ペプチド合成研究 45 年の回顧

岡田 芳男

Overview of 45 Years of Studies on Peptide Chemistry

Yoshio OKADA

*Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kobe Gakuin University, 518 Arise,
Ikawadani-cho, Nishi-ku, Kobe 651-2180, Japan*

(Received May 7, 2009)

This review documents my research for the past 45 years in peptide chemistry. Initially, in order to study the structure-activity relationships of active center of α - and β -melanocyte stimulating hormones (H-His-Phe-Arg-Trp-Gly-OH), we employed D-amino acids. That approach yielded first published report in 1965 of antagonists containing D-amino acids. Monkey β -melanocyte stimulating hormone (β -MSH), an 18 amino acid peptide stimulated pigment cells. We synthesized β -MSH and fragments thereof, and studied in detail structure-activity relationships. A major and valuable result revealed that the C-terminal pentadecapeptide of β -MSH exhibited higher MSH activity than the parent hormone providing a new question; namely, what was the role of the N-terminal tripeptide? In order to identify the novel enzyme, spleen fibrinolytic proteinase (SFP), I developed a specific chromogenic substrate, Suc-Ala-Tyr-Leu-Val-pNA, and a specific inhibitor, Suc-Tyr-D-Leu-D-Val-pNA, once again employing my D-amino acid strategy. SFP was purified by affinity chromatography using Suc-Tyr-D-Leu-D-Val-pNA as the bound ligand. The success of this approach provided me the incentive to develop a variety of potential drugs. Thus, I prepared a specific plasmin inhibitor (YO-2) and a plasma kallikrein inhibitor (PKSI-527). Next, my research developed novel opioid receptor specific opioid agonists and antagonists based on 2',6'-dimethyl-L-tyrosine (Dmt) dimers coupled with unique pyrazinone ring as a spacer. They exhibited potent oral antinociceptive activity acting through the μ -opioid receptor. Potent μ -receptor agonists (H-Dmt-Pro-Phe/Trp-Phe-NH₂) were transformed into highly selective μ -receptor antagonists (N-allyl-Dmt-Pro-Phe/Trp-Phe-NH₂), which reversed ethanol-induced increases in GABAergic neurotransmission, suggesting the possibility that they may emerge as candidates for the treatment of ethanol addiction.

Key words—peptide chemistry; structure-activity relationship; μ -opioid receptor antagonist; therapeutics; ethanol addiction

1. はじめに

筆者は 1958 年に岐阜薬科大学に入学し、1961 年に特別実習生として牧敬文助教授（当時：薬化学第 II 講座）の門をたたいた。ここで初めて化学研究の一端に触れることができたと言っても過言ではない。新進気鋭の牧助教授は京都大学大学院薬学研究科（薬品製造学教室）博士課程終了後に岐阜薬科大学に赴任され化学反応機構の研究と植物成分の研究を続けられた。私が牧先生の指導の下「スマイル転移反応機構の研究」と「イチイ葉中のタキシニンの

構造研究」に携わることができたのは幸いであった。当時薬学分野では、植物成分の研究が代表的な花形研究であった。研究の指導を受ける中で牧先生から伺った京大大学院時代の思い出や研究の楽しさは私に大きな転機をもたらした。多感な学生時代に聞いた大学院生活の楽しさや植物成分研究の重要性は私の進路を決定づけた。1962 年に京都大学大学院薬学研究科薬品製造学教室にて上尾庄次郎教授の指導を受けることとなった。大学院学生としての生活、京都大学助手としての生活を通じ、多くの方々との出会いや新しい研究との出会いがあり今日の私の基礎を作ることができたと感謝している。その後アメリカ留学を経て 1973 年 10 月に神戸学院大学に赴任し、私の半生をそこで過ごした。今回薬学雑誌編集委員会から執筆の機会を頂いたことに感謝し、

神戸学院大学薬学部（〒651-2180 兵庫県神戸市西区伊川谷町有瀬 518）

e-mail: okada@pharm.kobegakuin.ac.jp

本総説は、平成 20 年度退職にあたり在職中の業績を中心に記載されたものである。

人生の機微を振り返り、その間の研究活動を回顧したい。

2. ペプチドとの出会い

京都大学大学院薬学研究科における花形研究であり、私が心躍らせて取り組もうとしていた「植物成分の研究」からなぜ「ペプチド合成研究 45 年」に変わってしまったのか。人生の不思議さ、人との出会いについて語らなければならない。1962 年 4 月に京都大学大学院薬学研究科薬品製造学教室にて加藤旭先生の指導の下、ヒガンバナアルカロイドの分解産物の合成を始めた。新しい合成反応やシリカゲルクロマトグラフィーによる精製操作などは私にとっては初めてで何をやっても新鮮で心弾む毎日であった。なかなかうまく進行しなかったシュミット反応に取り組み、酸としてポリリン酸を使用することによりうまく目的物を得ることができたことを思い出す。アルカロイド分解産物の合成が順調に進み始めた秋頃、薬品製造学教室に教員移動があり矢島治明先生が助教授として赴任された。矢島先生は自身の研究をアルカロイド研究からペプチド合成研究に方向転換され、米国ピッツバーグ大学ホフマン教授の下でペプチド合成研究に 6 年間従事し多くの成果を挙げた後の帰国であった。上尾教授に呼ばれアルカロイド研究からペプチド合成研究に転向しないかと打診された。当時日本においてペプチド合成研究分野に従事する研究者は少なく、未知の分野と言っても過言ではなかった。私はその未知の分野に魅力を感じて矢島先生の下でペプチド合成研究に進むことを決意した次第である。上尾教授を通じて矢島先生とまたペプチドとの出会いが今日までの私の研究生生活の出発点となったのである。博士課程 1 年の久保一雄氏（現宇治製薬社長）と修士課程 1 年の私が矢島先生に師事し、京都大学大学院薬学研究科においてペプチド合成研究グループが出発した。当時、

