

氏 名 木 曾 良 明
 学位の種類 薬 学 博 士
 学位記番号 薬 博 第 128 号
 学位授与の日付 昭 和 49 年 9 月 24 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 固相上の区分縮合法によるウシ膵臓塩基性トリプシンイン
 ヒビターの合成研究

論文調査委員 (主 査)
 教 授 矢 島 治 明 教 授 山 科 郁 男 教 授 犬 伏 康 夫

論 文 内 容 の 要 旨

蛋白質の構造研究の進歩につれて、ペプチド合成化学も非常な発展をとげ、有用な保護基、結合試薬の開発が進んだ。これらの知見をもとに現在ではかなりの高分子の生物活性ペプチドが確実に合成されるようになったが、尚分子内にジスルフィド結合をもつ高分子物質を確実に合成するには多くの困難があり、これらの問題点の解決を目指すことはペプチド合成化学上、極めて重要である。

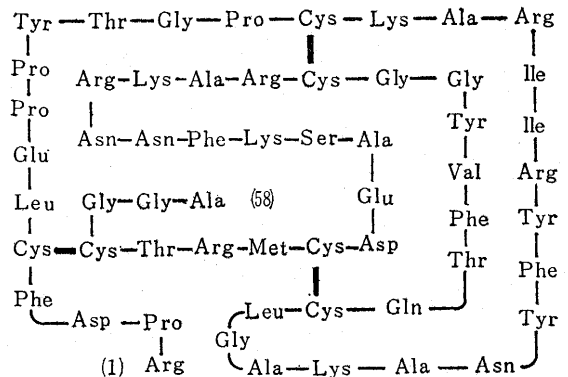
そこで著者は図に示す58個のアミノ酸より成り、分子内に3個のジスルフィド結合を有する分子量6500のポリペプチドであるウシ膵臓塩基性トリプシンインヒビター (BTI) を合成対象に選び、新しいペプチド合成法の開発を行ないつつ、本品の合成研究を行なった。

1 ペプチド合成法の研究

- (i) アミノ基保護試薬 p-methoxybenzyl azidoformate の簡易合成法

p-methoxybenzyloxycarbonyl [Z(OMe)] 基は 0°C でトリフルオロ酢酸 (TFA) などの比較的温和な酸処理により簡単にアミノ基から除去されるという特性をもっているためペプチド合成における重要なアミノ基保護基の一つである。この Z(OMe) 基のアミノ酸への導入は Weygand らによる Z(OMe)-N₃ 試薬によるのが最も一般的な方法であるが、この Z(OMe)-N₃ の合成には長い反応工程を必要とする欠点があった。

そこで著者はアニスアルコールとホスゲンより生成した Z(OMe)-Cl に直接 NaN₃ 水溶液を反応させることにより Z(OMe)-N₃ を合成することを試みた所、ほぼ定量的な収率で本品を得ることができ、この簡易合成法を確立することができた。これによりペプチド合成の原料となる p-methoxybenzyloxycar-



bonyl—アミノ酸が容易に合成できるようになった。

(ii) 縮合試薬としての N-isobutoxycarbonyl-2-isobutoxy-1,2-dihydroquinoline (IIDQ)

Belleau らにより報告された縮合試薬 N-ethoxycarbonyl-2-ethoxy-1,2-dihydroquinoline の反応機構は中間に混酸無水物をとるものと考えられている。一般に混酸無水物法においては ethyl 基よりも isobutyl 基の方が秀れていることが知られているので1位を isobutoxycarbonyl 基にした三種の N-isobutoxycarbonyl-2-alkoxy-1,2-dihydroquinoline (2-isobutoxy 体, 2-methoxy 体, 2-ethoxy 体)を合成してそれらの反応性を検討した結果, IIDQ が他より秀れていることがわかった。本品は特に Gln, Asn を含むペプチドの合成に副反応を認めない特性を示し, BTI の合成に利用した。

2 BTI の固相区分縮合法による合成

BTI は世界の4箇所の研究室でその構造研究がなされ, 構造の確実な点, またそのジスルフィド結合の還元後, 再酸化により活性が回復することも十分研究されている点から, 合成の対象として適当な物質である。

BTI の合成に関して泉屋らは Merrifield の stepwise 固相合成を踏襲して約30%活性物質を得たことを速報したが, 著者は独自の方法により本品の合成研究を行なった。まず縮合に際しラセミ化を避けるために全体を Gly を C 末端とする4区分(1—12)(13—28)(29—37)(38—56)と C 末端(57—58)に分けこれら各区分を液相法で合成した。合成にあたり側鎖官能基の保護には, 最終段階に HF で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, Asp, Glu の側鎖カルボキシ基, Cys の SH はともに benzyl (Bzl) 基で保護し, Arg にはニトロ又はトシル基を使用した。これらはいずれも合成途中 TFA 処理で除去されず, 一方同試薬で除去される Z(OMe)基を α -アミノ保護基として使用することにより保護基に選択性をもたせた。なお Thr, Ser, Tyr の OH は保護せずに合成を進めた。

(I) Z-Arg(NO₂)-Pro-Asp(OBzl)-Phe-Cys(Bzl)-Leu-Glu(Bzl)-Pro-Pro-Tyr-Thr-Gly-OH(BTI 1—12)の合成: 本区分を3つの subunits (1—2)(3—8)(9—12)に分け, まず各 subunits を活性エステル法と azide 法で合成し, この subunits を活性エステル法で結合することにより合成した。

