

# 博士論文

ホスホニウムトリアゾリド型縮合剤を用いた  
新規ペプチド核酸類縁体の合成と  
汎用的ペプチド固相合成法への展開

齋藤 敬太

# はじめに

本論文は、2011年4月から2014年3月の期間、東京大学大学院新領域創成科学研究科メディカルゲノム専攻医用機能分子工学分野（和田研究室）にて行った、研究をまとめたものである。

## 略号表

Bn : benzyl

BOP: (Benzotriazol-1-yloxy)-tris(dimethylamino)phosphonium hexafluorophosphate

Bz : benzoyl

COMU : (1-Cyano-2-ethoxy-2-oxoethylideneaminoxy)dimethylamino-morpholino-carbenium hexafluorophosphate

DIPEA : diisopropylethylamine

DMAP : 4,4-dimethylaminopyridine

DMF : *N,N*-dimethylformamide

DMSO : dimethylsulfoxide

HATU : 2-(1H-7-azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate

HBTU : 2-(1H-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate

MALDI-TOF MS: matrix assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry

Ms : methanesulfonyl

NMM : *N*-methylmorpholine

NMP : *N*-methylpyrrolidone

PNA: peptide nucleic acid

PyAOP: (7-Azabenzotriazol-1-yloxy)tripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate

PyBOP: benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate

PyNTP : 3-nitro-1,2,4-triazol-1-yl-tris(pyrrolidin-1-yl)phosphonium hexafluorophosphate

Su: succinimide

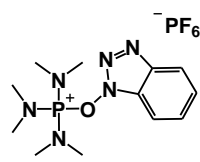
TEA : triethylamine

TFA : trifluoroacetic acid

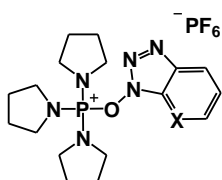
THF: tetrahydrofuran

TIS : triisopropylsilane

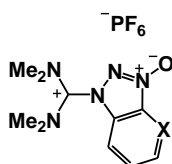
Z: benzyloxycarbonyl



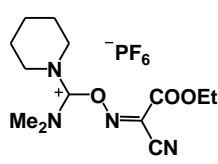
BOP



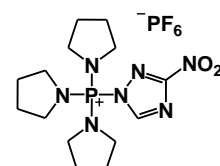
PyBOP(X=CH)  
PyAOP(X=N)



HBTU(X=CH)  
HATU (X=N)



COMU



PyNTP

# 目次

序論	6
本論	
1. ホスホニウムトリアゾリド型縮合剤を用いた新規ペプチド核酸類縁体の合成	
1.1. 研究背景	
1.1.1. ペプチド核酸の概要	8
1.1.2. ペプチド核酸と天然型核酸の相互作用	8
1.1.3. ペプチド核酸と天然型核酸の二重鎖の特徴	9
1.1.4. ペプチド核酸の応用	11
1.1.5. 研究目的及び分子デザイン	12
1.2. 研究結果	
1.2.1. 合成戦略	14
1.2.2. DBNA モノマーの合成	15
1.2.3. 固相合成の概要	20
1.2.4. グリシンリンカー2量体の合成	20
1.2.5. DBNA 鎖長伸長条件の検討	22
1.2.6. 第二世代のモノマー合成法の開発	25
1.2.7. シトシン塩基を有するDBNA10量体の合成と、天然型核酸との二重鎖形成能の調査	26
1.3. 小括	28
2. ホスホニウムトリアゾリド型縮合剤を用いた汎用的ペプチド固相合成法の開発	
2.1. 研究背景	
2.1.1. 固相合成法に用いられる固相担体	29
2.1.2. カルボジイミド型縮合剤	31
2.1.3. カルベニウム型縮合剤	32
2.1.4. ホスホニウム型縮合剤	33
2.1.5. 近年開発された高活性縮合剤 COMU と PyNTP	34
2.1.6. 固相合成では合成困難なオリゴペプチドの合成	35
2.2. 研究結果	
2.2.1. 従来型ペプチド縮合剤との反応性の比較	37
2.2.2. 膨潤性固相担体と非膨潤性固相担体の比較	38

2.2.3. ラセミ化度合いの測定	39
2.3. 小括	41
総括	42
実験項	44
参考文献	53
謝辞	56

# 序論

本博士論文は、第 1 章と第 2 章の二部構成になっている。

第 1 章では、第 2 章で述べる新規ペプチド合成法の開発に至る経緯である、新規ペプチド核酸類縁体の合成について述べる。ペプチド核酸 (PNA) は、糖-リン酸骨格の代わりに、ペプチド骨格を有する核酸類縁体である。ペプチド核酸は、天然型核酸とワトソン・クリック塩基対による二重鎖形成能を有する一方、酸性条件下、塩基性条件下、いずれの条件下においても安定であり、また、プロテアーゼの基質にならないことから、化学的にも、生物学的にも安定な核酸類縁体である。PNA は、安定性をはじめとする、PNA 独自の特徴を生かした応用研究がなされており、実用化が期待されている。

PNA の特徴の中で、実用化に際し不利に働く性質として、PNA が、天然型核酸と二重鎖を形成する際、複数の配向性を有する点が挙げられる。複数の配向性は、情報の 1 対 1 対応性が失われることを意味しており、改善が望まれる点である。この問題の原因となっているのが、PNA の二次構造である。PNA はより直線的な二次構造をとるため、パラレル配向とアンチパラレル配向の構造的差異が小さくなり、結果、両配向間のエネルギー差が小さくなる。

PNA の構造学的知見を踏まえた上で、デザインされたのが新規ペプチド核酸類縁体 diaminobutanoic acid-based nucleobase-linked polyamide (DBNA) である。本研究では DBNA のオリゴマーを合成し、天然型核酸との二重鎖形成能等の物性を評価することを目標とした。

DBNA 合成では、モノマーを合成後、ペプチド固相合成によるオリゴマー合成を試みたが、現在主流のペプチド合成法では、目的とするオリゴマーを得ることができなかった。そこで、Wada らによって開発された縮合剤 3-nitro-1,2,4-triazol-1-yl-tris(pyrrolidin-1-yl)phosphonium hexafluorophosphate (PyNTP) と、非膨潤性固相担体を用いた、独自の手法で、この問題を解決した。

第 2 章では、この独自の手法を、DBNA 合成に留まらず、一般的なペプチド合成への応用を検討した。ペプチド合成は、核酸合成に比べて、長鎖のオリゴマーの合成が困難であるが、この主な原因は、固相担体上のオリゴペプチドの鎖長が長くなるにつれて、高次構造を形成し、末端のアミノ基の反応性が低下するためである。また、短鎖のオリゴマーであっても、低活性アミノ酸を多く含む配列であった場合に、同様の末端のアミノ基の反応性が低く、目的とするオリゴペプチドが得られない場合が存在する。すなわち、縮合反応の効率を向上させることで、従来法では困難であった配列のオリゴペプチドが合成可能になり、ペプチド固相合成法の適用範囲を広げることが可能となる。

本研究により開発された新規ペプチド合成法は、従来型の高活性縮合剤である 2-(1H-7-azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate (HATU) や (1-Cyano-2-ethoxy-2-oxoethylideneaminoxy)dimethylamino-morpholino-carbenium hexafluorophosphate (COMU) よりも優れた縮合活性を示した。一方で、本手法で合成されたオリゴペプチドは、HATU によって合成されたオリゴペプチド以上に光学的に純度の高

いものであり、縮合効率とラセミ化の抑制を両立した合成法のである。

# 本論

## 第1章 ホスホニウムトリアゾリド型縮合剤を用いた新規ペプチド核酸類縁体の合成

### 1.1. 研究背景

#### 1.1.1. ペプチド核酸の概要

1991年に Nielsen らによって合成されたペプチド核酸 (PNA) は、糖—リン酸骨格の代わりにペプチド骨格を有する核酸類縁体である<sup>1</sup> (Figure 1)。ペプチド核酸は、相補的な塩基配列を有する天然型核酸とワトソン・クリック塩基対により二重鎖を形成するという、核酸の基本的な性質を有している一方、安価な原料から簡便に合成が可能で、化学的にも生物学的にも安定であることから、アンチセンス法やアンチジーン法といった核酸医薬への応用や、マイクロアレイなどの分子デバイスへの応用が期待されている分子である。

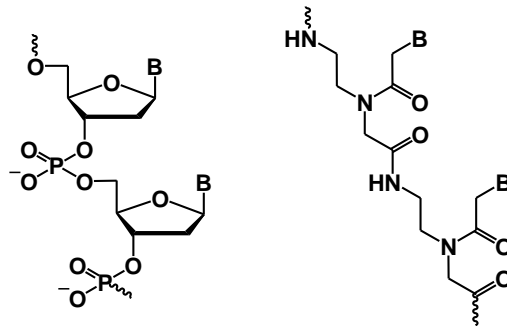


Figure 1. DNA と PNA の構造

#### 1.1.2. ペプチド核酸と天然型核酸の相互作用

PNA/DNA 二重鎖や PNA/RNA 二重鎖の融解温度は、対応する配列を有する DNA/DNA 二重鎖や DNA/RNA 二重鎖のそれと比べて高い (Table 1<sup>1b</sup>)。この理由は、PNA と天然型核酸の二重鎖及び天然型核酸同士の二重鎖形成にまつわる熱力学的パラメータから、二重鎖形成時のエントロピー損失が小さいためである (Table 2<sup>1b</sup>)。PNA が、天然型核酸との二重鎖形成時にエントロピー損失が小さいのは、リン酸部位を有していないため、ポリアニオン分子である天然型核酸との負電荷の静電反発が無く、二重鎖形成時、水和に必要な水分子の量が、天然型核酸

Table 1. PNA/DNA, PNA/RNA, DNA/DNA, DNA/RNA 二重鎖融解温度<sup>1b</sup>

TABLE 1 Melting temperatures $T_m$ (°C) for PNA-DNA, PNA-RNA, DNA-DNA and DNA-RNA complexes			
First-strand sequence*	TGTACGTCACAAC <sup>†</sup>	GTAGATCACT <sup>‡</sup>	AGTGATCTAC <sup>‡</sup>
PNA:DNA (parallel)	56.1	38.0	38.0
PNA:DNA (antiparallel)	69.5	51.0	49.0
PNA:RNA (parallel)	51.2	ND	ND
PNA:RNA (antiparallel)	72.3	ND	ND
DNA:DNA	53.3	33.5	33.5
DNA:RNA	50.6	ND	ND

Absorbance versus temperature curves were measured at 260 nm in 100 mM NaCl, 10 mM sodium phosphate, 0.1 mM EDTA, pH 7, as described in ref. 11.  $T_m$ , the temperature at which half of the molecules are hybridized, was obtained by fitting triplicate melting curves at 4  $\mu$ M of each strand to a modified two-state model with linear sloping baseline<sup>20</sup>.

\* Written 5'-3' for oligonucleotides and N to C terminal for PNA.

<sup>†</sup> The PNA terminates in a carboxamide.

<sup>‡</sup> The PNA terminates in a lysine amide.



同士の二重鎖形成時に比較して少ないためと解釈できる。このため、PNA と天然型核酸の二重鎖は、熱力学的に安定である。

PNA の性質として特徴的なのが、dsDNA の認識である<sup>2</sup> (Figure 2)。PNA がホモピリミジン配列である場合、相補的な配列を有する dsDNA に対し、フーグスティン型塩基対による三重鎖を形成する (Figure 2A)。また、PNA がさらに1当量多く存在する場合は、DNA 二重鎖のワトソン・クリック塩基対が一部開裂し、2本のPNA鎖とDNAが三重鎖を形成する、triplex invasion と呼ばれる構造を形成する (Figure 2B)。

一方で、PNA がホモピリミジン配列を有していない場合、PNA はDNA 二重鎖のワトソン・クリック塩基対を一部開裂、PNA/DNA 二重螺旋を形成し、duplex invasion と呼ばれる構造が安定となる (Figure 2C)。これらのDNA 二重鎖認識能はPNA 特徴的なものであり、二重鎖が熱力学的に安定であるということを裏付けている。

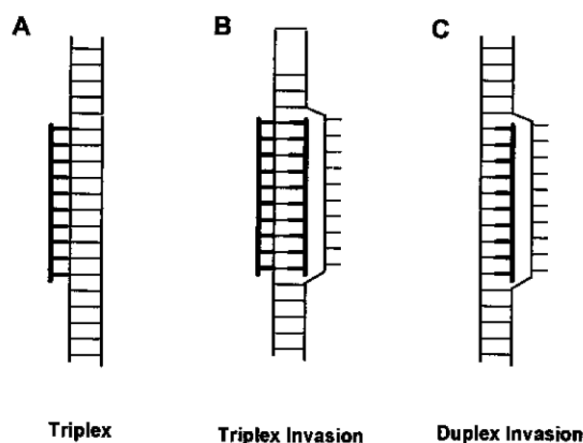


Figure 2. PNA と dsDNA の結合様式<sup>2</sup>

### 1.1.3. ペプチド核酸と天然型核酸の二重鎖の特徴

PNA/DNA 二重鎖や PNA/RNA 二重鎖の特徴として、最安定構造であるアンチパラレル配向の他に、準安定構造としてパラレル配向の二重鎖を形成することが知られている (Table 1)。これは、ペプチド結合により重合した PNA の主鎖の構造が直線的であり、アンチパラレル配向とパラレル配向の構造が近いことに起因していると考えられている。2種類の配向性を有することは、PNA の配列と2重鎖を形成することの可能なオリゴヌクレオチドの配列が1対1でないことを意味しており、核酸及びその類縁体の特徴的な長所の一つである、情報の1対1対応性が崩れることを意味しており、分子認識に関して改善が必要な点である。

Table 2. DNA/RNA、PNA/RNA、DNA/DNA、PNA/DNA 二重鎖形成の熱力学的パラメータ<sup>1b</sup>

	DNA:RNA	PNA:RNA	DNA:DNA	PNA:DNA
$\Delta H^\circ$ (kcal mol <sup>-1</sup> )*	-128.9	-128.5	-105.3	-106.6
$\Delta S^\circ$ (EU)*	-372.8	-345.9	-296.2	-285.8
$\Delta G^\circ_{37}$ (kcal mol <sup>-1</sup> )*	-13.3	-21.2	-13.4	-18.0
$T_m$ (°C, 8 $\mu$ M)*	50.1	72.2	53.5	68.8

Measured in 100 mM NaCl, 10 mM sodium phosphate, 0.1 mM EDTA, pH 7.0.

\* Obtained from linear plots of  $1/T_m$  versus  $\log(\text{concentration})$ <sup>20</sup>.

PNA が 2 種類の配向性を有する理由の 1 つとして考えられるのが、PNA の直線的な二次構造である。PNA の直線的な二次構造は、右巻きの天然型核酸の二次構造と異なり、パラレル、アンチパラレル配向間の差が小さい。PNA が直線的な二次構造を有することは、PNA/DNA 及び PNA/RNA 二重鎖の溶液構造に生じている歪みから見て取れる (Figure 3)。

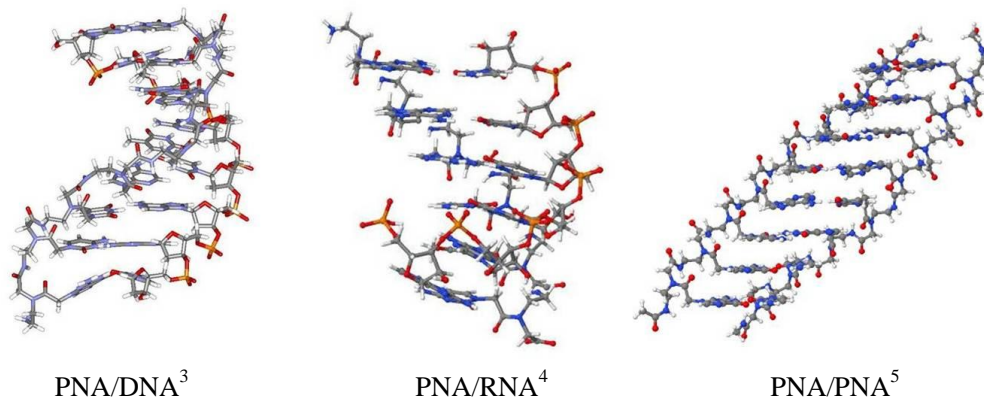


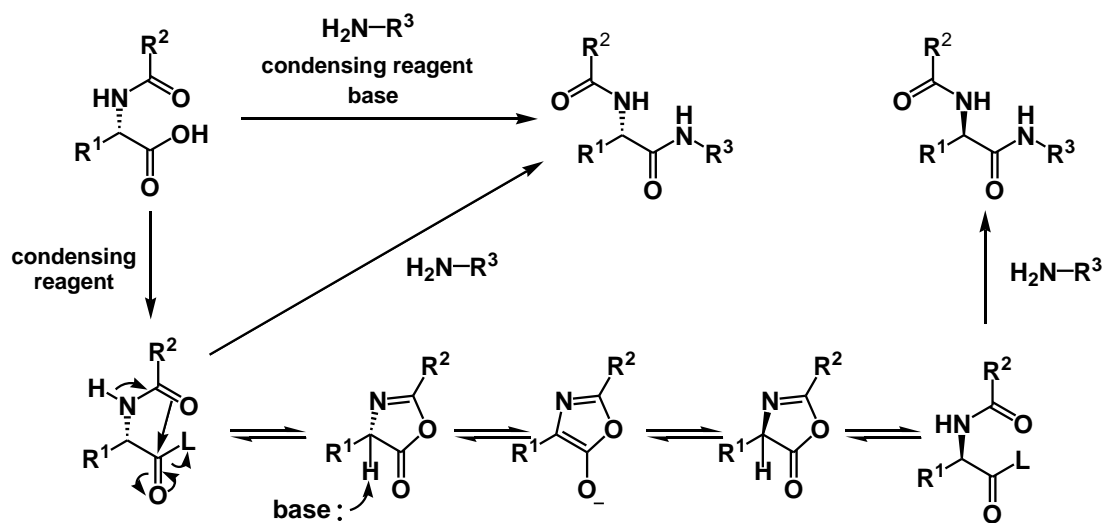
Figure 3. PNA/DNA 二重鎖、PNA/RNA 二重鎖及び PNA/PNA 二重鎖の溶液中での構造

PNA が 2 種類の配向性を有する別の理由として、PNA がアキラルな化合物である点が挙げられる。PNA はアキラルな化合物であるが、PNA 骨格中にキラルなアミノ酸を導入することで、PNA 鎖に螺旋を誘起する研究が行われている。通常の PNA/PNA 二重鎖は、右巻きと左巻きの螺旋の 1 : 1 混合物であるが、末端に L-Lys を挿入することで、PNA/PNA 二重鎖に右巻きが誘起され、D-Lys を挿入すると、逆の左巻きの二重螺旋を与える<sup>6</sup>。

また、PNA のグリシン部位をリシンやロイシンに置換した、キラルな PNA 類縁体を用いた、らせん構造のコントロールも試みられている<sup>7</sup> (Table 3a)。グリシン部位に置換されたアミノ酸の種類に関わらず、D 体のアミノ酸で置換された場合はアンチパラレル配向が安定化し、L 体のアミノ酸で置換された場合は、パラレル配向が安定化している (Table 3<sup>8</sup>)。

このように、PNA に不斉点を導入することで、単一の配向を安定化する試みは、一定の成果を上げているものの、十分であるとは言えない。Table 3 の結果から、3 か所修飾が施

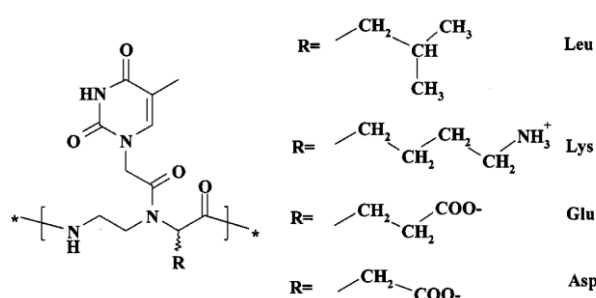
### Scheme 1



されたオリゴ PNA は、1 か所修飾が施されたオリゴ PNA と比較して、単一配向性は顕著となっており、修飾箇所を増やすことで、単一の配向がさらに安定化すると考えられるが、グリシン部位が他のキラルなアミノ酸に置換された PNA は、*N*-アシル- $\alpha$ -アミノ酸の一種であり、縮合反応の段階で、一部ラセミ化が進行してしまい、光学的に純粋なポリマーを得ることが困難であり、修飾箇所を増やすのは現実的ではない (Scheme 1)。

**Table 3<sup>7</sup>.** a) グリシン部位がキラルなアミノ酸に置換された PNA 類縁体の構造。b) 骨格内にキラルなアミノ酸を含む PNA オリゴマーの配列。c) 骨格内にキラルなアミノ酸を含む PNA オリゴマーと天然型核酸の二重鎖融解温度。

**a**



**b**

- (1) -  $T_{L\text{-Leu}}$  (C-ter.) H-GTAGATCACT $_{L\text{-Leu}}$ -NH<sub>2</sub>
- (2) -  $T_{L\text{-Leu}}$  (middle) H-GTAGAT $_{L\text{-Leu}}$ CACT-NH<sub>2</sub>
- (3) -  $3T_{L\text{-Leu}}$  H-GT $_{L\text{-Leu}}$ AGAT $_{L\text{-Leu}}$ CACT $_{L\text{-Leu}}$ -NH<sub>2</sub>
- (4) -  $T_{L\text{-Lys}}$  (C-ter.) H-GTAGATCACT $_{L\text{-Lys}}$ -NH<sub>2</sub>
- (5) -  $T_{D\text{-Lys}}$  (C-ter.) H-GTAGATCACT $_{D\text{-Lys}}$ -NH<sub>2</sub>
- (6) -  $T_{L\text{-Lys}}$  (middle) H-GTAGAT $_{L\text{-Lys}}$ CACT-NH<sub>2</sub>
- (7) -  $T_{D\text{-Lys}}$  (middle) H-GTAGAT $_{D\text{-Lys}}$ CACT-NH<sub>2</sub>
- (8) -  $3T_{L\text{-Lys}}$  H-GT $_{L\text{-Lys}}$ AGAT $_{L\text{-Lys}}$ CACT $_{L\text{-Lys}}$ -NH<sub>2</sub>
- (9) -  $3T_{D\text{-Lys}}$  H-GT $_{D\text{-Lys}}$ AGAT $_{D\text{-Lys}}$ CACT $_{D\text{-Lys}}$ -NH<sub>2</sub>

**c**

Table 1. Melting temperatures ( $T_m$ , °C)<sup>[a]</sup> of L-leucine and D- and L-lysine-based PNAs and comparison to an achiral PNA<sup>[b]</sup> ( $\Delta T_m$ , °C, in brackets)

PNA	PNA/PNA antiparallel	PNA/PNA parallel	Chirality	PNA/DNA antiparallel	PNA/ DNA parallel
$T_{L\text{Leu}}$ (C-term.)	66 (+1)	44 (-4)	L (1)	46 (-3)	38 (-1)
$T_{L\text{Leu}}$ (middle)	63 (-2)	42 (-6)	L (2)	47 (-2)	39 (0)
$3T_{L\text{Leu}}$	58 (-7)	38 (-10)	L (3)	45 (-4)	31 (-8)
$T_{L\text{Lys}}$ (C-term.)	68 (+3)	45 (-3)	L (4)	52 (+3)	38 (-1)
$T_{L\text{Lys}}$ (middle)	65 (0)	44 (-4)	D (5)	51 (+2)	39 (0)
			L (6)	47 (-2)	44 (+5)
$3T_{L\text{Lys}}$	63 (-2)	41 (-7)	D (7)	51 (+2)	40 (+1)
			L (8)	49 (0)	42 (+3)
			D (9)	53 (+4)	38 (-1)

<sup>[a]</sup> Measurements were made in a 10 mM phosphate buffer, 100 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, pH = 7.0. The melting temperatures for the PNA-PNA duplexes are the average of the results obtained with the two enantiomers. Estimated deviations:  $\pm 1^\circ\text{C}$ . - <sup>[b]</sup> PNA sequence: H-GTAGATCACT-NH<sub>2</sub>.

