

氏 名	藤 井 利 幸 ふじ い とし ゆき
学位の種類	薬 学 博 士
学位記番号	論 薬 博 第 162 号
学位授与の日付	昭 和 51 年 9 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 5 条 第 2 項 該 当
学位論文題目	N^{im}-Tosylhistidine 誘導体を用いるペプチドの合成研究

論文調査委員 (主 査) 教 授 矢 島 治 明 教 授 井 上 博 之 教 授 犬 伏 康 夫

論 文 内 容 の 要 旨

本研究はヒスチジン含有ペプチドの合成にあたり、実用的なイミダゾール核の保護基の開発を目的としたものである。

この目的に適う保護基としては、まず保護基の導入及び除去が容易で、N^αの保護基との間に選択性があること、さらに誘導体の結晶性並びに安定性が良好であること、また出来れば原料の入手が容易であることなど、多くの条件を具備することが要請される。著者はこの大半の要件を満たす保護基として p-Toluenesulfonyl 基 (Tosyl 基) が良好であることを見出し、各種の N^α-置換-N^{im}-Tosylhistidine 誘導体を調製し、本保護基の特徴ある性質を利用して、固相法では 11e⁵-Angiotensin II を、また液相法では Thyrotropin Releasing Hormone (TRH)、及び Luteinizing Hormone Releasing Hormone (LH-RH) を選んで合成し、N^{im}-Tosyl 基の有用性を確かめることが出来た。なお、本合成研究に際し、著者は反応性の高い新縮合剤としてカルボニルジ-オキサダイアゾロンを開発した。

N^α-置換-N^{im}-Tosylhistidine 誘導体の合成と化学的性質。

His-OMe (I) を X-Cl または X-N₃ [X: Aoc(*t*-amyloxycarbonyl), Boc(*t*-butoxycarbonyl), Z(benzyloxycarbonyl), Z(OMe)(*p*-methoxybenzyloxycarbonyl)] と反応させて X-His (X)-OMe (II) とし、II を苛性アルカリと処理してエステルの鹼化と同時に N^{im}-X 基を脱離し、次いで炭酸ソーダの存在下に Tosylchloride を反応させて目的とする X-His (Tos)-OH (III) を好収量で合成した。これら四種の誘導体は全て結晶性の良い化合物であり、通常のペプチド合成に用いられる各種の溶媒に易溶である。

N^{im}-Tosyl 基は、Aoc, Boc, Nps (*o*-nitrophenylsulfonyl), Z(OMe) 基が除去可能な条件、例えば CH₂Cl₂ 中 50%CF₃COOH 処理、15℃以下30分乃至1時間安定である。一方、本基は酸では無水弗化水素 (0, 30分間)、アルカリではN-苛性アルカリ (室温、1~2時間) 及び、メタノール中の飽和アンモニア (室温、一昼夜) 処理することによって完全に除去される。また本基は 1-hydroxybenzotriazole (HOBT) の存在下室温で容易に切断されることが判明した。以上の除去条件の特異性は従来使用されて来た接触

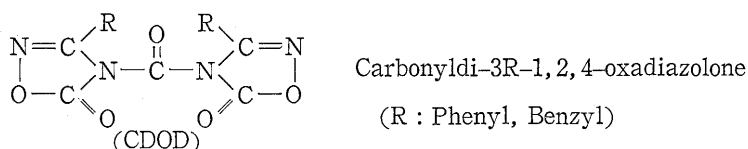
還元または液相中金属ナトリウム処理によってのみ除去可能な、 N^{im} -Benzyl 基に優るものと考えられる。

