“Safety-catch”型保護基の特性を活用した硫酸化チロシン含有ペプチドの新規合成法の開発

北川 幸己*・二木 史朗**・矢上 健***

A Novel Approach for the Synthesis of Tyrosine-Sulfate-Containing Peptides Using a “Safety-Catch”-Type Protecting Group as a Key Feature

Kouki KITAGAWA*, Shiroh FUTAKI** and Takeshi YAGAMI***

Dimethylformamide-sulfur trioxide (DMF-SO₃) complex was found to be more suitable for tyrosine sulfation than pyridine-sulfur trioxide (pyridine-SO₃) complex, the most commonly used sulfur trioxide complex for sulfation. In addition, a new method for the effective reduction of methionine sulfoxide [Met(O)] in protected peptides was established using DMF-SO₃ complex in the presence of nucleophile such as thiol or iodide ion. Based on these findings concerning DMF-SO₃ complex, a unique synthetic method for tyrosine-sulfate [Tyr(SO₃H)] containing peptide was developed. In this methodology, the *p*-(methylsulfinyl) benzyl : (Msib) group, a safety-catch type protecting group, was used as a key protecting group for the alcoholic hydroxyl function of Ser/Thr in order to achieve the selective sulfation on Tyr. An effective acidic deprotection system to minimize the decomposition of sulfate ester on Tyr(SO₃H) residue was also developed. Several biologically active Tyr(SO₃H)-containing peptides were prepared by this new method.

Key words : Chemical synthesis; Tyrosine-sulfate-containing peptide; Sulfation reagent; Reduction of sulfoxide; DMF-SO₃ complex / thiol system; DMF-SO₃ complex / iodide ion system; Safety-catch type protecting group; Acid-lability of Tyr(SO₃H) residue; TFA deprotection; Fmoc-based solid-phase peptide synthesis.

1. はじめに

1954年にフィブリノペプチドB中に硫酸エステル化されたチロシン(Tyr)残基(図1)が存在することが確認されて以来、硫酸化チロシン[Tyr(SO₃H)]を含む多くのタンパク質、ペプチドが単離されてきた。現在ではタンパク質の硫酸化は、リン酸化、グリコシル化などとともに、広くタンパク質中に起こる翻訳後修飾の一種と考え

られている。こうしたタンパク質の硫酸化は、動物細胞由来のタンパク質に関する限り、細胞内のゴルジ体でチロシルプロテインスルホトランスフェラーゼの働きにより行われるTyrに特有な修飾であり、水酸基を含む他のアミノ酸[セリン(Ser)、スレオニン(Thr)、ヒドロキシプロリンなど]には見られない。硫酸化はタンパク質の細胞内輸送や分泌のためのシグナルとして、また、安定性の向上などタンパク質の代謝制御に関与しているこ

* 徳島大学薬学部薬品製造化学 ()

** 徳島大学薬学部医薬資源教育研究センター環境生物工学 ()

*** 国立衛生試験所療品部 ()

* Department of Chemistry and Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, The

University of Tokushima ()

** Department of Medicinal Biotechnology, Institute for Medicinal Resources, The University of Tokushima ()

*** Division of Medical Devices, National Institute of Health Sciences ()

Fig. 1 Tyrosine and modified tyrosines in protein.

とが示唆されているが、詳細は不明である¹⁾。このようなタンパク質中での硫酸化の意義や機能を理解するためには、化学合成により得られる硫酸化ペプチドをツールとして用いた研究の展開が必要である。

一方、硫酸化チロシンを含むペプチドのうち、コレシストキニン(CCK)や、蛙の皮膚由来のセルレインなどでは、硫酸エステルの存在が生理活性の発現にきわめて重要であることが知られている。また、ガストリンにはそれぞれ同等の胃酸分泌刺激作用を示す非硫酸化体と硫酸化体の両者が存在するが、硫酸化体の存在意義は明らかではない。これらのペプチドは古くから知られている消化管ホルモンであるが、天然からは超微量にしか得られず、その詳細な生理作用を検討するうえで合成面からの支援が重要であることはいままでのない。

このように硫酸化チロシンを含むペプチド、タンパク質の簡便な合成法を確立することは、それらの生理活性や生理機能を解明するためにきわめて有用である。しかし、次節で述べるように、硫酸化チロシン含有ペプチドの化学合成は容易なものではなく、現在でも一般的な合成法は確立されていないといっても過言ではない。本稿では、既に報告されている硫酸化チロシン含有ペプチドの合成法を概説するとともに、私たちの開発してきたアプローチに関して紹介をさせていただく。

2. 従来の硫酸化チロシン含有ペプチドの合成法とその問題点

現在までに報告されている硫酸化チロシン含有ペプチドの合成例を整理すると、①ペプチド鎖構築時に硫酸化チロシンを building block に用いて合成を進めるアプローチと、②ペプチド鎖構築後に硫酸化試薬を用いてチロシンを硫酸化するアプローチの2つに大別できる。

①のアプローチをとる場合には、硫酸化チロシンが酸に不安定であることからトリフルオロ酢酸(TFA)で α -アミノ保護基[t-ブチルオキシカルボニル(Boc)など]を除去して合成を進める従来のペプチド合成法が適用できない。また、②のアプローチをとる場合には、分子内に

無保護の Ser, Thr が存在すればそのアルコール性水酸基が硫酸化試薬により優先的に硫酸化されるため、アルコール性水酸基の保護が必要になる。さらに硫酸化試薬は遊離のアミノ基[N末端アミノ基、リシン(Lys)の ϵ -アミノ基]と反応してスルファミン酸を形成する可能性があり、アミノ保護基も必要である。

①のアプローチに沿った例に、Ondetti らが最初の硫酸化チロシン含有ペプチドの合成として報告した CCK-12 の合成がある²⁾(図2)。彼らはデカペプチドの段階で

Fig. 2 Synthesis of CCK-12 by Ondetti *et al.*²⁾.

