

学術論文

## 低温マイクロ波利用が切り開いた糖ペプチド合成の汎用化

### Study of Glycopeptide Synthesis under Microwave Irradiation at Low Temperatures towards Automated Synthesiser

横江 貴之<sup>1</sup>、大木 裕太<sup>2</sup>、長島 生<sup>1</sup>、高橋 直行<sup>2</sup>、清水 弘樹<sup>1\*</sup>

Takayuki Yokoe<sup>1</sup>, Yuuta Ohki<sup>2</sup>, Izuru Nagashima<sup>1</sup>, Naoyuki Takahashi<sup>2</sup>, Hiroki Shimizu<sup>1\*</sup>

1. 国立研究開発法人 産業技術総合研究所 生物プロセス研究部門、

2. 東京理化器械株式会社

1. 〒305-8566 茨城県つくば市東 1-1-1 中央第 6、2. 〒112-0002 東京都文京区小石川 1-15-17

1. Life Science and Biotechnology, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), 1-1-1, Higashi, Tsukuba, Ibaraki, 305-8566, Japan

2. Tokyo Rikakikai Co., Ltd, 1-15-17, Koishikawa Bunkyo-ku, Tokyo, 112-0002, Japan

corresponding author\*, e-mail address : hiroki.shimizu@aist.go.jp

キーワード: マイクロ波、進行波、低温照射、半導体発振器、ペプチド固相合成、糖ペプチド

Keywords: microwave, traveling wave, low temperature irradiation, semiconductor oscillator, solid-phase peptide synthesis (SPPS), glycopeptides

#### Abstract

We have developed a new waveguide for 2.45GHz microwave which is equipped an aluminum block jacket thermostat, and built up a novel microwave synthesizer which can perform chemical reactions even at low temperatures with continuous microwave irradiation. Applying this for solid-phase peptide synthesis (SPPS), we successfully obtained some advantages. Reactions were accelerated even at lower temperatures. Microwave unique effect could be clearly observed. Only small excess reagents (ex. 1.2 equivalent of Fmoc-amino acids and condensation reagents) were enough in microwave supported SPPS even at low temperatures, though large excess (more than five equivalent) of reagents are commonly used. As glycosylated amino acid synthons are expensive and relatively unstable, also as glycopeptides are potentially suffered epimerization and are easily to be decomposed by elimination of sugars, microwave supported SPPS at low temperatures gave big advantages for glycopeptide synthesis.

#### 1. 緒言

一般に、化学反応を高温で進めると反応はより迅速に進行するが、副生成物の増加や原料、目的物の分解などの問題も協奏的に生じる。加熱手段としてマイクロ波を利用すると、その特性から反応系が迅速に加熱さ

れ、反応時間の短縮ならびに目的物の収率向上といった効能が多数報告されている[1, 2]。一方、我々は、マイクロ波加熱と通常加熱で反応経路の選択性が変化する反応事例[3, 4]、マイクロ波を低温中で照射してはじ

めて可能となる反応事例[5]、酵素反応で照射周波数によって効果が変化する事例[6]などを報告しており、マイクロ波には化学反応に寄与する「効果」が存在することを示唆してきた[7]。

一方、化学反応においてマイクロ波特有の効果があるかないかは、依然、議論的ともなっている[8]。このマイクロ波効果の検証は様々なアプローチで進められているが、我々は、実験化学的にマイクロ波効果を明らかにする研究を指向した。そのために、

- 1) 同温度、同スケール、同条件、さらに同装置で化学反応におけるマイクロ波照射有無の差異を実証可能とする、
  - 2) マイクロ波照射しつつ、加熱される以上に早い速度レベルの緩衝力をもって冷却が可能な反応系で、熱的効果を除いた検証を可能とする、
- という化学反応システムの開発をおこなった。そしてこれを固相合成仕様へと改良をおこない、近年、創薬分野で着目されているペプチドや、さらに合成困難な糖ペプチド合成へ展開させた。

## 2. 方法

### 2-1. 低温マイクロ波反応装置の開発 –マイクロ波反応場創生やマイクロ波効果が検証可能な装置の開発

マイクロ波が創り出す新しい反応場の検証や、マイクロ波の熱に依らない効果を研究するため、つまり前項1) 2) を可能とするマイクロ波合成装置を創り上げるため、まず反応部とマイクロ波通路部をアルミブ



Fig. 1 Developed waveguide equipped with an aluminum block jacket thermostat.

