



Title	水溶性保護基を用いた水中でのペプチド固相合成に関する研究
Author(s)	北條, 恵子
Citation	大阪大学, 2005, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/46033
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	ほうじょう すがわら けい こ 北 條 (菅原) 恵 子
博士の専攻分野の名称	博 士 (薬 学)
学 位 記 番 号	第 1 9 1 1 5 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 17 年 2 月 21 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学 位 論 文 名	水溶性保護基を用いた水中でのペプチド固相合成に関する研究
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 今 西 武 (副査) 教 授 小 林 祐 次 教 授 田 中 徹 明 教 授 北 泰 行

論 文 内 容 の 要 旨

固相法は、1963 年 Merrifield らによって初めて報告され、以後、ペプチド合成の分野で飛躍的な発展をとげた。コンビナトリアル化学の普及に伴い、現在では一般の有機合成にもその手法は応用され始めている。ペプチド固相合成では、有機溶媒を大量に消費する。近年、「Green Chemistry」の観点からできる限り有機溶媒使用の低減化、毒性の少ない試薬の利用が望まれている。ここ数年、有機溶媒を使用しない有機合成法が検討され始め、有機溶媒にかわる「環境にやさしい溶媒」として「水」が注目を集めている。しかしながら現在のところ、ペプチドの水溶液中での固相合成の報告例は全くない。また、水中でのペプチドの液相合成の例はいくつか断片的に報告されているが、いずれも全工程を水中で行うといったものではない。全工程水中でのオリゴペプチド合成法が確立できれば、有機溶媒の使用が最小限となり環境を考えたペプチドの工業合成につながるであろう。そこで著者は、全工程水中で行うペプチド固相合成つまり各工程の反応、反応終了後の洗浄、これらに用いる溶媒全てを水とするペプチド合成法を確立すべく本研究に着手した。

水を溶媒とするペプチド固相合成では、保護アミノ酸、試薬が水に溶解していることが必須となる。現在、ペプチドの固相合成法に利用されている *tert*-butoxycarbonyl あるいは 9-fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc) アミノ酸は水に難溶で、これらを用いた水中合成はほぼ不可能である。これまでに水溶性保護基として 2-methanesulfonylethoxycarbonyl 基や 2-(triphenylphosphonio)ethoxycarbonyl 基など数種類が報告されている。また、Kunz らは水溶性保護基 2-[diphenyl(methyl)phosphonio]ethoxycarbonyl 基で保護した水溶性保護アミノ酸を用い、水中での 3 残基ペプチド (Leu-Phe-Phe) の液相合成を報告している。しかし、この合成は全工程を水中で行ったわけではなく最終的なペプチドの単離にも至っていない。著者は、全工程を水中とする固相合成に用いる水溶性保護基として、保護アミノ酸の取り扱いやすい 2-ethanesulfonylethoxycarbonyl (Esc) 基を選択した。Esc 保護アミノ酸は、2-ethanesulfonylethanol より合成した導入試薬 2-ethanesulfonylethyl 4-nitrophenyl carbonate を利用して合成した。Esc 保護アミノ酸はいずれも結晶性の安定な誘導体として得られた。疎水性側鎖をもつ Esc 保護アミノ酸は水にやや難溶であったが、界面活性剤の Triton X100 を加えると水に可溶化した。

次に Esc 基を利用した水中固相合成について検討した。水中固相合成では、水で膨潤する樹脂が求められる。通常の固相に使われるポリスチレン樹脂は水で膨潤しない。そこで、両親媒性のポリエチレングリコールのハンドルを有し、極性溶媒や水でも膨潤する TentaGel 樹脂を選択した。樹脂の膨潤を高めその凝集を解離させる目的で界面活性剤 Triton X100 を添加した水溶液を反応溶媒とし、TentaGel 樹脂上での水中固相合成について、縮合、脱離条件の

最適化を行い、縮合反応は water-soluble carbodiimide (1-ethyl-3-(3'-dimethylaminopropyl)carbodiimide · HCl (WSCD)/*N*-hydroxy-5-norbornene-*endo*-2,3-dicarboximide(HONB)/*N,N*-diisopropylethylamine 法で1時間、脱保護反応は、0.025 mol/L NaOH-50% EtOH 溶液数分の全工程を水中で行うプロトコルを構築した。このプロトコルではアミノ酸1残基導入に必要な時間は1.5時間以内と短く、通常の Fmoc 法マニュアル固相合成に匹敵する。このプロトコルに従って、Leu-enkephalin amide (Try-Gly-Gly-Phe-Leu-NH₂) の水中固相合成を行い成功した。これまでにペプチドの水中固相合成の報告例は全くなく、この成功の意義は大きい。

