

学位論文

固相に担持されたニトロピリジンスルフェニル型  
チオール選択的標識試薬の創製とペプチド合成への応用

2017年1月

福元 謙太郎

## 目 次

略号		3
序論		6
本論		
第一章	固相担持型 SH 基選択的ビオチン標識試薬の開発	
序節		12
第一節	既存のビオチン標識試薬	14
第二節	既存のビオチン標識試薬における課題と固相法を利用 する意義	20
第三節	固相担持型ビオチン標識試薬のデザイン	23
第四節	固相担持型 SH 基選択的ビオチン標識試薬 KSH-1 の合成	25
第五節	KSH-1 を用いた SH 基を有する低分子化合物に対するビ オチン標識反応	31
第六節	小括	34
第二章	固相担持型 SH 基選択的オリゴアルギニン導入試薬の開発	
序節		35
第一節	固相担持型 SH 基選択的オリゴアルギニン導入試薬の設計	37
第二節	固相担持型 SH 基選択的オリゴアルギニン導入試薬 KSH-2 の合成	39
第三節	SH 基を有する化合物へのオリゴアルギニン導入反応	46
第四節	小括	49
第三章	固相担持された Npys-Cl を活用した環状ジスル フィドペプチドの合成	
序節		51
第一節	固相担持された Npys-Cl の合成とペプチドの導入	58
第二節	固相ジスルフィドライゲーションによる非対称ジスルフィド ペプチドの合成	62
第三節	オキシトシンの合成	64
第四節	小括	68
実験の部		70

総括	91
謝辞	93
引用文献	96

## 略号

本論文中に記載した略号を以下に示す。

Ac : acetyl

ACE : angiotensin converting enzyme

Acm : acetamidomethyl

Acp : 6-aminocaproic acid

Ala : Alanine

aq. : aqueous

Arg : Arginine

Asn : Asparagine

Bn : benzyl

Boc : *tert*-butoxycarbonyl

Bpoc : biphenylisopropoxycarbonyl

Bu : butyl

Cbz : carbobenzyloxy

Cys : Cysteine

DBU : 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene

DCC : *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimide

1,2-DCE : 1,2-dichloroethane

DEAD : diethyl azodicarboxylate

DIPCI : diisopropylcarbodiimide

DIPEA : diisopropylethylamine

DMAP : *N,N*-dimethyl-4-aminopyridine

DMF : *N,N*-dimethylformamide

DMSO : dimethylsulfoxide

DMT-MM : 4-(4,6-Dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholinium chloride

DTT : dithiothreitol

EDC·HCl : 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride

EDT : 1,2-ethanedithiol

Fmoc : 9-fluorenylmethyloxycarbonyl

FT-IR : Fourier Transform Infrared Spectroscopy

Gln : Glutamine

Gly : Glycine

HATU : *O*-(7-aza-1*H*-benzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluroniumhexafluoro phosphate

HOBt : 1-hydroxybenzotriazole

HOObt : 3,4-dihydro-3-hydroxy-4-oxo-1,2,3-benzotriazine

HPLC : High-Performance Liquid Chromatography

HRMS : High-Resolution Mass Spectrometry

Ile : Isoleucine

<sup>i</sup>Pr : isopropyl

Leu : Leucine

Lys : Lysine

Me : methyl

mp : melting point

MS : Mass Spectrometry

MW : Molecular Weight

N.D. : not detected

NHS : *N*-hydroxysuccinimidyl

NMR : Nuclear Magnetic Resonance

N.R. : no reaction

OSu : hydroxysuccinimidyl

PAD : prop-apoptotic domein

Pbf : *N*- $\omega$ -2,2,4,6,7-pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl

PEG : polyethylene glycol

Ph : phenyl

PMB : *p*-methoxybenzyl

PP : polypropylene

Pro : Proline

PS : polystyrene

Pys : pyridinesulfenyl

quant. : quantitative yield

rt : room temperature

Rt : retention time

SAMs : Self-Assembled Monolayers

SH : sulfhydryl

Tat : Trans activator of transcription

<sup>t</sup>Bu : tertiary butyl

TCEP·HCl : Tris (2-carboxyethyl) phosphine hydrochloride

TFA : trifluoroacetic acid

TLC : Thin-Layer Chromatography

TNB : thionitrobenzoic acid

Trt : trityl

Ts : tosyl

Tyr : Tyrosine

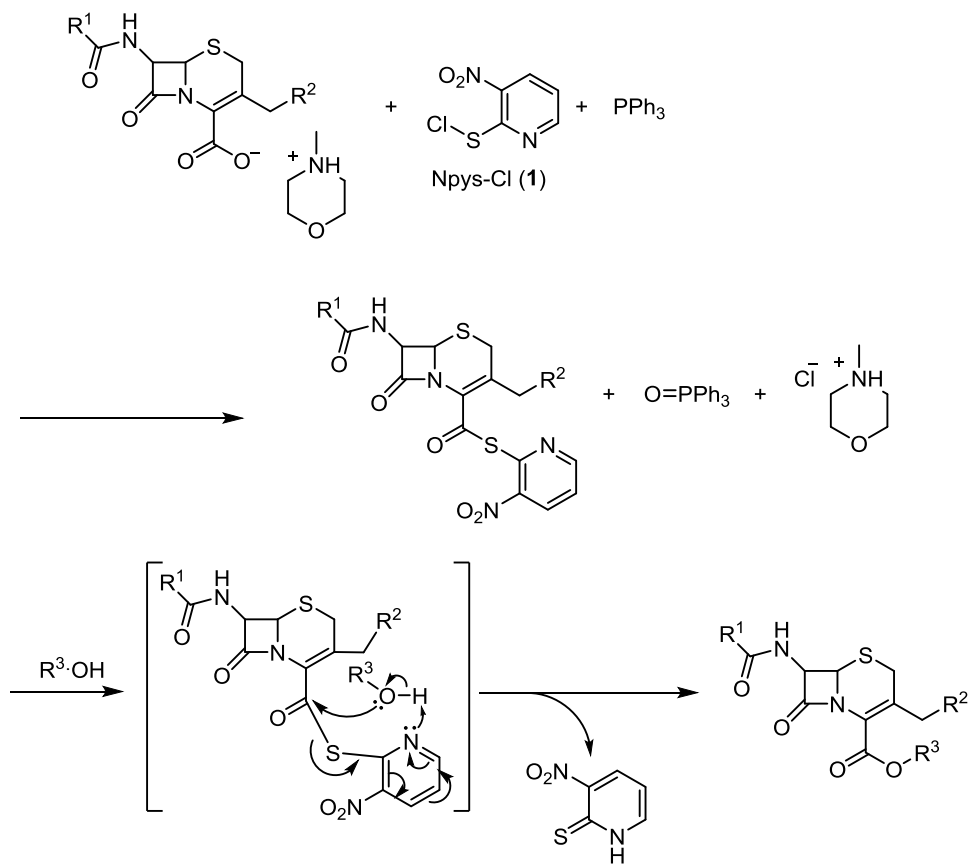
UV : ultraviolet

## 序 論

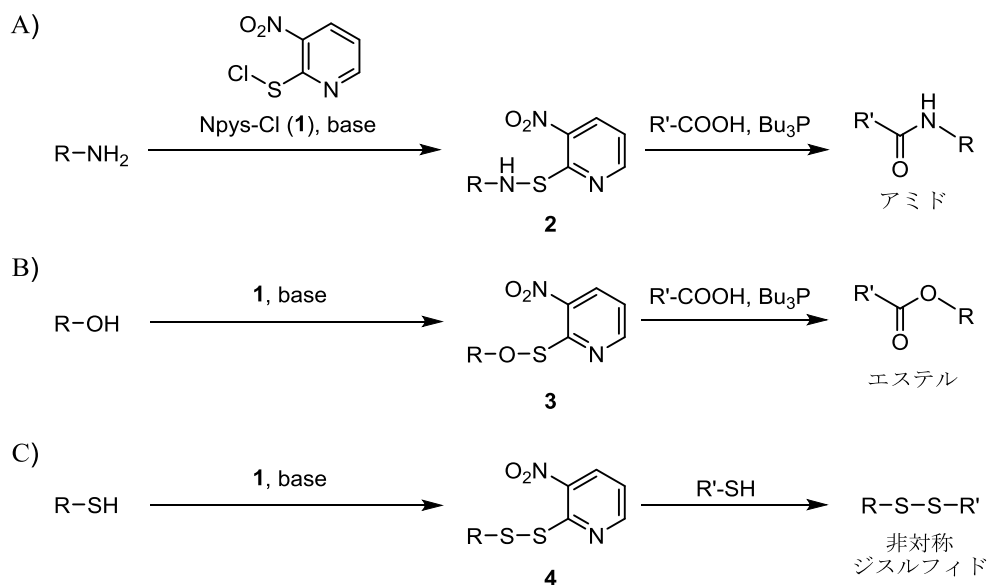
薬学やケミカルバイオロジーなどの研究分野では、生物活性を有する物質の機能を分子レベルで解析することが肝要となる。この機能解析における有機合成化学の役割として、複雑な化学構造を有する生物活性物質の合成による供給・化学構造の証明や誘導体の合成が挙げられる。最近、さらに生物活性物質に存在する特異な官能基を適切に利用し、選択的化学修飾を行うことで、生物活性物質を化学プローブ化する「タグ付けの合成化学」も重要度を増している。化学プローブ化により生物活性物質の細胞内での挙動や標的分子の同定に基づく機能解明を容易にすることができる。このような特異的な被修飾官能基の一つに、蛋白質やペプチドにおいてはシステイン(Cys)残基の側鎖スルファニル(SH)基が挙げられる。当該官能基は、一般に2分子が酸化により縮合したジスルフィドとして存在することが多く、蛋白質やペプチドの活性発現に重要な「高次構造の維持」に寄与することが多い。しかし一方で、SH基として単独に存在し、酵素の触媒中心など「生物活性物質の機能発現」に重要な役割を担う場合もある。

本博士論文は、このSH基の修飾を主テーマとするものである。すなわち、ケミカルバイオロジーに焦点を当てたSH基の化学修飾試薬の創製と、ペプチド化学に焦点を当てたSH基からジスルフィド構造への効率的な変換法の開発である。どちらも非対称ジスルフィドの構築が基盤となる。そして、この修飾を行う共通基盤として、筆者は、SH基の保護基の一つである3-ニトロピリジンスルフェニル(Npys)基に着目し研究を展開した。

Npys基は1978年、MatsuedaとAibaによって見いだされた官能基であり、Npys-Cl (**1**)を緒としている。この化合物は、初めて見いだされた安定なピリジンスルフェニルハライドである<sup>1)</sup>。その後、同グループの研究により、Mukaiyama型酸化還元縮合<sup>2)</sup>における酸化剤成分としてトリフェニルホスフィンと共に用い、セファロスポリン誘導体の縮合に利用された(Scheme 1)<sup>3)</sup>。また、Matsueda、KaiserらはNpys-Cl (**1**)が塩基性条件下でアミン、アルコール、スルファン(本論文中ではチオールと表記する)と反応し、保護基としても利用可能であることを明らかにした。更に、Npys基で保護されたアミン**2**、アルコール**3**は、カルボン酸と共にトリアルキルホスフィンを加えると、酸化還元系による縮合反応が進行し、それぞれ対応するアミドやエステルを生成することも明らかとなった(Scheme 2)<sup>4)</sup>。



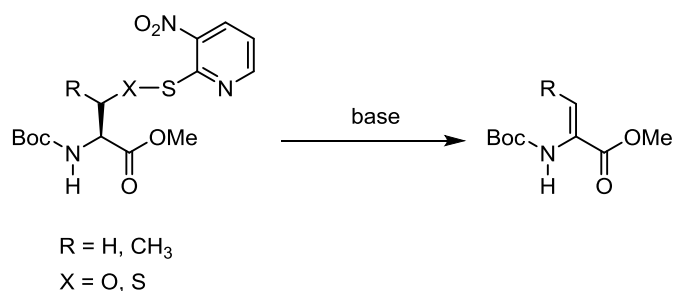
**Scheme 1.** Npys-Cl (1) とトリフェニルホスフィンを用いた酸化還元による縮合反応



**Scheme 2.** Npys-Cl (1) による官能基の保護とその保護体を利用した反応：A) アミン保護体 **2** を用いるアミド化、B) アルコール保護体 **3** を用いるエステル化、C) チオール保護体 **4** を用いる非対称ジスルフィド化反応

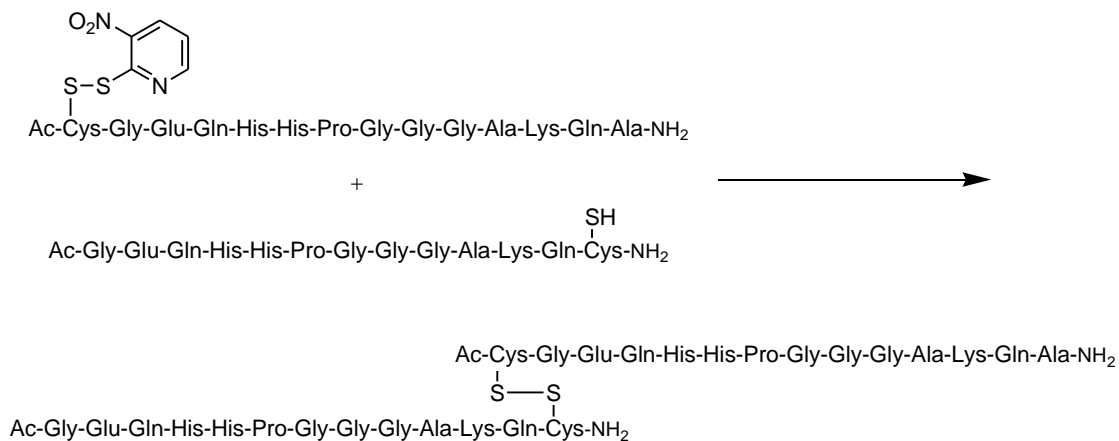


Ikeda、Yokota らはこれらの反応を固相ペプチド合成へ応用した<sup>5)</sup>。また最近では、Olsen、Tsakos らが、側鎖 Npys により保護したセリン、スレオニンおよびシステインを用いると、DBU 等の塩基存在下にデヒドロアラニンを構築できることを報告した (Scheme 3)<sup>6)</sup>。



**Scheme 3.** Npys 保護されたセリン誘導体を用いたデヒドロアラニンの合成

また、Npys 基で保護された SH 基は、Npys 基との間で活性なジスルフィド構造を構築することから、別の SH 基の存在下に非対称ジスルフィドを生成することが知られている (Scheme 4)<sup>7)</sup>。



**Scheme 4.** Npys 保護されたチオールと、無保護のチオールによる非対称ジスルフィド合成

さらに、Npys 基は、ペプチド合成に多用されるトリフルオロ酢酸の様な脱保護試薬には抵抗性を有し、一方で、還元剤や希塩酸を用いた穏和な条件下で脱保護されることから、直交型の保護が可能となる興味深い特徴を兼ね備えている (Table 1)<sup>8), 9)</sup>。

**Table 1.** 代表的な酸感受性保護基と Npys 基の酸性条件下における安定性の比較 <sup>a)</sup>

Conditions	Boc	Bpoc	Pys	Npys
0.04 M HCl in dioxane	–	±	±	±
0.1 M HCl in dioxane	–	±	+	±
0.2 M HCl in dioxane	–	+	+	+
1 M HCl in dioxane	±	+	+	+
4 M HCl in dioxane	+	+	+	+
50% TFA in CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	+	+	+	–
TFA	+	+	+	–
88% HCOOH aq.	±	+	±	+
Ph <sub>3</sub> P + ROH	–	–	+	+
2-Pyridinethiol-1-oxide	–	–	+	+

a) Leu and Ile derivatives of each protecting group listed as well as Z-Ser(Npys)-OH in the case of the Npys group was tested.

+ : Cleavable within 5 min.

± : Partially cleavable in 2 h

– : Not cleaved in 24 h.

さらに、Matsueda、Higashida らは「保護された SH 基」を Npys-Cl (**1**) と反応させると、塩基非存在下に Npys 保護体 (**4**) が得られることを明らかにしている (Table 2) <sup>10)</sup>。

**Table 2.** Npys-Cl (**1**) による側鎖保護システインとの保護基交換による Npys 保護体 (**4**) の合成

Entry	Starting Materials	Npys-Cl (eq.)	Conditions	yield %
1	Boc-Cys(Bn)-OH	1.2	rt, 24 h in CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	N.R.
2	Z-Cys(Bn)-OH	2.0	rt, 5 h in CF <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> OH	61 <sup>a)</sup>
3	Boc-Cys(PMB)-OH	1.2	0 °C, 30 min. in CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	92
4	Boc-Cys(Bn(Me) <sub>2</sub> )-OH	1.2	0 °C, 30 min. in CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	90
5	Fmoc-Cys( <sup>t</sup> Bu)-OH	1.2	0 °C, 30 min. in CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	80 <sup>b)</sup>
6	Boc-Cys(Trt)-OH	1.2	–30 °C, 3 h in CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	91
7	Boc-Cys(Acm)-OH	1.2	0 °C, 30 min. in AcOH	63

a) Isolated as dicyclohexylamine salt, melting point 122–123 °C,  $[\alpha]_D^{22}$  –60.6° (c=1.0, MeOH)

b) Melting point 120–122 °C,  $[\alpha]_D^{22}$  –74.1° (c=1.0, MeOH)

この場合、無保護のチオールを経由しないことから、2種のチオールを用いる非対称ジスルフィドの構築において課題となるホモジスルフィド(二量体)の副生を抑制でき

る。

筆者は、この様な Npys 誘導体の興味深い特長に着目し、さらに固相化学の技術を適用することにより、簡便に非対称ジスルフィドを得る手法の開発をめざした。すなわち、Npys 構造を「固相担体上に担持する」戦略により、反応場を固相にすることで、より効率的且つ高純度に非対称ジスルフィドを得る統一的手法を確立できると考え、研究に着手した。そして、臨床薬学の基盤となる生命科学研究に有益な、新規標識試薬(ビオチン化およびオリゴアルギニン導入試薬)の創製に成功した。また、同様の戦略から、インシュリンなど医薬品としてよく臨床で利用される「環状ペプチド」の化学合成手段として、9 残基のアミノ酸からなる環状ペプチド「オキシトシン」の全合成を例に、「ジスルフィド先導型環状ペプチド合成法」という新概念の提案に至った。

第一章では、Npys 構造を持つ固相ビオチン標識試薬「KSH-1」の創製について述べる。本試薬を用いれば、ペプチド・蛋白質等の SH 基を有する分子を選択的かつ簡便にビオチン標識できる。生物活性分子のビオチン化によるタグ付けは、免疫化学・生化学・ケミカルバイオロジー等の研究分野で重要な手法である。そこで、簡便なビオチン化試薬として、固相担持型 Npys 基に活性ジスルフィド並びにリンカーを介してビオチンを付与した固相ビオチン化試薬 KSH-1 を設計・合成した。そして、SH 基含有分子として ACE 阻害剤カプトプリルをモデルに、KSH-1 の SH 基選択的標識試薬としての機能を評価した。その結果、反応液からの樹脂の濾去のみで所望のビオチン化体を良好な純度で得ることに成功した。本固相試薬の特徴は、試薬のみならず副生成物も固相上に担持されるため、精製することなく濾過のみの簡便な操作で所望の標識体を比較的良好な純度(87%)で得られる点にある。一例のみであるが、得られた結果から本固相標識試薬の高い汎用性が示唆された。

第二章では、SH 基を有する分子に細胞膜透過性ペプチド「オクタアルギニン(Arg<sub>8</sub>)」を付与する固相オリゴアルギニン化試薬「KSH-2」の創製を述べる。オリゴアルギニンは、膜透過ペプチド(CPP: cell-penetrating peptide)の一つとして知られ、マクロピノサイトーシスにより細胞内に取り込まれる性質がある。このような CPP をベクターとして使い、細胞内に蛋白質をはじめとする膜不透過性の分子を導入する方法が、近年生命科学研究で盛んに利用されている。したがって、細胞内で機能を発現させたい分子に Arg<sub>8</sub> を簡便に付与できる試薬の開発は有益と考えた。KSH-2 の分子設計は、KSH-1 と同様の考え方で実施し、第一章での合成中間体を出発物質として、両親媒性を有する樹脂に Arg<sub>8</sub> 誘導体を 3 工程で導入することで所望の化学構造を構築し、KSH-2 の合成に至った。そして、KSH-2 の固相オリゴアルギニン化試薬としての機能を、2 種の SH 基含有化合物(カプトプリルおよびシステイン含有 16 残基ペプチド)をモデルに評価した。その結果、いずれの場合も濾過のみの簡便な操作で、比較的高純度(90%および 96%)に所望の Arg<sub>8</sub> 標識体を得た。この結果から、KSH-2 は高い実用性

を有するオリゴアルギニン化試薬であることが示唆された。

第三章では、上記標識試薬と同様の戦略に基づいて、環状ペプチドの新規合成手法「ジスルフィド先導型環状ペプチド合成」という概念を提案した。一般に、環状ペプチドの化学合成では、ペプチド鎖を構築後にジスルフィド結合を形成することにより、環状化させることが定法となっている。提案したジスルフィド先導型環状ペプチド合成は、ペプチド鎖の構築途上にジスルフィド結合も逐次構築していくものである。これにより最終環化を「分子内」でのアミド結合形成により実施することが可能となる。筆者は、この概念を実現させる基盤として、固相 Npys-Cl の利用を考案した。すなわち、固相 Npys-Cl を用いて区分ペプチド間の固相ジスルフィドライゲーション (SPDSL : Solid Phase Disulfide Ligation) を実施し、非対称ジスルフィドペプチドの構築をめざした。ジスルフィド含有モデルペプチドとして、陣痛促進剤オキシトシンを例にその全合成を実施した。その結果、2分割したオキシトシン区分ペプチドの効率的な SPDSL に成功し、続くアミド形成反応等により所望のオキシトシンの合成に至り、ジスルフィド先導型環状ペプチド合成の最初の例を示すことに成功した。本結果は、ペプチド化学における新たな合成法の提供である。

以下に詳細を記載する。

## 第一章 固相担持型 SH 基選択的ビオチン標識試薬の開発

### 序節

免疫化学を始め、生化学やケミカルバイオロジー研究において、蛋白質を検出したり精製したりする目的で「化学標識」が良く用いられている。その中で、「ビオチン標識」は最も有名な標識の一つである。ビオチン(5)<sup>1)</sup>は、ビタミン B 複合体の一つで、ビタミン H とも呼ばれる。一方、糖蛋白質アビジン<sup>2)</sup>は、ビオチンに対して強力な親和性( $K_a = 10^{-15}$  M)を有する(Figure 1)<sup>3)</sup>。そこで、このビオチン-アビジンの強固な結合を利用して、ビオチンで標識された分子が標的とする未知分子の検出や同定、精製に古くから利用されてきた<sup>4)</sup>。

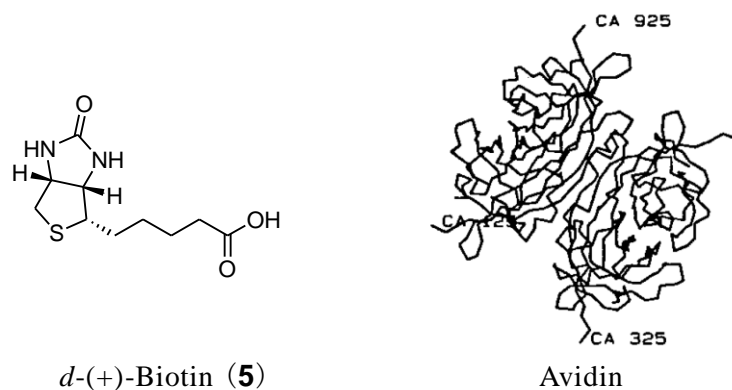
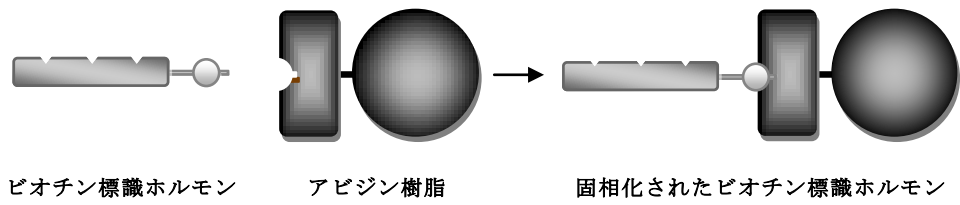


Figure 1. ビオチン 5 とアビジン

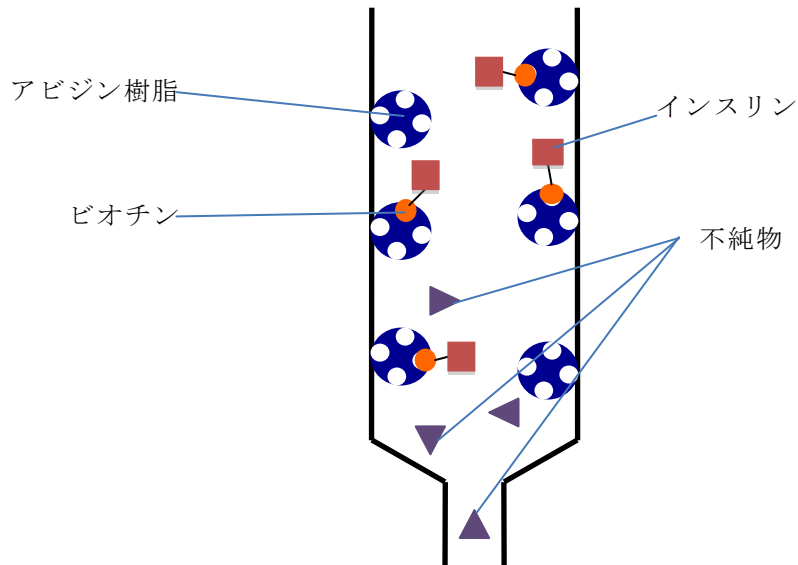
Hofmann、Kiso らによって 1976 年に提案されたインスリン受容体の精製を、一例として Figure 2 に模式した。Hofmann、Kiso らは、生理活性に影響しない部位にビオチンを導入したインスリン-ビオチン標識体をアビジン-セファロース 4B 樹脂と混合することで、効率よく生理活性を有するインスリンを樹脂に担持し、この樹脂に細胞の破碎液を添加することで、ペプチドホルモンと特異的に会合する受容体を精製しようとした訳である。

ビオチン-アビジンの強固な会合に基づくこのようなアフィニティークロマトグラフィーを有効に機能させるためには、被標識体の機能を損なわない「位置選択的なビオチン化」が重要となる。そのため特定の官能基に対して選択的に反応する多様な「ビオチン標識試薬」が開発され、今日容易に入手可能な市販品もある。ビオチンへの官能基選択性の付与については、ビオチンの持つ吉草酸型側鎖のカルボン酸の活性化、あるいは当該カルボン酸を利用した誘導体化により達成されている。

A)



B)



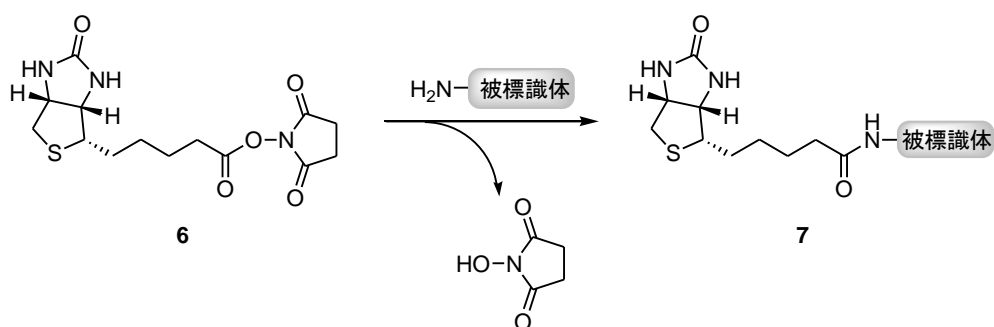
**Figure 2.** ビオチン標識体を架橋したアビジン樹脂によるアフィニティークロマトグラフ  
A) ビオチン標識されたインスリンのアビジン樹脂への固相化、B) インスリン受容体のアフィニティークロマトグラフによる精製

## 第一節 既存のビオチン標識試薬

既存の官能基選択的ビオチン化試薬を以下にまとめる。

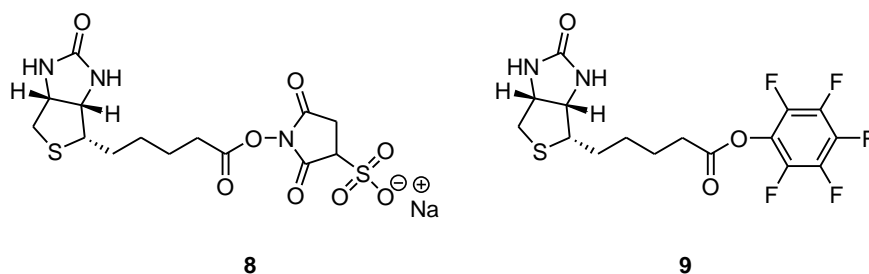
### 1) 被標識体がアミノ基を持つ場合

アミノ基の選択的ビオチン標識では、ビオチンが持つカルボン酸を活性エステルとして知られる *N*-ヒドロキシスクシンイミジル (NHS) エステルに変換したビオチン標識試薬 (**6**) が多用されている<sup>5)</sup>。本試薬 **6** は、pH が 7~9 程度の中性~弱塩基性条件下においてアミノ基と反応し、アミド結合を形成することでビオチン標識された標識体 (**7**) を生成する (Scheme 5)。



**Scheme 5.** ビオチン-*N*-ヒドロキシスクシンイミジルエステル **6** によるアミノ基選択的ビオチン標識

この他にアミノ基選択的に反応するビオチン標識試薬として、NHS エステルにスルホン酸塩が導入された試薬 **8**<sup>6)</sup> や活性エステルとしてペンタフルオロフェニル基を有する試薬 **9**<sup>7)</sup> も知られている (Figure 3)。試薬 **8** は水に対する優れた溶解性を有し、有機溶媒に不安定な被標識体のビオチン化に多用されている。また、試薬 **9** は 2 級アミンのビオチン化に用いられる。



**Figure 3.** 活性エステルをもつアミノ基選択的ビオチン標識試薬

一方、アビジン中のビオチン結合部位は、蛋白質の表面から約 9 Å 内側に入り込んだ場所に存在する<sup>8)</sup>。このため、アビジンとビオチンの結合効率の向上を目的に、アミノカプロン酸<sup>9)</sup>や PEG<sup>10)</sup>をリンカーとして有するビオチン標識試薬 (10, 11) も用いられている (Figure 4)。

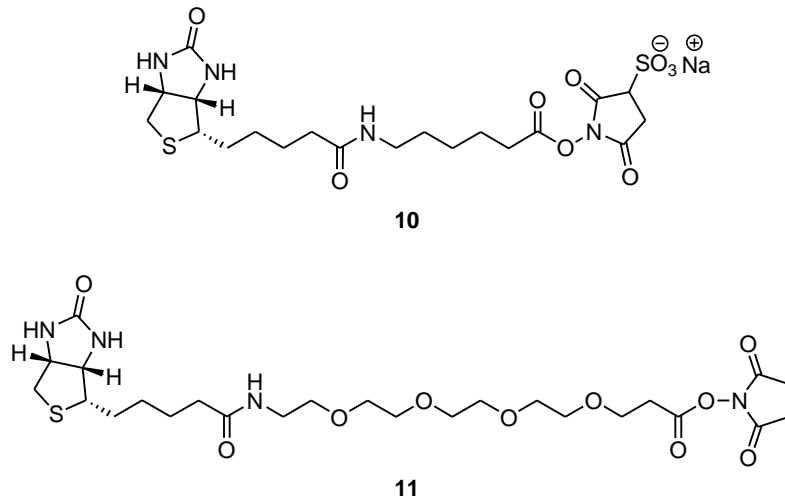
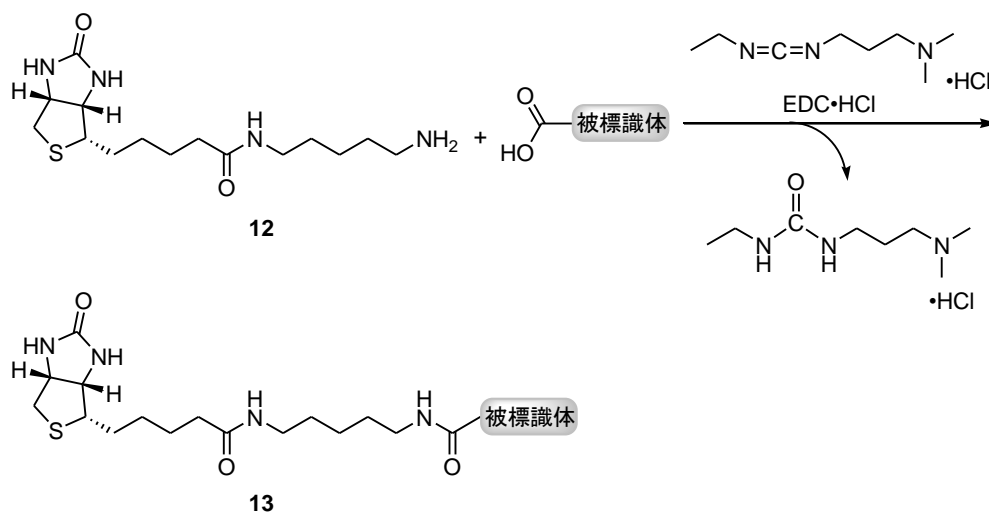


Figure 4. リンカー部を伸長したアミノ基選択的ビオチン標識試薬



## 2) 被標識体がカルボキシル基を持つ場合

カルボキシル基のビオチン標識では、ビオチンにアミノ基を有するリンカーを縮合させた試薬(12)が利用される。被標識体のカルボキシルに対し、EDC・HCl等の縮合剤を用いてアミノ基と反応させる。すなわち脱水縮合反応によりアミド結合を有する標識体(13)を調製することができる(Scheme 6)<sup>11)</sup>。



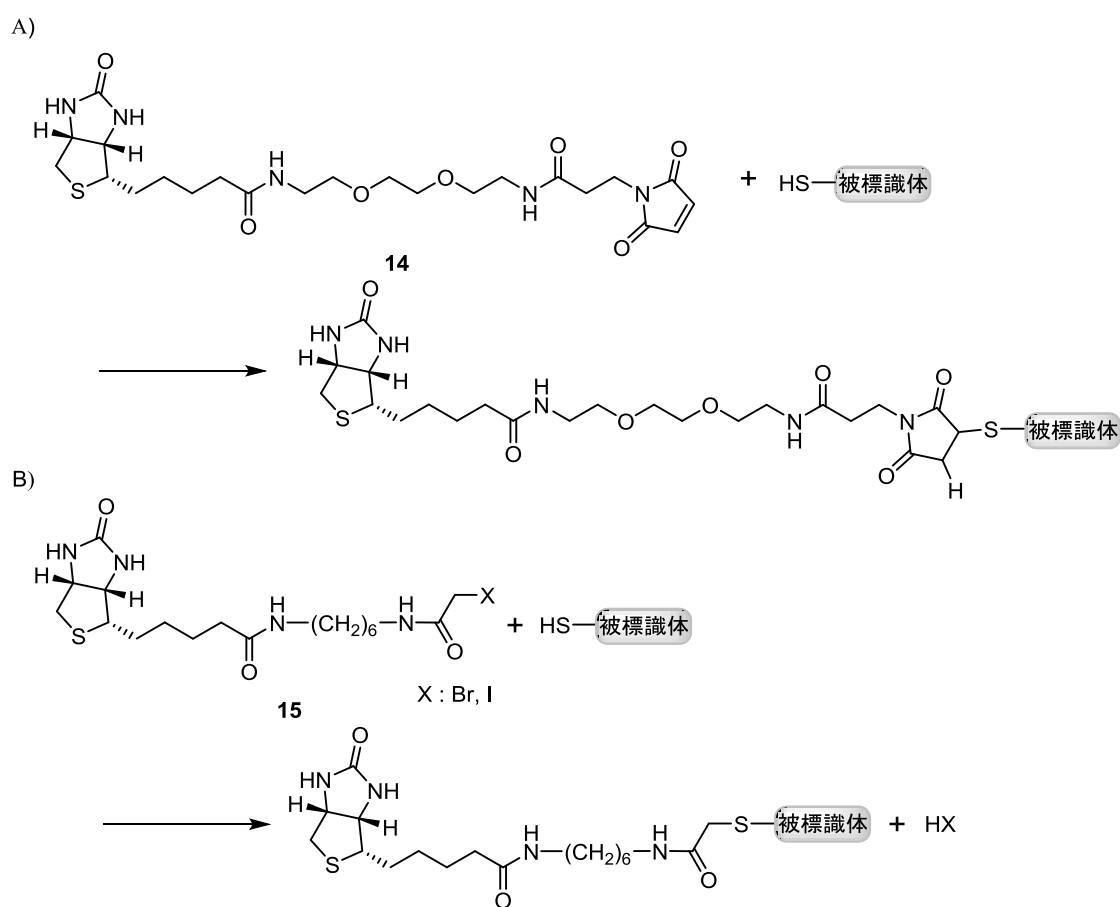
**Scheme 6.** カルボキシル基のビオチン標識

## 3) 被標識体が SH 基を持つ場合

チオールのビオチン標識は、以下に述べる SH 基高選択的な反応が知られていることからよく使われる方法である。また、アミノ基の標識により蛋白質等の被標識体が失活してしまう場合にも利用される。ビオチン標識試薬としては、形成する結合の様式により大きく2種類に分類できる。すなわち、S-C結合を形成するものとジスルフィド結合を形成するものである。

