

---

# ホスゲンフリー法によるポリメチオニンオキシドの合成と たんぱく質および細胞の非接着表面材料への応用

## Phosgene-Free Synthesis of Polymethionine Oxides and their Application to Antifouling Polymer against Proteins and Cells

山田 修平 後藤 光昭 遠藤 剛  
Shuhei Yamada Mitsuki Goto Takeshi Endo

Phosgene-free and facile synthesis of polymethionine oxides, including polymethionine sulfoxide, and polymethionine sulfone, through polycondensation of the corresponding *N*-phenoxycarbonyl derivatives along with the elimination of phenol and CO<sub>2</sub> in the presence of amines as an initiator has been developed. These urethane derivatives were readily synthesized through *N*-carbamylation of onium salts of methionine with diphenyl carbonate, followed by the selective oxidation of sulfide into sulfoxide or sulfone by the treatment of hydrogen peroxide. The polycondensation took place under heating urethane derivatives using amines as an initiator to give the corresponding polypeptide. As a result of the detailed investigation on polycondensation behavior, we have found that this approach has the following advantages: (1) the successful incorporation of amine residue in the chain end, (2) the control of molecular weight by varying feed ratio of the urethane derivative to amines.

Based on results of our polycondensation method, synthesis of polystyrene bearing oligo (L-methionine sulfoxide) in the side chain and their possibility to be used as an antifouling polymer against proteins and cells were investigated. Their polystyrene was readily synthesized through polycondensation of urethane derivative of L-methionine sulfoxide in the presence of 4-vinylbenzylamine, followed by a radical polymerization with water-soluble azo-initiator. The inhibition of proteins (hRP-IgG) adsorption and F9 cells adhesion were observed on the polymer-coated PS dishes, because of a hydrophilic nature of L-methionine sulfoxide segment. The result of CCK-8 assay for the resulting polystyrene also appeared a low cytotoxicity against F9 cell. From these results, this novel polymer are expected to be utilized as a surface-coating material, leading to antifouling property against biological matters.

### 1 はじめに

近年、ポリペプチドの構造を組み込んだ高分子材料はその生体適合性や生分解性などの優れた特徴を示すこと、バイオセンサーやドラッグデリバリーシステム(DDS)および再生医療の分野で研究されている<sup>1)~8)</sup>。これまでポリペプチドの合成には $\alpha$ -アミノ酸 $N$ -カルボン酸無水物(NCA)が広く用いられてきた<sup>9),10)</sup>。しかしながら、NCAの合成には極めて毒性の強いホスゲンの使用が必要であること、さ

らにアミノ酸との反応で塩化水素が発生することから、工業スケールでのNCAの生産は環境および安全面で大きな課題となってきた<sup>11)~13)</sup>。これらの課題を解決するために、著者らはこれまでにジフェニルカーボナートを(DPC)をホスゲンの代替とした使用するNCAの合成法の開発を行ってきた<sup>14),15)</sup>。アミノ酸とDPCの $N$ -カルバモイル化によって得られるウレタン誘導体は加熱により、フェノールが脱離しながら環化反応が進行してNCAを与える事が明らかとなった。さらに、ウレタン誘導体をNCA合成の前駆体として利

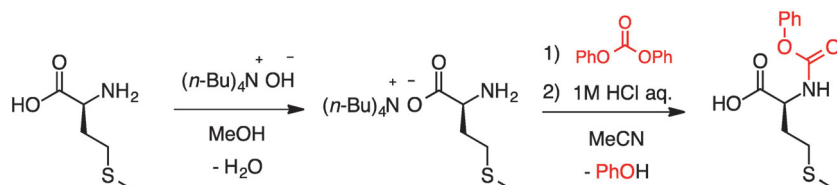
用するだけでなく、アミンの共存下の加熱する事により、系中でNCAの生成しながらフェノールと二酸化炭素の脱離を伴う重縮合が進行し、直接ポリペプチドを合成すること事も可能であった<sup>16)~19)</sup>。詳細な重合挙動の解析から、これらの重縮合では(1)添加したアミンがポリペプチドの末端に導入されること、(2)ウレタン誘導体とアミンの仕込み比を変化させることでポリペプチドの重合度を制御できること、(3)大気中で不安定なNCAを使用しないことから、工業スケールでポリペプチドが合成できるなどの特徴があった。本手法を用いてたんぱく質を構成する20種類のアミノ酸に適応したところ、いずれのアミノ酸の場合もウレタン誘導体の合成と重縮合によるポリペプチドの合成が可能である事がわかった。

