

氏 名	北 川 幸 己 きた がわ こう き
学位の種類	薬 学 博 士
学位記番号	論 薬 博 第 209 号
学位授与の日付	昭 和 54 年 3 月 23 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	視床下部ペプチド : Substance P, Neurotensin の 合成および関連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 犬 伏 康 夫 教 授 井 上 博 之

論 文 内 容 の 要 旨

最近、脳下垂体視床下部に存在する各種のペプチドホルモン分泌促進、あるいは抑制因子の研究が進められているが、1971年、Leeman らはこれら以外にキニン様作用を有するペプチド Substance P を、ついで1973年、同様の作用を有する Neurotensin をウシ視床下部より単離し、構造決定した。

Substance P (I) は、その後 Studer らによりウマ小腸粘膜からも単離され、血圧降下作用、平滑筋収縮作用、唾液分泌促進作用、腸の蠕動抗進作用を有し、さらに最近では知覚神経系における化学伝達物質の有力な候補として注目されている。

また Neurotensin (II) は、Substance P 単離の過程でその存在が明らかにされたペプチドで、Substance P と同様のキニン様作用の他、胃酸の分泌を抑制する作用、チアノーゼを起こす作用、一過性の過血糖症を起こす作用を持っている。

Substance P ; H-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH₂ (I)

Neurotensin ; H-PCA-Leu-Tyr-Glu-Asn-Lys-Pro-Arg-Arg-Pro-Tyr-Ile-Leu-OH (II)

(PCA=pyrrolidone carboxylic acid)

これら2種のペプチドは、Leeman のもとで固相法で合成されたのであるが、著者はこれらを液相法で合成するとともに、ペプチド鎖と活性との関連性を明らかにした。さらに数種の関連ペプチドを合成し、これらの構造と活性との関連性に検討を加えた。

[I] Substance P および関連ペプチドの合成

Substance P はC末端に methionine を含有するため、接触還元を脱保護法とする合成方法によっては合成できない。したがって、アミノ酸側鎖官能基の保護基として、最終段階で弗化水素 (HF) により除去できる保護基を採用した。すなわち Lys の ε-アミノ基には benzyloxycarbonyl (Z) 基、Arg のグアニド基にはニトロ基を用いた。また合成中間体の α-アミノ保護基に *p*-methoxybenzyloxycarbonyl[Z(OMe)] 基を用い、これをトリフルオロ酢酸 (TFA) で除去しつつペプチド鎖を延長した。

全合成に導く区分ペプチドとして、まず H-Leu-Met-NH₂ に各アミノ酸を活性エステル法で順次導入し、C 端部 heptapeptide amide ; Z(OMe)-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH₂ を得た。一方 Z-Arg(NO₂)-Pro-OH と H-Lys(Z)-Pro-OH を活性エステル法で縮合し、N 端部 tetrapeptide ; Z-Arg(NO₂)-Pro-Lys(Z)-Pro-OH を得た。この 2 つの区分ペプチドを N,N'-dicyclohexylcarbodiimide (DCC)+N-hydroxybenzotriazole (HOBT) 法により縮合し、保護 undecapeptide amide としたのち、HF により全保護基を除去し、CM-Cellulose カラムクロマトグラフィーで精製し、高純度の合成品を得た。

本品および純度の確定した短鎖ペプチドを生物検定に供したところ、摘出モルモット回腸平滑筋の収縮作用では、C 端部 pentapeptide amide ; H-(7-11)-NH₂ ですでにその活性が発現し、heptapeptide amide ; H-(5-11)-NH₂ は、Substance P 自体の約 3 倍近くの高い活性を有することが明らかになった。

次に、Substance P の radioimmunoassay を考慮し、分子中にヨード化の可能な tyrosine を含む誘導体の合成を行った。すなわち N 末端に Tyr を付した [N^α-Tyr]-Substance P、および 8 位の Phe を Tyr に置換した [8-Tyr]-Substance P を上記の合成中間体を利用して合成した。前者は Substance P と同程度、また後者は約 2 倍の活性を示した。

上記の Substance P の合成研究を通じて、C 端 hepta、および octapeptide amide が強い平滑筋収縮活性を有することを明らかにしたが、天然に Substance P に類似した構造を持つペプチドが知られているので、heptapeptide amide のレベルで、これら相互の活性を比較検討することにした。これらのペプチドは、Tachykinin (5 種) および Bombesin 様ペプチド (2 種) として分類されるもので、主としてカエルの皮膚から単離されたものである。著者の合成したのは、下記に示した 7 種の各 C 末端 heptapeptide amide である。

- | | |
|------------------|---|
| 1. Eledoisin | H-Asp-Ala-Phe-Ile-Gly-Leu-Met-NH ₂ |
| 2. Phyllomedusin | H-Asp-Arg-Phe-Ile-Gly-Leu-Met-NH ₂ |
| 3. Physalaemin | H-Asn-Lys-Phe-Tyr-Gly-Leu-Met-NH ₂ |
| 4. Uperolein | H-Asn-Ala-Phe-Tyr-Gly-Leu-Met-NH ₂ |
| 5. Kassinin | H-Asp-Gln-Phe-Val-Gly-Leu-Met-NH ₂ |
| 6. Bombesin | H-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met-NH ₂ |
| 7. Litorin | H-Trp-Ala-Val-Gly-His-Phe-Met-NH ₂ |

