

東海大学大学院平成 29 年度博士論文

セレン含有アミノ酸およびペプチドの合成と
酵素モデルとしての応用

指導教員 岩岡 道夫 教授

東海大学大学院総合理工学研究科
総合理工学専攻

下平 伸吾

目次

| | |
|--|-----------|
| 略語 | 3 |
| 1章 序論 | 6 |
| 1-1 生体におけるセレンの利用 | 6 |
| 1-2 セレノシステインの生合成経路 | 7 |
| 1-3 セレノシステイン誘導体の有機化学的合成法 | 12 |
| 1-4 グルタチオンペルオキシダーゼ(GPx)とモデル化合物 | 14 |
| 1-5 化学合成法によるペプチド合成とライゲーシオン | 18 |
| 1-6 結論 | 22 |
| 1-7 参考文献 | 23 |
| 2章 ペプチド合成に有用なセレノシステイン誘導体の効率的合成法の開発 | 25 |
| 2-1 緒言 | 25 |
| 2-2 Boc 法に有用なセレノシステイン誘導体の効率的合成 | 28 |
| 2-3 Fmoc 法に有用なセレノシステイン誘導体の効率的合成 | 29 |
| 2-4 結論 | 32 |
| 2-5 実験操作 | 33 |
| 2-6 参考文献 | 41 |
| 3章 セレノグルタチオンの液相合成と酸化還元反応 | 42 |
| 3-1 緒言 | 42 |
| 3-2 液相ペプチド合成に用いるアミノ酸誘導体の合成 | 45 |
| 3-3 Pfp エステルを用いたカップリング | 46 |
| 3-4 Pfp エステルを用いないカップリング | 47 |
| 3-5 セレノグルタチオン誘導体の脱保護 | 48 |
| 3-6 ^{77}Se NMR によるセレノグルタチオンの反応追跡 | 50 |
| 3-7 セレノグルタチオンを用いたミスフォールド RNaseA のリフォールディング | 60 |
| 3-8 結論 | 62 |
| 3-9 実験操作 | 63 |
| 3-10 参考文献 | 70 |

| | |
|---------------------------------|----|
| 4章 新規環状セレノペプチドの合成と GPx 様触媒活性の評価 | 72 |
| 4-1 緒言 | 72 |
| 4-2 NAC 法に用いるジペプチドの合成 | 75 |
| 4-3 環状セレノペプチドの合成 | 76 |
| 4-4 セレノペプチドの GPx 様触媒活性測定 | 80 |
| 4-5 結論 | 81 |
| 4-6 実験操作 | 82 |
| 4-7 参考文献 | 86 |
| 5章 総括 | 87 |
| 謝辞 | 89 |

略語

| | |
|--------------------|-----------------------------------|
| AcOH | 酢酸 |
| AEMTS | 2-アミノエチルメタンチオスルホン酸塩 |
| Ala | アラニン |
| Ar | アリール |
| Asn | アスパラギン |
| Asp | アスパラギン酸 |
| ATP | アデノシン 5'-三リン酸 |
| Boc | <i>tert</i> -ブトキシカルボニル |
| BPTI | ウシ膵臓トリプシンインヒビター |
| CPE | システイニルプロリルエステル |
| CysSH | 還元型システイン |
| CysSSCys | 酸化型システイン |
| DCC | ジシクロヘキシルカルボジイミド |
| DCE | 1,2-ジクロロエタン |
| DCM | ジクロロメタン |
| DHS ^{ox} | 酸化型 <i>trans</i> -3,4-ジヒドロキシセレノラン |
| DHS ^{red} | 還元型 <i>trans</i> -3,4-ジヒドロキシセレノラン |
| DIC | ジイソプロピルカルボジイミド |
| DIEA | ジイソプロピルエチルアミン |
| DMAP | <i>N,N</i> -ジメチル-4-アミノピリジン |
| DMF | <i>N,N</i> -ジメチルホルムアミド |
| DmH | ジメドン |
| DPDS | ジピリジルジスルフィド |
| DTNP | 2,2'-ジチオビス(5-ニトロピリジン) |
| DTT ^{ox} | 酸化型ジチオスレイトール |
| DTT ^{red} | 還元型ジチオスレイトール |
| e.e. | エナンチオマー過剰率 |
| EDCI | 1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミド |
| EDTA | エチレンジアミン四酢酸 |
| ESI | エレクトロスプレーイオン化法 |
| Et ₂ NH | ジエチルアミン |
| Et ₂ O | ジエチルエーテル |
| Et ₃ N | トリエチルアミン |
| EtOAc | 酢酸エチル |

| | |
|---------------------------------|---|
| EtOH | エタノール |
| Fmoc | 9-フルオレニルメトキシカルボニル |
| GdnSCN | グアニジンチオシアン酸塩 |
| Gln | グルタミン |
| Glu | グルタミン酸 |
| Gly | グリシン |
| GPx | グルタチオンペルオキシダーゼ |
| GR | グルタチオンレダクターゼ |
| GSH | 還元型グルタチオン |
| GSSG | 酸化型グルタチオン |
| HBTU | 1-[ビス(ジメチルアミノ)メチレン]-1H-ベンゾトリアゾリウム 3-オキシドヘキサフルオロホスファート |
| HEPES | 4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジンエタンスルホン酸 |
| HF | フッ化水素 |
| HOAt | 1-ヒドロキシ-7-アザベンゾトリアゾール |
| HOBt | 1-ヒドロキシベンゾトリアゾール |
| HOObt | 3-ヒドロキシ-1,2,3-ベンゾトリアジン-4(3H)-オン |
| HPLC | 高速液体クロマトグラフィー |
| IAM | ヨードアセトアミド |
| LPPS | 液相ペプチド合成 |
| Lys | リシン |
| MALDI | マトリックス支援レーザー脱離イオン化法 |
| MBn | メチルベンジル |
| Me ₂ NH | ジメチルアミン |
| MeCN | アセトニトリル |
| MeOH | メタノール |
| MESNa | 2-メルカプトエタンスルホン酸ナトリウム |
| MPM | <i>p</i> -メトキシフェニルメチル |
| Na ₂ SO ₄ | 硫酸ナトリウム |
| NAC | <i>N</i> -アルキルシステイン |
| NADPH | ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸 |
| NCL | ネイティブケミカルライゲーション |
| NMP | <i>N</i> -メチルピロリドン |
| PDI | プロテインジスルフィドイソメラーゼ |
| Pfp | ペンタフルオロフェニル |
| RNase A | リボヌクレアーゼ A |

| | |
|--------|---------------------|
| Sec | セレノシステイン |
| Ser | セリン |
| SPPS | 固相ペプチド合成 |
| SPy | ピリジルスルファニル |
| TA | チオアニソール |
| TFA | トリフルオロ酢酸 |
| TfOH | トリフルオロメタンスルホン酸 |
| TIS | トリイソプロピルシラン |
| TOF-MS | 飛行時間型質量分析 |
| Tris | トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン |
| Trp | トリプトファン |
| Trt | トリチル |
| Ts | トシル |
| Xan | キサントール |

動物及びある種のバクテリアでは、セレンは必須微量元素であるが、一方では毒性の強い元素としても知られている。セレン欠乏症の症状としては、心筋症、不整脈、貧血、筋力低下などがあり、重症化すると致命的になる。土壌中のセレン濃度が低い地域では、克山病⁶⁾に代表されるように、セレン欠乏による風土病が知られている。一方で、セレンの慢性的な過剰摂取は神経障害、呼吸不全症候群、心筋梗塞、腎障害などを引き起こすことが明らかになっている⁷⁾。そのため、セレンが毒なのか栄養なのかという議論は長らく続いてきた。Table 1-1 に、厚生労働省が2015年に作成したセレンの日常摂取量の推奨値を示す⁸⁾。この表からセレン摂取量の許容範囲が狭く、日々の食事による摂取量には注意が必要であることがわかる。

Table 1-1. セレンの日常摂取量 (µg/day)

| 性別 | 男性 | | | | 女性 | | | | |
|----------|-----|-------------|-----|-----|-----------|-------------|-----|-----|-----------|
| | 年齢等 | 推定平均 必要量 | 推奨量 | 目安量 | 耐容 上限量 | 推定平均 必要量 | 推奨量 | 目安量 | 耐容 上限量 |
| 0～5(月) | — | — | 15 | — | — | — | 15 | — | — |
| 6～12(月) | — | — | 15 | — | — | — | 15 | — | — |
| 1～2(歳) | 10 | 10 | — | 80 | 10 | 10 | — | 70 | — |
| 3～5(歳) | 10 | 15 | — | 110 | 10 | 10 | — | 110 | — |
| 6～7(歳) | 15 | 15 | — | 150 | 15 | 15 | — | 150 | — |
| 8～9(歳) | 15 | 20 | — | 190 | 15 | 20 | — | 180 | — |
| 10～11(歳) | 20 | 25 | — | 240 | 20 | 25 | — | 240 | — |
| 12～14(歳) | 25 | 30 | — | 330 | 25 | 30 | — | 320 | — |
| 15～17(歳) | 30 | 35 | — | 400 | 20 | 25 | — | 350 | — |
| 18～29(歳) | 25 | 30 | — | 420 | 20 | 25 | — | 330 | — |
| 30～49(歳) | 25 | 30 | — | 460 | 20 | 25 | — | 350 | — |
| 50～69(歳) | 25 | 30 | — | 440 | 20 | 25 | — | 350 | — |
| 70以上(歳) | 25 | 30 | — | 400 | 20 | 25 | — | 330 | — |
| 妊婦(付加量) | | | | | | +5 | +5 | — | — |
| 授乳婦(付加量) | | | | | | +15 | +20 | — | — |

1-2 セレノシステインの生合成経路

Figure 1-2 に示すように、セレノシステインは天然型アミノ酸 (α-アミノ酸) であり、その構造はタンパク質構成アミノ酸のセリンの酸素原子あるいは、システインの硫黄原子を同じ 16 族元素のセレン原子に置換した構造である。セレンは硫黄原子と性質が類似しているため、セレノシステインは生体内においてシステインと似たような挙動を示すことが多い。しかしながら、システインとセレノシステインの間には、側鎖官能基 (チオール SH、セレノール SeH) の違いに

よって pK_a 値や酸化還元電位に大きな差があり、その化学的及び生化学的な性質は明確に異なる (Table 1-2)^[9,10]。

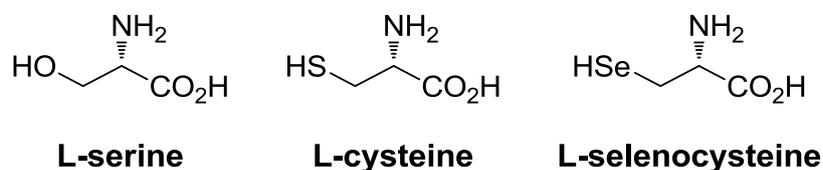


Figure 1-2. L-セリン、L-システイン、L-セレノシステインの構造

Table 1-2. 硫黄とセレンの化学的性質の比較

| Properties | X | |
|--------------------------|---------|----------|
| | Sulfur | Selenium |
| Electronegativity | 2.58 | 2.55 |
| Covalent radius | 1.02 Å | 1.17 Å |
| Bond length C β -X | 1.82 Å | 1.95 Å |
| Bond length X-X | 2.03 Å | 2.33 Å |
| Van der Waals radii | 1.8 Å | 1.9 Å |
| pK_a at X site | 8.25 | 5.24 |
| Redox potential E_0 | -238 mV | -383 mV |

セレノシステインを含むタンパク質をセレノプロテインと呼ぶ。ヒトゲノム解析の結果、ヒトにはセレノプロテインは 25 種類存在することが確認されている^[11]。中でも、抗酸化酵素である Glutathione peroxidase (GPx) はセレノシステインを活性中心に持つ酵素として代表的なセレノプロテインの一つであり、セレン原子に起因する高い抗酸化触媒活性を示すことが知られている^[12]。Table 1-3 には、ヒトにける 25 種類のセレノプロテインについてまとめた。

Table 1-3. ヒトにおけるセレノプロテイン

| セレノプロテイン 名称 | 略称 | Sec 残基の位置 (総残基数) | 機能 |
|--------------------------|---------------|---------------------|---------------------------------|
| Glutathione peroxidase 1 | GPx1, GPX1 | 47 (201) | グルタチオンを基質とした活性酸素種 (過酸化水素) の分解 |
| Glutathione peroxidase 2 | GPx2, GPX2 | 40 (190) | グルタチオンを基質とした活性酸素種の分解 (主に消化管に発現) |
| Glutathione peroxidase 3 | GPx3, GPX3 | 73 (226) | グルタチオンを基質とした活性酸素種の分解 (主に血漿に発現) |

| セレノプロテイン 名称 | 略称 | Sec 残基の位置 (総残基数) | 機能 |
|---|----------------------|---------------------|---|
| Glutathione peroxidase 4 | GPx4, GPX4 | 73 (197) | グルタチオンを基質とした活性酸 素種 (リン脂質ヒドロペルオキシ ド) の分解 |
| Glutathione peroxidase 6 | GPx6, GPX6 | 73 (221) | グルタチオンを基質とした活性酸 素種の分解 (主に嗅覚器官に発 現) |
| Iodothyronine deiodinase 1 | DI1, DIO1 | 126 (249) | チロイドホルモンの活性化 |
| Iodothyronine deiodinase 2 | DI2, DIO2 | 133, 266 (273) | 組織特異的なチロイドホルモンの 活性化 |
| Iodothyronine deiodinase 3 | DI3, DIO3 | 144 (278) | 組織特異的なチロイドホルモンの 不活性化 |
| Thioredoxine reductase 1 | TR1, TrxR1, | 498 (499) | チオレドキシンの還元 |
| Thioredoxine /glutathione reductase | TGR, TR2, TrxR3, | 655 (656) | 組織特異的なチオレドキシンの還 元 |
| Thioredoxine reductase 3 | TR3, TrxR2, | 522 (523) | ミトコンドリアのチオレドキシ ン及びグルタレドキシンの還元 |
| Methionine-R- sulfoxide reductase | MsrB1, SelR, SelX | 95 (116) | 酸化型メチオニンの還元 |
| Selenophosphate synthetase 2 | SPS2 | 60 (488) | セレノホスフェイトの合成 |
| Selenoprotein W | SelW, SEPW1 | 13 (87) | Unknown |
| Selenoprotein T | SelT | 36 (182) | Unknown |
| Selenoprotein H | SelH | 38 (116) | Unknown |
| Selenoprotein V | SelV | 273 (346) | Unknown |
| Selenoprotein I | SelI, SEPI, EPT1 | 387 (397) | Unknown |
| 15kDa selenoprotein | Sep15 | 93 (162) | [小胞体内のタンパク質フォールデ ィングに関与]*1 |
| Selenoprotein M | SelM, SEPM | 48 (145) | Unknown |
| Selenoprotein K | SelK | 92 (94) | [小胞体に関連した分解に関与]*1 |

| セレノプロテイン 名称 | 略称 | Sec 残基の位置 (総残基数) | 機能 |
|-----------------|-------------------------|--|-------------------|
| Selenoprotein S | SelS, SEPS1, VIMP | 188 (189) | [小胞体に関連した分解に関与]*1 |
| Selenoprotein O | SelO | 667 (669) | Unknown |
| Selenoprotein N | SelN, SepN, SEPN1 | 428 (556) | [筋肉の発達に関与]*1 |
| Selenoprotein P | SelP, SEPP1 | 59, 300, 318, 330, 345, 352, 367, 369, 376, 378 (381) | セレンの運搬 |

*1 推定される機能

タンパク質が生体内で合成される際、アミノ酸はそれぞれに対応するコドンに応じた tRNA に結合した後、リボソームにおいてペプチド鎖に連結される。コドンを構築する 3 つの塩基（アデニン(A)、グアニン(G)、シトシン(C)、またはチミン(T)）の組み合わせは 64 通りある。そのうち 61 の組み合わせについては 20 種類のタンパク質構成アミノ酸が割り当てられており、UAA、UAG、UGA の 3 つがペプチド鎖伸長停止を意味する終止コドンである。しかしながら、近年の研究結果から、終止コドンの一つである UGA がセレノシステインの挿入に利用されていることが明らかとなった。セレノシステインを含まない通常のタンパク質において、UGA コドンは本来の終止コドンとして認識されペプチド鎖伸長はそこで停止する。このことは、ペプチド鎖にセレノシステインを導入するためのコドンとして UGA コドンを認識する機構が存在すること、それに対応する tRNA (Sec-tRNA^{[Ser]Sec}) が存在することを意味している。現在、セレノシステイン残基の挿入は、Figure 1-3 のように行われると考えられている。

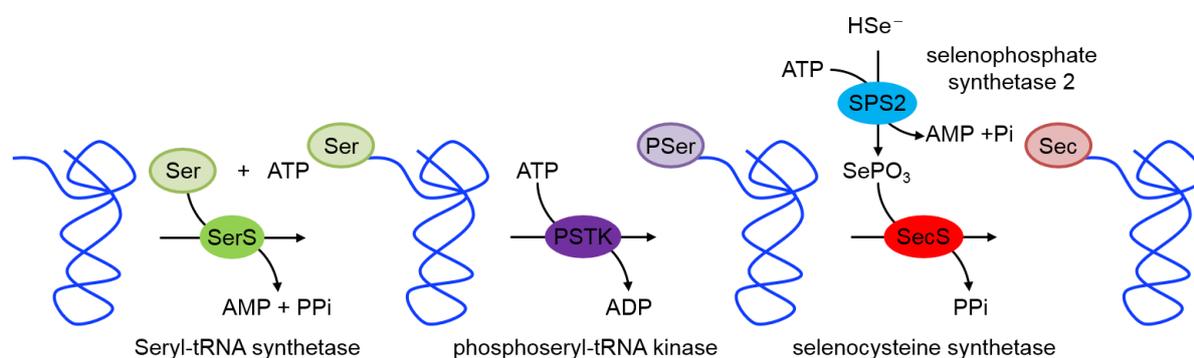


Figure 1-3. Sec-tRNA^{[Ser]Sec} の生合成経路

まず、セリル tRNA 合成酵素 (seryl-tRNA synthetase, SerS) によって tRNA^{[Ser]Sec} にセリンが付加される。続いて、ホスホセリル tRNA キナーゼ (phosphoseryl-tRNA kinase, PSTK) の

作用によってセリン残基のヒドロキシ基がリン酸化されることで活性化された後、ホスフェイトの脱離によってデヒドロアラニンが生成する。その後、セレノホスフェイト合成酵素 2 (selenophosphate synthetase 2, SPS2) によって合成されたセレノホスフェイト (selenophosphate, $H_2SePO_3^-$) が、セレノシステイン合成酵素 (selenocysteine synthetase, SecS) の触媒作用によってデヒドロアラニンに導入されて Sec-tRNA^{[Ser]Sec} の生合成が完結する。

Figure 1-3 のようにして合成された Sec-tRNA^{[Ser]Sec} はリボソームに運搬されてセレノシステインがペプチド鎖に挿入される。この際に重要なことは、mRNA の非翻訳領域に存在するセレノシステイン挿入配列 (selenocysteine insertion sequence, SECIS) の存在である (Figure 1-4)。SECIS は、SECIS binding protein 2 (SBP2) と相互作用することで複合体を形成する。その後、Selenocysteine-specific eukaryotic elongation factor (eEFSec) が Sec-tRNA^{[Ser]Sec} と相互作用することによって UGA コドンが認識され、ペプチド鎖へのセレノシステイン残基の転移が可能となる。また、それらの複合体に対して結合するいくつかの結合タンパク質がセレノシステインの転移を制御しているという報告があるが、詳細は未だに明らかではない^[13]。

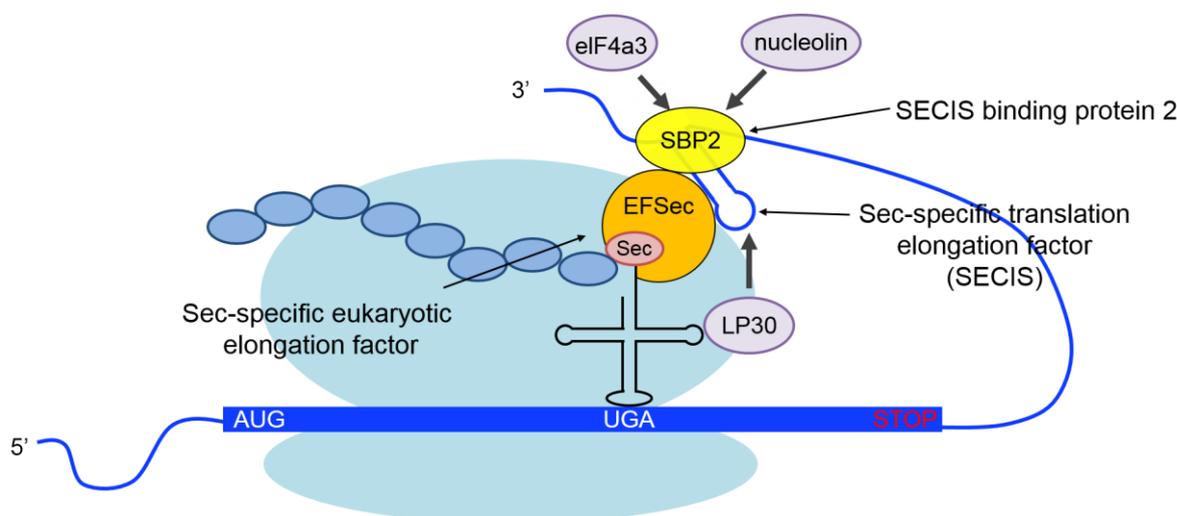


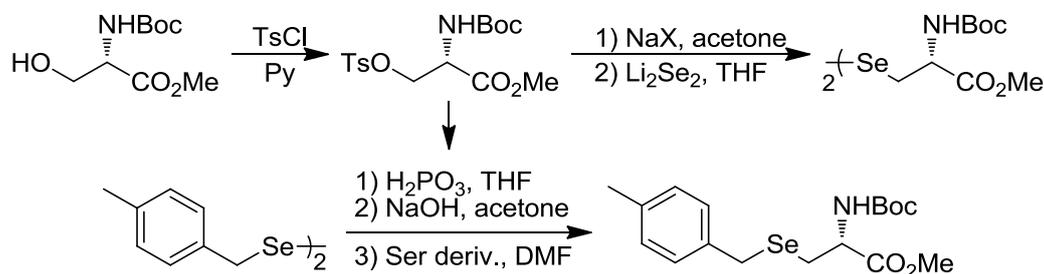
Figure 1-4. ペプチド鎖へのセレノシステインの挿入機構

このように、セレノシステインがタンパク質に組み込まれる生合成過程は非常に複雑である。現在までに確認されているセレノプロテインは、ヒト以外のものも含めると 50 種類以上にもなるが、それらの詳細な機能は明らかにされていないものがほとんどである。この原因として、天然に存在するセレノプロテインの機能解明にはセレノプロテインそのものやミュータント、モデルセレノペプチド化合物を入手することが必須であるが、セレノプロテインは生合成過程が複雑であるため遺伝工学的手法によるセレノプロテインの発現が難しいことが挙げられる。そのため、セレノプロテインの機能解明は他のタンパク質と比較して遅れをとっているのが現状である。最近、遺伝工学的にセレノプロテインを発現する方法が開発されている^[14-16]が、この手法が完成された技術となるまでには、まだまだ時間が必要であろう。

1-3 セレノシステイン誘導体の有機化学的合成法

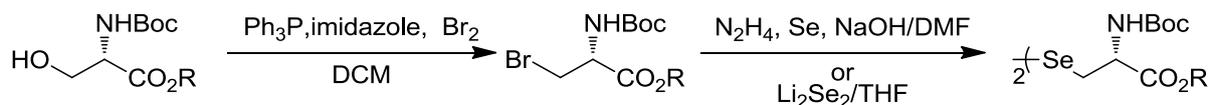
前述したように、セレノシステインは生体内で合成された後に、タンパク質に直接組み込まれる。ことからセレノシステインは 21 番目のタンパク質構成アミノ酸として認識されている。セレノプロテインを遺伝工学的に合成することが難しい現状において、化学合成によってセレノプロテインを得ようとする試みが注目されており、その原料となるセレノシステイン誘導体の合成が精力的に進められている。セレノシステイン誘導体は、アミノ基、カルボキシ基、セレノール基がそれぞれ適切な保護基で保護されている必要がある。そのようなセレノシステイン誘導体の合成法としては、様々な方法が報告されている。その多くは、生合成経路と同様にセリンを出発物質としており、高活性な中間体を経由し、様々なセレン化試薬と反応させることでセレノシステイン誘導体を得ている。以下に、その代表例を述べる。

Metanis らは、セリンの側鎖のヒドロキシ基をトシル化して脱離能を高めた後に、セレン化試薬を作用させることでセレノシステイン誘導体を合成した^[17]。この手法では、セリンのアミノ基を *tert*-ブトキシカルボニル(Boc)基、カルボキシ基をメチルエステル化することでそれぞれを保護し、側鎖ヒドロキシ基をトシル化した。別途合成したセレン化剤を活性化し、トシラートと反応させることでセレノシステイン誘導体を合成している。また、Stocking らはトシラートをハロゲン化した後に、 Li_2Se_2 をセレン化試薬として用いて反応させることによってセレノシスチン誘導体を得ている(Scheme 1-1)^[18]。



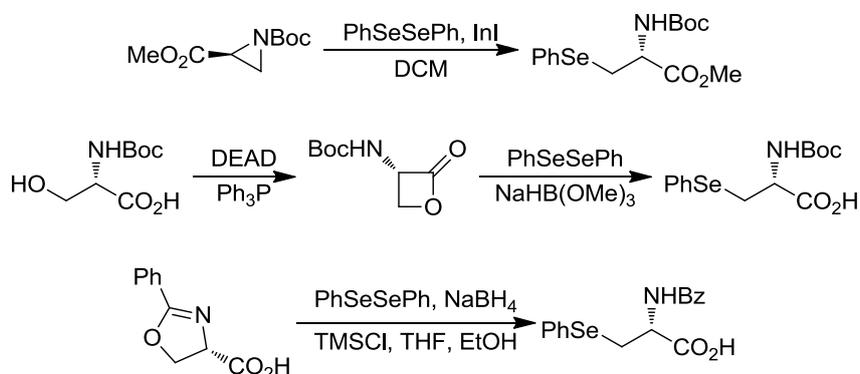
Scheme 1-1

Lugtenburg らや Mugesh らは、セリン誘導体のヒドロキシ基をトリフェニルホスフィン及びイミダゾール存在下で臭素化し、セレン化することでセレノシスチン誘導体を合成した(Scheme 1-2)^[19,20]。この手法では、セリン誘導体のヒドロキシ基を Appel 反応によって臭素化することでブロモアラニン誘導体を得ている。次に、得られたブロモアラニン誘導体とセレン化剤との反応によってセレノシスチン誘導体を得ている。



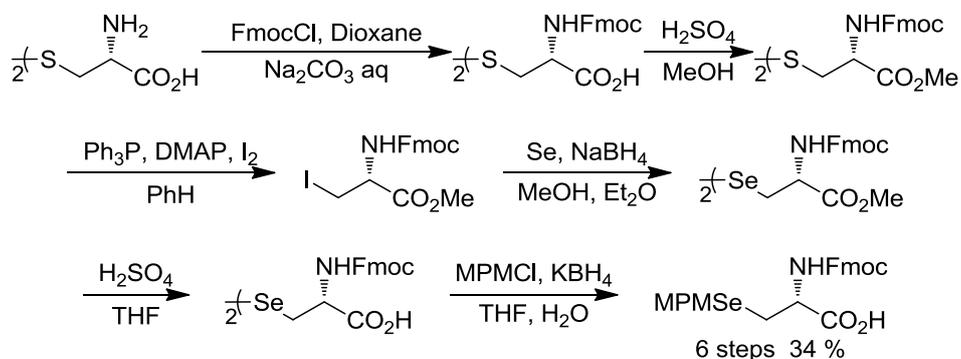
Scheme 1-2

Braga らは 3 員環中間体^[21]もしくは、5 員環中間体^[22]、Donk らは 4 員環中間体^[23]を経由するセレンシステイン誘導体の合成法を報告している。これらの合成法では、環状中間体を合成した後に、セレン化試薬を反応させることによりセレンシステイン誘導体を得られる(Scheme 1-3)。



Scheme 1-3

一方で Iwaoka らは、L-シスチンを出発物質として、9-フルオレニルメトキシカルボニル(Fmoc)法に有用なセレンシステイン誘導体の合成法を開発した(Scheme 1-4)^[24]。この合成法は、ヨウ素化を経由することでシスチンのジスルフィド結合をジセレンド結合へと変換できる点でユニークな合成法である。しかし、目的化合物を得るまでの合成が多段階であること、副生成物としてセレンドが生成してしまうこと、スケールアップが難しいことなど、実用的な反応とするには問題点があった。



Scheme 1-4

このように、トシラートやハロゲン化物はセレンシステイン誘導体の合成によく用いられている。また、セリンを出発物質としたセレンシステイン誘導体の合成報告例が多い理由としては、セリン側鎖のヒドロキシ基が有機化学的に容易にトシラートやハロゲン化物、環状化合物などの活性中間体への変換が可能であることが挙げられる。これらの脱離能の高い活性中間体を経由することによって、生合成経路と同様にデヒドロアラニンが中間体として生成してしまう可能性が考えられる。デヒドロアラニンが生じると、その二重結合に対するセレン求核剤のマイケル付加において、立体選択性が乏しく、 α 位炭素原子のラセミ化が進行してしまうため好ましくない。

セレンシステインの生合成経路においては選択的に L 体のみが得られているが、このことは有機合成化学の観点からも興味深い。セレンシステイン誘導体をラセミ化することなく高光学純度で合成することは、セレンシステイン合成の重要なポイントとなっている。

1-4 グルタチオンペルオキシダーゼ(GPx)とモデル化合物

グルタチオンペルオキシダーゼ(GPx)は、代表的なセレンプロテインの一つである^[12]。その生体内での働きは、グルタチオン(GSH)を還元基質として有害な活性酸素種(ROOH)を無害なアルコールまたは水に分解し(ペルオキシダーゼ活性)、生体分子の損傷(酸化)を抑制することである。このようなペルオキシダーゼ活性をもつ酵素ファミリーを総称してグルタチオンペルオキシダーゼと呼ぶ。GPx のスーパーファミリーとしては GPx1-8 が知られており、それぞれ局在部位やターゲットとなる活性酸素種などが異なる。また、Table 1-3 に示したように GPx1-4,6 は活性中心にセレンシステイン残基を持つが、GPx5,7,8 はセレンシステイン残基ではなくシステイン残基が活性中心に存在するといった構造的な違いがある。Figure 1-5 に X 線構造解析によって得られた GPx1 の立体構造を示す。このとき、セレンシステイン残基はセレン酸に酸化されて安定化されている点に注意されたい。活性中心であるセレンシステイン(Sec)のセレン原子とトリプトファン(Trp)、グルタミン(Gln)の側鎖の窒素原子との間には相互作用が存在し、トライアッド構造を形成している^[25]。GPx の高い触媒活性はこのトライアッド構造の構築が関与していることが、X 線構造解析(Figure 1-5)や Trp や Gln が欠損したミュータントを使用した触媒活性測定から示唆されている。

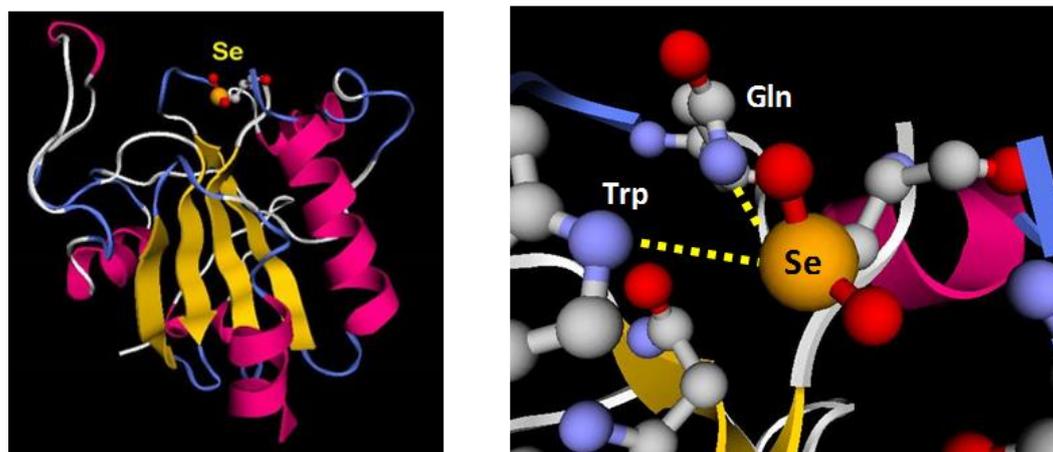


Figure 1-5. GPx1 の分子モデル (左) と活性中心 (右)

GPx の触媒サイクルは、Figure 1-6 に示すように考えられている。まず、セレンール(E-SeH)が ROOH と反応して ROH を生じ、自身はセレン酸中間体(E-SeOH)へと酸化される。E-SeOH は GSH と反応してセレニルスルフィド中間体(E-SeSG)となり、さらにもう 1 分子の GSH と反応することで E-SeH が再生する。また、過剰に ROOH が存在すると E-SeOH はさらに酸化

され不活性なセレン酸中間体(E-SeO₂H)を生じる。この E-SeO₂H は 3 分子の GSH との反応によってセレニルスルフィド中間体へと変換されることで、再び触媒サイクルが回る(Figure 1-6)^[26]。

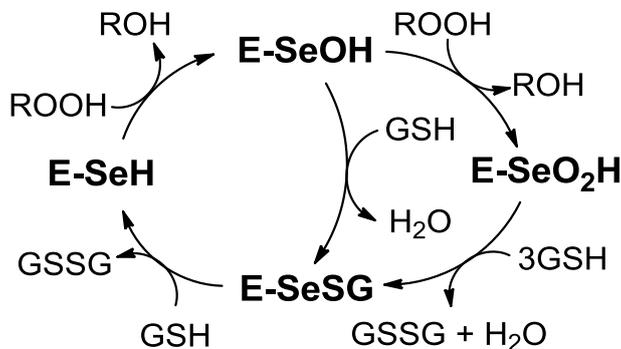


Figure 1-6. GPx の触媒サイクル

このような GPx の酵素活性を模倣したモデル化合物として、数多くの低分子有機セレン化合物が報告されている。ebselen は、1984 年に Sies と Wendel によってはじめて GPx モデルとして合成された^[27,28]。ebselen が高い GPx 活性を示したことをきっかけとし、以後 GPx の酵素モデルに関する研究が盛んに行われるようになった。ebselen の触媒サイクルは Figure 1-7 のように進行すると報告されている^[29]。

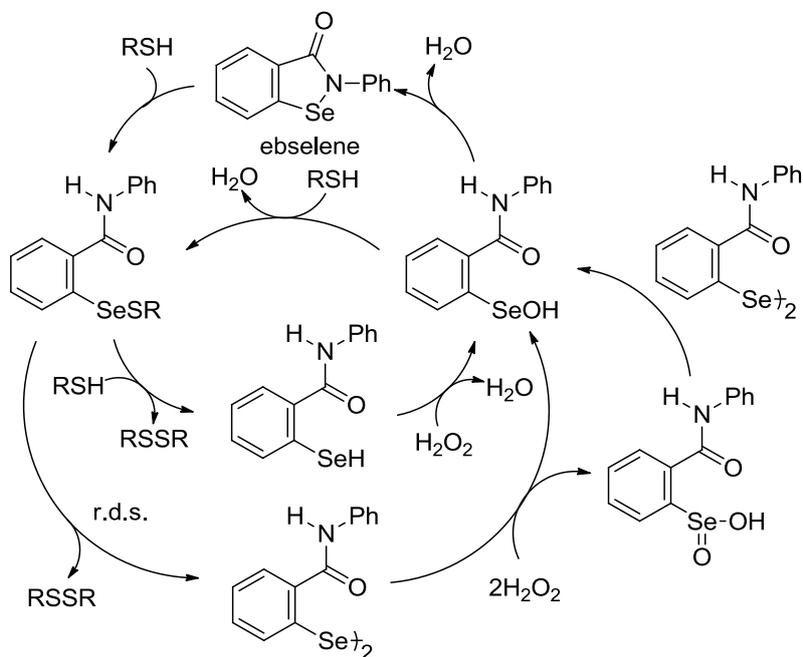


Figure 1-7. ebselen の GPx 様触媒サイクル

まず ebselen がチオール(RSH)と反応してセレニルスルフィド中間体を生成した後、不均化によってジセレニド体が生成する。次に、ジセレニド体と酸化剤が反応することでセレン酸ある

いはセレニン酸になって反応が進行するというものである。この反応では、用いるチオール基質の種類によってセレネニルスルフィド中間体が Figure 1-6 の触媒サイクルと同様にセレノール体となる場合もある。ebselen の触媒サイクルにおける律速段階は、セレネニルスルフィド中間体からジセレニド体あるいはセレノール体を生じる過程とされている。この過程ではセレン原子と酸素原子が適度な強さで相互作用することによりスルファニル基（チオール基）が抜けやすくなっている^[30]。そのため、ebselen ではセレネニルスルフィド中間体の反応がスムーズに進行するものと考えられる。

ebselen 誘導体あるいは芳香族ジセレニド(Ar-SeSe-Ar)のような芳香族セレン化合物は化学的に安定であり高い生理活性をもつことから、GPx のモデル化合物として広く研究されてきた。芳香族ジセレニドの触媒サイクルは GPx とほぼ同様であるが、セレネニルスルフィド中間体からセレノール体に戻る反応が進みにくいという問題がある。即ち、セレネニルスルフィド中間体の Se-S 結合のセレン原子に GSH が優先的に反応してしまうと、セレノール中間体が生じずにチオール基質の交換が起こり、触媒サイクルが回らなくなってしまう(Figure 1-8)。

