

## 非タンパク質構成アミノ酸の設計・合成とそのペプチドの2次構造

田中正一

## Design and Synthesis of Non-proteinogenic Amino Acids and Secondary Structures of Their Peptides

Masakazu TANAKA

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University, 3-1-1 Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka City 812-8582, Japan

(Received June 30, 2006)

Replacement of the  $\alpha$ -hydrogen atom of L- $\alpha$ -amino acids with an alkyl substituent results in  $\alpha,\alpha$ -disubstituted amino acids. The modification changes the properties of the amino acids. Incorporation of  $\alpha,\alpha$ -disubstituted amino acids into oligopeptides restricts the conformational freedom of their peptides. The author developed a synthetic route for optically active  $\alpha$ -ethylated  $\alpha,\alpha$ -disubstituted amino acids using chiral cyclic 1,2-diol, and disclosed that the preferred conformation of peptides composed of chiral  $\alpha$ -ethylated disubstituted amino acids is a fully planar conformation, whereas that of chiral  $\alpha$ -methylated disubstituted amino acids is a  $3_{10}$ -helical structure. Furthermore, the author designed and synthesized two chiral cyclic  $\alpha,\alpha$ -disubstituted amino acids, *i.e.*, (3*S*,4*S*)-1-amino-3,4-di(methoxy)cyclopentanecarboxylic acid {(*S,S*)-Ac<sub>5</sub>c<sup>dOM</sup>}, and (1*R*,6*R*)-8-aminobicyclo-[4.3.0]non-3-ene-8-carboxylic acid {(*R,R*)-Ab<sub>5,6</sub>=c}. They do not have a chiral center at the  $\alpha$ -position, but do have chiral centers on the side-chain cyclopentane or the bicyclic skeleton. The preferred secondary structure of the (*S,S*)-Ac<sub>5</sub>c<sup>dOM</sup> homopeptides was the left-handed (*M*)  $3_{10}$ -helical structure (hexapeptide) and the left-handed (*M*)  $\alpha$ -helical structure (octa- and decapeptides), while that of the (*R,R*)-Ab<sub>5,6</sub>=c hexapeptide was both the right-handed (*P*) and left-handed (*M*)  $3_{10}$ -helices. These results indicate that the side-chain chiral centers affect the secondary structure of their peptides, and the side-chain chiral environment is important for the control of the helical-screw direction of peptides.

**Key words**— $\alpha,\alpha$ -disubstituted amino acid; peptide; conformation; asymmetric synthesis; helix; secondary structure

## 1. はじめに

有機合成化学の手法により今まで誰も設計・合成したことのない天然化合物の機能を越えた新しい分子を創り出し、生体機能解明、創薬研究あるいは新規な化学分野の研究ができないか。このような分子の1つが、Gellman教授が命名した低分子を並べてオリゴマーにすると一定の2次構造を取るフォールドマーである。<sup>1)</sup> L- $\alpha$ -アミノ酸を並べて決まった3次構造を取り機能を発揮するタンパク質は、天然の究極のフォールドマー分子とも言える。しかし、L- $\alpha$ -アミノ酸を数個並べたオリゴペプチドでは、アミノ酸の自由度の多さのためにならざるも安定

な一定の2次構造を取ることができない。また、天然のL- $\alpha$ -アミノ酸からのオリゴペプチドではペプチド鎖の短いものでは安定な2次構造を取らないために生体機能解明のためのプローブとしての利用や、創薬研究などでかならずしも良好な結果が得られていないのが現状である。

## 2. ジ置換アミノ酸

アミノ酸・ペプチドの自由度の制限のためには各種の修飾が行われているが、その中にアミノ酸の $\alpha$ 位水素をアルキル基で置換したジ置換アミノ酸(二置換アミノ酸,  $\alpha$ -アルキルアミノ酸,  $\alpha$ -置換アミノ酸とも呼ばれている)がある。<sup>2)</sup> 通常のアミノ酸をジ置換アミノ酸に改変すると、(1) 化学的な安定化、(2) 脂溶性の増大、(3) アミノ酸側鎖の自由度の制限、(4) 含有ペプチドのコンフォメーション自由度の制限、(5) 含有ペプチドの生体内での安定化、などが起こることが予想される。

九州大学大学院薬学研究院 (〒812-8582 福岡市東区馬出3-1-1)

e-mail: mtanaka@phar.kyushu-u.ac.jp

本総説は、平成18年度日本薬学会学術振興賞の受賞を記念して記述したものである。

ジ置換アミノ酸としては、天然のペプタイボール抗生物質アラメチシンやアンチアモピンの構成アミノ酸として単離されたジメチルグリシン ( $\alpha$ -メチル化アラニン,  $\alpha$ -アミノイソブタン酸: Aib) がよく知られている。このアミノ酸は天然物として得られるのでジ置換アミノ酸を非天然アミノ酸と記載するのは不相当であり、非タンパク質構成アミノ酸と称するのが適当であろう。このアミノ酸 Aib はヘリカルペプチドの設計を始めとして、医薬候補品の分子設計、有機触媒の設計など各種の研究に利用されている。<sup>3-6)</sup> 現時点 (2006 年 6 月) で、キーワード “2-aminoisobutyric acid or Aib” にて文献を検索すると 6000 以上もの文献がヒットすることからも、このアミノ酸 Aib の重要性が分かる。その他の各種ジ置換アミノ酸の構造とそれらのペプチドのコンフォメーションの詳細は別の総説にゆずり、<sup>2)</sup> 本総説では必要最小限のペプチド 2 次構造の説明と筆者らの研究成果を中心に記述する (Fig. 1)。

### 3. ジ置換アミノ酸よりなるペプチドの 2 次構造

ジ置換アミノ酸よりなるペプチドの 2 次構造研究では、米国の Karle らによる Aib に関する研究とイタリアの Toniolo らによるアキラルなジ置換アミノ酸及び  $\alpha$ -メチル化ジ置換アミノ酸に関する研究が先行していた。<sup>7-10)</sup> Aib よりなるホモペプチドを合成すると溶液状態並びに結晶状態にて  $3_{10}$ -ヘリックスを取ることが報告されていた。Aib はアキラルなジ置換アミノ酸であるため、当然、ヘリックスにはエナンチオマーの関係にある右巻き (*P*) のものと左巻き (*M*) のものが 1:1 で存在することになる。ここでヘリックスについて簡単に説明すると、よく知られている  $\alpha$ -ヘリックス ( $3.6_{13}$ -ヘリックス) が

アミノ酸残基 3.6 個で 1 回転し、13 個の原子からなる分子内水素結合 ( $i \leftarrow i+4$ ) の輪を形成するのに対して、 $3_{10}$ -ヘリックスではアミノ酸残基 3 個で 1 回転し、10 個の原子からなる分子内水素結合 ( $i \leftarrow i+3$ ) の輪を形成することになる。つまり、 $3_{10}$ -ヘリックスは  $\alpha$ -ヘリックスに比較して締まったヘリックスで、比喩的に表現すると  $3_{10}$ -ヘリックスは “タオルをよりきつく絞ったらせん” ということになる。最近、精密な X 線結晶解析により、このような  $3_{10}$ -ヘリックスもタンパク質中に頻繁にみられることが分かっている。ジ置換アミノ酸 Aib を通常の L-アミノ酸からなるペプチドの中に導入すると、そのペプチドは右巻きのヘリックスを形成することが知られている。短いペプチドでかつ Aib の個数が多い場合では右巻きの  $3_{10}$ -ヘリックスを取り、比較的長く Aib の個数の少ないペプチドでは右巻きの  $\alpha$ -ヘリックスになることが知られている。これらのヘリックスの巻き方の方向性は、ペプチドの中に存在する通常の L- $\alpha$ -アミノ酸の  $\alpha$  位の不斉中心のために右巻きになる訳である (Figs. 2, 3)。

ジ置換アミノ酸 Aib よりなるホモペプチドが  $3_{10}$ -ヘリックスを形成するのに対して、アキラルなジ置換アミノ酸ジエチルグリシン (Deg) よりなるホモペプチドは、ペプチド主鎖が完全に延びたプラナー構造を取ることが報告されていた。<sup>11-13)</sup> アキラルなジ置換アミノ酸ジプロピルグリシン、ジブチルグリシン、ジフェニルグリシンなどでも同様の傾向があることが知られていた。ソロモンの有機化学教科書には、<sup>14)</sup> ペプチド主鎖が完全に延びたプラナー構造はタンパク質中にはみられないペプチド主鎖を引き延ばした構造であるとの記載があるが、アキラルなジ置換アミノ酸では 2 つの側鎖が同一であり対称性がよく、そのペプチドはプラナー構造を例外的に取る訳である。最近になりタンパク質の X 線結晶解析により、このようなペプチド主鎖が完全に延び

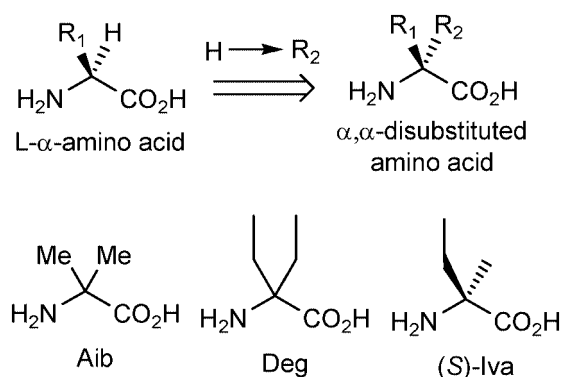
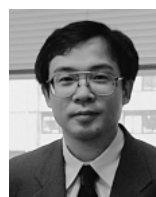


