ペプチ道

塩基脱保護流極意

第肆版其之零

九州大学大学院工学研究院
片山研究室

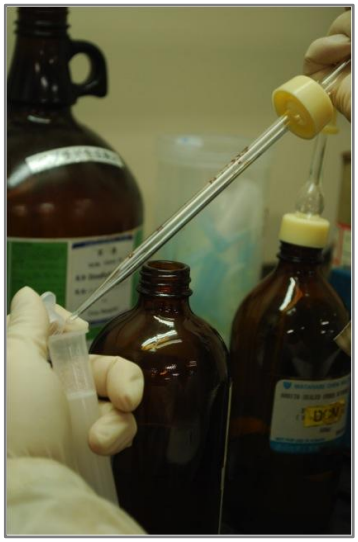
平成弐拾陸年神無月吉日

日本ペプ
党糸島支
部長ノ印

目次

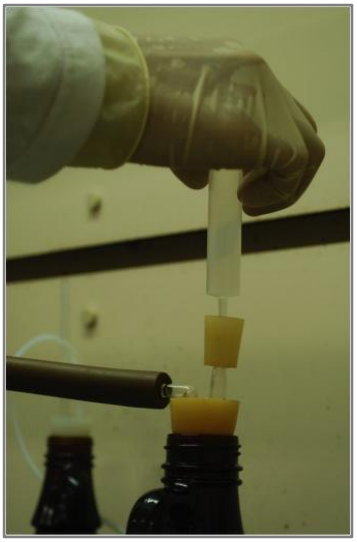
1. Fmoc/tBu 固相合成法 ------- 3
2. 合成設備を確認する ---------- 4
   2-1. 一般試薬
   2-2. 周辺設備
3. 試薬や器具を準備する -------- 5
   3-1. 樹脂の選択
   3-2. カラムの選択
   3-3. 樹脂の膨潤
   3-4. Fmocアミノ酸
   3-5. カップリング試薬の調製
   3-6. Kaiserテスト試薬の調製
4. ペプチドを伸長する ---------- 7
   4-1. Fmoc 保護樹脂への導入
   4-2. DCC/DMAP法によるヒドロキシ樹脂への導入
   4-3. 活性トリチル樹脂への導入
   4-4. ペプチド鎖の伸長
   4-5. ペプチドの伸長の終了
5. 反応を分析する ---------- 9
   5-1. アミノ酸の導入率の定量
   5-2. Kaiser テスト
   5-3. アセチル化
6. ペプチドを切り出す ---------- 10
   6-1. 強酸による脱樹脂・脱保護
   6-2. 希酸による保護ペプチドの脱樹脂
7. 特殊なアミノ酸をあつかう - 12
   7-1. Fmoc-Lys(ivDde)-OH
   7-2. Fmoc-Cys(Acm)-OH
   7-3. Fmoc-Cys(tButhio)-OH
   7-4. Fmoc-Cys(Mmt)-OH
8. コラム ---------- 14
9. おわりに ---------- 17
   9-1. 参考文献
   9-2. 本書の執筆に関して

