

博士論文

翻訳後修飾ペプチドの合成研究

本論文は静岡県立大学大学院薬学研究院博士論文である。

2016年3月

望月 雅允

Synthetic study of peptides with post-translational modification

March 2016

Masayoshi Mochizuki

略語一覽

6-Cl-HOBt	6-chloro-1-hydroxybenzotriazole	HATU	1-[bis(dimethylamino)methylene]-1 <i>H</i> -1,2,3-triazolo(4,5- <i>b</i>)pyridinium 3-oxide hexafluorophosphate
AcOH	acetic acid		
AcM	acetamidomethyl		
Aq.	aqua	HBTU	1-[bis(dimethylamino)methylene]-1 <i>H</i> -benzotriazolium 3-oxide hexafluorophosphate
Boc	<i>t</i> -butoxycarbonyl		
Bom	benzyloxymethyl		
BrZ	2-brombenzyloxycarbonyl	HCTU	1-[bis(dimethylamino)methylene]-5-chloro-1 <i>H</i> -benzotriazolium 3-oxide hexafluorophosphate
Bzl	benzyl		
cHex	cyclohexyl		
CNP-53	C-type natriuretic peptide-53	HDTC	hydrazine dithiocarbonate
CPE	cysteinyl-prolyl ester	HFIP	1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol
CPME	cyclopentyl methyl ether	HMW	high-molecular-weight
Cbz	benzyloxycarbonyl	HOAt	1-hydroxy-7-azabenzotriazole
ClAc	chloroacetyl	HOBt	1-hydroxybenzotriazole
CIZ	2-chlorobenzyloxycarbonyl	HOObt	3,4-dihydro-3-hydroxy-4-oxo-1,2,3-benzotriazine
DEA	diethylamine		
DIC	<i>N,N'</i> -diisopropylcarbodiimide	HPLC	high performance liquid chromatography
DIEA	<i>N,N'</i> -diisopropylethylamine	Hyl	hydroxylysine
DMB	1,3-dimethoxybenzene	Hyp	hydroxyproline
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamide	MBHA	methylbenzhydramine
DMS	dimethyl sulfide	MBom	4-methoxybenzyloxymethyl
DMSO	dimethyl sulfoxide	MPA	3-mercaptopropionic acid
DTT	dithiothreitol	MPAA	4-mercaptophenylacetic acid
Ddm	4,4'-dimethoxydiphenylmethyl	MS	molecular sieves
Dpm	diphenylmethyl	Meb	methylbenzyl
EDC	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide	Mob	methoxybenzyl
		Msbh	4,4'-dimethylsulfinylbenzhydramine
Fmoc	9-fluorenylmethyloxycarbonyl	NCL	native chemical ligation
For	formyl	NIS	<i>N</i> -iodosuccinimide
GSH	glutathione	NMP	<i>N</i> -methylpyrrolidone
GSSG	oxidized glutathione	PAM	phenylacetamidomethyl
Gal	galactosyl	PEG	polyethylene glycol
Glc	glucosyl	Pbf	2,2,4,6,7-pentamethyl-dihydrobenzofuran-5-sulfonyl
Gn	guanidine	PhSH	thiophenol
		Py	pyridine

Pyr	pyrogultamic acid	TFA	trifluoroacetic acid
PyBop	1 <i>H</i> -benzotriazol-1-yloxy-tri (pyrrolidino)phosphonium Hexafluorophosphate	TFMSA	trifluoromethanesulfonic acid
quant.	Quantitative	TIS	triisopropylsilane
rt	room temperature	TMSOTf	trifluoromethanesulfonic acid trimethylsilyl ester
RP	reverse phase	Thz	thiazolidine
SAL	super acid labile	Tos	tosyl
SEA	bis(2-sulfanylethyl)amino	Trt	trityl
SEAlide	sulfanylethylanilide	Trt-OH	trityl alcohol
SPPS	solid-phase peptide synthesis	TsOH	<i>p</i> -toluenesulfonic acid
S <i>t</i> Bu	<i>t</i> -butylsulfenyl	Xan	xanthyl
Su	succinimide	<i>p</i> -	para
TCEP	tris(2-carboxyethyl)phosphine	<i>p</i> NA	<i>p</i> -nitroaniline
TES	triethylsilane	<i>t</i> Bu	<i>tert</i> -butyl
		μ-SIIIA	μ-conotoxin SIIIA

目次

用語説明	1
序論	4
第一章 Human adiponectin (19-107) の合成研究	6
第一節 緒言	6
第二節 逆合成解析	8
第三節 グリコシル化 Hyl ユニットの合成	10
第四節 Human adiponectin (19-107) セグメント合成	13
第五節 Human adiponectin (19-107) の合成	16
第六節 小括	19
第二章 無保護ペプチドの Cys 残基選択的保護基導入方法の開発と段階的 NCL への応用	20
第一節 緒言	20
第二節 Trt 化の検討	23
第三節 Cys 残基選択的 Trt 化反応を利用した rat CNP-53 の合成戦略	26
第四節 rat CNP-53 の合成	27
第五節 小括	31
第三章 位置選択的ジスルフィド結合形成反応の検討	32
第一節 緒言	32
第二節 <i>tert</i> -Bu 基を利用した位置選択的ジスルフィド結合形成反応について	34
第三節 μ -SIIIA の合成	35
第四節 Human hepcidin の合成	39
第五節 小括	41
結論及び結語	42
Experimental Section	45
General information	45
第一章に関わる実験	47
第二章に関わる実験	63
第三章に関わる実験	74
主論文	81
参考文献	82
謝辞	85

用語説明

Boc 合成法

α -アミノ基の保護基として Boc 基を用い、TFA 処理による Boc 基の脱保護、続く Boc アミノ酸との縮合反応を順次繰り返し伸張する方法。アミノ酸の側鎖官能基には強酸処理で除去可能な保護基が用いられ、最終脱保護は無水 HF を用いるのが一般的である。液相合成、固相合成の両方で用いられる。

Fmoc 合成法

α -アミノ基の保護基として Fmoc 基を用い、塩基処理（一般的に固相合成ではピペリジンが用いられる）による Fmoc 基の脱保護、続く Fmoc アミノ酸との縮合反応を順次繰り返し伸張する方法。アミノ酸の側鎖官能基には TFA 処理で除去可能な保護基を用いる。Fmoc 基の脱保護時に生じるジベンゾフルベンの除去が困難であることから液相合成には向かず、一般に固相合成で用いられる。

縮合反応

ペプチド合成に用いられる縮合剤は各種開発されているが、液相合成では EDC/HOBt を用いることが多い。固相合成ではカルボジイミド系の縮合剤よりも反応性の高い HBTU、HCTU や PyBop などが用いられる (Figure A)。また、セグメント縮合時にはエピマー化抑制のため、添加剤として HOObt を用いられることが多い。

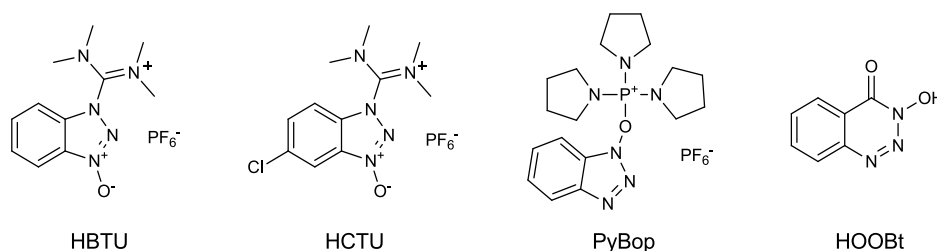
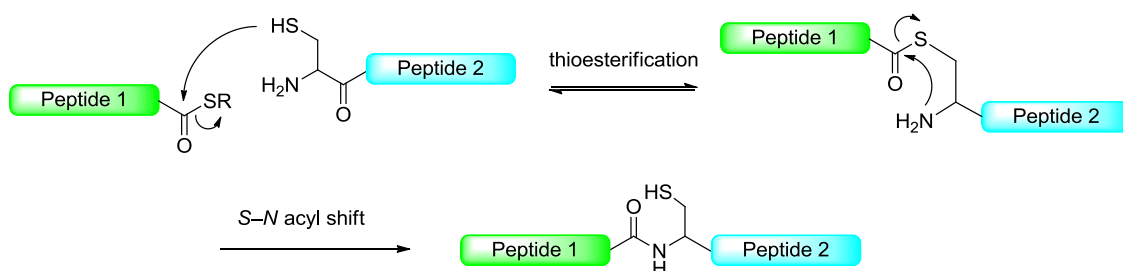


Figure A. Examples of condensation reagents and additive reagent.

ネイティブケミカルライゲーシオン (NCL)

C 末端にチオエステルを持つペプチドと N 末端に Cys を持つペプチドが、分子間のチオエステル交換反応と続く分子内 S-N アシル転位反応によってアミド結合を形成する反応 (Scheme A)。極めて官能基選択性が高く、無保護ペプチドで反応が行える。また、一般に反応を促進するためチオフェノール (PhSH) や 4-メルカプトフェニル酢酸 (MPAA) などのアリールチオールを添加剤として用いる。現在最も汎用されているセグメント縮合方法である。



Scheme A. Proposed mechanism of NCL.

NCL-脱硫反応

NCL後に脱硫反応を行うことで、反応点の Cys を Ala へと変換する手法。これにより Ala での NCL が可能となり、NCL の欠点であった適用範囲の問題が克服された。また、Ala 以外にも各種アミノ酸にスルフヒドリル基を導入したアミノ酸を調製し、それを用いた NCL-脱硫反応が多数報告されている。脱硫反応は、官能基選択性が高く無保護でも行えるが、配列中の Cys だけは保護基を導入しなければならない。脱硫方法には、ラネーニッケルなどを用いた方法も知られているが、現在ではトリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン (TCEP)、チオールソース [EtSH、*t*BuSH、グルタチオン (GSH)] とラジカル開始剤 (VA-044) を用いた手法が一般的である。

チオエステル法

ペプチドチオエステルとアミノ基との選択的縮合反応。銀塩と HOObt などの活性化剤存在下、アミド結合形成反応を行う。チオエステルを銀イオンにより活性化し、HOObt (添加剤) との活性エステルへと変換した後、アミノ基が反応する。NCL とは異なり無保護では行えず、反応に関与しないアミノ基とスルフヒドリル基は保護しなければならないが、縮合サイトに制限を受けない利点がある

チオエステル合成

ペプチドチオエステルは、NCL やチオエステル法などに用いられ、近年のペプチド合成において極めて需要の高いユニットである。その合成において、Boc 法では直接合成できるため問題とはならないが、Fmoc 法では脱 Fmoc 時の塩基処理にチオエステルが不安定なため、直接合成することは困難である。近年、この問題を解決するための Fmoc 法におけるチオエステル合成法が多数報告されている。主な方法としては、アミド型でチオエステル前駆体を固相合成し、脱保護・脱樹脂後に *N*-S アシル転位反応によりチオエステルへと変換するものである (Figure B)。

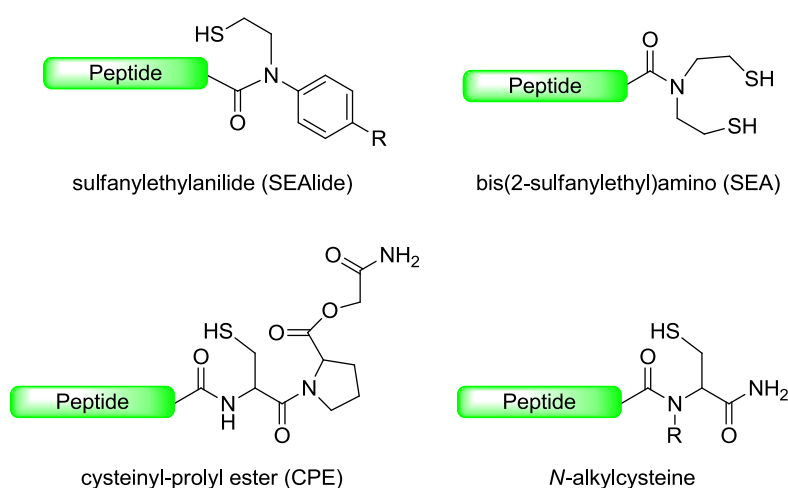
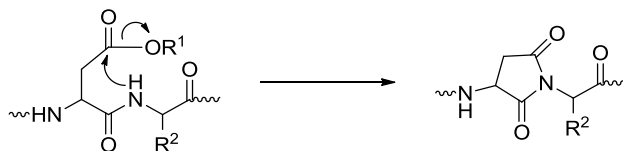


Figure B. Examples of thioester surrogates.

アスパルチミド (Asi) の形成

Asi の形成は、ペプチド合成における主要な副反応の一つである。ペプチドの配列に Asp-Xaa が含まれる際、Xaa の窒素と Asp の側鎖カルボン酸とで Asi が形成される (Scheme B)。配列に強く依存し Xaa が Gly の時に顕著に進行する。保護体合成時には塩基処理で進行し (Fmoc 法で問題となる)、脱保護後は強酸性条件で主に進行する (HF 処理時に問題となる)。

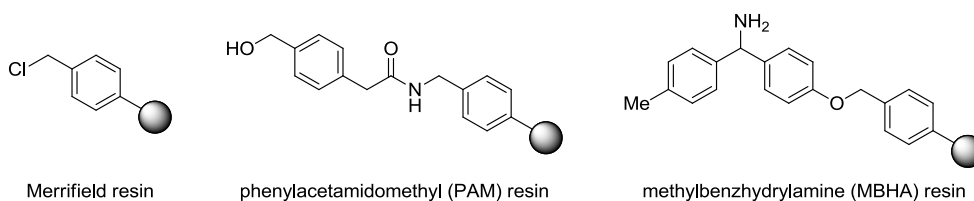


Scheme B. Mechanism of aspartimide formation.

固相合成用樹脂

担体としてはポリスチレンを用いることが多く、長鎖ペプチド合成時には PEG をリンカーの一部に含む PEG-ポリスチレンがしばしば用いられる。アミノ酸を導入するためのリンカーには種々のものが開発されており、下記に一例を示す (Figure C)。

Boc-SPPS



Fmoc-SPPS

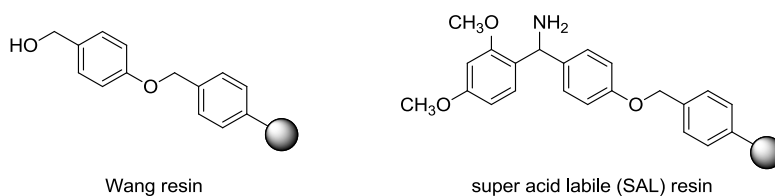


Figure C. Examples of SPPS resins.

序論

タンパク質やペプチドは、代謝などの反応を触媒する酵素、生体内の情報伝達・神経系の制御あるいは造血系や免疫系に關与するホルモンなど、生体内において多岐にわたる役割を果たしている。これらの生理活性発現には、高次構造の形成に加え、アセチル化、ユビキチン化、リン酸化、グリコシル化、ヒドロキシ化、ジスルフィド結合形成など種々の翻訳後修飾が重要な役割を担っている (Figure 1)。これらの修飾は、構造、機能、局在、タンパク質間の相互作用やシグナル伝達等に大きな影響を与えるため、タンパク質やペプチドの機能解析研究には、翻訳後修飾されたタンパク質やペプチドの調製が不可欠である。

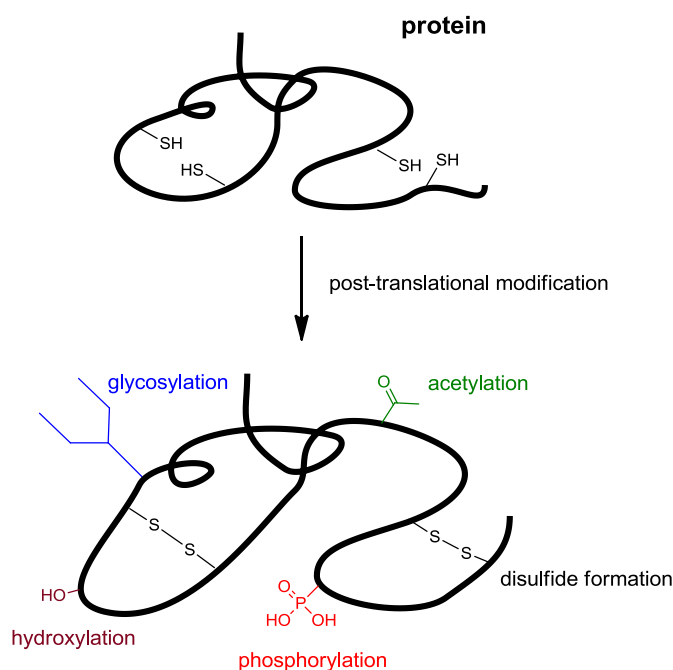


Figure 1. Post-translational modification.

タンパク質やペプチドの調製法としては、リコンビナントによるものと化学合成によるものとの 2 種類が知られている。リコンビナント合成では、鎖長に制限がないものの、翻訳後修飾は実験系に依存するため、望む修飾タンパク質を単一化合物として得ることは困難なことが多い。¹⁾ 一方、化学合成では、時間と手間を必要とするが、任意の位置を修飾することが可能であり、非天然のアミノ酸の導入も容易である。そのため、タンパク質やペプチドの化学合成は以前から多く実施されてきた。しかし、翻訳後修飾ペプチドの合成は未だ問題点も多い。例えば、グリコシル化ペプチドの合成では、グリコシル化した保護アミノ酸のカルボキシル基と樹脂上のアミノ基との縮合反応が立体障害から難しいことに加え、²⁾ 縮合反応時のエピマーの生成も懸念される。³⁾ 他にも、複数のジスルフィド結合を有するペプチドの合成では、段階的かつ位置選択的にジスルフィド結合を形成するための Cys の保護基が多数開発されているが、⁴⁾ 4 組以上のジスルフィド結合を形成することは難しく、汎用性の高い方法は未だ開発されていない。このような背景のもと著者は、翻訳後修飾ペプチドの合成研究を行った。

第一章では、アディポサイトカインの一種である adiponectin の機能解明に向け、ヒドロキシ化、グリコシル化により翻訳後修飾された human adiponectin (19-107) (**1**) の合成を、NCL、チオエステル法を併用した収束的合成手法にて達成した。また、グリコシル化された 5-ヒドロキシリジン (Hyl) は、ジペプチドユニット“(Glc-Gal)-Hyl-Gly” とすることで固相合成への簡便な導入を可能とした。部分配列ではあるが、翻訳後修飾された adiponectin の合成は世界初の成果である。

第二章では、Cys 残基を含むペプチドの合成ツールとして、無保護ペプチドへの Cys 残基選択的な保護基導入反応について研究を行った。結果として、1,1,1,3,3,3-ヘキサフルオロ-2-プロパノール (HFIP) 中、トリチルアルコール (Trt-OH) との反応により、高収率で Cys 残基選択的に Trt 基を導入できることを見出した。本手法を用いた rat C-type natriuretic peptide-53 (rat CNP-53) (**35**) の合成では、NCL-脱硫反応を用いた多成分のセグメント縮合において、新たな収束的合成戦略を提唱することに成功した。

第三章では、位置選択的ジスルフィド結合形成反応について研究を行い、従来位置選択的ジスルフィド結合形成反応への応用が困難であった *t*-ブチルスルフェニル (S*t*Bu) 基を、第二章で開発した Trt 化反応を用いることで、位置選択的ジスルフィド結合形成反応における有用な保護基へと進化させた。S*t*Bu 基と Trt、アセトアミドメチル (Acm) 基を組み合わせることで 3 組のジスルフィド結合を持つ μ -conotoxin SIIIA (μ -SIIIA) (**46**) を、さらに、これらにメチルベンジル (Meb) 基を加えることで 4 組のジスルフィド結合を持つ human hepcidin (**50**) の精密合成に成功した。

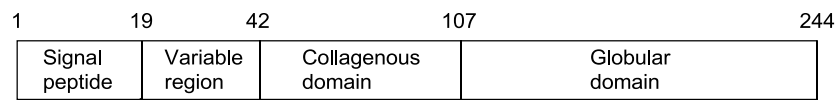
第一章 Human adiponectin (19-107) の合成研究

第一節 緒言

Adiponectin について

Adiponectin は、インシュリンの感受性を亢進するアディポサイトカインであり、抗糖尿病、アテローム産生抑制、抗炎症作用、心保護的作用など種々の活性を有している。⁵⁾ Human adiponectin は、244 残基のアミノ酸から構成され、シグナル部位、可変性領域、コラーゲンドメイン、球状ドメインの 4 つのドメインに分割される。コラーゲンドメインに含まれる Lys 残基と一部の Pro 残基は翻訳後修飾を受けており、Lys はヒドロキシ化により Hyl となった後、グリコシル化され (Glc-Gal-)Hyl (**2**) となる。また、Pro はヒドロキシ化されることでヒドロキシプロリン (Hyp) (**3**) となる (Figure 2)。⁶⁾ 循環血中において adiponectin は、モノマーでは存在せず、トリマー、ヘキサマー、及び、18 分子以上からなる high-molecular-weight (HMW) の 3 種の構造で存在しており、中でも、HMW がインシュリン感受性の亢進に重要な役割を担っていると考えられている。多量体の構築は、まず、球状ドメインが疎水性相互作用により凝集した後、コラーゲンドメインがトリプルヘリックスを形成することでトリマーが形成される。このトリプルヘリックス構造は、Hyp のヒドロキシ基の寄与により安定化される。⁷⁾ 次いで、可変性領域に存在する Cys³⁶ が分子間でジスルフィド結合を形成することでヘキサマーとなり、このヘキサマーが凝集する事により HMW が形成される。⁸⁾ この際、Lys のヒドロキシ化、グリコシル化による翻訳後修飾が HMW 形成に必要であることが示されている。⁹⁾ しかし、均一な糖鎖構造を有する adiponectin の入手が困難なこともあり、詳細な機構については依然判明していない。

Adiponectin はヒトの循環血中に多量に存在しているが、前述の通り多量体で存在しているためモノマーを単離することは難しい。加えて、糖鎖が代謝により不均一に分解されるため、翻訳後修飾された adiponectin を単離することは困難を極める。また、リコンビナント合成では均一なグリコシル化タンパク質を得ることは難しい。^{1a)} そのため、翻訳後修飾された領域、すなわちコラーゲンドメインに関しては化学合成が必須となる。そこで今回著者は、adiponectin の更なる機能解明のために、翻訳後修飾されたコラーゲンドメインと可変性領域を含む human adiponectin (19-107) (**1**) の合成に取り組むこととした。



36
ETTTQGPGLVLLPLPKGACTGWMAGIHypGHYpGHNGAHypGRDGRDGTGP-





 EHyI^{GEHyI}IGDPGLIGPHyI^{IGDIGETGVPGAEGHyp}RGFPGIQGRHyI^{GEPGEG}

human adiponectin (19-107) (1)

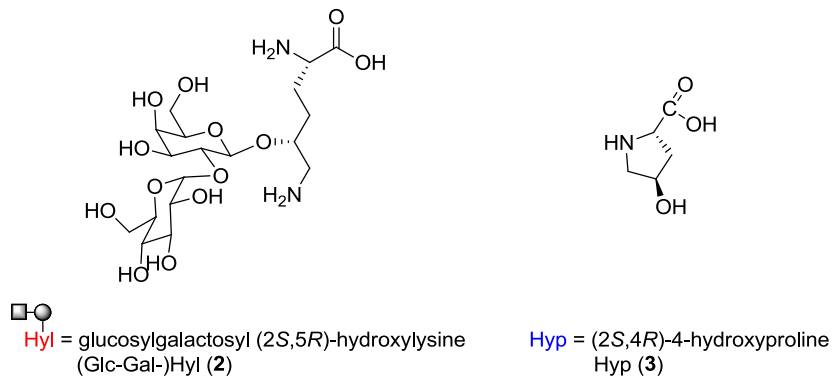


Figure 2. Structure of human adiponectin (19-107) (1).

第二節 逆合成解析

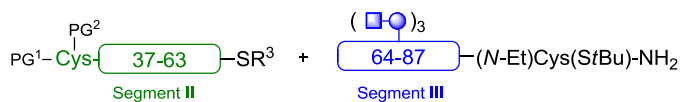
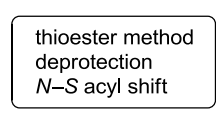
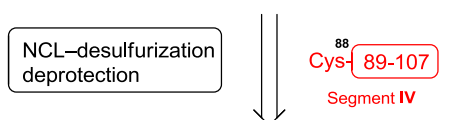
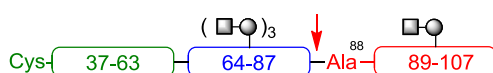
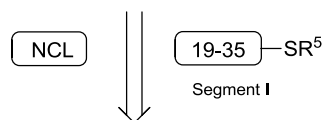
Human adiponectin(19-107) (**I**) の逆合成解析を Scheme 1 に示した。89 残基のペプチドを (19-35) (**I**)、(36-63) (**II**)、(64-87) (**III**)、(88-107) (**IV**) の 4 成分に分けて合成することとした。各セグメントの縮合は、無保護でも反応可能な NCL¹⁰⁾ を利用することが理想的である。しかし、NCL の反応点に必須である Cys は、配列中に Cys³⁶ しか存在せず、Ala³⁵-Cys³⁶ 以外の縮合サイトには NCL とは異なる手法が必要となる。そこで、近年汎用されている脱硫反応¹¹⁾ を併用することとした。すなわち、Ala⁸⁸ を Cys⁸⁸ としてセグメントを合成し、Gly⁸⁷-Cys⁸⁸ 間で NCL を行った後に、脱硫反応を行うことで Cys⁸⁸ を Ala⁸⁸ へと変換するものである。脱硫反応では無保護のスルフヒドリル基が全て反応してしまうため、Gly⁸⁷-Ala⁸⁸ での NCL は、Ala³⁵-Cys³⁶ よりも先に行わなければならない。残る Gly⁶³-Glu⁶⁴ の縮合には、チオエステル法¹²⁾ を用いることとした。チオエステル法は、ペプチドチオエステルを銀イオンで活性化し、アミノ基と官能基選択的に反応させる手法である。そのため、反応点以外のアミノ基は Boc 基等で保護しなくてはならず、無保護ペプチドの適応が可能な NCL よりも先に行うこととした。以上の考察から、**II** と **III** をチオエステル法により縮合した後、**IV**、(**II+III**)、**I** を C 末端側から順次 NCL により縮合していくこととした。本工程において、セグメント **III** の C 末端はセグメント **II** とチオエステル法を行う際には不活性で、続くセグメント **IV** との NCL 時には活性種 (チオエステル) へと変換する必要がある。すなわち、セグメント **III** の C 末端にはチオエステル前駆体を導入しなくてはならない。チオエステル前駆体は、CPE¹³⁾、SEAlide¹⁴⁾、SEA¹⁵⁾ や、N-アルキル Cys¹⁶⁾ など様々なものが開発されているが、これらの中で、合成の容易さから N-アルキル Cys を用いることにした。各セグメントの合成は、セグメント **I**、**II** はチオエステルの合成が容易に行える Boc 固相合成法を用い、セグメント **III**、**IV** は配列中に (Glc-Gal-)Hyl を含み、Boc 法の最終脱保護条件である無水 HF 処理に糖鎖が不安定であるため、Fmoc 固相合成法を用いることとした。

ETTTQGPVLLPLPKGA-³⁶CTGWMAGIHypGHHypGHNGAHypGRDGRDTPG-⁶³
 Segment I Segment II

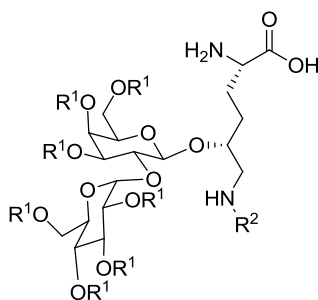
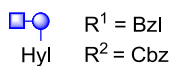
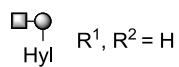
⁶⁴EHyIGEHyIGDPGLIGPHyIGDIGETGVPG-⁸⁸AEGHypRGFPGIQGRHyIGEPEEG
 Segment III Segment IV



human adiponectin (19-107) (1)



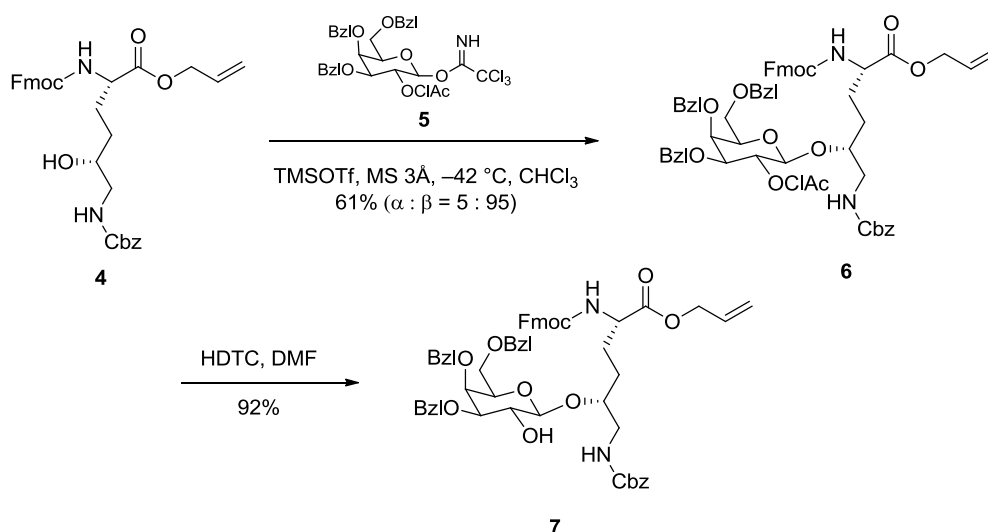
-SR : thioester



Scheme 1. Synthetic strategy of human adiponectin (19-107) (1).

