

機能性疎水性ベンジルアルコール担体の開発 と液相ペプチド合成への応用

東京農工大学大学院

連合農学研究科 応用生命科学専攻 生物機能化学講座

若松 弘起

略語一覽

DART	Direct analysis in real time
DBU	1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene
DIPCI	<i>N,N</i> -Diisopropylcarbodiimide
DIPEA	<i>N,N</i> -diisopropylethylamine
DMAP	<i>N,N</i> -dimethyl-4-aminopyridine
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamide
HBTU	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethyl- <i>O</i> -(benzotriazol-1-yl)uronium Hexafluorophosphate
HOBt	1-Hydroxybenzotriazole
NMR	Nuclear magnetic resonance
ODS	Octadecylsilane
THF	Tetrahydrofuran
TLC	Thin layer chromatography

目次

1. 序論	2
2. 酸による発色性をもつ機能性担体の開発と液相ペプチド合成への応用	7
2-1. 緒言	7
2-2. 実験結果と考察	8
2-3. 結論	28
2-4. 実験項	29
2-5. スペクトルデータ	32
3. 適度な酸耐性と蛍光性をもつ機能性担体の開発と液相ペプチド合成への応用	38
3-1. 緒言	38
3-2. 実験結果と考察	40
3-3. 結論	65
3-4. 実験項	66
3-5. スペクトルデータ	69
4. 総括と展望	87
5. 謝辞	90
6. 使用機器	91
7. 本研究に関する出版物	92
8. 参考文献	93
9. NMR スペクトル	95

1. 序論

有機化学は、現在のモノづくりの最小単位といえる分子スケールで、目的のモノを設計し、手に入れることを可能にする。現代に至るまでに、新しい結合様式を生み出す合成法の開発や収率向上やスケールアップのような合成効率の向上、目的物を最小限の労力で取り出す分離精製技術の開発、自然界にあるモノや合成したモノを評価する分析技術の開発などが、様々な研究者によって行われてきた。自然界の現象の理解と模倣から始まり、今日では、化学的に分子を設計・合成して生命活動を制御することが可能になってきた。

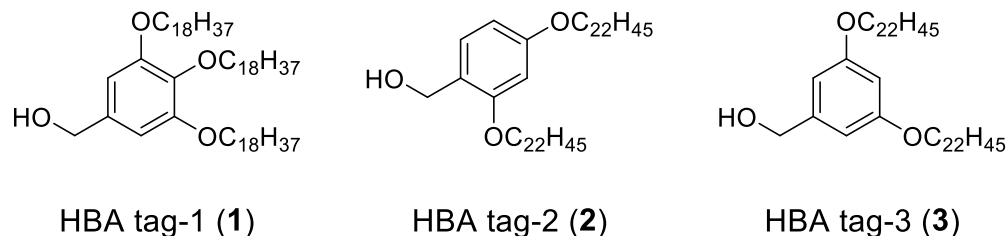
近年、創薬の候補分子として中分子と呼ばれる分子量500–5,000程度の核酸やペプチドが注目されている。¹ 従来の低分子医薬品は、有機合成化学的に安価に大量合成でき、経口投与が可能である一方で、特異性が低いために副作用が起こることが多く、その構造の多様性の限界や治療効果が得られない疾患領域があるなどの問題点がある。それとは対照的に、遺伝子工学的な手法の発展によって生まれた高分子のタンパク質医薬品は、非常に高い特異性をもつために副作用が少なく、また今までに有効な治療法がなかった難病へも応用を可能にしている。しかし、静脈投与が必要であることや免疫原性の可能性があること、巨大分子であるために細胞内タンパク質をターゲットにできないことに加え、開発コストが高いために供給面でも課題がある。これら低分子と高分子の両方の利点を併せ持つとして期待されているのが、中分子医薬品であり、その合成研究が広く行われている。

核酸やペプチドは、それぞれヌクレオチド、アミノ酸をビルディングブロックとして、それらの繰り返し構造をもつ。基本的な合成は脱保護と縮合を繰り返すだけであるために、各反応段階での回収率や収率などの効率向上が重要な課題になる。1963年にMerrifieldが、分子を不溶性の樹脂の上に結合させ、反応完結後に洗い流すだけで、目的物の分離精製を行う固相合成技術を開発し

てから、核酸やペプチドの自動合成やコンビナトリアル合成が可能となった。² このように、目的のものを人の手を介さずに自動的に合成することは有機合成化学の究極の目標である。しかし、固相合成法は不均一触媒の利用ができないなどの潜在的な制限や均一系の合成法で培ってきた様々な知識や経験を活かせないといった課題もある。また反応をモニタリングするためには、一度固相担体上から切り出す必要があることや、不均一系のため反応効率が悪く多量の反応試薬が必要であるためコストが高くなってしまうなどの問題点も抱えている。

一方で、不溶性の樹脂ではなく可溶性のポリマーを担体として用いた化学合成法も発展してきた。³ ポリエチレングリコール (PEGs) のような可溶性のポリマーを目的物に結合させ、反応をポリマーの溶解する均一系で行った後、貧溶媒を加えることで、目的物とともに沈殿させ、固体として回収を行う。⁴ 固相法の反応効率の低さを克服し、TLCやNMR, MSでの反応モニタリングが可能となる一方で、厳密な溶解性の制御が重要な課題である。1%の損失が数十段階後には著しい収率の低下を招いてしまうため、必要なときには十分溶解し、回収時には固体として1%未満の損失で回収する必要がある。我々の研究室では、Scheme 1-1 が示すような疎水性ベンジルアルコールもしくはベンジルアミンを可溶性担体として用いたペプチド合成を開発してきた。⁵ ペプチド合成において反応試薬であるアミノ酸や縮合剤などが極性物質であるために、それらを各反応終了後に洗い流すには、極性溶媒に対して不溶である可溶性担体が必要であり直鎖の長鎖アルキル鎖を用いている。本ベンジルアルコール担体 (Hydrophobic Benzyl Alcohol tag: HBA tag) は、可溶性ポリマーと比較すると低分子量であるために、担体重量当たりの目的物の担持量が大きい。分子量20,000程度で反応点が2つあるPEGsの場合、約0.10 mmol/gであるのに対して、HBA tag-2の場合、1.3 mmol/gと10倍ほどである。⁴ またベンジルアルコールを基本骨格とした利点に、構造が単純であるため低コストで市販の出発原料からの合成が可能であることに加えて、芳香族の置換位置によってベンジルエステルの反応性を制御できる点が挙げられる。

Scheme 1-1. 従来の疎水性ベンジルアルコール担体の構造

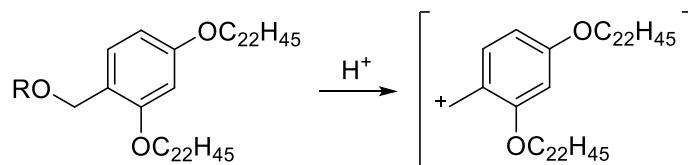


2,4 位に docosyloxy 基を有する HBA tag-2 (2) は, 1%の trifluoroacetic acid (TFA) でも容易に脱保護することが可能である. これは, 脱保護反応の中間体であるベンジルカチオンが, 2,4-位の電子供与基である長鎖アルコキシ基により安定化されるからである. 他のアミノ酸の保護基を保持したまま担体を切り離すことができるため, フラグメント縮合が可能である. この特性を利用して, 28 個のアミノ酸からなるペプチドであるヒトの h-Ghrelin を 4 つのフラグメントに分割して合成し, それらを縮合させることで, 効率的な合成を達成している.^{5e} 一方で, 3,5 位に同様の置換基を有する HBA tag-3 (3) では, 100%の TFA においてもその脱保護反応は非常にゆっくりとしか進行しない. 一般的なペプチド合成は, Fmoc 法という N 末端を Fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc) で保護されたアミノ酸を基質として, 塩基による Fmoc 基の脱保護と Fmoc アミノ酸の縮合を繰り返す方法が用いられる. しかし, Fmoc 法では, 脱保護時の塩基性条件下において, ペプチド配列内に Asp がある場合の aspartimide 形成^{6a} や C 末端からの 2 残基以内に Pro がある場合の diketopiperadine 形成^{6b} などの可能性があり, それらの配列を有するペプチド合成は困難である. そうした場合, Boc 法という *tert*-butyloxycarbonyl (Boc) によって N 末端を保護したアミノ酸を基質として用いる方法が適用される. Boc 基は, 強塩基性や還元条件において比較的強い安定性をもつ一方で, TFA や HCl のような強酸によって脱保護される. 強酸条件下で脱保護されるために, aspartimide 形成や diketopiperadine 形成の心配はないが, 担体には強い酸耐性が求められる

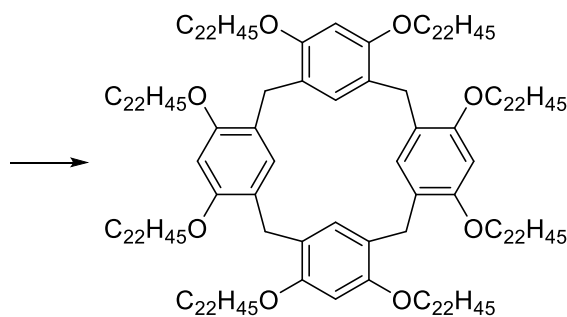
る。HBA tag-3 (3) の強い酸耐性を利用することで、Boc 法の適用が可能となり、15 個のアミノ酸からなり C 末端に Pro をもつ TNF- α antagonist を、Boc 法と Fmoc 法を組み合わせることで、27 段階、収率 70%で得ることに成功している。⁶ このように、特に精密な溶解性制御が求められている中、可能な限りシンプルな基本骨格を保ちながら酸耐性の大きく異なる担体を開発し、実用的な様々なペプチド合成が達成されてきた。

さらに、2,4-置換の HBA tag-2 (2) は、穏和な酸による脱保護が可能なることに加えて TLC 上および酸性条件下での溶液が鮮やかな赤紫色に発色することが報告されている。^{5d} 実験手法上ではあるが、TLC 上でペプチド部分の構造に依存せずに発色することは、反応モニタリングにおいて非常に有用である。TLC 上および酸性条件下の溶液において担体結合ペプチドから切り出された 2,4-アルコキシベンジルカチオンが 4 量体のレゾルシンアレーン誘導体を形成し発色していると推定されている (Scheme 1-2)。その発色機構は、TFA との複合体形成により、化合物の立体構造が平面構造へと固定化されるためであると報告されているが、定かではない。⁷ このようなペプチド配列に依存しない発色は、その発色の程度を利用した定量法への応用が期待される。特にペプチドの定量検定には標準品を用いた UV の吸光度測定が一般的であるが、新規配列のペプチドの場合、標準品が存在しないため、その定量は困難である。ここで HBA tag-2 由来のレゾルシンアレーン誘導体 (4) の発色を利用した定量法が考えられるが、溶解性が非常に低いために、溶液中での正確な定量は行うことができない。一方で、3,5-型の HBA tag-3 では、酸による脱保護時に発色はほとんど見られない。これは、ベンジルカチオンの安定性が低いために発色性を持つような多量体を形成する前に、ベンジルカチオンが捕捉されてしまうからだと推測できる。このような置換配置による発色特性の変化から、より優れた発色性などの機能をもつ置換配置があると予測した。

Scheme 1-2. HBA tag-2 (2) の酸による発色反応



R = H or peptide



4

本研究では、芳香族の置換配置によるベンジルエステルの特性の変化に着目し、長鎖アルコキシ鎖の置換配置を検討し、担体の溶解性に影響を与えずに発色性や蛍光性といった新たな機能をもつ置換配置を見出した。また発色や蛍光特性を有する原因についても解明した。さらに、3,5-型よりもより穏和な条件下で担体を脱保護でき、かつ Boc 法への適用にも耐える実用的な長鎖アルコキシ鎖の置換配置を見出した。

第二章では、酸による脱保護時に鮮やかな発色性を示し、その発色原因物質の溶解性が高いために比色定量を可能とする担体の開発とそのペプチド合成への応用について述べる。

第三章では、Boc 法への適用も可能であることに加えて、穏和な酸条件で脱保護可能であり、かつ酸による発色性や蛍光性をもつ担体の開発と、その蛍光性をもつ原因について解析する。さらに、その蛍光性を利用した定量法の開発と Boc 法と Fmoc 法を併用したペプチド合成への応用について述べる。

2. 酸による発色性をもつ機能性担体の開発と液相ペプチド合成への応用

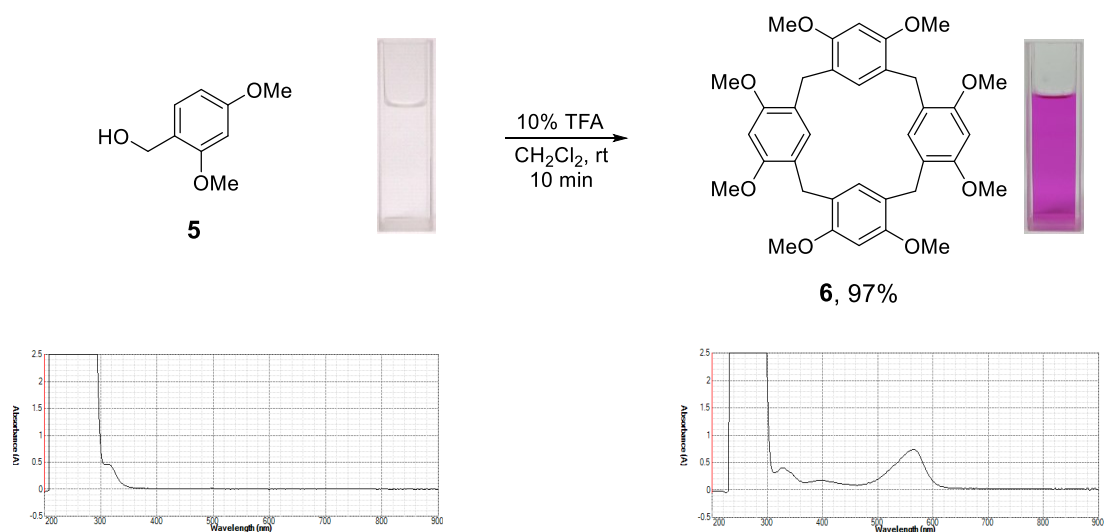
2.1. 緒言

可溶性担体を用いた化学合成において、精密な溶解性の制御がもっとも重要な要素である。溶解性への影響を与えずに、発色や蛍光などの機能を付与することができれば、反応完結の検出などの反応モニタリング、担体が結合した分子の所在の確認やその簡便な定量など、従来の可溶性担体化学にはない機能の獲得が期待される。一般的に他の結合様式の吸収波長と被らないような定量可能な発色性や蛍光性を分子が獲得するには、より長い共役二重結合を分子内に有するか⁸、共役系に加えて電子を押し出す官能基 (push) と電子を受け取りやすい官能基 (pull) を分子内に同時に有する必要がある。⁹ しかし、長い共役二重結合は溶解性の低下を招く可能性がある。また push-pull 系の構築には、反応性の高い官能基が必要なことから、精密な溶解性の制御と多種多様な反応に対して不活性である必要のある可溶性担体には適用することが非常に難しい。一方で、ベンジルアルコールという単純な基本骨格を保ったままであれば、その溶解性に影響を与えない可能性が高い。2,4-置換の HBA tag-2 (2) が酸条件下において発色性をもつ難溶性のオリゴマーを形成することと、3,5-置換においてはほとんど発色性を示さないことから、長鎖アルコキシ基の置換位置と発色性との関係に着目し、他の長鎖アルコキシ基の置換配置において、より優れた溶解性をもつ発色性オリゴマーを形成する可能性があると考え、各置換配における発色性の検討を行った。

2-2. 実験結果と考察

まず、HBA tag と類似した構造をもつ methoxybenzyl alcohol を担体モデルとして、置換様式が異なる基質の酸への反応性と形成物質の発色性を検討することとした。溶媒に dichloromethane を用い、酸は 10% (v/v) になるように TFA を加え室温下で 10 分間反応させた。期待した通りに、2,4-置換のものは、HBA tag-2 (2) と同様に、収率 97% で 4 量体のレゾルシンアレーン誘導体 (6) を形成し、鮮やかな赤紫色を示した。長鎖アルコキシ基の有無にかかわらず、同様の反応が進行することを確認した。

Scheme 2-1. 2,4-dimethoxybenzylalcohol (5) の発色反応と反応液の写真 (30 mM) と UV-Vis 吸収スペクトル (10 mM in 10% TFA/CH₂Cl₂)



続いて、2つもしくは3つアルコキシ基をもつ各種置換体の中で、可溶性担体への出発原料の hydroxybenzaldehyde もしくは hydroxybenzoic acid として市販されている置換様式の基質を担体の候補とした (Figure 2-1—2-6)。各種置換様式の dimethoxybenzyl alcohol を、同様に TFA を用いて酸処理した結果、2,3-置換は発色性を全く示さなかった (Figure 2-1)。一方で、2,5-置換は鮮やか

な緑色を (Figure 2-2), 3,4-置換は紫色を示した (Figure 2-3). しかし DART-MS により, それぞれ 3 量体, 5 量体が形成されていることが示唆されたため, 溶解性の向上は期待できないと推察した.

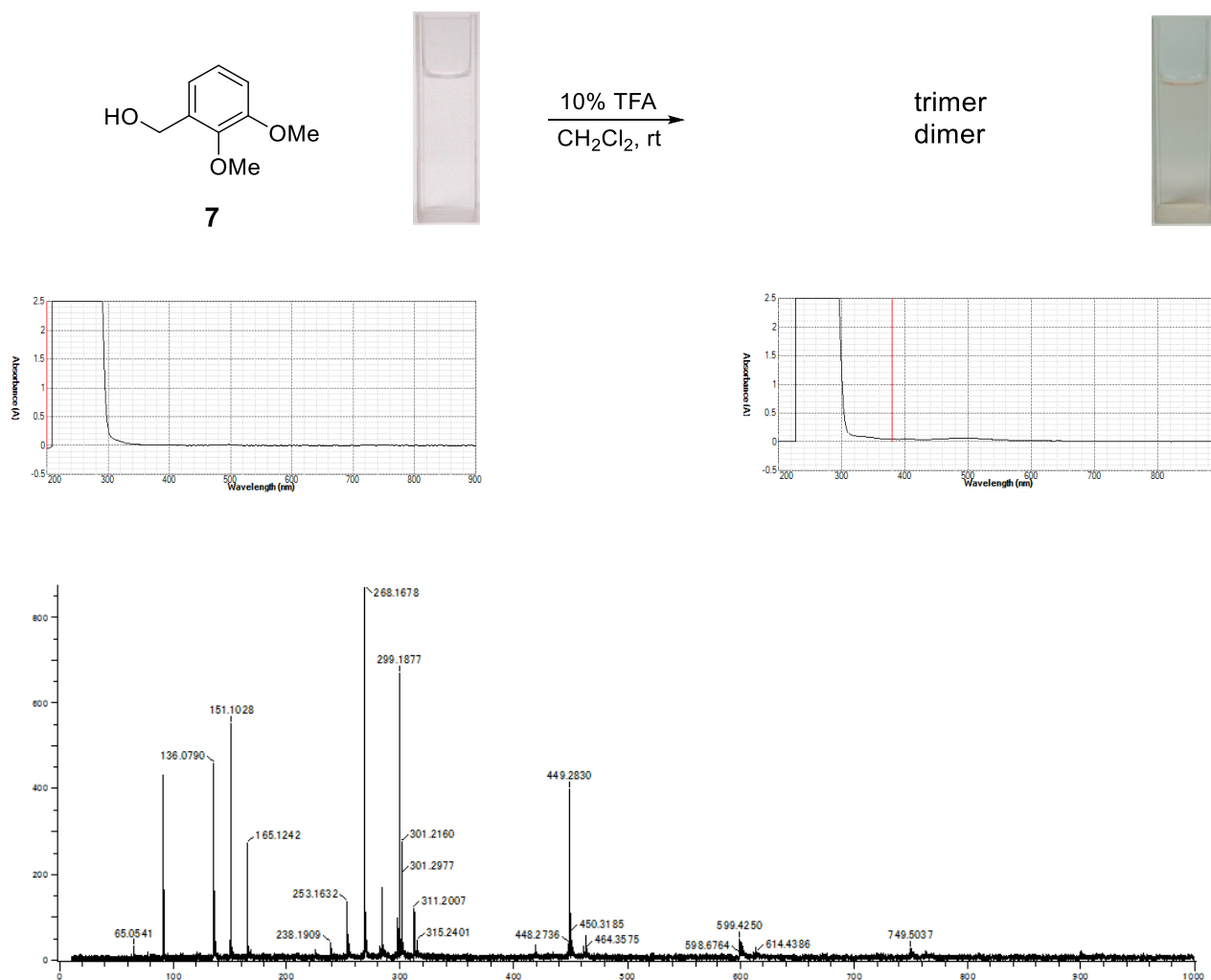


Figure 2-1. 2,3-dimethoxybenzyl alcohol (7) の UV-Vis 吸収スペクトル (above, 10 mM in 10% TFA/CH₂Cl₂) と MS スペクトル (DART mode, below). *m/z* 450 と 301 がそれぞれ 3 量体と 2 量体と帰属.

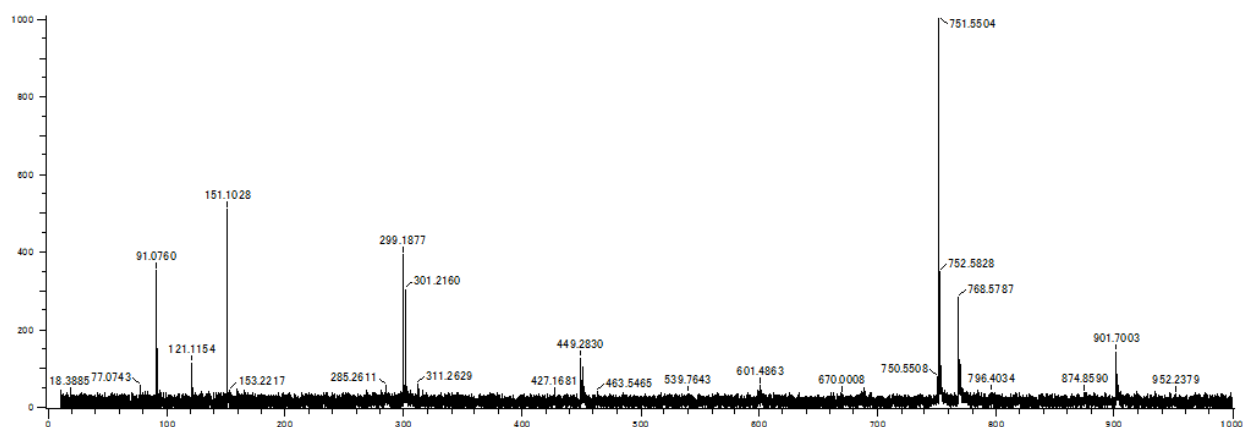
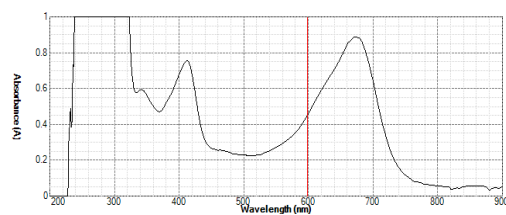
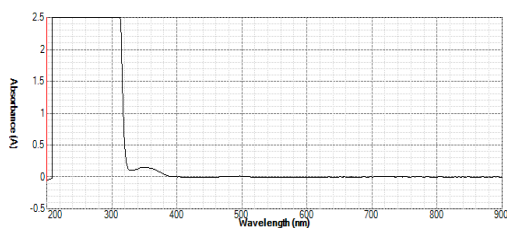
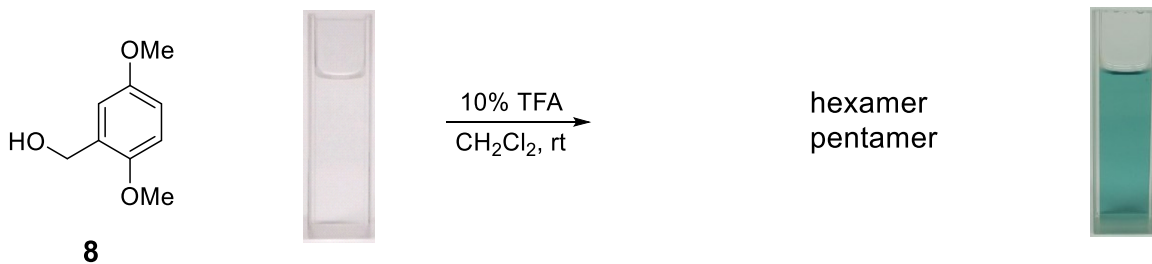


Figure 2-2. 2,5-dimethoxybenzyl alcohol (**8**) の UV-Vis 吸収スペクトル (above, 10 mM in 10% TFA/ CH_2Cl_2) と MS スペクトル (DART mode, below). m/z 901 と 752 がそれぞれ 6 量体と 5 量体と帰属。

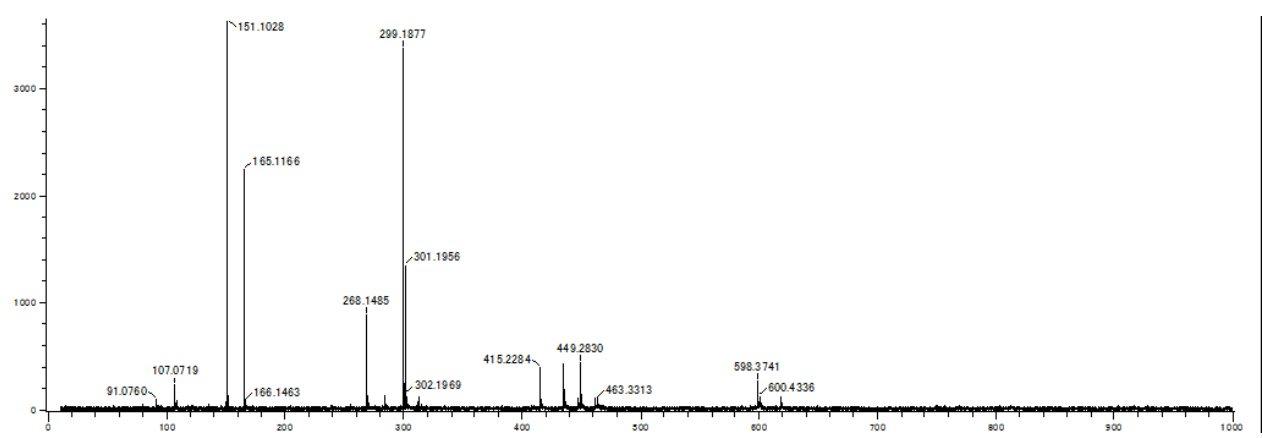
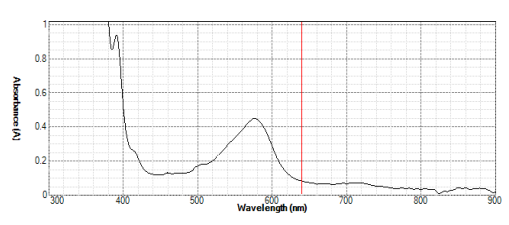
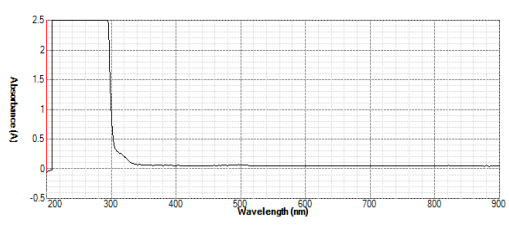
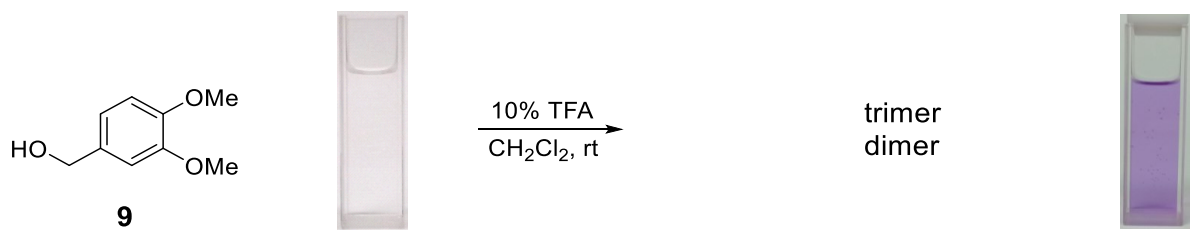
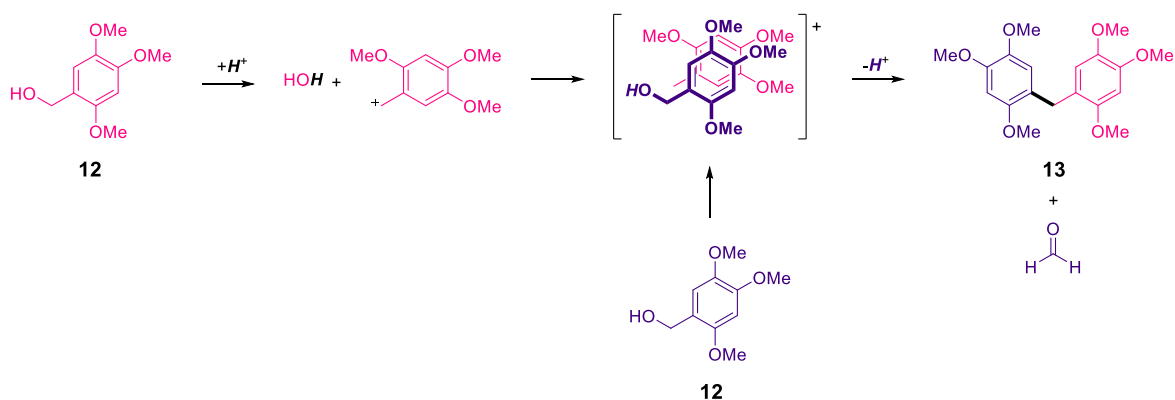


Figure 2-3. 3,4-dimethoxybenzyl alcohol (9) の UV-Vis 吸収スペクトル (above, 10 mM in 10% TFA/CH₂Cl₂) と MS スペクトル (DART mode, below). *m/z* 449 と 302 がそれぞれ 3 量体と 2 量体と帰属.

次に trimethoxybenzyl alcohol を探索した結果、2,4,6-置換はオレンジ色に発色したが、5 量体、6 量体の形成が示唆され、同様に溶解性の向上は期待できないと考えた (Figure 2-4)。2,3,4-置換は、全く発色性を示さなかった (Figure 2-5)。一方で、2,4,5-置換のものが非常に濃い鮮やかな青色を示すことがわかった (Figure 2-6)。このとき、TFA を加えた瞬間に反応液が濃い青色に染まることから、反応性も高いことがわかった。発色物質を解析したところ、脱アルキル反応を伴うイプソ置換による 2 量体 (**13**) が形成されており、わずか 1 分で 97% の収率で発色物質である 2 量体を得ていることがわかった。2 量体であるため、4 量体レゾルシンアレーン誘導体よりも高い溶解性が期待された。詳細な反応機構は不明であるが、Scheme 2-2 に示すように reverse Friedel-Crafts アルキル化反応を経て、脱アルキル化反応を伴うイプソ置換反応が生じ、ホルムアルデヒドが形成されることで二量体を得られたと推測している。同様の 2 量体化合物の合成は、既に報告されており、Lewis 酸触媒を用いアルキル基を求電子的に導入する Friedel-Crafts アルキル化を用いるか^{10a}、レーザーフラッシュフォトリシス法により、2,4,6-triphenylpyrylium tetrafluoroborate (TPP) を活性化させルイス酸触媒として用い、ベンジルカチオンを経由して化合物 **13** を形成させて得ていた。^{10b} しかし、前者は別の反応経路であり、後者はわずかに 7% の収率であった。また先行文献には、発色性についても言及がなく、化合物 **13** が鮮やかな発色を示すことを本研究において発見した。

Scheme 2-2. 予想される二量体形成の反応経路



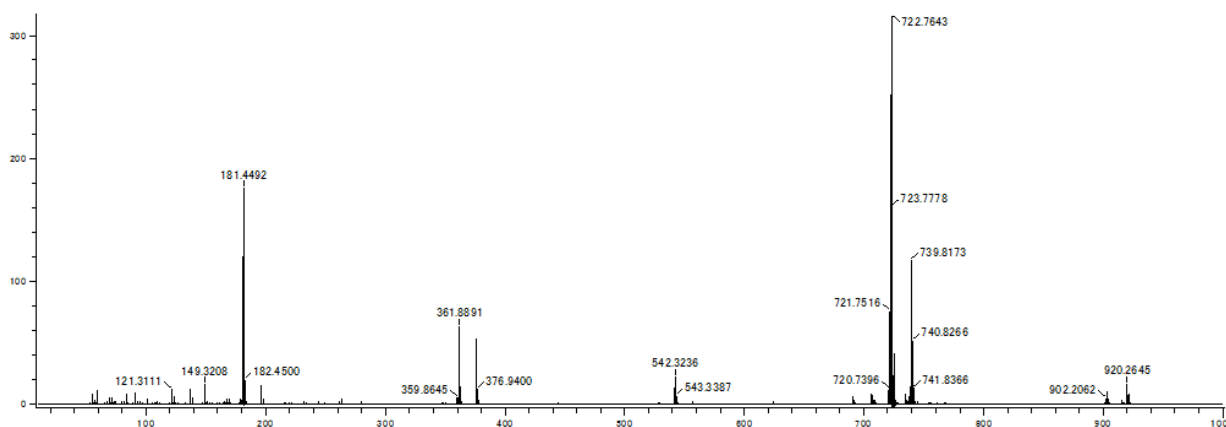
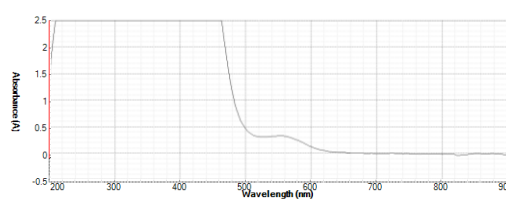
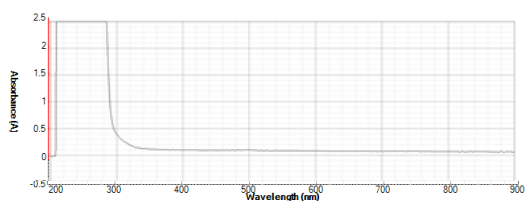
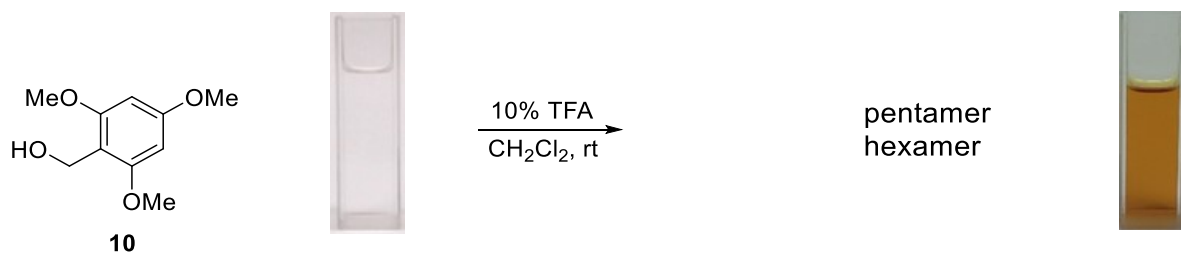


Figure 2-4. 2,4,6-trimethoxybenzyl alcohol (**10**) の UV-Vis 吸収スペクトル (above, 10 mM in 10% TFA/CH₂Cl₂) と MS スペクトル (DART mode, below). *m/z* 722 と 902 がそれぞれ 5 量体と 6 量体と帰属.

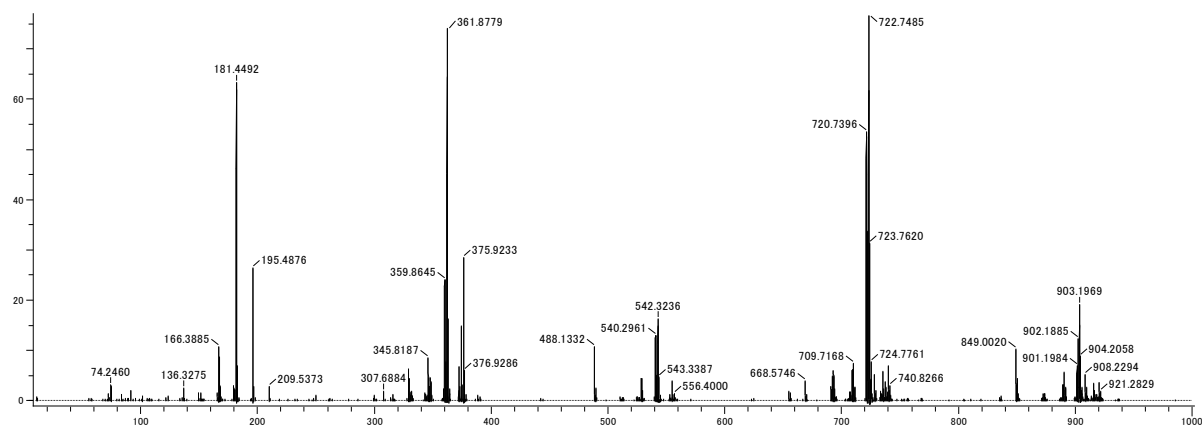
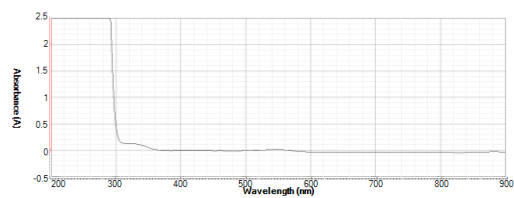
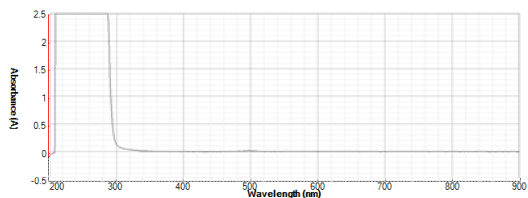
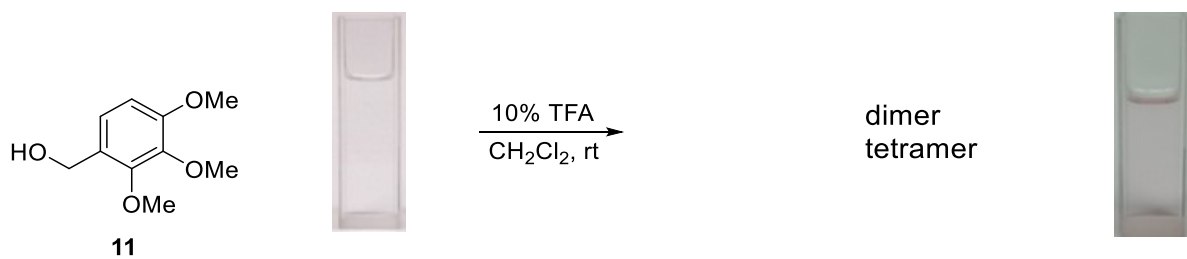


Figure 2-5. 2,3,4-trimethoxybenzyl alcohol (**11**) の UV-Vis 吸収スペクトル (above, 10 mM in 10% TFA/CH₂Cl₂) と MS スペクトル (DART mode, below). *m/z* 722 と 361 がそれぞれ 5 量体と 2 量体と帰属.

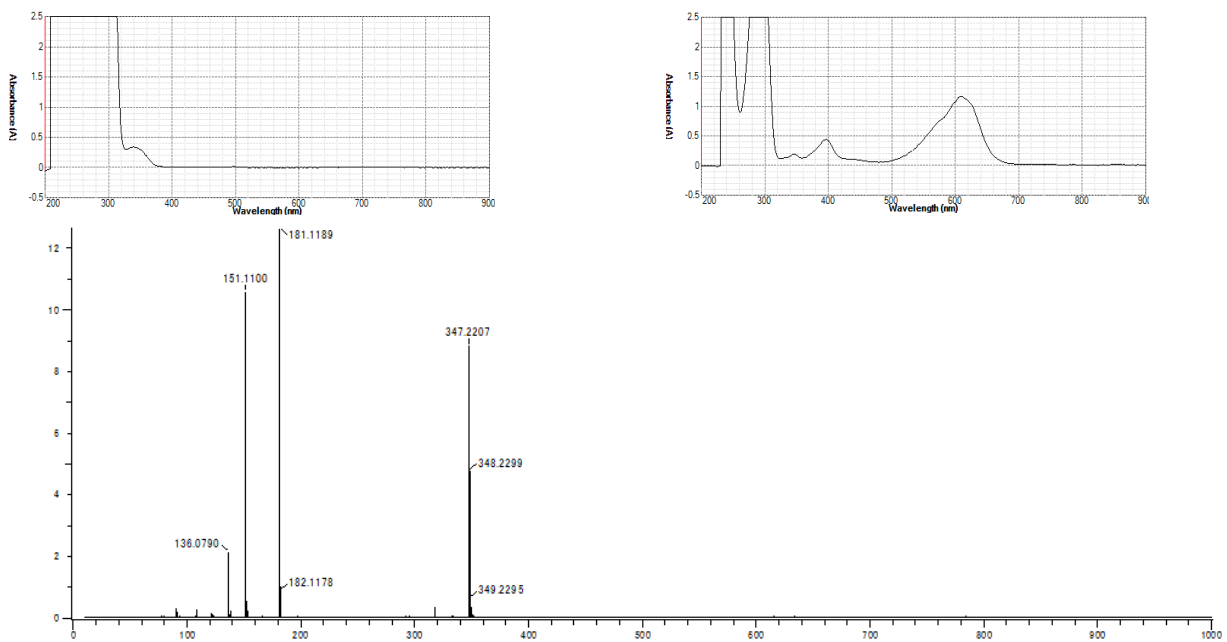
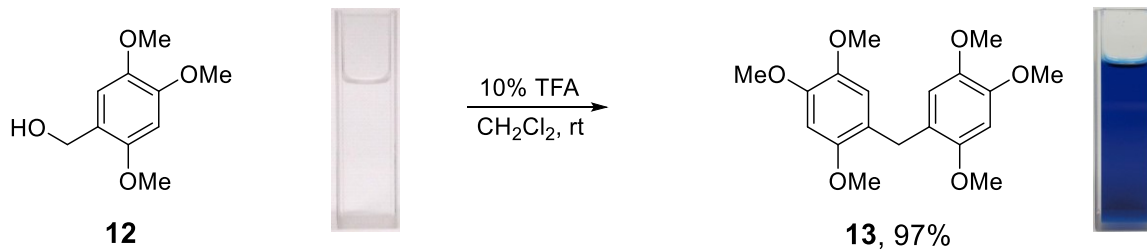
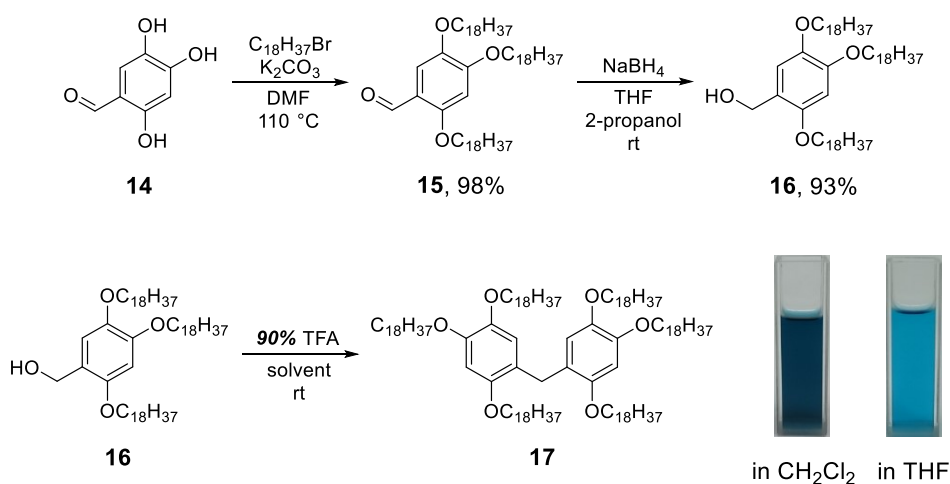


Figure 2-6. 2,4,5-trimethoxybenzyl alcohol (**12**) の UV-Vis 吸収スペクトル (above, 10 mM in 10% TFA/CH₂Cl₂) と MS スペクトル (DART mode, below). *m/z* 349 が 2 量体と帰属.

以上の結果より、2,4,5-位に長鎖アルコキシ基をもつ疎水性ベンジルアルコール担体が鮮やかな発色性と溶解性の高い発色性のオリゴマーを形成すると期待して、HBA tag-4 (**16**) を合成した。出発原料 2,4,5-trihydroxybenzaldehyde (**14**) を、脱水 DMF 中、炭酸カリウム存在下で、1-bromooctadecane と反応させることで、アルキル化を行った (収率98%)。その後 THF と 2-propanol 中で、NaBH₄ を用いて alcohol へと還元し、目的物である 2,4,5-trioctadecyloxybenzylalcohol (HBA tag-4, **16**) が収率 93% で得られた (Scheme 2-3)。酸による発色機能を検討したところ、期待したように鮮やかな青色を示した。このとき、より迅速な発色反応が定量検定において重要であるため、90% の TFA を用いて反応を行い、その後 3 倍希釈を行った。以降の発色反応では同様の操作を行っている。また溶媒に THF を用いると、溶解性がよく、より鮮やかな発色を示すことを確認したため ($\lambda_{\max} = 612 \text{ nm}$)、反応溶媒および希釈溶媒として THF を用いることとした。また、このとき得られたクルードの二量体 (**17**) の純度は、順相カラムを用いて HPLC 測定したところ 70–80% であった。

Scheme 2-3. HBA tag-4 (**16**) の合成と発色性の確認 (基質濃度 1 mM)。



ここで、HBA tag-2 由来の 4 量体レゾルシンアレーン誘導体 (**4**) と 2 量体 (**17**) の溶解性を比較するために、化合物 **4** と **17** がそれぞれ dichloromethane に 1 mM、THF に 2 mM になるように

TFA を用いて発色反応させ、各溶媒で希釈した。発色物質 **4** と **17** の物質量を同じ濃度にしたため、基質の HBA tag の濃度は、化合物 **4** の方が 2 倍である。しかし、化合物 **4** と **17** とでは明確な差が見られ、それぞれの溶媒において、化合物 **4** は沈殿が見られるものの、化合物が **17** は溶解していた。このことから当初の目的である溶解性の向上が確認された (Figure 2-7)。また発色性の持続性を確認したところ、24 時間後でも発色性に差は見られず、酸性条件下において非常に安定な発色性を示すことがわかった (Figure 2-8)。

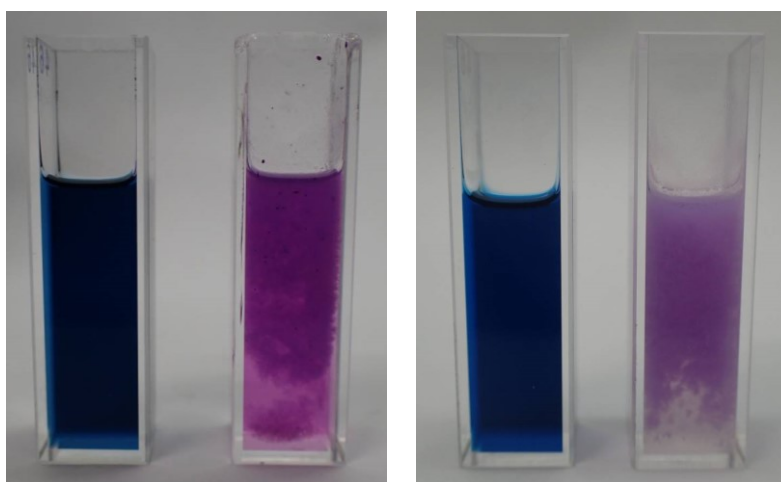


Figure 2-7. 二量体 (**17**) とレゾルシンアレーン誘導体 (**4**) の dichloromethane 中の発色 (left, 発色物質濃度 1 mM in 30% TFA) と THF 中の発色 (right, 発色物質濃度 2 mM in 30% TFA) の様子。

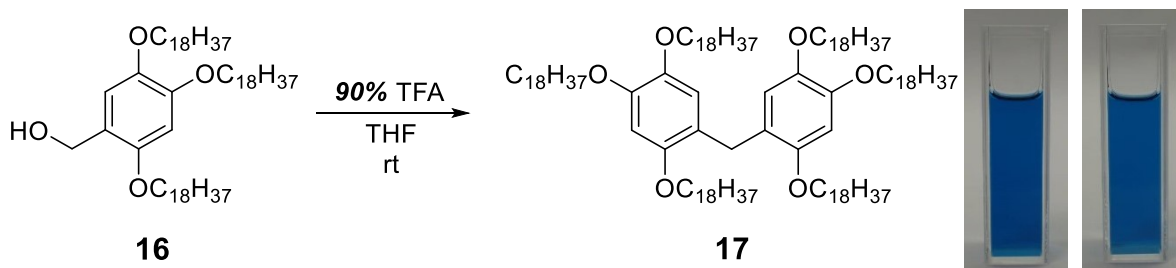


Figure 2-8. HBA tag-4 (**16**) の酸による発色反応の持続性の確認 (left, 10 min, right, 24 h, 基質濃度 1 mM in 30% TFA/THF)。

期待した通り優れた発色性と溶解性の高さを確認できたため、続いて発色性を利用した定量法へ

と応用できるかを検討した。定量検定では HBA tag のエステル結合からの二量体形成が必要である。そこで、5 残基の β -sheet breaker peptide iA β 5 (**18**, H-Leu-Pro-Phe-Phe-Asp-OH) をモデルペプチドとして、その構成アミノ酸それぞれに HBA tag を結合させた後 (Fmoc-AA-HBA tag-4 (**19**—**22**)), 酸による発色性を用いて検量線を作成した (Figure 2-9)。この際に、安定した発色を得るために、THF 中、90%TFA で 10 分間反応させた後に、THF を用いて希釈し、すぐに UV-Vis 吸収スペクトルを測定した。その結果、いずれの基質においても類似した吸収波長 ($\lambda_{\max} = 612 \text{ nm}$) を示し、0.2-1.0 mM の範囲において良好な直線性を示した。また吸光度も多少のばらつきはあるものの各濃度で近い値を示した。これによりアミノ酸配列に依存せずに発色することが期待された (Figure 2-9)。また、各発色反応において二量体形成が行われていることを MALDI-MS によって確認した。(Figure 2-10—2-14)。

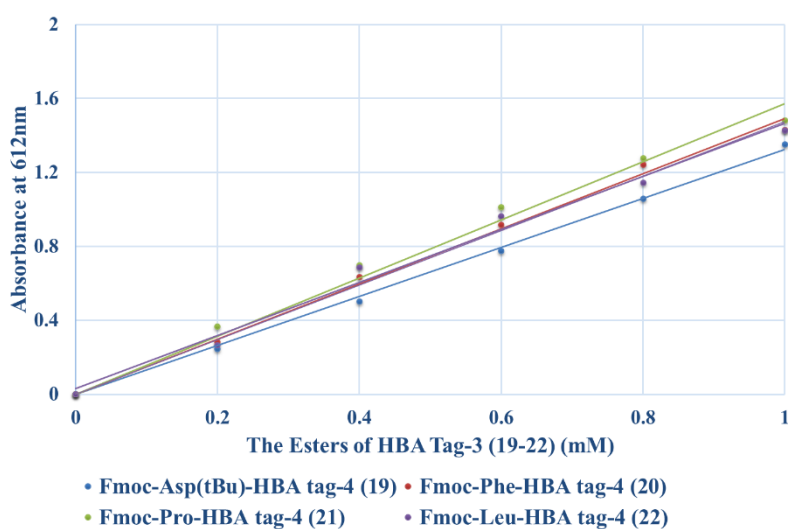


Figure 2-9. HBA tag-4 の酸による発色を用いた検量線(Fmoc-AA-HBA tag-4 (**19**—**22**))

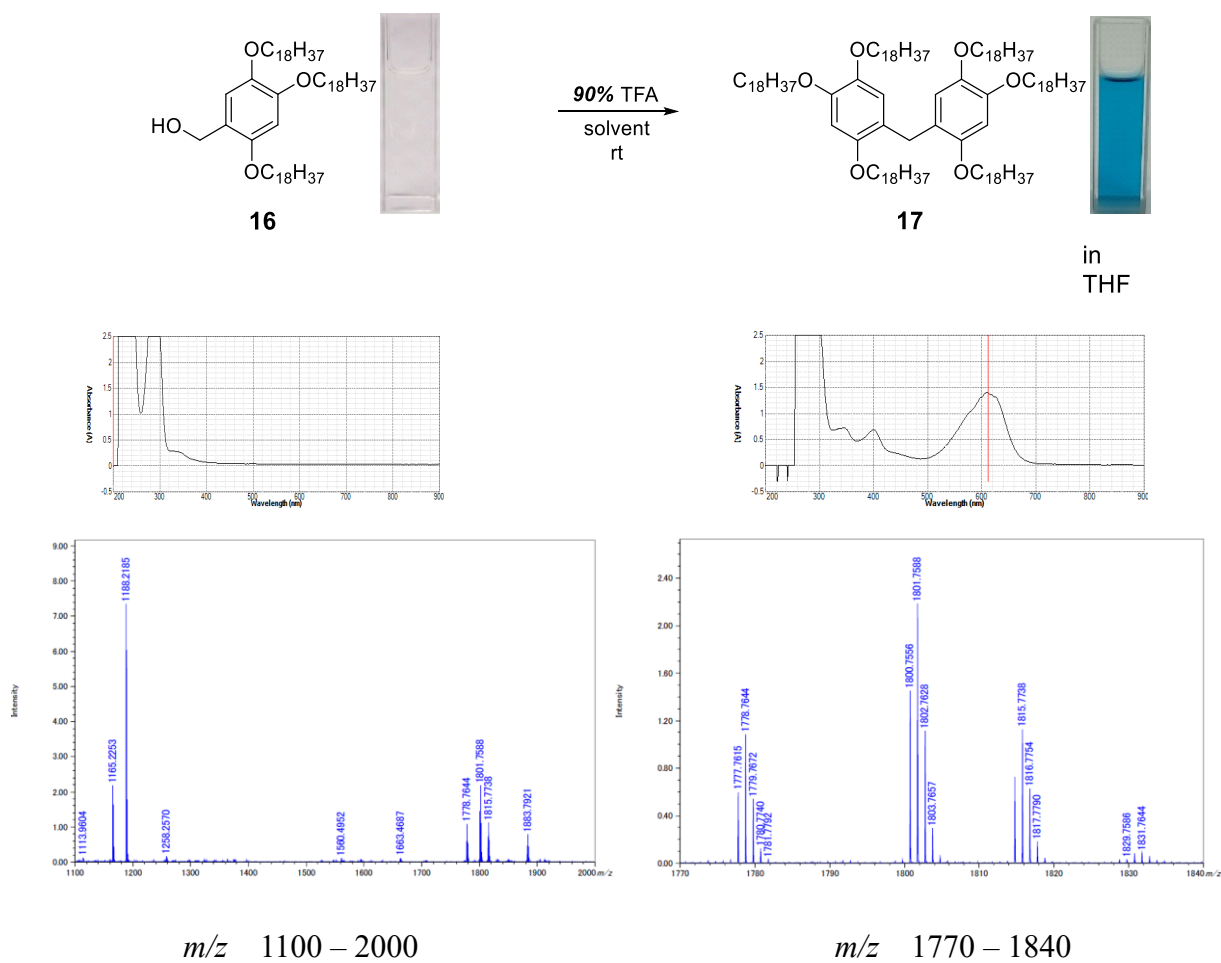
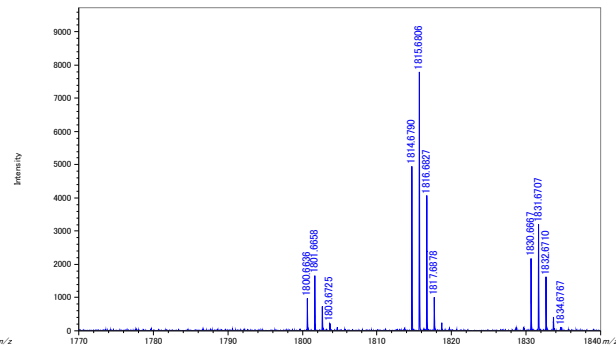
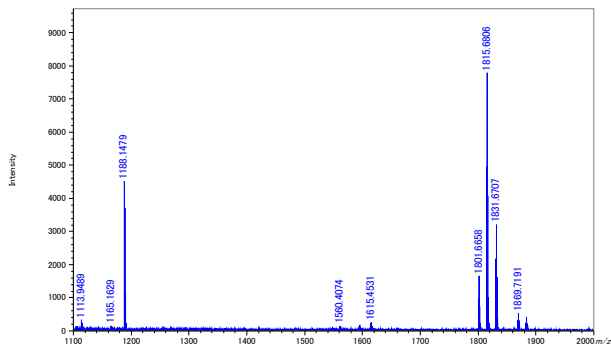
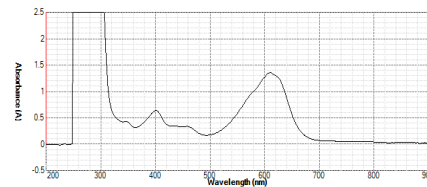
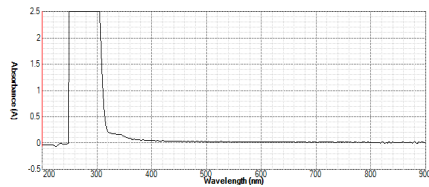
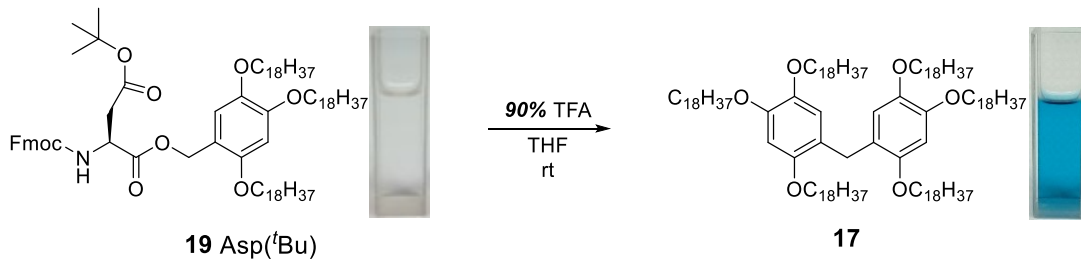


Figure 2-10. HBA tag-4 (**16**) の UV-Vis 吸収スペクトル (above, 1 mM in 30% TFA/THF) and MS (MALDI mode, below) スペクトル. m/z 1800 を二量体 (Na^+ , **17**) と帰属.



m/z 1100 – 2000

m/z 1770 – 1840

Figure 2-11. Fmoc-Asp(^tBu)-HBA tag-4 (**19**) の UV-Vis 吸収スペクトル(above, 1 mM in 30% TFA/THF) and MS (MALDI mode, below) スペクトル. m/z 1800 を二量体 (Na^+ , **17**) と帰属.

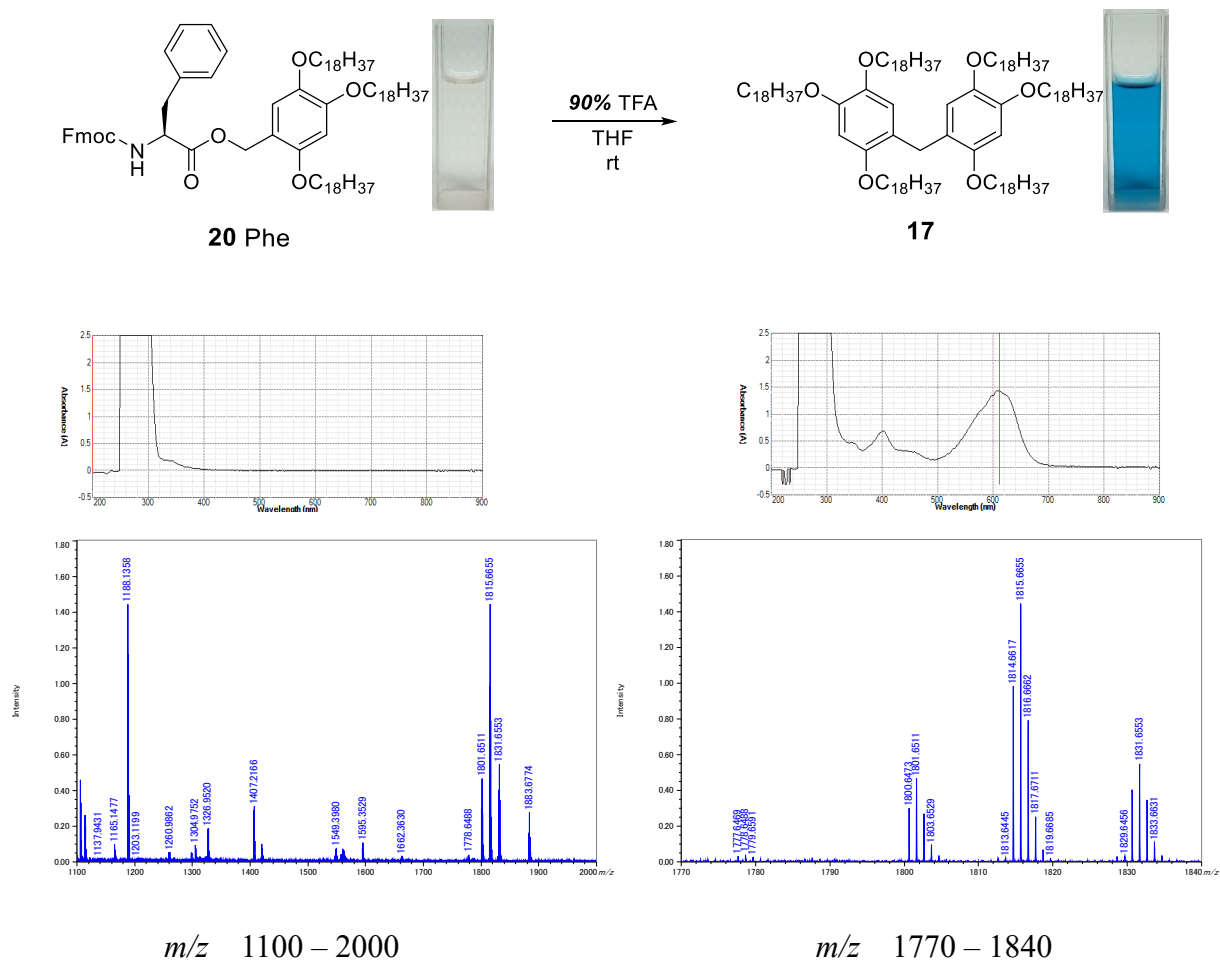
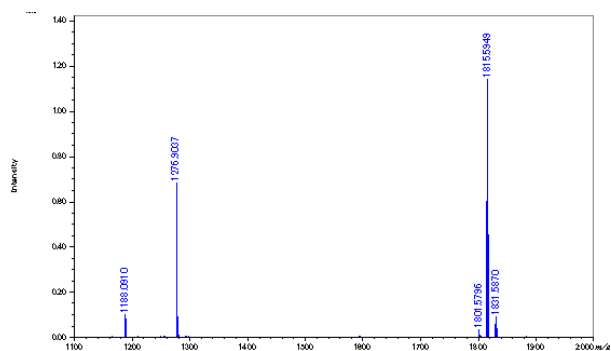
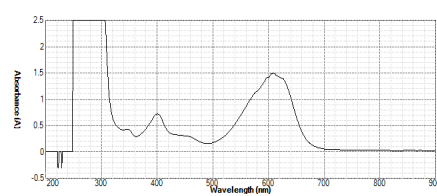
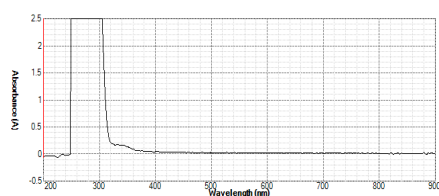
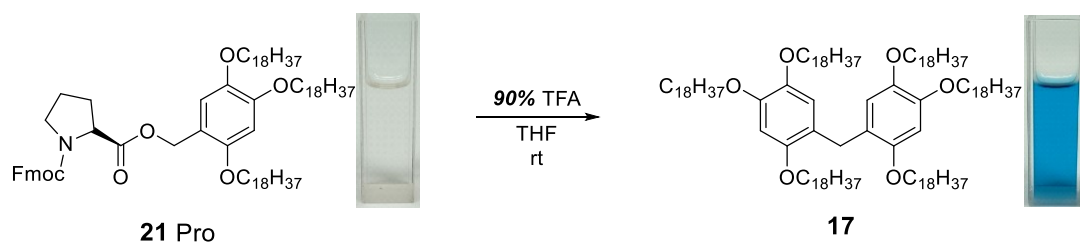
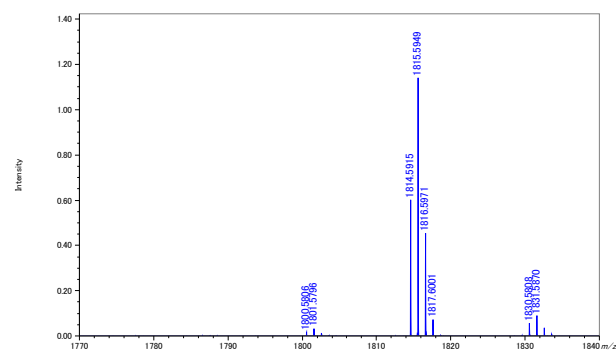


Figure 2-12. Fmoc-Phe-HBA tag-4 (**20**) の UV-Vis 吸収スペクトル (above, 1 mM in 30% TFA/THF) and MS (MALDI mode, below) スペクトル. m/z 1800 を二量体 (Na^+ , **17**) と帰属.