分析機器の貧弱な状況下ではあったがペプチドホルモンのアミノ酸配列が次々と明らかにされていた。今日では体の各所で合成分泌され健康維持のためさまざまな情報が発信されそれを受け取る受容体が明らかにされてきている。ペプチド化学からペプチド科学へと進化している。

既に記したように、出発当時日本のペプチド合成研究は緒に就いたところであり、必要なアミノ酸、保護基さらには結合試薬も入手困難な状態であった。D 型アミノ酸、benzyloxycarbonyl chloride (Z-Cl), *tert*-butyloxycarbonylhydrazide (Boc-NHNH₂) さらには *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide (DCC) を研究室で合成したが、この経験はペプチド合成化学について理解する上で大いに役立っている。ペプチド性ホルモンに代表されるように、ペプチドには生理作用が付随している。合成ペプチドの生理活性を測定しアミノ酸配列と生理活性の関係を明らかにして初めて研究が完成する。ペプチド研究を推進するには学際的研究組織が必要になることを痛感した。またアミノ酸がいかに配列するかにより異なった情報が作り出されることにも奥深い不思議さと興味を感じたものである。このような背景の下、私の研究活動が始まった。

3. 大学院時代

3-1. サル β -Melanocyte Stimulating Hormone (β -MSH) の全合成研究 サル β -MSH は脳下垂体中葉から分泌されるアミノ酸 18 個からなるホルモンであり (Fig. 1), メラニン顆粒を拡散させ皮膚の色を黒化させる作用を有している。当時のペプチド合成法から検討すると多くの問題点を含んでおり、それを解決しながら全合成に成功し構造と活性の関係について明らかにすることができた。17 位 Lys の ϵ -アミノ基の保護基としてフォルミル (CHO) を使用した。この合成で問題となるのは

α -MSH

Ac-Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys-Pro-Val-NH₂

monkey β -MSH

H-Asp-Glu-Gly-Pro-Tyr-Arg-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-

Ser-Pro-Pro-Lys-Asp-OH

Fig. 1. Structures of α -MSH and Monkey β -MSH

Arg⁶-Met⁷ の合成方法である. Arg グアニジル基の保護基としてニトロ基を使用するのが一般的であるが Met が触媒毒となるため, ニトロ基の除去に Pd-C を触媒とする接触還元法を利用することができない. 種々検討した結果, 新しく開発されたフッ化水素法を利用することにした.¹⁾ フォルミル基の除去に従来稀塩酸が用いられていたが, 今回は抱水ヒドラジンを使用する方法を開発した.²⁾ Figure 2 に示す方法で合成した.^{3,4)} すべての保護基を除去したのち CM-Cellulose を用いるクロマトグラフィーにて精製し, ろ紙電気泳動法とろ紙クロマトグラフィーにて単一スポットを示す目的物を得た. この合成方法によると中間ペプチドを単離精製できるのでそれらの活性をカエル (*Rana pipiens*) の皮膚を使用して測定した. 結果を Table 1 に示す. 興味深いことに中間体であるペンタデカペプチドが 2.2×10^{12} MSH U/g を示し最終目的物 (合成 β -MSH) の活性は 2.5×10^{10} MSH U/g であった.⁴⁾ 天然ペプチドホルモンより中間ペプチドのほうが活性が高いこ

とを明らかにすることができ, N 端部トリペプチドの活性上の役割は何かという疑問を投げかけた. この研究は筆者の博士論文となった.

3-2. D 型アミノ酸を用いる構造活性相関研究: アンタゴニストの概念 Figure 1 に示すように α -MSH と β -MSH に共通する活性中心 (His-Phe-Arg-Trp-Gly) を使用してアミノ酸配列と活性の関係を検討した. この研究に D 型アミノ酸を使用したのは本研究室が世界で最初である. ペプチド, His-D-Phe-D-Arg-Trp-Gly は全 L 型と同様の活性 (2.4×10^4 MSH U/g) を示した. 一方 D-His-D-Phe-D-Arg-Trp-Gly と His-D-Phe-D-Arg-D-Trp-Gly は活性を示さずむしろ α -MSH 活性を阻害した.⁵⁾ このことから受容体を介するアゴニストとアンタゴニストの関係にあることが分かる. 先進的な研究に参加することができたことに感謝するとともに誇りに思っている.

