新しい試薬

トリフェニルホスフィンと 2,2'-ジピリジルジスルフィド

ペプチドおよびヌクレオチドの新しい合成試薬

向山光昭*・松枝 礼**・橋本光紀**

Triphenylphosphine (Ph_3P) and 2,2'-Dipyridyldisulfide ($(\text{PyS})_2$)

The new coupling reagents to synthesis of peptides and nucleotides

Teruaki MUKAIYAMA*, Rei MATSUEDA** and Mitsunori HASHIMOTO**

はじめに

タンパク質および核酸は生体内において生命現象の基礎となる重要な化合物群であり、それぞれアミノ酸およびヌクレオチドが脱水縮合して生成した形の高分子化合物である。これらを化学的に合成するためにはいくつかの限定された条件が要求されるが、特に高い反応性と高い反応の選択性が必須のものである。以下、近年われわれの研究室で開発され、いくつかのオリゴペプチド、あるいはオリゴヌクレオチド、サイクリックホスフェート、補酵素Aなどの合成に有用に利用された酸化還元系による新しい縮合反応を紹介したい。

二価のイオウ化合物であるスルフェン酸誘導体やジスルフィドは分極性が高く Pearson の Hard Soft 理論¹⁾による Soft な化学種に属し反応し易い一群の化合物で

ある。特にスルフェン酸誘導体のジスルフィドへの還元、さらにジスルフィドのチオレートアニオンへの還元など電子移動を伴いその酸化状態が容易に変化することは特徴的な性質の一つである。筆者らはスルフェン酸誘導体が Soft な酸としての性質を示し Soft な塩基であるホスフィンとの反応性が大きく、これら2つの化合物が酸化還元反応を受け易い点に着目し、これらを組合せてペプチドおよびヌクレオチドの合成に応用できる試薬の開発を進めてきた。ここではトリフェニルホスフィン (Ph_3P) を還元剤、2,2'-ジピリジルジスルフィド ($(\text{PyS})_2$) を酸化剤とする酸化還元系による縮合反応によるペプチド、ヌクレオチド合成反応について述べる。なお本試薬の開発過程の詳細に関しては文献²⁾を参照して頂きたい。

I. 試薬の性質、製法および反応機構

Ph_3P および $(\text{PyS})_2$ はそれぞれ mp 80°C および mp 58°C の安定な白色結晶であり、各種有機溶媒に可溶であり、市販品をそのまま用いることができる。なお $(\text{PyS})_2$ を実験室で合成する³⁾ 場合には 2-クロルピリジンとチオ尿素より 2-メルカプトピリジン (mp 125°C) を合成し、これをフェリシアン化カリで酸化することにより容易に合成することができる。 Ph_3P 、 $(\text{PyS})_2$ を用いる脱水縮合反応をペプチド合成の場合を例に模式的に示したのが 図 1 であり、この反応では $(\text{PyS})_2$ が還元されて 2-メルカプトピリジン (2H を受容) に変化し、一方同時に Ph_3P がトリフェニルホスフィンオキシド (O を受容) に酸化される酸化還元の組合せと共役し

* 東京工業大学理学部化学科教授 ()

* Department of Chemistry, Faculty of Science, Tokyo Institute of Technology ()

* 東京大学理学部化学科教授 ()

* Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Tokyo ()

** 三共株式会社生産技術研究所 ()

** Product Development Laboratories, Sankyo Co. Ltd., ()

図 1

て起る脱水縮合反応によりペプチド、ヌクレオチドの合成を行うものである。本試薬を用いてペプチド、ヌクレオチドを合成する場合には出発物質であるアミノ酸あるいはヌクレオチド、ヌクレオシドと Ph_3P 、 $(\text{PyS})_2$ を混合し反応させることができるので反応は -70°C から 120°C まで任意の温度が選択でき、また特に特別な反応条件を設定する必要がなく任意の溶媒中で反応を行うことができる。この場合反応中生成する 2-メルカプトピリジンおよびトリフェニルホスフィオキシドはエーテルをはじめとする極性の小さい溶媒によく溶けるので目的物のみを沈殿させたり、シリカゲルを用いるドライカラムで分離することにより容易に目的物を単離することができる。また後述する水溶性ホスフィンを用いれば水洗のみの操作で目的物を単離することもできる。本反応の反応機構はペプチド合成の場合を例にとると 図 2 に示すように、まずトリフェニルホスフィンと 2,2'-ジピリジルジスルフィドが反応して 4 級塩を生じ、カルボン

