

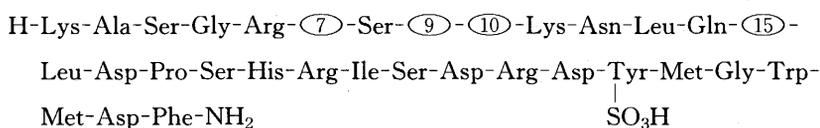
氏 名 二 木 史 郎  
 学位の種類 薬 学 博 士  
 学位記番号 論 薬 博 第 404 号  
 学位授与の日付 平成元年 7 月 24 日  
 学位授与の要件 学位規則第 5 条第 2 項該当  
 学位論文題目 消化管ホルモン, cholecystokinin-33 (ヒト) の合成研究

(主 査)  
 論文調査委員 教授 藤井信孝 教授 藤多哲朗 教授 米田文郎

### 論 文 内 容 の 要 旨

cholecystokinin (CCK)-33 は, 1971年, Mutt, Jorpes によりブタの小腸から最初に単離構造決定されたアミノ酸33残基よりなるペプチドアミドである。1985年には, Takahashi, Matsubara によりヒト CCK-33 の構造がその遺伝子の塩基配列から解明された。本品は胆嚢収縮や膵液分泌促進作用を示す代表的な消化管ホルモンの一種であるが, 近年消化管のみならず脳内にも存在することが明らかになり, 神経伝達物質としての働きも注目されるに至った。CCK の構造上の特徴は27位に硫酸化チロシン (Tyr (SO<sub>3</sub>H)) 残基を持つことであり, これが消化管ホルモンとしての活性に重要な役割を果たしている。しかし, 一方ではこの Tyr(SO<sub>3</sub>H) の存在が本品の合成を非常に困難なものとしている。

cholecystokinin-33 (ヒト, ブタ) の構造



	7	9	10	15
human	Met	Ile	Val	Asn
porcine	Val	Met	Ile	Ser

ブタ CCK-33 は, 1987年, Kurano らにより全合成されたが, 著者はヒト CCK-33 の構造が解明されたのを機に, 彼らとは全く異なる方法で Tyr 残基を選択的に硫酸化する方法を開発し, ヒト CCK-33 を全合成した。また本品の C 端部分 (30位) には酸に不安定なトリプトファン (Trp) 残基が存在する。このため, 著者は Trp の新しい誘導体を開発し本品の合成に応用した。

[ I ] 新しいトリプトファン誘導体, N<sup>m</sup>-mesitylenesulfonyl-tryptophan [Trp(Mts)] の開発とその実用性の検討

Trp 含有ペプチドを合成する際, N<sup>α</sup>-脱保護時生じるカチオンによるインドール環へのアルキル化を

防ぐため保護基が必要となる。さきに、矢島、武山らは Mts 基をアルギニンの N<sup>G</sup>-保護基に用いたが、著者はこれをトリプトファン N<sup>m</sup>-保護基に採用し、その実用性を検討した。まず、相間転移試薬を用いる Illi の方法によって Trp(Mts) を合成した。予備実験の結果、Trp(Mts) はトリフルオロ酢酸 (TFA), NH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> 処理, 接触還元等通常のペプチド鎖延長上の諸操作に安定であり、藤井、矢島らによるトリメチルシリルトリフルオロメタンスルホネート (TMSOTf)-チオアニソール含有 TFA 等で除去可能であることがわかった。そこで、本誘導体を用いて 2 つのモデルペプチド, CCK-7 非硫酸化体, および消化管ペプチド, galanin を合成しその実用性を確認した。

