

【論文】

異常アミノ酸を含有する環状ジペプチドの簡便な合成

添嶋康廣*・神尾克彦*・山崎澄男*・迎 勝也*・境 正志*

Facile synthesis of Cyclic dipeptides containing abnormal amino acid

Yasuhiro Soejima, Katsuhiko Kamio, Sumio Yamasaki, Katsuya Mukae and Masashi Sakai

Abstract—cyclo(-Phe-ΔAla-) was Prepared by a new method for cyclic dipeptide synthesis; cyclo (-Phe-ΔAla-) is an abbreviation of cyclo (-L-Phenylalanyl-Δ-Alanine-) ;ΔAla is an abbreviation of dehydroalanine. Z-Phe-Ser-OMe was synthesized from Z-Phe-OH and HCl · H-Ser-OMe by the use of EDC reagent, and similarly cyclo (-Phe-Ser-) was obtained from H-Phe-Ser-OMe . The cyclo (-Phe-ClAla-) containing β-chloroalanine was prepared by chlorination of the cyclo (-Phe-Ser-) using PCl₅. Finally, treatment of triethyl amine on cyclo (-Phe-ClAla-) let to produce cyclo (-Phe-ΔAla-) . Thus , present authors could propose a novel and new method for cyclo (-Phe-ΔAla-) synthesis via cyclo (-Phe-ClAla-).

Keywords: Peptide Synthesis, Dehydropeptide, Cyclic Dipeptide

1. 緒 言

近年、自然界から生理活性を示す異常アミノ酸を含むペプチドが、数多く発見されている。その中で、デヒドロアミノ酸（Δアミノ酸と略す）の生理活性の機能や生合成などの生化学的な関心と共に生合成、反応有機化学の面からも興味が高まっている。

これら異常アミノ酸を含有するペプチドの多くは微生物起源の比較的分子量の物質であり、化学構造と生理活性機能の立場から注目を集めている。

デヒドロアラニン（ΔAla）を含有した生理活性ペプチドには植物毒AM-toxin（AMT）が知られている。Fig.1のAM-toxin II（AMT-II）は、A.Mari菌の産生する宿主特異的毒素で、リンゴ斑点落葉病を発症させる微生物起源ペプチドである。AM-toxinは、3種類（IIの他I IIIのcongener存在）の構造が確認されている。このペプチドは環状テトラペプチド構造をとり、1個のL-アラニンと3個の異常アミノ酸から構成されている。

AM-toxinを合成する場合、デヒドロ化反応（ΔAla基）と環化反応が最大の難題である。

これまで、それらペプチド中のΔAla部分の化学合成には、前駆的 L-Ser（O-Bzl）部分が使われてきた。¹⁾²⁾ この場合には接触還元による脱Bzl化が必要のため、ΔAla生理活性ペプチド分子中に含Sアミノ酸が存在すると合成困難のきらいがあった。

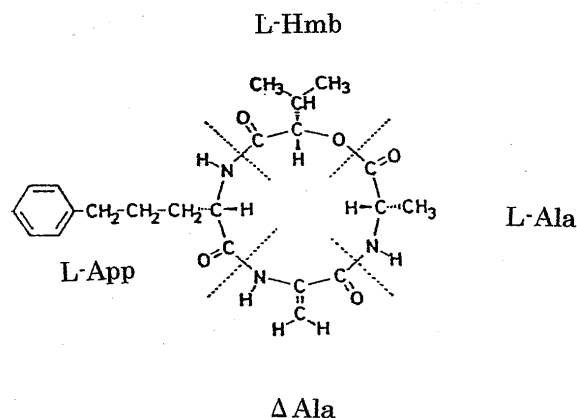


Fig. 1 Structure of AM-toxin II

* 物質生命化学科

このうち Δ Ala基導入反応の基礎研究のため、S含有アナログの新合成法の開発を指向した基礎実験である。すなわち、従来のO-Bzl-L-Serの代わりにL-CIAla(あるいはD-CIAla)の使用を試みるものである。デヒドロアラニン(Δ Ala)を含む代表的な天然ペプチドは環状テトラペプチド構造のAM-toxin類が知られている。分子中に Δ Ala残基が存在するため固有の生理活性を示し、リング斑点落葉病を発症する。この3種のペプチド毒素の構造と活性相関の研究のため、基礎実験として環状ジペプチドCyclo(-Phe- Δ Ala-)を合成する。ここで化学合成するには Δ Ala残基中の二重結合($H_2C=C$)による不安定さのため、合成困難のことである。現在2つの方法がある。1つはSer残基(L-Ser(O-Bzl))を前駆体とし、Tos化し塩基を用いて Δ Ala残基を得る。³⁾しかし、3ステップを必要とするため低収率である。