ック恒温槽で覆った「アルミブロック恒温槽一体型導波管 (Fig. 1)」の開発をおこなった[9]。この導波管に、伝送線路型のマイクロ波の通り道である方形テーパ導波管 (入口側と出口側の2箇所) と、2.45 GHz 帯固定半導体デバイスによるマイクロ波発振器を組み合わせ、1~3mL 程度の少量バッチ式マイクロ波反応装置を作製した。これにより、マイクロ波照射しつつ同時にアルミニウムブロック恒温槽によって緩衝冷却が可能となり前項2) の性能を担保することができた。さらに、前項1) で述べた、同じ装置で全く同じ条件下、マイクロ波照射の有無のみの差異を精密に検証することも可能となった。

Fig. 2 に作製した反応装置の詳細について示した。低温反応場を実現するアルミブロック恒温槽内の中心部に高電界密度のマイクロ波を再現良く形成するため、TE<sub>10</sub>のシングルモードを用いた。TE<sub>10</sub>モードの進行波を形成する導波管の寸法は電磁界シミュレータを用いて決定し、反応部で電界強度が最大となることで反応溶液の誘電特性にしたがったマイクロ波の吸収加熱による効率的な加熱を可能とし、過熱の影響を排除した。そして、反射波を抑制しマイクロ波発振器を保護するためのチューナーおよびアイソレーターや、マイクロ波発振器内に方向性結合器を、さらに導波管前後に出力波と反射波と透過波のパワーメータ(モニター)を内蔵させた。これらのデバイスを使用することにより、マイクロ波挿入損失の自動キャリブレーションが行え、さらに「(出力波) - {(反射波) + (透過波) + (挿入

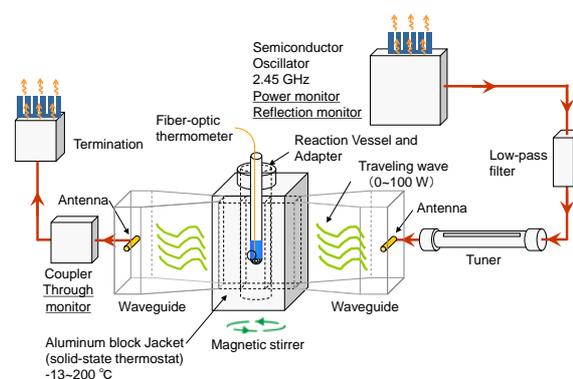


Fig. 2 Flow diagram of a microwave synthesizer which available to perform reactions at low temperatures with continuous microwave irradiation.

損失) } のリアルタイム演算により、反応溶液の温度や状態が変化した際でも、反応部で吸収したマイクロ波吸収量[W]を測定し続けることができるようになった。これにより、反応熱量(エンタルピー変化)の測定や、反応進行状況のモニタリングが可能となった。

さらに、マイクロ波発振器によって出力を1 W から100 W まで増幅する機能を付与し、反応遂行中に任意に出力を変更できる様にした。また、溶媒内にある *in situ* の光ファイバー温度計からの温度情報を基に、マイクロ波出力を自動的に調整することで、反応溶液の温度維持機能を付加させた。このとき、緩衝力のあるアルミブロック恒温槽の温度を反応温度よりも低い温度で冷却維持させることにより、急な反応温度の変化にも対応ができ、精密な温度制御が可能となった。また、マイクロ波照射を受けた物質は一般に迅速かつ高温に加熱されるため、化学反応のマイクロ波利用は「加熱反応への熱源としての利用」が一般的であったが、本装置では、アルミブロック恒温槽を氷点下とすることにより、反応温度を低温に維持したまま連続的にマイクロ波を照射することが可能となり、前項2)のマイクロ波の熱的効果以外の効果、いわゆる非熱効果の利用の汎用化を実現させた。一例として、Fig. 3 に2.5 mLのDMF(ジメチルホルムアミド)に対し、アルミブロック恒温槽を0°Cとしたときの実験を示す。まず、マイクロ波出力を最大90 Wとして溶媒を昇温させた。溶媒

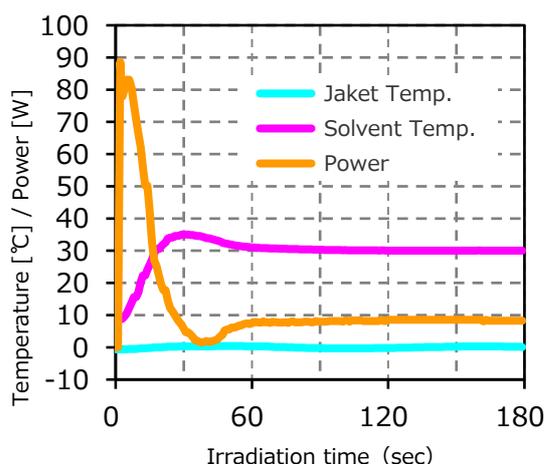


Fig. 3 Diagram of power of irradiated microwave [W] (orange), temperature of aluminum block jacket [°C] (sky blue) and solvent temperature [°C] (pink) for 2.5 mL of DMF.

