

氏名	み よし けん ご 三 好 剣 五
学位(専攻分野)	博 士 (薬 学)
学位記番号	薬 博 第 453 号
学位授与の日付	平 成 12 年 11 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	薬 学 研 究 科 製 薬 化 学 専 攻
学位論文題目	選 択 的 脱 保 護 反 応 を 利 用 し た リ ン 酸 化 ペ プ チ ド 類 の 合 成 法 の 開 発

論文調査委員 (主 査)
教授 藤 井 信 孝 教授 富 岡 清 教授 富 士 薫

論 文 内 容 の 要 旨

細胞内のシグナル伝達機構の解明, キナーゼ, ホスファターゼ阻害剤の開発研究において, リン酸化ペプチドは必要不可欠な生化学的ツールであり, その実用的な合成法の確立が切望されている。著者はジメチルリン酸化アミノ酸誘導体 [Boc-Tyr/Ser/Thr(OPO₃Me₂)-OH] に着目し, リン酸化ペプチド類の実用的な合成法を検討した。リン酸基の保護基としてのメチル基は, TFA 処理に安定であるため通常の Boc 法によるペプチド鎖の構築が可能であるが, 従来の脱保護法では, メチル基の除去が困難であったため, 本誘導体の実際の合成への応用に問題を残していた。そこで著者は, このメチル基の除去に焦点を当て, これら誘導体を含む保護ペプチド樹脂に対し詳細な脱保護条件の検討を行った結果, 目的とするリン酸化ペプチドを高収率で与える条件を見いだすことができた。さらに著者は本法とチオエステル法によるフラグメント縮合法を組み合わせた長鎖リン酸化ペプチド合成法の開発を行い, 83残基からなるリン酸化ペプチド (HIV-1 REV, 34-116) の合成に応用し, 有用性を実証した。

リン酸化ペプチド類の合成法の開発

著者は予備実験より 1M TMSOTf (trimethylsilyl trifluoromethanesulfonate)-thioanisole/TFA (trifluoroacetic acid) 系の最終脱保護試薬中に DMS (dimethyl sulfide) を加えることによりリン酸メチルエステルの除去が促進されることを見いだした。1M TMSOTf-thioanisole/TFA 系の脱保護溶液中では S_N1 タイプの反応と S_N2 タイプの反応が同時に起こっていると予想されるが, soft nucleophile である DMS を加えることで系全体の酸性度が下がり, S_N2 タイプの反応が優先して起こるようになると考えられる。さらに DMS と同時に TMSOTf を加えるとメチル基の除去がより促進されることが判明した。これらの結果からメチル基の効率的な除去には soft nucleophile である DMS と hard acid である TMSOTf とのコンビネーションが重要であることを明らかにした。

そこで著者は, リン酸化アミノ酸含有保護ペプチド樹脂を通常の Boc 法により合成し, まずメチル基を除く全保護基の除去とペプチドの樹脂からの切断を完了させるため, 通常最終脱保護試薬 [1M TMSOTf-thioanisole/TFA : *m*-cresol : EDT (1, 2-ethanedithiol)=100:5:5 (v/v), 4°C, 1.5時間] による処理を行った。次いでこの系に DMS と TMSOTf を加えるという one-pot, 2段階脱保護法を採用した結果, 高収率で目的物を得ることができた (Figure 1)。

次に, リン酸エステルの酸素原子をジフルオロメチレンに置換した非水解性リン酸化アミノ酸誘導体含有ペプチドの合成に本脱保護法を適用することとした。しかしながら本誘導体のリン酸基の保護基として導入したエチル基の除去は上記の条件では不完全であった。そこでさらなる検討を行った結果, DMS:TMSOTf:*m*-cresol=6:4:1 (v/v) の系により, エチル基が完全に除去されることが判明した。

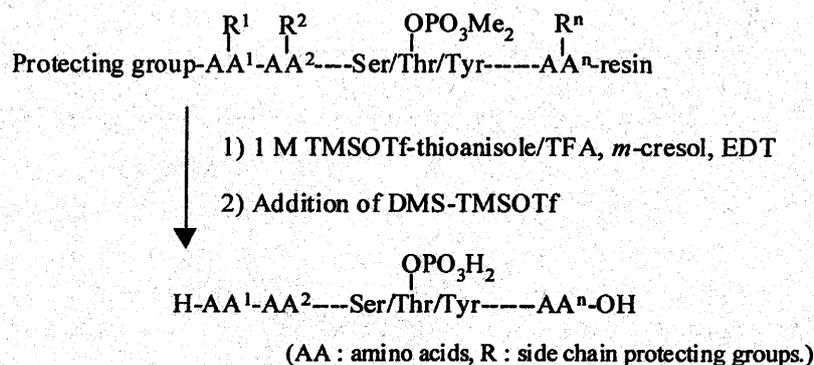


Figure 1. General deprotection scheme for the synthesis of phosphopeptides.

