**, *ent*-**46** (868 mg, 1.94 mmol) was converted into *ent*-**50** (680 mg, 83% yield): white solid; [α]_D²⁶ +22.9 (*c* 0.25, CHCl₃); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 2.82 (d, *J* = 2.9 Hz, 1H), 3.56 (dd, *J* = 10.3, 10.3 Hz, 1H), 3.77–3.80 (m, 1H), 3.82 (dd, *J* = 10.3, 5.7 Hz, 1H), 3.86–3.93 (m, 2H), 3.96 (dd, *J* = 9.2, 4.6 Hz, 1H), 4.28 (dd, *J* = 10.3, 5.7 Hz, 1H), 4.56 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H), 4.60 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H), 4.67 (d, *J* = 11.5 Hz, 1H), 4.82 (d, *J* = 11.5 Hz, 1H), 5.45 (s, 1H), 7.28–7.38 (m, 13H), 7.42–7.44 (m, 2H); HRMS (ESI-TOF) *m/z*: [M + Na]⁺ calcd for C₂₆H₂₈NaO₅, 443.1829; found, 443.1829.

(4*R*,5*S*)-5-Azido-4-[(*R*)-1,2-bis(benzyloxy)ethyl]-2-phenyl-1,3-dioxane (51**)**

To a stirred solution of **50** (560 mg, 1.33 mmol), DPPA (0.84 mL, 3.9 mmol) and PPh₃ (1.03 g, 3.93 mmol) in THF (78 mL) was slowly added DIAD (1.9 M solution in toluene; 2.1 mL, 3.9 mmol) at 0 °C under argon. After being refluxed for 7.5 h, the mixture was concentrated *in vacuo* to give a residue, which was purified by flash chromatography over silica gel with *n*-hexane–EtOAc (7:1) and toluene–EtOAc (30:1) to give **51** (414 mg, 70% yield): colorless oil; [α]_D²⁵ +62.4 (*c* 0.99, CHCl₃); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 2.92–2.93 (m, 1H), 3.65 (dd, *J* = 10.9, 3.4 Hz, 1H), 3.71 (dd, *J* = 10.9, 2.3 Hz, 1H), 3.85–3.88 (m, 1H), 4.21 (dd, *J* = 12.6, 2.0 Hz, 1H), 4.38 (dd, *J* = 8.0, 1.7 Hz, 1H), 4.45 (dd, *J* = 12.6, 1.7 Hz, 1H), 4.50 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H), 4.61 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H), 4.69 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H), 4.75 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H), 5.66 (s, 1H), 7.22–7.41 (m, 13H), 7.51–7.53 (m, 2H); ¹³C {¹H} NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 53.4, 68.5, 70.6, 73.5, 73.7, 78.2, 81.0, 102.1, 126.2–129.1, 137.6, 137.8, 138.4; HRMS (ESI-TOF) *m/z*: [M + Na]⁺ calcd for C₂₆H₂₇N₃NaO₄, 468.1894; found, 468.1897.

(4*S*,5*R*)-5-Azido-4-[(*S*)-1,2-bis(benzyloxy)ethyl]-2-phenyl-1,3-dioxane (*ent*-51**)**

By a procedure identical with that described for synthesis of **51** from **50**, *ent*-**50** (680 mg, 1.62 mmol) was converted into *ent*-**51** (514 mg, 71% yield): colorless oil; [α]_D²⁶ –66.5 (*c* 1.20, CHCl₃); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 2.92–2.93 (m, 1H), 3.66 (dd, *J* = 10.9, 3.4 Hz, 1H), 3.71 (dd, *J* = 10.9, 2.3 Hz, 1H), 3.86–3.87 (m,

1H), 4.21 (dd, $J = 12.6, 2.0$ Hz, 1H), 4.38 (dd, $J = 8.0, 1.7$ Hz, 1H), 4.45 (dd, $J = 12.6, 1.7$ Hz, 1H), 4.50 (d, $J = 12.0$ Hz, 1H), 4.61 (d, $J = 12.0$ Hz, 1H), 4.69 (d, $J = 12.0$ Hz, 1H), 4.75 (d, $J = 12.0$ Hz, 1H), 5.67 (s, 1H), 7.23–7.41 (m, 13H), 7.52–7.53 (m, 2H); HRMS (ESI-TOF) m/z : $[M + Na]^+$ calcd for $C_{26}H_{27}N_3NaO_4$, 468.1894; found, 468.1891.

(2*S*,3*R*,4*R*)-2-Azido-3,4,5-tris(benzyloxy)pentan-1-ol (52)

To a stirred solution of **51** (367 mg, 0.824 mmol) in CH_2Cl_2 (23 mL) were added $BH_3 \cdot Me_2S$ (2.0 M solution in THF; 4.0 mL, 7.9 mmol) and Bu_2BOTf (1.0 M solution in CH_2Cl_2 ; 7.9 mL, 7.9 mmol) at 0 °C under argon. After being stirred for 30 min at this temperature, the mixture was diluted with saturated aqueous $NaHCO_3$. The whole was extracted with $CHCl_3$, washed with brine and dried over $MgSO_4$. After concentration *in vacuo*, the residue was purified by flash chromatography over silica gel with *n*-hexane–EtOAc (5:1) and toluene–EtOAc (13:1) to give **52** (169 mg, 46% yield): colorless oil; $[\alpha]_D^{24} -11.5$ (c 0.62, $CHCl_3$); IR (neat cm^{-1}): 3432 (OH); 1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ 1.95 (dd, $J = 6.3, 6.3$ Hz, 1H), 3.55–3.59 (m, 1H), 3.61–3.64 (m, 2H), 3.67 (dd, $J = 10.3, 5.2$ Hz, 1H), 3.72–3.76 (m, 2H), 3.82–3.85 (m, 1H), 4.51 (s, 2H), 4.57 (d, $J = 12.6$ Hz, 1H), 4.63–4.68 (m, 2H), 4.74 (d, $J = 12.6$ Hz, 1H), 7.29–7.38 (m, 15H); $^{13}C\{^1H\}$ NMR (125 MHz, $CDCl_3$): δ 62.4, 64.0, 69.1, 73.0, 73.4, 74.4, 78.0, 78.3, 127.7–128.5, 137.6, 137.8, 137.9; HRMS (ESI-TOF) m/z : $[M + Na]^+$ calcd for $C_{26}H_{29}N_3NaO_4$, 470.2050; found, 470.2055.

(2*R*,3*S*,4*S*)-2-Azido-3,4,5-tris(benzyloxy)pentan-1-ol (ent-52)

By a procedure identical with that described for synthesis of **52** from **51**, *ent*-**51** (335 mg, 0.752 mmol) was converted into *ent*-**52** (140 mg, 42% yield): colorless oil; $[\alpha]_D^{26} +13.2$ (c 0.21, $CHCl_3$); 1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ 1.98 (dd, $J = 6.3, 6.3$ Hz, 1H), 3.55–3.58 (m, 1H), 3.62–3.64 (m, 2H), 3.67 (dd, $J = 10.3, 5.2$ Hz, 1H), 3.72–3.75 (m, 2H), 3.83–3.84 (m, 1H), 4.51 (s, 2H), 4.57 (d, $J = 12.6$ Hz, 1H), 4.64–4.67 (m, 2H), 4.74 (d, $J = 12.6$ Hz, 1H), 7.30–7.35 (m, 15H); HRMS (ESI-TOF) m/z : $[M + Na]^+$ calcd for $C_{26}H_{29}N_3NaO_4$, 470.2050; found, 470.2049.

(2*R*,3*R*,4*R*)-2-Azido-3,4,5-tris(benzyloxy)pentanoic Acid (53)

To a stirred solution of **52** (169 mg, 0.378 mmol), AZADOL (11.8 mg, 0.0770 mmol) and $NaClO_2$ (219 mg, 2.42 mmol) in MeCN (4.4 mL) and pH 7.4 phosphate buffer (3.2 mL) was added $NaOCl$ solution (active chlorine 8.5–13.5 %; 1.0 mL) at room temperature under argon. After being stirred for 30 min at this temperature, the mixture was diluted with 1M HCl. The whole was extracted with CH_2Cl_2 , washed with brine and dried over $MgSO_4$. After concentration *in vacuo*, the residue was purified by flash chromatography over silica gel with *n*-hexane–EtOAc (1:1, 0.05% AcOH) to give **53** (127 mg, 72% yield): colorless oil; $[\alpha]_D^{25} -17.9$ (c 0.60, $CHCl_3$); IR (neat cm^{-1}): 3031 (OH), 1722 (C=O); 1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ 3.62 (dd, $J = 10.6, 4.6$ Hz, 1H), 3.71 (dd, $J = 10.6, 4.6$ Hz, 1H), 3.87–3.90 (m, 1H), 4.00 (d, $J = 3.4$ Hz, 1H), 4.21 (dd, $J = 5.7, 3.4$ Hz, 1H), 4.50 (d, $J = 12.0$ Hz, 1H), 4.54 (d, $J = 12.0$ Hz, 1H), 4.60–4.65 (m, 3H), 4.75 (d, $J = 11.5$ Hz, 1H), 7.23–7.36 (m, 15H); $^{13}C\{^1H\}$ NMR (125 MHz, $CDCl_3$): δ 61.4, 68.9, 73.3, 73.5, 74.8, 78.3, 79.7, 127.8–128.5, 137.3, 137.7, 137.8, 173.2; HRMS (ESI-TOF) m/z : $[M + Na]^+$ calcd for $C_{26}H_{27}N_3NaO_5$, 484.1843; found, 484.1844.

