

氏 名	こ い で た か き 小 出 隆 規
学位(専攻分野)	博 士 (薬 学)
学位記番号	薬 博 第 338 号
学位授与の日付	平成 6 年 3 月 23 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	スルホキシドを用いた新規酸化法によるシスチン及びセレノシ スチン含有ペプチドの合成研究

論文調査委員 (主 査)
教授 藤井信孝 教授 別所 清 教授 藤多哲朗

論 文 内 容 の 要 旨

生理活性ペプチド中のジスルフィド結合はそれらの立体構造を固定し、安定化させることによりその活性発現に重要な役割を果たしている。シスチン含有ペプチドの合成において、最終段階のジスルフィド結合形成は合成の正否を握る重要な反応である。従来より、ペプチドのジスルフィド結合形成には、塩基性水溶液中で行なう空気酸化法が多用されている。しかし、目的とするペプチドが塩基性あるいは疎水性の高いものである場合、基質の溶媒への溶解性が問題となる。その他にもヨウ素や重金属などによるジスルフィド結合形成法が報告されているが、これらの方法は副反応や毒性の問題から広く一般に應用されているとはいえない。これら従来法の欠点を克服した簡便なジスルフィド結合形成法の開発はシスチン含有ペプチド合成及び構造機能相関研究において意義がある。

(1)ジメチルスルホキシド(DMSO)-トリフルオロ酢酸(TFA)系によるジスルフィド結合形成法の開発

著者はスルホキシドが有する酸化力に着目し、TFA中DMSOを用いたジスルフィド結合形成反応について検討した。その結果10%DMSO-TFA系が遊離のシステイン残基間で速やかにジスルフィド結合を形成させる能力を有していることを明らかにした。この反応を用いて分子内に1本のジスルフィド結合を有するオキシトシンおよびヒト α 型カルシトニン遺伝子関連ペプチドの合成を行ない、短時間かつ高収率に目的物を得た。また、この系は4-methoxybenzyl (MBzl) 基等の保護基でチオール基を保護したシステインからも直接ジスルフィド結合を形成させることができることを見出し、これを応用して2個のシステイン残基をMBzl基で保護したオキシトシンから直接目的とするジスルフィド体を得ることに成功した。このような直接的ジスルフィド結合形成法は空気による酸化を受けやすい遊離のチオール基を持つペプチドを扱う困難を回避できるという点で、特にジスルフィド結合形成前に精製を必要とするような長鎖のペプチドの合成に有利であると考えられる。

また、このDMSO-TFAによる脱保護-酸化系が複数のランダムなジスルフィド結合形成にも応用可能か否かを分子内に2本のジスルフィド結合を有するアパミンをモデルとして詳細に検討した。その結果、

DMSO-TFA 系では水系溶媒中での空気酸化とは異なり、非天然型のジスルフィド架橋様式をもつ異性体が優先的に生成した。従って、TFA をジスルフィド結合形成の溶媒とすることは、その高い溶解力によりペプチドの不溶性の問題を解決したが、反面、その変性作用によりジスルフィド異性体が生成する危険性があることも明らかになった。

(2)スルホキシド-シリル化剤-TFA 系によるジスルフィド結合形成法の開発

DMSO-TFA 系では S-acetamidomethyl 基など TFA に対して安定性の高い S-保護基を有するシステイン誘導体をシスチンに変換することはできなかった。そこで、これら比較的安定な S-保護基を有するシステイン残基間においても直接的なジスルフィド結合形成を可能にする目的で、種々のスルホキシドとシリル化剤の組み合わせによる脱保護-酸化系を検討した。その結果、各種 S-保護システインからのシスチン形成には、その保護法と試薬の組み合わせにおいて選択性のあることが明らかになった。また、このスルホキシド-シリル化剤-TFA 系を用いて、S-保護オキシトシンおよび S-保護チキンカルシトニンからの直接的なジスルフィド結合形成を行ない、良好な結果を得た。

(3)セレノシスチン含有ペプチドの合成とその性質

セレノシステインは天然に存在するアミノ酸であるが、セレノシステインあるいはセレノシスチンを含有するペプチドの合成研究はほとんどなされておらず、その性質も明かではない。そこで著者は、セレノシスチン含有ペプチドの合成法を確立するため、まず前駆体となる N-9-fluorenylmethoxycarbonyl-Se-4-methoxybenzyl-L-selenocysteine (Fmoc-Sec (MBzl)-OH) の合成を行ない、この前駆体が現在最も汎用されている Fmoc-固相合成法に応用可能であることを確認した。さらに、ジセレニド結合形成法の研究において、Se-MBzl 基は S-MBzl 基と同様、上記の DMSO-TFA 系あるいはスルホキシド-シリル化剤-TFA 系により直接ジセレニドに変換されることを明らかにした。一方、ヨウ素を酸化剤として用いた場合 Se-MBzl 基と S-MBzl 基では全く異なる反応性を示した。また、合成したセレノシスチン含有モデルペプチドを用いてジセレニドとチオールとの間の酸化還元反応の速度論的解析を行ない、ペプチド中のジセレニド結合がジスルフィド結合とは大きく異なる挙動を示すことを明らかにした。

