

Title	ブタC5a-アナフィラトキシンの合成研究
Author(s)	茅野, 直良
Citation	大阪大学, 1988, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/1807
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

ブタC5a-アナフィラトキシンの合成研究

1988

茅野直良



ブタC5a-アナフィラトキシンの合成研究

1988

茅野直良

目次

1章 序	1
2章 プタ [Gln ⁶⁵]C5a-アナフィラトキシン保護ペプチドの合成	5
2-1 合成計画	5
2-1-1 システイン残基保護基とジスルフィド結合の形成	5
2-1-2 その他の保護基	6
2-1-3 ペプチド鎖の延長法	7
2-2 保護ペプチドの純度分析	10
2-2-1 各セグメントの純度	10
2-2-2 Asp-Gly 構造を持つペプチドの分析	14
2-2-3 Cys(Acm)残基のCys(^t Bu)残基への置換副反応	16
2-2-4 セグメント縮合生成物の純度	18
2-2-5 セグメント縮合時のラセミ体の分析	20
3章 プタ [Gln ⁶⁵]C5a-アナフィラトキシンの合成	26
3-1 [6Acm]体遊離ペプチドの純度と精製	26
3-2 アセトアミドメチル(Acm)基の脱離	28
3-3 3組のジスルフィド結合の形成： プタ [Gln ⁶⁵]C5a-アナフィラトキシンの合成	30
3-4 合成プタ [Gln ⁶⁵]C5a-アナフィラトキシンの構造の確認	33
3-4-1 アミノ酸分析	33
3-4-2 分子量測定	33
3-4-3 トリプシン消化	35
3-4-4 シスチン残基を含むトリプシン消化フラグメントの 合成：合成によるジスルフィド結合保持様式の確認	39
3-4-5 ヒトC5a-アナフィラトキシン 単一クローン性抗体との交叉性	45
3-4-6 合成ペプチドの生物活性	46

4章 合成品と天然物の比較	48
4-1 逆相およびイオン交換HPLCによる比較	48
4-2 トリプシン消化物による比較	48
5章 結語	53
6章 実験の部	55
6-1 プタ[Gln ⁶⁵]C5a-アナフィラトキシンを構築する 各セグメントの合成	55
6-2 セグメント縮合による 保護プタ[Gln ⁶⁵]C5a-アナフィラトキシンの合成	80
6-3 プタ[Gln ⁶⁵]C5a-アナフィラトキシンの合成	85
6-4 固相法によるペプチド合成	86
略記号	88
参考文献	89
謝辞	92

1 章 序

ペプチド合成法の進歩により長鎖ペプチドの合成や複数のジスルフィド結合を有するペプチドの合成が行なわれ、さらにその両者の特徴を分子内に合わせ持つ複雑な構造を有する長鎖ペプチドが合成の対象となってきた。

ペプチドの化学合成に対しては、液相法と固相法、最大保護法と最少保護法などいくつかの対照される方法論があるが、著者は、複雑な構造を有する長鎖ペプチドの合成には、各段階における生成物の純度を確実に検定しながら合成を進める液相法を採用し、また、側鎖官能基は反応性を有していることからそれら全てを保護する最大保護法を採用すべきであると考え。この方法論の組み合わせで広くペプチド合成に応用される合成法として、 α 位アミノ基を t -ブチル系保護基である t -ブチルオキシカルボニル (Boc) 基¹⁾で保護し、その他の官能基をベンジル系保護基で保護して、トリフルオロ酢酸 (TFA) で Boc 基を切断してペプチド鎖を延長し、最後に無水フッ化水素 (HF)²⁾ 処理により全ての保護基を一度に脱離させる方法がよく用いられる。著者は、この合成法を適用することにより、ノナあるいはデカペプチドである β -ネオエンドルフィン³⁾、 α -ネオエンドルフィン⁴⁾ およびトリ LH-RH I⁵⁾ を推定構造式に従って合成し、得られた高純度のペプチドを用いてそれらの一次構造式の確定に寄与した。

長鎖ペプチドの合成は、上で述べたような10アミノ酸残基程度のペプチド(短鎖ペプチド)を構成単位(セグメント)として全体の構造を構築する方法がとられる。その場合短鎖ペプチドを合成する際には存在しない新たな問題が生じる。例えば、保護ペプチドの純度や溶解度の問題あるいはセグメント縮合時に起こるラセミ化の問題などである。それ故、長鎖ペプチドを合成するためには、高純度のセグメントを用い、短鎖ペプチドの合成よりも厳密に縮合や脱保護の反応を観察しながらペプチド鎖を延長する必要がある。そのためには従来から頻繁に使用されている薄層クロマトグラフィー (TLC) による分析に加えて高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による分析法を採用すべきである。この分析法は、縮合反応時に生成するジアステレオマーなどの副生成物を分析するために感度および精度が飛躍的に優れている。

以上のことから、側鎖官能基にベンジル系保護基を用いる最大保護法を採用し、各セグメントの純度や縮合および脱保護反応における生成物の純度を HPLC で確実に検定しながらペプチド鎖を延長し、最後に HF により脱保護してペプチドを合成する方法は、脱保護に使用する TFA や HF が ペプチドをよく溶解する溶媒であることから長鎖ペプチドを高純度かつ再現性よく合成できる有効な方法であると考え。この方法でペプチドの一次構造を問題なく構築することができれば、複数のジスルフィド結合を分子内に持ち合わせるペプチドの合成も容易に行なうことが可能となる。このような背景のもと、複雑な構造を有する長鎖ペプチドの合成戦略を確立することを目的とし、合成する標的としてブタ C5a-アナフィラトキシンを選択した。このペプチドは、生体防御機構に関与する補体系が活性化される際に血清中に存在する補体系蛋白質第5成分 (C5) から遊離される塩

基性ポリペプチドである。

生体に異物が侵入すると免疫機構が活性化され、異物に対する抗体が産生されて免疫複合体が形成される。このことを契機として食細胞が動員され異物の処理が開始されるが、その際に関与するのが補体系である。すなわち、免疫複合体によりあるいは異物により直接補体第3成分(C3)を活性化させるC3転換酵素が形成され、この酵素によりC3が水解されて蛋白質成分であるC3bとC3a-アナフィラトキシンが遊離する。C3bは異物と結合して赤血球上の受容体に結合して肝臓での異物処理を行なうとともに、C3転換酵素をC5転換酵素に変換する。この酵素によりC5がC5bとC5a-アナフィラトキシンに限定分解されるとさらに補体成分の活性化が継続して殺菌、溶菌作用を示す膜傷害複合体を形成し異物を処理する。このような異物処理過程における生体の変化が炎症であり、補体系が活性化される際に遊離するペプチドフラグメントであるアナフィラトキシンは血管や血液細胞の補体受容体に結合して種々の炎症反応を引き起こすことが知られている。特に、C5a-アナフィラトキシンは白血球遊走活性や、リゾソーム酵素遊離活性が非常に強いことから、炎症に深く関与するペプチドとして注目されている。

アナフィラトキシン (anaphylatoxin) という名は、新鮮な血清を免疫複合体で処理すると生体にとって有毒な物質(toxic substance) が産生され、その物質により生体は過敏症(anaphylaxis) あるいは極度の過敏症(anaphylactic shock) と類似した症状を呈することからFriedbergerにより命名されたものである。その生物活性は、上で述べたものに加えて、血管透過性上昇作用、肥満細胞からのヒスタミン遊離作用、平滑筋収縮作用など多彩である。補体系が活性化される際にC3a-, C4a-, C5a-の3種類のアナフィラトキシンが遊離されるが、その生物活性の強さには差が認められ、C5aが最も強くC3a、C4aの順に比活性は低下する。

C5a-アナフィラトキシンは、 α 鎖と β 鎖の2本鎖からなる血清中の蛋白質C5から、セリン酵素であるC5転換酵素により α 鎖N端部に存在するアルギニン残基カルボキシル側結合が選択的に切断されて生成する。そして、このペプチドは、他のアナフィラトキシンと同様に、血清中のカルボキシペプチダーゼ-Nによる作用を受けてC末端アルギニン残基が速やかに切断され([des Arg]体形成)、活性が消失するかもしくは大きく低下することが知られている。この例からも明らかなようにC5a-アナフィラトキシンの活性中心の一つはC端部にある。しかし、C3a-とC4a-アナフィラトキシンの場合にはC末端7残基ペプチドにも活性が認められるのに対して、C5a-アナフィラトキシンの場合にはC端部ペプチドのみでは活性を示さずN端部アミノ酸も重要であるという報告もあり、分子全体が活性発現に重要な働きを持つと考えられている。

現在では蛋白質の一次構造解析あるいは相補的デオキシリボ核酸(cDNA)の構造を基に一次構造を推定する方法で、ラット、マウス、ブタ、ウシおよびヒトC5a-アナフィラトキシンの一次構造が決定されている(図1-1)。図から明らかなように、C5a-アナフィラトキシンは77あるいは74アミノ酸残基から構成され、ヒトとラットの場合にはN-配糖体に典型的な構造であるAsn-X-Serの構造がC端部にあり、アスパラギン残基側鎖に糖鎖が結合したペプチドである。図中に線で囲って示したアミノ酸残基が共通な部分が

本研究においては、複雑な構造を有する長鎖ペプチドの合成戦略を確立するための標的として、74アミノ酸残基からなるブタC5a-アナフィラトキシンの全構造の解析により提出されたGerardとHugli式のブタ[Gln⁶⁵]C5a-アナフィラトキシンを採用し、合成ペプチドと天然ブタC5a-アナフィラトキシンをHPLC分析により比較して65位アミノ酸残基に関して2種類提出されているブタC5a-アナフィラトキシンの一次構造式に検討を加えた。その結果、前述の最大保護法とHFによる脱保護法を組み合わせたペプチドの合成法がこのような複雑な構造を有する長鎖ペプチドの合成に有効であることを明らかにするとともに、2種類の異なった提出一次構造式に決定的結論を下すことができた。本研究において得られたペプチドの合成法に関する知見は今後更に長鎖ペプチドひいては蛋白質の合成に対して有用な示唆を与えるものであると考える。

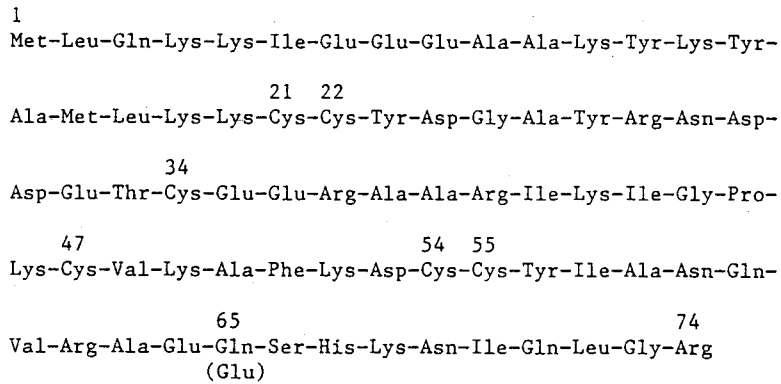


図1-2 ブタC5a-アナフィラトキシンに対して提出されている2種類の一次構造式

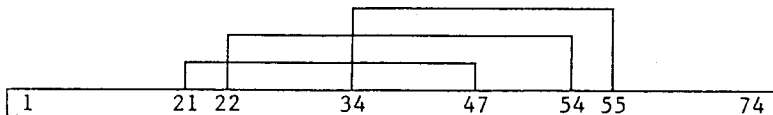


図1-3 ブタC5a-アナフィラトキシンのジスルフィド結合保持様式

2章 ブタ [Gln⁶⁵]C5a-アナフィラトキシン保護ペプチドの合成

2-1 合成計画

分子内に3組のジスルフィド結合を保持する74アミノ酸残基からなるペプチド、ブタ [Gln⁶⁵]C5a-アナフィラトキシンの合成計画を立てるにあたり、二つの大きな問題点をまず考慮しなければならない。一つは保護基の選択を含めて如何にペプチド鎖を延長するかということであり、他方はペプチド鎖を構築後のジスルフィド結合形成方法についてである。両問題は当然互いに関連することであり、システイン残基に使用する保護基により合成方法は変化する。この項では、以上の観点を中心としてブタ [Gln⁶⁵]C5a-アナフィラトキシンの合成計画について述べる。

2-1-1 システイン残基保護基とジスルフィド結合の形成

システイン残基に使用する保護基の選択は合成方法全体を左右する大きな要素である。システイン残基保護基には数多くの種類があるが、最終脱保護剤として使用するHFに対しては切断されるものと安定なものがある。HFにより切断される保護基を使用する場合には、遊離スルフィド基を持つ粗ペプチドを精製することなく酸化させジスルフィド結合形成反応を行なうことになる。比較的短鎖ペプチドの合成ではこの種の保護基を適用しても問題は少なく、実際に著者は4-メチルベンジル(4-MeBzl)基⁹⁾をシステイン残基保護基に採用して1組のジスルフィド結合のみを持つ28アミノ酸残基ペプチド、 α -ヒト心房性ナトリウム利尿ペプチド(α -hANP)を効率よく合成することができた¹⁰⁾。しかし、74アミノ酸残基の長鎖ペプチドであるブタ [Gln⁶⁵]C5a-アナフィラトキシンの合成では合成途上に形成される種々雑多な副生成物が混入することが予想され、HFで切断されるシステイン残基保護基を採用して粗ペプチドをそのまま用いてジスルフィド結合形成反応を行なう方法の適用は危険である。そこで、本研究ではHF処理に安定なAcm基¹¹⁾をシステイン残基保護基として選択し、このAcm基で保護したペプチドを精製後ジスルフィド結合形成反応を行なう方針をとった。

Acm基を脱離後にジスルフィド結合を形成させる方法として2種類ある。一つは、ヨウ素などで処理することによりAcm基の脱離と同時に酸化して直接ジスルフィド結合を形成させる方法であり、もう一つは、Acm基を除去後一旦還元型で単離し、その後空気酸化などの方法で徐々にジスルフィド結合を形成させる方法である。分子内に1組のジスルフィド結合のみを保持する場合にはどちらの方法を採用しても結果に大きな差は認められない場合が多い。しかし、ブタ [Gln⁶⁵]C5a-アナフィラトキシンは分子内に3組のジスルフィド結合を保持することから、一段階で反応を強行する前者の方法よりも後者の段階的方法によりジスルフィド結合を形成させる方が確実であると思われる。また、一般に天然の蛋白質のジスルフィド結合を還元後空気酸化することにより再びジスルフィ

ド結合を形成させた場合，元のジスルフィド結合保持様式を回復することが可能であることが知られている。以上のことから長鎖ペプチドであるブタ [Gln⁶⁵]C5a-アナフィラトキシンのジスルフィド結合形成反応は精製した [6Acm] 体ペプチドを酢酸第二水銀で処理して一旦ヘキサヒドロ体に通じ，ついで空気酸化することにより行なう方法を採用した。

2-1-2 その他の保護基

以上述べたようにシステイン残基側鎖官能基は Acm 基で保護することにしたが，その他のアミノ酸官能基保護基としては，ペプチド鎖を延長する際に切断しなければならない α 位アミノ基とカルボキシル基，さらには最終脱保護時以外は安定でなければならない側鎖官能基に使用する 3 種類の脱離方法の異なるものが必要である。本研究においては， α 位アミノ基の一時的保護基には TFA で容易に切断できる Boc 基を採用し， α 位カルボキシル基には酢酸中の亜鉛末などにより C 端アミノ酸の光学純度に影響することなく脱離できるフェナシル (Pac) 基¹²⁾を採用した。また，システイン残基以外のアミノ酸側鎖官能基は HF により容易に除去可能なベンジル系保護基を採用した (表 2-1)。その中チロシン残基側鎖水酸基保護基には，HF 処理の際に生じるカチオンが芳香環を攻撃して

表 2-1 本研究に使用した保護基

官能基	保護基
α -アミノ基	t-ブチルオキシカルボニル (Boc)
α -カルボキシル基	フェナシル (Pac)，ベンジル (Bzl) ¹³⁾
ϵ -アミノ基	2-クロロベンジルオキシカルボニル (ClZ) ¹⁴⁾
ω -カルボキシル基	シクロヘキシル (Hex) ¹⁵⁾
アルコール性水酸基	ベンジル (Bzl) ¹⁶⁾
フェノール性水酸基	2-ブロモベンジルオキシカルボニル (BrZ) ¹⁷⁾
スルフィドリル基	アセトアミドメチル (Acm)
グアニド基，イミダゾール基	トシル (Tos) ^{18, 19)}

生成するアルキル化副生成物の量を最小限に抑制するために2-ブロモベンジルオキシカルボニル(BrZ)基を選択した²⁰⁾。アスパラギン酸残基β-カルボキシル基は後に続くアミノ酸残基のアミノ基と反応してアミノサクシンイミド(Asc)体を形成する副反応が知られている。それ故、その保護基の選択には特に注意を払わねばならない。実際に、著者はアスパラギン酸残基側鎖カルボキシル基をベンジルエステルで保護したヒト成長ホルモン放出因子(hGRF)合成のセグメント、Boc-Tyr(BrZ)-Ala-Asp(OBzl)-Ala-Ile-Phe-Thr(Bzl)-OPacをジメチルホルムアミド(DMF)に溶解して放置するだけでAsp(OBzl)-Ala構造が自発的に1日当たり約5% Asc体に変換することを観察しており²⁰⁾、アスパラギン酸側鎖カルボキシル基をベンジルエステルで保護して長鎖ペプチドを合成することは不可能である。またその際に、ベンジルエステルの代わりにシクロヘキシルエステルで保護するとAsc体形成が抑制できることを確認しており、ブタ[Gln⁶⁵]C5a-アナフィラトキシンの構造に含まれる全てのアスパラギン酸残基保護基にはシクロヘキシル基を採用した。

2-1-3 ペプチド鎖の延長法

液相法で長鎖ペプチドを合成する場合はペプチド鎖を適当な位置で分割したセグメントを合成し、それらを縮合させて全体を構築するセグメント縮合法を採用する必要がある。その場合ラセミ化に関して問題がないグリシン残基やプロリン残基をC端とするセグメントが用いられるとは限らないので、カルボキシル成分C端アミノ酸で起こり得るラセミ化に注意しなければならない。どのアミノ酸間で縮合させるとラセミ化が少ないという一般則もなく、また、試験的に縮合部位のアミノ酸間でラセミ化度を調べてもそれは所詮モデルでの結果に過ぎず実際の縮合反応の結果を予測できるとは限らない。それ故、縮合方法に対してはラセミ化を少なくするための配慮を最大限に払う必要がある。

ペプチド合成で使用する代表的な縮合剤であるジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC)あるいは水溶性カルボジイミド(WSCI)[1-エチル-3-(3'-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド]²¹⁾を用いる場合、単にこれらの縮合剤のみを使用してセグメント縮合を行なうとかなりの程度のラセミ化が起こることが知られており、ラセミ化を減少させたり反応を促進する目的で種々添加剤が開発されている。その代表的なものとして1-ヒドロキシサクシンイミド(HOSu)²²⁾や1-ヒドロキシベンゾトリアゾール(HOBt)²³⁾などがある。本研究で用いる縮合剤は副生する尿素誘導体の除去が比較的容易なWSCIを選択した。添加剤に関してはHOBtあるいはHOSuを使用しても非常に多量のラセミ化が起こったことをhGRFの合成時に経験したことから(表2-2)、本研究においては、HOBtはアミノ酸誘導体を段階的に延長する場合やラセミ化の恐れのないアミノ酸をC末端としてセグメント縮合を行なう場合にのみ使用し、ラセミ化の起こる可能性があるセグメント縮合を行なう場合にはHOBtよりもラセミ化を抑制する効果が大きいといわれる3,4-ジヒドロ-3-ヒドロキシ-4-オキソ-1,2,3-ベンゾトリアジン(HOObt)²³⁾を採用した。

ブタ [Gln⁶⁵]C5a-アナフィラトキシンの構造中には 縮合時のラセミ化を考慮しなくてもよいグリシン残基とプロリン残基は合わせて4残基のみである。それ故ラセミ化の可能性のあるアミノ酸残基をカルボキシル末端にしてセグメント縮合をする段階を避けることはできない。その場合には、縮合反応時に起こるラセミ化度をHPLCを用いて確実に分析できるアミノ酸をC端としたセグメントを選ばなければならない。また、短いセグメントを順次縮合させて74アミノ酸残基ペプチドを組み上げるのは効率が悪いので、短いセグメントは10アミノ酸残基を越える程度の中間に一旦導き、それらの結合により全体を構築することが望ましい。以上の考察にもとづき図2-1に示す合成経路を計画した。すなわち、各セグメントのC端アミノ酸としては1残基ずつのグリシンとグルタミン酸以外は全てアラニン残基を選び計9個のセグメントに分割し、それらを縮合させて(1-25)位および(26-74)位の比較的長鎖中間体を合成し、ついで両者を縮合させて保護ペプチドを構築する計画とした。

表2-2 hGRFセグメント, Boc-Gln-Leu-Ser(Bzl)-Ala-Arg(Tos)-Lys(ClZ)-Leu-OHと H-Leu-Gln-Asp(OBzl)-Ile-Met-Ser(Bzl)-Arg(Tos)-Gln-Gln-Gly-OPacの縮合時における縮合部位ロイシン残基のラセミ化度

縮合方法	アミン成分	D/(D+L) (%)
WSCl/HOBt	塩酸塩	24.6
WSCl · HCl/HOBt	遊離塩基	16.2
WSCl/HOSu	”	4.5