(2*S*,3*S*,4*S*)-2-Azido-3,4,5-tris(benzyloxy)pentanoic Acid (*ent*-53)

By a procedure identical with that described for synthesis of **53** from **52**, *ent*-**52** (140 mg, 0.312 mmol) was converted into *ent*-**53** (114 mg, 79% yield): colorless oil; $[\alpha]_D^{26} +13.6$ (*c* 2.37, CHCl₃); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 3.61 (dd, *J* = 10.6, 4.6 Hz, 1H), 3.71 (dd, *J* = 10.6, 4.6 Hz, 1H), 3.87–3.88 (m, 1H), 4.00 (d, *J* = 3.4 Hz, 1H), 4.21 (dd, *J* = 5.7, 3.4 Hz, 1H), 4.50 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H), 4.53 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H), 4.62–4.63 (m, 3H), 4.75 (d, *J* = 11.5 Hz, 1H), 7.24–7.36 (m, 15H); HRMS (ESI-TOF) *m/z*: $[M + Na]^+$ calcd for C₂₆H₂₇N₃NaO₅, 484.1843; found, 484.1845.

(2*R*,3*R*,4*R*)-2-Amino-3,4,5-trihydroxypentanoic Acid [(-)-54] [(-)-Polyoxamic Acid]

To a stirred solution of **53** (46.8 mg, 0.101 mmol) in MeOH (9.3 mL) was added 20% w/w Pd(OH)₂/C (54.2 mg, 0.0386 mmol) at room temperature. After being stirred for 27.5 h at this temperature under H₂ atmosphere (7.0 atm), the mixture was filtered with membrane filter and lyophilized. Then the resulting solid was subjected to ion-exchange chromatography on Dowex-50Wx8 (H⁺ form) using 0.6 M aq NH₄OH as eluent to give (-)-**54** (13.7 mg, 82% yield): white solid; mp 145–147 °C; $[\alpha]_D^{25} -2.1$ (*c* 0.17, H₂O); IR (neat cm⁻¹): 3174 (NH and OH), 1606 (C=O); ¹H NMR (500 MHz, D₂O): δ 3.67 (dd, *J* = 11.5, 5.2 Hz, 1H), 3.71 (dd, *J* = 11.5, 5.2 Hz, 1H), 3.90 (d, *J* = 3.4 Hz, 1H), 3.91–3.94 (m, 1H), 4.21–4.25 (m, 1H); ¹³C{¹H} NMR (125 MHz, D₂O): δ 58.6, 63.0, 68.7, 73.7, 173.4; HRMS (ESI-TOF) *m/z*: $[M + H]^+$ calcd for C₅H₁₂NO₅, 166.0710; found, 166.0710.

(2*S*,3*S*,4*S*)-2-Amino-3,4,5-trihydroxypentanoic Acid [(+)-54] [(+)-Polyoxamic Acid]

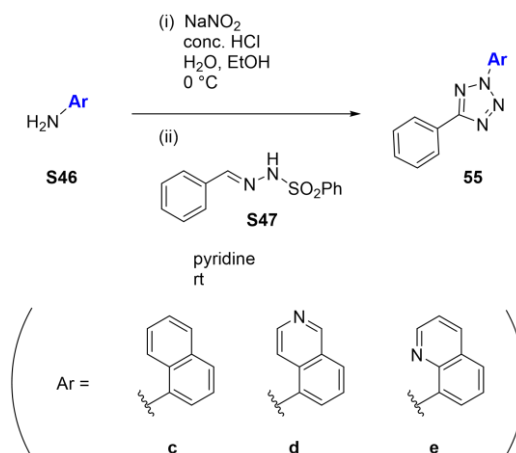
By a procedure identical with that described for synthesis of (-)-**54** from **53**, *ent*-**53** (69.1 mg, 0.150 mmol) was converted into (+)-**54** (18.4 mg, 74% yield): white solid; mp 149–152 °C; $[\alpha]_D^{25} +2.1$ (*c* 0.57, H₂O) {Lit^{3g}. $[\alpha]_D^{23.5} +2.2$ (*c* 0.17, H₂O)}; IR (neat cm⁻¹): 3156 (NH and OH), 1614 (C=O); ¹H NMR (500 MHz, D₂O): δ 3.67 (dd, *J* = 11.5, 5.2 Hz, 1H), 3.71 (dd, *J* = 11.5, 5.2 Hz, 1H), 3.90 (d, *J* = 3.4 Hz, 1H), 3.91–3.94 (m, 1H), 4.21–4.25 (m, 1H); ¹³C{¹H} NMR (125 MHz, D₂O): δ 58.6, 63.0, 68.7, 73.7, 173.4; HRMS (ESI-TOF) *m/z*: $[M + H]^+$ calcd for C₅H₁₂NO₅, 166.0710; found, 166.0709.

Experiments in section 2

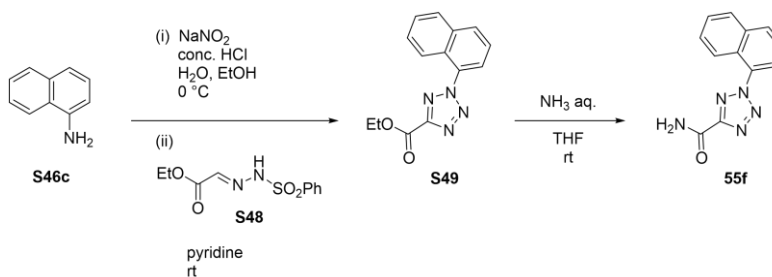
General information

¹H NMR spectra were recorded using a JEOL ECA-500 or JEOL ECZ600R spectrometer. Chemical shifts are reported in δ (ppm) relative to Me₄Si (in CDCl₃, CD₃OD or DMSO-*d*₆) or residual H₂O (in D₂O) as internal standard. ¹³C NMR spectra were recorded using a JEOL ECA-500 or JEOL ECZ600R and referenced to the residual CHCl₃ signal (in CDCl₃), the residual CH₃OH signal (in CD₃OD) and the residual DMSO signal (in DMSO-*d*₆). Exact mass (HRMS) spectra were recorded on a Shimadzu LC-ESI-IT-TOF-MS equipment (ESI). IR spectra were obtained on a JASCO FT/IR-4100 spectrometer. Optical rotations were measured with a JASCO P-1020 polarimeter. Column chromatography was performed using flash chromatography on a Wakogel C-300E (Wako) or Biotage Isolera flash purification system on Sfar Silica D (Biotage). For photocatalysis in batch manner, A160WE Tuna Blue (40W, Kessil) was utilized. Synthetic method for compounds **55a**⁴⁵, **55b**⁴⁶, **S47**⁴⁶,

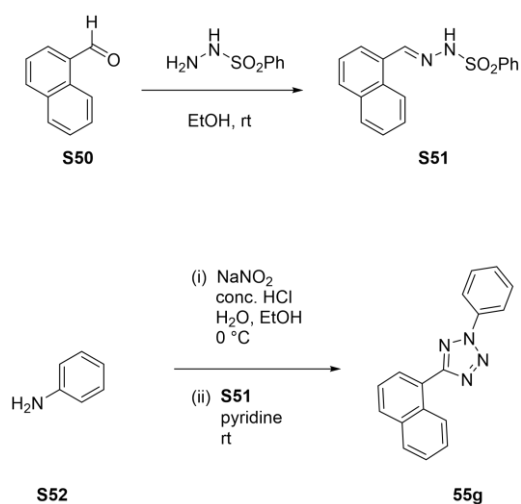
S48⁴⁷ and **S56**⁴⁸ are reported. Compounds **S46**, **S48** and **S53** are commercially available.



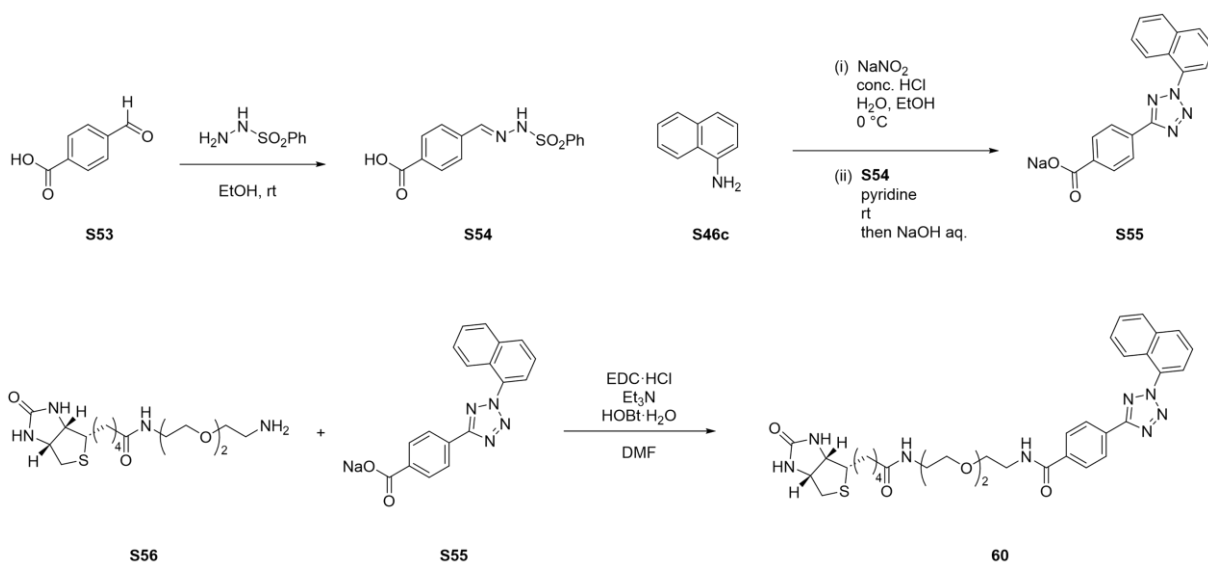
Scheme 2-S2. Synthesis of **55c–e**.



Scheme 2-S3. Synthesis of **55f**.



Scheme 2-S4. Synthesis of **55g**.



