

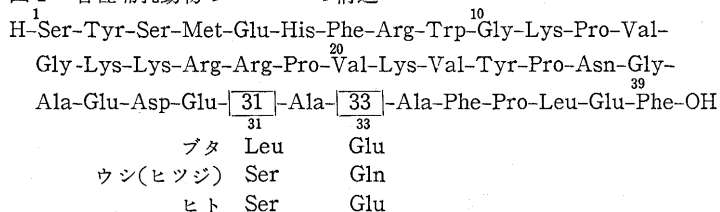
氏名 小 山 要
こ やま かなめ
 学位の種類 薬 学 博 士
 学位記番号 論 薬 博 第 207 号
 学位授与の日付 昭 和 54 年 1 月 23 日
 学位授与の要件 学 位 規 則 第 5 条 第 2 項 該 当
 学位論文題目 ブタ, ウシ (ヒツジ) およびヒトの副腎皮質刺激ホルモン (ACTH) の全合成研究

(主 査)
 論文調査委員 教 授 矢 島 治 明 教 授 犬 伏 康 夫 教 授 山 科 郁 男

論 文 内 容 の 要 旨

副腎皮質刺激ホルモン (ACTH) は脳下垂体前葉ペプチドホルモンの一種であり、39個のアミノ酸より構成されている。1971年, Gráf らはブタ ACTH のアルカリによる脱アミド化反応を再検討した際、かつて1954年, Bell ら, White らが提出した構造式のC末端区分に一部誤りのあることを指摘し、この構造を訂正するに至った。ひきつづき、従来のヒト, ウシの ACTH の構造もそれぞれ Riniker ら, Li らによって再検討, 訂正され、ヒツジはウシと同一の ACTH を有することが明らかにされた。すなわち、現在知られている哺乳動物の ACTH の種差は図1に示されるように31位と33位の2ヶ所であることが判明した。

図1 各種哺乳動物の ACTH の構造



以上の構造研究以外に、ACTH の研究上に加えられた重要な知見は1973年, Scott らがブタ ACTH を前駆体とする α -メラニン細胞刺激ホルモン (α -MSH) と ACTH 様脳下垂体中葉ペプチド (Corticotropin-Like Intermediate Lobe Peptide ; CLIP) の生体内生成機構を解明したことである。後者は ACTH の18位~39位に対応する docosaepptide であり、Larsson が消化管における CLIP 様ペプチドの存在を示唆しているように、その生理的意義の解明が急がれている。

合成研究として、訂正構造式に従ったヒト ACTH は1972年, Sieber らによって初めて合成され、その後、別途合成の報告もあるが、著者はここに、未合成のブタ CLIP を含め、構造訂正されたブタ、およびウシ (ヒツジ) の ACTH を初めて全合成した。なお、ヒトの ACTH も上記の著者らとは異なる方法で

合成したものであるが、これらの合成に先立ち、DCC (dicyclohexyl-carbodiimide) による区分ペプチドの縮合の際のラセミ化抑制剤に検討を加えた。

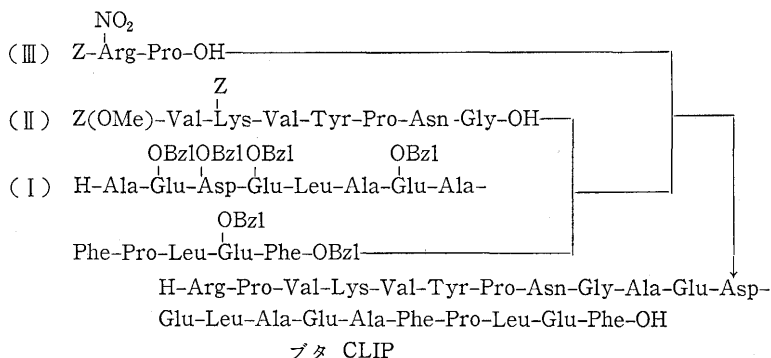
1. ラセミ化抑制剤クロル置換 8-ヒドロキシキノリンの検討

DCC によって区分ペプチドを縮合する際、区分ペプチドの C 末端のアミノ酸残基が Pro か Gly でなければ、オキサゾロンを経由してラセミ化することが知られている。それ故、優秀なラセミ化抑制剤を開発することができれば、C 末端のアミノ酸残基に関係なく DCC による区分ペプチドの縮合が可能となり、合成法はかなり簡易化されるものと思われる。そこで、著者は Jakubke の 8-ヒドロキシキノリン以外に、そのクロル置換 8-ヒドロキシキノリン類のラセミ化抑制能を Bodanszky らのラセミ化検出法により調べた。その結果、5, 7-ジクロル-8-ヒドロキシキノリンが、現在最も有効なラセミ化抑制剤とされる N-hydroxybenztriazole (HOBT) とほぼ同等のラセミ化抑制能を有することを認めた。しかし、現在、最もラセミ化の少ない縮合法であると言われているアジド法に比べるとまだ満足すべきものではないと思われるので、今回の合成に際し、DCC による区分縮合は Pro か Gly を C 末端とする場合に限り、Pro, Gly 以外のアミノ酸残基を C 末端とする区分ペプチドの縮合はすべてアジド法により行った。

2. ブタ CLIP の合成

ヒト、ウシ型 CLIP はすでに矢島、河谷によって合成されたが、著者は図 2 に示す方法により、ブタ CLIP を合成した。使用した区分ペプチドのうち、(II) と (III) は上記の合成にも利用されたペプチドであるが、区分ペプチド (I) は動物差のある区分であり、まず、Z(OMe)-Leu-Ala-NHNH₂ と H-Glu(OBzl)-Ala-Phe-Pro-OH をアジド法で縮合して hexapeptide とし、これと H-Leu-Glu(OBzl)-Phe(OBzl) を IIDQ (N-isobutoxycarbonyl-2-isobutoxy-1, 2-dihydroquinoline) で縮合後、Z(OMe) 基を TFA (トリフルオロ酢酸) で除去しつつ、対応のアミノ酸を順次活性エステル法で導入して新たに合成した。これに Gly, Pro を C 末端とする 2 区分ペプチドを HOBT の存在下、DCC で順次縮合したが、ここに加えた HOBT はラセミ化抑制ではなく、N-acyl 尿素の副生を抑制するために使用したものである。

図 2 ブタ CLIP の合成図



Z(OMe)=p-methoxybenzyloxycarbonyl, Z=benzyloxycarbonyl

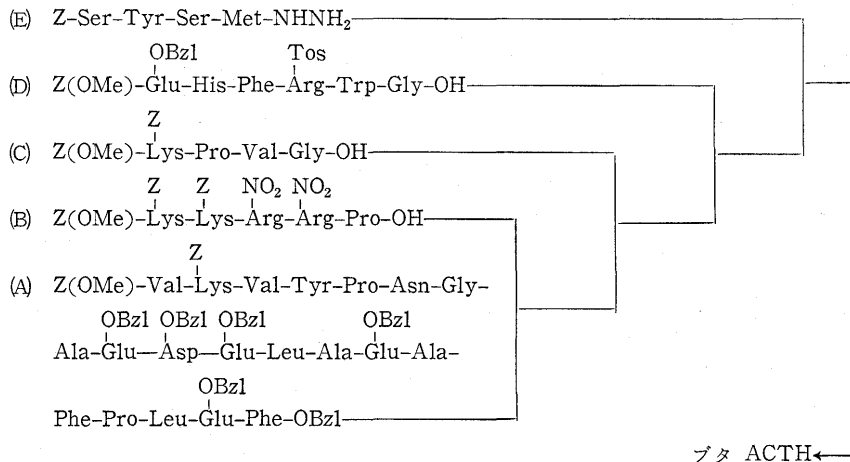
得られた保護 docosaepptide ester をアニソール存在下、0°, 60分間弗化水素処理して全保護基を除去した後、Amberlite IR-4B 樹脂処理により酢酸塩に変換、ついで、Sephadex G-25 上の Partition column chromatography で精製してブタ CLIP を得た。本品は天然ブタ ACTH の抗血清に対し、¹²⁵I-ヒト CL

IP を tracer とした時、天然ブタ ACTH と同様の交差反応を示した。

3. ブタ ACTH の全合成

ブタ ACTH の全合成は上記 CLIP の合成に際して得られる (I) と (II) の縮合体, eicosapeptide ester を出発原料として、これに 4 区分ペプチドを順次縮合して行なわれたものである (図 3)。側鎖官能基のあるアミノ酸に対しては、弗化水素によって除去出来る保護基を採用した。すなわち、上記の Glu (OBzl), Asp(OBzl), Arg(NO₂) 以外に、Arg(Tos) および Lys(Z) を用いた。ACTH の N 末端区分ペプチドの合成についてはすでに多数の報告があるのであるが、 α -アミノ保護基の Z(OMe) 基と組み合わせて、保護基の選択の点で他の著者らと異った方法を採用した。区分ペプチド(B), (C)はそれぞれ Pro, Gly を C 末端とする区分ペプチドであるので、まず、これらを上記した DCC-HOBT 法で縮合した。つぎの(D)も Gly を C 末端とする区分ペプチドであるが、分子中の His 残基と DCC との副反応が知られているので、これは PCP-O-TCA (pentachlorophenyltrichloroacetate) による活性エステル法で導入した。ついで、N 末端区分ペプチド(E)をアジド法で導入し、保護基のついた nonatriacontapeptide ester を得た。ついで、全保護基を弗化水素処理 (0°, 60分間) して除去したが、この際、アルキル化の副反応を抑制するため、anisole 以外に、Trp, Met を添加した。ついで、生成物を Amberlite IR-4B 樹脂 (酢酸型) 処理して酢酸塩に変換後、Sephadex G-25 のゲル濾過、CM-Sephadex のイオン交換クロマトグラフィーにより精製し、Sephadex G-25 のゲル濾過脱塩後、凍結乾燥してブタ ACTH を得た。本品は TLC および Disc 電気泳動で単一スポットを示し、酸分解およびアミノペプチダーゼ消化後のアミノ酸分析値は理論値に一致した。また、本合成ブタ ACTH は天然ブタ ACTH と TLC で同一挙動を示した。本品の in vivo における steroidogenic activity は 148.2 IU/mg であった。

図 3 ブタ ACTH の全合成図



4. ウシ (ヒツジ) ACTH の全合成

つぎに、ウシ ACTH の全合成を上記のブタ ACTH の合成に準じて行った。すなわち、本合成は矢島、河谷らのウシ型 CLIP の合成中間体に多少の改良を加えて得られる C 端 eicosapeptide ester を出発原料とし、これに上記の区分ペプチド(B), (C)を順次縮合したが、N 末端部には decapeptide, Z-Ser-Tyr-Ser-

Met-Glu(OBu^t)-His-Phe-Arg(Tos)-Trp-Gly-OH を用い、これを DCC-HOBt 法で縮合した。この際の His 残基への DCC 付加体を Riniker の指摘するように、メタノール-酢酸処理によって除去した。このようにして得られた保護基のついた nonatriacontapeptide ester を弗化水素処理し、ついで、ブタ ACTH の合成の時と同様に、精製を行ってウシ (ヒツジ) ACTH を得た。本品の純度を TLC, Disc 電気泳動, 酸分解およびアミノペプチダーゼ消化後のアミノ酸分析によって確認した。なお、本品の in vivo における steroidegenetic activity は 93.8 IU/mg であった。

5. ヒト ACTH の全合成

ヒト ACTH は Sieber ら, Kisfaludy ら, 藤野らによって液相法で、また、Yamashiro らによって固相法で合成されている。これらの液相法による合成はすべて Glu(OBu^t), Asp(OBu^t) を使用して行なわれたものであり、上記の著者の合成原理と異なるので、ブタ ACTH 合成法を適用してヒト ACTH を別途合成した。本合成ヒト ACTH の in vivo における steroidogenetic activity は 153.1 IU/mg であった。

以上、著者は訂正構造式に従うブタ CLIP を含め、ブタ ACTH, ウシ (ヒツジ) ACTH を全合成し、また、ヒト ACTH を別途合成した。特に、ブタ ACTH は哺乳動物の ACTH 中、最も早く研究に着手されたものであり、1954年の Bell らの構造式の提出、ついで、1963年、Schwyzer らの全合成の報告があったのであるが、1971年、Gráf らの構造訂正後、著者はここに初めて、本品の全合成を記録することが出来た。

論文審査の結果の要旨

本論文は3種の哺乳動物の副腎皮質刺激ホルモン (ACTH) の全合成に関するものである。

ACTH の構造研究は1954年、Bell ら, White らがブタのホルモンの推定構造式を提出したのにはじまり、その後ウシ, ヒツジ, ヒトの ACTH の構造式が提出され、これらはすでに確定されたものと考えられていたが、1971年、Gráf らはブタ ACTH の構造式を再検討し、39個のアミノ酸よりなるペプチド鎖上 C 末端部に一部誤のあることを指摘した。ついでヒト, ウシ (ヒツジと同一) の ACTH の構造もすべて再検討、訂正されるに至った。このうち訂正構造式にしたがったヒト ACTH はただちに Sieber らによって全合成され、その後別途合成の報告もみられる。

著者は以上の構造、合成研究を考慮し、ここに未合成のブタ, ウシ (ヒツジ) の ACTH の全合成を行い、さらにヒト ACTH も上記の報告とは異なる方法で別途全合成した。

合成は弗化水素を最終段階における脱保護試薬とする手法によって行われた。まず対応する動物種差を含む3種の C 末端 eicosapeptide を出発原料とし、これに動物に共通の4個の区分ペプチドを順次結合して完成されたのであるが、合成ペプチドはいずれも文献記載値に比敵する高い生物活性を示し、なかでも合成ブタ ACTH の純度は天然品と比較して確認されている。

また ACTH に関連して興味ある問題は、1973年、Scott らが ACTH を前駆体とする α -メラニン細胞刺激ホルモンの生成機構を論じたことであり、此の際生成する C 末端の docosapeptide を corticotropin-like intermediate lobe peptide (CLIP) と呼んだ。現在、本品の生理作用の解明が急がれているが、著者

は本合成研究途上、ブタ型の CLIP を合成した。

また著者は本合成に先だって、dicyclohexylcarbodiimide によるペプチド区分縮合の際に生ずるラセミ化抑制について検討を加え、特に 5,7-dichloro-8-hydroxyquinoline が優秀であることを見い出している。

以上著者はブタ CLIP を含め、3種の哺乳動物の ACTH を全合成したのであるが、特にブタ、ウシ（ヒツジ）の ACTH は著者によりはじめて全合成されたものであり、脳下垂体前葉ホルモンの内分泌化学の研究に貢献する所大なるものがあると考ええる。

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。