

明 細 書

発明の名称：ランチオニン誘導体

技術分野

[0001] 本発明は、CaSRアゴニスト活性を示す新規化合物、および、それを含有する食品組成物、コク味付与剤に関する。

背景技術

[0002] 近年、食生活の多様化等により味覚に対する消費者の要求が高まってきており、これに伴い、甘味、塩味、酸味、苦味、うま味で表される5基本味だけでは表すことのできない、厚み・ひろがり・持続性・まとまりなど上記基本味の周辺の味をも増強した味覚である「コク味」を付与することのできる優れたコク味付与剤へのニーズが高まっている。

一方、カルシウムセンシング受容体（Calcium Sensing Receptor：CaSR）は、カルシウム受容体とも呼ばれるが、当該受容体シグナルは種々の生体内機能を調節し、CaSRアゴニスト活性を有する物質はコク味付与剤として用いることができる（特許文献1、非特許文献1）。

また、古くからコク味付与活性を有する化合物としてグルタチオンが知られている。しかし、グルタチオンは含硫アミノ酸であるシステインを分子内に含むため、安定性や臭いなどの面で課題がある。

[0003] 従って、CaSRアゴニスト活性を有する多くのバリエーション化合物を探索し、より優れたコク味付与作用、特に先味型のコク味付与作用を有し、かつ安定性に優れ簡便かつ低コストで生産することが可能なコク味を付与するこのできる物質を見出し、該物質からなるコク味付与剤、及び該物質を他のCaSRアゴニスト活性を有する物質と併用してなる複合コク味付与剤を提供することが求められている。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：国際公開第2007/055393号パンフレット

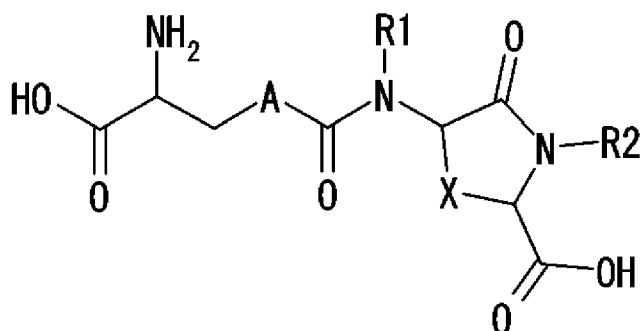
非特許文献

[0005] 非特許文献1: The Journal of Biological Chemistry (2010), 285 (2), 1016-22

発明の概要

- [0006] 本発明は、C a S Rアゴニスト活性を有する多くのバリエーション化合物を探索してより優れたコク味付与作用を有する物質を提供し、該物質からなるコク味付与剤、及び該物質を他のC a S Rアゴニスト活性を有する物質と併用してなる複合コク味付与剤を提供することを課題とする。更に、一定濃度の該物質を含有する食品組成物を提供することを課題とする。
- [0007] 本発明者は、種々の化合物を鋭意探索した結果、下記式 (I) の構造を有する新規化合物であるランチオニン誘導体（以下、本発明の化合物、または本発明のランチオニン誘導体ともいう。）が、高いC a S Rアゴニスト活性と極めて優れたコク味付与効果を有することを見出した。さらに、見出された本発明の化合物を添加することにより、コク味の増強した、好ましい食品組成物が得られることを見出し、本発明を完成させた。
- [0008] すなわち、本発明は、下記式 (I) の構造を有する化合物またはその可食性塩を提供する。

[化1]



(I)

（式中、R 1 及びR 2 は、それぞれ独立して、水素原子又は炭素数 1 ～ 3 の低級アルキル基を示し、

A は、メチレン基又はオキシ基（-O-）を示し、

Xは、炭素数1から5のアルキル基を示し、ただし、該アルキル基中の1つのメチレン基が、チオ基(—S—)、ジスルフィド基(—S—S—)、オキシ基(—O—)、イミノ基(—NH—)または炭素数1～3のアルキルイミノ基(—NRa—、ここでRaは炭素数1～3のアルキル基を示す)で置換されていても良く、また更に、該アルキル基は、1から6個の、炭素数1～3のアルキル基で置換されていても良い。)

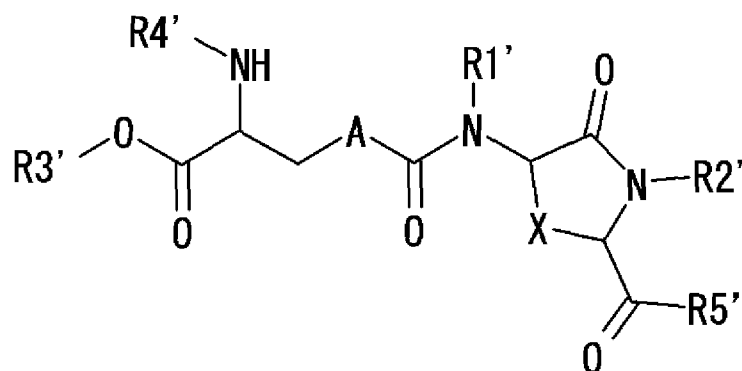
また、本発明は前記式(1)に記載の化合物またはその可食性塩を10ppb～99.9質量%含有する食品組成物をも提供する(以下、「本発明の食品組成物」という。)

また、本発明は前記式(1)に記載の化合物またはその可食性塩を有効成分として含有するコウ味付与剤をも提供する(以下、「本発明のコウ味付与剤」という。)

また、本発明は、(a)前記式(1)に記載の化合物またはその可食性塩に、(b) γ -Glu-X-Gly (Xはアミノ酸またはアミノ酸誘導体を表す)、 γ -Glu-Val-Y (Yはアミノ酸またはアミノ酸誘導体を表す)、 γ -Glu-Abu、 γ -Glu-Ala、 γ -Glu-Gly、 γ -Glu-Cys、 γ -Glu-Met、 γ -Glu-Thr、 γ -Glu-Val、 γ -Glu-Orn、Asp-Gly、Cys-Gly、Cys-Met、Glu-Cys、Gly-Cys、Leu-Asp、D-Cys、 γ -Glu-Met(O)、 γ -Glu- γ -Glu-Val、 γ -Glu-Val-NH₂、 γ -Glu-Val-OH、 γ -Glu-Ser、 γ -Glu-Tau、 γ -Glu-Cys(S-Me)(O)、 γ -Glu-Leu、 γ -Glu-Ile、 γ -Glu-Leuおよび γ -Glu-Cys(S-Me)からなる群より選択される1種又は2種以上のアミノ酸又はペプチド、を併用してなる複合コウ味付与剤を提供する。

また、本発明は前記式(1)に記載の化合物またはその可食性塩の製造中間体として有用な、下記式(1A)の構造を有する化合物、又はその化学的に許容しうる塩を提供する。

[0009] [化2]



(IA)

(式中、 $R1'$ 及び $R2'$ は、それぞれ独立して、水素原子、及び炭素数 1～3 のアルキル基を示し、

$R3'$ は、水素原子、炭素数 1 から 4 のアルキル基、ベンジル基、又は 9-フルオレニルメチル基を示し、

$R4'$ は、*t*-ブトキシカルボニル基、ベンジロキシカルボニル基、又は 9-フルオレニルメチロキシカルボニル基を示し、

$R5'$ は、水酸基、炭素数 1～4 のアルコキシ基、ベンジロキシ基、アミノ基 ($-NH_2$) 又は炭素数 1～3 のアルキルアミノ基を示し、

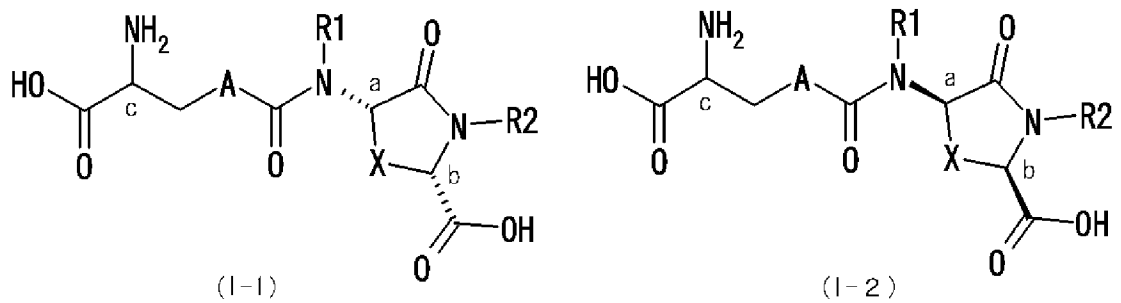
A は、メチレン基又はオキシ基を示し、

X は、炭素数 1 から 5 のアルキレン基を示し、ただし、該アルキレン基中 1 つのメチレン基が、チオ基、ジスルフィド基、オキシ基、イミノ基、または炭素数 1～3 のアルキルイミノ基で置換されていても良く、また、該アルキレン基は、1 から 6 個の、炭素数 1～3 のアルキル基で置換されていても良い。)

[0010] 本発明によれば、極めて優れたコク味付与作用を有し、かつ安定性に優れ簡便かつ低コストで生産することが可能なコク味付与剤、及び複合コク味付与剤を提供することができる。又、本発明によれば、優れたコク味付与作用を有する物質を一定濃度以上含有する、優れた食品組成物を提供することができる。

OC(=O)C(N)C(A)C(=O)N(R1)C(=O)N(R2)C(=O)C(X)C(=O)O

[化4]

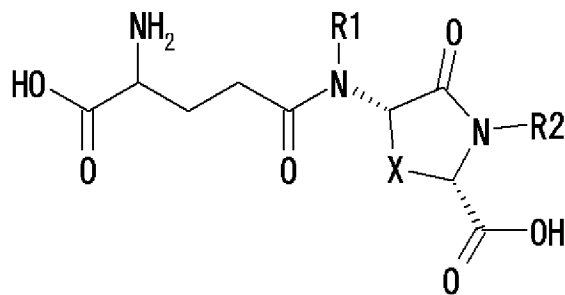


[0013] 本発明の一般式 (I) で表される化合物、又はその可食性塩としては、より具体的には以下で表される化合物、又はその可食性塩が好ましい。

式 (I) において、R1 及び R2 が水素原子であり、A がメチレン基であり、X がチオ基で置換されたトリメチレン基である化合物。

式 (I-1a) で表される化合物。

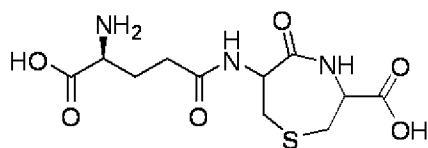
[化5]



(I-1a)

下記式 (IIa) で表される化合物。

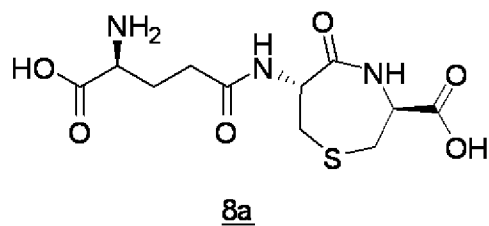
[化6]



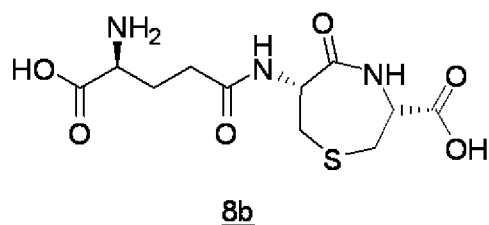
(IIa)

[0014] 以下の立体配置を有する、上記式 (I I a) で表される化合物。これら化合物 8a ~ 8d、いずれの化合物であっても使用できるが、特に 8b が好ましい。

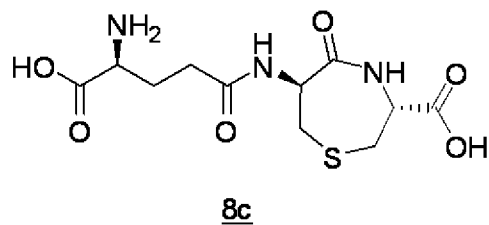
[化7]



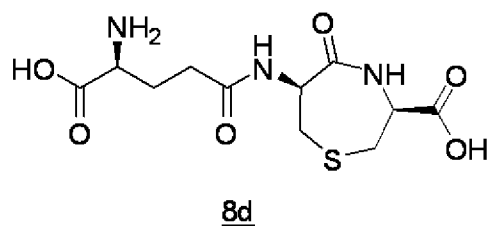
[化8]



[化9]



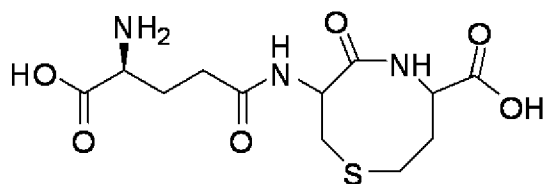
[化10]



[0015] 式（I）において、R₁及びR₂が水素原子であり、Aがメチレン基であり、Xがチオ基で置換されたテトラメチレン基、又は炭素数1～3のアルキル基で置換された、1つのメチレン基がチオ基で置換されたトリメチレン基である化合物。

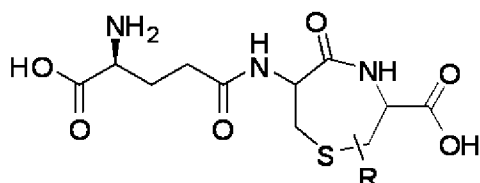
下記式（IIb）及び（IIc）で表される化合物。

[化11]



(I Ib)

[化12]



(I Ic)

(式中、Rは炭素数 1 ～ 3 のアルキル基を示す。)

[0016] 可食性塩としては、具体的に例えば、十分に酸性である本発明化合物については、アンモニウム塩、アルカリ金属塩（ナトリウム塩、カリウム塩などが例示され、これらが好ましい）、アルカリ土類金属塩（カルシウム塩、マグネシウム塩などが例示され、これらが好ましい）、有機塩基の塩としては、リジン塩、アルギニン塩などが挙げられる。さらに十分に塩基性である本発明化合物については、塩酸などの無機塩、または酢酸、クエン酸、乳酸、コハク酸、フマル酸、リンゴ酸などの有機酸塩などが挙げられる。

また、化学的に許容しうる塩としては、たとえば上述の可食性塩が挙げられる。

[0017] (製造方法)

