

薬学 研究科

平成 26 年度

(論文提出による博士論文)

響 野 元

# 学位論文審査結果の報告書

氏 名 響 野 元

---

生 年 月 日 (昭和)・平成 52 年 2 月 18 日

本 籍 (国籍) 大 阪 府

---

学位の種類 博 士 ( 薬 学 )

学位記番号 第 **121** 号

学位授与の条件 学位規程第 5 条 2 項該当  
(博士の学位)

論 文 題 目

---

ペプチド化学合成におけるラセミ化抑制を指向した保護基開発

---

---

審 査 委 員

(主 査) 三 木 康 義



(副主査) 村 岡 修



(副主査) 鈴 木 茂 生



(副 査)



(副 査)



## 論文内容の要旨

ペプチド医薬品の多くは受容体アゴニストであり、低分子医薬品に比べて極めて少量で強い生理活性作用を示す。そのためペプチドの活性評価試験や臨床試験を行う場合、それらには極めて高い純度が求められる。その理由としてはラセミ化を始めとした副生成物が元のペプチドの生理活性を消失し、時には異なる作用を発現する 경우가多く知られているからである。それゆえ、ペプチドを高純度かつ再現性良く化学合成を行うために、アミノ酸の保護基の選択、縮合試薬を始めとし、縮合条件、脱保護条件や精製技術の研究および開発が日々重ねられてきた。

ペプチドの化学合成におけるラセミ化は、原理的には合成における何れの段階においても起こりうる。しかし、実際の合成においては、活性化および縮合反応時を除けば、ラセミ化の可能性は通常無視できうる。活性化および縮合反応時のラセミ化は、ほとんどのアミノ酸においてオキサゾロン体生成に起因する。

ペプチドの化学合成において、各種アミノ酸の  $N^{\alpha}$  保護基は、Boc 基や Fmoc 基が汎用されている。その理由としては、カルバメート型保護基の構造がオキサゾロン体の生成を妨げるためである。

しかしながら、Fmoc 型保護基を用いるペプチドの化学合成において、ヒスチジン (His) とシステイン (Cys) を用いる際には、他のアミノ酸とは異なり、カルバメート型保護基をこれらのアミノ酸誘導体に導入したとしても、容易にラセミ化が進行することが知られている。His と Cys のラセミ化の問題は、いくつかのグループによる改善策が提唱されているが、試薬入手の容易さおよび実用性などの面から現実的に利用可能な方法論には至っていない。

本論文では His および Cys ラセミ化における問題を低減するために、Fmoc アミノ酸誘導体の側鎖保護基の検討による、実用的な手法の開発を述べる。

第一章では His に関する検討し、新規化合物である Fmoc-His(MBom)-OH [ $N^{\alpha}$ -9-fluorenylmethoxycarbonyl- $N^{\epsilon}$ -4-methoxybenzyloxymethyl-L-histidine] を開発した。Fmoc-His(MBom)-OH は、ラセミ化の原因となる His 誘導体のイミダゾール基  $\pi$  位窒素原子を保護する構造を持たせることにより、縮合反応時における His ラセミ化の問題を本質的に改善することができた。また本化合物の合成工程についても、一切のク

ロマト操作を必要とせず，分液および晶析工程のみで生産できる大量合成法を確立した。

第二章では Cys のラセミ化を制御する要因に関する検討を行った。新規化合物である Fmoc-Cys(MBom)-OH [9-fluorenylmethoxycarbonyl-4-methoxybenzyloxymethyl-L-cysteine]だけでなく，既知化合物の Fmoc-Cys(Ddm)-OH [9-fluorenylmethoxycarbonyl-S-4,4'-dimethoxydiphenylmethyl-L-cysteine]が，ラセミ化抑制において，これまで用いられている Fmoc-Cys(Trt)-OH に代わる有力な Fmoc-Cys 誘導体であることを新たに見いだすことができた。

Fmoc-His(MBom)-OH および Fmoc-Cys(MBom)-OH 両化合物について，30 残基程度の中鎖ペプチドを用いて有用性を証明するだけでなく，近年迅速合成を目的としたマイクロウェーブ固相ペプチド合成法にも有効であることを証明した。

以上のことより，著者は Fmoc-His(MBom)-OH および Fmoc-Cys(MBom)/(Ddm)-OH が，これまでの Fmoc ペプチド合成法において問題であったラセミ化を克服した有用なアミノ酸誘導体であることを明らかにした。これら誘導体を用いることで高純度な長鎖ペプチドを合成できるだけでなく，ネイティブケミカルライゲーション法などをも組み合わせて合成した蛋白質の品質も高めることができた。今回開発した His および Cys 誘導体は高い品質が求められるペプチドや蛋白質合成において有用なシントンのことが期待できる。