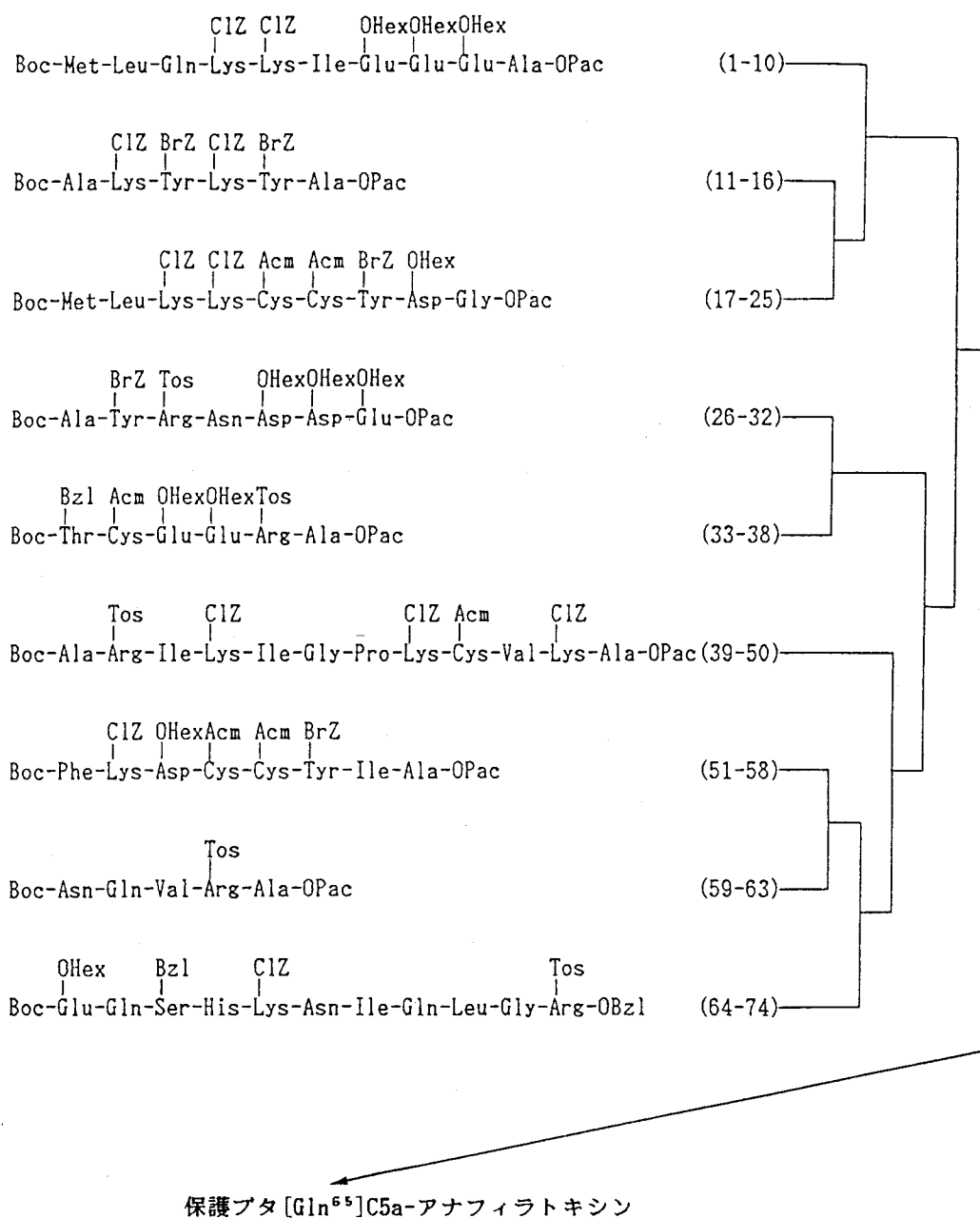


図2-1 保護ブタ [Gln⁶⁵]C5a-アナフィラトキシンの合成経路

2-2 保護ペプチドの純度分析

ペプチドを合成する際に、縮合反応生成物の溶解度が低下しそのために保護ペプチドの精製やその純度分析が困難になることがある。特にブタ[Gln⁶⁵]C5a-アナフィラトキシンは長鎖ペプチドであることからその可能性が大きく、溶解度がよい場合にはペプチド鎖を構築するための各セグメントはもとよりセグメント縮合生成物の純度もできるだけ多くの方法で分析しなければならない。

旧来から保護ペプチドの純度分析は、TLC、アミノ酸分析、元素分析などにより行なわれており、これらは合成ペプチドの純度検定のために有用な方法の1つである。また、それらに加えて保護基を除去した遊離ペプチドの純度を逆相HPLCで調べることもよく行なわれており、TLCによる分析よりも詳細な情報が得られている。しかし、保護基を脱離する操作の際に、本来含まれていた副生成物が修飾を受けたりあるいは本来は含まれていなかった副生成物が新たに生成することがあることから、この分析法では保護ペプチドの真の純度を誤って判断する可能性がある。そのために保護ペプチドのまま逆相HPLCを用いてその純度を調べる検定法が行なわれるようになった。著者はhGRFを合成した際にこの分析方法を適用して44アミノ酸残基からなる保護ペプチドが溶出可能であることを確認しており、本研究における合成ペプチドの純度分析にも脱保護した遊離ペプチドのHPLC分析法の他にこの保護ペプチド分析法も併用し、各セグメントや合成中間体の純度を確実に検定しながらペプチド鎖を延長した。

この項では、合成した各セグメントおよびセグメント縮合生成物の純度検定を保護ペプチドおよび脱保護した遊離ペプチドに対して行なった結果について述べる。

2-2-1 各セグメントの純度

保護ブタ[Gln⁶⁵]C5a-アナフィラトキシンを構築するための9個のセグメントはWSCl/HOBt法により段階的にアミノ酸を延長して合成した。TLCによる分析ではそれらは全て高純度であることが確認され、アミノ酸分析および元素分析の結果は理論値とよく一致した。保護ペプチドおよびHFで脱保護した遊離ペプチドの純度をHPLCにより検定し、この分析法でも各セグメントは高純度であることを確認した。この項では、HPLCによる分析結果の中から合成上の問題点を挙げその分析例について述べる。なお、アミノサクシニイミド(Asc)体を形成しやすいAsp-Gly構造を含む(17-25)位セグメントの分析とペプチド中のCys(Acm)残基がCys('Bu)残基に置換する副反応の分析についてはそれぞれ2-2-2, 2-2-3項で述べる

セグメントC端カルボキシル基保護基であるフェナシルエステルは保護ペプチドの酢酸に対する溶解度が大きい場合には亜鉛末により容易に切断できるが、溶解度が低い場合には切断の完結を十分に確認する必要がある。通常TLCによる分析で十分であるが、フェナシルエステルで保護したペプチドは250 nm近傍に分子吸光度が大きい紫外吸収を持つので、HPLC分析をこの波長で行なうとフェナシルエステルが切断されずに残存するペプチドが混入する場合には相対的に大きなピークとして観察され容易に検出できる。合成に使用した各セグメントは酢酸のみの溶媒には完全に溶解できないことが多く、酢酸にトリフルオロエタノール (TFE) やN-メチルピロリドン (NMP) などの有機溶媒を適宜加えて溶解した。酢酸に最も溶解しにくかった(51-58)位セグメントは、酢酸-NMP(7:3)の混合溶媒中で脱離反応を行なった。図2-2にはフェナシルエステルを脱離する前後で(51-58)位保護ペプチドの純度を検定したクロマトグラムを示した。フェナシルエステルの溶出位置にはわずかのピークも認められず脱離が完全に行なわれたことを確認した。

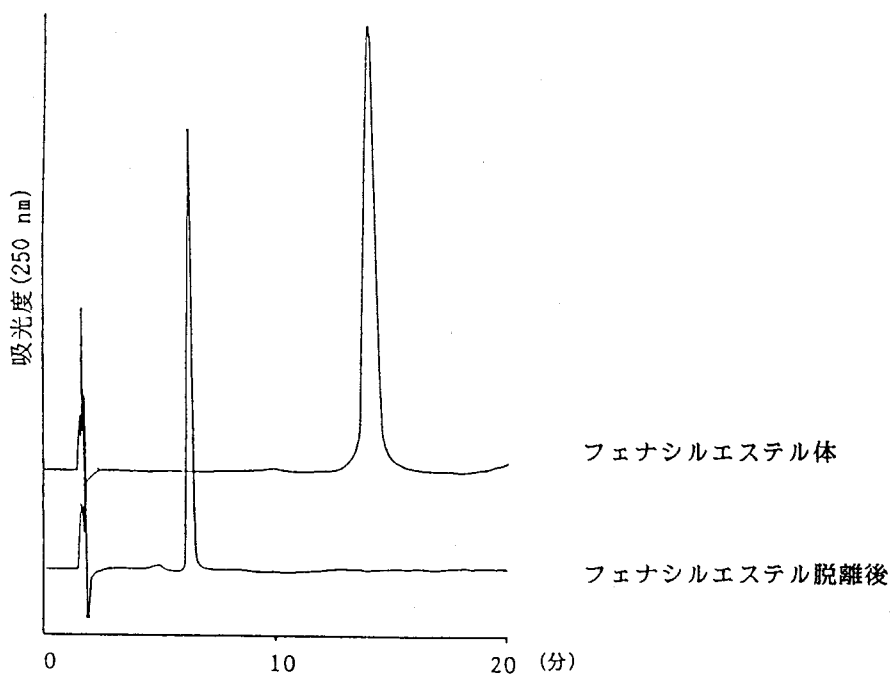


図2-2 (51-58)位保護ペプチドにおけるフェナシルエステル脱離の確認

カラム: Nucleosil 5C₁₈ (4 X 150 mm)

溶離液: CH₃CN/H₂O/TFA(70/30/0.1)

流速: 1.0 ml/分

イオウを含むアミノ酸はペプチドを合成する間にスルホキシド誘導体に酸化される傾向を持つ。そのようなアミノ酸としてブタ[Gln⁶⁵]C5a-アナフィラトキシン保護ペプチド中には2残基のメチオニンと Ac_m基で保護した6残基のシステインがあり、それらの酸化体の分析においてもHPLCが大きな威力を発揮した。分析のための酸化体標品はペプチドを過酸化水素で処理することにより容易に調製できる。酸化速度は上記2種アミノ酸間に大きな違いがありメチオニン残基の方が速い。

保護基が付いたシステイン残基酸化体をアニソール存在下にHF処理するとシステイン残基にアニソールが付加した生成物に変化することが知られている²⁴⁾。それ故、システイン残基酸化体の分析はHF処理した遊離ペプチドで行なうと誤った判断をする可能性が大きく、特にこの場合の分析は保護ペプチドで行なわなければならない。図2-3にはCys(Ac_m)残基を含むセグメントの分析例として、(33-38)位保護ペプチドの純度を示した。主ピークの面積を100として酸化体のピークは0.1以下であり混入するシステイン残基酸化体は少量であった。また、システイン残基を含むその他のセグメントに混入する酸化体量も同様にして検定し、全て少量であることを確認した。

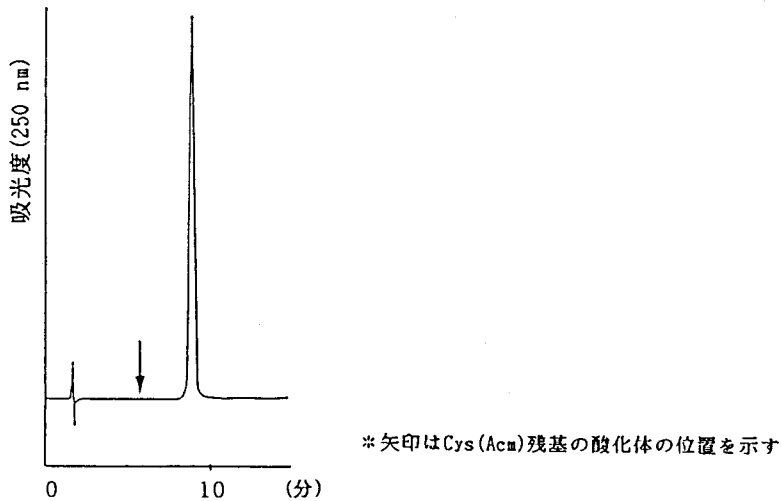


図2-3 Cys(Ac_m)残基を含む(33-38)位保護ペプチドの純度

カラム: Nucleosil 5C₁₈ (4 X 150 mm)

溶離液: CH₃CN/H₂O/TFA(70/30/0.1)

流速: 1.0 ml/分

1位と17位メチオニン残基はともにセグメントN端にあるため合成中に酸化される可能性は少なく、実際に図2-4に示した(1-10)位セグメントのクロマトグラムでは酸化体はごく小ピークであった。17位メチオニン残基を含む(17-25)位セグメントのクロマトグラムは図2-6に示すが、酸化体の混入量はこの場合と同様にわずかであった。

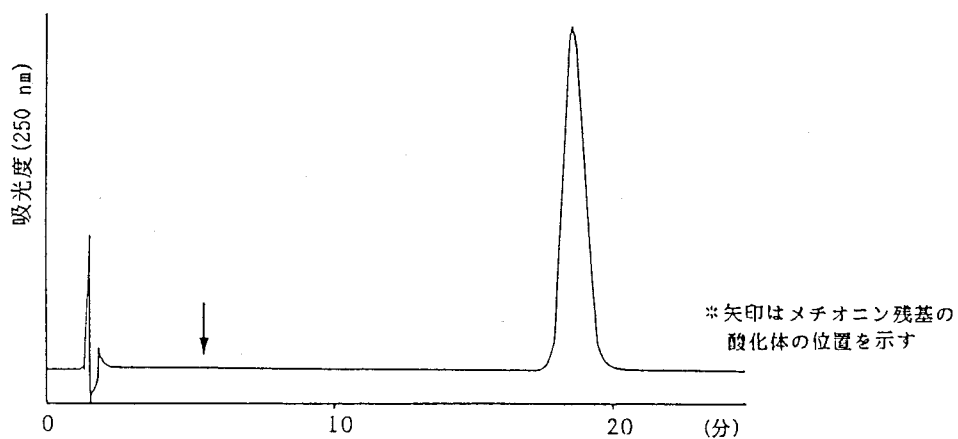


図2-4 メチオニン残基を含む(1-10)位セグメントの純度

カラム: Nucleosil 5C₁₈ (4 X 150 mm)

溶離液: CH₃CN/H₂O/TFA(80/20/0.1)

流速: 1.0 ml/分

2-2-2 Asp-Gly 構造を持つペプチドの分析

ブタ [Gln⁶⁵]C5a-アナフィラトキシン分子中にある 4 残基のアスパラギン酸のうち 24 位と 25 位の Asp-Gly 構造は特に Asc 体を形成しやすいことが知られている。この項では、側鎖カルボキシル基をシクロヘキシルエステルで保護した Asp(OHex)-Gly 構造を含む (17-25) 位セグメントおよびその関連ペプチドにおける Asc 体形成副反応を分析した結果について述べる。

まず、(23-25) 位セグメント、Boc-Tyr(BrZ)-Asp(OHex)-Gly-OPac を用いトリエチルアミンを添加した塩基性条件下における Asp(OHex)-Gly 構造の安定性を検討した。図 2-5 には DMF に溶解直後のペプチドの純度 およびそこに 5 当量のトリエチルアミンを添加して室温で 11 日間放置後に分析したクロマトグラムを示した。トリエチルアミン処理により副生した Asc 体ペプチドのピークは保持時間 4 分に認められた。この反応の日変化を調べた結果、1 日当たり約 1 % の Asc 体ペプチドが副生したことが明らかになった。また、ペプチドを DMF に溶解して放置するだけで自発的に形成される Asc 体ペプチド量を同様にして求めると 1 日当たり 0.21 % であった。著者は Asp-Ala 構造を持つペプチドの場合には側鎖カルボキシル基をシクロヘキシルエステルで保護すれば Asc 体ペプチドの形成はほとんど起こらないことを確認しており²⁰⁾、その場合と比較して Asp-Gly 構造において検出された Asc 体形成量は顕著であった。

(17-25) 位セグメントは弱酸性で反応が進行する WSCI/HOBt 法により段階的にペプチド鎖を延長して合成した。それ故、反応系が塩基性になることはないので、縮合反応時に副生した Asc 体ペプチド量は上で述べた 1 日当たり 0.21 % の値を越えることはないと考えられる。この値を基にして Boc-Asp(OHex)-Gly-OPac を出発物質として実際に (17-25) 位セグメントを合成する際に副生する Asc 体ペプチド量を推測した。1 残基縮合させるのに 18 時間必要であると仮定するとこのペプチドを合成するためにその 7 倍の時間が必要であり、(17-25) 位セグメントには約 1.1 % の Asc 体ペプチドが混入する計算になる。しかし、図 2-6 に示した (17-25) 位セグメントおよび 21 位システイン残基保護基を Ac 基から 4-MeBzl 基に置換した (21-25) 位ペプチド誘導体、Boc-Cys(4-MeBzl)-Cys(Ac)-Tyr(BrZ)-Asp(OHex)-Gly-OPac のクロマトグラムには、Asc 体ペプチドの溶出位置にピークは検出されなかった。このことは縮合反応時に一旦形成された Asc 体ペプチドが目的物を単離する再沈殿の際に除去されたことを示している。

以上のことからアスパラギン酸側鎖カルボキシル基をシクロヘキシル基で保護すれば、Asp-Gly 構造でも Asc 体形成を最小限に抑制することができ、また、少量副生した Asc 体ペプチドは再沈殿により除去することが可能であるから、(17-25) 位セグメントに Asc 体ペプチドは混入しないことを確認した。ペプチド鎖が長くなるに従いセグメント縮合生成物に混入する Asc 体ペプチドを再沈殿により除去することが徐々に不可能になり、また、その混入量を分析定量することも困難になることが考えられるが、この項で観察された結果を考慮すると完全保護ブタ [Gln⁶⁵]C5a-アナフィラトキシン中にも Asc 体ペプチドの混入はごく少量であると推測できる。

溶解直後

トリエチルアミン処理

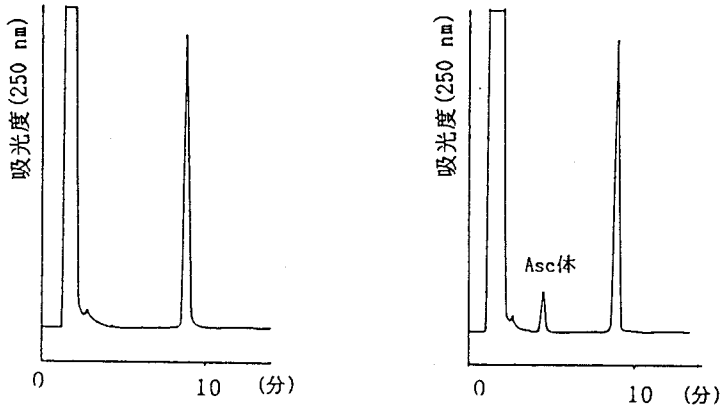


図2-5 トリエチルアミン処理によるBoc-Tyr(BrZ)-Asp(OHex)-Gly-OPacの

Asc体の確認

カラム: Nucleosil 5C₁₈ (4 X 150 mm)

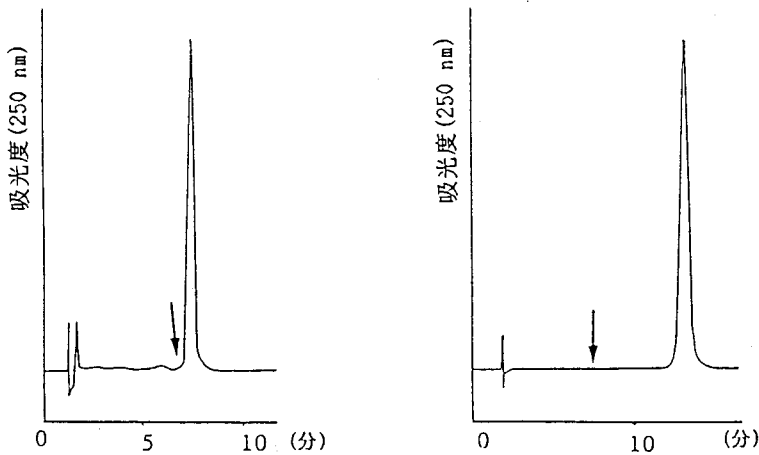
溶離液: CH₃CN/H₂O/TFA(70/30/0.1)

流速: 1.0 ml/分

(A) (17-25)位

(B) (21-25)位ペプチド

誘導體



* 矢印はAsc体の位置を示す

図2-6 (17-25)位および(21-25)位ペプチド誘導體保護ペプチドの純度

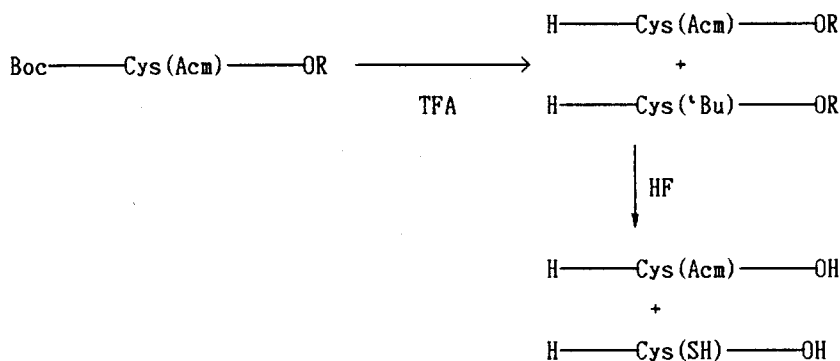
カラム: Nucleosil 5C₁₈ (4 X 150 mm)

溶離液: (A) CH₃CN/H₂O/TFA(80/20/0.1), (B) CH₃CN/H₂O/TFA(70/30/0.1)

流速: 1.0 ml/分

2-2-3 Cys(Acm)残基のCys('Bu)残基への置換副反応

下に示すように、Boc基とCys(Acm)残基を含むペプチドをTFA処理するとAcm基が一部 'Bu基に置換される副反応が知られている。しかし、この副反応を定量的に扱った実験は少なく、Boc-Cys(Acm)-OHを60分間TFA処理するとCys('Bu)が2.6%副生することが報告されている程度である²⁵⁾。Acm基はHF処理により切断されない保護基であるが、この副反応により導入される 'Bu基はHF処理により容易に切断されるので、もしこの副反応が顕著に起こるならばHF処理した遊離ペプチド中に無保護のシステイン残基を含むペプチドが多量に混入することになり、粗ペプチドを精製してからジスルフィド結合形成反応を行なう計画に支障を来たす。しかも、ブタ[Gln⁶⁵]C5a-アナフィラトキシン分子にはシステインが6残基あることから、保護ペプチドの純度検定にも困難が生じる。この項では、図2-1の合成経路に示したシステイン残基を含むセグメントに混入するCys('Bu)体ペプチド量を定量した結果について述べる。



副生したCys('Bu)体ペプチド量はHPLCのクロマトグラム上で標品が溶出する位置のピーク面積から求めた。そのCys('Bu)体ペプチドの標品は、Boc-Cys(Acm)-OHの代わりにBoc-Cys('Bu)-OHを縮合させて調製したり、システイン残基をAcm基で保護したペプチドをt-ブタノールを含むTFAに溶解して室温で終夜放置することにより積極的にAcm基を 'Bu基に置換させて調製した。47位にシステイン残基が存在する(39-50)位セグメントの合成中間体に混入するCys('Bu)体ペプチド量の変化を表2-3に、合成したCys(Acm)残基を含む全てのセグメントに混入するこの副生成物量を表2-4に示した。