ペプチド合成への応用。

Ⅲをペプチド合成に応用する予備実験としてモデルペプチド H-Ala-His-Gly-OH (Ⅳ) を合成した。まず、Ⅲ[X: Aoc, Boc, Nps, Z (oMe)] と H-Gly-OBzl との縮合反応は、ジシクロヘキシルカルボジイミド (DCC) 法、混酸無水物法、活性エステル法のいずれの方法でも良好に進行した。ついで、生成物 X-His(Tos)-Gly-OBzl の N^α の保護基を 50%CF₃COOH/CH₂Cl₂ で除去後、Nps-Ala-OH と DCC 法、または N-ヒドロキシサクシンイミドエステル法(ONSu)で縮合させて結晶性の良い Nps-Ala-His(Tos)-Gly-OBzl を好収量で得ることが出来た。最後に本品を無水弗化水素で処理し、全保護基を除去してⅣを得た。本モデル実験で、本ヒスチジン誘導体を酸成分とした場合、従来のアジド法のみには制限されることなく、そのカルボキシル基を任意に活性化することが出来ること、またアミノ成分とした場合、 N^α の保護基を除去する際にもそのまま維持することが出来、その結果、生成物がたえず中性であるため精製が容易であること、最終的に他の保護基と共に弗化水素で除去可能なこと等、 N^{im} -Tosyl 基が液相法におけるヒスチジン含有ペプチドの合成に際し、そのイミダゾール核の良好な保護基となり得ることを確かめた。

新縮合剤 Carbonyldi-oxadiazolone (CDOD) の開発。

従来、Anderson 等の開発した Carbonyldi-imidazole は反応に比較的時間がかかる欠点がある。著者は、この種の試薬の反応性を高めるべく種々検討した結果、下記化合物 CDOD がその目的に適った化合物であることを見出した。



本試薬は低温で短時間に反応すること、しかも弱酸性で反応するためジケトピペラジンの生成が無いこと、また、特に N^α -アシル- N^ϵ -置換アルギニン誘導体の縮合に際しラクタム形成の副反応を生じない利点を有することが判明したので、この特徴を以下に述べる TRH、及び LH-RH の合成に応用した。

N^{im} -Tosylhistidine 誘導体を用いる生理活性ペプチドの合成。

1) 11e⁵-Angiotensin II の固相合成。

まず、著者は N^{im} -Tosylhistidine 誘導体の固相合成への応用性をも検討するため、11e⁵-Angiotensin II の合成を行った。従来、固相法においてイミダゾール核を保護しないとヒスチジンの導入率は著しく低下し、その結果、欠陥ペプチドが得られることが知られていた。著者は Merrifield の方法に倣って、Aoc-Phe-樹脂より出発し、50%CF₃COOH/CH₂Cl₂ による Aoc の除去法と DCC による Aoc-アミノ酸の縮合法を組み合わせ、Z-Asp(OBzl)-Arg(Tos)-Val-Tyr(Bzl)-11e-His(Tos)-Pro-Phe-樹脂を合成した。ついで無水弗化水素処理で樹脂からのペプチドの脱離及び保護基の切断を一挙に行ない、欠陥ペプチドを含まない高純度の 11e⁵-Angiotensin II : H-Asp-Arg-Val-Tyr-11e-His-Pro-Phe-OH を合成することが出来、固相法においても N^{im} -Tosyl 基が有用な保護基であることを立証した。

2) TRH の合成。

Nps-His(Tos)-OH と Pro-NH₂ を CDOD 法で縮合させて Nps-His(Tos)-Pro-NH₂ (V) とし, V を 50%CF₃COOH/CH₂Cl₂ で脱 Nps 化後, Z-Gln-OH と再び CDOD 法で縮合し Z-Gln-His(Tos)-Pro-NH₂ (IV) を合成した。粗 VI をシリカゲルクロマトグラフィーで精製し, 最後は無水弗化水素処理をして高純度の TRH を合成した。本品は DCC 法によって得た標品とも一致し, 著者の開発した CDOD が N^{im}-Tosylhistidine の縮合にも使用出来ること, および, 本誘導体の使用によって精製過程を簡易化出来る利点を認めた。