(II) Z(OMe)-Pro-Cys(Bzl)-Lys(Z)-Ala-Arg(Tos)-Ile-Ile-Arg(Tos)-Tyr-Phe-Tyr-Asn-Ala-Lys(Z)-Ala-Gly-OH(BTI 13—28)の合成: 本区分を4つの subunits (13—15)(16—20)(21—23)(24—28)に分け, まず各 subunit を活性エステル dicyclohexylcarbodiimide (DCC), 混酸無水物法, IIDQ の各方法により合成し, これらの subunits を C 末端から azide 法で結合してゆくことにより合成した。

(III) Z(OMe)-Leu-Cys(Bzl)-Gln-Thr-Phe-Val-Tyr-Gly-Gly-OH(BTI 29—37)の合成: 2つの subunits (29—32)(33—37)を IIDQ, DCC, 混酸無水物法, 活性エステルの各方法で合成し, この subunits を azide 法で結合して合成した。

(IV) Z(OMe)-Cys(Bzl)-Arg(Tos)-Ala-Lys(Z)-Arg(Tos)-Asn-Asn-Phe-Lys(Z)-Ser-Ala-Glu(OBzl)-Asp(OBzl)-Cys(Bzl)-Met-Arg(Tos)-Thr-Cys(Bzl)-Gly-OH(BTI 38—56)の合成: 本区分を3つの subunits (38—42)(43—48)(49—56)に分け, まず各 subunit を活性エステル, azide, DCC,

IIDQ等の方法により合成し、これらの subunits を C 末端から順次 azide 法により結合して合成した。

(V) Z(OMe)-Gly-Ala-OH (BTI 57—58) の合成 : 本合成は、H-Gly-Ala-OH に Z(OMe)-N₃ を作用させて合成した。

以上の方法で合成した純度の確定した区分ペプチドを固相上で順次縮合した。まずブロムメチル化樹脂に C 末端 dipeptide(V) を縮合し、TFA による α -アミノ基保護基の脱離、DCC+N-ヒドロキシスクシニイミドを縮合剤とする縮合反応をくり返して保護 octapentacontapeptide 樹脂を得た。本品の HF 処理で全保護基の除去と共にペプチドを樹脂より離脱させ、生成物を Sephadex G—25でのカラムで gel 濾過後、pH 4.5 での空気酸化によるジスルフィド結合形成を行なった。次に trypsin-Sepharose カラムでの affinity chromatography を行ない disc electrophoresis で天然 BTI と同じ挙動を示す目的物を得た。本品はアミノ酸分析で予想値を示し、Tos-Arg-OMe を基質として活性を測定すると天然 BTI の82%の比活性をもつことが判明した。

以上、著者は固相上の区分縮合法を利用することにより高活性をもつ BTI を合成することができた。本合成法はちょうど液相法と固相法を併用したペプチド合成法と考えられるもので、高級ペプチド合成化学に有意義な資料を提供するものとする。

また、著者の開発した Z(OMe)-N₃ の簡易合成法ならびに縮合試薬 IIDO も一般のペプチド合成化学に広く寄与するものであると考える。

論文審査の結果の要旨

本論文は58個のアミノ酸よりなり、分子内に3個のジスルフィド結合を有するポリペプチド、ウシ膵臓塩基性トリプシンイヒビター (BTI) の合成研究に関するものである。

BTI の合成に関して泉屋らは stepwise 固相合成を踏襲して30%の活性物質を得たことを報告しているが、著者は固相上の区分縮合法を用いて従来とは異った方法により本品の合成を行い、天然品に匹敵する高純度、高活性をもつ BTI を合成することに成功した。この固相上の区分縮合法には中間体の精製が洗浄という簡易な操作に簡略できた利点はあったが、各縮合段階での定量的な縮合が困難で、縮合段階が進むにつれて多量の貴重な酸成分を使用せねばならない等の制約がある。しかし分子量を異にする物質の分離の手段を有する現在、固相上の区分縮合法は、たとえ不完全縮合が生じても従来の stepwise 固相合成にまさることが明らかにされた。以上著者はこの BTI の合成例をもって高級ペプチドの合成に際する本法の得失を論じた。

本合成において、原料区分ペプチドを合成するためには液相法、またこれらの区分ペプチドの縮合には固相法が採用されており、この点で本合成は液相法と固相法を併用したペプチド合成法と考えられるもので、高級ペプチド合成化学に有意義な資料を提供するものと考えられる。

また本合成は多量のパラメトオキシベンズルオキシカルボニルアミノ酸の供給によって支えられたものであり、これには著者の開発したパラメトオキシベンズルアチドホルメイトの簡易合成法が大きな貢献をはたした。

さらに著者は新しいペプチド結合試薬 N-イソプトオキシカルボニル-2-イゾプトオキシ-1, 2-デヒ

ドロキノリンを開発したが、本試薬は従来結合に際し分子内脱水副反応を起すことで知られていたアスパラギン、グルタミンに対し特に有効であることがわかり、本 BTI の合成に利用された。

以上著者の開発した2つの新しい知見も一般のペプチド合成に広く寄与するものと考える。

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。