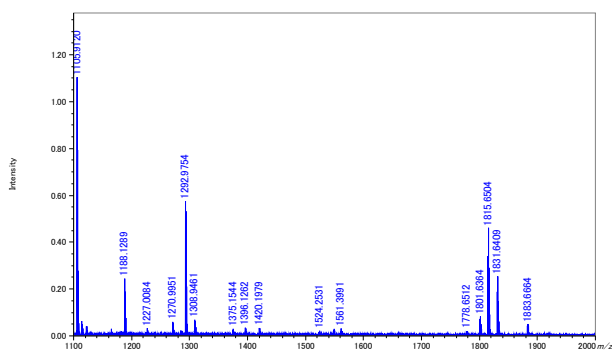
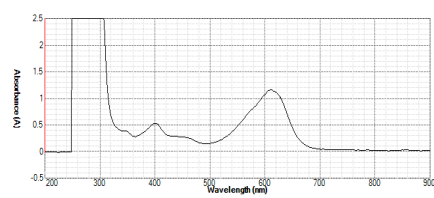
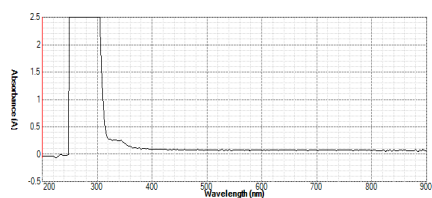
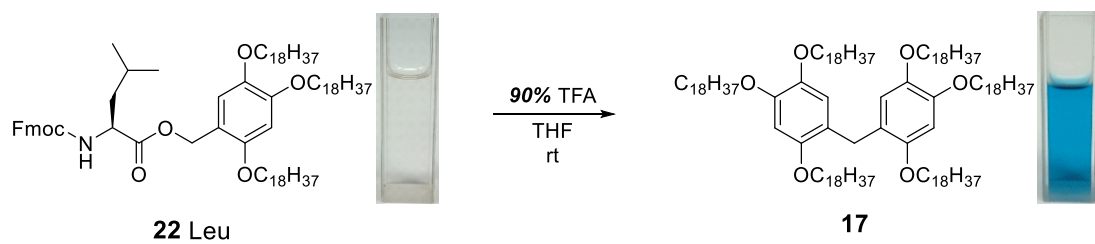


m/z 1100 – 2000

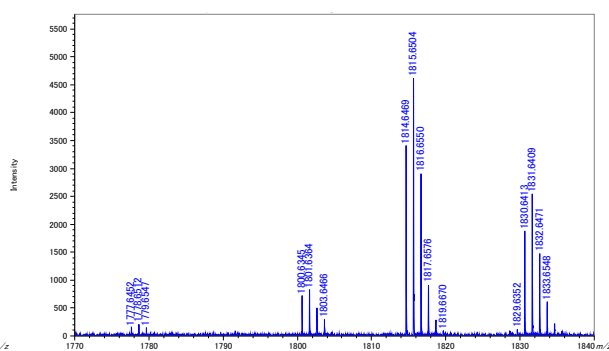


m/z 1770 – 1840

Figure 2-13. Fmoc-Pro-HBA tag-4 (**21**) の UV-Vis 吸収スペクトル (above, 1 mM in 30% TFA/THF) and MS (MALDI mode, below) スペクトル. m/z 1800 を二量体 (Na^+ , **17**) と帰属.



m/z 1100 – 2000

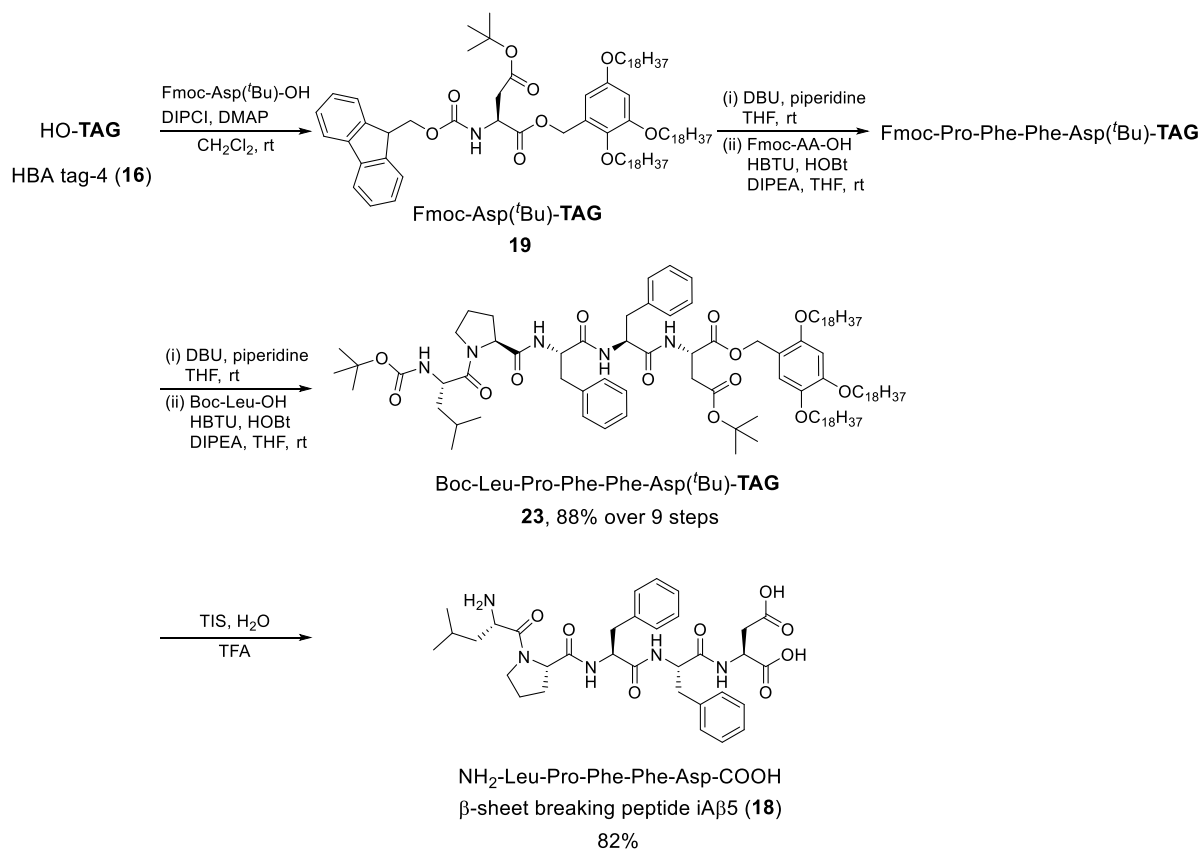


m/z 1770 – 1840

Figure 2-14. Fmoc-Leu-HBA tag-4 (**22**) の UV-Vis 吸収スペクトル (above, 1 mM in 30% TFA/THF) and MS (MALDI mode, below) スペクトル. m/z 1800 を二量体 (Na^+ , **17**) と帰属.

続いて、HBA tag-4 (**16**) を用いて、 β -sheet breaker peptide iA β 5 (**18**) を合成し、HBA tag の溶解性や沈殿特性と配列が伸びた場合の発色性を確認した (Scheme 2-4)。合成法は、我々の研究室で一般的に用いられている Fmoc ペプチド合成法を用いて、1%DBU, 1%piperidine による Fmoc 基の脱保護と HBTU, HOBT, DIPEA による Fmoc アミノ酸の縮合反応を繰り返すことで目的配列を 9 段階、収率 88% で得た (純度は HPLC にて確認, Figure 2-15)。その後、95%TFA, 2.5%TIS, 2.5% H_2O を用いて、全脱保護を行い、収率 82% で β -sheet breaker peptide iA β 5 (**18**, Figure 2-16) を得た。また反応過程において、TLC 上においても担体が結合した化合物は鮮やかな青色に発色していた (Figure 2-17)。

Scheme 2-4. ペプチド 18 の HBA tag-4 (**16**) を用いた合成



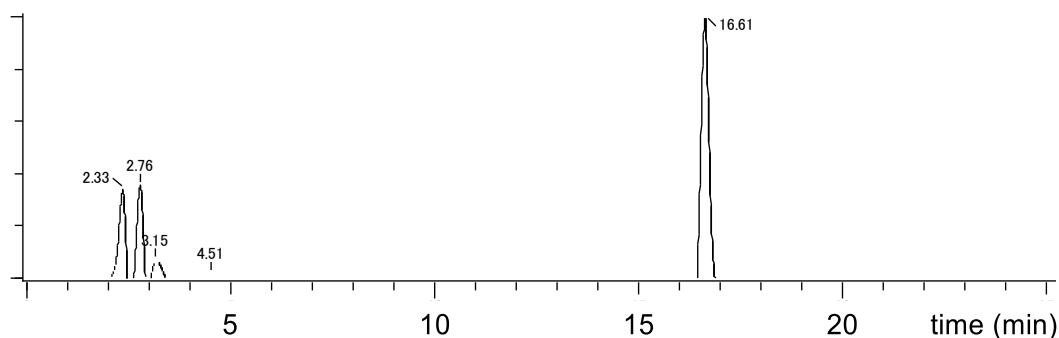


Figure 2-15. HPLC UV-Vis 吸収スペクトル (190-950 nm, Agilent 1200 Infinity series). C_8 カラムを用いた。水系溶媒は 0.1% TFA を含む H_2O , 有機系溶媒は, THF : Acetonitrile = 8 : 2 の溶媒を用いた。水系溶媒: 有機系溶媒 = 2 : 8 で流し始め, 40 分で有機系溶媒が 100% になるようにグラジエントをかけた。流速は 0.2 mL / min であった。

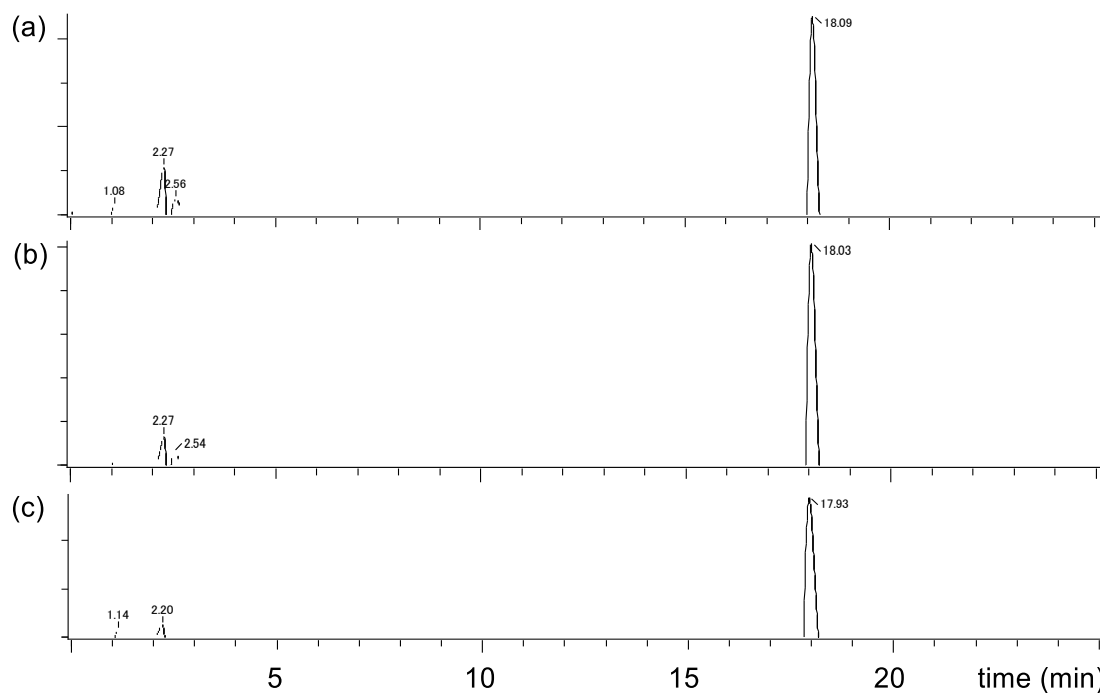


Figure 2-16. HPLC UV-Vis 吸収スペクトル (190-950 nm, Agilent 1200 Infinity series). (a) 合成ペプチド **18**, 合成ペプチド **18** + 標準サンプル, (c) 標準サンプル。ODS カラムを用いた。水系溶媒は 0.1% TFA を含む H_2O , 有機系溶媒は, 0.1% TFA を含む Acetonitrile を用いた。水系溶媒: 有機系溶媒 = 9 : 1 で流し始め, 25 分で有機系溶媒が 60% になるようにグラジエントをかけた。流速は 0.2 mL / min であった。

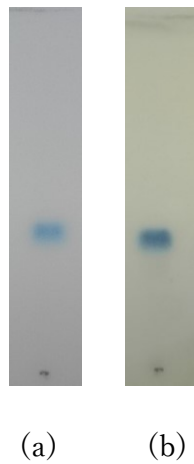


Figure 2-17. Fmoc-Asp(^tBu)-HBA tag-4 (19) の TLC 上での酸による発色の写真(hexane : ethyl acetate = 7 : 1). (a) trifluoroacetic acid, (b) phosphomolybdic acid で染色した.

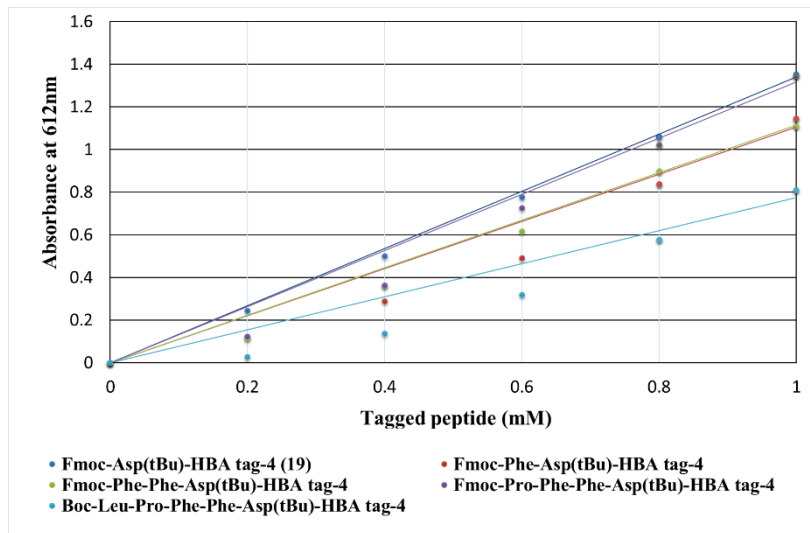


Figure 2-18. HBA tag-4 の酸による発色を用いた検量線.

担体結合アミノ酸と同様に、各段階でのペプチド残基を用いて、検量線を作成したところ、0.4-

1.0 mM の比較的高い濃度では直線的な検量線が得られた (Figure 2-18). また, 2 残基目および 3 残基, 5 残基目の発色性が低い結果となったが, その 4 残基目は, 他の担体結合アミノ酸とほとんど同じ発色性を示したため, ペプチド配列の長さが低い発色性の要因ではないと推測される. そして 5 残基目において発色性が特に低かったが, Boc 基のように酸によって外れる保護基が配列内に多数存在した場合には, 二量体形成が阻害されると推察した. このように, 厳密な定量検定にはその保護基などの使用条件は限られていると推察されるが, 0.8 mM 以上の濃度の場合いずれも良好な直線性を示している. そのため, 保護基などの使用条件はあるが, 配列に依存しない定量法の可能性が示された.

最後に, 得られた検量線を用いて, 反応液からの定量検定を試みた. 定量検定法は, 簡便かつ少量で行えることが好ましい. そこで, 反応液から直接発色反応を試みたが, 本来得られるはずの濃度の 1/100 の濃度しか発色しなかった. これは, 反応液に共存している Fmoc アミノ酸や縮合剤が二量体形成反応を阻害していると考えられた. そこで, 簡易的に担体結合ペプチド以外を除去する方法として, シリカゲルを充填させたショートカラムを用いた. 担体が結合したペプチドは, 縮合剤やアミノ酸などと比較して極性が低いため, シリカゲルに極性物質を吸着させることで分離が可能であると考えた. モデル反応として, モデルペプチド合成過程において 2 回目の縮合反応の反応液を用いた (THF 中 30 mM $\text{NH}_2\text{-Phe-Asp}(\text{tBu})\text{-HBA tag-4}$). 直径 17 mm のフィルター付きチューブを用いて高さ 1.5 cm までシリカゲルを充填した. 反応液 100 μL をチャージし, 重力により THF を流し, 1500 μL 分取し, 減圧下で濃縮した. 検量線作成時と同じ条件になるように, 100 μL の THF と 900 μL の TFA を加えて 10 分間反応させた後, 3 倍希釈して吸光度を測定した. 検量線からの計算された溶液濃度は, 約 0.97 mM であり, 計算上の濃度は 1.00 mM であることから誤差 3% で定量できることが確認された.

2-3. 結論

Methoxybenzyl alcohol をベンジルアルコール担体のモデル化合物として用い、HBA tag-2 (2)よりも優れた発色性と定量検定に適用可能な高い溶解性を有する置換様式を探索した。2,4,5-置換が、脱アルキル化反応を伴うイプソ置換反応により、酸条件下において鮮やかな青色に発色する二量体を形成することを発見した。その反応経路や発色機構については不明であるが、形成される発色性の二量体は、四量体のレゾルシンアレーン誘導体よりも THF や dichloromethane への溶解性が高く、酸による発色性を用いた定量検定が可能となった。また 2,4,5-置換の HBA tag-4 は、可溶性担体化学において重要な溶解性の制御も十分に機能し、高効率で 5 残基のモデルペプチド β -sheet breaker peptide iA β 5 (18) を得ることができた。また TLC 上でも鮮やかな青色に発色するために、簡便な反応モニタリングが可能であった。発色性を用いて作成した検量線は、各種アミノ酸やペプチド配列の長さに依存せずに 0.4-1.0 mM において良好な直線を示したが、より低濃度の場合は直線性が下がる傾向にあった。またこのときアミノ酸や縮合剤などが共存すると発色性が下がることを確認した。アミノ酸や縮合剤は担体と極性が大きく異なるために除去可能であり、反応液からも簡便に定量が可能であった。しかし、酸によって外れる保護基が配列内に多数存在した場合には、二量体形成が阻害されることも推察され、定量検定の使用条件は限られている。また厳密な定量検定を行うには、発色反応の阻害要因の探索が必要である。

2-4. 実験項

2-4-1. Methoxybenzyl alcohol の酸による発色反応 (5, 7-12)

Dimethoxybenzylalcohols (5, 7-9) (101 mg, 0.600 mmol) もしくは trimethoxybenzyl alcohol (10-12) (119 mg, 0.600 mmol) をジクロロメタン溶液 (18 mL) に溶解させ, TFA (2 mL) を加え, 室温で 10 分反応させた後 (2,4,5-trimethoxybenzylalcohol のみ反応時間は 1 分), すぐに写真撮影と紫外可視吸光度を測定した後, 飽和 NaHCO₃ 溶液 (100 mL) を加えた. ジクロロメタン (100 mL x 2) で抽出した後, 飽和 NaHCO₃ 溶液 (100 mL x 3) と飽和食塩水 ((100 mL x 3) で有機層を洗浄した後, Na₂SO₄ で脱水し, 減圧下で濃縮することで, 2,4-dimethoxybenzyl alcohol (5) の場合は, 4 量体のレゾルシンアレーン誘導体 (6) (87.4 mg, 0.145 mmol) を収率 97% で得た. 2,4,5-trimethoxybenzylalcohol の場合は, 二量体 (13) (101 mg, 0.290 mmol) を収率 97% で得た. その他の混合物は, 精製することなく MS によって分析した.

2-4-2. HBA tag-4 の調整

2,4,5-trimethoxybenzylaldehyde (12) (617 mg, 4.00 mmol) を脱水 DMF (30 mL) に溶解させ, 1-bromooctadecane (6.00 g, 18.0 mmol) と K₂CO₃ (4.42 g, 32.0 mmol) を加えた後, 100°C で 72 時間反応させた. 反応終了後, 水を加え (30 mL), トルエンで抽出した (20 mL x 3). 有機層を, Na₂SO₄ で乾燥させた後, 減圧下濃縮した. 混合物を, 60°C のアセトニトリル (350 mL x 3) で熱時濾過し, 2,4,5-tris(octadecyloxy)benzaldehyde (15) (3.56 g, 3.91 mmol) を収率 98% で得た. 2,4,5-tris(octadecyloxy)benzaldehyde (15) (1.82 g, 2.00 mmol) を THF (100 mL) と 2-propanol (40 mL) に溶解させ, NaBH₄ (113 mg, 3.00 mmol) を加え, 室温で 90 分間攪拌した. 反応終了後, 飽和食塩水 (200 mL) を加え, THF (200 mL) で抽出した後, Na₂SO₄ で乾燥させ, 減圧下で濃縮した.

得られた乾燥粉末に、MeOH を加え、吸引濾過で洗浄した後、HBA tag-4 (4) (1.69 g, 1.85 mmol) を 93%の収率で得た。

2-4-3. HBA tag-4 (16) の酸による発色反応

ジクロロメタンもしくは THF (2 mL) に、HBA tag-4 (16) (54.8 mg, 0.0600 mmol) を溶解させ、TFA (18 mL) を加え、室温で 1 分もしくは 10 分間攪拌した。溶液の写真撮影および紫外可視吸光度測定後すぐに、飽和 NaHCO₃ 溶液 (100 mL) を加え、減圧下で濃縮した。得られた固体を、水 (100 mL x 3) とメタノール (100 mL x 3) で洗浄し、二量体 (13) (51.8 mg, HPLC purity 70–80%) の混合物を得た。混合物のまま MS で分析した。

2-4-4. HBA tag-4 とアミノ酸との縮合反応 (19-22)

HBA tag-4 (16) (57.0 mg, 0.500 mmol) をジクロロメタン (30 mL) に溶解させ、Fmoc-AA-OH (0.75–1.0 mmol, 1.50–2.00 mol equiv.), DIPCI (1.50–4.00 mol equiv.), DMAP (0.0500 mol equiv.) を加え、室温で 1 時間攪拌した。反応終了後、メタノール (100 mL) を用い、メタノールに溶媒置換をした。得られた懸濁液を吸引濾過し、メタノール (100 mL x 3) により洗浄し、Fmoc-AA-OHBA tag (19-22) (536–647 mg, 0.435–0.495 mmol) を、収率 87–99%で得た。

2-4-5. 可溶性担体結合ペプチドの Fmoc 基の脱保護反応

可溶性担体結合ペプチドを THF (30 mM) に溶解させ、DBU, piperidine をそれぞれ 1%になるように加え、室温で 10 分攪拌した。反応終了後、1 N HCl 溶液を加えた後、減圧下濃縮によりメタノールへ溶媒置換を行った。得られた懸濁液を吸引濾過し、メタノール (100 mL x 3) により洗浄し、Fmoc 基を取り除いたペプチドを得た。

2-4-6. 可溶性担体結合ペプチドのアミノ酸 (Fmoc-AA-OH or Boc-Leu-OH)との縮合反応

Fmoc 基を脱保護したペプチドを THF (20 mM) に溶解して, Fmoc-AA-OH もしくは Boc-Leu-OH (1.50 mol equiv.) , HBTU (1.20 mol equiv.), HOBt (1.20 mol equiv.), DIPEA (2.00 mol equiv.) を加え, 室温下で 1-3 時間攪拌した. 反応終了後, 減圧下濃縮によりアセトニトリルへと溶媒置換を行い, 得られた懸濁液を吸引濾過し, アセトニトリル (100 mL x 3) で洗浄した. モデルペプチド合成時では, 9 段階目の反応終了後, シリカゲルクロマトグラフィー (hexane/EtOAc = 2/1) により分離精製をおこない, 収率 88%で目的配列 (**23**) (1.49 g, 0.883 mmol) を得た.

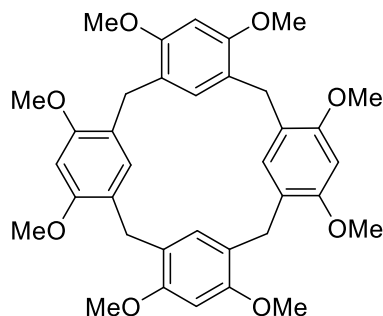
2-4-7. 可溶性担体結合ペプチドの全脱保護反応

可溶性担体結合ペプチド (**23**) (50.7 mg, 0.0300 mmol) に, TFA (28.5 mL), TIS (0.75 μ L), H₂O (0.75 μ L) を加え, 室温で 1 時間攪拌した. 反応終了後, 減圧下で濃縮し, ジイソプロピルエーテル (30 mL) を加えた. 冷却遠心機を用いて懸濁液から固体の回収およびジイソプロピルエーテル (30 mL x 3) による洗浄を行った. 得られた固形物に TFA および水を加えて凍結乾燥させた後, β -sheet breaker peptide iA β 5 (**18**) (19.0 mg, 0.0252 mmol) を収率 82%で得た.

2-4-8. 酸による発色反応を利用した定量検定

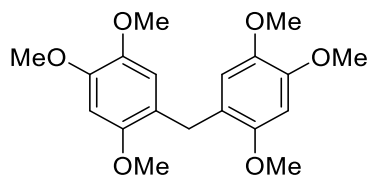
縮合反応の反応溶液 (THF, 30 mM) から 100 μ L 分取し, シリカゲルを充填したショートカラム (17 mm x 50 mm) に添加した後, THF (1.50 mL) を流し, 得られた溶液を減圧下で濃縮した. 得られた固体に THF (100 μ L)と TFA (900 μ L)を加えた (推定 3.0 mM). 室温下で 10 分間反応させた後, THF で 3 倍希釈し, 紫外可視吸光度を測定した (推定 1.0 mM).

2-5. スペクトルデータ



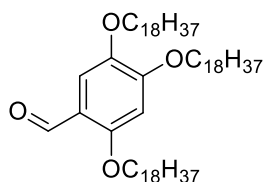
6

White solid (under neutral pH): $^1\text{H NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) δ 6.42 (4H, s), 6.19 (4H, s), 3.78 (24H, s), 3.69 (8H, s); $^{13}\text{C NMR}$ (150 MHz, CDCl_3) δ 156.5, 130.8, 120.5, 95.1, 55.8, 28.4; IR (KBr) 3003, 2934, 2913, 2833, 1613, 1397, 1313, 1297, 1222, 1201, 1184, 1173, 1116, 1093, 1038, 954, 899, 857, 814 cm^{-1} ; HRMS calc. for $[\text{M}+\text{H}]^+$: 601.2801, found 601.2820.



13

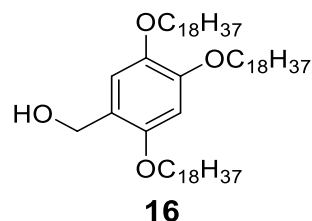
White solid (under neutral pH): $^1\text{H NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) δ 6.66 (2H, s), 6.54 (2H, s), 3.88 (6H, s), 3.84 (2H, s), 3.81 (6H, s), 3.75 (6H, s), 3.75 (6H, s); $^{13}\text{C NMR}$ (150 MHz, CDCl_3) δ 151.6, 147.8, 142.9, 121.1, 114.6, 97.8, 56.6, 56.5, 56.2, 28.8; IR (KBr) 3006, 2990, 2952, 2932, 2909, 2847, 1604, 1512, 1458, 1397, 1322, 1286, 1271, 1219, 1203, 1173, 1124, 1047, 1030, 988, 875, 862, 855, 776, 661 cm^{-1} ; HRMS calc. for $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 371.1471, found 371.1451.



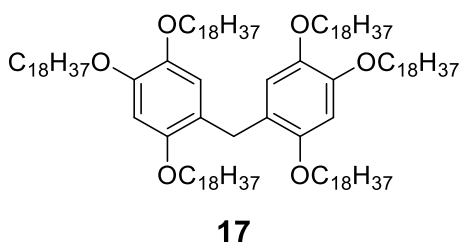
15

White solid: $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 10.31 (1H, s), 7.31 (1H, s), 6.44 (1H, s), 4.13-3.92 (6H, m), 1.91-1.71 (6H, m), 1.50-1.40 (6H, m), 1.40-1.20 (84H, m), 0.88 (9H, t, $J = 7.3$ Hz); $^{13}\text{C NMR}$ (150 MHz, CDCl_3) δ 188.2, 158.4, 156.2, 143.3, 117.6, 111.3, 98.2, 69.7, 69.4, 69.2, 32.0, 29.7, 29.6, 29.4, 29.2, 29.0, 26.2, 26.1, 26.0, 22.7, 14.1; IR (KBr) 3083, 2956, 2915, 2848, 1660, 1605, 1514,

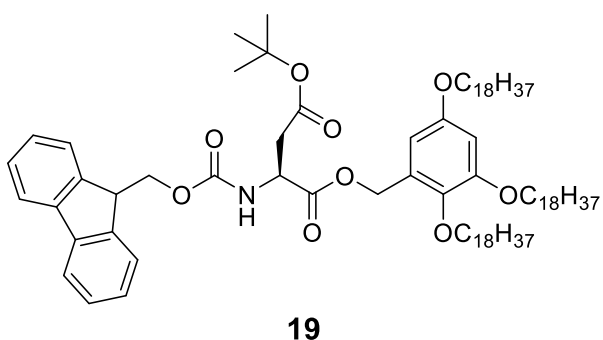
1468, 1354, 1275, 1217, 1138, 1018, 721 cm^{-1} ; HRMS calc. for $[\text{C}_{61}\text{H}_{115}\text{O}_4]^+$: 911.8795, found: 911.8776.



White solid: ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 6.85 (1H, s), 6.50 (1H, s), 4.62-4.57 (2H, m), 4.03-3.89 (6H, m), 2.24 (1H, br, s), 1.85-1.75 (6H, m), 1.50-1.40 (6H, m), 1.86-1.71 (2H, m), 1.50-1.30 (6H, m), 1.38-1.20 (84H, m), 0.88 (9H, t, $J = 7.3$ Hz); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ 151.6, 149.7, 143.0, 121.4, 116.8, 100.9, 70.7, 69.9, 68.9, 61.9, 31.9, 29.7, 29.5, 29.4, 26.2, 26.1, 22.7, 14.1; IR (KBr) 3457, 3091, 2954, 2918, 2850, 1524, 1468, 1203, 1072, 719 cm^{-1} ; HRMS calc. for $[\text{C}_{61}\text{H}_{117}\text{O}_4]^+$: 913.8952, found: 913.8973.

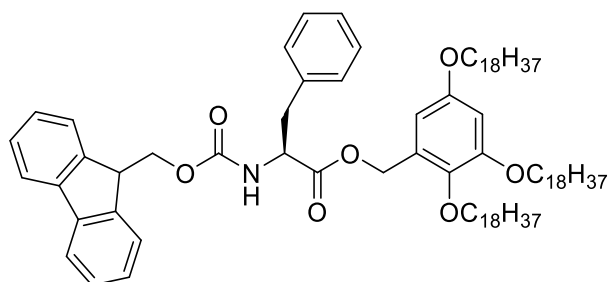


White solid (under neutral pH): HRMS calc. for $[\text{C}_{121}\text{H}_{228}\text{O}_6\text{Na}]^+$: 1800.7428, found: 1800.7433.



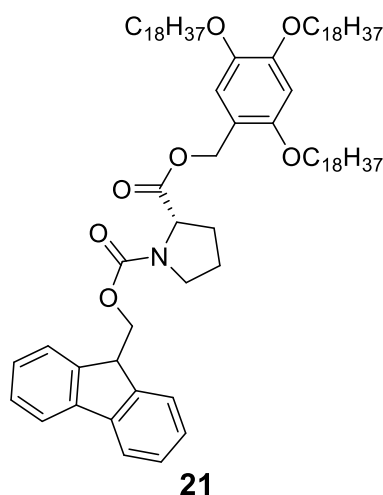
White solid: ^1H NMR (CDCl_3 , 600 MHz) δ 7.75 (2H, d, $J = 7.6$ Hz), 7.58 (2H, d, $J = 7.6$ Hz), 7.39 (2H, apparent t, $J = 7.6$ Hz), 7.32-7.28 (2H, m), 6.88 (1H, s), 6.46 (1H, s), 5.81 (1H, d, $J = 8.2$ Hz), 5.22 (1H, d, $J = 11.7$ Hz), 5.15 (1H, d, $J = 11.7$ Hz), 4.64-4.59 (1H, m), 4.42-4.37 (1H, m), 4.33-4.29 (1H, m), 4.22 (1H, t, $J = 7.6$), 3.95 (2H, t, $J = 7.6$ Hz), 3.93-3.86 (4H, m), 2.94 (0.4H, d, $J = 4.8$ Hz, minor rotamer), 2.92 (0.6H, d, $J = 4.8$ Hz, major rotamer), 2.79 (0.6H, d, $J = 4.8$ Hz, major

rotamer) ,2.77 (0.4H, d, $J = 4.8$ Hz, minor rotamer), 1.82-1.71 (6H, m), 1.49-1.38 (15H, m), 1.37-1.21 (84H, m), 0.88 (9H, d, $J = 6.9$ Hz); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ 170.9, 169.8, 155.9, 152.2, 150.5, 144.0, 143.7, 142.8, 141.3, 141.2, 127.7, 127.1, 125.2, 120.0, 117.7, 115.4, 100.5, 81.7, 70.6, 69.6, 69.3, 67.3, 62.9, 50.7, 47.1, 37.9, 31.9, 29.7, 29.6, 29.5, 29.4, 29.0, 28.0, 26.1, 22.7, 14.1; IR (KBr) 3065, 2919, 2850, 1730, 1697, 1524, 1467, 1293, 1216, 1153, 1069, 739 cm^{-1}
 HRMS calc. for $[\text{C}_{84}\text{H}_{139}\text{NNaO}_9]^+$: 1329.0348, found: 1329.0339

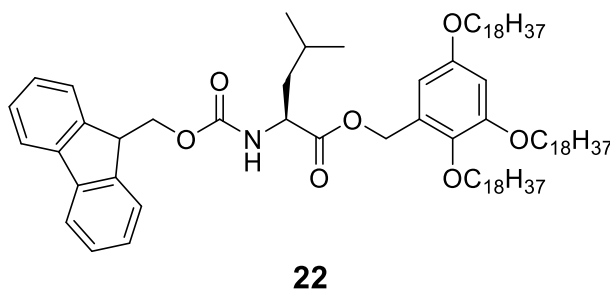


20

White solid. ^1H NMR (CDCl_3 , 600 MHz) δ 7.77 (2H, d, $J = 7.6$ Hz), 7.56 (2H, apparent t, $J = 7.6$ Hz), 7.40 (2H, apparent t, $J = 7.6$ Hz), 7.32-7.28 (2H, m), 7.23-7.19 (3H, m), 7.03-6.98 (2H, m), 6.86 (1H, s), 6.50 (1H, s), 5.28 (1H, d, $J = 7.6$ Hz), 5.19 (1H, d, $J = 11.7$ Hz), 5.13 (1H, d, $J = 11.7$ Hz), 4.73-4.67 (1H, m), 4.45-4.39 (1H, m), 4.34-4.29 (1H, m), 4.20 (1H, t, $J = 7.6$ Hz), 3.99 (2H, t, $J = 6.2$ Hz), 3.96.-3.86 (4H, m), 3.16 (0.3H, d, $J = 4.8$ Hz, minor rotamer), 3.13 (0.7H, d, $J = 4.8$ Hz, major rotamer), 3.01 (0.7H, d, $J = 4.8$ Hz, major rotamer), 3.08 (0.3H, d, $J = 4.8$ Hz, minor rotamer), 1.85-1.71 (6H, m), 1.50-1.39 (6H, m), 1.38-1.20 (84H, m), 0.88 (9H, t, $J = 7.6$ Hz); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ 171.4, 155.5, 152.4, 150.8, 143.9, 143.8, 142.7, 141.3, 135.7, 129.5, 128.5, 127.7, 127.1, 125.2, 125.1, 119.9, 118.2, 115.1, 100.4, 70.6, 69.6, 69.2, 66.9, 62.9, 54.7, 47.2, 38.1, 31.9, 29.7, 29.6, 29.5, 29.4, 26.1, 22.7, 14.1; IR (KBr) 3033, 2919, 2850, 1723, 1692, 1540, 1523, 1466, 1418, 1389, 1290, 1263, 1221, 1141, 1073, 1015, 738 cm^{-1} ; HRMS calc. for $[\text{C}_{85}\text{H}_{135}\text{NNaO}_7]^+$: 1305.0136, found: 1305.0114.



White solid. $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 600 MHz) δ 7.75 (1H, d, $J = 6.2$ Hz), 7.72 (1H, dd, $J_1 = 7.6$ Hz, $J_2 = 2.8$ Hz), 7.59 (1H, apparent t, $J = 7.6$ Hz), 7.57-7.49 (1H, m), 7.41-7.32 (2H, m), 7.32- 7.26 (2H, m), 6.88 (0.4H, s, minor rotamer), 6.81 (0.6H, s, major rotamer), 6.45 (0.4H, s, minor rotamer), 6.34 (0.6H, s, major rotamer), 5.27-5.14 (1H, m), 5.06 (1H, d, $J = 12.4$ Hz), 4.47-4.39 (2H, m), 4.31-4.22 (1H, m), 4.11-4.05 (1H, m), 3.98-3.72 (6H, m), 3.72-3.62 (1H, m), 3.55-3.48 (1H, m), 2.30-2.15 (1H, m), 2.10-1.84 (3H, m), 1.81-1.62 (6H, m), 1.49-1.10 (90H, m), 0.87 (9H, s); $^{13}\text{C NMR}$ (150 MHz, CDCl_3) δ 172.8, 172.6, 154.8, 154.4, 152.2, 150.5, 150.3, 144.5, 144.2, 143.9, 143.6, 142.8, 142.6, 141.2, 141.1, 127.6, 127.5, 127.1, 127.0, 125.4, 125.3, 125.1, 125.0, 119.9, 119.8, 117.8, 117.4, 115.9, 115.5, 100.5, 100.1, 69.6, 69.4, 69.2, 69.1, 67.7, 67.5, 62.4, 59.4, 59.0, 47.2, 47.1, 47.0, 46.5, 31.9, 31.1, 29.7, 29.6, 29.5, 29.4, 26.1, 24.3, 23.4, 22.7, 14.1; IR (KBr) 3079, 2956, 2917, 2849, 1738, 1611, 1524, 1469, 1452, 1418, 1210, 1168, 1131, 1072, 757, 737, 719 cm^{-1} ; HRMS calc. for $[\text{C}_{81}\text{H}_{133}\text{NNaO}_7]^+$: 1254.9980, found: 1254.9997.



White solid. $^1\text{H NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) δ 7.76 (2H, d, $J = 7.6$ Hz), 7.59 (2H, d, $J = 7.6$ Hz), 7.40 (2H, apparent t, $J = 7.6$ Hz), 7.32-7.28 (2H, m), 6.87 (1H, s), 6.47 (1H, s), 5.24-5.09 (3H, m), 4.47-4.33 (3H, m), 4.21 (1H, t, $J = 7.6$ Hz), 3.97 (2H, t, $J = 7.6$ Hz), 3.93-3.87 (4H, m), 1.83-1.62 (9H, m), 1.49-1.38 (6H, m), 1.35-1.20 (84H, m), 0.92 (6H, t, $J = 7.6$ Hz), 0.88 (9H, t, $J = 7.6$ Hz); $^{13}\text{C NMR}$ (150 MHz, CDCl_3) δ 173.2, 155.9, 152.2, 150.5, 144.0, 142.7, 141.3, 127.7, 127.1, 125.2, 120.0,

rotamer), 3.06 (1H, dd, $J = 14.4, 5.5$ Hz), 3.00-2.92 (2H, m), 2.85 (0.9H, dd, $J = 16.5, 5.5$ Hz, major rotamer), 2.75 (0.9H, dd, $J = 16.5, 4.8$ Hz, major rotamer), 2.61 (0.1H, dd, $J = 16.5, 4.8$ Hz, minor rotamer), 2.34 (0.1H, dd, $J = 12.4, 6.2$ Hz, minor rotamer), 2.24-2.10 (1H, m), 2.06-1.98 (1H, m), 1.98-1.87 (2H, m), 1.83-1.67 (6H, m), 1.48-1.40 (17H, m), 1.39 (9H, s), 1.37-1.13 (84H, m), 0.96 (3H, d, $J = 6.9$ Hz), 0.94 (3H, d, $J = 6.9$ Hz), 0.88 (9H, t, $J = 7.2$ Hz); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ 173.4, 172.2, 171.5, 171.0, 170.8, 170.6, 170.5, 170.4, 170.4, 170.1, 169.8, 169.6, 157.5, 155.8, 152.1, 150.5, 150.5, 142.9, 147.6, 136.8, 136.7, 129.4, 129.2, 128.9, 128.7, 128.6, 128.5, 128.5, 127.0, 126.8, 126.7, 117.8, 117.7, 115.6, 115.5, 100.5, 81.6, 81.5, 80.6, 79.7, 70.7, 69.6, 69.3, 62.6, 60.5, 56.9, 55.0, 54.9, 54.2, 52.1, 50.4, 49.1, 48.8, 47.2, 46.6, 41.6, 40.5, 39.0, 37.7, 37.5, 37.4, 36.8, 36.7, 31.9, 31.3, 29.7, 29.6, 29.5, 29.4, 28.6, 28.4, 28.0, 27.9, 26.1, 26.1, 25.1, 24.8, 24.7, 23.6, 23.5, 22.8, 22.7, 22.6, 21.6, 21.5, 21.3, 14.1; IR (KBr) 3292, 3065, 3030, 2922, 2850, 1736, 1714, 1708, 1643, 1524, 1468, 1419, 1392, 1366, 1242, 1159, 1072, 1048, 1025, 854, 747, 721, 699 cm^{-1} ; HRMS calc. for $[\text{C}_{103}\text{H}_{173}\text{N}_5\text{NaO}_{13}]^+$: 1711.2928, found: 1711.2907.

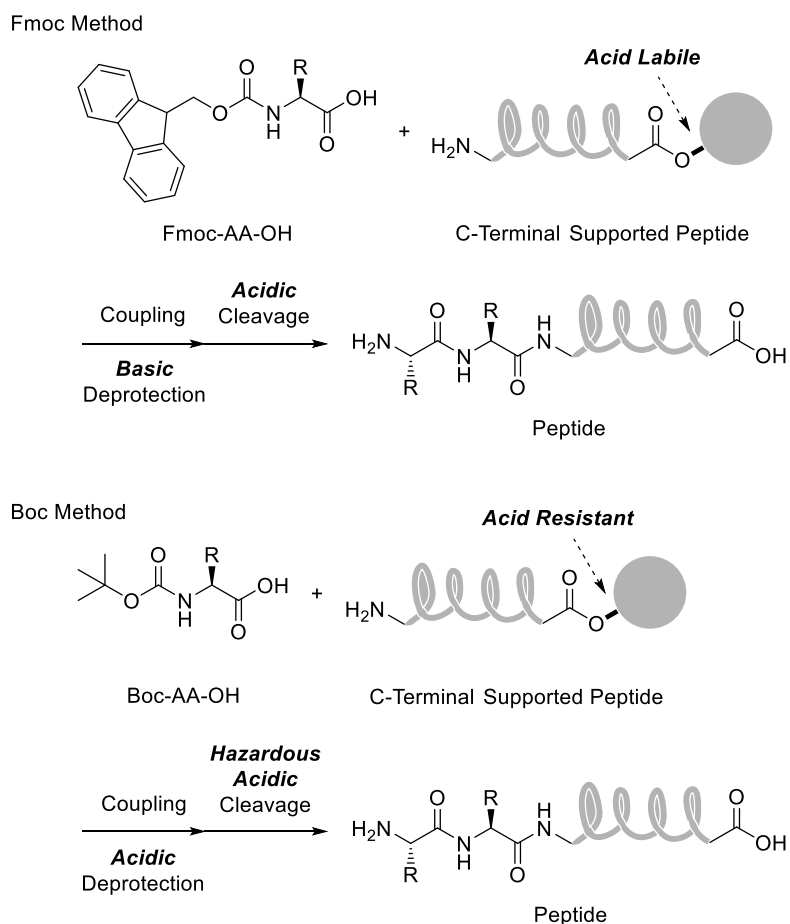
3. 適度な酸耐性と蛍光性をもつ機能性担体の開発と液相ペプチド合成への応用

3-1. 緒言

固相法、液相法問わず、ペプチド合成において一般的に普及している基質は、N末端が Fmoc 基もしくは Boc 基によって、保護されたアミノ酸である。C末端側から N末端への伸長は、活性エステルを経る際にエピマー化が生じるという課題をもつために、N末端側での脱保護と伸長が行われているのが一般である。Fmoc 基は、DBU や piperidine などの比較的求核性が弱い 2級アミンによって選択的に脱保護される一方で、強酸条件や酸化、還元には比較的強い性質を持つ。¹¹ Boc 基は、強塩基性条件下でも安定であり、還元条件においても比較的強い安定性をもつ一方で、TFA や HCl などの強酸によって脱保護される。Boc アミノ酸は、Fmoc アミノ酸と比較して様々な利点をもつ。比較的高い溶解性を持つことから反応効率が高いこと、分子量が小さいために原子効率が良く経済的な優位性があること、Boc 基は脱保護されると、気体である isobutene と CO₂ になるために後処理が簡便であること、酸性条件下で脱保護反応が進行するため、Asp が配列内にある場合の aspartimide 形成^{6a} や C末端から 2残基以内に Pro がある場合^{6b} の diketopiperadine 形成などの副反応が起きる心配がないことなどが挙げられる。しかし従来の固相法では、固相担体からの Boc 基の脱保護に、その扱いに特殊な設備が必要な HF を用いる必要があり、一般的には Fmoc 法が用いられてきた。¹² 我々の可溶性担体を用いたペプチド合成においても Boc 法の利点は大きいですが、その脱保護条件下に耐えられる 3,5-置換の HBA tag-3 (**3**)を適用する必要があり、HBA tag-3 の脱保護時に 95%TFA, 2.5% TIS, 2.5%H₂O と加熱条件のような比較的激しい条件が求められる。しかし、その脱保護反応は非常にゆっくりとしか進行せず、配列によっては切断しきれないこともある。そのために、より穏やかな条件で担体からのペプチドの脱保護が可能であり、Boc 基の脱離時の強酸条件にも耐える担体が求められている。

また、HBA tag-3 (3) は、2,4-置換の HBA tag-2 (2), 2,4,5-置換の HBA tag-4 (4) のような鮮やかな発色性は有していない。これはベンジルカチオンの安定性が低いために発色性を持つような多量体を形成する前に、ベンジルカチオンが捕捉されてしまうからだと推測できる。つまり、発色性を有し、かつ Boc 基の強酸条件にも耐えられる担体を開発することができれば、より実用的なペプチド合成が可能になると期待される。そこで本研究では、まず適度な酸耐性と発色性という二つの機能をもった担体を開発することを目的とした。

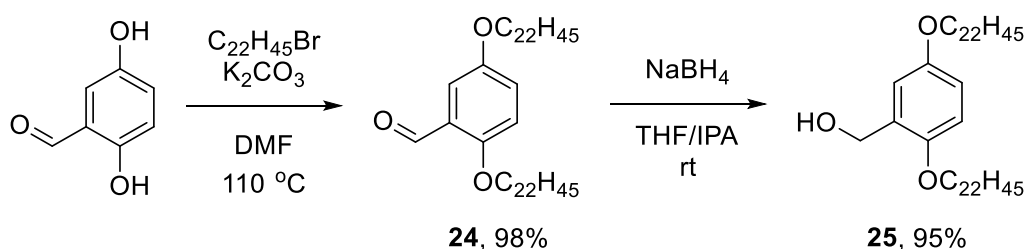
Scheme 3-1. ペプチド合成における Fmoc 法と Boc 法



3-2. 実験結果と考察

前章での methoxybenzyl alcohol の発色性の探索の際に、鮮やかな緑色に発色していたことに加え、methoxy 基が 2,5 置換に配置されることで、2,4-置換と 3,5-置換の中間程度の適度な酸耐性を示すと期待された。そのため、2,5-置換の HBA tag を合成することとした。出発原料 2,5-dihydroxybenzaldehyde を、脱水 DMF 中、炭酸カリウム存在下で、1-bromodocosane と反応させることで、アルキル化を行った。その後 THF と 2-propanol 中で、NaBH₄ を用いてアルコール体へと還元し、目的物である 2,5-didocosyloxybenzylalcohol (HBA tag-5, **25**) を二段階、収率 93% で得た (Scheme 3-2).

Scheme 3-2. HBA tag-5 (**25**) の合成

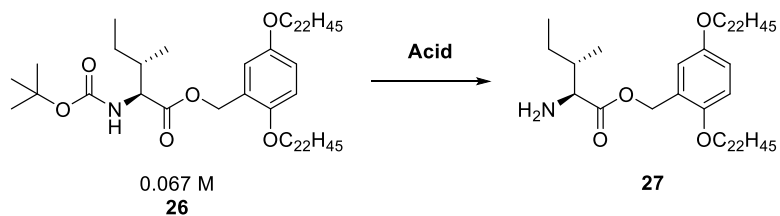


Boc 基の脱保護条件下において HBA tag-5 (**25**) が脱保護されないかどうかを検討するために、Boc-Ile-OH と HBA tag-5 を縮合させ、Boc-Ile-O-HBA tag-5 (**26**) を合成し、条件検討を行った。まず、1-10%TFA を用いて、加温冷却など様々条件下で検討したが、1% TFA であっても、HBA tag が脱離し形成したと思われる発色性オリゴマーを TLC 上で確認した。少量でも副生成物があるのは好ましくないため、続いて HNO₃^{13a} や H₂SO₄^{13b} を用いて検討したが、いずれの場合でも副生成物の形成を確認した。またこのとき反応開始時において、酸の希釈液が 1 滴でも反応液に触れた瞬間に発色したことを確認していた。そのため、HNO₃ や H₂SO₄ では希釈や添加方法によって、発色性のオリゴマー形成を抑制することはできないと推測した。ここで、詳細は不明であるが前章での発色剤となる酸性溶媒の検討時に HCl は比較的発

色性が弱いことを確認していた。また、同様に溶媒として toluene を用いたときに発色性が弱いことを確認していた。そのため、酸として HCl を用い、溶媒として toluene を用いた場合、HBA tag の脱離反応の反応性が低いと推測し各種条件を検討した (Table 3-1)。その結果、2 M になるように HCl をゆっくりと滴下して反応を開始させると全く副生成物を生じずに 99% の収率で目的物である NH₂-Ile-HBA tag-5 (27) を得られることを発見した。Boc-Gly-HBA tag-5 (28) や Boc-Ala-HBA tag-5 (29) などの他の担体が結合した Boc アミノ酸を用いた場合においても同様に収率 99% で NH₂-AA-HBA tag-5 が得られ、その後 Boc-Val-OH とそれぞれ縮合させ、収率 99% で Boc-Val-Gly-HBA tag-5 (30) および Boc-Val-Ala-HBA tag-5 (31) を得た。一方で、HCl を素早く加える場合や加温条件、3 M のように濃度を高くした場合などでは発色性オリゴマー形成が確認された。以上より、Boc 基の選択的な脱保護条件は、HCl の滴下と 4-5 時間の反応時間が必要ではあるが、HBA tag-5 (25) は、その結合を保持したまま Boc 基を選択的に脱保護できることに加え、95%TFA, 2.5%TIS, 2.5%H₂O という通常の全脱保護において容易に脱保護可能であるため、HBA tag-3 (3) よりも有用性が高いと期待できる。

続いて、HBA tag-5 (25) の TLC および溶液状態の発色性を確認したところ、いずれの場合でも 2,5-置換の methoxybenzyl alcohol と類似した鮮やかな緑色を示した (Figure 3-1)。また驚いたことに、HBA tag-5 が TLC 上や溶液状態でわずかな蛍光性をもつことを発見した。近年我々の研究室では、2,5-dialkoxybenzaldehyde が、分子内の push-pull 系形成によると思われる青い蛍光性をもつことを報告していたが¹⁴、HBA tag-5 (25) は benzyl alcohol であるために push-pull 系による蛍光性ではないと考えられた。HBA tag-5 (25) および 2,5-dimethoxybenzyl alcohol の蛍光特性を、蛍光分光計を用いて測定したところ、いずれも aldehyde 体の蛍光特性と類似した特性を示した。近年、benzyl alcohol の光酸化を用いた benzaldehyde 体の合成が報告されており¹⁵、同様に、光酸化により aldehyde が形成され、benzyl alcohol が蛍光性を有しているように見えていたと推測した。

Table 3-1. Boc 基の選択的脱保護条件の検討



acid	solvent	concentration of Acid	temp.	time	Isolated yield (%)
Trifluoroacetic acid	CH ₂ Cl ₂	1% (v/v)	rt	30 min	- ^a
HNO ₃ ^[14a]	CH ₂ Cl ₂	1 M	0°C ^b	20 min	- ^a
H ₂ SO ₄ ^[14b]	Toluene	2 M	rt	10 min	- ^a
H ₂ SO ₄	Toluene	0.2 M	rt	20 min	35
HCl in 1,4-dioxane	Toluene	2 M	rt	4 h	52
HCl in 1,4-dioxane	Toluene	2 M ^c	rt	5 h	99
HCl in 1,4-dioxane	Toluene	2 M ^c	40°C	2 h	52
HCl in 1,4-dioxane	Toluene	3 M ^c	rt	3 h	94
HCl in 1,4-dioxane ^d	Toluene	2 M	rt	5 h	99
HCl in 1,4-dioxane ^e	Toluene	2 M	rt	5 h	99

^aUndesired mixtures including tag cleavage were detected.

^bShielded from light.

^cAdded dropwise.

^dGly was used instead of Ile.

^eAla was used instead of Ile.

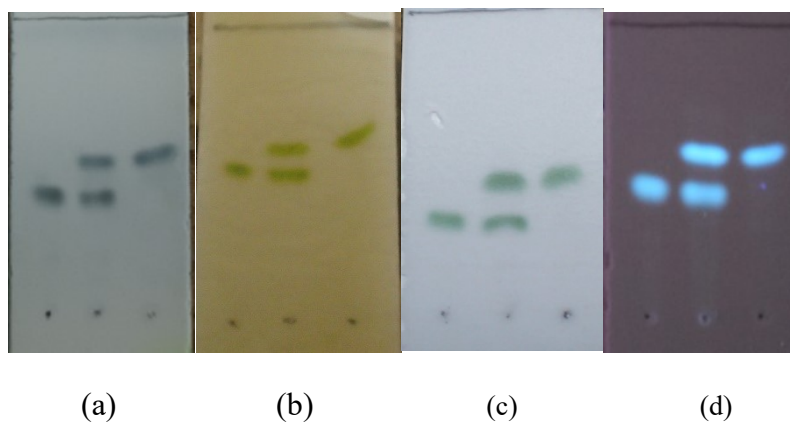
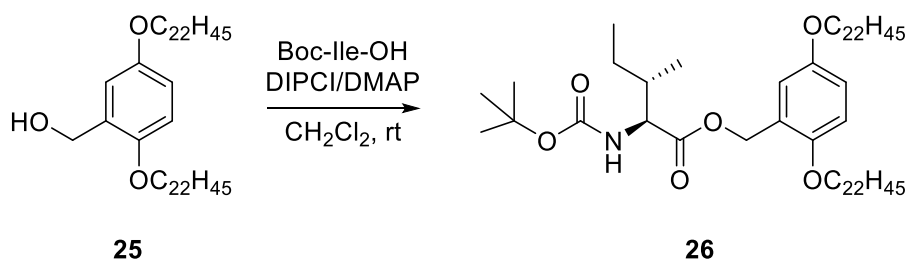


Figure 3-1. 縮合反応の TLC 写真 (hexane : ethyl acetate = 7 : 1); HBA tag-5 (**25**, left), mixed (center), Boc-Ile-HBA tag-5 (**26**, right). TLC は, (a) phosphomolybdic acid, (b) trifluoromethanesulfonic acid, (c) trifluoroacetic acid で染色した, (d)は, 1 cm の距離から 10 秒間 UV 照射 (365 nm, 250 W) を行った後, 365 nm の UV (4 W) を照射しながら写真を撮影した.

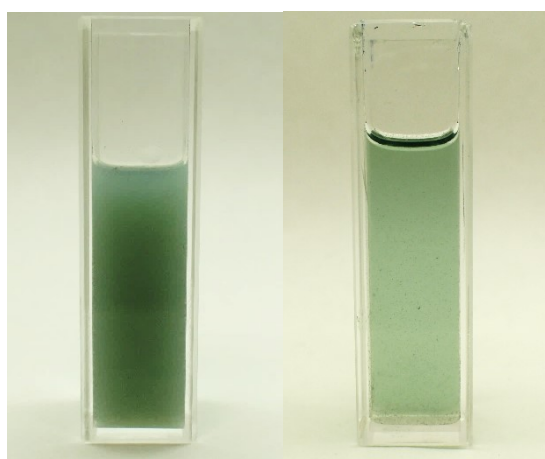


Figure 3-2. HBA tag-5 (**25**) の dichloromethane 中での酸による発色の様子 (left: 3 mM in 90% TFA, 3 mM in 10% H₂SO₄).

そこで、2,5-dimethoxybenzyl acetate (**32**) を担体付きペプチドの簡便なモデル化合物として用い蛍光性を持つ原因を探索することとした。2,5-dimethoxybenzyl acetate (**32**) を MeOH もしくは chloroform に溶解させ (10 mM), 0°C で 250 W の UV ランプ (365 nm) を用いて UV 照射した。このとき試料溶液が入ったガラス製の容器の外側から、容器に光源が直接接触する距離で UV を照射した。GC-MS および UV-Vis, 蛍光分光計を用いて、反応時間 1, 5, 10, 20 分においてそれぞれモニタリングした。その結果, MeOH, chloroform いずれの場合でも, 2,5-dimethoxybenzaldehyde (**33**) の形成を GC-MS で確認し, 反応時間に伴い aldehyde が増加し (Figure 3-3 and 3-5), UV 吸収の 360 nm 付近の増加や蛍光強度 (極大蛍光波長 465 nm in MeOH, 428 nm in chloroform) が増加していく様子が観察された (Figure 3-4 and 3-6)。MeOH 中では, chloroform よりも反応が早く, 反応開始 20 分において, すでに蛍光強度の低下が確認された。また蛍光波長も MeOH 中の方が, 長波長側に見られた。これらは, 極性溶媒中では光励起状態が安定化されるために反応速度が速く, push-pull 系に特徴的な溶媒効果により MeOH では長波長側に蛍光波長が移動したと考えられる。これらの結果より, HBA tag-5 (**25**) においても, 光酸化により aldehyde が形成され, 蛍光性を示していたと示唆された。

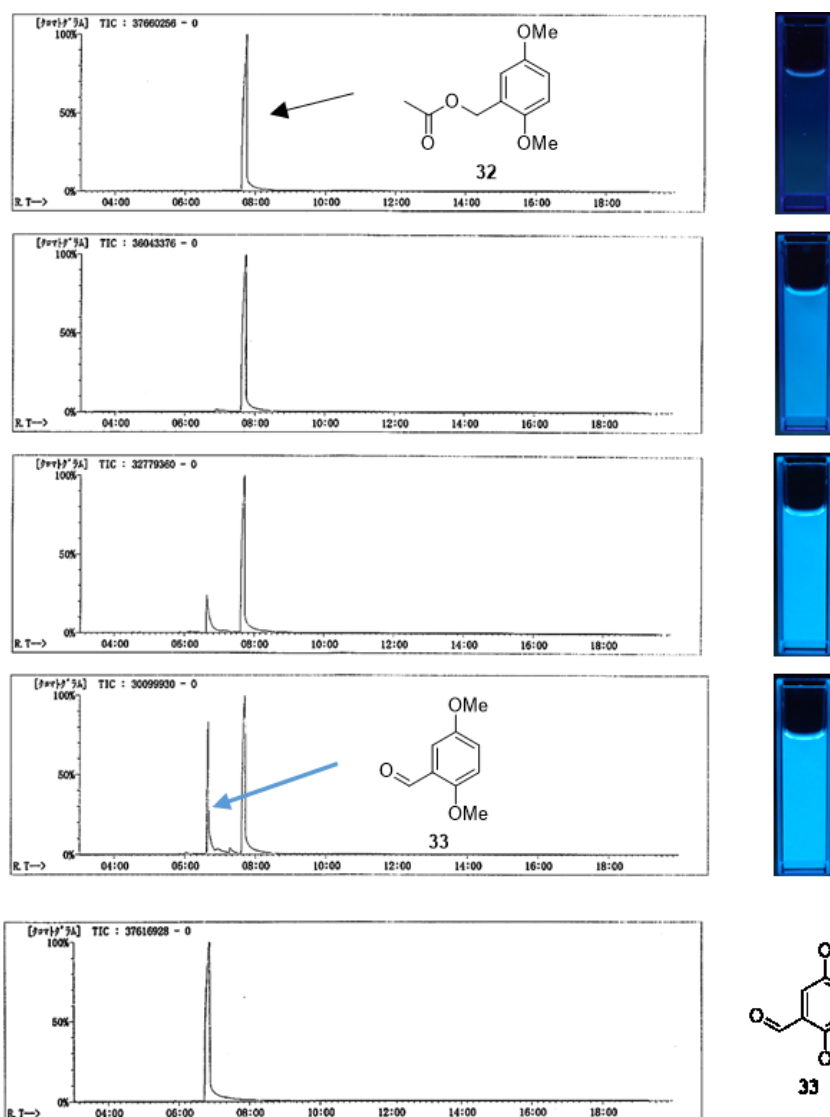


Figure 3-3. 2,5-dimethoxybenzyl acetate (**32**) の光酸化反応 (in MeOH) の各反応時間 (上から 0, 1, 5, 10 分) における GC-MS (JEOL Jms-Q1000GC K9) total ion chromatograms と写真 (100 μ M, 365 nm 照射). 反応溶液は, 0 $^{\circ}$ C において 250 W の UV ランプで照射された. 2,5-dimethoxybenzaldehyde (**33**) は, GC-MS chromatogram において RT = 7 分に検出された.

