

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 4 月 17 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K17851

研究課題名（和文）ライブラリスクリーニング法による高活性ペプチド触媒の創製

研究課題名（英文）Development of highly active peptide catalysts by library screening

研究代表者

赤川 賢吾（Akagawa, Kengo）

東京大学・生産技術研究所・助教

研究者番号：60548733

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：コンビナトリアル化学的手法で構築したペプチドライブラリの中から高活性な触媒をスクリーニングする簡便な方法確立し、これを用いたペプチド触媒の創製を行った。N末端にプロリンをもち、配列中にヒスチジンあるいはリシンを含む二官能性ペプチド触媒、相補的なエナンチオ選択性を示すペプチド触媒など、新規なペプチド触媒を開発した。不斉マイケル付加反応を高効率・高選択的に行うことができたのに加え、これまで達成されていない反応を促進するペプチド触媒を見出すことができた。

研究成果の概要（英文）：A facile screening method for finding active catalysts from the peptide library constructed in a combinatorial manner has been established. With this method, novel bifunctional peptide catalysts having N-terminal proline and a histidyl residue were developed. The screening in aqueous media afforded the prolyl peptide with a lysine residue. In the presence of these peptide catalysts, asymmetric Michael addition could be performed with high efficiency and enantioselectivity. Notably, two kinds of histidine-containing peptides showed opposite enantioselectivities, although both peptides had common N-terminal residues. By applying the screening method to the reaction that could not be performed with other catalysts, the peptide effective for that reaction was successfully identified.

研究分野：有機合成化学

キーワード：ペプチド触媒 ライブラリスクリーニング コンビナトリアル化学 不斉マイケル付加

### 1. 研究開始当初の背景

酵素は高効率・高活性な触媒の代表であり、人工的な酵素模倣の触媒としてペプチドが挙げられる。ペプチド触媒は構成アミノ酸の種類と組み合わせに限りがないため、高い可能性をもつ反面、最適配列を見出すのが難しいという問題がある。通常、実験的に試行錯誤を重ねて配列検討を行うため、ペプチド触媒の開発には多大な時間と労力がかかる。もし、コンビナトリアル化学的手法により作製したペプチドライブラリの中から高活性な配列をスクリーニングすることができれば有効な触媒開発の手段となる。しかしながら、これまで報告されているスクリーニング方法は限られた反応にしか適用できないという欠点があった。

### 2. 研究の目的

(1) キラルなアミン触媒を用いた反応は数多く知られており、ペプチド N 末端のアミノ基は汎用性の高い有機触媒となり得る。そこでまず、様々な配列を含むペプチドライブラリの中から高活性なアミン触媒をスクリーニングする簡便な手法の確立を目指した。これにより、広範な反応に対してペプチドライブラリのスクリーニングが可能になると期待した。

(2) 大規模ライブラリのスクリーニングを行い、新たな骨格や機能をもつペプチド触媒の創製を目指した。また、これまでに達成されていない反応にスクリーニング手法を適用することでペプチド触媒の可能性を引き出し、新反応の実現を試みた。

### 3. 研究の方法

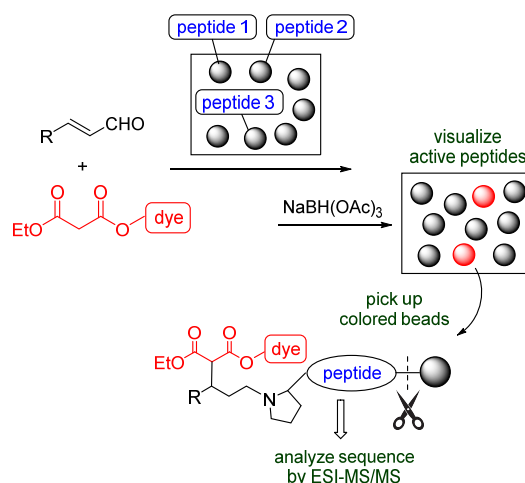
(1) マロン酸ジエステルの  $\alpha$ -不飽和アルデヒドへの不斉マイケル付加をモデル反応とし、ビーズ上に構築したペプチドライブラリの中から高効率・高選択的な触媒を見出すスクリーニング法について検討した。触媒サイクルの律速段階を促進するペプチドのスクリーニングが可能であることを示すため、反応の速度論的解析を行った。

