

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：32659

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16324

研究課題名(和文) Npys誘導体を基盤とするジスルフィド駆動型環状ペプチド合成法の開発

研究課題名(英文) Development of disulfide-driven cyclic peptide synthesis based on Npys derivatives

研究代表者

田口 晃弘 (Taguchi, Akihiro)

東京薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：40707311

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：3-ニトロ-2-ピリジンスルフェン酸エステルを用いたオンレジン-ジスルフィド駆動型環状ペプチド合成法の開発を実施した。まず、本手法において鍵反応となるスルフェン酸エステルによるシステイン残基側鎖の活性ジスルフィド化を精査した。その結果、誘導体Npys-OPh(pF)を用いるとその反応は効率的であった。さらに、本手法の概念を実証すべく、オキシトシンの配列を分割した2つのフラグメントによるオキシトシン合成を検討した。フラグメント間のジスルフィド架橋および分子内アミド結合形成を含む樹脂上の反応によりワンポットでオキシトシン合成を達成した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、環状ジスルフィドペプチドが医薬品候補化合物として注目を集めている。スルフェン酸エステルのジスルフィド形成能に立脚したペプチド合成法の構築は、環状ペプチドの効率的合成に繋がり、有機化学、ペプチド・タンパク質化学において学術的貢献が期待できる。また、本手法の自動化により、環状ペプチドのプロセス合成および効率的自動合成法の提供も可能と考えられる。

研究成果の概要(英文)：We have developed an on-resin disulfide-driven cyclic peptide synthesis method using 3-nitro-2-pyridinesulfenates. First, as a key reaction in this method, the active disulfide formation at side chain of the cysteine residue by sulfenates was investigated. As a result, it found that the reaction was efficient when the derivative Npys-OPh(pF) was used. Furthermore, in order to demonstrate the concept of this method, we tried the synthesis of oxytocin using two fragments divided from its sequence. A one-pot synthesis of oxytocin has been achieved by on-resin reactions including a disulfide exchange reaction between two fragments and an intramolecular amide bond formation.

研究分野：創薬化学

キーワード：ジスルフィド 環状ペプチド 3-ニトロ-2-ピリジンスルフェン酸エステル 創薬化学 ペプチド合成  
固相合成 有機化学

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

近年、環状ジスルフィドペプチドが医薬品候補化合物として注目されている。本ペプチドの分子内ジスルフィド結合構築には、空気酸化やヨウ素酸化が一般的に用いられる。しかし、分子間反応を抑えるために、高希釈条件下にて反応を行う必要があり、反応終結や溶媒除去などに時間を要する。また、酸化に影響され易いアミノ酸残基を含むペプチドや溶解性の乏しい直鎖ペプチドの場合、収率が低下する。そのため、環状ジスルフィドペプチドの効率的合成の実現には、従来法とは異なる新規なペプチド合成法の開発が求められる。

一方で申請者らは、3-ニトロ-2-ピリジンスルフェン酸エステル誘導体 (Npys-OR) がジスルフィド形成試薬として機能することを見出した。Npys-OMe (**1**, 図1A) は、i) 温和な酸化能を有し、他のアミノ酸残基に影響を及ぼさない。ii) 物理化学的安定性が高く、室温にて保存可能であるなど、他の酸化剤とは異なる特性を有している<sup>1</sup>。また、最近 Npys-OPh(pF) (**2**, 図1A) の創製にも至っている<sup>2</sup>。アミノ酸やペプチドへの3-ニトロ-2-ピリジンスルフェニル (Npys) 基の導入には Npys-Cl を用いているが、当該誘導体は高い反応性を有するため安定性が低く、取り扱いが困難であった。一方で、誘導体 **2** は Npys-Cl と同様な化学反応性を有しているが、物理化学的安定性が大幅に改善された。従って、これら当該スルフェン酸エステルの化学に基づいたジスルフィドペプチドの効率的合成法は、従来法における課題克服の可能性を秘めている。