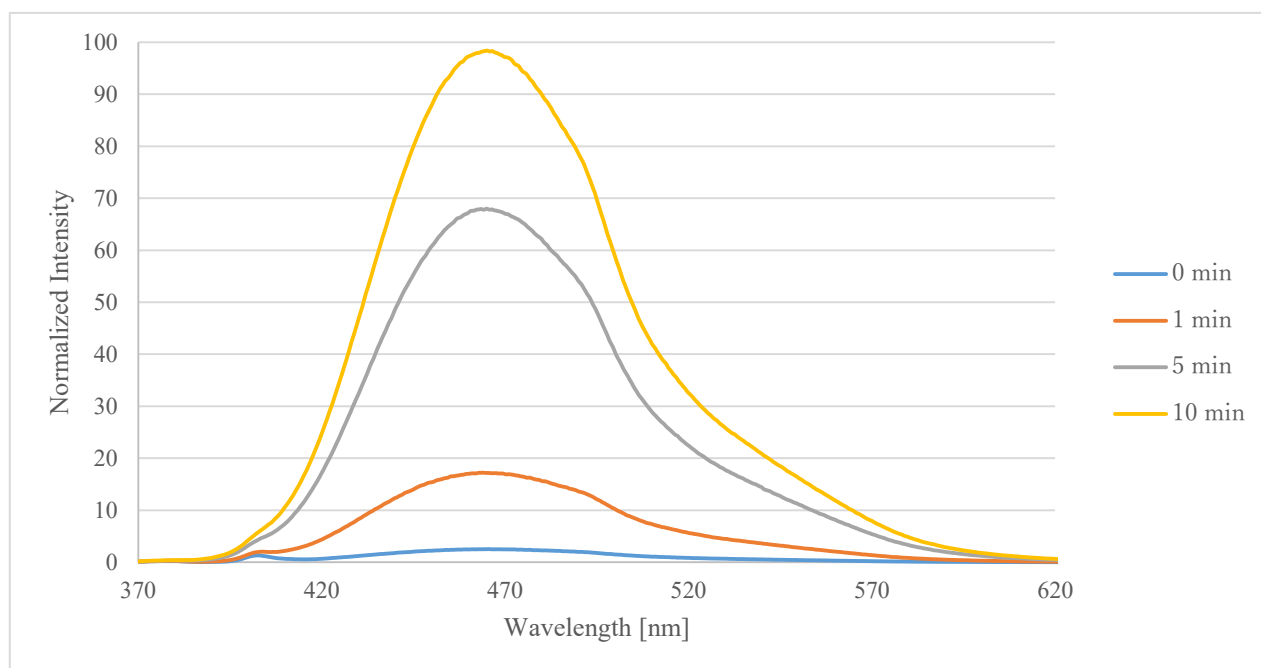
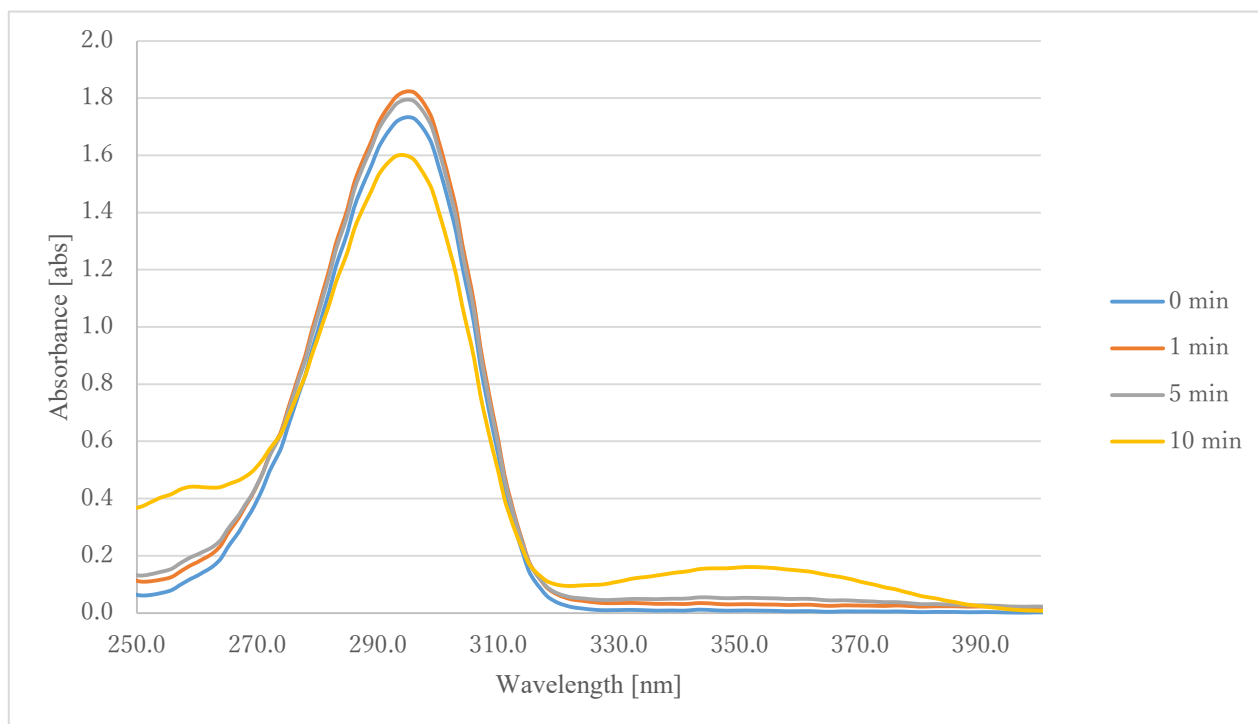


Figure 3-4. 2,5-dimethoxybenzyl acetate (**32**) の光酸化反応 (in MeOH) の各反応時間 (上から 0, 1, 5, 10 分) における UV/Vis spectra (above, 100 μ M, GE Healthcare GeneQuant1300) と normalized fluorescence spectra (below, 100 μ M, , exited at 360 nm, JASCO FP8300).

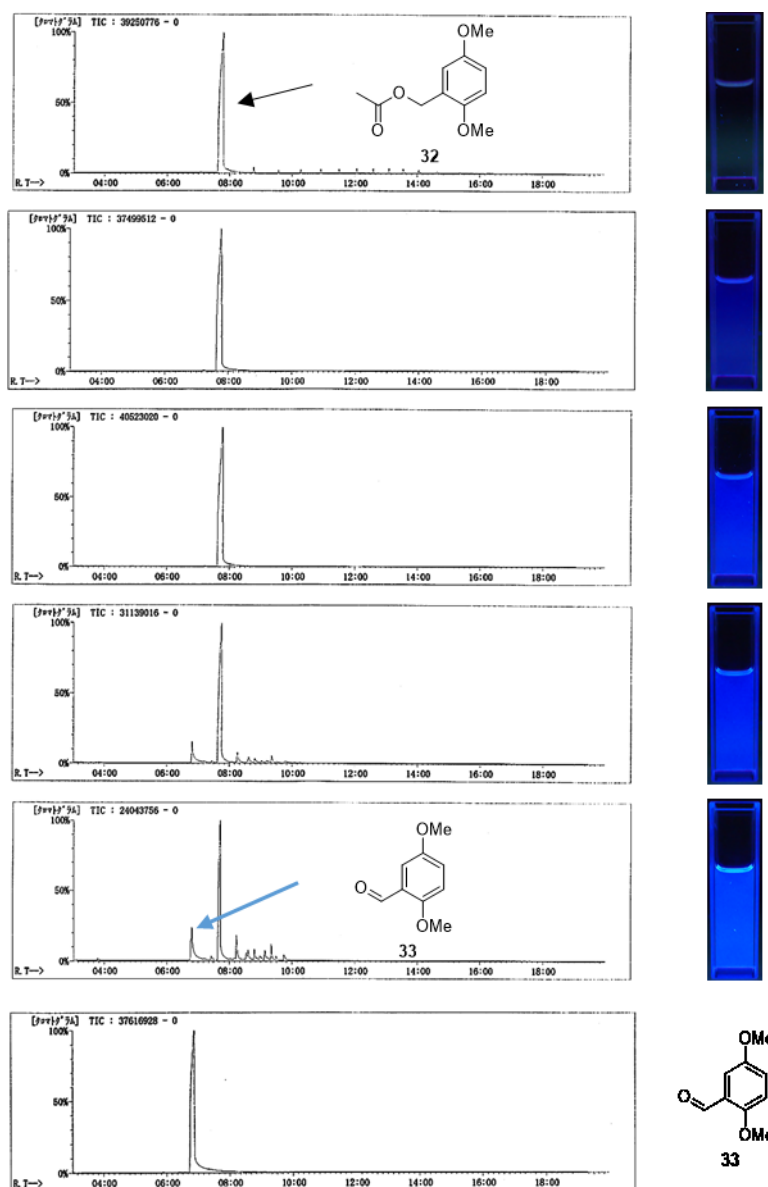


Figure 3-5. 2,5-dimethoxybenzyl acetate (**32**) の光酸化反応 (in chloroform) の各反応時間 (上から 0, 1, 5, 10, 20 分) における GC-MS (JEOL Jms-Q1000GC K9) total ion chromatograms と写真 (100 μ M, 365 nm 照射). 反応溶液は, 0 $^{\circ}$ C において 250 W の UV ランプで照射された. 2,5-dimethoxybenzylaldehyde (**33**) は, GC-MS chromatogram において RT = 7 分に検出された.

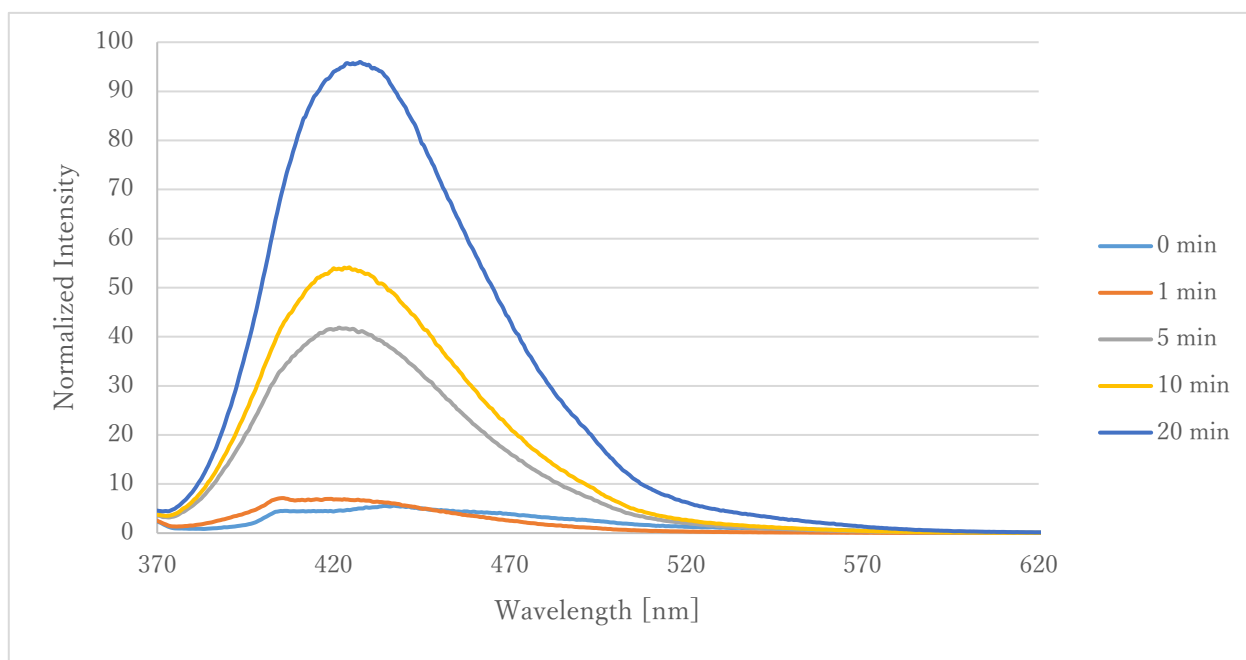
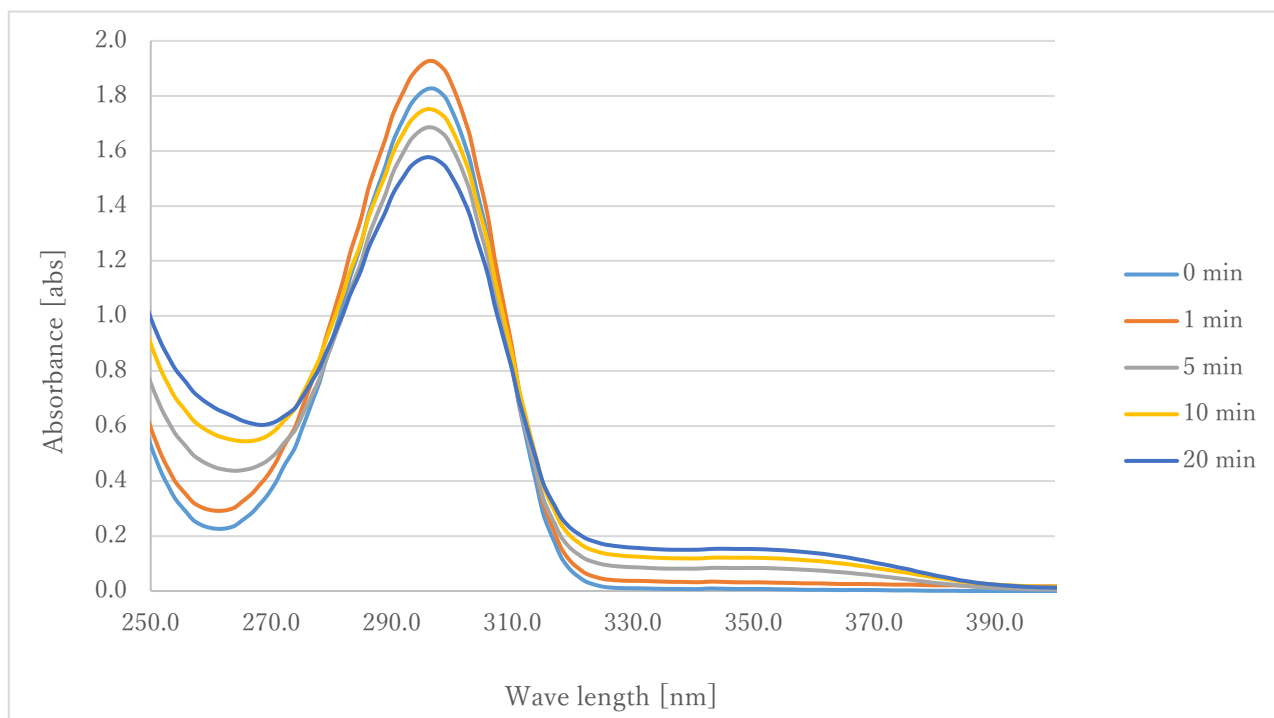


Figure 3-6. 2,5-dimethoxybenzyl acetate (**32**) の光酸化反応 (in chloroform) の各反応時間 (上から 0, 1, 5, 10, 20 分) における UV/Vis spectra (above, 100 μ M, GE Healthcare GeneQuant1300) と normalized fluorescence spectra (below, 100 μ M, excited at 360 nm, JASCO FP8300).

HBA tag-5 の場合においても同様の反応が起こっていることを確認するために、HBA tag-5 acetate (34) を合成し、同様の光酸化反応を行った。基質および生成物は揮発性がないため、GC-MS の代わりに NMR を用いた (Figure 3-7)。また HBA tag-5 は極性溶媒には溶解しないため、chloroform のみを溶媒として用いた。予想通り、HBA tag-5 においても aldehyde 形成が確認され、光酸化反応の進行とともに類似した UV-Vis, 蛍光波長の変化を観察した (Figure 3-8)。

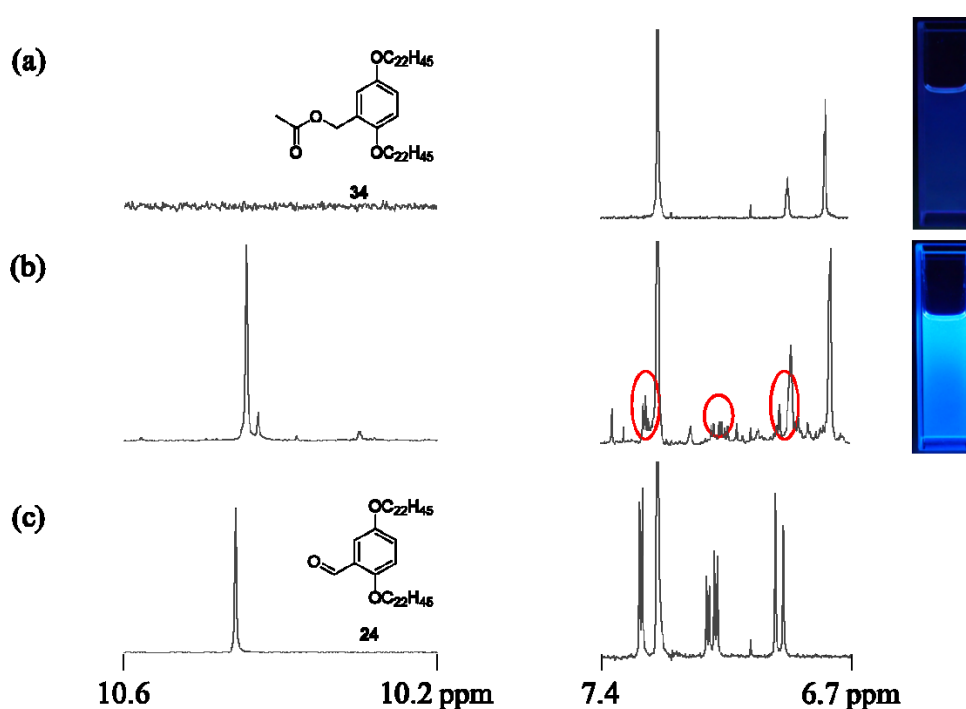


Figure 3-7. 各 NMR spectram (a) HBA tag-5 acetate (34), (b) HBA tag-5 acetate の chloroform 中の光酸化反応 30 分後の反応液, (c) 2,5-di(docosyloxy)benzaldehyde (24). 反応溶液は、0°C において 250 W の UV ランプ (365nm) で照射された。写真は、chloroform 中の各反応溶液の様子 (100 μM, 365 nm 照射)。

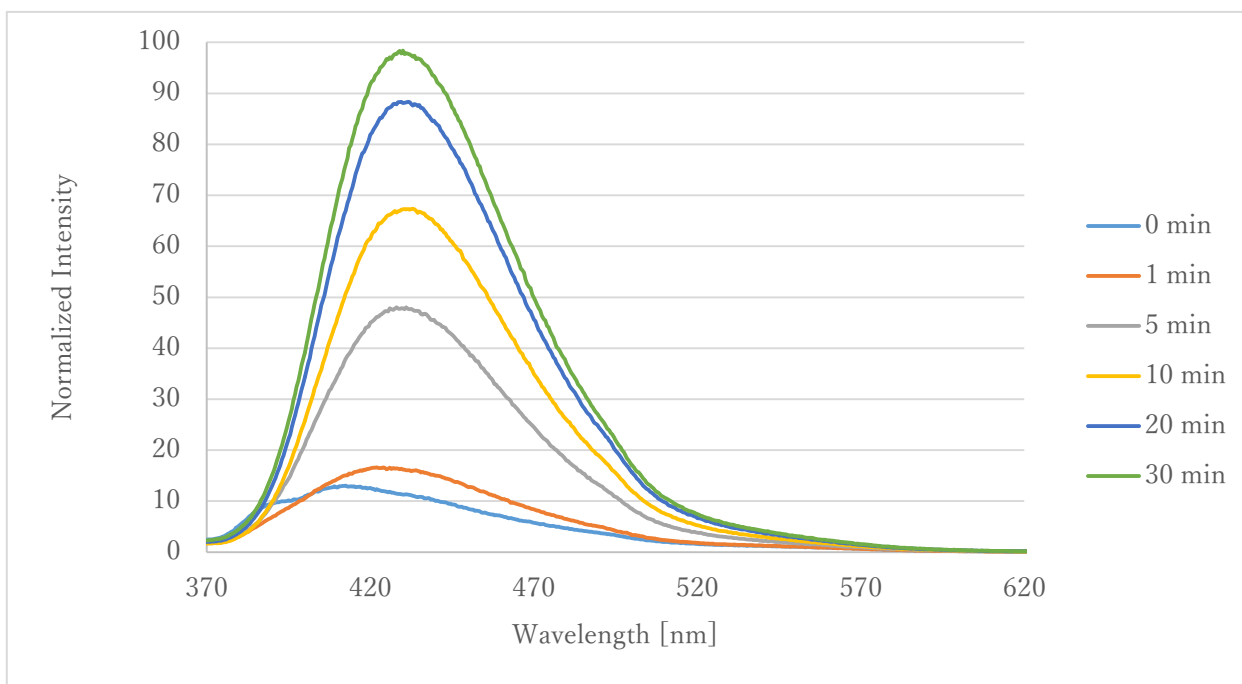
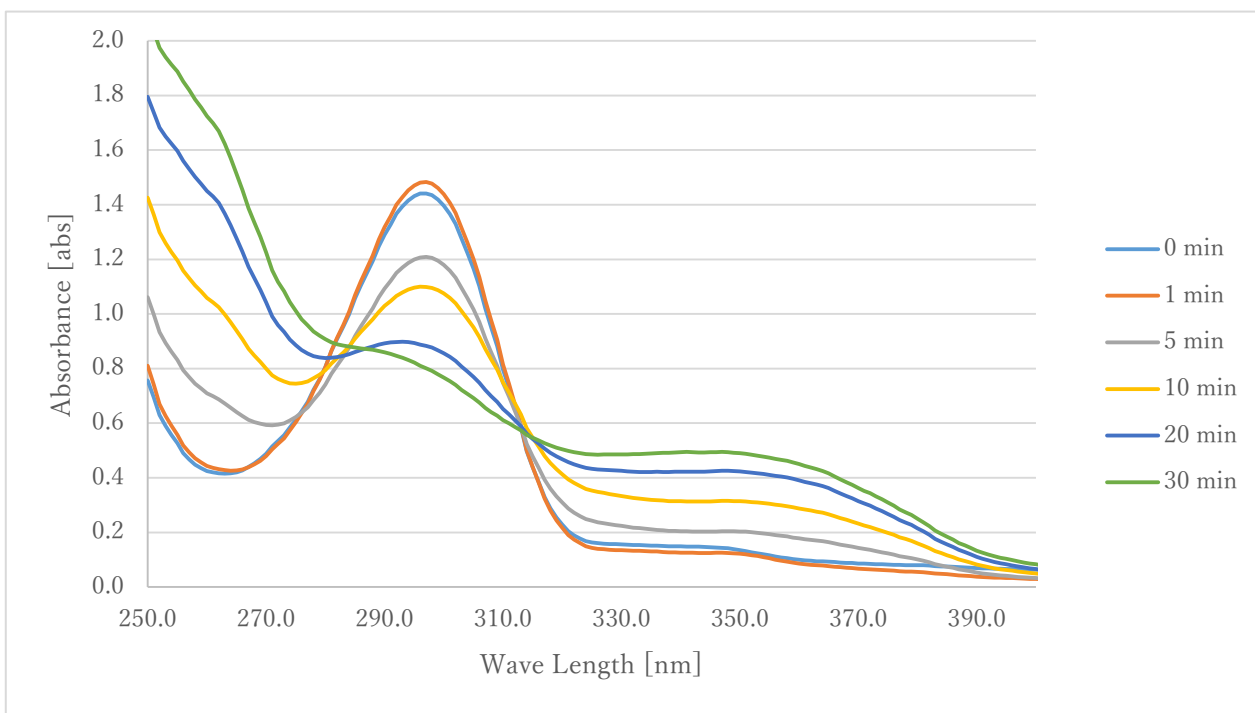
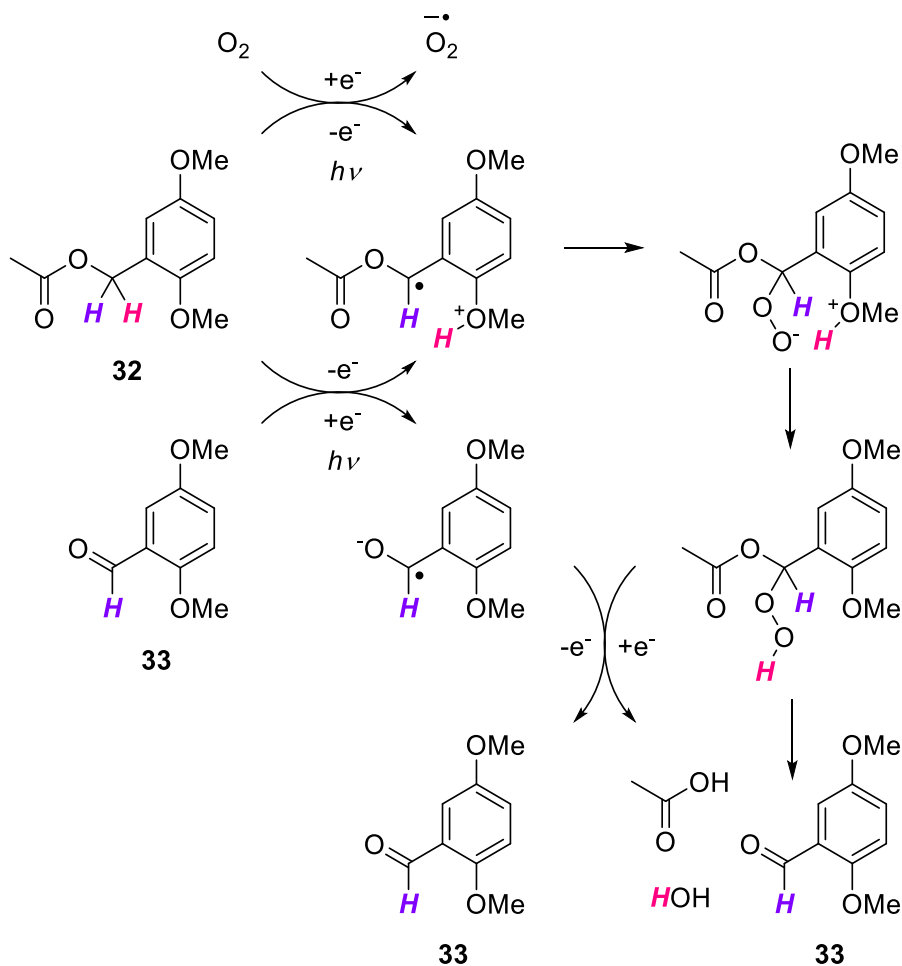


Figure 3-8. HBA tag-5 acetate (**34**) の光酸化反応 (chloroform 中) の各反応時間 (上から 0, 1, 5, 10, 20, 30 分) における UV/Vis spectra (above, 100 μ M, GE Healthcare GeneQuant1300) と normalized fluorescence spectra (below, 100 μ M, excited at 360 nm, JASCO FP8300).

これらの光酸化は，scheme 3-2 が示すような，2,5-dimethoxybenzaldehyde (**33**) が有機光触媒として作用した¹⁶ プロトン共役電子移動¹⁷による光酸化反応が進んでいるものと推測される．以上の結果より，HBA tag-5 および 2,5-dimethoxybenzyl alcohol はそれ自身蛍光性を持たないが，光酸化によって aldehyde を形成し，蛍光性を示していることがわかった．TLC 上でも光照射すると強い蛍光性を示した (Figure 3-1d)．

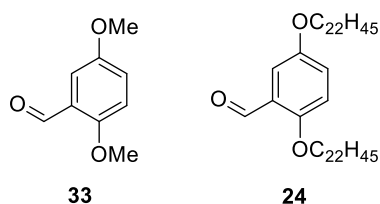
Scheme 3-2. 推定される光酸化反応プロセス



蛍光観察は，発色と比較すると非常に高感度であり，比色定量以上の感度での定量検定が可能であると考えられる．そこで，蛍光特性を利用した定量方法の検討を行うこととした．まず，aldehyde

の蛍光特性を調べたところ、CH₂Cl₂中で極大吸収波長 356 nm、極大蛍光波長 438 nm、chloroform 中で極大吸収波長 354 nm、極大蛍光波長 431 nm であった (Table 3-2)。また HBA tag aldehyde (**24**) の検出限界は、chloroform 中で約 10 nM であった。検出限界や絶対量子収率は、一般的な蛍光性分子と比較すると低いが、反応モニタリングや濾過漏れの検出などには十分な感度である。検量線作成は、chloroform 中で、励起波長 360 nm、蛍光波長 431 nm での蛍光強度を測定することとした。また安定した結果を得るために、光照射は測定時の励起光のみとして、各濃度に調整し蛍光分光計に試料を静置後、すぐに蛍光測定を行うこととした。

Table 3-2. Dialkoxybenzaldehyde の光特性



Compound	Solvent	$\lambda^{\max}_{\text{abs}}$ [nm] ^a	$\lambda^{\max}_{\text{em}}$ [nm] ^a	ϕ^b
33	CHCl ₃	354	427	0.03
33	CH ₂ Cl ₂	353	433	0.02
24	CHCl ₃	354	431	0.05
24	CH ₂ Cl ₂	356	438	0.05

^aMeasured at 1.0 x 10⁻⁴ M.

^bAbsolute quantum yield measured in an integrating sphere.

まず、Boc-Ile-HBA tag-5 (**26**) を用いて光酸化を行い、検量線を作成した。その結果、10-100 μM において非常に直線性の高い検量線を得ることができた (Figure 3-9)。これは、HBA tag-4 を用いた比色定量法よりも 1000 倍近く高感度であった。続いて、他のアミノ酸側鎖や保護基の影響を調べるために、UV を吸収する可能性が高い芳香族アミノ酸や Fmoc アミノ酸なども含めて検量線を作

成することとした。可溶性担体が結合した各種アミノ酸を合成し、検量線を作成した結果、芳香族性の側鎖や Fmoc 基などの影響はほとんど見られず、類似した検量線を示した (Figure 3-9)。これらの結果は、アミノ酸の側鎖や保護基の影響を受けずに、HBA tag の蛍光性を利用した定量が可能であることを示唆した。

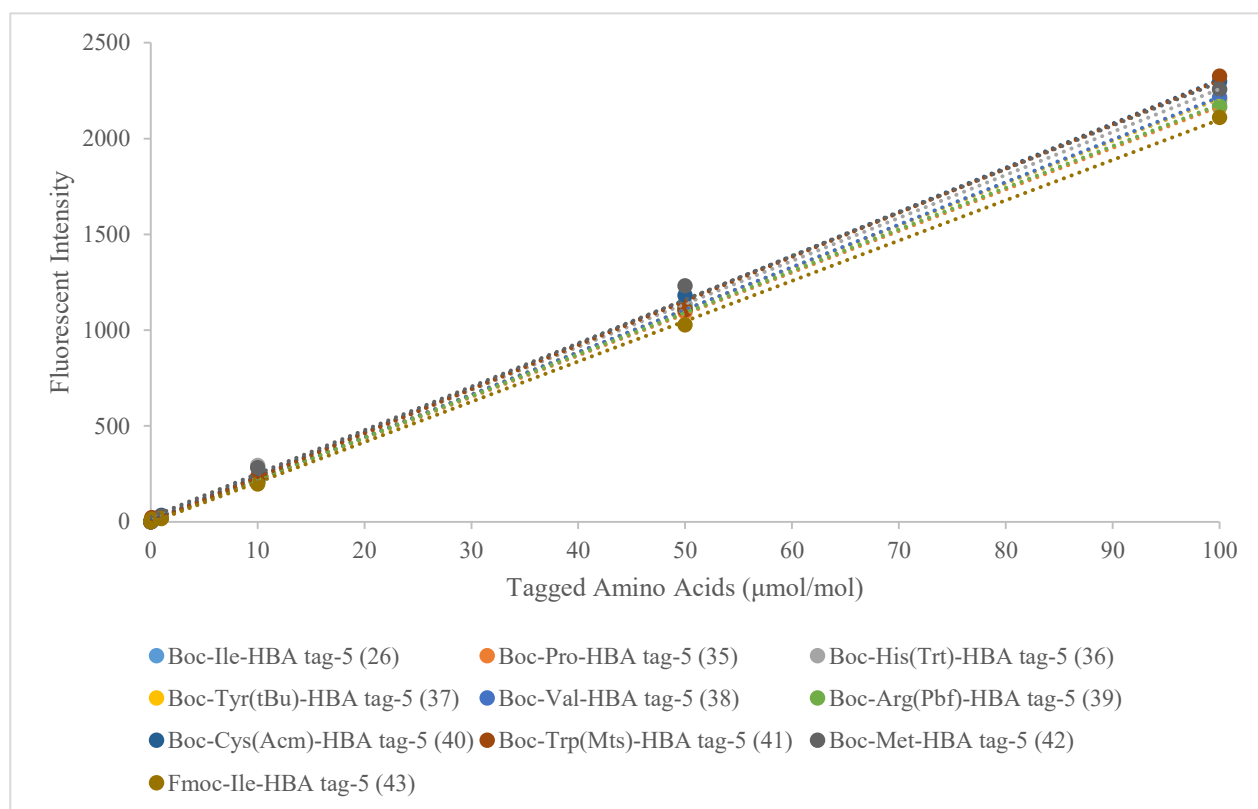


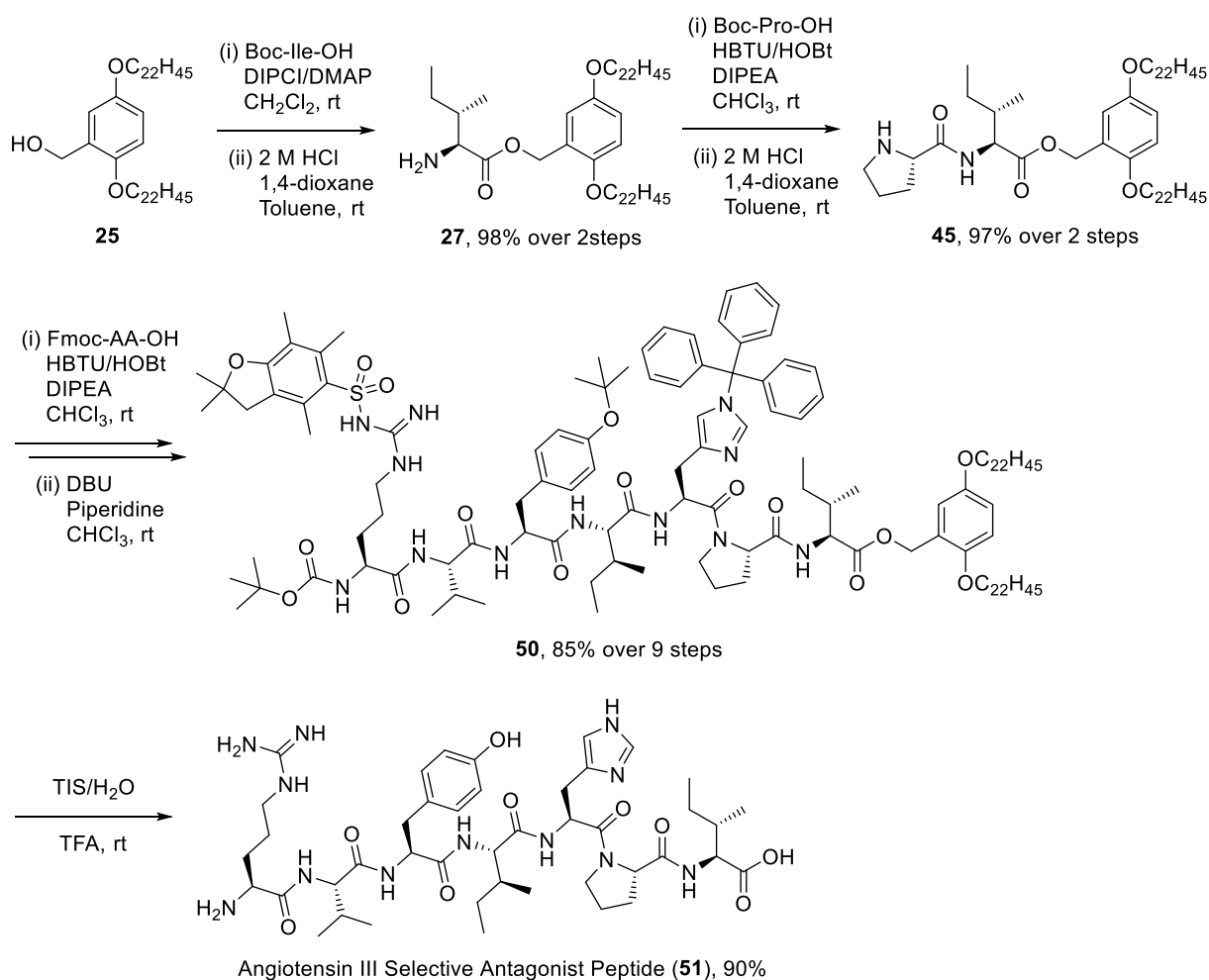
Figure 3-9. HBA tag-5 の光酸化による蛍光を用いた検量線

Boc 法および Fmoc 法を用いたペプチド合成とペプチド配列に依存しない定量が可能かどうかを検証するために、angiotensin III selective antagonist peptide (51) の合成を行った。この生理活性ペプチドは、C 末端から 2 番目に Pro を持つために、Fmoc 法では diketopiperadine 形成が起こる。そのために 2 残基目の脱保護までは Boc 法を用いた合成が好ましい。

まず、C 末端から N 末端方向へ始まる合成反応において、最初の 2 残基目の脱保護反応までは、Boc

法を用いた。選択的な Boc 基の脱保護により 4 段階の収率 95% で化合物 **45** のペプチドを得ることができた。残りは Fmoc 法を用いて、可溶性担体が結合した化合物 **50** を 13 段階で合成し、全体収率 80% で得た。精製操作を行わなくても非常に純度の高い担体結合ペプチド **50** を得ることができた (Figure 3-10).

Scheme 3-3. angiotensin III selective antagonist peptide (**51**) の合成



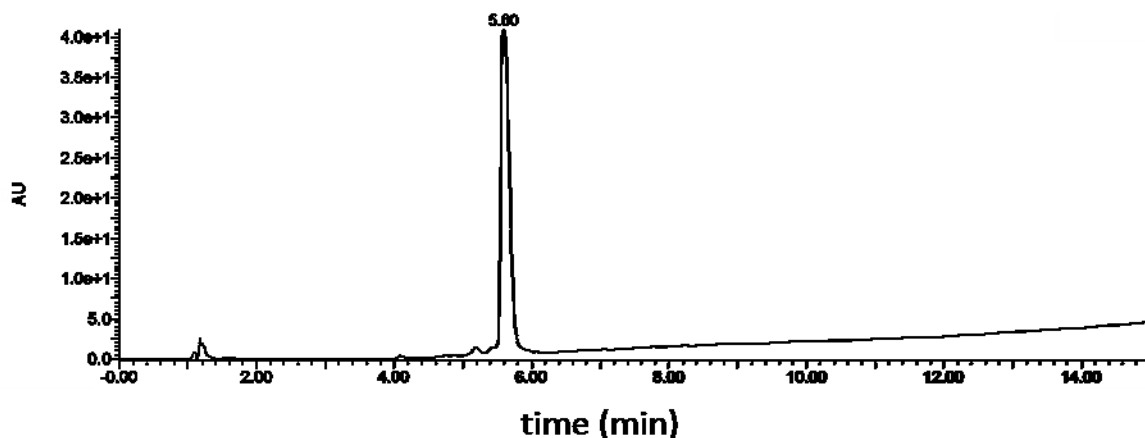


Figure 3-10. HPLC UV/Vis 吸収スペクトル (210-700 nm, Waters ACQUITY UPLC H-Class system). C₈ カラムを用いた. 水系溶媒は 0.1% TFA を含む H₂O, 有機系溶媒は, THF : Acetonitrile = 8 : 2 の溶媒を用いた. 水系溶媒: 有機系溶媒= 2 : 8 で流し始め, 12 分で有機系溶媒が 100% になるようにグラジエントをかけた. 流速は 0.2 mL / min であった.

最後に, 全脱保護を 95%TFA, 2.5% TIS, 2.5%H₂O により行い, 目的物である生理活性ペプチド **51** を, 収率 90% で得た. Figure 3-11 が示すように, 非常に純度の高い目的物が得られた. またすべての反応は, TLC 上にて蛍光もしくは酸による緑色の発色性を利用して, 簡便にモニタリングすることができた. また, 各残基において検量線作成したところ, 期待した通り, ペプチド配列の影響を受けずに直線的な検量線を得ることができた (Figure 3-12).

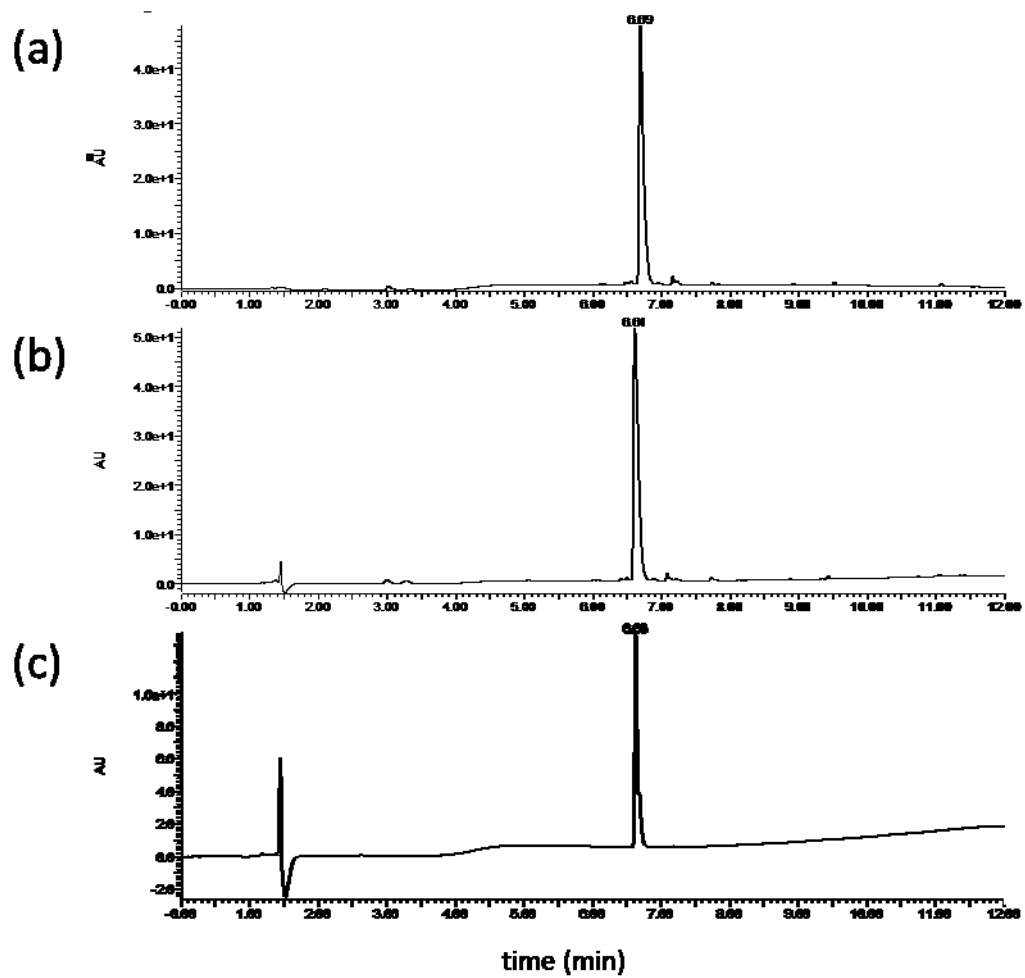


Figure 3-11. HPLCUV/Vis 吸収スペクトル (210-700 nm, Waters ACQUITY UPLC H-Class system). (a) 合成ペプチド **18**, 合成ペプチド **18** + 標準サンプル, (c) 標準サンプル. ODS カラムを用いた. 水系溶媒は 0.1% TFA を含む H₂O, 有機系溶媒は, 0.1% TFA を含む Acetonitrile を用いた. 水系溶媒: 有機系溶媒= 9 : 1 で流し始め, 8.5 分まで有機系溶媒が 60% になるようにグラジエントをかけた. 流速は 0.2 mL/min であった.

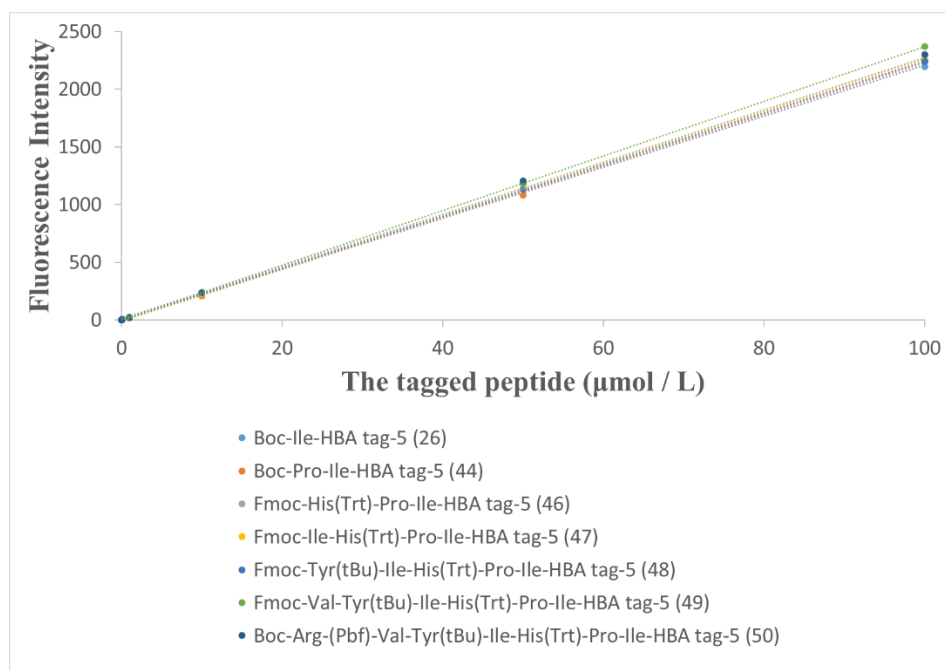


Figure 3-12. HBA tag-5 の光酸化による蛍光を用いた検量線

ペプチド合成において、エピマー化は非常に重要な問題である。特に1残基目のエステル結合形成反応では、His や Ser, Pro などは、エピマー化されやすいと報告されている。¹⁸C 末端アミノ酸残基に HBA tag-5 が結合している場合、エステル結合部位が可溶性担体と空間的に近いために、その影響を受ける可能性がある。そこで、一残基目に、L 体もしくは D 体の Pro, Ser, His をもち、2 残基目に L 体の Val を縮合させた互いにジアステレオマーである Boc-L-Val-L-AA-HBA tag-5 および Boc- L-Val- D-AA-HBA tag-5 をそれぞれ合成し、エピマー化率を検証した。また、モデルペプチドにおいてもエピマー化が起こっているか検証するために Boc-Pro-D-Ile-HBA tag-5 (52) を合成し、同様に検証した。Boc-Pro-D-Ile-HBA tag-5 (52) と Boc-Pro-L-Ile-HBA tag-5 (44) を用いて、¹H NMR 測定により比較した。L 体 D 体それぞれを溶解したものと混合したものの 3 サンプルを測定した。その結果、L 体 D 体は、混合状態においても HBA tag-5 のベンジル位のプロトンおよびベンゼン環のオルト位のプロトン、Ile 側鎖の CH₃ 末端のシフト値に差があり、ほとんどエピマー化が起きていないことがわかった。同様に、Pro, Ser, His においても L 体

と D 体に NMR スペクトルの差異がみられ、いずれもほとんどエピマー化が起こっていないことを確認した (Figure 3-13—3-25). HBA tag-5 を結合させた場合、一残基目のエピマー化を NMR 測定によって簡単に分析可能であり、担体結合時はエピマー化がほとんど起こらないことが示唆された。

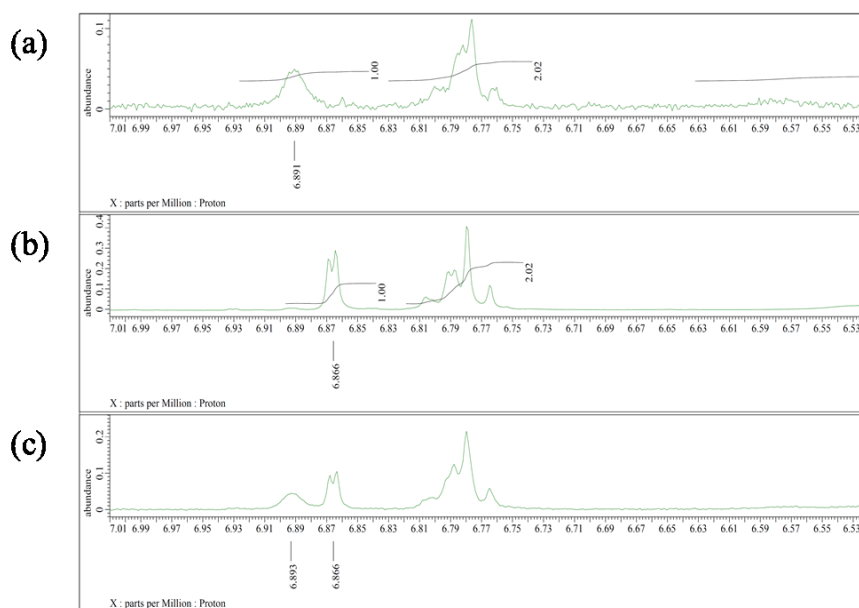


Figure 3-13. 部分的な NMR spectra (around 7 ppm) : (a) Boc-Pro-L-Ile-HBA tag-5 (**44**), (b) Boc-Pro-D-Ile-HBA tag-5 (**52**), and (c) Mixed.

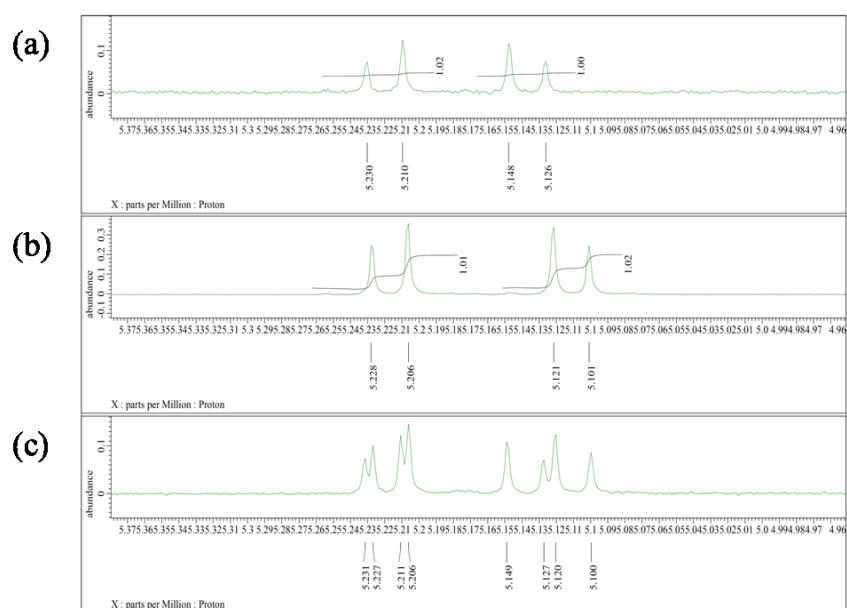


Figure 3-14. 部分的な NMR spectra (around 5 ppm) of (a) Boc-Pro-L-Ile-HBA tag-5 (**44**), (b) Boc-Pro-D-Ile-HBA tag-5 (**52**), and (c) Mixed.

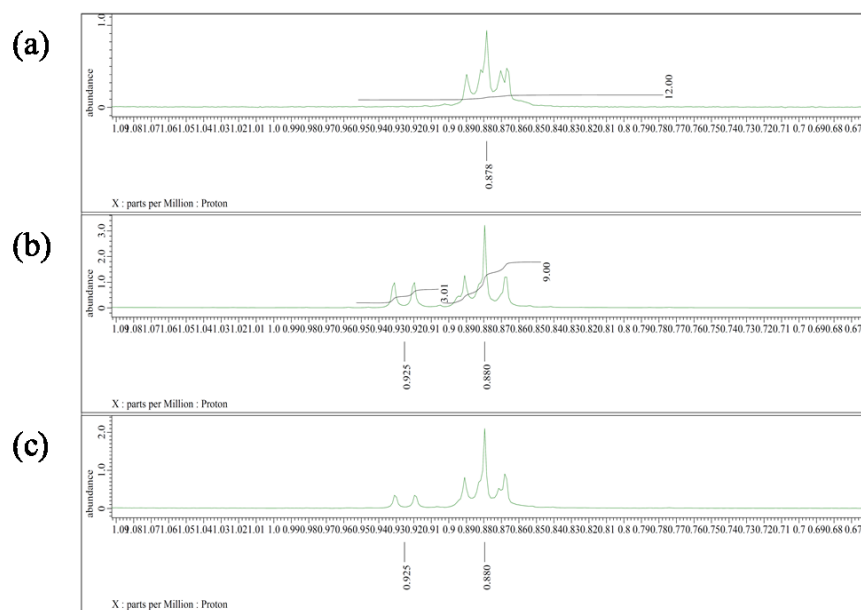


Figure 3-15. 部分的な NMR spectra (around 1 ppm) of (a) Boc-Pro-L-Ile-HBA tag-5 (**44**), (b) Boc-Pro-D-Ile-HBA tag-5 (**52**), and (c) Mixed.

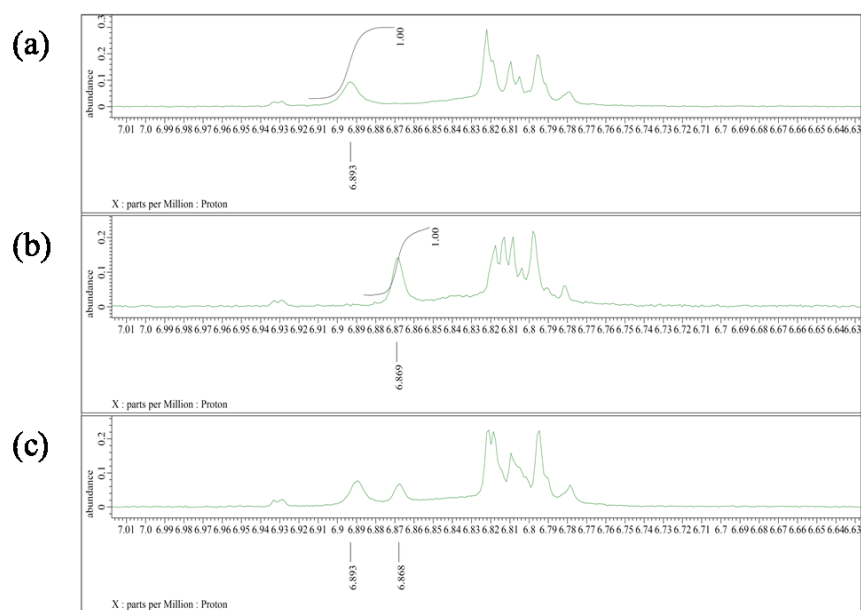


Figure 3-16. 部分的な NMR spectra (around 7 ppm) of (a) Boc-Val-L-His(Bom)-HBA tag-5 (**55**), (b) Boc-Val-D-His(Bom)-HBA tag (**56**), and (c) Mixed.

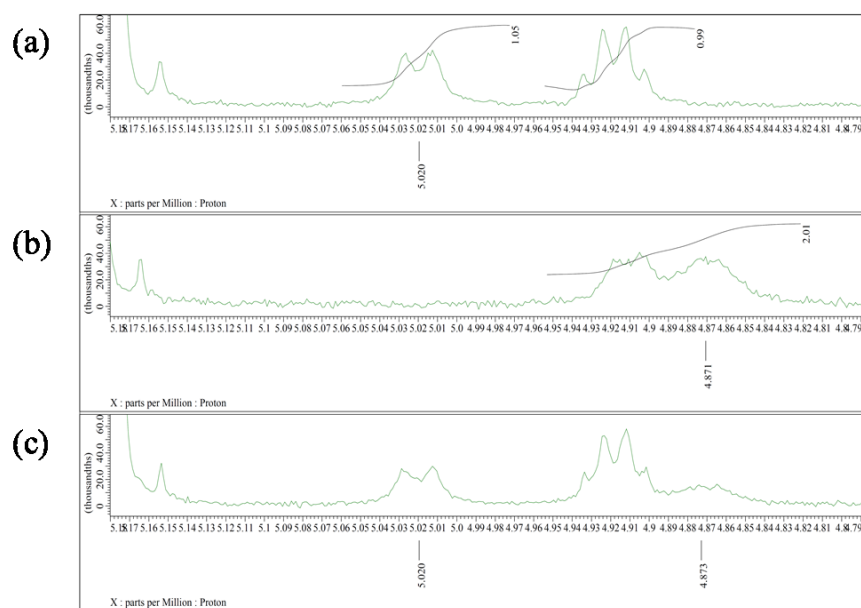


Figure 3-17. 部分的な NMR spectra (around 5 ppm) of (a) Boc-Val-L-His(Bom)-HBA tag-5 (**55**), (b) Boc-Val-D-His(Bom)-HBA tag-5 (**56**), and (c) Mixed.

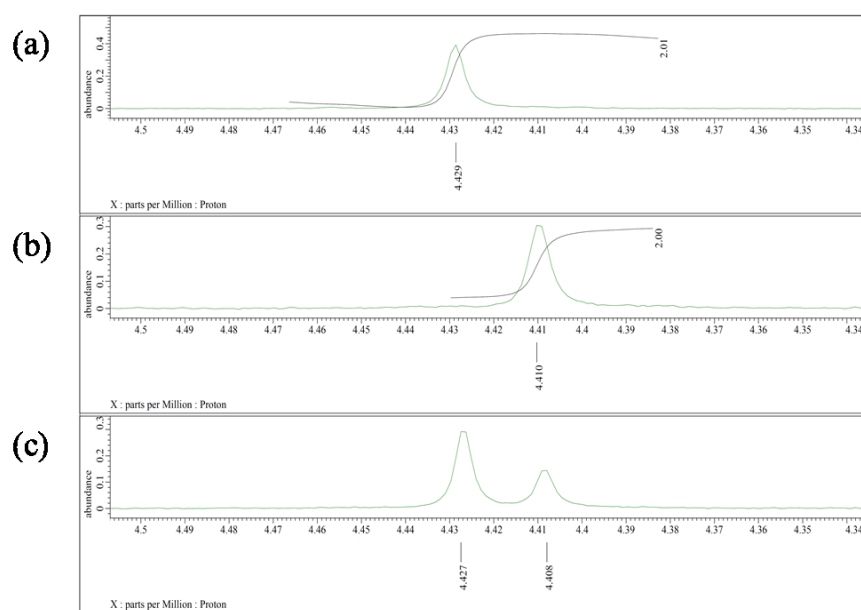


Figure 3-18. 部分的な NMR spectra (around 4 ppm) of (a) Boc-Val-L-His(Bom)-HBA tag-5 (**55**), (b) Boc-Val-D-His(Bom)-HBA tag-5 (**56**), and (c) Mixed.

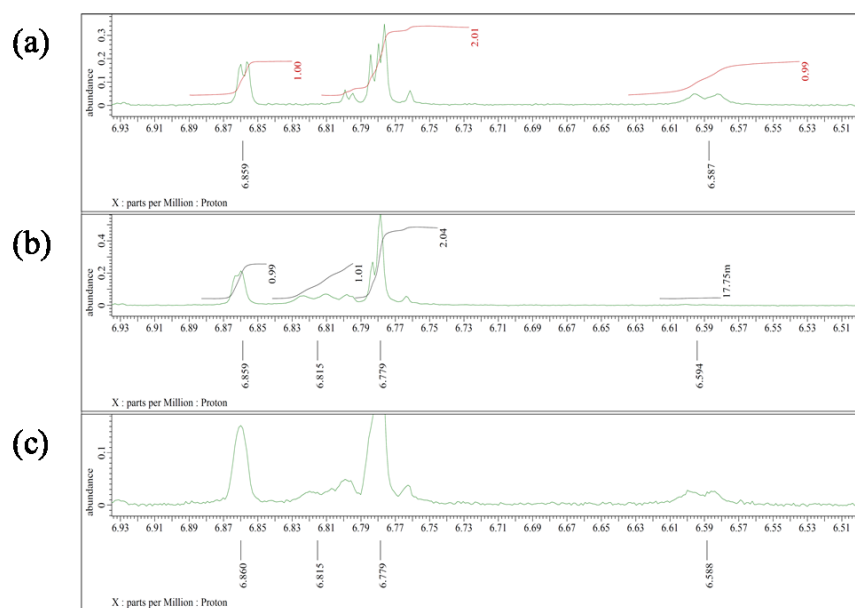


Figure 3-19. 部分的な NMR spectra (around 7 ppm) of (a) Boc-Val-L-Ser(Bzl)-HBA tag-5 (**57**), (b) Boc-Val-D-Ser(Bzl)-HBA tag-5 (**58**), and (c) Mixed.

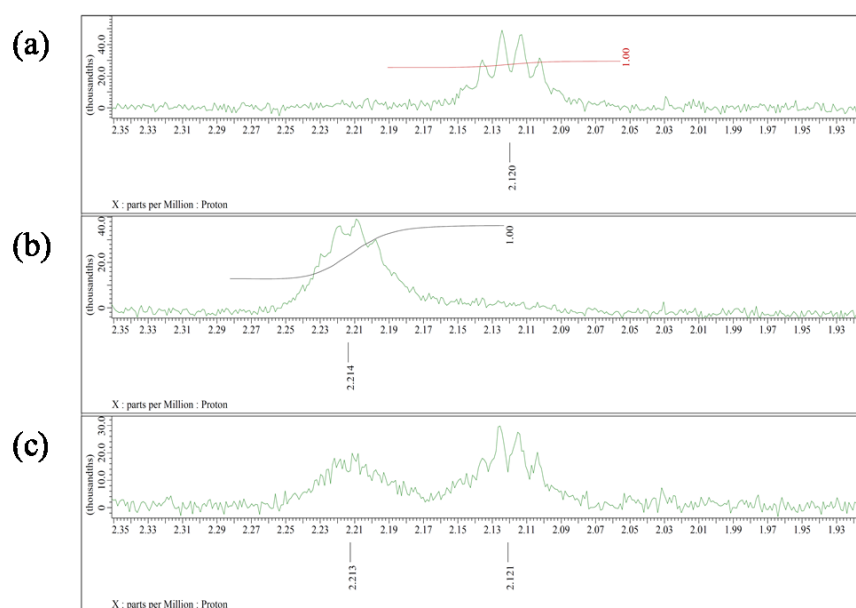


Figure 3-20. 部分的な NMR spectra (around 2 ppm) of (a) Boc-Val-L-Ser(Bzl)-HBA tag-5 (**57**), (b) Boc-Val-D-Ser(Bzl)-HBA tag-5 (**58**), and (c) Mixed.

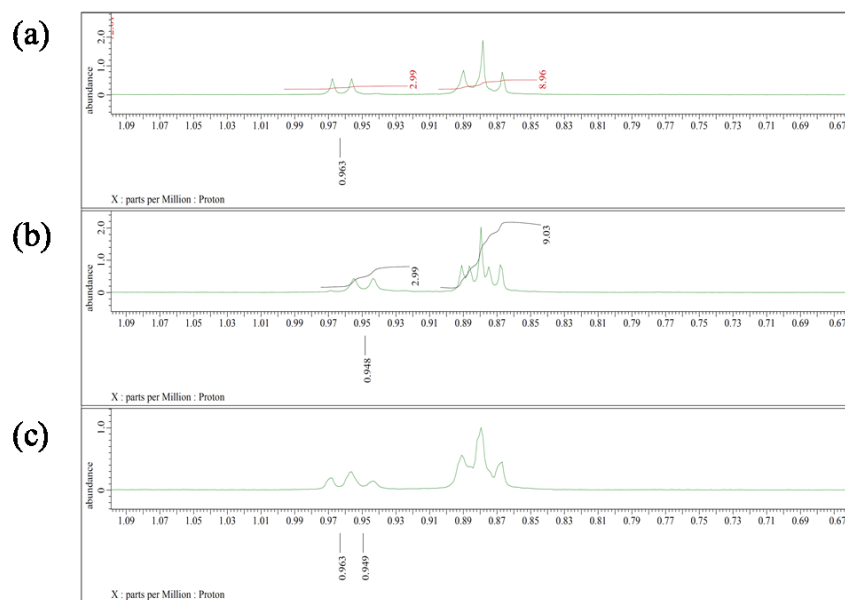


Figure 3-21. 部分的な NMR spectra (around 1 ppm) of (a) Boc-Val-L-Ser(Bzl)-HBA tag-5 (**57**), (b) Boc-Val-D-Ser(Bzl)-HBA tag-5 (**58**), (c) Mixed.

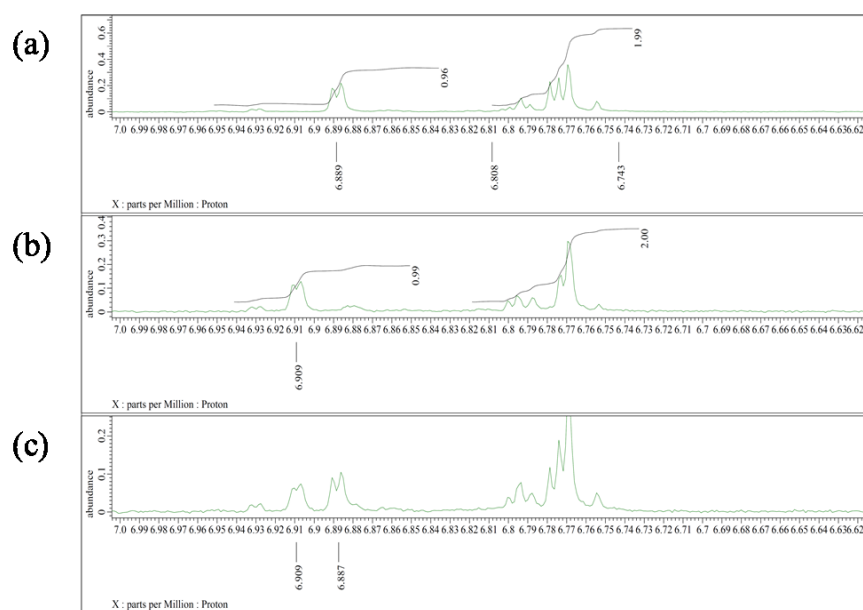


Figure 3-22. 部分的な NMR spectra (around 7 ppm) of (a) Boc-Val-L-Pro-HBA tag-5 (**59**), (b) Boc-Val-D-Pro-HBA tag-5 (**60**), and (c) Mixed.

