

平成 21 年 5 月 31 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2005 ～ 2008
 課題番号：17790025
 研究課題名（和文） 水系での固相合成～グリーンケミストリーを指向したペプチド合成法の開発
 研究課題名（英文） Solid-phase synthesis in water: development of a method for peptide synthesis with the aim of green chemistry
 研究代表者：
 北條 恵子 (HOJO KEIKO)
 神戸学院大学・薬学部・助教
 研究者番号：20289028

研究成果の概要：科学技術における重要課題に「グリーン・サステイナブル ケミストリー」が挙げられ、有機溶媒使用の低減化、毒性の少ない試薬の利用が望まれている。しかし、現在、固相合成のほとんどが有機溶媒中で行われており、水中での試みは特殊な例に限られている。試薬、building block 等の水に対する難溶性が、それらを利用した水中反応の試みと一般汎用化を障害している。本研究では、building block の難溶性解決の方法として水溶性基の導入と水分散性をもたせることを提案し、また、ペプチド合成においてそれを実証した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005 年度	0	0	0
2006 年度	1,000,000	0	1,000,000
2007 年度	900,000	0	900,000
2008 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
総計	2,700,000	240,000	2,940,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・化学系薬学

キーワード：グリーンサステイナブルケミストリー、水、ペプチド合成、固相合成、水溶性、水分散性、ナノ粒子、building block

1. 研究開始当初の背景

この 100 年間に有機溶媒中で反応を行うというのが科学者の常識となっている。しかし近年、地球の汚染や温暖化が問題とされ、最終的には燃焼処理される有機溶媒はその使用の低減化が望まれているのが現状である。有機溶媒を使用しない環境調和型有機合成への転換、すなわち環境に負荷をかけない新たな方法論の開発と発展が急務となっている。一方、ペプチドの化学合成は、たいていその各アミノ酸を building block として、有機溶媒中、連続的な縮合反応によって行われており、

固相合成法がその中心的な役割を果たしている。しかし、その工業合成はもとより実験室レベルの合成においても環境調和型の固相合成が望まれていることは言うまでもない。そこで、従来型のペプチド固相合成から、有機溶媒を使用しない環境調和型ペプチド固相合成への転換を目指して、環境にやさしい溶媒として「水」を選択し、「水」中でのペプチド固相合成法の開発に着手した。

2. 研究の目的

(1) 水溶性保護アミノ酸を用いる水中ペプチ

ド固相合成の開発

反応で効率的に反応を行うためには、まず反応分子が液相の水に溶解する必要がある。しかし、通常のペプチド合成で用いられる保護アミノ酸のたいていは水に難溶である。そこで、新規な水溶性保護アミノ酸を開発し水中固相合成を展開する。

(2) 水分散型保護アミノ酸ナノ粒子を用いる水中ペプチド固相合成の開発

現在、ペプチド固相合成のほとんどは、Fmoc 法で行われている。しかし、Fmoc 保護アミノ酸は、ほとんど水に溶解しないので、水中固相合成は不適とされ、その利用は検討されてこなかった。そこで、新しい技術として Fmoc 保護アミノ酸を水分散型ナノ粒子化して水中固相合成に利用する方法を開発する。

3. 研究の方法

(1) 新規な水溶性保護アミノ酸をデザインし、合成する。その保護アミノ酸誘導体を用いて、水中反応条件および連続的合成反応を検討し、水溶性保護アミノ酸を用いる水中ペプチド固相合成法を確立する。

(2) Fmoc 保護アミノ酸を水分散型ナノ粒子化をまず検討する。その後ナノ粒子を用いて、水中反応条件および連続的合成反応を検討し、水分散型ナノ粒子の保護アミノ酸を用いる水中ペプチド固相合成法を確立する。

4. 研究成果

(1) 固相合成の利点の一つとして、その工程を自動化に展開しやすい点が挙げられる。自動化時反応を追跡するための UV 吸収の部位としての芳香環、高い水溶性と結晶性を示すスルホン酸ナトリウム塩構造をもつ新規な水溶性保護基 Sps 基を開発した。また、Sps 基は温和な塩基性条件で素早く 脱離する保護基であった。

