

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20390007

研究課題名(和文) トリアジンを基盤とする脱水縮合反応場の開拓と新技術の創成

研究課題名(英文) DEVELOPMENT OF REACTION FIELDS FOR DEHYDROCONDENSATIONS TOWARD CREATION OF NEW TECHNOLOGIES ON THE BASIS OF TRIAZINE CHEMISTRY

研究代表者

国嶋崇隆(KUNISHIMA MUNETAKA)

金沢大学・薬学系・教授

研究者番号：10214975

研究成果の概要(和文)：トリアジンを含む脱水縮合剤は水やアルコール中でもアミドを合成できる上に、様々な官能基の導入が容易であるという点で特に優れている。本課題では、これらの特性を利用して、水を含む均一系の種々の溶媒、ポリマー、界面、タンパクなど、多様な反応場での反応を検討した。その結果、従来法と比べて簡便な化学変換反応の開発や、膜やタンパク質などの生体分子の機能解析に役立つ新技術を開発することに成功した。

研究成果の概要(英文)：Dehydrocondensing reagents composed of 1,3,5-triazine are superior to other related reagents because they allow synthesizing amides in aqueous solvents or in alcohols, in addition, a diversity of functional groups can be readily introduced into the chlorotriazine ring. In this research project, we examined reactions using such useful triazine reagents in various reaction fields including aqueous or non-aqueous homogeneous solvents, polymers, interfaces, and proteins. As a result, we succeeded in developing several new chemical transformation methods, and new technologies available for functional analysis of biomolecules such as membranes or proteins.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	5,800,000	1,740,000	7,540,000
2009年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
2010年度	3,000,000	900,000	3,900,000
年度			
年度			
総計	13,000,000	3,900,000	16,900,000

研究分野：有機化学

科研費の分科・細目：薬学・化学系薬学

キーワード：トリアジン、アミド、脱水縮合、標識化、ホスト化合物、タンパク質、脂質

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 以下の理由より脱水縮合反応およびその反応剤は学術・産業両面から重要である。

① アミド、エステルは医薬品の約半数に見られる非常に一般性の高い重要な構造であり、医薬品の合成中間体としても多用されている。

② 化成品やポリマーにも基本構造にアミドやエステルを持つものが多い。

③ 主な生体分子(タンパク質、脂質、糖質)はアミドやエステルが構成単位である。

(2) 新技術に対するニーズ：脱水縮合反応は無水が常識であるが、生体分子のように生理機能を有する分子は極性官能基を持つことが多い。もしこれらの極性化合物が可溶性、水やアルコールを反応溶媒として用いることができれば、幅広い応用が可能となり、縮合反応の合成上の価値は格段に上がる。この

ような前提のもと、研究代表者らは以下の研究を行ってきた。

① 水やアルコール中でアミドを合成できる DMT-MM を開発した。

② DMT-MM の原料である CDMT と 3 級アミンを活用した「水中で進行する触媒的脱水縮合反応」を見出し、ホスト化合物やミセル界面を反応場とする新しい反応として、人工アシル基転移酵素、ミセル界面での反応促進へと展開した。

③ さらにその応用として膜界面でのセラミド合成による膜融合の人為的制御に成功した。

以上のような結果に基づいて、今回さらに幅広い多様な「反応場」を対象とし、図 1-1 に記した縮合反応の特徴を最大限に利用した全く新しい技術開発を計画立案するに至った。

## 2. 研究の目的

本研究では、研究代表者らがこれまでに見出した水中で行える触媒的脱水縮合反応を基盤とし、特に反応場に注目してこれを多面的に展開することによって、創薬分野を中心とした学術・産業に幅広く役立つ新しい技術の創成を行う。従来型の単なる合成に留まらず、有機反応を基盤として細胞生物学、タンパク工学などの技術革新を目指した先駆的な基盤研究を行う。

すなわち、具体的には脱水縮合能を中心とするトリアジン化合物の特性を利用して次のような技術開発を行う。反応場としては均一場、分子認識場、不均一場、界面場などを想定する。