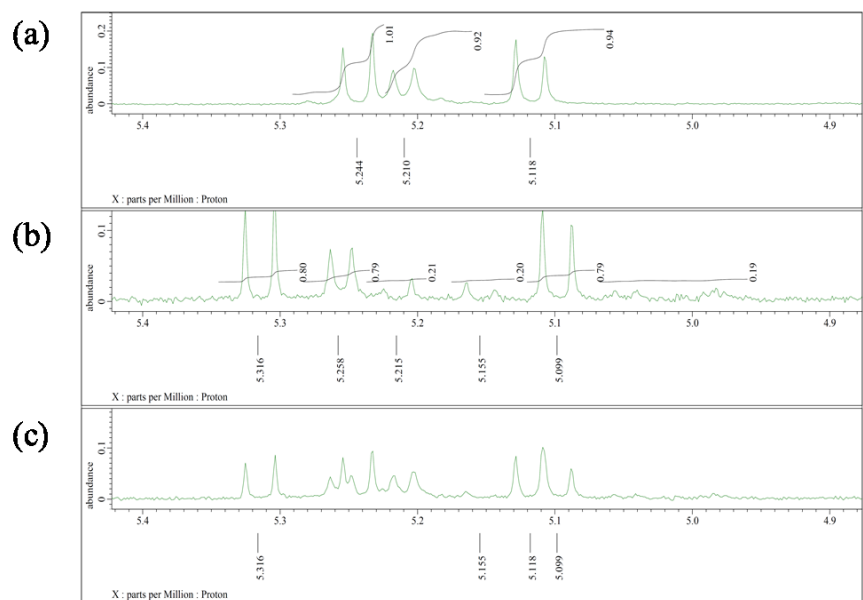


Figure 3-23. 部分的な NMR spectra (around 5 ppm) of (a) Boc-Val-L-Pro-HBA tag-5 (**59**), (b) Boc-Val-D-Pro-HBA tag-5 (**60**), and (c) Mixed.

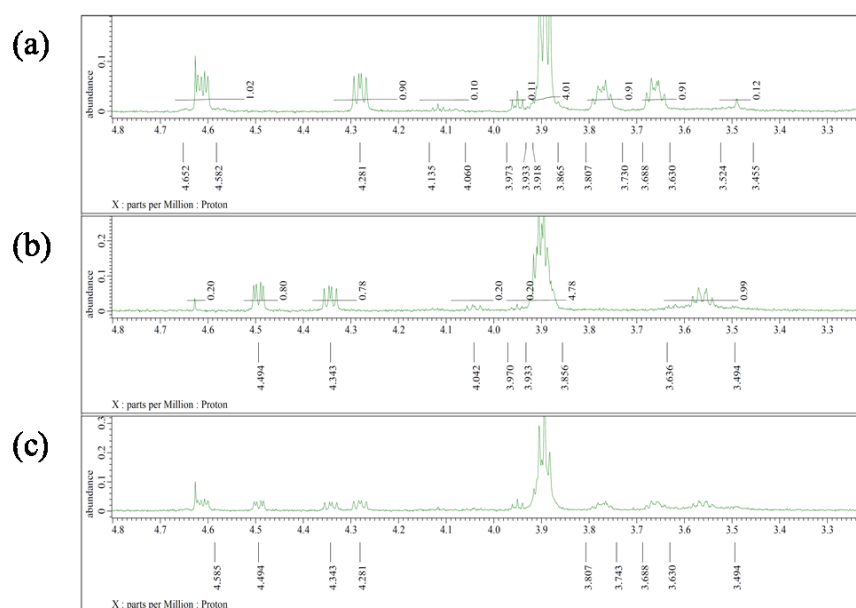


Figure 3-24. 部分的な NMR spectra (around 4 ppm) of (a) Boc-Val-L-Pro-HBA tag-5 (**54**), (b) Boc-Val-D-Pro-HBA tag-5 (**55**), and (c) Mixed.

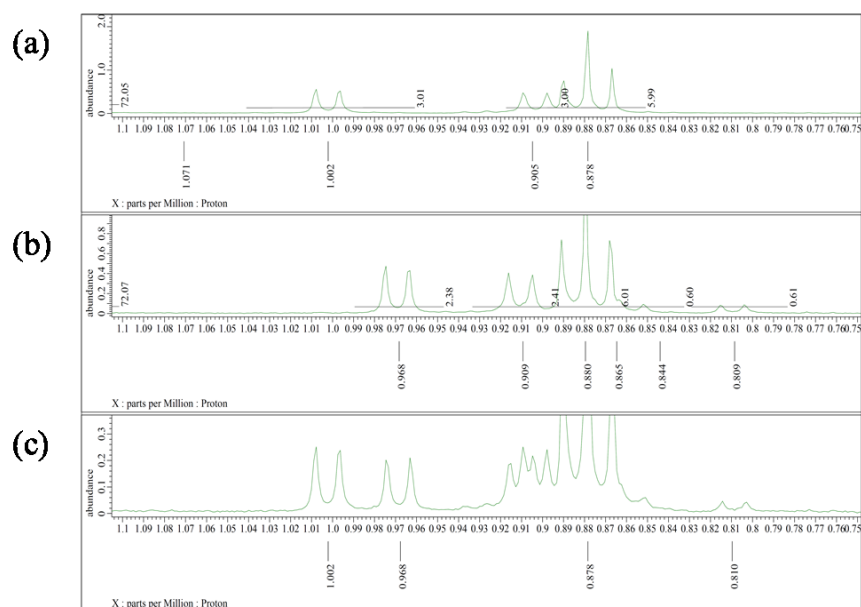


Figure 3-25. 部分的な NMR spectra (around 1 ppm) of (a) Boc-Val-L-Pro-HBA tag-5 (**54**), (b) Boc-Val-D-Pro-HBA tag-5 (**55**), and (c) Mixed.

3-3. 結論

Boc 基の脱保護条件に耐えられ、かつ全脱保護条件で容易に脱保護可能である適度な酸耐性を 2,5-置換の HBA tag-5 が有すると推測し、Boc 基の選択的な脱保護条件を検討した結果、HCl の滴下により定量的に Boc 基のみを外すことができ、全脱保護条件においても速やかに脱保護可能であることを見出した。また、HBA tag-5 は、TLC 上および溶液状態において酸性条件下で鮮やかな緑色に発色した。発色性オリゴマーの溶解性は低いため、比色定量試験には適用できないが、従来の Boc 法に用いていた 3,5-置換の HBA tag-3 は発色性を有していなかったため、TLC 上でより簡便に担体が結合した化合物を識別することが可能となった。さらに HBA tag-5 および HBA tag-5 が C 末端に結合したペプチドやアミノ酸が、光酸化により aldehyde が形成されることで蛍光性を示すことを見出した。HBA tag-5 の光酸化による蛍光性は、結合するアミノ酸種や保護基、ペプチド配列の長さなどに依存しないことが示唆され、前章の酸による発色性を用いた定量よりも簡便な方法かつ 1000 倍以上の感度での定量が可能となった。また TLC 上においても、酸による発色に加えて光酸化により強い蛍光性を示した。HBA tag-5 は蛍光性と発色性という機能が付与されながらも十分な溶解性の制御も可能であり、C 末端から 2 つめに Pro を有する 7 残基のモデルペプチド angiotensin III selective antagonist peptide (**51**) を、Boc 法と Fmoc 法を合わせて効率的に合成した。得られたペプチドは精製操作なしに高い純度を保っていた。また、HBA tag が C 末端に結合することとで、1 残基目の縮合反応のエピマー化を $^1\text{H NMR}$ によって容易に判別することができることを見出し、各種アミノ酸においてエピマー化がほとんど起きていないことを確認した。

3-4. 実験項

3-4-1. HBA tag-5 (25) の調製

2,5-dihydroxybenzaldehyde (691 mg, 5.00 mmol) を脱水 DMF (30 mL) に溶解させ、1-bromodocosane (5.84 g, 15.00 mmol) と K_2CO_3 (5.39 g, 39.00 mmol) を加えた後、90°C で 18 時間反応させた。反応終了後、水を加え (30 mL) , トルエンで抽出した (20 mL x 3)。有機層を、 Na_2SO_4 で乾燥させた後、減圧下濃縮した。混合物を、60°C のアセトニトリル (350 mL x 3) で熱時濾過し、2,5-di(dococyloxy)benzaldehyde (**24**) (3.69 g, 4.90 mmol) を収率 98% で得た。2,5-di(dococyloxy)benzaldehyde (**24**) (11.33 g, 15.00 mmol) を THF (500 mL) と 2-propanol (50 mL) に溶解させ、 $NaBH_4$ (1.13 g, 30.00 mmol) を加え、室温で 60 分間攪拌した。反応終了後、飽和食塩水 (300 mL) を加え、THF (150 mL x 3) で抽出した後、 Na_2SO_4 で乾燥させ、減圧下濃縮した。得られた乾燥粉末に、MeOH と H_2O を加え、吸引濾過で洗浄した後、HBA tag-5 (**25**) を得た。(10.79 g, 14.25 mmol, 収率 95%)

2-4-2. 2,5-dimethoxybenzyl acetate (32) の調製

2,5-dimethoxybenzyl alcohol (1.01 g, 6.00 mmol) を acetic anhydride (30 mL) および piperidine (15 mL) に溶解させ、室温で 180 分攪拌した。反応終了後、飽和食塩水 (150 mL) を加え、ethyl acetate (100 mL x 3) で抽出した後、有機層を 1 M HCl (50 mL), 飽和炭酸水素ナトリウム溶液 (50 mL), 飽和食塩水 (50 mL) でそれぞれ順に洗浄した。その後、 Na_2SO_4 で乾燥させ、減圧下濃縮し 2,5-dimethoxybenzyl acetate (**32**) を得た。(1.24 g, 5.88 mmol, 収率 98%)

2-4-3. HBA tag-5 とアミノ酸との縮合反応 (26, 35-43)

HBA tag-5 (**25**) (379 mg, 0.500 mmol) を CH_2Cl_2 (30 mL) に溶解させ、Fmoc-AA-OH もしくは Boc-AA-OH (1.50–2.00 mmol), DIPCI (3.00 mmol equiv.), DMAP (0.0500 mol equiv.) を加え、室温で 1 時

間攪拌した。反応終了後、CH₃CN (100 mL) を用い、CH₃CN に溶媒置換をした。得られた懸濁液を吸引濾過し、CH₃CN (100 mL x 3) により洗浄し、Fmoc-AA-HBA tag-4 もしくは Boc-AA-HBA tag-4 (**26, 35-43**)を得た。(435–627 mg, 0.490–0.495 mmol, 収率 98–99%)

2-4-4. HBA tag-5 acetate の調製

HBA tag-5 (**25**) (799 mg, 1.00 mmol) を CH₂Cl₂ (30 mL) に溶解させ、acetic anhydride (5 mL), piperidine (2.5 mL), DMAP (0.0500 mol equiv.) を加え、室温で攪拌した。反応終了後、1M HCl を用いて pH1.0 に調整した後、CH₃CN を加え、得られた懸濁液を吸引濾過し、HBA tag-5 acetate (**34**) を得た。(736 mg, 0.92 mmol, 収率 92%)

2-4-5. Boc-AA-HBA tag-5 もしくは Boc-peptide-O-HBA tag-5 の Boc 基の選択的な脱保護反応

可溶性担体結合ペプチド (1.00 mmol) を、toluene (7.50 mL) に溶解させた後、1,4-dioxane 中 4 M HCl (7.50 mmol) をゆっくりと滴下し、室温下で、4–5 時間攪拌させた。反応終了後、減圧下濃縮により CH₃CN へと溶媒置換を行い、得られた懸濁液を吸引濾過し、CH₃CN (100 mL x 3) で洗浄した。

2-4-6. 可溶性担体結合ペプチドの Fmoc 基の脱保護反応

可溶性担体結合ペプチドを、THF (30 mM) に溶解させ、DBU, piperidine をそれぞれ 1%になるように加え、室温で 10 分攪拌した。反応終了後、1 N HCl 溶液を加えた後、減圧下濃縮により CH₃CN へと溶媒置換を行った。得られた懸濁液を吸引濾過し、CH₃CN (100 mL x 3) により洗浄し、Fmoc 基を取り除いたペプチドを得た。

2-4-8. 可溶性担体結合ペプチドのアミノ酸 (Fmoc-AA-OH or Boc-Leu-OH)との縮合反応

Fmoc 基もしくは Boc 基を脱保護したペプチドを chloroform (30 mM) に溶解させ、Fmoc-AA-OH もしくは Boc-AA-OH (1.50 mol equiv.) , HBTU (1.20 mol equiv.), HOBt (1.20 mol equiv.), DIPEA (2.50 mol equiv.) を加え、室温下で 1-3 時間攪拌した。反応終了後、減圧下濃縮により CH₃CN へと溶媒置換を行い、得られた懸濁液を吸引濾過し、CH₃CN (100 mL x 3) で洗浄した。モデルペプチド合成時では、13 段階目の反応終了後、これ以上の分離精製することなく、目的配列を得た。(1.87 g, 0.82 mmol, 全体収率 80%)

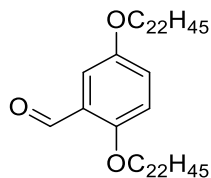
2-4-9. 光酸化による蛍光性を利用した検量線作成

可溶性担体結合ペプチドを、chloroform (1.0 mM) に溶解させ、段階希釈により 0.1, 1.0, 10.0, 50.0, 100.0 μM の試料溶液を調製した。それぞれの濃度の試料を、蛍光分光計 (キセノンランプ 150 W) を用いてすぐに測定した。

2-4-10. 可溶性担体結合ペプチドの全脱保護反応

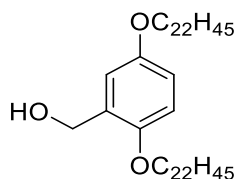
可溶性担体結合ペプチド (**50**) (228.7 mg, 0.10 mmol) に、TFA (38.0 mL), TIS (1.0 mL), H₂O (1 mL) を加え、室温で 1 時間攪拌した。反応終了後、減圧下濃縮し、ジイソプロピルエーテル (30 mL) を加えた。冷却遠心機を用いて懸濁液から固体の回収およびジイソプロピルエーテル (30 mL x 3) による洗浄を行った。得られた固形物に TFA および水を加えて凍結乾燥させた後、Angiotensin III selective Antagonist Peptides (**51**)を得た。(111.3 mg, 0.090 mmol, 収率 90%)

2-5. スペクトルデータ



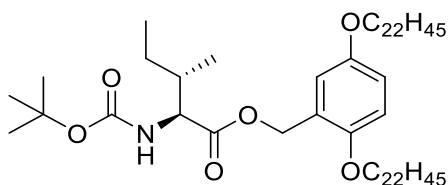
24

2,5-di(docosyloxy)benzaldehyde *White solid (under neutral pH)* : ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 10.47 (1H, s), 7.31 (1H, d, $J = 3.4$ Hz), 7.11 (1H, dd, $J = 8.9, 3.4$ Hz), 6.92 (1H, d, $J = 8.9$ Hz), 4.03 (2H, t, $J = 6.2$ Hz), 3.94 (2H, t, $J = 6.2$ Hz), 1.85-1.72 (4H, m), 1.50-1.40 (4H, m), 1.38-1.11 (72H, m), 0.88 (6H, t, $J = 6.9$ Hz); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ 189.8, 156.3, 153.0, 125.0, 124.1, 114.4, 110.8, 69.2, 68.7, 31.9, 29.7, 29.6, 29.4, 29.2, 26.1, 26.0, 22.7, 14.1; IR (KBr) 3045, 2954, 2850, 1693, 1585, 1468, 1379, 1269, 1252, 1076, 719 cm^{-1} ; HRMS calc. for $[\text{C}_{51}\text{H}_{95}\text{O}_3]^+$: 755.7281, found: 755.7300.



25

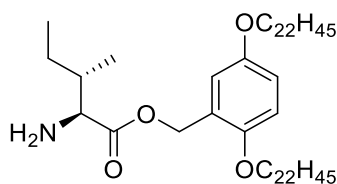
2,5-di(docosyloxy)benzyl alcohol *White solid (under neutral pH)* : ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 6.86 (2H, d, $J = 2.8$ Hz), 6.80-6.73 (1H, m), 4.65 (2H, d, $J = 6.9$ Hz), 3.96 (2H, t, $J = 6.2$ Hz), 3.90 (2H, t, $J = 6.2$ Hz), 2.44 (1H, t, $J = 6.9$ Hz), 1.81-1.71 (4H, m), 1.48-1.39 (4H, m), 1.38-1.10 (72H, m), 0.88 (6H, t, $J = 6.9$ Hz); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ 153.0, 151.0, 130.2, 115.4, 113.8, 112.1, 68.6, 68.6, 62.6, 31.9, 29.7, 29.6, 29.5, 29.4, 29.2, 26.2, 26.1, 22.7, 14.1; IR (KBr) 3421, 3047, 2954, 2916, 2850, 1504, 1471, 1223, 1049, 1036, 719 cm^{-1} ; HRMS calc. for $[\text{C}_{51}\text{H}_{97}\text{O}_3]^+$: 757.7438, found: 757.7412.



26

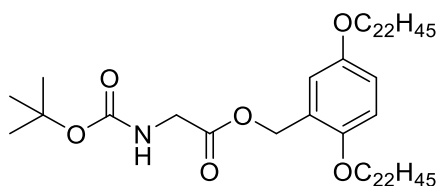
Boc-Ile-HBA tag-5 *White solid (under neutral pH)* : ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 6.89 (1H, d, $J = 2.8$ Hz), 6.82-6.76 (2H, m), 5.24-5.13 (2H, m), 5.08 (0.9H, d, $J = 8.9$ Hz, major rotamer), 4.83-4.76 (0.1H, m, minor

rotamer), 4.36-4.29 (0.9H, m, major rotamer), 4.18-4.10 (0.1H, m, minor rotamer), 3.93-3.86 (3.7H, m, major rotamer), 3.65-3.44 (0.3H, m, minor rotamer), 1.93-1.83 (1H, m), 1.78-1.71 (4H, m), 1.47-1.38 (15H, m), 1.37-1.10 (72H, m), 0.93-0.86 (12H, m); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ 172.3, 155.5, 152.9, 151.0, 124.9, 116.2, 114.9, 112.5, 79.6, 68.9, 68.7, 62.4, 58.0, 38.2, 32.0, 29.7, 29.6, 29.5, 29.4, 28.3, 26.1, 25.0, 22.7, 15.5, 14.1; IR (KBr) 3382, 3047, 2955, 2917, 2851, 1739, 1716, 1506, 1472, 1391, 1366, 1224, 1172, 1046, 863, 795, 717, 557 cm^{-1} ; HRMS calc. for $[\text{C}_{62}\text{H}_{115}\text{NNaO}_6]^+$: 992.8617, found: 992.8617.



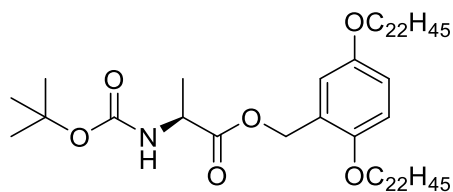
27

NH₂-Ile-HBA tag-5 *White solid (under neutral pH)* : ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 8.83 (2H, brs), 6.89 (1H, d, $J = 2.8$ Hz), 6.80 (1H, dd, $J = 8.9, 2.8$ Hz), 6.76 (1H, d, $J = 8.9$ Hz), 5.35 (1H, d, $J = 12.4$ Hz), 5.13 (1H, d, $J = 12.4$ Hz), 4.05 (1H, d, $J = 3.4$ Hz), 3.92-3.84 (4H, m), 2.25-2.16 (1H, m), 1.78-1.70 (4H, m), 1.55-1.47 (2H, m), 1.47-1.37 (4H, m), 1.37-1.13 (72H, m), 1.08 (3H, d, $J = 7.6$ Hz), 0.92 (3H, t, $J = 6.9$ Hz), 0.88 (6H, t, $J = 6.9$ Hz); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ 168.6, 152.8, 151.1, 123.8, 116.5, 115.6, 112.4, 68.8, 68.7, 63.6, 57.4, 36.6, 31.9, 29.9, 29.6, 29.5, 29.4, 26.1, 22.7, 15.0, 14.1, 11.8; IR (KBr) 3178, 2918, 2850, 2700, 2621, 1741, 1591, 1506, 1471, 1430, 1396, 1372, 1308, 1279, 1270, 1226, 1212, 1172, 1046, 1033, 806, 718; HRMS calc. for $[\text{C}_{57}\text{H}_{107}\text{NNaO}_4]^+$: 892.8092, found: 892.8087.



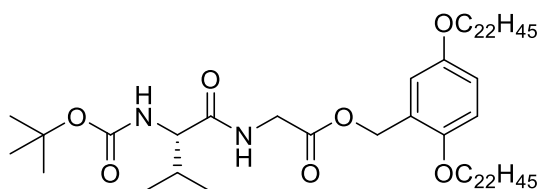
28

Boc-Gly-HBA tag-5 *White solid (under neutral pH)* : ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 6.88 (1H, d, $J = 2.8$ Hz), 6.82-6.76 (2H, m), 5.21 (2H, s), 5.05-4.98 (1H, m), 3.97 (2H, d, $J = 5.5$ Hz), 3.93-3.87 (4H, m), 1.78-1.71 (4H, m), 1.49-1.39 (13H, m), 1.38-1.10 (72H, m), 0.88 (6H, t, $J = 6.9$ Hz); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ 170.3, 156.6, 152.9, 151.0, 124.7, 116.3, 114.8, 112.6, 79.9, 68.9, 68.6, 62.6, 42.5, 31.9, 29.7, 29.6, 29.5, 29.4, 28.3, 26.1, 22.7, 14.1; IR (KBr) 3385, 3023, 2918, 2850, 1744, 1722, 1530, 1508, 1471, 1390, 1365, 1283, 1240, 1224, 1202, 1169, 1052, 1031, 961, 866, 806, 760, 719 cm^{-1} ; HRMS calc. for $[\text{C}_{68}\text{H}_{107}\text{NNaO}_6]^+$: 936.7991, found: 936.7981.



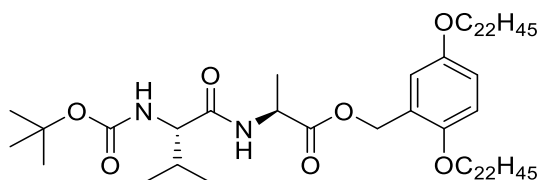
29

Boc-Ala-HBA tag-5 *White solid (under neutral pH)*: ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 6.88 (1H, d, $J = 2.8$ Hz), 6.82-6.76 (2H, m), 5.23 (1H, d, $J = 13.1$ Hz), 5.16 (1H, d, $J = 13.1$ Hz), 5.12-5.07 (1H, m), 4.42-4.33 (1H, m), 3.93-3.87 (4H, m), 1.78-1.71 (4H, m), 1.48-1.37 (16H, m), 1.36-1.14 (72H, m), 0.88 (6H, t, $J = 6.9$ Hz); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ 173.2, 155.0, 152.9, 151.0, 124.9, 116.0, 114.7, 112.5, 79.7, 68.9, 68.6, 62.6, 49.3, 31.9, 29.7, 29.6, 29.5, 29.4, 28.3, 22.7, 18.9, 14.1.; IR (KBr) 3361, 3344, 3003, 2954, 2918, 2850, 1742, 1717, 1506, 1471, 1391, 1366, 1344, 1305, 1223, 1169, 1067, 1051, 1033, 858, 794, 718; HRMS calc. for $[\text{C}_{59}\text{H}_{109}\text{NNaO}_6]^+$: 950.8147, found: 950.8156.



30

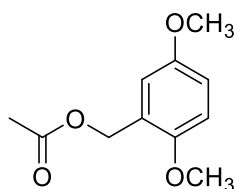
Boc-Val-Gly-HBA tag-5 *White solid (under neutral pH)*: ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 6.87 (1H, d, $J = 2.8$ Hz), 6.83-6.76 (2H, m), 6.52-6.40 (1H, m), 5.21 (1.9H, s, major rotamer), 5.04 (1H, d, $J = 8.3$ Hz), 4.63 (0.1H, s, minor rotamer), 4.16-4.04 (2H, m), 4.03-3.93 (1H, m), 3.93-3.85 (4H, m), 2.25-2.13 (1H, m), 1.82-1.67 (4H, m), 1.50-1.38 (13H, m), 1.37-1.08 (72H, m), 0.98 (3H, d, $J = 6.9$ Hz), 0.92 (3H, d, $J = 6.9$ Hz), 0.87 (6H, t, $J = 7.6$ Hz); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ 171.7, 169.6, 152.9, 151.0, 124.5, 116.3, 114.9, 112.6, 80.0, 68.9, 68.7, 62.8, 59.8, 41.3, 31.9, 30.8, 29.7, 29.6, 29.5, 29.4, 29.3, 28.3, 26.1, 22.7, 19.2, 17.6, 14.1; IR (KBr) 3333, 3052, 2956, 2918, 2850, 1767, 1682, 1658, 1525, 1505, 1470, 1383, 1371, 1355, 1304, 1281, 1248, 1217, 1192, 1174, 1079, 1046, 1020, 876, 795, 721 cm^{-1} ; HRMS calc. for $[\text{C}_{63}\text{H}_{116}\text{N}_2\text{NaO}_7]^+$: 1035.8675, found: 1035.8645.



31

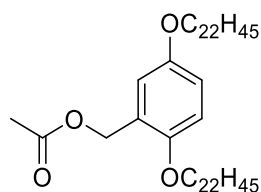
Boc-Val-Ala-HBA tag-5 *White solid (under neutral pH)*: ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 6.86 (1H, d, $J = 2.1$ Hz), 6.82-6.76 (2H, m), 6.43 (1H, d, $J = 6.9$ Hz), 5.24 (1H, d, $J = 12.4$ Hz), 5.15 (1H, d, $J = 12.4$ Hz), 5.09

(1H, d, $J = 8.9$ Hz), 4.68-4.61 (1H, m), 3.97-3.83 (4.9H, m; 4 Ar-O-CH₂, 0.9 major rotamer), 3.16-3.10 (0.1H, m, minor rotamer), 2.82-2.78 (0.1H, m, minor rotamer), 2.20-2.00 (0.9H, m, major rotamer), 1.82-1.68 (4H, m), 1.51-1.38 (16H, m), 1.38-1.06 (72H, m), 0.96 (3H, d, $J = 6.9$ Hz), 0.91 (3H, d, $J = 6.9$ Hz), 0.88 (6H, t, $J = 6.9$ Hz); ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ 172.6, 171.0, 155.8, 152.9, 151.0, 124.6, 116.1, 114.8, 112.5, 79.9, 68.8, 68.6, 62.8, 59.8, 48.2, 31.9, 31.1, 29.7, 29.6, 29.5, 28.3, 26.1, 22.7, 19.2, 18.6, 17.7, 14.1; IR (KBr) 3322, 3286, 3078, 3055, 2954, 2918, 2850, 1741, 1688, 1652, 1528, 1505, 1471, 1391, 1366, 1297, 1247, 1224, 1198, 1171, 1069, 1046, 1023, 753, 718 cm⁻¹; HRMS calc. for [C₆₄H₁₁₈N₂NaO₇]⁺: 1049.8831, found: 1049.8848.



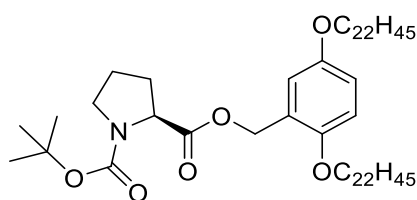
32

2,5-dimethoxybenzyl acetate *Liquid*: ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 6.91 (1H, s), 6.82 (2H, d, $J = 1.8$ Hz), 5.14 (2H, s), 3.80 (3H, s), 3.77 (3H, s), 2.11 (3H, s); ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ 171.0, 153.5, 151.7, 125.3, 115.7, 113.8, 111.6, 61.6, 56.1, 55.8, 21.1; IR (NaCl) 3073, 3000, 2951, 2910, 2836, 1740, 1593, 1504, 1465, 1431, 1380, 1279, 1221, 1181, 1161, 1047, 1026, 966, 874, 806, 714, 607 cm⁻¹; HRMS calc. for [C₁₁H₁₄NaO₄]⁺: 233.0784, found: 233.0760.



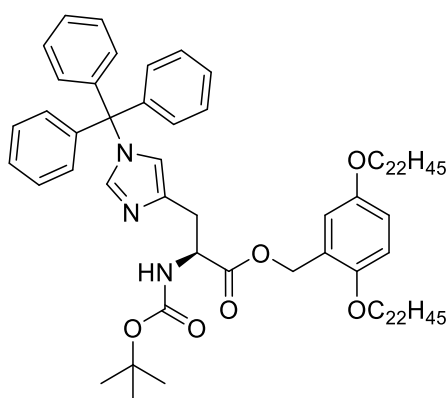
34

2,5-di(docosyloxy)benzyl acetate *White solid (under neutral pH)*: ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 6.90-6.89 (1H, m), 6.80-6.77 (2H, m), 5.13 (2H, s), 4.94-3.88 (4H, m), 2.11 (3H, s), 1.80-1.71 (4H, m), 1.47-1.40 (4H, m), 1.36-1.11 (72H, m), 0.88 (6H, t, $J = 6.9$ Hz); ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ 171.0, 152.9, 151.0, 125.4, 116.2, 114.5, 112.6, 68.9, 68.6, 61.8, 31.9, 29.7, 29.4, 26.1, 22.7, 21.1, 14.1; IR (KBr) 3014, 2953, 2918, 2850, 1738, 1508, 1472, 1379, 1239, 1045, 1035, 795, 718 cm⁻¹; HRMS calc. for [C₅₃H₉₈NaO₄]⁺: 821.7357, found: 821.7356.



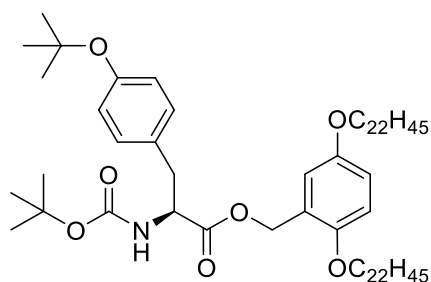
35

Boc-Pro-HBA tag-5 *White solid (under neutral pH)* : ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 6.93-6.88 (1H, m), 6.81-6.75 (2H, m), 5.31-5.1 (2H, m), 4.40 (0.3H, dd, $J = 8.9, 4.1$ Hz, minor rotamer), 4.27 (0.7H, dd, $J = 8.9, 4.1$ Hz, minor rotamer), 3.93-3.86 (4H, m), 3.62-3.55 (0.7H, m, major rotamer), 3.55-3.49 (0.3H, m, minor rotamer), 3.48-3.42 (0.7H, m, major rotamer), 3.42-3.33 (0.3H, m, minor rotamer), 2.27-2.14 (1H, m), 2.04-1.97 (1H, m), 1.90-1.81 (1H, m), 1.78-1.70 (4H, m), 1.46 (3H, s), 1.45-1.39 (4H, m), 1.37 (6H, s), 1.35-1.04 (72H, m), 0.88 (6H, t, $J = 6.9$ Hz); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ 173.1, 172.8, 154.4, 153.9, 153.0, 152.9, 151.0, 125.5, 125.1, 116.1, 115.5, 114.7, 112.6, 112.5, 79.8, 79.7, 69.0, 68.6, 62.1, 59.2, 58.9, 46.6, 46.3, 32.0, 31.0, 30.0, 29.7, 29.6, 29.4, 28.5, 28.3, 26.1, 24.3, 23.6, 22.7, 14.1; IR (KBr) 3048, 2954, 2918, 1748, 1703, 1506, 1472, 1398, 1365, 1224, 1169, 1122, 1087, 1035, 887, 803, 771, 718 cm^{-1} ; HRMS calc. for $[\text{C}_{61}\text{H}_{111}\text{NNaO}_6]^+$: 976.8304, found: 976.8333.



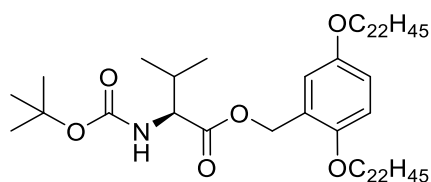
36

Boc-His(Trt)-HBA tag-5 *White solid (under neutral pH)* : ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 7.37-7.34 (1H, m), 7.34-7.28 (9H, m), 7.13-7.03 (6H, m), 6.83-6.76 (1H, m), 6.76-5.68 (2H, m), 6.58-6.50 (1H, m), 6.09 (1H, d, $J = 8.9$ Hz), 5.15 (1H, d, $J = 13.8$ Hz), 4.98 (1H, d, $J = 13.8$ Hz), 4.68-4.64 (0.2H, m, minor rotamer), 4.64-4.56 (0.8H, m, major rotamer), 4.06-3.97 (1H, m), 3.88-3.76 (4H, m), 3.09 (1H, dd, $J = 14.4, 4.8$ Hz), 3.00 (1H, dd, $J = 14.4, 4.8$ Hz), 1.73-1.64 (4H, m), 1.45-1.34 (13H, m), 1.34-1.10 (72H, m), 0.88 (6H, t, $J = 7.6$ Hz); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ 171.8, 155.6, 152.9, 150.5, 142.3, 136.6, 129.8, 128.0, 125.1, 119.6, 115.2, 114.3, 112.3, 79.4, 75.2, 68.8, 68.5, 62.3, 54.0, 42.2, 31.9, 29.7, 29.4, 23.5, 14.1; IR (KBr) 3352, 3060, 3032, 3004, 2954, 2921, 2851, 1746, 1716, 1502, 1469, 1365, 1282, 1238, 1216, 870, 747, 701, 661, 638 cm^{-1} ; HRMS calc. for $[\text{C}_{81}\text{H}_{126}\text{N}_3\text{O}_3]^+$: 1236.9641, found: 1236.9629.



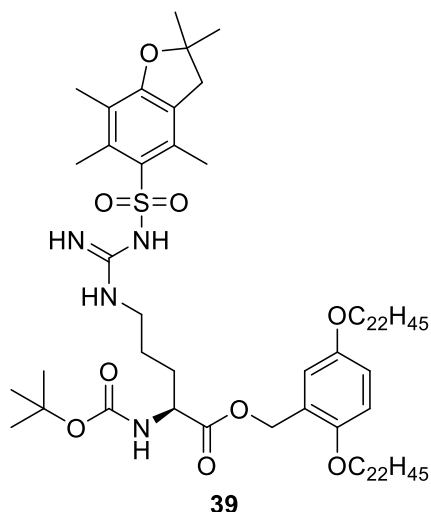
37

Boc-Tyr(4Bu)-HBA tag-5 *White solid (under neutral pH)* : ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 6.97 (2H, d, $J = 8.3$ Hz), 6.88 (1H, d, $J = 2.8$ Hz), 6.85 (2H, d, $J = 8.3$ Hz), 6.83-6.77 (2H, m), 5.17 (2H, s), 4.99 (0.9H, d, $J = 8.3$ Hz, major rotamer), 4.78-4.68 (0.1H, m, minor rotamer), 4.68-4.58 (0.9H, m, major rotamer), 4.47-4.39 (0.1H, m, minor rotamer), 3.96-3.85 (4H, m), 3.10 (0.9H, dd, $J = 13.8, 5.5$ Hz, major rotamer), 3.01 (0.9H, dd, $J = 13.8, 5.5$ Hz, major rotamer), 2.95-2.86 (0.2H, m, minor rotamer), 1.80-1.70 (4H, m), 1.48-1.36 (13H, m), 1.36-1.08 (81H, m), 0.88 (6H, t, $J = 6.9$ Hz); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 171.8, 155.1, 154.3, 152.9, 151.1, 130.8, 129.8, 124.7, 124.1, 116.4, 115.0, 112.6, 79.7, 78.3, 68.9, 68.7, 62.6, 54.4, 37.6, 31.9, 29.7, 29.6, 29.5, 29.4, 28.8, 28.3, 26.1, 22.7, 14.1; IR (KBr) 3387, 3087, 3052, 2917, 2851, 1758, 1698, 1611, 1508, 1473, 1391, 1366, 1225, 1167, 1048, 903, 853, 802, 717, 623 cm^{-1} ; HRMS calc. for $[\text{C}_{69}\text{H}_{121}\text{NNaO}_7]^+$: 1098.9035, found: 1098.8998.

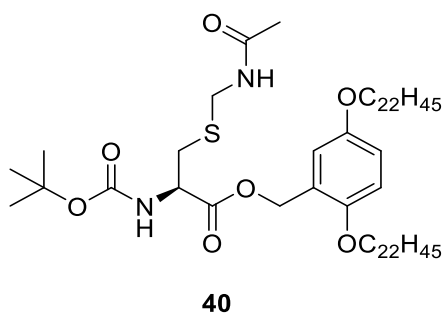


38

Boc-Val-HBA tag-5 *White solid (under neutral pH)* : ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 6.89 (1H, d, $J = 2.8$ Hz), 6.82-6.76 (2H, m), 5.24-5.13 (2H, m), 5.06 (0.9H, d, $J = 8.9$ Hz, major rotamer), 4.80-4.73 (0.1H, m, minor rotamer), 4.33-4.25 (0.9H, m, major rotamer), 4.14-4.07 (0.1H, m, minor rotamer), 3.93-3.87 (4H, m), 2.22-2.13 (0.9H, m, major rotamer), 2.13-2.06 (0.1H, m, minor rotamer), 1.78-1.71 (4H, m), 1.47-1.39 (13H, m), 1.37-1.12 (72H, m), 0.95 (3H, d, $J = 6.9$ Hz), 0.91-0.85 (9H, m); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ 172.3, 155.7, 152.9, 151.1, 124.8, 116.2, 114.9, 112.5, 79.7, 68.8, 68.7, 62.5, 58.6, 31.9, 31.5, 29.7, 29.6, 29.5, 28.3, 26.1, 22.7, 19.0, 17.5, 14.1; IR (KBr) 3341, 3051, 2955, 1741, 1690, 1617, 1506, 1472, 1391, 1366, 1305, 1225, 1174, 1090, 1045, 872, 804, 718, 641 cm^{-1} ; HRMS calc. for $[\text{C}_{61}\text{H}_{113}\text{NNaO}_6]^+$: 978.8460, found: 978.8435.

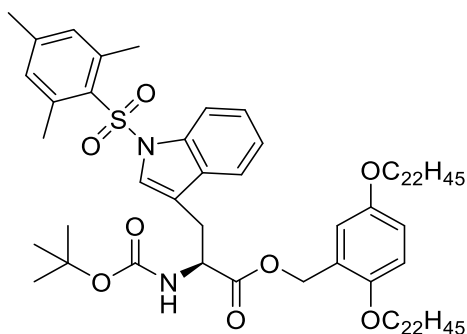


Boc-Arg(Pbf)-HBA tag-5 *White solid*: $^1\text{H NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) δ 6.84-6.83 (1H, m), 6.82-6.76 (2H, m), 6.01 (3H, brs), 5.32 (1H, d, $J = 7.6$ Hz), 5.24-5.12 (2H, m), 4.34-4.23 (0.8H, m, major rotamer), 4.19-4.04 (0.2H, m, minor rotamer), 3.94-3.84 (3.8H, m, major rotamer), 3.84-3.74 (0.2H, m, minor rotamer), 3.37-3.2 (1H, m), 3.21-3.04 (1H, m), 2.94 (2H, s), 2.56 (3H, s), 2.50 (3H, s), 2.08 (3H, s), 1.86-1.78 (2H, m), 1.78-1.69 (4H, m), 1.69-1.50 (2H, m), 1.48-1.37 (19H, m), 1.37-1.08 (72H, s), 1.36-0.88 (6H, t, $J = 6.9$ Hz); $^{13}\text{C NMR}$ (150 MHz, CDCl_3) δ 172.1, 158.6, 156.9, 156.0, 152.8, 151.0, 138.3, 133.0, 132.2, 124.4, 117.3, 116.5, 114.7, 112.6, 86.2, 80.3, 68.9, 68.7, 62.9, 52.4, 43.2, 42.2, 40.6, 31.9, 29.6, 29.3, 28.6, 28.3, 26.1, 24.9, 23.5, 22.7, 19.3, 17.8, 14.1, 12.5; IR (KBr) 3443, 3341, 3155, 3004, 2954, 2919, 2850, 1741, 1716, 1620, 1555, 1503, 1468, 1368, 1249, 1167, 1107, 853, 807, 786, 721 cm^{-1} ; HRMS calc. for $[\text{C}_{75}\text{H}_{132}\text{N}_4\text{NaO}_9\text{S}]^+$: 1287.9607, found: 1287.9612.



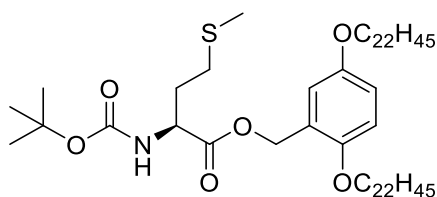
Boc-Cys(Acm)-HBA tag-5 *White solid (under neutral pH)*: $^1\text{H NMR}$ (600 MHz, CDCl_3) δ 6.91 (1H, d, $J = 6.9$ Hz), 6.84-6.77 (2H, m), 6.72-6.61 (1H, m), 5.44 (1H, d, $J = 7.6$ Hz), 5.26 (1H, d, $J = 12.4$ Hz), 5.19 (1H, d, $J = 12.4$ Hz), 4.60-4.50 (1H, m), 4.38 (1H, dd, $J = 13.8, 6.2$ Hz), 4.26 (1H, dd, $J = 14.4, 5.5$ Hz), 3.94-3.87 (4H, m), 3.08 (1H, dd, $J = 14.4, 4.8$ Hz), 2.97-2.85 (1H, m), 1.96 (3H, s), 1.78-1.71 (4H, m), 1.49-1.39 (13H, m), 1.37-1.10 (72H, m), 0.88 (6H, t, $J = 6.9$ Hz); $^{13}\text{C NMR}$ (150 MHz, CDCl_3) δ 170.9, 170.0, 152.8, 151.0, 124.3, 116.5, 114.9, 112.6, 80.5, 68.9, 68.7, 53.8, 42.1, 31.9, 29.7, 29.6, 29.4, 28.3, 26.1, 23.1, 22.7,

14.1; IR (KBr) 3338, 3308, 3054, 2955, 2918, 2850, 1748, 1717, 1696, 1658, 1538, 1507, 1472, 1432, 1393, 1367, 1347, 1309, 1269, 1235, 1223, 1170, 1046, 1031, 1011, 857, 797, 718 cm^{-1} ; HRMS calc. for $[\text{C}_{62}\text{H}_{114}\text{N}_2\text{NaO}_7\text{S}]^+$: 1053.8239, found: 1053.8235.



41

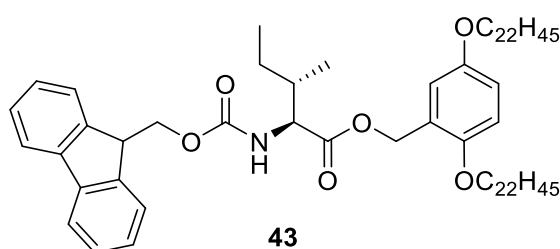
Boc-Trp(Mts)-HBA tag-5 *White solid (under neutral pH)*: ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 8.25-8.22 (0.1H, m, minor rotamer), 7.58-7.55 (0.1H, m, minor rotamer), 7.52-7.46 (0.9H, m, major rotamer), 7.46-7.45 (0.1H, m, minor rotamer), 7.39 (0.9H, s, major rotamer), 7.35-7.27 (0.9H, m, major rotamer), 7.25-7.09 (2H, m), 6.95 (0.2H, s, minor rotamer), 6.92 (1.8H, s, major rotamer), 6.83-6.78 (3H, m), 6.58-6.54 (0.1H, m, minor rotamer), 5.18 (1H, d, $J = 13.1$ Hz), 5.10 (0.9H, d, $J = 7.6$ Hz, major rotamer), 5.05 (1H, d, $J = 13.1$ Hz), 4.84-4.75 (0.1H, m, minor rotamer), 4.73-4.64 (0.9H, m, major rotamer), 4.58-4.50 (0.1H, m, minor rotamer), 3.98-3.78 (4H, m), 3.67-3.65 (0.1H, m, minor rotamer), 3.50-3.48 (0.1H, m), 3.35 (0.8H, dd, $J = 14.4, 4.8$ Hz, major rotamer), 3.21 (0.8H, dd, $J = 15.1, 5.5$ Hz), 3.10-3.06 (0.1H, m, minor rotamer), 3.00-2.94 (0.1H, minor rotamer), 2.52 (0.6H, s, minor rotamer), 2.49 (5.4H, s, major rotamer), 2.29 (0.3H, s, minor rotamer), 2.27 (2.7H, s, major rotamer), 1.78-1.69 (4H, m), 1.47-1.37 (13H, m), 1.36-1.00 (72H, m), 0.88 (6H, t, $J = 6.9$ Hz); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ 171.5, 155.0, 152.9, 151.1, 143.9, 140.2, 134.7, 133.0, 132.4, 130.4, 124.9, 124.4, 122.6, 119.7, 116.2, 115.0, 114.4, 112.6, 112.4, 79.9, 68.9, 68.6, 63.0, 53.8, 42.3, 31.9, 29.7, 29.6, 29.5, 29.4, 28.3, 28.2, 27.6, 26.1, 23.5, 22.7, 21.0, 14.1; IR (KBr) 3439, 3342, 3293, 3046, 2028, 2970, 2918, 2850, 1742, 1715, 1652, 1604, 1505, 1471, 1448, 1169, 1128, 1050, 1034, 1018, 852, 804, 742, 721 cm^{-1} ; HRMS calc. for $[\text{C}_{76}\text{H}_{124}\text{N}_2\text{NaO}_8\text{S}]^+$: 1247.8971, found: 1247.8997.



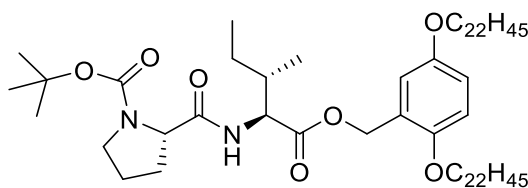
42

Boc-Met-HBA tag-5 *White solid (under neutral pH)*: ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 6.91-6.86 (1H, m), 6.83-

6.75 (2H, m), 5.23 (1H, d, $J = 12.4$ Hz), 5.20-5.13 (1.9H, m; 1 Ar-CH, 0.9 amide-H major rotamer), 4.92-4.79 (0.1H, m, minor rotamer), 4.46 (0.9H, d, $J = 4.8$ Hz, major rotamer), 4.38-4.26 (0.1H, m, minor rotamer), 3.95-3.85 (4H, m), 2.56-2.45 (2H, m), 2.19-2.09 (1H, m), 2.05 (3H, s), 1.99-1.89 (1H, m), 1.81-1.68 (4H, m), 1.49-1.38 (13H, m), 1.38-1.08 (72H, m), 0.88 (6H, t, $J = 7.2$ Hz); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ 172.1, 155.3, 152.8, 124.6, 114.9, 112.5, 79.9, 68.9, 68.6, 52.9, 32.5, 31.9, 29.9, 29.7, 29.6, 29.5, 29.4, 28.3, 26.1, 22.7, 15.4, 14.1; IR (KBr) 3342, 3308, 3052, 3011, 2952, 2917, 2850, 1747, 1714, 1694, 1660, 1541, 1507, 1472, 1390, 1367, 1262, 1234, 1223, 1170, 1047, 1030, 1009, 797, 718 cm^{-1} ; HRMS calc. for $[\text{C}_{61}\text{H}_{113}\text{NNaO}_6\text{S}]^+$: 1010.8181, found: 1010.8197.



Fmoc-Ile-HBA tag-5 *White solid (under neutral pH)*: ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 7.76 (2H, d, $J = 7.6$ Hz), 7.59 (2H, d, $J = 7.6$ Hz), 7.40 (2H, apparent t, $J = 7.6$ Hz), 7.31 (2H, apparent t, $J = 7.6$ Hz), 6.90-6.87 (1H, m), 6.80-6.75 (2H, m), 5.38-5.33 (1H, m), 5.26-5.15 (2H, m), 4.44-4.35 (3H, m), 4.26-4.20 (1H, m), 3.93-3.82 (4H, m), 1.97-1.88 (1H, m), 1.79-1.67 (4H, m), 1.47-1.37 (4H, m), 1.37-1.07 (74H, m), 0.96-0.86 (12H, m); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ 172.0, 156.1, 152.8, 151.1, 144.0, 143.8, 141.3, 127.7, 127.1, 125.1, 124.6, 120.0, 116.4, 115.0, 112.5, 68.9, 68.7, 67.0, 62.6, 58.5, 47.2, 31.9, 29.7, 29.6, 29.4, 22.7, 15.5, 14.1, 11.7; IR (KBr) 3289, 3066, 2954, 2920, 2849, 1737, 1694, 1543, 1505, 1468, 1450, 1379, 1266, 1225, 1192, 1035, 740 cm^{-1} ; HRMS calc. for $[\text{C}_{72}\text{H}_{117}\text{NNaO}_6]^+$: 1114.8773, found: 1114.8748.

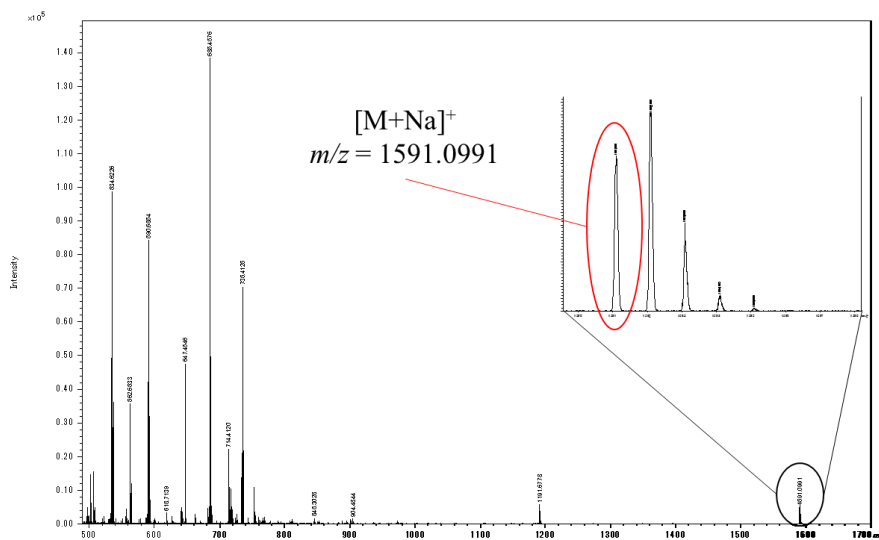


Boc-Pro-L-Ile-HBA tag-5 *White solid (under neutral pH)*: ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 7.58-7.46 (0.5H, m, rotamer), 6.93-6.86 (1H, m), 6.82-6.73 (2H, m), 6.62-6.53 (0.5H, m, rotamer), 5.22 (1H, d, $J = 12.4$ Hz), 5.14 (1H, d, $J = 12.4$ Hz), 4.70-4.53 (1H, m), 4.40-4.17 (1H, m), 3.89 (4H, dd, $J = 13.1, 6.9$ Hz), 3.54-3.44 (1H, m), 3.44-3.25 (1H, m), 2.44-2.32 (0.4H, m, minor rotamer), 2.21-2.08 (0.6H, m, major rotamer), 2.00-1.81 (4H, m), 1.79-1.61 (5H, m), 1.51-1.37 (13H, m), 1.37-1.00 (73H, m), 0.91-0.85 (12H, m); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ 172.3, 171.6, 151.9, 151.0, 115.9, 114.9, 112.5, 80.3, 68.9, 68.6, 62.3, 61.2, 59.6, 56.8, 56.2, 47.0,

38.2, 37.8, 31.9, 30.9, 29.7, 29.6, 29.4, 28.3, 27.6, 26.1, 25.0, 24.9, 24.7, 22.7, 15.5, 14.1, 11.6; IR (KBr) 3317, 3070, 3054, 2954, 2917, 2851, 1740, 1704, 1671, 1539, 1505, 1473, 1397, 1366, 1222, 1171, 1120, 1090, 1036, 858, 806, 773, 717 cm^{-1} ; HRMS calc. for $[\text{C}_{67}\text{H}_{122}\text{N}_2\text{NaO}_7]^+$: 1089.9144, found: 1089.9133.

Fmoc-His(Trt)-Pro-Ile-HBA-tag-5 (46)

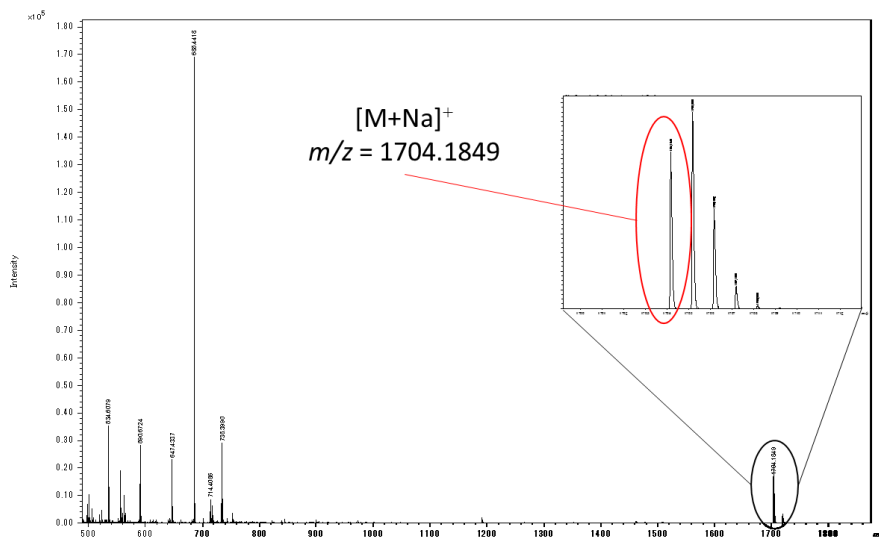
HRMS calc. for $[C_{101}H_{143}N_5NaO_8]^+$: 1591.0985, found: 1591.0991.



MS spectrum of **43**

Fmoc-Ile-His(Trt)-Pro-Ile-HBA-tag-5 (47)

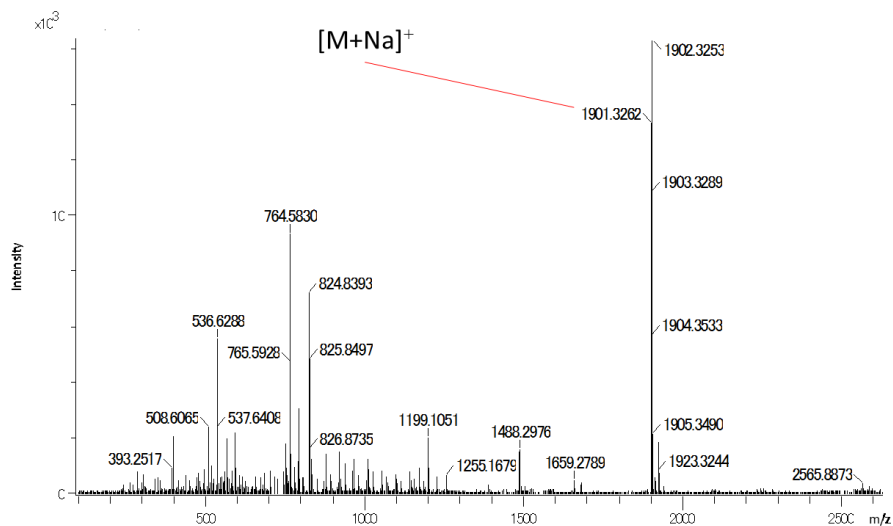
HRMS calc. for $[C_{108}H_{156}N_6NaO_9]^+$: 1704.1826, found: 1704.1849.



MS spectrum of **44**

Fmoc-Tyr(^tBu)-Ile-His(Trt)-Pro-Ile-HBA-tag-5 (48)

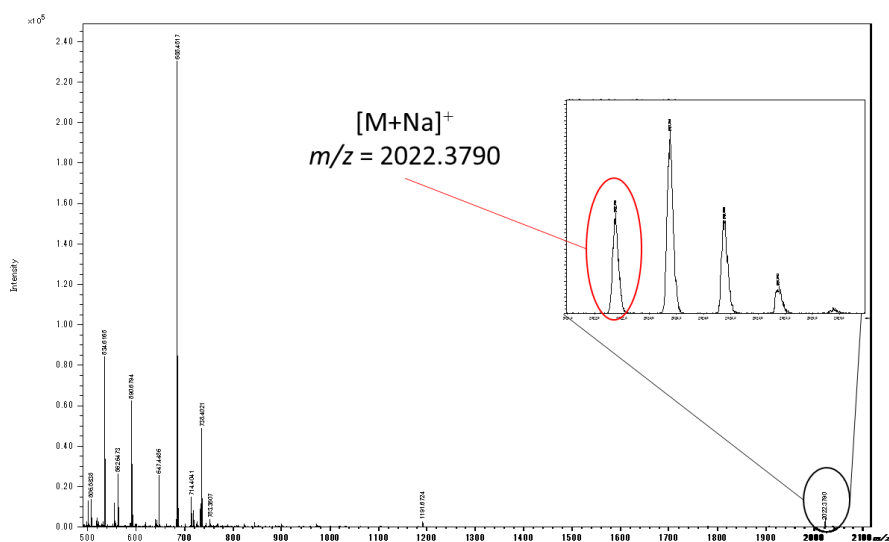
HRMS calc. for $[C_{121}H_{174}N_7O_{11}]^+$: 1901.3266, found: 1901.3262.



MS spectrum of 45

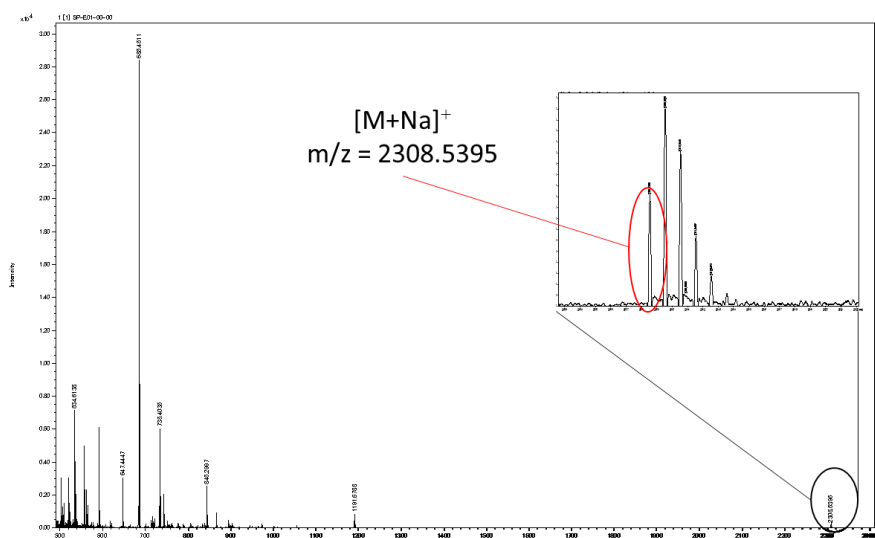
Fmoc-Val-Tyr(^tBu)-Ile-His(Trt)-Pro-Ile-HBA-tag-5 (49)

HRMS calc. for $[C_{126}H_{182}N_8NaO_{12}]^+$: 2022.3769, found: 2022.3790.

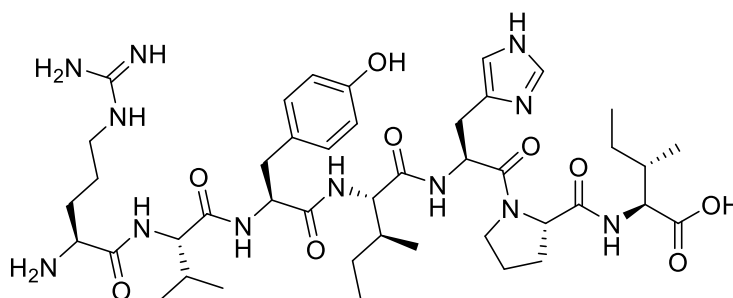


Boc-Arg(Pbf)-Val-Tyr(^tBu)-Ile-His(Trt)-Pro-Ile-HBA tag-5 (50)

HRMS calc. for $[C_{135}H_{208}N_{12}NaO_{16}]^+$: 2308.5444, found: 2308.5395.

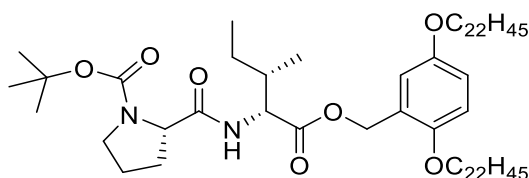


MS spectrum of **50**



Angiotensin III Selective Antagonist Peptide (**4**)

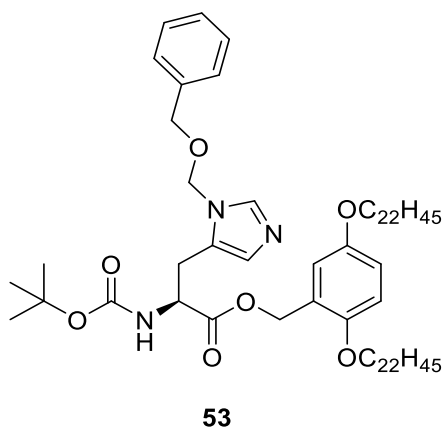
NH₂-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Ile-COOH (51) *White solid*: HRMS calc. for $[C_{45}H_{72}N_{12}NaO_9]^+$: 821.7357, found: 821.7356.



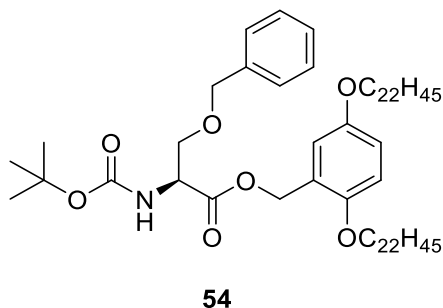
52

Boc-Pro-D-Ile-HBA tag-5 *White solid (under neutral pH)*: ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 7.24-7.16 (0.5H, m, rotamer), 6.87 (1H, d, *J* = 2.8 Hz), 6.82-6.75 (2H, m), 6.59-6.46 (0.5H, m, rotamer), 5.22 (1H, d, *J* = 12.4 Hz), 5.11 (1H, d, *J* = 12.4 Hz), 4.72 (1H, m), 4.43-4.19 (1H, m), 3.89 (4H, dd, *J* = 14.4, 6.9 Hz), 3.56-3.24 (2H, m), 2.37-2.03 (0.3H, m, minor rotamer), 2.23-2.03 (0.7H, m, major rotamer), 2.03-1.90 (1H, m), 1.90-1.79 (2H,

m), 1.79-1.70 (4H, m), 1.63-1.54 (2H, m), 1.51-1.38 (13H, m), 1.37-1.00 (73H, m), 0.92 (3H, t, $J = 6.9$ Hz), 0.91-0.86 (9H, m); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ 172.4, 171.7, 152.9, 151.1, 125.0, 124.5, 116.4, 116.2, 114.9, 114.7, 112.5, 80.7, 80.3, 68.8, 68.7, 62.6, 62.3, 61.4, 56.4, 47.1, 38.0, 31.9, 29.7, 29.6, 29.4, 28.3, 26.1, 24.9, 22.7, 15.6, 14.1, 11.6; IR (KBr) 3420, 3334, 3075, 2954, 2917, 2851, 1743, 1698, 1683, 1507, 1474, 1457, 1395, 1367, 1298, 1220, 1195, 1168, 1120, 1044, 990, 855, 809, 774, 753, 717 cm^{-1} ; HRMS calc. for $[\text{C}_{67}\text{H}_{122}\text{N}_2\text{NaO}_7]^+$: 1089.9144, found: 1089.9164.

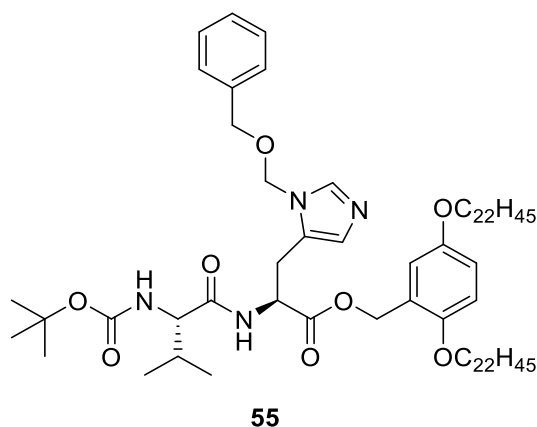


Boc-His(Bom)-HBA tag-5 *White solid (under neutral pH)*: ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 7.44 (1H, s), 7.37-7.29 (3H, m), 7.26-7.24 (2H, m), 6.88-6.83 (2H, m), 6.82-6.76 (2H, m), 5.27 (1H, d, $J = 7.6$ Hz), 5.24-5.14 (4H, m), 4.63 (1H, dd, $J = 13.1, 6.2$ Hz), 4.39 (2H, 18.6, 12.4 Hz), 3.93-3.85 (4H, m), 3.23 (1H, dd, $J = 15.1, 4.8$ Hz), 3.11 (1H, dd, $J = 15.1, 6.2$ Hz), 1.77-1.70 (4H, m), 1.46-1.36 (13H, m), 1.36-1.11 (72H, m), 0.88 (6H, t, $J = 7.2$ Hz); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ 171.3, 155.1, 152.9, 151.1, 138.3, 136.1, 129.5, 128.7, 128.3, 128.0, 126.6, 124.5, 116.4, 114.9, 112.6, 80.1, 72.9, 69.6, 68.9, 68.7, 62.9, 53.2, 31.9, 29.7, 29.6, 29.5, 29.4, 28.3, 26.8, 26.1, 22.7, 14.1; IR (KBr) 3373, 3336, 3093, 3064, 3033, 3005, 2918, 2850, 1733, 1696, 1685, 1521, 1506, 1471, 1391, 1382, 1366, 1300, 1282, 1235, 1222, 1195, 1176, 1170, 1105, 1073, 1051, 1030, 858, 806, 741, 718, 698, 659 cm^{-1} ; HRMS calc. for $[\text{C}_{70}\text{H}_{120}\text{N}_3\text{O}_7]^+$: 1114.9121, found: 1114.9133.