両表から明らかなように、各ペプチドに対して検出されたCys('Bu)体ペプチド量はBoc-Cys(Acm)-OHをTFA処理した際に検出された報告値よりも小さな値であった。表2-3に示した(39-50)位セグメントの合成中間体に混入するCys('Bu)体ペプチド量の変化から推測して、システイン残基のアミノ基側にn残基のアミノ酸を延長した場合にこの副生成物が形成される量は、目的物の面積を100として、 $0.5 + 0.1 \times (n-1)$ と表現できる。つまり、副生するCys('Bu)体ペプチド量はCys(Acm)残基のアミノ基に結合した

Boc基を切断する際に約0.5%で最も多く、それ以降は1回のTFA処理当たり0.1%程度増加すると考えてよい。実際に表2-4に示した各セグメント中のそれぞれのシステイン残基に対して検出された値はこの式から求めた値とほぼ一致した1%前後であった。以上のことから各セグメントに混入するCys(^tBu)体ペプチド量は許容範囲であると判断した。

この項における検討で、Cys(Acm)残基がCys(^tBu)残基に置換した副生成物量はTFAによる酸処理の回数に依存していることが明らかであり、ペプチドにCys(Acm)残基を導入してから行なうTFA処理回数を減らすセグメント分割法も高純度保護ペプチドを得るための選択方法の一つになるであろう。

表2-3 (39-50)位セグメントの合成中間体に混入するCys(^tBu)体ペプチド量

	TFA処理回数	Cys(^t Bu)体*
(46-50)	1	0.5
(44-50)	2	0.6
(43-50)	3	0.7
(42-50)	4	1.1
(41-50)	5	0.9
(40-50)	6	0.7
(39-50)	7	1.1

* Cys(Acm)体を100とした時の値

表2-4 各セグメントに混入するCys(^tBu)体ペプチド量

	TFA処理回数	Cys(^t Bu)体*
(51-58) Cys ⁵⁵	4	1.4
Cys ⁵⁴	3	0.9
(39-50) Cys ⁴⁷	7	1.1
(26-38) Cys ³⁴	2	0.5
(17-25) Cys ²²	5	1.0
Cys ²¹	4	0.8

* Cys(Acm)体を100とした時の値

2-2-4 セグメント縮合生成物の純度

図2-1に示した合成経路に従ってWSCI/HOObt法により(1-25)位と(26-74)位の比較的長鎖中間体を合成し、ついで両ペプチドをWSCI/HOBt法で縮合させて保護プタ[Gln⁶⁵]C5a-アナフィラトキシンを得た。この際、(1-25)位ペプチドのC末端はグリシンであることから添加剤にはHOBtを使用した。縮合反応生成物のアミノ酸分析値および元素分析値は理論値とよく一致した。この項ではHPLCによる分析を中心にしてセグメント縮合生成物の純度検定を行なったことについて述べる。なお、WSCI/HOObt法で行なったセグメント縮合時に形成されたラセミ体の分析については次の2-2-5項で述べる。

(51-58)位と(59-63)位ペプチドを縮合させた(51-63)位保護ペプチドは、プタ[Gln⁶⁵]C5a-アナフィラトキシンを構築するために合成した保護ペプチドの中で最も溶解度が低く、酢酸中の亜鉛末によりC端フェナシルエステルを脱離することは不可能であった。そこで、アセチルアセトンを用いる方法²⁶⁾で脱離することを試みた。ジメチルスルホキシド(DMSO)を溶媒としピリジン存在下に亜鉛とアセチルアセトンを加え45℃の湯浴上で反応した。脱離の経過をHPLCで追跡したところ、1回の処理では約50%程度が脱離しただけであったが同様の操作を3回繰り返すことによりフェナシルエステルの脱離が完結したことを確認した。また、(1-25)位ペプチドも酢酸に対する溶解度が低いことからアセチルアセトンを用いる方法でフェナシルエステルの脱離反応を行なった。

セグメント縮合生成物は全てトリフルオロエタノールあるいはDMSOに十分な溶解度があり保護ペプチドの純度をHPLCで分析することは可能であった。しかし、(1-25)位保護ペプチドはC端フェナシルエステルを脱離したカルボキシル基遊離ペプチドでもカラムから溶出することはできず、また、完全保護プタ[Gln⁶⁵]C5a-アナフィラトキシンの場合も同様であった。図2-7には36アミノ酸残基からなる(39-74)位保護ペプチドおよび49アミノ酸残基からなる(26-74)位保護ペプチドの純度を分析したクロマトグラムを示した。クロマトグラムから明らかなように、両保護ペプチドとも主ピークよりも短い保持時間に数多くの副次ピークを認めたが、副生成物の混入が少ないセグメントを使用してペプチド鎖を延長したことによりこのような長鎖ペプチド中間体も高純度で合成できたことを確認した。なお、(26-74)位保護ペプチドは溶離液のアセトニトリル濃度を95%にして初めて溶出することが可能となり、保護ペプチドで純度検定ができる限界は50アミノ酸残基程度の長さであることが推測された。

保護ペプチドで分析することが不可能であった(1-25)位ペプチドの純度をHFで脱保護した遊離ペプチドで分析したクロマトグラムを図2-8に示した。主ピークの前後に副生成物のピークを認めたが、その中メチオニン残基酸化体ペプチドのピークは主ピークの直前に溶出する小さなピークであり、このペプチドに混入する1位と17位メチオニン残基の酸化体はごく少量であることを確認した。

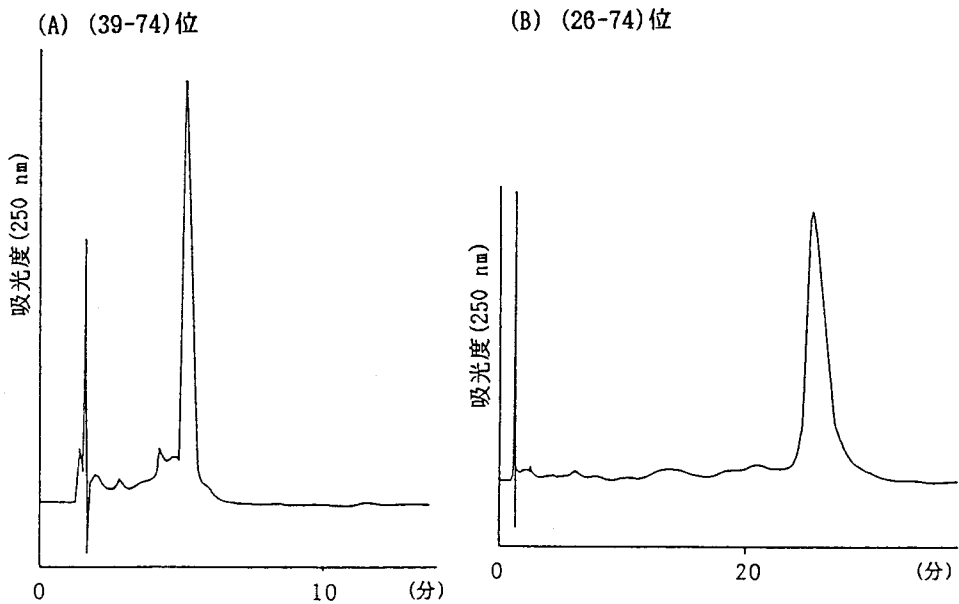


図2-7 (39-74)位と(26-74)位保護ペプチドの純度
 カラム: Nucleosil 5C₁₈ (4 X 150 mm)
 溶離液: (A) CH₃CN/H₂O/TFA(75/25/0.1), (B) CH₃CN/H₂O/TFA(95/5/0.1)
 流速: 1.0 ml/分

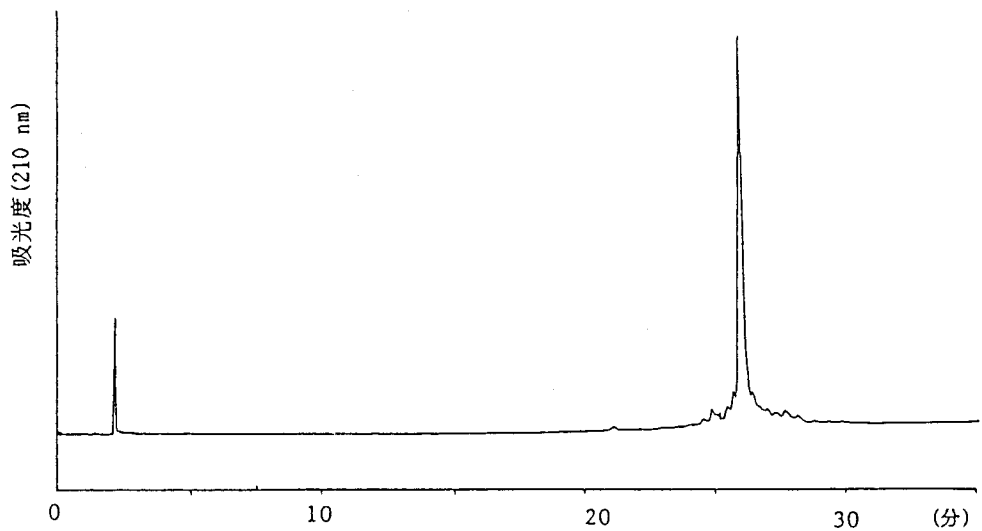


図2-8 (1-25)位遊離ペプチドの純度
 カラム: Nucleosil 5C₁₈ (4 X 150 mm)
 溶離液: (A) CH₃CN/H₂O/TFA(1/99/0.1), (B) CH₃CN/H₂O/TFA(60/40/0.1)
 直線濃度勾配法: A→B(25分)
 流速: 1.0 ml/分

2-2-5 セグメント縮合時のラセミ体の分析

保護プタ [Gln⁶⁵]C5a-アナフィラトキシンを構築するためのセグメント縮合をラセミ化の可能性のあるアミノ酸をC端として行なった場合はWSCl/HOObt法を用いた。この項では、その際にラセミ化により形成されたD体量を定量したことについて述べる。

ラセミ体検出法としては、合成ペプチドを酸水解後に誘導体化してキラールな担体を用いてガスクロマトグラフィーで調べる方法やアミノペプチダーゼなどによる酵素水解物のアミノ酸組成比から調べる方法がよく行なわれている。これらの方法は標品となるジアステレオマーペプチドを調製しなくても分析できるという長所を持つ。しかし、前者の方法では、水解時に新たにアミノ酸が一部ラセミ化するので、真のラセミ化度について議論をするためには²⁷⁾ ²⁷⁾HClで水解して質量分析により検出定量する方法²⁷⁾をとる必要がある。また、後者の方法で検討する場合には、L-アミノ酸の結合のみを選択的に水解するというアミノペプチダーゼ-M (AP-M)やカルボキシペプチダーゼ-P (CPase-P)のような酵素がD-アミノ酸の結合を完全に切断して、ラセミ化について必ずしも正確な情報を与えないことがある。その実例として、ダイノルフィン (H-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-Ile-Arg-Pro-Lys-Leu-Lys-Trp-Asp-Asn-Gln-OH) と [D-Lys¹³]-ダイノルフィンのCPase-P消化物のアミノ酸分析の結果を表2-5に示した。両者の結果はほとんど同一であり、13位リジン残基がD体であることをアミノ酸分析の結果から判断することは全く不可能であった。

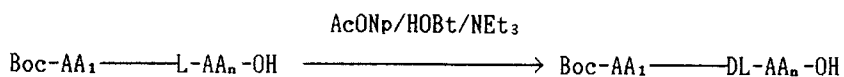
以上のような観点から、縮合時に起こるラセミ体の分析はペプチドを水解処理することなく行なう方が正確な情報が得られることは明らかであり、そのためには問題となるアミノ酸残基に関するD体の標品を合成して分析能力の大きいHPLCで比較同定するのが確実な方法である。このD-アミノ酸残基を含むペプチドの標品を調製するために、次のページに示したセグメントC端アミノ酸のみをラセミ化させそのジアステレオマーを得る方法²⁸⁾を適用した。すなわち、実際に縮合反応に用いたC端アミノ酸がL体のセグメントをDMF等の有機溶媒に溶解し、酢酸p-ニトロフェニル (AcONp) (1.1当量)、HOObt (0.25当量)およびトリエチルアミン (1.0当量)を加えて終夜反応してC端アミノ酸のみ

表2-5 ダイノルフィンおよび[D-Lys¹³]-ダイノルフィンの
CPase-P 消化によるアミノ酸分析

	Asp	Gln	Asn	Pro	Gly	Ile	Leu	Tyr	Phe	Trp	Lys	Arg
ダイノルフィン	1.01	0.98	1.04	0.95	0.48	0.99	2.00	-	0.96	1.01	2.02	3.03
[D-Lys ¹³]体	1.01	0.96	1.06	0.96	0.22	0.99	2.00	-	1.00	0.93	2.00	3.09

0.1 M 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.8) 中 30℃で24時間消化

DL残基に変換し、ついで、このジアステレオマー混合物のペプチドを対応するアミン成分と縮合させて縮合部位アミノ酸残基がジアステレオマーである標品ペプチドを調製した。



(1-10)位、(11-16)位、(26-32)位、(39-50)位および(51-58)位の各セグメントとそれらをセグメント縮合して得られた(26-38)位と(51-63)位ペプチドをAcONp/HOBtで処理し、生成したジアステレオマー混合物を遊離ペプチドおよび保護ペプチドでHPLCにより分析した。表2-6に各ペプチドのC端アミノ酸のジアステレオマーの保持時間および分離の程度を示した。なお、(26-38)位と(51-63)位ペプチドはセグメント縮合により合成したものであるが、後に述べるように、混入する32位と58位アミノ酸残基のD体はともに少量であり、これらのペプチドのC端ジアステレオマーの分析を行なうのに支障を与えることはなかった。

表から明らかのように、遊離ペプチドで分析することによりカルボキシル末端アミノ酸のL体とD体の相対的な位置関係は全て判断することができ、AcONp/HOBtで処理することにより各セグメントC端アミノ酸は確実にDL残基に変換したことを確認した。勾配溶出条件で分析した場合には、急激にアセトニトリル濃度を変化させて溶出したので、ジアステレオマーペプチドは容易には分離しなかった。単一溶出法で分析すると不十分ながらジアステレオマーを全て分離することができ、D体がL体の前に溶出したのは、(51-63)位、(51-58)位および(39-50)位ペプチドであり、残りの(26-38)位、(26-32)位、(11-16)位および(1-10)位ペプチドはそれとは逆にL体がD体の前に溶出した。なお、(51-63)位ペプチドのC端ジアステレオマーはTFAを添加した溶離液を用いて分析した場合には分離せず、食塩を含む緩衝液で溶出することによりC端アミノ酸がDL残基に変換したことを確認した。

C端アミノ酸残基のジアステレオマーを保護ペプチドで分析した場合には、遊離ペプチドの分析と比較すると分離効率は若干低下した。しかし、(26-32)位および(26-38)位ペプチドの分析は保護ペプチドで行なった方が分離は良好であった。この分析方法におけるC端アミノ酸残基のジアステレオマーの溶出順序に注目すると、全ての例においてD体がL体の後に溶出していた。この傾向は著者の別の実験でhGRFの(1-7)位セグメント(C端アミノ酸はベンジル基で保護したスレオニン残基)および(16-22)位セグメント(C端アミノ酸はロイシン残基)でも確認されている。

ついで、このジアステレオマー混合物をそれぞれ対応するアミン成分のペプチドと WSCI/HOBt法で縮合させ、得られたジアステレオマー混合物を標品としてセグメント縮合時に生成したD体量を定量した。表2-7に遊離ペプチドおよび保護ペプチドで分析した標品ジアステレオマーペプチドの溶出時間を示した。

遊離ペプチドのジアステレオマー混合物をTFAを添加した溶離液で分析すると、(51-63)位ペプチド中の58位アラニン残基および(26-38)位ペプチド中の32位グルタミン酸残基のジアステレオマーの2例を除きそれらは容易に分離した。(51-63)位ペプチドをこの条件で分析すると、D体はL体のピークの後部の肩の位置に溶出して分離の傾向を示したが(図2-9)、溶離液のアセトニトリル濃度を減少してピークの溶出位置を遅らせ

表2-6 各セグメントC端アミノ酸残基のジアステレオマーの分離

	遊離ペプチド				保護ペプチド	
	勾配溶出 ^{*1}		単一溶出		L	D
	L	D	L	D		
(51-63)位	23.8分 (全く分離せず)	23.8分	12.0分	11.6分 ^{*2} (ピークの頂上は分離)	3.9分	4.0分 ^{*3} (わずかに分離)
(51-58)位	24.7分 (完全に分離)	23.8分	—————		5.9分	6.6分 ^{*3} (ほぼ完全に分離)
(39-50)位	22.0分 (全く分離せず)	22.0分	10.5分	9.7分 ^{*4} (ほぼ完全に分離)	5.9分	6.2分 ^{*5} (ピークの頂上は分離)
(26-38)位	19.0分 (全く分離せず)	19.0分	9.4分	9.5分 ^{*6} (わずかに分離)	7.7分	8.2分 ^{*7} (ほぼ完全に分離)
(26-32)位	16.5分 (全く分離せず)	16.5分	5.8分	6.0分 ^{*8} (ピークの頂上は分離)	8.0分	9.2分 ^{*3} (完全に分離)
(11-16)位	19.4分 (完全に分離)	20.1分	—————		6.3分	6.6分 ^{*7} (ピークの頂上は分離)
(1-10)位	19.9分 (わずかに分離)	21.1分	5.4分	5.9分 ^{*4} (ほぼ完全に分離)	8.7分	8.7分 ^{*7} (全く分離せず)

—— : 溶出せず, *1: 0.1% TFA 中アセトニトリルの直線濃度勾配(1→60%),
 *2: 17.5% CH₃CN/0.1 M NaCl (pH 2.4), *3: CH₃CN/H₂O/TFA(70/30/0.1),
 *4: CH₃CN/H₂O/TFA(15/85/0.1), *5: CH₃CN/H₂O/TFA(65/35/0.1),
 *6: CH₃CN/H₂O/TFA(12/88/0.1), *7: CH₃CN/H₂O/TFA(80/20/0.1),
 *8: CH₃CN/H₂O/TFA(7/93/0.1)

てもジアステレオマーの分離が改善されることはなく、縮合時に生成したD体量を定量するための分析条件としては不十分であった。そこで、ジアステレオマーが良好に分離する溶離液を検索した。検討した緩衝液は、A) 0.1 M NaCl (pH 2.4), B) 50mM 硫酸ナトリウムを含む10mM リン酸緩衝液 (pH 2.6), C) 0.1 M リン酸緩衝液 (pH=3.8, 4.5, 4.9, 6.0)である。A)およびB)の緩衝液で溶出した場合にはTFAを添加した溶離液で溶出した場合よりもジアステレオマーの分離は悪化した。しかし、比較的pHの高いC群のリン酸緩衝液を用いた場合にはジアステレオマーの分離はかなり改善された。その中最も良好な分離が得られたpH=4.9のリン酸緩衝液で溶離したクロマトグラムを図2-9に示した。この分析条件においてもジアステレオマーの分離は完全でないことから縮合時に生成したD体量を直接定量することは困難であった。そこで、縮合生成物のクロマトグ

表2-7 セグメント縮合時に生成するジアステレオマーペプチドの分離

セグメント		遊離ペプチド		保護ペプチド	
		L	D	L	D
(51-63)位	DL-Ala ⁵⁸	9.2 分	10.2 分 ^{*1}	6.0 分	6.0 分 ^{*2}
		(ほぼ完全に分離)		(全く分離せず)	
(26-38)位	DL-Glu ³²	8.5 分	8.5 分 ^{*3}	8.0 分	11.0 分 ^{*4}
		(全く分離せず)		(完全に分離)	
(51-74)位	DL-Ala ⁶³	13.0 分	7.5 分 ^{*5}	8.3 分	7.0 分 ^{*6}
		(完全に分離)		(完全に分離)	
(39-74)位	DL-Ala ⁵⁰	13.3 分	10.9 分 ^{*7}	5.0 分	5.0 分 ^{*8}
		(完全に分離)		(全く分離せず)	
(26-74)位	DL-Ala ³⁸	15.2 分	12.0 分 ^{*7}	26.0 分	23.0 分 ^{*9}
		(完全に分離)		(完全に分離)	
(11-25)位	DL-Ala ¹⁶	14.9 分	13.0 分 ^{*10}	18.0 分	16.0 分 ^{*8}
		(完全に分離)		(完全に分離)	
(1-25)位	DL-Ala ¹⁰	27.0 分	18.0 分 ^{*7}	溶出されず	
		(完全に分離)			

*1: 15% CH₃CN/0.1 M リン酸緩衝液 (pH 4.9),

*2: CH₃CN/H₂O/TFA (70/30/0.1),

*3: CH₃CN/H₂O/TFA (12/88/0.1),

*4: CH₃CN/H₂O/TFA (80/20/0.1),

*5: CH₃CN/H₂O/TFA (21/79/0.1),

*6: CH₃CN/H₂O/TFA (75/25/0.1),

*7: CH₃CN/H₂O/TFA (24/76/0.1),

*8: CH₃CN/H₂O/TFA (90/10/0.1),

*9: CH₃CN/H₂O/TFA (95/ 5/0.1),

*10: CH₃CN/H₂O/TFA (17/83/0.1)

ラムと縮合生成物にジアステレオマーの標品を種々の比率で混合して共溶出したクロマトグラムとを比較することにより58位アラニン残基のラセミ化度の最大値を求めた。

セグメント縮合部位アミノ酸残基のジアステレオマー混合物を保護ペプチドで分析した場合には、(51-63)位および(39-74)位ペプチドはそれらが全く分離せず、また、(1-25)位ペプチドは先に述べたようにカラムから溶出することはできなかったが、他の4例ではジアステレオマーが明瞭に分離した。特に(26-38)位ペプチドの場合は、遊離ペプチドで分析すると32位グルタミン酸残基のジアステレオマーは全く分離しなかったが、保護ペプチドではそれらは明瞭な分離を示した(図2-10)。また、ペプチド鎖が長い(26-74)位におけるジアステレオマーの分離の方が(39-74)位ペプチドの分離よりも良好であったことから、この分析法におけるジアステレオマーの分離の良否は必ずしもペプチドの長さにはよらないことを認識した。

D体とL体の溶出順序に着目すると、遊離ペプチドと保護ペプチドの分析で1例ずつの例外を除き全てD体がL体の前に溶出した。この挙動と表2-6に示したC端アミノ酸のジアステレオマーの溶出順序間に相関関係は認められなかった。特に保護ペプチドで溶出した場合には、C端アミノ酸のジアステレオマーは全てD体がL体の後に溶出したにもかかわらず、それらをセグメント縮合させた大部分のペプチドの溶出順序は逆転した。