Tyr を硫酸化し(硫酸化の収率:8%), 以後 TFA で Boc 基を除去して CCK-12 に導いた(デカペプチドからの全収率:4%)。硫酸化以後の Boc 基の除去は2回であるが、酸処理を繰り返すこの方法を長鎖の硫酸化チロシン含有ペプチドの合成に適用できないことは明らかである。また、Wünsch らの CCK-10 の合成³⁾では(図3)、途

Fig. 3 Synthesis of CCK-10 by Wünsch *et al.*³⁾.

中で α -アミノ保護基を塩基で除去できる9-フルオレニルメチルオキシカルボニル(Fmoc)基に切り替えて合成が進められており、t-Bu 基($\times 3$)の最終除去は TFA で行われている。Tyr(SO₃H)のバリウム塩を用いていることやアルギニン(Arg)を無保護で導入するなどの工夫をしているが、長鎖の硫酸化ペプチドをこのアプローチで合成するには保護基の数を最小限に止める必要があり、

一般的な合成法とはなり得ない。

②のアプローチの採用する場合には、Ser, Thr を保護したうえで硫酸化を行い、そのあとで保護基を塩基などで除去する方法がとられる。こうした例として、倉野らのブタ CCK-33 の合成⁴⁾がある。この合成では、まず Ser 水酸基の保護に酸に安定なフェノキシアセチル (PhA) 基を用いて、液相法で保護ペプチドを構築する。フッ化水素 (HF) で PhA 基以外の保護基を除去した後、Tyr の硫酸化を行い、最後に PhA 基を DMSO 中、0.1 M 水酸化ナトリウムで除去して CCK に誘導しているが (保護ペプチドからの収率 5%)、アルカリ処理時に β -脱離反応による Ser(PhA) のデヒドロアラニン化が懸念される。次に藤井らのヒト CCK-33 の合成⁵⁾を図 4 に示す。この合成では通常の前置基を採用した液相法で保護

Fig. 4 Synthesis of human CCK-33 by Fujii *et al.*⁵⁾.

ペプチドを構築し、ハード酸脱保護法⁶⁾にて全保護基を除去する。こうして得られるフリーのペプチドのアミノ基 (N 末端アミノ基および Lys×2) を Fmoc 基で再保護し、次いでアルコール性水酸基 (Ser×4) を *t*-ブチルジフェニルシリル (TBDPS) 基で保護する。Tyr を硫酸化後、最後にフッ素イオン処理で TBDPS 基と Fmoc 基を同時に除去して CCK-33 に導いている (フリーのペプチドからの収率 15%)。トリアルキルシリルクロリドがフェノール性水酸基よりも一級アルコール性水酸基に対して反応性が高いことを利用している点、また、アミノ基の再保護にフッ素イオン処理⁷⁾でも除去できる Fmoc 基を用いている点、など非常に熟慮された合成法であるが、TBDPS 基の導入は決してアルコール性水酸基に選択的でないところにこの方法の問題点があるように思われる。

以上、数例の合成についてそれぞれの抱える問題点を指摘したが、硫酸化チロシンを含むペプチドの化学合成が容易なものでないことを理解いただけたと思う。

3. 硫酸化試薬としてのジメチルホルムアミド-三酸化イオウ (DMF-SO₃) 錯体

天然には硫酸化チロシンを含むペプチド、タンパク質以外にも、ヘパリンなど硫酸エステルを含む生理活性多糖類が存在する。こうした硫酸エステルを含む分子を化学合成する場合、硫酸化試薬として濃硫酸⁸⁾、ピリジニウムアセチルスルフェート (PAS)⁹⁾ 1、ピリジン-三酸化イオウ錯体¹⁰⁾ 2 のような安定な三酸化イオウ錯体などが用いられてきた。硫酸化ペプチドの合成に限って言えば、濃硫酸は Tyr(SO₃H) とともに 3'-スルホニルチロシンを副生成物として与え、好ましい試薬ではない。1 は Penke らによって開発された硫酸化試薬であり、倉野らのブタ CCK-33 の合成⁴⁾では TFA 中で用いられた^{*1}。一方、酸に不安定なトリプトファン (Trp) などの残基が反応基質中に存在する場合には硫酸化を中性付近で行うのが望ましい。藤井らのヒト CCK-33 の合成⁵⁾では、中性から弱塩基性の条件下で 2 を用いて硫酸化が行われている。1 は酸性以外に中性でも硫酸化に使用できるが、この場合 2 の方が硫酸化の速度は速い。なお、Borin らはピリジニウムトリフルオロアセチルスルフェート (PTS)¹²⁾ 3 を 1 よりも有効な硫酸化試薬として紹介している。

筆者らは、ピリジン-SO₃ 錯体 2 を用いて何度かペプチドの硫酸化を行ったが、生成物が若干着色することや硫酸化後の精製に多少の困難が生じることを経験した。そこで市販されている他の SO₃ 錯体のうち、特に DMF-SO₃ 錯体¹³⁾ 4 の硫酸化能に着目した。DMF がピリジンに比べて弱い塩基であることから、4 の S 原子の δ^+ 性が 2 のものに比べて大きいと考え、反応性に優れていることを期待したのである。Boc-Tyr-OH の硫酸化を 5 当量の 2 あるいは 4 を用いて行ったところ、予想どおり、4 を用いた場合に約 25% 硫酸化が速く進行することを認めた (図 5)¹⁴⁾。

次に DMF-SO₃ 錯体 4 の有用性を示すため、ロイシン・エンケファリン硫酸化体の合成を行った¹⁴⁾。液相法により Z-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-OBzl を合成し、DMF-

*1 TFA などの酸性条件では 1 はアミノ基と反応しないが、一方、2 は酸性および中性でアミノ基と反応してスルファミン酸を形成することが知られている^{4a, 11)}。

Fig. 5 Sulfation of Boc-Tyr-OH by DMF-SO₃ 4 or pyridine-SO₃ 2 complex.

