

氏 名	河 谷 紘 樹
	かわ たに ひろ き
学位の種類	薬 学 博 士
学位記番号	薬 博 第 126 号
学位授与の日付	昭 和 49 年 7 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 製 薬 化 学 専 攻
学位論文題目	ACTH様脳下垂体中葉ペプチドの合成研究

論文調査委員 (主 査) 教授 矢島 治明 教授 井上 博之 教授 富田 謙吉

論 文 内 容 の 要 旨

ACTH 様脳下垂体ペプチド (Corticotropin-like Intermediate Lobe Peptide; CLIP) は Scott らによりブタ脳下垂体中葉のみならず, ヒト, ラットからも分離されたドコサペプチドであり, これら動物の ACTH (副腎皮質刺激ホルモン) の c 末端 18—39 位にそれぞれ対応する 構造を有している。彼等はこの CLIP の存在を確認することによって, ACTH が α -MSH (α -メラニン細胞刺激ホルモン) と免疫活性を有す CLIP という 2 種の活性ペプチドの前駆体であること, すなわちこれらホルモンの生体内生成機構を解明する上に重要な知見を加えた。

従来より ACTH の c 末端部分 (25—33 位) は, ブタ, ヒト, ウシ, ヒツジのホルモンについて動物の種差の存在する部分として知られていた個所であるが, 近年これらの構造に誤りのあることが指摘され, いずれも一部訂正されるに至った。

著者は, 従来より ACTH の合成研究が主として N 末端部にかぎられていたこと, また最近の Sieber らのヒト ACTH の合成においても CLIP は同定されていない様に, c 末端部に関する合成研究がみあたらないことを考慮し, ここに訂正構造式に従った各種動物に対応する CLIP 中, ヒト型 (I) およびウシ型 CLIP (II) の全合成を実施した。本合成にあたり著者は固相縮合によるペプチドの合成法にも検討を加えた。

H-Arg-Pro-Val-Lys-Val-Tyr-Pro-Asn-Gly-Ala-Glu-Asp-Glu-Ser-Ala-X-Ala-Phe-Pro-Leu-Glu-Phe-OH

〔I〕 ヒト型 CLIP X=Glu

〔II〕 ウシ型 CLIP X=Gln

1. 固相区分縮合法の検討

近年ペプチドの合成は主に次の 2 法によって行われている。一つは従来の方法 (液相法) によるものであり, 他は Merrifield によって開発された 1 個づつアミノ酸を樹脂上に結合させる固相合成法である。

後者の方法は各種縮合試薬をペプチドの結合した樹脂より洗浄によって除去できる点、操作が簡単であるが、すでに Bayer らによって指摘されている様に、各段階での不完全縮合に起因する欠損ペプチドの生成を防止できない欠点を有し、著者らもこの点を指摘した。従って固相合成を利用するかぎり、その結合回数を減少させ、最終品の精製を容易にすることが必要である。著者はこのためあらかじめ合成した純度の確定したペプチドを順次樹脂上で結合させることが有利と考え、この線にそった基礎研究を実施した。

まずペプチドの樹脂へのエステル化反応であるが、ブロムメチル化樹脂を使用すれば、モデルペプチド $Z(\text{OMe})-\text{Ala}-\text{Gly}-\text{OH}$ 等が、ジシクロヘキシルアミンの存在下加熱することなく室温下に収量よくエステル化されることを認めた。ついでこの $Z(\text{OMe})$ 基をトリフルオロ酢酸 (TEA) で除去した $\text{H}-\text{Ala}-\text{Gly}-\text{樹脂}$ と $Z(\text{OMe})-\text{Val}-\text{Lys}(\text{Z})-\text{Val}-\text{Tyr}-\text{Pro}-\text{OH}$ との縮合反応を種々の結合試薬を用いて検討した結果、 $N\text{-ethoxycarbonyl-2-ethoxy-1,2-dihydroquinoline}$ (EEDQ) が良好な結果を与えることを認めた。なお固相合成における本試薬の有用性は後に Barton らによっても確認されている。

