

【研究論文】

Staudinger Ligation 法を用いたアミド結合形成反応の開発

Development of novel amide bond formation reaction with Staudinger ligation

植木章晴, 網野佳奈, 櫛引遥, 秋元友花, 鈴木達哉, 鈴木克彦

青森大学薬学部

Abstract

Biological macromolecules, such as nucleic acids, proteins, and carbohydrates, are very important compounds and deeply involved in the expression of physiological functions. However, they can be obtained only in small amounts from nature and are very difficult to isolate in high purity. Therefore, synthetic methods by organic chemistry have been developed for easily supplying the compounds in large amount. In recent years, we have reported to develop the formation reaction of the amide bond, which was one of the important structures in such biological molecules, using the Staudinger ligation reaction at the reducing terminal of the carbohydrate. In this study, we applied our Staudinger ligation reaction condition for a galactose derivative with the azide group on the C2 position. As a result, the amide structure was efficiently formed in a one-pot procedure using a specific acylating reagent in a hydrous condition. In addition, a part of the condition and the reaction mechanism was clarified. This method is expected to become a simple and highly efficient method for amide bond formation.

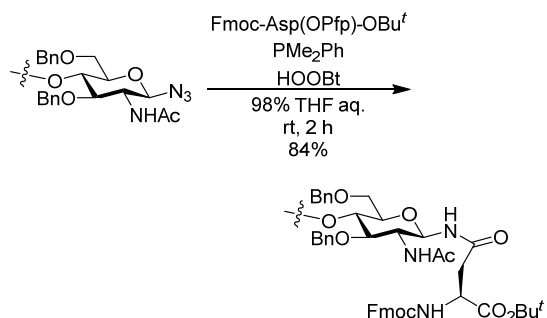
Keywords ; Amide bond formation, glycosyl amide synthesis, glycosyl azide, one-pot synthesis, Staudinger ligation reaction

1. はじめに

核酸やタンパク質, 糖鎖に代表される生体高分子は, 非常に重要な化合物群であり, 生理機能の発現に深く関わっている. しかしながら, それらは天然から微量しか得られず, また高純度で単離することが非常に困難であることから, 単一かつ大量に供給可能な有機化学的手法による合成研究が古くから行われてきた. その中でも, これら生体高分子を構築する重要な結合のひとつであるアミド結合は特に鍵となる構造であり, 様々な部分に存在しているため多くの研究者の注目を集め, その研究が進められてきた. 例えばタンパク質においてアミノ酸同士を結合しているペプチド結合はアミド結合であり, その構造的特性である平面

性や水素結合により立体構造を形成している. その構築方法は自動合成が可能なレベルまで研究が発展しており, 様々な試薬や手法が開発されている. 実際に, インスリンアナログ類や抗がん作用を示すリュープロレリン, 免疫抑制作用を持つシクロスポリンなど, アミノ酸配列や構造を改変した非天然型ペプチドが合成され, 医薬品として利用されている.

一方, 複合糖質である *N*-結合型糖タンパク質ではタンパク質と糖鎖の結合や, その構成分子である *N*-アセチルグルコサミンや *N*-アセチルガラクトサミンなどのアミノ糖のアセトアミド構造など多岐にわたって存在している. しかしながらこれらアミド構造の構築においては, 多数の官能基を



Scheme 1 Staudinger ligation 法を利用した糖鎖還元末端におけるアミド結合形成

有する糖鎖特有の構造特性からタンパク質やペプチドの合成とは異なり画一的な手法は少なく、糖の 2 位アミノ基においては隣接する水酸基の保護基の転移が、また、還元末端のアミンは反応性、安定性、立体選択的に調製しにくいなど、多くの問題点があった。

