

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：32624

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2022

課題番号：20K22721

研究課題名（和文）SDGsに対応した環境調和型アミン検出試薬の開発とペプチド合成への応用

研究課題名（英文）Development of environment-friendly amine detection reagents that contribute to achieving SDGs and their application to peptide synthesis

研究代表者

梅野 智大（Umeno, Tomohiro）

昭和薬科大学・薬学部・特任助教

研究者番号：40879524

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究課題では、塩酸塩型のドナー・アクセプター型分子を用いた新たなアミン検出試薬の開発とそのペプチド固相合成への応用を行った。具体的には、分子内に電子供与性のグアニジノ基と電子求引性基をもつ共役分子を新たに合成し、塩酸塩とした後、溶液中でのアミン検出を行った。その結果、アミンの量が増えるに従って、可視領域の吸光度が直線的に増加し、定量検出が可能であることが示され、溶液は黄色に着色した。続いて、本アミン検出法をペプチド固相合成へと適用したところ、樹脂上のアミノ基検出においても高い直線性を示し、定量検出が可能であることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により得られた成果は、近年注目されている中分子医薬の1つであるペプチドの効率的合成への貢献が期待される。また、従来法では検出できなかったアミノ酸の検出を定量的に行えるため、カップリング反応の試薬量の低減や時間の短縮、さらにアミン検出試薬の再利用など現代の科学研究に重要とされるSDGsに対応したペプチド合成を実現することが可能である。

研究成果の概要（英文）：In this study, we developed a novel quantitative and non-destructive colorimetric amine detection method based on the acid-base reaction of the hydrochloride of electron donor-acceptor-type dyes with amines. In this method, a non-colored solution of HCl salt of dyes, whose pKBH+ value was carefully modified was deprotonated by amines on resin, and colored yellow. By measuring the absorption spectra of the colored solution, a good linear relationship ( $R^2 = 0.998$ ) with amine groups on the resin was confirmed.

研究分野：分析化学

キーワード：アミン検出 ペプチド ドナー・アクセプター 固相合成 酸塩基反応

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

中分子医薬は低分子医薬と抗体医薬の中間に位置しており、それぞれがもつ問題点を解決できる次世代医薬品として大きな注目を集めている。代表的な中分子医薬であるペプチドは、化学合成が可能のため製造コストの低減が可能であり、次世代医薬の中核を担うとされている。ペプチドの化学合成は一般的にペプチド固相合成法 (SPPS: Solid-Phase Peptide Synthesis) により行われる。SPPS は樹脂上でアミノ酸のカップリングと脱保護を行い、アミノ酸を伸長する手法であり、樹脂上で目的のペプチド配列まで伸長した後、樹脂から切り出すことで目的のペプチドを簡便に合成できる手法である。SPPS では反応は不溶性の樹脂上で進行するため、反応の追跡には有機合成で用いられる薄層クロマトグラフィー (TLC) や質量分析などを用いることができない。そのため、SPPS におけるカップリング反応後の反応追跡にはアミン検出法が用いられ、中でもニンヒドリン反応を利用したカイザーテストが頻繁に用いられる。しかし、半世紀に渡って用いられるカイザーテストには以下のような問題点があり、新たなアミン検出法の開発が望まれている。問題点：プロリンなど検出できないアミノ酸がある。樹脂を一部分取する必要がある。加熱が必要。毒物 (KCN) の使用。定量検出が困難。

### 2. 研究の目的

分子内に電子供与性 (ドナー性) 官能基と電子求引性 (アクセプター性) 官能基をもつ共役分子はドナー・アクセプター (D-A) 型分子とよばれ、長波長側 (可視領域) に吸収をもつためその溶液は多くの場合有色の溶液となる。所属研究室では独自の D-A 型分子として分子内に電子求引性のトリフルオロメチル基と電子供与性のアミノ基を有するキノリンであるピストリフルオロメチルアミノキノリン (TFMAQ) を報告しており、本研究では TFMAQ を基本骨格とした塩酸塩型のアミン検出試薬の開発を目指した。TFMAQ のような分子中にアミノ基を有する D-A 型分子はアミノ基が塩酸塩としてプロトン化された場合、アミノ基の電子供与性が低下し、吸収の短波長シフトが確認される (無色となる)。一方、外部に存在するアミンがこの塩酸塩を脱塩した場合、D-A 型分子は再度長波長側に吸収をもつようになる (着色する) ため、D-A 型分子の塩酸塩はアミン検出試薬としての可能性を有している。