本研究では、生体適合性の材料として期待されるポリメチオニンオキシドに着目し、それらのホスゲンフリー法による簡便な合成法の確立を目指した。さらに、これらを“Building block”として用いて、生体物質(たんぱく質や細胞)に対する非接着性を有する新規表面コート剤の合成を行った。

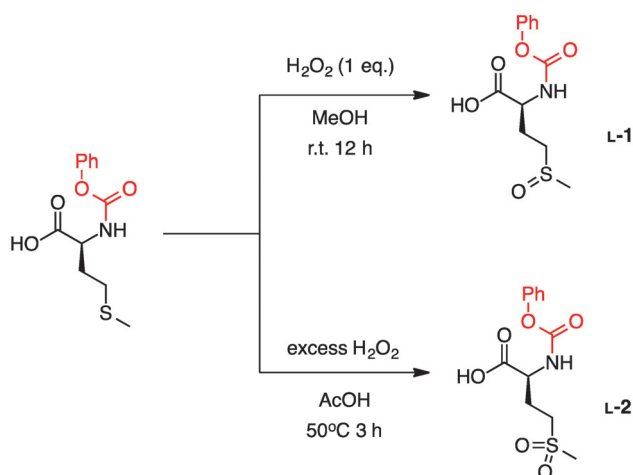
## 2 結果と考察

### 2.1 ウレタン誘導体の合成

L-メチオニンのウレタン誘導体は既報に従って合成し



Scheme 1 Synthetic route to urethane derivative of L-methionine.



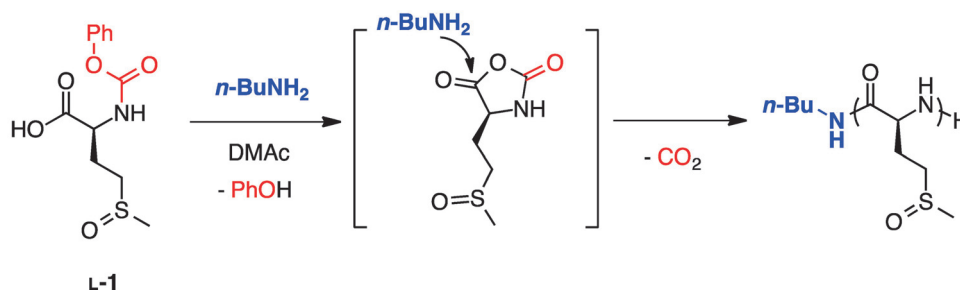
Scheme 2 Selective oxidation of sulfide into sulfoxide and sulfone using hydrogen peroxide.

た<sup>17)</sup>。合成ルートをScheme 1に示す。まず、L-メチオニンをメタノール中で水酸化テトラブチルアンモニウムを作用させる事により、第四級アンモニウム塩を調製した。次に、このアンモニウム塩をアセトニトリルに溶解させ、室温でDPCを作用させたところ、N-カルバモイル化が速やかに進行し数時間でDPCが完全に消失した。反応後、希塩酸で処理し精製することで対応するL-メチオニンのウレタン誘導体が合成できた。さらに、過酸化水素を用いて適切な条件で酸化反応させることにより、スルフィドを酸化してメチオニンスルホキドおよびメチオニンスルホンのウレタン誘導体はそれぞれ合成した(Scheme 2)。まず、メチオニンのウレタン誘導体をメタノール中で等モル量の過酸化水素を作用させることにより合成した。<sup>1</sup>H NMRスペクトルからスルホンに由来するシグナルを観測できないことから、選択的にスルホキドへ変換されることを確認した。また、酢酸溶媒中で過剰量の過酸化水素(5等量)を50℃で数時間反応させることでスルフィドからスルホンまで定量的に変換することができた。いずれの酸化反応もウレタン結合の分解などは観察されず、高い収率で目的の化合物を得ることができた(90%以上)。また得られたウレタン誘導体は大気中で安定であり、長期間の保存が可能であった。