ピリジン(4:1)中、4(20 eq)を用いて硫酸化を行った後(20°C, 2時間), 接触還元で保護基を除去して硫酸化体に導いた(HPLC 精製後の収率は硫酸化から66%)。比較のために、同量の2を用いて硫酸化を行ったが、反応の完結に4時間を要し、単離収率も55%にとどまった。4を用いた硫酸化では、2を用いた場合のような生成物の着色は見られず、また、4は水で容易にDMFと硫酸に分解するために反応後の処理も容易であった。

4. ジメチルホルムアミド-三酸化イオウ錯体/求核試薬の反応系によるスルホキシドのスルフィドへの還元

筆者らは、前節で述べたDMF-SO₃錯体4を用いたペプチドの硫酸化を想定して個々のアミノ酸レベルでの副反応の有無を検討した際、硫酸化の反応条件にエタンジチオール(EDT)を加えた系がメチオニンスルホキシド[Met(O)]をメチオニン[Met]に還元することに気づいた。

4.1. ペプチド合成におけるメチオニン・チオエーテル基の保護

Metのチオエーテル基は無保護でペプチド合成に用いることができるが、合成途中での空気酸化などにより部分的にスルホキシドに酸化をうける。また、 α -アミノ保護基の除去に際し、生じるアルキルカチオンにより、S-アルキルスルホニウム体が生成することがある。こうした理由から、工程の長くなる液相法ではMetを最初からMet(O)として用いることが多い。この場合、合成の最終段階でMet(O)をMetに還元する必要があるが、脱保護後にチオール類とインキュベーションする方

法が一般に行われる(例えば37°Cで12~18時間)。また、簡便なMet(O)の還元法として、脱保護前の保護ペプチドをDMF中でトリメチルフェニルチオシランで処理する方法¹⁵⁾や、HF-ジメチルスルフィド(25~40% HF)¹⁶⁾、1Mトリメチルシリルプロミド-チオアニソール/TFA¹⁷⁾、テトラクロロシラン-アニソール/TFA¹⁸⁾などの還元能を持つ脱保護試薬を用いて保護基の除去と同時に還元を行う方法が知られている。

4.2. ジメチルホルムアミド-三酸化イオウ錯体/エタンジチオール系によるスルホキシドの還元

スルホキシドのスルフィドへの還元は合成化学で重要な反応の1つであり、古くから多くの方法が知られている¹⁹⁾。しかし、報告されているほとんどの方法が、主として反応溶媒の制約からペプチドへの使用に適さない。一方、筆者らの見いだした反応は、保護ペプチドに高い溶解性を示すDMF中で行え、保護ペプチドレベルでのMet(O)の還元にも有効であると考えた。そこで、Z(OMe)-Phe-Met(O)-OMeを反応基質に用いて、種々のSO₃錯体と求核試薬との組み合わせを検討した²⁰⁾。

Fig. 6 Reduction of Met(O) in the protected peptide. (a) Effect of SO₃ complex, and (b) effect of thiol.

1) SO₃ 錯体：反応基質を DMF-ピリジン(4:1)に溶かし、EDT(5 eq)存在下、2.5 eq の SO₃ 錯体(ピリジン-SO₃ 2, DMF-SO₃ 4, トリエチルアミン-SO₃)を用いて 20°C で反応を行った(図 6a)。SO₃ 錯体の反応性は錯体中に使用されている塩基の強度と逆の傾向が見られ、4 が最も高い反応性を示した。なお、SO₃ 錯体が存在しない場合、還元は進行しなかった。

2) チオール：反応基質を DMF-ピリジン(4:1)に溶かし、4(5 eq)の存在下、5 eq のチオール(Ph-SH, EDT, Et-SH)あるいはジメチルスルフィド(DMS)を用いて 20°C で反応を行った(図 6b)。なお、EDT は 2 個のメルカプト基を持つため、他のチオール類の 1/2 の当量数で比較した。DMS の反応性は低く、また、チオール類が存在しない場合は、還元はほとんど進行しなかった。Ph-SH と EDT は同等の効果を示したが、Ph-SH が強い悪臭を有することから以下の実験では EDT を使用した。

3) 添加塩基：反応基質を DMF に溶かし、4 と EDT

(各 5 eq)の存在下に、種々の塩基(10 eq)を添加して 20°C で反応を行った。検討した塩基のうちピリジンが最も有効であったが、その理由として、ピリジンはその塩基性ととも、一連の求核反応に好ましい溶媒効果を与えるのではないかと考えている。また、塩基が存在しない場合、反応系は強い酸性を示し、還元はほとんど進行しない。

4) その他の要因：この還元反応は、氷冷から室温の温度域で効果的に行える。また、ピリジンのみ、あるいはピリジンと DMF、N-メチル-2-ピロリドンを混合溶媒として用いたときに最もスムーズに還元が進行する。アセトニトリル、テトラヒドロフランなどもピリジンとの混合溶媒として使用できるが、SO₃ 錯体と直接反応するアルコール類および DMSO は用いることができない。

以上の結果から、Met(O)を含む保護ペプチドの還元は、DMF-ピリジン中、DMF-SO₃ 錯体 4 と EDT を組み合わせた反応系で室温下に行うのが最適であると判断し

Table 1 Reduction of sulfoxide to sulfide.

