

学位論文

ネガマイシン天然類縁体を基盤とした新規高活性リードスルー誘導体の創製と
その作用機構解析における基礎的研究

2018年 1月

濱田 圭佑

目次

1. 略号一覧	5
2. 緒論	6
3. 本論	
第1章 3- <i>epi</i> -deoxyneqamycin の主鎖及び末端カルボン酸に着目した誘導体の合成と生物活性評価	
第1節 序説	13
第2節 3- <i>epi</i> -deoxyneqamycin の主鎖炭素鎖長を変更した誘導体の設計と合成	13
(1) 誘導体の分子設計①	14
(2) 誘導体の合成①	14
(3) 誘導体の分子設計②	15
(4) 誘導体の合成②	15
第3節 3- <i>epi</i> -deoxyneqamycin の主鎖炭素鎖長を変更した誘導体の活性評価 (COS-7細胞を用いてのリードスルー活性評価)	16
第4節 カルボン酸部位に着目した誘導体の合成とその生物活性評価①	18
(1) 誘導体の分子設計	18
(2) 誘導体の合成	19
(3) 誘導体の活性評価 (COS-7細胞を用いてのリードスルー活性評価)	20
第5節 カルボン酸部位に着目した誘導体の合成とその生物活性評価②	21
(1) 誘導体の分子設計	21
(2) 誘導体の合成	21
(3) 誘導体の活性評価 (COS-7細胞を用いてのリードスルー活性評価)	22
第6節 無細胞タンパク質合成系の構築と高活性エステル誘導体の活性評価	24
(1) 序論	24
(2) 無細胞タンパク質合成系の構築	24
(3) 誘導体の活性評価 (無細胞タンパク質合成系における、エステル誘導体のリードスルー活性評価)	25
第7節 エステラーゼを用いた加水分解実験	26
(1) 序論	26
(2) エステラーゼを用いた加水分解実験とその結果	27
第8節 小括	29
第2章 Leucyl-3- <i>epi</i> -deoxyneqamycin の主鎖及び末端カルボン酸に着目した誘導体の合成と生物活性評価	

第1節	序説	31
第2節	Leucyl-3- <i>epi</i> -deoxynegamycin の3位アミノ基に着目した誘導体の設計と合成とその生物活性評価	31
	(1) 誘導体の分子設計	31
	(2) 誘導体の合成	32
	(3) 誘導体の活性評価 (COS-7細胞を用いてのリードスルー活性評価)	33
第3節	Leucyl-3- <i>epi</i> -deoxynegamycin のカルボン酸部位に着目した誘導体の合成とその生物活性評価	35
	(1) 誘導体の分子設計	35
	(2) 誘導体の合成	35
	(3) 誘導体の活性評価 (COS-7細胞を用いてのリードスルー活性評価)	36
第4節	ブタ肝臓由来エステラーゼを用いる加水分解実験	38
第5節	誘導体の <i>in vivo</i> 生物活性評価	39
	(1) 誘導体の <i>in vivo</i> リードスルー活性評価	39
	(2) 誘導体の毒性評価① (B10マウスを用いた体重変化に基づく毒性評価)	40
第6節	誘導体の血漿中安定性評価	41
第7節	誘導体の毒性評価② (培養細胞における殺細胞活性の評価)	42
第8節	小括	44

第3章 ネガマイシン作用機構解析を目的とした多剤超感受性酵母株の構築

第1節	序説	45
第2節	12gene Δ HSR を基盤とした、リードスルー活性定性用酵母株 (ナンセンス変異含有酵母株) の構築	48
第3節	YKH-002株のリードスルー感受性評価	51
第4節	ネガマイシン耐性株の単離とゲノムリシーケンス	52
	(1) ネガマイシン耐性株の単離	52
	(2) ネガマイシン耐性株のゲノムリシーケンス解析	52
第5節	ネガマイシン耐性遺伝子の解析	53
	(1) 各種耐性遺伝子破壊株の構築	53
	(2) 各遺伝子と <i>cup9</i> との関連性	54
	(3) 二重遺伝子破壊株におけるネガマイシン誘導体の感受性評価	55
	(4) ジペプチド競合アッセイ	56
	(5) pH依存試験の実施	57
第6節	小括	59

4. 総括	61
5. 実験の部	62
6. 引用文献	109
7. 発表論文	112
7. 謝辞	113

略号一覧

本論文中に記載した略号を下記に示す.

Ac : acetyl

Boc : *tert*-butoxycarbonyl

Bu : butyl

Cbz : benzyloxycarbonyl

CK : creatine kinase

Dab : Diaminobutylic acid

Dap : Diaminopropionic acid

DCC : *N,N*-dicyclohexylcarbodiimide

DMAP : *N,N*-dimethyl-4-aminopyridine

DMD : duchenne muscular dystrophy

DMF : *N,N*-dimethylformamide

EDC : 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide

Et : Ethyl

FBS : fetal bovine serum

Gln : Glutamine

HOBt : 1-hydroxybenzotriazole

HPLC : high-performance liquid chromatography

HRMS : high-resolution mass spectrometry

Me : Methyl

NMM : *N*-methyldmorpholine

NMR : nuclear magnetic resonance

Orn : Ornithine

PBS : phosphate buffer solution

PTC : premature termination codon

PTSA : *p*-toluenesulfonic acid

ppm : parts per million

rt : room temperature

t-Bu : tertiary butyl

TEA : triethylamine

THF : tetrahydrofuran

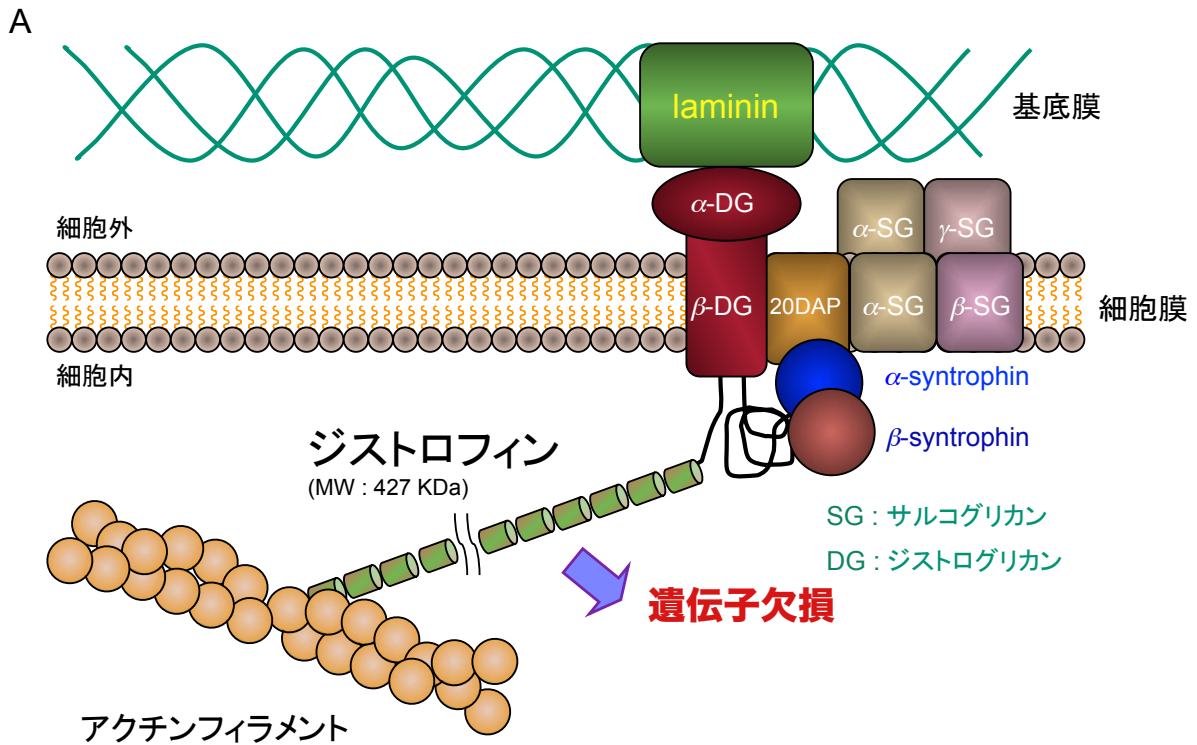
TLC : thin-layer chromatography

緒 論

ナンセンス変異によって引き起こされる遺伝性疾患は 1800 種類以上あると言われており、デュシェンヌ型筋ジストロフィー (Duchenne muscular dystrophy; DMD) もその一つである。デュシェンヌ型は数ある筋ジストロフィー中、最も一般的で、かつ重篤な病体を示すことが知られている¹⁻⁴⁾。DMD は X 染色体上にナンセンス変異が生じ、未熟終止コドン (premature termination codon ; PTC) が挿入される事によって起こる、重篤でかつ進行性の伴性劣性遺伝性疾患であり、新生男児の 3,500 人に 1 人の割合で発生する⁵⁾。本疾患の約 20% は、ジストロフィン遺伝子上に PTC が生じることでタンパク質翻訳が正常に行われず、完全長なジストロフィンタンパク質が発現しない⁶⁾。ジストロフィンタンパク質は、分子量 427KDa のタンパク質で、細胞内でそのアミノ末端側でアクチンと結合する。その一方でサルコグリカン、ジストログリカンとの結合を通じて細胞外マトリックスのラミニンと結合し、基底膜と細胞骨格とをつなぎ止め、膜を補強する重要な役割をもつ (Figure 1A)。この構造をジストロフィン軸といい、筋繊維の急速な収縮、弛緩に伴う筋細胞膜の破壊の阻止に働いている。そのため本タンパク質が欠損すると、筋細胞内骨格、筋細胞膜、細胞外基底膜の架橋構造に破綻が生じ、結果として筋組織が破壊され、筋組織の細胞骨格を維持できないことから、首屈筋、腹筋、腰帯筋をはじめとする筋力低下等の症状が見られる⁷⁻⁸⁾。それに伴い、7 歳から 12 歳までの間に歩行不全となると同時に、呼吸不全、心不全等により死に至ることが知られている。

このジストロフィンタンパク質をコードしている遺伝子がジストロフィン遺伝子である。ジストロフィン遺伝子は、ヒト最大の遺伝子で X 染色体上 3000Kb に広がり、79 のエクソンから構成されている。Duchenne 型筋ジストロフィーの患者の 65% はジストロフィン遺伝子におけるエクソン単位での遺伝子欠損・重複を有している。また、13~15% の患者は、ジストロフィン遺伝子のナンセンス変異を有しており、残りの患者はその他の点突然変異を有していることも知られている⁶⁾。

現在、DMD の原因療法は未だ存在せず、対症療法として行われている治療として、副腎皮質ホルモンである Prednisone や Deflazacort の投与が知られている。これら薬剤は、主として DMD の進行を遅らせたり、筋力や筋肉の機能を安定化させたりする効果があるが、体重増加や無症候性白内障、骨密度減少といった重篤な副作用があり、短期投与に限定される⁹⁻¹¹⁾。このため、DMD への有効な治療法は存在せず、臨床的に有用な薬剤の開発が望まれている。

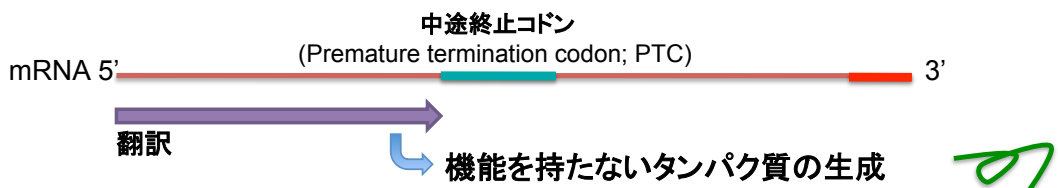


B

A) 正常な場合



B) ナンセンス変異の場合



C) 化合物による中途終止コダンの読み飛ばし

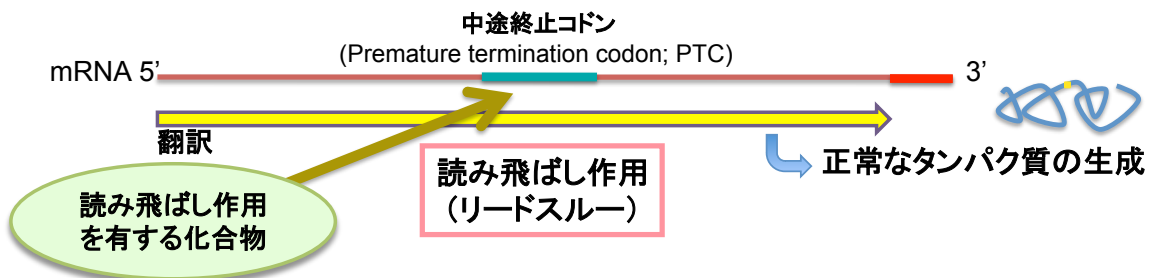


Figure 1. (A) The role of dystrophin (B) Nonsense mutation and readthrough activity.

近年、低分子化合物を用い、この PTC を読み飛ばす、即ちリードスルーさせることで完全長のジストロフィンタンパク質を発現させる試みが注目されている (Figure 1B)¹²⁾。このような作用を有するリードスルー化合物として、Figure 2 に示す Gentamicin (1)、G418 (2) に代表されるアミノグリコシド系抗生物質が報告されている¹³⁾。Gentamicin (1) は 1990 年代に実際に筋ジストロフィーモデルマウスに投与され、正常の約 10% のジストロフィンタンパク質を発現することが報告された¹⁴⁾。しかしながら、アミノグリコシド系抗生物質には、耳毒性や腎毒性といった重篤な副作用の出現により、長期投与は困難である^{15,16)}。G418 (2) はアミノグリコシド系抗生物質の中で、最も強力なリードスルー活性を有するが、毒性発現も高く、治療薬としての使用は困難である¹⁷⁻¹⁹⁾。さらにこれらアミノグリコシドの構造を基盤とした構造変換により、Nudelman らは NB54 (3) を報告した²⁰⁾。これは Gentamicin (1) よりも高いリードスルー活性を有しているとともに、アッシャー症候群、ハーラー症候群、さらには嚢胞性線維症といったデュシェンヌ型筋ジストロフィー以外のナンセンス変異性遺伝性疾患へも高い活性を示すことが明らかとなっている。また、これは HEK293、COS-7、MDCK といった代表的な培養細胞において Gentamicin (1) よりも低い細胞毒性を示すとともに、マウスを用いた急性毒性試験においても低毒性を示した。一方、Shulman らはアミノグリコシド抗生物質の長期投与における副作用である、耳毒性の低減を図った誘導体として NB74 (4) を報告している²¹⁾。このリードスルー活性は Gentamicin (1) より高く (G418 > NB74 > gentamicin)、耳毒性も G418 と比較して約 200 倍減少していることが明らかとなった。

アミノグリコシド以外のリードスルー化合物として Atarulen (PTC-124) (5) が挙げられる²²⁾。これは経口投与可能な 1,2,4-オキサジアゾール誘導体として、ハイスルーPUT スクリーニングによりケミカルライブラリーから見いだされた化合物である。2007 年に 4 週間にわたる mdx マウス (DMD モデルマウス) への投与実験が行われ、前頸骨筋、横隔膜筋、心筋でのジストロフィンタンパク質の蓄積が報告された。その後欧州にて、DMD を対象疾患とした治験が実施され、第 IIb 相無作為化二重盲検プラセボ対照試験 (40 mg / kg / day における運動機能評価) においてプラセボ投与群との有意差が見られると同時に、安全性プロファイルは、プラセボ投与群と同程度であると判断された。一方、高用量投与群 (80 mg / kg / day) ではプラセボ投与群と有効性に差がなく、むしろプラセボ投与群より有効性低下傾向が見られたことから、十分な薬効が得られないとされ、総合的に判断して第 II 相後期試験で中断されている現状がある²³⁾。しかしながら、欧州医薬品庁医薬品委員会 (CHMP) は、これらの臨床試験データは頑健性を欠くものであるとする一方で臨床的有用性はあると定義づけし、デュシェンヌ型筋ジストロフィーに対する臨床的意義を有していると判断した。これらの経緯を経て、現在 EU において 5 歳以上の歩行可能なナンセンス変異型デュシェンヌ型筋ジストロフィー患者のみの条件付き販売認証を受け、上市されるに至っている²⁴⁾。一方、この Atarulen (5) のリードスルー効果については、それを否定する報告もあることから²⁵⁾、議論の余地が残されているともいえる。

抗アレルギー薬として本邦にて販売承認を受けている Amlexanox (6) もリードスルー活

性を有する薬剤である。Amlexanox (6) は 2012 年に Gonzalez-Hilarion らにより、ナンセンス変異含有 mRNA の生体内品質管理機構である nonsense mediated mRNA decay (NMD)²⁶⁾ の阻害剤探索を目的としたケミカルスクリーニングより見出された²⁷⁾。各種ナンセンス変異(がん抑制遺伝子 TP53、DMD、及び嚢胞性線維症)のナンセンス変異に対するリードスルー活性によつての完全長タンパク質の発現が確認された。他の NMD 阻害剤の中にも、リードスルー活性を有する化合物が存在する可能性が示唆された本結果は、今後の新規リードスルー化合物の探索研究において有用な知見を与えるものである。

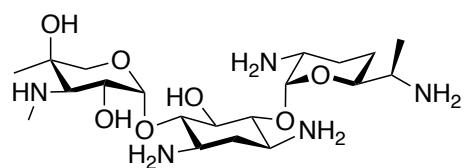
また、川原らは、デュシェンヌ型筋ジストロフィーモデルゼブラフィッシュにて新規リードスルー化合物のスクリーニングを実施した結果、ホスホジエステラーゼ阻害剤であるアミノフィリン (7) が、化合物未添加群と比較して有意なリードスルー活性を有していることを明らかとした²⁸⁾。実際、ゼブラフィッシュのジストロフィンタンパク質の免疫染色の結果、当該タンパク質の発現が確認されたことから、本薬剤のナンセンス変異性疾患に対する一定の病態改善効果が期待される。

1970 年に *Streptomyces purpeofuscus* から、梅沢らによつて単離・構造決定された、ヒドラジド構造を有するジペプチド型抗生物質 (+)-Negamycin (8)²⁹⁾ もリードスルー化合物の 1 つである。(+) -Negamycin (8) はグラム陰性菌に対して強い抗菌活性を有している¹⁰⁾にもかかわらず、その急性毒性 (IC₅₀) が Gentamicin (1) の 10 分の 1 と低く、かつ、アミノグリコシド系抗生物質で見られる聴力低下等の耳毒性は見られなかった。さらに、2003 年に松田らによつて DMD のナンセンス変異型モデルマウス (*mdx* マウス) への投与によつて、骨格筋および心筋においてジストロフィンタンパク質の発現が確認された³⁰⁾。これより 8 は、ナンセンス変異を有する遺伝性疾患の新たな治療薬となりうる可能性を秘めている。しかしながら、8 の投与マウスにおけるジストロフィンタンパク質の発現量は、正常マウスの 10%程度であり、より強力なリードスルー活性を有する誘導体の創製が必要であると考えられる。以上の理由から著者らは、医薬候補化合物の獲得を目指し、8 に着目した創薬研究を展開してきた。

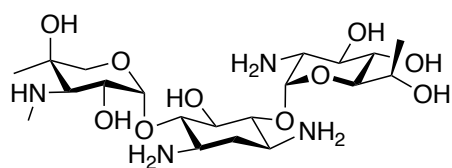
以前の研究により、著者らは、(+)-Negamycin (8) の 5 位水酸基に着目した構造活性相関研究から 3-*epi*-deoxynegamycin (9) および leucyl-3-*epi*-deoxynegamycin (10) が 8 よりも高いリードスルー活性を有することを見いだした。これら化合物は、1977 年に *streptomyces goshikiensis* より単離された抗菌活性を持たない天然有機化合物であった³¹⁾。つまり、これらの誘導体はリードスルー活性と抗菌活性の薬効分離に成功した化合物であるということが明らかとなった。また、これら誘導体は、大腸菌 *E.Coli* の細胞抽出液を用いた無細胞タンパク質合成系を用いるリードスルー評価系においてリードスルー活性が観察されなかった。このことから、ネガマイシン天然類縁体は真核細胞選択的にリードスルー活性を発揮することも明らかとなった。

そこで、本研究では、9 及び 10 を基盤とした構造活性相関研究を展開し、さらなる高活性誘導体の獲得を目指した。第 1 章では 9 の主鎖炭素鎖長並びに末端カルボン酸部位に焦点を当てた誘導体の合成・生物活性評価を行った。さらに、得られた高活性誘導体のリー

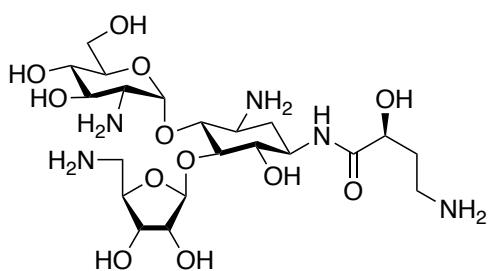
ドスルー活性の増減に与える構造的影響を精査することを目的として、細胞膜の影響を考慮することなく当該活性を評価可能な無細胞タンパク質合成系を確立し、評価を行った。さらに、ブタ肝臓由来エステラーゼを用いた加水分解実験を行った。第2章では、**10**の3位アミノ基に着目した構造変換を実施した。さらに、第1章で検討した種々のエステル構造を末端カルボン酸部位に導入することでさらなる高活性誘導体の獲得を図った。さらに誘導体の生体内安定性評価、および *in vivo* における毒性評価も実施した。一方、高活性誘導体の獲得に必要なネガマイシン類のリードスルー活性発現に寄与する標的分子、並びにその結合部位は未だ明らかとなっていない。さらに、細胞内で通常抑制されているリードスルーが発現するメカニズムも十分に解明されていないのが現状である。そこで、第3章ではネガマイシン誘導体の作用機構解析を目的として、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を用いた遺伝学的解析研究を実施した。



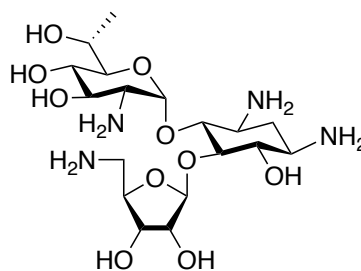
Gentamicin (1)



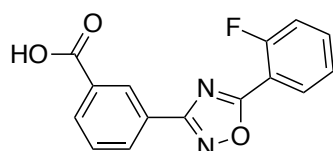
G418 (2)



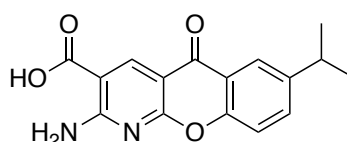
NB54 (3)



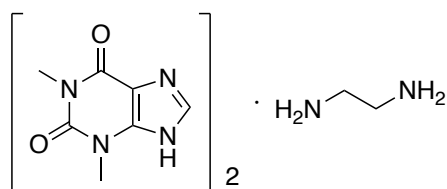
NB74 (4)



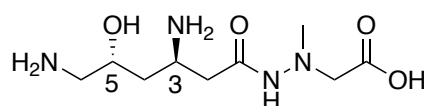
Ataluren (5, PTC-124)



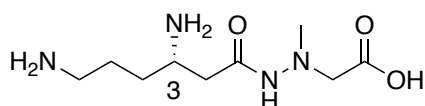
Amlexanox (6)



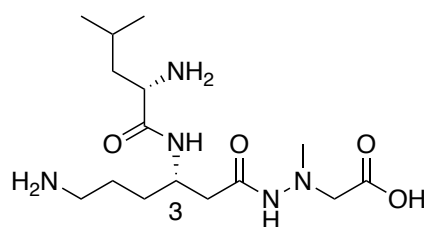
Aminophylline (7)



(+)-Negamycin (8)



3-*epi*-deoxynegamycin
(TCP-107, 9)



Leucyl-3-*epi*-deoxynegamycin
(TCP-126, 10)

Figure 2. Structures of readthrough compounds and negamycin analogues.

本 論

第 1 章

3-*epi*-deoxynegamycin の主鎖及び末端カルボン酸に着目した誘導体の合成と 生物活性評価

第 1 節 序説

これまでに著者らは、(+)-negamycin (8) からの誘導により、3-*epi*-deoxynegamycin (9) 及び Leucyl-3-*epi*-deoxynegamycin (10) が 8 よりも高いリードスルー活性を有することを見出した。さらにこれら誘導体は、1977 年に単離同定され、抗菌活性を示すことから薬効未知として報告された天然有機化合物であった。そこで、更なるリードスルー活性の向上を目指して、3-*epi*-deoxynegamycin (9) の、1) 主鎖炭素鎖長の変更、2) β -アミノ酸残基の α -アミノ酸への変更、を行なった誘導体を設計・合成し、生物活性評価を実施した。さらに得られた誘導体を用いて、更なる高活性誘導体の獲得を目的として、末端カルボン酸に着目した誘導体の合成を行った。具体的にはエステル構造、アミド構造への変換を行った。

第 2 節 3-*epi*-deoxynegamycin (9) の主鎖炭素鎖長を変更した誘導体の設計と合成

(1) 誘導体の分子設計①

著者は、3-*epi*-deoxynegamycin (9) の主鎖炭素鎖長に着目し、この炭素鎖長を種々変更した誘導体の分子設計、合成を行うこととした。すなわち、N 末端および 3 位アミノ基間の距離最適化を実施した。

Figure 3 に設計した 3 つの誘導体を示す。具体的には、1 炭素増炭した誘導体として誘導体 11a を、1 炭素短縮した誘導体として誘導体 11b を、さらには 2 炭素短縮した誘導体として 11c を設計した。

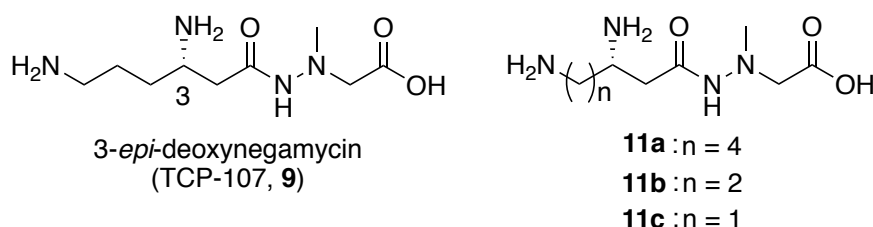
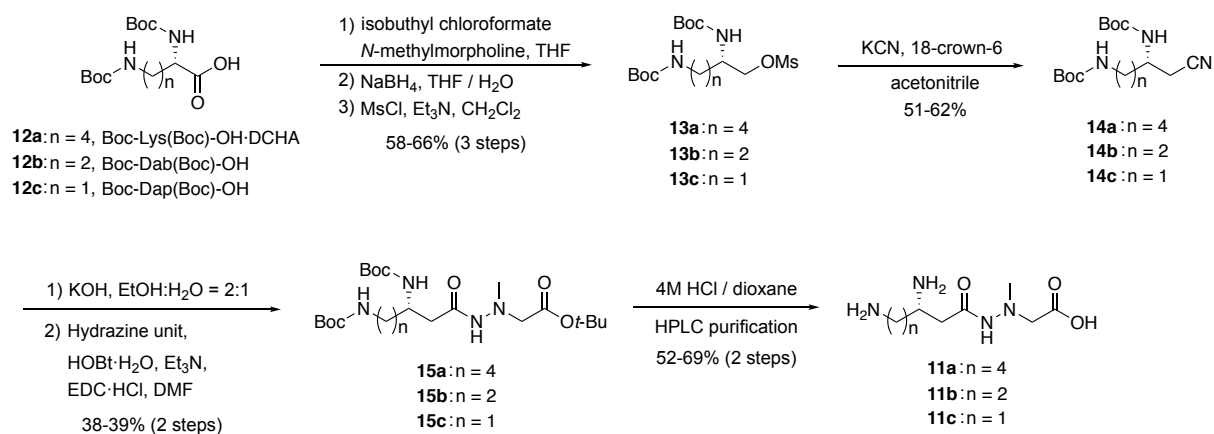


Figure 3. Structure of derivative 11a-c.

(2) 誘導体の合成①

Scheme 1 に示す合成経路を用いて設計した誘導体を合成した。

各 Boc 保護アミノ酸 (**12a-c**) のカルボン酸をクロロギ酸イソブチルを用い混合酸無水物へと導き、NaBH₄ にてアルコールへと還元、続けてメシル化を行うことにより、3 工程、58-66%の収率で化合物 **13a-c** を得た。シアノ化を施すことで 51-62%の収率でニトリル **14a-c** を得た。得られたニトリルを塩基性条件下にて加水分解する事でカルボン酸へと変換後、HOBt·EDC 法³²⁾を用いてヒドラジン化合物³³⁾と縮合反応に付す事でヒドラジド **15a-c** を合成した。**15a-c** の保護基を酸処理にて除去し、HPLC で精製することで所望の誘導体 **11a-c** を合成した。



Scheme 1. Synthetic route of **11a-c**.

(3) 誘導体の分子設計②

3-*epi*-deoxyneigamycin (**9**) におけるβ-アミノ酸残基をα-アミノ酸へ変更した誘導体の分子設計、合成を行った。

Figure 4 に設計した 4 つの誘導体を示す。具体的には、炭素鎖長を 1 炭素増炭した誘導体として Lys を導入した誘導体 **16a** を、3-*epi*-deoxyneigamycin (**9**) と同様の炭素鎖長を有する誘導体としては、Orn を導入した誘導体 **16b** を設計した。さらに、Dab を導入した誘導体 **16c**、2 炭素短縮した誘導体として Dap を導入した **16d** を設計した。

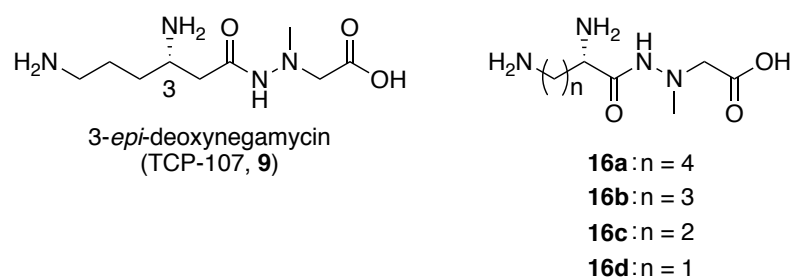
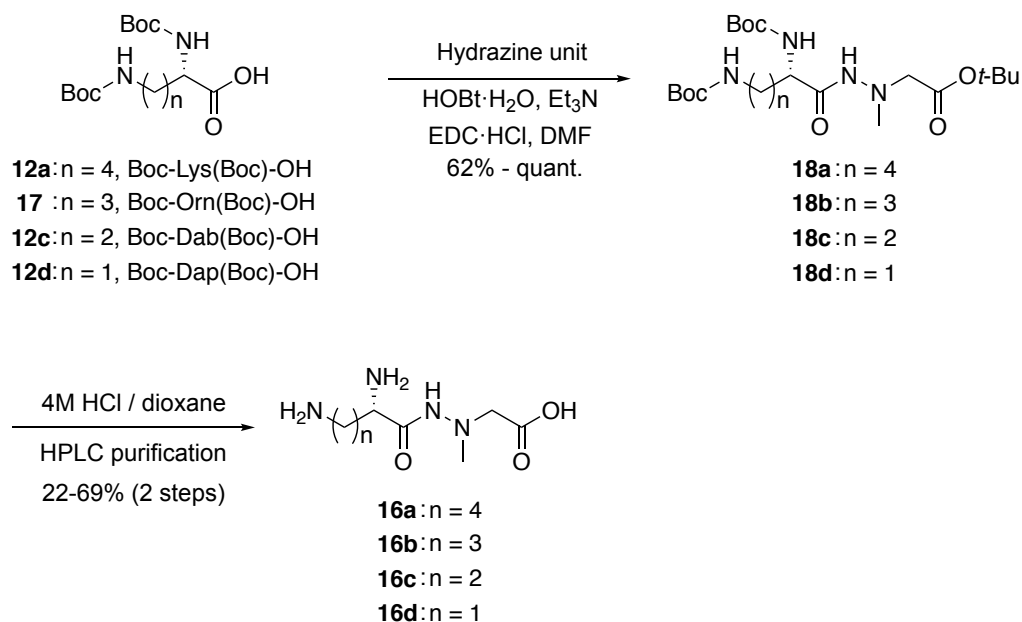


Figure 4. Structure of derivative **16a-c**.

(4) 誘導体の合成②

Scheme 2 に示す合成経路を用いて設計した誘導体を合成した。

各 Boc 保護アミノ酸 (**12a**, **12c-d**, **17**) に対して、HOBt-EDC 法を用いてヒドラジン化合物と縮合反応に付す事で、収率 62%-quant.にて各種炭素鎖を有するヒドラジド **18a-d** を合成した。**18a-d** の保護基を酸処理にて除去し、HPLC で精製することで所望の誘導体 **16a-d** を収率 22-69%にて合成した。



Scheme 2. Synthetic route of **16a-d**.

第 3 節 3-*epi*-deoxyneomycin (9) の主鎖炭素鎖長を変更した誘導体の活性評価 (COS-7 細胞を用いてのリードスルー活性評価)

本研究における誘導体のリードスルー活性は、**Figure 5** に示すプラスミドをトランスフェクションした COS-7 細胞を用いて評価した。すなわち、PTC である TGA の前に β -ガラクトシダーゼ、後ろにルシフェラーゼを組み込んだデュアルレポーター遺伝子³⁴⁾を用いた。PTC の前後配列は、デュシェンヌ型筋ジストロフィーモデルマウス (mdx マウス) に由来する。化合物にリードスルー活性が無い場合、翻訳は PTC 配列で停止することから、 β -ガラクトシダーゼのみが発現する。しかし、誘導体にリードスルー活性がある場合、PTC である TGA の読み飛ばしが起こり、後方配列に存在するルシフェラーゼも翻訳され、その結果、 β -ガラクトシダーゼとルシフェラーゼの両方が発現する。以上の原理をもとに、本遺伝子をトランスフェクションした COS-7 細胞 (アフリカミドリザル腎細胞) を用いて、合成した誘導体 (200 μ M) のリードスルー活性を評価した。なお、リードスルー活性値は、

リードスルー活性 (Readthrough activity) = Luciferase activity / β -Galactosidase activity

で求めた。また、各誘導体の活性値は、コントロールである化合物未添加群の活性値を 1 とした時の比活性として算出した。

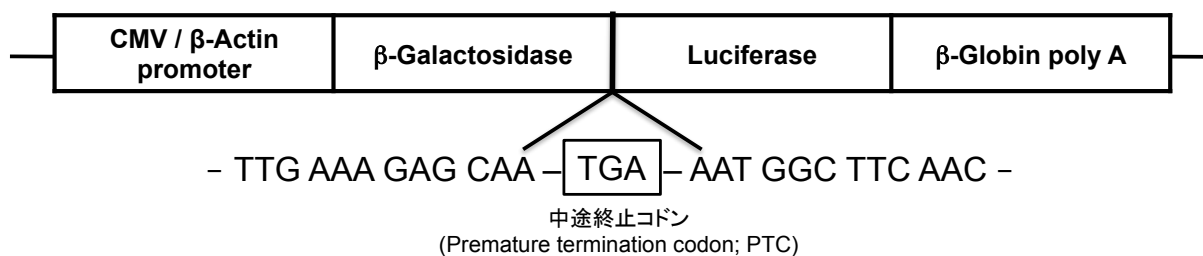
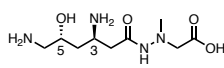
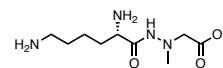
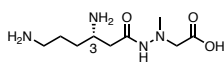
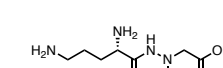
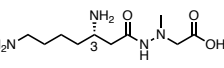
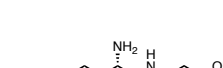
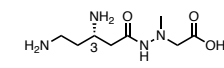

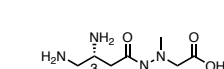


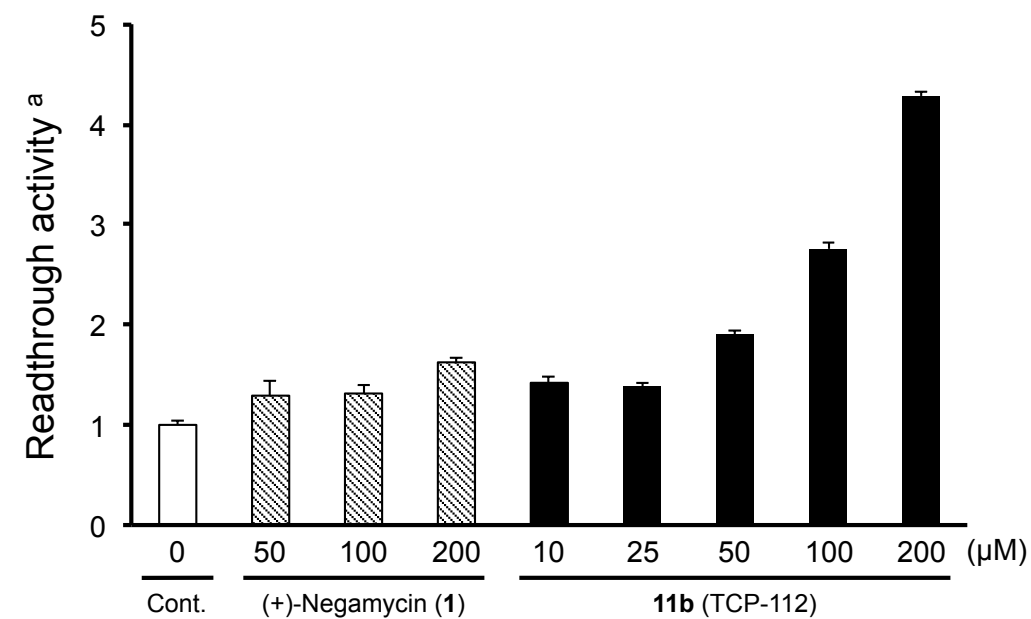
Figure 5. Schematic structure of the dual-reporter gene construct.

評価した誘導体とその活性値を **Table 1** に示す。3-*epi*-deoxynegamycin (**9**) の主鎖炭素鎖長を 1 炭素増炭した **11a** は活性値が減弱した一方、1 炭素短縮した **11b** (TCP-112) はその活性値が大幅に増強する結果となった。さらに、**11b** のリードスルー活性は、濃度依存的に増加することも明らかとなった (**Figure 6**)。 **11b** からさらに 1 炭素減炭すると、その活性値は (+)-negamycin (**8**) 付近まで低下した。一方、β-アミノ酸構造を α-アミノ酸へ変更した誘導体 **16a-d** においては、その活性値は化合物未添加群程度まで低下する結果となった。以上の結果から、ネガマイシンのリードスルー活性発揮にはβ-アミノ酸構造が必須であることが推測された。

Table 1. Readthrough activity of derivatives **11a-c** and **16a-d**.

Compound	Structure	Readthrough activity ^a	Compound	Structure	Readthrough activity ^a
(+)-Negamycin (8)		1.81 ± 0.17	16a		1.01 ± 0.06
9 (3- <i>epi</i> -deoxynegamycin)		2.94 ± 0.12	16b		0.99 ± 0.03
11a		2.05 ± 0.23	16c		1.07 ± 0.22
11b (TCP-112)		4.28 ± 0.16	16d		1.30 ± 0.09
11c		1.49 ± 0.07			

^a Ratio of readthrough activity of compound (200 μM) against that of negative control (= 1). Cell : COS-7



^a Ratio of readthrough activity of compound (200 μM) against that of negative control (= 1). Cell : COS-7

Figure 6. Cell-based readthrough activity (TGA) of **11b** in COS-7 cells.

第4節 カルボン酸部位に着目した誘導体の合成とその生物活性評価①

(1) 誘導体の分子設計

著者は、TCP-112 (**11b**) の末端カルボン酸部位に着目し、このカルボキシル基を修飾した誘導体の分子設計、合成を行うことで、さらなる高活性ネガマイシン誘導体の獲得を図った。

Figure 7 に設計した4つの誘導体を示す。具体的にはエステル構造を有する誘導体としてエチルエステル誘導体 **19a**、ベンジルエステル誘導体 **19b** を設計した。アミド構造を有する誘導体としてはエチルアミド誘導体 **19c**、およびベンジルアミド誘導体 **19d** を設計した。

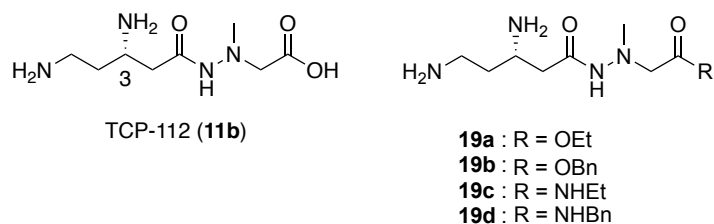
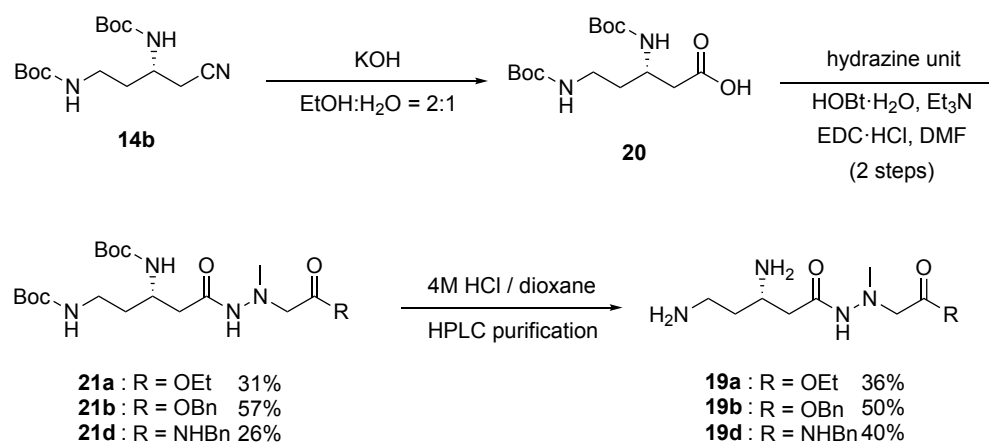


Figure 7. Structure of derivatives **19a-d**.