### 2.2 ウレタン誘導体の重縮合によるポリペプチドの合成

上記のように得られたL-メチオニンオキシドのウレタン誘

導体(L-1)を*N,N*-ジメチルアセトアミド(DMAc, 0.5 mol/L)に溶解させ、*n*-ブチルアミン(*n*-BuNH<sub>2</sub>)の共存下、60 °Cで24時間加熱を行なった。反応後はわずかに沈殿物の生成が確認された。反応溶液の<sup>1</sup>H NMRスペクトルの解析から、ウレタン誘導体に由来するシグナルは完全に消失し、かわりにフェノールの生成が確認された。このことからウレタン誘導体の重縮合が進行し、ポリ-L-メチオニンスルホキシドが生成したことが示唆された(Scheme 3)。反応溶液をジエチルエーテルの中で再沈殿精製することにより、高い収率でポリペプチド回収できた。得られたポリペプチドは水やアルコール溶媒に高い溶解性を示した。サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)を用いて分子量を測定したところ、比較的単分散なピークが確認された。さらに、*n*-BuNH<sub>2</sub>の添加量を変化させたところ、



Scheme 3 Polycondensation of urethane derivative of L-methionine sulfoxide (L-1) in the presence of *n*-BuNH<sub>2</sub> as an initiator along with elimination of phenol and CO<sub>2</sub>.

Table 1 Synthesis of polymethionine oxides by polycondensation of its urethane derivative in the presence of *n*-BuNH<sub>2</sub> as an initiator.

entry	urethane derivative	feed ratio [M] <sub>0</sub> /[amine] <sub>0</sub>	reaction time (h)	conversion (%) <sup>a</sup>	yield (%) <sup>b</sup>	M <sub>n</sub> <sup>c</sup>	M <sub>w</sub> /M <sub>n</sub> <sup>c</sup>
1	L-1	5	5	>99	95	530	2.30
2	L-1	10	12	>99	92	1,300	1.51
3	L-1	25	20	>99	97	1,900	1.50
4	L-1	50	24	>99	96	3,200	1.89
5	DL-1	5	5	>99	90	510	1.75
6	DL-1	10	12	>99	91	1,210	1.22
7	DL-1	25	20	>99	97	2,000	1.17
8	DL-1	50	24	>99	91	3,000	1.23
9	L-2	5	5	>99	94	ND <sup>d</sup>	ND <sup>d</sup>
10	L-2	10	12	>99	96	ND <sup>d</sup>	ND <sup>d</sup>
11	DL-2	5	5	>99	95	1,400	1.41
12	DL-2	10	12	>99	93	2,500	1.36
13	DL-2	25	20	>99	98	7,300	1.31
14	DL-2	50	24	>99	92	15,000	1.14
15	DL-2	100	48	>99	95	28,000	1.21

<sup>a</sup> Calculated by <sup>1</sup>H NMR spectra, <sup>b</sup> Ether-insoluble parts, <sup>c</sup> Estimated by SEC, <sup>d</sup> ND = not determined because of poor solubility for eluents.