本研究では D-A 型分子の塩酸塩を用いたアミン検出法の開発を目指し、さらに、SPPS における未反応アミノ基の検出のための新たなアミン検出試薬としての応用を目的に研究を行った。

### 3. 研究の方法

まず TFMAQ を文献既知の方法により、*m*-フェニレンジアミンとヘキサフルオロアセチルアセトンから合成した。溶液中でのアミン検出を達成するためには溶液中で安定に存在できる D-A 型分子の塩酸塩を開発する必要がある。溶液中で塩酸塩が安定に存在するためには D-A 型分子の塩基性度が重要であるとの考えから、塩基性度が異なる TFMAQ 誘導体 1~6 を新たに合成した。合成した TFMAQ 誘導体の塩酸塩の溶液中での安定性を吸収スペクトルを測定することで明らかにした。続いて、溶液中安定な D-A 型分子の塩酸塩を用いて、1~3 級アミン (1 級: プロピルアミン、2 級: ピペリジン、3 級: トリエチルアミン) の定量検出を紫外可視吸光光度計を用いて調査した。さらに、SPPS におけるアミン検出も同様に紫外可視吸光光度計を用いて調査した。SPPS における定量検出を調査するに当たって、樹脂上のアミノ基の当量は Fmoc 検出を用いて算出することとした。Fmoc 検出は樹脂上の Fmoc 保護アミノ酸を脱保護した際に生成する Fmoc 保護基の脱離体のモル数を吸光度から算出する手法であり、このモル数は樹脂上に存在するアミノ基のモル数に相当する。樹脂上に導入するアミノ酸としてグリシンを導入し定量検出の調査を行い、つづいてその他の天然・非天然アミノ酸の検出を調査した。

### 4. 研究成果

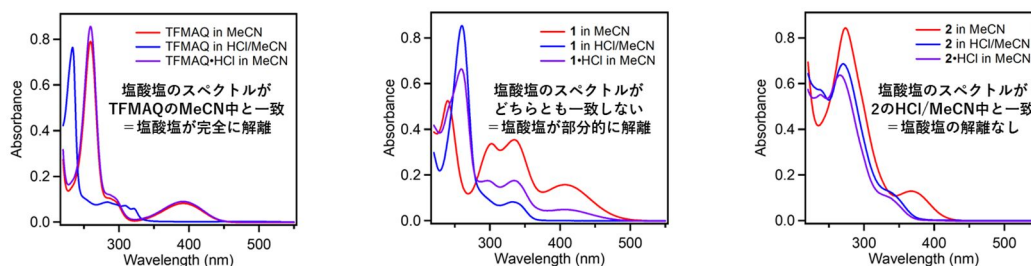
TFMAQ を原料として 6 種類の誘導体の合成に成功した。化合物 2~5 の合成にはパラジウム触媒を用いた触媒的グアニジニル化反応を用いて合成を達成した。合成した化合物の塩基性度 ( $pK_{BH^+}$ ) を算出するため 1,4-dioxane/buffer 中で吸光度を測定したところ、そのスペクトル変化からそれぞれ TFMAQ : 0.9、1 : 2.4、2 : 4.5、3 : 5.5、4 : 6.7、5 : 7.2、6 : 9.0 と見積もられた (図 1)。グアニジン上のフェニル基の置換基を置換することで化合物の塩基性度のチューニングが可能であり、幅広い  $pK_{BH^+}$  をもつ D-A 型分子の合成に成功した。



図1. 本研究で開発したD-A型分子の構造と $pK_{BH^+}$ .