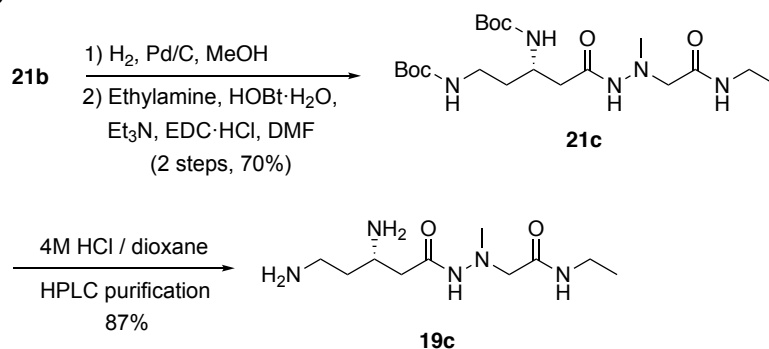
(2) 誘導体の合成

Scheme 3 に示す合成経路を用いて設計した誘導体を合成した。**Scheme 1** と同様の手法によって得られたニトリル体 **14b** を塩基性条件下にて加水分解する事でカルボン酸 **20** へと変換後、HOBt·EDC 法を用いて各種ヒドラジン化合物と縮合反応に付す事でヒドラジド **21a**、**21b**、**21d** を合成した。**21a**、**21b**、**21d** の保護基を酸処理にて除去し、HPLC で精製することで誘導体 **19a**、**19b**、**19d** を合成した (**Scheme 3A**)。エチルアミド誘導体 **19c** は、合成中間体 **21b** から合成した。接触還元により **21b** のベンジルエステルを除去したのち、エチルアミンを HOBt·EDC 法を用いて縮合することでヒドラジド **21c** を得た。**21c** の保護基を酸処理にて除去し、HPLC で精製することで誘導体 **19c** を合成した (**Scheme 3B**)。

A



B

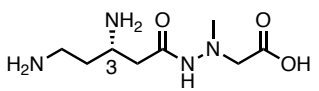
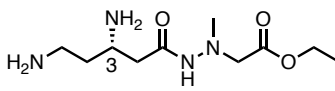
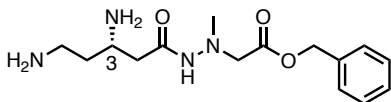
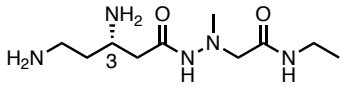
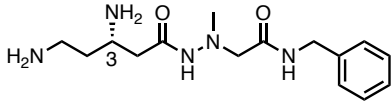


Scheme 3. Synthetic route of derivative **19a-d**.

(3) 誘導体の活性評価 (COS-7 細胞を用いてのリードスルー活性評価)

本研究における誘導体のリードスルー活性は、COS-7 細胞を用いる培養細胞評価系を用いて実施した。評価した誘導体とその活性値を **Table 2** に示す。エチルエステル誘導体 **19a** の活性値は TCP-112 (**11b**) より減弱し、ベンジルエステル誘導体 **19b** は活性を維持する結果となった。一方で、アミド誘導体であるエチルアミド体 **19c**、ベンジルアミド体 **19d** ともにその活性がコントロールと同程度まで減少しており、活性を消失した (**Table 2**)。

Table 2. Readthrough activity of derivatives **19a-d**.

Compound	Structure	Readthrough activity ^a
TCP-112 (11b)		4.26 ± 0.02
19a		2.08 ± 0.11
19b		4.04 ± 0.06
19c		1.42 ± 0.15
19d		0.80 ± 0.05

^a Ratio of readthrough activity of compound (200 μM) against that of negative control (= 1). Cell : COS-7

第5節 カルボン酸部位に着目した誘導体の分子設計・合成とその生物活性評価②

第4節ではTCP-112 (**11b**)の末端カルボン酸部位に着目し、エステル構造への変換(**19a**、**9b**)、およびアミド構造(**19c**、**19d**)への変換を行った誘導体を合成し、リードスルー活性を評価した。その結果、リード化合物である**11b**のリードスルー活性を凌ぐ誘導体の獲得には至らなかったものの、ベンジルエステル誘導体**19b**が**11b**と同等の活性を維持していた。**19b**のベンゼン環部位に着目し、ベンゼン環上に各種置換基を導入した誘導体を合成することでさらなる高活性誘導体の獲得を図った。

(1) 誘導体の分子設計

ベンジルエステル誘導体**19b**のベンゼン環上に各種置換基を導入した誘導体を設計した。具体的には、臭素、塩素のハロゲン基、ニトロ、メトキシ基をそれぞれオルト位、メタ位、パラ位にそれぞれ1置換した誘導体(**22a-l**)を設計した(**Figure 8**)。

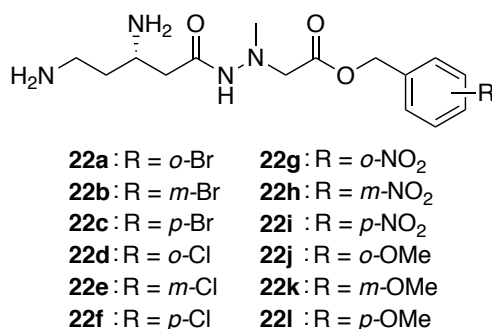
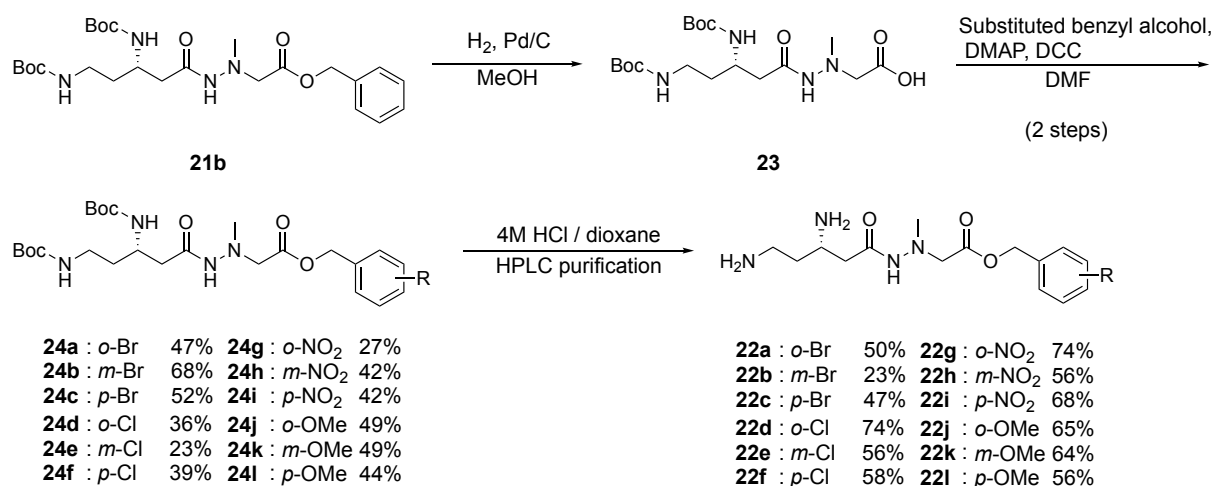


Figure 8. Structure of derivatives **22a-l**.

(2) 誘導体の合成

誘導体の合成に関しては、ベンジルエステル誘導体**19b**の合成経路をもとにして行うこととした。すなわち、ベンジルエステル中間体**21b**のベンジル基をPd/Cを用いる接触還元によりカルボン酸**22**とし、DCC、DMAPを用いて種々の置換基を有するベンジルアルコールを縮合することで**23a-l**を得る。酸処理にてBoc基を脱保護後、HPLCにて精製することで、所望の誘導体**22a-l**を合成することに成功した。以下に実際の合成方法を、収率とともに示す(**Scheme 4**)。

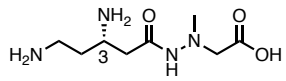


Scheme 4. Synthetic route of derivatives **22a-l**.

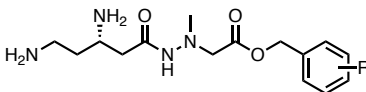
(3) 誘導体の活性評価 (COS-7 細胞を用いてのリードスルー活性評価)

第4節と同様、デュアルレポーター遺伝子をトランスフェクションした COS-7 細胞を用いて、合成した誘導体 (200 μM) のリードスルー活性を評価した。本評価においては、各評価実験における TCP-112 (**11b**) の値を、4.27 に補正した場合でのリードスルー活性値を示す。(この活性値は **11b** を 16 回、実験に付した際に得られた数値の平均値である。) **Table 3** にその詳細を示す。加えて、今回は脂溶性の指標となる ClogP 値も併せて考察する。

Table 3. Readthrough activity of derivatives **22a-l**.



TCP-112 (**11b**)



22

Compound	R	ClogP ^b	Readthrough activity ^a		Compound	R	ClogP ^b	Readthrough activity ^a
TCP-112 (11b)	—	-4.07	4.26 ± 0.02		22g	<i>o</i> -NO ₂	-0.42	4.51 ± 0.07
19b	H	-0.08	4.04 ± 0.06		22h	<i>m</i> -NO ₂	-0.42	3.21 ± 0.13
22a	<i>o</i> -Br	0.78	3.83 ± 0.56		22i	<i>p</i> -NO ₂	-0.42	3.05 ± 0.16
22b	<i>m</i> -Br	0.78	3.75 ± 0.31		22j	<i>o</i> -OMe	-0.16	3.10 ± 0.13
22c	<i>p</i> -Br	0.78	2.98 ± 0.40		22k	<i>m</i> -OMe	-0.16	3.71 ± 0.19
22d	<i>o</i> -Cl	0.63	3.34 ± 0.15		22l	<i>p</i> -OMe	-0.16	3.25 ± 0.09
22e (TCP-182)	<i>m</i> -Cl	0.63	4.90 ± 0.21					
22f	<i>p</i> -Cl	0.63	4.21 ± 0.16					

^a The value of calculate log P (ClogP) was calculated by CS ChemBioDraw Ultra 12.0

^b Ratio of readthrough activity of compound (200 μM) against that of negative control (= 1).

Cell : COS-7.

臭素置換体である誘導体 **22a-c** では、パラ置換体で活性値の減弱がみられるものの、オルト位置置換体である **22a** において活性の維持が確認できた。加えて、塩素置換体 **22d-f** ではメタ置換体 **22e** (TCP-182) において TCP-112 (**11b**) を凌ぐ、活性の向上が確認された。これらハロゲン基を有する誘導体の ClogP 値は、臭素、塩素置換体でそれぞれ 0.78、0.63 を示し、**11b** より脂溶性が向上したことが考えられる。

しかしながら、ベンゼン環上の置換基の位置とリードスルー活性との関連性については、明確な相関を得ることは出来なかった。

第6節 無細胞タンパク質合成系の構築と高活性エステル誘導体の活性評価

(1) 序論

第5節でTCP-112 (**11b**)のカルボン酸部位に各種1置換ベンジルアルコールを導入(**22a-l**)することで、リードスルー活性が向上することが示され、その中でもハロゲン基、特にメタ位塩素置換体 **22e** (TCP-182) が、**11b** の活性値を凌ぐ活性値を示した。また、これらの誘導体は他の誘導体と比較して ClogP 値が高く、化合物そのものの脂溶性が向上していることが考えられた。一方で、第4節では、TCP-112 (**11b**) 末端カルボン酸をアミド構造へと変換した誘導体 **19c**、**19d** において、その活性値がコントロール付近にまで低下、すなわち活性が消失するという結果を得ている。

以上より、カルボン酸をエステル構造に変換することによる細胞膜透過能の改善が、活性に影響を与えているのではないかと考察した。そこで、エステル構造の活性への影響を調べることを目的として無細胞タンパク質合成系を新たに確立し、誘導体の活性評価を行うこととした。この無細胞タンパク質合成系においては、化合物の細胞膜透過能を考慮することなく、純粋な化合物の活性を評価することが可能である。

(2) 無細胞タンパク質合成系の構築

Figure 9 に無細胞タンパク質合成系を用いたリードスルー活性評価に用いるプラスミドの模式図を示す。COS-7細胞を用いたリードスルー評価法と同様に、PTCであるTGA配列の上流に β -Galactosidase、下流にLuciferaseを組み込んだデュアルレポータープラスミドを用いた。プロモーターとしては、細胞系で用いていたCMV/ β -actin promoterをT7 promoterに変更し、非翻訳領域にはIRES (internal ribosome entry sites)を導入している。これは、翻訳を開始する機能を持ち、リボソームの呼び込みを担っていることが知られている¹⁹⁾。

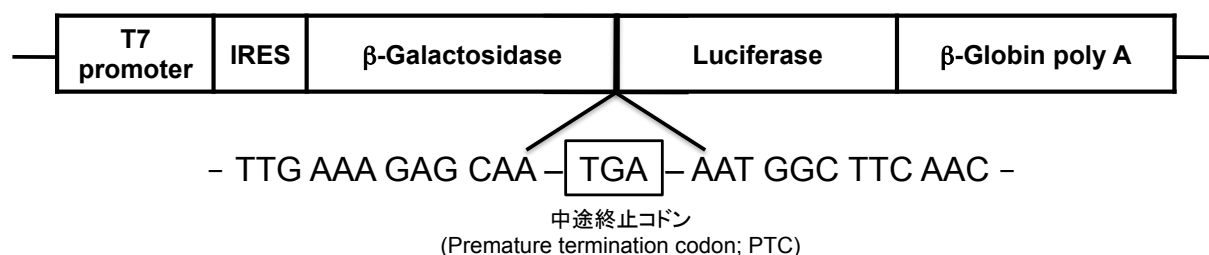
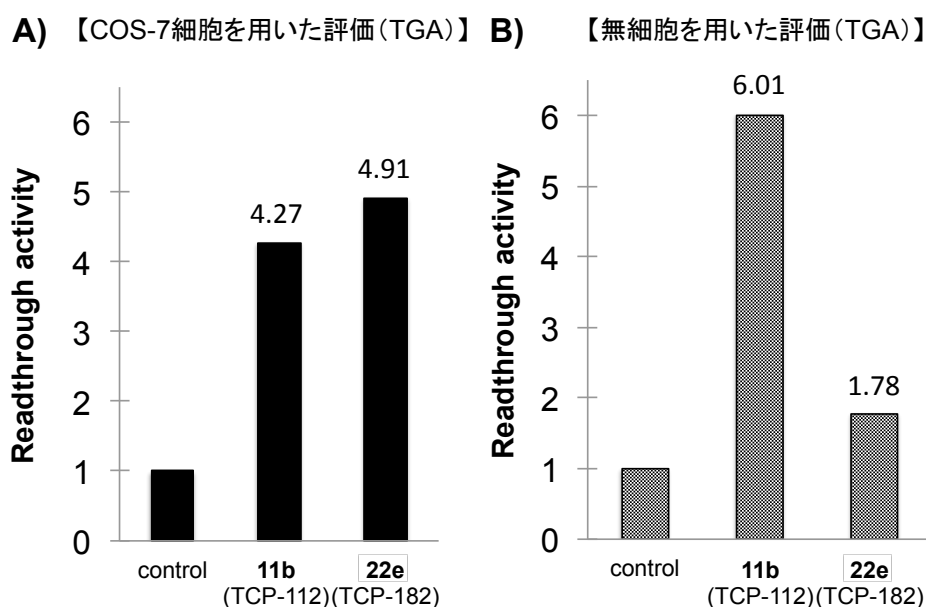


Figure 9. Schematic structure of the dual-reporter gene construct for cell-free assay system.

なお本評価系におけるリードスルー活性は、COS-7 細胞を用いた評価と同様に、Luciferase の活性値を β -Galactosidase の活性値で除した値をリードスルー活性値とした。また、各誘導体の活性値は、コントロールすなわち化合物無添加群の活性値を 1 とした時の比活性にて算出した。

(3) 誘導体の活性評価（無細胞タンパク質合成系における、エステル誘導体のリードスルー活性評価）

上記にて構築した無細胞タンパク質合成系を用いて、TCP-112 (**11b**)、およびその *m*-クロロベンジルエステル誘導体 **22e** それぞれの 20 μ M におけるリードスルー活性評価を行った。以下にその結果を、培養細胞評価系の活性値と合わせて記載する (**Figure 10**)。TCP-112 (**11b**) は、培養細胞評価系と同様に、無細胞タンパク質合成系においても良好なリードスルー活性を示した (**Figure 10B**)。一方で、ベンジルエステル誘導体 **22e** の無細胞評価系での活性値は、化合物未添加群付近まで低下しており、細胞評価系での結果に相反する結果となった。このことから、ベンジルエステル誘導体 **22e** は、化合物そのものではリードスルー活性が減弱していることが明らかとなった。すなわち、エステル型誘導体は細胞内で酵素等の影響を受け、活性本体である TCP-112 (**11b**) に変換されることで活性を発揮するプロドラッグである可能性が示唆された。



^{a)} Ratio of readthrough activity of compound (200 μ M) against that of negative control (= 1). Cell : COS-7.

^{b)} Ratio of readthrough activity of compound (20 μ M) against that of negative control (= 1). Human cell lysate.

Figure 10. Cell-based and cell-free readthrough activity of derivative **11b** and **22e**.

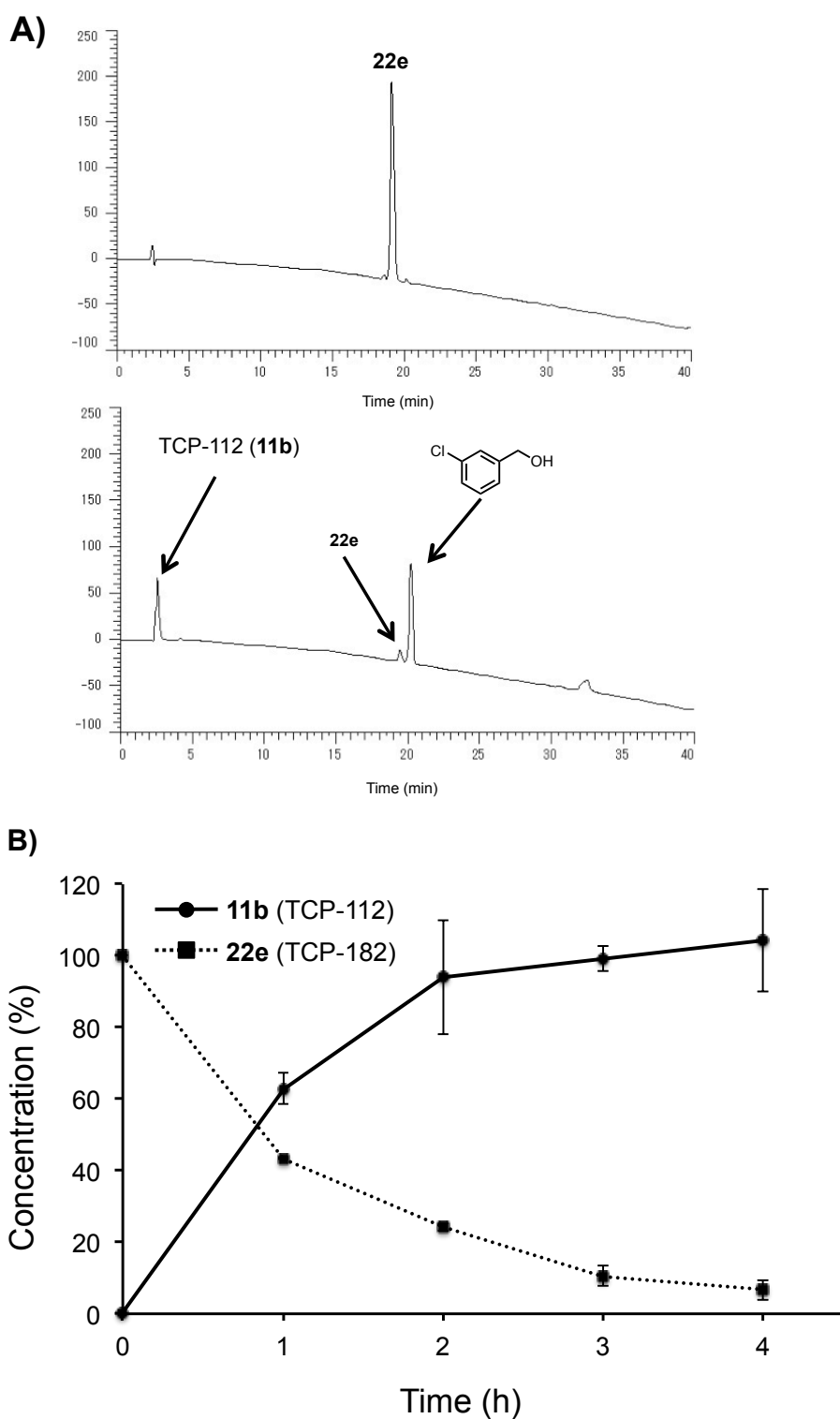
第7節 エステラーゼを用いた加水分解実験

(1) 序論

高活性ベンジルエステル型誘導体は、細胞培養評価系では良好なリードスルー活性を示す一方で、無細胞タンパク質合成系における活性値は、大幅に低下することが明らかとなった (**Figure 10**)。すなわち、エステル型誘導体は細胞内で酵素等の影響によって活性本体である TCP-112 (**11b**) に変換されるプロドラッグである可能性が示唆された。そこで、ブタ肝臓由来エステラーゼを用いて誘導体の加水分解実験を行うことで、親化合物 TCP-112 (**11b**) の生成の有無を調べることにした。

(2) エステラーゼを用いた加水分解実験とその結果

エステル誘導体を生理的条件下 (pH 7.4)、ブタ肝臓由来エステラーゼを用いる加水分解反応を行い、HPLC にて経時的に分析を行った。即ち、0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) に溶解させた誘導体 **22e** の 2 mM 溶液に豚肝臓由来エステラーゼを添加した後、37 °C の恒温槽にて 0 分、30 分、1 時間、2 時間、3 時間、4 時間それぞれインキュベートした。逆相 HPLC にてエステラーゼ分解産物を分析することで加水分解産物の同定を行った。以下にその結果と 4 時間経過時の HPLC チャートを示す (**Figure 11**)。

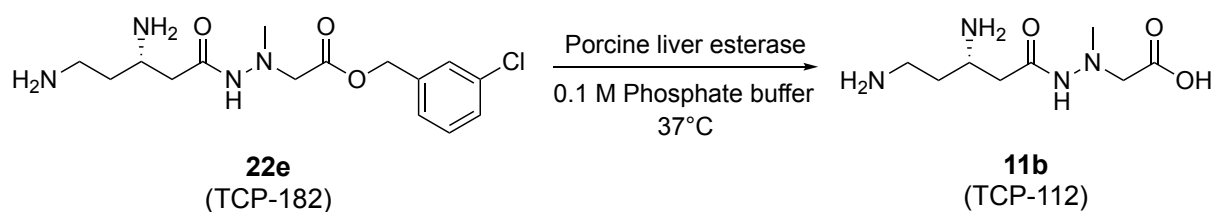


Compound concentration (%) is determined by RP-HPLC. Error bars indicate \pm SD ($n = 3$). Gradient: H_2O (0.1% TFA) / $\text{CH}_3\text{CN} = 100 : 0$ to $90 : 10$ over 10 min and $90 : 10$ to $35 : 65$ over 30 min, flow rate: 0.9 mL / min, UV: 222 nm, column: COSMOSIL Protein-R, 4.6 mm I.D. x 150 mm.

Figure 11 (A) HPLC analysis of products after esterase hydrolysis of **22e**. (B) Hydrolysis of **22e** by porcine liver esterase.

エステラーゼ加水分解実験の結果、時間経過に伴いベンジルエステル型誘導体 **22e** のピークは減少し、一方で2分、20分付近に新たなピークが出現した (**Figure 11B**)。このピークを分析したところ、2分のピークはTCP-112 (**11b**) のピークと保持時間が一致し、HRMSにて **11b** の分子量が確認された (calcd for C₈H₁₈N₄O₃ [M + H]⁺ 219.1457, found 219.1464)。加えて約20分のピークはGC/MSにて分析を行ったところ、*m*-クロロベンジルアルコールであることが明らかとなった。以上のことから、ベンジルエステル型誘導体 **22e** (TCP-182) は生体内にてエステラーゼによって加水分解を受け、親化合物として **11b** (TCP-112) を生成している可能性が示唆された。また、エステラーゼ未処理条件下における評価として、同様のエステル誘導体 **22e** を生理的条件下 (pH 7.4, 37 °C) にてインキュベートし、HPLCにて経時的に分析を行ったが、6時間の反応においても **22e** の分解はほとんどみられず、約6%程度の分解にとどまった。

すなわち、誘導体 **22e** はプロドラッグとして、細胞内エステラーゼにて速やかに加水分解を受けることで、活性本体である TCP-112 (**11b**) を生成し活性を発揮することが示された (**Scheme 5**)。



Scheme 5. Benzyl ester derivatives **22e** function as a prodrug to produce parent drug **11b**.

第 8 節 小括

以前の研究により、我々は、(+)-Negamycin (8) からの誘導によって得られた、3-*epi*-deoxynegamycin (9)、leucyl-3-*epi*-deoxynegamycin (10) が (+)-Negamycin (8) よりも高いリードスルー活性を有すると同時に、抗菌活性を持たない、薬効分離に成功した化合物であるという事を見いだした。

より高活性なリードスルー化合物の獲得を目的とし、3-*epi*-deoxynegamycin (9) を基盤とした構造活性相関研究を実施するにあたり、本章では 1) β -アミノ酸残基の側鎖炭素鎖長の変更および 2) α -アミノ酸への変換、を行った誘導体を設計、合成した。さらに、3) 得られた高活性誘導体の末端カルボン酸をエステル構造、アミド構造へ変換した誘導体を設計、合成した。その結果、以下の成果を得た。

(1) 9 の主鎖炭素鎖長を 1 つ短縮した TCP-112 (11b) が、既存のネガマイシン誘導体を凌駕する高いリードスルー活性を有していることが明らかとなった。一方、ネガマイシンにおける主鎖 β -アミノ酸構造を α -アミノ酸へと変換すると活性が大幅に減弱することも明らかとなった。

(2) TCP-112 (7) のカルボン酸部位をエチルエステル (19a) へと変換すると活性がやや低下し、ベンジルエステル (19b) へと変換すると活性が維持される。その一方でアミド構造 (19c, 19d) へと変換すると活性が消失することが明らかとなった。

(3) 活性維持となったベンジルエステル誘導体 19b を用いて、そのベンゼン環上に各種置換基を有する誘導体を合成することによって活性の向上を目指した。その結果、メタ位塩素置換体 22e において TCP-112 (11b) を凌ぐ活性の向上が確認された。

(4) 無細胞タンパク質合成系を新たに確立し、評価を行った。TCP-112 (11b) は COS-7 細胞を用いた評価と同様に、無細胞タンパク質合成系においても良好なリードスルー活性を示した。一方で、ベンジルエステル体である誘導体 22e はその活性値は化合物未添加群付近まで低下した。このことから、ベンジルエステル誘導体は、化合物そのものでは活性を示さないことが明らかとなった。すなわち、エステル型誘導体は細胞内で酵素等の影響を受け、活性本体である TCP-112 (11b) に変換されるプロドラッグである可能性が示唆された。

(5) ブタ肝臓由来エステラーゼを用いてエステル型誘導体 22e の加水分解実験を行い、HPLC にて分解物を評価したところ、時間経過に伴って、誘導体 22e が消失し、TCP-112 (11b) が生成することが明らかとなった。このことから、エステル型誘導体は生体内でエステラーゼによって加水分解を受け、TCP-112 (11b) を生成することで活性を発揮する、プロド

ラッグであることが改めて示唆された。

以上の結果から、エステル構造への変換により活性の向上が見られたのは、化合物自体の活性増強ではなく、脂溶性が向上した担体性プロドラッグとして機能し、細胞内への透過効率が改善されたためと考えられた。

第 2 章

Leucyl-3-*epi*-deoxyneomycin の 3 位アミノ基および末端カルボン酸部位に着目した誘導体の合成と生物活性評価

第 1 節 序説

本章では Leucyl-3-*epi*-deoxyneomycin (**10**) を基本骨格として 3 位アミノ基部のロイシン構造に着目した構造活性相関研究を展開することで、高活性な誘導体の獲得を図った。具体的には、**10** のロイシン構造を各種アミノ酸に変換した誘導体を合成するとともに、得られた高活性誘導体のカルボン酸部位をエステル構造へと変換することでさらなる高活性化を図った。

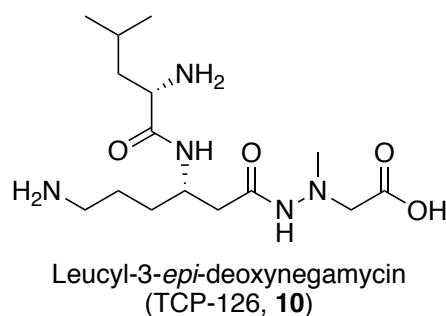


Figure 12. Structure of Leucyl-3-*epi*-deoxyneomycin (TCP-126, **10**).

第 2 節 Leucyl-3-*epi*-deoxyneomycin (**10**) の 3 位アミノ基に着目した誘導体の設計と合成とその生物活性評価

(1) 誘導体の分子設計

著者は、Leucyl-3-*epi*-deoxyneomycin (**10**) を基本骨格として、3 位アミノ基部のロイシン構造に着目した構造活性相関研究を実施した。すなわち、**10** の 3 位アミノ基部の L-ロイシン構造をアミノ酸を含む各種構造に変換した誘導体を合成することとした。

Figure 13 に設計した 6 つの誘導体を示す。具体的には、D-ロイシン構造を導入した誘導体 **25a**、(S)-2-hydroxy-4-methylpentanoic acid を導入した **25b** の合成を計画した。さらに、フェニルアラニン、チロシンを導入した誘導体 **25c**、**25d**、バリンを導入した **25e**、グリシンを導入した誘導体 **25f** を設計した。

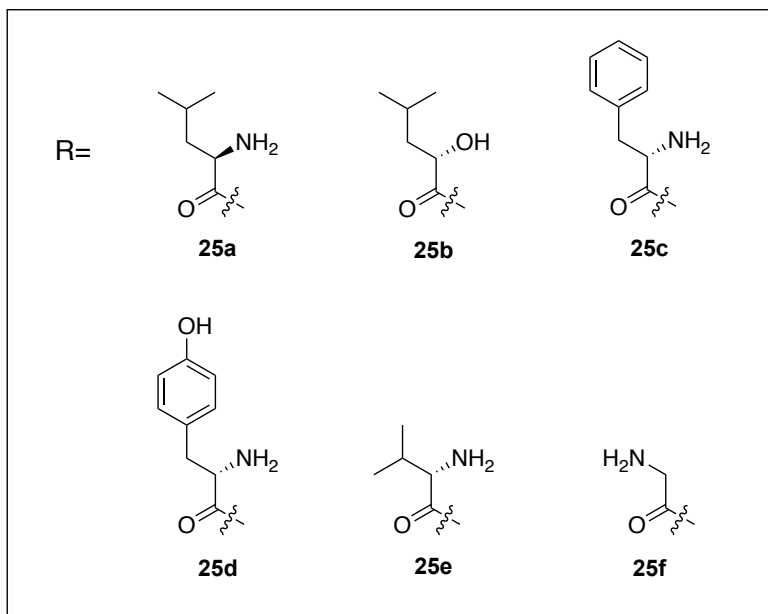
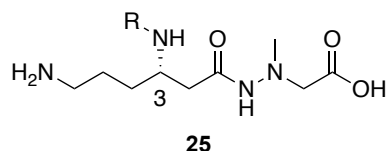
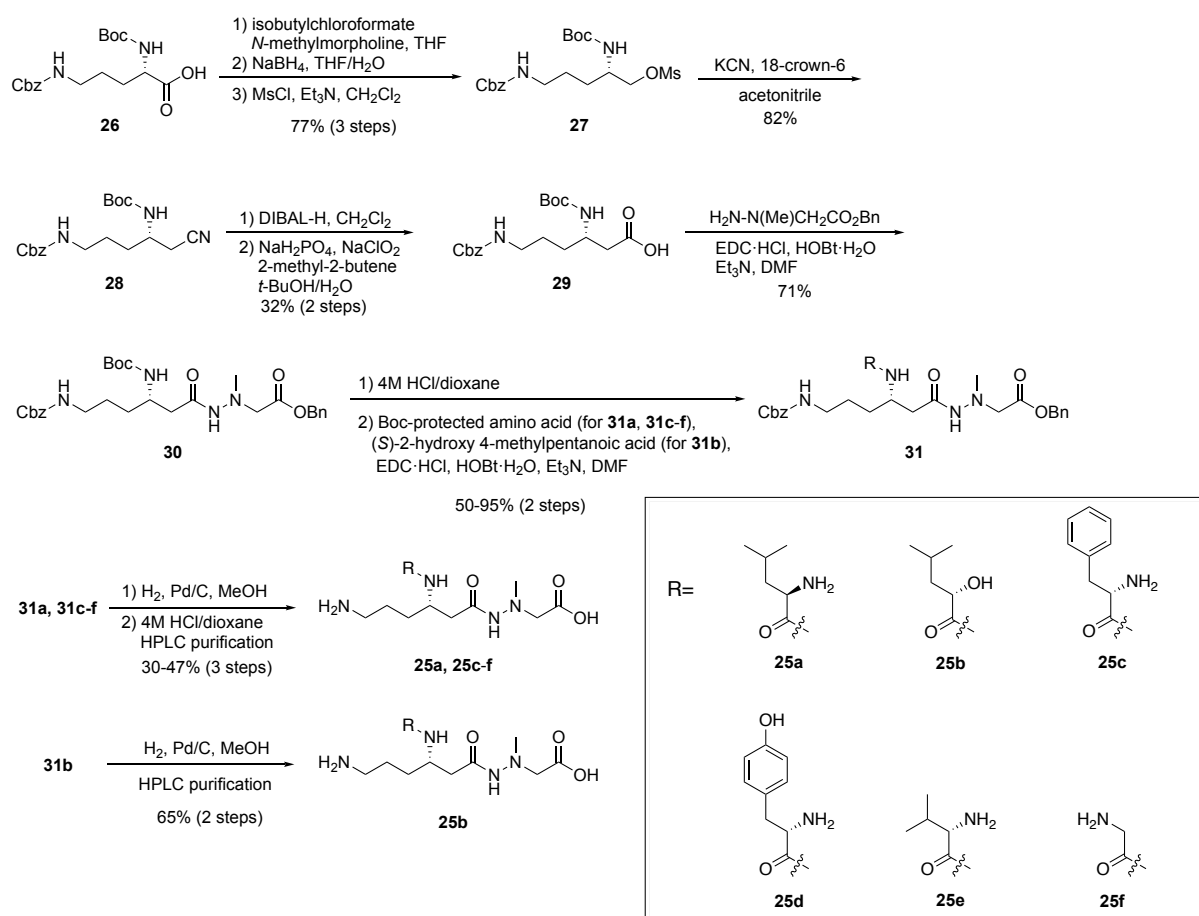


Figure 13. Structure of derivatives **25a-f**.

(2) 誘導体の合成

設計した4誘導体の合成法を **Scheme 6** に示す。Boc-Orn(Cbz)-OH (**25**) を出発原料とし、カルボン酸部位をクロロギ酸イソブチルを用い混合酸無水物へと導き、NaBH₄にてアルコールへと還元、続けてメシル化を行うことにより、3工程、77%の収率で化合物**27**を得た。続けてシアノ化を行い82%の収率でニトリル体**28**を得た。得られたニトリル**28**をDIBALを用いて還元することでアルデヒドへと導き、続くピニック酸化によりカルボン酸**29**へと導いた。別途合成したヒドラジンユニットをHOBt·EDC法を用いて縮合することにより中間体**30**を収率71%で得た。酸処理にて**30**のBoc基を脱保護したのち、各種Boc保護アミノ酸を縮合することにより、化合物**31**を収率50-95%で得た。接触還元を付すことでCbz基並びにベンジルエステルを脱保護した後、続く4M HCl/DioxaneにてBoc基の脱保護、HPLC精製を行うことで、誘導体**25a**, **25c-f**を合成した。**31b**においては、同様の接触還元を付すことでCbz基並びにベンジルエステルを脱保護した後、HPLC精製を行うことで、誘導体**25b**へと導いた。



Scheme 6. Synthetic route of derivatives **25a-f**.

(3) 誘導体の活性評価 (COS-7 細胞を用いたリードスルー活性評価)

第1章と同様のデュアルレポーター遺伝子をトランスフェクションした、COS-7 細胞を用いて、合成した誘導体 (**22a-f**) のリードスルー活性を評価した。**Table 4** にその活性値の詳細を示す。

Table 4. Readthrough activity of derivatives **25a-f**.

Compound	R =	Readthrough activity ^{a)}	Compound	R =	Readthrough activity ^{a)}
(+)-Negamycin (1)		1.54 ± 0.13			
Leucyl-3- <i>epi</i> -deoxynegamycin (10)		2.72 ± 0.50	25c		2.13 ± 0.08
25a		1.30 ± 0.09	25d		1.92 ± 0.21
25b		1.33 ± 0.14	25e		1.87 ± 0.29
			25f		2.10 ± 0.90

^{a)} Cell-based readthrough activity as compared to control (= 1). COS-7 cell. Compound 200 μM. Data mean ± SD. n = 3.

Leucyl-3-*epi*-deoxynegamycin (**10**) に含まれる L-ロイシン構造を立体異性体である D-ロイシンに変換した **25a** は、天然型 (**10**) と比較してその活性値は半分程度まで低下した。一方、L-ロイシン構造を (S)-2-hydroxy-4-methylpentanoic acid へと変更した誘導体 **25b** の活性値においても同様の傾向を示した。これらの結果より、3位アミノ基に導入するアミノ酸はL-体であることが活性発現に必要であり、かつ、α位のアミノ基が活性発現に重要であることも明らかとなった。L-ロイシン構造の側鎖に着目し、その鎖長及び分岐構造を変更したL-バリンを導入した誘導体 **25e** 及びグリシンを導入した誘導体 **25f** においては **10** と比較して若干の活性値の低下が見られた。一方で、L-フェニルアラニン体 **25c**、L-チロシン体 **25d** においても leucyl-3-*epi*-deoxynegamycin (**10**) の活性値を凌駕する結果には至らなかった。

これらの結果より、3位アミノ基に着目した誘導化においては、L-ロイシン構造を有するリード化合物である、leucyl-3-*epi*-deoxynegamycin (**10**) が最適構造であると判断した。

第 3 節 Leucyl-3-*epi*-deoxyneqamycin (10) のカルボン酸部位に着目した誘導体の合成とその生物活性評価

(1) 誘導体の分子設計

Leucyl-3-*epi*-deoxyneqamycin (10) を基本骨格として、3 位アミノ基部のロイシン構造に着目した構造活性相関研究を実施した結果、L-ロイシン構造を有する天然型、Leucyl-3-*epi*-deoxyneqamycin (10) を凌ぐ誘導体の獲得には至らなかった。一方、3-*epi*-deoxyneqamycin (9) の主鎖炭素鎖長に着目した構造誘導により、TCP-112 (11b) の獲得に成功し、さらには 11b のカルボン酸部位をエステル構造へと変換することで、さらに活性が向上することが明らかになった。そこで、Leucyl-3-*epi*-deoxyneqamycin (10) のカルボン酸部位に着目し、同様にエステル化を施すことで活性の向上を試みた。

Figure 14 に設計した 5 つの誘導体を示す。具体的には、TCP-112 のカルボン酸部位に着目した誘導体合成時に得られた知見を元に、ベンジルエステルおよび、各種 1 置換ベンジルエステル構造を導入した誘導体 (32a-e) を合成した。置換基には、TCP-112 の各種ベンジル置換体中で高活性を示した *o*-Br ベンジルアルコール、*m*-Cl ベンジルアルコール、*o*-NO₂ ベンジルアルコール、そして *m*-OMe ベンジルアルコールを選択した。

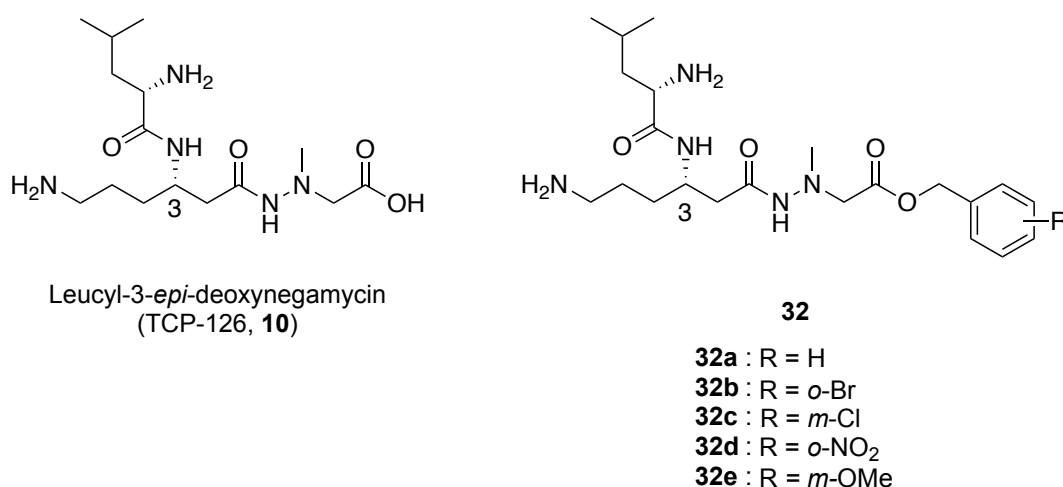
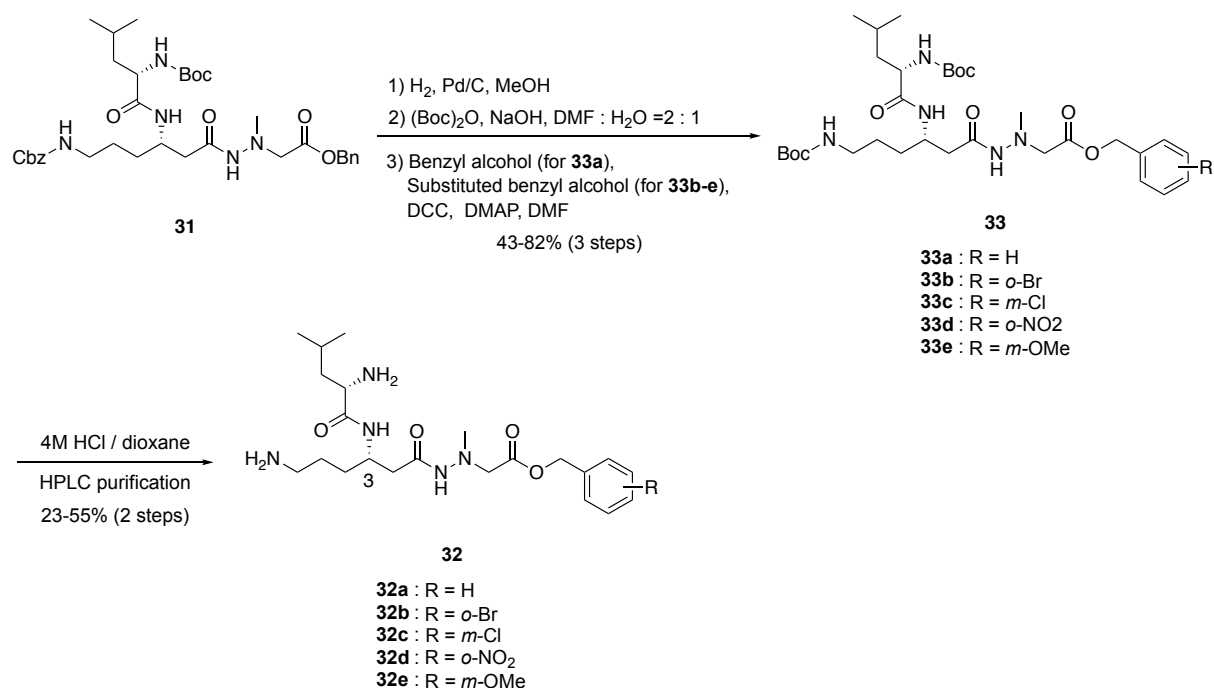


Figure 14. Structure of derivatives 32a-e.