(1) 有機合成技術：実用的な縮合反応および関連する反応剤の開発

① 均一場反応として、1 級アミドやオキサゾリン類の簡便合成

② 分子認識場反応として、分子間相互作用を利用した官能基特異的反応

③ 界面場反応として、界面効果を利用した選択的反応

(2) 不斉合成技術：新規分子不斉触媒や液晶不斉場を利用した不斉合成

① 均一場および不斉場を利用した酵素モデルの開発

② 界面不均一場を利用した新しい不斉アミド化反応

(3) 生体機能解析技術：生体分子の構造解析や機能解明に役立つ化学修飾法の開発

① 均一場として水溶性ペプチド間の相互認識に基づく反応

② 分子認識場としてタンパク-薬物リガンド間の親和性を利用した化学修飾

③ 膜界面での脂質合成を利用した相転移反応とその分子機構解明

これらの研究を通して化学反応という視

点から、それぞれの場の機能や特性について様々な知見を集約し、それらを礎として、将来は他の化学反応における場の利用や新たな技術創成へと展開していく。

## 3. 研究の方法

主たる研究は DMT-MM の新規活用、並びに触媒的アミド化反応 (図 1-1) に基づいて計画実施した。

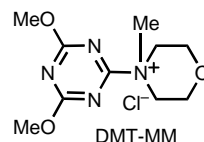
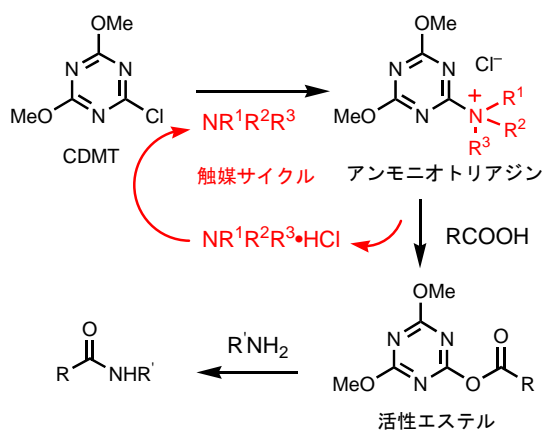


図 1-1 : 触媒的アミド化反応



### (1) 有機合成技術

① 水やアルコール溶媒を利用できるという利点を生かし極性化合物を原料とした温和で簡便な合成法の開発を行う。具体的には 1 級アミドやオキサゾリンの簡便合成、分析化学への応用などを検討する。

② 界面効果に基づく超分子相互作用を利用した選択的反応：局所濃縮効果と前配向性効果によってミセルや膜界面で脱水縮合反応が著しく促進されるという研究代表者らの知見に基づいて、界面に相互に並んだ化合物間で期待される超分子的相互作用 (引力または斥力) の発現を利用して、より効率的で促進的な合成手法の開発を行う。

③ CDMT-第 3 級アミン系における新しい触媒開発：モデル系を用いて各種の 3 級アミン類を用いて反応収率と時間を指標にし、構造と触媒能の相関性を解明する。

④ イオン結合を利用した官能基特異的反応：カルボン酸、リン酸、スルホン酸などの陰イオンを特異的に認識するホスト化合物を用いて選択的反応の開発を検討する。

(2) 不斉アミン触媒による触媒的不斉アシル化技術の開発：既知化合物から簡単に誘導できる不斉クラウン型触媒を用いた不斉ラ

クタム化反応として、アミノ酸の速度論的光学分割や非対称化、さらにタンパク質の安定性に関与するシクロトランスフェラーゼのモデルとして、グルタミン酸をN端に有するペプチドへの基質特異的な反応を行う。

### (3) 生体機能解析技術の開拓

① デンドリマー/オリゴマー型縮合剤の開発：トリアジン型縮合剤の原料である塩化シアヌルの特性を利用して、これらを秩序立てて連結した機能性のデンドリマーあるいはオリゴマー型脱水縮合剤を開発する。

② タンパクを反応場とする反応：触媒反応の機構に基づいて、アビジン-ビオチン系をモデルに用いた触媒の合成と、これを用いた標識化におけるタンパクおよびアミノ酸特異性や修飾率の解明を行う。次に膜タンパクや、医薬品とその標的タンパクをモデルにして応用性を検討する。

