

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：12605

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25660087

研究課題名(和文) 活性型エステル担体を用いた無保護アミノ酸による相溶二相系ペプチド合成法の構築

研究課題名(英文) Peptide coupling of unprotected amino acids with an active ester support under biphasic condition

研究代表者

北野 克和 (KITANO, Yoshikazu)

東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：10302910

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究開発では、N-ヒドロキシイミド部分を有する、低極性溶媒のみに溶解する活性エステル担体を用いることによって、無保護のアミノ酸を用いたペプチド化合物の合成法を確立することを目的とした検討を行った。その結果、まず、疎水性部分として炭素数18のアルキル鎖を3個有しているポリフェノール部分を有する活性エステル担体の合成に成功した。そして、合成した活性エステル担体にアミノ酸を担持させた後、無保護のアミノ酸と反応させた結果、効率よく反応が進行することを確認した。さらには、活性エステル担体は、反応終了後回収して再利用でき、無保護アミノ酸を用いた連続的なペプチド結合形成が可能であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Peptide coupling of unprotected amino acids was examined with an active ester support under biphasic condition. At first, an active ester support which has polyalkoxyphenol ethers and N-hydroxyimide moieties was synthesized. The desired coupling reaction of unprotected amino acids proceeded effectively by using the synthesized active ester compound. In addition, the reusability of the ester active support was verified after using the coupling reaction. It was suggested that this method could be applied to the continuous peptide coupling of unprotected amino acids.

研究分野：生物有機化学

キーワード：ペプチド合成 無保護アミノ酸

## 1. 研究開始当初の背景

(1) ペプチド化合物は、生体内由来の機能性物質として注目され、医薬品、バイオ材料などあらゆる分野で極めてニーズが広がっている化合物である。

(2) ペプチド化合物を合成するには、メリフィールド(1984年ノーベル賞受賞)の開発した固相合成法や、通常の液相合成法が一般的に用いられている。

(3) また、近年では、当研究室の千葉らにより、固相合成法と液相合成法の長所を合わせ持つ相溶二相系合成法が開発されていた。しかしながら、固相、液相合成法ともに保護基の導入されたアミノ酸の使用を前提としていた。

(4) 一方、無保護のアミノ酸を用いるペプチド結合形成法としては、 $\alpha$ -ケト酸とオキシムによる縮合、ペプチドチオエステルを利用する方法、および、カルボキシ基とイソニトリルの縮合など、特殊なライゲーションの例もあるが、通常のアミノ酸の、アミノ基とカルボキシ基の縮合による連続的なペプチド結合形成反応は、無保護のアミノ酸を用いた時には効率的には進行しないのが現状であった。

(5) さらに、保護基の導入されたアミノ酸の使用は、高価であるとともに、必ず脱保護のプロセスが必要となり、その高価な保護基を脱保護のプロセスによりこれをそのまま廃棄することは、多段階合成においては多くの資源を浪費していることになることから、無保護のアミノ酸を用いたペプチド合成法の開発は極めて重要な技術であった。

## 2. 研究の目的

(1) 前述のような背景をふまえて、本研究では、保護基の導入されていない、無保護のアミノ酸を用いたペプチド合成法の構築を目的とした。

(2) 具体的には、N-ヒドロキシイミド部分を有する、低極性溶媒のみに溶解する担体化合物を用いることによって、アミノ酸とN-ヒドロキシイミド担体の縮合による活性エステルの合成、アミノ酸との混合によるアミノ基と活性エステルの求核置換反応のメカニズムによるペプチド結合の合成、を相溶二相系で繰り返すことによって、無保護のアミノ酸を用いたペプチド化合物の合成法を構築することを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) まずは、ペプチド合成に重要となる、低極性溶媒のみに溶解する活性エステル化合物(活性エステル担体)の合成を中心とした

検討を行った。

(2) 具体的には、構造的な特徴として低極性溶媒(シクロヘキサン等)に溶解しやすくするために、比較的長い炭素鎖(炭素数18)を3個有しているベンゼン誘導体(トリス(オクタデシルオキシ)ベンゼン)とともに、N-ヒドロキシイミド構造を有する化合物の合成検討を行った。

(3) 活性エステル担体については、アミノ酸の導入効率、および求核置換反応によるペプチド結合の効率性を調べながら微調整し、複数のN-ヒドロキシイミド構造を有する担体を合成した。

(4) 合成した担体については、まず、アミノ酸の導入(末端のためアミノ基が保護されたアミノ酸)の検討を行った後、無保護のアミノ酸のアミノ基と、活性エステル担体との求核置換反応によるペプチド結合形成を検討した。また、連続的なペプチド結合形成反応、さらには活性エステル担体の再利用についても検討した。

## 4. 研究成果

(1) まず、一つ目の活性エステル担体として、疎水性部分として、トリス(オクタデシルオキシ)ベンゼンを、また、活性エステル部分として、N-ヒドロキシフタルイミド構造を有する担体(A)を合成した。活性エステル担体(A)については、市販の化合物を原料として5段階で行われた。なお、トリス(オクタデシルオキシ)ベンゼン部分と、N-ヒドロキシフタルイミド構造のリンカーについては、ヘテロ原子の導入されていない炭素鎖とした。

