

環状メタロペプチドの 新規合成法の開発

茂森一輝

総合研究大学院大学

数物科学研究科

機能分子科学専攻

目次

要旨 (日本語)	I
要旨 (英語)	III
略語説明	VI
1. 序論	1
2. 目的	5
3. 環状メタロペプチドの合成	
3-1. 緒言	7
3-2. メタロペプチドのデザイン	9
3-3. ペプチド側鎖への金属錯体の導入	11
3-3-1. 実験の部	11
3-3-2. 結果・考察	18
3-4. メタロペプチドの環化反応	23
3-4-1. 実験の部	23
3-4-2. 結果・考察	29
3-5. 環状メタロペプチドからの金属錯体の除去	43
3-5-1. 実験の部	43
3-5-2. 結果・考察	44
3-6. 総括	46
4. 環状メタロペプチドを用いた分子認識	
4-1. 緒言	48
4-2. アニオン性分子の選択的分離	50
4-2-1. 実験の部	50
4-2-2. 結果・考察	51
4-3. 総括	58
5. 結論	59
6. 参考文献	60
発表論文・学会発表	63
謝辞	64

要旨

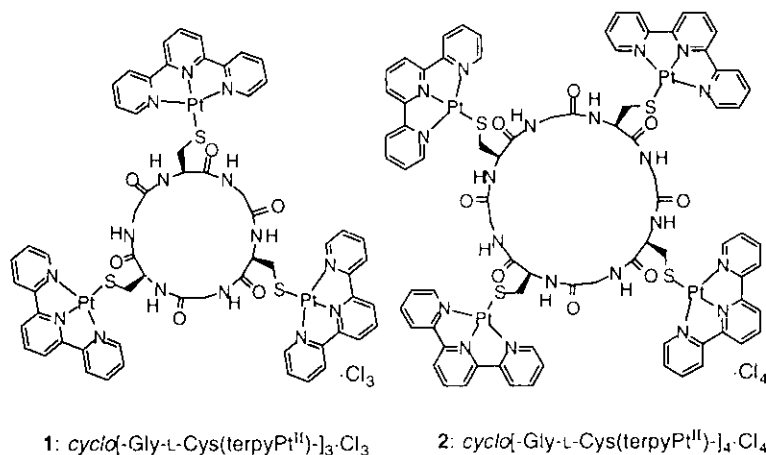
1. 序論 ペプチドは、そのアミノ酸配列を設計通りに合成する手法が確立しているため、生体機能性物質としてのみならず、機能性材料の構成要素としても大きな期待が寄せられている。中でも環状ペプチドについては、天然のものとして抗生物質の中に見出され、また人工分子としてもイオンの膜輸送に関するユニークな機能などが注目されてきた。例えば、Ghadiriらは環状ペプチドをチューブ状に並べ脂質二重膜に導入することにより、イオンや薬物輸送システムへの適用を試みている。一方、金属イオンや錯体は、有機分子にはない構造および機能上の特性を有している。例えば、酸化還元、磁性、光物性やルイス酸性といった反応性に関する特性や、さらには、機能性配位子の固定や集積化を様々な立体化学の様式で行うことができる機能をもつ。これらは、機能分子を構築する上で極めて有用な構成単位となりうる。そこで、私は、環状ペプチドと金属錯体の構造融合による環状メタロペプチドの新合成法を開発することにした。

2. 目的 アミノ酸の中には、システインのチオール基やヒスチジンのイミダゾール基のように金属に配位する残基が幾つか見られ、金属酵素の活性中心においても重要な役割を果たしている。これらのアミノ酸をペプチド中に組み込むことにより、ペプチド上に金属イオンや錯体を導入することができ、それぞれ単独では実現できない空間配置や機能などが期待される。本研究では、ペプチド中に複数の金属錯体を導入する新しい合成法を開発することを目的として、金属錯体を導入した直鎖状ペプチドの高効率環化、および環状メタロペプチドの化学的性質について検討を行った。具体的には、金属配位能を有するシステインとグリシンの繰り返し配列をもつペプチド上に、DNA結合能や光応答機能をもつターピリジン白金(II)錯体(terpyPt^{II})を整列させた、環状メタロペプチド $cyclo[-Gly-L-Cys(terpyPt^{II})-]_n \cdot Cl_n$ ($n = 3 : 1, n = 4 : 2$) を合成することに成功した。

3. 実験・結果 まず、自動合成機により合成した直鎖状ペプチド $H_2-(Gly-L-Cys)_n-OH \cdot CF_3CO_2$ ($n = 2, 3, 4, 5$) のチオール残基にそれぞれターピリジン白金(II)錯体を導入し、直鎖状メタロペプチド $H_2-[Gly-L-Cys(terpyPt^{II})]_n-OH \cdot (CF_3CO_2)_{n+1}$ ($n = 2, 3, 4, 5$) を約90%の高収率で得た。次に、 $n = 3$ および $n = 4$ の直鎖状メタロペプチドを水溶性縮合剤(EDC·HCl)と活性化剤(HOBt)の存在下、 H_2O-CH_3CN (7:3) 中で縮合環化することにより、それぞれ単離収率58%で暗赤色の環状メタロペプチド

ド $cyclo[-Gly-L-Cys(terpyPt^{II})-]_n \cdot Cl_n$ ($n = 3, 4$) を得た。興味深いことに、 $n = 2$ の直鎖状メタロペプチドを同様に縮合環化すると、二分子が縮合したのち環化した環状メタロペプチド $cyclo[-Gly-L-Cys(terpyPt^{II})-]_4 \cdot Cl_4$ が得られた。これら直鎖および環状メタロペプチドの構造は、エレクトロスプレーイオン化質量分析 (ESI-MS) およびプロトン核磁気共鳴 (1H NMR) により同定した。それぞれの環状メタロペプチドの環サイズは、高分解能スペクトルにおける同位体スプリットの間隔により決定した。また、 1H NMR 測定 (D_2O , $60^\circ C$) において、直鎖状メタロペプチドはそれぞれのアミノ酸ユニットが独立した共鳴スペクトルを与えるのに対し、環状メタロペプチドの場合、それぞれの $Gly-L-Cys(terpyPt^{II})$ 部分がすべて等価なスペクトルを示し、水溶液中で対称性の高い構造をとっていることが明らかとなった。

これら環状体の金属錯体 ($terpyPt^{II}$) 部分は、酸処理により容易に除去できた。また、環状ヘキサメタロペプチド ($n = 3$) は、種々のベンゼントリカルボン酸塩の混合物中から 1,3,5-異性体に高い選択性を示し、1:1 複合体として分離することができた。



4. 考察 これまで、環状ペプチドはそのほとんどが有機溶媒中や固相法により合成されてきた。本研究においては、天然型アミノ酸であるシステインとグリシンの繰返し配列を有するペプチド上に金属錯体を導入させることにより、水溶液中で効率よく環化させることに成功した。これは、直鎖状メタロペプチドが、金属錯体の導入により、環化に適した折り畳み構造をとるためと推察される。本法により、環状ペプチド上に金属錯体を規則正しく集積化することができた。また、金属錯体 ($terpyPt^{II}$) 部分は除去が可能のため、他の機能性金属錯体で置換することも可能である。ペプチドの環サイズや金属錯体の種類を変えることにより、本法の一般性を高めることが今後の大きな課題である。本研究により開発された環状メタロペプチドの新しい合成法は、金属錯体を集積・配列化する方法の一つとして新しい切り口を提供するものであり、さらに特殊空間（分子認識場、光応答場、不斉場等）の構築に展開できると確信する。

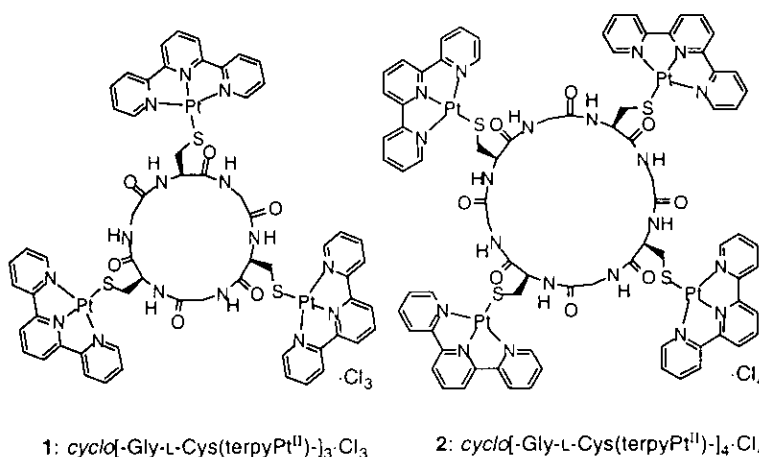
Development of Novel Synthetic Methods for Cyclic Metallopeptides

Kazuki Shigemori

Department of Functional Molecular Science, School of Mathematical and Physical Science
The Graduate University for Advanced Studies

Introduction Cyclopeptides are a class of compounds with their biological activity and great potential as functional molecules. The development of strategies for functionalizing cyclic peptides is a fundamental challenge in the emerging field of *de novo* protein design. Natural or even unnatural peptides would be promising prototypes of functionalized compounds, because they can be rationally modified in terms of sequence, size, and variety of side chains. As another advantageous tool for the functionalization of peptides, metal complexes would be incorporated into peptides using the side chains of naturally occurring amino acids. In comparison with organic molecules, metal complexes have unique characteristics such as redox activity, magnetic and optical properties, Lewis acidity, and so on. Moreover, metal complexes have abilities to spatially fix or array functional ligands. Thus, peptides and metal complexes have possibility to serve as useful building blocks for functional molecular architectures.

Our approach is based on the use of amino acids containing a metal coordination site (*e.g.* the thiol group of Cys) as the components of cyclopeptides for constructing cyclopeptide-metal complex conjugates. In this thesis, an efficient strategy for



the liquid-phase synthesis of cyclopeptides having a repeated sequence of Gly-L-Cys(terpyPt^{II}),

cyclo[-Gly-L-Cys(terpyPt^{II})-]_nCl_n, **1** (n = 3) and **2** (n = 4) is described. Interest in the incorporation of a terpyPt^{II} complex onto L-Cys was initially aroused by its binding to DNA and antitumor properties. In these peptides, positively charged Pt^{II} complexes are designed to align on the periphery of the macrocyclic peptide scaffold.

Synthetic Experiments

The linear peptides, H₂-(Gly-L-Cys)_n-OH·(CF₃CO₂) (n = 2, 3 and 4), were prepared on a peptide synthesizer. Treatment of these peptides with [(terpyPt^{II})Cl]Cl·2 H₂O in H₂O at room temperature afforded H₂-[Gly-L-Cys(terpyPt^{II})]_n-OH·(CF₃CO₂)_{n+1} in 75-97 % yields. The resulting linear peptides were well cyclized at the concentration of 0.5-1.0 mM in H₂O-CH₃CN (7:3) at 25 °C for 48-72 h, in the presence of excess HOBt and water-soluble carbodiimide, EDC. *Cyclo*[-Gly-L-Cys(terpyPt^{II})-]_nCl_n, **1** (n = 3) and **2** (n = 4), were successfully obtained in fairly good yields.

Results and Discussion

The structure of linear and cyclic metalloptides was identified by electrospray ionization mass spectrometry (ESIMS), proton nuclear magnetic resonance (¹H NMR) studies, and elemental analyses. The size of cyclic metalloptides could be clearly determined based on the numbers of isotopic split lines observed in the high-resolution mass spectra. The linear peptides, H₂-[Gly-L-Cys(terpyPt^{II})]_n-OH·(CF₃CO₂)_{n+1}, n = 3, 4, were cyclized to *cyclo*[-Gly-L-Cys(terpyPt^{II})-]_nCl_n (n = 3, 4) in 58 % yields in both cases. Interestingly, H₂-[Gly-L-Cys(terpyPt^{II})]₂-OH·(CF₃CO₂)₃ formed *cyclo*[-Gly-L-Cys(terpyPt^{II})-]₄Cl₄ which was cyclized after the intermolecular coupling between two linear peptides. Whereas the ¹H NMR spectral patterns for the linear metalloptides as starting materials were highly complicated, those for the cyclopeptides, **1** and **2**, were much more symmetrical and only one set of signals corresponding to a Gly-L-Cys(terpyPt^{II}) moiety was observed in each case. This result

unequivocally demonstrated that the structure of the cyclic metallopeptides is highly symmetrical in aqueous solution. The terpyPt^{II} complex moieties of **1** were readily removed by treatment with TFA to afford the corresponding cyclic peptide, *cyclo*[-Gly-L-Cys-]₃, which was confirmed by ESIMS.

Cyclo[-Gly-L-Cys-]₃ was found to act as a positively-charged anion receptor. Its ¹H NMR study showed that the cyclohexapeptide **1** selectively separated 1,3,5-benzenetricarboxylate anion from an equimolar mixture of three isomeric tricarboxylates to form a 1:1 ternary complex in neutral water at room temperature.

Conclusion

We have demonstrated an efficient strategy for the liquid-phase synthesis of cyclopeptides containing a repeated sequence of Gly-L-Cys(terpyPt^{II}). These results raise the intriguing possibility that this strategy will provide a powerful tool for arraying metal centers on cyclopeptide frameworks, which could lead to structural as well as functional control of multinuclear metal complexes.

References

- (1) Cyclic metallopeptides, *cyclo*[Gly-L-Cys(terpyPt^{II})]_nCl_n, Kentaro Tanaka, Kazuki Shigemori and Mitsuhiro Shionoya, *Chem. Commun.*, **1999**, 2475-2476.
- (2) Incorporation and Alignment of Functional Metal Complexes onto Cyclopeptide Frameworks, Kazuki Shigemori, Kentaro Tanaka, Sachiko Arie, Sanae Furusho and Mitsuhiro Shionoya, in preparation.

略語説明

L-Cys.....L-Cystein (i)

Gly.....Glycine (ii)

terpy.....Terpyridine (iii)

terpyPt^{II}.....Terpyridine platinum(II) (iv)

TFA.....Trifluoroacetic acid (v)

EDT.....Ethanedithiol (vi)

*t*Bu-Me ether.....*t*-Butyl methyl ether (vii)

Trt.....Triphenylmethyl (viii)

Fmoc.....9-Fluorenylmethoxycarbonyl (ix)

EDC·HCl.....*N*-Ethyl-*N*'-(3-(dimethylamino)propyl)carbodiimide hydrochloride (x)

HOBt.....1-Hydroxy-1H-benzotriazole monohydrate (xi)

TSP.....3-Trimethylsilylpropionic acid sodium salt (xii)

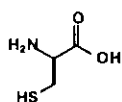
HPLC..... 高速液体クロマトグラフィー

(High-performance liquid chromatography)

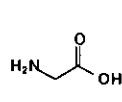
ESIMS..... エレクトロスプレーイオン化マススペクトル

(Electrospray ionization mass spectrometry)

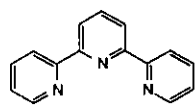
NMR..... 核磁気共鳴 (Nuclear magnetic resonance)



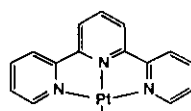
i



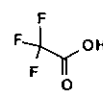
ii



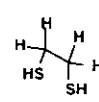
iii



iv



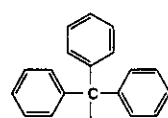
v



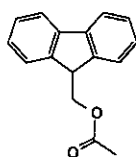
vi



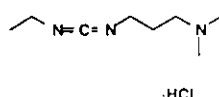
vii



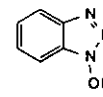
viii



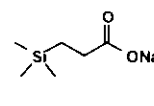
ix



x



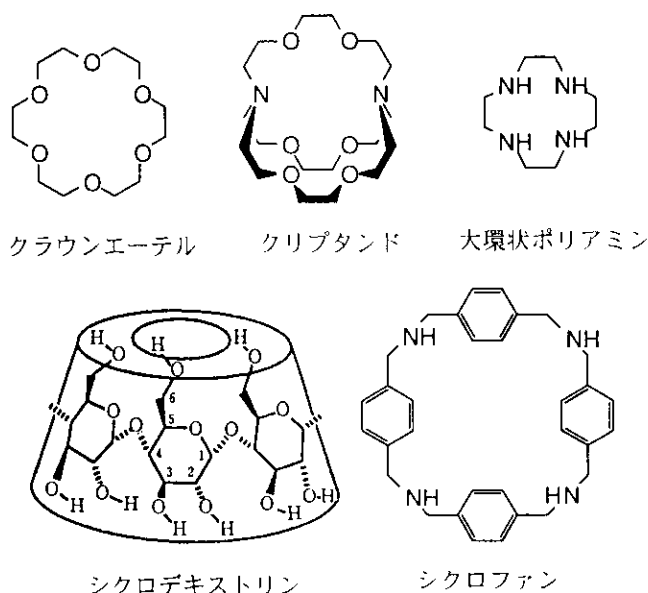
xi



xii

1. 序論

環状および多環式環状化合物であるクラウンエーテルやクリプタンドのアルカリ金属イオン捕捉能が発見されて以来^{1)~5)}、分子認識の概念は化学研究の新分野、ホストゲストの化学として広く普及してきた^{6)~8)}。また、シクロデキストリン、シクロファン、大環状ポリアミンなどの環状化合物もホスト



トゲストの化学において注目されてきた^{9)~16)}。このように、環状化合物がホストゲストの化学で注目された理由として、環状化合物が直鎖状化合物と比べ立体構造が制約されるため、基質分子の認識に必要な相補的な立体構造や電子構造をデザインしやすいことが挙げられる。

一方、上記の人工化合物以外にも、生体内分子であるアミノ酸や化学修飾を施したアミノ酸を用いて作られた環状ペプチドも、分子認識場や反応場を提供する機能性分子として期待できる。環状ペプチドは、天然のものとして抗生物質の中に見出され、人工分子としてもイオンの膜輸送や分子認識等に関するユニークな機能などが注目されてきた。

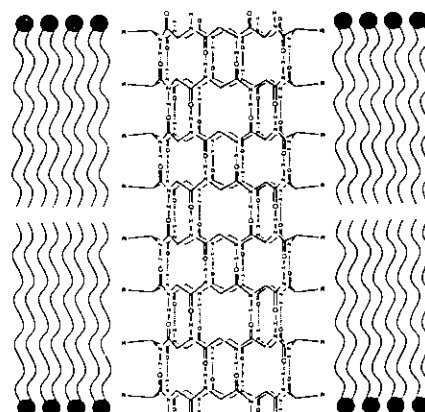
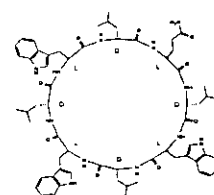
ペプチドを機能性分子の構成単位として用いる利点としては、アミノ酸配列を自由にコントロールし合成することができ、さらに非天然アミノ酸も配列中に組み込めることが挙げられる。ペプチド自動合成機の発達により、数十から数百残基の構造や長さの異なるペプチドを容易に合成することができるため、生体機能性物質¹⁷⁾としてのみならず、機能性材料の有用な構成要素としても大きな期待が

寄せられている^{18)~20)}。天然および非天然のアミノ酸を用いて作成した環状ペプチドも、配列や環サイズの異なるものを作成することが可能であり、分子認識や金属イオンの捕捉等の場を提供する可能性を秘めた有用な機能性分子であると考えられる。しかし、環状ペプチドの機能性分子としての研究は立ち遅れていた。その理由として、環サイズの比較的小さい天然の環状オリゴペプチドは、分子内水素結合により内孔がふさがりため有効なゲスト分子捕捉場をデザインすることが困難であったこと、また、アミド結合に由来する立体的制約により環化反応が一般的には容易でないことなどが挙げられる。

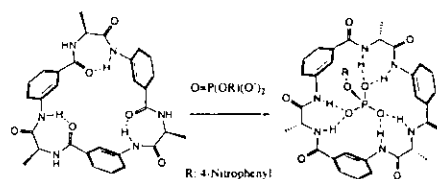
このような状況でありながら、最近大変興味深い機能性環状ペプチドがいくつか報告されている。例えば、Ghadiri らは、D型アミノ酸や非天然のアミノ酸を含んだ環状ペプチドを用いてペプチドのチューブ構造を作製し、脂質二重膜に導入することにより、イオンチャンネルや薬物輸送システムへの応用を試みている^{21)~36)}。また、石田らはメタアミノ安息香酸 (γ -amino acid) を配列中に持つ環状ヘキサペプチドを作成し、パラニトロフェニルリン酸との結合能を検討している^{37)~41)}。さらに、

Göpel らは環状ペプチドを利用し、アミノ酸のエナンチオ選択的分子認識に挑戦している⁴²⁾。

天然のアミノ酸の中には、システインのチオール基、ヒスチジンのイミダゾール基、チロシンのフェノール性水酸基のように、金属イオンに配位できる側鎖を有するものはいくつかある。実際に、これらのアミノ酸は、金属酵素の活性中心や金属タンパク質の構造因子として重要な役割を果たしている。金属イオンに結合できるアミノ

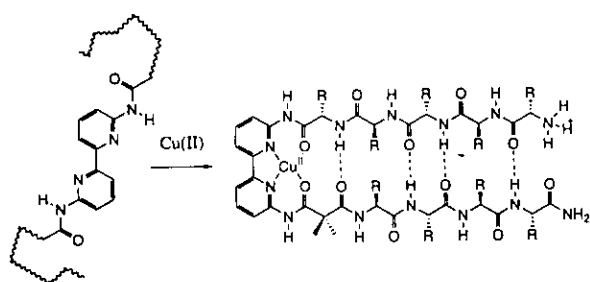


Ghadiri (1994)
Ion channel

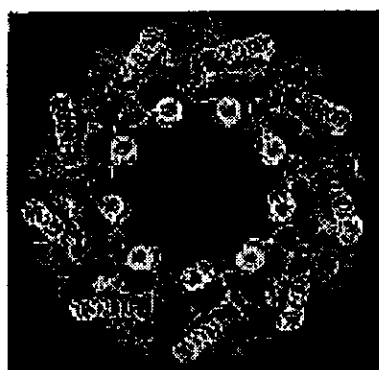


Ishida (1995)
Molecular recognition

酸を配列中に組み込むことにより、ペプチド中に金属イオンや金属錯体を導入することができ、人工の機能分子を構築するための有用な方法になると考えられる。金属イオンや金属錯体は、有機分子にはない構造および機能上の特性を有している。例えば、酸化還元、磁性、光物性やルイス酸性といった反応性に関する特性や、さらには、機能性配位子の固定や集積化を様々な立体化学的様式で行うことができるといった機能を有する。ペプチドと金属イオンを融合した例としては、



Kelly (1995)
Protein folding model



Isaacs (1995)
Cyclic array of metal centers

KellyやImperialiらのタンパク質のフォールディングモデルが挙げられる^{43~49)}。

ここでは、金属配位子をペプチドに組み込むことにより、金属イオン誘起型フォールディングが実現されている。また、Scriminらは、複数の金属錯体を持つペプチドをリン酸基転移反応の触媒として利用することに成功している⁵⁰⁾。さらに、Isaacsらは、生体内でポルフィリン錯体がタンパク質をテンプレートとして環状に集積化し、光アンテナ機能を発現していることをつきとめている⁵¹⁾。

このように、ペプチドおよび金属錯体は、機能分子を構築する上で極めて有用な構成単位であり、ペプチド上に複数の金属錯体を導入したメタロペプチドをデザインすることが可能である。筆者は、環状ペプチドと金属錯体を構造融合した環状メタロペプチドが、分子認識場や不斉反応場等を提供する機能性分子になりうると考えた。そこで、環状ペプチド骨格上に金属錯体を集積化する新しい方法として、金属錯体を側鎖にもつペプチドの合成法、および金属錯体を含む直鎖状ペプチドの環化法の開発研究に着手した。

ペプチドの環化反応は直鎖状のものと同様に液相法や固相法により行われ、分子内縮合を促進するため一般的には高希釈条件下で行われる。ペプチドの環化反応は、目的とする単量体環化物以外に多量体環化物も副生しやすい。このため、環化収率が低いケースが多く見られ、一般性の高い手法の開発が強く望まれている。金属錯体を含むペプチドの環化反応については、知る限り報告例がない。本研究では、環状メタロペプチドの新しい合成法を開発することに成功した。

2. 目的

環状化合物群の一つである、環状ペプチドは、その配列および大きさを自由に変えることができることから、様々なタイプの分子認識や金属イオン捕捉等の機能構築が可能であると考えられる。一方、金属錯体は有機分子にない構造および機能上の特性を有している。筆者は、これら金属錯体および環状ペプチドを構造的に融合することにより、複数の金属錯体が環状ペプチド上に集積した環状メタロペプチドを構築できることに注目した。環状メタロペプチドを作成する方法として、環状ペプチド上に金属錯体を導入する方法、あるいは、金属錯体を含む直鎖状ペプチドを環化する方法が考えられる。前者の方法では、天然環状ペプチドの合成は収率が低い場合が多いため、環状ペプチドを合成してから金属錯体を導入する方法は効率が良くない。金属錯体を導入した直鎖状ペプチドを合成し、それを環化する後者の方法がより有効であると考えた。

本研究では、直鎖および環状ペプチド上に複数の金属錯体を導入する合成法を開発することを目的とし、複数の金属錯体を導入した直鎖状ペプチドの合成と、それを環化することによる環状メタロペプチドの合成、およびその宿主化合物としての機能性について検討した。

具体的には、金属配位能を有するシステインを配列中にもつペプチド上に、DNA 結合能や光応答機能をもつターピリジン白金 (II) 錯体 (terpyPt^{II}) を配列した直鎖状メタロペプチドを合成し、引き続き、環状メタロペプチドへの環化反応を試みた。合成した環状メタロペプチドの分子認識能、および金属錯体の除去についても検討した。

第3章 環状メタロペプチドの合成

Cyclic metallopeptides, cyclo[Gly-L-Cys(terpyPt^{II})]_nCl_n

Kentaro Tanaka, Kazuki Shigemori and Mitsuhiro Shionoya

Chem. Commun., **1999**, 2475-2476.