$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{---S---} \end{array} \xrightarrow[\text{In DMF - pyridine}]{1 \sim 4 / \text{nucleophile}} \text{---S---}$				
Entry	Sulfoxide-containing Substrate	Product	Conditions	Yield ¹⁾
1	Z(OMe)-Phe-Met(O)-OMe	Z(OMe)-Phe-Met-OMe	4 (5 eq) / EDT (5 eq) 20°C, 30 min	84 %
2			4 (5 eq) / TBAI (5 eq) 20°C, 30 min	72 %
3			1 (10 eq) / EDT (10 eq) 20°C, 30 min	90 %
4	Boc-Tyr(Msib)-OH	Boc-Tyr(Mtb)-OH	4 (10 eq) / EDT (10 eq) 20°C, 30 min	73 %
5	Boc-Tyr(Cl ₂ Bzl)-Gly-Gly-Phe-Met(O)-OBzl	Boc-Tyr(Cl ₂ Bzl)-Gly-Gly-Phe-Met-OBzl	4 (10 eq) / EDT (10 eq) 20°C, 1 h	92 %
6	Boc-Tyr(Cl ₂ Bzl)-D-Met(O)-Phe-His-Leu-Met(O)-Asp(OBzl)-NH ₂	Boc-Tyr(Cl ₂ Bzl)-D-Met-Phe-His-Leu-Met-Asp(OBzl)-NH ₂	4 (20 eq) / EDT (20 eq) 20°C, 2 h	82 %
7	Boc-Tyr(Msib)-Gly-Gly-Phe-Met(O)-OMsib	Boc-Tyr(Mtb)-Gly-Gly-Phe-Met-OMtb	4 (100 eq) / EDT (100 eq) 20°C, 2 h	88 %
8	Protected Leucosulfakinin (oxidized form) ²⁾	Protected Leucosulfakinin (reduced form) ²⁾	4 (20 eq) / EDT (20 eq) 25°C, 2 h	94 %
9			4 (20 eq) / TBAI (20 eq) 25°C, 1 h	94 %
10	Protected Leucosulfakinin-II (oxidized form) ³⁾	Protected Leucosulfakinin-II (reduced form) ³⁾	4 (20 eq) / TBAI (20 eq) 30°C, 30 min	90 %
11	Z(OMe)-Met(O)-OMsib	Z(OMe)-Met-OMtb	1 (10 eq) / EDT (10 eq) 30°C, 1 h	65 %
12	Msz-Phe-OH	Mtz-Phe-OH	3 (10 eq) / EDT (10 eq) 25°C, 1 h	74 %
13	Boc-Leu-Met(O)-NH ₂	Boc-Leu-Met-NH ₂	3 (10 eq) / EDT (10 eq) 25°C, 1 h	69 %

1) Isolation yield.

2) Protected Leucosulfakinin : Oxidized form, Z(OMe)-Glu(OBzl)-Gln-Phe-Glu(OBzl)-Asp(OChp)-Tyr(Cl₂Bzl)-Gly-His-Met(O)-Arg(Mts)-Phe-NH₂ ; Reduced form, Z(OMe)-Glu(OBzl)-Gln-Phe-Glu(OBzl)-Asp(OChp)-Tyr(Cl₂Bzl)-Gly-His-Met-Arg(Mts)-Phe-NH₂

3) Protected Leucosulfakinin-II : Oxidized form, pGlu-Ser(Bzl)-Asp(OChp)-Asp(OChp)-Tyr(Cl₂Bzl)-Gly-His-Met(O)-Arg(Mts)-Phe-NH₂ ; Reduced form, pGlu-Ser(Bzl)-Asp(OChp)-Asp(OChp)-Tyr(Cl₂Bzl)-Gly-His-Met-Arg(Mts)-Phe-NH₂

た。本反応系および後述する類似の反応系による種々のスルホキシドを含む反応基質の還元を表1にまとめた。

次に本還元系を実際のペプチド合成に適用して、その実用性を確認した。メチオニン・エンケファリンの合成²⁰⁾では、Met(O)を含む保護ペプチドを液相法で合成した後、4/EDTで処理し(表1 entry 5)、還元体とした(92%)。続いて1Mトリフルオロメタンスルホン酸(TFMSA)-チオアニソール/TFAで保護基の除去を行い、イオン交換クロマトグラフィーで精製後、最終標品に導いた(49%)。さらにMet(O)を2残基含む(2位のMetはD体)デルトルフィン²¹⁾の合成では(表1 entry 6)、メチオニン・エンケファリンの合成と同様の処理を行って、保護還元体から25%の収率で精製品を得た。

4.3. ジメチルホルムアミド-三酸化イオウ錯体/I⁻系によるスルホキシドの還元

DMF-SO₃ 錯体 4/EDT 系によるスルホキシドの還元は、求電子試薬である SO₃ とスルホキシドにより形成されたスルホニウム中間体の S⁺ 原子を EDT の S 原子が求核的に攻撃することにより進行すると推定される(図7a)。したがって、チオール類の代わりに他のソフ

Fig. 7 Plausible mechanism of Met(O) reduction by (a) DMF-SO₃ complex 4/thiol system and (b) 4/I⁻ system.