Fig. 1. Structure of  $\alpha,\alpha$ -Disubstituted Amino Acids



田中正一

九州大学大学院薬学研究院助教授。1963 年香川県生まれ。1986 年九州大学薬学部卒業。1988 年同修士課程修了。1988 年国立衛生試験所大阪支所厚生技官研究職、1990 年九州大学薬学部教員・助手、1997 年助教授。この間スイス連邦工科大学に留学 (Seebach 教授)。専門は有機合成化学、薬物分子設計学。

計学。

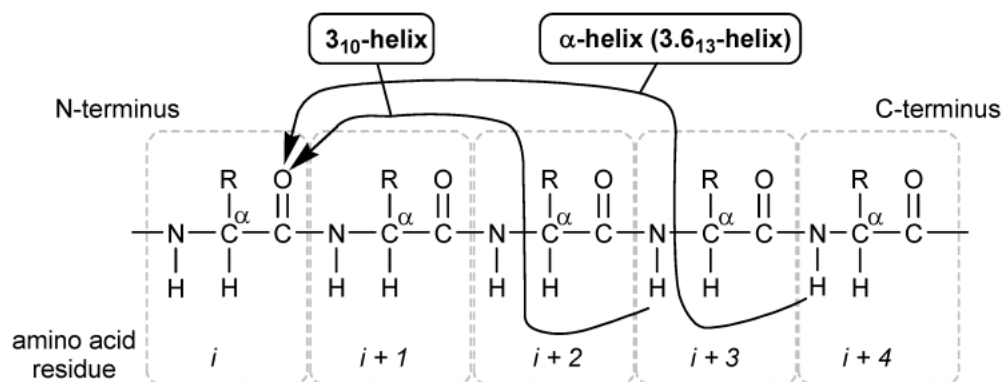
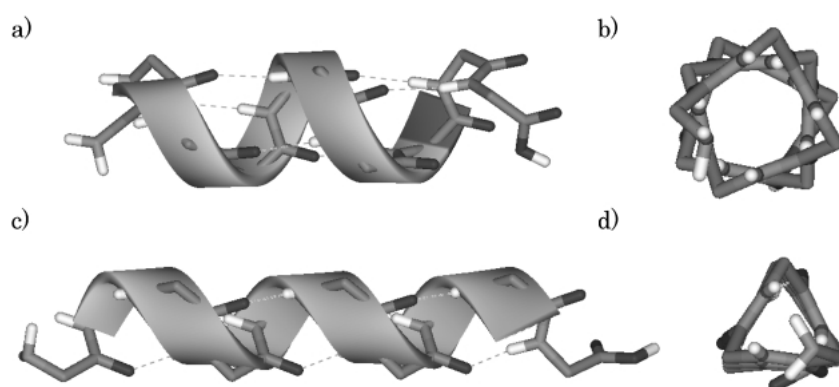


Fig. 2. Hydrogen Bonding Scheme of Helical Peptide

Fig. 3. Structure of  $\alpha$ -Helix and  $3_{10}$ -Helix

a)  $\alpha$ -helix as viewed perpendicularly to the helical axis, b)  $\alpha$ -helix as viewed along the helical axis, c)  $3_{10}$ -helix as viewed perpendicularly to the helical axis, d)  $3_{10}$ -helix as viewed along the helical axis.

たプラナー構造も tRNA-synthetase のグリシンテトラマー中にみられることも報告されている。グリシンは、側鎖が水素であり対称な構造のために例外的にプラナー構造を取った訳であろう (Fig. 4).<sup>10)</sup>

キラルなジ置換アミノ酸からなるペプチドの2次構造として、キラルな  $\alpha$ -メチル化ジ置換アミノ酸からなるペプチドに関するものが、Toniolo ら<sup>15-19)</sup> と Seebach ら (筆者を含む)<sup>20)</sup> により報告されていた。イソバリン (エチルメチルグリシン: Iva) は、アミノ酸  $\alpha$  位炭素が不斉4級炭素である構造の最も簡単なキラルなジ置換アミノ酸である。このイソバリンの不斉4級炭素の絶対配置とそのペプチド2次構造の関係は紆余曲折したものであった。詳細は別の総説に記載したが、<sup>2)</sup> Toniolo らはこの関係を解明するために (*R*)-Iva からなるホモペプチド *p*-BrBz-{(*R*)-Iva}<sub>*n*</sub>OBu<sup>t</sup> (*n*=3, 4, 5) を合成し、X線結晶解析によりそのコンフォメーションを調べた。彼らは (*R*)-Iva からなるホモペプチドは左巻き

(*M*)  $3_{10}$ -ヘリックスを取ることを解明し、Iva の (*R*)-絶対配置の4級不斉中心はそのペプチドに左巻き (*M*) ヘリックスを誘起するとの結論に至った。<sup>17)</sup> ところが、Seebach と筆者らが合成した (*S*)-Iva からなるホモペプチド Boc-{(*S*)-Iva}<sub>*n*</sub>-OMe (*n*=3, 4, 6) では、結晶状態では3つのペプチドとも右巻き (*P*) と左巻き (*M*) の両方の  $3_{10}$ -ヘリックス構造が存在した。ヘキサペプチドでは、ペプチド主鎖上に6つもの不斉中心が存在するのにジアステレオマーのコンフォメーションの関係にある右巻き (*P*) と左巻き (*M*) の  $3_{10}$ -ヘリックスが存在した。ヘキサペプチド Boc-{(*S*)-Iva}<sub>6</sub>-OMe の溶液状態でのコンフォメーションを、低温にて <sup>1</sup>H NMR 測定を行い解析した。その結果、低温測定では6つのNHプロトンピークの分裂が観測され、その比率は4:1となり、低温測定での Nuclear Overhauser and Exchange Spectroscopy (NOESY) <sup>1</sup>H NMR スペクトル測定より右巻き (*P*)  $3_{10}$ -ヘリックスが優先し

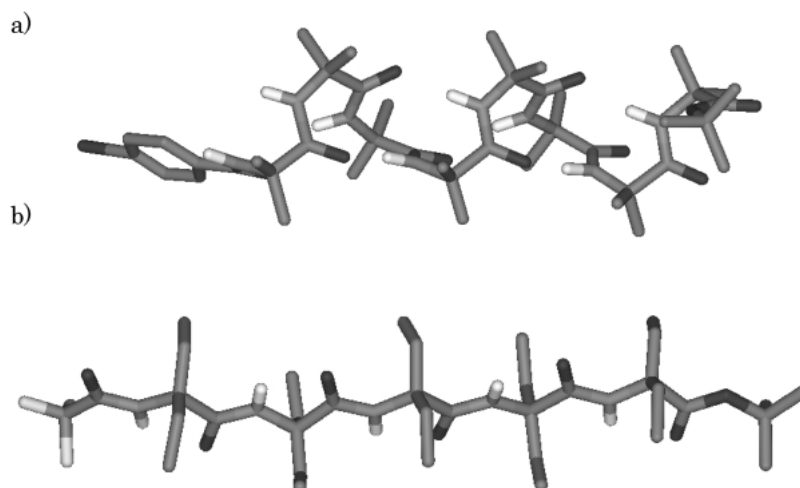


Fig. 4.  $3_{10}$ -Helix and Planar Structure of Homopeptides Composed of  $\alpha,\alpha$ -Disubstituted Amino Acids  
 a)  $3_{10}$ -helical structure of Aib homopeptide  $p\text{-BrBz}\text{-}(\text{Aib})_8\text{-OBu}'$ , b) planar  $C_5$ -conformation of Deg homopeptide  $\text{CF}_3\text{CO}\text{-}(\text{Deg})_5\text{-OBu}'$ .

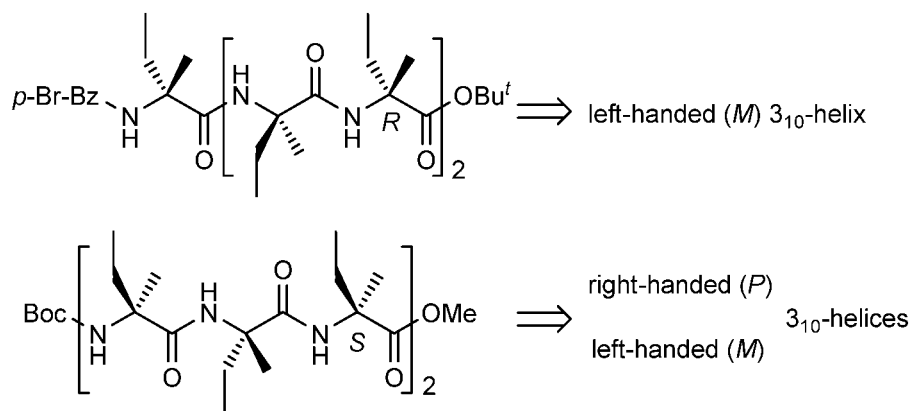


Fig. 5. Secondary Structures of Iva Homopeptides Reported by Toniolo, and Seebach

