

【160】

氏名	岡 田 芳 男 おか だ よし お
学位の種類	薬 学 博 士
学位記番号	薬 博 第 60 号
学位授与の日付	昭 和 44 年 1 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 5 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	薬 学 研 究 科 薬 学 専 攻
学位論文題目	サル の $\beta$ -Melanocyte-Stimulating Hormone の 全合成研究

論文調査委員 (主 査) 教授 上尾庄次郎 教授 山科郁男 教授 犬伏康夫

論 文 内 容 の 要 旨

1961年 Lee 等は、サルの脳下垂体より  $\alpha$  および  $\beta$ -Melanocyte-Stimulating Hormone ( $\alpha$ -MSH および  $\beta$ -MSH) を分離し、これらのアミノ酸配列がそれぞれ次式で示される事を明らかにした。これらは共に細胞中のメラニン顆粒を拡散させて皮膚の色を黒化させる作用を有している。

$\alpha$ -MSH : Ac-Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys-Pro-Val-NH<sub>2</sub>

$\beta$ -MSH : H-Asp-Glu-Gly-Pro-Tyr-Arg-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Ser-Pro-Pro-Lys-Asp-OH (I)

このうち  $\alpha$ -MSH は、他の動物たとえば牛、馬、羊等のそれと構造上全く同じであり、すでにその合成も報告されている。しかしサル  $\beta$ -MSH は、その構造中にアルギニルメチオニンという合成困難なアミノ酸配列を有しており、その全合成に関する報告は未だ見当たらない。

今回著者は以下に記すごとく、本サル  $\beta$ -MSH すなわちオクタデカペプチド(I)の全合成に成功するとともに、その構造と MSH 活性度との関係を明らかにする事が出来た。

1. C末端デカペプチド, H-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Ser-Pro-Pro-Lys (N<sup>ε</sup>-formyl) -Asp-OH(II)の合成

サル  $\beta$ -MSH はC末端部17位にリジンを有しているので、この側鎖  $\epsilon$ -アミノ基を合成最終段階まで適当な保護基で保護しておく必要がある。著者はこの保護基としてホルミル基を採用した。これは N<sup>ε</sup>-ホルミルリジンを含むペプチドが一般に水に易容なため、必要な合成中間体をカルボキシメチル(CM-)セルローズの様なイオン交換クロマトグラフィーによって精製する事が容易なためである。さらに著者は N<sup>ε</sup>-ホルミルリジンからホルミル基の脱離の条件を種々検討した結果、本基が従来の稀塩酸による以外、ヒドラジンアセテートを用いて緩和な条件で除去される事を見出し、本条件を合成の最終段階に応用した。

ペプチドの合成には、まず一つのアミノ酸のアミノ基を接触還元で除去出来るベンジルオキシカルボニ

ル基(CBZO),あるいはトリフルオロ酢酸で除去出来る *t*-ブトキシカルボニル基(Boc)で保護し,他方のアミノ酸カルボキシル基をアルキルエステルあるいはトリエチルアミン塩として保護しておき,その後両者の結合すなわちペプチド結合形成には,混酸無水物法,アチド法あるいはパラニトロフェニルエステル等を利用する活性エステル法等によるのが一般的である。そして結合後アミノ保護基を除去し,生成物を次の結合のアミノ成分として使用してペプチド鎖の延長が行なわれる。

まず CBZO-Lys(N<sup>ε</sup>-formyl)-Asp(OMe)<sub>2</sub> を混酸無水物法で合成し,そのエステルを鹼化後接触還元して H-Lys(N<sup>ε</sup>-formyl)-Asp-OH を得た。本品に CBZO-Pro-OH を段階的に二度活性エステル法で導入し,ついで CBZO-Ser-OH をアチド法で結合後,生成物を接触還元して H-Ser-Pro-Pro-Lys(N<sup>ε</sup>-formyl)-Asp-OH を合成した。

本ペプチドと文献記載の方法で合成した CBZO-His-Phe-Arg(N<sup>α</sup>-nitro)-Trp-Gly-OH を混酸無水物法で結合後接触還元し,生成物をピリジンアセテート緩衝液を用いて CM-セルロースカラムクロマトグラフィーで精製し(II)を得た。

なお生理活性を検討するため,上記とほぼ同様の方法で関連ペプチド, H-Phe-Arg-Trp-Gly-Ser-Pro-Pro-OH を合成した。

## 2. H-Pro-Tyr-Arg-Met-OH の合成

サル β-MSH(I) 中にアルギニルメチオニンというアミノ酸配列があるが,メチオニンが硫黄原子を含むため,アルギニンの α-アミノ基とグアニド基に対する保護基の選択とその除去方法に問題があり,このジペプチド自体従来の方法では合成されることがない。

種々検討の結果,著者は H-Arg-Met-OH を異なった三つの方法で合成することに成功したが,このうち Boc 又は CBZO-Arg(N<sup>α</sup>-nitro)-Met-OH を榊原等による弗化水素法で H-Arg-Met-OH に導く方法は,この種ジペプチドだけでなく著者の必要とする H-Arg-Met-ペプチドの合成にも適応出来る可能性を認めた。何故なら,この条件下にリジンの ε-アミノ基についてのホルミル基は安定である事が認められたからである。