トな求核試薬を用いても反応が行えると予想できる。そこで、ペプチド合成での実用性という観点から I⁻ に焦点を絞り、DMFに高い溶解性を示すヨウ化テトラブチルアンモニウム(TBAI)を用いて以下の実験を行った。Z(OMe)-Phe-Met(O)-OMeをDMF-ピリジン中、4(5eq)の存在下、TBAI(2.5eq)を用いて20°Cで反応を行ったところ、EDT(1.25eq)を用いた場合と同等に還元反応が行えることがわかった²¹⁾。この還元反応も4/EDT系と同様の反応機構で進行すると推定される(図7b)。

本還元系をゴキブリ(*Leucophaea Maderae*)頭部の抽出物から単離された硫酸化チロシン含有ペプチド：ロイコスルファキニン[H-Glu-Gln-Phe-Glu-Asp-Tyr(SO₃H)-Gly-His-Met-Arg-Phe-NH₂]の非硫酸化体の合成²¹⁾に応

Fig. 8 HPLC of Leucosulfakinin non-sulfate. (a) Gel-filtered sample after Met(O) reduction with 4/I⁻ system followed by TFMSA. (b) Gel-filtered sample after deprotection with TFMSA followed by Met(O) reduction with thiol. Arrow shows Met(O)-peptide.

用した。Met(O)を含む保護ペプチドを液相法で合成後、4/TBAIで処理して還元体とし(94%、表1 entry 9)、次いで1M TFMSA-チオアニソール/TFAで保護基を除去して粗ロイコスルファキニン非硫酸化体に導いた(図8a)。ここで、脱保護後にチオールとインキュベーションする方法との比較を行った。保護酸化体を1M TFMSA-チオアニソール/TFAで処理後、2-メルカプトエタノールを加えてインキュベーションしたが(37°C, 20時間)、かなりのMet(O)体が残存した(図8b)。このように4/EDTあるいはI⁻を用いる反応系は、反応時間を短縮できるだけでなく、還元を完結できる点でも優れた方法である。

以上述べてきたように、適切な求核試薬が存在すれば、三酸化イオウ錯体を用いて保護ペプチド中のMet(O)を効率よくMetに還元することができる。また、スルホキシドを含む保護基の還元も行えることから(表1 entry 4,7)、本法は一般的なスルホキシドのスルフィドへの還元にも適用できる。なお、PAS1は酢酸と硫酸とで形成される混合酸無水物をピリジン塩として安定化させたものであるが、酸性および中性条件で水酸基と反応して硫酸エステルを形成するほか、中性条件でアミノ基をアセチル化するなど求電子試薬としての働きを有し¹¹⁾、還元反応への応用が期待できる。実際、ソフトな求核試薬の存在下に1や3のような硫酸化試薬を用いても、スルホキシドの還元を行える(表1 entry 3および11~13)。

4.4. “Safety-catch”型保護基：Msib/Msz基のMtb/Mtz基への変換

p-メチルスルフィニルベンジル(Msib)基5はSamanenらによりカルボキシル保護基としてペプチド化学に紹介されたものであり、酸化型のMsib基はTFA

に安定である一方、還元型の *p*-メチルチオベンジル (Mtb) 基 7 は TFA でスムーズに除去できる²²⁾。また、この保護基に基づいて木曾らによって開発されたウレタン型アミノ保護基：*p*-メチルスルフィニルベンジロキシカルボニル (Msiz) 基 6 および *p*-メチルチオベンジロキシカルボニル (Mtz) 基 8 も Msib/Mtb 基と同様の性質を持つ²³⁾。分子中にスルホキドを含む Msib/Msz 基は、DMF-SO₃ 錯体 4/EDT によりそれぞれ対応するスルフィド、すなわち Mtb/Mtz 基に還元できる (図 9)。

Fig. 9 Transformation of the Msib/Msz protecting groups to the Mtb/Mtz protecting groups.

そこで、C 末端カルボキシル基および Tyr 水酸基の保護に Msib 基を採用した保護メチオニン・エンケファリンを合成し、これを 4/EDT で処理したところ (表 1 entry 7)、対応する還元体を 88% の収率で得た²⁰⁾。次いで TFA で Mtb 基 (×2) を除去し、57% で最終標品に誘導した。

Msib 基や Msz 基は、通常のペプチド鎖延長時に用いる TFA 程度の酸には安定な保護基であるが、還元体に変換されると酸で除去ができるようになるいわば “protected protecting group” の一種である。既に 1963 年に Rudinger によって “safety-catch protection” の記述があるが²⁴⁾、Msib/Msz 保護基の紹介とともに再びこの “safety-catch” という用語が使われ始めた。最近、このような特性を持つ保護基に関して、Rudinger と同じチェコ出身の Patek により総説が書かれている²⁵⁾。Msib/Msz 保護基を DMF-SO₃ 錯体 4/EDT 系で確実にかつ簡便に Mtb/Mtz 保護基に変換できることが、6 節で述べる硫酸化チロシン含有ペプチドの新規合成法を開発する鍵反応となった。

5. 硫酸化チロシンの分解を最小限に抑制する 酸脱保護系の検討

TFA で α -Boc 基を除去しつつペプチド鎖を延長する Boc 型固相合成法では、酸に不安定な Tyr(SO₃H) を building block として用いることはできない。しかし、

近年、塩基で除去できる Fmoc 基を α -アミノ保護基に用いる Fmoc 型固相合成法が、簡便なペプチド鎖構築法として広く使われてきた。この方法は、合成の最後で全保護基の脱保護 (deprotection) と樹脂からのペプチドの遊離 (cleavage) とを TFA 程度の強さの酸で行う点に特徴がある。一方、Tyr(SO₃H) のバリウム塩³⁾ やナトリウム塩²⁶⁾ は TFA 中で比較的安定なことが指摘されている。従来、TFA で C 末端アミド型ペプチドを与えるペプチド-固相担体間のリンカーがなかったため、Fmoc 型固相法を CCK のような硫酸化チロシン含有ペプチドの合成に適用することができなかったが、この問題も最近になって解決されつつある。Penke らは自ら開発した TFA に鋭敏なアミド型リンカーを用いて、Tyr(SO₃Na) を直接導入するアプローチでヒト CCK-33 を固相合成したことを報告している²⁶⁾。しかし、彼らの合成では、最終脱保護を硫酸エステルの分解に注意を払った条件で行ったのではないように思われた。そこで筆者らは、Fmoc 型固相法での deprotection/cleavage に使用される

Fig. 10 Stability of Tyr(SO₃Na) in the model peptide, Fmoc-Tyr(SO₃Na)-Ala-OMe. (a) Effect of acid at 4°C, and (b) effect of scavenger in TFA (4°C).