Esc 保護アミノ酸は結晶性の安定な取り扱いやすい誘導体であるが、疎水性側鎖をもつアミノ酸の保護体は水にやや難溶である。また、固相法の利点として工程が自動化されやすい点があるが、Esc 基は、芳香環など強い UV 吸収の部位を有しておらず自動合成には応用しにくい。そこで、高い水溶性を持つ部分としてスルホニウム塩の構造と、強い UV 吸収を持つ部分としてベンゼン環とをあわせもつ新規水溶性保護基 2-[phenyl(methyl)sulfonyl]ethoxycarbonyl (Pms) 基をデザインした。Pms 保護アミノ酸は、2-(phenylthio)ethanol より3工程で合成し、収率約70%で得た。合成した Pms 保護アミノ酸はいずれも水に溶解した。Pms 基の脱離条件について検討を行い、緩やかな塩基性水溶液条件下でβ脱離する保護基であることを確認した。また、Pms 導入試薬として 2-[phenyl(methyl)sulfonyl]ethoxycarbonylsuccinimide、2-[phenyl(methyl)sulfonyl]ethoxycarbonyl-5-norbornene-*endo*-2,3-dicarboximide、及び 2-[phenyl(methyl)sulfonyl]ethyl 4-nitrophenyl carbonate を開発し、アミノ酸全20種類の Pms 保護体の合成法を確立した。

TentaGel 樹脂上での Pms 保護アミノ酸を用いた水中固相合成を検討した。反応溶媒は0.2% Triton X100 水溶液、縮合は WSCD/HONB 法を用い、また、脱保護は、5%NaHCO₃ 水溶液で行うプロトコルを構築した。このプロトコルで Leu-enkephalin amide の水中固相合成を行い成功した。

近年、ポリスチレンを基幹とせず広範囲の溶媒中で大きく膨潤するよう設計された樹脂が開発されてきている。その中で、Kempe らによって開発された CLEAR 樹脂は、基幹自体が両親媒性のエチレングリコール重合体であるため水で大きく膨潤すると報告されている。そこで、CLEAR 樹脂の水中合成への利用を検討した。脱保護試薬を0.01 mol/L NaOH 水溶液とし、縮合条件は WSCD/HONB 法としたプロトコルに従って、Met-enkephalin amide (Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-NH₂) の水中固相合成を CLEAR 及び TentaGel 樹脂上で行った。CLEAR 樹脂、TentaGel 樹脂上いずれにおいても Met-enkephalin amide の水中合成を達成した。しかし、CLEAR 樹脂上での合成では樹脂の分解産物が観察され、強固なポリスチレンベースの TentaGel 樹脂がより水中固相合成に適していると推察された。新規水溶性保護基 Pms 基は UV 吸収の部位を有し自動化に対応できる可能性をもつ。この Pms 基を用いた水中ペプチド固相合成の成功は、水中自動合成の実用化に結びつくことを期待させる成果である。

論文審査の結果の要旨

環境汚染や枯渇資源の無駄遣いが有機化学において問題視されており、現在、一般的な有機合成化学の領域において、有機溶媒中の従来反応を水中や無溶媒で行うなどの取り組みが活発に展開され、徐々にその成果が得られてきている。しかしながら、ペプチド合成化学の分野においては対応が遅れており、主流である固相ペプチド合成では大量の有機溶媒を消費し続けているのが現状である。断片的な取り組みとして、ペプチド合成工程の一部を水中で行った報告はあるが、ペプチド合成の全工程を水中で行う取り組みは皆無であった。

このような背景の下、申請者は固相でのペプチド合成の全工程を水中で行う研究に着手した。アミノ酸の水溶性保護の新規開発、固相材質や縮合剤の機能評価や選別、水中ペプチド合成プロトコルの策定などのさまざまな検討と工夫を重ね、その知見と技術を基にして Leu-エンケファリンおよび Met-エンケファリンの固相合成の全工程を水中で行うことに初めて成功し、水中ペプチド合成への道を切り開いている。

申請者の本研究成果は、需要が増え続けている様々な種類のペプチド類を水中で固相合成する実用化に向けた大変大きな進展であり、博士(薬学)の学位論文として充分価値あるものと認められる。