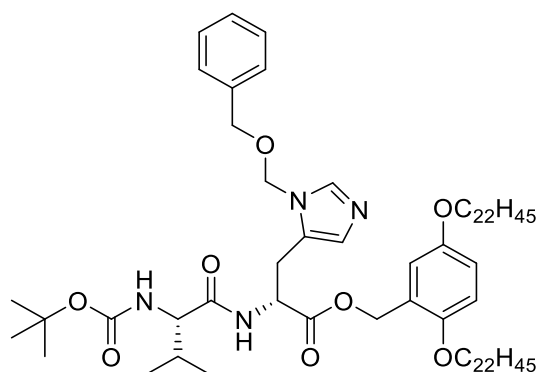


Boc-Ser(Bzl)-HBA tag-5 *White solid (under neutral pH)*: ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 7.33-7.27 (2H, m),

7.26-7.19 (3H, m), 6.89-6.87 (1H, m), 6.80-6.74 (2H, m), 5.44 (1H, d, $J=8.9$ Hz), 5.28-5.20 (1.8 H, m, major rotamer), 5.14-5.08 (0.2H, m, minor rotamer), 4.55-4.44 (2.7H, m, major rotamer), 4.35-4.26 (0.3H, m, minor rotamer), 4.16-4.08 (0.1H, m, minor rotamer), 3.95-3.81 (4.9H, m; 4 Ar-O-CH₂, 0.9 minor rotamer), 3.71 (0.9H, dd, $J=9.6, 2.8$ Hz), 3.51-3.48 (0.1H, m), 1.78-1.67 (4H, m), 1.48-1.37 (13H, m), 1.35-1.10 (72H, m), 0.88 (6H, t, $J = 6.9$ Hz); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 170.6, 155.5, 152.9, 150.8, 137.6, 128.6, 127.7, 127.5, 116.0, 114.4, 112.5, 79.9, 73.3, 70.2, 68.9, 68.6, 62.6, 54.1, 31.9, 29.7, 29.6, 29.5, 29.4, 28.3, 26.1, 22.7, 14.1; IR (KBr) 3443, 3358, 3087, 3064, 3031, 3005, 2917, 2850, 1750, 1719, 1506, 1472, 1455, 1394, 1367, 1346, 1303, 1224, 1201, 858, 806, 779, 738, 717, 696 cm⁻¹; HRMS calc. for [C₆₆H₁₁₅NNaO₇]⁺: 1056.8566, found: 1056.8544.

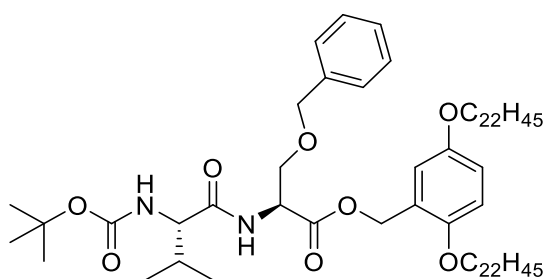


Boc-Val-L-His(Bom)-HBA tag-5 *White solid (under neutral pH)*: ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 7.44 (1H, s), 7.36-7.28 (3H, m), 7.27-7.24 (2H, m), 6.94-6.85 (1H, m), 6.85-6.73 (4H, m), 5.25-5.14 (4H, m), 5.07 (1H, d, $J = 8.3$ Hz), 4.98-4.92 (1H, m), 4.40 (2H, s), 3.96-3.80 (5H, m), 3.26-3.12 (2H, m), 2.10 (1H, m), 1.78-1.69 (4H, m), 1.49-1.37 (13H, m), 1.36-1.05 (72H, m), 0.91-0.86 (9H, m), 0.84 (3H, d, $J = 6.2$ Hz); ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ 171.5, 170.6, 155.8, 152.8, 151.1, 138.4, 136.0, 129.3, 128.7, 128.3, 128.1, 126.5, 116.5, 115.0, 112.6, 79.9, 73.0, 69.8, 68.9, 68.7, 59.9, 51.9, 32.0, 29.8, 29.7, 29.6, 29.5, 28.4, 26.7, 26.2, 26.2, 26.1, 22.8, 19.3, 17.7, 14.2; IR (KBr) 3306, 3065, 3032, 2954, 2919, 2850, 1720, 1686, 1649, 1546, 1506, 1469, 1390, 1379, 1367, 1341, 1304, 1282, 1240, 1224, 1224, 1196, 1168, 1092, 1075, 1046, 1029, 953, 924, 858, 806, 742, 720 cm⁻¹; HRMS calc. for [C₇₅H₁₂₉N₄O₈]⁺: 1213.9805, found: 1213.9793.



56

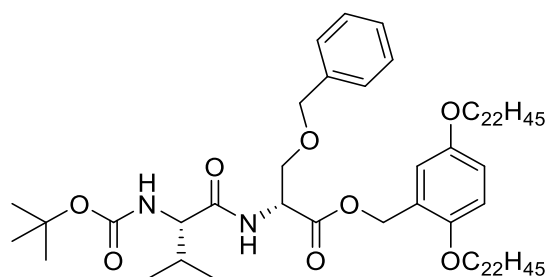
Boc-Val-D-His(Bom)-HBA tag-5 *White solid (under neutral pH):* ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 7.92 (0.1H, d, $J = 8.3$ Hz, minor rotamer), 7.66 (0.1H, d, $J = 8.3$ Hz, minor rotamer), 7.46-7.40 (1H, m), 7.35 (3H, m), 7.26-7.22 (2H, m), 6.84-6.75 (3.9H, m), 6.73 (0.9H, d, $J = 6.9$ Hz, major rotamer), 5.23-5.20 (2H, m), 5.19 (1H, d, $J = 11.7$ Hz), 5.16 (1H, d, $J = 11.7$ Hz), 4.96-4.87 (2H, m), 4.37 (2H, s), 4.01-3.94 (1H, m), 3.91-3.84 (4H, m), 3.22 (1H, dd, $J = 15.1, 5.5$ Hz), 3.16 (1H, dd, $J = 15.8, 6.9$ Hz), 2.21-2.12 (0.9H, m, major rotamer), 2.11-2.09 (0.1H, minor rotamer), 1.77-1.69 (4H, m), 1.46-1.36 (13H, m), 1.36-1.11 (72H, m), 0.91 (3H, d, $J = 6.9$ Hz), 0.88 (6H, t, $J = 6.9$ Hz), 0.80 (3H, d, $J = 6.9$ Hz); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ 171.5, 170.8, 155.8, 152.8, 151.1, 138.3, 136.0, 128.7, 128.3, 128.0, 126.6, 126.3, 124.3, 124.0, 119.3, 116.5, 114.9, 112.6, 109.9, 80.1, 73.2, 69.8, 68.9, 68.6, 63.0, 59.7, 51.7, 31.9, 30.5, 29.7, 29.6, 29.5, 29.4, 29.3, 26.4, 26.1, 26.1, 22.7, 19.3, 17.2, 14.1; IR (KBr) 3306, 3065, 3032, 2954, 2919, 2850, 1720, 1686, 1649 1546, 1525, 1506, 1469, 1390, 1379, 1367, 1341, 1304, 1092, 1075, 1046, 1029, 953, 924, 858, 806, 742, 720 cm^{-1} ; HRMS calc. for $[\text{C}_{75}\text{H}_{129}\text{N}_4\text{O}_8]^+$: 1213.9805, found: 1213.9828.



57

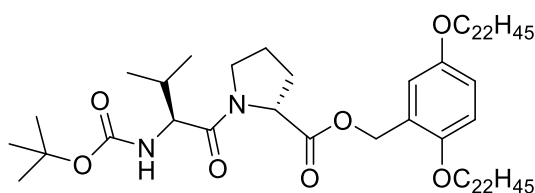
Boc-Val-L-Ser(Bzl)-HBA tag-5 *White solid (under neutral pH):* ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 7.32-7.27 (2H, m), 7.25-7.19 (3H, m), 6.86 (1H, d, $J = 2.1$ Hz), 6.81-6.75 (2H, m), 6.59 (1H, d, $J = 7.6$ Hz), 5.23 (2H, s), 5.13-5.07 (1H, m), 4.83-4.78 (1H, m), 4.64-4.40 (2H, m), 4.03 (1H, m), 3.94 (1H, dd, $J = 9.6, 2.8$ Hz), 3.89 (2H, t, $J = 6.5$ Hz), 3.85 (2H, t, $J = 6.5$ Hz), 3.68 (1H, dd, $J = 9.6, 3.4$ Hz), 2.16-2.08 (1H, m), 1.77-1.68 (4H, m), 1.47-1.37 (13H, m), 1.35-1.10 (72H, m), 0.96 (3H, d, $J = 6.88$ Hz), 0.91-0.84 (9H, m); ^{13}C NMR (150 MHz,

CDCl₃) δ 171.2, 169.8, 155.7, 152.9, 150.9, 137.4, 128.4, 127.8, 127.6, 114.7, 116.1, 114.6, 112.5, 79.7, 73.3, 69.7, 68.9, 68.6, 62.8, 59.5, 52.7, 31.9, 31.5, 29.7, 29.6, 29.5, 29.4, 28.3, 26.1, 22.7, 19.1, 17.5, 14.1; IR (KBr) 3323, 3062, 3032, 2956, 2918, 2850, 1747, 1691, 1650, 1524, 1506, 1470, 1392, 1365, 1293, 1241, 1225, 1199, 1173, 1139, 1114, 1060, 1047, 1025, 932, 878, 854, 804, 734, 718, 695, 666, 653 cm⁻¹; HRMS calc. for [C₇₁H₁₂₄N₂NaO₈]⁺: 1155.9250, found: 1155.9258.



58

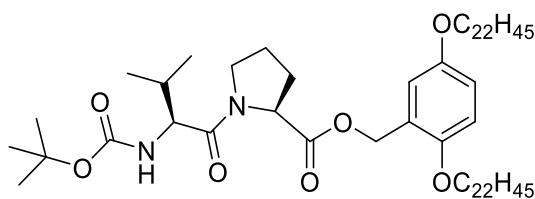
Boc-Val-D-Ser(Bzl)-HBA tag-5 *White solid (under neutral pH)*: ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 7.31-7.27 (2H, m), 7.25-7.17 (3H, m), 6.89-6.85 (1H, m), 6.85-6.75 (3H, m), 5.23 (2H, s), 5.03 (1H, d, *J* = 8.3 Hz), 4.86-4.76 (1H, m), 4.53-4.43 (2H, m), 4.14-3.98 (1H, m), 3.96-3.82 (5H, m), 3.68 (1H, d, *J* = 9.6, 3.4 Hz), 2.28-2.09 (1H, m), 1.78-1.67 (4H, m), 1.47-1.37 (13H, m), 1.34-1.12 (72H, m), 0.95 (3H, d, *J* = 6.9 Hz), 0.90-0.85 (9H, m); ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ 171.2, 169.1, 155.8, 152.9, 150.9, 137.4, 128.4, 127.8, 127.5, 124.8, 116.1, 114.5, 112.5, 79.9, 73.3, 69.7, 68.9, 68.6, 62.8, 59.7, 52.7, 31.9, 30.8, 29.7, 29.6, 29.5, 29.4, 28.3, 26.1, 22.7, 19.2, 17.3, 14.1; IR (NaCl) 3309, 3087, 3065, 3029, 2954, 2920, 2849, 1746, 1688, 1648, 1529, 1508, 1468, 1390, 1365, 1356, 1300, 1247, 1226, 1201, 1174, 1113, 1070, 1045, 1029, 1-13, 994, 951, 943, 932, 878, 852, 811, 732, 722 cm⁻¹; HRMS calc. for [C₇₁H₁₂₄N₂NaO₈]⁺: 1155.9250, found: 1155.9233.



59

Boc-Val-L-Pro-HBA tag-5 *White solid (under neutral pH)*: ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 6.89 (1H, d, *J* = 2.8 Hz), 6.81-6.74 (2H, m), 5.24 (1H, d, *J* = 12.4 Hz), 5.21 (1H, d, *J* = 8.9 Hz), 5.19 (1H, d, *J* = 12.4 Hz), 4.65-4.58 (1H, m), 4.28 (0.9H, dd, *J* = 8.9, 6.2 Hz, major rotamer), 4.14-4.06 (0.1H, m, minor rotamer), 3.97-3.93 (0.1H, m, minor rotamer), 3.92-3.87 (4H, m), 3.81-3.73 (0.9H, m, major rotamer), 3.69-3.63 (0.9H, m, major rotamer), 3.52-3.46 (0.1H, m, minor rotamer), 2.27-2.17 (1H, m), 2.08-1.94 (4H, m), 1.81-1.69 (4H, m), 1.48-

1.38 (13H, m), 1.37-1.07 (72H, m), 1.00 (3H, d, $J = 6.88$ Hz), 0.90 (3H, d, $J = 6.8$ Hz), 0.88 (6H, t, $J = 6.8$ Hz); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ 171.9, 171.1, 155.9, 152.9, 150.9, 125.0, 115.9, 114.7, 112.5, 79.4, 68.8, 68.7, 62.4, 58.9, 56.8, 47.1, 31.9, 31.4, 29.7, 29.6, 29.5, 29.4, 29.1, 28.4, 26.1, 24.9, 22.7, 19.3, 17.3, 14.1; IR (KBr) 3441, 3295, 3049, 3005, 2954, 2917, 2850, 1747, 1716, 1650, 1505, 1472, 1437, 1390, 1366, 1310, 1274, 1225, 1173, 1093, 1045, 1016, 882, 874, 803, 717 cm^{-1} ; HRMS calc. for $[\text{C}_{66}\text{H}_{120}\text{N}_2\text{O}_7]^+$: 1075.8988, found: 1075.8991.



60

Boc-Val-D-Pro-HBA tag-5 *White solid (under neutral pH)*: ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 6.91 (0.8H, d, $J = 2.1$ Hz, major rotamer), 6.88 (0.2H, d, $J = 2.1$ Hz, minor rotamer), 6.82-6.74 (2H, m), 5.32 (0.8H, d, $J = 13.1$ Hz, major rotamer), 5.26 (0.8H, d, $J = 8.9$ Hz, minor rotamer), 5.22 (0.2H, $J = 12.4$ Hz, minor rotamer), 5.16 (0.2H, $J = 12.4$ Hz, minor rotamer), 5.10 (0.8H, $J = 13.6$ Hz, major rotamer), 5.07-4.97 (0.2H, m, minor rotamer), 4.94 (0.8H, dd, $J = 8.9, 3.4$ Hz, major rotamer), 4.34 (0.8H, dd, $J = 9.6, 6.2$ Hz, major rotamer), 4.04 (0.2H, dd, $J = 10.3, 6.9$ Hz, minor rotamer), 3.97-3.93 (0.2H, m, minor rotamer), 3.93-3.86 (4.8H, m; 4 Ar- $\text{O}-\text{CH}_2$, 0.8H major rotamer), 3.64-3.49 (1H, m), 2.22-2.14 (1H, m), 2.14-2.06 (1H, m), 2.06-2.00 (1H, m), 2.00-1.89 (1.9H, m), 1.89-1.79 (0.1H, m, minor rotamer), 1.79-1.70 (4H, m), 1.48-1.39 (13H, m), 1.37-1.12 (72H, m), 0.97 (2.4H, d, $J = 6.9$ Hz, major rotamer), 0.91 (2.4H, d, $J = 6.9$ Hz, major rotamer), 0.88 (6H, t, $J = 6.9$ Hz), 0.87-0.84 (0.6H, m, minor rotamer), 0.81 (0.6H, d, $J = 6.9$ Hz); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ 171.7, 170.8, 155.7, 152.9, 150.8, 125.2, 15.6, 114.6, 112.5, 79.4, 68.9, 68.6, 58.9, 58.8, 42.1, 31.9, 31.6, 29.7, 29.6, 29.5, 29.4, 28.3, 26.1, 24.6, 22.7, 19.6, 17.4, 14.1; IR (KBr) 3429, 3075, 3006, 2953, 2919, 2850, 1745, 1718, 1641, 1501, 1470, 1448, 1366, 1305, 1278, 1245, 1223, 1172, 1090, 1044, 1019, 882, 808, 720 cm^{-1} ; HRMS calc. for $[\text{C}_{66}\text{H}_{120}\text{N}_2\text{O}_7]^+$: 1075.8988, found: 1075.9000.

4. 総括と展望

本研究では、ベンジルアルコールという基本骨格を保持しながら、酸による発色性や適度な酸耐性、光酸化による蛍光性といった機能性を有する疎水性ベンジルアルコール担体を開発し、ペプチド合成や定量法の開発へ応用した。

第2章では、methoxybenzyl alcohol を疎水性ベンジルアルコール担体のモデル化合物として用い、優れた発色性と溶解性を併せもつ置換置換を検討した。2,4,5-置換において、脱アルキル化反応を伴うイプソ置換反応により、酸性条件下で鮮やかに発色し、2,4-置換由来の発色性物質であるレゾルシンアレーン誘導体よりも溶解性の高い二量体が形成することを発見した。2,4,5-置換の疎水性ベンジルアルコール担体は、精密な溶解性の制御も可能であり、5残基からなるモデルペプチドを高効率に合成可能であることを確認した。また TLC 上でも鮮やかな青色に発色するために、担体が結合した化合物の容易な反応モニタリングが可能となった。さらに、酸によって脱保護される保護基やアミノ酸や縮合剤などの共存下では定量性が落ちるものの、配列の長さやアミノ酸種に依存しない、酸による発色性を利用した定量法の可能性が示された。

第3章では、適度な酸耐性をもつことで Boc 法と Fmoc 法を併用でき、全脱保護条件下で速やかに脱離可能な疎水性ベンジルアルコール担体の開発を目的に、2,5-置換の疎水性ベンジルアルコール担体を合成した。HCl の滴下により反応を開始することで Boc 基の選択的な脱保護を達成した。このとき、2,5-置換の担体は、TLC 上および溶液状態において酸性条件下で鮮やかな緑色に発色することを確認した。さらに2,5-置換の担体もしくは担体が結合したペプチドやアミノ酸が、光酸化によって担体が脱離し aldehyde を形成することで蛍光性を示すことを発見した。この光酸化による担体の蛍光性は、アミノ酸種やペプチド配列の長さや芳香族性の側鎖や保護基に依存しないことがわかり、第1章で開発した酸による発色性を利用した定量法と比較し約 1,000 倍感度を向上した。また TLC 上においても、酸による緑色の発色性に加えて、UV 照射により蛍光性を示すために、簡便かつ高感度に反応をモニタリング

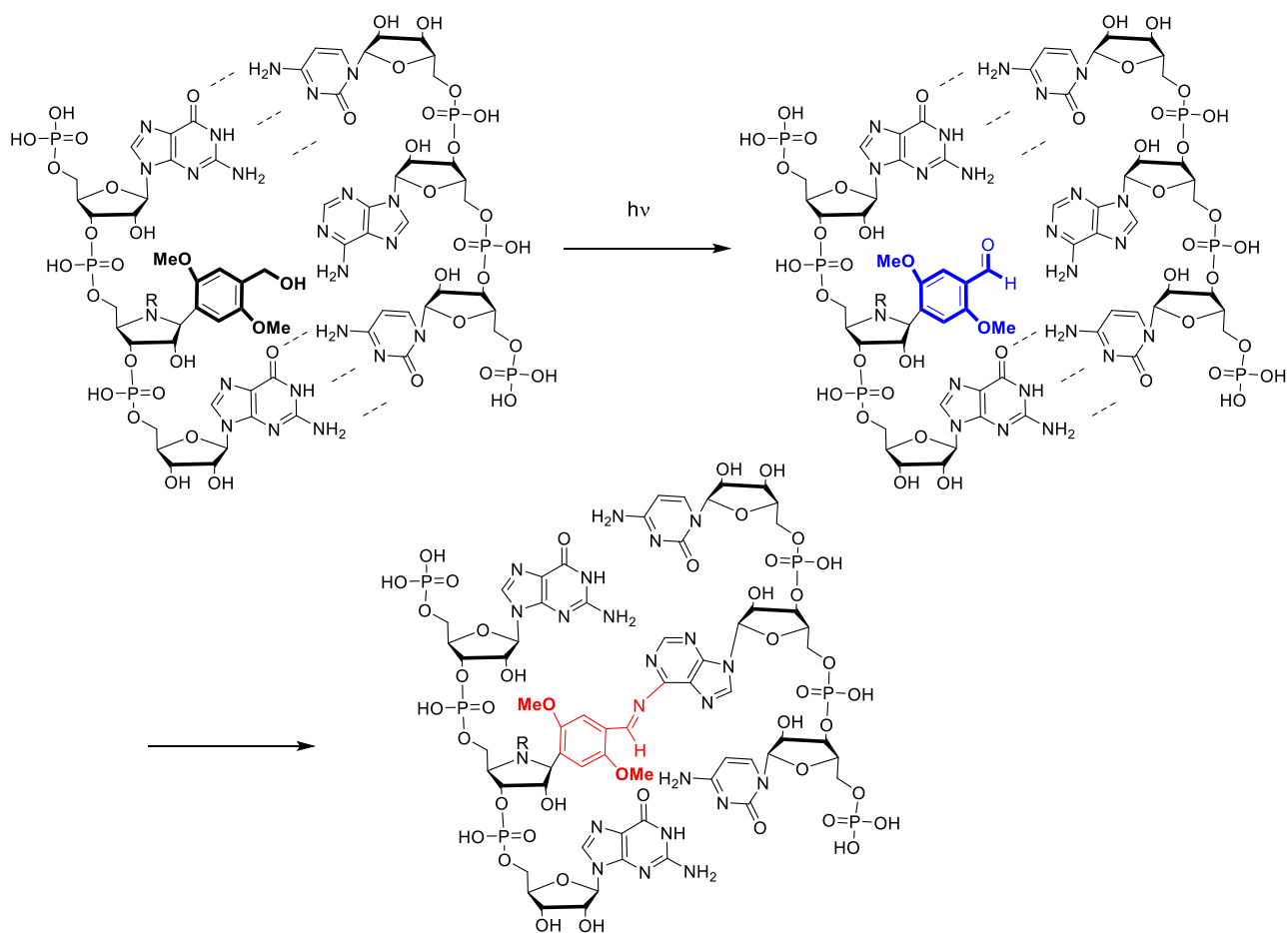
が可能となった。さらに 2,5-置換の担体は、溶解性の制御においても従来の担体と変わらない機能を維持し、Boc 法と Fmoc 法を併用し、C 末端から 2 残基目に Pro を有する 7 残基のモデルペプチドを高効率な合成が可能であった。この際に、全脱保護条件において 2,5-置換担体が容易に脱離可能であることも確認した。また、担体導入時のエピマー化についても NMR を用いて簡便に確認できることを発見し、ほとんどエピマー化が起こっていないことを確認した。また、光によって担体の脱保護が可能であり、酸塩基、酸化還元に加えて新たな脱保護手段を得たといえる。

これらの結果から、精密な溶解性の制御が重要である可溶性担体を用いた化学合成において、最小限の構造修飾によって、その溶解特性を保持しながら発色性や蛍光性の付与、精密な酸耐性の制御、光による脱保護が可能となった。このような機能が、可溶性担体化学の可能性をさらに広げることが期待される。

一方で、可溶性担体化学だけではなく、他の分野への応用が期待される発見もあった。2,4,5-置換の担体において、酸により形成された二量体は、発色する際にその酸を“吸着”していると推測される。そのため、二量体の溶解性をコントロールすることで、水層にある酸を有機層に移動させるような新たな相関移動触媒への応用が期待される。また、2,5-置換型は benzyl alcohol もしくは benzyl ester といった比較的反応性の低い官能基から、光によって aldehyde への変換が可能である。我々の研究室では、ヌクレオシドのリボース環内酸素を窒素原子に置換したアザヌクレオシドを、天然素材であるプロリノールからの一段階での合成を可能にし、各種アザヌクレオシド誘導体の合成法を開発してきた。¹⁹ アザヌクレオシドは天然置換のヌクレオシドと構造類似性が高く、ヌクレアーゼ耐性が高いため核酸医薬品の重要な構成ユニットとして期待されている。そこで、Scheme 5-1 に示すように、2,5-置換の benzyl alcohol を疑似塩基として導入されたアザヌクレオシドユニットを合成し、核酸オリゴマー内に導入することで、アンチセンス核酸とのハイブリット形成時に、光照射によって aldehyde を生成すれば、空間的に近いことからアデノシンのアミンとのイミン形成が起こり不可逆的な結合形成が可能と考えられる。つまり特

定の核酸をターゲットに、不可逆的に結合し、光照射によりその機能を停止させるという新たな機能をもった新たな核酸ユニットの開発が考えられる。イミン形成により共役系が伸びると蛍光性の変化が起こると考えられるため、それらの反応の完了を可視化も期待できる。また、核酸のリン酸ジエステル部分に、2,5-置換の光感受性疎水性ユニットを結合させることで、ホスホジエステル結合によるアニオン性の低下と疎水性の増加による膜透過性機能を付与することができ、さらに光照射によりホスホジエステル結合に戻ることができる新たな機能付加も期待される。これらのように、本研究成果は、可溶性担体化学だけではなく、創薬や分子生物学、遺伝子工学への応用も期待される。

Scheme 5-1. 2,5-置換光感受性ユニットの核酸化学への応用例



5. 謝辞

本研究を実施するにあたり，ご指導，ご教示くださいました東京農工大学千葉一裕教授に心より感謝致します。また，本研究の審査においてご助言賜りました茨城大学戸嶋浩明教授，東京農工大学北野克和准教授，宇都宮大学二瓶賢一教授，東京農工大学川合伸也准教授に心から感謝致します。

さらに，東京農工大学岡田洋平助教には，研究当初より指導していただき，ペプチド合成や可溶性担体化学の基礎知識や研究における心構え等，多くのご助言いただき心より感謝致します。また，共同研究に対してご協力，ご指導いただきましたキューピー株式会社，半田明弘様に深く謝意を表します。

6. 使用機器

【核磁気共鳴装置】

日本電子JNM-ECA 600 (^1H NMR: 600 MHz, ^{13}C NMR: 150 MHz)

日本電子JNM-ECS 400 (^1H NMR: 400 MHz, ^{13}C NMR: 100 MHz)

内部標準 ^1H -NMR : TMS ($\delta = 0.00$) ^{13}C -NMR : CDCl_3 ($\delta = 77.03$)

【赤外分光光度計】

日本分光 FT/IR-4100

試料調整 KBr 法, NaCl 板法

【質量分析計】

日本電子 JMS-T-100LC AccuTOF ESI 法

Ionsense SVP100 DART 法

日本電子 JMS-S300 Spiral TOF MALDI 法

日本電子 JMS-Q1000GC K9 GC-MS

Waters Xevo G2 Q-TOF ESI 法

【紫外可視吸光光度計】

GE Healthcare Japan GeneQuqnt1300

【蛍光分光光度計】

日本分光 FP8300

【HPLC】

Agilent 1200 Infinity series

Waters ACQUITY UPLC H-Class system

7. 本研究に関する出版物

1. Okada, Y.; Wakamatsu, H.; Sugai, M.; Kauppinen, E. I.; Chiba, K. Acid-Triggered Colorimetric Hydrophobic Benzyl Alcohols for Soluble Tag-Assisted Liquid-Phase Synthesis. *Org. Lett.* **2015**, *17*, 4264-4267.
2. Wakamatsu, H.; Okada, Y.; Sugai, M.; Hussaini, S. R.; Chiba, K. Photo-Triggered Fluorometric Hydrophobic Benzyl Alcohol for Soluble Tag-Assisted Liquid-Phase Peptide Synthesis. *Asian. J. Org. Chem.* **2017**, *6*, 1584-1588.
3. Wakamatsu, H.; Handa, A.; Chiba, K. Observations using Phosphorus-31 Nuclear Magnetic Resonance (³¹P-NMR) of Structural Changes in Freeze-Thawed Hen Egg Yolk. *Food Chemistry* **2018**, *244*, 169-176.

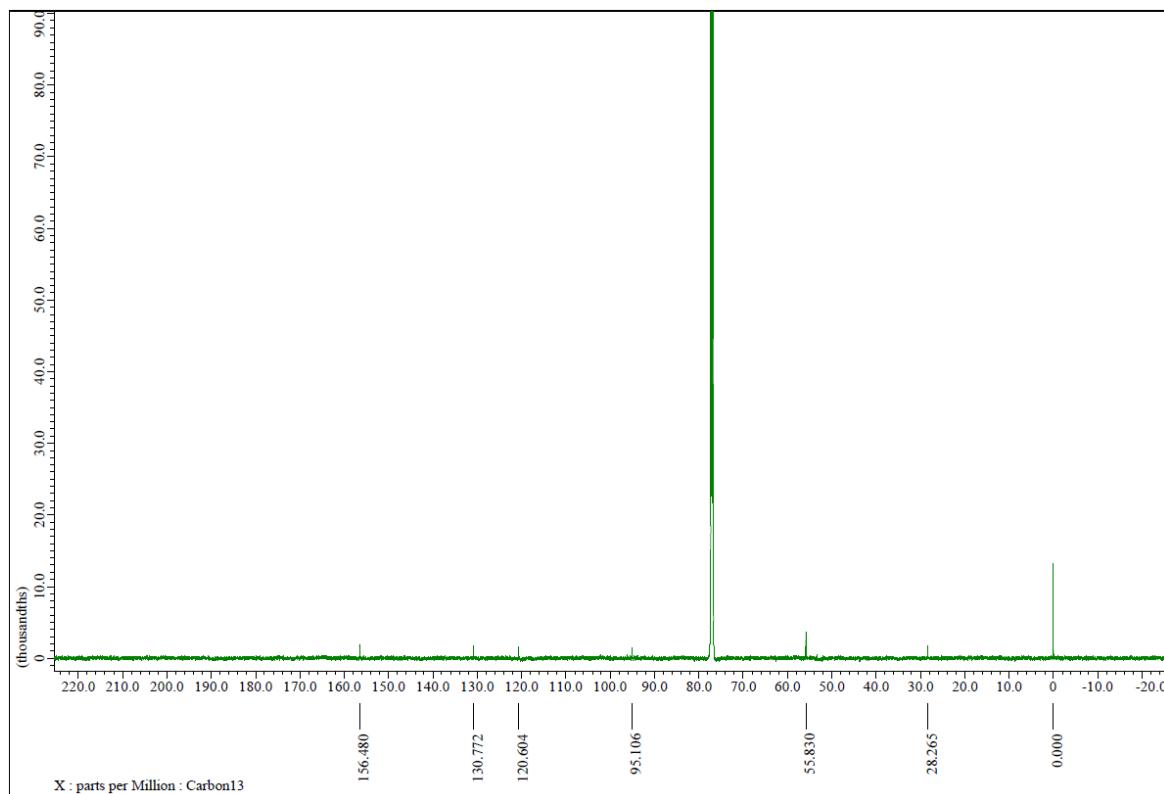
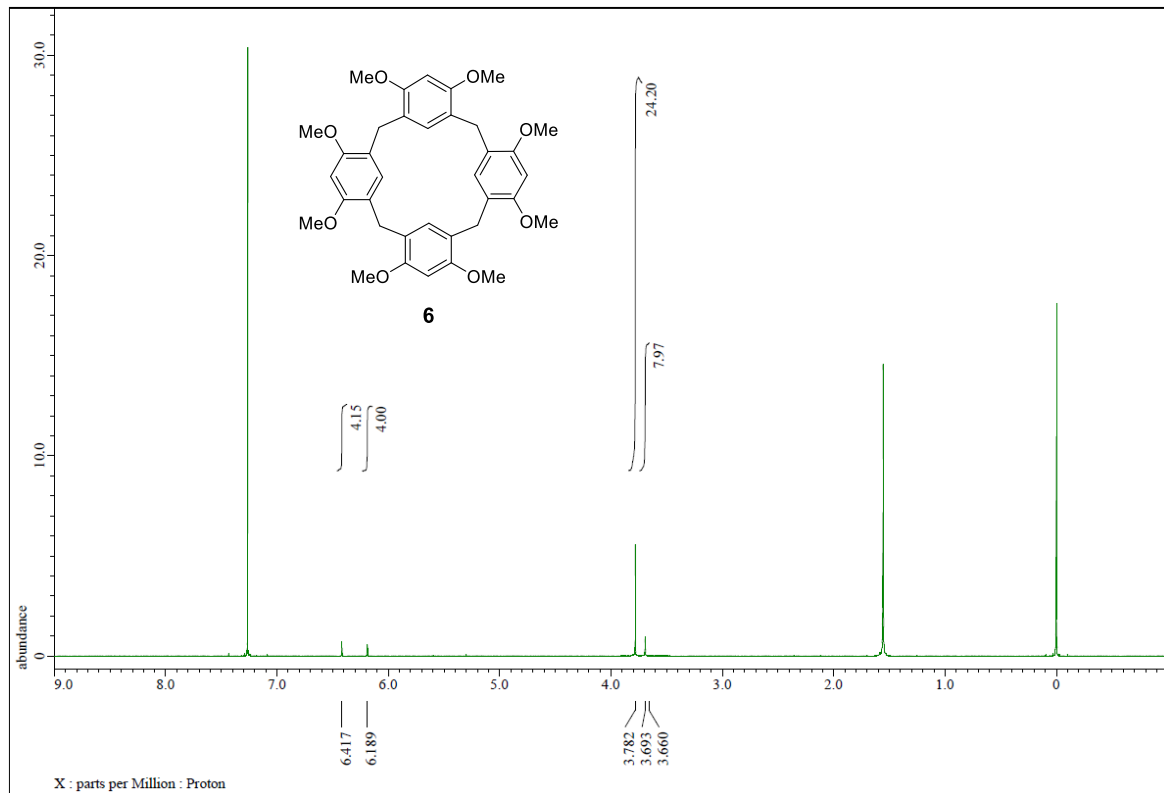
8. 参考文献

- (a) Fosgerau, K.; Hoffmann, T. *Drug Discovery Today* **2015**, *20*, 122-128. (b) Uhlig, T., Kyprianou, T.; Martinelli, F. G.; Oppici, C. A.; Heiligers, D.; Hills, D.; Calvo, X. R.; Verhaert, P. *EuPA Open Proteomics* **2014**, *4*, 58-69. (c) Okada, Y.; Chiba K. *J. Synth. Org. Chem. Jpn.* **2016**, *74*, 588-598. (d) Dowling, J. J. *Nat. Rev. Neurol.* **2016**, *12*, 675-676. (e) Kole, R.; Krieg, A. M. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2015**, *87*, 104-107. (f) Latorre, A.; Latorre, A.; Somoza, Á. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 3548-3550. (g) Deleavey, G. F.; Damha, M. *J. Chem. Biol.* **2012**, *19*, 937.
- R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2149-2154.
- (a) Bergbreiter, D. E.; Tian, J.; Hongfa, C. *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 530-582. (b) Bergbreiter, D. E. *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 3345-3384. (c) Dickerson, T. J.; Reed, N. N.; Janda, K. D. *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 3325-3344. (d) Gravert, D. J.; Janda, K. D. *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 489-510. (e) Takahashi, D.; Inomata, T.; Fukui, T. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **2017**, *56*, 7803-7807.
- (a) Zhang, C.-X.; Tong, H.-B.; Yan, C.-G. *J. Comb. Chem.* **2007**, *9*, 924-925. (b) Fischer, P. M.; Zheleva, D. I. *J. Pept. Sci.* **2002**, *8*, 529. (c) Janda, K. D.; Han, H. *Methods Enzymol.* **1996**, *267*, 234-247. (d) Bayer, E. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1991**, *30*, 113-129. (e) Geckeler, K.; Pillai, V. N. R.; Mutter, M. *Adv. Polym. Sci.* **1981**, *39*, 65-94. (f) Pillai, V. N. R.; Mutter, M.; Bayer, E.; Gatfield, I. *J. Org. Chem.* **1980**, *45*, 5364-5370. (g) Bayer, E.; Mutter, M. *Nature* **1972**, *237*, 512-513. (h) Mutter, M.; Hagenmaier, H.; Bayer, E. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1971**, *10*, 811-812.
- (a) Okada, Y.; Hosoya, S.; Suzuki, H.; Chiba, K. *Org. Lett.* **2014**, *16*, 6448-6451. (b) Fujita, Y.; Fujita, S.; Okada, Y.; Chiba, K. *Org. Lett.* **2013**, *15*, 1155-1157. (c) Kitada, S.; Fujita, S.; Okada, Y.; Kim, S.; Chiba, K. *Tetrahedron* **2013**, *69*, 2555-2559. (d) Okada, Y.; Suzuki, H.; Nakae, T.; Fujita, S.; Abe, H.; Nagano, K.; Yamada, T.; Ebata, N.; Kim, S.; Chiba, K. *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 320-327. (e) Kitada, S.; Takahashi, M.; Yamaguchi, Y.; Okada, Y.; Chiba, K. *Org. Lett.* **2012**, *14*, 5960-5963.
- (a) Ruczyński, J.; Lewandowska, B.; Mucha, P.; Rekowski, P. *J. Pept. Sci.* **2008**, *14*, 335-341. (b) Tana, G.; Kitada, S.; Fujita, S.; Okada, Y.; Kim, S.; Chiba, K. *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 8219-8221.
- Falana, O. M.; keehn, P. M.; Stevenson, R. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 8147-8154.
- (a) Beppu, T.; Tomiguchi, K.; Masuhara, A.; Pu, Y. J.; Katagiri, H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 7332-7335. (b) Martin, R. E.; Diederich, F. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 1350-1377. (c) Watson, M. D.; Fechtenkötter, A.; Müllen, K. *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 1267-1300.
- (a) Gompper, R.; Wagner, H. U. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1988**, *27*, 1437-1455. (b) Meier, H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 2482-2506. (c) Lord, S. J.; Lee, H. -L. D.; Samuel, R.; Weber, R.; Liu, N.; Conley, N. R.; Thompson, M. A.; Twieg, R. J.; Moerner, W. E. *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114*, 14157-

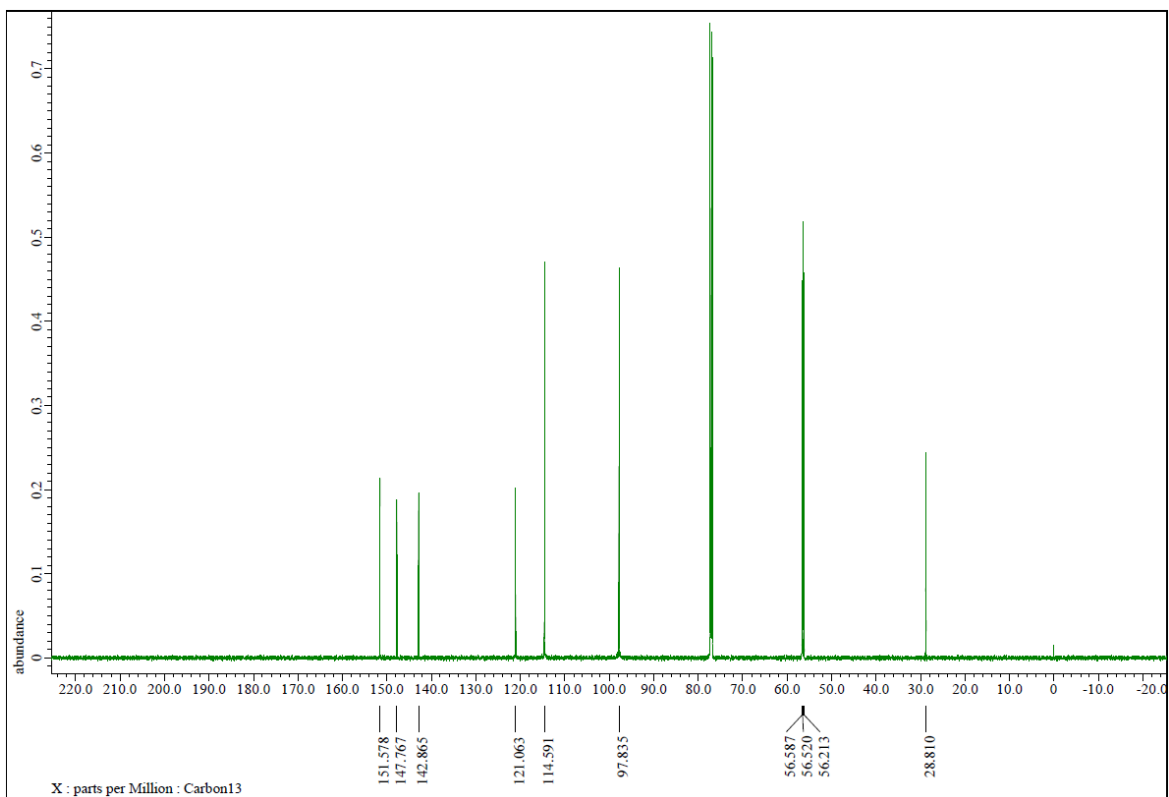
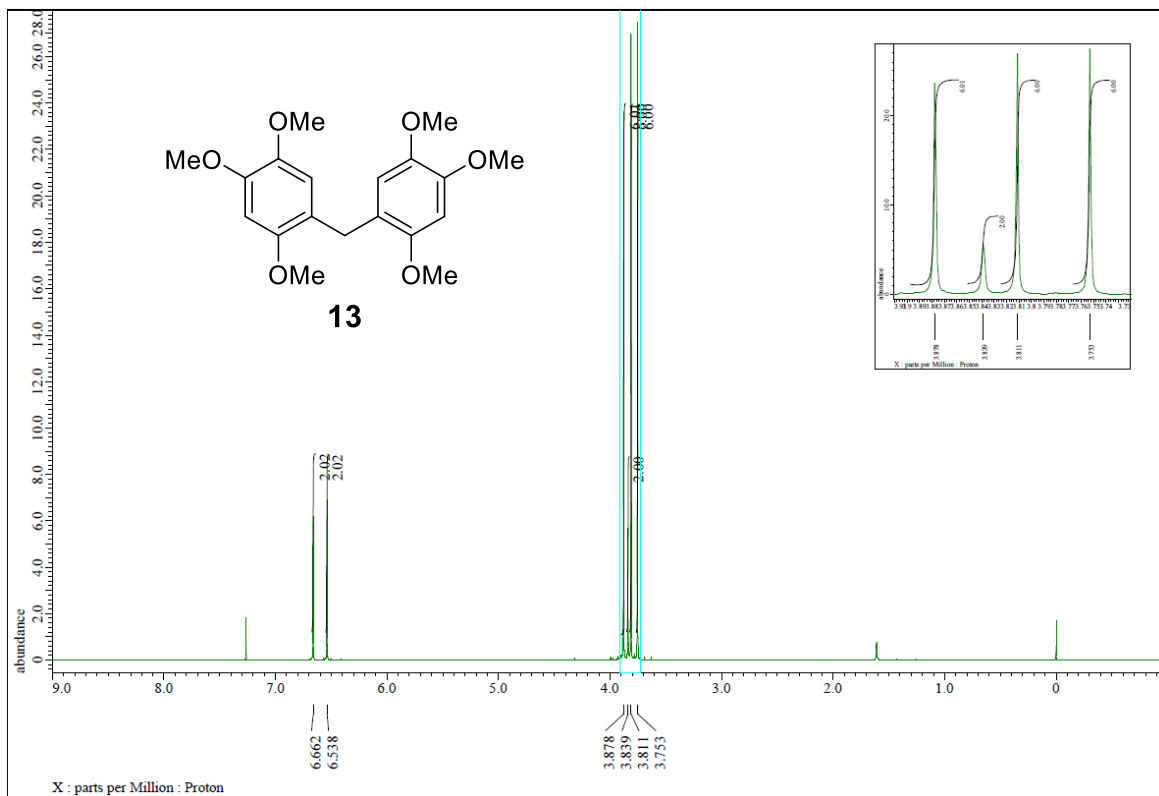
14167.

10. (a) Wilsdorf, M.; Lechnitz, D.; Reissing, H. U. *Org. Lett.* **2013**, *15*, 2494-2497. (b) Branchi, B.; Bietti, M.; Ercolani, G.; Izquierdo, M. A.; Miranda, M. A.; Stella, L. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 8774-8885.
11. (a) Carpino, L. A.; Han, G. Y. *J. Org. Chem.* **1972**, *37*, 3404-3409. (b) Carpino, L. A.; Han, G. Y. *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92*, 5748-5749.
12. (a) Gates, Z. P.; Dhayalan, B.; Kent, S. B. H. *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 13979-13982. (b) Thapa, P.; Cabalteja, C. C.; Philips III, E. E.; Espiritu, M. J.; Peigneur, S.; Mille, B. G.; Tytgat, J.; Cummins, T. R.; Bingham, J. *Biopolymers*, **2016**, *106*, 737-745. (c) Raz, R.; Burlina, F.; Ismail, M.; Downward, J.; Li, J.; Smerdon, S. J.; Quibell, M.; White, P. D.; Offer, J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 13174-13179. (d) Izumi, M.; Murakami, M.; Okamoto, R.; Kajihara, Y. *J. Pept. Sci.* **2014**, *20*, 98-101. (e) Murakami, M.; Okamoto, R.; Izumi, M.; Kajihara, Y. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 3567-3572.
13. (a) Houghten, R. A.; Beckman, A.; Osteresh, J. M. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1986**, *27*, 653-658. (b) Strazzolini, P.; Melloini, T.; Giumanini, A. G. *Tetrahedron* **2001**, *57*, 9033-9043.
14. Okada, Y.; Sugai, M.; Chiba, K. *J. Org. Chem.* **2016**, *81*, 10922-10929.
15. (a) Scandura, G.; Palmisano, G.; Yurdakal, S.; Tek, B. S.; Özcan, L.; Loddo, V.; Augugliaro, V. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* **2016**, *328*, 122-128. (b) Palmisano, G.; Scandura, G.; Augugliano, V.; Loddo, V.; Pace, A.; Tek, B. S.; Yurdakal, S.; Palmisano, L. *J. Mol. Catal. A: Chem.* **2015**, *403*, 37-42.
16. (a) Zhang, Y.; Teuscher, K. B.; Ji, H. *Chem. Sci.* **2016**, *7*, 2111-2118. (b) Ravelli, D.; Fagnoni, M. *ChemCatChem* **2015**, *7*, 735-737. (c) Arceo, E.; Montroni, E.; Melchiorre, P. *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2014**, *53*, 12064-12068.
17. (a) Weinberg, D. R.; Gagliardi, C. J.; Hull, J. F.; Murphy, C. F.; Kent, C. A.; Westlake, B. C.; Paul, A.; Ess, D. H.; McCafferty, D. G.; Meyer, T. J. *Chem. Rev.* **2012**, *112*, 4016-4093. (b) Hammes-Schiffer, S.; Stuchebrukhov, A. A. *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 6939-6960. (c) Huynh, M. H.; Meyer, T. J. *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 5004-5064.
18. (a) Fenza, A. D.; Tancredi, M.; Galoppini, C.; Rovero, P. *Tetrahedron Letters* **1998**, *39*, 8529-8532. (b) Harding, S. J.; Jones, J. H.; Sabirov, A. N.; Samukov, V. V. *J. Pept. Sci.* **1999**, *5*, 368-373. (c) Kuroda, H.; Kubo, S.; Chino, N.; Kimura, T.; Sakakibara, S. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1992**, *40*, 114-118.
19. (a) Shoji, T.; Kim, S.; Chiba, K. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 4011-4014. (b) Shoji, T.; Haraya, S.; Kim, S.; Chiba, K. *Electrochim. Acta* **2016**, *200*, 290-295. (c) Shoji, T.; Kim, S.; Yamamoto, K.; Kawai, T.; Okada, Y.; Chiba, K. *Org. Lett.* **2014**, *16*, 6404-6407.

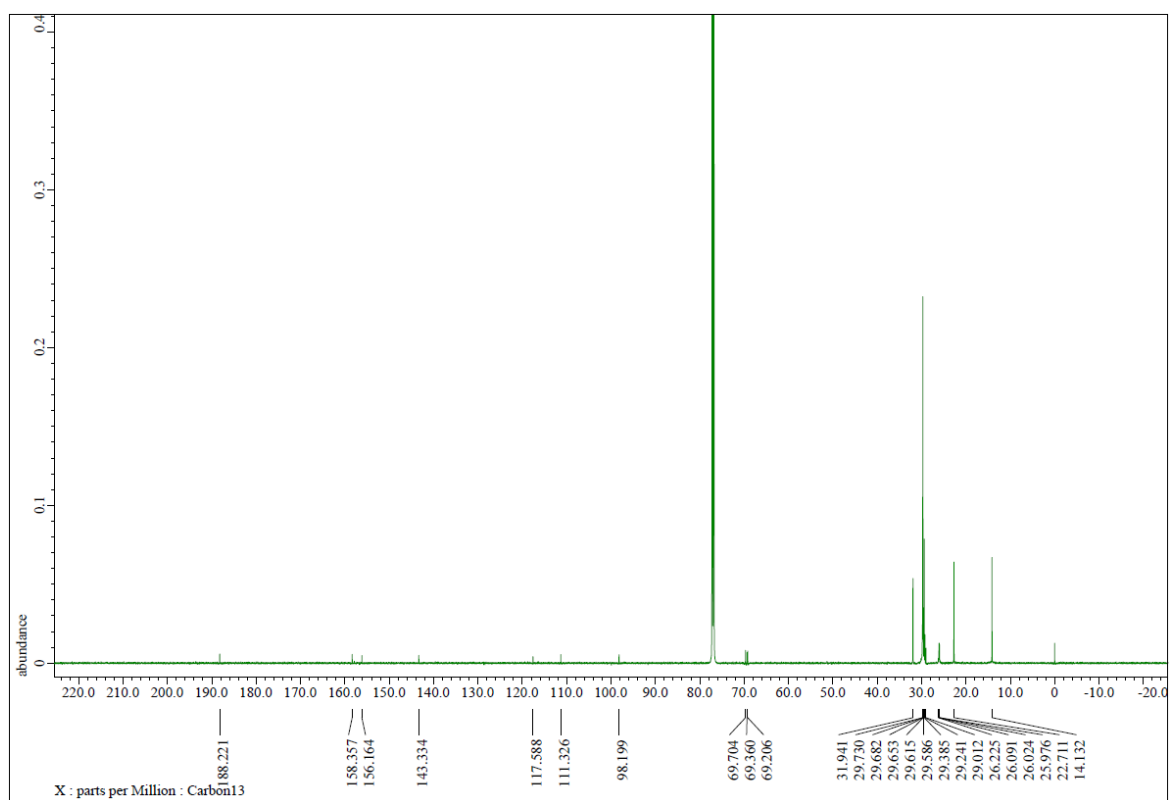
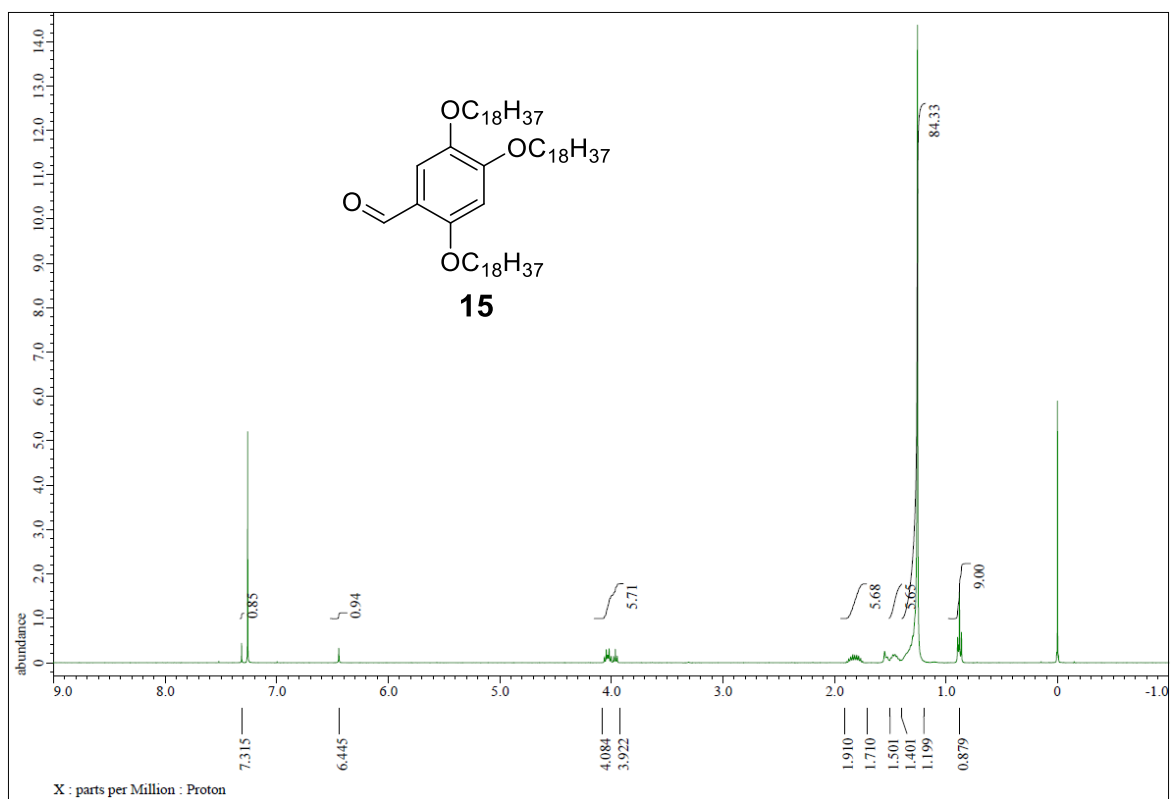
9. NMR スペクトル



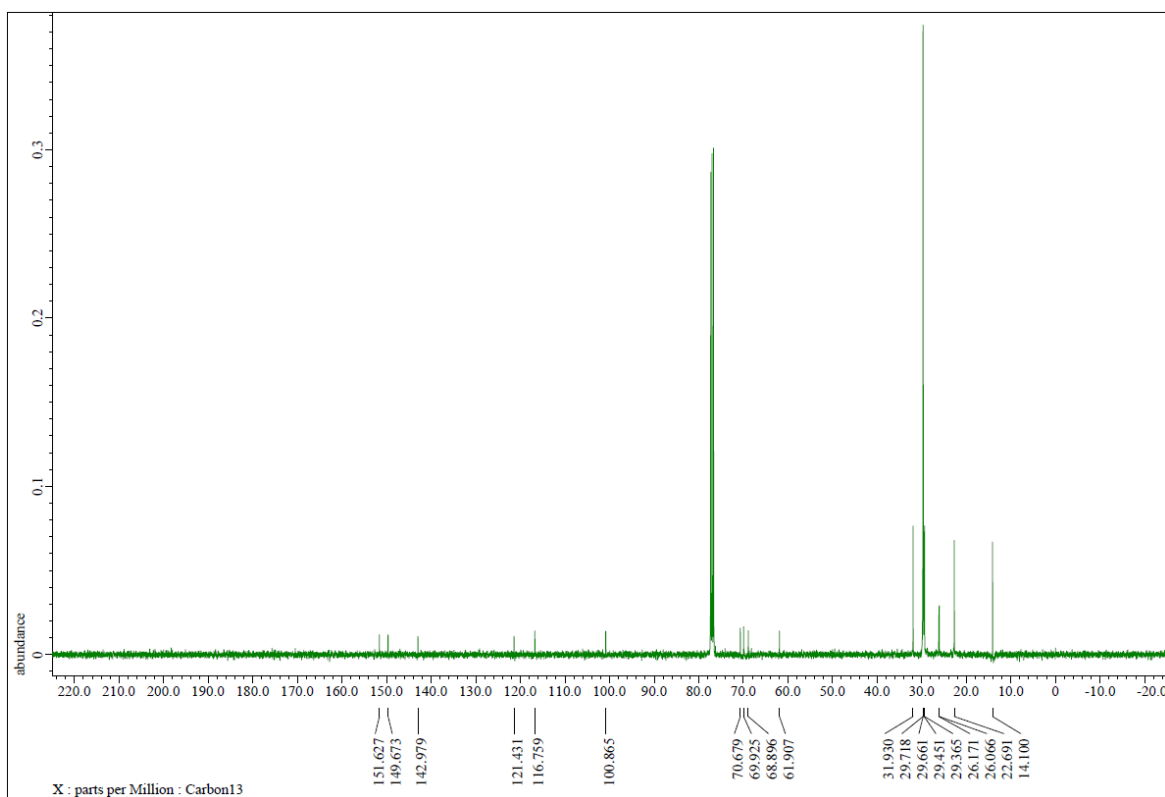
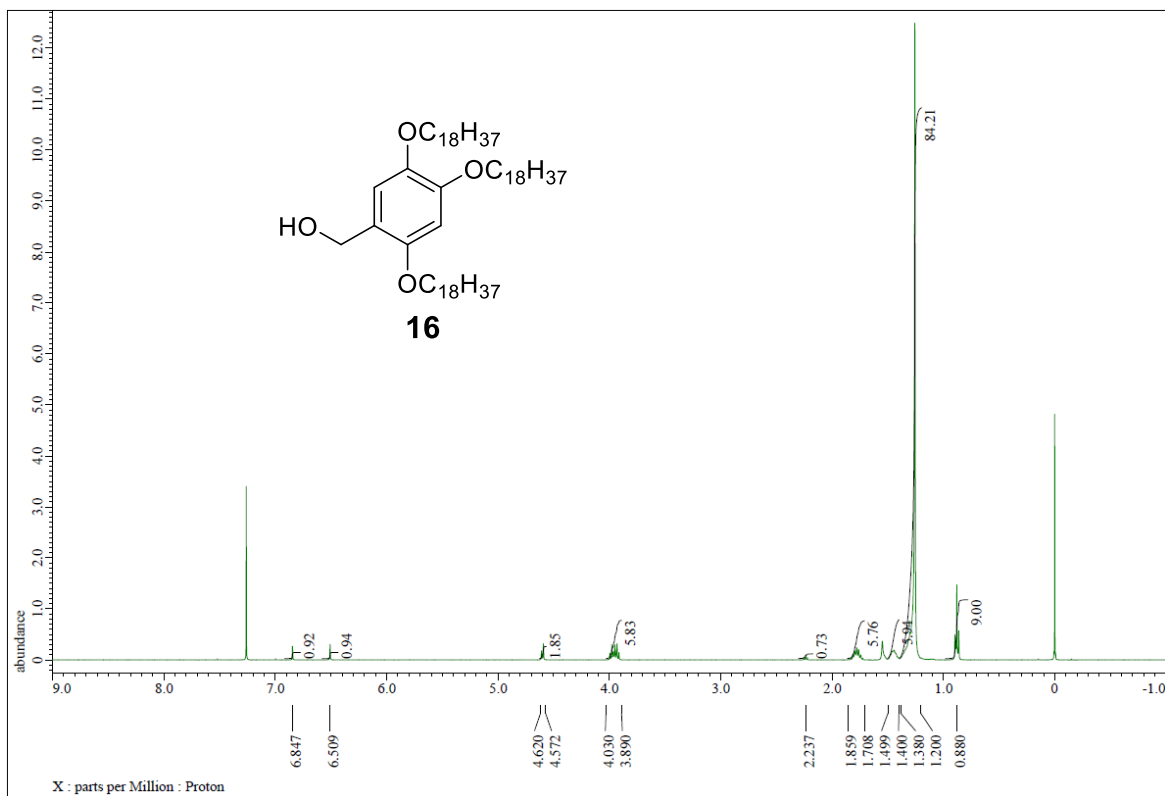
^1H and ^{13}C NMR spectra of **6**



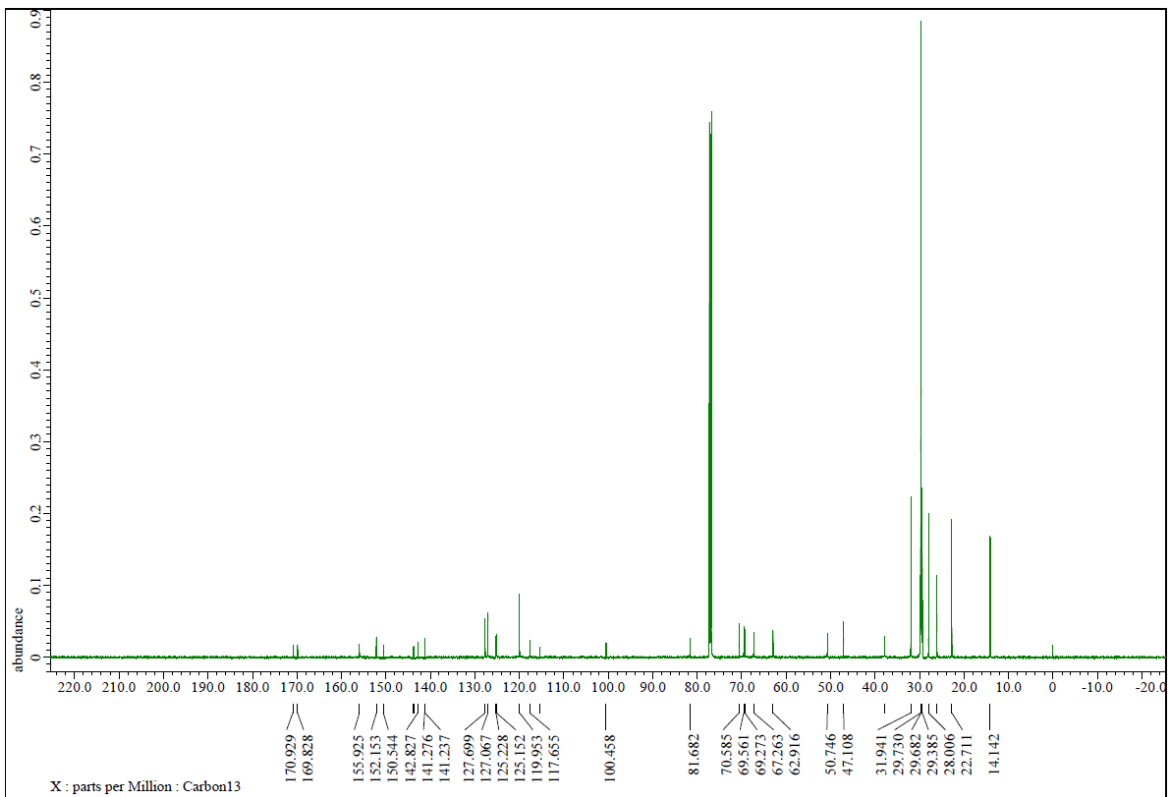
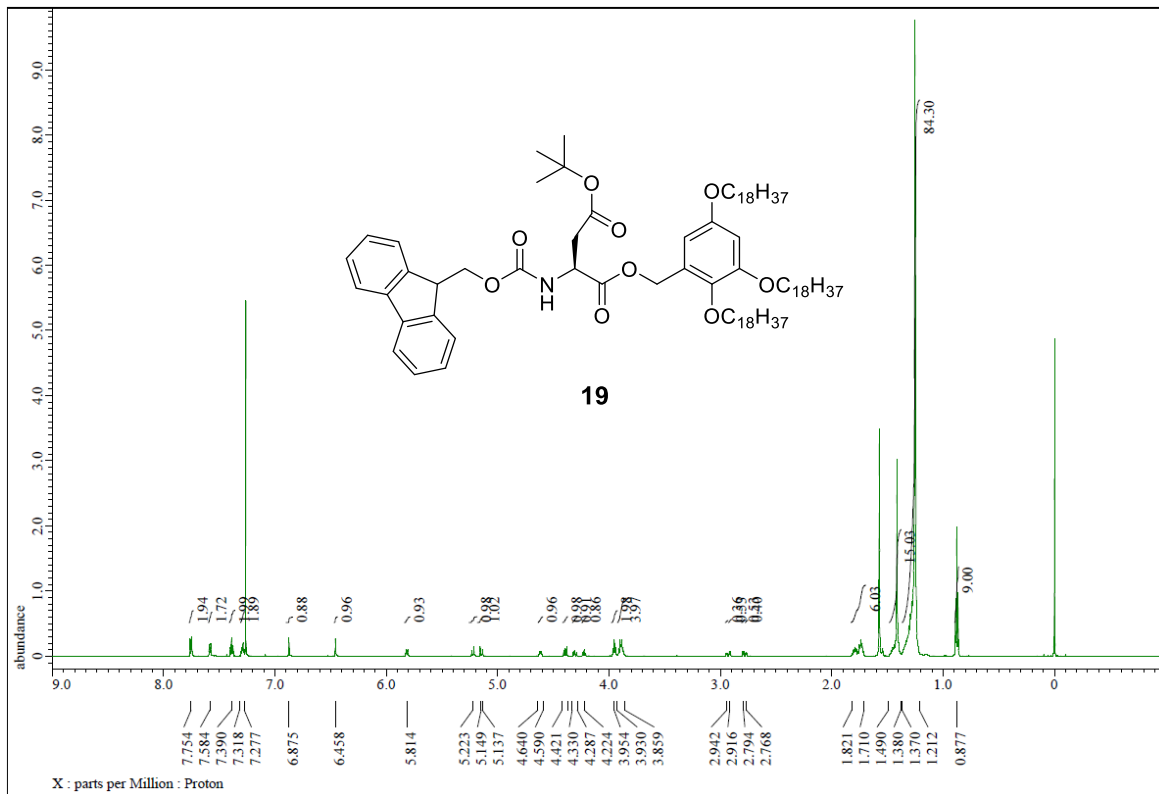
¹H and ¹³C NMR spectra of **13**



