# 科学研究費補助金研究成果報告書

平成21年6月12日現在

研究種目:基盤研究(B)研究期間:2006~2008 課題番号:18380071

研究課題名(和文) 多相有機溶媒反応系による糖ペプチドの網羅的合成法の確立

研究課題名(英文) Development of Exhaustive Synthesis of Glycopeptides by using Multiphase Organic Reaction System

研究代表者 千葉 一裕(CHIBA KAZUHIRO)

東京農工大学・大学院連合農学研究科・教授

研究者番号: 20227325

#### 研究成果の概要:

本研究では、近年見出したシクロアルカン系有機溶媒相溶二相化現象を応用し、多様なオリゴ糖ーペプチド複合体標品のワンポット逐次多段階化学合成法を確立する新たな方法について研究を実施し、目的とする糖ペプチド合成システムを構築した。また、このシステムを応用し、オリゴ糖、糖ペプチドなど十数段階から数十段階を要する物質の簡易操作による合成に成功した。

#### 交付額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合 計
2006	9, 600, 000	2, 880, 000	12, 480, 000
2007	2, 800, 000	840, 000	3, 640, 000
2008	2, 700, 000	810,000	3, 510, 000
総 計	15, 100, 000	4, 530, 000	19, 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:糖鎖 有機化学 化学合成 生体分子 生理活性

# 1. 研究開始当初の背景

プロテオーム、グライコーム研究の急速な 進展に伴い、多様なグリコペプチド標準物質 を網羅的合成技術の重要性を益々増してい る。これまでに固相合成法は網羅的な化学合 成において、その有用性を広く認められ、特 にペプチド合成においては標準的な方法と なっている。その一方で、オリゴ糖合成にお いては、溶媒系の制限や反応性の低さから固 相法は一般的な方法には至っておらず、液相 合成法が広く用いられている。しかし、液相 合成法では、反応の各段階において分離・精 製操作が必要となり、多段階または同時並行 に多数の合成反応を行う目的には多くの困 難を伴う。本研究では、申請者らが近年見出 した、シクロアルカン系有機溶媒相溶二相化 現象を応用し、多様なオリゴ糖ーペプチド複 合体標品のワンポット逐次多段階化学合成 法を確立する新たな突破口を切り拓くことを目的とする。

研究代表者らは最近、メディア効果に関する一連の研究過程(Chiba K. et al., J. Am. Chem. Soc. 2001 など)で、シクロアルカンとそれ以外の単一または混合有機溶媒を特定の比率に混合することにより、固有の温度を境として完全に均一状態と二相分離状態を形成することを初めて発見し、液相ペプチド連続合成に成功した(Chiba K. et al., Chem. Commun. 2002 など)。本技術は世界に先駆けた概念であり、すでに基本特許が成立し(特許第 3538672 号 出願人:科学技術振興機構、発明者:千葉一裕、河野悠介)、さらに 2002 年から 2004 年にかけて、8 件の海外出願も含め15 件の応用特許が出願済み(出願人:JSTまたは農工大TLO)である。

#### 2. 研究の目的

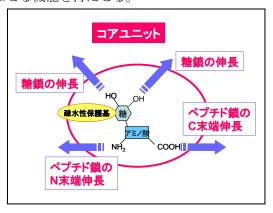
本研究は炭化水素系担体に結合させた可溶化した基質を逐次反応に供し、均一系で反応を行うと共に、主として二相分離現象を利用して生成物のみを各段階で分離する。本反応系では、過剰・不要な試薬、過剰な反応原料と生成物との分離を僅かな温度変化によって実現することが可能となる。このような方法を基本に、多段階の合成経路が必要となるグリコペプチドの網羅的合成を世界に先駆けて実現するものである。

#### 3. 研究の方法

研究目的であるグリコペプチドのワンポット逐次連続合成を実現するためには、以下の 三つの課題が必要になる。

## (1)コアユニットの基本概念

相溶二相系でグリコペプチドを連続合成する場合、コアユニットに糖鎖またはアミノ酸が逐次結合した各段階の生成物が、反応溶液が二相に分離した状態でシクロアルカン相(上層)に分配・回収される必要がある。そのために、右図のユニットを構築し、糖鎖、C末端、N末端アミノ酸の各方向へ自由に鎖を伸ばせる機能を持たせる。