なお,ここに得られた H-Arg-Met-OH に Boc-Pro-Tyr-OH をアチド法で結合し,ついで生成物をトリフルオロ酢酸で処理し,好収率で H-Pro-Tyr-Arg-Met-OH を得,サル β-MSH の合成に必要な基礎的実験を完了した。

## 3. C末端ペプタデカペプチド, H-Pro-Tyr-Arg-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Ser-Pro-Pro-Lys(N<sup>ε</sup>-formyl)-Asp-OH(III) の合成

上に得られた基礎実験の結果をもとにして,デカペプチド(II)に CBZO-Glu(γ-OBzl)-OH および Boc-Met-OH を活性エステル法で段階的に結合し,ついで Boc-Arg(N<sup>α</sup>-nitro)-OH を混酸無水物法で縮合後,弗化水素処理し生成物を CM-セルロースカラムクロマトグラフィーによって精製し,トリデカペプチド H-Arg-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Ser-Pro-Pro-Lys(N<sup>ε</sup>-formyl)-Asp-OH を得た。これに前記の実験にならって Boc-Pro-Tyr-OH をアチド法で縮合,ついでトリフルオロ酢酸処理後生成物を CM-セルロースカラムクロマトグラフィーによって精製してペプタデカペプチド(III)を得た。メチオニンの導入後 Boc 基を利用したのは CBZO 基がもはや接触還元で除去され

ないからである。得られた(III)を蛋白分解酵素(LAP)で処理すると1モル当量のN<sup>ε</sup>-ホルミルリジンが検出され、本ペプチド中のリジンの側鎖はなおホルミル基で保護されている事を確認した。

#### 4. サル β-MSH(I) の全合成

N末端トリペプチド誘導体 Boc-Asp(β-OBu<sup>t</sup>)-Glu(γ-OBu<sup>t</sup>)-Gly-OHは段階的に混酸無水物法あるいは活性エステル法を用いて合成した。本品を活性エステル的一种、N-ヒドロキシコハク酸イミドエステルとした後、ペンタデカペプチド(III)と反応させ生成物のBoc基およびt-Buエステル基をトリフルオロ酢酸で除去後、精製して[17N<sup>ε</sup>-formyllysine]-サルβ-MSHを得た。本品をpH6に調節した10%ヒドラジンアセテートで85~90°, 3時間処理後、生成物をCM-セルロースカラムクロマトグラフィーで精製し、サルβ-MSHに対応するオクタデカペプチド(I)を得た。本品はシリカゲル薄層クロマトグラフィーおよび濾紙電気泳動において単一の挙動を示し、その酸分解物および蛋白分解酵素(LAP)消化物のアミノ酸比も理論値とよく一致した。

本合成中間体および合成サルβ-MSHについて、蛙(Rana pipiens)の皮膚を用いin vitroでMSH活性を測定した結果、H-Phe-Arg-Trp-Gly-Ser-Pro-Pro-OHには活性がないが、Hisが導入されたデカペプチド(II)は活性であり、これより、ペプチド鎖の延長につれてその活性も増大し、ペンタデカペプチド(III)で $2.2 \times 10^3$ MSHU/gと最高になり、そのN端側にトリペプチドが結合した型の合成サルβ-MSH(I)は $2.5 \times 10^4$ MSHU/gを示し、活性は少しく減少する事が判明した。この値は天然サルβ-MSHに報告されている値 $1 \sim 2 \times 10^3$ MSHU/gにほぼ匹敵するものである。

以上著者は合成が困難視されていたアルギニルメチオニンというアミノ酸配列を含むサルβ-MSHの合成を、N<sup>ε</sup>-ホルミルリジンを利用し、その緩和な除去条件を採用することにより、又メチオニンに隣接するアルギニンの保護基、ニトロの除去に新しい弗化水素法を採用することによって完成した。その結果、本ホルモンのペプチド鎖の長さやMSH活性度との関係に興味ある知見を得る事が出来た。

ひるがえって考察するに、同じ動物の脳下垂体中に何故αおよびβという二種のMSHが含まれているのかという疑問点は内分泌化学上非常に興味ある問題といわねばならない。それに対してMSHの示す種々の生理作用が検討されている現状であるので、著者の合成品はこの目的に対しても将来役立つものと考えられる。

### 論文審査の結果の要旨

本論文はサルの脳下垂体より分離されたベーターメラニン細胞刺激ホルモンの全合成に関するものである。このホルモンは一種のオクタデカペプチドであるが、その構造中に今迄合成が困難であったアルギニルメチオニン配列を有するため現在迄その合成に関する報告はなかった。今回の著者の合成は分子中17位にあるリジン側鎖のアミノ基の保護にホルミル基を採用し、その除去を合成最終段階で緩和なヒドラジンアセテート試薬を使用して行なったこと、およびメチオニンに隣接したアルギニンのグアニド側鎖の保護にニトロ基を用い、その除去を弗化水素を用いて行なったこと、ならびに4種類のアミノ保護基を適当に組合せてラセミ化をふせぎつつペプチド鎖を延長させることによってその目的を達したものであり、これはペプチド合成化学の進歩に貢献するところ大なるものがある。

さらに本合成の各種中間体を利用して本ホルモンの構造と活性との関係を明かにしたことは内分泌化学上有意義と認められる。

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。