③ 縮合反応で誘起されるリポソームの膜融合の分子機構：膜組成と形態変化の動的相関性を解明するために、エネルギー転移、消光作用などの蛍光色素の物理的特徴を駆使すると同時に、蛍光顕微鏡や共焦点顕微鏡による観察を行う。

④ タンパク相互認識モデル：コイルドコイルを形成するペプチド間の相互認識を利用した化学標識を検討する。

## 4. 研究成果

(1) 有機合成技術開拓の分野では以下の成果を上げた。

① 1級アミド合成：アミドの中で窒素上に置換基を有さない単純な構造でありながら温和で優れた合成方法が知られていなかった。そこでアンモニアや塩化アンモニウム塩のメタノール溶液とトリアジン型脱水縮合剤である DMT-MM を用いて、カルボン酸から室温下収率良く合成する反応を開発し、学術論文に発表した。

② オキサゾリンの簡便合成：オキサゾリンはカルボン酸の保護基や不斉リガンドとして有用であるがカルボン酸からの合成には多段階反応を要する。今回 DMT-MM を用いて同一容器内で一挙にカルボン酸を対応するオキサゾリンに変換する反応の開発に成功し、学術論文に発表した。また、反応は全く異なるが、類似のヘテロ環であるオキサゾロンの合成法を開発し、学会発表するとともに、学術論文への年内の投稿をめざし現在執筆中である。

③ トリアジン型縮合剤ならびに関連試薬の合成原料であるトリアジノン化合物では良い合成法が知られていなかったが、固相担持試薬を用いてこれを効率よく合成する方法を開発し学術論文に発表した。

④ 界面効果に基づく超分子相互作用を利用した選択的反応： $\pi$ - $\pi$ 相互作用の利用に

重点を置き、カルボン酸と縮合剤にそれぞれドナー性及びアクセプター性のある化合物を用いて選択的反応が進行することを明らかにし、学会発表した。ミセル系での反応加速については国際学会で招待講演をするるとともに、その成果について現在論文執筆中である。

⑤ CDMT-第3級アミン系における新しい触媒開発を行い、反応性や機能導入の簡便性などの点からいくつかの有力候補となる触媒骨格を見出し、学会発表し、現在は論文執筆の段階にある。これらは従来までのジメチルグリシン構造と比べて、触媒活性が高く、安定で様々な機能性分子への導入が容易である。

⑥ DMT-MM の機器分析における合成技術として、水中でのペプチド合成や、低分子量のカルボン酸イオンの定量分析法を開発し分析学会で発表した。

⑦ ⑤の研究から新たに発展した研究課題として、フォルダマーの一つであるオリゴトリアゾールの新規簡便合成法の開発に成功した。その成果を学会発表並びに学術論文誌(2011年5月にWebに掲載済)に発表した。

(2) 不斉合成技術開拓分野では、不斉アミン触媒による触媒的不斉アシル化技術の開発を目的として数種の不斉クラウン型触媒の合成を終えたが、不斉アミド化反応において検討を重ねた結果、エナンチオ選択性が発現されたものの十分な大きさではなく、基質構造と選択性についてさらに検討中である。

(3) 生体機能解析技術の開拓では以下の成果を上げた。

① 超分子化合物は生体分子のモデルとしてその機能解明に利用されている。そこでトリアジンを母核に有する新しい超分子化合物であるカリクサジンの効率的合成に成功し学術論文として発表した。従来の関連化合物と比べフラットな $\pi$ 系を形成している点が特徴で、新しいホストとしての特性に期待が寄せられる。

② 非常に簡便な新しいタンパク質標識化法としてモジュール式アフィニティーラベル化法(MoAL法)の開発に成功した。従来型のアフィニティーラベル化法では、タンパク質と相互作用するリガンドに目印となる標識部位とタンパクと共有結合形成をする反応性部位の両方を有する複雑な化合物(アフィニティープローブ)を必要とするが、この化合物の合成が本法の大きな障害の一つになっていた。そこでこれらの部位を別々の分子に切り離すことによって、プローブ合成の簡単な方法を開発した。標的のタンパクに応じてこれらのモジュール分子を適宜組み合わせるだけで望みの標識剤を特異的に導入可能であることを明らかにした。アビジン-ビオチン系をモデルに用いて以上の