(2) スプリット・ミックス法によって数万~数百万種類の配列のバリエーションをもつペプチドライブラリを作製し、スクリーニングを行った。検出された配列のペプチドを合成し、実際の反応に用いて触媒能を評価した。新たに得られた高活性なペプチドの構造と機能について計算と実験の両面から考察した。

### 4. 研究成果

(1) ペプチド N 末端のアミノ基と基質のカルボニル基との間の還元的アミノ化反応を

鍵としたライブラリスクリーニング法を開発した。



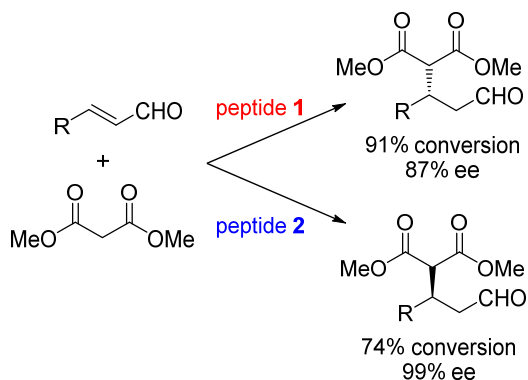
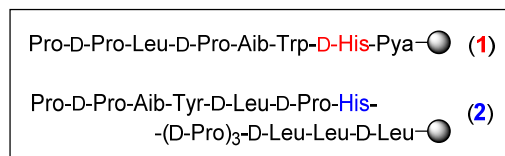
この方法ではあらかじめペプチドライブラリに基質や反応のレポーター分子を導入することなく、触媒活性に応じたペプチドの着色が可能である。ライブラリ全体の触媒活性を一度に可視化できるため、迅速にスクリーニングを行うことができる。

触媒反応の各ステップについて速度論的解析を行い、アミノ基と基質のカルボニル基が縮合してできる中間体に対して色素ラベル化した求核剤が付加する段階が律速であること、触媒と生成物の間には縮合と解離の平衡があり、縮合した状態が熱力学的に安定であること、この縮合・解離反応はビーズ内では速いが、ビーズ間では遅いことを明らかにした。これらのことは、触媒と基質が等モル量ある場合、ビーズ内のペプチドによってできた生成物が他のビーズに移動することはなく、律速段階の付加を促進するペプチド程濃く着色されることを意味している。以上より、色の濃淡で触媒活性の評価を行う本手法の妥当性を示すことができた。

(2) ペプチド配列を完全にランダム化して構築した大規模ライブラリを用いてスクリーニングを行い、新たな高活性ペプチド触媒を創製した。構成アミノ酸の異なる二種類のライブラリを有機溶媒中でスクリーニングしたところ、二種類のペプチド群が得られた。興味深いことに、これらの配列は N 末端の数残基が同じにもかかわらず、全く逆のエナンチオ選択性を示した。本スクリーニング法は触媒活性の高いペプチド配列を検出するものであり、反応のエナンチオ選択性とは無関係である。しかし、側鎖が関与して反応を促進するペプチドの場合、反応面も側鎖によるコントロールを受けて高選択的になる傾向がある。今回得られた二種類のペプチド群は異なる立体構造によって反応面がコントロールされ、逆のエナンチオ選択性を示したと考えられる。

次に、これらの配列をもとにして第二世代の

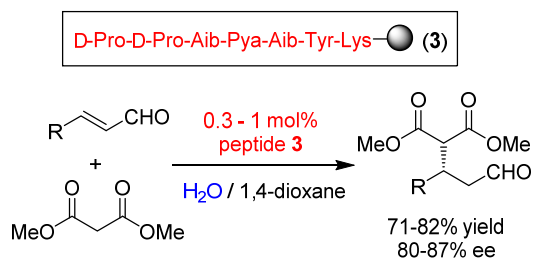
ペプチドライブラリを構築した。ペプチドの高次構造形成に關与する重要アミノ酸を固定して他の部分をランダム化したライブラリと、最も良い触媒能を示したペプチド配列のC末端を伸長して作製したライブラリから、さらなる高効率・高選択的なペプチド触媒 1, 2 を得ることができた。