(2) 糖鎖・ペプチドを逐次伸長する均一/二相溶媒システムの確立

糖鎖ユニットの伸長には、シクロアルカン /極性有機溶媒系相溶性二相溶液システムを 用いる。ここで、次の基本操作によって、逐 次多段階合成を実現する。すなわち、

- ・コアユニットは二相分離状態では上層に回収し、糖鎖またはペプチド鎖伸長試薬は下層に回収する。
- ・目的とする分子間反応は均一化状態、または二相分離状態で実施する。
- ・コアユニット溶液は常に同一容器に保持する。
- (3) 保護基の切断、分離、精製、構造確認システムの確立

本反応系は、疎水性保護基を生成物が均一 に可溶化するため、固相法では困難であった、 担体結合分子間の反応や、固体触媒などを用 いた反応へ応用することが可能である。従って、保護基の切断、側鎖の伸長などに、一般 化学合成と同じ試薬、触媒を使用することが できることが十分に期待され、それら応用し た簡易合成法を確立することを計画している。 また、グリコペプチドの合成反応のモニター や、分離精製においても、均一に溶解した単 一分子を取扱うため、分離、精製、純度検定 等が飛躍的に簡便に行えるものと考えられる。

## 4. 研究成果

反応条件の選択:多段階ワンポット反応を 構築するために反応溶媒系の設計を行った。 グリコシド結合形成は低温・無水条件で特定 の溶媒選択の下で効率的に進行する。本反応 系では、エーテル、ジクロロメタンなど従来 から用いられた汎用溶媒系の他、プロピオニトリル、ニトロメタンなど、より優れた反る 性が確認されている溶媒系にも適用であることが明らかとなった。これらは、いであり、 とが明らかとなった。これらは、いであり、 具体的には下記の特性を有する有機溶媒系 組み合わせることにより、実際の反応システムへ応用した。

メチルシクロへキサン・プロピオニトリル系: 相溶温度は0℃以下であるため、定温反応に応用可能であると共に、フェニルスルファニル基と酸化剤(NBSなど)を組み合わせた活性化法によりグリコシド結合が効率的に形成できる溶媒系。コアユニットおよびその反応性生物はメチルシクロへキサン相に回収され、その他の試薬類はプロピオニトリル相に回収され、さらにいずれも安全性の高い有機溶媒であるため、非常に有用性が高いことが明らかとなった。

(メチル)シクロヘキサン・ニトロメタン系: 最近ニトロメタンを溶媒とすることにより糖ーアミノ酸結合反応が効率的に進行することが明らかになっている。本溶媒はシクロアルカン系溶媒と相溶二相溶媒系を形成するため、コアユニットの合成に有用と考えている。本溶媒系においても、生成物であるコアユニットは二相分離後、シクロアルカン相に回収できた。

メチルシクロヘキサン・ジエチルエーテル <u>系</u>:グリコシド結合形成反応として一般的な イミデート活性化グリコシド結合形成反応に 適用できた。

これまでに確立した多相有機溶媒反応系により、コアユニットをベースとした糖ペプチドの網羅的合成法を検討した。その結果、次に示すような糖ユニットまたは糖ユニットを有するペプチドを、反応途中における分離精製なしで合成することに成功した。

# 主な発表論文等 (計 19 件)

- 1) <u>Kazuhiro Chiba</u>, Shokaku Kim, Anodic Carbon-Carbon Bond Formation in Lithium Perchlorate/Nitromethane Electrolyte Solution, *Electrochemistry*, Vol.77, No.1, p.21-29 (2009). (查読有)
- 2) Yohei Okada; Ryoichi Akaba; <u>Kazuhiro Chiba</u>, Electrocatalytic Formal [2+2] Cycloaddition Reactions between Anodically Activated Aliphatic Enol Ethers and Unactivated Olefins Possessing an Alkoxyphenyl Group, *Org. Lett.*, **2009**, *11* (4), pp 1033–1035. (查読有)
- 3) Tatsuya Mizoguch, Kohdai Nagata, Makoto Kitsunai, Kumi Hirose, Akira Hirasawa, and <u>Kazuhiro Chiba</u>, Construction of Cold-triggered/Heat-destroyed Emulsions for Use as a Practical Cold-Storage Thermal History Indicator, *J. Sci. Food Agric.*, (2009) in press, (查読有)
- 4) Kohdai Nagata, Tatsuya Mizoguchi, Makoto Kitsunai, Kumi Hirose, Akira Hirasawa and <u>Kazuhiro Chiba</u>, Cold-triggered/ Heat-destroyed Emulsions Composed of Phospholipids and Triacylglycerols as Thermal History Indicators for Cold-Chain Distribution Systems, *J. Sci. Food Agric.*, **88**:1019–1024 (**2008**). (查読有)
- 5) Shokaku Kim, Keisuke Yamamoto, Kanako Hayashi and <u>Kazuhiro Chiba</u>, A cycloalkane-based thermomorphic system for palladium-catalyzed cross-coupling reactions, *Tetrahedron*, (2008), 64(12), 2855-2863. (查 読有)
- 6) Shokaku Kim, Ai Tsuruyama, Akihiro Ohmori and <u>Kazuhiro Chiba</u>, "Solution-Phase Oligosaccharide Synthesis in a Cycloalkane-Based Thermomorphic System", *Chem. Comm.*, **2008**, 1816 1818. (查読有)
- Shokaku Kim, Satoko Noda, Kanako Hayashi and <u>Kazuhiro Chiba</u>, An Oxidative Carbon-Carbon Bond Formation System in