以下に、本発明の化合物の代表的な製造方法を述べる。

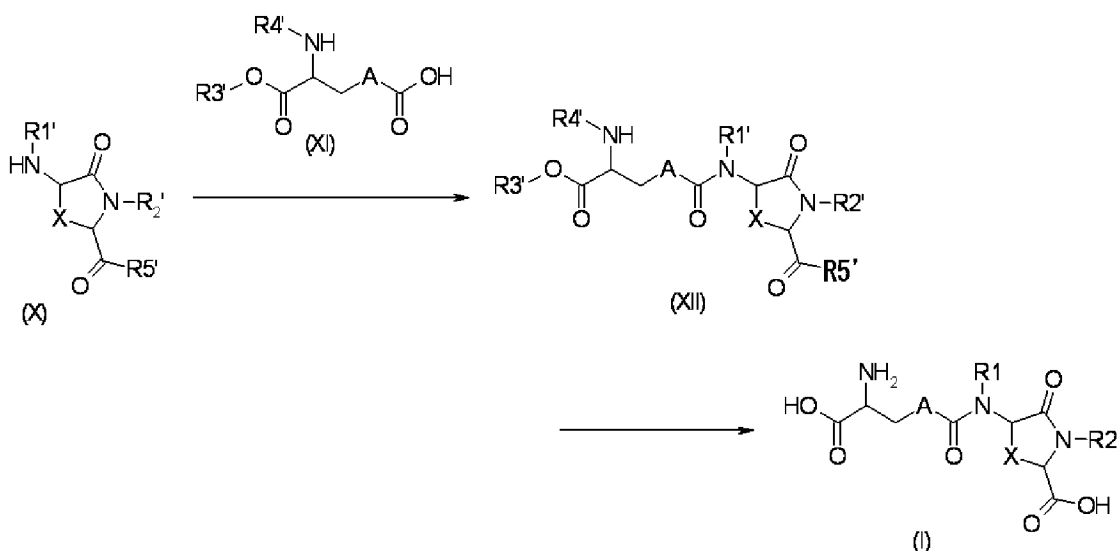
なお、以下の製造法において、官能基の種類によっては、当該官能基を原料ないし中間体の段階で適当な保護基、すなわち容易に当該官能基に転化可能な基に置き換えておくことが製造技術上効果的な場合がある。しかるのち、必要に応じて保護基を除去し、所望の化合物を得ることができる。このような官能基としては例えばアミノ基、水酸基、カルボキシル基等を挙げるこ

とができ、それらの保護基としては例えば、アミノ基の保護基として *t*-ブトキシカルボニル (Boc) やベンジルオキシカルボニル (Cbz)、9-フルオレニルメトキシカルボニル (Fmoc) など、カルボキシル基の保護基として *t*-ブチル (t-Bu) やベンジル (Bn または Bzl) など、Protective Groups in Organic Synthesis 第3版 (T. W. Green、P. G. M. Wuts 著、JOHN WILLY & SONS, INC. 発行) に記載の保護基等を挙げることができ、これらを反応条件に応じて適宜用いればよい。保護基の導入および脱保護は当該参考書記載の方法を適時適応できる。例えば下記製造法に記した Prot1, Prot2 の様に記した官能基が保護基として用いられている事を示すが、これに限定されるものではない。

本発明の化合物 (I) は、例えば下記に示す合成スキーム I に従い製造することが出来る。

[0018] 合成スキーム I

[化13]



(式中の置換基の定義は、前述の式 (I) 又は (I A) の定義と同じである。)

[0019] 化合物 (X) を塩基存在下、縮合剤を用いてグルタミン酸誘導体 (XI) と縮合させ、 γ -グルタミル化合物 (XII) とする。その後、化合物 (XII) のカルボキシル基およびアミノ基の保護基をすべて除去することにより、化合物 (I)

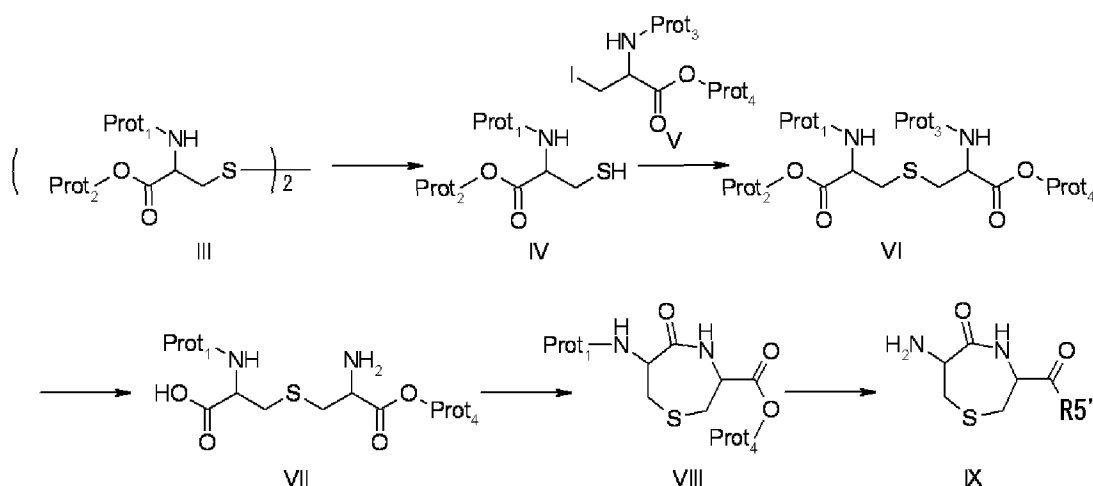
が得られる。

このようにして得られる一般式 (I) で示される化合物は、公知の分離手段、例えば減圧濃縮、溶媒抽出、晶析、クロマトグラフィーなどにより単離精製することができる。

[0020] また、出発原料 (X) の一例として、R1' および R2' が水素原子、Xが (-CH₂-S-CH₂-) である化合物は、例えば下記に示す合成スキーム I I に従い製造することが出来る。

合成スキーム I I

[化14]



(式中、Prot1からProt4は、それぞれ独立して適当な保護基を示す。)

[0021] 詳述すると、まず化合物(III)をトリフェニルホスフィンなどで還元してチオール (IV) を得る。次に化合物IVとハロゲン化アルキルを塩基存在下反応させ、チオエーテル化合物 (VI) とする。化合物 (VI) の一部保護基を除去後、塩基存在下、縮合剤を用いて環状化合物 (VIII) に導いた後、VIIIのアミノ基の保護基を除去し、適当な縮合剤を用いてグルタミン酸誘導体 (X) と縮合させる。

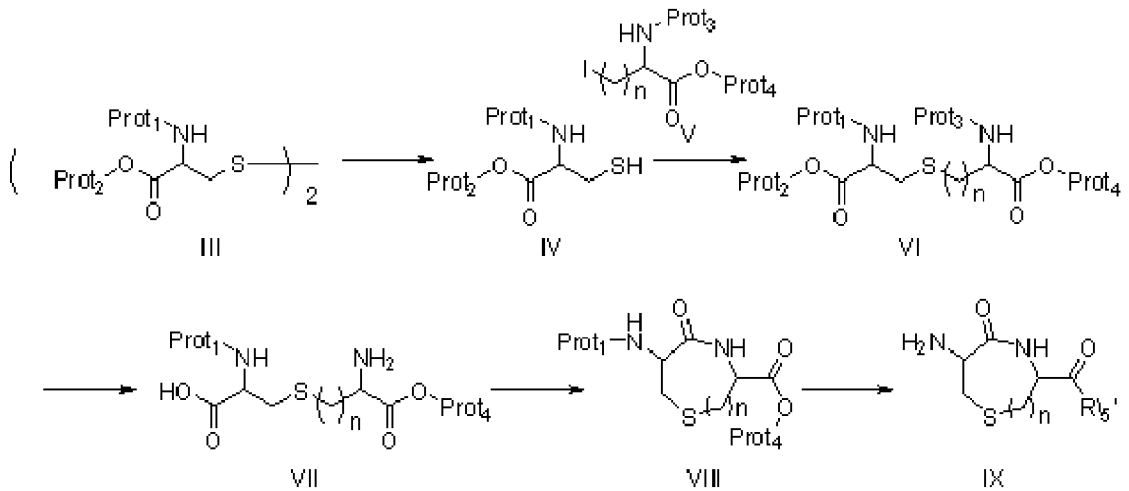
このようにして得られる一般式 (X) で示される化合物は、公知の分離手段、例えば減圧濃縮、溶媒抽出、晶析、クロマトグラフィーなどにより単離精製することができる。

[0022] Xがチオ基で置換されたテトラメチレン基である前記の出発物質 (X) は

、例えば、以下の合成スキーム I I I に従って、上記の化合物と同様にして合成することができる。

合成スキーム I I I

[化15]

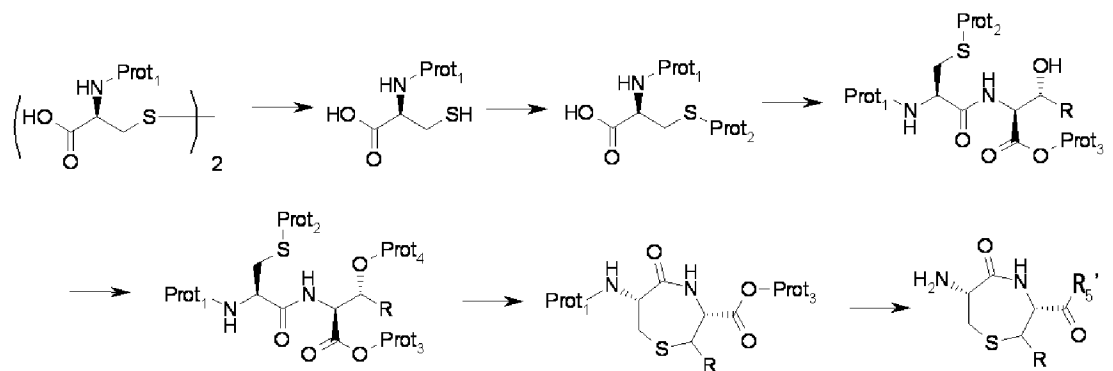


(式中の置換基の定義は、前述した通りであり、nは2である。)

[0023] Xが炭素数1～3のアルキル基で置換された、チオ基で置換されたトリメチレン基である前記の出発物質(X)は、以下の合成スキーム I V に従って、上記の化合物と同様にして合成することができる。

合成スキーム I V

[化16]

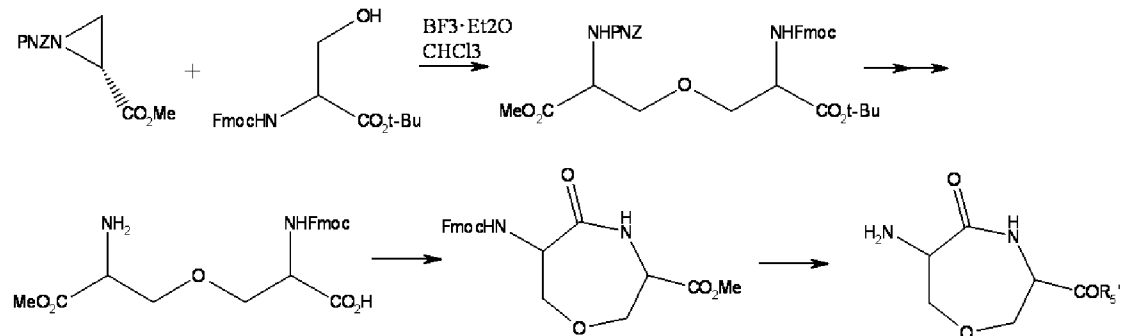


(式中の置換基の定義は、前述した通りである。)

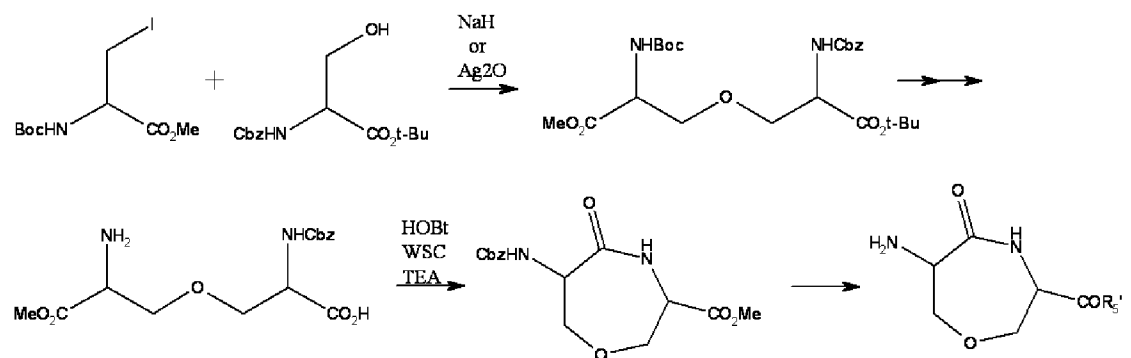
[0024] Xがオキシ基で置換されたトリメチレン基である前記の出発物質(X)は、例えば、以下の合成スキーム (V) に従って、合成することができる。

合成スキームⅤ

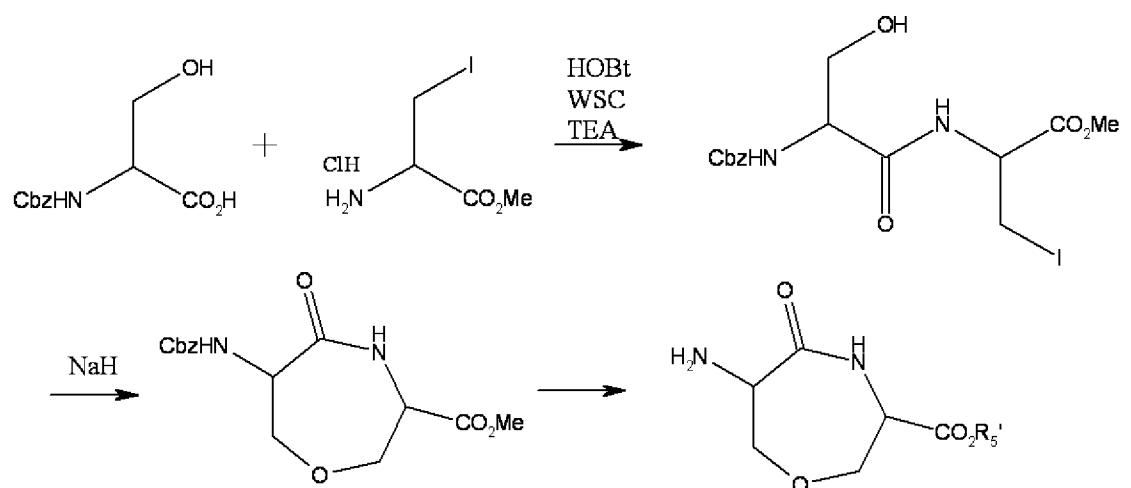
1) アジリジン誘導体を用いる環状化合物の合成法



[0025] 2) 分子間エーテル化による環状化合物の合成法



3) 分子内エーテル化による環状化合物の合成法



[0026] 本発明のランチオニン誘導体は、優れたコク味付与効果を有するため、コク味付与剤として用いることができる。本発明のランチオニン誘導体は、コク味を付与する食品組成物の重量に対して、 $10 \text{ ppb} \sim 99.9\%$ 、好ましくは $0.05 \text{ ppm} \sim 99.9\%$ 、より好ましくは $0.1 \text{ ppm} \sim 99.$