ていることが明らかとなった。この結果は、Tonioloらの報告と異なったものとなったが、これはペプチドのN末とC末の保護基の違いのためであろう。残念ながら、Tonioloらは(*R*)-Ivaホモペプチドの低温における $^1\text{H}$  NMR測定による溶液状態でのコンフォメーション解析は報告していない(Fig. 5)。<sup>20)</sup>

キラルな $\alpha$ -メチル化ジ置換アミノ酸からなるペプチドの2次構造としてIva以外では、(*S*)- $\alpha$ -メチルバリン,<sup>18)</sup> (*R*)- $\alpha$ -メチルロイシン, (*R*)- $\alpha$ -メチルフェニルアラニン<sup>19)</sup>などのホモペプチドとヘテロペプチドのコンフォメーションが調べられ、アミノ酸 $\alpha$ 位の不斉4級炭素の絶対配置(*R*)あるいは(*S*)により、右巻き(*P*)あるいは左巻き(*M*)の $3_{10}$ -ヘリックスが優先することが報告されている

Table 1. Secondary Structures of Homopeptides Composed of Chiral  $\alpha$ -Methylated  $\alpha,\alpha$ -Disubstituted Amino Acids<sup>15–20)</sup>

Entry	Peptide	Secondary structure
1	$p\text{-BrBz}\text{-}\{(R)\text{-Iva}\}_5\text{-OBu}'$	( <i>M</i> ) $3_{10}$ -helix
2	$\text{Boc}\text{-}\{(S)\text{-Iva}\}_6\text{-OMe}$	( <i>P</i> ) & ( <i>M</i> ) $3_{10}$ -helices
3	$\text{Cbz}\text{-}\{(S)\text{-}\alpha\text{MeVal}\}_8\text{-OBu}'$	( <i>P</i> ) $3_{10}$ -helix
4	$p\text{-BrBz}\text{-}\{(R)\text{-}\alpha\text{MeLeu}\}_4\text{-OH}$	( <i>P</i> ) $3_{10}$ -helix
5	$p\text{-BrBz}\text{-}\{(R)\text{-}\alpha\text{MePhe}\}_4\text{-OBu}'$	( <i>P</i> ) $3_{10}$ -helix
6	$p\text{-BrBz}\text{-}\{(R)\text{-}\alpha\text{MeHph}\}_3\text{-OBu}'$	( <i>M</i> ) $3_{10}$ -helix

Iva: isovaline,  $\alpha\text{MeVal}$ :  $\alpha$ -methylvaline,  $\alpha\text{MeLeu}$ :  $\alpha$ -methylleucine,  $\alpha\text{MePhe}$ :  $\alpha$ -methylphenylalanine,  $\alpha\text{MeHph}$ :  $\alpha$ -methylhomophenylalanine.

(Table 1).<sup>15–20)</sup>

#### 4. キラルな $\alpha$ -エチル化ジ置換アミノ酸とその合成

光学活性 $\alpha$ -エチル化ジ置換アミノ酸よりなるペ

プチドも  $\alpha$ -メチル化ジ置換アミノ酸よりなるペプチドと同様な右巻き (*P*) あるいは左巻き (*M*) の  $3_{10}$ -ヘリックスを取ると予想されていた.<sup>21,22)</sup> 筆者は、光学活性  $\alpha$ -エチル化ジ置換アミノ酸よりなるペプチドの2次構造に興味を抱いた。それは例えば、キラルな (*S*)-ブチルエチルグリシン {(*S*)-Beg} を考えると、このジ置換アミノ酸 (*S*)-Beg は側鎖がブチル基とエチル基であり異なる2つの置換基を持っているが、ブチル基 (すなわちジブチルグリシンよりのペプチド) はプラナーな特性を有しており、かつエチル基 (すなわちジエチルグリシンよりのペプチド) もプラナーな特性を有している。したがって、この (*S*)-Beg よりなるホモペプチドを合成した場合に、その2次構造は2つの異なる置換基のためにヘリックスになるのか、あるいはプラナーになるのか興味を持たれた。

光学活性  $\alpha$ -アルキル化ジ置換アミノ酸の不斉合成としては、<sup>23,24)</sup> 現在では効率的な川端ら、<sup>25)</sup> 丸岡ら<sup>26)</sup>の合成手法などが存在するが、当時筆者も研究室独自の不斉合成法の開発を目指した。筆者は、研究室にて既に開発されていたキラルな環状1,2-ジオールをキラル素子として利用した不斉4級アルキル化を鍵行程として光学活性ジ置換アミノ酸を合成することを計画した。<sup>27,28)</sup> すなわち、2位がメチル化あるいはエチル化されたアセト酢酸エチルのケトン (*S,S*)-シクロヘキサン-1,2-ジオールでアセタール (**1**)としたのち、lithium diisopropyl amide (LDA), アルキルハライドの条件で THF-HMPA 溶液中でアルキル化を行い、エノールエーテル体 (**2**)を高ジアステレオ選択的 (>95% de—92% de) に合成した。エノールエーテル体 (**2**)からは、酸性条件下でシクロヘキサン-1,2-ジオール部分を除去

し、 $\beta$ -ケトエステル (**3**)から Georg ら<sup>29)</sup>の条件にて Schmidt 転位反応を行うと、光学純度を減じることなく光学活性  $\alpha$ -アルキル化ジ置換アミノ酸 (**4**)が合成できた。(*S,S*)-シクロヘキサン-1,2-ジオールを用いると (*R*)-体のアミノ酸が得られ、(*R,R*)-ジオールを用いると (*S*)-体のアミノ酸が得られた。この合成法は、行程数と収率の面では満足できるものではないが、実験室レベルで確実に各種の光学活性  $\alpha$ -アルキル化ジ置換アミノ酸を供給できる手法となった (Fig. 6).<sup>30)</sup>

### 5. キラルな $\alpha$ -エチル化ジ置換アミノ酸よりなるペプチドの2次構造

光学活性  $\alpha$ -エチル化ジ置換アミノ酸として (*S*)-ブチルエチルグリシン {(*S*)-Beg} よりなるホモペプチド  $\text{CF}_3\text{CO}-\{(\textit{S})\text{-Beg}\}_n\text{-OEt}$  ( $n=1-6$ ),<sup>31)</sup> 並びに (*S*)-Beg を Aib 中に含むヘテロペプチド  $\text{CF}_3\text{CO}-(\text{Aib})_2-\{(\textit{S})\text{-Beg}\}-(\text{Aib})_2\text{-OEt}$  と  $\text{CF}_3\text{CO}-\{(\textit{S})\text{-Beg}\}-(\text{Aib})_4\text{-OEt}$  を合成し、その2次構造を解析した。<sup>32,33)</sup> (*S*)-Beg よりなるホモペプチドは IR スペクトルでは、分子内水素結合した N 末のアミノ酸残基の N-H に基づく弱い吸収が  $3380-3415\text{ cm}^{-1}$  {C-F...H(N)...O=C} にみられ、また分子内水素結合したペプチド N-H の強い吸収が  $3335-3360\text{ cm}^{-1}$  にみられた。ペプチド主鎖を長くすると、相対強度を増しながら、この吸収は低波数  $3335\text{ cm}^{-1}$  から高波数  $3360\text{ cm}^{-1}$  側への移動がみられた。これらの IR スペクトルは、プラナー構造を取る Deg からなるホモペプチドのものに類似していた。また、ホモペプチドの  $\text{CDCl}_3$  中での  $^1\text{H NMR}$  スペクトル測定において、ジ置換アミノ酸よりなるペプチドの溶液状態での2次構造解析に頻用されている、水素結合の受容体となる安定ラジカル 2,2,6,6-

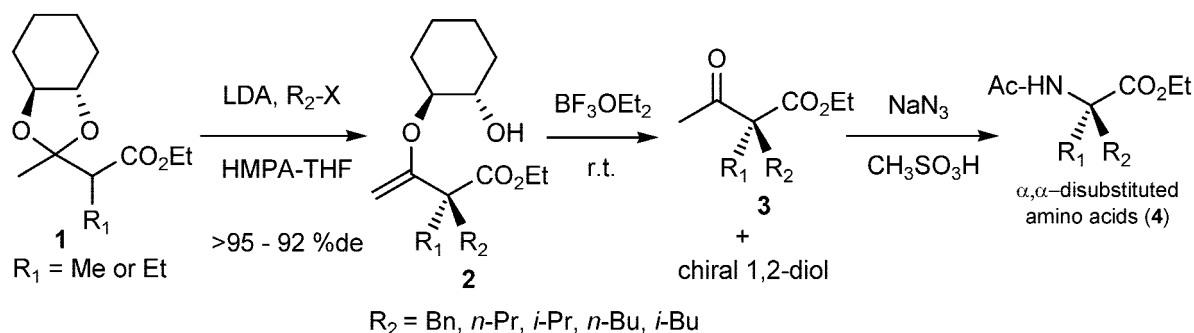


Fig. 6. Diastereoselective Synthesis of Chiral  $\alpha,\alpha$ -Disubstituted Amino Acids Using (*S,S*)-Cyclohexane-1,2-diol

tetramethyl-1-piperidinyloxy, free radical (TEMPO) あるいは dimethyl sulfoxide (DMSO) の添加実験を行った。その結果, (S)-Beg からなるホモペプチドの N-H プロトンは, 両方の添加剤の影響をほとんど受けないことが分かった。このことは, すべての N-H プロトンが分子内水素結合に関与していることを示唆しており, 溶液中でのプラナー構造の形成を意味する。X 線結晶解析による結晶状態での 2 次構造では, (S)-Beg よりなるテトラペプチド  $\text{CF}_3\text{CO}-\{(S)\text{-Beg}\}_4\text{-OEt}$  は, 完全にペプチド主鎖が延びたプラナー構造を取ることが解明された。このプラナー構造ではペプチド主鎖に対してブチル基とエチル基が互い違いになり, すべてのペプチドアミドプロトン N-H は同じアミノ酸残基内で  $\text{C}_5$  型の分子内水素結合を形成している。この結晶状態の 2 次構造は, 溶液状態での構造に一致していた。

