

令和元年6月10日現在

機関番号：32659

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18914

研究課題名(和文)ペプチド化学に応用可能な新規SH基選択的ジスルフィド結合形成試薬創製の基礎研究

研究課題名(英文)Development of thiol-selective disulfide forming reagent for the application to peptide chemistry

研究代表者

田口 晃弘 (Taguchi, Akihiro)

東京薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：40707311

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ニコチン酸誘導体(Npys-OMe誘導体)に着目し、画期的かつ効率的なジスルフィド結合形成試薬の創製研究を実施した。還元型ペプチドの酸化反応を用いた検討において、Npys-OMe誘導体およびその樹脂化合物が、温和な酸化剤として効率的に機能することを見出した。また、本化合物を用いた独自ジスルフィド結合構築法の提供にも成功した。従って、これら成果は、当該結合を有する生理活性ペプチドの合成ならびに機能性分子の創製に寄与し、創薬およびペプチド化学に貢献できると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題で着目したNpys-OMe誘導体はその構造中に特徴的なメトキシチオ構造を含むことから、当該化合物に基づくジスルフィド結合形成試薬の創製は、新規性かつ独自性が高い。また、効率的なジスルフィド結合構築手法の確立および提供が可能となり、創薬化学、有機化学、ペプチド・タンパク質化学における学術的なインパクトがある。本研究成果は、ペプチド医薬品の開発および機能性分子の創製にも繋がり、社会的貢献も大きいと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Focused on nicotinic acid derivative (Npys-OMe derivative), the innovative and efficient reagents for disulfide bond formation were developed. In model study using the oxidation of reduced-form peptides, it was found that the Npys-OMe derivative and its resin efficiently function as a mild oxidizing agent. And it was succeeded in providing a unique disulfide bond formation method using this compound. Therefore, it is thought that these results can contribute the synthesis of bioactive disulfide peptides and the development of functional molecules in fields of drug discovery and peptide chemistry.

研究分野：創薬化学

キーワード：ジスルフィド結合 創薬化学 ペプチド合成 固相合成 有機化学 固相担持試薬 3-ニトロ-2-ピリジンスルフェニル基

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ジスルフィド結合は生理活性ペプチドやタンパク質の立体構造の安定化に寄与し、それら機能を発揮するために重要な役割を担っている。当該結合の構築は、非常に重要な工程であり、これまでに多くの合成法が報告されてきた。一般的には、空気酸化 (DMSO 酸化) が用いられるが、分子中の複数のジスルフィド結合を一挙に構築すると、架橋異性体の副生が避けられず、位置選択的なジスルフィド結合の形成は困難である。そのため、システイン (Cys) 残基側鎖チオール基の直交型保護基を利用し、段階的に当該結合を構築する方法が開発されてきた。この Cys 残基側鎖の直交型保護基として 3-ニトロ-2-ピリジンスルフェニル (Npys) 基 (図 1) がある。Npys 基は、ペプチド合成化学における保護基として知られているが、Cys 残基側鎖の保護では、活性ジスルフィドとしても機能する¹⁾。即ち、側鎖無保護の Cys 残基が共存すれば、活性ジスルフィドとのジスルフィド交換反応が選択的に進行する。そのため、これまで Npys 基は様々なジスルフィドペプチドの合成に利用されてきた。

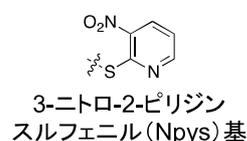


図 1

一方で、研究代表者が所属する研究室では、Npys の化学に着目したジスルフィド形成試薬の開発を展開しているが、ユニークなメトキシチオ構造を有する 6-(メトキシチオ)-5-ニトロニコチン酸メチル (Npys-OMe 誘導体 1) に着目した (図 1)。本研究課題では、誘導体 1 を基盤とした新規ジスルフィド結合形成試薬創製の基礎研究を展開した。

2. 研究の目的

ペプチド・タンパク質化学への応用を目指した基礎研究を行い、画期的かつ効率的なジスルフィド結合形成試薬となり得る化合物を獲得する。更に、本化合物を用いた独自ジスルフィド結合構築法の提供により、当該結合を有する生理活性ペプチドの合成ならびに機能性分子の創製への貢献を目指す。