第三節 グリコシル化 Hyl ユニットの合成

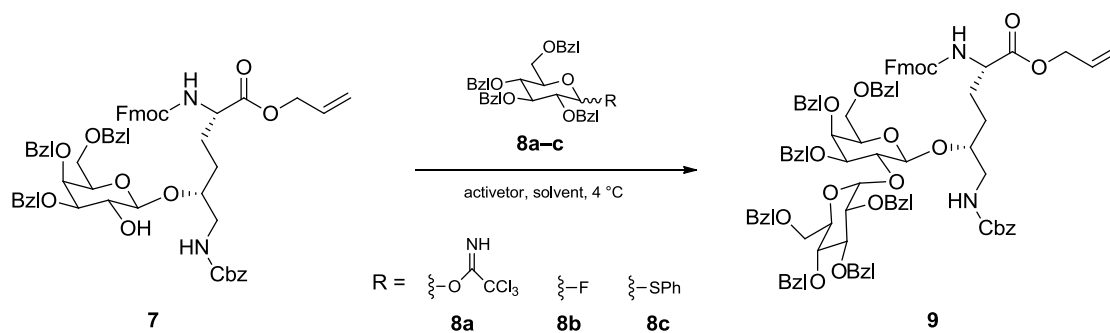
まず、adiponectin の活性において重要な役割を持ち、また化学合成の成否を左右する鍵物質でもある α -D-グルコピラノシル(1 \rightarrow 2)- β -D-ガラクトピラノシル-(2S,5R)-Hyl [(Glc-Gal)-Hyl] 誘導体 **10**¹⁷⁾ の合成を行った。初めに Fmoc-Hyl(*N*⁶-Cbz)-OAllyl (**4**)¹⁸⁾ のガラクトシル化反応を行った。グリコシルドナーとして 2 位の水酸基を ClAc 基で保護したガラクトースのトリクロロアセトイミデート体 **5**^{17a)} を用い、TMSOTf 存在下隣接基効果を利用した β 選択的ガラクトシル化反応によって α : β =5:95 と高い選択性にて β 体 **6** を得た。続いて、ガラクトースユニットの 2 位 ClAc 基の脱保護を試みた。常用されているチオウレアでは、反応性に乏しく望む結果が得られなかったため、各種検討を行った結果、ヒドラジンジチオカーボネート (HDTC)¹⁹⁾ を用いることで、室温にて反応が完結し、高収率で **7** を得ることができた (Scheme 2)。



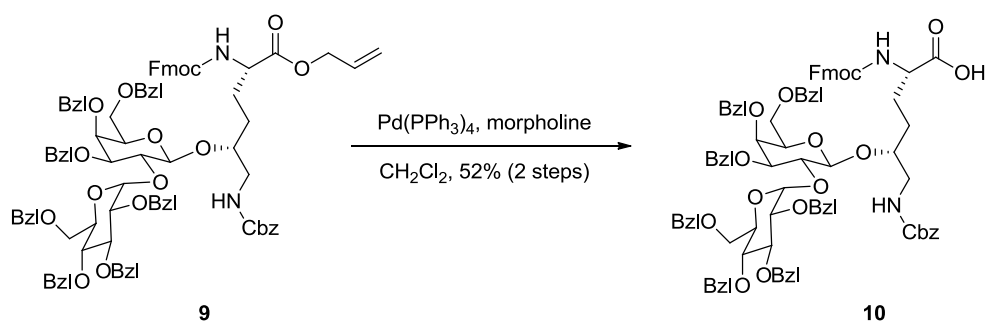
Scheme 2. Synthesis of Fmoc-(Gal)-Hyl derivative **7**.

次いで、 α 選択的グリコシル化反応について検討を行った (Table 1)。まず、トリクロロアセトイミデート体 **8a** を利用したグリコシル化反応を試みたが、各種溶媒を用いても 7 割程度の選択性しか得られなかった (entries 1-3)。また、フッ化物 **8b** での導入も試みたが同様の結果であった (entries 4, 5)。そこで、近年 Lu らにより報告された DMF を利用した α 選択的グリコシル化反応を試みた。²⁰⁾ すなわち、DMF 存在下チオフェニルグルコース **8c** を NIS、TMSOTf により活性化することで、オキシカルベニウムイオンと DMF の複合体からなる活性種を形成した後、アクセプターである **7** を加え反応を行った。反応に 48 時間要したものの、 α : β =88:12 と高い α 選択性が得られ、シリカゲル精製を経て α 体 **9** を得た。次いで、**9** の Allyl 基を Pd(PPh₃)₄ を用いて除去することで、Fmoc-(Glc-Gal)-Hyl 誘導体 **10** を得ることに成功した (Scheme 3)。

Table 1. Glycosylation of Fmoc-(Gal-)Hyl derivative **7**.

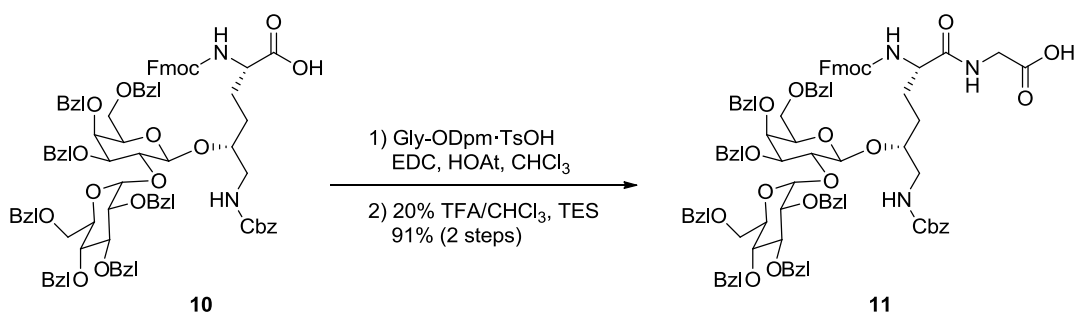


entry	donor	activator	solvent	$\alpha : \beta$
1	8a	TMSOTf	CH ₂ Cl ₂	59 : 41
2	8a	TMSOTf	Et ₂ O	57 : 43
3	8a	TMSOTf	<i>t</i> BuOMe	67 : 33
4	8b	BF ₃ ·Et ₂ O	CH ₂ Cl ₂	62 : 38
5	8b	BF ₃ ·Et ₂ O	CPME	49 : 51
6	8c	NIS, TMSOTf, DMF	CH ₂ Cl ₂	88 : 12



Scheme 3. Synthesis of Fmoc-(Glc-Gal-)Hyl derivative **10**.

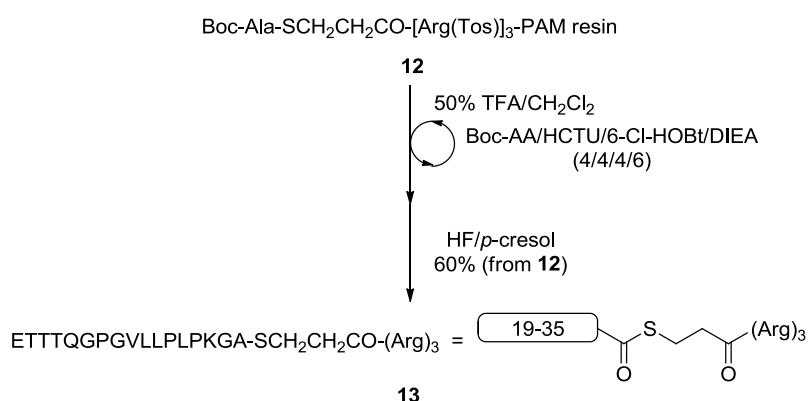
得られた Fmoc-(Glc-Gal-)Hyl 誘導体 **10** は、糖鎖に複数の Bzl 基を持つため立体障害が大きく、固相上でのアミノ基との反応が困難で、また、エピマー化を招くことも予想される。一方で human adiponectin (19-107) の配列において、導入する 4 つの (Glc-Gal-)Hyl はいずれも Gly の *N* 末端側に位置しているため (65, 68, 77, 101 位)、ジペプチドユニット “Fmoc-(Glc-Gal-)Hyl-Gly” として導入することが可能である。ジペプチドユニットでの導入であれば、Gly がスペーサーとなることで立体障害が緩和され、かつ、Gly サイトでの縮合反応となることからエピマー化の懸念もなくなる。そのため、ジペプチドユニットを用いて固相合成を行うこととした。ジペプチドユニット **11** は、Fmoc-(Glc-Gal-)Hyl 誘導体 **10** と Gly-ODpm とを EDC/HOAt により縮合し、20% TFA を用いて Dpm 基の脱保護を行うことで簡便に得られた (Scheme 4)。



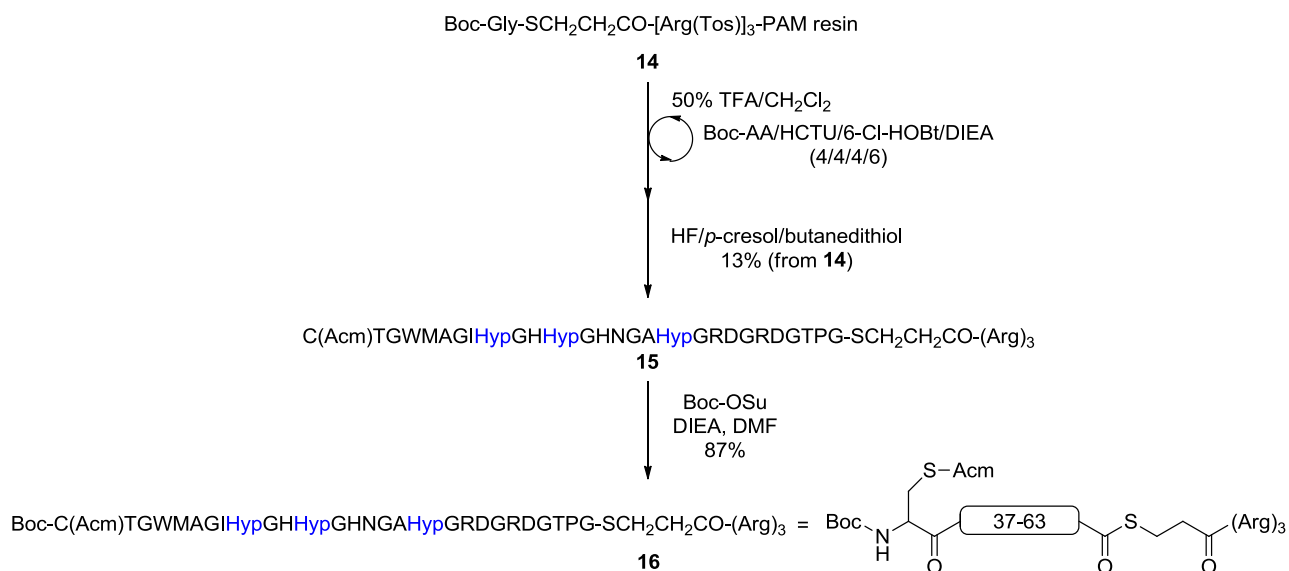
Scheme 4. Synthesis of Fmoc-(Glc-Gal-)Hyl-Gly derivative **11**.

第四節 Human adiponectin (19-107) セグメント合成

N 末端の 2 つのセグメント **I**、**II** は、ペプチド合成機 ABI433A を用いて、それぞれ Boc-Ala-SCH₂CH₂CO-[Arg(Tos)]₃-PAM resin (**12**)、Boc-Gly-SCH₂CH₂CO-[Arg(Tos)]₃-PAM resin (**14**) を原料に Boc 法にて合成した。Boc 基の除去は 50% TFA/CH₂Cl₂ で行い、縮合反応は NMP 中 Boc アミノ酸/HCTU/6-Cl-HOBt/DIEA (4/4/4/6) の条件を用いて 30 分間行った。²¹⁾ 得られた保護ペプチド樹脂を無水 HF 処理し、脱樹脂と同時に Ac_m 基を除くすべての保護基の除去を行い、(19-35)-SR (**13**) を 60%、[Cys(Ac_m)³⁶](36-63)-SR (**15**) を 13% の収率で得た (-SR はペプチドチオエステルを示している)。得られた **15** は、チオエステル法を行うために α-アミノ基を Boc-OSu により Boc 化することで **16** へと変換した (Schemes 5, 6)。



Scheme 5. Synthesis of (19-35)-SR (**13**) (segment **I**).



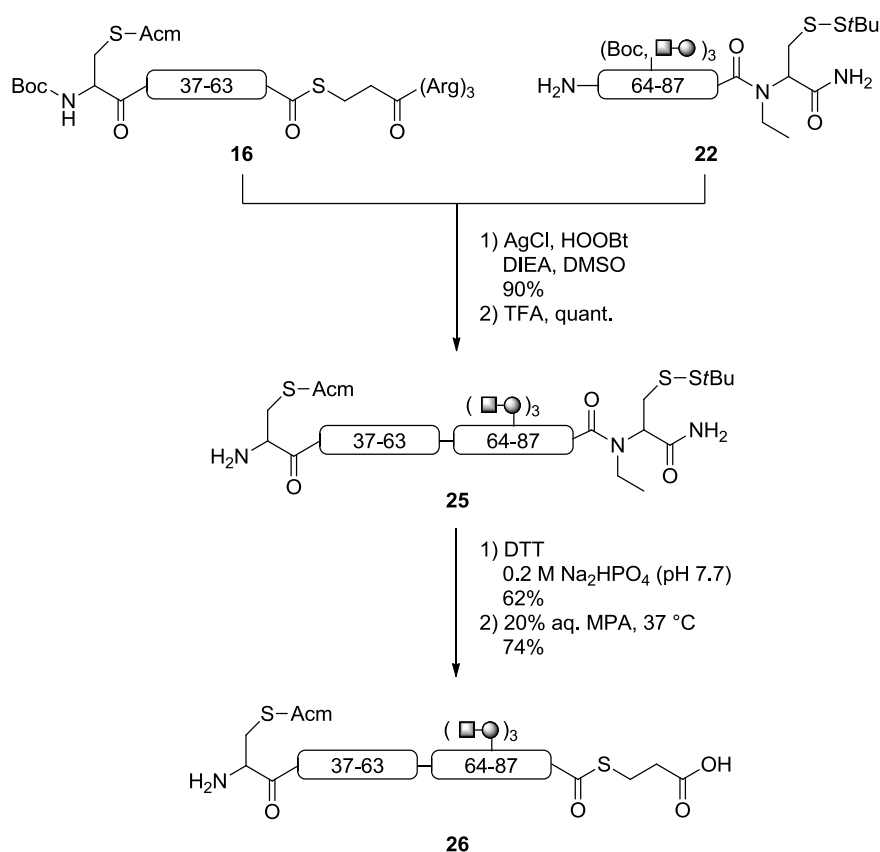
Scheme 6. Synthesis of [Boc-Cys(Ac_m)³⁶](36-63)-SR (**16**) (segment **II**).

セグメント **III** の C 末端には、チオエステル前駆体として *N*-アルキル Cys を導入する必要がある。まず、液相合成にて、Cys(*S*tBu) (**17**) へ還元的アミノ化により Et 基を導入し、(*N*-Et)Cys(*S*tBu) (**18**) とした。**18** のアミノ基は、2 級アミンであるため反応性が乏しく、続く固相上でのアシル化反応はしばしば困難である。¹⁶⁾ より反応性の高い液相合成ならば、比較的容易にアシル化できると考えられるため、Fmoc-Gly をあらかじめ縮合させたジペプチドユニットを樹脂へ導入することとした。すなわち、(*N*-Et)Cys(*S*tBu) (**18**) と Fmoc-Gly-OSu を HOObt 存在下加熱攪拌することでジペプチドユニット **19** を合成した。²²⁾ 得られた **19** は、樹脂への導入時に Cys のエピマー化が懸念されるため、セグメント縮合においてエピマー化を抑制できる HOObt を添加剤として用い NH₂-SAL-PEG resin に導入した。²³⁾ 得られた樹脂上に、ABI433A を用いて Fmoc 法にてペプチド鎖を順次伸張した。Fmoc 基の除去は 20% ピペリジン/NMP 溶液を用い、縮合反応は NMP 中 Fmoc アミノ酸/HCTU/6-Cl-HOBT/DIEA (4/4/4/8) の条件を用いて 30 分間行った。²⁴⁾ Fmoc-(Glc-Gal-)Hyl-Gly 誘導体 **11** の導入は、マニュアル合成機を用い **11**/DIC/HOAt/DIEA (1.5/2/2/4) の条件で行った。Gly をスペーサーに持つ **11** の導入は良好な収率で進行した。なお、ジペプチドユニットの代わりに、Fmoc-(Glc-Gal-)Hyl 誘導体 **10** を直接縮合させる試みは、予想通り HATU などの活性の高い縮合剤を用いても低収率であった。得られた保護ペプチド樹脂を TFA 処理することで (Glc-Gal-)Hyl の糖鎖 Bzl 基、側鎖アミノ基の Cbz 基、(*N*-Et)Cys の *S*tBu 基を除く保護基の除去と脱樹脂を行った。得られた Bzl、Cbz 体は、疎水性の高さから HPLC での分析、精製が難しく、続くチオエステル法を行うことは困難であった。そのため、Bzl、Cbz 基を除去した後、再度 Hyl の側鎖アミノ基に保護基を導入してチオエステル法を行うこととした。すなわち、*N* 末端を Fmoc 基で保護したペプチドを樹脂から切り出し、TFA 中 *p*-クレゾール、ジメチルスルフィド (DMS) 存在下 TFMSA を用いて Bzl、Cbz 基の除去を行い **21** を得た。²⁵⁾ その後、側鎖アミノ基を Boc-OSu により再 Boc 化、次いで 20% ジエチルアミン (DEA)/NMP により Fmoc 基の除去を行い **22** を得ることができた (Scheme 7)。

セグメント **IV** は、Fmoc-Gly-Wang-PEG resin (**23**) を原料とし、セグメント **III** と同様の手法で得られた (Scheme 8)。

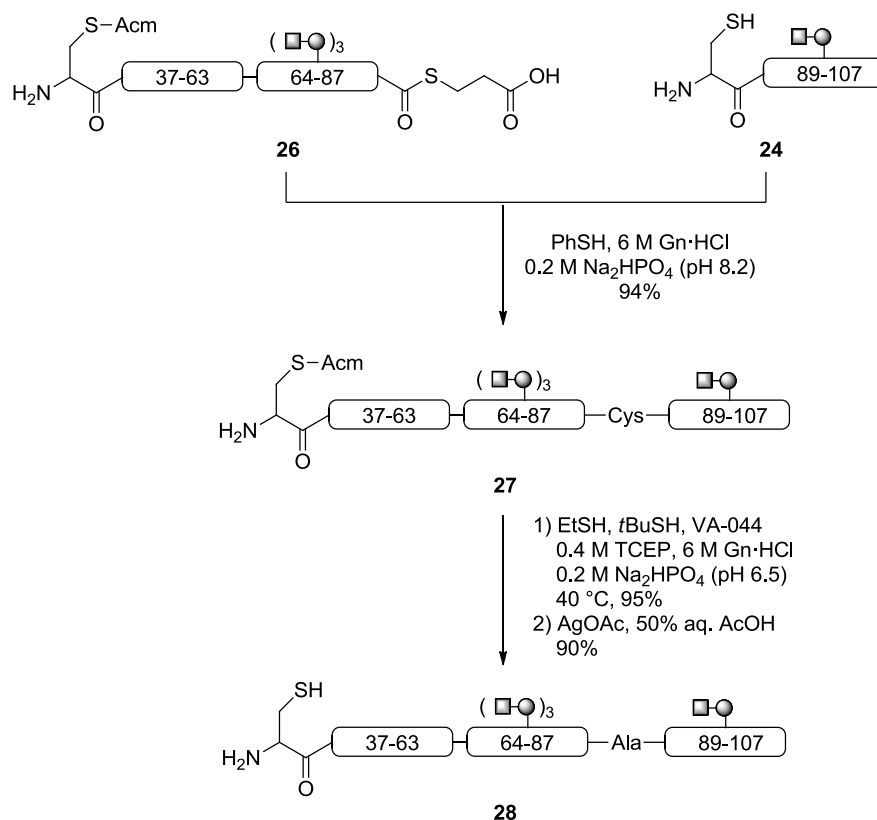
第五節 Human adiponectin (19-107) の合成

得られた [Boc-Cys(Acm)³⁶](36-63)-SR (**16**) と [(Glc-Gal-)Hyl(N^E-Boc)^{65,68,77}](64-87)-(N-Et)Cys(S*t*Bu)-NH₂ (**22**) のチオエステル法による縮合を行った。すなわち、両セグメントを DMSO に溶解し、AgCl、HOObt、DIEA を加えることで反応は速やかに進行し 90% の収率で目的物が得られた。その後、TFA により Boc 基の除去を行い **25** を得た。次いで、S*t*Bu 基をジチオトレイトール (DTT) により除去した後、20% aq. メルカプトプロピオン酸 (MPA) 中反応を行うことで N-S アシル転位と続くチオエステル交換反応を経て MPA エステル **26** を得た (Scheme 9)。¹⁶⁾ N 末端 Cys の保護基には当初チアゾリジン (Thz) を用いて合成していた。Thz は酸、塩基に安定で、MeONH₂ を用いた特定の条件において Cys へと変換可能であることから、²⁶⁾ 多成分の NCL を行う際には第一選択となる保護基である。しかし、MPA を用いたチオエステルへの変換反応の際、一部 Thz が分解し Cys へと変換される副反応が観測された。この反応を回避するため、**16** の N 末端 Cys の保護基には Acm 基を用いることとした。



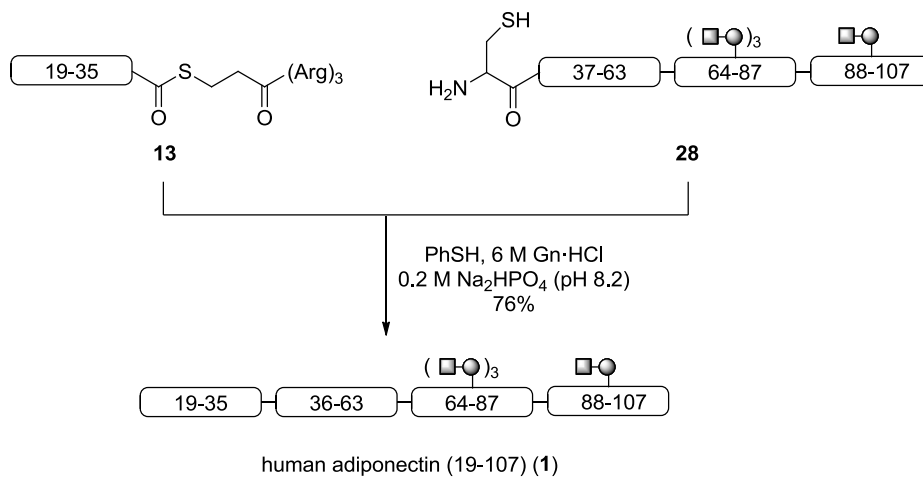
Scheme 9. Synthesis of [Cys(Acm)³⁶](36-87)-SR (**26**).

得られた MPA エステル **26** と [Cys⁸⁸](88-107) (**24**) を pH 8.2 のリン酸緩衝液中 PhSH を添加剤とした NCL によって縮合し **27** を得た。**27** を 0.5 M TCEP を含む pH 6.5 のリン酸緩衝液中、VA-044、EtSH、*t*BuSH を加えて脱硫反応を行い、NCL サイトの Cys⁸⁸ を Ala⁸⁸ へと変換した。^{11b)} その後、Acm 基を AgOAc を用いて脱保護することで **28** を得た (Scheme 10)。



Scheme 10. Synthesis of (36-107) (**28**).

得られた **28** と (19-35)-SR (**13**) を pH 8.2 のリン酸緩衝液中、PhSH を添加剤とした NCL にて縮合し、カラム精製することで human adiponectin (19-107) (**1**) の合成を達成した (Scheme 11)。Human adiponectin (19-107) (**1**) は、HPLC 分析にて単一ピークであり、質量値も理論値とよく一致した (Figure 3)。



Scheme 11. Synthesis of human adiponectin (19-107) (**1**).

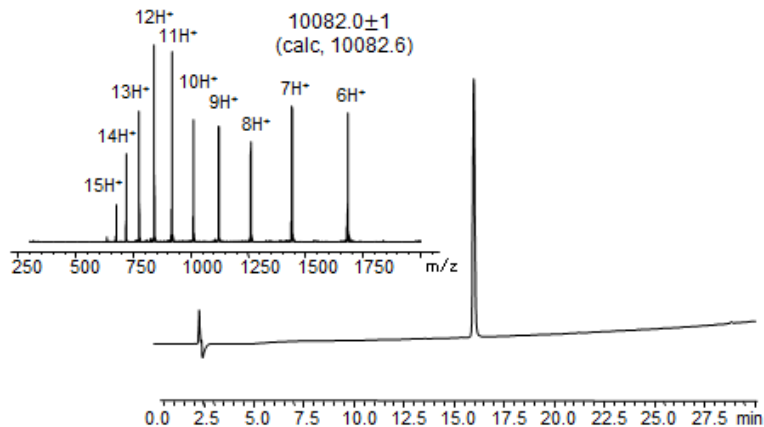


Figure 3. RP-HPLC and ESI MS analyses of purified human adiponectin (19-107) (**1**).

HPLC conditions: column, YMC-Pak ODS (4.6 x 150 mm); elution, 10–60% CH₃CN in 0.1% TFA (25 min) at 40 °C; detection, 220 nm.

第六節 小括

Adiponectin の合成において最も重要となるグリコシル化 Hyl をグリシンとのジペプチドユニット“(Glc-Gal)-Hyl-Gly” とすることで、樹脂への導入を容易とし、効率的にセグメントを得ることに成功した。得られたセグメントをチオエステル法、NCL-脱硫反応、NCL を駆使することで、コラーゲンドメインと可変性領域を含む human adiponectin (19-107) (**1**) の化学合成を達成した。部分配列ではあるが、グリコシル化により翻訳後修飾された adiponectin の合成は世界初の成果である。今後、adiponectin の多量体形成における糖鎖の影響を確認するとともに、シグナルペプチドを除く全配列 human adiponectin (19-244) の合成に取り組む予定である。

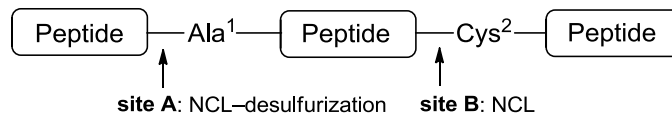
第二章 無保護ペプチドの Cys 残基選択的保護基導入法の開発と段階的 NCL への応用

第一節 緒言

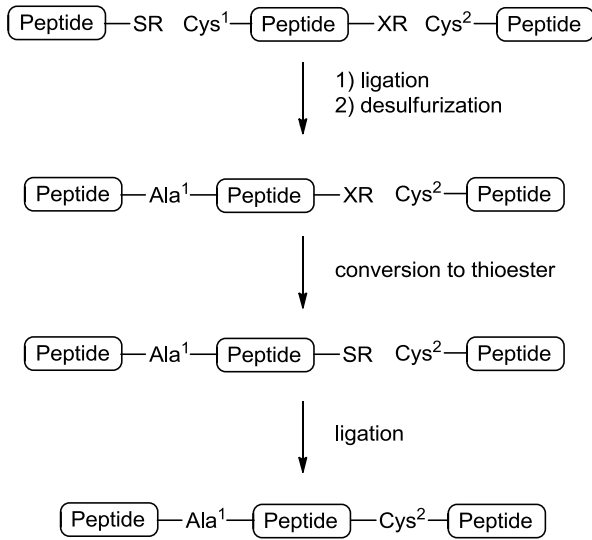
NCL-脱硫反応について

NCL と続く脱硫反応を利用したセグメント縮合法は、前章における adiponectin の合成でも利用したように、長鎖ペプチドの合成において極めて有用な手法である。Adiponectin 合成時には、Cys を Ala へと変換する脱硫反応を利用することでセグメント縮合を行ったが、他にも Phe、Lys、Asp など種々のアミノ酸にスルフヒドリル基を導入し、NCL 後に脱硫反応を行うことで天然型へと変換する手法が多数報告されている。²⁷⁾ 脱硫反応を行う際には、望むスルフヒドリル基のみを選択的に反応させるため、他のスルフヒドリル基は保護しなければならない。すなわち、所望の配列中に Cys を含む際には、脱硫反応中、その Cys は保護されている必要がある。しかし、無保護ペプチド中の Cys 残基選択的に保護基を導入する手法は確立されていないため、脱硫してはならない Cys は、セグメント合成時から保護基を導入しておく必要があった。側鎖保護 Cys は NCL に利用できないため、長鎖ペプチドの合成時など、NCL-脱硫反応を利用し多成分を縮合する際には、その結合順に制約を受けてしまう。例えば Figure 4 に示すように、標的ペプチドを 3 成分に分け、Ala¹ (site A) を NCL-脱硫反応で Cys² (site B) を NCL を用いて縮合する際、Cys² が脱硫反応に共存できないことから、site B での NCL よりも先に site A での NCL-脱硫反応を行わなければならない (route A)。この手法では、site A での NCL-脱硫反応を行った後に、得られたペプチドの C 末端をチオエステルへと変換するため、中央セグメントには調製に手間のかかるチオエステル前駆体を導入し、収率低下の原因となるチオエステルへの変換反応が必要となる。仮に、無保護ペプチド中の Cys 残基を選択的に保護できれば、site B での NCL 後に反応点の Cys を保護することで、続く site A での NCL-脱硫反応が可能となる (route B)。これにより、C 末端セグメントから順次縮合する、チオエステル前駆体を必要としない、より効率的な合成ルートを設定できるようになる。そこで、今回著者は、無保護ペプチド中の Cys 残基選択的保護基導入反応の開発を行った。

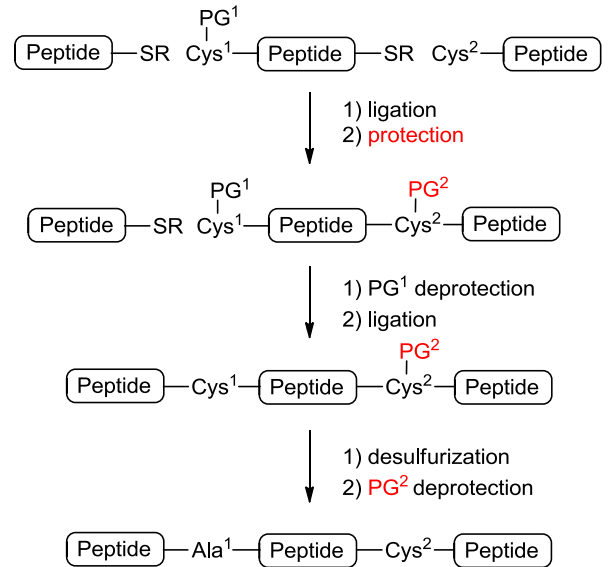
Target peptide



route A



route B



-SR : thioester, -XR : thioester surrogate

PG : protecting group

Figure 4. Convergent synthetic strategy of a model peptide.