ペプチ道の基本所作



溶媒を添加する

攪拌する

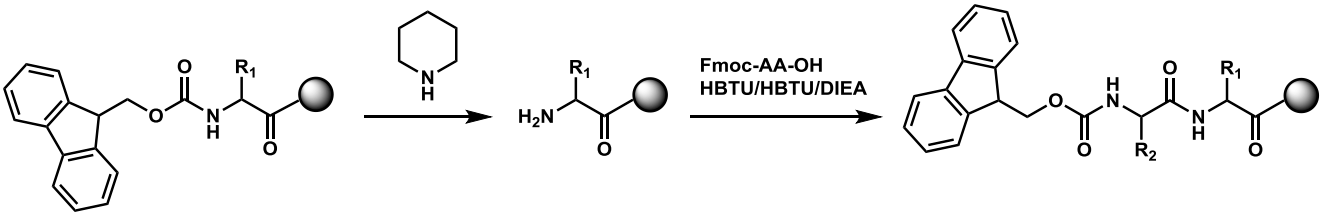


溶媒を除去する

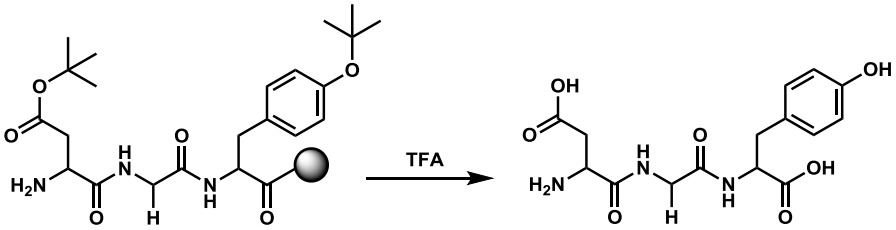
1-1. 反応

①第2級アミン（ピペリジン）による脱Fmoc反応
②縮合剤によるアミノ酸の伸長反応

スキーム．脱Fmoc反応①と伸長反応②



スキーム．強酸（TFA）による脱保護＆脱樹脂

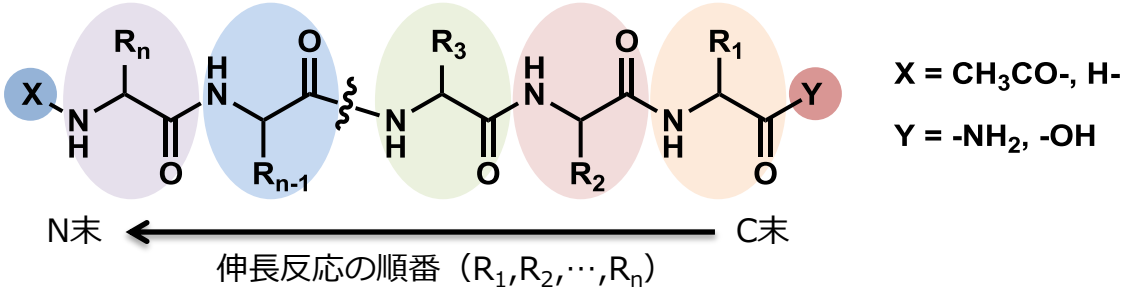


※　TFAによる脱保護では、Fmoc基は切断されない。

1-2. 分子設計

C末端側の置換基（Y）は樹脂の種類によって変わる。TFAによる脱樹脂後、ペプチドカルボキサミドの場合はY = $-NH_2$、ペプチド酸はY = -OHになる。
N末端側の置換基（X）は、脱Fmoc後、アミンになり（H-）、アセチル化（X = CH_3CO-）やカルボキシル基（X = HOOC-$(CH_2)_2$-CO-）の修飾ができる。

図．ペプチドの構造式



1-3. 固相合成

液相合成と異なり、固相合成は、簡単なステップで、高効率かつ大量に目的のペプチドを合成できる。またステップの最適化を行えば、純度の高いペプチドを得ることができる（操作、縮合剤など）。
直鎖状アミノ酸だけでなく、環状アミノ酸、側鎖修飾型アミノ酸の合成もできる。側鎖選択的な脱保護については、7章ならびに固相合成ハンドブックなどが詳しい[1]。

合成設備を確認する

2-1. 一般試薬

表．通常の合成サイクルで使用する試薬

試薬	表記	主用途
dichloromethane	DCM	樹脂の膨潤
N,N-dimethylformamide	DMF	反応溶媒
N-methylpyrrolidone	NMP	反応溶媒、樹脂の保存
methanol	MeOH	樹脂の収縮
piperidine	PPD	Fmoc基の脱保護
2-(1H-Benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate	HBTU	アミノ酸の縮合（縮合剤）
1-Hydroxy-1H-benzotriazole, monohydrate	HOBt	アミノ酸の縮合（活性化剤）
diisopropylethylamine	DIEA	有機塩基
phenol		Kaiser テスト
ninhydrin		Kaiser テスト
ethanol	EtOH	Kaiser テスト
0.0013%KCN/pyridine		Kaiser テスト（国産化学）
acetic anhydride	Ac_2O	未反応点のアセチル化
trifluoroacetic acid	TFA	側鎖の脱保護および脱樹脂
triisopropylsilane	TIS	側鎖の脱保護のスカベンジャー
ethanedithiol	EDT	側鎖の脱保護のスカベンジャー
diethyl ether	Et_2O	エーテル沈殿

表．特別な条件で使用する試薬

試薬	表記	主用途
dicyclohexylcarbodiimide	DCC	ヒドロキシ樹脂へのアミノ酸の導入
N,N-dimethyl-4-aminopyridine	DMAP	有機塩基
benzoic anhydride		未反応点のベンゾイル化
pyridine		Sieber, 2-Chlorotrityl resinからの脱樹脂
hydrazine monohydrate		ivDde基の脱保護
2-mercaptoethanol		tButhio基の脱保護
iodine	I_2	Acm,Trt基の脱保護、-SS-形成

2-2. 周辺設備

表．周辺機器および消耗品

機器名	用途
駒込ピペット/ピペットマン	溶液の添加　駒込ピペットは2mLスケールが適当
ボルテックスミキサー	カラムの攪拌　有機溶媒耐性のモデルが良い
ダイアフラムポンプ/吸引瓶	溶液の除去　吸引瓶はガロン瓶+ゴム栓で作製可
ガラスチューブ/ホットプレート	Kaizerテストに　IWAKI 9830-1007
デシケータ/真空ポンプ	サンプルの乾燥
UV吸光光度計	Fmoc定量
遠心機	脱保護ペプチドの回収
エバポレータ	溶媒の留去

3-1. 樹脂の選択

通常の合成では、コストパフォーマンスが良く高い収量が期待できる「Rink Amide AM resin HL」を利用する。ただし、配列が長くかさ高いペプチドやα-helixを形成するペプチドなどの合成では、伸長が困難になることがある。その場合は、密度が低く、PEG鎖を有する樹脂に適宜変更すること。
樹脂によっては、4-1.<脱Fmoc>の操作が要らない。樹脂の構造を確認する。

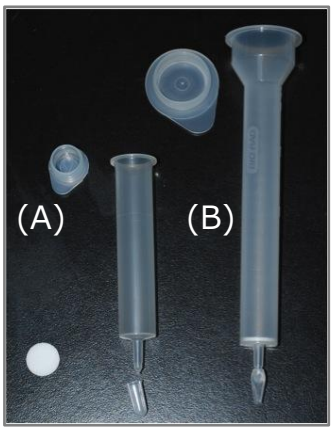
表．樹脂の種類と利用方法[1]