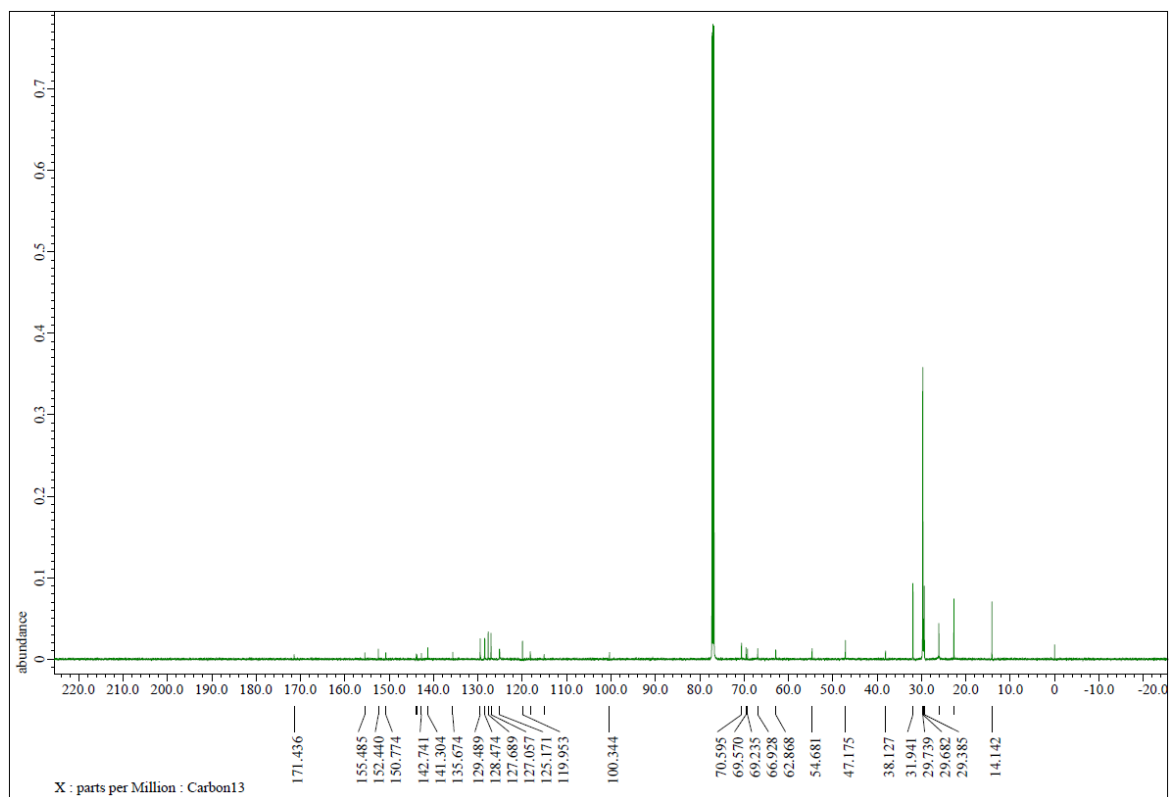
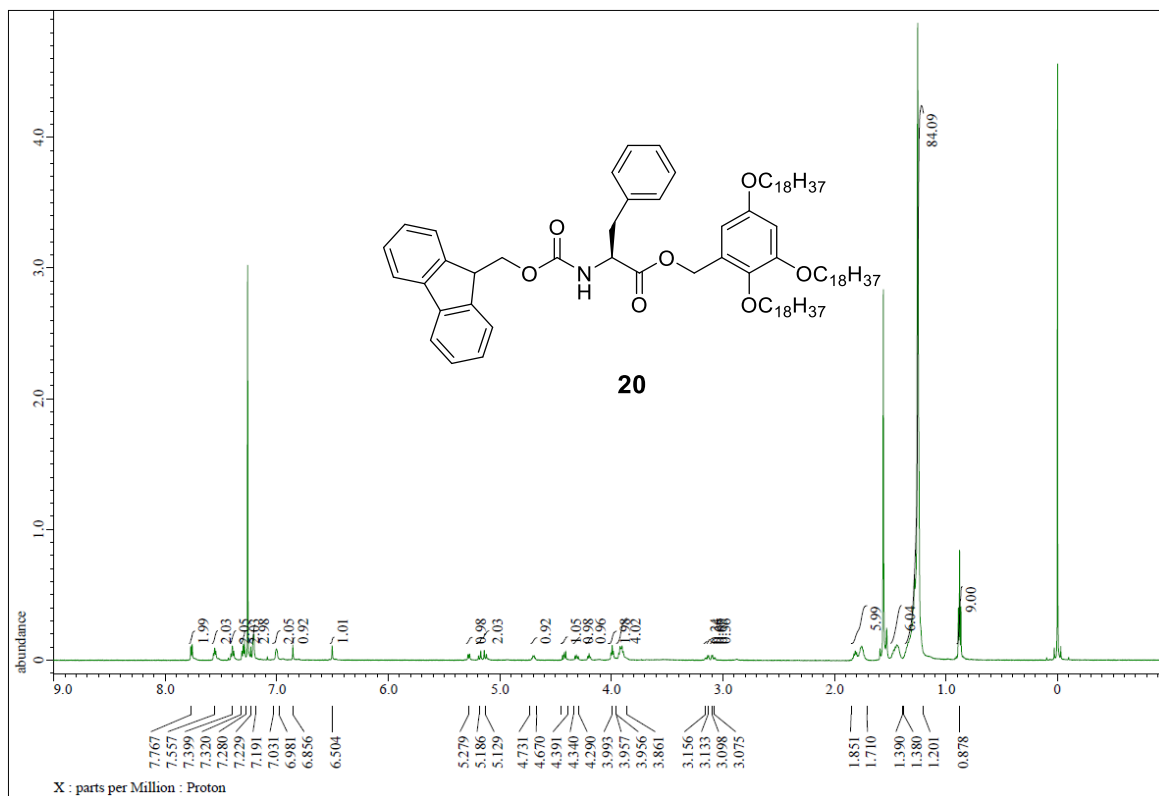
¹H and ¹³C NMR spectra of **15**



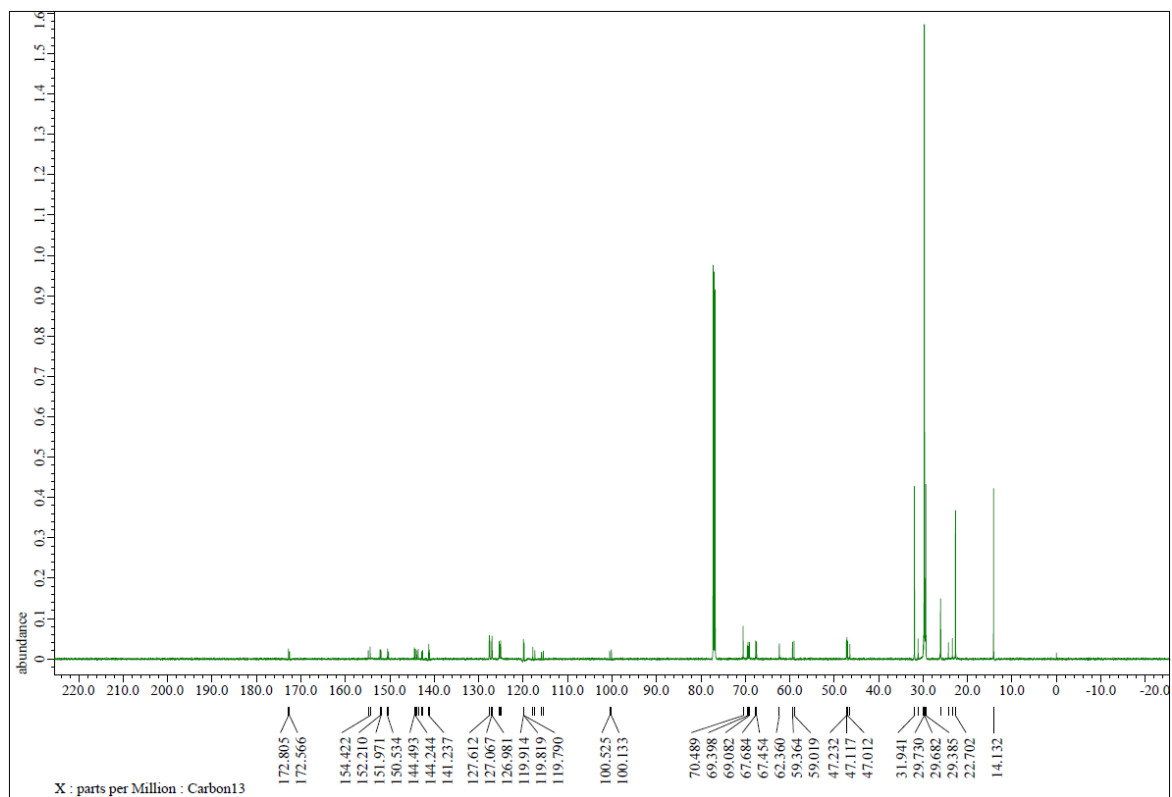
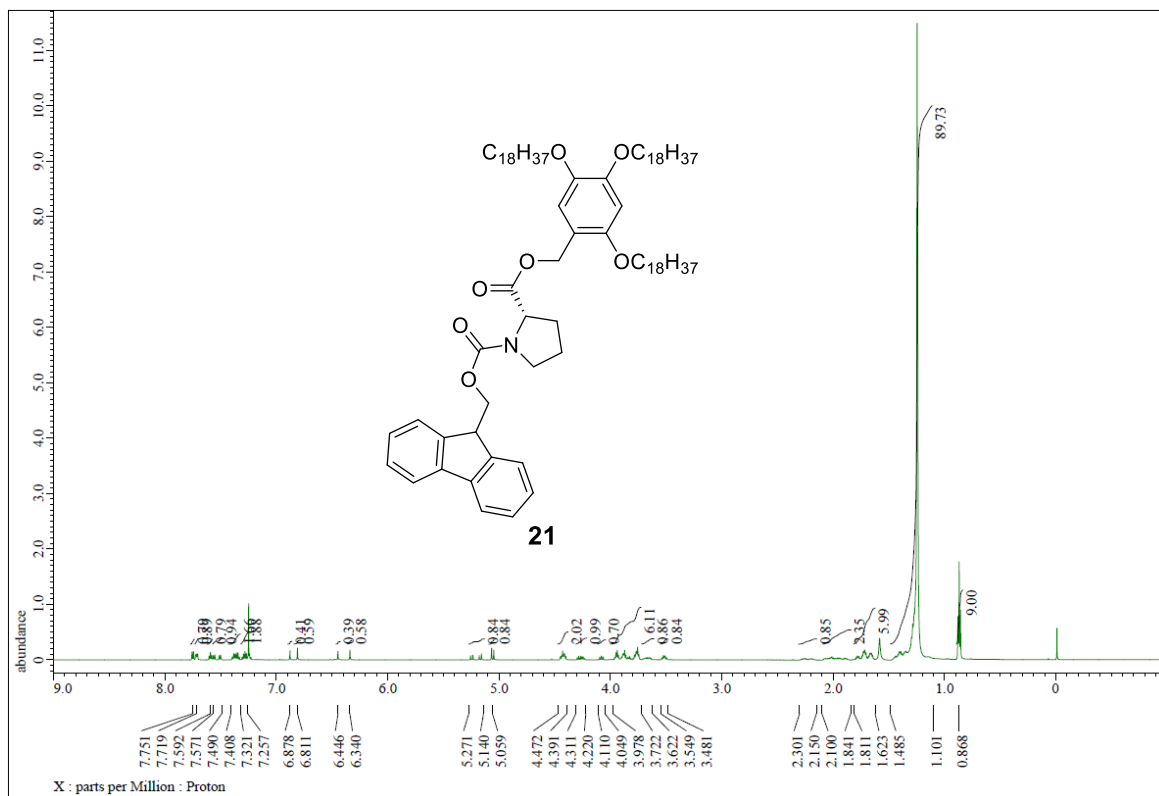
¹H and ¹³C NMR spectra of **16**



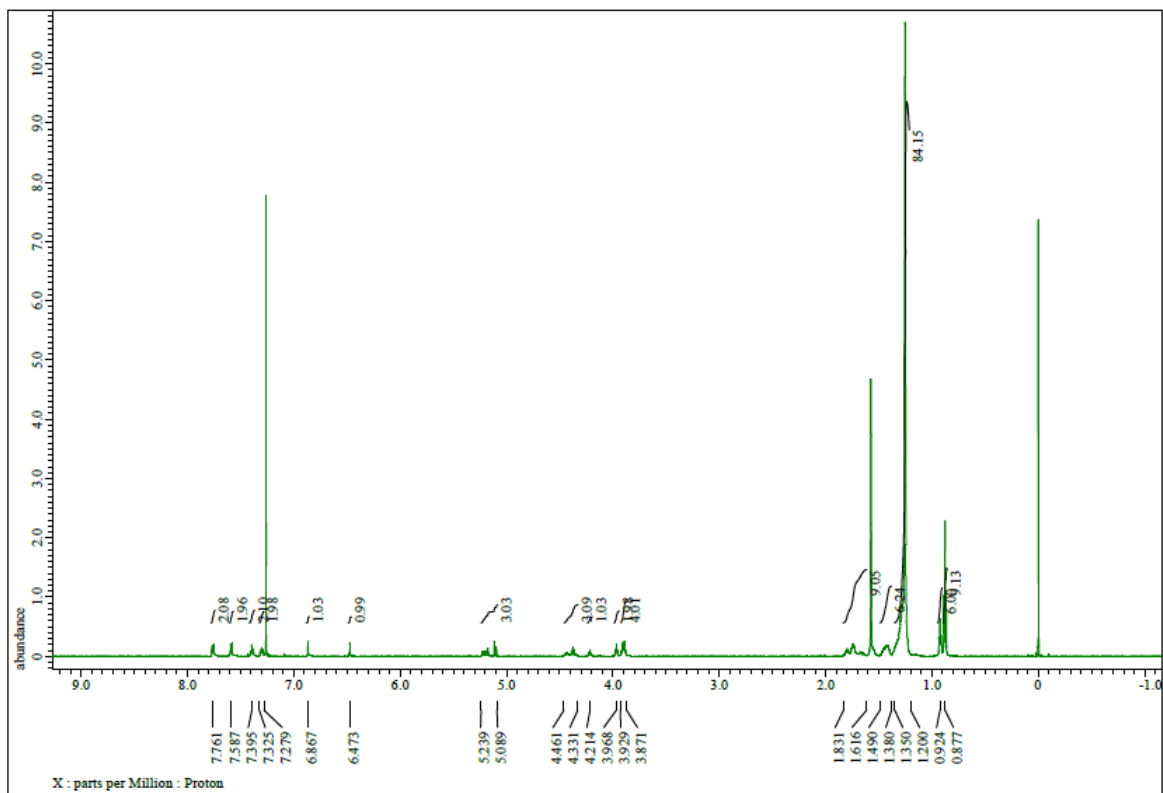
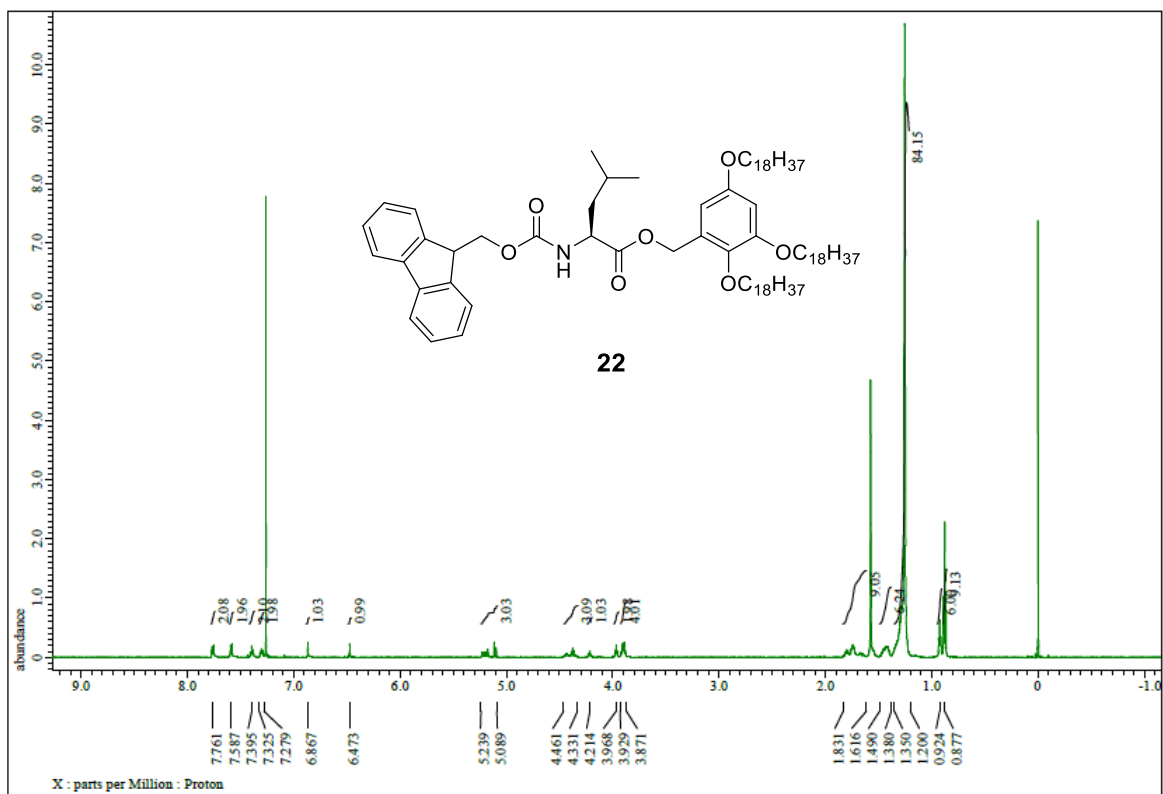
^1H and ^{13}C NMR spectra of **19**



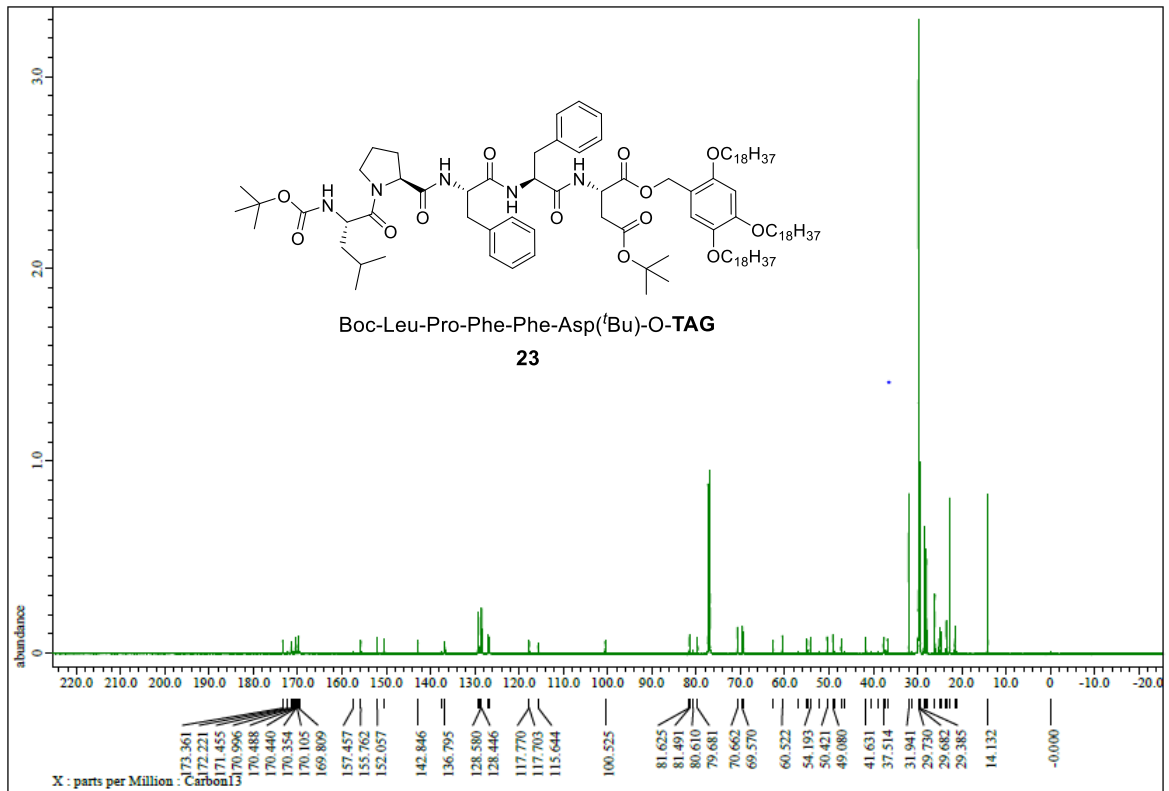
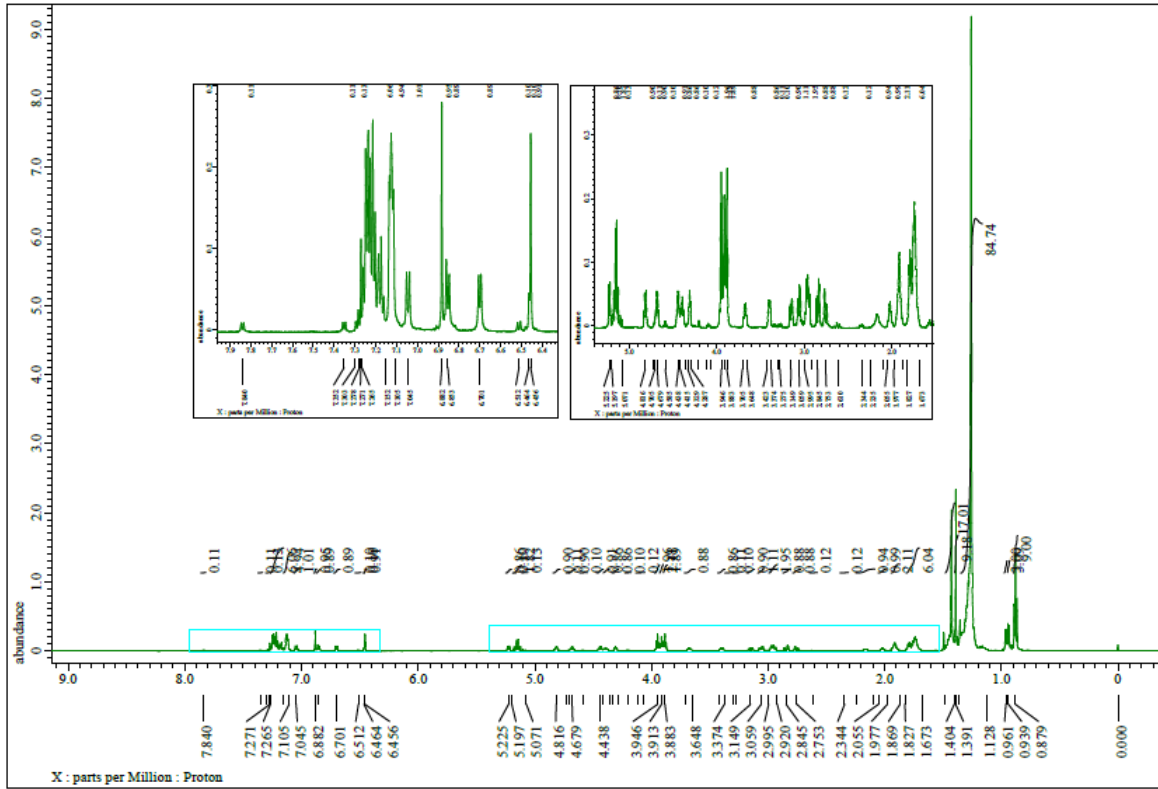
^1H and ^{13}C NMR spectra of **20**



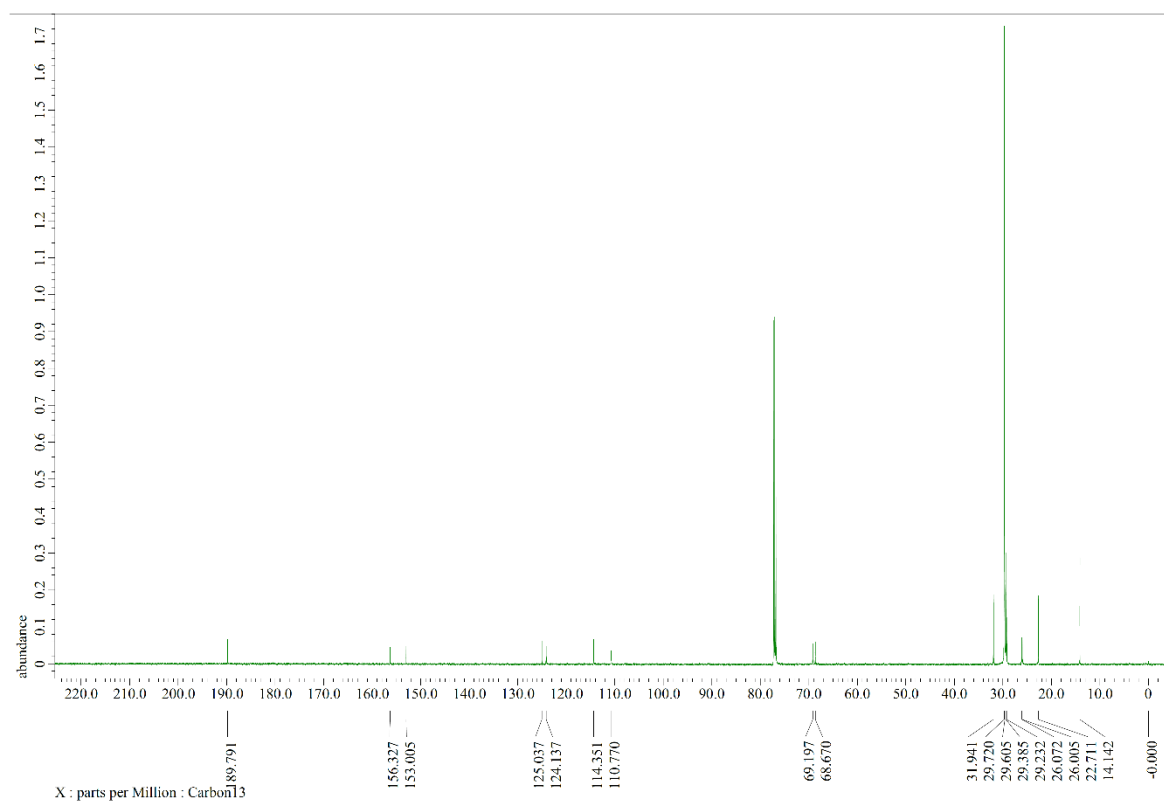
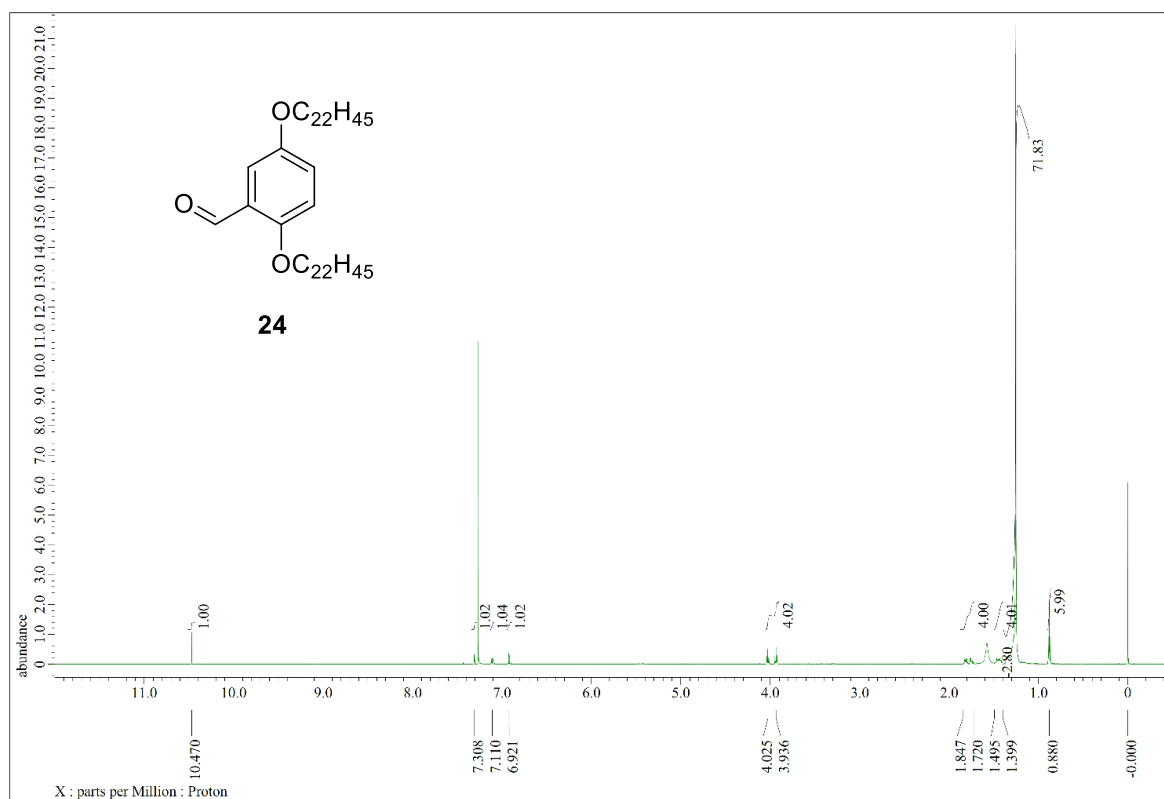
¹H and ¹³C NMR spectra of **21**



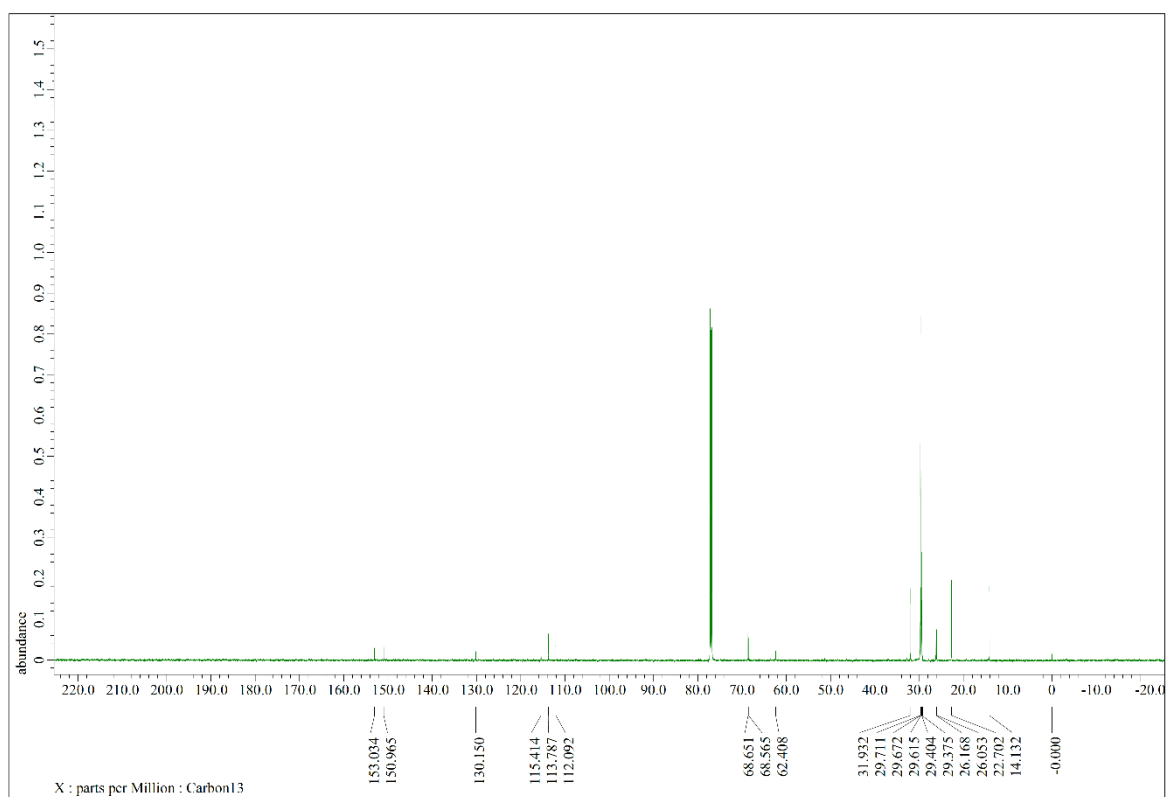
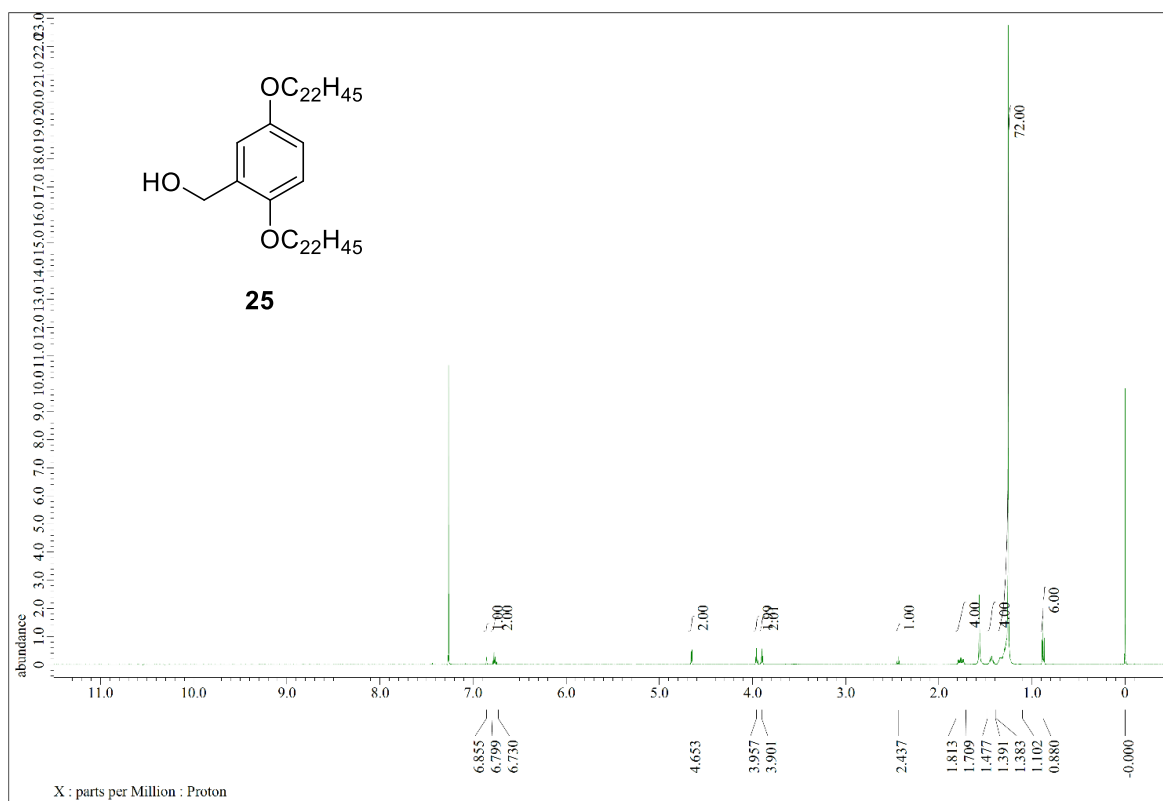
¹H and ¹³C NMR spectra of **22**



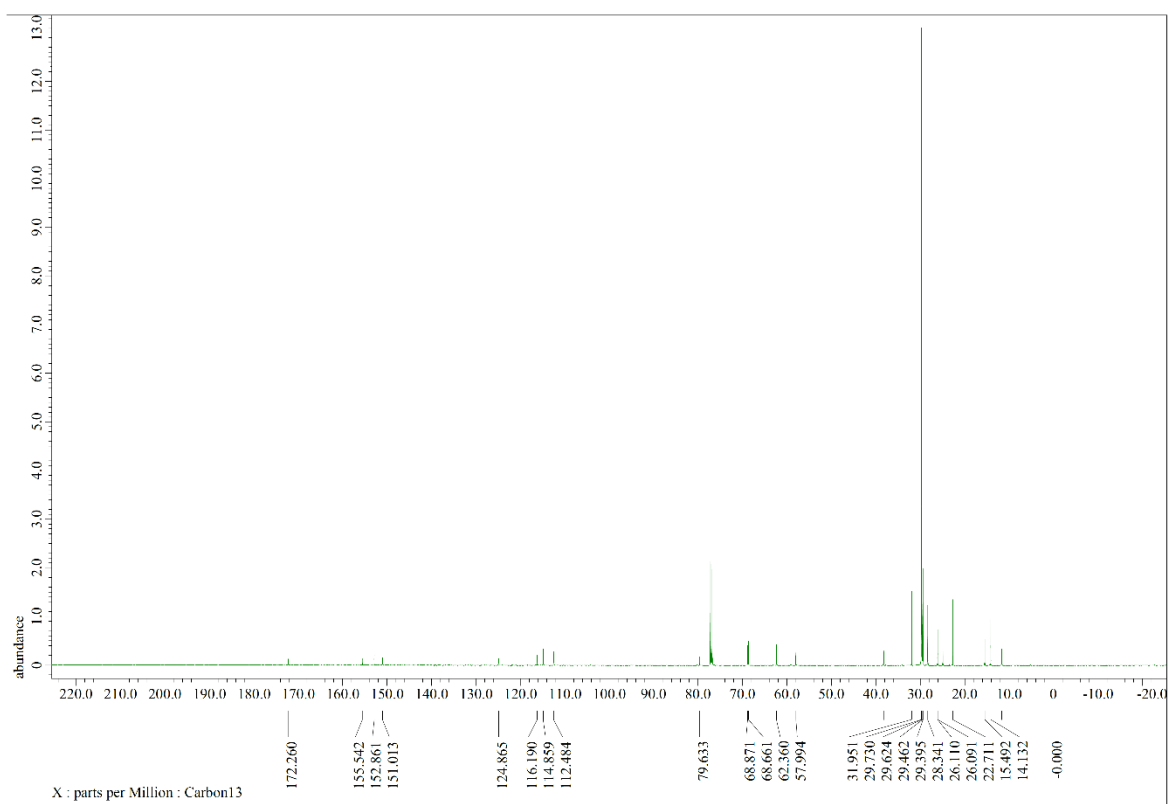
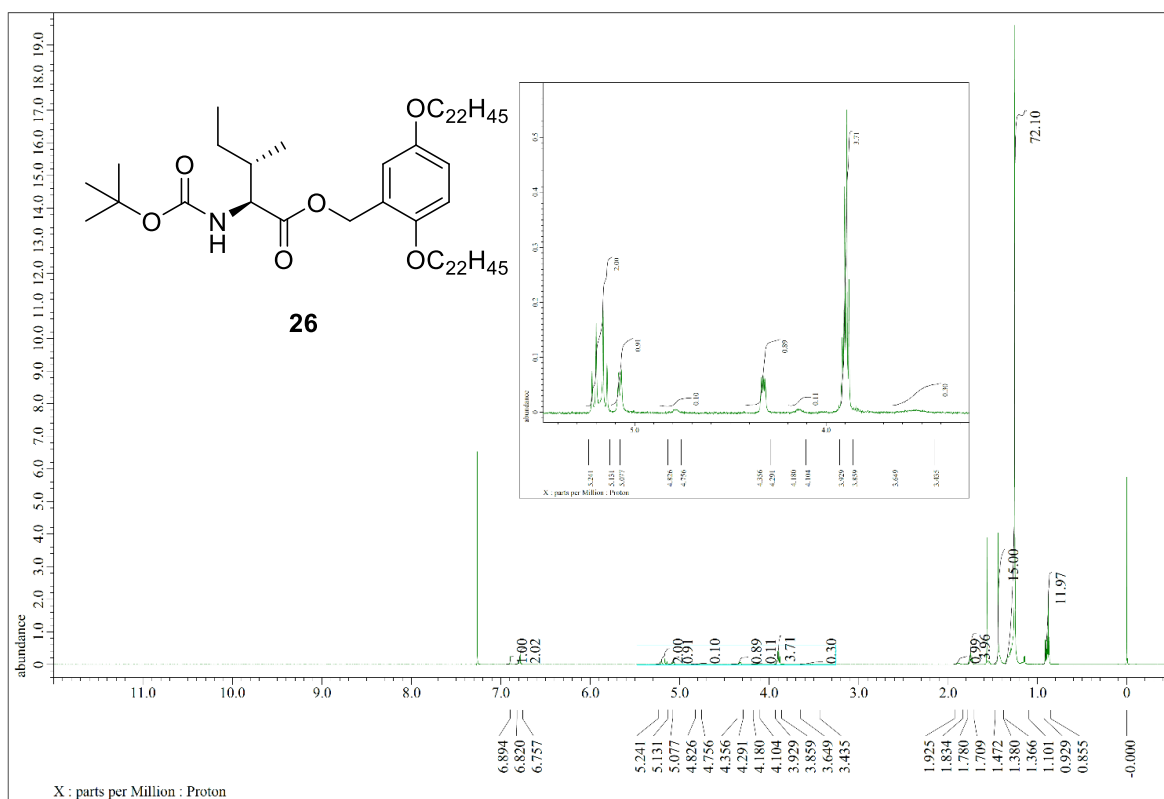
¹H and ¹³C NMR spectra of 23



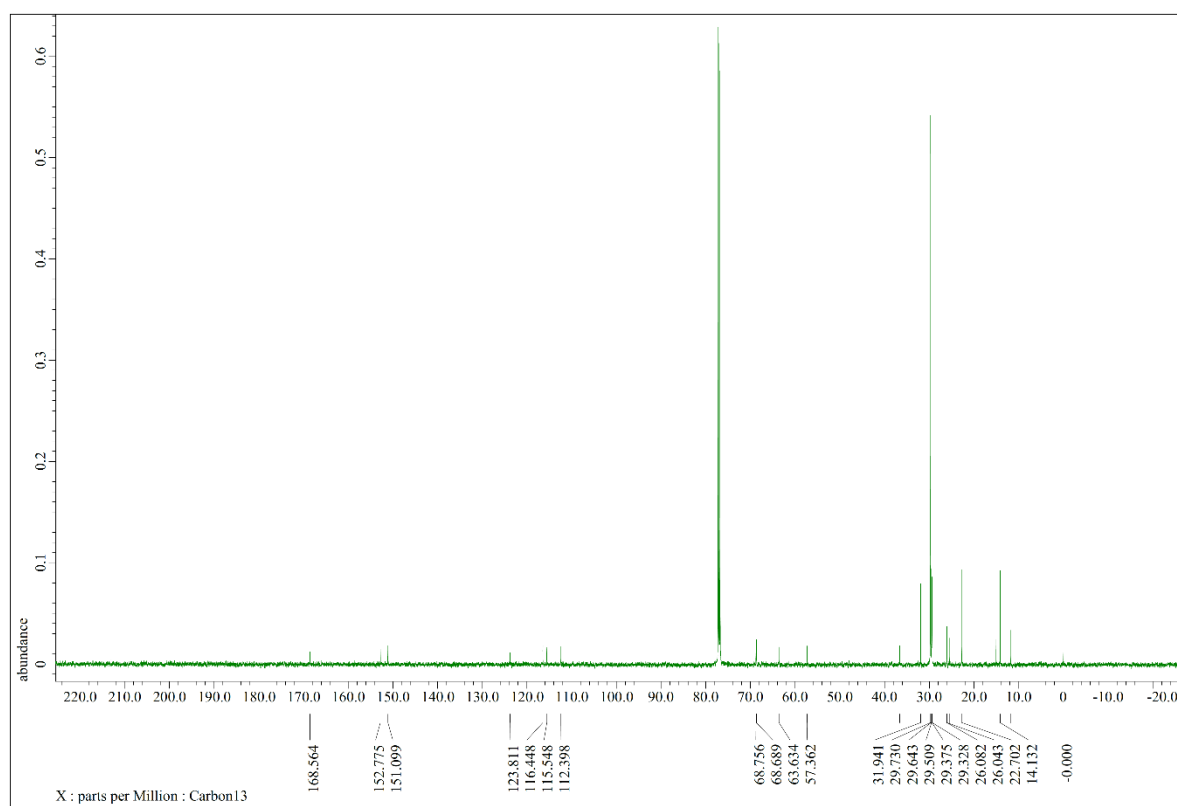
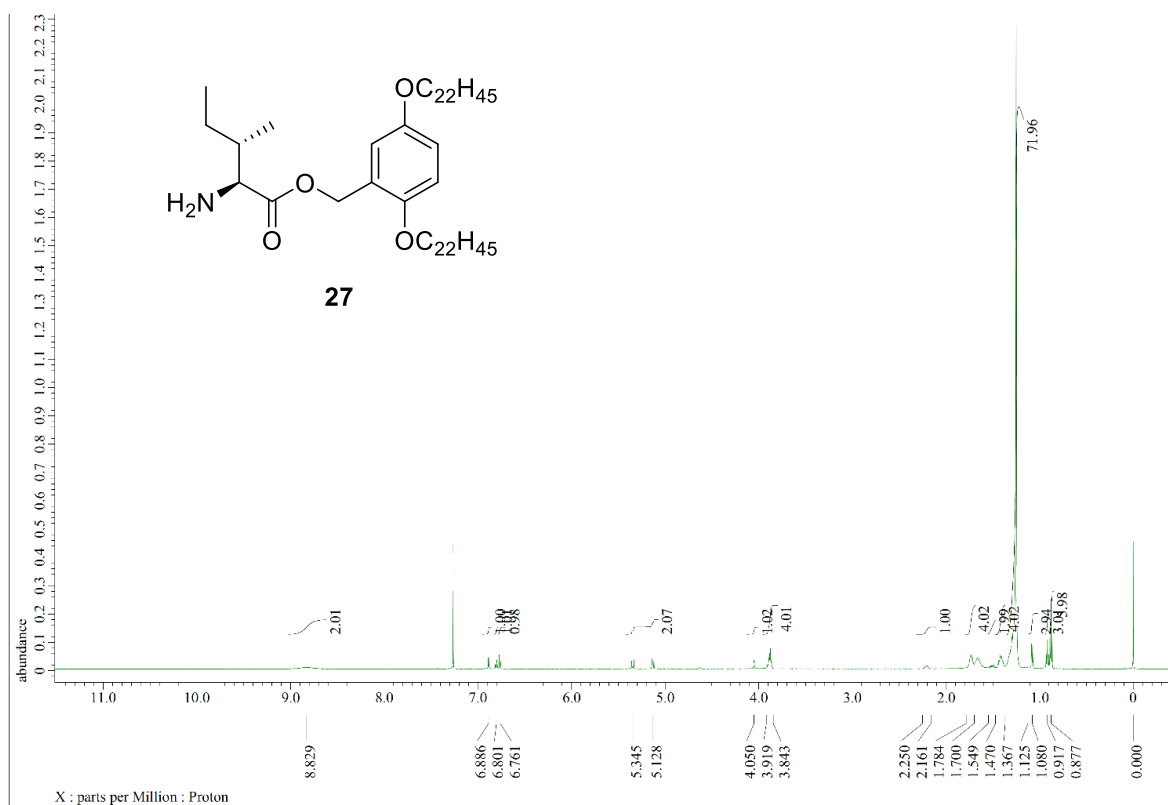
^1H and ^{13}C NMR spectra of **24**



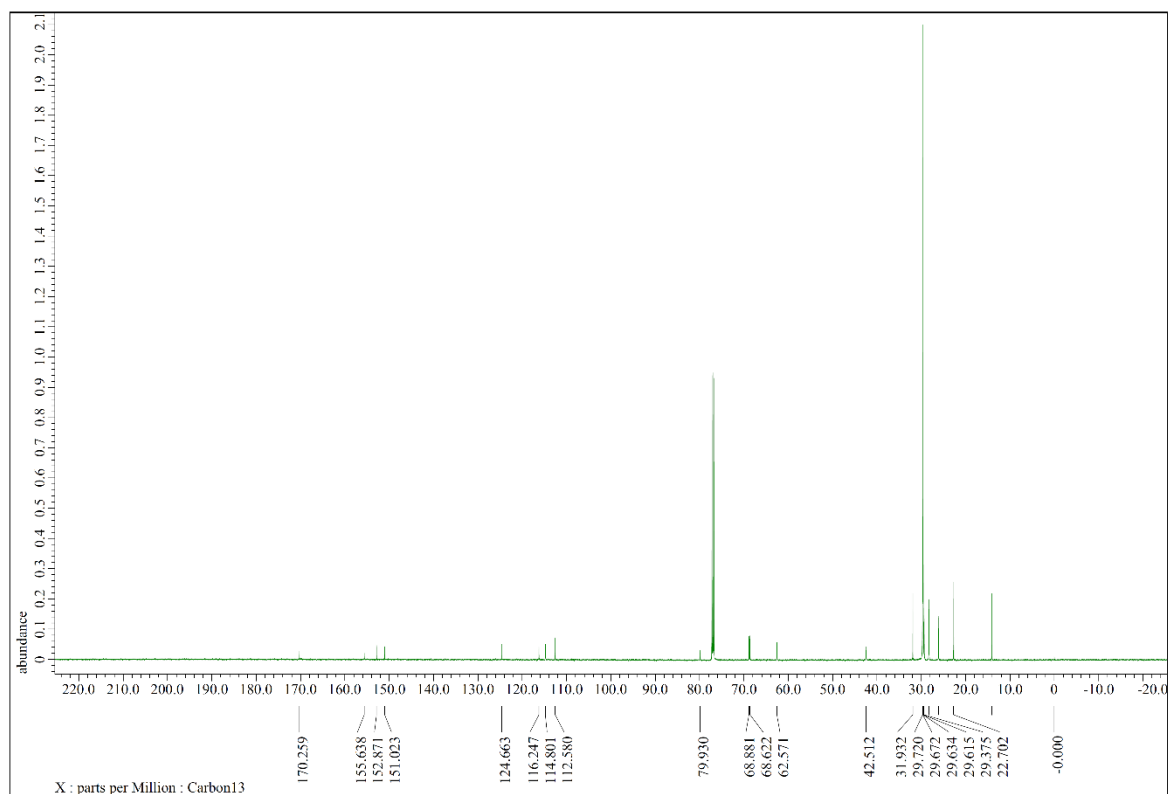
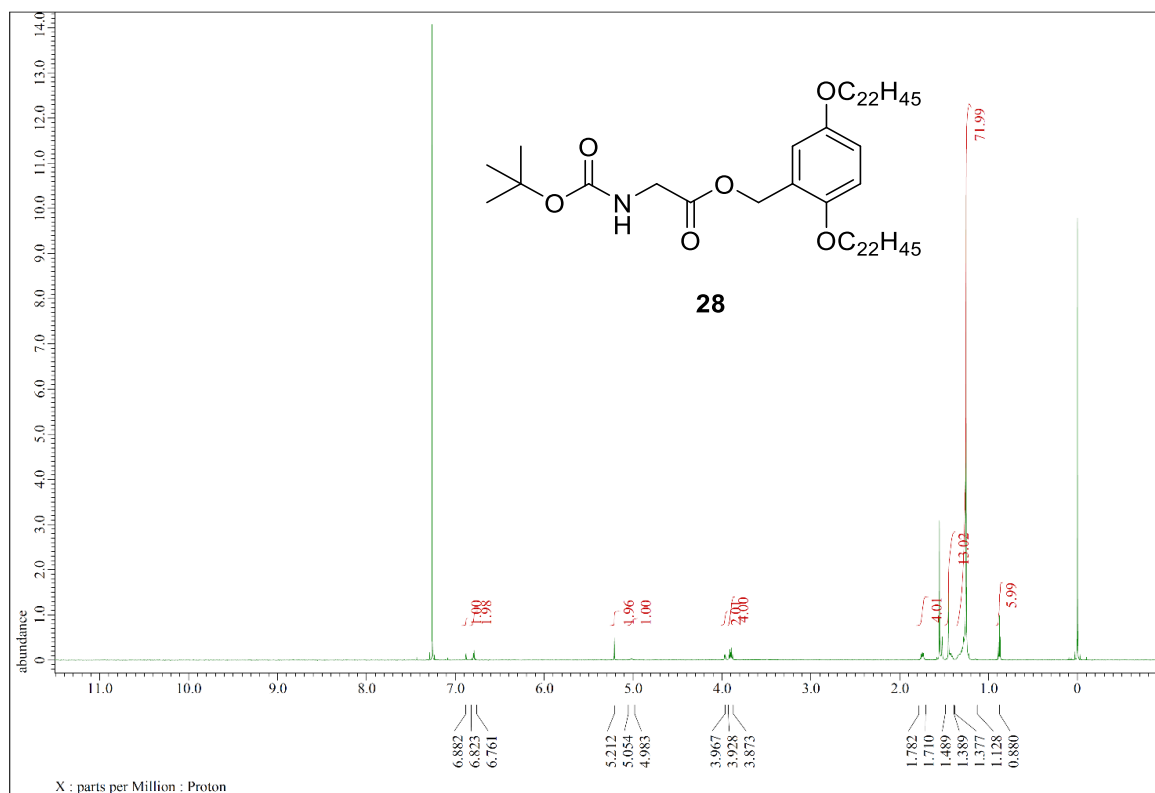
^1H and ^{13}C NMR spectra of **25**



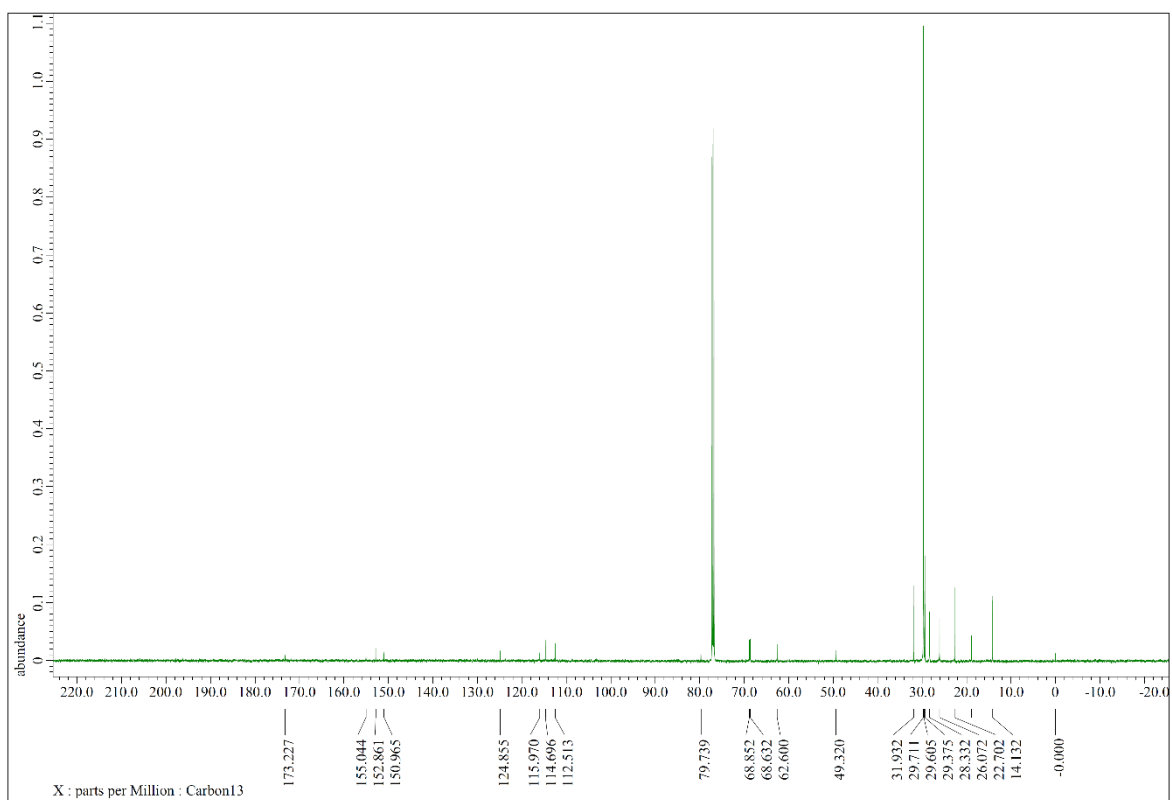
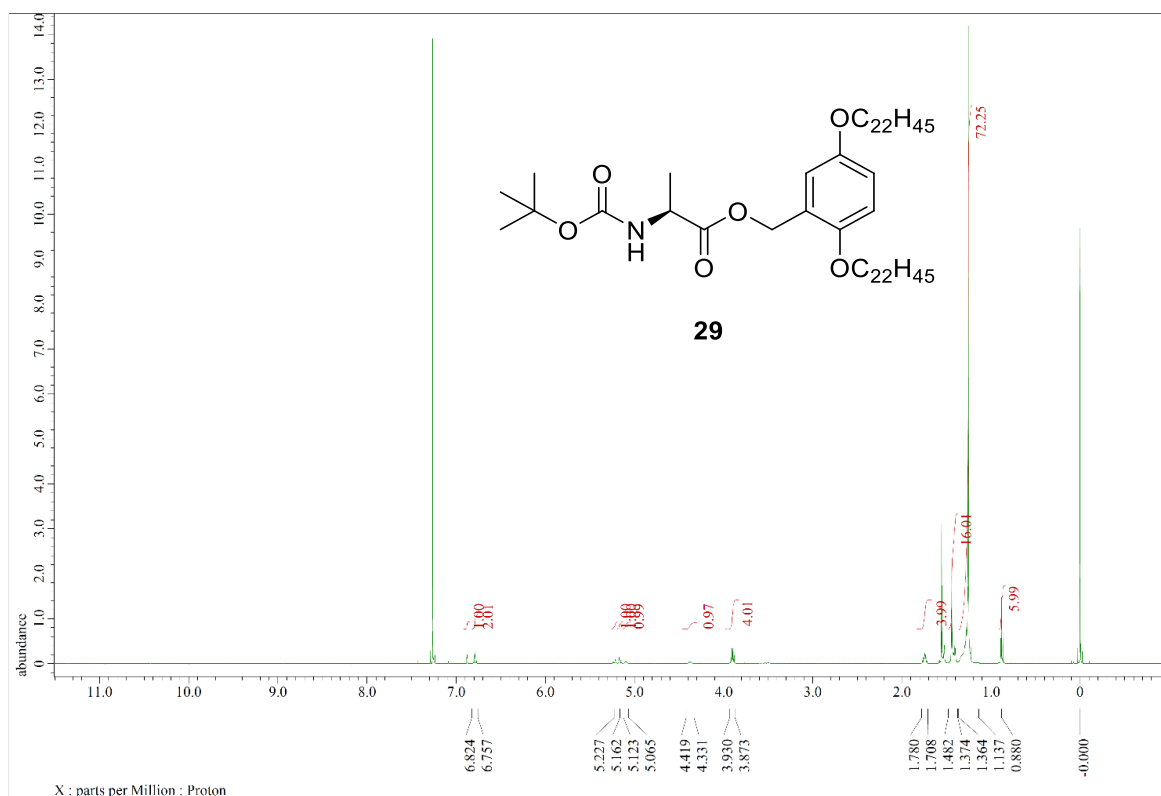
^1H and ^{13}C NMR spectra of **26**



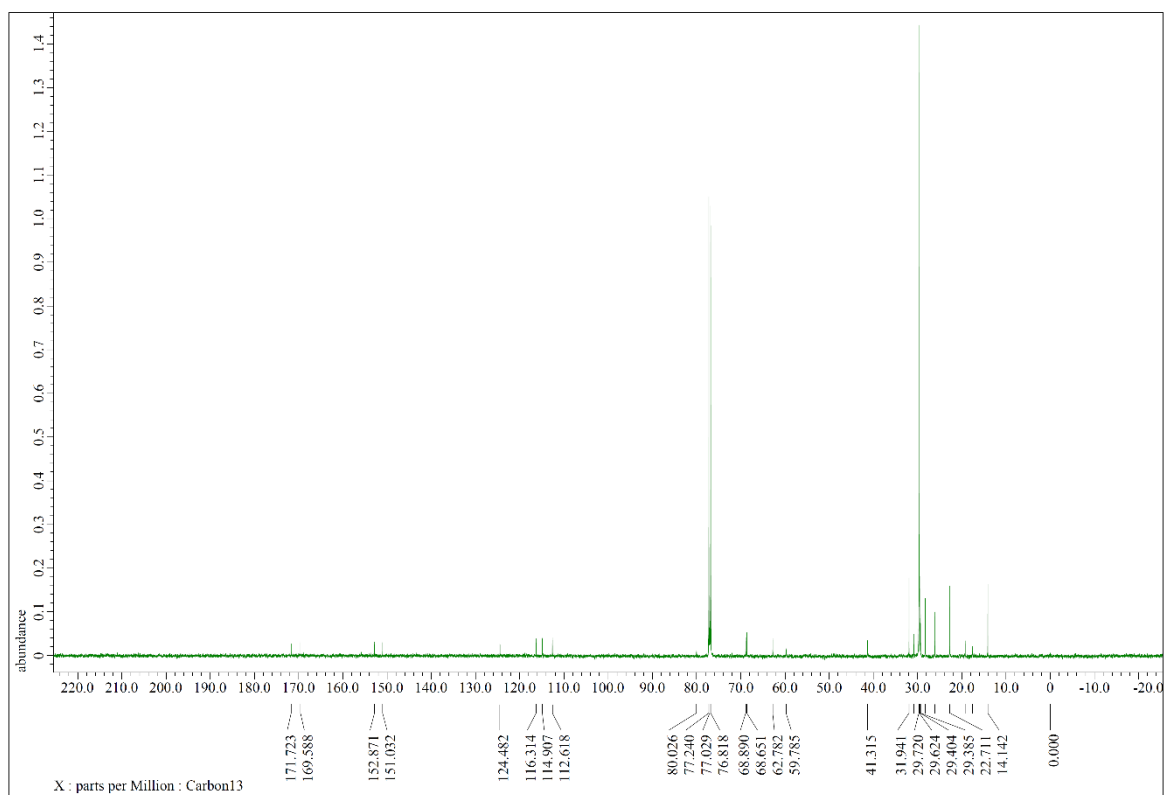
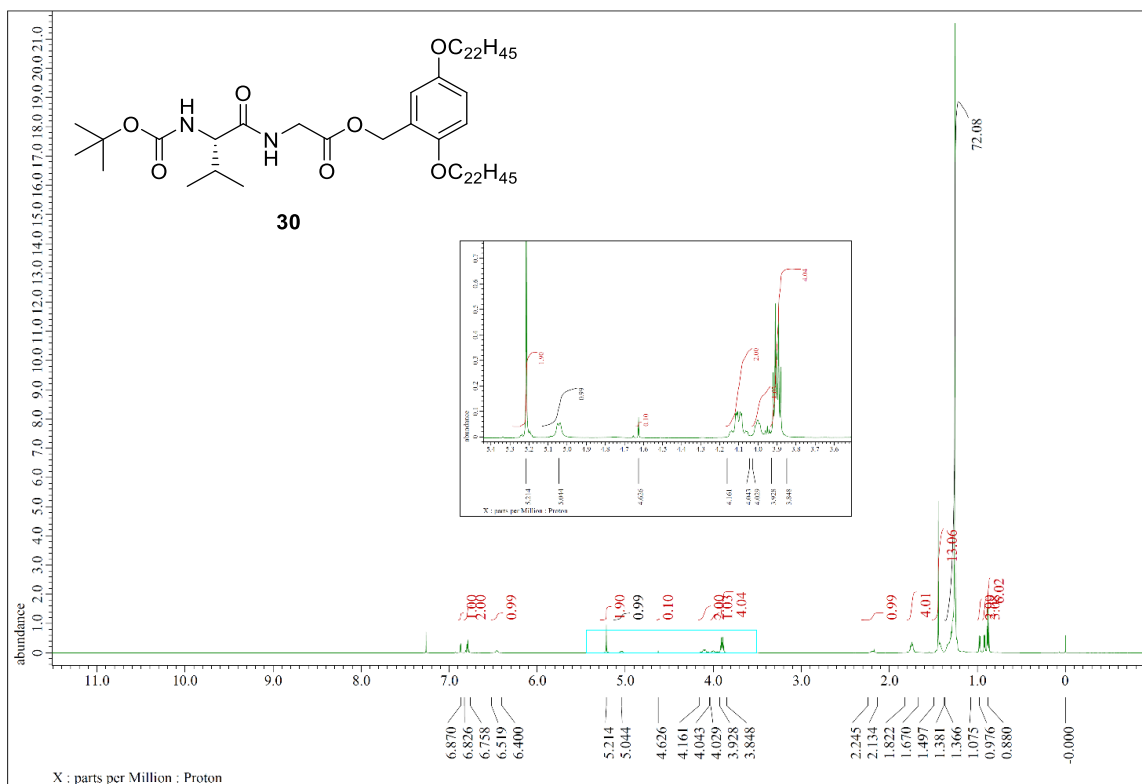
^1H and ^{13}C NMR spectra of **27**