Cys 残基選択的修飾反応について

無保護のタンパク質やペプチドへの Cys 残基選択的な化学修飾法は、蛍光団導入などのためによく研究されており、マレイミドへの Michael 付加や、ヨード酢酸への S_N2 反応など種々の方法が開発されている (Figure 5)。²⁸⁾

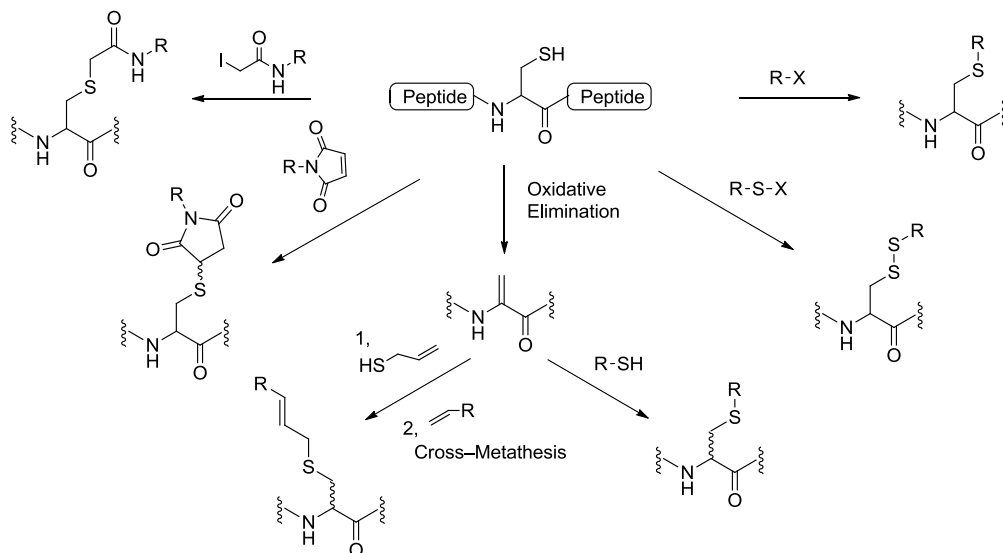
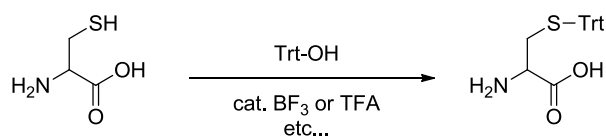


Figure 5. Chemical modifications of cysteine.

しかし、Cys 残基選択的に保護基を導入する方法としては、ほとんど報告されていない。これまでに報告された中では、塩基性条件下におけるアルキルハライドとの反応によるベンジル基などの導入があるが、²⁹⁾ この条件ではアルキルハライドがアミノ基や他の官能基とも反応してしまうため現実的ではなかった。

今回著者は、Trt-OH から生じた Trt カチオンをスルフヒドリル基と反応させることで、選択的な Trt 基の導入を試みることにした。例えば、H-Cys(Trt)-OH は、酸性条件下 H-Cys-OH と Trt-OH とを用いて合成される (Scheme 12)。³⁰⁾ この際、アミノ基、カルボキシル基は反応しないことから、Trt カチオンとの反応であれば、無保護ペプチド中の Cys 残基選択的な Trt 化が可能であると考えた。無保護ペプチド中の Cys 残基を TFA 中 Trt 化している報告もあるが、³¹⁾ 各種官能基に対する選択性や反応条件に関しては精査されておらず、実用的な手法には至っていない。本研究で著者は、ペプチドを HFIP 中にて Trt-OH と反応させることで、効率よく Cys 残基選択的に Trt 基を導入できることを見いだした。また、本手法を用いた rat CNP-53 (35) の合成では、NCL-脱硫反応を用いた多成分の縮合反応において新たな合成戦略を提唱することに成功した。

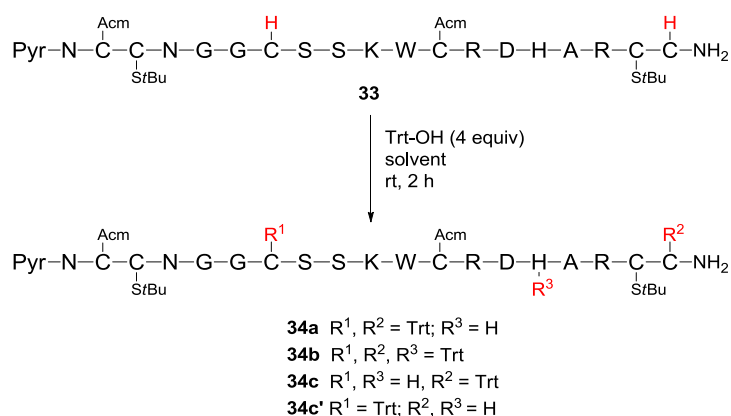


Scheme 12. Selective tritylation of sulfhydryl group.

で反応させた結果、Fmoc-His(*N*^ε-Trt) の生成を認めたことから、この副生成物は Cys 側鎖に加えて、His 側鎖のイミダゾールの τ 位が Trt 化されたものと推測した。His(Trt) 体は、TFA 処理により容易に Trt 基の除去が行えるため本質的な問題とはならないが、収率の低下や反応追跡の複雑化を招くとも考えられる。そのため、His 存在下でも適用可能な条件の探索を行った。

His の Trt 体が副生した原因は、HFIP の酸性度が低く、生成した His(Trt) がある程度安定に存在できたためだと考えた。配列中に His を含む [Cys(Acm)^{3,13}, Cys(*S*tBu)^{4,19}, Cys^{8,20}]μ-SIIIA (**33**) (本化合物の詳細は、第三章第三節に記載する) を基質に用いて、HFIP に TFA を加え酸性度を高めた溶媒中での Trt 化反応を試みた (Table 4, entry 2)。本条件では His(Trt) は産生しなかったものの、酸性度が高まりすぎたために Cys(Trt) の分解反応も亢進し、Cys への Trt 化が完了しなかった。酸性度を調整するために、50% AcOH を加えた条件にて Trt 化を実施したところ、反応は完結し、また、His(Trt) 体も確認されなかった (entry 3)。以上の結果から、His を含まない配列では HFIP を、His を含む配列では 2% TFA を含む 50% HFIP/AcOH を溶媒に用いることで、Cys 残基選択的に Trt 基を導入できることを明らかにできた。

Table 4. Tritylation of His-containing model peptide, [Cys(Acm)^{3,13}, Cys(*S*tBu)^{4,19}, Cys^{8,20}]μ-SIIIA (**33**).



entry	solvent	34a (%) ^a	34b (%)	34c + 34c' (%)	33 (%)
1	HFIP	93	5.0	1.7	-
2	1% TFA/HFIP	9.4	-	37	54
3	2% TFA in 50% HFIP/AcOH	98	0.4	1.1	-

^aYields were determined by RP-HPLC (220 nm).

第三節 Cys 残基選択的 Trt 化反応を利用した rat CNP-53 の合成戦略

本手法の有用性を確認すべくモデルペプチドとして、rat CNP-53 (**35**) の合成を行うこととした。rat CNP-53 (**35**) は、53 残基のアミノ酸から構成され、血圧や体液量の恒常性維持、循環器や骨形成制御などに関わるペプチドである。³⁴⁾ 53 残基のペプチドを (1-21) **I**、(22-36) **II**、(37-53) **III** の 3 つのセグメントに分割し、Asn²¹-Ala²²(site A) を NCL-脱硫反応で、Gly³⁶-Cys³⁷(site B) を NCL により縮合することとした。従来の合成法では、Cys²² から Ala²² へと選択的に脱硫反応を行うため、site B での NCL よりも先に site A での NCL-脱硫反応を行う必要がある。一方、本 Trt 化反応を用いれば、site B での NCL 後に反応点の Cys を Trt 保護することで、続く site A での NCL-脱硫反応が行え、C 末端から順次縮合することが可能となる (Figure 7)。

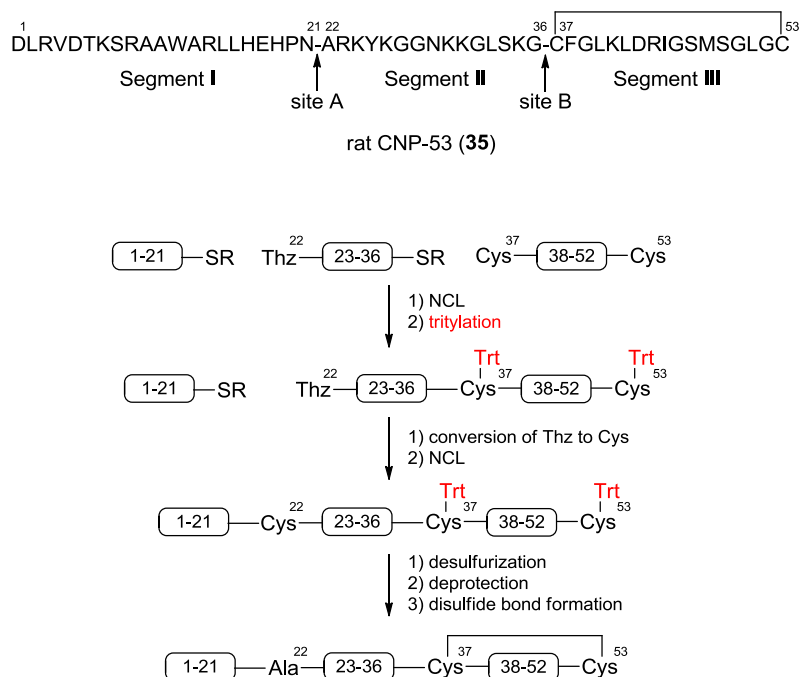
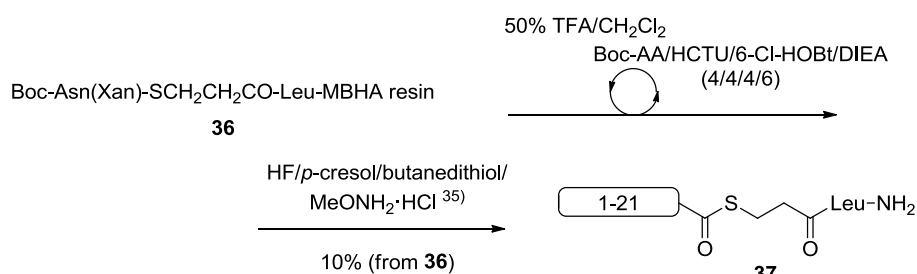


Figure 7. Synthetic strategy of rat CNP-53 (**35**).

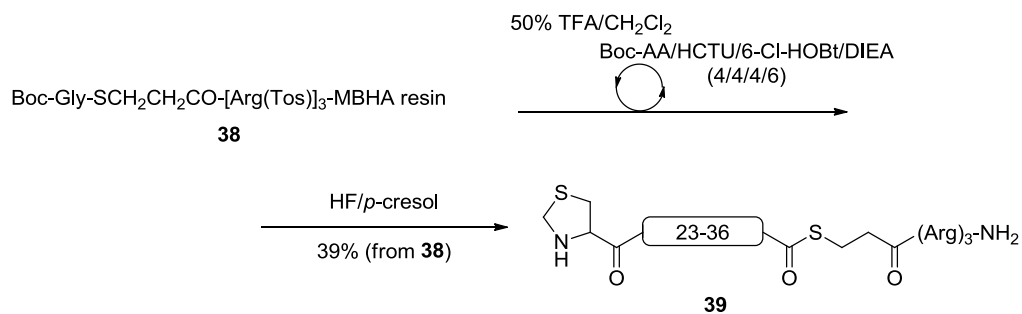
第四節 rat CNP-53 の合成

セグメント **I**、**II**、**III** をそれぞれ、Boc-Asn(Xan)-SCH₂CH₂CO-Leu-MBHA resin (**36**)、Boc-Gly-SCH₂CH₂CO-[Arg(Tos)]₃-MBHA resin (**38**)、Boc-Cys(Meb)-PAM resin (**40**) を原料として Boc 固相合成法によりペプチド鎖を構築した。得られた保護ペプチド樹脂を無水 HF 処理により脱樹脂・脱保護し、(1-21)-SR (**37**) を 10%、[Thz²²](22-36)-SR (**39**) を 39%、(37-53) (**41**) を 31% の収率でそれぞれ得た (Scheme 13)。

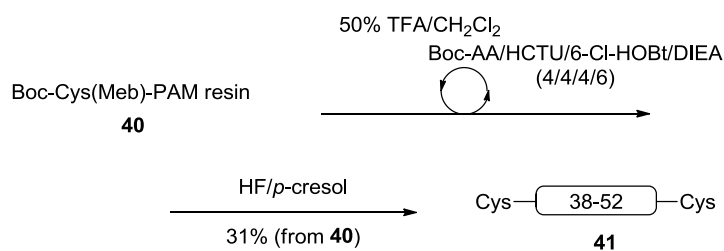
Segment I



Segment II

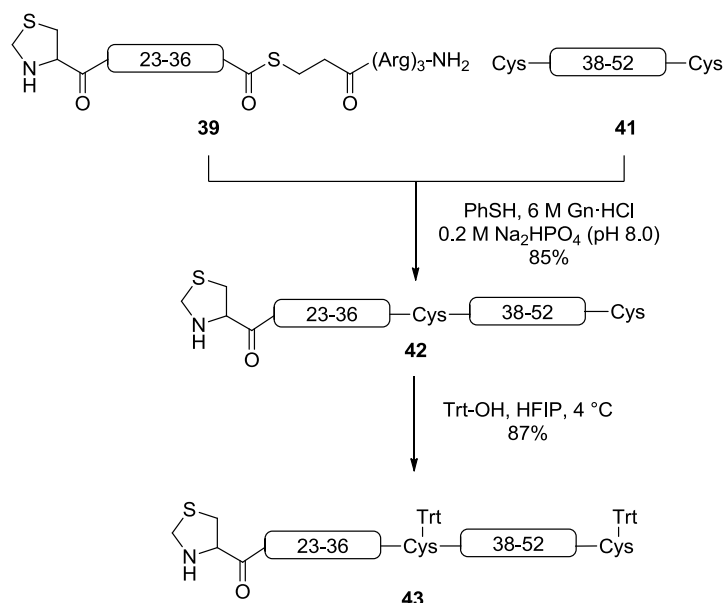


Segment III



Scheme 13. Synthesis of rat CNP-53 segments.

得られた [Thz²²](22-36)-SR (**39**) と (37-53) (**41**) を pH 8.0 のリン酸緩衝液中 PhSH を添加剤とした NCL にて縮合し、[Thz²²](22-53) (**42**) を得た。次いで、**42** の Trt 化を試みた。**42** は配列中に His を含まないため、HFIP を溶媒に 4 当量の Trt-OH を用いて反応を行った。反応はスムーズに進行したが、室温では、Thz²² が Cys(Trt)²² となった副生物が約 6% 確認された。各種検討の結果、この副反応を完全に抑制することはできなかったが、氷冷下反応を行うことで 2% まで抑制可能であった。反応終了後、反応液にジイソプロピルエーテルを加えて固化させることで、[Thz²², Cys(Trt)^{37,53}](22-53) (**43**) を収率 87% で得ることができた (Scheme 14, Figure 8)。本反応は、副反応が少ないことから、カラム精製を必要とせず高純度の目的物を得ることが可能であった。



Scheme 14. Synthesis of [Thz²², Cys(Trt)^{37,53}](22-53) (**43**).

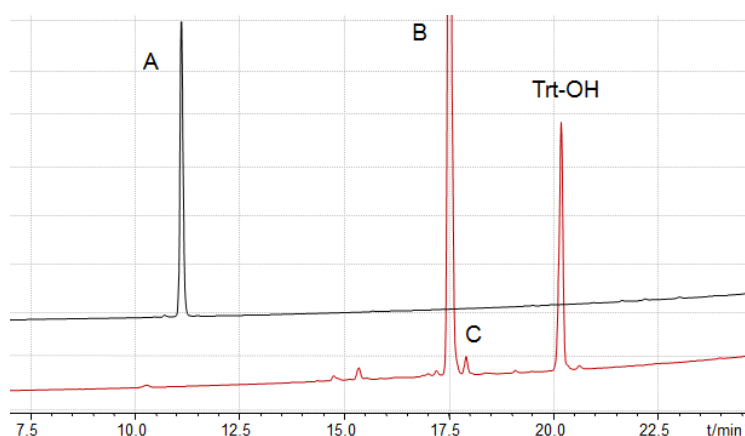
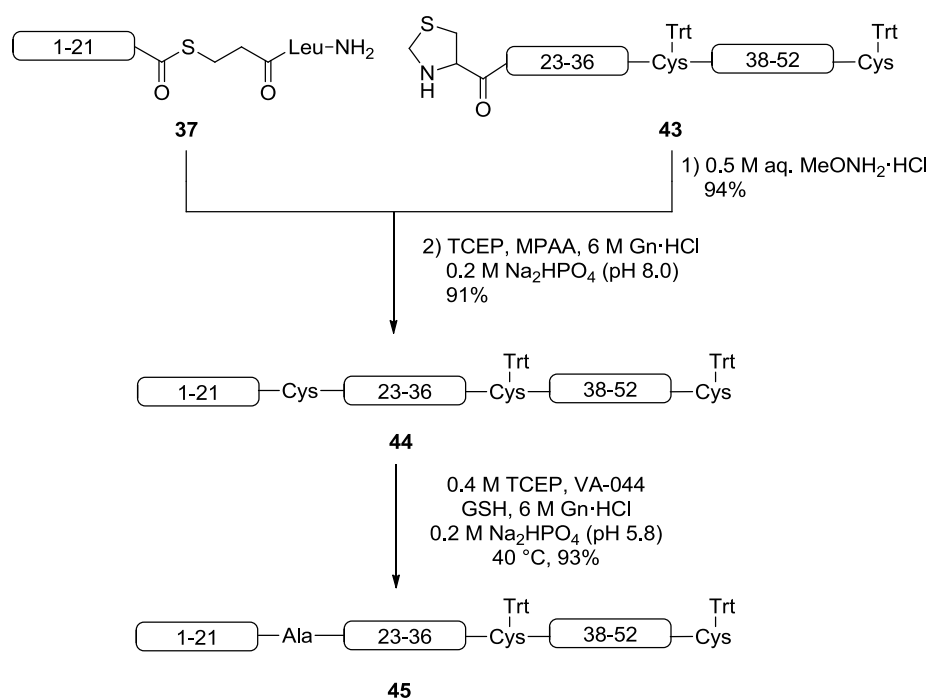


Figure 8. Tritylation of [Thz²²](22-53) (**42**) in HFIP.

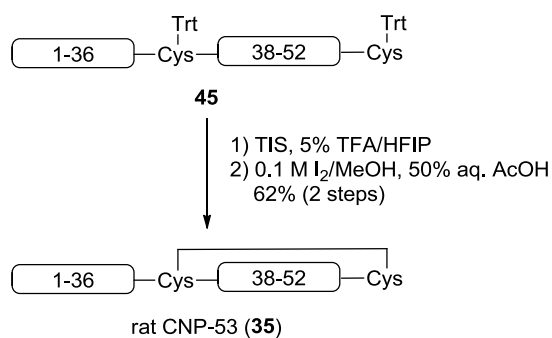
A) [Thz²²](22-53) (**42**). B) [Thz²², Cys(Trt)^{37,53}](22-53) (**43**). C) [Cys(Trt)^{22,37,53}](22-53). HPLC conditions: column, YMC-Pak ODS (4.6 x 150mm); elution, 10–80% CH₃CN in 0.1% TFA (25 min) at 40 °C; detection, 220 nm.

続いて、Trt 体 **43** の Thz²² を MeONH₂ により Cys²² へと変換した。²⁶⁾ その後、(1-21)-SR (**37**) と pH 8.0 のリン酸緩衝液中 30 mM TCEP、20 mM MPAA を添加剤とした NCL を行い [Cys²², Cys(Trt)^{37,53}](1-53) (**44**) を得た。得られた **44** を 0.4 M の TCEP を含む pH 5.8 のリン酸緩衝液中、VA-044 と GSH を用いて Ala へと変換し、³⁶⁾ 収率 93% で [Cys(Trt)^{37,53}](1-53) (**45**) を得た。これにより、Trt 基が脱硫反応時における Cys の保護基として利用できることを明らかにできた (Scheme 15)。



Scheme 15. Synthesis of [Cys(Trt)^{37,53}](1-53) (**45**).

最後に、TIS 存在下 5% TFA/HFIP 中、**45** の Trt 基を除去し、反応液を AcOH、H₂O で希釈した後、I₂/MeOH を滴下することでジスルフィド結合を形成し、rat CNP-53 (**35**) の合成を達成した (Scheme 16, Figure 9)。



Scheme 16. Synthesis of rat CNP-53 (**35**).

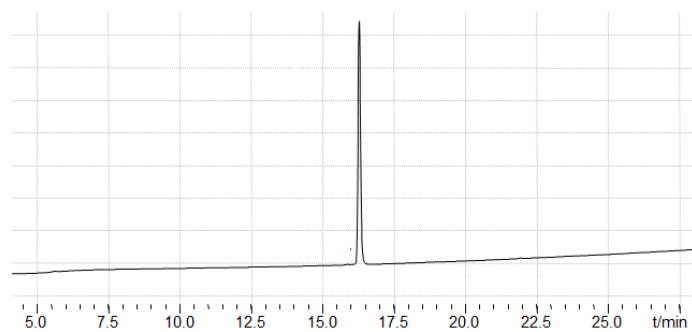


Figure 9. RP-HPLC analysis of synthetic rat CNP-53 (**35**).

HPLC conditions: column, YMC-Pak ODS (4.6 x 150mm); 1–60% CH₃CN in 0.1% TFA (25 min) at 40 °C; detection, 220 nm.

第五節 小括

無保護ペプチド中の Cys 残基選択的な保護基導入法について検討を行い、Trt-OH 存在下 HFIP 中で、高収率で Cys 残基選択的に Trt 基を導入できることを発見した。副反応として His への Trt 化が確認されたが、溶媒を HFIP から 2% TFA を含む 50% HFIP/AcOH へと変更することで、この副反応を抑制できることも見いだした。本手法を利用した NCL と NCL-脱硫反応を用いた rat CNP-53 (35) の合成では、NCL 後の反応点の Cys を Trt 化して脱硫反応と共存可能とすることで、C 末端から順次縮合する新たな合成戦略の開発に成功した。本手法は、位置選択的ジスルフィド結合形成反応への利用 (第三章に記載) や、しばしば脱保護が問題となる Thz や Acm 基の代替としての Trt 基の利用など、種々の合成へと応用可能であり、ペプチド合成における有用なツールになると期待される。

第三章 位置選択的ジスルフィド結合形成反応の検討


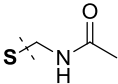
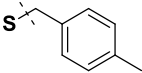
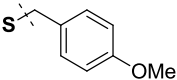
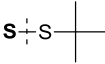

第一節 緒言

ジスルフィド結合形成反応について

タンパク質やペプチドのジスルフィド結合は構造安定化に重要な役割を担っており、³⁷⁾ 複数のジスルフィド結合を持つタンパク質やペプチドでは、ジスルフィド結合の架橋様式がその活性に強い影響を与えることが知られている。³⁸⁾ そのため、複数のジスルフィド結合を有するペプチドを化学合成する際には、正確な位置でジスルフィド結合を形成することが重要である。現在汎用されているジスルフィド結合の形成方法は、還元型のペプチドをグルタチオン (GSH) と酸化型グルタチオン (GSSG) 等を用いた酸化還元系における平衡反応にて、熱力学的に安定な天然型の架橋様式へと収束させる方法である。³⁹⁾ 一般に、天然型の架橋様式は熱力学的に安定と考えられるが、前駆体ペプチドの段階でジスルフィド結合を構築するペプチドに関しては、プロセッシング後も天然型の架橋様式が安定だとは限らない。そのため、酸化還元系を用いた手法では、合成の難しいケースもしばしばみられる。⁴⁰⁾ また、非天然型の架橋様式を有するペプチドは熱力学的に不安定なため合成できない。さらに、酸化還元系を用いて合成したペプチドの架橋様式を確定するためには、酵素消化などの断片化による解析や、NMR などによる構造解析が必要となる。⁴¹⁾

一方、Cys の側鎖保護基を複数組み合わせ、選択的に脱保護と続くジスルフィド結合形成を繰り返し位置選択的に合成する方法は、合成に時間を要するが、目的とする架橋様式を確実に得ることができる。Fmoc 法における位置選択的ジスルフィド結合形成反応では、保護基として Trt、Acm、Meb、メトキシベンジル (Mob)、*S*tBu、*t*Bu 基が主に利用されている (Table 5)。⁴²⁾ これらの中で、2 組のジスルフィド結合を形成する際には Trt と Acm 基がよく用いられる。3 組のジスルフィド結合を有する場合、これらに加え様々な保護基が使われるが、Meb ないし Mob 基を用いることが多い。⁴³⁾ 4 組のジスルフィド結合の形成は保護基の組み合わせが難しく、Trt、Acm、Meb に加え、*t*Bu⁴⁴⁾ ないし、4,4'-ジメチルスルフィニルベンズヒドリル (Msbh) 基⁴⁵⁾ を利用した 2 例しか報告されていない。これらの方法のうち、*t*Bu 基を用いた方法では、*t*Bu 基の脱保護に TFA/DMSO^{44, 46)} やシリルクロライドスルホキシド⁴⁷⁾ などの強い条件が必要で、副反応が多く低収率となることが多い。Msbh 基を用いた方法では、Fmoc-Cys(Msbh) の合成が必要であることに加え、Msbh 基の脱保護時に Trp 残基が副反応を起こしてしまう。そのため、4 組のジスルフィド結合を位置選択的に形成する手法は依然として確立されていない。そこで、今回著者は Trp 残基を含むペプチドにも適応可能な 4 組のジスルフィド結合の構築方法について検討を行い、Trt、Acm、Meb 基に加え、4 組目の保護基として *S*tBu 基を用いる方法を確立することに成功した。

Table 5. Commonly-used cysteine protecting groups.

protecting group	structure	stable to	removal conditions
trityl (Trt)		base	1% TFA I ₂
acetamidomethyl (Acm)		base TFA, HF	I ₂ Hg, Ag
4-methylbenzyl (Meb)		base TFA	HF
4-methoxybenzyl (Mob)		base TFA	HF TFMSA
<i>t</i> -butylsulfenyl (<i>S</i> tBu)		TFA HF	reducing reagents thiols
<i>t</i> -butyl (<i>t</i> Bu)		base TFA	5% TFA/DMSO 25 °C HF 20 °C silyl chloride-sulfoxide

第二節 *S*tBu 基を利用した位置選択的ジスルフィド結合形成反応について

*S*tBu 基は、DTT やトリアルキルホスフィンなど還元剤によって除去可能な保護基である。そのため、*S*tBu 基を位置選択的ジスルフィド結合形成反応に用いる際には、ジスルフィド結合の還元や組み替えを防ぐため、1 組目にジスルフィド結合を形成する Cys の保護基に用いなければならない。また、大抵の場合において *S*tBu 基は Trt 基と併用されているため、*S*tBu 基の脱保護と続くジスルフィド結合の形成は、TFA による最終脱保護前、すなわち、固相上で行われている。しかし、固相上での *S*tBu 基の脱保護は、立体障害のために反応効率が悪く、⁴⁸⁾ 続くジスルフィド結合の形成を複雑化するため、得られる成績体は低純度、低収率となることが多い。そのため、*S*tBu 基を実用的にジスルフィド結合形成反応へと利用することは難しいと考えられてきた。しかし、*S*tBu 基の脱保護と続くジスルフィド結合の形成を固相上ではなく液相にて行うことができれば、反応性の問題が解決されるため実用的な利用が可能となる。また、*S*tBu 基は、Acm、Trt、Meb 基とはオルソゴナルな保護基であることから、これら保護基と組み合わせることで位置選択的ジスルフィド結合形成反応における 4 組目の保護基として利用することが可能である。*S*tBu 基の脱保護を液相で行うためには、Cys の側鎖保護基に Acm、Trt、Meb、*S*tBu 基を持つペプチドを単離する必要がある。Fmoc 法にて用いられる一般的な最終脱保護の TFA 条件では、Acm、Meb、*S*tBu 基は保持できても、Trt 基を保持することはできない。そのため、TFA 処理後も Trt 基を保持させる方法が必要となる。その方法としては 2 通り考えられる。すなわち、1) 前章にて開発した Trt 化反応を用い、TFA 処理後再度 Trt 化する方法 (Figure 10, route A) と 2) Stathopoulos らにより報告された、TFA 処理における添加剤に TIS ではなく、ジメトキシベンゼン (DMB) を用いる方法である (route B)。⁴⁵⁾ 後者の方法は、Trt カチオンがその立体障害のために DMB と反応しないことを利用している。今回著者は、*S*tBu 基を利用した 4 組のジスルフィド結合を位置選択的に形成する手法の確立を目指し検討を行った。

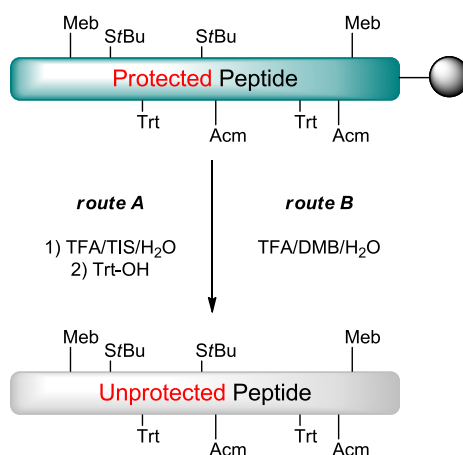


Figure 10. Preparation of Cys(Trt)-containing peptide by Fmoc SPPS.