これに対し、我々は糖鎖還元末端にアスパラギンを導入することが可能な Staudinger Ligation 反応を利用した高効率なアミド結合形成反応を見出した (中原・北條 他, 2011; Scheme 1). Staudinger Ligation 法はリン試薬を用いた Staudinger 還元によりアジド基を還元することによりアミノ基を遊離させ (Staudinger et al., 1919; Gololobov et al., 1992), 次いでアシル化試薬と縮合させることによりアミド結合を形成する手法である (Gololobov et al., 1992; Barluenga et al., 1991; Zbiral et al., 1972; Bachì et al., 1979, 1983; Bosch et al., 1996; Shalev et al., 1996; Garcia-Lopez et al., 1997). アジド基は比較的簡便に導入可能な官能基の一つであり、且つ、一般的な反応条件において安定であり、アミノ基の保護基としても優秀であるため、様々な場面に用いられている。その中でも traceless Staudinger ligation 法として知られる手法はエステルを分子内に有したリン試薬によりアジド基を還元し、続く分子内反応によりライゲーション反応を起こすものであり、効率的にペプチド結合を構築する (Bertozzi et al., 2000; Raines et al., 2000). また、糖鎖還元末端に対して行う手法も数例報告されている (Inazu et al., 1993, 1999; Boullanger et al., 1997, 2000; Davis et al., 2006). 我々の開発した手法は、種々の変換を行った糖鎖合成の最終段階において、含水条件下にリン試薬による還元及

び活性エステルとの縮合反応を一挙に行うものであり、その簡便さや収率、反応時間、立体選択性など、これまでに報告されている手法とは一線を画すものである。しかしながら本手法の反応機構や基質特異性など、その詳細は未だ明らかになっていない部分も多く、我々は更なる応用および汎用性の獲得を目指して研究を行ってきた。今回、糖鎖還元末端とは反応性の異なる 2 位にアジド基を有するガラクトース誘導体を用いて、種々の反応条件下における Staudinger Ligation 法を検討し、一般的なアルキルアジドを原料とするアミド結合形成反応の開発を行った。

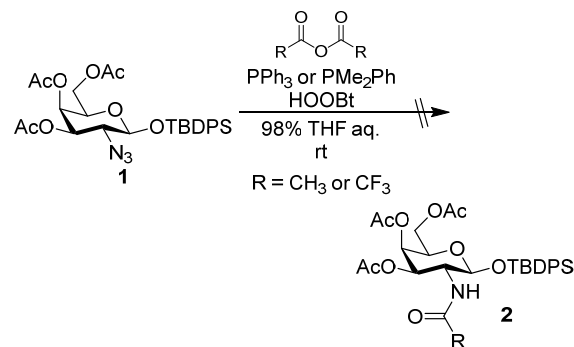
2. 2-アジドガラクトース誘導体を用いたアミド結合形成反応の検討

2-1 酸無水物を用いた検討

我々が報告した手法 (中原・北條 他, 2011) はアジドを有する基質に対し、小過剰のリン試薬、3-hydroxy-1,2,3-benzotriazin-4(3*H*)-one

(HOOBt), およびアスパラギン酸の活性エステルであるペンタフルオロフェニル (Pfp) エステルを 98%テトラヒドロフラン (THF) 水溶液中に室温で反応させると還元及び縮合が連続して進行し、目的とするアミド結合を有する糖アミノ酸を得るものである。これに対し、まず、活性エステルの効果を検証するために、酸無水物として無水酢酸 (Ac_2O) およびトリフルオロ酢酸無水物を用いたアミド結合形成反応の検討水物 (TFAA) を用いて本手法を検討した。

論文に従い合成した GalN₃ 誘導体 **1** (小川・中原 他, 1990, 1991) の 98% THF 水溶液に 1.2 当量の Ac_2O , トリフェニルホスフィン (PPh_3),