3. 研究の方法

還元型ペプチドの酸化反応を用い、合成した Npys-OMe 誘導体 1 およびその樹脂化合物 2 のジスルフィド形成能を評価した。また、Npys-OMe 誘導体 1 の酸化還元特性を評価した。誘導体の更なる応用として、より複雑な構造を有する環状ペプチドの合成を実施した。本研究課題で用いた還元型ペプチドは、Fmoc/*t*-Bu ペプチド固相合成法により合成し、還元型ペプチドの酸化反応は、分析 HPLC を用い反応を追跡した。

4. 研究成果

(1) Npys-OMe 誘導体 1 および樹脂化合物 2 の合成 (図 2)

6-ベンジルチオ-5-ニトロニコチン酸メチル (3) を 1,2-ジクロロエタン (1,2-DCE) 中、ピリジン存在下、塩化スルフリル (SO₂Cl₂) と反応させ、クロロ体 4 へと導いた。得られた 4 を精製すること無く、THF 中、メタノールおよび塩基で処理することで誘導体 1 を合成した (図 2A、2 工程 79%)。一方で、図 2B に示す樹脂化合物の合成では、用いる固相担体として水系及び有機溶媒にて使用可能な ChemMatrix[®] resin を選択した。この樹脂にニコチン酸誘導体を担持させた樹脂 5²⁾ よりクロロ化、続くメタノール処理により樹脂化合物 2 を得た。

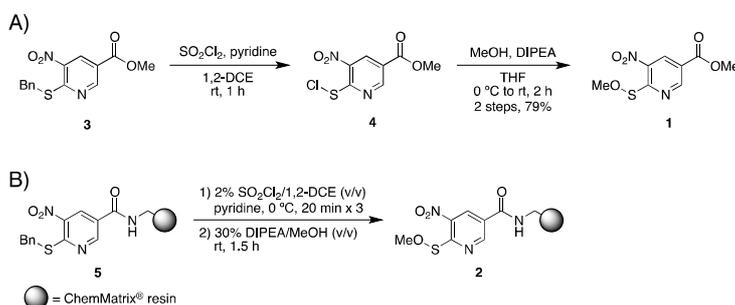


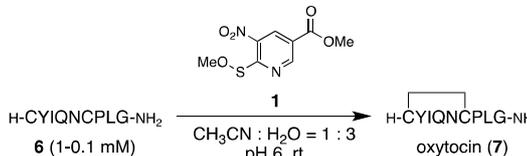
図 2

(2) Npys-OMe 誘導体 1 のジスルフィド形成能評価 (表 1)

還元型オキシトシン (6) からオキシトシン (7) への酸化反応をモデルとし、Npys-OMe 誘導体 1 のジスルフィド形成能を評価した。反応中に生成するオキシトシンを HPLC にて追跡し、検量線に基づき HPLC 収率を算出した。始めに反応溶媒の検討を行うべく、種々の溶媒を用い、ペプチド 6 の 1 mM 溶液を調製、誘導体 1 を 2 当量添加し、室温にて 6 時間攪拌した。その結果、CH₃CN : H₂O = 1 : 3 の混合溶媒において良好な結果を示した (収率 88%、Entry 1)。しかし、

副生成物としてペプチド6のオリゴマーが観察されたため、これらの生成を抑制すべく、更なる反応条件の最適化を行った。ペプチド6の濃度を0.1 mMに調製し、酸化反応を実施したところ、オキシトシンを収率90%で得られた。また、オリゴマーの生成は2%にまで抑えることができた(Entry 2)。更に、同様のペプチド6溶液に対し、誘導体1を5当量用いると、3時間で反応は完結し、オキシトシンを収率92%で得ることができた(Entry 3)。一方で、Entry 4の様にNpys-OMe誘導体1を添加しないとオキシトシンがほとんど生成しないことから、当該誘導体の添加によりはじめて酸化反応が効率的に進行することが示唆された。また、樹脂2を用いる条件でも良好な収率(85%)でオキシトシン(7)が生成できることを確認した。この方法では、試薬成分が樹脂上に残るため、反応溶液のろ過操作のみで、純度の高いペプチドの回収が可能である。