(2) 固相上での水中縮合反応を検討した。TentaGel 樹脂を用い、種々の水溶性縮合試薬と反応添加剤を用いる反応条件について検討した。その結果、WSCD に HONB を加え、さらに DIEA を添加する条件が、最も効率よく水中固相上での反応を進行させることを見いだした。

(3) Sps 保護アミノ酸を利用した水中固相合成のためのプロトコル、すなわち全工程の溶媒を水系で行うプロトコルを組み、TentaGel 樹脂上で Leu-enkephalinamide の水中合成を検討し達成した。これは、全工程水中、つまり各工程の反応、反応終了後の洗浄、これらに用いる溶媒全てを水系溶媒で達成したペ

プチド固相合成である。

この成功は、単なる水中での固相反応というだけでなく、有機溶媒を使わない連続的な多工程固相合成であるという点でも意義がある。

(4) Fmoc 保護アミノ酸の水系分散型ナノ粒子の調製を行った。Fmoc 保護アミノ酸に分散添加剤として PEG を加え、ジルコニアビーズを利用した遊星ボールミルによって水中で粉碎した。得られた水分散型ナノ粒子の粒子径を動的光散乱法により測定したところ 200~400 nm でした。走査型電子顕微鏡の投影からもナノサイズの粒子が観察された。

(5) 水分散型ナノ粒子を用いた水中固相上での縮合反応について、縮合試薬を WSCD として、HONB、DIEA 加えた条件下検討を行った。その結果、ナノ粒子を用いた縮合反応は、水中固相上にもかかわらず、30 分と短時間で定量的に進行することを見いだした。これは、ナノ粒子が樹脂と均一に混合されたことによると考えられる。

(6) 水分散型ナノ粒子とした Fmoc 保護アミノ酸を用いる Leu-enkephalinamide の水中固相合成を検討した。固相は TentaGel 樹脂として、縮合反応を WSCD と HONB、DIEA によって行う水中合成のプロトコルによって行った。収率は、76%であった。また、樹脂より切断後の粗ペプチドの純度は 90%以上と高く、従来の有機溶媒中での Fmoc 法による合成の結果により近づいた結果が得られた。

これまで水分散型ナノ粒子の building block を用いる水中反応例、さらにその固相反応例の報告はない。従来の固相法は、「固体と溶液の反応」だが、本法は「固体とサスペンションの反応」であり、溶媒に不溶物をナノ粒子として溶媒に懸濁させて反応させるナノケミストリーとしてあらゆる有機反応への応用が期待できる。今後 building block のナノ粒子化による反応特性の知見は、新たな有機合成反応の足掛かりともなる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 14 件)

Hojo, K., development of the aolid-phase peptide synthesis in water, *Peptide Science* 2008, 5-8(2009).査読有

Hojo, K., Ichikawa, H., Fukumori, Y., Kawasaki, K., Development of a method for the solid-phase peptide synthesis in water, *Int. J. pept. Res. Ther.*, **14**, 373-380

(2008). 査読有

Kida, S., Maeda, M., **Hojo, K.**, Eto, Y., Mizuguchi, H., Hayakawa, T., Mayumi, T., Nakagawa, S., Kawasaki, K., Cell-penetrating peptide as adenovirus vector *Peptide Science 2007*, 337-340 (2008). 査読有

Kida, S., Maeda, M., **Hojo, K.**, Eto, Y., Mizuguchi, H., Hayakawa, T., Mayumi, T., Nakagawa, S., Kawasaki, K., Preoartion of a Tat related transporter peptide for carrying the adenovirus vector into cells, *Protein & Peptide Letters*, **15**, 219-222 (2007). 査読有

Hojo, K., Ichikawa, H., Maeda, M., Kida, S., Fukumori, Y., Kawasaki, K., Solid-phase peptide synthesis using amino acid nanoparticles in water, *PEPTIDES*, **29**, 108-109(2007). 査読有

Kida, S., Maeda, M., **Hojo, K.**, Eto, Y., Nakagawa, S., Kawasaki, K., *Chem Pharm Bull*, **55**, 685-687 (2007). 査読有

Hojo, K., Maeda, M., Kawasaki, K., peptide synthesis in water. 2-(4-sulfophenylsulfonyl)ethoxycarbonyl group and coupling reagents, *Understnading Biology Using Peptides*, 74-75 (2006). 査読有

