

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：32661

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26810062

研究課題名(和文)新規チオールリレー法によるオリゴペプチドの逆方向グリーン合成

研究課題名(英文) Green synthesis of oligopeptides in the inverse direction by a novel, thiol-relay method

研究代表者

佐々木 要 (SASAKI, Kaname)

東邦大学・理学部・講師

研究者番号：10611783

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：アミド結合形成は形式上カルボン酸とアミンの脱水反応であるが、特にペプチド結合は、カルボン酸とアミン、そして、等量以上の縮合剤と添加剤を用いた反応により構築されるのが一般的であり、共生成物co-productが廃棄物となっている。この原子効率が低いという問題を解決するために、本研究では新たに、共生成物が二酸化炭素だけとなるチオールリレー法をデザインし、その実現性について検討した。まず、本法実現の重要構造となるチオカルボン酸を従来法よりも簡便に構築する手法を開発し、本文報告した。また、チオールリレー法によるペプチド結合の形成に成功した。併せて、より効率的な反応へと進展させる際の課題を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The most reliable and generally used method for preparation of oligopeptides is currently solid-supported synthesis, which requires excess monomers, excess dehydrating agents and protective group manipulations. We consider this classical method to be updated to circumvent its low atom economy, and design a novel method named 'thiol-relay,' which discharges only carbon dioxide along with construction of a peptide bond. First, we improved an access to the thiocarboxylic acid, a key function in thiol-relay method, by introducing a novel, easy-to-prepare, and easy-to-handle precursor. The basic concept of thiol-relay peptide synthesis was proven, and we also found some problems toward more practical use of this method.

研究分野：有機合成化学

キーワード：ペプチド合成 グリーン合成 アミド結合形成

1. 研究開始当初の背景

ペプチド合成は、後のノーベル賞受賞者である Merrifield らにより 1963 年に報告された固相合成法に基づくものがなお主流であるが、原子効率や経済性の面で現代の社会要請に合っていない。すなわち、アミド結合形成は形式上、カルボン酸とアミンの脱水反応であるが、特にペプチド結合は、カルボン酸とアミン、そして、等量以上の縮合剤と添加剤を用いた反応により構築されるのが一般的であり、共生物 *co-product* が廃棄物となっている。この原子効率が低いという問題は広く共有されており、アミド結合形成の新反応開発は注目度の高い研究分野である。

ところで、ペプチドのアミノ基側の末端、*N*-末端からカルボキシ基側の末端、*C*-末端に向けてオリゴペプチドを合成すると、*C*-末端残基のラセミ化が問題となるため、*C*-から *N*-末端に向けて一残基ずつ伸長する合成が強いられている。その結果、従来のペプチド合成は、アミノ酸モノマーのアミノ基に高価な保護基を用いる必要があり、原子効率のみならず、経済的にも改善点の多い合成法となっている。

以上のことから、原子効率の高い、経済性に優れた *N*-から *C*-末端方向のペプチド合成法が求められており、本研究でその開発に取り組んだ。

2. 研究の目的

我々もこれまでに、高原子効率のアミド結合形成反応としてチオカルボン酸やカルボン酸とイソシアナートから脱炭酸あるいは脱酸化硫化炭素のみを伴うアミド化反応を報告してきた。この実績に基づき、ラセミ化を伴わずに *N*-から *C*-末端へのオリゴペプチド合成を可能にする、高原子効率の手法を開発する。

本研究で開発する反応の詳細は次項 3. 研究の方法に詳述するが、二酸化炭素のみを共生物とし高価な保護基を使用しない、高原子効率かつ低コストの反応である。この特色は、ペプチドやタンパク合成の工業プロセス化に寄与する。現在、タンパクを純物質として得る手法として化学合成が注目されている。未修飾の天然型ペプチドであれば遺伝子工学的手法による合成という選択肢もあるが、特に均一に修飾されたタンパクの供給は化学合成が圧倒的に有利である。動物細胞を用いた糖タンパクの合成では、株や培養条件が変化すると糖による修飾のパターンが変化するため、均質な修飾タンパクを定常的に得ることは困難である。一方、糖タンパク製剤エリスロポエチンが実験室スケールで純物質として化学合成されている。本研究は、特許切れを迎えた糖タンパク製剤の後発品供給などに向けて、高い原子効率かつ低コスト、低排出で純物質を供給する工業プロセスの構築、ひいては高騰する医療費の低減に貢献できる意義深い研究である。

また、後述のように学術的意義も高い。従来のペプチド化学合成では酸あるいは塩基による逐次的な脱保護が必須であるのに対し、本研究で開発する反応ではそれが不要である。これにより、従来法では構築困難な、不安定結合により修飾されたペプチドやタンパクの合成が可能となる。