### 3) —1 S—C 結合の形成を基盤とするチオール選択的ビオチン標識試薬

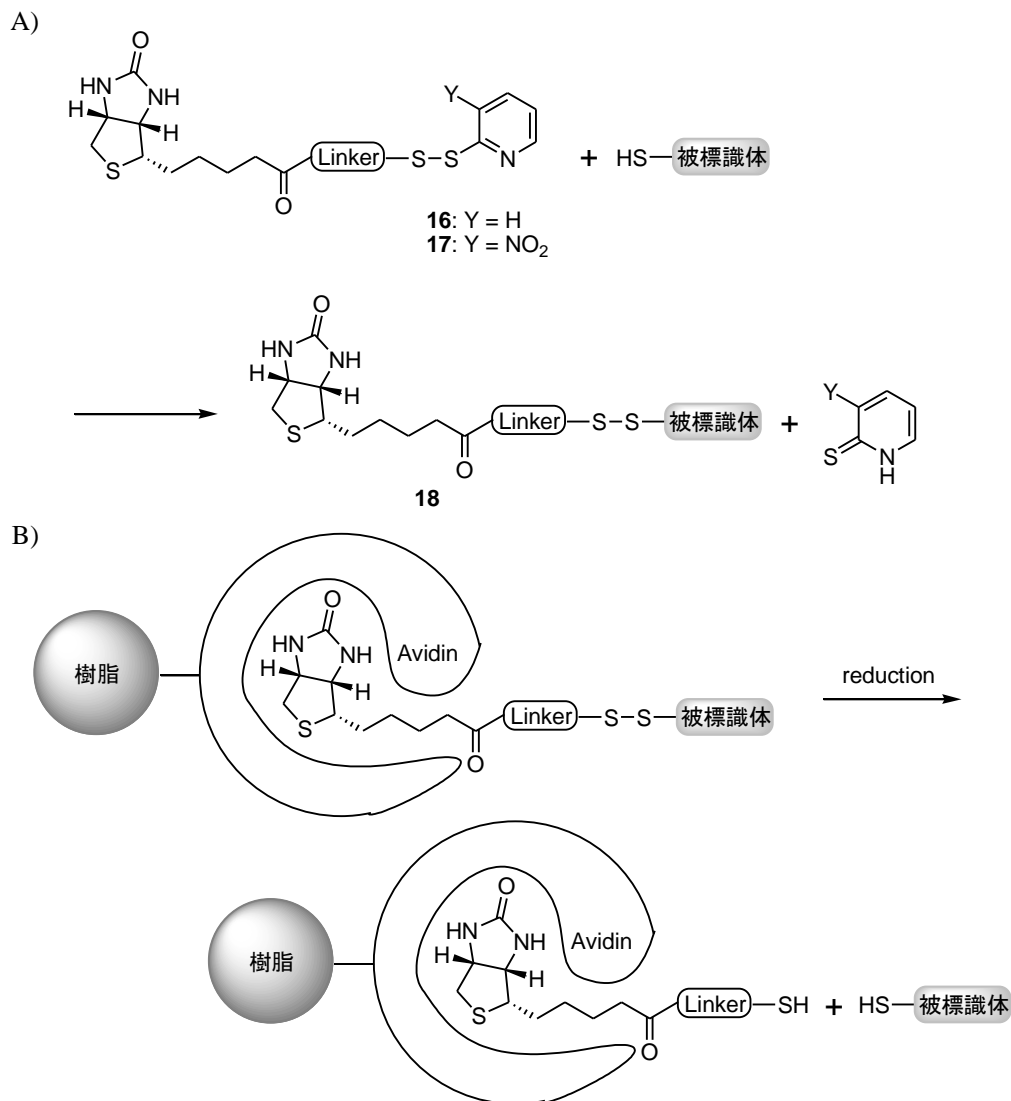
本分類に包含されるビオチン標識試薬には、マレイミド構造を有するものが多く知られている。マレイミドは、SH 基と効率的にマイケル型付加反応を起こす。代表的なビオチン標識試薬として、Scheme 7A に示す試薬 **14** が挙げられる<sup>12)</sup>。試薬 **14** は、中性条件下で反応させることが重要である。塩基性条件下では、マレイミドのカルボニル基が求核攻撃を受け易く、酸性条件下では反応の進行が制限されるためである。他に、ヨードあるいはブロモアセトアミド型の標識試薬 **15** も知られている (Scheme 7B)<sup>13)</sup>。



**Scheme 7.** C—S 結合の形成を利用したビオチン標識試薬 A) マレイミド型ビオチン標識試薬 **14**、および B) ブロモあるいはヨードアセトアミド型ビオチン標識試薬 **15** を用いた反応

### 3) —2 ジスルフィド結合の形成を基盤とする SH 基選択的ビオチン標識試薬

2—ピリジルジスルフィド **16**<sup>14)</sup>や 3—ニトロ—2—ピリジルジスルフィド **17**<sup>15)</sup> のように活性なジスルフィドを有するビオチン標識試薬を用いてジスルフィド交換により被標識体を標識する手法がある (**Scheme 8**)。

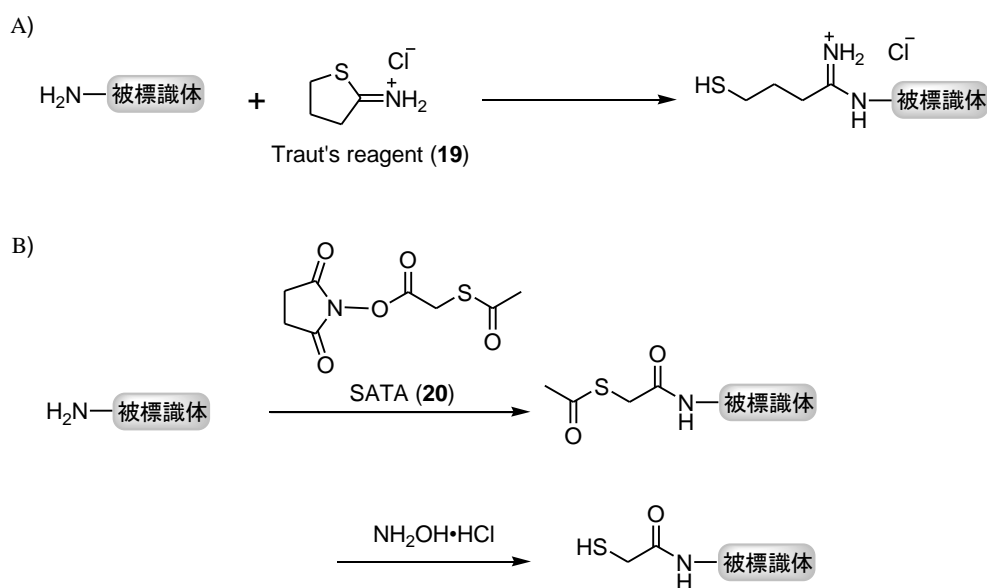


**Scheme 8.** A) ピリジルジスルフィド型ビオチン標識試薬 (**16**, **17**) を用いた標識反応、B) ジスルフィドの還元によるチオール再生。

この方法を用いた場合、ジスルフィド結合を介したビオチン標識体 **18** が得られる (**Scheme 8A**)。ジスルフィド結合は、還元剤により容易に元の SH 基に変換できることからビオチンを被標識体から除去することも可能である。よって、本手法はビオチン標識後の蛋白質などの単離や精製を目的としたアビジンアフィニティークロマトグラ

フィーに利用される (**Scheme 8B**)。すなわち、ビオチン標識後の蛋白質をアビジンが固定化されたカラムへ添加することで、ビオチンとアビジンとの親和性により、ビオチン標識蛋白質を樹脂上に担持させる。次いで樹脂を洗浄し、不要物を除去後にトリアルキルホスフィンや EDT、あるいは DTT 等の還元剤で樹脂を処理することでジスルフィド結合を切断させ、ビオチン部分を樹脂に残存させた形で蛋白質を樹脂から遊離させ、精製することができる。

また、被標識体に SH 基が存在しない場合でも、別途 SH 基を導入後、官能基選択的にビオチン標識を行うことができる。具体例として、被標識体中の遊離 1 級アミンに対して 2-アミノチオラン塩酸塩 (**19**, Traut's Reagent) を用いてチオール基を導入する方法<sup>16)</sup>、あるいは *N*-スクシンイミジル-*S*-アセチルチオアセテート (**20**, SATA) を付加後、ヒドロキシルアミン塩酸塩を作用させ<sup>17)</sup>、チオール基を導入する方法が挙げられる。チオール基を導入後は、上述の SH 基選択的なビオチン標識試薬にて、ビオチン標識が行われる (**Scheme 9**)。



**Scheme 9.** チオール選択的標識に向けたアミノ基へのチオール基の導入

## 第二節 既存のビオチン標識試薬における課題と固相法を利用する意義

上述のビオチン標識試薬を用いた反応は、一般に被標識体標識に対して過剰の試薬を用いるため、標識反応後には未反応の試薬や試薬の分解物が残存する。このため、大抵の場合は標識体の分子サイズに応じた精製手段が必要となる。被標識体が抗体の様な高分子量の蛋白質や高分子化合物の場合、分子サイズの違いを利用したゲル濾過や限外濾過により精製が可能である。一方、ペプチドのような中～低分子量の化合物では、一般に高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いて精製する。筆者らは、当該ビオチン標識において煩雑な精製を経ずとも、より高純度のビオチン標識体を獲得する手法として、近年ペプチド等の有機合成に多用されている固相合成法に着目した。固相合成法は、樹脂等の固相担体上に目的物を保持し反応を行うことで、目的物を樹脂上に担持したまま、未反応の試薬や副生成物などの不要物を反応後に濾過で除去できるという利点がある。このため、多段階の反応が必要となる長鎖ペプチドの化学合成では、固相法が多用されている。

また、試薬が固相上に担持された固相担持型試薬は、化学合成を効率的に行う目的で幅広く利用されている。特に、パラレル合成や多段階の有機合成反応において、回収や精製を簡便化する目的で、試薬、触媒、あるいはスカベンジャーとして利用されている (Figure 5)。

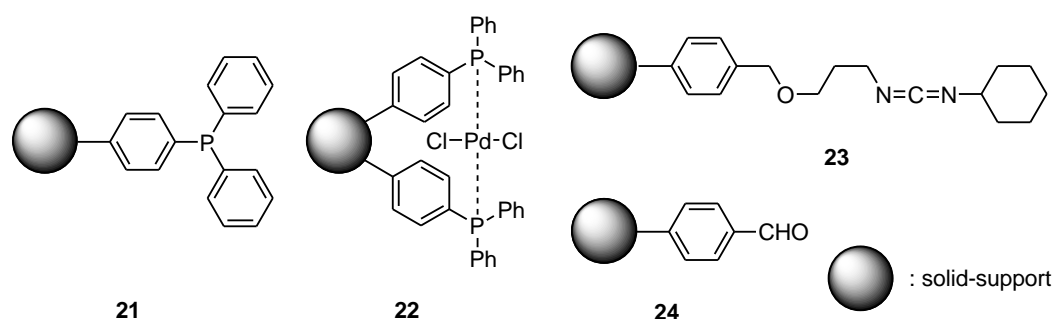


Figure 5. 種々の固相担持型試薬

具体的な固相担持型試薬の例として、トリフェニルホスフィンを固相に担持した試薬 **21**<sup>18)</sup>がある。この試薬は酸化還元反応や光延反応に用いられ、還元反応後に生成するトリフェニルホスフィンオキシドの溶解性に起因する煩雑な精製を回避できる。パラジウム触媒型の試薬 **22**<sup>19)</sup>では、反応終了後に系中に金属触媒が残留せず、目的物と試薬の分離が容易な点が利点となる。一方、カルボジイミドを固相に担持した試薬 **23**<sup>20)</sup>は、しばしば問題となるカルボジイミドの皮膚感作性を回避し、安全に取り扱える利点がある。また、ベンズアルデヒドを固相に担持させた試薬 **24**<sup>21)</sup>は、スカベンジ

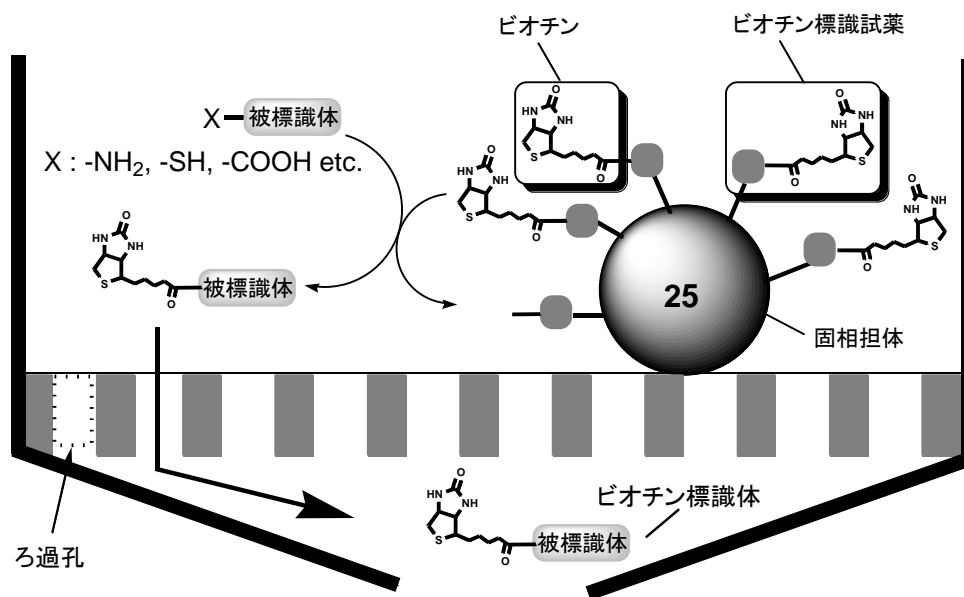
ヤーとして用いることで、反応に用いた過剰のアミン等の成分を吸着により除去可能で、簡便に高純度の目的物を得るために用いられる。加えて、イオン交換樹脂による塩交換も固相上での化学反応の利点を活かした例と言える。すなわち、化学合成において、高分子に担持された固相担持型試薬の利点をまとめると、

- 1) 濾過操作により生成物から試薬を容易に分離することができる。
- 2) 大過剰の試薬を使用しても回収が容易で、反応を促進できる。
- 3) 樹脂上に試薬を担持することで、高濃度の反応環境を作ることができる。

などが挙げられ、反応後の精製工程の簡略化、反応効率の向上、反応速度の調節などが可能となる。一方、合成技術の視点からは、次のような利点が挙げられる。

- 1) 反応の後処理工程を自動化できる。
- 2) ライブラリー合成において、試薬分注操作が容易となる。
- 3) 毒性、爆発性、揮発性、悪臭を有する試薬をより安全に用いることができる。
- 4) 試薬の再利用や再活性化が可能な場合、簡便な処理で再生できる。

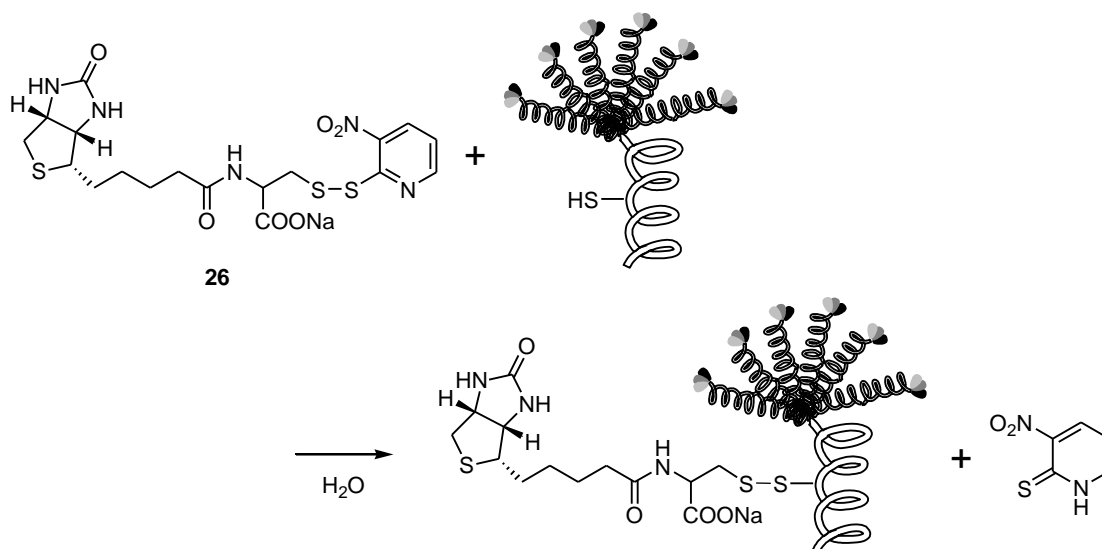
筆者の調査では、ビオチン等の化学プローブを固相上に担持するという「固相担持型の標識試薬」の事例は、合成例を含め確認できなかった。しかし、上記固相化学反応の利点を鑑みれば、筆者はこの固相担体を用いたシステムがビオチン標識反応においても有効に機能すると考えた。すなわち、**Figure 6**に示すように、固相に担持されたビオチン標識試薬 **25** を用いれば、標識反応において除去すべき未反応の試薬および試薬の分解物は、反応の前後を通じて固相担体上に存在する。一方、ビオチン標識体は、液相中に存在することから、反応が完全に進んで被標識体が消失すれば、濾過のみで高純度のビオチン標識体が生成することが想定された。さらに、このシステムは低分子化合物へのビオチン標識にも適用可能であり、HPLC の様な高度な精製手段を必要としない、有効で効率的な標識手法を提供できると考えた。



**Figure 6.** 固相に担持されたビオチン標識試薬 **25** を用いたビオチン標識反応

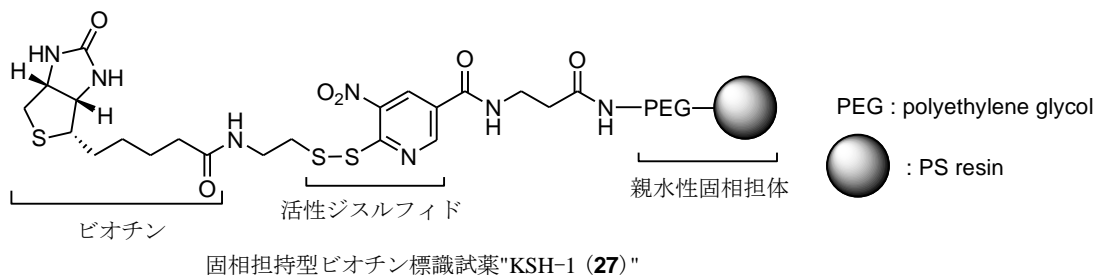
### 第三節 固相担持型ビオチン標識試薬のデザイン

前述の考察に従い、筆者は、優れた SH 基選択性と保護基としても利用可能な化学的安定性を併せ持つ Npys 基に着目した。そして、最初に Npys 型活性ジスルフィドを利用した新規固相担持型 SH 基選択的ビオチン標識試薬の創製を計画した。ところで、1988 年に Hayashi らは、SH 基選択的ビオチン標識試薬として化合物 **26** を開発し、補体第一成分である C1q 内の SH 基を利用した C1q ビオチン標識体の合成を報告している (Scheme 10)<sup>15)</sup>。



**Scheme 10.** Npys 型ビオチン標識試薬 (**26**) を用いた補体 C1q のビオチン標識

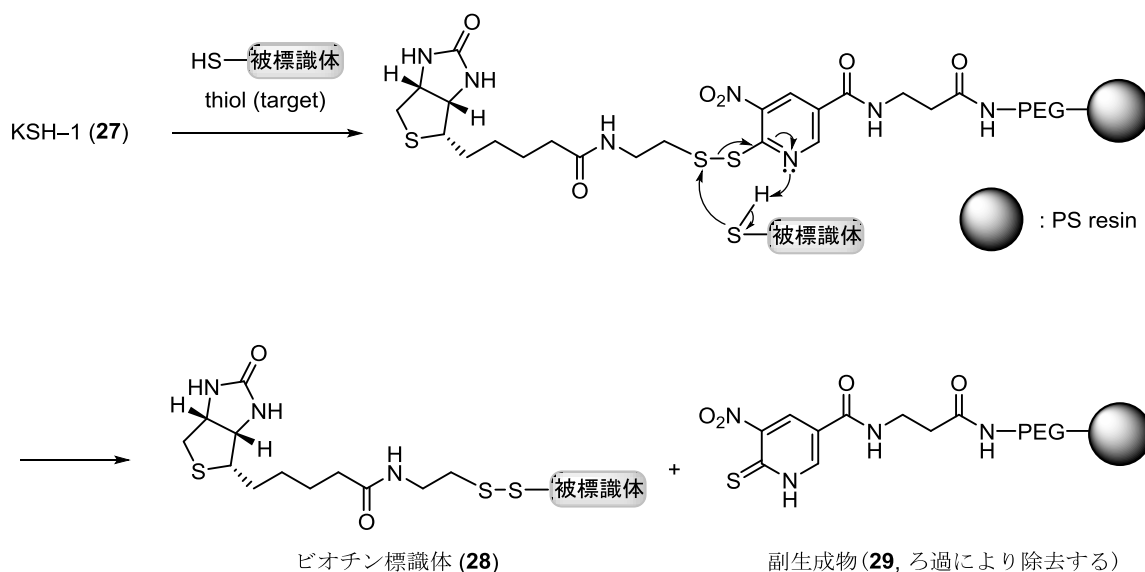
筆者は、このビオチン標識試薬 **26** を固相化すれば、簡単な操作で標的分子をビオチン標識体に変換できる新規固相担体が創出できると考えた。そして、この着想を礎に新規固相担持型 SH 基選択的ビオチン標識試薬 KSH-1 (**27**) を設計した (Figure 7)。



**Figure 7.** 新規固相担持型 SH 基選択的ビオチン標識試薬 KSH-1 (**27**)



標識試薬 **27** は、3つの部分から構成される。それらは、1) ビオチン誘導体、2) Npys 基を含む活性ジスルフィド、そして 3) 親水性のリンカー構造を有する固相担体である。ビオチン誘導体は、ビオチンが持つカルボン酸部でシステアミンを縮合したものである。そして、当該誘導体の SH 基を活性ジスルフィドとして Npys 基に連結させることにした。ただし、この Npys 基は、3 位にカルボキシル基を有する Npys 誘導体であり、当該カルボキシル基を介して  $\beta$ -アラニンに連結させ、次いでポリスチレン (PS) 型固相樹脂にアミド結合で連結させることにした。尚、当該 PS 型樹脂は、疎水性の固相担体上に親水性 PEG リンカーを配置したものをを用いることとした。これにより、標識試薬 **27** は有機溶媒のみならず水系溶媒においても膨潤し、蛋白質やペプチドなどの水溶性分子においても固相上でのビオチン標識が達成できると考えた。そして、適切な溶媒中で固相試薬 **27** を SH 含有被標識分子に作用させることでジスルフィド交換反応が進行し、SH 含有被標識分子がビオチン標識体 **28** に変換できるものと考えた (Scheme 11)。



**Scheme 11.** 標識試薬 KSH-1 (**27**) の設計とジスルフィド交換反応によるビオチン化の反応機構

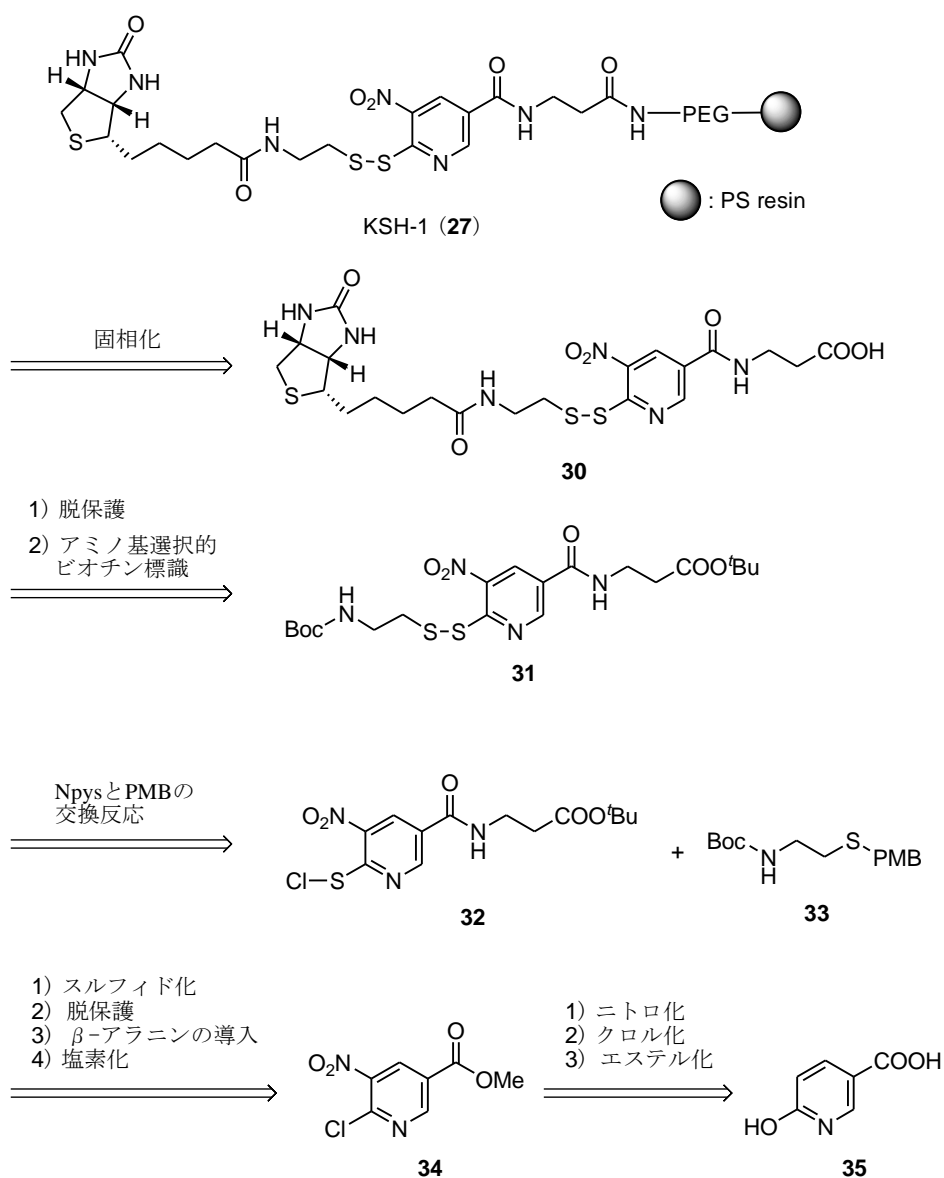
一方、固相担体に担持された Npys 部分は、副生物として相当する固相担体に担持されたチオピリドン **29** に変化するが、未反応の Npys 部分と共に固相上に残存するため、反応の完結後に樹脂を濾過により除去すれば、理論的に標識体のみが液相中に残り、濾過操作で高純度の標識体が獲得できると想定した。

筆者は、この仮説に基づいて設計した固相担持型 SH 基選択的ビオチン標識試薬 KSH-1 (**27**) の合成に着手した。次節においてその合成を述べる。

#### 第四節 固相担持型 SH 基選択的ビオチン標識試薬 KSH-1 の合成

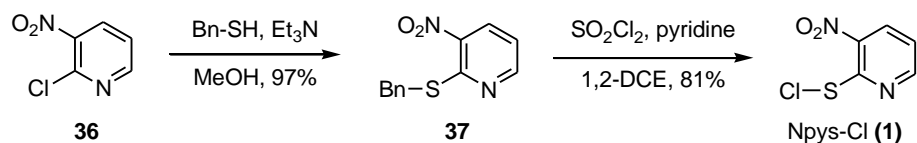
##### 1) 合成計画

**Scheme 12** に固相担持型 SH 基選択的ビオチン標識試薬 KSH-1 (**27**) の合成計画を示す。基本的には、ビオチンが導入された Npys 型ジスルフィド **30** を構築後、PEG 含有ポリスチレン樹脂へアミド結合により導入することで、標識試薬 **27** を合成する計画である。



**Scheme 12.** 固相担持型 SH 基選択的ビオチン標識試薬 KSH-1 (**27**) の合成計画

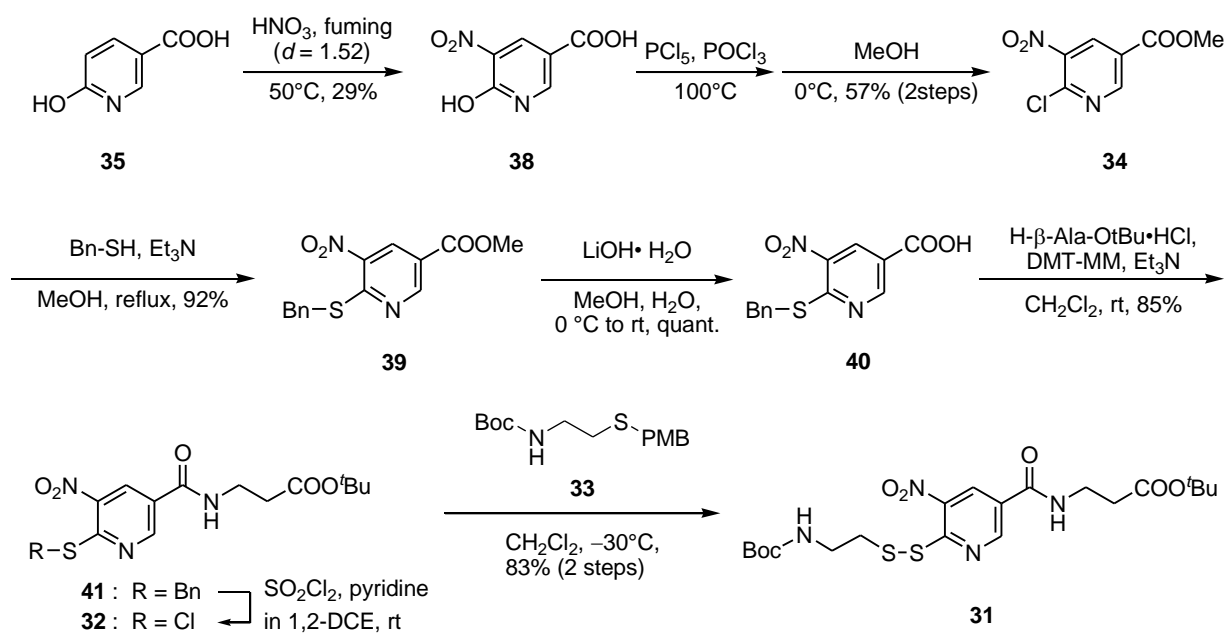
ビオチンの Npys 誘導体 **30** は、Npys 構造を有する  $\beta$ -アラニン誘導体 **31** の末端アミノ基部の Boc 基を脱保護後に、カルボキシル基が活性化されたアミノ基選択的ビオチン標識試薬 **6** を用いてビオチン化することで調製することとした。Npys 構造を有するジスルフィド **31** の合成には、序論 (Table 1) において示した Matsueda らによる Npys 基の導入法と同様の反応条件が適用できると考えた。すなわち、Npys-Cl 誘導体 **32** にスルフヒドリル基が *p*-methoxybenzyl (PMB) 基で保護された *N*-Boc-システアミン **33** と反応させることで、 $\beta$ -アラニン誘導体 **31** を調製することとした。尚、Npys 誘導体 **32** の合成、およびそのクロロスルフェニル構造への変換には、Ueki らにより報告された塩化スルフリルを用いた Npys-Cl(**1**)の合成法が利用できると考えた<sup>22)</sup>。すなわち、Ueki らは、Scheme 13 に示すように、ピリジルクロライド **36** に、ベンジルチオールを塩基性条件下で反応させることにより合成したベンジルピリジルスルフィド **37** を塩化スルフリルにより塩素化し、Npys-Cl(**1**)を調製している。そこで、筆者は、市販のニコチン酸誘導体 (6-ヒドロキシニコチン酸) **35** をニトロ化後、そのヒドロキシ基をクロル化し、次いでカルボキシル基に  $\beta$ -アラニンを導入しピリジルクロライド **34** を調製することとした。このピリジルクロライド **34** を植木らの手法により Npys-Cl 誘導体 **32** を調製できると考え、実際の合成に着手した。



Scheme 13. Ueki らによる Npys-Cl(**1**)の合成法

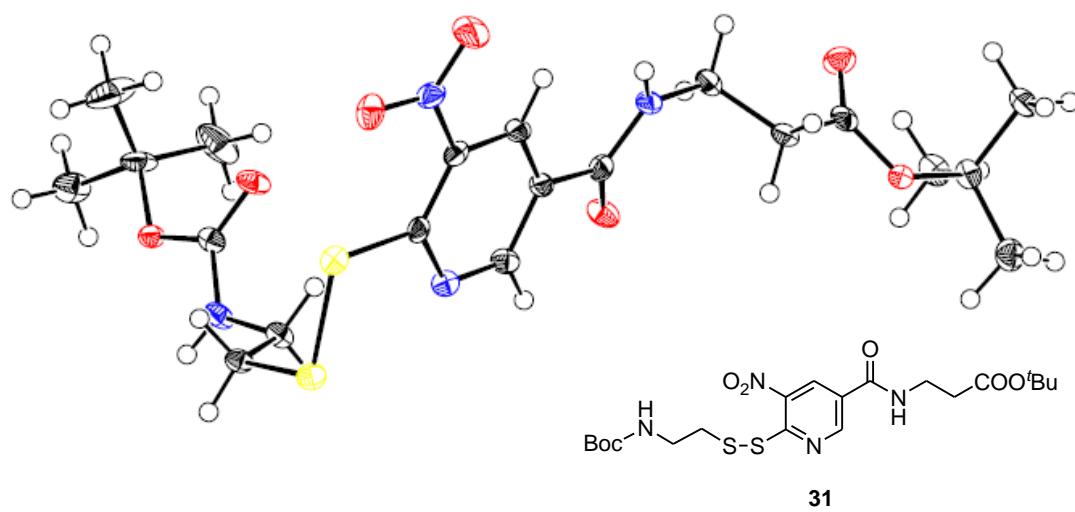
## 2) Npys 構造を有するジスルフィド **31** の合成

上記合成計画をもとに、まず Npys 構造を有するジスルフィド **31** の合成を行った (Scheme 14)。6-ヒドロキシニコチン酸 **35** に発煙硝酸 ( $d = 1.52$ ) を加え、 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  で反応させることにより、ニトロ化体 **38** を得た。次に、ニトロ化体 **38** を五塩化リンと共にオキシ塩化リンに溶解し、 $100\text{ }^{\circ}\text{C}$  で加熱した。この反応溶液をエバポレーターにて濃縮し、揮発性酸成分を留去後、得られた残渣に氷冷下慎重にメタノールを滴下した。生じた沈殿を、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (Hexane:EtOAc = 6:1) にて精製することで、中程度の収率ながらメチルエステル **34** を獲得した。得られたメチルエステル **34** に対し、前述の Ueki らの方法に準拠し、ベンジルチオールと塩基性条件下メタノール中で還流した。溶媒を留去および後処理後、ヘキサンと酢酸エチルによる再結晶にて、ベンジルピリジルスルフィド **39** を良好な収率で得た。このベンジルピリジルスルフィド **39** のメチルエステルを塩基性条件下に加水分解することで、定量的にカルボン酸 **40** を得、さらにカルボン酸 **40** に対し、ジクロロメタン溶媒中塩基性条件下室温にて、 $\beta$ -アラニン-*tert*-ブチルエステル塩酸塩を DMT-MM<sup>23</sup>) を用い脱水縮合することで、 $\beta$ -アラニン誘導体 **41** を良好な収率で得た。この  $\beta$ -アラニン誘導体 **41** ピリジン存在下、室温で塩化スルフィリルを反応させた。反応後、溶媒を留去、ヘキサンを加え 3 回共沸後に、生じたニトロピリジンスルフェニルクロライド **32** を含む残渣をそのまま次の反応に用いた。すなわち、PMB で保護された *N*-Boc-システアミン **33** とジクロロメタン中で反応させることで、Npys 構造を有するジスルフィド **31** を良好な収率で得た。なお、このジスルフィド **31** は結晶性があり、得られた結晶の X 線