これに対して, (S)-Beg を Aib 中に 1 つ含むヘテロペプチドでは溶液状態, 並びに結晶状態で  $3_{10}$ -ヘリックスを取り, そのヘリックスの方向性は一定にはならなかった。すなわち, このヘテロペプチドでは 4 個の Aib のために  $3_{10}$ -ヘリックスを取るが, 1 個の光学活性  $\alpha$ -エチル化ジ置換アミノ酸 (S)-Beg ではヘリックスの方向性を制御するには弱く, ジアステレオマーの関係にある右巻き (P) と左巻き (M) の両方の  $3_{10}$ -ヘリックスが存在した訳である (Fig. 7)。

また, すべてのアミノ酸残基が異なる  $\alpha$ -エチル化ジ置換アミノ酸からなるヘテロペプチドを, C 末

側からペントペプチド  $\text{CF}_3\text{CO}-\{(S)\text{-}\alpha\text{EtVal}\}-\{(S)\text{-}\alpha\text{EtLeu}\}-\{(S)\text{-}\alpha\text{EtNva}\}\text{-Deg}-\{(S)\text{-Beg}\}\text{-OEt}$  までを順次合成し, その 2 次構造解析を行った。溶液状態のコンフォメーション解析を  $^1\text{H NMR}$ , IR スペクトルにより行ったところ, それらのスペクトルは (S)-Beg からなるホモペプチドのものに類似しており, ジペプチドからペントペプチドまですべてのペプチドは, 溶液状態にて主鎖が延びたプラナー構造を形成することが分かった。しかし, X 線結晶解析による結晶状態のコンフォメーションでは, トリペプチド  $\text{CF}_3\text{CO}-\{(S)\text{-}\alpha\text{EtNva}\}\text{-Deg}-\{(S)\text{-Beg}\}\text{-OEt}$  は中央部で折れ曲がったプラナー構造を取り, テトラペプチド  $\text{CF}_3\text{CO}-\{(S)\text{-}\alpha\text{EtLeu}\}-\{(S)\text{-}\alpha\text{EtNva}\}\text{-Deg}-\{(S)\text{-Beg}\}\text{-OEt}$  は 1 : 1 の比率で右巻き (P) と左巻き (M) の  $3_{10}$ -ヘリックスを形成し, ペントペプチド  $\text{CF}_3\text{CO}-\{(S)\text{-}\alpha\text{EtVal}\}-\{(S)\text{-}\alpha\text{EtLeu}\}-\{(S)\text{-}\alpha\text{EtNva}\}\text{-Deg}-\{(S)\text{-Beg}\}\text{-OEt}$  は右巻き (P) の  $3_{10}$ -ヘリックスを取ることが明らかとなった。結晶状態にてヘリックスとなったのは,  $3_{10}$ -ヘリックスを取ると分子間水素結合が 2 つ存在し, ヘリックスの分子間での鎖を形成するが, プラナー構造では分子間水素結合は存在しない。このため, この分子間の水素結合が結晶化に影響を及ぼし, 溶液状態でごくわずかに存在した  $3_{10}$ -ヘリックスが優先して晶出したのであろう。つまり, 溶液状態で安定構造として優先して存在していたプラナー構造が, 結晶化する際にヘリックスへと平衡が偏りながら結晶化した訳である (Fig. 8).<sup>34)</sup>

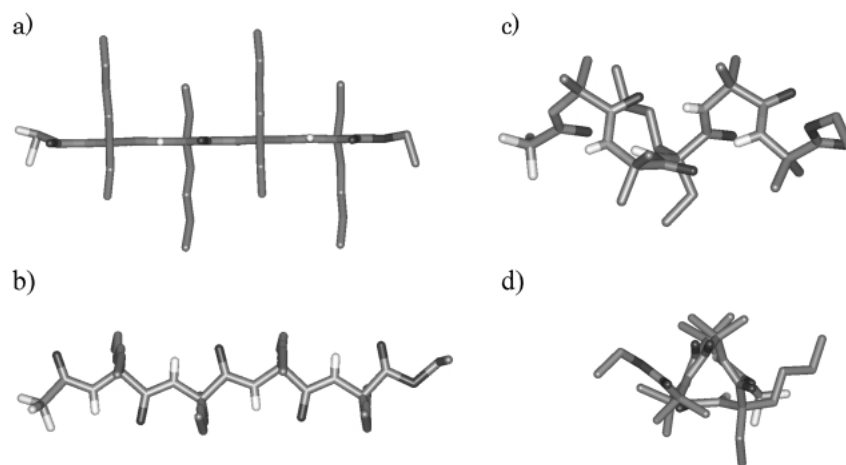


Fig. 7. Crystal Structure of Homopeptide  $\text{CF}_3\text{CO}-\{(S)\text{-Beg}\}_4\text{-OEt}$  (Planar Conformation), and Heteropeptide  $\text{CF}_3\text{CO}-(\text{Aib})_2-\{(S)\text{-Beg}\}-(\text{Aib})_2\text{-OEt}$ , ( $3_{10}$ -Helix)

a) top view, b) side view, c)  $3_{10}$ -helix as viewed perpendicularly to the helical axis, d) as viewed along the helical axis.

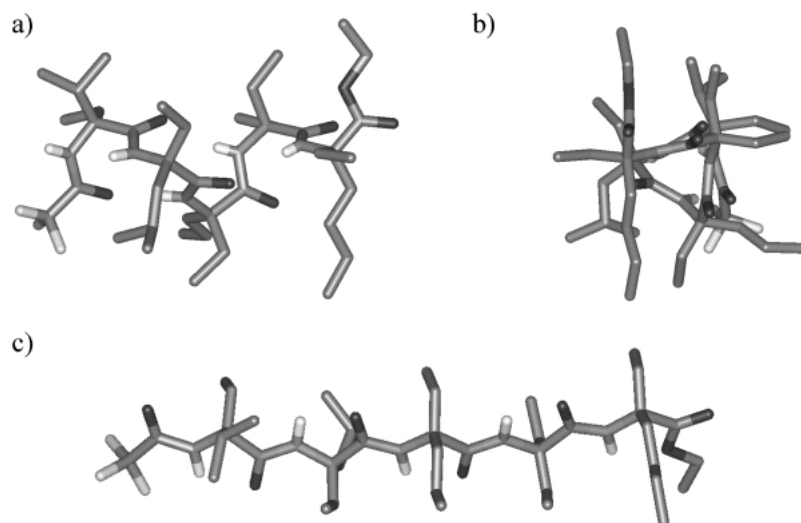


Fig. 8. Structures of Heteropeptide  $\text{CF}_3\text{CO}-\{(\text{S})-\alpha\text{EtVal}\}-\{(\text{S})-\alpha\text{EtLeu}\}-\{(\text{S})-\alpha\text{EtNva}\}-\text{Deg}-\{(\text{S})-\text{Beg}\}-\text{OEt}$

$_{310}$ -helix in the crystal state, a) as viewed perpendicularly to the helical axis, b) as viewed along the helical axis, c) fully planar conformation in solution by modeling.

以上、アキラルな対称な置換基を持つアミノ酸からなるペプチドの場合にのみ存在すると考えられていたプラナー2次構造が、キラルな $\alpha$ -エチル化ジ置換アミノ酸からなるペプチドでは優先して形成されることを明らかとした。すなわち、プラナー2次構造の形成には従来必須条件と考えられていたアミノ酸の対称構造は、かならずしも必要ないということである。このことは、従来知られていた $\alpha$ -メチル化ジ置換アミノ酸からなるペプチドの $_{310}$ -ヘリックスと比較すると際だったものである。

#### 6. アミノ酸側鎖上の不斉中心について

タンパク質の2次構造として頻繁にみられる $\alpha$ -ヘリックスに着目すると、そのヘリックスの巻き方はほとんどすべてが右巻きとなっており、左巻きは短いヘリックスとしてごくわずかに存在するのみである。タンパク質中の $\alpha$ -ヘリックスが右巻きになるのは、アミノ酸がグリシンを除いて $\alpha$ 位に不斉中心を持ったL- $\alpha$ -アミノ酸であり、 $\alpha$ -ヘリックスを左巻きにするとカルボニル酸素とC $\beta$ 炭素との反発が起きるためと考えられている。ところで、タンパク質を構成するL- $\alpha$ -アミノ酸の中で、イソロイシンとスレオニンには $\alpha$ 位に加えて側鎖上の $\beta$ 位炭素にも不斉中心が存在する。イソロイシンとスレオニンの側鎖上の不斉中心に関する研究としては、側鎖上不斉中心の立体化学が異なるアロイソロイシンとアロスレオニンの不斉合成に関する報告とその医薬化学的な利用に関する研究が大部分であった。例