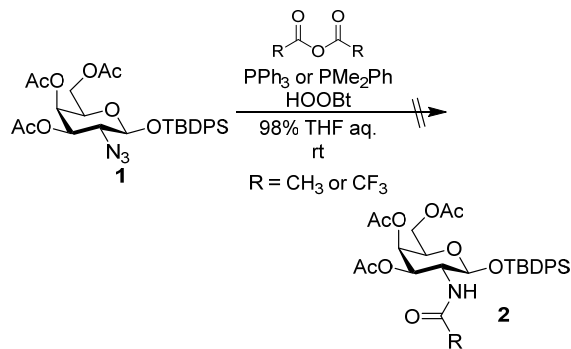
Scheme 2 酸無水物を用いたアミド結合形成反応の検討

HOObt を加え、室温で 2 日反応させたところ、薄層クロマトグラフィー (TLC) により原料の消失は見られたものの、目的とする *N*-アシルガラクトサミン **2** は得られなかった (Scheme 2). 次に酸無水物として TFAA を用いて 2 種類のリン試薬 (PPh₃, ジメチルフェニルホスフィン (PMe₂Ph)) と先の条件下に反応させたがいずれの場合においても目的物を得ることができなかった. 本反応では原料の消失が見られたことからリン試薬の種類によらずアジド基の還元は進行しているものの、その後のアシル化反応が進行していなかったのではないかと推測している. その理由として、本反応条件は含水条件であり、報告にある活性エステルよりも反応性の高い酸無水物が加水分解され、液性が酸性に傾きアミノ基の求核性が失われてしまったこと、また、アシル化に必要な、試薬としての十分量が残っていなかったことが考えられ、酸無水物の本反応への利用は困難であることが明らかとなった.

2-2 活性エステルおよび活性化剤の影響

前項で酸無水物の高い反応性が本反応に対して負に働き、十分な機能を発揮することが難しいことから、水に対して比較的安定だと考えられている活性エステルをアシル化剤として固定し、その反応性を検討することとした.

以前の報告に従い、活性エステルとして Pfp エステルを持つ、1.2 当量のベンゾイルエステル (BzOPfp) を用いて、GalN₃ 誘導体 **1** を 1.7 当量の PPh₃ および 1.2 当量の HOObt の存在下に 98% THF 水溶液中で 2 日間反応させたところ、目的とする *N*-アシルガラクトサミン誘導体 **2** が 82% の収率で得られることが分かった (Scheme 3, Table 1, Entry 1). 本反応を TLC により追跡すると、原料 **1** は数時間で消失し、より高極性の化合物となった後にアシル化され、目的化合物 **2** へと収束したことが確認された. この高極性の化合物は Shalev ら (1996) による Staudinger 反応の反応機構からアザイリド中間体 **3** またはアミノ糖中間体 **4** であると考えている (Scheme 4) が、単離精製が困難であったため構造は未決定である. 次に活性エステルとしてコハク酸イミドエステル (BzOSu) を用いて、先と同様の条件下、5 日間反応させると目的物が 14% と低収率で得られるこ

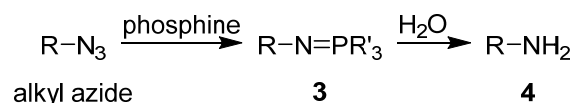


Scheme 3 アミド結合形成反応における活性エステルおよび活性化剤の検討

Table 1 アミド結合形成反応における活性エステルおよび活性化剤の検討

Entry	activated ester	activator	time (h)	yield (%)
1	BzOPfp	HOObt	48	82
2	BzOSu	HOObt	120	14
3	BzOPfp	HOSu	48	8
4	BzOPfp	-	48	4

とが分かった (Table 1, Entry 2). また、BzOPfp を活性エステルと、添加物として用いている HOObt をヒドロキシコハク酸イミド (HOSu) に変更した場合、さらに添加物を用いない場合ではいずれの場合でも低収率 (8%, 4%) となることが明らかとなった (Table 1, Entry 3, 4). この結果を各脱離基の共役酸の酸解離定数 (pK_a) から考察すると、ペンタフルオロフェノール (PfpOH) は約 5.50, HOSu は約 7.81 であることから Pfp エステルはコハク酸エステルよりも反応性が高く、効率良くアシル化反応が進行したと考えられる. しかしながら、添加剤である HOObt の pK_a は約 7.78 であり、単純な脱離能の違いだけで制御されているわけではないことが推測される.