(2) 誘導体の合成

誘導体の合成経路を Scheme 7 に示す。合成中間体 31 に対し接触還元を施すことで Cbz 基とベンジルエステル基の脱保護を行った後、β-アミノ酸ユニットのアミノ基を Boc 基で保護し、DMAP、DCC を用いてベンジルアルコール、及び各種 1 置換ベンジルアルコールを適宜縮合することで 34a-e を得た。34a-e の Boc 基を酸処理にて除去し、HPLC にて精製することで所望の誘導体 32a-e を合成した。



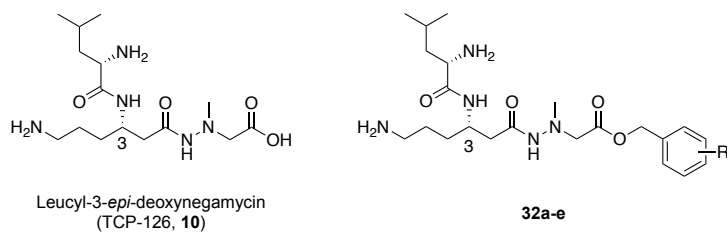
Scheme 7. Synthetic route of derivatives **32a-e**.

(3) 誘導体の活性評価 (COS-7 細胞を用いてのリードスルー活性評価)

デュアルレポーター遺伝子をトランスフェクションした COS-7 細胞を用いて、合成した誘導体 (200 μM) のリードスルー活性を評価した。脂溶性の指標となる ClogP 値も併せて考察する。Table 5 にその活性値の詳細を、各誘導体の収率、および ClogP 値と共に示す。

ベンジルアルコールを導入した誘導体 **32a** は、Leucyl-3-*epi*-deoxyneogamycin (**10**) の活性値を大幅に凌駕するリードスルー活性 (8.92 ± 0.19) を示した。*o*-Br ベンジルアルコールを導入した誘導体 **32b** も **32a** と同様に高いリードスルー活性値を示した。さらに、*o*-NO₂ ベンジルアルコールを導入した誘導体 **32d** においても高い当該活性を有することが明らかとなった。*m*-Cl ベンジルエステル及び *m*-OMe ベンジルエステル誘導体である **32c**、**32e** においても、親化合物 Leucyl-3-*epi*-deoxyneogamycin (**10**) の 2 倍のリードスルー活性を示し、エステル誘導体を総じて活性値の上昇がみられた。特に高いリードスルー活性を示した **32b** (TCP-199) は最も高活性な天然由来リードスルー化合物として知られるアミノグリコシド、G418 (**2**) を凌ぐものであった。また、**32b** は 10μM から 200μM の濃度において、濃度依存的にリードスルー活性を示すことも明らかとなった (Figure 15)。**32b** が高いリードスルー活性値を示したのは、TCP-112 (**11b**) のエステル構造への変換時と同様、高親水性化合物である Leucyl-3-*epi*-deoxyneogamycin (**10**) の脂溶性が向上したことにより、細胞内移行能が改善したためであると考察した。

Clog 値とリードスルー活性値から総合的に判断し、後の *in vivo* 生物活性評価においては **32b** (TCP-199) を用いることとした。

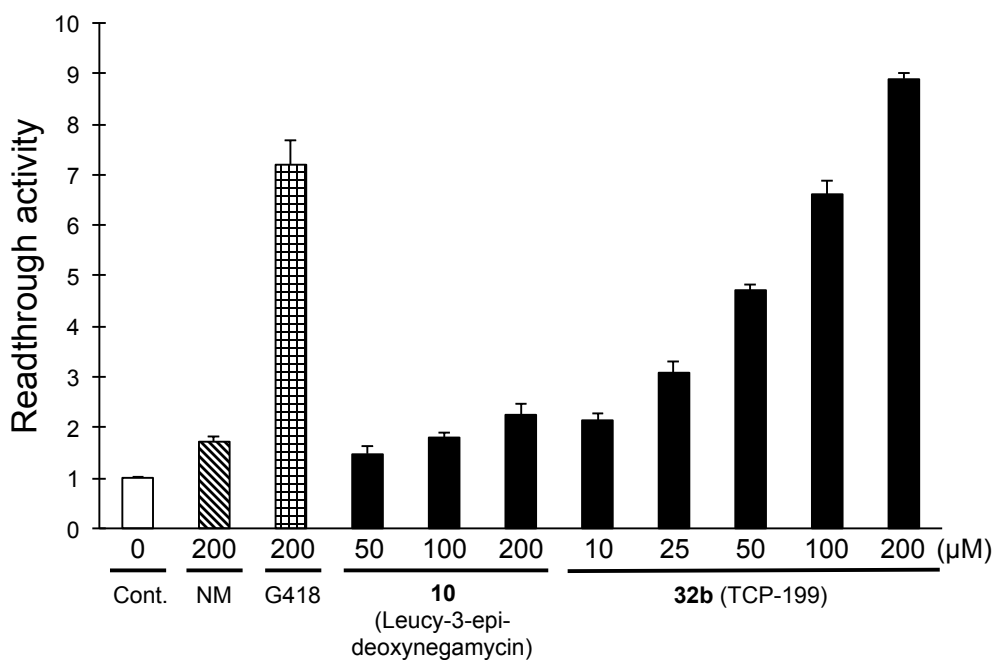
Table 5. Readthrough activity of derivatives **32a-e**.

Compound	R	ClogP ^a	Readthrough Activity ^b
Leucyl-3- <i>epi</i> -deoxynegamycin (10)	n.a ^c	-1.97	2.58 ± 0.07
32a	H	0.02	8.92 ± 0.19
32b (TCP-199)	<i>o</i> -Br	0.85	8.84 ± 0.07
32c	<i>m</i> -Cl	0.58	5.37 ± 0.22
32d	<i>o</i> -NO ₂	-0.23	9.15 ± 0.21
32e	<i>m</i> -OMe	-0.10	5.15 ± 0.13

^a The value of calculate log P (ClogP) was calculated by CS ChemBioDraw Ultra 12.0

^b Ratio of readthrough activity of compound (200 μM) against that of negative control (= 1).
Cell : COS-7.

^c Not applicable.



a) Cell-based readthrough activity as compared to control (= 1).
COS-7 cell. Compound 200 μM. Data mean ± SD. n = 3.

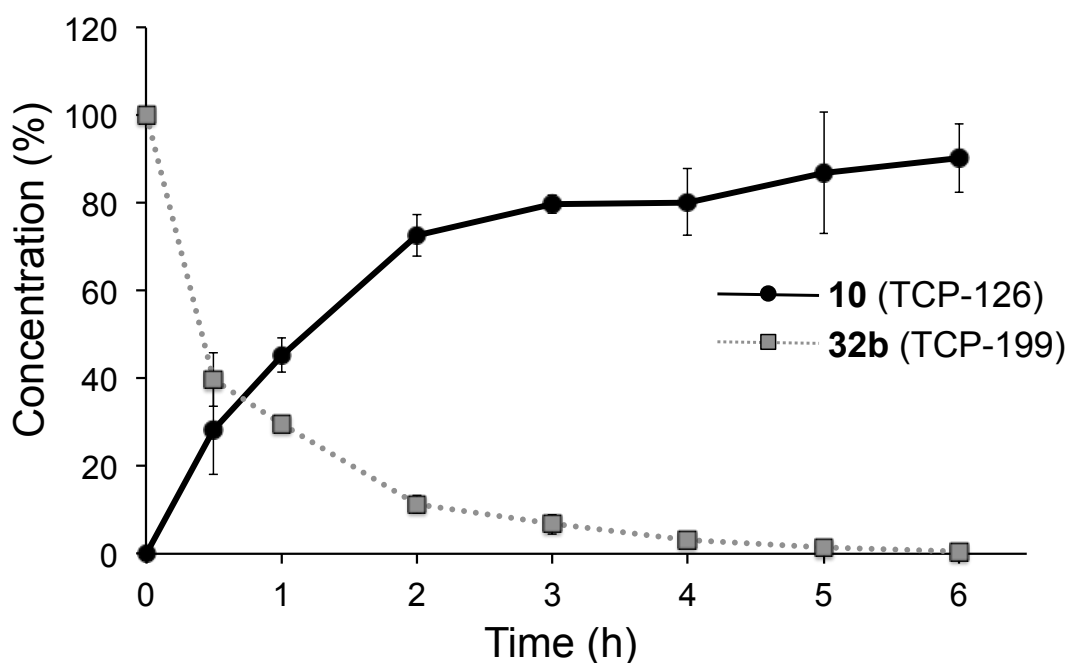
Figure 15. Cell-based readthrough activity (TGA) of **32b** (TCP-199) in the COS-7 cells.

第 4 節 ブタ肝臓由来エステラーゼを用いる加水分解実験

TCP-112 (**11b**) の末端カルボン酸に *m*-Cl ベンジルエステル構造を導入した TCP-182 (**22e**) はエステラーゼを用いた加水分解実験、ならびに無細胞タンパク翻訳系を用いた評価により、細胞内に移行後エステラーゼにより加水分解され、親化合物 TCP-112 (**11b**) を生成するプロドラッグである可能性が示唆されている。そこで、第 1 章にて構築したエステラーゼ加水分解実験を用いて、TCP-182 (**22e**) と同様の加水分解実験を実施することで、再度エステル構造の活性に対する影響を考察することとした。すなわち、エステル誘導体を生理的条件下 (pH 7.4)、ブタ肝臓由来エステラーゼを用いた加水分解反応を行い、HPLC にて経時的に分析を行った。0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) に溶解させた誘導体 **32b** の 2 mM 溶液に、ブタ肝臓由来エステラーゼを添加し、37 °C 恒温槽にて 0 分、30 分、1 時間、2 時間、3 時間、4 時間それぞれインキュベートした。インキュベート後、**32b** の残存率と **10** (Leucyl-3-epi-deoxyneogamycin, TCP-126) の生成率を HPLC 分析で得られたピーク面積と各化合物の検量線から算出した。

その結果、**32b** は時間依存的に減少し、その親化合物である **10** (Leucyl-3-epi-deoxyneogamycin, TCP-126) の生成が確認された。またエステラーゼ非存在下で 37°C における化合物の安定性を評価したところ、**32b** は 6 時間のインキュベートにお

いても残存率 99% と安定であった。したがって **32b** は、細胞内においてエステラーゼにより、そのエステル構造が加水分解され、親化合物である **10** (Leucyl-3-*epi*-deoxyneomycin) を生成することで効果を発揮するプロドラッグであるということが示唆された (**Figure 16**)。



Compound concentration (%) is determined by RP-HPLC. Error bars indicate \pm SD (n = 3). Gradient: H₂O (0.1% TFA) / CH₃CN = 100 : 0 to 90 : 10 over 10 min and 90 : 10 to 35 : 65 over 30 min, flow rate: 0.9 mL / min, UV: 222 nm, column: COSMOSIL Protein-R, 4.6 mmI.D. x 150 mm.

Figure 16. Hydrolysis of **32b** by porcine liver esterase.

第 5 節 誘導体の *in vivo* 生物活性評価

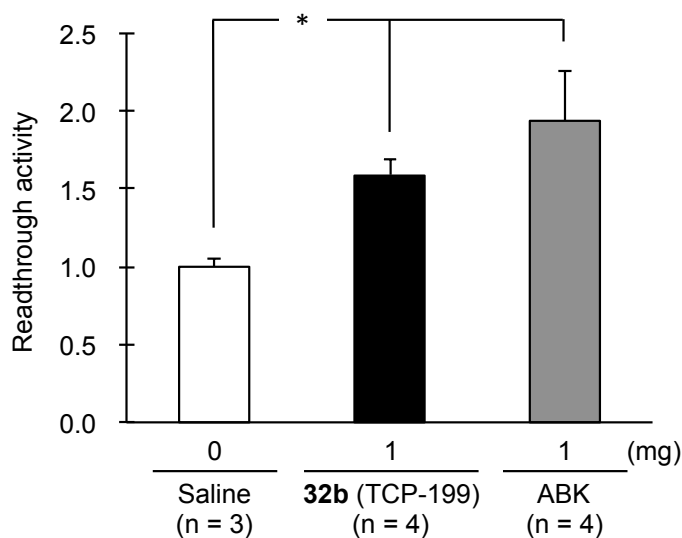
(1) 誘導体の *in vivo* リードスルー活性評価

10 (Leucyl-3-*epi*-deoxyneomycin, TCP-126) をリード化合物とする末端カルボン酸に着目したエステル変換により、総じて活性が向上する結果を得た。特にベンジルエステル体 **32a**、*o*-Br ベンジルエステル体 **32b**、*o*-NO₂ ベンジルエステル体 **32d** が、顕著なリードスルー活性を示した。次に *in vivo* におけるリードスルー活性評価を実施するにあたり、これら誘導体の中で最も ClogP が高い (細胞内移行性が高いと考えられる) *o*-Br ベンジルエステル体 **32b** を選択した。

in vivo 評価は第 3 節でリードスルー活性評価に用いたデュアルレポータープラスミドのベクターを導入したトランスジェニックマウス (READ マウス; Readthrough Evaluation and

Assessment by Dual-reporter mice) を用いた。生理食塩水に溶解した化合物 **32b** を、READ マウスに 1 mg/day/20 g の用量で 7 日間 READ マウスの腹部領域に皮下投与した。コントロールとして生理食塩水を、ポジティブコントロール群にはアミドグリコシド系抗生物質でリードスルー活性を有するとして知られるアルベカシン (ABK)³⁵⁾を用いて、同様に 7 日間 READ マウスの腹部領域に皮下投与した。

化合物 **32b** 添加群は、アルベカシン投与群に比べて、ややリードスルー活性が劣るものの、*in vivo* においても有意なリードスルー活性を有することが示された (Figure 17)。



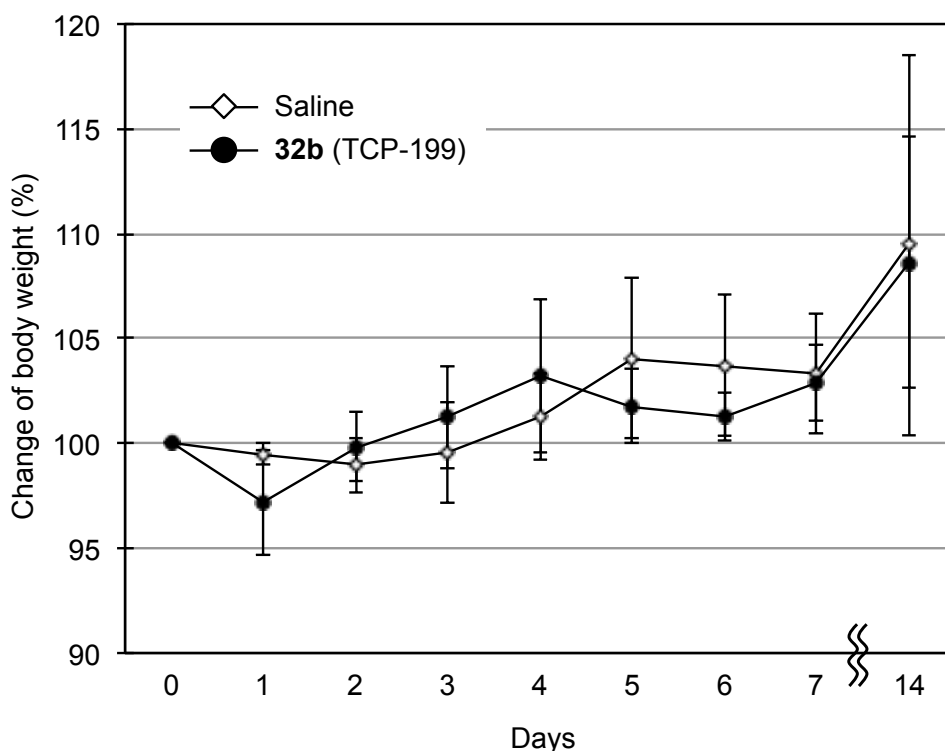
In vivo readthrough activity in READ mice. Compound **32b** (TCP-199) and ABK (arbekacin) were subcutaneously injected into the abdominal region of READ mice at a dosage of 1 mg day⁻¹ 20 g⁻¹ body weight for 7 days. Data are mean ± SD * p < 0.01.

Figure 17. *In vivo* readthrough activity of **32b** in READ mice.

(2) 誘導体の毒性評価① (B10 マウスを用いた体重変化に基づく毒性評価)

B10 マウスに 10 mg/day/20 g の用量で腹部領域に単回皮下投与し、**32b** (TCP-199) の毒性を、B10 マウス 2 週間の体重変化に基づき評価した。比較群として生理食塩水を同様に腹部領域に単回皮下投与した。

32b (TCP-199) 投与群は、1 日目においてわずかな体重の減少が見られたものの、その後はコントロール群と同様の体重増減が確認された。このことから化合物 **32b** の急性毒性は低く、ナンセンス変異性疾患治療における長期投与に適応しうる可能性が示唆された (Figure 18)。

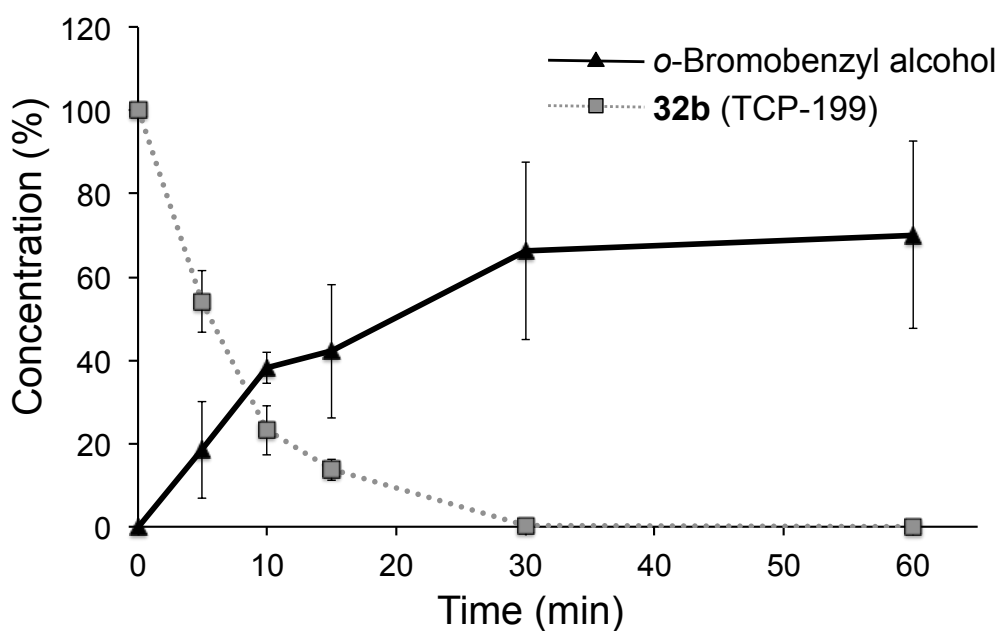


Acute toxicity test of **32b**. The body weight of **32b**-treated B10 mice ($n = 4$) during 2 weeks was measured in comparison to saline-treated B10 mice ($n = 3$) as a control. The analogue was subcutaneously injected only once ($10 \text{ mg day}^{-1} 20 \text{ g}^{-1}$ body weight) into the abdominal region of B10 mice.

Figure 18. Acute toxicity test of **32b**.

第 6 節 誘導体の血漿中安定性評価

32b (TCP-199) は、READ マウスを用いる *in vivo* リードスルー活性評価においてアルベカシン投与群に比べやや劣るものの、有意なリードスルー活性を有することが示された。また、第 2 章第 4 節において **32b** はエステラーゼにて加水分解され、活性本体である **10** (Leucyl-3-*epi*-deoxynegamycin, TCP-126) を発現するプロドラッグである可能性が示唆されている。一般に、エステラーゼは、肝臓中、そして血漿中等に多く含まれることが知られている。そこで、次に、ヒト血漿を用いた加水分解実験を行うことで、**32b** の *in vivo* 投与時における、より詳細な化合物安定性評価を実施した。ヒト血漿安定性試験は R. Konsoula らの方法に基づいて実施した³⁶⁾。すなわち、ヒト血漿 ($49.5 \mu\text{L}$ 、4%クエン酸三ナトリウムを抗凝固剤として含む) に対し、超純水にて溶解させた **32b** を添加し、 37°C にて適切な時間インキュベートした。インキュベーション後、 $200 \mu\text{L}$ のアセトニトリルを添加し、攪拌することで血漿タンパクの沈殿を行った。続けて、 4°C で $14,000 \text{ rpm}$ 、 15 min にて遠心分離した後、上清を RP-HPLC および高分解能質量分析によって分析した。その結果を **Figure 19** に示す。



Compound concentration (%) is determined by RP-HPLC. Error bars indicate \pm SD (n = 3). Gradient: H₂O (0.1% TFA) / CH₃CN = 100 : 0 to 90 : 10 over 10 min and 90 : 10 to 35 : 65 over 30 min, flow rate: 0.9 mL / min, UV: 222 nm, column: COSMOSIL Protein-R, 4.6 mm I.D. x 150 mm.

Figure 19. Stability of derivative **32b** in human plasma.

RP-HPLC による分析の結果、**32b** (TCP-199) は経時的に減少し、加水分解産物である *o*-Br ベンジルアルコールが増加することを確認できた。すなわち、ヒト血漿中安定性評価の結果、**32b** (TCP-199) はヒト血漿中エステラーゼにて 30 分にて速やかに加水分解され、活性本体である **10** (Leucyl-3-*epi*-deoxynegamycin, TCP-126) を生成することが示された。

第 7 節 誘導体の毒性評価② (培養細胞における殺細胞活性の評価)

第 5 節における B10 マウスを用いた体重変化に基づく毒性評価によって、**32b** (TCP-199) の *in vivo* における急性毒性は低いことが示された。そこで、次にヒト線維芽細胞 (HDF ; Human Dermal Fibroblast)、及び COS-7 細胞を用い、合成したエステル誘導体 (**32a-e**) の殺細胞活性評価を実施した。本評価は、細胞培養液中に WST-1 reagent を添加し、48 時間後の吸光度を測定することによって算出した。WST-1 reagent 中に含まれるテトラゾリウム塩は、生細胞中のコハク酸塩テトラゾリウム還元酵素によりホルマザン色素に変換される。生細胞数の増加により、ホルマザン色素の産生が増加することから、このホルマザン色素量を吸光度に基づいて測定することで、間接的に生細胞数の割合の算出が可能である。結果を **Figure 20** に示す。

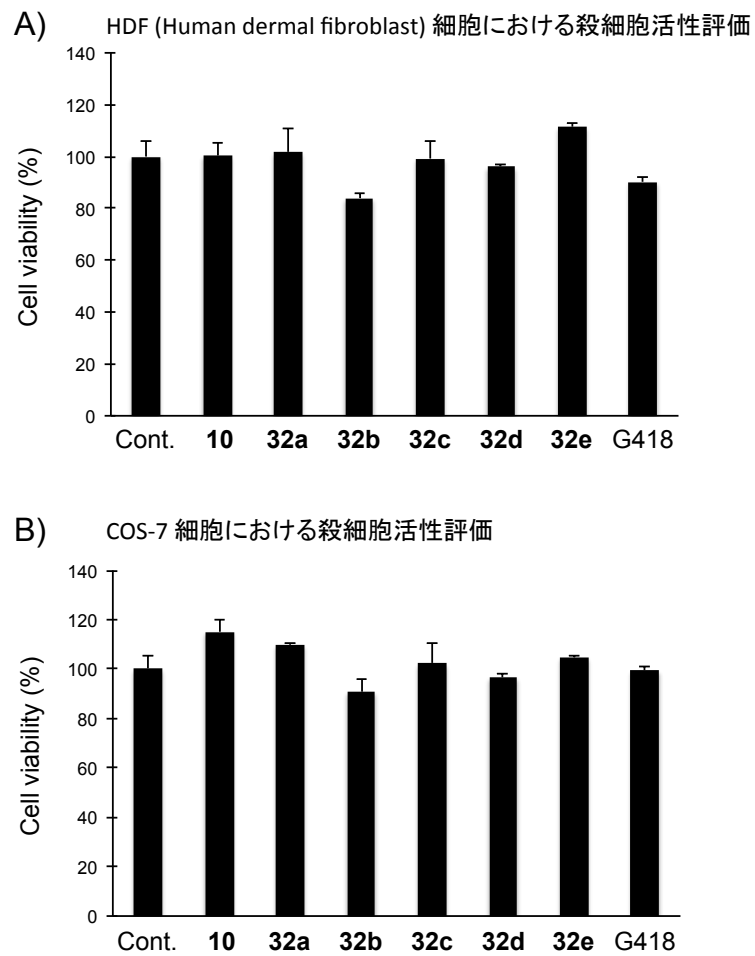


Figure 20. *In vitro* cytotoxic assay of synthetic derivatives **32a-e** against HDF and COS-7 cells.

WST1 reagent を用いた、TCP-126 エステル誘導体 (**32a-e**) の殺細胞活性評価の結果、HDF・COS-7 細胞共に顕著な細胞数減少は確認されず、本エステル誘導体は、ナンセンス変異性遺伝性疾患治療における長期投与にも適応可能であることが改めて示唆された。

第7節 小括

著者らは、以前の研究により、Leucyl-3-*epi*-deoxynegamycin (**10**) が(+)-Negamycin (**8**) よりも高いリードスルー活性を有することを見出した。そこで今回、Leucyl-3-*epi*-deoxynegamycin (**10**) の3位アミノ基に着目した構造変換を行うことで高活性誘導体の獲得を図った。結果として、構造変換を行ったものの、Leucyl-3-*epi*-deoxynegamycin (**10**) の活性値をしのぐ誘導体の獲得には至らなかった。一方で、**11b** (TCP-112) のカルボン酸部位に着目した構造変換によりエステル誘導体 **22b** (TCP-182) が高いリードスルー活性を有することが明らかとなっている。そこで、今回 Leucyl-3-*epi*-deoxynegamycin (**10**) に同様のエステル構造の導入を行うことで活性向上を図った。その結果、*o*-Br ベンジルエステルを導入した誘導体 TCP-199 (**32b**) が高いリードスルー活性を有することが明らかとなった。これは、天然由来のリードスルー化合物として最も高活性であるとして知られるアミノグリコシド、G418 (**2**) の活性をも凌駕するものであった。さらに、**32b** のエステル構造はブタ肝臓由来エステラーゼにて切断され、Leucyl-3-*epi*-deoxynegamycin (**10**) を生成すること、ヒト血漿中においても同様に **10** を生成することが示された。また、TCP-199 (**32b**) は、*in vivo* での評価においても有意なリードスルー活性を示すとともに、顕著な急性毒性も観察されず、ナンセンス変異性疾患治療への長期投与にも有用である可能性が示唆された。

第 3 章

ネガマイシン作用機構解析を目的とした多剤超感受性酵母株の構築

第 1 節 序説

リードスルー薬創製の実現には、リードスルー化合物の活性増強は必須であるが、それと同時に多くの課題を克服することが求められる。その最も大きなものの一つがリードスルー発現機構の解明である。本活性発現機構の解明は、高活性誘導体創製の観点からも必要不可欠であると考えられる。

一般にリードスルー活性は、標的とするナンセンス変異配列によって影響を受けるとされている。実際、ナンセンス変異は TGA > TAG > TAA の順に読み飛ばし効率が減少することがよく知られており、この結果はネガマイシン類縁体添加時においても同様の傾向がみられる。さらに、PTC 配列のみならず、その周辺配列によってリードスルー効率が影響を受けることも知られている。Floquet らは、PTC の前後配列に関する網羅的解析を実施した³⁷⁾。その結果 PTC 配列直下に C (シトシン) が含まれるナンセンス変異配列において、高効率でリードスルーが起こる事を明らかとした。しかしながら、その直下配列のみならず、そのさらに前後の配列もリードスルー効率には影響を与えることから、疾患ごとにそのリードスルー効率は大きく異なる。また、2014 年、Blanchet らはリードスルー活性発現により発現した完全長タンパク質において、PTC 配列の代わりに挿入されるアミノ酸を、酵母から抽出したリードスルー産物の MS/MS 解析から明らかにした³⁸⁾。その結果、TGA 配列に対しては Trp (82%)、Cys (14%)、Arg (4%)、TAG 配列では Tyr (92%)、Gln (5%)、Lys (3%)、TAA 配列では Tyr (54%) Gln (44%) Lys (2%) が挿入されることで完全長タンパク質が発現することが明らかとなった。このように、リードスルーの発生頻度および、リードスルー活性発現後の翻訳産物に関連する報告があるものの、その一方で、リードスルー活性発現に必須な酵素やタンパク質は未だ同定されていない。

代表的なリードスルー化合物であるアミノグリコシド系抗生物質は 30S リボソームサブユニット内に存在する 16S rRNA のアミノアシルサイト (A site) 近傍に結合し、A site 分子スイッチに作用することで抗菌作用を発揮する。RNA 分子スイッチは、その内部に存在する A1492 と A1493 部位の構造変化により、コドン・アンチコドンの塩基対形成の正確性をその構造変化により確認することで、RNA からタンパク質へのデコーディングを正確に行う補助の役割を担っている。アミノグリコシド系抗生物質はこの分子スイッチ内に結合することで、A1492 と A1493 部位の立体を常に一方方向に固定する³⁹⁾。これにより、本来では誤りであるコドン・アンチコドン認識によるアミノアシル tRNA の運搬が生じ、誤ったアミノ酸がタンパク質配列に組み込まれることで、翻訳の誤読が引き起こされる。これがアミノグリコシド系抗生物質の殺菌作用の発現メカニズムであり、同時にリードスルー作用を発揮するメカニズムの一つであると考えられる (翻訳の誤読が終止コドン (PTC) に生じた場合がリードスルーであると考えられる)。しかしながら、このメカニズム及び結合部位

が、アミノグリコシドにおいて抗菌活性とリードスルー活性とを薬効分離できない原因でもあるといえる。

ネガマイシンの結合部位に関してもこれまで精力的に研究がなされてきた。2007年に Susan らは、原核細胞（古細菌）50S リボソームサブユニットとネガマイシンとの共結晶構造解析を実施した⁴⁰⁾。その結果、ネガマイシンは新生タンパク質 Exit tunnel 近傍に結合し、新生タンパクのリリースを阻害している可能性が示唆された。しかしながら、大腸菌 *E.Coli* においてはこの Exit tunnel への結合と、抗菌活性との関係性を見いだすことができなかったとの記載がある。また、Polikanov らは好気性真正細菌の 70S リボソームおよび、mRNA、tRNA とネガマイシンとの共結晶構造解析を実施し、合計 9 箇所のネガマイシン結合サイトを報告している⁴¹⁾。さらに Olivier らは、大腸菌リボソームへのネガマイシンの作用部位を、ネガマイシン耐性株（抗菌活性に関して）の単離、およびその変異箇所の同定を通じて明らかにするとともに、その詳細を共結晶構造解析にて明らかにした⁴²⁾。その結果、16S rRNA 内の点突然変異によりネガマイシンの抗菌活性が消失し、耐性化することが明らかとなり、この変異箇所は、同様の抗生物質として知られるテトラサイクリン結合部位の近傍であることが示された。

我々は、3-*epi*-deoxynegamycin (9) および Leucyl-3-*epi*-deoxynegamycin (10) が (+)-negamycin (8) と比較して高いリードスルー活性を有しているとともに、抗菌活性を示さない、薬効分離に成功したネガマイシン天然類縁体であることを明らかにしてきた。上記のネガマイシン結合部位に関する報告はその全てがネガマイシン抗菌活性に着目して、その結合評価を実施していることから、我々が獲得したネガマイシン天然類縁体およびその誘導体は、これまでの報告とは異なる生体内分子・箇所に結合することでリードスルー活性を発揮する可能性が考えられる。

さらに、原核細胞ならびに真核細胞の細胞抽出液を用いる無細胞タンパク質合成系によるリードスルー活性評価の結果、本ネガマイシン類縁体は、真核細胞選択的にリードスルー活性を発現することが明らかとなっている。上記のネガマイシン結合部位に関する報告は、原核細胞を標的として議論していることから、ネガマイシン天然類縁体およびその誘導体は、これまでの報告とは異なる生体内分子・箇所に結合することでリードスルー活性を発現している可能性が改めて推測された。

一般に、結合部位・標的分子の探索には大きく分けて 1) 物理学的解析研究、2) 遺伝学的解析研究の 2 つの手法がある。ケミカルプローブ化を施した化合物を用い、標的分子との物理的相互作用を利用する手法が物理学的解析である。この手法においては、目的の標的部位と化合物との親和性を確保した（標的分子の相互作用を維持した）ケミカルプローブ化合物の獲得が必要不可欠である。このプローブとしては、リガンドと標的タンパク質を架橋するための反応性基（光親和性基（ベンゾフェノン、ジアジリン等）に代表される）、およびポリエチレングリコール、アミノカプロン酸等のリンカーが汎用される。しかしながら、これらケミカルプローブの結合は、標的分子への結合親和性の低下や非特異吸着の増加を招きかねないことから詳細な構造活性相関の検討が求められる。プローブ化化

化合物と標的分子との結合親和性以外にも、その選択性や標的分子の局在が問題となることも多い⁴³⁾。このような物理学的アプローチによる標的分子同定が困難な場合に有用な手法が2) 遺伝学的解析である (**Figure 21**)。これは、酵母などのモデル生物を用い、目的とするリガンドに対する耐性変異株を取得後、その変異株のゲノム解析を行うことで、変異部位を同定する。続く生化学的・分子生物学的手法による詳細な解析によって、間接的に標的分子を同定するという手法である。これまで、この遺伝学的アプローチを用いた標的分子の同定に成功した例として、免疫抑制剤 Rapamycin が挙げられ⁴⁴⁾、その標的である mTOR は動物細胞の細胞内シグナル伝達を理解する上で、欠かすことのできない大変重要な知見を与えている。また本解析法は、古典的ではあるもののプローブ化合物を用いた標的タンパク質同定法にて決定できない標的分子を同定可能な場合も多いとされており、有効性は高いと言える^{45,46)}。

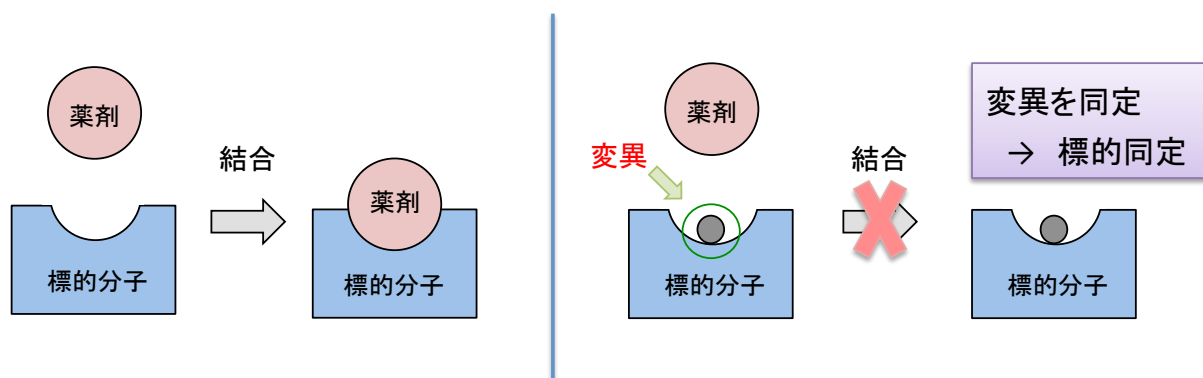


Figure 21. Schematic models of genomic analysis.

