

平成21年 5月18日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18580108
 研究課題名（和文）超高压反応条件の汎用性拡張をめざして—保護基の導入・除去への応用—
 研究課題名（英文）Deprotection under high-pressure conditions

研究代表者
 松尾 一郎（MATSUO ICHIRO）
 群馬大学・大学院工学研究科・教授
 研究者番号：40342852

研究成果の概要：

超高压反応条件を用いた有機合成反応は常圧では進行しない反応への応用が主であった。本研究では、一般的な反応に超高压反応条件を適応することにより、その汎用性の拡張をめざした。保護基の導入および除去反応、エステル化やアミド化反応に超高压条件を適応した結果、反応の進行には圧力依存性があること、および溶媒の選択が重要であることが明らかになった。また、ペプチド合成において反応試薬の軽減も可能なことを確認した。以上のことより、超高压反応条件は、反応時間の短縮や効率化以外にも、試薬の使用量の軽減といった観点からも有用な方法であることが示された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	900,000	0	900,000
2007年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	630,000	3,630,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・生物生産化学・生物有機化学

キーワード：超高压反応、脱保護反応、ペプチド合成、有機化学

1. 研究開始当初の背景

有機合成化学者の最大の興味は、欲しいものだけを無駄なく作り上げることにある。そして、立体障害や反応性の低さ、熱不安定性などを克服するために、酸や塩基、光や熱、金属触媒など様々な試薬や手法が開発されてきた。この様な進歩のなかにあつて圧力の効果を利用した反応も数多く報告されている（松本澄、井畑敏一、超高压有機合成、ナカニシヤ出版、1999；小槻日吉三、隅本康司、有機合成化学、63、770-779、2005）。特に分

子数の減少を伴うような反応や環状遷移状態を経由する反応、立体障害による反応速度の低下が見られる反応、加溶媒分解反応や各種縮合反応のようなイオン性の中間体を経由する反応において絶大な威力を発揮し、今まで合成できなかった骨格の構築や反応の促進効果など、有機合成化学の発展に貢献してきた。我々も糖鎖の全合成研究において、立体的に込み合った位置に導入した *tert*-ブチルジフェニルシリル (TBDPS) 基を選択的に除去することができず、合成経路の変更を

迫られた。その際、超高压条件を適応することにより、他の官能基に影響を与えることなく、選択的かつ収率よく TBDPS 基の除去が可能となった (I. Matsuo, et al., "Desilylation under High Pressure" *Tetrahedron Lett.*, 43, 3273-3275, 2002)。そして、本反応を積極的に利用することにより種々の N-結合型糖鎖の合成に成功した。

この様に超高压条件は有用ではあるが、既存の手法ではどうしても上手くいかないときに“力づくでも望みの反応を実現させる”また“超高压条件でのみ進行する反応の探索”が中心に進められ、決して一般性が高い方法とはなっていないのが現状である。

2. 研究の目的

前述したように、超高压反応は特殊な方法であると考えられているが、有機合成において一般的に用いられる保護基の導入や除去反応に対して超高压条件を積極的に利用し、反応の簡便化や効率化などの利点を示すことができれば、一般的になり、多くの研究者に利用されるようになることを期待される。そこで、超高压反応の汎用性の向上を目指して脱保護反応を 1) 圧力依存性と 2) 超高压反応条件下の溶媒効果に着目し検証を行い、その一般性を高めると共に、超高压反応の特徴でもある 3) 常圧では反応しない基質を利用したペプチド合成と 4) 合成困難な N-アルキル化されたペプチドの合成を目的として研究に取り組んだ。

3. 研究の方法

(1) 超高压反応装置

超高压反応は独立行政法人理化学研究所化学分析室所有の超高压反応装置 (理研精機社製とテラメックス社製) を用いた (図 1)。反応容器は 5 mL、1 mL および 0.2 mL の容量のものを用いた。これらの装置は 500 気圧から 14000 気圧 (1.4 GPa) までの圧力を 500 気圧単位でコントロールする事ができる。



図 1 : 超高压反応装置

(2) 超高压反応の解析

脱 TBDPS 基反応における圧力依存性および溶媒効果を検証する。各圧力下での反応変換率は HPLC を用いて定量的に解析する。同様に脱アセチル化反応における圧力効果を検証する。

(3) 常圧では困難なペプチド合成

超高压条件下 (8000 気圧) アミノ酸メチルエステルを利用したペプチド合成反応を検討する。また、N-アルキル化されたアミノ酸を含むペプチド合成に超高压条件を適応することにより、反応収率の向上を目指す。