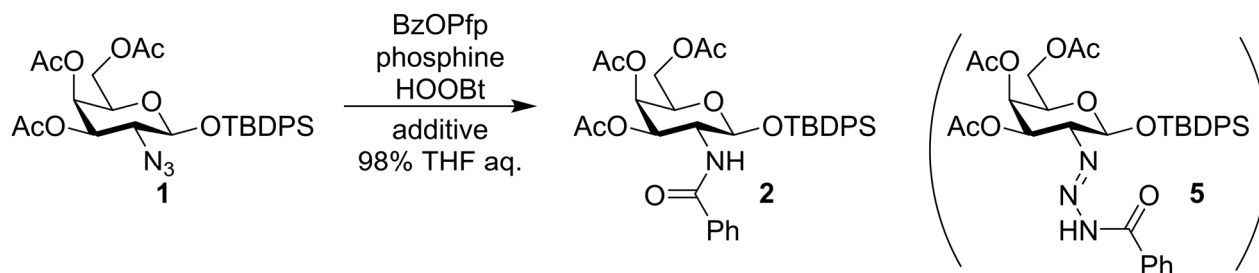


Scheme 4 Staudinger 反応

2-3 リン試薬と添加剤による影響

次に、リン試薬の効果を検証すべく、PPh₃の代わりにジメチルフェニルホスフィン (PMe₂Ph) を用いて反応を行った。すなわち、1.2 当量の PMe₂Ph を用いて先と同様の条件下 (1.2 当量の BzOPfp, HOObt, 98% THF 水溶液中) に室温で 48 時間反応させると 90%の高収率で目的物 **2** を与えることが分かった (Scheme 5, Table 2, Entry 1)。そこで、先の結果でその効果が明らかとなっていない HOObt および他の添加剤について検討することとした。98% THF 水溶液中、BzOPfp, PMe₂Ph の存在下に 0.5 当量へ減量した HOObt を用いて反応を行ったところ、量を減じることで若干ながら収率の低下が認められたものの 81% の良好な収率で目的物を得ることができた (Table 2, Entry 3)。このことから HOObt は発生したアミノ基に対するアシル化において、活性化剤として触媒的に働いていることが考えられた。そこで、アミノ基の反応性を向上させるために反応液の pH を上昇させることを目的として添加剤として

トリエチルアミン (TEA) を加えて反応を行った。先と同様に 0.5 当量の HOObt を用いて、0.6 当量の TEA を加えて反応を行ったところ、反応時間が 24 時間へと短縮されるとともに予想通り 86% の高収率で目的物が得られることが分かった (Table 2, Entry 4)。さらに PPh₃ を用いて、0.1 当量へとさらに減量した HOObt および TEA (1.2, 0.5, 0.1 当量) を添加し反応を行ったが、いずれの場合も低収率 (17%, 21%, 13%) となることが明らかとなった (Table 2, Entry 5~7)。TLC 上では全ての場合で原料の消失が確認されていることから、還元された後のアシル化反応において、高くなりすぎた pH によるアシル化剤の分解または HOObt の減量による反応速度の低下が原因となり低収率となったと考えられる。また、本反応時では副生成物として MS により推定されるアジド基の末端がそのままアシル化された化合物 **5** が得られることが分かった。現在のところ、その生成理由は明らかとなっていないが HOObt の減量と pH の上昇によりアザイリド中間体への変換速度、



Scheme 5 BzOPfp, HOObt を用いるアミド結合形成反応における条件検討

Table 2 BzOPfp, HOObt を用いるアミド結合形成反応における条件検討

Entry	phosphine (eq.)	HOObt (eq.)	additive (eq.)	temp.	time (h)	yield (%)
1	PMe ₂ Ph(1.2)	1.2	–	rt	48	90
2	PPh ₃ (1.7)	1.2	–	rt	48	82
3	PMe ₂ Ph(1.1)	0.5	–	rt	48	81
4	PMe ₂ Ph(1.1)	0.5	TEA (0.6)	rt	24	86
5	PPh ₃ (2.0)	0.1	TEA (1.2)	rt	24	17
6	PPh ₃ (2.0)	0.1	TEA (0.5)	rt	24	21
7	PPh ₃ (2.0)	0.1	TEA (0.1)	rt	24	13
8	PMe ₂ Ph(1.2)	0.5	–	70 °C	10	77
9	PMe ₂ Ph(1.2)	0.1	–	70 °C	24	80
10	PPh ₃ (2.0)	0.1	–	70 °C	24	80