図 2

酸が反応して反応の重要な中間体であるアシルオキシホスホニウム塩 (I) を生じるが、この場合 (I) はむしろ共有結合性の強い 5 価の性質を持ち反応してくるアミンと環状の遷移状態 (II) を経る協奏反応で一気にペプチドを与える機構により進行するものと考えられる。この場合ピリジン環の N 原子が重要な役割を演じ、分子内塩基触媒効果および 2-メルカプトピリジンがチオール型よりむしろチオン型を取ろうとする tautomeric な効果と相まって特異的にアミノリシスを起しやすく、副反応、ラセミ化が起りにくいものと思われる²⁾。

II. ペプチドの合成

1. 各種アミノ酸を含むペプチドの合成

ペプチド合成では緩和な条件下、高収率で反応が進行することと同時にペプチド生成反応の過程でアミノ酸の側鎖に基づく副反応が起らないことが一つの重要な問題である。本試薬を用いると従来法では側鎖にいろいろな副反応が起ることが知られている各種アミノ酸についてもペプチド生成反応で良い結果を与える²⁾。これらの結果を表 1 に示す。特に側鎖アミドの脱水反応が起ることが知られているアスパラギン、グルタミンに関しては D.T. Gish ら⁵⁾ により副反応が見い出されたモデルペプチド ($\text{Z-Asp}(\text{NH}_2)\text{-Cys}(\text{Bzl})\text{-OMe}$) を用いて更に詳細に検討した結果、一般に用いられる DCC 法では目的物が 35% に対し副反応生成物である脱水体が 28% 生じ、これは目的物とほぼ同等生成することになるが、本法によれば目的物が 73% の収率で単離され、副生物はたとえばプレパラティヴクロマトで分離した結果 1% 以下の微量生じるのみであることがわかった。なお $\text{Z-Glu}(\text{NH}_2)\text{-Cys}(\text{Bzl})\text{-OMe}$ の合成においては副反応物は検出されず、

本試薬を用いれば従来活性エステルで導入されているこれらアミノ酸が直接ペプチド鎖に導入できることを示しているが、実際固相法によるペプチド合成においても副反応を伴わずこれらアミノ酸を導入することができる。

2. ラセミ化

ペプチド合成を行う場合、1. で述べた側鎖に基づく副反応と同様にペプチド鎖単位で延長する際にラセミ化が起らないことが最も重要な問題の一つである。このラセミ化はオキサゾロンを経由して起ることがよく知られている⁶⁾。このラセミ化の問題に対して最も厳しいテストとして知られている Young test⁷⁾ を行なった結果を表 2 の下段にまた Young による従来法のデータを上段に示す。本法によれば CH_2Cl_2 中室温