9%、含有するように添加して用いることができる。すなわち、本発明の別の態様は、ランチオニン誘導体を含有する食品組成物、好ましくは、ランチオニン誘導体を0.05ppm~99.9%含有する食品組成物に関する。

また、本発明のランチオニン誘導体は、グルタミン酸ナトリウム（MSG）などのアミノ酸類、イノシンーリン酸（IMP）などの核酸類、塩化ナトリウムなどの無機塩類、クエン酸などの有機酸類、種々の酵母エキスなどから選択される少なくとも1種の他の調味原料と組み合わせて用いることにより、他の調味原料を単独で用いる場合に比べて、よりコク味の増した、好ましい調味料を提供することができる。本発明のランチオニン誘導体を上記の他の調味原料と組み合わせて用いる場合の濃度は、当業者であれば官能評価等の検討を経て適宜設定することができるが、一例を挙げると、最終濃度に対して、本発明のランチオニン誘導体を0.1ppm~500ppm程度含有させればよい。

[0027] 本発明において「コク味」とは、甘味（sweet taste）、塩味（salty taste）、酸味（sour taste）、苦味（bitter taste）、うま味（umami）で表される5基本味（five basic tastes）では表すことのできない味を意味し、基本味だけでなく、厚み（thickness）・ひろがり（growth（mouthfulness））・持続性（continuity）・まとまり（harmony）など基本味の周辺の味（marginal tastes）をも増強した味をいう。ここで、「コク味付与」とは、甘味、塩味、酸味、苦味、うま味で表される5基本味の増強と、それに伴う厚み・ひろがり・まとまりなど基本味の周辺の味を付与することをいう。また、これを呈味増強作用と表現することもできる。したがって、本発明の化合物は、呈味増強剤（Flavor Enhancer）と表現することもできる。本発明の化合物は、甘味増強剤、塩味増強剤、酸味増強剤、苦味増強剤またはうま味増強剤として使用することができる。

また、味覚は喫食後の時間経過とともに変化するが、喫食直後から順に、先味（initial taste）、中味（middle taste）及び後味（after taste）と呼ぶ。これらは相対的な概念であるが、概して、先味、中味及び後味は、そ

れぞれ喫食後0から2秒まで、2秒から5秒まで、及び5秒以降に感じる呈味である。また、先味と中味を合わせて「先中味」といい、中味と後味を合わせて「中後味」という。また、0から5秒までを「先中味」といい、2秒以降約30秒前後までを「中後味」とする。3区分に分けた評価について、喫食者の評価への集中が困難なため、ふつう2区分に分けた評価を常用する。

コク味及び呈味パターンに対するCaSR活性を有する物質の効果は、ヒトによる味覚試験などの方法によって確認することができる。このようなヒトによる味覚官能試験としては例えば本願明細書の実施例で示される試験が挙げられるが、これらに限定されない。

[0028] 本明細書において、「CaSR」とは、カルシウムセンシング受容体 (Calcium Sensing Receptor) を意味し、7回膜貫通型受容体のクラスCに属するものであり、カルシウム受容体とも呼ばれる。本明細書において「CaSRアゴニスト」とは、上記CaSRに結合し、CaSRを活性化する物質を意味する。また、本明細書において、「CaSRを活性化する」とは、CaSRにリガンドが結合し、グアニンヌクレオチド結合タンパク質を活性化して、シグナルを伝達することを意味する。また、CaSRに結合し、CaSRを活性化する性質を「CaSRアゴニスト活性」という。

[0029] CaSRアゴニスト活性を有する化合物をスクリーニングする方法を具体的に示すが、これらのステップに限定されるものではない。

- 1) CaSR活性を測定するためのCaSR活性測定系に被検物質を添加して、CaSR活性を測定する。
- 2) 被検物質を添加したときのCaSR活性と、被検物質を添加しなかったときのCaSR活性を比較する。
- 3) 被検物質を添加したときにCaSRアゴニスト活性を示す被検物質を選択する。

[0030] CaSR活性の測定は、例えば、CaSRを発現する細胞を用いた測定系を用いて行うことができる。上記細胞は、CaSRを内在的に発現する細胞

であっても、外来的にC a S R遺伝子を導入した組み換え細胞であってもよい。上記C a S R活性測定系は、上記C a S Rを発現する細胞に、C a S Rに特異的な細胞外リガンド（活性化物質）を加えたときに、活性化物質とC a S Rとの結合（反応）を検出することができるか、又は、活性化物質とC a S Rとの結合（反応）に応答して細胞内に検出可能なシグナルを伝達するものであれば、特に制限なく用いることができる。被検物質との反応によりC a S R活性が検出された場合、当該被検物質はC a S R刺激活性を有すると判定される。

[0031] 上記C a S Rとしては、GenBank Accession No. NM_000388で登録されているヒトC a S R遺伝子によってコードされるヒトC a S Rが好ましく例示できる。尚、C a S Rは、上記配列の遺伝子によってコードされるタンパク質に制限されず、C a S R機能を有するタンパク質をコードする限りにおいて、上記配列と60%以上、好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上の相同性を有する遺伝子によってコードされるタンパク質であってもよい。なお、C a S R機能はこれらの遺伝子を細胞に発現させ、カルシウム添加時の電流の変化や細胞内カルシウムイオン濃度の変化を測定することによって調べることができる。

上記C a S Rは、その由来は特に制限されず、上記ヒトのC a S Rのみならず、マウス、ラット、イヌなどを含むあらゆる動物由来のC a S Rが挙げられる。

[0032] 上述の如く、C a S R活性は、C a S R又はその断片を発現した生きた細胞、C a S R又はその断片を発現した細胞膜、C a S R又はその断片のタンパク質を含むインビトロの系などを利用して確認することができる。

以下に生きた細胞を用いた一例を示すが、これに限定されるものではない。

C a S Rは、アフリカツメガエル卵母細胞やハムスター卵巢細胞やヒト胎児腎臓細胞等の培養細胞に発現させる。これは外来遺伝子を保持するプラスミドにC a S R遺伝子をクリーニングしたものを、プラスミドの状態もしくは

はそれを鋳型にした cRNA を導入することで可能となる。反応の検出には電気生理学的手法や細胞内カルシウム上昇の蛍光指示試薬を用いることができる。

CaSR の発現は、初めにカルシウムもしくは特異的活性化剤による応答で確認する。5 mM 程度の濃度のカルシウムに対して、細胞内電流が観察された卵母細胞もしくは蛍光指示試薬の蛍光が観察された培養細胞を使用する。カルシウムの濃度を変えて濃度依存性を測定する。次に、被検物質を $1 \mu\text{M} \sim 1 \text{mM}$ 程度に調製し、卵母細胞もしくは培養細胞に添加し、上記被検物質存在下での CaSR 活性を測定することで、上記被検物質の CaSR アゴニスト活性を測定する。

又、より具体的には、CaSR アゴニスト活性試験としては例えば本願明細書の試験例で示される試験が挙げられるが、これらに限定されない。

[0033] 本発明の複合コク味付与剤において本発明のランチオニン誘導体と併用されるアミノ酸又はペプチドは、 $\gamma\text{-Glu-X-Gly}$ (X はアミノ酸又はアミノ酸誘導体を表す)、 $\gamma\text{-Glu-Val-Y}$ (Y はアミノ酸又はアミノ酸誘導体を表す)、 $\gamma\text{-Glu-Abu}$ 、 $\gamma\text{-Glu-Ala}$ 、 $\gamma\text{-Glu-Gly}$ 、 $\gamma\text{-Glu-Cys}$ 、 $\gamma\text{-Glu-Met}$ 、 $\gamma\text{-Glu-Thr}$ 、 $\gamma\text{-Glu-Val}$ 、 $\gamma\text{-Glu-Orn}$ 、 Asp-Gly 、 Cys-Gly 、 Cys-Met 、 Glu-Cys 、 Gly-Cys 、 Leu-Asp 、 D-Cys 、 $\gamma\text{-Glu-Met (O)}$ 、 $\gamma\text{-Glu-}\gamma\text{-Glu-Val}$ 、 $\gamma\text{-Glu-Val-NH}_2$ 、 $\gamma\text{-Glu-Val-ol}$ 、 $\gamma\text{-Glu-Ser}$ 、 $\gamma\text{-Glu-Tau}$ 、 $\gamma\text{-Glu-Cys (S-Me) (O)}$ 、 $\gamma\text{-Glu-Leu}$ 、 $\gamma\text{-Glu-Ile}$ 、 $\gamma\text{-Glu-t-Leu}$ および $\gamma\text{-Glu-Cys (S-Me)}$ からなる群より選択される 1 種又は 2 種以上のアミノ酸又はペプチドであるが、ここで、アミノ酸とは、 Gly 、 Ala 、 Val 、 Leu 、 Ile 、 Ser 、 Thr 、 Cys 、 Met 、 Asn 、 Gln 、 Pro 、 Hyp 、 t-Leu 等の中性アミノ酸、 Asp 、 Glu 等の酸性アミノ酸、 Lys 、 Arg 、 His 等の塩基性アミノ酸、 Phe 、 Ty

r、Trp等の芳香族アミノ酸や、ホモセリン、シトルリン、オルニチン、 α -アミノ酪酸、ノルバリン、ノルロイシン、タウリン等も含まれる。また、tert-ロイシン、シクロロイシン、 α -アミノイソブチル酸、レーペニシラミン、アロスレオニン、アロイソロイシン等の非天然（非タンパク質構成）アミノ酸であってもよい。尚、ペプチド γ -Glu-X-Glyにおいては、Xは上記のようなアミノ酸又はその誘導体のいずれでもよいが、Cys以外のアミノ酸又はその誘導体が好ましい。

[0034] 本明細書において、アミノ酸残基の略号は以下のアミノ酸を意味する。

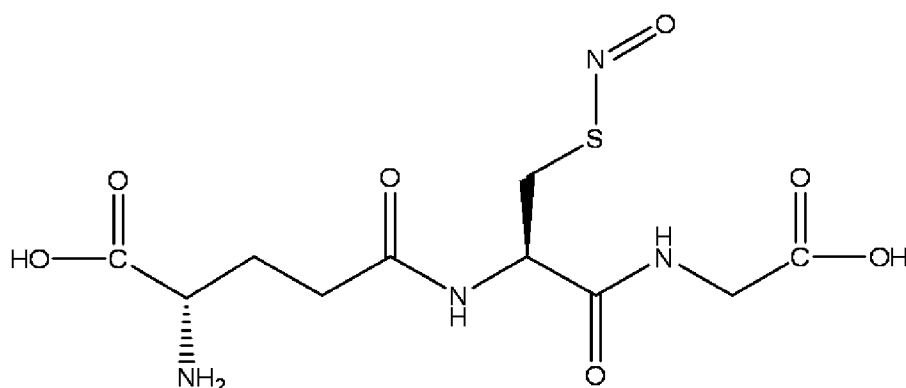
- (1) Gly : グリシン
- (2) Ala : アラニン
- (3) Val : バリン
- (4) Leu : ロイシン
- (5) Ile : イソロイシン
- (6) Met : メチオニン
- (7) Phe : フェニルアラニン
- (8) Tyr : チロシン
- (9) Trp : トリプトファン
- (10) His : ヒスチジン
- (11) Lys : リジン
- (12) Arg : アルギニン
- (13) Ser : セリン
- (14) Thr : スレオニン
- (15) Asp : アスパラギン酸
- (16) Glu : グルタミン酸
- (17) Asn : アルパラギン
- (18) Gln : グルタミン
- (19) Cys : システイン
- (20) Pro : プロリン

- (21) O r n : オルニチン
- (22) S a r : サルコシン
- (23) C i t : シトルリン
- (24) N - V a l (又は、N v a) : ノルバリン (2-アミノ吉草酸)
- (25) N - L e u (又は、N l e) : ノルロイシン
- (26) A b u : α -アミノ酪酸
- (27) T a u : タウリン
- (28) H y p : ヒドロキシプロリン
- (29) t - L e u : t e r t - ロイシン
- (30) C l e : シクロロイシン
- (31) A i b : α -アミノイソブチル酸 (α -aminoisobutyric acid、2-メチルアラニン)
- (32) P e n : L-ペニシラミン (penicillamine)
- (33) a l l o - T h r : アロスレオニン
- (34) a l l o - I l e : アロイソロイシン

[0035] また、アミノ酸誘導体とは、上記アミノ酸の各種誘導体であって、例えば、特殊アミノ酸や非天然アミノ酸、アミノアルコール、或いは末端カルボニル基やアミノ基、システインのチオール基等のアミノ酸側鎖が各種置換基により置換したものが挙げられる。置換基としては、アルキル基、アシル基、水酸基、アミノ基、アルキルアミノ基、ニトロ基、スルホニル基や各種保護基等が挙げられ、例えば、A r g (NO₂) : N- γ -ニトロアルギニン、C y s (SNO) : S-ニトロシステイン、C y s (S-Me) : S-メチルシステイン、C y s (S-allyl) : S-アリルシステイン、V a l -NH₂ : バリンアミド、V a l -o l : バリノール (2-アミノ-3-メチル-1-ブタノール) 等が含まれる。尚、本明細書において、 γ -G l u -C y s (SNO) -G l y は下記の構造式を有するものであり、上記 γ -G l u -M e t (O) および γ -G l u -C y s (S-Me) (O) 式中の (O) はスルホキシド構造であることを意味する。 γ -G l u の (γ) とは、グルタミ

ン酸の γ 位のカルボキシル基を介して他のアミノ酸が結合していることを意味する。

[化17]



S-ニトロシグルタチオン (S-Nitrosoglutathione (GNSO))