分子量を制御することが可能であった(Table 1)。同様の重合をDL体のウレタン誘導体(DL-1)で行ったところ、沈殿が生じることなく反応が均一系で進行した。この違いはL体のポリペプチドと比較して、DL体の方がポリマー鎖間の相互作用(水素結合)が弱いためDMAcに高い溶解性を示すためだと考えられる。また、重合過程で沈殿が起こらないため、分散度もL体比べて低くなる傾向が見られた。マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析計(MALDI-TOF mass)および<sup>1</sup>H NMRスペクトルを用いて、より詳細にポリマーの末端基構造を解析したところ、開始末端には添加した*n*-BuNH<sub>2</sub>由来の構造が導入されており、停止末端はアミノ基が存在することが明らかとなった。これらの結果は*n*-BuNH<sub>2</sub>が重合初期に開始剤として作用している事を示唆している。

L-メチオニンスルホキシドのウレタン誘導体(**L-2**)も同様の手法で重合を行った。L体を用いた場合は、得られてくるポリペプチドの溶解性が低いため、重合過程における沈殿のため分子量の制御が困難であった。一方でDL体(**DL-2**)を用いた場合では、反応は均一系で進行し、高い溶解性を示すポリペプチドが得られた。さらに、SEC解析の結果から単分散で且つ分子量制御されたポリペプチドの生成が確認された。また、本重合系において、*n*-ブチルアミンの代わりに末端にアミノ基を有するポリエチレング

リコール(PEG-NH<sub>2</sub>)を開始剤に用いることにより、ブロック共重合体の合成も検討した(Table 2)。溶解性の高いDL体のウレタン誘導体にPEG-NH<sub>2</sub>(*M*<sub>n</sub>=5300, *M*<sub>w</sub>/*M*<sub>n</sub>=1.04)の共存下で加熱した。SECから本来のPEG-NH<sub>2</sub>のピークが高分子量側へシフトしたことからブロックポリマーの合成が確認された(Figure 1)。さらに<sup>1</sup>H NMRからペプチドの重合度はアミンとウレタン誘導体の仕込み比によって任意の値に制御することが可能であった(Table 2)。

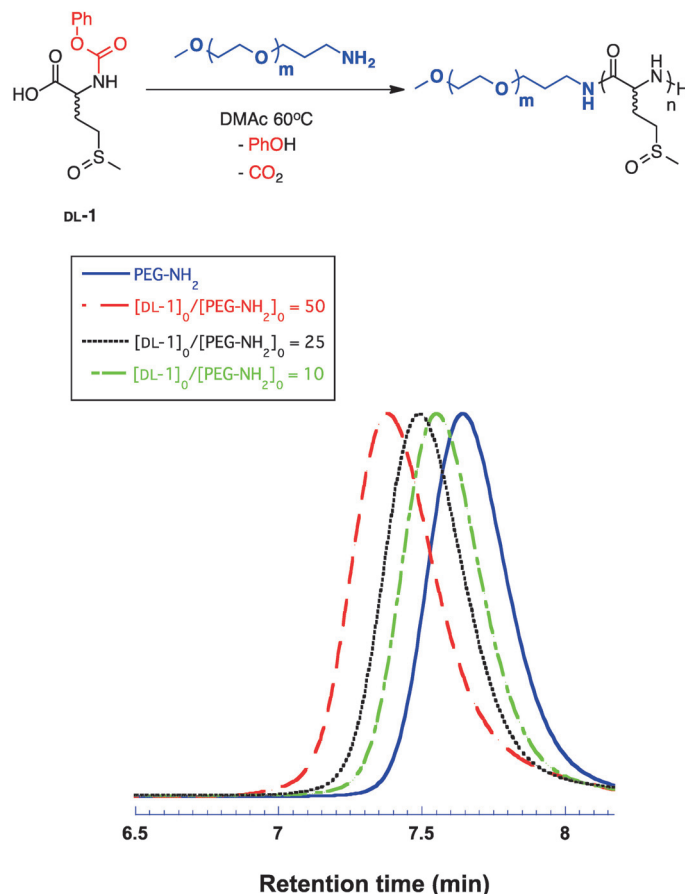


Figure 1 SEC traces of poly(DL-methionine sulfoxide) by polycondensation of **DL-1** in the presence of PEG-NH<sub>2</sub> as an initiator.

