シリルクロリドを用いる位置選択的架橋反応による トリプトファン含有シスチンペプチド類の新規合成法

藤原 洋一

京都薬科大学, 〒607-8414 京都市山科区御陵中内町 5

A Novel Synthetic Approach of Tryptophan-Containing Cystine Peptides by Regioselective Disulfide Bond-Forming Reaction Using the Silyl Chloride-Sulfoxide System

Yoichi FUJIWARA

Kyoto Pharmaceutical University, Yamashina-ku, Kyoto 607-8414, Japan

(Received October 1, 1999)

A general scheme for the efficient synthesis of Trp-containing cystine peptide by the successive treatment with methyltrichlorosilane-diphenylsulfoxide in trifluoroacetic acid (TFA) and trifluoromethanesulfonic acid (TFMSA)-thioanisole in TFA, is described. A disulfide bond-forming reaction by silyl chloride-sulfoxide system is completed within 10—15 min without modifications at sensitive residues (Tyr, His, Met) in peptide chain, except for a Trp residue. In order to synthesize a Trp-containing cystine peptide using silyl chloride, the indole moiety of Trp has to be protected since the chlorination of the indole ring proceeded predominantly. A formyl group has been the only protecting group employed for this purpose in practical syntheses of cystine peptides, although it was clarified that a side reaction derived from the formyl group migration was inevitable in the synthesis of somatostatin. Firstly, we examined the application of the following N^m -protecting groups, mesitylene-2-sulfonyl (Mts), cyclohexyloxycarbonyl (Hoc), and 2,4-dimethylpent-3-yloxycarbonyl (Doc) for an efficient synthesis of the Trp-containing cystine peptide by the silyl chloride method. In order to find a feasible scheme of the successive treatment with $\text{CH}_3\text{SiCl}_3\text{-PhS(O)Ph/TFA}$ and TFMSA-thioanisole in TFA, we synthesized somatostatin using Trp(Mts), Trp(Hoc) or Trp(Doc) derivative. The Doc group was found to be the most suitable as an indole protecting group, since the protecting group was cleaved under mild conditions (4°C, 30 min) *via* the corresponding N^m -carboxylic acid intermediate. We then applied the above procedure to the synthesis of endothelin-1 (ET-1), a peptide containing 21-amino acid residues having a C-terminal Trp residue and two disulfide bonds, by regioselective disulfide formation. The combination of the silyl chloride method with iodine oxidation using *S*-acetamidomethyl (Acm) and *S*-tBu groups for the regioselective double disulfide formation was successfully applied to give a highly purified ET-1. These results also show that the N^m -Doc group would be useful for the efficient syntheses of complex cystine-peptides by the silyl chloride method.

Key words—Trp-containing cystine peptide; silyl chloride-sulfoxide system; 2,4-dimethylpent-3-yloxycarbonyl; somatostatin; endothelin-1

1. はじめに

オキシトシン, バゾプレッシン, インシュリン, ソマトスタチン, ナトリウム利尿ペプチド, エンドセリン等をはじめとし, 生理活性ペプチドの多くはその分子内にジスルフィド結合を有している. このジスルフィド結合は, ペプチドあるいは蛋白質の特定の立体構造を安定化させ, その生理活性を発現するために重要な役割を担うものである. このシスチン含有ペプチドを効率よく合成するためには, ジスルフィド結合形成反応がその成否を左右する重要なステップとなる.

通常, 複数のジスルフィド結合を形成させる方法

としては, ほとんどの場合, 空気酸化法が用いられる.^{1,2)} 空気酸化法はアミノ酸配列により規定される立体構造のうち, 最も熱力学的に安定と考えられる天然型のジスルフィド架橋様式を形成させるのに主として使用される. しかしながら, エンドセリンを例にすると, 空気酸化法でジスルフィド結合を形成させた場合, 非天然型の架橋様式を有するものが約30%も副成してくるため, 目的物の単離・精製がかなり困難となることが報告されている (Fig. 1).³⁾ これらの難点を解決するためには, 複数のジスルフィド結合を位置選択的に形成させる必要があるが,^{4,5)} そのためには, 異なる切断機構で除去される複数の

