

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24651253

研究課題名(和文) 生体高分子を鋳型とした大環状リガンド創製と分子進化

研究課題名(英文) Generation and optimization of macrocyclic synthetic ligands through biomacromolecule-templated cyclizations

研究代表者

大栗 博毅(Oguri, Hiroki)

北海道大学・理学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：80311546

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)：生体高分子表面を鋳型として大環状骨格を構築するアプローチで、標的ドメインに特異的に相互作用するリガンドを創製する手法の開発を目指す。本研究では、複数の機能性ユニットを提示できる多官能性のスキャフォールドを設計し、簡便に合成することができた。ペプチドフラグメントをスキャフォールドに連結しながら、大環状骨格を形成する手法を検討した。

研究成果の概要(英文)：This research intends to develop template-synthesis protocols for generating macrocyclic ligands as specific modulators of targeted biomacromolecules. In this project, we have designed and synthesized densely functionalized scaffolds capable of integrating multiple functional units on the rigid skeletons. We are exploring assembly peptidyl fragments on the scaffold and subsequent macrocyclization in the presence of biomacromolecule as a template.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学・ケミカルバイオロジー

キーワード：テンプレート合成 スキャフォールド マクロ環化 多官能性分子 フラグメント

### 1. 研究開始当初の背景

医薬品の探索研究では、酵素等の生体高分子と“鍵と鍵穴様式”で相互作用する天然物や既存の薬剤をモチーフとしてアナログを創製するアプローチが主流となってきた。合成コストや薬物動態の観点から、コンビナトリアル化学合成分野においても、分子量 (<500) 以下の低分子ライブラリーを構築する研究が大多数を占めてきた。

一方、生体高分子の機能性サブドメインに相当する分子サイズを有する高次構造リガンドを化学合成するための方法論は確立されていない。表面積が大きく (>1000 Å<sup>2</sup>)、特異的な分子認識能力を獲得した生体親和性の化合物群を現実的なコストで創製できれば、蛋白質間や蛋白質 核酸間相互作用を変調・制御する医薬品や分子プローブの開発に大きな進展が期待できる。

蛋白質の表面を認識する人工化合物の創出に向けて、合理的なアプローチの一つに鑄型合成法が挙げられる。標的とする生体高分子ドメインを鑄型(テンプレート)として、標的分子群と相互作用する化合物群を合成し、選別する手法である。このテンプレート合成の成否を左右するのは、多官能性のスカフォールドの設計と生理的条件下での共有結合形成反応の効率と考えられる。本研究では、複数の官能基や機能性ユニットを連結できる生体親和性スカフォールドの重要性に着目した。

### 2. 研究の目的

本研究では、生体高分子を鑄型として大環状骨格を構築するアプローチで、標的ドメインと特異的に相互作用する人工リガンドを創出する合成化学的なアプローチを開発する。生体高分子表面と効果的に相互作用する複数のペプチド鎖を骨格上に高密度で集積化できる多官能性のスカフォールドを設計し、合成する。また、テンプレート存在下でのみ大環状骨格の形成が可能なスカフォールドや生体直交型反応の開発を目指す。

蛋白質 蛋白質間や蛋白質 核酸間相互作用を変調・制御する機能性サブドメインとして必要な分子表面積(>1000 Å<sup>2</sup>)を獲得しながら、大環状天然物群と同等の細胞膜透過性を備えた化合物群を創出する。標的分子との結合親和性に基づいて目的の化合物を選別・単離できるシステムの開発に取り組む。

### 3. 研究の方法

#### (1) ビスピロリジノインドリン型スカフォールドの設計と合成

ペプチドと同様な生体親和性が期待され、複数の機能性ユニットの連結が可能な多官能性のビスピロリジノインドリン型スカ

フォールド (1) を設計した(図1)。この光学活性な二量体型スカフォールド(1)は、三環性骨格の四級炭素同士が連結した C<sub>2</sub> 対称型の骨格を持つ。また、プロリンユニットとアニリン型官能基を併せ持つので、標的蛋白質と相互作用するペプチドユニットを C<sub>2</sub> 対称型スカフォールドの三箇所連結することができる。