Scheme 2-S5. Synthesis of **60**.

2-(Naphthalen-1-yl)-5-phenyl-2*H*-tetrazole (**55c**)

To a stirred solution of aniline **S46c** (1.31 g, 9.15 mmol) and conc. HCl (3.37 mL) in H₂O (6.77 mL) and EtOH (8.41 mL) was added NaNO₂ (636 mg, 9.22 mmol) in H₂O (2.52 mL) dropwise at 0 °C. After being stirred for 30 min at this temperature, the suspension was added to the stirred solution of **S47** (2.52 g, 9.68 mmol) in pyridine (50.6 mL) at −10 °C. Then the solution was stirred for 3 h at room temperature, and the mixture was concentrated *in vacuo*. The whole was extracted with CH₂Cl₂, washed with 1M HCl and brine and dried over MgSO₄. After concentration *in vacuo*, the residue was purified by flash chromatography over silica gel with *n*-hexane–EtOAc (40:1) to give **55c** (1.11 g, 44 % yield): brown solid; mp 75–77 °C; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 7.51–7.58 (m, 3H), 7.61–7.67 (m, 3H), 7.92 (dd, *J* = 7.4, 1.1 Hz, 1H), 7.99–8.02 (m, 1H), 8.08–8.10 (m, 2H), 8.30–8.33 (m, 2H); ¹³C{¹H} NMR (125 MHz, CD₃OD): δ 123.4, 124.7, 126.1, 128.0 (2C), 128.3, 128.4, 128.5, 129.3, 129.6, 130.2 (2C), 131.9, 132.5, 134.7, 135.8, 166.5; HRMS (ESI-TOF) *m/z*: [M + H]⁺ calcd for C₁₇H₁₃N₄, 273.1135; found, 273.1136.

5-(5-Phenyl-2*H*-tetrazol-2-yl)isoquinoline (**55d**)

By a procedure identical with that described for synthesis of **55c** from **S46c**, the aniline **S46d** (453 mg, 3.14 mmol) was converted into **55d** (321 mg, 37 % yield). Column chromatography: silica gel (gradient 10% to 60% EtOAc in *n*-hexane): yellow solid; mp 121–123 °C; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 7.52–7.60 (m, 3H), 7.82 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H), 8.21–8.24 (m, 2H), 8.27–8.34 (m, 3H), 8.70 (d, *J* = 5.7 Hz, 1H), 9.43 (d, *J* = 1.1 Hz, 1H); ¹³C{¹H} NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 115.9, 126.5, 126.6, 126.8, 127.1 (2C), 129.0 (2C), 129.1, 129.2, 130.6, 130.8, 132.4, 145.1, 152.8, 165.4; HRMS (ESI-TOF) *m/z*: [M + H]⁺ calcd for C₁₆H₁₂N₅, 274.1087; found, 274.1083.

8-(5-Phenyl-2*H*-tetrazol-2-yl)quinoline (**55e**)

By a procedure identical with that described for synthesis of **55c** from **S46c**, the aniline **S46e** (444 mg, 3.07

mmol) was converted into **55e** (370 mg, 44 % yield). Column chromatography: silica gel (gradient 6% to 40% EtOAc in *n*-hexane), followed by silica gel (toluene:EtOAc = 15:1): pale pink solid; mp 144–145 °C; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 7.48–7.57 (m, 4H), 7.75 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H), 8.05 (dd, *J* = 7.4, 1.7 Hz, 1H), 8.10 (dd, *J* = 7.4, 1.7 Hz, 1H), 8.29–8.32 (m, 3H), 9.01 (dd, *J* = 4.0, 1.7 Hz, 1H); ¹³C{¹H} NMR (150 MHz, CDCl₃): δ 122.5, 125.7, 127.2 (2C), 127.3, 127.4, 128.9 (2C), 129.2, 130.4, 131.2, 134.5, 136.1, 142.5, 152.3, 165.3; HRMS (ESI-TOF) *m/z*: [M + H]⁺ calcd for C₁₆H₁₂N₅, 274.1087; found, 274.1085.

2-(Naphthalen-1-yl)-2*H*-tetrazole-5-carboxamide (**55f**)

To a stirred solution of aniline **S46c** (439 mg, 3.06 mmol) and conc. HCl (1.12 mL) in H₂O (2.26 mL) and EtOH (2.80 mL) was added NaNO₂ (210 mg, 3.04 mmol) in H₂O (840 μL) dropwise at 0 °C. After being stirred for 20 min at this temperature, the suspension was added to the stirred solution of **S48** (842 mg, 3.29 mmol) in pyridine (16.9 mL) at –10 °C. Then the solution was stirred for 3 h at room temperature, and the mixture was diluted with CH₂Cl₂ and H₂O. The whole was extracted with CH₂Cl₂, washed with 1M HCl and brine and dried over MgSO₄. After concentration *in vacuo*, the residue was purified by flash chromatography over silica gel with a gradient of 6% to 35% EtOAc in *n*-hexane, followed by silica gel with *n*-hexane–EtOAc (7:1) to give **S49** (353 mg), which was used without further purification. Then, to a stirred solution of **S49** (261 mg) in THF (10.0 mL) was added NH₃ aq. (28% in H₂O; 5.04 mL) at room temperature. After being stirred for 19 h at this temperature, the mixture was concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash chromatography over silica gel with *n*-hexane–EtOAc (1:1) to give **55f** (169 mg, 31% yield, 2 steps): pale orange solid; mp 174–175 °C; IR (neat cm^{–1}): 1721 (C=O); ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 7.69–7.80 (m, 4H), 8.03 (d, *J* = 6.8 Hz, 1H), 8.13–8.18 (m, 1H), 8.19 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 8.33 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 8.52–8.57 (m, 1H); ¹³C{¹H} NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆): δ 121.9, 124.5, 125.4, 126.6, 127.5, 128.5, 128.6, 131.9, 132.4, 133.6, 157.9, 160.1; HRMS (ESI-TOF) *m/z*: [M + Na]⁺ calcd for C₁₂H₉N₅NaO, 262.0699; found, 262.0698.

5-(Naphthalen-1-yl)-2-phenyl-2*H*-tetrazole (**55g**)

To a stirred solution of benzenesulfonyl hydrazide (1.74 g, 10.1 mmol) in EtOH (20.0 mL) was added **S50** (1.36 mL, 10.0 mmol) at room temperature. After being stirred for 4 h at this temperature, the mixture was diluted with H₂O. Then, the suspension was filtered through Kiriya funnel and washed with H₂O to afford **S51**, which was used without further purification. Then, to a stirred solution of aniline **S52** (273 μL, 3.00 mmol) and conc. HCl (1.12 mL) in H₂O (2.26 mL) and EtOH (2.80 mL) was added NaNO₂ (217 mg, 3.14 mmol) in H₂O (840 μL) dropwise at 0 °C. After being stirred for 30 min at this temperature, the suspension was added to the stirred solution of **S51** (999 mg, 3.22 mmol) in pyridine (16.9 mL) at –10 °C. Then the solution was stirred for 3 h at room temperature, and the mixture was concentrated *in vacuo*. The residue was suspended in H₂O/MeOH (1:1), followed by filtration with Kiriya funnel to give **55g** (622 mg, 76% yield): white solid; mp 75–77 °C; ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD): δ 7.54–7.69 (m, 6H), 7.98 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 8.06 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 8.24 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 8.29 (d, *J* = 6.9 Hz, 1H), 8.92 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H); ¹³C{¹H} NMR (125 MHz, CD₃OD): δ 121.0 (2C), 125.0, 126.3, 126.7, 127.5, 128.5, 129.6, 129.8, 131.0 (2C), 131.1, 131.8, 132.4, 135.5, 138.3, 166.5; HRMS (ESI-TOF) *m/z*: [M + H]⁺ calcd for C₁₇H₁₃N₄, 273.1135; found, 273.1136.

***N'*-(4-Methoxyphenyl)-*N'*-(3-phenylpropanoyl)benzohydrazide (57b)**

The solution of **55b** (50.2 mg, 0.199 mmol), 3-phenylpropionic acid (300 mg, 2.00 mmol) and Ir[dF(CF₃)ppy]₂(dtbpy)PF₆ (4.39 mg, 3.91×10⁻³ mmol) in H₂O (10.0 mL) and MeCN (10.0 mL) was stirred under Ar and irradiated with two blue LED lamps (Kessil) 4 cm away from the reaction vessel at room temperature. After being stirred for 6 h at this temperature, the mixture was concentrated *in vacuo* to remove MeCN. Then, the whole was extracted with EtOAc, washed with saturated aqueous solution of NaHCO₃ and brine, and dried over MgSO₄. After concentration *in vacuo*, the residue was purified by flash chromatography over silica gel with CHCl₃–MeOH (10:1), followed by silica gel with a gradient of 12% to 60% EtOAc in *n*-hexane to give **57b** (27.9 mg, 37 % yield): orange oil; IR (neat cm⁻¹): 1739 (C=O), 1686 (C=O); ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆, 140 °C): δ 2.52–3.08 (m, 4H), 3.75 (s, 3H), 6.92 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.13–7.25 (m, 5H), 7.38 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.48 (dd, *J* = 7.4, 7.4 Hz, 2H), 7.56–7.58 (m, 1H), 7.86 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H), 11.18 (s, 1H); ¹³C{¹H} NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆): δ 29.9, 30.4, 34.2, 35.2, 55.17, 55.25, 113.6, 114.4, 125.8, 127.4, 128.1–128.4, 128.7, 129.0, 131.6, 131.9, 132.1, 132.4, 134.6, 134.9, 140.8, 141.1, 157.3, 158.8, 164.8, 165.5, 170.0, 172.5 (rotamer mixture); HRMS (ESI-TOF) *m/z*: [M + Na]⁺ calcd for C₂₃H₂₂N₂NaO₃, 397.1523; found, 397.1525.