Fig. 1. Disulfide Bond Formation of Endothelin-1 by Air Oxidation

Fig. 2. Disulfide Bond Formation by Iodine Oxidation

Fig. 3. Disulfide Bond Formation by Silyl Chloride-Sulfoxide Method

チオール保護基並びに異なる反応機構で進行する酸化反応を組み合わせることが不可欠となる。この要件を満たすものとして、しばしば使用される酸化反応としては空気酸化法以外には Kamber ら⁶⁾ により開発されたヨウ素酸化法がある (Fig. 2)。すなわち、位置選択的にジスルフィド架橋を行うためには、まず酸に対する安定性の異なる 2 種類のチオール保護基を組み合わせ、酸による切断反応後、順次空気酸化とヨウ素酸化を行い、2 本のジスルフィド結合を形成させるといった方法がよく用いられて

いる。しかしながら、空気酸化法では、反応の完結に長時間を要する場合があったり、また、ジスルフィド架橋をさせるための前駆体ペプチドが水性溶媒に極めて溶解性が悪い場合、反応がうまく進行しないといった問題点がある。また、ヨウ素酸化法では本反応に敏感なアミノ酸残基 (Tyr, His, Met, Trp) をその分子中に含有する場合、溶媒を慎重に選択して、その残基由来の副反応を抑制する必要がある。⁶⁾

著者の研究室で開発されたシリルクロリド-スルホキシド法^{7,8)}によるジスルフィド結合形成反応は、

て、インドール核を保護することなくシリクロリド法にてジスルフィド結合形成反応を行うと、インドール環へのハロゲン付加反応が優先して進行するため、目的のジスルフィド結合体が全く得られてこない (Fig. 5).⁸⁾

本論文ではまず、1) Trp インドール環に從來からよく使用されているホルミル基を使用した場合のソマトスタチンの合成と保護基を除去する際の副反応について簡単に触れた後、2) N^{α} -保護基の再検討とモデルペプチドの合成、並びに 3) N^{α} -Doc (2,4-dimethylpent-3-yloxy-carbonyl) 基を用いた位置選択的架橋反応によるエンドセリン-1 の効率的合成について紹介したい。

2. ホルミル基を使用したソマトスタチンの合成とその脱保護の際の副反応

上述の Trp インドール環へのハロゲン付加反応は保護基を導入することで、そのインドール環の求核性を下げれば、抑制できるのではないかと考えた。そこで、再度ソマトスタチンをモデルとして、インドール核をホルミル基で保護した状態でシリクロリド法によるジスルフィド結合形成反応を行い、次にその保護基であるホルミル基を短時間のアルカリ処理を行うことで除去するスキームを考えた。すなわち、Boc-Cys(Acm)-Merrifield 樹脂を出発原料樹脂として、Boc (*tert*-butyloxycarbonyl) 法によ

りペプチド鎖の構築を行った後、¹¹⁾ HF 処理により目的の [Cys(Acm)^{3,14}, Trp(CHO)⁸]-somatostatin を得た。得られた前駆体ペプチドを $\text{CH}_3\text{SiCl}_3\text{-PhS(O)Ph/TFA}$ にて処理したところ、目立った副反応を伴うことなく、ジスルフィド結合体を得た。最後に、インドール保護基であるホルミル基をアルカリ処理により除去しようと試みたが、目的のソマトスタチン以外に相当量の予期しない副生成物が認められた (Fig. 6)。著者はこの副生成物の構造を明らかにすべく、分取 HPLC により副反応物を単離・精製し、アミノ酸分析、質量分析並びにアミノ酸配列分析を行った (Fig. 7)。その結果、本副生成物は 8 位の Trp インドール核に導入されていたホルミル基が隣の 9 位のリジン ϵ -アミノ基に転移したものの、すなわち [Lys(CHO)⁹]-somatostatin であると判明した (Fig. 8).¹²⁾

さらに、1) シリクロリド法でジスルフィド結合形成反応を行う前の段階でアルカリ処理した場合や、2) リジンそのものと Trp(CHO) を混合した後、アルカリ処理した場合のどちらも、この転移反応は起こらないことも分かった。これらのことから、この転移反応は、このソマトスタチンのアミノ酸配列由来あるいはコンホメーション由来のユニークな副反応であると考えられた。¹²⁾

そこで、著者はこれらの問題点を解決し、位置選

Fig. 6. Synthetic Scheme for Somatostatin Using Trp(CHO)

Fig. 7. Characterization of the Unknown Product of [Trp(CHO)⁸]-somatostatin after NaOH Treatment

Fig. 8. Formation of [Lys(CHO)⁹]-somatostatin after Alkaline Treatment Fig. 9. Proposed Mechanism for Deprotection of Doc Group via a Nⁱⁿ-Carboxylic Acid Intermediate