Kida, S., Maeda, M., **Hojo, K.**, Eto, Y., Mizuguchi, H., Hayakawa, T., Mayumi, T., Nakagawa, S., Kawasaki, K., Synthesis of a RGD peptide-PEG hybrid for carrying adenovirus vector into cells, *Understnading Biology Using Peptides*, 497-498 (2006). 査読有

Hojo, K., Maeda, M., Tanakamaru, N., Mochida, K., Kawasaki, K., Solid phase synthesis in waterVI: evaluation of water-soluble coupling reagents for solid phase peptide synthesis in aqueous media. *Protein Pept. Lett.*, **13**, 189-92(2006). 査読有

Kida, S., Maeda, M., **Hojo, K.**, Eto, Y., Gao, JO., Kurachi, S., Mizuguchi, H., Hayakawa, T., Mayumi, T., Nakagawa, S., Kawasaki, K., Design and synthesis of a Tat-related gene transporter: atool foe carrying the adenovirus vector into cells. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **16**, 743-745(2006). 査読有

Hojo, K., Ichikawa, H., Kida, S., Maeda, M., Fukumori, Y., Kawasaki, K., Solid-phase synthesis in water using nanoparticulate Fmoc-amino acids. *Peptide Science. 2006*, 56 (2006). 査読有

Wade, J.D., **Hojo, K.**, Kawasaki, K., Johns, T.G., Gatimel B., Rothacker, J., Nice, E.C.,

An automated peptide and protein thiazolidine coupling chemistry for biosensor immobilization biving a unique N-termial orientation. *Anal Biochem.*, **348**, 315-317(2006) 査読有

Maeda, M., Ueda, K., **Hojo, K.**, Synthesis of peptide mimetics that related to thrombin receptor and their agonist/antagonist acitivities and platelet aggregation, *Peptide Science 2005*, 447-448 (2006). 査読有

Hojo, K., Maeda, M., Kawasaki, K., A new water-soluble protecting group, 2,4-sulfophenylsulfonyl)ethoxycarbonyl group, and its application to solid-phase peptide synthesis in water, *PEPTIDES*, **28**, 339-340 (2005).

[学会発表](計20件)

北條恵子(招待講演), Development of a method for the solid-phase peptide synthesis in water, 関西冬のペプチドセミナー, 大阪, 2008年12月6日

北條恵子, 市川秀喜, 福森義信, 川崎紘一, Peptide synthesis in water: application of Boc-amino acid nanoparticles, 関西冬のペプチドセミナー, 大阪, 12月6日

Keiko Hojo(日本ペプチド学会奨励賞受賞講演), Development of the solid-phase peptide synthesis in water., 第45回ペプチド討論会, 東京, 2008年10月29-31日.

北條恵子, 市川秀喜, 福森義信, 川崎紘一, 水分散型 Boc 保護アミノ酸ナノ粒子を用いた水中合成, 第58回日本薬学会近畿支部総会・大会, 神戸薬科大学, 2008年10月25日

Hojo, K., Ichikawa, H., Maeda, Fukumori, Y., Kawasaki, K., Peptide synthesis in water using Boc-amino acid nanoparticles, 30th European Peptide Symposium, Helsinki, Finland, 31 August - 5 September 2008.

北條恵子, 市川秀喜, 前田光子, 喜田進也, 福森義信, 川崎紘一, 水分散型保護アミノ酸ナノ粒子を用いた水中固相合成(その2), 第128回日本薬学会年会, 横浜, 2008年3月26-28日.

北條恵子, 市川秀喜, 前田光子, 喜田進也, 福森義信, 川崎紘一, Solid-phase Peptide Synthesis in water: Application of Amino Acids Nanoparticles., 関西冬のペプチドセミナー, 大阪, 2007年12月8日.

喜田進也, 衛藤佑介, Ratima Asavatanabodee, 前田光子, 吉岡靖雄, 中川晋作, **北條恵子**, 津田裕子, 真弓忠

範, 川崎紘一, Adenovirus Vector Carrier としての細胞膜透過ペプチド, 第 44 回ペプチド討論会, 富山, 2007 年 11 月 7-9 日.