#### 1.1.4. ペプチド核酸の応用

PNA は上述した欠点を有してはいるものの、天然型核酸にはない、特有の性質を示すため、その性質を活かすことで、天然型核酸では為し得ないことも可能にすることのできる、魅力的な分子であると言える。

PNA はペプチド結合により、単量体が連なった構造をしているが、非天然の構造であるため、プロテアーゼの基質にならないことが知られており、核酸医薬としての応用は最も広く研究が行われている応用法の一つである。ただし、PNA には細胞膜透過性が無いと言

う致命的な欠点が存在するため、脂質<sup>8</sup>や、細胞膜透過性ペプチド<sup>9</sup>を結合させることによって、この欠点を補っている。

PNAは核酸医薬に留まらず、分子デバイスの分野への応用も、盛んに研究されている。化学的かつ生物学的に安定であり、末端がアミンであるため、修飾が容易、2重鎖が高い二重鎖融解温度  $T_m$ 、を示し、タンパク質との親和性の低いといったPNAの性質は、マイクロアレイのプロブとして理想的な条件を兼ね備えていると言える<sup>10</sup>。また、天然型核酸と比較してMALDI-TOF-MSで分析し易いため、質量プロブとしての応用も報告されている<sup>11</sup>。

このように、PNAの応用は多岐にわたるが、そのどれもが、配向性の問題を解決することで、さらなる改良が可能である。

### 1.1.5. 研究目的及び分子デザイン

上述した通り、PNAはその特徴的な性質を生かした応用研究が盛んになされている有用な分子であるが、一方で、2つの異なる配向性で天然型核酸と結合するという欠点を有している。そこで、PNAに特徴的な性質を残しつつ、単一の配向性で天然型核酸と結合する、新規ペプチド核酸類縁体のデザインを行った。

1.1.3.で述べたように、先行研究ではPNAに対して、不斉点を導入することで、単一の配向を安定化することに成功している。また、Figure 3に示した、PNAと天然型核酸に生じている歪みは、PNAの構造が直線的で、螺旋のピッチが長くなってしまっていることに起因していると考えられる。そこで、モノマーあたりの骨格元素数をPNAの6から一つ減らした5とすることで、より歪みの少ない二重鎖が形成できるのではないかと考えた。

モノマーあたりの骨格元素数を5に固定した上で、不斉点を有した骨格として、ジアミノ酸骨格に着目した。骨格となり得るジアミノ酸は $\alpha, \gamma$ -ジアミノ酸、 $\beta, \gamma$ -ジアミノ酸、 $\gamma, \gamma$ -ジアミノ酸の3種類となる (Figure 4)。このうち、 $\gamma, \gamma$ -ジアミノ酸は不安定であり、 $\alpha, \gamma$ -ジアミノ酸は側鎖の付け根となる不斉炭素の立体制御が困難 (Scheme 1) であると考え、 $\beta, \gamma$ -ジアミノ酸を骨格に採用した。

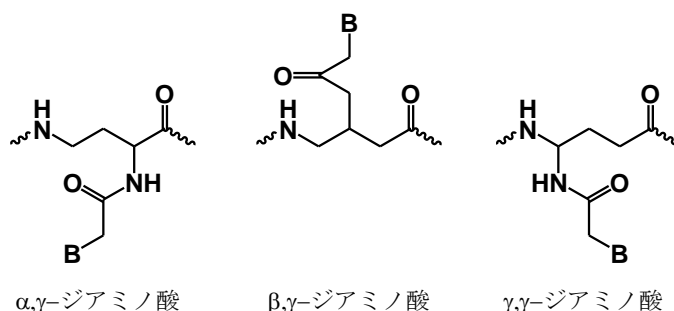
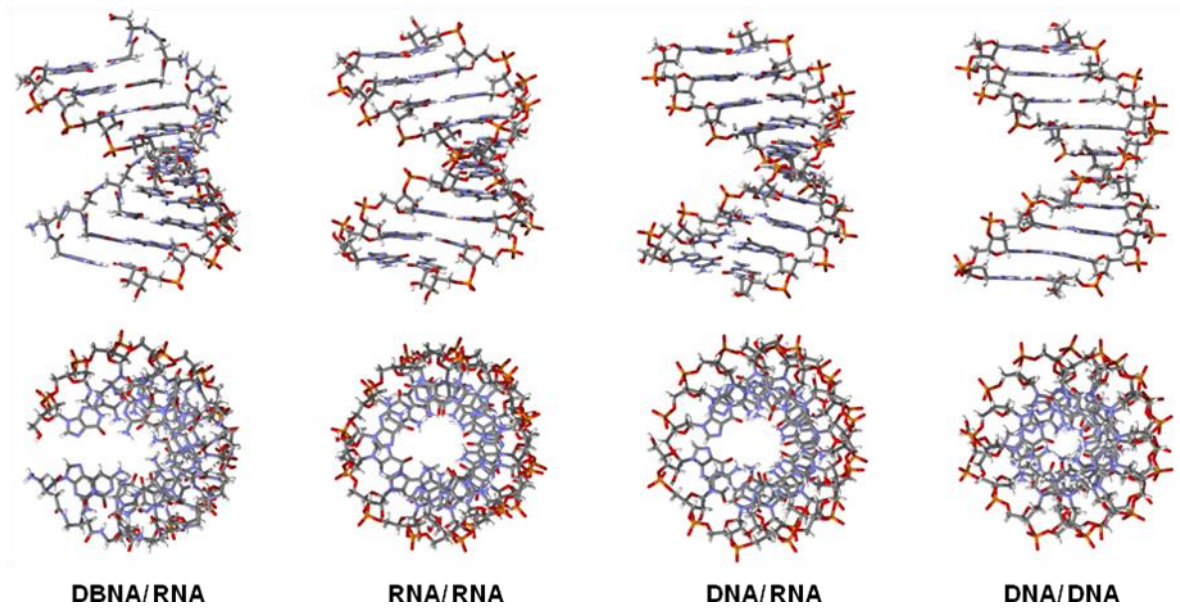


Figure 4.  $\alpha, \gamma$ -ジアミノ酸、 $\beta, \gamma$ -ジアミノ酸、 $\gamma, \gamma$ -ジアミノ酸の構造

こうしてデザインされた $\beta, \gamma$ -ジアミノ酸骨格を有する新規ペプチド核酸類縁体 (diaminobutanoic acid-based nucleobase-linked polyamide, DBNA)は分子力学計算の結果、天然型核酸と歪みの少ない二重鎖を形成することが示唆された (Figure 5)。



**Figure 6.** DBNA/RNA 二重鎖の構造及び天然型核酸の二重鎖の構造 (AMBER, GB/ SA water)

本研究では、新規ペプチド核酸類縁体である DBNA の合成を行い、天然型核酸との相互作用を調査することとした。

## 1.2. 研究結果

### 1.2.1. 合成戦略

DBNA の合成戦略を立てる際に最も重要となるのが、 $\gamma$ -アミノ基アミノ基の保護基の選択である。また、選択する保護基の種類により、核酸塩基部の保護基が従属的に決定される。DBNA はペプチドと核酸両方の化学的、構造的性質を有するため、 $\gamma$ -アミノ基アミノ基の保護基としては主に 3 種類の汎用的保護基が考えられる。ペプチド合成で用いられ、酸性条件下除去可能なカルバメート型保護基の *t*-ブトキシカルボニル基 (Boc 基)、塩基性条件下除去可能なカルバメート型保護基の 9-フルオレニルメトキシカルボニル基 (Fmoc 基)、また、核酸合成で用いられる酸性条件下除去可能なエーテル型保護基の 4,4'-ジメトキシトリチル基 (DMTr 基) である (Figure 7)。この 3 種類を比較すると、Boc 基はオリゴマー伸長時に比色定量を行うことができず、縮合効率を見積もることが難しい。Fmoc 基は、縮合収率の比色定量が可能なものの、塩基性条件下で除去されるため、側鎖のアシル基が転位する可能性がある (Scheme 2)。一方、DMTr 基は比色定量が可能で、そのような副反応の進行が懸念されないという利点があるが、アミノ基の保護基としては不安定すぎる。そこで、本研究ではより安定な 4-モノメトキシトリチル基 (MMTr 基) を採用することとした。

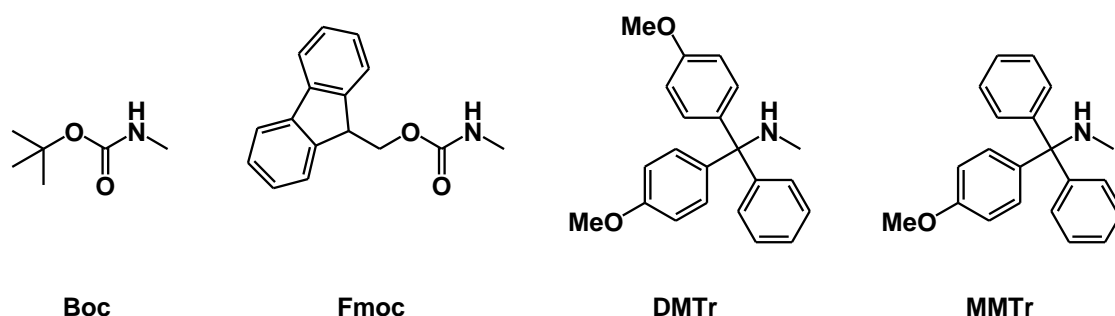
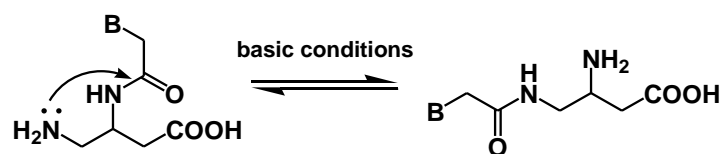


Figure 7. アミノ基の保護基の構造

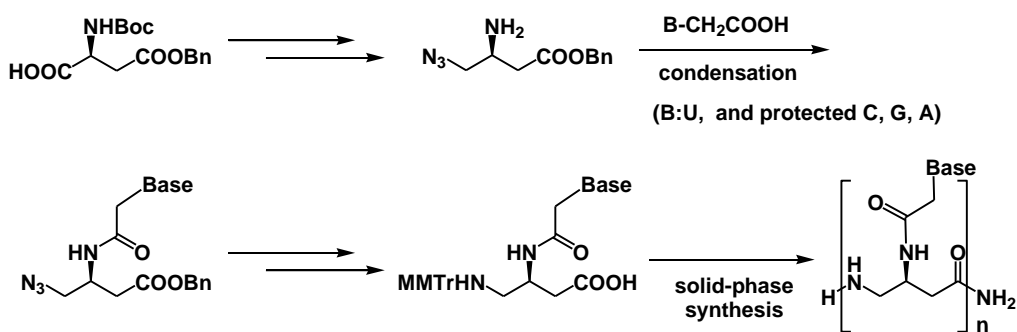
$\gamma$ -アミノ基を MMTr 基で保護した DBNA モノマーの合成戦略を Scheme 3 に示す。この合成戦略では、保護基を最終工程で導入するため、仮に MMTr 基が保護基としての必要条件を満たしていなかった場合、代替となる保護基の検討が容易であるという利点がある。

### Scheme 2



4 種類存在する核酸塩基のうち、合成が比較的容易であることが知られているピリミジン塩基を有する DBNA10 量体を合成標的とした。

Scheme 3

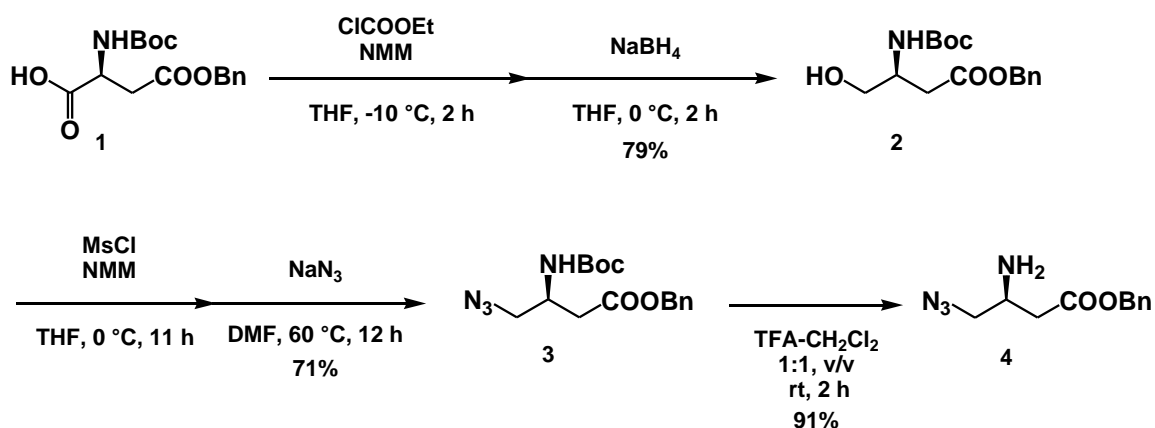


### 1.2.2. DBNA モノマーの合成

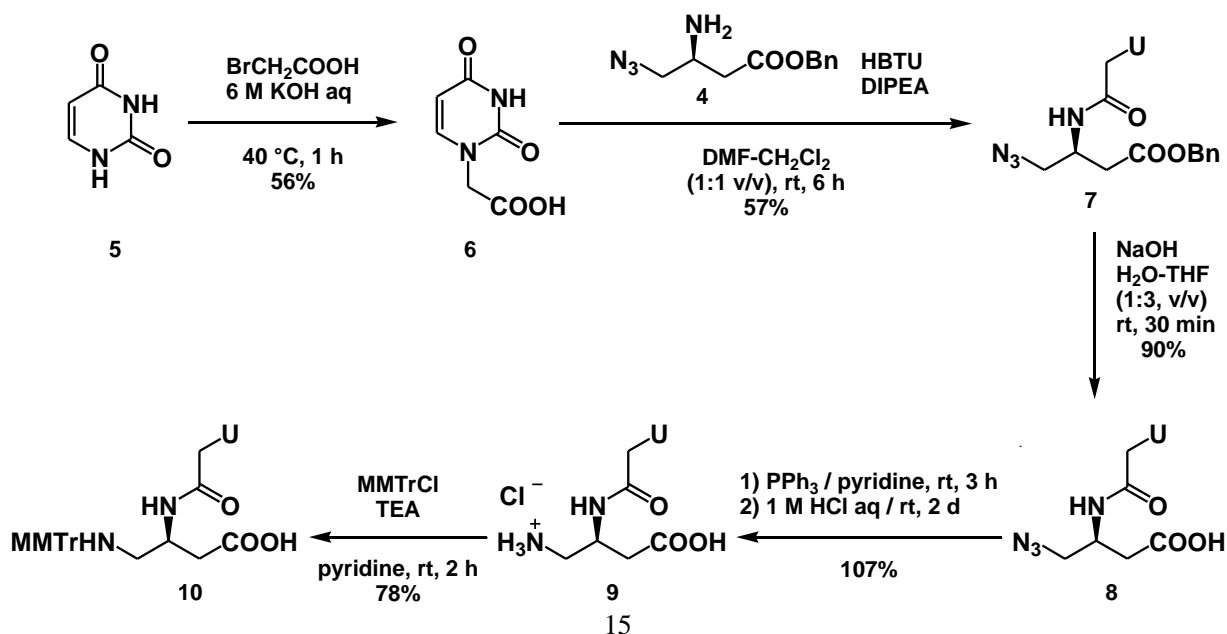
主鎖はアスパラギン酸誘導体 **1** を出発原料とし、以下の Scheme 4 に従って合成を行った。**1** のカルボキシル基を文献法に従って還元し、収率 79% で **2** を得た。得られた **2** の水酸基のメシル化、アジド化を行い、水酸基からアジド基へと官能基変換を行った。

次に、側鎖の導入を行うために、Boc 基の除去を行った。常法に従い、Boc 基を除去し、良好な収率で脱保護体 **4** を得た (Scheme 4)。

Scheme 4



Scheme 5

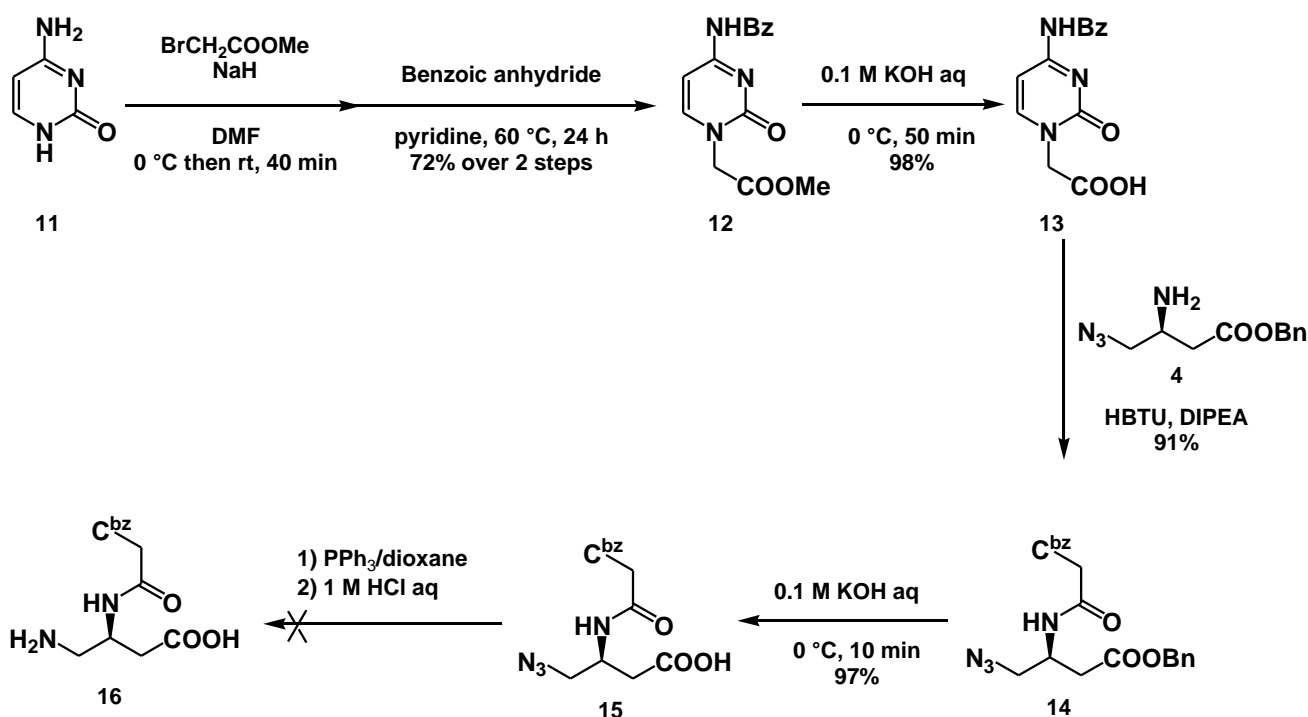




先行研究でウラシル塩基を有する DBNA モノマーの合成法が確立されている<sup>12</sup> (Scheme 5)。

そこで、この合成法に従い、シトシン塩基を有する DBNA モノマーの合成を試みた (Scheme 6)。シトシン塩基のアミノ基の保護基として、最も汎用されているベンゾイル基を用いた。一般的に、シトシン塩基のアミノ基に導入されたベンゾイル基は、酸性条件下安定であり、アンモニアなどの塩基性求核剤存在下、脱保護が可能な保護基である。主鎖と側鎖の縮合は先行研究と同様の条件で進行し、水からの再沈殿により、91%の収率で目的物を得た。次に、水酸化ナトリウムを用いたベンジルエステルの加水分解を試みた。原料の水への溶解度が低いため、水と 1,4-ジオキサンを混合溶媒を用いたところ、目的とする反応は迅速に完了した。反応完結後、反応系中に塩酸を加えることで、カルボキシル基をプロトン化することによって目的とする C 末端遊離の **15** を収率 97% で得た。

Scheme 6



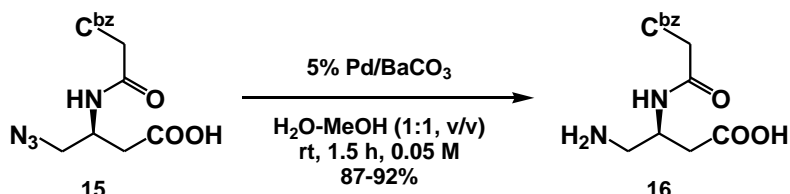
得られたカルボキシル基が遊離の **15** のアジド基を、Staudinger 反応によって還元を試みた。しかし、イミノホスホラン中間体は形成されたものの、中性条件下ではイミノホスホランの加水分解は進行しなかった。反応を加速するため、中性の水から弱塩基性のアンモニア水へと反応溶媒を変更したが、側鎖の転位 (Scheme 2) が起こった。そこで、1 M の塩酸を加え、酸性条件下でのイミノホスホランの加水分解を試みた。しかし、反応生成物の <sup>1</sup>H NMR のスペクトルから、一般的には酸性条件下安定と言われている、シトシン塩基の保護基であるベンゾイル基が脱離した副反応生成物が確認された。より酸性度の低い酢酸を用いた加水分解を試みたが、加水分解は進行しなかった。

そこで、中性条件下アジド基を還元可能な、パラジウム触媒を用いた水素添加反応を試みた。(Scheme 11) シトシン塩基は環内に二重結合を有しているため、その二重結合がパ



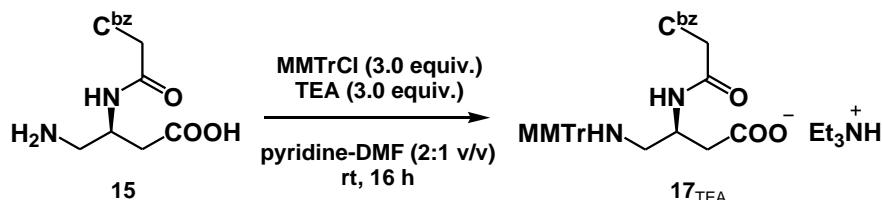
ラジウム触媒と反応する可能性が考えられる。そのため、この反応はアジド基が還元され次第、直ちに停止する必要があるため、反応速度の制御が重要となる。反応条件の検討の結果、Pd/C よりもより触媒活性の低いリンドラ触媒として知られる Pd/BaCO<sub>3</sub> を用い、かつ低濃度で反応を行うと、再現性良く目的物が得られた。(Scheme 7)