Scheme 14. Npys 構造を有する  $\beta$ -アラニン誘導体 **31** の合成

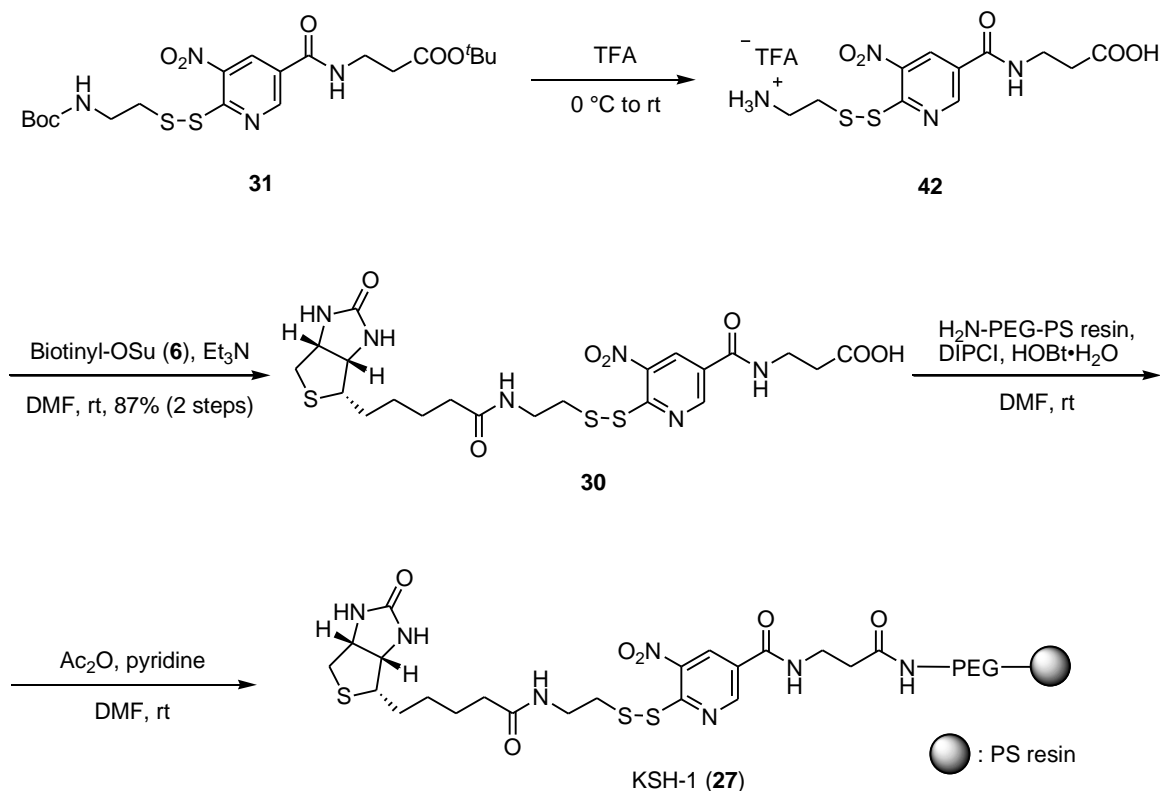
結晶構造解析から、**Figure 8** に示すように所望の構造であることが確認された。



**Figure 8.** Npys 構造を有するジスルフィド **31** の単結晶 X 線構造解析結果

### 3) 固相担持型 SH 基選択的ビオチン標識試薬 KSH-1 (27) の合成

上記 Npys 構造を有するジスルフィド **31** を用い、固相担持型 SH 基選択的ビオチン標識試薬 KSH-1 (**27**) の合成を行った (Scheme 15)。



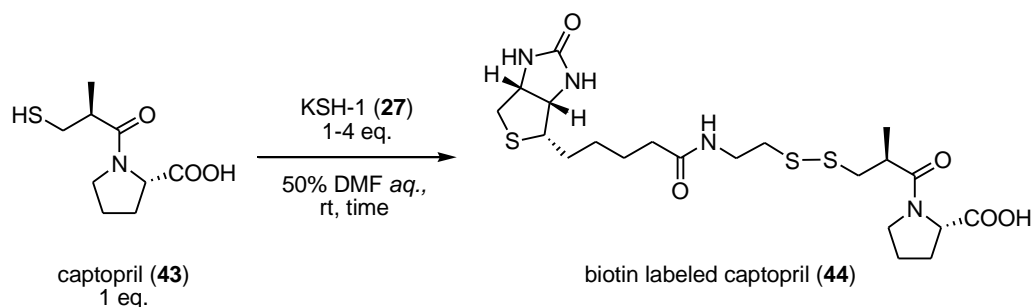
**Scheme 15.** 固相担持型 SH 基選択的ビオチン標識試薬 KSH-1 (**27**) の合成

ジスルフィド **31** を 4 mol/L 塩化水素酢酸エチル溶液と反応させたところジスルフィド結合の分解が観察された。一方、TFA を氷浴中で添加し、室温で攪拌することでアミノ基とカルボキシル基の脱保護が一度に進行し、その結果カルボキシルアミン **42** が TFA 塩として得られ、そのまま次の反応に用いた。カルボキシルアミン **42** にアミノ基選択的ビオチン標識試薬 **6** を DMF 溶媒中で塩基と共に反応させることで、ビオチンが導入された Npys 型ジスルフィド **30** を良好な収率で得た。この Npys 型ジスルフィド **30** とアミノ基を有する樹脂 (H<sub>2</sub>N-PEG-PS resin) を脱水縮合によりアミド化することで固相化を行った。すなわち、振とう攪拌機に PP 製濾過容器を取り付け、ここに PEG リンカーを有するアミノポリスチレン樹脂をとり、DMF を加えることで樹脂を膨潤させた。ここに Npys 型ジスルフィド **30** を DIPC1 および HOBt·H<sub>2</sub>O と共に加え、室温下振とう攪拌を行った。16 時間の反応後、溶液中の樹脂を一部取り、未反応のアミノ基を検出するべくニンヒドリンを用いた呈色試験 (Kaiser test<sup>24</sup>) に付し、陰性

であることを確認した。さらに、樹脂上に僅かに残存しうる未反応のアミノ基に対し、無水酢酸を塩基性条件下室温で反応させることによりアセチル化した。得られた樹脂を DMF で洗浄し、濾過により洗液を除去し、得られた樹脂を減圧下乾燥することで「固相担持型 SH 基選択的ビオチン標識試薬 **KSH-1 (27)**」を合成した。

## 第五節 KSH-1 を用いた SH 基を有する低分子化合物に対するビオチン標識反応

合成した固相担持型 SH 基選択的ビオチン標識試薬 KSH-1 (27) のビオチン標識能を評価するべく、モデル実験を行った。SH 基を有する低分子化合物としてアンジオテンシン変換酵素阻害薬カプトプリル (43)<sup>25)</sup> を選び、KSH-1 とチオールの反応性をみるべく検討をおこなった (Scheme 16)。



Scheme 16. KSH-1 (27) を用いたカプトプリル (43) へのビオチン標識反応

PP 製濾過容器に水 : DMF=1:1 の混合溶媒に溶解させたカプトプリル 43 と KSH-1 を 1-4 当量加え、振とう攪拌を行った。KSH-1 (27) の試薬導入量は、アミノポリスチレン樹脂上のアミノ基置換量 (0.42 mmol/g) を元に、0.34 mmol/g と推定した。このとき、溶媒量は濃度が KSH-1 (27) に対して一定 (0.011 mol/L) となるように調節した。反応から 5 分、10 分、20 分、30 分、60 分後の溶液をそれぞれ HPLC 分析し、カプトプリル 43 の残存量を観察することで、反応の進行を観測した (Figure 9)。

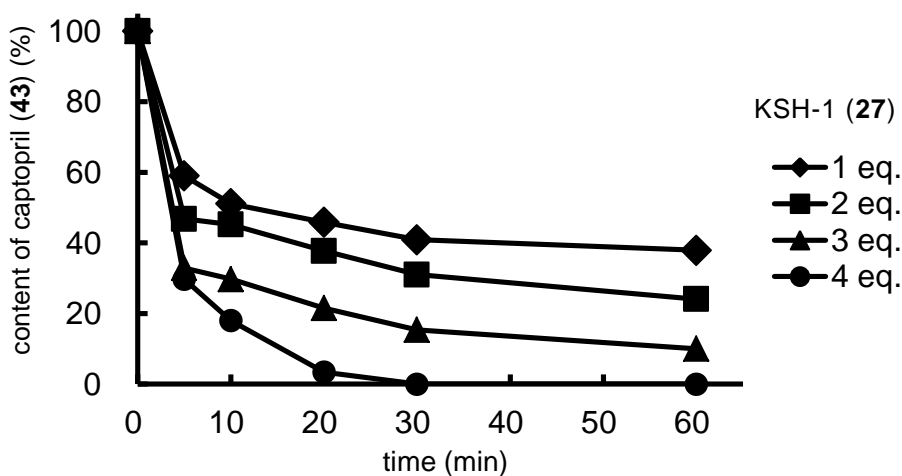
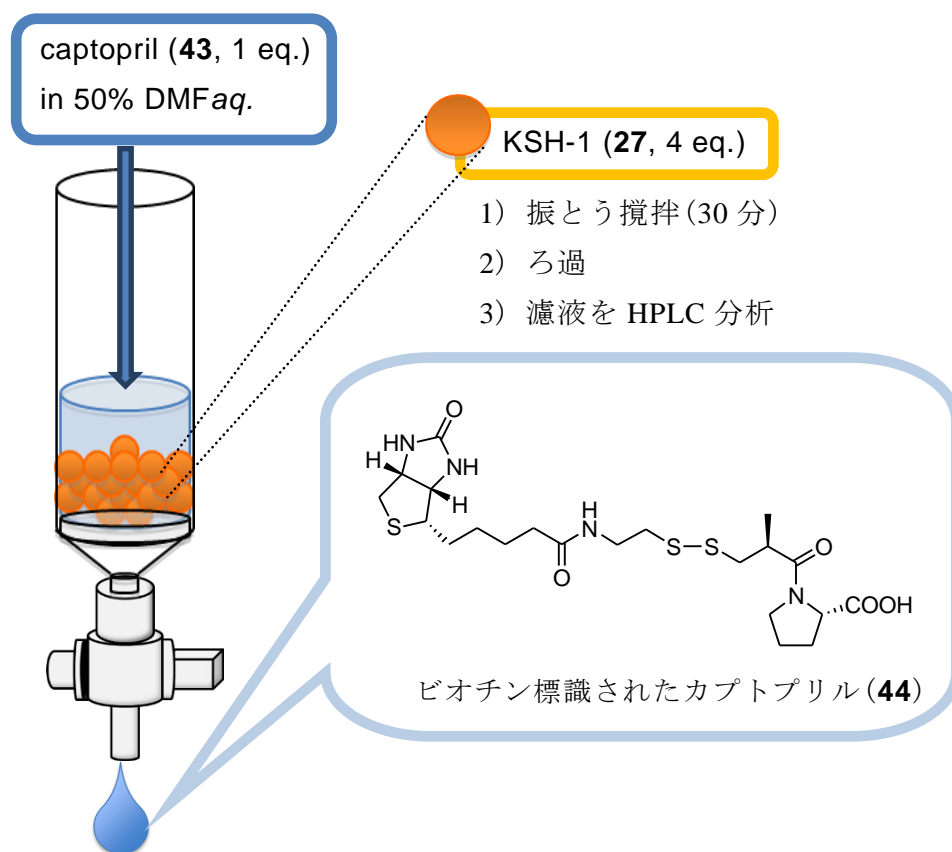


Figure 9. KSH-1 (27, 1-4 eq.) を用いるカプトプリル (43, 1 eq.) へのビオチン標識反応における最適當量と反応時間の検討。

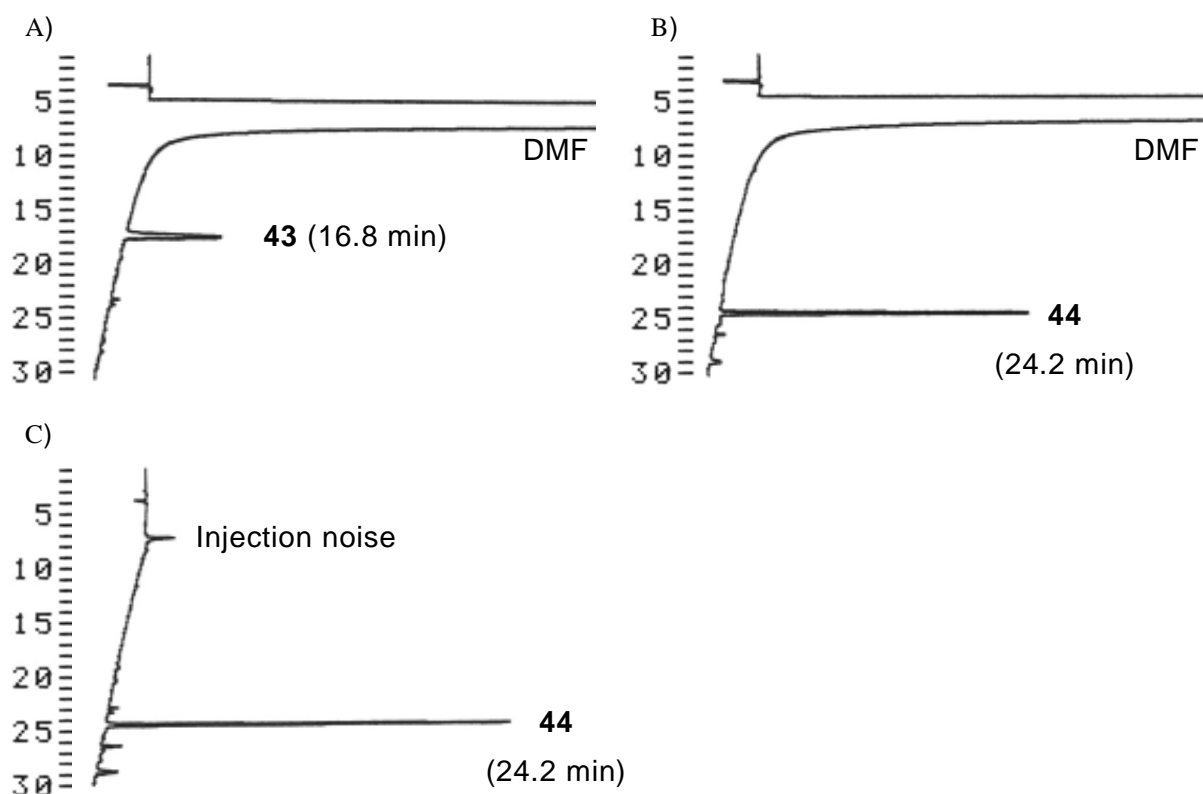


その結果、いずれも反応の進行と共にカプトプリルの残存量が減少していく様子が観察された。特に4当量のKSH-1を用いた場合においては、30分でカプトプリル**43**が検出限界以下まで消費されることが明らかになった。そこで、KSH-1(**27**)をカプトプリルに対して4当量用い、室温下30分反応させる条件を最適条件として、KSH-1を用いたビオチン標識反応について検討をおこなった(**Figure 10**)。



**Figure 10.** KSH-1(**27**)を用いるカプトプリル**43**へのビオチン標識

PP製の濾過容器にKSH-1(**27**)を4当量相当分入れ、次にカプトプリル**43**の溶液を加え、振とう攪拌することで反応を行った。30分後溶液を一部採取し、HPLC分析により反応の追跡を行った、**Figure 11**に結果の推移を示す。



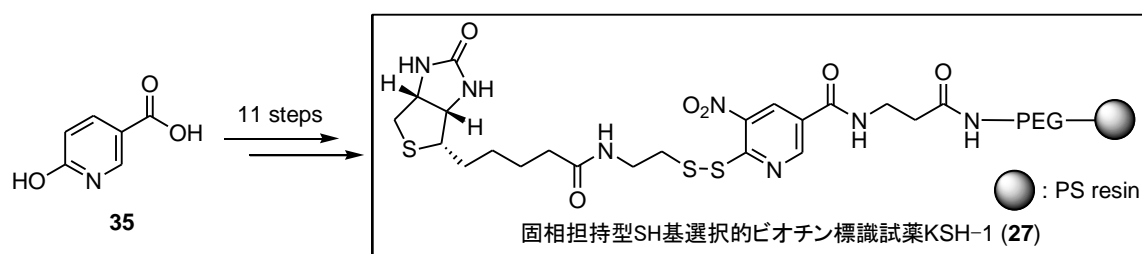
**Figure 11.** KSH-1 (**24**)を用いたカプトプリル **43** へのビオチン標識における、溶液の HPLC 分析、A)カプトプリルの DMF/H<sub>2</sub>O (1:1)溶液、B) 30 分後の反応溶液、C) 反応後の濾液を回収後、濃縮乾燥し 15%メタノール水溶液に再溶解した溶液

HPLC conditions: YMC-pack ODS-AM (4.6×150 mm) with a linear gradient of 0.1% TFA-MeCN (100:0–60:40 over 30 min) at a flow rate of 0.9 mL/min, detection at 230 nm. A peak with a retention time of 24.2 min in (b) and (c) corresponded to the biotin-labeled captopril (**44**).

その結果、反応開始時にはカプトプリル **43** に対応する 16.8 分のピークが確認されたが、30 分後には当該ピークは消失し、24.2 分の位置に新たなピークの出現を認めた。反応溶液を濾過し、樹脂を洗浄した溶液と合わせ、減圧下溶媒を留去し乾燥した。得られた固体を <sup>1</sup>H-NMR 及び質量分析をおこなった。HPLC にて検出した新たなピークが目的のビオチン標識されたカプトプリル **44** に対応することを確認し、収率は 96% であった。また、15% メタノール水溶液に再度溶解して HPLC 分析を行った所、純度は 87% であった。このことから、KSH-1 は SH 基を持つ低分子化合物カプトプリルに対し室温で 30 分反応させることで官能基選択的にビオチンを標識し、反応終了後には濾過のみで比較的良好な純度のビオチン標識体を生成することを明らかにした。この知見は KSH-1 が SH 基を有する化合物に対して広く適用可能で効率的なビオチン標識手法であると考えられる。

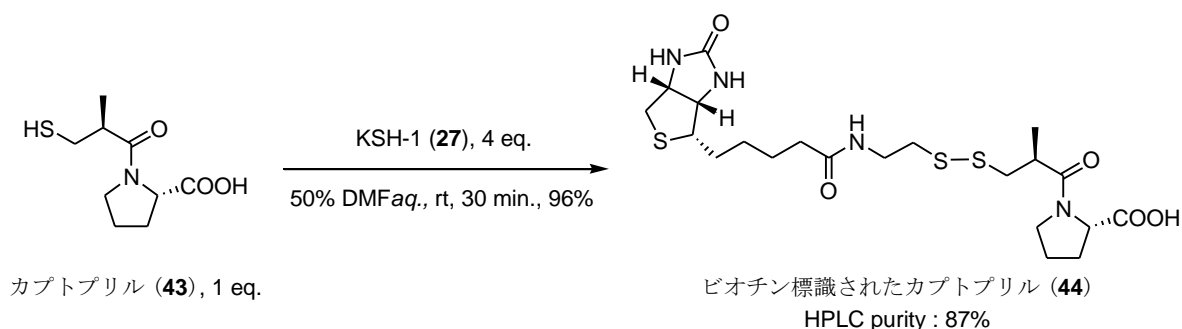
## 第六節 小括

第一章では、SH 基選択的に簡便にビオチン標識できる、固相担持型試薬「KSH-1」の創製について述べた。SH 基と選択的に反応し、非対称ジスルフィドを形成する Npys 基を有するビオチン標識試薬に着目し、従来のビオチン標識法に伴う煩雑な精製が必要となっていた問題を、この試薬を固相化学の技術を用いることで解決できると考えた。すなわち、固相担体に担持されたビオチン標識試薬を用いた反応では、未反応の試薬や副生成物が反応の前後を通じて固相上に担持されているため、精製することなく、濾過のみの簡便な操作でビオチン標識体が得られると期待した。そして、この新しい発想に基づく試薬「固相担持型 SH 基選択的ビオチン標識試薬 KSH-1 (27)」を設計し、市販で入手容易な 6-ヒドロキシニコチン酸より 11 工程で合成した (Scheme 17)。



Scheme 17. 固相担持型ビオチン標識試薬 KSH-1 (27)

そして、SH 基含有分子として、ACE 阻害剤カプトプリル **43** をモデルに KSH-1 の標識試薬としての機能を評価し、室温下 30 分の後、樹脂を濾過により除去するのみで所望のビオチン標識体 **44** を 87% という良好な純度、高収率 (96%) にて得ることに成功した (Scheme 18)。



Scheme 18. KSH-1 (27) を用いたカプトプリル **43** へのビオチン標識反応

一例のみであるが、得られた結果から本固相試薬の高い汎用性が期待される。

## 第二章 固相担持型 SH 基選択的オリゴアルギニン導入試薬の開発

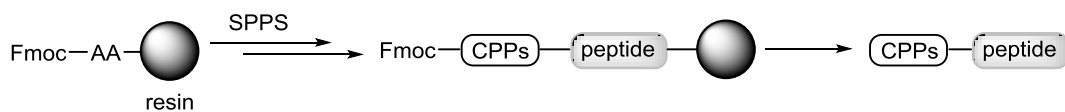
### 序節

1988年、ヒト免疫不全ウイルス1型(HIV-1)のTat蛋白質が細胞内へ移行するというFrankelらの偶然の発見<sup>1)</sup>を緒に、アルギニンに富むペプチドは、膜透過ペプチド(CPP)の一つとして認識されるようになった。加えてCPPを付与した各種蛋白質の細胞内導入法が1994年にFawellらにより報告された<sup>2)</sup>ことから、CPPをベクターとして用いて、細胞内に蛋白質、ペプチド、核酸誘導體、リポソーム、ナノ粒子等の膜不透過性のカーゴ(積荷)分子を導入する方法が盛んに試みられている。この様なCPPとしては、HIV-1 Tat蛋白質由来ペプチド(Tatペプチド)の他、オリゴアルギニン( $R_n$ ,  $n = 7-12$ )が知られ<sup>3)</sup>、最近ではCPP自体あるいはCPPの導入試薬が開発され市販されている。

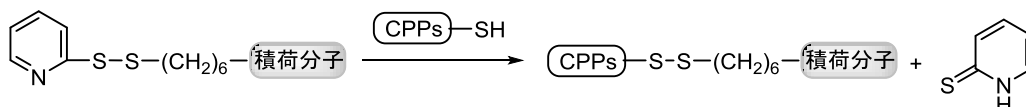
CPPを用いた蛋白質細胞内導入技術は、特殊な機器を必要とせず、細胞培養の培地に添加することで細胞内移行を可能にすることから、基礎研究のみならず薬物送達研究においても有用な技術となっている。オリゴアルギニンの細胞内移行メカニズムは、エンドサイトーシスによる取り込みが主たる経路と考えられているが、オリゴアルギニン架橋体の種類や添加濃度、血清の有無、温度等により変化することがあり、その全容の理解には未だ至っていない<sup>4)-6)</sup>。一方、細胞内導入の用途以外にも、オリゴアルギニンを用いて薬物の消化管粘膜透過性を改善させる試み<sup>7)</sup>やプロドラッグ<sup>8)</sup>、ポリマー基材<sup>9)</sup>としての応用も報告されている。

一般にオリゴアルギニンを用いた効率的な積荷分子の細胞内導入では、オリゴアルギニンとの共有結合による積荷分子の化学修飾が必要となる<sup>10)</sup>。このようなオリゴアルギニン架橋体を得る方法として、CPPを含む組換え蛋白質としての発現が挙げられる<sup>11)</sup>。一方、化学合成によりCPPとの架橋体を合成する方法も多数報告されている。それらの合成例をScheme 19に示す。導入しようとする積荷分子がペプチドの場合は、固相ペプチド合成法によりCPPの配列を内包したペプチドの合成により達成できる(Scheme 19A)<sup>12)</sup>。一方、オリゴアルギニンと積荷分子を別々に準備し、それらを官能基選択的に架橋させる手法も挙げられる。例えば、ジスルフィド交換反応によるジスルフィド架橋の構築を利用する例として、SH基と選択的な反応性を有するピリジンスルフェニル(Pys)型ジスルフィドを有する積荷分子とシステイン含有CPPを架橋させる方法(Scheme 19B)<sup>13)</sup>、やCys(Npys)含有オリゴアルギニンとSH基含有積荷分子を架橋させる方法が報告されている(Scheme 19C)<sup>14)</sup>。また、高い官能基選択性を有するHuisgen反応を用いる方法(Scheme 19D)<sup>15)</sup>や、二価反応性架橋試薬を用いる方法<sup>16)</sup>(Scheme 19E)も報告されている。

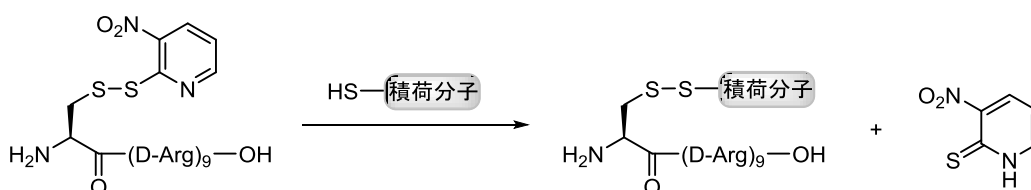
A) : 固相ペプチド合成法による方法<sup>12)</sup>



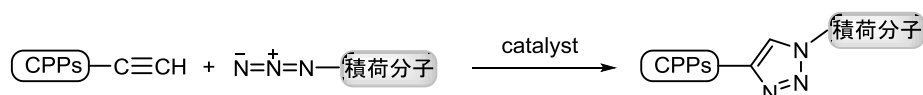
B) : Pys型ジスルフィドとのジスルフィド交換反応による方法<sup>13)</sup>



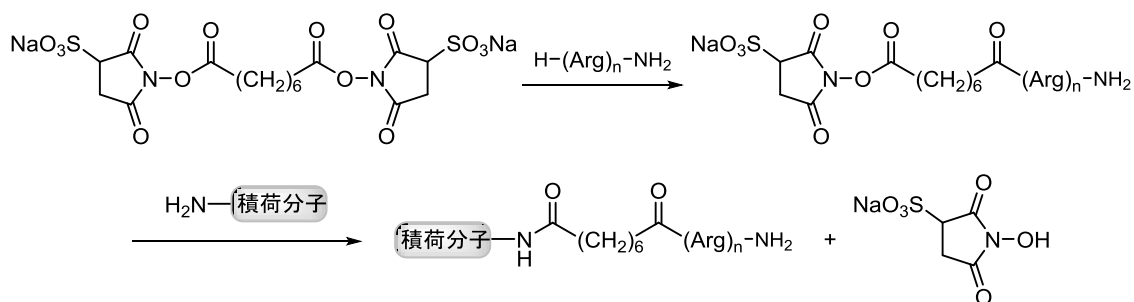
C) : Npys型ジスルフィドとのジスルフィド交換反応による方法<sup>14)</sup>



D) : Huisgen反応による方法<sup>15)</sup>



E) : クロスリンカーを用いる方法<sup>16)</sup>



**Scheme 19.** 化学合成に基づくオリゴアルギニン-積荷分子架橋体の既知合成手法

しかしながら、これらの手法はいずれも第一章で述べたビオチン標識の場合と同様に、ペプチドや低分子化合物の場合では、架橋体の合成に際し HPLC など高次の精製手法が必要となる。この課題の改善に向けて、筆者は、第一章で検討した固相担持型の Npys 基による標識手法がオリゴアルギニンと積荷分子の架橋体合成においても応用可能と考えた。すなわち、簡便な操作で高純度のオリゴアルギニン架橋体を合成する試薬として、SH 基選択的固相担持型オリゴアルギニン導入試薬の開発に着手した。

## 第一節 固相担持型 SH 基選択的オリゴアルギニン導入試薬 KSH-2 のデザイン

前章にて開発した KSH-1 (27) の構造を参考に、SH 基を有する積荷分子に CPP であるオリゴアルギニンとして、オクタアルギニン (Arg<sub>8</sub>) を導入する固相担持型の SH 基選択的オクタアルギニン導入試薬 KSH-2 (45) を次のようにデザインした。すなわち導入試薬 39 を、1) CPP としてのオクタアルギニン、2) *N*-アミノカプロン酸および L-システインをリンカーとして有する Npys 型ジスルフィド、3) アミド結合を介して Npys 基を架橋した親水性固相担体の 3 つのユニットから構成される分子としてデザインした (Figure 12)。

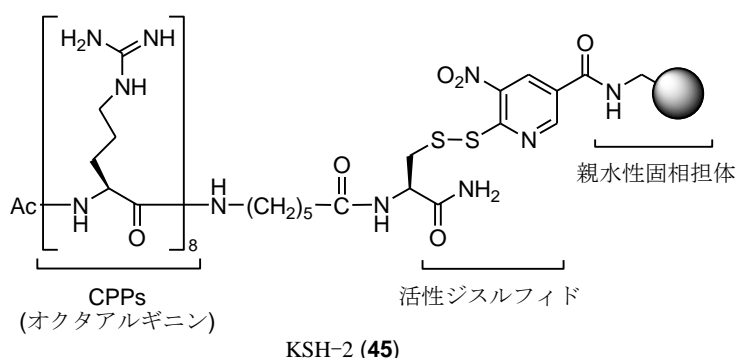
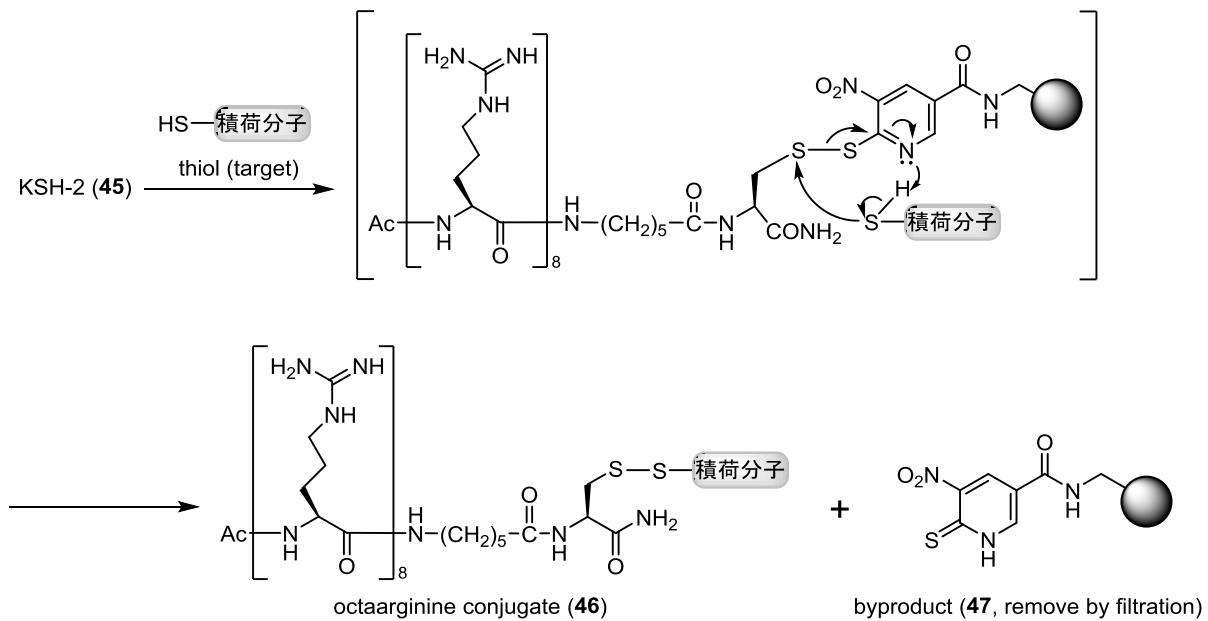


Figure 12. 固相担持型 SH 基選択的オクタアルギニン導入試薬 KSH-2 (45)

したがって、導入試薬 39 を用いれば、SH 基を有する積荷分子とジスルフィド交換により反応し、オクタアルギニンを導入した架橋体 46 が生成すると思われる。反応の際、固相担体に連結された未反応の Npys 導入試薬本体および反応により生じる副生物 47 は、濾過により容易に分離できると考えた。すなわち、KSH-2 (45) は、煩雑な精製過程無しに SH 基含有化合物に対して選択的にオクタアルギニンを導入できる試薬になることが期待された (Scheme 20)。

そこで、この着想を基に「SH 基選択的オクタアルギニン導入試薬 KSH-2 (45)」の合成に着手した。

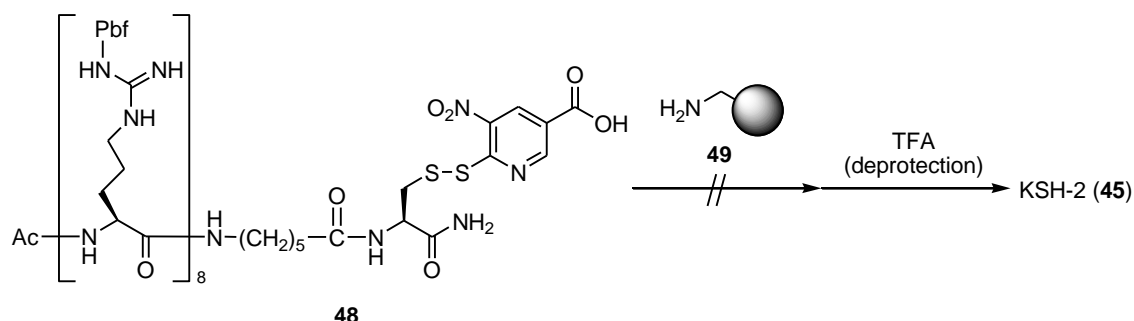


**Figure 20.** オクタアルギニン導入試薬 KSH-2(45)を用いたジスルフィド交換反応による  
 オクタアルギニン導入の反応機構

## 第二節 固相担持型 SH 基選択的オクタアルギニン導入試薬の合成

### 1) 合成計画

上記導入試薬 **KSH-2 (45)** の合成法において、当初、前章で述べた **KSH-1** と同様に、オクタアルギニン ( $\text{Arg}_8$ ) と連結した **Npys** 型のジスルフィドを合成し、樹脂上に担持する方法を検討した。すなわち、**Scheme 21** に示すように、側鎖が **Pbf** 基で保護されたオクタアルギニンを含有する **Npys** カルボン酸 **48** とアミノ基含有樹脂 **49** を縮合する手法である。そして、最終段階で酸性条件下に脱保護することを計画したが、実際に合成すると、ペプチド **48** の溶解性が非常に乏しく、これを縮合反応により固相上に担持させることができなかった。



**Scheme 21.** **KSH-2 (45)** の合成案

そこで、**Scheme 22** に示すように、樹脂上で活性化した **Npys** 基と、オクタアルギニンペプチドフラグメントを、ジスルフィドの形成をもって固相化する戦略を考えた。すなわち、はじめに樹脂上に **Npys-Cl** 構造を構築し、この活性化された **Npys** 基とオクタアルギニンペプチドフラグメント (**50**, Ac-(Arg)<sub>8</sub>-Acp-Cys(<sup>t</sup>Bu)-NH<sub>2</sub>) に含まれる保護システイン残基との交換反応により固相化を行う計画である。オリゴアルギニンペプチドフラグメント **50** は、固相ペプチド合成にて容易に調製できる構造であった。また、固相上に担持された **Npys-Cl (51)** の調製においては、第一章で述べたベンジルスルフィド **40** から誘導できると考えた。すなわち、ベンジルスルフィド **40** をアミド結合で親水性樹脂 **53** に導入後、塩素化することで **Npys-Cl** 型樹脂 **51** に変換可能と考えた。一方、固相担体については、第一章のビオチン標識試薬では、PEG リンカーを有するポリスチレン樹脂を用いたが、ポリスチレン構造が塩素化反応において置換反応が進行する懸念があった。そこで、固相担体にはベンゼン環を持たず、さらにポリスチレン樹脂よりも水系溶媒と有機溶媒双方に良好な膨潤能を有する、PEG を基材とした樹脂、アミノメチル ChemMatrix<sup>®</sup> 樹脂<sup>17)</sup> を選び、実際の合成に着手した。