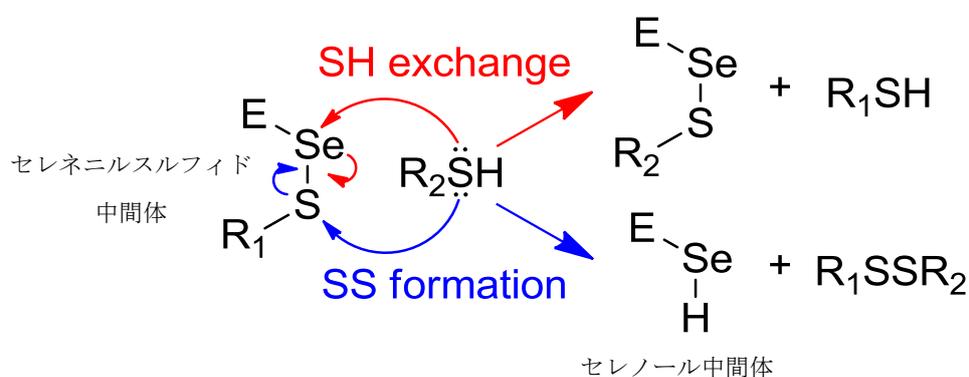


Figure 1-8. セレネニルスルフィドとチオールとの反応

そこで、この問題を解決するために、分子内に窒素原子や酸素原子を含む化合物が合成された(Figure 1-9)。これらの化合物ではセレン原子とヘテロ原子との間に非結合性相互作用が働き、この相互作用が存在することによって GSH がセレネニルスルフィド中間体のセレン原子へ求核攻撃することを抑制する。その結果、Se-S 結合の硫黄原子の求電子性を相対的に高めることができる^[31-34]。

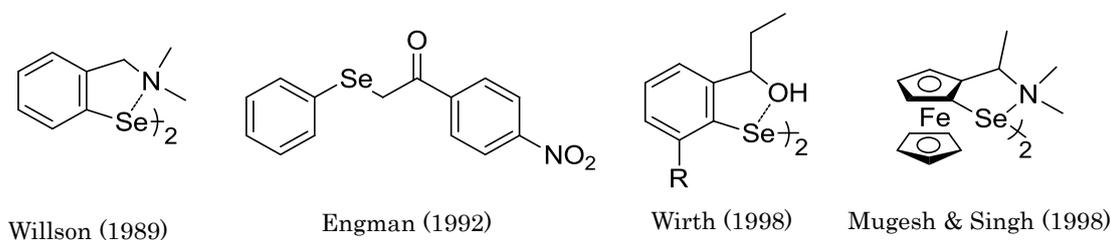


Figure 1-9. 芳香族 GPx モデル化合物

Goto らは、非常に嵩高い置換基を有するセレン化合物を合成した^[35,36]。この置換基は、ボウルのような独特な形状の中心付近にセレンが位置しているため、過酸化水素やジチオスレイトー

ル(DTT^{red})などの低分子化合物と反応するための大きな空間を有している。一方で、置換基同士がぶつかり合うために高活性な化学種のジセレニド結合の形成による不活性化を抑制することができるという利点がある(Figure 1-10)。これによって、本来不安定である GPx 様触媒サイクルで重要なセレノールやセレネン酸といった中間体が安定に単離された。

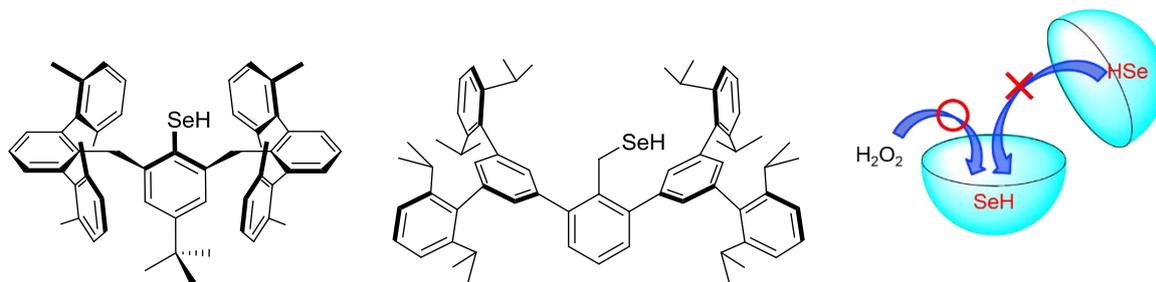


Figure 1-10. ボウル型置換基を有するセレン化合物

このように、これまでに報告されている GPx モデル化合物のほとんどは芳香族化合物である。このことは、脂肪族セレン化合物が酸化されたときに生じるセレノキシドやセレネン酸が不安定であることに起因していると考えられる。 β 位にプロトンを持つセレニドを酸化することでセレノキシドを生成するとシグマトロピー転移による β 位プロトンの引抜による *syn* 脱離が起こることでアルケンとセレネン酸を生じてしまう(Figure 1-11)。このことから、脂肪族セレン化合物による GPx モデル化合物が少ないと考えられる。

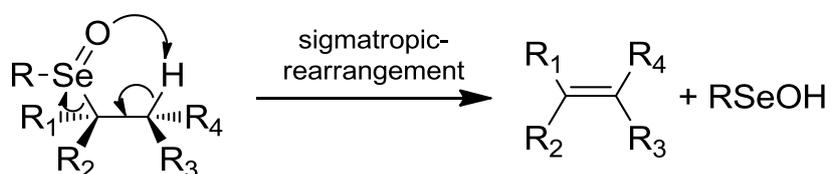


Figure 1-11. セレノキシドにおける β 脱離の機構

Back らは、2つのヒドロキシ基を有する Di-(3-hydroxypropyl)-selenide を酸化することで自発的にスピロ環化合物 spirodioxaselenanonane に変換されることを報告している^[37]。このスピロ環化合物は 2 分子のチオールと反応することで Di-(3-hydroxypropyl)-selenide が再生する(Figure 1-12)。この化合物は、セレノキシドの生成後、 β 脱離よりも速やかにスピロ環形成が起こるために GPx モデル化合物として高い活性を有している。

また、Iwaoka らは、2つのヒドロキシ基を有する 5 員環状セレニド *trans*-3,4-dihydroxyselenolane (DHS^{red})を合成した^[38]。この化合物は、環状にすることによって立体的に β 位のプロトンと近づきにくくすることで、シグマトロピー転移によるセレンの脱離を抑制しているため、対応したセレノキシド(DHS^{ox})を安定に単離することに成功している。また、得られたセレノキシドはチオールを酸化し、自身はセレニドに酸化されるといった GPx 様触媒サイクルを示すことも報告している(Figure 1-13)。

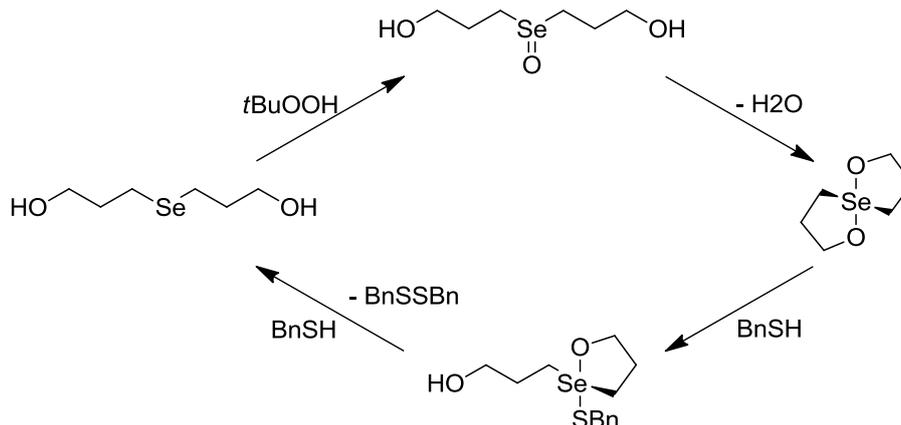


Figure 1-12. di(3-hydroxypropyl) selenide の反応サイクル

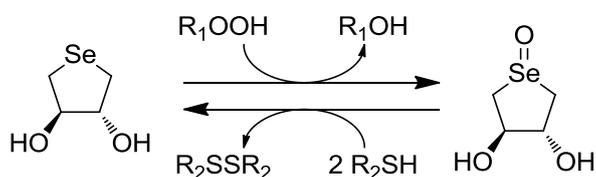


Figure 1-13. DHS^{red} の反応サイクル

1-5 化学合成法によるペプチド合成とライゲーション

ペプチドの化学合成法には、液相ペプチド合成法(LPPS)と固相ペプチド合成法(SPPS)がある。どちらにも共通している点は、目的の一次配列を得るために、アミノ酸を一つずつ伸長していく点である。これらの化学合成法では、液相法では C 末端アミノ酸のカルボキシ基をエステルもしくはアミドなどによる化学修飾によって、固相法では不溶性ポリマーに担持させることによって保護し、これを一残基目のアミノ酸として N 末端側に向かってペプチドを伸長する。液相法は、古くから用いられてきた有機化学的な手法であるが、各段階においてペプチド中間体を精製する必要があり手間がかかることや、ペプチド鎖が長くなるにつれて精製時に有機溶媒に溶けにくくなることから、合成できるペプチド鎖の限界は経験的に 10 残基程度とされている。一方固相法は、1963 年に Merrifield によって開発された手法であり^[39]、アミノ酸を固相担体に保持させることによって、過剰の試薬などをろ過のみで容易に除去できることや精製が最終段階のみでよいなど、操作の簡便性が達成されている。また、伸長できるペプチド鎖の上限は 50 残基程度とされている。アミノ酸残基数が 50 残基を超えると、固相担体上でペプチド鎖同士が凝集してしまい、アミノ酸の縮合が進行しにくくなる。また、欠陥ペプチドなどの不純物が多くなることによる回収率の低下が起こる。しかしながら、固相法は液相法に比べて簡単な操作でより長いペプチド鎖が合成可能であることから、現在のペプチド合成分野において主流として用いられている手法である。Figure 1-14 には一般的な化学合成法によるペプチド合成のプロトコルを示している。カルボキシ基及びアミノ基が保護された C 末端アミノ酸のアミノ基上の保護基 X を脱保護し、2 番目のアミノ酸のカルボキシ基とカップリングする。同様にして、保護基 X の脱保護とカップリ

ングを繰り返す。ペプチド鎖を伸長し終えたところで、C末端と側鎖の保護基をすべて脱保護することで目的のペプチドを得る。

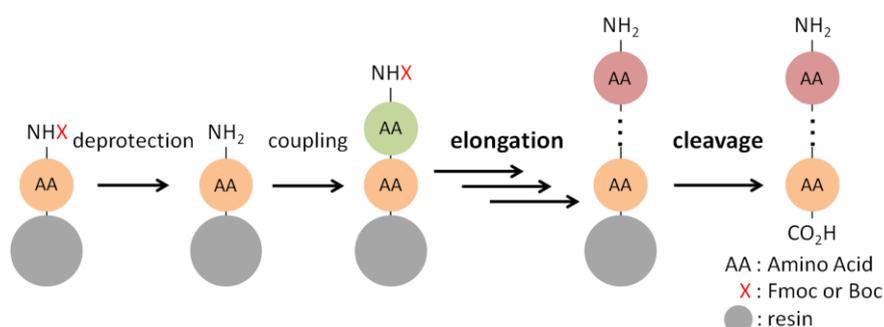


Figure 1-14. ペプチドの化学的合成法のプロトコル

ペプチドの化学合成法におけるアミノ基の保護基 X としては、Boc 基または、Fmoc 基が広く用いられている(Figure 1-15)。これらの保護基を用いた合成法はそれぞれ保護基の名前をそのまま使用し、Boc 法もしくは、Fmoc 法と呼ばれている。

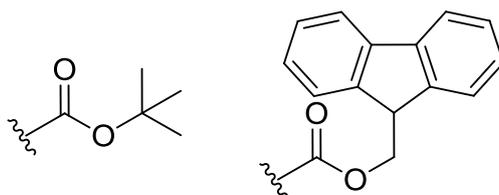


Figure 1-15. Boc 基 (左) と Fmoc 基 (右)

Boc 法では、アミノ基の脱保護をトリフルオロ酢酸(TFA)によって行う。酸性条件下での脱保護となるため、ペプチドの側鎖官能基はベンジル基などの酸に強いもので保護しなければならない。SPPS における固相担体からの切り出しの際は、フッ化水素(HF)の様な強酸を用いて行うため特殊な装置が必要となり、操作にも十分に注意を払う必要がある。しかし、強酸を用いているため、固相担体からのペプチドの切り出し、および側鎖の脱保護が効率良く進行するため高純度のペプチドを高収率で得ることができる。

Fmoc 法では、アミノ基の脱保護をピペリジンなどの弱い塩基によって行なう。塩基性条件下での脱保護となるため、側鎖官能基は *t*-ブチル基などの塩基に強いもので保護する必要がある。Fmoc 基の脱保護試薬として TFA を用いないことから、酸に弱い側鎖官能基の副反応を抑制することができ、ペプチド鎖を効率的に伸長できる。SPPS における固相担体からの切り出しの際は、TFA を用いて行うため Boc 法に比べ特殊な装置を必要としない簡便な手法であるといえる。しかし、経験則的に Fmoc 法における切り出し効率率は Boc 法の切り出し効率より低く、同じペプチドを Fmoc 法と Boc 法で合成すると Fmoc 法は収率の面では Boc 法に劣る。

生体内におけるタンパク質合成では、ペプチドの N 末端から C 末端に向けて縮合していく。一方で、化学合成法において N 末端から C 末端に向けて伸長させると、アズラクトンを経由し

た α 位のラセミ化が起こる可能性がある (Figure 1-16)。このようなラセミ化を回避するために、化学合成法では C 末端から N 末端に向かってペプチド鎖を伸長していく。また、 α プロトンの引き抜きによるラセミ化は、化学合成法においては起こり得るが、求核性の高い縮合剤である HOBt や HOAt など系内に共存させることで、ラセミ化をほとんど抑えることが出来る^[40]。

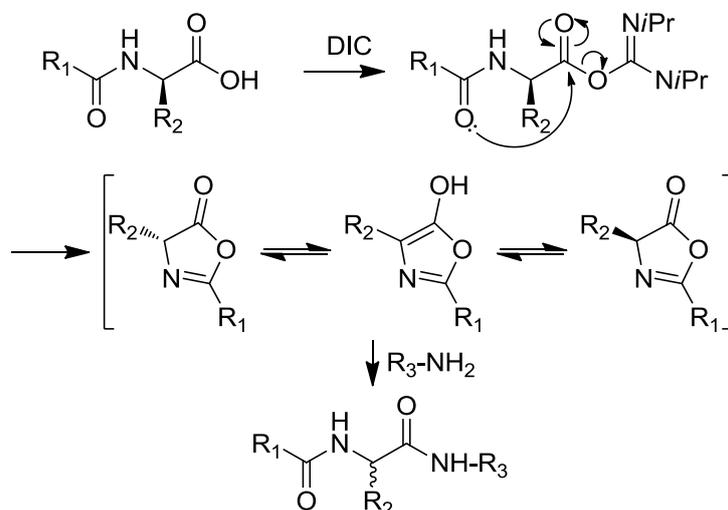


Figure 1-16. アズラクトンを経由する α 位のラセミ化の機構

固相法の発展によってある程度の長さのペプチドの合成が可能となった。しかしながら、前述したようにアミノ酸残基数が 100 を超えるような長鎖ペプチド (あるいはタンパク質) については、固相法をもってしてもその合成は不可能である。そこで、このような長鎖ペプチドを化学合成するためには、ペプチドの全長配列をいくつかのセグメントに分割し、それぞれのペプチドを固相法によって合成した後に、セグメント同士を縮合 (ライゲーション) する必要がある。このようなセグメント縮合の手法として、現在最も広く用いられている手法の一つがネイティブケミカルライゲーション (NCL) 法である^[41]。NCL 法では、C 末端にチオエステルを有するセグメントと N 末端にシステイン残基を有するセグメントを縮合する。この反応は Figure 1-17 のように進行する。まず、N 末端システイン残基のチオール基と C 末端チオエステルのチオエステル交換反応によってペプチド同士が縮合する。続いて、生じたチオエステルにおいて S \rightarrow N アシル転移が起こる。この 2 段階の反応によって、天然型のアミド結合をもつ長鎖ペプチドが得られる。この NCL 法の利点は、非常に選択性の高いチオエステル交換を起点とすることで、ペプチド鎖上のアミノ酸側鎖を無保護の状態のまま効率的にセグメント同士の縮合が達成される点である。

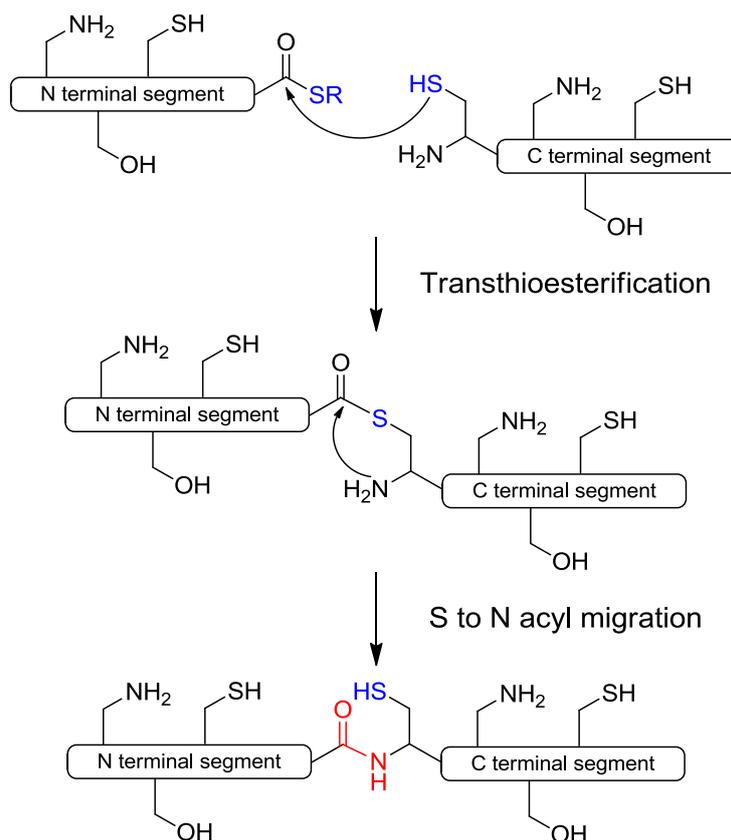


Figure 1-17. ネイティブケミカルライゲーションの反応機構

この反応に重要なチオエステル中間体を得るための手法としては様々な手法が開発されている。Figure 1-18 には、系内でチオエステルに変換する手法を示している。これらの手法は、システイン残基のチオール基に由来する N→S アシル転移によってチオエステルを得る方法である。Kawakami らが開発したシステイニルプロリルエステル(CPE)法^[42]は pH>7.8 の塩基性条件、Hojo らが開発した *N*-アルキルシステイン(NAC)法^[43]は pH4-6 の弱酸性条件において、それぞれチオエステルに変換される。Asahina らは、これらの手法においてチオエステル化の際の pH 条件が異なることに着目し、3つのペプチドセグメントをワンポットで縮合する方法を報告している^[44]。

このように、NCL 法の開発と応用によって種々のタンパク質の全合成が達成されようとしている。一方で、システイン残基は天然のタンパク質に 3%ほどしか含まれておらず、NCL 法が適用可能な部位には大きな制限があり、そもそもシステイン残基を持たないタンパク質には NCL 法は適用できない。そこで近年では、チオール基を導入した非天然型アミノ酸誘導体をライゲーションサイトとして用いて、NCL 法による長鎖ペプチドの合成の後に、チオール基を脱硫することで天然のアミノ酸に変換するなど、縮合部位を拡張するための様々な工夫が行われている^[45]。しかし、脱硫反応には選択性がないために、天然に存在するシステイン残基のチオール基は特定の保護基で保護しておかなければならない。一方で、セレノシステインやセレノエステルを用いた NCL 法も開発されている^[46]。ライゲーション手法の発展により様々なタンパク質が全合成され、その機能が解明されることが期待されている。

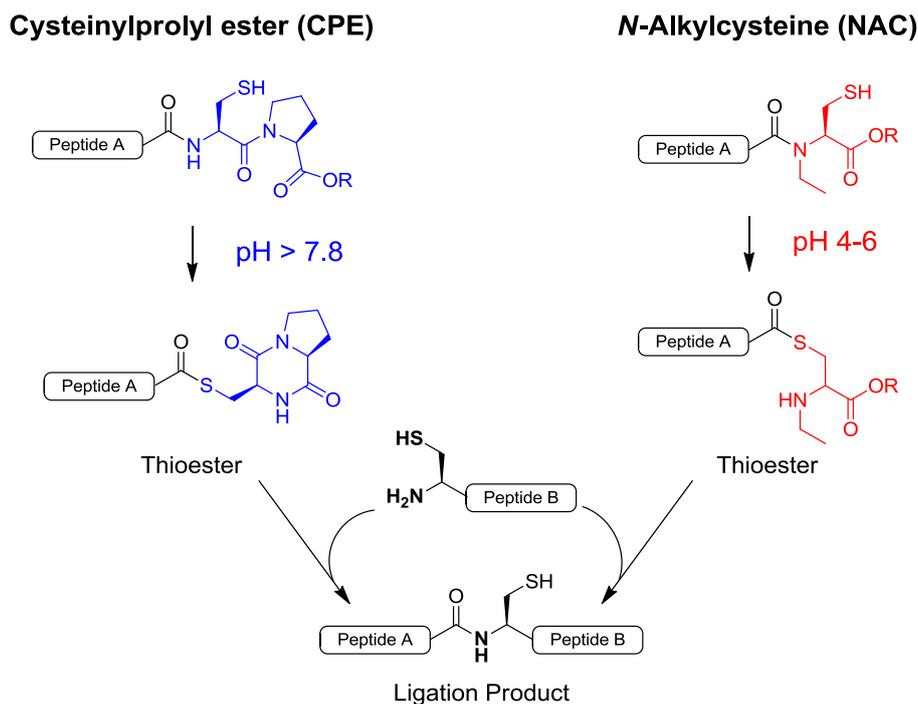


Figure 1-18. C 末端チオエステルペプチドの調整法

1-6 結論

本章では、生体内でのセレンの働き、セレノシステインやセレノプロテインの生合成経路、これまでに報告されているタンパク質の有機化学的合成法を概観した。セレノプロテインは、その生合成経路が複雑であることや有機合成が困難であることから、セレンを含まない一般的なタンパク質よりも機能解明が遅れているのが現状である。このことから、モデル化合物を利用してセレノプロテインの作用機序を明らかにしていくことが重要であると考えられる。しかしながら、これまでに報告されたセレノプロテインのモデル化合物はほとんどが芳香族化合物であり、脂肪族化合物、特にセレノペプチドを利用したモデル研究は皆無に近い。そこで本研究では、ターゲットとするセレノプロテインを GPx に絞り、そのモデルペプチドを設計・合成することで、GPx の活性中心に存在するトライアドやテトラッドなどの立体構造と酵素作用との関係について議論することを最終目的とした。そのために、1)ペプチド合成に有用なセレノシステイン誘導体の効率的合成法の開発(2 章)、2)液相ペプチド合成法によるセレノグルタチオンの合成と酸化還元反応(3 章)、3)新規環状セレノペプチドの合成と GPx 様触媒活性の評価(4 章)について研究を行うこととした。5 章では、本研究で得られた結果を総括し、この分野の今後の発展について所見を述べる。

1-7 参考文献

- [1] 吉田宗弘. 植物に存在する含セレンアミノ酸の同定と生理機能. 化学と生物 (2008)46(8): 564–570
- [2] H. S. Hsieh, and H. E. Ganther, *Biochemistry*, **1975**, *14*, 1632–1636.
- [3] K. T. Suzuki, and M. Itoh, *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.*, **1997**, *692*, 15–22.
- [4] N. Esaki, T. Nakamura, H. Tanaka, T. Suzuki, Y. Morino, and K. Soda, *Biochemistry*, **1981**, *20*, 4492–4496.
- [5] N. Esaki, T. Nakamura, H. Tanaka, and K. Soda, *J. Biol. Chem.*, **1982**, *257*, 4386–4391.
- [6] Y. J. Lu, and K. L. Wang, *Chin. Med. J.*, **1964**, *83*, 430–440.
- [7] M. P. Rayman, *British Journal of Nutrition*, **2008**, *100*, 254–268.
- [8] 厚生労働省：日本人の食事摂取基準—厚生労働省「日本人の食事摂取基準」策定検討会報告書. 2015; 東京, 第一出版.
- [9] R. E. Huber, and R. S. Criddle, *Arch. Biochem. Biophys.*, **1967**, *122*, 164–173.
- [10] J. Beld, K. J. Woycechowsky, and D. Hilvert, *Biochemistry*, **2007**, *46*, 5382–5390.
- [11] G. V. Kryukov, S. Castellano, S.V. Novoselov, A. V. Lobanov, O. Zehrab, R. Guigo, and V. N. Gladyshev, *Science*, **2003**, *300*, 1439–1443.
- [12] L. Flohe, W. A. Gunzler, and H.H. Schock, *FEBS Lett.*, **1973**, *32*, 132–134.
- [13] V. M. Labunskyy, D. L. Hatfield, and V. N. Gladyshev, *Physiol. Rev.*, **2014**, *94*, 739–777.
- [14] E. S. J. Arnér, H. Sarioglu, F. Lottspeich, A. Holmgren, and A. Böck, *J. Mol. Biol.*, **1999**, *292*, 1003–1016.
- [15] L. Johansson, G. Gafvelin, and E. S. J. Arnér, *Biochim. Biophys. Acta*, **2005**, *1726*, 1–13.
- [16] F. Li, P. B. Lutz, Y. Pepelyayeva, E. S. J. Arnér, C. A. Bayse, and S. Rozovsky, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **2014**, *111*, 6976–81
- [17] N. Metanis, E. Keinan, and P. E. Dawson, *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, *128*, 16684–16691.
- [18] E. M. Stocking, J. N. Schwarz, H. Senn, M. Salzmann, and L. A. Silks, *J. Chem. Soc., Perkin Trans.*, **1997**, *1*, 2443–2447.
- [19] A. H. G. Siebum, W. S. Woo, J. Raap, and J. Lugtenburg, *Eur. J. Org. Chem.*, **2004**, 2905–2913.
- [20] P. P. Phadnis, G. Mughesh, *Org. Biomol. Chem.*, **2005**, *3*, 2476–2481.
- [21] A. L. Braga, P. H. Schneider, M. W. Paixão, A. M. Deobald, C. Peppe, and D. P. Bottega, *J. Org. Chem.*, **2006**, *71*, 4305–4307.
- [22] A. L. Braga, F. Vargas, J. A. Sehnem, and R. C. Braga, *J. Org. Chem.*, **2005**, *70*, 9021–9024.
- [23] N. M. Okeley, Y. Zhu, and W. A. van der Donk, *Org. Lett.*, **2000**, *2*, 3603–3606.
- [24] M. Iwaoka, R. Ooka, T. Nakazato, S. Yoshida, S. Oishi, *Chem. Biodiversity*, **2008**, *5*, 359–374.
- [25] O. Epp, R. Ladenstein, and A. Wendel, *Eur. J. Biochem.*, **1983**, *133*, 51–69.
- [26] K. P. Bhabak, and G. Mughesh, *Acc. Chem. Res.*, **2010**, *43*, 1408–1419.

- [27] A. Müller, E. Cadenas, P. Graf, and H. Sies, *Biochem. Pharmacol.*, **1984**, *33*, 3235–3239.
- [28] A. Wendel, M. Fausel, H. Safayhi, G. Tiegs, and R. Otter, *Biochem. Pharmacol.*, **1984**, *33*, 3241–3245.
- [29] P. K. Bhabak, and G. Mugesh, *Chem. A. Eur. J.*, **2008**, *14*, 8640–8651.
- [30] B. K. Sarma, and G. Mugesh, *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, *127*, 11477–11485.
- [31] I. A. Cotgreave, P. Moldéus, R. Brattsand, A. Hallberg, C. M. Andersson, and L. Engman, *Biochem. Pharmacol.*, **1992**, *43*, 793–802.
- [32] S. R. Wilson, P. A. Zucker, R. R. C. Huang, and A. Spector, *J. Am. Chem. Soc.*, **1989**, *111*, 5936–5939.
- [33] T. Wirth, *Molecules*, **1998**, *3*, 164–166.
- [34] G. Mugesh, A. Panda, H. B. Singh, N. S. Punekar, and R. J. Butcher, *Chem. Commun.*, **1998**, 2227–2228.
- [35] K. Goto, M. Nagahama, T. Mizushima, K. Shimada, T. Kawashima, and R. Okazaki, *Org. Lett.*, **2001**, *3*, 3569–3572.
- [36] S. Sase, R. Kakimoto, and K. Goto, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2015**, *54*, 901–904.
- [37] T. G. Back, Z. Moussa, and M. Parvez, *Angew. Chem. Int., Ed.*, **2004**, *43*, 1268–1268.
- [38] M. Iwaoka, T. Takahashi, and S. Tomoda, *Heteroatom Chem.*, **2001**, *12*, 293–299.
- [39] R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.*, **1963**, *85*, 2149–2154.
- [40] E. Valeur, *Chem. Soc. Rev.*, **2009**, *38*, 2, 606–631.
- [41] P. E. Dawson, T. E. Muir, I. Clark-Lewis, S. B. Kent, *Science.*, **1994**, *226*, 776–779.
- [42] T. Kawakami, and S. Aimoto, *Chem. Lett.*, **2007**, *36*, 76–77.
- [43] H. Hojo, Y. Onuma, Y. Akimoto, Y. Nakahara and Y. Nakahara, *Tetrahedron Lett.*, **2007**, *48*, 25–28.
- [44] Y. Asahina, T. Kawakami, and H. Hojo, *Chem. Commun.*, **2017**, *53*, 2114–2117.
- [45] L. Z. Yan, and P. E. Dawson, *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**, *123*, 526–533.
- [46] C. C. Hanna, S. S. Kulkarni, E. E. Watson, B. Premdjee, and R. J. Payne, *Chem. Commun.*, **2017**, *53*, 5424–5427.

2章 ペプチド合成に有用なセレノシステイン誘導体の効率的合成法の開発

2-1 緒言

1-5 項で述べたようにペプチドを化学合成法によって合成する際には、アミノ酸のカルボキシ基は無保護で、アミノ基は Boc 基もしくは Fmoc 基で保護されている必要がある。さらに、側鎖に官能基がある場合には、それぞれの合成条件に耐えうる保護基によって保護された各種アミノ酸を用意しなければならない。したがって、セレノペプチドを合成するためには、以下に示すセレノシステイン誘導体が必要となる(Figure 2-1)。

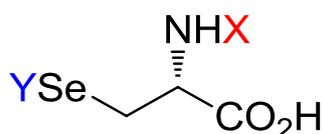
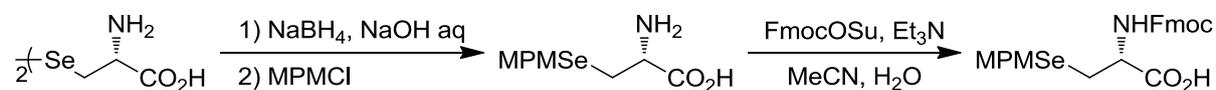


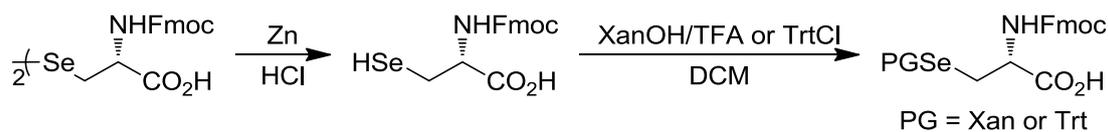
Figure 2-1. ペプチドの化学合成法に有用なセレノシステイン誘導体

このようなセレノシステイン誘導体は試薬会社から購入可能ではあるが、高価である。Koideらは、セレノシステインの二量体であるセレノシスチンを出発物質とし、ジセレニドの還元、セレン原子の保護、及びアミノ基の保護という3段階の反応でセレノシステイン誘導体を得ることに成功している(Scheme 2-1)^[1]。



Scheme 2-1

セレノシステインにおけるセレン上の保護基 Y には、システインの硫黄上と同様の保護基が用いられることが多い。特にベンジル系保護基はセレノシステイン誘導体の保護基として多用されている。中でも、メチルベンジル(MBn)基は、脱 Boc 試薬である TFA に対して十分な耐性があり、脱樹脂条件の HF によって脱保護可能であることから、Boc 法で用いられている。メトキシフェニルメチル(MPM)基は、ヨウ素や 2,2'-ジチオビス(5-ニトロピリジン)(DTNP)/TFA で脱保護可能であることから、Fmoc 法でよく用いられる。Fmoc 法においては、セレンの保護基の脱保護条件とペプチド鎖の脱樹脂条件が異なるため、ペプチドの精製回数が増加し、それに伴って収率が低下してしまうという問題が存在する。一方で、Flemer は TFA で容易に脱保護可能なトリチル(Trt)基やキサントール(Xan)基を持つセレノシステイン誘導体の合成を報告している(Scheme 2-2)^[2]。さらに、得られたセレノシステイン誘導体を用いて Fmoc 法固相合成によってセレノペプチドを合成しており、脱樹脂条件においてセレン上も脱保護され効率的にジセレニドが得られることも報告している。

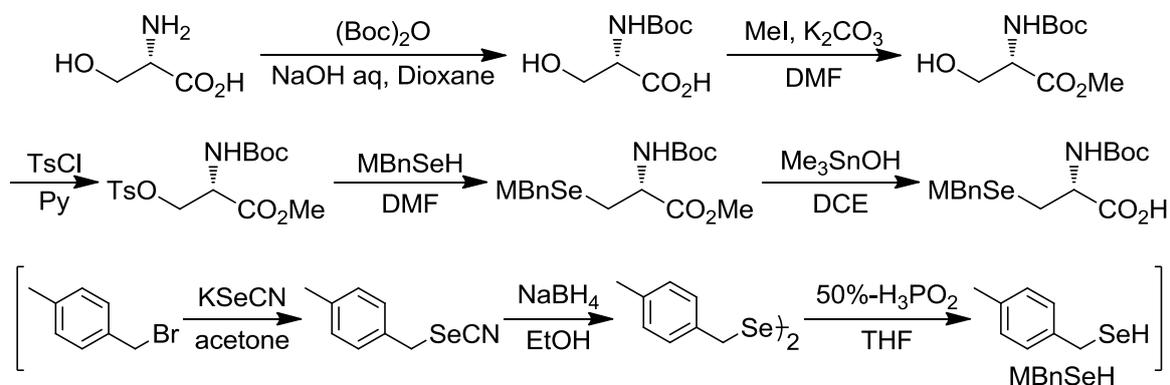


Scheme 2-2

しかしながら、これらの報告で原料として用いられているセレノシスチンもまた高価であり、大量に入手することは困難であることから、安価で高収率かつ大量に合成が可能となる合成法の開発が求められている。

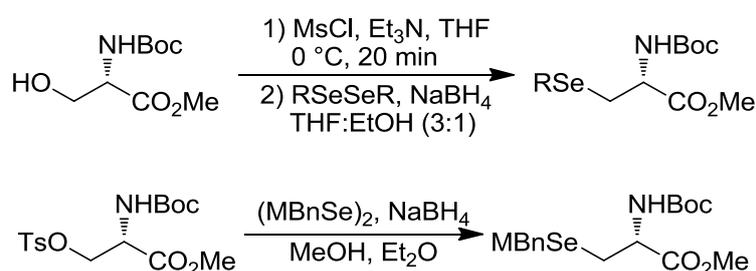
セレノプロテインの構造を模倣したセレノペプチドを人工的に合成し、その抗酸化活性を調査することで、活性中心であるセレノシスチン残基とその周辺のアミノ酸（一次配列やトライアッド構造など）との相互作用が酵素の活性とどのように関連しているのかを明らかにできると考えられる。また、シスチンをセレノシスチンに変換したセレノプロテインの全合成が達成されれば、酵素活性の向上や分解酵素に対する耐性の向上などが期待されることから、医学、薬学分野でも興味を持たれている。

Metanis らは、グルタレドキシシン 3 (Grx3)の活性中心に存在するシスチン残基をセレノシスチンにミューテーションしたセレノペプチドを Boc 法固相ペプチド合成によって合成した。このとき使用したセレノシスチン誘導体は、L-セリンを出発物質として合成した(Scheme 2-3)³⁾。この合成法では、アミノ基が Boc 基で保護されたセリンメチルエステル誘導体のヒドロキシ基をトシル化することによって活性化している。別途合成したビス-*p*-メチルベンジルジセレニド ((MBnSe)₂)を次亜リン酸によって還元し、生じたセレノール(MBnSeH)を単離した後に、トシラートと反応させることでセレノシスチン誘導体を得ている。しかし、セレノールは空气中で簡単に酸化されてジセレニドを生じてしまうため、取り扱いが難しい化学種である。そのため、この反応は不活性ガス雰囲気下で行わなければならない。セレン化の段階の収率は 53%、総収率は 30%であり、合成効率は低いものであった。



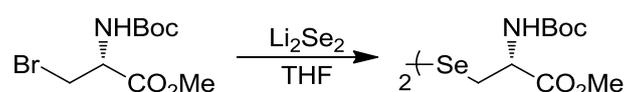
Scheme 2-3

Braga らは、不活性ガス雰囲気下でアミノ基とカルボキシ基が保護されたセリン誘導体のヒドロキシ基をメシル化した後に、ジセレニド化合物(RSeSeR)と水素化ホウ素ナトリウムとの反応から生じたセレノラート(RSe-)を反応させることによって 50~80%程度 of 良好な収率でセレノシステイン誘導体を合成することに成功している^[4]。当研究室の新庄は、セリン誘導体から合成したトシラートと(MBnSe)₂を溶媒に溶かし、空气中で水素化ホウ素ナトリウムを加えることで、セレノシステイン誘導体を 69%で得ることに成功した(Scheme 2-4)。これらの反応は、ジセレニド化合物と水素化ホウ素ナトリウムから反応活性種であるセレノラートを生じさせることによって、反応操作を簡便化することに成功した。このようにスルホン酸エステルはセレン化の際の活性中間体として有用であり、セレノシステイン誘導体の合成に広く用いられている。



