薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
100 (1) 110-113 (1980)

S-アルキルシステインおよびそのジペプチド誘導体の合成

永井外夫,^{1a)} 福原 裕,^{1b)} 岡田幸蔵^{1c)}

北陸大学薬学部,^{1a)} 金沢大学薬学部,^{1b)} 近畿大学薬学部^{1c)}

Synthesis of S-Alkyl Cysteines and Their Dipeptide Derivatives

SOTOO NAGAI,^{1a)} YUTAKA FUKUHARA,^{1b)} and KOZO OKADA^{1c)}

School of Pharmacy, Hokuriku University,^{1a)} Faculty of Pharmaceutical Sciences,
Kanazawa University,^{1b)} and Faculty of Pharmaceutical Sciences,
Kinki University^{1c)}

(Received June 23, 1979)

A series of S-alkyl cysteine- (R=Me, Bzl, All) and dipeptide derivatives with the sequences Cys(R)-Ser and Ser-Cys(R), fully or partially protected or free at the terminals, were prepared for use in a study of antioxidative action against the autoxidation of linoleic acid.

N-Acyl-S-alkyl cysteines (1—5) and S-alkyl cysteine methyl esters (6—8) were prepared from the corresponding S-alkylcysteine in the usual manner. Further, the former were condensed with serine methyl ester and the latter with N-acyl serine by the mixed anhydride or DCC method to give BOC- or Z-Cys(Bzl)-Ser-OMe (9, 10) and BOC- or Z-Ser-Cys(Bzl)-OR (15, 16), respectively. Saponification and/or acidification of these peptides led to the partially protected peptides (11, 17—19) or free peptides (12, 20). With the same procedure, cysteinylcysteine derivatives (13, 14) were also prepared.

Keywords—S-alkyl cysteines; dipeptides containing cysteine and serine; N-acylation; esterification; peptide synthesis; antioxidative activity

アミノ酸の油脂ないし不飽和脂肪酸に対する抗酸化性についてこれまで多くの研究が行なわれているが,²⁾ 抗酸化力の測定法や測定条件によって結果が左右され、報告者によって異なった結果が得られている。しかし一般に異項環アミノ酸（トリプトファン、ヒスチジン）と含硫アミノ酸のうちでメチオニンに著しい抗酸化効力のあることが共通して認められている。これに対し含硫アミノ酸であるシステインの抗酸化性についてはこれまでに相反する結果が得られている。名武ら³⁾ はシステインがリノール酸の自動酸化を促進することを見出しその機構を考察した。これに対し小嶋ら⁴⁾ はリノレン酸の自動酸化に対してシステインエステルがメチオニンより優れた抗酸化作用を有することを認めている。

われわれは α -トコフェロール (α -Toc) とブチルヒドロキシトルエン (BHT) の抗酸化作用に対するアミノ酸の影響を調べたところ、システインは α -Toc に対して相乗効果を示すが BHT に対しては拮抗的に働くことを認めた。⁵⁾

今回、油脂の自動酸化および上記の抗酸化剤に対するシステインの作用を明確にし、併せてその構造と作用相関についての知見を得る目的で数種のシステイン誘導体を合成した。他方、最近山口ら⁶⁾ はある種のジペプチドがそれを構成するアミノ酸より大きい抗酸化力をもつことを報告している。 α -Toc と BHT のいずれに対しても

- 1) Location: a) Kanagawa-machi, Kanazawa 920-11, Japan; b) Takara-machi, Kanazawa 920, Japan; c) Kowakae, Higashi-Osaka 577, Japan.
- 2) R. Marcuse, *Nature* (London), **183**, 836 (1960); 満田久輝, 安本教伝, 岩見公和, 栄養と食糧, **19**, 210 (1966); M. Karel, S.R. Tannenbaum, H.D. Wallance, H. Maloney, *J. Food Science*, **31**, 892 (1966); 山口真彦, 油化学, **25**, 249 (1976).
- 3) 名武昌人, 団野源一, 栄養と食糧, **26**, 251 (1973).
- 4) 小嶋 操, 末次良子, 日本薬学会第 93 年々会, 東京, 1973 年 4 月.
- 5) 岡田幸蔵, 永井外夫, 番匠悦子, 日本薬学会第 94 年々会, 仙台, 1974 年 4 月, 衛生化学, 印刷中.
- 6) 山口直彦, 横尾良夫, 藤巻正生, 食品工誌, **22**, 425 (1975).