外的な報告として、Lorenziらのイソロイシンとアロイソロイシンそれぞれからなるホモペプチドの比較による側鎖上の不斉中心によるペプチド2次構造への影響についての文献がある。<sup>35)</sup> 彼らは、固体状態では両ジアステレオマーの間に各種スペクトルにてほとんど違いはなく、またペプタドまでは溶液状態でも両者に違いは小さいと結論付けている。しかし、ヘキサペプチドになるとトリフルオロエタノール (TFE) 溶液中での凝集のし易さに違いがでてくると報告をしており、さらなる研究が必要とのコメントをしている。また、Tonioloらもイソロイシンとアロイソロイシンそれぞれからなるホモペプチドの2次構造について研究を行い、側鎖上の不斉中心は $\beta$ -シート2次構造の安定性へ影響を与えると報告している。<sup>36)</sup>

#### 7. キラルな環状ジ置換アミノ酸の設計・合成とそのペプチド

筆者は、アミノ酸側鎖上の不斉中心がペプチド2次構造へ影響を与えるかを実験科学的に解明するためにジ置換アミノ酸の利用を考えた。設計したキラルな環状ジ置換アミノ酸 (3S,4S)-1-amino-3,4-di(methoxy)cyclopentanecarboxylic acid  $\{(S,S)\text{-Ac}_5\text{c}^{\text{dOM}}\}$  の構造を Fig. 9 に示している。このアミノ酸 (S,S)-Ac $_5\text{c}^{\text{dOM}}$  には、次に挙げるようないくつかの特徴がある。(1) 新規なジ置換アミノ酸：新しい環状ジ置換アミノ酸で設計・合成の報告はない。(2)  $\alpha$ 位炭素は不斉中心ではない：ジ置換アミ

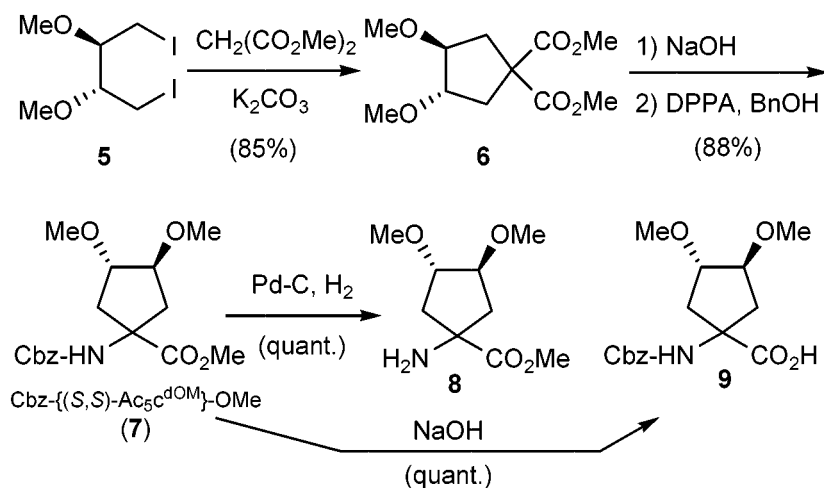


Fig. 9. Synthesis of Chiral Cyclic Amino Acid (*S,S*)-Ac<sub>5</sub>c<sup>dOM</sup>

ノ酸の2つの側鎖が同一であるため $\alpha$ 位の炭素は不斉中心ではない。(3) 不斉中心は環状側鎖上にある：不斉炭素は $\alpha$ 位から離れた位置の環状側鎖の $\gamma$ 位にある。(4) ペプチド合成が容易になる：一般にジ置換アミノ酸では立体障害のためにペプチド合成が困難になることが多いが、アキラルな環状ジ置換アミノ酸ではペプチド合成が容易であるという報告があり、このキラル環状ジ置換アミノ酸のカップリング反応も容易に進行することが予想された。(5) 親水性の増大：ジ置換アミノ酸は普通のアミノ酸に比較して脂溶性が高く、その含有ペプチドは水溶液に溶けにくくなる。しかし、今回設計した環状ジ置換アミノ酸は、環状側鎖上にエーテル官能基を有するため親水性の増大が予想された。

キラルな環状ジ置換アミノ酸 (*S,S*)-Ac<sub>5</sub>c<sup>dOM</sup> の合成は、キラルプール法によりL-(+)-酒石酸ジメチルを出発原料として行った。すなわち、古賀ら<sup>37)</sup>の方法に準じて数行程にてジヨード体(5)を合成し、これを用いてマロン酸ジメチルをビスアルキル化して5員環を構築し6とした。その後、モノエステルの加水分解反応、ジフェニルリン酸アジドを用いた Curtius 転位反応により、<sup>38)</sup> C末とN末が保護されたジ置換アミノ酸 (*S,S*)-Ac<sub>5</sub>c<sup>dOM</sup> を5から約75%の収率で効率よく合成した。C末のエステルはアルカリ加水分解により、またN末のCbz保護基はPd-Cを用いた接触還元により問題なく除去して、それぞれのアミノ酸(8, 9)をペプチド合成に利用した。

ホモペプチド Cbz-{{(*S,S*)-Ac<sub>5</sub>c<sup>dOM</sup>}}<sub>n</sub>-OMe ( $n=2,$

4, 6, 8, 10)の合成は、液相法によりN末を脱保護したペプチドとC末を脱保護したジペプチド Cbz-{{(*S,S*)-Ac<sub>5</sub>c<sup>dOM</sup>}}<sub>2</sub>-OH をカップリング剤 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC) を用いて縮合し行った。合成したオクタペプチドとデカペプチドは、側鎖の5員環上のエーテル官能基のために予想したように水溶性(>5 mg/ml)であった (Fig. 10)。

#### 8. キラルな環状ジ置換アミノ酸よりなるペプチドの2次構造

環状ジ置換アミノ酸 (*S,S*)-Ac<sub>5</sub>c<sup>dOM</sup> ホモペプチドの CDCl<sub>3</sub> 溶液中での2次構造解析を IR スペクトルにより行った。IR スペクトルでは、フリーな N-H に基づく弱い吸収が 3420—3440 cm<sup>-1</sup> にみられ、また分子内水素結合したペプチド N-H の強い吸収が 3320—3370 cm<sup>-1</sup> にみられた。ペプチド主鎖を長くするとこの吸収は高波数 3370 cm<sup>-1</sup> から低波数 3320 cm<sup>-1</sup> 側への移動がみられた。これらの IR スペクトルは、ヘリックス構造を取るアキラルな環状ジ置換アミノ酸からのホモペプチドのものに類似しており、プラナー構造を取る Deg あるいは (*S*)-Beg からなるホモペプチドのものとは全く異なったものであった。

ホモペプチドの CDCl<sub>3</sub> 溶液中での <sup>1</sup>H NMR スペクトルを測定した。ヘキサペプチドの Rotating Frame Nuclear Overhauser and Exchange Spectroscopy (ROESY) <sup>1</sup>H NMR スペクトルでは、N末の N-H から C末の N-H まで連続した相関が観測されたことからヘリックス構造の形成が示唆され



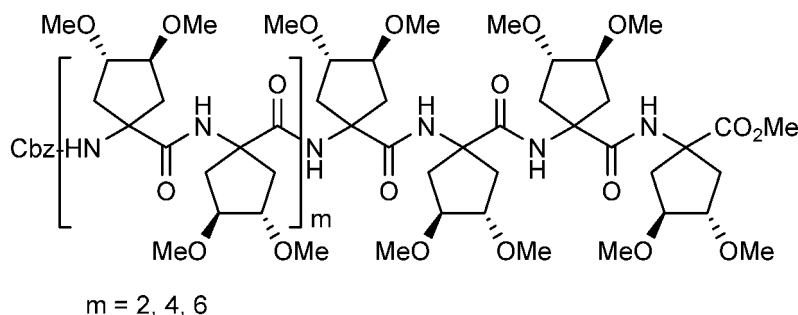


Fig. 10. Homoheptapeptides Cbz- $\{(S,S)\text{-Ac}_5\text{c}^{\text{dOM}}\}_m\text{-OMe}$  ( $n=6, 8, 10$ )

た。また、水素結合の受容体となる安定ラジカル TEMPO あるいは DMSO の添加実験では、N 末から 2 つの N-H プロトンが添加剤の影響を強く受け、このことはこの N 末から 2 つの N-H は分子内水素結合に関与していなく、溶液中でのヘリックス構造の形成を示唆した。

ホモペプチドの CD スペクトルを TFE 溶液中にて測定したところ、ヘキサペプチド、オクタペプチド、デカペプチドのすべてで 222 nm と 208 nm に正の極大が観測された。このことは、これらのホモペプチドは左巻き ( $M$ ) のヘリックスを溶液中で形成していることを示唆している。また、2 つの極大の比率 [ $R = \theta_{222}/\theta_{208}$ ] から、ヘキサペプチドは  $3_{10}$ -ヘリックスを形成し、オクタペプチド、デカペプチドは  $\alpha$ -ヘリックスを形成していることが示唆された。さらにオクタペプチド、デカペプチドは水溶性であり、水中にて CD スペクトルを測定したところ極大の強度が増大したことから、これらのホモペプチドは TFE 中よりも水中でより  $\alpha$ -ヘリックス性が増すことが分かった。