***N'*-(Naphthalen-1-yl)-*N'*-(3-phenylpropanoyl)benzohydrazide (57c)**

By a procedure identical with that described for synthesis of **57b** from **55b**, the aniline **55c** (55.2 mg, 0.203 mmol) was converted into **57c** (56.4 mg, 70% yield). Column chromatography: silica gel (gradient 12% to 60% EtOAc in *n*-hexane): orange oil; IR (neat cm⁻¹): 1739 (C=O), 1656 (C=O); ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆, 140 °C): δ 2.78–3.12 (m, 4H), 6.95–7.29 (m, 5H), 7.44 (dd, *J* = 7.7, 7.7 Hz, 2H), 7.48–7.55 (m, 4H), 7.75–7.80 (m, 1H), 7.83 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H), 7.86–7.95 (m, 2H), 8.05–8.23 (m, 1H), 10.97 (s, 1H); ¹³C{¹H} NMR (150 MHz, CDCl₃): δ 31.2, 35.5, 122.2, 125.7, 126.1, 126.6, 127.5 (2C), 127.6, 127.8, 128.26 (2C), 128.30 (2C), 128.4 (2C), 128.6, 129.8, 130.2, 131.4, 131.9, 134.5, 137.1, 140.4, 166.5, 173.2; HRMS (ESI-TOF) *m/z*: [M + H]⁺ calcd for C₂₆H₂₃N₂O₂, 395.1754; found, 395.1756.

***N'*-(Isoquinolin-5-yl)-*N'*-(3-phenylpropanoyl)benzohydrazide (57d)**

By a procedure identical with that described for synthesis of **57b** from **55b**, the aniline **55d** (55.1 mg, 0.202 mmol) was converted into **57d** (58.2 mg, 73% yield). Column chromatography: silica gel (gradient 5% to 80% EtOAc in *n*-hexane): yellow oil; IR (neat cm⁻¹): 1686 (C=O); ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆, 140 °C): δ 2.75–2.82 (m, 2H), 2.88–2.97 (m, 2H), 7.10–7.18 (m, 2H), 7.19–7.25 (m, 2H), 7.45 (m, 2H), 7.51–7.55 (m, 1H), 7.68 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H), 7.83 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H), 7.98 (d, *J* = 6.9 Hz, 2H), 8.05–8.12 (m, 2H), 8.50 (d, *J* = 6.9 Hz, 1H), 9.30 (s, 1H), 11.01 (s, 1H); ¹³C{¹H} NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆, 140 °C): δ 29.6, 33.4, 115.7, 125.2, 126.5, 126.8, 127.4–127.7, 128.4, 131.3, 131.8, 132.0, 137.4, 140.3, 142.5, 151.7, 165.6; HRMS (ESI-TOF) *m/z*: [M + H]⁺ calcd for C₂₅H₂₂N₃O₂, 396.1707; found, 396.1706.

2-[2-(Naphthalen-1-yl)-2-(3-phenylpropanoyl)hydrazineyl]-2-oxoacetamide (57f)

By a procedure identical with that described for synthesis of **57b** from **55b**, the aniline **55f** (47.6 mg, 0.199

mmol) was converted into **57f** containing inseparable impurities (18.8 mg, 26% yield). Column chromatography: silica gel with a gradient of 1% to 10% MeOH in CHCl₃, followed by silica gel with CHCl₃–MeOH (10:1): yellow oil; IR (neat cm⁻¹): 1662 (C=O); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 2.29–2.36 (m, 1H), 2.43–2.52 (m, 1H), 2.88–3.00 (m, 2H), 5.91 (s, 0.8H), 5.99 (s, 0.2H), 6.97 (d, *J* = 6.9 Hz, 2H), 7.10–7.25 (m, 3H), 7.27–7.33 (m, 1H), 7.44 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.52–7.56 (m, 2H), 7.63 (d, *J* = 6.9 Hz, 1H), 7.80–7.91 (m, 2H), 8.01–8.02 (m, 1H), 9.72 (s, 0.8H), 9.96 (s, 0.2H); ¹³C{¹H} NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆): δ 29.8, 30.5, 33.7, 34.8, 123.3, 125.7, 125.8, 126.0–126.2, 126.7, 127.2, 127.4, 128.1–128.5, 129.6, 129.7, 130.0, 133.7, 134.0, 137.3, 140.6, 141.1, 159.4, 161.1, 161.3, 169.9, 173.0 (rotamer mixture); HRMS (ESI-TOF) *m/z*: [M + Na]⁺ calcd for C₂₁H₁₉N₃NaO₃, 384.1319; found, 384.1317.

***N'*-Decanoyl-*N'*-(isoquinolin-5-yl)benzohydrazide (59a)**

By a procedure identical with that described for synthesis of **57b** from **55b** and 3-phenylpropionic acid, the aniline **55d** (55.6 mg, 0.203 mmol) and decanoic acid (346 mg, 2.01 mmol) was converted into **59a** (62.2 mg, 73% yield). Column chromatography: silica gel with a gradient of 1% to 10% MeOH in CHCl₃: orange oil; IR (neat cm⁻¹): 1739 (C=O), 1687 (C=O); ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆, 140 °C): δ 0.76 (t, *J* = 6.9 Hz, 3H), 0.95–1.31 (m, 12H), 1.38–1.54 (m, 2H), 2.10 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H), 2.83 (m, 1H), 7.38 (dd, *J* = 6.9, 6.9 Hz, 2H), 7.42–7.50 (m, 1H), 7.63 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.72–7.81 (m, 2H), 7.85–8.03 (m, 3H), 8.48 (d, *J* = 4.6 Hz, 1H), 9.25 (s, 1H), 11.0 (s, 1H); ¹³C{¹H} NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆): δ 13.88, 13.90, 22.0, 22.1, 24.1, 24.5, 24.6, 28.1, 28.50, 28.54, 28.65, 28.72, 28.77, 28.84, 31.16, 31.24, 31.8, 32.8, 33.7, 115.7, 127.3, 127.4–127.7, 128.5, 128.7, 128.8, 129.0, 129.1, 131.6, 131.7, 132.0, 132.1, 132.2, 132.5, 132.7, 136.9, 138.1, 142.9, 144.0, 152.5, 152.7, 165.9, 171.1, 174.3, 174.5 (rotamer mixture); HRMS (ESI-TOF) *m/z*: [M + H]⁺ calcd for C₂₆H₃₂N₃O₂, 418.2489; found, 418.2488.

***N'*-(Isoquinolin-5-yl)-*N'*-pivaloylbenzohydrazide (59b)**

By a procedure identical with that described for synthesis of **57b** from **55b** and 3-phenylpropionic acid, the aniline **55d** (55.4 mg, 0.203 mmol) and pivalic acid (204 mg, 2.00 mmol) was converted into **59b** (26.8 mg, 38% yield). Column chromatography: silica gel with a gradient of 1% to 10% MeOH in CHCl₃: dark red oil; IR (neat cm⁻¹): 1739 (C=O), 1684 (C=O); ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆, 140 °C): δ 1.29 (s, 9H), 7.47 (dd, *J* = 7.2, 7.2 Hz, 2H), 7.52–7.58 (m, 1H), 7.68 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.80–7.85 (m, 2H), 8.00–8.16 (m, 3H), 8.55 (d, *J* = 5.2 Hz, 1H), 9.31 (s, 1H), 10.99 (s, 1H); ¹³C{¹H} NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆): δ 26.4, 27.0, 27.8, 29.9, 110.7, 114.1, 127.4–128.7, 131.2, 132.5, 134.3, 152.5, 152.6, 167.9 (rotamer mixture); HRMS (ESI-TOF) *m/z*: [M + H]⁺ calcd for C₂₁H₂₂N₃O₂, 348.1707; found, 348.1710.

***N'*-Benzoyl-*N'*-(isoquinolin-5-yl)-4-methylbenzohydrazide (59c)**

By a procedure identical with that described for synthesis of **57b** from **55b** and 3-phenylpropionic acid, the aniline **55d** (54.7 mg, 0.200 mmol) and *p*-toluic acid (279 mg, 2.05 mmol) was converted into **59c** (44.9 mg, 59% yield). Column chromatography: silica gel with a gradient of 12% to 80% EtOAc in *n*-hexane: orange oil; IR (neat cm⁻¹): 1738 (C=O), 1682 (C=O); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 2.21 (s, 3H), 6.83–6.94 (m, 2H), 7.08–

7.25 (m, 4H), 7.32–7.40 (m, 2H), 7.74–7.87 (m, 4H), 8.06 (m, 1H), 8.34 (m, 1H), 9.17 (s, 1H), 10.40 (s, 1H); $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (125 MHz, DMSO- d_6): δ 21.4, 115.7, 127.0, 127.5, 128.3–128.8, 129.2, 130.4, 131.6, 132.2, 132.5, 132.7, 137.8, 141.8, 144.1, 152.7, 166.9, 171.5; HRMS (ESI-TOF) m/z : $[\text{M} + \text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{O}_2$, 382.1550; found, 382.1548.