TABLE I. S-Alkyl Cysteines (1—8)

$\begin{array}{c} \text{R}^2 \\ \\ \text{R}^1\text{-Cys-COOR}^3 \end{array}$	1 : R ¹ =Ac, R ² =Me, R ³ =H	5 : R ¹ =BOC, R ² =Me, R ³ =H							
	2 : R ¹ =Ac, R ² =Bzl, R ³ =H	6 : R ¹ =H, R ² =R ³ =Me							
	3 : R ¹ =Bz, R ² =R ³ =Bzl	7 : R ¹ =H, R ² =Bzl, R ³ =Me							
	4 : R ¹ =Z, R ² =Bzl, R ³ =H	8 : R ¹ =H, R ² =All, R ³ =Me							
Compd. No.	mp (°C)	Yield (%)	Recryst. solvent	[α] _D ²⁵ (c=1, solv.)	TLC <i>R</i> _{f1} (<i>R</i> _{f2})	Formula	<i>Anal.</i> Calcd (Found)		
							C	H	N
1	148—150	51	MeOH—ether— petr. ether	−5 ¹⁵ (MeOH)	0.27	C ₆ H ₁₁ NO ₃ S	40.66 (40.22)	6.26 (6.21)	7.90 (7.58)
2	142—145	60	CHCl ₃ —ether— petr. ether	−56 ¹⁶ (MeOH)	0.32	C ₁₂ H ₁₅ NO ₃ S	56.89 (56.78)	5.97 (5.91)	5.52 (5.21)
3	123—126	88	CHCl ₃ —ether	−5 ³² (CHCl ₃)	0.86	C ₂₄ H ₂₃ NO ₃ S	71.09 (70.81)	5.71 (5.66)	3.46 (3.51)
4 ^{a)}	93— 95	71	AcOEt— petr. ether	−45 ²⁴ (acetone)	0.52				
5 ^{b)}	125—126.5	84	MeOH—ether	+5 ¹⁶ (MeOH)	0.64	C ₂₁ H ₄₀ N ₂ O ₄ S ·H ₂ O	60.54 (60.69)	10.16 (9.78)	6.72 (6.38)
6 ^{c)}	146—148	80	MeOH—ether	−9 ¹⁸ (MeOH)	(0.45)	C ₅ H ₁₁ NO ₂ S ·HCl	32.35 (32.15)	6.51 (6.38)	7.54 (7.35)
7 ^{c,d)}	150—152.5	85	MeOH—ether	−14 ¹⁸ (H ₂ O)	(0.73)				
8 ^{c)}	118.5—121	61	MeOH—ether	+5 ¹⁵ (MeOH)	(0.51)	C ₇ H ₁₃ NO ₂ S ·HCl	39.71 (39.61)	6.66 (6.69)	6.61 (6.34)

a) Lit.⁹⁾: mp 99°, $[\alpha]_D^{25}$ -45.1° (c=2, acetone).

b) DCHA salt.

c) HCl salt.

d) Lit.⁹⁾: mp 150°, $[\alpha]_D^{25}$ -13.9° (c=2.9, H₂O).

強い相乗効果を示したセリン⁵⁾ をシステイン誘導体とペプチドに組み込んだばあい、抗酸化性と抗酸化剤との相乗作用にどのような変化が現われるか興味もたれる。そこで Cys-Ser ないし Ser-Cys 配列のジペプチド誘導体を合成しリノール酸の自動酸化ならびに α -Toc と BHT に対する相乗効果を検討した。

本報ではシステイン誘導体およびそれらとセリンのジペプチド誘導体の合成を報告する。

システイン誘導体 (1—8)

S-アルキルシステインないしそのエステルを常法に従いアセチル化するか、Schotten-Baumann 法によるアシル化によって化合物 (1—5) を 51—88% の収率で結晶状に得た。

また、メチルエステル (6—8) は塩化チオニル法⁷⁾ で対応する遊離酸より合成した。Table I にこれらの化合物の恒数と元素分析値を示す。

ジペプチド誘導体 (9—20)

