

Title	STUDIES ON FACILE AND EFFICIENT SYNTHETIC METHODS FOR THE PREPARATION OF HISTIDINE-CONTAINING PEPRIDES Synthesis and Structure-Function Relationships of Anemonia Elastase Inhibitor, a "Non-classical" Kazal-type Inhibitor from Anemonia sulcata
Author(s)	熊谷, 久美子
Citation	大阪大学, 2005, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/46545">https://hdl.handle.net/11094/46545</a>
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、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">ご参照ください</a> 。

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

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

Osaka University

氏名	熊谷久美子
博士の専攻分野の名称	博士(薬学)
学位記番号	第 19680 号
学位授与年月日	平成 17 年 4 月 15 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	STUDIES ON FACILE AND EFFICIENT SYNTHETIC METHODS FOR THE PREPARATION OF HISTIDINE-CONTAINING PEPTIDES Synthesis and Structure-Function Relationships of Anemonia Elastase Inhibitor, a "Non-Classical" Kazal-type Inhibitor from <i>Anemonia sulcata</i> (ヒスチジン含有ペプチドの高効率合成法の開発研究—イソギンチャク由来エラスターゼインヒビターの合成と構造活性相関)
論文審査委員	(主査) 教授 小林 祐次  (副査) 教授 田中 徹明 教授 今西 武 教授 小林 資正

## 論文内容の要旨

生体内には様々な生理活性ペプチドが存在する。ペプチド性ホルモンやペプチド性プロテアーゼインヒビターなどはその一例である。これらの構造を始め、機能、作用機序、疾患との関連等を解明し、さらには臨床応用を目指したペプチドを創生するには、ペプチドの化学合成からのアプローチが不可欠である。申請者は、*t*-butyloxycarbonyl (Boc) 法を援用した最大保護ストラテジーと、最終脱保護にフッ化水素 (HF) 法を組み合わせた合成法の開発研究を行ってきた。この合成法を生理活性ペプチドの合成に適用し、しかも目的ペプチドを高純度で得るためには、ペプチド鎖伸長反応時のみならず HF 反応時に伴う種々の副反応の解明および、これらの抑制法の検討が必要となる。

申請者は、現在のペプチド合成においてもなお多くの問題点が残されているヒスチジン (His) 含有ペプチドの合成に着目して本研究を行った。すなわち、His 誘導体の縮合時さらにはペプチド鎖伸長時には、イミダゾール核の二つの窒素原子 ( $\tau$  と  $\pi$ ) の求核性が関与したアシル化やラセミ化等の副反応を伴う。副反応を抑制するためには、適当な保護基が必要であり、特にラセミ化を防ぐためには  $\pi$  窒素への保護基の導入が必須となる。これらの条件を満たした保護基として、benzyloxymethyl (Bom) 基が理想的な保護基として Boc 法で汎用されている。申請者は、この Bom 基を適用した His 含有ペプチドの合成を行う中で、上記以外の新たな副反応を見出し、その解決策を提示することにより His 含有ペプチド合成の最適化を行った。その問題点は、①Boc-His (Bom) の Boc 基が、トリフルオロ酢酸 (TFA) 処理で定量的に切断されない、②HF 処理の際、Bom 基から生じるホルムアルデヒドが新たな副反応を引き起こす、の二点である。Boc 法による固相法は、反応サイクル毎の TFA による定量的な Boc 基の除去を前提条件としている。Boc 基の除去が不完全であると、次に N 端側に導入するアミノ酸が反応せず (結果として欠損ペプチドが副生する)、目的ペプチドの精製を困難なものとする。標準的な TFA 反応条件 (50% TFA/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 20 分) は、化学者の試行錯誤の結果設定されているものの、各アミノ酸誘導体間での Boc 基切断速度の差については、特段の注意が払われてこなかった。今回、標準的な条件下に Boc 基切断速度を再検討した。Boc-His (Bom) を除く全ての Boc-アミノ酸誘導体は、5 分以内に Boc 基が除去されるのに対し、Boc-His (Bom) のそれには 15 分も要した。さらに Boc-His (Bom) を N 端に持つペプチドの場合、所定の 20 分以内に Boc 基の除去は完了しなかった。固相合成を円

滑に進行せしめるには、側鎖保護基・リンカーの安定性を勘案し、80% TFA/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> が Boc 基の脱離条件として最適であると結論した。次に、Bom 基を HF 処理で切断すると、Bom 基に由来するホルムアルデヒドが生じ、これがペプチド中のアミノ基と反応するばかりでなく、N 末端システインまたは N 末端トリプトファンと反応して、それぞれチオプロリン誘導体およびテトラヒドロ-β-カルボリン誘導体に変換した。また、ホルムアルデヒドは N-メチルアントラニル基とも反応し、ジヒドロキナゾリン誘導体を副生する。これらの副反応を詳細に検討し、何れも HF 反応時にシステインを添加することにより、効果的に副反応を抑制できた。