#### Scheme 7



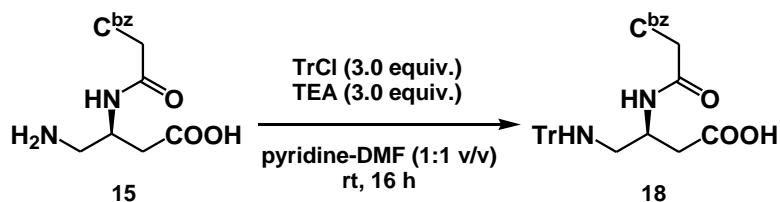
次に、得られた **16** のアミノ基に MMT<sub>r</sub> 基を導入することを検討した (Scheme 8)。**17**<sub>TEA</sub> は分子内にカルボキシル基を有しているため、TEA と塩を形成していないとカルボキシル基の酸性によって MMT<sub>r</sub> 基が脱離してしまう。しかし、TEA は揮発性であり、また、塩基性度も十分に高くないため、真空乾燥を行うとカルボキシル基との塩が解離し、カルボキシル基が遊離となってしまふ。そのため、**17**<sub>TEA</sub> と TEA が 1:1 の割合で塩を形成した状態で単離することは難しく、常に TEA が過剰の状態を取り扱う必要があり、扱いが困難である。また、得られた粗精製物を、展開溶媒にトリエチルアミンを添加したシリカゲルカラムクロマトグラフィーを用いて精製を試みたところ、目的物のトリエチルアンモニウム塩が溶出溶媒に難溶であったため、目的物を回収することが困難で、目的物を再現性良く高収率で得ることができなかつた。一般的に、シリカゲルカラムクロマトグラフィー以外の精製法としては再結晶が広く用いられているが、MMT<sub>r</sub> 基は加熱することで脱離してしまうと考えられるため、再結晶による精製も行えない。

#### Scheme 8



そこで、より安定なトリチル基を導入することで、酸性条件下の安定性及び、熱安定性の向上を試みた。しかし、トリチル化された **18** は極性が高く、抽出操作の段階で有機層に回収することができなかつた (Scheme 9)。

#### Scheme 9

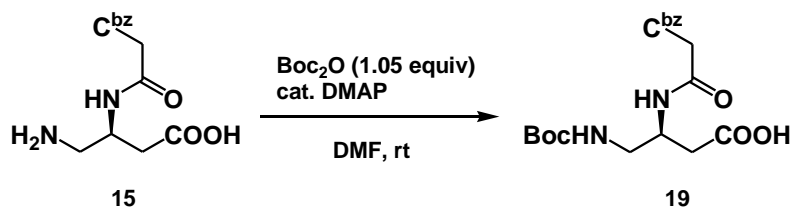


以上より、 $\gamma$ -アミノ基への Tr 型保護基の導入が困難であると考え、先述した Boc 基、Fmoc 基の適用可能性を再検討することとした。Boc 基に関しては、通常アミノ酸のアミノ基に

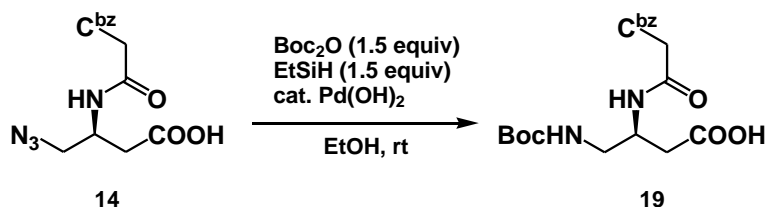
導入する際に用いられる条件と、Kotsuki らによって報告されたアジドを還元しながら導入する条件<sup>13</sup>の2通りの条件を試みた (Scheme 10a, Scheme 10b)。しかし、TLC による反応追跡の結果、どちらの条件も、複数の副反応の進行が確認された。一方で、通常のパепチド合成に用いられる条件で Fmoc 化を行った場合、反応系中から析出した目的物 **20** を濾過後、再結晶を行うことで高純度の Fmoc モノマーを簡便に得ることができた (Scheme 10)。便宜上得られた Fmoc モノマーを Fmoc-dbC<sup>bz</sup>-OH と記す。

### Scheme 10

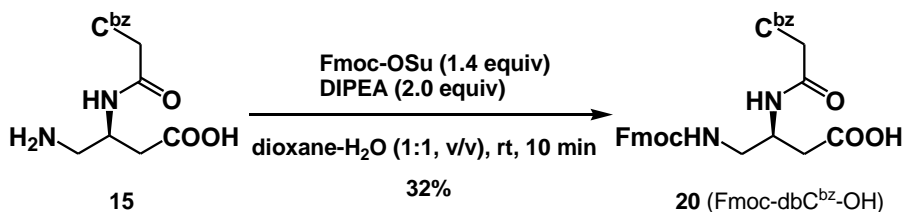
a)



b)

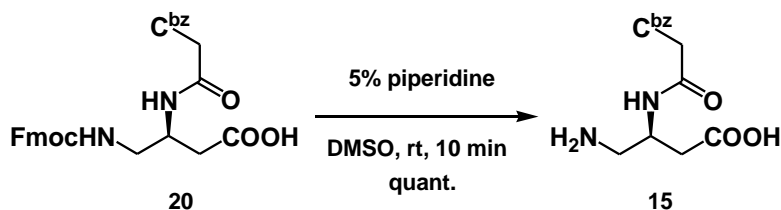


### Scheme 11



そこで、DBNA 合成における Fmoc 基の有用性を調べることにした。固相合成に用いるには、Fmoc 基の脱保護が迅速に完結し、かつその条件下副反応が進行しないことが必要である。この時起こり得る副反応としては、側鎖の転位反応 (Scheme 2) と、塩基部位の保護基であるベンゾイル基の脱離である。そこで、既知の Fmoc 基除去条件の中で、最も穏和な条件である 5% ピペリジンを用いた脱保護を試みた (Scheme 12)。17 の有機溶媒に対する溶解度は低く、DMSO を除く各種溶媒に難溶であったため、溶媒として DMSO- $d_6$  を用いて反応の NMR 追跡を行った。

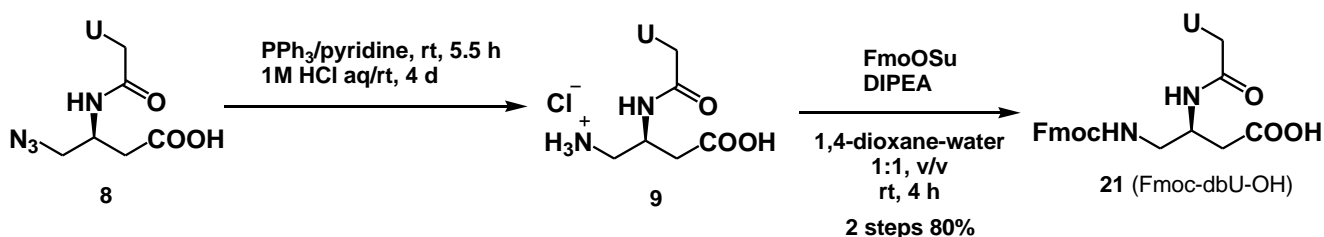
### Scheme 12



反応は迅速に完結し、10 分後の NMR では定量的に脱保護体 **15** が得られていることが分かった。24 時間後には副反応生成物が観測されたものの、5 時間経過時では目的物の分解を観測することはできなかったため、Fmoc 基は DBNA の固相合成へ適用可能であると判断した。

そこで、共通中間体 **9** の  $\gamma$ -アミノ基を Fmoc 基で保護することで、ウラシル塩基を有する DBNA モノマー、固相合成に十分適用可能な高純度のモノマーを得た (Scheme 13)。

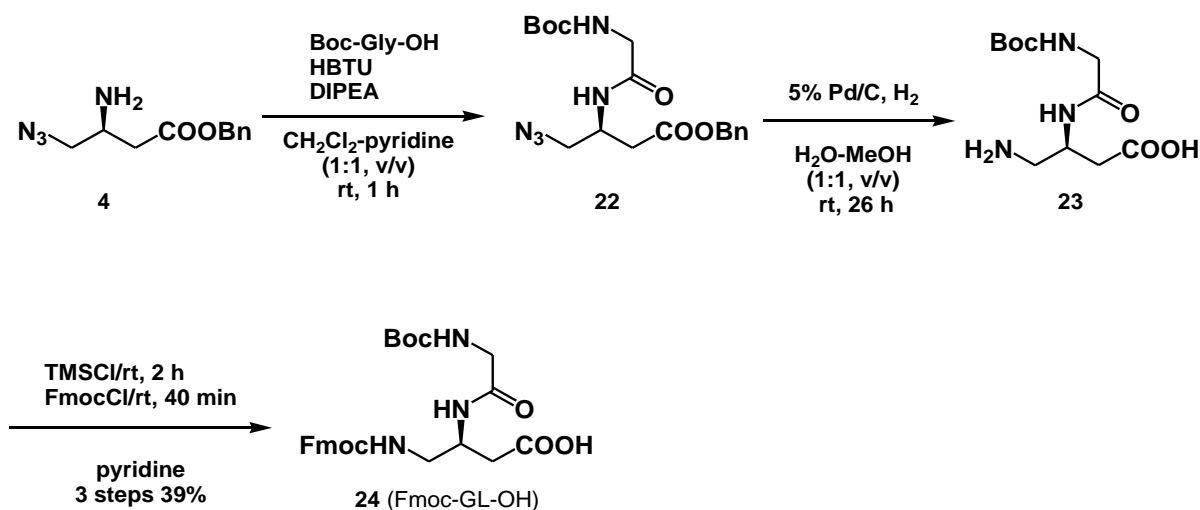
### Scheme 13



一般に、遊離のリンオキシアニオンを有さない中性の核酸類縁体は、鎖長が長くなるにつれて水への溶解度が低下することが知られている。PNA 類縁体では、C 末端に正電荷を有するリジンを挿入することで、溶解度の問題を解決している。そこで、DBNA の合成の際には側鎖に、生理的条件下、プロトン化されて正電荷を帯びるグリシンを縮合した **23** を、リジンの代わりに用いることとした。このグリシンリンカー **23** はリジンよりも極性が高いことが期待され、より高い水への溶解度を示すことが期待される。

ピリミジン塩基の場合と同様の条件で主鎖と側鎖の縮合を行った。得られた **23** は核酸塩基を有さないため、Pd/C を用いた水素添加反応によってアジド基をアミノ基に還元し、ベンジルエステルを遊離のカルボキシル基に変換した後、アミノ基の Fmoc 化を行った (Scheme 14)。ここで得られたグリシン側鎖を有する Fmoc モノマーを Fmoc-GL-OH と記す。

### Scheme 14



側鎖にシトシン及びウラシルを有する DBNA モノマーとグリシン側鎖を有するモノマー

の合成を達成したので、固相合成法による、DBNA オリゴマーの合成を検討することとした。

### 1.2.3. 固相合成の概要

DBNA オリゴマーの固相合成は Figure. 12 に示すサイクルに従って行った。DBNA は核酸の性質とペプチドの性質を有しており、合成法も核酸合成に則った手法とペプチド合成に則った手法が考えられる。核酸の固相合成とペプチドの固相合成で最も異なる点是用いる固相担体にある。一般に、核酸の固相合成では、溶媒に膨潤しないガラス製のビーズや高架橋ポリスチレンが用いられる。ガラス製のビーズや高架橋ポリスチレンは溶媒に膨潤しないため、反応が不均一系で行われるため、液相反応と比較して反応効率が低く、担体上の反応点に対して、20 当量以上のモノマーが必要であるが、一方で系中から溶媒を完全に除き、真空乾燥をすることができるので、反応系から水分を除くという点において優れている。一方で、ペプチドの固相合成では、溶媒に膨潤するポリスチレン樹脂を用いるため、より液相に近い条件で反応を行うことが可能であり、一般的には、担体上の反応点に対して 2-3 当量のモノマーを用いれば十分である。少ない量のモノマーで鎖長伸長が可能な一方で、乾燥した樹脂を完全に膨潤させるために長時間（1 時間程度）要するので、1 サイクルごとに真空乾燥を行うと、再度膨潤させるのに時間がかかってしまう。そのため、膨潤性の樹脂を合成サイクル中に真空乾燥することは好ましくなく、水分は非膨潤性の担体に比較して、除きづらいと言える。両手法が考えられる中で、ペプチド固相合成に用いるモノマーの当量が少ない点に着目し、膨潤性の固相担体を用いた固相合成を行うこととした。

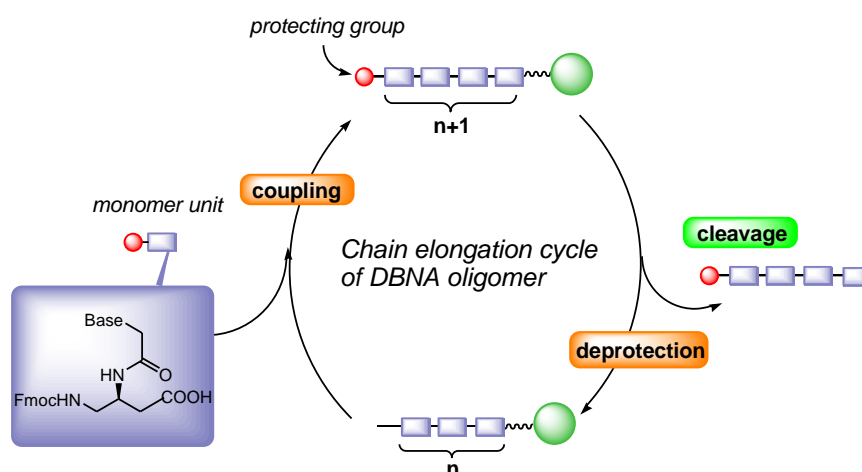


Figure 8. 固相合成の鎖長伸長サイクル

### 1.2.4. グリシンリンカー2 量体の合成

核酸塩基を有する DBNA モノマーよりも合成が容易なグリシン側鎖を有するモノマーを用いて、グリシンリンカー2 量体合成の検討を行った (Figure 9)。

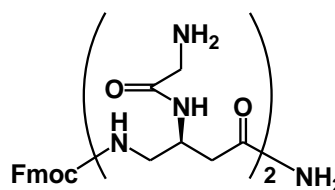


Figure 9. グリシンリンカー2 量体の構造

固相担体としては TFA によって切り出しが行われる Rink-amide-MBHA-resin<sup>14</sup> を、溶媒には PNA 合成で最適化された条件である 20% DMSO/NMP を用い、脱保護には、穏和な Fmoc 基の除去条件である 5% ピペリジンを用いた。縮合剤には一般的なペプチド合成で高い縮合効率を与えることが知られている、2-(1H-7-azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate (HATU) を、モノマーは、一般的なペプチド合成の条件よりも多い 5 当量を用いた。

切り出し条件には、一般のペプチド合成で用いられている、脱保護反応の際に生成するカルボカチオンの補足剤として、トリエチルシランと水をトリフルオロ酢酸に加えた混合溶媒を用いた。オリゴマーの N 末端に Fmoc 基が結合した状態で切り出しを行い、得られた粗精製物を、逆相 HPLC を用いて分析した (Figure 10)。

manipulations	conditions	time
wash		
swelling		1 h
deprotection	5% piperidine/solvent*	20 min
wash		
coupling	monomer (5 equiv, 0.1 M) HATU (7.5 equiv, 0.15 M) DIPEA (10 equiv, 0.2 M)	15 min
wash		
cleavage	TFA-H <sub>2</sub> O-TIS 95:2.5:2.5, v/v/v	1 h
HPLC		

\*solvent:20%DMSO/NMP

Figure 10. グリシンリンカー合成手順

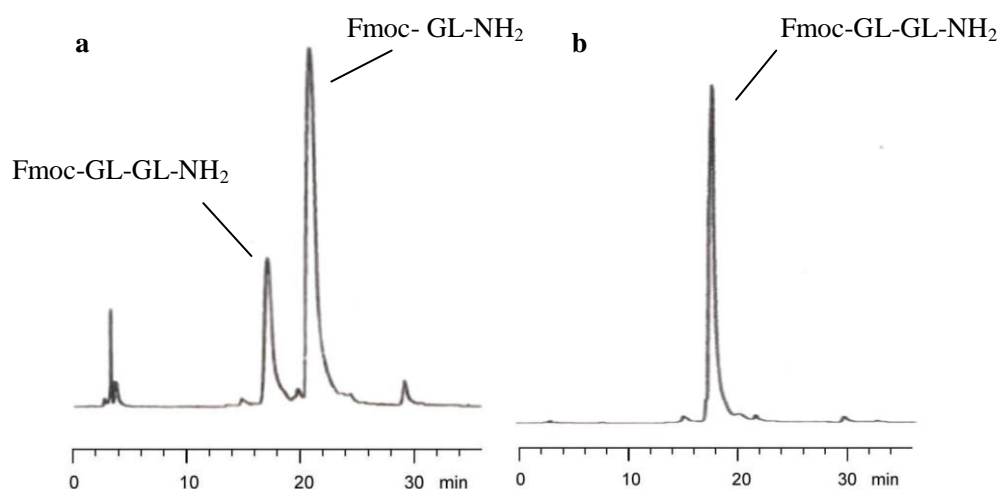


Figure 11. a) 5% ピペリジンで脱保護を行ったときの HPLC プロファイル。b) 25% ピペリジンで脱保護を行ったときの HPLC プロファイル。

得られた HPLC プロファイルを Figure 11a に示す。マスマスペクトルによる分析の結果から、メインピークとして得られた 22 分付近のピークがモノマーであることが示唆された。この原因として、固相担体に導入したモノマーの Fmoc 基の脱保護が完了していない可能性を考え、脱保護条件をペプチド合成で用いられる条件よりも強い塩基性条件である 25% ピペリジンへと変更して同様の実験を行ったところ、目的とする 2 量体を高収率で得ることに成功した (Figure 11b)。ピーク面積比から算出した収率は 95%であった。このことか

ら、グリシンリンカーを合成する場合は、高い収率でオリゴマーを合成できることが期待される。また、Fmoc 基の除去条件を Scheme 12 と比べてより強い塩基性条件にしても、転位体は生成しなかった。

### 1.2.5. DBNA 鎖長伸長条件の検討

グリシンリンカーの合成を達成したので、次にシトシン塩基を有する DBNA を同様の条件を用いて合成した (Figure 16)。

まず、Fmoc 基の脱保護条件を強塩基性条件に変更したため、シトシン塩基を有する DBNA をモノマーとして用いたときに、転位体の生成や塩基部位の保護基の脱離が懸念される。そこで、担体にモノマーを縮合し、N 末端をそれぞれ 20% ピペリジンと 50% ピペリジンで脱保護、アセチル基へと保護基の架け替えを行った後に担体からの切り出しを行った。その結果、20% ピペリジン、50% ピペリジンいずれの条件においても、転位体及びシトシンのベンゾイル基の脱離は観測されず、単一の化合物からなる HPLC チャートが得られた (Figure 13)。

以上の結果から、20% ピペリジンを用いても、転位、保護基の脱離は起きないことが確認できたので、以後は Fmoc 基の除去反応を 20% ピペリジンで行うこととした。

次に、縮合条件を検討した。なお、この際に固相担体を、反応性の低いペプチド合成に用いられる

Fmoc-NH-SAL-PEG-Resin<sup>15</sup> へと変更した。縮合剤として、活性の異なる HATU と

2-(1H-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium

hexafluorophosphate (HBTU) を用い、縮合剤の活性が与える影響を調べた (Figure 14)。HATU、HBTU いずれの縮合剤を用いた場合も、副反応の進行が顕著であり、また、HBTU を用いた場合は、未反応の単量体が大量に得られた。この際に、モノマーが、溶媒として用いていた

20% DMSO/NMP 混合溶媒に難溶であることが判明した。そこで、溶媒としてより溶解度の高い DMSO を用いたところ、逆に副反応の進行が顕著となった (Figure 14c)。

	manipulations	conditions	time
repeat	wash		
	swelling		1 h
	deprotection	20% piperidine/solvent*	15 min
	wash		
	coupling	monomer (5 equiv, 0.1 M) HATU (7.5 equiv, 0.15 M) DIPEA (10 equiv, 0.2 M)	15 min
	wash		
	deprotection		
	capping	Ac <sub>2</sub> O-pyridine 1:9, v/v	1 min
	cleavage	TFA-H <sub>2</sub> O-TIS 95:2.5:2.5, v/v/v	1 h
	HPLC		

\*solvent: 20% DMSO/NMP or DMSO

Figure 12. DBNA 合成手順

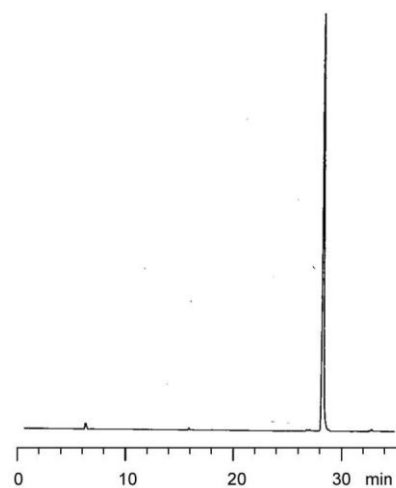
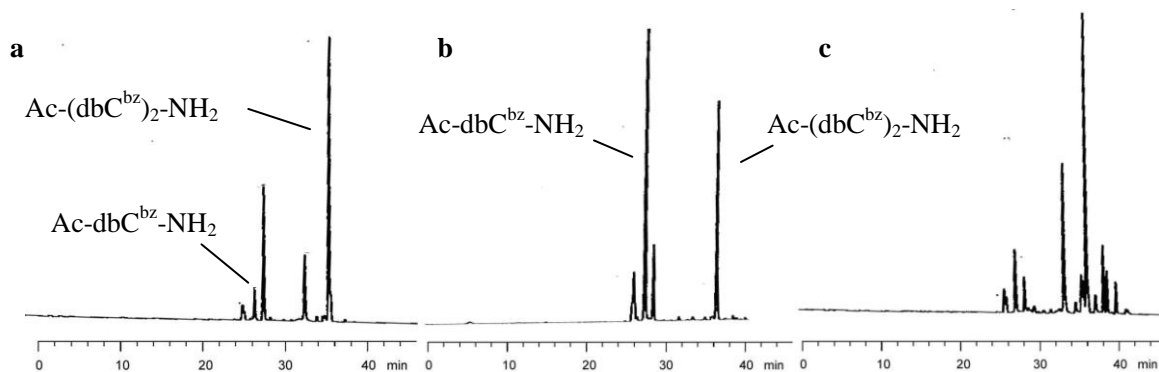


Figure 13. 50% ピペリジンによって Fmoc 基を脱保護した際の Ac-dbc<sup>bz</sup>-NH<sub>2</sub> の逆相 HPLC チャート



**Figure 14.** 様々な条件で縮合を行った際の  $\text{Ac}-(\text{dbC}^{\text{bz}})_2\text{-NH}_2$  の HPLC プロファイル。a) 縮合剤：HATU、溶媒：20%DMSO/NMP。b) 縮合剤：HBTU、溶媒：20%DMSO/NMP。c) 縮合剤：HATU、溶媒：DMSO。

以上の結果から、溶媒によって、副反応の進行度合いが異なることが示唆された。DMSO と NMP は、どちらも分極した求核性の酸素官能基を有しているが、DMSO のスルホキシ基の求核性は、NMP のアミドの求核性と比較して高く、溶媒の求核性が副反応の度合いに影響していると考えられる。そこで、NMP のみを溶媒として用いた場合、副反応が大きく抑制されることが期待できるが、シトシン塩基を有する *N*-Fmoc-DBNA モノマーである  $\text{Fmoc-dbC}^{\text{bz}}\text{-OH}$  は、NMP に対する溶解度が低く、固相合成による操作上の困難が予想された。