[0036] 本発明のランチオニン誘導体及びこれと併用されるアミノ酸又はペプチドは、市販されている場合には市販品を用いることもでき、その他、(1) 化学的に合成する方法、又は(2) 酵素的な反応により合成する方法等の公知手法を適宜用いることによって取得することができるが、化学的な合成がより簡便である。本発明のランチオニン誘導体及びこれと併用されるアミノ酸又はペプチドを化学的に合成する場合には、該オリゴペプチドを、ペプチド合成機を用いて合成あるいは半合成することにより行うことができる。化学的に合成する方法としては、例えばペプチド固相合成法等が挙げられる。そのようにして合成したペプチドは通常の手段、例えばイオン交換クロマトグラフィー、逆相高速液体クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー等によって精製することができる。このようなペプチド固相合成法、およびそれに続きペプチド精製はこの技術分野においてよく知られたものである。

[0037] また、本発明において用いられるランチオニン誘導体及びこれと併用されるアミノ酸又はペプチドを酵素的な反応により生産する場合には、例えば、国際公開パンフレットWO 2004/011653号に記載の方法を用いてもよい。すなわち、一方のアミノ酸又はジペプチドのカルボキシル末端をエ

ステル化又はアミド化したアミノ酸又はジペプチドと、アミノ酸がフリーの状態であるアミノ酸（例えば、カルボキシル基が保護されたアミノ酸）とを、ペプチド生成酵素の存在下において反応させ、生成したジペプチド又はトリペプチドを生成することによっても生産することが可能である。ペプチド生成酵素としては、ペプチドを生成する能力を有する微生物の培養物、該培養物より分離した微生物菌体、又は該微生物の菌体処理物、又は該微生物に由来するペプチド生成酵素が挙げられる。

さらに、上述したような酵素的な方法や化学的合成方法以外にも本発明において用いられるペプチドが、野菜や果物等の植物、酵母等の微生物、その他の天然物中に存在する場合がある。天然に存在する場合には、これらから抽出して用いることも可能である。

本発明のコク味付与剤あるいは複合コク味付与剤は、そのまま、又は飲食品的に許容しうる担体や他の調味原料と混合して、調味料とすることができる。他の調味原料としては、例えば、香料、糖類、甘味料、食物繊維類、ビタミン類、グルタミン酸ナトリウム（MSG）などのアミノ酸類、イノシン酸（IMP）などの核酸類、塩化ナトリウムなどの無機塩類、クエン酸などの有機酸類が挙げられ、更には種々の酵母エキスも挙げられる。

[0038] 本発明において用いられるランチオニン誘導体及び併用されるアミノ酸又はペプチドは塩の形態をも包含する。本発明のランチオニン誘導体及び併用されるアミノ酸又はペプチドが塩の形態を形成し得る場合、その塩は薬理的に許容される、可食性の塩であればよく、例えば、カルボキシル基等の酸性基に対しては、アンモニウム塩、ナトリウム、カリウム等のアルカリ金属との塩、カルシウム、マグネシウム等のアルカリ土類金属との塩、アルミニウム塩、亜鉛塩、トリエチルアミン、エタノールアミン、モルホリン、ピロリジン、ピペリジン、ピペラジン、ジシクロヘキシルアミン等の有機アミンとの塩、アルギニン、リジン等の塩基性アミン酸との塩を挙げることができる。また、塩基性基に対しては、塩酸、硫酸、リン酸、硝酸、臭化水素酸等の無機酸との塩、酢酸、クエン酸、安息香酸、マレイン酸、フマル酸、酒石

酸、コハク酸、タンニン酸、酪酸、ヒベンズ酸、パモ酸、エナント酸、デカン酸、テオクル酸、サリチル酸、乳酸、シュウ酸、マンデル酸、リンゴ酸等の有機カルボン酸との塩、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸等の有機スルホン酸との塩を挙げることができる。

[0039] 本発明のランチオニン誘導体、コク味付与剤、食品組成物、あるいは複合コク味付与剤は、乾燥粉末、ペースト、溶液などの物性に制限なしにあらゆる形態で用いることができる。

本発明のランチオニン誘導体、コク味付与剤、食品組成物、あるいは複合コク味付与剤は、食品、飲料、調味料等の各種飲食品に配合して用いることができる。

本発明のランチオニン誘導体、コク味付与剤、食品組成物、あるいは複合コク味付与剤を食品、飲料、調味料等の各種飲食品に配合して用いる場合の最終的なランチオニン誘導体の量及び併用されるアミノ酸又はペプチドの量は所望の効果が得られる量であれば特に制限されないが、ランチオニン誘導体の量及び／又はアミノ酸若しくはペプチドの量として、食品、飲料あるいは調味料等の全質量を基準として、それぞれについて10ppb～99.9%、好ましくは0.05ppm～99.9%、より好ましくは0.1ppm～99.9%、程度である。

[0040] 本発明のランチオニン誘導体、コク味付与剤、食品組成物、あるいは複合コク味付与剤が配合された食品、飲料、調味料等の各種飲食品には、飲食品的に許容しうるあらゆる固体又は液体の担体、適当な調味原料等をさらに配合させてもよい。

上記担体としては、例えば、グルコース、乳糖、ショ糖、澱粉、マンニトール、デキストリン、脂肪酸グリセリド、ポリエチレングリコール、ヒドロキシエチルデンプン、エチレングリコール、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル、ゼラチン、アルブミン、アミノ酸、水、生理食塩水等が挙げられる。

上記の調味原料は、当業界で用いられるいずれの調味原料であってもよく

特に制限されないが、より具体的には既に上述のものが挙げられる。

上記の担体、他の調味原料等はいずれもその含有量は特に制限されない。

上記調味原料のうち、酵母エキ스는、由来となる菌体・その培養条件・抽出処理方法のいずれも特に限定されず任意の酵母エキスをを用いることができ、更に加熱処理、酵素処理、濃縮、粉末化処理等が施されたものでも良い。

以下に、実施例を挙げて本発明をさらに詳しく説明するが、これらは本発明を限定するものではない。

実施例

[0041] (実施例 1) 化合物1の合成

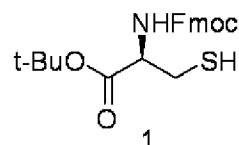
(Fmoc-L-Cys-Ot-Bu)₂ (N,N'-difluorenylmethoxycarbonyl-L-cystine di-*t*-butylester, 4.81 mmol)をテトラヒドロフラン (58.5 mL) と水 (1.5 mL) に溶解した。氷冷下トリブチルホスフィン (5.28 mmol) を加えて室温に戻し、4 時間攪拌した。反応液を冷却し、10%クエン酸水溶液 (60 mL) を加えた。白濁液を室温に戻し、酢酸エチル (60 mL) で抽出した。有機層を食塩水 60 mL で洗浄後、濃縮し油状残渣を得た。残渣をシリカゲルカラム (*n*-ヘキサン-酢酸エチル) にて精製し、化合物1を油状物として得た。

収率 97%。

ESI MS *m/z* 422.4 (M+Na)⁺

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.50 (9H, s), 2.99 (2H, m), 4.23 (1H, t, *J*=6.8 Hz), 4.41 (2H, m), 4.54 (1H, m), 5.68 (1H, d, *J*=7.2 Hz), 7.32 (2H, m), 7.41 (2H, t, *J*=7.2 Hz), 7.61 (2H, d, *J*=7.6 Hz), 7.77 (2H, d, *J*=7.2 Hz).

[化18]



[0042] (実施例 2) 化合物2の合成

化合物1 (6.04 mmol) を脱水ジメチルホルムアミド (60 mL) に溶解し、Boc-

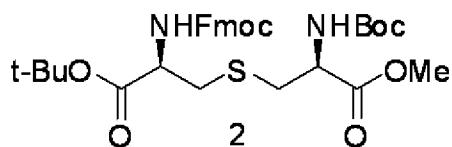
iodo-D-Ala-OMe (N-t-butoxycarbonyl-3-iodo-D-alanine methylester) (6.20 mmol)を加えた後、炭酸セシウム (6.02 mmol)を加え、室温で一晩攪拌した。反応液を冷却し10%クエン酸水溶液 (50 mL) および水 (30 mL) を加えた後、酢酸エチル (60 mL) で抽出後、再び水層を酢酸エチル (60 mL) で抽出した。有機層を合わせ、10%クエン酸水溶液 (50 mL)、食塩水 (50 mL) で順次洗浄し、有機層を濃縮した。得られた油状残渣をシリカゲルカラム(n-ヘキサン-酢酸エチル)を用いて精製し、化合物2を油状物として得た。

収率 66%。

ESI MS m/z 601.2 (M+H)⁺

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.45 (9H, s), 1.49 (9H, s), 3.01 (4H, m), 3.73 (3H, s), 4.24 (1H, t, J=7.2 Hz), 4.39 (2H, d, J=7.2 Hz), 4.48-4.55 (2H, m), 5.37 (1H, brd, J=6.8 Hz), 5.80 (1H, brd, J=6.8 Hz), 7.32 (2H, m), 7.40 (2H, t, J=7.2 Hz), 7.63 (2H, m), 7.77 (2H, d, J=7.6 Hz).

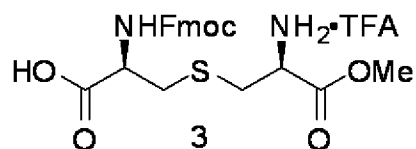
[化19]



[0043] (実施例3) 化合物4の合成

(工程1) 化合物2(4.01 mmol)をジクロロメタン 70 mLに溶解し、トリフルオロ酢酸 (70 mL) を加えて室温で1時間攪拌後、反応液を濃縮し、3を含む残渣が得られた。収率 100%と仮定してそのまま次の反応に用いた。

[化20]



[0044] (工程2) 氷冷下、化合物3 (4.01 mmol相当) に脱水ジメチルホルムアミド (60 mL) を加えて均一液とし、そこへジイソプロピルエチルアミン(8.04 mmol)を滴下した。室温に戻してカルボニルビスイミダゾール(8.10 mmol)を加

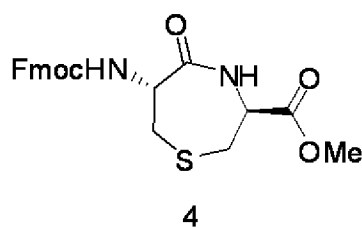
えそのまま一晩攪拌した。冷却攪拌条件下、反応液に10%クエン酸水溶液 (50 mL) を加え、室温に戻した後、酢酸エチル (100 mL) で抽出、水層を更に酢酸エチルで抽出して有機層を合わせた。この有機層を10%クエン酸水溶液 (50 mL × 2)、食塩水で1回洗浄後濃縮し油状残渣を得た。得られた残渣をシリカゲルカラム (n-ヘキサン-酢酸エチル) を用いて精製し、化合物4を油状物として得た。

収率 39% (2工程)。

ESI MS m/z 448.5 ($M+Na$)⁺

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 2.71 (1H, dd, $J=9.2, 14.4$ Hz), 2.78–2.90 (2H, m), 3.02 (1H, d, $J=14.4$ Hz), 3.86 (3H, s), 4.20 (1H, t, $J=6.8$ Hz), 4.40 (2H, d, $J=6.8$ Hz), 4.56 (1H, dd, $J=5.6, 9.2$ Hz), 4.68 (1H, m), 6.30 (1H, d, $J=5.6$ Hz), 7.32 (2H, t, $J=7.6$ Hz), 7.40 (2H, t, $J=7.6$ Hz), 7.60 (2H, d, $J=7.6$ Hz), 7.77 (2H, d, $J=7.6$ Hz).

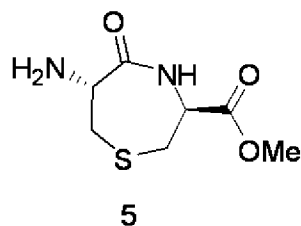
[化21]



[0045] (実施例4) 化合物6の合成

(工程1) 化合物4 (1.54 mmol) に10%ホルリンージメチルホルムアミド溶液 (14 mL) を加えて室温にて30分攪拌した。反応液を濃縮すると化合物5を含む残渣が得られた。収率 100%と仮定してそのまま次の反応に用いた。

[化22]



[0046] (工程2) Boc-L-Glu-OtBu (N-t-butoxycarbonyl-L-glutamic acid α -t-but

ylester)

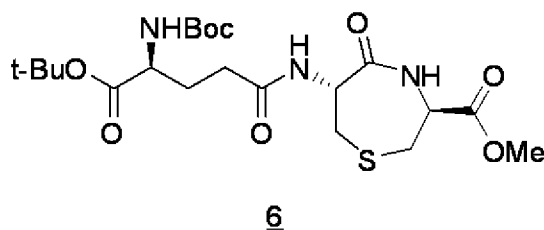
(1.70 mmol)を脱水ジメチルホルムアミド (9 mL) に溶解し、HOBt・H₂O (1-hydroxybenzotriazole hydrate) (1.85 mmol) とWSC・HCl (1-(3-dimethylaminopropyl)-3-Ethoxycarbodiimide hydrochloride) (1.90 mmol) を加えて室温で15分攪拌した。そこへジメチルホルムアミド (20 mL) に懸濁した化合物5 (1.54 mmol相当) を加え、室温で一晩反応させた。反応液を濃縮後、残渣に酢酸エチル (50 mL) と水 (50 mL) を加えて分液し、水層を更に酢酸エチル (50 mL) で抽出した。有機層を合わせて重曹水 (50 mL) と食塩水 (50 mL) で洗浄後、濃縮した。得られたペースト状残渣をシリカゲルカラム (n-ヘキサン-酢酸エチル) にて精製し、**6**を油状物として得た。

収率 81% (2工程)。

ESI MS m/z 490.0 (M+H)⁺

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 1.44 (9H, s), 1.46 (9H, s), 1.90 (1H, m), 2.17 (1H, m), 2.32 (2H, m), 2.60 (1H, dd, J=10.5, 14.1 Hz), 2.92-2.98 (2H, m), 3.18 (1H, dd, J=6.0, 14.7 Hz), 3.84 (3H, s), 4.46 (1H, m), 4.80 (1H, m), 5.19 (1H, d, J=8.1 Hz), 6.32 (1H, d, J=8.1 Hz), 7.09 (1H, brs).