### 2. 研究の目的

本研究課題は、独自開発したジスルフィド形成能を有する 3-ニトロ-2-ピリジンスルフェン酸エステル誘導体を基盤としたオンレジン-ジスルフィド駆動型環状ペプチド合成法の確立を目指すものである。本手法は、図1B に示すように固相担体上で2つのペプチドフラグメント間をジスルフィド結合で繋げ、その後、分子内縮合により環化させる。即ち、①固相合成によりペプチド鎖を構築後、②Npys 誘導体を用い、ペプチド-樹脂中のシステイン (Cys) 残基側鎖に活性ジスルフィドを選択的に形成させる。次いで、③別途合成した側鎖無保護 Cys 残基含有ペプチドとのジスルフィド交換により、樹脂上に担持させる。④樹脂上のペプチドフラグメント間を縮合により環化させ、最後に、⑤脱保護及び脱樹脂することで一挙に環状ペプチドを得る方法である。本手法では、ペプチドフラグメント間のジスルフィド形成を先に構築するため、分子内環化では、反応点が近接し、効率的に進む可能性がある。また、従来法では、反応後のペプチドの単離に HPLC 精製などの煩雑な操作が必須であるが、本手法は、固相法を基としているため、反応①～④の各溶液中に残存する試薬 (ペプチド) または副生成物は、ろ別により除去が容易となる。

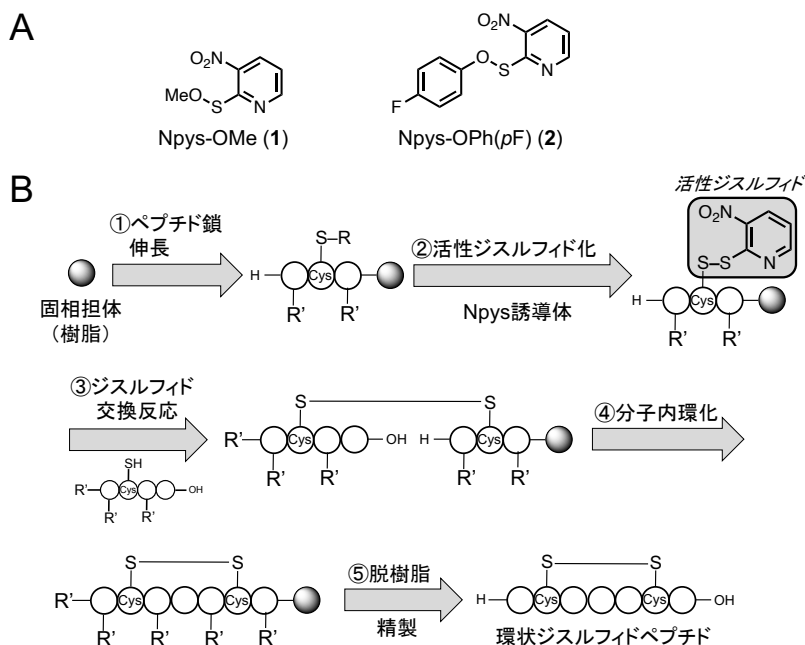


図1. A) 開発した 3-ニトロ-2-ピリジンスルフェン酸エステル誘導体、B) 本研究で取り組むオンレジン-ジスルフィド駆動型環状ペプチド合成法の概略

### 3. 研究の方法

本ジスルフィド駆動型ペプチド合成法の要となる Npys 誘導体による Cys 誘導体の活性ジスルフィド形成反応を精査した。さらに、本法におけるモデルペプチドとしてオキシトシン合成を行った。また、より複雑なペプチド合成への応用として、ヒトインスリンの合成を試みた。

Npys 誘導体は、一般的な液相合成法により合成し、得られた生成物の NMR 測定および質量分析にてその合成を確認した。また、ペプチドおよびペプチド-樹脂は、一般的な Fmoc-ペプチ

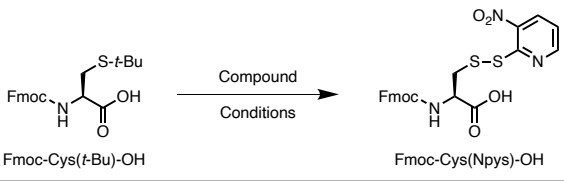
ド固相合成法により調製した。本法によるオキシトシンおよびインスリン合成では、各反応は樹脂上で行うため、反応後の乾燥樹脂一部を脱樹脂し、得られた粗生成物を HPLC および質量分析にて解析し、反応の進行を確認した。