ペプチド触媒 2 を最適条件下で用いて基質一般性を検討し、2 mol% の触媒量で 80~84% の収率、96~99% ee のエナンチオ選択性で反応が行えることを示した。

ペプチド 1, 2 とともにヒスチジン残基を配列中に含むが、このアミノ酸の側鎖が反応中心の近傍に配置されていることが構造計算により示唆された。ヒスチジンの役割について検討したところ、N 末端のアミノ基と基質のカルボニル基との間で形成される中間体に対して可逆的な付加を起こし、そのために基質をペプチド触媒上にトラップする効果があることが分かった。このような機能をもつ二官能性のペプチド触媒をあらかじめデザインする、あるいは試行錯誤の配列検討によって見つけることは難しく、ライブラリスクリーニング法による触媒開発の有用性が示された。

(3) 本スクリーニング法の鍵反応である還元的アミノ化は水存在下でも進行することが分かり、水系溶媒中でのライブラリスクリーニングを行った。水系溶媒中ではアミノ酸側鎖の官能基のはたらきやペプチドの構造が有機溶媒中とは異なると考えられ、新たな配列が得られるものと期待した。スクリーニングにより C 末端にリシンを含むペプチドが得られ、このアミノ酸残基が触媒活性に大きく影響することが分かった。最適条件下では 0.3~1 mol% の触媒量で反応が進行し、これまでで最も高い触媒活性を示した。



(4) ペプチドライブラリのスクリーニングをこれまでに達成されていない反応に適用した。クロトンアルデヒドのような不飽和アルデヒドを用いたグアイアズレンのフリーデル・クラフツ型のアルキル化反応は報告例がなく、またこれまでに開発したペプチド触媒を用いても反応は進行しなかった。そこでこの反応に対してライブラリスクリーニングを行ったところ、エナンチオ選択的に反応を進行させる新たなペプチド配列を見出すことに成功した。今後ペプチドの構造・機能などに関する検討が必要だが、本研究で開発したスクリーニング法によって通常の触媒では困難な反応を実現したことは意義深い。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 8 件)

Kengo Akagawa, Junichi Satou, Kazuaki Kudo,  
“Exploration of Structural Frameworks for Reactive and Enantioselective Peptide Catalysts by Library Screenings”,  
*The Journal of Organic Chemistry*,  
査読有, vol.81, 2016, pp.9396-9401.  
DOI:10.1021/acs.joc.6b01591

Kengo Akagawa, Yumika Iwasaki, Kazuaki Kudo,  
“Library Screening in Aqueous Media To Develop a Highly Active Peptide Catalyst for Enantioselective Michael Addition of a Malonate”,  
*European Journal of Organic Chemistry*,  
査読有, 2016, pp.4460-4464.  
DOI:10.1002/ejoc.201600828

Atsushi Ueda, Tomohiro Umeno, Mitsunobu Doi, Kengo Akagawa, Kazuaki Kudo, Masakazu Tanaka,  
“Helical-Peptide-Catalyzed Enantioselective Michael Addition Reaction and Their Mechanistic Insights”,  
*The Journal of Organic Chemistry*,  
査読有, vol.81, 2016, pp.6343-6356.  
DOI:10.1021/acs.joc.6b00982

Shingo Hattori, Kengo Akagawa, Kazuaki

Kudo, Kazuyuki Ishii,  
“Determination of the Absolute Configuration of Side Chains of Basic Amino Acid Residues Using the Water-Soluble Porphyrin-Based Exciton Chirality Method”,  
*The Journal of Physical Chemistry B*,  
査読有, vol.120, 2016, pp.10280-10287.  
DOI:10.1021/acs.jpcc.6b07925

Kengo Akagawa, Tomoaki Hirata, Kazuaki Kudo,  
“Asymmetric Epoxidation of Enones by Peptide-based Catalyst: A Strategy Inverting Julia-Colonna Stereoselectivity”,  
*Synlett*,  
査読有, vol.27, 2016, pp.1217-1222.  
DOI:10.1055/s-0035-1560597