種々の酸-スカベンジャー系が Tyr(SO₃Na) の分解にどの程度の影響を与えるのかをモデルペプチドを用いて詳細に検討した²⁷⁾。この実験から以下のことが要約できる。

①硫酸化チロシンは、氷冷下での TFA 中でかなり安定である。一方、TFA より強い酸であるトリフルオロメタンスルホン酸やハード酸であるトリメチルシリルプロミドなどは硫酸化チロシンを含むペプチドの脱保護試薬として不適当である(図 10a)。

②酸脱保護系においてスカベンジャーとして用いられる水、*m*-クレゾール、アニソール、およびペプチド中の Trp・インドール核へのカチオン付加を抑制するのに有効な 2-メチルインドール(2-MI)などの添加は硫酸化チロシンの分解にあまり影響しない。一方、酸と組み合わせて脱保護に使われる DMS, チオアニソール, EDT などの含硫化合物の添加は硫酸化チロシンの分解をきわめて促進する(図 10b)。

③TFA での反応を 4°C で行うのと 18°C で行うのとでは硫酸化チロシンの安定性に決定的な違いがあり、できるだけ低温で脱保護を行うのが望ましい。

以上の結果より、Tyr(SO₃Na)を含むペプチドの最終脱保護には、90%aqueous TFA(4°C)に *m*-クレゾール、2-MI を添加した系が Tyr(SO₃Na)の分解を最小限に抑えるものとして有効であると判断した。そこで、本脱保護系を CCK-12 の Fmoc 型固相合成に適用してみた²⁷⁾(図 11)。固相担体には Arbericio らにより開発された最も酸に鋭敏とされる PAL 樹脂 9^{*2}を使用し、TFA で除去できる保護基で保護されたアミノ酸誘導体 [Asp(O^tBu), Ser(^tBu), Arg(Pmc)^{*3}], および Fmoc-

Tyr(SO₃Na)-OH を用いて固相合成を行った。ペプチド鎖構築後、保護ペプチド樹脂を 90%aq. TFA/*m*-クレゾール/2-MI で処理して deprotection/cleavage を行い(4°C, 15 時間), 粗標品を脱保護時の収率 37% で得た。さらに HPLC にて精製後, C 末端アミノ酸の樹脂への導入からの通算収率 9.3% で CCK-12 に導いた。ここに示したように, 比較的短鎖の硫酸化チロシン含有ペプチドは Fmoc 型固相合成法での直接法により十分合成できる。筆者らの設定した 90%aq. TFA/*m*-クレゾール/2-MI(4°C)という酸脱保護条件下では, 15 時間という長時間処理でも硫酸エステルの分解をかなり抑制でき, 満足できる純度で目的物が得られた。ただ本法では最終酸処理での固相担体からのペプチドの cleavage が完全でなく, 収率の点で改善の余地がある。今後さらに酸に鋭敏なアミド型リンカーの開発が必要である。

6. 硫酸化チロシン含有ペプチドの新規合成法の開発

筆者らは①DMF-SO₃ 錯体の優れた硫酸化能, ②DMF-SO₃ 錯体と求核試薬とを組み合わせた反応系によるスルホキシドの簡便な還元法, さらに③硫酸化チロシンの分解を最小限に抑制できる酸脱保護条件, という 3 つの成果を手にした。そこで改めて“safety-catch”型保護基: Msib/Msz 基に着目し, 上記の成果を組み合わせれば硫酸化チロシン含有ペプチドの新しい合成法を展開できると考えた³⁰⁾(図 12)。以下に各ステップを解説する。

[ステップ 1] Ser/Thr の水酸基を Msib 基で, また Lys の ε-アミノ基と N 末端残基のアミノ基を Msz 基で保護して, Fmoc 型固相合成法でペプチド鎖を構築する。
[ステップ 2] TFA により Msib/Msz 以外の保護基の

*2 PAL=Peptide Amide Linker, 5-(4'-Fmoc-aminomethyl-3',5'-dimethoxyphenyl)valeric acid²⁸⁾

*3 Pmc=2,2,5,7,8-pentamethylchroman-6-sulfonyl²⁹⁾

Fig. 11 Synthesis of CCK-12 by the Fmoc-based solid-phase approach.
Inset: HPLC profile of the crude CCK-12 after gel-filtration.
(Asterisk shows CCK-12 non-sulfate).