表1 各種アミノ酸を含むペプチドの合成

ペプチド	反応溶媒	収率 %	mp (°C) (lit)	$[\alpha]_D^{25}$ (lit) (C 溶媒)
1. Z-L-Met-Gly-OEt	CH ₂ Cl ₂	92	94~6 (95~6)	$[\alpha]_D^{27}$ -19.8 (-20.0) (C4.6 EtOH)
2. Z-L-Cys(SBzl)-Gly-OEt	"	91	97~9 (98~9)	$[\alpha]_D^{20}$ -27.0 (-26.6) (C6 AcOH)
3. Z-L-Trp-Gly-OEt	"	92	118~20 (119~20)	$[\alpha]_D^{20}$ -19.8 (-20.0) (C2 EtOH)
4. Z-L-Tyr-L-Ileu-OMe	"	93	69~70 (70)	$[\alpha]_D^{23}$ -4.1 (-4.2) (C2.6 DMF)
5. Z-L-Thr-Gly-OEt	"	83	105~7 (—)	$[\alpha]_D^{25}$ -13.8 (—) (C1 EtOH)
6. Z-L-Ser-Gly-OEt	"	84	98~100 (98~101)	$[\alpha]_D^{20}$ -5.5 (-5.5) (C1 DME)
7. Z-L-Glu-Gly-OEt	"	86	168~70 (169~71)	$[\alpha]_D^{20}$ -7.3 (-7.2) (C1 DMF)
8. Z-L-Asp-Gly-OEt	DMF+CH ₂ Cl ₂	85	185~7 (184~6)	$[\alpha]_D^{20}$ -5.6 (-3.8) (C1 DMF)
9. Z-L-Arg-Gly-OEt	"	82	119~21 (118~20)	$[\alpha]_D^{23}$ -15.4 (-15.8) (C2 MeOH)
10. Z-L-His-Gly-OEt	CH ₂ Cl ₂	80	112~3 (113~4)	$[\alpha]_D^{20}$ -18.6 (—) (C1 EtOH)
11. Z-L-Phe-Gly-OEt	"	90	110~2 (110~3)	$[\alpha]_D^{20}$ -16.8 (-16.6) (C2 EtOH)
12. Z-L-Val-Gly-OEt	Benzene	92	166~7 (167)	$[\alpha]_D^{23}$ -32.0 (-31.3) (C1 MeOH)

表2 Young test (Bz-Leu-Gly-OEt の合成) 結果

方法	溶媒	収率 (%)	$[\alpha]_D^{20}$ (C3.1 EtOH)	L-isomer (%)
Azide 法	Et ₂ O	87	-34.0	100
"	"	74	-29.8	88
<i>p</i> -Nitrophenyl ester 法	AcOEt	95	-34.3	100
"	CHCl ₃	86	-32.6	96
DCC 法	CH ₂ Cl ₂	84	-18.1	53
"	CH ₂ Cl ₂	74	-18.3	54
Mixed	THF	88	-6.1	18
Anhydride	"	85	-7.6	22
Woodward	MeCN	77	-32.8	96
"	MeNO ₂	78	-22.5	66
Ph ₃ P ₂ (PyS) ₂ 法	CH ₂ Cl ₂	91	-32.6	96
" +	DMF, -30°	88	-32.0	94
"	Dioxane + 10eq H ₂ O	90	-31.9	"

注1) L-isomer% はアジド法で得られる旋光度の最高値-34°C を100% として実際に得られた旋光度の%で表わす数値である。

注2) *p*-nitrophenyl ester の合成はラセミ化の起らないベンジルオキシカルボニル基で保護したエステルを合成し、ベンジルオキシカルボニル基をベンゾイル基に変換する方法で行なわれている。実際にはこの活性エステルを合成する際のラセミ化が問題となる。

注3) DL 体, L 体の赤外線吸収スペクトルを比較すると L 体では NH の吸収が singlet である一方, DL 体では doublet であることを見出し, IR より定性的判定はできることがわかった。

てきする光学純度のペプチドを 91% の高収率で得ることができる。またラセミ化を起しやすいジメチルホルムアミド (DMF) 中や水共存下の反応においてもあらかじめ 2-メルカプトピリジンを加えて反応を行えば好結果を得ることができる²⁾。

3. 活性エステルの合成²⁾ ペプチド合成反応中, アミノ成分の代りに水酸基を持つ化合物を反応させれば同じ反応型式により活性エステルを合成することができる。これら活性エステルの中には不安定なものもあり, 調製時同時に生成するホスフィンオキシドとの分離操作中に分解するものもあるが, この場合には水溶性ホスフィンであるジフェニルホスフィン-*p*-ベンゼンスルホン酸 N-エチルピペリジン塩を用いて反応させれば水洗操作により表3に示すような各種の活性エステルを容易に合成することができる。一方, アスパラギン, グルタミン等の活性エステルはこれらが反応系から析出するので, 副反応を伴わず表4に示すように好収率で Ph₃P を用いて容易に活性エステルを合成することができる。