樹脂	反応点密度	基材	価格 /g	1st loading	脱樹脂
ペプチド酸					
Fmoc-AA-Wang resin	1.0 mmol/g	PS		pre-loaded	6-1.
NovaSyn TGA resin	0.2 mmol/g	PEG-PS	9,500	4-2.	6-1.
ペプチドカルボキサミド					
Rink amide PEGA resin	0.2 mmol/g	PEG-AAm	21,000	4-1.	6-1.
NovaSyn TGR resin	0.3 mmol/g	PEG-PS	15,000	4-1.	6-1.
Rink Amide AM resin LL	0.4 mmol/g	PS	8,000	4-1.	6-1.
Rink Amide AM resin HL	0.6 mmol/g	PS	8,000	4-1.	6-1.
Rink Amide NovaGel	0.7 mmol/g	PEG-PS	13,600	4-1.	6-1.
保護ペプチド酸					
2-Chlorotrityl chloride resin	1.3 mmol/g	PS	6,400	4-3.	6-2.
NovaSyn TGT alcohol resin	0.2 mmol/g	PEG-PS	14,800	4-2.	6-2.
保護ペプチドカルボキサミド					
Sieber Amide resin	0.6 mmol/g	PEG-PS	18,100	4-1.	6-2.

3-2. カラムの選択

カラム	至適スケール	価格	備考
PD-10 Empty Columns	~0.1 mmol	19,800円/50本	(A) GE, 17-0435-01
エコノパックカラム	~0.3 mmol	27,000円/50本	(B) BIO RAD, 732-1010

合成スケール（溶液量）に合わせて、カラムを選択する。樹脂が反応溶液に十分浸るカラムの太さにする。再利用可能だが、フィルターの劣化やキャップの破損などに注意すること。特に下部キャップは繰り返しのボルテックスでヒビが入りやすい。脱樹脂・脱保護で強酸を添加する前は、入念に確認すること（下部キャップはPetiSyzer用のもの (p.16) も利用できる）。フィルターが浮いていたら、セットし直す。



図．合成カラム

3-3. 樹脂の膨潤

選択した樹脂をカラムに測り取り、DMFに一晩浸漬させる。より膨潤係数の高いDCMで行っても良い（2-3時間程度）ただし、DCMは静置している間に揮発しやすく、また、低密度の樹脂の場合には液面に浮きやすいので注意すること。
（膨潤時間を長めに設定しているので、短縮可）

3-4. Fmocアミノ酸

樹脂の反応点に対して3等量のアミノ酸をチューブに分注する。
湿気を避けて遮光保存することが望ましい。

表．使用する主なFmocアミノ酸（赤字は-20℃で保存）

アミノ酸	表記	分子量	アミノ酸	表記	分子量	アミノ酸	表記	分子量
Ala	A	311.3	Leu	L	353.4	Lys(biotin)	Kb	594.7
Arg(Pbf)	R	648.8	Lys(Boc)	K	468.6	Lys(ivDde)	Ki	574.6
Asn(Trt)	N	596.7	Met	M	371.5	Lys(Mtt)	Km	624.8
Asp(OtBu)	D	411.7	Phe	F	387.4	Asp(Odmab)	Do	497.4
Cys(Trt)	C	585.7	Pro	P	337.4	Ser(PO(Obzl)OH)	pS	666.8
Gln(Trt)	Q	610.7	Ser(tBu)	S	383.4	Thr(PO(Obzl)OH)	pT	511.5
Glu(OtBu)	E	425.5	Thr(tBu)	T	397.5	Tyr(PO(Obzl)OH)	pY	573.5
Gly	G	297.3	Trp(Boc)	W	526.6	Cys(Acm)	Ca	414.5
His(Trt)	H	619.7	Tyr(tBu)	Y	459.6	Cys(tButhio)	Ct	431.6
Ile	I	353.4	Val	V	339.4	Cys(Mmt)	Cm	615.7

3-5. カップリング試薬の調製

合成スケールに合わせて用時調製する。試薬の溶解には、超音波を利用するが、水の混入に注意すること。一時保管する時は、窒素ガスをバブリングして遮光冷蔵保存する。一ヶ月程度は利用できるが、徐々に活性が低下するため、一度の合成で使い切る。分注しておくとフタの開閉による活性の低下を避けられる。

表．カップリング試薬のレシピ

0.45M 縮合剤カクテル		
HBTU	6.1 g	3.05 g
HOBt·H_2O	2.5 g	1.25 g
DMF	32 ml	16 ml
0.1 mmolスケールでの縮合回数	約45回	約20回

0.9M DIEA		
DIEA	5.5 ml	2.75 ml
NMP	29.5 ml	14.25 ml
0.1 mmolスケールでの縮合回数	約45回	約20回

（0.1mmol スケールでの各溶液の添加量：700μL（1回））

3-6. Kaiserテスト試薬の調製

1~3 の試薬セットを国産化学社より購入できる（品番:2590077, Reagents for Kaiser Test, 9,000円/set）。試薬 1, 2 は比較的安全なので、自身で調製できる。試薬 1 は色が濃くなってきたら作り直すこと。試薬 2 の調製は時間がかかるので、十分量あることを合成開始前に確認すること。

表．Kaiserテスト試薬のレシピ

Kaiserテスト試薬	原料	溶媒
1. ninhydrin/EtOH	0.5 g ninhydrin	10 ml EtOH
2. phenol/EtOH	8 g phenol	2 ml EtOH
3. KCN/pyridine	0.13 mg KCN	10 ml pyridine

最初のアミノ酸を導入する

4-1. Fmoc 保護樹脂への導入

4-4. ペプチド鎖の伸長 の手順で導入できる。

4-2. DCC/DMAP法によるヒドロキシ樹脂への導入 (0.1mmol スケール)