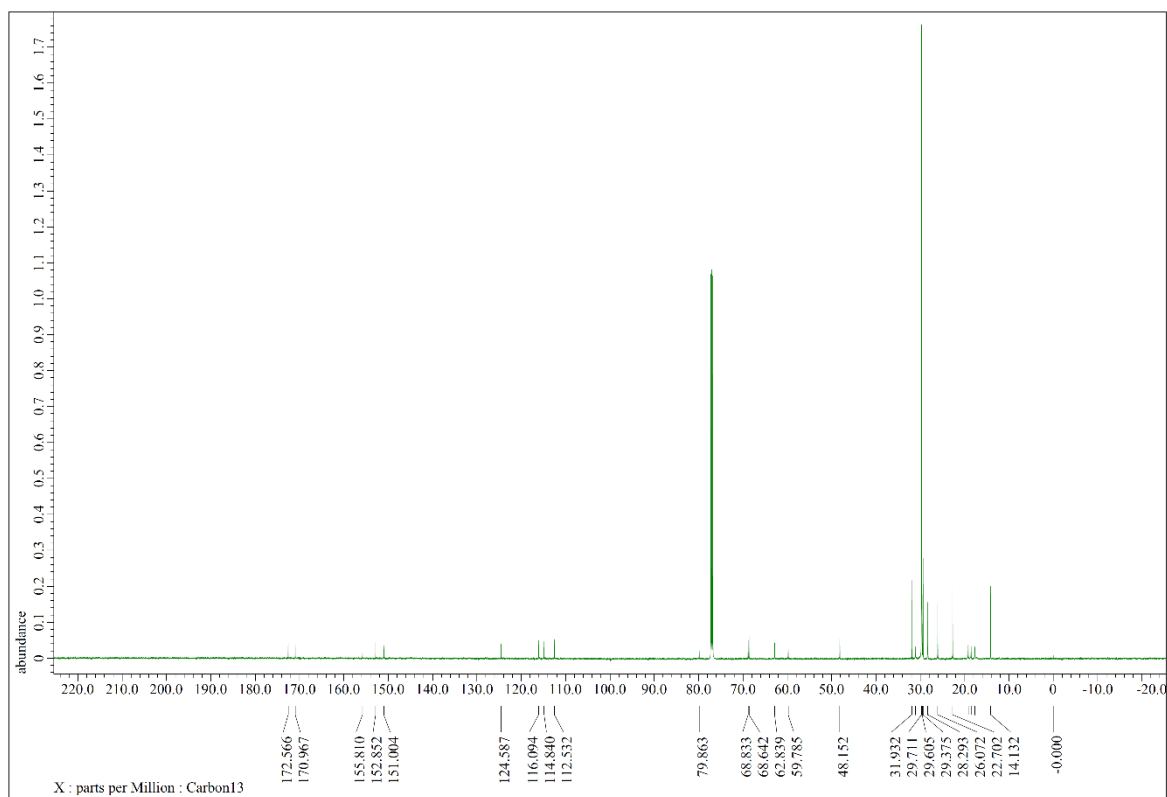
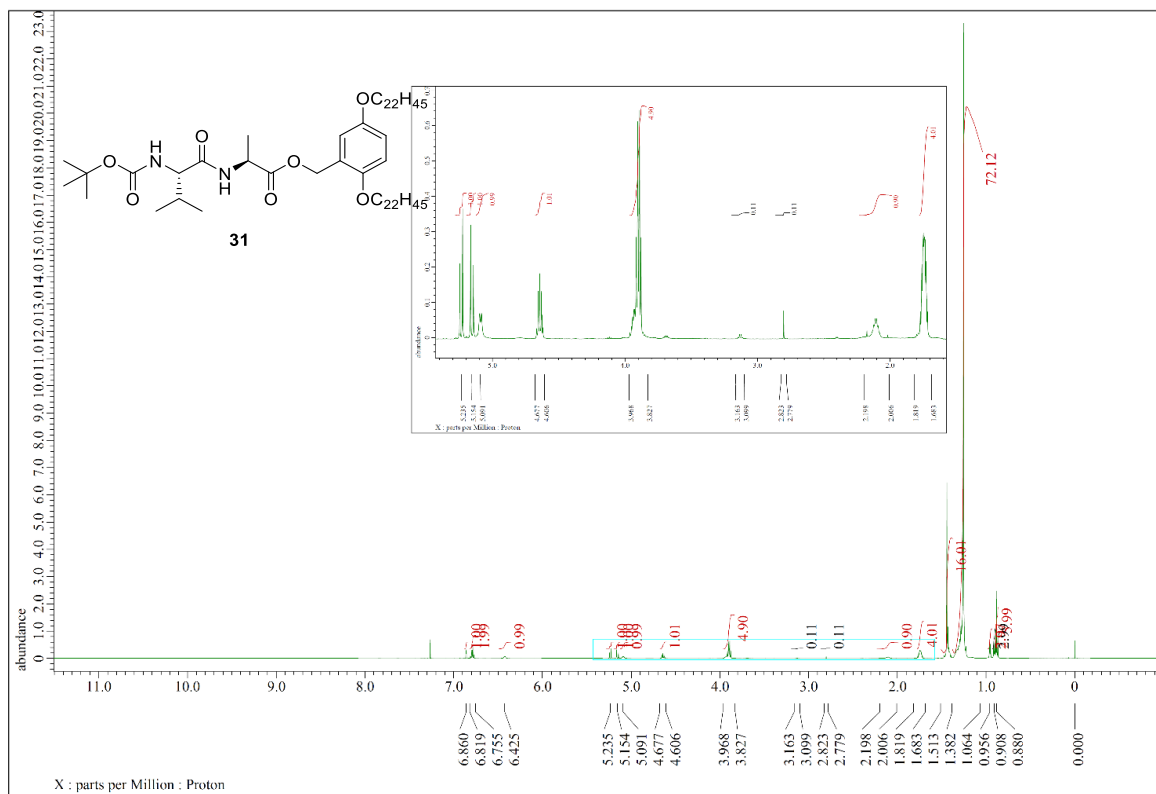
^1H and ^{13}C NMR spectra of **28**



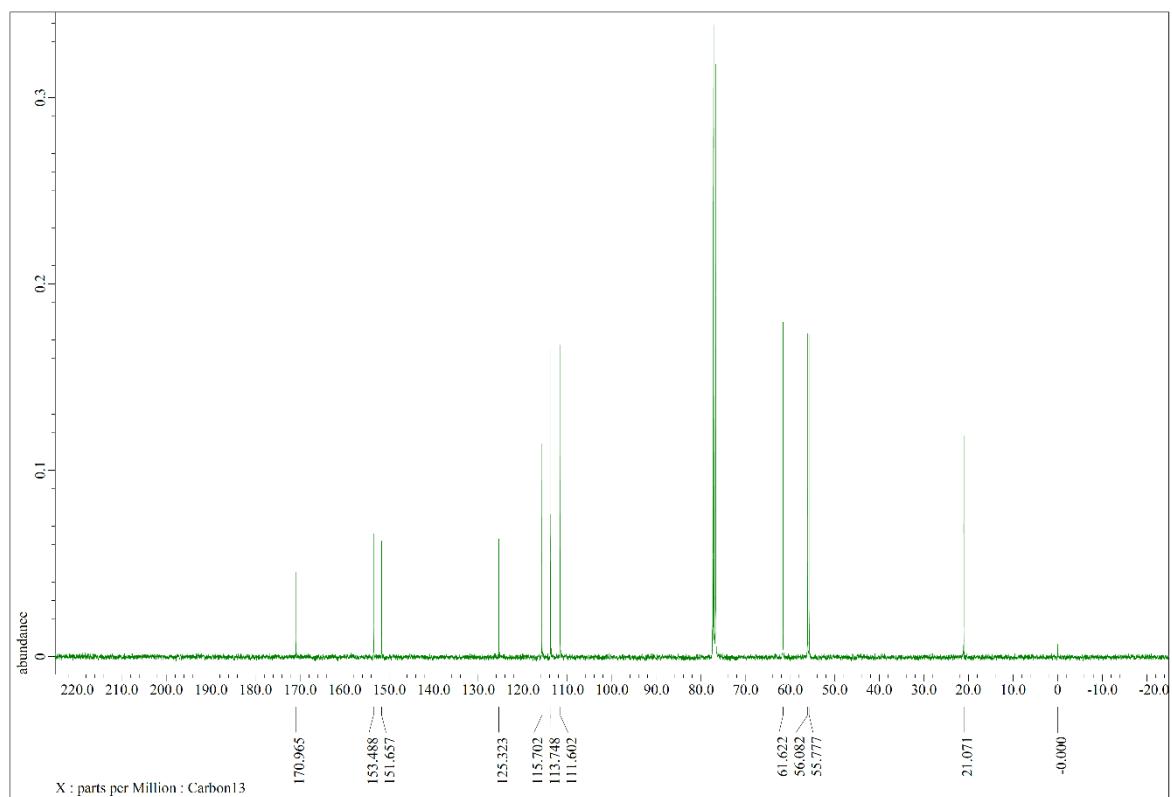
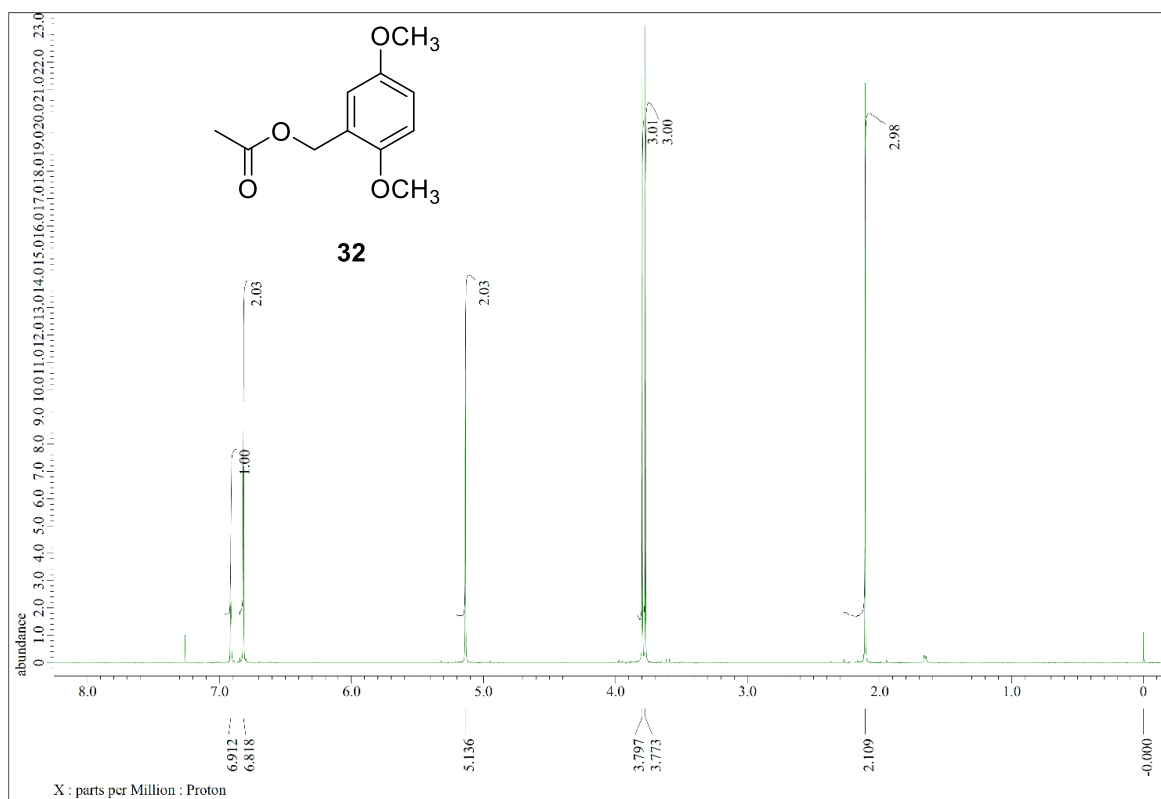
¹H and ¹³C NMR spectra of **29**



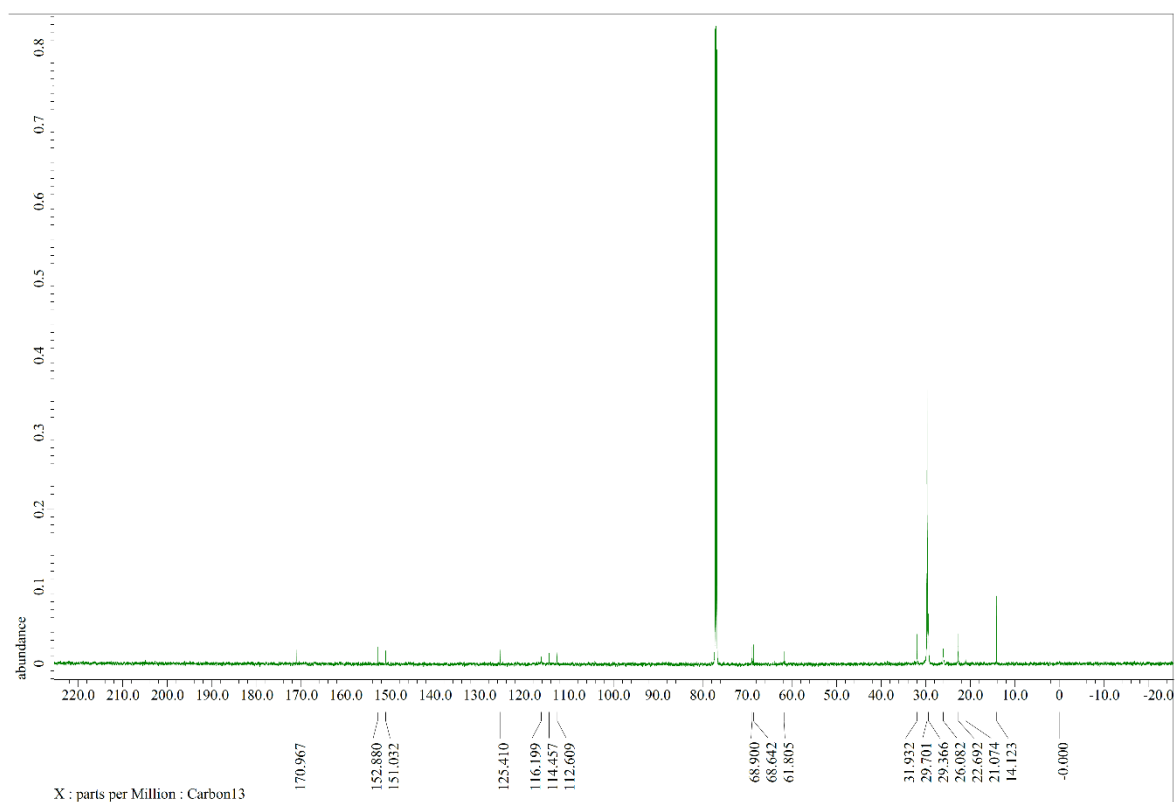
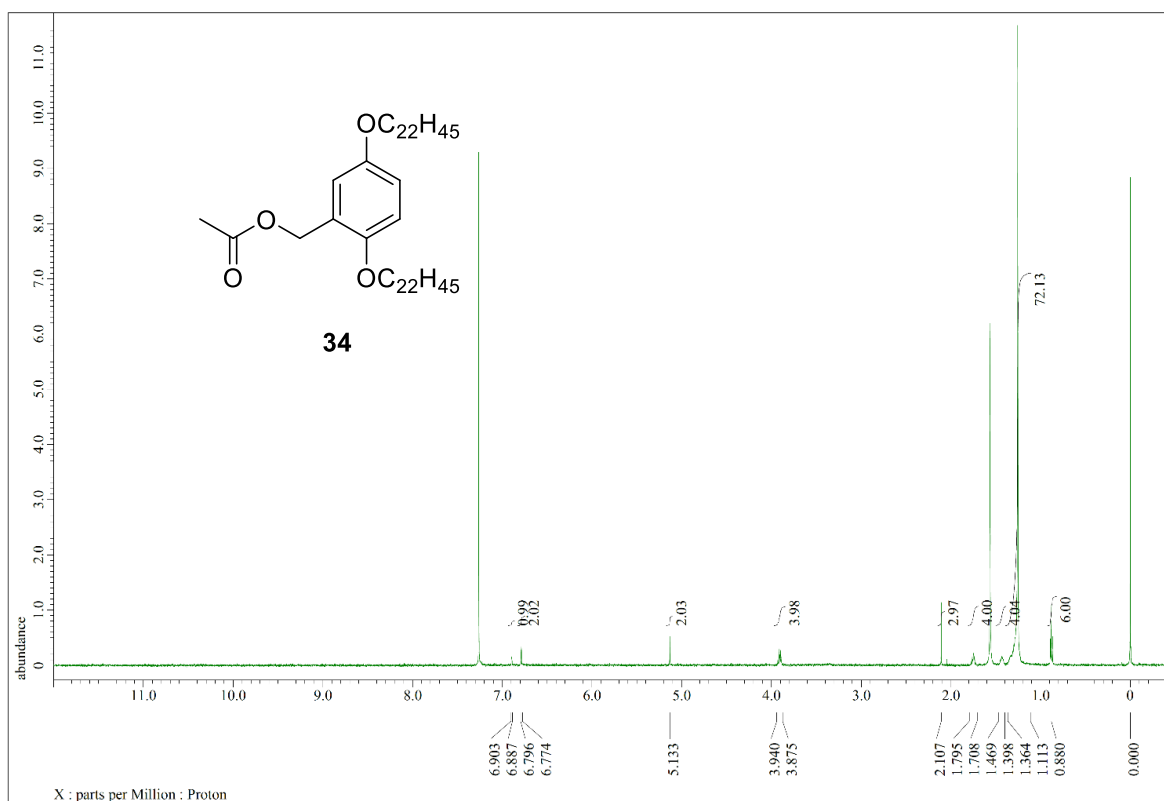
^1H and ^{13}C NMR spectra of **30**



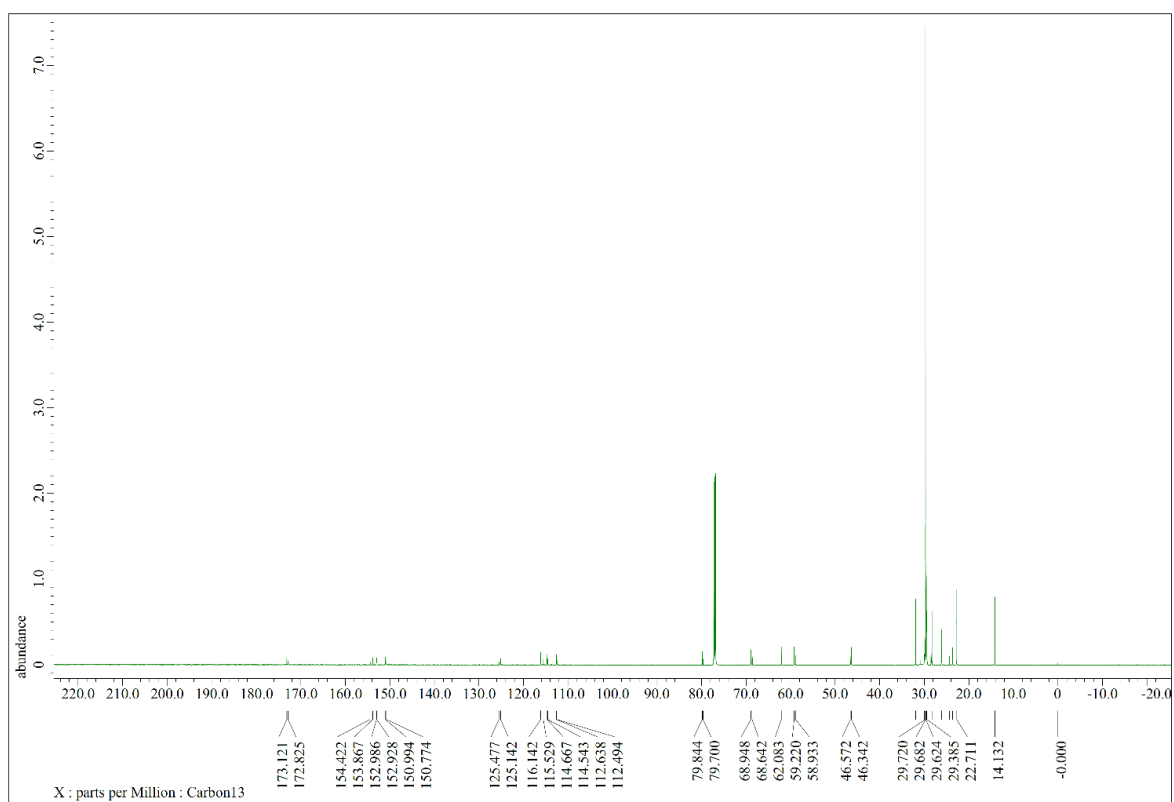
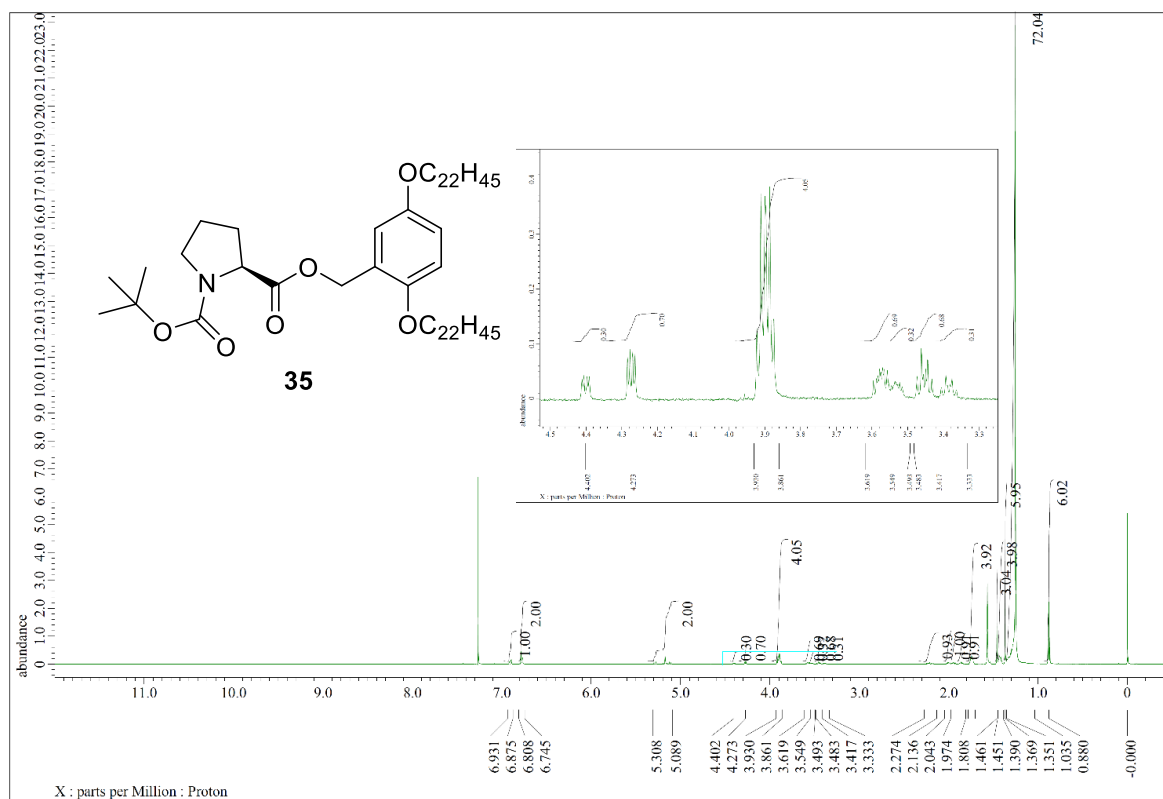
^1H and ^{13}C NMR spectra of **31**



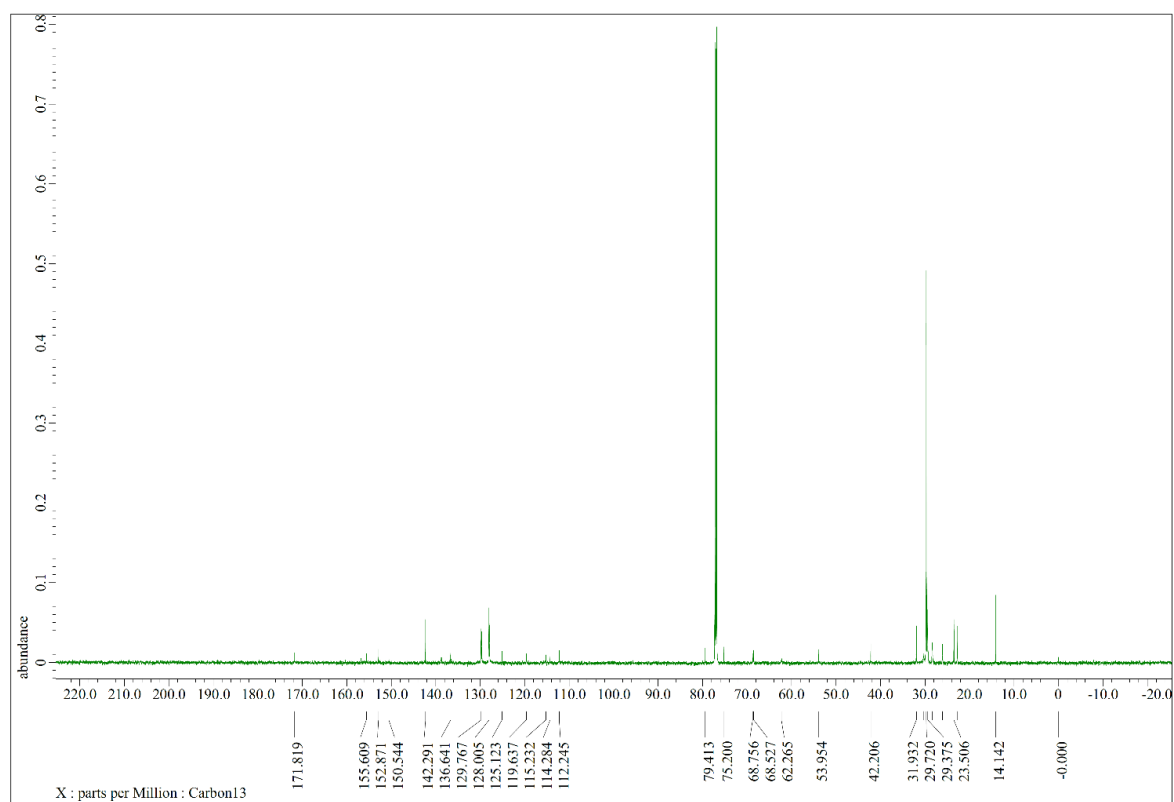
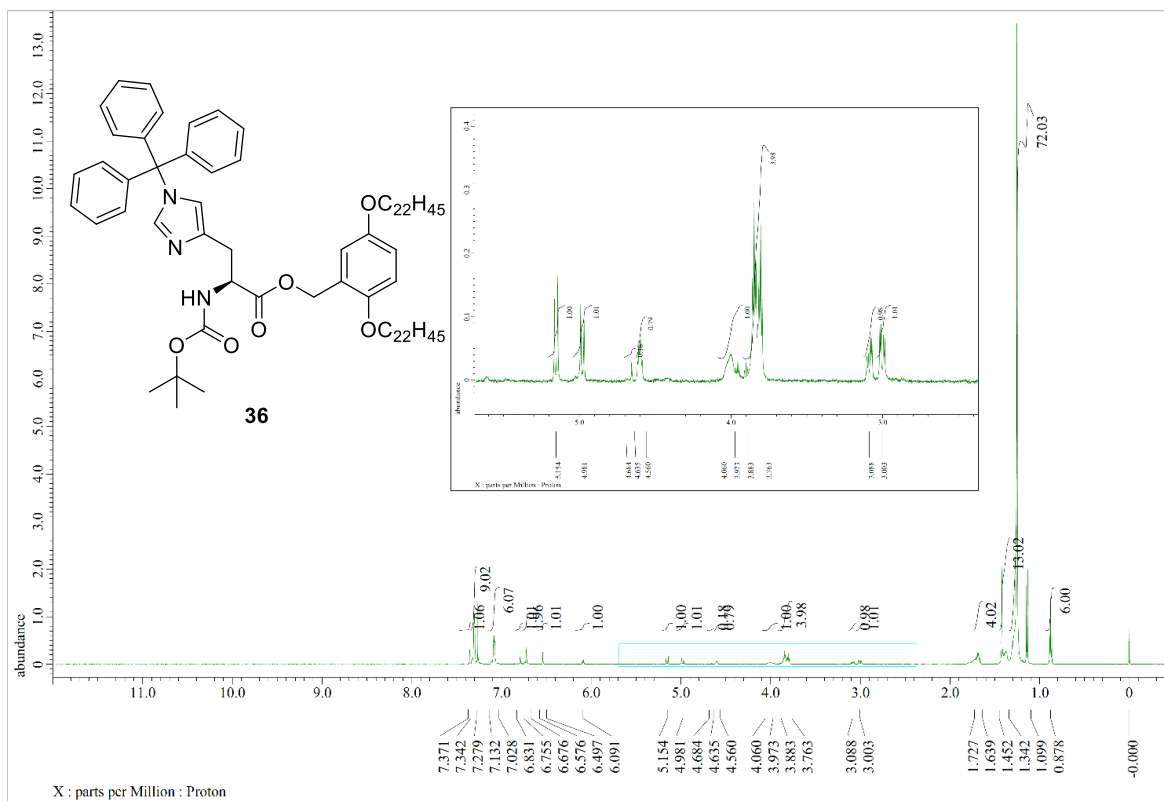
^1H and ^{13}C NMR spectra of **32**



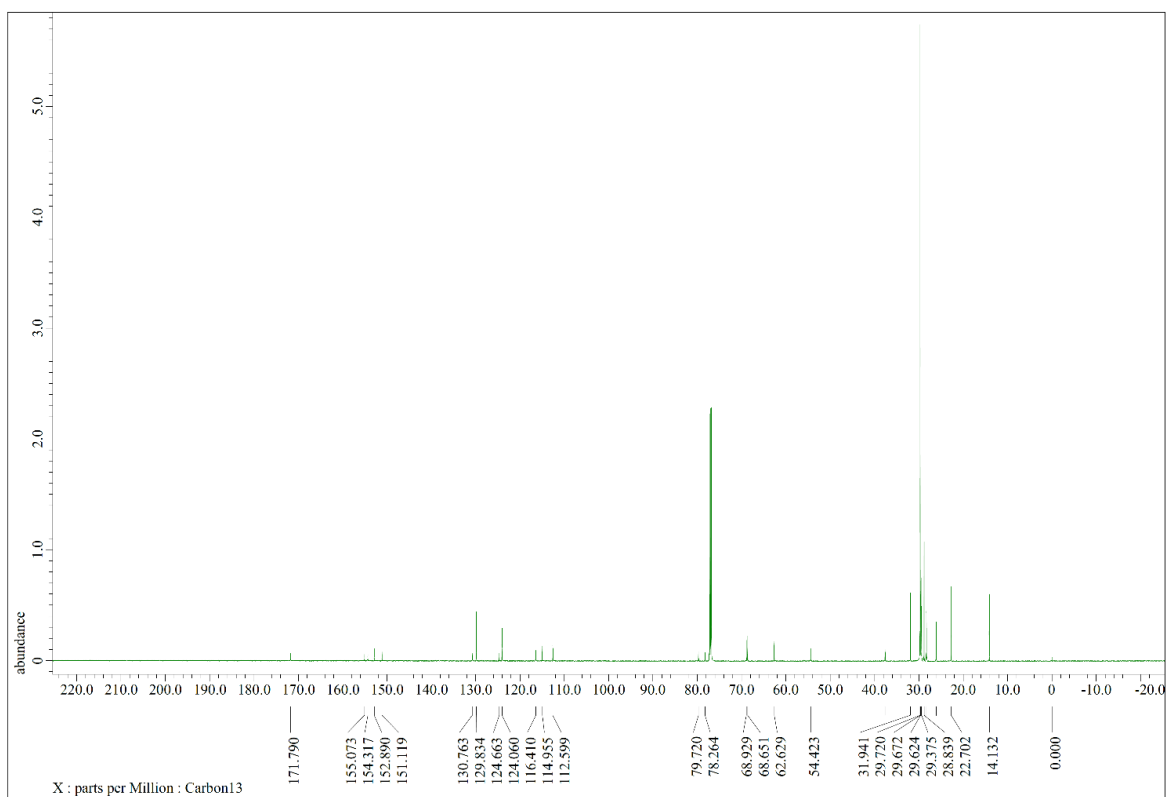
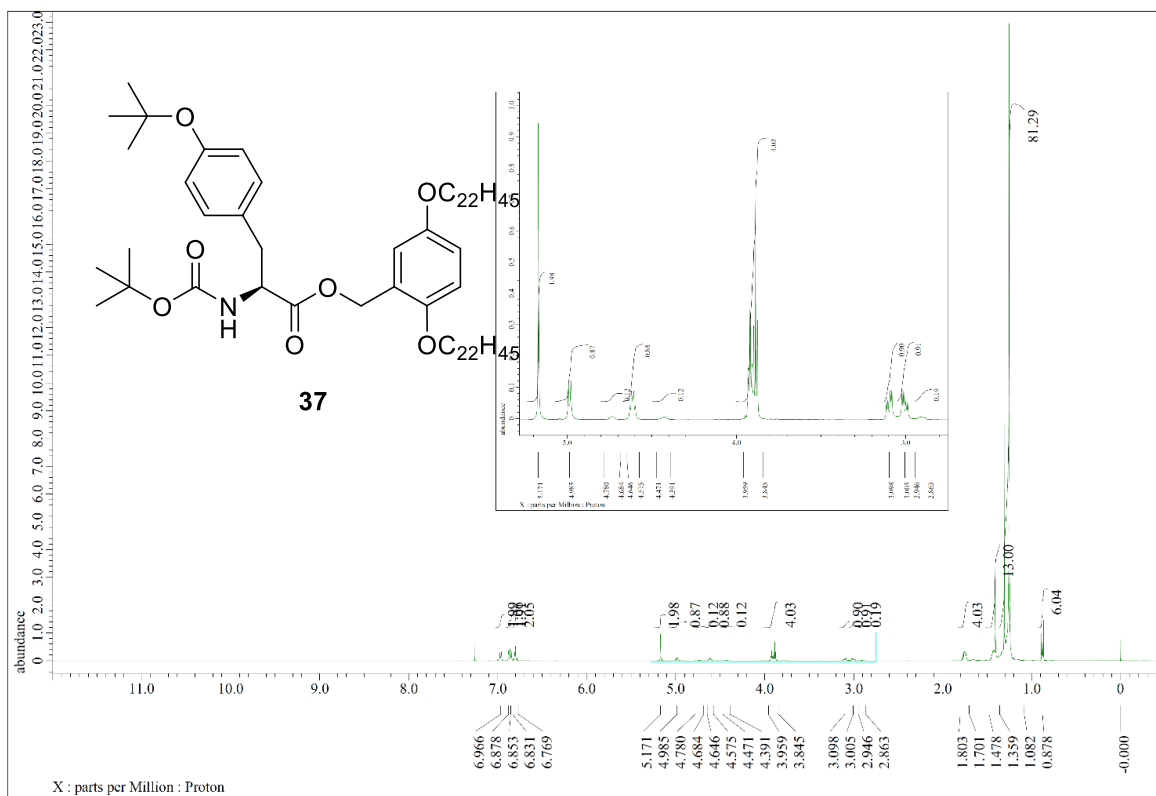
¹H and ¹³C NMR spectra of **34**



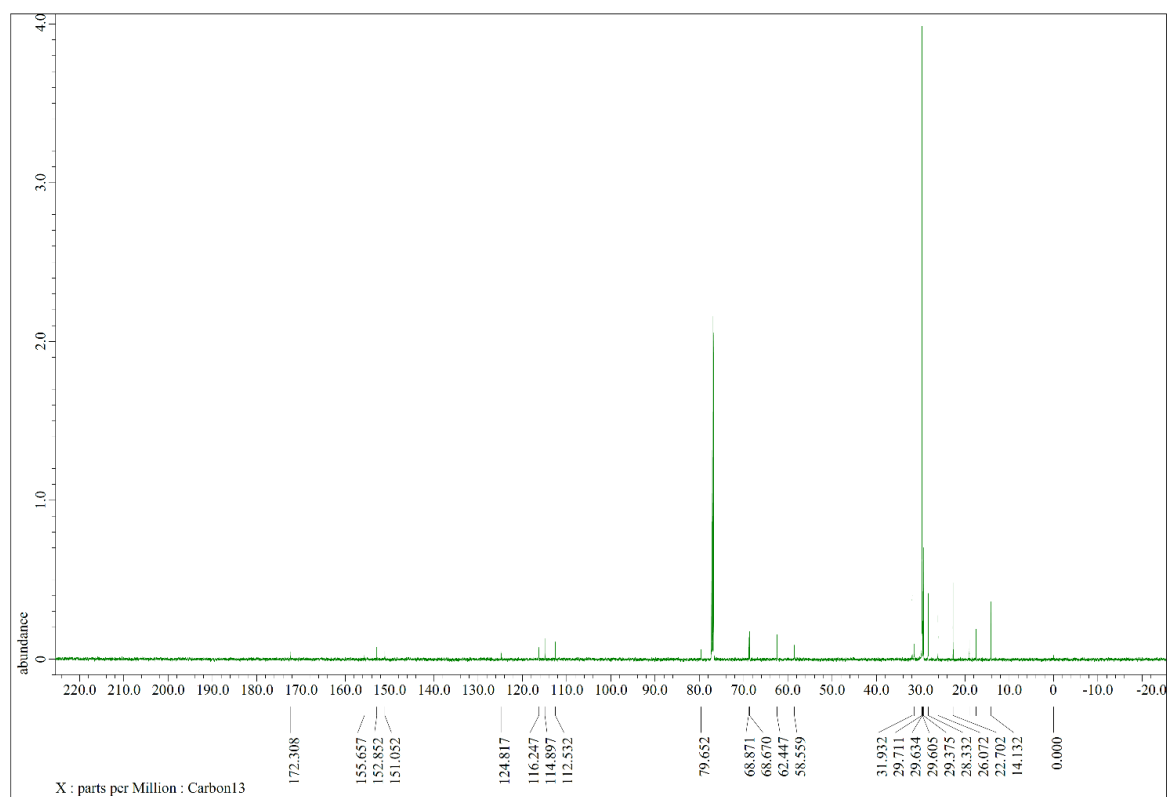
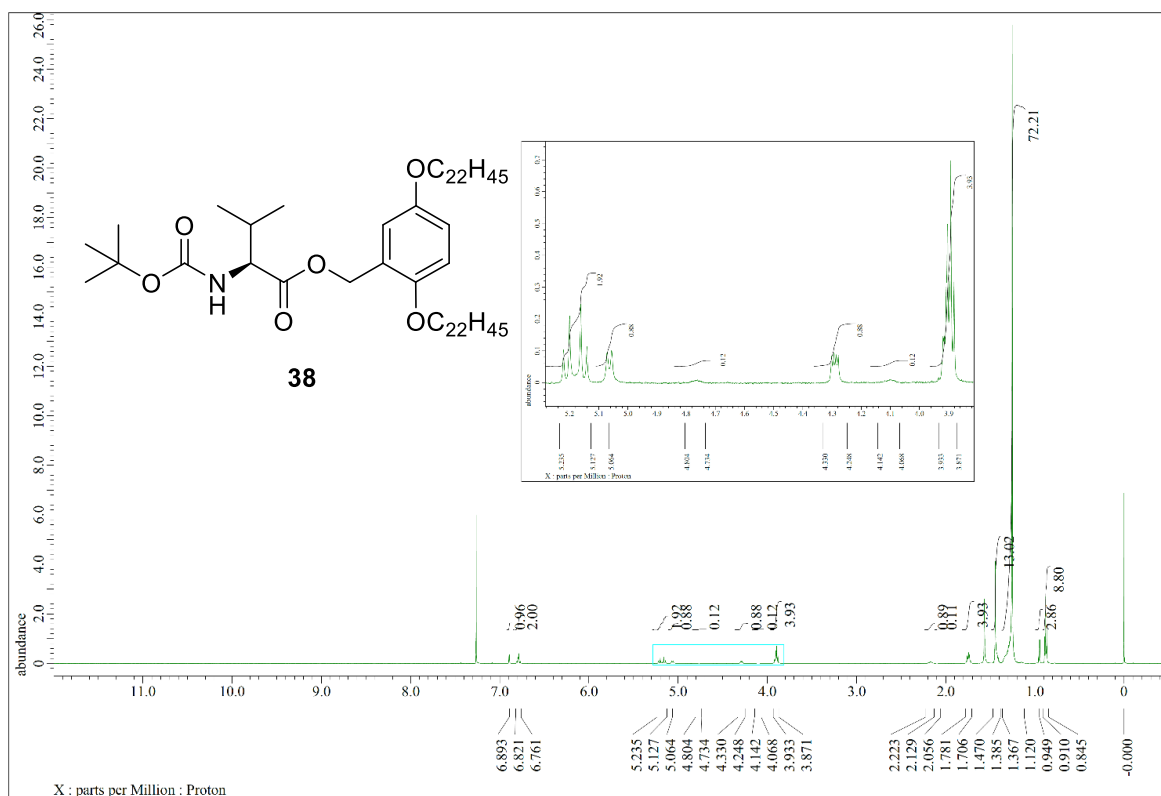
¹H and ¹³C NMR spectra of **35**



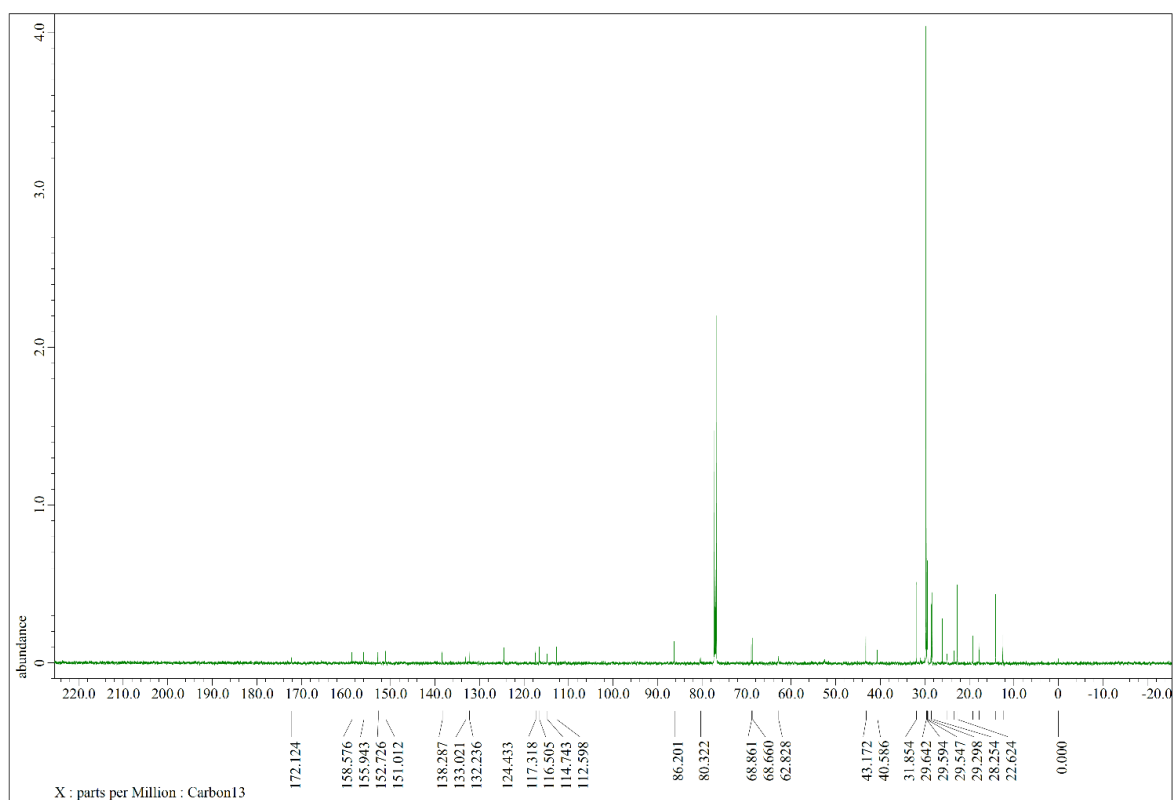
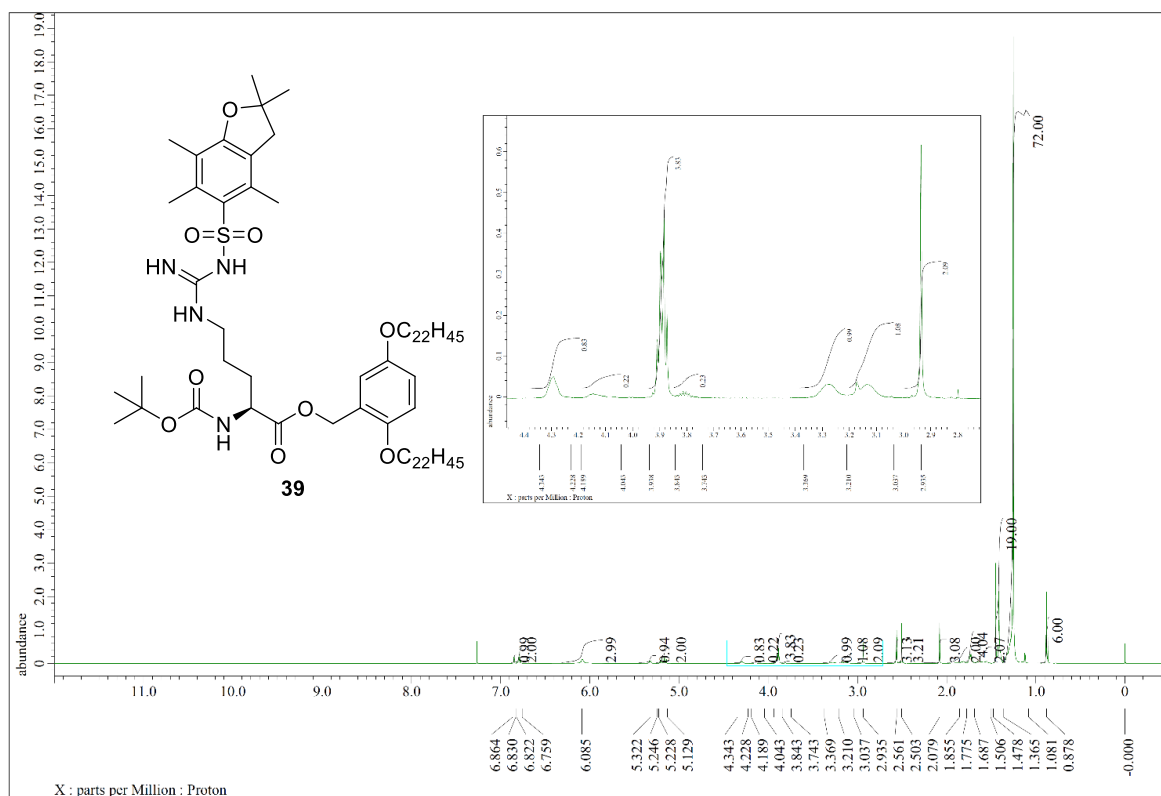
¹H and ¹³C NMR spectra of **36**



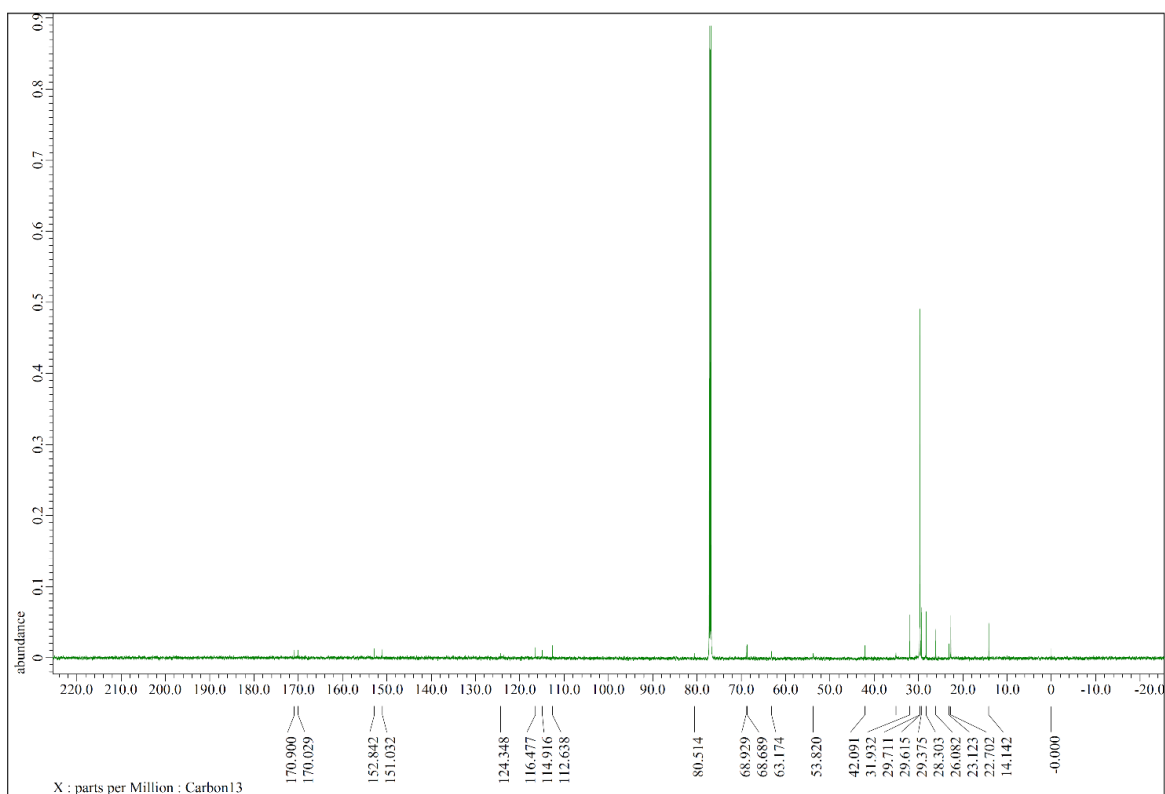
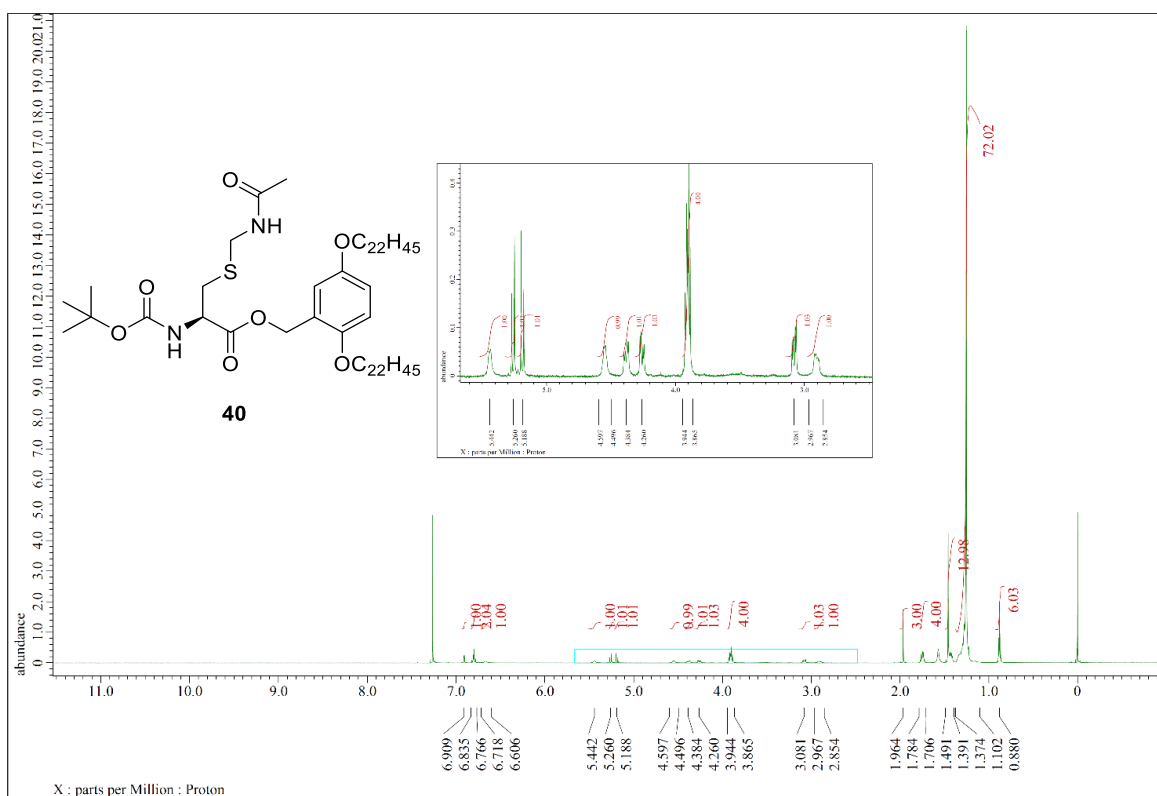
^1H and ^{13}C NMR spectra of **37**



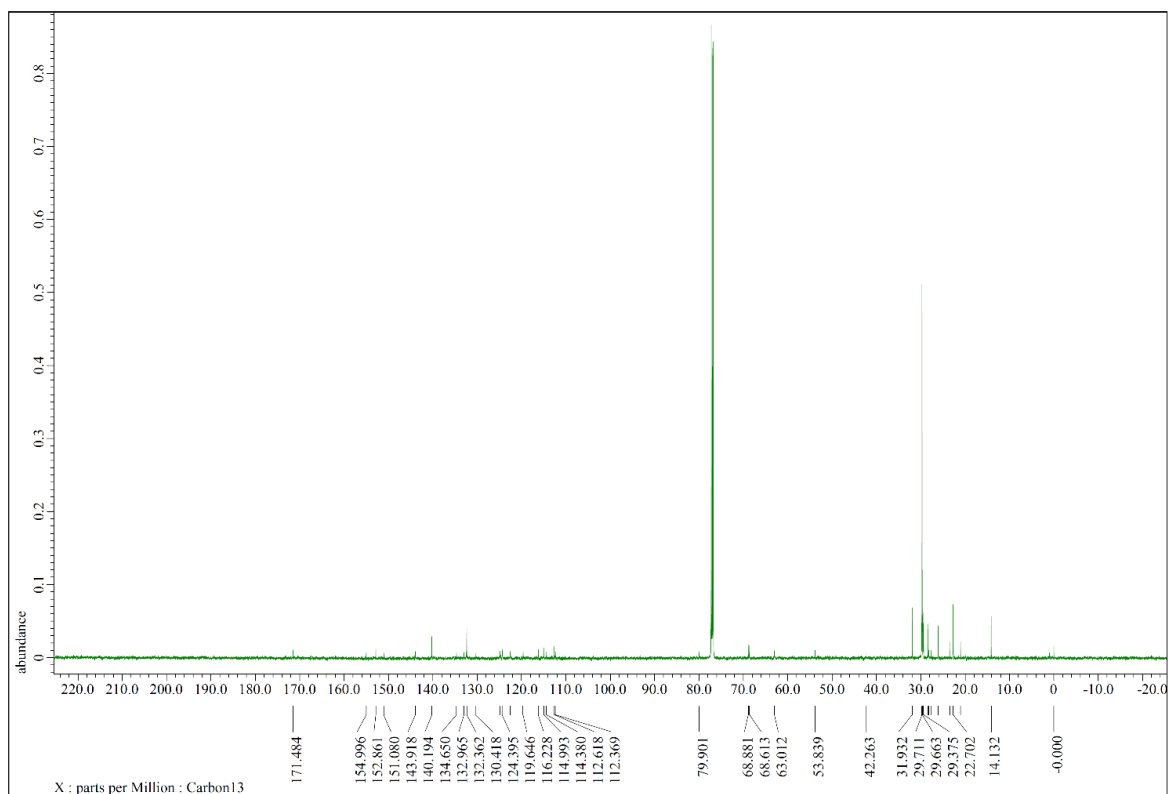
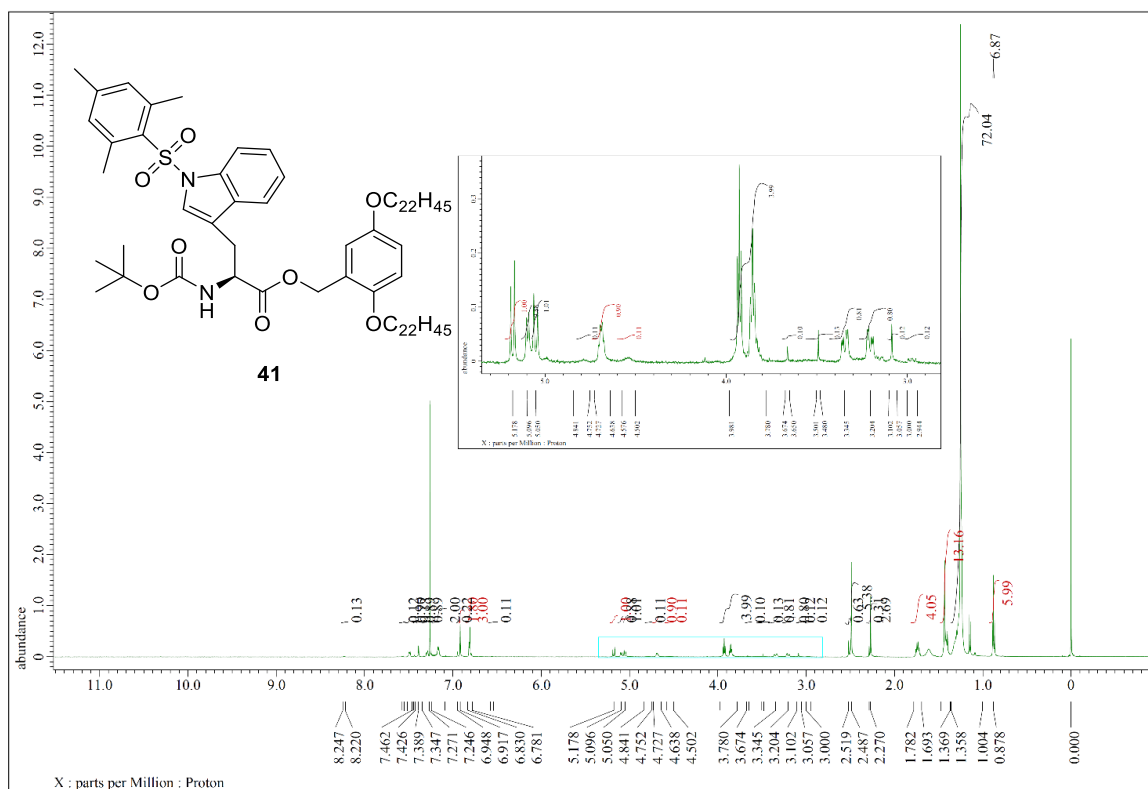
¹H and ¹³C NMR spectra of 38



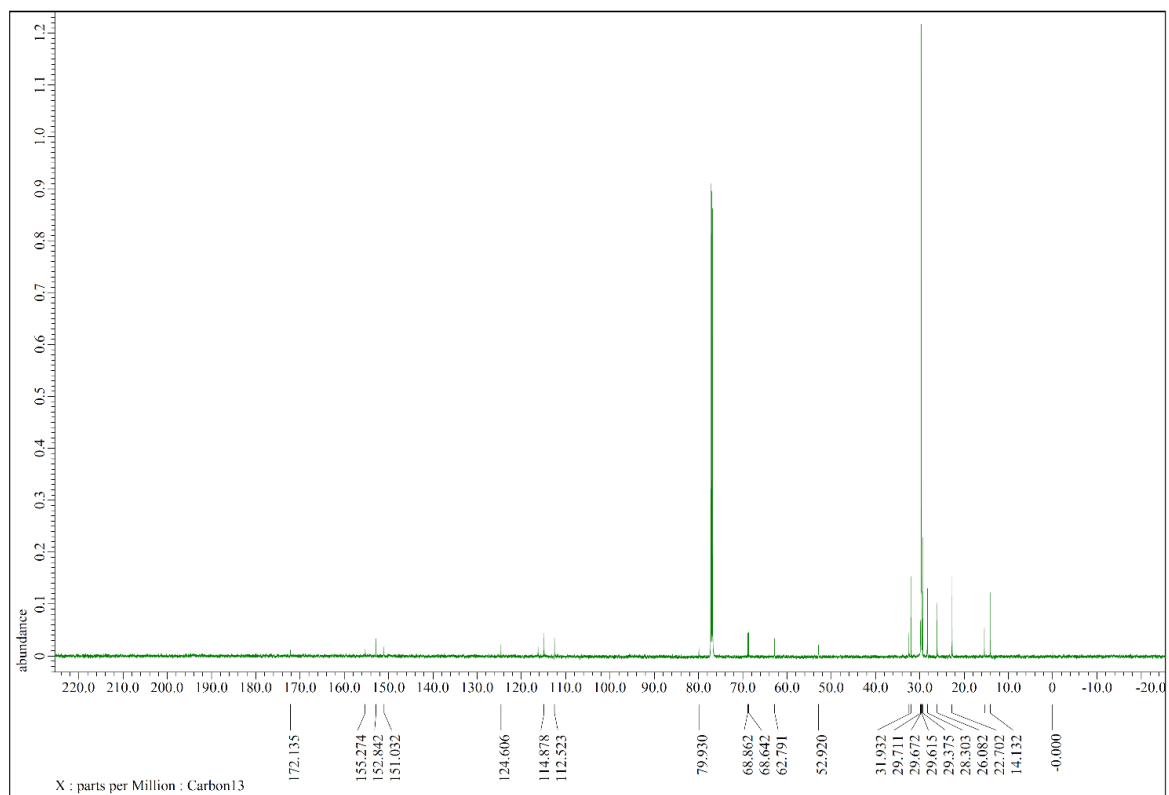
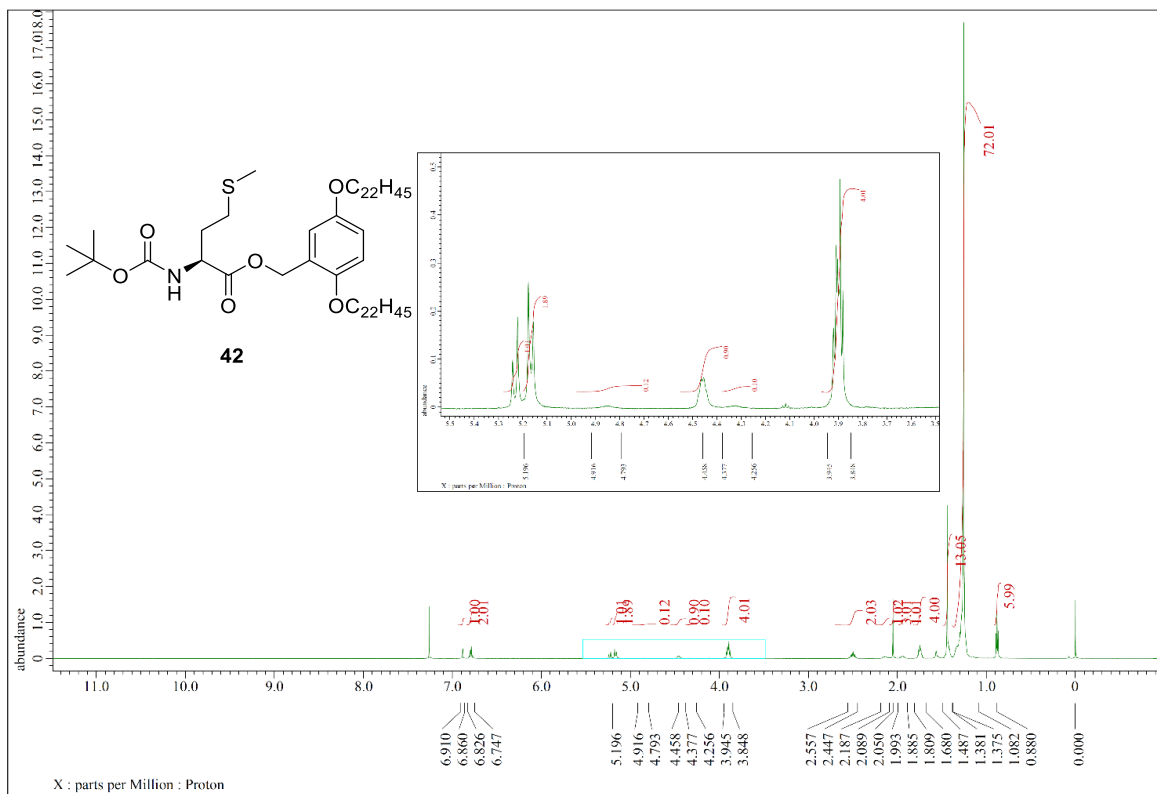
¹H and ¹³C NMR spectra of **39**