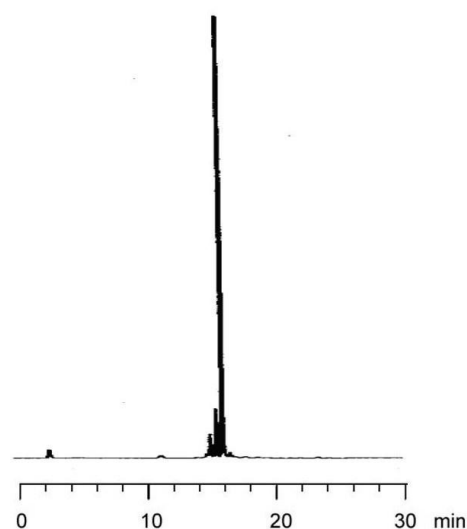
そこで、より NMP に対する溶解度が高い、ウラシル塩基を有する DBNA について、同様の反応を行った (Figure 15)。副反応はある程度抑制することに成功したものの、固相合成に適用可能な程度まで抑制できたとはいえない。

Figure 14、Figure 15 に示した結果から、溶媒の種類が副反応の進行に大きく影響することが示唆されており、溶媒の最適化が必要である。

しかし、膨潤性の固相担体を用いる以上、使用可能な溶媒は限られており、アセトニトリルやピリジンなどの、樹脂が膨潤しない溶媒を用いることはできない。

そこで、溶媒の選択肢が広い非膨潤性の固相担体を用いたペプチド固相合成が考えられるが、非膨潤性の固相担体を用いたペプチド合成前例が少なく、HATU を用いた通常の縮合系では、十分な縮合効率で反応が進行しない可能性が懸念された。

そこで、Wada らによって開発された、カルボン酸エステルやリンオキシ酸エステル合成に有効な、より反応性の高い縮合剤である 3-nitro-1,2,4-triazol-1-yl-tris(pyrrolidin-1-yl)phosphonium hexafluorophosphate (PyNTP) を、非膨潤性固相担体と組み合わせて用いることで、高い縮合効率と、副反



**Figure 15.** 縮合反応の溶媒として NMP を用いた場合の  $\text{Ac}-(\text{dbU})_2\text{-NH}_2$  の HPLC プロファイル

応の少ない反応系が実現できるのではないかと考えた。PyNTP がカルボン酸エステルの合成に有効なのは、カルボン酸と PyNTP が反応して生成するトリアゾリド型活性中間体の反応性が極めて高く、水酸基と速やかに反応するからである。したがって、この活性中間体は加水分解され易いため、縮合反応は厳密な禁水条件が要求される。そのため、乾燥が容易な非膨潤性固相担体を用いるのが有効である。

固相担体として高架橋ポリスチレン、縮合剤として PyNTP、溶媒としてピリジンをを用いて、ウラシル塩基を有する DBNA モノマーの 2 量体 Ac-(dbU)<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> を合成した (Figure 16a)。副反応は大幅に抑制され、95% の収率 (ピーク面積比から算出) で目的物を得た。この条件が長鎖オリゴマー合成に適用可能であると判断し、DBNA10 量体 Fmoc-Gly-GL-(dbU)<sub>10</sub>-GL-NH<sub>2</sub> の合成を試みた (Figure 16b)。逆相 HPLC による分析から、目的とする 10 量体を観測することができたが、一方で、副反応に由来する、分離不可能な副生成物が生じた。各ピークを分取し、質量分析を行った結果、ウラシル塩基部位がピロリジニル化された化合物が生成していた (Scheme 15)。ウラシル塩基部位がピロリジニル化される機構は以下のように考えられる。まず、縮合剤とウラシル塩基の O4 位が反応し、活性化したのちに、4 位炭素原子をニトロトリアゾールが求核攻撃して中間体を与え、これに Fmoc 基の除去に用いられたピロリジンと反応する、というものである。

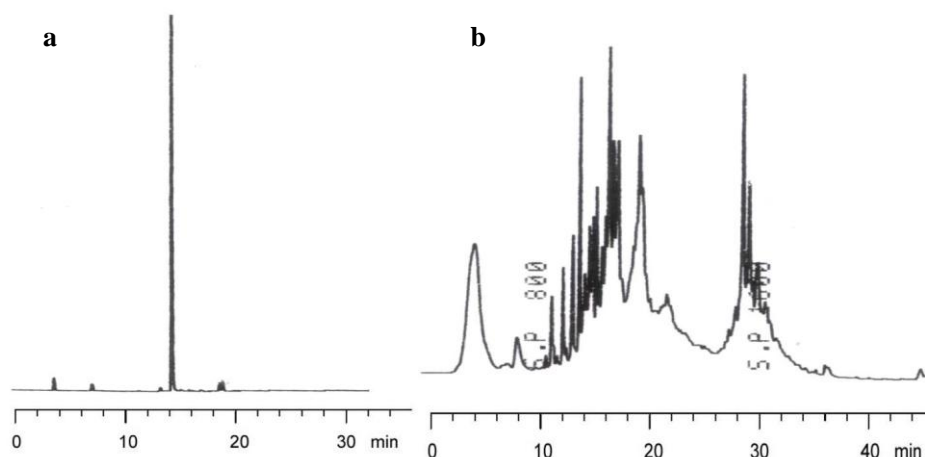
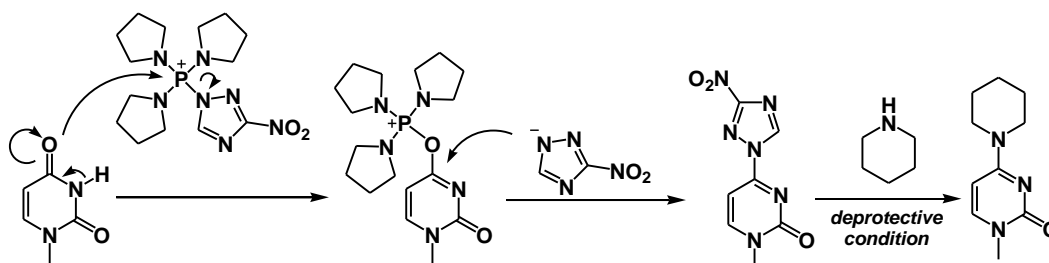


Figure 16. a) 非膨潤性固相担体、縮合剤 PyNTP、溶媒ピリジンの条件下合成された粗精製物の HPLC プロファイル

### Scheme 15



この副反応を防ぐためには、ウラシル塩基を保護するのが最も確実な方法であるが Fmoc 基と併用可能なウラシル塩基の保護基は報告例がなく、保護基の開発から始める必要がある。その点、アミノ基の保護基が多く報告されているシトシン塩基では、この副反応は問



題にならない。しかし、シトシンのアミノ基がベンゾイル基で保護された DBNA モノマーは、ピリジンへの溶解度が低いため、モノマーの有機溶媒への溶解度を向上させる性質を有する保護基を導入する必要がある。そこで、シトシンのアミノ基の保護基を再検討することとした。

### 1.2.6. 第二世代のモノマー合成法の開発

シトシンのアミノ基の保護基を検討するにあたって、合成ルート of 改良を行った。(1.2.1.)で述べた第一世代の合成ルートは、最終ステップで保護基の導入を行ったため、保護基の検討が容易に行えるというメリットがあったが、一方で早い段階で核酸塩基を導入するため、中間体が高極性となり、有機溶媒への溶解性が低下し、扱いが困難になる点や、異なる核酸塩基に関して、初めから合成法を開発する必要があるという欠点を有していた。そこで、最終ステップで核酸塩基部位を導入する合成ルートの検討を行った (Scheme 16)。

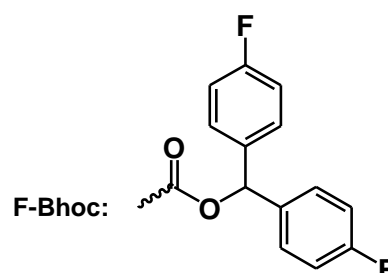
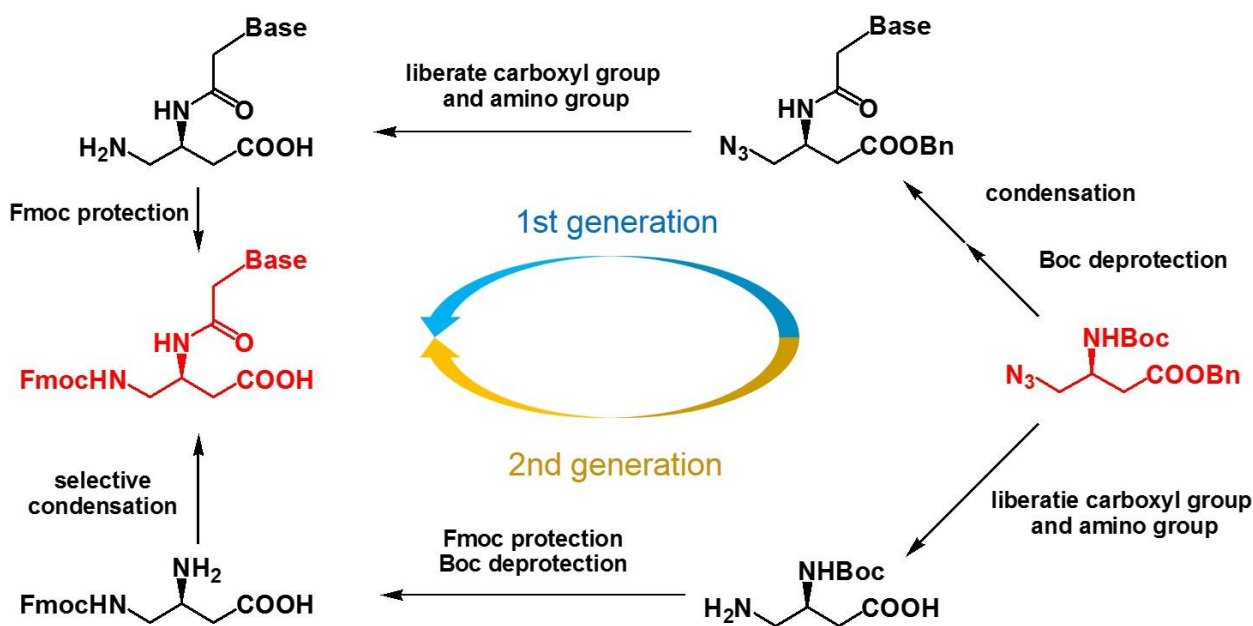


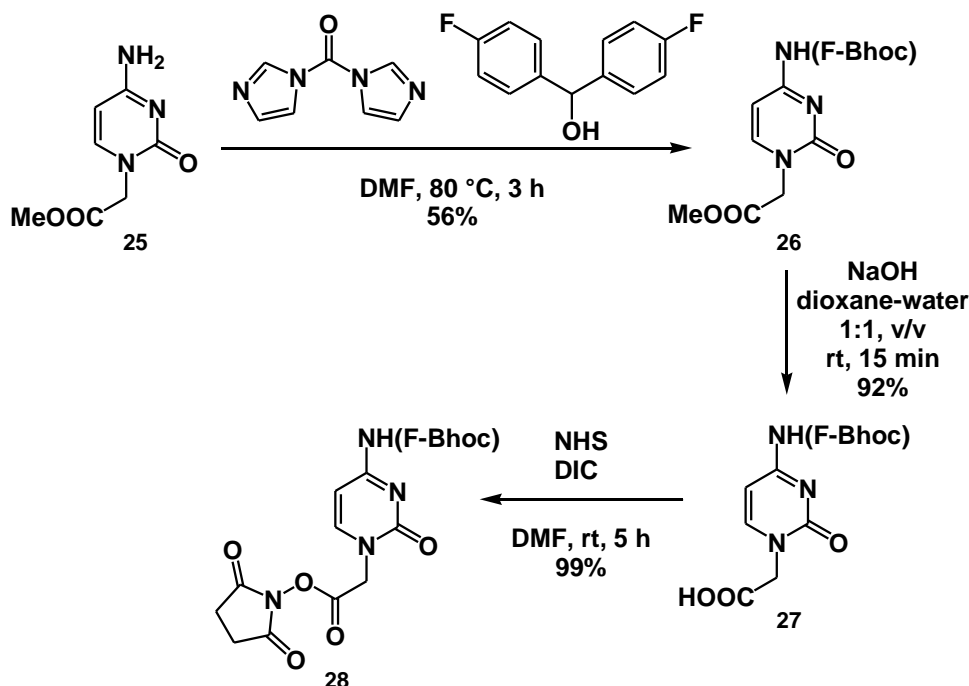
Figure 17. F-Bhoc 基の構造

#### Scheme 16

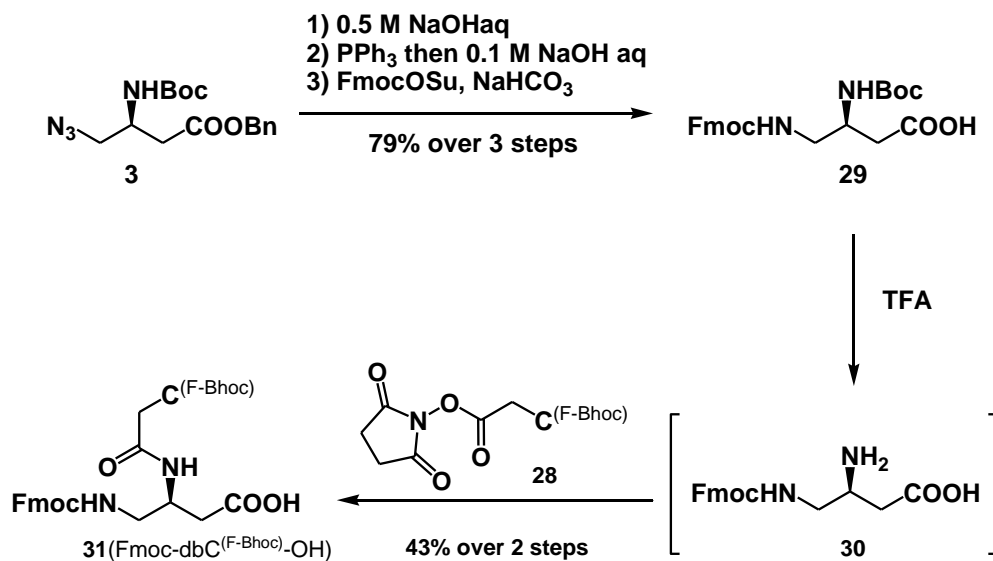


新たな核酸塩基部位の保護基として、酸性条件下脱保護可能な F-Bhoc 基<sup>17</sup> (Figure 17) を使い、第二世代の合成ルートに従って、シトシン塩基を有する DBNA モノマーの合成を行った。文献法を参考に **27** を合成した後、縮合剤 DIC を用いて *N*-ヒドロキシスクシンイミドと縮合し、活性エステル **28** を得た (Scheme 17)。得られた活性エステルを、遊離のアミノ基を有する **30** と反応させて、目的とする F-Bhoc 基で保護されたシトシン塩基を有する DBNA モノマー **31** (Fmoc-dbc<sup>(F-Bhoc)</sup>-OH) を得た (Scheme 18)。

Scheme 17



Scheme 18



### 1.2.7. シトシン塩基を有する DBNA10 量体の合成と、天然型核酸との二重鎖形成能の調査

得られた Fmoc-dbC-OH を(1.2.5.)で最適化した鎖長伸長条件に適用し、シトシン塩基を有する DBNA10 量体 Fmoc-Gly-GL-(dbC)<sub>10</sub>-GL-NH<sub>2</sub> の合成を試みた (Figure 18)。副反応を完全に抑制することはできなかったが、生じた副生成物は、目的とする DBNA10 量体 Fmoc-Gly-GL-(dbC)<sub>10</sub>-GL-NH<sub>2</sub> と、逆相 HPLC の保持時間が大きく異なったため、単離が可能であった。

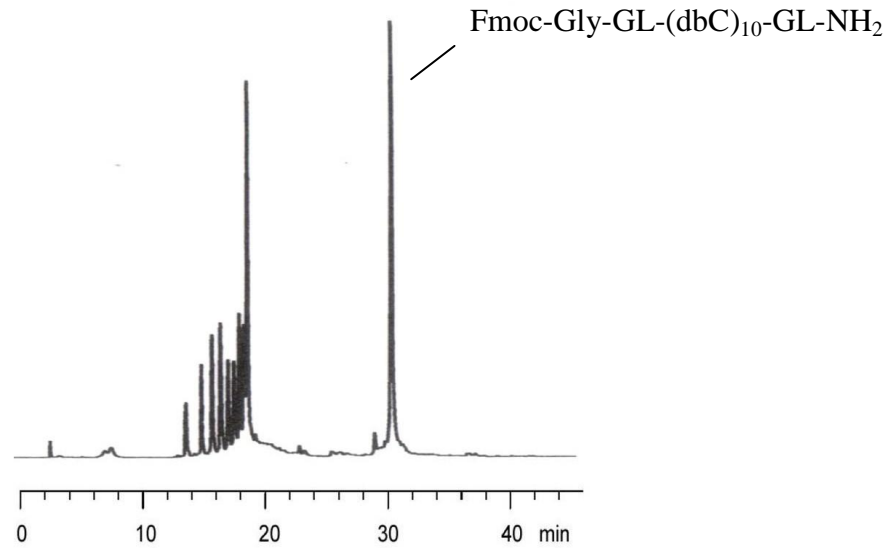


Figure 18. Fmoc-Gly-GL-(dbC)<sub>10</sub>-GL-NH<sub>2</sub> の粗精製物の HPLC プロファイル

得られた粗精製物の一部を精製、分取後、N 末端の Fmoc 基を脱保護、UV 定量を行うことで、合成収率を算出したところ、9%の収率で、目的とする DBNA10 量体を得ることに成功した。

単離した DBNA10 量体 Fmoc-Gly-GL-(dbC)<sub>10</sub>-GL-NH<sub>2</sub> を、相補的な塩基配列を有する RNA(rG<sub>10</sub>)との二重鎖形成能を測定した (Figure 19)。しかし、DBNA 鎖と RNA 鎖を混合したサンプルから得られた T<sub>m</sub> 曲線と同様の曲線が、RNA 鎖のみのサンプルからも観測されており、RNA 鎖のみでも一定の高次構造を形成し、DBNA とは相互作用していないことがわかった。この原因として、RNA の配列がグアノシン 10 量体であったことから、グアノシン同士の相互作用が DBNA との相互作用に対し、優先的に起きてしまっているためと考えられる。

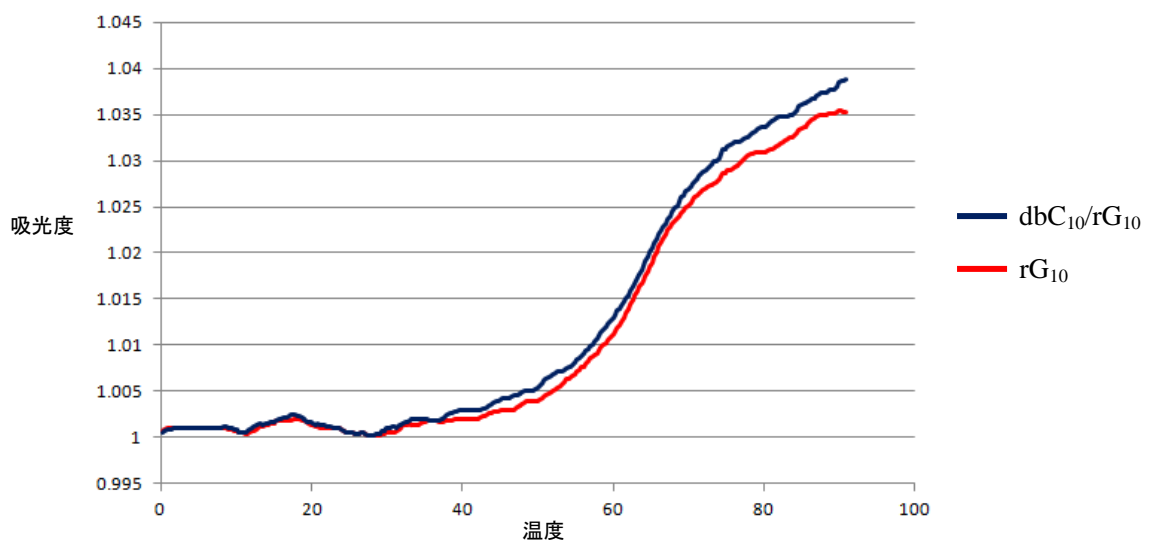


Figure 19. DBNA/RNA 二重鎖の融解温度曲線

### 1.3. 小括

本章では新規ペプチド核酸類縁体である DBNA の合成法を開発したについて述べた。

まず、 $\gamma$ -アミノ基に MMT<sub>r</sub> 基を有するモノマーの合成を検討したが、MMT<sub>r</sub> 基によって保護された DBNA は溶解度が低く、単離が困難であった。そこで、 $\gamma$ -アミノ基の保護基を検討し、Fmoc 基を有するモノマーを単離することができた。また、Fmoc 基の脱保護時に懸念された副反応は進行せず、Fmoc 基が本合成に適用可能であることを示した。

$\gamma$ -アミノ基を Fmoc 基で保護した DBNA モノマーを合成するにあたり、合成スキームの改良を行った。第二世代の合成ルートは、第一世代と比較して反応工程数が 1 つ短いだけでなく、最終工程において核酸塩基部位を導入するため、共通の中間体から異なる種類の核酸塩基の導入が可能であり、高極性の核酸塩基導入に伴う有機溶媒への溶解度の低下の問題を、最小限に抑えることができる。最終的に、側鎖にグリシン、ウラシル塩基、アミノ基が F-Bhoc 基で保護されたシトシン塩基を有する 3 種類の DBNA モノマーの合成法を確立することに成功した。

得られた 3 種類のモノマーを用いて固相法により、オリゴマーの合成を試みた。側鎖にグリシンを有するモノマーを用いた場合、通常のペプチド合成法を適用することで、高収率で 2 量体を得ることに成功した。しかし、DBNA モノマーを用いた場合、目的とする 2 量体の他に、副反応の進行が観測された。

しかし、従来型の膨潤性固相担体を用いるペプチド固相合成法では、溶媒の選択肢が限られているため、溶媒の選択肢に制限がない非膨潤性固相担体と、高活性な縮合剤である PyNTP を組み合わせることで、高い収率で 2 量体を得る条件を確立した。

ウラシル塩基を有する DBNA は、塩基部位が縮合剤と副反応することが明らかとなったため、10 量体を単離することができなかったが、シトシン塩基を有する DBNA に関しては、シトシンのアミノ基に保護基が導入されているため、核酸塩基部位へ副反応が進行せず、目的とする 10 量体を得ることに成功した。合成したオリゴマーは、相補的な RNA が自己会合性の rG10 であったことから、二重鎖形成を観察することは出来なかったが、本研究で DBNA の合成法を確立したため、異なる塩基配列を有する DBNA を合成することで、DBNA と天然型核酸の二重鎖形成を検討することができると考えられる。

DBNA10 量体を合成する際に開発した条件は、現在主流となっているペプチド固相合成法と手段、概念が異なっており、独自の手法であると言える。第 2 章では、この合成手法を汎用性の高いオリゴペプチド合成法へと展開した結果について述べる。