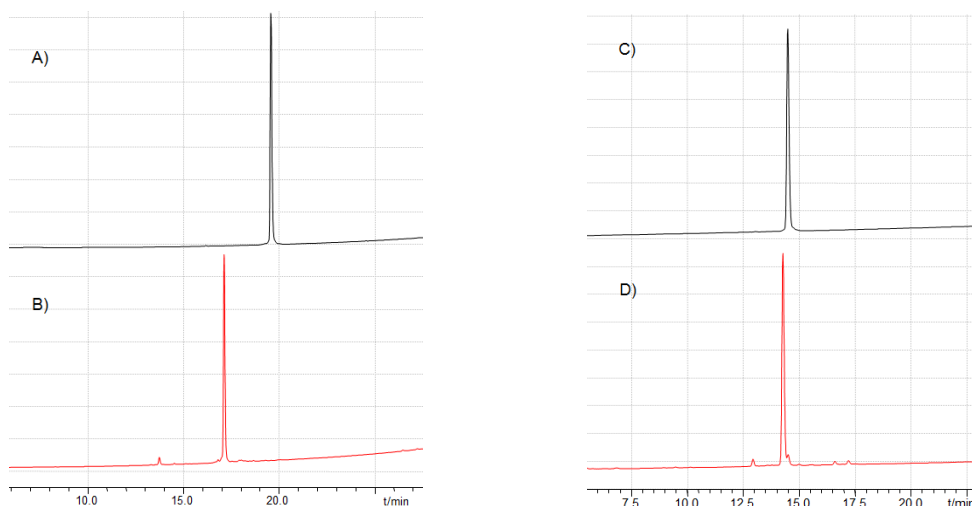
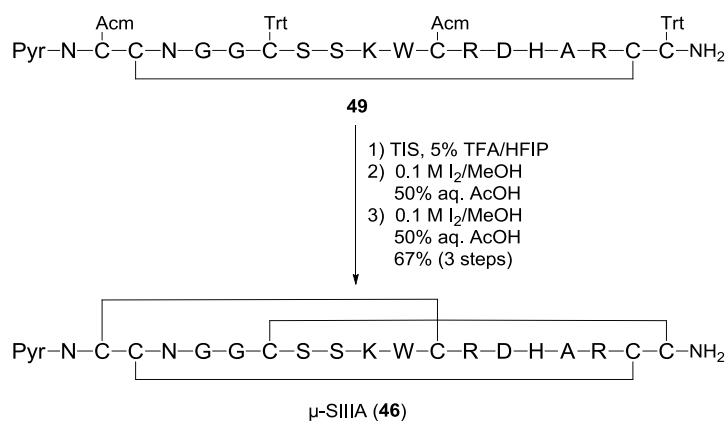


Figure 12. Deprotection of *SiBu* groups followed by disulfide bond formation of Cys⁴–Cys¹⁹.

A) [Cys(Acm)^{3,13}, Cys(*SiBu*)^{4,19}, Cys(Trt)^{8,20}]μ-SIIIA (**34a**). B) Reaction mixture of deprotection of *SiBu* groups. C) [Cys(Acm)^{3,13}, Cys^{4,19}, Cys(Trt)^{8,20}]μ-SIIIA. D) Reaction mixture of disulfide bond formation of Cys⁴–Cys¹⁹. HPLC conditions: column, YMC-Pak ODS (4.6 x 150mm); elution, 10–80% or 30–60% CH₃CN in 0.1% TFA (25 min) at 40 °C; detection, 220 nm.

次いで、Cys^{8,20} と Cys^{3,13} のジスルフィド結合をワンポットで形成し μ-SIIIA (**46**) へと導いた。すなわち、Trt 基を TIS 存在下 5% TFA/HFIP を用いて除去した後、反応液を AcOH と H₂O により希釈し、I₂/MeOH (1.1 当量) を滴下することで 2 組目のジスルフィド結合を形成した。さらに過剰量の I₂/MeOH (15 当量) を加えることで、Acm 基の酸化的除去と同時に 3 組目のジスルフィド結合を形成した (Scheme 19, Figure 13)。



Scheme 19. Synthesis of μ-SIIIA (**46**).

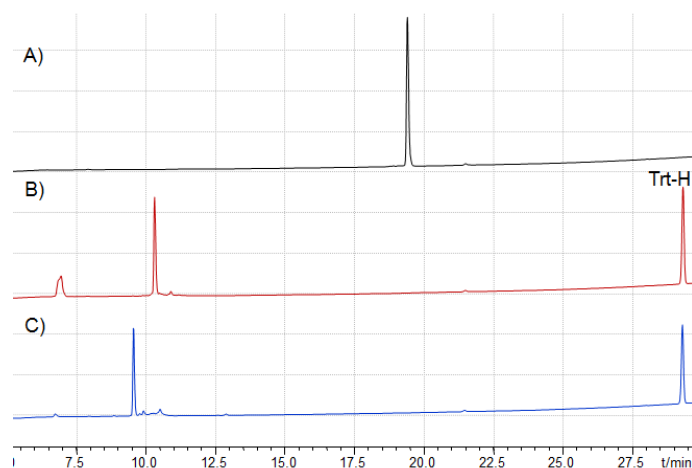


Figure 13. HPLC profile of the stepwise formation of disulfide bonds in the μ -SIIIA molecule.

A) [Cys(Acm)^{3,13}, Cys⁴-Cys¹⁹, Cys(Trt)^{8,20}] μ -SIIIA (**49**). B) [Cys(Acm)^{3,13}, Cys⁴-Cys¹⁹, Cys⁸-Cys²⁰] μ -SIIIA. C) μ -SIIIA (**46**). HPLC conditions: column, YMC-Pak ODS (4.6 x 150mm); elution, 1–60–98% CH₃CN in 0.1% TFA (0–20–30 min) at 40 °C; detection, 220 nm.

得られた μ -SIIIA (**46**) は、GSH、GSSG を用いた酸化還元系にてジスルフィド結合を形成し、酵素消化を用いてジスルフィド結合の架橋様式を確認した標品と比較し HPLC の溶出時間が一致した (Figure 14)。⁵⁵⁾ 以上の結果から、*S*tBu 基が位置選択的ジスルフィド結合形成反応における有用な保護基となることを確認できた。また、*S*tBu 基の脱保護は、現在広く用いられている *M*eb 基の脱保護 (HF 処理) よりも容易に行えるため、Trt、Acm、*S*tBu 基を用いた 3 組のジスルフィド結合形成方法は、今後広く用いられることが期待される。

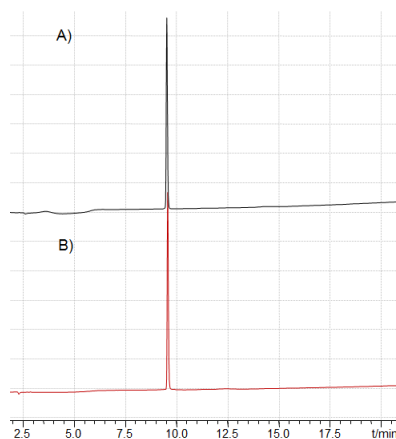
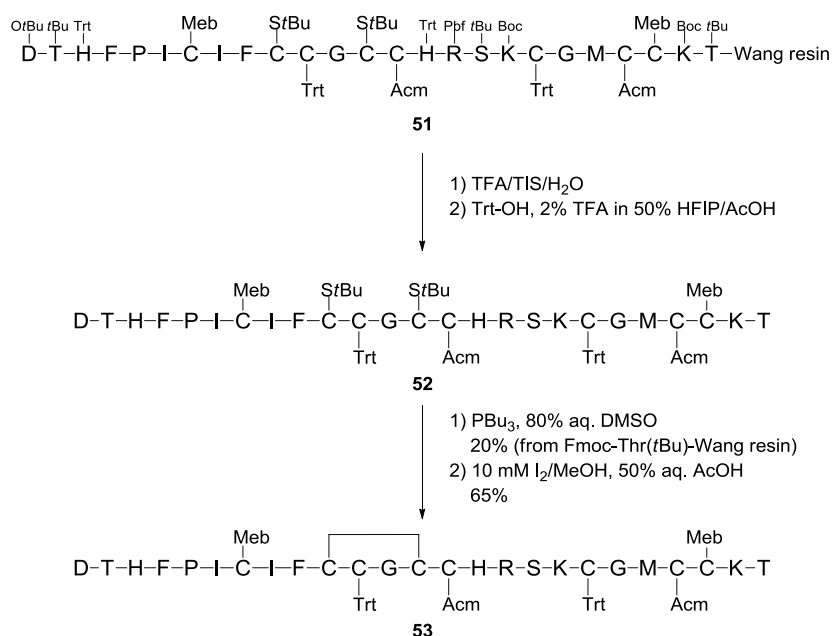


Figure 14. RP-HPLC profiles of the synthetic μ -SIIIA (**46**).

A) Site-selectively synthesized μ -SIIIA (**46**). B) μ -SIIIA obtained by the oxidative folding procedure. HPLC conditions: column, YMC-Pak ODS (4.6 x 150mm); elution, 1–60% CH₃CN in 0.1% TFA (25 min) at 40 °C; detection, 220 nm.

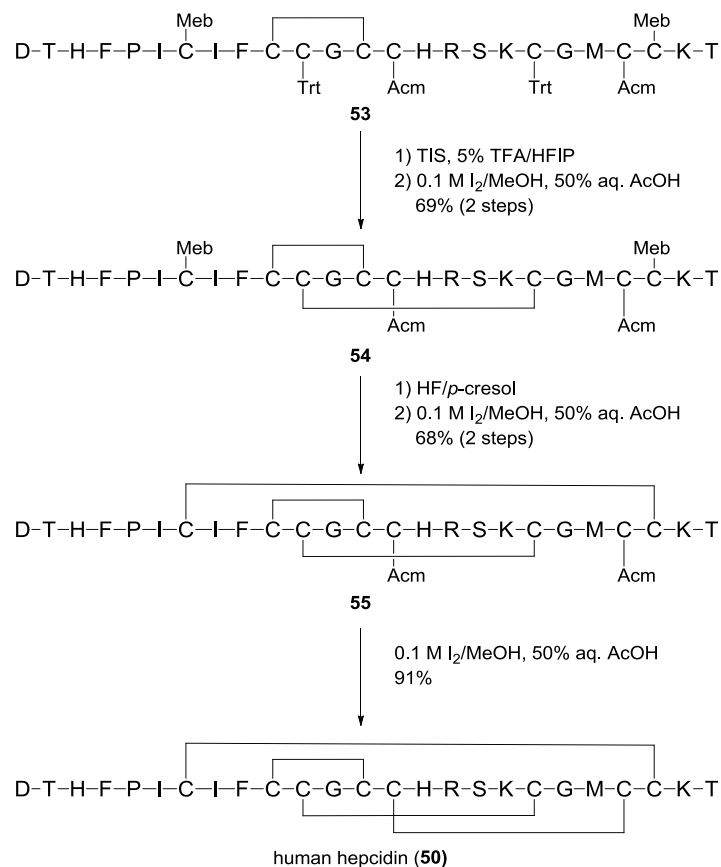
第四節 Human hepcidin の合成

位置選択的ジスルフィド結合形成反応における *S*tBu 基の有用性を確認できたため、Trt、Acm、Meb 基と組み合わせて、4 組のジスルフィド結合を持つ human hepcidin (**50**) の合成を行った。Human hepcidin は、25 残基のアミノ酸から構成され、鉄の恒常性維持に中心的な役割を担うペプチドである。⁵⁶ Fmoc-Thr(*t*Bu)-Wang resin を原料に、Fmoc 固相合成法にてペプチド鎖を構築した。縮合反応は、 μ -SILIA 同様エピマー化しやすい Cys が配列中に多いことから Fmoc アミノ酸/DIC/Oxyma Pure (4/4/4) の条件を用いた。Fmoc 基の除去は 20% ピペリジン/NMP 溶液を使用した。得られたペプチド樹脂 **51** を TFA/TIS/H₂O を用いて脱保護・脱樹脂し、[Cys(Meb)^{7,23}, Cys(*S*tBu)^{10,13}, Cys^{11,19}, Cys(Acm)^{14,22}]hepcidin を得た。Cys^{11,19} の Trt 化を行い **52** へと変換、PBU₃ を用いて *S*tBu 基の脱保護を行った後、I₂/MeOH により 1 組目のジスルフィド結合を形成し **53** を得た (Scheme 20)。



Scheme 20. Synthesis of [Cys(Meb)^{7,23}, Cys¹⁰-Cys¹³, Cys(Trt)^{11,19}, Cys(Acm)^{14,22}]hepcidin (**53**).

次いで、5% TFA/HFIP 中 TIS を用いて Trt 基を除去した後、AcOH、H₂O で希釈後 I₂/MeOH を滴下して 2 組目のジスルフィド結合を形成し **54** を得た。無水 HF 処理により Meb 基の脱保護を行い、I₂/MeOH により 3 組目のジスルフィド結合を形成し **55** へと変換した。最後に 50% aq. AcOH 中、過剰量の I₂/MeOH (15 当量) により Acm 基の酸化的除去と同時に 4 組目のジスルフィド結合を形成し、human hepcidin (**50**) の合成を達成した (Scheme 21)。得られた human hepcidin (**50**) は市販されている商品と HPLC の溶出時間が一致した (Figure 15)。



Scheme 21. Synthesis of human hepcidin (**50**).

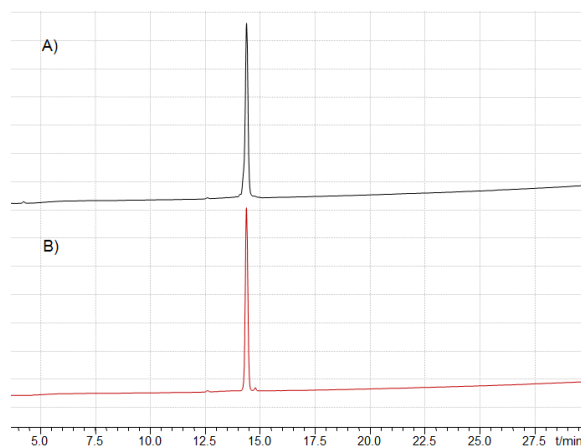


Figure 15. RP-HPLC profiles of the synthetic human hepcidin (**50**).

A) Site-selectively synthesized human hepcidin (**50**). B) Commercial human hepcidin (*Peptide International, PI4392s*). HPLC conditions: column, YMC-Pak ODS (4.6 x 150mm); elution, 1–60% CH₃CN in 0.1% TFA (25 min) at 50 °C; detection, 220 nm.

第五節 小括

保護ペプチド樹脂を TFA 処理により脱保護・脱樹脂した後に、再度 Trt 基を導入することで、*S*tBu 基の脱保護と続くジスルフィド結合形成反応を液相にて行うことを可能とした。これにより、*S*tBu 基を位置選択的ジスルフィド結合形成反応における実用的な保護基へと進化させることに成功した。*S*tBu 基を Trt、Acm 基と組み合わせることで 3 組のジスルフィド結合を持つ μ -SIII A (**46**) を、これらに加えて Meb 基を用いることで 4 組のジスルフィド結合を持つ human hepcidin (**50**) の合成を達成した。

本手法は Trp 含有ペプチドにも適応可能であることに加え、Cys の側鎖保護基に Trt、Acm、Meb、*S*tBu 基を持つ保護アミノ酸ユニットは市販品として購入可能であることから、複数のジスルフィド結合を持つペプチド、タンパク質の合成に広く利用されると期待される。

結論及び結語

第一章では、アディポサイトカインの一種である adiponectin の機能解明に向け、Lys 残基がヒドロキシ化とグリコシル化により (Glc-Gal-)Hyl (**2**) に、Pro 残基がヒドロキシ化により Hyp (**3**) へと翻訳後修飾された human adiponectin (19-107) (**1**) の合成を行った (Figure 16)。鍵となる (Glc-Gal-)Hyl の導入反応は、Gly をスペーサーとしたジペプチドユニット “Fmoc-(Glc-Gal-)Hyl-Gly” を用いることで効率的に進行した。得られたセグメントを、チオエステル法 (セグメント **II+III**)、NCL-脱硫反応 (セグメント **[II+III]+IV**)、NCL (セグメント **I+[II+III+IV]**) を用いて縮合し、human adiponectin (19-107) (**1**) の合成を達成した。部分配列ではあるが、翻訳後修飾された adiponectin の合成は世界初の成果である。

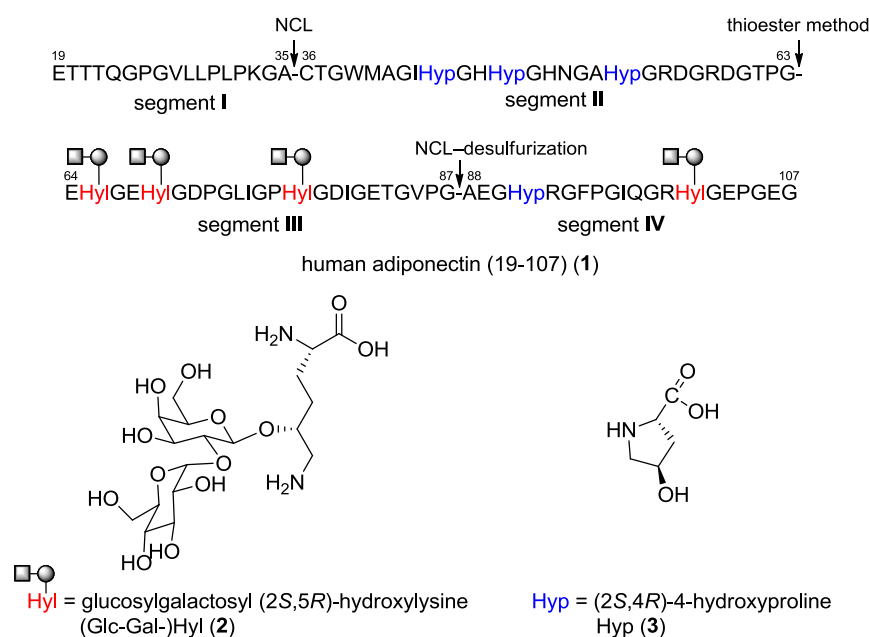
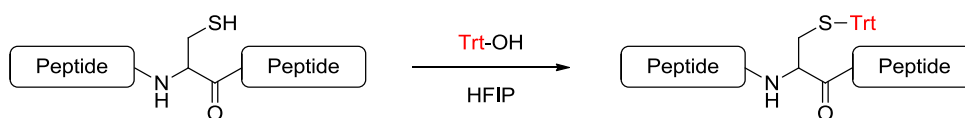


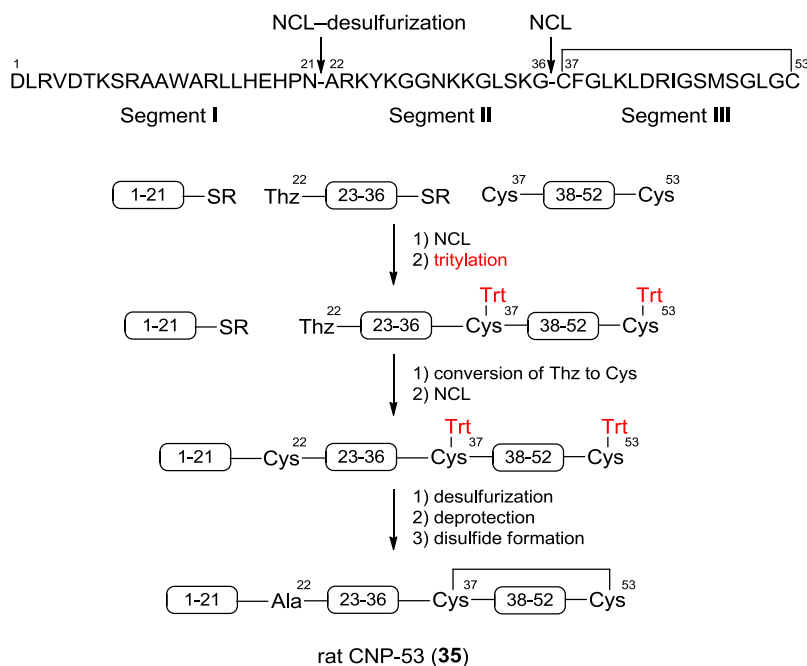
Figure 16. Structure of human adiponectin (19-107) (**1**).

第二章では、Cys を含むペプチドの合成ツールとして、無保護ペプチドにおける Cys 残基選択的保護基導入法について研究を行い、HFIP 中、Trt-OH との反応により、簡便に高収率で Cys 残基選択的に Trt 基を導入できることを見出した (Scheme 22)。



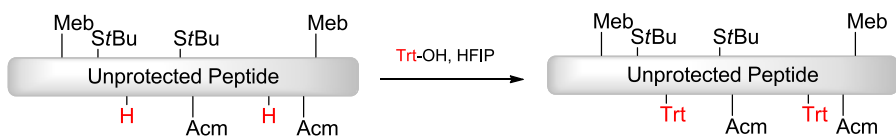
Scheme 22. Cys selective tritylation of unprotected peptide.

また、本手法を用いて rat CNP-53 (**35**) の合成を行った。53 残基のペプチドを 3 つのセグメントに分割し、まずセグメント **II** と **III** を NCL (Gly³⁶-Cys³⁷ サイト) により縮合した後、反応点の Cys³⁷ を今回開発した Trt 化反応により保護することで脱硫反応と共存可能とし、続くセグメント **I** との NCL-脱硫反応 (Asn²¹-Ala²² サイト) を行うことで rat CNP-53 (**35**) の合成を達成した (Scheme 23)。



Scheme 23. Synthesis of rat CNP-53 (**35**).

第三章では、3 組以上のジスルフィド結合を位置選択的に形成する手法について研究を行った。保護ペプチド樹脂を TFA 処理により脱保護・脱樹脂した後に、第二章にて開発した Trt 化反応を用いて再度 Cys に Trt 基を導入し、*S*tBu、Trt、Acm、Meb 基を Cys の保護基に持つペプチドを単離することで、*S*tBu 基の脱保護と続くジスルフィド結合形成反応を液相にて行うことを可能にした。これにより、*S*tBu 基を段階的かつ位置選択的なジスルフィド結合形成反応における実用的な保護基へと進化させ、Trt、Acm 基と組み合わせて 3 組のジスルフィド結合を持つ μ -SIIIA (**46**) を、これらに Meb 基を加えることで 4 組のジスルフィド結合を持つ human hepcidin (**50**) の精密合成を達成した (Scheme 24, Figure 17)。本手法は Trp 含有ペプチドにも適応可能であることに加え、Cys の側鎖保護基に Trt、Acm、Meb、*S*tBu 基を持つ保護アミノ酸ユニットは市販品として購入可能であることから、複数のジスルフィド結合を持つペプチド、タンパク質の合成に広く利用されると期待される。



Scheme 24. Cys selective tritylation.

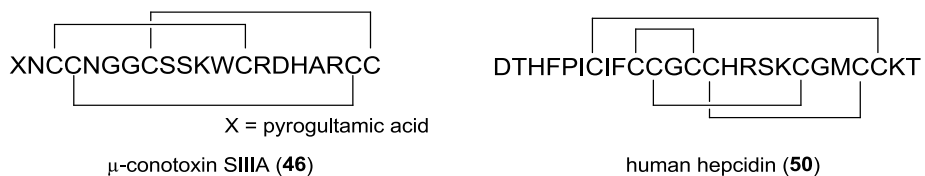


Figure 17. Structure of μ-SIIIA (**46**) and human hepcidin (**50**).

第一章にて確立した糖鎖修飾 Hyl 含有ペプチドの合成、第二章にて確立した Cys 残基選択的 Trt 化反応、第三章にて確立した位置選択的ジスルフィド結合形成方法は、それぞれ今後様々なペプチドやタンパク質の化学合成に活かされると期待される。

Experimental Section

General information

Materials

All reagents and solvents were obtained from Peptide Institute, Inc. (Osaka, Japan), Wako Chemical (Osaka, Japan), Tokyo Chemical Industry (Tokyo, Japan) and Watanabe Chemical Industries (Hiroshima, Japan).

HPLC

Analytical HPLC was performed on a Shimadzu liquid chromatograph Model LC-10AT (Kyoto, Japan) with a YMC-ODS AA12S05-1546WT (4.6 x 150 mm) using a flow rate of 1 mL/min at 40 °C and the following solvent systems: 0.1% TFA in H₂O (A), 0.1% TFA in CH₃CN (B). Preparative HPLC was performed on a Shimadzu liquid chromatograph Model LC-8A (Kyoto, Japan) with a YMC-ODS AA12305-2530WT (250 x 30 mm) using a flow rate of 20 mL/min and the following solvent systems: 0.1% TFA in H₂O (A), 0.1% TFA in CH₃CN (B).

Mass spectrometry and NMR

Mass spectra were measured on an Agilent G1956B LC/MSD detector using an Agilent 1100 series HPLC system. Nuclear magnetic resonance [¹H NMR (400 MHz), ¹³C NMR (100 MHz)] spectra were recorded at JEOL-ECX400 spectrometer. All chemical shifts are reported in parts per million (ppm) from tetramethyl-silane (δ 0.00 ppm) and were measured relative to the solvent in which the sample was analyzed (CDCl₃: δ 7.26 ppm for ¹H NMR, δ 77.0 ppm for ¹³C NMR; dimethyl sulfoxide-*d*₆ (DMSO-*d*₆): δ 2.49 ppm for ¹H NMR, δ 39.9 ppm for ¹³C NMR; D₂O: δ 4.70 ppm for ¹H NMR; CD₃OD: 49.0 ppm for ¹³C NMR).

Automated solid-phase peptide synthesis (Fmoc-SPPS)

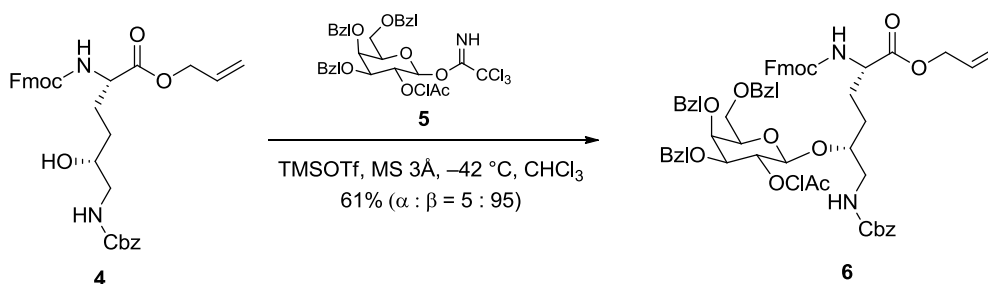
Automated peptide synthesis was performed on an ABI433A (Forester, CA, USA) peptide synthesizer. The peptide chain was elongated using the FastMoc protocol of coupling with Fmoc-amino acid/HCTU/6-Cl-HOBt/DIEA (4/4/4/8 equiv with respect to the peptide resin) in NMP (30 minutes) for adiponectin or Fmoc-amino acid/DIC/Oxyma Pure (4/4/4 equiv with respect to the peptide resin) in NMP (30 minutes) for μ -SIIIA and human hepcidin. The acetyl capping was performed using acetic anhydride/NMP in the presence of HOBt/DIEA after each coupling step. The following side-chain-protected amino acids were employed: Arg(Pbf), Asn(Trt), Asp(*t*Bu), Cys(Acm), Cys(Meb), Cys(*S**t*Bu), Cys(Trt), Gln(Trt), Glu(*t*Bu), His(Trt), Lys(Boc), Ser(*t*Bu), Thr(*t*Bu), Trp(Boc), Tyr(*t*Bu). Fmoc deprotection was carried out with 20% piperidine/NMP (2.5 minutes x 4) for adiponectin and human hepcidin or 20% morpholine/NMP (5 minutes x 4) for μ -SIIIA.