Table 2 Synthesis of polymethionine oxides by polycondensation of its urethane derivative (**DL-1** and **DL-2**) in the presence of PEG-NH<sub>2</sub> as an initiator.

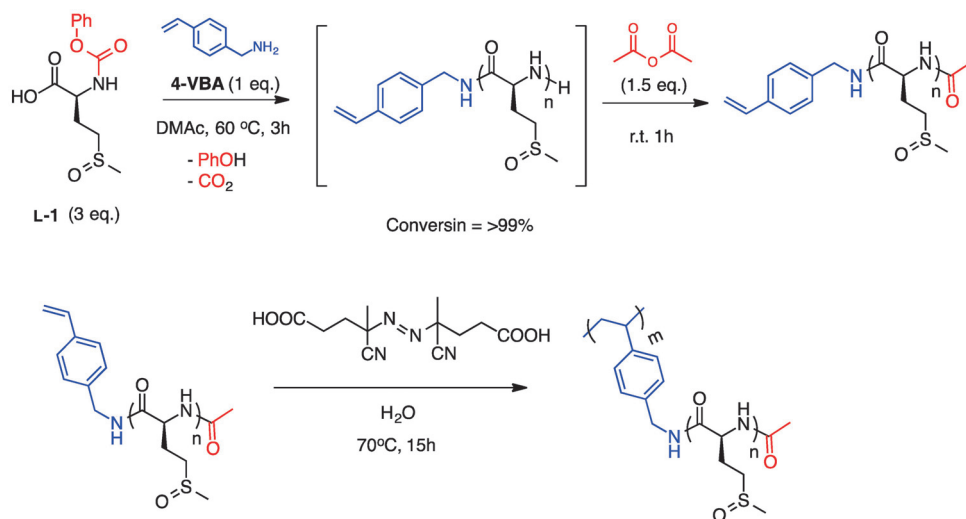
entry	urethane derivative	feed ratio [M] <sub>0</sub> /[amine] <sub>0</sub>	reaction time (h)	conversion (%) <sup>a</sup>	yield (%) <sup>b</sup>	<i>M</i> <sub>n</sub> <sup>c</sup>	<i>M</i> <sub>w</sub> / <i>M</i> <sub>n</sub> <sup>c</sup>
1	<b>DL-1</b>	10	10	>99	90	5,600	1.17
2	<b>DL-1</b>	25	20	>99	91	6,460	1.21
3	<b>DL-1</b>	50	24	>99	93	8,200	1.32
4	<b>DL-2</b>	10	10	>99	89	12,800	1.12
5	<b>DL-2</b>	25	15	>99	93	22,000	1.12
6	<b>DL-2</b>	50	24	>99	95	29,000	1.14

<sup>a</sup> Calculated by <sup>1</sup>H NMR spectra, <sup>b</sup> Ether-insoluble parts, <sup>c</sup> Estimated by SEC

### 2.3 オリゴ-L-メチオンニンスルホキシド-*graft*-ポリスチレンの合成とたんぱく質および細胞の非接着材料への応用

ポリメチオンニンスルホキシドは高い親水性と優れた生体適合性を有する事が知られている<sup>20)~22)</sup>。Pithara<sup>23)</sup>は、疎水性の薬剤の水中への可溶化剤として用いて、細胞内へのドラッグのデリバリーについて検討している。本研究ではこれらの特徴に着目し、生体物質の非接着性の表面コート材料としての応用を検討した。これらを調査するために、高分子を以下のように設計した。まず主鎖には疎水性の基盤への接着を促す為にポリスチレン構造を用いた。さ