セグメント縮合反応生成物に混入するD体量を表2-8に示した。1例を除き遊離ペプチドの分析から求めた値であるが、対応する保護ペプチドの分析でもジアステレオマーが分離した場合にはそのクロマトグラムからも混入するD体量を求め同等の結果を得た。表から明らかなように、セグメント縮合時に形成されたD体量は約1%かそれ以下

表2-8 セグメント縮合生成物に混入するD体量

		D (%) [*]
(51-63)位	(51-58) + (59-63)	1.0
(26-38)位	(26-32) + (33-38)	0.5 ^{**}
(51-74)位	(51-63) + (64-74)	1.1
(39-74)位	(39-50) + (51-74)	0.7
(26-74)位	(26-38) + (39-74)	1.0
(11-25)位	(11-16) + (17-25)	0.6
(1-25)位	(1-10) + (11-25)	0.5

* L体の量を100とした時の値

** 保護ペプチドのクロマトグラムから決定

の値であり無視しうるラセミ化度といえる。比較的大きな値が検出されたのは縮合させるペプチドが反応溶媒に溶解しにくかった場合である。

以上のように、WSCl/HOObt法による縮合反応で形成されたD体は全て少量であり、カルボジイミド系縮合剤を使用してセグメント縮合を行なう場合にはラセミ化を抑制するための添加剤として HOObtを使用すべきであることを確認した。

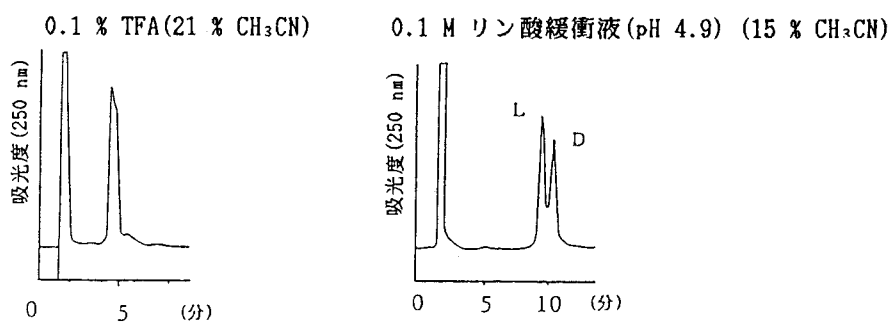


図2-9 (51-63)位遊離ペプチドにおける58位アラニン残基のジアステレオマーの分離

カラム: Nucleosil 5C₁₈ (4 X 150 mm)

溶離液: クロマトグラム上部に表示

流速: 1.0 ml/分

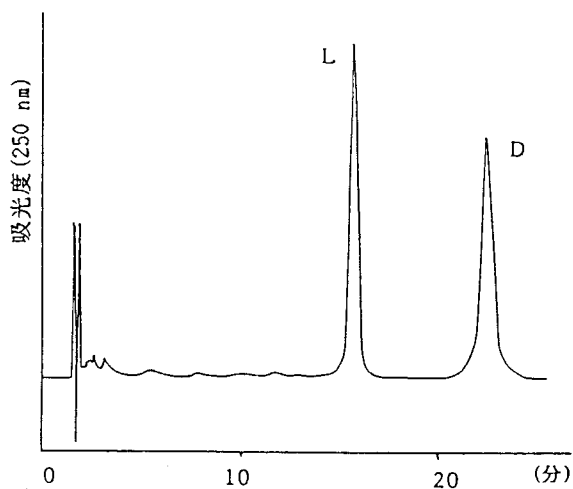


図2-10 (26-38)位保護ペプチドにおける32位グルタミン酸残基ジアステレオマーの分離

カラム: Nucleosil 5C₁₈ (4 X 150 mm)

溶離液: CH₃CN/H₂O/TFA(80/20/0.1)

流速: 1.0 ml/分

3章 プタ [Gln⁶⁵] C5a-アナフィラトキシンの合成

3-1 [6AcM]体遊離ペプチドの純度と精製

HF処理の際に起こる副反応の1つであるメチオニン残基の^tBu化²⁹⁾を避けるために、保護プタ [Gln⁶⁵]C5a-アナフィラトキシンをTFAで処理してN端 Boc基を脱離した。このペプチドをp-クレゾール存在下、HFで-4℃、60分間処理しAcM基を除く全ての保護基を除去した。この時HFと添加剤の比率は9:1に設定した。図3-1上部にはHPLCで検定したHF処理直後の[6AcM]体粗ペプチドの純度を示した。クロマトグラム上、鋭い主ピークとその後に溶出する多くのピークが検出された。しかし、主ピークよりも前に溶出するピークはほとんど認められず、保護プタ [Gln⁶⁵]C5a-アナフィラトキシン分子中に存在する2残基のメチオニンが酸化されたペプチドはほとんど混入しないことを確認した。

長鎖保護ペプチドをHF処理する場合、-4℃で60分間反応を行なっても全ての保護基が完全には切断されず一部の保護基が残存したペプチドが混入してHPLCのクロマトグラム上主ピークより遅れて溶出する可能性がある。そこで、下で述べるカルボキシメチルセルロース (CMC)による精製の際に目的物よりも塩濃度が高い領域に溶出した画分のペプチド (HPLCによる分析では目的物の溶出位置以降に台地状のピークを認めた)を初めと同じ条件で再度HF処理し、その前後でHPLCのクロマトグラムを比較した。しかし、HFで再処理したペプチドのクロマトグラムに顕著な差は認められず、目的物のピークよりも遅れて溶出する数多くの副生成物のピークはHFによる保護基脱離反応が不完全なために生じたものではなく、合成途上あるいはHF処理時にペプチドに何等かの修飾が起こって生じたペプチドの混合物であることを確認した。

[6AcM]体粗ペプチドを CMCを担体としたイオン交換クロマトグラフィにより精製した。溶出は、3 M 尿素を添加した0.05 M 酢酸アンモニウム緩衝液 (pH 5.3)と 0.45 M 酢酸アンモニウム緩衝液 (pH 6.0)を用いて直線型濃度勾配にて行なった。その際のクロマトグラムを図3-2に示した。HPLCで純度を検定して目的物の画分を集め、ダイアイオン HP-20により脱塩して [6AcM]体ペプチドを25%の収率で得た。図3-1下部にはCMCで精製したペプチドの純度を示した。粗ペプチドで検出された主ピークよりも遅れて溶出する不純物のピークはこの一段階の精製のみでほとんど除くことができ、ピークがわずかに尾を引くとともに主ピークから離れた場所に小ピークが残存する純度であった。

この[6Ac_m]体ペプチドをトリプシン処理後アミノペプチダーゼ-M (AP-M)消化してアミノ酸分析を行なった結果を表3-1に示した。Gly-Pro構造が完全に水解されずにロイシン付近に重なって検出され、また、アルギニン残基はAP-Mに混入する酵素により完全にシトルリン (Cit)に変換されてグルタミン酸と同一の位置に溶出したが、その他のアミノ酸の分析値は予想値とほぼ一致した。

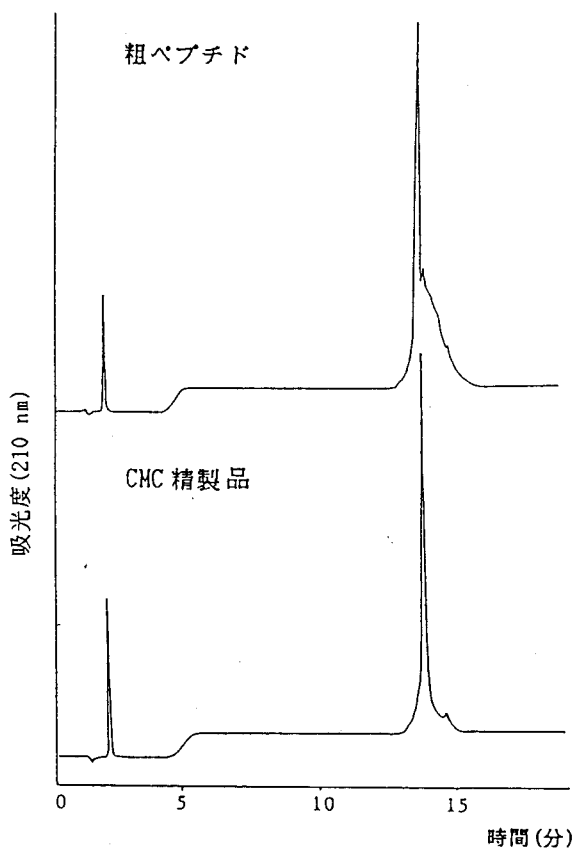


図3-1 [6Ac_m]体粗ペプチドおよびCMC精製ペプチドの純度

カラム: Nucleosil 5C₁₈ (4 X 150 mm)

溶離液: (A) CH₃CN/H₂O/TFA (1/99/0.1), (B) CH₃CN/H₂O/TFA (50/50/0.1)

直線濃度勾配法: A→B (20分)

流速: 1.0 ml/分

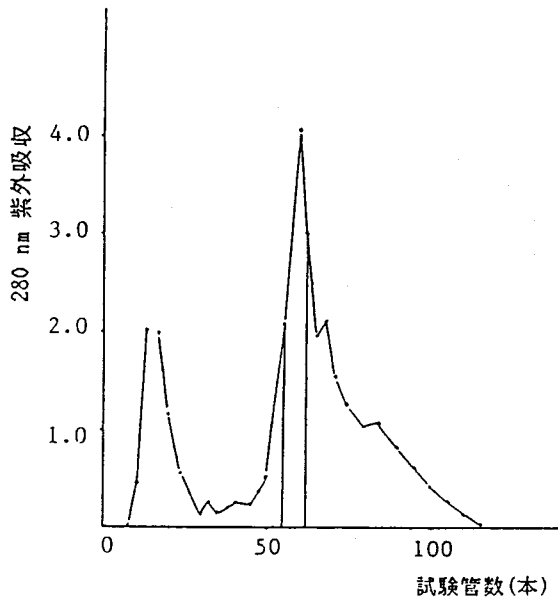


図3-2 CMCによる[6Acm]体ペプチドの精製

表3-1 CMCにより精製した[6Acm]体ペプチドのAP-M水解アミノ酸分析

Cys(Acm) (6)	Asp(4)	Gln(4)+Thr(1)	Ser(1)	Asn(3)	
6.40	3.72	4.70	1.32	2.76	
Glu(7)+Cit(5)	Pro(1)	Gly(3)	Ala(9)	Val(2)	Met(2)
10.80	0.49	2.47	8.64	2.00	2.00
Ile(5)	Leu(3)	Tyr(5)	Phe(1)	Lys(11)	His(1)
5.95	3.78	5.10	0.97	11.22	0.83

Cit : シトルリン(本文参照)

3-2 アセトアミドメチル(Acm)基の脱離

CMCにより精製した[6Acm]体ペプチドを5%酢酸水に溶かし、5当量の酢酸第二水銀を添加して窒素気流下室温で5.5時間反応して全てのAcm基を脱離した。反応液にβ-メルカプトエタノール(β-ME)を加えて水銀との錯体を沈殿させ、10℃の部屋に終夜放置後セファデックス G-25を担体としたゲルろ過クロマトグラフィーにより水銀を除去した。ペプチドのピークは水銀とβ-MEの錯体のピークと完全に分離したが、水銀の除去

を確実にするために 再度 β -MEを加えてゲルろ過クロマトグラフィーを繰り返した。図3-3にはHPLCで検定したヘキサヒドロ体ペプチドの純度を示した。[6AcM]体ペプチドの溶出位置にピークは認められず、また、目的物は鋭い主ピークとして検出された。しかし、主ピーク直前に[6AcM]体ペプチドのクロマトグラムでは認められなかったピークが観察された。3-3項で述べるように、この副次ピークはメチオニン残基が酸化した副生成物によるものであり、[6AcM]体ペプチドにメチオニン残基酸化体は混入しないことを確認してあることから、酢酸第二水銀で AcM基を脱離する間にこの副生成物が生成したことは明らかである。ヨウ素で処理することにより AcM基を切断すると同時にジスルフィド結合形成反応を行なう場合にもメチオニン残基が酸化することが知られているが、ジスルフィド結合形成後にメチオニン残基酸化体を還元することは可能であり、また、複数のスルフィドリル基を持つペプチドを精製することは困難であることが予想されることから、そのままジスルフィド結合形成反応に進んだ。

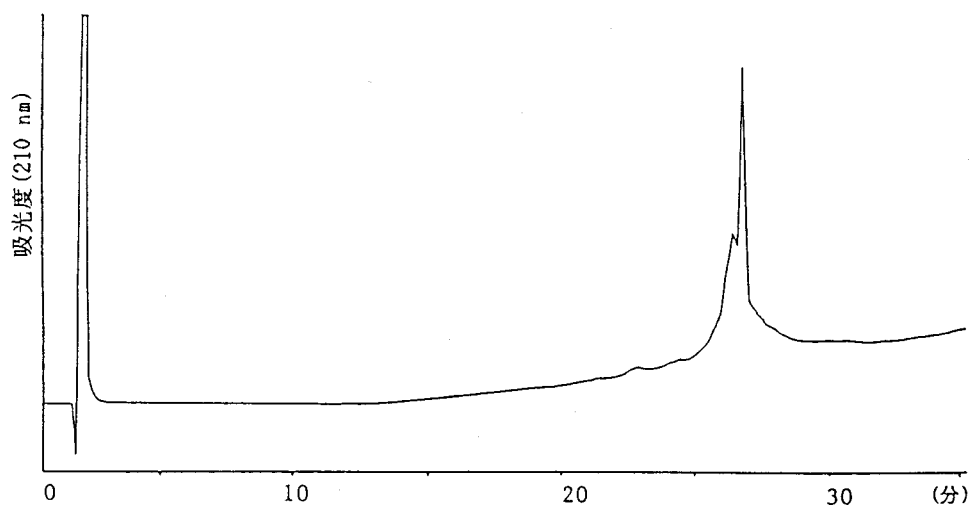


図3-3 ヘキサヒドロ体ペプチドの純度

カラム: Nucleosil 5C₁₈ (4 X 150 mm)

溶離液: (A) CH₃CN/H₂O/TFA(1/99/0.1), (B) CH₃CN/H₂O/TFA(60/40/0.1)

直線濃度勾配法: A→B(25分)

流速: 1.0 ml/分

3-3 3組のジスルフィド結合の形成：ブタ [Gln⁶⁵]C5a-アナフィラトキシンの合成

上述のようにして得たヘキサヒドロ体ペプチドを空気酸化することにより分子内に3組のジスルフィド結合を形成させるための条件を検討した。反応温度およびペプチド濃度は既にある報告³⁰⁾を参考にして、それぞれ、5℃、 1×10^{-5} Mに設定した。ペプチドを溶解する緩衝液はpHを7~8に設定している場合が多い。そこで、pH 7.1、7.5および7.7の3種類の0.1 M 酢酸アンモニウム緩衝液中でジスルフィド結合形成反応を行ない、この反応へのpHの影響を検討した。反応の時間変化をHPLCで追跡したクロマトグラムを図3-4に示した。明らかにpHが高いほど反応は速やかに進行し、3種類の溶媒間の反応速度に約1日ずつの差が観察された。pH=7.1の溶媒は反応が遅いことから除外され、残りの溶媒のうち保持したジスルフィド結合の安定性を考慮しpHの低い7.5の緩衝液を反応溶媒として選択した。なお、pH=7.7の溶媒中3日間反応後のクロマトグラムに認められる主ピーク直前に溶出する副次ピークは、スルフヒドリル基が残存するペプチドのピークではなく、メチオニン残基酸化体由来することを過酸化水素による酸化実験あるいはヨウ化アンモニウムによる還元実験により確認した。

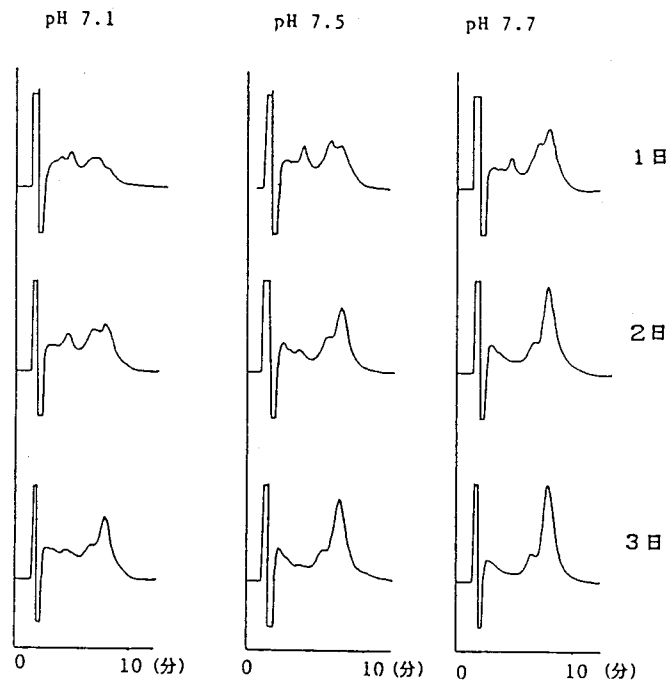


図3-4 ジスルフィド結合形成反応へのpHの影響

カラム：Nucleosil 5C₁₈ (4 X 150 mm)

溶離液：CH₃CN/H₂O/TFA(29/71/0.1)

検出法：210 nm 紫外吸収，流速：1.0 ml/分

以上のようにして設定した条件でジスルフィド結合形成反応を行なったクロマトグラムを図3-5に示した。この場合は図3-4の分析条件とは違いヘキサヒドロ体ペプチドの変化も確認できる勾配溶出条件で分析した。反応を開始後15分経過するとクロマトグラム上数多くのピークが広い保持時間の範囲に認められ、1日経過した段階で全体が保持時間の短い所に移動するとともに1本の主ピークが現われた。反応が進行するに従いそのピークが徐々に高くなりついで鋭くなった。5日後にはHPLCのクロマトグラムに変化が認められなくなり、また、Ellman試験による遊離スルフィド基の定量結果もこの段階で陰性となったことからジスルフィド結合形成反応が完結したことを確認した。以上のことから5日後に反応を終了とし、凍結乾燥後、Nucleosil 5C₁₈を担体とした逆相HPLCで精製して目的とするブタ[Gln⁶⁵]C5a-アナフィラトキシンを10%の収率で得た。合成品を2種類のHPLCで分析した結果を図3-6と3-7に示した。

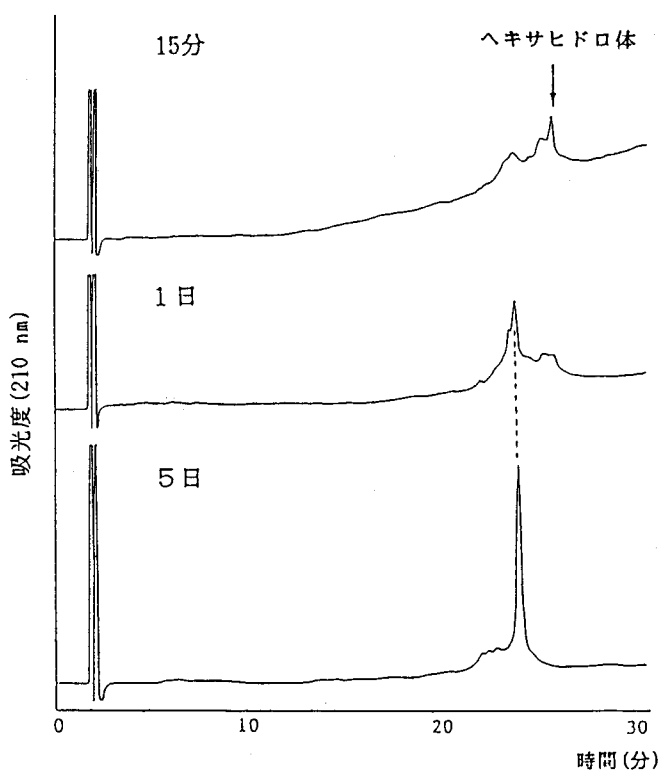


図3-5 ジスルフィド結合形成反応の時間変化

カラム：Nucleosil 5C₁₈ (4 X 150 mm)

溶離液：(A) CH₃CN/H₂O/TFA(1/99/0.1), (B) CH₃CN/H₂O/TFA(60/40/0.1)

直線濃度勾配法：A→B(25分)

流速：1.0 ml/分

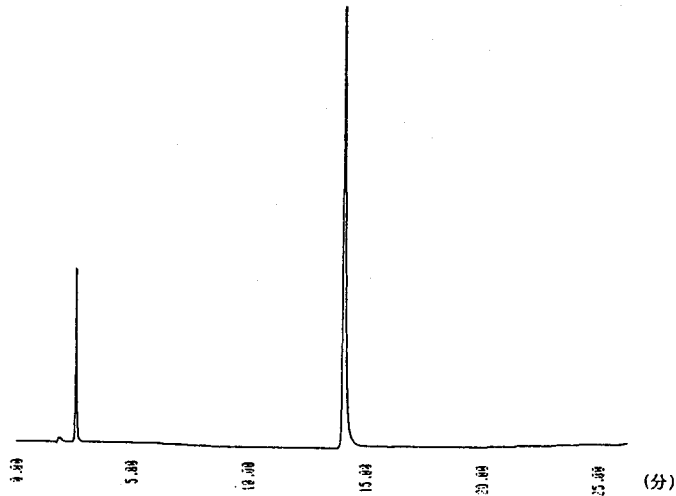


図3-6 合成ブタ [Gln⁶⁻¹⁵]C5a-アナフィラトキシンの逆相HPLCによる分析
 カラム : YMC-Pak A-302 ODS (4.6 X 150 mm)
 溶離液 : CH₃CN/0.1 M NaCl (pH 2.4); (A) (10/90), (B) (60/40)
 直線濃度勾配法 : A→B (25分)
 検出法 : 210 nm 紫外吸収, 流速 : 1.0 ml/分