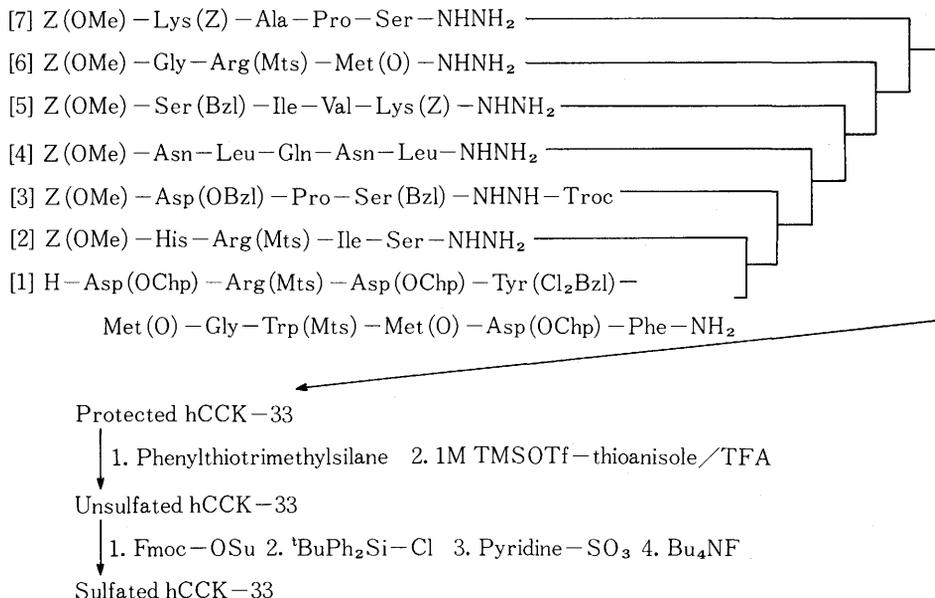
[Tyr]-CCK-7: H-Tyr-Met-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH<sub>2</sub>

galanin: H-Gly-Trp-Thr-Leu-Asn-Ser-Ala-Gly-Tyr-Leu-Leu-Gly-Pro-His-Ala-Ile-Asp-Asn-His-Arg-Ser-Phe-His-Asp-Lys-Tyr-Gly-Leu-Ala-NH<sub>2</sub>

## 〔II〕 ヒト cholecystokinin(CCK)-33 の全合成

CCK-33 は非常に合成困難なペプチドである。その理由は、Tyr(SO<sub>3</sub>H) が酸に不安定であること、さらに硫酸エステル化にあたって Ser の水酸基の方が Tyr のものよりも速やかにエステル化されるからである。著者は、以下に述べるように Ser の水酸基をシリル化合物で可逆的にマスクし Tyr 残基を選択的に硫酸エステル化する方法を見出し、本品の合成に成功した。

### (1) 保護ヒト CCK-33 の合成



Z(OMe) = p-methoxybenzyloxycarbonyl, Z = benzyloxycarbonyl,  
Met(O) = methionine sulfoxide, Bzl = benzyl, Chp = cycloheptyl,  
Cl<sub>2</sub>Bzl = 2,6-dichlorobenzyl, Fmoc = 9-fluorenylmethyloxycarbonyl,  
Su = N-hydroxysuccinimidyl.

著者は、7つの区分ペプチドをC端から順次ラセミ化の少ないアジド法で縮合し保護ヒト CCK-33を得た。この際、N<sup>α</sup>-保護基として TFA により除去可能な Z(OMe)基あるいは Boc 基を使用した。側鎖保護基には Trp(Mts)をはじめ、TMSOTf-チオアニソール/TFA により除去可能な Lys(Z), Arg(Mts), Ser(Bzl), Asp(OBzl) 又は Asp(OChp), Tyr(Cl<sub>2</sub>Bzl) を用いた。また区分ペプチド [3] は Asp(OBzl) を含むため、この合成には亜鉛/酢酸で除去可能な 2,2,2-トリクロロエチルオキシカルボニルヒドラジン(Troc-NHNH<sub>2</sub>)を用いた。

## (2) ヒト CCK-33 の合成

ここに得た保護ヒト CCK-33 の Met(O) をフェニルチオトリメチルシランにより還元した。次いで、これを 1M TMSOTf-チオアニソール/TFA で処理し全保護基を除去し、Sephadex G-25 によるゲル濾過、CM-トリスアクリルによるイオン交換クロマトグラフィー、分取逆相 HPLC により精製し、高純度のヒト CCK-33 非硫酸化体を得た。