らに、側鎖には生体適合性と親水性を付与するために、メチオンニンスルホキシドのオリゴペプチドをグラフトしたポリマーを設計した。合成ルートをScheme 4に示している。まず、重合性のスチリル基を末端に導入するために、4-ビニルベンジルアミン(4-VBA)とL-1 ( $[L-1]_0/[4-VBA]_0=3$ )を用いて重縮合を行なった。末端に残存するアミンはたんぱく質の吸着を引き起こす事が懸念されるため、反応後の溶液に過剰量の無水酢酸を作用させて、末端アミノ基の保護を行った。得られたスチレンモノマーはFigure 2にあるようにMALDI-TOF massの解析から、目的とする重合度3-5量体のオリゴペプチドの合成できていることを確認し



Scheme 4 Synthesis of polystyrene bearing oligo (L-methionine sulfoxide) in the side chain through polycondensation of urethane derivative (**L-1**) with 4-vinylbenzylamine as an initiator and subsequent radical polymerization with water-soluble azo-initiator.

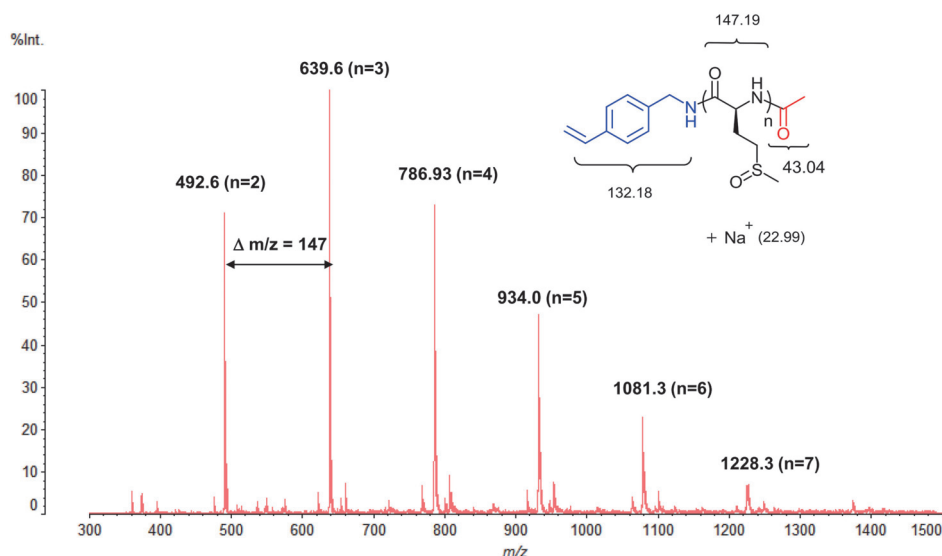


Figure 2 MALDI-TOF mass result of oligo (L-methionine sulfoxide) with styrene group at the terminal end.

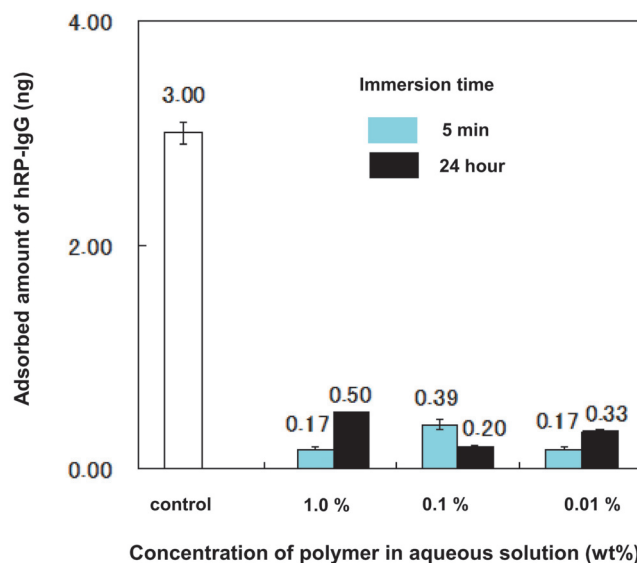


Figure 3 Adsorbed amount of hRP-IgG on the surface of PS dishes modified with various concentrations of a synthesized polymer aqueous solution (0.01–1.0 wt%).