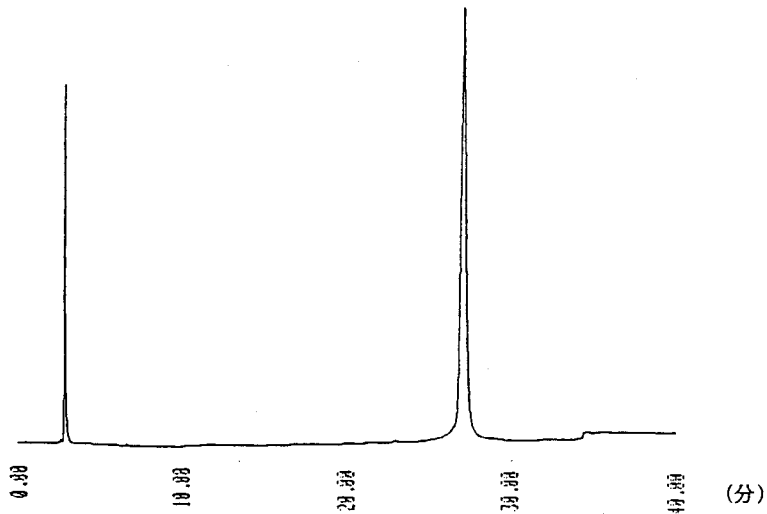


図3-7 合成ブタ [Gln⁶⁻¹⁵]C5a-アナフィラトキシンのイオン交換HPLCによる分析
 カラム : TSK-Gel CM-2SW (4.6 X 250 mm)
 溶離液 : A) 10 % CH₃CN/20 mM Pi (pH 6.0)
 B) 10 % CH₃CN/20 mM Pi (pH 7.0) + 0.5 M NaCl
 直線濃度勾配法 : 20 % B)→60 % B) (25分)
 検出法 : 220 nm 紫外吸収, 流速 : 0.8 ml/分, 温度 : 42℃

3-4 合成プタ [Gln⁶⁵]C5a-アナフィラトキシンの構造の確認

図3-6と3-7に示したように、合成プタ [Gln⁶⁵]C5a-アナフィラトキシンは2種類のHPLCによる分析系で高純度であることを確認した。この項ではアミノ酸分析、分子量測定、トリプシン消化、ヒトC5a-アナフィラトキシン単クローン性抗体との交叉性および生物活性測定により合成ペプチドの純度や構造を確認したことについて述べる。

3-4-1 アミノ酸分析

表3-2には合成ペプチドの6N 塩酸水解物のアミノ酸分析値を示した。酸水解時に分解するアミノ酸の回収量が若干低いが生ずる以外は予想値とよく一致した。

表3-2 合成プタ [Gln⁶⁵]C5a-アナフィラトキシンのアミノ酸分析

Asp(7)	Thr(1)	Ser(1)	Glu(11)	Pro(1)	Gly(3)	Ala(9)	Cys(6)	Val(2)
7.14	0.98	1.03	11.22	0.98	3.52	9.81	4.92	1.88
Met(2)	Ile(5)	Leu(3)	Tyr(5)	Phe(1)	Lys(11)	His(1)	Arg(5)	
1.68	4.60	2.82	4.20	1.00	10.34	0.99	5.00	

3-4-2 分子量測定

合成ペプチドのジスルフィド結合が分子間ではなく分子内に保持することを確認するために分子量を2種類の方法で測定した。

一つの方法は、ゲル浸透クロマトグラフィー (GPC) によるものである。分子量の指標には牛血清アルブミン、 β -および α -心房性ナトリウム利尿ペプチド (β -, α -hANP)、アンジオテンシン II、ロイシンエンケファリンを用いた。対数目盛りでとった分子量を縦軸に、保持時間(分)を横軸にとって各ペプチドの点を結んで得られる直線から、ペプチドの分子量の対数(Y)は保持時間(X)を変数として、 $Y = -0.340X + 9.083$ ($r = -0.9958$) の関係が得られ、この式から未知のペプチドの分子量を推定することができる(図3-8)。合成ペプチドは15.00分に溶出したことから分子量を求めると約1万という値が得られた。この値は分子式から計算した8603と近似した。

もう一つの方法はポリアクリルアミドゲル電気泳動によるものである。図3-9に結果を示したが、 β -メルカプトエタノールを使用しない非還元条件で行なったものである。粗ペプチドで主バンドの前後に認められた副バンドは精製過程で確実に除去されたことが確認された。分子量の指標はファルマシア社低分子量用標準物質を用いたが、合成プタ [Gln⁶⁵]C5a-アナフィラトキシンは、その中で最も小さい分子量の蛋白質である α -ラクトアルブミン(分子量 14400)よりも低分子量にバンドが検出され、推定分子量は約1万であった。なお、この分析は大阪大学医学部の井上公蔵教授、竹田潤二博士により行なわれたものである。

以上のように、合成ペプチドの分子量は2種類の方法で約1万であるという結果が得られ、合成ペプチド [Gln⁶⁵]C5a-アナフィラトキシンは分子内でジスルフィド結合を保持し分子間ジスルフィド結合を含まないことを確認した。

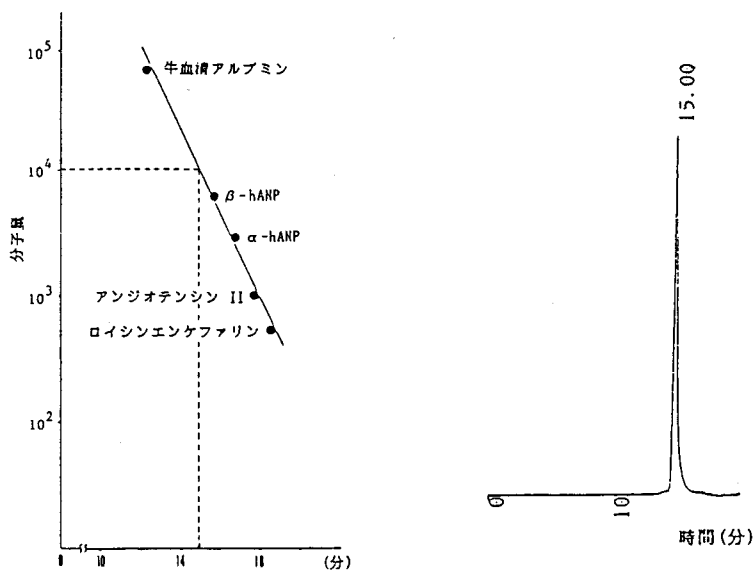


図3-8 ゲル浸透クロマトグラフィーによる合成ペプチド [Gln⁶⁵]C5a-アナフィラトキシンの分子量測定
 カラム: Shim Pac Diol-150 (7.9 X 500 mm)
 溶離液: 30 % CH₃CN/10 mM リン酸緩衝液 (pH 6.5) + 0.2 M 硫酸ナトリウム
 検出法: 280 nm 紫外吸収, 流速: 1.0 ml/分

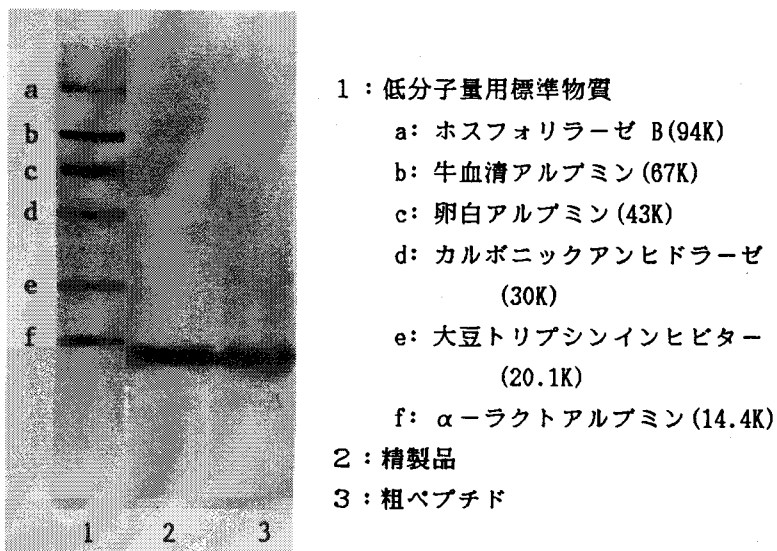


図3-9 合成ペプチド [Gln⁶⁵]C5a-アナフィラトキシンのポリアクリルアミドゲル電気泳動図

3-4-3 トリプシン消化

合成品の構造を確認するためにトリプシン消化物をHPLCで分析した(図3-10)。酵素反応は0.1Mリン酸緩衝液(pH 6.5)中、酵素とペプチドの量比を1/10として、37℃、5時間行なった。クロマトグラム上数字の頭にTを付けて表示した各ピークの構造を図3-11に示した。図に示した各ピークの構造の同定および下で述べるシステイン残基を含むピークの構造解析はアミノ酸分析あるいはEdman分解による一次構造分析により行なった。なお、本研究におけるEdman分解による一次構造分析は、宮崎医科大学松尾寿之教授、寒川賢治博士により行なわれたものである。

保持時間19分より前に溶出するピークのペプチドの構造はアミノ酸分析により同定した(表3-3)。塩基性アミノ酸が2残基連続する構造が2箇所(4位と5位および19位と20位)あるが、ともに塩基性アミノ酸間で優先的に切断が起こった。それ故、同定の図に示したT2, T7の溶出位置を確認することはできずクロマトグラムには表示してない。また、T3のN端リジン残基が切断して生成するT4のピークは時間的に遅れて出現した。52位リジン残基は酸性アミノ酸のアスパラギン酸と結合することからトリプシンによる水解を受けにくく、リジン残基カルボキシル側結合が切断して生成するT15の回収率は低かった。

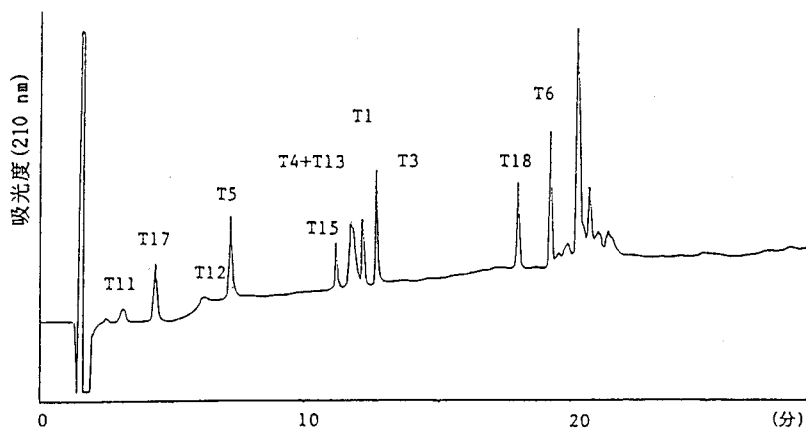


図3-10 合成ペプチド [Gln⁶⁵]C5a-アナフィラトキシンのトリプシン消化ペプチドマップ

カラム: Nucleosil 5C₁₈ (4 X 150 mm)

溶離液: (A) CH₃CN/H₂O/TFA(1/99/0.1), (B) CH₃CN/H₂O/TFA(30/70/0.1)

直線濃度勾配法: A→B(25分), 流速: 1.0 ml/分

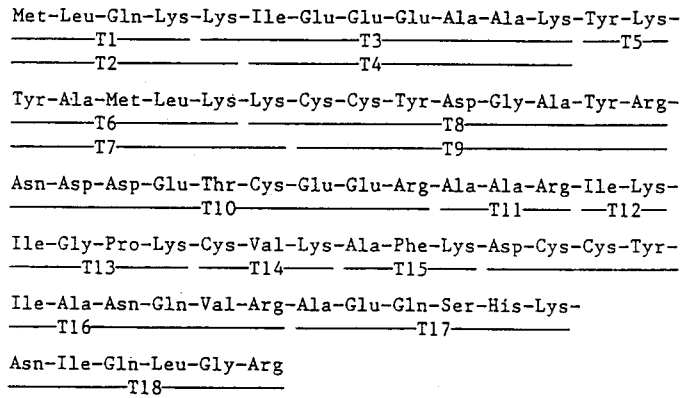


図3-11 トリプシン消化フラグメントの同定

表3-3 トリプシン消化フラグメントのアミノ酸分析

	T1	T3	T4	T5	T6	T11	T12	T13	T15	T17	T18
Asp											1.05
Ser										1.01	
Glu	1.09	3.03	3.00							2.00	1.00
Pro								1.00			
Gly								0.99			0.88
Ala		2.00	1.76		1.31	2.22			1.14	1.06	
Met	0.68				0.78						
Ile		0.91	1.36				1.04	1.00			0.88
Leu	1.00				1.00						0.93
Tyr				0.82	1.00						
Phe									0.94		
Lys	1.19	1.98	1.00	1.00	1.05		1.00	1.00	1.00	1.06	
His										0.97	
Arg						1.00					0.99

保持時間19分から22分にかけて認められた複数のピークはジチオスレイトール (DTT) 処理により移動することから全てシスチン残基を含む。ブタC5a-アナフィラトキシン分子中の6残基のシステインは4部分のペプチドに分かれて存在するが, Zimmermannらにより決定された保持様式で3組のジスルフィド結合により全てが連結している。図3-10のクロマトグラム上保持時間20.2分に溶出するシスチン残基を含む最も大きなピークのペプチドを単離しその一次構造をEdman分解で調べた。その結果, 主ピークのペプチドは図3-11に示したT8の(20-28)位, T10の(29-37)位, T14の(47-49)位およびT15とT16の間が水解されていない(50-62)位ペプチドから構成される図3-12に示したフラグメントであることがわかった。すなわち, トリプシン消化が完結すれば切断される20位リジン残基および(50-52)位ペプチドが切断されていないフラグメントであった。その他のシスチン残基を含む複数のピークはトリプシン消化時間を長くすると増加する傾向が観察された。そこで, 構造が明らかにされたシスチン残基を含む主ピークのペプチドを単離しトリプシン消化を2時間継続した。その際のクロマトグラムの変化を図3-13に示した。トリプシン消化を継続することによりHPLC上単一であったピークからその前後に小さなピークが多数生成し, そのパターンは図3-10に示したシスチン残基を含むペプチドの領域と全く同一であった。また, クロマトグラム上保持時間11分にはAla-Phe-Lysの構造を持つT15のピークも生成した。酵素消化を行なった緩衝液にペプチドを溶解後37℃に放置しても純度に変化が認められないことを確認してあることから, シスチン残基を含むトリプシン消化フラグメントの領域が複雑であるのは, ジスルフィド結合保持様式が異なる複数のペプチドが溶出するためではなく, トリプシンによる切断様式が異なるフラグメントが溶出するためであると結論した。また, 詳しくは4章で示すが, 天然ブタC5a-アナフィラトキシンをトリプシン消化した場合もシスチン残基を含むフラグメントの領域には複数のピークが認められ, そのパターンは合成品と全く同一であった。このことは合成ペプチドのジスルフィド結合保持様式が天然物のそれと同一であることを示している。

以上のことから 合成ブタ[Gln⁶⁵]C5a-アナフィラトキシンの構造はジスルフィド結合保持様式を含めて単一であることを確認した。なお, 図3-12に示した天然型のジスルフィド結合保持様式を有するトリプシン消化フラグメントを合成し, 合成ブタ[Gln⁶⁵]C5a-アナフィラトキシンのジスルフィド結合保持様式を確認したことについて次の3-4-4項で述べる。

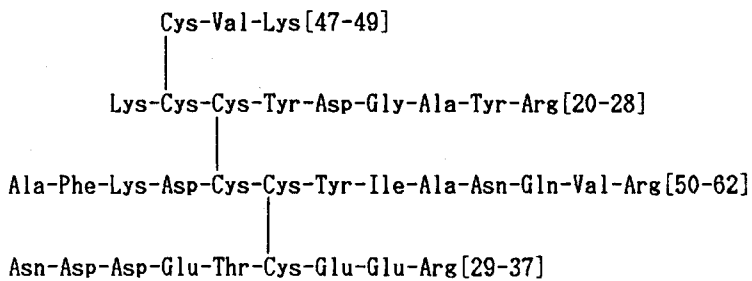


図3-12 シスチン残基を含むトリプシン消化フラグメント主生成物の構造
(ジスルフィド結合保持様式はZimmermannらの決定による)

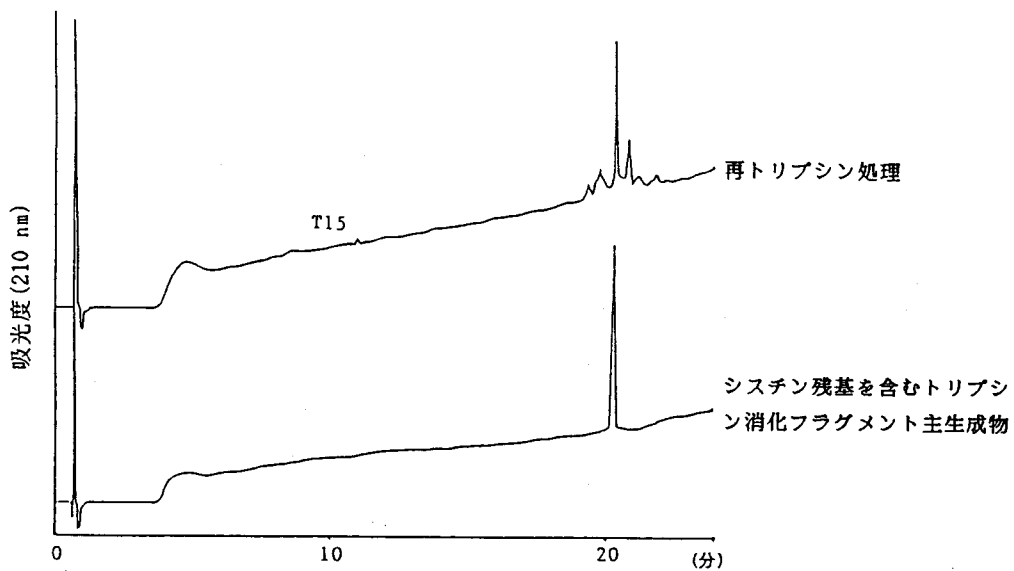


図3-13 シスチン残基を含むトリプシン消化フラグメント主生成物の
再トリプシン処理
分析条件：図3-10と同一

3-4-4 シスチン残基を含むトリプシン消化フラグメントの合成：

合成によるジスルフィド結合保持様式の確認

合成ペプチド [Gln⁶⁵]C5a-アナフィラトキシンをトリプシン処理すると、シスチン残基を含むフラグメントの主生成物は、4部分のペプチドフラグメントが3組のジスルフィド結合で連結した図3-12に示した構造であることを既に述べた。天然ペプチドC5a-アナフィラトキシンのジスルフィド結合保持様式はZimmermannらにより、21位と47位、22位と54位、34位と55位シスチン残基間に保持することが明らかにされている。また、4章で述べるように、合成ペプチドと天然ペプチドのジスルフィド結合保持様式は同一であることが確認されている。この項では図3-12に示した一次構造並びにジスルフィド結合保持様式を持つトリプシン消化フラグメントを合成し、それを合成ペプチド [Gln⁶⁵]C5a-アナフィラトキシンのトリプシン消化ペプチドマップで認められる主ピークと比較することにより合成ペプチドのジスルフィド結合保持様式を確認したことについて述べる。

合成したトリプシン消化フラグメントは(47-49)位、(20-28)位、(50-62)位および(29-37)位の4部分のペプチドにより構成されている。この4本鎖ペプチド間に3組のジスルフィド結合を保持するフラグメントを合成するために次の2点が要求される。

- [1] ペプチド鎖間に選択的にジスルフィド結合を形成させる。
- [2] 既に保持するジスルフィド結合に影響を与えずに新たにジスルフィド結合を形成させる。

[1]の条件に適合するシスチン残基保護基として3-ニトロピリジン-2-スルフェニル(Npys)基³³⁾を選択した。図3-14に示すように、この保護基は遊離スルフィド基が共存すると除去されると同時に混合ジスルフィド結合を形成させることが知られている。すなわち、この反応により異なった分子に存在するシスチン残基間に選択的にジスルフィド結合を形成させることが可能である。著者は2本鎖のペプチド間に2組のジスルフィド結合を保持するヒトβ-心房性ナトリウム利尿ペプチド(β-hANP)の合成にこの保護基を適用し、分子間に選択的にジスルフィド結合を形成させるためにこの保護基が有用であることを確認している³⁴⁾。また、Acm基などで保護したシスチン残基を含むペプチドを塩化3-ニトロピリジン-2-スルフェニル(Npys-Cl)で処理してシスチン残基保護基をNpys基に置換できることが知られている³⁵⁾。もしこの置換反応を既に分子間ジスルフィド結合を保持するペプチドに適用してそのジスルフィド結合に影響することなくシスチン残基保護基をNpys基に置換できれば、遊離スルフィド基を持つペプチドと反応させて新たな分子間ジスルフィド結合を選択的に形成することが可能となる([2]の条件に適合)。すなわち、シスチン残基スルフィド基が遊離のペプチドを調製するための保護基にHFで切断できる4-MeBzl基を採用し、HFで切断されないNpys基とAcm基の3種類の保護基を組み合わせることにより、図3-15に示す3本鎖のペプチド間に2組のジスルフィド結合を選択的に形成することが可能となる。目的と

する4本鎖のペプチド間に3組のジスルフィド結合を持つトリプシン消化フラグメントはこの反応を繰り返すことにより合成することができる。このような考察をもとにブタC5a-アナフィラトキシンのシステイン残基を含むトリプシン消化フラグメントを合成することを計画し、まずNpys-Clによる置換反応について検討を加えた。

Ac_m基からNpys基へのシステイン残基保護基置換反応は、酢酸を溶媒として1.2当量のNpys-Clを用いて行なうことができると報告されている³⁴⁾。しかし、従来は官能基を保護したシステイン残基誘導体やペプチドに対してこの置換反応を適用しているのみであり³⁵⁾、遊離ペプチドにこの反応を適用した例はない。そこで、この置換反応に使用する溶媒およびCys(Ac_m)残基以外のアミノ酸官能基とNpys-Clの反応性について検討した。

