

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24655076

研究課題名(和文) 合成生物学に向けた脱水型 S アリル化法の開発

研究課題名(英文) Development of Dehydrative S-Allylation toward Synthetic Biology

研究代表者

北村 雅人 (Kitamura, Masato)

名古屋大学・創薬科学研究科・教授

研究者番号：50169885

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000 円、(間接経費) 960,000 円

研究成果の概要(和文)：本研究では、人工的なペプチド修飾法の確立に向けて、標的官能基としてシステインチオール残基を取り上げて、S-アリル化触媒の開発を目指した。目的達成にむけて、当研究室で開発された CpRuAlIQA 触媒に着目した。本触媒存在下、単純なチオールに対して、1モル量のアリルアルコールを作用させると定量的にアリルスルフィドを得ることができる。水/アルコール系溶媒を用いても反応は進行する。この触媒を用いると、システイン塩酸塩に大しても S 選択的にアリル化が進行する。トリペプチドであるグルタチオンとしても反応は完結する。アリル基の位に置換基を導入してもよく、これを足掛かりに任意の官能基を導入できると期待される。

研究成果の概要(英文)：S-Allylated cysteine and peptides show various biological activities. In order to efficiently generate a series of chemical libraries, direct S-allylation of thiol-containing amino acid and peptides in the native form is favored. This ideal process has been firstly realized by use of our catalytic system consisting of either [CpRu(CH₃CN)₃]PF₆ and 2-quinolinecarboxylic acid or the *pai*-allyl Ru complex. The S-allylation process even in aqueous media including an acetate buffer system with high reactivity and S-chemoselectivity, suggesting a possibility of application of the present method for cysteine-containing proteins. Various C(2)-substituted allyl alcohols can be utilized, paving a way to a new type of lipopeptide library.

研究分野：合成有機化学

科研費の分科・細目：複合化学・合成化学

キーワード：アリルアルコール システイン ペプチド修飾 ルテニウム アリル化

1. 研究開始当初の背景

細胞内で生合成されたタンパク質は翻訳後修飾(PTM)され、はじめて生物機能が付与される。数多くの修飾可能アミノ酸残基のなかで「低い酸化還元電位」「高い HOMO 水準」を有するシステインのチオール(SH)基は「ジスルフィド形成」「求核置換」「共役付加」等に反応活性を示す。PTMにおける重要な被修飾官能基であり(図 1)、リポタンパクや糖タンパクの機能発現に重要な役割を担っている。機構解明や新規医薬品開発の観点から構造活性相関を知ることが重要であるが「遺伝子情報からの修飾構造の推定が困難」「細胞内には様々な PTM タンパク質が混在する」ため容易ではない。タンパク質を人工的に修飾する「合成生物学(Synthetic Biology)」が注目される理由である。如何に SH 基を効率的に官能基化するかが肝要である。タンパク質 SH 修飾には、標識官能基導入や SH 基定量を目的に、古くから、a) アリール水銀、b) ハロニトロベンゼン、c) アジリジン、d) セレノスルフィド、e) ヨードアセトアミド、f) マレイミド等の求電子性反応剤が用いられている。人工複合タンパク合成はこれらの手法を基盤にしている。なかでも d), e), f)法が汎用される。しかし、i) ジスルフィド結合の還元的切断、ii) 化学選択性が低い、iii) 毒性元素の利用、iv) 共生成物発生による単離操作性の低下、v) 塩基・酸等の添加剤の必要性、等の問題があり、より効率的な修飾法が強く望まれていた。この状況下、最近、Davis らは「アミノ酸、ペプチド、糖、長鎖アルキル等で修飾したチオール」を「タンパク質内システインから誘導したデヒドロアラニン体」へ共役付加する手法を報告した(Davis, B. G. et al *J. Am. Chem. Soc.* 2008)。「水系溶媒・室温」の温和な条件で、安定なスルフィド結合を介して修飾部を導入することができる。合成生物学分野で最も注目されている大変に優れた手法であるが、「タンパク質をデヒドロアラニン体に変換しなければならない」「システイン残基のα位立体化学が失われる」等の問題がある。