4. 研究成果

(1) 脱保護反応における圧力依存性の検証

モデル反応として脱 TBDPS 化および脱アセチル化反応について反応進行率に対する圧力依存性を検証した。立体的に込み合った位置の水酸基に TBDPS 基を有するマンノース誘導体を、DMF 中フッ化水素・ピリジン脱シリル化剤として反応を行った。各圧力下、2 時間後における TBDPS 基の除去率を HPLC にて分析した。その結果、脱 TBDPS 化反応は圧力依存的に加速されることが示された (図 2)。

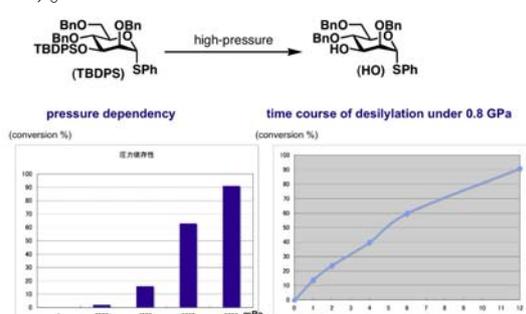


図 2 : 脱 TBDPS 化反応における圧力依存性

また、種々の反応溶媒を検討した結果、アセトニトリルやピリジン中では、DMF に比べて 3 倍以上の効率で反応が進行することが示された (図 3)

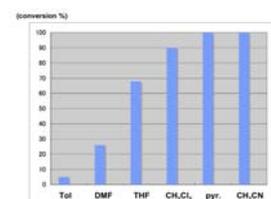


図 3 : 溶媒効果の検証

同様に、アセチル基、リン酸エステル、脂肪酸エステルを含むグルコース誘導体の選択的脱アセチル化反応を検討した。その結果、超高压条件下 (5000 気圧) では常圧に比べて低濃度の脱アセチル化試薬で反応が進行し、さらに約 5 倍程度の反応加速効果が明らかとなった。

(2) メチルエステルを利用したペプチド合成

ペプチド合成は通常、カルボン酸を活性エステルや縮合剤を用いて活性化後、アミノ基と反応させる。メチルエステルはその反応性の低さから通常ペプチド合成には利用されない。しかし超高压条件下、メチルエステルを用いてペプチド結合の形成が可能となれば、特別な縮合剤を必要とせず、さらに反応残渣はメタノールであるために反応試薬の除去等が必要なく、効率的なペプチド合成法

となり得る。メチルエステルを用いたペプチド合成は、すでに報告があるものの、その利用は限られている (Klarner et al J. Prakt. chem., 339, 359-363, 1997)。そこで、アミノ酸メチルエステルの可能性を探るべく、立体的要因を考慮して Val 誘導体と Gly 誘導体をそれぞれ調製し、アミノ酸-OtBu エステルとの縮合反応を検討した (図 4)。

methylester	amino acid	Product	yield
Z-Val-OMe	H ₂ N-Ala-OtBu	Z-Val-Ala-OtBu	n.d
	H ₂ N-Leu-OtBu	Z-Val-Leu-OtBu	n.d
	H ₂ N-Gly-OtBu	Z-Val-Gly-OtBu	(12 %)
	H ₂ N-Val-OtBu	Z-Val-Val-OtBu	n.d
Z-Gly-OMe	H ₂ N-Ala-OtBu	Z-Gly-Ala-OtBu	(19 %)
	H ₂ N-Leu-OtBu	Z-Gly-Leu-OtBu	(16 %)
	H ₂ N-Gly-OtBu	Z-Gly-Gly-OtBu	(36 %)
	H ₂ N-Val-OtBu	Z-Gly-Val-OtBu	(14 %)

conditions : 0.8GPa, THF, 7 days

図 4 : 超高压反応における立体効果の検証

その結果、立体的に大きいメチルエステルを用いた場合はペプチドの生成率が低く、アミノ基側の側鎖置換基はペプチド結合の形成に大きな影響を与えない事が示された。

グリシンメチルエステルを用いたペプチド合成をモデルに、反応溶媒の検討を行った (図 5)。極性溶媒、非極性溶媒およびプロトン性溶媒を用いて溶媒効果の検証を行った結果、プロトン性溶媒が最も効率よくジペプチドを与えることが明らかとなった。また、極性溶媒 > 非極性溶媒の順に生成率が低下した。以上のことより、超高压下のジペプチド合成において、溶媒の選択が重要であることが明らかとなった。