***N'*-Benzoyl-*N*-(isoquinolin-5-yl)-4-methoxybenzohydrazide (59d)**

By a procedure identical with that described for synthesis of **57b** from **55b** and 3-phenylpropionic acid, the aniline **55d** (55.5 mg, 0.203 mmol) and 4-methoxybenzoic acid (311 mg, 2.04 mmol) was converted into **59d** (19.8 mg, 25% yield). Column chromatography: silica gel with a gradient of 12% to 80% EtOAc in *n*-hexane: orange oil; IR (neat cm^{-1}): 1739 (C=O), 1684 (C=O); ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6 , 140 $^\circ\text{C}$): δ 3.65 (s, 3H), 6.76 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 7.35 (dd, J = 7.7, 7.7 Hz, 2H), 7.43–7.52 (m, 3H), 7.57 (t, J = 7.7 Hz, 1H), 7.66 (d, J = 7.4 Hz, 2H), 7.81 (d, J = 6.9 Hz, 1H), 7.98 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 8.03–8.08 (m, 1H), 8.48 (d, J = 6.3 Hz, 1H), 9.24 (s, 1H), 11.14 (s, 1H); $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (125 MHz, DMSO- d_6): δ 55.27, 55.33, 113.5, 126.0, 126.3, 127.1–128.1, 128.7, 129.9, 130.0, 131.6, 131.8, 132.0, 132.3, 133.3, 133.5, 143.2, 144.0, 152.6, 153.0, 161.0, 161.5, 165.6, 166.0, 168.6, 170.7 (rotamer mixture); HRMS (ESI-TOF) m/z : $[\text{M} + \text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{O}_3$, 398.1499; found, 398.1501.

***N'*-Benzoyl-*N*-(isoquinolin-5-yl)nicotinohydrazide (59e)**

By a procedure identical with that described for synthesis of **57b** from **55b** and 3-phenylpropionic acid, the aniline **55d** (54.3 mg, 0.199 mmol) and nicotinic acid (251 mg, 2.04 mmol) was converted into **59e** (18.8 mg, 26% yield). Column chromatography: silica gel with a gradient of 2% to 10% MeOH in CHCl_3 : orange oil; IR (neat cm^{-1}): 1739 (C=O), 1686 (C=O); ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6 , 140 $^\circ\text{C}$): δ 7.35 (s, 1H), 7.40–7.48 (m, 2H), 7.50–7.55 (m, 1H), 7.62–7.75 (m, 3H), 7.95–8.03 (m, 1H), 8.12 (d, J = 6.9 Hz, 1H), 8.15–8.20 (m, 2H), 8.55 (s, 1H), 8.61 (d, J = 5.7 Hz, 1H), 8.83 (s, 1H), 9.35 (s, 1H), 11.41 (s, 1H); $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (125 MHz, DMSO- d_6): δ 115.5, 116.4, 123.2, 123.3, 127.2, 127.6, 128.3, 128.7–128.8, 130.6, 131.2, 131.7, 131.8, 132.0, 132.3, 132.4, 132.5, 135.1, 135.2, 137.1, 137.5, 143.4, 144.2, 147.8, 147.9, 151.3, 151.5, 152.7, 152.9, 165.7, 165.8, 167.0, 169.6 (rotamer mixture); HRMS (ESI-TOF) m/z : $[\text{M} + \text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{17}\text{N}_4\text{O}_2$, 369.1346; found, 369.1345.

Benzyl *N*⁵-benzamido-*N*²-[(benzyloxy)carbonyl]-*N*⁵-(isoquinolin-5-yl)-L-glutamate (59f)

By a procedure identical with that described for synthesis of **57b** from **55b** and 3-phenylpropionic acid, the aniline **55d** (55.2 mg, 0.202 mmol) and 1-benzyl *N*-benzyloxycarbonyl-L-glutamate (743 mg, 2.00 mmol) was converted into **59f** (78.6 mg, 63% yield). Column chromatography: silica gel with a gradient of 2% to 10% MeOH in CHCl_3 , followed by silica gel with a gradient of 0% to 5% MeOH in CHCl_3 : orange oil; $[\alpha]_D^{25}$ –7.9 (*c* 0.57, CHCl_3); IR (neat cm^{-1}): 1739 (C=O), 1725 (C=O); ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6 , 140 $^\circ\text{C}$): δ 1.89–2.11 (m, 2H), 2.12–2.26 (m, 1H), 2.28–2.39 (m, 1H), 4.11–4.34 (m, 1H), 4.97–5.18 (m, 4H), 7.25–7.38 (m, 13H), 7.45–7.50 (m, 2H), 7.52–7.60 (m, 1H), 7.68–7.72 (m, 1H), 7.85 (d, J = 7.4 Hz, 2H), 7.95–8.15 (m, 2H), 8.55 (s, 1H), 9.35 (s, 1H); $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (125 MHz, DMSO- d_6): δ 25.8, 26.0, 26.2, 28.4, 29.3, 29.9, 53.3, 53.4,

65.6, 66.0, 115.7, 115.8, 127.5–128.8, 129.2, 131.7, 131.9, 132.0, 132.1, 132.2, 132.5, 132.6, 135.8, 135.9, 136.0, 136.7, 136.8, 136.9, 138.0, 152.5, 152.7, 152.8, 156.0, 156.1, 156.2, 156.3, 165.9, 166.0, 170.3, 170.4, 172.0, 172.1, 173.6, 173.7 (rotamer mixture); HRMS (ESI-TOF) m/z : $[M + H]^+$ calcd for $C_{36}H_{33}N_4O_6$, 617.2395; found, 617.2392.

Benzyl N^4 -benzamido- N^2 -(*tert*-butoxycarbonyl)- N^4 -(isoquinolin-5-yl)-L-asparaginate (**59g**)

By a procedure identical with that described for synthesis of **57b** from **55b** and 3-phenylpropionic acid, the aniline **55d** (55.2 mg, 0.202 mmol) and 1-benzyl N -(*tert*-butoxycarbonyl)-L-aspartate (658 mg, 2.03 mmol) was converted into **59g** (122 mg, quant). Column chromatography: silica gel with a gradient of 1% to 10% MeOH in $CHCl_3$: orange oil; $[\alpha]_D^{25} +17.3$ (c 0.56, $CHCl_3$); IR (neat cm^{-1}): 1739 (C=O), 1686 (C=O); 1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6 , 140 °C): δ 1.39 (m, 9H), 2.64–2.79 (m, 1H), 3.00–3.25 (m, 1H), 4.44–4.63 (m, 1H), 5.14 (s, 2H), 6.69 (s, 1H), 7.30–7.35 (m, 6H), 7.45–7.56 (m, 2H), 7.70 (t, J = 7.4 Hz, 1H), 7.86 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 7.92–8.20 (m, 3H), 8.51 (s, 1H), 9.33 (s, 1H), 11.34 (s, 1H); $^{13}C\{^1H\}$ NMR (150 MHz, DMSO- d_6): δ 28.00, 28.04, 35.8, 50.3, 66.0, 78.4, 78.5, 79.1, 115.7, 115.9, 116.9, 127.3–129.2, 131.5, 131.9, 132.0, 132.1, 132.5, 135.7, 135.8, 135.9, 137.6, 142.9, 143.9, 144.0, 152.4, 152.5, 155.16, 155.19, 165.8, 168.5, 168.7, 171.0, 171.1, 171.4, 171.6 (rotamer mixture); HRMS (ESI-TOF) m/z : $[M + H]^+$ calcd for $C_{32}H_{33}N_4O_6$, 569.2395; found, 569.2394.

Sodium 4-[2-(naphthalen-1-yl)-2*H*-tetrazol-5-yl]benzoate (**S55**)

To a stirred solution of **S53** (1.51 g, 10.1 mmol) in EtOH (100 mL) was added benzenesulfonyl hydrazide (1.74 g, 10.1 mmol) at room temperature. After being stirred for 1 h at this temperature, the mixture was diluted with H_2O . Then, the suspension was filtered through Kiriya funnel and washed with H_2O to afford **S54** (2.83 g), which was used without further purification. Then, to a stirred solution of aniline **S46c** (434 mg, 3.03 mmol) and conc. HCl (1.12 mL) in H_2O (2.26 mL) and EtOH (2.80 mL) was added $NaNO_2$ (206 mg, 2.99 mmol) in H_2O (840 μ L) dropwise at 0 °C. After being stirred for 30 min at this temperature, the suspension was added to the stirred solution of **S54** (997 mg) in pyridine (16.9 mL) at –10 °C. Then the solution was stirred for 3.5 h at room temperature, the mixture was diluted with CH_2Cl_2 and H_2O . The whole was extracted with CH_2Cl_2 , washed with H_2O and brine and dried over $MgSO_4$. After concentration *in vacuo*, the residue was purified by flash chromatography over silica gel with a gradient of 10% to 70% EtOAc in *n*-hexane. Then, to the suspension of that purified residue in CH_2Cl_2 was added 1M NaOH, followed by filtration through Kiriya funnel to give **S55** (602 mg, 59% yield): brown solid; mp >300 °C; 1H NMR (500 MHz, D_2O): δ 7.50–7.59 (m, 3H), 7.71 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 7.88–7.95 (m, 5H), 8.04 (d, J = 8.0 Hz, 1H); $^{13}C\{^1H\}$ NMR (125 MHz, CD_3OD): δ 123.5, 124.8, 126.2, 127.4 (2C), 128.4, 128.6, 129.4, 129.6, 129.8, 131.0 (2C), 132.5, 134.8, 135.8, 141.7, 166.4, 174.4; HRMS (FAB) m/z : $[M - Na]^+$ calcd for $C_{18}H_{11}N_4O_2$, 315.0887; found, 315.0888.