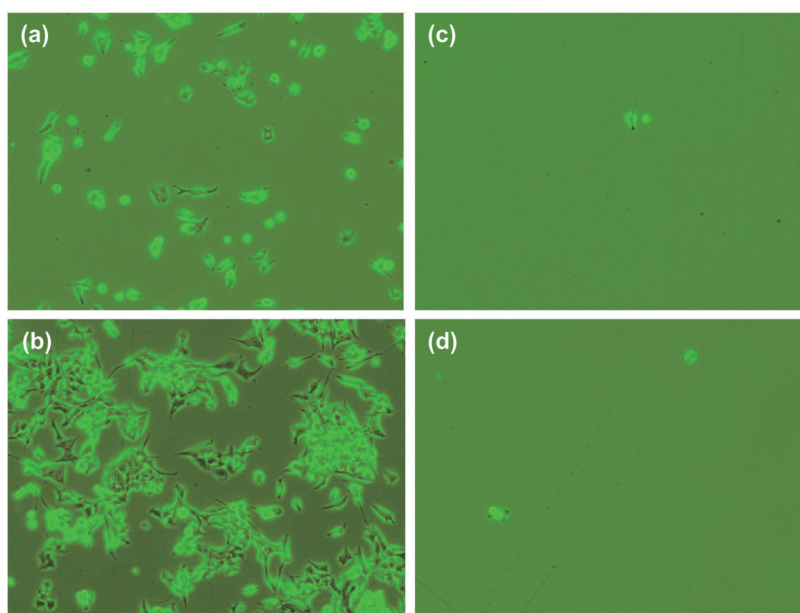


Figure 4 Morphology of F9 cells cultured on PS dishes as a control for 4 h (a) and 24 h (b), and on PS plate modified with a synthesized polymer for 4 h (c) and 24 h (d).

た ( $M_n=630$ ,  $M_w/M_n=1.56$ , SECから算出). このスチレンモノマーを水溶液中でラジカル重合することによって目的のポリスチレン ( $M_n=84,000$ ,  $M_w/M_n=1.30$ , SECから算出) を合成した. 任意の濃度で水に溶解させ, ポリスチレン (PS) シャーレ上にキャストした. ポリマーで被覆された PS シャーレの表面は, 水の接触角が  $89.9^\circ$  から  $50^\circ$  程度まで減少しており, 高い濡れ性を示した. 次に, このシャーレを用いてたんぱく質 (hRP-IgG) の吸着実験を行っ

た. 表面をポリマーでコートしていないシャーレ上では, hRP-IgG の吸着が見られたが, ポリマーで被覆されたシャーレでは, ポリマー濃度が  $0.01 \text{ wt} \%$  の水溶液を用いた場合であっても吸着の抑制効果が見られた (Figure 3). さらに, F9 細胞を用いて細胞接着試験を行ったところ, ポリマーで被覆された場合では細胞の接着が見られずに 24 時間培養を行ったあとも細胞の増殖がほとんど確認されなかった (Figure 4). 以上の結果から, 側鎖にグラフ



トされた親水性のL-メチオニンスルホキシドのオリゴペプチド鎖が生体物質の非接着部位として機能していることが示唆された。また、CCK-8アッセイからF9細胞に対する毒性を評価したところ、0.1 wt%のポリマー水溶液の場合でも細胞の毒性は見られなかった。このことから、合成したポリマーは高い生体適合性を有していることが確認された。

### 3 おわりに

メチオンを出発原料としてジフェニルカーボネート(DPC)との反応から合成したウレタン誘導体は、アミン類を開始剤として共存下で加熱による重縮合で、ホスゲンフリーで且つ簡便にポリメチオニンオキシドを生成することが分かった。本手法は従来のNCAの開環重と同様に分子量や末端基構造を容易に制御することが可能である。また、メチオニンスルホキシドのオリゴペプチドを側鎖に有するポリスチレンは、生体物質(たんぱく質や細胞)に対する非接着性を有する表面コート剤として有用であることが分かった。得られた結果は、ポリペプチドの特徴を活かした高分子材料の創製、特にドラッグデリバリーシステム、バイオセンサーおよび再生医療分野の材料への展開が期待できる。