Automated solid-phase peptide synthesis (Boc-SPPS)

Automated peptide synthesis was performed on an ABI433A (Forester, CA, USA) peptide synthesizer. The peptide chain was elongated using *in situ* neutralization protocols of coupling with Boc-amino acid/HCTU/6-Cl-HOBt/DIEA (4/4/4/6 equiv with respect to the peptide resin) in NMP (30 minutes). The acetyl capping was performed using acetic anhydride/NMP in the presence of HOBt/DIEA after each coupling step. The following side-chain-protected amino acids were employed: Arg(Tos), Asn(Xan), Asp(OcHex), Cys(Meb), Gln(Xan), Glu(OcHex), His(Bom), Hyp(Bzl), Lys(ClZ), Ser(Bzl), Thr(Bzl), Trp(For), Tyr(BrZ). Boc deprotection was carried out with 50% TFA in CH₂Cl₂ (5 minutes x 3), followed by washing with NMP.

第一章に関わる実験

allyl (2*S*,5*R*)-6-benzyloxycarbonyl-amino-2-(9-fluorenylmethyloxycarbonyl)-amino-5-(3,4,6-tri-*O*-benzyl-2-*O*-chloroacetyl- β -D-galactopyranosyloxy)hexanoate (**6**)



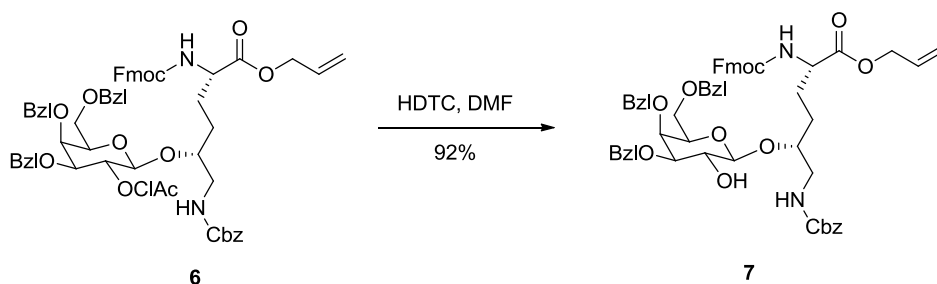
A mixture of Fmoc-Hyl(Cbz)-OAllyl (**4**) (1.00 g, 1.80 mmol), *O*-(3,4,6-tri-*O*-benzyl-2-*O*-chloroacetyl-D-galactopyranosyl)trichloroacetimidate (**5**) (1.80 g, 2.71 mmol) and molecular sieves 3Å (1.00 g) in anhydrous CHCl₃ (10 mL) was stirred for 10 minutes at -42 °C. Then, trifluoromethanesulfonic acid trimethylsilyl ester (96.8 μ L, 532 μ mol) was added and stirring for 1 hour under an argon atmosphere. After addition of CHCl₃, the organic layer was successively washed with saturated aqueous NaHCO₃ and brine, dried over MgSO₄, filtered and concentrated. The crude residue was precipitated with Et₂O. The resulting powders were collected by filtration and washed with Et₂O to obtain the title compound (1.81 g, 61%).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 7.86 (d, $J = 7.7$ Hz, 2H), 7.77 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.67 (d, $J = 7.3$ Hz, 2H), 7.42–7.21 (m, 24H), 6.96 (t, $J = 5.5$ Hz, 1H), 5.91–5.82 (m, 1H), 5.27 (dd, $J = 10.5, 1.4$ Hz, 2H), 5.15 (dd, $J = 9.1, 1.4$ Hz, 1H), 4.99–4.90 (m, 3H), 4.73 (d, $J = 11.0$ Hz, 1H), 4.66 (d, $J = 12.3$ Hz, 1H), 4.35–4.17 (m, 11H), 4.03–3.99 (m, 2H), 3.78 (t, $J = 6.0$ Hz, 1H), 3.70 (dd, $J = 7.8, 2.8$ Hz, 1H), 3.56–3.44 (m, 3H), 3.10–3.02 (m, 2H), 1.77–1.36 (m, 4H).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 171.9, 166.2, 156.1, 156.0, 143.7, 140.7, 138.5, 138.2, 138.0, 137.0, 132.2, 128.3, 128.2, 128.1, 127.8, 127.6, 127.5, 127.0, 125.2, 120.1, 117.8, 100.0, 79.1, 79.0, 74.1, 73.1, 72.9, 72.5, 72.3, 71.0, 68.1, 65.7, 65.3, 64.9, 54.1, 46.6, 44.6, 40.9, 29.0, 26.5.

ESI-MS: calcd for C₆₁H₆₄ClN₂O₁₃ [M+H]⁺ $m/z = 1067.4$, found: 1067.4.

allyl (2*S*,5*R*)-6-benzyloxycarbonyl-amino-2-(9-fluorenylmethyloxycarbonyl)-amino-5-(3,4,6-tri-*O*-benzyl-β-*D*-galactopyranosyloxy)hexanoate (7)



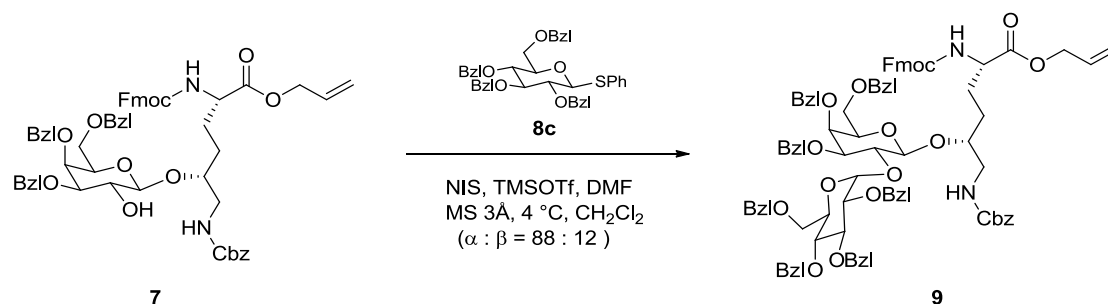
To a solution of **6** (4.50 g, 4.27 mmol) in DMF (45 mL) was added 0.375 M hydrazinedithiocarbonate/EtOH (13.6 mL, 5.10 mmol). The reaction mixture was stirred for 2.5 hours and then diluted with EtOAc. The resulting mixture was successively washed with H₂O, 1 M aqueous HCl and brine. The organic layer was dried over MgSO₄, filtered, and concentrated. The crude residue was precipitated with hexane. The resulting powders were collected by filtration and washed with hexane to obtain the title compound (3.91 g, 92%).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 7.85 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H), 7.73 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.68 (d, *J* = 7.3 Hz, 2H), 7.39–7.22 (m, 24H), 6.95 (t, *J* = 5.5 Hz, 1H), 5.93–5.83 (m, 1H), 5.28 (dd, *J* = 15.5, 1.4 Hz, 2H), 5.21 (s, 1H), 5.16 (dd, *J* = 9.2, 1.4 Hz, 1H), 4.95 (s, 2H), 4.73 (d, *J* = 11.0 Hz, 1H), 4.68 (d, *J* = 3.2 Hz, 2H), 4.54 (d, *J* = 5.0 Hz, 2H), 4.44–4.19 (m, 6H), 4.05–3.99 (m, 1H), 3.87 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 3.64 (t, *J* = 6.4 Hz, 1H), 3.58 (t, *J* = 5.0 Hz, 1H), 3.49–3.41 (m, 4H), 3.12–3.07 (m, 2H), 1.77–1.36 (m, 4H).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 172.1, 156.2, 156.1, 143.8, 140.7, 139.0, 138.8, 138.1, 137.1, 132.4, 128.3, 128.2, 128.1, 127.8, 127.7, 127.6, 127.5, 127.4, 127.3, 127.1, 125.3, 120.1, 117.7, 102.9, 81.9, 78.4, 74.1, 74.0, 72.5, 72.4, 71.7, 70.4, 68.5, 65.7, 65.3, 64.8, 54.3, 46.7, 44.5, 28.8, 26.3.

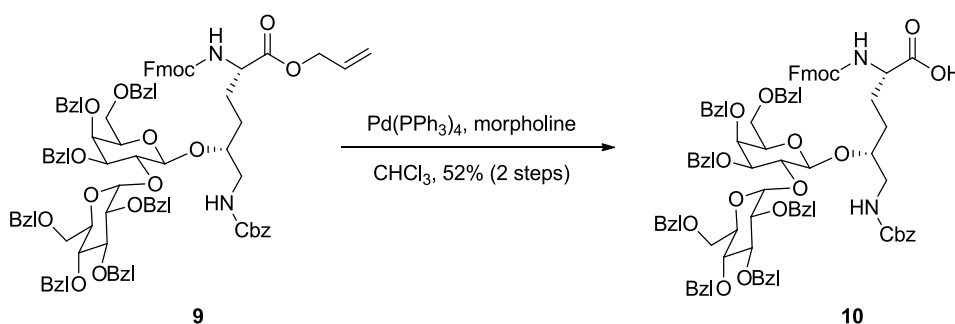
ESI-MS: calcd for C₅₉H₆₃N₂O₁₂ [M+H]⁺ *m/z* = 991.4, found: 991.4.

allyl (2*S*,5*R*)-6-benzoyloxycarbonyl-amino-2-(9-fluorenylmethyloxycarbonyl)-amino-5-[(2,3,4,6-tetra-*O*-benzyl- α -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-(3,4,6-tri-*O*-benzyl- β -D-galactopyranosyloxy)]hexanoate (9**)**



A mixture of phenyl 2,3,4,6-tetra-*O*-benzyl-1-thio- α -D-glucopyranoside (**8c**) (4.78 g, 7.56 mmol), *N*-iodosuccinimide (1.75 g, 7.81 mmol) and molecular sieves 3Å (3.00 g) in anhydrous CH₂Cl₂ (85.0 mL) and DMF (2.30 mL, 30.2 mmol) was stirred for 10 minutes at room temperature. Trifluoromethanesulfonic acid trimethylsilyl ester (1.36 mL, 7.56 mmol) was added at -10 °C, and the mixture was stirred for 1 hour at -10 °C. Then a solution of **7** (2.41 g, 2.42 mmol) in anhydrous CH₂Cl₂ (10 mL) was added dropwise. The reaction mixture was stirred for 48 hours at 4 °C. After the addition of CHCl₃, the organic layer was successively washed with aqueous Na₂S₂O₃, saturated aqueous NaHCO₃ and brine, dried over MgSO₄, filtered and concentrated. The crude residue was purified by column chromatography on silica gel (15% EtOAc in toluene) to give a crude product (3.52 g). The crude product was used in the next step without further purification.

(2*S*,5*R*)-6-benzoyloxycarbonyl-amino-2-(9-fluorenylmethyloxycarbonyl)-amino-5-[(2,3,4,6-tetra-*O*-benzyl- α -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-(3,4,6-tri-*O*-benzyl- β -D-galactopyranosyloxy)]hexanoic acid (10**)**



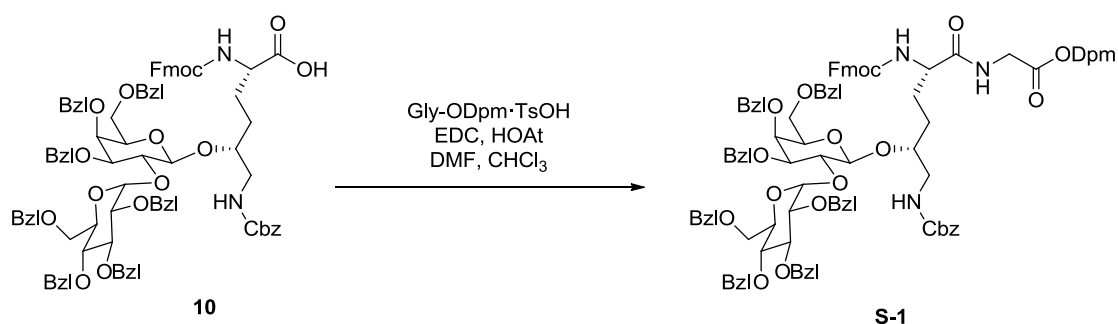
To a solution of the crude product **9** (3.50 g) in CH₂Cl₂ (35 mL) were added morpholine (400 μ L, 4.60 mmol) and Pd(PPh₃)₄ (133 mg, 115 μ mol) at room temperature. The reaction mixture was stirred for 1 hour and then diluted with CHCl₃. The resulting mixture was washed with 0.2 M aqueous HCl, H₂O and brine. The organic layer was dried over MgSO₄, filtered, and concentrated. The crude residue was purified by column chromatography on silica gel (20% EtOAc in toluene) to obtain the title compound (1.85 g, 52% in 2 steps).

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ 7.83 (d, $J = 7.4$ Hz, 2H), 7.66–6.99 (m, 48H), 5.54 (d, $J = 3.7$ Hz, 1H), 4.95 (s, 2H), 4.77 (d, $J = 11.5$ Hz, 1H), 4.71–4.64 (m, 5H), 4.58–4.53 (m, 4H), 4.45–4.30 (m, 8H), 4.17–4.02 (m, 4H), 3.94–3.88 (m, 1H), 3.85–3.79 (m, 2H), 3.73–3.65 (m, 3H), 3.51–3.10 (m, 6H), 1.70–1.60 (m, 4H).

^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ 173.8, 156.1, 143.8, 143.7, 140.7, 138.7, 138.6, 138.4, 138.2, 137.8, 137.4, 137.1, 132.0, 131.6, 131.5, 128.9, 128.8, 128.3, 128.2, 127.9, 127.8, 127.5, 127.4, 127.3, 127.1, 125.3, 120.2, 101.1, 94.5, 81.2, 80.3, 79.2, 77.8, 76.8, 74.5, 74.2, 73.6, 72.5, 72.3, 72.2, 72.0, 71.4, 68.7, 68.5, 68.2, 65.7, 65.4, 53.8, 46.6, 43.6, 27.7, 26.4.

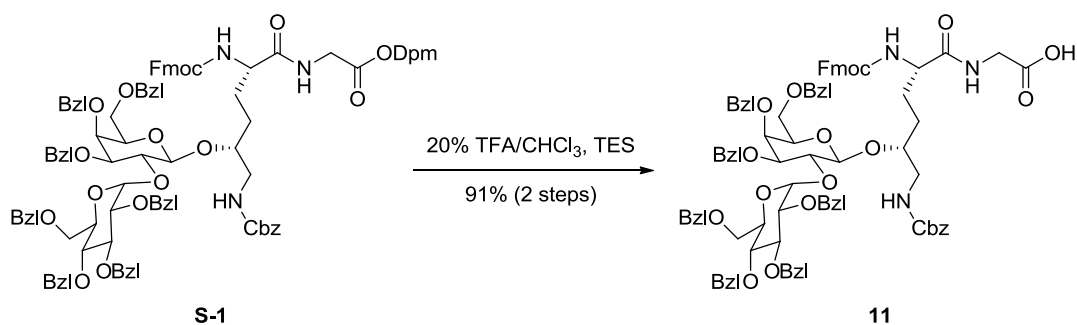
ESI-MS: calcd for $\text{C}_{90}\text{H}_{93}\text{N}_2\text{O}_{17}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ $m/z = 1473.6$, found: 1473.6.

benzhydryl (2*S*,5*R*)-[benzyloxycarbonyl-amino-2-(9-fluorenylmethyloxycarbonyl)-amino-5-[(2,3,4,6-tetra-*O*-benzyl- α -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-(3,4,6-tri-*O*-benzyl- β -D-galactopyranosyloxy)]hexanamide]acetate (S-1)



To a solution of **10** (1.85 g, 1.26 mmol), Gly-ODpm-TsOH (622 mg, 1.50 mmol) and HOAt (204 mg, 1.50 mmol) in DMF/CHCl_3 (v/v, 2/8, 25 mL) was added EDC (274 μL , 1.50 mmol). The reaction mixture was stirred at room temperature for 3 hours. After the addition of EtOAc, the organic layer was successively washed with saturated aqueous NaHCO_3 , 1 M aqueous HCl and brine, dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated to give a crude product (2.11 g). The resulting residue was used for the next step without further purification.

(2*S*,5*R*)-[benzyloxycarbonyl-amino-2-(9-fluorenylmethyloxycarbonyl)-amino-5-[(2,3,4,6-tetra-*O*-benzyl- α -D-glucopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)-(3,4,6-tri-*O*-benzyl- β -D-galactopyranosyloxy)]hexanamide]acetic acid (11**)**

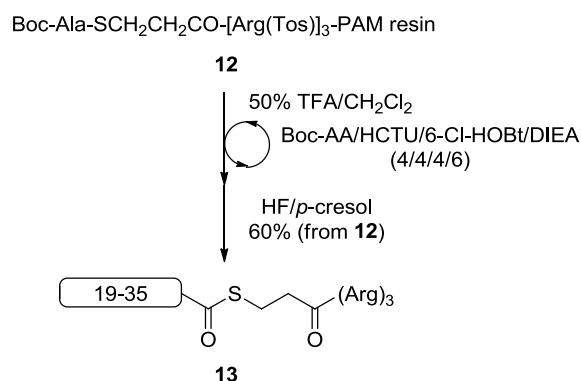


To a solution of **S-1** (2.10 g) and triethylsilane (300 μ L, 1.89 mmol) in CHCl_3 (16 mL) was added TFA (4 mL). The reaction mixture was stirred at room temperature for 1 hour. After the addition of EtOAc, the organic layer was successively washed with saturated aqueous NaHCO_3 , 1 M aqueous HCl and brine, dried over Na_2SO_4 , filtered and concentrated. The residue was precipitated with hexane. The resulting powders were collected by filtration and washed with hexane to obtain the title compound (1.75 g, 91% in 2 steps).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 7.72–7.45 (m, 7H), 7.35–6.99 (m, 41H), 6.36 (t, $J = 5.5$ Hz, 1H), 6.16 (t, $J = 5.0$ Hz, 1H), 5.58 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H), 5.53 (d, $J = 3.2$ Hz, 1H), 5.02 (s, 2H), 4.89–4.72 (m, 6H), 4.61–4.48 (m, 4H), 4.53 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H), 4.41–4.30 (m, 4H), 4.30–4.23 (m, 3H), 4.16–4.05 (m, 3H), 4.00–3.95 (m, 2H), 3.79 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H), 3.74–3.71 (m, 2H), 3.65 (dd, $J = 9.6, 9.6$ Hz, 1H), 3.60–3.55 (m, 4H), 3.40–3.10 (m, 5H), 1.83–1.55 (m, 4H).

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 172.0, 171.0, 157.4, 156.3, 143.8, 141.2, 138.7, 138.6, 138.4, 138.3, 137.8, 137.4, 137.3, 136.5, 132.5, 132.1, 132.0, 128.8, 128.7, 128.3, 128.2, 127.9, 127.8, 127.7, 127.5, 127.4, 127.3, 127.1, 127.0, 125.2, 119.9, 102.7, 95.6, 82.1, 81.3, 79.7, 79.5, 77.8, 75.4, 74.8, 74.5, 73.4, 73.3, 73.2, 73.1, 73.0, 72.4, 69.7, 69.1, 67.9, 67.0, 66.8, 54.3, 47.1, 44.3, 41.3, 28.3.

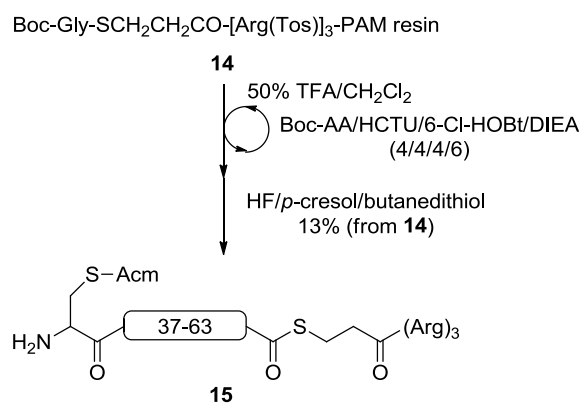
ESI-MS: calcd for $\text{C}_{92}\text{H}_{96}\text{N}_3\text{O}_{18}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ $m/z = 1530.6$, found: 1530.6.

ETTTQGGVLLPLPKGA-SCH₂CH₂CO-(Arg)₃ [(19-35)-SR] (13)

The peptide was assembled using an ABI 433A peptide synthesizer on a Boc-Ala-SCH₂CH₂CO-[Arg(Tos)]₃-PAM resin (**12**) (820 mg, 300 μmol) according to the general automated Boc-SPPS procedure. The peptide resin was treated with HF/*p*-cresol (v/v, 80/20, 15 mL) at -5 °C to -2 °C for 1 hour to give a crude product, which was purified by preparative HPLC to obtain the title compound (403 mg, 60% from **12**).

Analytical HPLC: R_t, 14.2 min [1–60% CH₃CN in 0.1% TFA (25 min); detection, 220 nm].

ESI-MS: calcd for C₉₆H₁₆₉N₃₁O₂₈S [M+H]⁺ *m/z* = 2237.6, [M+2H]²⁺ *m/z* = 1118.8, [M+3H]³⁺ *m/z* = 746.2, found: 1118.5, 746.1.

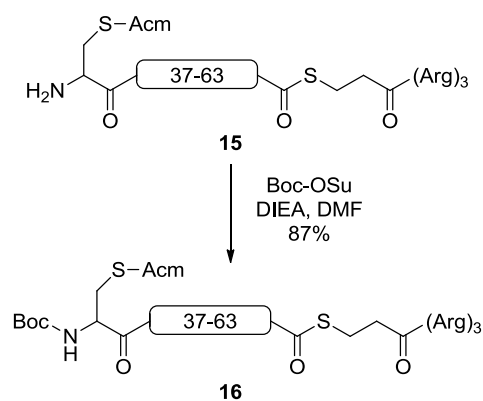
C(Acm)TGWMAGIHypGHHypGHNGAHypGRDGRDGTTPG-SCH₂CH₂CO-(Arg)₃ {[Cys(Acm)³⁶](36-63)-SR} (15)

The peptide was assembled using an ABI 433A peptide synthesizer on a Boc-Gly-SCH₂CH₂CO-[Arg(Tos)]₃-PAM resin (**14**) (824 mg, 300 μmol) according to the general automated Boc-SPPS procedure. The peptide resin was treated with HF/*p*-cresol/butanedithiol (v/v/v, 80/5/15, 15 mL) at -5 °C to -2 °C for 1 hour to give a crude product, which was purified by preparative HPLC to obtain the title compound (160 mg, 13% from **14**).

Analytical HPLC: R_t, 8.7 min [10–60% CH₃CN in 0.1% TFA (25 min); detection, 220 nm].

ESI-MS: calcd for C₁₃₇H₂₁₆N₅₃O₄₄S₃ [M+H]⁺ *m/z* = 3405.7, [M+3H]³⁺ *m/z* = 1135.4, [M+4H]⁴⁺ *m/z* = 851.8, found: 1135.6, 852.0.

Boc-C(Acm)TGWMAGIHypGHHypGHNGAHypGRDGRDGTGP-SCH₂CH₂CO-(Arg)₃
{[Boc-Cys(Acm)³⁶](36-63)-SR} (16)

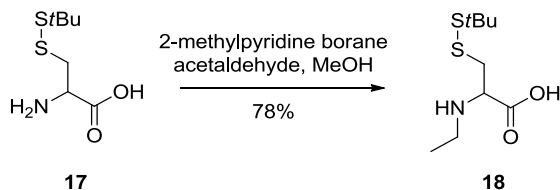


To a solution of **15** (160 mg, 38.0 μ mol) in DMF (3 mL) was added Boc-OSu (101 mg, 470 μ mol) at room temperature. The pH was adjusted to 7 by the addition of DIEA. After 17 hours stirring, the pH was adjusted to < 3 by the addition of 0.1% aqueous TFA. The reaction mixture was directly subjected to preparative HPLC to obtain the title compound (139 mg, 87%).

Analytical HPLC: R_t, 12.1 min [10–60% CH₃CN in 0.1% TFA (25 min); detection, 220 nm].

ESI-MS: calcd for C₁₄₂H₂₂₄N₅₃O₄₆S₃ [M+H]⁺ m/z = 3505.8, [M+3H]³⁺ m/z = 1169.1, [M+4H]⁴⁺ m/z = 877.2, found: 1169.0, 877.1.

N-ethyl-*S*-*t*-butylsulfenyl-L-cysteine (**18**)



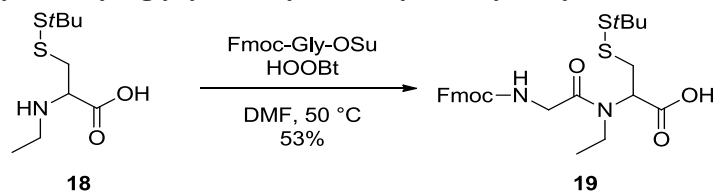
To a solution of **17** (2.02 g, 9.16 mmol) and acetaldehyde (661 μ L, 11.9 mmol) in MeOH (220 mL) was added 2-methylpyridine borane (881 mg, 8.24 mmol). The reaction mixture was stirred at room temperature for 3 hours. Then, the reaction mixture was concentrated, and the residue was precipitated with Et₂O. The resulting powders were collected by filtration and washed with Et₂O to obtain the title compound (1.70 g, 78%).

¹H NMR (400 MHz, D₂O): δ 4.19 (t, J = 5.4 Hz, 1H), 3.27 (q, J = 5.5 Hz, 2H), 3.11 (dd, J = 7.3, 7.3 Hz, 2H), 1.25 (s, 9H), 1.23 (t, J = 7.3 Hz, 3H).

¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD): δ 170.7, 61.1, 42.9, 41.0, 29.6, 10.9.

ESI-MS: calcd for C₉H₂₀NO₂S₂ [M+H]⁺ m/z = 238.1, found: 238.1.

N-(9-fluorenylmethoxycarbonyl)-glycyl-*N*-ethyl-*S*-*t*-butylsulfenyl-L-cysteine (**19**)



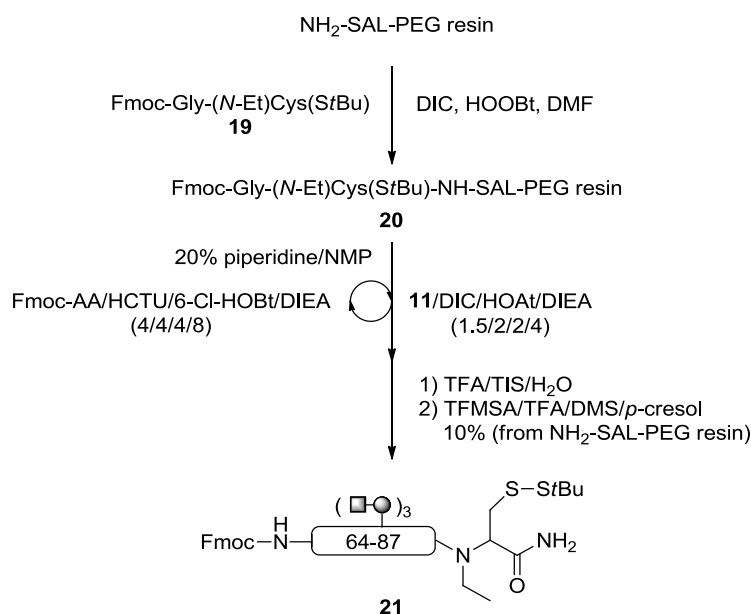
To a solution of **18** (410 mg, 1.72 mmol) and Fmoc-Gly-OSu (814 mg, 2.06 mmol) in DMF (8 mL) was added HOObt (280 mg, 1.72 mmol). The reaction mixture was stirred at 50 °C for 15 hours. After the addition of EtOAc, the organic layer was successively washed with 0.5 M aqueous HCl and brine, dried over MgSO₄, filtered and concentrated. The crude residue was purified by column chromatography on silica gel (2% AcOH in CHCl₃) to obtain the title compound (560 mg, 53%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.75 (d, J = 7.3 Hz, 2H), 7.60 (d, J = 7.3 Hz, 2H), 7.39 (t, J = 7.3 Hz, 2H), 7.30 (t, J = 7.3 Hz, 2H), 5.93 (t, J = 4.1 Hz, 1H), 4.36 (d, J = 7.3 Hz, 2H), 4.23–4.03 (m, 4H), 3.60–3.55 (m, 1H), 3.44–3.26 (m, 3H), 1.39–1.24 (m, 12H).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 173.3, 169.0, 156.3, 143.9, 141.3, 127.7, 127.1, 125.2, 119.9, 67.3, 60.6, 48.6, 47.1, 44.9, 42.8, 38.5, 31.6, 29.9.

ESI-MS: calcd for C₂₆H₃₃N₂O₅S₂ [M+H]⁺ m/z = 517.2, found: 517.2.