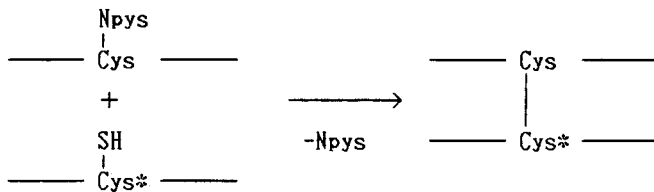


図3-14 システイン残基保護基のNpys基の反応性

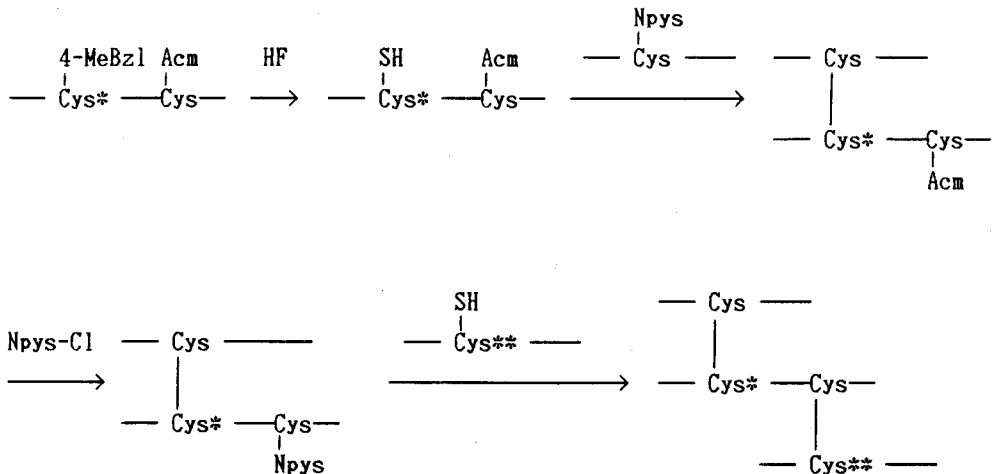


図3-15 分子間に2組のジスルフィド結合を選択的に形成させる方法

モデル反応並びにその典型的なクロマトグラムを図3-16に示した。モデルペプチドは、(47-49)位と(21-28)位ペプチドの47位、21位および22位システイン残基をそれぞれ Npys基、4-MeBzl基、Acm基で保護して固相法により合成したペプチドを、HF処理後0.1 M リン酸緩衝液 (pH 6.5) に溶解して10分間反応することにより47位と21位システイン残基間にジスルフィド結合を形成させて調製した。この反応に使用する溶媒としては酢酸、トリフルオロ酢酸、0.1 M リン酸緩衝液 (pH 6.5) を検討した。1.2当量のNpys-Clを使用してそれぞれの溶媒中における反応を分析した結果、どの溶媒を使用しても置換反応は進行するが、最も目的物の収率がよかったのは酢酸を使用した場合であり、そのクロマトグラムを図3-16に示した。この際、保持時間29分付近に顕著な副生成物のピークが2本認められた。使用するNpys-Clの量が増加するとこれらのピークも増加する傾向が観察され、また、この副生成物をキモトリプシン消化後分析するとN端側フラグメントに修飾が起こっていることが明らかになった。そこで、この副生成物を塩酸水に溶解してアミノ基に結合したNpys基を切断する条件にしたところ副生成物のピークは

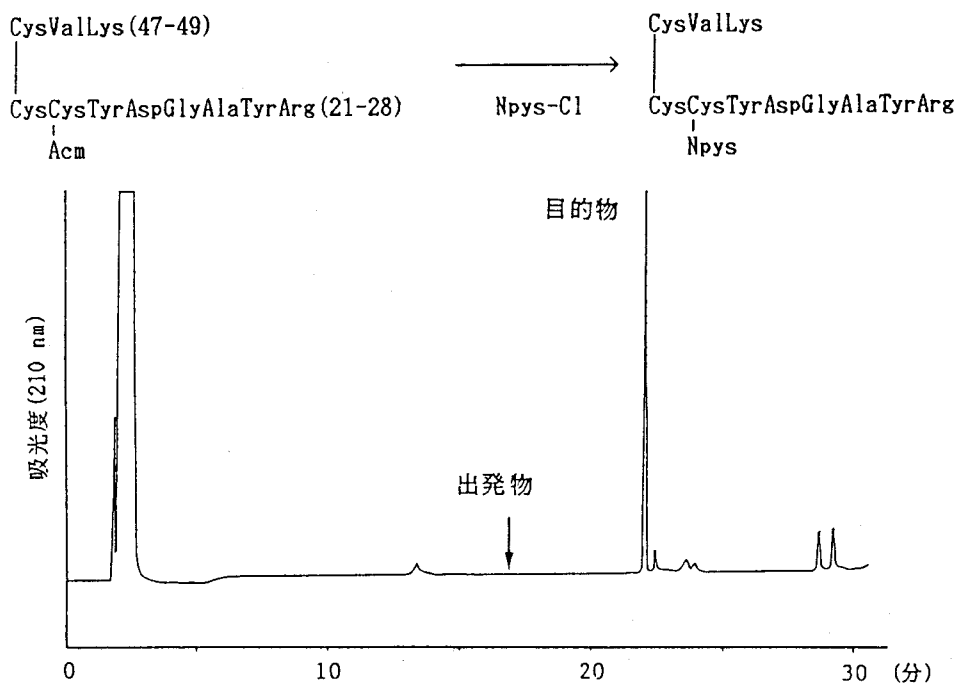


図3-16 システイン残基保護基Acm基をNpys基に置換するモデル反応

カラム: Nucleosil 5C₁₈ (4 X 150 mm)

溶離液: (A) CH₃CN/H₂O/TFA(1/99/0.1), (B) CH₃CN/H₂O/TFA(30/70/0.1)

直線濃度勾配法: A→B(25分)

流速: 1.0 ml/分

目的物の溶出位置に移動した。これらのことから29分付近に溶出する副生成物はアミノ基にNpys基が導入されたペプチドであると結論した。キモトリプシン処理で生成するC端側フラグメントは置換反応の前後で変化がなかったことから、チロシン残基側鎖官能基はこの置換反応条件で顕著に修飾されることはないことがわかった。以上のように、システイン残基のAcm基をNpys基に置換する反応は共存するアミノ基への反応と競争反応であるが、Cys(Acm)残基において最も速やかに進行することは明らかであり、また、クロマトグラム上ジスルフィド結合の巻き変えにより生成する顕著なピークは検出されず、この置換反応は既に保持するジスルフィド結合に影響することなく進行することを確認した。そこでこの置換反応を適用して目的とするトリプシン消化フラグメントの合成を行なった。

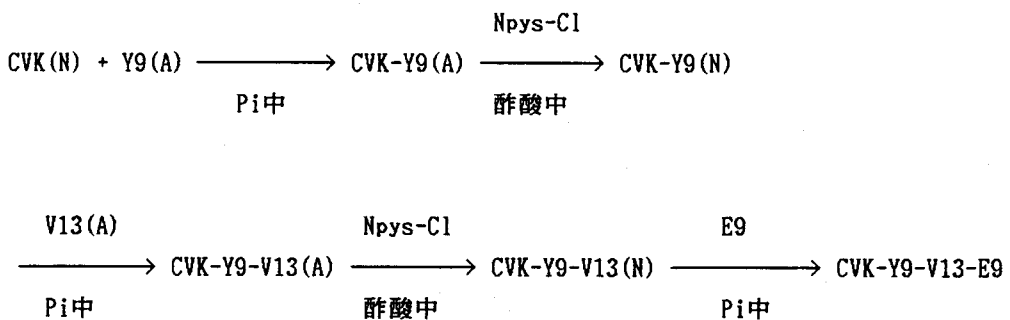
図3-12に示したトリプシン消化フラグメントを合成するための4種類のペプチドとその略号並びに具体的な合成経路を図3-17に示した。それぞれのペプチドは固相

Cys(Npys)ValLys(47-49) ----- CVK(N)

LysCysCys(Acm)TyrAspGlyAlaTyrArg(20-28) ----- Y9(A)

AlaPheLysAspCysCys(Acm)TyrIleAlaAsnGlnValArg(50-62) ---- V13(A)

AsnAspAspGluThrCysGluGluArg(29-37) ----- E9



A: Acm, N: Npys, Pi: 0.1 M リン酸緩衝液(pH 6.5)

図3-17 Zimmermannらにより決定されたジスルフィド結合保持様式を有するトリプシン消化フラグメントの合成

法でペプチド鎖を延長しHFにより脱保護して合成した。HF処理後に残存するシステイン残基保護基をカッコの中に示して、(47-49)位、(20-28)位、(50-62)位および(29-37)位ペプチドをそれぞれCVK(N)、Y9(A)、V13(A)およびE9と便宜上表現した。CVK(N)中のNpys基で保護したシステイン残基とY9(A)中のシステイン残基間に1組目のジスルフィド結合を選択的に形成させた。CVK-Y9(A)中のAcm基をNpys基に置換してまずCVK-Y9(N)を合成した。ついで、このペプチドとV13(A)を反応させて3分子のペプチド鎖間に2組目のジスルフィド結合を形成させた。3組目の分子間ジスルフィド結合はCVK-Y9-V13(A)中のAcm基をNpys基に置換後E9と反応させて形成させ、目的とする図3-12に示したトリプシン消化フラグメントに相当するCVK-Y9-V13-E9を得た。

Npys基とスルフヒドリル基間の反応は0.1 M リン酸緩衝液(pH 6.5)中10分間で行ない、Acm基のNpys基への置換反応は1当量のNpys-Clを用い酢酸中10分間で行なった。Acm基をNpys基に置換する反応は全て図3-16に示したクロマトグラムと同様に進行した。Npys基で保護したシステイン残基と遊離スルフヒドリル基を持つシステイン残基間の反応例として分子間に2組目のジスルフィド結合を形成させCVK-Y9-V13(A)を合成したクロマトグラムを図3-18に示した。保持時間9.5分に溶出するピークは切断したNpys基に由来するものであり、23分のピークは原料のV13(A)のピークである。

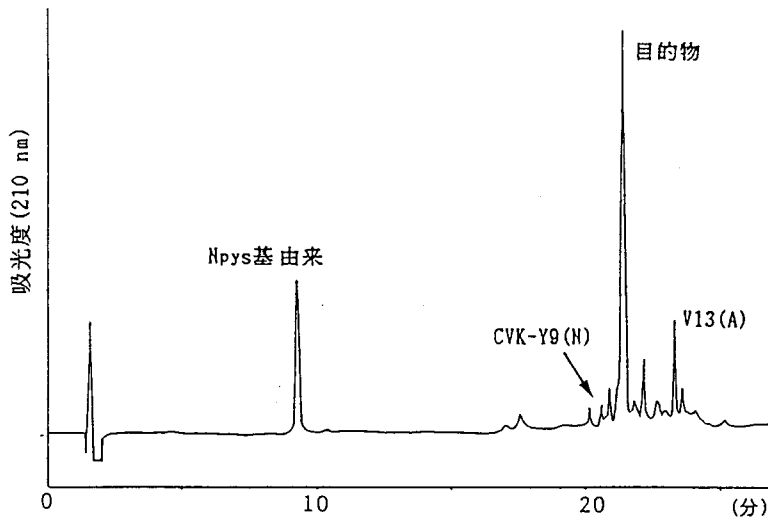


図3-18 CVK-Y9(N)とV13(A)の反応
分析条件：図3-16と同一

CVK-Y9-V13(N)とE9を反応させて目的とするブタC5a-アナフィラトキシンのトリプシン消化フラグメントを合成したクロマトグラムを図3-19上部に示した。主ピークのペプチドを単離しジチオスレイトール(DTT)でジスルフィド結合を還元後HPLCで分析すると、このフラグメントを構成する4部分のペプチドが検出されその構造を確認した。図3-19下部には、合成ブタ[Gln⁶⁵]C5a-アナフィラトキシンのトリプシン消化物のペプチドマップを示した。合成したトリプシン消化フラグメントとブタ[Gln⁶⁵]C5a-アナフィラトキシンのシスチンを含むトリプシン消化フラグメントの主ピークは明らかに同一の保持時間に溶出した。以上のことから合成ブタ[Gln⁶⁵]C5a-アナフィラトキシンのジスルフィド結合保持様式を合成的に確認しえた。

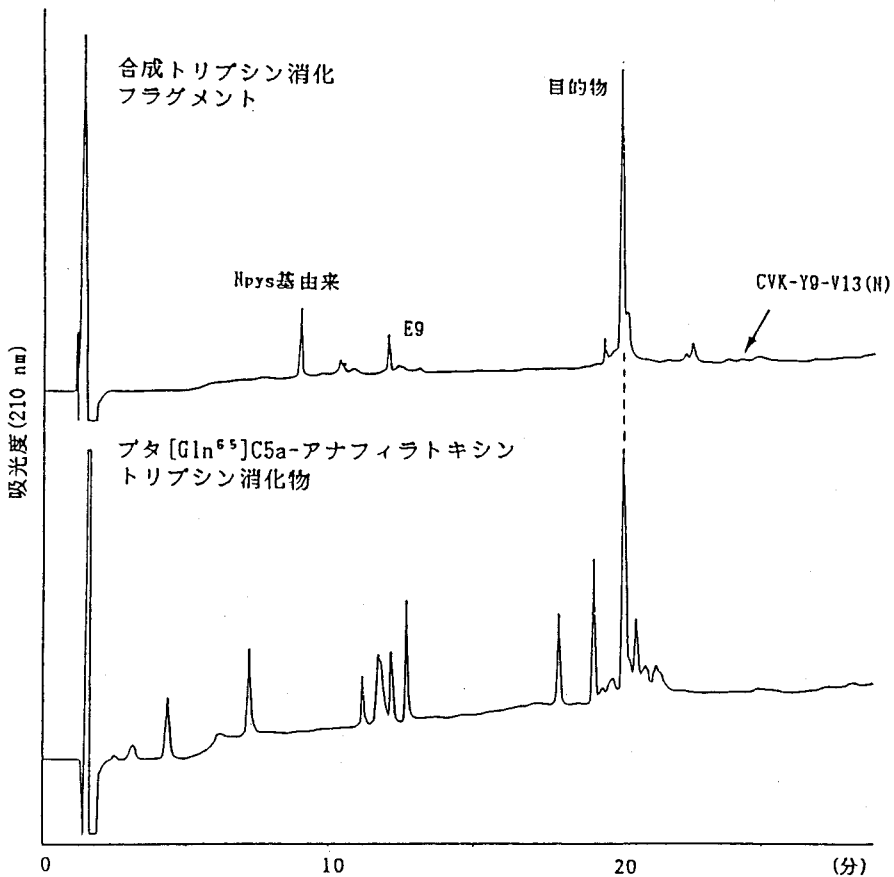


図3-19 ブタ[Gln⁶⁵]C5a-アナフィラトキシンのトリプシン消化ペプチドマップと合成トリプシン消化フラグメントの比較
分析条件：図3-16と同一

3-4-5 ヒトC5a-アナフィラトキシン単一クローン性抗体との交叉性

合成ブタ [Gln⁶⁵]C5a-アナフィラトキシンの免疫的性質を調べた。この実験は大阪大学医学部の井上公蔵教授、竹田潤二博士により行なわれたものである。大きく分けて3種類の特異性を示すヒトC5a-アナフィラトキシン単一クローン性抗体³¹⁾に対する合成ブタ [Gln⁶⁵]C5a-アナフィラトキシンの交叉性を検討した。結果を表3-4に示した。ヒトC5a-アナフィラトキシンは64位アスパラギン酸残基に糖鎖が結合したペプチドであり、また、一次構造もブタC5a-アナフィラトキシンと違っていることから、ブタ由来のペプチドがヒト由来のペプチドに対する単一クローン性抗体と全て交叉するとは考えられず、事実、最も数の多いグループAの抗体とは合成ブタ [Gln⁶⁵]C5a-アナフィラトキシンは交叉しなかった。しかし、ペプチドのC末端アルギニン残基を認識する抗体(グループB)に対してはヒト由来のペプチドと同一の性質を示し、体外免疫法により得られたクラスの違う抗体(グループC)に対してはヒト由来のペプチドと同様な交叉性を示した。

表3-4 合成ブタ [Gln⁶⁵]C5a-アナフィラトキシンの
ヒトC5a-アナフィラトキシン単一クローン性抗体との交叉性

グループ	ヒトC5a	ヒトC5a-desArg*	ブタC5a	ブタC5a-desArg*
A (Ig G)	+	+	-	-
B (Ig G)	-	+	-	+
C (Ig M)	+	+	+	+

* カルボキシペプチダーゼ-B消化により調製

3-4-6 合成ペプチドの生物活性

合成ブタ[Gln⁶⁵]C5a-アナフィラトキシンの生物活性を2種類の系で測定した。一方はモルモット回腸標本における収縮活性であり他方はリソゾーム酵素であるβ-ヘキソサミニダーゼ遊離活性である。なお、後者の活性測定は大阪大学医学部の井上公蔵教授、竹田潤二博士のもとで行なわれたものである。

ブタC5a-アナフィラトキシンのモルモット回腸標本における収縮活性は、 5×10^{-10} モル量の低濃度で発現し、一度収縮が起こると二度と同じ収縮が起こらないというタキフィラキシー(tachyphylaxis)現象が認められることが特徴である³²⁾。合成ペプチドの活性を測定したパターンを図3-20に示した。合成品は 1×10^{-9} モルで収縮活性を発現し、上で示した天然ブタC5a-アナフィラトキシンの対して報告されている値と同程度であった。また、天然物と同様にタキフィラキシー現象も認められた。

このモルモット回腸標本における収縮活性測定系で観察されたブタC5a-アナフィラトキシンの特徴的な活性は合成中間体の[6Ac_m]体ペプチドには認められず、活性発現にはジスルフィド結合を保持することにより形成される高次構造が重要な働きをしていることがうかがえた。

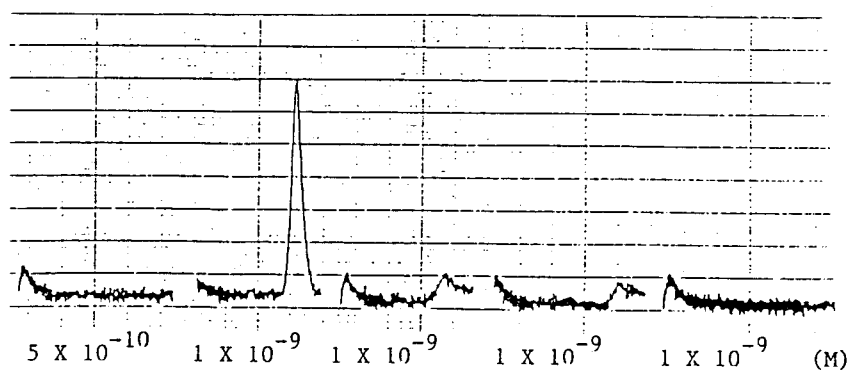


図3-20 合成ブタ[Gln⁶⁵]C5a-アナフィラトキシンのモルモット回腸標本における収縮活性

β -ヘキソサミニダーゼ遊離活性はヒト単核細胞様培養細胞 (U937細胞)で測定した。サイトカラシンBで処理することにより酵素が外に浸出するのを阻害した細胞に、刺激剤であるC5a-アナフィラトキシンを加えて細胞外に放出された酵素量を求め、変成剤で細胞を処理した際に検出される酵素量を100とした相対的な値でペプチドの酵素遊離活性を表現した。結果を図3-21に示した。合成ブタ[Gln⁶⁵]C5a-アナフィラトキシンの活性はナノモル量で発現し、10ナノモルで平衡に達した。また、同時に測定した天然ヒトC5a-アナフィラトキシンよりも強い活性を示した。本研究で使用した細胞系において天然ブタC5a-アナフィラトキシンの酵素遊離活性を測定した例がないことから活性の絶対値については評価することは不可能であるが、合成ブタ[Gln⁶⁵]C5a-アナフィラトキシンのリソゾーム酵素遊離活性はナノモル量で発現する強いものであった。また、糖鎖が結合するペプチドであるヒトC5a-アナフィラトキシンはその糖鎖により種々生物活性が抑制されていることが知られており、本研究における β -ヘキソサミニダーゼ遊離活性測定系においてもブタC5a-アナフィラトキシンの方がヒト由来のペプチドよりも強い活性であった。なお、先の収縮活性の場合と同様にこの測定系においても合成中間体の[6Acm]体ペプチドには活性が認められなかった。

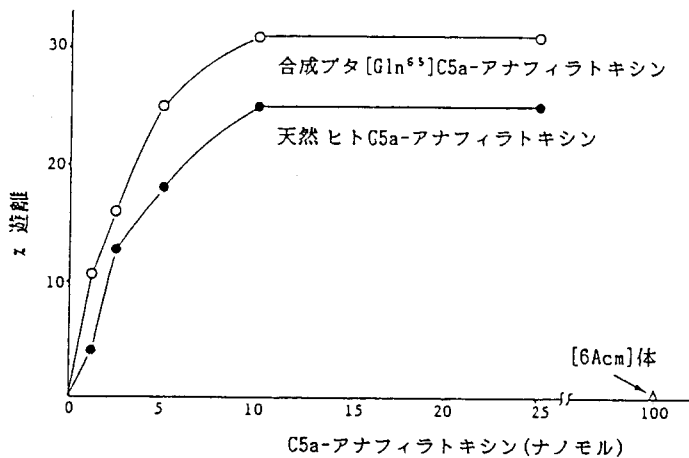


図3-21 C5a-アナフィラトキシンの β -ヘキソサミニダーゼ遊離活性

4章 合成品と天然物の比較

Gerardらの推定構造式に従って合成したブタ[Gln⁶⁵]C5a-アナフィラトキシンと 米国 Scripps Clinic研究所のTony. E. Hugli博士から提供された天然物ペプチドをHPLCで比較検討した。

4-1 逆相およびイオン交換HPLCによる比較

合成ブタ[Gln⁶⁵]C5a-アナフィラトキシンと天然物ペプチドを逆相HPLC (図4-1)および陽イオン交換樹脂(TSK-Gel CM-2SW)を担体としたイオン交換HPLC(図4-2)で比較した。逆相HPLC分析系では、合成品は天然物よりわずかに早い溶出位置にピークが認められ、このわずかな保持時間の差は共溶出することにより確認された。一方、イオン交換HPLC分析系では、合成品は天然物より遅れてベースライン分離で溶出し、天然物のクロマトグラムには合成品の溶出位置に全くピークを認めなかった。イオン交換HPLC分析の挙動から推測すると、用いた天然物は血清中で分解が進んで生成した[des Arg⁷⁴]ペプチドである可能性があった。しかし、合成品をカルボキシペプチダーゼ-B消化して溶出すると、[des Arg⁷⁴]ペプチドは、この分析系では天然物のピークと非常に近接するがわずかに短い保持時間であることがわかり、その可能性は否定された。