Fig. 2. Synthetic Scheme for Monkey β -MSH

Table 1. The MSH Activities of the Synthetic Monkey β -MSH and Fragments

Synthetic Peptides	MSHU/g
H-Phe-Arg-Trp-Gly-Ser-Pro-Pro-OH	0
Ac-Phe-Arg-Trp-Gly-Ser-Pro-Pro-OH	0
H-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Ser-Pro-Pro-Lys-Asp-OH	1×10^6
H-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Ser-Pro-Pro-Lys-Asp-OH	2.4×10^6
H-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Ser-Pro-Pro-Lys-Asp-OH	6×10^6
H-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Ser-Pro-Pro-Lys-Asp-OH	1.9×10^6
H-Arg-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Ser-Pro-Pro-Lys-Asp-OH	2.3×10^7
H-Arg-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Ser-Pro-Pro-Lys-Asp-OH	1.8×10^8
H-Pro-Tyr-Arg-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Ser-Pro-Pro-Lys-Asp-OH	2.2×10^{12}
H-Asp-Glu-Gly-Pro-Tyr-Arg-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Ser-Pro-Pro-Lys-Asp-OH	2.0×10^9
H-Asp-Glu-Gly-Pro-Tyr-Arg-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Ser-Pro-Pro-Lys-Asp-OH (β -MSH)	2.5×10^{10}

4. 京都大学助手時代

4-1. Bovine Pancreatic Basic Trypsin Inhibitor 合成への参加 1963 年 Merrifield は樹脂上でアミノ酸を結合するペプチドの固相合成法を開発した。⁶⁾ その後世界的にその改良法が検討されてきた。本研究室においても固相合成法の改良型として固相上にてペプチドフラグメントを縮合する計画を立てた (Fig. 3)。⁷⁾ α -アミノ基の保護基として弱酸で除去可能な 4-Methoxybenzyloxycarbonyl [Z (OMe)] を使用し 4 つのフラグメントを合成した。博士の学位を授与された後、独立した研究者となった筆者は合成計画のうち、13 位から 28 位に相当する hexadecapeptide を Fig. 4 に示すように合成して⁸⁾ 固相合成に供し新しいペプチド合成法の開発に係わることができた。

5. ニューヨーク市立大学医学部への留学時代

筆者は 1971 年 4 月から 1973 年 9 月までニューヨーク市立大学医学部生化学教室の Katsoyannis 教授の下で Visiting Associate としてインスリン合成に従事した。ニューヨーク市立大学医学部はマンハッタンの北部 100 番通り付近の 5 番街とマジソン街の間に位置する。Katsoyannis 教授は 1942 年、アテネ大学に入学、有機化学の研究室にてアミノ基の保護基、benzyloxycarbonyl (Z 基)⁹⁾ を開発した

Zervas 教授に師事した。1952 年博士の学位を取得後、直ちにアメリカに渡りコーネル大学医学部 duVigneaud 教授の下で脳下垂体ホルモン特にオキシトシンの合成に従事し duVigneaud 教授のノーベル賞受賞に貢献している。その後ここでの経験を生かしインスリン合成に着手し 1963 年に合成インスリン作用物質を得ることに成功した。彼はインスリン合成法や最終化合物の精製方法を改良し合成インスリンを結晶状に得ることに成功した。その後その技術を生かして、スーパーインスリンの開発など医療への応用を夢見てインスリンのアミノ酸配列と活性の関係検討を続けてきた。筆者はその研究に参加することができた。当時インスリンの遺伝子工学による合成が緒に就いたばかりであり Katsoyannis 教授らが進めるインスリンの化学合成、特にインスリン A 鎖と B 鎖結合収率の向上は遺伝子工学によるインスリン合成に大きな貢献をしている。Figure 5 にインスリンの構造と一般的合成法を記す。筆者はインスリン A 鎖アナログを合成し天然インスリンから得られた B 鎖 sulfonate と結合させてインスリンアナログを合成し、アミノ酸配列とインスリン活性の関係について検討した。¹⁰⁻¹³⁾

6. 神戸学院大学薬学部時代

1972 年に神戸学院大学薬学部が設置され、筆者

Fig. 3. Synthetic Scheme for Basic Trypsin Inhibitor from Bovine Pancreas

は1973年10月に助教授として赴任した。新設学部であり、研究面でこれから描いていこうとするキャンパスは真っ白であり研究設備から準備を始めた。赴任当初は学生実習の指導と講義準備に追われる毎日であったが、研究可能な分野から少しずつ取りかかった。遂行可能な小ペプチド合成から研究を進め

た。もちろん薬学部における研究であるので、合成のみで研究が終わるのではなく生理活性の検討を同時に進めることを研究方針とした。この方針は筆者の定年まで変わることなく、ペプチド化学を基礎とする医薬品開発にまで進めることができた。また当時ペプチドの固相合成法に改良が加えられ、ペプチ

Fig. 4. Synthetic Route to the Protected Hexadecapeptide Corresponding to Position 13 to 28 of Basic Trypsin Inhibitor