そこで今回著者は、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* をモデル生物として選択し、遺伝学的解析研究によるネガマイシン類縁体の結合部位並びに作用機構の解析に着手することとした。出芽酵母は 16 本の染色体を有しており、その全ゲノム塩基配列 (約 6000 遺伝子) がすでに解読されている。出芽酵母のゲノムサイズは 1200 万 bp 程度であり、ヒトの 250 分の 1 と大変小さいものの、生命現象の基本的な分子機構の多くが保存されていることから、真核細胞の有用なモデルとして今日まで様々な研究分野で利用されてきた⁴⁷⁾。さらに出芽酵母は、増殖が早い・病原性がない点で実験室レベルでの利用に適しており、一倍体世代と二倍体世代とが安定に存在し、一倍体における mating による相補性試験により遺伝子変異の優性劣性の判断が容易に可能である。また、遺伝子相同組換え効率が良好で、かつ外来 DNA の形質転換効率が高いことに加え、遺伝子破壊、タンパク精製といった多くの分子生物学的手法がこれまでに蓄積されており、遺伝学的解析を行う上で最適であると言

える。上記の理由から、出芽酵母は、これまでケミカルスクリーニング、標的分子の同定・推測、そして化合物の生物活性評価に広く使用されてきた。

2011年に知念らにより構築された酵母株 *12geneΔHSR* は、薬剤排出系に関わる 12 種の遺伝子（薬剤排出ポンプ 8 遺伝子、及びその転写因子 4 遺伝子）を破壊するとともに、*RME1* 遺伝子のプロモーター領域に点変異を導入 (*ins-308A*) することで孢子形成能を向上させることにより、遺伝学的解析に必要な形質転換能、接合能、孢子形成能を維持したまま多くの薬剤に対し高い薬剤感受性を示す多剤超感受性酵母である⁴⁸⁾。そこで今回、この *12geneΔHSR* を用い、ネガマイシン誘導体の作用機構解析、及びリードスルー活性評価に有効な酵母株の構築を行った。さらには、構築した酵母株を用いる遺伝学的解析研究として、ネガマイシン誘導体に対するリードスルー耐性株を単離後、そのゲノム解析を実施することで、ネガマイシン作用機構の解明を目指した。

第 2 節 *12gene ΔHSR* を基盤としたリードスルー活性定性用酵母株(ナンセンス変異含有酵母株)の構築

出芽酵母を用いる遺伝学的解析研究に着手するにあたり、まず親株である *12geneΔHSR* を用いてリードスルー活性を定性的に判断可能な酵母株を構築した。すなわち、ナンセンス変異を含有する酵母株の構築を行った。これまでリードスルー活性の有無を定量可能な系として、ナンセンス変異配列を含むデュアルレポータープラスミドを形質転換することで、リードスルー活性を測定可能な酵母株の報告がなされているが⁴⁹⁾、これはリードスルー化合物を作用させたのちに酵母の破碎、ライセートの調製、各レポータータンパク質活性の定量、といった多段階の工程を要し、煩雑な作業を伴う点で、効率的ではない。さらに、 β -galactosidase 発現配列である *LacZ* 内にナンセンス変異を導入したプラスミドを導入し、その β -galactosidase 活性を別途測定することで、リードスルー活性を評価する試みも行われているが⁵⁰⁾、こちらも同様の理由で遺伝学的解析研究には適さないと考えられる。

一方、著者らは、酵母生体内のアデニン合成酵素 *ADE2* に着目した (**Figure 22**)。アデニンは、Ribose-5-phosphate より多段階の変換を経て生合成される。出発原料であるリボース 5 リン酸から多段階反応により *p*-Ribosylaminoimidazole (AIR) へと変換された後、AIR から *p*-Ribosylaminoimidazole carboxylate (CAIR) へと変換が行われる。この AIR から CAIR への変換担う酵素が、アデニン合成遺伝子 2 (*ADE2*) である。この *ADE2* タンパク質が欠損すると、液胞内において、AIR の CAIR への変換が行われないことで蓄積した上流の AIR が、酸化的に重合することで赤色色素 (AIR 酸化重合体) へと変換された後、液胞内に蓄積する。これにより、アデニン欠損培地において、酵母が通常の色から赤色へと変換することが知られている⁵¹⁾。そこで今回、この *ADE2* に各種ナンセンス変異を導入し、機能を欠損させたナンセンス変異含有酵母株を構築することとした。本酵母株は、リードスルー化合物の培地への添加により、*ADE2* のナンセンス変異読み飛ばしが生じることで、完全

長 *ADE2* タンパクが合成され酵母が赤色から白色へと変化する。

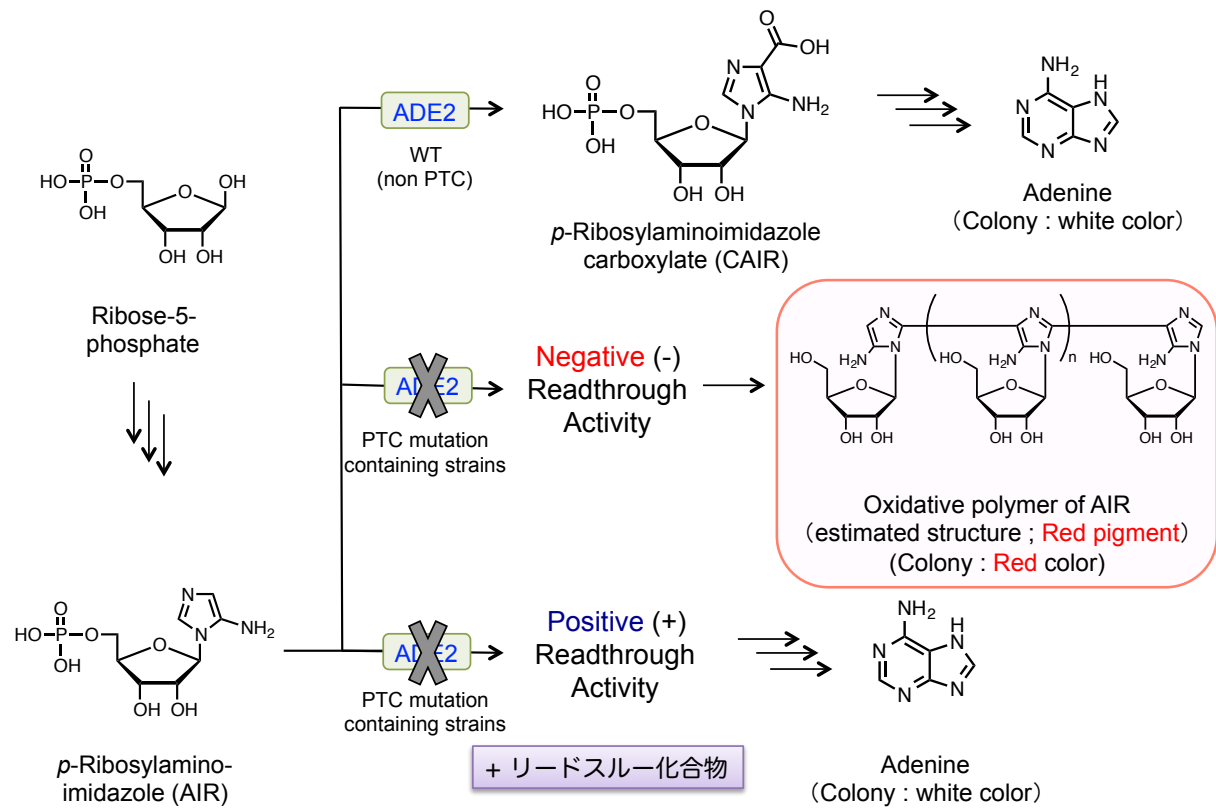


Figure 22. Schematic synthetic pathway of Adenine.

本酵母株を構築するにあたり、*ADE2* ナンセンス変異配列は、YPH499 株を元にクローニングした。この YPH499 株は *ADE2* 内に *E54X* (*TAA*) の変異をすでに有しており、アデニン欠損培地にて赤色のコロニーを生成する。N 末端欠損 *ADE2* 遺伝子をクローニング後、栄養選択マーカである *URA3* 発現ベクター (pRS306) に infusion reaction を用いて組み込むことで環状ベクターを構築した。その後、*Bgl*III にて *ADE2* 内部配列の 1 箇所を切断後、リチウムアセテート法を用いる相同組換えによる形質転換を実施することで、親株である OTA017 へ N 末欠損 *ADE2* 遺伝子を導入した。SC-URA 培地にてセレクション後、目的の遺伝子挿入を PCR にて確認した。その後、5-フルオロオロチン酸 (5-FOA) を用いるカウンターセレクションにより pop-out を行い、本来の *ADE2* 遺伝子を欠損し、ナンセンス変異 (*TAA*) 含有 *ADE2* を有する変異酵母株を構築した (**Figure 23**)。TGA 配列及び TAG 配列を有するナンセンス変異含有酵母株は、PCR にて目的のナンセンス配列を組み込んだ断片

を作成後、同様のベクターを作成することで構築した。今後、それぞれの酵母株を YKH-001 (TAA)、YKH-002 (TGA)、YKH-003 (TAG) と表記する。

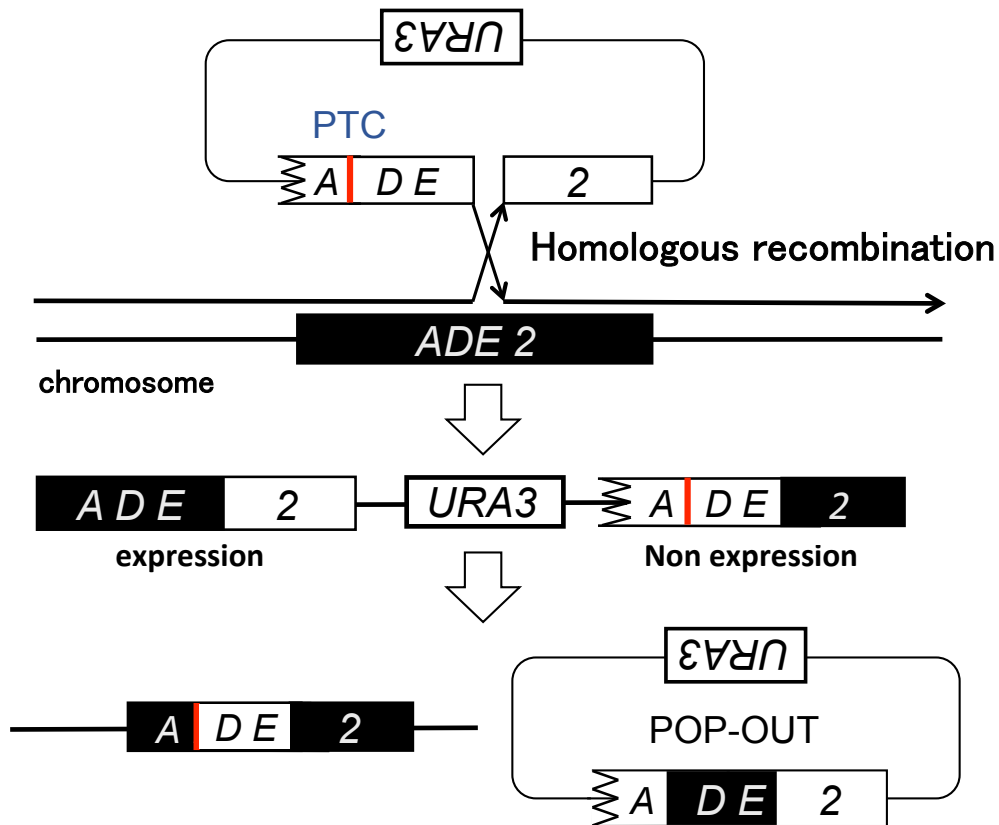


Figure 23. Schematic models of plasmid transformation and pop-out.

構築した変異酵母株は、アデニン欠損培地にて生育せず、アデニン量を制限した栄養選択培地にて赤色にて生育することを確認した。種々検討した結果、富栄養培地 YPD においては 0.0005%、合成完全培地 SC-ADE においては 0.0045% のアデニン硫酸塩・2 水和物を添加することで、生育には影響を与えず、かつ色調の変化（赤白の変化）を目視にて判別可能であることが明らかとなった (**Figure 24**) 。

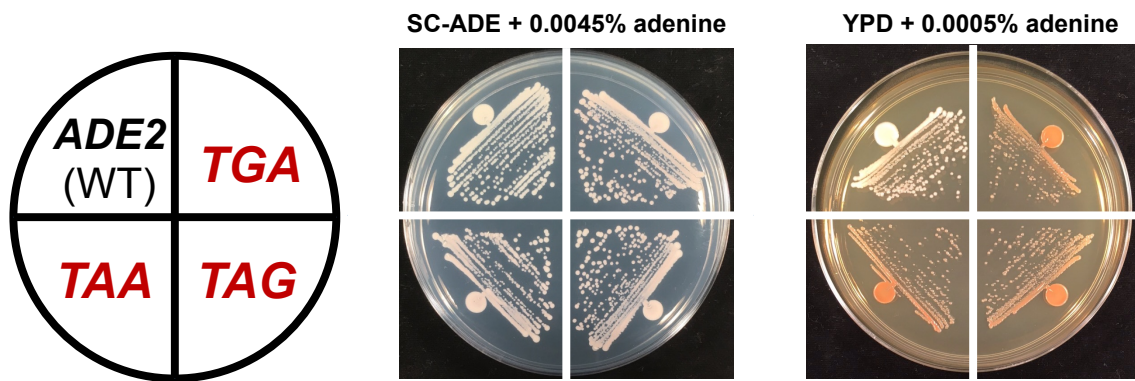


Figure 24. The color of *12geneΔ0HSR ade2-E64X* strains.

第 3 節 YKH-002 株のリードスルー感受性評価

ネガマイシン類縁体である Leucyl-3-*epi*-deoxynegamycin (**10**) 及び高活性誘導体 TCP-112 (**11b**) を含む SC-ADE + 0.0045% adenine プレートを作成し、ナンセンス変異含有酵母株を播種することで本酵母株のリードスルー感受性を評価した。本評価においては、ネガマイシン誘導体に対するリードスルー感受性が高い TGA 配列含有酵母株 YKH-002 株を用いることとした。その結果を **Figure 25** に示す。

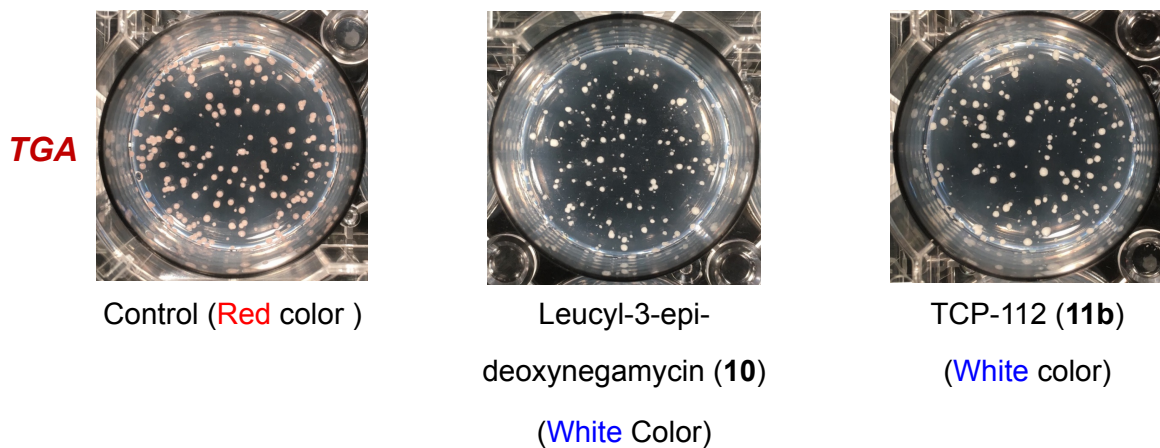


Figure 25. The colour of *12geneΔ0HSR* and *ade2-E64X* strains turned from red to white in the presence of readthrough compounds.

種々検討した結果、500 μM のネガマイシン類縁体を含む SC-ADE + 0.0045% アデニン寒天培地において、本来赤色の YKH-002 は白色のコロニーを生成することが明らかとなった。一方、G418 (2) においても同様に 170 μM にて白色コロニーの生育が確認できた。G418 (2) に関してネガマイシン類縁体と同様の 500 μM を添加すると、その細胞毒性によって、YKH-002 株は生存しないことも確認できた。

第 4 節 ネガマイシン耐性株の単離とゲノムリシーケンス

(1) ネガマイシン耐性株の単離

第 2 節にて構築したリードスルー感受性ナンセンス変異含有酵母株を用い、ネガマイシン誘導体の標的分子を同定することを目的として、ネガマイシン類縁体に対するリードスルー耐性変異株を取得することとした。すなわち、ネガマイシン誘導体 (Leucyl-3-*epi*-deoxynegamycin (10) 及び TCP-112 (11b)) 500 μM を含み、0.0045% のアデニン硫酸塩・2 水和物を含む栄養要求性培地 (SC-ADE) を作成し、 $\text{OD}_{600}=0.05$ (5.0×10^8 個) の YKH-002 細胞を播種した。30 $^{\circ}\text{C}$ にて 4 日インキュベートした後、リードスルーにより白色変化したコロニーの中で赤色のまま変化していないものを単離した。単離したコロニーを、再度ネガマイシン含有寒天培地に植継ぎすることで、リードスルー耐性を有しており赤色のコロニーにて生育することを再度確認後、ネガマイシン誘導体間でのクロスチェックを実施することで、ネガマイシン類全般に対するリードスルー耐性が付与されていることを確認した。この結果、計 30 株のネガマイシンリードスルー耐性変異株を取得することに成功した。これら 30 株を以降の解析に用いることとした。

(2) ネガマイシン耐性株のゲノムリシーケンス解析

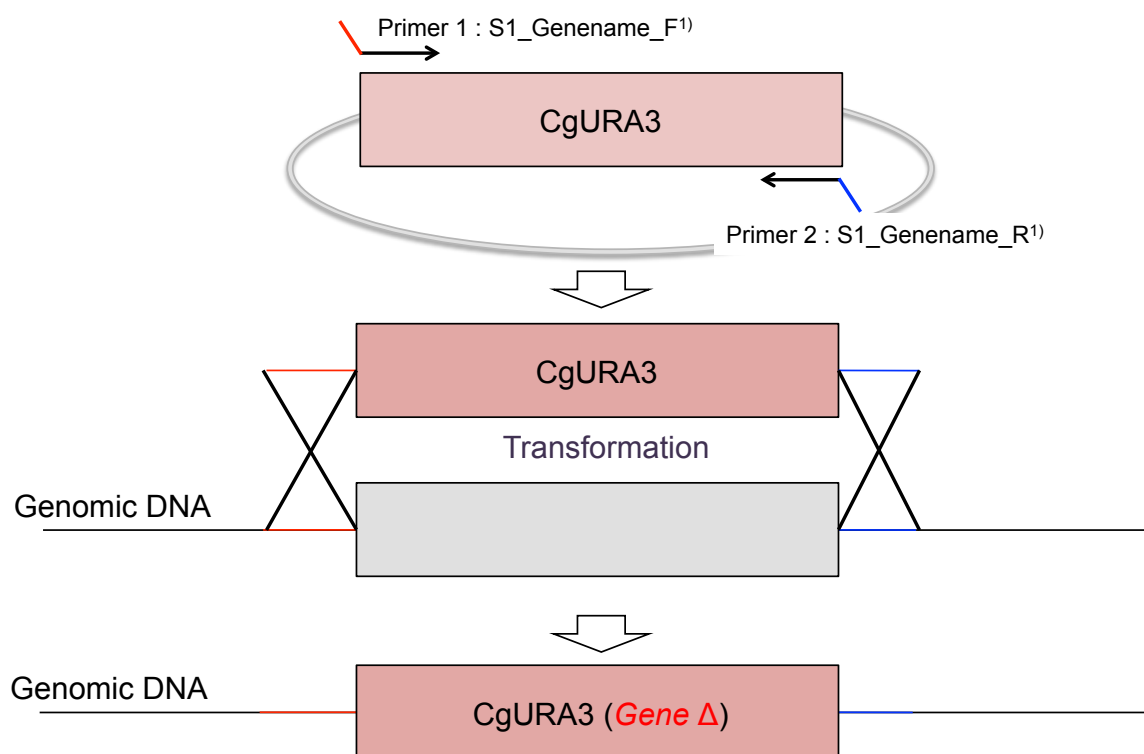
上記にて、ネガマイシン誘導体に対する耐性変異株を取得に成功したことから、これらの変異遺伝子の同定を行うこととした。すなわち、ゲノムリシーケンス解析を行うことで、変異遺伝子の同定を行った。単離したリードスルー耐性株 30 株のゲノム DNA (chromosome) を Takara Gen とるくん[®]を用いて単離精製後、東京農業大学応用生物科学、笠原浩司准教授及び東京農業大学ゲノム解析センターの兼崎友研究員にゲノムリシーケンス解析を依頼した。

ゲノムリシーケンスによる、ネガマイシン耐性株の変異部位解析の結果、27 個の遺伝子のタンパク質コード領域に 1 アミノ酸変化を含む種々の遺伝子変異があることが明らかとなった。これらの情報を元にネガマイシン耐性を付与する遺伝子変異の探索を行うこととした。

第5節 ネガマイシン耐性遺伝子の解析

(1) 各種耐性遺伝子破壊株の構築

ゲノムリシーケンスの結果明らかとなった 27 遺伝子の中で、酵母の生育に必須ではないとの報告がある 15 個において破壊断片を作成し、YKH-002 に導入することで遺伝子破壊株を構築した (**Figure 26**)。耐性株取得時と同様の栄養要求性培地 SC-ADE+0.0045%アデニン寒天培地を用い、ネガマイシン誘導体 (500 μ M) に対するリードスルー感受性をスポットアッセイにより評価した。評価結果を、**Figure 27** に記載する。その結果、*UBR1*、*RAD6*、*UBP3*、*PTR2* の計 4 遺伝子の破壊株はネガマイシン添加プレートにおいても赤色を呈することが明らかとなり、ネガマイシン類縁体へのリードスルー耐性が付与されていることが明らかとなった (**Figure 27**)。一方、高いリードスルー活性を有するアミノグリコシド、G418 (2) も合わせて評価したが、2 へのリードスルー耐性は付与されないことが確認できた。このことから、これらの遺伝子がネガマイシン感受性に何らかの影響を与えていることが示唆された。その一方で、この G418 (2) における評価においては、*UBP3* 破壊株 (*ubp3* Δ ::*CgURA3*) で G418 (2) 感受性の向上が確認された。この考察については後述する。



1) C. Janke., et al., *Yeast*, **2004**, 21, 947-962.

Figure 26. Method of gene disruption.

(2) CUP9 の関連性

遺伝子破壊株を用いたスポットアッセイの結果、*UBR1*、*RAD6*、*UBP3*、*PTR2* の計 4 遺伝子の破壊株においてネガマイシンに対するリードスルー耐性が付与されていることが明らかとなった。これらはそれぞれユビキチン E3 リガーゼ、E2 ユビキチンリガーゼ、ユビキチン特異的プロテアーゼ、ジペプチドトランスポーターをそれぞれコードする遺伝子である。ここで著者は、ジペプチドトランスポーター *PTR2* に着目した。

2015 年、D. Mckinney らは大腸菌において、ジペプチドトランスポーター *DppA* を介してネガマイシンが細胞内移行することで抗菌活性を發揮していると報告した⁵²⁾。本報告は抗菌活性の発現にのみ着目しており、リードスルー活性発現との関連性は議論していない。Mckinney らが合成したネガマイシン誘導体は、(+)-negamycin (8) 同様の基本骨格を有することから、著者の合成した高活性ネガマイシン誘導体も類似の経路で細胞内に移行し、リードスルー活性を發揮している可能性が考えられた。

ジペプチドトランスポーター *Ptr2p* の発現は、そのサプレッサーである *Cup9p* の分解、及び N 末端アミノ酸に依存してタンパク質分解を誘導する E3 ユビキチンリガーゼ *Ubr1p* によって正に制御されることが知られている⁵³⁾。さらに *Rad6p* もまた、*Ubr1p* と相互作用することで *Ptr2p* の発現を調節している⁵⁴⁾ (**Figure 27**)。一方、*UBP3* に関しては、*PTR2* との関連性の報告は現時点でなされていない。

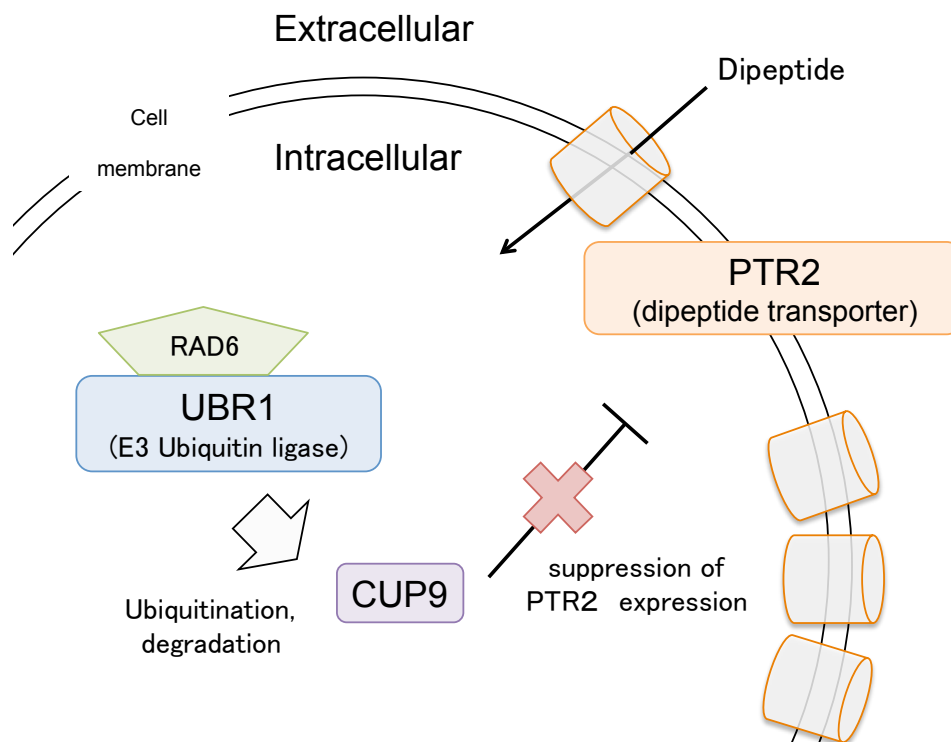


Figure 27. Schematic diagram of relationship of *UBR1*, *RAD6*, *CUP9*, and *PTR2*.

そこで著者は、ネガマイシン誘導体はそのジペプチド様構造を *Ptr2p* によって認識されることで、細胞内に輸送されているのではないかと考えた。すなわち、その上流に位置する *Ubr1p*, *Rad6p* の減少（破壊）により *Cup9p* がユビキチン化されず、下流の *Ptr2p* 発現量を低下させることでネガマイシン誘導体の細胞内移行量が減少するために、ネガマイシン（リードスルー）耐性が引き起こされている、という仮説を立てた。

この仮説を立証することを目的として、上記にて構築した *UBR1*、*UBP3*、*RAD6*、*PTR2* の破壊株 (*ubr1* Δ :: *CgURA3*、*ubp3* Δ :: *CgURA3*、*rad6* Δ :: *CgURA3*、*ptr2* Δ :: *CgURA3*) に加え、*CUP9* の欠失変異体 (*cup9* Δ :: *CgURA3*) を構築し、ネガマイシン誘導体 TCP-112 のスポットアッセイにてその感受性を再評価した。スポットアッセイの結果、*cup9* Δ :: *CgURA3* を除く全ての単一欠失変異体はネガマイシン耐性であったが、*cup9* Δ :: *CgURA3* のみがネガマイシン誘導体に対して非常に高い感受性を示した (**Figure 28**)。これは、ネガマイシンの細胞内移行効率が非常に高いことで、その毒性によって酵母の生育そのものが阻害されたものであると考察した。さらに、*cup9* Δ :: *CgURA3* は、通常 YKH-002 株が白色を示さずに赤色のままである 30 μ M においても、白色（リードスルー感受性）を呈した。この結果からも、*CUP9* 破壊によってネガマイシンの細胞内移行量が増大したことが推察される。

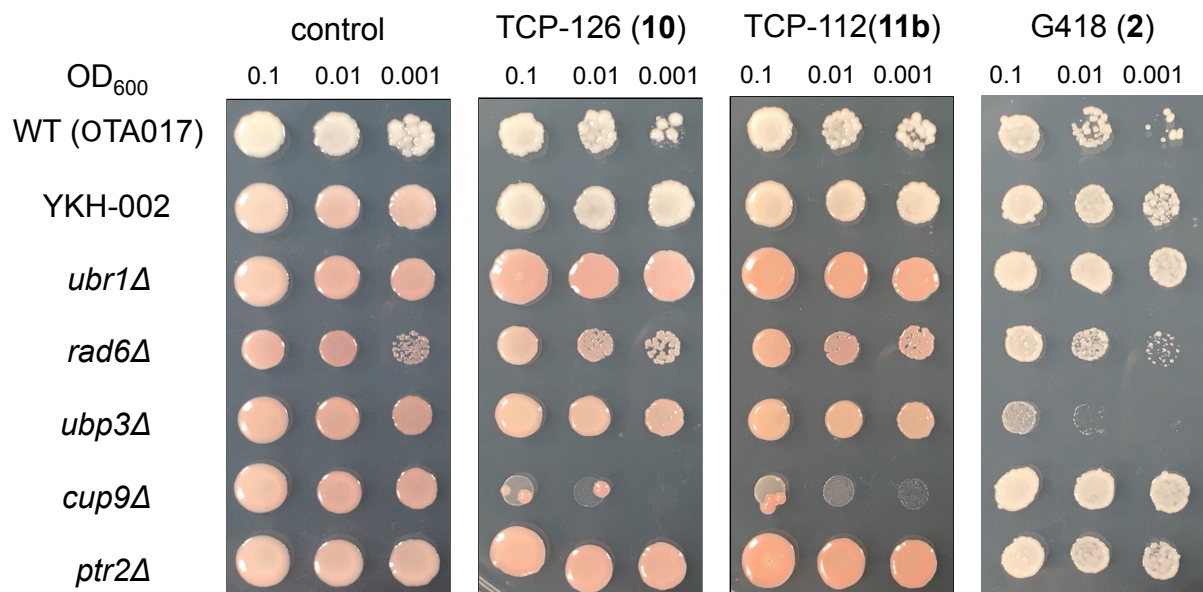


Figure 28. The sensitivity of gene disruptant strains to negamycin analogues and G418.

(3) 二重遺伝子破壊株におけるネガマイシン誘導体の感受性評価

次に著者らは、二重遺伝子破壊株を構築し、さらに詳細な機構解析を実施することとした。すなわち、*Ptr2p* 関連タンパク質間の相互作用を精査することを目的として *CUP9* 遺伝子を破壊すると同時に *UBR1*、*RAD6*、*CUP9* を破壊した変異酵母株を構築し、その感受性評価を行った。*UBP3* に関しては、*PTR2* との関連性の報告はないが、*CUP9* との二重破壊

時においても (*PTR2* の過剰発現が生じても) ネガマイシン耐性が維持されるのか否かを調べることを目的として、同様の 2 重破壊株を構築した。

構築した二重破壊株の感受性評価は、スポットアッセイにて実施した。すなわち、500 μ M のネガマイシン誘導体を含む栄養要求性 SC-ADE + 0.0045% アデニンプレートに OD600 = 0.1、0.01、0.001 に段階希釈した酵母細胞 (YKH-002) を 3 μ L ずつスポット後、30 $^{\circ}$ C にて 4 日インキュベートすることでネガマイシンの感受性を評価した。評価結果を **Figure 29** に示す。

スポットアッセイの結果、ネガマイシン耐性を示した *UBR1*、*RAD6*、*UBP3* Δ ::*His3MX6* 株に *CUP9* 破壊 (*cup9* Δ ::*CgURA3*) を施すと (二重破壊すると)、その全てでネガマイシン感受性の増大が確認された。一方で *PTR2* と *CUP9* の二重破壊株では予想通りにリードスルー耐性がみられた。以上の結果より、ネガマイシンはジペプチドトランスポーターPtr2p を介して細胞内に移行しており、その移行効率は、*UBR1*、*RAD6*、*CUP9* によって制御されていることが示唆された。

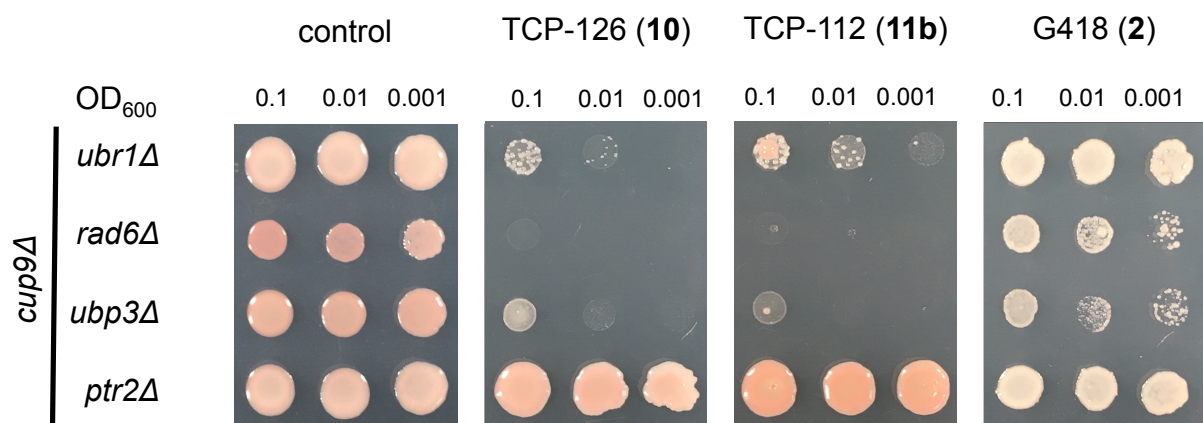


Figure 29. The sensitivity of *CUP9* disruptant strains to negamycin analogues and G418.

(4) ジペプチド競合アッセイ

上述の通り、ネガマイシン誘導体はジペプチドトランスポーターPTR2p を介して細胞内に移行することでリードスルー活性を発揮している可能性が示唆された。そこで、ジペプチド単体をネガマイシン誘導体と同時に共添加し、競合させることにより、その細胞内移行及びリードスルー活性が変動するかを調べることにした。競合させるジペプチドには Trp-Phe 及び Gly-Gly の 2 種を選択した。これらはジペプチドライブラリーを用いた網羅的

解析により、Ptr2p への認識されやすさが最も高い、もしくは低いと報告されているジペプチドである。つまり、Trp-Phe は Gly-Gly と比較してより Ptr2p 認識性が高いことから、細胞内移行性が高く、ネガマイシン誘導体の細胞内移行に関してより強く競合することが予想される。それぞれをネガマイシン誘導体とともに培地に添加することで、ネガマイシンのリードスルー効率に差が生じるかを検討した。すなわち、ネガマイシン誘導体存在下で野生型及び *cup9*Δ 株の感受性評価を行った。結果を **Figure 30** に示す。

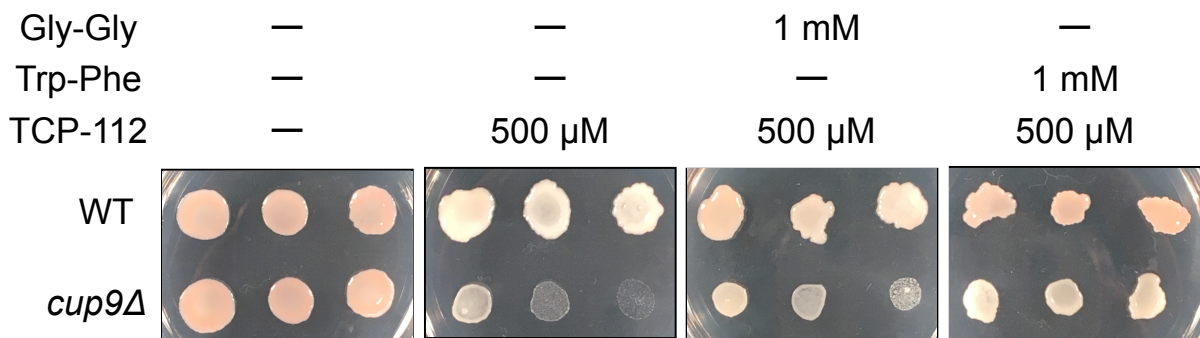


Figure 30. Competition assay with dipeptide and TCP-112 (11b).

ジペプチド競合アッセイの結果、1 mM のジペプチド添加において、Trp-Phe は Gly-Gly と比較して、よりネガマイシンと競合していることが明らかとなった。すなわち、ネガマイシンとこれらジペプチドは細胞内移行手段の1つとして共にジペプチドトランスポーターを利用していることが示唆された。

(5) pH 依存試験の実施

ジペプチドトランスポーターはプロトン勾配を駆動力としてジペプチドを輸送するプロトン駆動シンポーターであることが知られている。つまり培地中の pH 組成によってジペプチド及びジペプチド類似物質の細胞内移行性が変化すると考えられる。そこで pH 5.5 の寒天培地に加え、0.2 M HEPES バッファーにて pH 7.0 および pH 8.0 の寒天培地を調製し、野生型株および *cup9*Δ 株を播種することで、ネガマイシン感受性の違いを調べた (**Figure 31**)。その結果、*cup9*Δ 株における致死率が pH 依存性であることが明らかとなり、プロトン濃度に依存して、ネガマイシンの細胞内導入が変化することも示された。

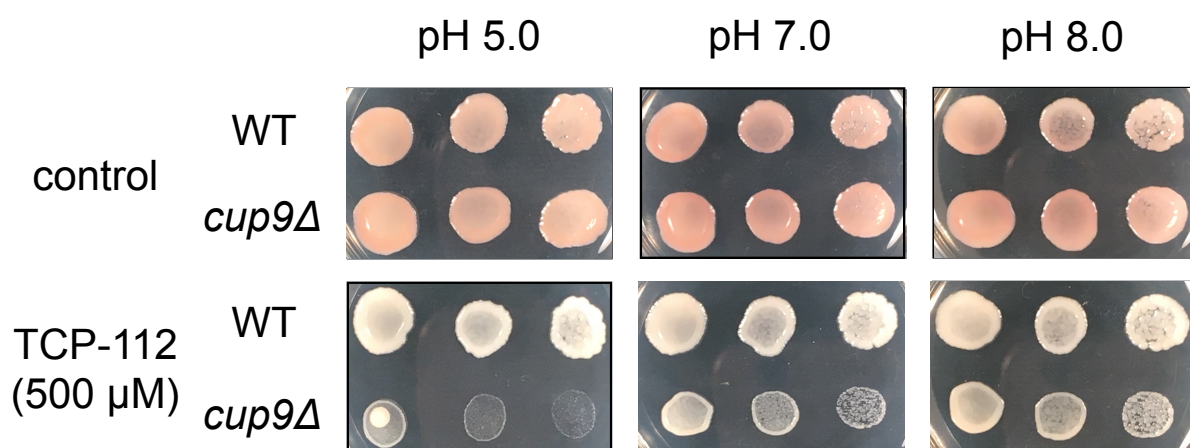


Figure 31. pH dependent activity of TCP-112 (**11b**) to *cup9 Δ* strain.

以上の結果から、ネガマイシン誘導体はジペプチドトランスポーターPtr2p を介して酵母の細胞内に移行し、リードスルー活性を発揮することが示唆された。

第6節 小括

高活性ネガマイシン誘導体の詳細な作用機構・結合部位を調べることを目的として、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を用いる遺伝学的解析研究を実施した。まず、アデニン合成経路中のアデニン合成遺伝子 *ADE2* に着目し変異酵母株を構築することで、各種ナンセンス変異を含む酵母株 YKH-001、002、003 を構築した。続くネガマイシン誘導体に対するリードスルー耐性変異株の取得、および総ゲノム解析によって、耐性付与に関与すると考えられる 27 種の遺伝子変異情報を獲得した。それら遺伝子の破壊株を構築後、リードスルー感受性評価を実施したところ、ジペプチドトランスポーターに関連する 4 遺伝子 (*UBR1*、*RAD6*、*UBP3*、*PTR2*) の同定に至った。これらの遺伝子のうち、*UBR1*、*RAD6*、*PTR2* の 3 遺伝子は N-end rule 則と呼ばれる一連のシグナル経路に関連しており、Ptr2p の発現に影響を与えることが知られていた。そこでその経路に関連する *PTR2* の抑制因子 *CUP9* とともに、ネガマイシン類縁体感受性に関する詳細な解析を実施した。

UBR1、*RAD6*、*UBP3* 破壊株の *CUP9* を破壊した二重破壊株では、その全てでネガマイシン感受性の増大が確認できた。一方で、*PTR2* と *CUP9* の二重破壊株ではリードスルー耐性が確認され、ネガマイシンはジペプチドトランスポーターPtr2p を介して細胞内に移行しており、その移行効率は、*UBR1*、*RAD6*、*CUP9* によって制御されていることが示唆された。さらに、ネガマイシンの細胞内移行は、ジペプチド Trp-Phe と競合することが競合アッセイの結果より明らかとなり、改めてジペプチドトランスポーターを介して細胞内移行していることが示唆された。また、ジペプチドトランスポーターがプロトン勾配を駆動力としてジペプチドを輸送するプロトン駆動シンポーターであることに着目し、培地の pH を種々変更したところ、そのプロトン濃度に依存して、ネガマイシンの細胞内導入が変化することも明らかとなった。

以上より、ネガマイシン類縁体はその細胞内移行方法の一つとしてジペプチドトランスポーターを利用していることが示唆された。

さて、ゲノムシーケンス及び、一遺伝子破壊株による評価において、*ubp3* Δ 株はネガマイシン誘導体に対するリードスルー耐性を有していた。一方で、*CUP9* と *UBP3* の二重破壊株においては、他の遺伝子破壊株と同様に *PTR2* の過剰発現に基づく細胞内移行性の向上により高い感受性を示し、ネガマイシン耐性の有無を確認することはできなかった。この *UBP3* とリードスルー活性との関係性は、ネガマイシン誘導体の濃度を低減した化合物含有培地を作成し、リードスルー感受性評価を実施することで（毒性による酵母増殖阻害活性がみられず、リードスルー活性のみを確認できる濃度域を探索することで）、精査することが可能であると考えられる。

UBP3 はオートファジーとの関連性について多数の報告がある。オートファジーは生体内の恒常性の維持に関与する、タンパク質の分解機構の一つである。その中の一つとして、リボソームのオートファジー（リボファジー）があり、近年、*UBP3* はこのリボファジーに関与することが見出された。アミノグリコシド系抗生物質をはじめとするリードスルー化

化合物の多くは、リボソームを標的としていることから、この知見は大変興味深いものである。さらに、2015年に S.P.Kelly らは、この *UBP3* 破壊株において、化合物未添加時 (Basal) のリードスルー頻度が約 2 倍となると報告したが、その原因については詳細が述べられていない。*UBP3* 破壊株における G418 感受性増加の関連性は依然として不明であるが、この報告からも *UBP3* は少なからずリードスルー活性発現に関連していると推測され、*UBP3* 破壊株においてネガマイシン耐性が付与された事にも大いに関与していると考えられる。今後より詳細な検討が実施され、リードスルー活性発現機構の解明に繋がることを期待する。

総 括

本研究では、ネガマイシン天然類縁体 (3-*epi*-Deoxynegamycin (9)、Leucy-3-*epi*-deoxynegamycin (10)) の主鎖炭素鎖長、3 位アミノ基部、並びに末端カルボン酸部位に着目した構造活性相関研究を展開した。その結果、TCP-182 (22e)、TCP-199 (32b) の獲得に至り、32b においては既存の高活性リードスルー化合物 G418 (2) を凌駕する、強力なリードスルー活性を有することが明らかとなった。さらに 32b は、*in vivo* 投与においても顕著な急性毒性は示さず、ナンセンス変異性疾患の治療に有用な医薬候補化合物となる可能性が示唆された。一方、出芽酵母中のアデニン合成遺伝子 *ADE2* へ各種 PTC 変異を導入した多剤超感受性酵母株の構築にも成功した。本酵母株を用いる遺伝学的解析研究によって、ネガマイシン類縁体はその細胞内移行方法の一つとしてジペプチドトランスポーターPtr2p を利用していることが示され、本酵母株のリードスルー活性発現メカニズムの解析への有用性が示唆された。

近年、リードスルー薬に関する研究が加速している。それは、DMD 以外の遺伝性疾患でも遺伝子解析が進み、ナンセンス変異を有する患者が多数同定されてきていることに起因すると思われる。「がん」も遺伝子異常がその発症原因のひとつであるとされている。実際、アポトーシス誘導に関わるがん抑制遺伝子 p53 の変異が、がん患者の 50%以上に見られ、その内 8%がナンセンス変異であるとの報告がある⁵⁵⁾。我が国における 2010 年のがん罹患患者数 (約 80 万人)⁵⁶⁾ を考慮すれば、p53 のナンセンス変異のみでも国内で約 3.2 万人の潜在的治療対象患者が毎年生じていることになる。リードスルー化合物は、これらに適用できる薬剤として奏効する可能性を秘めており、大変興味深い。

遺伝性疾患の化学療法剤開発では、種々の難病を含む各遺伝性疾患の患者数がとても少ないために、疾患毎に治療薬を開発することは経済的観点からハードルが高い。すなわち疾患横断的に適用できる薬剤開発が理想的である。こういった観点からも、多くの難病を含む Unmet Medical Needs の高いナンセンス変異性遺伝性疾患を克服する、新規化学療法の創出へと繋がる本研究の成果は、大変意義深いものであると考えている。

2018 年 1 月 9 日

濱田 圭佑

実験の部

本実験に際して使用した分析機器等は以下の通りである。

¹H 核磁気共鳴スペクトル (¹H NMR)

Varian Mercury-300 NMR Spectrometer (300 MHz)

Bruker DPX-400 NMR Spectrometer (400 MHz)

重溶媒中の TMS (0.00 ppm) を内部標準として測定した。

¹³C NMR 核磁気共鳴スペクトル (¹³C NMR)

Bruker DPX-400 NMR Spectrometer (400 MHz)

重クロロホルム中のクロロホルム (77.05 ppm) および TMS (0.00 ppm) を内部標準として測定した。

NMR スペクトルの記載は次の略号に従うものとする。

s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quartet, quint = quintet, m = multiplet, br s = broad singlet, br d = broad doublet.