表 1



Entry	1 (equiv.)	Peptide 6 conc. (mM)	Yield of oxytocin (%) ^a	Oligomer (%) ^b
1	2	1	88	19
2	2	0.1	90	2
3	5	0.1	92 ^c	1
4	0	0.1	1	0

a: 反応6時間後におけるオキシトシン(7)のHPLC収率。b: オリゴマーのHPLC収率。
c: 反応3時間後におけるオキシトシン(7)のHPLC収率。

(3) Npys-OMe 誘導体 1 の酸化還元特性の評価

サイクリックボルタンメトリー測定³⁾における誘導体1の還元波のピーク電位(E_{pc})は-0.541 Vであり、酸化型グルタチオンの-1.55 Vよりも正側であった。この結果は、Npys-OMe 誘導体1により2つのSH基をジスルフィドへと酸化可能であることを示唆している。一方で、既存の酸化剤であるヨウ素(I_2)および最近ジスルフィド形成試薬として報告されたN-クロロスクシンイミド(NCS)⁴⁾の E_{pc} は、それぞれ+0.437および-0.175 Vであった。Npys-OMe 誘導体1の E_{pc} (-0.541 V)は、 I_2 およびNCSの値よりもはるかに負側であることから、誘導体1は温和な酸化剤として機能することが電気化学的手法により確認された。

(4) Npys-OMe 誘導体 1 を用いたより複雑な構造を有する環状ペプチドの合成

ヒト心房性ナトリウム利尿ペプチド(hANP(8))の合成(図3A)

還元型hANP(9)の $CH_3CN:H_2O$ (1:3、ペプチド濃度1 mM)溶液にNpys-OMe 誘導体1を5当量添加し、室温にて24時間撹拌した。反応溶液をHPLCにて精製することで8を単離収率50%で得た。また、本ペプチドは、酸化されやすいアミノ酸の1つであるメチオニン(10)を有しているが、酸化反応による影響は無かった。

α -コノトキシン ImI (10) の合成(図3B)

続いて、2組のジスルフィド結合を有する α -コノトキシン ImI (10)の合成検討を実施した。保護Cys残基を有する還元型ペプチド11を用い、酸化反応を段階的に行うことで、位置選択的なジスルフィド架橋を試みた。即ち、Npys-OMe 誘導体1により無保護Cys²-Cys⁸残基間を架橋した後、 I_2 酸化により保護Cys³-Cys¹²残基間を架橋することとした。Cys保護ペプチド11の $CH_3CN:H_2O$ (1:3、ペプチド濃度1 mM)溶液に誘導体1(2当量)を添加し、室温にて27時間撹拌した。HPLC精製により、所望のジスルフィドペプチド12を単離収率61%で得た。次に、得られたペプチド12に対して I_2 酸化を行い、アセトアミドメチル(Acm)基で保護されたCys残基間を架橋した10を単離収率46%で得た。本方法にて得られたペプチド10と標品とのHPLCの重ね打ちにより、ピークが一致したことから、構築した2組のジスルフィド結合は位置選択的であることが示された。

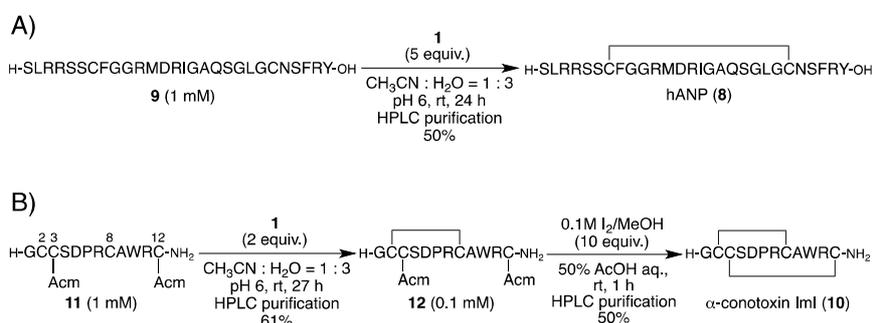


図 3

以上のように、Npys-OMe 誘導体およびその樹脂化合物が、温和なジスルフィド形成試薬として機能することを見出した。当該化合物を用いると、比較的高濃度な還元型ペプチド溶液にお