Fmoc-E(Glc-Gal-)HylGE(Glc-Gal-)HylGDPGLIGP(Glc-Gal-)HylGDIGETGVPG-(N-Et)Cys(S*t*Bu)-NH₂
[Fmoc-(64-87)-(N-Et)Cys(S*t*Bu)-NH₂] (21)

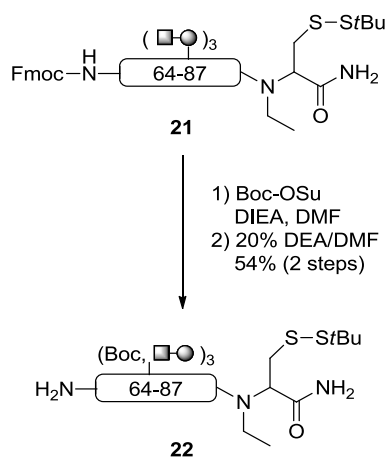


Compound **19** (124 mg, 240 μ mol) was loaded on NH₂-SAL-PEG resin (480 mg, 120 μ mol) by DIC (37.2 μ L, 240 μ mol) and HOObt (32.4 mg, 240 μ mol) in DMF (5 mL) at room temperature for 2 hours to afford Fmoc-Gly-(*N*-Et)Cys(*S**t*Bu)-NH-SAL-PEG resin (**20**). Then, the protected peptide was constructed on the resin using an ABI 433A peptide synthesizer according to the general automated Fmoc-SPPS procedure except for the coupling of Fmoc-(Glc-Gal-)Hyl-Gly derivative **11**. Compound **11** (276 mg, 180 μ mol) was manually assembled with DIC (37.2 μ L, 240 μ mol), HOAt (32.6 mg, 240 μ mol) and DIEA (81.0 μ L, 480 μ mol) in CHCl₃/NMP (v/v, 3/1, 5 mL) for 17 hours. Finally, the resulting resin was treated with TFA/TIS/H₂O (v/v/v, 95/5/5, 10 mL) at room temperature for 1 hour. Then, the resin was filtered and washed with TFA. The combined filtrates were concentrated under reduced pressure, and the residue was precipitated with Et₂O. The crude product was treated with trifluoromethanesulfonic acid/TFA/*p*-cresol/dimethylsulfide (v/v/v/v, 1/5/1/3, 6 mL) at -10 °C. After 1 hour stirring, the reaction mixture was cooled at -78 °C, and the peptide was precipitated with pyridine/Et₂O (v/v, 20/80). The resulting powders were purified by preparative HPLC to obtain the title compound (95.2 mg, 10% from NH₂-SAL-PEG resin).

Analytical HPLC: R_t, 16.6 min [10–60% CH₃CN in 0.1% TFA (25 min); detection, 220 nm].

ESI-MS: calcd for C₁₅₉H₂₅₂N₂₉O₇₁S₂ [M+H]⁺ *m/z* = 3769.9, [M+3H]³⁺ *m/z* = 1257.3, [M+4H]⁴⁺ *m/z* = 943.2, found: 1257.2, 943.2.

E(Glc-Gal-)Hyl(N^ε-Boc)GE(Glc-Gal-)Hyl(N^ε-Boc)GDPGLIGP(Glc-Gal-)Hyl(N^ε-Boc)GDIGETGVPG-(N-Et)Cys(S*t*Bu)-NH₂ {[(Glc-Gal-)Hyl(N^ε-Boc)^{65,68,77}](64-87)-(N-Et)Cys(S*t*Bu)-NH₂} (22**)**

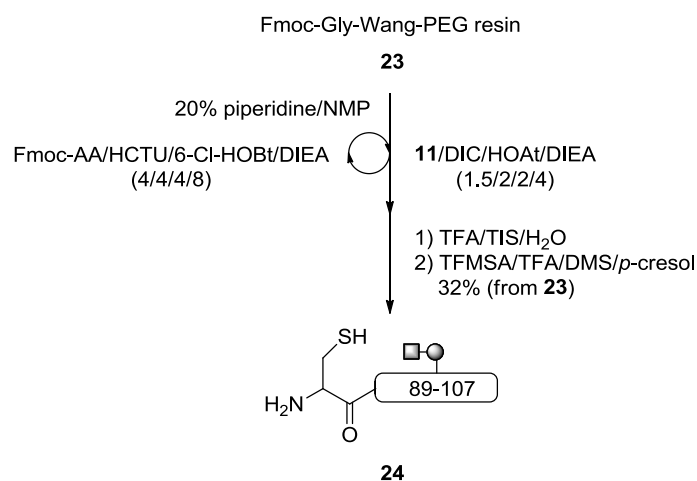


To a solution of **21** (101 mg, 24.8 μmol) in DMF (4 mL) was added Boc-OSu (115 mg, 536 μmol). The pH was adjusted to 7 by the addition of DIEA. The reaction mixture was stirred at room temperature for 4 hours. The reaction was terminated by addition of propylamine (66.0 μL, 803 μmol). Then, diethylamine (200 μL, 1.92 mmol) was added, and the mixture was stirred for 1 hour. The reaction mixture was acidified to pH < 3 by AcOH, and directly subjected to preparative HPLC to obtain the title compound (55.1 mg, 54% in 2 steps).

Analytical HPLC: R_t, 17.3 min [10–60% CH₃CN in 0.1% TFA (25 min); detection, 220 nm].

ESI-MS: calcd for C₁₅₉H₂₆₆N₂₉O₇₅S₂ [M+H]⁺ *m/z* = 3848.1, [M+2H]²⁺ *m/z* = 1924.5, [M-Boc+3H]³⁺ *m/z* = 1250.0, [M-2Boc+3H]³⁺ *m/z* = 1216.6, found: 1924.0, 1249.7, 1216.5.

CEGHypRGFPGIQGR(Glc-Gal-)HylGEPGEG {[(Cys⁸⁸)](88-107)} (24**)**

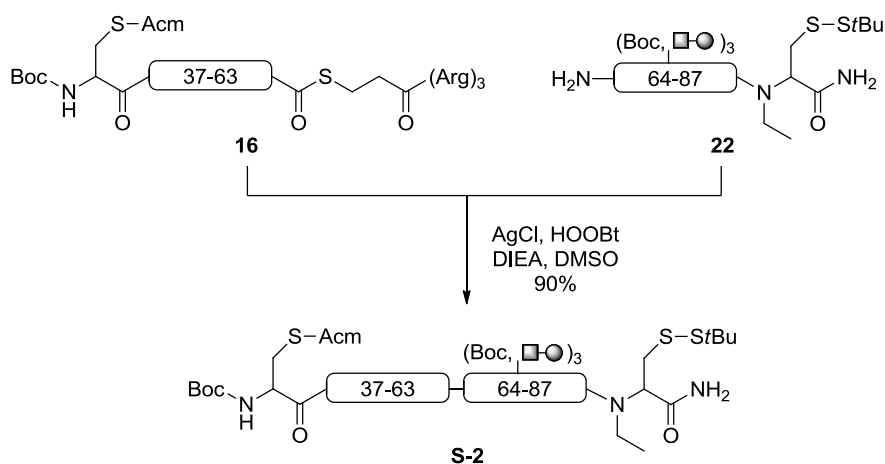


The peptide was assembled using an ABI 433A peptide synthesizer on an Fmoc-Gly-Wang-PEG resin (**23**) (390 mg, 100 μmol) according to the general automated Fmoc-SPPS procedure except for the coupling of Fmoc-(Glc-Gal-)Hyl-Gly derivative **11**. Compound **11** (229 mg, 150 μmol) was manually coupled by DIC (31.0 μL , 200 μmol), HOAt (27.2 mg, 200 μmol) and DIEA (64.0 μL , 400 μmol) in CHCl_3/NMP (v/v, 3/1, 5 mL) for 15 hours at room temperature. Finally, the protected peptide-resin was treated with TFA/TIS/ H_2O (v/v/v, 95/5/5, 8 mL) at room temperature for 1 hour. Then, the resin was filtered and washed with TFA. The combined filtrates were concentrated under reduced pressure. The residue was precipitated with Et_2O . The crude product was treated with trifluoromethanesulfonic acid/TFA/ *p*-cresol/dimethyl sulfide (v/v/v/v, 1/5/1/3, 6 mL) at $-10\text{ }^\circ\text{C}$ for 1 hour. The reaction mixture was cooled at $-78\text{ }^\circ\text{C}$, and the peptide was precipitated with pyridine/ Et_2O (v/v, 20/80). The resulting powders were purified by preparative HPLC to obtain the title compound (72.9 mg, 32% from **23**).

Analytical HPLC: R_t , 11.4 min [1–60% CH_3CN in 0.1% TFA (25 min); detection, 220 nm].

ESI-MS: calcd for $\text{C}_{97}\text{H}_{155}\text{N}_{28}\text{O}_{40}\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ $m/z = 2385.5$, $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ $m/z = 795.8$, $[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$ $m/z = 597.1$, found: 795.7, 597.0.

Boc-C(Acm)TGWMAGIHypGHHypGHNGAHypGRDGRDGTPE(Glc-Gal-)Hyl(N^{ϵ} -Boc)GE(Glc-Gal-)Hyl(N^{ϵ} -Boc)GDPGLIGP(Glc-Gal-)Hyl(N^{ϵ} -Boc)GDIGETGVPG-(*N*-Et)Cys(*S*tBu)- NH_2 {[Boc-Cys(Acm)³⁶, (Glc-Gal-)Hyl(N^{ϵ} -Boc)^{65,68,77}](36-87)-(N-Et)Cys(*S*tBu)- NH_2 } (S-2**)**

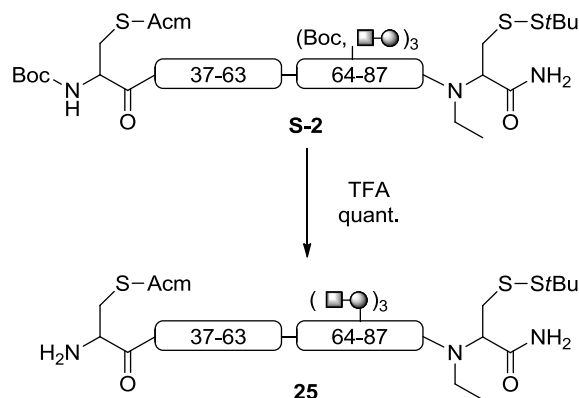


To a solution of **16** (73.8 mg, 21.0 μmol), **22** (54.0 mg, 14.0 μmol) and HOObt (68.5 mg, 0.42 mmol) in DMSO (3 mL) was added AgCl (8.02 mg, 56.0 μmol). The pH was adjusted to 6 by the addition of DIEA. After 15 hours stirring at room temperature, the pH was adjusted to <3 by the addition of AcOH. The reaction mixture was directly subjected to preparative HPLC to obtain the title compound (83.8 mg, 90%).

Analytical HPLC: R_t , 16.8 min [10–60% CH_3CN in 0.1% TFA (25 min); detection, 220 nm].

ESI-MS: calcd for $\text{C}_{280}\text{H}_{447}\text{N}_{70}\text{O}_{116}\text{S}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ $m/z = 6778.2$, $[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$ $m/z = 1695.3$, $[\text{M}-\text{Boc}+5\text{H}]^{5+}$ $m/z = 1336.4$, found 1695.5, 1336.5.

**C(Acm)TGWMAGIHypGHHypGHNGAHypGRDGRDGPGE(Glc-Gal-)HylGE(Glc-Gal-)HylGDPGLIG
P(Glc-Gal-)HylGDIGETGVPG-(N-Et)Cys(S*t*Bu)-NH₂ {[Cys(Acm)³⁶](36-87)-(N-Et)Cys(S*t*Bu)-NH₂} (**25**)**

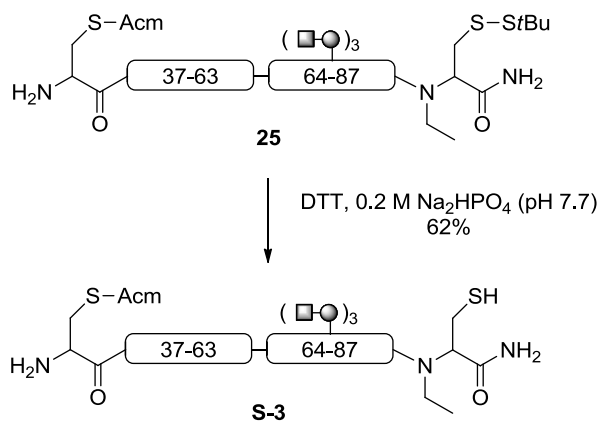


S-2 (83.8 mg, 12.6 μmol) was treated with 95% aqueous TFA at 3 °C for 1 hour. The reaction mixture was concentrated. The residue was diluted with H₂O and lyophilized to obtain the title compound (80.5 mg, quant.).

Analytical HPLC: R_t, 9.8 min [20–50% CH₃CN in 0.1% TFA (25 min); detection, 220 nm].

ESI-MS: calcd for C₂₆₀H₄₁₅N₇₀O₁₀₈S₄ [M+H]⁺ *m/z* = 6377.7, [M+4H]⁴⁺ *m/z* = 1595.1, [M+5H]⁵⁺ *m/z* = 1276.3, found: 1595.0, 1276.3.

**C(Acm)TGWMAGIHypGHHypGHNGAHypGRDGRDGPGE(Glc-Gal-)HylGE(Glc-Gal-)HylGDPGLIG
P(Glc-Gal-)HylGDIGETGVPG-(N-Et)Cys-NH₂ {[Cys(Acm)³⁶](36-87)-(N-Et)Cys-NH₂} (**S-3**)**



To a solution of **25** (78.1 mg, 12.2 μmol) in freshly degassed 0.2 M sodium phosphate buffer (pH 7.7, 5 mL) was added dithiothreitol (36.1 mg, 234 μmol) at room temperature under an argon atmosphere. After 17 hours stirring, the reaction mixture was directly subjected to preparative HPLC to obtain the title compound (51.8 mg, 62%).

Analytical HPLC: R_t, 13.8 min [1–60% CH₃CN in 0.1% TFA (25 min); detection, 220 nm].

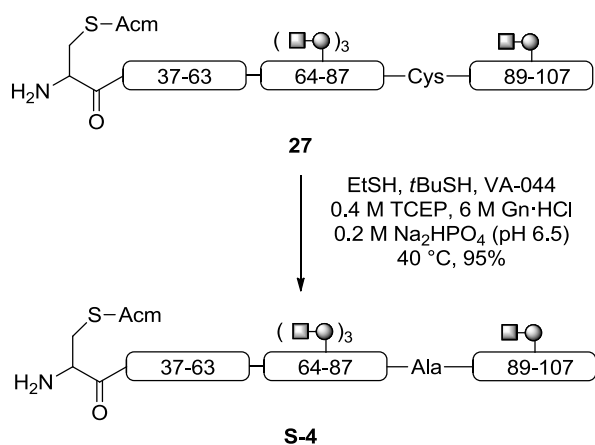
ESI-MS: calcd for C₂₅₆H₄₀₇N₇₀O₁₀₈S₃ [M+H]⁺ *m/z* = 6289.5, [M+4H]⁴⁺ *m/z* = 1573.1, [M+5H]⁵⁺ *m/z* = 1258.7, found: 1572.9, 1258.6.

26 (31.4 mg, 5.00 μmol) and **24** (16.2 mg, 6.50 μmol) were dissolved in freshly degassed 0.2 M sodium phosphate buffer (pH 8.2, 5 mL) containing 6 M guanidine hydrochloride. 2% Thiophenol (v/v) was added to the solution which was stirred for 20 hours at room temperature under an argon atmosphere, and then treated with dithiothreitol (30.8 mg, 200 μmol). After 20 minutes, the pH was adjusted to < 3 by adding AcOH. The mixture was washed with Et₂O, and the aqueous layer was directly subjected to preparative HPLC to obtain the title compound (40.1 mg, 94%).

Analytical HPLC: R_t, 13.7 min [1–60% CH₃CN in 0.1% TFA (25 min); detection, 220 nm].

ESI-MS: calcd for C₃₄₈H₅₄₉N₉₆O₁₄₇S₃ [M+H]⁺ m/z = 8525.8, [M+5H]⁵⁺ m/z = 1705.9, [M+6H]⁶⁺ m/z = 1421.8, found: 1705.8, 1421.7.

C(Acm)TGWMAGIHypGHHypGHNGAHypGRDGRDGTPE(Glc-Gal-)HylGE(Glc-Gal-)HylGDPGLIGP(Glc-Gal-)HylGDIGETGVPGAEGHypRGFPGIQGR(Glc-Gal-)HylGEPGEG {[Cys(Acm)³⁶](36-107)}
(**S-4**)

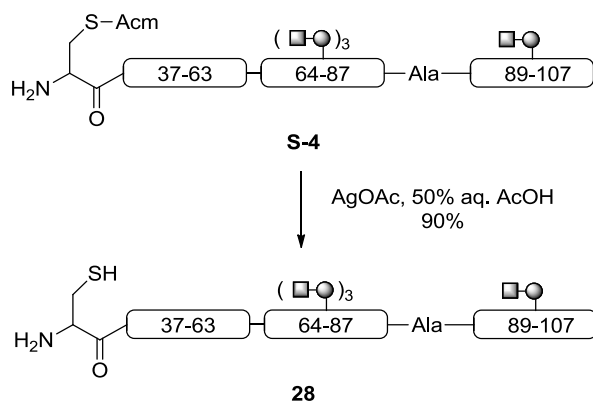


To a solution of **27** (40.1 mg, 4.70 μmol) in freshly degassed 0.2 M sodium phosphate buffer (pH 6.5, 3 mL) containing 6 M guanidine hydrochloride and 0.4 M tris(2-carboxyethyl)phosphine were added 0.5 M aqueous VA-044 (100 μL , 50.0 μmol), ethanethiol (40.0 μL , 542 μmol) and *t*-butylmercaptane (200 μL , 1.77 mmol). The mixture was stirred at 40 °C for 2 hours under an argon atmosphere, and directly subjected to preparative HPLC to obtain the title compound (38.1 mg, 95%).

Analytical HPLC: R_t, 14.5 min [12–32% CH₃CN in 0.1% TFA (25 min); detection, 220 nm].

ESI-MS: calcd for C₃₄₈H₅₄₉N₉₆O₁₄₇S₂ [M+H]⁺ m/z = 8493.7, [M+5H]⁵⁺ m/z = 1699.5, [M+6H]⁶⁺ m/z = 1416.4, found: 1699.3, 1416.4.

**CTGWMAGIHypGHHypGHNGAHypGRDGRDGTPE(Glc-Gal-)HylGE(Glc-Gal-)HylGDPGLIGP
(Glc-Gal-)HylGDIGETGVPGAEGHypRGFPGIQGR(Glc-Gal-)HylGEPGEG [(36-107)] (28)**

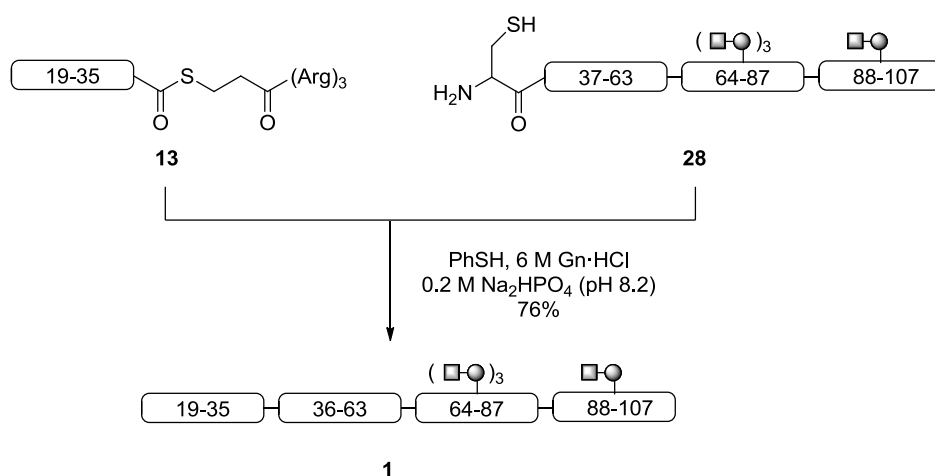


To a solution of **S-4** (37.5 mg, 4.41 μmol) in 50% aqueous AcOH (4.8 mL) was added AgOAc (39.5 mg, 276 μmol). The reaction mixture was stirred at room temperature for 2 hours under an argon atmosphere. Then, 1 M aqueous dithiothreitol (4 mL) was added. After 15 minutes, precipitate was filtered off, and filtrate was directly subjected to preparative HPLC to obtain the title compound (33.5 mg, 90%).

Analytical HPLC: R_t , 14.7 min [12–32% CH_3CN in 0.1% TFA (25 min); detection, 220 nm].

ESI-MS: calcd for $\text{C}_{345}\text{H}_{544}\text{N}_{95}\text{O}_{146}\text{S}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ $m/z = 8422.7$, $[\text{M}+5\text{H}]^{5+}$ $m/z = 1685.5$, $[\text{M}+6\text{H}]^{6+}$ $m/z = 1404.6$, found: 1685.3, 1404.6.

Human adiponectin (19-107) (1)



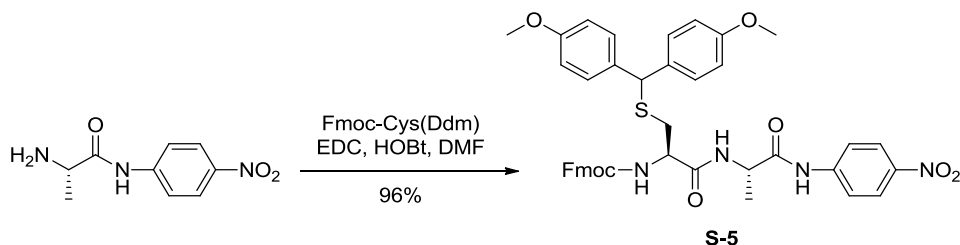
28 (33.0 mg, 3.92 μmol) and **13** (17.5 mg, 7.84 μmol) were dissolved in freshly degassed 0.2 M sodium phosphate buffer (pH 8.2, 2 mL) containing 6 M guanidine hydrochloride. 2% Thiophenol (v/v) was added to the solution which was stirred for 20 hours at room temperature under an argon atmosphere, and then treated with dithiothreitol (10.2 mg, 64.9 μmol). After 20 minutes, the pH was adjusted to < 3 by adding AcOH. The mixture was directly subjected to preparative HPLC to obtain the title compound (28.8 mg, 76%).

Analytical HPLC: R_t , 16.1 min [1–60% CH₃CN in 0.1% TFA (25 min); detection, 220 nm].

ESI-MS: calcd for C₄₂₀H₆₆₉N₁₁₄O₁₆₉S₂ [M+H]⁺ m/z = 10083.6, [M+6H]⁶⁺ m/z = 1681.4, [M+7H]⁷⁺ m/z = 1441.3, found: 1681.3, 1441.3.

第二章に関わる実験

N-(9-fluorenylmethoxycarbonyl)-*S*-dimethoxydiphenylmethyl-L-cysteinyl-L-alanine *p*-nitroanilide (**S-5**)



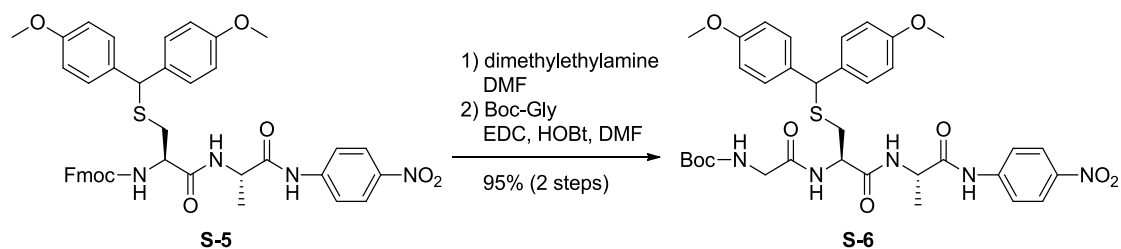
To a solution of Ala-*p*NA·TsOH (1.00 g, 2.62 mmol), Fmoc-Cys(Ddm) (1.42 g, 2.49 mmol) and HOBt (354 mg, 2.62 mmol) in DMF (8 mL) was added EDC (479 μ L, 2.62 mmol). The reaction mixture was stirred at room temperature for 2 hours. After addition of EtOAc, the organic layer was successively washed with saturated aqueous NaHCO₃, 1 M aqueous HCl and brine, dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated. The crude residue was precipitated with diisopropyl ether. The resulting powders were collected by filtration and washed with diisopropyl ether to obtain the title compound (1.81 g, 96%).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 10.45 (s, 1H), 8.40 (d, *J* = 6.9 Hz, 1H), 8.17–8.14 (m, 2H), 7.85 (d, *J* = 7.3 Hz, 2H), 7.75 (d, *J* = 9.1 Hz, 2H), 7.71–7.65 (m, 3H), 7.38–7.34 (m, 2H), 7.28–7.22 (m, 6H), 6.78 (t, *J* = 7.3 Hz, 4H), 5.27 (s, 1H), 4.44–4.37 (m, 1H), 4.32–4.16 (m, 4H), 3.65 (s, 3H), 3.64 (s, 3H), 2.65–2.69 (m, 1H), 2.50–2.44 (m, 1H), 1.30 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 171.7, 170.3, 158.1, 155.9, 144.9, 143.7, 142.2, 140.7, 133.6, 129.1, 129.0, 127.6, 127.0, 125.3, 124.9, 120.1, 118.9, 113.7, 65.8, 55.0, 54.2, 51.5, 49.4, 46.6, 17.8.

ESI-MS: calcd for C₄₂H₄₁N₄O₈S [M+H]⁺ *m/z* = 761.3, found: 761.3.

***N*-(*t*-butoxycarbonyl)glycyl-*S*-dimethoxydiphenylmethyl-L-cysteinyl-L-alanine *p*-nitroanilide (**S-6**)**



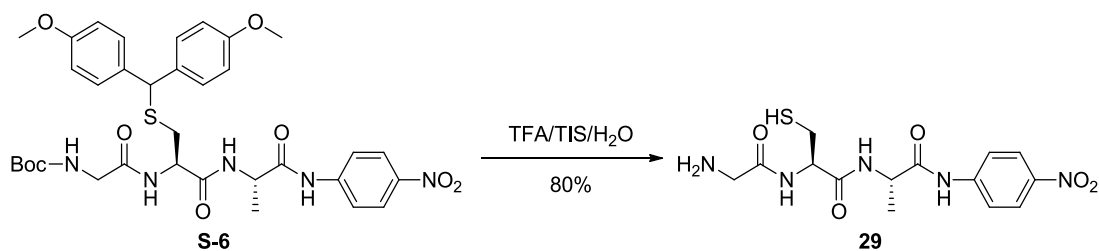
To a solution of **S-5** (1.70 g, 2.23 mmol) in DMF (10 mL) was added dimethylethylamine (2.40 mL, 22.3 mmol). The mixture was stirred at room temperature for 1.5 hours and concentrated in vacuo. The resulting residue was used for the next step without further purification. To a solution of the product, Boc-Gly (410 mg, 2.34 mmol) and HOBT (316 mg, 2.34 mmol) in DMF (10 mL) was added EDC (428 μ L, 2.34 mmol). The reaction mixture was stirred at room temperature for 5 hours. After addition of EtOAc, the organic layer was successively washed with saturated aqueous NaHCO₃, 1 M aqueous HCl and brine, dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated. The residue was precipitated with diisopropyl ether, and the resulting powders were collected by filtration and washed with diisopropyl ether to obtain the title compound (1.47 g, 95% in 2 steps).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 10.37 (s, 1H), 8.45 (d, *J* = 6.9 Hz, 1H), 8.18 (d, *J* = 9.1 Hz, 2H), 8.10 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 7.81 (d, *J* = 9.1 Hz, 2H), 7.29–7.26 (m, 4H), 7.05 (t, *J* = 5.9 Hz, 1H), 6.85–6.80 (m, 4H), 5.27 (s, 1H), 4.57–4.52 (m, 1H), 4.46–4.42 (m, 1H), 3.69 (s, 3H), 3.68 (s, 3H), 3.60–3.57 (m, 2H), 2.64–2.59 (m, 1H), 2.53–2.48 (m, 1H), 1.36–1.30 (m, 12H).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 171.7, 169.9, 169.5, 158.1, 155.9, 144.9, 142.3, 133.5, 129.1, 124.9, 118.9, 113.7, 78.1, 59.8, 55.0, 52.1, 51.5, 43.2, 33.7, 28.2, 22.8, 20.8, 17.6, 14.1.

ESI-MS: calcd for C₃₄H₄₂N₅O₉S [M+H]⁺ *m/z* = 696.3, found: 696.3.

glycyl-L-cysteinyl-L-alanine *p*-nitroanilide (**29**)



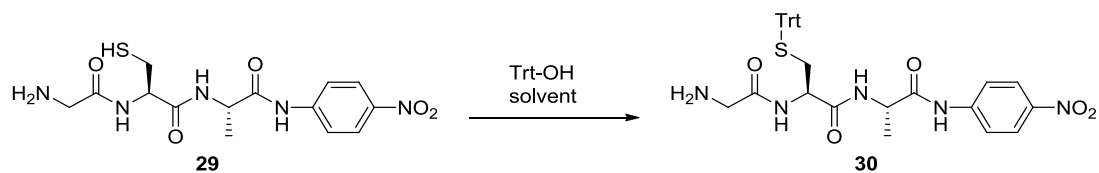
S-6 (1.40 g, 2.00 mmol) was treated with TFA/TIS/H₂O (95/5/5, 12 mL) at room temperature. After 1 hour, TFA was evaporated, and the residue was precipitated with Et₂O. The resulting powders were collected by filtration and washed with Et₂O. The product was purified by preparative HPLC to give the title compound (751 mg, 80%).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 10.62 (s, 1H), 8.61 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 8.58 (d, *J* = 6.4 Hz, 1H), 8.22–8.18 (m, 2H), 7.82–7.78 (m, 2H), 4.57–4.52 (m, 1H), 4.40–4.36 (m, 1H), 3.62–3.58 (m, 2H), 2.84–2.68 (m, 2H), 2.30 (t, *J* = 8.2 Hz, 1H), 1.33 (d, *J* = 7.3 Hz, 3H).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 172.0, 169.2, 166.0, 145.0, 142.3, 125.0, 118.9, 54.7, 49.6, 26.6, 17.6.