Mass スペクトル

Micromass LCT (HRMS)

逆相液体クロマトグラフィー

YMC-Pack ODS-AM 250 x 20 mm Column

溶出液には TFA をイオンペア試薬として 0.1 % 含むアセトニトリル、H₂O を使用した。

分析用逆相液体クロマトグラフィー

COSMOSIL Packed column Protein R 4.6 ID x 150 mm

溶出液には、TFA をイオンペア試薬として 0.1% 含む H₂O、無添加のアセトニトリルを使用した。

比旋光度測定

日本分光 自動旋光度計 P-1030

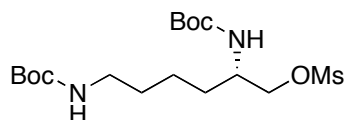
カラムクロマトグラフィーによる分離精製には関東化学株式会社から購入した Silica gel 60N (spherical, neutral) (40-50 mm) 及び (63-210 mm) を用いた。

薄層クロマトグラフィー (TLC) による分析には、MERCK Silica gel 60F₂₅₄ を用いた。

使用試薬, 溶媒

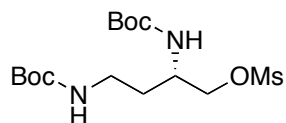
無水ジクロロメタン (安定剤無添加) および無水 THF (安定剤無添加) は関東化学株式会

社、国産化学株式会社より購入したものをを使用した。HPLC 精製に使用したアセトニトリルは国産化学株式会社、和光純薬株式会社より購入した。その他の試薬および溶媒については、特に記載のない限り市販のものをそのまま用いた。

(S)-2,6-bis(*tert*-Butoxycarbonylamino)hexylmethanesulfonate (13a)

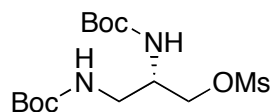
Boc-Lys(Boc)-OH-DCHA **12a** (600 mg 1.14 mmol) に対し、 $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ にて、*N*-メチルモルホリン (140 μL , 1.25 mmol), クロロギ酸イソブチル (165 μL , 1.25 mmol) を添加し、同温度にて 10 分間攪拌した。反応溶液をろ過、THF で洗浄し、得られた母液に氷塩浴中、水素化ホウ素ナトリウム (65 mg, 1.71 mmol) の水 (1 mL) 溶液を添加し、同温度にて 10 分間攪拌した。反応液に氷冷下攪拌した、水を加え、酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄、 Na_2SO_4 で乾燥した。ろ過後、母液を減圧留去することで、無色油状物質を得た。このものは精製すること無く次の反応に用いた。

得られた残渣をジクロロメタン (7.5 mL) に溶解し、氷冷攪拌下、トリエチルアミン (237 μL , 1.71 mmol), 塩化メタンスルホニル (264 μL , 3.42 mmol) を添加し、室温に終夜攪拌した。氷冷攪拌下、反応溶液に水を加え、クロロホルムで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄、 Na_2SO_4 で乾燥した。ろ過後、母液を減圧留去し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (クロロホルム : メタノール = 100 : 1) で精製することで白色固体を得た (270 mg, 0.658 mmol, 2 工程 58%)。; $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -11.2$ (c 2.07, MeOH); m.p. 83.6-85.4 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 4.89-4.73 (br d, 1H), 4.64 (br s, 1H), 4.34-4.22 (m, 1H), 4.18 (dd, $J = 10$ and 4.2 Hz, 1H), 3.81 (br s, 1H), 3.12 (br s, 2H), 3.04 (s, 3H), 1.64-1.34 (m, 24H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 156.1, 155.4, 79.8, 79.1, 71.1, 49.6, 39.9, 37.3, 30.6, 29.7, 28.4 (3 carbons), 28.3 (3 carbons), 22.8; HRMS (ES⁺) calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{34}\text{N}_2\text{O}_7\text{SNa}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 433.1984 found 433.1991.

(S)-2,4-bis(*tert*-Butoxycarbonylamino)butylmethanesulfonate (13b)

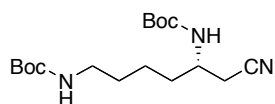
13b は、Boc-Dab(Boc)-OH **12b** (10.0 g, 31.4 mmol) を用い、**13a** と同様の方法により合成した (無色油状物質, 7.97 g, 20.9 mmol, 2 工程 66%)。; $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -38.1$ (c 1.97, CHCl_3); ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 5.07 (br s, 1H), 5.03-4.78 (br d, 1H), 4.30 (dd, $J = 10$ and 3.5 Hz, 1H), 4.23 (dd, $J = 10$ and 4.4 Hz, 1H), 4.01-3.88 (m, 1H), 3.38 (br s, 1H), 3.12-2.94 (m, 4H), 1.87-1.55 (m, 2H), 1.44 (s, 18H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 156.0, 155.7, 80.1, 79.4, 71.4, 47.3, 37.3, 36.9, 31.9, 28.4 (3 carbons), 28.3 (3 carbons); HRMS (ES⁺) calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_7\text{SNa}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 405.1671, found 405.1671.

(S)-2,3-bis(*tert*-Butoxycarbonylamino)propylmethanesulfonate (13c)



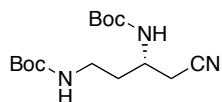
13c は、Boc-Dap(Boc)-OH **12c** (383 mg, 1.26 mmol) を用い、**13a** と同様の方法により合成した (白色粉末, 270 mg, 0.733 mmol, 2 工程 58%); $[\alpha]_D^{25} = -4.74$ (c 0.27, MeOH); m.p. 90.8-92.1 °C; $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 5.46-5.26 (br d, 1H) 4.99 (br s, 1H), 4.34-4.17 (m, 2H), 4.02-3.83 (m, 1H), 3.33 (t, $J = 6.1$ Hz, 2H), 3.06 (s, 3H), 1.44 (s, 18H); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ 156.9, 155.6, 80.1 (2 carbons), 68.5, 50.6, 40.8, 37.4, 28.3 (6 carbons); HRMS (ES+) calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_7\text{SNa}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 391.1515, found 391.1512.

(S)-*tert*-Butyl 6-cyanoheptane-1,5-diylidicarbamate (14a)



13a (198 mg, 0.499 mmol) のアセトニトリル (14 mL) 溶液に、18-クラウン-6-エーテル (860 mg, 3.25 mmol), シアン化カリウム (353 mg, 5.42 mmol) を添加し、100 °C にて 2 時間加熱還流した. 反応溶液を室温に戻した後、氷冷攪拌下、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加え、酢酸エチルで抽出した. 有機層を飽和食塩水で洗浄、 Na_2SO_4 で乾燥した. ろ過後、母液を減圧留去し、得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (ヘキサン : 酢酸エチル = 2 : 1) で精製することで白色固体を得た (475 mg, 1.39 mmol, 51%); $[\alpha]_D^{25} = -43.5$ (c 0.53, CHCl_3); m.p. 79.0-79.8 °C; $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 4.93-4.77 (br d, 1H), 4.60 (br s, 1H), 3.89-3.68 (m, 1H), 3.23-3.03 (m, 2H), 2.72 (dd, $J = 17$ and 5.5 Hz, 1H), 2.56 (dd, $J = 17$ and 3.6 Hz, 1H), 1.83-1.32 (m, 24H); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ 156.2, 155.2, 117.4, 80.1, 79.2, 47.2, 39.8, 32.9, 29.8, 28.4 (3 carbons), 28.3 (3 carbons), 23.8, 22.8; HRMS (ES+) calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}_4\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 364.2212, found 364.2216.

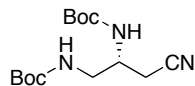
(S)-*tert*-Butyl 4-cyanobutane-1,3-diylidicarbamate (14b)



14bは、**13b** (7.97 g, 20.9 mmol), アセトニトリル (105 mL) を用い、40°C にて終夜攪拌した後、**14a**と同様の方法により精製することで合成した (白色固体, 4.08 g, 13.0 mmol, 62%); $[\alpha]_D^{25} = -64.1$ (c 1.14, CHCl_3); m.p. 84.7-85.6 °C; $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 5.03-4.72 (m, 2H), 4.00-3.83 (m, 1H), 3.48-3.26 (m, 1H), 3.16-2.97 (m, 1H), 2.74 (dd, $J = 17$ and 5.4 Hz, 1H), 2.62 (dd, $J = 17$ and 4.6 Hz, 1H), 1.90-1.67 (m, 2H), 1.45 (s, 9H), 1.44 (s, 9H); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ 156.0,

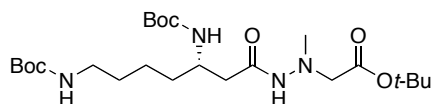
155.3, 117.2, 80.4, 79.6, 45.0, 36.9, 34.3, 28.4 (3 carbons), 28.3 (3 carbons), 23.9; HRMS (ES+) calcd for $C_{15}H_{27}N_3O_4Na$ $[M+Na]^+$ 336.1899, found 336.1896.

(S)-tert-Butyl 3-cyanopropane-1,2-diyl dicarbamate (14c)



14cは、**13c** (205 mg, 0.557 mmol), アセトニトリル (3mL) を用い、40°Cにて3時間攪拌した後、**14a**と同様の方法により精製することで合成した (白色粉末, 100 mg, 0.334 mmol, 60%); $[\alpha]_D^{25} = -31.1$ (c 0.63, $CHCl_3$); m.p. 120.4-120.9 °C; 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 5.63-5.36 (br d, 1H), 4.94 (br s, 1H), 4.00-3.83 (m, 1H), 3.50-3.22 (m, 2H), 2.77-2.51 (m, 2H), 1.44 (s, 18H); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ 157.0, 155.4, 117.1, 80.4, 80.2, 48.8, 43.0, 28.31 (3 carbons), 28.29 (3 carbons), 21.2; HRMS (ES+) calcd for $C_{14}H_{25}N_3O_4Na$ $[M+Na]^+$ 322.1743, found 322.1738.

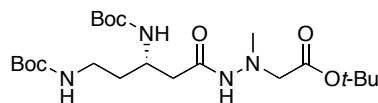
(S)-tert-Butyl 2-{2-[3,7-bis(tert-butoxycarbonylamino)heptanoyl]-1-methylhydrazinyl}acetate (15a)



14a (75.4 mg, 0.221 mmol) の EtOH/H₂O (2 : 1, 2 mL) 溶液に、KOH (124 mg, 2.20 mmol) を室温にて加え、80 °Cにて終夜攪拌した。反応溶液を室温に戻した後、溶媒を減圧留去後、得られた残渣に対し、氷冷下にて1M HCl を添加し、pH 1.0とし、酢酸エチルで抽出した。得られた有機層を飽和食塩水で洗浄、Na₂SO₄で乾燥した。ろ過後、母液を減圧留去し、得られた残渣を精製することなく次の反応に用いた。この DMF (2 mL) 溶液に、PTSA·H₂NN(Me)CH₂CO₂*t*-Bu (147 mg, 0.442 mmol), HOBt·H₂O (67.7 mg, 0.442 mmol) を添加した。氷冷攪拌下、トリエチルアミン (61.3 μ L, 0.442 mmol), EDC·HCl (84.7 mg, 0.442 mmol) を順次添加し、室温で終夜攪拌した。10%クエン酸水溶液に反応溶液を加え、酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、水、飽和食塩水で洗浄、Na₂SO₄で乾燥した。ろ過後、母液を減圧留去し、得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (クロロホルム : メタノール = 100 : 1) で精製することで白色固体 **15a** を得た (42.0 mg, 83.6 μ mol, 2 工程 38%); $[\alpha]_D^{25} = -12.4$ (c 0.56, $CHCl_3$); m.p. 86.5-87.3 °C; 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.90 (s) and 7.44-7.31 (br d, total 1H), 5.49-5.17 (m, 1H), 4.75-4.52 (br s, 1H), 3.98-3.77 (m, 1H), 3.67-3.33 (m, 2H), 3.20-3.03 (m, 2H), 2.88-2.48 (m, 4H), 2.42-2.21 (m, 1H), 1.88-1.20 (m, 33H); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ 170.3, 169.1, 156.1, 155.7, 82.4, 79.2, 79.0, 58.3, 47.7, 43.9, 40.3, 39.4, 34.4, 29.6, 28.4 (6 carbons), 28.2 (3 carbons), 23.3; HRMS (ES+) calcd for $C_{24}H_{46}N_4O_7Na$ $[M+Na]^+$ 525.3264, found 525.3265.

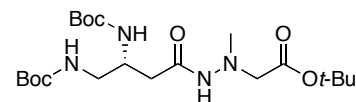
(S)-tert-Butyl 2-{2-[3,5-bis(tert-butoxycarbonylamino)pentanoyl]-1-methylhydrazinyl}

acetate (15b)



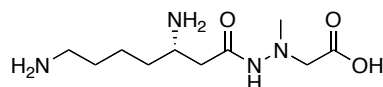
15bは、**14b** (90.2 mg, 0.288 mmol) を用い、**15a**と同様の方法により精製することで合成した (白色粉末, 51.3 mg, 0.108 mmol, 2 工程 62%); $[\alpha]_D^{25} = -40.1$ (c 0.52, CHCl_3); m.p. 108.9-110.8 °C; $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.94 (s) and 7.47-7.35 (br d, total 1H), 5.83-5.49 (m, 1H), 5.49-5.11 (m, 1H), 4.15-3.80 (m, 1H), 3.69-3.46 (m, 2H), 3.46-3.20 (m, 1H), 3.05-2.81 (m, 1H), 2.81-2.48 (m, 4H), 2.48-2.18 (m, 1H), 1.75-1.18 (m, 29H); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ 174.7, 170.2, 169.1, 156.1, 82.4, 79.3, 79.0, 58.2, 45.1, 43.9, 38.9, 37.1, 35.2, 28.44 (3 carbons), 28.36 (3 carbons), 28.2 (3 carbons); HRMS (ES+) calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{42}\text{N}_4\text{O}_7\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 497.2951, found 497.2959.

(S)-tert-Butyl 2-{2-[3,4-bis(tert-butoxycarbonylamino)butanoyl]-1-methylhydrazinyl}acetate (15c)



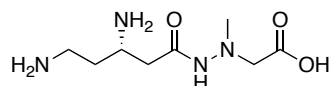
15cは、**14c** (76.9 mg, 0.257 mmol) を用い、**15a**と同様の方法により精製することで合成した (白色粉末, 46.0 mg, 0.100 mmol, 2 工程 39%); $[\alpha]_D^{25} = -5.90$ (c 0.62, CHCl_3); m.p. 84.7-85.9 °C; $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 8.11 (s) and 7.33 (s, total 1H); 5.78-5.36 (m, 1H), 5.08 (br s, 1H), 4.08-3.83 (m, 1H), 3.63-3.49 (m, 2H), 3.45-3.19 (m, 2H), 3.09-2.50 (m, 4H), 2.34 (d, $J = 5.1$ Hz, 1H), 1.57-1.35 (m, 27H); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ 170.1, 168.9, 156.6, 155.8, 82.3, 79.5, 79.3, 58.8, 48.6, 45.1, 43.9, 36.7, 28.4 (6 carbons), 28.2 (3 carbons); HRMS (ES+) calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{40}\text{N}_4\text{O}_7\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 483.2795, found 483.2792.

(S)-2-[2-(3,7-Diaminoheptanoyl)-1-methylhydrazinyl]acetic acid·2TFA (11a)



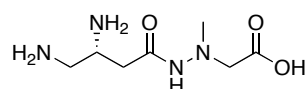
15a (22.0 mg, 43.8 μmol) に氷冷攪拌下, 4M 塩酸/ジオキサン (2 mL) を添加し, 室温で1時間攪拌した. 溶媒を減圧留去後, 得られた残渣を水に溶解し, HPLC (gradient: milli-Q water (TFA 0.1%) : CH_3CN (TFA 0.1%) = 100 : 0 to milli-Q water (TFA 0.1%) : CH_3CN (TFA 0.1%) = 95 : 5 over 40 min, flow rate 5 mL/min, UV: 222 nm) で精製することで白色固体 **11a** を得た (14.4 mg, 30.4 μmol , 69%); m.p. 66.0-67.0 °C; $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, D_2O) δ 3.66-3.54 (m, 3H), 3.01 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H), 2.68 (s, 3H), 2.60 (dd, $J = 16$ and 5.6 Hz, 1H), 2.51 (dd, $J = 16$ and 7.0 Hz, 1H), 1.81-1.63 (m, 4H), 1.57-1.40 (m, 2H); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, D_2O) δ 173.3, 169.4, 58.6, 48.4, 44.1, 39.0, 35.0, 31.3, 26.3, 21.6; HRMS (ES+) calcd for $\text{C}_{10}\text{H}_{23}\text{N}_4\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 247.1770, found 247.1770.

(S)-2-[2-(3,5-Diaminopentanoyl)-1-methylhydrazinyl]acetic acid·2TFA (11b, TCP-112)



11bは、**15b** (29.3 mg, 61.8 μmol) を用い、**11a**と同様の方法により精製することで合成した (無色固体, 14.6 mg, 32.6 μmol , 53%); $[\alpha]_D^{25} = +8.21$ (c 1.22, H_2O); m.p. 127.9-129.0 $^\circ\text{C}$; ^1H NMR (400 MHz, D_2O) δ 3.81-3.72 (m, 1H), 3.71 (s, 2H), 3.18-3.08 (m, 2H), 2.75-2.57 (m, 5H), 2.16-2.00 (m, 2H); ^{13}C NMR (100 MHz, D_2O) δ 172.3, 168.9, 58.3, 46.1, 44.4, 35.7, 34.6, 29.7; HRMS (ES+) calcd for $\text{C}_8\text{H}_{19}\text{N}_4\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 219.1457, found 219.1455.

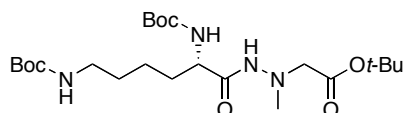
(S)-2-[2-(3,4-Diaminobutanoyl)-1-methylhydrazinyl]acetic acid·2TFA (11c)



11cは、**15c** (25.4 mg, 55.2 μmol) を用い、**11a**と同様の方法により精製することで合成した (無色固体, 12.4 mg, 28.6 μmol , 52%); m.p. 108.1-108.7 $^\circ\text{C}$; ^1H NMR (400 MHz, D_2O) δ 4.00 (q, $J = 6.2$ Hz, 1H), 3.64 (s, 2H), 3.48-3.33 (m, 2H), 2.85-2.62 (m, 5H); ^{13}C NMR (100 MHz, D_2O) δ 173.3, 168.1, 58.5, 46.1, 44.1, 40.6, 33.4; HRMS (ES+) calcd for $\text{C}_7\text{H}_{17}\text{N}_4\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 205.1301, found 205.1303.

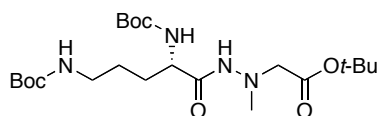
3. Synthesis of derivatives 12a-d

(S)-tert-Butyl 2-[1-methyl-2-(2,2,14,14-tetramethyl-4,12-dioxo-3,13-dioxa-5,11-diazapentadecanonyl)hydrazinyl]acetate (18a)



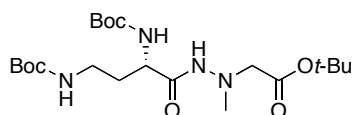
Boc-Lys(Boc)-OH·DCHA **12a** (50.0 mg, 94.7 μmol) の DMF 溶液 (2mL) に対し、PTSA· $\text{H}_2\text{NN}(\text{Me})\text{CH}_2\text{CO}_2t\text{-Bu}$ (62.8 mg, 0.189 mmol), HOBt· H_2O (29.0 mg, 0.189 mmol) を添加した。氷冷攪拌下、トリエチルアミン (26.2 μL , 0.189 mmol), EDC·HCl (36.2 mg, 0.189 mmol) を順次添加し、室温で終夜攪拌した。10%クエン酸水溶液に反応溶液を加え、酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、水、飽和食塩水で洗浄、 Na_2SO_4 で乾燥した。ろ過後、母液を減圧留去し、得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (クロロホルム : メタノール = 100 : 1) で精製することで無色油状物質**18a**を得た (45.1 mg, 92.3 μmol , 98%); $[\alpha]_D^{25} = -3.08$ (c 0.50, CHCl_3); ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8.16 (s) and 7.54 (br d, $J = 24$ Hz, total 1H), 5.32-5.06 (m, 1H), 4.90-4.52 (m, 1H), 4.08-3.86 (m, 1H), 3.78-3.33 (m, 2H), 3.26-3.03 (m, 2H), 2.75 (s, 3H), 1.90-1.20 (m, 33H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 170.1, 169.3, 156.1, 155.6, 82.4, 80.0, 79.5, 58.4, 53.3, 43.9, 40.1, 32.3, 29.7, 28.46 (3 carbons), 28.41 (3 carbons), 28.1 (3 carbons), 22.5; HRMS (ES+) calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{45}\text{N}_4\text{O}_7$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 489.3288, found 489.3278.

(S)-tert-Butyl 2-[1-methyl-2-(2,2,13,13-tetramethyl-4,11-dioxo-3,12-dioxa-5,10-diazatetradecanecarbonyl)hydrazinyl]acetate (18b)



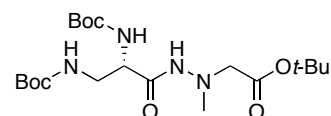
18bは、Boc-Orn(Boc)-OH **17a** (100 mg, 0.303 mmol) を用い、**18a**と同様の方法により精製することで合成した (無色油状物質, (131 mg, 0.277 mmol, 91%); ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8.28 (s) and 7.63 (d, $J = 25$ Hz, total 1H), 5.38-5.18 (m, 1H), 4.79 (br s, 1H), 4.13-3.95 (m, 1H), 3.77-3.38 (m, 2H), 3.29-3.10 (m, 2H), 2.75 (s, 3H), 1.89-1.34 (m, 31H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 170.0, 169.1, 156.0, 155.4, 82.2, 79.5, 79.0, 58.4, 52.8, 43.8, 39.8, 29.9, 28.3 (3 carbons), 28.2 (3 carbons), 28.1 (3 carbons), 26.1; HRMS (ES+) calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{43}\text{N}_4\text{O}_7$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 475.3132, found 475.3127.

(S)-tert-Butyl 2-[1-methyl-2-(2,2,12,12-tetramethyl-4,10-dioxo-3,11-dioxa-5,9-diazatridecanecarbonyl)hydrazinyl]acetate (18c)



18cは、**12c** (60.6 mg, 0.190 mmol) を用い、**18a**と同様の方法により精製することで合成した (無色油状物質, (59.4 mg, 0.129 mmol, 68%); $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -20.4$ (c 0.63, CHCl_3); ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8.30 (s) and 7.69-7.48 (m, total 1H), 5.46-5.26 (m, 1H), 5.13 (br s) and 4.90-4.72 (m, total 1H), 4.15-4.00 (m, 1H) and 3.78-3.50 (m, 2H), 3.48-3.29 (m, 1H), 3.11-2.92 (m, 1H), 2.76 (s, 3H), 2.06-1.68 (m, 2H), 1.68-1.19 (m, 27H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 169.9, 169.8, 156.1, 155.7, 82.4, 80.1, 79.7, 58.4, 50.8, 43.4, 36.8, 34.0, 28.4 (3 carbons), 28.3 (3 carbons), 28.2 (3 carbons); HRMS (ES+) calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{41}\text{N}_4\text{O}_7$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 461.2975, found 461.2978.

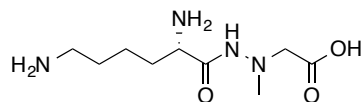
(S)-tert-Butyl 2-[1-methyl-2-(2,2,11,11-tetramethyl-4,9-dioxo-3,10-dioxa-5,8-diazadecanecarbonyl)hydrazinyl]acetate (18d)



18dは、**12d** (172 mg, 0.565 mmol) を用い、**18a**と同様の方法により精製することで合成した (白色固体, 158 mg, 0.353 mmol, 62%); $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -12.4$ (c 0.38, CHCl_3); m.p. 64.6-65.9 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8.55 (s) and 7.73-7.30 (m, total 1H), 5.82 (br s, 1H), 5.19 (br s, 1H), 4.16 (br s, 1H), 3.56 (d, $J = 5.2$ Hz, 2H), 3.55-3.39 (m, 2H), 2.75 (s, 3H), 1.49 (s, 9H), 1.46-1.33 (m, 18H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 169.8, 168.4, 157.0, 155.8, 82.3, 80.1, 79.8, 58.4, 54.7, 43.9, 42.3, 28.28

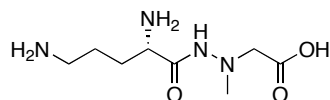
(3 carbons), 28.25 (3 carbons), 28.1 (3 carbons); HRMS (ES+) calcd for C₂₀H₃₉N₄O₇ [M+H]⁺ 447.2819, found 447.2827.

(S)-2-[2-(2,6-Diaminohexanoyl)-1-methylhydrazinyl]acetic acid·2TFA (16a)



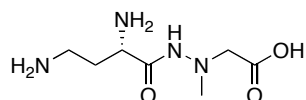
18a (26.7 mg, 54.6 μmol) に氷冷攪拌下, 4M 塩酸/ジオキサン (2 mL) を添加し, 室温で1時間攪拌した. 溶媒を減圧留去後, 得られた残渣を水に溶解し, HPLC(gradient: milli-Q water (TFA 0.1%) : CH₃CN (TFA 0.1%) = 100 : 0 to milli-Q water (TFA 0.1%) : CH₃CN (TFA 0.1%) = 95 : 5 over 40 min, flow rate 5 mL/min, UV: 222 nm) で精製することで白色固体**16a**を得た (17.4 mg, 37.8 μmol, 69%); m.p. 71.1-72.5 °C; ¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ 3.87 (t, *J* = 6.7 Hz, 1H), 3.65 (q, *J* = 17 Hz, 2H), 3.00 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H), 2.70 (s, 3H), 2.00-1.82 (m, 2H), 1.76-1.65 (m, 2H), 1.41 (q, *J* = 7.7 Hz, 2H); ¹³C NMR (100 MHz, D₂O) δ 173.2, 167.4, 58.6, 51.8, 44.2, 38.9, 30.2, 26.3, 21.2; HRMS (ES+) calcd for C₉H₂₁N₄O₃ [M+H]⁺ 233.1614, found 233.1613.

(S)-2-[2-(2,4-Diaminopentanoyl)-1-methylhydrazinyl]acetic acid·2TFA (16b)



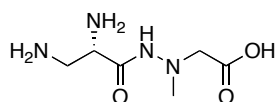
16bは、**18b** (86.8 mg, 0.183 mmol) を用い, **16a**と同様の方法により精製することで合成した (黄色固体, 36.4 mg, 81.7 μmol, 45%); m.p. 51.6-52.5 °C; ¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ 3.92 (t, *J* = 6.7 Hz, 1H), 3.78-3.62 (m, 2H), 3.02 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 2.70 (s, 3H), 2.03-1.86 (m, 2H), 1.78-1.63 (m, 2H); ¹³C NMR (100 MHz, D₂O) δ 172.5, 167.0, 58.2, 51.5, 44.4, 38.7, 27.7, 22.3; HRMS (ES+) calcd for C₈H₁₉N₄O₃ [M+H]⁺ 219.1457, found 219.1456.

(S)-2-[2-(2,4-Diaminobutanoyl)-1-methylhydrazinyl]acetic acid·2TFA (16c)



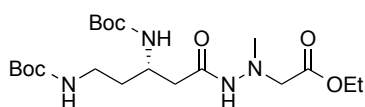
16cは、**18c** (29.9 mg, 64.9 μmol) を用い, **16a**と同様の方法により精製することで合成した (黄色固体, 12.7 mg, 29.3 μmol, 45%); m.p. 71.7-72.4 °C; ¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ 4.00 (t, *J* = 6.7 Hz, 1H), 3.78-3.61 (m, 2H), 3.17-3.02 (m, 2H), 2.71 (s, 3H), 2.34-2.20 (m, 2H); ¹³C NMR (100 MHz, D₂O) δ 172.8, 166.3, 58.2, 49.7, 44.3, 35.1, 28.3; HRMS (ES+) calcd for C₇H₁₇N₄O₃ [M+H]⁺ 205.1301, found 205.1300.

(S)-2-[2-(2,3-Diaminopropanoyl)-1-methylhydrazinyl]acetic acid·2TFA (16d)



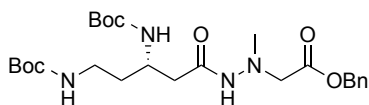
16dは、**18d** (24.4 mg, 53.0 μmol) を用い、**16a**と同様の方法により精製することで合成した (黄色固体, 4.83 mg, 11.6 μmol , 22%); m.p. 113.2-115.1 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (400 MHz, D_2O) δ 4.28 (t, J = 6.0 Hz, 1H), 3.83-3.63 (m, 2H), 3.63-3.43 (m, 2H), 2.73 (s, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, D_2O) δ 175.6, 167.2, 60.8, 52.6, 47.0, 42.3; HRMS (ES+) calcd for $\text{C}_6\text{H}_{15}\text{N}_4\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 191.1144, found 191.1143.

(S)-Ethyl 2-{2-[3,5-bis(tert-butoxycarbonylamino)pentanoyl]-1-methylhydrazinyl} acetate (21a**)**



20 (105mg, 0.335 mmol) の DMF (3 mL) 溶液に、 $\text{H}_2\text{NN}(\text{Me})\text{CH}_2\text{CO}_2\text{Et}$ (1.01 g, 0.670mmol), HOBt $\cdot\text{H}_2\text{O}$ (103 mg, 0.670 mmol) を添加した. 氷冷攪拌下, トリエチルアミン (92.9 μL , 0.670 mmol), EDC $\cdot\text{HCl}$ (128 mg, 0.670 mmol) を順次添加し, 室温で終夜攪拌した. 10%クエン酸水溶液に反応溶液を加え, 酢酸エチルで抽出した. 有機層を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液, 水, 飽和食塩水で洗浄, Na_2SO_4 で乾燥した. ろ過後, 母液を減圧留去し, 得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (クロロホルム : メタノール = 100 : 1) で精製することで無色固体を得た (46.5 mg, 0.104 mmol, 2 工程 31%); $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -44.6$ ($c = 1.01$, CHCl_3); ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.81 (s) and 7.28 (br d, total 1H), 5.77 (m, 1H), 5.44-5.20 (m, 1H), 4.21 (q, $J = 7.2$ Hz, 2H), 4.08-3.88 (m, 1H), 3.75-3.46 (m, 2H), 3.38 (br s, 1H), 2.92 (br s 1H), 2.88-2.49 (m, 2H), 2.48-2.39 (m) and 2.24 (dd, $J = 15$ and 5.8 Hz, total 1H), 1.75-1.55 (m, 2H), 1.44 (s, 18H), 1.32-1.23 (m, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 174.7, 169.7, 156.14, 156.04, 79.4, 79.1, 60.1, 57.7, 45.4, 44.1, 38.9, 37.2, 35.1, 28.5 (3 carbons), 28.4 (3 carbons), 14.2; HRMS (ES+) calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{39}\text{N}_4\text{O}_7$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 447.2819, found 447.2812.

(S)-Benzyl 2-{2-[3,5-bis(tert-butoxycarbonylamino)pentanoyl]-1-methylhydrazinyl} acetate (21b**)**

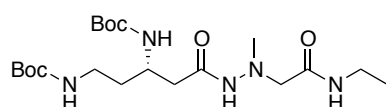


20 (101 mg, 0.322 mmol), $\text{H}_2\text{NN}(\text{Me})\text{CH}_2\text{CO}_2\text{Bn}$ (87.3 mg, 0.450 mmol) を用い、**21a**と同様の方法により合成した (白色固体, 64.9 mg, 0.127 mmol, 2 工程 57%). $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -34.5$ ($c = 2.17$, CHCl_3); ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.77 (s) and 7.42-7.27 (m, total 6H), 5.72-5.54 (m, 1H), 5.42-5.09 (m, 3H), 4.04-3.86 (m, 1H), 3.81-3.49 (m, 2H), 3.37 (br s, 1H), 3.04-2.50 (m, 5H),

2.49-2.35 (m) and 2.29-2.17 (m, total 1H), 1.78-1.57 (m, 2H), 1.43 (s, 18H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 170.5, 169.5, 156.2, 156.0, 135.1, 128.7, 128.6, 128.5 (2 carbons), 77.0, 76.7, 66.7, 57.7, 44.1, 38.9, 37.1, 34.8, 28.5 (3 carbons), 28.4 (3 carbons); HRMS (ES⁺) calcd for $\text{C}_{25}\text{H}_{41}\text{N}_4\text{O}_7$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 509.2975, found 509.2981.

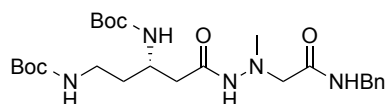
(S)-di-tert-Butyl

{5-[2-(2-ethylamino-2-oxoethyl)-2-methylhydrazinyl]-5-oxopentane-1,3-diy}dicarbamate (21c)



21b (75 mg, 0.148 mmol) のメタノール溶液 (2 mL) に, 10% Pd/C (7.5 mg) を加え, 水素雰囲気下, 15分間攪拌した. 反応溶液をセライトろ過し, 溶媒を減圧留去した. 得られた残渣は精製することなく次の反応に用いた. 残渣溶液のDMF溶液 (2mL) に, Ethylamine·HCl (24.1 mg, 0.296 mmol) and HOBt·H₂O (45.3 mg, 0.296 mmol) を添加した. 氷冷攪拌下, トリエチルアミン (41.0 μL , 0.296 mmol), EDC·HCl (56.7 mg, 0.296 mmol) を順次添加し, 室温で終夜攪拌した. 10%クエン酸水溶液に反応溶液を加え, 酢酸エチルで抽出した. 有機層を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液, 水, 飽和食塩水で洗浄, Na_2SO_4 で乾燥した. ろ過後, 母液を減圧留去し, 得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (クロロホルム : メタノール = 100 : 1) で精製することで白色固体を得た (46.0 mg, 0.103 mmol, 2 工程 70%); $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -16.4$ (c 1.12, CHCl_3); m.p. 123.0-124.0 °C; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.90 (br s, 1H), 5.53 (br s, 1H), 5.22 (br, s, 1H), 4.06-3.82 (m, 1H), 3.55-3.14 (m, 5H), 2.96 (br s, 1H), 2.68 (s, 3H), 2.52-2.27 (m, 2H), 2.04 (s, 1H), 1.70-1.56 (m, 2H), 1.43 (s, 18H), 1.14 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 170.0, 168.9, 156.3, 156.0, 79.6, 79.3, 62.6, 46.7, 45.6, 38.8, 37.1, 35.2, 34.1, 28.5 (3 carbons), 28.4 (3 carbons), 14.5; HRMS (ES⁺) calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{39}\text{N}_5\text{O}_6\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 468.2798 found 468.2799.

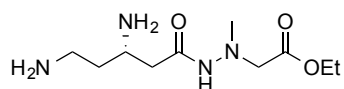
(S)-tert-Butyl 5-[2-[2-(benzylamino)-2-oxoethyl]-2-methylhydrazinyl]-5-oxopentane-1,3-diyldicarbamate (21d)



20 (98.0 mg, 0.313 mmol), $\text{H}_2\text{NN}(\text{Me})\text{CH}_2\text{CONHBn}$ (97.8 mg, 0.506 mmol) を用い, **21a** と同様の方法により合成した (白色固体, 41.3 mg, 81.3 μmol , 2 工程 26%). $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -22.4$ ($c = 0.62$, CHCl_3); ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8.35-8.21 (m, 1H), 7.69 (s, 1H), 7.39-7.20 (m, 5H), 5.38 (br d, 1H), 5.15 (br s, 1H), 4.53-4.38 (m, 2H), 3.89-3.76 (m, 1H), 3.38 (s, 2H), 3.36-3.14 (m, 1H), 3.01-2.94 (m, 1H), 2.64 (s, 3H), 2.31 (dd, $J = 16$ and 5.1 Hz) and 2.21 (dd, $J = 14$ and 6.3 Hz, total 2H), 1.78-1.50 (m, 2H), 1.44 (s, 18H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 169.9, 168.9, 156.3, 156.0,

128.6 (2 carbons), 128.0 (2 carbons), 127.3, 77.2, 77.1, 62.6, 46.6, 45.6, 43.1, 38.6, 37.2, 34.9, 28.5 (3 carbons), 28.4 (3 carbons); HRMS (ES+) calcd for C₂₅H₄₂N₅O₆ [M+H]⁺ 508.3135, found 508.3116.

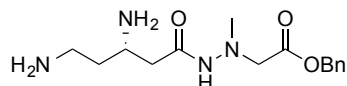
(S)-Ethyl 2-[2-(3,5-diaminopentanoyl)-1-methylhydrazinyl]acetate · 2TFA (19a)



21a (29.1mg, 65.2 μmol) に氷冷攪拌下, 4M 塩酸/ジオキサン (2 mL) を添加し, 室温で1時間攪拌した. 溶媒を減圧留去後, 得られた残渣を水に溶解し, HPLC (gradient: milli-Q water (TFA 0.1%) : CH₃CN (TFA 0.1%) = 95 : 5 to milli-Q water (TFA 0.1%) : CH₃CN (TFA 0.1%) = 85 : 15 over 40 min, flow rate 5 mL/min, UV: 222 nm)で精製することで無色固体を得た (11.03 mg, 23.3 μmol, 36%).

[α]_D²⁵ = +8.44 (c = 0.43, H₂O); m.p. 72.3-73.8 °C; ¹H NMR (300 MHz, D₂O) δ 4.17 (q, 2H), 3.74-3.70 (m, 1H), 3.61 (s, 2H), 3.10 (t, J = 8.17 Hz, 2H), 2.67-2.56 (m, 5H), 2.11-2.01 (m, 2H), 1.23 (t, J = 7.14 Hz, 3H); HRMS (ES+) calcd for C₁₀H₂₃N₄O₃ [M+H]⁺ 247.1770, found 247.1764.

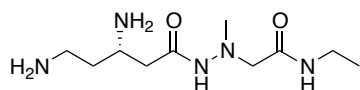
(S)-Benzyl 2-[2-(3,5-diaminohexanoyl)-1-methylhydrazinyl]acetate · 2TFA (19b)



21b (64.9 mg, 0.128 mmol) を用い, **19a** と同様の方法により合成し, HPLC (gradient: milli-Q water (TFA 0.1%) : CH₃CN (TFA 0.1%) = 95 : 5 to milli-Q water (TFA 0.1%) : CH₃CN (TFA 0.1%) = 85 : 15 over 40 min, flow rate 5 mL/min, UV: 222 nm)で精製した (無色固体, 34.6 mg, 64.5 μmol, 50%).

[α]_D²⁵ = +5.80 (c = 1.15, H₂O); m.p. 65.5-66.3 °C; ¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ 7.44-7.39 (m, 5H), 5.20 (s, 2H), 3.68-3.60 (m, 3H), 3.07 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 2.63 (s, 3H), 2.59-2.44 (m, 2H), 2.14-1.98 (m, 2H); ¹³C NMR (100 MHz, D₂O) δ 173.6, 171.8, 138.2, 131.7 (2 carbons), 131.6, 131.3 (2 carbons), 70.1, 61.3, 48.9, 47.2, 38.5, 37.6, 32.7; HRMS (ES+) calcd for C₁₅H₂₅N₄O₃ [M+H]⁺ 309.1927, found 309.1915.