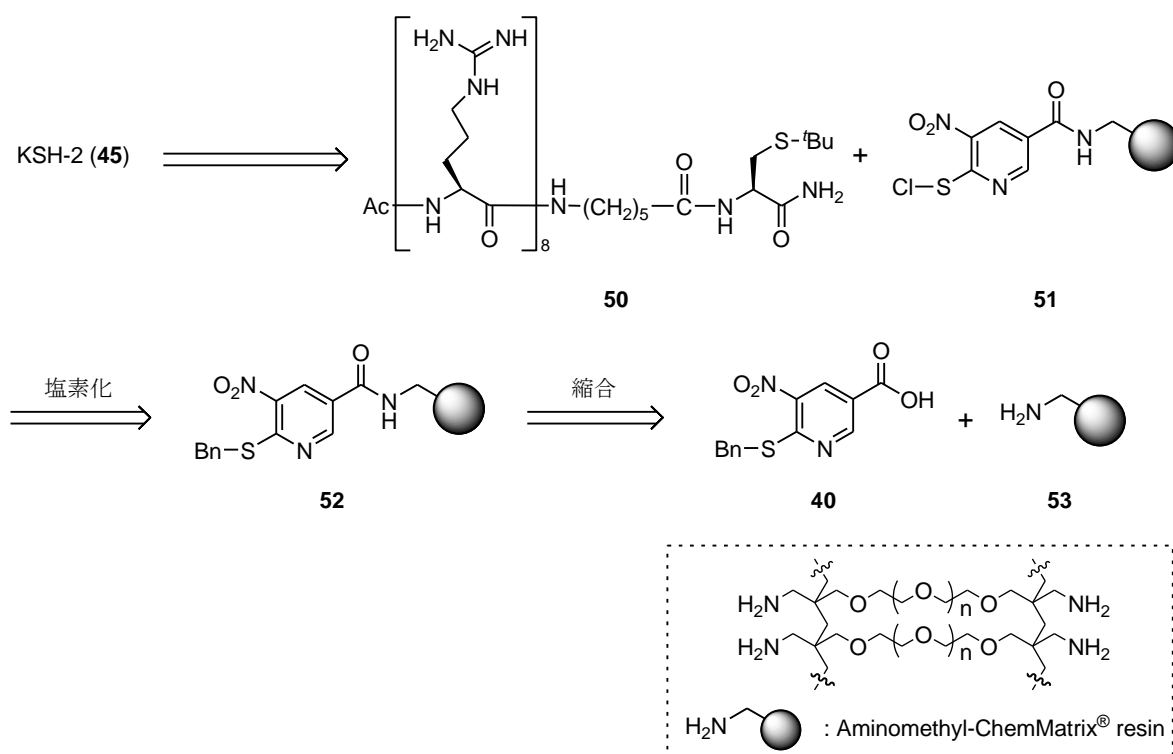


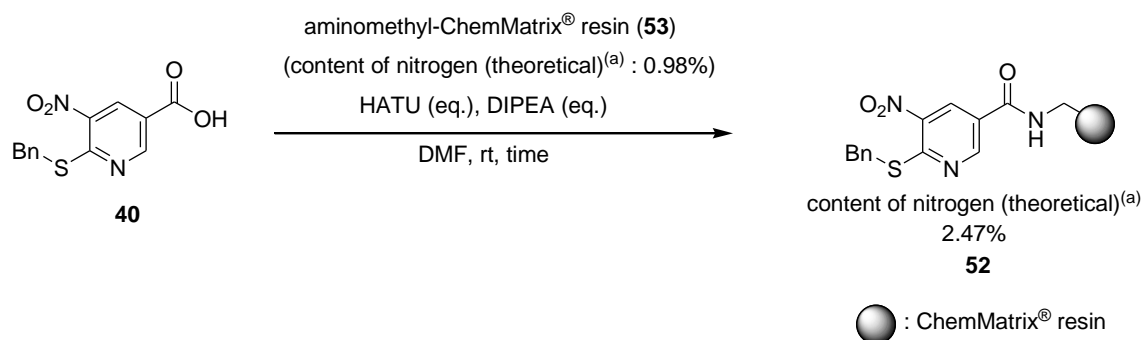
Figure 22. Npys 型ジスルフィドを構築するとともに固相化する KSH-2 (45) の合成計画

## 2) Npys-Cl 型樹脂 51 の調製

アミノメチル ChemMatrix® 樹脂 53 に、ベンジルスルフィド 40 を導入するにあたり、反応の完結をめざすために、まず、縮合試薬 HATU および塩基 DIPEA の使用量ならびに反応時間に関し検討を行った。ベンジルスルフィド 40 が樹脂中のアミノ基と反応することで、アミノ基 1 個当り窒素原子 2 個が増加することになる。そこで、ベンジルスルフィド 40 の導入率を反応後のベンジルスルフィド化 ChemMatrix® 樹脂 52 に存在する窒素含量を元に計算した。その結果を Table 3 に示すが、実際には、ベンジルスルフィド化樹脂 52 中の窒素含量の理論値 (2.47%) との差から最適反応条件を決定した。まず、1 当量のアミノメチル ChemMatrix® 樹脂 53 に対し、ベンジルスルフィド 40、HATU、DIPEA を各 4.0、3.9、4.0 当量用い、振とう攪拌をおこなった (Entry 1)。1 時間の反応後、得られた樹脂は、アミンの定性試験 (Kaiser test) が陰性であったにもかかわらず、窒素含量は理論値と乖離し、約 0.6% 低い値を示した。そこで、Entry 1 の試薬量を変えず反応時間を延長 (3 時間) したところ (Entry 2)、理論値との差は 0.2% まで改善したが、さらに改良の余地があると思われた。そこで、各試薬の量を樹脂 53 のアミノ基 1 当量に対して、各 5.0、4.9、5.0 当量に増やし、3 時間反応させたところ (Entry 3)、窒素含量は理論値と非常に良い一致 (-0.04%) を示した。一方、Entry 3 の反応条件で反応時間を更に延長 (24 時間) すると、窒素含量の低下 (-0.13%) が僅かに見られた。

この結果から Entry 3 の反応条件が最適であったので、以後の合成においては当該反応条件を適用した。尚、調製されたベンジルスルフィド化樹脂 **52** は、冷凍保管にて 6 ヶ月以上安定であった。

**Table 3.** ベンジルスルフィド **40** の固相化における反応条件の検討



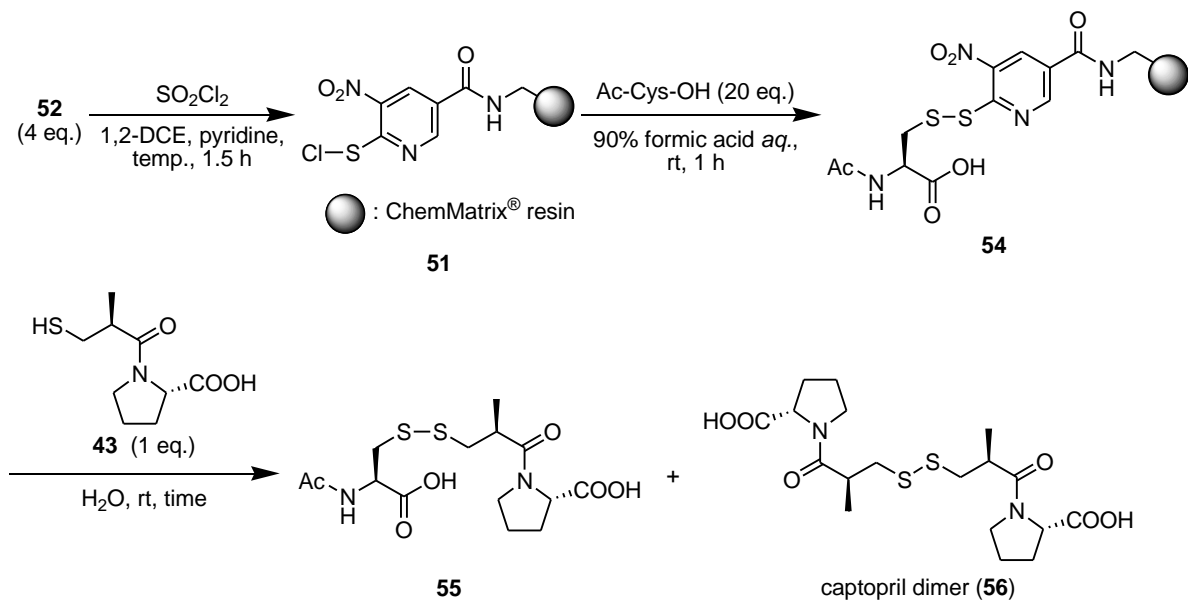
Entry	<b>40</b> (eq.)	HATU (eq.)	DIPEA (eq.)	Time	Kaiser test	Content of nitrogen (difference from theoretical value)
1	4.0	3.9	4.0	1 h	Negative	1.84% (-0.63%)
2	4.0	3.9	4.0	3 h	Negative	2.26% (-0.21%)
3	5.0	4.9	5.0	3 h	Negative	2.43% (-0.04%)
4	5.0	4.9	5.0	24 h	Negative	2.34% (-0.13%)

(a) The theoretical value was calculated from -NH<sub>2</sub> group on the aminomethyl-ChemMatrix<sup>®</sup> resin **53** (0.70 mmol/g).

続くベンジルスルフィド化樹脂 **52** の塩素化では、KSH-1 (**27**) の合成における液相での塩素化の条件を参考にした。すなわち、ベンジルスルフィド化樹脂 **52** に塩化スルフルルを加え、攪拌子により穏やかに混合することで、Npys-Cl 型樹脂 **51** の合成を行った。しかしながら、樹脂が固体であるため NMR や IR では塩素化効率の評価が困難であった。そこで、単純な構造で SH 基を有する分子を用いたモデル反応により非対称ジスルフィドの合成効率を評価することで、塩素化における塩化スルフルルの濃度及び温度について最適条件の検討を行った。具体的には、Table 4 に示すように、ベンジルスルフィド化樹脂 **52** (18.4 μmol) をピリジン存在下に、塩化スルフルルの 1,2-ジクロロエタン溶液 (2 mL) で 90 分処理後、得られた樹脂をジクロロメタンで洗浄し、Npys-Cl 型樹脂 **51** を得る。この Npys-Cl 型樹脂 **51** をギ酸水溶液 (2 mL) 中、過剰の *N*-アセチルシステイン (92.0 μmol) で室温下処理した。1 時間の反応後、濾液の pH が 5-6 の弱酸性となるまで水で洗浄し、*N*-アセチルシステインが導入された Npys ジスルフィド型樹脂 **54** を得た。そして、得られた Npys ジスルフィド型樹脂 **54** にカプトブ

リル **43** (4.6  $\mu\text{mol}$ ) の水溶液 (0.9 mL) を加え、終夜撹拌した。反応開始より 30 分経過後と、終夜撹拌後の反応液を採取し、HPLC にて分析することで非対称ジスルフィド **55** が生成する様子を解析した。

**Table 4.** ベンジルスルフィド樹脂 **52** の固相化と非対称ジスルフィド合成の試行実験



Entry	SO <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /1,2-DCE (v/v)	temp.	time	HPLC yield			
				<b>43</b>	<b>55</b>	<b>56</b>	others
1	10%	rt	30 min	51	13	13	21
2	5%	rt	30 min	66	18	4	12
3	5%	rt	Overnight	12	57	2	29
4	2%	rt	30 min	66	23	4	7
5	2%	rt	Overnight	5	66	4	25
6	2%	50 °C	30 min	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
7	1%	rt	30 min	72	11	5	12
8	1%	rt	Overnight	14	65	4	18
9	0.5%	rt	30 min	92	3	2	2
10	0.5%	rt	Overnight	51	39	8	2
11	0.5%	4 °C	30 min	90	7	3	0
12	0.5%	4 °C	Overnight	25	71	3	1

その結果、Entry 1 に示すように、10%の塩化スルフリルを室温下で用いると、反応後 30 分で目的の非対称ジスルフィド **55** は生成する (13%) ものの、カプトプリル **43**

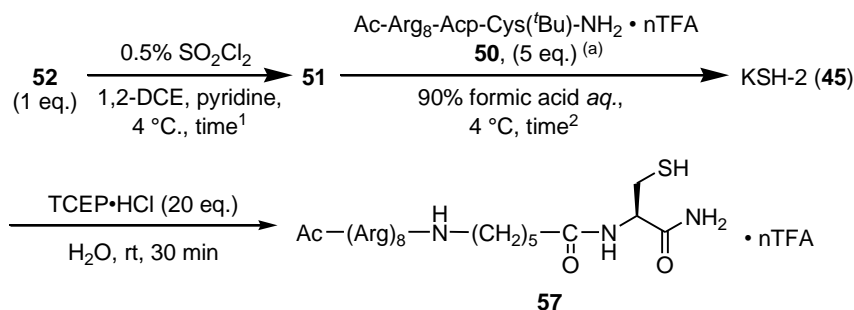
は残存(51%)しており、ホモジスルフィド体 **56**(13%)や他の生成物(21%)も副生する結果となった。そこで、ホモジスルフィド体 **56**や副生成物生成の抑制を目的として、塩化スルフリルの濃度を 5% (Entry 2 および 3)へ低減した。その結果、目的とする非対称ジスルフィド **55**の生成は 30 分の反応時間では 18%と低下した(Entry 2)が、終夜反応により 57%に上昇した(Entry 3)。一方、終夜反応においても原料であるカプトプリル **43**は残存(12%)し、副生成物の生成は Entry 1 の結果と同程度(29%)であった。しかし、ホモジスルフィド体 **56**の生成は 4%以下という低水準であった。そこで、さらに Entry 4 および 5 に示すように、塩化スルフリルの濃度を 2%へ低減したところ、非対称ジスルフィド **55**の生成は 30 分の反応時間では 23% (Entry 4)、終夜反応では 66% (Entry 5)と、Entry 2 および 3 の結果と比べてわずかに上昇し、ホモジスルフィド **56**の生成も同程度(4%)であった。さらに、終夜反応においても原料であるカプトプリル **43**は残存(5%)していたものの、副生成物の生成はわずかに抑制(25%)された。しかしながら、さらに反応を加速するため Entry 4 の反応条件を基に加温(50 °C)を検討したが(Entry 6)、樹脂の形態が崩壊した。これは塩素化樹脂 **51**より塩素が脱離し、樹脂間でのランダムな共有結合形成が起こったためと考えている。一方、さらに塩化スルフリルの濃度を 1% (Entry 7 および 8)および 0.5% (Entry 9 および 10)へ低減した場合、非対称ジスルフィド **55**の生成は、終夜反応において各々 65%および 39%となり、特に Entry 8 の条件は、Entry 5 のそれに匹敵するものであった。これに対し、Entry 10 では、カプトプリルの残存は 51%と多いものの、副生成物の生成が 2%と大きく抑制されていたため、次に、塩化スルフリル濃度 0.5%とし冷却下反応を試みた(Entry 11 および 12)。その結果、非対称ジスルフィド **55**の生成は、終夜反応において 71%と最も良い数値を与え、さらに、ホモジスルフィド体 **56**の生成が 3%、副生成物の生成が 1%と良好な結果を与えた。Entry 7 の反応条件では、カプトプリルの残存が 25%あり、反応は完結していないが、検討した中では最も目的物が多く得られた。また副生成物の生成が最も抑えられたことから、当該反応条件を用いて、Arg<sub>8</sub> フラグメント **50**を樹脂に導入する事で、KSH-2(**45**)の合成検討を行った。

### 3)固相担持型 SH 基選択的オリゴアルギニン導入試薬 KSH-2(**45**)の合成

次に Npys-Cl 型樹脂 **51**に、Arg<sub>8</sub> フラグメント **50**(Ac-(Arg)<sub>8</sub>-Acp-Cys(<sup>t</sup>Bu)-NH<sub>2</sub>·nTFA salt)を導入することで Npys 型ジスルフィドを構築すると共に固相化し、固相担持型 SH 基選択的オリゴアルギニン導入試薬 KSH-2(**45**)の合成検討を行った( Table 5)。具体的には Npys-Cl 型樹脂 **51**をギ酸溶液中で膨潤後、樹脂 **51**に対して 5 当量の Arg<sub>8</sub> フラグメント **50**を氷冷下加え振とう攪拌することにより KSH-2(**45**)を合成した(この時、反応終了後に濾液を回収し凍結乾燥することで未反応の **45**を回収し、再利用することが可能であった)。そして、KSH-2(**45**)に導入された Arg<sub>8</sub> フラグメントの導

入率を評価することで最適な反応時間の条件について模索した。樹脂に対する Arg<sub>8</sub> フラグメント導入率は、得られた KSH-2(45)を水により洗浄した後、還元剤 TCEP・HCl で室温下処理することで樹脂 45 上のジスルフィド結合を切断した後、樹脂を濾過により分離し、その際の濾液中に含まれる還元型ペプチド 57 の量を求めることにより評価した。尚、Arg<sub>8</sub> フラグメント 50 は、手動にて Fmoc-based Solid Phase Peptide Synthesis (Fmoc-based SPPS)により合成した。すなわち Rink amide resin を用い、C 末端より各種 Fmoc アミノ酸 (Fmoc-Cys(<sup>t</sup>Bu)-OH, Fmoc-Acp-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Cys(<sup>t</sup>Bu)-OH) を DIPCI-HOBt 法にて逐次縮合し、さらに Fmoc 基を 20% piperidine/DMF で脱保護することでペプチド鎖を構築した。また、N 端は、ピリジン存在下に無水酢酸によりアセチル化した。得られた保護ペプチド樹脂を、TFA : H<sub>2</sub>O : thioanisole : m-cresol (57:1:1:1)で処理し、Cys(<sup>t</sup>Bu)以外の保護基を除去すると共にペプチドの樹脂から切断を行い粗ペプチドを得た。粗ペプチドを HPLC で精製することにより、所望の Arg<sub>8</sub> フラグメント 50 を得た (yield : 53%, purity : 92%)。また、還元型ペプチド 57 はアミノ酸に Fmoc-Cys(Trt)-OH を用いたことの他は Arg<sub>8</sub> フラグメント 50 と同様の方法により合成し (yield : 15%, purity : 94%)アルギニン残基の含有量を指標としたアミノ酸分析の結果を元に HPLC による検量線を作成した。

**Table 5.** KSH-2(45)の合成と反応条件の検討



Entry	time <sup>1</sup>	time <sup>2</sup>	Loading rate of octaarginine peptide on KSH-2 (45) <sup>(b)</sup>
1	1.5 h	2.0 h	20%
2	1.5 h	8.0 h	77%
3	1.5 h	16.0 h	87%
4	4.5 h	8.0 h	59%

[a] Molar quantity was calculated as 8TFA salt.

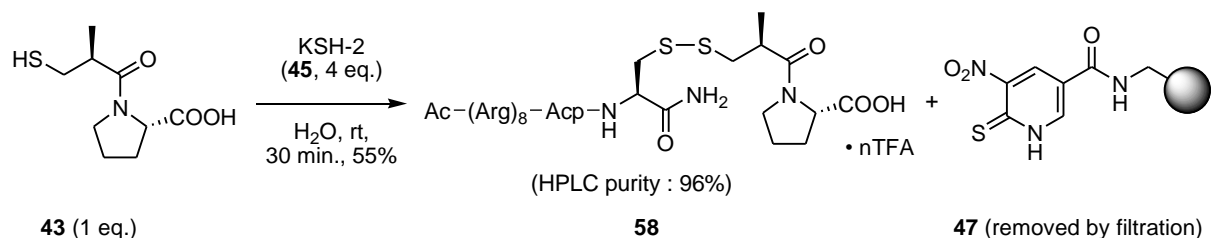
[b] Loading rate was calculated from a calibration curve based on the result of the amino acid analysis of peptide 57 synthesized by SPPS.

その結果、Entry 1 に示すように、第二節 2)の結果より得られた条件の下合成した Npys-Cl 型樹脂 51 に、Arg<sub>8</sub> フラグメント 50 の 90%ギ酸水溶液を氷冷下加え、振とう攪拌した。2時間の反応後、得られた KSH-2(45)の導入率を求めると 20%であった。

Entry 2 に示すように、Arg<sub>8</sub> フラグメント **50** の反応時間を 8 時間に延長すると導入率は 77% に向上した。Entry 3 に示すように、Arg<sub>8</sub> フラグメント **50** の反応時間を更に 16 時間に延長すると 87% の良好な導入率をもって KSH-2 (**45**) が生成することが明らかになった。一方、Entry 4 に示すように Npys-Cl 型樹脂 **51** の調製における塩素化の反応時間を 4.5 時間とすると導入率の低下 (59%) が見られた。そこで Entry 3 の条件を最適条件として、実際に SH 基を有する化合物に対する Arg<sub>8</sub> 導入反応を行った。

### 第三節 SH 基を有する化合物へのオリゴアルギニン導入反応

KSH-2 (**45**) の Arg<sub>8</sub> 導入の性能を評価するためにモデル実験として、SH 基を有する化合物としてカプトプリル **43** に対する Arg<sub>8</sub> 導入反応を行った (Scheme 23)。



Scheme 23. KSH-2 (**45**) を用いたカプトプリル **43** へのオクタアルギニン導入反応

カプトプリル **43** と Table 4 における最適条件の下合成された KSH-2 (**45**) を 4 当量水中室温下で混合し、振とう攪拌することで Arg<sub>8</sub> 導入反応をおこなった。反応溶液に残存するカプトプリル **43** と生成する Arg<sub>8</sub> 架橋体 **58** を HPLC により分析することで、反応の進行を追跡した (Figure 13)。

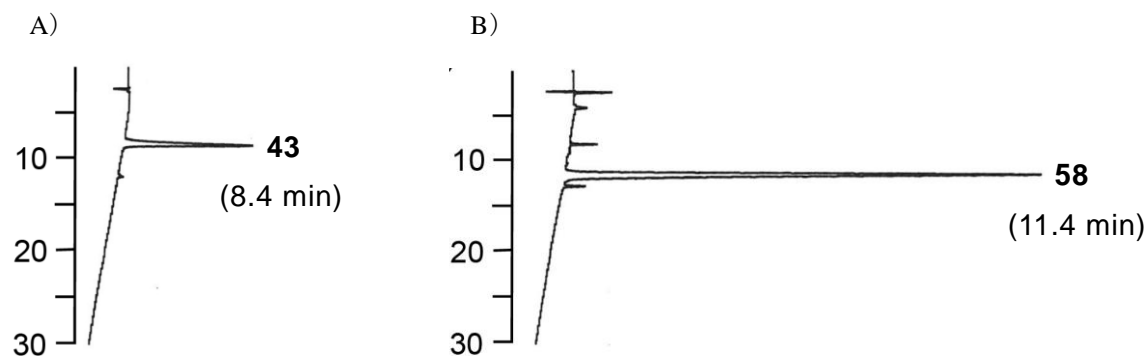


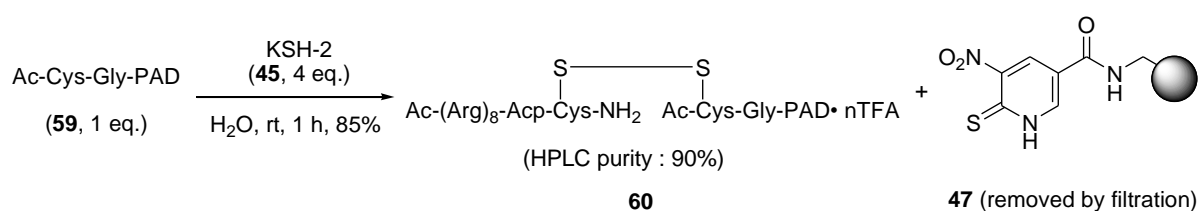
Figure 13. KSH-2 (**45**) を用いたカプトプリル **43** へのオクタアルギニン導入反応における HPLC 分析のチャート A) 反応開始時の反応溶液 B) 30 分後の反応溶液

HPLC conditions: YMC-pack ODS-AM (4.6 × 150 mm) with a linear gradient of 0.1% TFA-CH<sub>3</sub>CN (100:0–60:40 over 30 min) at a flow rate of 0.9 mL/min, detection at 230 nm.

反応直後に検出されていたカプトプリル **43** に対応する HPLC のピークが、30 分後の分析においては検出されず、HPLC 純度 96% の新たなピークを検出した。反応溶液を濾過し、濾液を集め、凍結乾燥することで白色固体を得た。得られた固体を質量分析に付したところ、所望の Arg<sub>8</sub> 架橋体 **53** に対応する結果が得られた。すなわち、当初の期待通り、精製することなく濾過のみで高純度のオリゴアルギニン架橋体を得る

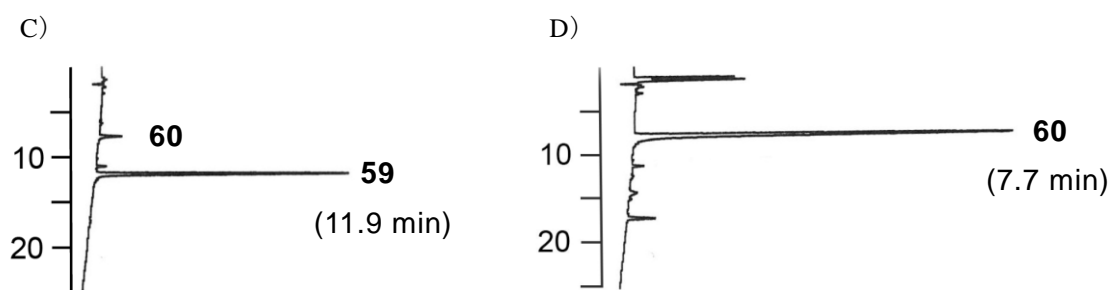
事ができた。また、凍結乾燥後の収率は 55% (架橋体 **53** は 8TFA 塩であるものとして計算した) であった。これにより、KSH-2 (**45**) は SH 基を有する化合物と官能基選択的に反応し、Arg<sub>8</sub> が導入された架橋体を生成することが明らかになった。反応は室温下 30 分で進行し、精製をせずとも濾過のみで 96% の HPLC 純度で得られた

続いて、細胞死誘導ドメイン PAD<sup>18</sup>) より誘導したシステインを含む 16 残基のペプチド **52** (Ac-Cys-Gly-PAD : Ac-Cys-Gly-(D-Lys-D-Leu-D-Ala-D-Lys-D-Leu-D-Ala-D-Lys)<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>·nTFA salt) に対して KSH-2 (**45**) を用い Arg<sub>8</sub> 導入反応を行った (Scheme 24)。



**Scheme 24.** KSH-2 (**45**) を用いた PAD ペプチド **59** へのオクタアルギニン導入反応

Ac-Cys-Gly-PAD ペプチド **59** と KSH-2 (**45**) を 4 当量 (PAD ペプチド **59** を 6TFA 塩として計算した) 水中で室温下混合し、振とう攪拌することで Arg<sub>8</sub> 導入反応を行った。反応溶液に残存する Ac-Cys-Gly-PAD ペプチド **59** と生成する Arg<sub>8</sub> 架橋体 **60** を HPLC により分析することで、反応の進行を追跡した (Figure 14)。



**Figure 14.** KSH-2 (**45**) を用いた PAD ペプチド **59** への Arg<sub>8</sub> 導入反応における HPLC 分析 C) 反応開始時のチャート D) 1 時間後のチャート。

HPLC conditions: Waters Sunfire C18 (18.5 mm, 4.6 × 150 mm) with a linear gradient of 0.1% TFA-CH<sub>3</sub>CN (80:20–55:45 over 25 min) at a flow rate of 0.9 mL/min, detect at 230 nm.

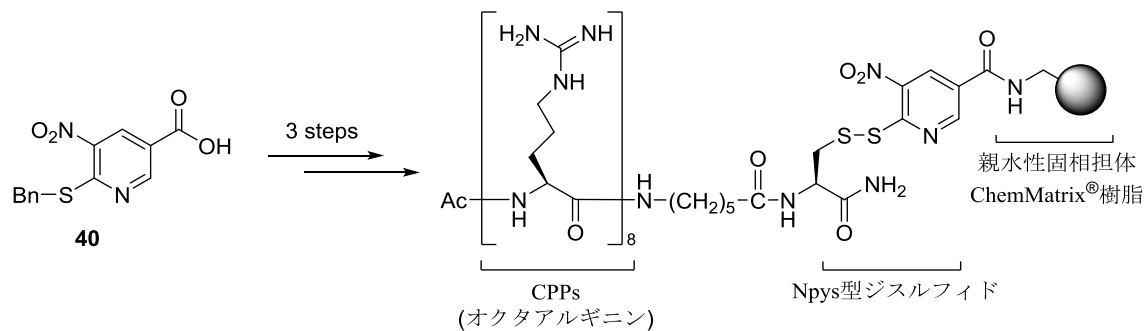
反応直後に検出されていた Ac-Cys-Gly-PAD ペプチド **59** に対応する HPLC のピークは、一時間後の分析においては検出されず、HPLC 純度 90% の新たなピークを検出した。反応溶液を濾過し、濾液を集め凍結乾燥することで白色固体を得た。得られた固体を質量分析に付したところ、所望の Arg<sub>8</sub> 架橋体 **60** に対応する結果が得られた。すなわち、導入する対象が SH 基を有するペプチドである場合においても、60 分で反



応が完結し、精製することなく濾過のみで良好な純度(90%)で Arg<sub>8</sub> 架橋体を官能基選択的に生成することが明らかになった。収率は 85% (架橋体 **60** を 14TFA 塩として計算した) と良好であり、**KSH-2(45)** はシステインを含むペプチドに対しても適用可能であったことから、**SH** 基を有する化合物に対する利便性の高い **CPP** 導入法としての利用が期待される。

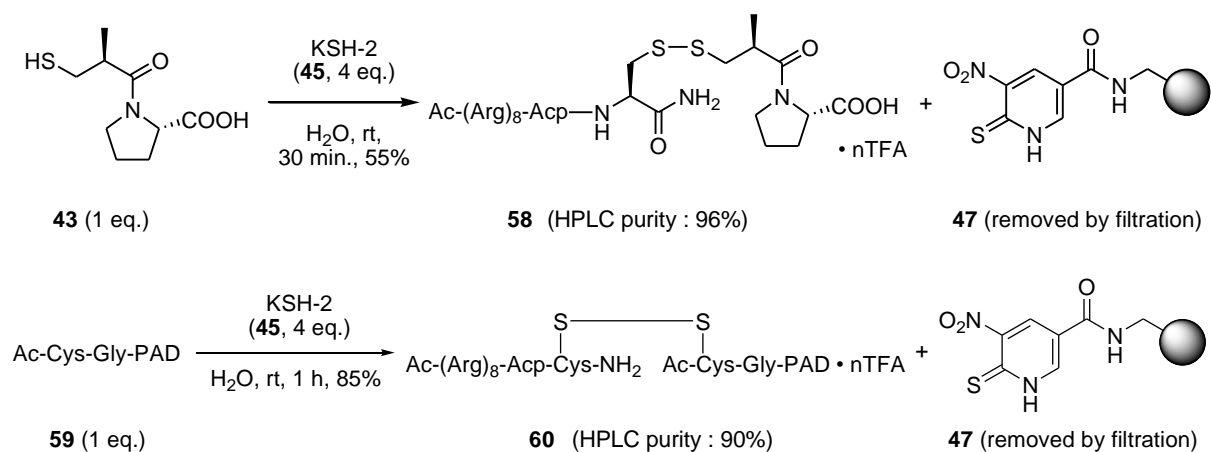
#### 第四節 小括

第二章では、SH 基を有する分子に細胞膜透過性ペプチド「オクタアルギニン Arg<sub>8</sub>」を付与する固相オリゴアルギニン化試薬 **KSH-2 (45)** の創製について述べた。**KSH-2 (45)** は、**KSH-1 (27)** と同様の考え方で設計し、第一章での合成中間体を出発物質として 3 工程で両親媒性樹脂上に Npys-Cl を構築し、これに Arg<sub>8</sub> ペプチドフラグメントを導入する事で、所望の **KSH-2 (45)** の合成に至った (**Scheme 25**)。



#### **Scheme 25.** 固相担持型 SH 基選択的オリゴアルギニン導入試薬 **KSH-2 (45)** の合成

標識試薬としての **KSH-2 (45)** の機能を 2 種の SH 基を含有する化合物、カプトプリル **43** およびシステインを含有する 16 残基のペプチド **Ac-Cys-Gly-PAD 59** をモデルに評価した。その結果、室温水溶液中 30 分から 60 分で反応が完結し、反応終了後濾過のみで比較的高純度 (96% および 90%) の Arg<sub>8</sub> 架橋体を得た (**Scheme 26**)。



#### **Scheme 26.** **KSH-2 (45)** を用いた SH 基選択的オリゴアルギニン導入反応

この結果から、本固相担持型試薬は SH 基を有する化合物と反応し、Arg<sub>8</sub> が導入された架橋体を 30 分から 1 時間という短時間で生成することが明らかになった。この試薬を用い反応を行うと、未反応の試薬や副生成物は反応の前後を通じて固相担体上に担持されているため、反応終了後に精製をせずとも濾過するのみで、目的物が高純度で得られる。したがって、細胞内機能探索研究や創薬研究における、被標識化合物の細胞膜透過性の向上に用いられる CPP を簡便に導入する方法として利用できる可能性が示された。

### 第三章 固相担持された Npys-Cl を活用した環状ジスルフィドペプチドの合成 序節

薬学やケミカルバイオロジーなどの有機合成化学をツールとした研究分野においては、研究の対象となる新規化合物が様々な官能基や物性をもち、複雑な構造を有することも多い。このため、狙いの化合物を効率的かつ高選択的に生成する、新しい反応や合成手法の開発は有機合成化学において重要な課題となっている。

有機合成化学において重要な結合の一つにジスルフィド結合があり、生理活性を有する多くの蛋白質やペプチドに見られる。ペプチドや蛋白質に見られるジスルフィドは、ペプチド鎖の環状化により立体構造を固定化することで、その生理機能の発現をもたらす重要な官能基である。このジスルフィドを有する生理活性ペプチドは数多く知られ、A) インスリン<sup>1)</sup>、B) カルシトニン<sup>2)</sup>、C) アパミン<sup>3)</sup>および D) ナトリウム利尿ペプチド<sup>4)</sup>など医薬品としても利用されている (Figure 15)。

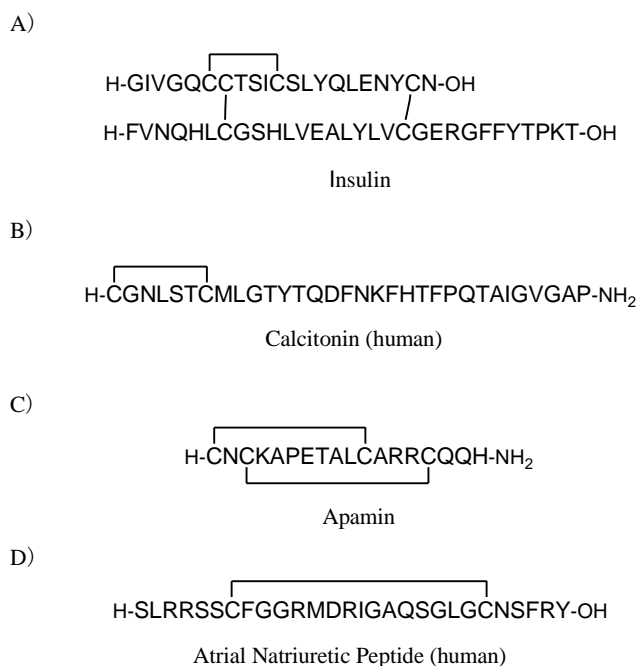


Figure 15. ジスルフィド結合を有する生理活性ペプチド

このため、ジスルフィドを合成する反応は、多くの生理活性物質の化学合成において欠かせないものとなっている<sup>5)</sup>。一方で、近年ジスルフィド結合を有する化合物は、Figure 16 に示すようにナノマテリアル分野の素材として、A) 自己組織化単分子膜 (SAMs)<sup>6)</sup>や、B) 単分子膜保護クラスターの構築<sup>7)</sup>、C) あるいは動的コンビナトリアルライブラリにおけるケージド化合物<sup>8)</sup>、D) カテナン<sup>9)</sup>、E) 大環状分子<sup>10)</sup>、F) デンドリ

マー<sup>11)</sup>および G) ミセル<sup>12)</sup>など超分子、高分子といった機能性分子の合成に用いられている。

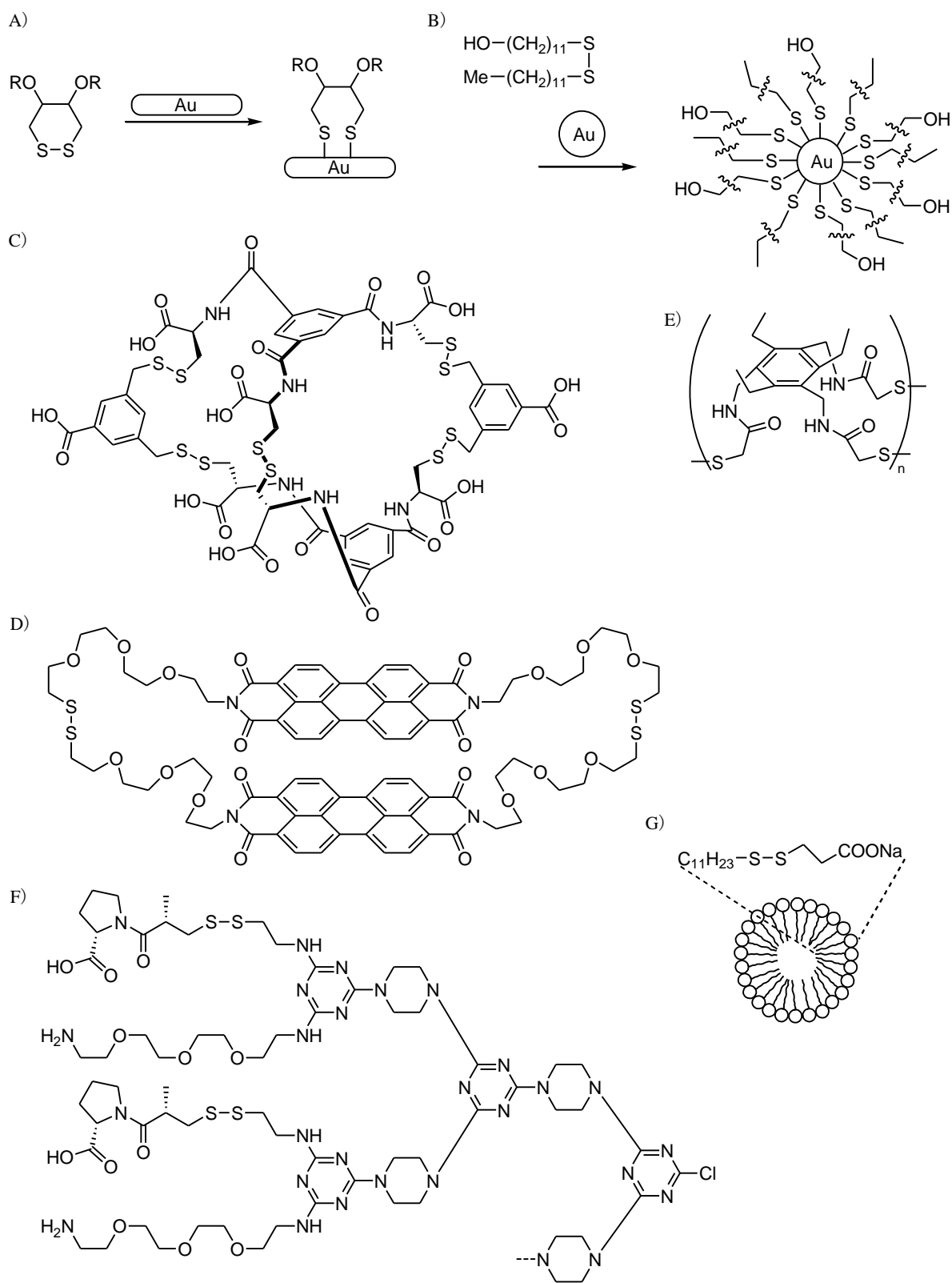
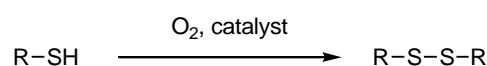