Fig. 5. Structure of Bovine Insulin and Synthetic Scheme for Insulin

ドの自動合成機がペプチド合成分野に導入されつつあったが、筆者は学部学生や大学院生の教育のために液相法を基本とする研究を続けることにした。^{14,15)}

6-1. ジペプチド、Ala-Ala の立体異性体の合成とその作用 留学中研究室内で β -ラクタム系抗生物質のラクタム構造が D-Ala-D-Ala の構造と類似していることを議論した際、帰国後の検討事項とすることを計画した。研究室の立ち上げに小ペプチドの合成から取りかかることは合目的的である。新し

い研究室で初めて Z-Ala-OH の真っ白な結晶を得たときの感激を今でも思い出す。Ala-Ala の立体異性体誘導体を合成しこれらの抗菌作用を検討したがいずれの化合物も作用を示さなかった。¹⁶⁾ この研究から研究室内で柳生正見教授の協力を得ることができ、それ以降の研究を展開していく上で大いに役立ち感謝している。当時神戸学院大学薬学部においてほかのグループが芽胞の発芽研究を行っていた。この発芽において L-Ala が促進作用を有し D-Ala は発芽阻止作用を有することを明らかにしていた。では

これらを結合すれば活性はどう変わるかに興味を持たれた。発芽実験を行った結果、Table 2 に示すような活性結果となった。^{17,18)} L-Ala と D-Ala を結合するとただ混ぜ合わせた場合（1:1 混合物は活性を示さない）とは異なり立体異性体で活性に違いが出ることを明らかにすることができた。簡単な合成であるが合成グループと生物グループとが共同研究を行うことにより思わぬ成果が得られることを体験でき、それ以降の研究に大きな影響を与えた。

その他 bradykinin フラグメントなど小ペプチドを合成し、それらフラグメントの活性¹⁹⁾を検討したが、誌面の関係から省略する。これら一連の研究が研究室の充実に役立ったことは否定できない。

6-2. ヒト絨毛性ゴナドトロピンと妊娠診断薬

ヒト絨毛性ゴナドトロピン（hCG）は胎盤から分泌される糖タンパク質ホルモンである。妊娠初期から分泌され妊娠の維持に必要なホルモンである。したがって妊娠初期に抗体を使用してこのホルモンの存在を検知することができれば早い段階で妊娠診断が可能になる。hCG は α -サブユニットと β -サブユニットからなり α -サブユニットの構造（アミノ酸配列）はヒト黄体形成ホルモン（hLH）、ヒト濾胞刺激ホルモン（hFSH）及びヒト甲状腺刺激ホルモン（hTSH）のそれと類似しており hCG の抗体

は hCG だけではなく hLH などとも交差し hCG のみを検出することができない。hCG の β -サブユニットは hLH のそれと類似しているが hCG の β -サブユニット C 端部（112-145）は hLH には存在せず hCG に特有のアミノ酸配列を有する（Fig. 6）。したがってこの部分のペプチドに対する抗体は、hLH とは交差せず hCG のみと反応して hLH などの存在にも邪魔されずに hCG のみを検出することができ、妊娠の早期診断薬となり得る。筆者は Fig. 7 に示すように hCG β -サブユニット C 端部 112-145 位 tetratriacontapeptide を合成した。合成ペプチドを bovine serum albumin（BSA）と結合後、ウサギに免疫し抗体を得た。この抗体は hCG や hCG β -サブユニットと交差するが hLH や hLH β -サブユニットとは交差せず、目的とする抗体を得ることができた。^{20,21)}

6-3. ペプチド合成は酵素研究に貢献できるか

筆者が神戸学院大学で栄養学部生理学研究室の岡本歌子教授に出会ったことは、筆者の研究を医薬品開発により近づけるものであった。

6-3-1. 脾臓のフィブリン分解酵素（SFP）とペプチド合成

岡本歌子教授は脾臓にプラスミンとは性質の異なるフィブリン分解酵素が存在することを見出し、この酵素を spleen fibrinolytic protease（SFP）と呼ぶことにした。プラスミンは塩基性アミノ酸の後のペプチド結合を好んで切断するが SFP は全く異なっていた。この酵素の性質を解明するため、筆者はまず SFP の特異的基質の開発に取り組んだ。

6-3-1-1. SFP の特異的発色基質の開発

既に岡本らは Suc-(Ala)₃-pNA がわずかながら SFP によって切断され p-nitroaniline を遊離することを認めていた。また 1976 年に同種の酵素がインスリン B 鎖の Val-Glu と Val-Cys の結合を好んで切断することが報告されていた。筆者がインスリンのアミノ酸配列を模して合成した Suc-Tyr-Leu-Val-pNA が

Table 2. Effects of Ala-Ala on Germination of *Bacillus thiamonolyticus* Spores

Germinant	Germinability ^{a)}	Inhibition of ^{b)} germination
L-Ala	100	0
L-Ala-L-Ala	>90	0
L-Ala-D-Ala	0	>90
D-Ala-L-Ala	0	5-10
D-Ala-D-Ala	0	20-25
D-Ala	0	100

a) relative germinability (L-Ala=100%). b) relative potency of inhibitory effect (D-Ala=100%).