4. Nps-アミノ酸を用いるペプチド合成 アミノ基の保護基として用いられる *o*-ニトロフェニルスルフェニル (Nps) 基は酸化還元系により活性化され新しいペプチド結合を生成するので, 過剰モルの Ph₃P を用いると下式のように Nps 基を脱離する過程を省略して一挙にペプチド結合を生成させることができる。

30 分で反応が完結し, Azide 法, Woodward 法にひっ

表 3 水溶性ホスフィンを用いる活性エステルの合成

活 性 エ ス テ ル	収 率	mp (lit)	$[\alpha]_D^{25}$ (lit) (C 溶 媒)
Z-L-Phe-OSu ¹⁾	75	136~7.5 (134~6)	$[\alpha]_D^{25}$ -54.2° (-53.8°) (C1 DMF)
Z-L-Val-OSu	61	116~7.5 (116~7)	$[\alpha]_D^{25}$ -25.8° (-25.1±2.4°) (C2 Dioxane)
Z-L-Phe-OPCP ²⁾	86	157.5~8 (157)	$[\alpha]_D^{25}$ -51.4° (-49.4°) (C1 DMF)
Z-L-Val-OPCP	82	140 (140~1)	$[\alpha]_D^{25}$ -22.6° (-22.8°) (C1 DMF)
Z-L-Phe-OQ ³⁾	70	138.5~9.5 (139.5~40)	$[\alpha]_D^{25}$ -70.6° (-70.0°) (C2 DMF)
Z-L-Ala-OQ	72	101~2.5 (102~3)	$[\beta]_D^{25}$ -67.7° (-67.9°) (C1 DMF)
Bz-L-Leu-OSu ⁴⁾	59	168~9 (167~9)

結果, Bz-L-Leu-Gly-OEt 83% yield, L-isomer 95% を与えた。

表 4 トリフェニルホスフィンを用いる活性エステルの合成

活 性 エ ス テ ル	収率 %	mp (lit)	$[\alpha]_D^{25}$ (C 溶 媒)
NPS-L-Glu-OPCP	74	146~7 (142~6)	$[\alpha]_D^{25}$ -59.8° (-61.3°) (C2DMF)
Z-L-Glu-OSu	72	182~4.5 (182~7)	$[\alpha]_D^{25}$ -17.3° (11.0°) (C1DMF)
Z-L-Asp-OPCP	74	167~8.5 (—)	$[\alpha]_D^{25}$ -26.7° (—) (C1DMF)
Z-L-Arg-OPCP	71	109~111 (109~111.5)	$[\alpha]_D^{25}$ -14.0° (-14.2°) (C1DMF)

たとえば, Z-Pro-Leu-Gly-OEt の合成において, 当モルの Ph_3P , $(\text{PyS})_2$ を用いて Nps-Leu-Gly-OEt を合成し, これを単離精製することなく次に 3 当量の Ph_3P を用いて Nps 基を活性化し Z-Pro-OH と反応させることにより通算 81% の高収率でトリペプチドを一挙に合成することができる。

5. 液相法によるオキシトシンの合成

以上述べたように本法によるペプチド合成法には 4. で述べた保護基である Nps 基を除去することなく次のカップリングを行なえる A 反応, 1. で述べた遊離の酸成分

Cys	Tyr	Ileu	Gln	Asn	Cys	Pro	Leu	Gly
Bzl			NPS				NPS	
			OH 74%				OH	H
			HO-Su				⑧	
			OSu				⑨	
Z	OH	H	H	O ⁺ Bu	Z	OH	(NPS)	OEt
Bzl	⑩	90%		85%	Z		⑩	81%
Z		O ⁺ Bu	Z-OHNPS	O ⁺ Bu	Z	NH ₂ /MeOH		98%
			⑪	72%	Z			NH ₂
Bzl			H ₂ /Pd-C			H ₂ /Pd-C		94%
Z	CF ₃ COOH	OH		O ⁺ Bu	Bzl		⑫	86%
Bzl	SuOH	⑬	65%	O ⁺ Bu	Z			NH ₂
Z		CF ₃ COOH	91%	O ⁺ Bu	Z	HBr/AcOH		NH ₂
Bzl			Su-OH	⑭	Bzl			NH ₂
Z				91%	H			NH ₂
			1) HF					NH ₂
			2) O ₂ (air)					NH ₂
H								NH ₂

と遊離のアミノ成分とを結合させる適用範囲の広いB反応, 3. で述べた活性エステル合成を行なうC反応があり, それぞれペプチド合成に利用されるいくつかの優れた特長を持っている。これらの反応型式の特長を組み込み, (2+3)+4 のフラグメント縮合によりオキシトシンを合成した例を 図 3 に示す。アミノ基を遊離にするとピロ化の起るグルタミンの場合にも Nps-Gln-Asn-OBu^t から Nps 基を脱離することなくA反応によりペプチド鎖を延長することができる。(1~5) と (6~9) のフラグメント縮合はC反応により縮合剤を 1.5 当量用いることにより 91% の高収率でノナペプチドを得ることができた。この保護ノナペプチドは HF で保護基を脱離し, 空気酸化してオキシトシンに誘導し, 溶液のまま血圧降下作用を測定したところ, 保護基の脱離および酸化が定量的に行なわれたと仮定して 104 unit/mg を示した。

6. 固相法による LH-RH の合成⁹⁾ 固相法によればC末アミノ酸からN末アミノ酸に向かってアミノ酸1個ずつ機械的に延長できるのでペプチド合成の大幅なスピードアップが可能である。しかし, その最終物の純度には問題があり, 目的物に分子量的にも物性的にも近似の物が混入する点が最大の欠点とされている。この問題に対し, 著者らはアミノ酸1個ずつ延長する代りに Ph₃P, (PyS)₂ を用いてペプチド鎖単位で延長する方法を検討し, 好結果を得ている。ここでは黄体形成ホルモン放出ホルモン (LH-RH) の合成例を紹介する。

i. C末アミノ酸よりN末アミノ酸への延長 固相法ペプチド合成は一般に液相法に比して反応性が劣ることが指摘されているが, レジンのマトリックスを考えると最初に導入するアミノ酸を反応しやすい点に導入することは以後のペプチド鎖の延長に重要であると考えられる。従来, この Boc-アミノ酸の導入はクロルメチルレジジンと Boc-アミノ酸を Et₃N 存在下エタノール中加熱還流することにより行なわれているが, 導入点の選択は困難と考えられる。しかしハイドロキシメチルレジジンを用い Ph₃P, (PyS)₂ によるエステル化反応により導入すれば室温下の反応で導入最適とされている 0.1~0.5 mmol/g 量を容易に導入することができる¹⁰⁾。この方法によれば従来法では分解を伴うメチオニン, アスパラギン, グルタミン等も円滑に導入され, 従来は困難とされているペプチドフラグメントも容易に導入することができる。この方法により導入した Boc-グリシンレジジンを用いて LH-RH の合成を行なったルートを 図 4 に示す。得られたノナペプチドの保護基を脱離後, ピログルタミン酸ペンタクロルフェニルエステルと反応させて LH-

図 4

RH に誘導した後 Sephadex G-25, CM-Sephadex による精製で天然品に比し full 活性を持つ純粋な LH-RH を合成することができた。なおフラグメント縮合の際に問題となるラセミ化に関しては酵素分解により Trp にラセミ化が起っていないことを確認した。この方法によれば最初のアミノ酸の導入とペプチド鎖の延長が同一条件であるため, 最初の導入から機械化可能であり, 反応しやすい点に導入されたアミノ酸を円滑に延長することができる。

ii. N末アミノ酸よりC末アミノ酸への延長 i. で述べた従来広く用いられている固相法のペプチド鎖延長方向とは逆にN末アミノ酸よりC末アミノ酸へ延長する場合を考えると, 最大の問題点はカルボキシル基の活性化に基づくラセミ化, 副反応であり, termination が起るため収率よくペプチド鎖の延長が行なえない点である。しかし, Ph₃P, (PyS)₂ を用いれば副反応がきわめて少ないのでN末アミノ酸からC末アミノ酸への延長も収率よく行なうことができる。この方法により LH-RH の合成を行なったルートを 図 5 に示す。グルタミン-tブチ