**Incorporation and Alignment of Functional Metal Complexes
onto Cyclopeptide Frameworks**

Kazuki Shigemori, Kentaro Tanaka, Sachiko Arie,

Sanae Furusho and Mitsuhiro Shionoya

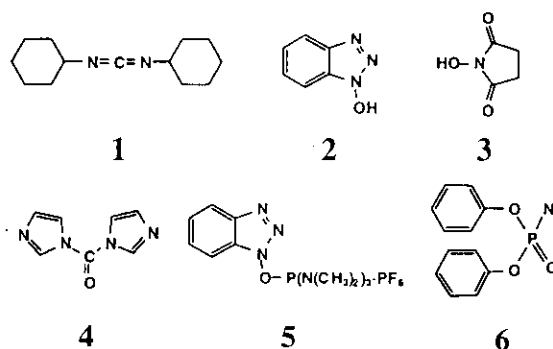
in preparation.

3-1. 緒言

ペプチドの一般的な合成法には、大きく分けて二種類の方法がある⁵²⁾。一つは溶液中で縮合する液相法である。この方法の利点は、粗生成物の精製が容易であり、純度の高い目的物を得ることができる点にある。しかしながら、ペプチドはそのアミノ酸配列が長くなるにつれ溶媒への溶解性が低下するため、長鎖のペプチド合成には一般的に適していない。もう一つは、自動合成機等で使用されている固相法である。固相法とは、レジンと呼ばれる不溶性支持体にアミノ酸を結合させ、ペプチドを伸長させる方法である。この方法の利点としては、操作が簡便であり、長鎖のペプチド合成に利用でき、合成したペプチドレジン(粗生成物)の収量が高いことが挙げられる。しかし、レジンを取り除くまで精製ができないため、合成途中で純度を確認できないという問題点がある。

最も頻繁に用いられる縮合剤としては、ジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC: 1)が挙げられる。通常のペプチド合成では、この縮合剤が用いられているが、ほとんどのアミノ酸が縮合時にラセミ化を起こすため、ラセミ化防止のために活性化剤が併用されている。活性化剤としては、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール(HOBT: 2)やN-ヒドロキシスクシンイミド(HONSu: 3)等があり、ラセミ化防止と縮合の反応速度を上げるために

縮合剤と合わせて用いられている。また、この他にも縮合剤としてカルボジイミダゾール(CDI: 4)、BOP試薬(5)やジフェニルホスホリルアジド(DPPA: 6)等が使われている。



環状ペプチドの合成についても、直鎖状ペプチドと同様の縮合剤・活性化剤が使用される。しかし、環状ペプチド合成においては、目的物である単量環化物以

外に、分子間で縮合した二量体やそれ以上の多量体が副生されるため、高希釈条件下で反応が行われている。しかし、この条件下においても分子内環化に有利なコンホメーションをとることができず、その結果、分子間反応によるオリゴマーの副生が優先し、環状ペプチドの収率が低くなることが多い。環状ペプチドを簡便に作成できる新しい合成法を開発することは、ペプチド化学における重要な課題の一つである。

本研究は、直鎖および環状ペプチド上に複数の金属錯体を導入する合成法を開発することを目的とした。金属に配位する側鎖を有するアミノ酸を複数もつペプチドを自動合成機により合成し、複数の金属錯体を導入することにより直鎖状メタロペプチドを合成した。ペプチド上に金属錯体を導入した直鎖状メタロペプチドを液相法により縮合し、環状メタロペプチドの合成を試みた。

本章では、金属錯体を導入した直鎖状メタロペプチドの合成、水溶液中での環状メタロペプチドの合成、およびその化学的性質について述べる。さらに、合成した環状メタロペプチドからの金属錯体の除去についても報告する。

3-2. メタロペプチドのデザイン

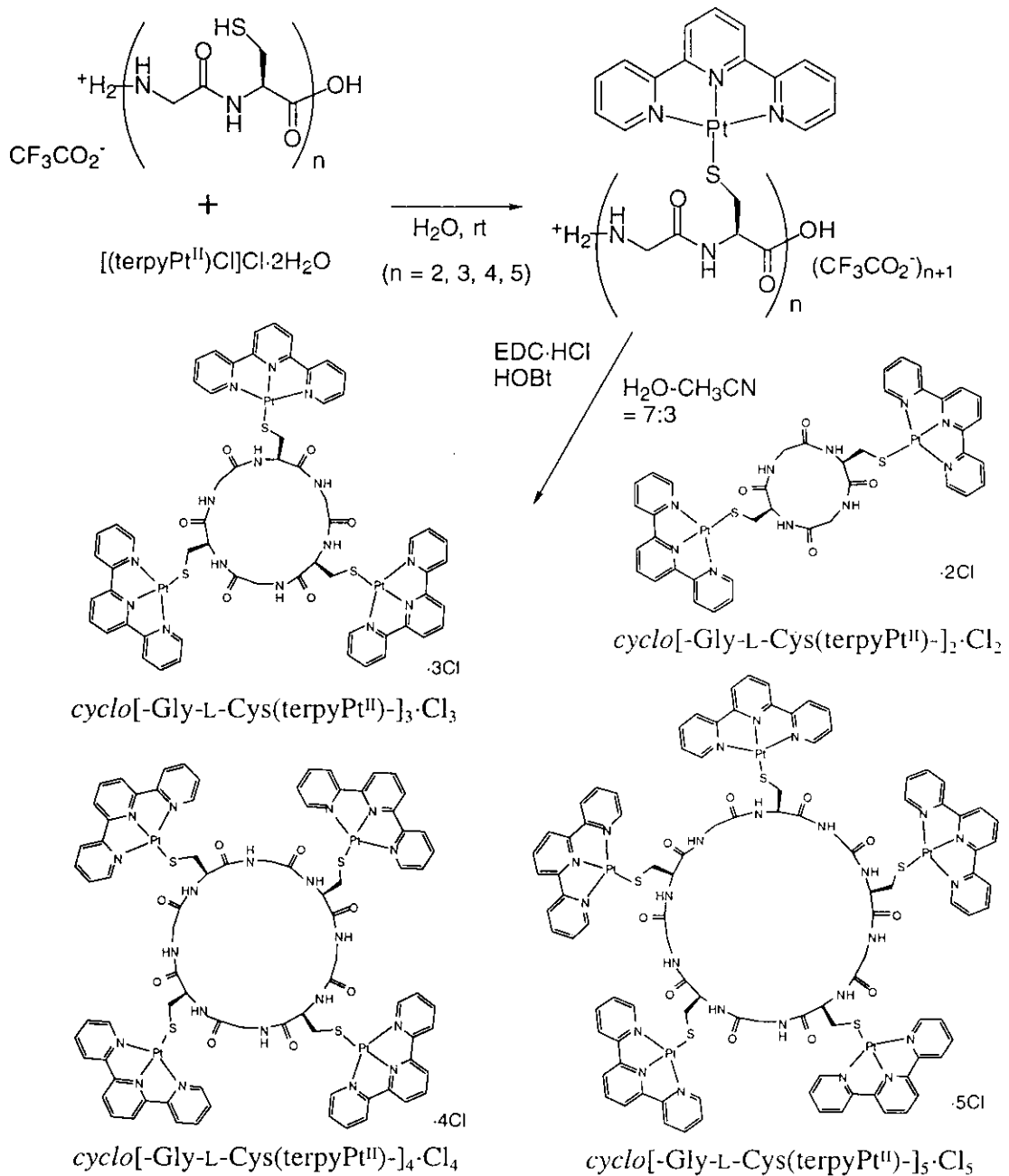
ターピリジン白金 (II) 錯体 ($[\text{terpyPt}^{\text{II}}\text{Cl}]\text{Cl}$) は、可視部に蛍光を発する物質であり、DNA 結合能を有することから制ガン剤として期待されてきた^{53)~55)}。terpyPt^{II} に L-Cys のチオールが配位した $[\text{L-Cys}(\text{terpyPt}^{\text{II}})]^+$ もまた、DNA 結合能を有する制ガン剤として注目されてきた。このアミノ酸が結合した金属錯体 $[\text{L-Cys}(\text{terpyPt}^{\text{II}})]^+$ は 2 価のカチオンである白金イオン (Pt^{2+}) に L-Cys のチオレートアニオン (S) が配位しているため、1 価の正電荷を持つ金属錯体である。複数の L-Cys を有するペプチドを作成することにより、ペプチド骨格上に複数の terpyPt^{II} を導入することが可能である。複数の terpyPt^{II} を導入したメタロペプチドは、この金属錯体の性質を利用した DNA の多点認識や、金属イオンによる静電的相互作用やターピリジンによる疎水的相互作用を利用した分子認識能を有する機能性分子になりうると考えた。

三座配位子である terpy は、立体的に嵩高い含窒素芳香族化合物である。この金属錯体を複数有する直鎖状ペプチドは、金属錯体間の静電的反発と立体反発により、環状メタロペプチドへの環化に適した構造をとると期待し、この $[\text{L-Cys}(\text{terpyPt}^{\text{II}})]^+$ を配列中に持つメタロペプチドの合成に着手した。

ペプチド骨格上に金属錯体を規則正しく並べるためには、金属に配位する側鎖を有するアミノ酸をペプチド中に規則正しく配列する必要がある。ペプチドはその配列や長さを自由に設定し合成する手法が確立している。そこで最初に、 $[\text{L-Cys}(\text{terpyPt}^{\text{II}})]^+$ が単純に並んだ配列をデザインした。しかしながら、この配列は、立体的に嵩高い金属錯体が近接するために合成することができなかった。この結果を考慮し、次に、二つの L-Cys の間に Gly をスペーサーとして組み込んだ L-Cys と Gly の繰り返し配列を持つペプチドをデザインした。このペプチドに terpyPt^{II} を導入することにより、terpyPt^{II} をペプチド中に整列させた直鎖状メタロ

ペプチドを合成し、環状メタロペプチドの合成を試みた。

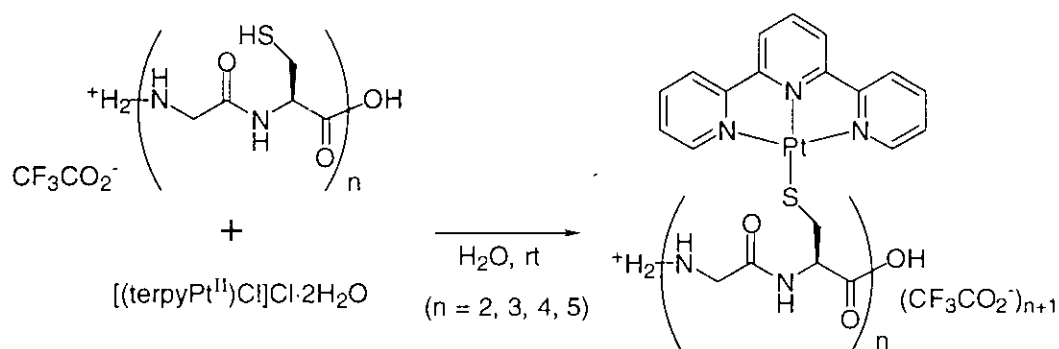
具体的には、L-Cys と Gly の繰り返し配列を持つペプチド $H_2-(-Gly-L-Cys-)_n-OH \cdot CF_3CO_2^-$ ($n = 2, 3, 4, 5$) を合成し、次に $terpyPt^{II}$ を L-Cys のチオール基上に導入することにより、ペプチド上に金属錯体が規則正しく整列した直鎖状メタロペプチド $H_2-[-Gly-L-Cys(terpyPt^{II})-]_n-OH \cdot (CF_3CO_2^-)_{n+1}$ ($n = 2, 3, 4, 5$) の合成を行った。この直鎖状メタロペプチドを水-アセトニトリル (7:3) 中で水溶性縮合剤 (EDC·HCl) および、活性化剤 (HOBt) を用いて環化することにより、環状メタロペプチド $cyclo[-Gly-L-Cys(terpyPt^{II})-]_n \cdot Cl_n$ ($n = 2, 3, 4, 5$) の合成を試みた。



3-3. ペプチド側鎖への金属錯体の導入

3-3-1. 実験の部

金属に配位するチオール基を有する L-Cys と Gly の繰り返し配列を持つオリゴペプチドを合成し、次に terpyPt^{II} 錯体を導入することにより、直鎖状メタロペプチドの合成を行った。



a) 試薬・機器について

ペプチドはペプチド自動合成機 (Model 433A, PE Applied Biosystems) により、H-Cys(Trt)-2-ClTrt resin (04-12-2811, Calbiochem-Novabiochem AG) を用いて合成した。ペプチドカートリッジ (Fmoc-L-Cys(Trt)-OH and Fmoc-Gly-OH) は PE Applied Biosystems 製を使用し、エタンジチオール (EDT)、TFA および CH₃CN は和光純薬製をそのまま使用した。*t*Bu-Me ether は東京化成、[(terpyPt^{II})Cl]Cl·2H₂O は Aldrich 製をそのまま使用した。

高速液体クロマトグラフィー (HPLC) は、TOSO HPLC システムを使用した。カラムは、TSK-gel 80Ts (21.5 mmID x 30 cm, TOSO) を使用し、溶媒 0.1 % TFA 含有 H₂O-CH₃CN = 7:3、流速 5 ml/min、カラム温度 25 °C で行った。検出には UV (235 nm) を用いた。

遠心機は、トミー精工製の LC-120 を使用した。

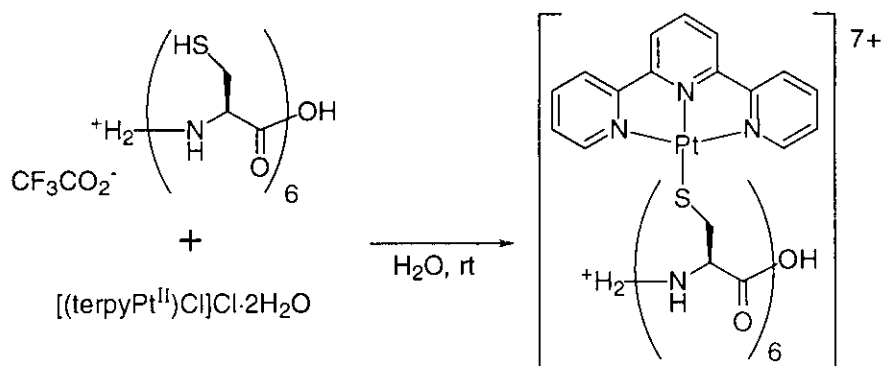
¹H NMR は JEOL Lambda 500 (500 MHz for ¹H) および Burkert (500 MHz for ¹H) を

使用し、D₂O 溶液のスペクトルの標準物質には TSP を外部標準として用いた。化学シフト (δ) は ppm で表し、シグナルの開裂パターンを s (singlet)、d (doublet)、dd (doublet of doublet)、ddd (doublet of doublet of doublet)、t (triplet)、m (multiplet)、br (broad) で表記した。カップリング定数 J は Hz で表記した。

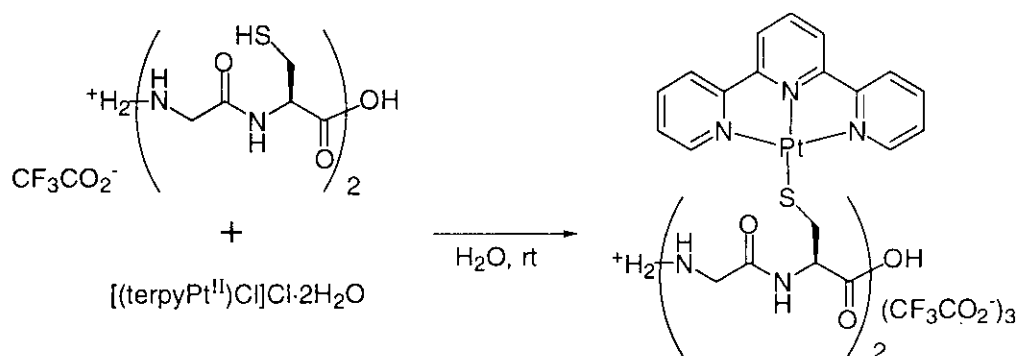
エレクトロスプレーイオン化マススペクトル (ESIMS) は、パーキンエルマー製の PE SCIEX API-300 spectrometer (イオン化法：エレクトロスプレー、質量分析：四重極型質量分析計 (QMS)) と Micromass 社製の Micromass LC-TOF/MS (イオン化法：エレクトロスプレー、質量分析：飛行時間型質量分析計 (TOFMS)) により測定した。マトリクスアシスティドレーザーデソープシオンイオン化マススペクトル (MALDI-TOF) は、BRUKER 製の BIFLEX III (イオン化法：マトリクスアシスティドレーザーデソープシオン、質量分析：飛行時間型質量分析計 (TOFMS)) により測定した。

b) ペプチド自動合成機によるペプチドの合成法

ペプチド自動合成機 (Model 433A, PE Applied Biosystems) の Fast moc 法 (0.23 mmol - 0.25 mmol スケール) により、それぞれのペプチドレジンを作成した。合成したペプチドレジンに 30 ml のナスフラスコに入れ氷浴で冷やし、そこに 8 ml の TFA と 2 ml のエタンジチオールを加えた。室温に戻し攪拌しながら 2 時間反応した。反応終了後、反応溶液中に不溶物として残ったレジンと保護基である Trt 基を除去するため濾過した。反応容器は 1 ml の TFA で洗った。濾過はアスピレーターにより行い、濾過鐘を用い、ハイターを入れた吸引ピンでトラップした。濾液は 50 ml の遠沈管で受け、30 ml の *t*Bu-Me ether をあらかじめ入れておきペプチドを析出させた。さらに、10 ml の *t*Bu-Me ether を加え 50 ml とし、遠心 (3,000 rpm \times 10 min) を行った。ペプチドを沈殿させた後、上清を取り除き、50 ml の *t*Bu-Me ether を加えて攪拌し再び遠心 (3,000 rpm \times 10 min) した。この操作を 3 回行った。

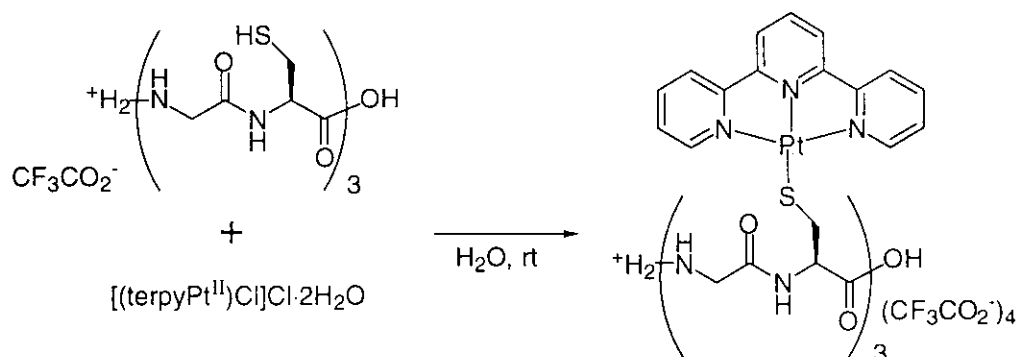
c) ヘキサメタロペプチド $\text{H}_2\text{-[L-Cys(terpyPt}^{\text{II}}\text{)]}_6\text{-OH}$ 合成の試み

ペプチド自動合成機により Fast moc 法 (0.25 mmol スケール) で $\text{H}_2\text{-[L-Cys-]}_6\text{-OH}\cdot\text{CF}_3\text{CO}_2$ を合成し、HPLC により分離精製した。溶出時間 23.5-25 分のピークを分取した後、凍結乾燥し、 $\text{H}_2\text{-[L-Cys-]}_6\text{-OH}\cdot\text{CF}_3\text{CO}_2$ (98 mg, 130 μmol , 52 %) を得た。 $\text{H}_2\text{-[L-Cys-]}_6\text{-OH}\cdot\text{CF}_3\text{CO}_2$ (3.0 mg, 4.7 μmol) を試験管に入れ窒素ガスで置換した。そこへ、 $[(\text{terpyPt}^{\text{II}})\text{Cl}]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (2.5 mg, 4.7 μmol) の橙赤色の水溶液 (100 μl) を加え、室温で攪拌しながら反応させた。溶液の色が濃赤色となったが、ペプチドが完全に溶解していないようであったため、さらに、 $[(\text{terpyPt}^{\text{II}})\text{Cl}]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (2.5 mg, 4.7 μmol) の橙赤色の水溶液 (100 μl) を 3 回追加した。6 個の L-Cys の 4 個分の $\text{terpyPt}^{\text{II}}$ を加えたところ、ペプチドが完全に溶けたため HPLC により反応をみた。free の $\text{terpyPt}^{\text{II}}$ が無くなったのを確認して 5 当量目の $\text{terpyPt}^{\text{II}}$ を加えた (反応開始から 12 時間後)。5 当量目を加えてから、さらに 12 時間攪拌したが原料の $\text{terpyPt}^{\text{II}}$ が無くならなかったため、40 $^{\circ}\text{C}$ の湯浴中で反応させた。5 時間後に原料の $\text{terpyPt}^{\text{II}}$ が無くなっていることを確認し、6 当量目の $\text{terpyPt}^{\text{II}}$ を加え 40 $^{\circ}\text{C}$ の湯浴中で反応させた。2 日間反応をモニターしたが、原料の $\text{terpyPt}^{\text{II}}$ が無くならず変化がなかったため、反応を止め、HPLC により分離精製を行った。溶出時間 14-15 分のピークを分取し、凍結乾燥し濃赤色の固体 15 mg を得た。得られた固体を ESIMS により同定を試みたが、 $\text{terpyPt}^{\text{II}}$ が 5 個あるいは 4 個入ったものの混合物であった。MS (ESI): m/z (Calcd) 533 (533, $[\text{M}]^{6+}$) MS (MALDI-TOF): m/z (Calcd) 3199 (3199, $[\text{M} + 5\text{e}]^+$).

d) テトラメタロペプチド $H_2\text{-[Gly-L-Cys(terpyPt}^{\text{II}}\text{)]}_2\text{-OH}\cdot(\text{CF}_3\text{CO}_2)_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ の合成

ペプチド自動合成機により Fast moc 法 (0.23 mmol スケール) で $H_2\text{-[Gly-L-Cys]}_2\text{-OH}\cdot\text{CF}_3\text{CO}_2$ を合成し、HPLC により分離精製した。溶出時間 17.5-19.5 分のピークを分取した後、凍結乾燥し $H_2\text{-[Gly-L-Cys]}_2\text{-OH}\cdot\text{CF}_3\text{CO}_2$ (63 mg, 140 μmol , 61 %) を得た。 $H_2\text{-[Gly-L-Cys]}_2\text{-OH}\cdot\text{CF}_3\text{CO}_2$ (10.5 mg, 23.2 μmol) の水溶液 (1.5 ml) に $[(\text{terpyPt}^{\text{II}})\text{Cl}]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (34.8 mg, 65.2 μmol) の水溶液 (1.0 ml) を加え、室温で攪拌しながら 24 時間反応させた。反応終了後、HPLC により分離精製を 2 回行った。溶出時間 15.5-19 分のピークを分取し、凍結乾燥した後、濃赤色の固体 $H_2\text{-[Gly-L-Cys(terpyPt}^{\text{II}}\text{)]}_2\text{-OH}\cdot(\text{CF}_3\text{CO}_2)_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (28.5 mg, 17.4 μmol , 75 %) を得た。 $^1\text{H NMR}$ (D_2O , 30 $^\circ\text{C}$): δ 2.92 (dd, $J = 5.0, 12.5$ Hz, 1H), 2.98 (dd, $J = 5.5, 12.0$ Hz, 1H), 3.08 (dd, $J = 7.8, 12.8$ Hz, 1H), 3.31 (dd, $J = 5.0, 12.5$ Hz, 1H), 3.94 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H), 3.98 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H), 4.03 (d, $J = 17.5$ Hz, 1H), 4.13 (d, $J = 17.5$ Hz, 1H), 4.45 (dd, $J = 5.3, 5.3$ Hz, 1H), 4.59 (dd, $J = 5.3, 7.8$ Hz, 1H), 7.61 (ddd, $J = 1.1, 5.9, 7.4$ Hz, 2H), 7.70 (ddd, $J = 1.4, 5.9, 7.4$ Hz, 2H), 7.87 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H), 7.89 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 8.02 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H), 8.09 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H), 8.12 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 8.15-8.19 (m, 4H), 8.38 (t, $J = 8.3$ Hz, 1H), 8.63 (d, $J = 5.5$ Hz, 2H), 9.05 (d, $J = 4.5$ Hz, 2H). MS (ESI): m/z (Calcd) 596 (596, $[\text{M}]^{2+}$), 1191 (1191, $[\text{M} - \text{H}^+]^+$). Anal. Calcd for $\text{C}_{46}\text{H}_{51}\text{F}_9\text{N}_{10}\text{O}_{17}\text{Pt}_2\text{S}_2$: C, 33.66; H, 3.13; N, 8.53. Found: C, 33.54; H, 3.25; N, 8.65.