- Cycloalkane-Based Thermomorphic Multi-Phase Solution, *Org. Lett.*, **2008**, 10(9), 1827-1829. (査読有)
- 8) Makoto KITSUNAI, Kentaro MIYAJIMA, Yuzuru MIKAMI, Shokaku KIM, Akira HIRASAWA, <u>Kazuhiro CHIBA</u>, Phase-separable Aqueous Amide Solutions as a Thermal History Indicator, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 2008, Vol.76, No.12, p.871-873. (查読有)
- 9) Tomio NAGANO, Yuzuru MIKAMI, Shokaku KIM. Kazuhiro CHIBA, Cycloalkane-based Construction of Thermomorphic (CBT) Electrolyte Solution Systems and Application for Conversion of а Furan Derivative. Electrochemistry, 2008, Vol.76, No.12, p.874-879. (査読有)
- 10) Kumi HIROSE, Shokaku KIM, <u>Kazuhiro CHIBA</u>, Cyclic Voltammetric Studies on Anodic Cycloaddition Reactions between Electrogenerated Phenoxonium Cations and Alkenes, *Electrochemistry*, Vol.76, No.12, p.871-873 (2008). (查読有)
- 11) Tomohiro Marui, Shinya Kajita, Yoshihiro Katayama, <u>Kazuhiro Chiba</u>, Laser Raman Detection of an Electrogenerated Intermediate during Anodic Synthesis of Dihydrobenzofurans *via* Formal [3+2] Cycloaddition, *Electrochem. Commun.* 9, **2007**, 1331-1336. (查読有)
- 12) <u>千葉 一裕</u>,シクロアルカン可溶化疎水性タグを用いた化学プロセスの効率化, "*化学工業*" (特集) コンビナトリアルケミストリーの新展開、**2007** 年 4 月号 (VOL. 58) No. 4, 281-287. (査読有)
- 13) Arata, M.; Miura, T.; <u>Chiba, K.</u>; Electrocatalytic Formal [2+2] Cycloaddition Reactions between Anodically Activated Enyloxy Benzene and Alkenes, *Org. Lett.*, **2007**, 9(21), 4347–4350. (查読有)
- 14) Kohsuke Nishimoto, Shokaku Kim. Yoshikazu Kitano, Masahiro Tada, Kazuhiro Chiba, Rate Enhancement of Diels-Alder Reactions in Aqueious Perfluorinated 2006. Emulsions. Org. Lett., 8(24),5545-5547. (査読有)
- 15) Kitano, Yoshikazu; Manoda, Tetsuya; Miura, Teppei; <u>Chiba, Kazuhiro</u>; Tada, Masahiro. A convenient method for the preparation of benzyl isocyanides. *Synthesis* (2006), (3), 405-410. (查読有)
- 16) Hayashi, Kanako; Kim, Shokaku; Kono, Yusuke; Tamura, Mihoko; <u>Chiba, Kazuhiro.</u> Microwave-promoted Suzuki-Miyaura coupling reactions in a cycloalkane-based thermomorphic biphasic system.

- **Tetrahedron Letters** (**2006**), 47(2), 171-174. (査読有)
- 17) Teppei Miura, Shokaku Kim, Yoshikazu Kitano, Masahiro Tada, <u>Kazuhiro Chiba</u>, Electrochemical Enol Ether-Olefin Cross-Metathesis in a Lithium Perchlorate-Nitromethane Electrolyte Solution. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2006**, 45(9), 1461 1463. (查読有)
- 18) Fumiyoshi Tanaka, Michiko Arata, Kanako Hayashi, Shokaku Kim and <u>Kazuhiro Chiba</u>, Cycloalkane-based Thermomorphic Electrochemical Reaction System Composed of Nitrile-solvents, *Electrochemistry*, **2006**, 74(8), 625-627. (查読有)
- 19) Kanako Hayashi, Shokaku Kim, and <u>Kazuhiro Chiba</u>, Reversible capture of electrogenerated intermediates by liquefiable micro-particles containing an amphiphilic tag, *Electrochemistry*, **2006**, 74(8), 621-624. (查 読有)