Fig. 12 Synthetic outline of a new approach to the Tyr(SO₃H)-containing peptides.

deprotection と、固相担体からのペプチドの cleavage を行う。

[ステップ3] DMF-SO₃ 錯体 4 により Tyr 水酸基への硫酸化を行う。同時に、この反応系に EDT を添加することにより Msib/Msz 基を Mtb/Mtz 基に変換する。

[ステップ4] 90% aq. TFA をベースとした脱保護系で Mtb/Mtz 基の除去を行い、目的の硫酸化ペプチドに導く。

この合成法ではステップ4での酸処理時に若干の硫酸エステル損失が免れないものの、比較的簡便に硫酸化チロシン含有ペプチドを得ることが期待できる。そこで CCK-12 の合成に本スキームを適用してみた³⁰⁾(図 13)。

まず、Fmoc 型固相合成法により保護ペプチド樹脂を構築した。樹脂には前述の PAL-樹脂と同様に酸に鋭敏な Rink 樹脂 10^{*4}を用い、Ser は Ser(Msib)誘導体で、また N 末端のイソロイシン(Ile)は Msz-Ile でペプチド鎖に導入した。N 末端残基を Msz-アミノ酸で導入することで、硫酸化時のスルファミン酸形成を防げるとともに、最終酸処理で one step に保護基の除去が行える。こうして構築した保護ペプチド樹脂を TFA/EDT/*m*-クレゾールで deprotection/cleavage を行ったが、この酸条件は還元能を持たず、Msib/Msz 基が除去されることはない。次に Msib/Msz 基で保護されたペプチドを DMF-pyridine 中、4 と EDT(各 100 eq)を加えて反応し(20°C, 12時間)、Tyr の硫酸化と Msib/Msz 基の Mtb/Mtz 基への還元を同時に行った。過剰の試薬を Sephadex LH-20 で除いた後、得られる Mtb/Mtz 保護硫酸化ペプチドを 90% aq. TFA/*m*-クレゾール/2-MI で処理し(4°C, 1時間)、Mtb/Mtz 基を除去した。ゲル濾過および HPLC で精製後、収率 7% (Phe の樹脂への導入からの通算収率)で CCK-12 に導いた。同様の戦略でロイコスルファキニン-II [pGlu-Ser-Asp-Asp-Tyr(SO₃H)-Gly-His-Met-Arg-Phe-NH₂]の合成を行い^{*5}、最初の Phe の導入から収率 6% で精製品を得た^{30b)}。以上のようにして、Ser の水酸基を Msib 基で保護し、ペプチド鎖構築後に Tyr へ選択的に硫酸化を行うという合成戦略を確立することができた。

*4 4-(2',4'-dimethoxyphenyl)-Fmoc-aminomethyl)phenoxy resin³¹⁾

*5 このペプチドでは N 末端が pGlu (pyroglutamic acid) でブロックされており、N 末端アミノ保護基を必要としない。

Fig. 13 Synthetic scheme of CCK-12 by the Msib/Msz approach. Inset: HPLC profile of the crude CCK-12 after gel-filtration, (Asterisk shows CCK-12 non-sulfate).

Fig. 14 Synthetic scheme of two mono-sulfated cionin derivatives by the Msib/Msz approach.

さらに本合成法をホヤ由来の CCK/ガストリン様ペプチド：シオニン[Asn-Tyr(SO₃H)-Tyr(SO₃H)-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH₂]のモノ硫酸化誘導体の合成に適用した³²⁾(図 14)。この合成では Tyr(Msib)を活用して、複数の Tyr の存在下に特定の Tyr 残基への硫酸化を達成している。この誘導体合成から 2 位の硫酸化チロシン残基がシオニンの生理活性に重要であることを明らかにした。

このように、筆者らが展開してきた硫酸化チロシンを含むペプチドの新しい合成法では、“safety-catch”型保護基である Msib/Msz 基の化学的な特性がフルに活用されている。また、筆者らの合成研究とは別個に、木曾らは Msib/Msz 保護基を活用して、より効率的なペプチド合成を目指した合成戦略を展開している³³⁾。

7. おわりに

1960 年代から知られているガストリンや CCK は古い歴史をもつ生理活性ペプチドであり、その化学合成に関しても、当初からペプチドケミストの大きな関心事であった。しかし、我々は長鎖の硫酸化チロシン含有ペプチドの全合成に対応できる化学合成法をまだ手にしていないのが現状である。比較的短鎖の硫酸化ペプチドの化学合成は Fmoc 型固相法で十分対応できるが、それでもその大量合成となると依然課題が残されており、保護基やリンカーの問題を含めて、まだまだ地道な検討が必要である。また、硫酸化に関与する酵素を用いた生化学的な合成アプローチ³⁴⁾や、化学的なペプチド鎖構築法とプロテアーゼによるフラグメント縮合法とを組み合わせたアプローチなども、今後硫酸化ペプチドの合成に利用さ

れよう。

本稿では筆者らの行ってきた硫酸化チロシン含有ペプチドの合成法に関して、研究の経緯を紹介させていただいた。収率に不満が残るものの、偶然に見いだした 1 つの反応から出発してここまで展開できたことに一応の満足感を覚えている。本法をビッグ・ガストリン(34 残基)や CCK-33(33 残基)などの大分子型硫酸化ペプチドの合成に適用し得るかどうか、筆者らの今後の課題である。また、化学合成した硫酸化ペプチドを用いて、硫酸化の意義や生理機能の解明といった生化学的な研究への展開も今後に期待したい。

最後に、本研究に参加していただいた小川豊子、大家孝志、志和 聡の各修士、および秋田 正徳島大学名誉教授に深く感謝いたします。

(平成 6 年 4 月 12 日受理)