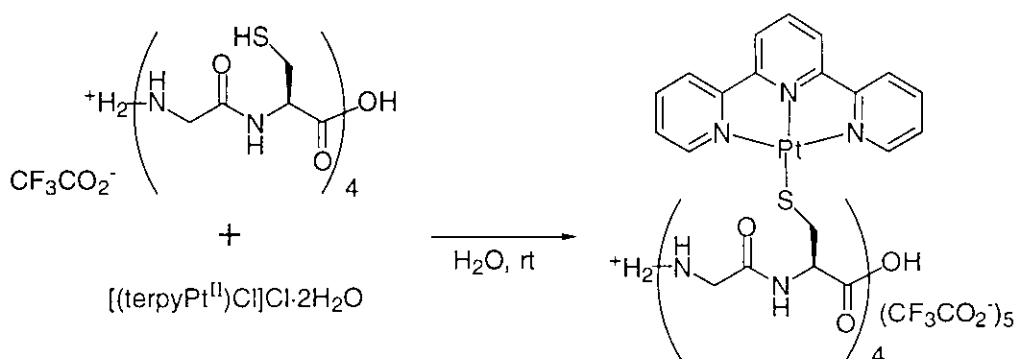
e) ヘキサメタロペプチド $\text{H}_2\text{-[Gly-L-Cys(terpyPt}^{\text{II}}\text{)]}_3\text{-OH}\cdot(\text{CF}_3\text{CO}_2)_4\cdot 14\text{H}_2\text{O}$ の合成



ペプチド自動合成機により Fast moc 法 (0.25 mmol スケール) で $\text{H}_2\text{-[Gly-L-Cys-]}_3\text{-OH}\cdot\text{CF}_3\text{CO}_2$ を合成し、HPLC により分離精製した。溶出時間 17-19 分のピークを分取した後、凍結乾燥し $\text{H}_2\text{-[Gly-L-Cys-]}_3\text{-OH}\cdot\text{CF}_3\text{CO}_2$ (115 mg, 190 μmol , 63 %) を得た。 $\text{H}_2\text{-[Gly-L-Cys-]}_3\text{-OH}\cdot\text{CF}_3\text{CO}_2$ (21.7 mg, 35.4 μmol) の水溶液 (2 ml) に $[(\text{terpyPt}^{\text{II}})\text{Cl}]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (68.2 mg, 127.4 μmol) の水溶液 (0.5 ml) を加え、室温で攪拌しながら 5 時間反応させた。反応終了後、HPLC による分離精製を 2 回行った。溶出時間 15-17 分のピークを分取し、凍結乾燥した後、濃赤色の固体 $\text{H}_2\text{-[Gly-L-Cys(terpyPt}^{\text{II}}\text{)]}_3\text{-OH}\cdot(\text{CF}_3\text{CO}_2)_4\cdot 14\text{H}_2\text{O}$ (77.5 mg, 31.2 μmol , 88 %) を得た。

$^1\text{H NMR}$ (D_2O , 30 $^\circ\text{C}$): δ 2.76 (dd, $J = 5.7, 12.8$ Hz, 1H), 2.83 (dd, $J = 4.3, 12.6$ Hz, 1H), 3.04 (d, $J = 5.6$ Hz, 2H), 3.18 (dd, $J = 7.3, 11.5$ Hz, 1H), 3.45 (dd, $J = 6.1, 11.5$ Hz, 1H), 3.83 (d, $J = 17.6$ Hz, 1H), 3.87 (d, $J = 16.9$ Hz, 1H), 3.94 (d, $J = 16.2$ Hz, 1H), 4.05 (d, $J = 17.1$ Hz, 1H), 4.12 (d, $J = 17.1$ Hz, 1H), 4.27 (d, $J = 17.3$ Hz, 1H), 4.40 (dd, $J = 5.0, 5.0$ Hz, 1H), 4.50 (dd, $J = 6.7, 6.7$ Hz, 1H), 4.54 (t, $J = 5.6$ Hz, 1H), 7.55 (dd, $J = 6.6, 6.6$ Hz, 2H), 7.59 (dd, $J = 6.6, 6.6$ Hz, 2H), 7.64 (dd, $J = 6.6, 6.6$ Hz, 2H), 7.71 (d, $J = 7.6$ Hz, 2H), 7.77 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 7.79 (d, $J = 9.6$ Hz, 2H), 7.82 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H), 7.90 (d, $J = 7.9$ Hz, 2H), 8.01 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H), 8.05-8.13 (m, 8H), 8.29 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H), 8.58 (d, $J = 5.4$ Hz, 2H), 8.62 (br, 2H), 8.97 (d, $J = 5.6$ Hz, 2H). MS (ESI): m/z (Calcd) 593 (593, $[\text{M}]^{3+}$), 889 (889, $[\text{M} - \text{H}^+]^{2+}$). Anal. Calcd for $\text{C}_{68}\text{H}_{85}\text{F}_{12}\text{N}_{15}\text{O}_{29}\text{Pt}_3\text{S}_3$: C, 32.85; H, 3.44; N, 8.45. Found: C, 32.65; H, 3.00; N, 8.59.

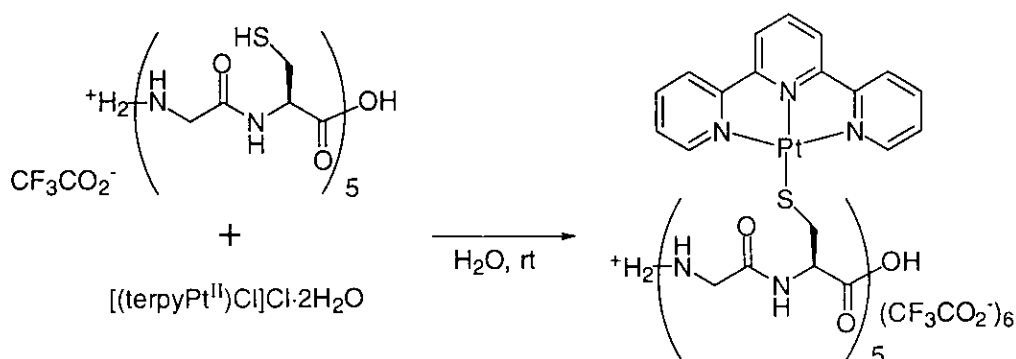
f) オクタメタロペプチド $\text{H}_2\text{-[Gly-L-Cys(terpyPt}^{\text{II}}\text{)]}_4\text{-OH}\cdot(\text{CF}_3\text{CO}_2)_5\cdot 18\text{H}_2\text{O}$ の合成



ペプチド自動合成機により Fast moc 法 (0.25 mmol スケール) で $\text{H}_2\text{-[Gly-L-Cys-]}_4\text{-OH}\cdot\text{CF}_3\text{CO}_2$ を合成し、HPLC により分離精製した。溶出時間 18.5-19.5 分のピークを分取した後、凍結乾燥し $\text{H}_2\text{-[Gly-L-Cys-]}_4\text{-OH}\cdot\text{CF}_3\text{CO}_2$ (80 mg, 100 μmol , 40 %) を得た。 $\text{H}_2\text{-[Gly-L-Cys-]}_4\text{-OH}\cdot\text{CF}_3\text{CO}_2$ (7.2 mg, 9.3 μmol) の水溶液 (1 ml) に $[(\text{terpyPt}^{\text{II}})\text{Cl}]\text{Cl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (23.9 mg, 44.6 μmol) の水溶液 (0.2 ml) を加え、室温で攪拌しながら 24 時間反応させた。反応終了後、HPLC による分離精製を行った。溶出時間 14.5-17 分のピークを分取し、凍結乾燥した後、濃赤色の固体 $\text{H}_2\text{-[Gly-L-Cys(terpyPt}^{\text{II}}\text{)]}_4\text{-OH}\cdot(\text{CF}_3\text{CO}_2)_5\cdot 18\text{H}_2\text{O}$ (29.4 mg, 9.0 μmol , 97 %) を得た。

$^1\text{H NMR}$ (D_2O , 30 $^\circ\text{C}$): δ 2.75 (dd, $J = 4.7, 13.2$ Hz, 1H), 2.88 (dd, $J = 3.9, 13.0$ Hz, 1H), 2.95 (dd, $J = 5.6, 13.0$ Hz, 1H), 3.01 (dd, $J = 4.9, 12.9$ Hz, 1H), 3.29-3.39 (m, 3H), 3.52 (dd, $J = 4.5, 12.1$ Hz, 1H), 3.75 (d, $J = 17.4$ Hz, 1H), 3.85 (d, $J = 16.4$ Hz, 1H), 3.91 (d, $J = 17.1$ Hz, 1H), 3.94 (d, $J = 16.4$ Hz, 1H), 4.05 (d, $J = 17.1$ Hz, 1H), 4.11 (d, $J = 17.1$ Hz, 1H), 4.29 (d, $J = 17.4$ Hz, 1H), 4.40 (t, $J = 4.3$ Hz, 1H), 4.49-4.58 (m, 4H), 7.59-7.69 (m, 14H), 7.71 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H), 7.84 (d, $J = 7.8$ Hz, 2H), 7.88 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H), 7.95 (d, $J = 7.3$ Hz, 2H), 7.99-8.15 (m, 13H), 8.34 (t, $J = 8.1$ Hz, 1H), 8.62 (d, $J = 5.2$ Hz, 2H), 8.76 (d, $J = 5.1$ Hz, 2H), 8.82 (d, $J = 4.4$ Hz, 2H), 8.99 (d, $J = 4.4$ Hz, 2H). MS (ESI): m/z (Calcd) 592 (592, $[\text{M}]^{4+}$), 711 (711, $[\text{M} - \text{H}^+ - \text{terpy}]^{3+}$), 789 (789, $[\text{M} - \text{H}^+]^{3+}$). Anal. Calcd for $\text{C}_{90}\text{H}_{111}\text{F}_{15}\text{N}_{20}\text{O}_{37}\text{Pt}_4\text{S}_4$: C, 33.17; H, 3.43; N, 8.60. Found: C, 32.84; H, 2.89; N, 9.04.

g) デカメタロペプチド $\text{H}_2\text{-[Gly-L-Cys(terpyPt}^{\text{II}}\text{)]}_5\text{-OH}\cdot(\text{CF}_3\text{CO}_2)_6\cdot 18\text{H}_2\text{O}$ の合成



合成機により合成したペプチドレジン $\text{H-[Gly-L-Cys(Trt)]}_5\text{-2-ClTrt resin}$ (154 mg, 0.041 mmol) を 30 ml のナスフラスコに入れ氷浴で冷やし、そこに 8 ml の TFA と 2 ml のエタンジチオールを加えた。室温に戻し攪拌しながら 2 時間反応した。反応終了後、濾過を行い、反応容器は 1 ml の TFA で洗った。濾過はアスピレーターにより行い、濾過鐘を用い、ハイターを入れた吸引ピンでトラップした。濾液は 50 ml の遠沈管で受け、30 ml の *t*Bu-Me ether をあらかじめ入れておきペプチドを析出させた。さらに、10 ml の *t*Bu-Me ether を加え 50 ml とし、遠心 (3,000 rpm × 10 min) をおこなった。ペプチドを沈殿させた後、上清を取り除き、50 ml の *t*Bu-Me ether を加えて攪拌し再び遠心 (3,000 rpm × 10 min) した。この操作を 5 回行った。上清を取り除いた白色沈殿に [Pt(terpy)Cl]Cl·2H₂O (130 mg, 0.24 mmol) を 2.5 ml の H₂O に溶解し加えた。加えた直後の反応液は橙赤色であり、ペプチドも溶解残りが見られた。5 時間ほど攪拌したところ溶解残りの沈殿はなくなり、溶液は濃赤色になっていた。36 時間後、HPLC のチャートに変化が見られなくなったため、反応容器を 50 °C の湯浴につけて反応を続けた。72 時間後、HPLC のピークがシャープになり変化が見られなくなったため、CH₃CN (50 ml) を加えて直鎖状メタロペプチドを析出させた。遠心機 (3,000 rpm × 10 min) により濃赤色固体を沈殿させた。上清を取り除き沈殿物を 0.1 % TFA 含有 H₂O-CH₃CN = 7:3 に溶解し、HPLC により分取精製を 3 回行った。溶出時間 13-16 分のピークを分取し、凍結乾燥した後、濃赤色の固体 $\text{H}_2\text{-[Gly-L-Cys(terpyPt}^{\text{II}}\text{)]}_5\text{-OH}\cdot(\text{CF}_3\text{CO}_2)_6\cdot 18\text{H}_2\text{O}$ (89.5

mg, 55 %) を得た。 $^1\text{H NMR}$ (D_2O , $30\text{ }^\circ\text{C}$): δ 2.72-2.32 (m, 10H), 3.71 (d, $J = 17.4$ Hz, 1H), 3.77 (d, $J = 16.3$ Hz, 1H), 3.85 (d, $J = 16.4$ Hz, 1H), 3.94-4.05 (m, 4H), 4.09 (d, $J = 17.0$ Hz, 1H), 4.23 (d, $J = 17.4$ Hz, 1H), 4.26 (d, $J = 17.3$ Hz, 1H), 4.47 (dd, $J = 4.3, 4.3$ Hz, 1H), 4.50-4.57 (m, 4H), 7.62-7.68 (m, 12H), 7.74 (d, $J = 7.9$ Hz, 2H), 7.78-7.83 (m, 10H), 7.91 (d, $J = 7.9$ Hz, 2H), 7.98 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H), 8.01 (d, $J = 7.9$ Hz, 2H), 8.04-8.18 (m, 13H), 8.22 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H), 8.34 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H), 8.76 (br, 2H), 8.81 (br, 6H), 8.96 (d, $J = 5.8$ Hz, 2H). High-resolution Mass Spectroscopy (HRMS): m/z (Calcd) 591.0589 (591.0832, $[\text{M}]^{5+}$), 738.5941 (738.6002, $[\text{M} - \text{H}^+]^{4+}$), 984.4667 (984.4672, $[\text{M} - 2\text{H}^+]^{3+}$). Anal. Calcd for $\text{C}_{112}\text{H}_{129}\text{F}_{18}\text{N}_{25}\text{O}_{41}\text{Pt}_5\text{S}_5$: C, 33.97; H, 3.28; N, 8.84. Found: C, 33.96; H, 3.17; N, 8.93.

3-3-2. 結果・考察

まず最初に、金属に配位するチオール基を有する L-Cys のみで構成されたヘキサペプチド $\text{H}-(\text{-L-Cys-})_6\text{-OH}$ を合成し、 $\text{terpyPt}^{\text{II}}$ をチオール残基に導入することを試みた。しかし、 $\text{terpyPt}^{\text{II}}$ は正電荷を持ち立体的に嵩高い金属錯体であり、L-Cys のみで構成されたヘキサペプチド上のすべてのチオール基に導入することはできなかった。 $\text{terpyPt}^{\text{II}}$ が 5 個あるいは 4 個がペプチド上に導入されたものの混合物を得たが、HPLC で精製し単離することができなかった。金属錯体間に生じる静電的な反発と立体障害により、すべてのチオール基上に金属錯体を導入することが困難であったと考えられる。ESIMS および MALDI-TOFMS により目的物が極微量生成したことが確認できているため、今後、合成の条件および精製分離法の検討が必要である。

L-Cys と Gly の繰り返し配列を持った直鎖状メタロペプチド $\text{H}_2\text{-[Gly-L-Cys(terpyPt}^{\text{II}}\text{)]}_n\text{-OH}\cdot(\text{CF}_3\text{CO}_2)_{n+1}$ ($n = 2, 3, 4$) は、収率良く (75-97 %) 合成することができた (表 3-1)。 $n = 5$ の直鎖状デカメタロペプチド

H₂-[-Gly-L-Cys(terpyPt^{II})]₅-OH の合成は、2 段階で 55 % であった。ここでは、溶解性の問題から、合成機により作成したペプチド H₂-[-Gly-L-Cys-]₅-OH·CF₃CO₂ を精製せず次の反応に進んだ。他のテトラ、ヘキサおよびオクタペプチド H₂-[-Gly-L-Cys-]_n-OH·CF₃CO₂ (n = 2, 3, 4) の精製収率 (40-63 %) を考慮すると、デカペプチドへの金属錯体の導入の収率は良好であると推察された。括弧内に 2 段階の反応収率を示した。

表 3-1

生成物	収率 (%)			
	n = 2	3	4	5
H ₂ -[-Gly-L-Cys-] _n ⁺ -OH·CF ₃ CO ₂	62	63	40	↓
H ₂ -[-Gly-L-Cys(terpyPt ^{II})] _n ⁽ⁿ⁺¹⁾⁺ -OH·(CF ₃ CO ₂) _{n+1}	75 (47)	88 (55)	97 (39)	(55)

ペプチド H₂-[-Gly-L-Cys-]_n-OH·CF₃CO₂ (n = 2, 3, 4) については、レジジンおよび保護基の除去の際に用いたトリフルオロ酢酸 (CF₃CO₂H) により、ペプチドのアミノ基がプロトン化している。また、直鎖状メタロペプチド H₂-[-Gly-L-Cys(terpyPt^{II})]_n-OH·(CF₃CO₂)_{n+1} (n = 2, 3, 4, 5) については、HPLC で用いた溶媒に含まれているトリフルオロ酢酸により、アミノ基がプロトン化し、金属イオンの対アニオンが CF₃CO₂⁻ となっている。

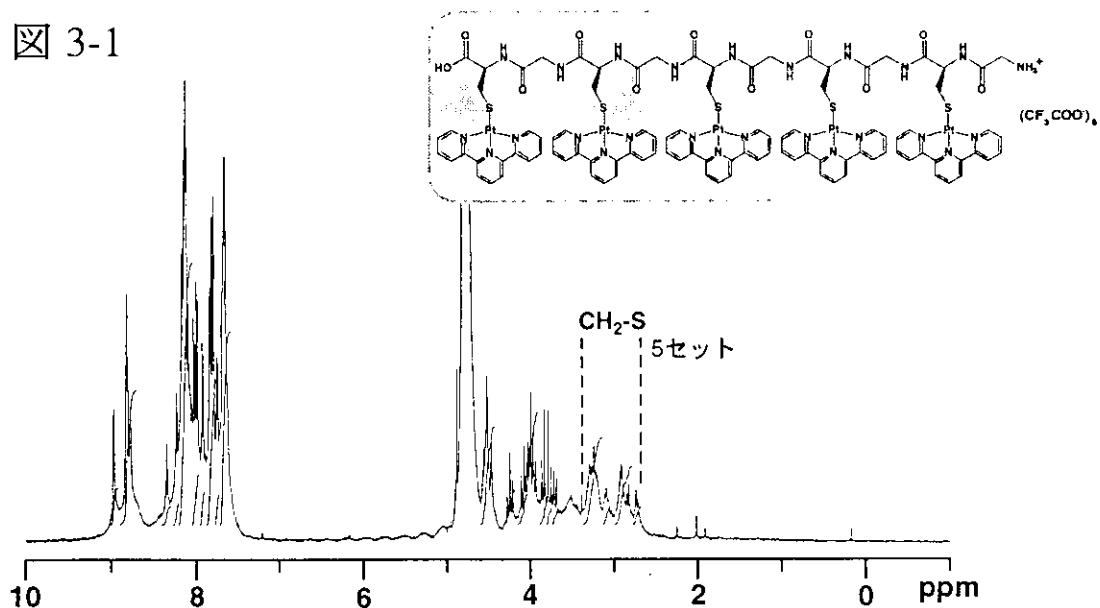
これら直鎖状メタロペプチドの同定は、ESIMS、¹H NMR および元素分析により行った。ESIMS の測定においては、直鎖状メタロペプチドは対アニオンが全くつかない状態で検出される傾向があった。例えば、n = 3 の直鎖状ヘキサメタロペプチドのときは、ほとんどが [M]³⁺ で検出されており、1 つプロトン化された [M + H]²⁺ も見られた。その他に、terpy や terpyPt^{II} がはずれたものも検出された。また、n = 5 の直鎖状デカメタロペプチドは、¹H NMR 測定において芳香環のプロトンが複雑に重なり合っており (図 3-1)、直鎖状デカペプチド上に terpyPt^{II} が 5 つ導

入されているかどうか確認するために、ESI-TOFによる高分解能マススペクトルを測定した(図 3-2 b)。図 3-2 a に同位体分布の理論値を示した。

これらの直鎖状メタロペプチドの ^1H NMR では、いずれの場合も Gly-L-Cys(terpyPt^{II}) ユニットがそれぞれ異なるシグナルを与え、対称性の低いスペクトルが得られた(図 3-3)。例えば、L-Cys のメチレン鎖において説明すると、直鎖状テトラペプチドでは 2 セット観測されており、ヘキサおよびオクタはそれぞれ 3 セットおよび 4 セット観測されている。

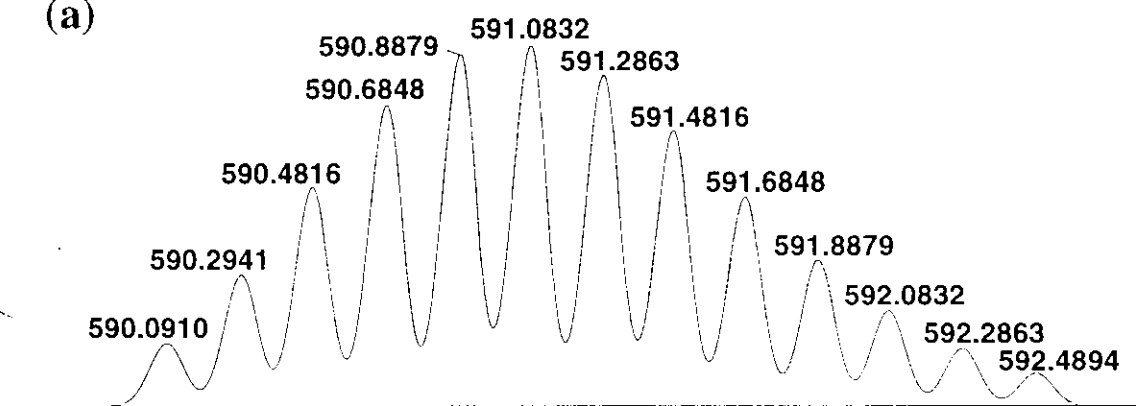
これは、Gly-L-Cys(terpyPt^{II}) ユニットが n 個 ($n = 2, 3, 4, 5$) あるペプチド上で、 n 個の金属錯体がすべて異なる環境下に置かれていることを示唆している。

☒ 3-1

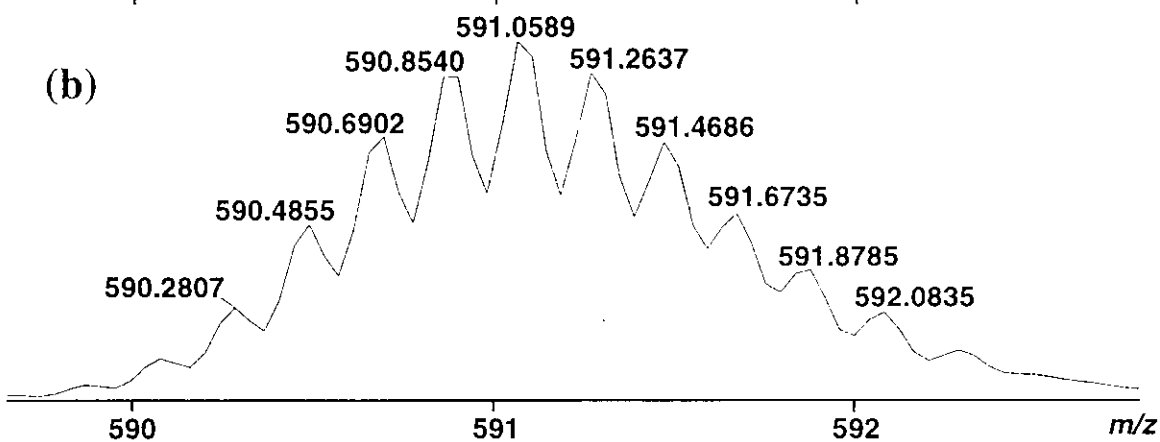


☒ 3-2

(a)



(b)

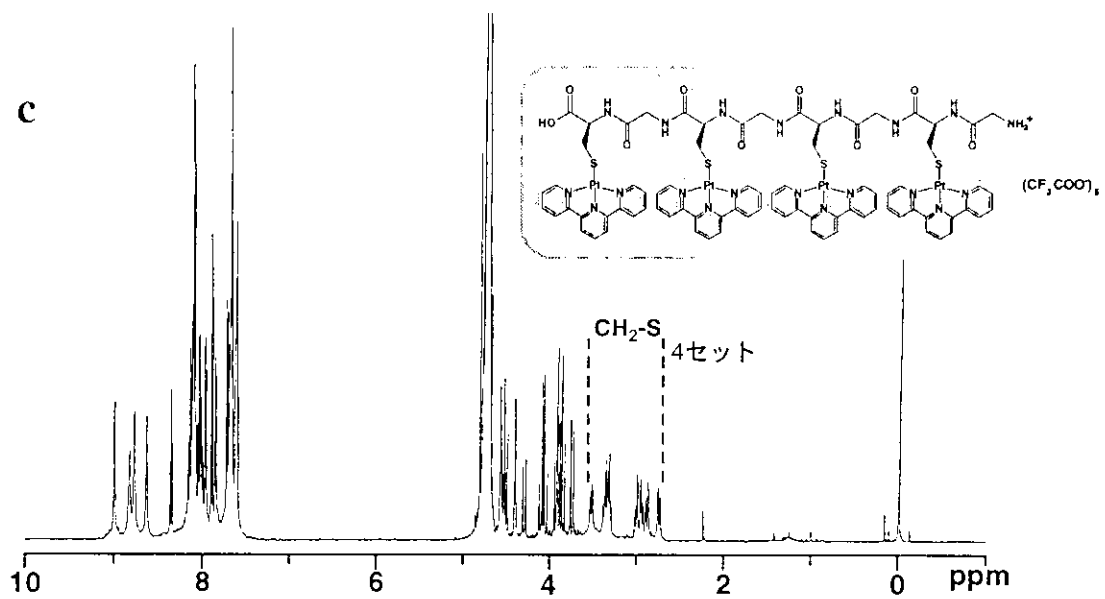
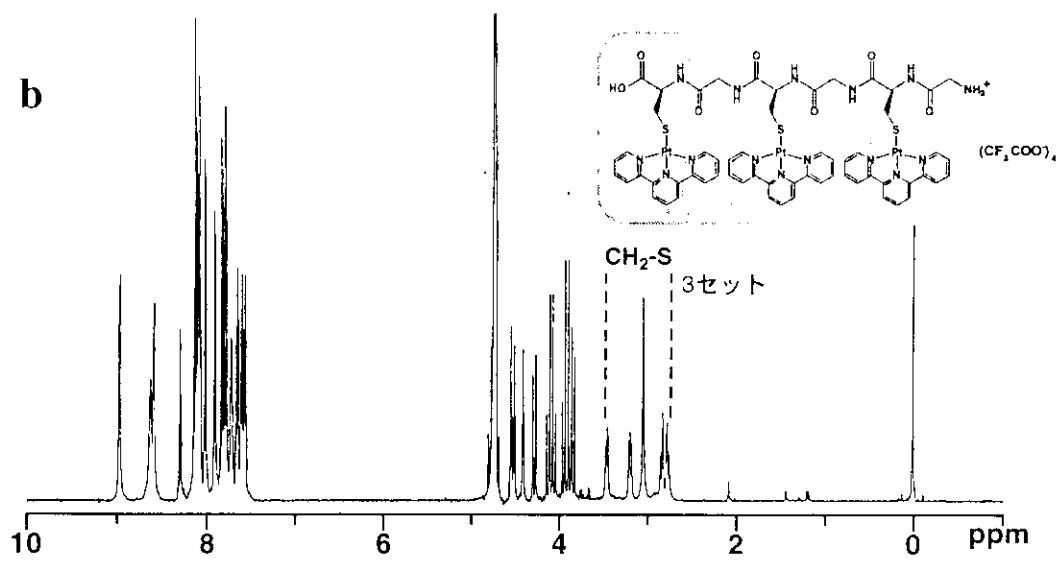
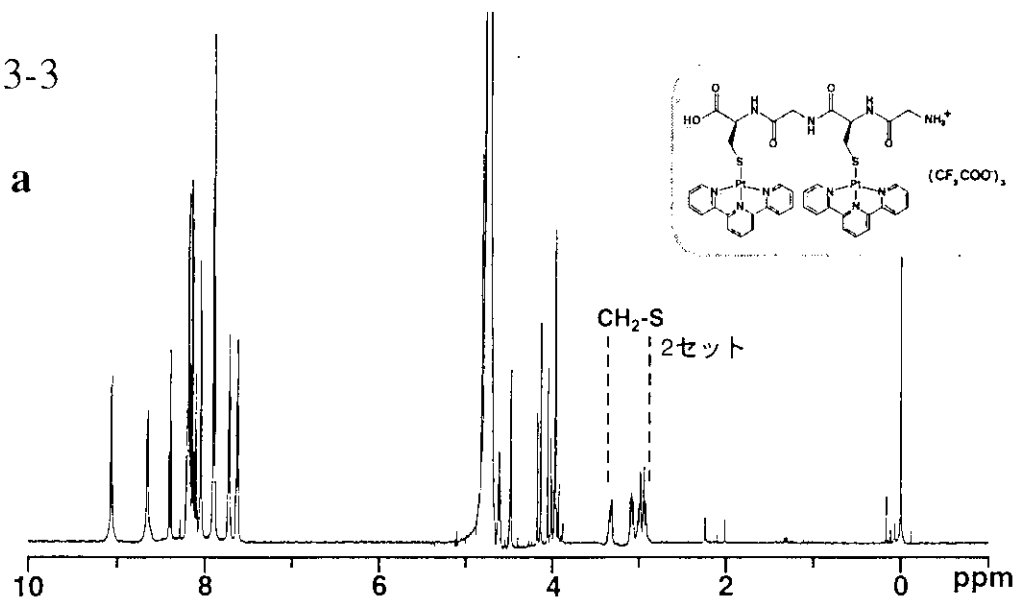


ESI-TOF mass spectra of $\text{H-}[-\text{Gly-L-Cys}(\text{terpyPt}^{\text{II}})]_5^{5+}\text{-OH}$:

(a) a theoretical isotopic distribution at 591.1 Da ,

(b) an experimental isotopic distribution at 591.1 Da .