市川秀喜, **北條恵子**, 川崎紘一, 福森義信, 粉碎技術をもっと利用しよう, APPIE 産学官連携フェア 2007, 大阪, 2007 年 10 月 18 日

Hojo, K., Ichikawa, H., Maeda, M., Kida, S., Fukumori, Y., Kawasaki, K., , Development of Solid-Phase Peptide Synthesis in Water, Modern Solid Phase Peptide Synthesis & Its Application, Port Douglas, Australia, 17-20 October 2007.

喜田進也, 前田光子, **北條恵子**, 衛藤佑介, 森重智弘, 渡邊光, Ratima

Asavatanabodee, 吉岡靖雄, 水口裕之, 真弓忠範, 中川晋作, 川崎紘一,

Adenovirus Vector Carrier としての細胞膜透過ペプチド, 第 127 回日本薬学会年会, 富山, 2007 年 3 月 28-30 日.

北條恵子, 市川秀喜, 前田光子, 喜田進也, 福森義信, 川崎紘一, 水分散型 Fmoc 保護アミノ酸ナノ粒子を用いた水中固相合成法の開発, 第 127 回日本薬学会年会, 富山, 2007 年 3 月 28-30 日.

喜田進也, 前田光子, **北條恵子**, 衛藤佑介, 森重智弘, 渡邊光, Ratima

Asavatanabodee, 吉岡靖雄, 水口裕之, 真弓忠範, 中川晋作, 川崎紘一,

Adenovirus Vector Carrier としての細胞膜透過ペプチド, 第 127 年会日本薬学会, 富山, 2007 年 3 月 28 日-30 日

北條恵子, 市川秀喜, 前田光子, 喜田進也, 福森義信, 川崎紘一, 水分散型 Fmoc 保護アミノ酸ナノ粒子を用いた水中固相合成法の開発, 第 127 年会日本薬学会, 富山, 2007 年 3 月 28 日-30 日

北條恵子, 市川秀喜, 前田光子, 喜田進也, 福森義信, 川崎紘一, Solid Phase Synthesis in Water Using Fmoc-Amino Acid Nanoparticles., 第 43 回ペプチド討論会・第 4 回ペプチド工学国際会議, 横浜, 2006 年 11 月 5-8 日

北條恵子, 市川秀喜, 前田光子, 喜田進也, 福森義信, 川崎紘一, Solid Phase Synthesis in Water Using Nanoparticulate Amino Acids., 第 29 回 European Peptide Symposium, Gdansk, Poland, 2006 年 9 月 3-8 日

喜田進也, 前田光子, **北條恵子**, 衛藤佑介, 高建青, 倉知慎之輔, 水口裕行, 早川堯夫, 真弓忠範, 中川晋作, 川崎紘一, Design and Synthesis of a Tat-related Gene Transporter: A Tool for Carrying the Adenovirus Vector into Cells, 第 6 回 Australian Peptide Conference Symposium,

Great Barrier Reef, Australia, 2005 年 10 月 11-15 日

前田光子, 上田香織, **北條恵子**, 川崎紘一, トロンピン受容体関連ペプチドの合成とその活性について, 第 42 回ペプチド討論会, 大阪, 2005 年 10 月 27-29 日

北條恵子, 市川裕佳, 原田慎一, 前田光子, 川崎紘一, 水中固相合成 ~ Sps 基を用いる完全水系での Dermorphin の合成, 第 55 回日本薬学会近畿支部大会, 武庫川女子大, 2005 年 10 月 29 日

喜田進也, 前田光子, **北條恵子**, 衛藤佑介, 高建青, 倉知慎之輔, 森重智弘, 水口裕之, 真弓忠範, 中川晋作, 川崎紘一, アデノウイルスベクター用細胞内移行性ペプチドの合成, 第 55 回日本薬学会近畿支部大会, 武庫川女子大, 2005 年 10 月 29 日

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称: ペプチド合成方法及び該方法に使用可能な水性分散液

発明者: 菅原 (北條) 恵子, 市川秀喜, 福森義信, 川崎紘一, 金子貫太郎, 吉川隆輔

権利者: 菅原 (北條) 恵子, 市川秀喜, 株式会社栗本鐵工所

種類: 特願 2006-232837

番号出願年月日: 2006 年 8 月 2 日

国内外の別: 国内

取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北條恵子 (HOJO KEIKO)

神戸学院大学・薬学部・助教

研究者番号: 20289028