方法論を確立しさらに標識化の詳細な機構を解明しその研究成果を2報の学術論文として報告した。また、同法を用いてシクロオシキゲナーゼやアセチルコリン受容体の標識化にも成功し学会で発表した。前者については標識位置の特定結果を待って学術論文に発表予定である。後者は構造活性相関に関する検討を実施後の発表になる。

③ 膜界面場の反応として、膜の標識化による融合現象の可視化に成功し、また巨大ベシクルの分裂反応が進行する条件を見つけ、いずれも学会で発表した。前者については論文準備中である。さらに、この膜内でのセラミド合成の速度論的解析を行いミセル系以上の大きな反応加速が起きることを明らかにし、この成果については本年5月に学会で発表後、学術論文として執筆予定である。

以上、期間内に全てが論文発表にまで至らなかったものの、成果がまとまって執筆段階に有るものだけで相当数に上り（これらについては一兩年の内にまとめる予定である）、研究は概ね期待通りの成果を上げることができた。脱水縮合反応を中核に据えた、新しい合成反応はもちろん、タンパクや脂質の生体分子を対象とした反応は生命科学研究に有用な優れた技術として、いずれも創薬研究に多大な貢献が期待される。また、本課題から意図しなかった新しい研究の芽も幾つか見つかり、今回の研究が礎となり反応場を利用した幅広い研究展開に大きな期待が持たれる。

#### 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 12 件)

- 1) Y. Tsukada, K. Yamada, and M. Kunishima, New approach to oligotriazoles using a cobalt complex of propargyl azides as a synthetic component, *Tetrahedron Lett.*, 査読有, Vol 52, 2011, 印刷中.
- 2) S. Nakanishi, H. Tanaka, K. Hioki, K. Yamada, M. Kunishima, Labeling study of avidin by modular method for affinity labeling (MoAL), *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 査読有, Vol. 20, 2010, 7050-7053.
- 3) K. Miyamoto, T. Okubo, M. Hirobe, M. Kunishima, M. Ochiai, Effects of stereochemistry and  $\beta$ -substituents on the rates of vinylic  $S_N2$  reaction of hypervalent vinyl(phenyl)- $\lambda$ 3-iodanes

with tetrabutylammonium halides, *Tetrahedron*, 査読有, Vol: 66, 2010, 5819-5826.

- 4) K. Hojo, H. Ichikawa, Y. Fukumori, K. Kawasaki, Application of water-dispersible Boc-amino acid Nanoparticles to peptide synthesis in water, *Peptide Science* 2009, 査読有, 2010, pp. 177-178.
- 5) M. Kunishima, S. Nakanishi, J. Nishida, H. Tanaka, D. Morisaki, K. Hioki, H. Nomoto, Convenient Modular Method for Affinity Labeling (MoAL Method) Based on a Catalytic Amidation, *Chem. Commun.*, 査読有, 2009, pp. 5597-5599.
- 6) H. Tanaka, I. A. Wada, M. Shiro, K. Hioki, D. Morisaki, M. Kunishima, Synthesis of Aza-bridged Calix(4-methoxy)triazines toward Flattened p-Conjugated Macrocycles, *Heterocycles*, 査読有, Vol. 79, 2009, pp. 609-616.
- 7) K. Hioki, K. Ohshima, Y. Sota, M. Tanaka, M. Kunishima, A Simple Practical Method for Synthesis of 4,6-Dimethoxy-1,3,5-triazin-2(1H)-one Using Dimethylamine-Functionalized Solid-Phase Reagent, *Synthesis*, 査読有, 2009, pp. 542-544.
- 8) H. I. Ali, K. Tomita, E. Akaho, M. Kunishima, Y. Kawashima, T. Yamagishi, H. Ikeya, T. Nagamatsu, Antitumor Studies-Part 2: Structure-Activity Relationship Study for Flavin Analogs Including Investigations on Their in vitro Antitumor Assay and Docking Simulation into Protein Tyrosine Kinase., *Eur. J. Med. Chem.*, 査読有, Vol. 43, 2008, pp. 1376-1389.
- 9) T. Mizuhara, K. Hioki, M. Yamada, H. Sasaki, D. Morisaki, M. Kunishima, Direct Preparation of Primary Amides by Reaction of Carboxylic Acids and Ammonia in Alcohols Using DMT-MM, *Chem Lett.*, 査読有, Vol. 37, 2008, pp. 1190-1191.
- 10) K. Hioki, Y. Takechi, N. Kimura, H. Tanaka, M. Kunishima, Convenient One-Pot