Scheme 2-4

一方、ハロアラニン誘導体(Boc-β-X-Ala-OMe, X = Cl, Br, or I)もセレノシステイン誘導体の合成中間体としてよく用いられている。ハロゲン、トシル基やメシル基のようなスルホン酸エステルと同様、ヒドロキシ基から容易に誘導することが可能であり、よい脱離基として働く。実際に、Mugesh らによってブロモアラニンと Li₂Se₂のようなセレン化剤との反応からセレノシステイン誘導体を合成する方法が報告されている(Scheme 2-5)^[5]。ブロモアラニンのみならず、種々のハロアラニンからセレノシステイン誘導体を合成した報告例は多い。

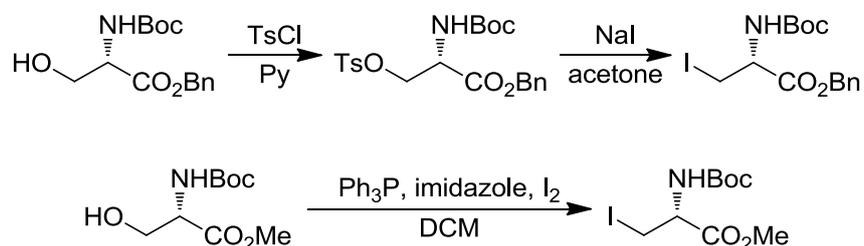


Scheme 2-5

本研究では、より脱離能の高いヨードアラニンに着目した。Stocking らはヒドロキシ基をトシル化することで活性化したのちに、ヨウ化ナトリウムとの反応からヨードアラニンを得る方法を報告している^[6]。一方で Trost らは、Appel 反応を用いることでセリン誘導体のヒドロキシ基を直接ヨウ素化し、効率的にヨードアラニンへと変換する方法を報告している(Scheme 2-6)^[7]。

これまでに述べたように、スルホン酸エステルやハロアラニンはセリン誘導体から容易に変換可能であることから、セレノシステイン誘導体合成の活性中間体として広く用いられている。また、セレン化剤としては Na₂Se₂、Li₂Se₂、ジセレニドの還元から生じるセレノールやセレノラートが用いられている。しかし、ハロアラニンとセレノラートとの反応によってセレノシステイン

誘導体を合成する方法は報告されていなかった。また、このような反応に用いられるセリン誘導体のアミノ基は、これまで示したように Boc 基で保護されている場合がほとんどであり、Fmoc 保護されたセリン誘導体を用いた報告は少ない。



本章では、より簡便に大量かつ高収率で、ペプチド合成に有用なセレノシステイン誘導体を合成することを目的として、これまでに報告されたセレノシステイン誘導体の合成法を再度見直し、これらを組み合わせることでセレノシステイン誘導体 1-4 (Figure 2-2)の合成条件の最適化を行った。本章で見出される合成法は、セレノシステイン誘導体を安価かつ大量に供給することを可能にするものであり、セレノシステインやセレノペプチドを利用した研究の普及、発展に大きく貢献できる重要な研究成果と位置づけられる。

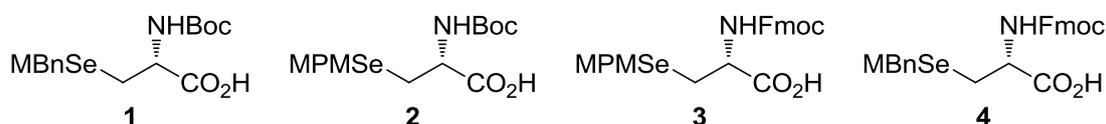
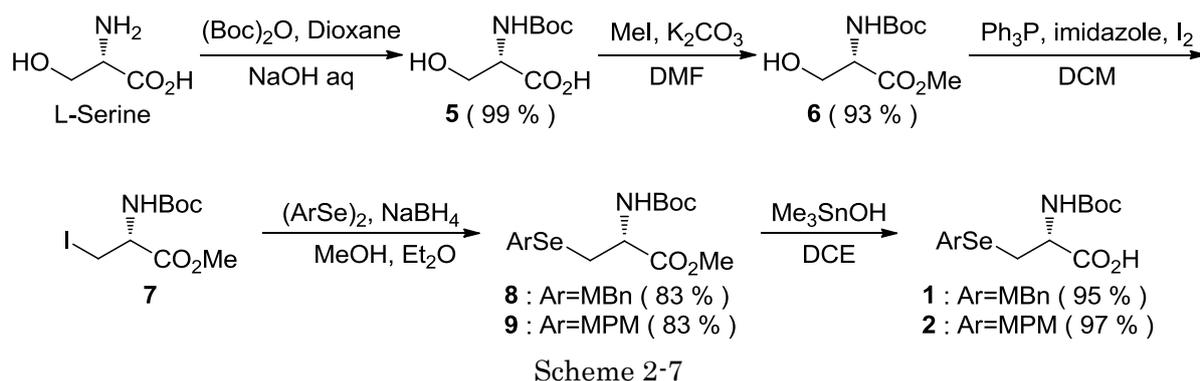


Figure 2-2. 目的のセレノシステイン誘導体の構造

2-2 Boc 法に有用なセレノシステイン誘導体の効率的合成

Metanis の方法¹³⁾に従って L-セリンのアミノ基を Boc 基で、カルボキシ基をメチルエステル化によってそれぞれ保護することでセリン誘導体 **6** を得た。Trost の方法¹⁴⁾に従い、Appel 反応を用いて **6** のヒドロキシ基をヨウ素化することでヨードアラニン誘導体 **7** を合成した。このとき得られた **7** は、単離精製することなく次のセレン化反応に用いた。**6** に対して 0.5 当量の (MBnSe)₂ と先ほど得られた粗製の **7** を MeOH:Et₂O=2:3 に溶かし、氷浴中で溶液が無色になるまで水素化ホウ素ナトリウムを加えた後、0°C で 1 時間攪拌した。この 2 段階の反応によってセレノシステイン誘導体 **8** を収率 83% で得ることができた。得られた **8** のメチルエステルを水酸化トリメチルスズによって加水分解することで目的のセレノシステイン誘導体 **1** を収率 95% で得ることができた。このときの 5 段階の通算収率は 73% であった。また、セレン化剤として (MPMSe)₂ を用いた場合も同様に通算収率 74% と高い収率でセレノシステイン誘導体 **2** を得ることに成功した (Scheme 2-7)。



新庄が報告したトシラートを経由した合成法の通算収率は 55% であり、ヨードアラニン誘導体を経由することで収率が向上することが分かった。また、このとき使用するセレン化剤の当量も抑えることができた。得られたセレノシステイン誘導体 **1**, **2** は、キラルカラム HPLC 分析によって光学純度 (e.e.) を測定し、どちらもほぼ 100% e.e. であることが確認された (Figure 2-3)。

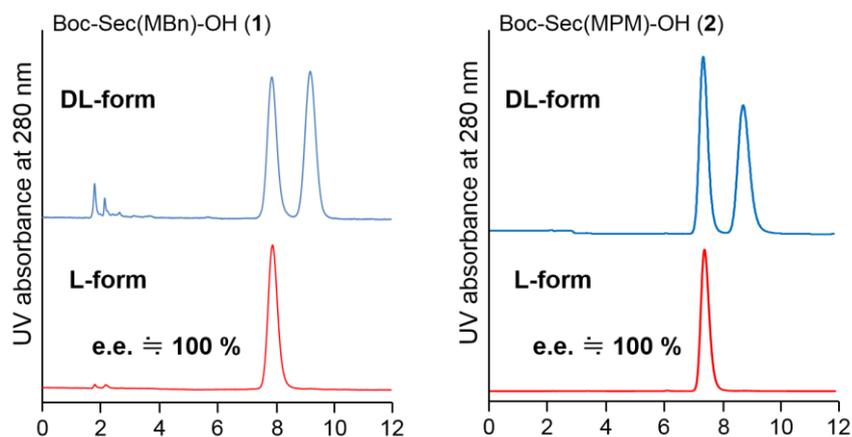
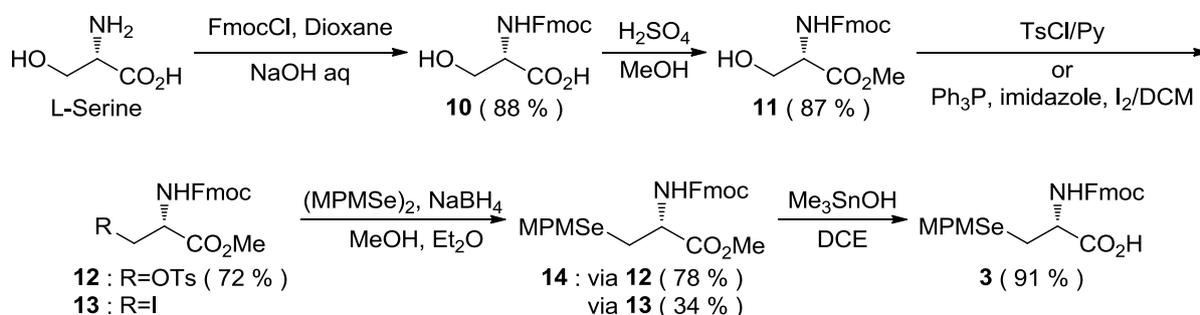


Figure 2-3. セレノシステイン誘導体 **1**, **2** のキラルカラム HPLC チャート

2-3 Fmoc 法に有用なセレノシステイン誘導体の効率的合成

Boc 法ペプチド合成に有用なセレノシステイン誘導体の合成法の確立に成功したので、この方法を Fmoc 法ペプチド合成に有用なセレノシステイン誘導体の合成にも応用することを考えた。すなわち、L-セリンのアミノ基を Fmoc 基で、カルボキシ基をメチルエステル化によってそれぞれ保護することでセリン誘導体 **11** を得た。ヒドロキシ基を収率 72% でトシル化した後、得られたトシラート **12** に対して 1 当量の (MPMSe)₂ を MeOH:Et₂O=2:3 で溶かし、室温で溶液が無色になるまで水素化ホウ素ナトリウムを加え、室温で 1 時間攪拌した。抽出、カラムによってセレノシステイン誘導体を単離したところ、収率は 35% と低収率であった。そこで、水素化ホウ素ナトリウムを加えてから 30 分後に再度水素化ホウ素ナトリウムを加えて反応を行ったところ収率 78% に向上した。一方で、ヨードアラニン誘導体 **13** を経由する方法では、2-2 項での方法と同様

に、Appel 反応によって得られたヨードアラニン誘導体 **13** を精製することなく **11** に対して 0.5 当量の (MPMSe)₂ を MeOH:Et₂O=2:3 で溶かし、氷浴中で溶液が無色になるまで水素化ホウ素ナトリウムを加えて反応を行った。しかし、目的物を得ることはできなかった。そこで、まず別の容器で (MPMSe)₂ を MeOH に溶かし、氷浴中で溶液が無色になるまで水素化ホウ素ナトリウムを加えセレンラートを生成したのちに、ヨードアラニン誘導体 **13** を MeOH:Et₂O の混合溶媒に溶かして加え、氷浴中で 1 時間反応させた。このとき、最終的な反応溶液が MeOH:Et₂O=2:3 になるように調整した。この 2 段階の収率は 34% であった。水酸化トリメチルスズを用いて加水分解することで目的のセレノシステイン誘導体 **3** を収率 91% で得た (Scheme 2-8)。トシラート **12** もしくは、ヨードアラニン誘導体 **13** を経由した合成法の通算収率はそれぞれ、39% と 24% であり、Boc 保護体の場合とは異なり、ヨードアラニン誘導体を経由することで収率が減少してしまうという結果になった。



Scheme 2-8

このとき得られたセレノシステイン誘導体 **3** をキラルカラム HPLC 分析によって e.e. を決定したところ、ラセミ化していることが確認された。そこで、各段階における生成物をキラルカラムによって分析したところ、セレニド **14** がすでにラセミ化しており、セレン化の段階においてラセミ化していることが確認された (Figure 2-4)。特に、トシル化を経由した合成法では、**14** の e.e. は 50% 程度と低かった。一方、ヨウ素化を経由した合成法では、セレニドの e.e. は 80% 程度であった。この結果から、トシラート **12** やヨードアラニン誘導体 **13** に水素化ホウ素ナトリウムを加えてしまうと、 α プロトンの引き抜きを伴った、 β 脱離によるデヒドロアラニンの生成が起こりラセミ化してしまうということが考えられる。

実際に、単離したトシラート **12** を MeOH と Et₂O の混合溶媒に溶かし、氷浴中で水素化ホウ素ナトリウムを加えてみたところ、15 分後には TLC 上で **12** のスポットが薄くなり複数の生成物のスポットが観測された。デヒドロアラニンの生成を直接観測できたわけではないが、この結果は、予想したように **12** と水素化ホウ素ナトリウムとの反応によって、**12** の分解が起こっていることを示唆している。Boc 基も Fmoc 基も嵩高い置換基を有している保護基であるが、ウレタン結合と嵩高い置換基の間にメチレン基を含んでいるかという違いがある。このメチレン基があるために α プロトン近傍の空間の大きさに違いが生じ、Fmoc 保護体ではラセミ化が進行したものと考えられる。一部ラセミ化したセレニド **14** は、ジクロロメタン/*n*-ヘキサンを用いて 2 回再

結晶することによってほぼ純粋なエナンチオマー(100% e.e.)になることがわかった(Figure 2-5)。この際、セレニド **14** の回収率は 70%程度であり、収量がやや減少してしまった。

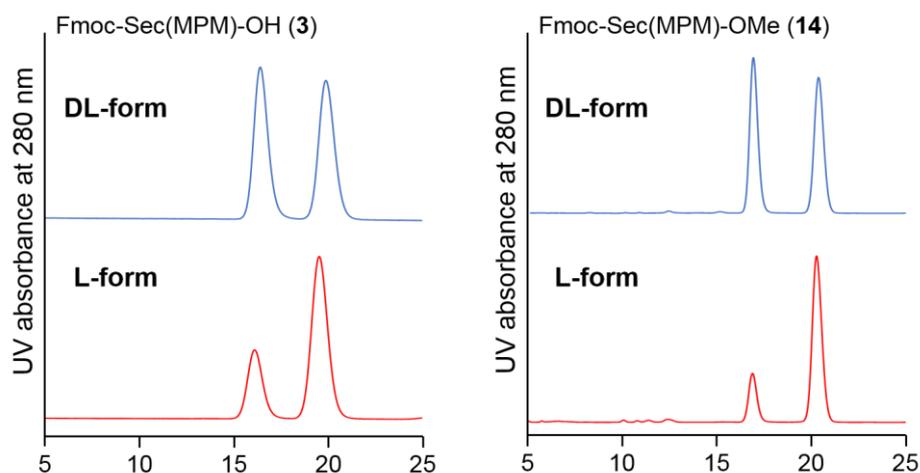


Figure 2-4. セレノシステイン誘導体 **3**, **14** のキラルカラム HPLC チャート

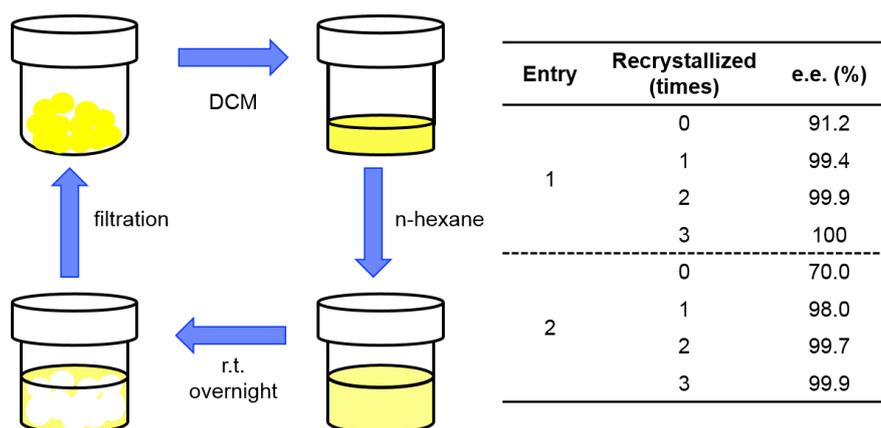
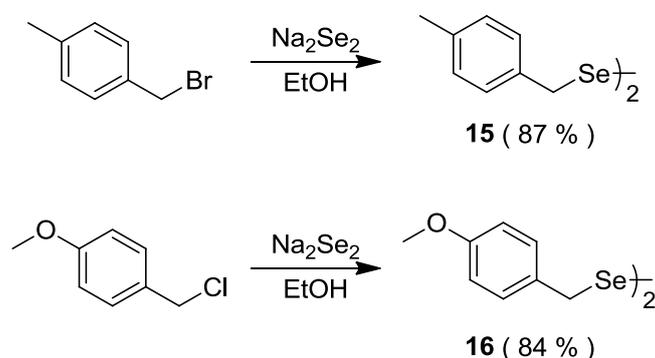


Figure 2-5. セレノシステイン誘導体 **14** の再結晶方法と e.e. の変化

しかしながら、Scheme 2-8 における各反応段階の溶媒、反応温度、反応時間を再検討することによって、セレノシステイン誘導体 **1**, **2** と同様に通算収率 70%以上でセレノシステイン誘導体 **3** を合成することができるようになった。その合成法に従うことによってセレノシステイン誘導体 **4** も効率的に合成することができた。

本研究においてセレン化剤として用いたビス-*p*-メチルベンジルジセレニド((MBnSe)₂, **15**)及び、ビス-*p*-メトキシフェニルメチルジセレニド((MPMSe)₂, **16**)は、Back らが報告した Na₂Se₂ を用いた方法に従って合成した⁸。0.5 当量のセレン粉末と 1 当量の水素化ホウ素ナトリウムを量り取ったフラスコを窒素雰囲気に入れ、氷浴中で脱水 EtOH を加えた。NaHSe が生成し、溶液が透明になったことを確認した後、反応溶液を室温に戻し、さらに 0.5 当量のセレン粉末を加えることで Na₂Se₂ を系内に生成した。各ベンジルハライドの脱水 EtOH 溶液をフラスコに加

え、室温で 1-2 時間攪拌することで対応したジセレニドを高収率で得ることができた(Scheme 2-9)。



Scheme 2-9

2-4 結論

本章では、ペプチド合成に有用であるセレノシステイン誘導体 **1-4** の効率的合成法の開発に取り組んだ。本研究では、Metanis や Braga の手法を参考に、それらを組み合わせることで L-セリンから 5 段階の反応によって目的のセレノシステイン誘導体を効率的に合成することに成功した。Boc 法に有用なセレノシステイン誘導体 **1, 2** はそれぞれ通算収率 73%, 74% で合成することができた。さらに、得られたセレノシステイン誘導体はラセミ化していない(100% e.e.)ことが確認された。しかしながら、Fmoc 法に有用なセレノシステイン誘導体 **3** の合成では、**1, 2** の合成に比べ、低収率かつ得られたセレニドがラセミ化していることが確認された。得られたセレニドを 2 回再結晶することで 100% e.e. の目的化合物が得られることが確認されたが、このときの回収率は約 70% であった。この問題は、各反応段階の反応条件を再検討し、最適化することで収率の向上及びセレノシステイン誘導体 **4** の合成に成功した。Fmoc 法に用いるセレノシステイン誘導体の合成法としては、収率の向上やラセミ化の抑制など、検討の余地は残されているが、本研究によっていずれの誘導体(**1-4**)もグラムスケールで、かつ再現性良く合成することができるようになった。

本研究によって達成されたセレノシステイン誘導体 **1-4** の効率的かつ高収率での合成によって、セレノペプチドの合成研究において多種多様の検討を行うことができるようになった。したがって、本研究成果はセレノペプチドの応用研究の発展に大きく貢献する結果であるといえる。

2-5 実験操作

使用した装置・薬品について

^1H NMR (500 MHz), ^{13}C NMR (125.8 MHz), ^{77}Se NMR (95.4 MHz) スペクトルの測定には BRUKER AVANCE 500-FTNMR 装置を使用した。なお、 ^1H NMR は内部基準としてクロロホルム (δ 7.26), ^{13}C NMR は内部基準としてクロロホルム (δ 77.06), ^{77}Se NMR は外部基準としてジフェニルジセレニド (δ 461.0) を用いた。ゲル透過クロマトグラフィー (GPC) には日本分析工業 LC-918, LC-9201 装置を使用した。薄層クロマトグラフィー (TLC) には MERCK TLC アルミニウムシート 20×20 cm (シリカゲル 60F₂₅₄) を使用し、カラムクロマトグラフィーには和光純薬工業 Wakogel C-300 を使用した。

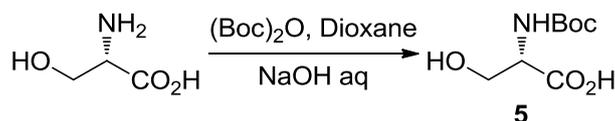
キラルカラムを用いた分析は以下の高速液体クロマトグラフィー (島津製作所) を使用した。

| | |
|-----------|------------|
| オンラインデガッサ | DGU-12A |
| 紫外可視検出器 | SPD-10A vp |
| カラムオーブン | CTO-10A vp |
| デュアルポンプ | LC-10Ai |

このとき HPLC 分析によって得られた HPLC クロマトグラムは LCsolution software (島津製作所) を用いて解析した。

実験に使用した試薬は、購入品を精製することなくそのまま使用し、脱水溶媒はモレキュラーシーブス 3A を用いて脱水した。

N-(*tert*-Butoxycarbonyl)-L-serine (**5**) の合成

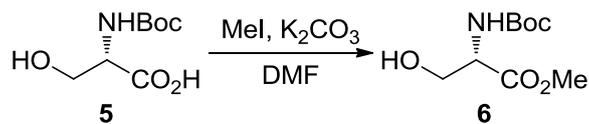


100 mL ナス型フラスコに L-セリン (2.00 g, 19.0 mmol) を量り取り、1M 水酸化ナトリウム水溶液 (22 mL) に溶かし、氷浴に移した。ニ炭酸ジ-*tert*-ブチル (5.4 mL, 23.5 mmol) の 1,4-ジオキサン (16 mL) 溶液をゆっくりと滴下した。氷浴で 30 分間攪拌した後、室温に戻し、さらに 24 時間攪拌した。エバポレーターで 1,4-ジオキサンを減圧留去した後、残渣を Et₂O で抽出し、Et₂O 可溶物を取り除いた。水層に 1M 硫酸水素カリウム水溶液を加えて液性を酸性にした後に目的物を EtOAc で抽出し、油層を飽和食塩水で洗浄後、硫酸マグネシウムで乾燥させ、ろ過した後にエバポレーターで溶媒を減圧留去することで表題化合物を無色油状物として得た (3.90 g, 99%)。化合物 **5** のスペクトルデータは既報の文献⁵と一致した。

^1H NMR (CDCl₃) δ 5.90 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz, NH) 4.34 (m, 1H, H α), 3.84-4.04 (m, 2H, H β), 1.44 (s, 9H, Boc);

^{13}C NMR (CDCl₃) δ 174.0, 156.3, 80.6, 62.9, 55.5, 28.3.

N-(*tert*-Butoxycarbonyl)-L-serine Methyl Ester (**6**)の合成

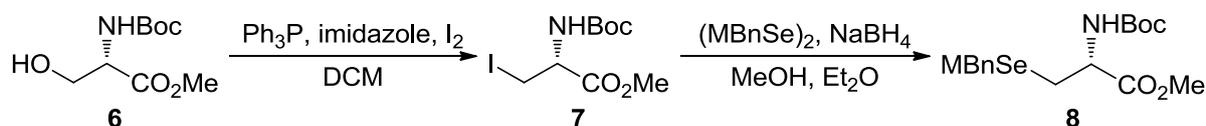


50 mL ナス型フラスコに *N*-Boc-Ser-OH (**5**) (1.26 g, 6.1 mmol) と炭酸カリウム (0.908 g, 6.6 mmol) を量り取り、DMF (12 mL) に溶かした。氷浴中で、ヨードメタン (0.8 mL, 12.8 mmol) の DMF (6 mL) 溶液を加え、30 分間攪拌した後、室温に戻し、さらに 4 時間攪拌した。不溶物をろ過した後、EtOAc で抽出し、油層を飽和食塩水で洗浄後、硫酸マグネシウムで乾燥させ、ろ過した後にエバポレーターで溶媒を減圧留去した。得られた粗生成物(無色油状物)をオープンカラム(シリカゲル, *n*-hexane : EtOAc = 1 : 1) で精製することで表題化合物を無色油状物として得た (1.24 g, 93 %)。化合物 **6** のスペクトルデータは既報の文献⁵⁾と一致した。

¹H NMR (CDCl₃) δ 5.69 (d, 1H, *J* = 9.2 Hz, NH), 4.20 (t, 1H, *J* = 3.9 Hz, H_α), 3.70 (m, 1H, OH), 3.78 (m, 2H, H_β), 3.62 (s, 3H, CO₂Me), 1.31 (s, 9H, Boc);

¹³C NMR (CDCl₃) δ 171.5, 155.8, 79.9, 62.7, 55.6, 52.3, 28.1.

N-(*tert*-Butoxycarbonyl)-*Ser*-(*p*-methylbenzyl)-L-selenocysteine Methyl Ester (**8**)の合成



50 mL 二口ナス型フラスコにトリフェニルホスフィン (0.911 g, 3.5 mmol) とイミダゾール (0.237 g, 3.5 mmol) を量り取り、窒素雰囲気下で脱水 DCM (12 mL) に溶解させ、氷浴に移した。ヨウ素 (0.899 g, 3.5 mmol) を加え、黄色懸濁が生じたことを確認し、室温で 10 分間攪拌した。再び、氷浴に移し、*N*-Boc-Ser-OMe (**6**) (0.507 g, 2.3 mmol) の脱水 DCM (8 mL) 溶液を加えた後、氷浴中で 2 時間攪拌した。得られた粗生成物(黄色懸濁)をオープンカラム(シリカゲル, *n*-hexane : Et₂O = 1 : 1) を用いて不溶物をろ過した。得られたろ液はエバポレーターによって溶媒を減圧留去した。得られた橙色油状物とビス-*p*-メチルベンジルジセレンイド (0.385 g, 1.1 mmol) を Et₂O (12 mL) と MeOH (8 mL) に溶かし、氷浴に移した。そこに水素化ホウ素ナトリウムを溶液の色が消えるまで加え、氷浴中でさらに 1 時間攪拌した後、EtOAc で抽出し、油層を飽和食塩水で洗浄後、硫酸マグネシウムで乾燥させ、ろ過した後にエバポレーターで溶媒を減圧留去した。得られた粗生成物(黄色油状物)をオープンカラム(シリカゲル, *n*-hexane : EtOAc = 4 : 1) で精製することで表題化合物を淡黄色油状物として得た (0.741 g, 83 %)。化合物 **8** のスペクトルデータは既報の文献⁵⁾と一致した。

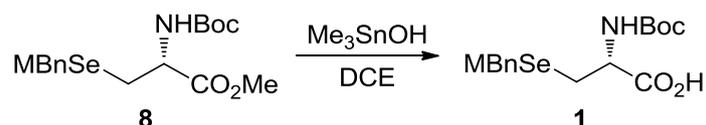
¹H NMR (CDCl₃) δ 7.19 (d, 2H, *J* = 8.0 Hz, MBn-Ar), 7.12 (d, 2H, *J* = 7.9 Hz, MBn-Ar), 5.32 (d, 1H, *J* = 7.5 Hz, NH), 4.63 (m, 1H, H_α), 3.79 (t, 2H, *J* = 6.4 Hz, MBn-CH₂), 3.77 (s, 3H, CO₂Me),

2.92 (m, 2H, H β), 2.34 (s, 3H, *p*-Me), 1.48 (s, 9H, Boc);

¹³C NMR (CDCl₃) δ 171.7, 155.1, 136.6, 135.6, 129.3, 128.8, 80.1, 53.4, 52.5, 28.3, 27.7, 25.9, 21.1;

⁷⁷Se NMR (CDCl₃) δ 216.5.

N-(*tert*-Butoxycarbonyl)-*Se*-(*p*-methylbenzyl)-L-selenocysteine (**1**)の合成



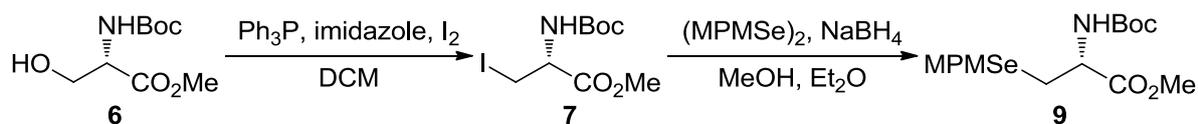
50 mL ナス型フラスコに *N*-Boc-Sec(MBn)-OMe (**8**) (0.993 g, 2.6 mmol) を量り取り、脱水 DCE (10 mL) に溶かした。そこに、水酸化トリメチルスズ (1.32 g, 7.3 mmol) を加え、油浴中 80°C で 2 時間攪拌を行なった。得られた粗生成物(白色懸濁)をオープンカラム(シリカゲル, *n*-hexane : EtOAc = 4 : 1 → 0 : 1) で精製することで表題化合物を白色固体として得た (0.912 g, 95 %)。化合物 **1** のスペクトルデータは既報の文献³⁾と一致した。

¹H NMR (CDCl₃) δ 7.19 (d, 2H, *J* = 8.0 Hz, MBn-Ar), 7.11 (d, 2H, *J* = 7.9 Hz, MBn-Ar), 5.28 (d, 1H, *J* = 7.0 Hz, NH), 4.62 (m, 1H, H α), 3.82 (t, 2H, *J* = 6.4 Hz, MBn-CH₂), 2.95 (d, 2H, *J* = 4.0 Hz, H β), 2.34 (s, 3H, *p*-Me), 1.48 (s, 9H, Boc);

¹³C NMR (CDCl₃) δ 175.4, 155.5, 136.7, 135.5, 129.4, 128.8, 80.6, 53.3, 28.3, 27.9, 25.2, 21.1;

⁷⁷Se NMR (CDCl₃) δ 217.7.

N-(*tert*-Butoxycarbonyl)-*Se*-(*p*-methoxyphenylmethyl)-L-selenocysteine Methyl Ester (**9**)の合成



50 mL ニロナス型フラスコにトリフェニルホスフィン (0.795 g, 3.0 mmol) とイミダゾール (0.216 g, 3.2 mmol) を量り取り、窒素雰囲気下で脱水 DCM (12 mL) に溶解させ、氷浴に移した。ヨウ素 (0.771 g, 3.0 mmol) を加え、黄色懸濁が生じたことを確認し、室温で 10 分間攪拌した。再び、氷浴に移し、*N*-Boc-Ser-OMe (**6**) (0.438 g, 2.0 mmol) の脱水 DCM (8 mL) 溶液を加えた後、氷浴中で 2 時間攪拌した。得られた粗生成物(黄色懸濁)をオープンカラム(シリカゲル, *n*-hexane : Et₂O = 1 : 1) を用いて不溶物を濾過した。得られたろ液はエバポレーターによって溶媒を減圧留去した。得られた橙色油状物とビス-*p*-メトキシフェニルメチルジセレニド (0.373 g, 0.9 mmol) を Et₂O (12 mL) と MeOH (8 mL) に溶かし、氷浴に移した。そこに水酸化ホウ素ナトリウムを溶液の色が消えるまで加え、氷浴中でさらに 1 時間攪拌した後、EtOAc で抽出し、油

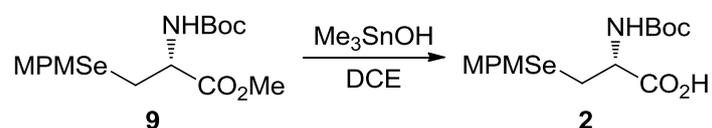
層を飽和食塩水で洗浄後、硫酸マグネシウムで乾燥させ、ろ過した後にエバポレーターで溶媒を減圧留去した。得られた粗生成物(黄色油状物)をオープンカラム(シリカゲル, *n*-hexane : EtOAc = 4 : 1)で精製することで表題化合物を淡黄色油状物として得た(0.668 g, 83 %)。化合物 **9** のスペクトルデータは既報の文献^[4]と一致した。

¹H NMR (CDCl₃) δ 7.13 (m, 2H, MPM-Ar), 6.75 (m, 2H, MPM-Ar), 5.22 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz, NH), 4.54 (m, 1H, Ha), 3.72 (s, 3H, CO₂Me), 3.69 (s, 2H, MPM-CH₂), 3.68 (s, 3H, *p*-OMe), 2.82 (m, 2H, Hβ), 1.39 (s, 9H, *t*Bu);

¹³C NMR (CDCl₃) δ 171.7, 158.6, 155.1, 130.6, 130.0, 114.0, 80.2, 55.3, 53.4, 52.5, 28.3, 27.4, 25.8;

⁷⁷Se NMR (CDCl₃) δ 216.3.

N-(*tert*-Butoxycarbonyl)-*Se*-(*p*-methoxyphenylmethyl)-L-selenocysteine (**2**)の合成



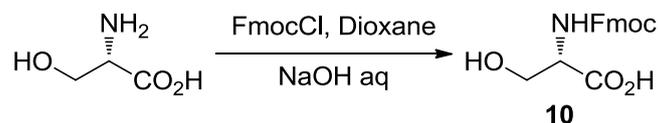
50 mL ナス型フラスコに *N*-Boc-Sec(MPM)-OMe (**9**) (0.523 g, 1.3 mmol)を量り取り、脱水 DCE (10 mL)に溶かした。そこに、水酸化トリメチルスズ (0.703 g, 3.9 mmol)を加え、油浴中 80°Cで 3 時間攪拌を行なった。得られた粗生成物(白色懸濁)をオープンカラム(シリカゲル, *n*-hexane : EtOAc = 4 : 1→0 : 1)で精製することで表題化合物を黄色油状物として得た(0.912 g, 95 %)。化合物 **2** のスペクトルデータは既報の文献^[9]と一致した。

¹H NMR (CDCl₃) δ 7.21 (d, 2H, *J* = 8.6 Hz, MPM-Ar), 6.84 (d, 2H, *J* = 8.6 Hz, MPM-Ar), 5.33 (d, 1H, *J* = 7.7 Hz, NH), 4.63 (m, 1H, Ha), 3.81 (s, 5H, *p*-OMe and MPM-CH₂), 2.95 (m, 2H, Hβ), 1.48 (s, 9H, *t*Bu);

¹³C NMR (CDCl₃) δ 175.6, 158.5, 155.5, 130.6, 130.0, 114.1, 80.6, 55.3, 53.3, 28.3, 27.6, 25.3;

⁷⁷Se NMR (CDCl₃) δ 217.3.

N-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)-L-serine (**10**)の合成



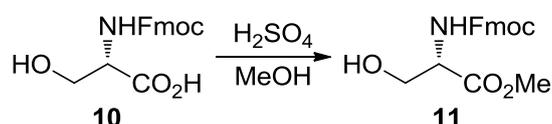
30 mL ナス型フラスコに L-セリン(**8**, 0.103 g, 0.98 mmol)を量り取り、10% 炭酸ナトリウム水溶液(3 mL)に溶かした。氷浴中、9-フルオレニルメトキシカルボニルクロリド(0.245 g, 0.95 mmol)の 1,4-ジオキサン(3 mL)溶液を、ゆっくりと滴下した。室温で 1 時間攪拌した後、EtOAc で抽出し、EtOAc 可溶物を取り除いた。水層に 1M 塩酸を加えて酸性にした後に目的物を EtOAc

で抽出し、油層を飽和食塩水で洗浄後、硫酸マグネシウムで乾燥させ、ろ過した後にエバポレーターで溶媒を減圧留去することで表題化合物を白色固体として得た(0.284 g, 88%)。既報の文献^[10]では CDCl₃ を用いて NMR 測定を行っているが、化合物 **10** は CDCl₃ に溶けにくかったため、本研究では DMSO-d₆ に溶かして NMR 測定を行った。

¹H NMR (DMSO-d₆) δ 7.89 (d, 2H, *J* = 7.5 Hz, Fmoc-Ar), 7.73 (q, 2H, *J* = 3.7 Hz, Fmoc-Ar), 7.41 (t, 2H, *J* = 7.3, Fmoc-Ar), 7.33 (m, 2H, Fmoc-Ar), 7.14 (d, 1H, *J* = 7.6 Hz, NH), 4.27 (m, 2H, Fmoc-CH₂), 4.22 (m 1H, Fmoc-CH), 3.89 (m, 1H, H_α), 3.60 (m, 2H, H_β);

¹³C NMR (DMSO-d₆) δ 171.0, 156.2, 144.4, 143.7, 141.3, 127.8, 127.1, 125.1, 120.0, 66.1, 62.2, 56.8, 47.1.

N-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)-L-serine Methyl Ester (**11**)の合成

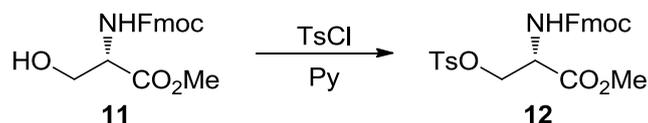


30 mL ナス型フラスコに *N*-Fmoc-Ser-OH (**10**) (0.263 g, 0.80 mmol) を量り取り、MeOH (5 mL) を加え懸濁させた。そこに濃硫酸(3 滴)を加え、油浴中 80°C で 3 時間加熱還流を行なった。室温まで冷却し、20% 炭酸ナトリウム水溶液で pH8 に調整した後、EtOAc で抽出し、油層を飽和食塩水で洗浄後、硫酸マグネシウムで乾燥させ、ろ過した後にエバポレーターで溶媒を減圧留去することで表題化合物を白色固体として得た(0.238 g, 87%)。化合物 **11** のスペクトルデータは既報の文献^[11]と一致した。

¹H NMR (CDCl₃) δ 7.70 (d, 2H, *J* = 5.0 Hz, Fmoc-Ar), 7.54 (m, 2H, Fmoc-Ar), 7.34 (m, 2H, Fmoc-Ar), 7.26 (m, 2H, Fmoc-Ar), 5.61 (d, 1H, *J* = 7.3 Hz, NH), 4.37 (m, 3H, Fmoc-CH₂ and H_α), 4.23 (t, 1H, *J* = 6.7 Hz, Fmoc-CH), 3.92-4.00 (m, 2H, H_β), 3.79 (s, 3H, CO₂Me);

¹³C NMR (CDCl₃) δ 172.9, 156.7, 144.4, 144.3, 141.2, 128.1, 127.6, 125.8, 120.6, 67.2, 63.3, 56.0, 52.8, 47.1.