### 謝辞

本研究を遂行するにあたり、たんぱく質(hRP-IgG)吸着実験および細胞毒性の評価においてご協力頂いた一久和弘氏、磯和宏氏(JSRライサイエンス株式会社)に感謝致します。

### 発表論文

- 1) Y. Yamada, A. Sudo, M. Goto, T. Endo: *Polym. Prepr. Jpn.* **63**, 483(2014)
- 2) Y. Yamada, M. Goto, T. Endo: *Polym. Prepr. Jpn.* **63**, 4126(2014)
- 3) Y. Yamada, K. Ikkyu, K. Iso, M. Goto, T. Endo: *Polym. Chem.* in press(2015)

### 引用文献

- 1) T. J. Deming: *Adv. Drug Delivery Rev.* **54**, 1145(2002).
- 2) Y. Bae, S. Fukushima, A. Harada, K. Kataoka: *Angew. Chem. Int. Ed.* **42**, 4640(2002).
- 3) T. Nakanishi, S. Fukushima, K. Okamoto, M. Suzuki, Y. Matsumura, M. Yokoyama, T. Okano,

Y. Sakurai, K. Kataoka: *J. Controlled Release* **74**, 295(2001).

- 4) L. Griffith, G. Naughton: *Science* **295**, 1009(2002).
- 5) S. Lowe, N. M. O'Brien-Simpson, L. A. Connal: *Polym. Chem.* **6**, 198(2015)
- 6) R. A. McMillan, V. P. Conticello: *Macromolecules* **33**, 4809(2000).
- 7) H. Akbulut, M. Yavuz, E. Guler, D. O. Demirkol, T. Endo, S. Yamada, S. Timur, Y. Yagci: *Polym. Chem.* **5**, 3929(2014).
- 8) M. Kesik, H. Akbulut, S. Soylemze, S. C. Cevher, G. Hızalan, Y. A. Udum, T. Endo, S. Yamada, A. Crpan, Y. Yagci, L. Toppare: *Polym. Chem.* **5**, 6295(2014).
- 9) T. J. Deming: *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.* **38**, 3011(2000).
- 10) H. R. Kricheldorf: *Angew. Chem. Int. Ed.* **45**, 5752(2006).
- 11) A. C. Farthing: *J. Chem. Soc.*, 3213(1950).
- 12) D. Coleman, A.C. Farthing: *J. Chem. Soc.*, 3218(1950).
- 13) R. Wilder, S. Mobashery: *J. Org. Chem.* **57**, 2755(1992).
- 14) K. Koga, A. Sudo, T. Endo: *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.* **48**, 4351(2010).
- 15) 遠藤剛, 須藤篤, 古賀孝一: JSRテクニカルレビュー **117**, 1(2010).
- 16) S. Yamada, K. Koga, T. Endo: *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.* **50**, 2527(2012).
- 17) S. Yamada, K. Koga, A. Sudo, M. Goto, T. Endo: *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.* **51**, 3726(2013).
- 18) S. Yamada, A. Sudo, M. Goto, T. Endo: *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.* **51**, 4565(2013).
- 19) S. Yamada, A. Sudo, M. Goto, T. Endo: *RSC Adv.* **4**, 29890(2014).
- 20) N. Minoura, Y. Fujikawa, T. Nakagawa: *J. Appl. Polym. Sci.* **22**, 1593(1978).
- 21) S. Aiba, N. Minoura, Y. Fujikawa: *J. Appl. Polym. Sci.* **27**, 1409(1982).
- 22) A. R. Rodriguez, J. R. Kramer, T. J. Deming: *Biomacromolecules* **14**, 3610(2013).
- 23) J. Pitha, L. Szenté, J. Greenberg: *J. Pharm. Sci.* **82**, 665(1983).