3) LH-RH の合成。

つぎに, LH-RH の合成については, さきの N^{im}-Tosyl 基が HOBT によって脱離される特異性, 及び前記縮合剤が Z-Arg (Tos)-OH の反応において, ラクトム形成の副反応を惹起しない秀れた性質を利用して合成した。すなわち, Z-Arg (Tos)-OH を CDOD の存在下, H-Pro-Gly-OEt と反応させて極めて好収率で Z-Arg(Tos)-Pro-Gly-OEt (VII) としたのち, VII を脱 Z 化後, Boc-Leu-Arg(Tos)-Pro-Gly-NH₂ (VIII) に導き, VIII を脱 Boc 化したものを, 別に合成した Boc-Trp-Ser(Bzl)-Tyr(Bzl)-Gly-OH と水溶性カルボジイミド法で縮合して Boc-Trp-Ser(Bzl)-Tyr(Bzl)-Gly-Leu-Arg(Tos)-Pro-Gly-NH₂ (IX) を合成した。この IX を脱 Boc 化後, Boc-His(Tos)-OH を HOBT の存在下に DCC 法で縮合させると, 主反応生成物は予想した如く, N^{im}-Tosyl 基の脱離した Boc-His-Trp-Ser(Bzl)-Tyr(Bzl)-Gly-Leu-Arg(Tos)-Pro-Gly-NH₂ (X) で, ここに N^{im}-Tosylhistidine 誘導体の新しい利用法を提供することが出来た。なお, X を脱 Boc 化後, Z-Glu-ONSu と反応させて Z-Glu-His-Trp-Ser(Bzl)-Tyr(Bzl)-Gly-Leu-Arg(Tos)-Pro-Gly-NH₂ (XI) とした後, XI をアニソール及びトリプトファンの存在下に無水弗化水素で全ての保護基を脱離し, 粗品を Sephadex LH-20 を用いるゲル濾過法で精製して高純度の LH-RH を得ることが出来た。

以上, 著者はヒスチジンのイミダゾール核の保護基に Tosyl 基を採用することにより, その特徴ある性質を利用して, 今迄煩雑な手段を余儀無くされていたヒスチジン含有ペプチドの合成を, 固相, 液相両合成法において比較的容易に行なうことが出来ることを実例をもって示した。特に, その誘導体の一つである Boc-His(Tos)-OH・DCHA 塩はすでに一般のペプチド合成に広く利用されつつあり, また新たに開発した CDOD も秀れた特性を有する縮合剤の一種と判断されるので著者の研究はペプチド合成化学上有意義であると考ええる。

論文審査の結果の要旨

従来 histidine 含有ペプチドの合成に際し, 実用的な imidazole 核の保護基として使用されて来たものは du Vigneaud らによって報告されたベンジル基が唯一のものであった。しかし本保護基の除去には含硫アミノ酸のない場合にかぎり長時間の接触還元法が用いられるが, 一般には液安中の金属ナトリウムによる還元法が唯一の方法であったため, これに変わりうる実用性の高い imidazole 核の保護基が要求されていた。

本論文は上記の要求に答えて N^{im}-tosylhistidine を新しく開発し, 本誘導体を用いて数種の生物活性ペ

プチドを合成して、その実用性を検討するとともに、研究途上、新しい酸アミド形成試薬、carbonyl di-1,2,4-oxadiazolone を開発したものである。

著者はまずトシル基を histidine の imidazole 核に導入すると、本基は従来知られていた1級アミノ基に導入されたトシル基とは非常に異った化学的性質を示すことを見い出した。すなわち本基は室温下短時間に1規定苛性ソーダ、あるいは飽和アンモニア性メタノール中で除去される以外に、弗化水素、N-hydroxybenzotriazoleによっても容易に除去される。しかし本基は α -アミノ保護基、例えば tert-butoxy-carbonyl 基等を除去してペプチド鎖を延長しようとする場合のトリフルオロ酢酸処理に安定である。これらの性質を利用して、著者は angiotensin を固相法により、thyrotropin releasing hormone, luteinizing hormone releasing hormone を従来の液相法で合成し、本誘導体がペプチド合成法のいずれにも利用出来ることを示した。現在本誘導体は外国でも実際のペプチド合成に広く利用されるに到っている。

以上の研究途上、著者は新しい縮合試薬、carbonyldioxadiazoloneを開発したが、本試薬は従来知られていた carbonyldiimidazole よりも高い反応性を示すものであり、上記のペプチド合成に活用された。

以上の研究は、従来困難が多かった histidine 含有ペプチドの合成をいちじるしく改善したものであり、また新しく開発された縮合剤とともにペプチド合成化学に寄与するところ大なるものがある。

よって、本論文は薬学博士の学位論文として価値あるものと認める。