N-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)-*O*-(*p*-toluenesulfonyl)-L-serine Methyl Ester (**12**)の合成

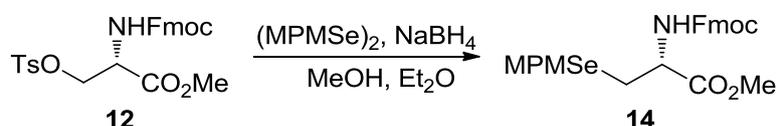


30 mL ニロナス型フラスコに *N*-Fmoc-Ser-OMe (**11**) (0.539 g, 1.6 mmol) と塩化-*p*-トルエンスルホンル(1.51 g, 7.9 mmol) を量り取った。窒素雰囲気下でピリジン(5 mL) に溶かし、氷浴中で 10 時間攪拌した後、EtOAc で抽出し、油層を 10% 硫酸水素カリウム水溶液、飽和炭酸水素カルシウム水溶液、蒸留水、飽和食塩水で洗浄後、硫酸マグネシウムで乾燥させ、ろ過した後

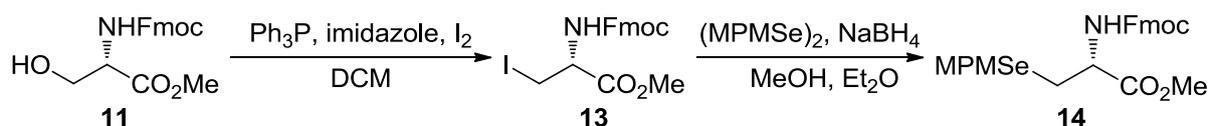
にエバポレーターで溶媒を減圧留去した。得られた粗生成物(黄色油状物)をオープンカラム(シリカゲル, *n*-hexane : EtOAc = 4 : 1)で精製することで表題化合物を淡黄色油状物として得た(0.762 g, 72 %)。化合物 **12** のスペクトルデータは既報の文献^[12]と一致した。

¹H NMR (CDCl₃) δ 7.79 (t, 4H, *J* = 7.9 Hz, Ts-Ar), 7.62 (q, 2H, *J* = 6.3 Hz, Fmoc-Ar), 7.44 (m, 2H, Fmoc-Ar), 7.36 (q, 2H, *J* = 6.6 Hz, Fmoc-Ar), 7.28 (d, 2H, *J* = 8.1 Hz, Fmoc-Ar), 5.80 (d, 1H, *J* = 7.6 Hz, NH), 4.56 (m, 1H, Ha), 4.47 (dd, 1H, *J* = 3.2 Hz, 10.25 Hz, Hβ), 4.38 (m, 2H, Fmoc-CH₂), 4.35 (q, 1H, *J* = 3.5 Hz, βH), 4.21 (t, 1H, *J* = 7.3 Hz, Fmoc-CH), 3.75 (s, 3H, CO₂Me), 2.37 (s, 3H, *p*-Me)。

N-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)-*Se*-(*p*-methoxyphenylmethyl)-L-selenocysteine Methyl Ester (**14**)の合成



トシラート **12** を経由するルート: 30 mL ナス型フラスコに *N*-Fmoc-Ser(OTs)-OMe (**12**) (0.122 g, 0.25 mmol) とビス-*p*-メトキシフェニルメチルジセレニド (0.100 g, 0.25 mmol) を量り取り、Et₂O (6 mL) と MeOH (4 mL) に溶かし、氷浴に移した。そこに水素化ホウ素ナトリウムを溶液の色が消えるまで加え、氷浴中でさらに 30 分間攪拌した後、再度無色になるまで水素化ホウ素ナトリウムを入れ、さらに 30 分間攪拌した。この溶液を EtOAc で抽出し、油層を飽和食塩水で洗浄後、硫酸マグネシウムで乾燥させ、ろ過した後にエバポレーターで溶媒を減圧留去した。得られた粗生成物(黄色油状物)をオープンカラム(シリカゲル, *n*-hexane : EtOAc = 2 : 1)で精製することで表題化合物を淡黄色油状物として得た(0.101 g, 78 %)。



ヨードアラニン **13** を経由するルート: 30 mL ナス型フラスコにトリフェニルホスフィン (0.124 g, 0.47 mmol) とイミダゾール (0.0379 g, 0.57 mmol) を量り取り、窒素雰囲気下で脱水 DCM (3 mL) に溶かし、氷浴に移した。ヨウ素 (0.124 g, 0.49 mmol) を加え、黄色懸濁が生じたことを確認し、室温で 10 分間攪拌した。再び氷浴に移し、*N*-Fmoc-Ser-OMe (**11**) (0.111 g, 0.33 mmol) を脱水 DCM (3 mL) に溶かした溶液を加えた後、2 時間攪拌した。得られた粗生成物(黄色懸濁)をろ過し、ろ液をエバポレーターで溶媒を減圧留去することで粗製のヨウ化物を橙色油状物として得た。30 mL ナス型フラスコにビス-*p*-メトキシフェニルメチルジセレニド (0.0705 g, 0.18 mmol) を量り取り MeOH (2 mL) に懸濁させた。氷浴に移し攪拌し、溶液が無色になるまで水素化ホウ素ナトリウムを加えた。先ほど得られたヨウ化物を Et₂O (6 mL) と MeOH (2 mL)

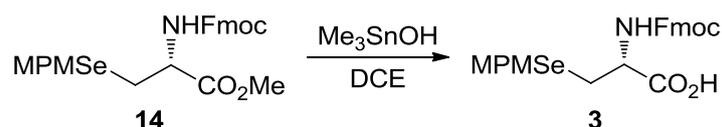
に溶かし、ゆっくりと 30 mL ナス型フラスコに加えた。氷浴で 1 時間攪拌した後、EtOAc で抽出し、油層を飽和食塩水で洗浄後、硫酸マグネシウムで乾燥させ、ろ過した後にエバポレーターで溶媒を減圧留去した。得られた粗生成物(黄色油状物)を GPC で精製することで表題化合物を無色油状物として得た(0.0585 g, 34%)。化合物 **14** のスペクトルデータは既報の文献^[13]と一致した。

¹H NMR (CDCl₃) δ 7.79 (m, 2H, Fmoc-Ar), 7.63 (t, 2H, *J* = 7.1 Hz, Fmoc-Ar), 7.42 (m, 2H, Fmoc-Ar), 7.34 (m, 2H, Fmoc-Ar), 7.22 (d, 2H, *J* = 8.5 Hz, MPM-Ar), 6.85 (m, 2H, MPM-Ar), 5.57 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz, NH), 4.70 (m, 1H, H_α), 4.44 (d, 2H, *J* = 7.1 Hz, Fmoc-CH₂), 4.27 (t, 1H, *J* = 7.1 Hz, Fmoc-CH), 3.80 (s, 3H, CO₂Me), 3.79 (s, 3H, *p*-OMe), 3.77 (s, 2H, MPM-CH₂), 2.95 (m, 2H, H_β);

¹³C NMR (CDCl₃) δ 171.4, 158.6, 143.7, 141.3, 130.5, 130.0, 127.8, 127.1, 125.1, 120.0, 114.0, 67.2, 55.3, 53.8, 52.7, 47.1, 27.5, 25.7;

⁷⁷Se NMR (CDCl₃) δ 214.7.

N-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)-*Se*-(*p*-methoxyphenylmethyl)-L-selenocysteine (**3**)の合成



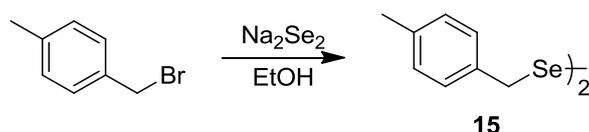
50 mL ニロナス型フラスコに *N*-Fmoc-Sec(MPM)-OMe (**14**) (0.790 g, 1.5 mmol) を量り取り、脱水 DCE (15 mL) に溶かした。そこに、水酸化トリメチルスズ (0.989 g, 5.5 mmol) を加え、35°C で一晩攪拌を行なった。反応溶液をろ過した後に、ろ液をエバポレーターで溶媒を減圧留去した。得られた粗生成物(淡黄色油状物)をオープンカラム(シリカゲル, *n*-hexane : EtOAc = 2 : 1 → 0 : 1) で精製することで表題化合物を無色油状物として得た(0.702 g, 91%)。化合物 **3** のスペクトルデータは既報の文献^[1]と一致した。

¹H NMR (CDCl₃) δ 7.78 (m, 2H, Fmoc-Ar), 7.63 (t, 2H, *J* = 6.7 Hz, Fmoc-Ar), 7.42 (m, 2H, Fmoc-Ar), 7.33 (m, 2H, Fmoc-Ar), 7.20 (d, 2H, *J* = 8.3 Hz, MPM-Ar), 6.83 (d, 2H, *J* = 8.4 Hz, MPM-Ar), 5.54 (d, 1H, *J* = 7.8 Hz, NH), 4.70 (m, 1H, H_α), 4.45 (d, 2H, *J* = 6.7 Hz, Fmoc-CH₂), 4.26 (t, 1H, *J* = 6.8 Hz, Fmoc-CH), 3.79 (s, 2H, MPM-CH₂), 3.78 (s, 3H, *p*-OMe), 2.98 (m, 2H, H_β);

¹³C NMR (CDCl₃) δ 158.7, 143.6, 141.3, 130.0, 127.8, 127.1, 125.1, 120.0, 114.1, 67.3, 55.3, 53.6, 47.1, 27.7, 25.1;

⁷⁷Se NMR (CDCl₃) δ 216.7.

Bis-*p*-methylbenzyl diselenide の合成



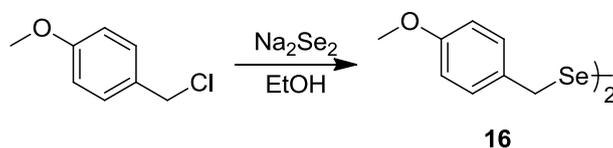
100 mL 二口ナス型フラスコにセレン粉末(0.7045 g, 8.9 mmol)と水素化ホウ素ナトリウム(0.676 g, 17.9 mmol)を量り取り、窒素雰囲気下でフラスコを氷浴に移した。EtOH (20 mL)に溶かし、0°Cで 15 分間攪拌した。反応溶液を室温に戻し、セレン粉末(0.704 g, 8.9 mmol)を加え、さらに 15 分間攪拌した。そこに、*α*-ブromo-*p*-キシレン(3.02 g, 16.3 mmol)と EtOH (10 mL)を加えた。室温で 2 時間攪拌した後、酢酸エチルで抽出し、油層を飽和食塩水で洗浄後、硫酸マグネシウムで乾燥させ、ろ過した後にエバポレーターで溶媒を減圧留去した。得られた粗生成物(黄色固体)を再結晶(*n*-hexane)で精製することで表題化合物を黄色結晶として得た(2.6062 g, 87 %)。化合物 **15** のスペクトルデータは既報の文献^[3]と一致した。

¹H NMR (CDCl₃) δ 7.04 (m, 8H, MBn-Ar), 3.77 (s, 4H, MBn-CH₂), 2.25 (s, 6H, *p*-Me);

¹³C NMR (CDCl₃) δ 136.8, 136.0, 129.2, 128.9, 32.5, 21.2;

⁷⁷Se NMR (CDCl₃) δ 399.1.

Bis-*p*-methoxyphenylmethyl diselenide の合成



100 mL 二口ナス型フラスコにセレン粉末(1.46 g, 18.5 mmol)と水素化ホウ素ナトリウム(1.40 g, 36.9 mmol)を量り取り、窒素雰囲気下でフラスコを氷浴に移した。EtOH (25 mL)に溶かし、0°Cで 15 分間攪拌した。反応溶液を室温に戻し、セレン粉末(1.46 g, 18.5 mmol)を加え、さらに 15 分間攪拌した。そこに、*p*-メトキシフェニルメチルクロリド(5 mL, 36.8 mmol)の EtOH (15 mL)溶液を加えた。室温で 1 時間攪拌した後、蒸留水を加えることで固体を析出させた。ろ過によって得られた固体を酢酸エチルで抽出し、油層を飽和食塩水で洗浄後、硫酸マグネシウムで乾燥させ、ろ過した後にエバポレーターで溶媒を減圧留去した。得られた粗生成物(黄色固体)を再結晶(*n*-hexane)で精製することで表題化合物を黄色結晶として得た(5.95 g, 84 %)。化合物 **16** のスペクトルデータは既報の文献^[14]と一致した。

¹H NMR (CDCl₃) δ 7.19 (m, 4H, MPM-Ar), 6.86(m, 4H, MPM-Ar), 3.86 (t, 4H, *J* = 7.1 Hz, MPM-CH₂), 3.82 (s, 6H, *p*-OMe);

¹³C NMR (CDCl₃) δ 158.8, 131.1, 130.1, 113.9, 55.3, 32.2;

⁷⁷Se NMR (CDCl₃) δ 396.6.

キラルカラムによる HPLC 分析

・ Boc-Sec(MBn)-OH(1), Boc-Sec(MPM)-OH(2)の分析

Boc-Sec(MBn)-OH(1)の分析は、Chiralpak AD-RH 0.46 cmΦ×15 cm をカラムとして用いて、移動相には 0.1%-リン酸を含む 40%-アセトニトリル水溶液をイソクラチック条件で使用した。カラム温度を 35°C に設定し、流速 1 mL/min、検出波長 280 nm で分析を行った。Boc-Sec(MPM)-OH(2)の分析は、流速を 0.8 mL/min に変更し、それ以外の条件は 1 と同様の条件で分析を行った。

・ Fmoc-Sec(MPM)-OH(3), Fmoc-Sec(MPM)-OMe(2)の分析

Fmoc-Sec(MPM)-OH(3)の分析は、Chiralcel OD-RH 0.46 cmΦ×15 cm をカラムとして用いて、移動相には 0.1%-リン酸を含む 60%-アセトニトリル水溶液をイソクラチック条件で使用した。カラム温度を 35°C に設定し、流速 1 mL/min、検出波長 280 nm で分析を行った。Fmoc-Sec(MPM)-OMe(14)の分析は、移動相を 0.1%-リン酸を含む 70%-アセトニトリル水溶液に、流速を 0.8 mL/min にそれぞれ変更し、それ以外の条件は 3 と同様の条件で分析を行った。

2-6 参考文献

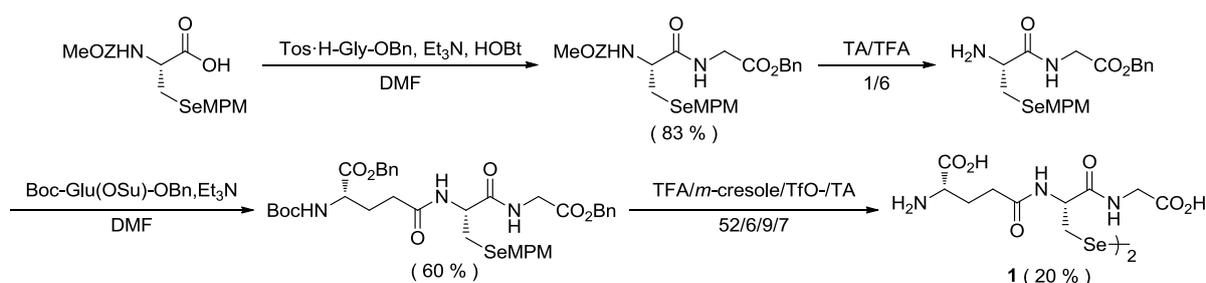
- [1] T. Koide, H. Itoh, A. Otaka, H. Yasui, M. Kurada, N. Esaki, K. Soda, and N. Fujii, *Chem. Pharm. Bull.*, **1993**, *41*, 502–506.
- [2] S. Flemer, Jr., *Pept. Sci.*, **2015**, *21*, 53–59.
- [3] N. Metanis, E. Keinan, P. E. Dawson, *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, *128*, 16684–16691.
- [4] A. L. Braga, L. A. Wessjohann, P. S. Taube, F. Z. Galetto, and F. M. Andrede, *Synthesis*, **2010**, *18*, 3131–3137.
- [5] P. P. Phadnis, and G. Mugesh, *Org. Biomol. Chem.*, **2005**, *3*, 2476–2481.
- [6] E. M. Stocking, J. N. Schwarz, H. Senn, M. Salzmann, and L. A. Silks, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1997**, 2443–2447.
- [7] B. M. Trost, and M. T. Rudd, *Org. Lett.*, **2003**, *5*, 4599–4602.
- [8] T. G. Back, and Z. Moussa, *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, *125*, 13455–13460.
- [9] O. Flogel, G. Casi, D. Hilvert, and D. Seebach, *Helv. Chim. Acta.*, **2007**, *90*, 1651–1666.
- [10] Z. L. Pianowski, and N. Winssinger, *Chem. Commun.*, **2007**, *37*, 3820–3822.
- [11] Y. Harayama, M. Yoshida, D. Kamimura, Y. Wada, and Y. Kita, *Chem. Eur. J.*, **2006**, *12*, 4893–4899.
- [12] S. Tabanella, I. Valancogne, R. F. W. Jackson, *Org. Biomol. Chem.*, **2003**, *1*, 4254–4261.
- [13] A. L. Schroll, R. J. Hondal, S. Flemer, Jr., *J. Pept. Sci.*, **2012**, *18*, 155–162.
- [14] M. D. Gieselman, L. Xie, and W. A. van der Donk, *Org. Lett.*, **2001**, *3*, 1331–1334.

3章 セレノグルタチオンの液相合成と酸化還元反応

3-1 緒言

グルタチオン(GSH)は、 γ -Glu-Cys-Gly の 3 残基からなる水溶性ペプチドであり、生体の細胞内に豊富に存在し、フリーラジカルや過酸化物などの活性酸素種の分解^[1,2]やタンパク質中のジスルフィド結合を切断する^[3]などの重要な役割を担っている。グルタチオンのシステインをセレノシステインに置き換えたセレノグルタチオン(GSeH)は、グルタチオンより高い抗酸化作用や生理活性を示すと考えられ、基礎生物分野や医学分野への応用が期待される。実際には、GSeH は容易に酸化されるため酸化型セレノグルタチオン(GSeSeG, **1**)として単離される。GSeSeG はこれまでに、タンパク質の酸化的フォールディングの酸化剤^[4,6]、ラジカルスカベンジャー^[7,8]、重金属元素との反応^[9,10]など様々な研究への応用がされており、グルタチオンよりも高い活性を示すことが明らかにされている。これらの報告に用いられている GSeSeG は、ほとんどの場合において固相ペプチド合成法(SPPS)によって合成されている。Hilvert らは、以前にペンタフルオロフェニル(Pfp)エステル化することで活性化されたセレノシステイン誘導體(Fmoc-Sec(MPM)-OPfp)を用いて SPPS によるセレノグルタチオンを合成しており、その収率は 33%であった。Yoshida らは、事前に活性化されていないセレノシステイン誘導體(Fmoc-Sec(MPM)-OH)を用いてセレノグルタチオンを合成したが、収率は 9%と低かった^[11]。

一方、液相ペプチド合成法(LPPS)は SPPS よりも古くから用いられている手法であり、LPPS を用いた GSeSeG の合成報告例も存在する。Soda らは、(Z(OMe)-Sec(MPM)-OH)を原料とし、アンモニウム塩として 0.13g のセレノグルタチオンを合成することに成功している(Scheme 3-1)^[12]。



Scheme 3-1

しかし、この報告では通算収率が 9%と低いことから、より簡便な SPPS での合成が主流となり、LPPS での合成が顧みられることはなかった。固相法と液相法には、これまでの経験則からメリットとデメリットがそれぞれ存在するとされる。Table 3-1 には各項目における固相法と液相法の違いを表にまとめ比較している。セレノグルタチオンは 3 残基の短いペプチドであり、原料であるセレノシステインの入手が困難である。このことを踏まえて Table 3-1 を見てみると、セレノグルタチオンの合成には液相法の方が向いていると考えられる。

Table 3-1. ペプチド合成における液相法と固相法の比較

| | 固相法 | 液相法 |
|--------------|--------|----------|
| C 末端の保護基 | 固相担体 | エステル、アミド |
| 操作の難易度 | 易しい | 難しい |
| 加える試薬の量 | 4~5 当量 | 1~2 当量 |
| 精製の頻度 | 最後に一回 | 各段階で毎回 |
| 伸長可能なアミノ酸残基数 | ~50 | ~10 |
| 収量・収率 | 低い | 高い |

Singh らは、セレノシステイン(CysSeH)の二量体であるセレノシスチン(CysSeSeCys)を用いて ^{77}Se NMR による反応追跡を試み、セレノシステインの GPx 様触媒サイクルを明らかにした (Figure 3-1)^[13]。タンパク質はアミノ酸が多数縮合したポリペプチドである。GPx の活性中心を構成する最小単位であるセレノシステインにおいて、GPx と同様の触媒サイクルの存在が示されたことは、タンパク質のモデル研究において意義深いことである。

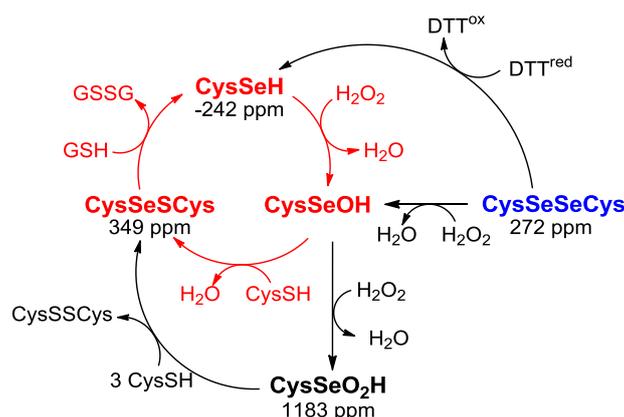


Figure 3-1. CysSeSeCys の触媒サイクル

Yoshida は、固相ペプチド合成によってセレノグルタチオン(GSeSeG)を合成し、過酸化水素やチオールとの反応を HPLC で追跡することで GPx 様触媒サイクルに重要な中間体(GSe-, GSeSG)を観測した (Figure 3-2)。さらに、GSeSeG と過酸化水素との反応溶液を ESI-MS にて分析することで、GSeO₂H が生成していることを確認している^[11]。

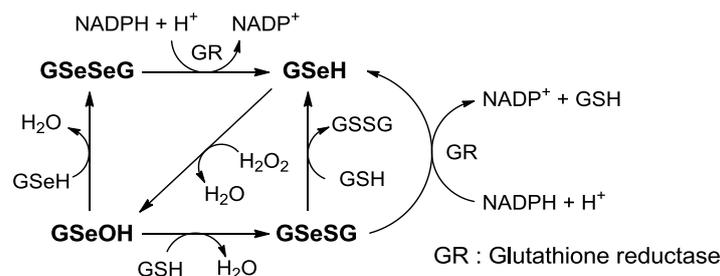


Figure 3-2. GSeSeG の触媒サイクル

しかしながら、 ^{77}Se NMR を利用したセレノグルタチオンの反応追跡は行われていなかった。セレンには複数の安定同位体が存在するが、NMR によって測定可能な ^{77}Se の天然存在比は 7.6% と小さい。したがって、 ^{77}Se NMR を利用した反応追跡では化合物を高濃度で溶解させるか ^{77}Se で同位体標識したセレン化合物を用いるなどの方法が必要となる。本研究では、2 章において効率的にセレノシステイン誘導体を合成することに成功したが、この合成法では ^{77}Se で同位体標識したセレノシステイン誘導体を得ることは経済的でない。したがって、 ^{77}Se NMR でのセレノグルタチオンの反応追跡を行うためには高濃度のセレノグルタチオン溶液を NMR サンプル管内に調整する必要があり、そのためには大量のセレノグルタチオンを合成する必要がある。

一方、酸化型セレノグルタチオン(GSeSeG)は、グルタチオンレダクターゼ(GR)によって認識され、生体内の豊富に存在する還元物質であるニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸(NADPH)によって還元型セレノグルタチオン(GSeH)に還元されることが明らかにされている^[4,11]。また、GSeSeG を利用することで、ジスルフィド(SS)結合を有するタンパク質の酸化的フォールディング過程を加速することが報告されている^[4,6]。タンパク質は、その機能を発現するために固有の立体構造を構築する必要がある。この状態を天然型(N 体)と呼ぶ。システイン残基を多く含むタンパク質では、システイン残基間の SS 結合が正しく架橋することによって天然型の立体構造が安定化されている。すなわち、SS 結合をもつタンパク質のフォールディング過程は、ポリチオール酸化反応に置き換えて議論することができる。しかしながら、タンパク質の酸化的フォールディング過程においては、必ずしも天然型の SS 結合のみが形成するとは限らず、非天然型の SS 結合が形成しタンパク質ミスフォールド体が形成してしまうことがある。このミスフォールド体が細胞内に蓄積してしまうとアルツハイマー病などの神経変性疾患を引き起こすと考えられている^[14,15]。プロテインジスルフィドイソメラーゼ(PDI)は、このようなミスフォールド体の SS 結合を還元し、正しい立体構造へとリフォールドさせることで小胞体内の恒常性を保っている。本研究では、牛睨臓リボヌクレアーゼ A (RNaseA)のミスフォールド体を用いて、セレノグルタチオンの PDI 様の触媒作用について検討を行った。

RNase A は天然型でジスルフィド結合を 4 つ持つタンパク質であり、タンパク質の酸化的フォールディング研究においてよく用いられるタンパク質の 1 つである。そのフォールディング経路はすでに詳細に研究が行われている^[16]。以下に、RNaseA のフォールディング経路を示す (Figure 3-3)。

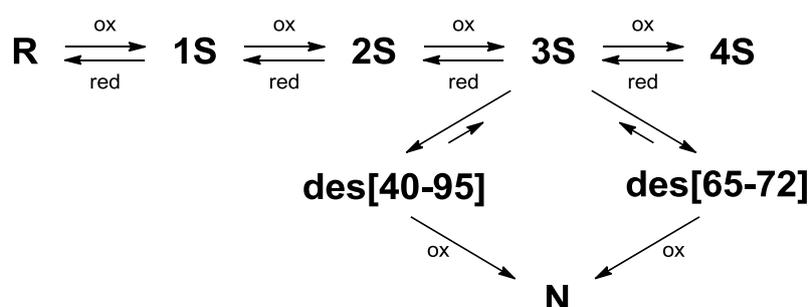


Figure 3-3. RNaseA のフォールディング経路

Hilvert らは、RNaseA や牛腓臓トリプシンインヒビター(BPTI)などのタンパク質の酸化的フォールディングにおいて、セレノグルタチオン(GSeSeG)がグルタチオン(GSSG)に比べてタンパク質フォールディングを加速する能力がより高いことを明らかにした^[46]。一方、Raines らは、RNaseA のミスフォールディング体に対して、酸化型及び還元型のグルタチオン(GSSG/GSH)と共に PDI のミミックとして低分子ジチオール化合物を触媒量加えて反応させることで、ミスフォールド体の天然型へのリフォールディングが触媒的に加速されることを最近報告している^[47]。しかしながら、セレノグルタチオンをタンパク質のミスフォールド体のリフォールディング反応に応用した報告例はない。

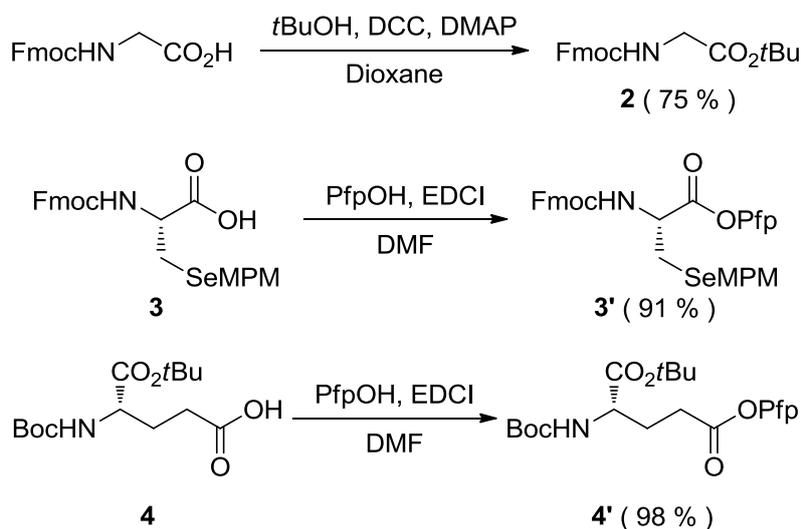
本章では、2章で合成したセレノシステイン誘導体を用いて Fmoc 法液相ペプチド合成によってセレノグルタチオンを大量に合成することを目的として、反応条件の検討を行った。次に、得られたセレノグルタチオンを用いて、その GPx 様触媒サイクルの詳細について ⁷⁷Se NMR を用いて検討した。ペプチドもタンパク質も同じポリペプチドであることから、セレノグルタチオンの酸化還元反応における挙動は GPx 活性中心におけるセレノシステイン残基の挙動と高い相関性があると考えられる。さらに、GSeSeG をグルタチオンレダクターゼと NADPH の共存下、RNaseA のミスフォールド体(4S 体)に対して作用することで、4S 体から N 体への変換が起こるかどうかも検討を行った。本研究によってセレノグルタチオンがこれらのタンパク質のモデル化合物としての有用性を示すのであれば、将来セレノグルタチオンを抗酸化剤や神経変性疾患の治療薬としての利用などへの展開を視野に入れることができる。すなわち、モデル化合物としての化学・生化学分野におけるその挙動への興味のみならず、医学・薬学分野への応用・発展が可能になるのではないかと考えている。

3-2 液相ペプチド合成に用いるアミノ酸誘導体の合成

一般にペプチド結合の形成は 2 種類の方法によって行われる。一つは、無保護のカルボン酸とアミンを縮合剤と共に攪拌することによって系内でカルボン酸を活性化しながら縮合する方法、もう一つは、Pfp エステルなどによって事前に活性化された活性エステルとアミンを反応させることで縮合する方法である。縮合剤を用いる場合には選択性を持たせるため C 末端のカルボキシ基を適切に保護する必要があるが、活性エステルを用いて縮合する場合には、アミンは選択的に活性エステルとのみ反応するため C 末端のカルボキシ基を保護する必要はない。しかしながら、無保護のカルボン酸はその高い極性によって、シリカゲルカラムクロマトグラフィーによる精製の過程が困難となる場合がある。そのため、本研究ではどちらの縮合法を用いる場合においても C 末端のカルボキシ基は保護された状態のアミノ酸を使用することにした。

C 末端アミノ酸であるグリシンのカルボキシ基は、カップリング後の最終段階において TFA で容易に脱保護可能な *t*Bu 基で保護することとした。Fmoc-Gly-OH と *t*BuOH, DCC, DMAP をジオキサン中で一晩攪拌することで目的の Fmoc-Gly-OtBu (**2**)を収率 75%で得た。2 残基目のセレノシステイン誘導体は 2 章で合成した Fmoc-Sec(MPM)-OH (**3**)を、3 残基目のグルタミン酸誘

導体は TFA によって脱保護が容易な Boc-Glu-O*t*Bu (**4**)を使用することとした。さらに、セレノシステイン誘導体とグルタミン酸誘導体については、Kisfaludy らの方法^[18]に従って Pfp エステル化を行った。すなわち、アミノ酸誘導体とペンタフルオロフェノール(PfpOH), EDCI を DMF に溶かし一晩攪拌することで Fmoc-Sec(MPM)-OPfp (**3'**)を収率 91%で、Boc-Glu(OPfp)-O*t*Bu (**4'**)を収率 98%でそれぞれ得ることができた(Scheme 3-2)。



Scheme 3-2

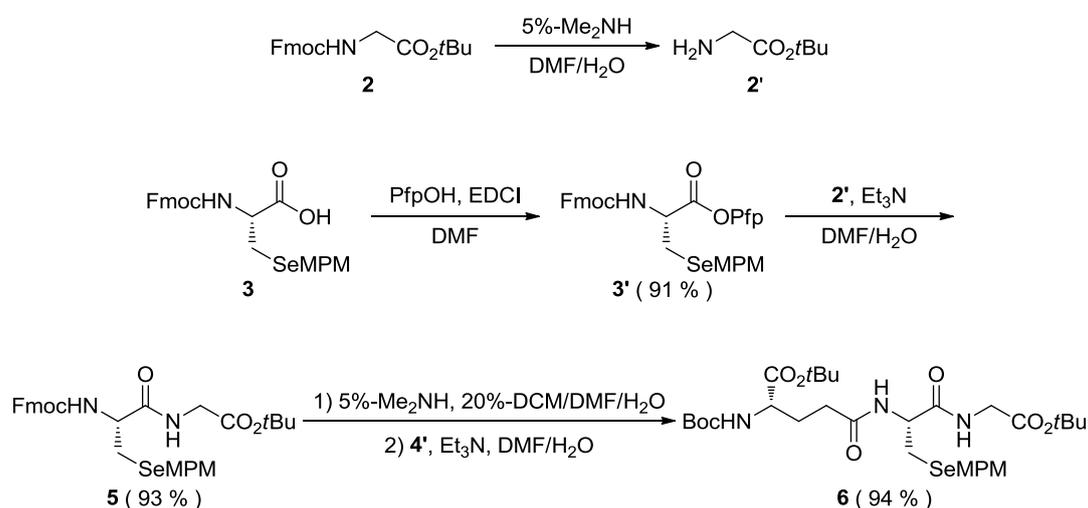
3-3 Pfp エステルを用いたカップリング

3-2 項で得られた Pfp エステル化されたアミノ酸誘導体を用いて Kisfaludy らの方法^[18]を参考に、脱 Fmoc 化とそれに続く活性アミノ酸とのカップリングを行うことにした。Kisfaludy らは脱 Fmoc 化の溶媒として 5% Me₂NH/DMF を用いていたが、この試薬を入手することはできなかった。そこで、市販の 40% Me₂NH 水溶液を DMF で 8 倍希釈することで、その溶液を 5% Me₂NH/DMF の代わりに用いて行った。Me₂NH の沸点は 7°C であり、反応終了後に過剰分をエバポレーターで容易に留去することができることが利点である。一方、固相法における一般的な脱 Fmoc 化試薬としてピペリジンが用いられているが、沸点が 106°C と高いため液相法においては除去が困難な化合物であり、脱 Fmoc 化試薬としては不適切であると考えられる。

グリシン誘導体 **2** を 5% Me₂NH/DMF に溶かし反応を TLC にて追跡したところ、5 分後には原料のスポットが完全に消失していることから、脱 Fmoc 化の反応時間を 5 分に決定した。室温で 5 分間攪拌した後に、過剰に残存している Me₂NH をエバポレーターで減圧留去することで脱 Fmoc されたグリシン誘導体 **2'** を得た。**2'** は精製することなく、セレノシステイン誘導体と Et₃N を加え 15 分間攪拌した。検討の結果、**3'** に対してグリシン誘導体 **2** を 1.5 当量、Et₃N を 2 当量加えることにより収率 93% で目的のジペプチド **5** を得ることができた。

次に、得られたジペプチド **5** の脱 Fmoc 化の溶媒検討を試みた。Moroder らは、セレノシステ

イン残基導入後、DMF などの高極性溶媒を用いて脱 Fmoc を行うと Se 原子の脱離が起こることから DCM やその混合溶媒等を用いたほうが効率よく脱 Fmoc 化が進行すると報告している^[19]。そこで、希釈する溶媒を DMF と DCM の混合溶媒とし、その比率を変えて脱 Fmoc を行った。続くグルタミン酸誘導体 **4'** とのカップリングは先ほどと同様に、**4'** を 1.5 当量、Et₃N を 2 当量とし、2 段階の反応の収率を脱 Fmoc 化の収率と考えた。DCM の比率を高くすると脱 Fmoc に要する時間も増加し、収率の低下が見られた。すなわち、溶媒の極性だけでなく長時間アミンと反応させることによってもセレン原子の脱離が進行しているものと考えられる。さらに DCM のみで脱 Fmoc 化を行った場合には、2 時間攪拌しても反応が進行していないことを TLC にて確認した。これらの検討の結果、20% DCM/DMF を溶媒として用いた場合には、先と同様に 5 分間で脱 Fmoc 化が完了し、94% と高収率で目的のトリペプチド **6** を得ることができた。これらの 3 段階の反応によるセレノシステイン誘導体 **3** からの通算収率は 80% であり、高収率でのセレノグルタチオン誘導体 **6** の合成に成功した(Scheme 3-3)。



Scheme 3-3

3-4 Pfp エステルを用いないカップリング

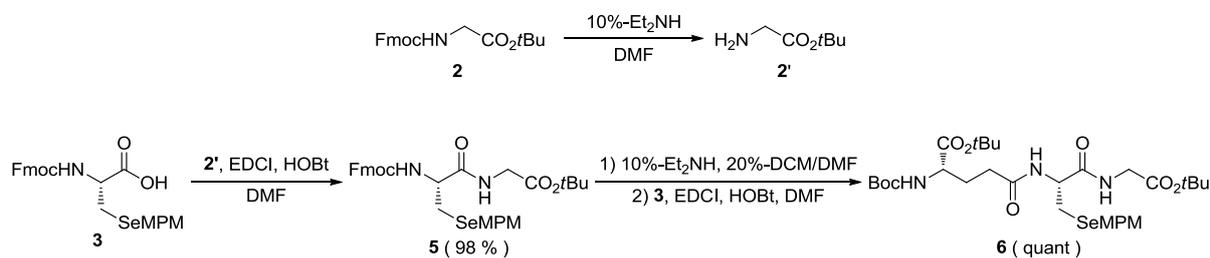
Pfp エステルは活性エステルであるものの、安定性が高いため単離することが可能である。そのためペプチド合成以外でも様々な反応に用いられている。しかし、活性エステルであるがために通常のエステルとは異なりシリカゲル上で加水分解してしまうため、シリカゲルによる精製は困難であり、GPC や再結晶など手間のかかる方法による精製が必要となる。また、Pfp エステルを合成する際の収率の低下による化合物の収量の低下も生じてしまう。