続いてこれらの化合物の塩酸塩の溶液中での安定性を調査した(図2)。各化合物のアセトニトリル溶液中と塩酸を加えたアセトニトリル溶液中の吸収スペクトルを測定し、続いて塩酸塩のアセトニトリル溶液中のスペクトルを測定した。この塩酸塩のスペクトルが塩酸/アセトニトリル中のスペクトルと一致していた場合、その塩酸塩はアセトニトリル中で安定に存在しているといえる。結果を見てみると、TFMAQはアセトニトリル溶液中で塩酸塩が完全に解離し、化合物1は一部解離していることが明らかとなった。一方で、 $pK_{BH^+}$ が4.5以上の化合物では塩酸塩の解離は見られず塩酸塩が安定に存在していたことから、これらの化合物は溶液中でのアミン検出に適用可能であることが示唆された。なお、本研究中に化合物6がメタノール中でプロトン化され、吸収スペクトルと蛍光スペクトルに変化が見られたことから、本メカニズムを利用した新たなメタノール検出試薬の開発に成功し、論文として報告した。

(1) 合成したD-A型分子とその塩酸塩のMeCNとHCl/MeCN中での吸収スペクトル



(2) D-A型分子の $pK_{BH^+}$ と塩酸塩の解離の有無との関係

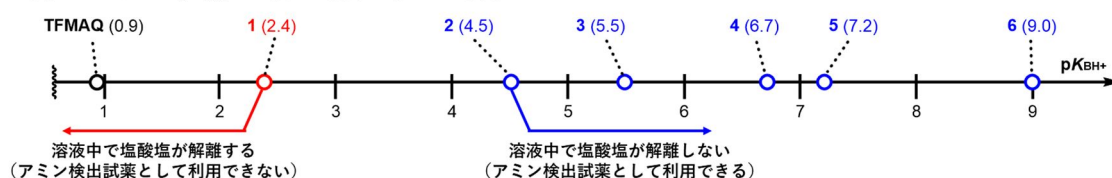


図2. 合成したD-A型分子の塩酸塩の溶液中での安定性評価

続いて、溶液中で安定に存在可能な化合物のうち  $pK_{BH^+}$ が中央に位置し、合成が容易な化合物4 ( $pK_{BH^+}$  6.7)の塩酸塩を用いて溶液中でのアミン検出を行った。化合物4の塩酸塩のアセトニトリル溶液に対して0~1.6当量のアミンを加え、吸光度を測定したところ、アミンの添加量を増加するに従って長波長側の吸収が上昇し、アミン検出試薬に対して1当量のアミンを加えたときにプラトーに達した(図3)。このことからアミン検出試薬はアミンと1:1で反応しており、塩酸塩はアミンによって脱塩されることが明らかとなった。また、このスペクトル変化は1級~3級のすべてのアミンで同様の結果が得られ、塩酸塩型アミン検出試薬を用いることでアミンの級数に依存しない定量的なアミン検出が可能であった。