☒ 3-3

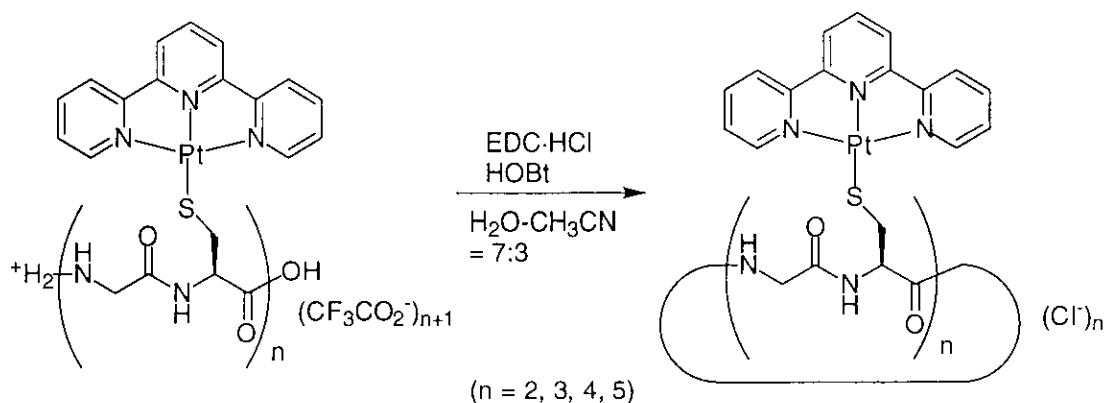


¹H NMR spectra of H₂-[-Gly-L-Cys(terpyPt^{II})]_n-OH-(CF₃CO₂)_{n+1}
(n = 2; a, 3; b, 4; c) in D₂O at 30 °C.

3-4. メタロペプチドの環化反応

3-4-1. 実験の部

環状メタロペプチドを合成する目的で、3-3 で合成した直鎖状メタロペプチドを、水溶性縮合剤 (EDC-HCl) と活性化剤 (HOBt) の存在下、 $\text{H}_2\text{O}-\text{CH}_3\text{CN} = 7:3$ の溶液中で反応させた。



a) 試薬・機器について

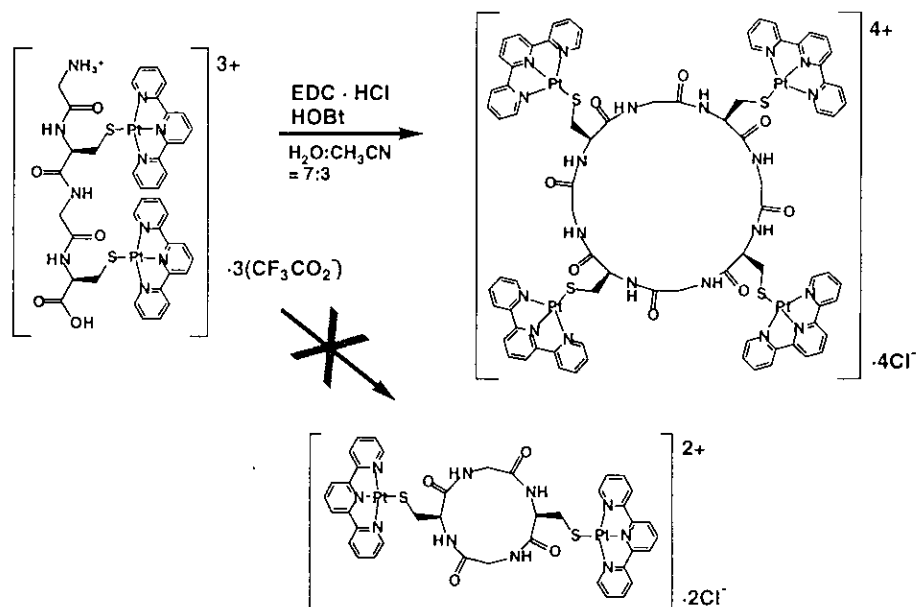
活性化剤 HOBt (1-hydroxy-1H-benzotriazole monohydrate) および水溶性縮合剤 EDC-HCl (*N*-ethyl-*N'*-(3-(dimethylamino)propyl)carbodiimide hydrochloride) は、Dojindo Laboratories 製をそのまま使用した。

メンブレンフィルターは、Millipore のオムニポアメンブレンフィルター (pore size 0.45 μm , JHWPO2500) を使用した。

^1H NMR は JEOL Lambda 500 (500 MHz for ^1H) および JEOL Alpha 500 (500 MHz for ^1H) により測定し、 D_2O 溶液のスペクトルの標準物質には TSP を外部標準として用いた。化学シフト (δ) は ppm で表し、シグナルの開裂パターンを s (singlet)、d (doublet)、dd (doublet of doublet)、ddd (doublet of doublet of doublet)、t (triplet)、dt (doublet of triplet)、m (multiplet)、br (broad) で表記した。カップリング定数 J は Hz で表記した。

エレクトロスプレーイオン化マススペクトル (ESIMS) は、PE SCIEX API-300 spectrometer (イオン化法：エレクトロスプレー、質量分析：四重極型質量分析計 (QMS)) と Micromass LC-TOF/MS (イオン化法：エレクトロスプレー、質量分析：飛行時間型質量分析計 (TOFMS)) により測定した。

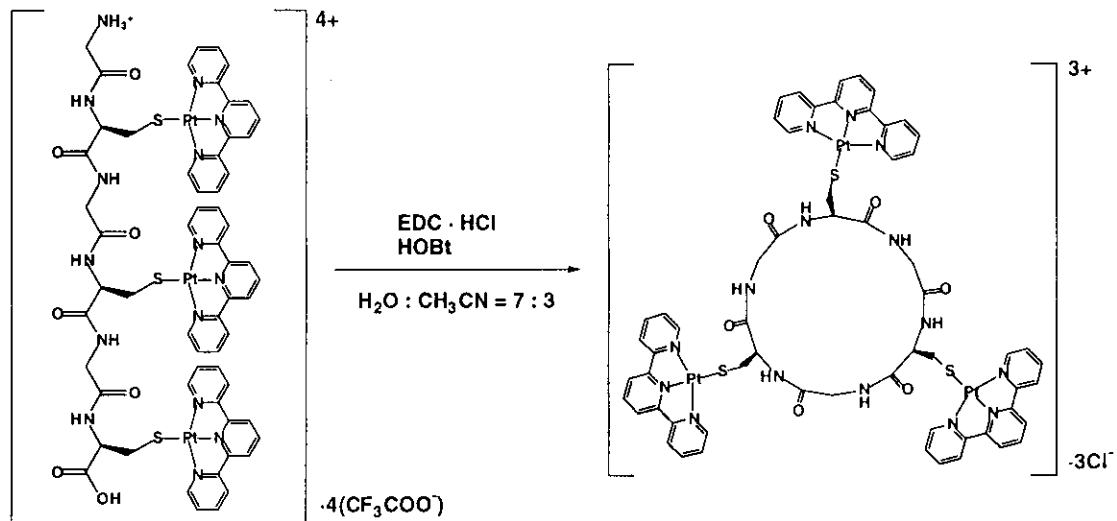
a) 直鎖状テトラメタロペプチド $\text{H}[\text{Gly-L-Cys}(\text{terpyPt}^{\text{II}})]_2\text{-OH}\cdot(\text{CF}_3\text{CO}_2)_3$ の環化



$\text{H}_2\text{-}[\text{Gly-L-Cys}(\text{terpyPt}^{\text{II}})]_2\text{-OH}\cdot(\text{CF}_3\text{CO}_2)_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (7.2 mg, 4.4 μmol) の水溶液 (2.6 ml) にアセトニトリル (1.6 ml) に溶解した HOBT (7.9 mg, 51.6 μmol) と EDC·HCl (99.7 mg, 520.0 μmol) の水溶液 (1 ml) を加え、25 $^{\circ}\text{C}$ で 24 時間攪拌した。析出した濃赤色の沈殿物をメンブレンフィルターにより濾取し、真空乾燥した後、濃赤色固体 $\text{cyclo}[\text{Gly-L-Cys}(\text{terpyPt}^{\text{II}})]_4\cdot\text{Cl}_4\cdot 17\text{H}_2\text{O}$ (2.6 mg, 0.93 μmol , 42 %) を得た。¹H NMR (D₂O, 60 $^{\circ}\text{C}$): δ 2.87 (dd, $J = 7.3, 12.8$ Hz, 4H), 3.23 (dd, $J = 5.8, 12.3$ Hz, 4H), 3.92 (d, $J = 17.0$ Hz, 4H), 4.07 (d, $J = 17.0$ Hz, 4H), 4.56 (dd, $J = 6.5, 6.5$ Hz, 4H), 7.67 (dd, $J = 6.8, 6.8$ Hz, 8H), 7.93 (d, $J = 8.0$ Hz, 8H), 8.01 (d, $J = 7.5$ Hz, 8H), 8.11

(dd, $J = 7.8, 7.8$ Hz, 8H), 8.26 (t, $J = 7.8$ Hz, 4H), 8.91 (d, $J = 5.0$ Hz, 8H). MS (ESI): m/z (Calcd) 587 (587, $[M]^{4+}$), 783 (783, $[M - H^+]^{3+}$). High Resolution Mass Spectroscopy (HRMS): m/z (Calcd) 587.5855 (587.5809, $[M]^{4+}$).

b-1) 環状ヘキサメタロペプチド $cyclo[-Gly-L-Cys(terpyPt^{II})-]_3 \cdot Cl_3 \cdot 11H_2O$ の合成



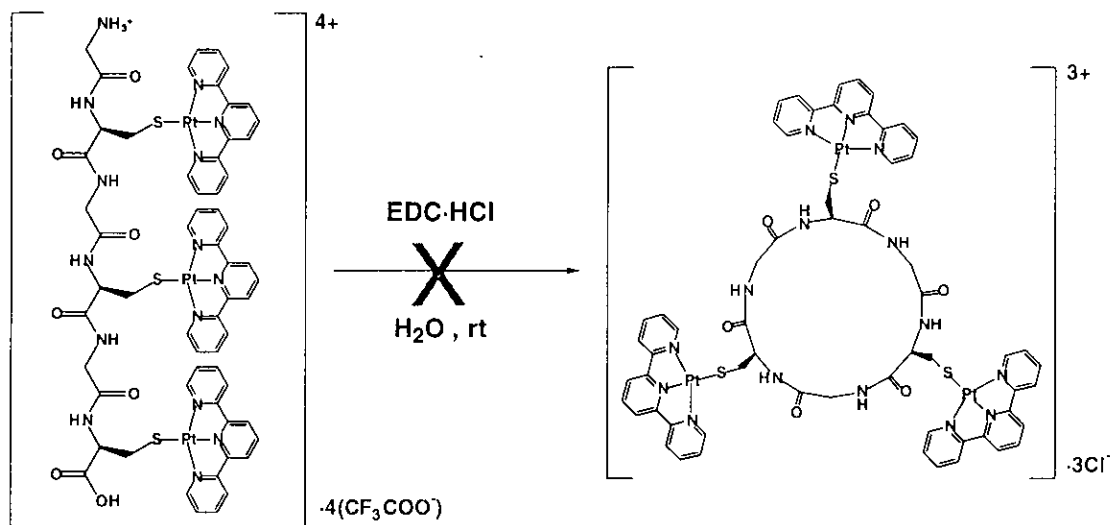
$H_2[-Gly-L-Cys(terpyPt^{II})-]_3-OH \cdot (CF_3CO_2)_4 \cdot 14H_2O$ (10.0 mg, 4.0 μ mol) の水溶液 (5.5 ml) にアセトニトリル (2.4 ml) に溶解した HOBT (6.1 mg, 40 μ mol) と EDC·HCl (25.6 mg, 133 μ mol) 水溶液 (0.1 ml) を加え、25 $^{\circ}$ C で 48 時間反応させた。尚、12 および 24 時間後に、EDC·HCl (25.6 mg, 133 μ mol) 水溶液 (0.1 ml) をそれぞれ追加した。析出した濃赤色の反応物をメンブレンフィルターにより濾取し、真空乾燥した後、濃赤色固体 $cyclo[-Gly-L-Cys(terpyPt^{II})-]_3 \cdot Cl_3 \cdot 11H_2O$ (4.7 mg, 2.3 μ mol, 58%) を得た。

1H NMR (D_2O , 60 $^{\circ}$ C): δ 3.13 (dd, $J = 6.4, 12.2$ Hz, 3H), 3.28 (dd, $J = 5.3, 12.3$ Hz, 3H), 3.88 (d, $J = 17.9$ Hz, 3H), 4.24 (d, $J = 17.1$ Hz, 3H), 4.61 (dd, $J = 5.6, 5.6$ Hz, 3H), 7.70 (dd, $J = 6.6, 6.6$ Hz, 6H), 7.96 (d, $J = 7.8$ Hz, 6H), 8.02 (d, $J = 7.8$ Hz, 6H), 8.14 (dd, $J = 7.8, 7.8$ Hz, 6H), 8.21 (t, $J = 7.9$ Hz, 3H), 8.98 (d, $J = 5.2$ Hz, 6H). MS (ESI): m/z (Calcd) 587 (587, $[M]^{3+}$), 667 (667, $[M - terpyPt^{II} + H^+]^{2+}$). (HRMS): m/z

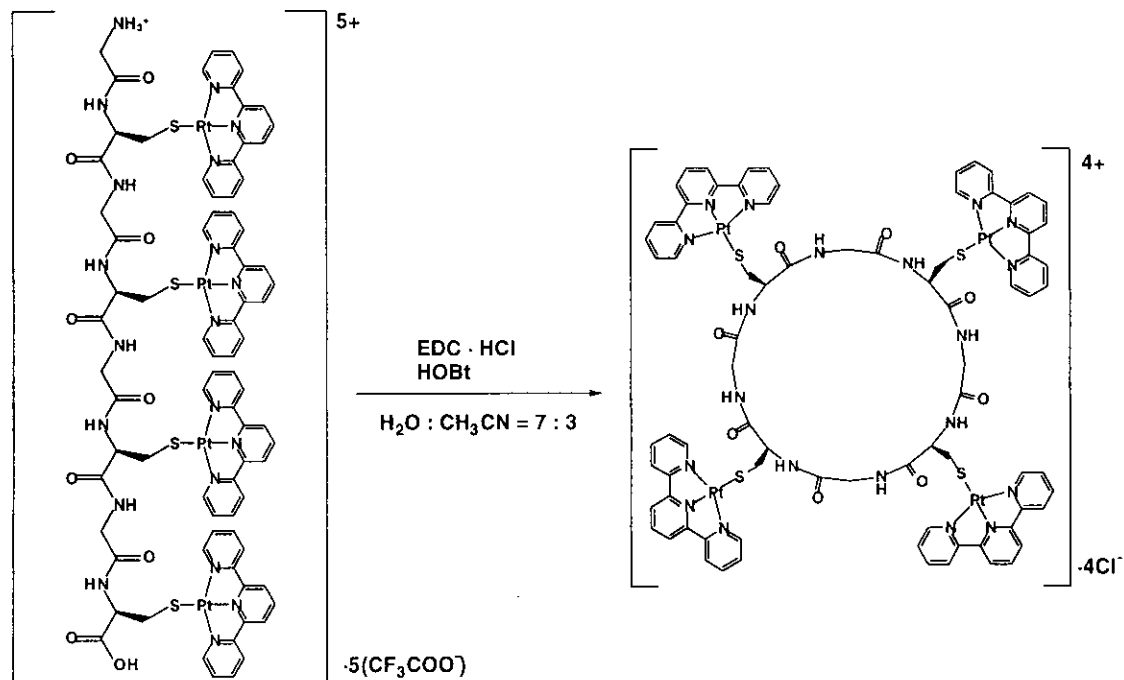
(Calcd) 1760.3234 (1760.2351, $[M - 2H]^+$). Anal. Calcd for $C_{112}H_{133}F_{18}N_{25}O_{43}Pt_5S_5$: C, 33.67; H, 3.35; N, 8.76. Found: C, 33.45; H, 2.56; N, 8.75. Anal. Calcd for $C_{60}H_{76}C_{13}N_{15}O_{17}Pt_3S_3$: C, 34.86; H, 3.71; N, 10.16. Found: C, 35.13; H, 3.41; N, 9.83.

b-2) 直鎖状ヘキサメタロペプチド $H\text{-}[-\text{Gly-L-Cys}(\text{terpyPt}^{\text{II}})\text{-}]_3\text{-OH}$ の環化反応

(HOBt を使用しない方法)



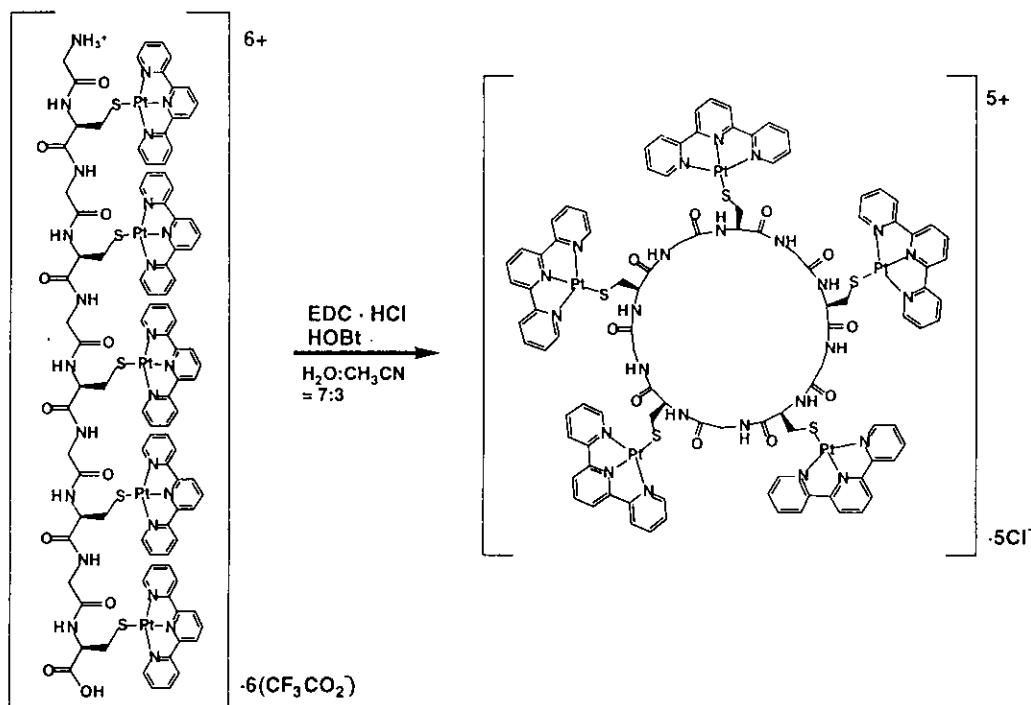
$H_2\text{-}[-\text{Gly-L-Cys}(\text{terpyPt}^{\text{II}})\text{-}]_3\text{-OH}\cdot(\text{CF}_3\text{CO}_2)_4\cdot 14\text{H}_2\text{O}$ (2.6 mg, 1.0 μmol) の水溶液 (0.5 ml) に EDC·HCl (29.0 mg, 151 μmol) 水溶液 (1.0 ml) を加え、25 $^\circ\text{C}$ で反応させた。HPLC により反応を追ったところ、保持時間 14、16、17、20 分に 4 つのピークが現れた。60 時間後、HPLC による変化が見られなくなったため、それぞれのピークを分取し、ESIMS の測定を行ったところ、いずれのフラクションも目的物に帰属されるシグナルは観察されなかった。

c) 環状オクタメタロペプチド $cyclo[-Gly-L-Cys(terpyPt^{II})-]_4 \cdot Cl_4 \cdot 17H_2O$ の合成

$H_2[-Gly-L-Cys(terpyPt^{II})-]_4 \cdot OH \cdot (CF_3CO_2)_5 \cdot 18H_2O$ (17.9 mg, 5.5 μmol) の水溶液 (8.4 ml) にアセトニトリル (3.7 ml) に溶解した HOBt (9.3 mg, 61 μmol) と EDC·HCl (38.9 mg, 203 μmol) 水溶液 (0.14 ml) を加え、25 $^{\circ}\text{C}$ で 72 時間反応させた。尚、12、24、36、48 および 60 時間後に、EDC·HCl (38.9 mg, 203 μmol) 水溶液 (0.1 ml) をそれぞれ追加した。析出した濃赤色の反応物をメンブレンフィルターにより濾取し、真空乾燥した後、濃赤色固体 $cyclo[-Gly-L-Cys(terpyPt^{II})-]_4 \cdot Cl_4 \cdot 17H_2O$ (9.0 mg, 3.2 μmol , 58 %) を得た。 $^1\text{H NMR}$ (D_2O , 60 $^{\circ}\text{C}$): δ 2.88 (dd, $J = 6.5, 12.3$ Hz, 4H), 3.23 (dd, $J = 5.5, 12.3$ Hz, 4H), 3.92 (d, $J = 17.1$ Hz, 4H), 4.07 (d, $J = 17.1$ Hz, 4H), 4.56 (dd, $J = 6.5, 6.5$ Hz, 4H), 7.68 (dd, $J = 6.5, 6.5$ Hz, 8H), 7.94 (d, $J = 7.9$ Hz, 8H), 8.02 (d, $J = 6.6$ Hz, 8H), 8.12 (dd, $J = 7.6, 7.6$ Hz, 8H), 8.27 (t, $J = 8.3$ Hz, 4H), 8.91 (d, $J = 5.4$ Hz, 8H). MS (ESI): m/z (Calcd) 587 (587, $[M]^{4+}$), 640 (640, $[M - terpyPt^{II} + H^+]^{3+}$), 783 (783, $[M - H^+]^{3+}$). (HRMS): m/z (Calcd) 587.3318 (587.3309, $[M]^{4+}$) 1920.3213 (1920.2657, $[M - terpyPt^{II} - H^+]^+$). Anal. Calcd for $C_{80}H_{106}Cl_4N_{20}O_{25}Pt_4S_4$: C, 34.34; H,

3.82; N, 10.01. Found: C, 34.11; H, 3.52; N, 9.92.

d) 環状メタロペプチド $cyclo[-Gly-L-Cys(terpyPt^{II})-]_5 \cdot Cl_5$ の合成

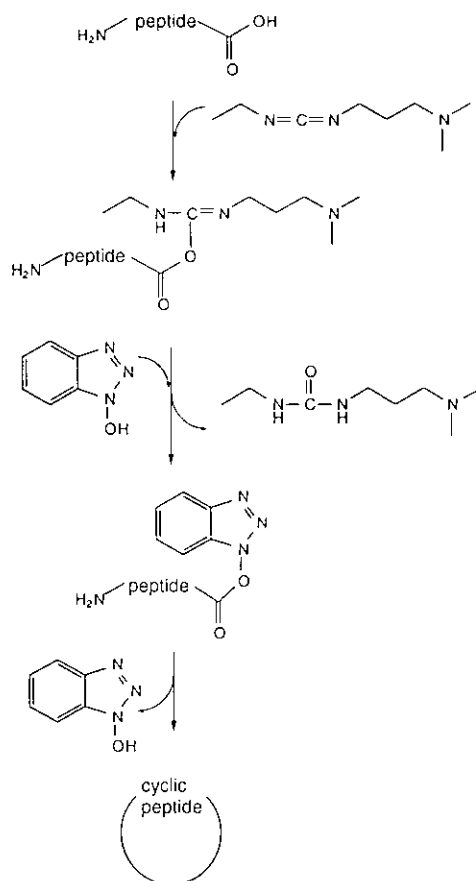


$H_2-[-Gly-L-Cys(terpyPt^{II})-]_5-OH \cdot (CF_3CO_2)_6 \cdot 18H_2O$ (5.0 mg, 1.25 μ mol) の水溶液 (1.0 ml) に、アセトニトリル (0.75 ml) に溶解した HOBT (1.9 mg, 12.5 μ mol) と EDC·HCl (8.0 mg, 42 μ mol) 水溶液 (0.25 ml) を加え、室温で 144 時間反応させた。尚、12、24、36、48、60、72、96 および 120 時間後に、EDC·HCl (8.0 mg, 42 μ mol) 水溶液 (0.1 ml) をそれぞれ追加した。析出した濃赤色の反応物をメンブレンフィルターにより濾取し、真空乾燥した後、濃赤色固体 $cyclo[-Gly-L-Cys(terpyPt^{II})-]_5 \cdot Cl_5$ (1.3 mg) を得た。この生成物の元素分析による同定を現在行っている。 1H NMR (D_2O , 60 $^{\circ}C$): δ 3.11 (dd, $J = 7.0, 13.1$ Hz, 5H), 3.24 (dd, $J = 5.5, 12.6$ Hz, 5H), 4.03 (d, $J = 17.1$ Hz, 5H), 4.13 (d, $J = 16.9$ Hz, 5H), 4.62 (dd, $J = 5.6, 5.6$ Hz, 5H), 7.71 (dd, $J = 6.7, 6.7$ Hz, 10H), 7.93 (d, $J = 8.1$ Hz, 10H), 8.00 (d, $J = 8.1$ Hz, 10H), 8.18 (dd, $J = 7.8, 7.8$ Hz, 10H), 8.25 (t, $J = 8.2$ Hz, 5H), 8.94 (d, $J = 4.9$ Hz, 10H).