## 第2章 ホスホニウムトリアゾリド型縮合剤を用いた汎用的ペプチド固相合成法の開発

### 2.1. 研究背景

#### 2.1.1. 固相合成法に用いられる固相担体

固相合成法は、1963年に Merrifield によってペプチドの合成に利用された例<sup>18</sup>に始まり、現在ではオリゴペプチド<sup>19,20</sup>だけでなく、オリゴヌクレオチド<sup>21</sup>、オリゴサッカライド<sup>22</sup>の合成や、コンビナトリアルケミストリーへの応用<sup>23-25</sup>など、幅広い分野へと展開が行われている。特に、オリゴペプチドやオリゴヌクレオチドの合成では、両分野が化学的に成熟している点も相まって広く用いられており、現在合成されているオリゴマーの多くが固相合成法によるものである。

ペプチド合成では、固相担体として、Merrifield による報告から現在に至るまで、広く用いられているのが 1%-5%程度のジビニルベンゼンで架橋されたポリスチレン担体である。ポリスチレンは安価に入手が可能であり、さらにジビニルベンゼンによって架橋されることで、溶媒に対する膨潤性を維持しつつ、力学的強度と溶媒への完全な不溶性を獲得することができる。ポリスチレン担体を用いて、これまでに 100 残基を超えるタンパク質の合成が報告されている (Table 4<sup>20</sup>)。

**Table 4.** ペプチド固相合成によって合成されたタンパク質

Proteins	Number of amino acid residues	Year	Reference
Ferredoxin	55	1968	26
Ribonuclease A	124	1969	27
Growth hormone	188	1970	28
Ribonuclease T <sub>1</sub>	104	1973	29

一方、ポリスチレン固相担体上でオリゴペプチド鎖を合成した場合、鎖長伸長に伴って縮合効率が低下する現象が知られている。この原因として、オリゴペプチド鎖の疎水性残基がポリスチレンと疎水性相互作用をすることで、固相担体の立体的影響を受け、伸長末端のアミノ基の反応性が低下する場合や、オリゴペプチドが二次構造を形成し、伸長末端のアミノ基がペプチド鎖の奥に内包され、反応性が低下するためであると言われている。前者は、疎水性の固相担体と疎水性ペプチド側鎖の相互作用であるため、疎水性の高いポリスチレンの代わりに、親水性の高いポリアクリルアミド担体やポリアミド担体を用いることで克服が可能であると言われている<sup>30,31</sup>。

また、種々の溶媒で膨潤するポリマーとして、ポリエチレングリコール鎖がポリスチレンに導入された TentaGel が挙げられる<sup>20</sup>。通常のポリスチレン固相担体は限られた溶媒でのみ膨潤するのに対し、TentaGel はポリエチレングリコール鎖と親和性を有する種々の溶

**Table 5.** 1%ジビニルベンゼンにより架橋されたポリスチレンと PEG (M=3300 Da) が導入されたポリスチレンの膨潤度の比較

Solvent	PS	PS-PEG
Water	—	2.5
MeOH	0.95	2.5
EtOH	1.05	1.2
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	5.2	3.0
Toluene	5.3	3.1
DMF	3.5	3.2
CH <sub>3</sub> CN	2.0	3.0
THF	5.5	3.4
Dioxane	4.8	3.7
Ether	2.5	1.1

媒に膨潤する (Table 5)。また、反応点と固相担体の間にポリエチレングリコール鎖が挿入されているため、目的とするオリゴペプチドの動きが制限されず、より液相に近い条件で反応を行うことができる。そのため、固相担体上の反応点の反応性が高く、高収率でオリゴペプチドを得ることができる。固相担体の膨潤性が反応効率に大きな影響を与えることは、反応溶媒に膨潤しない、多孔質のガラス製ビーズである CPG (Controlled Pore Glass) を用いた比較検討の結果からも理解できる。CPG を用いた際の反応効率は、膨潤性のポリスチレンに大きく劣ることが知られている (Table 6<sup>32</sup>)。

**Table 6.** Fmoc-(60-67)-uterglobin-OH を H-(68-70)-uterglobin が担持された担体に対して縮合した際の収率

Solid support	Yield, %			
	2 h	7 h	24 h	48 h
1% DVB cross-linked polystyrene	31	100		
polyacrylamide	24	87	100	
controlled pore glass (CPG)	18	35	41	46

このように、ペプチド合成では歴史的に膨潤性の固相担体が多く用いられてきた一方、オリゴヌクレオチドの合成では非膨潤性の固相担体が多く用いられてきた。オリゴペプチドの合成では、切り出し条件としてアンモニア水溶液が広く用いられているが、ポリスチレン固相担体はアンモニア水溶液中に膨潤せず、切り出し効率に問題があるためである。また、現在主流の核酸合成法であるホスホロアミダイト法では、アセトニトリル中、テトラゾールなどの酸性活性化剤を用いて縮合反応を行う必要があるため、アセトニトリルを溶媒として使用可能な、非膨潤性の固相担体が多く用いられてきた。

現在汎用されているペプチド固相合成法と核酸固相合成法は、反応条件やプロトコルが

大きく異なるが、用いる固相担体が、膨潤性であるか、非膨潤性であるかという違いが、合成手法の本質に影響を及ぼしている。膨潤性固相担体を用いた系では、均一系の液相反応条件に近いため、反応点の反応性が高く、オリゴペプチドの合成には鎖長伸長には 2-5 当量のモノマーを用いれば十分であるのに対し、非膨潤性の固相担体を用いた系では、不均一系の固液反応であるため、反応点の反応性が低く、オリゴペプチドの標準的プロトコルでは、十分な反応性を確保するため、20 当量のモノマーを用いる必要がある。このように、膨潤性の固相担体では、反応点の高い反応性により、鎖長伸長に必要なモノマーの使用量を抑制することができる一方、非膨潤性の固相担体は、あらゆる溶媒を用いることができると言う、膨潤性の固相担体には無い利点が存在するため、膨潤性固相担体に適用不可能な溶媒を用いて反応を行う際に、好んで用いられる。例としてはアノマー位にトリクロロアセトイミデート基を有するグリコシルドナーを用いたオリゴサッカライドの合成が挙げられる<sup>33</sup>。これは、オリゴサッカライド合成の鍵反応となるグリコシル化を、核酸合成と同様に酸性条件下行うため、用いることのできる溶媒に制限があるためである。

### 2.1.2. カルボジイミド型縮合剤

ペプチド化学合成の黎明期から広く用いられ、現在でも汎用されている縮合剤として、カルボジイミド型縮合剤がある。初期に汎用された *N,N'*-ジシクロヘキシルカルボジイミド<sup>34</sup> (DCC) は、縮合剤をカルボン酸とアミンと混合するだけで反応が進行し、簡便に良好な収率でアミドを合成可能であったが、反応の際に副生する *N,N'*-ジシクロヘキシルウレアの有機溶媒への溶解度が低く、特に固相合成に適用した際に、洗浄による除去が困難であるという欠点を抱えていた。この欠点を解決すべく、*N,N'*-ジイソプロピルカルボジイミド (DIC) や 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド塩酸塩 (EDC) が開発された<sup>35,36</sup>。前者は副生する *N,N'*-ジイソプロピルウレアが有機溶媒に対して易溶であり、固相合成に広く用いられている。一方、後者は水に可溶であり、抽出操作によって水層へと除去可能なことから、液相法による縮合反応で広く用いられている (Figure 20)。

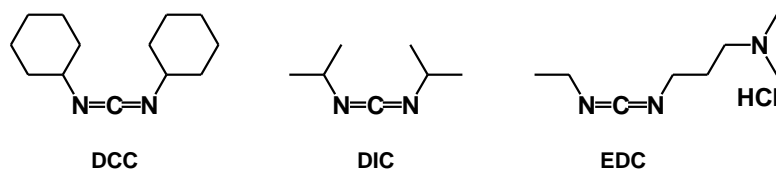
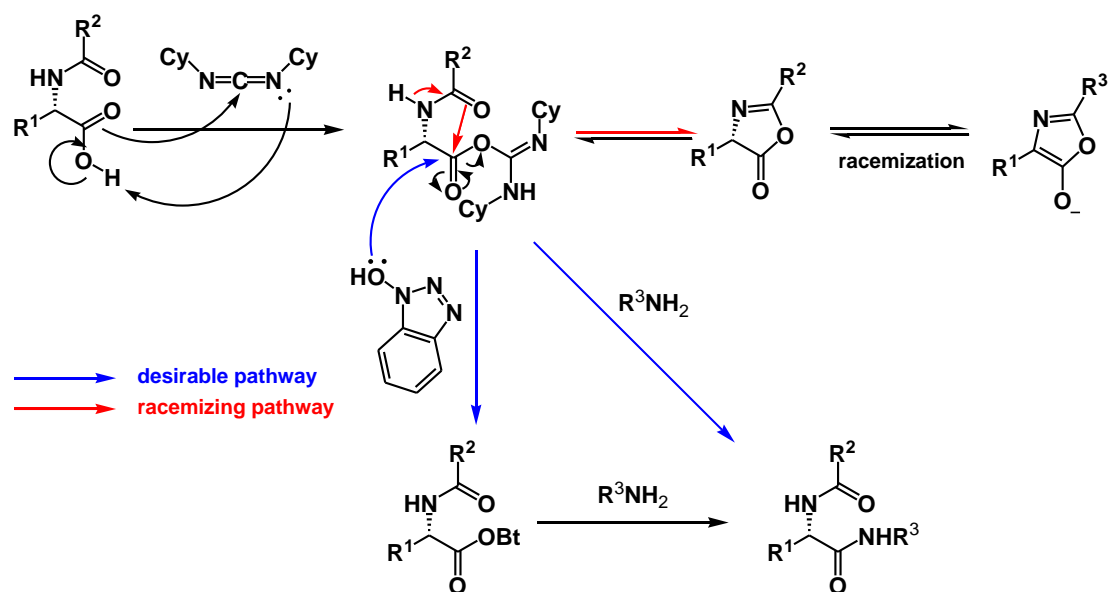


Figure 20. 汎用されているカルボジイミド型縮合剤の構造

カルボジイミド型縮合剤は、アミド結合の生成に広く用いられるが、 $\alpha$ -アミノ酸の縮合反応で、Scheme 1 に示す反応機構でラセミ化が進行することが知られている。このラセミ化を防ぐために、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール (HOBt) や 1-ヒドロキシ-7-アザベンゾトリアゾール (HOAt) を添加するのが一般的である。これは、カルボン酸とカルボジイミドが反応して生成する中間体に対し、HOBt が求核攻撃を行い、生成する活性エステルを経由することで、分子内環化反応が遅くなり、ラセミ化が抑制されるため考えられている。

Scheme 19



### 2.1.3. カルベニウム型縮合剤

カルボジイミド型縮合剤は安価であり、液相反応を行なった場合は、副生するウレアの濾過による除去が容易であるという利点を有しているが、固相合成に適用する際には、しばしばその反応性が問題になる。現在最も汎用されている、カルベニウム型縮合剤である HBTU は、カルボン酸と反応することで系中にベンゾトリアゾリルオキシエステルを生成させる縮合剤であり、カルボジイミド型縮合剤と比較して、高収率かつ、ラセミ化も生じにくいという特徴を有している<sup>37</sup>。また、HBTU の 1-ヒドロキシベンゾトリアゾール部位が 1-ヒドロキシ-7-アザベンゾトリアゾールに置換した縮合剤 HATU は、HBTU と比較してさらに高活性である<sup>38</sup>。

HBTU や HATU などのカルベニウム型の縮合剤は、溶液中で脱離基の窒素原子がジアザカルベニウム炭素に結合したグアニジニウム型 (*N*-form) と、酸素原子がジアザカルベニウム炭素に結合したウロニウム型 (*O*-form) の平衡混合物として存在する<sup>39</sup> (Figure 20)。グアニジニウム型とウロニウム型の両異性体間のうち、熱力学的に安定なのはグアニジニウム型であり、反応性に優れているのはウロニウム型である<sup>40</sup>。一方、これらの縮合剤と

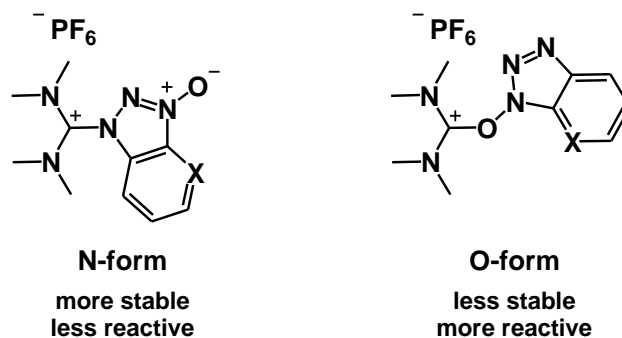
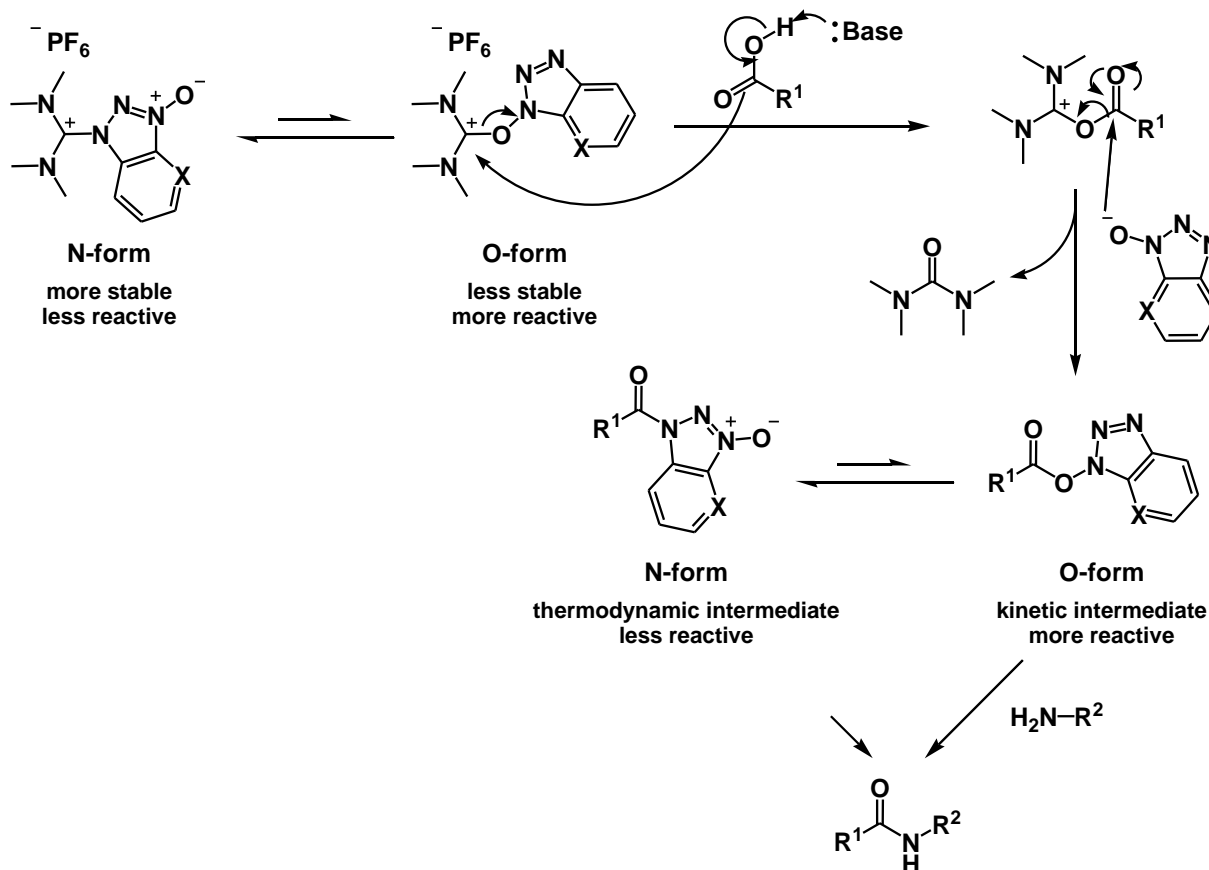


Figure 21. HBTU (X=CH) と HATU (X=N) のグアニジニウム型及びウロニウム型の構造



遊離のカルボン酸誘導体を反応させると、活性中間体として *N*-オキシベンゾトリアゾリル基の窒素原子がアシル化された活性アミド (*N*-form) と、酸素原子がアシル化された活性エステル (*O*-form) の平衡混合物を与える (Scheme 20)。カルベニウム型縮合剤の異性体と同様に、反応性が高いのは活性エステル (*O*-form) 型の間mediateである。この機構によると、*N*-form は反応性を低下させている好ましくない異性体であることから、より良い縮合剤を開発するためには、*N*-form の異性体が存在しない、もしくは、*N*-form 自体が高活性を有していれば良い。

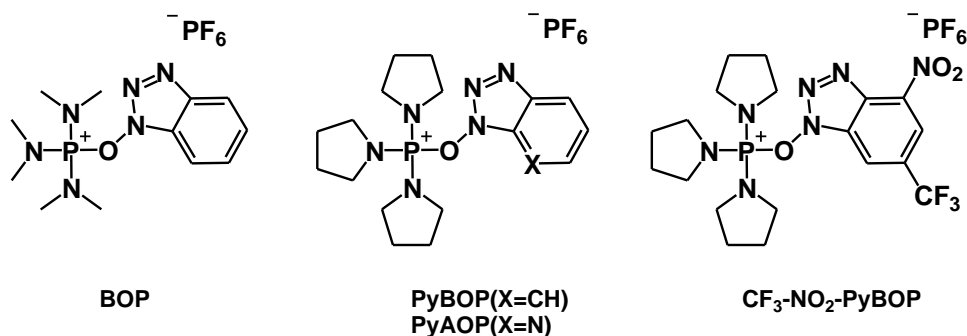
Scheme 20



#### 2.1.4. ホスホニウム型縮合剤

カルベニウム型縮合剤と同様に広く用いられているのが、ホスホニウム型縮合剤である。1-ヒドロキシベンゾトリアゾールを脱離基として有する BOP 試薬は、最初に報告されたホスホニウム型縮合剤であり、液相合成、固相合成いずれにも適用可能な、高活性な縮合剤である<sup>41</sup> (Figure 22)。しかし、BOP 試薬は、副生するヘキサメチルリン酸トリアミドの高い発がん性が知られており、現在では類似の骨格を有するホスホニウム型試薬で代用されることが多い。

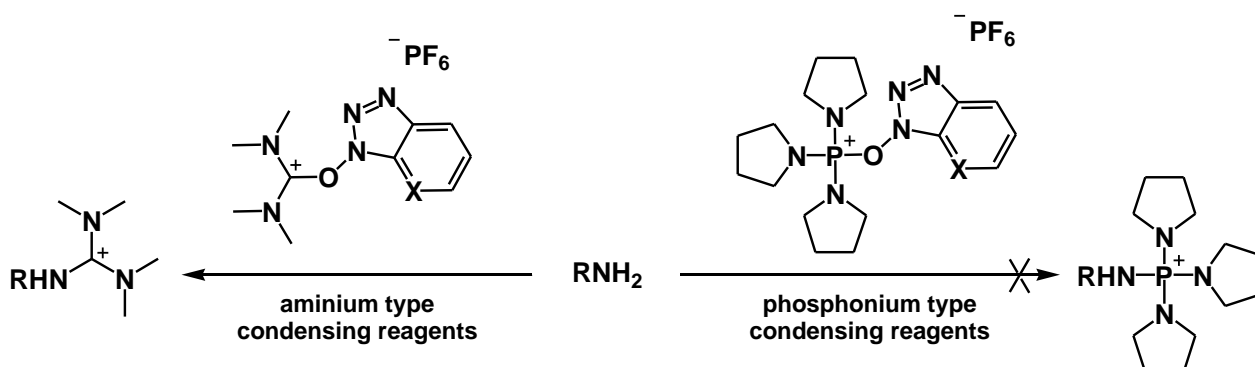
BOP 試薬の代用試薬として汎用されているのが、PyBOP である<sup>42</sup>。また、PyBOP のベンゾトリアゾリルオキシ基が、より脱離能の高い7-アザベンゾトリアゾリルオキシ基に置換した縮合剤 PyAOP は、より高活性な縮合剤として、低反応性のアミノ酸の縮合に用いられている<sup>43</sup> (Figure 22)。



**Figure 22.** ホスホニウム型縮合剤 BOP, PyBOP, PyAOP, CF<sub>3</sub>-NO<sub>2</sub>-PyBOP の構造

HOBt や HOAt を脱離基として有する PyBOP や PyAOP は、対応するカルベニウム型の縮合剤である HBTU や HATU と比較して保存性に劣るものの<sup>44</sup>、縮合剤がアミノ基と反応する副反応が進行しにくいという利点がある<sup>45</sup> (Scheme 21)。また、合成が煩雑なため、市販はされていないが、PyBOP のベンゾトリアゾール部位に電子求引基であるトリフルオロメチル基とニトロ基を導入した CF<sub>3</sub>-NO<sub>2</sub>-PyBOP は、HATU と同程度の活性を示す高活性な縮合剤である<sup>46</sup>。しかし、脱離基に電子求引基を導入することにより、CF<sub>3</sub>-NO<sub>2</sub>-PyBOP が HATU と同程度の活性を有していたとする事実は、この戦略が有力であることを意味している。

### Scheme 21



尚、PyBOP や PyAOP には *N*-form が存在しないが、この縮合剤によってカルボン酸誘導体を活性化した場合には、カルベニウム型縮合剤を用いた場合と同様に、活性中間体として *N*-form 及び *O*-form が生成する。

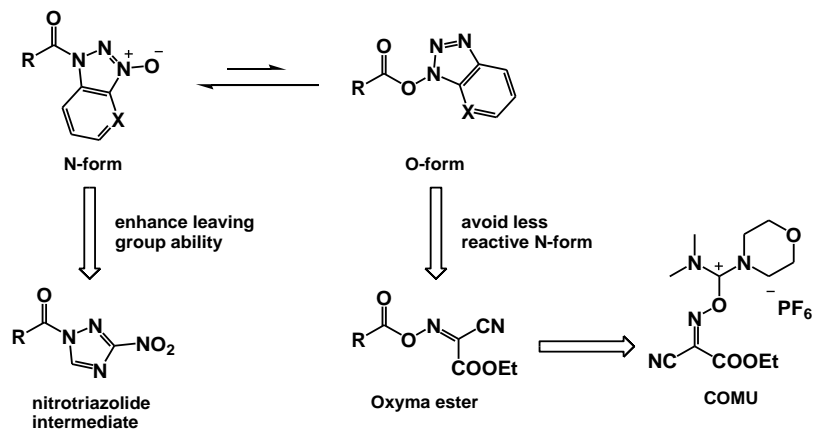
### 2.1.5. 近年開発された高活性縮合剤 COMU と PyNTP

(2.1.2.) 及び (2.1.3.) で述べたように、既存のベンゾトリアゾリルオキシ基を脱離基として有する縮合剤の反応性を向上させる上で、主に 2 つの戦略が考えられる。1 つ目は中間体である *O*-form の存在比を向上させる、2 つ目は電子求引基を脱離基に導入し、*N*-form の反応性を向上させるものである (Scheme 22)。

前者の戦略に基づき、デザインされたのが (1-Cyano-2-ethoxy-2-oxoethylideneaminoxy) dimethylamino-morpholino-carbenium hexafluorophosphate (COMU) である<sup>47</sup>。COMU を用いる縮合反応は、活性エステル型の中間体のみを経由するため、HATU よりも高い反応性を示し、市販されている縮合剤の中では最も強力な縮合剤である。

一方、第1章で用いた PyNTP は、後者の戦略に基づいてデザインされた縮合剤である。電子求引基であるニトロ基によってトリアゾール環上の電子密度が下がり、高い脱離能を有するニトロトリアゾールを脱離基にもつ活性中間体を經由して反応が進行する。