2. 固相上区分縮合法によるヒト型 CLIP の合成

以上の基礎実験をもとに、固相上区分縮合法によるヒト型 CLIP の合成を試みた。必要な区分ペプチドは縮合に際しラセミ化のおそれのない Gly 又は Pro を c 末端とする 4 区分を液相法で合成した。側鎖官能基は Asp, Glu の β - および γ -カルボキシル基をベンジル基 (Bzl), Lys の ϵ -アミノ基をカルボベンゾキシ基 (Z), Arg のグアニド基をニトロ基 (NO_2) でそれぞれ保護し、樹脂よりの脱離と同時に全保護基を除去しうる様を選択した。 $Z\text{-Arg}(\text{NO}_2)\text{-Pro-OH(A)}$ (ACTH, 18—19) は既知の報告に従って合成した。 $Z(\text{OMe})\text{-Val-Lys(Z)-Val-Tyr-Pro-Asn-Gly-OH(B)}$ (ACTH, 20—26) は H-Gly-OBzl より出発し活性エステル法, アジド法, 接触還元を組み合わせで合成した。デカペプチド $Z(\text{OMe})\text{-Ala-Glu(Obzl)-Asp(Obzl)-Glu(Obzl)-Ser-Ala-Glu(Obzl)-Ala-Phe-Pro-OH(C)}$ (ACTH, 27—36) はアジド法および活性エステル法を利用して合成した。c 末端トリペプチド, $Z(\text{OMe})\text{-Leu-Glu(Obzl)-Phe-OH(D)}$ (ACTH, 37—39) は活性エステル法で段階的に合成し、ジシクロヘキシルアミン塩とした。

固相上反応はまず c 末トリペプチド(D)を前述の方法でブロムメチル化樹脂に結合し、TFA による α -アミノ保護基の脱離、EEDQ を縮合剤とする縮合反応をくり返して、保護ドコサペプチド樹脂を得た。本品を HF で処理して、全保護基を除去するとともにペプチドを樹脂より離脱させ生成物を CM—セルローズでのカラムにかけ、ピリジン—酢酸緩衝液で溶出させた。再クロマトで薄層上単一スポットを示す目的物を得た。この結果から区分縮合法は中間操作を簡易に出来る一面、最終品の精製には多少の困難がともなうこと、また縮合には 2—3 当量のカルボキシ成分を要する等の欠点が指摘された。

3. ヒト型 CLIP の合成

ついで液相法による CLIP の合成を行った。本合成に上記 A, B の 2 区分ペプチドを利用したが、他は本法のため合成法を変更した。

まず上記(D)に対応する c 末端トリペプチドは、 $Z(\text{OMe})\text{-Leu-Glu(Obzl)-Phe-OBzl}$ の型でベンジルエステルとし、これを TFA 処理後、上記デカペプチド(C)の合成中間体 $Z(\text{OMe})\text{-Ser-Ala-Glu}$

(OBzl)—Ala—Phe—Pro—OH とジシクロヘキシルカルボジイミド (DCC)+N—ヒドロキシベンツトリアゾール (HOBT) で縮合してノナペプチドを得、その後活性エステル法で段階的に延長してトリデカペプチド Z(OMe)—Ala—Glu (OBzl)—Asp(OBzl)—Glu (OBzl)—Ser—Ala—Glu (OBzl)—Ala—Phe—Pro—Leu—Glu(OBzl)—Phe—OBzl を得た。ついで本品を TFA 処理後、Z(OMe)—Val—Lys(Z)—Val—Tyr—Pro—Asn—Gly—OH(B)を DCC+HOBT で、更に Z—Arg(NO₂)—Pro—OH(A) をペンタクロロフェニルエステル法で順次縮合して保護ドコサペプチドとした。本品を HF 処理後、CM—セルローズでのカラムで精製し、薄層で単一のスポットを示し、元素分析、アミノ酸分析で理論値と一致するヒト型 CLIP を得た。