いても、酸化型ペプチドを効率的かつ簡便に得ることができる。また、誘導体 1 は、中分子サイズのペプチドに対しても応用可能であることが示された。一方で、Npys-OMe 誘導体による酸化法と他の酸化法を組み合わせることで、ジスルフィド結合の新たな位置選択的の合成法も提供できた。本研究課題で得られた成果はペプチド・タンパク質化学に貢献できると考えられる。

<引用文献>

1. Rei Matsueda, Roderich Walter, 3-NITRO-2-PYRIDINESULFENYL (Npys) GROUP: A Novel Selective Protecting Group Which Can Be Activated for Peptide Bond Formation, International journal of peptide and protein research, 16, 1980, 392-401.
2. Akihiro Taguchi, Kentarou Fukumoto, Yuya Asahina, Akihiro Kajiyama, Shunsuke Shimura, Keisuke Hamada, Kentaro Takayama, Fumika Yakushiji, Hironobu Hojo, Yoshio Hayashi, 3-Nitro-2-pyridinesulfenyl-mediated Solid-phase Disulfide Ligation in the Synthesis of Disulfide Bond-containing Cyclic Peptides, Organic & Biomolecular Chemistry, 13, 2015, 3186-3189.
3. Akira Kotani, Kota Nagami, Chika Mino, Yasuhito Sugawara, Kouji Takahashi, Fumiyo Kusu, Hideki Hakamata, Determination of Nobiletin in Rat Plasma after Ingestion of *Citrus depressa* Juice by Capillary Liquid Chromatography with Electrochemical Detection Using Boron-doped Diamond Electrode, Electrochemistry, 83, 2015, 363-367.
4. Tobias M. Postma, Fernando Albericio, *N*-Chlorosuccinimide, an Efficient Reagent for On-resin Disulfide Formation in Solid-phase Peptide Synthesis, Organic Letters, 15, 2013, 616-619.

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計2件)

1. Akihiro Taguchi, Kiyotaka Kobayashi, Akira Kotani, Kyohei Muguruma, Misaki Kobayashi, Kentarou Fukumoto, Kentaro Takayama, Hideki Hakamata, Yoshio Hayashi, 3-Nitro-2-pyridinesulfenates as Efficient Solution- and Solid-phase Disulfide Bond Forming Agents, Chemistry-A European Journal, 査読有, 23, 2017, 8262-8267.
2. Yan Cui, Cedric Rentier, Akihiro Taguchi, Kentaro Takayama, Atsuhiko Taniguchi, Yoshio Hayashi, 4-Fluorophenyl 3-Nitro-2-pyridinesulfenate as a Practical Protecting Agent for Amino Acids, Journal of Peptide Science, 査読有, 24, 2018, e3070. DOI: 10.1002/psc.3070.

[学会発表](計23件)