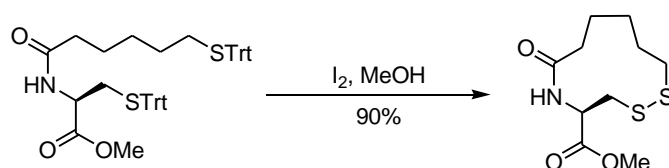
Figure 16. ナノマテリアル分野に活用される様々なジスルフィド化合物

ジスルフィド結合は、蛋白質中で酵素の働きにより形成される<sup>13)</sup>ことなどが知られているが、合成化学においては2つのチオールもしくはその誘導体より合成する方法が一般的である。その中で最も単純な方法としてチオールの酸化によりジスルフィドを合成する方法がある。酸化によるジスルフィド結合の生成は、空气中に存在する酸素により反応が進行するが、触媒の添加により反応が促進される(**Scheme 27**)。このとき用いられる触媒として、臭素<sup>14)</sup>、フェリシアン化カリウム<sup>15)</sup>、DMSO<sup>16)</sup>、塩化スルフルル<sup>17)</sup>などを用いることによりホモジスルフィドが得られる。



**Scheme 27.** ホモジスルフィドの合成

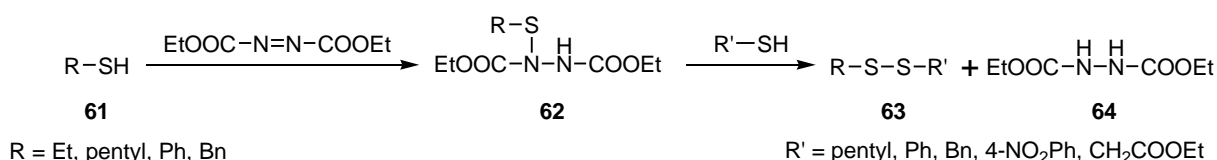
その他の空気酸化を促進する試薬として、ヨウ素も様々な条件下で広く用いられている<sup>18)</sup>。ヨウ素を用いたジスルフィド形成反応の特徴的な点として、保護されたSH基とも反応が進行することが挙げられる(**Scheme 28**)<sup>19)</sup>。



**Scheme 28.** トリチルチオエーテルのジスルフィドへの変換

空気酸化によるジスルフィドの合成は高収率にて目的物が得られるが、2種類のチオールから分子間で反応し、非対称ジスルフィドを合成しようとする場合には、ホモジスルフィドの生成が競合する問題がある。

選択的に非対称ジスルフィドを合成する手法として、1968年 Mukaiyama らは、酸化剤としてジエチルアゾジカルボキシレート(DEAD)を用いた2段階による非対称ジスルフィドの合成を報告している(**Scheme 29**)<sup>20)</sup>。



**Scheme 29.** DEAD を用いる 2 種類のチオールによる非対称ジスルフィド **63** の合成

DEAD とチオール **61** の反応による中間体 **62** の生成と、2 つ目のチオールとの反応における溶液は DEAD に由来した色の変化を伴う。これを観察することで反応の追跡が可能であった。この DEAD を用いる非対称ジスルフィドの合成法は、バンコマイシン誘導体の合成<sup>21)</sup>や、ワンポットによる糖ジスルフィドの合成<sup>22)</sup>において用いられている。また、DEAD と同じくジアゾ型酸化剤であるジイソプロピルカルボキシレート (DIAD)<sup>23)</sup>、テトラメチルアゾジカルボキシレート (TMAD)<sup>24)</sup>、および 4-フェニル-1,2,4-トリアゾリン-3,5-ジオン (PTAD)<sup>25)</sup> を用い、2 種類のチオールより非対称ジスルフィドを合成する方法も報告されている (Figure 17)。

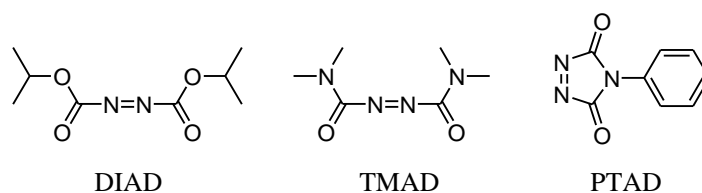
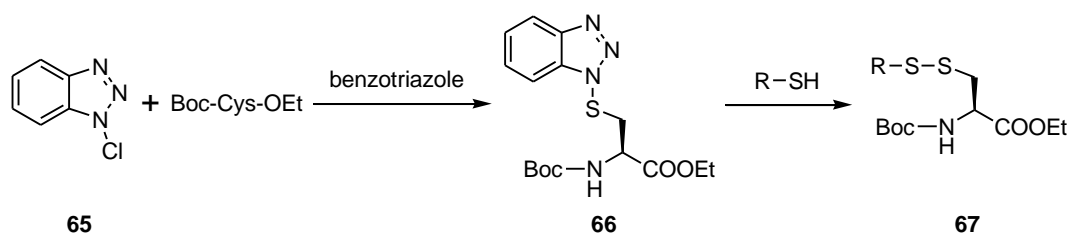


Figure 17. 2 種類のチオールより非対称ジスルフィドの合成に用いられるジアゾ型酸化剤

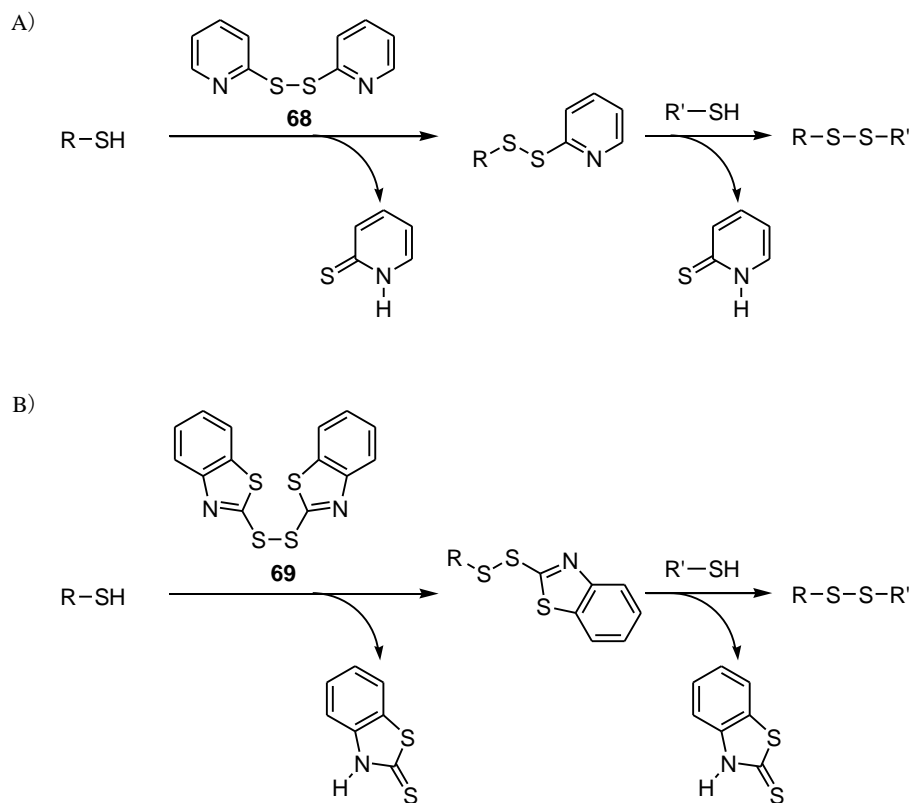
ジアゾ型酸化剤と同じく、試薬が 1 つのチオールとの活性な中間体を形成し、ジスルフィドを合成する方法として、1-クロロベンゾトリアゾール誘導体 **65** を用いる方法がある (Scheme 30)<sup>26)</sup>。



Scheme 30. 1-クロロベンゾトリアゾール **65** を用いる非対称ジスルフィドの合成

この方法では、1-クロロベンゾトリアゾール **65** と、保護システインから活性な中間体 **66** が生成し、続いてアルキルチオールを加える事で非対称ジスルフィド **67** が得られる。

しかし、上述した方法はいずれも **SH** 基以外のカルボキシル基やアミノ基の置換基は保護されている必要があり、適用できる基質に制限があった。**SH** 基と選択的に反応し、非対称のジスルフィド結合を形成する方法として、活性なジスルフィド結合を有するジピリジルジスルフィド **68**<sup>27)</sup>や 2,2'-ジチオビス(ベンゾチアゾール) **69**<sup>28)</sup>による合成法が知られている (**Scheme 31**)。



**Scheme 31.** 活性なジスルフィドを有する試薬を用いる非対称ジスルフィドの合成。A)ジピリジルジスルフィド **68**、B)2,2'-ジチオビス(ベンゾチアゾール) **69**

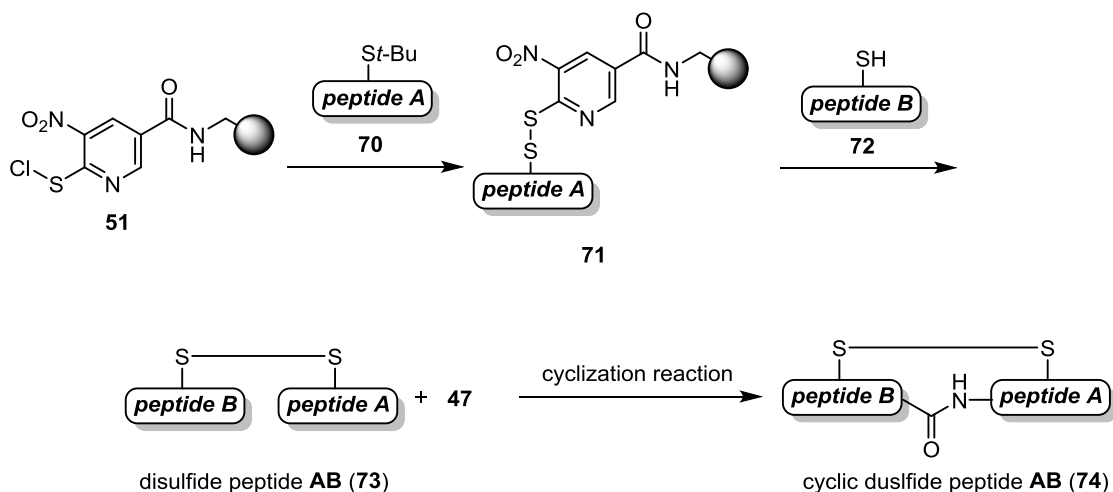
これらの方法では、アミノ基、カルボキシル基、ヒドロキシル基、ハロゲン化アルキル存在下においても **SH** 基選択的に反応が進行する。しかし、いずれの場合においても中間体である活性なジスルフィドの生成段階において、一部ホモジスルフィドが副生成物として生成する。この事象は、特にホモジスルフィドと非対称ジスルフィドの構造や物性が似ている場合には、分離精製を困難にする。

システイン含有ペプチドの合成において、固相担体上でジスルフィド結合を形成する手法は、液相による手法と比べて大きな恩恵がある。例えば、溶解性の異なる2種のチオールを段階的に結ぶことができ、この時濾過のみで不要物を除去できるため、煩雑な精製や凍結乾燥を省略できる等の利点が考えられる。



最近では Galanis、Albericio らは 2 つのジスルフィド環構造を有する 16 残基のペプチド  $\alpha$ -コノトキシシン MII の合成において、固相上で 2 つのジスルフィド結合を掛け分けている<sup>29)</sup>。また、Postma、Albericio らは、固相上に担持された NCS (*N*-クロロスクシンイミド) を用い環状ジスルフィドを合成している<sup>30)</sup>。

筆者は前章で KSH-2 (45) が SH 基を持つ化合物にオクタアルギニンを導入し、非対称のジスルフィド結合を形成しながらオクタアルギニン複合体が得られることを明らかにした。KSH-2 (45) の合成は保護されたシステインが固相上に担持された Npys-Cl 51 と Npys 型ジスルフィドを形成することにより達成される。つまり、KSH-2 (45) の合成からチオールとのジスルフィド形成にかけた一連の反応は、2 種類のチオールより非対称ジスルフィドを形成する技術とみることが出来る。筆者らは、固相に担持された Npys-Cl 51 は、2 種類のシステインを含有するペプチド同士を選択的にジスルフィド結合で連結させることができ、有用な環状ジスルフィド合成法になりえると考えた (Scheme 32)。



**Figure 32.** Npys を活用した固相ジスルフィドライゲーション (SPDSL)

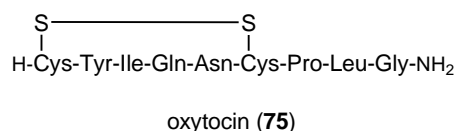
つまり、Npys-Cl 51 が Fmoc ペプチド固相合成法で合成された側鎖が *t*Bu 保護されたシステインペプチド A (70) と反応すると Npys と *t*Bu チオエーテルの交換を経て活性な Npys 型ジスルフィド 71 が得られる。この固相化合物 71 は SH 基を有するもう 1 方のシステインペプチドフラグメント 72 と反応し、非対称ジスルフィドペプチド 73 が得られる。

この際、副生物である固相化合物 47 は KSH-2 (45) のシステムと同様に濾過のみで除去することができ、その結果、非対称ジスルフィド 73 が高純度で得られると期待された。そして常法によるアミド化により環化反応を行うことでジスルフィド結合を

持つ環状ペプチド **68** が効率よく合成出来るものと考えられた。この手法は、保護チオールと無保護のチオールより非対称ジスルフィドを形成し、常法により環化を行う、環状ジスルフィドの合成における新たなアプローチ「固相ジスルフィドライゲーショ  
ン(SPDSL : Solid Phase Di-Sulfide Ligation)」と呼べるものである。この発想を実証す  
るべく研究に着手した。

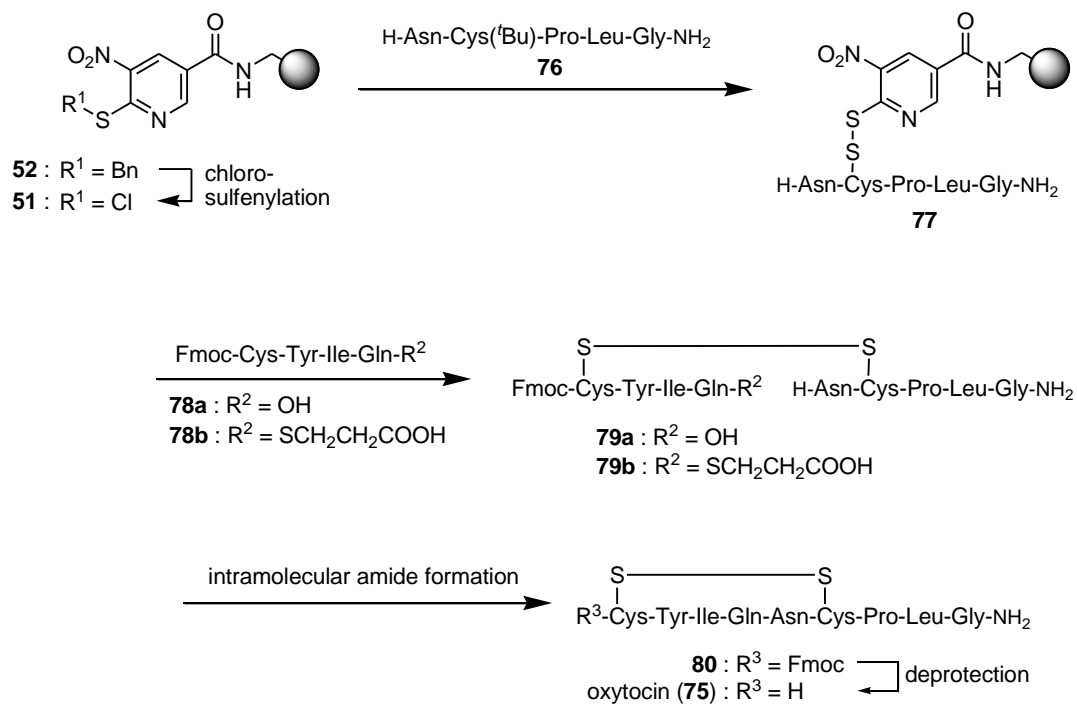
## 第一節 固相担持された Npys-Cl の合成とペプチドの導入

この固相ジスルフィドライゲーション (SPDSL) を実際に 9 残基からなる環状ジスルフィドペプチドであり、子宮筋収縮作用が知られる脳下垂体後葉ホルモン、オキシトシン<sup>31)</sup> **75** の合成に適用することで証明することにした (**Figure 18**)。



**Figure 18.** 脳下垂体後葉ホルモン、オキシトシン **75**

合成の計画を **Scheme 33** に示した。KSH-2 合成と同様に、固相化されベンジルスルフィド **52** を塩素化することにより、固相担持された Npys-Cl **51** を合成する。Rink amide resin を用いた一般的な Fmoc-based SPPS により合成できる <sup>t</sup>Bu 保護システインを持つペプチドフラグメント **76** を作用させると、樹脂上の Npys と活性なジスルフィドを形成しながら樹脂に取り込まれ活性な Npys 型ジスルフィド **77** を生成する。これに SH 基を有するペプチドフラグメント **78a** および **78b** を作用させることでそれぞれ非対称ジスルフィド **79a** および **79b** を得る。

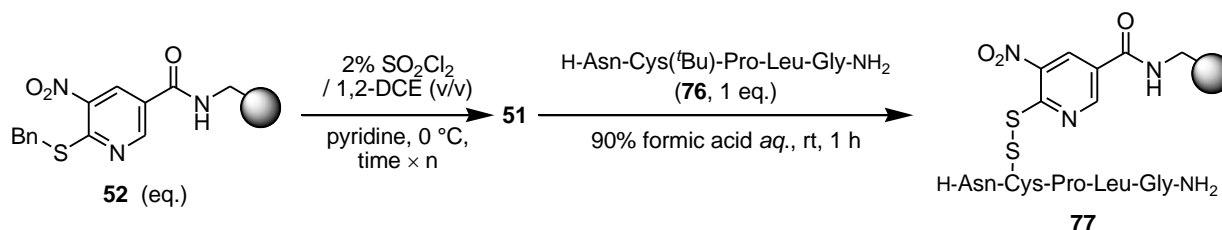


**Scheme 33.** SPDSL によるオキシトシン **75** の合成計画

**78a** は一般的な Fmoc ペプチド合成法により合成が可能であり、**79b** は Hojo らによる安定なチオエステルリンカーを持つペプチド合成法<sup>32)</sup>により合成する。これらを分子内で環化することで、どちらも N 末端が保護されたオキシトシン **80** が得られる。この時、**79a** は縮合反応による環化、**79b** は Asahina らにより報告されている塩化銀を用いたケミカルライゲーション<sup>33)</sup>により環化する。そして N 末端の保護基を脱保護によりオキシトシン **75** を得る戦略である。

はじめに、ベンジルスルフィド樹脂 **52** の塩素化反応とオキシトシンのペプチドフラグメント **76** の樹脂への導入反応を行った。ベンジルスルフィド樹脂 **52** を 2% 塩化スルフルルの 1,2-DCE 溶液で塩素化し、得られた Npys-Cl 型樹脂 **51** を溶媒で洗浄した後、フラグメント **76** を加え、1 時間反応した。このとき、反応の進行にしたがい溶液中のフラグメント **76** の量が減少するため、溶液中に存在するフラグメント **76** の量を HPLC により追跡することで樹脂への導入率を算出し、この反応における最適条件の検討を行った (Table 6)。

**Table 6.** ベンジルスルフィド樹脂 **52** の塩素化およびフラグメント **76** の導入における最適条件の検討



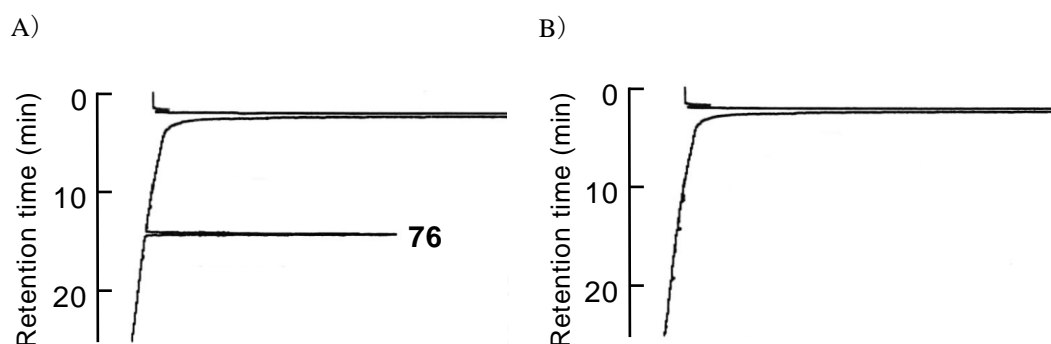
Entry	Amount of resin <b>52</b> (eq.) <sup>(a)</sup>	Chlorosulfenylation <sup>(b)</sup>		Loading yield (%) <sup>(c)</sup>
		Reaction time	Number of times	
1	1.5	2 h	3	51
2	2	2 h	3	95
3	3	2 h	3	100
4	5	2 h	3	100
5	5	1 h	3	98
6	5	3 h	1	86
7	3	20 min	3	70
8	5	20 min	3	100

(a) Equivalent of resin **52** to peptide **76**.

(b) Resin **52** was treated with 2% SO<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> / 1,2-DCE (v/v%) at 0 °C.

(c) Loading yield (%) of peptide **76** was calculated from the HPLC peak area of residual peptide **76** in the reaction solution after vortex stirring for 1 h.

Entry 1 に示すようにペプチドフラグメント **76** に対し 1.5 当量のジスルフィド樹脂 **52** を用い、2 時間の塩素化反応を 3 回繰り返し行った。ペプチドフラグメント **76** を加え、1 時間攪拌すると 51% の樹脂への取り込みが観察された。Entry 2 に示すように用いる樹脂 **52** を増やすと取り込み量が向上 (95%) し、Entry 3 および 4 に示すように 3 から 5 当量の樹脂を用いると完全に反応が進行した。Entry 4 の条件において、Entry 5 に示すように塩素化の時間を短縮 (1 時間) する、あるいは Entry 6 に示すように塩素化反応の回数を 1 回とするとペプチドフラグメント **76** が残存する結果 (各々 98% および 86%) となった。そこで、塩素化の回数を 3 回に固定し、塩素化の反応時間 (30 分) の短縮を試みた。Entry 7 に示すようにペプチドフラグメント **76** に対し 3 当量のジスルフィド樹脂 **52** を用いると反応は完結しなかったが、Entry 8 に示すように用いると樹脂の量を 5 当量とすると、塩素化の反応時間を 20 分に短縮しても反応が完全に進行することが明らかとなった。この Entry 8 の最適条件における HPLC は Figure 19 に示すように推移し、反応開始時に検出されたピークが 1 時間の反応後には消失した。



**Figure 19.** Npys-Cl 型樹脂 **51** へのペプチドフラグメント **76** の導入反応 (Entry 8) における HPLC 分析 A) 反応開始時 B) 1 時間の反応後

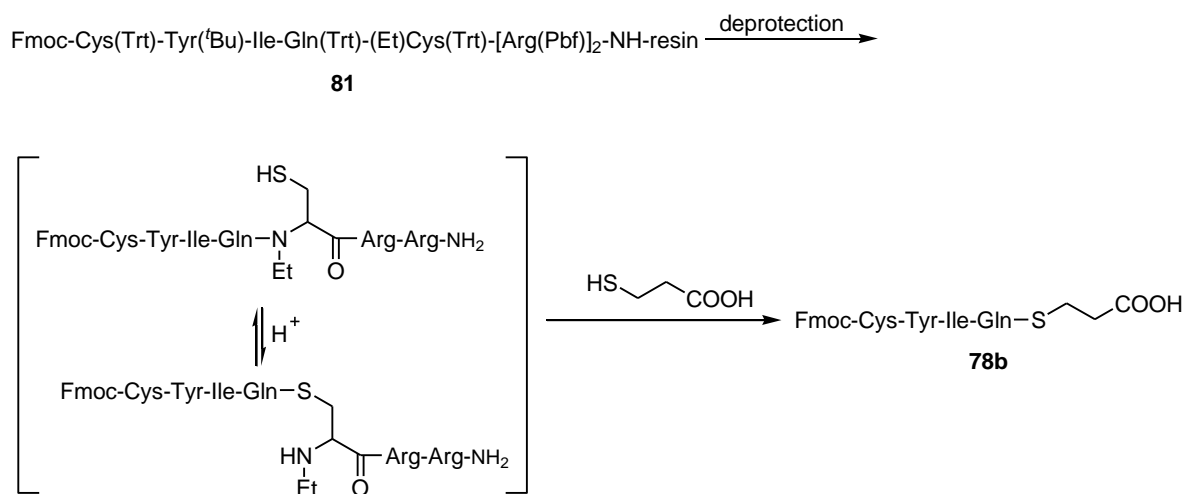
HPLC conditions: A linear gradient starting from 5% CH<sub>3</sub>CN in 0.1% aqueous TFA to 55% CH<sub>3</sub>CN in 0.1% aqueous TFA over 25 min at a flow rate of 0.9 mL/min, and detection at 230 nm.

このように固相化されたジスルフィド型樹脂 **52** は 2% 塩化スルフルルの 1,2-ジクロロエタン溶液を 20 分間の反応を 3 回繰り返すことによって、固相担持された Npys クロライドが得られることを明らかにした。ここで塩素化反応を行った段階の樹脂 **51** に元素分析を行った。その結果、原料樹脂上のアミノ基置換率 (0.70 mmol / g) を元に算出した推定元素組成に比して、塩素含量は理論値の 66% 程度であることが分かった。(Anal. Calcd for C<sub>142.62</sub>H<sub>263.24</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>6</sub>O<sub>68.31</sub>S<sub>2</sub>: C, 52.06; H, 8.06; Cl, 2.16; N, 2.55; O, 33.22; S, 1.95; Found: C, 46.55; H, 7.75; Cl, 1.42; N, 2.51; O, 34.88; S, 3.49;).

この差異の原因は分析に際して塩素が脱離した、あるいは樹脂が吸湿した等の複数の理由によると考えている。最適条件下においては。樹脂をペプチドフラグメントに対し5当量用いることから、実際に塩素化反応の進行を66%と仮定としても十分量(3.3当量)が反応していると判断し、そのまま検討を進めた。

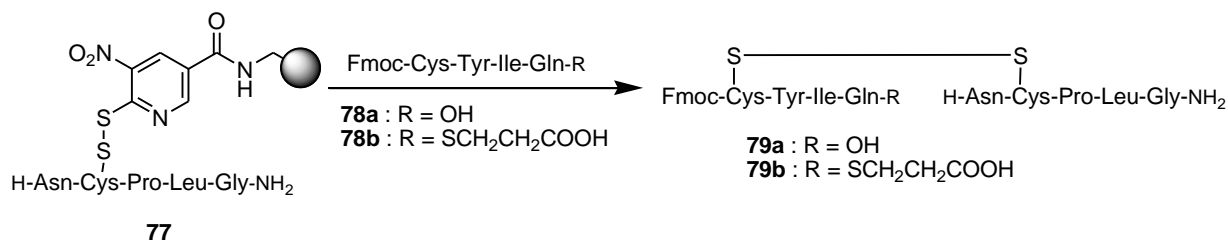
## 第二節 固相ジスルフィドライゲーションによる非対称ジスルフィドペプチドの合成

続いて、ペプチドフラグメント **78a**、**78b** の合成を行った。ペプチドフラグメント **78a** は Wang resin を用いた一般的な Fmoc-based SPPS により合成し、HPLC により精製することで合成出来た。ペプチドフラグメント **78b** は前述の通り Hojo らの方法に従い合成した (Scheme 34)。すなわち、Rink amide resin を使い、Fmoc 合成法により樹脂 **81** を合成し、脱樹脂反応の後メルカプトプロピオン酸を作用させることでペプチドフラグメント **78b** が得られ、HPLC による精製後用いた。



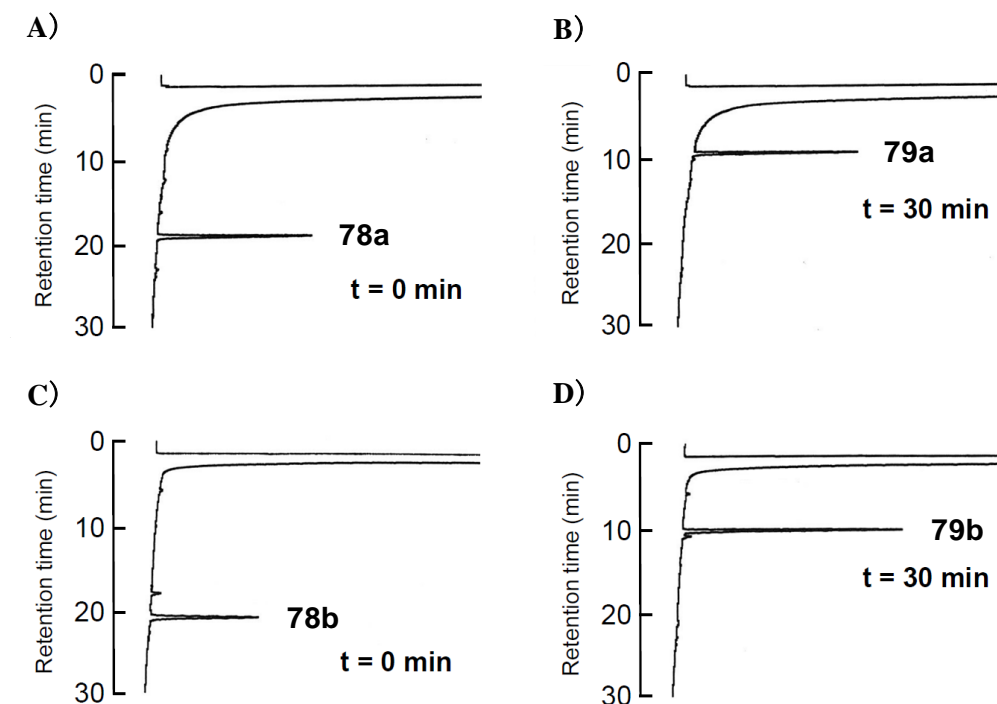
**Scheme 34.** ペプチドフラグメント **78b** の合成

第一節において明らかとなった最適条件下で合成された活性な Npys ジスルフィド型樹脂 **77** に対し、各々0.83当量のペプチドフラグメント **78a** および **78b** を DMF : 水 = 2 : 1 溶媒中に加え、室温下攪拌することで「固相ジスルフィドライゲーション (SPDSL)」による非対称ジスルフィド **79a** および **79b** の合成を行った (Scheme 35)。



**Scheme 35.** SPDSL による非対称ジスルフィドの合成

反応の進行を HPLC により分析すると、反応直後に観察された **78a**、**78b** に対応するピークは 30 分後には完全に消失し、それぞれ新たなピークを検出した。これを質量分析に付すことで、目的のペプチド **79a**、**79b** に相当する化合物が得られたことを確認した (Figure 20)。



**Figure 20.** 非対称ジスルフィド形成における HPLC チャート

A), B) ペプチド **78a** と樹脂 **77** の反応 A) 反応開始時 B) 反応 30 分後

C), D) チオエステルペプチド **78b** と樹脂 **77** の反応 C) 反応開始時 D) 反応 30 分後

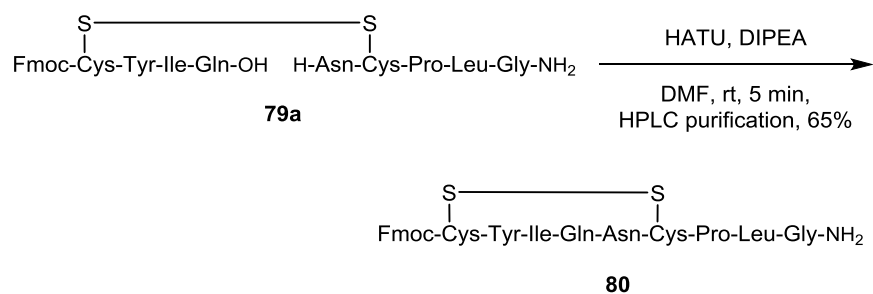
HPLC conditions: Waters SunFire™ C18 (18.5 mm, 4.6 x 150 mm) with a linear gradient starting from 30% CH<sub>3</sub>CN in 0.1% aqueous TFA to 60% CH<sub>3</sub>CN in 0.1% aqueous TFA over 30 min at a flow rate of 0.9 mL/min and detection at 230 nm.