Synthesis of 2-Oxazolines from Carboxylic Acids, *Chem. Pharm. Bull.*, 査読有, Vol. 56, 2008, pp. 1735-1737.

11) 国嶋崇隆, 反応場の特性を基盤とする反応制御と実用的試薬の開発研究, 薬誌, 査読無, Vol. 128, 2008, pp. 425-438.

12) 国嶋崇隆, 機能拡張性を備えた実用的なポリマー型脱水縮合剤の開発, 薬学研究の進歩, 査読無, Vol. 24, 2008, pp. 29-35.

[学会発表] (計 26 件)

1) 小笠原拓也, 巨大ベシクル膜界面での脱水縮合反応により誘起される膜の形態変化, 日本薬学会第 131 年会, 2011 年 3 月 29 日, 東日本大震災のため誌上開催

2) 塚田裕以智, Huisgen 反応を用いたペプチド様オリゴトリアゾール化合物の新規合成法の開発, 日本薬学会第 131 年会, 2011 年 3 月 29 日, 東日本大震災のため誌上開催

3) 吉田将勇, モジュール式アフィニティラベル化法を用いたニコチン性アセチルコリン受容体の特異的標識化, 日本薬学会第 131 年会, 2011 年 3 月 29 日, 東日本大震災のため誌上開催

4) 藤田光, 水溶性脱水縮合剤 DMT-MM を用いたオキサゾロン誘導体のワンポット合成, 日本薬学会第 131 年会, 2011 年 3 月 29 日, 東日本大震災のため誌上開催

5) M. Kunishima, An Efficient Dehydrocondensing Reaction Accelerated at a Micellar Interface, 環太平洋化学会 (PacifiChem 2010), 2010 年 12 月 17 日, ハワイコンベンションセンター (USA)

6) M. Kunishima, Convenient modular method for specific labeling of targeting proteins by catalytic amidation: MoAL Method, 環太平洋化学会 (PacifiChem 2010), 2010 年 12 月 17 日, ハワイコンベンションセンター (USA)

7) 塚田裕以智, Huisgen 反応を用いたペプチド様オリゴトリアゾール化合物の新規合成法の開発, 日本薬学会北陸支部 1 2 2 回例会, 2010 年 10 月 21 日, 北陸大学(石川県)

8) 中西修一, モジュール式アフィニティラベル化法 (MoAL 法) を用いた標的タンパク質の特異的標識化, 第 4 回バイオ関連化学シンポジウム, 2010 年 9 月 25 日, 大阪大学(大阪府)

9) 美野卓大, ハロゲン化ホウ素を用いたアルキルフェノールエトキシレート of 化学分解ガスクロマトグラフィー, 日本分析化学会第 59 年会発表, 2010 年 9 月 17 日, 東北大学(宮城県)

10) 田中弘之, クロロトリアジンをを用いた脱水縮合反応に有用な新規触媒ユニットの開発, 第 8 回次世代を担う有機化学シンポジ

ウム, 2010 年 5 月 13 日, 東京, 長井記念ホール

11) 田中弘之, 脂質界面での触媒的脱水縮合反応を用いた膜融合現象と巨大ベシクルの形成, 日本薬学会第 130 年会, 2010 年 3 月 29 日, 岡山大学(岡山県)

12) 田中弘之, モジュール式アフィニティラベル化法 (MoAL 法) に有効な新規触媒ユニットの開発, 日本薬学会第 130 年会, 2010 年 3 月 29 日, 岡山大学(岡山県)