そこでセレノシステイン誘導体 **2** を Pfp エステル化することなくそのままペプチド合成に用いることを検討した。ここで問題となるのが、3-3 項において使用していた脱 Fmoc 化の条件では 40% Me₂NH aq を希釈して用いている点である。すなわち、ここで含まれている水は続くカップリングの際には取り除かれていないため、脱水縮合によるアミノ酸のカップリングがうまく

進行しないと考えられる。そこでそれ自身が液体で取り扱いが容易であり、なおかつ沸点が 55°C と低くエバポレーターで留去可能な Et₂NH を代わりに用いることにした。まず、グリシン誘導体 **2** の脱 Fmoc 化の際の Et₂NH の濃度を検討したところ、DMF 中の Et₂NH の濃度を 10% にすることによって Me₂NH の場合と同様に室温で 5 分間の攪拌で脱 Fmoc 化が完了することが TLC によって確認された。次に、カップリングに用いるカルボジイミドと添加剤の検討を行った。カルボジイミドとしては、DCC、DIC、EDCI を用いて、添加剤としては HOBt、DMAP を使用し、それぞれの組み合わせや当量について種々検討した。検討の結果、カルボジイミドとして EDCI を 1.5 当量、添加剤として HOBt を 1.5 当量加え、室温で 2 時間反応することで目的のジペプチド **5** が収率 98% で得られることが分かった。また、2 当量の DIC および、HOBt を室温で 6 時間反応させると同様に 98% で **5** を得ることができた。一方で、DCC を用いた場合でも同様に高い収率で **5** が得られることが確認できたが、未反応の DCC と **5** との分離が困難であったため、本研究におけるカップリング試薬としては適していないと判断した。

次に 3-3 項と同様に **5** の脱 Fmoc に使用する DCM/DMF 混合比について検討した。続くカップリングは、**5** に対して 1.5 当量のグルタミン酸誘導体 **4** を使用し、縮合剤および添加剤はジペプチド **5** の合成における最適条件である EDCI, HOBt を **4** に対してそれぞれ 1.5 当量、すなわち、**5** に対して 2.25 当量反応させた。その結果 20% DCM/DMF の時、定量的にトリペプチド **6** を得ることができた。このことから、10% Et₂NH においても脱 Fmoc の溶媒は 20% DCM/DMF が最適であることが確認された。また、2 当量の DIC と 1.5 当量の HOBt を室温で 6 時間反応させることで目的のトリペプチドを収率 98% で得ることができたが、スケールを大きくすることで未反応の DIC との分離が困難になることが確認されている。これらの検討の結果、カルボキシ基を事前に活性化していないアミノ酸誘導体を用いたカップリングの通算収率は 2 段階で 98% となった (Scheme 3-4)。

この手法は、事前にアミノ酸を活性化する必要がなく、通算収率も高い。このことから、縮合剤と添加剤により系内でカルボキシ基を活性化させながらカップリングする手法の方が、活性 Pfp エステルを用いる方法よりも効率よくアミノ酸を縮合できることがわかった。



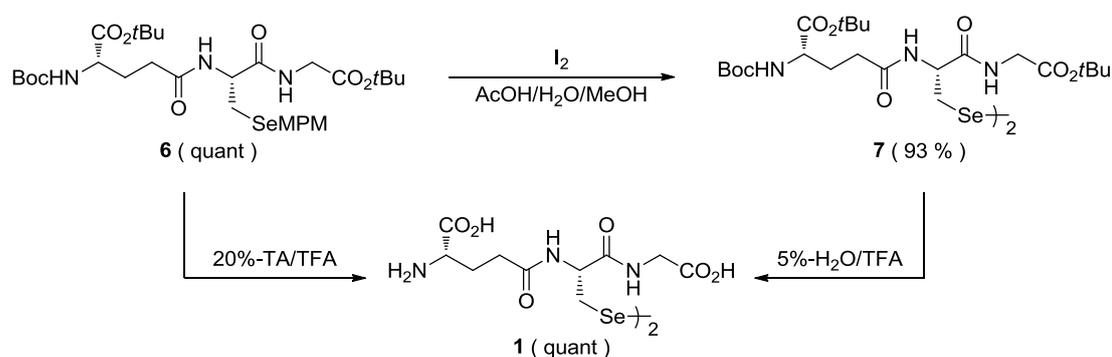
Scheme 3-4

3-5 セレノグルタチオン誘導体の脱保護

前述したように、2 つの方法を用いてセレノグルタチオン誘導体 **6** の合成を検討してきた。こ

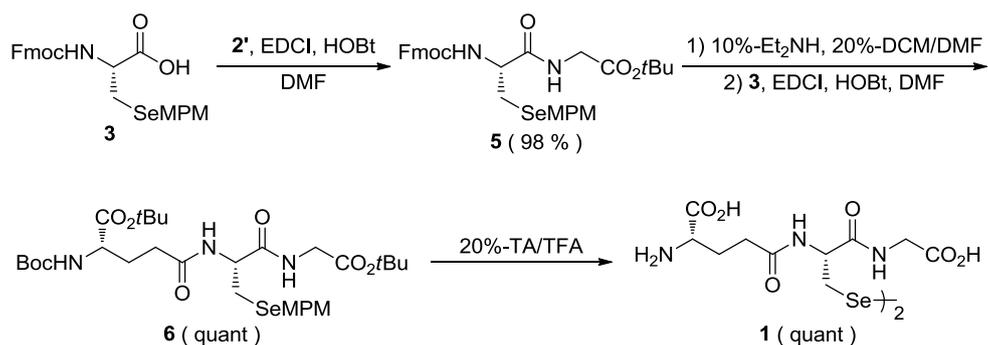
ここでは得られたセレノグルタチオン誘導体 **6** の脱保護について、2つの方法を検討した。一方は、セレン上の保護基とその他の官能基の保護基を異なる条件で脱保護する方法であり、他方は、すべての保護基を同時に脱保護する方法である(Scheme 3-5)。まず、異なる条件で脱保護する方法について検討した。文献では MPM 基を有するセレノペプチドについて、MPM 基の様々な脱保護条件が報告されている^[20]。本研究ではまず、ヨウ素を用いた MPM 基の脱保護を検討した。セレノグルタチオン誘導体を AcOH:H₂O:MeOH(=1:1:8)に溶かし、1.5 当量のヨウ素を加え、室温で1時間攪拌したところ、収率 93%でジセレニド体 **7** を得ることに成功した。得られた **7** を 5%-H₂O/TFA に溶かし、2時間攪拌することで目的の酸化型セレノグルタチオン **1** を 2 TFA 塩として定量的に得ることができた。

次に、すべての保護基を1段階で脱保護する方法について検討した。木曾らはチオアニソール(TA)と TFA の混合溶媒を用いることで *O*-メチルチロシンの脱メチル化が速やかに進行することを報告している^[21]。そこでセレノグルタチオン誘導体 **6** を 20%-TA/TFA に溶かし、37°Cで振盪した。2時間では MPM 基が残っていたが、6時間振盪することで定量的にすべての保護基を脱保護することができた。しかし、大スケールで脱保護反応を行う場合には6時間でも脱 MPM が完了しておらず、一晩振盪する必要があるがあった。収率のみを比較した場合には、TA/TFA を用いた1段階での脱保護の方がより効率が良かったが、反応後の Et₂O による洗浄で TA を除去しきれないことがあった。特にスケールを上げると TA の量も増えるためそのようなケースが増えた。また、TA はスルフィド特有の異臭も持っている。一方、ジセレニド **7** を経由した場合には、一度シリカゲルによって精製しているため TFA 処理後に精製の必要がないほど純度の高いセレノグルタチオンを得ることができ、水以外の特殊なスカベンジャーを用いる必要もないことから、2段階での脱保護法の方が実用的であると考えられる。



Scheme 3-5

以上の検討の結果、酸化型セレノグルタチオン **1** を高収率かつ大量に合成することのできる合成法を確立した(Scheme 3-6)。すなわち、セレノグルタチオンの合成における液相法の有用性を示すことができた。以降では、得られたセレノグルタチオンの応用について述べる。



Scheme 3-6

3-6 ^{77}Se NMR によるセレノグルタチオンの反応追跡

合成した酸化型セレノグルタチオンを D_2O に溶かし、 ^{77}Se NMR を測定したところ 293 ppm にジセレニドのシグナルが観測された(Figure 3-4 a)。以降の実験では、 D_2O 溶媒中、NMR サンプル管内で種々の反応を行うことで、 ^{77}Se NMR のシグナルがどのように変化するかを調べることによって、酸化型セレノグルタチオンの反応を追跡した。また、必要に応じて ^1H NMR や MALDI-TOF-MS も利用して生成物の同定を行った。

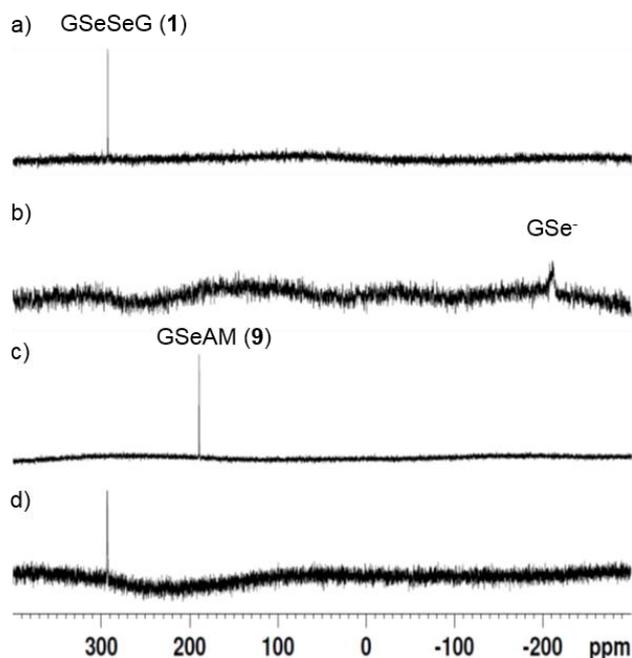


Figure 3-4. GSeSeG の反応に伴う ^{77}Se NMR スペクトルの変化

まず、吉田の方法^[11]に従って、グルタチオンレダクターゼ(GR)とニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸(NADPH)を用いてジセレニドを還元しようと試みた。しかし、GSeSeG に対して 2 当量の NADPH と触媒量の GR を加えても ^{77}Se NMR スペクトルにおいて変化は観測さ

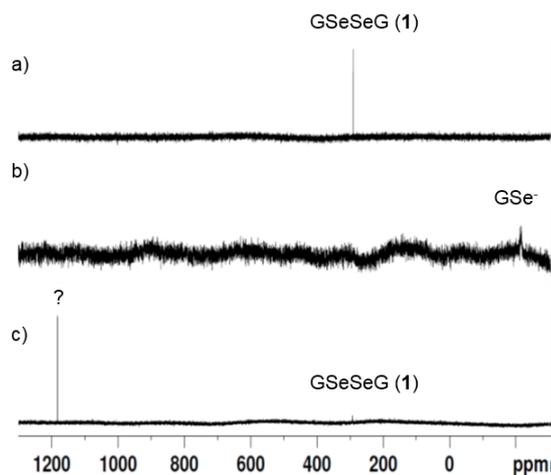


Figure 3-5. GSeの酸化による ^{77}Se NMR スペクトルの変化

GSeSeG に H_2O_2 を加えることで新たに生成する化合物が、セレン酸(GSeOH)もしくはセレン酸(GSeO₂H)のどちらなのかを検証した。まず、GSeSeG に対して 1 当量の H_2O_2 を加えたところ、ジセレニドのシグナルが減少し、1213 ppm に新たなシグナルが観測された。さらに 2 当量の H_2O_2 を加えるとジセレニドのシグナルは完全に消失し、1213 ppm のシグナルのみが観測された(Figure 3-6 A)。また、この反応を ^1H NMR でも追跡したところ Sec 残基の αH に大きな変化が観測された。ジセレニドの時には 4.51 ppm にシグナルが観測されていたが、 H_2O_2 を 1 当量加えるとシグナルは減少し、新たに 4.83 ppm にシグナルが観測された。さらに 2 当量の H_2O_2 を加えると 4.51 ppm のシグナルは消失し、4.83 ppm のシグナルのみとなった(Figure 3-6 B)。これらの観察結果から、GSeSeG は 3 当量の H_2O_2 と反応して GSeO₂H を生成したものと考えられる。

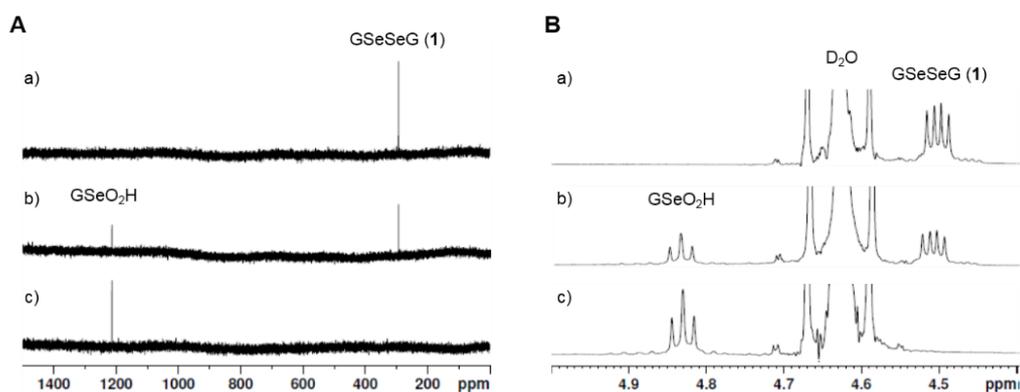
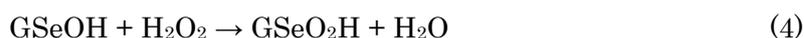


Figure 3-6. GSeSeG の酸化による ^{77}Se NMR, ^1H NMR スペクトルの変化

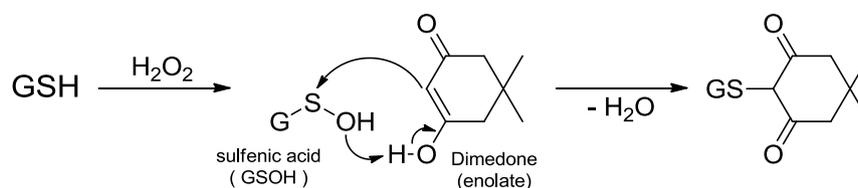
Kamigata らは、メタンセレン酸、2-メチルプロパン-1-セレン酸、2,2'-ジメチルプロパン-1-セレン酸、シクロヘキサンセレン酸の ^{77}Se NMR の化学シフトがそれぞれ 1294、1314、1314、1322 ppm であることを報告している^[23]。さらに Mugesch らは ebselen から誘導されるセレン酸の化学シフトが 1122 ppm であることを報告している^[24,25]。このように、これまでのセ

レニン酸化合物と比較すると本研究で得られた 1213 ppm という値は、セレニン酸であると帰属することができる化学シフトの範囲内である。一方で、Goto らは嵩高い置換基を用いることで不安定な 2 種類のセレネン酸化合物を単離しており、それぞれの化学シフトは 1079、1261 ppm であると報告している^[26,27]。このように、生成した化合物が GSeOH もしくは GSeO₂H のどちらであるかを ⁷⁷Se NMR の化学シフトのみで同定することは困難である。しかしながら、本研究では反応の完結までに要した H₂O₂ の当量から化学量論的に生成物が GSeO₂H であること推定した。このことの実証を得るために、さらにいくつかの実験を行った。

まず、反応溶液の MALDI-TOF-MS 測定を行った。しかし、酸化生成物の分子イオンピークがフラグメント化してしまったため、GSeO₂H の生成を結論付けるには至らなかった。GSeSeG と H₂O₂ との反応は、次に示した式 1-4 に従って進行するものと考えられる。



そこで GSeO₂H が生成する過程 (式 3) で生じる不安定な GSeOH 中間体を補足剤によって補足することを考えた。Farmer らは、ジメドン(DmH)存在下、グルタチオンと H₂O₂ を反応させることで、系内で生じたスルフェン酸(GSOH)が DmH にトラップされ、ジメドン付加物(GSDm)を与えることを報告している(Scheme 3-8)^[28]。



Scheme 3-8

そこで、この反応を GSeSeG に適用してみた。GSeSeG に対して 6 当量の DmH 存在下、1 当量の H₂O₂ を反応させたところ、過渡的に生じた GSeOH がジメドンによって捕捉され、ジメドン付加物(GSeDm)が生じたことを ⁷⁷Se NMR によって確認することができた。この反応では、生成物として GSeSeG 以外に新たに 50 ppm にシグナルが観測された(Figure 3-7)。

この反応溶液の MS 測定を行ったところ、GSeDm に相当する分子イオンピークが $m/z = 494.07$ (calc. $[M+H]^+ = 494.10$)に観測された(Figure 3-8)。このことから GSeSeG と H₂O₂ との反応では、高反応性の中間体として GSeOH が過渡的に生じていることが示唆された。一方、GSeSeG と 3 当量の H₂O₂ との反応で生じた酸化生成物に対して 1 当量のジメドンを加えたところ、ほとんどが GSeSeG へと変換され、ごく微量ではあるものの GSeDm のシグナルが観測された(Figure 3-7 c)。このとき、反応溶液中には酸化生成物のシグナルが 1213 ppm に観測されて

いることから、この酸化生成物は GSeOH ではないことがわかる。

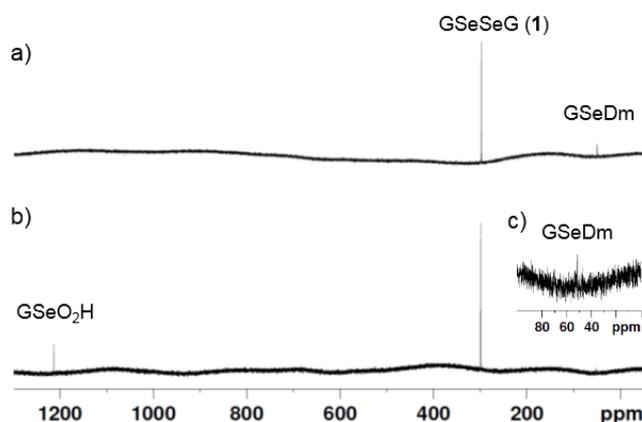


Figure 3-7. GSeOH の捕捉実験における ^{77}Se NMR スペクトル

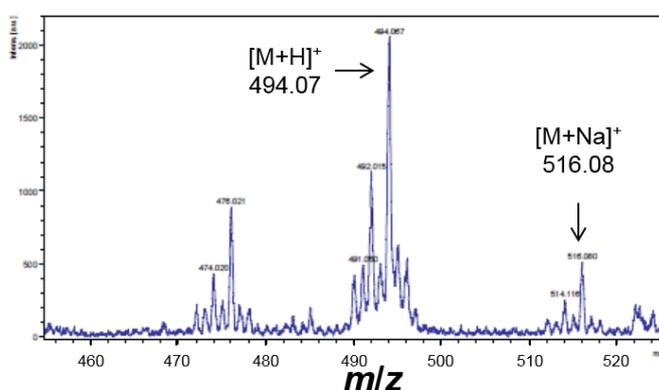


Figure 3-8. GSeOH の捕捉実験における MALDI-TOF MS スペクトル

次に、過酸化水素との反応によって生じた GSeO_2H に 1 当量のグルタチオンを加えたところ、 GSeO_2H のシグナルの大きさが半分減少し、367 ppm に新たなシグナルが観測された。以前に行われたセレノシスチンを用いた反応においてセレネニルスルフィド(CysSeSCys)は 349 ppm に観測されている^[13]ことから、この新たなシグナルはセレネニルスルフィド(GSeSG)であると考えられる (Figure 3-9)。

1213 ppm の酸化生成物が GSeOH だとすればグルタチオンと 1 : 1 で、 GSeO_2H だとすれば 1 : 3 で反応が完結し、それぞれ GSeSG を生成するはずである (式 5, 6)。



以上の結果より、 ^{77}Se NMR において 1213 ppm にシグナルが観測された酸化生成物は GSeOH ではなく GSeO_2H であると決定した。 GSe- に過酸化水素を反応させたときの生成物 (Figure 3-5 c) も GSeO_2H であると考えられるが、溶液の液性が pH 10 であったことから GSeO_2H は GSeO_2^- にイオン化し、その結果異なる化学シフト値 (1181 ppm) を示したものと考えられる。

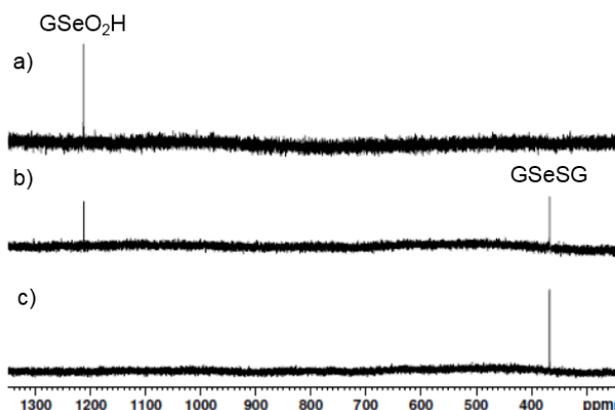


Figure 3-9. GSeSG への変換における ^{77}Se NMR スペクトルの変化

GSeO₂H に対して 3 当量の GSH を反応させると式 2 のように GSeSG を生成すると考えられる。実際にその反応溶液の MS 測定を行ったところ、GSeSG と GSSG に相当する分子イオンピークがそれぞれ $m/z = 661.00$ (calc. $[\text{M}+\text{H}]^+ = 661.10$) と $m/z = 613.07$ (calc. $[\text{M}+\text{H}]^+ = 613.16$) に観測された(Figure 3-10)。

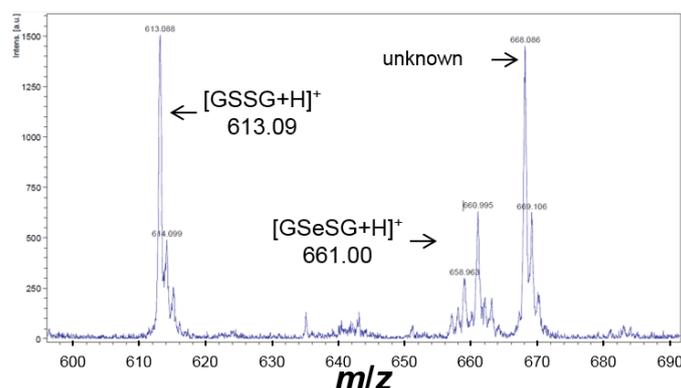


Figure 3-10. GSeSG への変換における MALDI-TOF MS スペクトル

興味深いことに、GSeO₂H と GSH との反応は GSH を 2 当量反応させた段階ですでに完結していることが ^{77}Se NMR の測定から明らかになった(Figure 3-9 c)。このことは、GSeO₂H と 2 当量の GSH との反応によって生じた GSeOH と GSSG が反応したことを示唆している。すなわち、式 6 は以下のように 2 段階で進行しているものと考えられる。



式 7 に従って、セレニン酸は 2 当量のグルタチオンによってセレネン酸へと還元される。このとき系内に過剰な GSH が存在する場合には式 8 のように反応し、GSeSG を生成するが、GSH が不在の場合には GSSG との反応によって GSeSG と GSOH を生成するものと考えられる。

Santi らは、セレノシスチン(CysSeSeCys)と過剰の H_2O_2 を反応させることで生じる高活性なセレニン酸過酸化物(CysSe(O)OOH)を用いた触媒反応を報告している^[29]。そこで、酸化型セレノグルタチオン(GSeSeG, **1**)においても過剰の H_2O_2 を反応させることで同様のセレニン酸過酸化物(GSe(O)OOH)が生成するのではないかと予測し、GSeO₂H にさらに過剰に H_2O_2 を加え、⁷⁷Se NMR を観測した。まず、GSeSeG に 3 当量の H_2O_2 を反応させることで 1213 ppm にシグナルが観測されることを確認した。続いて、さらに 2 当量の H_2O_2 を加えたところ、サンプル管内に不溶の白色固体が析出した。この反応溶液の ⁷⁷Se NMR を測定したが、⁷⁷Se NMR に変化はなかった。さらに 2 当量の H_2O_2 を加えたところ白色固体の量が増加した。しかし、⁷⁷Se NMR には変化はみられなかった。次に、この白色固体をろ過によって取り出し、分析を試みた。白色固体は MeOH や DMSO などの有機溶媒にも不溶であったが、塩基性水溶液には可溶であった。そこで白色固体を炭酸水素アンモニウム水溶液に溶かして MS 測定を行った。しかし、GSeO₂H の時と同様にフラグメント化してしまい、その詳細な構造を決定するには至らなかった。

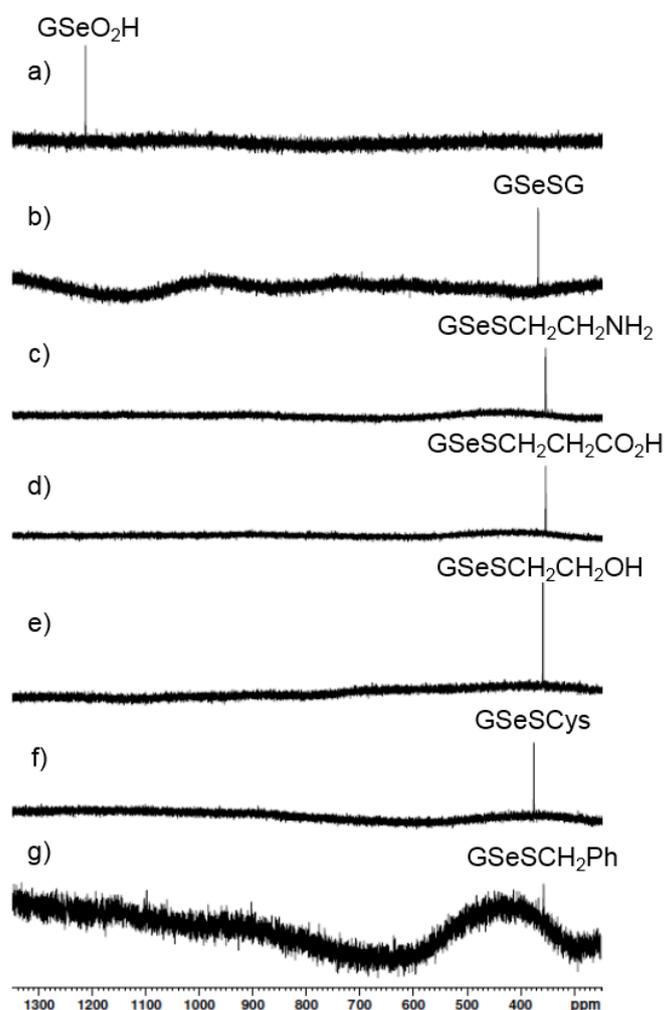


Figure 3-11. GSeO₂H とモノチオール(RSH)との反応生成物の ⁷⁷Se NMR スペクトル

GSeO₂H に対し、3 当量の GSH を加えると、GSeSG が生成することが確認できたので、その他のモノチオールとしてシステアミン(HSCH₂CH₂NH₂)、3-メルカプトプロピオン酸(HSCH₂CH₂CO₂H)、2-メルカプトエタノール(HSCH₂CH₂OH)、システイン(CysSH)、ベンジルメルカプタン(HSCH₂Ph)を用いて様々なセレネニルスルフィドの合成を試みた。GSeO₂H に対してチオールを 3 当量加えたところ、353 ppm (GSeSCH₂CH₂NH₂)、353 ppm (GSeSCH₂CH₂CO₂H)、357 ppm (GSeSCH₂CH₂OH)、375 ppm (GSeSCys)、357 ppm (GSeSCH₂Ph)にそれぞれセレネニルスルフィドに対応するシグナルが観測された(Figure 3-11)。

このとき生じた GSeSCH₂CH₂NH₂ は室温で 24 時間放置すると、わずかながらジセレニドに不均化していることが観測された(Figure 3-12 A)。また、GSeSCH₂Ph では 24 時間で 1/3 程度、GSeSCys では 6 時間でほとんどが GSeSeG に不均化していた(Figure 3-12 B, C)。

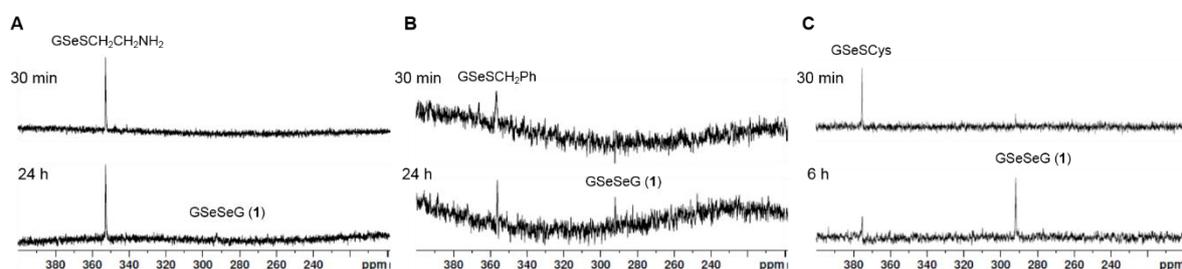


Figure 3-12. GSeSR の不均化反応における ⁷⁷Se NMR スペクトル

観測された不均化の反応機構を考えるために、GSeO₂H と CysSH を室温で 5 分間反応させセレネニルスルフィド(GSeSCys)を生成させた後、5 当量の IAM を加えた。一定時間後にこの反応溶液の ⁷⁷Se NMR を観測したところ、GSeSeG (293 ppm)のシグナルの増加は著しく抑制され、代わりに GSeAM (189 ppm)のシグナルが新たに観測された(Figure 3-13 c)。このことから不均化反応では、セレノール GSeH が過渡的に生成していること、セレノールを捕捉すると不均化の進行が抑制されることが分かった。

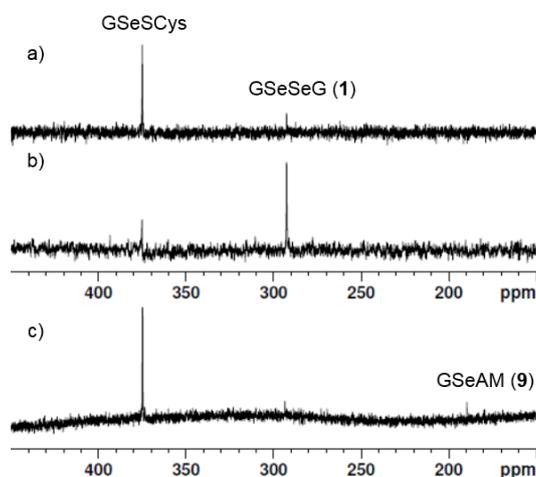


Figure 3-13. IAM の有無による不均化反応の挙動の違い

このことから、GSeSCys の不均化反応は Figure 3-14 のように進行していると考えられる。Se-S 結合近傍にアミノ基（あるいは GSeSCH₂Ph の場合にはベンゼン環）が存在すると Se 原子との相互作用によって Se-S 結合が開裂しやすくなり、セレネニルスルフィドからセレノラートとスルフェニリウムカチオン(A)が生成する。生じたセレノラートは別のセレネニルスルフィドのセレン原子に求核攻撃し、ジセレニドとチオラートを生成する。チオラートは反応初期で生成した A と反応しジスルフィドを生成すると考えられる。Mugesh らは、セレネニルスルフィドの S 原子がヘテロ原子と相互作用をすることで SS 形成反応が優位に進行することを報告している^[24]。システインの場合にはカルボキシ基の O 原子がセレネニルスルフィドの S 原子と相互作用していると考えられ、生じたチオラートは別のセレネニルスルフィドの硫黄原子を求核攻撃することができ、ジスルフィドを生成しながらセレノラートを再生するというサイクルが効率的に進行する。このことによって不均化反応が加速していると考えられる。GSeSCys に IAM を共存させたときにセレネニルスルフィドの不均化速度が遅くなったことは、この反応サイクルが実際に存在していることを示唆している。すなわち、IAM の共存下では、生じたセレノラートが IAM にトラップされてしまうためサイクルが進行せず、その結果不均化反応が進行しなかったものと考えられる。システアミンやベンジルメルカプタンの場合には、アミンや芳香環がセレン原子と相互作用することで Se-S 結合の開裂を促すことができる。一方で、S 原子と相互作用できる O 原子が存在していないために、生じたチオラートアニオンがもう 1 分子のセレネニルスルフィドの S 原子とうまく反応することができず、反応サイクルがうまく進行しない。そのため、システインの場合よりも不均化反応の進行が遅くなったものと推測できる。また、グルタチオン、2-メルカプトエタノール、3-メルカプトプロピオン酸は Se 原子との有効な相互作用を持たないため不均化反応が進行しなかったものと考えられる。

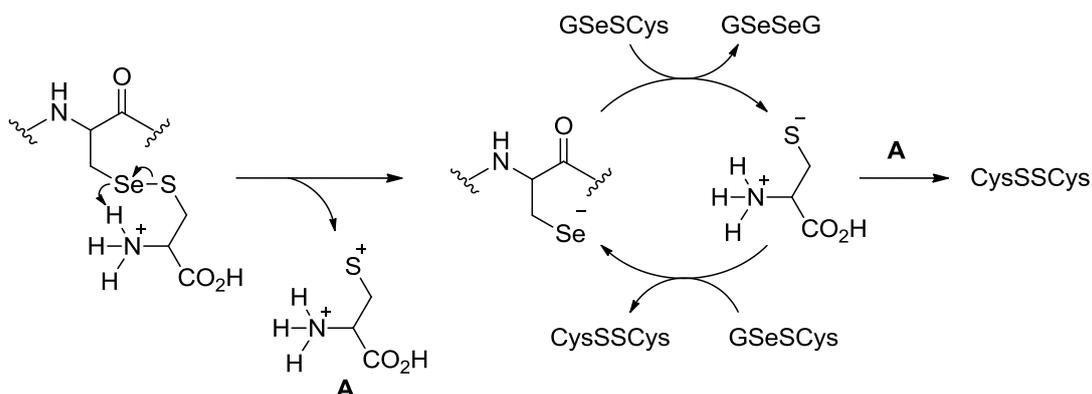


Figure 3-14. GSeSCys の不均化反応の反応機構

GPx の触媒サイクルではセレネニルスルフィドともう 1 分子の GSH が反応することでセレノールを再生し、触媒サイクルが完結する。この反応を再現するために GSeSG に対して過剰量の GSH を加えたが、10 当量まで加えてもシグナルの変化は観測できなかった。そこで、より還元力の強いチオールとして DTT_{red} を GSeSG に対して 2 当量加え 30 分間放置したところ、GSeSG のシグナルが消失し、代わりに GSeSeG のシグナルのみが観測された。このとき、5 当量の IAM

を共存させて同様の反応を行ったところ、GSeSG、GSeSeG さらに GSeAM のシグナルが観測された(Figure 3-15)。このことは GSeSG とチオールの反応からセレノールが再生していることを示している。

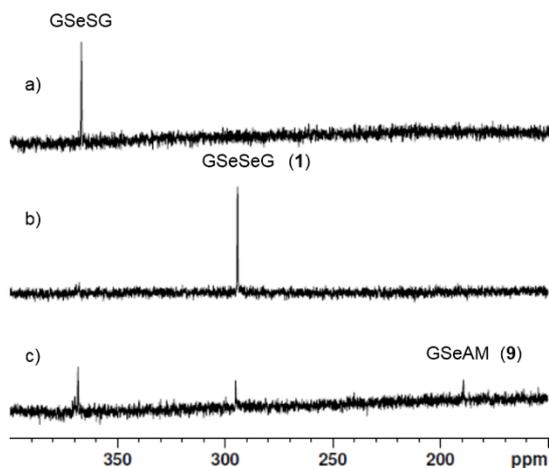


Figure 3-15. GSeSG と DTT^{red} の反応の ⁷⁷Se NMR スペクトル

一方、その他のモノチオールとして先の実験でも利用したシステアミン、3-メルカプトプロピオン酸、2-メルカプトエタノール、システイン、ベンジルメルカプタンを 3 等量加えた。Figure 3-16 には GSeSG とシステアミンの反応溶液の経時変化における ⁷⁷Se NMR スペクトルの変化をまとめた。30 分後にはチオールの交換反応によって生じた GSeSR のシグナルと GSeSeG のシグナルが新たに確認された(Figure 3-16 a)。6 時間後及び、24 時間後に再度測定すると、GSeSG 及び GSeSR のシグナルが減少し、GSeSeG が生成してきている様子が観測された(Figure 3-16 b, c)。このことから、この反応はチオール交換反応によって生じた非対称な GSeSR が、溶液中に過剰に存在する別の RSH 分子と反応してジスルフィド RSSR と GSeH を生成し、生じた GSeH が別の GSeSR 分子と速やかに反応して GSeSeG を生成することで進行しているものと考えられる。

