

氏名	藤井信孝 ふじい のぶ たか
学位の種類	薬学博士
学位記番号	論薬博第240号
学位授与の日付	昭和55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	Total Synthesis of Bovine Pancreatic Ribonuclease A (ウシ膵臓リボヌクレアーゼAの全合成研究)

論文調査委員 (主査) 教授 矢島治明 教授 山科郁男 教授 富田謙吉

### 論文内容の要旨

ウシの膵臓リボヌクレアーゼ (RNase) Aは、1960～1963年にわたる Moore, Stein らの研究により構造決定された124個のアミノ酸残基より成る酵素であり、酵素として最初に構造の解明をみたものである。1969年、米国の2つの研究所が RNase Aの部分活性を示す物質の合成を報告した。まず Merrifield らは中間体を精製しない固相合成法により、RNase Aの合成を行い、最終的にトリプシン処理体の硫酸分画により得た上澄液が78%の活性を示すことを報告したが本活性体を化学的に同定するに至らなかった。また、Denkewalter らは液相法による S-Protein (スブチリシン限定水解によって得られる蛋白、RNase 21-124位)の合成を行い、天然品から得られた S-Peptide (上記の水解によって得られるペプチド、RNase 1-20位)と会合させ、約2γの RNase S' 活性を有する溶液を得たことを報告したが、微量のため目的物を化学的に同定することができなかった。すなわち、RNase Aの全化学合成は未だ達成されないまま現在に至った。

著者はまず、蛋白質合成に必要な新しい脱保護試薬として、各種スルホン酸類に検討を加え、その結果、メタンスルホン酸を最終脱保護試薬として選び、液相法による本酵素の全合成を行った。

#### [ I ] 最終脱保護試薬としての各種スルホン酸類の検討

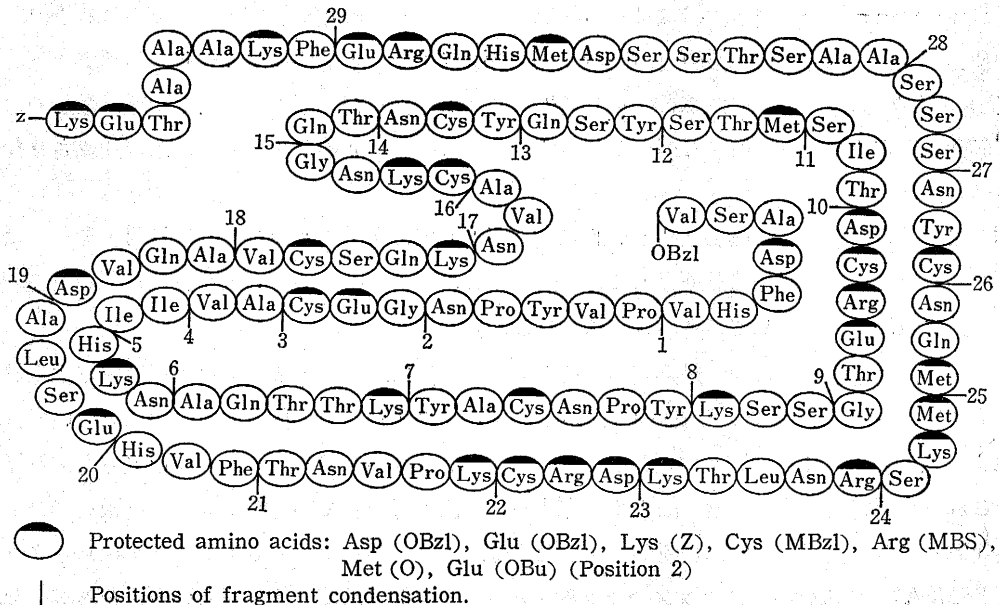
各種のアミノ酸官能基に対する保護基の選択とその除去法は、ペプチド合成の成否を左右する最も大きな要素である。現在のペプチド合成は主として、1) t-ブタノールを主体とする保護基を用いて合成を進め、これらを最終的にトリフルオロ酢酸で除去する方法、2) ベンジルアルコールを主体とする保護基を用い、これらを最終的に弗化水素で除去する方法の2方法で行われているが、著者は高級ペプチドの合成に必要な数多くの保護基を一度に切断除去するために、より有効な手段としてトリフルオロメタンスルホン酸 (TFMSA)、あるいは、メタンスルホン酸 (MSA) を脱保護試薬とする新しい方法を考案した。両スルホン酸はともに現在のペプチド合成化学に採用されているベンジルアルコールを主体とする保護基を、室温、短時間に、ほぼ定量的に除去することがわかったが、ただ Met 残基に顕著な副反応が認められた。

著者は本副反応が、保護基に由来するアルキルカチオンの除去剤として用いたアニソールに起因するこ

とを解明するとともに、この副反応を避けるためには、Met を Met(O) (スルホキシド) として保護するか、あるいはアニソールにかえて m-クレゾール等を使用すれば保護しなくてもよいことを知った。つぎに両酸による Cys (MBzl) よりの Cysteine 回収を比較した場合、TFMSA では一部分解を起こすが、MSA では定量的に Cysteine が回収されることを確認した。さらに両酸の有用性を数種のモデルペプチドを合成して検討した結果、MSA を除去試薬とし、m-クレゾールをアルキルカチオンの除去剤として用いる方法が、種々の可能性のある副反応を抑制する上にも有利であり、操作も簡便であることを認めた。

## 〔II〕 RNase A の全合成

著者は上記の基礎研究にもとずき、ここに新しく開発した MSA を最終脱保護試薬として用いる RNase A の全合成計画を立てた。すなわち図に示すごとく、MSA により容易に除去可能な保護基を持ったアミノ酸誘導体、Arg (MBS), Lys (Z), Cys (MBzl), Glu (OBzl), Asp (OBzl), (MBS=p-methoxybenzenesulphonyl, Z=benzyloxycarbonyl, MBzl=p-methoxybenzyl, Bzl=benzyl) を採用し、全体を、比較的小さくて反応性が高い30の区分ペプチドに分けて、それぞれを合成した。これらの純度を確認後、ラセミ化の危険の少ない Rudinger による Azide 変法を主体として、C-末端部より順次縮合した。各縮合反応後の合成中間体を、ジメチルホルムアミド-メタノール、ジメチルスルホキシド-ジメチルホルムアミド等による再沈澱法により精製したが、精製が困難な場合は、Sephacryl S-200 によるゲル濾過法で精製した。ペプチド鎖の延長につれて、保護ペプチドはしだいに難溶性となってきたが、ジメチルホルムアミド-ジメチルスルホキシド-ヘキサメチルホスホラミドの混合溶媒を用いることにより反応を進行させることができた。



各縮合後の合成中間体の純度をアミノ酸分析により確認したが、その際、合成の全般を通じて Phe を計算の基準とした。このアミノ酸は、RNase A 分子中 C-末端部 120 位に 1 個、それ以外は 46, 8 位の計 3ヶ所に存在するのみであり、各フラグメント縮合の後、新しく導入されたアミノ酸と Phe との比を比

較することが純度の検定に有利であった。

以上の様にして、保護基の付いた RNase A を全合成したが、アミノ酸分析上、Cys (MBzl) 残基が一部スルホキンドに酸化されていることが示唆されたので、まずチオフェノールを用いてこれを還元した。この際、合成に用いた Met(O) は同時に還元される。つぎに、こうして得られた保護基の付いた RNase A を、前述したように種々の副反応を考慮して、*m*-クレゾールの共存下 MSA により全保護基を除去した。つぎに、Anfinsen, Haber らの天然品の還元、再酸化の実験に従い、まず 4 M 塩酸-ゲアニジン中で 2-メルカプトエタノールを用いて還元した後、空気酸化によるジスルフィド結合形成を行った。そして、Sephadex G-75 によるゲル濾過の後、yeast RNA に対して 12% の活性を有する粗精製物を得た。つぎに、Wilcheck, Gorecki らの方法に従い、Sephacryl S-200-5'-(4-aminophenyl-phosphoryl) uridine-2'(3')-phosphate を担体とするアフィニティクロマトグラフィーで精製し、82% の活性体を得た。さらに CM-cellulose によるイオン交換クロマトグラフィーにかけて精製を行ったところ、目的物は pH 4.3 における disc 電気泳動上、天然 RNase A (Sigma 社) と同一の移動度を示す単一のバンドを与え、yeast RNA に対しても、天然品に匹敵する活性 (104~107%) を示した。また、合成品のアミノ酸分析値、種々の物理恒数 (UV 吸収、比旋光度、Michaelis 定数) も天然品とよく一致し、また本品は 2'-3'-cyclic cytidine phosphate に対して、天然品と同様な特異的な酵素活性を示した。

以上、著者は新しく開発した MSA を脱保護試薬とする方法により、液相法で、RNase A の全合成を行ったが、これは full 活性を有する酵素の化学合成としては初めてのものであり、複雑な構造を有する蛋白質の化学合成に対して重要な知見を与えるものと考えられる。

### 論文審査の結果の要旨

本論文は天然品に匹敵する酵素活性を有するウシ膵臓リボヌクレアーゼ A (RNase A) の全有機化学合成に関するものである。

1963年、米国ロックフェラーの研究所の Stein, Moore は自から開発したアミノ酸分析機を駆使して、アミノ酸 124 個からなり、分子中に 4 個のジスルフィド結合を有するウシ膵臓 RNase A の全構造を決定した。かくて本酵素は蛋白質構造研究史上、はじめて構造の解明をみた記念すべき酵素となった。1969年、同研究所の Merrifield らは固相法による本酵素の合成を、またメルク研究所の Denkwalter らは S-蛋白 (スブチリシン限定水解によって得られる蛋白質) の液相法による合成を報告したが、ともに部分活性を示す物質を得たに止り、最終品を化学的に同定するに至らなかった。

著者は本合成にさきだち、従来使用されて来た弗化水素にかわる新しい脱保護試薬、メタンスルホン酸 (MSA) をペプチド合成化学に導入し、まず本試薬によって生ずるメチオニンの副反応の問題点を解明した。

以上の基礎研究をもとに、著者はベンジルアルコールを主体とする保護基を採用し、比較的小さな 30 個の区分ペプチドを Rudinger のアチド法を主体として、カルボキシル末端より順次結合し、この間、Sephacryl S-200 による保護ペプチド中間体の精製、また混合溶媒による溶解度の問題点を解決しつつ保護基のついた RNase A を合成した。

ついで上記の MSA による脱保護後, Anfinsen らによる天然品の還元, 空気酸化によるジスルフィド結合の形成, Gorecki らによるアフィニティクロマトグラフィ, CM セルローズによる精製法を参考にしつつ合成品の精製を進め, ここに全酵素活性を示す本酵素の合成に成功した。合成品の純度は電気泳動, 酸分解によるアミノ酸分析によって確認され, また合成品の物理恒数も天然品によく一致することが確認された。

以上はペプチド合成化学上, 全活性を有する酵素の世界最初の全合成を記録したものであり, ペプチド合成化学の発展に寄与する所大なるものがある。

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。