Fig. 6. Amino Acid Sequences of the C-Terminal Region of hCG β and hLH β

Fig. 7. Synthetic Scheme for the Tetratriacontapeptide

Table 3. Kinetic Parameters for the Amidolysis of Synthetic Substrates of Various Chain Lengths by SFP

Substrate	K_m (mM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)
Suc-Val- <i>p</i> NA	n.d.	n.d.	
Suc-Leu-Val- <i>p</i> NA	7.0	2.52	360
Suc-Tyr-Leu-Val- <i>p</i> NA	0.17	3.85	22600
Suc-Ala-Tyr-Leu-Val- <i>p</i> NA	0.125	10.5	84000
Suc-Ala-Ala-Tyr-Leu-Val- <i>p</i> NA	0.11	15.2	138000
Suc-Ala-Ala-Ala-Tyr-Leu-Val- <i>p</i> NA	n.d.	n.d.	

k_{cat} was calculated on the assumption that the protein in the purified preparation was only SFP. n.d.=No hydrolysis was detectable.

特異性の高い発色性基質であることが分かった。一連の結果を Table 3 にまとめる。²²⁾ このうち Suc-Ala-Tyr-Leu-Val-*p*NA は溶解性と特異性から SFP の測定に使用されるようになり、SFP 研究を加速させた。

6-3-1-2. SFP の特異的阻害物質の開発と同酵素純化への応用 筆者は SFP の特異的阻害物質を開発するにあたって、特異的基質の立体異性体の合成と阻害活性を測定した。そのうち Suc-Tyr-D-Leu-D-Val-*p*NA が強力かつ特異的に SFP 活性を阻害することを明らかにした。²³⁾ この阻害物質を SFP の純化に応用するため、水溶性 DCC を用いて AH Sepharose 4B と結合させ Affinity Chromatography に応用することにした。溶出溶液に 8M 尿素を用い粗抽出物を 116 倍純化することに成功した。この手

法を類似の酵素である白血球中のエラスターゼ (ELP) の精製に応用しその純化に成功した。純化した SFP の抗体は ELP と交差し、ELP の抗体は SFP と交差することから両者は同一酵素であることを明らかにした。²⁴⁾

6-3-2. プラスミンとプラズマカリクレインの活性中心阻害物質 血液の凝固や線溶に係わる酵素としてトロンビン (凝固) とプラスミン (繊維素溶解) がよく知られている。プラズマカリクレインは高分子キニノゲンからブラダイキニンを遊離する作用のほかに FactorXII や plasminogen を活性化するなど血液の凝固線溶に関与していることが指摘されているがその役割については不明な点も多い。酵素は生体内で活性化されたり阻害されて健康が維持されている。しかしこれらのバランスが崩れるという

いゝな疾病を引き起こす。プラスミンは主に生体内の α_2 -plasmin inhibitor (α_2 -PI) によって阻害される。したがって α_2 -PI の少ない、あるいは欠損した人は出血傾向の疾病にかかり易い手術の後の止血も困難を伴う。プラスミン阻害剤として開発され臨床応用されている *trans*-4-methylaminocyclohexanecarboxylic acid (tAMCHA, トランサミン) はプラスミンの結合部位を阻害するものである。筆者はプラスミンの活性中心指向型の阻害剤開発に参画する機会を得た。阻害剤は酵素特異的であることが望ましい。研究を推進するに当たり plasmin, thrombin, plasma kallikrein, urokinase, factor Xa, trypsin に対する阻害活性を検討した。Figure 8 に示すように構成する 3 つのパーツをうまく組み合わせることによりプラスミンに特異的な阻害剤 (YO-2)²⁵⁾ とプラズマカリクレインに特異的な阻害剤 (PKSI-527)²⁶⁾ を得ることに成功した。特異的酵素阻害剤開発の方法の 1 つと言える。PKSI-527 はプラズマカリクレインの研究用試薬として市販されており、YO-2 は抗腫瘍薬開発研究へと進んでいる。²⁷⁾

6-4. Eglin c の全合成研究 Eglin c はヒル (*Hirudo medicinalis*) から単離されたアミノ酸 70 個からなる酵素阻害タンパク質であり chymotrypsin, leukocyte elastase, cathepsin G などを強力に阻害する。筆者は液相法にて eglin c を全合成し、合成途中ペプチドフラグメントと阻害活性の検討を進めた。Figure 9 に示すようにして全合成に成功するとともに Table 4 に示すようにペプチドフラグメントと酵素阻害活性の関係を明らかにした。^{28,29)} 1 つ