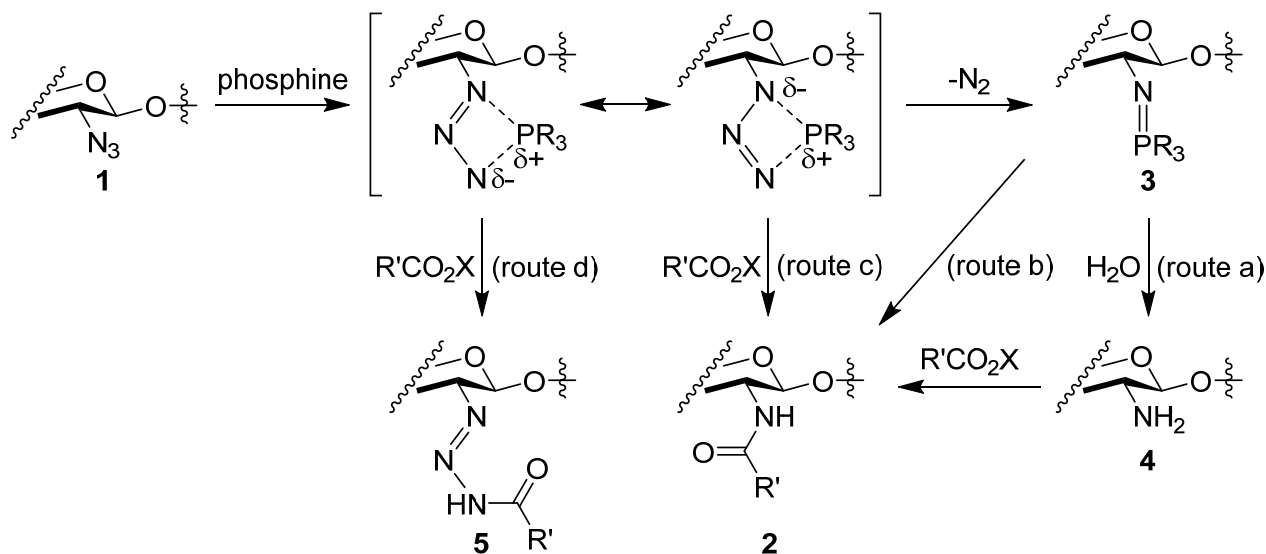


Figure 1 アミド結合形成反応の反応機構

あるいはアザイリド中間体の加水分解速度の低下が一つの要因ではないかと考えている。

2-4 温度条件による最適化

以上の結果から、本反応の律速段階はアシル化反応であると推測されることから反応温度を上昇させることにより、その反応性が変化することが予想された。そこで、先と同様に PMe_2Ph の存在下に 0.5 当量の HOObt を用いて 70°C で反応させるとさらに反応時間が短縮され、10 時間で反応が完結し、77%の収率で目的物を得ることができた (Table 2, Entry 8)。さらに 0.1 当量の HOObt を用いた場合でもリン試薬にかかわらず 24 時間で反応が完結し、82%の良好な収率で目的物が生成することが分かった (Table 2, Entry 9, 10)。

3. 反応機構の考察

これまでの結果から、本反応の反応機構は次のように推測している (Figure 1)。すなわち、一般的な Staudinger 反応に従って、リン試薬によりアジド基が還元されアザイリド **3** が生成する。このアザイリドが溶媒に含まれる水により加水分解され、アミノ体 **4** へと変換された後にアシル化が進行し、アミド結合が形成されると考えている (route a)。しかしながら、中原、北條ら (2011) の報告では、還元末端にアジド基を有する化合物において、アジド基がそのままアシル化された化合物が得られており、また、今回使用した基質においても、アミンを添加物として用いた際に副生