合成カラム　　25ml ナスフラスコ

〈カップリング〉

- 0.1 mmol ヒドロキシ樹脂 in DCM or DMF
  一晩膨潤
- 0.5 mmol Fmoc-AA-OH
  0.5 mmol DCC
  in DMF（溶解量、5ml以下）
  0℃，30分攪拌

※ DCCが解けない場合、DICでも可
※ 溶液量が少なすぎて、撹拌できない場合は、適宜DMFを加える。

- 0.05 mmol DMAP
  RT，60分攪拌

〈不純物の除去と未反応点のマスク〉

2ml DMF wash ×3
2ml DCM/EtOH (50/50) wash ×3
2ml DCM wash ×3
2ml DMF wash ×3

- 0.5 mmol benzoic anhydride in 2mL 20%pyridine/DMF
  RT，60分攪拌

DMF wash ×3
DCM wash ×3

4-4. ペプチド鎖の伸長へ ※ 5-1. Fmoc定量 により導入率を算出すること。

4-3. 活性トリチル樹脂への導入 (0.1mmol スケール)

25ml ナスフラスコ（合成カラムでも可）

〈カップリング〉

- 0.1 mmol 2-Chlorotrityl chloride 樹脂
  in DCM（浸漬量）
  RT，10分攪拌
- 0.15 mmol Fmoc-AA-OH
  0.5 mmol DIEA (80μl)
  in DCM (溶解量)
  RT，120分攪拌

※ 溶解しない場合は、適宜少量のDMFを追加して良い。

合成カラム

〈未反応点の不活性化〉

2ml DCM/MeOH/DIEA=17/2/1 wash ×3
2ml DCM wash ×3
2ml DMF wash ×3
2ml DCM wash ×3

4-4. ペプチド鎖の伸長へ ※ 5-1. Fmoc定量 により導入率を算出すること。

※ 4-2、4-3のアミノ酸の濃度は0.1M以上になる溶媒を選択 (目安は0.3~0.5M程度)

4-4. ペプチド鎖の伸長 (0.1mmol スケール)

Fmoc-AA_0-‥‥-resin

〈脱Fmoc〉
- 2ml 20%PPD/DMF　1分間ボルテックスで攪拌
- 2ml 20%PPD/DMF
- RT，10分振とう
- 2ml DMF wash ×5

※ 上部・下部のキャップに付着した溶媒、樹脂をよく洗浄すること。
保存時にFmoc基を外す恐れがある。

H-AA_0-‥‥-resin

〈カップリング〉
- 0.3 mmol Fmoc-AA_1-OH
- 0.3 mmol 縮合剤カクテル　700μl
- 0.6 mmol DIEA　700μl
- RT，15分振とう
- 2ml DMF wash ×5

※ 事前に混合し、完全に溶解したものを添加する。

Kaiser テスト

positive → 〈カップリング〉へ戻る

positive※ → アセチル化

3~4回カップリングしてもアミノ酸が導入されない場合は未反応点をアセチル化する。

negative → 〈樹脂の膨潤〉

〈樹脂の膨潤〉
- 2ml DCM wash ×3
- 2ml DMF wash ×3

※ 伸長途中のペプチドを一晩以上おく時は、ここで合成を中断し、DCMまたはNMPに浸漬させて冷蔵保存する。

Fmoc-AA_1-‥‥-resin

繰り返し

※ 合成スケールを変更する時は、〈カップリング〉時の mol 比が
Fmoc-AA-OH：縮合剤カクテル: DIEA：H_2N-(Resin) = 3: 3：6：1
となるように変更する。また〈脱Fmoc〉や各 wash 溶媒の量を、樹脂の体積の1.5倍程度となるように変更する。

4-5. ペプチドの伸長の終了

Fmoc-AA_n-‥‥-resin

〈脱Fmoc〉
- 2ml 20%PPD/DMF　1分間ボルテックスで攪拌
- 2ml 20%PPD/DMF
- RT，10分振とう
- DMF wash ×5

H-AA_n-‥‥-resin

アセチル化

N末端アセチルのペプチドを合成するときはここでアセチル化する。

- 2ml DCM wash ×5
- 2ml MeOH wash ×5

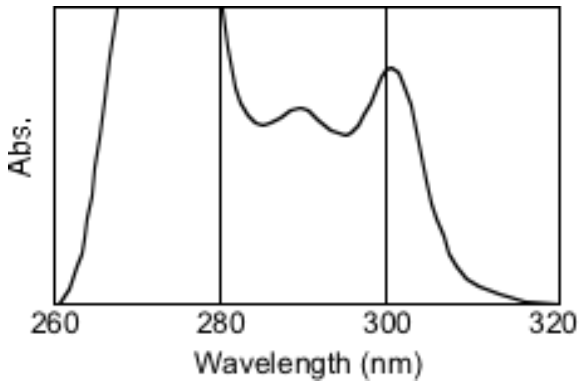
キャップを外し、デシケータで2時間以上乾燥させる。

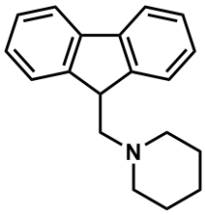
5-1. アミノ酸の導入率の定量

脱Fmoc反応が100%進行すると仮定すると、アミノ酸の導入率は〈脱Fmoc〉過程で溶出するFmoc基の量から見積もることができる。

操作

・4-4.〈脱Fmoc〉過程のろ液をすべて回収し、体積をメスシリンダーで測る（0.1 mmolスケールで約14ml、計量は15ml遠心管を用いてもよい）。
・DMFをブランクとして、DMFで10～100倍希釈したサンプルの301nmにおける吸光度を測定する。
・ε_{301nm} = 7,800 $M^{-1}cm^{-1}$としてFmoc 基の量を算出する。