温度が30°Cを超えたとき、マイクロ波出力を絞りアルミブロック恒温槽の冷却機能を働かせたところ、最大1°C/2秒の速さで冷却された。最終的には、マイクロ波出力を8-10 Wで随時調整することで、連続的に照射しつつも溶媒温度を30°Cに維持することができた。最終的に、これらの機能を保有した低温マイクロ波反応装置(GPS型)を作製した[10]。

## 2-2. ペプチド固相合成と糖ペプチド固相合成

ペプチド合成として現在広く用いられているのは、固相合成法である[11, 12]。一般に、各反応の後には合成品の分離精製作業が伴うが、固相合成法では、反応後の望む化合物のみが固相上に残る様に設計され、反応後に余剰の試薬を洗い流すだけで次工程へ進むことができる。そして、固相合成法では副反応を抑えて本反応を収率良くおこなうことがカギとなることから[13]、ペプチド固相合成では、一般に大過剰の試薬が用いられる。また、反応の高収率化の一環としてマイクロ波利用も効果的であると知られており[14, 15]、既に国内外メーカーからマイクロ波を利用したペプチド固相合成装置がいくつか製造、販売されている。これらの装置では、ペプチド合成は高温ですすめられる。ペプチドやその合成原料になるアミノ酸誘導体などは多官能基性化合物のため、概して言うと不安定化合物のひとつであるが、装置メーカーでは、高温(75°C以上)かつ短時間(数分から1分)で処理することで、副反応を抑えつつアミノ酸縮合反応を進める方法を示している[16]。

一般に、動物生体内のタンパク質のほとんどは糖化された「糖タンパク」として存在する。しかし生体内での糖修飾は翻訳後修飾と呼ばれ、糖化を制御する仕組みが無い。その結果、生体内糖タンパクの糖部分は多様な混合物となり、これまで研究対象になりにくくなっていた。また、糖タンパクのエピトープ部となる糖ペプチドは、基本的にはペプチド固相合成法と同様の手法で合成可能であるが、実際には糖アミノ酸シントンの非常に高価であることから、その合成は汎用化されていない。例えば、天然型のO-グリカン糖アミノ酸の代表である、GalNAc-SerやGalNAc-Thrは、糖のヒドロキシ基とアミノ基がアセチル保護され、アミノ酸N末端のアミノ基にはFmocが導入された合成シントンの形で13~25万円/100mgで国内外の試薬メーカーか

ら販売されている。100 mg はモル数換算すると約 0.15 mmol になる。一般に、糖アミノ酸シントンの反応性は、側鎖糖部分のかさ高さにも起因して、アミノ酸シントンより反応性が劣る。また先に述べた様に、ペプチド固相合成では大過剰の試薬 (3 当量以上) を使用するのが定法である。そこで本来であれば糖アミノ酸の反応ではより過剰量の試薬を投じたいところであるが、ペプチド固相合成と同様に、糖アミノ酸シントンを 3 当量利用して合成する場合でも、「0.05 mmol スケールでの糖ペプチド体合成で、糖アミノ酸 1 残基伸長の試薬代だけで 13~25 万円かかる」ことになる。合成総収率が 20% の場合、得られる糖ペプチド体は 10  $\mu$ mol 程度となるが、糖が 1 か所ならともかく、ムチンの様に、糖が 7 か所 8 か所に存在し糖の重量割合が 50% を超える様な糖ペプチド体の合成では、試薬代だけで 100 万円を優に超えることになり、その化学合成は現実離れしている。

この糖ペプチド合成において、反応性の劣る糖アミノ酸反応を加速させるために、加熱条件下でのマイクロ波照射を利用する研究も進められてはいるが[16]、一般に糖ペプチド体はエピメリ化しやすく、また糖の脱離などの副反応が起こりやすいことから、反応温度は極力低温で進めるのが定石である。