フラグメント縮合法を利用した長鎖リン酸化ペプチドの合成法の開発

次に、長鎖リン酸化ペプチドの合成について検討することとした。まず、ペプチド鎖の構築には相本らにより報告されているチオエステル法を利用することとした。すなわち、固相法によりチオエステル型ペプチドフラグメントを調製し、これを銀塩存在下、アミン成分に縮合させる方法である。これに先立ち著者は、Boc型固相合成法により調製した保護リン酸化ペプチド樹脂を High TFMSA (trifluoromethanesulfonic acid) 系で処理するとリン酸およびリジンの側鎖保護基として使用した Me, ClZ (2-chloro-benzyloxycarbonyl) 基は影響を受けず、他の保護基の除去とペプチドの樹脂からの切断が起こることを見いだした。即ち、この High acidic な系 (TFMSA:TFA:*m*-cresol=1:9:1 (v/v)) を Figure 2 に示したような保護ペプチド樹脂の脱保護に適用すれば、各種官能基の再保護を必要とすることなく直ちにフラグメント縮合に供することができるチオエステルペプチドフラグメントの合成が可能であることを明らかにした。

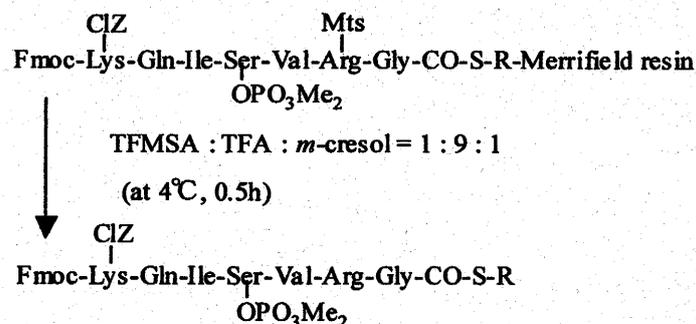


Figure 2. Synthesis of protected phosphopeptide fragment using High TFMSA.

次にこのように合成したチオエステルフラグメントを順次縮合するに際し、Fmoc基除去時のリン酸エステルの安定性について解決すべき問題があった。ジメチル保護リン酸化アミノ酸は、Fmoc基切断に一般的に用いるピペリジン処理に不安定で、リン酸化アミノ酸部分は一部デヒドロアラニン体へと変換される。一方モノメチルリン酸化アミノ酸にはこのような問題は生じない。そこでFmoc基切断時に、ジメチルリン酸化アミノ酸残基を選択的にモノメチルリン酸化アミノ酸に変換しうる試薬系について検討を加えた。その結果、この目的を満たすべきFmoc基切断法として5%piperidine-25%1,4-diazabicyclo [2, 2, 2] octane/DMF系を見いだした。

著者は、これらの基礎研究をもとに Figure 3 に示す長鎖リン酸化ペプチドの新規合成法を考案し、リン酸化蛋白質 REV (HIV-1トランス活性化蛋白質) の83残基部分ペプチド (REV 34-116) の合成を通じて、本法の有用性を実証した。

以上、著者の研究は、従来合成が困難であったリン酸化ペプチド、蛋白質及びその類縁体の合成に有効な手段を提供し、蛋白質のリン酸化、脱リン酸化を介する生体内情報伝達機構の解明研究及びそれに基づく創薬研究に寄与するものと判断される。