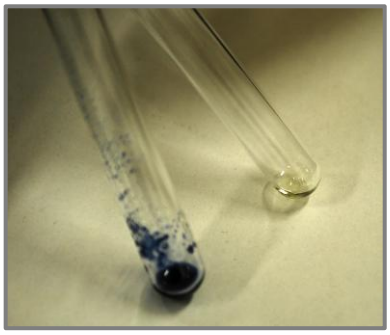
260~320nmに複数の3つの吸収ピークが認められる。

5-2. Kaiser テスト

ニンヒドリン反応を利用して、未反応のアミノ基の有無を確認する。

操作

・Kaiser テスト試薬1~3 を各 20μl をガラスチューブに入れる。
・微量の樹脂を入れ、沸騰水中で 1 分間加熱し、樹脂あるいは溶液の色を確認する。
濃赤～青色：positive / 黄色：negative



図．Kaiser テストの結果
左：positive / 右：negative

5-3. アセチル化

カップリングできなかったアミノ基のマスク、あるいはN末端のアミノ基のアセチル化に使用する。古い試薬は加水分解が進みpHが低くなっていることがある。希酸で脱樹脂される樹脂の使用時は注意すること。

操作 (0.1 mmolスケール)

2ml DCM wash ×3
2ml 25%Ac_2O/DCM　30秒間ボルテックスで攪拌
（RT，5分振とう）← N末端アミノ基のアセチル化の場合
2ml DCM wash ×3
2ml DMF wash ×5

樹脂から切り出す、保護基を外す

6-1. 強酸による脱樹脂および側鎖の脱保護

Fmocアミノ酸の側鎖の保護基は副反応を防ぐスカベンジャーを加えたTFAで脱保護できる。

表．脱保護カクテルの選択

脱保護カクテル	体積比	0.1 mmol スケールでの量 (μl)
Cys(Trt)やMetを含む場合		
TFA/water/TIS/EDT	94/2.5/1.0/2.5	2350/62.5/25/62.5
Cys(Trt)やMetを含まない場合		
TFA/water/TIS	95/2.5/2.5	2375/62.5/62.5

操作1　樹脂 in 合成カラム

〈脱樹脂・脱保護〉

- 脱保護カクテル（浸漬量、予め冷やす）
  RT，30分毎に軽く振って90分静置
  濾液を50ml遠沈管に回収
- 1.5ml 冷TFA ×3 →各濾液を50ml遠沈管に回収

操作2　粗ペプチド溶液 in 50ml 遠沈管

〈エーテル沈殿〉

- 40ml 冷Et_2O
  十分に攪拌
  遠心分離 (4℃, 3,500×*g*, 5分)
  上澄みを除去
  ］これを計3回繰り返す
- 10分程度ドラフト内で静置してEt_2Oを飛ばす
  デシケータで2時間以上乾燥

粗ペプチド

〈参考1〉ペプチドの精製

粗ペプチドを精評して粗収量を確認する。粗収率が著しく低い場合は、
- ·各アミノ酸の導入率が低い。
- ·脱保護が不十分で樹脂内に保護ペプチドが残存している。

可能性がある。前者はFmoc定量を、後者は脱保護をやり直すことで評価する。

0.1%TFA水溶液で10 mg/ml を目安に粗ペプチド溶液を調製する。沈殿が生じる場合は、以下の手法で溶解を試みる。
- ·塩基性ペプチドの場合はさらに1%までTFAを加える。
- ·アセトニトリル/水混合溶媒に溶解させる。

フィルタを通した後、MALDI-TOF-MS で目的物の生成を確認する。

水/アセトニトリル系の RP-HPLC で目的物を分取する。事前にSephadex G-10~25で粗精製しても良いが、pHによる溶解度の変化に注意すること。

エバポレータでアセトニトリルを留去したのち、凍結乾燥して目的物の粉末を得る (TFA塩として得られる、アセトニトリルが残っていると、凍乾できない場合がある)。

6-2. 希酸による保護ペプチドの脱樹脂 (0.1 mmolスケール)[2]

操作1　保護ペプチド on 樹脂 in 合成カラム

〈脱樹脂〉
- 〈DCMで膨潤させておく〉
- 2ml 1%TFA/DCM
  ボルテックスで2分間攪拌
  2ml 10%pyridine/MeOH入りの
  5ml 試験管に濾液を回収
  ］これを計10回繰り返す
  最後に10本の試験管から溶液を100ml ナスフラスコに移す
- 2ml DCM ×3
- 2ml MeOH ×3
- 2ml DCM ×3
- 2ml MeOH×3
  ］各濾液をナスフラスコに回収
  ※ TLCで溶出の終了を確認できる

操作2　保護ペプチド溶液

〈再沈殿〉
- エバポレータで濃縮
- 40ml 冷H_2O
  沈殿を濾別し、冷H_2Oで沈殿を洗う
  デシケータで2時間以上乾燥

保護ペプチド

保護ペプチドは基本的に精製できないので、伸長反応を高収率に行う必要がある。例えば〈カップリング〉時の mol 比を、
　Fmoc-AA-OH：縮合剤カクテル: DIEA：H_2N-(Resin) = 4: 4：8：1
とし、反応時間を10分間に短縮して副反応を抑制させる、Kaiserテストがnegativeであってもアセチル化を行うなど、適宜純度の向上に努めること。
側鎖の脱保護は 6-1.と同様の操作を行えばよい。