[化23]

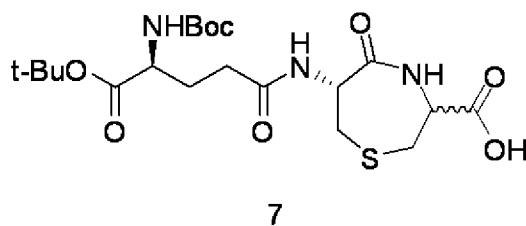


[0047] (実施例5) 化合物8aおよび8bの合成

(工程1) 化合物**6** (1.25 mmol) をテトラヒドロフラン (30 mL) に溶解し、氷冷攪拌下、0.2M水酸化リチウム水溶液 (2.50 mmol) を加えた。30分後、10%クエン酸水溶液を用いて約pH6に中和した。室温に戻して反応液を濃縮後、酢酸エチル抽出 (20 mL × 3) を行った。水層を更に酢酸エチル抽出 (20 mL × 3) して有機層を合わせ、食塩水 (10 mL) で洗浄した後、有機層を濃

縮し化合物**7**を得た。収率 100%と仮定してそのまま次の反応に用いた。

[化24]



[0048] (工程2) 化合物**7**(1.25 mmol相当)に4N塩酸／ジオキサン溶液(25 mL)を加え室温で一晩反応させた後、反応液を濃縮した。得られたペースト状の残渣は強塩基性イオン交換樹脂(アンバーライト IRA400 OH AG)を用いて精製を行い2つの画分を得た。先に溶出した画分の一部を更に逆相分取HPLC(カラム: 野村化学社製Develosil RPAQUEOUS-AR-5、移動相: 0.1%蟻酸を含む水／アセトニトリル系リニアグラジエント)で精製することにより化合物**8a**をあめ状物質として得た。一方、後から溶出した画分を濃縮することにより白色の固体が得られ、さらにこの固体を水に溶解後、凍結乾燥することにより得られた残渣を、少量の水でスラリー洗浄し、化合物**8b**を白色固体として得た。

化合物**8a**

ESI MS m/z 318.3 (M-H)⁻

¹H NMR (600 MHz, D₂O) δ 2.13 (2H, m), 2.50 (2H, t, J=7.8 Hz), 2.64 (1H, d, J=15.0 Hz), 2.83 (1H, dd, J=10.8, 15.0 Hz), 3.02 (1H, dd, J=2.4, 15.0 Hz), 3.15 (1H, dd, J=5.4, 15.0 Hz), 3.83 (1H, t, J=6.0 Hz), 4.55 (1H, dd, J=2.4, 5.4 Hz), 4.91 (1H, dd, J=2.4, 10.8 Hz).

化合物**8b**

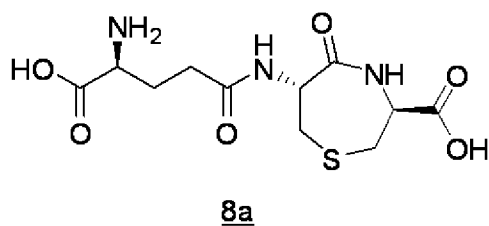
収率 26%(2工程)

ESI MS m/z 318.0 (M-H)⁻

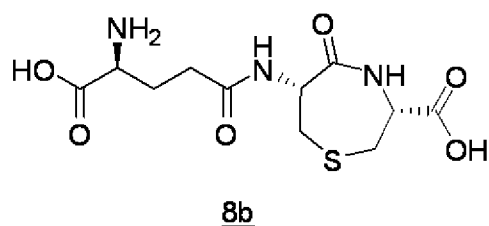
¹H NMR (600 MHz, D₂O) δ 2.12 (2H, m), 2.48 (2H, t, J=7.2 Hz), 2.72 (1H, d, J=14.4 Hz), 2.76 (1H, dd, J=10.2, 14.4 Hz), 2.89 (1H, dd, J=9.6, 14.4 Hz), 3.05 (1H, d, J=14.4 Hz), 3.78 (1H, t, J=6.0 Hz), 4.42 (1H

, d, J=9.6 Hz), 4.91 (1H, d, J=10.2 Hz).

[化25]



[化26]



[0049] (実施例6) 化合物9の合成

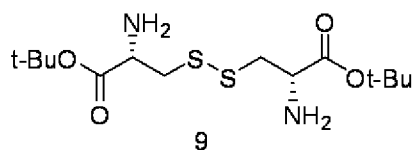
D-cystine (5.20 mmol) を60%過塩素酸水溶液 (2.1 mL) に溶解し、*t*-ブチルアセテート (12.6 mL) を滴下し室温にて2日間攪拌後、反応液を氷冷し、4N水酸化ナトリウム水溶液を用いて約pH11に調整した。室温に戻して酢酸エチル (50 mL) で6回抽出し、有機層を合わせて硫酸ナトリウムで乾燥後、濃縮することにより化合物9を油状物として得た。

収率 72%。

ESI MS m/z 353.2 (M+H)⁺

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.48 (18H, s), 2.88 (2H, dd, J=8.0, 13.2 Hz), 3.14 (2H, dd, J=4.4, 13.2 Hz), 3.69 (2H, dd, J=4.4, 8.0 Hz).

[化27]



[0050] (実施例7) 化合物9の合成

化合物9 (3.70 mmol) をテトラヒドロフラン (40 mL) に溶解し、Fmoc-Osc (N-(9-fluorenylmethoxycarbonyloxy)-succinimide) (7.40 mmol) を加えた。反

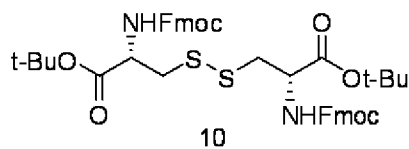
応液を氷冷し、攪拌下N-メチルモルホリン(7.46 mmol)を滴下し、そのまま一晩攪拌した。反応液に酢酸エチル(50 mL)と10%クエン酸水溶液(25 mL)を加えて分配した。有機層をさらに10%クエン酸水溶液(25 mL)と食塩水(25 mL)で2回洗浄後濃縮して得られたスラリー状の残渣を、シリカゲルカラム(*n*-ヘキサン-酢酸エチル)にて精製し、化合物10を白色固体として得た。

収率 54%。

ESI MS m/z 819.1 ($M+Na$)⁺

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.48 (18H, s), 3.21 (4H, m), 4.20 (2H, m), 4.35 (4H, m), 4.56 (2H, m), 5.72 (2H, d, $J=7.2$ Hz), 7.28 (4H, m), 7.38 (4H, m), 7.28 (4H, d, $J=7.6$ Hz), 7.28 (4H, d, $J=7.6$ Hz).

[化28]



[0051] (実施例8) 化合物8cおよび8dの製造

実施例7記載の化合物10を原料に、実施例1～5の方法を用いて化合物8cおよび8dを合成した。

化合物8c

ESI MS m/z 317.9 ($M-H$)⁻

¹H NMR (600 MHz, D₂O) δ 2.10 (2H, m), 2.44 (2H, m), 2.59 (1H, brd, $J=14.4$ Hz), 2.79 (1H, dd, $J=10.4, 14.4$ Hz), 2.98 (1H, dd, $J=2.8, 14.8$ Hz), 3.11 (1H, dd, $J=6.0, 14.8$ Hz), 3.80 (1H, t, $J=6.0$ Hz), 4.50 (1H, dd, $J=2.8, 6.0$ Hz), 4.81 (1H, dd, $J=2.0, 10.4$ Hz).

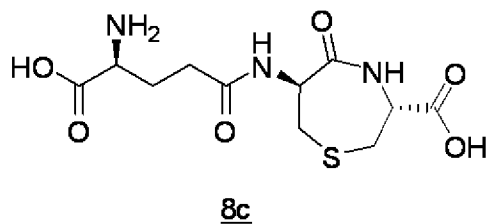
化合物8d

ESI MS m/z 317.8 ($M-H$)⁻

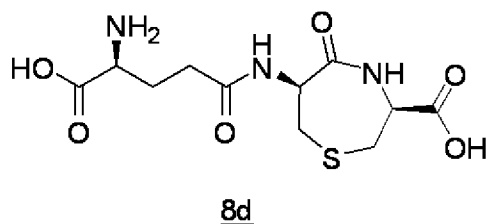
¹H NMR (600 MHz, D₂O) δ 2.09 (2H, m), 2.43 (2H, m), 2.67 (1H, dd, $J=1.6, 14.4$ Hz), 2.72 (1H, dd, $J=9.6, 14.4$ Hz), 2.84 (1H, dd, $J=9.6, 14.4$ Hz), 3.02 (1H, d, $J=14.4$ Hz), 3.77 (1H, t, $J=6.0$ Hz), 4.42 (1H, dd,

$J=1.6, 9.6 \text{ Hz}$), $4.87 \text{ (1H, dd, } J=2.4, 9.6 \text{ Hz)}$.

[化29]



[化30]



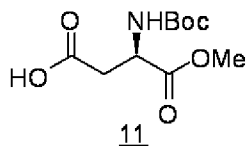
[0052] (実施例 9) 化合物11の合成

H-D-Asp-OMe (D-aspartic acid α -methylester) (6.81 mmol) にテトラヒドロフラン (14 mL) と水 (14 mL) を加えて溶解した。氷冷下、Boc20 (di-*t*-butyl dicarbonate) (8.38 mmol) をテトラヒドロフラン (5 mL) に溶かした溶液、トリエチルアミン (13.63 mmol)、DMAP (N,N-dimethyl-4-aminopyridine) (1.36 mmol) を加えた。室温に戻して6時間攪拌後、反応液を濃縮し、テトラヒドロフランを除去した。残った反応液に1~2N 塩酸を加えて約pH 2に調整した後、酢酸エチル (50 mL) で抽出した。有機層を食塩水 (25 mL) で洗浄後、濃縮してあめ状の目的化合物11を得た。

収率 76%。

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 1.48 (9H, s), 2.91 (1H, dd, $J=4.4, 8.0 \text{ Hz}$), 3.10 (1H, dd, $J=3.6, 8.0 \text{ Hz}$), 3.79 (3H, s), 4.61 (1H, m), 5.52 (1H, brd, $J=8.8 \text{ Hz}$).

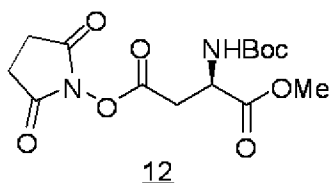
[化31]



[0053] (実施例 10) 化合物13の合成

(工程 1) 化合物11 (5.19 mmol) を酢酸エチル (21 mL) に溶解し、HOSu (N-hydroxysuccinimide) (5.73 mmol) を加えた。氷冷下、DCC (dicyclohexylcarbodiimide) (5.71 mmol) を加えた後、反応液を室温に戻し 4 時間攪拌した。析出した不溶物をろ別後、ろ過液を濃縮して12を含むゲル状残渣を得た。収率 100%と仮定してそのまま次の反応に用いた。

[化32]

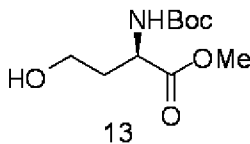


[0054] (工程 2) テトラヒドロフラン (20 mL) と水 (5 mL) の混合液を氷冷し、そこへ水素化ホウ素ナトリウム (9.47 mmol) を加えて 10 分間攪拌後、化合物12 (5.19 mmol 相当) のテトラヒドロフラン溶液 (20 mL) をゆっくり滴下した。10 分後に飽和塩化アンモニウム水溶液 (12 mL) を加えて、反応液を室温に戻した。酢酸エチル (30 mL x 3) で抽出し、有機層を濃縮した後、得られた残渣をシリカゲルカラム (ジクロロメタン-メタノール) にて精製を行い、ゲル状の化合物13を得た。

収率 67% (2 工程)。

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 1.47 (9H, s), 1.63 (1H, m), 2.17 (1H, m), 3.73 (2H, m), 3.80 (3H, s), 4.50 (1H, m), 5.39 (1H, m).

[化33]



[0055] (実施例 11) 化合物14の合成

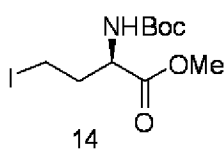
化合物13 (3.47 mmol) を脱水ジクロロメタン (10 mL) に溶解後、トリフェニルホスフィン (4.18 mmol)、イミダゾール (4.17 mmol) およびヨウ素 (4.16 mmol) の脱水塩化メチレン溶液 (10 mL) に滴下した。室温にて 2 時間攪拌後、

反応液を濃縮して得られた残渣に酢酸エチル（35 mL）を加えた。スラリー状態で1時間攪拌後、不溶物をろ別し、ろ過液を濃縮すると褐色のオイルが得られた。これをシリカゲルカラム（n-ヘキサン-酢酸エチル）で精製し、オイル状の化合物14を得た。

収率56%。

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 1.47 (9H, s), 2.20 (1H, m), 2.45 (1H, m), 3.20 (2H, t, $J=7.6$ Hz), 3.79 (3H, s), 4.38 (1H, m), 5.13 (1H, brs).

[化34]



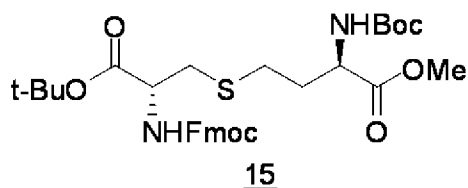
[0056] （実施例 1 2）化合物15の合成

Fmoc-Cys-Ot-Bu (N-fluorenylmethoxycarbonyl-L-cysteine t-butylester) (1.90 mmol)を脱水ジメチルホルムアミド（10 mL）に溶解し、そこへ化合物14(1.94 mmol)の脱水ジメチルホルムアミド溶液（10 mL）を加えた。次に炭酸セシウム（1.92 mmol）を加え、室温で5時間攪拌した後、反応液に酢酸エチル（20 mL）と10%クエン酸水溶液（10 mL）を加えて分配した。水層を酢酸エチル（20 mL）で再抽出して有機層を合わせ、更に10%クエン酸水溶液（10 mL）と飽和食塩水（10 mL）で洗浄した。有機層を濃縮して得られたオイル状残渣を、シリカゲルカラム（n-ヘキサン-酢酸エチル）で精製し、オイル状の化合物15を得た。

収率62%。

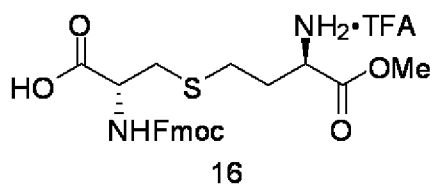
^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 1.45 (9H, s), 1.51 (9H, s), 1.92 (1H, m), 2.12 (1H, m), 2.63 (2H, m), 2.99 (2H, m), 3.74 (3H, s), 4.26 (1H, t, $J=7.2$ Hz), 4.41 (2H, m), 4.50 (1H, m), 5.17 (1H, br), 7.34 (2H, m), 7.43 (2H, t, $J=7.2$ Hz), 7.65 (2H, d, $J=7.2$ Hz), 7.79 (2H, d, $J=7.6$ Hz).