1. 小林清孝、田口晃弘、小林美咲、六車共平、福元謙太郎、高山健太郎、林 良雄、3-ニトロ-2-ピリジンスルフェニル(Npys)を基盤とした新規ジスルフィド形成試薬の開発、創薬懇話会 2016 in 薬科、2016年
2. Kiyotaka Kobayashi, Akihiro Taguchi, Misaki Kobayashi, Kyohei Muguruma, Kentarou Fukumoto, Kentaro Takayama, Yoshio Hayashi, Development of New Npys-based Reagents for Synthesis of Disulfide-containing Peptides, 20th Korean Peptide Protein Symposium, 2016年
3. Akihiro Taguchi, Kiyotaka Kobayashi, Kentarou Fukumoto, Misaki Kobayashi, Kyohei Muguruma, Kentaro Takayama, Yoshio Hayashi, Development of New Npys-based Disulfide Formation Reagents for the Synthesis of Cyclic Disulfide Peptides, 第53回ペプチド討論会, 2016年
4. 田口晃弘、小林清孝、福元謙太郎、小林美咲、六車共平、濱田圭佑、高山健太郎、林 良雄、3-ニトロ-2-ピリジンスルフェニル基を基盤とした新規ジスルフィド形成手法の創製とその応用、第42回反応と合成の進歩シンポジウム、2016年
5. 小林清孝、田口晃弘、小谷 明、六車共平、小林美咲、崔 岩、福元謙太郎、高山健太郎、谷口敦彦、袴田秀樹、林 良雄、環状ジスルフィドペプチドの効率的合成を指向した新規ジスルフィド架橋試薬の創製、第35回メディシナルケミストリーシンポジウム、2017年
6. 小林清孝、田口晃弘、小谷 明、六車共平、小林美咲、崔 岩、福元謙太郎、高山健太郎、谷口敦彦、袴田秀樹、林 良雄、3-ニトロ-2-ピリジンスルフェニル(Npys)構造を基盤とした新規ジスルフィド架橋試薬の創製研究、第61回日本薬学会関東支部大会、2017年
7. Yan Cui, Cedric Rentier, Akihiro Taguchi, Kentaro Takayama, Atsuhiko Taniguchi, Yoshio Hayashi, Synthesis and Stability Evaluation of New 3-Nitro-2-pyridinesulfenate Derivatives, 第54回ペプチド討論会、2017年
8. Akihiro Taguchi, Kiyotaka Kobayashi, Akira Kotani, Kyohei Muguruma, Misaki Kobayashi, Kentarou Fukumoto, Kentaro Takayama, Atsuhiko Taniguchi, Hideki Hakamata, Yoshio Hayashi, Development of a New Method on Npys-based Disulfide Bond Formation for the Preparation of Bioactive Cyclic Disulfide Peptides, 12th Annual Peptide Therapeutics Symposium, 2017年
9. Kiyotaka Kobayashi, Akihiro Taguchi, Akira Kotani, Kyohei Muguruma, Misaki Kobayashi, Yan Cui, Kentarou Fukumoto, Kentaro Takayama, Hideki Hakamata, Atsuhiko Taniguchi, Yoshio Hayashi, Development of a Disulfide Bond-forming Toward Efficient Multi-disulfide Peptide Synthesis, 3rd Annual Peptides and Proteins Symposium Singapore, 2017年
10. Akihiro Taguchi, Kentarou Fukumoto, Kyohei Muguruma, Kiyotaka Kobayashi, Kentaro Takayama, Yoshio Hayashi, Application of 3-Nitro-2-pyridinesulfenyl(Npys) Derivatives to Chemical Biology, Peptide Chemistry and Medicinal Chemistry, The 12th Australian peptide Conference, 2017年