Z-Gly-OMe + H₂N-Gly-OtBu → Z-Gly-Gly-OtBu
0.8GPa, 7 days

solvents	conversion	solvents	conversion
1-propanol	79 %	THF	36 %
methanol	57 %	DMSO	19 %
DMF	48 %	1,4-dioxane	18 %
CH ₃ CN	41 %	CH ₂ Cl ₂	8 %

図 5 : 超高压反応における溶媒効果の検証

(3) 超高压条件を利用した N-アルキルアミノ酸の縮合反応の検討

チオエステルを経由するペプチド合成はタンパク質合成などに広く応用されている。近年、N-アルキルシステインを補助因子とする方法が開発され (Hojo, H et al., Tetrahedron Lett., 48, 25-28, 2007)、従来法に比べ格段の合成収率の向上が図られた。しかしながら C-末端がグリシン以外のアミノ酸では、アミノ基上のアルキル基のために鍵中間体となる N-アルキルシステインの合成が困難であった。そこで、超高压条件を利用

して、N-アルキルシステインを含むペプチドの合成を検討した。アミノ酸フルオリドと N-エチルシステインの縮合反応は常圧下ではほとんど生成物が得られなかったのに対し (8 %以下)、超高压条件下 (8000 気圧) では目的のジペプチドが収率よく得られた。その結果を図 6 に示す。また、本反応において 2-5 % 程度のジペプチド異性体の生成を確認した。MS および X-線結晶構造解析により、C 末端がエピメリ化していることが明らかとなった。常圧下でも縮合剤によってはエピメリ化が起こることは知られている。以上、合成困難な N-アルキルペプチドが、超高压条件を利用することにより常圧下の反応に比べて 10 倍以上の収率で得られることが明らかとなった。今後はエピメリ化の制御が課題である。

fluorides	N-Ethyl amino acid	Product	yield
Fmoc-Leu-F	EtN-Cys(Trt)-OAl	Fmoc-Leu-N-Cys-OAl ^{Et}	(70 %)
Fmoc-Ala-F		Fmoc-Ala-N-Cys-OAl ^{Et}	(67 %)
Fmoc-Gln(Trt)-F		Fmoc-Gln(Trt)-N-Cys-OAl ^{Et}	(67 %)
Fmoc-Asp(tBu)-F		Fmoc-Asp(tBu)-N-Cys-OAl ^{Et}	(74 %)

conditions : 0.8GPa, CH₂Cl₂, DIEA, 3h

図 6 : 超高压反応による N-エチルシステインの縮合反応

(4) まとめ

超高压反応の汎用性の向上を目指して、有機合成においてよく利用される TBDPS 基やアセチル基の脱保護反応を行った。その結果、いずれの反応も圧力依存性を示し、圧力が高い方が反応が効率的に進行することが示された。また、超高压反応条件下でも溶媒の選択が重要であることがわかった。常圧では反応しないメチルエステルを基質として利用したペプチド合成では、嵩高いアミノ酸の縮合には問題があるが、ジペプチドが得られることが示された。一方、糖タンパク質の化学合成における重要な鍵化合物である N-アルキルシステインを含んだペプチドを常圧下の 10 倍以上の収率で合成することに成功した。

超高压反応は、今まで合成することができなかった化合物を手にする方法として優れていることはいままでのない。そのような手法をあえて常圧でも進行する反応に適応することにより、超高压反応条件がより身近になる。そして超高压反応が、エネルギー消費が少なく、アトムエコノミーに優れ、環境にも優しく、そして精製などの手間も省ける。なによりも化学者に優しい方法である。今後より一層、超高压反応の利便性をアピールすることにより“困ったときの手段”ではなく“とりあえず圧力をかけてみようか”と言うレベルまで汎用性を向上させる試みは、

今後の有機合成化学の発展に貢献するものと確信する。

(5) 謝辞

日本学術振興会科学研究費補助金による本研究へのご援助に対し、厚くお礼申し上げます。本研究を進めるにあたり、有意義なご助言を頂いた理化学研究所 伊藤幸成主任研究員、東海大学 中原悠子博士、北條裕信教授、中原義昭教授に感謝致します。また、超高压反応装置を利用させて頂いた理化学研究所化学分析室 千原貞次博士に感謝致します。本研究は、最初の2年を理化学研究所で、最終年度は群馬大学工学研究科で行われたものです。日々の研究を支えていただいた高橋明美氏、小林京子技官に感謝致します。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計6件)

