

## Fmoc 固相合成法による硫酸化チロシン含有ペプチドの直接合成法の開発

二 木 史 朗<sup>(1)</sup>・北 川 幸 己<sup>(2)</sup>・矢 上 健<sup>(3)</sup>・山 口 実<sup>(4)</sup>

### Direct Synthesis of Tyrosine-Sulfate Containing Peptides, Using Fmoc-Solid-Phase Method

by Shiroh FUTAKI

*Institute for Chemical Research, Kyoto University, Kyoto, Japan*

and

Kouki KITAGAWA

*Niigata College of Pharmacy, Niigata, Japan*

and

Takeshi YAGAMI

*National Institute of Health Sciences, Tokyo, Japan*

and

Minoru YAMAGUCHI

*Life Science Department, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan*

(Received January 23, 1999)

#### Abstract

Tyrosine sulfation is one of the most frequently encountered post-translational modification of proteins. Synthetic peptides containing tyrosine sulfate [Tyr(SO<sub>3</sub>H)] will be of great help for the study of the biological significance of tyrosine sulfation. We have established a new, reliable method to synthesize peptides containing Tyr(SO<sub>3</sub>H), by means of the Fmoc-solid-phase method. In this method, Tyr(SO<sub>3</sub>H) is introduced into the peptide chain in the form of Fmoc-Tyr(SO<sub>3</sub>Na), and then, deprotection is conducted at a low temperature (0 °C) in the presence of trifluoroacetic acid (TFA). This method was successfully applied to the synthesis of cholecystokinin (CCK) and gastrin-II related peptides.

**Keywords :** Tyrosine sulfation, Post-translational modification, Fmoc-solid-phase peptide synthesis, Cholecystokinin (CCK), Gastrin-II, Synthetic peptide, 2-Chlororityl resin

#### 要 旨

近年、チロシン硫酸化はリン酸化と並ぶ一般的なタンパク質の翻訳後修飾の一つであることが明らかとなってきた。この生理的意義の解明のためには、硫酸化チロシン [Tyr(SO<sub>3</sub>H)] 含有ペプチドが重要な役割を果たしうる。著者らは、その簡便さのために近年広く用いられるようになってきた Fmoc (=9-fluorenylmethoxycarbonyl) 固相合成法を活用した硫酸化チロシン含有ペプチドの効率的な合成法を開発した。この方法は、Fmoc-Tyr(SO<sub>3</sub>Na) の形で Tyr(SO<sub>3</sub>H) 残基をペプチド鎖に直接導入し、ペプチド鎖を構築した後、低温 (0 °C) 下で trifluoroacetic acid (TFA) により脱保護を行い目的物を得るというアプローチをとる。この方法によって、代表的な硫酸化チロシン含有ペプチドである CCK (コレシストキニン)、ガストリン-II やこれらの関連ペプチドが容易に得られることを確認した。

注<sup>(1)</sup> 京都大学化学研究所 薬博 (3) 国立医薬品食品衛生研究所 薬博  
注<sup>(2)</sup> 新潟薬科大学 薬博 (4) ライフサイエンス機器部

## 1. はじめに

古くより、CCK (コレシストキニン)、ガストリンなど、いくつかのペプチド中のチロシン残基が硫酸化されていることが知られていたが、近年、種々のタンパク質中のチロシンが硫酸化されていることが明らかとなり、チロシン硫酸化は代表的な翻訳後修飾 (mRNA の情報に基づきタンパク質が合成された後、生体内酵素により受ける修飾) の一つであると見なされるようになった (図 1)<sup>1,2)</sup>。チロシン硫酸化はタンパク質の細胞内輸送や分泌、生体機能のスイッチ等に関与していると言われるものの、その本質はいまだに不明のままである。また、硫酸基が生理活性に重要である CCK には、CCK-8, 33, 39 などの種々の分子多形が存在することが知られているが、これらの存在意義も不明のままである。これらのタンパク質あるいはペプチドの硫酸化の意義を解明する上で、合成ペプチドは重要な役割を担うが、従来こうした硫酸化ペプチドの合成は非常に困難なものであった。その理由として硫酸化チロシンの酸に対する不安定さが挙げられるが、これは、ペプチドを合成する場合に必要な酸による保護基の除去時に硫酸化チロシン残基を如何に安定に保つかということが問題であったからである。また、ペプチド鎖を構築後に硫酸化を行おうとする場合、一般にセリン、スレオニンのアルコール性水酸基はチロシンのフェノール性水酸基よりも優先的に硫酸化試薬により硫酸化を受けるが、このようなアミノ酸が存在する場合に、如何にしてチロシンのフェノール性水酸基のみを選択的に硫酸化するかといった問題も解決されていなかった。著者らは、ジメチルホルムアミド-三酸化硫黄錯体が硫酸化試薬として有用であることを見いだすとともに、Fmoc 固相合成法とセフティーキャッチ型保護基を組み合わせた硫酸化チロシン含有ペプチドの新規合成法をすでに報告している<sup>3-6)</sup>。しかし、この方法は、一旦、樹脂から切