X 線結晶解析によるヘキサペプチドとオクタペプチドの結晶状態での 2 次構造解析に成功した。ヘキサペプチドは X 線結晶解析では、結晶学的に独立した分子  $A, B, C$  が存在し、すべての分子は左巻き ( $M$ ) の  $3_{10}$ -ヘリックスを取っていた。分子  $A, B, C$  は側鎖置換基の配座が異なっており、各々には 4 つの分子内水素結合が存在した。また、それぞれの分子間には 2 つの分子間水素結合が存在し、分子は head-to-tail 型で  $\cdots A \cdots B \cdots C \cdots$  のヘリックスの鎖を形成していた。

オクタペプチドでは 1 つの左巻き ( $M$ ) のヘリックスが存在した。興味深いことにオクタペプチドのヘリックスは、ヘキサペプチドでみられた  $3_{10}$ -ヘ

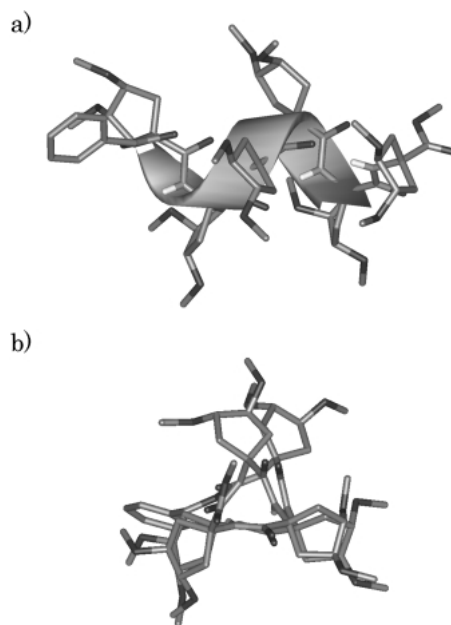


Fig. 11. Illustrative Structure of Hexapeptide Cbz- $\{(S,S)\text{-Ac}_5\text{c}^{\text{dOM}}\}_6\text{-OMe}$  in the Crystal State (Molecule  $A$ )

a)  $3_{10}$ -helix as viewed perpendicularly to the helical axis, b) as viewed along the  $3_{10}$ -helical axis.

リックスではなく左巻きの  $\alpha$ -ヘリックスであった。 $\alpha$ -ヘリックスには 5 つの分子内水素結合 ( $i \leftarrow i+4$ ) が存在し、分子間では水分子を介した水素結合により head-to-tail 型で鎖を形成していた (Figs. 11, 12)。

分子力場計算を用いた配座解析では、ヘキサペプチドとオクタペプチドともに左巻きの  $\alpha$ -ヘリックスが最安定配座となった。ヘキサペプチドでみられた左巻きの  $3_{10}$ -ヘリックスはローカル配座 (+3.22 kcal/mol) として存在した。

以上、 $\alpha$ -アミノ酸の側鎖上の不斉中心のみにてそのペプチドのヘリックスの方向性を制御できることを示した。また、この環状置換アミノ酸 ( $S,S$ )- $\text{Ac}_5\text{c}^{\text{dOM}}$  からなるホモペプチドの左巻き ( $M$ ) ヘリックスは水中でも安定なものであった。さらに、ホ

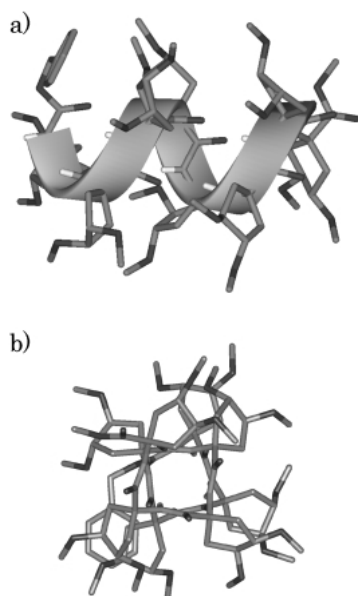


Fig. 12. Illustrative Structure of Octapeptide Cbz- $\{(S,S)\text{-Ac}_{5c}^{\text{dOM}}\}_8\text{-OMe}$  in the Crystal State

a)  $\alpha$ -helix as viewed perpendicularly to the  $\alpha$ -helical axis, b) as viewed along the  $\alpha$ -helical axis.

モペプチドの鎖長をヘキサマーからオクタマーへ長くすると、 $3_{10}$ -ヘリックスから $\alpha$ -ヘリックスへの転移が起きた。これらの結果は、もちろんイソロイシンとスレオニンには $\alpha$ 位の不斉中心が存在しその影響が大きい、側鎖上の不斉中心もそのペプチドの2次構造へ影響を与えることを実験的に示唆したものである。<sup>39)</sup>

### 9. キラルな双環式ジ置換アミノ酸の設計・合成とそのペプチド

前節にて、環状ジ置換アミノ酸の側鎖上の不斉中心は、そのホモペプチドのヘリックスの巻き方を制御できることを示した。しかし、側鎖上の不斉中心はどの程度の影響を2次構造へ与えているかは不明であり、不斉環境と2次構造の関係を調べるためには、各種のキラルな環状ジ置換アミノ酸の合成が必要と考えられた。そこで筆者は、アミノ酸あるいはペプチドの状態から各種の修飾が可能であるキラルな双環式ジ置換アミノ酸 ( $1R,6R$ )-8-aminobicyclo[4.3.0]non-3-ene-8-carboxylic acid  $\{(R,R)\text{-Ab}_{5,6=c}\}$  を設計した。この双環式ジ置換アミノ酸 ( $R,R$ )- $\text{Ab}_{5,6=c}$  はシクヘキセン構造を有するので、オレフィン部分を接触還元あるいは切断することにより各種のアミノ酸あるいはペプチドへの変換が可能と予想された。

双環式ジ置換アミノ酸 ( $R,R$ )- $\text{Ab}_{5,6=c}$  の合成は、Bernardi らの方法により合成した光学活性 ( $S,S$ )-シクロヘキセ-4-エン-1,2-ジカルボン酸 (**10**) から行った。<sup>40)</sup> すなわち、**10** のカルボン酸を還元、ヨウ素化し、ジヨード体 (**11**) としたのち、エチルイソシアノアセテートを **11** にてビスアルキル化し、<sup>41)</sup> N 末を Boc にて保護してアミノ酸 Boc- $\{(R,R)\text{-Ab}_{5,6=c}\}\text{-OEt}$  (**12**) を合成した。このアミノ酸の N 末の保護基、C 末のエステルは、それぞれ定量的に脱保護が可能でありペプチド合成に利用可能であった。また、アミノ酸のシクロヘキセン部分は、接触還元反応によりシクロヘキサンに変換可能であり (**13**)、さらにオレフィン部分をオゾン分解反応により開裂することにより各種の変換が可能であった。すなわち、オゾン分解後、還元反応により水酸基を有する環状ジ置換アミノ酸 (**14**) へ、酸化反応によりジカルボン酸を有する環状ジ置換アミノ酸 (**15**) へ変換可能であり、また還元的アミノ化反応により7員環と5員環の双環式ジ置換アミノ酸 (**16**) へ変換することができた (Fig. 13)。

ホモペプチド Boc- $\{(R,R)\text{-Ab}_{5,6=c}\}_n\text{-OEt}$  ( $n=3, 6, 9$ ) の合成は、液相法により N 末を脱保護したペプチドと C 末を脱保護したトリペプチド Boc- $\{(R,R)\text{-Ab}_{5,6=c}\}_3\text{-OH}$  をカップリング剤 *O*-benzotriazol-1-yl-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium hexafluorophosphate (HBTU) を用いて縮合して行った。合成したヘキサペプチド Boc- $\{(R,R)\text{-Ab}_{5,6=c}\}_6\text{-OEt}$  の6つのオレフィン、接触還元により1行程にて飽和型のヘキサペプチド Boc- $\{(R,R)\text{-Ab}_{5,6=c}\}_6\text{-OEt}$  へ変換可能であった (Fig. 14)。

### 10. キラルな双環式ジ置換アミノ酸よりなるペプチドの2次構造

ホモペプチド Boc- $\{(R,R)\text{-Ab}_{5,6=c}\}_n\text{-OEt}$  の  $\text{CDCl}_3$  溶液中での IR スペクトルでは、フリーな N-H に基づく弱い吸収が  $3420\text{--}3440\text{ cm}^{-1}$  に、分子内水素結合したペプチド N-H の強い吸収が  $3320\text{--}3370\text{ cm}^{-1}$  に観測された。後者の吸収は、トリペプチドでは  $3370\text{ cm}^{-1}$  に観測されたが、ペプチド鎖を伸長すると低波数  $3320\text{ cm}^{-1}$  側に移動し、さらにその相対強度が増大した。これらの IR スペクトルは、ヘリックス2次構造を取るアキラルなジ置換アミノ酸からのホモペプチドのものに類似したものであった。