もう1つの方法はDap残基を前駆体として、 CH_3I , $KHCO_3$ により中間体を経て、加熱により Δ Ala残基を得る。本法は、さらに低収率であり、副生成物も混入している。只今、AMTアナログの合成を計画しているが、現在法(1989)ではS原子の触媒毒のため合成は不可能である。

以上の難点を解決するためL-Ser(O-Bzl)の代わりにL-CIAla中間体を経る方法を企画した。このアミノ酸を用いると Δ Ala化は1ステップのため収率の向上が期待され、さらに接触還元不必要のためS原子を含んだL-Cys(S-Bzl)置換AMTアナログ合成も可能となる。

2. 実験

2.1 略号とRf値

Δ Ala, デヒドロアラニン。CIAla, β -クロロ-L-アラニン。-OBzl, ベンジルエステル, $-OCH_2C_6H_5$, 接触還元(H_2/Pd)処理で除去。Tos-, p-トルエンスルホン基, $CH_3C_6H_4SO_2-$ 。Tos-Cl, 塩化トシル, $CH_3C_6H_4SO_2Cl$ 。Et₂NH, ジエチルアミン。Et₃N, トリエチルアミン。EDC, 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド, $C_2H_5-N=C=N-(CH_2)_3-N(CH_3)_2$, カップリング試薬, 脱水反応によりペプチド結合生成。Z-, ベンジルオキシカルボニル基, $C_6H_5CH_2OCO-$, 接触還元(H_2/Pd)処理で除去。

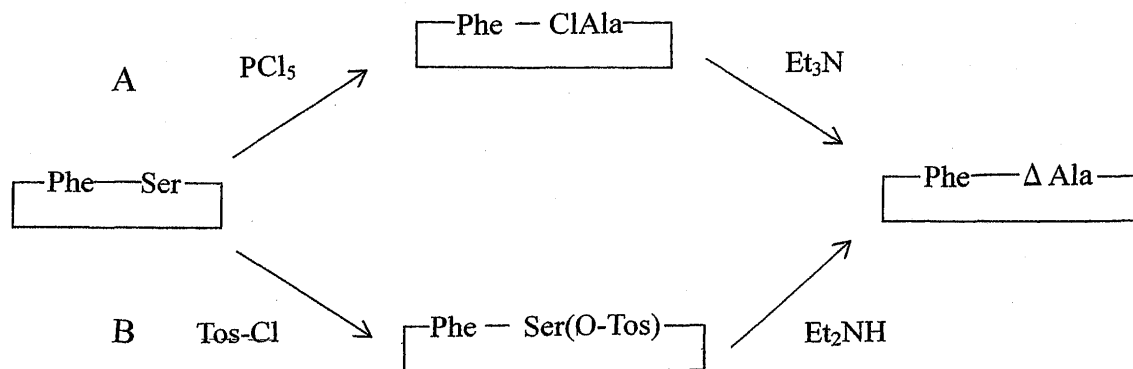
各種合成物の純度は、数種の展開溶媒を使用して薄層クロマトグラフィー(TLC)により確認した。

Z-Cl, 塩化ベンジルオキシカルボニル、アミノ酸へのZ基の導入, $C_6H_5CH_2COCl$ 。Rf値は $CHCl_3:MeOH=5:1$ の展開溶媒中でのTLCにおける値である。L-フェニルアラニン, L-セリン, その他EDC·HClなどはペプチド研究所より購入した。