図 5

ルエステルを導入したレジンをフラグメント縮合によりデカペプチドまで延長し, HF で脱離後ピロ化して LH-RH に誘導し, 通算収率 51% で full 活性を持つ LH-

RH を容易に合成することができた。この方法においては過剰に用いるフラグメントは反応系で変化を受けないため回収、再使用が可能であり、また用いるフラグメントの合成も **i** の場合に高価な Boc-アミノ酸を要するのに比し、安価な Z-アミノ酸で行なえる点、さらに側鎖の保護が最少で済む点等数多くの利点があるので将来広い範囲にわたってペプチド合成に利用されるものと考えられる。

III. ヌクレオチド誘導体の合成

1. オリゴヌクレオチドやヌクレオチド誘導体を合成するには DCC(Dicyclohexylcarbodiimide)¹¹⁾, MSC (Mesitylenesulfonyl chloride)¹²⁾ や TPS (2, 4, 6-Triisopropyl benzene sulfonyl chloride)¹³⁾ 等の縮合剤によるホスホリル化反応が一般に利用されている。ホスホリル化反応で問題にされる点は一般に反応率が低いことや副反応を伴いやすいこと (特に対称ピロホスフェート体の副生) 等であり、それらの点を改良する新しい反応の開発が望まれている 現状である。ここに述べる Ph_3P (PyS)₂ を縮合剤として用いるホスホリル化反応は次式に示すような機構で進行する。この際中間体 (III a, b) はピリジン溶媒中ですみやかに生成し、しかも溶液中で安定に存在することから従来の縮合剤を用いる反応では副生をさけられない対称ピロ体をはほとんど生ずることなく選択的に反応が進行する。たとえば、5'-O-トリチルチミジン (0.6 mM) と 3'-O-アセチルチミジン 5'-ホスフェート (0.5 mM) とを Ph_3P , (PyS)₂ (2.5 mM) とピリジン (5 ml) 中室温で反応させ常法により保護基を脱離すればジヌクレオチド (TpT)^{14,15)} が収率 90% で得られしかもピロ体, TpT , はほとんど副生しないことが明らかになった。同様に他のヌクレオチド (シチジン; C, アデノシン; A, グアノシン; G, 5'-ホスフェート) と 5'-O-トリチルチミジン, TpT とを反応させればピロ体をはほとんど副生することなくジヌクレオチド TpC , TpA , TpG を 80~85% の収率で得ることができる。さらにこの方法によりタンパク質の生合成に重要な

役割を果たしているトリヌクレオチドの合成を検討した結果たとえば d- TpTpT , d- TpApA , d- CpApT , d- TpGpT 等 DNA を構成する四種類の塩基を含むトリヌクレオチドを 50~70% の収率で合成することができた (表 5)。

表 5 トリヌクレオチドの合成

Trinucleotide	3'-OH containing component	Amount m mol	5'-Phosphate containing component	Amount m mol	Yield % ^a
d- TpTpT	TrTpT	0.05	d-pT-OAc	0.15	65
d- TpTpA	"	"	d-pA ^{Bz} -OAc	0.10	55
d- TpTpC	"	"	d-pC ^{An} -OAc	"	58
d- TpApT	TrTpA ^{Bz}	"	d-pT-OAc	0.15	60
d- TpApA	"	"	d-pA ^{Bz} -OAc	0.10	58
d- TpApC	"	"	d-pC ^{An} -OAc	"	50
d- TpCpC	TrTpC ^{An}	"	"	"	53
d- TpCpT	"	"	d-pT-OAc	0.15	63
d- ApTpT	TrA ^{Bz} pT	"	"	"	61
d- ApTpA	"	"	d-pA ^{Bz} -OAc	0.10	55
d- ApApA	TrA ^{Bz} pA ^{Bz}	"	"	"	60
d- ApApC	"	"	d-pC ^{An} -OAc	"	55
d- CpApT	TrC ^{An} pA ^{Bz}	"	d-pT-OAc	0.15	"
d- TpGpT	TrTpG ^{i-Bu}	"	"	0.10	63
d- TpGpG	"	"	d-pG ^{i-Bu} -O ⁱ Bu	"	50

a) Yields were determined spectrophotometrically in water and methanol Tr; Tr or MMTr group