### 2-3. 低温マイクロ波反応装置をペプチド固相合成システムへ対応展開する

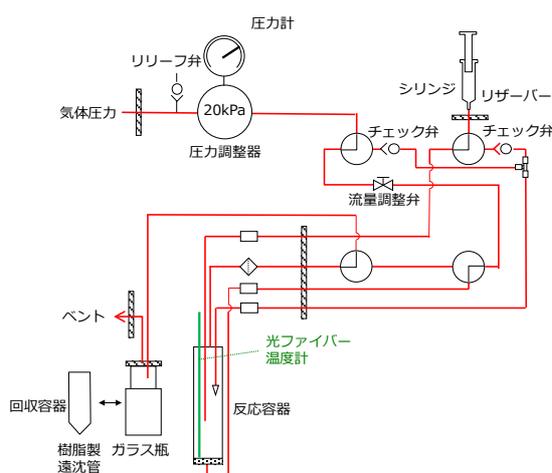


Fig. 4 Flow diagram for solid-supported peptide synthesis. Bottom line is used either to drain solvents/regents off or to bubble for mixing reaction by pressured gas.

ペプチド合成においてマイクロ波加熱により反応の迅速化を行う流れの中、我々は、小出力のマイクロ波の On/Off を繰り返すことで反応温度を 50°C 以下に保ちつつ反応を進めた場合でも、ペプチドや糖ペプチド合成において高収率化などのメリットが得られることを認知していた[17, 18, 19]。しかし、論文報告を積み上げて、小出力のパルス照射で本当にマイクロ波効果が現れているのか、一時的な昇温による高収率化ではないのかなどの議論が常に生じた。そこで、低温でも連続的なマイクロ波照射が可能で、さらに反応温度を精密に制御できる固相合成装置の製作を目指した。

2-1 項で述べた低温マイクロ波反応装置 (GPS 型) [10] を固相合成仕様にする、「低温制御したままマイクロ波照射によって反応加速効果が得られるペプチド合成装置が作製でき、さらにこれは糖ペプチド合成装置への展開も可能になる」と考えた。そこで、GPS 型の固相反応仕様への展開を検討した。まず解決すべき課題であったのは、攪拌に代わる代替法の確立であった。固一液反応系である固相反応においては反応の振とう攪拌が必須とされているが、GPS 型装置では反応部をアルミニウム恒温槽に密着させて緩衝冷却させることから、振とう攪拌法の導入は不可能である。そこで、攪拌に代わる代替法を種々検討した結果、反応液をバブリングすることで攪拌と同等の効果を得ることに成功した。

この結果を踏まえて、まず、固相反応を市販のフィルター付ポリプロピレン製固相反応容器 (内径 9 mm) で進めることができる様、アルミ製のアプリケーションを作製した。次に、固相合成ユニットの作製をすすめた。



Fig. 5 Overview of GPS synthesizer (right) [10] and a unit of solid-supported peptide synthesis (left).

一連のペプチド合成を通じて、固相レジンを入れた固相反応容器を取り外しすることなく全合成が進められる様、液体や気体の流路を設計した (Fig. 4)。反応容器の上部に3ライン、下部に1ラインの流路を導入し、流路切替え弁を介して液体や気体の供給、反応液の排出を可能とした。反応のバブリングの他、試薬や溶媒などの液体の供給、反応液の排出はガス圧によっておこない、アミノ酸シント、糖アミノ酸シントは溶媒に溶解させ、シリンジにて適時、反応容器の上部ラインを通じて反応槽に注入する様にした。4ラインの流路切替えパターンは、「添加、攪拌、反応」操作モードと「洗浄、濾過、回収」操作モードに集約させ、一つの切替えレバーで連動させることにより、誤操作を防ぐ様にした。これらを集約させた固相合成ユニットを作製し連結することで、GPS型を基にしたペプチド固相合成装置を製作し、新たに特許出願をおこなった (Fig. 5)。

#### 2-4. 低温マイクロ波反応装置を使ったペプチド、糖ペプチド合成

2-3項で述べたGPS型ペプチド固相合成装置の性能を評価した。最大の興味は、マイクロ波照射によって、反応の昇温なく反応性や収率の向上が得られるかということであった。また、糖ペプチド合成の汎用化を指向して、必要試薬量の低減化についても検討した。

Fmoc法ペプチド固相合成では、一般に「1. Fmoc基の脱保護」「2. アミノ酸の縮合反応」「3. アセチルキャッピング」の3ステップを1サイクルとして反応を行う。各反応の条件は、レジン50mgに対し以下のように設定した。