の酵素阻害タンパク質の構造中に酵素特異的阻害部位のあることを示すことができた。

6-5. 副反応の解明からオピオイドミメティックスの開発へ

6-5-1. 新規ピラジノン環形成法の確立 筆者はエンケファリナーゼ阻害剤としてロイシン-エンケファリリンクロロメチルケトン (Fig. 10)³⁰⁾ の合成途上、C 端ジペプチジルクロロメチルケトンの酸加水分解の際アミノ酸回収が極端に少ないことに疑問を持った。精査の結果 Fig. 11 に示すように酸加水分解中にピラジノン環を形成することを明らかにした。³¹⁾ 本反応を利用するとピラジノン環の 3 位と 6 位に望む置換基を導入することができる。この反応を応用して fravacol, deoxymuta-aspergillilic acid と光学活性な deoxyaspergillilic acid の合成に成功した。³²⁾ またピラジノン誘導体にオピオイド受容体と結合する化合物を見出し、ピラジノン環を用いるオピオイドミメティックスの開発へと進んだ。

6-5-2. オピオイドアゴニストの開発 内因性オピオイドペプチドは 1 つの例外を除いてすべて 1 位が Tyr であり、1 位 Tyr は鎮痛活性に必須のアミノ酸である。オピオイドペプチドの活性増強に Tyr の誘導体である 2',6'-dimethyl-L-tyrosine (Dmt) が報告された。筆者は Dmt の性質について検討しモルヒネと同程度の μ -受容体親和性を示すものの生物活性はモルヒネの 1% 以下であることを明らかにした。Dmt を利用した種々のオピオイドミメティックスを検討した中でピラジノン環をスペーサーとする Dmt の二量体が消化管や血液脳関門を通過し μ -受容体を介してモルヒネに匹敵する鎮痛作用を

YO-2

PKSI-527

Fig. 8. Structures of YO-2 and PKSI-527 and Their Inhibitory Activity against Plasmin and Plasma Kallikrein

Fig. 9. Synthetic Scheme for Eglin c

Table 4. K_i Values of Synthetic Eglin c and Its Derivatives

	K_i (M) (mol dm ⁻³)		
	Elastase ^{a)}	Cathepsin G ^{b)}	α -Chymotrypsin ^{b)}
Eglin c (60-70)	1.7×10^{-3}	ND ^{c)}	ND
Eglin c (50-70)	2.0×10^{-4}	ND	3.4×10^{-5}
Eglin c (45-70)	7.0×10^{-5}	ND	2.5×10^{-5}
Eglin c (41-70)	1.2×10^{-5}	2.1×10^{-4}	7.0×10^{-6}
Eglin c (31-70)	2.6×10^{-6}	3.5×10^{-6}	1.0×10^{-5}
Eglin c (22-70)	2.8×10^{-6}	1.7×10^{-4}	1.3×10^{-5}
Eglin c (8-70)	2.2×10^{-9}	1.0×10^{-9}	1.4×10^{-9}
Eglin c (1-70)	5.1×10^{-9}	1.5×10^{-9}	2.2×10^{-9}
N ^{α} -Ac-eglin c	5.0×10^{-9}	1.0×10^{-9}	2.3×10^{-9}

^{a)} Substrate for elastase: Suc-Ala-Tyr-Leu-Val-pNA. ^{b)} Substrate for Cathepsin G and α -Chymotrypsin: Suc-Ile-Pro-Phe-pNA. ^{c)} Not detectable.

Boc-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-CH₂Cl

Fig. 10. Structure of Leucine-Enkephalin Chloromethyl Ketone

示すことを明らかにした (Fig. 12).³³⁾

6-5-3. オピオイドアンタゴニストの開発 前項で弱いながらも μ -受容体を介して鎮痛作用を示す Dmt を二量化することにより高活性オピオイドミメティックを得ることができたことを紹介した。アンタゴニストの二量化はアンタゴニスト活性を増強するのに興味を持たれた。H-Dmt-Tic-OH (Fig. 13) は δ -オピオイド受容体に対し高い選択性と親和性を示し強いアンタゴニスト活性を示す

($pA_2=8.2$)。Dmt-Tic の二量化を計画した (Fig. 14)。

Table 5 に示すように Dmt-Tic の二量体は Dmt-Tic の 100 倍以上のアンタゴニスト活性を示した。³⁴⁾ アゴニストの二量化は強いアゴニスト活性を示しアンタゴニストの二量化はアンタゴニスト活性をより強くするという興味ある結果を得た。

6-5-4. アゴニストからアンタゴニストへの変換 アゴニストは受容体と結合して情報を伝達する。アゴニストの構造の一部を変換することにより受容体との親和性を維持しつつ情報伝達に必要な受容体の構造変化を阻止できればアンタゴニストになる可能性は大きいと期待する。筆者が試みた 1 つの例を紹介したい。Endomorphin-1, -2 (H-Tyr-Pro-Trp/Phe-Phe-NH₂: EM-1, -2) は μ -オピオイド受容体に高い

Fig. 11. Formation of Pyrazinone Ring from Dipeptidyl Chloromethyl Ketone

Fig. 12. Structure of Dmt Dimer and Its Antinociceptive Activity in Mice

選択性と親和性を持ち、高い鎮痛活性を示す。筆者は Tyr を Dmt に置換した [Dmt¹]EM-1 と [Dmt¹]EM-2 を合成しこれらがより強い μ -オピオイド受容体への親和性と鎮痛活性を示すことを明らかにした。これらの構造を保ちつつ構造の一部を変換して μ -オピオイド受容体に特異的なアンタゴニストが開発できないかと考えた。これまでに δ -オピオイド受容体アンタゴニストは数多く報告されているもの