3-4-2. 結果・考察

直鎖状メタロペプチド $H_2-[-Gly-L-Cys(terpyPt^{II})-]_n-OH \cdot (CF_3CO_2)_{n+1}$ ($n = 2, 3, 4, 5$) を水溶性縮合剤 (EDC-HCl) と活性化剤 (HOBt) の存在下、 H_2O-CH_3CN (7:3) 中で縮合環化することにより環状メタロペプチドの合成を試みた。

環状ペプチドの合成は、目的物である単量環化物以外に、分子間で縮合した二量体やそれ以上の多量体が副生されるため、高希釈条件下 (1 mM 以下) で反応が行われてきた。しかし、この条件下でも分子間反応によるオリゴマーの副生がみられることが多く、環状ペプチドの収率は低いことが多い。今回の環状メタロペプチドの合成についても、0.5-1 mM の濃度で環化反応を行った。高希釈条件下であるため、EDC-HCl および HOBt の量は過剰量加えた。HOBt については、触媒になりうるため 10 倍量加え、EDC-HCl については、水により徐々に分解してしまうため、100-300 倍量を加えた。また、水溶性である直鎖状メタロペプチドを水中で環化させるために、水に難溶な HOBt を溶かすためにアセトニトリルを溶剤として加えた。



これまで、環状ペプチドはそのほとんどが有機溶媒中や固相法により合成されてきた。本研究において、天然型アミノ酸である L-Cys と Gly の繰り返し配列を有するペプチド上に金属錯体を導入させることにより、水溶液中で効率よく環化させることに成功した。これは、直鎖状メタロペプチドが、導入した金属錯体の電荷の反発や立体的要因によって、環化に適した折り畳み構造を取るためと推察された。

最初に行った直鎖状ヘキサメタロペプチド ($n = 3$) の環化反応は、EDC·HCl のみで行った。しかし、目的物は生成せず、分子間での縮合も起こらなかった。これは、terpyPt^{II} を導入した直鎖状メタロペプチドが立体的に嵩高いため、EDC·HCl が縮合剤として機能しなかったのではないかと考えられた。そこで、EDC·HCl に比べ構造的に小さい HOBt を活性化剤として入れて環化を試みたところ、期待された目的の環状メタロペプチドを合成することができ、ペプチド上に金属錯体を集積化することに成功した。

これら環状メタロペプチドの構造は、ESIMS、¹H NMR および元素分析により同定した (図 3-5~3-12)。環状メタロペプチドの合成において、直鎖状メタロペプチドが二分子以上で縮合した環サイズの大きいものの生成が考えられる。例えば、直鎖状ヘキサメタロペプチドを環化した場合、分子内で環化した $\text{cyclo}[-\text{Gly-L-Cys}(\text{terpyPt}^{\text{II}})-]_3^{3+}$ 以外に、二分子が縮合し環化した環状ドデカメタロペプチド $\text{cyclo}[-\text{Gly-L-Cys}(\text{terpyPt}^{\text{II}})-]_6^{6+}$ が生成する可能性がある。多価の分子を ESIMS で測定した場合、分子量を価数で割った値が得られるため、いずれの場合においても Gly-L-Cys(terpyPt^{II}) ユニットに対応する m/z 587 の値が得られる。このため、通常の ESIMS 測定では環サイズを決定することはできない。これら環状メタロペプチドを環サイズを決定するために、ESI-TOF による高分解能マスペクトルを測定した。高分解能マスペクトルについて、3 価の $\text{cyclo}[-\text{Gly-L-Cys}(\text{terpyPt}^{\text{II}})-]_3^{3+}$ を例にして説明する (図 3-6)。ほとんどの元素には同位体が天然に存在するため、フラグメントイオンピークの $1 \sim$ 数 u (原子質量単位, atomic mass unit) 高質量部に同位体ピークが認められる。そのため、 $1u$ ずつの間隔で同位体ピークが検出される。しかし、マスペクトルは m/z (質量/電荷) が観測されることから、 n 価の多価イオンの場合、 1 価イオンの m/z に対して m/nz となり、 m/z の $1/n$ の質量としてチャートに現れる。3 価のイオンである $\text{cyclo}[-\text{Gly-L-Cys}(\text{terpyPt}^{\text{II}})-]_3^{3+}$ は、質量を価数の 3 で割るため、同位体との間隔が $1/3$ として現れ、同位体スプリット間隔は 0.33 となる。同様に、4 価の場合、同

位体スプリット間隔は、1/4 である 0.25 となり (図 3-8 a)、5 価の場合、その間隔は、1/5 である 0.2 となる (図 3-10 a)。合成した環状メタロペプチドの同位体スプリットの間隔を測定することにより、それぞれの環サイズを決定した。

その結果、直鎖状ヘキサメタロペプチド $H_2\text{-[Gly-L-Cys(terpyPt}^{\text{II}}\text{)]}_3\text{-OH}\cdot(\text{CF}_3\text{CO}_2)_4$ を環化することにより得られた生成物は、同位体スプリットが 0.33 である 3 価の環状ヘキサメタロペプチド $\text{cyclo[}\text{-Gly-L-Cys(terpyPt}^{\text{II}}\text{)]}_3^{3+}$ であると決定した (図 3-6 b)。同様に、直鎖状オクタメタロペプチド $H_2\text{-[}\text{-Gly-L-Cys(terpyPt}^{\text{II}}\text{)]}_4\text{-OH}\cdot(\text{CF}_3\text{CO}_2)_5$ を環化することにより得られた生成物は、同位体スプリットが 0.25 である 4 価の環状オクタメタロペプチド $\text{cyclo[}\text{-Gly-L-Cys(terpyPt}^{\text{II}}\text{)]}_4^{4+}$ であると決定し (図 3-8 b)、直鎖状デカメタロペプチド $H_2\text{-[}\text{-Gly-L-Cys(terpyPt}^{\text{II}}\text{)]}_5\text{-OH}\cdot(\text{CF}_3\text{CO}_2)_6$ を環化することにより得られた生成物は、同位体スプリットが 0.2 である 5 価の環状デカメタロペプチド $\text{cyclo[}\text{-Gly-L-Cys(terpyPt}^{\text{II}}\text{)]}_5^{5+}$ であると決定した (図 3-10 b)。一方、直鎖状テトラメタロペプチド $H\text{-[}\text{-Gly-L-Cys(terpyPt}^{\text{II}}\text{)]}_2\text{-OH}\cdot(\text{CF}_3\text{CO}_2)_3$ を環化した生成物を同様に高分解能マススペクトルを測定したところ、同位体スプリットが 0.25 であった (図 3-12 b)。直鎖状テトラメタロペプチド ($n = 2$) からは、二分子が縮合して環化した 4 価の $\text{cyclo[}\text{-Gly-L-Cys(terpyPt}^{\text{II}}\text{)]}_4^{4+}$ が得られることがわかった。図 3-6 a、図 3-8 a、図 3-10 a および図 3-12 a に、ESI-TOF によるそれぞれの同位体分布の理論値を示した。

表 3-2 に環化反応の結果を示した。 $n = 3$ および $n = 4$ の直鎖状メタロペプチドを縮合環化することにより、分子内で環化した環状メタロペプチド $\text{cyclo[}\text{-Gly-L-Cys(terpyPt}^{\text{II}}\text{)]}_n\cdot\text{Cl}_n$ ($n = 3, 4$) をそれぞれ単離収率 58 % で得ることができた。一方、 $n = 2$ の直鎖状メタロペプチドを同様に縮合環化すると、二分子が分子間で縮合したのち環化した、環状オクタメタロペプチド $\text{cyclo[}\text{-Gly-L-Cys(terpyPt}^{\text{II}}\text{)]}_4\cdot\text{Cl}_4$ が 42 % で得られた。また、 $n = 5$ の直鎖状デカメタロペプチドについても、 $^1\text{H NMR}$ から対称性のよい環状ペプチドが得られてい

ることを確認し、ESI-TOFにより、分子内で環化した環状デカメタロペプチドであると同定した。この環状メタロペプチドについては、現在、元素分析を行っている。環状オクタメタロペプチド $cyclo[-Gly-L-Cys(terpyPt^{II})-]_4 \cdot Cl_4 \cdot 18H_2O$ から推測し、環状デカメタロペプチド $cyclo[-Gly-L-Cys(terpyPt^{II})-]_5 \cdot Cl_5$ は、約 40%の収率で得られていると考えられる。

表 3-2

原料 $H-[-Gly-L-Cys(terpyPt^{II})-]_n-OH$ $\cdot (CF_3CO_2)_{n+1}$	反応 時間 (hour)	温度 (°C)	濃度 (mM)	生成物 $cyclo[-Gly-L-Cys(terpyPt^{II})-]_n$ $\cdot Cl_n$	単離 収率 (%)
n = 2	24	25	0.5	n = 4	42
n = 3	48	25	0.5	n = 3	58
n = 4	72	25	0.5	n = 4	58
n = 5	120	rt	0.5	n = 5	~40

縮合剤 (EDC·HCl)、活性化剤 (HOBT)

過剰に加えた縮合剤 (EDC·HCl) により、生成物の対アニオンは Cl^- になっている。

n = 3, 4, 5 の直鎖状メタロペプチドが分子内で縮合し環状メタロペプチドを形成しうる理由として、直鎖状メタロペプチドが導入した金属錯体 ($terpyPt^{II}$) の静電的反発および立体障害により環化に適した折り畳み構造を取り、分子内の C 末端と N 末端が非常に近接している可能性が考えられる。また、分子間で縮合した後環化した二量体や多量体の存在が確認できないことから、これらのペプチドの長さが環化に適しているものと考えられる。一方、n = 2 の直鎖状テトラメタロペプチドの場合は、n = 3, 4, 5 の直鎖状メタロペプチドに比べ、より直線的な構造をとり C 末端と N 末端が離れているため、分子内で環化するよりも分子間で縮合しやすいと考えられる。また、三量体以上の環状メタロペプチドが得られなかったことから、分子間で縮合し直鎖状オクタメタロペプチド (n = 4) が得られることにより、環化しやすい折り畳み構造となって環状オクタメタロペプチドが得られたものと考えられる。

合成した環状メタロペプチドの $^1\text{H NMR}$ 測定を D_2O 中 $30\text{ }^\circ\text{C}$ で行ったところ、すべてのシグナルがブロードとして現れた。そこで、 $60\text{ }^\circ\text{C}$ で $^1\text{H NMR}$ の測定を行ったところシャープなシグナルが得られた (図 3-13)。環状メタロペプチドは $30\text{ }^\circ\text{C}$ において、運動性が悪いためブロードとして現れると考えられる。

$^1\text{H NMR}$ (D_2O , $60\text{ }^\circ\text{C}$) 測定において、直鎖状メタロペプチドはそれぞれのアミノ酸ユニットが独立した共鳴スペクトルを与えるのに対し、環状メタロペプチドはそれぞれの Gly-L-Cys(terpyPt^{II}) 部分がすべて等価なスペクトルを与え、 $60\text{ }^\circ\text{C}$ の水溶液中で対称性の高い構造をとっていることが明らかとなった。例えば、ヘキサメタロペプチドの場合 (図 3-14)、直鎖状メタロペプチドにおける L-Cys のメチレン鎖 ($-\text{CH}_2-$) が、それぞれ独立し 3 セットのシグナルが観測されているのに対し、環状メタロペプチドの L-Cys のメチレン鎖 ($-\text{CH}_2-$) は、1 セットのシグナルしか観測されなかった。その他のプロトンについても同様に、直鎖状では 3 セットのものが、環状では 1 セットしか見られなかった。これは、オクタメタロペプチドについても同様であった (図 3-15)。

図 3-16 は、環状メタロペプチドのペプチド骨格部分の $^1\text{H NMR}$ である。 3 ppm 付近の L-Cys のメチレンプロトン (CH_2) と 4 ppm 付近の Gly のメチレンプロトン (CH_2) に、顕著な違いが見られる。環状ヘキサメタロペプチドにおける Gly のメチレンプロトンのシグナルは、環状オクタメタロペプチドのそれに比べ化学シフトの幅が広がっている。一方、L-Cys のメチレンプロトンは、環状オクタメタロペプチドの化学シフトの方が幅広く観測されている。このように同じ構成単位 $[-\text{Gly-L-Cys}(\text{terpyPt}^{\text{II}})-]$ から作られる環状メタロペプチドも、環のサイズにより、NMR が大きく異なることがわかる。これは、環状メタロペプチドの環サイズの違いによる歪が影響を及ぼしていると推察される。

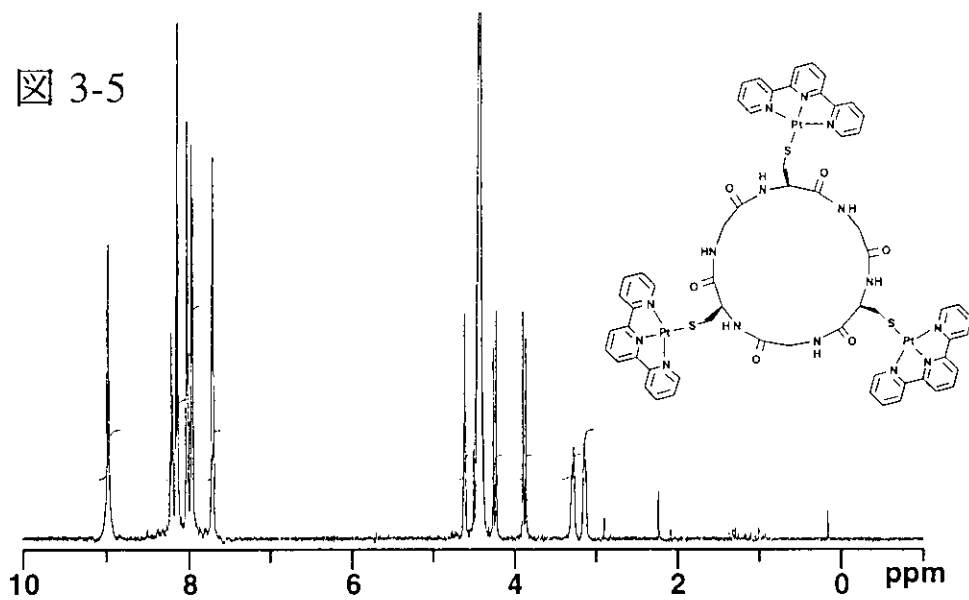
本研究において、直鎖状メタロペプチド $\text{H}_2-[-\text{Gly-L-Cys}(\text{terpyPt}^{\text{II}})-]_n-\text{OH}\cdot(\text{CF}_3\text{CO}_2)_{n+1}$ ($n = 2, 3, 4, 5$) の環化反応を行った結果、 $n = 3, 4$ からはそれぞれ $n = 3, 4$ の環状メタロペプチド

$cyclo[-Gly-L-Cys(terpyPt^{II})-]_n \cdot Cl_n$ が得られ、二分子以上が分子間で縮合して環化したものは得られなかった。一方、 $n = 2$ の直鎖状テトラメタロペプチド $H_2[-Gly-L-Cys(terpyPt^{II})-]_2 \cdot OH \cdot (CF_3CO_2)_3$ からは、環状オクタメタロペプチド $cyclo[-Gly-L-Cys(terpyPt^{II})-]_4 \cdot Cl_4$ が得られるという興味深い結果となった。直鎖状ヘキサメタロペプチド $H_2[-Gly-L-Cys(terpyPt^{II})-]_3 \cdot OH \cdot (CF_3CO_2)_4$ から $cyclo[-Gly-L-Cys(terpyPt^{II})-]_6 \cdot Cl_6$ が得られていないということから、直鎖状ドデカメタロペプチド $H_2[-Gly-L-Cys(terpyPt^{II})-]_6 \cdot OH \cdot (CF_3CO_2)_7$ を縮合させたときに、環状ドデカメタロペプチド $cyclo[-Gly-L-Cys(terpyPt^{II})-]_6 \cdot Cl_6$ が得られるのかどうかに興味をもたれる。さらに、L-Cys のみで構成された環状メタロペプチド $cyclo[-L-Cys(terpyPt^{II})-]_6 \cdot Cl_6$ を合成するための直鎖状メタロペプチド $H_2[-L-Cys(terpyPt^{II})-]_6 \cdot OH \cdot (CF_3CO_2)_7$ は精製単離できなかったが、L-Cys の直鎖状トリメタロペプチド $H_2[-L-Cys(terpyPt^{II})-]_3 \cdot OH \cdot (CF_3CO_2)_4$ から二量化環化により、 $cyclo[-L-Cys(terpyPt^{II})-]_6 \cdot Cl_6$ を合成できるのではないかと期待される。

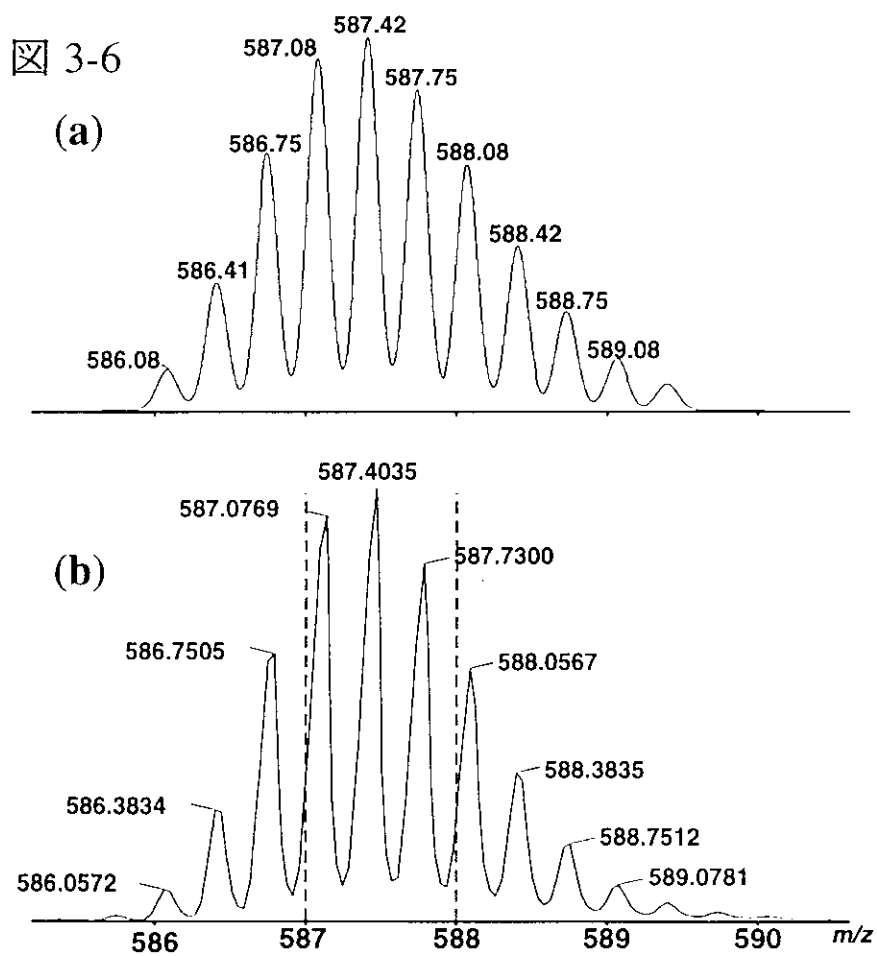
また、今回合成した環状メタロペプチドは、反応溶液中で沈殿として得ることができた。これは、水に可溶である直鎖状メタロペプチドが環化することで、親水性であるペプチドや金属イオンの周りを疎水性分子であるターピリジンが取り巻くことにより溶解度に差ができ、塩酸塩である縮合剤 (EDC-HCl) を反応溶液中に大過剰加えたことで、溶液中の塩素イオン (Cl) の濃度が高くなり、塩析効果により起こるものと思われる。

また、HPLC の結果から、環化反応の変換率は高く、反応溶液中に環状メタロペプチドが残っていることが示唆された。反応液に溶けている生成物の回収は課題の一つである。

合成した環状メタロペプチドは可視部に吸収を持つ (図 3-17)。環状メタロペプチドの吸収スペクトル変化を利用したセンサーとしての機能が期待される。



^1H NMR spectrum of *cyclo*[-Gly-L-Cys(terpyPt^{II})-]₃·Cl₃ in D₂O at 60 °C.

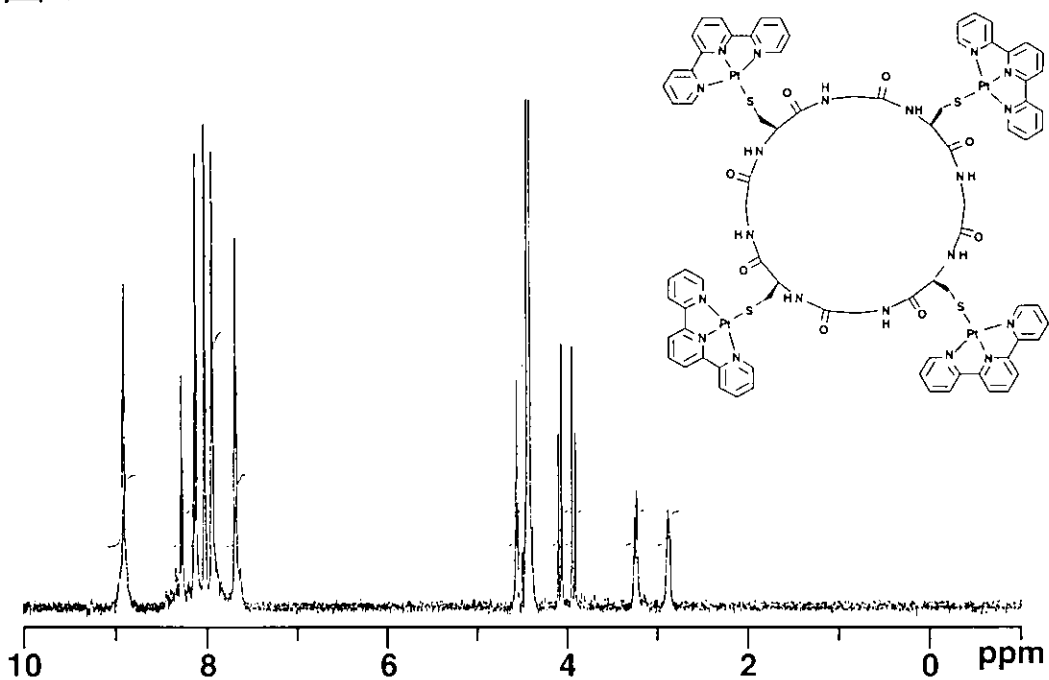


ESI-TOF mass spectra of *cyclo*[-Gly-L-Cys(terpyPt^{II})-]₃³⁺:

(a) a theoretical isotopic distribution at 587.4 Da,

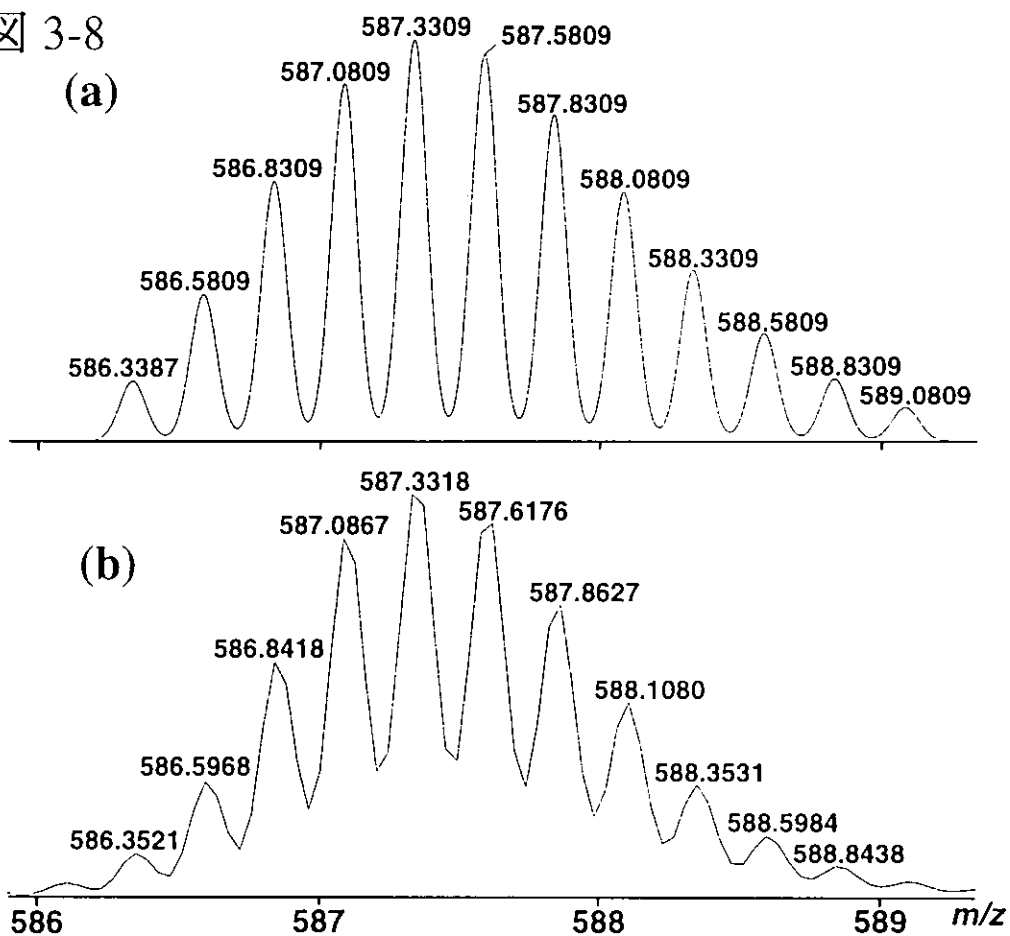
(b) an experimental isotopic distribution at 587.4 Da.