[化35]

[0057] (実施例 1 3) 化合物16の合成

(工程 1) 化合物15 (0.55 mmol) を脱水ジクロロメタン (8 mL) に溶解し、トリフルオロ酢酸 (4 mL) を加えて室温で 2 時間攪拌した。反応液を濃縮し、脱水ジメチルホルムアミド (4 mL) で共沸することにより、化合物16を含むジメチルホルムアミド溶液を得た。収率 100% と仮定してそのまま次の反応に用いた。

[化36]

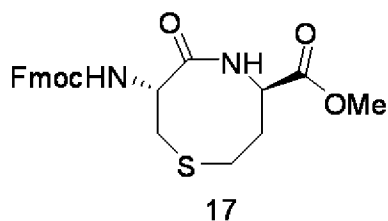


[0058] (工程 2) 化合物16 (0.55 mmol 相当) を含むジメチルホルムアミド溶液に、脱水ジメチルホルムアミド (24 mL) を追加して攪拌下、PyBOP (benzotriazole-1-yl-oxy-tris-pyrrolidino-phosphonium hexafluorophosphate) (0.82 mmol) と WSC · HCl (1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethoxycarbodiimide hydrochloride) (0.83 mmol) を加えた。次にトリエチルアミン (0.65 mmol) を添加して室温で 24 時間反応した後、反応液を濃縮した。別の容器に水 (10 mL) と酢酸エチル (10 mL) を入れて攪拌し、そこへ濃縮した反応液を添加した。さらに酢酸エチル (10 mL) で洗いこみ、有機層を抽出した。水層を酢酸エチル (10 mL x 2) で抽出し、有機層を合わせ、飽和重曹水 (10 mL) と飽和食塩水 (10 mL) で洗浄した。有機層を濃縮して得られた白色固体に酢酸エチルを加えてスラリー状態で攪拌後、ろ過により不溶物を除去した。ろ過液を濃縮して得られたオイル状残渣をシリカゲルカラム (n-ヘキサン-酢酸エチル) で精製し、化合物17を白色固体として得た。

収率15%（2工程）。

ESI MS m/z 257.5 (M+H)+.

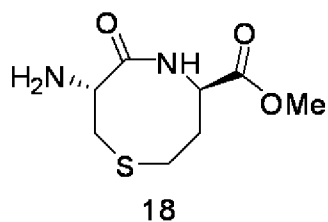
[化37]



[0059]（実施例14）化合物19の合成

（工程1）化合物17（0.08 mmol）に5%モルホリン/ジメチルホルムアミド溶液（0.70 mL）を加えて室温で1時間攪拌した後、反応液を濃縮し、化合物18を含む溶液を得た。収率 100%と仮定してそのまま次の反応に用いた。

[化38]



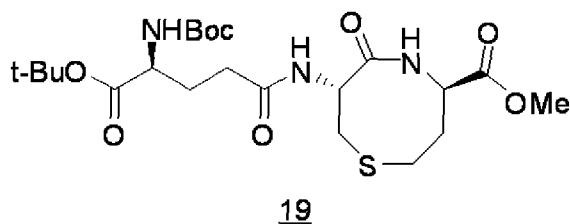
[0060]（工程2）Boc-Glu-Ot-Bu(N-t-butoxycarbonyl-L-glutamic acid α -t-butyl ester)（0.096 mmol）を脱水ジメチルホルムアミド（1 mL）に溶解した。次に HOBt $\cdot$ H₂O（1-hydroxybenzotriazole hydrate）（0.12 mmol）とWSC $\cdot$ HCl（1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethoxycarbodiimide hydrochloride）（0.12 mmol）を加え室温で10分攪拌した。この反応液に、化合物18（0.08 mmol相当）の脱水ジメチルホルムアミド（2 mL）溶液を加え、室温で一晩反応した。反応液を濃縮して得られた残渣に酢酸エチル（20 mL）と水（10 mL）を加えて分配した。有機層を飽和重曹水（10 mL）と飽和食塩水（10 mL）で洗浄後、濃縮した。残渣をシリカゲルカラム（n-ヘキサン-酢酸エチル）で精製し、あめ状の化合物19を得た。

収率90%。

¹H NMR（400 MHz, CDCl₃） δ 1.46（9H, s）, 1.48（9H, s）, 1.88（1H, m）, 2

. 40–2.15 (5H, m), 2.50 (1H, m), 2.78 (1H, dd, $J=10.0, 14.4$ Hz), 3.09 (1H, dd, $J=4.8, 15.6$ Hz), 3.37 (1H, dd, $J=4.8, 14.4$ Hz), 3.68 (1H, t, $J=4.8$ Hz), 3.79 (3H, s), 4.18 (1H, m), 4.51 (1H, m), 5.01 (1H, m), 5.20 (1H, brd, $J=6.8$ Hz).

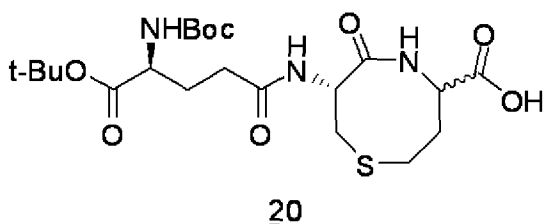
[化39]



[0061] (実施例 15) 化合物21の合成

(工程 1) 化合物19 (0.092 mmol) をテトラヒドロフラン (1.84 mL) に溶解し、氷冷下、0.2 M 水酸化リチウム水溶液 (0.18 mmol) を加え、室温に戻して 1 時間攪拌した。TLC で原料の消失を確認後、0.2 N 塩酸を添加して反応液の pH を弱酸性にし、濃縮してテトラヒドロフランを除去した。残溶液を酢酸エチル (10 mL x 3) で抽出し、有機層を飽和食塩水 (3 mL) で洗浄した。有機層を濃縮するとあめ状の化合物20がジアステレオマー混合物として得られた。収率 100% と仮定してそのまま次の反応に用いた。

[化40]

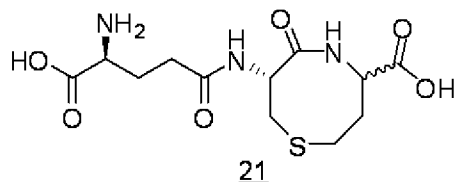


[0062] (工程 2) 化合物20 (0.092 mmol 相当) に、4N 塩酸/ジオキサン溶液 (1.8 mL) を加え、室温で一晩攪拌した。反応液を濃縮して得られた残渣を水に溶解し、陰イオン交換樹脂 (アンバーライト IRA 400 OH AG) に通した。イオン交換水で洗浄後、1~3N 酢酸で溶出後、凍結乾燥を行うことにより化合物21をジアステレオマー混合物として得た。

収率 56% (2 工程)。

ESI MS m/z 334.0 (M+H)⁺; ¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ 2.07 (2H, m), 2.42 (2H, m), 2.86–3.17 (2H, m), 3.75 (1H, t, J=6.0 Hz), 4.27~4.41 (1H, m), 4.75~5.24 (1H, m).

[化41]



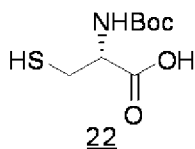
[0063] (実施例 1 6) 化合物22の合成

(Boc-L-Cys-OH)₂ (N,N'-dit-butoxycarbonyl-L-cystine) (2.51 mmol) をテトラヒドロフラン (29.2 mL) と水 (0.8 mL) に溶解し、氷冷下、トリブチルホスフィン (2.76 mmol) を加えた。室温に戻して1時間半攪拌し、反応液を濃縮した。残渣に酢酸エチル (20 mL) と10%クエン酸水溶液 (10 mL) を加えて分配し、有機層を飽和食塩水 (10 mL) で洗浄した。有機層を濃縮し、得られた残渣をシリカゲルカラム (n-ヘキサン-酢酸エチル) で精製し、オイル状の化合物22を得た。

収率99%。

ESI MS m/z 220.1 (M-H)⁻; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 5.47 (1H, brs), 4.65 (1H, brs), 3.09–2.97 (2H, m), 1.48 (9H, s).

[化42]



[0064] (実施例 1 7) 化合物23の合成

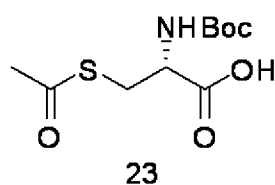
化合物18 (4.97mmol) と無水酢酸 (49.90 mmol) を合わせて氷冷し、そこへ炭酸水素カリウム (5.93 mmol) を水 (2.4 mL) に溶かした溶液を滴下した。室温に戻して2時間攪拌後、水 (5 mL) と酢酸エチル (20 mL) を加えて抽出した。水層を酢酸エチル (20 mL) で再抽出して有機層を合わせ、飽和食塩水 (5 mL) で洗浄した。有機層を濃縮し、得られた残渣をシリカゲルカラム (n

-ヘキサン-酢酸エチル)で精製し、あめ状の化合物23を得た。

収率76%。

ESI MS m/z 261.9 (M-H)⁻; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 5.33 (1H, d, J=6.4 Hz), 4.53 (1H, m), 3.47 (1H, dd, J=4.0, 14.0 Hz), 3.34 (1H, dd, J=6.8, 14.0 Hz), 2.40 (3H, s), 1.48 (9H, s).

[化43]



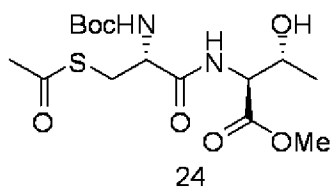
[0065] (実施例 18) 化合物24の合成

化合物23 (3.76 mmol)を脱水ジメチルホルムアミド (30 mL)に溶解し、HO Bt・H₂O (1-hydroxybenzotriazole hydrate) (4.14 mmol)とCMC (1-cyclohexyl-3-(2-morpholinoethyl)carbodiimide metho-p-toluenesulfonate) (4.13 mmol)を加えて室温で15分攪拌した。次にL-Thr-OMe・HCl (L-threonine methyl ester・HCl) (3.77 mmol)とトリエチルアミン (3.80 mmol)を加え、室温で2時間攪拌した。反応液を濃縮し、得られた残渣に水 (20 mL)と酢酸エチル (40 mL)を加えて抽出した。有機層を重曹水 (20 mL)および飽和食塩水 (20 mL)で洗浄後、濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラム (ジクロロメタン-メタノール)で精製し、化合物24を白色固体として得た。

収率74%。

ESI MS m/z 401.3 (M+Na)⁺; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.14 (1H, d, J=7.6 Hz), 5.37 (1H, d, J=7.2 Hz), 4.60 (1H, dd, J=2.8, 8.8 Hz), 4.37 (2H, m), 3.80 (3H, s), 3.39 (1H, dd, J=4.4, 14.0 Hz), 3.24 (1H, dd, J=8.0, 14.0 Hz), 2.40 (3H, s), 1.47 (9H, s), 1.24 (3H, d, J=6.4 Hz).

[化44]



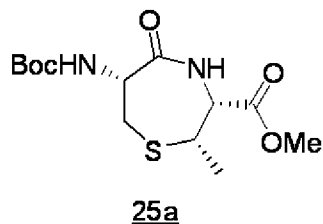
[0066] (実施例 19) 化合物25aおよび25bの合成

化合物24 (4.20 mmol) を脱水ジクロロメタン (5 mL) に溶解し、ジイソプロピルエチルアミン (8.38 mmol) および塩化メタンスルホニル (8.00 mmol) を加えた。室温で1時間半攪拌後、反応液を濃縮してオイル状の残渣を得た。一方、脱水テトラヒドロフラン (50 mL) に氷冷下、水素化リチウムアルミニウム (33.6 mmol) を加えた。次に脱水メタノール (101.48 mmol) をゆっくりと滴下した。反応液に脱水テトラヒドロフラン (50 mL) を追加してさらに攪拌した。10分後、先ほど得られた残渣の脱水テトラヒドロフラン溶液 (15 mL) を滴下して2時間反応した。この反応液を、酢酸エチル (150 mL) と0.5 N 塩酸 (120 mL) の混合液に少しずつ加えた。分液により得られた有機層を、更に0.5 N 塩酸 (120 mL) と飽和食塩水 (120 mL) で洗浄後、濃縮した。残渣をシリカゲルカラム (n-ヘキサン-酢酸エチル) で精製し、異性体である2つ化合物25aおよび25bを得た。

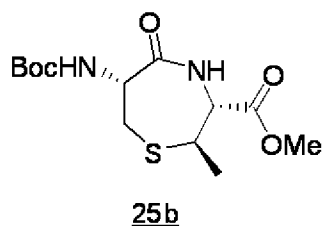
25a: 収率13%。ESI MS m/z 341.1 (M+Na)⁺; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 6.50 (1H, d, J=5.6 Hz), 6.01 (1H, d, J=5.2 Hz), 4.87 (1H, dd, J=1.2, 6.0 Hz), 4.61 (1H, m), 3.87 (3H, s), 3.30 (1H, m), 2.95 (1H, dd, J=10.0, 14.8 Hz), 2.76 (1H, dd, J=1.2, 14.8 Hz), 1.47 (9H, s), 1.24 (3H, d, J=6.8 Hz).

25b: 収率20%。ESI MS m/z 341.4 (M+Na)⁺; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 6.05 (1H, d, J=8.8 Hz), 5.99 (1H, brs), 4.63 (1H, m), 4.15 (1H, m), 3.87 (3H, s), 3.48 (1H, m), 2.73 (2H, m), 1.49 (3H, d, J=7.2 Hz), 1.47 (9H, s).

[化45]



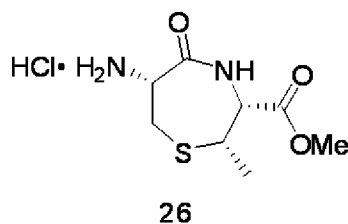
[化46]



[0067] (実施例 20) 化合物27の合成

(工程 1) 化合物25a (0.45 mmol) に 4N 塩酸/ジオキサン溶液 (2.26 mL) を加え室温で一晩攪拌した。反応液を濃縮することにより化合物26を含む残渣が得られた。収率 100%と仮定してそのまま次の反応に用いた。

[化47]



[0068] (工程 2)

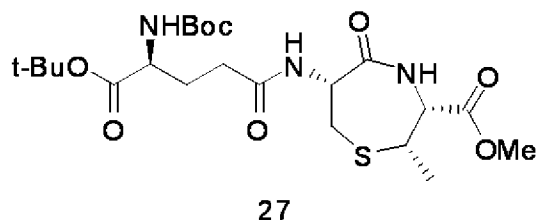
Boc-Glu-Ot-Bu (N-t-butoxycarbonyl-L-glutamic acid α -t-butylester) (0.52 mmol) を脱水ジメチルホルムアミド (4 mL) に溶解し、HOBt · H₂O (1-hydroxybenzotriazole hydrate) (0.65 mmol) とWSC · HCl (1-(3-dimethylamino propyl)-3-ethoxycarbodiimide hydrochloride) (0.66 mmol) を加えて室温で 10 分攪拌した。そこに、化合物26 (0.45 mmol 相当) の脱水ジメチルホルムアミド溶液 (2.5 mL) を加えた後、トリエチルアミン (0.77 mmol) を添加し、室温で 2 時間攪拌した。反応液を濃縮後、残渣に酢酸エチル (40 mL) と水 (20 mL) を加えて分配し、有機層を飽和重曹水 (20 mL) および飽和食塩水 (20 mL) で洗浄した。有機層を濃縮して得られた残渣をシリカゲルカラム (ジクロロメタン-メタノール) で精製し、化合物27を得た。

収率 98% (2 工程)。

ESI MS m/z 526.1 (M+Na)⁺; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.02 (1H, m), 6.53 (1H, d, J=6.0 Hz), 5.18 (1H, d, J=7.6 Hz), 4.88 (1H, dd, J=1.2, 5.6

Hz), 4.81 (1H, m), 4.19 (1H, m), 3.87 (3H, s), 3.32 (1H, m), 2.90 (1H, dd, J=10.0, 14.8 Hz), 2.78 (1H, dd, J=2.0, 14.8 Hz), 2.33 (2H, m), 2.21 (1H, m), 1.90 (1H, m), 1.49 (9H, s), 1.46 (9H, s), 1.25 (3H, d, J=6.8 Hz).