2. ヌクレオシドサイクリックホスフェートの合成¹⁴⁾

ヌクレオシドサイクリックホスフェートは 2', 3'-サイクリック体のようにオリゴリボヌクレオチド合成の際に 水酸基の保護基として用いられ、3', 5'-サイクリック体 (特にアデノシン 3', 5'-サイクリックホスフェート) のように生体内できわめて興味ある生理作用をもつものとして注目を集めている化合物である。まず 2', 3'-サイクリック体の合成は 2', (または 3'-) ホスフェートを出発原料として HMPA (Hexamethyl phosphotriamide) 溶媒中で反応を行なうと各種のヌクレオチドにつきいずれの場合にも定量的に合成することができる (表 6)。3', 5'-サイクリック体の場合は 5'-ホスフェートを出発原料とし大過剰のピリジン溶媒中加熱還流下反応を行なえば収率よく合成することができる。またシチ

表 6 リボヌクレオシド 2',3'-サイクリックホスフェートの合成

リボヌクレオシド	溶 媒	条件		$\lambda_{\text{max}}^{7.0}$	$\epsilon_{\text{max}} 10^3$
adenosine	HMPA	室温	3 時間	259	14.6
uridine	"	"	"	262	10.0
cytidine	"	70°C	40 分	271	9.1
guanosine	"	"	"	254	12.95
riboflavin (4',5')	"	室温	1 時間	264(370, 442)	
adenosine	CH ₃ OH-H ₂ O (1:1 v/v)	"	5 分	259	14.6

ジル酸やグアニル酸のように難溶性のヌクレオチドを用いた場合でも Ph_3P を加えると溶解性が増大するため従来法のように塩基部分のアミノ基にベンゾイル基、アニソイル基等を導入して溶解性を増す工程を経ずに目的物を得ることができる。結果を表 7 に示す。

表 7 ヌクレオシド 3',5'-サイクリックホスフェート

ヌクレオシド-5' ホスフェート*	溶 媒	条 件	収率 (%)
adenosine	pyridine	reflux 3 hr	86
uridine	"	" "	80
cytidine	"	" "	56
guanosine	"	" "	85
N-benzoyl guanosine	"	" "	"
thymidine	"	" "	70

* ヌクレオチドは 4-モルホリノ-N,N'-ジシクロヘキシルカルボキシアミジン塩として使用

3. ホスホロジアニリデート体の合成と反応¹⁶⁾

従来、リン酸の保護基としては緩やかなアルカリ条件で脱離できる β -シアノエチル基¹⁷⁾が一般に用いられているが 3'-水酸基の保護基であるアセチル基との間に選択性がないのが欠点であるとされている。ホスホロアミデートはイソアミルナイトライトにより中性条件下で P-N 結合が開裂できることが大塚ら¹⁸⁾により報告されてより保護基として注目されるようになった。 $\text{Ph}_3\text{P}-(\text{PyS})_2$ を用いればヌクレオシド 5'-ホスフェートとアミンとの反応は短時間で完了し DCC を用いた場合のような副反応も伴わず定量的に目的物 (IV) を得ることができる¹⁹⁾。

一方、リン酸に対して過剰のアミンを縮合剤を用い反応させるとさらに反応が進行してジアミデート体 (V)

が生成する。このジアミデート体 (V) はモノアミデート体 (IV) に比べて中性、アルカリ性条件下で安定でありリン酸の OH 基を 2 個ともアミノ基で保護するために有機溶媒に対する溶解性も増大しヌクレオチドの保護基としては有利であり新しい形の保護基として今後利用できるものと考えられる。