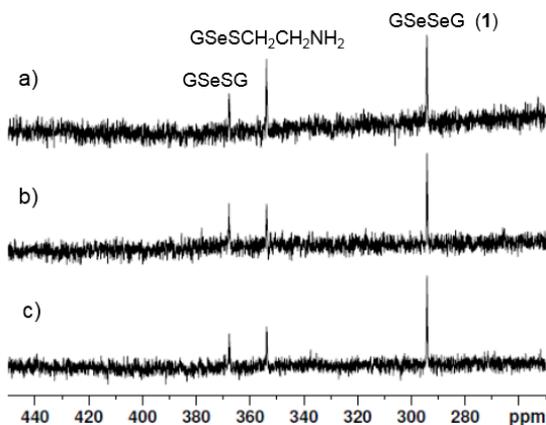


Figure 3-16. GSeSG とシステアミンの反応の ⁷⁷Se NMR スペクトルの変化

IAM 共存下での GSeSG と DTT^{red} との反応では、生じた GSeH が IAM で捕捉された化合物 (GSeAM) が観測された。そこで、DTT^{red} の時と同様に GSeSG とシステアミンとの反応を IAM 共存下で行ってみた。しかし、GSeSG 及び GSeSR のシグナルのみが観測され、GSeAM のシグナルを観測することはできなかった。これはシステアミンが IAM によってトラップされてしまい GSeSR と反応できなかったためであると考えられる。ジチオールである DTT^{red} の場合には、分子内にもう 1 つチオール基が存在するので、システアミンなどのモノチオール化合物よりも SS 形成反応が速やかに進行し、SS 交換反応によって生じる非対称なセレネニルスルフィド中間体の観測ができなかったものと考えられる。

また、GSeSG に GSH を過剰に加えても GSeH が生じなかったのは、GSH 分子が CysSH や本研究で用いた他のモノチオールに比べて嵩高いために GSH が GSeSG の S 原子を求核攻撃できなかったためだと思われる。しかしこの場合でも、GSeSG と GSH とのチオール交換反応は起きているものと考えている

ここまでの GSeSeG を用いた酸化還元反応の結果を Figure 3-17 にまとめた。

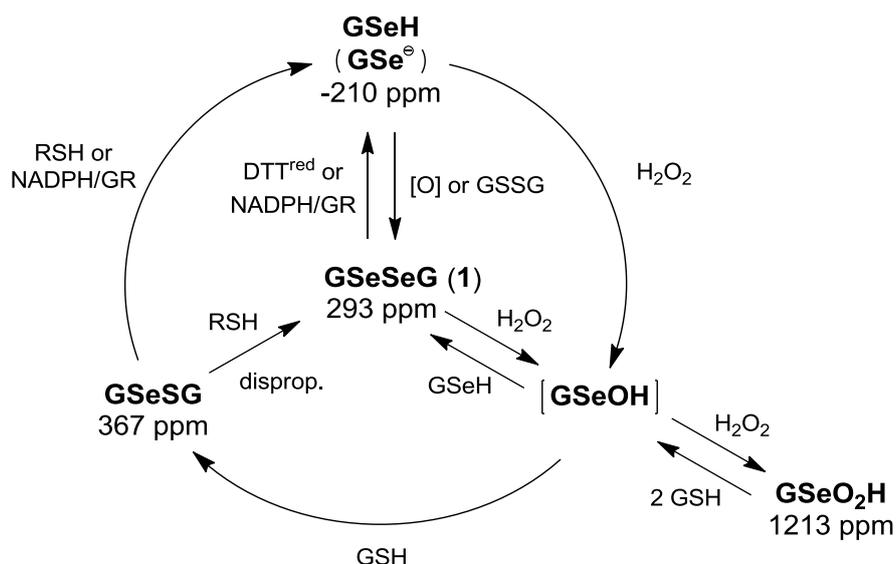


Figure 3-17. GSeSeG の GPx 様触媒サイクル

3-7 セレノグルタチオンを用いたミスフォールド RNase A のリフォールディング

非天然のジスルフィド(SS)結合を有するタンパク質ミスフォールド体の蓄積は、様々な神経変性疾患の原因とされている。このようなタンパク質ミスフォールド体を正常な天然型のフォールド構造へと再構築する研究が注目を集めている。そこで本項では、セレノグルタチオン(GSeSeG)を用いて、牛膵臓リボヌクレアーゼ A (RNase A) のミスフォールド体(4S 体)の巻き戻し (リフォールディング) 実験を行った。

RNase A の 4S 体は、RNaseA の還元体(R)に対して過剰量の *trans*-3,4-dihydroxyselenolane oxide (DHS^{ox})を反応させることで得た。DHS^{ox}は、当研究室で開発された水溶性セレノキンド試薬であり、その高い酸化能力から定量的かつ迅速に SS 結合を形成することができる^[30,31]。得られた 4S 体、酸化剤である GSeSeG (もしくは GSSG)、還元剤である GSH を反応溶液中の最終濃度がそれぞれ 15 μM、15 μM、1 mM となるように pH 7.5 の Tris 緩衝溶液中で混合し、25°C で 4S 体のリフォールディング実験を行った。一定時間後にチオール基ブロック試薬である 2-aminoethyl methanethiosulfonate (AEMTS)溶液を加えることで反応を停止した^[32]。得られた溶液は RP-HPLC にて分析し、観測された反応生成物のピーク面積の積分比から天然型の RNase A (N 体)への変換率を見積もった。

触媒を加えていない場合(Blank)における 5 時間後の N 体への変換率は 63%であったが、GSSG を加えることで 76%に向上した。さらに、GSeSeG を酸化剤として用いた場合には 84%まで変換率が向上した(Figure 3-18)。このことから GSeSeG がミスフォールド体を N 体へと効率的に変換することが可能であることが確認された。しかしながら、この反応系では GSeSeG は単に SS 結合形成の酸化剤としてのみ作用しているのか、それとも GSH との反応によってごく微量に生じると思われる GSeH がミスフォールドした 4S 体の SS 結合を還元するのにも用いられているのか、その詳細は不明である。そこで、4S は還元せず、GSeSeG のみを還元する方法としてグルタチオンレダクターゼ(GR)とニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸(NADPH)による反応系で実験を行うことを考えた。

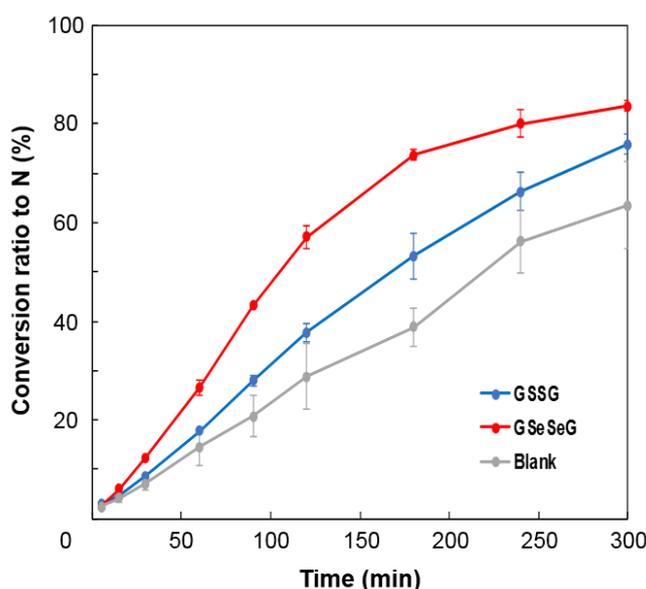


Figure 3-18. GSeSeG を用いたリフォールディング実験の N 体への変換率

GR と NADPH は生体に広く存在しており、GR は NADPH を利用して GSSG を GSH に還元する触媒の役割を果たしている。また、以前の研究より GSeSeG も GSSG と同様に GR と NADPH によって GSeH に還元されることが報告されている^[4,11]。そこで、4S 体(15 μM)に対して触媒量の GSeSeG もしくは GSSG (15 μM)、還元剤として NADPH (0.3 mM)と GR (4 unit/mL)を pH

7.5 の Tris 緩衝溶液中に混合して 25°C で反応させた。一定時間後に AEMTS を加えて反応を停止し、RP-HPLC で分析した。触媒として GSSG を用いた場合にはピークに変化が見られなかった(Figure 3-18 A)のに対して、GSeSeG を用いた場合には 4S 体はほとんどが R 体にまで還元されてしまっていた(Figure 3-18 B)。このことから系内で生じた GSH は 4S 体を還元することはできないが、GSeSeG は 4S 体を還元することが可能であることが確認された。しかし、還元力が強すぎるためにほぼ全ての 4S 体が R 体に還元されてしまったので、触媒の量を減らすことを次に検討した。

上記と同様の条件を用いて GSeSeG の濃度のみを 0.15–1.5 μM に調整して反応を行ったところ、0.15 μM のときにより変換率で N 体が生成していることが確認された。24 時間後における 4S 体から N 体への変換率は 47% であった(Figure 3-18 C)。また、5 時間後にはほとんどの 4S が還元されていることも確認された。このように、GSeSeG はタンパク質のミスフォールド体のリフォールディングにおけるよい触媒として利用できることを示すことができた。

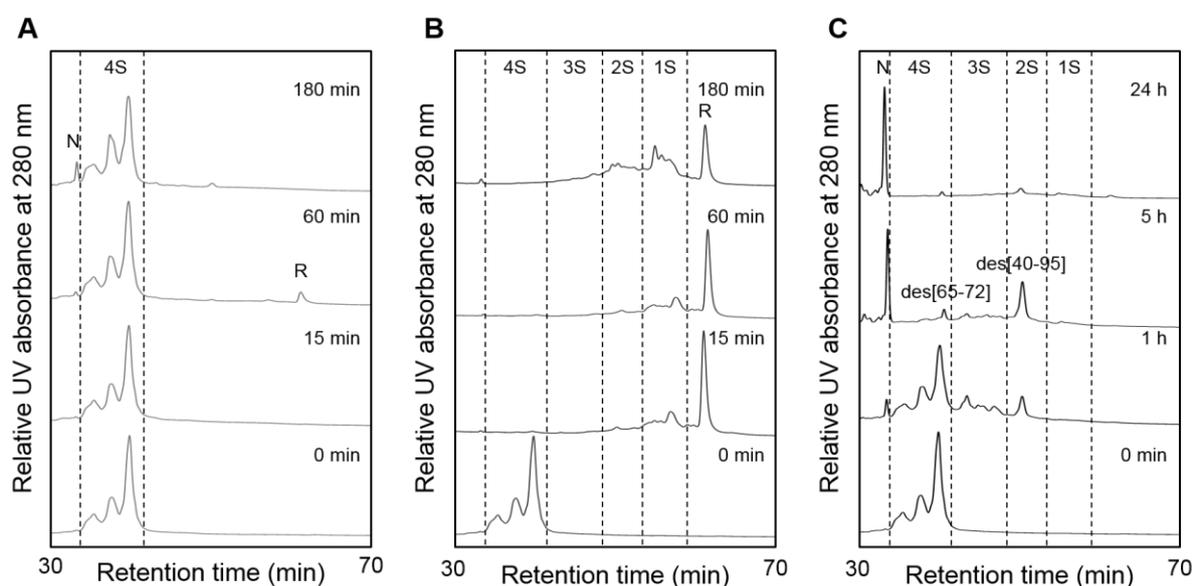


Figure 3-18. GSeSeG を用いたリフォールディング実験の HPLC チャート

3-8 結論

本章では、2 章にて合成したセレノシステイン誘導体を用いて、液相法による効率的なセレノグルタチオンの合成法の開発について検討した。アミノ酸誘導体を事前に Pfp エステルに活性化してからカップリングを行う方法と、事前の活性化をしないでカップリングを行う方法の 2 つについて検討し、どちらもこれまでの固相法に比べると格段の収率向上を達成することができた。特に事前の活性化をしないでカップリングする方法ではほぼ定量的にカップリング生成物を得ることができ、事前の活性化による手間や化合物の収量の低下も少ないことがわかった。また、カップリング生成物であるトリペプチドの脱保護方法についても 2 つの方法を検討した。2 段階

で行う方法では脱 MPM 化における収率が 90%程度ではあるが、この段階において精製を行うので 2 段階目の反応後に精製の必要がない。一方、1 段階で行う方法では、2 段階で行う方法よりも手間も少なく定量的にセレノグルタチオンを得ることができるが、特有の臭いを持つ TA を使用する必要があり、その除去にも手間がかかってしまうことがわかった。このように本研究によって高収率かつ大量にセレノグルタチオンを合成できる画期的な方法を開発することに成功した。

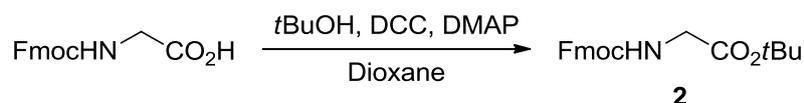
大量のセレノグルタチオンが得られるようになったことで ^{77}Se NMR により GSeSeG の GPx 様触媒サイクルを追跡することが可能となった。その結果、GPx 様触媒サイクルの重要な中間体である GSe⁻, GSeSG および、GSeO₂H を同定することに成功した。また、ジメドンによる捕捉実験によって GSeOH が過渡的に生成していることも確認できた。さらに、非対称セレネニルスルフィド(GSeSR)はチオールとの反応によってセレノールを再生させるだけでなく、不均化によってジセレニドへと変換されることも確認された。この不均化には、Se 原子とアミノ基や芳香環などの官能基との相互作用が重要であることが明らかとなった。これらの官能基は GPx の活性中心で構築されている触媒トライアッド構造を構成するアミノ酸側鎖がもつ官能基と類似していることから、GPx の活性中心においても同様の相互作用が触媒反応を加速していることが推定される。

さらに、GSH あるいは GR と NADPH の存在下、セレノグルタチオンによる RNase A のミスフォールド体(4S)のリフォールディング実験についても検討を行った。セレノグルタチオンは還元剤によって GSe⁻となり、SS 結合の還元とそれに続く SS 結合の交換を促し、効率的に N 体への変換を促進することがわかった。

本研究によってセレノグルタチオンは GPx 様の抗酸化剤及び、タンパク質のミスフォールド体に対するリフォールディング剤としての高い能力を有していることが明らかになった。セレノシステインはタンパク質構成アミノ酸であることから、セレノグルタチオンの生体への投与は可能であると考えられる。また、還元剤として利用した GSH や NADPH、GR も生体内に豊富に存在している。すなわち、セレノグルタチオンをアルツハイマー病など、ミスフォールド体の蓄積が原因とされる病気に対する治療薬として利用することが将来可能であると考えられる。今後の医学・薬学分野での応用・発展が期待される。

3-9 実験操作

N-(9-fluorenylmethoxycarbonyl)-glycine *tert*-Butyl Ester (**2**)の合成



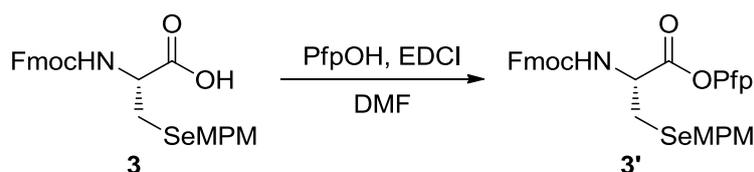
30 mL ナス型フラスコに *N*-(9-フルオレニルメトキシカルボニル)-グリシン (0.314 g, 1.1 mmol) と DMAP (0.0674 g, 0.55 mmol) を脱水ジオキサン(7 mL)に溶かし、窒素雰囲気下でフ

ラスコを氷浴に移した。*tert*-ブチルアルコール(300 μ L, 3.2 mmol)、DCC (0.445 g, 2.2 mmol)、脱水ジオキサン(3 mL)を加え、0°Cで15分間攪拌した。反応溶液を室温に戻し、さらに20時間攪拌した後、吸引ろ過を行った。ろ液をEtOAcで抽出し、1M塩酸、10%炭酸ナトリウム水溶液、飽和食塩水で洗浄後、硫酸マグネシウムで乾燥させ、ろ過した後にエバポレーターで溶媒を減圧留去した。得られた粗生成物(無色油状物)をオープンカラム(シリカゲル, *n*-hexane : EtOAc = 2 : 1)で精製することで表題化合物を白色固体として得た(0.279 g, 75%)。化合物**2**のスペクトルデータは既報の文献^[33]と一致した。

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 7.77 (d, $J = 7.6$ Hz, 2H, Fmoc-Ar), 7.60 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H, Fmoc-Ar), 7.40 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H, Fmoc-Ar), 7.32 (m, 2H, Fmoc-Ar), 6.64 (bs, 1H, Gly-NH), 4.39 (d, $J = 7.1$ Hz, 2H, Fmoc-CH₂), 4.2 (t, $J = 7.1$ Hz, 1H, Fmoc-CH), 3.90 (d, $J = 5.5$ Hz, 2H, Gly-CH₂), 1.49 (s, 9H, *t*Bu);

$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3) δ 169.2, 156.2, 143.9, 141.3, 127.7, 127.1, 125.1, 120.0, 82.4, 67.1, 47.1, 43.4, 28.1.

N-(9-fluorenylmethoxycarbonyl)-L-selenocysteine Pentafluorophenyl Ester (**3'**)の合成



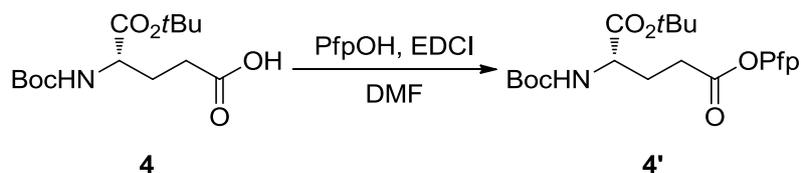
30 mLナス型フラスコに Fmoc-Sec(MPM)-OH (**3**) (0.102 g, 0.20 mmol)をDMF(3 mL)に溶かした。ペンタフルオロフェノール(0.0468 g, 0.25 mmol)のDMF(3 mL)溶液を加え、窒素雰囲気下でフラスコを氷浴に移した。EDCI塩酸塩(0.0478 g, 0.25 mmol)を加え、0°Cで1時間攪拌した。反応溶液を室温に戻し、さらに一晩攪拌した後、EtOAcで抽出し、1M塩酸、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で洗浄後、硫酸マグネシウムで乾燥させ、ろ過した後にエバポレーターで溶媒を減圧留去した。得られた粗生成物(無色油状物)をGPC(CHCl_3)で精製することで表題化合物を白色固体として得た(0.123 g, 91%)。化合物**3'**のスペクトルデータは既報の文献^[4]と一致した。

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 7.77 (m, 2H, Fmoc-Ar), 7.60 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H, Fmoc-Ar), 7.40 (m, 2H, Fmoc-Ar), 7.31 (m, 2H, Fmoc-Ar), 7.24 (d, $J = 8.5$, 2H, MPM-Ar), 6.82 (m, 2H, MPM-Ar), 5.47 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, Sec-NH), 4.93 (m, 1H, Ha), 4.46 (m, 2H, Fmoc-CH₂), 4.25 (t, $J = 7.0$, 1H, Fmoc-CH), 3.82 (s, 2H, MPM-CH₂), 3.76 (s, 3H, *p*-OMe), 2.96 (d, $J = 5.7$ Hz, 2H, Sec-H β);

$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3) δ 167.4, 158.8, 155.6, 143.7, 143.6, 141.3, 130.1, 130.0, 127.8, 127.1, 125.0, 125.0, 120.1, 114.2, 67.4, 55.3, 53.8, 47.1, 27.9, 24.7;

$^{77}\text{Se NMR}$ (CDCl_3) δ 221.8.

N-(*tert*-butoxycarbonyl)-*O*-(*tert*-butyl)-L-glutamic acid Pentafluorophenyl Ester (**4'**)の合成

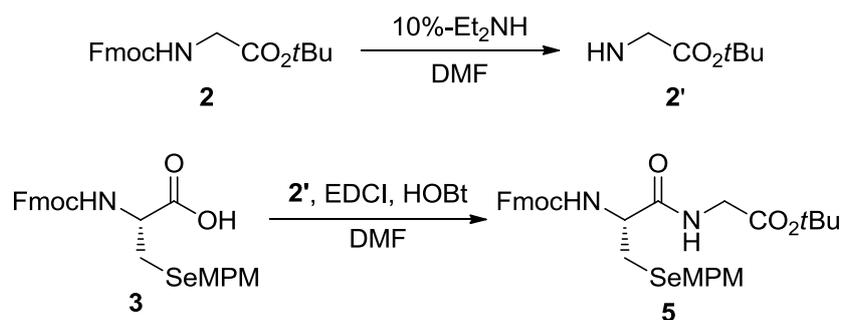


30 mL ナス型フラスコに Boc-Glu-O*t*Bu (**4**) (1.01 g, 3.3 mmol)を DMF (16 mL)に溶かした。ペンタフルオロフェノール(0.704 g, 3.8 mmol)の DMF (3 mL)溶液を加え、窒素雰囲気下でフラスコを氷浴に移した。EDCI 塩酸塩(0.708 g, 3.7 mmol)を加え、0℃で1時間攪拌した。反応溶液を室温に戻し、さらに一晩攪拌した後、EtOAcで抽出し、1M 塩酸、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で洗浄後、硫酸マグネシウムで乾燥させ、ろ過した後にエバポレーターで溶媒を減圧留去した。得られた粗生成物(無色油状物)を GPC(CHCl₃)で精製することで表題化合物を白色個体として得た(1.53 g, 98%)。化合物 **4'**のスペクトルデータは既報の文献^[4]と一致した。

¹H NMR (CDCl₃) δ 5.12 (d, 1H, *J* = 7.6 Hz, NH), 4.28 (m, 1H, H_α), 2.76 (m, 2H, H_β), 2.30 (m, 1H, H_γ), 2.02(m, 1H, H_γ), 1.48 (s, 9H, *t*Bu), 1.46 (s, 9H, *t*Bu);

¹³C NMR (CDCl₃) δ 171.0, 168.9, 155.5, 142.1, 140.3, 138.6, 136.9, 82.7, 80.1, 53.1, 29.5, 28.3, 28.0.

N-(9-fluorenylmethoxycarbonyl)-*Se*-(*p*-methoxybenzyl)-L-selenocysteinyl-glycine *tert*-Butyl Ester (**5**)の合成



Fmoc-Gly-O*t*Bu (**2**) (0.226 g, 0.64 mmol)を DMF (5.4 mL)に溶かした。Et₂NH (0.6 mL)を加え、室温で5分間攪拌した後に、エバポレーターで Et₂NH を減圧留去することで H-Gly-O*t*Bu (**2'**)を生成した。この溶液に Fmoc-Sec(MPM)-OH (**4**) (0.202 g, 0.40 mmol)、HOBT (0.0959 g, 0.63 mmol)、EDCI 塩酸塩(0.117 g, 0.61 mmol)と DMF (2 mL)を加え、室温で2時間攪拌した。反応溶液を *n*-hexane : EtOAc (7 : 3)で抽出し、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、1M 塩酸、飽和食塩水で洗浄後、硫酸マグネシウムで乾燥させ、ろ過した後にエバポレーターで溶媒を減圧留去した。得られた粗生成物(無色油状物)をオープンカラム(シリカゲル, *n*-hexane : EtOAc = 7 :

3)で精製することで表題化合物を無色油状物として得た(0.242 g, 98%)。

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 7.76 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, Fmoc-Ar), 7.59 (m, 2H, Fmoc-Ar), 7.40 (m, 2H, Fmoc-Ar), 7.32 (m, 2H, Fmoc-Ar), 7.22 (d, 2H, $J = 8.5$ Hz, MPM-Ar), 6.82 (d, 2H, $J = 8.7$ Hz, MPM-Ar), 6.64 (bs, 1H, Gly-NH), 5.59 (d, 1H, $J = 5.4$ Hz, Sec-NH), 4.41 (m, 3H, Fmoc-CH₂, Sec-H α), 4.23 (t, 1H, $J = 6.9$ Hz, Fmoc-CH), 3.92 (m, 2H, Gly-CH₂), 3.78 (s, 2H, MPM-CH₂), 3.736(s, 3H, *p*-OMe), 2.96 (d, 1H, $J = 8.2$ Hz, Sec-H β), 2.78 (dd, 1H, $J = 12.1$ Hz, 6.8 Hz, Sec-H β), 1.47 (s, 9H, *t*Bu);

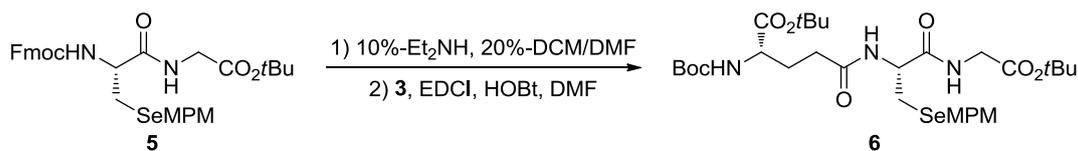
$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3) δ 170.3, 168.4, 158.6, 143.7, 141.3, 130.1, 127.8, 127.1, 125.1, 120.0, 114.1, 82.5, 67.2, 55.2, 47.1, 42.2, 28.1, 27.5, 25.7;

$^{77}\text{Se NMR}$ (CDCl_3) δ 220.4;

MALDI-TOF-MS (m/z) found: 646.94, calcd for $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 647.16;

$[\alpha]_{\text{D}} -3.4^\circ$ ($c = 1.00$ in CHCl_3).

N-(*tert*-butoxycarbonyl)-*O*-(*tert*-butyl)-L-glutamyl-*Se*-(*p*-methoxybenzyl)-L-selenocysteinyl-glycine *tert*-Butyl Ester (**6**)の合成



Fmoc-Sec(MPM)-Gly-OtBu (**5**) (0.242 g, 0.39 mmol)を20%-DCM/DMF (5.4 mL)に溶かした。Et₂NH (0.6 mL)を加え、室温で5分間攪拌した後に、エバポレーターでEt₂NHを減圧留去した。この溶液にBoc-Glu-OtBu (**3**) (0.180 g, 0.59 mmol)、HOBt (0.136 g, 0.88 mmol)、EDCI 塩酸塩(0.169 g, 0.88 mmol)とDMF (2 mL)を加え、室温で2時間攪拌した。反応溶液を*n*-hexane : EtOAc (6 : 4)で抽出し、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、1M 塩酸、飽和食塩水で洗浄後、硫酸マグネシウムで乾燥させ、ろ過した後にエバポレーターで溶媒を減圧留去した。得られた粗生成物(無色油状物)をオープンカラム(シリカゲル, *n*-hexane : EtOAc = 55 : 45)で精製することで表題化合物を無色油状物として得た(0.270 g, quant)。

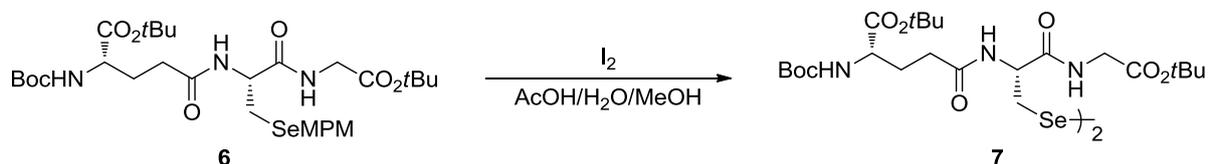
$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 7.22 (d, 2H, $J = 8.7$ Hz, MPM-Ar), 6.88 (t, 1H, $J = 5.1$ Hz, Gly-NH), 6.82 (d, 2H, $J = 8.7$ Hz, MPM-Ar), 6.74 (d, 1H, $J = 7.1$ Hz, Glu-NH), 5.29 (d, 1H, $J = 7.9$ Hz, Sec-NH), 4.60 (q, 1H, $J = 6.8$ Hz, Sec-H α), 4.21 (m, 1H, Glu-H α), 3.89 (m, 2H, Gly-CH₂), 3.78 (s, 2H, MPM-CH₂), 3.77 (s, 3H, *p*-OMe), 2.93 (dd, 1H, $J = 13.1$ Hz, 6.2 Hz, Sec-H β), 2.78 (dd, 1H, $J = 13.0$ Hz, 6.4 Hz, Sec-H β), 2.26 (m, 2H, Glu-H β), 2.14 (m, 1H, Glu-H γ), 1.86 (m, 1H, Glu-H γ), 1.44 (s, 9H, *t*Bu), 1.44 (s, 9H, *t*Bu), 1.42 (s, 9H, *t*Bu);

$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3) δ 172.3, 171.4, 107.5, 168.5, 158.5, 155.8, 131.0, 130.0, 114.0, 82.3, 82.3, 80.0, 77.3, 55.3, 53.4, 52.7, 42.1, 32.4, 29.0, 28.3, 28.0, 28.0, 27.7, 25.1;

$^{77}\text{Se NMR}$ (CDCl_3) δ 225.8;

MALDI-TOF-MS (m/z) found: 709.91, calcd for $[M+Na]^+$: 710.25;
[α]_D -8.6° ($c = 1.00$ in $CHCl_3$).

N-(*tert*-butoxycarbonyl)-*O*-(*tert*-butyl)-L-glutamyl-L-selenocysteinyl-glycine *tert*-Butyl Ester diselenide (**7**)の合成



Boc-γ-Glu(α-O*t*Bu)-Sec(MPM)-Gly-O*t*Bu (**6**) (0.268 g, 0.39 mmol)を $AcOH:H_2O:MeOH$ (1:1:8) (7.5 mL)に溶かした。 I_2 (0.149 g, 0.59 mmol)を加え、室温で1時間攪拌した。反応溶液を $EtOAc$ で抽出し、10% チオ硫酸ナトリウム水溶液、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で洗浄後、硫酸マグネシウムで乾燥させ、ろ過した後にエバポレーターで溶媒を減圧留去した。得られた粗生成物(無色油状物)をオープンカラム(シリカゲル, n -hexane : $EtOAc = 1 : 1$)で精製することで表題化合物を黄色油状物として得た(0.203 g, 93%)。

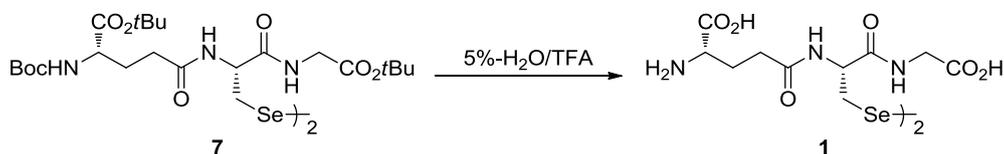
1H NMR ($CDCl_3$) δ 8.43 (s, 1H, Gly-NH), 7.05 (d, 2H, $J = 8.8$ Hz, Glu-NH), 5.39 (m, 1H, Sec-H α), 5.24 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz, Sec-NH), 4.23 (m, 1H, Glu-H α), 4.00 (dd, 1H, $J = 18.0$ Hz, 6.0 Hz, Sec-H β), 3.79 (dd, 1H, $J = 18.0$ Hz, 4.8 Hz, Sec-H β), 3.23 (m, 2H, Gly-CH $_2$), 2.31 (m, 2H, Glu-H β), 2.16 (m, 1H, Glu-H γ), 1.85 (m, 1H, Glu-H γ), 1.42 (s, 18H, *t*Bu), 1.40 (s, 9H, *t*Bu);

^{13}C NMR ($CDCl_3$) δ 172.4, 171.5, 170.9, 155.8, 82.1, 81.7, 79.9, 77.3, 53.7, 53.4, 42.0, 35.6, 32.5, 29.0, 28.3, 28.1, 28.0;

^{77}Se NMR ($CDCl_3$) δ 340.1;

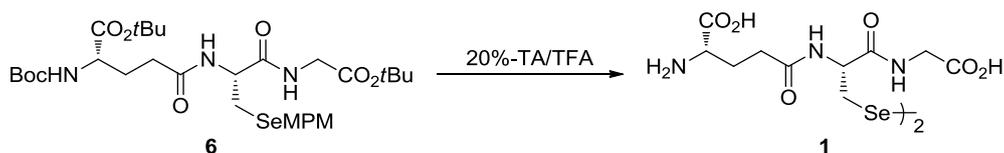
MALDI-TOF-MS (m/z) found: 1155.33, calcd for $[M+Na]^+$: 1155.38.

Selenoglutathione diselenide (**1**)の合成



2段階での脱保護法 : Boc-γ-Glu(α-O*t*Bu)-Sec-Gly-O*t*Bu diselenide (**7**) (0.242 g, 0.39 mmol)を 5% H_2O/TFA (6 mL)に溶かし、室温で2時間攪拌した後に、窒素を吹きかけることで TFA を気化させた。得られた残渣に Et_2O を加えることでペプチドを沈殿させた後に、溶液をデカンテーションした。同様の操作を3回繰り返すことでペプチドを洗浄し、エバポレーターで溶媒を減圧留去した。0.1% TFA を含む 50% $MeCN$ aq に溶かし、凍結乾燥を行うことで目的物を淡黄

色固体として得た(0.213 g, quant)。



1 段階での脱保護法 : Boc- γ -Glu(α -OtBu)-Sec(MPM)-Gly-OtBu (**6**) (0.261 g, 0.38 mmol) を 20% TA/TFA (4 mL) に溶かし、37°C で一晩振盪した後に、窒素を吹きかけることで TFA を気化させた。得られた残渣に Et₂O を加えることでペプチドを沈殿させた後に、溶液をデカンテーションした。同様の操作を 3 回繰り返すことでペプチドを洗浄し、エバポレーターで溶媒を減圧留去した。0.1% TFA を含む 50% MeCN aq に溶かし、凍結乾燥を行うことで目的物を淡黄色固体として得た(0.181 g, quant)。化合物 **1** のスペクトルデータは既報の文献^[4]と一致した。

¹H NMR (D₂O) δ 4.54 (dd, 1H, $J = 9.2$ Hz, 5.0 Hz, Sec-H α), 3.87 (t, 1H, $J = 6.5$ Hz, Glu-H α), 3.85 (s, 2H, Gly-CH₂), 3.23 (dd, 1H, $J = 13.2$ Hz, 5.0 Hz, Sec-H β), 3.00 (dd, 1H, $J = 13.1$ Hz, 9.2 Hz, Sec-H β), 2.41 (m, 2H, Glu-H β), 2.06 (m, 2H, Glu-H γ);

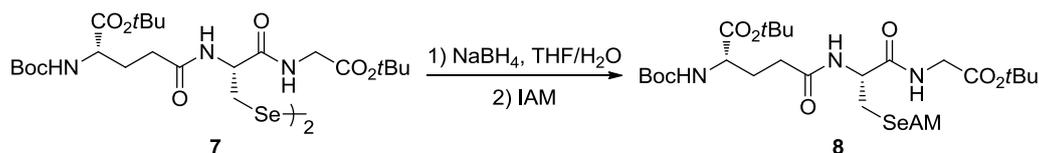
¹³C NMR (D₂O) δ 174.3, 172.89, 172.7, 171.9, 54.0, 52.5, 41.2, 31.0, 29.3, 25.5;

⁷⁷Se NMR (D₂O) δ 292.9;

MALDI-TOF-MS (m/z) found: 709.01, calcd for [M+H]⁺: 709.05;

$[\alpha]_D -59.3^\circ$ ($c = 1.00$ in H₂O).

N-(*tert*-butoxycarbonyl)-*O*-(*tert*-butyl)-L-glutamyl-*Se*-(acetamide)-L-selenocysteinyl-glycine *tert*-Butyl Ester (**8**) の合成



Boc- γ -Glu(α -OtBu)-Sec-Gly-OtBu diselenide (**7**) (0.242 g, 0.39 mmol) を THF:H₂O (1:2) (6 mL) に溶かした。氷浴中で水素化ホウ素ナトリウム(0.180 g, 0.59 mmol)を加え、0°C で 5 分間攪拌した。ヨードアセトアミド(0.180 g, 0.59 mmol)を加え、0°C で 1 時間攪拌した。反応溶液を EtOAc で抽出し、飽和食塩水で洗浄後、硫酸マグネシウムで乾燥させ、ろ過した後にエバポレーターで溶媒を減圧留去した。得られた粗生成物(無色油状物)を GPC(CHCl₃)で精製することで目的物を無色油状物として得た(0.270 g, quant)。

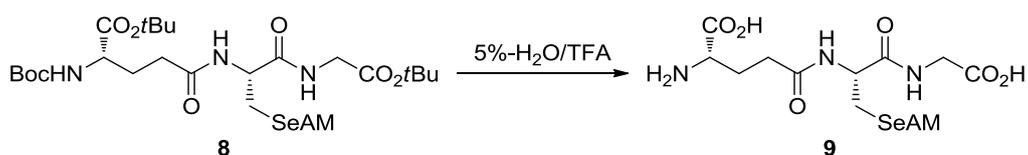
¹H NMR (CDCl₃) δ 7.70 (d, 1H, $J = 7.2$ Hz, AM-NH), 7.51 (t, 1H, $J = 5.4$ Hz, Gly-NH), 7.06 (s, 1H, AM-NH), 6.45 (s, 1H, Glu-NH), 5.49 (d, 1H, $J = 7.7$ Hz, Sec-NH), 4.74 (m, 1H, Sec-H α), 4.10 (m, 1H, Glu-H α), 3.86 (d, 2H, $J = 5.4$ Hz, Gly-CH₂), 3.22 (s, 2H, AM-CH₂), 3.13 (dd, 1H, $J =$

13.4 Hz, 6.1 Hz, Sec-H β), 2.95 (dd, 1H, J = 13.3 Hz, 5.5 Hz, Sec-H β), 2.33 (m, 2H, Glu-H β), 2.10 (m, 1H, Glu-H γ), 1.88 (m, 1H, Glu-H γ), 1.41 (s, 9H, *t*Bu), 1.40 (s, 9H, *t*Bu), 1.38 (s, 9H, *t*Bu); ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 174.2, 172.9, 171.6, 170.9, 168.7, 155.8, 82.2, 79.9, 77.3, 58.1, 53.6, 53.0, 42.1, 32.2, 28.3, 28.0, 28.0;

^{77}Se NMR (CDCl_3) δ 189.2 (major), 185.0 (minor);

MALDI-TOF-MS (m/z) found: 646.94, calcd for $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 647.22.