4. ウシ型 CLIP の合成

ウシ型 CLIP はヒト型 CLIP と 1 個のアミノ酸 Glu と Gln が異なるのみであるので、本品の合成はウシ型のアミノ酸配列に対応したヘキサペプチド、Z(OMe)—Ser—Ala—Gln—Ala—Phe—Pro—OH をまず合成し、これと上記 c 末トリペプチドエスエルとを DCC+HOBT で縮合後、活性エステル法で段階的にペプチド鎖を延長したが、この際 Asn, Gly も同法で結合し、ペンタデカペプチドとした。これにすでに得たペンタペプチド、Z(OMe)—Val—Lys(Z)—Val—Tyr—Pro—OH を DCC+HOBT 法、Z—Arg(NO₂)—Pro—OHをペンタクロロフェニルエステル法で順次縮合してウシ型保護 CLIP を得、接触還元で保護基を除去し、生成物を上記と同様 CM—セルローズのカラムで精製して、ウシ型 CLIP を得た。

以上著者は新たに分離されたヒト型 CLIP 以外にウシ型 CLIP の合成に成功し、ここに他種 CLIP 合成への道を開いた。

また上記合成途上に、著者の行った固相合成法の検討はペプチド合成化学上資するところあるものと考ええる。また近年 ACTH の定量がすべて Radioimmunosassay によって行われ、すでに ACTH c 末端ペプチド (16—39位) の部分が完全な分子より強く抗血清と反応することが示唆されていることを考慮するならば、著者の合成品は血中 ACTH の動向を知る上にも、また ACTH の構造上の機能の解明にも役立つものと考ええる。

論文審査の結果の要旨

本論文は脳下垂体中に存在が確認された副腎皮質刺激ホルモン (ACTH) 様中葉ペプチド (CLIP) と称するドコサペプチドの全合成に関する研究である。

本ペプチドは ACTH から α —メラニン細胞刺激ホルモンが生成するというホルモンの生合成機構の解明に重要な関連をもつ物質であり、ACTH の C 末端部18~39位に対応するアミノ酸配列を有し、動物 (ヒト, ウシ, ブタ, ヒツジ) によって多少構造を異にしている。従来より ACTH の C 末端部はその免疫学的性質を特徴づける部分として知られていたが、近年これらの化学構造が一部訂正されるに至った。著者は従来の ACTH 関連ペプチドの合成研究が N 末端部に限られていた事情を考慮し、ここに各種動物に対応する CLIP 中、ヒト、およびウシ型の CLIP の合成にはじめて成功した。

著者は本合成にあたり、樹脂上の区分縮合法という新しいペプチド合成法を実用化した。本法はあらかじめ合成した純度の確定したペプチドを順次固相上に縮合して目的物を得る方法である。このため著者

は、まずブロムメチル化樹脂を使用すれば、ペプチドが緩和な条件下にエステル化されること、第2にペプチド樹脂とペプチド間の縮合に N-エトオキシカルボニル-2-エトオキシ-1, 2-ジヒドロキノリンが良好な試薬であることをみい出した。以上の2つの知見をもとにまずヒト型 CLIP の合成に成功した。これは本法による生物活性のペプチドの最初の合成例と考えられる。

つぎに著者は液相法によるヒト型 CLIP の合成も行い、上記方法の有用性を確認し、さらに免疫性質の検討のためウシ型 CLIP の合成も行った。

以上著者は上記2種の CLIP の合成法を確立したが、これは他動物の CLIP 合成への道をも開拓したものであり、特に本合成研究中に著者が開拓した固相上の区分縮合法によるペプチドの合成法は、高級ペプチド合成化学に有意義な資料を提供するものである。

また最近血中ペプチドホルモンの定量が、免疫学的方法によっていることを考慮すれば、本合成研究は ACTH の内分泌化学に貢献する所も大なるものがある。

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。