13) 中西修一, モジュール式アフィニティラベル化法 (MoAL 法) を用いたアビジン標識化におけるリガンドモジュールの構造活性相関, 日本薬学会第 130 年会, 2010 年 3 月 29 日, 岡山大学(岡山県)

14) 鶴崎亮, モジュール式アフィニティラベル化法 (MoAL 法) を用いたシクロオキシゲナーゼの特異的標識化, 日本薬学会第 130 年会, 2010 年 3 月 29 日, 岡山大学(岡山県)

15) 北條恵子, 水分散型 Fmoc 保護アミノ酸ナノ粒子を用いる水中ペプチド固相合成 (その 4), 日本薬学会第 130 年会, 2010 年 3 月 29 日, 岡山大学(岡山県)

16) 田中弘之, アザ-カリックストリアジン類の合成, 第 35 回反応と合成の進歩シンポジウム, 2009 年 11 月 17 日, 金沢市文化ホール(石川県)

17) K. Hojo, Application of water-dispersible Boc-amino acid Nanoparticles to peptide synthesis in water, 第 46 回ペプチド討論会, 2009 年 11 月 5 日, 北九州国際会議場(福岡県)

18) K. Hojo, Peptide synthesis in water using Boc-amino acids nanoparticles, 8th Australian Peptide Conference, South Stradbroke Island, 2009 年 10 月 11 日, Couran Cove (Australia)

19) 吉田具弘, 縮合剤 DMT-MM を用いた水溶液中のカルボン酸の誘導體化 GC 分析, 日本分析化学会第 58 年会, 2009 年 9 月 24 日, 北海道大学(北海道)

20) 中西修一, モジュール型アフィニティラベル化法の開発, 第 7 回次世代を担う有機化学シンポジウム, 2009 年, 7 月 23 日, 大阪大学(大阪府)

21) 国嶋崇隆, トリアジン型脱水縮合剤の開発と応用, 平成 21 年度前期有機合成化学講習会, 2009 年 6 月 17 日, 長井記念ホール(東京都)

22) 国嶋崇隆, 触媒的脱水縮合反応を基盤とするモジュール式アフィニティラベル化法 (MoAL 法) の開発, 日本ケミカルバイオロジー学会第 4 回年会, 2009 年 5 月 19 日, 神戸市産業振興センター(兵庫県)

23) 田中弘之, リポソーム膜界面での触媒的脱水縮合反応が誘起する膜融合と GUV の形成, 日本ケミカルバイオロジー学会第 4 回年

会，2009年5月19日，神戸市産業振興センター（兵庫県）

24) 野元 裕，新規トリアジン型脱水縮合剤 DMT-MM を用いた細胞タンパク質の標識，日本薬学会第129年会，2009年3月26日，国立京都国際会館(京都府)

25) 筏 佳子，リボソーム膜界面での脱水縮合反応が誘起する膜融合と GUV の形成，日本薬学会第129年会，2009年3月28日，国立京都国際会館(京都府)

26) 中西修一，新規アフィニティーラベル化法によるアビジンの特異的標識化，日本薬学会第129年会，2009年3月27日，国立京都国際会館(京都府)

[その他]

ホームページ等

<http://www.p.kanazawa-u.ac.jp/lab/seibutsu.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

国嶋 崇隆 (KUNISHIMA MUNETAKA)

金沢大学・薬学系・教授

研究者番号：10214975

### (2) 研究分担者

日置 和人 (HIOKI KAZUHITO)

神戸学院大学・薬学部・助教

研究者番号：70268522

北條 恵子 (HOJO KEIKO)

神戸学院大学・薬学部・助教

研究者番号：20289028

田中 弘之 (TANAKAHIROYUKI)

金沢大学・薬学系・助教

研究者番号：40378873

盛崎 大貴 (MORISAKI DAIKI)

金沢大学・薬学系・助教

研究者番号：30462740

(平成21～22年度)

山田 耕平 (YAMADA KOHEI)

金沢大学・薬学系・助教

研究者番号：40583232