Scheme 22

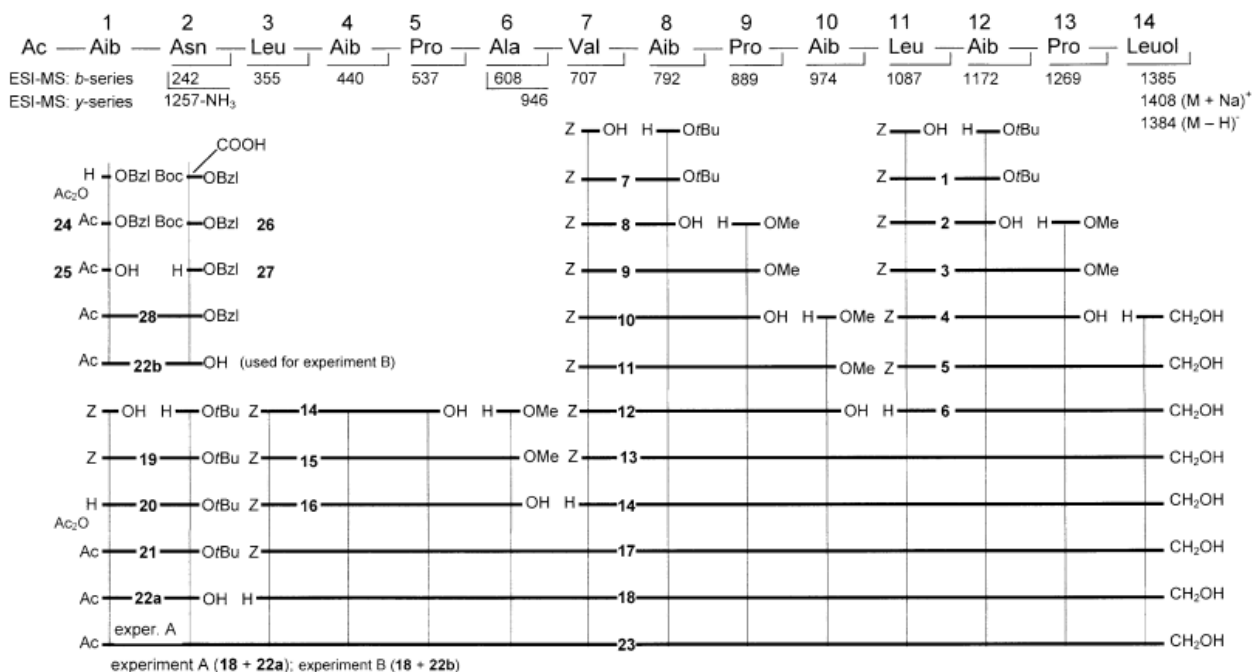


### 2.1.6. 固相合成では合成困難なオリゴペプチドの合成

第2章では、これまでペプチド固相合成法に用いられる固相担体や縮合剤を概観したが、本項では、これらの縮合剤を用いてもなお合成が困難な、オリゴペプチドの合成例を紹介する。

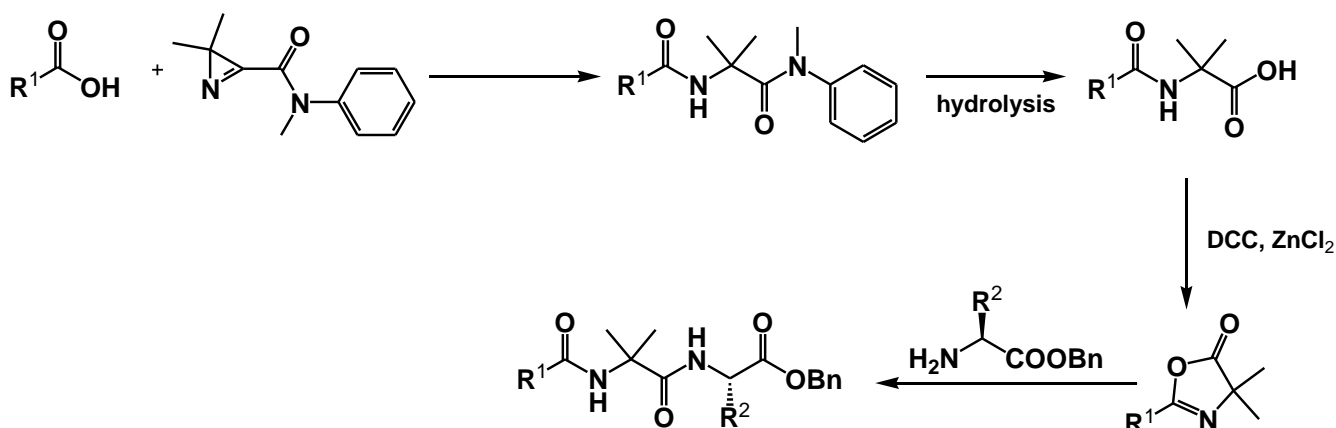
Trichovirin I は、カビの一種である *Trichoderma viride* NRRL 5243 由来のペプタイボールであり、Brückner らによって配列が決定された 14 量体のオリゴペプチドである。Brückner らは、Trichovirin I の合成を試みているが、Trichovirin I は、反応性の低いアミノイソブチル酸 (Aib) を多く含有しているため、縮合反応効率が極めて低く、固相法では合成が困難であるため、その合成を液相で行っているが、14 残基のオリゴペプチドを合成するにあたって 23 ステップを要している<sup>48</sup> (Scheme 23)。

Scheme 23



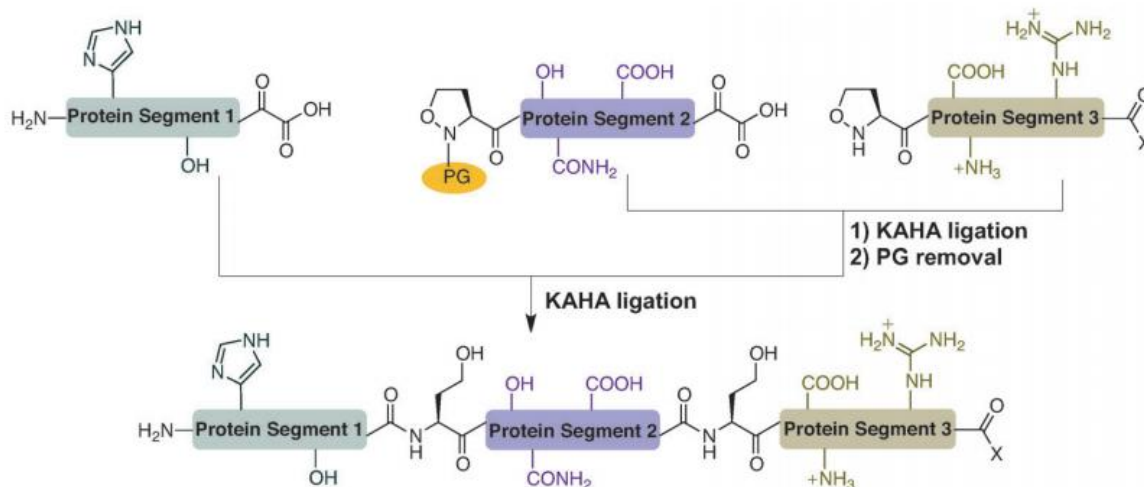
低反応性アミノ酸の代表例である Aib を含むペプチドの合成では、通常の Fmoc 固相合成法とは異なる、アジリジン/オキサゾロン法が知られている<sup>49</sup> (Scheme 24)。Heimgartnerらは、このアジリジン/オキサゾロン法を用いて、Aib6 量体の合成に成功している。アジリジン/オキサゾロン法は、液相、固相ともに適用が可能であるが、中間体のオキサゾロンが加水分解し易いなどの欠点を併せ持っており、はるかに簡便な Fmoc 固相合成法に適用可能でないため、汎用性が高いとは言い難い。

Scheme 24



Aib 等の低反応性アミノ酸を含有していない場合でも、オリゴマーが高次構造を取ることによって伸長末端の反応性が低下し、目的とするオリゴペプチドが得られない場合が存在する。Bodeらは、独自に開発した KAHA Ligation<sup>50</sup>法を用いて、80 量体程度のオリゴペプチドの合成を達成している<sup>51</sup> (Scheme 25)。KAHA Ligation 法は、KetoAcid と HydroxylAmine を混合することで、アミド結合を与えるというライゲーション反応である。現段階では、ライゲーション後のアミド結合 C 末端側に導入可能なアミノ酸の種類が限られているものの、フラグメント同士を結合することで、巨大アミノ酸を合成した例となる。

Scheme 25



上記の方法は、いずれも、Fmoc 固相合成法の適用範囲が限られているために開発された合成法である。すなわち、現在の Fmoc 固相合成法の適用範囲を広げることにより、低反

応性のアミノ酸やオリゴペプチド鎖の高次構造形成などの要因で、反応性が低下してしまった場合でも、目的とするオリゴペプチドを合成可能な合成手法、反応条件の開発が求められている。

## 2.2. 研究結果

### 2.2.1. 従来型ペプチド縮合剤との反応性の比較

従来型ペプチド縮合剤と PyNTP の反応性を比較するにあたり、天然型アミノ酸を用いてオリゴペプチドの合成を行うと、従来型縮合剤と PyNTP の間に有意な差が認められないことが予想されるため、合成困難なオリゴペプチドの合成における合成効率を比較する必要がある。

そこで、本研究では、アミノイソブチル酸 (Aib) に着目した。Aib は、カルボン酸の $\alpha$ 位が 4 級炭素であるため、立体的に嵩高く、アミノ基の求核性及びカルボキシル基の求電子性が低い低反応性アミノ酸である。加えて、オリゴ Aib は、鎖長が長くなると  $3_{10}$  ヘリックスと呼ばれる二次構造を形成し<sup>52</sup>、オリゴマー末端のアミノ基の求核性が著しく低下するため、合成が極めて困難なオリゴペプチドとして知られている。そこで、Aib の 4 量体にチロシンを UV マーカーとして導入したペプチド 5 量体 H-(Aib)<sub>4</sub>-Tyr-NH<sub>2</sub> を合成ターゲットとし、その合成収率を比較することで、縮合剤の反応性を比較することとした。

はじめに、市販されている縮合剤の中で最も高い縮合効率を与えることで知られている COMU と、PyNTP の比較を行った。固相担体として、低反応性アミノ酸の合成に用いられる、ポリスチレンと末端アミノ基間にポリエチレングリコール鎖が挿入された Rink amide NH-SAL-PEG resin を用い、5 当量のモノマーを用いて、汎用されている Fmoc ペプチド合成法のプロトコールに従って合成を行った。その結果、COMU を用いた場合では目的とする 5 量体の生成を確認することができず、主生成物として 2 量体 H-Aib-Tyr-NH<sub>2</sub> が得られた。一方で、PyNTP を用いた場合は、主生成物として目的とする 5 量体を 49% の収率で得た。(Figure 20)

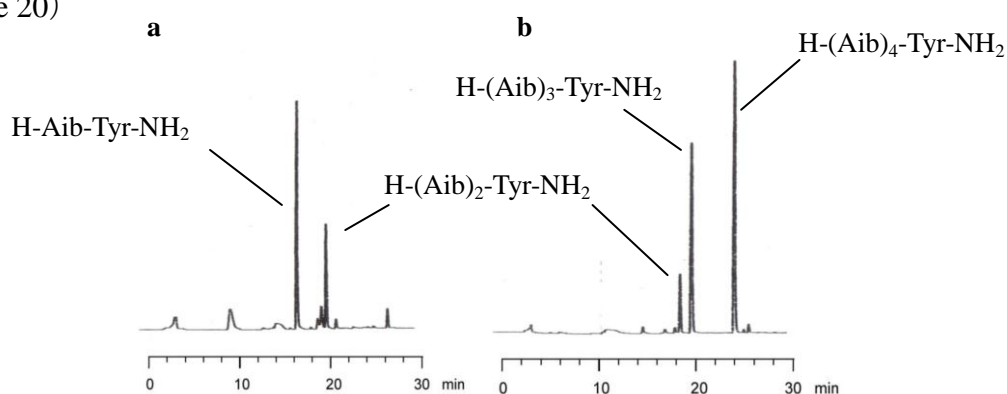


Figure 21. H-(Aib)<sub>4</sub>-Tyr-NH<sub>2</sub> の合成。a) COMU を用いた場合。b) PyNTP を用いた場合

この結果から、PyNTP は COMU よりも優れた縮合活性を示し、さらに、従来型のペプチド合成法にそのまま適用するだけで、有効であることがわかった。

### 2.2.2. 膨潤性担体と非膨潤性担体の比較

通常、ペプチド固相合成では、膨潤性の固相担体がいられる。一般に、低架橋ポリスチレンなどの膨潤性担体の膨潤度は、用いる溶媒によって顕著に異なる。たとえば、1%ジビニルベンゼン (DVB) 架橋ポリスチレンは、DMF や NMP などの溶媒には良く膨潤するが、アセトニトリルには膨潤せず、凝集してしまい、固相反応を行うことが困難である。このように、膨潤性の担体を用いている場合は、溶媒の選択肢は限定されてしまう。しかし、PyNTP を用いた縮合系において、上述した DMF や NMP が必ずしも最適な溶媒であるとは限らない。

一方、非膨潤性の固相担体は、あらゆる溶媒が使用可能である。ペプチド合成と同様に、固相法が確立されている核酸の合成では、ガラス製の担体や高架橋ポリスチレンのような非膨潤性担体が汎用されている。核酸の固相合成では、縮合反応溶媒としてアセトニトリルを用いた条件で最適化されており、DMF や NMP は用いられない。また、非膨潤性の固相担体は、真空乾燥させることも可能であり、特にマニュアル操作で行う固相合成で、より厳密な禁水条件で反応を行うことができる。

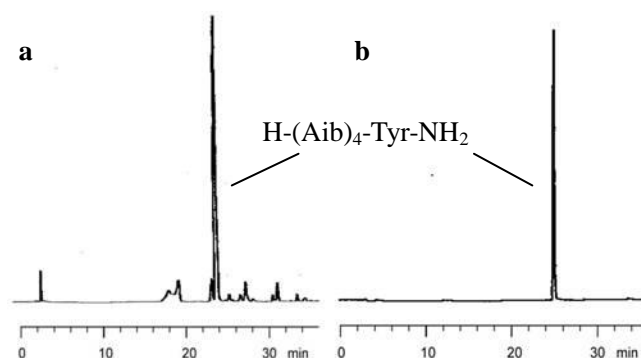
本研究では、非膨潤性の固相担体として高架橋ポリスチレン担体の Custom Primer Support® (CPS) を、Fmoc アミノ酸の溶解度が高い溶媒として、ピリジン、アセトニトリルまたは NMP を用いて反応条件の検討を行った (Table 4)。核酸の固相合成では、再現性を確保するため、モノマーを 20 当量使う手法が標準的であり、本研究ではそれに倣って 20 当量のモノマーを用いた<sup>21</sup>。また、通常膨潤性の固相担体を用いた系に関して、Figure 21 の条件では 5 当量のモノマーを用いていたが、公平な比較を行うため、Table 1 の Entry 1-3 では、20 当量のモノマーを用いた。ただし、反応速度に最も大きな影響を与える、モノマーの濃度は固定されているため、結果に大きな差異は認められなかった。

**Table 4.** 異なる固相担体、縮合剤、溶媒を用いた、ペプチド 5 量体 H-(Aib)<sub>4</sub>-Tyr-NH<sub>2</sub> の合成

Entry	Resin	Condensing reagent	Solvent	2mer %	3mer %	4mer %	5mer %
1	Rink amide NH-SAL-PEG	COMU	NMP	76	24	n.d.	0
2	Rink amide NH-SAL-PEG	HATU	NMP	76	19	5	n.d.
3	Rink amide NH-SAL-PEG	PyNTP	NMP	0	19	39	42
4	CPS	PyNTP	Pyridine	0	8	24	68
5	CPS	PyNTP	MeCN	0	13	34	53
6	CPS	PyNTP	NMP	0	9	11	80

溶媒としてアセトニトリルを用いた場合、副反応を抑制することができたが、反応効率は膨潤性の担体を用いた場合と同程度であった。一方、ピリジンや NMP を用いた場合、副反応の進行が示唆されたが、縮合効率は良好であった。

Table 4 のデータに関し、最も良い結果を与えた Entry 6 について、逆相 HPLC による目的物であるペプチド 5 量体の単離を試みた (Figure 22)。目的物は一回の逆相 HPLC により単離が可能であり、単離収率は 14% であった。



**Figure 22.** a) Table 4 の Entry 6 の粗精製物の HPLC プロファイル。b) 精製後の HPLC プロファイル

### 2.2.3. ラセミ化度合いの測定

前項では、PyNTP を用いた縮合系が、既存の縮合剤よりも高い縮合効率を達成し、さらにその効率は、非膨潤性の固相担体を用いることでさらに向上することを示した。しかし、汎用性の高いペプチド合成法を開発するにあたって、 $\alpha$ -アミノ酸を縮合した場合に起こりうるラセミ化の度合いを評価する必要がある。

ラセミ化度を測定するにあたって、本研究ではペプチド 2 量体 Z-Phg-Pro-NH<sub>2</sub> をモデル化合物として選んだ。フェニルグリシン (Phg) は $\alpha$ -アミノ酸の中でも、最もラセミ化し易いアミノ酸の一つであることが知られている。また、プロリンは、天然型のアミノ酸の中で唯一アミノ基が第二級であり、求核性が低いことから、ラセミ化反応とペプチド結合形成反応の競争反応において、ラセミ化が比較的有利になるため、プロリンの N 末端側に結合するアミノ酸は、ラセミ化し易いことが知られている。そこで、フェニルグリシンのアミノ基を Z 基で保護した Z-Phg-OH を、固相担体上に担持されたプロリンと縮合することで得られる Z-Phg-Pro-NH<sub>2</sub> の(L, L): (D, L)のジアステレオマー比を測定することで、ラセミ化の度合いを見積もった (Table 5)。

**Table 5.** Z-Phg-Pro-NH<sub>2</sub> の合成におけるラセミ化の度合いの測定

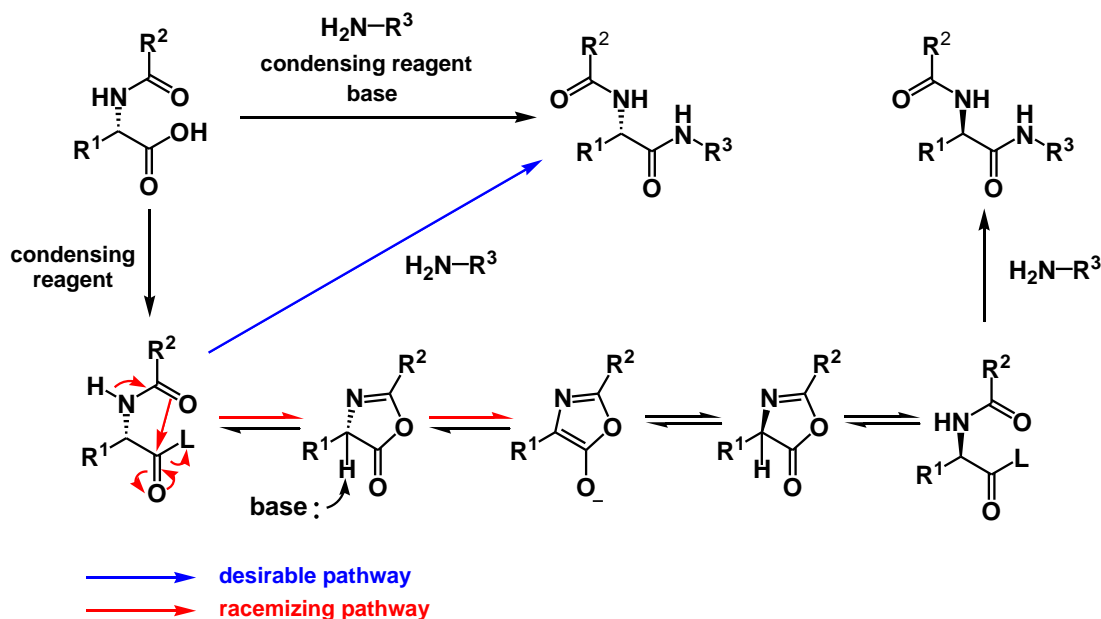
Entry	Resin	Condensing reagent	Monomer	Solvent	Preactivation.	d.r.
1	Rink amide NH-SAL-PEG	HATU	5 equiv.	NMP	0 min	92%
2	Rink amide NH-SAL-PEG	PyNTP	5 equiv.	NMP	0 min	94%
3	CPS	PyNTP	20 equiv.	MeCN	0 min	96%
4	CPS	PyNTP	20 equiv.	NMP	0 min	96%
5	CPS	PyNTP	20 equiv.	NMP	5 min	46%
6	CPS	PyNTP	20 equiv.	NMP	15 min	45%

PyNTP を通常のペプチド合成の条件に適用したところ、HATU とほぼ同等の光学純度のペプチド 2 量体 Z-Phg-Pro-NH<sub>2</sub> が得られた (Table 5, Entry 2)。また、非膨潤性の固相担体を用いた場合、若干ながら、さらなるジアステレオ比の向上が見られた (Table 5, Entry 3,4)。従来型の縮合剤である HATU は、光学純度の高いオリゴペプチドの合成に用いられる信頼度の高い縮合剤であり、HATU を用いた通常のペプチド固相合成法とほぼ同等の光学純度

で目的物が合成できれば、天然型アミノ酸の縮合には十分であると言える。

PyNTP を用いた縮合系において、ラセミ化を十分抑制できた理由として、縮合反応と、副反応であるラセミ化の反応が競争反応である点に着目した。Scheme 1 に示す、提唱されているラセミ化の機構では、用いる脱離基の脱離能により、正規反応であるアミンの求核攻撃の反応速度および、ラセミ化の第一段階となる分子内環化反応速度は影響を受けるものの、ラセミ化の第二段階にあたる脱プロトン化の反応速度は、脱離基の影響を受けない。そのため、脱離基としてニトロトリアゾールを有する活性中間体と、アミンの求核攻撃によるアミド結合形成反応が、ラセミ化の反応速度よりも早いため、結果的に光学純度の高い2量体が得られたと考えた。

### Scheme 1 (再掲)



この仮説を検証するため、Z-Phg-OH と PyNTP を DIPEA 存在下、あらかじめ反応させてプレアクチベーションを行ってから固相担体上のプロリンと反応させた場合と、プレアクチベーションを行わずに縮合を行った場合を比較した (Table 5, Entry 5,6)。その結果、プレアクチベーションを行った場合、つまり遊離のアミノ基の非存在下では、5分以内にフェニルグリシンモノマーはほぼ完全にラセミ化することが判明した。なお、光学的に純粋な Z-Phg-OH の代わりに、Z-D-Phg-OH と Z-L-Phg-OH の 1 対 1 混合物を用いて同様に縮合を行った場合、得られた Z-Phg-Pro-NH<sub>2</sub> のジアステレオマー比は 46% であることから、ラセミ化反応は 5 分以内に完結していると考えられる。

以上のことから、PyNTP を用いた縮合系では、アミド結合生成反応がラセミ化反応よりも極めて早い反応であるため、高い光学純度のオリゴペプチドが得られることがわかった。また、膨潤性固相担体を用いた場合よりも非膨潤性固相担体を用いた場合の方が、ラセミ化が抑制されたのは、膨潤性固相担体と比較して、非膨潤性固相担体の方が、固相担体表面における試薬の拡散速度が速いため、より光学的純度の高い目的化合物が得られたと考えられる。