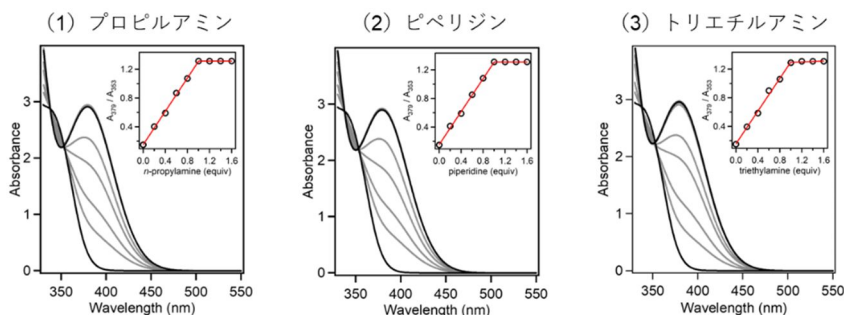


図3. 4-HClを用いた各種アミン検出結果

次に、本研究により開発した塩酸塩型アミン検出試薬を用いてSPPSにおけるアミン検出を行った。ペプチド固相樹脂上に導入されたグリシンのアミノ基検出を行ったところ、上述の溶液中でのアミン検出と同様に樹脂上に存在するアミノ基の量が増えるにつれて長波長側の吸光度の増加がみられた。この吸光度の増加は樹脂上アミノ基の量と高い直線性を示し( $R^2=0.999$ )、樹脂上アミノ基の定量検出に成功した。SPPSにおける樹脂上アミノ基の定量的なワンポットアミン検出はこれまで報告例がなく、本研究が初めての例である。また、本研究成果は効率的なペプチド合成に大きく貢献できる成果であるといえる。なお、グリシン以外の19種類のタンパク質構成アミノ酸のアミン検出も行っており、カイザーテストでは検出できないプロリンを含むすべてのアミノ酸で定量検出が可能であることがわかっている。加えて、近年、ペプチドの化学的安定性向上や高次構造の安定化の目的で用いられる、 $\alpha,\alpha$ -ジ置換アミノ酸やN-アルキルアミノ酸のような非天然のアミノ酸のアミン検出にも成功している。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Umeno Tomohiro, Usui Kazuteru, Karasawa Satoru	4. 巻 -
2. 論文標題 Extended Push Pull Type Bicyclic Fluorophores Based on Quinoline and Naphthyridine Frameworks with an Iminophosphorane Fragment	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Asian Journal of Organic Chemistry	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ajoc.202100015	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hagihara Ryusuke, Umeno Tomohiro, Ueki Shoji, Yoshihara Daisuke, Fuchi Yasufumi, Usui Kazuteru, Sakuma Masaomi, Yamada Ken ichi, Karasawa Satoru	4. 巻 27
2. 論文標題 Push?Pull Bisnaphthyridylamine Supramolecular Nanoparticles: Polarity Induced Aggregation and Crystallization Induced Emission Enhancement and Fluorescence Resonance Energy Transfer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chemistry - A European Journal	6. 最初と最後の頁 3039 ~ 3046
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/chem.202003854	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fuchi Yasufumi, Umeno Tomohiro, Abe Yuichiro, Ikeno Keita, Yamasaki Ryu, Okamoto Iwao, Usui Kazuteru, Karasawa Satoru	4. 巻 85
2. 論文標題 Characterization of Push-Pull-Type Benzo[X]quinoline Derivatives (X =gorf): Environmentally Responsive Fluorescent Dyes with Multiple Functions	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Organic Chemistry	6. 最初と最後の頁 13177 ~ 13190
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.joc.0c01878	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 梅野 智大、瀬戸 玲美、松本 祥汰、白井 一晃、唐澤 悟
2. 発表標題 塩基性蛍光分子によるメタノール選択的蛍光検出法の開発
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤原 萌圭、梅野 智大、臼井 一晃、唐澤 悟
2. 発表標題 ペプチド固相合成のための定量的なアミノ基検出法の開発
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 梅野智大、臼井一晃、唐澤悟
2. 発表標題 D-A 型アミン検出試薬の開発とペプチド固相合成への応用
3. 学会等名 第31回基礎有機化学討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 梅野智大、瀬戸玲美、臼井一晃、唐澤悟
2. 発表標題 グアニジノ基を有する蛍光分子によるメタノール選択的蛍光検出法の開発
3. 学会等名 第33回バイオメディカル分析科学シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 梅野 智大、臼井 一晃、唐澤 悟
2. 発表標題 ペプチド固相合成のための新規アミノ基検出法の開発研究
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤 和樹、梅野 智大、上田 篤志、土井 光暢、加藤 巧馬、田中 正一
2. 発表標題 N末をチオウレアで修飾したヘリカルペプチド触媒による不斉1,4-付加反応
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 白井 一晃、天野 亜美、村瀬 早槻、梅野 智大、唐澤 悟
2. 発表標題 ジヒドロピリダジン環を含むアザ[5]ヘリセンの合成と物性評価
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 真倉 唯、上田 篤志、梅野 智大、加藤 巧馬、平山 和浩、土井 光暢、大庭 誠、田中 正一
2. 発表標題 ペプチド側鎖におけるE選択的 <i>i, i+4</i> 閉環メタセシス反応
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 土屋 圭輔、梅野 智大、辻 徹一郎、横尾 英知、福原 潔、三澤 隆史、出水 庸介
2. 発表標題 光異性化に基づくエストロゲン受容体の活性制御
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 上田篤志, 佐藤和樹, 梅野智大, 田中正一
2. 発表標題 ヘリカルペプチドを基盤とした高活性有機分子触媒および不斉配位子としての展開
3. 学会等名 反応と合成の進歩2020特別企画シンポジウム
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 アミン類検出薬	発明者 唐澤 悟、梅野 智 大、松本 祥汰、臼井 一晃	権利者 昭和薬科大学
産業財産権の種類、番号 特許、2021- 33419	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関