また、当初の期待通りに、いずれの反応においても樹脂と混合した後は精製せずに濾過のみで、高純度のペプチドを得ることが出来た (**79a**:96%、**79b**:94%)。加えて良好な収率 (**79a**:70%、**79b**:63%) で対応するジスルフィドペプチドが得られ、筆者が考案したジスルフィドライゲーションの有意性を支持する結果となった。特に **79b** を用い合成した場合は、チオエステルの分解やホモジスルフィドの形成は確認されなかった。このことから、この手法はチオエステルを基盤とするケミカルライゲーション法と組み合わせて用いることが出来、汎用性を期待される結果となった。



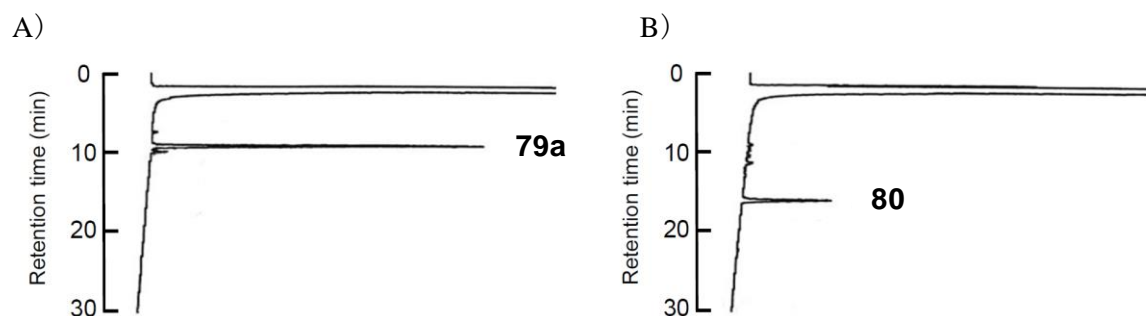
### 第三節 オキシトシンの合成

続いて、ジスルフィドペプチド **79a** 及び **79b** の分子内環化反応の検討を行った。ジスルフィドペプチド **79a** は一般的なペプチド合成に用いられる縮合反応により反応を行った (**Scheme 36**)。



**Scheme 36.** ジスルフィドペプチド **79a** の分子内環化反応

ジスルフィドペプチド **79a** の DMF 溶液 (10 mM) に DIPEA (2.5 eq.) と HATU (1.5 eq.) を加え、HPLC により反応を追跡すると 5 分後にペプチド **79a** に対応するピークは消失し、新たなピークが確認された (**Figure 21**)。

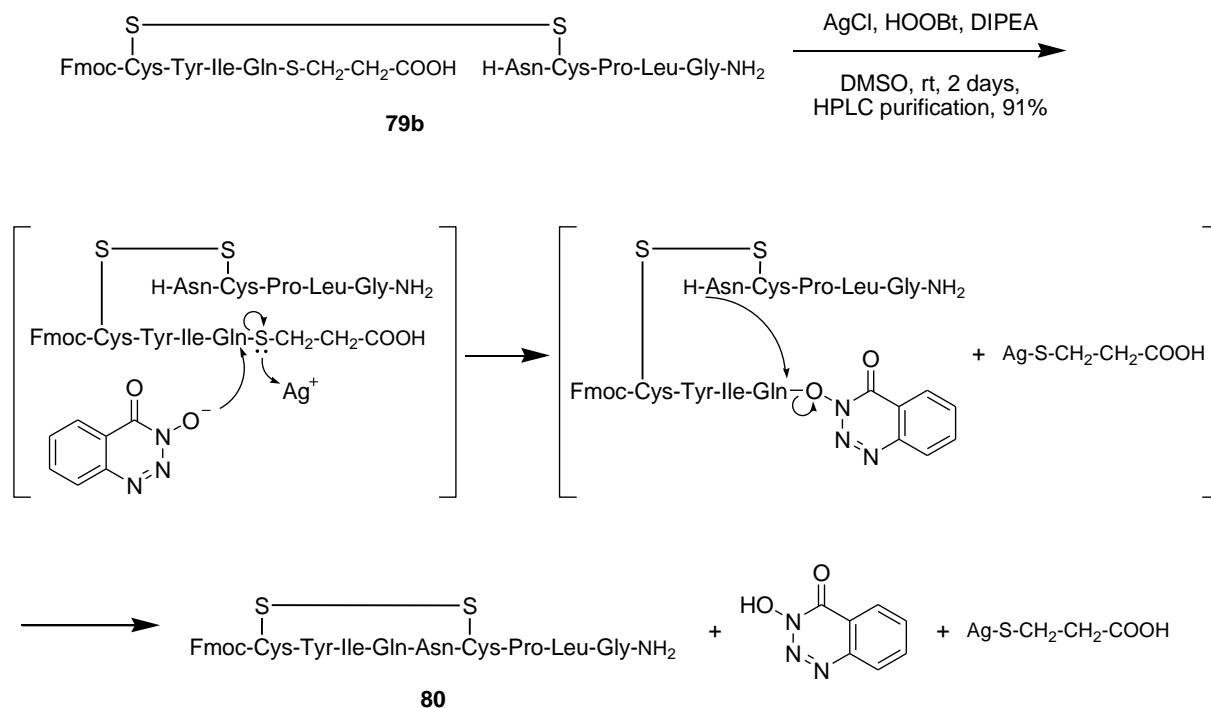


**Figure 21.** 常法のアミド化による **79a** の環化反応 A) 反応開始時、B) 5 分後。

HPLC conditions: Waters SunFire™ C18 (18.5 mm, 4.6 x 150 mm) with a linear gradient starting from 30% CH<sub>3</sub>CN in 0.1% aqueous TFA to 60% CH<sub>3</sub>CN in 0.1% aqueous TFA over 30 min at a flow rate of 0.9 mL/min and detection at 230 nm.

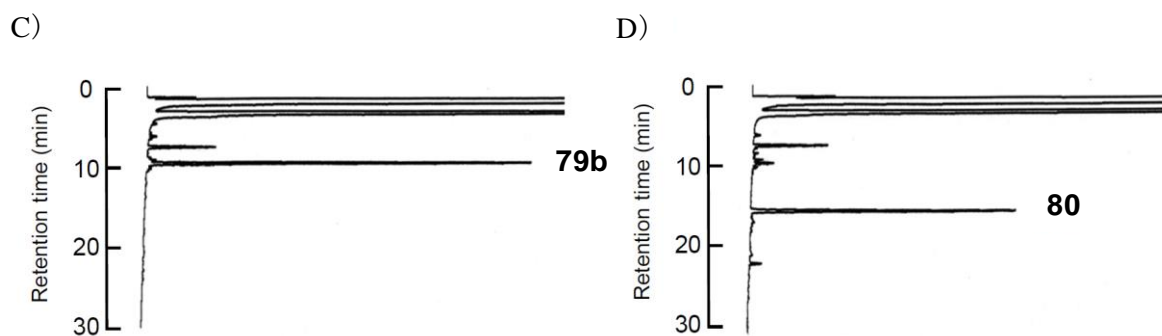
反応溶液を一部取り、MS により分析すると目的とする環状ジスルフィドペプチドに相当する結果が得られた。(HRMS (ES<sup>+</sup>) calcd for C<sub>58</sub>H<sub>77</sub>N<sub>12</sub>O<sub>14</sub>S<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup> 1229.5124, found 1229.5129.)濃縮後、HPLC により精製を行うことで 65% の収率で目的とする N

末端保護オキシトシン **80** が得られた。ジスルフィドペプチド **79b** を用いた環化反応は Asahina らの手法に則り、Ag(I)イオン存在下のケミカルライゲーション法により分子内環化反応を行った (Scheme 37)。



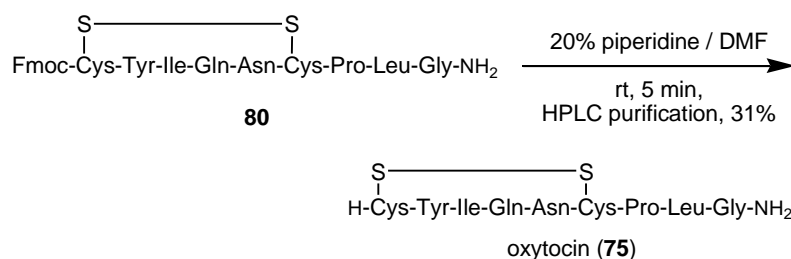
**Scheme 37.** ジスルフィドペプチド **79b** のケミカルライゲーションによる環化反応<sup>34)</sup>

**79b** の DMSO 溶液 (10 mM) に HOObt (15 eq.), DIPEA (7.5 eq.) と微量の塩化銀(I)を加え、遮光下室温で攪拌した。2 日間の反応後、HPLC により反応を追跡すると **79b** に対応するピークは消失し、Figure 22 B)におけるピークと同じ位置に新たなピークが出現した (Figure 22)。濾過により不溶物を除去し、濾液に溶解しているペプチドを HPLC にて精製を行い、凍結乾燥を行うと白色固体が得られた。質量分析を行ったところ、目的とする N 末端保護オキシトシン **80** と合致する結果が得られ、収率は 91% であった。



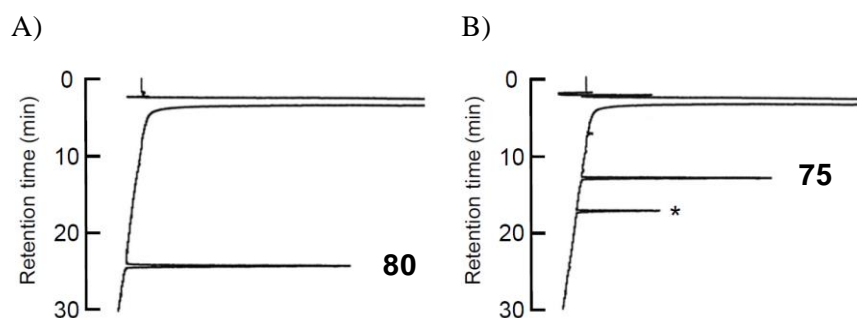
**Figure 22.** ケミカルライゲーションによる **79b** の分子内環化反応 C) 反応開始時 D) 2 日後  
HPLC conditions: Waters SunFire™ C18 (18.5 mm, 4.6 x 150 mm) with a linear gradient starting from 30% CH<sub>3</sub>CN in 0.1% aqueous TFA to 60% CH<sub>3</sub>CN in 0.1% aqueous TFA over 30 min at a flow rate of 0.9 mL/min and detection at 230 nm.

最後に Fmoc 保護オキシトシン **80** の脱保護反応を行った (**Scheme 38**)。



**Scheme 38.** ペプチド **80** の脱保護によるオキシトシン **75** の合成

Fmoc 保護ペプチド **80** に 20% piperidine/DMF を加え、室温下攪拌した。反応の進行を HPLC にて追跡すると、反応開始から 5 分後にペプチド **80** に対応するピークは消失し、新たなピークを認めた (**Figure 23**)。HPLC により保持時間 13 分の画分を精製し、得られた白色固体を質量分析に付したところ、オキシトシンに相応する結果が得られ、収率は 31% であった。



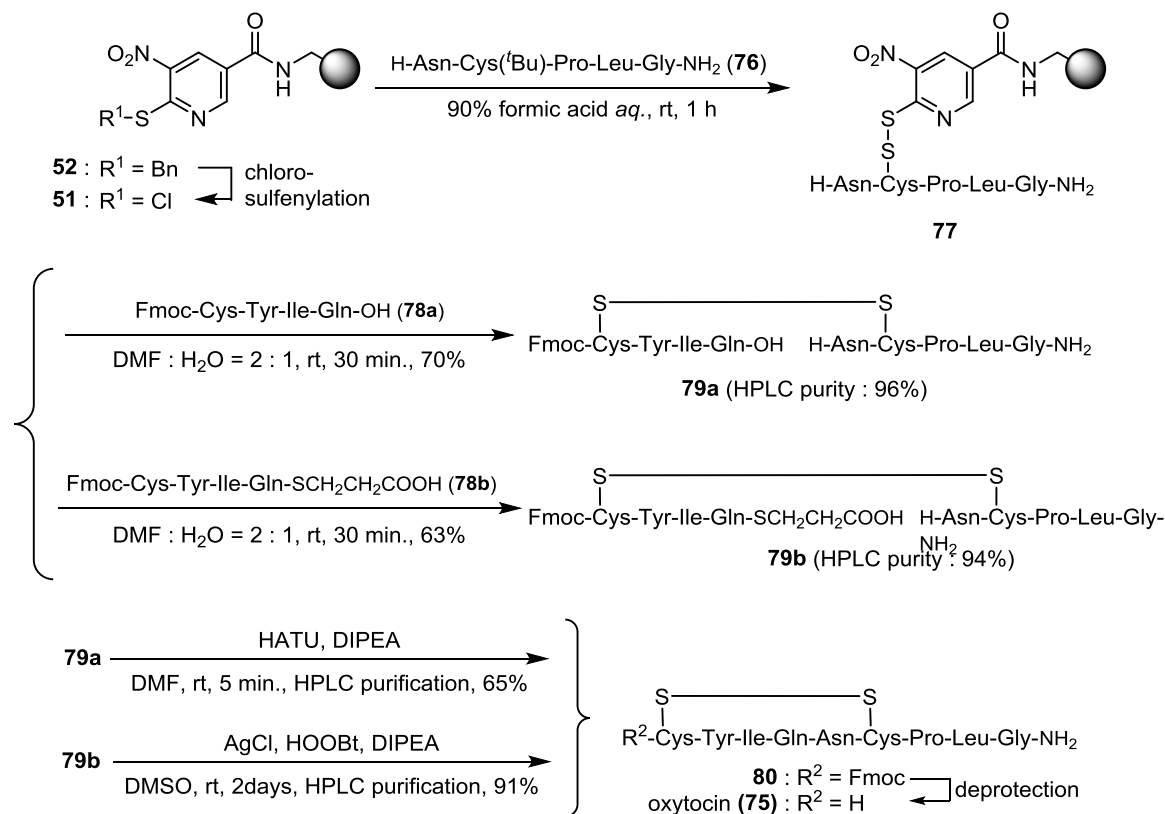
**Figure 23.** 保護ペプチド **80** の脱保護によるオキシトシン **75** の合成 A)反応開始時 B)5 分後  
 \*非ペプチドのピーク (保護基由来の Fmoc ピペリジンアミド)

HPLC conditions: Waters SunFire™ C18 (18.5 mm, 4.6 x 150 mm) with a linear gradient starting from 5% CH<sub>3</sub>CN in 0.1% aqueous TFA to 65% CH<sub>3</sub>CN in 0.1% aqueous TFA over 30 min at a flow rate of 0.9 mL/min with detect at 230 nm.

また、市販のオキシトシンを HPLC にて分析することで、**75** と同等の結果が得られることを確認し、新しい非対称ジスルフィド合成手法「SPDSL」がオキシトシンの合成に実際に適用可能であることを明らかにした。

#### 第四節 小括

第三章では、これまでの固相担持型試薬 **KSH-1 (27)** や **KSH-2 (45)** の特長である、**SH** 基選択的に非対称ジスルフィド結合を構築する戦略に基づいて、環状ジスルフィドペプチドの新規合成手法「ジスルフィド先導型環状ペプチド合成」という概念をオキシトシン **75** の合成を通して明らかにした (**Scheme 39**)。



**Scheme 39.** SPDSL を基軸としたオキシトシン **69** の全合成

固相に担持された Npys-Cl **71** に **SH** 基が保護されたペプチド **76** を導入し、2 種類のペプチド **78a**、**78b** を反応させた。この固相に担持された Npys 型ジスルフィド **77** は、**SH** 基を有する化合物と官能基選択的に反応し、30 分という短時間で非対称ジスルフィドを生成し、反応後濾過するのみでそれぞれ高純度(96%および 94%)でオキシトシンの前駆体となる非対称ジスルフィドが得られた。この保護されたチオールと無保護のチオール間で選択的に非対称ジスルフィドを生成する反応は「固相ジスルフィドライゲーション法(SPDSL)」と呼べる方法であり、煩雑な精製を必要とせず、濾過のみで高純度の目的物が得られる特長を有する。また、近年広く利用されているケミカルライゲーション法に不可欠であるチオエステルを有するペプチドに対して適用した場

合においても、チオエステルが加水分解されることなく非対称ジスルフィドを生成することも見出した。この幅広い応用が期待される新手法は、ペプチド合成を始めとした合成化学において有用な手法となり得るものと期待する。

## 実験の部

本実験で用いた分析機器等は以下の通りである。

### <sup>1</sup>H-NMR スペクトル

Varian Mercury-300 NMR Spectrometer (300 MHz)

Bruker AM-400 NMR (400 MHz)

重クロロホルム、重メタノール、重 DMSO 中で測定した <sup>1</sup>H-NMR スペクトルは、テトラメチルシランを内部標準として ppm で示した。

### <sup>13</sup>C-NMR スペクトル

Bruker AM-400 NMR(100 MHz)

重クロロホルム中で測定した <sup>13</sup>C-NMR スペクトルは重クロロホルムのピーク 77.16 ppm を基準として ppm で示した。

重メタノール中で測定した <sup>13</sup>C-NMR スペクトルは重メタノールのピーク 49.00 ppm を基準として ppm で示した。

重 DMSO 中で測定した <sup>13</sup>C-NMR スペクトルは重 DMSO のピーク 39.52 ppm を基準として ppm で示した。

NMR スペクトルの記載は次の略号に従うものとする。

s:singlet, d:doublet, t:triplet, dt:doubletriplet q:quartet, m: multiplet, br :broad singlet

### 赤外吸収スペクトル (IR)

日本分光株式会社 FT/IR-4100

### 単結晶 X 線構造解析

Bruker Apex2 Ultra

元素分析装置(東京薬科大学薬学部中央分析センター、窒素分析)

Elementar Varo EL

ヤナコ分析工業 MT-6

元素分析装置(京都大学薬学部微量元素分析センター、硫黄・塩素分析)

三菱化学アナリテック AQF-100(自動燃焼装置)

ダイオネクス ICS-1500 (イオンクロマト)

ダイオネクス IonPac AS-12A

#### 質量分析装置

Waters q-TOF Ultima API

#### 融点

Yanaco MP500P

#### 高速液体クロマトグラフィー

分析用逆相液体クロマトグラフィー構成

Hitachi L-6200 Intelligent Pump

Hitachi L-6200 Pump

Hitachi L-4000 Detector

Hitachi L-2500 Chromato-Integrator

YMC-Pack ODS-AM 150×4.6 mm I.D. S-5 $\mu$ m, 12 mm Column

Waters Sunfire™ C18 150×4.6 mm 18.5 mm Column

#### アミノ酸分析(東レリサーチセンター)

日立製作所 アミノ酸分析計 L-8500 型

#### カラムクロマトグラフィー

カラムクロマトグラフィーによる分離精製には、関東化学株式会社から購入したシリカゲル(球状、63-210 $\mu$ m)を用いた。

攪拌は一般的なマグネチックスターラーと攪拌子を用いておこなった。

樹脂を用いる反応において、振とう攪拌は次の機器を用いておこなった。

国産化学 マニュアル固相合成器 KMS-3

PP 製濾過カラムはポリプロピレン製のカラムにポリエチレン製のフリット(ポアサイズ約 20  $\mu$ m)を取り付けて用いた。

各種試薬は以下のように精製したものをを用いた。

- ・カプトプリル

和光純薬より薬理研究用規格の試薬を購入し、HPLCにより分取精製した後に



凍結乾燥した。得られた白色固体にヘキサンと酢酸エチルから再結晶を行い、減圧下十分乾燥したものをを用いた。

- 塩化スルフリル

和光純薬より購入し、蒸留精製したものをを用いた。

- ジイソプロピルエチルアミン

関東化学より購入し、蒸留精製したものをを用いた。

- ジエチルエーテル

メルクより購入し、国産化学より購入した食品添加物規格の乾燥硫酸第一鉄を加えた後、軽く振とうし、1晩静置したものをを用いた。

- 1,2-ジクロロエタン

関東化学より購入し、ダイヤフラムポンプを用いて、減圧下 200 °C で 3 時間乾燥処理したモレキュラーシーブ 4A を加え、1晩静置したものをを用いた。

- DMF

(液相反応)国産化学および関東化学より購入した低水分規格の製品をそのまま用いた。

(固相反応)和光純薬より購入したペプチド合成用規格の製品をそのまま用いた。

(固相合成用樹脂の洗浄)和光純薬より購入したペプチド合成用規格のものと和光一級規格のものをそのまま用いた

- Wang resin

渡辺化学工業より購入したものをそのまま用いた。官能基導入量はメーカーの発行する検査成績書に記載の値を用いた。

- Rink-amide resin

Bachem 社、渡辺化学工業より購入したものをそのまま用いた。官能基導入量は各社の発行する検査成績書に記載の値を用いた。

- amino-PEG-PS resin

渡辺化学工業より購入したものをそのまま用いた。

官能基導入量は渡辺化学工業の発行する検査成績書に記載の値を用いた。

- **aminomethyl-ChemMatrix<sup>®</sup> resin**

シグマアルドリッチ社より購入したものをそのまま用いた。

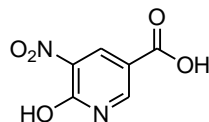
官能基導入量はシグマアルドリッチ社の発行する検査成績書に記載の値を用いた。

その他の試薬は主に国産化学、東京化成工業、渡辺化学工業、和光純薬、関東化学、シグマアルドリッチ、キシダ化学、GL Biochem、Acros organics、Bachem、Combi-Blocksより購入し、その他、特に記載が無い限り市販の試薬をそのまま用いた。

## 合成の部

### 第一章

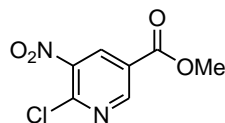
#### 6-Hydroxy-5-nitronicotinic acid (**38**)



6-ヒドロキシニコチン酸 (**35**, 25.0 g, 180 mmol) を発煙硝酸 ( $d = 1.52 \text{ g/mL}$ , 95 mL) に加え、 $50^\circ\text{C}$  で 18 時間攪拌した。この反応液を放冷して室温とした後、減圧下に濃縮した。残渣に水を加えて減圧濃縮することにより、酸性揮発成分を共沸した。共沸後に得られた残渣にメタノールを加え、冷却することで析出した沈殿を濾取した。得られた固体を冷却したメタノール (50 mL) で洗浄後、減圧下乾燥することにより、化合物 **38** を 9.67 g、収率 87%、褐色固体として得た。

$^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 8.44 (d,  $J = 2.6 \text{ Hz}$ , 1H), 8.85 (d,  $J = 2.6 \text{ Hz}$ , 1H); HRMS ( $\text{ES}^+$ ):  $m/z$  185.0194 [ $\text{M}+\text{H}$ ] $^+$  (Calcd for  $\text{C}_6\text{H}_5\text{N}_2\text{O}_5$ : 185.0198).

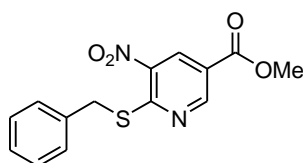
#### 6-Chloro-5-nitronicotinic acid methyl ester (**34**)



五塩化リン (12.98 g, 62.3 mmol)、化合物 **38** (4.00 g, 21.7 mmol) およびオキシ塩化リン (18 mL) を混合し、 $100^\circ\text{C}$  の油浴中で加熱還流した。3 時間後、得られた溶液を減圧下濃縮した。得られた残渣にジクロロメタンを加え、氷浴にて冷却し、ゆっくりとメタノール (30 mL) を加えて 30 分間攪拌した。過剰のメタノールを減圧留去し、残渣に酢酸エチルと水を加え、有機層を分離した。この有機層を水と飽和食塩水で順次洗浄した後、無水硫酸ナトリウムを加え乾燥した。濾過により硫酸ナトリウムを除去し、減圧下溶媒を留去した。シリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン : 酢酸エチル = 6 : 1) で精製することにより、エステル **34** を 2.54 g、収率 54%、明黄色針状固体として得た。

$^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 4.00 (s, 3H), 8.52 (d,  $J = 2.1 \text{ Hz}$ , 1H), 9.14 (d,  $J = 2.1 \text{ Hz}$ , 1H); HRMS ( $\text{ES}^+$ ):  $m/z$  217.0006 [ $\text{M}+\text{H}$ ] $^+$  (Calcd for  $\text{C}_7\text{H}_6\text{N}_2\text{O}_4\text{Cl}$ : 217.0016).

#### 6-Benzylsulfanyl-5-nitronicotinic acid methyl ester (**39**)



エステル **34** (2.54 g, 11.7 mmol)、ベンジルメルカプタン (2.06 mL, 17.6 mmol) およびトリエチルアミン (2.46 mL, 17.6 mmol) をメタノール (15 mL) に加え、加熱還流した。5 時間後、溶媒を減圧留去し、残渣に酢酸エチルと水を加え、10%クエン酸水溶液、飽和炭酸ナトリウム水溶液、水、および飽和食塩水で順次洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。濾過により硫酸ナトリウムを除去した後、溶媒を減圧留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン : 酢酸エチル = 6 : 1) で精製し、生成物をヘキサンと酢酸エチルから再結晶することで、エステル **39** を明黄色針状結晶として収量 3.27g、収率 92% で得た。また、得られた結晶を単結晶 X 線構造解析に付すことにより所望の構造であることを確認した (Figure 24)。

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 3.99 (s, 3H), 4.51 (s, 2H), 7.23-7.33 (m, 3H), 7.41-7.43 (m, 2H), 9.00 (d,  $J = 1.9$  Hz, 1H), 9.24 (d,  $J = 1.9$  Hz, 1H);  $^{13}\text{C NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 164.0, 162.3, 153.2, 141.1, 136.18, 134.39, 129.43, 128.6, 127.5, 121.7, 52.9, 35.8; HRMS ( $\text{ES}^+$ ):  $m/z$  305.0592 [ $\text{M}+\text{H}$ ] $^+$  (Calcd for  $\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$ : 305.0596); mp 82.1-83.4 °C; IR (KBr)  $\text{cm}^{-1}$ : 3437, 3064, 1731, 1599, 1551, 1517, 1362, 1343, 1305, 1214, 1129, 1067, 818, 767, 754, 695.

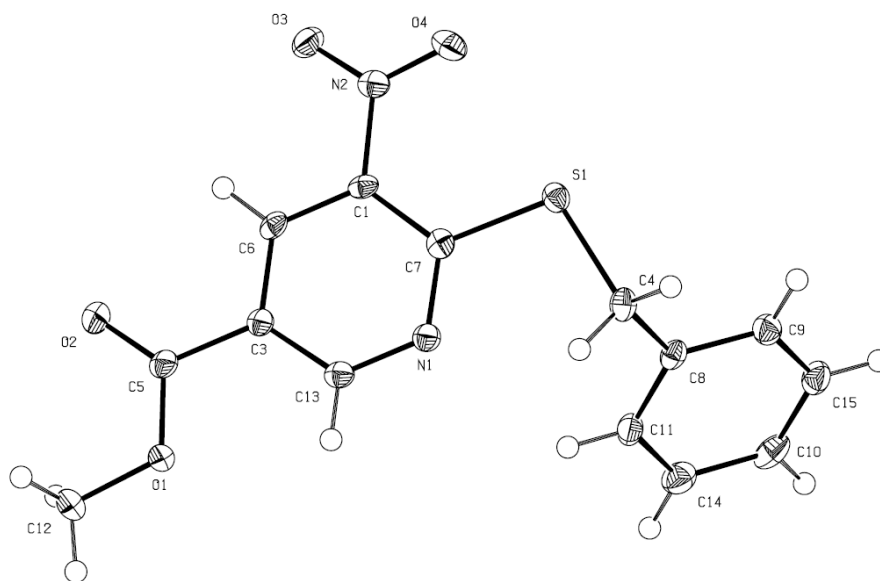
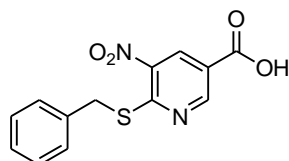


Figure 24. エステル **39** の単結晶 X 線構造解析結果

### 6-Benzylsulfanyl-5-nitronicotinic acid (**40**)

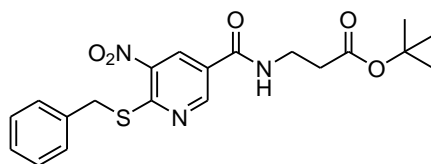


エステル **39** (3.27 g, 10.7 mmol) をメタノール (210 mL) に加え、氷浴中で水酸化リチ

ウム一水和物 (0.902 g, 21.5 mmol) の水溶液 (180 mL) を加えた。10 分後氷浴を撤去し、室温で攪拌した。15 時間後、水酸化リチウム一水和物 (0.225 g, 5.37 mmol) の水溶液 (5 mL) を加え、引き続き室温で攪拌した。4 時間後、メタノールを減圧留去し、残渣に 10% クエン酸水溶液を加え、pH 試験紙により液性が酸性であることを確認した。この水溶液に酢酸エチルを加え有機層を分離した。有機層を水、飽和食塩水で順次洗浄し、無水硫酸ナトリウムを加え乾燥した。溶媒を減圧下留去することで黄色粉末としてカルボン酸 **40** を収量 3.10 g と定量的に得た。

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 4.50 (s, 2H), 7.20-7.31 (m, 3H), 7.40-7.42 (m, 2H), 8.91 (d,  $J = 1.9$  Hz, 1H), 9.20 (d,  $J = 1.9$  Hz, 1H); HRMS ( $\text{ES}^+$ ):  $m/z$  291.0442 [ $\text{M}+\text{H}$ ] $^+$  (Calcd for  $\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$ : 291.0440);  $^{13}\text{C NMR}$  (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 166.4, 162.8, 154.5, 142.6, 138.0, 135.4, 130.5, 129.6, 128.4, 124.1, 36.6; mp 195.1-196.5 °C, IR (KBr)  $\text{cm}^{-1}$  2811, 2550, 1698, 1599, 1544, 1407, 1358, 1335, 1294, 1215, 1130, 1064.

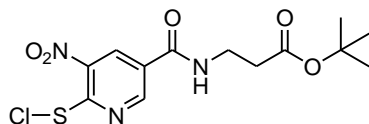
### 3-[(6-Benzylsulfanyl-5-nitropyridine-3-carbonyl)amino]propionic acid *tert*-butyl ester (**41**)



カルボン酸 **40** (1.50 g, 5.16 mmol) および H- $\beta$ -Ala-O $^t$ Bu·HCl (1.13 g, 6.20 mmol) とトリエチルアミン (0.859 mL, 6.20 mmol) をジクロロメタン (40 mL) に加え DMT-MM (2.04 g, 15.7% の水分を含む。6.20 mmol) を加え室温下攪拌した。18 時間の攪拌の後、黄色固体の析出を認めた。溶媒を減圧下濃縮することにより留去し、得られた残渣に酢酸エチルを加えた。この有機層を飽和炭酸ナトリウム水溶液で洗浄し、水、10% クエン酸水溶液、飽和食塩水で順次洗浄した。得られた有機層に無水硫酸ナトリウムを加え、硫酸ナトリウムを濾過により除去した後、減圧下濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン : 酢酸エチル = 3 : 1) にて精製し、ヘキサンと酢酸エチルより再結晶することで化合物 **41** を明黄色針状結晶として収量 1.84 g、収率 85% で得た。

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 1.47 (s, 9H), 2.59 (t,  $J = 5.8$  Hz, 2H), 3.72 (q,  $J = 5.9$  Hz, 2H), 7.23-7.32 (m, 3H), 7.40-7.42 (m, 2H), 8.82 (d,  $J = 2.0$  Hz, 1H), 9.08 (d,  $J = 2.0$  Hz, 1H), アミド由来のピークは観測されなかった;  $^{13}\text{C NMR}$  (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 172.2, 163.2, 160.7, 151.2, 141.0, 136.3, 132.2, 129.4, 128.6, 127.5, 125.6, 81.7, 35.8, 35.7, 34.7, 28.1; HRMS ( $\text{ES}^+$ ):  $m/z$  418.1421 [ $\text{M}+\text{H}$ ] $^+$  (Calcd for  $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{N}_3\text{O}_5\text{S}$ : 418.1437); mp 117.5-118.4 °C, IR (KBr)  $\text{cm}^{-1}$  3417, 3321, 3068, 2979, 2930, 1727, 1638, 1602, 1539, 1509, 1455, 1367, 1334, 1149, 934, 846, 746, 711;

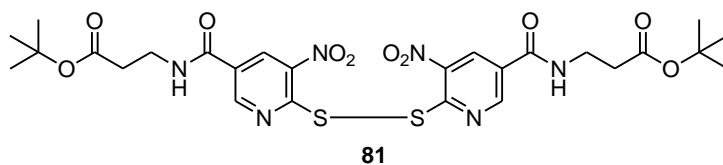
**3-[(6-Chlorosulfanyl-5-nitropyridine-3-carbonyl)amino]propionic acid *tert*-butyl ester (32)**



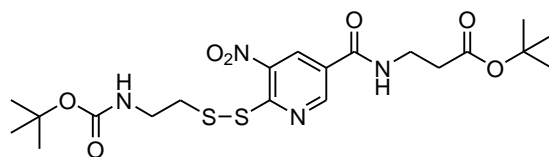
化合物 **41** (664 mg, 1.59 mmol) とピリジン (20  $\mu$ L) を 1,2-ジクロロエタン (5 mL) に溶解し、塩化スルフリル (283  $\mu$ L, 3.50 mmol) を室温下加えて攪拌した。3 時間後、過剰量の溶媒を減圧下濃縮することで留去した。さらにヘキサンを加えて共沸する操作を 3 度繰り返した。その結果、明黄色の粉末として化合物 **32** が得られ、精製せずにそのまま次の反応に用いた。

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 1.46 (s, 9H), 2.62 (t,  $J = 4.0$  Hz, 2H), 3.74 (br, 2H), 8.90 (d,  $J = 1.9$  Hz, 1H), 9.01 (d,  $J = 1.9$  Hz, 1H), アミド由来のピークは観測されなかった;  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 172.2, 162.4, 160.1, 152.7, 145.7, 141.1, 132.5, 127.2, 81.7, 35.9, 34.6, 28.1; mp 58.6-59.8  $^\circ\text{C}$ , IR (KBr)  $\text{cm}^{-1}$  3391, 1720, 1639, 1541, 1336, 1151, 1062, 840, 751.

HRMS ( $\text{ES}^+$ ):  $m/z$  675.1514 (これは質量分析の際、脱塩素を伴う分解によりより生じた化合物 **81** であると考えている。)  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  (Calcd for  $\text{C}_{26}\text{H}_{32}\text{N}_6\text{NaO}_{10}\text{S}_2$ : 675.1519);



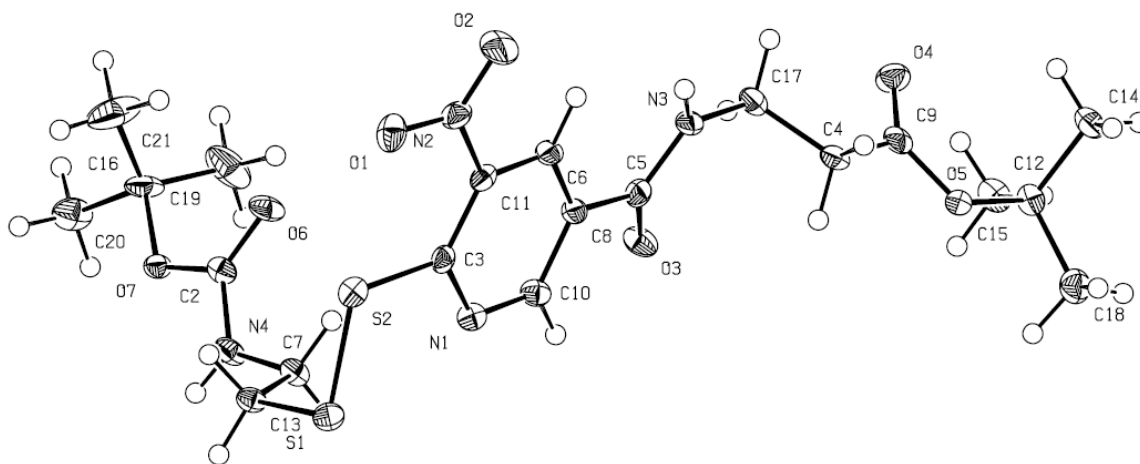
**3-[[6-(2-*tert*-Butoxycarbonylaminoethyl)disulfanyl]-5-nitro-pyridine-3-carbonyl]amino}propionic acid *tert*-butyl ester (31)**



アルゴン気流下、Boc-NH-C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>-S-PMB (**33**, 473 mg, 1.59 mmol, *N*-Boc-システアミンと PMB-Cl より合成した) を低水分ジクロロメタン (10 mL) に溶解し、-30  $^\circ\text{C}$  に冷却した。この反応溶液に化合物 **32** のジクロロメタン溶液 (52 mL) を 30 分かけて滴下しながら加え攪拌した。12 時間後、室温まで昇温し、10%クエン酸を加え有機層を洗浄した。水と飽和食塩水で順次洗浄した後、無水硫酸ナトリウムを加え乾燥した。濾過により硫酸ナトリウムを除去した後、減圧下濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン: 酢酸エチル = 3:1) にて精製することで黄色のオ

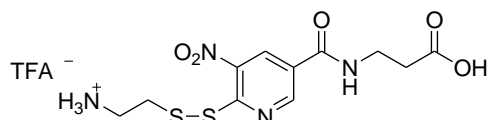
イルとして化合物 **31** (660 mg, 83% (2 steps))を得た。これをヘキサン、クロロホルムで再結晶することで黄色針状結晶が得られ、単結晶 X 線構造解析に付すことにより所望の構造であることを確認した (**Figure 25**)。

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 1.46 (s, 9H), 1.47 (s, 9H), 2.59 (t,  $J = 5.9$  Hz, 2H), 3.01 (t,  $J = 5.7$  Hz, 2H), 3.39 (br m, 2H), 3.73 (dt,  $J = 5.8, 12$  Hz, 2H), 5.68 (br s, 1H), 7.37 (s, 1H) 8.87 (br, 1H), 9.23 (d,  $J = 1.8$  Hz, 1H) , アミド由来のピークは観測されなかった;  $^{13}\text{C}$  NMR(100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 172.2, 162.7, 160.4, 155.8, 151.7, 142.3, 132.6, 128.0, 81.7, 79.6, 39.1, 38.9, 35.9, 34.6, 28.4, 28.1; HRMS ( $\text{ES}^+$ ):  $m/z$  503.1628  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (Calcd for  $\text{C}_{20}\text{H}_{31}\text{N}_4\text{O}_7\text{S}_2$ : 503.1634). mp 118.9-119.6 °C, IR (KBr)  $\text{cm}^{-1}$  3291, 3054, 2978, 2935, 1731, 1653, 1598, 1542, 1369, 1339, 1253, 1152, 1059, 946, 837, 753.



**Figure 25.** Npys 型ジスルフィド **31** の単結晶 X 線構造解析結果

### 3-(6-((2-Aminoethyl)disulfanyl)-5-nitronicotinamido)propanoic acid TFA salt (**42**)

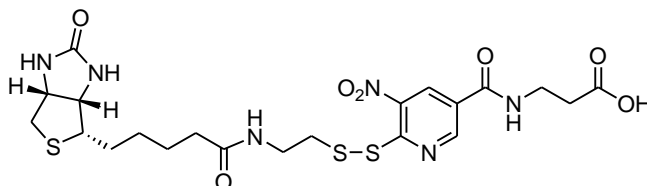


化合物 **31** (516 mg, 1.03 mmol) をトリフルオロ酢酸 (10 mL) に氷冷下で溶かし加え、氷浴を撤去し攪拌した。30 分後、溶液を減圧下濃縮し、残渣にヘキサンを加えて 3 回減圧下濃縮することにより揮発成分を共沸した。共沸後の残渣として黄色のシロップ状化合物 **42** を得て、精製せずそのまま次の反応に用いた。

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 2.68 (t,  $J = 6.8$  Hz, 2H), 3.20-3.25 (m, 4H), 3.68 (t,  $J = 6.8$  Hz, 2H), 9.01 (d,  $J = 2.0$  Hz, 1H), 9.28 (d,  $J = 2.0$  Hz, 1H) , アミンおよびアミド由来のピークは観測されなかった;  $^{13}\text{C}$  NMR(100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 175.2, 165.4, 153.6, 144.0, 133.9, 129.7, 39.2, 37.3, 36.6, 34.4, 27.7 (as TFA: 160.7, 160.3, 160.1, 159.9, 121.1, 118.2, 115.4, 112.6); HRMS ( $\text{ES}^+$ ):  $m/z$  347.0482  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (Calcd for  $\text{C}_{11}\text{H}_{15}\text{N}_4\text{O}_5\text{S}_2$ : 347.0484). IR

(KBr)  $\text{cm}^{-1}$  3441, 3302, 3038, 1719, 1669, 1594, 1516, 1436, 1345, 1204, 1128, 1060, 805, 629.