#### 4. 研究成果

##### (1) スルフェン酸エステルによる活性ジスルフィド化反応の検討

システイン誘導体 (Fmoc-Cys(*t*-Bu)-OH) と独自開発した Npys 誘導体を反応させ、生成する Fmoc-Cys(Npys)-OH の単離収率を求めた。まずは、反応溶媒を 90%ギ酸水溶液<sup>3</sup>にて検討したところ、エントリー1 に示すように Npys-OMe (**1**) は、中程度の収率で Fmoc-Cys(Npys)-OH を与えることがわかった。更に Npys-OPh(*p*F) (**2**) では、反応はより効率的であった (エントリー2、収率 98%)。そこで、本誘導体において、反応溶媒などの検討を実施したところ、酢酸を用いた場合でも良好な収率を与えた (エントリー3)。一方で、エントリー4 および5 のように、ジクロロメタンやジイソプロピルエチルアミン (DIPEA) の中性、または塩基条件下では反応率は低下することもわかった。従って、本反応は酸存在下で促進されることが示唆された。

表 1. Npys 誘導体による Fmoc-Cys(Npys)-OH の合成



Entry	Compound	Conditions		
		Solvent	Temp. (°C)	Yield (%)
1	Npys-OMe ( <b>1</b> )	90% HCOOH aq.	rt	57
2	Npys-OPh( <i>p</i> F) ( <b>2</b> )	90% HCOOH aq.	0	96
3	Npys-OPh( <i>p</i> F) ( <b>2</b> )	AcOH	rt	97
4	Npys-OPh( <i>p</i> F) ( <b>2</b> )	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	0 to rt <sup>a</sup>	66
5	Npys-OPh( <i>p</i> F) ( <b>2</b> )	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> , DIPEA	0 to rt <sup>a</sup>	N.O. <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Reaction conditions: at 0 °C for 1 h and then at rt for 12 h.

<sup>b</sup> N.O.: not obtained.

次に、Npys 誘導体 **2** の反応性を理解するために、側鎖保護基が異なる Cys 誘導体に対する反応性も調べたところ、アセトアミドメチルおよび *p*-メトキシベンジル基においても、活性ジスルフィド体が高収率で得られることがわかった。

##### (2) オンレジン-ジスルフィド駆動型環状ペプチド合成法によるオキシトシン合成

本法のモデルとしてオキシトシン (9 残基) 合成に着手した。オキシトシンの配列を二つのフラグメント A および B に分割し、樹脂上でジスルフィド架橋および分子内アミド結合形成を行うことでオキシトシン合成を目指した。まず、樹脂に担持されたフラグメント B と Npys-OPh(*p*F) (**2**) を反応させ、活性ジスルフィド化した樹脂を獲得した。その後、フラグメント A の無保護 Cys 残基とのジスルフィド交換によりペプチド間のジスルフィド結合を構築し、次いで縮合剤による分子内アミド結合形成を行った。最後に脱樹脂と HPLC の精製を経てオキシトシンのオンレジン合成を達成した。さらに、本縮合反応で得られる環状ペプチドのラセミ化を調べた。縮合反応後、脱樹脂により得られた粗生成物を HPLC にて解析したところ、ほとんどラセミ化は生じていなかった。また、縮合剤を用いない縮合法であるチオエステル法への適用も検討した。まず、北條らの方法<sup>4</sup>により、フラグメント A に対応するペプチドチオエステルを合成後、活性ジスルフィドを有するフラグメント B-樹脂とのジスルフィド結合交換反応により、ペプチドチオエステルを樹脂に担持させた。当該樹脂を銀イオン存在下、フラグメント間を縮合<sup>5</sup>させることで環状ペプチドへと導くことができた。本検討において、ラセミ体は検出されなかった。一方で別途合成した保護フラグメント A および B を、ジスルフィド結合を経由せずに縮合したところ、反応効率の低下が見られた。

##### (3) 本法によるインスリン合成

更に本合成法の有用性を示すため、ジスルフィド結合を3本有するヒトインスリンの合成にも着手した。当該ペプチドはAおよびB鎖を有するが、A鎖-樹脂を用いた合成経路を検討した。まず、固相合成により保護A鎖-樹脂を合成後、樹脂上にてCys残基の側鎖保護基を選択的に除去し、生成した2つのチオール基をNpys-OMe (**1**) を用いた酸化反応によりジスルフィドへと導いた。次いで、樹脂上に存在する別のCys残基側鎖をNpys-OPh(*p*F) (**2**) により活性化した。得られた樹脂と別途合成したチオール基含有B鎖とのジスルフィド結合形成により、B鎖を樹脂上に担持させることができた。今後、更なる検討により本合成法によるインスリンのオンレジン合成が期待できる。