### 2.3. 小括

縮合剤 PyNTP を用いた、新たなペプチド固相合成条件を開発した。縮合剤 PyNTP は、膨潤性固相担体を用いた一般的なペプチド合成法に適用可能であったが、従来、ペプチド合成では用いられたことのない、非膨潤性固相担体と組み合わせることで、縮合反応効率はさらに向上した。

また、縮合時に極めてラセミ化し易いことで知られる、ペプチド 2 量体 Z-Phg-Pro-NH<sub>2</sub> の合成に本手法を適用したところ、高い光学純度で目的物が得られた。この光学純度は、現在汎用されている条件である、HATU と膨潤性固相担体を用いた縮合条件により合成された 2 量体と比較しても遜色無く、本手法によりラセミ化を伴うことなく、オリゴペプチドが合成可能であることを示すものである。

縮合効率とラセミ化の抑制、2 つの観点から、本手法は有効であり、新規ペプチド合成法としての必要条件を満たしており、特に従来法では合成が困難な反応性の低いアミノ酸を含むオリゴペプチドの合成に有効であると考えられる。

## 総括

第1章では、新規ペプチド核酸類縁体、DBNAの合成について述べた。これまでに、PNAは、その独自の特徴を生かした様々な応用研究がなされており、機能性人工核酸として実用化が期待されている核酸類縁体の一つである。しかし、PNAの特徴の中で、実用化に際し不利に働く性質として、PNAが相補的な核酸と二重鎖を形成する際に、パラレル配向とアンチパラレル配向という、2種類の配向で結合し得る点が挙げられる。PNAは、天然型核酸と比較してより直線的な二次構造をとるため、パラレル配向とアンチパラレル配向の構造的差異及び両配向間のエネルギー差が小さく、相補鎖に対する結合の配向選択性が低い。

PNAが直線的な構造を取る理由として、2点の構造的特徴が考えられる。1点目は、PNAが剛直なアミド結合によって単量体同士が結合した化合物であり、螺旋のピッチが長くなっている点。2点目は、PNAがアキラルな化合物である点である。

こういった構造学的知見に着目してデザインされたのが、新規ペプチド核酸類縁体 **diaminobutanoic acid-based nucleobase-linked polyamide (DBNA)** である。本研究ではDBNAのオリゴマーを合成し、天然型核酸との二重鎖形成能等の物性を評価することを目標とした。

DBNAの合成では、アミノ基がFmoc基で保護されたモノマーを合成後、当初は汎用されている一般的なペプチド固相合成法によるオリゴマーの合成を試みたが、目的とするオリゴマーを得ることができなかった。そこで、Wadaらによって開発された縮合剤PyNTPと、非膨潤性固相担体を用いた、独自の手法を開発し、DBNAオリゴマーの合成を行った。

得られたDBNA10量体 (Fmoc-Gly-GL-(dbC)<sub>10</sub>-GL-NH<sub>2</sub>) と相補的なRNA10量体 (rG<sub>10</sub>) の二重鎖融解温度の測定を試みたが、RNAの配列がグアノシン10量体であったことから、グアノシン同士の相互作用がDBNAとの相互作用に対し、優先的に起きてしまったと考えられ、二重鎖の形成を確認することはできなかった。

第2章では、第1章で開発した独自のペプチド固相合成手法を、DBNAの合成に留まらず、一般的なペプチド合成へ応用することを検討した。新たなペプチド合成法を開発する際に要求される条件として、縮合効率がどれ程優れているかという点と、縮合反応の際に懸念されるラセミ化をどの程度抑制できるかという点である。

縮合効率は、低反応性アミノ酸Aibの4量体を含むペプチド5量体 H-(Aib)<sub>4</sub>-Tyr-NH<sub>2</sub> を合成することで評価した。その結果、PyNTPの縮合効率は、従来型の高活性縮合剤HATUやCOMUを上回り、さらに、非膨潤性溶媒と組み合わせることで、その縮合効率はさらに向上した。

また、ラセミ化体の評価は、ラセミ化し易いアミノ酸であるフェニルグリシンをプロリンに縮合することで得られる、Z-Phg-Pro-NH<sub>2</sub>の光学純度により、見積もった。天然型アミノ酸の合成に標準的に用いられるHATUを用いた従来型の縮合条件と比較したところ、本条件は、同程度若しくは若干優れたラセミ化抑制能を示した。

本研究により開発された新規ペプチド合成法は、従来型の高活性縮合剤であるHATUや

COMU よりも優れた縮合活性を示し、かつ、本手法で合成されたオリゴペプチドは、HATU によって合成されたオリゴペプチド以上に光学的に純度の高いものであり、縮合効率とラセミ化の抑制を両立した新規合成法の開発に成功した。本手法は、特に従来法では合成が困難な反応性の低いアミノ酸を含むオリゴペプチドの合成に有効であると考えられる。

## 実験項

反応に用いた溶媒は、市販のものを乾燥蒸留した後、ナトリウムまたはモレキュラーシーブで乾燥したものをを用いた。反応追跡用の薄層クロマトグラフィーには、Merck社のTLCガラスプレート（シリカゲル 60 F<sub>254</sub>）を用いた。分取薄層クロマトグラフィーには、WAKOのシリカゲル B-5Fを用いた。カラムクロマトグラフィーによる分離には、関東化学の中性シリカゲル 60 N (63-210 μm) を用いた。

各種分析機器類は、以下に示した機種を用いた。

核磁気共鳴スペクトル測定	Mercury 300 (Varian)
高速液体クロマトグラフィー	ポンプ: PU-2080i Plus (日本分光) 検出器: UV-2075 Plus (日本分光) 低圧グラジェントユニット: LG-2080-02 (日本分光) デガッサ: DG-2080-53 (日本分光) 逆相カラム: μ-Bondasphere 5μ C18 100 A (Waters)

### 4-azido-3-N- (t-Butoxycarbonyl)-3- (L)-aminobutanoic acid benzyl ester 3

アルゴン雰囲気下、**2** (6.73 g, 21.8 mmol)をトルエン 5 mL で 1 回共沸後、テトラヒドロフラン (100 mL) に溶解し、0 °C で *N*-メチルモルホリン (3.6 mL, 33 mmol)、メシルクロライド (2.6 mL, 34 mmol) を加え、11 時間攪拌した。100 mL のジクロロメタンで希釈した後、溶媒を留去し、200 mL ジクロロメタンを加え直した後、0.01 M 塩酸 150 mL で有機層を洗浄し、蒸留水層をジクロロメタン 60 mL で洗浄し、回収した有機層すべてを飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 150 mL で洗浄した。蒸留水層をジクロロメタン 60 mL で洗浄した後、有機層を無蒸留水硫酸ナトリウムで乾燥させ、溶媒を留去した。得られた油状物質をアルゴン雰囲気下、*N,N*-ジメチルホルムアミド (200 mL) に溶解し、アジ化ナトリウム (4.25 g, 65.2 mmol) を加えて 60 °C で 21 時間攪拌した。溶媒を留去し、酢酸エチルで希釈した後、飽和食塩蒸留水で 10 回有機層を洗浄し、蒸留水層を酢酸エチルで洗浄し、有機層を無蒸留水硫酸マグネシウムで乾燥させた後、濾別し、溶媒を留去し、これをシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ジクロロメタン 100%) で分離精製することにより、目的化合物 **3** (5.19 g, 15.4 mmol) を収率 71% で得た。無色粉末状固体。

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 7.38-7.30 (5H, m), 5.16-5.12 (3H, m), 4.12-4.07 (1H, m), 3.54-3.42 (2H, m), 2.63 (2H, d, *J* = 6.0 Hz), 1.43 (9H, s).

### 4-azido-3- (L)- aminobutanoic acid benzyl ester 4

**3** (5.06 g, 15.1 mmol) をジクロロメタン (75 mL) に溶解し、-15 °C でトリフルオロ酢酸 (75 mL) を 1 時間半かけて滴下して 2 時間 20 分攪拌した。溶媒を減圧留去し、ジクロロメタン (200 mL) に溶解させ、

飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (200 mL)で1回有機層を洗浄した。蒸留水層をジクロロメタン (100 mL)で7回洗浄し、有機層を無蒸留水硫酸ナトリウムで乾燥させた後、濾別し、溶媒を留去し、目的化合物 **4** (3.22 g, 13.8 mmol)を収率 91%で得た。黄色油状物質。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.36-7.30 (5H, m), 5.15-5.05 (2H, m), 3.72-3.60 (3H, m), 2.89-2.68 (2H, m).

#### 4-azido-3-*N*-(uracil-1-ylacetyl)-3-(L)-aminobutanoic acid benzyl ester **7**

アルゴン雰囲気下、**4** (3.05 g, 13.0 mmol)をジクロロメタン (65 mL)に溶かし、ウラシル酢酸 **6** (2.43 g, 14.3 mmol)、*N,N*-ジメチルホルムアミド (65 mL)を加え1:1の混合溶媒に溶解させた。室温でHBTU (8.14 g, 21.45 mmol)とDIPEA (7.25 mL, 41.6 mmol)を加えて2時間攪拌した後、メタノール (5 mL)を加えて反応を停止させ、溶媒を減圧留去した。アメ状の物質をエタノール (10 mL)から再結晶し、吸引濾過によって目的化合物 **7** (0.5045g, 1.7 mmol)を得た。濾液を再度エタノール (4 mL)から再結晶を行い、吸引濾過によって目的化合物 **7** (1.50 g, 5.06 mmol)を得た。濾液を放置しておいたところ、結晶の生成を確認したため、これを吸引濾過することで、目的化合物 **7**回収した。計 2.16 g, 7.40 mmol。収率は57%となった。無色固体。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.34 (1H, s), 7.36-7.35 (5H, m), 7.15 (1H, d,  $J = 8.1$  Hz), 6.76 (1H, d,  $J = 8.1$  Hz), 5.7 (1H, d,  $J = 8.1$  Hz), 5.13 (2H, s), 4.42-4.38 (1H, m), 4.27 (2H, s), 3.51-3.47 (2H, m), 2.66 (2H, d,  $J = 6.9$  Hz).

#### 4-azido-3-*N*-(uracil-1-ylacetyl)-3-(L)-aminobutanoic acid **8**

**7** (1.49 g, 3.8 mmol)をテトラヒドロフラン(150 ml)に溶解し、室温で攪拌しつつ1M水酸化ナトリウム水溶液(50 ml)を加え、一時間攪拌した。テトラヒドロフランを留去し、希塩酸でpH1に調整し、析出した固体を濾過により分離した。得られた個体を冷やした水で洗浄し、目的化合物 **8** (1.0 g, 3.4 mmol)を収率 90%で得た。白色粉末状固体。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.54 (1H, d,  $J = 8.1$  Hz), 5.83 (1H, d,  $J = 8.7$  Hz), 4.51-4.40 (3H, m), 3.50-3.44 (2H, m), 2.66-2.59 (2H, m).

#### 4-*N*-monomethoxytrityl-3-*N*-(uracil-1-ylacetyl)-3,4-(L)-diaminobutanoic acid **10**

アルゴン雰囲気下、**8** (0.90 g, 3.05 mmol)をピリジン(5 ml)で3回共沸乾燥した。これを、ピリジン(60 ml)に溶解し、室温でトリフェニルホスフィン (2.19g, 8.35 mmol)を加えて3時間攪拌した。ピリジンを半分程度になるまで留去し、水を加えた後溶媒を留去し、トルエン(5 ml)で5回共沸乾燥し、1M HCl (30 ml)を加えて48時間攪拌した。水で希釈した後、ジクロロメタンで2回水層を洗浄し、溶媒を留去した。アルゴン雰囲気下、水、ピリジン(5 ml)で3回、トルエン(5 ml)で3回共沸乾燥し、*N,N*-ジメチルホルムアミドに溶解し、室温でトリエチルアミン (2.09 ml, 15 mmol)とモノメトキシトリチルクロライド (1.85 g, 6.0 mmol)を加えて6時間攪拌した。メタノールを加え、ジクロロメタンで希釈した後、水で2回有機層を洗浄し、溶媒を乾固しない程度に留去した。これをジエチルエーテル(200 ml)中に滴下し、析出した固体を濾過により分離した。得られた個体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(ジクロロメタン中、トリエチルアミン 1%、メタノール 2-4%)で分離精製し、ジクロロメタンに溶解した後再度ジエチ

ルエーテル(200 ml)中に滴下し、析出した固体を濾過により分離した。得られた個体をジエチルエーテルで洗浄し、目的化合物 **10** (1.42 g, 2.2 mmol)を収率 72%で得た。白色粉末状固体。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.11 (1H, d,  $J = 7.2$  Hz), 7.47-7.14 (12H, m), 6.83 (2H, d,  $J = 9.0$  Hz), 5.52 (1H, d,  $J = 7.5$  Hz), 4.26-4.20 (3H, m), 3.71 (3H, s), 2.14 (2H, s), 0.96 (9H, t,  $J = 7.2$  Hz).

#### 4-azido-3-*N*-(4-*N*-benzoyl-cytosine-1-ylacetyl)-3-(L)-aminobutanoic acid benzyl ester **14**

4-*N*-ベンゾイルシトル酢酸 (0.873 g, 3.19 mmol)を *N,N*-ジメチルホルムアミド (3 mL)で 3 回共沸乾燥し、HBTU (1.82 g, 4.80 mmol)を加え、アルゴン雰囲気下 *N,N*-ジメチルホルムアミド (15 mL)に溶解させ、DIPEA (1.63 mL, 9.37 mmol)を加えた。そこに、**4** (0.679 g, 2.90 mmol)のジクロロメタン (15 mL)に溶解させたものを加えて 100 分攪拌した。TLC で **4** のスポットが消失したのを確認した後、溶媒を留去して、ジクロロメタン (50 mL)を加え、0.1 M 塩酸 (50 mL)で 1 回洗浄し、蒸留水層をジクロロメタンで 7 回洗浄し、有機層を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (20 mL)で 3 回洗浄し、蒸留水層をジクロロメタン (20 mL)で 7 回洗浄した後に有機層を無蒸留水硫酸ナトリウムで乾燥させた後、濾別し、溶媒を留去し、再び *N,N*-ジメチルホルムアミド (6 mL)に溶解させた後、氷浴しておいた蒸留水 (200 mL)に滴下することで生じた固体を濾過し、蒸留水で洗浄した後に真空乾燥をすることで、目的化合物 **14** (1.34 g, 2.73 mmol) を収率 91%で得た。無色粉末状固体。

$^1\text{H-NMR}$  ( $d^6\text{-DMSO}$ )  $\delta$  11.21 (1H, s), 8.51 (1H, d,  $J = 8.0$  Hz), 8.04-7.98 (3H, m), 7.66-7.59 (1H, m), 7.55-7.48 (2H, m), 7.42-7.30 (5H, m), 5.11 (2H, s), 4.48 (2H, s), 4.32-4.20 (1H, m), 3.44 (2H, d,  $J = 6.3$  Hz), 2.70-2.52 (2H, m).

#### 4-azido-3-*N*-(4-*N*-benzoyl-cytosine-1-yl)acetyl-3-(L)-aminobutanoic acid **15**

反応容器に 1 M 水酸化ナトリウム水溶液と 1, 4-ジオキサンを体積比にして 1:1 に混合した溶媒(100 mL)を加え、反応容器を氷浴した。そこへ、**14**(0.974 g, 1.99 mmol)を加え、**14** が溶解した後、TLC で **14** に相当するスポットが消失したのを確認後、1 M の塩酸を(140 ml)加えた。溶媒を留去し、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (20 mL)を加えたところ、沈殿が生じたので、濾過した。この時、pH は 5 であった。蒸留水で洗浄した後、真空乾燥を行い、目的化合物 **15**(0.741 g, 1.86 mmol)を 97%の収率で得た。無色固体。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  8.04-7.97 (3H, m), 7.68-7.52 (4H, m), 4.69-4.56 (2H, m), 4.43-4.32 (1H, m), 3.52 (2H, d,  $J = 5.5$  Hz), 2.62-2.56 (2H, m).

#### 4-amino-3-*N*-(4-*N*-benzoyl-cytosine-1-yl)acetyl-3-(L)-aminobutanoic acid **16**

アルゴン雰囲気下、**15** (0.0372 g, 0.0932 mmol)に蒸留水とメタノールが 1 : 1 の混合比になるよう調整した混合溶媒(10 ml)を加え、5% Pd/BaCO<sub>3</sub>を加えた。アルゴンを水素ガスに置換し、1.5 時間攪拌後 **11** が TLC 上消失したのを確認、減圧下に置くことで溶媒中のメタノールを留去した。パラジウムをセライト濾過により濾別、蒸留水により洗浄を行い、得られた水溶液を凍結乾燥することで、目的化合物 **16**(0.0320 g, 0.0858 mmol)を収率 92%で得た。無色粉末状固体。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  8.02 (1H, d,  $J = 7.4$  Hz), 7.89-7.85 (2H, m), 7.69-7.62(1H, m), 7.56-7.45 (3H, m), 4.72-4.56 (2H, m), 4.46-4.34 (1H, m), 3.18-2.94 (2H, m), 2.47-2.42 (2H, m).

#### 4-N-(9-fluorenylmethyloxycarbonyl)-3-N-(4-N-benzoylcytosine-1-yl)acetyl-3, 4-(L)-diaminobutanoic acid 21

**16** (0.3251 g, 0.871 mmol)をジオキサンと蒸留水の体積比 1 : 1 の混合溶媒に加えた。9-フルオレニルメチルオキシカルボニルスクシンイミデート (0.295 g, 0.874 mmol)を加え、DIPEA (0.3 mL, 1.73 mmol)を加え、10分攪拌した。TLC 追跡の結果、反応に進行が見られなくなったため、9-フルオレニルメチルオキシカルボニルスクシンイミデート (0.1256 g, 0.372 mmol)を新たに加え、10分間攪拌した。原料の消失を確認後、5% クエン酸水溶液 (8 mL)を加えた後に吸引濾過をし、残渣を 5% クエン酸水溶液 (3 mL)で3回、蒸留水 3 mL で3回洗浄を行った。得られた無色固体をエタノール (14 mL)中加熱還流し、冷却後、固体を吸引濾過した。得られた固体をエタノール (5 mL)で3回、ジエチルエーテル (5 mL)で3回洗浄し、真空乾燥した後、蒸留したテトラヒドロフラン (6 mL)を加え、加熱還流後、冷却し、固体を吸引濾過した。得られた固体をテトラヒドロフラン (3 mL)で3回洗浄し、真空乾燥を行い、目的化合物 **21** を収率 32% で得た。無色固体。

<sup>1</sup>H-NMR (*d*<sup>6</sup>-DMSO) δ 12.35-12.20 (1H, br), 11.30-11.19 (1H, br), 8.24-7.28 (16H, m), 4.56-4.41 (2H, m), 4.34-4.20 (3H, m), 4.18-4.06 (1H, m), 3.22-3.09 (2H, m), 2.44-2.25 (2H, m).

#### 4-N-(9-fluorenylmethyloxycarbonyl)-3-N-(uracil-1-yl)acetyl-3, 4-(L)-diaminobutanoic acid 21

**8** (1.229 g, 4.15 mmol)のピリジン溶液 (41 mL) に対し、トリフェニルフォスフィン (3.264 g, 12.4 mmol)を加えた。24時間後、溶媒を減圧留去し、トルエン (5 mL)で10回共沸し、終夜真空乾燥を行なった。1 M の塩酸を 41 ml 加え、6日間攪拌した後、ジエチルエーテル (20mL) を加え、得られた水層に対し、DIAION WA30 を pH が 4 になるまで加え、濾過、濾液を濃縮後、蒸留水を加えて、凍結乾燥を行い、中間体 **9** (1.33g, 104%)を得た。得られた **9** のうち、0.0613 g (0.2 mmol)を水 (1 ml) に溶解し、DIPEA (0.07 ml, 0.4 mmol)を加えた。そこに 9-フルオレニルメチルオキシカルボニルスクシンイミデート (0.0675 g, 0.2 mmol)を加え、2時間攪拌した。5%クエン酸水溶液を 3 ml 加え、生じた固体を濾過、5%クエン酸水溶液 (1 ml)で3回、蒸留水 (1 ml)で3回洗浄後、エタノール 2 ml を加え、加熱還流した後、室温まで冷却、析出した固体を濾過することで、目的化合物 **21** (0.0787g, 0.156 mmol)を収率 80% で得た。尚、2段階収率は 83% である。無色固体。

<sup>1</sup>H-NMR (*d*<sup>6</sup>-DMSO) δ 11.27-11.24 (1H, br), 8.10-7.28 (13H, m), 5.52, (1H, d, *J*=7.7 Hz), 4.34-4.00 (7H, m), 3.13-3.00 (2H, m), 2.42-2.24 (2H, m).