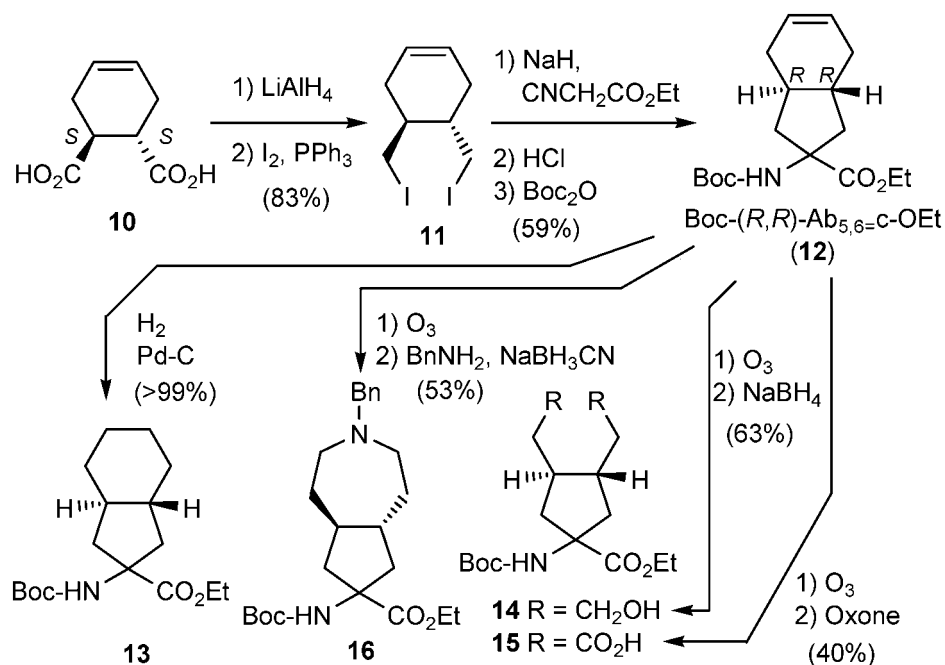


Fig. 13. Synthesis of Chiral Bicyclic Amino Acid (*R,R*)-Ab<sub>5,6=c</sub>, and Its Modification

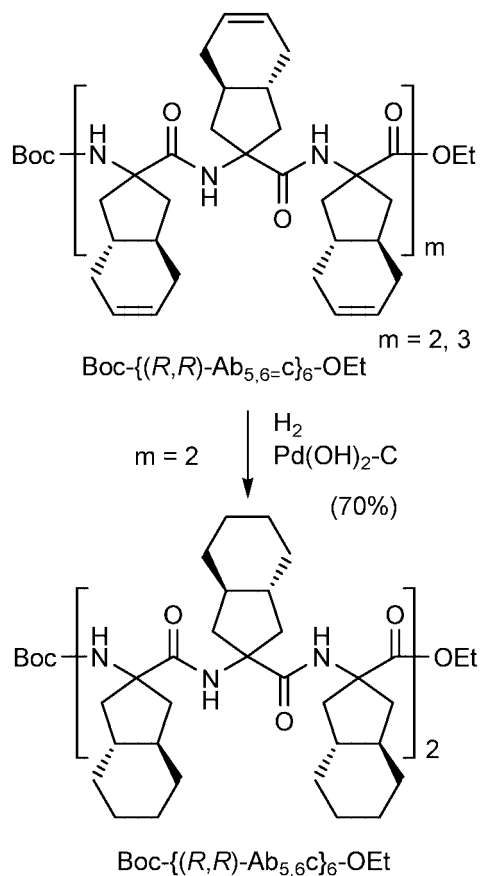


Fig. 14. Homo-peptides Boc-{(*R,R*)-Ab<sub>5,6=c</sub>}<sub>n</sub>-OEt (*n*=6, 9), and Its Modification

ホモペプチドの CDCl<sub>3</sub> 溶液中の <sup>1</sup>H NMR スペクトルは、ヘキサペプチド、ノナペプチドともに安定ラジカル TEMPO あるいは DMSO 添加により、N 末から 2 つの N-H プロトンが添加剤の影響を強く受けた。このことは、N 末から 2 つの N-H プロトンが溶媒和し易い、つまり分子内水素結合に関与していないことを意味し、<sub>3</sub>10-ヘリックス構造形成を示唆している。また、ヘキサペプチドの ROESY <sup>1</sup>H NMR スペクトルでは、N 末の N-H から C 末の N-H までの連続した相関が観測され、ノナペプチドでは、N 末の N-H (1) から N-H (5) までであるが部分的な相関が観測されたことからヘリックスの形成が示唆された。

ホモペプチドの TFE 中の CD スペクトルでは、特徴的な極大を示さなかった。これは、TFE 中で一定の 2 次構造を取らないか、あるいは右巻き (*P*) と左巻き (*M*) のヘリックスの両方が存在したためと考えられ、IR, <sup>1</sup>H NMR スペクトルから考えると両方の巻き方のヘリックスが存在したためと推測された。また、ヘキサペプチドのオレフィン部分を接触還元すると、還元する前と CD スペクトルがわずかではあるが変化したが、このことは 2 次構造も還元反応に伴い変化したことを示唆している。

ヘキサペプチドの X 線結晶構造解析では、結晶学的に独立した 4 つの分子 *A*, *B*, *C*, *D* が 2 分子の

エタノール分子とともに存在した。分子 *A* と *D* は右巻き (*P*) の  $3_{10}$ -ヘリックスであり、分子 *B* と *C* は左巻き (*M*) の  $3_{10}$ -ヘリックスであった。分子 *A* と *D*、分子 *B* と *C* それぞれはペプチド主鎖の構造はほぼ一致しているが、側鎖のシクロヘキセン部分とペプチドの C 末と N 末の配座に相違がみられた。2つの右巻きと左巻きのヘリックス 2 次構造は、ヘリックスの巻き方としてはエナンチオメリックな関係にあるが、アミノ酸自体に (*R*) の不斉中心があるためジアステレオメリックな関係になる。<sup>42)</sup> 結晶中では分子は、分子間水素結合により…*A*(*P*)…*B*(*M*)…*A*(*P*)…*B*(*M*)…と…*C*(*M*)…*D*(*P*)…*C*(*M*)…*D*(*P*)…の 2 本の鎖を形成していた (Fig. 15)。

分子力場計算 (AMBER\*) による配座解析では、右巻き (*P*) の  $3_{10}$ -ヘリックスが最安定配座となり、左巻き (*M*) の  $3_{10}$ -ヘリックスは、ローカル配座 (+1.60 kcal/mol) となった。結晶中でみられた右巻きと左巻きの  $3_{10}$ -ヘリックスそれぞれは、計算化学により得られた配座とよく一致していた。

以上、筆者は不斉中心を環の縮合部に有する双環式ジ置換アミノ酸 (*R,R*)-*Ab*<sub>5,6=c</sub> の設計・不斉合成とその修飾に成功した。この双環式ジ置換アミノ酸からなるホモペプチド、特にヘキサペプチドで

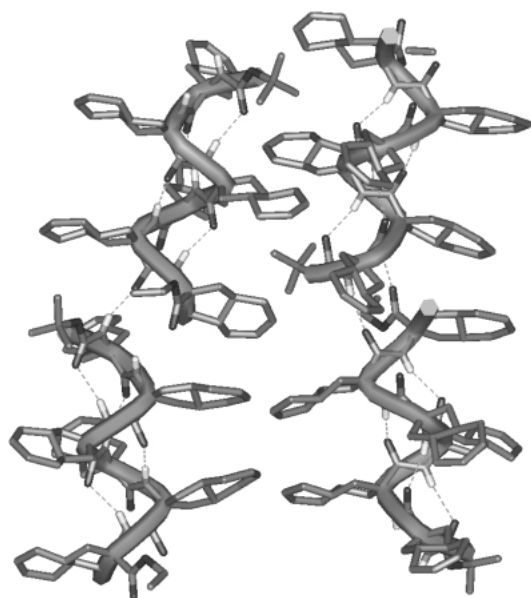


Fig. 15. Illustrative Structure of Hexapeptide Boc-((*R,R*)-*Ab*<sub>5,6=c</sub>)<sub>6</sub>-OEt as Viewed Perpendicularly to the  $\alpha$ -Helical Axis

Four crystallographically independent molecules.

は、側鎖上に 12 個もの不斉中心を有するにも係わらずジアステレオマーの関係にある右巻き (*P*) と左巻き (*M*) の  $3_{10}$ -ヘリックスが存在することを明らかとした。すなわち、ペプチドのヘリカル 2 次構造の巻き方の制御では、側鎖上の不斉中心の環境が重要であることを実験的に初めて示した。<sup>43)</sup>

## 11. 結 語

ペプチドの 2 次構造として、主鎖が完全に延びたプラナー構造は、従来はアキラルなアミノ酸からなるペプチドの場合のみにみられると考えられていたが、キラルな  $\alpha$ -エチル化ジ置換アミノ酸よりなるペプチドは優先してプラナー構造を取ることを発見した。また、 $\alpha$ 位炭素が不斉中心でなく側鎖上のみ不斉中心を有する 5 員環状ジ置換アミノ酸 (*S,S*)-*Ac*<sub>5c<sup>DOM</sup> と双環式ジ置換アミノ酸 (*R,R*)-*Ab*<sub>5,6=c</sub> を設計・合成し、それらのペプチドのヘリカル 2 次構造の巻き方と不斉中心の関係を調べた。その結果、アミノ酸側鎖上の不斉中心がペプチド主鎖の配座へ影響を与えていることを実験的に示した。</sub>