〈参考2〉Head-to-tail 環状ペプチドの合成

操作 6-2.から、N末端フリーの保護ペプチド酸を得ることができる。この保護ペプチドを、低濃度でアミド縮合反応させると、主鎖環化ペプチドが得られる。

操作　RGDペプチド (RGDfX) の環化反応

H-Arg(Pbf)-Gly-Asp(OtBu)-Dphe-Xxx-OH

〈縮合反応〉
- DMF (ペプチド終濃度 ≦ 5mM)
- 5 eq. $NaHCO_3$
- 3 eq. DPPA
  24時間攪拌

〈粗精製〉
- 固体$NaHCO_3$を濾別
- オイルポンプでDMFを留去
- 冷水で沈殿
- 吸引濾別し、水、エーテルで沈殿を洗う
- デシケータで2時間以上乾燥

-Arg(Pbf)-Gly-Asp(OtBu)-Dphe-Xxx-

7-1. Fmoc-Lys(ivDde)-OH[3]

ivDde基は、20%PPD/DMF及びTFAに安定で、hydrazineで選択的に脱保護できるため、リジンのεアミノ基を介した分岐ペプチドを合成できる。脱保護条件でFmoc基も脱保護されることに注意すること。Fmoc定量と同様に290nmで分光学的にモニターできる。

<u>操作</u>　Ac-AA-‥‥-Lys(ivDde)-‥‥-resin in 合成カラム

〈脱ivDde〉
- 2ml 2%hydrazine monohydrate/DMF
  1分間ボルテックスで攪拌
- 2ml 2%hydrazine monohydrate/DMF
  RT, 30分間静置
- 2ml DMF wash ×5

Ac-AA-‥‥-Lys-‥‥-resin in 合成カラム

εアミノ基からの伸長

7-2. Fmoc-Cys(Acm)-OH

Acm基は、20%PPD/DMF及びTFAに安定で、I_2で選択的に脱保護でき、脱保護と同時にジスルフィドを形成する。尚、通常のFmoc固相合成で利用するFmoc-Cys(Trt)-OH も、同様にI_2で脱保護されてジスルフィドを形成する。両者の主な違いは酸に対する安定性である。

<u>操作</u>　樹脂上でのヨウ素酸化[4]

Fmoc-AA-‥‥-Cys(Acm)-‥‥-Cys(Trt)-‥‥-resin in 合成カラム

〈ヨウ素酸化〉
- 1 mmol I_2 (250mg) in 2ml DMF
  RT, 1時間毎に攪拌して4時間静置
- 2ml DMF wash ×10
- 2ml DCM wash ×3
- 2ml DMF wash ×3

〈脱Fmoc 残存HI除去〉
- 2ml 20%PPD/DMF　1分間ボルテックスで攪拌
- 2ml 20%PPD/DMF
  RT，15分静置
- 2ml DMF wash ×5

H-AA-‥‥-Cys-‥‥-Cys-‥‥-resin in 合成カラム
└─ SS ─┘

ジスルフィドを解離させるEDTを脱保護スカベンジャーに利用してならない。
反応点の密度が高い場合は、分子間でジスルフィドを形成することがある。
第１アミノ酸の導入率の調整あるいは適当な樹脂の選択を行うこと。

〈参考3〉液相でのヨウ素酸化[5]

Cys(Acm) 含有粗ペプチドを 水/アセトニトリル=1/5 に溶解し、攪拌しながらI_2溶液を色が付くまで滴下する。30分静置したのち、アスコルビン酸Naを添加してI_2をクエンチする。溶媒を留去し、RP-HPLCで精製する。
ジスルフィド形成の分子内/分子間の選択性は、ペプチド濃度で調整する。

7-3. Fmoc-Cys(tButhio)-OH[6]

tButhio基は、チオールによる還元で選択的に脱保護できる。

操作　　····-Cys(tButhio)-····-resin in 合成カラム

〈脱tButhio〉
- 2ml 20%2-mercaptoethanol/DMF
- RT, 4時間静置
- 2ml DMF wash ×5

-Cys-····-resin in 合成カラム

7-4. Fmoc-Cys(Mmt)-OH[6]　　Fmoc-Lys(Mtt)-OHも同様に行う。

Mmt基は、希酸で可逆的に脱離する。トリチルカチオンスカベンジャーのTISを利用して副反応なく脱保護できる。Fmoc定量と同様に460nmで分光学的にモニターできる。Mmt、Mttが外れにくい場合は、操作を繰り返す。

操作　　····-Cys(Mmt)-····-resin in 合成カラム

〈脱Mmt〉
- 2ml TFA/TIS/DCM=1/5/94
- RT, 5分間静置
- 2ml DCM wash ×3

これを計3回繰り返す

····-Cys-····-resin in 合成カラム

〈参考4〉*in situ* Npys化による樹脂上でのジスルフィド形成[6]

2,2'-dithiobis(5-nitropyridine)（DTNP）による活性チオールの形成（Npys化）と7-3,4を併用することで、樹脂上でのジスルフィドの形成を追跡できる。

····-Cys(Mmt)-····-Cys(tButhio)-····-resin in 合成カラム

↓ 操作 7-3.