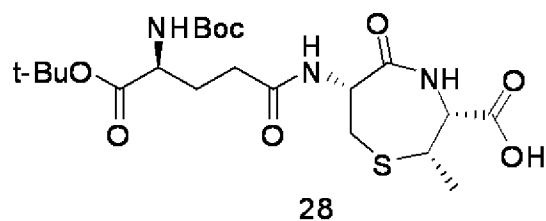
[化48]



[0069] (実施例 2 1) 化合物29の合成

(工程 1) 化合物27(0.38 mmol)をテトラヒドロフラン (7.6 mL) に溶解し、氷冷下、0.2M 水酸化リチウム水溶液(0.76 mmol)を加えて2時間攪拌した。0.5N 塩酸を加えて反応液を弱酸性にしてから室温に戻し、濃縮してテトラヒドロフランを除去した。残った溶液を酢酸エチル (20 mL x 3) で抽出し、有機層を飽和食塩水 (20 mL) で洗浄後、濃縮して化合物28を得た。収率 100%と仮定してそのまま次の反応に用いた。

[化49]



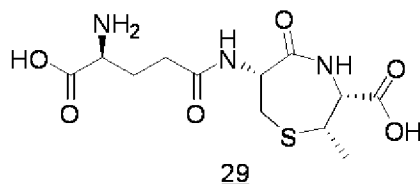
[0070] (工程 2) 化合物28(0.38 mmol相当)に、4N 塩酸/ジオキサン溶液 (7.2 mL) を加え室温で一晩攪拌した。反応液を濃縮し、得られた残渣を水に溶解し、陰イオン交換樹脂 (アンバーライト IRA 400 OH AG)に通した。イオン交換水で洗浄後、1~3N 酢酸で溶出、凍結乾燥を行い化合物29を白色固体として得た。

収率65% (2 工程)。

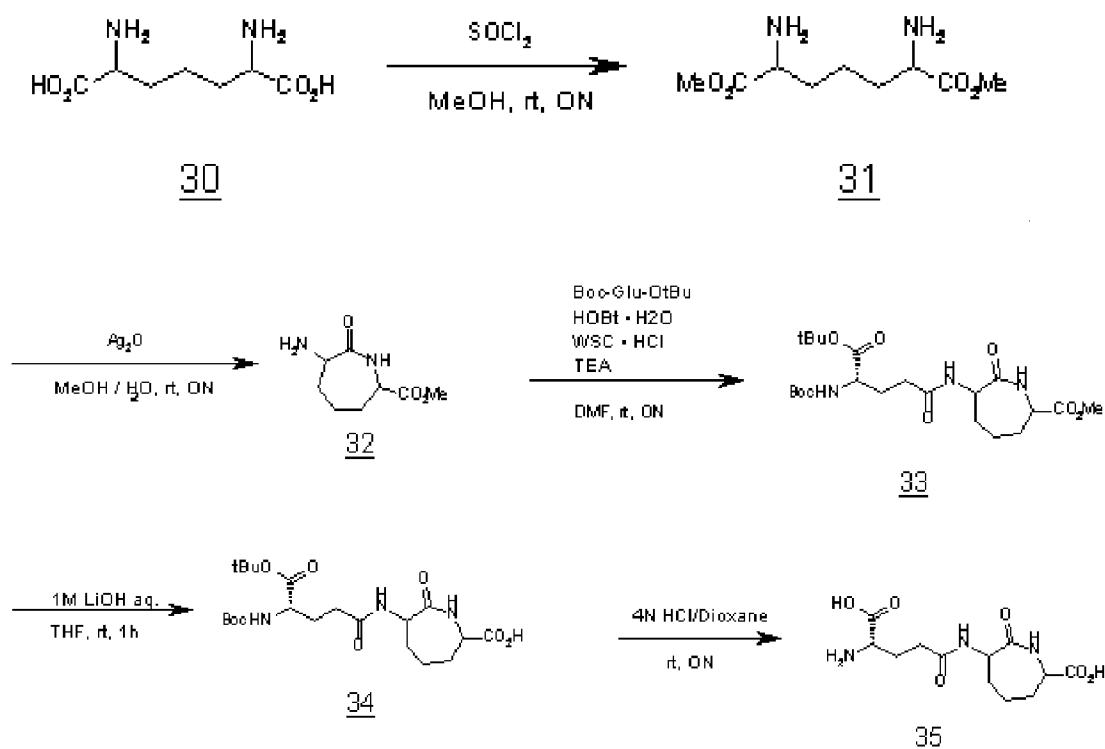
ESI MS m/z 333.6 (M+H)⁺; ¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ 4.86 (1H, dd, J=2.8,

9.6 Hz), 4.81 (1H, d, J=1.6 Hz), 3.82 (1H, t, J=6.4 Hz), 3.40 (1H, m), 2.95 (1H, dd, J=9.6, 15.2 Hz), 2.60 (1H, dd, J=2.8, 15.2 Hz), 2.46 (2H, t, J=7.2 Hz), 2.08 (2H, m), 1.14 (3H, d, J=7.2 Hz).

[化50]



[0071] (実施例 2 2) 化合物35の合成



[0072] (1) 化合物31

2, 6-ジアミノピメリン酸 (5.0 g、26.3 mmol) をメタノール 42 mL に溶解し、氷浴下で塩化チオニル (4.2 mL、57.9 mmol) をゆっくり滴下した。滴下終了後、室温まで自然昇温し、終夜攪拌した。反応終了後、溶媒を留去することで、化合物31を定量的に得た。

(2) 化合物32

化合物31 (0.582 g、2.0 mmol) を水 10 mL とメタノール 1

0 mLの混合溶媒に溶解し、酸化銀 (0.730 g、3.2 mmol) を加え、室温で終夜撹拌した。反応終了後、セライト濾過で酸化銀を除去し、溶媒を留去することで、化合物32の粗生成物を得た。

(3) 化合物33

Boc-Glu-OtBu (0.303 g、1.0 mmol)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール-水合物 (0.169 g、1.1 mmol)、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド塩酸塩 (0.211 g、1.1 mmol)、化合物32 (0.205 g、1.1 mmol) をN,N-ジメチルホルムアミド5 mLに溶解し、トリエチルアミン (0.198 mL、1.4 mmol) を加え、室温にて終夜撹拌した。反応終了後、溶媒を留去し、酢酸エチルを加え、希釈した。5%クエン酸水溶液で2回洗浄し、飽和食塩水で1回洗浄した後、10%飽和重曹水で2回洗浄し、最後に飽和食塩水で1回洗浄した。有機層を硫酸マグネシウムで乾燥し、ろ過した後、溶媒を留去し、化合物33の粗生成物を得た。

[0073] (4) 化合物34

化合物33 (0.277 g、0.59 mmol) をテトラヒドロフラン5 mLに溶解し、1 M水酸化リチウム水溶液を4 mL加え、室温にて2時間撹拌した。反応終了後、1 M塩酸を加え、pHを約2に調整し、酢酸エチルを加え、抽出した。得られた有機層を飽和食塩水で洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥後、ろ過し、溶媒を留去することで化合物34を得た。

(5) 化合物35

化合物34 (0.181 g、0.38 mmol) に4塩酸-ジオキサン溶液4 mLを加え、室温にて終夜反応させた。反応終了後、溶媒を留去し、化合物35を含む残渣の一部を、逆相分取HPLC (カラム: 野村化学社製Develosil RPA QUEOUS-AR-5、移動相: 0.1%ヘptaフルオロ酪酸を含む水/アセトニトリル系リニアグラジエント) で精製することにより、化合物35をジアステオマー混合物として得た。

¹H NMR (D₂O) δ = 1.41-1.78 (m, 3H), 1.80-1.91 (m, 2H), 1.99-2.03 (m, 1

H), 2.08–2.22 (m, 2H), 2.42–2.51 (m, 2H), 3.97–4.02 (m, 1H), 4.31–4.34 (m, 1H), 4.45–4.49 (m, 1H)

MS(ESI) m/z: 302.0 (M+1)

[0074] (実施例 23) CaSR 発現プラスミドの調製

CaSR 発現プラスミドの調製を以下のように行った。

NCBI に登録された DNA 配列 (CaSR (カルシウム受容体) : NM_00388、配列番号 1、2) を元に、PCR に使う合成オリゴ DNA (フォワードプライマー (配列番号 3 : ACTAATACGACTCACTATAGGGACCATGGCATTTCATAGCTGCTGCTGG)、及びリバースプライマー (配列番号 4 : TTATGAATTCACCTACGTTTTCTGT AACAG) を合成した。

ヒト腎臓由来の cDNA (Clontech 社製) を材料として、前記プライマー、及び Pfu Ultra DNA Polymerase (Stratagene 社製) を用い、以下の条件で PCR を実施した。94℃で 3 分の後、94℃で 30 秒、55℃で 30 秒、72℃で 2 分を 35 回繰り返した後、72℃で 7 分反応させた。アガロース電気泳動を行い、DNA 染色試薬で染色した後、紫外線照射によって PCR によって増幅がなされたか否かを検出した。又、同時に電気泳動したサイズ既知の DNA マーカーと比較することで、PCR 産物の鎖長を確認した。

プラスミドベクター pBR322 を制限酵素 EcoRV (Takara 社製) によって切断し、その切断部位に PCR によって増幅された遺伝子断片を Ligation kit (Promega 社製) を用いて連結した。この反応溶液でエシェリヒア・コリ DH5α 株を形質転換し、PCR 増幅産物がクローニングされたプラスミドを保持する形質転換体を選抜し、更に PCR 増幅産物を DNA 塩基配列解析によって確認した。

この組換えプラスミドを用いてヒト CaSR 発現プラスミド hCaSR/pcDNA3.1 を作製した。

[0075] (実施例 24) CaSR アゴニスト活性の評価 (1)

293E 細胞 (EBNA1 発現 HEK293 細胞、ATCC No. CRL-10852) を、200 µg/ml の G418 (ジェネティシン) 存在下、10% のウシ胎児血清を含む DMEM/Ham's-F12 (3.

15/ml Glucose含有Dulbecco's modified Eagle medium、ナカライテスク) にて培養した。3×10⁶cells/10mlでF25フラスコに撒き、CO₂インキュベータ (5% CO₂、37°C) に24時間静置した後、トランスフェクション試薬Fugene6 (Roche) にてヒトCaSR発現プラスミドhCaSR/pcDNA3.1をトランスフェクションした。CO₂インキュベータに6~7時間置いた後、細胞を10%ウシ胎児血清含有DMEM/Ham's-F12にて回収し、70,000cells/wellでpoly-D-lysine coat 96well plate (BD-Biocoat) に播種した。

CO₂インキュベータにて24時間静置した後、この細胞を播種した96 well plateから培地を除去し、Assay Buffer (146mM NaCl、5mM KCl、1mM MgSO₄、1mg/ml Glucose、20mM HEPES(pH 7.2)、0.75~1.25 mM CaCl₂) に溶解したCa²⁺蛍光指示薬Calcium 4 Assay Kit (Molecular Devices) を200μl/well添加し、37°Cで1時間、次いで室温で10分静置し指示薬を取り込ませた。

この96well plateに、0.1%BSA含有Assay Bufferに溶解した被験化合物を50μl/well添加し、FLEX Station (Molecular Devices) で3分間蛍光強度変化を測定した。

[0076] (EC₅₀算出法)

化合物添加前後の蛍光強度の最大値と最小値の差(RFU(Max-Min)) をFLEX Stationの自動計算にて求めた。化合物最大濃度添加時のRFU(Max-Min) を100%、被験化合物を含まない0.1%BSA含有Assay Bufferを使用時のRFU(Max-Min) を0%と定義した活性率を計算し、表計算ソフトXfitもしくはグラフパッドプリズムにてカーブフィッティングし、活性率50%時の化合物濃度であるEC₅₀値を求めた。

[0077] (実施例25) CaSRアゴニスト活性の評価(2)

293E細胞 (EBNA1発現HEK293細胞、ATCC No. CRL-10852) を、200μg/mlのG418 (ジェネティシン) 存在下、10%のウシ胎児血清を含むDMEM/Ham's-F12 (3.15/ml Glucose含有Dulbecco's modified Eagle medium、ナカライテスク) にて培養した。3×10⁶ cells /10ml でF25フラスコに撒き、CO₂インキュベータ (5%CO₂、37°C) に24時間静置した後、トランスフェクション試薬Fugene6 (Ro

che) にてヒトCaSR発現プラスミドhCaSR/pcDNA3.1をトランスフェクションした。CO₂インキュベータに6～7時間置いた後、細胞を10%ウシ胎児血清含有DMEM/Ham's-F12にて回収し、2×10⁶cells/wellでpoly-D-lysine coat 384well plate (BD-Biocoat) に播種した。

CO₂インキュベータにて24時間静置した後、この細胞を播種した384 well plateから培地を除去し、Assay Buffer (146mM NaCl、5mM KCl、1mM MgSO₄、1mg/ml Glucose、20mM HEPES(pH 7.2)、0.75～1.25 mM CaCl₂、2.5mM Probenecid (SIGMA) に溶解したCa²⁺蛍光指示薬Calcium 5 Assay Kit (Molecular Devices) を40 μl/well添加し、37°Cで45分間、次いで室温で15分静置し指示薬を取り込ませた。