☒ 3-7



¹H NMR spectrum of *cyclo*[-Gly-L-Cys(terpyPt^{II})]₄·Cl₄ in D₂O at 60 °C.

☒ 3-8

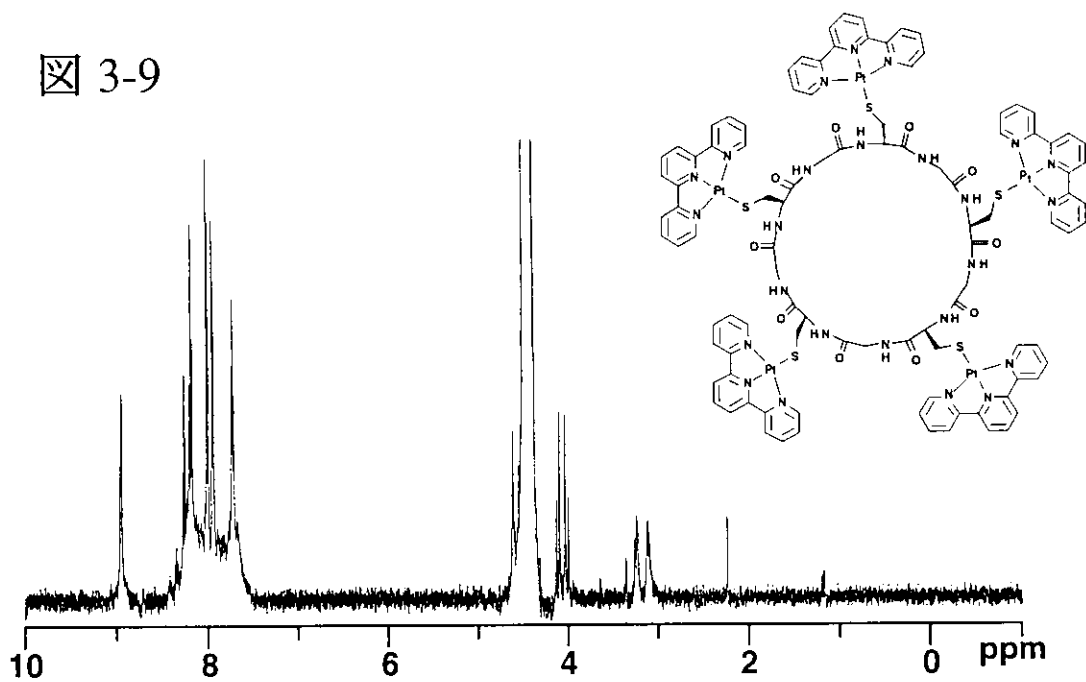


ESI-TOF mass spectra of *cyclo*[-Gly-L-Cys(terpyPt^{II})]₄⁴⁺:

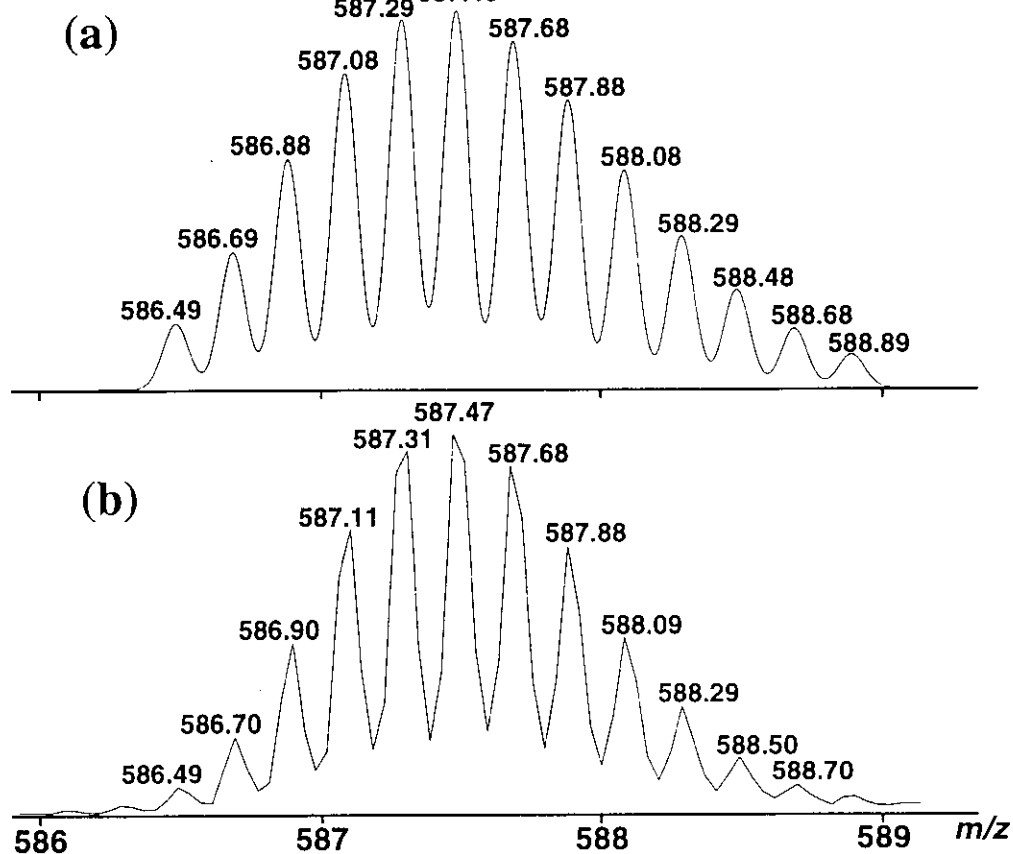
(a) a theoretical isotopic distribution at 587.3 Da,

(b) an experimental isotopic distribution at 587.3 Da.

☒ 3-9



☒ 3-10

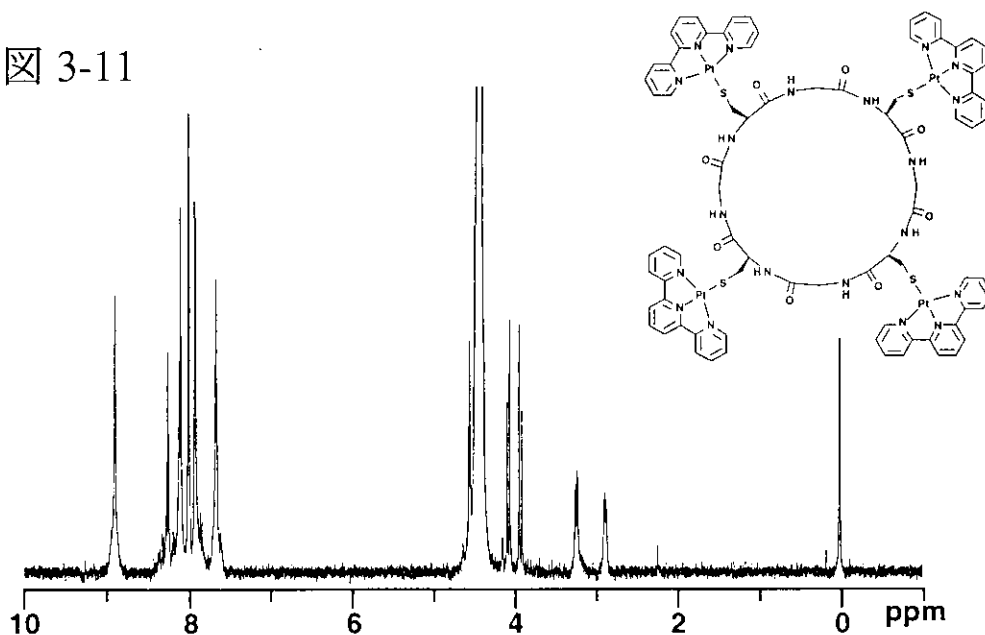


ESI-TOF mass spectra of *cyclo*[-Gly-L-Cys(terpyPt^{II})]₅⁵⁺:

(a) a theoretical isotopic distribution at 587.3 Da,

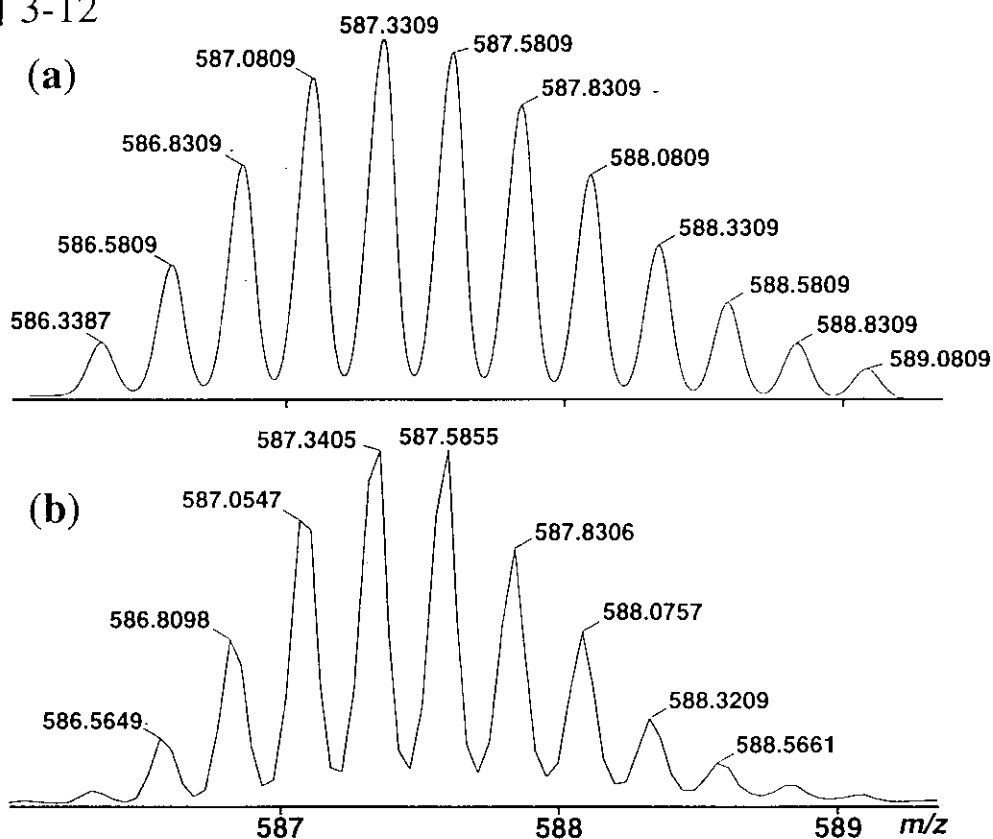
(b) an experimental isotopic distribution at 587.3 Da.

☒ 3-11



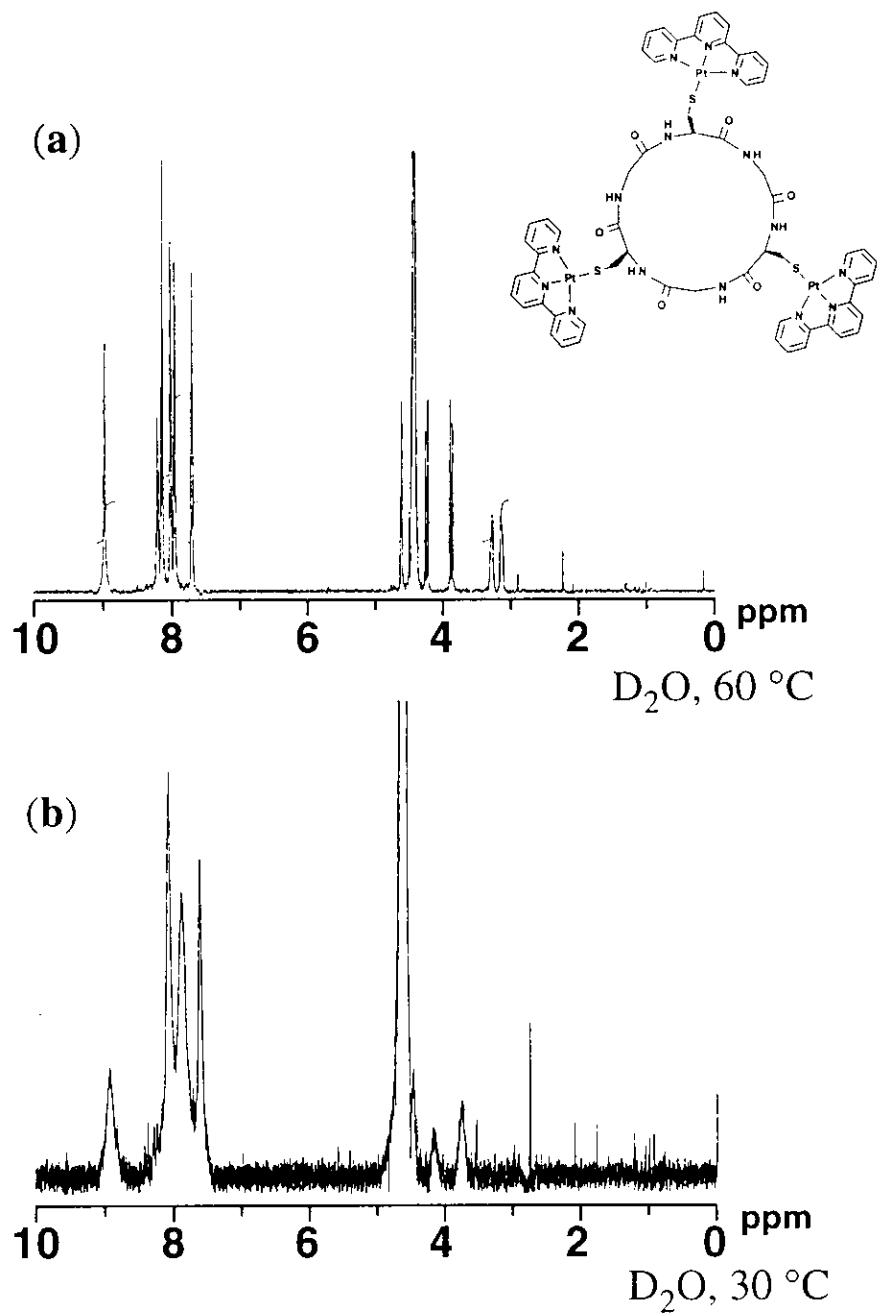
^1H NMR spectrum of $\text{cyclo}[-\text{Gly-L-Cys}(\text{terpyPt}^{\text{II}})-]_4 \cdot \text{Cl}_4$
 synthesized from $\text{H}[-\text{Gly-L-Cys}(\text{terpyPt}^{\text{II}})-]_2\text{-OH} \cdot (\text{CF}_3\text{CO}_2)_3$

☒ 3-12



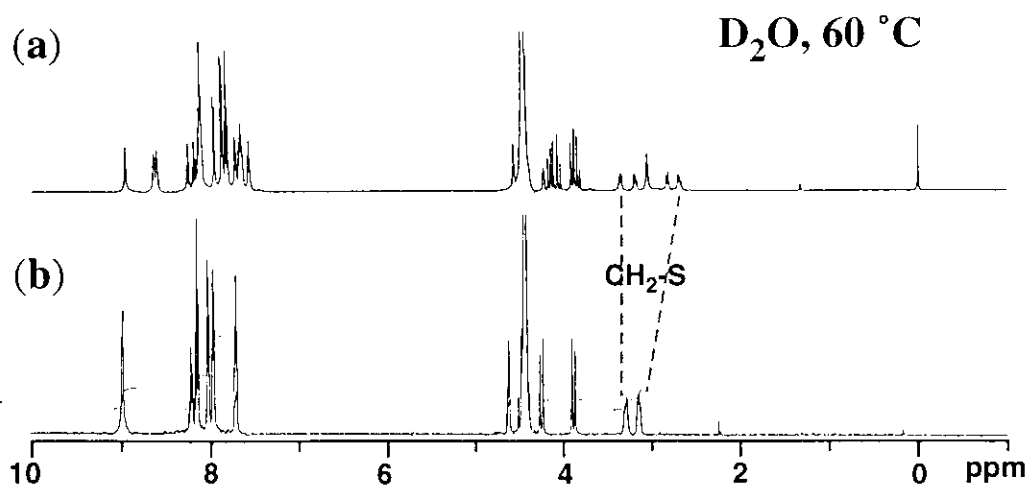
ESI-TOF mass spectrum of $\text{cyclo}[-\text{Gly-L-Cys}(\text{terpyPt}^{\text{II}})-]_4^{4+}$
 synthesized from $\text{H}[-\text{Gly-L-Cys}(\text{terpyPt}^{\text{II}})-]_2\text{-OH} \cdot (\text{CF}_3\text{CO}_2)_3$;
 (a) a theoretical isotopic distribution at 587.3 Da,
 (b) an experimental isotopic distribution at 587.3 Da.

☒ 3-13



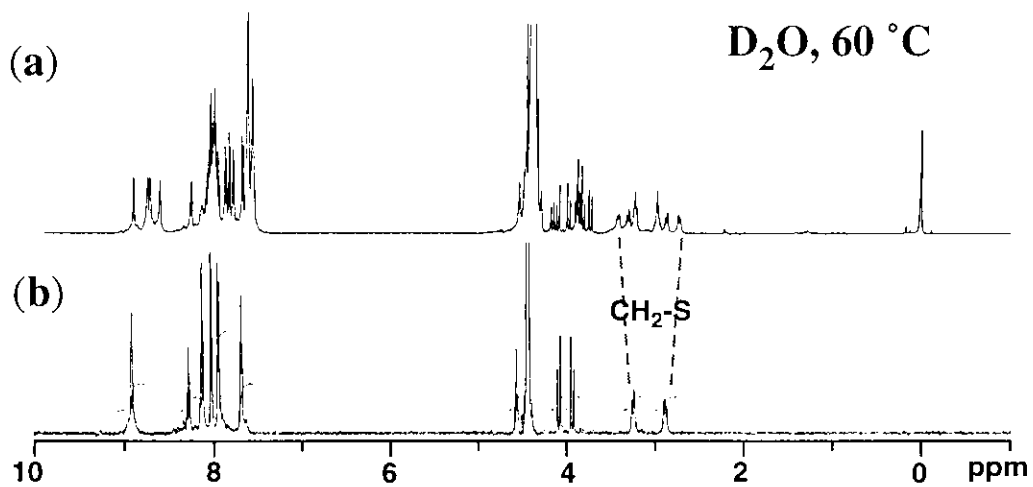
^1H NMR spectra of $\text{cyclo}[-\text{Gly-L-Cys}(\text{terpyPt}^{\text{II}})-]_3\text{-Cl}_3$ in D_2O at $60\text{ }^\circ\text{C}$ (a) and $30\text{ }^\circ\text{C}$ (b).

☒ 3-14



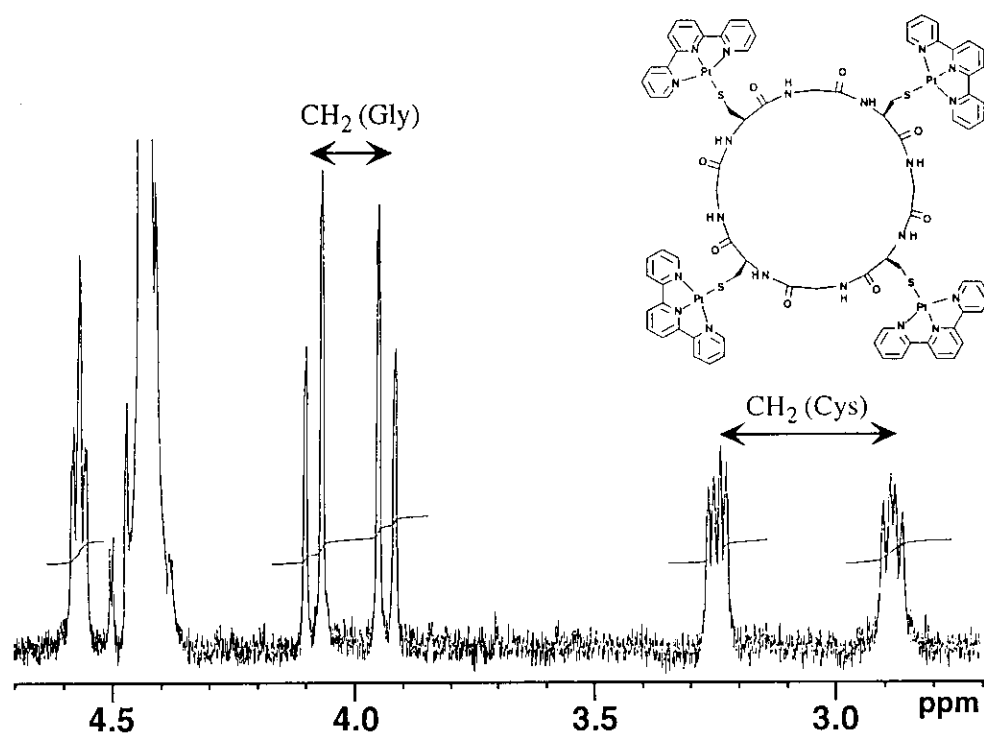
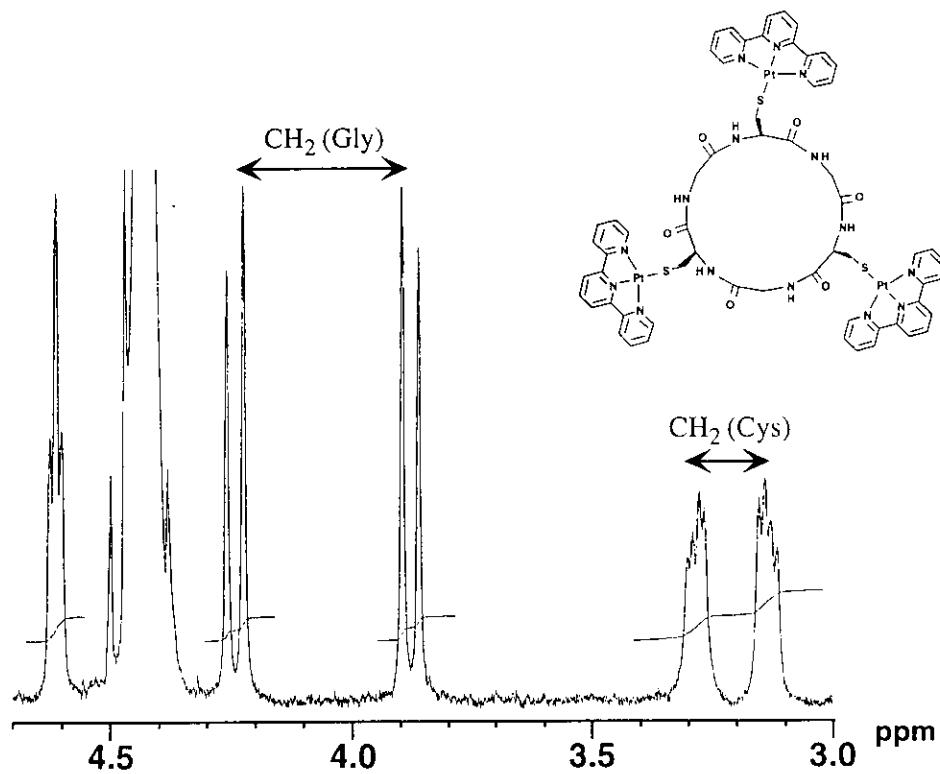
Comparison of 1H NMR Spectra of
Linear (a) and Cyclic (b) $[Gly-L-Cys(terpyPt^{II})]_3$