# 〔学会発表〕(計20件)

- 1) 岡田洋平、赤羽良一、千葉一裕:第32 回有機電子移動討論会,2008
- 2)吉岡朋彦·金承鶴·千葉一裕:第 32 回有 機電子移動討論会, 2008
- 3)大岡直哉·千葉一裕:第32回有機電子移動討論会,2008
- 4)河合朋充・杉原万理・千葉一裕:第 32 回 有機電子移動討論会,2008
- 5) Yohei Okada, Ryoichi Akaba, Kazuhiro Chiba:213<sup>th</sup> Electrochemical Society Meeting, 2008
- 6)Tomohiko Yoshioka, Shokaku Kim,Kazuhiro Chiba:213<sup>th</sup> Electrochem. Soc. Meeting, 2008
- 7)K.Nishimoto, S.Kim, K.Chiba:213<sup>th</sup> Electrochem. Soc. Meeting, 2008
- 8)Kumi Hirose, Kohsuke Nishimoto, Shokaku Kim, Kazuhiro Chiba:213<sup>th</sup> Electrochem.Soc. Meeting, 2008
- 9) 千葉一裕: 第27回Combinatorial Chemistry 研究会, 2008
- 10) 岡田洋平・赤羽良一・千葉一裕: 日本 化学会春季年会, 2009
- 11) 岡田洋平・赤羽良一・千葉一裕電気 化学会大会,2009
- 12) 尾関歩未、吉岡朋彦、金承鶴、千葉一裕: 日本農芸化学会2009年度大会
- 13)植松潤平、廣瀬久美、千葉一裕:日本農芸化学会2009年度大会
- 14) 西村宗親、飯島志行、金承鶴、千葉一裕: 日本農芸化学会2009年度大会
- 15) 小池幹男・千葉一裕:日本農芸化学会 2009年度大会
- 16)有吉佐奈惠·千葉一裕:日本農芸化学

- 会2009年度大会
- 17)中山英、岡田洋平、三上由鶴、金承鶴、 千葉一裕:日本農芸化学会2009年度大 会
- 18) ゲゲンタナ・藤田・千葉一裕: 日本農 芸化学会2009年度大会
- 19)大岡直哉,西本浩介,千葉一裕:日本農芸化学会2009年度大会
- 20)河合朋充・山本圭介・千葉一裕:日本 農芸化学会2009年度大会

#### [図書] (計6件)

- 1)<u>千葉一裕</u>、「食品流通の安全を監視する温度履 歴センサーシール」、*食品と技術*, 2008(12), pp 10-17.
- 2)高橋信弘、藤山沙理、<u>千葉一裕</u>、アフィニティー解析法、"分子間相互作用解析ハンドブックータンパク質とタンパク質・核酸・糖・低分子間のネットワーク解析"、p. 45-52,編集 磯辺俊明、中山敬一、伊藤隆司、羊土社,2007.
- 3)A. Tsuruyama, K. Abe, T. Higashiguchi, T. Yoshioka, <u>K. Chiba</u>, Development of Solution-Phase Peptide Synthesis Protocol toward Automatic Synthesizer by Using Precipitation Method, *Peptide Science*, 2007, S.Aimoto and S. Ono (Eds.), The Japanese Peptide Society, pp 43-44.
- 4)K. Abe, A. Tsuruyama, T. Higashiguchi, <u>K. Chiba</u>, Development of an Automatic Solution Phase Peptide Synthesizer, *Peptide Science*, **2007**, S.Aimoto and S. Ono (Eds.), The Japanese Peptide Society, pp 183-184.
- 5)T. Yoshioka, S. Yamamoto, M. Shimizu, S. Kim, <u>K. Chiba</u>, One-Pod Solution-Phase Peptide Synthesis Using Less-Polar Platforms, *Peptide Science*, 2007, S.Aimoto and S. Ono (Eds.), The Japanese Peptide Society, pp 193-194.
- 6)K. Yamamoto, M. Sugihara, S. Kim, <u>K. Chiba</u>, Synthesis of Various Proline Derivatives Using Organic Electrochemical Methods, *Peptide Science*, 2007, S. Aimoto and S. Ono (Eds.), The Japanese Peptide Society, pp 195-196.

# [その他]

- 6. 研究組織
- (1)研究代表者

千葉 一裕

- 東京農工大学・大学院連合農学研究科・教授 研究者番号:20227323
- (2)研究分担者 該当なし
- (3)連携研究者 該当なし