2.2 cyclo(-Phe-Ser-)の合成

Scheme 1に合成の概要を示した。

2.2.1 Z-Phe-OH 一般的Z-アミノ酸合成法⁴⁾にしたがった。L-フェニルアラニン(16.5g, 0.1mol)を2_MNaOH(50ml)に溶かし、エーテル(15~20ml)を加える。0℃で激しくかき混ぜ乍ら、Z-Cl(19ml, 0.12mol)および2_MNaOH(70ml)を3~4回に分けて約10分おきに加える。0℃で2時間、室温で1時間かき混ぜた後、エーテルで1回洗う。



Scheme. 1 Two Synthetic routes of cyclo(-Phe- Δ Ala-)

Route A: cyclo(-Phe- Δ Ala-) synthesis via cyclo(-Phe-CIAla-)

Route B: cyclo(-Phe- Δ Ala-) synthesis via cyclo(-Phe-Ser(O-Tos)-)

水層を分液漏斗に入れ、6M HCl (40ml) を加えた後、酢酸エチルで抽出する (100, 60ml)。Na₂SO₄で乾燥し、濾液を濃縮して生成した油状物に石油エーテルを加え、さらに、Z-Phe-OH結晶片を加えると全体が美しい結晶となる。収量25.8g (86%), mp88°C。

2.2.2 H-Ser-OMe · HCl アミノ酸メチルエステル塩酸塩合成法の一般法⁵⁾にしたがった。MeOH(100ml)を-10°Cに冷却し、かき混ぜながらSOCl₂ (26ml)を徐々に加えた。10分後、L-セリン(10.5g, 0.1mol)を加え、室温で15時間かき混ぜる。減圧濃縮し、残渣の湯状物にエーテルを加えて固化させた。濾取し、すばやくエーテルで洗うと13.7g (88%)を得た Rf 0.17。

2.2.3 Z-Phe-Ser-OMe EDCによるペプチド結合生成反応は、Sheehanにしたがった⁶⁾。

Z-Phe-OH(3.0g, 10mmol), H-Ser-OMe · HCl(1.56g, 10mmol), Et₃N(10mmol)のCH₂Cl₂(30ml)溶液に、EDC · HCl(10mmol)を反応させた。結晶状のZ-Phe-Ser-OMeの収量は2.96g (74%), mp124°C。文献値はmp123°C~124°C⁶⁾。

2.2.4 H-Phe-Ser-OMeの合成 今回はZ基(C₆H₅CH₂OCO-NH)をC₆H₅CH₃+CO₂+NH₂基に変換するものである。Z-Phe-Ser-OMe (2.0g, 5mmol)のMeOH(30ml)および10%Pd炭素(0.2g)の混合物に水素ガスを通し接触還元する(5~6時間)。濾液を濃縮して油状物1.33g (約100%), Rf0.75を得た。

2.2.5 cyclo(-Phe-Ser-)の合成 H-Phe-Ser-OMeの環化反応は、泉屋らの方法により好収率で合成した⁷⁾。

上述のH-Phe-Ser-OMe(1.33g)のMeOH (50ml) 溶液を約4日間還流煮沸すると、完全に環化した。全体を濃縮し、固形物をエーテルと石油エーテル (1:1)の混液で粉末化して濾取する。

収量0.96g (82%), Rf 0.46, mp225~226°C(分解)。

文献ではFischer法により70%で合成されて、そのmp223~225°C(分解)⁸⁾。

2.3 cyclo(-Phe-ClAla-)の合成

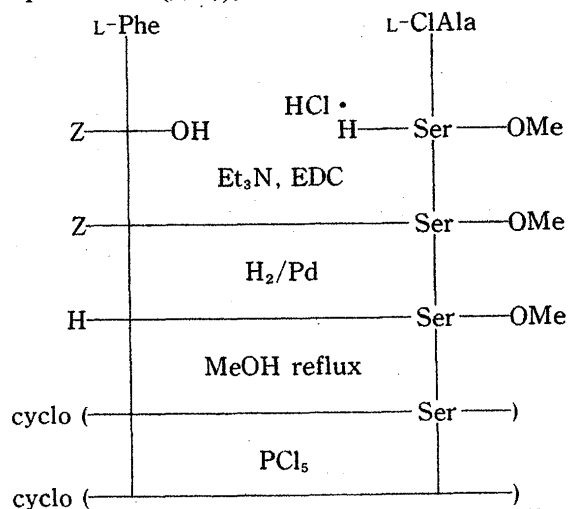
SrinivasanらによるZ-Gly-Ser-OM + PCl₅ → Z-Gly-ClAla-OMeの方法にしたがった⁹⁾。