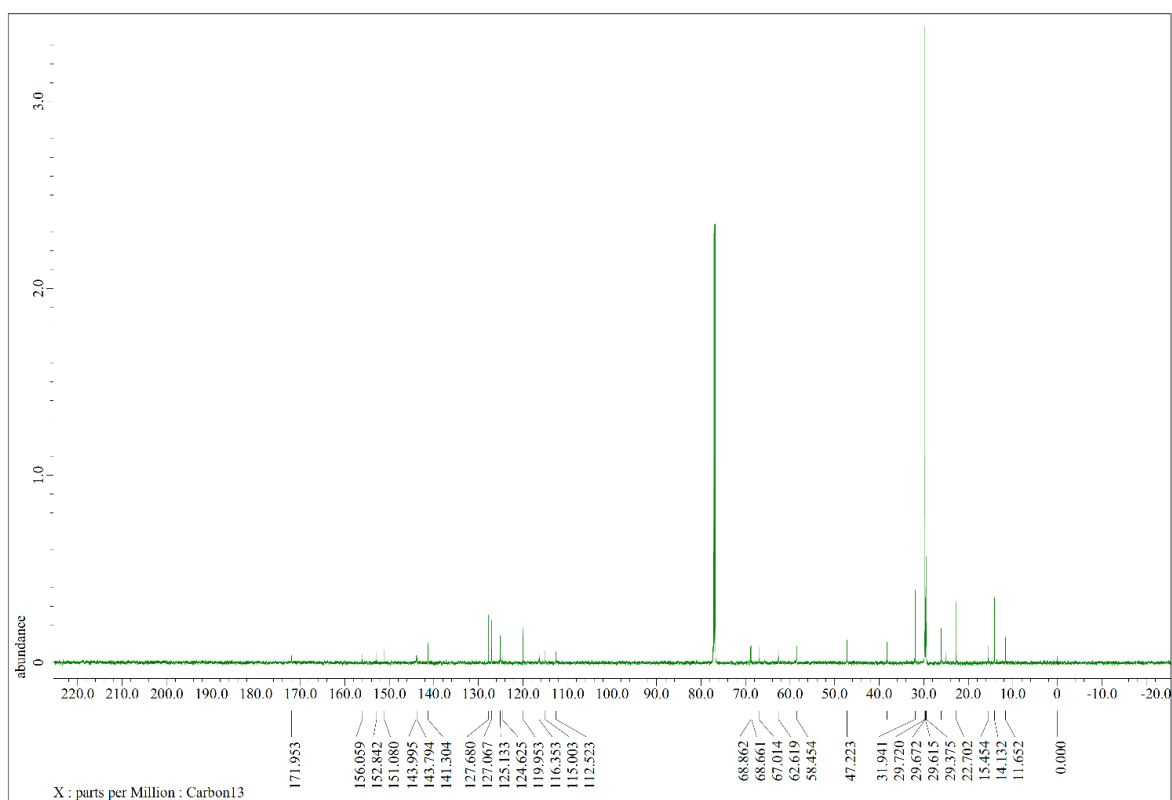
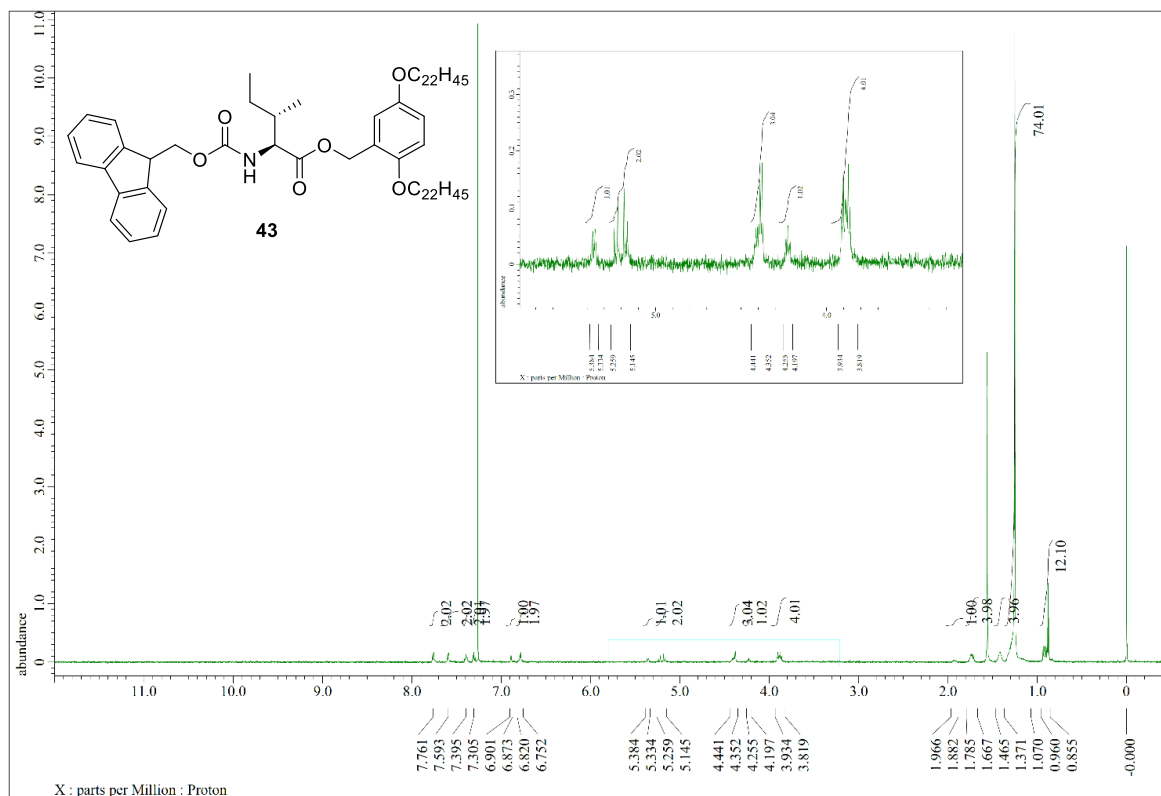
^1H and ^{13}C NMR spectra of **40**



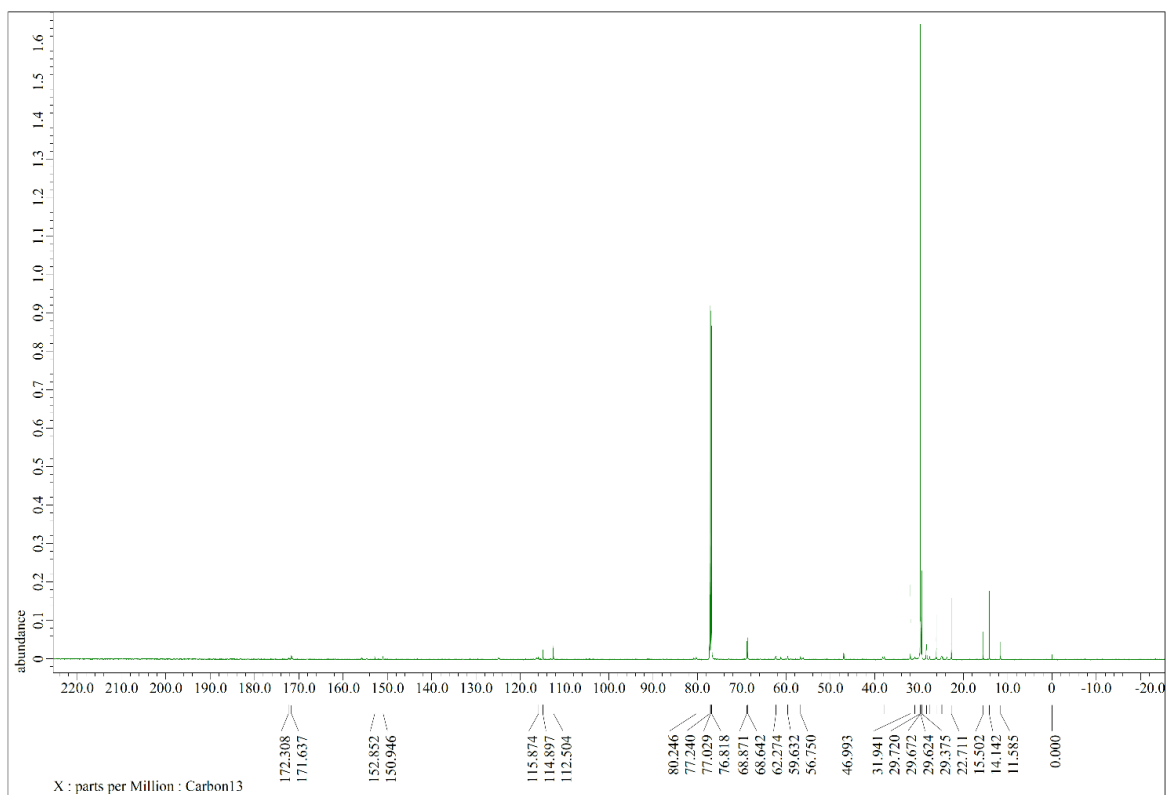
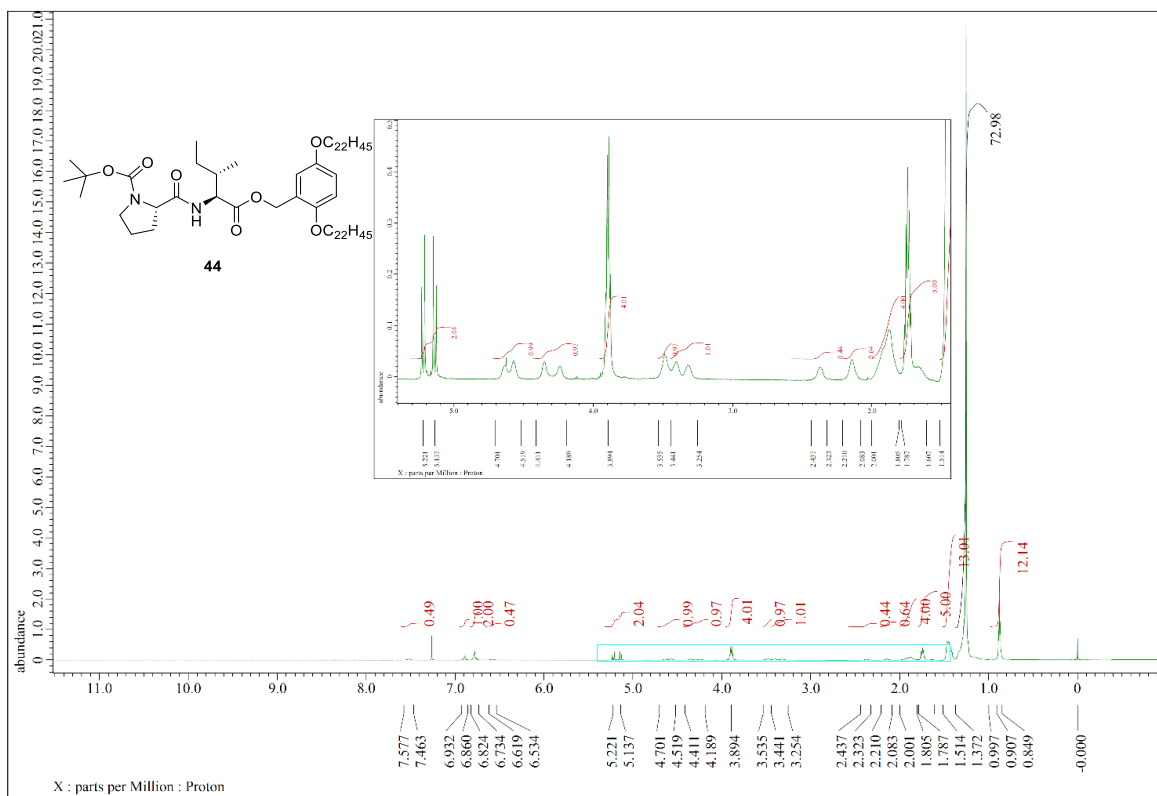
¹H and ¹³C NMR spectra of **41**



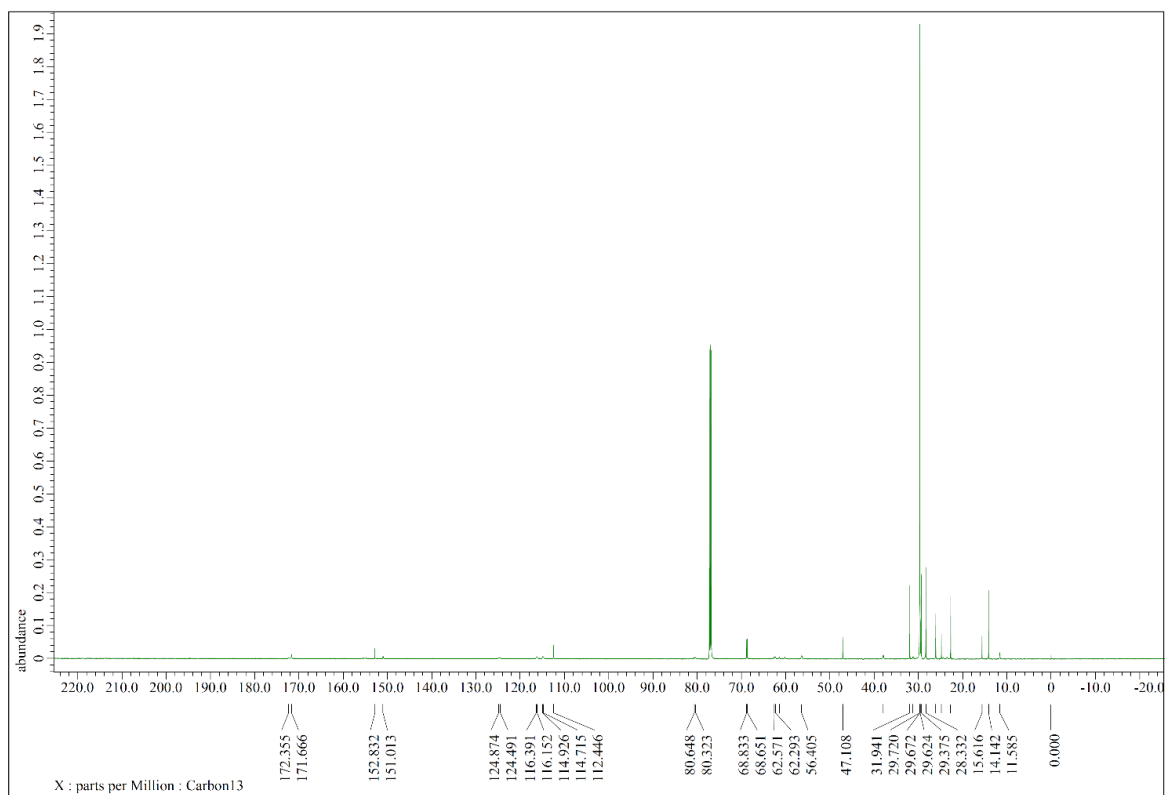
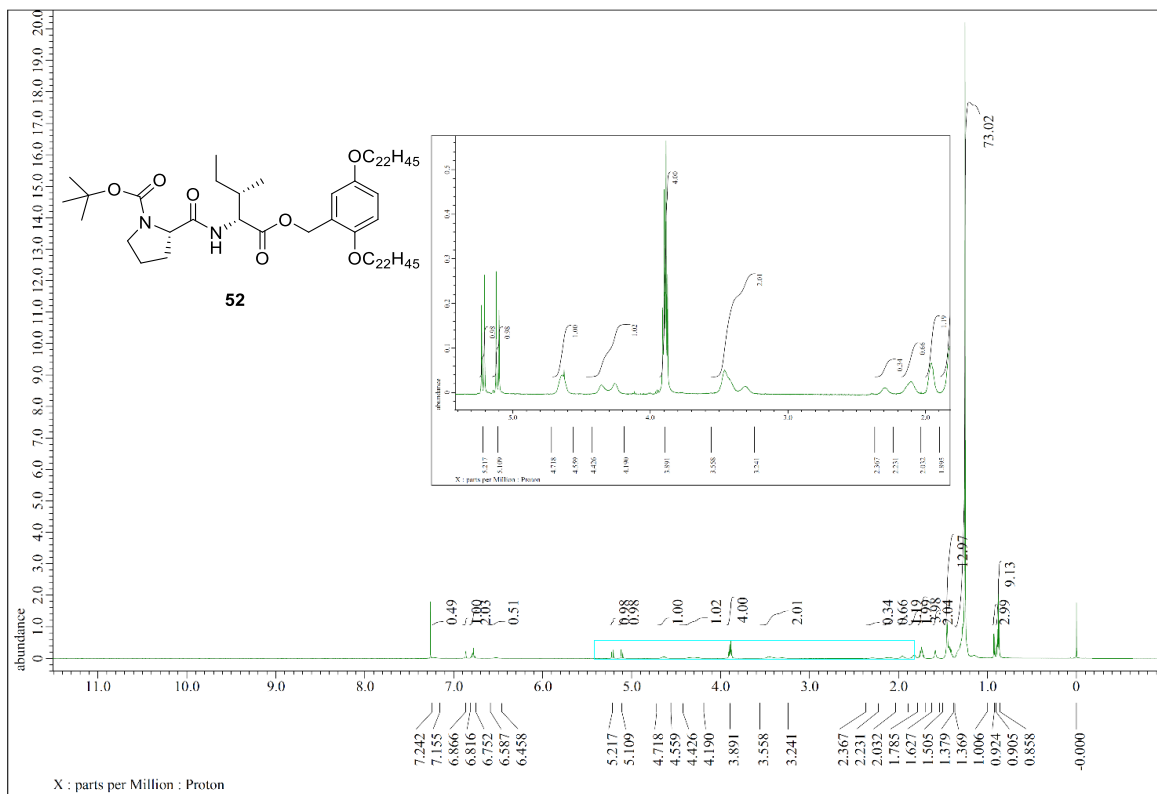
^1H and ^{13}C NMR spectra of **42**



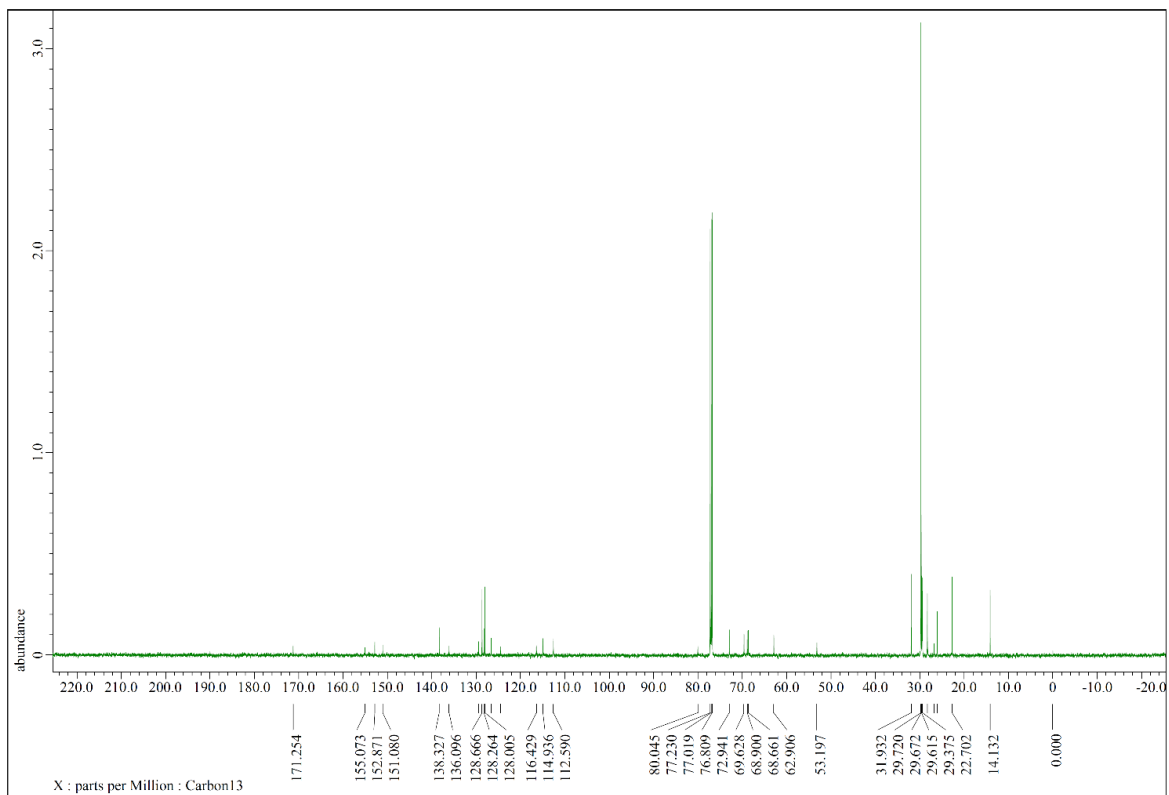
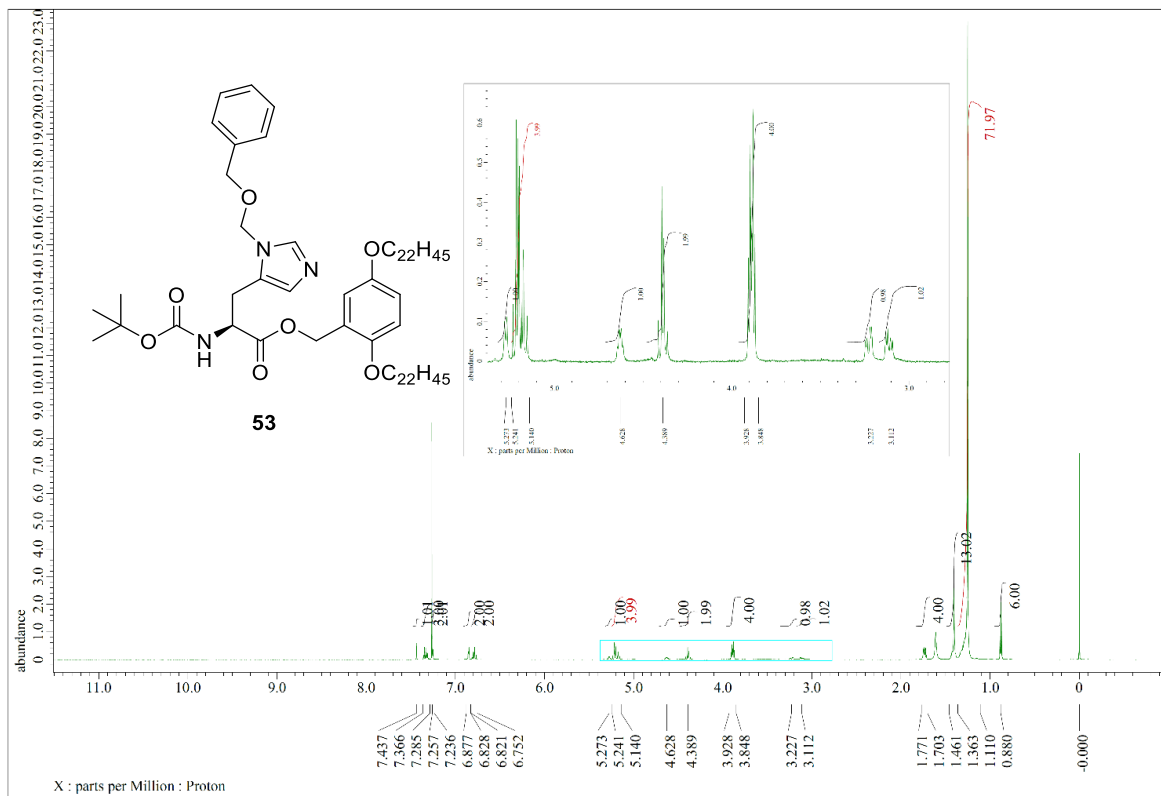
¹H and ¹³C NMR spectra of **43**



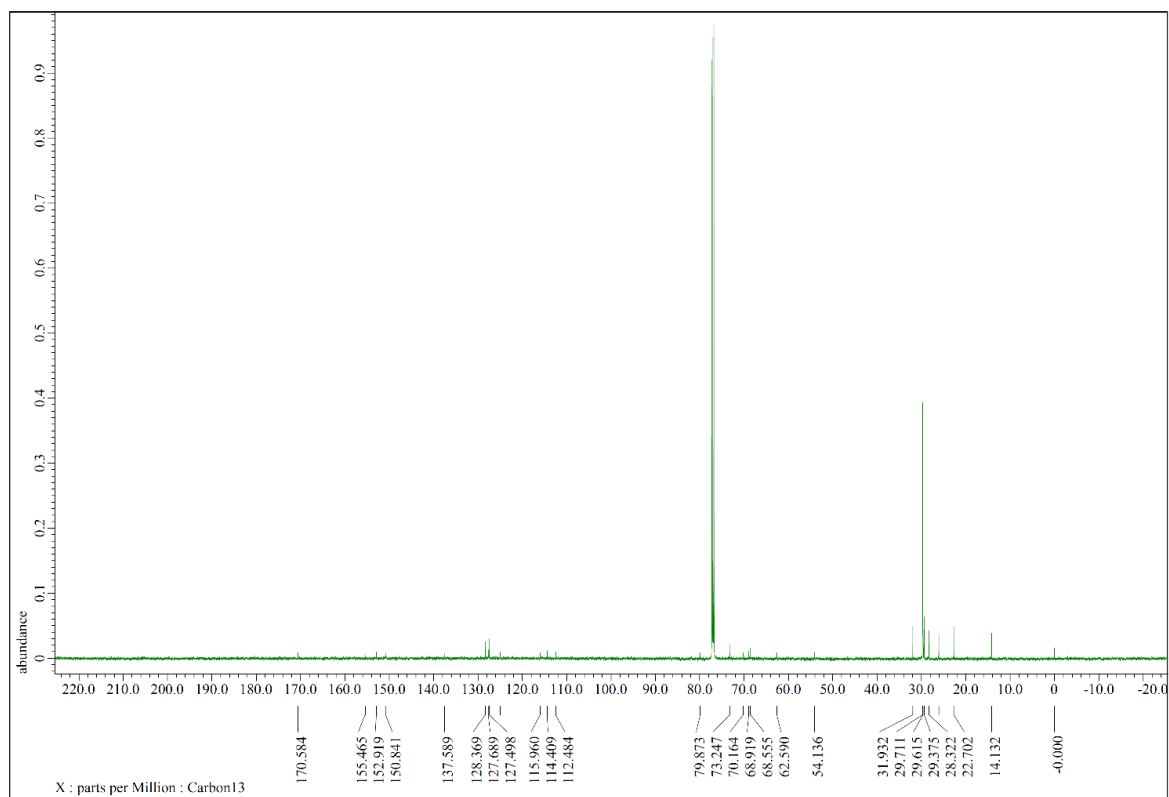
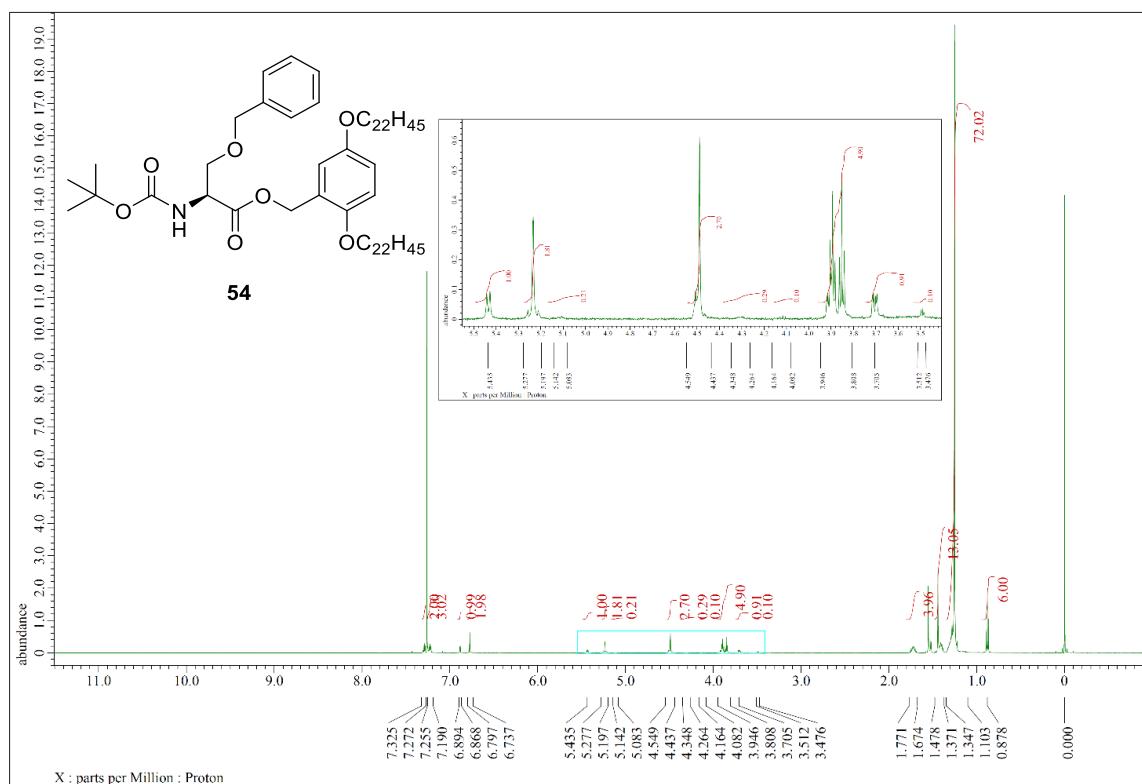
¹H and ¹³C NMR spectra of **44**



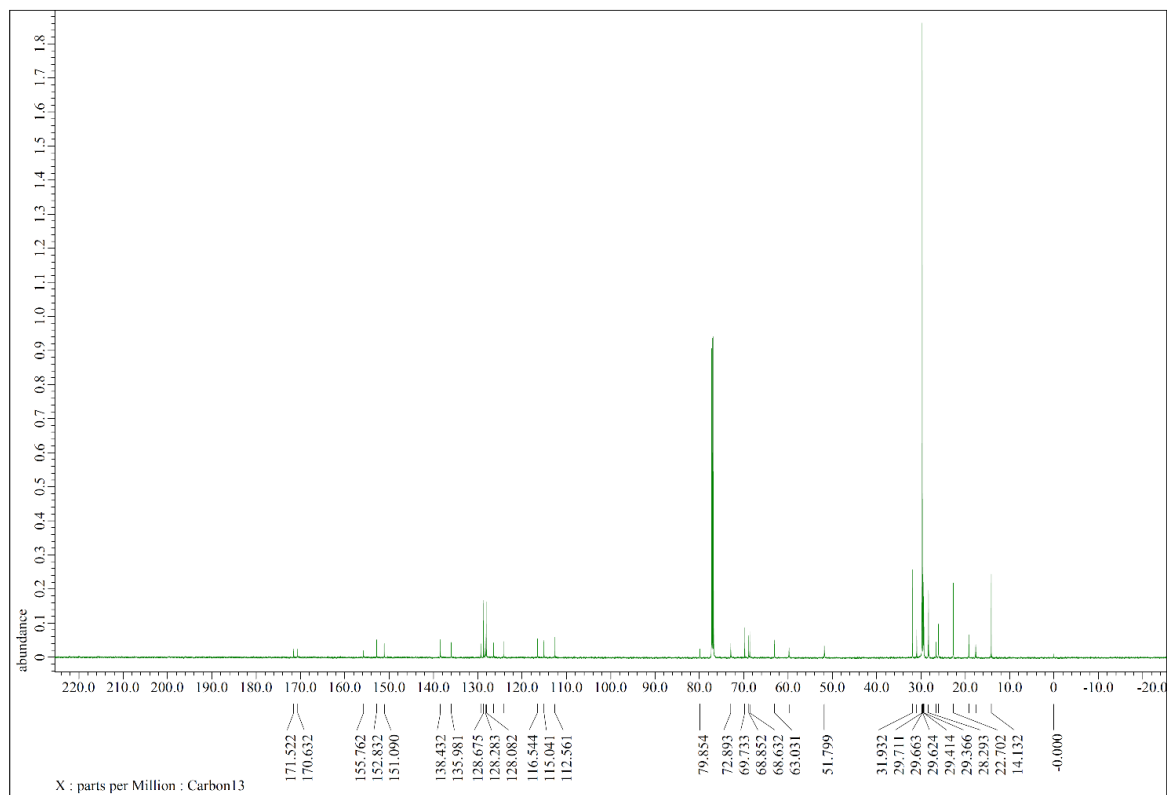
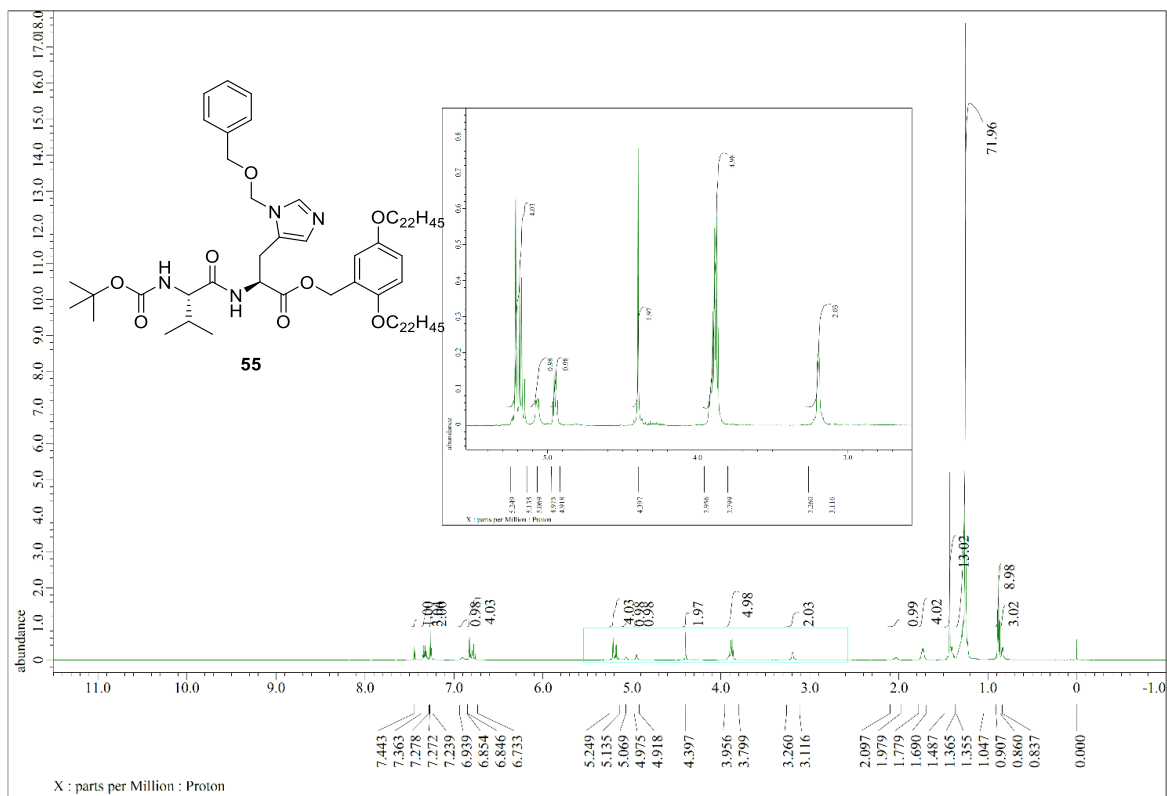
^1H and ^{13}C NMR spectra of **52**



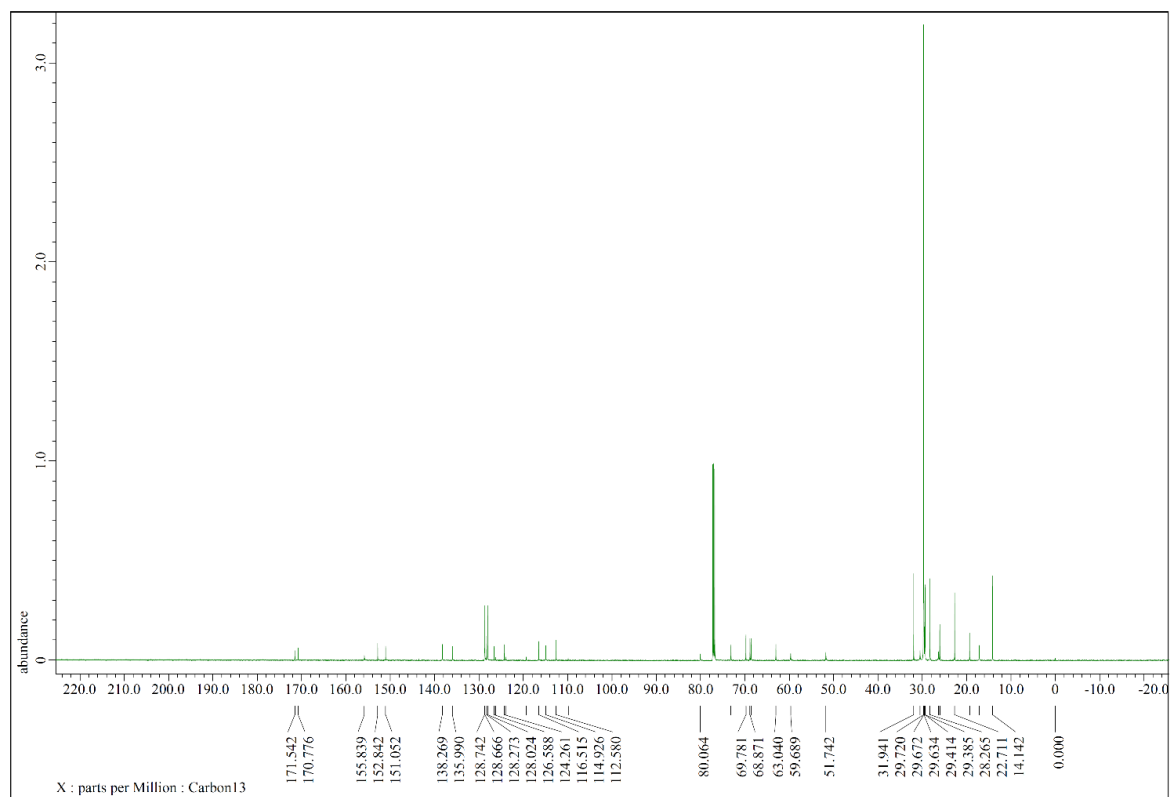
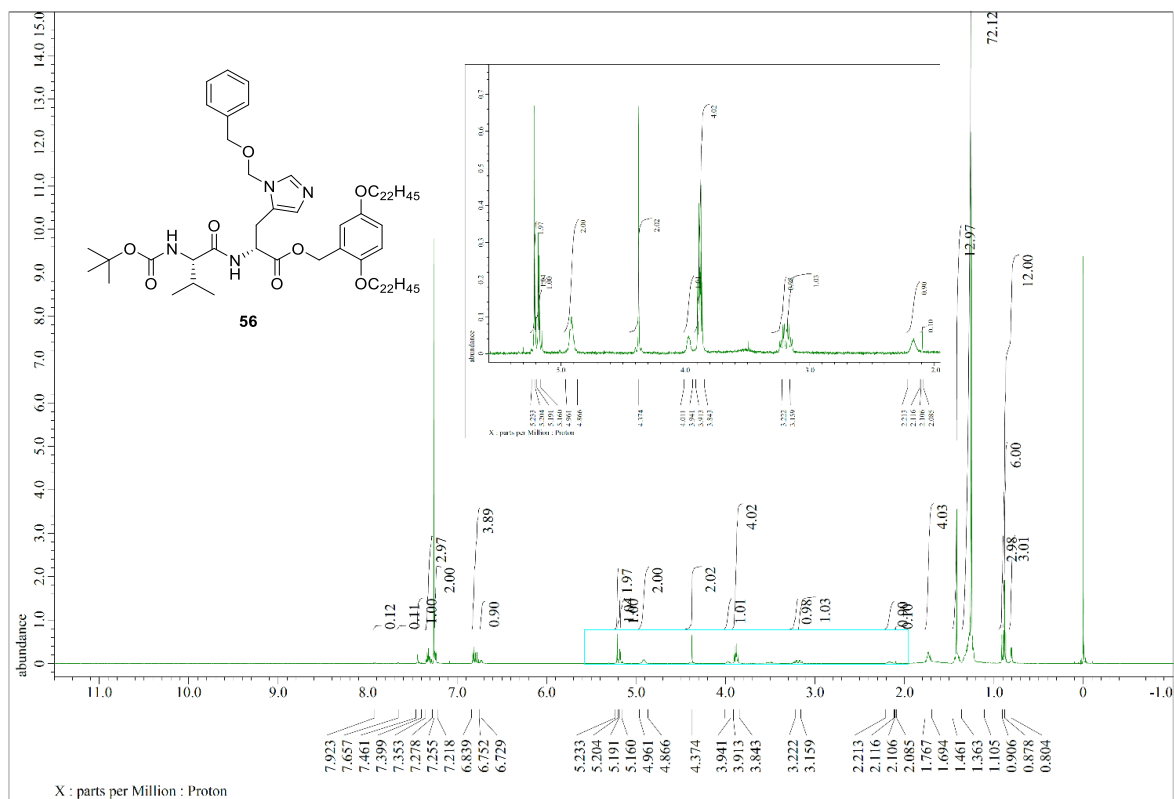
¹H and ¹³C NMR spectra of **53**



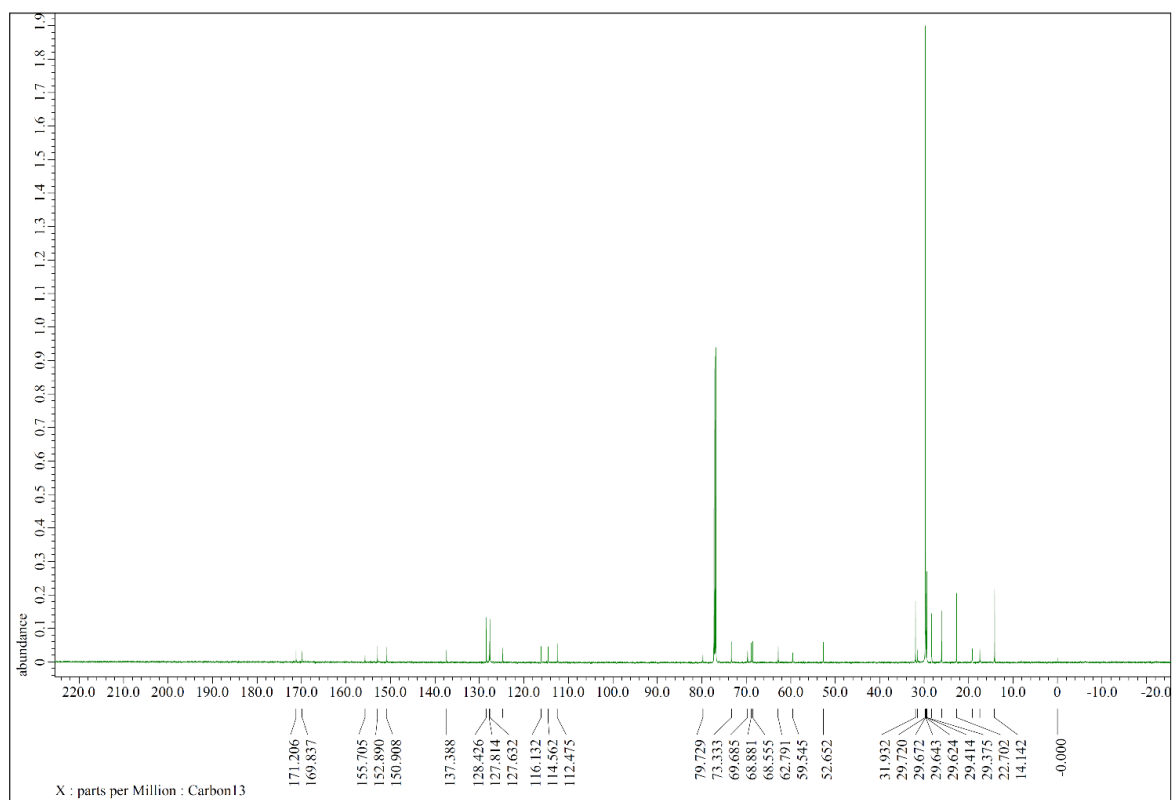
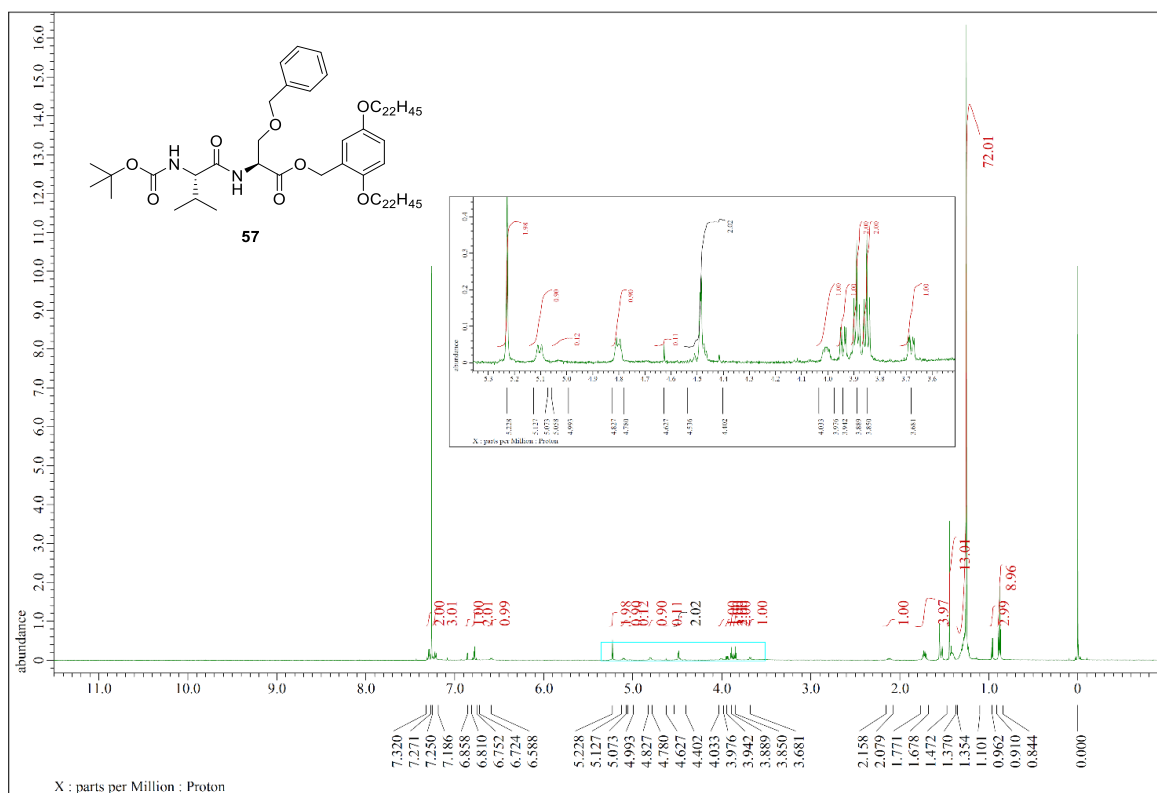
¹H and ¹³C NMR spectra of **54**



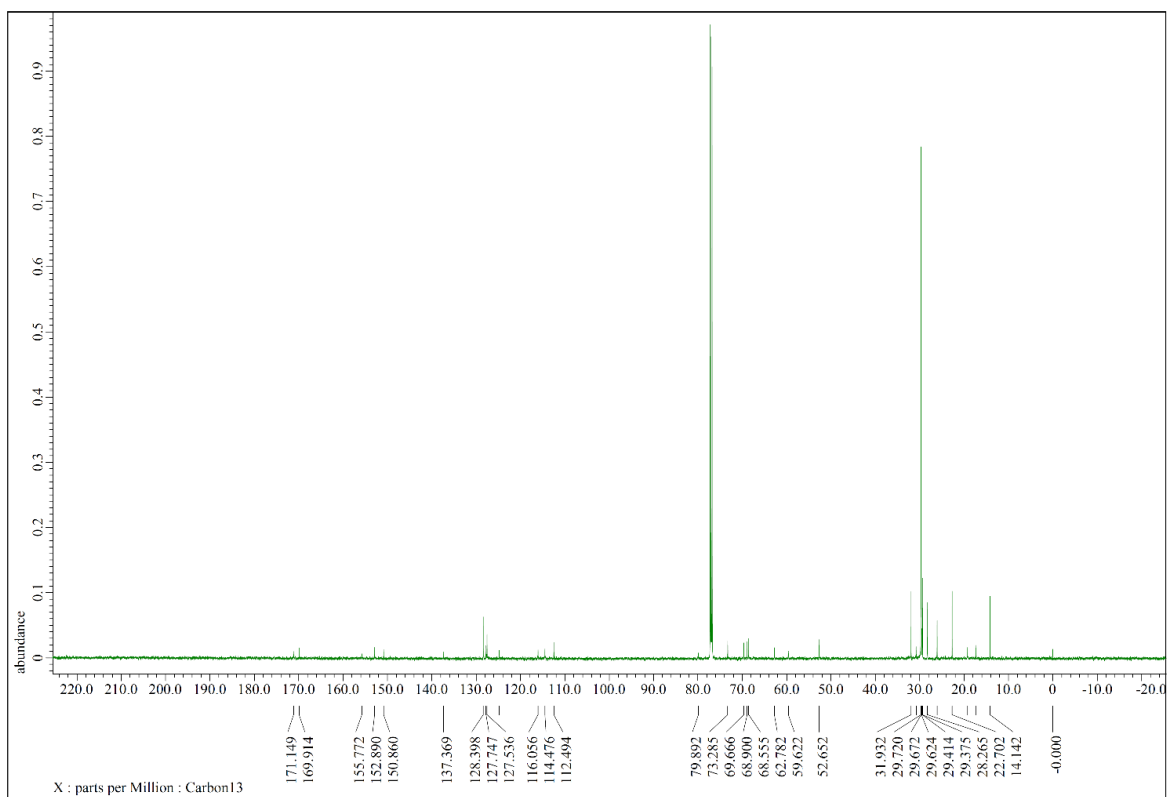
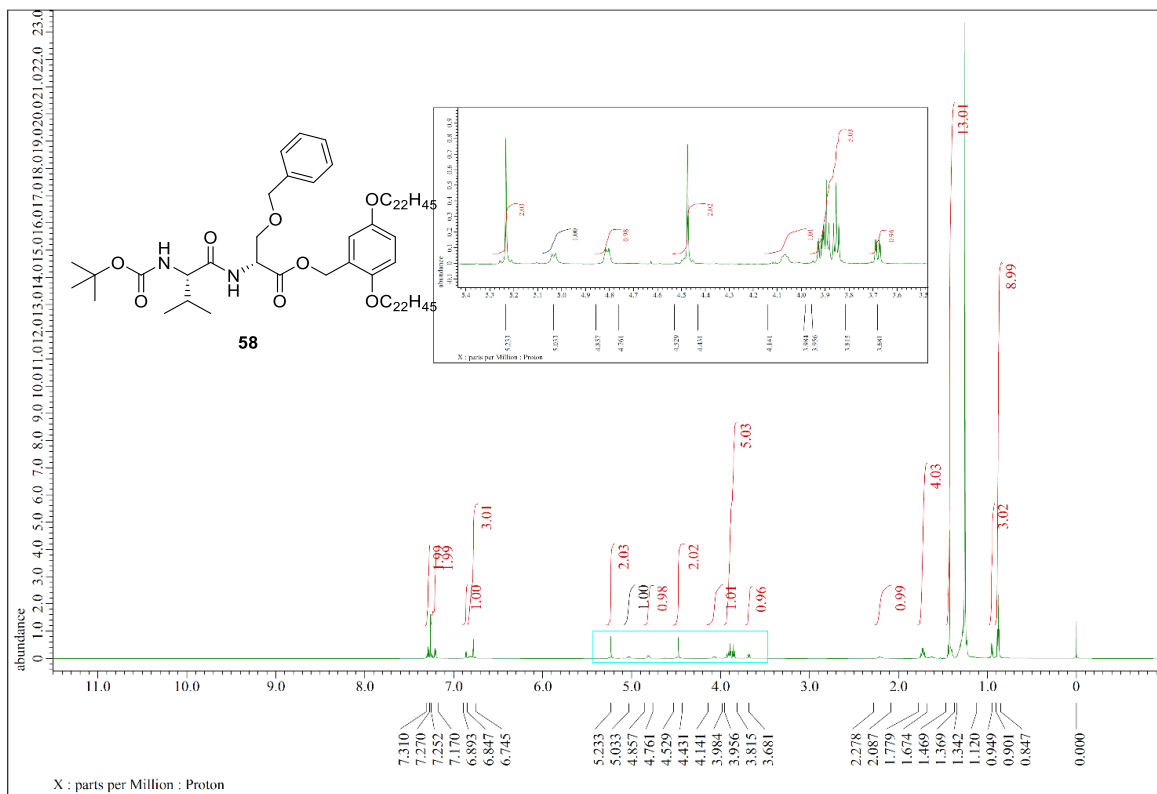
¹H and ¹³C NMR spectra of **55**



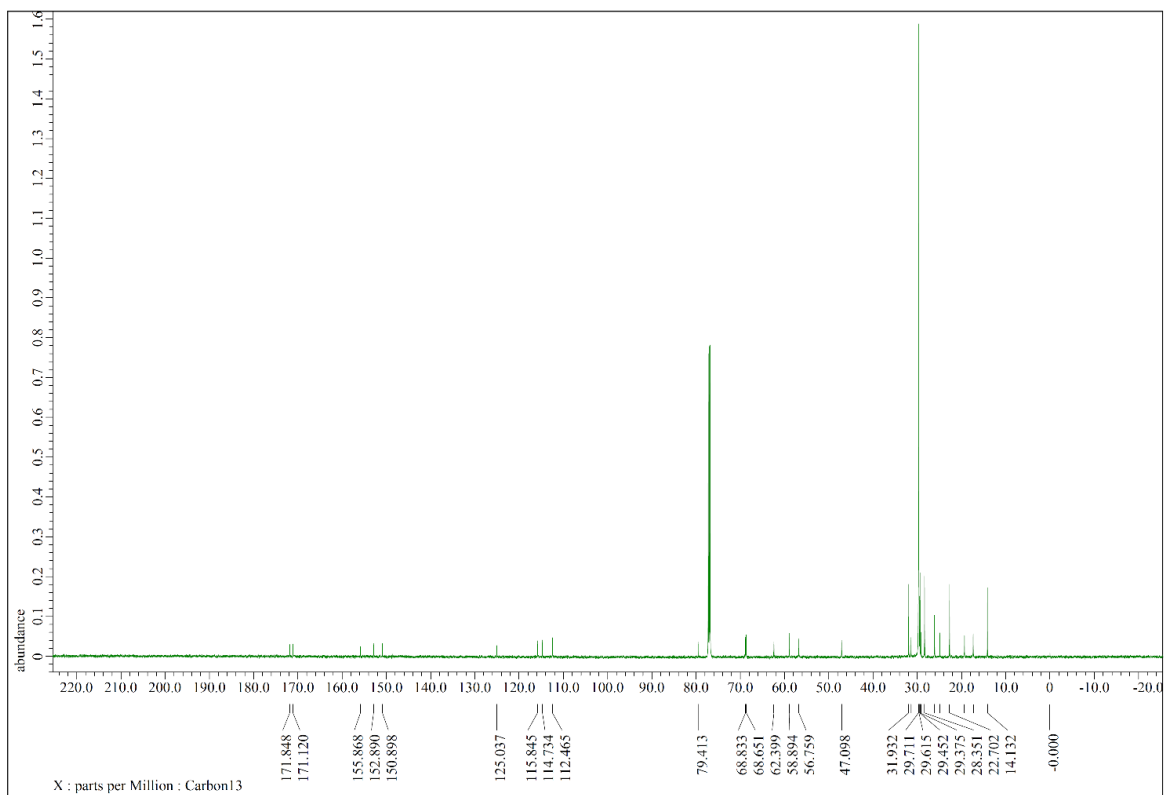
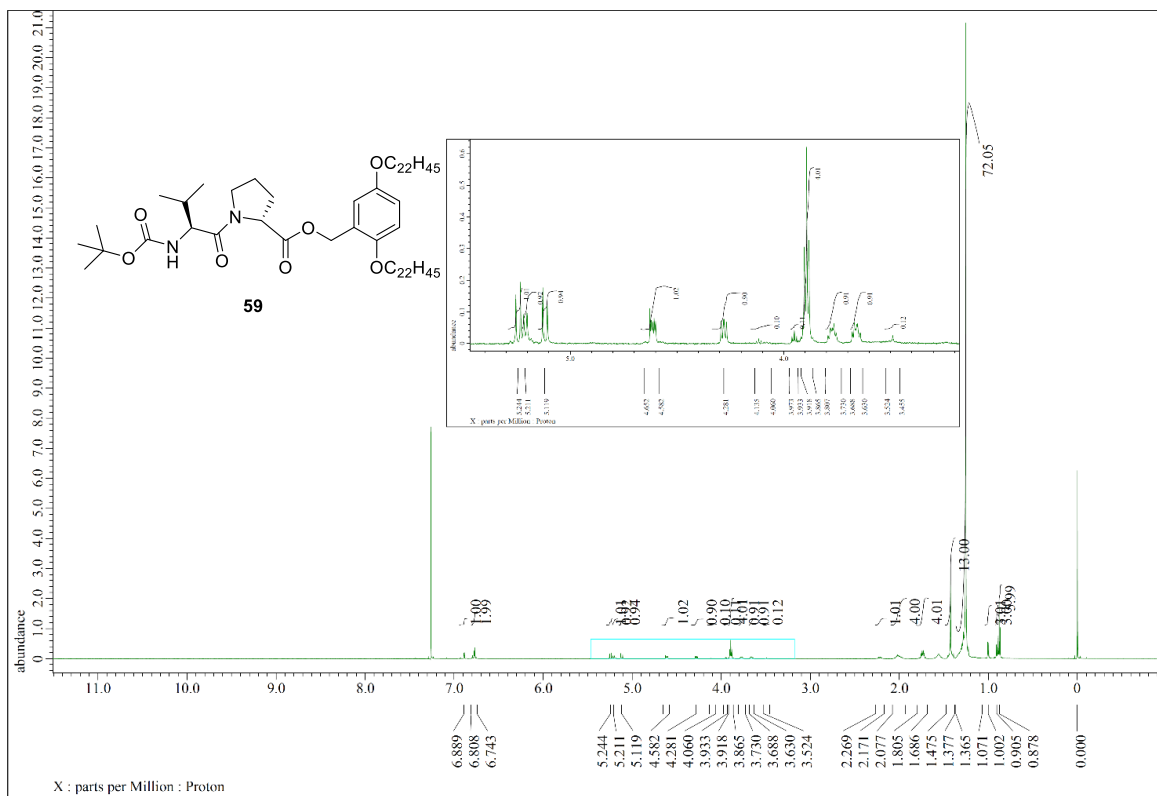
^1H and ^{13}C NMR spectra of **56**



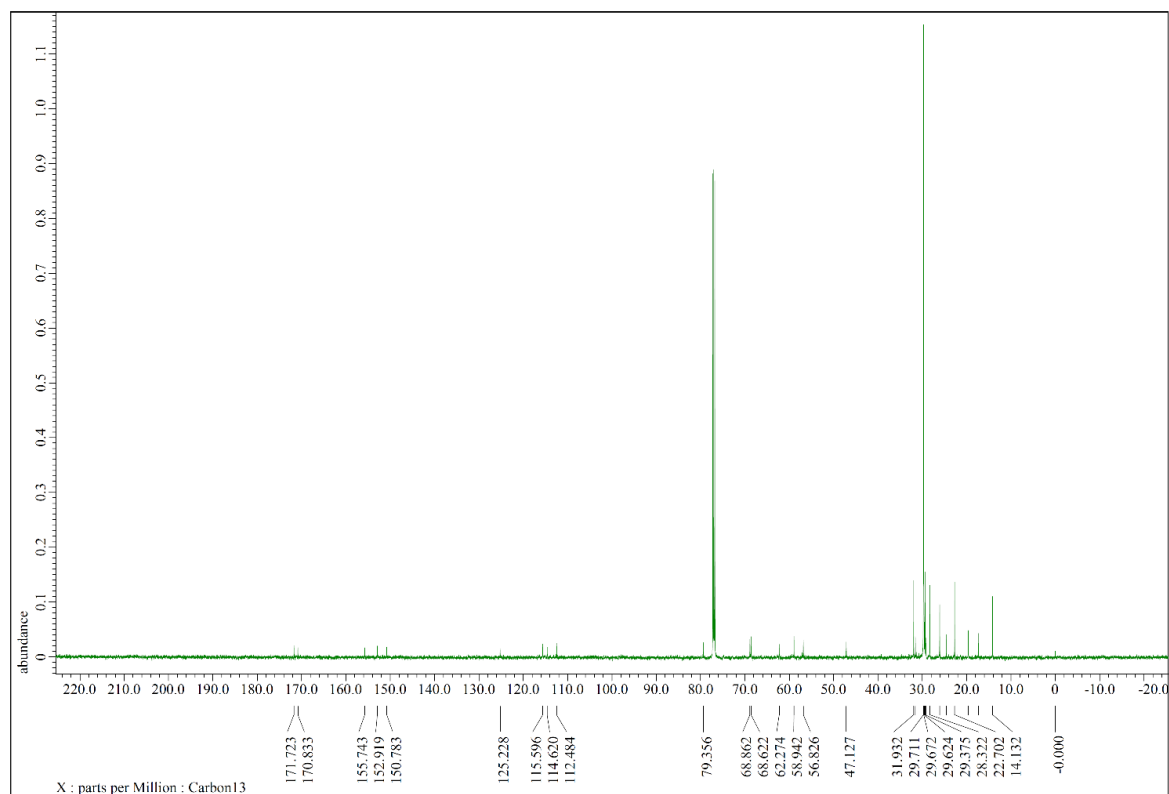
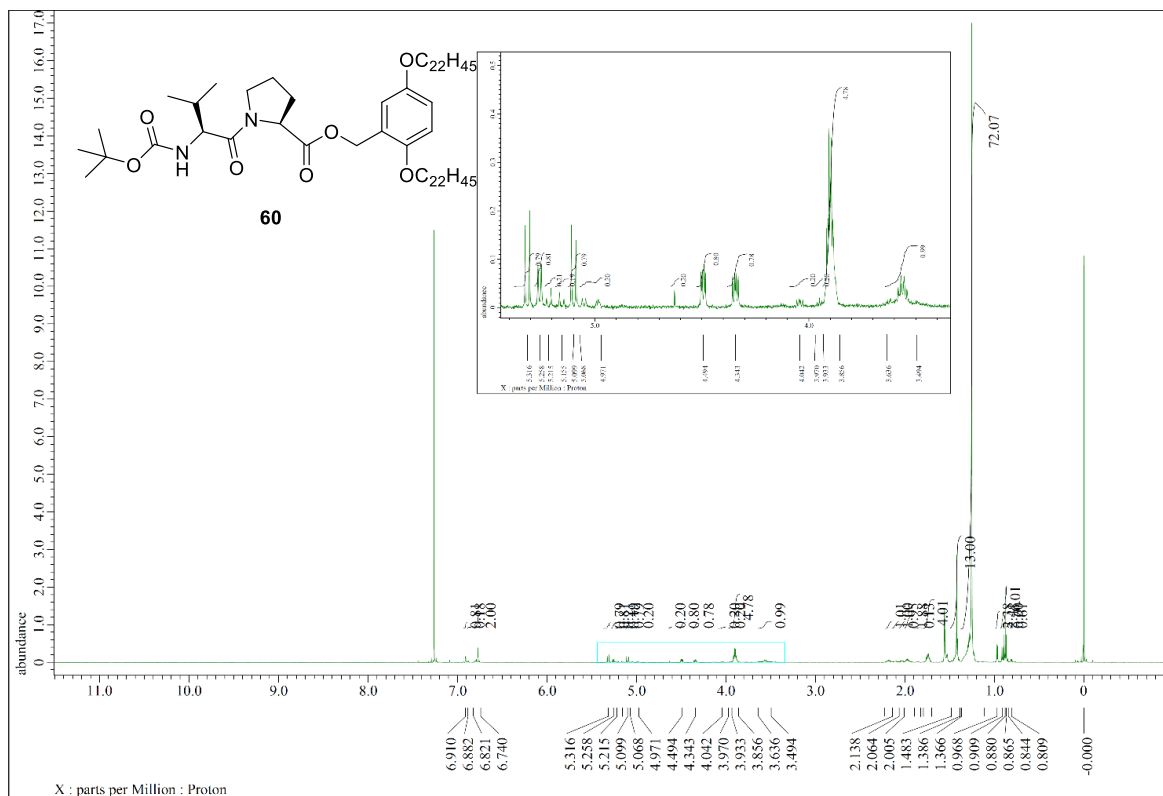
^1H and ^{13}C NMR spectra of **57**



¹H and ¹³C NMR spectra of **58**



¹H and ¹³C NMR spectra of **59**



¹H and ¹³C NMR spectra of **60**