#### <引用文献>

- ① A. Taguchi, K. Kobayashi, A. Kotani, K. Muguruma, M. Kobayashi, K. Fukumoto, K. Takayama, H. Hakamata, Y. Hayashi, 3-Nitro-2-pyridinesulfenates as efficient solution- and solid-phase disulfide bond forming agents, *Chem. Eur. J.*, 2017, 23, 8262-8267.
- ② Y. Cui, C. Rentier, A. Taguchi, K. Takayama, A. Taniguchi, Y. Hayashi, 4-Fluorophenyl 3-nitro-2-pyridinesulfenate as a practical protecting agent for amino acids, *J. Pept. Sci.*, 2018, 24, e3070.

- ③ A. Taguchi, K. Fukumoto, Y. Asahina, A. Kajiyama, S. Shimura, K. Hamada, K. Takayama, F. Yakushiji, H. Hojo, Y. Hayashi, 3-Nitro-2-pyridinesulfonyl-mediated solid-phase disulfide ligation in the synthesis of disulfide bond-containing cyclic peptides, *Org. Biomol. Chem.*, 2015, 13, 3186-3189.
- ④ H. Hojo, Y. Onuma, Y. Akimoto, Y. Nakahara, Y. Nakahara, *N*-Alkyl cysteine-assisted thioesterification of peptides, *Tetrahedron Lett.*, 2007, 48, 25-28.
- ⑤ K. Teruya, T. Tanaka, T. Kawakami, K. Akaji, S. Aimoto, Epimerization in peptide thioester condensation, *J. Pept. Sci.*, 2012, 18, 669-677.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Yan Cui, Akihiro Taguchi, Kiyotaka Kobayashi, Hayate Shida, Kentaro Takayama, Atsuhiko Taniguchi, Yoshio Hayashi	4. 巻 18
2. 論文標題 Use of solid-supported 4-fluorophenyl 3-nitro-2-pyridinesulfenate in the construction of disulfide-linked hybrid molecules	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Organic Biomolecular Chemistry	6. 最初と最後の頁 7094-7097
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/d0ob01370f	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 Kiyotaka Kobayashi, Akihiro Taguchi, Yan Cui, Hayate Shida, Kyohei Muguruma, Kentaro Takayama, Atsuhiko Taniguchi, Yoshio Hayashi	4. 巻 2021
2. 論文標題 "On-Resin" disulfide peptide synthesis with methyl 3-nitro-2-pyridinesulfenate	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 European Journal of Organic Chemistry	6. 最初と最後の頁 956-963
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/ejoc.202001517	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5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 志田 颯、田口 晃弘、小林 清孝、崔 岩、高山 健太郎、谷口 敦彦、林 良雄
2. 発表標題 固相法を基盤とした新規環状ジスルフィドペプチド合成法の開発
3. 学会等名 第64回日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Y. Cui, A. Taguchi, K. Kobayashi, H. Shida, K. Takayama, A. Taniguchi, and Y. Hayashi
2. 発表標題 Development of solid-supported 4-fluorophenyl 3-nitro-2-pyridinesulfenate (Npys-OPh(pF)) as an efficient disulfide-forming agent
3. 学会等名 第57回ペプチド討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 志田 颯、田口 晃弘、小林 清孝、崔 岩、高山健太郎、谷口 敦彦、林 良雄
2. 発表標題 固相ワンボットジスルフィド駆動型環状ペプチド合成法の開発
3. 学会等名 日本薬学会 第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Y. Cui, A. Taguchi, K. Kobayashi, H. Shida, K. Takayama, A. Taniguchi, and Y. Hayashi
2. 発表標題 Development of 4-Fluorophenyl 3-Nitro-2-Pyridinesulfonate, Npys-OPh(pF) Resin as An Efficient Disulfide-Forming Reagent
3. 学会等名 第37回 メディシナルケミストリーシンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 崔 岩、田口 晃弘、小林 清孝、志田 颯、高山健太郎、谷口 敦彦、林 良雄
2. 発表標題 Development of solid-supported 4-fluorophenyl 3-nitro-2-pyridinesulfonate agent for efficient solid-phase disulfide ligation
3. 学会等名 第63回 日本薬学会 関東支部大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
---------	---------