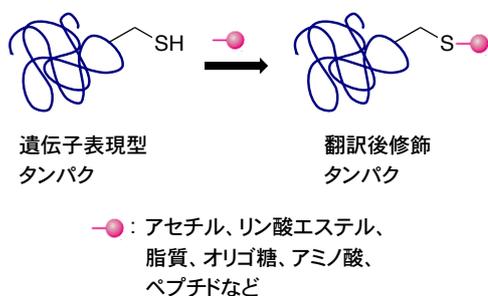


図1. タンパク質SHの翻訳後修飾.

2. 研究の目的

本研究では、「CpRuAllQA の脱水的アリル化能」(後述)を基盤に「水系溶媒・室温」「タ

ンパク質 SH の直接利用」「アリルアルコール(AllOH)の利用」を大前提条件とする、最も直接的な脱水的アリル化「RSH + AllOH → RSAll + H₂O」(All: アリル基)をタンパク質 SH 修飾法に設定する。共生成物は「水」のみであり、反応廃棄物によるタンパク質の劣化もない。任意の置換基を持つアリルアルコールを用いることによって、直接的な官能基導入も可能となる。

3. 研究の方法

チオールやスルフィドは配位性が高く、高原子価金属により酸化されやすい。遷移金属錯体触媒に最も敬遠される化合物である。この課題に、我々が独自に開発したアリルオキシ結合活性化触媒 [CpRu(η³-C₃H₅)QA]PF₆ (CpRuAllQA) (Kitamura, M. et al *Adv. Synth. Catal.* 2006)をもって挑む。CpRuAllQA (図 2) はアルコールのヒドロキシ基を AllOH で脱水的にアリル化することができる(Kitamura, M. et al *Angew. Chem. Int. Ed.* 2005)。アルコールを溶媒にすれば、逆反応も可能となる(Kitamura, M. et al *Org. Lett.* 2004)。ペプチド、核酸、糖などの多官能性な極性化合物に適用することができ、保護基の化学からの注目度も高い(Kitamura, M. et al *e-EROS* 2009, *Science of Synthesis*, 2008)。

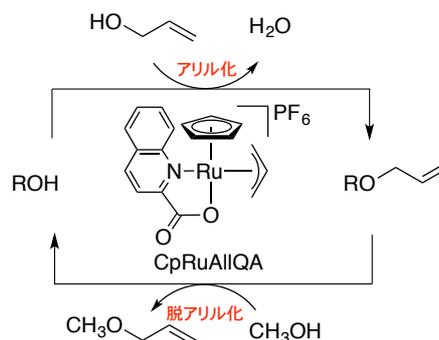


図2. アリルアルコール活性化触媒CpRuAllQA.

最近、本触媒を用いて単純なチオール類を SH 選択的にアリル化することに成功した(図 3) (Kitamura, M. et al *Chem. Commun.* 2010; Kitamura, M. et al *J. Org. Chem.* 2011)。例えば、フェニルメタンチオールに対して 1 モル%の触媒存在下、1 モル量のアリルアルコールと反応させると、対応するアリルスルフィドを定量的に与える。0.1 モル%の触媒量でも反応は完結する。様々な溶媒を用いることができ、水-メタノール 1:1 の水系溶媒でも脱水的に反応が進行する。チオール基質として、第二級および第三級アルキルチオール、アリールチオールを用いることもできる。アルコールやアミン塩酸塩を有する二官能性チオールでは硫黄原子が選択的にアリル化される。酸性度の高いチオ S-カルボン酸でも反応は完結する。

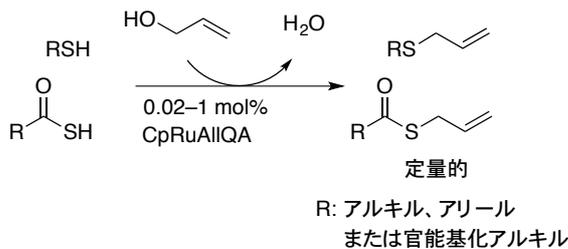


図3. CpRuAllQA触媒を用いるチオール類の脱水的アリル化.