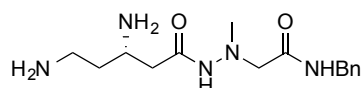
(S)-2-(2-(3,5-Diaminopentanoyl)-1-methylhydrazinyl)-N-ethylacetamide·2TFA (19c)



21c (21.3 mg, 47.8 μmol) を用い, **19a** と同様の方法により合成し, HPLC (gradient: milli-Q water (TFA 0.1%) : CH₃CN (TFA 0.1%) = 95 : 5 to milli-Q water (TFA 0.1%) : CH₃CN (TFA

0.1%) = 85 : 15 over 40 min, flow rate 5 mL/min, UV: 222 nm)で精製した (白色固体, 19.6 mg, 41.4 μmol , 87%); $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +20.4$ (c 0.38, H_2O); m.p. 133.7-134.4 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (400 MHz, D_2O) δ 3.80-3.69 (m, 1H), 3.45 (s, 2H), 3.22 (q, $J = 7.3$ Hz, 2H), 3.17-3.03 (m, 2H), 2.70-2.54 (m, 4H), 2.18-1.98 (m, 2H), 1.10 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, D_2O) δ 174.0, 172.4, 64.3, 49.1, 48.0, 38.6, 37.6, 37.3, 32.8, 16.4; HRMS (ES+) calcd for $\text{C}_{10}\text{H}_{24}\text{N}_5\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 246.1930, found 246.1928.

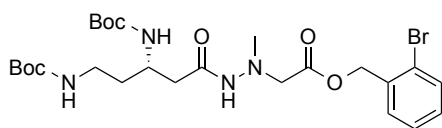
(S)-N-Benzyl-2-[2-(3,5-diaminopentanoyl)-1-methylhydrazinyl]acetamide · 2TFA (19c)



21c (34.7 mg, 68.3 μmol) を用い, **19a** と同様の方法により合成し, HPLC (gradient: milli-Q water (TFA 0.1%) : CH_3CN (TFA 0.1%) = 95 : 5 to milli-Q water (TFA 0.1%) : CH_3CN (TFA 0.1%) = 85 : 15 over 40 min, flow rate 5 mL/min, UV: 222 nm)精製した(白色固体, 14.8 mg, 27.6 μmol , 40%).

$[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +0.90$ ($c = 0.49$, H_2O); m.p. 77.3-78.2 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (400 MHz, D_2O) δ 7.43-7.22 (m, 5H), 4.41 (q, $J = 15$ Hz, 2H), 3.67-3.25 (m, 3H), 3.11-2.98 (m, 2H), 2.62 (s, 3H), 2.67-2.40 (m, 2H), 2.02-1.89 (m, 2H); ^{13}C NMR (100 MHz, H_2O) δ 174.1, 172.4, 140.7, 131.7 (2 carbons), 131.7 (2 carbons), 130.5, 64.0, 48.9, 45.7 (2 carbons), 38.6, 32.9; HRMS (ES+) calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{N}_5\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 308.2085, found 308.2087.

(S)-2-Bromobenzyl 2-{2-[3,5-bis(tert-butoxycarbonylamino)pentanoyl]-1-methylhydrazinyl}acetate (24a)

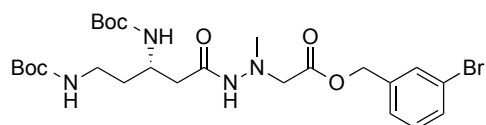


21b (103 mg, 0.203 mmol) のメタノール溶液 (2 mL) に, 10% Pd/C (10.3 mg) を加え, 水素雰囲気下, 15 分攪拌した. 反応溶液をセライトろ過し, 溶媒を減圧留去した. 得られた残渣は精製することなく次の反応に用いた.

残渣の DMF 溶液 (2 mL) に *o*-ブロモベンジルアルコール (45.6 mg, 0.244 mmol), DMAP (2.48 mg, 20.3 μmol) を加え, 氷冷攪拌下, DCC (46.0 mg, 0.223 mmol) を添加し, 室温にて終夜攪拌した. 反応溶液を減圧留去後, クロロホルムで希釈し, ろ過した. 有機層を水, 飽和食塩水で洗浄, Na_2SO_4 で乾燥した. ろ過後, 溶媒を減圧留去し, 得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (クロロホルム : メタノール = 100 : 1) で精製することで白色固体を得た (56.1 mg, 95.5 μmol , 2 工程 47%). $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -30.7$ ($c = 1.11$, CHCl_3); m.p. 122.0-123.4 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.77 (s) and 7.44-7.28 (m, total 3H), 7.60 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H),

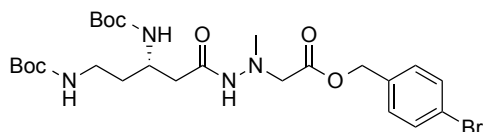
7.25-7.20 (m, 1H), 5.74-5.57 (m, 1H), 5.40-5.20 (m, 3H), 4.06-3.89 (m, 1H), 3.83-3.56 (m, 2H), 3.37 (br s, 1H), 3.00-2.89 (m, 1H), 2.83-2.72 (m) and 2.63-2.50 (m, total 4H), 2.46-2.38 (m) and 2.23 (dd, $J = 15$ and 5.8 Hz, total 1H), 1.74-1.57 (m, 2H), 1.44 (s, 18H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 174.8, 169.3, 156.1, 134.4, 133.0, 130.5, 130.3, 130.2, 127.7, 123.7, 79.3, 79.0, 66.3, 57.7, 45.4, 44.1, 38.9, 37.1, 35.0, 28.5 (3 carbons), 28.4 (3 carbons); HRMS (ES+) calcd for $\text{C}_{25}\text{H}_{40}\text{N}_4\text{O}_7\text{Br}[\text{M}+\text{H}]^+$ 587.2080, found 587.2092.

(S)-3-Bromobenzyl 2-{2-[3,5-bis(tert-butoxycarbonylamino)pentanoyl]-1-methylhydrazinyl}acetate (24b)



21b (108 mg, 0.212 mmol), *m*-ブロモベンジルアルコール (47.5 mg, 0.254 mmol) を用い、**24a** と同様の方法により合成した (白色固体, 84.6 mg, 0.144 mmol, 2 工程 68%). $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -27.7$ ($c = 1.24$, CHCl_3); m.p. 82.5-83.6 °C; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.82 (s) and 7.34 (br d, total 1H), 7.57-7.44 (m, 2H), 7.32-7.20 (m, 3H), 5.73-5.57 (m, 1H), 5.41-5.20 (m, 1H), 5.14 (s, 2H), 4.06-3.88 (m, 1H), 3.82-3.47 (m, 2H), 3.36 (br s, 1H), 3.04-2.88 (m, 1H), 2.87-2.49 (m, 3H), 2.48-2.38 (m) and 2.24 (dd, $J = 15$ and 5.7 Hz, total 1H), 1.86-1.57 (m, 2H), 1.43 (s, 18H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 174.8, 169.3, 156.0, 137.2, 131.7, 131.4, 130.3, 126.9, 122.6, 79.3, 79.0, 65.7, 58.9, 57.8, 45.5, 44.1, 38.9, 37.1, 35.0, 28.4 (3 carbons), 28.3 (3 carbons); HRMS (ES+) calcd for $\text{C}_{25}\text{H}_{40}\text{N}_4\text{O}_7\text{Br} [\text{M}+\text{H}]^+$ 587.2080, found 587.2080.

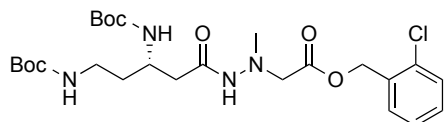
(S)-4-Bromobenzyl 2-{2-[3,5-bis(tert-butoxycarbonylamino)pentanoyl]-1-methylhydrazinyl}acetate (24c)



21b (120 mg, 0.236 mmol), *p*-ブロモベンジルアルコール (53.0 mg, 0.283 mmol) を用い、**24a** と同様の方法により合成した (白色固体, 71.6 mg, 0.122 mmol, 2 工程 52%). $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -31.7$ ($c = 1.10$, CHCl_3); m.p. 121.7-122.4 °C; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.77 (s) and 7.28 (br s, total 1H), 7.51 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 7.25-7.21 (m, 2H), 5.71-5.52 (m, 1H), 5.40-5.18 (m, 1H), 5.12 (s, 2H), 4.07-3.85 (m, 1H), 3.69-3.50 (m, 2H), 3.36 (br s, 1H), 3.00-2.86 (m, 1H), 2.68-2.48 (m, 4H), 2.45-2.38 (m) and 2.23 (dd, $J = 15$ and 5.8 Hz, total 1H), 1.74-1.57 (m, 2H), 1.43 (s, 18H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 174.7, 169.4, 156.1, 134.0, 131.9 (2 carbons), 130.2 (2 carbons), 122.7,

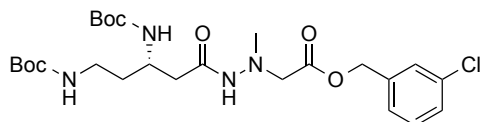
79.3, 79.0, 65.9, 58.9, 57.7, 45.4, 44.1, 38.9, 37.1, 35.0, 28.5 (3 carbons), 28.4 (3 carbons); HRMS (ES+) calcd for C₂₅H₄₀N₄O₇Br [M+H]⁺ 587.2080, found 587.2078.

(S)-2-Chlorobenzyl 2-{2-[3,5-bis(*tert*-butoxycarbonylamino)pentanoyl]-1-methylhydrazinyl}acetate (24d)



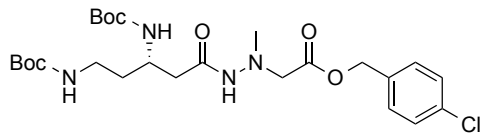
21b (98.0 mg, 0.193 mmol), *o*-クロロベンジルアルコール (32.9 mg, 0.232 mmol) を用い、**24a** と同様の方法により合成した (白色固体, 37.17 mg, 0.069 mmol, 2 工程 35.5%). $[\alpha]_D^{25} = -38.0$ ($c = 1.00$, CHCl₃); m.p. 90.3-91.3 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.88 (s, 1H), 2.28-7.42 (m, total 4H), 5.63 (m, 1H), 7.25-7.20 (m, 1H), 5.28-2.38 (m, 2H), 5.40-5.20 (m, 3H), 3.93 (br s, 1H), 3.68-3.77 (m, 2H), 3.38 (br s, 1H), 2.93 (br s, 2H), 2.78 (m, 3H), 2.39-2.60 and 2.28 (dd, $J = 14.9, 14.9$ Hz, total 2H), 1.59-1.65 (m, 2H), 1.43 (s, 18H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 170.3, 169.4, 156.1, 156.0, 133.8, 132.8, 130.3, 130.1, 130.0, 127.1, 77.3, 76.8, 64.0, 57.7, 45.4, 38.9, 37.2, 34.8, 28.8 (3 carbons), 28.4 (3 carbons); HRMS (ES+) calcd for C₂₅H₄₀N₄O₇NaCl [M+Na]⁺ 565.2405, found 265.2393..

(S)-3-Chlorobenzyl 2-{2-[3,5-bis(*tert*-butoxycarbonylamino)pentanoyl]-1-methylhydrazinyl}acetate (24e)



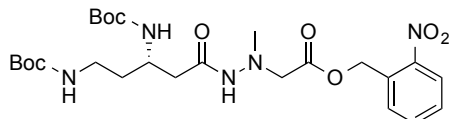
21b (100 mg, 0.197 mmol), *m*-クロロベンジルアルコール (34.4 mg, 0.242 mmol) を用い、**24a** と同様の方法により合成した (白色固体, 24.4 mg, 0.045 mmol, 2 工程 22.8%). $[\alpha]_D^{25} = -19.3$ ($c = 1.00$, CHCl₃); m.p. 95.9-96.3 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.78 (s) and 7.36-7.24 (m, total 4H), 5.57 (m, 1H), 5.12-5.11 (m, 2H), 3.92 (m, 1H), 3.75-3.67 (m, 2H), 3.37, (br s, 1H), 2.93(br s 2H), 2.78 (s, 3H), 2.60-2.40 and 2.2353 (dd, $J = 14.7, 14.7$ Hz, total 2H), 1.67-1.59 (m, 2H), 1.44 (s, 18H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 170.3, 169.4, 156.2 (2 carbons), 137.1, 134.6, 130.0, 128.7, 128.7, 128.5, 126.5, 77.4, 77.1, 65.7, 77.1, 45.5, 44.1, 38.9, 37.1, 34.9, 28.5 (3 carbons), 28.4 (3 carbons); HRMS (ES+) calcd for C₂₅H₄₀N₄O₇NaCl [M+Na]⁺ 565.2405, found 565.2405.

(S)-4-Chlorobenzyl 2-{2-[3,5-bis(*tert*-butoxycarbonylamino)pentanoyl]-1-methylhydrazinyl}acetate (24f)



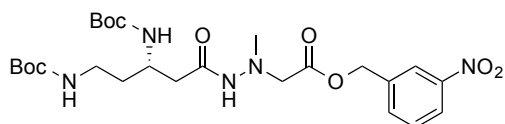
21b (100 mg, 0.197 mmol), *p*-クロロベンジルアルコール (35.5 mg, 0.250 mmol) を用い、**24a** と同様の方法により合成した (白色固体, 42.0 mg, 0.077 mmol, 2 工程 39.3%). $[\alpha]_D^{25} = -30.6$ ($c = 0.85$, CHCl_3); m.p. 102.6-103.9 °C; $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.76 (s, 1H), 7.35 (d, 20.7 Hz) and 7.31 (d, 5.5 Hz, total 4H), 5.65-5.58 (m, 1H), 5.14 (br s, 2H), 3.99-3.91 (m, 1H), 3.73 (br s 2H), 3.37 (br s, 1H), 2.93-2.72 (m, 4H), 2.23 (dd, $J = 31.4$ and 14.4 Hz), 1.66-1.59 (m, 2H), 1.43 (s, 18H); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ 170.4, 169.4, 156.2 (2 carbons), 134.6, 133.6, 129.9 (4 carbons), 77.0, 76.7, 57.7, 45.5, 44.1, 38.9, 37.2, 35.1, 28.5 (3 carbons), 28.4 (3 carbons)nk; HRMS (ES+) calcd for $\text{C}_{25}\text{H}_{40}\text{N}_4\text{O}_7\text{Cl}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, 543.2586 found 543.2590.

(S)-2-Nitrobenzyl 2-{2-[3,5-bis(*tert*-butoxycarbonylamino)pentanoyl]-1-methylhydrazinyl}acetate (24g)



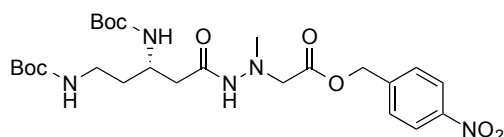
21b (80.6 mg, 0.193 mmol), *o*-ニトロベンジルアルコール (35.2 mg, 0.230 mmol) を用い、**24a** と同様の方法により合成した (白色固体, 28.3 mg, 51.1 μmol , 2 工程 27%). $[\alpha]_D^{25} = -33.0$ ($c = 1.40$, CHCl_3); m.p. 124.2-125.8 °C; $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 8.13 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 7.79-7.63 (m) and 7.26 (br s, total 2H), 7.62-7.50 (m, 2H), 5.77-5.50 (m, 3H), 5.40-5.19 (m, 1H), 4.09-3.88 (m, 1H), 3.87-3.51 (m, 2H), 3.37 (br s, 1H), 3.03-2.48 (m, 5H), 2.42 (dd, $J = 15$ and 4.5 Hz) and 2.35 (dd, $J = 15$ and 6.0 Hz, total 1H), 1.77-1.54 (m, 2H), 1.43 (s, 18H); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ 170.0, 169.1, 147.7, 133.9, 129.6, 129.3, 125.3, 125.2, 63.4, 57.6, 45.5, 44.1, 39.0, 37.1, 34.9; HRMS (ES+) calcd for $\text{C}_{25}\text{H}_{40}\text{N}_5\text{O}_9$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 554.2826, found 554.2826.

(S)-3-Nitrobenzyl 2-{2-[3,5-bis(*tert*-butoxycarbonylamino)pentanoyl]-1-methylhydrazinyl}acetate (24h)



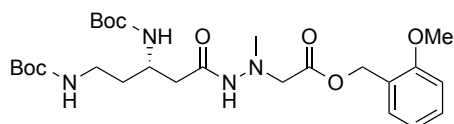
24b (60.3 mg, 0.118 mmol), *m*-ニトロベンジルアルコール (21.7 mg, 0.142 mmol) を用い、**21a** と同様の方法により合成した (白色固体, 41.4 mg, 74.8 μmol, 2 工程 63%). $[\alpha]_D^{25} = -32.0$ ($c = 1.49$, CHCl_3); m.p. 86.9-87.8 °C; $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 8.23 (s, 2H), 7.76 (s) and 7.25 (br s, total 1H), 7.70 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H), 7.59 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H), 5.71-5.52 (m, 1H), 5.40-5.18 (m, 3H), 4.06-3.85 (m, 1H), 3.84-3.57 (m, 2H), 3.36 (br s, 1H), 3.03-2.50 (m, 5H), 2.42 (dd, $J = 15$ and 4.8 Hz) and 2.25 (dd, $J = 15$ and 5.9 Hz, total 1H), 1.78-1.58 (m, 2H), 1.43 (s, 18H); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ 170.2, 169.3, 156.1, 148.4, 137.2, 134.1, 129.8 (2 carbons), 123.5, 123.1, 77.4, 76.7, 65.2, 57.7, 45.5, 44.1, 39.0, 37.1, 34.9, 28.4 (3 carbons), 28.4 (3 carbons); HRMS (ES+) calcd for $\text{C}_{25}\text{H}_{40}\text{N}_5\text{O}_9$ $[\text{M}+\text{H}]^+ 554.2826$, found 554.2817.

(S)-4-Nitrobenzyl 2-{2-[3,5-bis(tert-butoxycarbonylamino)pentanoyl]-1-methylhydrazinyl}acetate (24i**)**



21b (82.5 mg, 0.197 mmol), *p*-ニトロベンジルアルコール (36.3 mg, 0.237 mmol) を用い、**24a** と同様の方法により合成した (白色固体, 45.3 mg, 81.9 μmol, 2 工程 42%). $[\alpha]_D^{25} = -30.5$ ($c = 0.77$, CHCl_3); m.p. 98.7-100.5 °C; $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 8.25 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 7.71 (s) and 7.23 (br d, total 1H), 7.53 (t, $J = 8.5$ Hz, 2H), 5.74-5.48 (m, 1H), 5.40-5.17 (m, 3H), 4.08-3.84 (m, 1H), 3.83-3.75 (m, 2H), 3.36 (br s, 1H), 3.03-2.83 (m, 1H), 2.82-2.49 (m, 4H), 2.42 (dd, $J = 16$ and 5.8 Hz) and 2.24 (dd, $J = 15$ and 5.8 Hz, total 1H), 1.76-1.55 (m, 2H), 1.43 (s, 9H), 1.42 (s, 9H); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ 170.2, 169.3, 156.2, 156.0, 147.9, 142.2, 77.0, 76.6, 65.1, 57.7, 45.4, 44.1, 39.0, 37.1, 34.9, 28.4 (6 carbons), HRMS (ES+) calcd for $\text{C}_{25}\text{H}_{28}\text{N}_5\text{O}_9\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+ 576.2645$, found 576.2633.

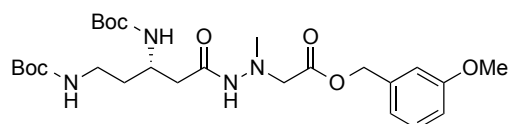
(S)-3-Methoxybenzyl 2-{2-[3,5-bis(tert-butoxycarbonylamino)pentanoyl]-1-methylhydrazinyl}acetate (24j**)**



21b (114 mg, 0.224 mmol), *o*-メトキシベンジルアルコール (37.1 mg, 0.269 mmol) を用い、**24a** と同様の方法により合成した (白色固体, 59.6 mg, 0.111 mmol, 2 工程 49%). $[\alpha]_D^{25} = -38.0$ ($c = 0.75$, CHCl_3); m.p. 77.1-79.0 °C; $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.80 (s) and 7.39-7.25 (m, total 3H), 7.04-6.86 (m, 2H), 5.77-5.56 (m, 1H), 5.39-5.17 (m, 3H), 4.05-3.89 (m, 1H), 3.86 (s, 3H),

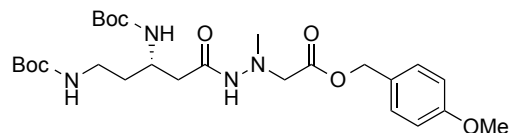
3.78-3.50 (m, 2H), 3.37 (br s, 1H), 3.00-2.83 (m, 1H), 2.81-2.49 (m, 4H), 2.48-2.37 (m) and 2.20 (dd, $J = 15$ and 5.6 Hz, total 1H), 1.78-1.57 (m, 2H), 1.43 (s, 18H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 174.7, 169.6, 157.7, 156.2, 130.4, 130.2, 123.3, 120.5, 110.6, 79.3, 79.0, 62.3, 59.0, 57.8, 55.5, 45.3, 44.0, 38.9, 37.1, 35.2, 28.4 (3 carbons), 28.3 (3 carbons); HRMS (ES+) calcd for $\text{C}_{26}\text{H}_{43}\text{N}_4\text{O}_8$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 539.3081, found 539.3079.

(S)-3-Methoxybenzyl 2-{2-[3,5-bis(tert-butoxycarbonylamino)pentanoyl]-1-methylhydrazinyl}acetate (24k)



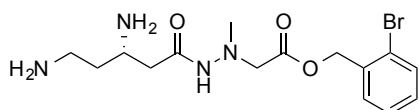
21b (79.7 mg, 0.157 mmol), *m*-メトキシベンジルアルコール (26.0 mg, 0.188 mmol) を用い、**24a** と同様の方法により合成した (白色固体, 41.0 mg, 76.2 μmol , 2 工程 49%). $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -33.8$ ($c = 0.94$, CHCl_3); m.p. 79.3-80.5 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.76 (s) and 7.36-7.25 (m, total 2H), 6.98-6.86 (m, 3H), 5.76-5.56 (m, 1H), 5.40-5.19 (m, 1H), 5.15 (s, 2H), 4.04-3.94 (m, 1H), 3.82 (s, 3H), 3.79-3.49 (m, 2H), 3.37 (br s, 1H), 3.02-2.88 (m, 1H), 2.87-2.48 (m, 4H), 2.47-2.38 (m) and 2.25 (dd, $J = 15$ and 5.7 Hz, total 1H), 1.76-1.56 (m, 2H), 1.43 (s, 18H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 174.7, 169.5, 159.8, 156.2 (2 carbons), 136.5, 129.8, 120.6, 114.1, 114.0, 79.3, 79.0, 66.6, 57.7, 55.3, 45.4, 44.1, 38.9, 37.2, 34.9, 28.5 (3 carbons), 28.4 (3 carbons); HRMS (ES+) calcd for $\text{C}_{26}\text{H}_{43}\text{N}_4\text{O}_8$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 539.3081, found 539.3072.

(S)-4-Methoxybenzyl 2-{2-[3,5-bis(tert-butoxycarbonylamino)pentanoyl]-1-methylhydrazinyl}acetate (24l)



21b (106 mg, 0.209 mmol), *p*-メトキシベンジルアルコール (34.7 mg, 0.251 mmol) を用い、**24a** と同様の方法により合成した (白色固体, 49.9 mg, 92.7 μmol , 2 工程 44%). $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -29.6$ ($c = 0.15$, CHCl_3); m.p. 89.6-90.2 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.81 (s) and 7.38-7.23 (m, total 3H), 6.90 (d, $J = 7.2$ Hz, 2H), 5.74-5.57 (m, 1H), 5.41-5.23 (m, 1H), 5.11 (s, 2H), 4.06-3.85 (m, 1H), 3.81 (s, 3H), 3.78-3.46 (m, 2H), 3.37 (br s, 1H), 3.00-2.86 (m, 1H), 2.85-2.45 (m, 4H), 2.44-2.37 (m) and 2.22 (dd, $J = 15$ and 5.7 Hz, total 1H), 1.76-1.56 (m, 2H), 1.43 (s, 18H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 174.7, 169.6, 159.9, 156.1, 130.4 (2 carbons), 127.1, 114.0 (2 carbons), 79.2, 78.9, 66.6, 57.7, 55.3, 45.4, 44.0, 38.9, 37.1, 34.7, 28.44 (3 carbons), 28.35 (3 carbons); HRMS (ES+) calcd for $\text{C}_{26}\text{H}_{42}\text{N}_4\text{O}_8\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 561.2900, found 561.2889.

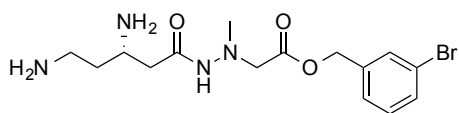
(S)-2-Bromobenzyl 2-(2-(3,5-diaminopentanoyl)-1-methylhydrazinyl)acetate · 2TFA (22a)



2a (52.0 mg, 88.5 μmol) に氷冷攪拌下, 4 M 塩酸/ジオキサン (2 mL) 加え, 室温にて 1 時間攪拌した. 反応溶液を減圧留去後, 得られた残渣を水に溶解し, HPLC (gradient: milli-Q water (TFA 0.1%) : CH_3CN (TFA 0.1%) = 75 : 25 to milli-Q water (TFA 0.1%) : CH_3CN (TFA 0.1%) = 55 : 45 over 40 min, flow rate 5 mL/min, UV: 222 nm) で精製することで白色固体を得た (26.9 mg, 43.9 μmol , 50%).

$[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +4.86$ ($c = 0.10$, H_2O); m.p. 84.7-85.8 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (400 MHz, D_2O) δ 7.73 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.57-7.43 (m, 2H), 7.40-7.37 (m, 1H), 5.33 (s, 2H), 3.82-3.69 (m, 3H), 3.16 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H), 2.71 (s, 3H), 2.70-2.55 (m, 2H), 2.22-2.01 (m, 2H); ^{13}C NMR (100 MHz, D_2O) δ 170.6, 168.8, 134.2, 133.0, 130.9, 130.7, 128.0, 123.3, 66.9, 58.3, 46.1, 44.3, 35.7, 34.6, 29.8; HRMS (ES+) calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{N}_4\text{O}_3\text{Br}[\text{M}+\text{H}]^+$ 387.1032, found 387.1033.

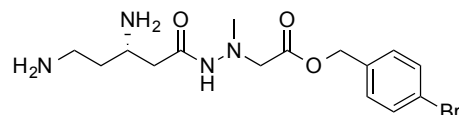
(S)-3-Bromobenzyl 2-(2-(3,5-diaminopentanoyl)-1-methylhydrazinyl)acetate · 2TFA (22b)



22b (44.9 mg, 76.4 μmol) を用い, **22a** と同様の方法により合成し, HPLC (gradient: milli-Q water (TFA 0.1%) : CH_3CN (TFA 0.1%) = 75 : 25 to milli-Q water (TFA 0.1%) : CH_3CN (TFA 0.1%) = 55 : 45 over 40 min, flow rate 5 mL/min, UV: 222 nm) で精製した (白色固体, 10.7 mg, 17.3 μmol , 23%).

$[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +8.08$ ($c = 0.77$, H_2O); m.p. 102.4-103.0 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (400 MHz, D_2O) δ 7.70-7.57 (m, 2H), 7.44-7.32 (m, 3H), 5.20 (s, 2H), 3.79-3.64 (m, 3H), 3.10 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H), 2.67 (s, 3H), 2.62-2.45 (m, 2H), 2.18-1.98 (m, 2H); ^{13}C NMR (100 MHz, D_2O) δ 170.6, 168.8, 137.7, 131.5, 130.9, 130.5, 127.0, 121.9, 66.2, 58.4, 46.0, 44.3, 35.6, 34.5, 29.8; HRMS (ES+) calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{N}_4\text{O}_3\text{Br}[\text{M}+\text{H}]^+$ 387.1032, found 387.1030.

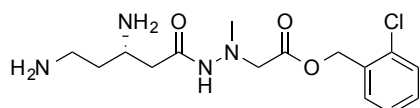
(S)-4-Bromobenzyl 2-(2-(3,5-diaminopentanoyl)-1-methylhydrazinyl)acetate · 2TFA (22c)



22c (37.2 mg, 63.3 μmol) を用い, **22a** と同様の方法により合成し, HPLC (gradient: milli-Q water (TFA 0.1%) : CH_3CN (TFA 0.1%) = 75 : 25 to milli-Q water (TFA 0.1%) : CH_3CN (TFA 0.1%) = 55 : 45 over 40 min, flow rate 5 mL/min, UV: 222 nm) で精製した (白色固体, 18.4 mg, 29.9 μmol , 47%).

$[\alpha]_D^{25} = +6.67$ ($c = 0.50$, H_2O); m.p. 88.5-89.4 °C; 1H NMR (400 MHz, D_2O) δ 7.59 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.33 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 5.16 (s, 2H), 3.74-3.62 (m, 3H), 3.09 (t, $J = 8.3$ Hz, 2H), 2.65 (s, 3H), 2.60-2.45 (m, 2H), 2.20-1.98 (m, 2H); ^{13}C NMR (100 MHz, D_2O) δ 173.5, 171.7, 134.6 (2 carbons), 133.1 (2 carbons), 124.9, 69.3, 61.4, 48.9, 47.2, 38.6, 37.5, 32.7; HRMS (ES+) calcd for $C_{15}H_{24}N_4O_3Br$ $[M+H]^+$ 387.1032, found 387.1024.

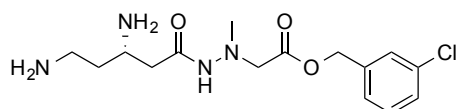
(S)-2-Chlorobenzyl 2-(2-(3,5-diaminopentanoyl)-1-methylhydrazinyl)acetate · 2TFA (22d)



24d (37.2 mg, 68.5 μ mol) を用い、**22a** と同様の方法により合成し、HPLC (gradient: milli-Q water (TFA 0.1%) : CH_3CN (TFA 0.1%) = 75 : 25 to milli-Q water (TFA 0.1%) : CH_3CN (TFA 0.1%) = 55 : 45 over 40 min, flow rate 5 mL/min, UV: 222 nm) で精製した (白色固体, 35.1 mg, 61.6 μ mol, 89.9%).

$[\alpha]_D^{25} = +4.99$ ($c = 1.00$, H_2O); m.p. 78.5-79.5 °C; 1H NMR (400 MHz, D_2O) δ 7.51-7.46 and 7.41-7.34 (m, total 4H), 5.30 (s, 2H), 3.69 (s) and 3.68-3.65 (m, total 3H), 3.09 (t, $J = 22.3$, 18.9 Hz, 2H), 1.64 (s, 3H), 2.60-2.48 (m, 2H), 2.11-1.99 (m, 2H); ^{13}C NMR (100 MHz, D_2O) δ 170.5, 168.8, 133.5, 132.5, 130.8, 130.4, 129.7, 127.3, 64.7, 58.3, 46.0, 44.2, 35.6, 34.5, 29.7 HRMS (ES+) calcd for $C_{15}H_{24}N_4O_3$ $[M+H]^+$ 387.1032, found 387.1024.

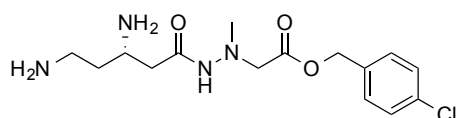
(S)-3-Chlorobenzyl 2-(2-(3,5-diaminopentanoyl)-1-methylhydrazinyl)acetate · 2TFA(22e)



24e (24.39 mg, 45.0 μ mol) を用い、**22a** と同様の方法により合成し、HPLC (gradient: milli-Q water (TFA 0.1%) : CH_3CN (TFA 0.1%) = 75 : 25 to milli-Q water (TFA 0.1%) : CH_3CN (TFA 0.1%) = 55 : 45 over 40 min, flow rate 5 mL/min, UV: 222 nm) で精製した (白色固体, 14.0 mg, 24.5 μ mol, 54%).

$[\alpha]_D^{25} = +5.27$ ($c = 1.00$, H_2O); m.p. 69.9-70.8 °C; 1H NMR (400 MHz, D_2O) δ 7.45-7.33 (m, 4H), 5.18 (s, 2H), 3.69 (s) and 3.66 (br s total 3H), 3.08 (t, $J = 21.5$, 19.1 Hz, 2H), 2.65 (s, 3H), 2.53 (t, $J = 12.8$, 17.7 Hz, 2H), 2.07-2.01 (m, 2H); ^{13}C NMR (100 MHz, D_2O) δ 170.6, 168.8, 137.4, 133.8, 130.2, 128.5, 128.0, 126.5, 66.2, 58.4, 46.0, 44.3, 35.6, 34.5, 29.7; HRMS (ES+) calcd for $C_{15}H_{24}N_4O_3Br$ $[M+H]^+$ 387.1032, found 387.1030.

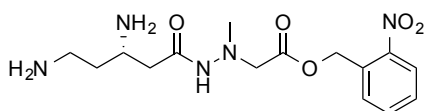
(S)-4-Chlorobenzyl 2-(2-(3,5-diaminopentanoyl)-1-methylhydrazinyl)acetate · 2TFA (22f)



24f (22.6 mg, 41.7 μmol) を用い, **22a** と同様の方法により合成し, HPLC (gradient: milli-Q water (TFA 0.1%) : CH_3CN (TFA 0.1%) = 75 : 25 to milli-Q water (TFA 0.1%) : CH_3CN (TFA 0.1%) = 55 : 45 over 40 min, flow rate 5 mL/min, UV: 222 nm) で精製した (白色固体, 13.1 mg, 29.9 μmol , 23%).

$[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +2.52$ ($c = 0.50$, H_2O); m.p. 72.1-73.2 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (400 MHz, D_2O) δ 7.41 (q, $J = 21.5$, 20.5 Hz, 4H), 5.17 (s, 2H), 3.67 (s) and 3.65-3.63 (m, total 3H), 3.08 (t, $J = 21.7$, 19.5 Hz, 2H), 2.63 (s, 3H), 2.57-2.46 (m, 3H), 2.10-1.97 (m, 2H); ^{13}C NMR (100 MHz, D_2O) δ 170.6, 168.8, 134.0, 133.8, 129.9 (2 carbons), 128.7 (2 carbons), 66.4, 58.4, 46.0, 44.2, 35.6, 34.5, 29.7; HRMS (ES+) calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{N}_4\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 387.1032, found 387.1024.

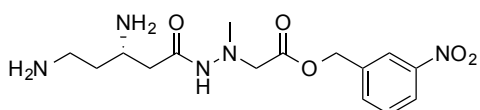
(S)-2-Nitrobenzyl 2-(2-(3,5-diaminopentanoyl)-1-methylhydrazinyl)acetate · 2TFA (22g)



24g (28.3 mg, 51.1 μmol) を用い, **22a** と同様の方法により合成し, HPLC (gradient: milli-Q water (TFA 0.1%) : CH_3CN (TFA 0.1%) = 75 : 25 to milli-Q water (TFA 0.1%) : CH_3CN (TFA 0.1%) = 55 : 45 over 40 min, flow rate 5 mL/min, UV: 222 nm) で精製した (白色固体, 21.8 mg, 37.5 μmol , 74%).

$[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +6.10$ ($c = 0.50$, H_2O); m.p. 79.9-80.4 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (400 MHz, D_2O) δ 8.15 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H), 7.75 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H), 7.69-7.58 (m, 2H), 5.52 (s, 2H), 3.79-3.68 (m, 3H), 3.11 (t, $J = 7.7$ Hz, 2H), 2.65 (s, 3H), 2.62 (m, 2H), 2.13-1.99 (m, 2H); ^{13}C NMR (100 MHz, D_2O) δ 173.3, 171.9, 150.3, 137.4, 133.3 (2 carbons), 132.6, 128.2, 67.0, 61.2, 49.0, 47.2, 38.6, 37.6, 32.7; HRMS (ES+) calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{N}_5\text{O}_5$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 354.1777, found 354.1782.

(S)-3-Nitrobenzyl 2-(2-(3,5-diaminopentanoyl)-1-methylhydrazinyl)acetate · 2TFA (22h)

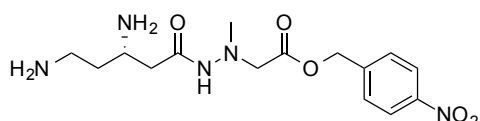


24h (36.9 mg, 66.6 μmol) を用い, **22a** と同様の方法により合成し, し, HPLC (gradient: milli-Q water (TFA 0.1%) : CH_3CN (TFA 0.1%) = 75 : 25 to milli-Q water (TFA 0.1%) : CH_3CN (TFA 0.1%) = 55 : 45 over 40 min, flow rate 5 mL/min, UV: 222 nm)で精製した (白色固体, 38.9 mg, 56%).

$[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +6.49$ ($c = 0.50$, H_2O); m.p. 76.0-76.7 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (400 MHz, D_2O) δ 8.25 (s, 1H), 8.21 (d,

$J = 8.3$ Hz, 1H), 7.80 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H), 7.62 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H), 5.30 (s, 2H), 3.79-3.63 (m, 3H), 3.11 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H), 2.66 (s, 3H), 2.60 (dd, $J = 17$ and 5.3 Hz) and 2.53 (dd, $J = 17$ and 7.5 Hz, total 2H), 2.18-1.97 (m, 2H); ^{13}C NMR (100 MHz, D_2O) δ 173.5, 171.8, 150.8, 140.1, 137.6, 132.8, 126.3, 125.7, 68.7, 61.3, 49.0, 47.2, 38.6, 37.6, 32.8; HRMS (ES+) calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{N}_5\text{O}_5$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 354.1777, found 354.1773.

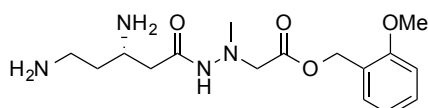
(S)-4-Nitrobenzyl 2-(2-(3,5-diaminopentanoyl)-1-methylhydrazinyl)acetate · 2TFA (22i)



22i (22.1 mg, 39.9 μmol) を用い, **22a** と同様の方法により合成し, HPLC (gradient: milli-Q water (TFA 0.1%) : CH_3CN (TFA 0.1%) = 75 : 25 to milli-Q water (TFA 0.1%) : CH_3CN (TFA 0.1%) = 55 : 45 over 40 min, flow rate 5 mL/min, UV: 222 nm) で精製した (白色固体, 15.7 mg, 68%).

$[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +3.72$ ($c = 0.50$, H_2O); m.p. 52.6-53.0 $^\circ\text{C}$; ^1H NMR (400 MHz, D_2O) δ 8.24 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 7.60 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 5.30 (s, 2H), 3.80-3.61 (m, 3H), 3.09 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H), 2.65 (s, 3H), 2.59 (dd, $J = 16$ and 5.3 Hz) and 2.52 (dd, $J = 17$ and 7.4 Hz, total 2H), 2.15-1.98 (m, 2H); ^{13}C NMR (100 MHz, D_2O) δ 173.4, 171.9, 150.3, 145.9, 131.5, 126.8, 126.7, 68.7, 61.2, 48.9, 47.2, 38.6, 37.8, 32.8; HRMS (ES+) calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{N}_5\text{O}_5$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 354.1777, found 354.1771.

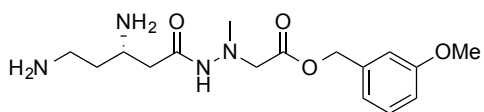
(S)-2-Methoxybenzyl 2-(2-(3,5-diaminopentanoyl)-1-methylhydrazinyl)acetate · 2TFA (22j)



22j (30.4 mg, 56.5 μmol) を用い, **22a** と同様の方法により合成し, HPLC (gradient: milli-Q water (TFA 0.1%) : CH_3CN (TFA 0.1%) = 75 : 25 to milli-Q water (TFA 0.1%) : CH_3CN (TFA 0.1%) = 55 : 45 over 40 min, flow rate 5 mL/min, UV: 222 nm) で精製した (白色固体, 20.8 mg, 36.8 μmol , 65%).

$[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +2.35$ ($c = 1.00$, H_2O); m.p. 66.5-66.8 $^\circ\text{C}$; ^1H NMR (400 MHz, D_2O) δ 7.46-7.35 (m, 2H), 7.10 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 7.03 (t, $J = 6.9$ Hz, 1H), 5.22 (s, 2H), 3.85 (s, 3H), 3.70-3.60 (m, 3H), 3.08 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H), 2.63 (s, 3H), 2.59-2.46 (m, 2H), 2.18-1.97 (m, 2H); ^{13}C NMR (100 MHz, D_2O) δ 173.6, 171.8, 160.4, 133.7, 133.5, 126.0, 123.8, 114.6, 65.8, 61.2, 58.6, 48.9, 47.0, 38.6, 37.6, 32.7; HRMS (ES+) calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{27}\text{N}_4\text{O}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 339.2032, found 339.2025.

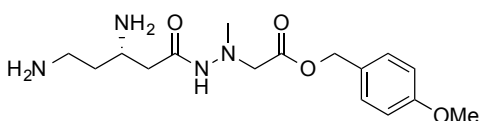
(S)-3-Methoxybenzyl 2-(2-(3,5-diaminopentanoyl)-1-methylhydrazinyl)acetate · 2TFA (22k)



24k (22.1 mg, 41.1 μmol) を用い, **22a** と同様の方法により合成し, HPLC (gradient: milli-Q water (TFA 0.1%) : CH_3CN (TFA 0.1%) = 75 : 25 to milli-Q water (TFA 0.1%) : CH_3CN (TFA 0.1%) = 55 : 45 over 40 min, flow rate 5 mL/min, UV: 222 nm) で精製した (白色固体, 15.0 mg, 26.5 μmol , 64%).