択的なジスルフィド結合形成反応による Trp 含有シスチンペプチド類の効率的な合成法を確立するため、以下の実験を行うこととした。

3. Nⁱⁿ-保護基の再検討とモデルペプチドの合成

最初に、著者は脱保護の際に転移副反応を起こさない Trp インドール保護基の検討を行う必要があると考えた。本方法で使用可能な Nⁱⁿ-保護基の条件としては、1) CH₃SiCl₃-PhS(O)Ph/TFA によるジスルフィド形成反応の条件下で安定であり、2) S-S 交換反応による異性体形成や塩基触媒転移反応を起こさない酸性条件下で容易に除去されなければならない。上記の条件を満たす保護基として、著者は、9-fluorenylmethyloxycarbonyl (Fmoc) 法で通常、最終脱保護反応に使用される TFA に安定であり、また、trifluoromethanesulfonicacid (TFMSA)-thioanisole/TFA 系により簡単に除去される性質を有するものが上記の条件に適切な保護基と考え、mesitylene-2-sulfonyl (Mts) 基¹³⁾、cyclohexyloxycarbonyl (Hoc) 基¹⁴⁾ 及び Doc 基¹⁵⁾ について検討を行った。このうち Hoc 基、Doc 基については酸性条件下で脱保護される際、それぞれ対応するカルボン酸中間体を経て除去されるので、通常 Trp インドール環の修飾を抑えるために添加しなければならない 1,2-エタンジチオールや 3-メチルインドールを脱保護時に加える必要がない (Fig. 9)。また、Mts 基及び Hoc 基については実際のペプチド合成への応用例が幾つか報告されているが、Doc 基についてはほとんど報告例はない。

まず、これらの保護基について Fmoc 法で通常使用される条件下 (20% piperidine/*N,N*-dimethylformamide (DMF), TFA-scavengers) 及びジスル

Fig. 10. A Novel Synthetic Strategy for Trp-Containing Cysteine Peptide Using Silyl Chloride Method

フィド結合形成反応の条件下 (CH₃SiCl₃-PhS(O)Ph/TFA) での安定性、さらに、TFMSA-thioanisole/TFA による酸処理で除去可能かどうかについて、検討を行った。予備試験の結果、3つのいずれの保護基も問題なく使用可能であることが分かった。そこで、somatostatin をモデルペプチドとして実際の合成に適用し、その有用性に差異がないかどうかの実験を行うこととした (Fig. 10)。まず、3種の Trp 誘導体を用いて Fmoc 型固相ペプチド合成で各前駆体ペプチドを調製した。必要な Trp 誘導体である Fmoc-Trp(Mts)-OH は市販品として入手可能であるが、残り 2 種類の Fmoc-Trp(Hoc)-OH, Fmoc-Trp(Doc)-OH については Fig. 11 に示す方法にて合成した。Fig. 12 に示すように、出発原料樹脂には、C 末端の Cys 残基に由来するラセミ化やジケトピ

Fig. 11. Preparation of Fmoc-Trp(Hoc)-OH and Fmoc-Trp(Doc)-OH

TFMSA treatment

protecting group	condition	additive
Trp(Mts)	25°C, 10min	3-methylindole
Trp(Hoc)	25°C, 30min	-
Trp(Doc)	4°C, 30min	-

Fig. 12. Synthetic Scheme for Somatostatin Using Trp(Mts), Trp(Hoc) or Trp(Doc)

ペラジン形成を抑えるため、Fmoc-Cys(Acm)-2-chlorotrityl (Clt) 樹脂^{16, 17)}を使用した。α-アミノ保護基にFmoc基を、各アミノ酸誘導体の縮合はN,N'-diisopropylcarbodiimide (DIPCDI)-1-hydroxybenzotriazole (HOBt) 法を用いてペプチド鎖の構築を行った。¹⁸⁾ 続いて、得られた各保護ペプチド樹脂をTFAにより樹脂からのペプチド鎖の切断とCys(Acm), Trp(R) (R=Mts, Hoc, Doc) 以外の脱保護反応を行った。得られた[Cys(Acm)^{3, 14}, Trp(R)⁸]-somatostatinについてそれぞれ、CH₃SiCl₃-PhS(O)Ph/TFAによるジスルフィド結合形成反応を行った。この反応をHPLCによりモニターしたところ、いずれも15分間で原料はほぼ消失し、シャープなメインピークをもつ目的物が生成した (Fig. 13)。また、この段階では目立った副反応物等の差異は認められなかった。次に、TFMSA-thioanisole/TFA系によるインドール保護基の脱保護反応時の収率及び純度の比較、検討を行った。その結果、Hoc基ではTFMSA系での脱保護反応が不完全であり、Mts基又はDoc基を用いた合成では、各段階での純度あるいは収率 (25%; Mts基, 23%; Doc基) はほぼ同程度であった (Fig. 13)。しかし、