CpRuAllQA は配位飽和状態にあり、 η^5 Cp、 η^3 C₃H₅、二座配位性 QA の特性から、アリルスルフィドによって被毒されない。一方、本反応は図4に示す触媒サイクルにより S-アリル化に対して活性を示す。チオールは CpRuAllQA の π アリル基と反応して、アリルスルフィドに移行すると同時に配位不飽和な CpRu(II)QAH を発生する。これは本来スルフィドやチオールに被毒されるが、AlIOH が共存すると、ソフトな Ru(II)と QAH のハードなプロトンが協働して AlIOH のソフトなオレフィン部とハードなヒドロキシ酸素原子を捕捉するため、S 化合物に被毒されることなく CpRu(IV)AllQA へと変化する。申請者ら独自のアイデアである「ソフト・ハード混合系触媒」の利点である。

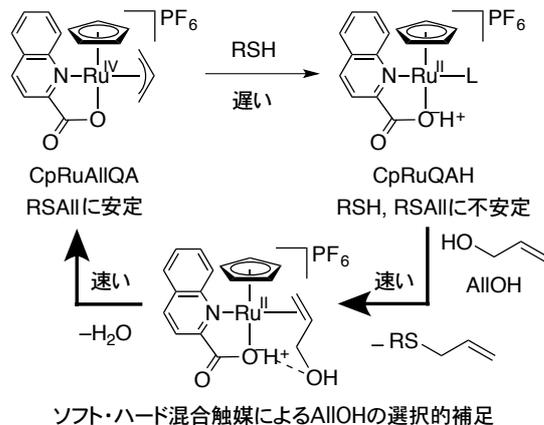


図4. チオール類のアリル化における触媒サイクル.

4. 研究成果

高性能な脱水的 S-アリル化触媒の開拓が本研究の成否の鍵を握る。CpRuAllQA 触媒は、単純チオール類やチオ S-カルボン酸に対してきわめて高い脱水的アリル化活性を示すだけでなく(図3)、水系溶媒中での脱水反応が可能であり、この適用性は、タンパク質修飾に有利である。これらの結果を踏まえて、その最小単位であるシステインの S-アリル化を取り上げて、反応温度 30 °C、[基質] = [アリルアルコール] = 100 mM、[触媒] = 1 mM を標準条件に設定し、CpRuAllQA 法の有効性を検討した(図5)。システイン塩酸塩に対して、水-メタノール 1:1、1 モル量のアリルアルコールを作用させると、1 時間で反応が完結し、

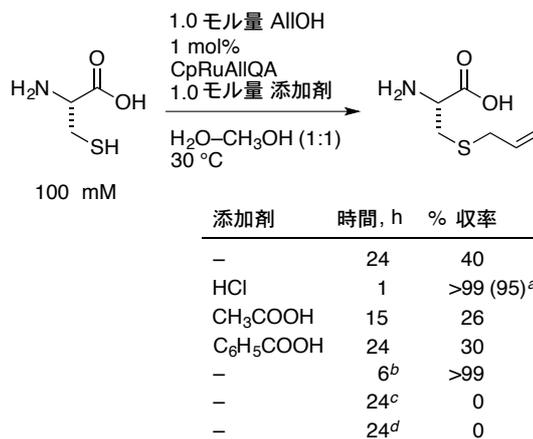


図5. システインの脱水的アリル化. [システイン] = [アリルアルコール] = 1000 mM. 24 h. ^apH 4.7 acetate bufferを用いた. ^bpH 7.0 phosphate bufferを用いた. ^cpH 8.0 phosphate bufferを用いた.