BOC- ないし Z-Cys(Bzl)-OH とアミノ成分 [H-Ser-OMe または H-Cys(Me)-OMe をそれぞれの塩酸塩より調製] を BCC を用いる混合酸無水物法 (MA 法) ないし DCC 法でカップリングして化合物 9, 10, 13 をそれぞれ 60—70% 収率で合成した。さらに 13 のけん化で遊離ペプチド 14 をその DCHA 塩として結晶状に得た。しかし同様の操作により 9 から 11 を得る試みは成功しなかった。そこで、BOC-Cys(Bzl)-OH とセリンを直接 MA 法で縮合し、生成物をシリカゲルクロマトグラフィーで精製して 11 を得た。このものはついで酸処理により脱 BOC 化を行ない遊離ペプチド 12 に導いた。他方、Ser-Cys 配列のペプチド誘導体の調製においても、先ず該当する酸成分とアミノ成分を MA 法でカップリングして完全保護ペプチド (15, 16) を得た後、けん化ないし酸処理によりそれぞれの部分保護ペプチド (17—20) とした。以上の生成物はいずれも薄層クロマトグラフィー

7) M. Brenner, W. Huber, *Helv. Chim. Acta*, **36**, 1109 (1953).

8) S. Goldschmidt, C. Jutz, *Chem. Ber.*, **86**, 1116 (1953).

9) R.A. Boissonnas, S. Guttman, P.A. Jaquenoud, J.P. Waller, *Helv. Chim. Acta*, **58**, 1491 (1955).

TABLE II. Derivatives of Cysteinylserine (9—12) and Cysteinylcysteine (13, 14)

Compd. No.	mp (°C)	Yield (%)	Recryst. solvent	[α] _D ²⁰ (c=1, MeOH)	TLC			Formula	Anal.		
					R _{f1}	R _{f2}	R _{f3}		Calcd	Found	
									C	H	N
9	43—45.5	73	AcOEt-ether-petr. ether	-25 ¹⁴	0.45	0.83		C ₁₉ H ₂₈ N ₂ O ₆ S	55.32 (55.51)	6.84 (6.79)	6.79 (6.35)
10 ^{a)}	107—110	59	AcOEt-ether-petr. ether	-30 ²³		0.75		C ₂₂ H ₂₆ N ₂ O ₆ S	59.18 (58.90)	5.87 (5.74)	6.27 (6.10)
10 ^{b)}	105—107.5	36	AcOEt-ether-petr. ether	-29 ²³		0.75					
11	93—98	40	AcOEt-ether-petr. ether	-16 ¹⁴	0.43	0.14		C ₁₈ H ₂₆ N ₂ O ₆ S	54.25 (53.96)	6.58 (6.50)	7.03 (6.75)
12 ^{c)}	98—102	95	MeOH-ether	+13 ¹⁴	0.60			C ₁₃ H ₁₈ N ₂ O ₄ S ·HCl	46.63 (46.63)	5.72 (6.08)	8.36 (7.88)
13	106—107.5	66	CHCl ₃ -ether-petr. ether	-54 ¹⁸	0.75	0.74		C ₁₄ H ₂₆ N ₂ O ₅ S ₂	45.88 (45.96)	7.15 (6.94)	7.64 (7.37)
14 ^{d)}	121—125	52	AcOEt-ether	-28 ¹⁹	0.53	0.31		C ₂₅ H ₄₇ N ₂ O ₅ S ₂	55.84 (55.68)	8.88 (8.69)	7.87 (7.36)

a) Prepared by DCC method. b) Prepared by MA method. c) HCl salt. d) DCHA salt.

TABLE III. Seryl cysteine Derivatives (15—20)