cyclo(-Phe-Ser-) (0.47g, 2mmol)のCH₂Cl₂ (10ml) 溶液に、かき混ぜながら-5~0°Cで1時間、室温で12時間かき混ぜ、濃縮し酢酸エチル(20ml)を加える。水洗いし、Na₂SO₄で乾燥、濾液を濃縮し、残渣をエーテルと石油エーテル (1:1)の混液で粉末固化して濾取する。収量0.59g(84%), Rf 0.58。

2.4 cyclo(-Phe-Ser(Tos)-)の合成

2.25項の環状ペプチド合成物の cyclo(-Phe-Ser-)

を原料とした。cyclo(-Phe-Ser-) (1.17g, 5mmol) を、ピリジン溶液に、かき混ぜながら0°C~4°Cで、Tos-Cl (3.8g, 20mmol) を5分毎に分けて加える。ついで、0°C~4°Cで1時間かき混ぜる。濃縮し生成した油状物に冷水を加え粉末化し、エーテルと石油エーテル (1:1)の混液を加えると美しい結晶が析出する。ただちに濾取する。収量1.68g (87%), Rf 0.81, mp258~260°C(分解)。



Scheme 2 Synthetic Route for cyclo(-Phe-ClAla-)

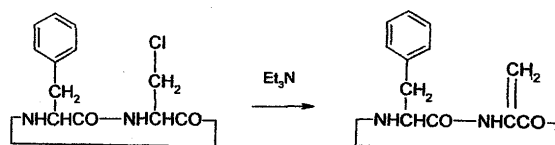
2.5 Cyclo(-Phe-ΔAla-)の合成

2.5.1 cyclo(-Phe-ClAla-)よりCyclo(-Phe-ΔAla-)の合成

Scheme 3に合成の概要を示した。

SrinivasanらによるZ-Gly-ClAla-OMe+Et₃N → Z-Gly-ΔAla-OMeの方法にしたがった⁹⁾。

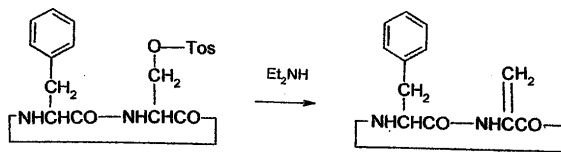
cyclo(-Phe-ClAla-) (0.35g, 1 mmol)の酢酸エチル(5ml)溶液に、かき混ぜながら0°CでEt₃N (0.14ml, 1mmol)を加える。0°Cで30分間、室温で12時間かき混ぜた後、水で洗いNa₂SO₄で乾燥する。濾液を濃縮し、残渣をエーテルと石油エーテル(1:1)の混液で、粉末化してから濾取する。収量0.145g (67%)。そのRfは0.69, mp約290°C (分解)。



Scheme.3 Conversion of cyclo(-Phe-ClAla-) into cyclo(-Phe-ΔAla-)

2.5.2 cyclo(-Phe-Ser(Tos)-)よりCyclo(-Phe- Δ Ala-)の合成 Scheme 4 に合成の概要を示した。泉屋らの方法により合成した⁸⁾。

cyclo(-Phe-Ser(Tos)-) (1.10g, 2.85mmol) のDMF(18ml) 溶液に,かき混ぜながら0°CでEt₂NH(0.59ml, 5.7mmol)を加える。0°Cで30分間,室温で12時間かき混ぜた後,水で洗いNa₂SO₄で乾燥する。濾液を濃縮し,残渣をエーテルと石油エーテル(1:1)の混液で,粉末化してから濾取する。収量0.372g (64%)。そのRfは0.69, mp約290°C (分解)。



Scheme. 4 Conversion of cyclo (-Phe-Ser(O-Tos)-) into cyclo (-Phe- Δ Ala-)