次に、上記で得られた知見を基にイソギンチャク由来のエラスターゼインヒビター (AEI) とそのアナログを合成し、AEI の 3 次構造の解明とその構造-活性相関についての研究を行った。AEI は、3 組の分子内ジスルフィド結合を持つ 48 残基から成るペプチドで、その配列とジスルフィド架橋様式のパターンから “non-classical” Kazal 型インヒビターに分類されている。大部分の、“non-classical” Kazal 型インヒビターは、分子内に α-ヘリックスを安定化するシスチンモチーフ (CSH-モチーフ) を有しているが、AEI には CSH-モチーフが存在しない。従って、CSH-モチーフを挿入した AEI アナログを合成し、CSH-モチーフが AEI 分子の 3 次構造と活性に及ぼす効果を検討することを計画した。合成にはネイティブ化学ライゲーション法を用いた。これは、チオエステル-ペプチドと N 末端にシステインを持つペプチドを縮合する合成法である。特に AEI の場合、N 末端にシステインを持つペプチドは His を含んでいるため、その合成には本研究の成果が不可欠であった。得られた AEI のブタ膵臓エラスターゼ (PPE) とヒト好中球エラスターゼ (HLE) に対する阻害活性は、天然 AEI の報告値とよく一致した。一方、アナログの阻害活性は天然型に比べて、PPE に対しては 1/10<sup>5</sup> に低下し、HLE に対しては数倍増強した。このことは、このアナログが PPE と HLE の活性中心の構造を識別している可能性を示唆している。NMR による溶液中での 3 次構造解析の結果、AEI およびアナログ共に、3 本の逆平行型 β-シートと 1 本の α-ヘリックスを持つ Kazal 型インヒビターに共通する典型的な構造を有していた。両者は非常に似通った分子構造を示すが、唯一活性部位を含む N 端部分に差異が認められた。この部位の構造差が阻害活性の差に反映していると推定される。今後、N 端部を構成しているアミノ酸残基を置換したアナログを合成し、それらの N 端部構造さらには活性に及ぼす影響を検討する必要性を提示できた。エラスターゼは多くの病態と関連があり、新たな低分子阻害剤を開発するためには、本研究で端緒についた構造-活性相関の解明が有用なアプローチのひとつであると考えられる。

#### 論文審査の結果の要旨

熊谷久美子君は現在広く用いられている t-butyloxycarbonyl (Boc) 法とフッ化水素 (HF) 法を組み合わせたペプチドの化学合成において解決すべき問題点として、ヒスチジン含有ペプチドの合成時に生じる副反応を取り上げ、その解決に努めた。特にヒスチジン (His) 基の保護に用いられている benzyloxymethyl (Bom) 基について Boc-His (Bom) の Boc 基のトリフルオロ酢酸 (TFA) による脱離条件に問題のあることを指摘し、その反応条件を検討することにより解決法を見出した。さらにこの脱離反応に伴い、ホルムアルデヒドが発生することを見出し、このホルムアルデヒドが N 末端システインおよび N 末端トリプトファンと反応し、それぞれをチオプロリン誘導体およびテトラヒドロ-β-カルボリン誘導体を生ずることを示した。このような副反応をよく検討し、脱離反応時にスカベシジャーとしてシステインを添加することによりこの副反応を抑えることが可能であることを見出した。最近大きなペプチドの合成によく用いられるチオエステル-ペプチドと N-末端にシステインを持つペプチドを縮合するネイティブ化学ライゲーション法において、この N 末端にシステインを含むペプチドは多用されていて、その副反応の抑制は非常に重要である。熊谷君はここに提案した合成の改良法を、His および N-末端にシステインを含むペプチドフラグメントを用いてイソギンチャク由来のエラスターゼインヒビター (AEI) の合成に適用し、その改良の効果を具体的に示した。得られた AEI を用いて、その構造活性相関を一連の Cystine Stabilized α-Helical (CSH) Motif との関連で考察した。

以上ヒスチジン含有ペプチドの高効率合成法の確立、ならびに多くの病態に関係するエラスターゼの低分子阻害剤の設計に不可欠なエラスターゼインヒビターの構造活性相関を明らかにした熊谷君の本論文は、博士 (薬学) の学位論文として価値あるものと認められる。