Compd. No.	mp (°C)	Yield (%)	Recryst. solvent	[α] _D ²⁰ (c=1, MeOH)	TLC			Formula	Anal.		
					R _{f1}	R _{f2}	R _{f3}		Calcd	Found	
									C	H	N
15	58.5—61	73	AcOEt-ether-petr. ether	-56 ¹³	0.38	0.65		C ₁₉ H ₂₈ N ₂ O ₆ S	55.32 (54.80)	6.84 (6.81)	6.79 (6.39)
16	119—121.5	56	AcOEt-ether-petr. ether	-44 ²³	0.56	0.79		C ₂₈ H ₃₀ N ₂ O ₆ S	64.06 (63.54)	6.22 (5.69)	5.34 (5.44)
17	115—120	74	AcOEt-ether-petr. ether	-19 ¹³	0.42	0.05		C ₁₈ H ₂₆ N ₂ O ₆ S ·1/2 H ₂ O	53.06 (53.04)	6.68 (6.39)	6.87 (6.68)
18	136—138.5	59	AcOEt-ether-petr. ether	-16 ¹⁸	0.29			C ₂₁ H ₂₄ N ₂ O ₆ S ·1/2 H ₂ O	57.13 (56.59)	5.71 (5.62)	6.35 (6.14)
19 ^{a)}	124—125.5	50	MeOH-ether	-42 ¹³	0.08	0.25		C ₁₄ H ₂₀ N ₂ O ₄ S ·HCl·1/2 H ₂ O	46.99 (46.91)	6.20 (5.86)	7.83 (7.65)
20 ^{a)}	100—104	93	MeOH-ether	-31 ¹⁴	0.48			C ₁₃ H ₁₈ N ₂ O ₄ S ·HCl	46.63 (46.60)	5.72 (6.06)	8.36 (7.82)

a) HCl salt.

(TLC) 上単一スポットを与えた。Table II, III にこれらの化合物の融点, 旋光度, TLC, 元素分析値を示す。

以上合成した各化合物のリノール酸の自動酸化に対する抗酸化能および BHT ないし α-Toc との相乗効果については別に報告する。⁵⁾

実験の部

融点は未補正。 $[\alpha]_D$ は Jasco DIP-SL 型旋光計で測定。TLC は Kieselgel G (Merck) プレート上 CHCl_3 - MeOH - AcOH (95:5:3, R_{f1}) n - BuOH - AcOH - H_2O (4:1:5 上層, R_{f2}) および CHCl_3 - MeOH -ピリジン (95:5:3, R_{f3}) で展開し, HBr -ニンヒドリンで発色させた。用いたアミノ酸は田辺アミノ酸研究財団より購入。S-methyl cysteine は Sigma, S-allyl cysteine は NBC, S-benzyl cysteine はペプチド研究所の各製品を使用。α-アミノ酸は全て L 型を使用し, 略名は IUPAC-IUB 生化学命名委員会 (*J. Biol. Chem.*, **247**, 977 (1972)) に従った。使用した略号: BCC=isobutyl chloroformate, DCC=dicyclohexylcarbodiimide, DMF=dimethylformamide, THF=tetrahydrofuran, DCHA=dicyclohexylamine, Bz=benzoyl, All=allyl.

Ac-Cys(Me)-OH(1) S-Methyl cysteine 0.27 g を Ac_2O + AcOH (1:1) 混液 4 ml に溶かし, 3 hr 放置, 溶媒を留去して 1 の結晶残渣を得る (Table I).

Ac-Cys(Bzl)-OH(2) S-Benzyl cysteine 1.06 g を 3.5 N NaOH 18 ml と 5% NaHCO_3 60 ml の混液に溶かし, 攪拌下 Ac_2O 8 ml を滴加, 1.5 hr 攪拌後 9 N H_2SO_4 を加えて酸性としエーテル抽出 (30 ml×3), 抽出液を水洗, MgSO_4 で乾燥し, 溶媒を留去すると 2 の結晶を得る (Table I).

Bz-Cys(Bzl)-OBzl(3) H-Cys(Bzl)-OBzl·Tos OH¹⁰⁾ 4.7 g をピリジン 19 ml に溶かし, 氷冷下攪拌しつつ BzCl 2.5 ml を滴下し, 室温で 2.5 hr 攪拌, 反応液を氷水 30 ml に注加し, 析出結晶をろ取, 1 N HCl , 水で洗浄, 乾燥 (Table I).

Z-Cys(Bzl)-OH(4) S-Benzyl cysteine を常法に従い, アルカリ条件下 Z-Cl と反応して Z 化した (Table I).

BOC-Cys(Me)-OH·DCHA(5) S-Methyl cysteine 2.7 g をジオキサン 11 ml, 水 11 ml, Et_3N 3.8 ml の混液に溶かし S-*t*-butyloxycarbonyl-4,6-dimethyl-2-mercaptopyrimidine¹¹⁾ 5.3 g を加え室温で 1 日攪拌, 水 30 ml を加え AcOEt (25 ml×2) 抽出, 水層を氷冷下 5 N HCl で pH 2 とし AcOEt (50 ml×2) 抽出, AcOEt 層を 1 N HCl , 水で洗い MgSO_4 で乾燥し溶媒を留去, 油状残渣をエーテルに溶かし DCHA を加えると結晶析出 (Table I).