これらの知見をもとにラット心房性ナトリウム利尿ペプチドのシスチン残基の硫黄原子をセレンに置換した数種のアナログの合成を行ない、Cys (MBzl) あるいは Sec (MBzl) 残基間でダイレクトに架橋するという新しい合成ルートの有用性を証明した。また、そのアナログのレセプター結合能及び cyclicGMP 産生能についても検討を加えた。

以上、著者は DMSO-TFA 系あるいはスルホキシド-シリル化剤-TFA 系による新しいペプチドのジスルフィド結合形成法を開発し、これらの方法が遊離のシステイン残基のみならずそのチオール基を保護したシステイン残基間でも直接架橋形成をできるという長所を有していることを明らかにした。本法は溶媒として TFA を用いるため従来の空気酸化法では合成が困難な疎水性の高い基質にも応用可能である。さらに、この方法で用いる試薬は安価で毒性も低いため、本法はペプチド性医薬品の合成にも有益な手法であると考えられる。また、著者はセレノシスチンを含有するペプチドの合成法を確立し、ペプチド中のジセレニド結合の性質についても新しい知見を得た。

これらの研究によって得られた成果はシスチン含有ペプチドの合成研究及び構造活性相関研究に有用な

知見を提供するものであり、ペプチド化学の進展に資するものがあると考えられる。

論文審査の結果の要旨

シスチン含有ペプチドの化学合成においてジスルフィド結合形成反応は合成の成否を左右する重要な鍵反応である。現在、水系溶媒中での空気酸化法が汎用されているが疎水性ペプチド等への適用に問題を残している。

著者は、トリフルオロ酢酸 (TFA) の優れた溶解性とスルフォキシドの酸化力に着目し、シスチン含有ペプチドの合成における新しいジスルフィド結合形成法として、1) ジメチルスルフォキシド (DMSO)-TFA 法、及び 2) スルホキシド-シリル化剤-TFA 法、を開発した。

本法は以下の優れた特徴を有している。

1) 溶媒として用いる TFA はペプチドに対して極めて高い溶解力を有し、水系溶媒に難溶な疎水性ペプチドや保護基の付いたペプチドにも応用可能である。

2) 種々の S-保護システインから S-脱保護と同時に直接的なジスルフィド形成が可能である。

3) 酸に対する安定性の異なる種々の S-保護システインに対してスルフォキシドとシリル化剤の組み合わせにより選択的な脱保護、ジスルフィド形成が可能である。

4) 従来の空気酸化法に比べて反応時間が短い。

5) S-脱保護時に毒性の強い重金属を用いないため生体に対する安全性も高くペプチド性医薬品の合成にも有用な手段となる。

更に、カルシトニンやカルシトニン遺伝子関連ペプチド等の生理活性ペプチドの合成を通じて本合成法の有用性を明らかにした。

一方、アバミンをモデルとした実験から、複数のジスルフィドを有するペプチドの合成に応用する場合、天然型と異なるジスルフィド異性体が優先的に生成する危険性を考慮する必要がある事を指摘している。

著者はまた、シスチン同属体であるセレノシスチンを含有するペプチドの合成法に検討を加えた。セレノシスチン前駆体として、現在ペプチドの化学合成に汎用されている Fmoc (fluorenylmethoxycarbonyl) 型固相合成法に適用できる Fmoc-Sec (MBzl)-OH を開発し、上記のスルフォキシド酸化法を用いる新しい合成ルートを確立した。さらにペプチド中のジセレニド結合の酸化還元反応における化学的挙動を速度論的に解析し、ジセレニド結合がジスルフィド結合と比較してチオールによる還元を受けやすいこと、また再酸化も受け易く、過剰のチオールの存在下でも平衡状態において酸化型の存在比が大きくなることを明らかにした。次に本法を応用してラット心房性ナトリウム利尿ペプチド (rANP) のシスチン残基のイオウ原子をセレンに置換した 3 種の誘導体の合成を行ない、合成法の有用性を証明するとともに、3 種の誘導体が天然のジスルフィド体と同等な生物活性を示すことを明らかにした。即ち、rANP の生物活性発現にはジスルフィド近傍の立体構造が重要であることが指摘されていることから、ペプチド中のシスチン残基は立体的構造を変化させることなくセレノシスチン残基に置換できる事を示している。

以上の研究は、シスチン含有ペプチドの化学合成および構造活性相関研究の進展に資するものがあると考えられる。

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6年2月17日論文内容とそれに関連した事項につき試問を行なった結果、合格と認定した。