ヒト CCK-33 非硫酸化体を硫酸化するにあたり、Tyr のフェノール性水酸基の選択的硫酸化が問題となる。著者はアミノ基、Ser のアルコール性水酸基をそれぞれ Fmoc 基、<sup>t</sup>BuPh<sub>2</sub>Si 基で一時的に保護しピリジン-SO<sub>3</sub> 錯体を用い硫酸化を行うことによりこの問題を解決した。さらに上記保護基の除去の際、フッ素イオンにより <sup>t</sup>BuPh<sub>2</sub>Si 基のみならず Fmoc 基も同時に除去可能であることを見出した。こうして得られたヒト CCK-33 をイオン交換クロマトグラフィー、HPLC を用いて精製し高純度の目的物を得た。本合成ペプチドはイヌの膵臓に対し蛋白質分泌量及び毛細管血流量を CCK-8 とほぼ同程度に増加させる活性を示した。またラットの胃酸分泌及びペプシン分泌に関して、合成ヒト CCK-33 は CCK-8 の約 2~3 倍強い活性を示した。

以上著者は、新たに Trp(Mts)基を開発し、また Tyr の選択的硫酸化法を開発するとともに、Fmoc 基がフッ素イオンにより除去可能であることを見だし、これらの新しい手法によってヒト CCK-33 の液相法による全合成に成功した。上記の研究は、ペプチド合成化学の進歩ならびに消化管ペプチド研究の発展に資するものと考えらる。

## 論文審査の結果の要旨

本論文は消化管ホルモン、ヒト cholecystokinin(CCK)-33 の全合成研究に関するものである。

CCK-33 は1971年 Mutt, Jorpes らによりブタ小腸より単離、構造決定されたアミノ酸33残基より成るペプチドホルモンである。ヒト型のは1985年、遺伝子解析によりその構造が明らかにされた。本物質は化学構造上 C 末端部30位に合成途上アルキル化等の副反応を受け易いトリプトファン (Trp) を含み、また27位に硫酸化チロシン [Tyr(SO<sub>3</sub>H)] を含む特異な構造を有する。特に Tyr(SO<sub>3</sub>H) 残基の存在が本物質の合成を非常に困難なものにしていた。

著者はまず Trp のインドール核のアルキル化副反応の抑制のために新しい Trp 誘導体、N<sup>m</sup>-mesitylenesulfonyltryptophan[Trp(Mts)] を開発した。本誘導体はペプチド合成化学上の諸操作に安定であり最終脱保護反応により定量的に Trp を与え Trp 含有ペプチドの大量合成に実用性の高い誘導体である。次いで Trp(Mts) を用いて液相法によりヒト CCK-33 の非硫酸化体を量的に合成した。本物質の27位

Tyr のフェノール性水酸基を選択的に硫酸エステル化するにあたり通常の硫酸エステル化法では分子中 4 個存在するセリン (Ser) のアルコール性水酸基の方が優先的にエステル化されるという問題を残していた。著者は Ser のアルコール性水酸基と Tyr のフェノール性水酸基のシリル化に対する反応性の差を利用し Ser の水酸基を選択的に保護することによりこの問題を解決した。すなわちヒト CCK33 の非硫酸化体のアミノ基を 9-fluorenylmethoxycarbonyl(Fmoc)基で保護した後, Ser の水酸基を tert.-butyl-diphenylsilyl(tBuPh<sub>2</sub>Si)基で一時的に再保護し, ピリジン-SO<sub>3</sub> 錯体を用いて27位の Tyr 残基を選択的に硫酸エステル化した。さらに t-BuPh<sub>2</sub>Si 基の脱保護に通常用いられるフッ素イオン (F<sup>-</sup>) 処理により Fmoc 基も同時に除去できることを新たに見出し本反応を用いてヒト CCK-33 の最初の全合成に成功した。

合成ヒト CCK-33 はイヌの膵液分泌, 膵血流増加作用において CCK-8 とモル比で同等の活性を示した。非硫酸化体の活性が CCK-8 の7.4%であることから CCK-33 の生理活性発現に対する硫酸エステルの重要性を合成的に立証した。またラットを用いる胃酸分泌及びペプシン分泌活性に於て合成ヒト CCK-33 は CCK-8 の約 2-3 倍の強い活性を示すことが確認された。

以上の著者のヒト CCK-33 の合成研究は, 未だ天然品の得られていないヒト CCK-33 の生理活性について内分泌学上新しい知見を提供したものであると併に Trp 含有ペプチド, Tyr(SO<sub>3</sub>H) 含有ペプチドの合成化学の進歩に寄与する所が大きい。

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。

さらに平成元年 5 月22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。