目的とする S-アリルシステインを定量的に得ることができた。基質を 1 M として 0.1 モル%の触媒を用いても高い収率で目的物が得られる。塩酸塩としない反応性は大きく低下するが、pH 4.7 酢酸緩衝液-メタノール 1:1 溶媒中反応することによって 6 時間で定量的に反応が進行する。酢酸などの弱酸塩や、pH 7.0 ないし 8.0 緩衝溶液溶媒中では高い活性は得られなかった。アリル基の置換基効果を調査したところ、 α 位メチルアリルアルコールを用いると、およそ 3:2 の位置異性体混合物が得られる(図6)。 γ 位メチル基質ではほぼ異性体比は 1:1 となる。 α 位ジメチル基質では 5:1 程度まで選択性は向上する。 γ 位ジメチル基質では反応は進行しなかった。異性体の形成の問題のない β 位メチル基質では、高い収率で単一生成物を得ることができた。メチル基のほかフェニル基、*n*-ヘキシル基、*n*-ウンデシル基などの置換基を導入することもできる。長鎖アルキル基は脂溶性官能基であり、リポペプチドの化学への展開が期待される。基質をトリペプチドであるグルタチオンとしても、同様に種々の β 位置換アリル基を導入することができた。その他、グルタチオンジエチルエステルや、 α -アミノ酸トリペプチドや、C-末端システインアナログであるジペプチドのアリルスルフィドも定量的に合成することができた(図7)。

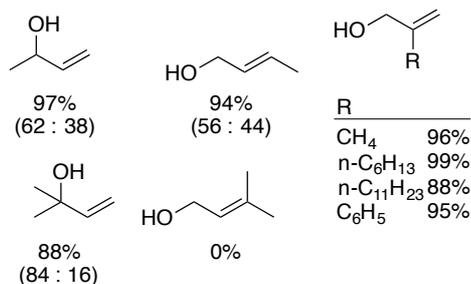


図6. システインの脱水的アリル化における置換効果. 括弧内は生成物の α メチル体: γ メチル体比を表す.

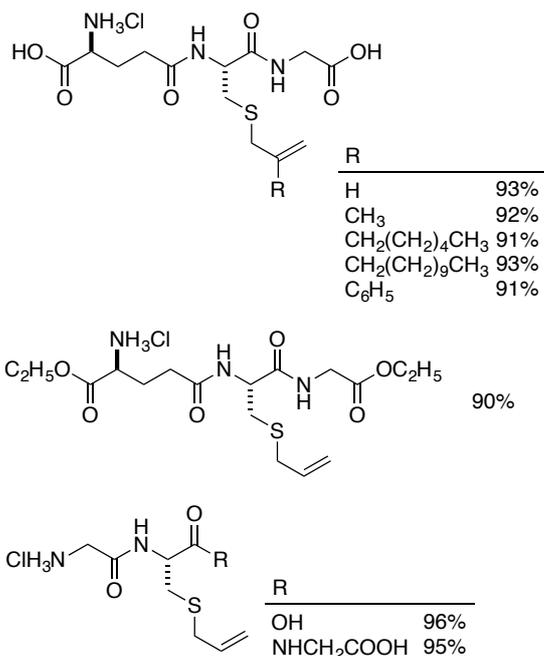


図7. ペプチド類の脱水型S-アリル化.

最後に、予備的ではあるが、タンパク質のアリル化を検証した。標的化合物にウシ血清アルブミンを取り上げて、アリルアルコール誘導体を CpRu 触媒存在下反応したところ、反応生成物の MALDI-TOF MS においてアリル基に相当する分子量の増加を確認することができた。本法は、独自の的方法論に基づくタンパク質 SH の新しい修飾法であり、本成果はタンパク質の化学合成において、医薬品創成への展開を可能とすると期待される。今後、生成物の構造解析を進めるとともに、更なる基質一般性調査、位置選択的な S-アリル化法の確立へと展開していきたいと考えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

- 1) Yamamura, T.; Nakatsuka, H.; Tanaka, S.; Kitamura, M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 9318-9315.
- 2) Kitamura, M.; Miyata, K.; Seki, T.; Vatmurge, N.; Tanaka, S. *Pure Appl. Chem.* **2013**, *85*, 1121-1132.
- 3) Xu, B-H.; Yanez, R. A. A.; Nakatsuka, H.; Kitamura, M.; Fröhlich, R.; Kehr, G.; Erker, G. *Chem. Asian J.* **2012**, *7*, 1347-1356.
- 4) Nakatsuka, H.; Fröhlich, R.; Kitamura, M.; Kehr, G.; Erker, G. *Eur. J. Inorg.*

Chem. **2012**, 1163-1166.