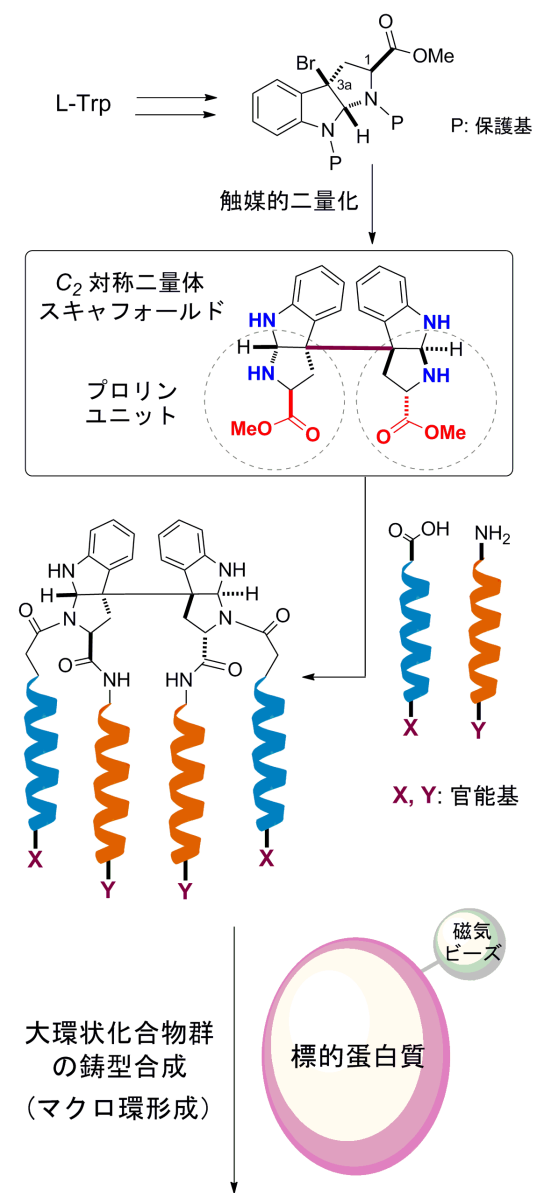


図1 ビスピロリジノインドリン型スカフォールドの設計と鑄型合成の概略

生体高分子表面をテンプレートとして、環化前駆体をフォールディングさせ、エントロピー障害のために通常はほとんど進行しないマクロ環形成反応を促進させる。鑄型とした生体高分子と環化生成物との複合体を反応系内から単離し、所望の結合親和性を獲得した人工リガンドを選別・構造決定する。単量体の置換基や立体化学のみならず、多量化や環形成を担う官能基を改良しながら、次の

サイクルのテンプレート合成を実施し、骨格形成効率や標的ドメインへの結合親和性を最適化した分子を創製する。

## (2) アズレノンへのユニット集積化による多官能性スカフォールドの設計と合成

本研究の基盤研究として筆者らは、ピシクロ [5.3.0] 骨格を持つアズレノン(2)をマニフォールドとして、2種の機能性ユニットの集積化を試みていた(図2)。アズレノンに鎖状/環状アゾ化合物を順次作用させるワンポット反応を実施し、Click反応のような簡便な操作で2種類の機能性ユニットを提示した五環性骨格を構築する手法を報告していた(H. Oguri *et al.* *Chem. Commun.* 2010, 46, 3304-3305.)。

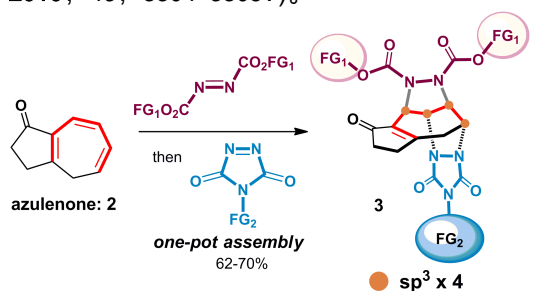


図2 アズレノンと2種のアゾ化合物とのワンポット反応による機能性ユニット集積化

生理的条件下での共有結合形成反応として、Native chemical ligation や Click 反応が現在多用されているが、本研究では、これらとは異なる結合形成反応や機能性ユニット集積化法の開発に取り組んだ。アズレノン(2)のシクロペプタトリエン部位に存在する6連続の $sp^2$ 炭素を全て活用した連続環化により、5種類の機能性ユニットを連結する手法の実現を目指した。このアプローチにおいても多環式骨格にプロリンユニットを導入し、(1)と同様のアプローチでテンプレート合成への展開が可能な分子を設計した。

## 4. 研究成果

### (1) ビスピロリジノインドリン型スカフォールドの設計と合成

$C_2$ 対称型スカフォールド(1)は、トリプトファンが二量化して生合成されると推定されている。ベンジル位を臭素化した三環性の単量体(5や6等)を二量化する手法として、Movassaghiらが $CoCl(PPh_3)_3$ を活用して、隣接四級炭素を構築する手法(*Angew. Chem. Int. Ed.* 2007, 46, 3725.)を開発し、これがスタンダードな二量化法となっていた。しかし、この既存の手法では、アセトン溶媒中化学量論量以上のコバルト錯体を使用する必要があり、特にグラムスケールでの合成の際に触媒やホスフィン配位子の分離に難点が

あった。そこで本研究では、ニッケル触媒を用いた二量化反応を開発した(図3)。金属触媒や配位子を最適化し、含水アミド系溶媒中でピロリジノインドリン骨格同士を高収率で二量化する新手法の開発に成功した。本触媒反応による単量体(5)の二量化は、効率良く進行し(最高収率76%)、3g以上の基質を用いた二量化にも適用可能であることを見出した。また、ジアステレオマー(6)の二量化では収率の低下がみられたものの、本手法はビスピロリジノインドリン型スカフォールド群の合成に適した触媒的二量化反応であることを実証した。

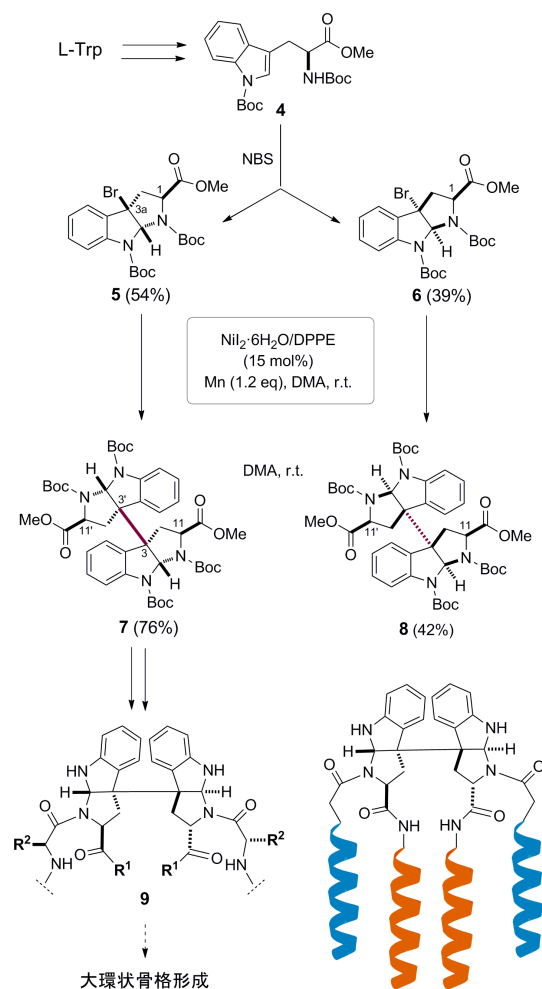


図3  $C_2$ 対称型スカフォールドの実践的合成、ユニット集積化、大環状骨格形成の試み

次に、ペプチド等の機能性ユニットを連結する手法を開発した。二量体(7)のカルバメート保護基を除去したテトラアミンでは、ペプチドのC末端との縮合がプロリンユニット側の脂肪族アミンと位置選択的に進行した。また、メチルエステル部位をカルボン酸とした後、種々のユニットを導入した。大環状骨格形成へ向け、カルボン酸部位に末端オレフィンを導入した化合物を数種類合成し、閉環メタセシス反応を実施した。閉環が

進行し、目的の分子量を持つ化合物が得られたが、詳細な NMR の解析や X 線結晶構造解析は今後の課題となっている。

このように図 1 で示した研究計画の実現に向け、スカフォールドの実践的な合成法とユニット集積化法を開発することができた。今後、生体高分子共存下での大環状骨格形成に取り組んでいく。

## (2) アズレノンへのユニット集積化による多官能性スカフォールドの設計と合成

アズレノン(2)のシクロペプタトリエン部位に存在する 6 連続の  $sp^2$  炭素を全て活用した連続環化により、5 種類のフラグメントを連結して 6 環性骨格を構築した(図 4)。まず、末端アセチレンフラグメントとアズレノン(2)との分子間環化を検討した。Buono らがシクロペプタトリエンを基質として報告したコバルト触媒による反応条件(*Org. Lett.* 2005, 7, 2353.)を応用し、共役ジエンの転位と四級炭素の構築を伴う形式的な [6+2] 環化で三環性骨格(10)を合成した。次に、環状ケトンと共役したジエンとマレインイミドを連結したフラグメントとの分子間 [2+2] 光環化を検討した。複数の電子が近接した基質を光で活性化するので、当初懸念した通り、様々な副反応が競争する複雑な反応系となった。試行錯誤の末、三環性基質の反応点付近に存在するスチレン部位をビニルシランへ改変することで、[2+2] 光環化反応の位置を制御することに成功した。また、写真用ランプ光源を照射する最適化条件を見出した。これにより、位置/立体選択性をほぼ完全に制御し、[2+2] 光環化が進行した 11 を高収率 (82%) で合成することができた。次に、アズレノン母骨格に残された、

- 不飽和ケトン部位に対する分子間 [3+2] 環化を実施した。グリシンと芳香族アルデヒドを縮合してアゾメチンイリドを発生させた。高度に官能化された複雑な基質に対しても、期待通りの [3+2] 環化が位置および立体選択的に高収率 (92%) で進行する条件を見出した。

アズレノン(2)に対して、3種類の構築ブロックを集積化しながら逐次環化させるアプローチで、3置換プロリンユニットを組み込んだ 6 環性骨格(12)の構築に成功した。X 線結晶構造解析で 2 つの四級炭素を含む 10 連続の  $sp^3$  炭素で構成される 6 環性骨格の構造を確実に決定した。さらに、ビニルシラン部位をヨウ化ビニルへ変換後、プロリン窒素を無保護のままアリールボロン酸フラグメントを鈴木-宮浦カップリングさせる手法を開発した(12-13)。このように 5 種類のフラグメント(アセチレン, マレインイミド,

グリシン, 芳香族アルデヒド, アリールボロン酸)をアズレノンに連結する迅速合成プロセス(5 工程)の開発に成功した。今後、多官能性の 6 環性骨格(14)に導入したプロリンユニットを活用したペプチドユニットの連結や大環状骨格形成を検討する予定である。

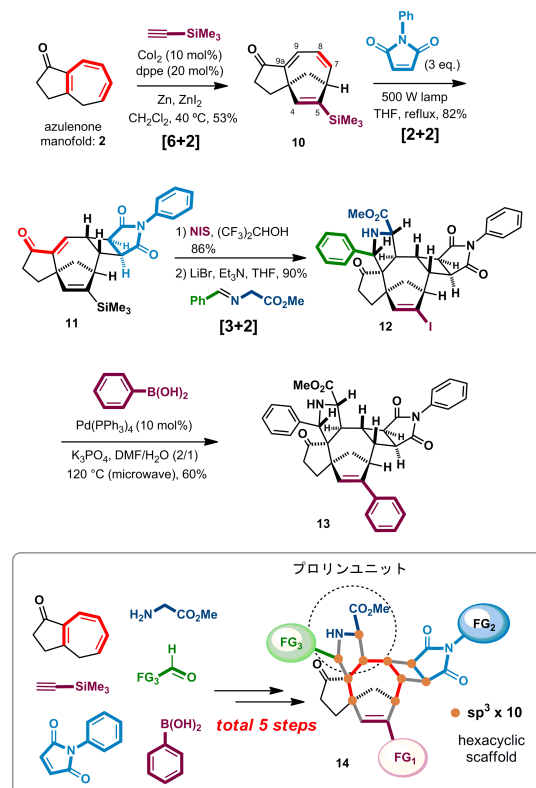


図 4 アズレノンへのユニット集積化プロセス

## 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 2 件)

Mitsuhiro Wada, Takahisa Murata, Hideaki Oikawa, Hiroki Oguri\* "A nickel-catalyzed dimerization of pyrrolidinoindoline scaffold: a systematic access to chimonanthines, folicanchines and (+)-WIN 64821" *Org. Biomol. Chem.* 2014, 12, 298 - 306. 査読有

Verisoju Mahendar, Hideaki Oikawa, Hiroki Oguri\* "Sequential [6+2], [2+2], [3+2] Annulations for Rapid Assembly of Multiple Fragments" *Chem. Commun.* 2013, 49, 2299-2301. 査読有

[学会発表](計 7 件)

大栗博毅 "多環性天然物の骨格多様化合成による生理活性化合物群の創製" 日本化学会 平成 25 年度函館地区化学講演会, 2014.2.27, 北海道大学函館キャンパス, 函館.

**大栗博毅** “天然物の骨格多様化合成プロセス開発” 第 16 回生命化学研究会, 2014.1.10, KKR ホテル熱海, 静岡.

**大栗博毅**, Velisoju Mahendar, 上田拓真, 及川英秋 “逐次的環構築によるフラグメント集積法の開発” 日本ケミカルバイオロジー学会第 8 回年会, 2013.6.19. 東京医科歯科大学 M&D タワー鈴木章夫記念講堂, 東京

和田光弘, **大栗博毅**, 及川英秋 “ニッケル触媒によるビスピロリジノインドリン近接四級炭素の構築” 第 9 3 日本化学会春季年会, 2013.3.25, 立命館大学びわこ・くさつキャンパス, 滋賀.

**大栗博毅** “Design & Expedition Synthesis of Natural Product-Inspired Multi-cyclic Scaffolds: Strategies for Fragment Assembly and Skeletal Diversification” 第 9 3 日本化学会春季年会 有機化学ディビジョン アジア国際シンポジウム, 2013.3.24, 立命館大学びわこ・くさつキャンパス, 滋賀.

**大栗博毅** “Chemical Evolution of Natural Products through Generation of Skeletal Variations” Asian Chemical Biology Initiative 2013 Bangkok Meeting, 2013.1.27, Pullman Bangkok Hotel, Thailand.

**大栗博毅** “3D-Fragment Assemblies on Natural Product-Inspired Scaffolds” Queenstown Molecular Biology Meetings 2012: Chemical Biology and Drug Discovery, 2012.8.27, Queenstown, New Zealand

〔その他〕

ホームページ:

[http://wwwchem.sci.hokudai.ac.jp/~yuhan/member/oguri\\_public.html](http://wwwchem.sci.hokudai.ac.jp/~yuhan/member/oguri_public.html)

[報道, ハイライト記事等]

*Chem. Commun.* **2013**, *49*, 2299. (雑誌論文) のハイライト記事掲載: David Bradley “Ten Stereocenters in Five Steps” *Chemistry views*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, [http://www.chemistryviews.org/details/news/4224191/Ten\\_Stereocenters\\_in\\_Five\\_Steps.html](http://www.chemistryviews.org/details/news/4224191/Ten_Stereocenters_in_Five_Steps.html), 2013 年 1 月 11 日.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大栗 博毅 (OGURI HIROKI)

北海道大学・大学院理学研究院・准教授