4. Coenzyme A の合成²⁰⁾ 脂質糖質代謝に必須の化合物である Co A は図 6 に示すように分子内に

図 6 Coenzyme A

ヌクレオチドと β -アミノ酸を含む化合物であり上述してきたペプチド、ヌクレオチド合成の応用例として興味ある化合物である。そこで酸化還元系による脱水縮合反応を用いて図 7 に示すようにパントテン酸、アデノ

図 7 Co A の合成

アデノシン 2',3'-サイクリックホスフェート 5'-ホスホモルホリデートの合成

シン 2'-(3'-) ホスフェートを出発原料としてその全合成を試みた結果収率よく CoA を合成できることがわかった。たとえばパンテチンの合成はパントテン酸とシスタミンとを $\text{Ph}_3\text{P}-(\text{PyS})_2$ の共存下反応させることにより 80% の収率で得ることができた。(従来の DCC 法では 39%)。ここで合成した CoA は phosphotransacylase 法により純度 98% を示した。

おわりに

以上述べてきたように $\text{Ph}_3\text{P}-(\text{PyS})_2$ を用いる脱水縮合反応は従来、ペプチドあるいはホスホリル化反応に用いられている縮合剤と比べ多くの利点をもっていることが実証されてきている。反応の収率、選択性および生成物の分離、精製の 2 つの難かしい問題を含むペプチド、ヌクレオチドの合成反応にここに述べた縮合剤は多くの有用性を示すのでさらに近い将来、より複雑な構造をもつこれらの化合物の合成に応用されるものと期待される。

(昭和 48 年 8 月 22 日受理)

文 献

- 1) R.G. Pearson, *J. Amer. Chem. Soc.* **91** 1554 (1969)
- 2) T. Mukaiyama, R. Matsueda, M. Suzuki, *Tetrahedron Lett.* **1970** 1901
- 3) 向山光昭, 有合化 **29** 848 (1971)

- 4) R. Matsueda, H. Maruyama, M. Ueki, T. Mukaiyama, *Bull. Chem. Soc. Japan* **44** 1373 (1971)
- 5) D.T. Gish, P.G. Katsoyannis, G.P. Hess, R.J. Stedman, *J. Amer. Chem. Soc.* **78** 5954 (1956)
- 6) M.W. Williams, G.T. Young, *J. Chem. Soc.* **1964** 3701
- 7) M.W. Williams, G.T. Young, *ibid.* **1963** 881
- 8) T. Mukaiyama, K. Goto, R. Matsueda, M. Ueki, *Tetrahedron Lett.* **1970** 5293
- 9) R. Matsueda, H. Maruyama, E. Kitazawa, H. Takahagi, T. Mukaiyama, *Bull. Chem. Soc. Japan* **46** 3240 (1973)
- 10) R. Matsueda, E. Kitazawa, H. Maruyama, H. Takahagi, T. Mukaiyama, *Chemistry Lett.* **1972** 379
- 11) P.T. Gilham, H.G. Khorana, *J. Amer. Chem. Soc.* **80** 6212 (1958) 以後のポリヌクレオチドの文献
- 12) R. Lohrmann, H.G. Khorana, *ibid.* **88** 829 (1966)
- 13) T.M. Jacob, H.G. Khorana, *ibid.* **86** 1630 (1964)
- 14) T. Mukaiyama, M. Hashimoto, *ibid.* **94** 8528 (1972)
- 15) 橋本光紀, 向山光昭, 有合化 **31** 624 (1973)
- 16) M. Hashimoto, T. Mukaiyama, *Chemistry Lett.* **1973** 513
- 17) G.M. Ternier, *J. Amer. Chem. Soc.* **83** 159 (1961)
- 18) E. Ohtsuka, K. Murao, M. Ubasawa, M. Ikehara, *ibid.* **92** 3441 (1970)
- 19) T. Mukaiyama, M. Hashimoto, *Bull. Chem. Soc. Japan* **44** 2284 (1971)
- 20) M. Hashimoto, T. Mukaiyama, *Chemistry Lett.* **1972** 595