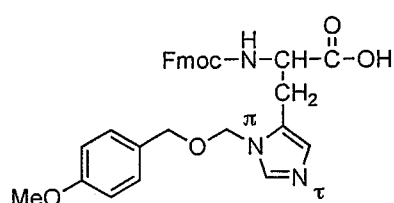
## 論文審査結果の要旨

ペプチド医薬品の多くは受容体アゴニストであり，低分子医薬品に比べて極めて少量で強い生理活性作用を示す．そのためペプチドの活性評価試験や臨床試験を行う場合，それらには極めて高い純度が求められる．

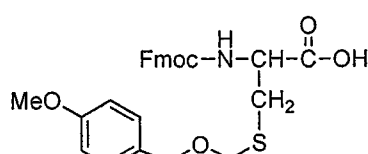
ペプチドの化学合成におけるラセミ化は，原理的には合成における何れの段階においても起こりうる．しかし，実際の合成においては，活性化および縮合反応時を除けば，ラセミ化の可能性は通常無視できうる．活性化および縮合反応時のラセミ化は，ほとんどのアミノ酸においてオキサゾロン体生成に起因する．

ペプチドの化学合成において，各種アミノ酸の  $N^\alpha$  保護基は，Boc 基や Fmoc 基が汎用されている．その理由としては，カルバメート型保護基の構造がオキサゾロン体の生成を妨げるためである．

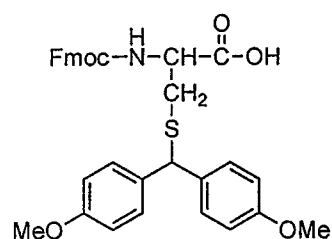
しかしながら，Fmoc 型保護基を用いるペプチドの化学合成において，ヒスチジン (His) とシステイン (Cys) を用いる際には，他のアミノ酸とは異なり，カルバメート型保護基をこれらのアミノ酸誘導体に導入したとしても，容易にラセミ化が進行することが知られている．His と Cys のラセミ化の問題は，いくつかのグループによる改善策が提唱されているが，試薬入手の容易さおよび実用性などの面から現実的に利用可能な方法論には至っていない．



Fmoc-His(MBom)-OH



Fmoc-Cys(MBom)-OH



Fmoc-Cys(Ddm)-OH

本論文では His および Cys ラセミ化における問題を低減するために，Fmoc アミノ酸誘導体の側鎖保護基の検討による，実用的な手法の開発を述べる．

第一章では His に関する検討し、新規化合物である Fmoc-His(MBom)-OH [*N*-9-fluorenylmethoxycarbonyl-*N*<sup>ε</sup>-4-methoxybenzyloxymethyl-L-histidine]を開発した。Fmoc-His(MBom)-OH は、ラセミ化の原因となる His 誘導体のイミダゾール基 π 位窒素原子を保護する構造を持たせることにより、縮合反応時における His ラセミ化の問題を本質的に改善することができた。また本化合物の合成工程についても、一切のクロマト操作を必要とせず、分液および晶析工程のみで生産できる大量合成法を確立した。

第二章では Cys のラセミ化を制御する要因に関する検討を行った。新規化合物である Fmoc-Cys(MBom)-OH [9-fluorenylmethoxycarbonyl-4-methoxybenzyloxymethyl-L-cysteine]だけでなく、既知化合物の Fmoc-Cys(Ddm)-OH [9-fluorenylmethoxycarbonyl-*S*-4,4'-dimethoxydiphenylmethyl-L-cysteine]が、ラセミ化抑制において、これまで用いられている Fmoc-Cys(Trt)-OH に代わる有力な Fmoc-Cys 誘導体であることを新たに見いだすことができた。

Fmoc-His(MBom)-OH および Fmoc-Cys(MBom)-OH 両化合物について、30 残基程度の中鎖ペプチドを用いて有用性を証明するだけでなく、近年迅速合成を目的としたマイクロウェーブ固相ペプチド合成法にも有効であることを証明した。

以上のことより、著者は Fmoc-His(MBom)-OH および Fmoc-Cys(MBom)/(Ddm)-OH が、これまでの Fmoc ペプチド合成法において問題であったラセミ化を克服した有用なアミノ酸誘導体であることを明らかにした。これら誘導体を用いることで高純度な長鎖ペプチドを合成できるだけでなく、ネイティブケミカルライゲーション法などをも組み合わせて合成した蛋白質の品質も高めることができた。今回開発した His および Cys 誘導体は高い品質が求められるペプチドや蛋白質合成において有用なシントンのことが期待できる。

以上のようにペプチド合成法において問題であったラセミ化を克服した有用なアミノ酸誘導体を開発し、これら誘導体を用いることで高純度な長鎖ペプチドを合成できることを明らかにした。それゆえ、本論文は薬学における博士論文として十分な内容であると判断します。