4-2 トリプシン消化物による比較

上で述べた2種類のHPLC分析系でブタC5a-アナフィラトキシンの合成品と天然物を比較すると互いに異なった保持時間に溶出してピークが一致しなかった理由を明らかにするために、両ペプチドを0.1 M リン酸緩衝液(pH 6.5)中、酵素とペプチドの量比を1/10として、37℃で3時間トリプシン消化を行ない逆相HPLCで分析した。そのクロマトグラムを図4-3に示した。74位アルギニン残基を含むフラグメントT18は合成品、天然物ともに全く同一の保持時間に溶出しており、先に示したカルボキシペプチダーゼ-B消化により得られた知見を確認した。保持時間35分付近に溶出したシスチン残基を含むフラグメントの領域の全てのピークも互いに同一の保持時間に溶出した。このことは合成ペプチドのジスルフィド結合保持様式が天然物のそれと完全に同一であることを示しており、空気酸化することにより3組のジスルフィド結合を形成させて得た主生成物が天然型ジスルフィド結合保持様式を持つペプチドであることを確認した。その他のピークも互いに同一の保持時間に溶出したが、合成品のT17は、図中矢印のみで示した天然物のフラグメントとは明らかに違った保持時間であった。このフラグメントT17はブタC5a-アナフィラトキシンに対して提出されている2種類の一次構造式に差が認められる65位アミノ酸残基を含む(63-68)位フラグメントに相当する。合成品はGerardらの推定構造式に従ったので65位アミノ酸残基はグルタミンであり、他方のZimmermannらの推定式ではグルタミン酸である。一般にグルタミン残基をグルタミン酸残基に置換した短鎖ペプチドを TFAを添加した酸性の溶離液で逆相HPLC分析を行なう場合、そのペプチドは

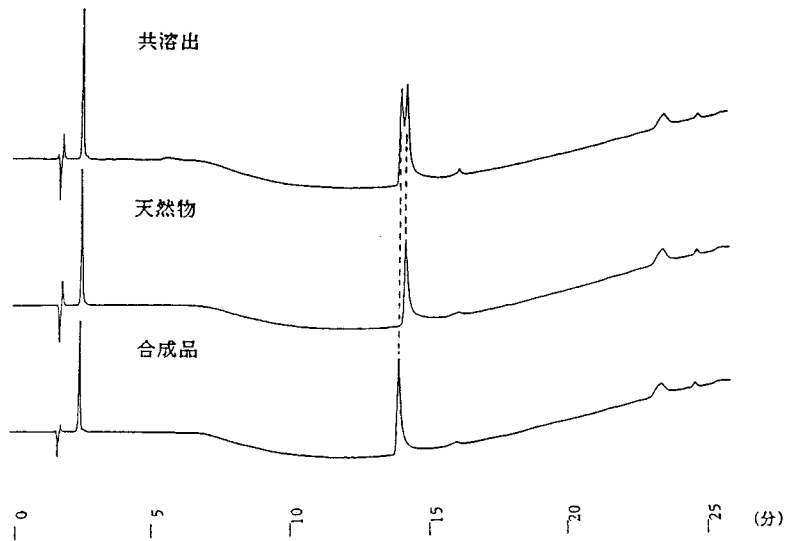


図4-1 逆相HPLC分析による合成ブタ [Gln⁶⁵]C5a-アナフィラトキシンと天然物の比較
分析条件：図3-6と同一

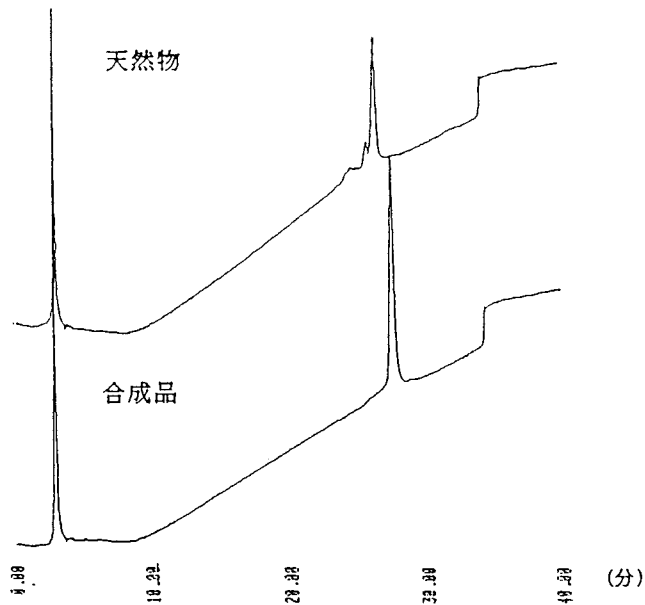


図4-2 イオン交換HPLC分析による合成ブタ [Gln⁶⁵]C5a-アナフィラトキシンと天然物の比較
分析条件：図3-7と同一

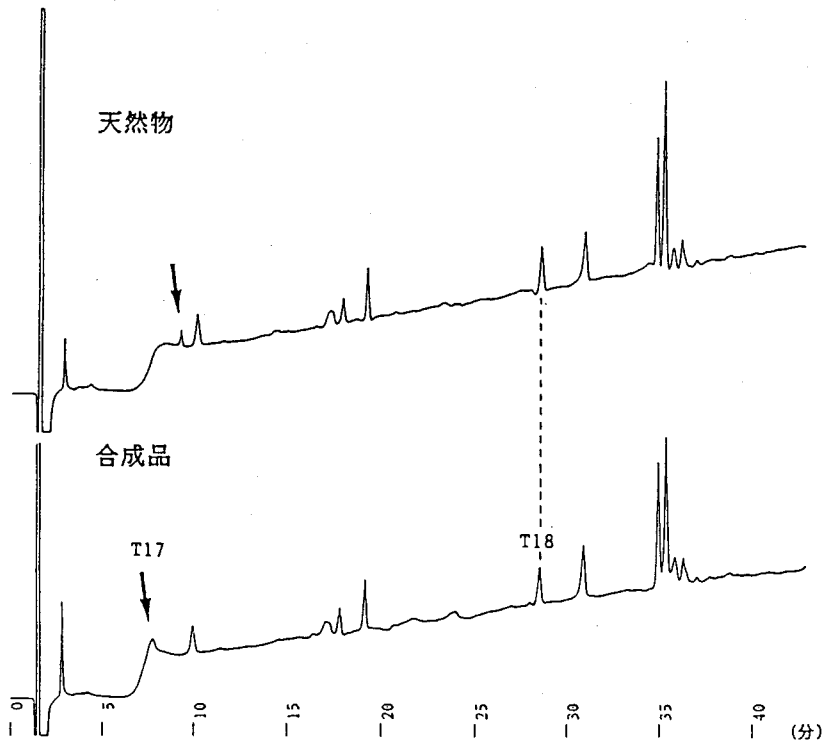


図4-3 トリプシン消化による合成プタ[Gln⁶⁵]C5a-アナフィラトキシンと天然物の比較
 カラム：Nucleosil 5C₁₈ (4 X 150 mm)
 溶離液：(A) CH₃CN/H₂O/TFA(1/99/0.1), (B) CH₃CN/H₂O/TFA(60/40/0.1)
 直線濃度勾配法：A→B(50分)
 検出法：210 nm 紫外吸収, 流速：1.0 ml/分

グルタミン残基を含むペプチドより遅れて溶出することが予測される。

以上の考察から、65位アミノ酸残基がグルタミンおよびグルタミン酸のトリプシン消化フラグメントT17に相当するペプチドを固相合成で調製し、単一溶出条件で逆相HPLCにより比較分析した(図4-4)。その結果、65位アミノ酸残基をグルタミンで調製したフラグメントは合成ブタ[Gln⁶⁵]C5a-アナフィラトキシンのトリプシン消化フラグメントT17と同一の保持時間に溶出し、一方、グルタミン酸残基に置換して調製したフラグメントは天然物で認められたピークと完全に同一の保持時間に溶出した。また、その天然物で認められたピークのペプチドを単離しEdman分解により一次構造を調べたところ、65位アミノ酸残基はグルタミン酸であることが確認された。更に、グルタミン残基がグルタミン酸残基に置換すると新たにカルボキシル基が増加してペプチド全体の電荷が変化し、上で示した陽イオン交換樹脂を担体としたイオン交換HPLCの分析条件で天然物が合成ブタ[Gln⁶⁵]C5a-アナフィラトキシンよりも早く溶出した挙動とも一致する。

グルタミンからグルタミン酸へは側鎖官能基の脱アミド化で変換されるので、天然ブタC5a-アナフィラトキシンの単離精製過程でグルタミンがグルタミン酸に変換された可能性がある。Gerardらは、ブタ血清を熱処理した酵母で活性化して生成させた天然ブタC5a-アナフィラトキシンの単離精製を、血清に塩酸を添加後温度を4℃に保ちながらpHが5.0から7.8の溶媒を用いてゲルろ過クロマトグラフィーおよびイオン交換クロマトグラフィーにより行なったと報告³²⁾している。また、Zimmermannらの場合も塩酸の代わりに蟻酸を使用していること以外はGerardらとほぼ同様な条件で単離精製を行なっている³⁷⁾。これらの単離精製条件の中、抽出液のpHを下げることにより抽出液に混入する種々の分解酵素の活性は抑制されていると考えられる。また、精製の過程で用いた条件は低温かつ中性付近のpHであることからペプチドの分解は起こりにくい条件であると考えられる。実際に、著者は合成ブタ[Gln⁶⁵]C5a-アナフィラトキシンを1%酢酸水に溶解後5℃で終夜放置してもあるいは0.1 M リン酸緩衝液(pH 6.5)に溶解後37℃で5時間放置してもペプチドの純度に変化はないことをHPLC分析により確認した。また、pH7.5の0.1 M 酢酸アンモニウム緩衝液中5日間ジスルフィド結合形成反応を行なって得た粗ペプチドのトリプシン消化物のペプチドマップにおいても、[Glu⁶⁵]トリプシン消化フラグメントの溶出位置にピークを認めなかった。更に、グルタミン残基を含む一連のペプチドを用いpH 7.4のリン酸緩衝液中、37℃の温度で起こる脱アミド化速度を測定したRobinsonの報告³⁸⁾によると、Glu-Glnの構造を持つGly-Glu-Gln-Ala-Glyの半減期は226日であるということと考え合わせると、天然ブタC5a-アナフィラトキシンの単離精製する過程で65位アミノ酸残基がグルタミンからグルタミン酸に変換された可能性は非常に低い。

以上の事実からブタC5a-アナフィラトキシンに対して提出されていた2種類の65位アミノ酸残基に関しては、Gerardらが推定したグルタミンは誤りであり、Zimmermann式のグルタミン酸が正しいことを認めることができた。このように本研究により初めてブタC5a-アナフィラトキシンの正しい一次構造式を確定することができた(図4-5)。

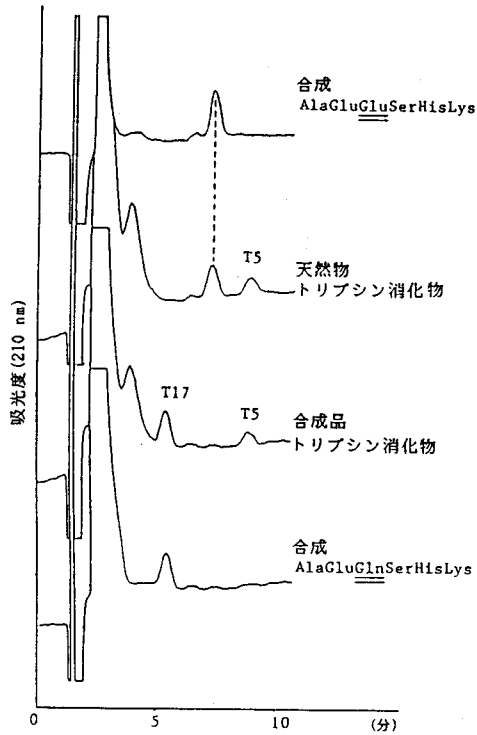


図4-4 プタC5a-アナフィラトキシンの65位アミノ酸残基の同定
 カラム : Nucleosil 5C₁₈ (4 X 150 mm)
 溶離液 : CH₃CN/H₂O/TFA (1/99/0.1)
 流速 : 1.0 ml/分

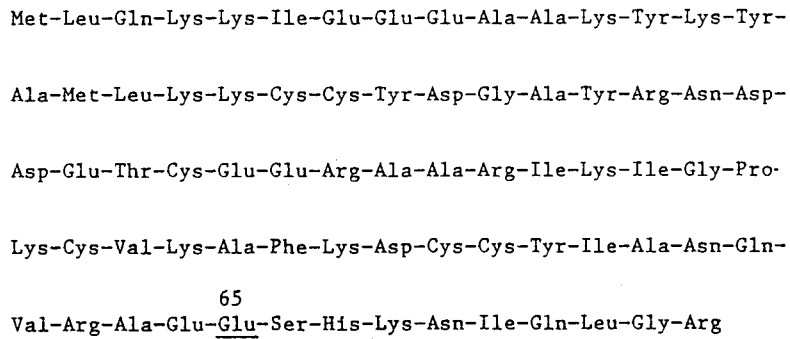


図4-5 プタC5a-アナフィラトキシンの確定一次構造式

5章 結語

生理活性ペプチドは一般に微量で活性を発現する場合が多く、抽出などの分離操作で生体から多量に単離することはむずかしい。従って、それらのペプチドの生物活性を測定したり、あるいは他の新たな活性を検索して薬剤を開発するためには、天然型の物質のみならずその類縁体が合成により供給されることが要求される。また、天然物の解析により推定された一次構造式を確定したり複雑な高次構造を決定するためには合成面からの取り組みが必要である。このような点を背景にしてペプチドの合成技術は飛躍的に進歩しており、現在では30残基程度の直鎖ペプチドは大きな困難もなく合成することが可能である。しかし、50残基を越える長鎖ペプチドの合成や構造的に複雑なペプチド、たとえば複数のジスルフィド結合を有したり特別な骨格を持つアミノ酸を含むペプチドを合成するための方法論は確立されていないのが現状であり、多くのグループによりそのための種々の挑戦が行なわれている。本研究は74アミノ酸残基からなるペプチドで分子内に3組のジスルフィド結合を持つブタC5a-アナフィラトキシンを合成の対象とし、複雑な構造を有する長鎖ペプチドの合成法について検討を加えるとともに65位アミノ酸残基に対して2種類(グルタミンあるいはグルタミン酸)提出されている一次構造式に検討を加えたものである。

本研究においては Gerard式 of ブタ [Gln⁶⁵]C5a-アナフィラトキシンの合成を目指したが、その合成を成功させるためには、縮合反応により生成するジアステレオマーの混入を抑制し、合成条件下で修飾を受けやすいアミノ酸に注意を払い高純度の直鎖ペプチドを合成することがまず重要である。そのためにベンジル系の保護基を使用した最大保護法でペプチド鎖を延長しHFで脱保護する合成法を採用し、合成中間体の純度を分析の精度および感度が優れたHPLCで検定することにより高純度であることを確認しながら合成を進めたところ、システイン残基を保護した [6Acu]体ペプチドをCMCによる一段階の精製のみで容易に合成することができた。また、このようにして得たペプチドを出発原料に使用して、3組のジスルフィド結合形成反応条件を厳密に検討した上でスルフヒドリル基を持つペプチドを空気酸化させたところ、種々分析方法で高純度であることが確認された天然型と同一のジスルフィド結合様式を保持した ブタ [Gln⁶⁵]C5a-アナフィラトキシンを合成することができた。

合成ペプチドと天然物をHPLC分析で比較することにより天然ブタC5a-アナフィラトキシンの一次構造に検討を加えた結果、合成ペプチドが高純度であったために74アミノ酸残基中の1アミノ酸残基のみの差異、即ち、65位グルタミンかグルタミン酸かというわずかな違いを認識することが可能になり、合成 [Gln⁶⁵]ペプチドが天然物と一致しなかった事実、さらに65位アミノ酸残基がグルタミンとグルタミン酸の2種類のヘキサペプチドと天然物トリプシン消化物との比較の結果等から、ブタC5a-アナフィラトキシンに対して2種類提出されていた一次構造式の方の [Glu⁶⁵]式が正しいことを初めて決定することができた。

今回確立することができたような最大保護法とHF法の組み合わせによる複雑な構造を有する長鎖ペプチドの合成法は、一般に同種類のペプチドを合成する際に有用であることは明らかであり、本研究の結果と知見は今後更に長鎖ペプチドや蛋白質などの化学合成にきわめて有用な示唆を与えるものと期待する。

6章 実験の部

6-1 プタ[Gln⁶⁵]C5a-アナフィラトキシンを構築する各セグメントの合成

(64-74)位のペプチドの合成

Boc-Leu-Gly-Arg(Tos)-OBzl

Boc-Leu-Gly-OH 17.3 g(60.0 mmol), H-Arg(Tos)-OBzl·HCl 27.3 g(60.0 mmol) およびHOBt 8.5 g(63 mmol)を DMF 140 mlに溶かし, -15℃以下に冷却してWSCl 11.5 ml (63.0 mmol)を滴下し終夜攪はんした。TLCで反応が終了したことを確認後酢酸エチルを加え, 1 N HCl, 水, 5 % NaHCO₃, 水で洗い無水硫酸ナトリウムで乾燥した。酢酸エチルを溜去して得られた残さを酢酸エチル/n-ヘキサンで処理して粉末とし, 同一の溶媒系から再沈殿して目的物 33 g(79.9 %)を得た。

mp 72℃(dec), $[\alpha]_D^{25}$ -18.7° (c 0.53, DMF)

元素分析 C₃₃H₄₈O₉N₆S·0.5 H₂O としての計算値

C, 56.80; H, 7.08; N, 12.02%

分析値 C, 56.77; H, 7.03; N, 11.98%

Boc-Gln-Leu-Gly-Arg(Tos)-OBzl

Boc-Leu-Gly-Arg(Tos)-OBzl 27.6 g(40.0 mmol)をTFA(80 ml)で0℃以下10分間, 室温45分間処理し, 5.1 N HCl/ジオキサン 9.5 ml(48.0 mmol)を加えた後溶媒を減圧溜去した。残さにエーテルを加えて粉末とし, ろ取後水酸化ナトリウム上2時間減圧乾燥した。この粉末, Boc-Gln-OH 10.8 g(44.0 mmol)およびHOBt 6.2 g(46.0 mmol)を DMF(60 ml)に溶かし, -15℃以下に冷却してWSCl 8.4 ml(46.0 mmol)を滴下し終夜攪はんした。TLCで反応が終了したことを確認後酢酸エチルを加え, 1 N HCl, 水, 5 % NaHCO₃, 水で洗い無水硫酸ナトリウムで乾燥した。酢酸エチルを溜去して得られた残さをエーテルで処理して粉末とし, メタノール/エーテルより2回再沈殿して目的物 28.6 g(87.3 %)を得た。

mp 104℃(dec), $[\alpha]_D^{25}$ -17.8° (c 0.50, DMF)

元素分析 C₃₈H₅₆O₁₀N₈Sとしての計算値

C, 55.87; H, 6.91; N, 13.72%

分析値 C, 55.87; H, 7.09; N, 13.71%

Boc-Ile-Gln-Leu-Gly-Arg(Tos)-OBzl

Boc-Gln-Leu-Gly-Arg(Tos)-OBzl 27.5 g(33.7 mmol)をTFA(90 ml)で0℃以下10分間, 室温55分間処理し, 5.1 N HCl/ジオキサン 8 ml(40.4 mmol)を加えた後溶媒を減圧溜去した。残さにエーテルを加えて粉末とし, ろ取後水酸化ナトリウム上2時間減圧乾燥した。この粉末, Boc-Ile-OH·0.5H₂O 9.3 g(38.8 mmol)にトルエンを加え共沸することにより脱水して得られた油状物およびHOBt 5.0 g (37.1 mmol)をDMF(80 ml)に溶かし,

-15℃以下に冷却してWSCl 6.8 ml(37.1 mmol)を滴下し終夜攪はんした。TLCで反応が終了したことを確認後氷冷水を加えて粉末とし、ろ取後クロロホルム、メタノール/エーテルより2回再沈殿して目的物 28.7 g(91.6 %)を得た。

mp 192℃(dec), $[\alpha]_D^{25}$ -18.2° (c 0.49, DMF)

元素分析 C₄₄H₆₇O₁₁N₉Sとしての計算値

C, 56.82; H, 7.26; N, 13.55%

分析値 C, 56.67; H, 7.25; N, 13.32%

Boc-Asn-Ile-Gln-Leu-Gly-Arg(Tos)-OBzl

Boc-Ile-Gln-Leu-Gly-Arg(Tos)-OBzl 28.0 g(30.1 mmol)をTFA(85 ml)で 0℃以下10分間、室温40分間処理し、5.1 N HCl/ジオキサン 7.1 ml(36.1 mmol)を加えた後溶媒を減圧溜去した。残さにエーテルを加えて粉末とし、ろ取後水酸化ナトリウム上終夜減圧乾燥した。この粉末、Boc-Asn-OH 7.7 g(33.1 mmol)およびHOBt 4.7 g (34.6 mmol)をDMF(50 ml)に溶かし、-15℃以下に冷却してWSCl 6.3 ml(34.6 mmol)を滴下し終夜攪はんした。TLCで反応が終了したことを確認後氷冷水を加えて粉末とし、ろ取後DMF/エーテルより再沈殿して目的物 29.0 g(92.3 %)を得た。

mp 225℃(dec), $[\alpha]_D^{25}$ -28.5° (c 0.48, DMF)

元素分析 C₄₉H₇₃O₁₃N₁₁Sとしての計算値

C, 55.21; H, 7.05; N, 14.75%

分析値 C, 55.11; H, 7.11; N, 14.72%

Boc-Lys(ClZ)-Asn-Ile-Gln-Leu-Gly-Arg(Tos)-OBzl

Boc-Asn-Ile-Gln-Leu-Gly-Arg(Tos)-OBzl 28.5 g(27.3 mmol)をTFA(90 ml)で 0℃以下10分間、室温60分間処理し、5.1 N HCl/ジオキサン 6.4 ml(32.8 mmol)を加えた後溶媒を減圧溜去した。残さにエーテルを加えて粉末とし、ろ取後水酸化ナトリウム上終夜減圧乾燥した。この粉末、Boc-Lys(ClZ)-OH 12.5 g(30.0 mmol)およびHOBt 4.2 g(31.4 mmol)をDMF(70 ml)とDMSO(30 ml)との混合溶媒に溶かし、-15℃以下に冷却してWSCl 5.7 ml(31.4 mmol)を滴下し終夜攪はんした。アミノ基の検出試薬であるフルオレスアミンの反応が陰性であることを確認後氷冷水を加えて粉末とし、ろ取後DMF/メタノールより再沈殿して目的物 31.4 g(85.7 %)を得た。

mp 233℃(dec), $[\alpha]_D^{25}$ -23.3° (c 0.60, DMF)

元素分析 C₆₂H₉₀O₁₆N₁₃SCl・H₂Oとしての計算値

C, 54.80; H, 6.82; N, 13.40%

分析値 C, 54.72; H, 6.71; N, 13.44%

Boc-His(Tos)-Lys(ClZ)-Asn-Ile-Gln-Leu-Gly-Arg(Tos)-OBzl

Boc-Lys(ClZ)-Asn-Ile-Gln-Leu-Gly-Arg(Tos)-OBzl 20.0 g(15.0 mmol)をTFA(60 ml)で0℃以下10分間、室温50分間処理し、5.1 N HCl/ジオキサン 3.5 ml(18.0 mmol)を加