4-[2-(Naphthalen-1-yl)-2*H*-tetrazol-5-yl]- N -{2-[2-(2-{5-[(3*aS*,4*S*,6*aR*)-2-oxohexahydro-1*H*-thieno[3,4-*d*]imidazol-4-yl]pentanamido}ethoxy)ethoxy]ethyl}benzamide (**60**)

To a stirred solution of aniline **S55** (93.6 mg, 0.277 mmol) and Et_3N (78.0 μ L, 0.56 mmol) in DMF (1.57 mL)

were added EDC·HCl (116 mg, 0.605 mmol) and HOBT·H₂O (94.9 mg, 0.620 mmol) successively at room temperature. The suspension was stirred for 30 min at this temperature, followed by the addition of freshly prepared **S56** (0.617 mmol) in DMF (1.57 mL). After being stirred for 16 h at this temperature, the mixture was concentrated *in vacuo*. The whole was extracted with EtOAc, washed with saturated aqueous solution of NaHCO₃ and dried over MgSO₄. After concentration *in vacuo*, the residue was purified by flash chromatography over silica gel with a gradient of 2% to 10% MeOH in CHCl₃, followed by silica gel with a gradient of 2% to 10% MeOH in CHCl₃ to give **60** (58.5 mg, 31%): brown amorphous; [α]_D²⁵ +25.9 (*c* 0.085, CHCl₃); IR (neat cm⁻¹): 1739 (C=O), 1702 (C=O), 1651 (C=O); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 1.35–1.43 (m, 2H), 1.57–1.72 (m, 4H), 2.18 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 2.69 (d, *J* = 12.6 Hz, 1H), 2.82 (dd, *J* = 12.6, 4.9 Hz, 1H), 3.05–3.08 (m, 1H), 3.34–3.46 (m, 2H), 3.55 (t, *J* = 5.2 Hz, 2H), 3.61–3.71 (m, 8H), 4.24 (dd, *J* = 7.4, 5.2 Hz, 1H), 4.44 (dd, *J* = 7.7, 4.9 Hz, 1H), 5.89 (s, 1H), 6.75–6.80 (m, 1H), 6.86 (s, 1H), 7.49–7.55 (m, 1H), 7.59–7.67 (m, 3H), 7.91 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 7.97–8.00 (m, 1H), 8.03 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 8.05–8.09 (m, 2H), 8.33 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H); ¹³C{¹H} NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 25.5, 28.0, 28.1, 35.9, 39.0, 39.9, 40.3, 55.6, 60.1, 61.7, 69.7, 69.8, 69.9, 70.0, 122.6, 123.3, 124.8, 126.9, 127.0 (2C), 127.1, 127.9 (2C), 128.2, 128.4, 129.7, 131.2, 133.2, 134.2, 136.2, 164.3, 164.4, 166.9, 173.5; HRMS (ESI-TOF) *m/z*: [M + Na]⁺ calcd for C₃₄H₄₀N₈NaO₅S, 695.2735; found, 695.2735.

Photocatalytic labeling of proteins

Protein solutions were prepared in PBS to a final concentration of 1 mg/mL (only GST: 0.275 mg/mL) followed by addition of biotinylated tetrazole **60** to give a final concentration of 50 μ M. Ir[dF(CF₃)ppy]₂(dtbpy)PF₆ was combined to this mixture to a final concentration of 20 μ M with 200 μ L total solution volume. The solution was irradiated with blue LED lamp (Kessil) for the indicated time points (0–15 min). After visible light irradiation, 10 μ L of each sample was mixed with 90 μ L of loading buffer and boiled at 95 °C for 5 min. The samples were then analyzed by western blotting according to the general western blotting procedure described below.

Western blotting for biotinylated proteins

Samples were loaded onto 15% acrylamide gels and subjected to gel electrophoresis. The proteins were then blotted onto PVDF membranes using the transfer device (Bio-rad). Membranes were blocked in PBST with 3% BSA followed by incubation with Streptavidin Alkaline Phosphatase (Promega) at a 1:5,000 dilution for 0.5–1 h. After being washed with PBST, the membrane was incubated with alkaline phosphatase substrate (Promega).

Coomassie brilliant blue staining of gels

After the protein electrophoresis was completed, the gel was carefully placed in Coomassie brilliant blue stain (nacalai). After 2 h, the gel was washed with milliQ and imaged for total protein concentration.

参考文献

- (1) Corbett, A. J.; Eckle, S. B. G.; Birkinshaw, R. W.; Liu, L.; Patel, O.; Mahony, J.; Chen, Z.; Reantragoon, R.; Meehan, B.; Cao, H.; Williamson, N. A.; Strugnell, R. A.; Sinderen, D. V.; Mak, J. Y. W.; Fairlie, D. P.; Kjer-Nielsen, L.; Rossjohn, J.; McCluskey, J. T-Cell Activation by Transitory Neo-Antigens Derived from Distinct Microbial Pathways. *Nature* **2014**, *509*, 361–365.
- (2) Naider, F.; Shenbagamurthi, P.; Steinfeld, A. S.; Smith, H. A.; Boney, C.; Becker, J. M. Synthesis and Biological Activity of Tripeptidyl Polyoxins as Antifungal Agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1983**, *24*, 787–796.
- (3) Rogers, E. W.; Molinski, T. F. Asymmetric Synthesis of Diastereomeric Diaminoheptanetetraols. A Proposal for the Configuration of (+)-Zwittermicin A. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 437–440.
- (4) Rogers, E. W.; Dalisay, D. S.; Molinski, T. F. Zwittermicin A: A Synthesis of Analogs and Structure-Activity Studies. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 2183–2185.
- (5) Ler, G. J. M.; Xu, W.; Mak, J. Y. W.; Liu, L.; Bernhardt, P. V.; Fairlie, D. P. Computer Modelling and Synthesis of Deoxy and Monohydroxy Analogs of a Ribitylaminouracil Bacterial Metabolite that Potently Activates Human T Cells. *Chem. Eur. J.* **2019**, *25*, 15594–15608.
- (6) Tarrade, A.; Dauban, P.; Dodd, R. H. Enantiospecific Total Synthesis of (–)-Polyoxamic Acid Using 2,3-Azirino- γ -lactone Methodology. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 9521–9524.
- (7) De Armas, P.; Francisco, C. G.; Suárez, E. Reagents with Hypervalent Iodine: Formation of Convenient Chiral Synthetic Intermediates by Fragmentation of Carbohydrate Anomeric Alkoxy Radicals. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1992**, *31*, 772–774.
- (8) Francisco, C. G.; León, E. I.; Martín, A.; Moreno, P.; Rodríguez, M. S.; Suárez, E. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 6967–6976.
- (9) Narayanam, J. M. R.; Stephenson, C. R. J. Visible Light Photoredox Catalysis: Applications in Organic Synthesis. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 102–113.
- (10) Prier, C. K.; Rankic, D. A.; MacMillan, D. W. C. Visible Light Photoredox Catalysis with Transition Metal Complexes: Applications in Organic Synthesis. *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 5322–5363.
- (11) Kärkäs, M. D.; Porco, J. A. Jr.; Stephenson, C. R. J. Photochemical Approaches to Complex Chemotypes: Applications in Natural Product Synthesis. *Chem. Rev.* **2016**, *116*, 9683–9747.
- (12) Zhang, J.; Li, Y.; Zhang, F.; Hu, C.; Chen, Y. Generation of Alkoxyl Radicals by Photoredox Catalysis Enables Selective C(sp³)-H Functionalization under Mild Reaction Conditions. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 1872–1875.
- (13) Ota, E.; Wang, H.; Frye, N. L.; Knowles, R. R. A Redox Strategy for Light-Driven, Out-of-Equilibrium Isomerizations and Application to Catalytic C–C Bond Cleavage Reactions. *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141*, 1457–1462.
- (14) Xia, Z.; Zhang, C.-L.; Gao, Z.-H.; Ye, S. Switchable Decarboxylative Heck-Type Reaction and Oxoalkylation of Styrenes with *N*-Hydroxyphthalimide Esters under Photocatalysis. *Org. Lett.* **2018**, *20*, 3496–3499.
- (15) Pratsch, G.; Lackner, G. L.; Overman, L. E. Constructing Quaternary Carbons from

- N*-(Acyloxy)phthalimide Precursors of Tertiary Radicals Using Visible-Light Photocatalysis. *J. Org. Chem.* **2015**, *80*, 6025–6036.
- (16) Zhao, W.; Wurz, R. P.; Peters, J. C.; Fu, G. C. Photoinduced, Copper-Catalyzed Decarboxylative C-N Coupling to Generate Protected Amines: An Alternative to the Curtius Rearrangement. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 12153–12156.
- (17) Zlotorzynska, M.; Sammis, G. M. Photoinduced Electron-Transfer-Promoted Redox Fragmentation of *N*-Alkoxyphthalimides. *Org. Lett.* **2011**, *13*, 6264–6267.
- (18) Stateman, L. M.; Nakafuku, K. M.; Nagib, D. A. Remote C–H Functionalization via Selective Hydrogen Atom Transfer. *Synthesis* **2018**, *50*, 1569–1586.
- (19) Crich, D.; Sun, S.; Brunckova, J. Chemistry of 1-Alkoxy-1-Glycosyl Radicals: The Manno- and Rhamnopyranosyl Series. Inversion of α - to β -Pyranosides and the Fragmentation of Anomeric Radicals. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 605–615.
- (20) Rueda-Becerril, M.; Leung, J. C. T.; Dunbar, C. R.; Sammis, G. M. Alkoxy Radical Cyclizations onto Silyl Enol Ethers Relative to Alkene Cyclization, Hydrogen Atom Transfer, and Fragmentation Reactions. *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 7720–7729.
- (21) Zhu, H.; Leung, J. C. T.; Sammis, G. M. Strategies to Control Alkoxy Radical-Initiated Relay Cyclizations for the Synthesis of Oxygenated Tetrahydrofuran Motifs. *J. Org. Chem.* **2015**, *80*, 965–979.
- (22) Henry, D. J.; Parkinson, C. J.; Mayer, P. M.; Radom, L. Bond Dissociation Energies and Radical Stabilization Energies Associated with Substituted Methyl Radical. *J. Phys. Chem. A* **2001**, *105*, 6750–6756.
- (23) Lonnecker, A. T.; Lim, Y. H.; Felder, S. E.; Besset, C. J.; Wooley, K. L. Four Different Regioisomeric Polycarbonates Derived from One Natural Product, D-Glucose. *Macromolecules* **2016**, *49*, 7857–7867.
- (24) Adinolfi, M.; Iadonisi, A.; Schiattarella, M. An Approach to the Highly Stereocontrolled Synthesis of α -Glycosides. Compatible Use of the Very Acid Labile Protecting Group with Yb(OTf)₃-Promoted Glycosidation. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 6479–6482.
- (25) Fukuyama, T.; Md. Rahman, T.; Sato, M.; Ryu, I. Adventures in Inner Space: Microflow Systems for Practical Organic. *Synlett* **2008**, *2*, 151–163.
- (26) Cambié, D.; Bottecchia, C.; Straathof, N. J. W.; Hessel, V.; Noel, T. Applications of Continuous-Flow Photochemistry in Organic Synthesis, Material Science, and Water Treatment. *Chem. Rev.* **2016**, *116*, 10276–10341.
- (27) (a) Isono, K.; Asahi, K.; Suzuki, S. Studies on Polyoxins, Antifungal Antibiotics. XIII. Structure of Polyoxins. *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, *91*, 7490–7505. (b) Naider, F.; Shenbagamurthi, P.; Steinfeld, A. S.; Smith, H. A.; Boney, C.; Becker, J. M. Synthesis and Biological Activity of Tripeptidyl Polyoxins as Antifungal Agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1983**, *24*, 787. (c) Mehta, R. J.; Kingsbury, W. D.; Valenta, J.; Actor, P. Anti-Candida Activity of Polyoxin: Example of Peptide Transport in Yeasts. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1984**, *25*, 373. (d) Shenbagamurthi, P.; Smith, H. A.; Becker, J. M.; Steinfeld, A.; Naider, F. Design of Anticandidal Agents: Synthesis and Biological Properties of Analogues of Polyoxin L. *J. Med. Chem.* **1983**, *26*, 1518–1522. (e) Khare, R. K.; Becker, J. M.; Naider, F. R. Synthesis