- ① K. Totani, I. Matsuo, (他2名、3番目) “Effects of macromolecular crowding on glycoprotein processing enzymes” J. Am. Chem. Soc., 130 2101-2107, 2008, 査読有
- ② A. Tatami, I. Matsuo (他4名、3番目) “Analyses of carbohydrate binding property of lectin-chaperone calreticulin” Biochem Biophys Res Commun., 346, 332-337, 2007, 査読有
- ③ T. Watanabe, I. Matsuo, (他3名、2番目) “Identification and characterization of an intracellular lectin, Calnexin, from *Aspergillus oryzae* using N-Glycan-Conjugated Beads” Biosci. Biotechnol. Biochem., 71, 2688-2696, 2007, 査読有
- ④ S. Hagihara, A. Miyazaki, I. Matsuo, A. Tatami, T. Suzuki, Y. Ito. “Fluorescently labeled inhibitor for profiling cytoplasmic peptide:N-glycanase” Glycobiology, 141-148, 2007, 査読有
- ⑤ S. Hagihara, I. Matsuo, (他2名、2番目) “Analysis of ER-associated glycoprotein degradation using synthetic glycopeptide probes” Biochem Biophys Res Commun., 360(2), 357-362, 2007, 査読有
- ⑥ I. Matsuo, K. Totani, (他2名、1番目) “Comprehensive synthesis of ER related high-mannose-type sugar chain by convergent strategy” Tetrahedron, 62, 8262-8277, 2006, 査読有

[学会発表] (計10件)

- ① 中原悠子、北條裕信、中原義昭、松尾一郎、伊藤幸成、糖ペプチドチオエステル

- 化のためのアミノアシルNCA素子の高圧下合成、日本農芸化学会、2009. 3. 28 福岡
- ② 松尾一郎、新井義行、中村直樹、林秀謙、渡邊泰祐、武田陽一、戸谷希一郎、伊藤幸成、蛍光糖鎖を用いたカルネキシンサイクルの解析、日本生化学会年会・日本分子生物学会年会、2008. 12. 9、神戸
 - ③ T. Watanabe, K. Totani, I. Matsuo, J. Maruyama, K. Kitamoto, Y. Ito, “Analysis of ER glycoprotein quality control system of *Aspergillus oryzae*”, International carbohydrate symposium, 2008. 8. 1, Oslo
 - ④ I. Matsuo, S. Hagihara, A. Miyazaki, T. Suzuki, Y. Ito” Fluorescently labeled inhibitor for profiling cytoplasmic peptide:N-glycanase”, International carbohydrate symposium, 2008. 8. 1, Oslo
 - ⑤ 松尾一郎、戸谷希一郎、伊藤幸成、糖鎖を介したタンパク質品質管理機構解明に向けた化学的アプローチ、日本生化学会、2008. 6. 21、桐生
 - ⑥ 松尾一郎、宮崎綾子、萩原伸也、武田陽一、鈴木匡、伊藤幸成、細胞内 Peptide-N-Glycanase 活性測定に向けた糖鎖分子プローブの合成、日本農芸化学会、2008. 3. 27、名古屋
 - ⑦ 松尾一郎、糖タンパク質糖鎖の機能解明に向けた合成化学的アプローチ、日本農芸化学会 関東支部シンポジウム、2008. 2. 23、東京 (招待講演)
 - ⑧ I. Matsuo, M. Takatani, Y. Ito, “Construction of N-Glycan library: Using top-down chemoenzymatic strategy” 14th European Carbohydrate Symposium, 2007. 9. 2, Lubeck, Germany
 - ⑨ 松尾一郎、萩原伸也、多々見篤、Yung-Son Hon、越野広雪、合田和央、高谷万紀、戸谷希一郎、伊藤幸成、レクチン様分子シャペロン: カルレティキュリンの糖鎖結合特異性の解析、日本糖質学会、2007. 8. 1、福岡
 - ⑩ I. Matsuo, T. Watanabe, Y. Ito, “High mannose glycan conjugated affinity beads: Search for new intracellular lectins from *Aspergillus oryzae*” RIKEN International symposium on Chemical Biology 2007, 2007. 6. 11、箱根

[図書] (計1件)

- ① 松尾一郎、伊藤幸成、“創薬を目指す有機合成最前線” 化学同人(分担)、2007年、201

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松尾 一郎 (MATSUO ICHIRO)

群馬大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号：40342852