の μ -オピオイド受容体アンタゴニストの開発が進んでいない状況にある。Table 6 に示すように [N-Allyl-Dmt¹]EM-2 (A) は GPI assay (guinea pig ileum: 主に μ -オピオイド受容体を介する鎮痛活性測定法) においてアゴニスト活性を示さず、 $pA_2 = 8.59$ という強いアンタゴニスト活性を示した。このものの MVD assay (mouse vas deferens: 主に δ -オピオイド受容体を介する鎮痛活性測定法) におけ

Table 5. Functional Bioactivity of Dmt-Tic Dimers

Peptide	MVD		GPI	
	Agonist IC ₅₀ , nM ^{a)}	Antagonist pA ₂ ^{b)}	Agonist IC ₅₀ , nM	Antagonist pA ₂
Bis[(Dmt—Tic—NH)—propyl]—pyrazinone	>10000 (<1%)	10.56	7025 ± 2467	N.D. ^{c)}
Bis[(Dmt—Tic—NH)—butyl]—pyrazinone	>10000 (<1%)	11.06	>10000 (<34%)	N.D.
H—Dmt—Tic—NH—(CH ₂) ₄ —NH—Tic—Dmt—H	>10000 (<1%)	10.51	>10000 (<16%)	6.99
H—Dmt—Tic—NH—(CH ₂) ₆ —NH—Tic—Dmt—H	>10000 (<1%)	10.62	2715 ± 1359	N.D.
H—Dmt—Tic—OH	none	8.48	N.D.	N.D.
Naltrindole		9.2		7.3

a) IC₅₀: the concentration causing a 50% reduction of the electrically induced twitches. b) pA₂: the equilibrium dissociation constant for the antagonist. c) N.D.: Not Determined.

Binding affinity (nM)	K _i μ / K _i δ	MVD antagonist activity
K _i δ = 0.022	150,780	pA ₂ = 8.2
K _i μ = 3320		

Fig. 13. Structure of Dmt-Tic

spacer:

Fig. 14. Structures of Dmt-Tic Dimers

るアンタゴニスト活性は pA₂=6.32 であり μ-オピオイド受容体アンタゴニスト活性の 100 分の 1 である。μ-オピオイド受容体に特異的なアンタゴニストを得ることに成功した。³⁵⁾ [N-Allyl-Dmt¹] EM-2 (A) は Fig. 15 に示すように、EtOH の存在下の

Table 6. Transformation of μ-Opioid Receptor Agonists into μ-Opioid Receptor Antagonists

	GPI assay		MVD assay	
	IC ₅₀ (nM)	pA ₂	IC ₅₀ (nM)	pA ₂
[H-Dmt ¹] EM-1	0.27		>10,000	8.60
[H-Dmt ¹] EM-2	0.07		1.87	
[N-Allyl-Dmt ¹] EM-2	>10,000	8.59	>10,000	6.32
[N-Allyl-Dmt ¹] EM-1	>10,000	8.18	>10,000	7.03

spontaneous IPSC frequency の増加を抑制することができアルコール依存症の治療薬となることが期待されている。³⁶⁾

7. おわりに

筆者は研究生活を通じてペプチドの液相法合成を続けてきた。その中で液相法合成に適した保護基の開発も活発に行ってきたがここでの紹介は省略する。また今回紹介した以外にもペプチド化学を基盤とする種々の医薬品開発や長鎖ペプチドの液相法合成を成功させてきたがその代表的なものの紹介にとどめた。この総説から筆者の研究の進め方や研究の目的をご理解頂ければ幸いである。

最後に筆者の研究を指導して頂いた方々、研究にご協力頂いた国内外の共同研究者や筆者とともに合成研究に携わって下さった方々に謝意を表します。

REFERENCES

- Yajima H., Kinomura Y., Oshima T., Okada Y., *Chem. Pharm. Bull.*, **15**, 1922–1928 (1967).
- Yajima H., Kawasaki K., Okada Y., Minami

Fig. 15. Changes in Spontaneous IPSC Frequency in the Presence of Ethanol and Ethanol plus $[N\text{-Allyl-Dmt}^1]\text{Endomorphin-2}$