and Anticandidal Properties of Polyoxin L Analogues Containing α -Amino Fatty Acids. *J. Med. Chem.* **1988**, *31*, 650–656.

- (28) (a) Trost, B. M.; Krueger, A. C.; Bunt, R. C.; Zambrano, J. On the Question of Asymmetric Induction with Acyclic Allylic Substrates. An Asymmetric Synthesis of (+)-Polyoxamic Acid. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 6520–6521. (b) Ghosh, A. K.; Wang, Y. Total Synthesis of (+)-Polyoxin J. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 2789–2795. (c) Kim, K. S.; Lee, Y. J.; Kim, J. H.; Sung, D. K. Synthesis of (+)-Polyoxamic Acid and D-Sorbitol from Simple Achiral Allylic Halides Employing (*S,S*)-Hydrobenzoin as a Chiral Source. *Chem. Commun.* **2002**, 1116–1117. (d) Tarrade, A.; Dauban, P.; Dodd, R. H. Enantiospecific Total Synthesis of (–)-Polyoxamic Acid Using 2,3-Aziridino- γ -lactone Methodology. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 9521–9524. (e) Joo, J.; Pham, V.; Tian, Y.; Chung, Y.; Oh, C.; Lee, K.; Ham, W. Stereoselective Synthesis of (+)-Polyoxamic Acid Based on the Synthesis of Chiral Oxazine. *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 1498–1501. (f) Lee, Y.-J.; Park, Y.; Kim, M.; Jew, S.; Park, H. An Enantioselective Synthesis of (+)-Polyoxamic Acid via Phase-Transfer Catalytic Conjugate Addition and Asymmetric Dihydroxylation. *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 740–743. (g) Yoon, H.; Sim, T. Stereoselective Synthesis of (+)-Polyoxamic Acid Starting with a Chiral Aziridine. *Synthesis* **2013**, *45*, 3276–3280.
- (29) Jiang, L.; Chan, T.-H. Borane/ Bu_2BOTf : A Mild Reagent for the Regioselective Reductive Ring Opening of Benzylidene Acetals in Carbohydrates. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 355–358.
- (30) Mandhapati, A. R.; Yang, G.; Kato, T.; Shcherbakov, D.; Hobbie, S. N.; Vasella, A.; Böttger, E. C.; Crich, D. Structure-Based Design and Synthesis of Apramycin-Paromomycin Analogues: Importance of the Configuration at the 6'-Position and Differences between the 6'-Amino and Hydroxy Series. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 14611–14619.
- (31) Fernández-Herrera, M. A.; Mohan, S.; López-Muñoz, H.; Hernández-Vázquez, J. M. V.; Pérez-Cervantes, E.; Escobar-Sánchez, M. L.; Sánchez-Sánchez, L.; Regla, I.; Pinto, B. M.; Sandoval-Ramírez, J. Synthesis of the Steroidal Glycoside (25*R*)-3 β ,16 β -Diacetoxy-12,22-Dioxo-5 α -Cholestan-26-yl β -D-Glucopyranoside and Its Anti-Cancer Properties on Cervicouterine HeLa, CaSki, and ViBo Cells. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45*, 4827–4837.
- (32) Reantragoon, R.; Corbett, A. J.; Sakala, I. G.; Gherardin, N. A.; Furness, J. B.; Chen, Z.; Eckle, S. B. G.; Uldrich, A. P.; Birkinshaw, R. W.; Patel, O.; Kostenko, L.; Meehan, B.; Kedzierska, K.; Liu, L.; Fairlie, D. P.; Hansen, T. H.; Godfrey, D. I.; Rossjohn, J.; McCluskey, J.; Kjer-Nielsen, L. Antigen-Loaded MR1 Tetramers Define T Cell Receptor Heterogeneity in Mucosal-Associated Invariant T Cells. *J. Exp. Med.* **2013**, *210*, 2305–2320.
- (33) Crowther, M. D.; Dolton, G.; Legut, M.; Cailaud, M. E.; Lloyd, A.; Attaf, M.; Galloway, S. A. E.; Rius, C.; Farrell, C. P.; Szomolay, B.; Ager, A.; Parker, A. L.; Fuller, A.; Donia, M.; McCluskey, J.; Rossjohn, J.; Svane, I. M.; Phillips, J. D.; Sewell, A. K. Genome-Wide CRISPR-Cas9 Screening Reveals Ubiquitous T Cell Cancer Targeting via the Monomorphic MHC Class I-Related Protein MR1. *Nat. Immunol.* **2020**, *21*, 178–185.
- (34) Qin, W.; Cho, K. F.; Cavanagh, P. E.; Ting, A. Y. Deciphering Molecular Interactions by Proximity Labeling. *Nat. Methods* **2021**, *18*, 133–143.

- (35) Geri, J. B.; Oakley, J. V.; Reyes-Robles, T.; Wang, T.; McCarver, S. J.; White, C. H.; Rodriguez-Rivera, F. P.; Parker Jr, D. L.; Hett, E. C.; Fadeyi, O. O.; Oslund, R. C.; MacMillan, D. W. C. Microenvironment Mapping via Dexter Energy Transfer on Immune Cells. *Science* **2020**, *367*, 1091–1097.
- (36) Oslund, R. C.; Reyes-Robles, T.; White, C. H.; Tomlinson, J. H.; Crotty, K. A.; Bowman, E. P.; Chang, D.; Peterson, V. M.; Li, L.; Frutos, S.; Vila-Perelló, M.; Vlerick, D.; Cromie, K.; Perlman, D. H.; Ingale, S.; O'Hara, S. D.; Roberts, L. R.; Piizzi, G.; Het, E. C.; Hazuda, D. J.; Fadeyi, O. O. Detection of Cell-Cell Interactions via Photocatalytic Cell Tagging. *Nat. Chem. Biol.* **2022**, *18*, 850–858.
- (37) Livingstone, K.; Little, G.; Jamieson, C. Recent Advances in the Generation of Nitrilium Betaine 1,3-Dipoles. *Synthesis* **2021**, *53*, 2395–2407.
- (38) Blasco, E.; Sugawara, Y.; Lederhose, P.; Blinco, J. P.; Kelterer, A.-M.; Barner-Kowollik, C. Understanding Reactivity Patterns in Light-Induced Nitrile Imine Mediated Tetrazole–Ene Cycloadditions. *ChemPhotoChem* **2017**, *1*, 159–163.
- (39) Zhao, S.; Dai, J.; Hu, M.; Liu, C.; Meng, R.; Liu, X.; Wang, C.; Luo, T. Photo-Induced Coupling Reactions of Tetrazoles with Carboxylic Acids in Aqueous Solution: Application in Protein Labelling. *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 4702–4705.
- (40) Herner, A.; Marjanovic, J.; Lewandowski, T. M.; Marin, V.; Patterson, M.; Miesbauer, L.; Ready, D.; Williams, J.; Vasudevan, A.; Lin, Q. 2-Aryl-5-Carboxytetrazole as a New Photoaffinity Label for Drug Target Identification. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 14609–14615.
- (41) Strieth-Kalthoff, F.; James, M. J.; Teders, M.; Pitzer, L.; Glorius, F. Energy Transfer Catalysis Mediated by Visible Light: Principles, Applications, Directions. *Chem. Soc. Rev.* **2018**, *47*, 7190–7202.
- (42) Guerra, C.; Ayarde-Henríquez, L.; Rodríguez-Neúñz, Y. A.; Ensuncho, A.; Chamorro, E. Elucidating the N–N and C–N Bond-breaking Mechanism in the Photoinduced Formation of Nitrile Imine. *ChemPhysChem* **2023**, *24*, e202200867.
- (43) Menzel, J. P.; Noble, B. B.; Lauer, A.; Coote, M. L.; Blinco, J. P.; Barner-Kowollic, C. Wavelength Dependence of Light-Induced Cycloadditions. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 15812–15820.
- (44) Zhang, J.; Liu, J.; Li, X.; Ju, Y.; Li, Y.; Zhang, G.; Li, Y. Unexpected Cyclization Product Discovery from the Photoinduced Bioconjugation Chemistry between Tetrazole and Amine. *J. Am. Chem. Soc.* **2024**, DOI: 10.1021/jacs.3c11574.
- (45) Livingstone, K.; Bertrand, S.; Jamieson, C. One-Pot Suzuki-Hydrogenolysis Protocol for the Modular Synthesis of 2,5-Diaryltetrazoles. *J. Org. Chem.* **2020**, *85*, 7413–7423.
- (46) Ortiz-Rojano, L.; Rojas-Martín, J.; Rodríguez-Díaz, C.; Carreño, M. C.; Ribagorda, M. Light-Induced Tetrazole-Quinone 1,3-Dipolar Cycloadditions. *Chem. Eur. J.* **2019**, *25*, 15050–15054.
- (47) Bach, K.; Beerkens, B. L. H.; Zanon, P. R. A.; Hacker, S. M. Light-Activatable, 2,5-Disubstituted Tetrazoles for the Proteome-Wide Profiling of Aspartates and Glutamates in Living Bacteria. *ACS Cent. Sci.* **2020**, *6*, 546–554.
- (48) Uvyn, A.; De Coen, R.; Gruijs, M.; Tuk, C. W.; De Vrieze, J.; van Egmond, M.; De Geest, B. G. Efficient Innate Immune Killing of Cancer Cells Triggered by Cell-Surface Anchoring of Multivalent Antibody-Recruiting Polymers. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, *58*, 12988–12993.