Fig. 13. HPLC of the Reaction Mixture and the Product for the Synthesis of Somatostatin Using Trp(Mts), Trp(Hoc) or Trp(Doc)

Doc基の除去の際にはMts基の場合に必要な3-methylindoleの添加の必要がなく、さらに除去反応が4°C, 30 minといった温和な条件下で行える点からDoc基が最も本合成法に適しているものと結論した。

4. N^{trp}-Doc基を用いた位置選択的架橋反応によるエンドセリン-1の合成

次に、実際のペプチド合成への本法の応用を検討する目的で、位置選択的ジスルフィド結合形成反応によるエンドセリン-1 (ET-1)の合成を行った。ET-1の2個の分子内ジスルフィド結合をその完全還元体からの空気酸化法により一挙に形成させると、約30%の架橋異性体の副生が避けられない。²⁾ これは、天然型架橋体とその異性体との間の熱力学的安定性にほとんど差がないためであり、ET-1の効率的合成には位置選択的架橋反応が不可欠となる。また、分子内の2本のジスルフィド結合の架橋方法はFig. 14に示すように2種のルートが考えられる。著者は実際に両方のルートでの合成を行うこととした。この際、システイン残基の保護基としてはヨウ素酸化で安定で、シリクロリド法により切断されるtert-butyl (tBu)基とヨウ素酸化で切断可能なAcm基を組み合わせて使用した。

4.1. Route Aによるエンドセリン-1の合成
著者のスキームをFig. 15に示す。Fmoc-Trp(Doc)-Wang resinを出発原料樹脂として、Fmoc法によるペプチド鎖の構築後、TFAによる脱保護及び樹脂からの切断を行い、[Cys(Acm)^{1, 15}, Cys(tBu)^{3, 11}, Trp(Doc)²¹]-endothelin 1を得た。得られたペプチドに対して室温、60分間のヨウ素酸化反応を行い、Acm基を有する1, 15位のシステイン残基間で1番目のジスルフィド結合を形成させた。続いて、CH₃SiCl₃-PhS(O)Ph/TFAによりtBu基をもった3, 11位のシステイン残基間で2番目のジスルフィド結合を形成させた。いずれの反応もHPLCにより反応を追

Fig. 14. A Novel Synthetic Strategy of ET-1 by Regioselective Disulfide Bond Formation

Fig. 15. Synthesis of ET-1 via Route A

Fig. 16. HPLC of ET-1 and Its Intermediates [Route A]

跡したが、原料は完全に消失し、鋭いメインピークを持った目的物が生成することを確認した (Fig. 16). 最後に 0.33 M TFMSA-thioanisole/TFA 系で N^{in} -Doc 基の除去を行い、目的の ET-1 を出発原料樹脂からの収率 4% で得ることができた。

4.2. Route B による ET-1 の合成 次に、Route A の場合と同様、Fmoc-Trp(Doc)-Wang resin を

出発原料樹脂として、[Cys(tBu)^{1,15}, Cys(Acm)^{3,11}, Trp(Doc)²¹]-endothelin 1 を得た。続いて、Fig. 17 に示したスキームに従い、ヨウ素酸化、シリルクロリド法によるジスルフィド架橋形成を行った。いずれの反応も HPLC 上、原料は完全に消失し、鋭いメインピークを持った目的物が生成した (Fig. 18)。最後に 0.33 M TFMSA-thioanisole/TFA 系で N^{in} -Doc 基の除去を行い、目的の ET-1 を出発原料樹脂からの収率 13% で得ることができた。

以上、A, B いずれの経路でもジスルフィド結合形成反応は速やかに進行し、目的物が得られることが確認できた。なお、両経路における収率の差異は反応の進行過程での差異によるものではなく、ジスルフィド結合を 1 本のみ含む合成中間体の化学的性質が異なり HPLC による単離・精製過程で収率に差が生じたことに由来している。

5. おわりに

これまで適切な Trp インドール保護基の選択とその脱保護法の確立がシリルクロリド法による Trp 含有シスチンペプチドの効率的合成のための大きな課題となっていたが、Doc 基を N^{in} -保護基として使用し、シリルクロリド法による位置選択的ジスル