このうち Eledoisin, Physalaemin, Kassinin 系 heptapeptide amide は、methanesulfonic acid(MSA)-thioanisole 系による新しい脱保護法で合成されたものである。

生物検定の結果、Bombesin 様ペプチド (6, 7) は、Tachykinin 系ペプチドと全く異った構造活性相関を有し、heptapeptide amide のレベルでは、非常に低い活性しか示さないことが確認された。また Tachykinin 系ペプチド間では、Eledoisin>Uperolein>Physalaemin>Phyllomedusin=Kassinin>Substance P の活性オーダーを示すことがわかった。

〔Ⅱ〕 Neurotensin の合成

Substance P は弗化水素を脱保護試薬とする方法で合成されたが、今回著者は、Trifluoromethanesulfonic acid (TFMSA) を脱保護試薬とする新しい方法で Neurotensin を合成した。

合成にあたり、 α -アミノ保護基には Substance P の場合と同様に Z(OMe) 基, Lys の ϵ -アミノ基には Z 基を用いたが, Arg のグアニド基にはニトロ基に代えてトシル (Tos) 基を採用した。その他 Glu の側鎖カルボキシル基にはベンジル (Bzl) 基を採用した。この Z, Tos, Bzl 基は、いずれも TFA 処理では安定で、最終的に TFMSA により除去できる保護基である。また合成経路は、C 端部より 1~2 個の小さい unit を活性エステル法、アジド法で順次導入し、全合成に導くこととした。

Z(OMe)-Pro-Tyr-Ile-Leu-OH を出発物質とし、これに Z(OMe)-Arg(Tos)-Arg(Tos)-NHNH₂ をアジド法で、続いて Z(OMe)-Lys(Z)-Pro-OH を pentachlorophenyl 法で縮合させ、Z(OMe)-Lys(Z)-Pro-Arg(Tos)-Arg(Tos)-Pro-Tyr-Ile-Leu-OH とした。ついで Z(OMe)-Asn-OH, Z(OMe)-Glu(OBzl)-OH を活性エステル法で導入後、Z(OMe)-Leu-Tyr-NHNH₂ をアジド法で縮合し、保護 dodecapeptide とした。最後に Z-PCA-OH を活性エステル法で導入し、Z-PCA-Leu-Tyr-Glu(OBzl)-Asn-Lys(Z)-Pro-Arg(Tos)-Arg(Tos)-Pro-Tyr-Ile-Leu-OH を得た。本品を Tos 基の除去に完全を期すため、40℃、60 分で TFMSA 処理を行い、全保護基の除去を行ったのち、Sephadex G-25 を担体とする partition クロマトグラフィーで精製を行い、高純度の Neuretensin を得た。

さらに構造活性相関を明らかにするため、各合成中間体を TFMSA 処理し、精製したのち、モルモット回腸平滑筋の収縮作用を測定した。その結果 C 端 tetrapeptide : NT₁₀₋₁₃ は不活性であり、hexapeptide : NT₈₋₁₃ で Neurotensin の約 20% の活性が発現し、ペプチド鎖の延長とともに活性が増強することを認めた。しかし、本生物検定に関するかぎり、Neurotensin は Substance P と異った構造活性相関を示すこと、また活性自体は多少低いことが明らかになった。

以上、著者は 2 種の視床下部ペプチドの合成を行ったが、これらは液相法による最初の合成であり、特に Neurotensin は従来にない新しい合成法によってのものである。また、これらの合成を通じて、本 2 種のペプチドのペプチド鎖長と活性との関連性、ならびに関連ペプチドとの活性相関を明らかにすることができた。

論文審査の結果の要旨

本論文は Leeman らによって、1971 年、ついで 1975 年に構造決定された 2 種の視床ペプチド、substance P、および neurotensin の全合成と、これらの構造・活性相関を論じたものである。

Substance P は血圧降下、平滑筋収縮作用等を示す undecapeptide であり、neurotensin は上記の作用以外に胃酸分泌抑制作用等を有する tridecapeptide である。ともに視床下部のみならず、消化管系にも存在することが知られて来た興味あるペプチドである。これら 2 種のペプチドは Leeman らにより樹脂を使用し、中間体を精製しない固相法で合成されたのであるが、著者は確実な液相法による最初の全合成を完成した。

著者の substance P の合成は全保護基を弗化水素で除去する方法によって行われたが、此の間、各中間体の平滑筋収縮作用を検討した結果、C-末端 pentapeptide でその活性が発現し、heptapeptide は substance P 自体の約 3 倍近い高活性を示すことをはじめて見出した。この傾向は後に Bergmann らによって再確認されている。

ついで著者は此の heptapeptide に注目し, substance P 関連ペプチドとして天然に知られている Tachykinin 系 (5 種), Bombesin 系 (2 種) の heptapeptide を合成し, これらの活性・構造相関性を論じた。また著者は substance P のラジオイムノアッセイを考慮し, 標識ペプチドとして必要な N^α-Tyr 体, 8-Tyr 体も合成している。

Neurotensin の合成はトリフルオロメタンスルホン酸を脱保護基剤とする従来にない新しい方法で合成された。本合成に際しても著者は各中間体の平滑筋収縮活性を組織的に検討した結果, C-末端より hexapeptide で活性が発現し, その後ペプチド鎖の延長とともに活性が増強することを認めた。

以上, 本論文は視床下部ペプチドの化学的研究に多くの重要な知見を加えた点で内分泌学上寄与する所が多いと考える。

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。