この384well plateに、0.1%BSA含有Assay Bufferに溶解した被験化合物を10 μl/well添加し、FLIPR (Molecular Devices) で3分間蛍光強度変化を測定した。

[0078] (EC₅₀算出法)

化合物添加前後の蛍光強度の最大値と最小値の差(RFU(Max-Min))をFLIPRの自動計算にて求めた。化合物最大濃度添加時のRFU(Max-Min)を100%、被験化合物を含まない0.1%BSA含有Assay Bufferを使用時のRFU(Max-Min)を0%と定義した活性率を計算し、表計算ソフトXfitもしくはグラフパッドプリズムにてカーブフィッティングし、活性率50%時の化合物濃度であるEC₅₀値を求めた。

上記(1)もしくは(2)により測定した結果を表1に示した。

[0079] 表1

化合物	CaSRアゴニスト活性(EC50)(μ M)
γ -Glu-Cys	0.46
化合物8a	14.27
化合物8b	0.053
化合物8c	19.99
化合物8d	1.95
化合物21	1.85
化合物29	0.58
化合物35	0.199

[0080] 本発明の化合物はいずれもCaSR作用活性を示した。中でも、好ましい本発明のランチオニン誘導体である化合物8bは、優れたCaSR作用活性を示し、その活性はCaSR作用活性を有することが既知の γ -Glu-Cysの約9倍ときわめて高活性であった。

[0081] (実施例26) コク味付与活性の評価

化合物8bについて、定量的な官能評価試験によりコク味付与活性の強度を調べた。

定量的官能評価試験は以下のように実施した。グルタミン酸ナトリウム(0.05g/dl)、イノシン酸ーリン酸(0.05g/dl)、塩化ナトリウム(0.5g/dl)を含有する蒸留水に、被験化合物を0.0001~0.0005g/dlにて混合した場合の、コク味付与活性の強度を測定した。無添加コントロールに対しpH $\pm$ 0.2の幅に合わせて使用した。官能評点について、コントロールに対し、同等:0点、強い:3点、非常に強い:5点とするとともに、尺度をより明確にするため、 γ -Glu-Val-Glyの先中味を2.5点、後味を3.0点とした評点を基準にし、評価は、n=5で実施した。なお、0.001g/dl γ -Glu-Val-Glyのコク味強度は、0.01g/dl γ -Glu-Cys-Gly(グルタチオン)のコク味強度(先中味3.0点、後味3.0点)に相当する。採点については、直線尺度法を用い、-5~0~5点の位置を示した直線に対し、該当する採点を位置として記入する方法を用いた。また、食品の調味開発を累積で半年以上経験し、うま味塩味溶液に添加した γ -Glu-Cys-Glyと γ -Glu-Val-Glyの力価の差が10倍前後と判定できる者(定期的に確認)を

パネラーとした。尚、「先中味」とは、口含み後、0～5秒の呈味、後味はそれ以降の呈味である。上記添加濃度で幅広くコク味付与活性を示したが、代表的な濃度の結果を表2に示した。

又、 γ -Glu-Val-Glyについて同様に評価した結果も表2に示した。

[0082]

表 2

化合物	濃度 (g/dl)	コク味の強さ		評価コメント
		先中味	後味	
コントロール	—	0	0	—
γ -Glu-Val-Gly	0.001	2.5	3.0	まろやかさ、濃厚感、ひろがりを中心に強くなる。
化合物8b	0.0001	2.3	2.4	γ -Glu-Val-Glyより先味の立ち上がり早く、先味よりのコク味が付与される。
	0.0005	3.4	3.5	γ -Glu-Val-Glyより先味の立ち上がり早く、先味よりのコク味が付与される。 うま味が強く感じられる。 厚みが付与される。

[0083] 本発明の化合物が低濃度から優れたコク味付与活性を有する、優れたコク味付与剤となりえることがわかり、これは、産業上も非常に有用である。

[0084] (実施例27) かつお節エキスにおけるコク味付与の活性評価

化合物8bについて、定量的な官能評価試験によりコク味付与活性の強度を調べた。

定量的官能評価試験は以下のように実施した。市販のかつお節エキス（50%かつお節だし相当）を20.0 g/dlになるように熱水希釈し、食塩（0.5 g/dl）を加えたかつお節エキス溶液に、被験化合物を0.0001～0.0005 g/dlにて混合した場合の、コク味付与活性の強度を測定した。無添加コントロールに対しpH±0.2の幅に合わせて使用した。官能評点について、コントロールに対し、同等：0点、強い：3点、非常に強い：5点とするとともに、尺度をより明確にするため、 γ -Glu-Val-Glyの先中味を2.5点、後味を3.0点とした評点を基準にし、評価は、n=5で実施した。なお、0.001g/dl γ -Glu-Val-Glyのコク味強度は、0.01g/dl γ -Glu

-Cys-Gly(グルタチオン)のコク味強度(先中味3.0点、後味3.0点)に相当する。採点については、直線尺度法を用い、-5~0~5点の位置を示した直線に対し、該当する採点を位置として記入する方法を用いた。また、食品の調味開発を累積で半年以上経験し、うま味塩味溶液に添加した γ -Glu-Cys-Glyと γ -Glu-Val-Glyの力価の差が10倍前後と判定できる者(定期的に確認)をパネラーとした。尚、「先中味」とは、口含み後、0~5秒の呈味、後味はそれ以降の呈味である。上記添加濃度で幅広くコク味付与活性を示したが、代表的な濃度の結果を表3に示した。

又、 γ -Glu-Val-Glyについて同様に評価した結果も表3に示した。

[0085]

表 3

化合物	濃度 (g/dl)	コク味の強さ		評価コメント
		先中味	後味	
コントロール	-	0	0	-
γ -Glu-Val-Gly	0.001	2.5	3.0	かつお節エキスの肉質感が強くなる。
化合物8b	0.0001	2.3	2.5	γ -Glu-Val-Glyより先味の立ち上がり早く、先味よりのコク味が付与される。 かつお節エキスの酸味がマイルドになる。
	0.0005	3.5	3.7	γ -Glu-Val-Glyより先味の立ち上がり早く、先味よりのコク味が付与される。 かつお節エキスの酸味がマイルドになる。かつお節エキスの肉質感がより強くなる。うま味が強く感じられる。

[0086] かつお節エキスにおいても、本発明のランチオニン誘導体が低濃度から優れたコク味付与活性を有する、優れたコク味付与剤となりえることがわかった。かつお節は味噌汁、そうめんつゆ、うどんつゆ、めんつゆなどに広く使用されており、本発明の化合物は、より低コストおよび微量で、かつお節を使用した食品を改善する事を可能とし、産業上も非常に有用である。

[0087] (実施例28) 牛乳におけるコク味付与活性の評価

化合物8bについて、定量的な官能評価試験によりコク味付与活性の強度を

調べた。

定量的官能評価試験は以下のように実施した。市販牛乳（脂肪分 3.6 %）に、被験化合物を 0.0001 ~ 0.0005 g/dl にて混合した場合の、コク味付与活性の強度を測定した。無添加コントロールに対し pH ± 0.2 の幅に合わせて使用した。官能評点について、コントロールに対し、同等：0 点、強い：3 点、非常に強い：5 点とするとともに、尺度をより明確にするため、 γ -Glu-Val-Gly の先中味を 2.5 点、後味を 3.0 点とした評点を基準にし、評価は、n = 5 で実施した。なお、0.001 g/dl γ -Glu-Val-Gly のコク味強度は、0.01 g/dl γ -Glu-Cys-Gly (グルタチオン) のコク味強度（先中味 3.0 点、後味 3.0 点）に相当する。採点については、直線尺度法を用い、-5 ~ 0 ~ 5 点の位置を示した直線に対し、該当する採点を位置として記入する方法を用いた。また、食品の調味開発を累積で半年以上経験し、うま味塩味溶液に添加した γ -Glu-Cys-Gly と γ -Glu-Val-Gly の力価の差が 10 倍前後と判定できる者（定期的に確認）をパネラーとした。尚、「先中味」とは、口含み後、0 ~ 5 秒の呈味、後味はそれ以降の呈味である。上記添加濃度で幅広くコク味付与活性を示したが、代表的な濃度の結果を表 4 に示した。

又、 γ -Glu-Val-Gly について同様に評価した結果も表 4 に示した。

[0088]

表 4

化合物	濃度 (g/dl)	コク味の強さ		評価コメント
		先中味	後味	
コントロール	-	0	0	-
γ -Glu-Val-Gly	0.001	2.5	3.0	牛乳の濃厚感が強くなる。
化合物 8b	0.0001	2.4	2.3	γ -Glu-Val-Gly より先味の立ち上がり早く、先味よりのコク味が付与される。
	0.0005	3.5	3.5	γ -Glu-Val-Gly より先味の立ち上がり早く、先味よりのコク味が付与される。 牛乳の濃厚感がより強くなる。

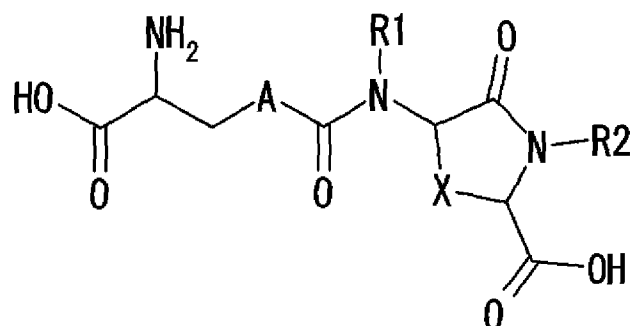
[0089] 牛乳においても、本発明のランチオニン誘導体が低濃度から優れたコク味付与活性を有する、優れたコク味付与剤となりえることがわかった。牛乳は食品・飲料・菓子・醗酵食品の原料などに広く使用されており、本発明の化

合物は、より低コストおよび微量で、牛乳を使用した食品を改善する事を可能とし、産業上も非常に有用である。

請求の範囲

〔請求項1〕 下記式（I）の構造を有する化合物、又はその可食性塩。

〔化1〕



(I)

（式中、R₁ 及び R₂ は、それぞれ独立して、水素原子又は炭素数 1 から 3 のアルキル基を示し、

A は、メチレン基又はオキシ基を示し、

X は、炭素数 1 から 5 のアルキレン基を示し、ただし、該アルキレン基中 1 つのメチレン基が、チオ基、ジスルフィド基、オキシ基、イミノ基、または炭素数 1 ～ 3 のアルキルイミノ基で置換されていても良く、また更に、該アルキレン基は、1 から 6 個の、炭素数 1 ～ 3 のアルキル基で置換されていても良い。）

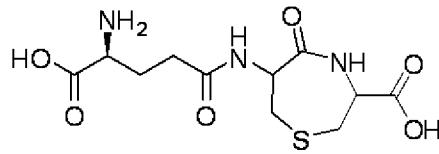
〔請求項2〕 式（I）において、R₁ 及び R₂ が水素原子である、請求項 1 記載の化合物、又はその可食性塩。

〔請求項3〕 式（I）において、A がメチレン基である、請求項 1 又は 2 に記載の化合物、又はその可食性塩。

〔請求項4〕 式（I）において、X が 1 つのメチレン基がチオ基で置換されたトリメチレン基である、請求項 1 ～ 3 のいずれか 1 項に記載の化合物、又はその可食性塩。

〔請求項5〕 下記式（IIa）の構造を有する、請求項 1 記載の化合物、又はその可食性塩。

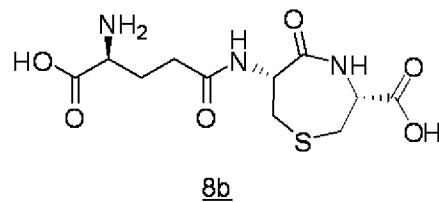
[化2]



(IIa)

[請求項6] 下記式 (8b) の構造を有する、請求項 5 記載の化合物、又はその可食性塩。

[化3]



[請求項7] 式 (I) において、X が、1 つのメチレン基がチオ基で置換されたテトラメチレン基、又は、炭素数 1 ～ 3 のアルキル基で置換された、1 つのメチレン基がチオ基で置換されたトリメチレン基である、請求項 1 ～ 3 のいずれか 1 項に記載の化合物、又はその可食性塩。

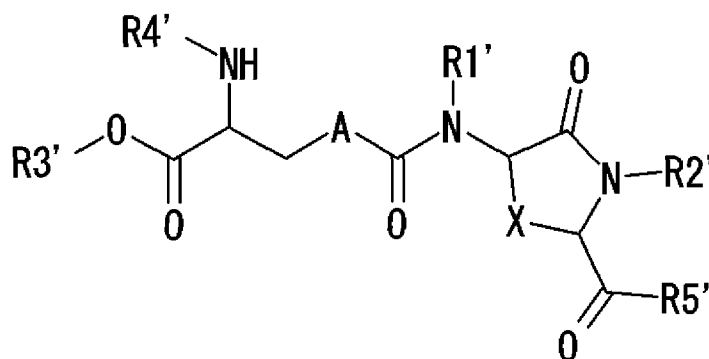
[請求項8] 式 (I) において、X がトリメチレン基である、請求項 1 ～ 3 のいずれか 1 項に記載の化合物、又はその可食性塩。

[請求項9] 請求項 1 ～ 8 記載のいずれか 1 項記載の化合物またはその可食性の塩を 10ppb ～ 99.9% 有する食品組成物。

[請求項10] 請求項 1 ～ 8 記載のいずれか 1 項記載の化合物またはその可食性の塩を有効成分として含有するコク味付与剤。

[請求項11] 下記式 (IA) の構造を有する化合物、又はその化学的に許容しうる塩。

[化4]



(IA)

(式中、 $R1'$ 及び $R2'$ は、それぞれ独立して、水素原子、及び炭素数 1～3 のアルキル基を示し、

$R3'$ は、水素原子、炭素数 1 から 4 のアルキル基、ベンジル基、又は 9-フルオレニルメチル基を示し、

$R4'$ は、*t*-ブトキシカルボニル基、ベンジルオキシカルボニル基、又は 9-フルオレニルメチルオキシカルボニル基を示し、

$R5'$ は、水酸基、炭素数 1～4 のアルコキシ基、ベンジルオキシ基、アミノ基 ($-NH_2$) 又は炭素数 1～3 のアルキルアミノ基を示し、

A は、メチレン基又はオキシ基を示し、

X は、炭素数 1 から 5 のアルキレン基を示し、ただし、該アルキレン基中 1 つのメチレン基が、チオ基、ジスルフィド基、オキシ基、イミノ基、または炭素数 1～3 のアルキルイミノ基で置換されていても良く、また、該アルキレン基は、1 から 6 個の、炭素数 1～3 のアルキル基で置換されていても良い。)