Fig. 17. Synthesis of ET-1 via Route B

Fig. 18. HPLC of ET-1 and Its Intermediates [Route B]

フィド架橋反応と TFMSA による N^{trp} -保護基の除去を組み合わせた方法で Trp 含有シスチンペプチドを効率的に合成することができた。Doc 基は対応するカルボン酸中間体を経て脱保護されるため、Trp インドール環の修飾を抑えるために添加しなければならない添加剤を脱保護時に加える必要がなく、比較的温和な条件 (4°C , 30 min) で除去できる。さらに、この保護基はホルミル基と比べて脂溶性が高いため、ソマトスタチンあるいはエンドセリン-1 の合成においてジスルフィド結合形成反応及びその保護基の除去反応の HPLC によるモニターが容易になることも分かった。

著者は、今回の方法論を適用することで、より複雑なジスルフィド架橋を有する生理活性ペプチドのみならず新規機能を持った人工蛋白質の合成も可能ではないかと考えている。

謝辞 本研究は京都薬科大学薬品化学教室にて行われたものであり、御支援を賜りました木曾良明教授に深謝いたします。また、研究の遂行にあたり暖かい励ましと貴重な御助言を賜りました赤路健一助教授（現・大阪大学蛋白質研究所助教授）に感謝致します。さらに、本研究の遂行に協力してい

ただいた多くの方々、特に、藤野賢二修士（現・協和発酵工業(株)）、西内 一修士（現・京都府）、木村 徹助手並びに 4 年次卒業研究生の方々に深く感謝致します。この研究を行うにあたり文部省科学研究費及び文部省学術フロンティア推進事業よりご支援を賜りました。この場を借りて御礼申し上げます。

REFERENCES

- 1) Hiskey R. G., "The Peptides," Vol. 3, ed. by Gross E., Meienhofer J., Academic Press, New York, 1981, pp. 1-38.
- 2) Tam J. P., Su C-R., Liu W., Zhang J-W., *J. Am. Chem. Soc.*, **113**, 6657-6662(1991).
- 3) Kumagaya S., Kuroda H., Nakajima K., Watanabe X. T., Kimura T., Masaki T., Sakakibara S., *Int. J. Peptide Protein Res.*, **32**, 519-526 (1988).
- 4) Ponsati B., Giralt E., Andreu D., *Tetrahedron*, **46**, 8255-8266 (1990).
- 5) Munson M. C., Barany G., *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 10203-10210 (1993).
- 6) Kamber B., Hartmann A., Eisler K., Riniker B., Rink H., Sieber P., Rittel W., *Helv. Chem. Acta*, **63**, 899-915 (1980).
- 7) Akaji K., Tatsumi T., Yoshida M., Kimura T., Fujiwara Y., Kiso Y., *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1991**, 167-168.
- 8) Akaji K., Tatsumi T., Yoshida M., Kimura T., Fujiwara Y., Kiso Y., *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 4137-4143 (1992).
- 9) Akaji K., Fujino K., Tatsumi T., Kiso Y., *Tetrahedron Lett.*, **33**, 1073-1076 (1992).
- 10) Akaji K., Fujino K., Tatsumi T., Kiso Y., *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 11384-11392 (1993).
- 11) Kiso Y., Fujiwara Y., Kimura T., Nishitani A.,

- Akaji K., *Int. J. Peptide Protein Res.*, **40**, 308–314 (1988).
- 12) Akaji K., Fujino K., Kiso, Y., “Peptide Chemistry 1992,” ed. by Yanaihara N., ESCOM, Leiden, 1993, pp. 27–29.
- 13) Fujii N., Futaki S., Yasumura K., Yajima H., *Chem. Pharm. Bull.*, **32**, 2660–2665 (1984).
- 14) Nishiuchi Y., Nishio H., Inui T., Kimura T., Sakakibara S., *Tetrahedron Lett.*, **37**, 7529–7532 (1996).
- 15) Karlström A., Unden A., *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1996**, 1471–1472.
- 16) Fujiwara Y., Akaji K., Kimura T., Kiso Y., *Chem. Pharm. Bull.*, **42**, 724–726 (1994).
- 17) Fujiwara Y., Yokotani J., Akaji K., Kimura T., Kiso Y., *Chem. Pharm. Bull.*, **44**, 1326–1331 (1996).
- 18) Atherton E., Sheppard R. C., “The Peptides,” Vol. 9, ed. by Udenfriend S., Meienhofer J., Academic Press, New York, 1987, pp. 1–38 and references cited therein.