3. 結果と考察

3.1 デヒドロアラニンに関する生化学とペプチド合成化学

天然より異常アミノ酸を含んだペプチドが発見され生理活性とペプチド合成が行われている。

クロロアラニンはタンパク性セリンの α -炭素の立体構造の解明研究で注目された¹⁰⁾。このアミノ酸は,非常に不安定な化合物のため,研究は希少である。

またL-CIAIa含有ペプチドの合成的研究は,わずか2報を数えるのみである。この内, Srinivasanらは直鎖状のCIAIaペプチドを合成し, 塩基で処理することにより Δ Alaペプチドを得ている。2報とも直鎖状(linear)のジペプチドのみであり環状ペプチドの合成には至っていない。この興味深い知見をもとに, 本稿では, 環状CIAIaペプチドと環状 Δ Alaペプチドの合成を試みた。

3.2 cyclo(-Phe- Δ Ala-)の合成

Scheme 1に合成の概要を示した。

3.2.1 Route A cyclo(-Phe-CIAIa-) 経路による cyclo(-Phe- Δ Ala-) の合成

今回の中間生成物cyclo(-Phe-CIAIa-)の合成は, 不安定 CIAIa残基を含む特殊合成法である。環状ジペプチドcyclo(-Phe-Ser-)にPCl₅を作用させて, Ser残基の側鎖-CH₂OHを-CH₂Clに変換するものである。この原料のcyclo(-Phe-Ser-)は, 泉屋法による簡便な

手法でえられるしPCl₅処理でのcyclo(-Phe-CIAIa-)への変換も好収率であった。cyclo(-Phe-CIAIa-)にEt₃Nを作用させて,好収率でCyclo(-Phe- Δ Ala-)を得ることが出来た。すなわち環状ジペプチド中のCIAIa残基を Δ Ala残基に変化させることを初めて示したことになる。この結果はAM-toxin群合成に応用できる可能性を与えるものである。

3.3 Route B cyclo(-Phe-Ser(Tos)-) 経路によるCyclo(-Phe- Δ Ala-)の合成

既知方法により合成した⁸⁾。

cyclo(-Phe-Ser(Tos))にEt₂NHを作用させてCyclo(-Phe- Δ Ala-)を得たが, これは, 2.5.1項CIAIa経路のcyclo(-Phe- Δ Ala-)の (Rf 0.69)と同一物であった。

Route AあるいはRoute Bの両法により合成されたCyclo(-Phe- Δ Ala-)の収率は,Route Aの方法が好収率であり, 簡便操作を約束するものである。

4. 結論

今回の研究では, 二つの観点から有意義な成果が得られた。その1つは,不安定な Δ Ala残基を含有した環状ポリペプチド合成に新ルートを提供するものである。第2の成果は不安定なCIAIaを含む環状ジペプチド合成を可能にした。さらに本方法は,広範な各種の環状ジペプチドの合成も可能である。

5. 文献

- 1) 泉屋信夫,加藤哲夫,青柳東彦,脇道典,“ペプチド合成の基礎と実験”, pp.240~250,丸善(1985)
- 2) K. Noda, Y. Shimohigasi, and N. Izumiya, “The Peptides” (ed. by E. Gross and J. Meienhofer), chapter 5 “ α , β -Dehydroamino Acid and Peptides” pp.285-339, Academic Press, NY (1983)
- 3) K. Ueda, M. Waki, Y. Teruya, and N. Izumiya, Bull. Chem. Soc. Jpn., 62, 1635 (1989)
- 4) M. Bergmann and L. Zervas, Chem. Ber., 65, 1192 (1932)
- 5) M. Brenner and M. Huber, Helv. Chim. Acta, 36, 1109 (1953)
- 6) J. C. Sheehan, J. Preston, and Preston, and P. A. Cruickshank, J. Am. Chem. Soc., 87, 2492 (1965)
- 7) T. Ueda, M. Saito, T. Kato, and N. Izumiya, Bull. Chem. Soc. Jpn., 56, 568 (1983)
- 8) S. Lee, T. Kammera, H. Aoyagi, and N. Izumiya, Int. J. Peptide Protein Res., 13, 207 (1979)
- 9) A. Srinivasan, R. W. Stephenson, and R. K. Plsen, J. Org. Chem., 42, 2253 (1977)
- 10) E. Fischer and K. Raske, Ber., 40, 3717 (1907)