γ -L-Glutamyl-*Se*-(acetamide)-L-selenocysteinyl-glycine (**9**)の合成



Boc- γ -Glu(α -O*t*Bu)-Sec(AM)-Gly-O*t*Bu (**8**) (0.128 g, 0.39 mmol)を5% $\text{H}_2\text{O}/\text{TFA}$ (2 mL)に溶かし、室温で2時間攪拌した後、窒素を吹きかけることでTFAを気化させた。得られた残渣に Et_2O を加えることでペプチドを沈殿させた後に、溶液をデカンテーションした。同様の操作を3回繰り返すことでペプチドを洗浄し、エバポレーターで溶媒を減圧留去した。0.1% TFAを含む50% MeCN aqに溶かし、凍結乾燥を行うことで目的物を白色固体として得た(0.106 g, 98%)。

^1H NMR (D_2O) δ 4.47 (dd, 1H, J = 8.5 Hz, 5.3 Hz, Sec-H α), 3.92 (t, 1H, J = 6.6 Hz, Glu-H α), 3.84 (d, 2H, J = 0.7 Hz, Gly- CH_2), 3.12 (d, 2H, J = 1.4 Hz, AM- CH_2), 3.00 (dd, 1H, J = 13.3 Hz, 5.3 Hz, Sec-H β), 2.85 (dd, 1H, J = 13.3 Hz, 8.3 Hz, Sec-H β), 2.42 (m, 2H, Glu-H β), 2.07 (m, 2H, Glu-H γ);

^{13}C NMR (D_2O) δ 176.5, 174.2, 172.9, 172.8, 171.6, 53.4, 52.2, 41.1, 30.9, 25.4, 25.3, 24.9;

^{77}Se NMR (D_2O) δ 189.1;

MALDI-TOF-MS (m/z) found: 412.88, calcd for $[\text{M}+\text{H}]^+$: 413.06.

ミスフォールド RNase A (4S)のリフォールディング

・4S RNase A の調整

N体 RNase A (12.4 mg)を100 mM Tris-HCl / 1 mM EDTA / 4 M GdnSCN buffer pH 8.5に溶かした。DTT^{red} (13.3 mg)を加え、室温で1時間攪拌した後、200 mM acetate buffer pH 4.0を用いて脱塩することでR体 RNase Aを得た。この溶液の275 nmにおけるUV測定を行い、モル吸光係数($\epsilon_{275}=8600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)を用いて濃度を決定し、R体に対して8当量のDHS^{ox}を加えた。室温で20分間攪拌した後、0.1 M AcOHを用いて脱塩を行い、凍結乾燥することによって4S体を得た。

・還元剤に GSH を用いたリフォールディング

4S 体を 10 mM 塩酸に溶かし、100 mM Tris-HCl / 1 mM EDTA buffer pH 7.5 によって 30 μ M 程度に調整し、UV 測定によって最終的な濃度を決定した。この 4S 体の溶液(200 μ L)とリフォールディング剤である 60 μ M GSeSeG もしくは、GSSG の 100 mM Tris-HCl / 1 mM EDTA buffer pH 7.5 溶液(100 μ L)、還元剤である 4 mM GSH の 100 mM Tris-HCl / 1 mM EDTA buffer pH 7.5 溶液(100 μ L)を 1.5 mL マイクロチューブにとり、攪拌した後、25°C で反応を行った。このときの各基質の反応初濃度は、[4S]=15 μ M, [cat.]=15 μ M, [GSH]=1 mM である。一定時間後 AEMTS (300 μ L, 8 mg/mL)を加え、攪拌することで反応を停止させた。conc. AcOH (10 μ L)を加え、0.1 M AcOH で脱塩した後にそれぞれのサンプルを HPLC で分析を行った。HPLC の移動相には、25 mM HEPES / 1 mM EDTA buffer pH 6.8 (HEPES buffer A)と 25 mM HEPES / 1 mM EDTA / 0.5 M Na₂SO₄ buffer pH 6.8 (HEPES buffer B)を用いて分析し、各ピークの面積比から N 体への変換率を見積もった。

・還元剤に NADPH, GR を用いたリフォールディング

4S 体を 10 mM 塩酸に溶かし、100 mM Tris-HCl / 1 mM EDTA buffer pH 7.5 によって 30 μ M 程度に調整し、UV 測定によって最終的な濃度を決定した。この 4S 体の溶液(300 μ L)とリフォールディング剤である 0.6 μ M, 1.2 μ M, 6 μ M, 60 μ M GSeSeG もしくは、60 μ M GSSG の 100 mM Tris-HCl / 1 mM EDTA buffer pH 7.5 溶液(150 μ L)、還元剤である 1.2 mM NADPH, 2.4 unit/mL GR の 100 mM Tris-HCl / 1 mM EDTA buffer pH 7.5 溶液(150 μ L)を 1.5 mL マイクロチューブにとり、攪拌した後、25°C で反応を行った。このときの各基質の反応初濃度は、[4S]=15 μ M, [cat.]=0.15-15 μ M, [NADPH]=0.3 mM, [GR]=4 unit/mL である。一定時間後 AEMTS (200 μ L, 7 mg/mL)を加え、攪拌することで反応を停止させた。conc. AcOH (10 μ L)を加え、0.1 M AcOH で脱塩した後にそれぞれのサンプルを HPLC で分析を行った。HPLC の移動相には、25 mM HEPES / 1 mM EDTA buffer pH 6.8 (HEPES buffer A)と 25 mM HEPES / 1 mM EDTA / 0.5 M Na₂SO₄ buffer pH 6.8 (HEPES buffer B)を用いて分析し、各ピークの面積比から N 体への変換率を見積もった。

3-10 参考文献

- [1] H. Sies, *Free Radical Biol. Med.*, **1999**, *27*, 916–921.
- [2] A. Pompella, A. Visvikis, A. Paolicchi, V. De Tata, and A. F. Casini, *Biochem. Pharmacol.*, **2003**, *66*, 1499–1503.
- [3] S. Chakravarthi, C. E. Jessop, and N. J. Bulleid, *EMBO Rep.*, **2006**, *7*, 271–275.
- [4] J. Beld, K. J. Woycechowsky, and D. Hilvert, *Biochemistry*, **2007**, *46*, 5382–5390.
- [5] J. Beld, K. J. Woycechowsky, and D. Hilvert, *Biochemistry*, **2008**, *47*, 6985–6987.
- [6] J. Beld, K. J. Woycechowsky, and D. Hilvert, *J. Biotechnol.*, **2010**, *150*, 481–489.
- [7] D. Steinmann, T. Nauser, J. Beld, M. Tanner, D. Gunther, P. L. Bounds, and W. H. Koppenol, *Biochemistry*, **2008**, *47*, 9602–9607.

- [8] J. M. Gebicki, T. Nauser, A. Domazou, D. Steinmann, P. L. Bounds, and W. H. Koppenol, *Amino Acids*, **2010**, *39*, 1131–1137.
- [9] M. A. K. Khan, A. M. Asaduzzaman, G. Schreckenbach, and F. Wang, *Dalton Trans.*, **2009**, 29,5766–72.
- [10] M. A. K. Khan, and F. Wang, *Chem. Res. Toxicol.*, **2010**, *23*, 1202–1206.
- [11] S. Yoshida, F. Kumakura, I. Komatsu, K. Arai, Y. Onuma, H. Hojo, B. G. Singh, K. I. Priyadarsini, and M. Iwaoka, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2011**, *50*, 2125–2128.
- [12] T. Tamura, T. Oikawa, A. Ohtaka, N. Fujii, N. Esaki, and K. Soda, *Anal. Biochem.*, **1993**, *208*, 151–154.
- [13] B. G. Singh, P. P. Bag, F. Kumakura, M. Iwaoka, and K. I. Priyadarsini, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **2010**, *83*, 703–708.
- [14] M. F. Mossuto, *Int. J. Cell Biol.*, **2013**, 318319.
- [15] K. Toichi, K. Yamanaka, and Y. Furukawa, *J. Biol. Chem.*, **2013**, *288*, 4970–4980.
- [16] D. M. Rothwarf, Y.-J. Li, and H. A. Scheraga, *Biochemistry*, **1998**, *37*, 3760–3766.
- [17] J. C. Lukesh, III, K. A. Andersen, K. K. Wallin, and R. T. Raines, *Biomol. Chem.*, **2014**, *12*, 8598–8602.
- [18] L. Kisfaludy, I. and Schon, *Synthesis*, **1983**, 325–327.
- [19] D. Besse, and L. Moroder, *J. Pept. Sci.*, **1997**, *3*, 442–453.
- [20] S. Flemer, Jr., *Pept. Sci.*, **2015**, *21*, 53–59.
- [21] Y. Kiso, S. Nakamura, K. Ito, K. Ukawa, K. Kitagawa, T. Akita, and H. Moritoki, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1979**, 971–972.
- [22] D. Steinmann, T. Nauser, and W. H. Koppenol, *J. Org. Chem.*, **2010**, *75*, 6696–6699.
- [23] Y. Nakashima, T. Shimizu, K. Hirabayashi, M. Yasui, M. Nakazato, F. Iwasaki, and N. Kamigata, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **2005**, *78*, 710–714.
- [24] B. K. Sarma, and G. Mugesh, *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, *127*, 11477–11485.
- [25] K. P. Bhabak, and G. Mugesh, *Acc. Chem. Res.*, **2010**, *43*, 1408–1419.
- [26] K. Goto, M. Nagahama, T. Mizushima, K. Shimada, T. Kawashima, and R. Okazaki, *Org. Lett.*, **2001**, *3*, 3569–3572.
- [27] S. Sase, R. Kakimoto, and K. Goto, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2015**, *54*, 901–904.
- [28] M. R. Kumar, and P. J. Farmer, *ACS Chem. Biol.*, **2017**, *12*, 474–478.
- [29] C. Santi, R. Di Lorenzo, C. Tidei, L. Bagnoli, and T. Wirth, *Tetrahedron*, **2012**, *68*, 10530–10535.
- [30] M. Iwaoka, F. Kumakura, M. Yoneda, T. Nakahara, K. Henmi, H. Aonuma, H. Nakatani, and S. Tomoda, *J. Biochem.*, **2008**, *144*, 121–130.
- [31] K. Arai, F. Kumakura, and M. Iwaoka, *Biochemistry*, **2010**, *49*, 10535–10542.
- [32] T. Bruice, and G. Kenyon, *J. Protein Chem.*, **1982**, *1*, 47–58.
- [33] M. L. Di Gioia, P. Costanzo, A. De Nino, L. Maiuolo, M. Nardi, F. Olivito, and A Procopio, *RSC Adv.*, **2017**, *7*, 36482–36491.

4章 新規環状セレノペプチドの合成と GPx 様触媒活性の評価

4-1 緒言

1-4 項に示したように、GPx の立体構造は X 線結晶構造解析により明らかにされており、その活性中心にはトリアッド構造の構築が示唆されている^[1]。Takei らは、トリアッド構造を構成する 3 つのアミノ酸を含む短い鎖状セレノペプチドの合成と GPx 様触媒活性評価を行った (Figure 4-1)^[2]。Peptide A のアミノ酸配列は、当研究室で独自に開発している単一アミノ酸ポテンシャル(SAAP)力場による分子シミュレーションによって設計され、Peptide A では Sec(U)、Gln(Q)、Trp(W)の側鎖が空間的に近づくことが示唆されている。この報告においては、固相法におけるセレノペプチドの合成条件を検討し、1)セレノシステイン導入以降の溶媒を通常の *N*-メチルピロリドン(NMP)からジクロロメタン(DCM)に変更すること、2)MPM 基の脱保護をトリフルオロメタンスルホン酸(TfOH)のカクテルを用いることでセレノペプチドの収率がこれまでよりも向上することを見出している。

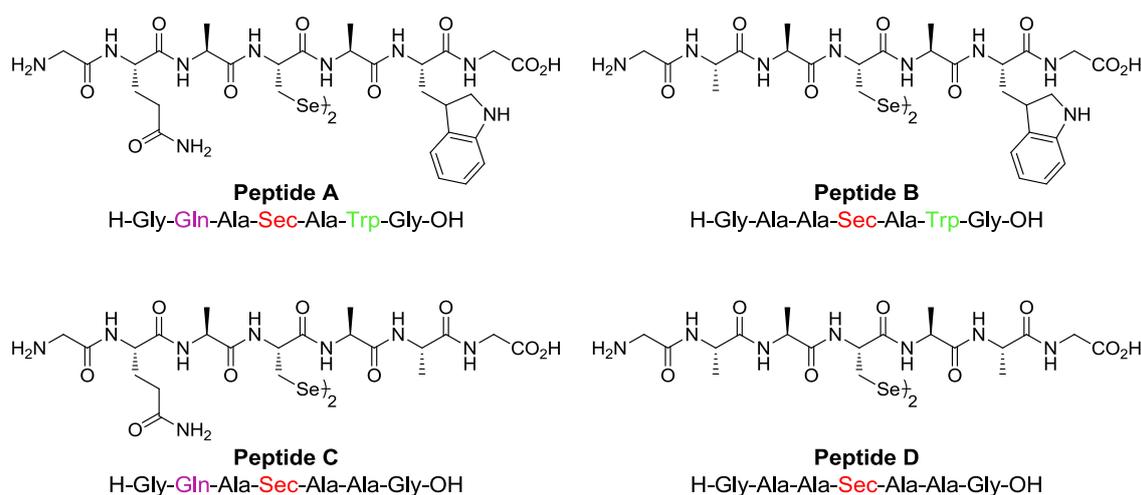


Figure 4-1. トリアッド構造を模倣したヘプタペプチドのアミノ酸配列

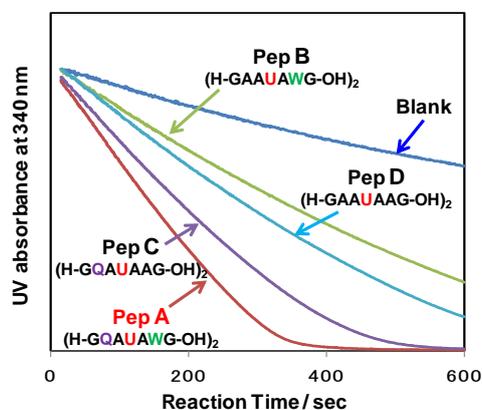


Figure 4-2. トリアッド構造を模倣したセレノペプチドの GPx 様触媒活性

さらに得られたセレノペプチド(Peptide A-D)の GPx 様触媒活性を評価したところ、トライアッド構造を構成する 3 つのアミノ酸全てを含む Peptide A は、欠損体 Peptide B-D よりも活性が高いことが明らかとなった。この結果は、GPx の活性発現においてトライアッド構造の構築が重要であることを初めて実験的に示した研究報告例である。

一方で Tosatto らは、トライアッド構造を構成する Sec、Gln、Trp の 3 残基にアスパラギン(Asn, N)を加えたテトラッド構造が構築されていることを示唆している(Figure 4-3)^[3,4]。この報告では、各アミノ酸を欠損させたミュータント GPx を用いて、システイン残基のチオール基の pKa のシミュレーション、酸化状態の MS/MS 解析、触媒活性測定の結果からアスパラギン残基の重要性について言及している。

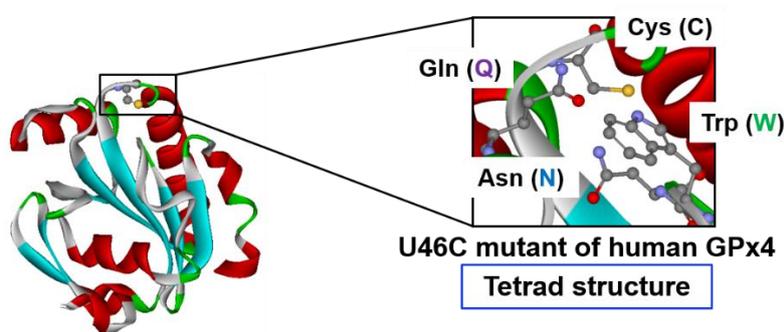


Figure 4-3. ヒト GPx4 の U46C ミュータントの X 線構造解析

そこで、Takei の手法を参考にこれらの 4 残基を含んだ鎖状セレノペプチド([RQPUPWNG]₂)及びそのミュータントを合成し、これらの GPx 様触媒活性評価を行った(Figure 4-4)。しかしながら、テトラッド構造の構築を支持する明確な実験データを得ることはできなかった。これは、ペプチドが鎖状であるために構造の自由度が大きく、4 つのアミノ酸側鎖がうまく近づくことができないことが原因と考えられる。

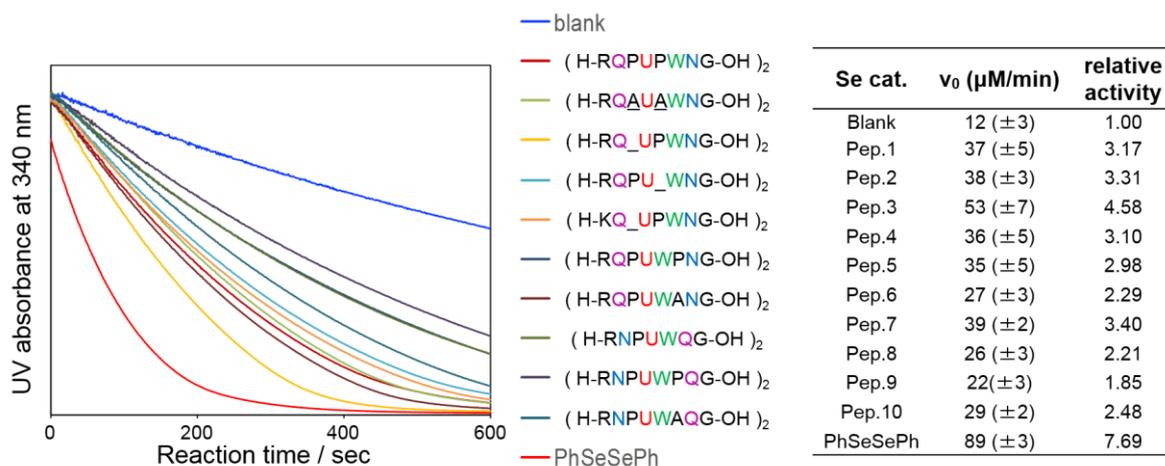


Figure 4-4. テトラッド構造を模倣した鎖状セレノペプチドの GPx 様触媒活性測定

環状ペプチドは、分子全体もしくは一部が化学結合によって環化しているペプチドのことであり、天然にも多くの環状ペプチドが存在している(Figure 4-5)。環化に用いられる化学結合は、末端や構成アミノ酸側鎖のカルボキシ基とアミノ基もしくはヒドロキシ基からなるアミド結合やエステル結合、システイン側鎖のチオールに由来するジスルフィド結合やチオエーテル結合など、その結合部位および結合様式は多岐にわたる。これらの環状ペプチドは、鎖状ペプチドと比較して高い細胞膜透過性やプロテアーゼ耐性を有している。さらに環化することによって構造が固定化されるため、標的タンパク質との高い親和性を示す。これらの性質から環状ペプチドは創薬分野において高い関心を集めている^[5]。

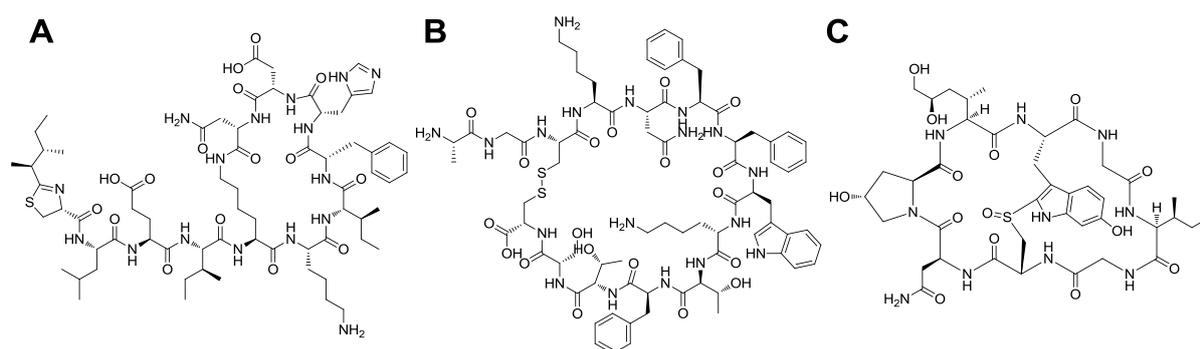


Figure 4-5. バシトラシン A(A)、ソマトスタチン(B)、 α -アマニチン(C)の構造

1-5 項において述べたように、長いペプチド鎖（タンパク質）を合成する際にネイティブケミカルライゲーション(NCL)法は非常に有用な手法である^[6]。この手法では、C 末端にチオエステル結合を持つペプチドセグメントと N 末端にシステイン残基を持つペプチドセグメントを混合するだけで容易にペプチド鎖間にペプチド結合が形成する。近年では、N 末端にシステイン残基、C 末端にチオエステルを有するペプチドを用いた分子内 NCL 法による環状ペプチドの合成にも応用されている^[7,8]。また、N 末端のシステイン残基の代わりに、セレンシステイン残基を有するセレノペプチドを用いた NCL 法の研究も広く行われており、Hilvert らは、セレノペプチドを用いた分子内 NCL 法による環状セレノペプチドの合成を達成している^[9]。

N-アルキルシステイン(NAC)法^[10]は Hojo らによって開発された固相合成により得られたペプチドの C 末端を効率的にチオエステルに変換する方法の一つである。システイン残基のアミノ基をアルキル化することで通常のペプチド結合とは異なる 3 級アミドを形成する。この 3 級アミド結合はペプチド結合よりも不安定であり、pH 4-6 の弱酸性条件において N 原子へのプロトン化に伴った N 原子から S 原子への分子内アシル転移が進行し、チオエステルが生成する。この反応は平衡反応であるため、チオエステルのみを単離することはできない。そこで、この反応溶液に過剰量のチオールを加えておくことで、生じたチオエステルとの分子間チオエステル交換反応が起こり、ペプチド C 末端チオエステルを効率的かつ安定に単離することができる。さらに、このとき用いるアルキル基はエチル基が最適であることも同時に報告している。

本章では、Figure 4-6 に示すように、固相合成によって N 末端にセレンシステイン、C 末端に *N*-エチルシステインを有するセレノペプチドを合成した。続いて、C 末端をチオエステル化した後に、分子内 NCL 法による新規環状セレノペプチド(Peptide 1, 1)の合成検討を行った。

このとき、テトラッド構造の構成アミノ酸である Gln、Trp、Asn のいずれかを欠損させたミュータント(Peptide 2-4, 2-4)及び、Peptide 1 と同様の配列を有する鎖状ペプチド(Peptide 5, 5)も合成した。得られた環状セレノペプチドの GPx 様触媒活性測定を行い、その活性の大きさを比較することで、GPx 活性中心におけるテトラッド構造の重要性について考察することを目的とした。

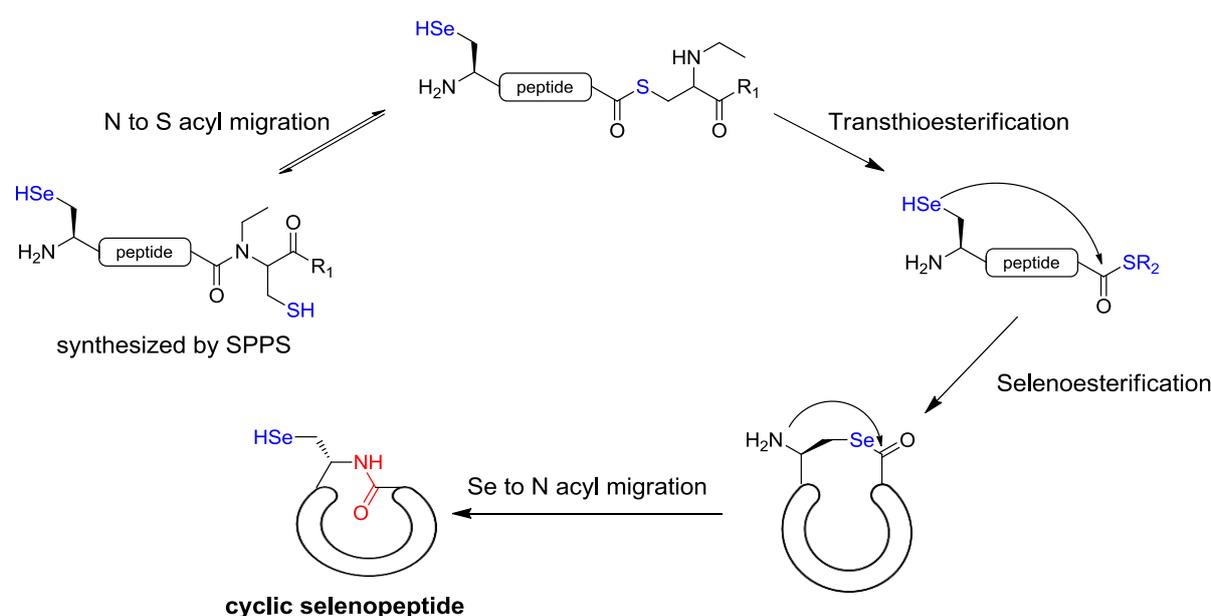


Figure 4-6. 環状セレノペプチドの合成戦略

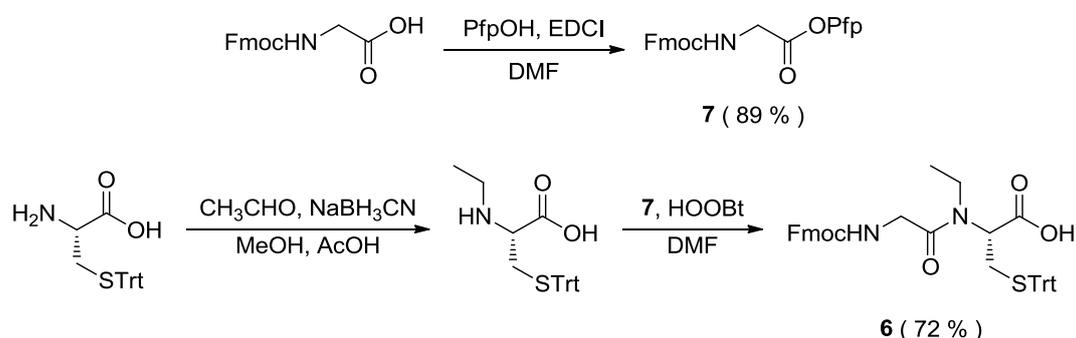
4-2 NAC 法に用いるジペプチドの合成

NCL 法によってペプチドを環化させるためには、合成したセレノペプチドの C 末端をチオエステル化する必要がある。このチオエステルは、Hojo が報告している *N*-アルキルシステイン (NAC)法を用いて調整することとした^[10]。NAC 法のためのペプチドを合成するためには、C 末端アミノ酸と *N*-アルキルシステインからなるジペプチド、すなわち、Fmoc-Gyl-(Et)Cys(Trt)-OH (6)を用意する必要がある。

Fmoc-Gly-OPfp (7)は Kisfaldy の方法に従って合成した^[11]。Fmoc-Gly-OH を DMF に溶かし、ペンタフルオロフェノールと EDCI を加えて室温で一晩攪拌することによって、収率 89%で Fmoc-Gly-OPfp を得た。次に、Asahina の方法に従って、H-Cys(Trt)-OH を MeOH:AcOH (9:1) 中でシアノ水素化ホウ素ナトリウムおよびアセトアルデヒドと反応させた^[12]。得られた生成物は精製することなく Fmoc-Gly-OPfp とのカップリング反応に用いた。

反応粗製物と Fmoc-Gly-OPfp を DMF 中で混合し、3-ヒドロキシ-1,2,3-ベンゾトリアジン-

4(3H)-オン(HOObt)を加えて、50°Cで3時間攪拌することで、目的の Fmoc-Gly-(Et)Cys(Trt)-OH を合成した(Scheme 4-1)^[13]。



Scheme 4-1

4-3 環状セレノペプチドの合成

はじめに、基本となるテトラッド構造を構成する4つのアミノ酸を含んだ環状ペプチド (Peptide 1, **1**)の合成に取り組んだ。そのために、まずアミノ酸配列 U-G-W-G-N-K-Q-G-(Et)C-K である鎖状ペプチドの合成を行った。Rink amide MBHA-resin を NMP で膨潤させた後、20%-ピペリジン/NMP で脱 Fmoc 処理を行った。DMF 中、DIEA と HBTU を反応させることで Lys を樹脂上にカップリングした。同様に脱 Fmoc した後に、4-2 項において合成したジペプチド **6** をカップリングした。ジペプチド **6** のカップリングは通常の Fmoc 法固相合成の条件とは異なり、DCE 中 DIC と HOBT によって **6** を活性化し、37°C で一晩攪拌することで行った。続いて、Gly 残基の脱 Fmoc 化をした後に Gln を通常の手法にてカップリングした。以降、同様の脱 Fmoc 化とカップリング反応を繰り返すことによってペプチドを伸長した。Takei は、セレノペプチドの合成においてセレノシステイン導入時以降の溶媒を通常 NMP や DMF ではなく DCM を用いることによって高収率で目的のセレノペプチドを伸長できることを見出しており、本実験においてもこの手法を適用した。すなわち、直前の Gly 残基の脱 Fmoc 化を行った後に、DCM によって樹脂をよく洗浄することで溶媒の変更を行い、DIC と HOBT を用いて Sec 残基のカップリングを行った。最後に、20%-ピペリジン/DCM で脱 Fmoc 処理を行うことによって樹脂上に目的のセレノペプチドを伸長した(Figure 4-7)。

続いてペプチドの脱樹脂条件について検討を行った。Takei は、脱樹脂を一般的な TFA カクテル (Reagent K, TFA:phenol:H₂O:TA:1,2-ethanedithiol=82.5:5:5:5:2.5) で行った後、脱 MPM は酸性度の高い Low-acidity TfOH カクテル (TFA:dimethylsulfide:*m*-cresol:TfOH=5:3:1:1) を使用している。本研究では、脱樹脂の TFA カクテルに 2,2'-ジピリジルジスルフィド (DPDS) を加えることによって MPM 基をピリジルスルファニル (SPy) 基に変換することが可能であるのではないかと考えた。すなわち、セレン上の保護基を Se-C 結合の MPM 基から Se-S 結合の SPy 基に変換することで、DTT^{red} などの還元剤によって容易に脱保護が進行するものと推測される。

そこで実際に、ペプチド鎖を伸長した樹脂を TFA:H₂O:TIS:TA:DPDS=90:2.5:2.5:2.5:2.5 の TFA カクテル中、室温で 2 時間攪拌したところ、効率的に脱 MPM が進行し、SPy 基に変換されたセレノペプチド **8** が生成していることが確認された。また、SPy 基の代わりに同一ペプチド中のシステイン側鎖のチオール基と Se-S 結合で架橋した環状ペプチド **9** の生成も同時に確認された。

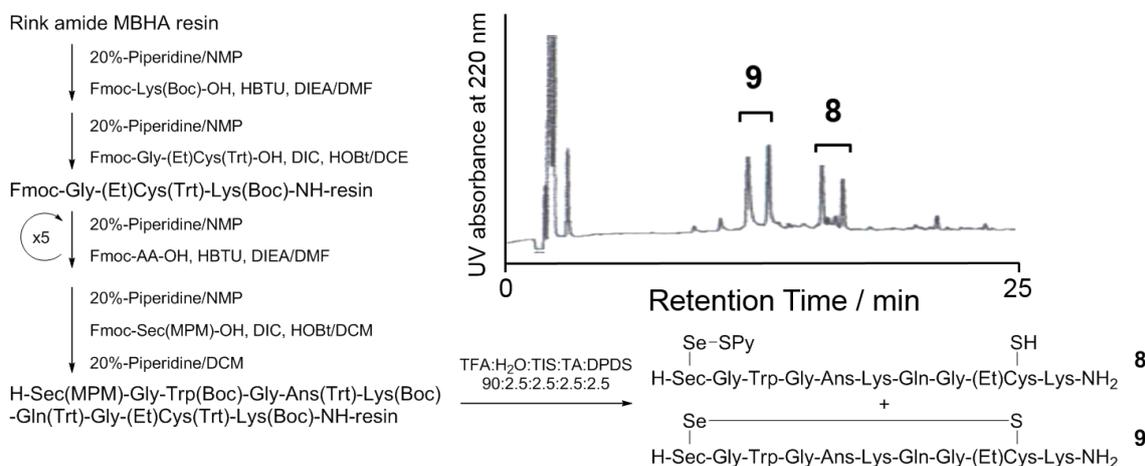


Figure 4-7. Peptide 1 の合成と脱樹脂

MALDI-TOF-MS による同定の結果、脱樹脂によって得られたセレノペプチド **8** 及び **9** は、HPLC 分析においてそれぞれ 2 本のピークに分割していることが確認された。この理由としては、次に示す 2 つの理由が考えられる。1 つは、ジペプチドを活性化することで縮合したことにより 1-5 項 Figure 1-16 に示した反応機構に従ってシステイン残基の α 位がラセミ化してしまった可能性が考えられる。もう 1 つは、グリシン残基とシステイン残基間のアミド結合がシストランス異性化した可能性である。一般に、アミド結合はトランス型の方が安定であり、ほとんどシス型になることはないが、N 原子がアルキル化されることでシス型に容易に異性化することが可能である。このように、脱樹脂によって得られたセレノペプチド **8** 及び **9** は、何らかの異性化が進行していると考えられるが、続く反応により脱離するため影響はないと考えられる。また、どちらのセレノペプチドも次に行うチオエステル交換反応の前駆体となりえるため、精製することなく続くチオエステル交換反応に用いることとした。

チオエステル化は、先程得られた粗製のペプチドを 10%-メルカプトエタンサルホン酸ナトリウム(MESNa)を含む 6M-Gdn 0.1M-phosphate buffer pH 5.5 に溶かし、37°Cで一晩攪拌することで行った。反応溶液を HPLC で分析し、各ピークの MS 測定を行なった結果、環化した後にセレノシステイン側鎖のセレノール基と MESNa が Se-S 結合したペプチド(**10**)がメインに得られていることが確認された(Figure 4-8 a)。この溶液に DTT^{red}を加え、37°Cで 3 時間攪拌したところ **10** のピークが減少し、異なるピークが増加したことから、脱 MESNa とジセレニド化が完了したとしてメインピークを分取した(Figure 4-8 b)。精製後、再度 HPLC で分析したところ、先ほどとは保持時間が異なる場所にピークが現れた(Figure 4-8 c)。これは、DTT^{red}によって MESNa との Se-S 結合が還元されたものの、過剰量のチオールが存在するため溶液内が強い還元状態にあり、ジセレニドへと酸化されずにセレノールのまま存在していたためと考えられる。精製によってチオールが取り除かれたことによって、ジセレニドへと空気酸化が進行したのでの

だと考えられる。

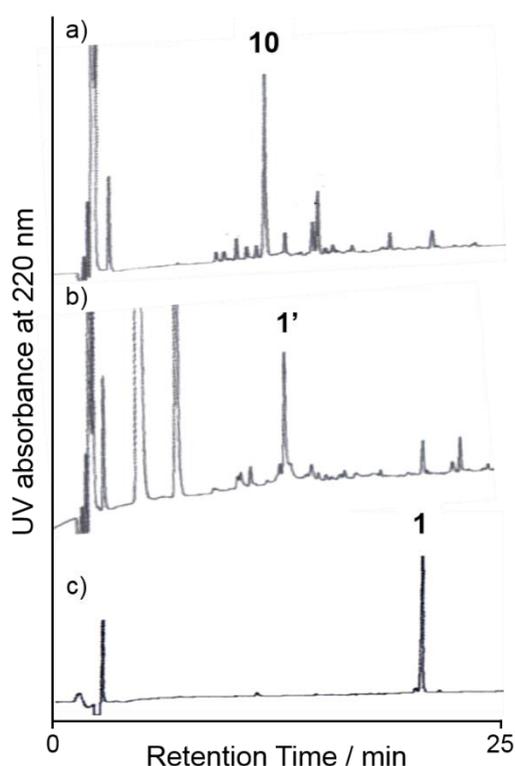


Figure 4-8. 分子内 NCL による環化及びジセレニド化による HPLC チャートの変化

環化反応の反応機構は次のように考えられる(Figure 4-9)。まず、粗製のセレノペプチド **8** と **9** の Se-S 結合が加えた MESNa によって還元的に切断される。次に *N*-Et-Cys 残基の遊離チオールがアシル転移を起こし、チオエステルが生じる。その後、生成したチオエステルの一部は、過剰の MESNa とのチオエステル交換によって別のチオエステルへと変化する。セレノシステインの側鎖のセレノールの pK_a は 5.2 であり^[4]、セレノール基は使用した緩衝溶液中でも十分な求核性がある。このため、チオエステルとの分子内セレノエステル化反応が進行し、環状セレノエステルを生じる。続いて、Se 原子から N 原子へのアシル転移が進行し、遊離したセレノールに過剰に存在する MESNa が付加することで one-pot で環状セレノペプチド **10** が得られる。この反応溶液に DTT^{red} を加え、MESNa の脱保護を行なうことによって、環状セレノペプチドのセレノール体(**1'**)が得られ、精製で過剰のチオールを除くことにより、目的の新規環状セレノペプチド Peptide **1** (**1**)をジセレニドとして用いた樹脂から通算収率 3.9%で得ることに成功した。

Peptide **2** (Trp 欠損体)、Peptide **3** (Asn 欠損体)、Peptide **4** (Gln 欠損体) においても同様の手法によって、ペプチド鎖の伸長及び分子内 NCL 法による環化反応を行うことで、それぞれ通算収率 7.1%、13.8%、10.2%で目的ペプチドを得ることができた。Peptide **2** は疎水性アミノ酸であるトリプトファン欠損体であることから、HPLC での精製において親水性の DTT^{red} や DTT^{ox} との分離が困難であると考えられた。そこで環化 MESNa 付加体(**10**)を一度精製した後に 1%-mercaptoethanol を含む 6M-Gdn 0.1M-phosphate buffer pH 7.0 に溶解し、37°C で 2 時間攪拌することでジセレニドを得た。