- 5) Miyata, K.; Kitamura, M. *Synthesis* **2012**, *44* 2138-2146.
- 6) Seki, T.; Tanaka, S.; Kitamura, M. *Org. Lett.* **2012**, *14*, 608-611.

[学会発表] (計 12 件)

- 1) 北村雅人、触媒的不斉水素化の開発・応用・機構解明、平成 25 年有機合成化学後期(秋期)講習会、2013 年 11 月 20-21 日、東京
- 2) 田中慎二、北村雅人、Development of Magnetically Separable Heterogeneous Deallylation Catalyst, The 16th International Symposium Relation Between Homogeneous and Heterogeneous Catalysis, 2013 年 8 月 4-9 日、札幌
- 3) 北村雅人、脱水型不斉 Tsuji-Trost 反応の開発、集積化学公開シンポジウム、2014 年 1 月 24 日、東京
- 4) 北村雅人、脱水型不斉 Tsuji-Trost 反応の開発、集積化学成果報告会、2014 年 1 月 25 日、東京
- 5) 吉村正宏、北村雅人、Design and Synthesis of Linear N4 Chiral Ligands: Its Application to Asymmetric Hydrogenation of Aromatic Ketones, Cambodian Malaysian Chemical Conference (CMCC) 2012, 2012 年 10 月 19-21 日、カンボジア
- 6) 田中慎二、北村雅人、CpRu-Catalyzed Dehydrative Allylation of Thiols and Application for Peptide Modification, 17th Malaysian Chemical Congress, 2012 年 10 月 15-17 日、クアラルンプール
- 7) 田中慎二、Jaisankar, P.、北村雅人、A New Method for Lipidation of Cysteine-containing Peptide, 第三回物質統合シンポジウム、2012 年 6 月 1-2 日、福岡
- 8) 北村雅人、2001 年ノーベル賞-右手型と左手型の分子を作り分ける-、あいちサイエンスフェスティバル、2012 年 6 月 9 日、豊橋
- 9) 北村雅人、CpRu-Catalyzed Asymmetric Dehydrative Allylation、19th International Conference on Organic Synthesis and 24th Royal Australian Institute Organic Conference、2012 年 7 月 1-6 日、メルボルン
- 10) 北村雅人、脱水型不斉 Tsuji-Trost 反応、第 24 回万有シンポジウム、2012 年 7 月 7 日、札幌
- 11) 北村雅人、A New sp²N Bidentate Ligand、The 2nd International Conference on Molecular and Functional Catalysis、2012 年 7 月 30-31 日、シンガポール
- 12) 北村雅人、New Chiral sp²N Bidentate Ligand; Naph-diPIM-dioxo-R-Donor-Acceptor Bifunctional

Catalyst-、The 6th Takeda Science
Foundation Symposium on
PharmaSciences、2012年9月13-14日、
大阪

[雑誌論文] (計 2件)

- 1) 北村雅人、Ferrocene,
1,1'-bis[(2R,4R)-2,4-diethyl-1-phosph
hetanyl]-, stereoisomer; Ferrocene,
1,1'-bis[(2S,4S)-2,4-diethyl-1-
phosphetanyl]-, stereoisomer, RN01622、
e-EROS、2013
- 2) 塚本眞幸、北村雅人、Reduction -
Hydrogenation: C=C; Chemoselective、
Comprehensive Chirality、2012

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北村 雅人 (KITAMURA, Masato)

研究者番号：50169885