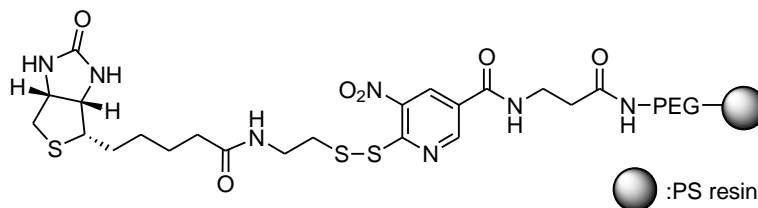
**3-[(5-Nitro-6-{2-[5-(2-oxo-hexahydrothieno[3,4-d]imidazol-6-yl)pentanoylamino] ethyldisulfanyl}pyridine-3-carbonyl)amino]propionic acid (30)**



化合物 **42** を DMF (25 mL) に溶解し、トリエチルアミン (660  $\mu\text{L}$ , 5.14 mmol) を加えた。この溶液にビオチンスクシンイミジルエステル (**6**, 292 mg, 0.856 mmol) を加え攪拌した。17 時間の反応の後、減圧下溶媒を留去し、残渣に酢酸エチル (20 mL) を加えると黄色の沈殿が生じた。沈殿を濾過し、得られた固体を酢酸エチル (10 mL) で 3 回洗浄し、続けてジエチルエーテル (10 mL) で 3 回洗浄した。得られた固体を減圧下乾燥させることでビオチン誘導体 **30** の黄色粉末を収量 425 mg、87% の収率で得た。

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 1.28–1.85 (m, 6H), 2.22 (t,  $J = 7.2$  Hz, 2H), 2.58–2.77 (m, 4H), 2.80–3.10 (m, 2H), 3.15–3.27 (m, 1H), 3.40–3.59 (m, 2H), 3.67 (t,  $J = 6.8$  Hz, 2H), 4.26–4.35 (m, 1H), 4.46–4.54 (m, 1H), 8.96 (d,  $J = 2.0$  Hz, 1H), 9.23 (d,  $J = 2.0$  Hz, 2H);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$ : 172.2 (2 carbons), 162.7 (2 carbons), 162.1, 157.7, 152.3, 142.1, 132.8, 127.8, 61.0, 59.2, 55.4, 48.6, 37.7, 36.8, 36.6, 35.1, 28.1, 25.2; HRMS ( $\text{ES}^+$ ):  $m/z$  573.1292 [ $\text{M}+\text{H}$ ] $^+$  (Calcd for  $\text{C}_{21}\text{H}_{29}\text{N}_6\text{O}_7\text{S}_3$ : 573.1260). mp 161.8–163.5  $^\circ\text{C}$ , IR (KBr)  $\text{cm}^{-1}$  3399, 3309, 2926, 1688, 1647, 1597, 1542, 1433, 1338, 1058.

**KSH-1 (27)**



ビオチン誘導体 **30** (250 mg, 0.436 mmol) の DMF (4 mL) 溶液に DIPCI (67.5  $\mu\text{L}$ , 0.436 mmol)、amino-PEG-PS resin (346 mg, 0.145 mmol)、HOBt $\cdot\text{H}_2\text{O}$  (73.4 mg, 0.480 mmol) を順次加え、振とう攪拌した。16 時間後、反応混合物を濾過し、得られた樹脂を DMF で 5 回洗浄した。得られた樹脂を一部取り、Kaiser テスト<sup>1)</sup>に付したところ、結果は陰性であった。樹脂上に残存したアミノ基を不活化するために、無水酢酸 (275  $\mu\text{L}$ , 2.91 mmol) とピリジン (236  $\mu\text{L}$ , 2.91 mmol) を加え攪拌した。30 分の攪拌の後、溶液を濾過し、得られた樹脂をメタノール (2 mL) で 6 回、ジエチルエーテル (2 mL) で 4 回順次洗

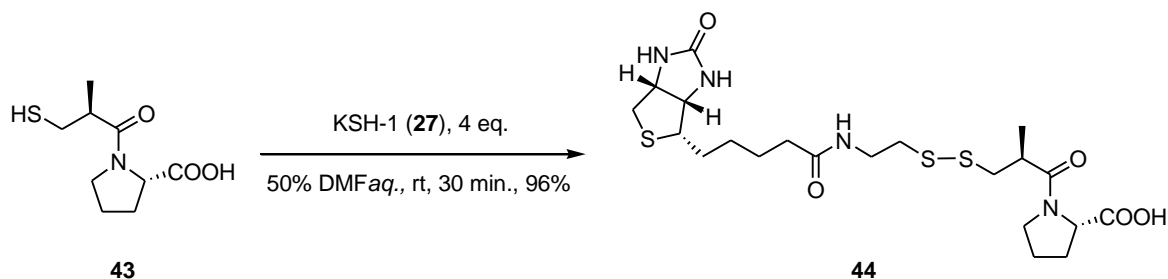


浄した。洗浄後の樹脂を減圧下乾燥させることで 明黄色の樹脂として KSH-1 (**27**, 410 mg, 0.145 mmol) を得た。KSH-1 (**27**) に導入されたビオチンの量は amino-PEG-PS resin 上のアミノ基含有量 (0.42 mmol/g) を元に算出した。

#### KSH-1 (**27**) を用いたビオチン標識反応における最適当量の検討実験

PP 製濾過カラム中で KSH-1 (**27**) を前述の方法に従い、0.022 mmol、0.044 mmol、0.066 mmol、0.088 mmol に相当する量を各々合成し、カプトプリル (**37**, 4.7 mg, 0.022 mmol) の 50% DMF 水溶液 (各々 2 mL、4 mL、6 mL、8 mL) を加え、振とう攪拌を行った。それぞれ反応開始から 5 分後、10 分後、20 分後、30 分後、60 分後に反応溶液を採取し、この溶液を逆相 HPLC にて分析することにより、カプトプリル **37** に対応する 16.8 分のピークを追跡し **Figure 9** に示したグラフが得られた。HPLC conditions: YMC-pack ODS-AM (4.6 × 150 mm) with a linear gradient of 0.1% TFA-CH<sub>3</sub>CN (100:0-60:40 over 30 min) at a flow rate of 0.9 mL/min, detection at 230 nm.

#### KSH-1 (**27**) を用いたカプトプリルへのビオチン標識反応

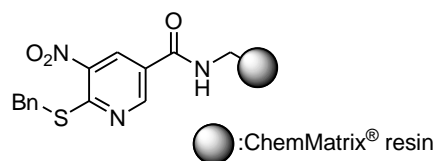


固相担持型ビオチン標識試薬 KSH-1 (**27**, 410 mg, 0.145 mmol、カプトプリルに対し 4 当量) を PP 製濾過カラム中で前述の方法に従い合成し、この容器にカプトプリル (**43**, 7.89 mg, 36.3 μmol) の DMF/H<sub>2</sub>O = 1/1 溶液 (7 mL) を加え、振とう攪拌をおこなった。30 分後、反応溶液を一部採取し逆相 HPLC により分析をおこない、カプトプリル (**43**) が完全に消費されたことを確認し、反応液を濾過することで樹脂と溶液を分離した。得られた樹脂を DMF で洗浄し、洗浄液を濾液と合わせて減圧下濃縮した。得られた残渣に水、エタノールを順次加え、減圧下濃縮することで揮発成分を共沸した。共沸後の残渣を減圧下乾燥することでビオチン標識されたカプトプリル (**44**) を無色固体として得た (収量 8.0 mg、収率 96%)。得られた固体を 15% メタノール水溶液に再度溶解し、HPLC にて分析すると純度は 87% であった。

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ: 1.21 (d, *J* = 6.8 Hz, 2H), 1.28–1.81 (m, 6H), 1.98–2.14 (m, 3H), 2.16–2.41 (m, 3H), 2.66–2.76 (m, 2H), 2.76–2.89 (m, 1H), 2.89–3.06 (m, 2H), 3.08–3.25 (m, 3H), 3.38–3.54 (m, 2H), 3.60–3.80 (m, 2H), 4.26–4.35 (m, 1H), 4.37–4.46 (m, 1H), 4.46–4.54 (m, 1H); HRMS (ES<sup>+</sup>): *m/z* 519.1745 [M+H]<sup>+</sup> (Calcd for C<sub>21</sub>H<sub>35</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>S<sub>3</sub>: 519.1770).

## 第二章

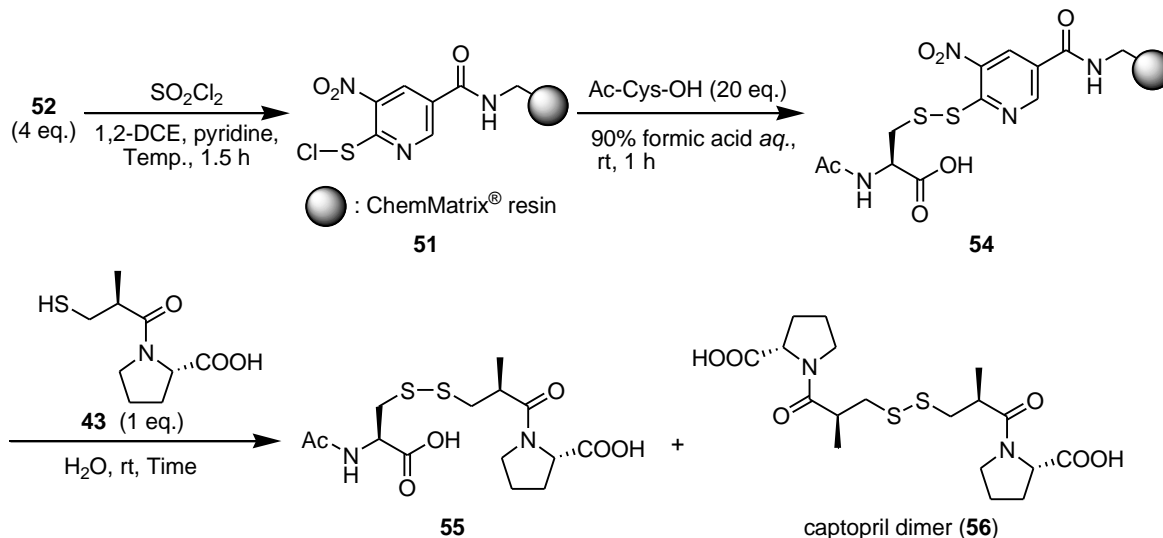
### ベンジルスルフィド樹脂 52



三角フラスコにベンジルスルフィド **40** (406 mg, 1.40 mmol)、DMF (12 mL)、HATU (420 mg, 1.37 mmol)、DIPEA (201  $\mu$ L, 1.40 mmol)を加え室温で振とう攪拌した。5分後、得られた溶液を PP 製濾過カラムに aminomethyl-ChemMatrix<sup>®</sup> resin (500 mg, 0.70 mmol/g, 0.35 mmol) と共に加え、室温下振とう攪拌をおこなった。3 時間後 Kaiser テストに付したところ、結果は陰性であった。反応溶液を濾過することにより樹脂と溶液を分離し、樹脂を DMF で 5 回、メタノールで 3 回順次洗浄した。得られた樹脂を減圧下乾燥させることでベンジルスルフィド樹脂 **52** (547 mg) を得た。

*Anal.* Calcd for  $C_{156.62}H_{249.24}N_6O_{68.31}S_2$ : C, 55.30; H, 8.21; N, 2.47. Found (**Table 3**, Entry 3): C, 54.62; H, 8.54; N, 2.43.

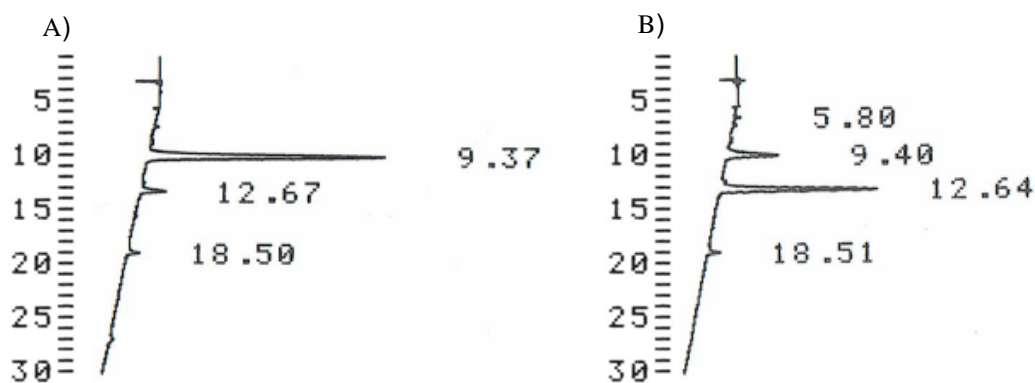
### ベンジルスルフィド樹脂 52 を用いた非対称ジスルフィド合成の試行実験 (**Table 3**)



ガラス容器にベンジルスルフィド樹脂 **52** (32.1 mg, 18.4  $\mu$ mol) をとり、**Table 4** の条件に従い、それぞれ 0.5%、1%、2%、5%、および 10% となるように調製した塩化スルフリルの 1,2-DCE (2.0 mL) 溶液とピリジン (7.8  $\mu$ L, 92.0  $\mu$ mol) を各温度条件の下で加えた。マグネチックスターラーにより穏やかに攪拌し、90 分後窒素気流下で濾過することにより、樹脂と溶液を分離した。得られた樹脂を氷冷したジクロロメタンで 5 回洗浄し、続いて氷冷した 90% ギ酸水溶液で 3 回洗浄することにより塩素化された Npys-Cl 型樹脂 **51** を得た。この樹脂 **51** に *N*-アセチルシステイン (15.0 mg, 92.0  $\mu$ mol) の 90% ギ酸 (1.0 mL) 水溶液を加え、室温で振とう攪拌した。2 時間後、反応溶液を濾

過することにより樹脂と溶液を分離し、得られた樹脂を純水で3回洗浄することで *N*-アセチルシステインが固相化された Npys 型ジスルフィド樹脂 **54** を得た。得られた Npys 型ジスルフィド樹脂 **54** にカプトプリル (**43**, 1.0 mg, 4.6  $\mu$ mol) の水溶液 (0.9 mL) を加え、攪拌した。30 分後および終夜反応後に反応溶液を一部採取した。得られた溶液をそれぞれ HPLC により分析することでカプトプリル **43**、非対称ジスルフィド **55** およびカプトプリルの 2 量体 **56** の含量を求めた。実施例として、Figure 26 に Table 4、Entry 12 における HPLC 分析結果のチャートを示す。

非対称ジスルフィド **55** : HRMS (ES<sup>+</sup>): *m/z* 401.0801 [M+Na]<sup>+</sup> (Calcd for C<sub>14</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>NaS<sub>2</sub>: 401.0817); ホモジスルフィド **56** : HRMS (ES<sup>+</sup>): *m/z* 455.1279 [M+Na]<sup>+</sup> (Calcd for C<sub>18</sub>H<sub>28</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>NaS<sub>2</sub>: 455.1287).



**Figure 26.** ベンジルスルフィド樹脂 **52** を用いた非対称ジスルフィド合成の試行実験 (Table 4、Entry 12) A) 30 分後の反応溶液、B) 終夜攪拌後の反応溶液。チャート中のピークはカプトプリル **43** (9.37 および 9.40 分)、非対称ジスルフィド **55** (12.67 分および 12.64 分)、ホモジスルフィド **56** (18.50 分および 18.51 分) に対応する。

HPLC conditions : YMC-pack ODS-AM (4.6  $\times$  150 mm) with a linear gradient of 0.1% TFA-CH<sub>3</sub>CN (100:0-60:40 over 30 min) at a flow rate of 0.9 mL/min, detection at 230 nm.

#### Ac-(Arg)<sub>8</sub>-Acp-Cys(<sup>t</sup>Bu)-NH<sub>2</sub>·TFA salt (**50**)

PP 製濾過カラムに Fmoc-Rink amide resin (500 mg, 0.235 mmol) をとり、20% piperidine/DMF 溶液 (10 mL) を加えた。30 分の振とう攪拌の後、一般的な Fmoc-based SPPS に従い、Fmoc アミノ酸、DIPCI をそれぞれ樹脂に対して 4 当量 (0.940 mmol)、HOBt·H<sub>2</sub>O を 4.4 当量 (1.03 mmol) 用い逐次伸長反応を行うことで H-[Arg(Pbf)]<sub>8</sub>-Acp-Cys(<sup>t</sup>Bu)-NH-resin を得た。得られた樹脂に無水酢酸 (480 mg, 4.70 mmol, 20 eq.) とピリジン (372 mg, 4.70 mmol, 20 eq.) を室温下で加え攪拌した。30 分の反応後、反応溶液中の樹脂を一部採取し、Kaiser テストに付したところ、結果は陰性

であった。反応溶液を濾過することにより樹脂と溶液を分離し、得られた樹脂を DMF で 5 回、メタノールで 3 回、ジエチルエーテルで 3 回順次洗浄した。洗浄後の樹脂を減圧下乾燥することで Ac-[Arg(Pbf)]<sub>8</sub>-Acp-Cys(<sup>t</sup>Bu)-NH-resin (1.29 g) が得られた。得られた樹脂に氷浴中で TFA 混合液 (TFA : H<sub>2</sub>O : *m*-cresol : thioanisole = 14.25 mL : 0.25 mL : 0.25 mL : 0.25 mL) を加え、氷浴を撤去した後、室温下で攪拌した。2 時間の反応後、濾過することにより樹脂を取り除き、濾液を減圧下濃縮した。得られた残渣をジエチルエーテルで洗浄し、デカンテーションにより溶液と固体成分を分離した。得られた残渣を減圧下乾燥することにより、粗精製ペプチドを得た。これを逆相 HPLC により精製しペプチドフラグメント **50** を得た (309 mg, 0.123 mmol, 53%)。

HRMS (ES<sup>+</sup>): *m/z* 1581.0095 [M+H]<sup>+</sup> (Calcd for C<sub>63</sub>H<sub>126</sub>N<sub>35</sub>O<sub>11</sub>S: 1581.0097).

### Ac-(Arg)<sub>8</sub>-Acp-Cys-NH<sub>2</sub>·TFA salt (**57**)

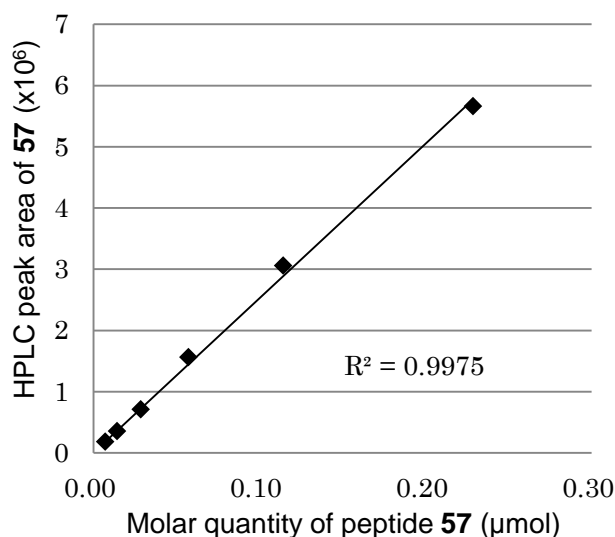
PP 製濾過カラムに Fmoc-Rink amide resin (500 mg, 0.440 mmol) をとり、20% piperidine/DMF 溶液 (10 mL) を加えた。30 分の振とう攪拌の後、一般的な Fmoc-based SPPS に従い、樹脂に対して 5 当量 (2.20 mmol) の Fmoc アミノ酸、DIPCI を、また HOBt·H<sub>2</sub>O を 5.05 当量 (2.22 mmol) それぞれ用い、逐次伸長反応を行うことで Fmoc-[Arg(Pbf)]<sub>8</sub>-Acp-Cys(Trt)-NH-resin (3.35 g, DMF を含む) を得た。得られた樹脂 Fmoc-[Arg(Pbf)]<sub>8</sub>-Acp-Cys(Trt)-NH-resin (1.00 g, 0.131 mmol) に 20% piperidine/DMF を加え攪拌した。20 分攪拌した後に濾過にすることで溶液を除去し、DMF で 10 回洗浄した。得られた H-[Arg(Pbf)]<sub>8</sub>-Acp-Cys(Trt)-NH-resin に無水酢酸 (270 mg, 2.62 mmol, 20 eq.) とピリジン (207 mg, 2.62 mmol, 20 eq.) を加え、室温で 20 分振とう攪拌した。溶液中の樹脂を一部採取し、Kaiser テストに付したところ結果は陰性であった。濾過により樹脂と溶液を分離し、得られた樹脂を DMF で 10 回、メタノールで 3 回、ジエチルエーテルで 3 回順次洗浄した。得られた樹脂を減圧下乾燥することで Ac-[Arg(Pbf)]<sub>8</sub>-Acp-Cys(Trt)-NH-resin を得た。得られた樹脂に TFA 混合液 (TFA : H<sub>2</sub>O : triisopropyl silane : 1,2-ethanedithiol = 19 mL : 0.5 mL : 0.2 mL : 0.5 mL) を氷浴中で加え、添加終了後に氷浴を撤去し、室温下攪拌した。2 時間後、窒素気流下で揮発成分を揮発させ、得られた残渣に対しジエチルエーテル (30 mL) を加えた。このジエチルエーテル溶液に素早く水 (16 mL) を加え、水層にペプチドを抽出する操作を 3 回おこなった。得られた粗精製ペプチドの水溶液を逆相 HPLC にて精製することで、ペプチド **57** を得た (49.8 mg, 0.020 mmol, 15%)。得られたペプチドを凍結乾燥し、アミノ酸分析に付し、アルギニン残基の含有量を元にペプチド含有量を算出した。

HRMS (ES<sup>+</sup>): *m/z* 1524.9471 [M+H]<sup>+</sup> (Calcd for C<sub>59</sub>H<sub>118</sub>N<sub>35</sub>O<sub>11</sub>S: 1524.9489).

amino acid analysis (66%, 6 M HCl hydrolysis at 110 °C for 22 h, 0.4314 μmol/mg).

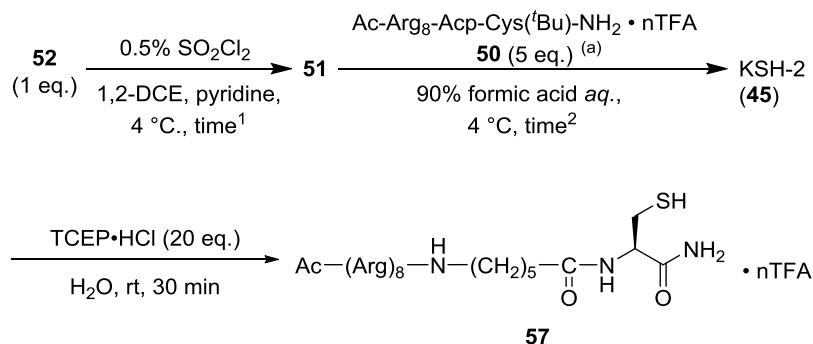
### ペプチド **57** の HPLC 検量線作成

凍結乾燥したペプチド **57** (16.6 mg) を水 (625  $\mu$ L) に溶解し、得られた溶液 (11.4 mM、分子量はペプチド **57** が 8TFA 塩であるものとして計算した) を水による 2 倍希釈を繰り返して、濃度の異なる 5 つの溶液 (5.72 mM, 2.86 mM, 1.43 mM, 0.715 mM, 0.357 mM) を調製した。各々溶液 (20  $\mu$ L) を HPLC 分析することで検量線を作成した (**Figure 27**)。



**Figure 27.** Calibration curve of solution **57** by HPLC analysis. The HPLC conditions were as follows: YMC-pack ODS-AM (4.6  $\times$  150 mm) with a linear gradient of 0.1% TFA-CH<sub>3</sub>CN (100:0-85:15 over 15 min) at a flow rate of 0.9 mL min<sup>-1</sup>, detection at 230 nm.

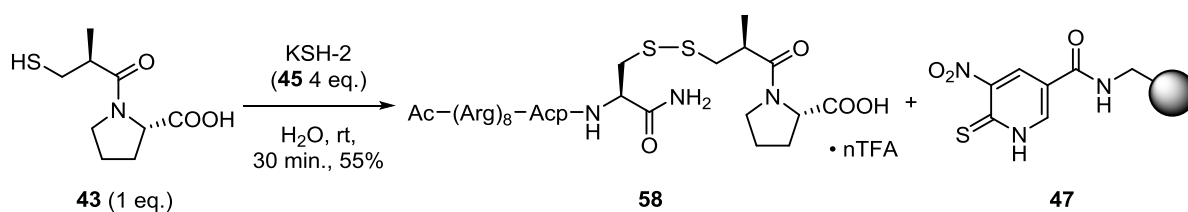
### KSH-2 (**45**) の合成とオリゴアルギニンフラグメント導入効率の検討 (**Table 5**)



ガラス容器にベンジルスルフィド樹脂 **52** (5.1 mg, 2.9  $\mu$ mol) をとり、0.5% 塩化スルフリルの 1,2-ジクロロエタン (1.0 mL) 溶液とピリジン (1.2  $\mu$ L, 15  $\mu$ mol) を氷冷下に加え、穏やかに攪拌した。**Table 5** における Time<sup>1</sup> に相当する時間をおいて攪拌した後、PP 製濾過カラムを用いて窒素気流下で濾過することにより樹脂と濾液を分離した。得られ

た樹脂を氷冷したジクロロメタンで5回洗浄し、つづいて氷冷した90%ギ酸水溶液により3回窒素気流下で洗浄することでNpys-Cl型樹脂**51**を得た。この樹脂**51**にオクタアルギニンペプチドフラグメント**50**(37 mg, 15  $\mu\text{mol}$ )の90%ギ酸溶液(600  $\mu\text{L}$ )を室温下に加え振とう攪拌した。氷冷下でTable 5におけるTime<sup>2</sup>に相当する時間攪拌した後、窒素気流下で溶液を濾過し、得られた樹脂を水で繰り返し洗浄した。pH試験紙を用いて溶液の液性を確認し、pHが5-6を示した時点で洗浄を止め、KSH-2(**45**)を得た(この時、濾液と洗浄液を集め凍結乾燥することで未反応のペプチドフラグメント**50**(20-26 mg)を回収した)。得られたKSH-2にTCEP $\cdot$ HCl(17 mg, 59  $\mu\text{mol}$ )を加え、30分の振とう攪拌後窒素気流下濾過した。樹脂を水で繰り返し洗い、濾液と洗浄液を合わせ2 mLメスフラスコにとり、標線まで水を加えた。フラスコ中の溶液の一部(20  $\mu\text{L}$ )を逆相HPLCで分析し、Figure 26にて作成した検量線より、オリゴアルギニンの導入量を算出した。

#### KSH-2(**45**)を用いたカプトプリル**37**に対するオリゴアルギニン導入反応



KSH-2 (**45**, 18  $\mu\text{mol}$ 、樹脂**52**(31 mg, 18  $\mu\text{mol}$ )より合成した)をPP製カラムにとり、続いてカプトプリル**43**(1.0 mg, 4.6  $\mu\text{mol}$ )の水溶液(1.0 mL)を加え、室温下振とう攪拌した。30分の反応後、溶液を逆相HPLCにより分析し、カプトプリルに対応するピークの消失を確認した。反応後の樹脂を濾過し、樹脂を水で洗浄した。濾液と洗浄液を合わせて、凍結乾燥することによりオリゴアルギニンが導入されたカプトプリル**58**を無色固体として収量7.0 mg、2.5  $\mu\text{mol}$ 、55%の収率で得た。(収率は化合物**58**が8TFA塩であるものとして計算した)。

HRMS (ES<sup>+</sup>):  $m/z$  1740.0020 [M+H]<sup>+</sup> (Calcd for C<sub>68</sub>H<sub>131</sub>N<sub>36</sub>O<sub>14</sub>S<sub>2</sub>: 1740.0087)

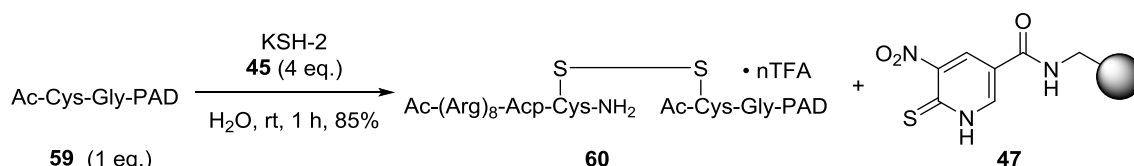
#### Ac-Cys-Gly-PAD :

#### Ac-Cys-Gly-(D-Lys-D-Leu-D-Ala-D-Lys-D-Leu-D-Ala-D-Lys)<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>·TFA salt (**59**)

PP製濾過カラム中にFmoc-Rink amide resin(300 mg, 0.165 mmol)をとり、20% piperidine/DMF溶液を加え、振とう攪拌した。20分の反応後、溶液を濾過により除去し、一般的なFmoc-based SPPSに従い、Fmocアミノ酸、DIPCI、HOBt $\cdot$ H<sub>2</sub>Oをそれぞれ樹脂に対して4当量(0.660 mmol)用い、逐次伸長反応を行うことでH-Cys(Trt)-Gly-[D-Lys(Boc)-D-Leu-D-Ala-D-Lys(Boc)-D-Leu-D-Ala-D-Lys(Boc)]<sub>2</sub>-NH-resinを得た。この樹脂に無水酢酸(337 mg, 3.30 mmol)とピリジン(261 mg, 3.30

mmol) を加え室温下撹拌した。得られた樹脂を一部採取し、Kaiser テストに付したところ、結果は陰性であった。濾過により樹脂と溶液を分離し、得られた樹脂を DMF で 5 回、メタノールで 3 回、ジエチルエーテルで 3 回順次洗浄した後、減圧下乾燥することで 635 mg の Ac-Cys(Trt)-Gly-[D-Lys(Boc)-D-Leu-D-Ala-D-Lys(Boc)-D-Leu-D-Ala-D-Lys(Boc)]<sub>2</sub>-resin を得た。この樹脂に TFA 混合液 (TFA : H<sub>2</sub>O : triisopropylsilane : 1,2-ethanedithiol = 14 mL : 0.38 mL : 0.15 mL : 0.38 mL) を氷浴中で加え、氷浴を撤去した後、室温下撹拌した。2 時間の反応後、樹脂を濾過により除去し、得られた溶液の TFA を窒素気流下揮発させることで留去した。得られた残渣にジエチルエーテル (20 mL) を加え、デカンテーションにより洗浄する操作を 3 回繰り返した。得られた残渣を減圧下乾燥することで粗精製ペプチドを得て、この粗精製ペプチドを HPLC により精製することで PAD ペプチド **59** を得た (52.4 mg, 0.022 mmol, 13%)。HRMS (ES<sup>+</sup>): *m/z* 1725.1240 [M+H]<sup>+</sup> (Calcd for C<sub>79</sub>H<sub>150</sub>N<sub>23</sub>O<sub>17</sub>S: 1725.1301)。

### KSH-2 (**45**) を用いた PAD ペプチド **59** に対するオリゴアルギニン導入反応



KSH-2 (**45**, 4.0 μmol, 6.8 mg の樹脂 **52** より合成した) を PP 製カラムにとり、2.4 mg の PAD ペプチド (**59**, 1.0 μmol、分子量は 6TFA 塩であるものとして計算した) の水溶液 (0.25 mL) を加え、室温下撹拌した。1 時間後、逆相 HPLC により分析し PAD ペプチド **59** に対応するピークの消失を確認した。反応後の溶液を濾過し、樹脂を水で洗浄した。濾液と洗浄液を合わせて、凍結乾燥することによりオリゴアルギニンが導入されたペプチド **60** を得た (4.1 mg, 0.85 μmol, 85%)。 (収率はペプチド **60** の分子量が 14TFA 塩であるものとして計算した)

HRMS (ES<sup>+</sup>): *m/z* 3247.0583 [M+H]<sup>+</sup> (Calcd for C<sub>138</sub>H<sub>265</sub>N<sub>58</sub>O<sub>28</sub>S<sub>2</sub>: 3247.0537)

## 第三章

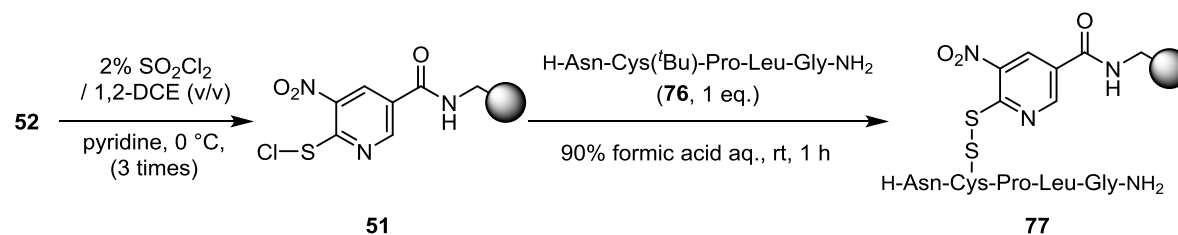
### H-Asn-Cys(<sup>t</sup>Bu)-Pro-Leu-Gly-NH<sub>2</sub> (**76**)

PP 製濾過カラムに Fmoc-Rink amide resin (500 mg, 0.290 mmol) をとり、20% piperidine/DMF (10 mL) 溶液を加え、振とう撹拌をおこなった。30 分後、Fmoc アミノ酸、DIPCI、HOBT·H<sub>2</sub>O をそれぞれ樹脂に対して 3 当量 (0.870 mmol) 用い、一般的な Fmoc-based SPPS に従い、逐次伸長反応を行うことで H-Asn(Trt)-Cys(<sup>t</sup>Bu)-Pro-Leu-Gly-NH-resin (673 mg) を得た。この樹脂に TFA 混合液 (TFA : H<sub>2</sub>O : triisopropylsilane : 1,2-ethanedithiol = 94 : 2.5 : 1.0 : 2.5, 25 mL) を氷浴中で加え、氷浴を撤去後、室温で撹拌した。3 時間の反応の後、濾過により濾液を集め、溶液を減圧下濃

縮した。得られた残渣にジエチルエーテルを加え洗浄した後、デカンテーションにより溶液を除去した。沈殿を減圧下乾燥することで得られた粗精製ペプチドを逆相 HPLC により精製することで、ペプチド **76** を得た (55.7 mg、82.9  $\mu\text{mol}$ 、29%)。

HRMS (ES<sup>+</sup>):  $m/z$  558.3074 [M+H]<sup>+</sup> (Calcd for C<sub>24</sub>H<sub>44</sub>N<sub>7</sub>O<sub>6</sub>S: 558.3074).