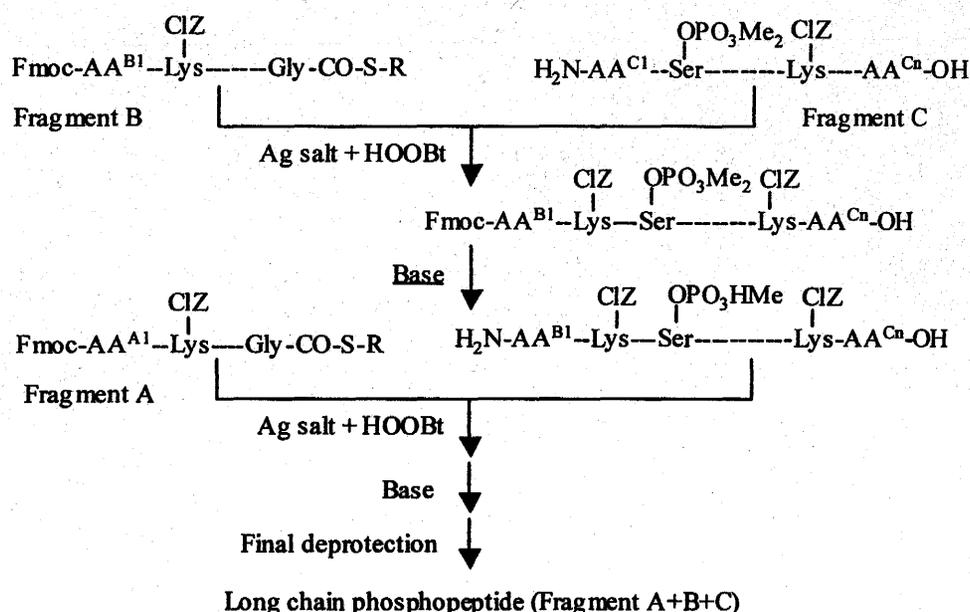


Figure 3. New synthetic methodology for long chain phosphopeptide.

論文審査の結果の要旨

生体内において、細胞内蛋白質中のチロシン、セリン、スレオニン残基のリン酸化、脱リン酸化は細胞表面の生理活性物質（あるいは薬物）受容体を介する細胞内情報伝達過程や核内受容体を介する転写制御に極めて重要な役割を果たしている。さらに、蛋白質の細胞内輸送や代謝過程におけるリン酸化修飾の寄与が明らかにされつつある。すなわち、細胞内の情報伝達機構の解明研究やこれら情報伝達系を標的とした薬物の開発研究において、リン酸化ペプチド類縁化合物は極めて重要な生化学的探索子であり、その実用的な合成法の確立が切望されている。このような観点から1980年代より、リン酸化ペプチドの実用的な合成法が検討されてきたが、最終脱保護反応の際のリン酸エステルの安定性に起因する大きな問題を残していた。すなわち、リン酸エステル上の保護基の除去反応とリン酸化アミノ酸からのリン酸基の脱離反応はいずれも炭素-酸素結合間の切断反応であり、脱保護反応に際して前者のみを選択的に進行させることが必須となる。著者は、ハード酸とソフト核剤による緩和な選択的脱保護反応を見だし、これを活用したリン酸化ペプチド類の合成法に詳細な検討を加えた。

リン酸基の保護基としてのメチル基は、トリフルオロ酢酸処理に安定であるため、ジメチルホスホアミノ酸誘導体を用いて、通常の Boc 法によるペプチド鎖の構築が可能である。しかしながら従来の脱保護法では、メチル基の除去が困難であったため、本誘導体の実際のペプチド合成への応用例はほとんど見られなかった。著者は、このメチル基の脱保護に焦点を当て、*teimethylsilyl trifluoromethanesulfonate* と *dimethyl sulfide* を用いる S_N2 型脱保護反応により、リン酸基を安定に保持したまま効率的に除去できる条件を見だし、本法と従来の脱保護反応を組み合わせたリン酸化ペプチドの効率的な合成法を確立した。さらに、リン酸エステルの酸素原子をジフルオロメチレンに置換した非水解性リン酸化アミノ酸誘導体含有ペプチドの合成にも本法が有効に应用できることを明らかにした。また、リン酸エステルの安定性に関する F^- イオンの影響に着目し、リン酸化ペプチドから非リン酸化ペプチドを得るための *tetrabutylammonium bifluoride* を用いる簡便かつ実用的な化学的脱リン酸化法を見出した。

一方、長鎖のリン酸化蛋白質の合成に際して、固相担体上での段階的伸長法によるペプチド合成には限界がある。そこで著者は、チオエステル法を利用したフラグメント縮合とリン酸化アミノ酸の選択的脱保護法の両立性に基づく長鎖リン酸化ペプチドの実用的な合成ストラテジーを考案し、リン酸化蛋白質 REV (HIV-1トランス活性化蛋白質) の83残基ペプチド (REV34-116) の合成を通じてその有用性を実証した。

以上のように、著者は新規最終脱保護系の開発を足掛かりに、リン酸化ペプチド類の効率的な合成法を確立した。本研究は蛋白質のリン酸化を介する生体内情報伝達様式の解明研究および非水解性リン酸化ペプチド等価体等の細胞内機能探索分子の創製の為に有用な基礎的知見を提供すると判断される。

よって、本論文は博士（薬学）の論文として価値あるものと認める。

更に、平成12年9月19日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果合格と認めた。