文 献

- 1) チロシンの硫酸化に関する総説：W.B. Huttner, *Methods in Enzymology*, 107, 200 (1984); *idem*, *Ann. Rev. Physiology*, 50, 363 (1988); W.B. Huttner, P.A. Baeuerle, “*Modern Cell Biology Vol. 6*”, ed. by B. Satir, Alan R. Liss Inc., New York, 1988, p.97
- 2) M.A. Ondetti, J. Pluščes, E.F. Sabo, J.T. Sheehan, N. Williams, *J. Am. Chem. Soc.*, 92, 195 (1970)
- 3) E. Wünsch, L. Moroder, L. Wikschowitz, W. Göhrich, R. Scharf, J.D. Gardner, *Z. Physiol. Chem.*, 362, 143 (1981)
- 4a) Y. Kurano, T. Kimura, S. Sakakibara, “*Peptide Chemistry 1986*”, ed. by T. Miyazawa, Protein Research Foundation, Osaka, 1987, p.151
- b) *idem*, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1987, 323
- 5) N. Fujii, S. Futaki, S. Funakoshi, K. Akaji, H. Morimoto, R. Doi, K. Inoue, M. Kogire, S. Sumi, M. Yun, T. Tobe, M. Aono, M. Matsuda, H. Narusawa, M. Moriga, H. Yajima, *Chem. Pharm. Bull.*, 36, 3281 (1988)
- 6) H. Yajima, N. Fujii, S. Funakoshi, T. Watanabe, E. Maruyama, A. Otaka, *Tetrahedron*, 44, 805 (1988)
- 7) M. Ueki, M. Amemiya, *Tetrahedron Lett.*, 28, 6617 (1987)
- 8) H.C. Reita, R.E. Ferrel, H. Frankel-Conrat, H.S. Olcott, *J. Am. Chem. Soc.*, 68, 1024 (1946)
- 9) B. Penke, F. Hajnal, J. Lonovics, G. Holzinger, T. Kadar, G. Tegedy, J. Rivier, *J. Med. Chem.*, 27, 845 (1984)
- 10) H.H. Sisler, L.A. Audrieth, *Inorg. Synth.*, 2, 173 (1946)

- 11) B. Penke, M. Zarándi, K. Kovács, J. Rivier, "Peptides 1984, Proc. 18th Eur. Peptide Symposium", ed. by U. Ragnarsson, Almqvist and Wiksell Int., Stockholm, 1985, p.279
- 12) G. Borin, A. Calderan, P. Ruzza, L. Moroder, G. Knaup, W. Göhring, E. Wünsch, "Peptide Chemistry 1987", ed. by T. Shiba, S. Sakakibara, Protein Research Foundation, Osaka, 1988, p.179
- 13) K.K. Kelly, J.S. Matthews, *J. Org. Chem.*, **36**, 2159 (1971)
- 14) S. Futaki, T. Taike, T. Yagami, T. Ogawa, T. Akita, K. Kitagawa, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1990**, 1739
- 15) N. Fujii, S. Kuno, A. Otaka, S. Funakoshi, K. Takagi, H. Yajima, *Chem. Pharm. Bull.*, **33**, 4587 (1985)
- 16) J.P. Tam, W.F. Heath, R.B. Merrifield, *Tetrahedron Lett.*, **23**, 2939 (1982)
- 17) N. Fujii, A. Otaka, N. Sugiyama, M. Hatano, H. Yajima, *Chem. Pharm. Bull.*, **35**, 3880 (1987)
- 18) Y. Kiso, M. Yoshida, M. Fujisaki, T. Mimoto, T. Kimura, M. Shimokura, "Peptide Chemistry 1986", ed. by T. Miyazawa, Protein Research Foundation, Osaka, 1987, p.205
- 19) スルホキシドの還元に関する総説として: M. Madesclaire, *Tetrahedron*, **44**, 6537 (1988); 大饗茂, 有機硫黄化学(反応機構編), 化学同人, 京都, 1982, p.379
- 20) S. Futaki, T. Taike, T. Yagami, T. Akita, K. Kitagawa, *Tetrahedron Lett.*, **30**, 4411 (1989); *idem*, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1990**, 653
- 21) S. Futaki, T. Yagami, T. Taike, T. Ogawa, T. Akita, K. Kitagawa, *Chem. Pharm. Bull.*, **38**, 1165 (1990)
- 22) J.M. Samanen, E. Brandeis, *J. Org. Chem.*, **53**, 561 (1988)
- 23) Y. Kiso, T. Kimura, M. Yoshida, M. Shimokura, K. Akaji, T. Mimoto, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1989**, 1511
- 24) J. Rudinger, *Pure Appl. Chem.*, **7**, 335 (1963)
- 25) M. Patek, *Int. J. Peptide Protein Res.*, **42**, 97 (1993)
- 26) B. Penke, L. Ngyerges, *Peptide Res.*, **4**, 289 (1991)
- 27) T. Yagami, S. Shiwa, S. Futaki, K. Kitagawa, *Chem. Pharm. Bull.*, **41**, 376 (1993)
- 28) F. Albericio, N. Kneib-Cordonier, S. Biancalana, L. Gera, R.I. Masada, D. Hudson, G. Barany, *J. Org. Chem.*, **55**, 3730 (1990)
- 29) R. Ramage, J. Green, A.J. Blake, *Tetrahedron*, **47**, 6353 (1991)
- 30a) S. Futaki, T. Taike, T. Akita, K. Kitagawa, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1990**, 523
b) *idem*, *Tetrahedron*, **48**, 8899 (1992)
- 31) H. Rink, *Tetrahedron Lett.*, **28**, 3787 (1987)
- 32) K. Kitagawa, S. Futaki, T. Yagami, S. Sumi, K. Inoue, *Int. J. Peptide Protein Res.*, **43**, 190 (1994)
- 33) 木曾良明, 木村 徹, 藤原洋一, 赤路健一, 第16回反応と合成の進歩シンポジウム要旨集, p.105 (1990); Y. Kiso, H. Itoh, S. Tanaka, T. Kimura, K. Akaji, *Tetrahedron Lett.*, **34**, 7599 (1993)
- 34) R. Muramatsu, A. Sukesada, Y. Inoue, H. Hayashi, E. Nukui, K. Wada, T. Morikawa, K. Kobashi, "Peptide Chemistry 1992", ed. by N. Yanaihara, ESCOM, Leiden, 1993, p.166