ESI-MS: calcd for C₁₄H₂₀N₅O₅S [M+H]⁺ *m/z* = 370.1, found: 370.1.

Trytylation of Gly-Cys-Ala-*p*NA (**29**)



To a solution of 10 mM Gly-Cys-Ala-*p*NA (**29**) in HFIP or TFA was added trityl alcohol (1.1 or 3.0 equiv). The reaction mixture was stirred at room temperature for 1 hour and analyzed by HPLC.

Manual SPPS of Gly-Xaa-Phe-Cys-Gly-NH₂ (31a-f)

Starting with Fmoc-NH-SAL resin (**47**), manual peptide chain assembly was carried out using the protocol of 30 minutes coupling with Fmoc-amino acid/HCTU/6-Cl-HOBt/DIEA (4/4/4/8 equiv with respect to the peptide resin, 1 minute preactivation) in DMF. The following side-chain-protected amino acids were employed: Cys(Ddm), Glu(*t*Bu), His(MBom), Ser(*t*Bu), Trp(Boc), Tyr(*t*Bu). Fmoc deprotection was carried out with 20% piperidine in DMF (5 minutes x 2), followed by washing with DMF.

Gly-Trp-Phe-Cys-Gly-NH₂ (31a)

This peptide was prepared from Fmoc-NH-SAL resin (**47**) (510 mg, 230 μ mol) according to the manual SPPS procedure described above. The peptide resin thus obtained was treated with TFA/TIS/H₂O (v/v/v, 95/5/5, 5 mL) at room temperature for 1 hour to give a crude product, which was purified by preparative HPLC to obtain the title compound (69.7 mg, 45%).

Analytical HPLC: R_t, 10.8 min [10–80% CH₃CN in 0.1% TFA (25 min); detection, 220 nm].

ESI-MS: calcd for C₂₇H₃₃N₇O₅S [M+H]⁺ *m/z* = 568.2, found: 568.2.

Gly-Tyr-Phe-Cys-Gly-NH₂ (31b)

This peptide was prepared from Fmoc-NH-SAL resin (**47**) (510 mg, 230 μ mol) as described above for **31a** to obtain the title compound (73.2 mg, 50%).

Analytical HPLC: R_t, 8.7 min [10–80% CH₃CN in 0.1% TFA (25 min); detection, 220 nm].

ESI-MS: calcd for C₂₅H₃₂N₆O₆S [M+H]⁺ *m/z* = 545.2, found: 545.2.

Gly-Ser-Phe-Cys-Gly-NH₂ (31c)

This peptide was prepared from Fmoc-NH-SAL resin (**47**) (510 mg, 230 μ mol) as described above for **31a** to obtain the title compound (65.0 mg, 50%).

Analytical HPLC: R_t, 6.7 min [10–80% CH₃CN in 0.1% TFA (25 min); detection, 220 nm].

ESI-MS: calcd for C₁₉H₂₈N₆O₆S [M+H]⁺ *m/z* = 469.2, found: 469.2.

Gly-Met-Phe-Cys-Gly-NH₂ (31d)

This peptide was prepared from Fmoc-NH-SAL resin (**47**) (310 mg, 140 μ mol) as described above for **31a** to obtain the title compound (34.1 mg, 40%).

Analytical HPLC: R_t, 9.1 min [10–80% CH₃CN in 0.1% TFA (25 min); detection, 220 nm].

ESI-MS: calcd for C₂₁H₃₂N₆O₅S₂ [M+H]⁺ *m/z* = 513.2, found: 513.2.

Gly-Glu-Phe-Cys-Gly-NH₂ (31e)

This peptide was prepared from Fmoc-NH-SAL resin (**47**) (310 mg, 140 μ mol) as described above for **31a** to obtain the title compound (31.5 mg, 37%).

Analytical HPLC: R_t, 7.0 min [10–80% CH₃CN in 0.1% TFA (25 min); detection, 220 nm].

ESI-MS: calcd for C₂₁H₃₀N₆O₇S [M+H]⁺ *m/z* = 511.2, found: 511.2.

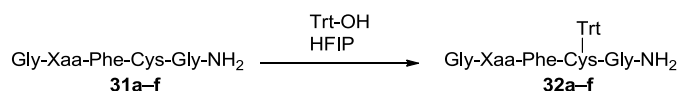
Gly-His-Phe-Cys-Gly-NH₂ (31f)

This peptide was prepared from Fmoc-NH-SAL resin (**47**) (510 mg, 230 μ mol) according to the general manual SPPS procedure. The peptide resin thus obtained was treated with TFA/TIS/H₂O (v/v/v, 95/5/5, 5 mL) in the presence of methoxyamine hydrochloride (96.0 mg, 1.15 mmol) at room temperature for 1 hour to give a crude product, which was purified by preparative HPLC to obtain the title compound (60.8 mg, 37%).

Analytical HPLC: R_t, 5.8 min [10–80% CH₃CN in 0.1% TFA (25 min); detection, 220 nm].

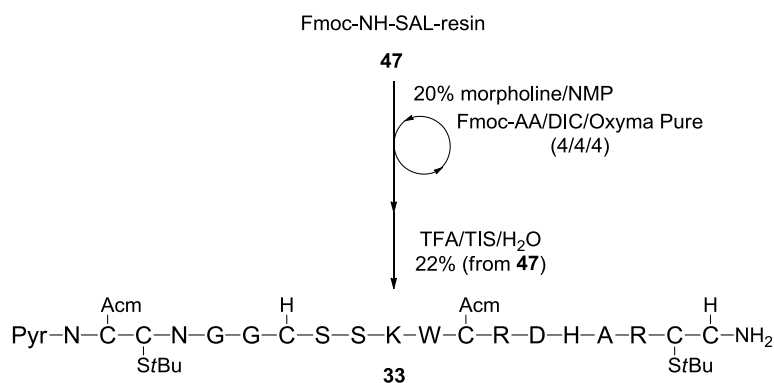
ESI-MS: calcd for C₂₂H₃₀N₈O₅S [M+H]⁺ *m/z* = 519.2, found: 519.2.

Tritylation of Gly-Xaa-Phe-Cys-Gly-NH₂ (31a–f)



To a solution of 10 mM Gly-Xaa-Phe-Cys-Gly-NH₂ **31a–f** in HFIP was added trityl alcohol (1.1 equiv). The reaction mixture was stirred at room temperature for 1 hour and analyzed by HPLC.

[Cys(Acm)^{3,13}, Cys(S*t*Bu)^{4,19}, Cys^{8,20}] μ -SIIIA (33**)**

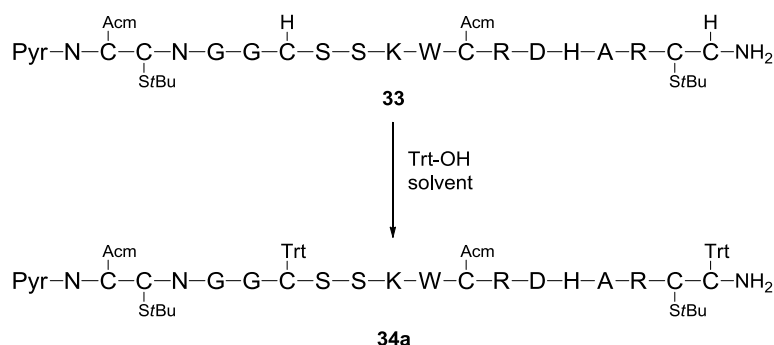


The peptide was assembled using an ABI 433A peptide synthesizer on an Fmoc-NH-SAL resin (**47**) (561 mg, 250 μmol) according to the general automated SPPS procedure. The resulting resin (100 mg, 15.1 μmol) was treated with TFA/TIS/H₂O (v/v/v, 95/5/5, 2 mL) at room temperature. After 1 hour stirring, the resin was filtered and washed with TFA. The combined filtrates were concentrated under reduced pressure. The residue was precipitated with Et₂O, and the resulting powders were purified by preparative HPLC to obtain the title compound (9.73 mg, 22% from **47**).

Analytical HPLC: R_t, 13.1 min [10–80% CH₃CN in 0.1% TFA (25 min); detection, 220 nm].

ESI-MS: calcd for C₉₇H₁₅₆N₃₅O₂₉S₈ [M+H]⁺ m/z = 2533.0, [M+2H]²⁺ m/z = 1267.0, [M+3H]³⁺ m/z = 845.0, found: 1266.7, 844.8.

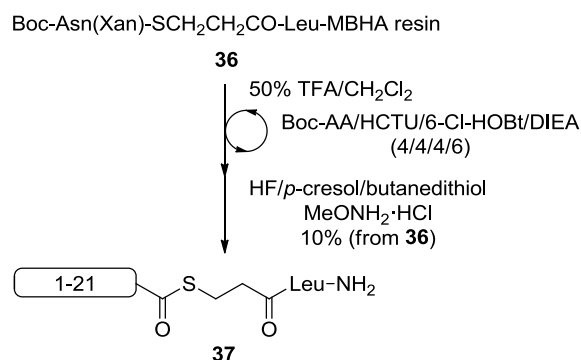
Trytylation of [Cys(Acm)^{3,13}, Cys(S*t*Bu)^{4,19}, Cys^{8,20}] μ -SIIIA (33**)**



To a solution of 5 mM **33** in HFIP, 1% TFA in HFIP, 2% TFA in 50% HFIP/AcOH was added trityl alcohol (4.0 equiv). The reaction mixture was stirred at room temperature for 2 hours and analyzed by HPLC.

Synthesis of rat C-type natriuretic peptide-53 (**35**)

DLRVDTKSRAAWARLLHEHPN-SCH₂CH₂CO-Leu-NH₂ [(1-21)-SR] (**37**)

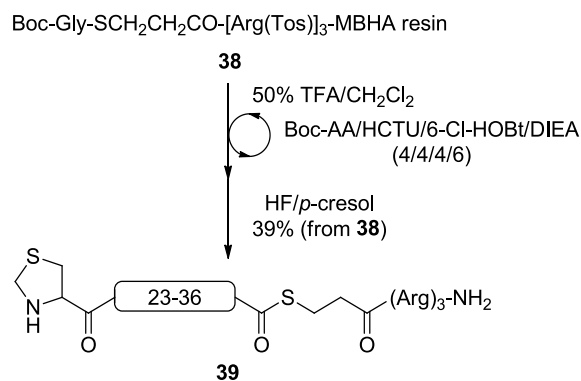


The peptide was assembled using an ABI 433A peptide synthesizer on a Boc-Asn(Xan)-SCH₂CH₂CO-Leu-MBHA resin (**36**) (1.00 g, 470 μmol) according to the general automated Boc-SPPS procedure. The peptide resin was treated with HF/*p*-cresol/butanedithiol (v/v/v, 80/5/15, 17 mL) in the presence of methoxyamine hydrochloride (200 mg, 2.35 mmol) at -5 °C to -2 °C for 1 hour to give a crude product, which was purified by preparative HPLC to obtain the title compound (174 mg, 10% from **36**).

Analytical HPLC: R_t, 16.5 min [1–60% CH₃CN in 0.1% TFA (25 min); detection, 220 nm].

ESI-MS: calcd for C₁₁₇H₁₉₀N₃₉O₃₂S [M+H]⁺ *m/z* = 2687.0, [M+2H]²⁺ *m/z* = 1344.0, [M+3H]³⁺ *m/z* = 896.3, found: 1344.1, 896.1.

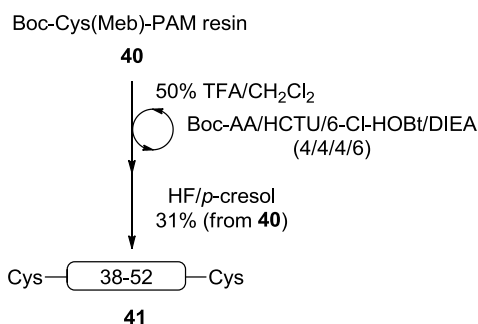
ThzRKYKGGNKKGLSKG-SCH₂CH₂CO-RRR-NH₂ {[Thz²²](22-36)-SR} (**39**)



The peptide was assembled using an ABI 433A peptide synthesizer on a Boc-Gly-SCH₂CH₂CO-Leu-MBHA resin (**38**) (863 mg, 500 μmol) according to the general automated Boc-SPPS procedure. The peptide resin was treated with HF/*p*-cresol (v/v, 80/20, 15 mL) at -5 °C to -2 °C for 1 hour to give a crude product, which was purified by preparative HPLC to obtain the title compound (622 mg, 39% from **38**).

Analytical HPLC: R_t, 9.6 min [1–60% CH₃CN in 0.1% TFA (25 min); detection, 220 nm].

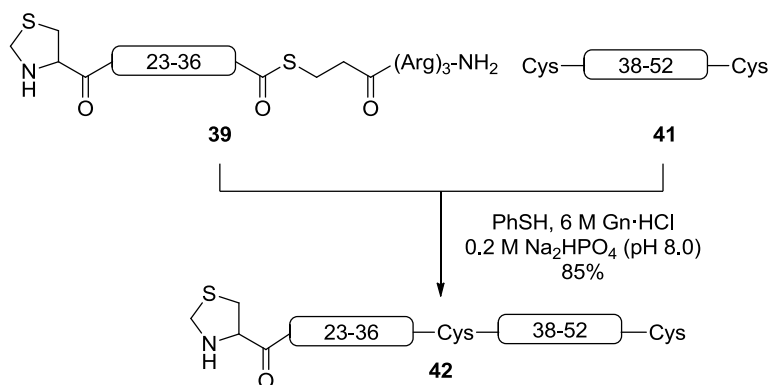
ESI-MS: calcd for C₉₁H₁₆₃N₃₆O₂₃S₂ [M+H]⁺ *m/z* = 2193.6, [M+2H]²⁺ *m/z* = 1097.3, [M+3H]³⁺ *m/z* = 731.8, found: 1097.1, 731.7.

CFGLKLDRIQSMSGGLGC [(37-53)] (41)

The peptide was assembled using an ABI 433A peptide synthesizer on a Boc-Cys(Meb)-PAM resin (**40**) (803 mg, 500 μ mol) according to the general automated SPPS procedure. The peptide resin was treated with HF/*p*-cresol (v/v, 80/20, 15mL) at -5 °C to -2 °C for 1 hour to give a crude product, which was purified by preparative HPLC to obtain the title compound (320 mg, 31% from **40**).

Analytical HPLC: R_t , 17.4 min [1–60% CH₃CN in 0.1% TFA (25 min); detection, 220 nm].

ESI-MS: calcd for C₇₄H₁₂₆N₂₁O₂₃S₃ [M+H]⁺ m/z = 1756.8, found: 1756.8.

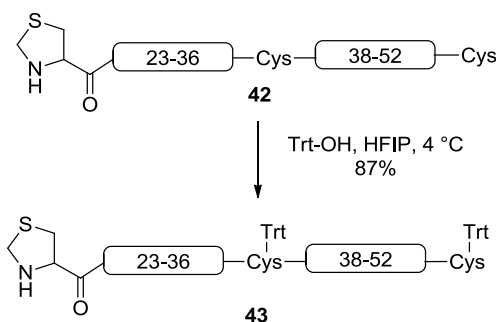
ThzRKYKGGNKKGLSKGCFGLKLDRIQSMSGGLGC {[Thz²²](22-53)} (42)

39 (283 mg, 89.4 μ mol) and **41** (187 mg, 91.2 μ mol) were dissolved in 0.2 M sodium phosphate buffer (pH 8.0, 5 mL) containing 6 M guanidine hydrochloride. 2% Thiophenol (v/v) was added to the solution which was stirred for 4 hours at room temperature, and then treated with dithiothreitol (30.8 mg, 200 μ mol). After 20 minutes, the pH was adjusted to < 3 by adding AcOH. The mixture was washed with Et₂O and the aqueous layer was directly subjected to preparative HPLC to obtain the title compound (330 mg, 85%).

Analytical HPLC: R_t , 15.6 min [1–60% CH₃CN in 0.1% TFA (25 min); detection, 220 nm].

ESI-MS: calcd for C₁₄₄H₂₄₆N₄₅O₄₀S₄ [M+H]⁺ m/z = 3376.0, [M+2H]²⁺ m/z = 1688.5, [M+3H]³⁺ m/z = 1126.0, found: 1688.3, 1125.8.

ThzRKYKGGNKKGLSKGC(Trt)FGLKLDRIKSMGLGC(Trt) {[Thz²², Cys(Trt)^{37,53}](22-53)} (43)

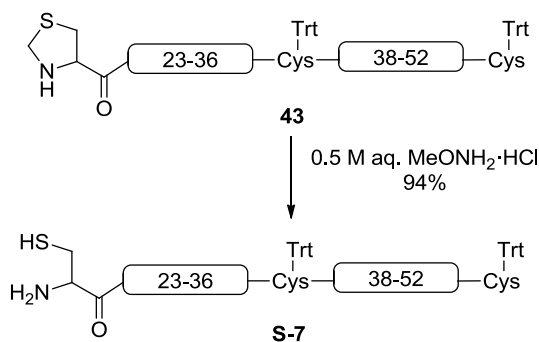


To a solution of **42** (87.6 mg, 20.2 μmol) in HFIP (1 mL) was added trityl alcohol (21.0 mg, 80.8 μmol). The reaction mixture was stirred at 4 °C for 2 hours. The product was precipitated with diisopropyl ether, and collected by filtration and washed with diisopropyl ether to give the title compound (82.8 mg, 87%).

Analytical HPLC: *R_t*, 17.6 min [10–80% CH₃CN in 0.1% TFA (25 min); detection, 220 nm].

ESI-MS: calcd for C₁₈₂H₂₇₄N₄₅O₄₀S₄ [M+H]⁺ *m/z* = 3860.6, [M+3H]³⁺ *m/z* = 1287.5, [M+4H]⁴⁺ *m/z* = 965.9, found: 1287.3, 965.7.

CRKYKGGNKKGLSKGC(Trt)FGLKLDRIKSMGLGC(Trt) {[Cys(Trt)^{37,53}](22-53)} (S-7)

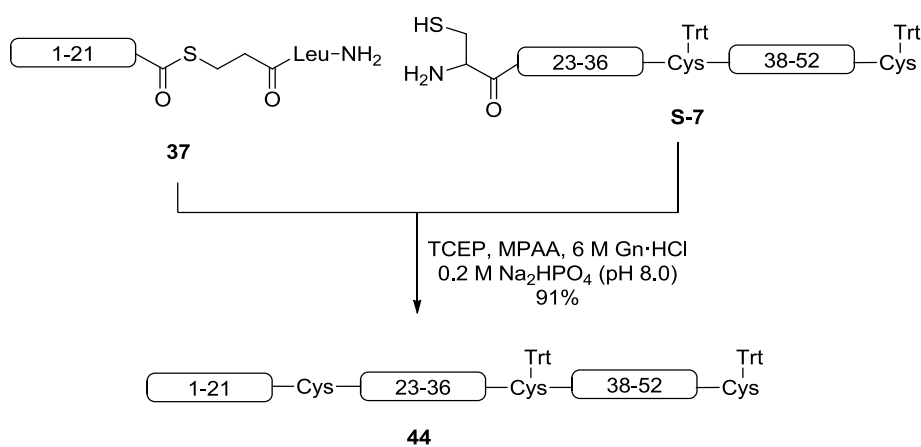


43 (80.3 mg, 16.9 μmol) was dissolved in degassed 0.5 M aqueous methoxyamine hydrochloride. The mixture was stirred at room temperature for 4 hours. The reaction mixture was directly subjected to preparative HPLC to obtain the title compound (75.3 mg, 94%).

Analytical HPLC: *R_t*, 17.6 min [10–80% CH₃CN in 0.1% TFA (25 min); detection, 220 nm].

ESI-MS: calcd for C₁₈₁H₂₇₄N₄₅O₄₀S₄ [M+H]⁺ *m/z* = 3848.6, [M+3H]³⁺ *m/z* = 1283.5, [M+4H]⁴⁺ *m/z* = 962.9, found: 1283.2, 962.7.

DLRVDTKSRAAWARLLHEHPNCRKYKGGNKKGLSKGC(Trt)FGLKLDRIQSMSGLGC(Trt)
{{Cys²², Cys(Trt)^{37,53}}(1-53)} (44)

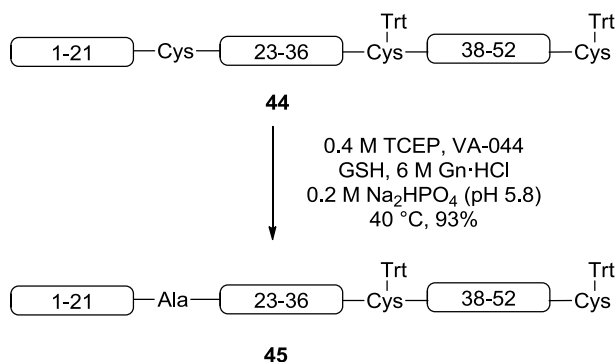


S-7 (24.0 mg, 5.08 μmol) and **37** (20.6 mg, 6.10 μmol) were dissolved in 0.2 M sodium phosphate buffer (pH 8.0, 2 mL) containing 20 mM tris(2-carboxyethyl)phosphine, 30 mM 4-mercaptophenylacetic acid and 6 M guanidine hydrochloride. The mixture was allowed to react under stirring for 20 hours at room temperature, and then treated with dithiothreitol (10.0 mg, 64.9 μmol). After 20 minutes, the pH was adjusted to < 3 by the addition of AcOH. The reaction mixture was directly subjected to preparative HPLC to obtain the title compound (35.4 mg, 91%).

Analytical HPLC: R_t , 16.1 min [10–80% CH_3CN in 0.1% TFA (25 min); detection, 220 nm].

ESI-MS: calcd for $\text{C}_{289}\text{H}_{445}\text{N}_{82}\text{O}_{70}\text{S}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ $m/z = 6316.3$, $[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$ $m/z = 1579.8$, $[\text{M}+5\text{H}]^{5+}$ $m/z = 1264.0$, found: 1579.6, 1263.9.

DLRVDTKSRAAWARLLHEHPNARKYKGGNKKGLSKGC(Trt)FGLKLDRIQSMSGLGC(Trt)
{{Cys(Trt)^{37,53}}(1-53)} (45)

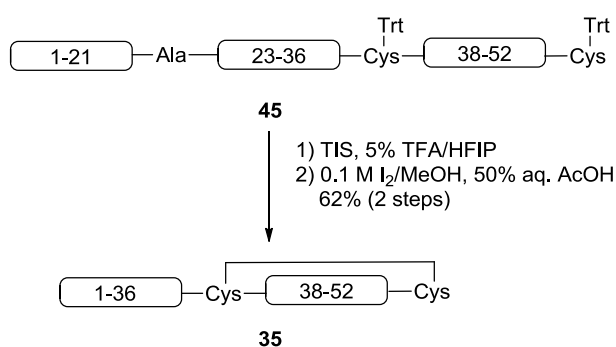


To a solution of **44** (25.0 mg, 3.21 μmol) in degassed 0.2 M sodium phosphate buffer (pH 5.8, 2 mL) containing 6 M guanidine hydrochloride and 0.4 M tris(2-carboxyethyl)phosphine were added 1 M aqueous VA-044 (64.2 μL , 64.2 μmol) and GSH (39.4 mg, 128 μmol). The mixture was stirred at 40 $^{\circ}\text{C}$ for 4 hours and then directly subjected to preparative HPLC to obtain the title compound (23.1 mg, 93%).

Analytical HPLC: R_t , 16.1 min [10–80% CH_3CN in 0.1% TFA (25 min); detection, 220 nm].

ESI-MS: calcd for $\text{C}_{289}\text{H}_{445}\text{N}_{82}\text{O}_{70}\text{S}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ $m/z = 6284.3$, $[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$ $m/z = 1571.8$, $[\text{M}+5\text{H}]^{5+}$ $m/z = 1257.6$, found: 1571.6, 1257.6.

rat C-type natriuretic peptide-53 (**35**)



To a solution of **45** (12.8 mg, 1.65 μmol) in 5% TFA/HFIP was added TIS (3.40 μL , 16.5 μmol). The mixture was stirred at room temperature for 20 minutes and then diluted with H_2O and AcOH. After 0.1 M I_2/MeOH (18.0 μL , 1.80 μmol) was added dropwise. After 2 minutes, the reaction was quenched by adding 1 M aqueous ascorbic acid (16.5 μL). The mixture was directly subjected to preparative HPLC to obtain the title compound (7.31 mg, 62% in 2 steps).

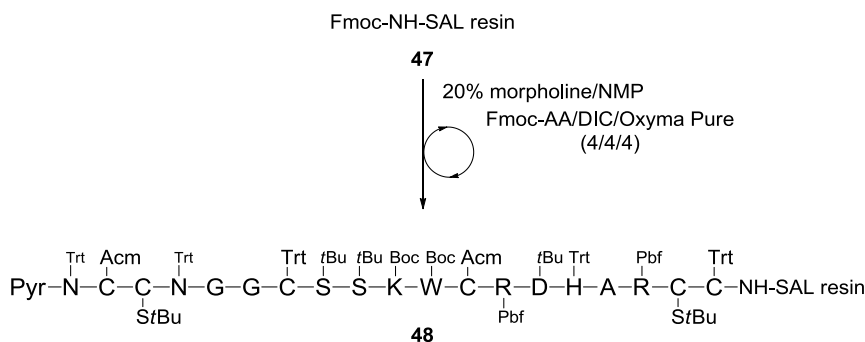
Analytical HPLC: R_t , 16.5 min [1–60% CH_3CN in 0.1% TFA (25 min); detection, 220 nm].

ESI-MS: calcd for $\text{C}_{251}\text{H}_{415}\text{N}_{82}\text{O}_{70}\text{S}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ $m/z = 5797.7$, $[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$ $m/z = 1450.1$, $[\text{M}+5\text{H}]^{5+}$ $m/z = 1160.3$, found: 1450.0, 1160.2.

第三章に関わる実験

Synthesis of μ -conotoxin SIIIA (46)

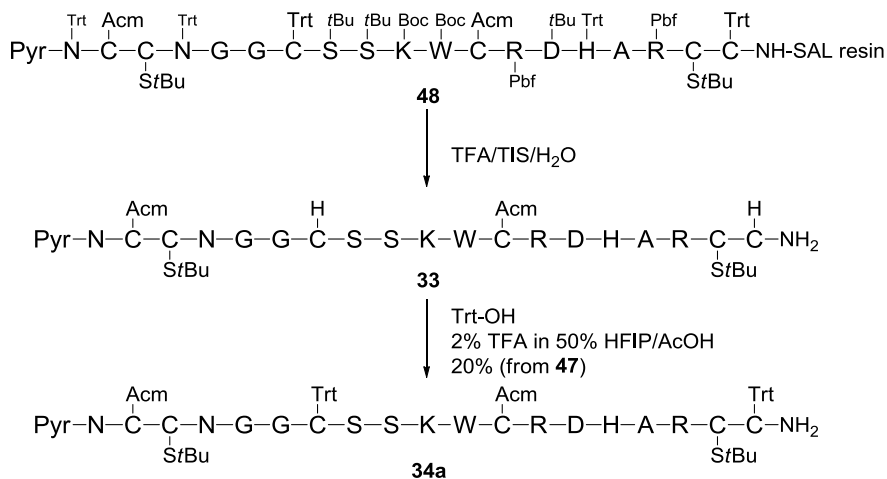
Protected peptide resin of μ -SIIIA **48**



The peptide resin was constructed using an ABI 433A peptide synthesizer on an Fmoc-NH-SAL resin (**47**) (563 mg, 250 μmol) according to the general automated Fmoc-SPPS procedure.

[Cys(Acm)^{3,13}, Cys(StBu)^{4,19}, Cys(Trt)^{8,20}] μ -SIIIA (**34a**)

(Deprotection and reintroduction of the Trt groups: route A)



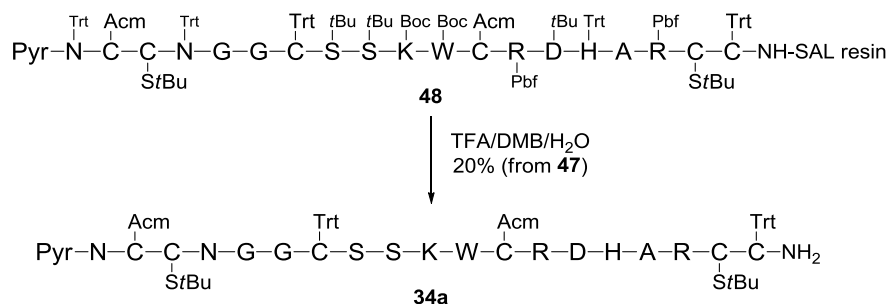
The peptide resin **48** (300 mg, 45.3 μmol) was treated with TFA/TIS/H₂O (v/v/v, 95/2.5/2.5, 10 mL) at room temperature. After 1 hour, the resin was filtered and washed with TFA. The combined filtrates were concentrated under the reduced pressure. The residue was precipitated with Et₂O. The resulting powders were used for the next step without further purification. To a solution of the product in 2% TFA in 50% HFIP/AcOH (4 mL) was added trityl alcohol (58.9 mg, 226 μmol). The mixture was stirred at room temperature for 2 hours. The reaction mixture was directly subjected to preparative HPLC to obtain the title compound (27.8 mg, 20% from **47**).