- H., Kubo K., Yamashita I., *Chem. Pharm. Bull.*, **16**, 919–928 (1968).
- 3) Yajima H., Okada Y., Kinomura Y., Minami H., *J. Am. Chem. Soc.*, **90**, 527–528 (1968).
- 4) Yajima H., Okada Y., Kinomura Y., Mizokami N., Kawatani H., *Chem. Pharm. Bull.*, **17**, 1237–1245 (1969).
- 5) Yajima H., Kubo K., Okada Y., *Chem. Pharm. Bull.*, **13**, 1326–1331 (1965).
- 6) Merrifield R. B., *J. Amer. Chem. Soc.*, **85**, 2148–2154 (1963).
- 7) Yajima H., Kiso Y., Okada Y., Watanabe H., *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 106–107 (1974).
- 8) Yajima H., Okada Y., Watanabe H., Kiso Y., *Chem. Pharm. Bull.*, **22**, 1067–1074 (1974).
- 9) Bergmann M., Zervas L., *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, **65**, 1192–1201 (1932).
- 10) Katsoyannis P. G., Okada Y., Zalut C., *Biochemistry*, **12**, 2516–2525 (1973).
- 11) Okada Y., Katsoyannis P. G., *J. Am. Chem. Soc.*, **97**, 4366–4372 (1975).
- 12) Cosmatos A., Okada Y., Katsoyannis P. G., *Biochemistry*, **15**, 4076–4082 (1976).
- 13) Okada Y., Chanley J. D., Burke G. T., Katsoyannis P. G., *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **362**, 629–638 (1981).
- 14) Okada Y., *Cur. Org. Chem.*, **5**, 1–43 (2001).
- 15) Okada Y., “Huben-Weyl Methods of Organic Chemistry, Vol. E22a, Synthesis of Peptides and Peptidomimetics,” eds. by Goodman M., Ferix A., Moroder L., Toniolo C., Thieme, Stuttgart-New York, 2002, pp. 591–626.
- 16) Okada Y., Tani S., Yawatari Y., Yagyu M., *Chem. Pharm. Bull.*, **24**, 1925–1927 (1976).
- 17) Okada Y., Okinaka M., Yagyu M., Watabe K., Sano K., Kakiuchi Y., *Chem. Pharm. Bull.*, **24**, 3081–3084 (1976).
- 18) Watabe K., Sano K., Otani M., Okada Y., Kakiuchi Y., Kondo M., *J. Bacteriol.*, **139**, 126–131 (1979).
- 19) Okada Y., Tsuchiya Y., Yagyu M., Kozawa S., Kariya K. *Neuropharmacology*, **16**, 381–383 (1977).
- 20) Okada Y., Kawasaki K., Iguchi S., Yagyu M., Yamaji K., Takagi T., Tanizawa O., *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 357–358 (1981).
- 21) Yamaji K., Takagi T., Sugita N., Tanizawa O., Okada Y., Kawasaki K., Iguchi S., Yagyu M., *Asia-Oceania J. Obstet. Gynecol.*, **8**, 291–296 (1982).
- 22) Okada Y., Tsuda Y., Hirata A., Nagamatsu Y., Okamoto U., *Chem. Pharm. Bull.*, **30**, 4060–4068 (1982).
- 23) Okada Y., Tsuda Y., Nagamatsu Y., Okamoto U., *Chem. Pharm. Bull.*, **29**, 1483–1486

- (1981).
- 24) Nagamatsu Y., Okamoto U., Tsuda Y., Okada Y., *Thromb. Haemostas.*, **51**, 243–247 (1984).
- 25) Okada Y., Tsuda Y., Tada M., Wanaka K., Okamoto U., Hijikata-Okunomiya A., Okamoto S., *Chem. Pharm. Bull.*, **48**, 1964–1972 (2000).
- 26) Teno N., Wanaka K., Okada Y., Taguchi H., Okamoto U., Hijikata-Okunomiya A., Okamoto S., *Chem. Pharm. Bull.*, **41**, 1079–1090 (1993).
- 27) Szende B., Okada Y., Tsuda Y., Horvath A., Bokonyi G., Okamoto S., Wanaka K., Keri G., *In Vivo*, **16**, 281–289 (2002).
- 28) Okada Y., Tsuboi S., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 3315–3319 (1991).
- 29) Okada Y., Tsuboi S., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 3321–3328 (1991).
- 30) Taguchi H., Nishiyama Y., Camargo A. C. M., Okada Y., *Chem. Pharm. Bull.*, **41**, 2038–2039 (1993).
- 31) Taguchi H., Yokoi T., Kasuya F., Nishiyama Y., Fukui M., Okada Y., *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 247 (1994).
- 32) Okada Y., Taguchi H., Yokoi T., *Chem. Pharm. Bull.*, **44**, 2259–2262 (1996).
- 33) Jinsmaa Y., Miyazaki A., Fujita Y., Li T., Fujisawa Y., Shiotani K., Tsuda Y., Yokoi T., Ambo A., Sasaki Y., Bryant S. D., Lazarus L. H., Okada Y., *J. Med. Chem.*, **47**, 2599–2610 (2004).
- 34) Li T., Fujita Y., Shiotani K., Miyazaki A., Tsuda Y., Ambo A., Sasaki Y., Jinsmaa Y., Braynt S. D., Salvadori S., Lazarus L. H., Okada Y., *J. Med. Chem.*, **48**, 8035–8044 (2005).
- 35) Li T., Jinsmaa Y., Nedachi M., Tsuda Y., Ambo A., Sasaki Y., Lazarus L. H., Okada Y., *Bioorg. Med. Chem.*, **15**, 1237–1251 (2007).
- 36) Li Q., Okada Y., Merczak E., Wilson W. A., Lazarus L. H., Swartzwelder H. S., *Alcohol & Alcoholism*, **44**, 13–19 (2009).