さらに、本反応は *C*-末端にチオカルボン酸を保持しながらペプチドを合成するという、従来に類例のない特色を有している。近年、タンパクの収束的な化学合成には、ペプチド同士のカップリング法として、*C*-末端チオエステルと *N*-末端システイン残基間で天然型ペプチド結合を形成するネイティブケミカルライゲーション (NCL) 法が盛んに用いられている。しかし、現在なお *C*-末端チオエステルの合成には多大な労力が費やされている。本法では、*C*-末端にチオカルボン酸を保持しながら、目的の配列を合成後にチオカルボン酸をアルキル化すれば、NCL 前駆体を合成できるという大きな利点を有することから、有用性が極めて高い。

3. 研究の方法

本研究の検討は、課題を(1)ペプチド *C*-末端に適用可能なチオカルボン酸合成法の開発と(2)チオカルボン酸を求核剤に用いたアミノ酸環状炭酸無水物の開環と続くペプチド結合の形成反応の 2 つに分割して検討を行った。

(1) ペプチド *C*-末端に適用可能なチオカルボン酸の合成法の開発

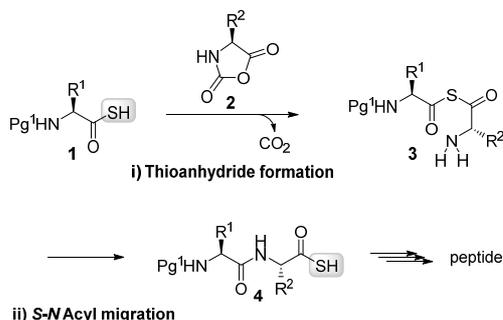
チオカルボン酸を含むペプチド鎖の合成のためには、あらかじめチオカルボン酸の前駆体となるチオエステルを有するアミノ酸単量体を合成し、Boc/TFA 法に則ったペプチド伸長反応ののち、信頼性が高く簡便な反応を用いてチオカルボン酸へと誘導することが重要である。これまでにチオカルボン酸前駆体となるチオエステルとして、2,4,6-トリメトキシベンジル (Tmob)、9-フルオレニルメチル (Fm)、トリチル (Trt) および、2-シアノエチルチオエステルが報告されている。しかし、これらのチオカルボン酸前駆体を用いて高分子量の修飾ペプチドの合成を試みる場合、酸性条件にて脱保護可能な Tmob 基、Trt 基では、前駆体由来のカチオン種が生じることにより、チオカルボン酸と前駆体チオエステル間で平衡が生じる。それにより、主鎖の Boc 基の脱保護の際にチオエステルの一部が損なわれるため、これらの前駆体は長鎖ペプチドの合成には不適となる。また、塩基を用いて脱保護する Fm 基や 2-シアノエチル基においては、ペプチド伸長後の側鎖官能基の脱保護と同時に、これらのチオカルボン酸前駆体も脱保護されるため、無保護のペプチドチオカルボン酸しか合成できない。以上より、現在報告されているチオカルボン酸前駆体は、チオカルボン酸を含むペプチド合成へ

の適用範囲が狭く、限られた化合物の合成にのみ適用が許されるのが現状である。

そこで我々は、既往の前駆体よりも広範に適用可能なチオカルボン酸前駆体として、ペプチド合成に広く用いられている Boc/TFA 法に基づく固相合成法と両立するチオカルボン酸前駆体の開発を行うこととし、カルボン酸の保護基として知られているフェナシル基に着目した。

(2) チオカルボン酸を求核剤に用いたアミノ酸環状炭酸無水物の開環と続くペプチド結合の形成反応

原子効率の高い、経済性に優れた *N*-から *C*-末端方向のペプチド合成法として、具体的には、Scheme 1 に示す反応を検討した。すなわち、アミノ酸モノマーとして炭酸無水物 **2** を用い、これを、() ペプチド *C*-末端のチオカルボン酸 **1** で求核的に開環することで、脱炭酸を伴いチオカルボン酸無水物 **3** を得る。これが、() *S*→*N* アシル転位を起こすことでペプチドを *C*-末端方向に一残基伸長できるとともに、次の伸長の足掛かりとなるチオカルボン酸が還元した **4** が生成する、という反応である。炭酸無水物 **2** はそれ自体でアミノ基が保護され、カルボキシ基が活性化された構造になっている。本反応はそれを用いることにより、二酸化炭素のみを共生成物とするため、原子効率が高く、かつ、モノマーに高価な保護基を必要としないため、経済性も高い反応となる。また、これまでに我々は、先駆的にチオカルボン酸の活用を検討し、ラセミ化を伴わないペプチド結合形成反応への有用性を報告してきた。そこでこれまでの実績を拡張し、**3** のような活性チオエステルと、エントロピー的に有利な分子内 *S*→*N* アシル転位反応を組み合わせることで、ラセミ化を伴わないペプチド形成反応を達成する計画であった。