$[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +8.44$ ($c = 0.43$, H_2O); m.p. 58.1-58.6 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (400 MHz, D_2O) 7.38 (t, $J = 19.3$, 19.2, 1H), 7.05-6.99 (m, 3H), 5.18 (s, 2H), 3.83 (s, 3H), 3.68 (s) and 3.67-3.65 (m, total 3H), 3.08 (t, $J = 18.2$, 18.5, 2H), 2.64 (s, 3H), 2.58-2.46 (m, 2H), 2.08-1.99 (m, 2H); ^{13}C NMR (100 MHz, D_2O) δ 170.6, 168.8, 159.0, 137.0, 130.1, 120.9, 114.2, 113.8, 66.9, 58.4, 55.4, 46.0, 44.2, 35.6, 34.6, 29.8; HRMS (ES⁺) calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{27}\text{N}_4\text{O}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 339.2032, found 339.2021.

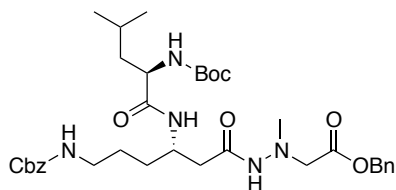
(S)-4-Methoxybenzyl 2-(2-(3,5-diaminopentanoyl)-1-methylhydrazinyl)acetate · 2TFA (22l)



24l (30.8 mg, 57.2 μmol) を用い, **22a** と同様の方法により合成し, HPLC (gradient: milli-Q water (TFA 0.1%) : CH_3CN (TFA 0.1%) = 75 : 25 to milli-Q water (TFA 0.1%) : CH_3CN (TFA 0.1%) = 55 : 45 over 40 min, flow rate 5 mL/min, UV: 222 nm) で精製した (白色固体, 18.2 mg, 32.1 μmol , 56%).

$[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +0.25$ ($c = 0.50$, H_2O); m.p. 71.0-72.1 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (400 MHz, D_2O) δ 7.50 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 7.02 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 5.15 (s, 2H), 2.84 (s, 3H), 3.73-3.61 (m, 3H), 3.09 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H), 2.64 (s, 3H), 2.55-2.49 (m, 2H), 2.15-1.94 (m, 2H); ^{13}C NMR (100 MHz, D_2O) δ 170.7, 168.8, 159.1, 130.4, 130.3, 127.8, 114.2 (2 carbons), 66.9, 58.4, 55.4, 46.0, 44.2, 35.6, 34.5, 29.7; HRMS (ES⁺) calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{27}\text{N}_4\text{O}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 339.2032, found 339.2036.

(7S,10R)-Benzyl 7-[3-(benzylcarbonylamino)propyl]-10-isobutyl-3,14,14-trimethyl-5,9,12-trioxo-13-oxa-3,4,8,11-tetraazapentadecan-1-oate (31a)

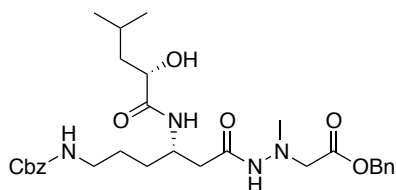


中間体 **30** (79.7mg, 0.143mmol) に氷冷攪拌下, 4M 塩酸/ジオキサン (2 mL) を添加し, 室

温で1時間攪拌した。溶媒を減圧留去後、得られた残渣を精製することなく次の反応に用いた。

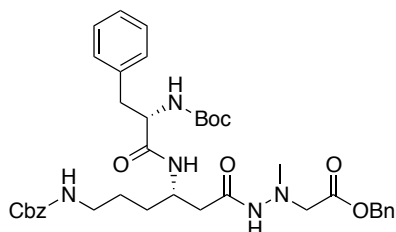
残渣の DMF 溶液 (2 mL) に Boc-D-Leu-OH·H₂O (71.3 mg, 0.286 mmol) および, HOBt·H₂O (43.8 mg, 0.286 mmol) を加え, 氷冷攪拌下, Et₃N (39.6 μL, 0.286 mmol), EDC·HCl (54.8 mg, 0.286 mmol) を添加し, 室温にて終夜攪拌した。10%クエン酸水溶液に反応溶液を加え, 酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液, 水, 飽和食塩水で洗浄, Na₂SO₄ で乾燥した。ろ過後, 母液を減圧留去し, 得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィ (クロロホルム : メタノール = 60 : 1) で精製することで無色固体 **31a** を得た (90.8 mg, 0.136 mmol, 2 工程 95%); [α]_D²⁵ = -8.53 (*c* = 1.31, CHCl₃); m.p. 98.4–99.6 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.17 (s) and 7.09 (br s, total 1H), 7.45–7.22 (m, 10H), 7.18 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 5.26–5.97 (m, 6H), 4.32–4.12 (m, 1H), 4.12–3.96 (m, 1H), 3.93–3.47 (m, 2H), 3.19 (br s, 2H), 2.98–2.47 (m, 4H), 2.39–2.18 (m, 1H), 1.80–1.50 (m, 7H), 1.42 (s, 9H), 1.00–0.86 (m, 6H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 174.6, 172.5, 170.7, 156.5 (2 carbons), 136.7, 135.0, 128.69 (2 carbons), 128.66 (2 carbons), 128.45 (2 carbons), 128.37 (2 carbons), 128.04, 127.98, 80.1, 66.8, 66.5, 57.8, 53.8, 46.4, 44.6, 41.2, 40.6, 39.1, 31.8, 28.3 (3 carbons), 26.4, 24.8 (2 carbons), 22.1; HRMS (ES⁺) calcd for C₃₅H₅₁N₅O₈Na [M+Na]⁺ 692.3635, found 692.3638.

Benzyl 2-{2-[(*S*)-6-(benzyloxycarbonylamino)-3-((*S*)-2-hydroxy-4-methylpentanamido)hexanoyl]-1-methylhydrazinyl}acetate (31b**)**



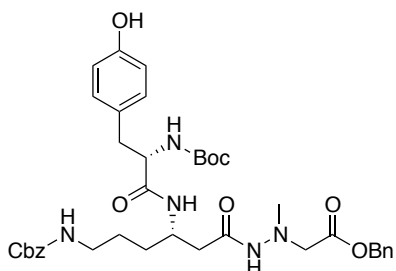
31b は **30** (55.5 mg, 99.8 μmol) および (*S*)-2-hydroxy-4-pentanoic acid (26.4 mg, 0.200 mmol) を用い, **31a** と同様の方法により合成した。(白色固体, 42.5 mg, 74.5 μmol, 2 工程 75%); [α]_D²⁵ = -21.2 (*c* = 0.34, CHCl₃); m.p. 82.5–84.6 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.84 (s) and 7.42–7.27 (m, total 11H), 7.25–7.10 (m, 1H), 5.34–4.80 (m, 5H), 4.37–4.18 (m, 1H), 4.08 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 3.84–3.46 (m, 2H), 3.30–3.14 (m, 2H), 2.85–2.59 (m, 4H), 2.42–2.18 (m, 1H), 1.98–1.70 (m, 1H), 1.69–1.40 (m, 6H), 0.95 (d, *J* = 6.5 Hz, 6H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 174.7, 170.8, 169.1, 156.57, 156.53, 136.6, 135.1, 128.8 (4 carbons), 128.55 (2 carbons), 128.53 (2 carbons), 128.1 (2 carbons), 70.7, 66.8, 66.7, 57.7, 46.3, 45.7, 44.2, 40.6, 31.7, 26.6, 24.6, 23.5, 21.4; HRMS (ES⁺) calcd for C₃₀H₄₂N₄O₇Na [M+Na]⁺ 593.2951, found 593.2949.

(7*S*,10*R*)-Benzyl 10-benzyl-7-[3-(benzylcarbonylamino)propyl]-3,14,14-trimethyl-5,9,12-trioxo-13-oxa-3,4,8,11-tetraazapentadecan-1-oate (31c**)**



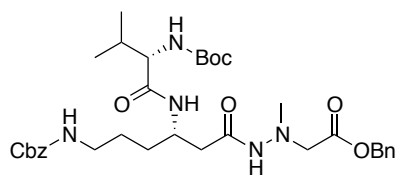
30 (82.9 mg, 0.149 mmol) および Boc-Phe-OH (79.1mg, 0.298 mmol) を用い、**31a** と同様の方法により合成した. (白色固体, 92.5 mg, 0.132 mmol, 2 工程 88%); $[\alpha]_D^{25} = -9.40$ ($c = 1.17$, CHCl_3); m.p. 126.7–128.1 °C; $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.69 (s) and 7.42-7.16 (m, total 16H), 6.96 (br d, 1H), 5.25-5.00 (m, 6H), 4.40-4.24 (m, 1H), 4.23-3.99 (m, 1H), 3.78-3.46 (m, 2H), 3.26-3.10 (m, 2H), 3.02 (d, $J = 6.1$ Hz, 2H), 2.89-2.63 (m) and 2.40-2.21 (m, total 4H), 2.18-1.98 (m, 1H), 1.64-1.42 (m, 4H), 1.38 (s, 9H); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ 174.4, 170.6, 168.9, 156.51, 156.48, 155.4, 136.8 (2 carbons), 129.37 (2 carbons), 128.69 (2 carbons), 128.61, 128.57, 128.51 (2 carbons), 128.46 (2 carbons), 128.42 (2 carbons), 128.04, 128.01, 126.8, 80.0, 66.7, 66.5, 57.6, 56.0, 46.4, 45.4, 44.1, 40.6, 38.5, 31.4, 28.2 (3 carbons), 26.4; HRMS (ES+) calcd for $\text{C}_{38}\text{H}_{50}\text{N}_5\text{O}_8$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 704.3659, found 704.3652.

(7S,10R)-Benzyl 7-[3-(benzylcarbonylamino)propyl]-10-(4-hydroxybenzyl)-3,14,14-trimethyl-5,9,12-trioxo-13-oxa-3,4,8,11-tetraazapentadecan-1-oate (31d)



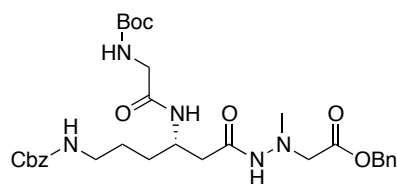
30 (61.2 mg, 0.110 mmol) および Boc-Tyr-OH (56.1mg, 0.258 mmol) を用い、**31a** と同様の方法により合成した. (無色固体, 39.3 mg, 54.6 μmol , 2 工程 50%); $[\alpha]_D^{25} = -11.1$ ($c = 0.49$, CHCl_3); m.p. 130.9–132.2 °C; $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.74 (s) and 7.39-7.28 (m, total 11H), 6.99 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H), 6.96-6.75 (m, 1H), 6.74-6.64 (m, 2H), 5.26-5.01 (m, 6H), 4.37-3.98 (m, 2H), 3.78-3.43 (m, 2H), 3.10-3.09 (m, 2H), 3.08-2.97 (m, 1H), 2.92-2.77 (m, 1H), 2.76-2.49 (m) and 2.36-2.28 (m, total 4H), 2.18-2.00 (m, 1H), 1.84 (br s, 1H), 1.60-1.36 (m, 13H); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ 174.5, 170.7, 169.2, 156.7, 155.4, 136.7, 135.2, 130.5, 128.76 (2 carbons), 128.74 (2 carbons), 128.53 (4 carbons), 128.47 (2 carbons), 128.1 (2 carbons), 115.8 (2 carbons), 80.2, 66.8, 66.7, 59.0, 57.7, 46.5, 44.1, 40.7, 38.5, 37.8, 35.6, 30.9, 28.3 (3 carbons), 26.5; HRMS (ES+) calcd for $\text{C}_{38}\text{H}_{50}\text{N}_5\text{O}_9$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 720.3609, found 720.3595.

(7S,10R)-Benzyl 7-[3-(benzylcarbonylamino)propyl]-10-isopropyl-3,14,14-trimethyl-5,9,12-trioxo-13-oxa-3,4,8,11-tetraazapentadecan-1-oate (31e)



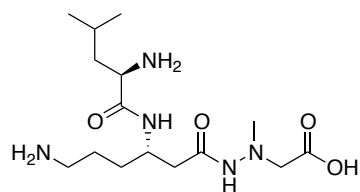
30 (71.7 mg, 0.129 mmol) および Boc-Val-OH (56.1 mg, 0.258 mmol)を用い、**31a** と同様の方法により合成した。(白色固体, 77.8 mg, 0.119 mmol, 2 工程 92%); $[\alpha]_D^{25} = -9.25$ ($c = 0.58$, CHCl_3); m.p. 167.1–168.3 °C; $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.81 (s) and 7.42–7.27 (m, total 11H), 7.04–6.93 (m, 1H), 5.28–4.88 (m, 6H), 4.39–4.10 (m, 1H), 3.87 (br s, 1H), 3.79–3.45 (m, 2H), 3.19 (br s, 2H), 2.98–2.42 (m, 4H), 2.38–2.18 (m, 1H), 2.17–2.00 (m, 1H), 1.72–1.50 (m, 4H), 1.42 (s, 9H), 1.00–0.83 (m, 6H); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ 174.6, 170.6, 169.1, 156.5, 155.9, 136.7, 135.1, 128.7 (4 carbons), 128.5 (2 carbons), 128.4 (2 carbons), 128.0 (2 carbons), 79.8, 66.7, 66.6, 60.2, 59.0, 46.5, 44.1, 40.7, 38.5, 31.1, 30.9, 28.3 (3 carbons), 26.5, 19.36, 19.31; HRMS (ES+) calcd for $\text{C}_{34}\text{H}_{49}\text{N}_5\text{O}_8\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 678.3479, found 678.3481.

(S)-Benzyl 7-[3-(benzyloxycarbonylamino)propyl]-3,14,14-trimethyl-5,9,12-trioxo-13-oxa-3,4,8,11-tetraazapentadecan-1-oate (31f)



30 (52.0 mg, 93.5 μmol) および Boc-Gly-OH (32.8 mg, 0.187 mmol)を用い、**31a** と同様の方法により合成した。(無色固体, 51.7 mg, 84.3 μmol , 2 工程 90%); $[\alpha]_D^{25} = -6.21$ ($c = 0.67$, CHCl_3); m.p. 65.3–66.6 °C; $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.90 (s) and 7.42–7.28 (m, total 11H), 7.17–7.04 (m, 1H), 5.38–5.22 (m, 1H), 5.21–5.00 (m, 5H), 4.35–4.12 (m, 1H), 3.82–3.36 (m, 4H), 3.27–3.12 (m, 2H), 2.98–2.47 (m, 4H), 2.40–2.17 (m, 1H), 1.60–1.49 (m, 4H), 1.43 (s, 9H); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ 174.7, 170.6, 169.0, 156.57, 156.53, 136.7, 135.1, 128.73 (2 carbons), 128.72 (2 carbons), 128.5 (4 carbons), 128.05 (2 carbons), 80.1, 66.8, 66.6, 57.7, 46.6, 45.8, 44.2, 40.6, 38.8, 31.7, 28.3 (3 carbons), 26.6; HRMS (ES+) calcd for $\text{C}_{31}\text{H}_{44}\text{N}_5\text{O}_8$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 614.3190, found 614.3175.

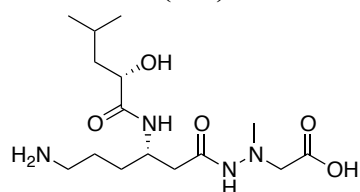
2-{2-[(S)-6-Amino-3-((R)-2-amino-4-methylpentanamido)hexanoyl]-1-methylhydrazinyl}acetic acid·2TFA (25a)



31a (43.1 mg, 64.4 μmol) のメタノール溶液 (2 mL) に, 10% Pd/C (4.3 mg) を加え, 水素雰

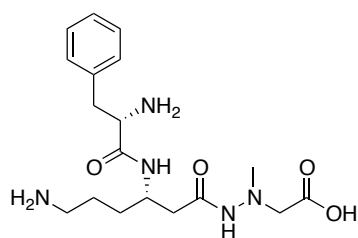
雰囲気下、1 時間攪拌した。反応溶液をセライトろ過し、溶媒を減圧留去した。得られた残渣は精製することなく次の反応に用いた。氷冷攪拌下、4 M 塩酸/ジオキサン (2 mL) を加え、室温にて 1 時間攪拌した。反応溶液を減圧留去後、得られた残渣を水に溶解し、HPLC (gradient: H₂O (TFA 0.1%) : CH₃CN (TFA 0.1%) = 90 : 10 to H₂O (TFA 0.1%) : CH₃CN (TFA 0.1%) = 85 : 15 over 40 min, Flow rate 5 mL/min, UV: 222 nm) で精製することで白色固体 **25a** を得た (17.2 mg, 30.0 μmol, 2 工程 47%); $[\alpha]_D^{25} = -23.2$ ($c = 0.73$, H₂O); m.p. 178.6–179.6 °C; ¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ 4.34-4.18 (m, 1H), 3.98 (t, $J = 7.6$ Hz, 1H), 3.67 (s, 2H), 3.08-2.99 (m, 2H), 2.73 (s, 3H), 2.52 (dd, $J = 15$ and 5.5 Hz, 1H), 2.41 (dd, $J = 15$ and 8.3 Hz, 1H), 1.87-1.57 (m, 7H), 1.08-0.92 (m, 6H); ¹³C NMR (100 MHz, D₂O) δ 173.1, 170.5, 170.0, 58.7, 52.0, 47.0, 44.3, 40.0, 39.0, 38.8, 30.5, 23.9, 23.6, 21.8, 20.9; HRMS (ES+) calcd for C₁₅H₃₂N₅O₄ [M+H]⁺ 346.2454, found 346.2459.

2-{2-[(S)-6-Amino-3-((S)-2-hydroxy-4-methylpentanamido)hexanoyl]-1-methylhydrazinyl}acetic acid·TFA (25b)



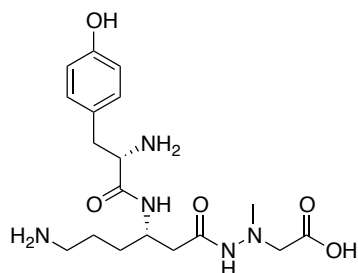
31b (33.5 mg, 64.4 μmol) のメタノール溶液 (2 mL) に、10% Pd/C (3.4 mg) を加え、水素雰囲気下、3 時間攪拌した。反応溶液をセライトろ過し、溶媒を減圧留去した。得られた残渣は精製することなく次の反応に用いた。氷冷攪拌下、4 M 塩酸/ジオキサン (2 mL) を加え、室温にて 1 時間攪拌した。反応溶液を減圧留去後、得られた残渣を水に溶解し、HPLC (gradient: H₂O (TFA 0.1%) : CH₃CN (TFA 0.1%) = 90 : 10 to H₂O (TFA 0.1%) : CH₃CN (TFA 0.1%) = 85 : 15 over 40 min, Flow rate 5 mL/min, UV: 222 nm) で精製することで白色固体 **25b** を得た (17.5 mg, 38.0 μmol, 65%); $[\alpha]_D^{25} = -25.8$ ($c = 0.74$, H₂O); m.p. 112.9–113.7 °C; ¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ 4.20 (br s) and 4.14 (t, $J = 6.8$ Hz, total 2H), 3.50 (s, 2H), 3.07-2.92 (m, 2H), 2.63 (s, 3H), 2.44 (dd, $J = 14$ and 5.2 Hz, 1H), 2.35 (dd, $J = 14$ and 8.6 Hz, 1H), 1.82-1.56 (m, 5H), 1.51 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H), 0.97-0.87 (m, 6H); ¹³C NMR (100 MHz, D₂O) δ 180.1, 177.8, 173.6, 73.0, 62.3, 49.3, 46.9, 46.0, 42.2, 41.9, 33.7, 26.9, 26.5, 25.6, 25.4; HRMS (ES+) calcd for C₁₅H₃₁N₄O₅ [M+H]⁺ 347.2294, found 347.2292.

2-{2-[(S)-6-Amino-3-((S)-2-amino-3-phenylpropanamido)hexanoyl]-1-methylhydrazinyl}acetic acid·2TFA (25c)



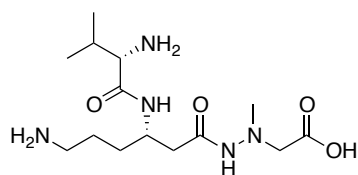
31c (43.7 mg, 62.1 μmol)を用い, **25a** と同様の方法により合成した. (無色固体, 11.2 mg, 18.4 μmol , 2 工程 30%); $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = 17.5$ ($c = 0.43$, H_2O); m.p. 149.3–150.8 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (400 MHz, D_2O) δ 7.47–7.37 (m, 3H), 7.32–7.25 (m, 2H), 4.24–4.09 (m, 2H), 3.57 (s, 2H), 3.23–3.09 (m, 2H), 2.98 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H), 2.66 (s, 3H), 2.24–2.11 (m, 2H), 1.76–1.38 (m, 4H); ^{13}C NMR (100 MHz, D_2O) δ 173.7, 170.2, 168.5, 133.7, 129.4 (2 carbons), 129.2 (2 carbons), 128.1, 58.8, 54.4, 46.6, 44.1, 38.9, 38.5, 37.1, 30.2, 23.3; HRMS (ES+) calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{30}\text{N}_5\text{O}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 380.2298, found 380.2290.

2-{2-[(*S*)-6-Amino-3-((*S*)-2-amino-3-(4-hydroxyphenyl)propanamido)hexanoyl]-1-methylhydrazinyl}acetic acid·2TFA (25d**)**



31d (27.8 mg, 38.6 μmol)を用い, **25a** と同様の方法により合成した. (無色固体 8.25 mg, 13.2 μmol , 2 工程 34%); $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = 6.34$ ($c = 0.29$, H_2O); m.p. 167.7–168.5 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (400 MHz, D_2O) δ 7.17 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 6.90 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 4.18–4.08 (m, 2H), 3.55 (s, 2H), 3.09 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H), 2.98 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H), 2.65 (s, 3H), 2.25–2.10 (m, 2H), 1.73–1.38 (m, 4H); ^{13}C NMR (100 MHz, D_2O) δ 174.0, 170.2, 168.6, 155.2, 130.8 (2 carbons), 125.5, 115.9 (2 carbons), 59.0, 54.5, 46.6, 44.0, 38.9, 38.4, 36.3, 30.1, 23.3; HRMS (ES+) calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{30}\text{N}_5\text{O}_5$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 396.2247, found 396.2258.

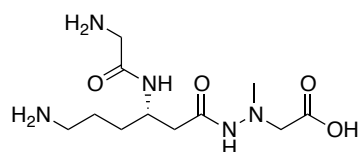
2-{2-[(*S*)-6-Amino-3-((*S*)-2-amino-3-methylbutanamido)hexanoyl]-1-methylhydrazinyl}acetic acid·2TFA (25e**)**



31e (40.4 mg, 61.6 μmol)を用い, **25a** と同様の方法により合成した. (無色固体, 11.2 mg, 20.0 μmol , 2 工程 33%); $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = 11.7$ ($c = 0.42$, H_2O); m.p. 197.7–198.6 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (400 MHz,

D₂O) δ 4.36-4.23 (m, 1H), 3.78 (d, *J* = 5.3 Hz, 1H), 3.69-3.57 (m, 2H), 3.02 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 2.68 (s, 3H), 2.50 (dd, *J* = 15 and 5.1 Hz, 1H), 2.38 (dd, *J* = 15 and 8.8 Hz, 1H), 2.23-2.12 (m, 1H), 1.80-1.54 (m, 4H), 1.01 (t, *J* = 6.7 Hz, 6H); ¹³C NMR (100 MHz, D₂O) δ 173.1, 170.3, 168.6, 58.6, 58.4, 46.6, 44.0, 39.0, 38.6, 30.7, 29.9, 23.4, 17.6, 16.8; HRMS (ES⁺) calcd for C₁₄H₃₀N₅O₄ [M+H]⁺ 332.2298, found 332.2286.

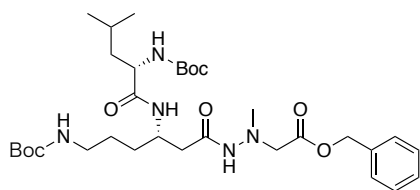
(S)-2-(2-(6-Amino-3-(2-aminoacetamido)hexanoyl)-1-methylhydrazinyl)acetic acid·2TFA (25f)



31f (30.8 mg, 50.2 μmol)を用い、**25a** と同様の方法により合成した。(無色固体, 12.3 mg, 23.8 μmol, 2 工程 47%); [α]_D²⁵ = -9.30 (*c* = 0.42, H₂O); m.p. 148.0–149.9 °C; ¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ 4.28-4.19 (m, 1H), 3.89-3.75 (m, 2H), 3.68 (s, 2H), 3.01 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H), 2.71 (s, 3H), 2.47 (dd, *J* = 14 and 5.3 Hz, 1H), 2.34 (dd, *J* = 14 and 9.0 Hz, 1H), 1.80-1.49 (m, 4H); ¹³C NMR (100 MHz, D₂O) δ 172.5, 170.5, 166.4, 58.4, 46.9, 44.3, 40.4, 38.98, 38.96, 30.6, 23.4; HRMS (ES⁺) calcd for C₁₁H₂₄N₅O₄ [M+H]⁺ 290.1828, found 290.1829.

(7S,10S)-Benzyl

7-[3-(tert-butoxycarbonylamino)propyl]-10-isobutyl-3,14,14-trimethyl-5,9,12-trioxo-13-oxa-3,4,8,11-tetraazapentadecan-1-oate (34a)

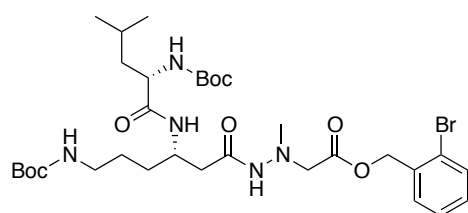


33 (155 mg, 0.231 mmol) のメタノール溶液 (2 mL) に、10% Pd/C (10.6 mg) を加え、水素雰囲気下、35 分攪拌した。反応溶液をセライトろ過し、溶媒を減圧留去した。得られた残渣は精製することなく次の反応に用いた。氷冷攪拌下、DMF (2 mL) 溶媒中 Et₃N (64.0 μL, 0.462 mmol) および Boc₂O (100.8 mg, 0.462 mmol)を加えたのち室温にて 2.5 時間攪拌した。1M HCl 溶液を反応溶液に加え、酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄後、Na₂SO₄ で乾燥した。ろ過後、母液を減圧留去し、得られた残渣は精製することなく次の反応に用いた。氷冷攪拌下、DMF (2 mL) 溶媒中、*N,N*-dimethyl-4-aminopyridine (DMAP, 2.59 mg, 23.1 μmol), *N,N*-dicyclohexylcarbodiimide (DCC, 52.4 mg, 0.231 mmol)および、benzyl alcohol (28.8 μL, 0.277 mmol) を加え室温にて 3.5 時間攪拌した。溶媒を減圧留去したのち、残渣を

CHCl₃にて濾過後、水、飽和食塩水で洗浄後、Na₂SO₄で乾燥した。ろ過後、母液を減圧留去し、得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー（クロロホルム：メタノール = 100 : 1）で精製することで白色固体 **34a** を得た（99.4 mg, 0.156 mmol, 3 工程 68%）; $[\alpha]_D^{25} = -22.3$ ($c = 1.27$, CHCl₃); m.p. 134.7–135.3 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.90 (s, 1H), 7.43–7.29 (m, 5H), 7.09 (br s, 1H), 5.27–5.13 (m, 2H), 5.13–4.94 (m) and 4.77 (br s, total 2H), 4.31–4.10 (m, 1H), 4.10–3.94 (m, 1H), 3.77–3.46 (m, 2H), 3.24–3.06 (m, 2H), 2.97–2.44 (m, 4H), 2.37–2.22 (m, 1H), 1.88–1.24 (m, 25H), 1.00–0.86 (m, 6H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 172.4, 170.5, 169.0, 156.1, 155.7, 135.1, 128.7 (2 carbons), 128.5 (2 carbons), 128.0, 79.9, 79.1, 66.7, 58.9, 57.8, 53.5, 45.8, 44.1, 41.5, 40.2, 31.0, 28.4 (3 carbons), 28.3 (3 carbons), 26.7, 24.8, 23.0, 21.9; HRMS (ES+) calcd for C₃₂H₅₃N₅O₈Na [M+Na]⁺ 658.3792, found 658.3795.

(7S,10S)-2-Bromobenzyl

7-(3-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)propyl)-10-isobutyl-3,14,14-trimethyl-5,9,12-trioxo-13-oxa-3,4,8,11-tetraazapentadecan-1-oate (**34b**)

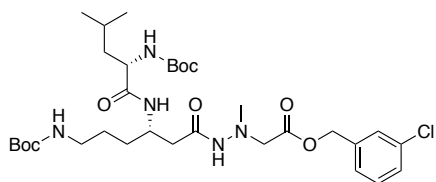


33 (106 mg, 0.158 mmol) のメタノール溶液 (2 mL) に、10% Pd/C (10.6 mg) を加え、水素雰囲気下、35 分攪拌した。反応溶液をセライトろ過し、溶媒を減圧留去した。得られた残渣は精製することなく次の反応に用いた。氷冷攪拌下、DMF (2 mL) 溶媒中 Et₃N (43.8 μ L, 0.316 mmol) および Boc₂O (69.0 mg, 0.316 mmol) を加えたのち室温にて 2.5 時間攪拌した。1M HCl 溶液を反応溶液に加え、酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄後、Na₂SO₄ で乾燥した。ろ過後、母液を減圧留去し、得られた残渣は精製することなく次の反応に用いた。氷冷攪拌下、DMF (2 mL) 溶媒中、*N,N*-dimethyl-4-aminopyridine (DMAP, 1.93 mg, 15.8 μ mol), *N,N*-dicyclohexylcarbodiimide (DCC, 35.9 mg, 0.174 mmol) および, *o*-bromobenzyl alcohol (35.5 mg, 0.190 mmol) を加え室温にて 3.5 時間攪拌した。溶媒を減圧留去したのち、残渣を CHCl₃にて濾過後、水、飽和食塩水で洗浄後、Na₂SO₄で乾燥した。ろ過後、母液を減圧留去し、得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー（クロロホルム：メタノール = 100 : 1）で精製することで白色固体 **34b** を得た（60.8 mg, 85.2 μ mol, 3 工程 54%）; $[\alpha]_D^{25} = -18.8$ ($c = 1.51$, CHCl₃); m.p. 124.0–124.9 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.82 (s, 1H), 7.59 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.45–7.29 (m, 3H), 7.23 (t, $J = 6.3$ Hz, 1H), 7.05 (brs, 1H), 5.35–5.20 (m, 2H), 5.03–4.90 (m, 1H), 4.80–4.63 (m, 1H), 4.35–4.12 (m, 1H), 4.12–3.96 (m, 1H), 3.81–3.51 (m, 2H), 3.26–3.03 (m, 2H), 2.97–2.43 (m, 4H), 2.39–2.20 (m, 1H), 1.78–1.50 (m, 6H), 1.43 (s, 18H), 0.93 (s, 6H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 172.4, 170.3, 169.0, 156.1, 155.7, 134.5, 133.0, 130.4, 128.5,

127.7, 123.6, 79.9, 79.1, 66.2, 58.8, 57.7, 53.4, 45.7, 44.1, 41.4, 40.2, 31.5, 28.4 (6 carbons), 26.7, 24.8, 23.0, 21.9; HRMS (ES+) calcd for C₃₂H₅₂N₅O₈NaBr [M⁺ + Na]⁺ 736.2897, found 736.2919.

(7*S*,10*S*)-3-Chlorobenzyl

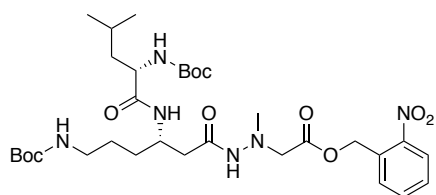
7-[3-(*tert*-butoxycarbonylamino)propyl]-10-isobutyl-3,14,14-trimethyl-5,9,12-trioxo-13-oxa-3,4,8,11-tetraazapentadecan-1-oate (34c)



33 (168 mg, 0.251 mmol)、および *m*-chlorobenzylalcohol (35.5 μ L, 0.301 mmol)を用い、**34a** と同様の方法により合成した。(白色固体, 72.5 mg, 0.108 mmol, 3 工程 43%); $[\alpha]_D^{25} = -20.0$ ($c = 0.96$, CHCl₃); m.p. 97.5–97.9 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.89 (s, 1H), 7.40–7.20 (m, 3H), 7.08 (br s, 1H), 5.24–4.97 (m, 2H), 4.77 (br s, 1H), 4.34–4.09 (m, 1H), 4.09–3.91 (m, 1H), 3.80–3.38 (m, 3H), 3.25–3.04 (m, 2H), 2.98–2.42 (m, 4H), 2.42–2.16 (m, 1H), 2.14–1.32 (m, 26H), 1.02–0.86 (m, 6H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 172.5, 171.1, 169.1, 156.1, 155.7, 137.1, 134.5, 130.0, 128.7, 128.5, 126.4, 79.8, 79.0, 65.7, 58.8, 57.7, 53.5, 45.8, 44.2, 41.4, 40.0, 31.0, 28.4 (3 carbons), 28.3 (3 carbons), 26.7, 24.8, 23.0, 21.9; HRMS (ES+) calcd for C₃₂H₅₃N₅O₈Cl [M+H]⁺ 670.3583, found 670.3585.

(7*S*,10*S*)-2-Nitrobenzyl

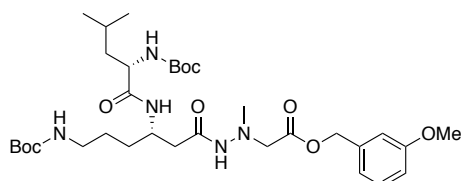
7-[3-(*tert*-butoxycarbonylamino)propyl]-10-isobutyl-3,14,14-trimethyl-5,9,12-trioxo-13-oxa-3,4,8,11-tetraazapentadecan-1-oate (34d)



33 (171 mg, 0.255 mmol)、および *o*-nitrobenzylalcohol (46.9 mg, 0.306 mmol) を用い、**34a** と同様の方法により合成した。(白色固体, 143 mg, 0.209 mmol, 3 工程 82%); $[\alpha]_D^{25} = -16.8$ ($c = 3.14$, CHCl₃); m.p. 114.8–116.2 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.16–8.08 (m, 1H), 7.99 (s, 1H), 7.74–7.49 (m, 2H), 7.37–7.31 (m, 1H), 7.14 (br s, 1H), 5.62–5.52 (m, 2H), 5.16–5.03 (m) and 4.89–4.79 (m, total 2H), 4.32–4.12 (m, 1H), 4.12–3.92 (m, 1H), 3.88–3.51 (m, 2H), 3.24–3.03 (m, 2H), 2.97–2.38 (m, 4H), 2.38–2.26 (m, 1H), 1.87–1.32 (m, 25H), 1.02–0.88 (m, 6H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 172.5, 170.0, 169.2, 156.1, 155.7, 147.6, 133.9, 131.2, 129.2, 128.4, 125.1, 79.8, 79.0, 63.3, 58.8, 57.7, 53.4, 45.5, 44.1, 41.4, 39.9, 31.1, 28.4 (3 carbons), 28.3 (3 carbons), 26.7, 24.7, 22.9, 21.9; HRMS (ES+) calcd for C₃₂H₅₂N₆O₁₀Na [M+Na]⁺ 703.3643, found 703.3642.

(7*S*,10*S*)-3-Methoxybenzyl

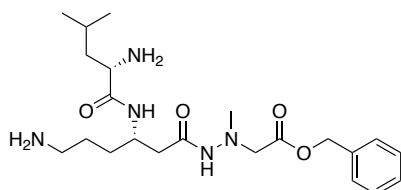
7-[3-(*tert*-butoxycarbonylamino)propyl]-10-isobutyl-3,14,14-trimethyl-5,9,12-trioxo-13-oxa-3,4,8,11-tetraazapentadecan-1-oate (**34e**)



33 (170 mg, 0.254 mmol)、および *m*-methoxybenzylalcohol (42.1 mg, 0.305 mmol) を用い、**34a** と同様の方法により合成した。 (白色固体, 84.3 mg, 0.127 mmol, 3 工程 50%); $[\alpha]_D^{25} = -18.3$ ($c = 1.40$, CHCl_3); m.p. 96.4–97.1 °C; $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.88 (s, 1H), 7.40–7.28 (m, 2H), 7.08 (br s, 1H), 6.96–6.84 (m, 1H), 5.26–4.92 (m, 3H), 4.85–4.65 (m, 1H), 4.34–4.10 (m, 1H), 4.10–3.97 (m, 1H), 3.86–3.40 (m, 5H), 3.26–3.00 (m, 2H), 3.00–2.38 (m, 4H), 2.38–2.12 (m, 1H), 1.84–1.38 (m, 26H), 1.02–0.85 (m, 6H); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ 172.4, 170.5, 169.0, 159.8, 156.1, 155.7, 136.6, 129.8, 128.5, 120.5, 114.0, 79.8, 79.1, 66.6, 58.8, 57.8, 55.3, 53.5, 46.7, 44.1, 41.4, 40.2, 31.1, 28.4 (3 carbons), 28.3 (3 carbons), 26.7, 24.8, 23.0, 21.9; HRMS (ES⁺) calcd for $\text{C}_{33}\text{H}_{55}\text{N}_5\text{O}_9\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 688.3897, found 688.3898.

5. Synthesis of derivatives 13a-e Benzyl

2-((*S*)-6-amino-3-((*S*)-2-amino-4-methylpentanamido)hexanoyl)-1-methylhydrazinyl)acetate·2TFA (**32a**)

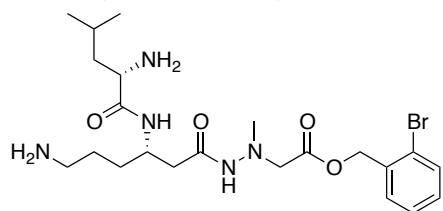


34a (55.7 mg, 87.6 μmol) を氷冷攪拌下、4 M 塩酸/ジオキサン (2 mL) を加え、室温にて1時間攪拌した。反応溶液を減圧留去後、得られた残渣を水に溶解し、HPLC (gradient: H_2O (TFA 0.1%) : CH_3CN (TFA 0.1%) = 80 : 20 to H_2O (TFA 0.1%) : CH_3CN (TFA 0.1%) = 56 : 44 over 12 min, Flow rate 5 mL/min, UV: 222 nm) で精製することで無色固体 **32a** を得た (13.5 mg, 20.3 μmol , 2 工程 65%); $[\alpha]_D^{25} = 2.48$ ($c = 0.39$, H_2O); m.p. 90.3–91.3 °C; $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, D_2O (NH_2 and NH (total 6H) were exchanged with D_2O)) δ 7.53–7.38 (m, 5H), 5.23 (s, 2H), 4.26–4.15 (m, 1H), 3.94 (t, $J = 6.0$ Hz, 1H), 3.73–3.59 (m, 2H), 3.03–2.91 (m, 2H), 2.64 (s, 3H), 2.31 (dd, $J = 5.2$ and 15 Hz, 1H), 2.21 (dd, $J = 8.7$ and 15 Hz, 1H), 1.76–1.46 (m, 7H), 1.00–0.88 (m, 6H); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, D_2O) δ 173.7, 173.1, 172.8, 138.2, 131.8 (2 carbons), 131.6, 131.4 (2

carbons), 70.1, 61.5, 54.8, 49.6, 47.2, 43.1, 41.8, 41.6, 33.5, 26.7, 26.3, 24.7, 23.6; HRMS (ES+) calcd for C₂₂H₃₈N₅O₄ [M+H]⁺ 436.2924, found 436.2916.

2-Bromobenzyl

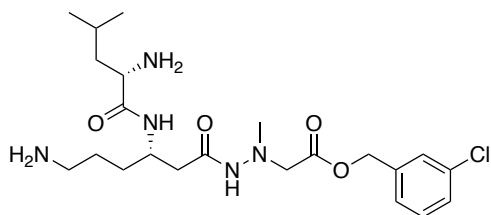
2-(2-((S)-6-amino-3-((S)-2-amino-4-methylpentanamido)hexanoyl)-1-methylhydrazinyl)acetate ·2TFA (32b, TCP-199)



34b (40.6 mg, 56.9 μmol)を用い, **34a** と同様の方法により合成した. (白色固体, 21.7 mg, 29.3 μmol , 2 工程 51%); $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = 2.70$ ($c = 0.22$, H₂O); m.p. 101.7–102.2 °C; ¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ 8.35 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H), 7.69 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.55–7.47 (m, 1H), 7.43 (t, $J = 7.4$ Hz, 1H), 7.33 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H), 5.30 (s, 2H), 4.30–4.24 (m, 1H), 4.02–3.85 (m, 1H), 3.80–3.60 (m, 2H), 3.07–2.90 (m, 2H), 2.64 (s, 3H), 2.34 (dd, $J = 15$ and 5.2 Hz, 1H), 2.23 (dd, $J = 15$ and 8.7 Hz, 1H), 1.80–1.44 (m, 7H), 1.03–0.84 (m, 6H); ¹³C NMR (100 MHz, D₂O) δ 173.6, 173.0, 172.8, 137.2, 135.9, 133.9, 133.6, 131.0, 126.3, 69.9, 61.4, 54.8, 49.6, 47.3, 43.2, 41.9, 41.7, 33.6, 26.8, 26.4, 24.8, 23.7; HRMS (ES+) calcd for C₂₂H₃₇N₅O₄Br [M⁺ + H]⁺ 514.2029, found 514.2032.