(2) 合成した活性エステル担体(A)について、アミノ酸(アミノ基が保護されたアミノ酸)の導入を検討した結果、一般的な縮合剤を用いた通常の脱水反応の条件により反応は円滑に進行し、アミノ酸が担持された活性エステル担体が合成された。

(3) 次に、アミノ酸が担持された活性エステル担体(A)について、無保護のアミノ酸との反応を行った。その結果、目的とする、無保護のアミノ酸のアミノ基と、活性エステル担体との求核置換反応によるペプチド化合物の生成が確認された。しかしながら、目的物の収率は高収率ではなく、また、反応後の活性エステル担体(A)の回収についても非効率的であることが示唆された。そこで、構造を微調整した、新たな活性エステル担体を創製した。

(4) 新たな活性エステル担体として、N-ヒドロキシイミド部分が、N-ヒドロキシコハク酸イミド構造に変換された活性エステル担体(B)を合成した。なお、活性エステル担体

(B)のトリス(オクタデシルオキシ)ベンゼン部分と、N-ヒドロキシコハク酸イミド構造のリンカー部分については、合成の効率から炭素鎖ではなくスルフィドとして調製された。

(5) 合成した活性エステル担体(B)について、アミノ酸(アミノ基が保護されたアミノ酸)の導入を検討した結果、活性エステル担体(A)の場合と同様に、一般的な縮合剤を用いた通常の脱水反応の条件により反応は円滑に進行し、アミノ酸が担持された活性エステル担体が合成された。

(6) 次に、アミノ酸が担持された活性エステル担体(B)について、無保護のアミノ酸との反応を行った。その結果、塩基性条件下において、反応を行うことによって、目的とする、無保護のアミノ酸のアミノ基と、活性エステル担体との求核置換反応が進行し、ペプチド化合物の生成が確認された。ペプチド結合の生成については、連続的なペプチド結合生成を想定して、マイクロウェーブ装置等を用いた、非塩基性条件下での検討も行ったが、塩基性条件下でないと反応の進行が非効率であることが示唆された。

(7) 一方、活性エステル担体(B)の回収・再利用については、低極性溶媒相への溶解による方法でも目的とする反応が進行することが示唆されたが、貧溶媒(高極性溶媒)添加による結晶を析出させる方法のほうが効率的であることが示唆された。

(8) 活性エステル担体(B)を用いたペプチド化合物合成について、種々のアミノ酸を用いて検討を行った。その結果、全てのアミノ酸についての検討はまだ行われていないが、複数のアミノ酸において、目的とする求核置換反応が進行し、ペプチド化合物が合成されることが確認された。

(9) さらに、上記(8)で合成したペプチドについて、連続的なペプチド結合の形成についての検討を行った。その結果、さらなるアミノ酸の導入によるペプチド鎖が形成されることが観察され、連続的なペプチド結合が可能であることが示唆された。

#### 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1件)

見原 果林、岡田 郁、千葉 一裕、北野 克和、「Facile synthesis of N-substituted amides from alkenes and amides by a Brønsted acid mediated electrophilic addition reaction」Synthesis, 46, 2014, 1455-1462、査読有

〔学会発表〕(計6件)

福田 拓也、我妻 未樹、小南 喜郁、野方 靖行、吉村 えり奈、千葉 一裕、北野 克和、「アミノ酸由来イソニトリル化合物のフジツボキプリス幼生に対する付着阻害活性」、2015年度日本付着生物学会総会・研究集会、2015年3月28日、東京水産大学(東京)

高嶋 脩平、北野 克和、「非天然型アミノ酸誘導体イソニトリルの合成と付着阻害活性に関する構造-活性相関の考察」、日本農芸化学会2015年度大会、2015年3月27日、岡山大学(岡山)

北野 克和、「Anti-barnacle activity of simple alkyl isocyanides derived from citronellol」、2nd International Symposium "Current Topics on Barnacle Biology"、2014年7月11日、シンガポール国立大学(シンガポール)

北野 克和、「Antibarnacle activity of isocyanides derived from amino acids」、17th International Congress on Marine Corrosion and Fouling、2014年7月8日、シンガポール国立大学(シンガポール)

見原 果林、岡田 郁、千葉 一裕、北野 克和、「Facile synthesis of N-substituted amides from alkenes with amides by nucleophilic addition reaction」、The International Symposium on Organic Reaction (ISOR)-11 Marine Corrosion and Fouling、2013年11月20日、台北(台湾)

小南 喜郁、我妻 未樹、岩橋 郁奈、野方 靖行、吉村 えり奈、千葉 一裕、北野 克和、「アミノ酸由来イソニトリルの合成と付着阻害活性に関する構造-活性相関の考察」、日本マリンエンジニアリング学会(JIME)海洋環境研究委員会・第3回ワークショップ「船底塗料と海洋環境に関する最新の話題」、2013年9月20日、神戸大学(神戸)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

なし

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

北野 克和(KITANO, Yoshikazu)  
東京農工大学・大学院農学研究院・准教授  
研究者番号: 10302910

(2)連携研究者

千葉 一裕 (CHIBA, Kazuhiro)

東京農工大学・大学院農学研究院・教授

研究者番号：20227325