成物 **5** が得られたことから、アジドへのリン付加物およびアザイリドから直接カルボニル炭素へ攻撃し、その後、加水分解によりアミド結合が生成するルートも考えられる (route b, c, d)。一方で、この中間体からの直接的なアシル化反応においてはリン試薬の種類により収率等が異なることも明らかとなっている (岡島, 2021)。今回の基質において、特に加熱条件での反応ではリン試薬によらず、収率、反応時間がほぼ同等であったことから、加水分解によりアミノ基が生成した後にアシル化される route a が優位に進行したものと推測している。

4. おわりに

今回、我々は単糖の 2 位にアジド基を導入したアルキルアジド **1** において、Staudinger Ligation 法を利用した、one-pot にアミド結合を形成する新規手法を開発することに成功した。本反応は簡便かつ高収率でアミド結合を構築することが可能であり、加えて、水中での利用が見込まれる点から大きな可能性を有していると考えられる。しかしながら、基質や試薬の特異性および活性化剤の限定など、未だ改良点が残されており、更なる検討が必要であると考えている。今後、より一般的かつ汎用性、応用性を備えた反応とすることにより、アミド結合を有する一連の化合物群の合成に大きく寄与するものと期待している。

文献

- Hagiwara, M., Dohi, M., Nakahara, Y., Komatsu, K., Asahina, Y., Ueki, A., Hojo, H., Nakahara, Y., and Ito, Y. (2011). Synthesis of biantennary complex-type nonasaccharyl Asn building blocks for solid-phase glycopeptide synthesis. *The Journal of Organic Chemistry*, **76**, 5229–5239.
- Staudinger, H. and Meyer, J. (1919). Über neue organische Phosphorverbindungen III. Phosphinmethylenderivate und Phosphinimine. *Helvetica Chimica Acta*, **2**, 635–646.
- Gololobov, Y. G. and Kasukhin, L. F. (1992). Recent advances in the Staudinger reaction. *Tetrahedron*, **48**, 1353–1406.
- Barluenga, J. and Palacios, F. (1991). Synthesis of reactivity of λ^5 -phosphazenes. Uses as synthetic intermediates. *Organic Preparations and Procedures International*, **23**, 1–65.
- Zbiral, E. and Bauer, E. (1972). Reactions with organophosphorus compounds. 30. Reaction of N-substituted iminotriphenylphosphoranes with acyl halides. *Phosphorus and the Related Group V Elements*, **2**, 35–39.
- Bachi, M. D. and Vaya, J. (1979). Phosphinimines as useful intermediates in the synthesis of 3-(acylamino)- β -lactams. *The Journal of Organic Chemistry*, **44**, 4393–4396.
- Bachi, M. D. and Klein, J. (1983). New polycyclic β -lactams. Synthesis of 2a,3-dihydroazeto[1,2a]quinoline-1,4(2H)-diones, structural analogues of the carbacephalosporin antibiotics. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, 1925–1928.
- Bosch, I., González, A., Urpi, F., and Vilarrasa, J. (1996). On the reaction of acyl chlorides and carboxylic anhydrides with phosphazenes. *The Journal of Organic Chemistry*, **61**, 5638–5643.
- Shalev, D. E., Chiacchiera, S. M., Radkowski, A. E., and Kosower, E. M. (1996). Sequence of reactant combination alters the course of the Staudinger reaction of azides with acyl derivatives. Bimanes. 30. *The Journal of Organic Chemistry*, **61**, 1689–1701.
- García-López, J. J., Santoyo-González, F., and Vargas-Berenguel, A. (1997). Efficient one-pot syntheses of chloroacetyl and S-acetylmercaptoacetyl N-glycosides from glycosyl azides. *Synlett*, 265–266.
- Saxon, E., Armstrong, J. I., and Bertozzi, C. R., (2000). A Traceless Staudinger Ligation for the Chemoselective Synthesis of Amide Bonds. *Organic Letters*, **2**, 2141–2143.
- Nilsson, B. L., Kiessling, L. L., and Raines, R. T., (2000). Staudinger Ligation: A Peptide from a Thioester and Azide. *Organic Letters*, **2**, 1939–1941.
- Inazu, T. and Kobayashi, K. (1993). A new simple method for the synthesis of N^α -Fmoc- N^β -glycosylated-L-asparagine derivatives. *Synlett*, 869–870.
- Mizuno, M., Muramoto, I., Kobayashi, K., Yaginuma, H., and Inazu, T. (1999). A simple method for the synthesis of N^β -glycosylated-asparagine and -glutamine derivatives. *Synthesis*, 162–165.
- Maunier, V., Boullanger, P., and Lafont, D. (1997). A one-pot synthesis of glycosyl amides from glycosyl azides using a modified Staudinger reaction. *Journal of Carbohydrate Chemistry*, **16**, 231–235.
- Boullanger, P., Maunier, V., and Lafont, D. (2000). Syntheses of amphiphilic glycosylamides from glycosyl azides without transient reduction to glycosylamines. *Carbohydrate Research*, **324**, 97–106.
- Doores, K. L., Miura, Y., Dwek, R. A., Rudd, P. M., Elliot, T., and Davis, B. G. (2006). Direct deprotected glycosyl-asparagine ligation. *Chemical Communications*, 1401–1403.
- Nakahara, Y., Iijima, H., Sibayama, S., and Ogawa, T. (1990). Synthetic studies on cell surface glycans. Part 76. A highly stereoselective synthesis of di- and trimeric sialoxyl-Tn epitope: a partial structure of glycophorin A. *Tetrahedron Letters*, **31**, 6897–6900.
- Nakahara, Y., Iijima, H., Shibayama, S., and Ogawa, T. (1991). Synthetic studies on cell-surface glycans. Part 80. Stereoselective total synthesis of glycopeptides bearing the dimeric and trimeric sialosyl-Tn epitope. *Carbohydrate Research*, **216**, 211–225.
- 岡島未槻 (2021). アジド基を有するグルコース誘導体を用いた Staudinger ligation 法の検討. 青森大学学位論文.