H-Cys(R)-OMe·HCl (6—8·HCl); 一般法 (Table I) 無水 MeOH 1.1 ml を -10° に冷却し, SOCl_2 0.25 ml を滴加した後, S-alkyl cysteine 1.5 mmol を加え, 室温で 2 hr, 45° で 3 hr 攪拌, 溶媒を減圧留去し, 残渣に無水 MeOH 10 ml を加え再び濃縮する。残渣に無水 MeOH を加え濃縮する操作をさらに 2 回繰り返して生成物の結晶を得た。

N-保護ジペプチドエステル (9, 10, 13, 15, 16) (Table II, III) (i) MA 法 (一般法)——既報¹²⁾ の方法によって行ない, 9, 10, 13, 15, 16 を得た。

(ii) DCC 法——Z-Cys(Bzl)-OH 1.04 g を CH_3CN 6 ml に溶かし氷冷下攪拌しながら DCC 0.62 g を加える。これへ H-Ser-OMe·HCl と Et_3N 0.42 g を含む CH_3CN 溶液 4.5 ml を滴加し 10 min 間, ついで室温で 1 夜攪拌, 析出した DC-urea をろ去し, ろ液を減圧濃縮, 残渣を CHCl_3 (10 ml×3) で抽出, 抽出液を水, 1 N HCl , 5% NaHCO_3 , 水で洗い, MgSO_4 で乾燥, 溶媒を留去し, 残渣にエーテルを加えると 10 が結晶化。

N-保護ジペプチド (11, 14, 17, 18) (Table II, III) (i) 直接縮合——BOC-Cys(Bzl)-OH 1.24 g と Et_3N 0.56 ml を乾燥 THF 8 ml に溶かし, 攪拌下 BCC 0.52 ml を加える。ついでセリン 0.53 g と Et_3N 0.56 ml を溶かした水溶液 6 ml を加え, 1 hr 室温で攪拌, THF を減圧留去し, 残液に 1 N HCl を加え pH 2 とし AcOEt (25 ml×2) で抽出, 抽出液を水洗, 乾燥後溶媒留去, 油状残渣を CHCl_3 - MeOH - AcOH (95:5:3) を溶媒とするカラムクロマトグラフィー (Kiesel gel 70-325 mesh, 30×300 mm) にかけて, 溶出液の HBr -ニンヒドリン陽性画分を集めた。溶媒を減圧留去, 油状残渣を石油エーテルで処理し, 11 の結晶を得た。

(ii) N-保護ジペプチドエステルのけん化 (一般法)——N-保護ジペプチドエステル 0.8 mmol を MeOH 1 ml に溶かし, 2 N NaOH 0.45 ml を加え室温で 2 hr 攪拌, ついで 1 N HCl を加え酸性にすると結晶析出, ろ取し, 水洗, 乾燥。生成物が油状の時には MeOH を減圧留去し, エーテル抽出 (30 ml×2), 抽出液を水洗, MgSO_4 で乾燥, 溶媒を留去し, 残渣を少量のエーテルに溶かし DCHA を加え結晶化。

H-Cys(Bzl)-Ser-OH·HCl (12·HCl) 11 0.4 g を乾燥 CHCl_3 1.2 ml に溶かし, 4.3 N HCl -ジオキサン 1.2 ml を加え室温で 15 min 間攪拌, 減圧濃縮し残渣にエーテルを加えると結晶析出, ろ取しエーテルで洗浄 (Table II)。同様の方法で 15, 17 を処理し, それぞれ 19 と 20 の HCl 塩を得た (Table III)。

謝辞 元素分析を担当された金沢大学薬学部中央分析室板谷芳京, 豊島佐智子両氏に感謝する。

10) L. Zervas, M. Winitz, J. P. Greenstein, *J. Org. Chem.*, **22**, 1515 (1957).

11) T. Nagasawa, K. Kuroiwa, K. Narita, Y. Isowa *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **46**, 1269 (1973).

12) 岡田幸蔵, 川瀬正之, 竹内良一, 永井外夫, 薬誌, **96**, 1038 (1976).