3-Chlorobenzyl

2-(2-((S)-6-amino-3-((S)-2-amino-4-methylpentanamido)hexanoyl)-1-methylhydrazinyl)acetate (32c)

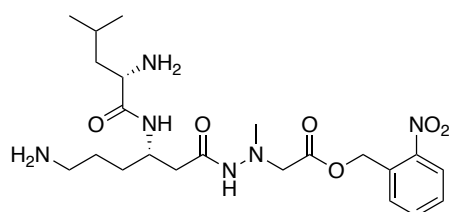


34c (38.1 mg, 56.8 μmol)を用い, **34a** と同様の方法により合成した. (吸湿性物質, 12.5 mg, 17.9 μmol , 2 工程 31%); $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = 3.07$ ($c = 0.37$, H₂O); ¹H NMR (400 MHz, D₂O (NH₂ and NH (total 6H) were exchanged with D₂O)) δ 7.48–7.31 (m, 4H), 5.20 (s, 2H), 4.23–4.16 (m, 1H), 3.98–3.85 (m, 1H), 3.73–3.60 (m, 2H), 3.03–2.90 (m, 2H), 2.63 (s, 3H), 2.30 (dd, $J = 5.2$ and 15 Hz, 1H), 2.21 (dd, $J = 8.7$ and 15 Hz, 1H), 1.75–1.42 (m, 7H), 1.01–0.85 (m, 6H); ¹³C NMR (100 MHz, D₂O) δ 173.6, 173.1, 172.8, 140.4, 136.8, 133.2, 131.5, 131.0, 129.6, 69.2, 61.6, 54.8, 49.6, 47.3,

43.2, 41.9, 41.7, 33.6, 26.8, 26.4, 24.8, 23.7; HRMS (ES⁺) calcd for C₂₂H₃₇N₅O₄Cl [M+H]⁺ 470.2534, found 470.2529.

2-Nitrobenzyl

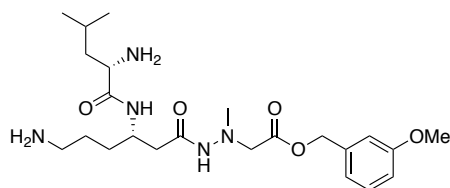
2-(2-((S)-6-amino-3-((S)-2-amino-4-methylpentanamido)hexanoyl)-1-methylhydrazinyl)acetate (32d)



34d (41.9 mg, 61.5 μmol)を用い, **34a** と同様の方法により合成した. (無色固体, 24.1 mg, 34.0 μmol , 2 工程 55%); $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = 3.11$ ($c = 0.74$, H₂O); m.p. 85.6–86.5 °C; ¹H NMR (400 MHz, D₂O (NH₂ and NH (total 6H) were exchanged with D₂O)) δ 8.17 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 7.78 (t, $J = 7.7$ Hz, 1H), 7.69–7.57 (m, 2H), 5.55 (s, 2H), 4.32–4.15 (m, 1H), 3.99–3.86 (m, 1H), 3.79–3.63 (m, 2H), 3.05–2.91 (m, 2H), 2.65 (s, 3H), 2.40 (dd, $J = 5.1$ and 15 Hz, 1H), 2.67 (dd, $J = 8.7$ and 15 Hz, 1H), 1.77–1.45 (m, 7H), 0.99–0.81 (m, 6H); ¹³C NMR (100 MHz, D₂O) δ 173.5, 173.2, 172.9, 150.3, 137.5, 133.5, 133.2, 132.7, 128.2, 117.9, 67.0, 61.3, 54.9, 49.7, 47.3, 43.2, 41.9, 33.6, 26.8, 26.4, 24.8, 23.7; HRMS (ES⁺) calcd for C₂₂H₃₇N₆O₆ [M+H]⁺ 481.2775, found 481.2771.

3-Methoxybenzyl

2-(2-((S)-6-amino-3-((S)-2-amino-4-methylpentanamido)hexanoyl)-1-methylhydrazinyl)acetate·2TFA (32e)



34e (41.0 mg, 61.6 μmol)を用い, **34a** と同様の方法により合成した. (無色固体, 10.7 mg, 15.5 μmol , 2 工程 25%);

13e was prepared in the same manner as described for compound **13a** using **12e**. **13e** (10.7 mg, 15.5 μmol , 2 工程 25%) was obtained as a colorless solid; $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = 2.98$ ($c = 0.31$, H₂O); m.p. 81.8–82.4 °C; ¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ 7.39 (t, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.10–6.99 (m, 3H), 5.20 (s, 2H), 4.26–4.16 (m, 1H), 3.97–3.87 (m, 1H), 3.85 (s, 3H), 3.74–3.60 (m, 2H), 3.04–2.90 (m, 2H), 2.64 (s, 3H), 2.31 (dd, $J = 5.1$ and 15 Hz, 1H), 2.21 (dd, $J = 8.8$ and 15 Hz, 1H), 1.80–1.42 (m, 7H),

1.03-0.82 (m, 6H); ^{13}C NMR (100 MHz, D_2O) δ 173.7, 173.1, 172.8, 162.0, 140.0, 133.1, 124.0, 117.2, 116.8, 69.8, 61.5, 58.3, 54.8, 49.6, 47.2, 43.2, 41.9, 41.6, 33.6, 26.8, 26.4, 24.7, 23.7; HRMS (ES+) calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{40}\text{N}_5\text{O}_5$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 466.3029, found 466.3024.

評価実験

[細胞培養]

細胞の培地には 10%ウシ胎児血清 (FBS, Nichirei, #171012, lot: 8G0297) を含む D-MEM,high glucose, (Wako) を用い, COS-7 細胞を 37 °C, 5 % CO₂ の湿潤雰囲気下にて培養した。

[*in vitro* リードスルー活性評価試験]

以後、表記する Reporter Lysis Buffer, 5 x, Assay 2 x buffer、1M Na₂CO₃ および検量線作成に用いるスタンダードは、 β -Galactosidase Enzyme Assay System with Reporter Lysis Buffer (Promega) に含まれているものである。

COS-7 細胞を 96 well plat bottomed plate (Costar) に 8000 cells/well で播種し、12-15 h 培養した。Reporter gene (β -ガラクトシダーゼ遺伝子とルシフェラーゼ遺伝子とを連結し、その繋ぎ目に未熟終止コドン (TGA) を挿入したコンストラクト) 2 μ g、OPTI-MEM[®] I (Reduced Serum Medium 1 X, Invitrogen) 100 μ L および FuGENE[®] HD Transfection Reagent (Roche) 4 μ L の比率にて調製した溶液を 4 μ L/well 添加し、37°C にて 10-12h 培養した。培地を除去し、200 μ M に調整した測定化合物溶液を 200 μ L 添加した。また、培地を 200 μ L 添加したものをコントロールとした。46-48h 培養後、well 中の培地を除去し、PBS で 2 回洗浄した。続いて、5x Reporter Lysis Buffer、を milliQ にて希釈した 1 x Reporter Lysis Buffer を 100 μ L ずつ添加後、15 分間室温で静置した。well ごとに内容物を回収し、全量を Nunc マイクロウェルプレート (V 底、Thermo Fisher SCIENTIFIC) に移し替え、遠心分離 (1800 回転、15 分間) を行った。このライセート 85 μ L を Nunc ローバインディングプレート 96 ウェルプレート (平底クリア、Thermo Fisher SCIENTIFIC) に移し替えた。

[*In vitro* 無細胞タンパク質合成系活性評価試験]

以後、表記する Cell lysate、Mixture-1、Mixture-2、Mixture-3、および T7 RNA polymerase は Human Cell-Free Protein Expression System (TaKaRa) に含まれている試薬である。

Human Cell-Free Protein Expression System (TaKaRa) のプロトコールに従い、Cell lysate (8.1 μ L)、Mixture-1 (5.4 μ L)、Mixture-2 (0.9 μ L) を氷上にて融解し、1 mL エッペンドルフチューブに分注する。3 試薬を十分混和した後、室温にて 10 分間静置した。Mixture-3 (1.8 μ L) を添加後、20 mM に調製してある誘導体を 1.8 μ L、添加し、0.3 μ g/ μ L のプラスミドを 0.9 μ L 添加する。最後に T7 RNA Polymerase を加え、反応液を十分に混和する。その後 32 °C で 3 時間インキュベートした。インキュベート後、反応チューブ内に 1 x Reporter Lysis Buffer を 178 μ L 添加し、全量を 200 μ L とする。これを Cell lysate として β -galactosidase, luciferase の測定に使用した。

[β-ガラクトシダーゼ活性評価]

Nunc ローバイディングプレート 96 ウェルプレート（平底クリア、Thermo Fisher SCIENTIFIC）を用い、1well あたり 1 x Reporter Lysis Buffer を 30 μL 添加後、回収したライセート 20 μL を添加し 50 μL とした。また別に、検量線作成に必要なスタンダードを β-Galactosidase Enzyme Assay System with Reporter Lysis Buffer（Promega）のプロトコールに従い、0、1、2、3、4、5、10 mU となるようにそれぞれ添加した。これら well に Assay 2 x buffer を 50 μL ずつ添加し、室温にて 25 分インキュベートした。1M Na₂CO₃ を 150 μL ずつ添加し、直ちに吸光/蛍光マイクロプレートリーダー（TECAN SAFIRE）を用いて発光強度（420 nm, reference 0 nm）を測定した。スタンダードの吸光度から検量線を作成し、この検量線に従い、吸光度を mU に換算することで活性値とした。

[ルシフェラーゼ活性評価]

Corning 社製 96 ウェルホワイトプレート（costar[®] 3912）に回収したライセートを 50 μL ずつ添加し、東洋インキ社製 ピッカジーン[®] を 100 μL 添加後、室温にて 15 分インキュベートした。15 分後、ベルトールドジャパン社製 ベルトールドルミノメーター マイクロルーマツプラス LB96V 型にて、発光強度を測定した。

[リードスルー活性値の算出]

まず、測定したβ-ガラクトシダーゼ活性値およびルシフェラーゼ活性値を次式で求めた。

$$\text{リードスルー活性 (Readthrough activity)} = \frac{\text{ルシフェラーゼ活性値}}{\beta\text{-ガラクトシダーゼ活性値}}$$

化合物のリードスルー活性値は、リードスルー活性値をコントロールを基準とした比活性で示した。

[エステラーゼ加水分解実験]

pH 7.4 の 0.1M リン酸緩衝液を用いて 20 mM 誘導体 **16e** をエッペンドルフチューブ内で調製した。これを 50 μL 用い、450 μL のリン酸緩衝液を用いることで 2 mM の溶液 500 μL を作成した。このうち 50 μL はエステラーゼ無添加群のコントロールとし、残り 450 μL に 9 μL（40 units of enzyme per mL）の豚肝臓由来エステラーゼ（porcine liver esterase ; EC 3.1.1.1; E-2884）を添加し、穏やかに混和した。直ちに 50 μL ずつエッペンドルフチューブに分注し、37 °C 恒温槽にてインキュベートした。0 分、30 分、1 時間、2 時間、3 時間、4 時間ごとにサンプルを回収し、ただちに centrifugal filter (0.22nm filter unit, Ultrafree[®]MC, Millipore) を用いて濾過した。その後 -78 °C にて保存を行い、凍結融解後ろ液を HPLC（HITACHI Chromaster）にて分析した。

[リードスルー活性評価用実験動物]

リードスルー活性測定用デュアルレポータープラスミドを発現したレポーター遺伝子を発現したREADマウスを用いた。このデュアルレポータープラスミドは、*lacZ*および*luc*遺伝子の間に、デュシェンヌ型筋ジストロフィーのモデルであるmdxマウスのジストロフィン遺伝子エクソン23由来の中途終止コドン領域を挿入したものをを用いた。また、本来mdxマウスの中途終止コドン配列はTAAであるが、本研究ではTGAを用いた。マウスは、温度・湿度を制御した条件下で個別に飼育され、水および食物に自由に与えた。本マウスを用いた実験はすべて、東京大学動物倫理委員会（許可番号：24-6）の承認を得て実施した。

[READマウスを用いる *In vivo* リードスルーアッセイ]

in vivo リードスルー活性は、上記のトランスジェニックREADマウスを用いたデュアルレポーター遺伝子発現系を用いて評価した。化合物**32b**（1mg）を生理食塩水（0.2mL、溶液のpHをNaHCO₃で8.0に調整）に溶解し、アルベカシン（1mg、Meiji seika;商品名ハベカシン）溶液を陽性コントロールとして、READマウス（n=4、5週齢、体重約20g）の腹部領域に7日間投与した。コントロールとして、食塩水で処置したREADマウス（n=3、5週齢、体重約20g）も同様の条件で評価した。投与終了時に、マウスを過量のエーテルで安楽死させたのち、組織サンプルを大腿直筋、腓腹筋およびヒラメ筋から採取した。組織をハサミで細かく刻み、組織粉碎機（Phycostron; MICROTEC CO., LTD, Japan）、Reporter lysis buffer（Promega, Madison, WI, USA）を用いてホモジナイズした。組織ホモジネートを1回凍結融解した後、溶解物上清を17,710 x g で10分間遠心分離した後に収集し、次いでBeta-GloおよびBright-Gloルシフェラーゼアッセイ系（Promega）を用いて分析した。ルミノメーター（Luminescencer-JNR11 AB-2300; Atto, Japan）を用いて、 β -ガラクトシダーゼ活性およびルシフェラーゼ活性を測定した。リードスルー活性は、 β -ガラクトシダーゼ活性に対するルシフェラーゼ活性の比活性として算出した。

In vivo 急性毒性試験

B10マウス（n=4）の腹部領域に**32b**（10mg/日/20g体重）の単回皮下注射後、13-処置B10マウスの体重を1-7日および14日に測定した。対照として、生理食塩水処理B10マウス（n=3）の体重も測定した。

[ヒト血漿安定性試験]

32bのストック溶液を精製水に希釈し、20mM溶液を調整した。37°Cでプレインキュベートしたヒト血漿（49.5 μ L、4%クエン酸三ナトリウム含有抗凝固剤、Aldrich、USAを含む）に、20mMの**32b**溶液を0.5 μ L添加し、200 μ M、50 μ Lの溶液を作成したのち、37°Cで適切な時間インキュベートした。インキュベーション後、200 μ Lのアセトニトリルを添加し、激しくボルテックスした。4°Cで14,000回/分で遠心分離した後、上清を遠心フィルター（0.2 μ m フィ

ルターユニット、NANOSEP®、PALL) で濾過し、直ちに-78°Cで凍結させた。融解後、**32b** およびその代謝産物を含む濾液をRP-HPLCおよび高分解能質量分析法によって分析した。

[*In vitro* 細胞傷害アッセイ]

HDF (ヒト上皮線維芽細胞)、およびCOS-7 (アフリカミドリザル腎細胞) 細胞を、10%ウシ胎仔血清 (ニチレイ、東京、日本) を添加したダルベッコ変法イーグル培地を用い、5%CO₂ を含む加湿雰囲気下で培養した。各細胞を、96ウェルマイクロプレートに、1ウェル当たり100 μL、3×10³個播種し、最終濃度200 μMとなるようにネガマイシン誘導体およびG418を添加した後、37°Cにて48時間処理した。インキュベーション後、WST-1試薬を10μL添加し、37°Cにて1時間インキュベートした。吸光マイクロプレートリーダー (Thermo Scientific) を用いて発光強度 (420 nm, reference 0 nm) を測定した。

出芽酵母を用いる実験

[培地]

Table 1. YPD 培地

Name	Concentration	Manufacture Description
Yeast Extract	1 %	Nacalai Tesque (Cat# 15838-45)
Polypeptone	2 %	Wako (Cat# 394-00115)
Glucose	2 %	Nacalai Tesque (Cat# 16806-25)

Table 2. YPDA 培地

Name	Concentration	Manufacture Description
Yeast Extract	1 %	Nacalai Tesque (Cat# 15838-45)
Polypeptone	2 %	Wako (Cat# 394-00115)
Glucose	2 %	Nacalai Tesque (Cat# 16806-25)
Adenine sulfate	0.04g / L	MP biochemicals, Inc (Cat# 16806-25)

Table 3. YPDA + 0.0005 % adenine 培地

Name	Concentration	Manufacture Description
Yeast Extract	1%	Nacalai Tesque (Cat# 15838-45)
Polypeptone	2%	Wako (Cat# 394-00115)
Glucose	2%	Nacalai Tesque (Cat# 16806-25)
Adenine sulfate	0.0005 %	MP biochemicals, Inc (Cat# 16806-25)

Table 4. X-drop out amino acid mix

Name	Concentration	Manufacture Description
L-Alanine	2 g	Wako (Cat# 010-01042)
Adenine	2 g	Wako (Cat# 013-00812)
L-Arginine	2 g	Wako (Cat# 017-04612)
L-Asparagine	2 g	Wako (Cat# 019-04812)
L-Aspartic acid	2 g	Wako (Cat# 013-04832)
L-Cysteine	2 g	Nacalai Tesque (Cat# 10309-12)
L-Glutamine	2 g	Wako (Cat# 074-00522)
L-Glutamic acid	2 g	Wako (Cat# 16911-35)
Glycin	2 g	Wako (Cat# 073-00732)

L-Histidine	2 g	Wako (Cat# 084-00682)
<i>myo</i> -Inositol	2 g	Wako (Cat# 092-00282)
L-Isoleucine	2 g	Wako (Cat# 121-00862)
L-Leucine	2 g	Wako (Cat# 124-00852)
L-Lysine	2 g	Wako (Cat# 124-01452)
L-Methionine	2 g	Wako (Cat# 133-01602)
p-Aminobenzoic acid	2 g	Wako (Cat# 015-02332)
L-Phenylalanine	2 g	Wako (Cat# 161-01302)
L-Proline	2 g	Wako (Cat# 161-04602)
L-Serine	2 g	Wako (Cat# 199-00402)
L-Threonine	2 g	Wako (Cat# 204-01322)
L-Tryptophan	2 g	Nacalai Tesque (Cat# 35607-32)
L-Tyrosine	2 g	Wako (Cat# 202-03562)
Uracil	2 g	
L-Valine	2 g	

Table 5. SC-URA 培地

Name	Concentration	Manufacture Description
Yeast nitrogen base without amino acid	0.67 %	BD Bioscience Cat# 2015-11-30)
Uracil drop out amino acid mix (表 2.2)	0.2 %	
Glucose	2 %	Nacalai Tesque (Cat# 16806-25)

*ウラシルを除いた X-drop out amino acid mix (**Table 4**)

Table 6. SC-ADE + 0.0045% adenine 培地

Name	Concentration	Manufacture Description
Yeast nitrogen base without amino acid	0.67 %	BD Bioscience Cat# 2015-11-30)
Uracil drop out amino acid mix (表 2.2)	0.2 %	
Glucose	2 %	Nacalai Tesque (Cat# 16806-25)
Adenine sulfate	0.0045 %	MP Biochemicals, Inc (Cat# 6509-19-9)

*アデニンを除いた X-drop out amino acid mix (**Table 4**)

Table 7. SC-HIS 培地

Name	Concentration	Manufacture Description
Yeast nitrogen base without amino acid	0.67 %	BD Bioscience Cat# 2015-11-30)
Histidine drop out amino acid mix (表 2.2)	0.2 %	
Glucose	2 %	Nacalai Tesque (Cat# 16806-25)

**ヒスチジンを除いた X-drop out amino acid mix (Table 4)

Table 8. 5-FOA 培地

Name	Concentration	Manufacture Description
Yeast nitrogen base without amino acid	0.67 %	BD Bioscience Cat# 2015-11-30)
Uracil drop out amino acid mix	0.2 %	
Glucose	2 %	Nacalai Tesque (Cat#16806-25)
Uracil	0.01 %	Wako (Cat# 212-00062)
5-Fluoroorotic acid (5-FOA)	0.1 %	Wako (Cat# 060-04923)

*ウラシルを除いた X-drop out amino acid mix (Table 4)

Table 9. LiSorb buffer

Name	Concentration	Manufacture Description
Lithium Acetate (LiOAc)	100 mM	Wako (Cat# 120-01535)
Tris-HCl (pH 8.0)	10 mM	Nacalai Tesque (Cat# 35434-34)
EDTA	1 mM	Nacalai Tesque (Cat# 15105-35)
D-Sorbitol	1 M	Merck (Cat# L580 65059)

Table 10. LiPEG buffer

Name	Concentration	Manufacture Description
LiOAc	100 mM	Wako (Cat# 120-01535)
Tris-HCl (pH 8.0)	10 mM	Nacalai Tesque (Cat# 35434-34)
EDTA	1 mM	Nacalai Tesque (Cat# 15105-35)
Polyethylene Glycol (MW~3500 (PEG3350))	40 % (w/v)	Sigma (Cat# P3640-500G)

Table 11. Zymolyase buffer

Name	Concentration	Manufacture Description
Zymolyase-20T	0.5 % (w/v)	SEIKAGAKU BIOSCIENCE CORPORATION (Cat# 120491)
D-Sorbitol	1 M	Wako (Cat# 198-03755)
Na ₂ HPO ₄	12.8 mM	Wako (Cat# 196-02835)
NaH ₂ PO ₄	5.6 mM	Wako (Cat# 192-02815)

[プライマー及びプラスミド]

Table 12. プライマー

Name	Description
ScADE2_pRS_BamHI_F	tagaactagtgatccCTGAAAATTCTCCTGCCAA
ScADE2_pRS_XhoI_R	cgggccccccctcgagTATATTTGGGAACACTACAAA
ADE2_TGA_F	CTAGCTTGAAAATGTGATGTGCTAACGATTGAG
ADE2_TGA_R	GCACATCACATTTTCAAGCTAGTTTTTCGATATC
ADE2_TAG_F	CTAGCTTAGAAAATGTGATGTGCTAACGATTGAG
ADE2_TAG_R	GCACATCACATTTCTAAGCTAGTTTTTCGATATC
S1-UBR1	CCCTAATCTTTACAGGTCACACAAATTACATAGAACATTCCA ATATG cgtacgctgcaggtegac
S2-UBR1	ATACAAATATGTCAACTATAAAACATAGTAGAGGGCTTGAAT CTA atcgatgaattcgagctcg
S1-UBP3	CCATCATCCAGGTACCGCTTTCCTTTCATCATCATTAAAAAA AATG cgtacgctgcaggtegac
S2-UBP3	TATTATTTTTTATGTATTTTGTCTATAATACCACCCCGTCT TA atcgatgaattcgagctcg
S1-RAD6	CAAAGATTATTTTTAGGCAGACAGAGACTAAAAGATAAAGCG TCATG cgtacgctgcaggtegac
S2-RAD6	ATATCGGCTCGGCATTCATCATTAAGATTCTTTTGATTTTTCT CA atcgatgaattcgagctcg
S1-PTR2	TTTTTTTTTCTTCTTTTGAATTAGATCACTAATAAACTCTTATA ATG cgtacgctgcaggtegac
S2-PTR2	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGACAGTAAGTTAATTAACGCA CTA atcgatgaattcgagctcg

S1-CUP9	CCTACTTTTATGCTAACAAACCTTCGAGAATAGTTACATTTCGAA GATG cgtacgetgcaggtegcac
S2-CUP9	GATATAATTATATGAATATTTAAGTAATGCATTGATAAGTGAT CA atcgatgaattcgagctcg

Table 13. プラスミド

Name	Description
pFA6a- <i>His3MX6</i> -pGAL1-GST	Cassette vector for <i>His3MX6</i> marker ⁸⁾
pFA6a-Cg <i>URA3</i>	Cassette vector for Cg <i>URA3</i> marker ⁸⁾
pRS306	Yeast integrative vector with a URA3 marker

[ネガマイシン誘導体に対するリードスルー耐性変異株の単離]

YKH-002 株を元株とし 1.3×10^8 個の酵母を $300 \mu\text{M}$ の Leucyl-3-*epi*-deoxyneomycin (9)、および TCP-112 (11b)、0.004% SDS を含んだ SC-ADE + 0.0045 % adenine 培地にまき、突然変異によって耐性化した株を取得した。得られた株を同じ濃度の培地上で再度耐性を確認した後、互いの化合物添加プレート間で再度耐性を示すことを確認し、リードスルー耐性変異株とした。

[ゲノムシーケンス]

東京農業大学、笠原 浩司教授、兼崎 友研究員に解析をしていただいた。解析には Genome Analyzer II (Illumina, San Diego, CA) を使用した。

[遺伝子破壊用 cassette の作製]

His3MX6 カセットプラスミド pFA6a-*His3MX6*-pGAL1-GST 又は、Cg*URA3* カセットプラスミド pFA6a-Cg*URA3* をテンプレートとし、S1/S2 プライマーを用いて Cassette PCR を行なった。PCR 酵素は KOD Dash (TOYOBO) を用いた。PCR の組成は Table 14 に、PCR プログラムは Table 15 に示した。

Table 14. cassette PCR 組成

Name	Concentration or volume
Plasmide	10~1000 ng
50 μM Forward primer	2 μl (2 μM)
50 μM Reverse primer	2 μl (2 μM)
2 mM dNTPmix	5 μl (200 μM)
KOD dash buffer	5 μl

KOD dash polymerase	0.5 μ l (0.025 U/ μ l)
---------------------	--------------------------------

MilliQ で 50 μ l に fill up して PCR を行った。

Table 15. cassette PCR プログラム

Temperature	Time	cycle
97°C	2 min	
97°C	20 sec	x9 cycles
54°C	30 sec	
68°C	2 min10 sec	
97°C	20 sec	x19 cycles
54°C	30 sec	
68°C	2 min10 sec(+20 sec/cycle)	

[リチウムアセテート法による DNA 断片の導入]

酵母を液体培地 50 ml で 30°C, 170 rpm で一晩培養し、対数増殖期 (細胞濃度 OD₆₀₀ = 0.3 ~ 0.4) の細胞を 5,000 rpm で 3 分遠心し回収した。MilliQ 50 ml で一回、LiSorb buffer (Table 9) 10 ml で一回洗浄した後、LiSorb 300 μ l に懸濁した。Lisorb buffer で懸濁した酵母を 50 μ l ずつ分注し、LiPEG buffer (Table 10) を 300 μ l、PCR 産物を 5 μ l、carrier DNA として Salmon sperm DNA (Invitrogen Cat# 15632011) を 5 μ l 加え攪拌し、室温に 20 分静置した。

DMSO を 35 μ l 加え 42°C で 15 分熱ショック処理を行ない、DNA を取り込ませた。その後氷上で冷却し、5,000 rpm で 3 分遠心して細胞を回収した。回収した細胞を MilliQ 100 μ l で懸濁し、選択培地に播いた。30°C で二晩培養後、生育してきたコロニーを 2 度新しい選択培地に塗布し、コロニーダイレクト PCR により遺伝子組み換えの確認を行った。

[コロニーダイレクト PCR による遺伝子改編の確認]

選択培地で生育した酵母株を Zymolyase buffer (Table 11) に懸濁し、37°C で 30 分処理したものをテンプレートとして PCR を行なった。PCR の組成を Table 16、PCR プログラムを Table 17 に示した。

Table 16. コロニーダイレクト PCR 組成

Name	Concentration or volume
Template	1 μ l
50 μ M Forward primer	0.4 μ l (2 μ M)
50 μ M Reverse primer	0.4 μ l (2 μ M)

2 mM dNTPmix	2 μ l (200 μ M)
KOD dash buffer	2 μ l
KOD dash polymerase	0.2 μ l (0.025 U/ μ l)

MilliQ で 20 μ l に fill up して PCR を行った。

Table 17. コロニーダイレクト PCR プログラム

Temperature	Time	cycle
94°C	4 min	x 1 cycle
94°C	30 sec	x 30 cycles
54°C	10 sec	
68°C	30 sec	
72°C	4 min	x 1 cycle

参考文献

- (1) Keeling K. M., Bedwell D. M. *Curr. Pharmacogenomics*. **2005**, 3, 259–269.
- (2) Kellermayer R. *Eur. J. Med. Genet*. **2006**, 49, 445–450.
- (3) Diop D., Chauvin C., Jean-Jean O. *C. R. Biol*. **2007**, 330, 71–79.
- (4) Kerem, E., Hirawat, S., Armoni, S., Yaakov, Y., Shoseyov, D., Cohen, M., Nissim-Rafinia, M., Blau, H., Rivlin, J., Aviram, M., Elfring, G. L., Northcutt, V. J., Miller, L. L., Kerem, B. & Wilschanski, M. *Lancet*. **2008**, 372, 719–727.
- (5) Bakker E.; Veenema H., Den Dunnen. J. T., van Broeckhoven C., Grootsholten P. M., Bonten E. J., van Ommen G. J., Pearson P. L. *J. Med. Genet*. **1989**, 26, 553–559.
- (6) Bidou L., Hatin I., Perez N., Allamand V., Panthier. J. J., Rousset J. P. *Gene Ther*. **2004**, 11, 619–627.
- (7) Campbell, K.P., Kahl S.D. *Nature* **1989**, 338, 259–262.
- (8) Ozawa E., Yoshida M., Suzuki A., Mizuno Y., Hagiwara Y., Noguchi S. *Hum. Mol. Genet*. **1995**, 4, 1711–1716.
- (9) Angelini G. *Muscle Nerve*. **2007**, 36, 424–435.
- (10) Mendell J. R., Moxley R. T., Griggs R. C., Brooke M. H., Fenichel G. M., Miller J. P., King W., Signore L., Pandya S., Florence J., Schierbecker J., Robison J., Kaiser K., Mandel S., Arfken C., Gilder B. *N. Engl. J. Med*. **1989**, 320, 1592–1597.
- (11) Biggar W., D Harris V. A., Eliasoph L., Alman B. *Neuromuscul. Disord*. **2006**, 16, 249–255.
- (12) Howard M., Frizzell R., A. Bedwell D M. *Nat. Med*. **1996**, 2, 467–469.
- (13) Martin R., Mogg A., E. Hyewood L. A., Nitschke L., Burke J. F. *Mol. Gen. Genet*. **1989**, 217, 411–418.
- (14) Wagner K. R., Hamed S., Hadley D.W., Gropman A.L., Burstein A.H., Escolar D.M., Hoffman E.P., Fischbeck K.H. *Ann Neurol*. **2001**, 49, 706–711.
- (15) Mingeot-Leclercq M. P., Tulkens P. M., *Antimicrob. Agents Chemother*. **1999**, 43, 1003–1012.
- (16) Hutchin T., Cortopassi G. *Antimicrob. Agents Chemother*. **1994**, 38, 2517–2520.
- (17) Manuvakhova M., Keeling K., Bedwell D. M. *RNA* **2000**, 6, 1044–1055.
- (18) Floquet C., Rousset J. P., Bidou L. *PLoS One* **2011**, 6, e24125.
- (19) Shulman E., Belakhov V., Wei G., Kendall A., Meyron-Holtz E.G., Ben-Shachar D., Schacht J., Baasov T. *J. Biol. Chem*. **2014**, 289, 2318–2330.
- (20) Nudelman I., Rebibo-Sabbah A., Cherniavsky M., Belakhov V., Hainrichson M., Chen F., Schacht F., Pilch D.S., Ben-Yosef. T., Baasov T. *J. Med. Chem*. **2009**, 52, 2836–2845.
- (21) Nudelman I., Smolkin B., Hainrichson M., Balekhov V., Baasav T. *Bioorg. Med. Chem*. **2010**, 18, 3735–3746.
- (22) Welch E. M., Barton E. R., Zhuo J., Tomizawa Y., Friesen W. J., Trifillis P., Paushkin, S.,

- Patel M., Trotta C. R., Hwang S., Wilde R. G., Karp G., Takasugi J., Chen G. Jones S., Ren H., Moon Y. C., Corson D., Turpoff A. A., Campbell J. A., Conn M. M., Khan A., Almstead N. G., Hedrick J., Mollin A., Risher N., Weetall M., Yeh S., Branstrom A. A., Colacino J. M., Babiak J., Ju W. D., Hirawat S., Northcutt V. J., Miller L. L., Spatrack P., He F., Kawana M., Feng H., Jacobson A., Peltz S. W., Sweeney H. L. *Nature* **2007**, 447, 87–91.
- (23) Sermet-Gaudelus I., D. Boeck K., Casimir G. J., Vermeulen F., Leal T., Mogenet A., Roussel D., Fritsch J., Hanssens L., Hirawat S. *Am. J. Respir Crit. Care Med.* **2010**, 182, 1262–1272.
- (24) Haas M.m Vlcek V., Balabanov P., Salmonson T., Bakchine S., Markey G., Weise M., Schlosser-Weber G., Brohmann H., Yerro C. P., Mendizabal M. R., Stoyanova-Beninska V., Hillege H. L. *Neuromuscul. Disord.* **2015**, 25, 5–13.
- (25) Aulda D.S., Lovellb S., Thornea N., Leaa W.A., Maloneya D. J., Shena M., Raia G., Battailec K. P., Thomasa C. J., Simeonova A., Hanzlikb R. P., Inglesea J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **2010**, 107, 4878-4883.
- (26) Frischmeyer P.A., Dietz, H. C. *Hum. Mol. Genet.* **1999**, 8, 1893–1900.
- (27) Hilarion S. G., Beghyn T., Jia J., Debreuck N., Berte G., Mamchaoui K., Mouly V. *Orphanet Journal of Rare Diseases.* **2012**, 7, 58-72.
- (28) Kawahara G., Karpfa J. A., JMyersa J. A., Alexandera M. S., Guyone J. R., Kunkel R. M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **2011**, 108, 5331–5336.
- (29) Hamada H., Takeuchi T., Kondo S., Ikeda Y., Naganawa H., Maeda K., Okami Y, Umezawa H. *J. Antibiotics.* **1970**, 23, 170–171.
- (30) Arakawa M., Shiozuka M., Nakayama Y., Hara T., Hamada M., Kondo S., Ikeda D., Takahashi Y., Nonomura Y., Sheykhleslami K., Kondo K., Kaga K., Kitamura T., Suzuki-Miyagoe Y., Takeda S., Matsuda R. *J. Biochem.* **2003**, 134, 751–758.
- (31) Kondo S., Yoshida K., Ikeda T., Iinuma K., Honma Y., Hamada M., Umezawa H. **1977**, 30, 1137–1139.
- (32) König W., Geiger R. *Chem. Ber.* **1970**, 103, 788–798.
- (33) Hayashi Y., Regnier T., Nishiguchi S., Sydnese M. O., Hashimoto D., Hasegawa J., Katoh T., Kajimoto T., Shiozuka M., Matsuda R., Node M., Kiso Y. *Chem. Commun.* **2008**, 20, 2379–2381.
- (34) Shiozuka M., Wagatsuma A., Kawamoto T., Sasaki H., Shimada K., Takahashi Y., Nonomura Y., Matsuda R. *J. Biochem.* **2010**, 147, 463–470.
- (35) Matsuda R., Shiozuka M., Wagatsuma A., Takahashi Y., Ikeda D., Nonomura Y., Matsuo M., Nishida A. **2011**, WO 2011096484.
- (36) Konsoula R., Jung M. *Int. J. Pharm.* **2008**. 361, 19–25.
- (37) Floquet C., Hatin I., Rousset J. P., Bidou L. *PLoS Genet.* **2012**. 8, e1002608.
- (38) Blanchet S., Cornu D., Argentini M., Namy O. *Nucleic Acids Research*, **2014**, 42, 10061–10072.

- (39) Feldman M. B., Terry D. S., Altman R. B., Blanchard S. C., *Nature Chemical Biology*, **2010**, 6, 54-62.
- (40) Schroeder S. J., Blaha G., Moore P. B. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **2007**, 51, 4462-4465.
- (41) Polikanov Y. S., Szal T. L., Jiang F., Gupta P., Matsuda R., Shiozuka M., Steitz T. A., Va'zquez-Laslop N., Mankin A. S. *Molecular Cell*, **2014**, 56, 541-550.
- (42) Olivier N. B., Altman R. B., Noeske J., Basarab G. S., Code E., Ferguson A. D., Gao N., Huang J., Uette M. F., Livchak S., Miller M. D., Prince D. B., Jamie H., Cate D., Buurman E. D., Blanchard S. D. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **2014**, 111, 16274-16279.
- (43) 上杉志成, 「ケミカルゲノミクスにおける標的タンパク質同定」, ケミカルバイオロジー・ケミカルゲノミクス (半田宏編・シュプリンガー・フェアラーク東京出版), **2005**. 77-90.
- (44) Heitman J., Movva N. R., Hall M. N. *Science*, **1991**, 253, 905-909.
- (45) Kobayashi Y., Mizunuma M., Osada H., Miyakawa T. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **2006**, 70, 2451-2459.
- (46) Wu C. Y., Feng Y., Cardenas E. R., Williams N., Floreancig P. E., Brabander J. K., Roth M. G. *J. Am. Chem. Soc.*, **2012**. 134, 18998-19003.
- (47) Miyamoto Y., Machida K., Mizunuma M., Emoto Y., Sato N., Miyahara K., Hirata D., Usui T., Takahashi H., Osada H., Miyakawa T. *J. Biol. Chem.*, **2002**, 277, 28810-28814.
- (48) Chinen T., Ota Y. Nagumo Y., Masumoto H., Usui T. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **2011**, 75, 1588-1593.
- (49) Fan-Minogue H., Bedwell D. M. *RNA*. **2008**, 14, 148-157.
- (50) Phillips-Jones M. K., Hill M. S., Atkinson J., Martin R. *Mol. Cell. Biol.* **1995**, 15, 6593-6600.
- (51) Smirnov M. N., Smirnov V. N., Budowsky E. J., Inge-Vechtomov S. G., Serebrjakov N.G. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1967**, 27, 299-302.
- (52) McKinney D. C., Bezdeneznih-Snyder N., Farrington K., Guo J., McLaughlin R. E., Ruvinsky A. M., Singh R., Basarab G. S., Narayan S., Buurman E. D. *ACS Infectious Diseases*, **2015**. 1, 222-230.
- (53) Byrd C., Turner G. C., Varshavsky A. *EMBO J.* **1998**, 17, 269-277.
- (54) Sung P., Berleth E., Pickart C., Prakash S., Prakash L. *EMBO J.* **1991**, 10, 2187-2193.
- (55) Floquet C. Deforges J. Rousset J-P. Bidou L. *Nucl. Acids Res.*, **2011**, 39, 3350-3362.
- (56) Matsuda A. Matsuda T. Shibata A. Katanoda K. Tomotaka S. Nishimoto H. *Jpn. J. Clin. Oncol.*, **2013**. 44, 388-396.

発表論文

- (1) Akihiro Taguchi, Keisuke Hamada, Masaya Kotake, Masataka Shiozuka, Hidemasa Nakaminami, Thanigaimalai Pillaiyar, Kentaro Takayama, Fumika Yakushiji, Norihisa Noguchi, Takeo Usui, Ryoichi Matsuda, and Yoshio Hayashi. Discovery of Natural Products Possessing Selective Eukaryotic Readthrough Activity : 3-*epi*-Deo-xynegmaycin and Its Leucine Adduct. *ChemMedChem*. **2014**, 9, 2233-2237.
- (2) Keisuke Hamada, Akihiro Taguchi, Masaya Kotake, Suguru Aita, Saori Murakami, Kentaro Takayama, Fumika Yakushiji, and Yoshio Hayashi. Structure-Activity Relationship Studies of 3-*epi*-deoxynegamycin Derivatives as Potent Readthrough Drug Candidates. *ACS Med. Chem. Lett.*, **2015**, 6, 689-694.
- (3) Akihiro Taguchi, Keisuke Hamada, Masataka Shiozuka, Misaki Kobayashi, Saori Murakami, Kentaro Takayama, Atsuhiko Taniguchi, Takeo Usui, Ryoichi Matsuda, and Yoshio Hayashi. Structure-Activity Relationship Study of Leucyl-3-*epi*-deoxynegamycin for Potent Premature Termination Codon Readthrough. *ACS Med. Chem. Lett.*, **2017**, 8, 1060-1065.

謝辞

本研究に際し、終始ご懇篤なご指導、ご鞭撻を賜りました東京薬科大学薬学部薬品化学教室、林 良雄教授に謹んで感謝いたします。

本論文を纏めるにあたり、懇切丁寧なご指導とご鞭撻を賜りました東京薬科大学薬学部三浦 剛教授、馬場 広子教授に深く感謝いたします。

本研究に際し、御指導、御協力および日々数多くの有益なる御助言をいただきました東京薬科大学薬品化学教室、薬師寺 文華講師、谷口 敦彦講師、高山 健太郎講師、田口 晃弘助教に謹んで感謝いたします。

本研究の計画、実施、考察及び論文作成に加え、酵母を用いたケミカルバイオロジー研究をご指導下さいました、筑波大学生命環境科学研究科生命機能科学専攻 臼井 健郎准教授に心より御礼申し上げます。

本研究における、生物活性評価にご協力いただきました東京大学大学院総合文化研究科、松田 良一教授、塩塚 政孝講師に謹んで感謝致します。

ネガマイシン耐性酵母株のゲノム解析を実施して頂きました、東京農業大学、笠原 浩司准教授、兼崎 友研究員に感謝の意を評します。

本研究に際し、実験に御協力いただきました東京薬科大学薬学部薬品化学教室、小竹 優也氏、会田 俊氏、生澤 俊太郎氏、村上 沙織氏、鈴木 奈々氏、小林 美咲氏、新井 実咲氏、大村 紀子氏に謹んで感謝いたします。

酵母を用いる遺伝学的解析研究に際し、実験に御協力いただきました筑波大学生命環境科学研究科臼井研究室、工藤 駿氏、内藤 あかり氏、岩本 亮介氏に謹んで感謝いたします。

本研究の遂行に多くのご助言、ご協力を頂きました東京薬科大学病態生化学教室、野水 基義教授、吉川 大和准教授、保住 健太郎講師、片桐 文彦助教に心より御礼申し上げます。

NMR 測定及び質量スペクトル測定に際し、御協力頂きました東京薬科大学、中央分析センターの諸氏に謹んで感謝いたします。

学部、大学院で共に切磋琢磨し、刺激を与えてくださった多くの先輩、同期、後輩に感謝いたします。

日本学術振興会には、特別研究員に採用して頂き、2年間に渡り、特別研究員奨励費並びに研究奨励金により、公私にわたり支援して頂きました。ここに感謝いたします。

最後に、これまでの学生生活を物心共に支えて下さり、終止暖かく見守って下さいました父・達朗、母・清代、妹・紗矢香に深く感謝いたします。