····-Cys(Mmt)-····-Cys-····-resin in 合成カラム

〈Npys化〉
- 2ml DCM wash ×3
- 1.0 mmol DTNP (310mg) in 2ml DCM
- RT, 1時間静置
- 2ml DCM wash ×5

····-Cys(Mmt)-····-Cys(Npys)-····-resin in 合成カラム

〈-SS-化〉
- 2ml TFA/TIS/DCM=1/5/94
- RT, 5分間静置
- 2ml DCM wash ×3

濾液の吸光度を測定し、386nmのDTNPの吸収が無くなるまで繰り返す。

····-Cys-····-Cys-····-resin in 合成カラム
└─ SS ─┘

ジスルフィドを解離させるEDTを脱保護スカベンジャーに利用してならない。
反応点の密度が高い場合は、分子間でジスルフィドを形成することがある。
第１アミノ酸の導入率の調整あるいは適当な樹脂の選択を行うこと。

その試薬は健康ですか？

ペプチド合成に使用する試薬の大半は、水や酸素で劣化する。研究室の合成頻度に見合ったスケールの試薬を購入し、必要に応じて分注保存するべき。試薬の種類や開栓頻度に因るが、およそ1年以内を目安に使い切る量が良い。安いからといって、デカい試薬ボトルを買わない！

保管方法や使用方法も重要。例えば、保護アミノ酸等の冷蔵・冷凍試薬は、室温に戻してから開封し、結露を防ぐ必要がある。酸化して劣化しやすいDIEAは窒素置換保存が望ましい。

試薬管理は収率や純度に直結する重要なファクター！徹底した管理を！

アミノ酸、いつ準備する？

使用するアミノ酸モノマーを前日に分注保存しておくと、当日の反応待ち時間を有効利用でき、不測の事態にも落ち着いて対処できる。もっとも、再カップリングが必要な時に備えて、アミノ酸の試薬ボトルは室温に戻しておくべき。一方で ~3本程度の合成であれば、〈脱Fmoc〉の待ち時間中に、ペプチドの精評～溶解までを無理なくこなせる。
10分という待ち時間の捉え方次第。あなたの実験スタイルに合わせてどうぞ。

手合成 vs PetiSyzer

PetiSyzerを使った方が圧倒的にラク。ただし、PetiSyzer用カラムは細いので使用可能な樹脂量が手合成用カラムより少ない。

手合成：~ 0.3 mmol　PetiSyzer：~100 mg

大量合成の場合を除いて、PetiSyzerを使用するのがオススメ。

PetiSyzer合成時の小技

カラムが多い（4本以上？）ときは、洗瓶を利用して洗浄溶媒を添加した方が早い。モレキュラーシーブを入れておいても、駒込ピペットを溶媒瓶に挿す時のように邪魔になることもない。

Kaiserテスト&Fmoc定量だけでは不安な時は、

少量の中間生成物を樹脂から切り出して分析しても良い。
合成途中のカラムから、Kaiserテストに使用する程度の少量のレジンをエッペンチューブにとり、脱樹脂カクテルをほんの少量加える。30分程度静置した後、卓上遠心機でエーテル沈殿を数回繰り返す。軽く風乾して水に溶かし、MALDI-TOF-MSやRP-HPLCで分析する。
色素を導入してレジンが着色する場合や鎖長が長いときなど、そう手間がかかる事ではないし、やると安心できたりする。

自動合成機はホントにラクか？

圧倒的にラクな自動合成機。少量のペプチドを何十種類も合成する場合は重宝する。しかし、Kaiser テスト及び再カップリングをしてくれないので、純度が低くなりがち。特に、稼働率が低くメンテナンスの甘い合成機を利用すると、RP-HPLCで分離困難なレベルになることもあり、結局、精製過程で膨大な時間を取られることに。
多少の手間をかけても、自身の手できれいなペプチドを合成し、精製の時間とアセトニトリルの節約を！

困ったとき

目的物の純度が低いとき

脱Fmoc&伸長反応、もしくは脱樹脂の工程に問題がある。
脱Fmoc＆伸長反応が進まない理由として、①渦流撹拌が不十分、②縮合剤の活性が低下している、③立体障害の大きいアミノ酸のため、反応しにくい　などが考えられる。①容器サイズや溶媒の量、撹拌の時間、強さを変える、②縮合剤を作り直す、③縮合剤の種類を変える（HBTUよりも高効率なHATU、COMUなど[7]）ことで対応する。いずれの場合もFmoc定量によって、分析・改善することができる。脱樹脂反応の対策では、下記の「脱樹脂のあれこれ」を参照。

Kaiserテスト

洗浄が不十分な場合、溶液の色が青や赤、紫色になる場合があるが、樹脂自体の色が変わっていなければ、negativeである。ただし樹脂が赤色のときはnegativeの場合が多い（活性トリチル樹脂の使用時など）。

樹脂の保存

①溶液中、②乾燥状態で保存する。①ではDCM、NMPが推奨の溶媒である。ただし、DCMは揮発しやすい。またDMFは長期保存ではアミンを生成しFmoc基が外れてしまうため使わない。②は長期保存に向いているが、実験を再開する前に、DCMで30分程度、膨潤する必要がある。

脱樹脂のあれこれ

純度が低くなる原因の一つ。発熱反応のため、脱樹脂カクテルやTFAを冷やしておくとよい。アミノ酸配列によっては、保護基が外れにくい or 再結合してしまうものがあり、脱樹脂カクテルの種類や反応時間の調整が必要な場合がある。また再沈殿でTFAや冷Et_2Oの量が少なすぎたり多すぎると、収量が少なってしまうことがあるので、必ず収率を確認する。目安はTFA/Et_2O=1/20 v/v