Analytical HPLC: R_t , 19.4 min [10–80% CH₃CN in 0.1% TFA (25 min); detection, 220 nm].

ESI-MS: calcd for C₁₃₅H₁₈₄N₃₅O₂₉S₈ [M+H]⁺ m/z = 3017.6, [M+2H]²⁺ m/z = 1509.3, [M+3H]³⁺ m/z = 1006.5, found: 1508.9, 1006.3.

[Cys(Acm)^{3,13}, Cys(SfBu)^{4,19}, Cys(Trt)^{8,20}] μ -SIIIA (34a)

(Deprotection and retrapping of the Trt groups: route B)

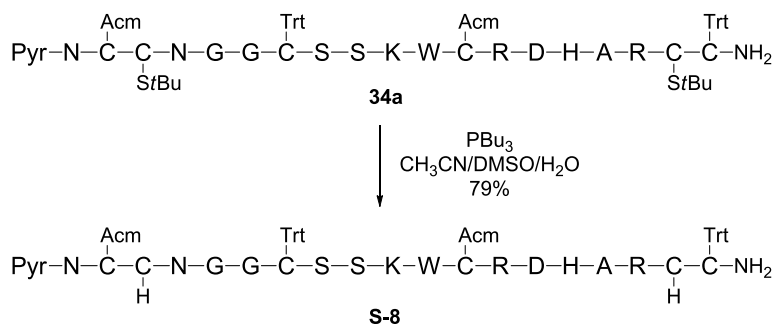


The peptide resin **48** (300 mg, 45.3 μ mol) was treated by TFA/1,3-dimethoxybenzene /H₂O (v/v/v, 95/2.5/2.5, 10 mL) at room temperature. After 1 hour stirring, the resin was filtered and washed with TFA. The combined filtrates were concentrated under the reduced pressure. The residue was precipitated with Et₂O. The resulting powders were subjected to preparative HPLC to obtain the title compound (28.6 mg, 20%).

Analytical HPLC: R_t , 19.4 min [10–80% CH₃CN in 0.1% TFA (25 min); detection, 220 nm].

ESI-MS: calcd for C₁₃₅H₁₈₄N₃₅O₂₉S₈ [M+H]⁺ m/z = 3017.6, [M+2H]²⁺ m/z = 1509.3, [M+3H]³⁺ m/z = 1006.5, found: 1508.9, 1006.3.

[Cys(Acm)^{3,13}, Cys^{4,19}, Cys(Trt)^{8,20}] μ -SIIIA (S-8)

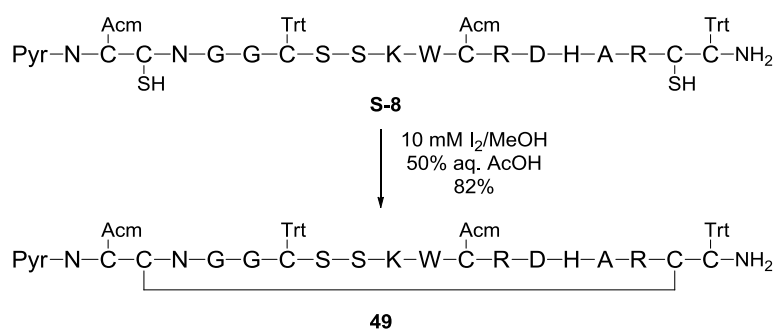


To a solution of **34a** (44.8 mg, 13.5 μmol) in $\text{CH}_3\text{CN}/\text{DMSO}/\text{H}_2\text{O}$ (v/v/v, 12/5/3, 4 mL) was added tributylphosphine (100 μL , 401 μmol). The mixture was stirred at room temperature for 2 hours and then directly subjected to preparative HPLC to obtain the title compound (33.5 mg, 79%).

Analytical HPLC: R_t , 17.2 min [10–80% CH_3CN in 0.1% TFA (25 min); detection, 220 nm].

ESI-MS: calcd for $\text{C}_{127}\text{H}_{168}\text{N}_{35}\text{O}_{29}\text{S}_6$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ $m/z = 2841.2$, $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ $m/z = 1421.1$, $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ $m/z = 947.7$, found: 1421.1, 947.5.

[Cys(Acm)^{3,13}, Cys⁴-Cys¹⁹, Cys(Trt)^{8,20}] μ -SIIIA (49)

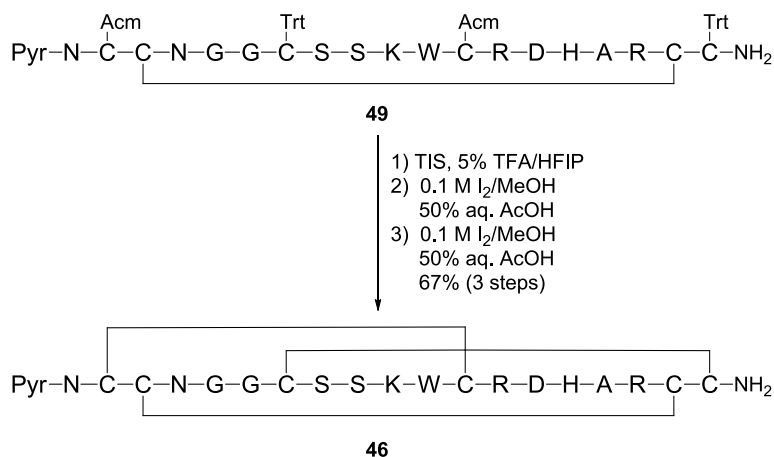


To a solution of **S-8** (39.0 mg, 12.5 μmol) in 50% aqueous AcOH (4 mL) was added 10 mM I_2/MeOH (1.38 mL, 13.8 μmol) dropwise. After 2 minutes, the reaction was quenched by adding 1 M aqueous ascorbic acid (130 μL). The mixture was directly subjected to preparative HPLC to obtain the title compound (32.0 mg, 82%).

Analytical HPLC: R_t , 14.3 min [30–60% CH_3CN in 0.1% TFA (25 min); detection, 220 nm].

ESI-MS: calcd for $\text{C}_{127}\text{H}_{166}\text{N}_{35}\text{O}_{29}\text{S}_6$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ $m/z = 2839.2$, $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ $m/z = 1420.1$, $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ $m/z = 947.0$, found: 1419.7, 946.9.

μ -conotoxin SIIIa (**46**)

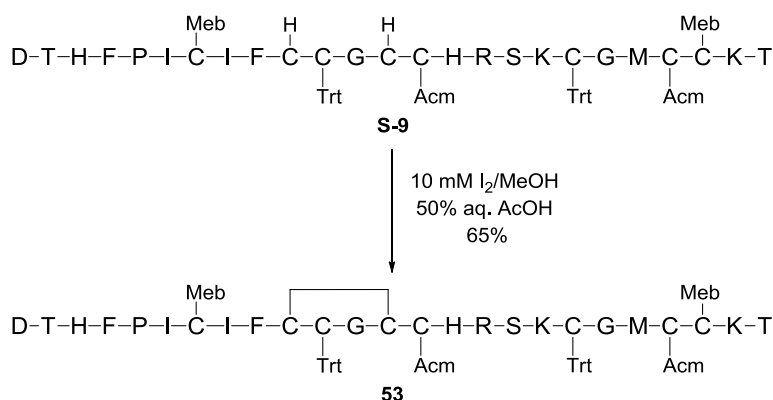


To a solution of **49** (26.5 mg, 8.47 μ mol) in 5% TFA/HFIP (3 mL) was added TIS (5.20 μ L, 25.4 μ mol). The mixture was stirred at room temperature for 10 minutes and then diluted with 50% aqueous AcOH (14 mL). After 0.1 M I₂/MeOH (93.2 μ L, 9.32 μ mol) was added dropwise, the reaction mixture was stirred for 5 minutes. And then 0.1 M I₂/MeOH (1.27 mL, 127 μ mol) was added and stirred for 1 hour. The reaction was quenched by adding 1 M aqueous ascorbic acid (260 μ L). The reaction mixture was washed with hexane and the aqueous layers were directly subjected to preparative HPLC to obtain the title compound (14.1 mg, 67% in 3 steps).

Analytical HPLC: R_t, 9.5 min [1–60% CH₃CN in 0.1% TFA (20 min); detection, 220 nm].

ESI-MS: calcd for C₈₃H₁₂₄N₃₃O₂₇S₆ [M+H]⁺ m/z = 2208.4, [M+2H]²⁺ m/z = 1104.7, [M+3H]³⁺ m/z = 736.8, found: 1104.5, 736.5.

[Cys(Meb)^{7,23}, Cys¹⁰-Cys¹³, Cys(Trt)^{11,19}, Cys(Acm)^{14,22}]hepcidin (53)

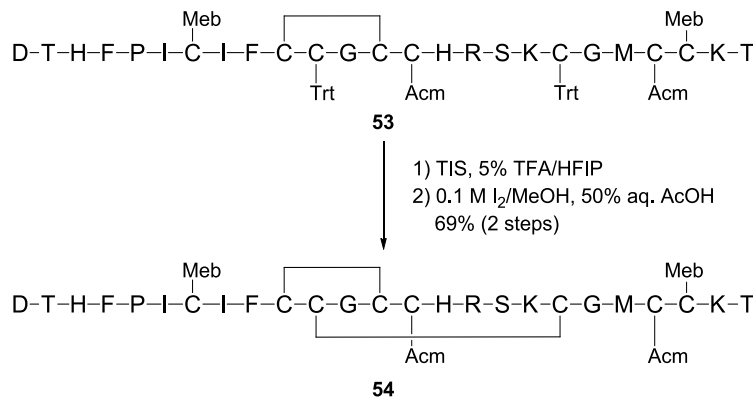


To a solution of **S-9** (130 mg, 30.8 μmol) in 50% aqueous AcOH (30 mL) was added 10 mM I₂/MeOH (3.10 mL, 31.0 μmol) dropwise. After 2 minutes, the reaction was quenched by adding 1 M aqueous ascorbic acid (310 μL). The reaction mixture was directly subjected to preparative HPLC to obtain the title compound (84.4 mg, 65%).

Analytical HPLC: R_t, 17.2 min [10–95% CH₃CN in 0.1% TFA (25 min) at 50 °C; detection, 220 nm].

ESI-MS: calcd for C₁₇₃H₂₃₁N₃₆O₃₃S₉ [M+H]⁺ *m/z* = 3631.5, [M+3H]³⁺ *m/z* = 1211.1, [M+4H]⁴⁺ *m/z* = 908.6, found: 1211.0, 908.5.

[Cys(Meb)^{7,23}, Cys¹⁰-Cys¹³, Cys¹¹-Cys¹⁹, Cys(Acm)^{14,22}]hepcidin (54)

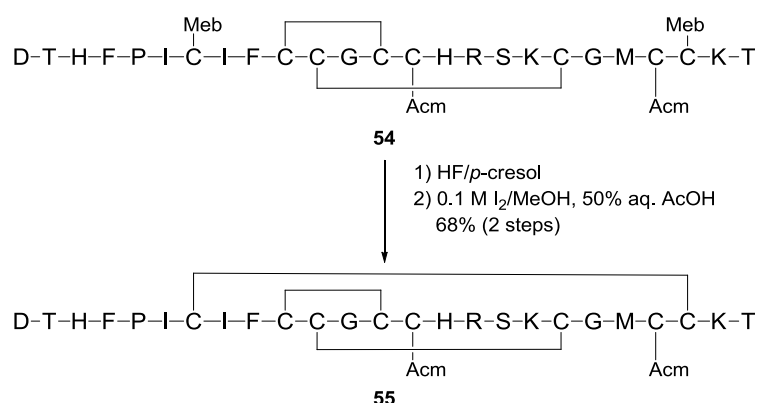


To a solution of **53** (84.0 mg, 20.0 μmol) in 5% TFA/HFIP (4 mL) was added TIS (20.0 μL, 101 μmol). The mixture was stirred at room temperature for 10 minutes and then diluted with 50% aqueous AcOH (16 mL). After 0.1 M I₂/MeOH (210 μL, 21.0 μmol) was added dropwise, the reaction mixture was stirred for 2 minutes. The reaction was quenched by adding 1 M aqueous ascorbic acid (210 μL). The reaction mixture was directly subjected to preparative HPLC to obtain the title compound (51.2 mg, 69% in 2 steps).

Analytical HPLC: R_t, 13.6 min [10–95% CH₃CN in 0.1% TFA (25 min) at 50 °C; detection, 220 nm].

ESI-MS: calcd for C₁₃₅H₂₀₁N₃₆O₃₃S₉ [M+H]⁺ *m/z* = 3144.8, [M+3H]³⁺ *m/z* = 1048.9, [M+4H]⁴⁺ *m/z* = 786.9, found: 1048.6, 786.7.

[Cys⁷-Cys²³, Cys¹⁰-Cys¹³, Cys¹¹-Cys¹⁹, Cys(Acm)^{14,22}]hepcidin (**55**)

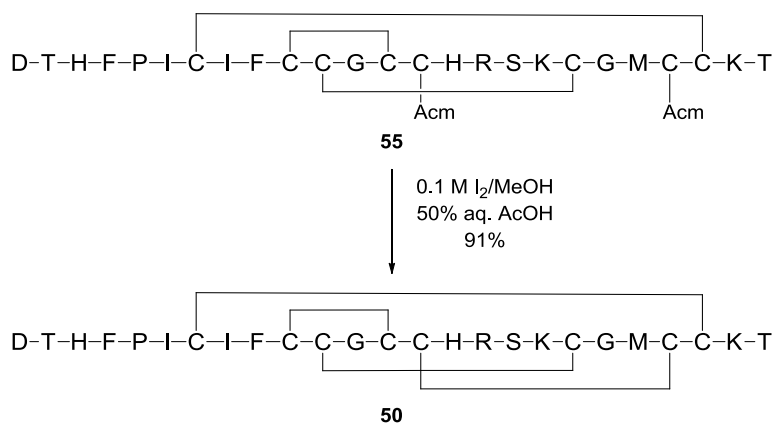


54 (10.0 mg, 2.67 μmol) was treated with HF/*p*-cresol (v/v, 80/20, 4 mL) at −3 °C. After 1 hour stirring, the reaction mixture was concentrated under the reduced pressure. The residue was diluted with 40% aqueous AcOH and washed with hexane. The resulting aqueous layer was used for the next step without further purification. 0.1 M I₂/MeOH (30.0 μL, 3.00 μmol) was added to the solution dropwise for 5 minutes. The reaction was quenched by adding 1 M aqueous ascorbic acid (30.0 μL). The reaction mixture was directly subjected to preparative HPLC to obtain the title compound (6.41 mg, 68% in 2 steps).

Analytical HPLC: R_t, 18.0 min [1–60% CH₃CN in 0.1% TFA (25 min) at 50 °C; detection, 220 nm].

ESI-MS: calcd for C₁₁₉H₁₈₃N₃₆O₃₃S₉ [M+H]⁺ *m/z* = 2934.5, [M+2H]²⁺ *m/z* = 1467.7, [M+3H]³⁺ *m/z* = 978.8, found: 1467.3, 978.5.

Human hepcidin (50)



To a solution of **55** (5.00 mg, 1.42 μmol) in 50% aqueous AcOH (6 mL) was added 0.1 M I₂/MeOH (210 μL, 21.0 μmol) dropwise. After 20 minutes stirring, the reaction was quenched by adding 1 M aqueous ascorbic acid (210 μL). The reaction mixture was directly subjected to preparative HPLC to obtain the title compound (4.40 mg, 91%).

Analytical HPLC: R_t, 14.2 min [10–60% CH₃CN in 0.1% TFA (25 min) at 50 °C; detection, 220 nm].

ESI-MS: calcd for C₁₁₃H₁₇₁N₃₄O₃₁S₉ [M+H]⁺ *m/z* = 2790.3, [M+2H]²⁺ *m/z* = 1395.6, [M+3H]³⁺ *m/z* = 930.7, found: 1395.2, 930.5.

主論文

1. Mochizuki, M.; Tsuda, S.; Tanimura, K.; Nishiuchi, Y. *Org. Lett.* **2015**, *17*, 2202–2205.
2. Mochizuki, M.; Hibino, H.; Nishiuchi, Y. *Org. Lett.* **2014**, *16*, 5740–5743.
3. Mochizuki, M.; Taichi, M.; Hibino, H.; Takuwa, A.; Yoshida, T.; Ohkubo, T.; Nishiuchi, Y. *Tetrahedron Lett.* **2014**, *55*, 3073–3076.

参考文献

1. (a) Unverzagt, C.; Kajihara, Y. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 4408–4420. (b) Holt, M.; Muir, T. *Annu. Rev. Biochem.* **2015**, *84*, 265–290.
2. Yamamoto, N.; Takayanagi, A.; Sakakibara, T.; Dawson, P. E.; Kajihara, Y. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 1341–1346.
3. Zhang, Y.; Muthana, S. M.; Farnsworth, D.; Ludek, O.; Adams, K.; Barchi, J. J.; Gildersleeve, J. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 6316–6325.
4. Postma, T. M.; Albericio, F. *Eur. J. Org. Chem.* **2014**, 3519–3530.
5. (a) Trujillo, M. E.; Schere, P. E. *J. Intern. Med.* **2005**, *257*, 167–175. (b) Matsuzawa, Y. *Curr. Pharm. Design.* **2010**, *16*, 1896–1901.
6. (a) Wang, Y.; Lam, K. S. L.; Yau, M.; Xu, A. *Biochem. J.* **2008**, *409*, 623–633. (b) Simpson, F.; Whitehead, J. P. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2010**, *42*, 785–788.
7. Takuwa, A.; Yoshida, T.; Taichi, M.; Nishiuchi, Y.; Okubo, T.; Kobayashi, Y. In *Peptide Science 2011: Proceeding of the 48th Japanese Peptide Symposium*; Sakaguchi, K., Ed.; The Japanese Peptide Society: Sapporo, 2012; pp 161–164.
8. Tsao, T. S.; Tomas, E.; Murrey, H.; Hug, C.; Lee, D. H.; Ruderman, N. B.; Heuser, J. E.; Lodish, H. F. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 50810–50817.
9. (a) Wang, Y.; Lam, K. S.; Chan, L.; Chan, K. W.; Lam, J. B.; Lam, M. C.; Hoo, R. C.; Mak, W. W.; Cooper, G. J.; Xu, A. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 16391–16400. (b) Richards, A. A.; Stephans, T.; Charlton, H. K.; Jones, A.; Macdonald, G. A.; Prins, J. B.; Whitehead, J. P. *Mol. Endocrinol.* **2006**, *20*, 1673–1687.
10. (a) Dawson, P. E.; Muir, T.; Clark-Lewis, I.; Kent, S. *Science* **1994**, *266*, 776–779. (b) Dawson, P. E.; Kent, S. B. H. *Annu. Rev. Biochem.* **2000**, *69*, 923–960. (c) Hackenberger, C. P. R.; Schwarzer, D. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2008**, *47*, 10030–10074.
11. (a) Yan, L. Z.; Dawson, P. E. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 526–533. (b) Wan, Q.; Danishefsky, S. J. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2007**, *46*, 9248–9252.
12. Hojo, H.; Aimoto, S. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1991**, *64*, 111–117.
13. (a) Kawakami, T.; Aimoto, S. *Chem. Lett.* **2007**, *36*, 76–77. (b) Kawakami, T.; Aimoto, S. *Tetrahedron* **2009**, *65*, 3871–3877.
14. Tsuda, S.; Shigenaga, A.; Bando, K.; Otaka, A. *Org. Lett.* **2009**, *11*, 823–826.
15. Ollivier, N.; Dheur, J.; Mhidia, R.; Blanpain, A.; Melnyk, O. *Org. Lett.* **2010**, *12*, 5238–5241.
16. Hojo, H.; Onuma, Y.; Akimoto, Y.; Nakahara, Y. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 25–28.
17. (a) Allevi, P.; Anastasia, M.; Paroni, R.; Ragusa, A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 3319–3321. (b) Herbert, K. R.; Williams, G. M.; Cooper, G. J. S.; Brimble, M. A. *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 1137–1144.
18. Holm, B.; Broddefalk, J.; Flodell, S.; Wellner, E.; Kihlberg, J. *Tetrahedron* **2000**, *56*, 1579–1586.
19. Van Boeckel, C. A. A.; Beetz, T. *Tetrahedron Lett.* **1983**, *24*, 3775–3778.
20. Lu, S.-R.; Lai, Y.-H.; Chen, J.-H.; Liu, C.-Y.; Mong, K.-K. T. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2011**, *50*, 7315–7320.

21. Schnoelzer, M.; Alewood, P.; Jones, A.; Alewood, D.; Kent, S. B. H. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1992**, *40*, 180–193.
22. Hojo, H.; Kobayashi, H.; Ubagai, R.; Asahina, Y.; Nakahara, Y.; Katayama, H.; Ito, Y.; Nakahara, Y. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 6807–6813.
23. Konig, W.; Bickel, M.; Karch, K.; Teetz, V.; Uhmman, R. *Peptides* **1984**, *5*, 189–193.
24. Tiburu, E. K.; Dave, P. C.; Vanlerberghe, J. F.; Cardon, T. B.; Minto, R. E.; Lorigan, G. A. *Anal. Biochem.* **2003**, *318*, 146–151.
25. Ueki, A.; Nakahara, Y.; Hojo, H.; Nakahara, Y. *Tetrahedron* **2007**, *63*, 2170–2181.
26. Bang, D.; Kent, S. B. H. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2004**, *43*, 2534–2538.
27. (a) Wong, C. T. T.; Tung, C. L.; Li, X. *Mol. BioSyst.* **2013**, *9*, 826–833. (b) He, Q. Q.; Fang, G. M.; Liu, L. *Chin. Chem. Lett.* **2013**, *24*, 265–269. (c) Malins, L. R.; Payne, R. J. *Aust. J. Chem.* **2015**, *68*, 521–537.
28. (a) Chalker, J. M.; Bernardes, G. J. L.; Lin, Y. A.; Davis, B. G. *Chem. Asian J.* **2009**, *4*, 630–640. (b) Takaoka, Y.; Ojida, A.; Hamachi, I. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2013**, *52*, 4088–4106.
29. Calce, E.; Leone, M.; Monfregola, L.; De Luca, S. *Org. Lett.* **2013**, *15*, 5354–5357.
30. Hiskey, R. J.; Adams Jr., J. B. *J. Org. Chem.* **1965**, *30*, 1340.
31. (a) Photaki, I.; Taylor-Papadimitriou, J.; Sakarellos, C.; Mazarakis, P.; Zervas, L. *J. Chem. Soc. C.* **1970**, 2683–2687. (b) Büllsbach, E. E.; Danho, W.; Helbig, H. J.; Zahn, H. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **1980**, *361*, 865–873.
32. Narita, M.; Honda, S.; Umeyama, H.; Obana, S. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1988**, *61*, 281–284.
33. Barlos, K.; Gatos, D.; Koutsogianni, S. *J. Pept. Res.* **1998**, *3*, 194–200.
34. Kojima, M.; Minamino, N.; Kangawa, K.; Matsuo, H. *FEBS Lett.* **1990**, *276*, 209–213.
35. Taichi, M.; Kimura, T.; Nishiuchi, Y. *Int. J. Pept. Res. Ther.* **2009**, *15*, 247–253.
36. Haase, C.; Rohde, H.; Seitz, O. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2008**, *47*, 6807–6810.
37. (a) Creighton, T. E. *BioEssays* **1988**, *8*, 57–63. (b) Colgrave, M. L.; Craik, D. J. *Biochemistry* **2004**, *43*, 5965–5975.
38. (a) Nishiuchi, Y.; Sakakibara, S. *FEBS Lett.* **1982**, *148*, 260–262. (b) Lewis, R. J.; Garcia, M. L. *Nat. Rev. Drug Discovery* **2003**, *2*, 790–802. (c) Sollod, B. L.; Wilson, D.; Zhaxybayeva, O.; Gogarten, J. P.; Drinkwater, R.; King, G. F. *Peptides* **2005**, *26*, 131–139.
39. (a) Beld, J.; Woycechowsky, K. J.; Hilvert, D. *Biochemistry* **2007**, *46*, 5382–5390. (b) Okumura, M.; Shimamoto, S.; Hidaka, Y. *FEBS J.* **2012**, *279*, 2283–2295.
40. Hidaka, Y.; Shimono, C.; Ohno, M.; Okumura, N.; Adermann, K.; Forssmann, W.-G.; Shimonishi, Y. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 25155–25162.
41. (a) Spackman, D. H.; Stein, W. H.; Moore, S. *J. Biol. Chem.* **1960**, *35*, 648–659. (d) Mobli, M.; King, G. F. *Toxicon* **2010**, *56*, 849–854.

42. (a) Yang, Y.; Sweeney, W. V.; Schneider, K.; Chait, B. T.; Tam, J. P. *Protein Sci.* **1994**, *3*, 1267–1275. (b) Kellenberger, C.; Hietter, H.; Luu, B. *Pept. Res.* **1995**, *8*, 321–327. (c) Gali, H.; Sieckman, G. L.; Hoffman, T. J.; Owen, N. K.; Mazuru, D. G.; Forte, L. R.; Volkert, W. A. *Bioconjugate Chem.* **2002**, *13*, 224–231. (d) Góngora-Benítez, M.; Tulla-Puche, J.; Paradis-Bas, M.; Werbitzky, O.; Giraud, M.; Albericio, F. *Pept. Sci.* **2011**, *96*, 69–80.
43. Akondi, K. B.; Muttenthaler, M.; Dutertre, S.; Kaas, Q.; Craik, D. J.; Lewis, R. J.; Alewood, P. F. *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 5815–5847.
44. Cuthbertson, A.; Indrevoll, B. *Org. Lett.* **2003**, *5*, 2955–2957.
45. Dekan, Z.; Mobli, M.; Pennington, M. W.; Fung, E.; Nemeth, E.; Alewood, P. F. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2014**, *53*, 2931–2934.
46. Otaka, A.; Koide, T.; Shide, A.; Fujii, N. *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 1223–1226.
47. Akaji, K.; Fujino, K.; Tatsumi, T.; Kiso, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 11384–11392.
48. (a) Denis, B.; Trifilieff, E. *J. Pept. Sci.* **2000**, *6*, 372–377. (b) Eliassen, R.; Andresen, T. L.; Conde-Frieboes, K.W. *Peptides* **2012**, *37*, 144–149.
49. Stathopoulos, P.; Papas, S.; Sakka, M.; Tzakos, A. G.; Tsikaris, V. *Amino Acids* **2014**, *46*, 1367–1376.
50. Bulaj, G.; West, P. J.; Garrett, J. E.; Marsh, M.; Zhang, M.-M.; Norton, R. S.; Smith, B. J.; Yoshikami, D.; Olivera, B. M. *Biochemistry* **2005**, *44*, 7259–7265.
51. Subirós-Funosas, R.; Prohens, R.; Barbas, R.; El-Faham, A.; Albericio, F. *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 9394–9403.
52. (a) Hibino, H.; Miki, Y.; Nishiuchi, Y. *J. Pept. Sci.* **2014**, *20*, 30–35. (b) Jad, Y. E.; Khattab, S. N.; De la Torre, B. G.; Govender, T.; Kruger, H. G.; El-Faham, A.; Albericio, F. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*, 8379–8385.
53. Taichi, M.; Yamazaki, T.; Kimura, T.; Nishiuchi, Y. *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 2377–2380.
54. Kamber, B.; Hartmann, A.; Eisler, K.; Riniker, B.; Rink, H.; Sieber, P.; Rittel, W. *Helv. Chim. Acta* **1980**, *63*, 899–915.
55. Tanimura, K.; Taichi, M.; Nishio, H.; Kubo, S.; Nishiuchi, Y. *9th Australian Peptide Conference*; Queensland, Australia, October 16–20, 2011.
56. Nemeth, E.; Ganz, T. *Annu. Rev. Nutr.* **2006**, *26*, 323–342.

謝辞

本論文の作成にあたり、直接のご指導、御討論を頂きました博士前期課程時代の恩師である静岡県立大学薬学部医薬品製造化学講座 教授 菅 敏幸 先生に深く感謝致します。

Adiponectin の研究に御協力頂いた、大阪大学大学院薬学研究科高分子化学分野 教授 大久保 忠 恭 先生、准教授 吉田 卓也 先生に深く感謝致します。

本論文を御高閲いただきました、静岡県立大学 薬学部 教授 眞鍋 敬 先生、教授 尾上 誠良 先生、教授 濱島 義隆 先生、准教授 江木 正浩 先生に深謝致します。

本研究は、株式会社ペプチド研究所内で行われたものであり、終始多くの御支援と御指導を賜りました研究部長、兼、大阪大学大学院理学研究科 招聘教授 西内 祐二 博士（現 株式会社 糖鎖工学研究所）に深甚なる誠意を表します。研究を進めるにあたりさまざまな御助言、御激励を頂きました西尾 秀喜 博士、熊谷 久美子 博士、響野 元 博士、泰地 美沙子 博士、谷村 恭子 修士、津田 修吾 修士、吉矢 拓 博士を始め、株式会社ペプチド研究所の皆様へ感謝致します。

折りに触れ御助言、御激励をいただきました静岡県立大学薬学部医薬品製造化学講座 助教 稲井 誠 先生、助教 浅川 倫宏 先生に厚く感謝致します。

最後に、研究生活を多大な支援と激励をもって支えてくれた妻をはじめ、家族に心より感謝致します。

2016 年 3 月
望月 雅允