Scheme 1. 新規チオールリレー法の概要

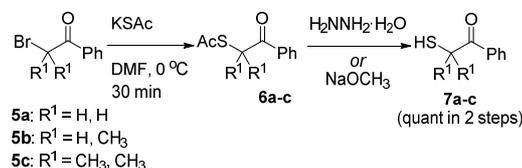
本反応はあたかもペプチド *C*-末端でスルフヒドリル基をリレーするようにアミノ酸残基を挿入していく反応であることから、チオールリレー法と名付けた。

4. 研究成果

(1) ペプチド *C*-末端に適用可能なチオカルボン酸の合成法の開発

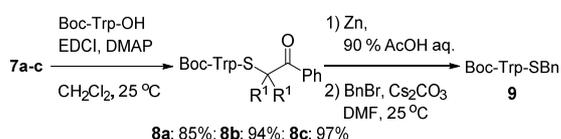
はじめに、ペプチドチオカルボン酸の前駆

体となるチオエステルの合成のために、嵩高さの異なる 3 種のフェナシルチオールの合成を行った (Scheme 2)。既知のフェナシルプロミド **5a-c** のチオアセチル化を行った。いずれも DMF 溶媒中、0 °C にてチオ酢酸カリウムによる求核置換反応を行うことにより、目的物を定量的に得た。次に、塩基による脱アセチル化を行った。塩基としてヒドラジン-水和物、あるいはナトリウムメトキドを用いて脱アセチル化を行うことにより、定量的にフェナシルチオール **7a-c** を得た。フェナシルプロミド **5a-c** から始まる一連の合成過程において、各段階ともに反応完結後、分液操作のみで精製が可能であり、シリカゲルカラムクロマトグラフィーを使用せず、グラムスケールで容易に各チオールの合成が可能であった。時間、コスト、労力を必要とする精製過程を伴わずに大量合成が可能であるという点で、チオカルボン酸合成に用いられる既往のチオールである Tmob あるいは Fm チオールよりもフェナシルチオールが優れていると言える。



Scheme 1. フェナシルチオール **7** の合成

続いて、合成した嵩高さの異なる 3 種のチオール **7a-c** をカルボン酸へ導入し、前駆体となるチオエステルを合成、続く脱保護反応によるチオカルボン酸への誘導を試みた。各チオールは EDCI, DMAP を使用した標準的な縮合反応によって効率的にカルボン酸へ導入が可能であった。ここで、生成したチオエステル **8a** は **8b-c** と比較して安定性が低かった。次に、チオエステル **8a-c** の脱保護を含水酢酸中、過剰量の亜鉛による還元反応で行った。その結果、フェナシル基の α -位の置換基が増えるにつれ、脱保護収率に低下がみられることから、嵩高さが増すにつれ脱フェナシル化の反応速度が遅くなるということが明らかとなった。一方で、本脱保護反応は一電子還元で進行するため、生成するラジカルの安定性が反応速度に寄与していれば、反応速度は **8c** > **8b** > **8a** の順になると考えられる。しかし、実験事実は逆で、チオールの置換基が小さいほど反応が速いことから、ラジカルの安定性よりも立体的要因が反応速度に大きく寄与していると考えられる。以上より、 α -メチルフェナシルチオエステル **8b** が高収率でチオエステルが得られ、また中程度の反応時間でチオカルボン酸へと脱保護が可能であることから、チオエステルの安定性および脱保護の反応速度の観点で最適なチオカルボン酸前駆体であると考え、 α -メチルフェナシル (Mpa) チオエステルについて以後の検討を行った。