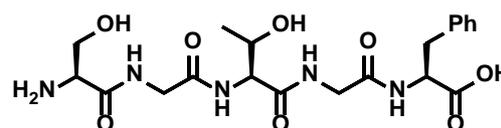
1. 20%ピペリジン/DMF溶液 (1 mL)
2. Fmoc-アミノ酸 (X mmol)、HBTU (X mmol)、HOBT (X mmol)、DIEA (2X mmol)、DMF (1 mL)
3. Acetyl Capping Solution (1 mL); Ac<sub>2</sub>O (1.2 mL)、DIEA (0.6 mL)、HOBT (50.0 mg) を DMF (23.2 mL) に溶解させたもの

なお、「1. Fmoc基の脱保護」及び「2. アミノ酸の縮合反応」については、アルミブロック恒温槽を低温で一定とし、マイクロ波出力を変化させることで反応温度を一定に保った。「3. アセチルキャッピング」はマイクロ波照射を行わず、アルミブロック恒温槽にて反応温度を制御した。

### 3. 結果

実際に Fig. 6 で示した5残基ペプチド (Ser-Gly-Thr-Gly-Phe, 分子量 = 467) をモデルに、合成の必須条件の検討をおこなった。Fmoc-Phe-HMPB-BHA Resin (0.49 mmol/g) 50 mg を用い、アルミブロック恒温槽を10°C、マイクロ波照射によって反応温度を50°Cに設定し、Fmoc基の脱保護は5分、アミノ酸の縮合反応は10分おこなった。アセチルキャッピング反応はマイクロ波を利用せずにアルミブロック恒温槽による加熱で反応温度を25°Cとして5分間おこなった。合成終了後、レジンから切り出しHPLCにて精製、得られた5残基ペプチドの重量から総収率を計算した。

まず、各反応に使用したFmocアミノ酸シントを各々3.0~1.1当量として比較検討したところ、使用する試薬量が少なくなるほど、得られた収率が低下した (Table 1, entry 1~4)。しかし、アミノ酸の縮合反応時



Ser-Gly-Thr-Gly-Phe

Fig. 6 Structure of synthesised model peptide.

Table 1 Study of essential equivalent of amino acid reagents (by microwave heating at 50°C).

entry	reagents	time	microwave absorption	yields
1	3.0 eq.	10 min.	8.2 - 9.4 W	92 % (10.5 mg)
2	1.5 eq.	10 min.	9.3 - 10.3 W	84 % (9.7 mg)
3	1.2 eq.	10 min.	9.3 - 11.2 W	71 % (8.1 mg)
4	1.1 eq.	10 min.	11.5 - 13.5 W	58 % (6.6 mg)
5	1.2 eq.	20 min.	10.5 - 12.1 W	92 % (10.5 mg)
6	1.1 eq.	20 min.	11.4 - 13.7 W	70 % (8.0 mg)

Table 2 Study of essential temperature conditions. (1.2 eq. reagents were used and reaction time was 20 min.) Entry 1 was same as Table 1 entry 5. Entry 3 and 5 were performed under conventional heating.

entry	temperatures reaction	outside	microwave absorption	yields
1	50 °C	10 °C	10.5 - 12.1 W	92 % (10.5 mg)
2	30 °C	-10 °C	8.9 - 11.5 W	93 % (10.6 mg)
3	30 °C		N/A	80 % (9.2 mg)
4	25 °C	-10 °C	8.3 - 9.7 W	93 % (10.7 mg)
5	25 °C		N/A	84 % (9.6 mg)

間を 20 分とすると、試薬量がわずか 1.2 当量であっても、収率として 92%、計算上の 1 サイクルの収率が 98% でアミノ酸伸長反応が進行することがわかった (Table 1, entry 5)。また、entry 1~4 の反応時間 10 分のとき、試薬量を少なくするとマイクロ波の反応部吸収電力が増える傾向がみられたが、entry 5,6 の反応時間 20 分のときの結果も考慮すると、マイクロ波吸収電力が収率に影響しているとは考えにくい。一方、マイクロ波による反応系の加熱に試薬や一役かかっているとすれば、試薬量が少なくなったときに必要なマイクロ波電力が大きくなったことは理解できる。

次に、必要温度条件の検討をおこなった (Table 2)。Table 1 で示した検討において必要最小量と分かった 1.2 当量の試薬を用い、反応時間を 20 分として反応温度条件を様々に変えて試験をすすめた。まず、先の実験と同様にマイクロ波によって 40°C 昇温される様に、アルミブロック恒温槽を -10°C にしてマイクロ波照射によって反応温度を 30°C としたとき、Table 1, entry 5 で得られた反応温度 50°C の場合と同等の収率を与えた (Table 2, entry 2)。一方、同じ 30°C でもマイクロ波を使わずアルミブロック恒温槽にて反応温度を 30°C としたときは、合成収率は 80% と大幅に低下した (Table 2, entry 3)。さらに、アルミブロック恒温槽を -10°C のままでマイクロ波照射によって反応温度を 25°C に抑えた時、昇温度が 35°C と小さくなったからか反応部のマイクロ波吸収電力が少なくなったものの、得られた収率は 30°C の時と同等で (Table 2, entry 4)、さらに反応温度 25°C でも 30°C のときと同様にマイクロ波有無による収率の差異が観察された (Table 2, entry 4 と 5)。つまり、マイクロ波を利用すると低温条件下でも高収率でペプチド固相合成反応が進行する結果が得られた。

これらの実験を通じ、本装置では緒言の 1) として述べた、「同温度、同スケール、同条件、さらに同装置で化学反応におけるマイクロ波照射有り無しとの差異が実証可能」で、このペプチド固相合成ではマイクロ波を利用することによって収率向上することも示された。

さらに、先の 5 残基ペプチド合成において、使用された Fmoc-Thr(<sup>t</sup>Bu)-OH の代わりに糖アミノ酸シントンの Fmoc-Thr(Ac<sub>3</sub>GalNAc)-OH を用いることで糖ペプチド合成試験をおこなった (Fig. 7)。本糖ペプ

チド合成では、Fmoc-アミノ酸もしくは Fmoc-保護糖アミノ酸を 1.5 当量使用し、反応温度は 30°C (アルミブロック恒温槽は -10°C)、アミノ酸の縮合反応時間は 20 分として合成をすすめたところ、目的とする糖ペプチド体 (Ser-Gly-Thr(Ac<sub>3</sub>GalNAc)-Gly-Phe, 分子量 = 797) を 14.6 mg (収率 75 %) で得た。同配列ペプチドを同温度条件、試薬量は 1.2 当量で合成した場合は 93% 収率で目的物を得ていたが (Table 2, entry 2)、これと比べると収率が低下したことになる。しかし、5 残基合成、つまり 4 残基アミノ酸伸長を逐次おこなうとき、総収率 93% で得られた場合の 1 反応換算収率は 98% であり、総収率 75% では 1 反応換算収率は 94% となる。つまり、計算上は、1 反応わずか 5% の差だけだったということになるが [13]、今回の結果は、反応収率が低下したためではなく、精製ロスによるものと考察している。つまり、糖ペプチド合成では粗精製後に 15.5 mg しか得られていたが、これを HPLC 精製して目的糖ペプチド体が 14.6 mg 得られている。短い配列の中でアセチル保護された糖が加わることで化合物の脂溶性が高まり、エーテル沈殿による粗精製の段階でロスが生じた可能性が高いと考えている。

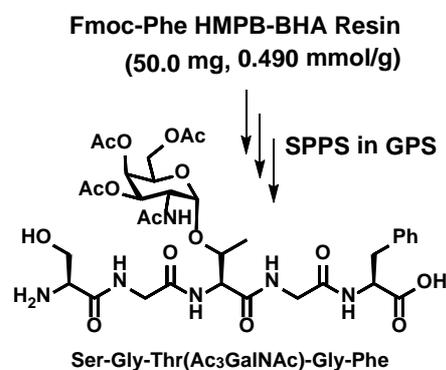


Fig. 7 Synthesis of a model glycopeptide.

#### 4. 考察と結論

本研究では、低温下でマイクロ波が利用できる合成装置の開発、及びマイクロ波照射下での固相ペプチド合成の検討を行った。これまでペプチド固相合成ではアミノ酸伸長サイクルの収率を少しでも高めるため、大過剰の試薬の利用や、マイクロ波照射による高温反応などが遂行されてきた。アミノ酸シントンや合成ペプチドなどが高温でも安定な場合、マイクロ波加熱に