このような安定な 2 次構造を形成するジ置換アミノ酸からなるペプチドの利用として、Hammer らはジ置換アミノ酸のヘリカル 2 次構造の特徴を利用した抗菌性ペプチドの設計に成功し、<sup>44)</sup> またプラナー 2 次構造の特徴を利用したアミロイドペプチドの凝集阻害性ペプチドの設計に成功している。<sup>45)</sup> さらに、Toniolo らはジ置換アミノ酸のヘリカル 2 次構造の特徴を利用した、エポキシ反応、<sup>46)</sup> 酸化反応等<sup>47,48)</sup> の不斉反応への展開を報告している。<sup>49)</sup> 今後、筆者も得られた 2 次構造解析結果を基にして、合成したキラルなジ置換アミノ酸を用いた機能性ペプチド分子の利用研究へと展開したいと考えている。

最後に、本研究の一部は日本学術振興会科学研究費補助金、並びに武田科学振興財団「薬学系研究奨励」の助成により行われたものであり深謝致します。また、本研究は九州大学大学院薬学研究院末宗洋教授のご指導ご鞭撻の下で行われたものであり、大学院生として献身的に研究活動を行ってくれた大庭 誠博士、出水庸介博士、今若直人修士、玉井宏一修士、西村 晋修士、阿南浩輔修士、高野由紀子修士、吉田 礼修士、河辺直美修士に感謝致します。さらに、研究に多大なご協力をくださった共同研究者の栗原正明博士 (国立医薬品食品衛生研究所) 並びに土井光暢教授 (大阪薬科大学) に厚く御礼申

上げます。

## REFERENCES

- 1) Gellman S. H., *Acc. Chem. Res.*, **31**, 173–180 (1998).
- 2) Tanaka M., *J. Synth. Org. Chem., Jpn.*, **60**, 125–136 (2002).
- 3) Prasad B. V. V., Balaram P., *CRC Crit. Rev. Biochem.*, **16**, 307–348 (1984).
- 4) Karle I. L., Balaram P., *Biochemistry*, **29**, 6747–6756 (1990).
- 5) Heimgartner H., *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **30**, 238–264 (1991).
- 6) Wysong C. L., Yokum T. S., McLaughlin M. L., Hammer R. P., *Chemtech*, **27**, 26–33 (1997).
- 7) Benedetti E., *Biopolymers (Pept. Sci.)*, **40**, 3–44 (1996).
- 8) Kaul R., Balaram P., *Bioorg. Med. Chem.*, **7**, 105–117 (1999).
- 9) Toniolo C., Crisma M., Formaggio F., Peggion C., Broxterman Q. B., Kaptein B., *Biopolymers (Pept. Sci.)*, **76**, 162–176 (2004).
- 10) Crisma M., Formaggio F., Moretto A., Toniolo C., *Biopolymers (Pept. Sci.)*, **84**, 3–12 (2006).
- 11) Benedetti E., Barone V., Bavoso A., Di Blasio B., Lelj F., Pavone V., Pedone C., Bonora G. M., Toniolo C., Leplawy M. T., Kaczmarek K., Redlinski A., *Biopolymers*, **27**, 357–371 (1988).
- 12) Toniolo C., Bonora G. M., Bavoso A., Benedetti E., Di Blasio B., Pavone V., Pedone C., Barone V., Lelj F., Leplawy M. T., Kaczmarek K., Redlinski A., *Biopolymers*, **27**, 373–379 (1988).
- 13) Tanaka M., Imawaka N., Kurihara M., Suemune H., *Helv. Chim. Acta*, **82**, 494–510 (1999).
- 14) Solomons T. W. G., Fryhle C. B., “Organic Chemistry,” 8th ed., John Wiley & Sons, 2003, pp. 1196–1197.
- 15) Toniolo C., Crisma M., Formaggio F., Valle G., Cavicchioni G., Precigoux G., Aubry A., Kamphuis J., *Biopolymers*, **33**, 1061–1072 (1993).
- 16) Dehner A., Planker E., Gemmecker G., Broxterman Q. B., Bisson W., Formaggio F., Crisma M., Toniolo C., Kessler H., *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 6678–6686 (2001).
- 17) Formaggio F., Crisma M., Bonora G. M., Pantano M., Valle G., Toniolo C., Aubry A., Bayeul D., Kamphuis J., *Pept. Res.*, **8**, 6–15 (1995).
- 18) Yoder G., Polese A., Silva R. A. G. D., Formaggio F., Crisma M., Broxterman Q. B., Kamphuis J., Toniolo C., Keiderling T. A., *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 10278–10285 (1997).
- 19) Valle G., Pantano M., Formaggio F., Crisma M., Toniolo C., Precigoux G., Sulzenbacher G., Boesten W. H. J., Broxterman Q. B., Schoemaker H. E., Kamphuis J., *Biopolymers*, **33**, 1617–1625 (1993).
- 20) Jaun B., Tanaka M., Seiler P., Kuhnle F. N. M., Braun C., Seebach D., *Liebigs Ann./Recueil*, 1697–1710 (1997).
- 21) Doi M., Ishida T., Polese A., Formaggio F., Crisma M., Toniolo C., Broxterman Q. B., Kamphuis J., *Pept. Res.*, **8**, 294–297 (1995).
- 22) Formaggio F., Pantano M., Crisma M., Bonora G. M., Toniolo C., Kamphuis J., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 1097–1101 (1995).
- 23) Cativiela C., Diaz · de-Villegas M. D., *Tetrahedron: Asymmetry*, **9**, 3517–3599 (1998).
- 24) Cativiela C., Diaz · de-Villegas M. D., *Tetrahedron: Asymmetry*, **11**, 645–732 (2000).
- 25) Kawabata T., Fuji K., *J. Synth. Org. Chem., Jpn.*, **58**, 1095–1099 (2000).
- 26) Ooi T., Takeuchi M., Kameda M., Maruoka K., *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 5228–5229 (2000).
- 27) Sakai K., Suemune H., *Tetrahedron: Asymmetry*, **4**, 2109–2118 (1993).
- 28) Kato K., Sakai K., Suemune H., *Tetrahedron*, **50**, 3315–3326 (1994).
- 29) Georg G. I., Guan X. M., Kant J., *Tetrahedron Lett.*, **29**, 403–406 (1988).
- 30) Tanaka M., Oba M., Tamai K., Suemune H., *J. Org. Chem.*, **66**, 2667–2673 (2001).
- 31) Imawaka N., Tanaka M., Suemune H., *Helv. Chim. Acta*, **83**, 2823–2835 (2000).
- 32) Tanaka M., Oba M., Imawaka N., Tanaka Y., Kurihara M., Suemune H., *Helv. Chim. Acta*, **84**, 32–46 (2001).
- 33) Oba M., Tanaka M., Kurihara M., Suemune H., *Helv. Chim. Acta*, **85**, 3197–3218 (2002).

- 34) Tanaka M., Nishimura S., Oba M., Demizu Y., Kurihara M., Suemune H., *Chem. Eur. J.*, **9**, 3082–3090 (2003).
- 35) Widmer U., Lorenzi G. P., Pino P., *Biopolymers*, **18**, 239–256 (1979).
- 36) Toniolo C., Bonora G. M., Salardi S., *Int. J. Biol. Macromol.*, **3**, 377–383 (1981).
- 37) Takahashi I., Odashima K., Koga K., *Tetrahedron Lett.*, **25**, 973–976 (1984).
- 38) Shioiri T., Ninomiya K., Yamada S., *J. Am. Chem. Soc.*, **94**, 6203–6205 (1972).
- 39) Tanaka M., Demizu Y., Doi M., Kurihara M., Suemune H., *Angew. Chem., Int. Ed.*, **43**, 5360–5363 (2004).
- 40) Bernardi A., Arosio D., Dellavecchia D., Micheli F., *Tetrahedron: Asymmetry*, **10**, 3403–3407 (1999).
- 41) Kotha S., Sreenivasachary N., Brahmachary E., *Eur. J. Org. Chem.*, 787–792 (2001).
- 42) Valle G., Crisma M., Toniolo C., Beisswenger R., Rieker A., Jung G., *J. Am. Chem. Soc.*, **111**, 6828–6833 (1989).
- 43) Tanaka M., Anan K., Demizu Y., Kurihara M., Doi M., Suemune H., *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 11570–11571 (2005).
- 44) Yokum S. T., Gauthier T. J., Hammer R. P., McLaughlin M. L., *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 1167–1168 (1997).
- 45) Etienne M. A., Aucoin J. P., Fu Y., McCarley R. L., Hammer R. P., *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 3522–3523 (2006).
- 46) Berkessel A., Koch B., Toniolo C., Rainaldi M., Broxterman Q. B., Kaptein B., *Biopolymers (Pept. Sci.)*, **84**, 90–96 (2006).
- 47) Licini G., Bonchio M., Broxterman Q. B., Kaptein B., Moretto A., Toniolo C., Scrimin P., *Biopolymers (Pept. Sci.)*, **84**, 97–104 (2006).
- 48) Formaggio F., Bonchio M., Crisma M., Peggion C., Mezzato S., Polese A., Barazza A., Antonello S., Maran F., Broxterman Q. B., Kaptein B., Kamphuis J., Vitale R. M., Saviano M., Benedetti E., Toniolo C., *Chem. Eur. J.*, **8**, 84–93 (2002).
- 49) Toniolo C., Crisma M., Formaggio F., Peggion C., Broxterman Q., Kaptein B., *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.*, **51**, 121–136 (2005).