総括

以上、著者は MAIT 細胞の創薬利用を見据えた機能制御リガンドの探索・構造活性相関研究、及び創薬利用・機能解明に資する基盤的研究に取り組んだ。

第一章第一節では、5-OP-RU の全立体異性体、及び関連化合物を合成し、その活性を網羅的に評価した。その結果、MAIT 細胞を活性化する上で、2'位と3'位のヒドロキシ基が重要な役割を担っていることを見出した。また、相互作用解析を実施し、MAIT 細胞の TCR からのリガンド認識において重要な相互作用を同定した。

第一章第二節では、効率的に MR1 リガンドを探索するために、MR1 の細胞表面量を指標とするリガンドスクリーニング法を確立した。また、本手法により、新たに *coniferyl aldehyde* を MR1 リガンドとして同定し、その機能評価・相互作用解析を実施した。これにより、MR1 から抗原提示を受ける上で重要な相互作用を同定した。

第一章において得られたこれらの知見は、MAIT 細胞制御分子の合理的なデザインやバーチャルスクリーニングの精度向上に貢献するものと期待される (**Figure S-1**)。

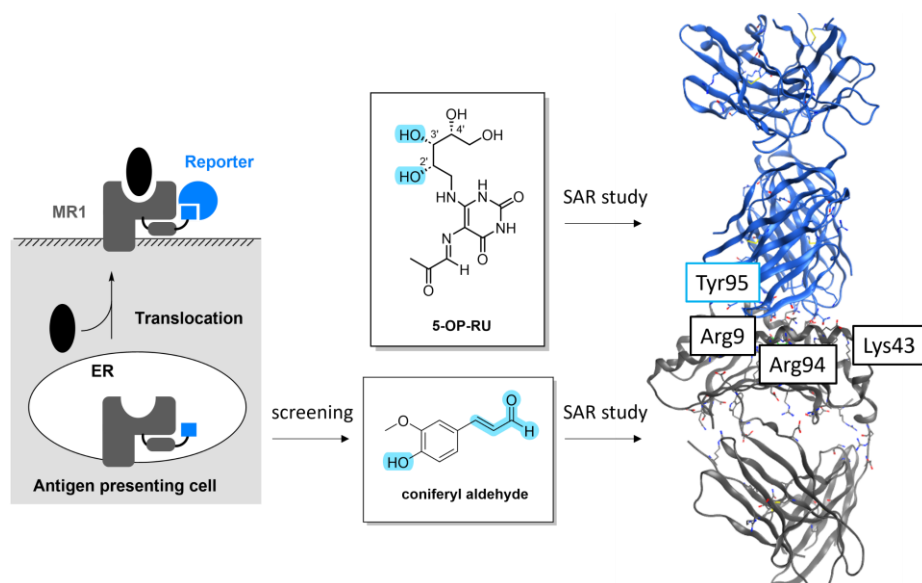


Figure S-1. Summary of Chapter 1.

第二章第一節では、可視光レドックス触媒を用いて、糖誘導体から *alditol* 構造を構築する反応を開発した (**Figure S-2**)。また、本手法により構築した *alditol* から、*polyoxamic acid* への誘導化に成功した。本手法は、極性官能基が連続的に配置された直鎖構造を持つ生物活性天然物の構造活性相関研究の推進に資するものと考えられる。

第二章第二節では、*tetrazole* を用いて、光触媒依存的にカルボン酸を標識する反応を開発した (**Figure S-2**)。また、本手法は、タンパク質の標識にも応用可能であることが確認された。今後本手法が MR1T 細胞の検出へ応用されることが期待される。

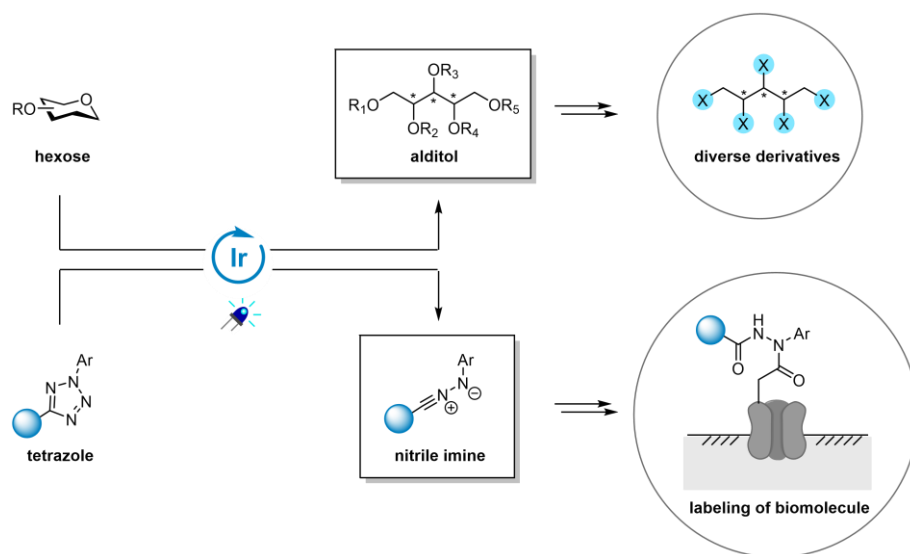


Figure S-2. Summary of Chapter 2.

論文目録

第一章

第一節

The Effects of 5-OP-RU Stereochemistry on Its Stability and MAIT-MR1 Axis

Takuro Matsuoka, Chihiro Motozono, Akira Hattori, Hideaki Kakeya, Sho Yamasaki, Shinya Oishi, Hiroaki Ohno, Shinsuke Inuki
ChemBioChem **2021**, 22, 672–678.

第二節

Establishment of an MR1-Presentation Reporter Screening System and Identification of Phenylpropanoid Derivatives as MR1 Ligands.

Takuro Matsuoka, Akira Hattori, Shinya Oishi, Mitsugu Araki, Bio Ma, Toshiki Fujii, Norihito Arichi, Yasushi Okuno, Hideaki Kakeya, Sho Yamasaki, Hiroaki Ohno, Shinsuke Inuki
J. Med. Chem. **2023**, 66, 12520–12535.

第二章

第一節

Total Synthesis of (+)-Polyoxamic Acid via Visible-Light-Mediated Photocatalytic β -Scission and 1,5-Hydrogen Atom Transfer of Glucose Derivative

Takuro Matsuoka, Shinsuke Inuki, Takashi Miyagawa, Shinya Oishi, Hiroaki Ohno
J. Org. Chem. **2020**, 85, 8271–8278.

第二節

Photocatalytic Nitrile Imine Formation for the Labeling of Carboxylic Acids in the Cellular Milieu

Takuro Matsuoka, Norihito Arichi, Hiroaki Ohno, Shinsuke Inuki
In preparation.

謝辞

本研究の遂行にあたり、ご懇篤なるご指導とご鞭撻を賜りました京都大学大学院薬学研究科教授・大野浩章先生、同准教授・井貫晋輔先生に心より感謝申し上げます。

研究の様々な点で有益な御助言・ご協力を頂きました京都薬科大学教授・大石真也先生、京都大学大学院薬学研究科助教・有地法人先生、京都大学大学院薬学研究科助教・秋葉宏樹先生に深甚なる感謝の意を表します。

日夜共に研究に取り組んだOB・OGを含めた京都大学大学院薬学研究科創薬有機化学分野の諸氏、事務関連での支援をして下さった藤井柳子氏、山田嘉奈子氏、米澤徳子氏、荒川尚子氏に深く感謝いたします。

MAIT細胞活性化リガンドの構造活性相関研究、及びMR1リガンドの探索研究を遂行するにあたりご協力賜りました、大阪大学大学院微生物病研究所教授・山崎晶先生、京都大学大学院薬学研究科教授・掛谷秀昭先生、同准教授・服部明先生、京都大学大学院医学研究科教授・奥野恭史先生、同特定准教授・荒木望嗣先生、熊本大学ヒトレトロウイルス学共同研究センター准教授・本園千尋先生、理化学研究所計算科学研究センター研究員・馬彪先生に厚く御礼申し上げます。

本論文を査読して頂き、多大なるご指導を賜りました掛谷秀昭教授、小野正博教授に深甚なる感謝の意を表します。

本研究の一部は、京都大学科学技術イノベーション創出フェローシップ、独立行政法人日本学術振興会の援助により達成されたものであり、ここに感謝の意を表します。

最後に、京都大学大学院への進学の機会を与え、長きにわたる学生生活を支えてくださった親族、ならびに友人たちに心から感謝いたします。