

氏名	甲斐啓幸 か い よし ゆき
学位の種類	薬学博士
学位記番号	論薬博第228号
学位授与の日付	昭和55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	消化管ホルモン, motilin の全合成および 関連ペプチドの合成研究

(主査)
論文調査委員 教授 矢島治明 教授 山科郁男 教授 犬伏康夫

論文内容の要旨

1935年, Shay らは十二指腸内に重曹を注入すると胃から食物の排出が促進されることを観察したが, 1966年, Brownらはこの十二指腸のアルカリ化によって生ずる胃運動の亢進は神経支配によらない消化管由来の物質によることを指摘し, ついで1973年, ブタ小腸粘膜より本活性物質を単離し, motilin と命名するとともに, 22個のアミノ酸より構成された本品の推定構造式を提出した。同年 Brown は Wünsch らと共同で分子中の Met を Nle に置換した motilin 同属体を合成したのであるが, 天然品との酵素分解物の比較検討の結果, 14位の Glu は Gln であることが判明し, 1974年その構造式を訂正するに至った。

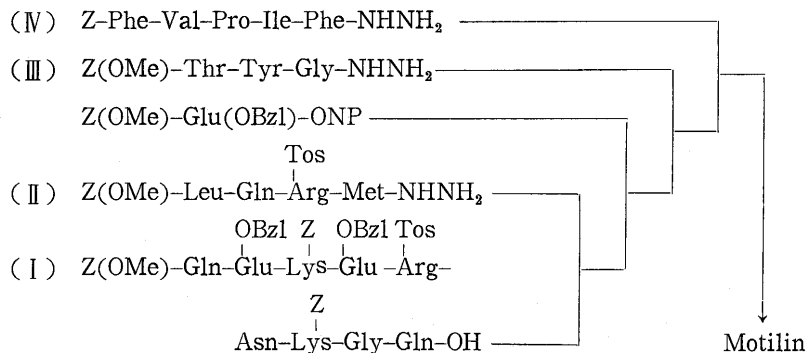
H-Phe-Val-Pro-Ile-Phe-Thr-Tyr-Gly-Glu-Leu-Gln-Arg-Met-Gln-Glu-Lys-Glu-Arg-Asn-Lys-Gly-Gln-OH

著者は以上の研究経過をふまえ, ここに1974年の訂正 motilin 式に従った docosaepptide をはじめて全合成するとともに, そのペプチド鎖と活性との関連性に考察を加えた。

1. motilin の全合成

motilin は13位に含硫アミノ酸である Met を含むため, 接触還元で除去出来る benzyloxycarbonyl(Z)基を α -アミノ保護基として採用しつつペプチド鎖を延長することが出来ない。このため上記の Wünsch らの合成は Met を Nle に置換し, その合成の簡易化をはかったものである。著者は本合成にあたり α -アミノ保護基としてトリフルオロ酢酸(TFA)で容易に除去出来る p-methoxybenzyloxycarbonyl[Z(OMe)]基を用いた。さらに最終段階でフッ化水素(HF)により全保護基を除去することとし, したがってアミノ酸側鎖の保護にはすべて HF で除去出来るものを採用した。すなわち, Lys の ϵ -アミノ基は Z 基, Arg のグアニド基は p-toluenesulfonyl (Tos) 基, Glu の γ -カルボキシル基は benzyl ester (OBzl) で保護することにした。

motilin のペプチド鎖をラセミ化の少ないアジド法で組み上げるため図に示す4区分ペプチドを選んだ。ただし9位の Glu (OBzl) は, これを含む hydrazide が合成困難なため, 単独で p-ニトロフェノール(ONP)による活性エステル法で導入することにした。



Z(OMe)-(motilin 14-22)-OH (I) の合成：まずC端 pentapeptide を2つの方法で合成した。最初の stepwise の方法は原料の Z-Gly-Gln-OH がかなり水溶性のため収率が悪く、したがって tetrapeptide (18-21 位) と1残基(22位)を縮合する方法を採用した。以後活性エステル法で各アミノ酸を導入した。

Z(OMe)-(motilin 10-13)-OH (II) の合成：H-Met-OMe より出発して DCC 法、活性エステル法を用い stepwise にペプチド鎖を延長し本区分を合成した。

Z(OMe)-(motilin 6-8)-NHNH₂ (III) の合成：本区分は Thr, Tyr を含むため、stepwise にアジド法で合成した。また本区分は末端が Gly であるため、ラセミ化なく区分縮合出来るが、Thr, Tyr の無保護の水酸基に対する副反応を避けるためアジド法による区分縮合を行うことにし、対応の hydrazide に導いた。

Z-(motilin 1-5)-NHNH₂ (IV) の合成：pentachlorophenyl-trichloroacetate (TCA-O-PCP) を用いて Z-Phe-Val-Pro-OH と H-Ile-Phe-OMe を縮合し、ついで常法により hydrazide に導いて合成した。

以上合成した各区分ペプチドを、前述した9位の Glu (OBzl) を除いて、順次アジド法により縮合し、保護 docosaepptide を得た。本品および各中間体を CHCl₃-MeOH-H₂O (8:3:1) を主体とするシリカゲルクロマトグラフィーで精製し、これらの純度を TLC, 元素分析, 酸分解後のアミノ酸分析で確認した。最後に保護 docosaepptide にアニソール, Met 存在下, HF を作用させて全保護基を除去後、目的物を Sephadex G-25 のゲル濾過, ついで CM-Sephadex のイオン交換クロマトグラフィーで精製した。このようにして得られた合成品は TLC 上単一スポットを示し、さらにその純度を酸分解およびアミノペプチダーゼによる酵素消化後のアミノ酸分析により確認した。本合成品は犬に i.v. 投与した場合、胃、十二指腸に特徴的な収縮が観察され、これは天然品に匹敵するものであった。

2. motilin のペプチド鎖長と活性との関連

ペプチド鎖長の活性相関を調べるため、4種のペプチド、M[6-22], M[9-22], M[14-22] および M[1-16] を合成した。前3者は全合成の中間体を利用したものであるが、後者は新たに合成した。

前3者はそれぞれ Z(OMe)-(motilin 6-22)-OH, Z(OMe)-(motilin 9-22)-OH, Z(OMe)-(motilin 14-22)-OH をそれぞれ HF 処理し、Sephadex G-25 によるゲル濾過精製を行い調製した。後者の hexadecaepptide の合成は、方法論的に全合成と同じであるが、ただ必要な保護 tripeptide Z(OMe)-Gln-Glu(OBzl)-Lys(Z)-OH (14-16 位) を新たに合成し、これを出発物質として前述の方法に従ってペプチド鎖を延長し、ついで HF による脱保護後、同様の精製を経て目的物を得た。

以上4種のペプチドのウサギの十二指腸平滑筋に対する収縮作用を調べたところ、M[6-22]、M[1-16]に2~3%の活性が認められたが、M[9-22]、M[14-22]は不活性であった。このことより motilin の活性発現にはN末端付近、少なくとも Thr-Tyr-Gly という配列が必要であることがわかった。しかし十分な活性発現にはほぼ全構成が必要であると考えられる。

motilin の合成はその後、塩入ら、三原ら、藤野らによっても報告されたが、著者は以上述べたように、本品の化学的全合成に初めて成功するとともに、本合成を通じて、ペプチド鎖長と活性との関連性を明らかにすることが出来た。著者の合成した motilin は主に radioimmunoassay を通じてその生理的役割の解明に利用されており、消化管系の内分泌学的研究の発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

本論文はモチリンと呼ばれる消化管ペプチドホルモンの全合成と、その構造・活性相関を論じたものである。

1973年カナダの Brown らはブタ小腸粘膜より胃運動を亢進させる特徴ある生理作用を持ったペプチドを単離し、モチリンと命名するとともに、22個のアミノ酸からなる本品の推定構造式を提出した。同年 Brown らはドイツの Wunsch らと13位のメチオニン残基をノルロイシンに置換した同属体を合成したのであるが、天然品との酵素分解物の比較検討の結果、14位のグルタミン酸残基はグルタミンであることが判明し、1974年、その構造式を訂正するに至った。

本論文はこの1974年の訂正モチリン式に従ったドコサペプチドの最初の全合成を記録したものである。本品は接触還元を妨げるメチオニン残基が存在するため、上記の Wunsch らは本残基を置換して合成の簡易化をはかったのであるが、著者は α -アミノ保護基としてトリフルオロ酢酸で除去出来るパラメトオキシベンジルオキシカルボニル基を採用し、ペプチド鎖の構築には4区分ペプチドをアチド法で結合し、ラセミ化を避ける方法で本品の合成を行った。ついで全保護基を弗化水素で除去後、イオン交換クロマトグラフィーを用いて精製し、高純度の合成品を得、本品が天然品に匹敵する胃運動の亢進作用を示すことを確認した。著者が1975年の初頭、本合成をイギリス化学会速報誌に発表したあと、3個所の研究所より本品の別途合成が報告された。

以上の合成研究につづいて著者はペプチド鎖長と活性との関連性を調べるため4種の区分ペプチドを合成した。その結果、本品の活性発現のためにはアミノ末端区分が大切であるが、十分な活性発現にはほぼ全構成が必要であることを明らかにした。現在著者の合成品はラジオイムノアッセイ等を通じて消化管研究分野に広く利用されている。

以上の研究はペプチド合成化学のみならず、消化管系の内分泌学的研究に貢献するところが大きい。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。