Scheme 3. チオエステル前駆体の合成と脱保護

次に, Mpa 基の汎用性検討のため, MpaSH (7b) を種々のカルボン酸へ導入し, 続いてチオカルボン酸への脱保護を行った。カルボン酸として, 芳香族, 脂肪族カルボン酸および Boc, Fmoc アミノ酸 10a-g を用いて検討を行ったところ, EDCI, DMAP を用いた縮合反応により, 相当する Mpa チオエステル 11a-g へと変換が可能であった。続いて, これらのチオエステル 11a-g に対し, 室温にて亜鉛による脱保護を行った結果, それぞれ対応するチオカルボン酸へと誘導可能であった。特に, カルボン酸として Boc-Thr(OBn)-OH (10f) より誘導したベンジルチオエステル 12f は, α -炭素でエピ化が起こればジアステレオマーとなるが, ジアステレオマーは確認されず, α -炭素がエピ化することなく Mpa チオエステルの導入とチオカルボン酸への誘導が可能であったことが示された。本反応系において, ラセミ化の可能性を排除できたことは, 本法がペプチド合成にも適用可能であることを示唆しており, 注目に値する成果である。また, Fmoc 保護アミノ酸 10g に対してもチオエステル化, 脱保護反応が高収率で進行した。

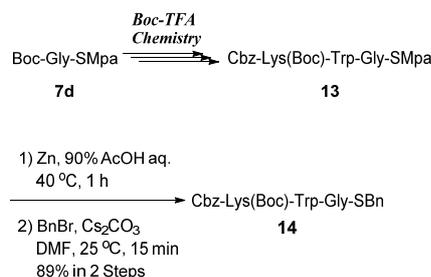
Table 1. Mpa チオエステル前駆体の汎用性

Entry	R ² -COOH	Yield %	
		11a-g	12a-i
1	PhCOOH (10a)	90	80
2	ⁿ C ₉ H ₁₉ COOH (10b)	92	91
3	Boc-Phe-OH (10c)	94	83
4	Boc-Gly-OH (10d)	95	83
5	Boc-Ser(OBn)-OH (10e)	98	78
6	Boc-Thr(OBn)-OH (10f)	94	73
7	Fmoc-Trp-OH (10g)	98	85
8	Boc-Glu(SFm)-SMpa (11h)	-	78
9	Fmoc-Glu(STmob)-SMpa (11i)	-	81

続いて, 他のチオカルボン酸前駆体である Fm-あるいは Tmob チオエステルを含むビスチオエステルから Mpa チオエステルを選択的に脱保護できるかを検討した。その結果, Fm-チオエステルを有するビスチオエステル 11h, あるいは Tmob チオエステルを有するビスチオエステル 11i においても他のチオエステルを損ねることなく Mpa 基の選択的脱保護が可能であった。

さらに, チオカルボン酸前駆体となる Mpa

基と Boc 基の直交性の証明のために, Boc/TFA 法によるペプチド伸長を行った (Scheme 4)。ペプチド C-末端として Boc 保護されたフェナシルチオグリシネート 10d を用い, Boc-TFA 法によりトリペプチド 13 としたのち, Boc 基存在下で Mpa 基の脱保護し, 生じたチオカルボン酸をベンジルプロミドで捕捉した。その結果, 高収率でベンジルチオエステル 14 へと誘導することに成功した。以上より, Boc 基存在下で Mpa 基の脱保護が可能であることが証明され, Boc 基と Mpa 基が完全に直交していることが確認された。また, 一般的なペプチド伸長では, EDCI や PyBOP, HBTU などの縮合剤とともに塩基として *N,N*-ジイソプロピルエチルアミン (DIPEA) が汎用されるが, 一連の反応では, *N*-メチルモルホリン (NMM) を使用することで, DIPEA 使用時と比較し良好な収率で反応が進行することが確認された。



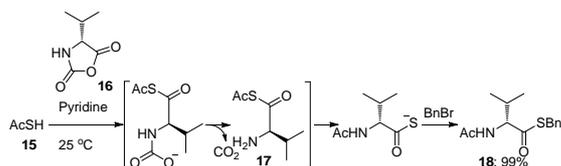
Scheme 4. オリゴペプチドチオカルボン酸

以上のように, 新たなチオカルボン酸導入法として α -メチルフェナシル (Mpa) チオエステルの開発を行った。チオエステル化剤となる α -メチルフェナシルチオールは, 安価な市販試薬から 2 工程のみで簡便に合成可能であった。Mpa チオエステルは種々のカルボン酸に対し容易に導入可能であり, 亜鉛による還元的処理により相当するチオカルボン酸へ誘導可能であった。さらに Mpa チオエステルは Boc/TFA 法によるペプチド伸長に安定であり, C-末端および側鎖にチオカルボン酸を有するオリゴペプチドの合成が可能であることを見出した。また Mpa 基は, Boc 基に対する直交性だけでなく, Fm-, Tmob チオエステル存在下での選択的脱保護も可能であった。これらの知見から, Mpa チオエステルを経るチオカルボン酸合成法は, より複雑なペプチドチオカルボン酸の合成を可能にすると考えられる。