Development of novel amide bond formation reaction with Staudinger ligation

Akiharu Ueki, Kana Amino, Haruka Kushibiki, Yuka Akimoto,
Tatsuya Suzuki, Katsuhiko Suzuki

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Aomori University

要 旨

核酸やタンパク質，糖鎖に代表される生体高分子は，非常に重要な化合物群であり，生理機能の発現に深く関わっている．しかしながら，それらは天然からは微量しか得られず，また高純度で単離することが非常に困難であることから，単一かつ大量に供給可能な有機化学的手法による合成研究が古くから行われてきた．生体高分子を構築する重要な結合のひとつであるアミド結合は，特に鍵となる構造であり，近年，我々は糖鎖還元末端にアスパラギンを導入することが可能な **Staudinger Ligation** 反応を利用した高効率なアミド結合形成反応を報告している．しかしながら本手法の詳細は未だ明らかになっていない部分も多く，更なる応用および汎用性の獲得を目指して研究を行っている．今回，糖鎖還元末端とは反応性の異なる 2 位にアジド基を有するガラクトース誘導体を用いて，種々の反応条件下における **Staudinger Ligation** 法を検討し，一般的なアルキルアジドを原料とするアミド結合形成反応の開発を行った．その結果，従来であればアジド基を還元した後に単離し，続くアシル化反応を行うことで形成されるアミド結合が，特定のアシル化剤を用いて含水溶媒中に反応させることにより一挙に合成できることが分かった．さらに，反応条件を精査することにより本反応の要因が明らかとなり，新規な簡便且つ高効率なアミド結合形成反応となる可能性が見いだされた．

キーワード : アミド結合形成反応, 糖アミド合成, 糖アジド, one-pot 合成, Staudinger ligation 反応