☒ 3-15

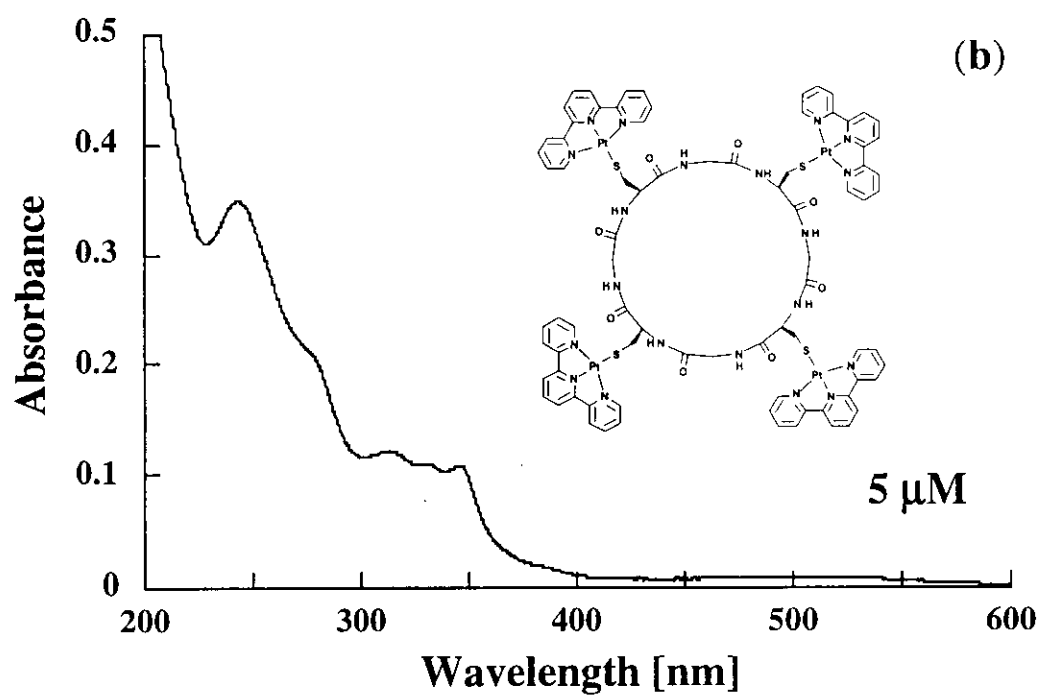
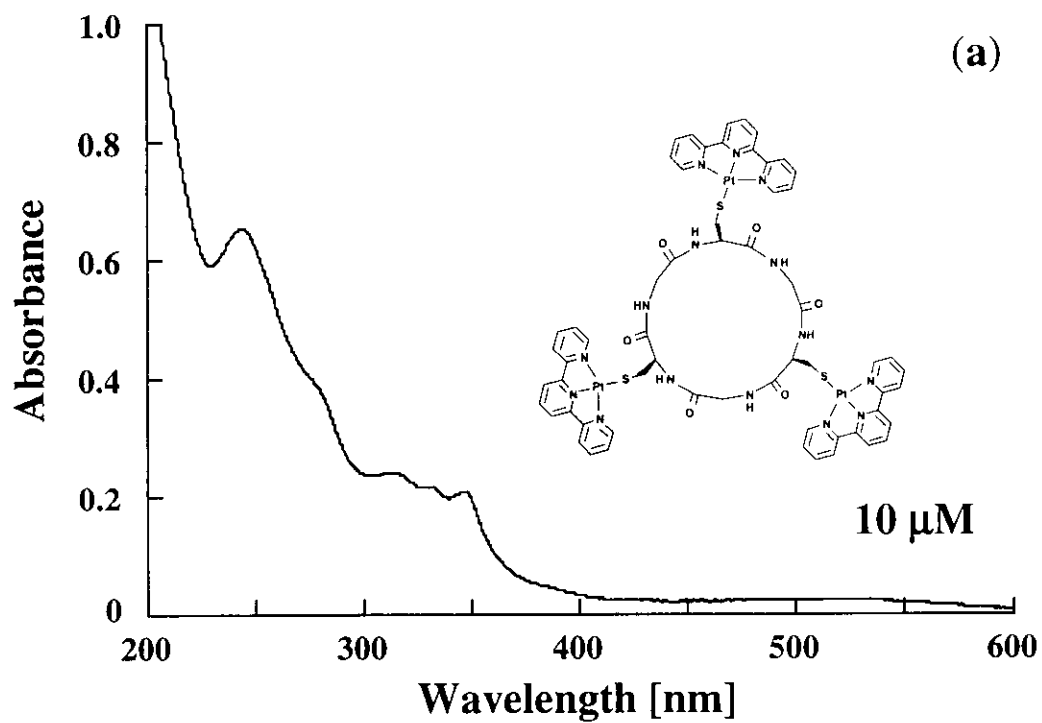


Comparison of 1H NMR Spectra of
Linear (a) and Cyclic (b) $[Gly-L-Cys(terpyPt^{II})]_4$

☒ 3-16



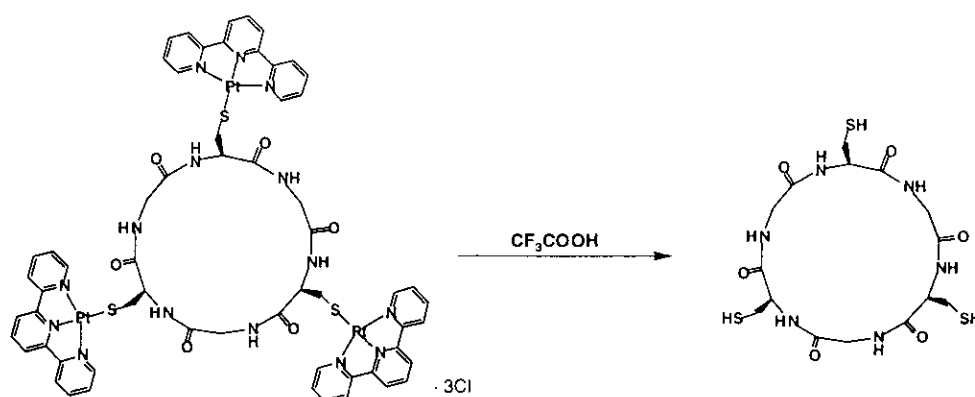
☒ 3-17



UV-vis spectra of $\text{cyclo}[-\text{Gly-L-Cys}(\text{terpyPt}^{\text{II}})-]_3 \cdot \text{Cl}_3$ (a) and $\text{cyclo}[-\text{Gly-L-Cys}(\text{terpyPt}^{\text{II}})-]_4 \cdot \text{Cl}_4$ (b) in H_2O at 25°C .

3-5. 環状メタロペプチドからの金属錯体の除去

L-Cys のチオレートアニオン (S) が配位した $\text{terpyPt}^{\text{II}}$ は、遷移金属イオン (Zn^{2+} , Cu^{2+}) により Pt-S 結合を切断することが知られている⁵⁶⁾。これは、遷移金属イオンのルイス酸性により起こっている。今回合成した環状メタロペプチドについても、L-Cys のチオレートアニオンから $\text{terpyPt}^{\text{II}}$ を除去できれば、天然の環状ペプチドの改良合成法あるいは、他の金属錯体の導入に展開できると考えられる。ここでは、環状メタロペプチドの $\text{terpyPt}^{\text{II}}$ 部分の除去を TFA を用いて行った。



3-5-1. 実験の部

a) 試薬・機器について

TFA は和光純薬製をそのまま使用した。

高速液体クロマトグラフィー (HPLC) は、TOSO HPLC システムを使用した。カラムは、TSK-gel 80Ts (21.5 mmID x 30 cm, TOSO) を使用し、溶媒 0.1 % TFA 含有 $\text{H}_2\text{O}-\text{CH}_3\text{CN} = 7:3$ 、流速 5 ml/min、カラム温度 25 °C で行った。検出には UV (220 nm) を用いた。

エレクトロスプレーイオン化マスペクトル (ESIMS) は、パーキンエルマー製の PE SCIEX API-300 spectrometer (イオン化法：エレクトロスプレー、質量分析：四重極型質量分析計 (QMS)) により測定した。

b) 金属錯体の除去

環状ヘキサメタロペプチド $\text{cyclo}[-\text{Gly-L-Cys}(\text{terpyPt}^{\text{II}})-]_3 \cdot 3\text{Cl} \cdot 11\text{H}_2\text{O}$ (0.5 mg, 0.24 μmol) を室温で TFA (1 ml) に溶解したところ、濃赤色の固体が橙色になった。この橙色溶液の ESIMS を測定した。MS (ESI): m/z (Calcd) 479 (479, $[\text{M} - \text{H}^+]$)

c) 環状ヘキサペプチドの単離精製

環状ヘキサメタロペプチド $\text{cyclo}[-\text{Gly-L-Cys}(\text{terpyPt}^{\text{II}})-]_3 \cdot 3\text{Cl} \cdot 11\text{H}_2\text{O}$ (1.0 mg, 0.48 μmol) を室温で TFA (1 ml) に溶解した。橙色になった溶液を蒸発乾固し、アルゴン置換した H_2O 1ml を加えてたところ、濃赤色の溶液になった。この溶液の ESIMS を測定したところ、環状ペプチドと思われるピークが無くなっていた。 $\text{terpyPt}^{\text{II}}$ に再び、Cys のチオール基が配位したものと考えられる。MS (ESI): m/z (Calcd) 587 (587, $[\text{M}]^{3+}$), 667 (667, $[\text{M} - \text{terpyPt}^{\text{II}} + \text{H}^+]^{2+}$).

次に、TFA 溶液をそのまま HPLC で分取精製することを試みたが、ピークが検出されなかった。

3-5-2. 結果・考察

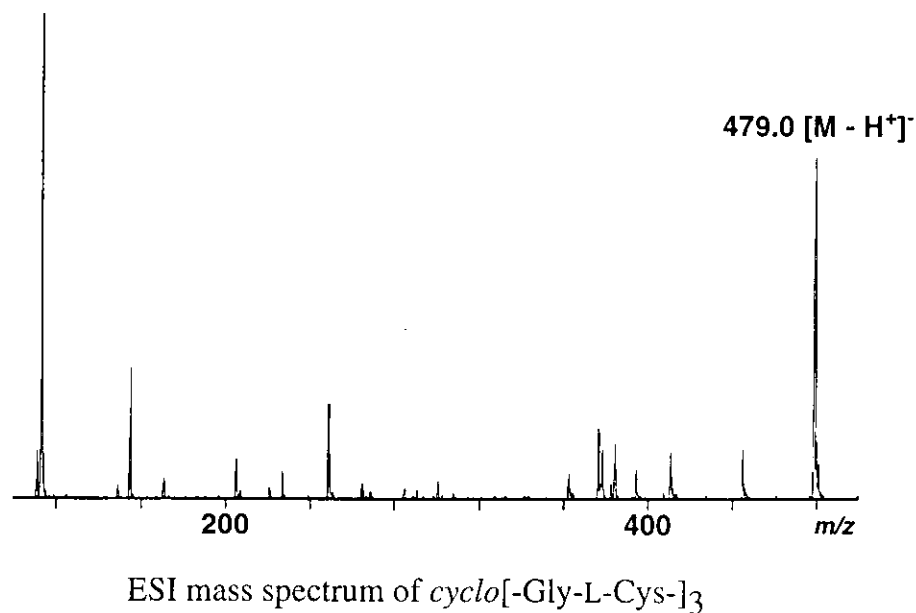
ESIMS 測定 (陰イオン検出) の結果、環状ヘキサメタロペプチド $\text{cyclo}[-\text{Gly-L-Cys}(\text{terpyPt}^{\text{II}})-]_3 \cdot \text{Cl}_3$ から $\text{terpyPt}^{\text{II}}\text{Cl}$ が除去された環状ヘキサペプチド $\text{cyclo}[-\text{Gly-L-Cys}-]_3$ である m/z 479 $[\text{M} - \text{H}^+]$ が得られた (図 3-18)。これは、環状メタロペプチドの $\text{terpyPt}^{\text{II}}$ が TFA により除去できることを示している。また、陽イオン検出の測定では、 $\text{terpyPt}^{\text{II}}\text{Cl}$ である m/z 463 $[\text{M}]^+$ が得られており、環状ヘキサメタロペプチドと思われるピークは検出されなかった。このことから、環状ヘキサメタロペプチドの金属錯体部分の除去が TFA により効率よく行われていると考えられる。

HPLC により、この環状ヘキサペプチドの単離を試みたが、ピークが検出でき

なかった。金属錯体を除去した環状ペプチドの単離が今後の大きな課題である。イオン交換樹脂や金属イオンを使用することによる金属錯体の除去について、現在、検討中である。

ペプチド上から金属錯体を除去できることから、他の機能性金属錯体との置換が可能であることを示唆している。また、金属錯体が環状ペプチド合成のための保護基としても利用できることを示唆している。

図 3-18



3-6. 総括

金属錯体を導入した直鎖状メタロペプチド、およびこれを環化することにより、環状メタロペプチドを合成することに成功した。環状ペプチド骨格上に金属錯体を集積化するための新しい手法の一つを開発することができた。

具体的には、天然型アミノ酸である L-Cys と Gly の繰返し配列を有するペプチド上に金属錯体を導入させることにより、直鎖状メタロペプチド $H_2[-Gly-L-Cys(terpyPt^{II})-]_n-OH \cdot (CF_3CO_2)_{n+1}$ ($n = 2, 3, 4, 5$) を収率良く合成することができた。

直鎖状ヘキサ、オクタおよびデカメタロペプチド ($n = 3, 4, 5$) を水溶液中で環化することにより、分子内で環化した環状メタロペプチド $cyclo[-Gly-L-Cys(terpyPt^{II})-]_n \cdot Cl_n$ ($n = 3, 4, 5$) を得ることができた。興味深いことに、直鎖状テトラメタロペプチド ($n = 2$) については、二分子が縮合し環化した環状オクタメタロペプチド $cyclo[-Gly-L-Cys(terpyPt^{II})-]_4 \cdot Cl_4$ が得られた。これは、直鎖状メタロペプチドが短いため、分子内の環化より分子間での縮合が優先したためと考えられる。

これまで、環状ペプチドはそのほとんどが有機溶媒中や固相法により合成されてきた。本研究において、ペプチド上に金属錯体を導入することにより、水溶液中で効率よく環化させることに成功した。また、これらの環状メタロペプチドは、水溶液中で対称性の高い構造をとっており、金属錯体がペプチド上で規則正しく集積化していることがわかった。

さらに、環状メタロペプチドを酸で処理することにより、金属錯体 ($terpyPt^{II}$) 部分を除去でき、天然型の環状ペプチドを得られることがわかった。

ペプチドの環サイズや金属錯体の種類を変えることにより、一般性を高めることが今後の大きな課題である。

第4章 環状メタロペプチドを用いた分子認識

Cyclic metallopeptides, cyclo[Gly-L-Cys(terpyPt^{II})]_nCl_n

Kentaro Tanaka, Kazuki Shigemori and Mitsuhiko Shionoya

Chem. Commun., **1999**, 2475-2476.

**Incorporation and Alignment of Functional Metal Complexes
onto Cyclopeptide Frameworks**

Kazuki Shigemori, Kentaro Tanaka, Sachiko Arie,

Sanae Furusho and Mitsuhiko Shionoya

in preparation.

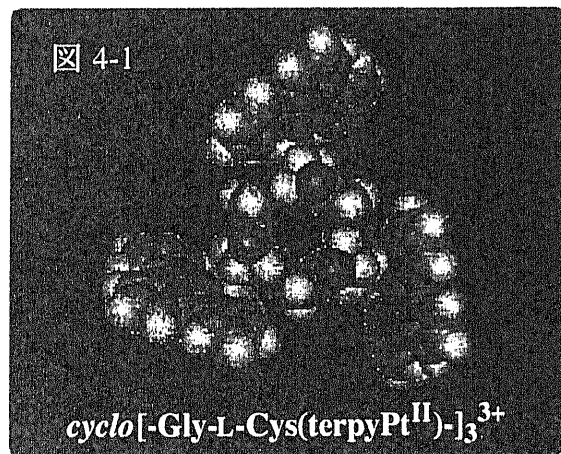
4-1. 緒言

クラウンエーテル、クリプタンド、シクロデキストリン、シクロファンや大環状ポリアミン等の環状化合物は、金属イオンの選択的結合、イオノフォアや低分子の分子認識場を提供する機能分子として広く研究されてきた^{1)~16)}。例えば、Pedersenによるクラウンエーテルのアルカリ金属イオン選択性^{1),2)}等があげられる。また、生体内アミノ酸や化学修飾を施したアミノ酸を用いて作られた環状ペプチドも、分子認識場を提供する機能性分子として期待されている。例えば、石田らによる環状ヘキサペプチドの水素結合によるパラニトロフェニルリン酸選択性等様々な研究がなされてきた^{37)~42)}。

本章ではペプチド上に金属錯体を導入した環状メタロペプチドの分子認識能について検討を行った。

環状メタロペプチド $cyclo[-Gly-L-Cys(terpyPt^{II})-]_n \cdot Cl_n$ は、カルボニル酸素やアミノ水素により水素結合部位を有しており、導入された金属錯体のタービリジンによる疎水的な性質と、金属イオンによる親水的な性質を併せ持っている。また、これらは+2価の白金カチオンと-1価のチオレートアニオンにより、全体として正電荷を有する環状化合物である。筆者は、これらの性質を分子認識能場のデザインに適用できると考え、環状メタロペプチドとアニオン性有機分子との相互作用を検討した。

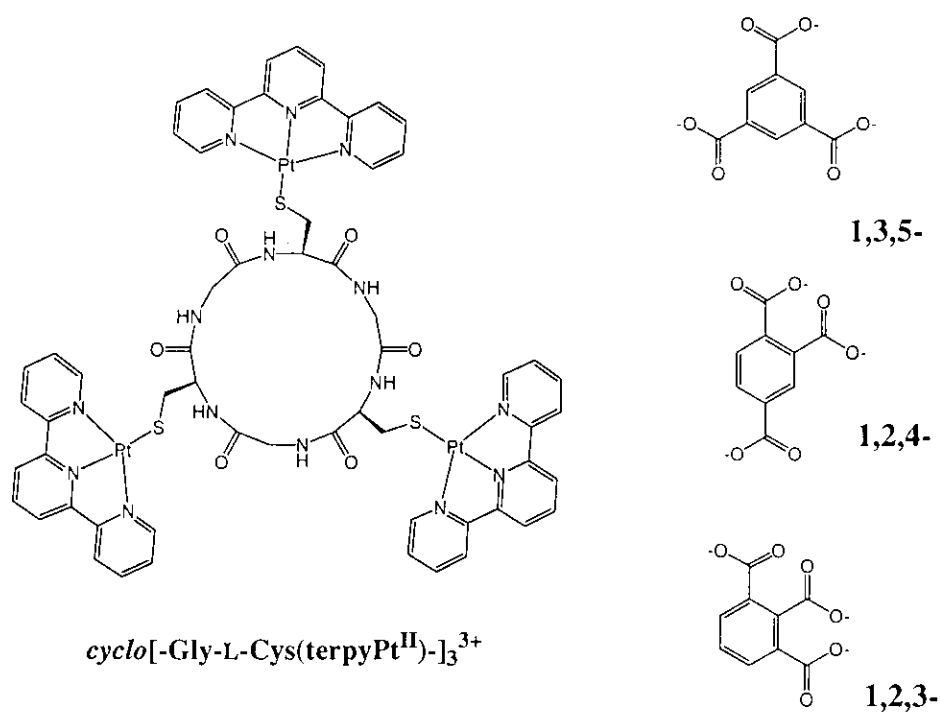
環状ヘキサメタロペプチド $cyclo[-Gly-L-Cys(terpyPt^{II})-]_3^{3+}$ は、3個の白金錯体 ($terpyPt^{II}$) が環状ヘキサペプチド上に等間隔で導入された対称性の高い構造を取っているものと考えられる。図4-1に環状ヘキサメタロペプチドをモレキュラーメカニクスで計算したものを示



した。Gly-L-Cys(terpyPt^{II}) ユニット中の Cys(terpyPt^{II}) は、+2 価の白金イオンと -1 価のチオレートアニオンが結合し、トータル+1 価の電荷を有しており、環状ヘキサペプチド上に 3 つの金属カチオン (正電荷) が空間的に固定化されていると考えることができる。このように環状ヘキサペプチドは対称性のよい正電荷を有する分子であるため、負電荷を有する分子を捕捉できるのではないかと考えた。そこで、3 価の負電荷を有するアニオン性分子との相互作用を見ることで、環状ヘキサメタロペプチドの分子認識能について検討した。基質としてベンゼントリカルボン酸アニオンの構造異性体である 1,3,5-、1,2,4- および 1,2,3- の 3 種類を用いた (図 4-2)。

図 4-2

ベンゼントリカルボン酸アニオン



4-2. アニオン性分子の選択的分離

3 価の正電荷を持つ環状ヘキサメタロペプチド $cyclo[-Gly-L-Cys(terpyPt^{II})-]_3^{3+}$ と 3 価の負電荷を持つ 3 種類のベンゼントリカルボン酸アニオンとの相互作用について 1H NMR および ESIMS により検討した。

4-2-1. 実験の部

a) 試薬・機器について

1H NMR は JEOL Lambda 500 (500 MHz for 1H) により測定し、20% CD_3CO_2D/D_2O 溶液のスペクトルの標準物質には TSP を外部標準として用いた。化学シフト (δ) は ppm で表し、シグナルの開裂パターンを s (singlet)、d (doublet)、dd (doublet of doublet)、ddd (doublet of doublet of doublet)、t (triplet)、m (multiplet)、br (broad) で表記した。カップリング定数 J は Hz で表記した。

エレクトロスプレーイオン化マススペクトル (ESIMS) は PE SCIEX API-300 spectrometer (イオン化法：エレクトロスプレー、質量分析：四重極型質量分析計 (QMS)) により測定した。

b) 1,3,5-ベンゼントリカルボン酸塩の選択的分離

$cyclo[-Gly-L-Cys(terpyPt^{II})-]_3 \cdot Cl_3 \cdot 11H_2O$ (1.0 mg, 0.48 μ mol) の水溶液 (3 ml) に、3 種類のベンゼントリカルボン酸ナトリウム (1,3,5-、1,2,4- および 1,2,3-) それぞれ等濃度 (1 mM) の混合水溶液 480 μ l を加え、一晚室温で放置した。濃赤色の沈殿が現れたため、これをメンブレンフィルターで濾取し水洗し、真空乾燥を行った (0.8 mg)。得られた沈殿物を $cyclo[-Gly-L-Cys(terpyPt^{II})-]_3^{3+}$ とベンゼントリカルボン酸アニオンとの 1:1 の化合物として収率 85 % であった。この沈殿物を 20 % 酢酸水溶液に溶解し ESIMS を測定し、さらに、20 % 重酢酸水溶液に溶解し 60 $^{\circ}C$ で 1H NMR を測定した。

4-2-2. 結果・考察

環状ヘキサメタロペプチドに3種類(1,3,5-, 1,2,4-, 1,2,3-)のベンゼントリカルボン酸塩の混合物を加えることにより得られた濃赤色の沈殿物は、 H_2O に全く溶解しなかった。これについては2つの要因が考えられる。一つは、溶液中で3価のカチオン分子である環状ヘキサメタロペプチドが3価のアニオン分子であるベンゼントリカルボン酸アニオンと複合体を形成し中性となったこと、もう一つは、親水性部分であるペプチド鎖が疎水性分子であるターピリジンとベンゼンに周囲を囲まれたことが考えられる。この沈殿物に20%の酢酸水溶液を加えたところ、完全に溶解した。これは、ベンゼントリカルボン酸アニオンの3つのカルボン酸アニオンが酢酸によりプロトン化し環状ヘキサメタロペプチドに正電荷を持たせることができたためであると考えられる。

そこで、沈殿物の20%酢酸水溶液および20%重酢酸水溶液を用いて、それぞれESIMSと 1H NMRの測定を行った。この沈殿物の 1H NMR(20% CD_3CO_2D/D_2O , 60°C)から、1,3,5,-ベンゼントリカルボン酸アニオンの芳香環プロトンに相当するシグナル($\delta = 8.76$)が観測された(図4-4)。これは、 $cyclo[-Gly-L-Cys(terpyPt^{II})-]_3^{3+}$ が1,3,5,-ベンゼントリカルボン酸アニオンを選択的に分離していること示唆された。プロトンの積分比からも1:1の組成であることがわかった。また、環状ヘキサメタロペプチドに1,3,5-, 1,2,4-, 1,2,3-を単独で加えたとき、それぞれ濃赤色の沈殿が得られた。このことから、環状ヘキサメタロペプチドが3種類のベンゼントリカルボン酸アニオン混合物の中から、1,3,5-ベンゼントリカルボン酸アニオンに高い選択性を有していると考えられる。

沈殿物のESIMSの測定結果から、 m/z 1970の値が得られた(図4-3)。これは、 $cyclo[-Gly-L-Cys(terpyPt^{II})-]_3^{3+}$ とベンゼントリカルボン酸アニオンとの1:1の複合体が1つプロトン化した分子量に相当し、1:1で複合体を形成していることを示唆している。2つプロトン化した m/z 986の値も得られている。

図4-5に環状ヘキサメタロペプチドと1,3,5-ベンゼントリカルボン酸アニオン

のモレキュラーメカニクスで計算したものを示した。金属カチオンが空間的に固定化された環状ヘキサペプチドと 1,3,5-ベンゼントリカルボン酸の 3 つのアニオンが、分子のサイズや電荷の位置を考えたときに相互作用しやすい構造をとり、環状ヘキサメタロペプチドが 1,3,5-ベンゼントリカルボン酸アニオンを選択的に分離するのではないかと考えられる。

この環状ヘキサメタロペプチドの 1,3,5-ベンゼントリカルボン酸アニオンに対する会合定数は、基質を加えることにより沈殿を生じるため測定できなかった。

また、沈殿物の $^1\text{H NMR}$ において、1,3,5-ベンゼントリカルボン酸のプロトンが高磁場側にシフトしている。これは、環状ヘキサメタロペプチドのターピリジン部分の芳香環による遮へい効果によるものと考えられる (図 4-6)。

以下に $^1\text{H NMR}$ および ESIMS の結果を示した。また、図 4-6 にそれぞれの $^1\text{H NMR}$ のチャートを示した。

A ternary complex of *cyclo*[-Gly-L-Cys(terpyPt^{II})]₃³⁺ with benzene tricarboxylates. $^1\text{H NMR}$ (20% $\text{CD}_3\text{CO}_2\text{D}/\text{D}_2\text{O}$, 60 °C): δ 3.22 (dd, $J = 6.2, 12.3$ Hz, 3H), 3.25 (dd, $J = 5.5, 12.8$ Hz, 3H), 3.82 (d, $J = 17.3$ Hz, 3H), 4.21 (d, $J = 17.1$ Hz, 3H), 7.76 (ddd, $J = 1.5, 5.8, 7.5$ Hz, 6H), 8.10 (pseudo d, $J = 7.8$ Hz, 6H), 8.17 (d, $J = 8.1$ Hz, 6H), 8.20 (ddd, $J = 1.5, 7.8, 7.8$ Hz, 6H), 8.34 (t, $J = 8.1$ Hz, 3H), 8.76 (s, 3H), 9.09 (dd, $J = 1.0, 5.6$ Hz, 6H). 3 プロトン分のシグナルは HOD のピークに隠れている。MS (ESI): m/z (Calcd) 1970 (1970, $[\text{M} + \text{H}^+]^+$), 986 (986, $[\text{M} + 2\text{H}^+]^{2+}$).