(2) チオカルボン酸を求核剤に用いたアミノ酸環状炭酸無水物の開環と続くペプチド結合の形成反応

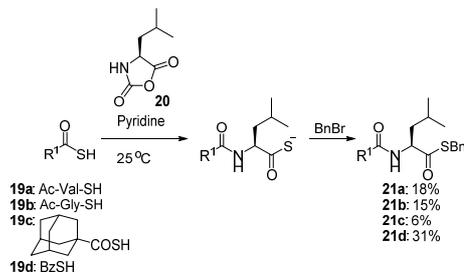
Scheme 1 でデザインしたチオールリレー法の実現可能性を見極めるため, 求核剤としてチオ酢酸 15, NCA としてパリンの誘導体 16 を用いた反応を検討した。その結果, 塩基としてピリジンを用いた条件で目的のチオエステル 18 を 99% で得ることに成功した (Scheme 5)。このことから, チオカルボン酸

イオンにより NCA が開環可能であること、また、生じたチオカルボン酸無水物 **17** から $S \rightarrow N$ アシル転位が進行しアミド結合が生成することが初めて明らかとなった。



Scheme 5. AcSH を用いたチオールリレー法

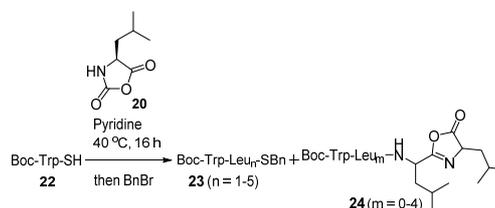
次に、より実践的なペプチド結合形成反応へと展開するため、種々のチオカルボン酸を用いた NCA の開環反応を試みた (Scheme 6)。その結果、Ac-Val-SH (**19a**) を用いた場合にもロイシン NCA (**20**) とペプチド形成反応が進行し、望むジペプチド Ac-Val-Leu-SBn (**21a**) が生成した。しかし、チオ酢酸 (**5**) を用いた場合と比較して著しい収率の低下が見られた。そこで、立体障害や隣接位のアミド結合の影響を明らかにするため、**19a** より立体障害の小さい Ac-Gly-SH (**19b**)、立体障害が大きいアミド結合を持たない **19c**、また、アミド結合を持たず立体障害が中程度の **19d** を用いた同様の反応を行った。その結果、いずれの場合にもチオ酢酸 (**5**) を用いた場合と比較して、収率は低下した。このことから、本反応の成否はチオカルボン酸の嵩高さに大きく依存することが明らかとなり、隣接位のアミド基が影響している可能性については排除できなかった。



Scheme 6. チオカルボン酸の立体障害の検証

そこで次に、本反応のホモオリゴマー化について検討を行った (Scheme 7)。チオカルボン酸 Boc-Trp-SH (**22**) に対し、ロイシン NCA (**20**) を 30 等量添加し 16 時間攪拌した後、チオカルボン酸を BnBr で捕捉し、LC-MS により分析した。その結果、目的とするチオエステル **23** に相当する質量が 1 量体から 5 量体の範囲で観測された。それに加えて、目的物とは異なるロイシンオリゴマーが観測された。これは、チオカルボン酸の捕捉に用いるアルキル化剤を変えて反応を行った場合にも同様に見られ、 C -末端にチオエステルを有していないことが示唆されたことから、質量数と合わせて C -末端アズラクトン **24** であると帰属した。また、Scheme 6 に示す、**19a**

あるいは **19b** を用いた反応の効率が上がらなかった原因もアズラクトンの生成のためである可能性が示された。



以上を総括すると、チオカルボン酸を求核剤に用いた NCA の開環反応により、自発的な $S \rightarrow N$ アシル転位を経てアミド結合を構築できることを見出した。現時点で、本反応の成否は求核剤となるチオカルボン酸の反応性に大きく依存することが明らかとなった。また、NCA を過剰に加えるとアミノ酸のホモオリゴマー化が進行し目的のチオエステルを得たが、 C -末端にチオカルボン酸を有しないアズラクトンも生成する課題が示された。

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)

Hatanaka, T.; Yuki, R.; Saito, R.; Sasaki, K. α -Methylphenacyl thioesters as convenient thioacid precursors. *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14*, 10589-10592. DOI:10.1039/c6ob02256a. (査読有)

[学会発表] (計 1 件)

畑中 徹・結城 亮介・齋藤 良太・佐々木 要, Boc 基と直交するチオカルボン酸前駆体の開発, 日本化学会第 96 春季年会, 同志社大学 (京都府京田辺市), 2016. 3. 25.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐々木 要 (SASAKI, Kaname)

東邦大学・理学部・講師

研究者番号: 10611783