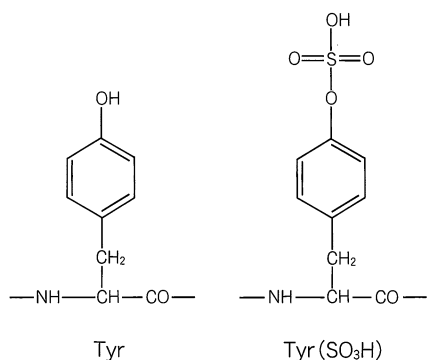


図 1 硫酸化チロシン [Tyr(SO<sub>3</sub>H)] の構造  
Structure of tyrosine sulfate

り出したペプチドに対して硫酸化を行うことから、操作が若干煩雑なものとなる。近年、研究室レベルでの固相ペプチド合成法の主流が Boc (*t*-butoxycarbonyl) 法から Fmoc 法へと転換しつつあるが、これは、後者の操作が前者のものに比べて簡便かつ安全なためであり、各社の自動合成機も Fmoc 法を標準法として採用しているものが多い。このような状況のなかで、著者らは、Fmoc 固相法を用いた Tyr(SO<sub>3</sub>H) 含有ペプチドの直接的な合成法を開発することができたので以下に紹介する。

## 2. 硫酸化チロシンの酸に対する安定性の検討<sup>6),7)</sup>

Tyr(SO<sub>3</sub>H) が酸に不安定であることは従来から言われていたが、これに関する詳しい情報はなかった。著者らは、Tyr(SO<sub>3</sub>H) の酸に対する安定性について再検討を行ったところ、通常 Fmoc 固相法で脱保護時に用いられる TFA 処理に対して、Tyr(SO<sub>3</sub>H) は 18°C では 1 時間程度で半減するが、0°C では 12 時間後も 7 割以上が残存することが判った (図 2)。これに対して、Fmoc 固相法で採用される 'Bu 系の保護基の TFA 中での除去は、氷冷下、数時間で完結することが判った。また、脱保護時にスカベンジャーとして反応系に添加する *m*-cresol や 2-methylindole は Tyr(SO<sub>3</sub>H) の安定性にあまり影響しないものの、ethanedithiol, thioanisole 等の含硫化合物は硫酸基の脱離を顕著に促進することが判った。

## 3. Fmoc 固相法を用いた硫酸化チロシン含有ペプチドの直接合成法の開発

2 章で述べた知見から、Tyr(SO<sub>3</sub>H) 残基の導入を他のアミノ酸残基の場合と同様に Fmoc-Tyr(SO<sub>3</sub>Na) を用いて

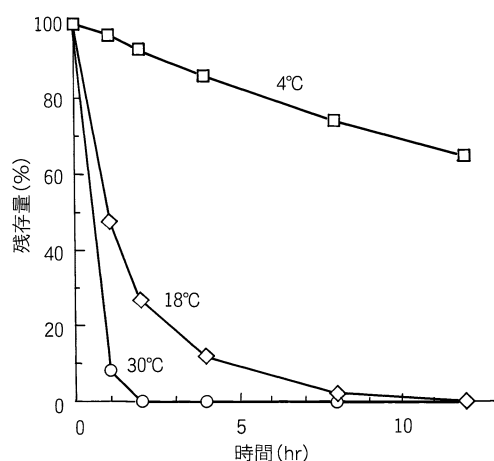


図 2 トリフルoro酢酸 (TFA) 処理に対する Fmoc-Tyr(SO<sub>3</sub>Na)-Ala-NH<sub>2</sub> 中の硫酸化チロシンの安定性  
Stability of tyrosine sulfate in Fmoc-Tyr(SO<sub>3</sub>Na)-Ala-NH<sub>2</sub> under trifluoroacetic acid (TFA) treatment