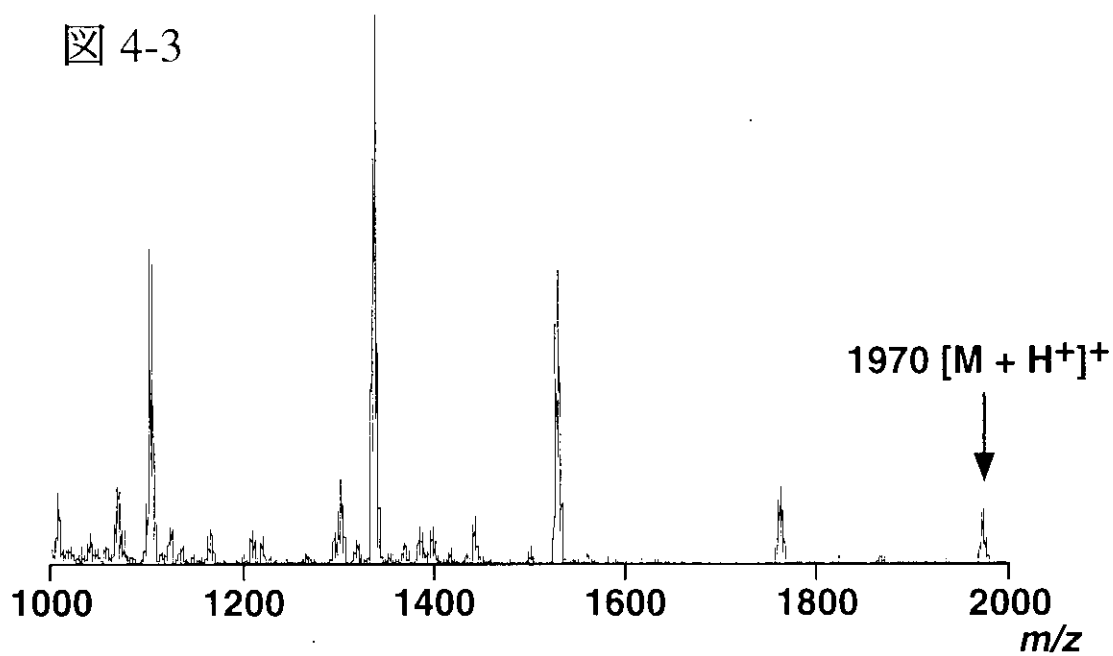
***Cyclo*[-Gly-L-Cys(terpyPt^{II})]₃·Cl₃·11H₂O.** $^1\text{H NMR}$ (20% $\text{CD}_3\text{CO}_2\text{D}/\text{D}_2\text{O}$, 60 °C): δ 3.21 (dd, $J = 6.4, 12.5$ Hz, 3H), 3.25 (dd, $J = 5.5, 12.6$ Hz, 3H), 3.82 (d, $J = 17.3$ Hz, 3H), 4.21 (d, $J = 17.3$ Hz, 3H), 7.76 (ddd, $J = 1.5, 5.8, 7.5$ Hz, 6H), 8.10 (pseudo d, $J = 8.1$ Hz, 6H), 8.17 (d, $J = 8.3$ Hz, 6H), 8.20 (ddd, $J = 1.5, 8.1, 8.1$ Hz, 6H), 8.34 (t, $J = 8.1$ Hz, 3H), 9.09 (dd, $J = 1.0, 5.6$ Hz, 6H). 3 プロトン分のシグナルは HOD のピークに隠れている。

Sodium 1,2,3-benzene tricarboxylate. ^1H NMR (20% $\text{CD}_3\text{CO}_2\text{D}/\text{D}_2\text{O}$, 60 °C): δ 7.71(t, $J = 8.0$ Hz, 1H), 8.24 (d, $J = 7.8$, 2H).

Sodium 1,2,4-benzene tricarboxylate. ^1H NMR (20% $\text{CD}_3\text{CO}_2\text{D}/\text{D}_2\text{O}$, 60 °C): δ 7.87 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 8.17 (dd, $J = 1.7, 8.1$ Hz, 1H), 8.43 (d, $J = 1.7$ Hz, 1H).

Sodium 1,3,5-benzene tricarboxylate. ^1H NMR (20% $\text{CD}_3\text{CO}_2\text{D}/\text{D}_2\text{O}$, 60 °C): δ 8.78 (s, 3H).

☒ 4-3



ESI mass spectrum for the 1 : 1 ternary complex of *cyclo*[-Gly-L-Cys(terpyPt^{II})-]₃³⁺ with 1,3,5-benzenetricarboxylate in 20 % CH₃COOH : *m/z* (Calcd) 1970 (1970, [M + H⁺]⁺).

☒ 4-4

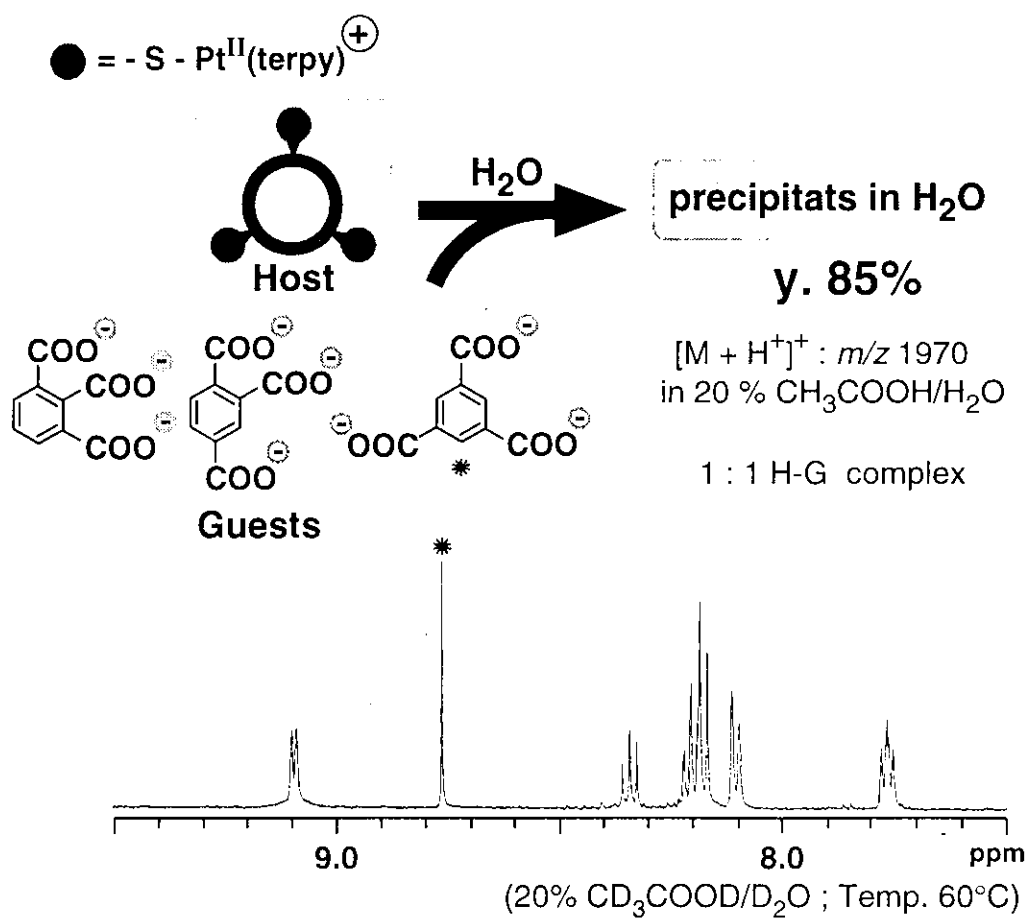
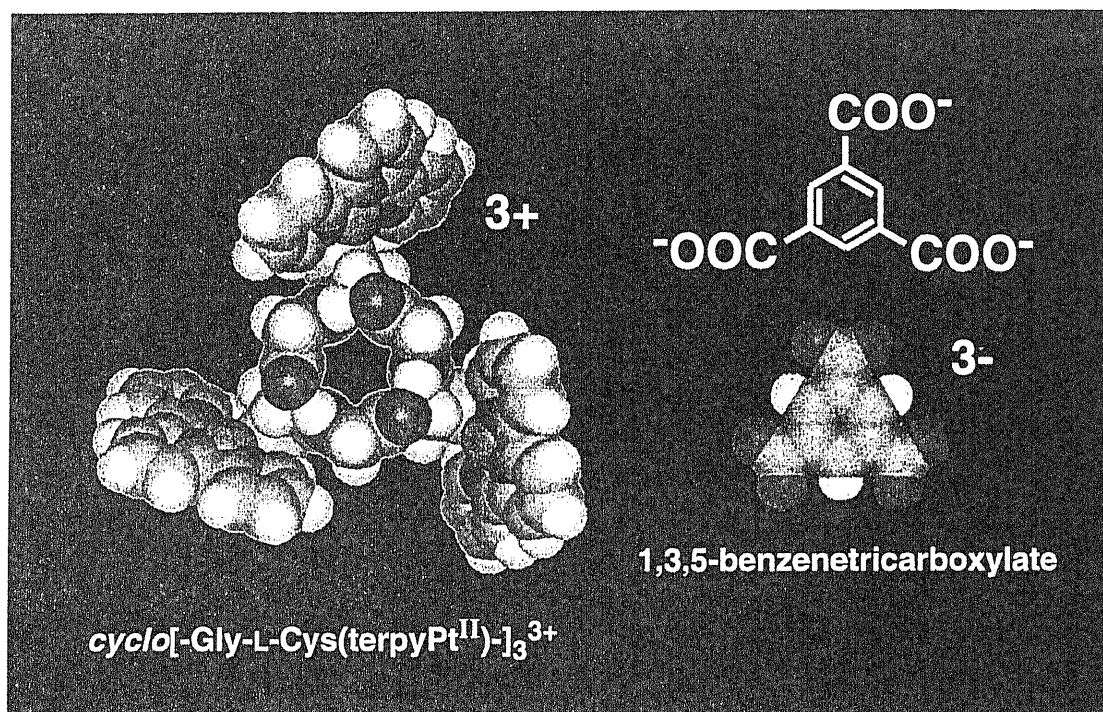
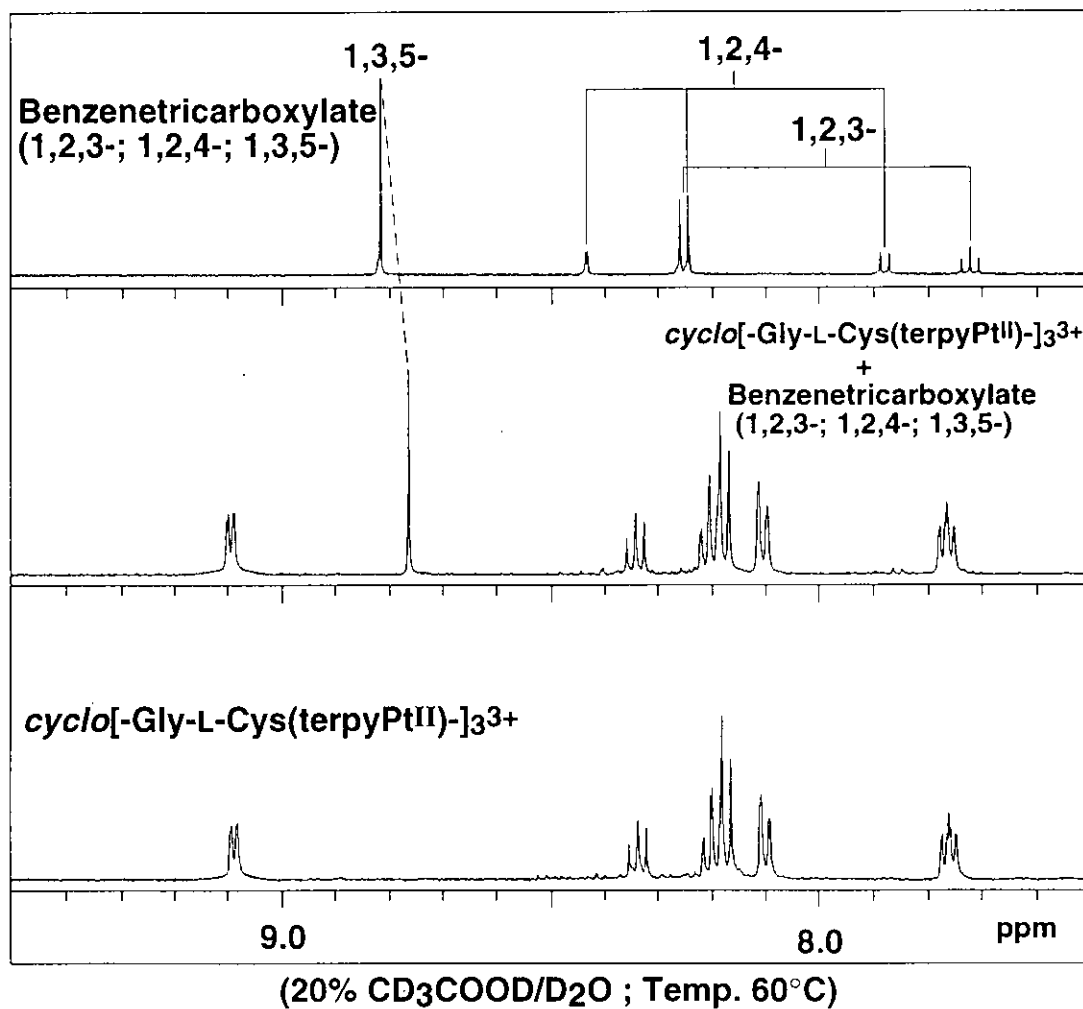


图 4-5



☒ 4-6



^1H NMR spectra of *cyclo*[Gly-L-Cys(terpyPt^{II})]₃, benzenetricarboxylates, and their ternary complex

4-3. 総括

本章では、3価の正電荷を持つ環状ヘキサメタロペプチド $\text{cyclo}[-\text{Gly-L-Cys}(\text{terpyPt}^{\text{II}})-]_3^{3+}$ と3価の負電荷を持つ3種類のベンゼントリカルボン酸アニオンとの相互作用について¹H NMR および ESIMS により検討した。

得られた濃赤色の沈殿物の¹H NMR 測定の結果から、環状ヘキサメタロペプチドは、1,3,5-ベンゼントリカルボン酸アニオンを選択的に分離することがわかった。また、ESIMS の測定から 1:1 のコンプレックスを形成していることも示唆された。

これらの結果は、両者が相補的に結合するのに適した分子サイズや電荷の位置を有しているためと考えられる。

5. 結論

本研究は、直鎖および環状ペプチド上に複数の金属錯体を導入する新しい合成法を開発することを目的とし、金属錯体を導入した直鎖状ペプチドの合成と、それを環化することによる環状メタロペプチドの合成、およびその機能性について検討した。

金属配位能を有する L-Cys と Gly の繰り返し配列をもつペプチド上に、DNA 結合能や光応答機能をもつ terpyPt^{II} を集積化させた直鎖状メタロペプチド H-[-Gly-L-Cys(terpyPt^{II})-]_n-OH·(CF₃CO₂)_{n+1} (n = 2, 3, 4, 5) の合成に成功した。これら直鎖状メタロペプチドを縮合剤および活性化剤存在下、水溶液中で環化することにより、環状メタロペプチド *cyclo*[-Gly-L-Cys(terpyPt^{II})-]_n·Cl_n (n = 3, 4, 5) を高効率で合成し、環状ペプチド上に金属錯体を集積化させることができた。これらの環状メタロペプチドから金属錯体 terpyPt^{II} を除去できることがわかった。金属錯体の除去により、他の機能性金属錯体との置換が可能であることが示唆された。

これらの環状ペプチドの機能性を評価するために、環状ヘキサメタロペプチドのアニオン分子に対する分子認識場としての機能について検討したところ、3 価の負電荷を持つ 3 種類のベンゼントリカルボン酸アニオン混合物から、1,3,5-ベンゼントリカルボン酸アニオンのみを選択的に分離できることがわかった。

本研究において、アミノ酸側鎖上に金属錯体を導入した環状メタロペプチドの新しい合成法を開発し、環状ペプチド上に金属錯体を規則正しく集積化することに成功した。本法の一般性を高めるために、ペプチドの配列や環サイズ、金属錯体の種類などを変えることが今後の大きな課題である。本研究により開発された環状メタロペプチドの新しい合成法は、金属錯体を集積・配列化する方法の一つとして新しい切り口を提供するものであり、さらに特殊空間(分子認識場、光応答場、不斉場等)の構築に展開できると確信する。

6. 参考文献

- 1) C. J. Pedersen, *J. Am. Chem. Soc.*, **89**, 2495 (1967).
- 2) C. J. Pedersen, *J. Am. Chem. Soc.*, **89**, 7017 (1967).
- 3) B. Dietrich, J.-M. Lehn and J.-P. Sauvage, *Tetrahedron Lett.*, 2885 (1969).
- 4) B. Dietrich, J.-M. Lehn, J.-P. Sauvage and J. Blanzat, *Tetrahedron*, **29**, 1629 (1973).
- 5) B. Dietrich, J.-M. Lehn and J.-P. Sauvage, *Tetrahedron*, **29**, 1647 (1973).
- 6) D. J. Cram and J. M. Cram, *Science*, **183**, 803 (1974).
- 7) A. Collet, J.-P. Dutasta, B. Lozach, J. Canceill, *Top. Curr. Chem.*, **165** (1993).
- 8) J.-M. Lehn, *Supramolecular Chemistry*, VCH, Weinheim (1995).
- 9) M. L. Bender, *J. Am. Chem. Soc.*, **88**, 2318 (1966).
- 10) R. Breslow, *Chem. Soc. Rev.*, **1**, 553 (1972).
- 11) F. Vögtle, H. Sieger and W. M. Müller, *Top. Curr. Chem.*, **98**, 107 (1981).
- 12) K. Odashima, A. Itai, Y. Iitaka and K. Koga, *J. Am. Chem. Soc.*, **102**, 2504 (1980).
- 13) I. Tabushi and K. Yamamura, *Top. Curr. Chem.*, **113**, 145 (1983).
- 14) Y. Murakami, *Top. Curr. Chem.*, **115**, 107 (1983).
- 15) E. Kimura, *Pure Appl. Chem.*, **61**, 823 (1989).
- 16) E. Kimura, *Prog. Inorg. Chem.*, **41**, 443 (1994).
- 17) R. Haubner, D. Finsinger, H. Kessler, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **36**, 1374 (1997).
- 18) W. F. DeGrado, *Adv. Protein Chem.*, **39**, 51 (1988).
- 19) W. F. DeGrado, *Science*, **261**, 879 (1993).
- 20) C. T. Choma, J. D. Lear, M. J. Nelson, P. L. Dutton, D. E. Robertson and W. F. DeGrado, *J. Am. Chem. Soc.*, **116**, 856 (1994).

- 21) M. R. Ghadiri, J. R. Granja, R. A. Milligan, D. E. McRee and N. Khazanovich, *Nature*, **366**, 324 (1993).
- 22) M. R. Ghadiri, J. R. Granja, R. A. Milligan, D. E. McRee and N. Khazanovich, *Nature*, **372**, 709 (1994).
- 23) M. R. Ghadiri, J. R. Granja and L. K. Buehler, *Nature*, **369**, 301 (1994).
- 24) N. Khazanovich, J. R. Granja, D. E. McRee, R. A. Milligan and M. R. Ghadiri, *J. Am. Chem. Soc.*, **116**, 6011 (1994).
- 25) J. R. Granja and M. R. Ghadiri, *J. Am. Chem. Soc.*, **116**, 10785 (1994).
- 26) M. R. Ghadiri, K. Kobayashi, J. R. Granja, R. K. Chadha and D. E. McRee, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **34**, 93 (1995).
- 27) T. D. Clark and M. R. Ghadiri, *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 12364 (1995).
- 28) K. Kobayashi, J. R. Granja, and M. R. Ghadiri, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **34**, 95 (1995).
- 29) M. Engels, D. Bashford and M. R. Ghadiri, *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 9151 (1995).
- 30) M. R. Ghadiri, *Adv. Mater.*, **7**, 675 (1995).
- 31) J. D. Hartgerink, J. R. Granja, R. A. Milligan and M. R. Ghadiri, *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 43 (1996).
- 32) K. Motesharei and M. R. Ghadiri, *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 11306 (1997).
- 33) H.S. Kim, J. D. Hartgerink and M. R. Ghadiri, *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 4417 (1998).
- 34) T. D. Clark, J. M. Buriak, K. Kobayashi, M. P. Isler, D. E. McRee and M. R. Ghadiri, *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 8949 (1998).
- 35) J. D. Hartgerink, T. D. Clark and M. R. Ghadiri, *Chem. Eur. J.*, **4**, 1367 (1998).
- 36) M. S. Vollmer, T. D. Clark, C. Steinem and M. R. Ghadiri, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **38**, 1598 (1999).
- 37) K. Donowaki, K. Ohkubo and H. Ishida, *Peptide Chem.*, 413 (1997).

- 38) H. Ishida, K. Donowaki, M. Suga, K. Shimose and K. Ohkubo, *Tetrahedron Lett.*, **36**, 8987 (1995).
- 39) H. Ishida, M. Suga, K. Donowaki and K. Ohkubo, *J. Org. Chem.*, **60**, 5374 (1995).
- 40) H. Ishida, K. Donowaki, Y. Inoue, Z. Qi and M. Sokabe, *Chem. Lett.*, 953 (1997).
- 41) H. Ishida and Y. Inoue, *Reviews on Heteroatom Chemistry*, **19**, 1 (1999).
- 42) G. Jung and W. Göpel, *Adv. Mater.*, **11**, 331 (1999).
- 43) J. P. Schneider and J. W. Kelly, *Chem. Rev.*, **95**, 2169 (1995).
- 44) J. P. Schneider and J. W. Kelly, *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 2533 (1995).
- 45) C. L. Nesloney and J. W. Kelly, *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 5836 (1996).
- 46) B. Imperiali and S. L. Fisher, *J. Am. Chem. Soc.*, **113**, 8527 (1991).
- 47) D. S. Wuttke, H. B. Gray, S. L. Fisher and B. Imperiali, *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 8455 (1993).
- 48) R. P. Cheng, S. L. Fisher and B. Imperiali, *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 11349 (1996).
- 49) G. K. Walkup and B. Imperiali, *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 3443 (1997).
- 50) P. Rossi, F. Felluga, P. Tecilla, F. Formaggio, M. Crisma, C. Toniolo and P. Scrimin, *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 6948 (1999).
- 51) A. M. van Oijen, M. Ketelaars, J. Köhler, T. Aartsma and J. Schmidt, *Science*, **285**, 400 (1999).
- 52) 泉屋信夫、加藤哲夫、青柳東彦、脇道典、ペプチド合成の基礎と実験、丸善、(1985).
- 53) M. Howe-Grant, K. C. Wu, W. R. Bauer and S. J. Lippard, *Biochemistry*, **15**, 4339 (1976).
- 54) K. W. Jennette, J. T. Gill, J. A. Sadownick and S. J. Lippard, *J. Am. Chem. Soc.*, **98**, 6159 (1976).
- 55) S. J. Lippard, *Acc. Chem. Res.*, 211 (1976).
- 56) C. C. Cheng and Y. L. Lu, *Chem. Commun.*, 253 (1998).

発表論文

- 1) Kentaro Tanaka, Kazuki Shigemori and Mitsuhiko Shionoya
Cyclic metallopeptides, $cyclo[\text{Gly-L-Cys}(\text{terpyPt}^{\text{II}})]_n\text{Cl}_n$
Chem. Commun., 1999, 2475-2476.
- 2) Kazuki Shigemori, Kentaro Tanaka, Sachiko Arie, Sanae Furusho and Mitsuhiko Shionoya
**Incorporation and Alignment of Functional Metal Complexes
 onto Cyclopeptide Frameworks** (準備中)

学会発表

- 1) 茂森一輝、田中健太郎、塩谷光彦
 「金属キレート能を有するペプチドを鋳型とした機能性金属錯体の合成」
 日本化学会第74春季年会、同志社大学・田辺キャンパス 1998年3月.
- 2) 茂森一輝、田中健太郎、塩谷光彦
 「大環状ペプチド金属錯体の合成と機能化」
 第13回生体機能関連化学シンポジウム、愛媛大学 1998年9月.
- 3) 茂森一輝、田中健太郎、塩谷光彦
 「大環状ペプチド金属錯体の精密設計と機能制御」
 第48回錯体化学討論会、高知大学 1998年9月.
- 4) K. Shigemori, K. Tanaka and M. Shionoya
 "An Efficient Strategy for the Liquid-phase Synthesis of Cyclic Metallopeptides"
 International Symposium ~Metal-assembled Complexes~, 岡崎 1998年10月.
- 5) 茂森一輝、田中健太郎、塩谷光彦
 "Cyclic Metallo-Peptides : Dynamic Chemosensing of Anionic Guest Molecules"
 第1回生命化学研究会シンポジウム、岡崎 1999年1月.
- 6) K. Shigemori, K. Tanaka and M. Shionoya
 "Cyclic Metallo-Peptides : Synthesis, Structures and Functions"
 The 62th Okazaki Conference、岡崎 1999年1月.
- 7) 茂森一輝、田中健太郎、塩谷光彦
 「大環状メタロペプチド： $cyclo[-\text{Gly-L-Cys}(\text{terpyPt}^{\text{II}})]_n\text{Cl}_n$ 」
 第14回生体機能関連化学シンポジウム、北海道大学 1999年9月.
- 8) 有江幸子、茂森一輝、田中健太郎、古荘早苗、塩谷光彦
 「金属錯体を側鎖に持つ大環状ペプチドの合成」
 日本化学会第78春季年会、日本大学 2000年3月.

謝辞

本研究を進めるにあたり、終始有益な御指導、御鞭撻を頂きました東京大学教授 塩谷 光彦 先生 (前 総合研究大学院大学および岡崎国立共同研究機構分子科学研究所 教授) に心から感謝いたします。

研究を進めるにあたり、終始有益な御助言を頂きました東京大学助手 田中 健太郎 博士 (前 岡崎国立共同研究機構分子科学研究所 助手) に感謝いたします。

研究を進めるにあたり、御協力を頂きました東京大学理学部化学科 4 年 有江幸子氏ならびに研究室諸氏に感謝いたします。

NMR 測定において、有益な御助言を頂きました岡崎国立共同研究機構分子科学研究所助教授 永田 央 先生に心から感謝いたします。

高分解能マスペクトルは、岡崎国立共同研究機構分子科学研究所技官 野村 幸代 氏およびジャスコインタナショナル株式会社 古荘 早苗 氏に測定して頂きました。心よりお礼申し上げます。

また、本研究は、岡崎国立共同研究機構分子科学研究所錯体化学実験施設ならびに東京大学大学院理学系研究科化学専攻生物無機化学研究室において行ったものです。御協力、御支援を頂きました教職員の皆様ならびに学生の皆様に感謝の意を表します。

平成 12 年 1 月

茂森一輝