蛍光基の修飾

Fmocアミノ酸より高く、反応スケールに気を付ける。
反応点に対して、1.2等量で反応させる場合、蛍光基の濃度、時間、温度を上げることで、反応を100%進めることができる。ただし、濃度を上げすぎて蛍光基が溶けない、渦流撹拌できないといった問題があるので気を付けること。

合成のノウハウ

①最適な反応条件を選択する！（濃度、pH&触媒、溶液量、撹拌の時間、温度）
②各操作の意味を考える！（反応、洗浄、脱樹脂etc...それぞれに最適な所作）
③合成の進行確認を怠らない！（Fmoc定量、MS分析、収量測定など）
　例えば、Fmoc定量による解析で、各反応の進行や試薬の活性を確認できる！

HPLCについて

サンプルに溶かす溶媒は、A/B液の混合溶媒にする。B液の割合は、グラジェントの初期値より低くすること。ゴミや溶け残りは、フィルターや遠心で除去する。A/B液で溶けない場合は、DMSOなどで溶かす方法があるが、カラム内で不溶化しないことを確認する。

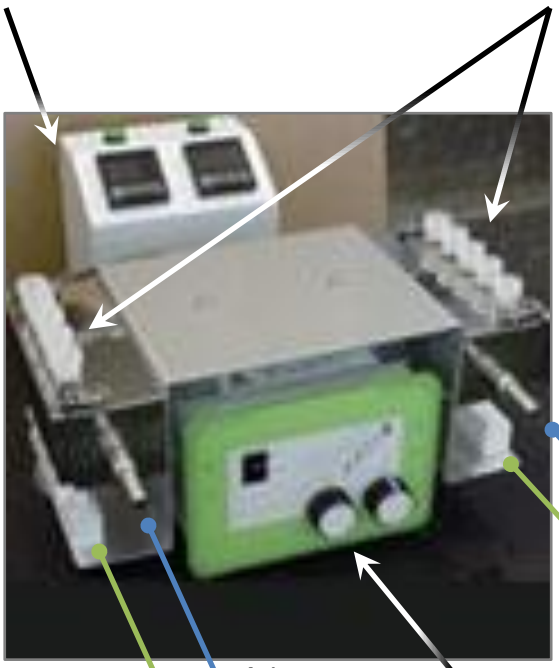
MSについて

ペプチド溶液とマトリックス溶液を、1:1、1:10、1:100の割合で混ぜる。乾燥後、結晶化していると、イオン化しやすい。どうしても飛ばない場合は、マトリックスや溶媒を変えることも検討する。（CHCA、DHCA、HPAなど）

装置の解説

裏に主電源。緑のボタンを押すと左右別々に設定温度に加温できる。左右のコードつなぎ間違いに注意！

専用カラムをHiPepに直接発注（この会社は代理店をとらない）。カラム本体、上部キャップ、下部キャップを別々に発注できる。価格や品番等は説明書を参照の事。



吸引瓶／ダイアフラムポンプにつなぐ。
サイドのつまみを垂直にすると対応するカラムのみを吸引できる。

11以上の強度に設定しない。
ブロックごと外れて危険！

プロトコル

使用可能な最大樹脂量は最大でも150mg程度。100mg程度が望ましい。
カップリング反応中は50℃に設定し、反応終了後～PPD処理は冷却水を流して常温に戻す（温度制御は溶液量が少ないときはたぶん意味がない）。
脱樹脂は上下両方のキャップをしたカラムをさして、50℃に設定しゆっくり攪拌。脱保護カクテルを加えるときは加温せず、冷却したものを加える。

メンテナンス

用途上、有機溶媒まみれになる。
使用後に有機溶媒が付着した部分をふくなどするのは当たり前！
振盪器の全面や加温ユニットの表示窓などは特に有機溶媒耐性が無いので、付着したらすぐに拭きとること。
溶媒除去するカラムをさすプラスチック部分は取り外し可能。詰まりの原因になるので、汚れてきたら外して洗浄すること。

使用後、真空ポンプのつけっぱなし、冷却水の流しっぱなしに注意。

9-1. 参考文献

1. B. Dorner *et al.*, novabiochem 固相合成ハンドブック（メルク）
2. R. Eritja *et al., Tetrahedron* **43**, 2676 (1987)
3. W. C. Chan *et al.*, *Tetrahedron Lett.* **39**, 1803 (1998)
4. R. Soll *et al.*, *J. Peptide Sci.* **6**, 387 (2000)
5. B. Zeynizadeh *et al.*, *J. Chem. Research (S)*, 564 (2002)
6. A. K. Galande *et al.*, *J. Comb. Chem.* **7**, 174 (2005)
7. A. EI-Faham *et al*., *Chemistry*, **15**, 9404 (2009)

9-2. 本書の執筆に関して

執筆編集：　中村雄太（九州大院工・博士1年）
　　渡部和人（九州大院工・OB）
模範演技：　下村　隆（九州大院工・OB）
技術提供：　秦　彬斗（九州大院工・OB）
　　：　土谷　享（九州大院工・OB）
責任監修：　新留琢郎（熊本大院工・教授）

公開許諾：　片山佳樹（九州大院工・教授）

ペプチ道　第肆版其之零　–塩基脱保護流極意–

平成26年10月吉日　公開

本書は、ペプチド固相合成に関する知識・手技の配属学生への伝承を目的としたものである。本書に従い実践すれば、ペプチ道を往く者として然るべき技の数々を習得できるだろう。しかしペプチ道は尚も深く険しい。開拓心を忘るることなく新規文献を読破し、数多の研究を重ねた猛者達の手によって、本書を超える新たな極意が著されること願う。