最初からペプチド鎖に導入し、Fmoc 固相法でペプチド鎖を構築後、低温で TFA 処理を行ってペプチドの樹脂からの切り出しと保護基の除去を行うというアプローチを、硫酸化チロシン含有ペプチドの直接的な合成法として開発した。このアプローチを用いていくつかの CCK, ガストリン関連ペプチドの合成を行い、その有用性を確認した。以下に、合成例を紹介する。

### 3.1 CCK-12 の合成<sup>6),7)</sup>

まず最初に、代表的な Tyr(SO<sub>3</sub>H) 含有ペプチドの一つである CCK-12 をモデルとして合成を行った(図 3)。CCK 類は C 末端がアミド構造であるため、Albericio らにより開発されたアミド型ペプチド調製用樹脂である PAL [Peptide Amide Linker; 5-(4'-Fmoc-aminomethyl-3',5'-dimethoxyphenyl)valeric acid] 樹脂を固相担体として用いた。ペプチド鎖の構築は通常の Fmoc 固相法で行い、Tyr(SO<sub>3</sub>H) は Fmoc-Tyr(SO<sub>3</sub>Na) を用いてペプチド鎖に導入した。その他、側鎖保護の必要なアミノ酸としては、Fmoc 固相法で用いられる Asp(<sup>t</sup>Bu), Ser(<sup>t</sup>Bu), Arg(Pmc) (Pmc=2, 2, 5, 7, 8-pentamethylchroman-6-sulfonyl) を用いた。ペプチド鎖構築後、90% 含水 TFA/m-cresol/2-methylindole で 0°C, 15 時間脱保護を行い、ついで逆相 HPLC で精製を行って全収率 9% で目的物を得た。

### 3.2 シオニンの合成<sup>8)</sup>

シオニンはホヤ由来の CCK/ガストリン様ペプチドであり、分子内に 2 つの Tyr(SO<sub>3</sub>H) 残基を含む(図 4)。3.1 節と同様に PAL リンカーを用いてシオニンおよび 2 種類のモノ硫酸化体を合成したが、生理活性発現には 2 位のチロシンが硫酸化されていることが重要であることを見いだした。複数の Tyr が存在するペプチドに選択的に、ある Tyr のみに硫酸化を行おうとする場合、ペプチド鎖構築後に硫酸化を行うアプローチでは保護基の選択等を考慮する必要がある。この場合のように最初から硫酸化チロシン残基をペプチド鎖に組み込むアプローチでは、容易に位置選択的な硫酸化体を得ることができる。

### 3.3 CCK-33 およびビッグガストリン-II の合成<sup>9)</sup>

このアプローチにより Tyr(SO<sub>3</sub>H) 含有ペプチドを容易に調製できることが上記の 2 例の合成を通じて確認できたが、さらにこの方法を長鎖の CCK-33 およびビッグガストリン-II (各 33, 34 残基) の合成に応用することを考えた。これらのペプチドの C 末端もやはりアミド構造であるが、C 末端がアミド体であるペ

チドの固相合成においては最終脱保護時に樹脂からのペプチドの切り出し効率に問題のある場合が多い。前述の PAL リンカーは最も酸に鋭敏であるとされる樹脂の一つであるが、前述の反応条件(90% 含水 TFA, 0°C)では、樹脂に結合したペプチドの約 4 割程度が切り出されるに過ぎず、これが収率の向上を妨げる主たる原因となっていた。

著者らは、この問題点を改良するため、酢酸程度の弱酸で樹脂からのペプチドの切り出しが可能な 2-chlorotrityl 樹脂に着目した。Fmoc 法で通常用いられる <sup>t</sup>Bu 等の側鎖保護基は酢酸に安定であることから、この樹脂は一般に C 端カルボン酸遊離の保護ペプチドフラグメントの調製に用いられている。この樹脂への Fmoc アミノ酸の導入は CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 中、diisopropylethylamine 存在下で極めて容易に行えることから、著者らは、C 端のジペプチドを Fmoc-Asp-Phe-NH<sub>2</sub> の形で樹脂に導入し、Fmoc 法でペプチド鎖を構築した後、酢酸で保護ペプチドを樹脂から切り出し、ついで TFA で保護基の除去を行い、硫酸化ペプチドに導くというアプローチを考案した。

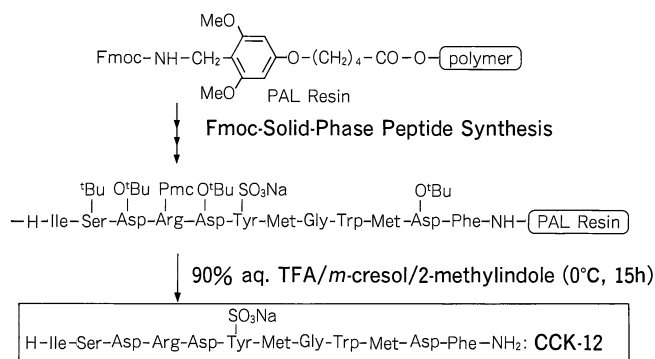


図 3 Fmoc 固相法を用いた直接合成法による CCK-12 の合成  
Direct synthesis of CCK-12 by using the Fmoc-solid-phase method

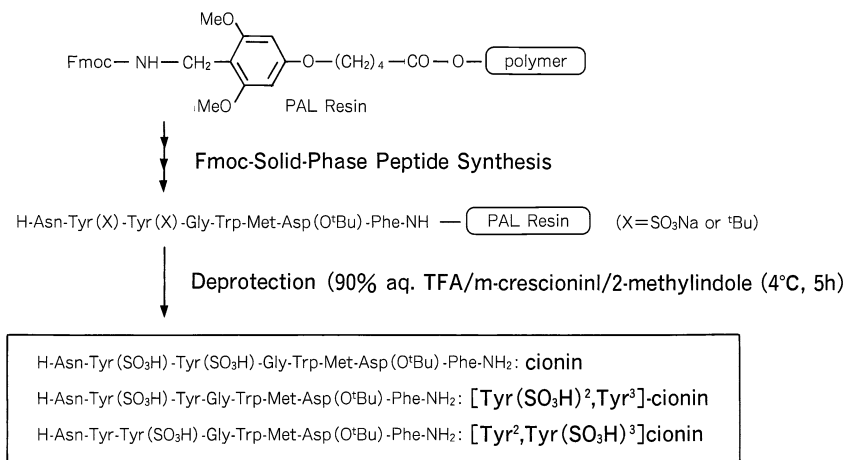


図 4 シオニンとそのモノ硫酸化体の合成  
Synthesis of cionin and its mono-sulfate derivatives

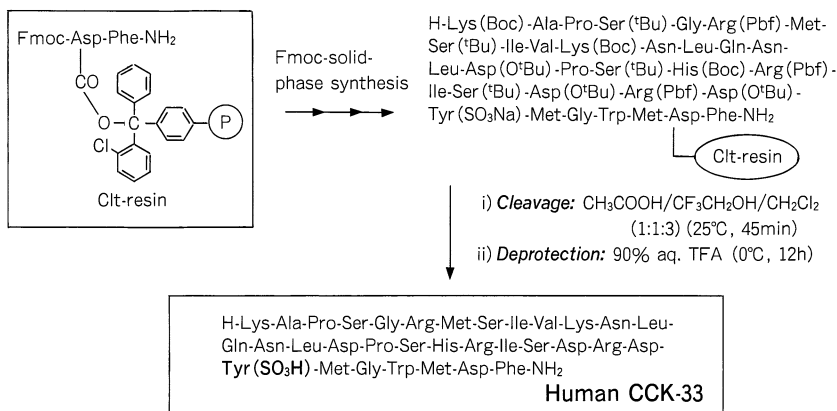


図5 2-chlorotrityl 樹脂 (Clt-resin) を活用した CCK-33 の合成  
Synthesis of CCK-33 using 2-chlorotrityl resin

CCK-33 の合成を図5に示す。通常の Fmoc アミノ酸を導入するのと同様に Fmoc-Asp-Phe-NH<sub>2</sub> を Asp の β 位のカルボキシル基を介して 2-chlorotrityl 樹脂に導入した後、PyBOP (benzotriazole-1-yl-oxy-tris-pyrrolidino-phosphonium hexafluorophosphate) を縮合剤とする Fmoc 固相法でペプチド鎖を構築した。この際、Arg には、Pmc に比べ TFA で除去しやすい保護基として開発された Pbf (2, 2, 4, 6, 7-pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl) 基を用いた。ついで、酢酸/trifluoroethanol/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:1:3) で 25°C, 45分処理し、ペプチドを保護基のついたまま樹脂から切り出し、引き続き 90% 含水 TFA で 0°C, 12時間処理して保護基の除去を行った。最後に HPLC で精製を行い、全行程 10% の収率で高純度の目的物を得ることができた。なお、これに先立ち、CCK-12 を同様な方法で合成したところ、全収率 25% で目的物を得ることができ、PAL リンカーを用いた時と比べて収率の格段の向上が達成できた。

ビッグガストリン-II [pGlu-Leu-Gly-Pro-Gln-Gly-Pro-Pro-His-Leu-Val-Ala-Asp-Pro-Ser-Lys-Lys-Gln-Gly-Pro-Trp-Leu-Glu-Glu-Glu-Glu-Ala-Tyr(SO<sub>3</sub>H)-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH<sub>2</sub>; pGlu=pyroglutamic acid] に関しても、同様な方法でペプチド鎖を構築したのち、樹脂からの切り出し、ついで 90% 含水 TFA (0°C, 8時間) の処理で保護基の除去を行い、収率 18% で高純度の目的物を得た。CCK-33 の場合の収率がガストリンの合成の際に比べて低収率なのは、CCK-33 では配列中に 3 残基の Met 残基が存在するために合成途上の Met の酸化に伴う副生成物が多く生成すること、および 3 残基の Arg からの保護基の完全な除去が困難なことに起因している。一般のペプチドの合成と同様、硫酸化ペプチドにおいても、その配列が収率に大きく影響することが判る。

#### 4. むすび

以上により、著者らの開発した Fmoc 固相法を用いた Tyr(SO<sub>3</sub>H) 含有ペプチドの直接的な合成法が実用的なものであることが確認できた。モデルとして合成したペプチドはいずれも C 末端アミド型のペプチドであるが、C 末端に遊離のカルボキシル基をもつペプチドの場合も、Wang 樹脂 (p-benzyloxybenzyl alcohol resin) を用いて同様にペプチド鎖を構築後、0°C での TFA 処理により樹脂からの切り出しと保護基の除去を同時に行うことにより、容易

に目的物が得られる。また、Wang 樹脂からのペプチドの切り出しは、TFA 処理でほぼ完全に行えるので、PAL リンカーを用いる C 末端アミド型ペプチドの場合と比べて、高収率で目的物が得られることが期待できる。ペプチド鎖の構築に関しては、例えば島津製作所製 PSSM-8 のようなペプチド自動合成機を利用することが可能であり、今回用いた PyBOP を用いる縮合法のほか、状況に応じて diisopropylcarbodiimide や TBTU [2-(1H-benzotriazole-1-yl)-1, 3, 3-tetramethyluronium hexafluorophosphate] といった縮合試薬も利用可能である。本アプローチにより得られる合成ペプチドが、チロシン硫酸化の生理的意義の解明に貢献することを期待している。

#### 参考文献

- 1) W. B. Huttner : Ann. Rev. Physiol., **50**, 363 (1988)
- 2) C. Niehrs, R. Beißwanger, W. B. Huttner : Chemico-Biol. Interact., **92**, 257 (1994)
- 3) S. Futaki, T. Taike, T. Yagami, T. Ogawa, T. Akita, K. Kitagawa : J. Chem. Soc., Perkin Trans 1, 1739~1744 (1990)
- 4) S. Futaki, T. Taike, T. Akita, K. Kitagawa : J. Chem. Soc., Chem. Commun., 523~524 (1990)
- 5) S. Futaki, T. Taike, T. Akita, K. Kitagawa : Tetrahedron, **48**, 8899~8914 (1992)
- 6) T. Yagami, S. Shiwa, S. Futaki, K. Kitagawa : Chem. Pharm. Bull., **41**, 376~380 (1993)
- 7) 北川幸己, 二木史朗, 矢上 健 : 有合化, **52**, 675~685 (1994)
- 8) K. Kitagawa, S. Futaki, T. Yagami, S. Sumi, K. Inoue : Int. J. Peptide Protein Res., **43**, 190~200 (1994)
- 9) K. Kitagawa, C. Aida, H. Fujiwara, T. Yagami, S. Futaki : Tetrahedron Lett., **38**, 599~602 (1997)