11. Kiyotaka Kobayashi, Akihiro Taguchi, Kyohei Muguruma, Kentaro Takayama, Atsuhiko Taniguchi, Yoshio Hayashi, On-resin Synthesis of Cyclic Disulfide Peptides Using Methyl 3-Nitro-2-pyridinesulfenates, 10th International Peptide Symposium/55th Japanese Peptide Symposium, 2018 年
12. Akihiro Taguchi, Saeka Kuraishi, Kiyotaka Kobayashi, Yan Cui, Kentaro Takayama, Atsuhiko Taniguchi, Yoshio Hayashi, Water-soluble Npys-OMe Derivatives of Organic Solvent Free Disulfide-bond Formation, 10th International Peptide Symposium/55th Japanese Peptide Symposium, 2018 年
13. Kiyotaka Kobayashi, Akihiro Taguchi, Akira Kotani, Kyohei Muguruma, Yan Cui, Kentaro Takayama, Atsuhiko Taniguchi, Hideki Hakamata, Yoshio Hayashi, Development of a Novel disulfide-forming Agent and Its Application to On-resin Synthesis of Cyclic Disulfide peptides, XXII International Conference on Organic Synthesis-22-ICOS, 2018 年
14. Yan Cui, Cedric Rentier, Akihiro Taguchi, Kiyotaka Kobayashi, Kentaro Takayama, Atsuhiko Taniguchi, Yoshio Hayashi, Development of 4-Fluorophenyl 3-Nitro-2-pyridinesulfenate as an Appropriate Surrogate for Sulfenylation Agent Npys-Cl, 15th Chinese International Peptide Symposium, 2018 年
15. Yan Cui, Cedric Rentier, Akihiro Taguchi, Kiyotaka Kobayashi, Kentaro Takayama, Atsuhiko Taniguchi, Yoshio Hayashi, Development of 4-Fluorophenyl 3-Nitro-2-pyridinesulfenate as an Appropriate Surrogate for Conventional Sulfenylation Agent Npys-Cl, 22nd Korean Peptide Protein Symposium, 2018 年
16. Kiyotaka Kobayashi, Akihiro Taguchi, Kentaro Takayama, Atsuhiko Taniguchi, Yoshio Hayashi, Solid-phase Synthesis of Cyclic Peptides Using a New Disulfide-forming Agent Npys-OMe, 22nd Korean Peptide Protein Symposium, 2018 年
17. Akihiro Taguchi, Kiyotaka Kobayashi, Kentaro Takayama, Atsuhiko Taniguchi, Yoshio Hayashi, Development of New Npys-based Chemical Methodology for Efficient Synthesis of Cyclic Disulfide Peptides, 54th International Conference on Medicinal Chemistry (RICT2018), 2018 年
18. Akihiro Taguchi, Kyohei Muguruma, Yoshio Hayashi, Npys-based Solid Phase Disulfide-peptide Synthesis and Its Application to Peptide-drug Conjugates, 10th International Peptide Symposium/55th Japanese Peptide Symposium, 2018 年
19. Akihiro Taguchi, Kyohei Muguruma, Kiyotaka Kobayashi, Yan Cui, Cedric Rentier, Kentaro Takayama, Atsuhiko Taniguchi, Yoshio Hayashi, A New Aspect of Npys-based Solid Phase Disulfide Peptide Synthesis, 35th European Peptide Symposium, 2018 年
20. 崔 岩、レンティール セドリック、田口晃弘、小林清孝、高山健太郎、谷口敦彦、林 良雄、新規 3-ニトロ-2-ピリジンスルフェン酸エステル誘導体の創製とその機能性評価、日本ケミカルバイオロジー学会第 13 回年会、2018 年
21. 小林清孝、田口晃弘、崔 岩、福元早穂子、倉石彩恵香、高山健太郎、谷口敦彦、林 良雄、固相 Npys 試薬を利用したジスルフィド先導型環状ペプチド合成によるヒトエンドセリン-2 の合成、日本ケミカルバイオロジー学会第 13 回年会、2018 年
22. 田口晃弘、小林清孝、崔 岩、高山健太郎、谷口敦彦、林 良雄、固相上ジスルフィド形成反応を利用した環状ペプチドの効率的合成法の開発、第 44 回反応と合成の進歩シンポジウム、2018 年
23. 倉石彩恵香、田口晃弘、小林清孝、崔 岩、高山健太郎、谷口敦彦、林 良雄、水溶性 Npys 誘導体の創製とそのジスルフィド結合能評価、日本薬学会第 139 年会、2019 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 2 件)

名称：含窒素化合物を用いた選択的ジスルフィド化試薬、およびジスルフィド含有化合物の製造方法

発明者：林 良雄、田口 晃弘、福元 謙太郎

権利者：同上

種類：特許

番号：特願 2016-101812

出願年：平成 28 年

国内外の別：国内

名称：Selective Disulfidation Reagent Using Nitrogen-containing Compound and Method for Producing Disulfide-containing Compound

発明者：林 良雄、田口 晃弘、福元 謙太郎

権利者：同上

種類：特許

番号：PCT/JP2017/019086

出願年：平成 29 年

国内外の別：国外

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://hinka-toyaku.s2.weblife.me/index.html>

6．研究組織

(1)研究分担者 なし

(2)研究協力者 なし

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、研究者個人に帰属されます。