Kengo Akagawa, Kazuaki Kudo,  
“Solvolysis of Formylphenyl Esters by a Bifunctional Peptide Catalyst”,  
*Chemistry Letters*,  
査読有, vol.45, 2016, pp.300-302.  
DOI:10.1246/d.151154

Kengo Akagawa, Nobuhiro Nishi, Isao Yoshikawa, Kazuaki Kudo,  
“Kinetic Resolution of a Planar-Chiral [2.2]Paracyclophane Derivative by Helical-Peptide-Catalyzed Michael Addition of Nitromethane”,  
*European Journal of Organic Chemistry*,  
査読有, 2015, pp.5055-5059.  
DOI:10.1002/ejoc.201500594

Kengo Akagawa, Midori Akiyama, Kazuaki Kudo,  
“Peptide-Catalyzed Desymmetrization of an Achiral Ferrocenyl Compound To Induce Planar Chirality”,  
*European Journal of Organic Chemistry*,  
査読有, 2015, pp.3894-3898.  
DOI:10.1002/ejoc.201500428

[学会発表](計10件)

Kengo Akagawa, Kazuaki Kudo  
“Development of Active Peptides for Asymmetric Catalysis by Library Screening”  
Protein & Peptide Conference-2017, 2017年3月27日, Hilton Fukuoka Sea Hawk (福岡県)

服部伸吾, 赤川賢吾, 工藤一秋, 石井和之  
「励起子キラリティー法を用いたペプチドの円偏光二色性解析」  
光電子融合研究センター公開シンポジウム

～光電子融合と先端材料～, 2016年4月21日, 東京大学生産技術研究所(東京都)

赤川賢吾

「選択的反応のためのペプチド触媒の開発」  
日本薬学会 第136年会, 2016年3月27日, パシフィコ横浜(神奈川県)

佐藤潤一, 赤川賢吾, 工藤一秋  
「大規模ライブラリスクリーニングによる新規ペプチド触媒の探索」  
日本化学会 第96春季年会, 2016年3月27日, 同志社大学 京田辺キャンパス(京都府)

Zhaonan Du, Kengo Akagawa, Kazuaki Kudo  
“Development of Peptide Catalysts for Activating Substrates via Michael-Type Addition”  
日本化学会 第96春季年会, 2016年3月24日, 同志社大学 京田辺キャンパス(京都府)

赤川賢吾, 岩崎由美香, 工藤一秋  
「水系溶媒中でのライブラリスクリーニング法による新規ペプチド触媒の創製」  
有機分子触媒 第6回公開シンポジウム, 2016年1月22日, 大阪科学技術センター(大阪府)

Kengo Akagawa

“Screening of peptide libraries for discovering efficient aminocatalysts”  
Pacifichem 2015, 2015年12月19日, Hawaii Convention Center (Honolulu, USA)

佐藤潤一, 赤川賢吾, 工藤一秋  
「大規模ライブラリスクリーニングによる新規ペプチド触媒の探索」  
第5回 CSJ 化学フェスタ, 2015年10月14日, タワーホール船堀(東京都)

Zhaonan Du, Kengo Akagawa, Kazuaki Kudo  
“Asymmetric Intramolecular Morita-Baylis-Hillman Reaction Promoted by Peptide Catalysts with Multiple Functional Groups”  
第5回 CSJ 化学フェスタ, 2015年10月13日, タワーホール船堀(東京都)

Kengo Akagawa

“Development of efficient peptide catalysts by a facile library screening method”  
The 39th Naito Conference, 2015年7月7日, シャトラーゼ ガトーキングダム サッポロ(北海道)

[図書](計1件)

Kengo Akagawa, John Wiley & Sons Ltd,  
Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis [Online],

DOI: 10.1002/047084289X.rn01909

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.iis.u-tokyo.ac.jp/~kkudo/publication.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

赤川 賢吾 (AKAGAWA, Kengo)

東京大学・生産技術研究所・助教

研究者番号: 60548733

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし