

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790020

研究課題名(和文)ホウ素元素の特性を活用したペプチドライゲーション法の開発

研究課題名(英文)Development of peptide ligation using chemical properties of boron

研究代表者

嶋田 修之(Shimada, Naoyuki)

北里大学・薬学部・助教

研究者番号：00455601

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：アミドは生体分子や多くの高分子、医薬品の構造に含まれる重要な結合様式である。本研究では、有機ホウ素触媒を用いたカルボン酸とアミンからの直接的アミド化反応の開発を目指した。具体的には、同一分子内にスルファニル基とボロン酸部位を有する新規スルファニルボロン酸の合成を行い、単純カルボン酸と単純アミンとの触媒的アミド化反応に適用した。その結果、芳香族ボロン酸におけるスルファニル側鎖の影響を明らかにすることができた。

研究成果の概要(英文)：The amide functionality is one of the most fundamental chemical building blocks. It constitutes the backbone of the biological and synthetic materials such as proteins, polymers and pharmaceuticals. In this research, we aimed at the development of catalytic and direct amide formation reaction of carboxylic acid with amine using organoboron. As a result, a series of sulfanyl organoboronic acids has been synthesized. The substituent effect of sulfanyl functional group was demonstrated by amidation of simple carboxylic acid and simple amine.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・化学系薬学

キーワード：有機合成化学 触媒反応 触媒 ペプチド アミド ホウ素 ボロン酸

1. 研究開始当初の背景

生命科学研究および物質科学研究の両分野において、ペプチドやタンパク質を素材とする分子ツールが注目されている。このような分子ツール創製の技術的基盤となるのがペプチド化学合成である。Merrifieldらにより報告された固相ペプチド合成法の開発を契機として、ペプチド・タンパク質研究は急速に発展を遂げたものの、適用可能なペプチド鎖はアミノ酸 50 残基程度が限界であり、それ以上の長鎖ペプチドの合成には困難が伴うのが現状である。また、従来利用されている縮合剤を用いた液相法によるペプチド化学合成には、低い変換効率、ラセミ化や副反応の進行、反応後の精製法の煩雑さなど多くの課題が残されている。こうしたなか、現在広く利用されているのが Kent らによって報告された NCL (Native Chemical Ligation) 法である。中性水溶液中、C 末端ペプチドチオエステルと N 末端にシステイン残基をもつペプチドとを反応させることでペプチド結合を形成する本手法は、長鎖ペプチド化学合成において最も信頼性の高い方法論の一つとなっている。しかしながら、本手法にも C 末端ペプチドチオエステルをあらかじめ調製しておく必要がある点、またペプチドフラグメントの N 末端アミノ酸残基がシステインに限定される点などの課題が残されている。

単純カルボン酸とアミンから形成されるアミドも有機合成化学上、最も重要な結合様式の一つとなっている。アミド結合はポリアミドを代表とする機能性高分子材料の構成単位である。また、上市されている医薬品および開発途上の医薬品の多くは、その化学構造にアミド結合が含まれている。数ある方法論の中で最も理想的なアミド化反応はカルボン酸とアミンからの触媒的脱水縮合反応である。現在知られている触媒的アミド化は主に金属触媒反応とホウ素触媒反応に大別される。金属触媒としては、チタンやタングステン、ジルコニウムなどが用いられているが、一般的に高温条件が必要なために適用可能な基質に制約がある点や反応生成物中に残存する微量金属の除去などの課題が残されているのが現状である。一方、山本らの先駆的な報告を契機に発展したボロン酸触媒アミド化反応は環境調和性が高いという利点がある。しかしながら、一部の例を除き、依然として高温条件が必要である点、適用可能な基質に制約がある点、ペプチド合成への適用については未開拓であるなど解決すべき課題が残されているのが現状である。

2. 研究の目的

本研究課題は、C 末端カルボキシ基と様々な N ペプチド末端アミノ酸残基との直接的ペプチド結合形成反応の開発を目指し、その基礎となる穏和な条件で進行する触媒的アミド化反応の開発を目的とする。

3. 研究の方法

ペプチド合成に適用可能な触媒的アミド化反応を開発するためには、C 末端ペプチドフラグメントのカルボキシ基を活性化すると同時に、N 末端ペプチドフラグメントのアミノ基を空間的に近接して配置することが肝要であると考えられる。そこで触媒候補分子として、分子内にスルファニル基を有する有機ボロン酸に着目した。想定する触媒サイクルを図 1 に示す。すなわち、触媒のボロ

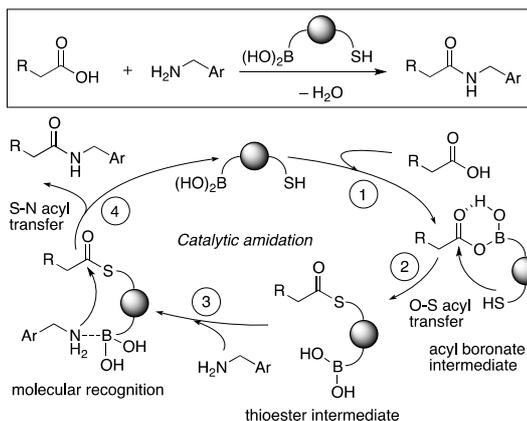


Figure 1

ン酸部位と C 末端カルボキシ基の反応によるアシルボロナート中間体の生成、分子内 O-S アシル基転位による活性ペプチドチオエステルの生成、ホウ素元素によるもう一方のペプチド N 末端アミノ基の分子認識による近接化、続く分子内 S-N アシル基転位が進行することにより、ペプチド結合が形成するとともに触媒が再生されることを期待した。想定する触媒反応を実現するためには、触媒分子のボロン酸部位とスルファニル側鎖の位置関係が重要になると考えられ、図 2 に示したスペーサーの異なる触媒候補分子

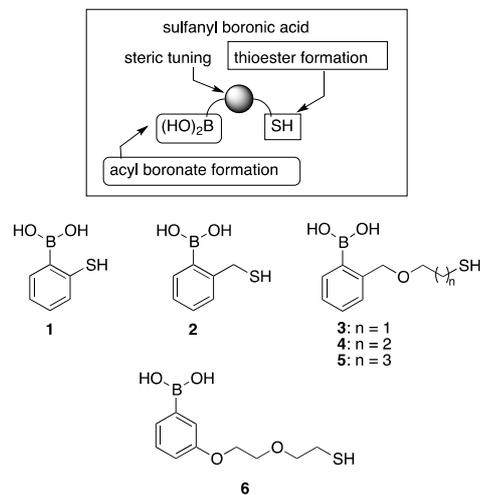


Figure 2

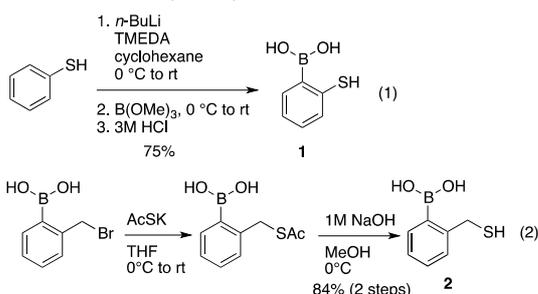
の合成を行う。なお、これまでに同一分子内にスルファニル基を組み込んだ有機ボロン酸誘導体の合成に関する知見は少なく、誘導体合成を視野に入れた実用的かつ柔軟な合成法の確立が課題となる。合成した触媒候補分子の触媒活性評価は当初、単純カルボン酸

と単純アミンのアミド化反応で行う。この際、ペプチド合成への適用を考慮し、室温条件で検討を行う。各種反応条件の精査ならびに、合成した触媒の分子構造と触媒活性の相関を明確にすることで反応の最適化を行う。その後、各種ペプチド誘導体を基質として用い、反応を検討する。一般的にペプチド結合形成反応の成否は、ペプチドC末端の立体的要因に大きく左右されることが知られている。この点を考慮し、本法の適用範囲を明らかにするとともに従来法との差異を明確にする。

4. 研究成果

(1) スルファニルボロン酸の合成

まず、触媒候補分子の中で最も単純な構造を有する2-スルファニルフェニルボロン酸(1)の合成を検討した。当初、2-メルカプトプロモベンゼンを出発原料とし、ハロゲンリチウム交換反応を経てホウ素の導入を検討したが、望みとする化合物を得ることは出来なかった。次に、スルファニル基を2-エトキシエチル基であらかじめ保護した後に、ホウ素の導入、脱保護を行う合成経路を検討したが、ボロン酸部位を傷めることなく2-エトキシエチル基を脱保護する条件を見出すことはできなかった。種々検討の結果、最終的には入手容易なチオフェノールを原料とし、*n*-ブチルリチウムのテトラメチルエチレンジアミン錯体を用いた直接的オルトリチオ化を経るホウ素の導入を行うことで、75%の収率で目的とする化合物を合成することができた(式1)。次に、硫黄元素の求核



性を考慮し、スペーサー末端をアルキルチオールとした2-スルファニルメチルフェニルボロン酸(2)の合成について検討を行った(式2)。チオ酢酸カリウムを用いて2-プロモメチルフェニルボロン酸ベンジル位の求核置換反応を検討したところ、遊離のボロン酸の影響が危惧されたが、意外にも高収率で硫黄元素を導入することが可能であった。塩基性条件下、アセチル基を脱保護することにより2工程84%の収率で望みとする化合物2を得た。なお、化合物2から誘導されたピナコールボロン酸誘導体が定量的にアセチル化されることから、2はジスルフィド結合を形成していないことを確認した。続いて、ベンジリエーテルスペーサーを有するボロン酸誘導体3-5の合成を行った。はじめに対応するメルカプトアルコールを酸性条件下、クロロホルム中トリチルアルコールと作用させることによりスルファニル基を選択的に保

護した。続いて、塩基として水酸化ナトリウムを用い、2-(プロモメチル)プロモベンゼンを求電子剤とする*o*-アルキル化を行い、いずれも高収率でボロン酸導入反応の前駆体を調製することができた。そこで、得られた前駆体を用い、ハロゲン-リチウム交換反応を経るホウ素導入反応を試みたところ、スペーサー長が*n* = 2または3の基質の場合では、良好な収率で望みとするボロン酸誘導体を得られることがわかった(図3)。一方スペーサー長をより短く、*n* = 1とした基質の場合には反応系中で生じたアリールリチウムからの分子内置換反応が進行するのみであり、望みとするボロン酸を得ることはできなかった。そこで次に、あらかじめボロン酸部位が導入された求電子剤を用いた*o*-アルキル化による合成経路について検討を行った。2-プロモメチルフェニルボロン酸をピナコールボロン酸エステルへと変換した後、前述の条件に従いアルキル化反応を検討したとこ

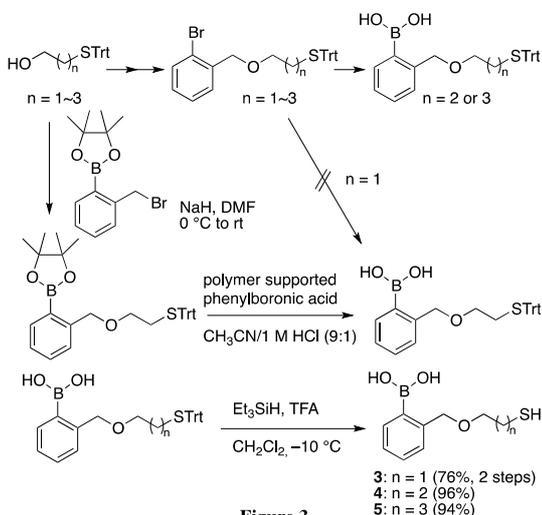


Figure 3

ろ、目的とする生成物が中程度の収率で得られた。なお、ボロン酸を保護していない基質を用いて*o*-アルキル化を行った場合には複雑な混合物を与えた。ピナコールの脱保護は酸性条件下、過剰量のポリマー担持フェニルボロン酸を用いたエステル交換反応を用いることで純度の高いボロン酸が得られた。目的とするボロン酸誘導体を合成することができたので、最後にトリチル基の脱保護について種々条件検討を行った。その結果、トリフルオロ酢酸存在下、ジクロロメタン中、-10 °Cにおいて短時間トリエチルシランを作用させることによりトリチル基を高収率で脱保護可能であることがわかった。3-5はいずれも長期間室温で保存することのできる安定な固体として得られた。次に、スルファニル側鎖をフェニルボロン酸の3位から伸長した6の合成について検討を行った(図4)。3-ヒドロキシフェニルボロン酸をナフタレンジアミンで保護した化合物を原料とし、スルファニル基をトリチルで保護したアルキル化剤との*o*-アルキル化、続くボロン酸とスルファニル基の脱保護を行い、6を良好な収率で得ることができた。

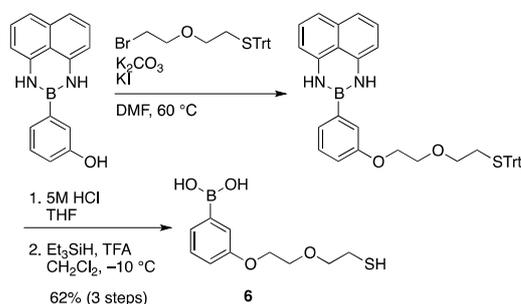
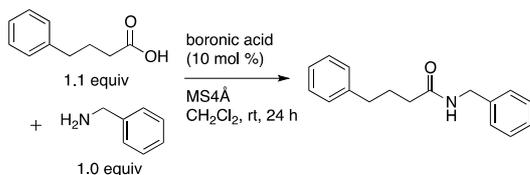


Figure 4

(2) スルファニルボロン酸を用いたアミド化反応

合成した各種スルファニルボロン酸をアミド化反応に適用した。はじめに、2-スルファニルフェニルボロン酸 **1** を用いてアミド化反応における触媒活性評価を行った。MS4Å 存在下、10 mol% のボロン酸を用い、室温条件において 4-フェニル酪酸とベンジルアミンとの反応を行った (表 1)。その結果、40% の収率でアミド化体が得られた。なお、比較としてフェニルボロン酸を用いたときの収率は 2.2% に留まった。このようにわずかながらではあるが、2 位スルファニル基の導入による収率の増加が認められたので、さらなる触媒活性の向上を期待し、フェニルボロン酸 2 位にスペーサー長の異なるアルキルチオール部位を組み込んだ有機ボロン酸誘導体 **2-5** を用いてアミド化反応の検討を行った。しかしながら、**2** を触媒とした場合には、収率 6% にとどまり、**3-5** を触媒とした場合にも、アミド化体は低収率でしか得られなかった。なお、**3-5** ジクロロエタン加熱還流条件で反応を行った場合には、反応の加速

Table 1



boronic acid	% yield	boronic acid	% yield
1	40	4	5
2	6	5	10
3	<5	6	<5

効果が認められ **3** の場合に 7.5%、**4-5** では、ほぼ定量的にアミド化生成物が得られることが明らかとなった。この結果から、室温条件においては 2 位にスルファニル側鎖を導入したボロン酸誘導体では、立体障害のために活性アシルボロナート中間体の形成が不利になると考え、次にフェニルボロン酸 3 位からスルファニル側鎖を伸長したボロン酸誘導体 **6** を用いて、触媒活性評価を行った。しかしながら、**6** を触媒とした場合にも室温条件においてアミド化体を高収率で得ることはできなかった。以上の結果から、当初の予想に反しスルファニル側鎖の効果が極め

て低いことが明らかとなった。また、反応系中における活性アシルボロナート中間体が重要な役割を果たし、室温条件でいかにこの濃度を高めるかが、アミド化反応の成否に関わることを示している。現在、今回得られた知見を踏まえ、室温において活性アシルボロナート中間体の安定化に寄与することが可能な触媒分子の創製とアミド化反応への応用について検討している。

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 2 件)

Watanabe, Y.; Shimada, N.; Anada, M.; Hashimoto, S. *Tetrahedron: Asymmetry* **2014**, *25*, 63-73. (査読有り) (DOI: 10.1016/j.tetasy.2013.10.016)
Shimada, N.; Stewart, C.; Bow, W. F.; Jolitt, A.; Wong, K.; Zhou, Z.; Tius, M. A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 5727-5729. (査読有り) (DOI: 10.1002/anie.201201724)

[学会発表](計 7 件)

荻原康太、高井理恵、嶋田修之、牧野一石、スルファニルボロン酸の合成とアミド化反応への応用、日本薬学会第 134 年会、2014 年 3 月 29 日、熊本
 落合貴之、天井勇太、嶋田修之、牧野一石、スルファニルボロン酸をスペーサーとする分子内グリコシル化反応、日本薬学会第 134 年会、2014 年 3 月 29 日、熊本
 荻原康太、高井理恵、嶋田修之、牧野一石、有機ボロン酸を用いたカルボン酸の触媒的活性化法の開発、第 8 回北里化学シンポジウム、2013 年 12 月 14 日、相模原
 落合貴之、天井勇太、嶋田修之、牧野一石、スルファニルボロン酸を用いた無保護糖のグリコシル化反応の開発、第 8 回北里化学シンポジウム、2013 年 12 月 14 日、相模原
 宮田航輔、嶋田修之、牧野一石、有機ホウ素化合物の分子認識能を利用した糖質レセプターの開発、第 8 回北里化学シンポジウム、2013 年 12 月 14 日、相模原
 市岡寛己、嶋田修之、牧野一石、含ホウ素多座配位子を有する有機金属錯体の合成と応用、第 8 回北里化学シンポジウム、2013 年 12 月 14 日、相模原
 松本哲平、腰塚正佳、嶋田修之、牧野一石、分子内に含窒素芳香族複素環を有する有機ケイ素化合物の合成と応用、第 8 回北里化学シンポジウム、2013 年 12 月 14 日、相模原

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.pharm.kitasato-u.ac.jp/medical/Welcome.html>

6．研究組織

(1)研究代表者

嶋田 修之 (SHIMADA, Naoyuki)

北里大学・薬学部・助教

研究者番号：004555601

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし