

氏名	赤路健一 あか じ けん いち
学位の種類	薬学博士
学位記番号	論薬博第306号
学位授与の日付	昭和59年11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	マウス上皮細胞増殖因子の合成研究

論文調査委員 (主査) 教授 矢島治明 教授 山科郁男 教授 米田文郎

論文内容の要旨

上皮細胞増殖因子 (EGF) は雄マウス顎下腺中に存在する53個のアミノ酸からなり分子中に3個のジスルフィド結合を有する一種のポリペプチドである。1973年, Cohen らが本構造を解明した後, Gregory らは, 人尿より胃酸分泌抑制物質として分離した urogastron が EGF と構造上の類似を示すこと, さらに EGF もまた強力な胃酸分泌抑制作用を有することを指摘した。現在, EGF の構造式は, Gray ら, Scott らにより, その前駆体 cDNA の塩基配列からも支持されている。

著者は, まず従来知られていなかった S 保護システイン酸化体の脱保護時における化学的性質を明らかにし, これらの知見をもとに本 EGF の全合成を計画し, 天然 EGF と同一の挙動を示し, 強力な胃酸分泌抑制作用を示す合成品を得ることに成功した。

[I] S 保護システインスルホキシドの酸による脱保護時の挙動

1. S-*p*-methoxybenzylcysteinesulfoxide [Cys(MBzl)(O)] の挙動

Tyr 含有保護ペプチドをアミノ酸分析する場合, この回収率をよくするためにフェノール含有6規定塩酸で酸分解する方法が採用されている。同条件で Cys(MBzl) 含有ペプチドを酸分解したところ, 時によってシステインの回収率が低下するとともに, ショートカラム上に未知のピークが出現することを認めた。Cys(MBzl) 自体はこの挙動を示さない事から, 本物質が合成途上一部生成した Cys(MBzl)(O) から導かれた S-*p*-hydroxyphenylcysteine であることを見出した。Cys(MBzl)(O) は, 通常の酸脱保護条件下, すなわちアニソール存在下, HF, あるいは $\text{CH}_3\text{SO}_3\text{H}$ 処理下に S-*p*-methoxyphenylcysteine を与え, 目的のシステインを再生しないので, 脱保護に先立ってチオフェノールで還元する必要があることを指摘した。

2. S-Acetamidomethylcysteine sulfoxide [Cys(Acm)(O)] の挙動

Acm 基は酸に安定であり, ヨードあるいは酢酸水銀処理によって脱保護されるが, スルホキシド体になると酸-アニソールにより一部 S-*p*-methoxyphenylcysteine を与えることがわかった。さらに Cys(Acm)(O) は, 上記の Cys(MBzl)(O) の場合と異なり, チオフェノール処理によって Cys(Acm) を再

生しない事を見出した。

〔Ⅱ〕 マウス EGF の全合成

著者は上記の Cys(MBzl)(O) の基礎研究をもとに、1M TFMSA(トリフルオロメタンスルホン酸)-チオアニソール/TFA (トリフルオロ酢酸) 系を脱保護剤とする方法で本品を全合成する計画をたてた。すなわち図に示すごとく、同試薬で容易に除去可能な保護基をもったアミノ酸誘導体、Cys(MBzl), Ser(Bzl), Glu(OBzl), Asp(OBzl), Arg(Mts) [Mts=mesitylene-2-sulfonyl] を採用した。中間体の α -アミノ保護基には、TFA で除去できる Z(OMe) [*p*-methoxybenzyloxycarbonyl] 基を用い、トリプトファン導入後は、 α 脱保護時にそのインドール核へのアルキル化副反応の少ない Boc [*tert*-butoxycarbonyl] 基を採用し、さらにこの副反応を抑制するために、TFA 処理に際しエタンジチオール含有アニソールをカチオン除去剤として用いた。また sequence 依存性のある Asp(OBzl) からのサクシンイミド化をさけるため特定の Asp 残基 (11, 27, 40位) からは中間体合成の段階でこの保護基を除去した。

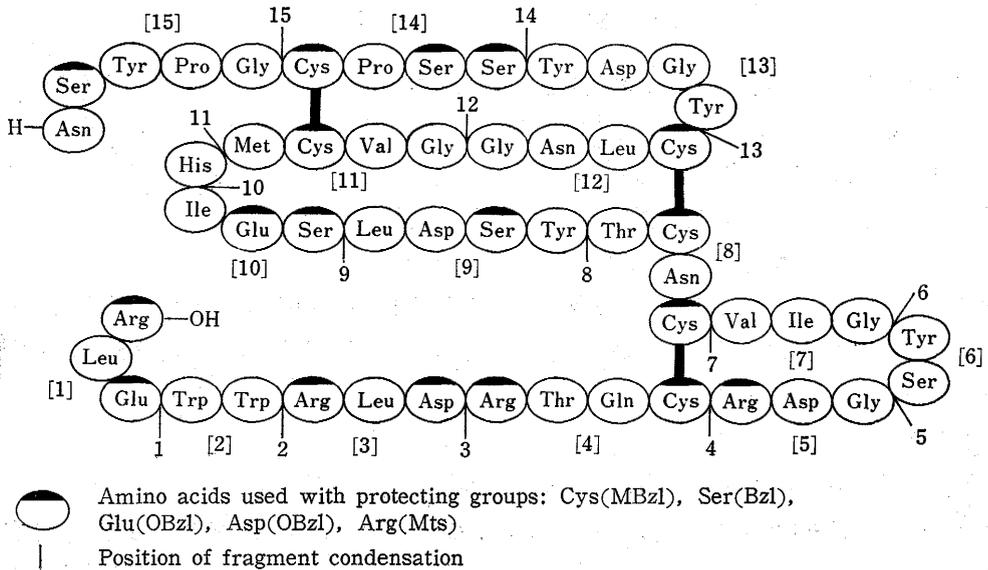


図 EGF の合成

全体を比較的小さな15個の区分ペプチドと1個のアミノ酸誘導体 (Boc-His-NHNH₂) に分け、これらをラセミ化の少ない Rudinger 変法によるアジド法によりC端部より順次縮合した。ただトリプトファンを含む区分ペプチド [2] のみは、アジド法に由来するインドール核のニトロソ化の危険性を避けるために DCC(dicyclohexylcarbodiimide)-HOBT(N-hydroxybenztriazole) 法でラセミ化を抑制して導入した。各中間体を沈殿法、あるいは Sephadex LH-60 によるゲルろ過法で精製し高純度の保護基のついた EGF を得た。

本品を上記の基礎実験に基づいてチオフェノールで処理して一部生成した Cys(MBzl)(O) を還元し、ついで 1M TFMSA-チオアニソール/TFA で処理して全保護基を除去した。続いて Savage らの天然品の還元・再酸化の実験に準じて、まず 6 M グアニジン塩酸中でジチオスライトールを用いて還元した後、

空気酸化法によるジスルフィド結合形成を行った。酸化反応の完結を Ellman 試薬で確認後、Sephadex G-10, DEAE-セルロース, 最後に高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で精製して高純度のマウス EGF を得た。

本品は, HPLC 上天然品と同一の挙動を示し, また天然 EGF 抗体と明瞭な免疫交叉反応を示した。さらに本合成品は, マウスを用いる実験で, ヒスタミン刺激による胃酸分泌を天然品と同程度に抑制した。

以上著者は, 従来知られていなかった S 保護システインスルホキンド体由来する副反応の解明を行うとともに, 液相法によるマウス EGF の最初の全合成を記録することができた。

論文審査の結果の要旨

1973年, Cohen らは53個のアミノ酸より構成され, 3個のジスルフィド結合を有する雄マウス唾液腺 EGF の構造を解明したが, 現在本構造式は遺伝子学的にも支持されるに到った。この間, EGF とヒト尿中 urogastron との構造上の類似性が指摘され, EGF のもつ強力な胃酸分泌抑制作用が注目されるようになった。

本論文は EGF に対応する tripentacontapeptide の合成に関するものである。著者はここに天然品と同一の挙動を示し, またこれに匹敵する胃酸分泌抑制作用を有するペプチドの最初の合成に成功したが, これに先立ち, 従来知られていなかった S 保護システイン酸化体の脱保護時における化学的性質を明らかにした。

ペプチド合成途上 Met は空気酸化されて一部スルホキンド体に導かれるが, S 保護システインについては, この現象が見落されていた。著者はフェノール添加による 6 規定塩酸加水分解によって, 酸化体より導かれる物質を同定し, これによって酸化体の検出が可能であること, さらに脱保護に先立って酸化体を還元しなければ定量的にシステインを回収出来ないことを明らかにした。

EGF は分子量に比してジスルフィド結合の数が多く, 合成最終段階でシステイン残基の空気酸化によるジスルフィド形成には, かなりの困難が予想された。著者はまず比較的小さい15個の区分ペプチドを順次縮合して EGF のペプチド鎖を構築した。この間, 21位の His は唯一個のアミノ酸として導入する必要のあること, また Trp におけるアルキル化副反応の抑制, Asp 側鎖の環化副反応の抑制等種々の合成上の考慮が払われた。

合成の最終脱保護の段階に著者のシステインスルホキンドの還元反応の知識が生かされた。ジスルフィド形成の収率は, 予想されたとおりあまり良好ではなかったが, イオン交換, ついで高速液体クロマトグラフィーによって, 電気泳動的にも天然品と同一の挙動を示す高純度の合成品が得られ, さらに本品がヒスタミン刺激による胃酸分泌を天然品と同程度に抑制することが確認された。

以上著者が天然 EGF に匹敵する活性を持った tripentacontapeptide の合成に成功したことは, また著者の明らかにしたシステインスルホキンドの化学と共にジスルフィド含有高級ペプチド合成化学の進歩に重要な貢献を果たしたのものであると共に有益な知見を加えたものである。

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。

さらに昭和59年10月26日論文内容とそれに関連した事項につき試問を行った結果優秀と認定した。