#### 3-(2-tert-Butoxycarbonylamino-acetylamino)-4-(9H-fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-butyric acid 24

アルゴン雰囲気下、**4** (0.982 g, 4.19 mmol)をピリジン (2 mL)で1回共沸し、Boc-Gly-OH (0.806 g, 4.60 mmol)をジクロロメタン (40 mL)に溶解し、室温でHBTU (2.66 g, 7.03 mmol) と DIPEA (2.35 mL, 13.5 mmol) を加え、ピリジン (40 mL)を加えて1時間攪拌した。メタノール (5 mL)を加えて反応を停止した後、溶媒を減圧留去し、ジクロロメタン (80 mL)に再び溶解させた。有機層を 0.1 M 塩酸 (100 mL)で1回洗浄し、蒸留水層をジクロロメタン (10 mL)で洗浄し、有機層を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (100 mL)で洗浄した。蒸留水層をジクロロメタン (10 mL)で洗浄した後、得られた有機層に無蒸留水硫酸ナ

トリウムを加えて乾燥させた後に無蒸留水硫酸ナトリウムを濾別、減圧留去して濃縮した後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (クロロホルム中、メタノール 0-1%)で精製を行ったが単離は困難であった。得られた粗精製物は油状 (2.0114 g)であった。アルゴン雰囲気下、得られた油状物質 (1.60 g)に蒸留水とメタノールの体積比 1 : 1 の混合溶媒 (40 mL)を加え、5% Pd/C を加えた。アルゴンを水素ガスに置換し、26 時間攪拌した後、減圧留去によってメタノールを留去し、セライト濾過によってパラジウムを濾別した後、凍結乾燥によって無色固体 (0.9373 g)を得た。得られた無色固体には、目的化合物 **23** の他に不純物が含まれていたが、これを精製することは困難であった。得られた無色固体 (0.2896 g)をピリジン (10 mL)に溶解し、トリメチルシリルクロライド (0.415 mL, 5.30 mmol)を加え、室温で 2 時間攪拌し、9-フルオレニルメチルクロフォーマート (0.2713 g, 1.05 mmol)を加え、40 分攪拌した。蒸留水 (0.5 mL)を加え、炭酸水素ナトリウム (1.26 g, 15.0 mmol)を加え溶媒を減圧留去した。トルエン (3 mL)で 3 回共沸した後、メタノール (5 mL)に溶解し、ジイソプロピルエーテル (150 mL)に滴下したが、結晶化しなかったため、5%クエン酸水溶液 (20 mL)で洗浄した後、ジクロロメタン (10 mL)及びメタノール (10 mL)を用いて溶解させた。濾液を分液ロートに移し、有機層を回収し、蒸留水層をジクロロメタン (30 mL)4 回洗浄した。無蒸留水硫酸ナトリウムを加えて有機層を乾燥させた後、固体を濾別し、濾液の減圧留去を行った。得られた粗精製物を酢酸エチル (10 mL)とメタノール (1 mL)の混合溶媒に溶解し、ヘキサン (150 mL)へ滴下することで、析出した個体を濾別、真空乾燥することで無色固体 **24** (0.206 g, 0.414 mmol)を得た。

<sup>1</sup>H-NMR (CD<sub>3</sub>OD) δ 7.84-7.28 (8H, m), 4.38-4.18 (4H, m), 3.66 (2H, s), 3.29-3.20 (2H, m), 2.51, (2H, d, *J*=6.3 Hz), 1.43 (9H, s)

#### {4-*N*-[Bis-(4-fluoro-phenyl)-methoxycarbonylamino]-cytosine-1-yl}-acetic acid 2,5-dioxo-pyrrolidin-1-yl ester **28**

**27** (0.8327 g, 2 mmol)と *N*-ヒドロキシスクシンイミド (0.299g, 2.6 mmol) の DMF (20 ml) 溶液にアルゴン雰囲気下、*N,N'*-ジイソプロピルカルボジイミド (0.63 ml, 4 mmol) を加え、60 °C で 7 時間攪拌した。溶媒を減圧留去後、酢酸エチル (50 ml) を加え飽和重曹水 (50 ml)で 3 回洗浄した。有機層を硫酸ナトリウムで脱湿、固体を濾別後、減圧環境下、濃縮した。得られた粗精製物にクロロホルム (5 ml)を加え、加熱還流後、固体を濾過、クロロホルムで洗浄することで、目的化合物 **28** (1.02 g, 99%)を得た。白色固体。

#### 3-*tert*-Butoxycarbonylamino-4-(9H-fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-butyric acid **29**

**3** (6.3 g, 6.88 mmol) のジオキサン溶液 (13.8 ml)に対し、1 M 水酸化ナトリウム水溶液 (13.8 ml)を加え、1 時間攪拌した。水 (50 ml)を加えた後、ジエチルエーテルで水層を 3 回洗浄した後、10%クエン酸水溶液を水層に加え、酢酸エチル (50 ml)で 3 回抽出した。得られた有機層を硫酸ナトリウムで脱湿後、固体を濾別、濃縮し、不純物としてベンジルアルコールを物質量比 20% (<sup>1</sup>H NMR から算出)及び、1,4-ジオキサンを物質量比 10%含む、4-Azido-3-*tert*-butoxycarbonylamino-butyric acid を(1.81 g, 96% calculated yield) 得た。これ以上の精製操作は行わず、次の反応へと進んだ。アルゴン雰囲気下、得られた



4-Azido-3-tert-butoxycarbonylamino-butyric acid (1.72 g, calcd. 6.26 mmol) の 1,4-ジオキサン (63 ml) 溶液に、トリフェニルフォスフィン (2.46 g, 9.39 mmol) を加え、12 時間攪拌した。そこへ 5%アンモニア水溶液 63 ml を加え、6 時間攪拌したが、TLC による反応追跡から反応の進行が確認できなかったため、1 M NaOH 水溶液 (12.5 ml) を加えた。15 分後、減圧下に置くことでアンモニアを除いた後、3 M 塩酸 (4 ml) を加えた。水層と有機層が体積比 1:1 になるまでジエチルエーテルを加え、水層をジエチルエーテルで 3 回洗浄した。得られた水層の溶媒を減圧留去した。得られた固体を蒸留水 (63 ml) に溶解し、炭酸水素ナトリウム (2.63 g, 31.3 mmol) を加え、1,4-ジオキサンで薄めた。そこへ 9-フルオレニルメチルオキシカルボニルスクシンイミデート (2.11 g, 6.26 mmol) のジオキサン溶液 (31 ml) を滴下し、12 時間攪拌した。pH が 2 になるまで 3 M 塩酸を加え、生じた固体を濾過、蒸留水で 3 回洗浄することで、目的化合物 **29** (2.25 g, 79% over 3steps) を得た。白色固体。

### 3-(2-{4-[Bis-(4-fluoro-phenyl)-methoxycarbonylamino]-2-oxo-2H-pyrimidin-1-yl}-acetylamino)-4-(9H-fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-butyric acid **31**

**29** (0.440 g, 1 mmol) に対し、トリフルオロ酢酸とジクロロメタンの体積比 1:1 混合溶液を加え、1.5 時間攪拌後、溶媒を減圧留去した。得られた **30** のトリフルオロ酢酸塩を蒸留水 (10ml) に溶かし、炭酸水素ナトリウム (0.42 g, 5 mmol) を加えた。そこへ **28** (0.512 g, 1 mmol) のジオキサン懸濁液 (5 ml) を滴下した。滴下に用いた滴下ロートはジオキサン (3 ml+ 2 ml) で洗浄した。1 時間攪拌後、10%クエン酸水溶液を 10 ml 加え、固体を濾過した。得られた固体の DMF (2 ml) 溶液を、5 ジエチルエーテル (50 ml) に滴下した。析出した固体を濾過後、炭酸水素ナトリウム (0.084 g, 1 mmol)、蒸留水 (1 ml)、エタノール (1 ml) 加え、加熱還流を行なった。室温まで冷却後、生じた固体を濾別した。得られた固体に対し、エタノール (1 ml) を加え 1 時間加熱還流後、10%クエン酸 (1 ml) を加え、5 ml の蒸留水で薄めた。生じた固体を蒸留水で洗浄後、氷冷したメタノール (1 ml) で洗浄した。得られた固体に、再びエタノール (1 ml) を加え 5 分加熱還流後、蒸留水 (10 ml) を加え、析出した固体を濾過、蒸留水で洗浄し、減圧乾燥することで、目的化合物 **31** (0.320 g, 43%) を得た。白色固体。

### 膨潤性固相担体を用いた場合の固相合成

固相担体として rink amide MBHA resin 又は rink amide NH-SAL-PEG resin (渡辺化学工業株式会社) を用い、反応容器としてポリプロピレン製フィルター付きカラム (LibraTube®、ハイペップ研究所) 用いた。各操作に関しては以下に示す。

**洗浄 (wash)** : 溶媒を加え、ボルテックスにより攪拌後、溶媒を吸引除去。この操作を 4 回繰り返した。

**膨潤 (swelling)** : 溶媒を加え、1 時間放置した。その後、溶媒を吸引除去した。

**Fmoc 基の脱保護 (deprotection)** : 脱保護溶液 (特に述べられていない場合は、20%ピペリジン/NMP 溶液) を加え、1 分間ボルテックス攪拌の後、脱保護溶液を吸引除去、新たに脱保護溶液を加え直し、15 分間または 20 分間放置した。その間、適宜ボルテックスによる攪拌を行った。15 分間または 20 分間経過後、溶媒を吸引除去した。

**縮合 (coupling)** : 反応容器にモノマー、縮合剤を加えた後、溶媒を加え、そこへ DIPEA を加えた。15

分後、反応液を除去した。反応中は、適宜ボルテックスによる攪拌を行った。

**キャップ化 (capping)** : 反応容器に、無水酢酸と NMP の 1:9 混合溶液を加え、10 分間放置した後、反応溶液を除去した。

**切り出し (cleavage)** : 樹脂をジクロロメタンで洗浄した後、反応容器からエッペンに樹脂を移した。ジクロロメタンを風乾した後、TFA と蒸留水と TIS を体積比 95:2.5:2.5 で混合した溶液を加えた。1 時間放置した後、アルゴン気流を送り込んで風乾した。ジエチルエーテル (1 mL)を加え反応容器を遠心し、上澄みを捨てるという作業を 4 回繰り返し、粗精製ペプチドを得た。

#### 非膨潤性固相担体を用いた場合の固相合成

固相担体として(Custom Primer Support®, GE Healthcare)反応容器として、フィルター付きガラス製手動固相合成用カラムを用いた。各操作に関しては以下に示す。

**洗浄 (wash)** : 溶媒を加え、反応容器を振って攪拌後、溶媒を吸引除去。この操作を 3 回繰り返した。

**Fmoc 基の脱保護 (deprotection)** : 脱保護溶液 (特に述べられていない場合は、20%ピペリジン/NMP 溶液)を加え、1 分間攪拌の後、脱保護溶液を吸引除去、新たに脱保護溶液を加え直し、15 分間放置した。その間、適宜ボルテックスによる攪拌を行った。15 分後、溶媒を吸引除去した。

**真空乾燥 (vac)** : あらかじめ蒸留後、乾燥剤としてモレキュラーシーブス 4A を加えたアセトニトリルで固相担体を 3 回洗浄後、反応容器を 10 分間真空乾燥した。10 分後、アルゴン気流を送ることで常圧に戻した。

**縮合 (coupling)** : 反応容器にモノマー、縮合剤を加えた後、溶媒を加え、そこへ DIPEA を加えた。15 分後、反応液を除去した。反応中は、適宜反応容器を軽く叩くことで攪拌を行った。

**キャップ化 (capping)** : 反応容器に、無水酢酸とピリジンの 1:9 混合溶液を加え、1 分間放置した後、反応溶液を除去した。

**切り出し (cleavage)** : 樹脂をジクロロメタンで洗浄した後、反応容器からエッペンに樹脂を移した。ジクロロメタンを風乾した後、TFA と蒸留水と TIS を体積比 95:2.5:2.5 で混合した溶液を加えた。1 時間放置した後、アルゴン気流を送り込んで風乾した。ジエチルエーテル (1 mL)を加え反応容器を遠心し、上澄みを捨てるという作業を 4 回繰り返し、粗精製ペプチドを得た。

#### HPLC による精製条件とキャラクタリゼーション

粗精製のペプチドを蒸留水に溶解し、メンブレンフィルターを用いて担体と不溶物を濾別し、濾液を HPLC にチャージした。また、展開溶媒には 0.05%トリフルオロ酢酸が添加されている。

カラム:  $\mu$ -Bondasphere 5 $\mu$  C18 100 A (Waters)

流速: 0.5 mL/min

#### Fmoc-(GL)<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> (Figure 11)

検出波長 : 280 nm

水/アセトニトリル= 85/15 - 50/50 (35 分間)

MS : Calcd. For  $[M+H]^+$ : 554.27, Found: 554.67.

Fmoc-GL-NH<sub>2</sub> (Figure 11)

検出波長 : 280 nm

水/アセトニトリル= 85/15 - 50/50 (35 分間)

MS:Calcd. For  $[M+Na]^+$ : 397.19, Found: 397.56.

Ac-(dbC<sup>bz</sup>)<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> (Figure 14)

検出波長: 260nm

水/アセトニトリル= 100/0 - 55/45 (45 分間)

MS : Calcd. For  $[M+H]^+$ : 770.30, Found: 770.79.

Ac-dbC<sup>bz</sup>-NH<sub>2</sub> (Figure 14)

検出波長: 260nm

水/アセトニトリル= 100/0 - 55/45 (45 分間)

MS:Calcd. For  $[M+H]^+$ : 415.18, Found: 415.41.

Ac-(dbU)<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> (Figure 14)

検出波長: 260nm

水/アセトニトリル= 100/0 - 55/45 (45 分間)

MS: Calcd. For  $[M+Na]^+$ : 586.21, Found: 586.6953.

Fmoc-Gly-GL-(dbU)<sub>10</sub>-GL-NH<sub>2</sub> (Figure 16b)

検出波長: 260nm

水/アセトニトリル= 100/0 - 55/45 (45 分間)

MS: Calcd. For  $[M+H]^+$ : 3132.14, Found:3132.7808.

Fmoc-Gly-GL-(dbU)<sub>10</sub>-GL-NH<sub>2</sub> including one nucleobase modified product (Scheme 15)

MS: Calcd. For  $[M+H]^+$ : 3199.22, Found:3199.8308.

Fmoc-Gly-GL-(dbC)<sub>10</sub>-GL-NH<sub>2</sub> (Figure 18)

検出波長: 260 nm

水/アセトニトリル= 100/0 - 55/45 (45 分間)

MS: Calcd. For [M+H]<sup>+</sup>: 3124.08, Found:3124.4873.

H-Aib-Tyr-NH<sub>2</sub> (Table 4)

検出波長: 280 nm

水/アセトニトリル= 100/0 - 65/35 (35 分間)

MS: Calcd. For [M+Na]<sup>+</sup>: 288.14, Found:287.9594.

H-(Aib)<sub>2</sub>-Tyr-NH<sub>2</sub> (Table 4)

検出波長: 280 nm

水/アセトニトリル= 100/0 - 65/35 (35 分間)

MS: Calcd. For [M+Na]<sup>+</sup>: 373.20, Found: 373.0530.

H-(Aib)<sub>3</sub>-Tyr-NH<sub>2</sub> (Table 4)

検出波長: 280 nm

水/アセトニトリル= 100/0 - 65/35 (35 分間)

MS: Calcd. For [M+Na]<sup>+</sup>: 458.25, Found: 458.0912.

H-(Aib)<sub>4</sub>-Tyr-NH<sub>2</sub> (Table 4)

検出波長: 280 nm

水/アセトニトリル= 100/0 - 65/35 (35 分間)

MS: Calcd. For [M+Na]<sup>+</sup>:543.30, Found: 543.1593.

Z-Phg-Pro-NH<sub>2</sub> (Table 5)

粗精製ペプチドは蒸留水にはなく、蒸留水とアセトニトリルの 1:1 混合物に溶かし、メンブレンフィルターで不溶物を取り除いた。

検出波長: 200 nm

水/アセトニトリル= 70/30 - 55/45 (30 分間), 40 °C

Z-L-Phg-Pro-NH<sub>2</sub> 及び Z-D-Phg-Pro-NH<sub>2</sub> は、別途合成した標準サンプルとの共打ちによって同定した。

Z-L-Phg-Pro-NH<sub>2</sub>: 15.5 min, Z-D-Phg-Pro-NH<sub>2</sub>: 16.8 min

## 参考文献

1. a) Nielsen, P. E.; Egholm, M.; Berg, R. H.; Buchardt, O. *Science* **1991**, *254*, 1497-1500. b) Egholm, M.; Buchardt, O.; Christensen, L.; Behrens, C.; Freier, S. M.; Driver, D. A.; Berg, R. H.; Kim, S. K.; Norden, B.; Nielsen, P. E. *Nature* **1993**, *365*, 566-568. c) Egholm, M.; Buchardt, O.; Nielsen, P. E.; Berg, R. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 1895-1897. d) Egholm, M.; Nielsen, P. E.; Buchardt, O.; Berg, R. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 9677-9678. e) Sen, A.; Nielsen, P. E. *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, 3367-3374.
2. Lohse, J.; Dahl, O.; Nielsen, P. E. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1999**, *96*, 11804-11808.
3. Eriksson, M.; Nielsen, P. E. *Nat. Struct. Biol.* **1996**, *3*, 410-413.
4. Brown, S. C.; Veal, J. M. *Science* **1994**, *265*, 777-780.
5. He, W.; Hatcher, E.; Balaeff, A.; Beratan, D.; Gil, R.; Madrid, M.; Achim, C. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 13264-13273.
6. Wittung, P.; Eriksson, M.; Lyng, R.; Nielsen, P. E.; Nordén, B. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 10167-10173.
7. Sforza, S.; Haaima, G.; Marchelli, R.; Nielsen, P. E. *Eur. J. Org. Chem.* **1999**, 197-204.
8. Shen, G.; Fang, H.; Song, Y.; Bielska, A. A.; Wang, Z.; Taylor, J. A. *Bioconjug. Chem.* **2009**, *20*, 1729-1736.
9. Oh, S. Y.; Ju, Y.; Park, H. *Mol. Cells* **2009**, *28*, 341-345.
10. a) Winssinger, N.; Damoiseaux, R.; Tully, D. C.; Geierstanger, B. H.; Burdick, K.; Harris, J. L. *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 1351-1360. b) Urbina, H. D.; Debaene, F.; Jost, B.; Bole-Feysot, C.; Mason, D. E.; Kuzmic, P.; Harris, J. L.; Winssinger, N. *Chembiochem* **2006**, *7*, 1790-1797.
11. Griffin, T. J.; Tang, W.; Smith, L. M. *Nat. Biotechnol.* **1997**, *15*, 1368-1372.
12. Horie, S. *Masterthesis*, **2008**.
13. Kotsuki, H.; Ohishi, T.; Araki, T. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *12*, 2129-2132.
14. Bernatowicz, M. S.; Daniels, S. B.; Köster, H. *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 4645-4648.
15. Rink, H. *Tetrahedron Lett.* 1987, *28*, 3787-3790.
16. a) Shimizu, M.; Wada, T.; Saigo, K. *J. Org. Chem.*, **2004**, *69*, 5261-5268. b) Oka, N.; Shimizu, M.; Saigo, K.; Wada, T. *Tetrahedron* **2006**, *15*, 3667-3673. c) Murata, A.; Wada, T.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 2933-2936.
17. Pothukanuri, S.; Pianowski, Z.; Winssinger, N. *Euro. J. Org. Chem.* **2008**, 3141-3148.
18. Merrifield, R. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2149-2154.
19. Chan, W. C.; White, P. D. *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis*, Oxford University Press, **2000**.
20. Bayer, E. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1991**, *30*, 113-129.
21. Beaucage, S. L. *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry*, John Wiley & Sons: New York, **2008**; Vol. 1, pp 3.0.1-3.17.21.
22. Seeberger, P. H.; Haase, W-C. *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 4349-4393.
23. Bunin, B. A. *The Combinatorial Index*, Academic Press, **1998**.
24. Czarnik, A. W.; DeWitt, S. H. *A Practical Guide To Combinatorial Chemistry*, American Chemical Society, **1997**.
25. Terrett, N. K.; Gardner, M.; Gordon, D. W.; Kobylecki, R. J.; Steele, J. *Tetrahedron* **1995**, *51*, 8135-8173.

26. Bayer, E.; Hagenmaier, H.; Jung, G. *Tetrahedron* **1968**, *24* 4853-4860.
27. Gutte, B.; Merrifield, R. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, *91* 501-502.
28. Li, C. H.; Yamashiro, D. *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92* 7608-7609.
29. Sharp, J.; Robinson, A. B.; Kamen, M. D. *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 6097-6108.
30. Ashardq, E.; Atherton, E.; Gait, M. J.; Lee, K.; Sheppard, R. C. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1979**, 423-425.
31. Stdhl, G. L.; Walter, R.; Smith, C. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 5383-5394.
32. Albericio, F.; Pons, M.; Pedroso, E.; Giralt, E. *J. Org. Chem.*, **1989**, *54*, 360-366.
33. a) Adinolfi, M.; Barone, G.; De Napoli, L.; Iadonisi, A.; Piccialli, G. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 1953-1956.  
b) Heckel, A.; Mross, E.; Jung, K.-H.; Rademann, J.; Schmidt, R. R. *Synlett* **1998**, 171-173.
34. Sheehan, J. C.; Hess, G. P. *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, *77*, 1067-1068.
35. Angell, Y. M.; García-Echeverría, C.; Rich, D. H. *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 5981-5984.
36. Nakajima, N.; Ikada, Y. *Bioconjug Chem.* **1995**, *6*, 123-130.
37. a) Dourtoglou, V.; Ziegler, J.C.; Gross, B. *Tetrahedron Lett.* **1978**, *19*, 1269-1272. b) Dourtoglou, V.; Gross, B.; Lambropoulou, V.; Zioudrou, C. *Synthesis* **1984**, 572-574. c) Knorr, R.; Trzeciak, A.; Bannwarth, W.; Gilleseen, D. *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 1927-1930.
38. Carpino, L.A., *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 4397-4398.
39. Carpino, L. A.; Imazumi, H.; El - Faham, A.; Ferrer, F. J.; Zhang, C.; Lee, Y.; Foxman, B. M.; Henklein, P.; Hanay, C.; Mügge, C. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 441-445.
40. Barlos, K.; Papaionnou, D.; Theodoropoulos, D. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1984**, *23*, 300-305.
41. Castro, B.; Dormoy, J.-R.; Evin, G.; Selve, C. *Tetrahedron Lett.* **1975**, *16*, 1219-1222.
42. a) Coste, J.; Le-Nguyen, D.; Castro, B. *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 205-208. b) Frérot, E.; Coste, J.; Pantaloni, A.; Dufor, M. N.; Jouin, P. *Tetrahedron* **1991**, *47*, 259-270.
43. Albericio, F.; Cases, M.; Alsina, J.; Triolo, S. A.; Carpino, L. A.; Kates, S. A. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 4853-4856.
44. Albericio, F.; Bofill, J. M.; El-Faham, A.; Kates, S. A. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 9678-9683.
45. Story, S. C. Aldrich, J. V. *Int. J. Peptide Protein Res.* **1994**, *43*, 292-296.
46. Wijkmans, J.H.H.M.; Blok, F.A.A.; van der Marel, G.A.; van Boom, J.H.; Bloemhoff, W. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 4643-4646.
47. a) El - Faham, A.; Albericio, F.; *Org. Lett.* **2007**, *9*, 4475-4477. b) El - Faham, A.; Funosas, R. S.; Prohens, R.; Albericio, F.; *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 9404-9416.
48. Brückner, H.; Koza, A. *Amino Acids* **2003**, *24*, 311-323.
49. Dannecker-Dörig, I.; Linden, A.; Heimgartner, H. *Helvetica Chimica Acta* **2011**, *94*, 993-1011.
50. a) Bode, J. W.; Fox, R. M.; Baucom, K. D. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 1248-1252. b) Carrillo, N.; Davalos, E. A.; Russak, J. A.; Bode, J. W. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 1452-1453.
51. Ogunkoya, A. O.; Pattabiraman, V. R.; Bode, J. W. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 9693-9697.
52. a) Toniolo, C.; Crisma, M.; Bonora, G. M.; Benedetti, E.; Di Blasio, B.; Pavone, V.; Pedone, C.; Santini, A. *Biopolymers* **1991**, *31*, 129-138. b) Kubelka, J.; Silva, R. A. G. D.; Keiderling, T. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**,

124, 5325–5332.

## 謝辞

本研究を行うにあたり、ご指導くださいました東京理科大学和田猛教授に謹んでお礼申し上げます、和田猛教授には、研究に行き詰った時に適切な助言をいただいたこと、御多忙の中、些細な内容のディスカッションも引き受けていただいたこと、快く留学へ送り出していただいたこと、ただただ感謝の気持ちでいっぱいです。

東京大学大学院新領域創成科学研究科の渡邊俊樹教授、津本浩平教授、山本一夫教授、鈴木穰准教授、富田野乃准教授には、御多忙な中、本論文の審査に多くの時間を割いていただきました。この場を借りて御礼申し上げます。特に渡邊俊樹教授は、和田猛教授と共に、私に研究の機会を与えてくださったこと、重ねて御礼申し上げます。

また、不慣れな実験操作を一から教えていただき、学部生の時から見守って下さった岩田倫太郎さん、本研究に大きく影響を与えた、重要な知見を研究室に多く残して下さった堀江暁さん、多くのアドバイスをいただいた岐阜大学大学院工学系研究科岡夏央准教授、緒方俊彦さんに謝意を申し上げます。

私が研究者として大きく成長するきっかけとなった、留学の機会を与えてくださった東京大学新領域創成科学研究科国際交流室の松岡万里さん、留学先で研究の機会を与えてくださり、さらにご指導いただいた ETH Zürich の Bode 教授には深く感謝致しております。

最後に、様々な面で支えていただいた家族に、心より感謝申し上げます。