### 樹脂 **52** を用いたペプチド **76** の固相化条件の検討実験 (Table 6, Entry 8)



ベンジルスルフィド樹脂 **52** (12.6 mg, 7.45  $\mu\text{mol}$ ) に 2% 塩化スルフリルの 1,2-DCE (1.25 mL) 溶液とピリジン (3.02  $\mu\text{L}$ , 37.3  $\mu\text{mol}$ ) を氷浴中で加えた。氷浴で冷却したまま 20 分間穏やかに攪拌した後、反応溶液をパスツールピペットを用いて除去した。得られた樹脂に 2% に調製した 塩化スルフリルの 1,2-DCE (1.25 mL) 溶液とピリジン (3.02  $\mu\text{L}$ , 37.3  $\mu\text{mol}$ ) を氷浴中で再度加え、20 分間の攪拌後に溶液を除去する操作を更に 2 回繰り返した。得られた樹脂を PP 製濾過カラムに移し、氷冷したジクロロメタンで 5 回洗浄し、続いて氷冷した 90% ギ酸水溶液で 3 回窒素気流下洗浄することで Npys-Cl 型樹脂 **51** を得た。このとき、Npys-Cl 樹脂 **51** に対し元素分析をおこなったところ、塩素が検出され樹脂の塩素化が進行していることを確認した。

*Anal.* Calcd for C<sub>142.62</sub>H<sub>263.24</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>6</sub>O<sub>68.31</sub>S<sub>2</sub>: C, 52.06; H, 8.06; Cl, 2.16; N, 2.55; O, 33.22; S, 1.95; Found C, 46.45; H, 7.75; Cl, 1.42; N, 2.51; O, 34.88; S, 3.49;

Npys-Cl 型樹脂 **51** にペプチドフラグメント **76** (1.00 mg, 1.49  $\mu\text{mol}$ ) のギ酸 (161  $\mu\text{L}$ ) 水溶液を加え、室温下振とう攪拌した。反応開始時および 1 時間後に反応溶液を採取し、得られた溶液をそれぞれ水で希釈した上で HPLC により分析した。その結果、反応開始時に採取された溶液より検出されたペプチド **76** に対応するピークは、1 時間後に採取した反応溶液では検出されなかった。

### Fmoc-Cys-Tyr-Ile-Gln-OH (**78a**)

ナスフラスコに DCC (94.9 mg, 0.460 mmol) と Fmoc-Gln(Trt)-OH (401 mg, 0.657 mmol) をとり、ジクロロメタン (12 mL) を加え、室温下攪拌した。10 分後、濃縮により溶媒を留去し、得られた残渣を DMF に溶解した。この溶液に DMAP (8.03 mg, 65.7  $\mu\text{mol}$ ) と Wang resin (300 mg, 0.219 mmol) を順次加え、攪拌した。3 時間後、濾過により溶液を除き、得られた樹脂を DMF により洗浄することで Fmoc-Gln(Trt)-resin を得た。この樹脂を用いて、一般的な Fmoc-based SPPS に則り Fmoc アミノ酸、HOBt·H<sub>2</sub>O



および DIPC1 をそれぞれ樹脂に対して 3 当量 (0.219 mmol) 用いて逐次伸長反応をおこなった。得られた Fmoc-Cys(Trt)-Tyr(<sup>t</sup>Bu)-Ile-Gln(Trt)-resin (670 mg) に TFA 混合液 (TFA : H<sub>2</sub>O : triisopropylsilane : 1,2-ethanedithiol = 94 : 2.5 : 1.0 : 2.5, 23.8 mL) を氷浴中で加え、氷浴を撤去した後室温で攪拌した。3 時間の反応の後、濾過により濾液を集め、得られた溶液を減圧下濃縮した。得られた残渣にジエチルエーテルを加え洗浄し、デカンテーションにより溶液を除去した。得られた残渣を減圧下乾燥することで粗精製ペプチドを得て、この粗精製ペプチドを逆相 HPLC により精製することでペプチド **72a** を得た (23.5 mg, 31.5 μmol, 31%)。

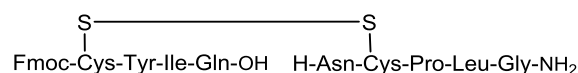
HRMS (ES<sup>+</sup>): *m/z* 748.3016 [M+H]<sup>+</sup> (Calcd for C<sub>38</sub>H<sub>46</sub>N<sub>5</sub>O<sub>9</sub>S: 748.3016).

### Fmoc-Cys-Tyr-Ile-Gln-SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>H (**78b**)

チオエステルペプチド **78b** は Hojo が報告した方法により合成した。<sup>2)</sup> PP 製カラム中に Fmoc-Rink amide resin (100 mg, 58 μmol) をとり、20% piperidine/DMF (2 mL) を加え、振とう攪拌をおこなった。20 分の反応後、溶液を濾過により除去し得られた樹脂に Fmoc-Arg(Pbf)-OH (124 mg, 174 μmol)、HOBt·H<sub>2</sub>O (26.6 mg, 174 μmol) および DIPC1 (27.0 μL, 174 μmol) を順次に加えた。同じ操作で脱保護と縮合を再度繰り返し、反応終了後 DMF を用いて洗浄することで Fmoc-[Arg(Pbf)]<sub>2</sub>-resin を得た。得られた樹脂に 20% piperidine/DMF により Fmoc 基を除去した後、Fmoc-Gln(Trt)-(Et)Cys(Trt)-OH (114 mg, 116 μmol)、DIPC1 (27.0 μL, 174 μmol) および HOBt·H<sub>2</sub>O (26.6 mg, 174 μmol) の 1,2-DCE 溶液を加え、室温下振とう攪拌をおこなった。2 時間後、得られた樹脂を DMF により洗浄することで Fmoc-Gln(Trt)-(Et)Cys(Trt)-[Arg(Pbf)]<sub>2</sub>-resin (183 mg) を得た。得られた Fmoc-Cys(Trt)-Tyr(<sup>t</sup>Bu)-Ile-Gln(Trt)-[Arg(Pbf)]<sub>2</sub>-resin の一部 (117 mg) を取り分け、TFA 混合液 (TFA : H<sub>2</sub>O : triisopropylsilane : 1,2-ethanedithiol = 94 : 2.5 : 1.0 : 2.5, 2 mL) を加え攪拌した。2 時間の反応後、濾過により濾液を集め、窒素気流下で TFA を揮発させることにより留去した。得られた残渣をジエチルエーテルで洗浄し、デカンテーションにより溶液を除去した。得られた残渣を減圧下で乾燥し、得られた粗精製ペプチド (66.7 mg) を 6 M の尿素と 5% の 3-メルカプトプロピオン酸と共に 50% アセトニトリル水溶液 (3 mL) に溶解し、3 日間攪拌した。反応溶液を減圧濃縮により溶媒を留去し、得られた残渣を逆相 HPLC により精製することでチオエステルペプチド **78b** を得た (3.06 mg, 3.66 μmol, 10%) で得た。

HRMS (ES<sup>+</sup>): *m/z* 836.3020 [M+H]<sup>+</sup> (Calcd for C<sub>41</sub>H<sub>50</sub>N<sub>5</sub>O<sub>10</sub>S<sub>2</sub>: 836.2999).

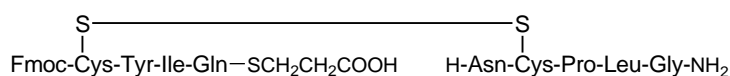
### ジスルフィドペプチド **79a**



ペプチド **76** (1.00 mg, 1.49  $\mu\text{mol}$ ) の 90% ギ酸 (161  $\mu\text{L}$ ) 溶液を Npys-Cl 型樹脂 **51** に室温下加え、振とう攪拌した。1 時間後、反応溶液を濾過することにより樹脂と溶液を分離し、樹脂を水で 10 回洗浄した。得られた樹脂 **77** に、ペプチド **78a** (0.93 mg, 1.24  $\mu\text{mol}$ ) の 66% DMF 水溶液 (270  $\mu\text{L}$ ) を室温下加え攪拌した。30 分後、濾過により濾液を集め、樹脂を DMF にて 5 回洗浄した。濾液と洗浄した DMF 溶液を集め、濃縮により溶媒を留去し、減圧下乾燥することでジスルフィドペプチド **79a** を得た (1.19 mg, 0.886  $\mu\text{mol}$ , 71%)。

HRMS (ES<sup>+</sup>):  $m/z$  1247.5229 [M+H]<sup>+</sup> (Calcd for C<sub>58</sub>H<sub>79</sub>N<sub>12</sub>O<sub>15</sub>S<sub>2</sub>: 1247.5229).

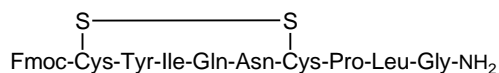
### ジスルフィドペプチド **79b**



ペプチド **76** (0.96 mg, 1.44  $\mu\text{mol}$ ) の 90% ギ酸 (161  $\mu\text{L}$ ) 溶液を Npys-Cl 型樹脂 **46** (12.2 mg, 7.18  $\mu\text{mol}$ ) に室温下加え、振とう攪拌した。1 時間後溶液を濾過し、得られた樹脂 **77** を水で 10 回洗浄した。得られた樹脂に、チオエステルペプチド **78b** (1.00 mg, 1.20  $\mu\text{mol}$ ) の 66% DMF 水溶液 (261  $\mu\text{L}$ ) を室温下加え攪拌した。30 分後、濾過により濾液を集め、樹脂を DMF にて 5 回洗浄した。濾液と洗浄した DMF 溶液を集め、濃縮により溶媒を留去し、減圧下乾燥することでチオエステルペプチド **79b** を得た (1.01 mg, 0.757  $\mu\text{mol}$ , 63%)。

HRMS (ES<sup>+</sup>):  $m/z$  1335.5200 [M+H]<sup>+</sup> (Calcd for C<sub>61</sub>H<sub>83</sub>N<sub>12</sub>O<sub>16</sub>S<sub>3</sub>: 1335.5212).

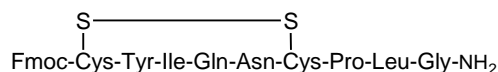
### ジスルフィドペプチド **79a** を用いた Fmoc 保護オキシトシン **80** の合成



ジスルフィドペプチド **79a** (1.19 mg, 0.874  $\mu\text{mol}$ ) の DMF (886  $\mu\text{L}$ ) 溶液に DIPEA (0.377  $\mu\text{L}$ , 2.22  $\mu\text{mol}$ ) と HATU (0.409 mg, 1.33  $\mu\text{mol}$ ) を氷冷下加え攪拌した。5 分後逆相 HPLC により N 末端が Fmoc 保護されたオキシトシン **80** を白色固体として得た (0.70 mg, 0.570  $\mu\text{mol}$ , 65%)。

HRMS (ES<sup>+</sup>):  $m/z$  1229.5129 [M+H]<sup>+</sup> (Calcd for C<sub>58</sub>H<sub>77</sub>N<sub>12</sub>O<sub>14</sub>S<sub>2</sub>: 1229.5124).

### ジスルフィドペプチド **79b** を用いたケミカルライゲーション<sup>3)</sup> による Fmoc 保護オキシトシン **80** の合成

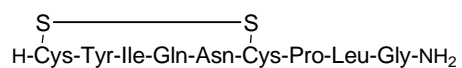


HOObt (1.25 mg, 7.67  $\mu\text{mol}$ ) と DIPEA (0.652  $\mu\text{L}$ , 3.83  $\mu\text{mol}$ ) の DMSO (50  $\mu\text{L}$ ) 溶液にチオエステルペプチド **79b** (0.74 mg, 0.511  $\mu\text{mol}$ ) を室温で加えた。続いて 1 かけらの塩化

銀(I)を加え、室温下遮光しながら激しく2日間攪拌した。不溶物を濾過により除去し、溶液を逆相 HPLC により精製することで N 末端が Fmoc 保護されたオキシトシン **80** を白色固体として得た (0.57 mg, 0.464  $\mu\text{mol}$ , 91%)。

HRMS ( $\text{ES}^+$ ):  $m/z$  1229.5112 [ $\text{M}+\text{H}$ ] $^+$  (Calcd for  $\text{C}_{58}\text{H}_{77}\text{N}_{12}\text{O}_{14}\text{S}_2$ : 1229.5124).

### oxytocin (**75**)



Fmoc 保護されたオキシトシン **80** (0.70 mg, 0.570  $\mu\text{mol}$ ) に 20% piperidine/DMF (216  $\mu\text{L}$ ) を室温で加え攪拌した。5 分後逆相 HPLC により精製することでオキシトシン **75** を白色固体として得た (0.20 mg, 0.178  $\mu\text{mol}$ , 31%)。

HRMS ( $\text{ES}^+$ ):  $m/z$  1007.4418 [ $\text{M}+\text{H}$ ] $^+$  (Calcd for  $\text{C}_{43}\text{H}_{67}\text{N}_{12}\text{O}_{14}\text{S}_2$ : 1007.4443).

## 総 括

本論文は『固相に担持されたニトロピリジンスルフェニル型チオール選択的標識試薬の創製とペプチド合成への応用』と題し、1981年 matsueda らにより見出された SH 基の保護基「Npys 基」の応用に関して 3 章にわたって述べたものである。

免疫化学を始め、プロテオームやケミカルバイオロジーに利用される化学プローブは生化学及び化学の発展と共に、定量、抽出、分離、検出、精製、解析など、様々な要求に応える物質や手法、あるいは関連する機器が開発されてきた。また、同じ目的の技術であっても、より高精度な方法、安価な方法、基質一般性に優れる方法、大量に処理できる方法、迅速に処理できる方法、安全な方法、分子エコノミーな方法等、用途や手段も様々存在する。このため、従来法と異なる特徴を有する様々な化学プローブの合成法や新しい合成アプローチを創出することは、この分野の進展のために重要な課題である。

筆者はこのような背景を踏まえて、優れた特長をもつ新しい試薬の開発を目指して研究を行い、いくつか有用な知見を見出すことができた。

第一章では、SH 基選択的に簡便にビオチン標識できる、固相担持型試薬「KSH-1」の創製について述べた。SH 基と選択的に反応し、非対称ジスルフィドを形成する Npys 基を有するビオチン標識試薬に着目し、従来のビオチン標識法に伴う煩雑な精製を必要としていた問題を、この試薬を固相化学の技術を取り入れることで解決できると考えた。SH 基と官能基選択的に反応する活性な Npys 型ジスルフィドを中核とし、ビオチンと固相担体をリンカーで繋いだ構造を有する固相担持型ビオチン標識試薬「KSH-1」を設計した。検討の結果、市販で入手容易な 6-ヒドロキシニコチン酸を出発原料として、11 工程で固相担持型 SH 基選択的ビオチン標識試薬 KSH-1 を合成した。実際に SH 基を有する低分子である ACE 阻害剤カプトプリルに対してモデル実験を行い、室温下 30 分の反応により反応が完結することを確認した。また、反応終了後には濾過により樹脂を分離するのみで比較的良好な純度 (87%) でビオチン標識された化合物が得られた。さらに濾液を乾燥すると、高い収率 (96%) にて目的物が得られ、効率的で簡便にビオチン標識が達成されることを明らかにした。一例のみではあるものの、本標識試薬の高い汎用性が期待される。

第二章では、近年 CPP として知られ、細胞内への分子輸送ツールとして広く注目を集めている細胞膜透過性ペプチド「オクタアルギニン (Arg<sub>8</sub>)」を官能基選択的に導入する新しい試薬、KSH-2 の開発について述べた。KSH-1 のジスルフィド形成を利用したビオチン標識の知見を応用し、KSH-1 同様 Npys 型ジスルフィドを中核としたオクタアルギニン導入試薬を設計した。検討の結果、KSH-1 の合成中間体を利用して、樹脂上に構築した Npys-Cl にオリゴアルギニンを直接導入するという、3 工程を経て「固

相担持型 SH 基選択的オリゴアルギニン導入試薬 KSH-2」を合成した。これを実際にカプトプリルと、16 残基からなる PAD より誘導したペプチドに対してそれぞれ適用し、室温下の反応後、濾過するのみで対応するオクタアルギニン架橋体が比較的高純度(96%、90%)にて得られることを明らかにした。このことから効率的で簡便に CPP 架橋体が得られる、新しい手法を提供することができた。この知見は細胞内送達のキャリア用途や創薬研究の他、多数のアルギニンが配された高分子担体と見ることもでき、応用化学における新しい素材としても期待される。

第三章では、KSH-1、KSH-2 に共通した、2 種類のチオールや、その誘導體から効率的に非対称ジスルフィドを構築する新しい手法を、環状ペプチドの新規合成手法「ジスルフィド先導型環状ペプチド合成」という概念に応用した。固相担持された Npys-Cl には、保護チオールが直接導入でき、次いで別のチオールを作用させることで簡便に非対称ジスルフィドが得られることを、陣痛促進剤オキシトシンの合成を通じて明らかにした。常法の環状ジスルフィドペプチド合成法とは異なり、2 種のペプチドフラグメントを Npys 樹脂と段階的に反応することで非対称ジスルフィドを形成し、最終環化反応を分子内アミド化により分子内のペプチド結合を構築した。特に非対称ジスルフィド形成においては 30 分という短時間で高純度のジスルフィドを生成した。この非対称ジスルフィド形成反応は、ケミカルライゲーシオンに頻用されるチオエステルに対して用いても加水分解等を起こすこと無く適用可能であった。すなわち、固相 Npys-Cl を活用し、固相ジスルフィドライゲーシオン(SPDSL)という新しい合成手法を創出するに至った。この統一的な合成手法はペプチド合成に代表される、チオールやジスルフィドの合成化学において新たなアプローチを提供できたと考えている。

KSH-1、KSH-2 における知見は、今後さまざまな SH 基選択的標識試薬や化学プローブの創製が期待でき、SPDSL の技術は 2 つの異なる区分ペプチドの組み合わせにより、網羅的なジスルフィドペプチドライブラリーの合成やハイブリッド分子の合成にも応用ができると考えている。

また、無保護のチオールは空気酸化により意図せずジスルフィド形成を起こすことがあり、さらに多くのチオールは強烈な臭気をもつことで知られる。その一方で、有用な還元剤として用いられることや、金属原子との親和性を有する特徴を持つ。このような様々な側面を持つチオールのケミストリー研究の一助となることも期待したい。また、固相化学とチオールの親和性を考えると、化粧品、公衆衛生、脱臭、処理剤、充填剤、クロマトグラフィー基材等様々な用途への応用可能性が期待でき、本研究の成果を通じて科学の発展や社会に貢献できれば幸いである。

2017 年 1 月 9 日

福元 謙太郎

## 謝 辞

本研究に際し、終始ご厚情なる御指導、御鞭撻を賜りました  
東京薬科大学薬品化学教室 林 良雄教授に甚大なる感謝の意を表します。

本論文をまとめるにあたり、懇切丁寧な御指導と御鞭撻を賜りました  
東京薬科大学薬学部 野水 基義教授、松本 隆司教授、三浦 剛教授に深く感謝致します。

筆者に東京薬科大学への派遣の機会を与えていただきました  
国産化学株式会社 加藤 訓子代表取締役社長兼企画開発室長に心より感謝致します。

本研究の実施にあたり、オキシトシン合成において御指導、御協力を賜りました、大阪大学蛋白質研究所蛋白質有機化学研究室 北條 裕信教授、朝比奈 雄也助教に心より感謝申し上げます。

本研究の実施にあたり、Npys 樹脂を用いた合成研究を共に進行すると共に親身な御指導と御鞭撻を賜りました。本学薬品化学教室 田口 晃弘助教に深く感謝致します。

本研究を行うにあたり、親身な御指導と御鞭撻を賜りました  
北海道大学大学院薬学研究院 薬師寺 文華講師、山崎 有理博士、  
東京薬科大学薬学部薬品化学教室 谷口 敦彦講師、高山 健太郎助教に心より感謝致します。

本研究期間中に共に研究に打ち込み、卒研究生として御支援を頂きました  
東京薬科大学 足立 久美氏、梶山 晶大氏、志村 駿介氏、濱田 圭佑氏、  
武田 康嗣氏、木村 振一郎氏、小川 優氏に深く感謝致します。

本学薬品化学教室に所属の今野 翔博士、プレイヤー タニガイ マライ博士、  
セドリック レンティール博士、林 良樹氏、六車 共平氏、秋山 大地氏、  
小林 清孝氏を始め、薬品化学教室に在籍中、また卒業生の皆様に感謝致します。

X線解析、質量分析、元素分析、アミノ酸分析にてお世話になりました、  
本学中央分析センターの皆様、東レリサーチセンターの皆様、  
京都大学薬学研究科有機微量元素分析センターの皆様感謝致します。

ペプチドの液相合成、固相合成、類縁体の合成技術やチオール<sup>1</sup>の性質を始めとした化学合成技術に関して御指導、御助言をいただきました、京都大学大学院薬学研究科 藤井 信孝名誉教授、大石 真也准教授、東京医科歯科大学 玉村 啓和教授、大橋 南美博士、早稲田大学 小出 隆規教授、東京薬科大学薬学部 吉川 大和准教授、保住 建太郎講師、片桐 文彦助教、東京工業大学 堤 浩准教授に感謝致します。

筆者の大学在籍時に学友として切磋琢磨し、また国産化学との共同研究、共同開発を通して相互に高め合った株式会社イーアールシー 鳴嶋 善聡氏、東京エンプラ商事株式会社 西北 謙吾氏に感謝致します。

業務を通じて化学知識、合成技術、分析技術の御助言をいただきました、国産化学株式会社生産本部 半田 正一取締役、国産化学群馬工場 松浦 哲朗顧問、植竹 啓秋工場長、製造部合成グループ 横田 勉部長、結城 義男部長、長島 重明氏、佐藤 高博氏を始めとする群馬工場の皆様、また営業部 永原 優氏、品質保証部 後藤 充令氏をはじめとする国産化学社員の技術職の皆様、及び石井 浩博士、田中 康弘氏、山崎 由夫氏、関口 京一氏を始めとする国産化学に所属しておられました皆様に感謝致します。

化学市場動向の助言、研究生活の補助、試薬調達先の調査、支援等様々な御助力をいただきました、経理部 内海 健二取締役、営業部 原川 博由部長、久田 巖部長、購買部 保坂 邦彦部長、岩田 和也課長、群馬工場 武藤 洋子氏、大杉 夏江氏、企画開発室 椎野 和重部長、鳴津 敏貴氏を始めとする全ての国産化学社員の皆様、近藤 明人氏、内田 郁氏、を始めとする国産化学に所属しておられました皆様に感謝致します。

筆者が学士から修士にかけて直接の御指導と御鞭撻を賜り、筆者の化学合成・技術・知識の礎を築いて戴き、Pysに関する研究により本研究の礎を与えて下さいました、東京工業大学特別栄誉教授、東京大学名誉教授、東京理科大学名誉教授、社団法人北里研究所基礎研究所 名誉所員 向山 光昭先生、エーザイ株式会社 大橋 芳章博士、キヤノン株式会社 新藤 太一博士、アステラス製薬株式会社 生貝 和弘博士、大正製薬株式会社 小橋 陽平博士、帝人ファーマ株式会社 佐藤 嘉紀博士、富士写真フイルム株式会社 菊池 渉氏に心より感謝致します。

Npys の発見、開発や緻密な研究の結果、様々な発見を見出され、向山研究室の先輩でもある、松枝 礼博士に心から尊敬と共に感謝を申し上げます。

筆者が学士から修士にかけ、講義の他、卒論あるいは修士論文作成について御指導を頂き、北里研究所での研究機会を与えて戴きました、北里研究所名誉理事長北里大学特別荣誉教授 女子美術大学名誉理事長 大村 智先生、北里大学北里生命科学研究所 砂塚 敏明教授、北里大学理学部 宮本 健名誉教授、弓削 秀隆教授に深く感謝致します。

筆者が北里研究所基礎研究所 有機合成化学研究室に在籍時、有機化学合成の知識、および技術を御指導いただきました、金沢大学薬学部 松尾 淳一教授、藤沢 英彦博士、岡山大学大学院自然科学研究科 萬代 大樹助教、東レ株式会社 高橋 英喜博士、大正製薬株式会社 端早田 隆博士、アステラス製薬株式会社 宅和 知文博士、日本曹達株式会社 山中 洋行博士、富士写真フイルム株式会社 佐野 聡氏、三菱ウェルファーマ株式会社 戸澤 孝博士、秘書 大地 鞠子氏を始めとする皆様に心より感謝致します。

筆者が学士から修士にかけて学生として共に切磋琢磨し技術、知識を高め合った富士写真フイルム株式会社 永田 裕三氏、エーザイ株式会社 山根 義伸氏、第一三共ケミカルファーマ株式会社 柳井 利治氏、黒田 貴一博士、箕輪 智史氏、萩原 義晶氏、株式会社東レリサーチセンター株式会社森 龍真氏、森 仁子氏、富樫 優子氏、末木 明人氏を始めとする、当時北里大学理学部、北里大学生命化学研究科、東京理科大学理工学部所属の皆様に心より感謝致します。

筆者が新宿区立戸山中学校在籍時、魅力あふれる指導により科学の魅力を伝えてくださいました新宿区立四谷中学校 小貝 宏主任教諭に心より感謝致します。

本研究の一部は、科学技術振興機構の研究成果最適展開支援プログラム A-STEP (課題番号：AS231Z04408F)の御支援の下、遂行致しました。御礼を申し上げます。

最後に筆者を経済的に、また内面から支え、陰ながら応援をいただきました父 健二、母 博子、姉 木全 智子、妹 岩佐 久美子、そして妻 佳奈に心から感謝すると共に本論文を捧げます。

平成 29 年 1 月 9 日  
福元 謙太郎



## 引用文献

### 序論

- 1) Matsueda R., Aiba K., *Chem. Lett.*, **7**, 951-952 (1978).
- 2) Mukaiyama T., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **15**, 94-103 (1976).
- 3) Matsueda R., *Chem. Lett.*, **7**, 979-982 (1978).
- 4) Matsueda R., Walter R., *Int. J. Peptide Protein Res.*, **16**, 392-401 (1980).
- 5) Ikeda S., Yokota T., Watanabe K., Kan M., Takahashi Y., Ichikawa T., Takahashi K., Matsueda R., *Peptide Chemistry (Peptide Research Foundation, Osaka 1986)*, 115-120 (1985).
- 6) Olsen F. N., Tsakos M., Poulsen T. B., *Synlett*, **26**, 2697-2701 (2015).
- 7) Bernatowics M. S., Matsueda R., Matsueda G. R., *Int. J. Peptide Protein Res.*, **28**, 107-112 (1986).
- 8) Matsueda R., Kaiser E. T., Walter R., *Peptide Chemistry*, 31-36 (1980).
- 9) Matsueda R., Maruyama H., Kitazawa E., Takahagi H., Mukaiyama T., *J. Am. Chem. Soc.*, **97**, 2573-2575 (1975).
- 10) Matsueda R., Higashida S., Ridge R. J., Matsueda G. R., *Chem. Lett.*, **11**, 921-924 (1982).

### 第一章

- 1) “ENCYCLOPAEDIA CHIMICA”, 30th ed., by Kyoritu Shuppan Co., Ltd., Tokyo, pp. 221 (1987).
- 2) Green N. M., *Adv. Protein Chem.*, **29**, 85-133 (1975).
- 3) Hofmann K., Kiso Y., *PNAS*, **73**, 3516-3518 (1976).
- 4) Hofmann K., Finn F. M., Kiso Y., *J. Am. Chem. Soc.*, **100**, 3585-3590 (1978).
- 5) Flanders K. C., Mar D. H., Folz R. J., England R. D., Coolican S. A., Harris D. E., Floyd A. D., Gurd R. S., *Biochemistry*, **21**, 4244-4251 (1982).
- 6) Frickel E., Riek R., Jelesarov I., Helenius A., Wüthrich K. W., Ellgaard L., *PNAS*, **99**, 1954-1959 (2002).
- 7) Muroi M., Ohnishi T., Tanamoto K., *J. Biol. Chem.*, **277**, 42372-42379 (2002).
- 8) Green M. N., Konieczny L., Toms E. J., Valentine R. C., *Biochem. J.*, **125**, 781-791 (1971).
- 9) Hirsch J. D., Eslamizar L., Filanoski B. J., Malekzadeh N., Haugland R. P., Beechem J. M., Haugland R. P., *Anal. biochem.*, **308**, 343-357 (2002).

- 10) Behrens M., Bartelt J., Reichling C., Winnig M., Kuhn C., Meyerhof W., *J. biol. Chem.*, **281**, 20650-20659 (2006).
- 11) Cernuda-Morollón E., Pineda-Molina E., Cañada F. J., Pérez-Sala D., *J. Biol. Chem.*, **276**, 35530-35536 (2001).
- 12) Oda Y., Nagasu T., Chait B. T., *Nat. Biotechnol.*, **19**, 379-382 (2001).
- 13) Sutoh K., Yamamoto K., Wakabayashi T., *J. Mol. Biol.*, **178**, 323-339 (1984).
- 14) Demidov V. V., Dokholyan N. V., Witte-Hoffmann C., Chalasani P., Yiu H., Ding F., Yu Y., Cantor C. R., Broude N. E., *PNAS*, **103**, 2052-2056 (2006).
- 15) Hayashi Y., Ezawa K., *Jpn. Kokai Tokkyo Koho*, JP63246382 (1988).
- 16) Traut R. R., Bollen A., Sun T-T., Hershey J. W. B., Sundberg J., Pierce L. R., **12**, 3266-3273 (1973).
- 17) Duncan R. S., Weston P. D., Wrigglesworth R., *Analytical Biochemistry*, **132**, 68-73 (1983).
- 18) Horiki K., *Tetrahedron Lett.*, **45**, 4103-4106 (1976).
- 19) Shieh W., Shekhar R., Blacklock T., Tedesco A., *Synthetic communications.*, **32**, 1059-1067 (2002).
- 20) Parlow, J. J., Mischke D. A., Woodard S.S., *J. Org. Chem.*, **62**, 5908-5919 (1997).
- 21) Schuerch C., Frechet J. M., *J. Am. Chem. Soc.*, **93**, 492-496 (1971).
- 22) Ueki M., Honda M., Kazama Y., Katoh T., *Synlett*, 21-22 (1994).
- 23) Kunishima M., Kawachi C., Morita J., Terao K., Iwasaki F., Tani S., *Tetrahedron*, **55**, 13159-13170 (1999).
- 24) Kaiser E., Colescott R. L., Bossinger C. D., Cook P. I., *Anal. Biochem.*, **34**, 595-598, (1970).
- 25) Murthy V. S., Waldron T. L. Goldberg M. E., Vollmer R. R., *European J. Pharm.*, **46**, 207-212 (1977).

## 第二章

- 1) Frankel A. D., Pabo C. O., *Cell*, **55**, 1189-1193 (1988).
- 2) Fawell S., Seery J., Daikh Y., Moore C., Chen L. L., Pepinsky B., Barsoum J., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 664-668 (1994).
- 3) Futaki S. ed., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **60**, 447-614 (2008).
- 4) Nakase I., Niwa M., Takeuchi T., Sonomura K., Kawabata N., Koike Y., Takehashi M., Tanaka S., Ueda K., Simpson J. C., Jones A. T., Sugiura Y., Futaki S., *Mol. Ther.*, **10**, 1011-1022 (2004).

- 5) Fretz M. M., Penning N. A., Al-Taei S., Futaki S., Takeuchi T., Nakase I., Storm G., Jones A. T., *Biochem. J.*, **403**, 335-342 (2007).
- 6) Kosuge M., Takeuchi T., Nakase I., Jones A. T., Futaki S., *Bioconjugate Chem.*, **19**, 656-664 (2008).
- 7) Morishita M., Kamei N., Ehara J., Isowa K., Takayama K., *J. Control. Release*, **118**, 177-184 (2007).
- 8) Hayashi Y., Takayama K., Suehisa Y., Fujita T., Nguyen J.-T., Futaki S., Yamamoto A., Kiso Y., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **17**, 5129-5132 (2007).
- 9) Sakuma S., Suita M., Masaoka Y., Kataoka M., Nakajima N., Shinkai N., Yamauchi H., Hiwatari K., Tachikawa H., Kimura R., Yamashita S., *J. Controlled Release*, **148**, 187-196 (2010).
- 10) Futaki S., Suzuki T., Ohashi W., Yagami T., Tanaka S., Ueda K., Sugiura Y., *J. Biol. Chem.*, **276**, 5836-5840 (2001).
- 11) Wadia J. S., Stan R. V., Dowdy S. F., *Nat. Med.*, **10**, 310-315 (2004).
- 12) Hayashi Y., Takayama K., Suehisa Y., Fujita T., Nguyen J.-T., Futaki S., Yamamoto A., Kiso Y., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **17**, 5129-5132 (2007).
- 13) Turner J. J., Arzumanov A. A., Gait M. J., *Nucleic Acids Research*, **33**, 27-42 (2005).
- 14) Candén G., Michiue H., Ishikawa S., Fujimura A., Hayashi K., Uneda A., Mori A., Ohmori I., Nishiki T., Matsui H., Tomizawa K., *Biomaterials*, **33**, 6468-6475 (2012).
- 15) Dutot L., Lécorché P., Burlina F., Marquant R., Point V., Sagan S., Chassaing G., Mallet J.-M., Lavielle S., *J. Chem. Biol.*, **3**, 51-65 (2010).
- 16) Takayama K., Tadokoro A., Pujals S., Nakase I., Giralt E., Futaki S., *Bioconjugate Chem.*, **20**, 249-257 (2009).
- 17) Garsia-Martin F., Quintarnar-A M., G.-R. Y., Cruz L. J., Gravel C., Furic R., Côte S., T.-P. *Bioconjugate Chem.*, **20**, 249-257 (2009).
- 18) Ellerby H. M., Arap W., Ellerby L. M., Kain R., Andrusiak R., Rio G. D., Krajewski S., Lombardo C. R., Rao R., Ruoslahti E., Bredesen D. E., Pasqualini R., *Nat. Med.*, **5**, 1032-1038 (1999).

### 第三章

- 1) Blundell T. L., Cutfield J. F., Cutfield S. M., Dodson E. J., Hodgkin D. C., Mercola D. A., Vijayan M., *Nature*, **231**, 506-511 (1971).
- 2) Andreotti G., Méndez B. L., Amodeo P., Morelli M-A. C., Nakamuta H., Motta A., *J. Biol. Chem.*, **281**, 24193-24203 (2006).
- 3) Vincent J. P., Schweitz H., Lazdunski M., *Biochemistry*, **14**, 2521-2525 (1975).

- 4) Kangawa K., Matsuo H., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **118**, 131-139 (1984).
- 5) Witt D., *Synthesis*, **16**, 2491-2509 (2008).
- 6) Nuzzo R. G., Allara D. L., *J. Am. Chem. Soc.*, **105**, 4481-4483 (1983).
- 7) Shon Y. S., Mazzitelli C., Murray R. W., *Langmuir*, **17**, 7735-7741 (2001).
- 8) West K. R., Bake K. D., Otto S., *Organic Lett.*, **7**, 2615-2618 (2005).
- 9) Wang W., Wang L., Palmer B. J., Exarhos G. J., Li A. D. Q., *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 11150-11159 (2006).
- 10) Tam-Chang S., Stehouwer J. S., Hao J., *J. Org. Chem.*, **64**, 334-335 (1999).
- 11) Umali A., Simanek E. E., *Org. Lett.*, **5**, 1245-1247 (2003).
- 12) Ghosh S., Irvin K., Thayumanavan S., *Langmuir*, **23**, 7916-7919 (2007).
- 13) Sridhar M., Vadivel S. K., Bhalerao U. T., *Synth. Commun.*, **28**, 1499-1502 (1998).
- 14) Ali M. H., McDerott M., *Tetrahedron Lett.*, **96**, 6271-6273 (2002).
- 15) Nishiuchi Y., Sakakibara S., *FEBS letters*, **148**, 260-262 (1982).
- 16) Soll R., Beck-Sickinger A. G., *J. Pept. Sci.*, **6**, 387-397 (2000).
- 17) Leino R., Lönnqvist J. E., *Tetrahedron Lett.*, **45**, 8489-8491 (2004).
- 18) Schulz A., Kluver E., Schulz-Maronde S., Adermann K., *Biopolymers*, **80**, 34-49 (2005).
- 19) Mays J. R., Restituyo J. A., Katzenberger R. J., Wassarman D. A., Rajski S. R., *Tetrahedron Lett.*, **48**, 4579-4583 (2007).
- 20) Mukaiyama T., Takahashi K., *Tetrahedron Lett.*, **56**, 5907-5908 (1968).
- 21) Mu Y. Q., Nodwell M., Pace J. L., Shaw J. P., Judice J. K., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **14**, 735-738 (2004).
- 22) Morais G. R., Falconer R. A., *Tetrahedron Lett.*, **48**, 7637-7641 (2007).
- 23) Harusawa S., Yoshida K., Kojima C., Araki L., *Tetrahedron*, **60**, 11911-11922 (2004).
- 24) Tsunoda T., Otsuka J., Yamamiya Y., Itô S., *Chem. Lett.*, **23**, 539-542 (1994).
- 25) Christoforou A., Nicolaou G., Elemen Y., *Tetrahedron Lett.*, **47**, 9211-9213 (2006).
- 26) Hunter R., Stellenboom N., Caira M. R., *Synlett*, 252-253 (2008).
- 27) Diaz C., Balasubramanian K., Schroit A. J., *Bioconjugate Chem.*, **9**, 250-254 (1998).
- 28) Ryu E. K., Choe Y. S., Byun S. S., Lee K., Chi D. Y., Choi Y., Kim B., *Bioorg. Med. Chem.*, **12**, 859-864 (2004).
- 29) Galanis A. S., Albericio F., Grøtli M., *Peptide Sci.*, **92**, 23-34 (2009).
- 30) Postma T. M., Albericio F., *ACS Comb. Sci.*, **16**, 160-163 (2014).
- 31) Manning M., *Peptide Sci.*, **90**, 203-212 (2008).
- 32) Hojo H., Onuma Y., Akimoto Y., Nakahara Y., Nakahara Y., *Tetrahedron Lett.*, **48**, 25-28 (2007).

- 33) Asahina Y., Kamitori S., Takao T., Nishi N., Hojo H., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **52**, 9733-9737 (2013).
- 34) Kawakami T. Kogure S., Aimoto S., *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **69**, 3331-3338 (1996).

実験の部

- 1) Kaiser E., Colecott R. L., Bossinger C. D., Cook P. I., *Anal. Biochem.*, **34**, 595-598, (1970).
- 2) Hojo H., Onuma Y., Akimoto Y., Nakahara Y., Nakahara Y., *Tetrahedron Lett.*, **48**, 25-28 (2007).
- 3) Asahina Y., Kamitori S., Takao T., Nishi N., Hojo H., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **52**, 9733-9737 (2013).