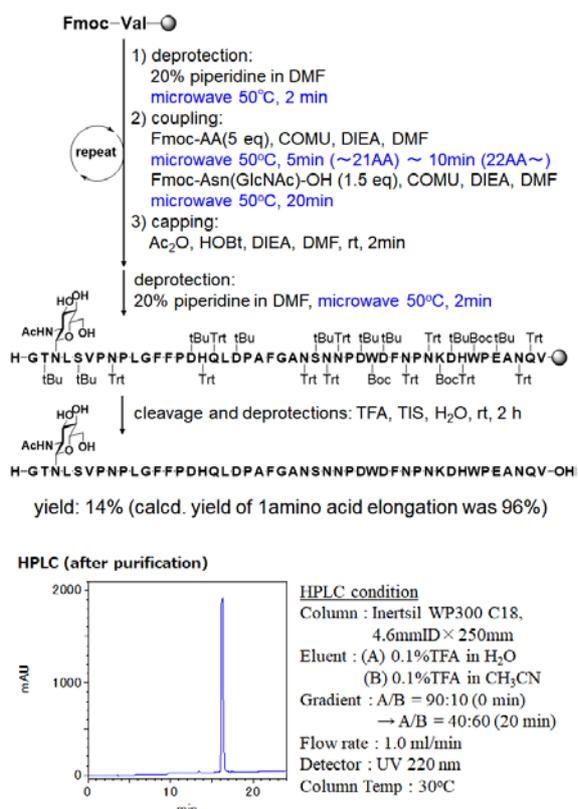


Fig. 8 Synthesis of 46 amino acids glycol-peptide, a part of a glycoprotein on hepatitis type B virus (HBV).

よって非常に迅速に合成ができ、これは大変有効な合成手段であると言える。一方、今回我々は、合成反応温度を 50°C 以下に抑えつつも、マイクロ波照射によって反応時間を 20 分とすると、必要試薬量を 1.2 当量まで抑えることが可能であることを見出した。この試薬量の低減化は、高価な糖アミノ酸シントンの使用が必要となる糖ペプチド合成には大変大きなメリットとなる。また、同温度、同スケール、同条件、さらに同装置において、マイクロ波照射有無における収率に明確な差が得られたことから、いわゆる「マイクロ波の加熱に依らない特有効効果」を明確に示すことができた。そして当初の目論見通り、本反応システムを糖ペプチド合成へ展開できることも示した。

本論文では詳細を論じなかったが、現在、本システムにおいて 40 残基程度のペプチド・糖ペプチドの合成は、配列上困難な組み合わせでない限り、汎用的に達成できるようになった。また、条件検討をすることなく、反応温度 50°C、*N*-グリカン Fmoc 糖アミノ酸合成シントン

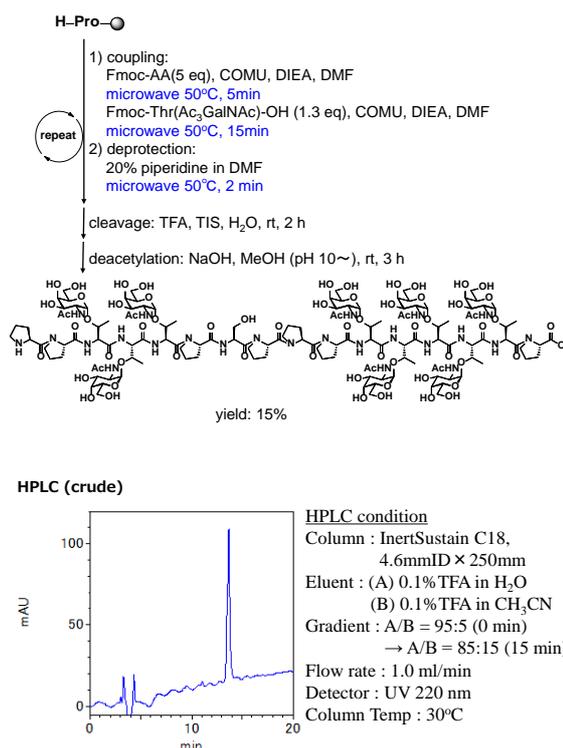


Fig. 9 Synthesis of a sugar riched 16 amino acids glycopeptide, a part of mucin 2, MUC2. Shown HPLC is for a data of crude, material before purification.

を 1.3~1.5 当量利用した初回合成で、B 型肝炎ウイルス表面糖タンパクの部分構造である 46 残基糖ペプチドを総収率 14% で (換算 1 残基伸長平均収率 96%) (Fig. 8)、8 個の *O*-グリカン糖 (*O*-ガラクトサミン) が最大 5 か所連続し重量比で糖が 50% 以上を占める 16 残基ムチン(MUC2)を総収率 15% で合成することにも成功している (Fig. 9)。

今後は、GPS 型を利用したより長鎖のペプチド固相合成法への展開、これまで合成困難とされてきた糖ペプチドの様々な合成法の開発、また低温マイクロ波照射利用合成におけるエピメリ化や糖の脱離などの副反応制御効果などについて、さらなる研究を展開させ、糖ペプチドの自動合成装置の開発へと展開させたいと考えている。

## 5. 謝辞

本研究の一部は、国立研究開発法人日本医療研究開発機構(AMED)の「次世代治療・診断実現のための創薬基盤技術開発事業(糖鎖利用による革新的創薬技術開

発)」、JSPS 科研費 JP26620142 などの支援助成を受けて遂行しました。

#### 引用文献・参考

1. P. Lidström, J. Tierney, B. Wathey, J. Westman, *Tetrahedron* 57 (45), (2001) 9225-9283.
2. S. L. Gaonkar, H. Shimizu, *Tetrahedron* 66 (18), (2010) 3314-3317.
3. H. Ohru, R. Kato, T. Kodaira, H. Shimizu, K. Akasaka, T. Kitahara, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 69 (5), (2005) 1054-1057.
4. Y. Yoshimura, H. Shimizu, H. Hinou, S. -I. Nishimura, *Tetrahedron Lett.* 46 (28), (2005) 4701-4705.
5. H. Shimizu, Y. Yoshimura, H. Hinou, S. -I. Nishimura, *Tetrahedron* 64 (43), (2008) 10091-10096.
6. I. Nagashima, J. -i. Sugiyama, T. Sakuta, M. Sasaki, H. Shimizu, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 78 (5), (2014) 758-760.
7. 長島生、清水弘樹、有機合成化学協会誌 70 (1)、(2012) 250-264.
8. S. K. Ritter, *C&EN* 92 (4), (2014) 26-28.
9. 特許第 6231295 号
10. Commercially available as GPS-1000 (EYELA).
11. J. M. Palomo, *RSC Adv.* 4, (2014) 32658-32672.
12. R. Behrendt, P. White, J. Offer, *J. Pept. Sci.* 22, (2016) 4-27.
13. ペプチド固相合成ではアミノ酸を1残基ずつ伸長させるため、1反応の収率を数%向上させることが高収率化や長鎖ペプチド合成のカギとなる。例えば20残基ペプチドを合成するとき、C末端1残基があらかじめ提示されたプレロード固相レジンをを用いた場合19回のアミノ酸伸長反応を行うことになり、もし1残基伸長が93%で進行すると0.93の19乗で総収率は25%となるが、1残基伸長が98%で進行すると総収率は0.98の19乗で68%と、3倍近くの収量が得られる。長鎖ペプチド合成ではこの差異が顕著に表れる。例えば44残基合成では1残基伸長が93%で進行すると総収率はわずか4%となる

が、1残基伸長が98%で進行すると総収率は42%と、40倍の差になる。また、実際には4%の含有物をHPLCにより分離精製することは困難であることから、この「1反応5%の収率の差」が「44残基ペプチド合成の可否」を左右している。1残基伸長が98%収率で進行すれば、100残基ペプチドを固相法で合成することも不可能ではないともいえる。

Total yield of	single reaction yields	
	93%	98%
20 AA	25%	68%
44 AA	4.4%	42%
69 AA	0.7%	25%
100 AA	0.08%	14%

14. 長島生、清水弘樹、*化学と生物* 56 (12), (2018) 811-818.
15. S. L. Pedersen, A. P. Tofteng, L. Malik, K. J. Jensen, *Chem. Soc. Rev.* 41, (2012) 1826-1844.
16. 2012年にBiotage社は、基本プロトコルとして「アミノ酸縮合反応を75°Cで5分+脱Fmoc反応を室温3分」を繰り返してペプチド合成可能と発表した。CEM社は2013年に1サイクル「90°Cで4分」のプロトコルを発表し、さらに2018年には「105°C1分(アミノ酸縮合反応)+90°C40秒(脱Fmoc反応)」を1残基伸長サイクルとするCarboMAX法を発表した。そして、CarboMAX法では糖ペプチド合成も可能としている。
17. T. Matsushita, H. Hinou, M. Kuroguchi, H. Shimizu, S. -I. Nishimura, *Org. Lett.* 7 (5), (2005) 877-880.
18. T. Matsushita, H. Hinou, M. Fumoto, M. Kuroguchi, N. Fujitani, H. Shimizu, S. -I. Nishimura, *J. Org. Chem.* 71 (8), (2006) 3051-3063.
19. K. Yamada, I. Nagashima, M. Hachisu, I. Matsuo, H. Shimizu, *Tetrahedron Lett.* 53(9), (2012) 1066-1070.

Manuscript received: June 12, 2019

Revised: Aug. 19, 2019

Accepted: Aug. 26, 2019