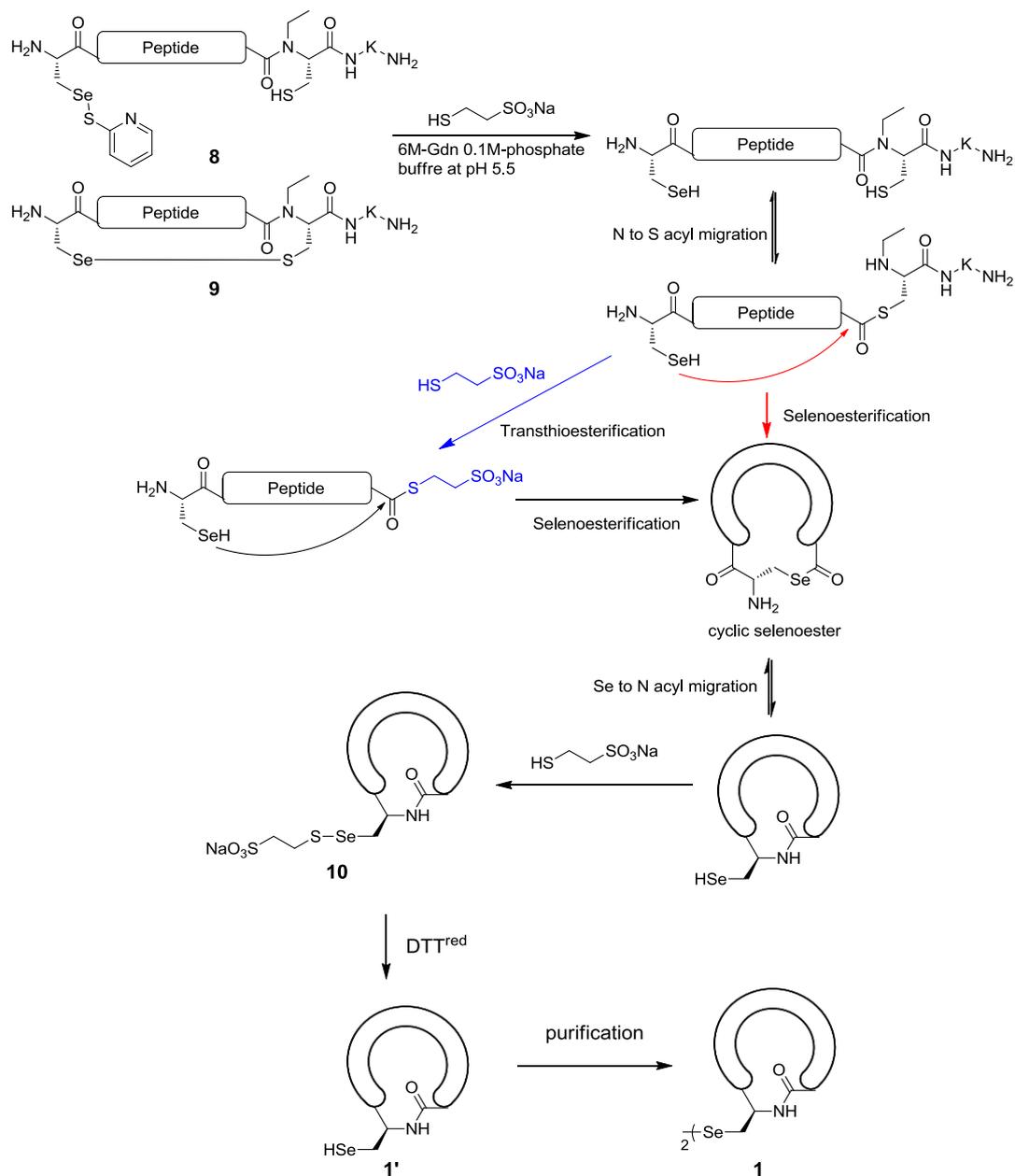


Figure 4-9. 分子内 NCL 反応の反応機構

環状ペプチドと鎖状ペプチドとの GPx 様触媒活性を比較するために、Peptide 1 の配列を鎖状にした Peptide 5 ([K-Q-G-U-G-W-G-N]₂) の合成も行った。この鎖状ペプチドは Fmoc-Asn(Trt)-CREAR Acid resin を出発物質とし、Sec 残基直前の Gly 残基の脱 Fmoc 化までを通常の Fmoc 法の手法によって伸長した。Sec 残基の導入以降は Takei の方法に従って、DCM を溶媒とした手法に切り替えて伸長を行った。脱樹脂は、環状ペプチドの脱樹脂条件と同様の TFA カクテルを用いて MPM 基を SPy 基に変換した後、DTT^{red} によって還元することで目的の鎖状ペプチドをジセレニドとして通算収率 5.9% で得た。

4-4 セレノペプチドの GPx 様触媒活性測定

得られたセレノペプチドの GPx 様触媒活性は、NADPH-coupled assay によって評価した (Figure 4-10)。この反応機構は、まずジセレニドが酸化されることでセレネン酸を生じる。セレネン酸はグルタチオン(GSH)を酸化し、自身はセレノールへと還元される。セレノールは過酸化水素によって再度セレネン酸を生じる。この反応サイクルを繰り返すことによって過酸化水素が分解される。一方で、反応中に生じた酸化型グルタチオン(GSSG)は、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸(NADPH)を還元剤とし、グルタチオンレダクターゼ(GR)の酵素作用によって還元されることで GSH を再生する。この反応における NADPH の消費による 340 nm の UV 吸収の減少を観測することで、間接的に過酸化水素の分解を見積もることができる。

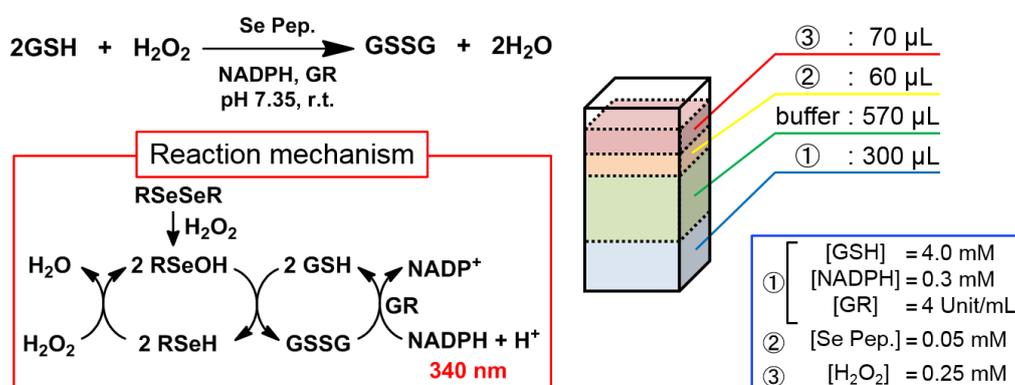


Figure 4-10. GPx 様触媒活性評価の方法と反応機構

それぞれの試薬の最終濃度が、[GSH]=4.0 mM, [NADPH]=0.3 mM, [GR]=4 unit/mL, [H₂O₂]=0.25 mM, [Se-cat.]=0.05 mM になるように調整したストック溶液を 1 mL セル内で混合し、10 分間反応をモニターした。Figure 4-11 には、活性測定より得られたチャート及び反応初速度 V₀ と Blank との活性の相対値をまとめた。

環状セレノペプチド Peptide 1 は、同じアミノ酸残基を有する鎖状セレノペプチド Peptide 5 よりも活性が高い。このことから、環化することによって構造が固定化され、アミノ酸側鎖が効果的に近づき、触媒活性が向上したと考えられる。すなわち、環状セレノペプチド Peptide 1-4 の GPx 様触媒活性を比較することで、GPx の活性中心における立体構造について議論できることを示唆している。Peptide 2 (Trp 欠損体)は、Peptide 1 と比べ活性が減少しているものの、その差はほとんどない。一方で、Peptide 4 (Gln 欠損体)は、活性が非常に低下しており、Peptide 3 (Asn 欠損体)は Peptide 4 ほどの活性の低下は見られなかったものの、活性は減少している。このことから、GPx の活性中心の立体構造における酵素活性へのアミノ酸の寄与は Gln>Asn>Trp であることが示唆された。Asn 欠損体の活性が低下したことは、GPx の酵素活性において Asn の存在が重要であることを示している。また、Takei が合成したトリアッド構造を模倣した鎖状

セレノペプチドの GPx 様触媒活性において、最も活性の高かった Peptide A の活性の相対値は 2.69^回であり、本研究で合成した鎖状の Peptide 5 は 4.08 であった。水溶性の向上のための Lys 残基の有無、スペーサーのアミノ酸などアミノ酸配列に異なっている点はあるものの、Asn 残基の導入によって活性が向上することが確認された。これらの結果は、GPx 活性中心において構築されている立体構造に Asn 残基が関与している、すなわち、Tosatto が提唱したテトラッド構造の構築を強く支持する初めての実験結果である。

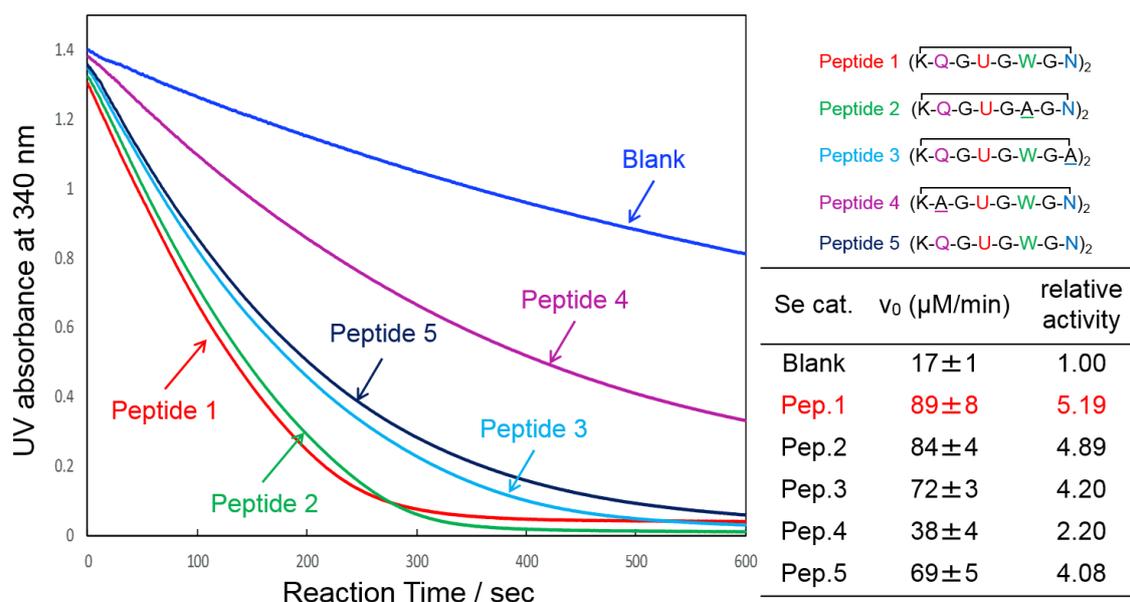


Figure 4-11. 環状セレノペプチドの GPx 様触媒活性測定の結果

4-5 結論

本章では、N 末端にセレノシステインを持つ種々のセレノペプチドを Fmoc 固相合成によって調整し、NAC 法を用いて C 末端をチオエステル化することで、分子内 NCL 法による環化反応に成功した。本研究によって N 末端アミノ基と C 末端カルボキシ基がアミド結合によって環化した環状セレノペプチドの合成を初めて達成した。得られた環状セレノペプチドは、鎖状セレノペプチドよりも高い GPx 様触媒活性を示し、環化による構造の固定化がアミノ酸側鎖を空間的に近づけることが示唆された。さらに各アミノ酸欠損ペプチドとの比較から、Gln、Trp のみならず、Asn も酵素活性に寄与していることが確認された。すなわち、本研究の結果は、Tosatto が提唱するテトラッド構造の構築を支持している初めての実験結果だといえる。しかしながら、ここまでの議論は“GPx 様触媒活性が高いのは、アミノ酸側鎖が近づいているためである”という考えに基づいており、実際にアミノ酸側鎖が近づいているという確証は得られていない。そのため、今後、蛍光スペクトルや分子シミュレーションなど、異なる分析法を用いた構造解析を進める必要がある。

本研究で達成された環状セレノペプチドの合成法、すなわち、セレノシステインを利用した分子内 NCL 法による環化反応は、今後の化学合成による環状ペプチド合成の発展に貢献する。さらに、合成された環状セレノペプチドは、酸化還元反応に使用可能な遊離のセレノール基を持つ一方で、ペプチド主鎖が環化しているというこれまでにない特異的な分子構造を有している。このことから、新規環状セレノペプチドは創薬分野への応用も期待される。

4-6 実験操作

N-(9-fluorenylmethoxycarbonyl)-glycine Pentafluorophenyl Ester (**7**)の合成

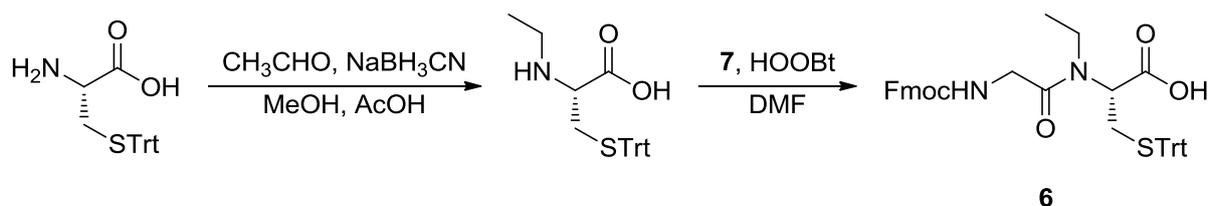


100 mL ナス型フラスコに *N*-(9-フルオレニルメトキシカルボニル)-グリシン(1.02 g, 3.4 mmol)を DMF (16 mL)に溶かした。ペンタフルオロフェノール(0.761 g, 4.1 mmol)の DMF (8 mL)溶液を加え、窒素雰囲気下でフラスコを氷浴に移した。EDCI 塩酸塩(0.813 g, 4.2 mmol)を加え、0°Cで 1 時間攪拌した。反応溶液を室温に戻し、さらに一晩攪拌した後、EtOAc で抽出し、1M 塩酸、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で洗浄後、硫酸マグネシウムで乾燥させ、ろ過した後にエバポレーターで溶媒を減圧留去した。得られた粗生成物(無色油状物)を再結晶(EtOAc)で精製することで表題化合物を白色個体として得た(1.42 g, 91 %)。化合物 **1** のスペクトルデータは既報の文献^[10]と一致した。

¹H NMR (CDCl₃) δ 7.77 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H, Fmoc-Ar), 7.59 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H, Fmoc-Ar), 7.41 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, Fmoc-Ar), 7.31 (m, 2H, Fmoc-Ar), 5.34 (m, 1H, NH), 4.46 (d, *J* = 7.0 Hz, 2H, Fmoc-CH₂), 4.37 (d, *J* = 5.9 Hz, 2H, Gly-CH₂) 4.25 (t, *J* = 6.9 Hz, 1H, Fmoc-CH)

¹³C NMR (CDCl₃) δ 166.5, 156.2, 143.6, 142.0, 141.3, 140.0, 138.9, 136.8, 127.8, 127.1, 125.0, 120.1, 67.5, 47.0, 42.2

N-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)-L-glycyl-*N*-ethyl-*S*-triphenylmethyl-L-cysteine (**6**)の合成



50 mL ナス型フラスコに H-Cys(Trt)-OH (0.517 g, 1.4 mmol)を MeOH:AcOH (9:1) (14 mL)

に溶かした。シアノ水素化ホウ素ナトリウム(0.098 g, 1.6 mmol)を加え、窒素雰囲気下でフラスコを氷浴に移した。冷やしたアセトアルデヒド (92 μ L, 1.6 mmol)を加え、0°Cで15分間撹拌した。エバポレーターで溶媒を減圧留去した後、クロロホルムで抽出し、飽和食塩水で洗浄後、硫酸マグネシウムで乾燥させ、ろ過した後にエバポレーターで溶媒を減圧留去した。得られた粗生成物(白色固体)に Fmoc-Gly-OPfp (**7**) (0.524 g, 1.1 mmol)、3-ヒドロキシ-1,2,3-ベンゾトリアジン-4(3H)-オン(0.1977 g, 1.2 mmol)を加え、DMF (15 mL)に溶かした。50°Cで3時間撹拌した後、*n*-hexane : EtOAc (1 : 1)で抽出し、飽和食塩水で洗浄後、硫酸マグネシウムで乾燥させ、ろ過した後にエバポレーターで溶媒を減圧留去した。得られた粗生成物(白色固体)を GPC (CHCl₃)で精製することで表題化合物を白色固体として得た(0.688 g, 72%)。

¹H NMR (CDCl₃) δ 7.75 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H, Fmoc-Ar), 7.58 (d, *J* = 7.4, 2H, Fmoc-Ar), 7.42 (d, *J* = 7.6 Hz, 8H, Trt-Ar), 7.38 (t, *J* = 7.4 Hz, 5H, Fmoc-Ar, Trt-Ar), 7.27 (t, *J* = 7.4 Hz, 10H, Fmoc-Ar, Trt-Ar), 7.21 (m, 5H, Fmoc-Ar, Trt-Ar), 5.87 (bs, 1H, Gly-NH), 4.33 (d, *J* = 6.6 Hz, 2H, Fmoc-CH₂), 4.19 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H, Fmoc-CH), 3.87-4.06 (m, 2H, Gly-CH₂), 3.24 (m, 1H, Cys-H α), 2.93-3.11 (m, 2H, Cys-H β), 2.81 (m, 2H, Et-CH₂), 0.97 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H, Et-CH₃)

¹³C NMR (CDCl₃) δ 156.3, 144.4, 143.9, 141.3, 129.6, 128.1, 127.7, 127.1, 126.9, 125.2, 120.0, 67.5, 67.2, 47.1, 43.8, 42.5, 30.3, 29.7, 13.4

Peptide 1 ([U-G-W-G-N-K-Q-G]₂)の合成

Fmoc-Rink amide MBHA resin (52.6 mg, 20 μ mol)を固相合成用チューブに分取し、NMPで30分間膨潤させた。その樹脂をNMPで洗浄し、20% Piperidine/NMP溶液を加え1分間撹拌した。反応溶液を捨て、再び20% Piperidine/NMP溶液を加えて5分間撹拌した後、NMPで洗浄した。Fmoc-Lys(Boc)-OH (49.2 mg, 100 μ mol)を0.45M HBTU/DMF (211 μ L, 95 μ mol)及びDIEA (34.8 μ L, 200 μ mol)で活性化した後、室温で12分間撹拌した。NMPで洗浄後、同様の手順でFmoc基の脱保護を行った。Fmoc-Gly-(Et)Cys(Trt)-OH (27.7 mg, 40 μ mol), HOBT (10.8 mg, 80 μ mol), DIC (12.4 μ L, 80 μ mol)をDCEに溶かし活性化した後に加え、37°Cで一晩撹拌した。以降は、Fmoc-Lys(Boc)-OHと同様の手法でFmoc-Gln(Trt)-OH (57.6 mg, 100 μ mol), Fmoc-Lys(Boc)-OH (51.2 mg, 100 μ mol), Fmoc-Asn(Trt)-OH (62.2 mg, 100 μ mol), Fmoc-Gly-OH (32.9 mg, 100 μ mol), Fmoc-Trp(Boc)-OH (54.9 mg, 100 μ mol), Fmoc-Gly-OH (32.3 mg, 100 μ mol)を活性化し、縮合脱Fmocを繰り返すことによって、H-Gly-Trp(Boc)-Gly-Asn(Trt)-Lys(Boc)-Gln(Trt)-Gly-(Et)Cys(Trt)-Lys(Boc)-resinを得た。樹脂をDCMでよく洗浄することで溶媒をNMPからDCMに変更した。Fmoc-Sec(MPM)-OH (22.4 mg, 40 μ mol), HOBT (51.4 mg, 80 μ mol), DIC (12.3 μ L, 80 μ mol)をDCMに溶かし、室温で30分間撹拌することによって活性化した後に加え、室温で1時間撹拌した。DCMで洗浄し、20% Piperidine/DCM溶液を加え5分間撹拌した。反応溶液を捨て、再び20% Piperidine/DCM溶液を加えて15分間撹拌した後、DCMで洗浄することでH-Sec(MPM)-Gly-Trp(Boc)-Gly-Asn(Trt)-Lys(Boc)-Gln(Trt)-Gly-(Et)Cys(Trt)-Lys(Boc)-resinを得た。得られた樹脂を減圧下で一晩乾燥させた後にTFA:TIS:H₂O:TA:DPDS=90:2.5:2.5:2.5:2.5 (2 mL)を加えて室温で2時間撹拌した。反応溶液をろ過して樹脂を取り除き、窒素ガスを吹きかけることでTFAを除去した。ジエチル

エーテルでペプチドを沈殿させた後、ジエチルエーテルで3回洗浄し、減圧下で固体を乾燥させた。得られた粗製のペプチドを10% MESNa を含む6M Gdn 0.1M phosphate buffer pH 5.5 (5 mL)に溶かし、37°Cで一晩攪拌した後に、反応溶液に DTT^{red} (250 mg)を加え、さらに3時間攪拌した。反応溶液を RP-HPLC にて精製することで Peptide 1 (385.5 nmol, 3.9%)を得た。

MALDI-TOF-MS (*m/z*) found: 878.24, calcd for [M+2H]²⁺: 878.29

Amino acid analysis: Asp_{1.46}Glu_{1.96}Gly_{3.00}Lys_{1.54}

Peptide 2 ([U-G-A-G-N-K-Q-G]₂)の合成

Peptide 2 の合成は Peptide 1 の合成と同様に環化反応までを行った。環化反応後、反応溶液を精製することで環化 MESNa 付加体 **10** を単離した。**10** を1%メルカプトエタノールを含む6M Gdn 0.1M phosphate buffer pH 7.0 (5 mL)に溶解し、37°Cで2時間攪拌した。Et₂O で過剰のメルカプトエタノールを抽出、除去した後に、RP-HPLC によって精製することで Peptide 2 (710.9 nmol, 7.1%)を得た。

MALDI-TOF-MS (*m/z*) found: 1525.96, calcd for [M+H]⁺: 1525.50

Amino acid analysis: Asp_{1.35}Glu_{1.68}Gly_{3.00}Ala_{1.33}Lys_{2.02}

Peptide 3 ([U-G-W-G-A-K-Q-G]₂)の合成

Peptide 3 の合成は Peptide 1 の合成と同様に行うことで Peptide 3 (1377.8 nmol, 13.8%)を得た。

MALDI-TOF-MS (*m/z*) found: 1670.10, calcd for [M+H]⁺: 1669.57

Amino acid analysis: Glu_{1.25}Gly_{3.00}Ala_{1.07}Lys_{1.51}

Peptide 4 ([U-G-W-G-N-K-A-G]₂)の合成

Peptide 4 の合成は Peptide 1 の合成と同様に行うことで Peptide 4 (1017.3 nmol, 10.2%)を得た。

MALDI-TOF-MS (*m/z*) found: 1641.72, calcd for [M+H]⁺: 1641.54

Amino acid analysis: Asp_{1.02}Gly_{3.00}Ala_{0.99}Lys_{1.49}

Peptide 5 ([U-G-W-G-N-K-Q-G]₂)の合成

Fmoc-Asn(Trt)-CREAR Acid resin (50.0 mg, 20 μmol)を固相合成用チューブに分取し、NMP で30分間膨潤させた。その樹脂をNMP で洗浄し、20% Piperidine/NMP 溶液を加え1分間攪拌した。反応溶液を捨て、再び20% Piperidine/NMP 溶液を加えて5分間攪拌した後、NMP で洗浄した。Fmoc-Gly-OH (33.2 mg, 100 μmol)を0.45M HBTU/DMF (211 μL, 95 μmol)及びDIEA (34.8 μL, 200 μmol)で活性化した後、室温で12分間攪拌した。NMP で洗浄後、同様の手順でFmoc基の脱保護を行った。以降は、同様の手法でFmoc-Gly-OH (33.2 mg, 100 μmol), Fmoc-Trp(Boc)-OH (55.5 mg, 100 μmol), Fmoc-Gly-OH (31.0 mg, 100 μmol)を活性化し、縮合と脱Fmocを繰り返すことによって、H-Gly-Trp(Boc)-Gly-Asn(Trt)-resinを得た。樹脂をDCMでよく洗浄することで溶媒をNMPからDCMに変更した。Fmoc-Sec(MPM)-OH (24.2 mg, 40

μmol), HOBt (10.8 mg, 80 μmol), DIC (12.3 μL , 80 μmol)を DCM に溶かし、室温で 30 分間攪拌することによって活性化した後に加え、室温で 1 時間攪拌した。DCM で洗浄し、20% Piperidine/DCM 溶液を加え 5 分間攪拌した。反応溶液を捨て、再び 20% Piperidine/DCM 溶液を加えて 15 分間攪拌した後、DCM で洗浄した。以降は、同様の手法で Fmoc-Gly-OH (30.8 mg, 100 μmol), Fmoc-Gln(Trt)-OH (67.5 mg, 100 μmol), Fmoc-Lys(Boc)-OH (47.4 mg, 100 μmol) を HOBt (31.0 mg, 200 μmol), DIC (27.0 μL , 200 μmol)によって活性化し、縮合と脱 Fmoc を繰り返すことによって、H-Lys(Boc)-Gln(Trt)-Gly-Sec(MPM)-Gly-Trp(Boc)-Gly -Asn(Trt)-resin を得た。得られた樹脂に TFA:TIS:H₂O:TA:DPDS=90:2.5:2.5:2.5:2.5 (2 mL)を加えて室温で 2 時間攪拌した。反応溶液をろ過して樹脂を取り除き、窒素ガスを吹きかけることで TFA を除去した。ジエチルエーテルでペプチドを沈殿させた後、ジエチルエーテルで 3 回洗浄し、減圧下で固体を乾燥させた。得られた粗製のペプチドを 0.1% TFA を含む 10% MeCN aq (5 mL)に溶かし、DTT^{red} (12.3 mg, 80 μmol)を加え、室温で 2 時間攪拌した。反応溶液を RP-HPLC にて精製することで Peptide 5 (593.3 nmol, 5.9 %)を得た。

MALDI-TOF-MS (*m/z*) found: 1792.08, calcd for [M+H]⁺: 1791.60

Amino acid analysis: Asp_{1.02}Glu_{1.24}Gly_{3.00}Lys_{1.33}

GPx 様触媒活性測定

・pH 7.35 100 mM リン酸緩衝溶液の作成

リン酸水素二ナトリウム(1.0660 g, 7.50 mmol)、リン酸二水素カリウム(0.3415 g, 2.50 mmol)、EDTA (0.2256 g, 0.60 mmol)を 100 mL ビーカーに量りとり、70 mL 程度の蒸留水を加え攪拌した。ニトロセルロースフィルターを用いて吸引ろ過し、ろ液の pH を 1M 塩酸を用いて pH 7.35 に調整した後、蒸留水で全量を 100 mL にメスアップした。

・ストック溶液 A ([GSH]=13.3 mM, [NADPH]=1.0 mM, [GR]=4 unit/mL)の調整

GSH (15.0 mg), NADPH (3.6 mg)をそれぞれリン酸緩衝溶液(500 μL)に溶かした。それぞれの溶液から 408.7 μL , 310.2 μL を分取し、15 mL 遠沈管に移した。GR [1000 unit/mL] (40 μL)を加え、リン酸緩衝溶液(2241.1 μL)によって全量を 3 mL にすることでストック溶液 A とした。溶液作成後には、氷浴に浸けることで空気酸化が起こらないようにした。

・ストック溶液 B ([Se cat.]=0.83 mM)の調整

得られたセレノペプチド(116.2 nmol)をリン酸緩衝溶液 (140 μL)に溶かすことでストック溶液とした。また、ジフェニルジセレニド(2.7 mg)を量りとり、メタノール(500 μL)に溶かした。この溶液(9.6 μL)をメタノール(190.4 μL)で希釈し、全量を 200 μL にすることでストック溶液 B とした。

・ストック溶液 C ([H₂O₂]=3.57 mM)の調整

過酸化水素の原液[H₂O₂]=11.31165 M (10 μL)を蒸留水(623.6 μL)で希釈した。この溶液(100 μL)を蒸留水(4900 μL)で希釈し、全量を 5 mL にすることでストック溶液 C とした。

・UVによる GPx 様触媒活性測定

ブランクの測定として、ストック溶液 A (300 μ L)、リン酸緩衝溶液 (630 μ L)の順で 1 mL 石英セルに溶液を入れ、セルを UV 装置にセットした。ストック溶液 C (70 μ L)を加え、素早く 5 回ピペッティングし、タイムスキャンモードで 340 nm の吸光度を 600 秒間測定した。各触媒を含む測定は、ストック溶液 A (300 μ L)、リン酸緩衝溶液 (570 μ L)、ストック溶液 B (60 μ L)の順で 1 mL 石英セルに溶液を入れ、セルを UV 装置にセットした。以降同様に測定を行った。

4-7 参考文献

- [1] O. Epp, R. Ladenstein, and A. Wendel, *Eur. J. Biochem.*, **1983**, *133*, 51–69.
- [2] T. Takei, Y. Urabe, Y. Asahina, H. Hojo, T. Nomura, K. Dedachi, K. Arai, and M. Iwaoka, *J. Phys. Chem. B*, **2014**, *118*, 492–500.
- [3] P. Scheerer, A. Borchert, N. Krauss, H. Wessner, C. Gerth, W. Hoehne, and H. Kuhn, *Biochemistry*, **2007**, *46*, 9041–9049.
- [4] S. C. E. Tosatto, V. Bosello, F. Fogolari, P. Mari, A. Roveri, S. Toppo, L. Flohe, F. Ursini, and M. Maiorino, *Antioxidants & Redox Signaling*, **2008**, *10*, 1515–1526.
- [5] D. J. Craik, *Science*, **2006**, *311*, 1563–1564.
- [6] P. E. Dawson, W. T. Muir, I. Clark-Lewis, and S. B. Kent, *Science*, **1994**, *226*, 776–779.
- [7] E. Boll, J. P. Ebran, H. Drobecq, O. El-Mahdi, L. Raibaut, N. Ollivier, and O. Melnyk, *Org. Lett.*, **2015**, *17*, 130–133.
- [8] L. Raibaut, H. Drobecq, and O. Melnyk, *Org. Lett.*, **2015**, *17*, 3636–3639.
- [9] R. Quadere, and D. Hilvert, *Chem. Commun.*, **2002**, 2620–2621.
- [10] H. Hojo, Y. Onuma, Y. Akimoto, Y. Nakahara and Y. Nakahara, *Tetrahedron Lett.*, **2007**, *48*, 25–28.
- [11] L. Kisfaludy, and I. Schon, *Synthesis*, **1983**, 325–327.
- [12] Y. Asahina, K. Nabeshima, and H. Hojo, *Tetrahedron Lett.*, **2015**, *56*, 1370–1373.
- [13] H. Hojo, H. Kobayashi, R. Ubagai, Y. Asahina, Y. Nakahara, H. Katayama, Y. Ito, and Y. Nakahara, *Org. Biomol. Chem.*, **2011**, *9*, 6807–6813.
- [14] R. E. Huber, and R. S. Criddle, *Arch. Biochem. Biophys.*, **1967**, *122*, 164–173.

5章 総括

セレノプロテインは、生体内でのセレノシステインの挿入機構が複雑であるために、遺伝工学的手法での合成が困難である。さらに化学合成によるセレノペプチドの合成は通常のペプチドよりも収率が低く、巨大なタンパク質へと誘導する手法も発展途上である。そのため、セレノプロテインへの理解が遅れているのが現状である。そこで本論文では、セレノペプチドをセレン含有酵素のモデル化合物として応用することで、活性中心の立体構造と触媒活性の関連性、すなわち構造活性相関について議論することを目的とした。

1章では、生体内におけるセレンの重要性や、セレノシステインの挿入機構、セレノプロテインの機能について詳細に述べることでモデル研究の重要性を示した。また、GPxをターゲットとしたモデル研究についてこれまでの研究例をまとめることで、そのほとんどが低分子芳香族セレン化合物であり、セレノペプチドを用いた例はほとんどないことを述べた。このことは、セレノシステイン及び、セレノペプチドの化学合成の収率が低いことに起因していると考えられ、効率的合成法の確立が必要とされているという問題点を明確にした。

2章では、アミノ基がBoc基もしくは、Fmoc基で保護されているセレノシステイン誘導体の合成条件の検討を行った。従来の方法では、活性中間体であるスルホン酸エステルとジセレニドから生じるセレノラートとの反応によってセレノシステイン誘導体を得ていた。一方で、同様に活性中間体であるヨードアラニンもセレノシステイン誘導体の合成に応用されているものの、セレノラートとの反応は報告されていなかった。そこで本研究では、ヨードアラニンとジセレニドから生じるセレノラートとの反応を検討することでセレノシステイン誘導体の効率的合成法の開発を行った。Boc保護体ではL-セリンから5段階の反応によって通算収率70%以上で合成することに成功した。一方で、Fmoc保護体では同様の5段階の反応の通算収率が24%と低かった。また、セレン化の段階において一部ラセミ化していることも確認された。しかし、再結晶によって単一のエナンチオマーを得ることができた。今後、各段階の反応条件を最適化することでBoc保護体と同様に高収率でのセレノシステイン誘導体の合成を検討する必要がある。

3章では、2章において合成されたFmoc-Sec(MPM)-OHを原料とした、セレノグルタチオンの液相合成について検討を行った。従来のセレノグルタチオンの合成法には固相法が主流として用いられていたが、収率や収量が低いことから、セレノグルタチオンの応用には制限があった。液相法と固相法のメリットとデメリットを明確にしたところ、セレノグルタチオンの合成には液相法が適していると考えられた。そこで本研究では、液相法の合成条件を検討することでセレノグルタチオンの大量合成を目的とした。アミノ酸のカップリングは、事前に活性化されたPfpエステルを用いたカップリングと無保護カルボン酸と縮合剤によってカップリングする2種類の方法を検討した。また、カップリングによって得られたセレノグルタチオン誘導体の保護基を1段階もしくは、2段階で脱保護する方法についても検討した。検討の結果、セレノシステイン誘導体から3段階の反応により通算収率98%でセレノグルタチオンを得ることに成功した。

また、セレノグルタチオンの酵素モデルとしての応用についても検討を行った。セレノグルタチオンを重水に溶かし、過酸化水素や種々のチオールとの反応を ^{77}Se NMR によって追跡した。その結果、GPx の触媒活性に重要な中間体を同定することに初めて成功した。さらに、セレネニルスルフィド中間体の不均化反応からセレノグルタチオンが再生することを見出した。このことから、GPx の活性中心に存在されると示唆されているトライアッド構造は、触媒サイクルにおける Se-S 結合の開裂によるセレノールの再生を促進していると考えられる。一方で、セレノグルタチオンをミスフォールド RNase A のリフォールディングにも応用した。その結果、触媒量のセレノグルタチオンが効率的に N 体へと変換できることを見出した。すなわち、セレノグルタチオンが GPx 及び PDI の酵素モデルとして有用であることが明らかにされた。

4 章では、新規環状セレノペプチドの合成と GPx 様触媒活性評価について検討を行った。これまでに GPx の活性中心には、Sec、Gln、Trp から構成されるトライアッド構造が構築されていることが報告されている。一方で、トライアッド構造に Asn 残基を加えたテトラッド構造の構築を示唆する報告もある。我々は以前に、鎖状のペプチドを用いたセレノペプチドを用いた触媒活性の評価からトライアッド構造の重要性を示唆する結果を報告しているが、テトラッド構造に関する有用な実験的な証拠は得られなかった。そこで本研究では、構造の固定化によってアミノ酸側鎖が効率的に接近することを期待して、N 末端アミノ基と C 末端カルボキシ基がアミド結合によって環化した新規の環状セレノペプチドの合成を目的とした。検討の結果、Fmoc 法固相合成によってペプチド鎖を伸長し、NAC 法によるチオエステル化と分子内 NCL 法による環化反応を one-pot で行うことで新規環状セレノペプチドの合成を達成した。また、得られた環状セレノペプチドは鎖状セレノペプチドよりも GPx 様触媒活性が高かったことから、環化によって構造の固定化されたと考えられる。さらに、各アミノ酸欠損体との触媒活性の比較によって Asn が活性に関与していることが示唆された。この結果は、テトラッド構造の構築を支持する初めての実験結果である。

本研究によって、セレノシステイン誘導体の効率的合成法の確立が達成された。これにより、ペプチドの化学合成に安価かつ大量にセレノシステイン誘導体を供給することが可能となり、セレノペプチドの合成及びライゲーション手法の発展や、タンパク質中のシステイン残基をセレノシステイン残基にミューテーションすることによるタンパク質の機能向上を目的としたセレノプロテインの開発などが期待される。また、得られたセレノペプチドは酵素モデルとして有用であることが示された。酵素と同様の最小単位であるアミノ酸から構成されている短いセレノペプチドが酵素と同様の働きを示すことは化学的に大変意義深く、今後のモデル研究における分子設計に大きな示唆を与えた。さらに、得られたセレノペプチドは、医学・薬学分野などにおいて注目されている機能や構造を有していることから、化学分野のみならず医学・薬学・創薬などの様々な分野に応用されることが期待される。

謝辞

本研究の遂行にあたり、多くの方にご指導・ご鞭撻を賜りましたのでこの場を借りて感謝申し上げます。

本学理学部化学科の岩岡道夫教授には、指導教官として6年間の長きに渡り、ご指導頂きました。研究室の在り方、研究者として立振舞いなど多くのことを学ばせて頂きました。深く感謝申し上げます。

本学理学部化学科の小玉修嗣教授には、アミノ酸の光学分割において、機器の提供や、測定を行っていただき、大変感謝しております。

また、大阪大学蛋白質研究所の北條裕信教授、朝比奈雄也助教、武居俊樹博士をはじめとする同研究所蛋白質有機化学研究室の皆様には、共同研究員として受け入れて頂き、岩岡研究室のみでは経験することができなかった様々な機会を与えてくださったことに、深く感謝申し上げます。

最後に、日々の研究生活において共に研究に励み、研究を支援して頂いた岩岡研究室の皆様に対して深く感謝申し上げます。