えた後溶媒を減圧溜去した。残さにエーテルを加えて粉末とし、ろ取後水酸化ナトリウム上2時間減圧乾燥した。この粉末、Boc-His(Tos)-OH 6.8 g(16.5 mmol)およびHOBt 2.3 g (17.3 mmol)をDMF(45 ml)とDMSO(35 ml)との混合溶媒に溶かし、-15℃以下に冷却してWSCl 3.2 ml(17.3 mmol)を滴下し終夜攪はんした。アミノ基の検出試薬であるフルオレスアミンの反応が陰性であることを確認後氷冷水を加えて粉末とした。ろ取後DMF/メタノールより再び粉末とし22.0 gを得た。このものはTLCで純度を調べるとヒスチジンのTos基が切断されたペプチドを約半分含む混合物であったが、後の反応には特に支障がないのでそのまま次の反応に進んだ。

Boc-Ser(Bzl)-His-Lys(ClZ)-Asn-Ile-Gln-Leu-Gly-Arg(Tos)-OBzl

Boc-His(Tos)-Lys(ClZ)-Asn-Ile-Gln-Leu-Gly-Arg(Tos)-OBzl(上で得たヒスチジンのTos基が約半分切断されている試料) 20.0 g(13.5 mmolとする)をTFA(60 ml)で0℃以下10分間、室温55分間処理し、5.1 N HCl/ジオキサソ 6.4 ml(32.4 mmol)を加えた後溶媒を減圧溜去した。残さにエーテルを加えて粉末とし、ろ取後水酸化ナトリウム上2時間減圧乾燥した。この粉末、Boc-Ser(Bzl)-OH 4.0 g(13.5 mmol)およびHOBt 1.9 g (14.2 mmol)をDMF(25 ml)とDMSO(50 ml)との混合溶媒に溶かし、-15℃以下に冷却してWSCl 2.6 ml(14.2 mmol)を滴下し終夜攪はんした。アミノ基の検出試薬であるフルオレスアミンの反応が陰性であることを確認後氷冷水を加えて粉末とした。ろ取後DMF/メタノールより再び粉末とし18.7 gを得た。このものはTLCで純度を調べるとヒスチジンのTos基が残存するペプチドを少量含む混合物であったが、後の反応には影響がないのでそのまま次の反応に進んだ。

Boc-Gln-Ser(Bzl)-His-Lys(ClZ)-Asn-Ile-Gln-Leu-Gly-Arg(Tos)-OBzl

Boc-Ser(Bzl)-His-Lys(ClZ)-Asn-Ile-Gln-Leu-Gly-Arg(Tos)-OBzl(上で得たヒスチジンのTos基が一部残存する試料) 9.7 g(5.9 mmolとする)をTFA(30 ml)で0℃以下10分間、室温55分間処理し、5.1 N HCl/ジオキサソ 2.8 ml(14.2 mmol)を加えた後溶媒を減圧溜去した。残さにエーテルを加えて粉末とし、ろ取後水酸化ナトリウム上終夜減圧乾燥した。この粉末、Boc-Gln-OH 1.6 g(6.5 mmol)およびHOBt 917 mg (6.8 mmol)をDMF(20 ml)とDMSO(21 ml)との混合溶媒に溶かし、-15℃以下に冷却してWSCl 1.24 ml(6.8 mmol)を滴下し終夜攪はんした。アミノ基の検出試薬であるフルオレスアミンの反応が陰性であることを確認後氷冷水を加えて粉末とした。ろ取後DMF/メタノールより再び粉末とし7.58 gを得た。このものはTLCで純度を調べるとヒスチジンのTos基が残存するペプチドをわずかに含むことがわかったがそのまま次の反応に進んだ。

Boc-Glu(OHex)-Gln-Ser(Bzl)-His-Lys(ClZ)-Asn-Ile-Gln-Leu-Gly-Arg(Tos)-OBzl

Boc-Gln-Ser(Bzl)-His-Lys(ClZ)-Asn-Ile-Gln-Leu-Gly-Arg(Tos)-OBzl(上で得たヒスチジンのTos基がわずかに残っている試料) 7.0 g(3.9 mmol)をTFA(25 ml)で0℃以下10分間、室温50分間処理し、5.1 N HCl/ジオキサソ 1.9 ml(9.4 mmol)を加えた後溶媒を

減圧溜去した。残さにエーテルを加えて粉末とし、ろ取後水酸化ナトリウム上2時間減圧乾燥した。この粉末、Boc-Glu(OHex)-OH 1.54 g(4.7 mmol)およびHOBt 606 mg (4.5 mmol)をDMF(20 ml), DMSO(18 ml)およびNMP(13 ml)との混合溶媒に溶かし、-15℃以下に冷却してWSCl 0.89 ml(4.9 mmol)を滴下し終夜攪はんした。アミノ基の検出試薬であるフルオレスアミンの反応が陰性であることを確認後水冷水を加えて粉末とし、ろ取後DMF/メタノール、エーテルより再沈殿して目的物 7.61 g(97.8 %)を得た。

mp 235℃(dec), $[\alpha]_D^{25}$ -17.5° (c 0.52, DMSO)

元素分析 $C_{94}H_{133}O_{24}N_{24}SCl \cdot 2.5H_2O$ としての計算値

C, 55.35; H, 6.82; N, 13.73%

分析値 C, 55.39; H, 6.71; N, 13.72%

アミノ酸分析(6 N HCl, 108℃, 22 時間)

Asp 1.01, Ser 0.87, Glu 0.98 X 3, Gly 1.00, Ile 0.96,

Leu 1.01, Lys 0.99, His 0.97, Arg 0.98

(59-63)位のペプチドの合成

Boc-Arg(Tos)-Ala-OPac

Boc-Ala-OPac 20.0 g(65.1 mmol)をTFA(100 ml)で0℃以下10分間、室温20分間処理し、5.1 N HCl/ジオキサン 20 ml(102.0 mmol)を加えた後溶媒を減圧溜去した。残さにエーテルを加えて粉末とし、ろ取後水酸化ナトリウム上2時間減圧乾燥した。この粉末、Boc-Arg(Tos)-OH 30.0 g(70.0 mmol)およびHOBt 10.4 g(77.0 mmol)をDMF(120 ml)に溶かし、-15℃以下に冷却してWSCl 14.1 ml(77.0 mmol)を滴下し終夜攪はんした。TLCで反応が終了したことを確認後酢酸エチルを加え、1 N HCl, 水, 5 % NaHCO₃, 水で洗い無水硫酸マグネシウムで乾燥した。酢酸エチルを溜去して得られた残さを酢酸エチル/エーテルで処理して粉末とし、クロロホルム/エーテルより3回再沈殿して目的物 28.4g(65.3 %)を得た。

mp 78-85℃, $[\alpha]_D^{25}$ -20.0° (c 0.67, DMF)

元素分析 $C_{29}H_{39}O_8N_5S \cdot 0.5H_2O$ としての計算値

C, 55.57; H, 6.43; N, 11.17%

分析値 C, 55.61; H, 6.43; N, 11.30%

Boc-Val-Arg(Tos)-Ala-OPac

Boc-Arg(Tos)-Ala-OPac 13.0 g(21.0 mmol)をTFA(50 ml)で0℃以下10分間、室温20分間処理し、5.1 N HCl/ジオキサン 6 ml(30.6 mmol)を加えた後溶媒を減圧溜去した。残さにエーテルを加えて粉末とし、ろ取後水酸化ナトリウム上2時間減圧乾燥した。この粉末、Boc-Val-OH 4.8 g(22.0 mmol)および HOBt 3.3 g(24.2 mmol)をDMF(100 ml)に

溶かし、 -15°C 以下に冷却してWSC1 4.4 ml (24.2 mmol)を滴下し終夜攪はんした。TLCで反応が終了したことを確認後酢酸エチルを加え、1 N HCl, 水, 5 % NaHCO_3 , 水で洗い無水硫酸マグネシウムで乾燥した。酢酸エチルを溜去して得られた残さを酢酸エチル/エーテルで処理して粉末とし、クロロホルム/エーテルより3回再沈殿して目的物 12.5 g (83.0 %)を得た。

mp $100-107^{\circ}\text{C}$ (dec), $[\alpha]_{\text{D}}^{25} -27.2^{\circ}$ (c 1.08, DMF)

元素分析 $\text{C}_{34}\text{H}_{48}\text{O}_9\text{N}_6\text{S} \cdot 0.5\text{H}_2\text{O}$ としての計算値

C, 56.27; H, 6.80; N, 11.58%

分析値 C, 56.01; H, 6.64; N, 11.68%

Boc-Gln-Val-Arg(Tos)-Ala-OPac

Boc-Val-Arg(Tos)-Ala-OPac 12.2 g (17.0 mmol)をTFA(40 ml)で 0°C 以下10分間、室温30分間処理し、5.1 N HCl/ジオキサン 5 ml (25.5 mmol)を加えた後溶媒を減圧溜去した。残さにエーテルを加えて粉末とし、ろ取後水酸化ナトリウム上2時間減圧乾燥した。この粉末、Boc-Gln-OH 4.6 g (18.7 mmol)および HOBt 2.8 g (18.7 mmol)をDMF(100 ml)に溶かし、 -15°C 以下に冷却してWSC1 3.8 ml (18.7 mmol)を滴下し終夜攪はんした。TLCで反応が終了したことを確認後氷冷水を加えて粉末とし、ろ取後クロロホルム、アセトニトリル/酢酸エチルより再沈殿して目的物 10.9 g (76.0 %)を得た。

mp 185°C (dec), $[\alpha]_{\text{D}}^{25} -30.5^{\circ}$ (c 0.92, DMF)

元素分析 $\text{C}_{39}\text{H}_{56}\text{O}_{11}\text{N}_6\text{S} \cdot 0.5\text{H}_2\text{O}$ としての計算値

C, 54.85; H, 6.73; N, 13.12%

分析値 C, 54.75; H, 6.74; N, 13.14%

Boc-Asn-Gln-Val-Arg(Tos)-Ala-OPac

Boc-Gln-Val-Arg(Tos)-Ala-OPac 10.8 g (12.8 mmol)をTFA(50 ml)で 0°C 以下10分間、室温30分間処理し、5.1 N HCl/ジオキサン 4 ml (20.4 mmol)を加えた後溶媒を減圧溜去した。残さにエーテルを加えて粉末とし、ろ取後水酸化ナトリウム上2時間減圧乾燥した。この粉末、Boc-Asn-OH 3.3 g (14.1 mmol)および HOBt 2.1 g (14.1 mmol)をDMF(100 ml)に溶かし、 -15°C 以下に冷却してWSC1 2.8 ml (14.1 mmol)を滴下し終夜攪はんした。TLCで反応が終了したことを確認後氷冷した飽和食塩水を加えて粉末とし、ろ取後水でよく洗い、DMF/アセトニトリルより再沈殿して目的物 11.2 g (91.0 %)を得た。

mp 214°C (dec), $[\alpha]_{\text{D}}^{25} -29.7^{\circ}$ (c 1.47, DMF)

元素分析 $\text{C}_{43}\text{H}_{62}\text{O}_{13}\text{N}_{10}\text{S} \cdot 1.5\text{H}_2\text{O}$ としての計算値

C, 52.37; H, 6.64; N, 14.20%

分析値 C, 52.25; H, 6.55; N, 14.19%

アミノ酸分析(6 N HCl, 108°C , 22 時間)

Asp 1.03, Glu 1.01, Ala 1.00, Val 1.00, Arg 0.90,

(51-58)位のペプチドの合成

Boc-Ile-Ala-OPac

Boc-Ala-OPac 12.3 g(44.0 mmol)をTFA(30 ml)で0℃以下10分間、室温30分間処理し、5.1 N HCl/ジオキサン 11.8 ml(60.0 mmol)を加えた後溶媒を減圧溜去した。残さにエーテルを加えて粉末とし、ろ取後水酸化ナトリウム上2時間減圧乾燥した。この粉末、Boc-Ile-OH・0.5H₂O 10.6 g(44.0 mmol)にトルエンを加え共沸することにより脱水して得られた油状物およびHOBt 5.94 g(44.0 mmol)をDMF(40 ml)に溶かし、-15℃以下に冷却してWSCl 8.1 ml(44.0 mmol)を滴下し4時間攪はんした。TLCで反応が終了したことを確認後氷冷水を加えて粉末とし、ろ取後メタノールより再結晶して目的物 14.2 g(84.5%)を得た。

mp 151-153℃, $[\alpha]_D^{25}$ -32.8° (c 1.31, DMF)

元素分析 C₂₂H₃₂O₆N₂としての計算値

C, 62.83; H, 7.67; N, 6.66%

分析値 C, 62.50; H, 7.79; N, 6.47%

Boc-Tyr(BrZ)-Ile-Ala-OPac

Boc-Ile-Ala-OPac 12.0 g(28.6 mmol)をTFA(30 ml)で0℃以下10分間、室温30分間処理し、5.1 N HCl/ジオキサン 8.4 ml(42.9 mmol)を加えた後溶媒を減圧溜去した。残さにエーテルを加えて粉末とし、ろ取後水酸化ナトリウム上2時間減圧乾燥した。この粉末、Boc-Tyr(BrZ)-OH 15.5 g(31.0 mmol)およびHOBt 4.2 g(31.0 mmol)をDMF(30 ml)に溶かし、-15℃以下に冷却してWSCl 5.7 ml(31.0 mmol)を滴下し終夜攪はんした。TLCで反応が終了したことを確認後氷冷水を加えて粉末とし、ろ取後DMF/メタノールより再結晶して目的物 18.4 g(80.7%)を得た。

mp 210℃(dec), $[\alpha]_D^{25}$ -24.7° (c 1.33, DMF)

元素分析 C₃₃H₄₆O₁₀N₃Brとしての計算値

C, 58.79; H, 5.82; N, 5.27%

分析値 C, 58.66; H, 5.81; N, 5.31%

Boc-Cys(Acm)-Tyr(BrZ)-Ile-Ala-OPac

Boc-Tyr(BrZ)-Ile-Ala-OPac 12.0 g(15.0 mmol)をTFA(40 ml)で0℃以下10分間、室温40分間処理し、5.1 N HCl/ジオキサン 4.4 ml(22.5 mmol)を加えた後溶媒を減圧溜去した。残さにエーテルを加えて粉末とし、ろ取後水酸化ナトリウム上2時間減圧乾燥した。この粉末、Boc-Cys(Acm)-OH 5.0 g(17.0 mmol)およびHOBt 2.3 g(17.0 mmol)をDMF(30 ml)に溶かし、-15℃以下に冷却してWSCl 3.2 ml(17.0 mmol)を滴下し4時間攪はんした。TLCで反応が終了したことを確認後氷冷水を加えて粉末とし、ろ取後メタノールより再結晶して目的物 13.8 g(95.2%)を得た。

mp 208℃(dec), $[\alpha]_D^{25}$ -24.5° (c 1.21, DMF)

元素分析 $C_{45}H_{56}O_{12}N_5SBr$ としての計算値

C, 55.47; H, 5.79; N, 7.10%

分析値 C, 55.28; H, 5.95; N, 7.18%

Boc-Cys(Acm)-Cys(Acm)-Tyr(BrZ)-Ile-Ala-OPac

Boc-Cys(Acm)-Tyr(BrZ)-Ile-Ala-OPac 9.0 g(9.3 mmol)をTFA(30 ml)で0℃以下10分間、室温40分間処理し、5.1 N HCl/ジオキサン 2.7 ml(14.0 mmol)を加えた後溶媒を減圧溜去した。残さにエーテルを加えて粉末とし、ろ取後水酸化ナトリウム上2時間減圧乾燥した。この粉末、Boc-Cys(Acm)-OH 3.0 g(10.3 mmol)およびHOBt 1.4 g(10.3 mmol)をDMF(30ml)に溶かし、-15℃以下に冷却してWSCl 1.9 ml(10.3 mmol)を滴下し3時間攪はんした。TLCで反応が終了したことを確認後氷冷水を加えて粉末とし、ろ取後メタノールより再結晶して目的物 9.6 g(90.6 %)を得た。

mp 207℃(dec), $[\alpha]_D^{25}$ -22.7° (c 0.90, DMF)

元素分析 $C_{51}H_{66}O_{14}N_7S_2Br \cdot 0.5H_2O$ としての計算値

C, 53.07; H, 5.85; N, 8.45%

分析値 C, 52.95; H, 5.86; N, 8.50%

Boc-Asp(OHex)-Cys(Acm)-Cys(Acm)-Tyr(BrZ)-Ile-Ala-OPac

Boc-Cys(Acm)-Cys(Acm)-Tyr(BrZ)-Ile-Ala-OPac 9.45 g(8.2 mmol)をTFA(30 ml)で0℃以下10分間、室温40分間処理し、5.1 N HCl/ジオキサン 2.4 ml(12.4 mmol)を加えた後溶媒を減圧溜去した。残さにエーテルを加えて粉末とし、ろ取後水酸化ナトリウム上2時間減圧乾燥した。この粉末、Boc-Asp(OHex)-OH 2.87 g(9.1 mmol)およびHOBt 1.3g(9.1 mmol)をDMF(30ml)に溶かし、-15℃以下に冷却してWSCl 1.7 ml(9.1 mmol)を滴下し4時間攪はんした。TLCで反応が終了したことを確認後氷冷水を加えて粉末とし、ろ取後メタノールより再結晶して目的物 10.2 g(91.9 %)を得た。

mp 220℃(dec), $[\alpha]_D^{25}$ -28.0° (c 0.87, DMF)

元素分析 $C_{61}H_{81}O_{17}N_8S_2Br$ としての計算値

C, 54.58; H, 6.08; N, 8.35%

分析値 C, 54.57; H, 6.20; N, 8.37%

Boc-Lys(ClZ)-Asp(OHex)-Cys(Acm)-Cys(Acm)-Tyr(BrZ)-Ile-Ala-OPac

Boc-Asp(OHex)-Cys(Acm)-Cys(Acm)-Tyr(BrZ)-Ile-Ala-OPac 9.5 g(7.08 mmol)をTFA(30 ml)で0℃以下10分間、室温40分間処理し、5.1 N HCl/ジオキサン 2.1 ml(10.6 mmol)を加えた後溶媒を減圧溜去した。残さにエーテルを加えて粉末とし、ろ取後水酸化ナトリウム上2時間減圧乾燥した。この粉末、Boc-Lys(ClZ)-OH 3.53 g(8.5 mmol)およびHOBt 1.2 g(8.5 mmol)をDMF(30ml)に溶かし、-15℃以下に冷却してWSCl 1.6 ml(8.5mmol)を滴下し3時間攪はんした。TLCで反応が終了したことを確認後氷冷水を加えて粉末とし、ろ取後メタノールより再結晶して目的物 11.2 g(96.6 %)を得た。

mp 215°C (dec), $[\alpha]_D^{25}$ -21.7° (c 0.81, DMSO)

元素分析 $C_{75}H_{98}O_{20}N_{10}S_2ClBr$ としての計算値

C, 54.96; H, 6.03; N, 8.55%

分析値 C, 55.09; H, 6.06; N, 8.41%

Boc-Phe-Lys(ClZ)-Asp(OHex)-Cys(Acm)-Cys(Acm)-Tyr(BrZ)-Ile-Ala-OPac

Boc-Lys(ClZ)-Asp(OHex)-Cys(Acm)-Cys(Acm)-Tyr(BrZ)-Ile-Ala-OPac 11.0 g(6.7 mmol)をTFA(30 ml)で0°C以下10分間, 室温40分間処理し, 5.1 N HCl/ジオキサン 2.0 ml(10.1 mmol)を加えた後溶媒を減圧溜去した。残さにエーテルを加えて粉末とし, ろ取後水酸化ナトリウム上2時間減圧乾燥した。この粉末, Boc-Phe-OH 1.96 g(7.4 mmol)およびHOBt 1.0 g(7.4 mmol)をDMF(30ml)に溶かし, -15°C以下に冷却して WSCI 1.4 ml(7.4 mmol)を滴下し4時間攪はんした。TLCで反応が終了したことを確認後氷冷水を加えて粉末とし, ろ取後メタノールより再結晶して目的物 11.2 g(93.6%)を得た。

mp 224°C (dec), $[\alpha]_D^{25}$ -16.1° (c 1.13, DMSO)

元素分析 $C_{84}H_{107}O_{21}N_{11}S_2ClBr$ としての計算値

C, 56.48; H, 6.04; N, 8.63%

分析値 C, 56.28; H, 6.12; N, 8.77%

Boc-Phe-Lys(ClZ)-Asp(OHex)-Cys(Acm)-Cys(Acm)-Tyr(BrZ)-Ile-Ala-OH

Boc-Phe-Lys(ClZ)-Asp(OHex)-Cys(Acm)-Cys(Acm)-Tyr(BrZ)-Ile-Ala-OPac 6.3 g(3.5 mmol)を酢酸 70 mlとNMP 30 mlの混合溶媒に溶かし, 亜鉛末 9.2 g(140 mmol)を加えて窒素気流下42°Cの湯浴上1時間攪はんした。亜鉛末をろ去後酢酸を減圧溜去し氷冷水に注ぎ粉末とした。ろ取後 DMF/酢酸エチル, エーテルより再沈殿して 目的物 5.2 g(89.7%)を得た。

mp 227°C (dec), $[\alpha]_D^{25}$ -11.4° (c 0.73, DMSO)

元素分析 $C_{76}H_{101}O_{20}N_{11}S_2ClBr \cdot H_2O$ としての計算値

C, 54.13; H, 6.16; N, 9.13%

分析値 C, 54.24; H, 6.16; N, 9.10%

アミノ酸分析(6 N HCl + PhOH, 108°C, 22時間)

Asp 1.03, Ala 1.00, Cys 小ピーク, Ile 0.96,

Tyr 0.71, Phe 0.99, Lys 1.27

(39-50)位のペプチドの合成

Boc-Lys(ClZ)-Ala-OPac

Boc-Ala-OPac 9.22 g(30.0 mmol)をTFA(45 ml)で0°C以下10分間, 室温50分間処理し, 5.1 N HCl/ジオキサン 7.1 ml(32.0 mmol)を加えた後溶媒を減圧溜去した。残さにエーテルを加えて粉末とし, ろ取後水酸化ナトリウム上2時間減圧乾燥した。この粉末, Boc-Lys(ClZ)-OH 13.0 g(31.5 mmol)およびHOBt 4.26 g(31.5 mmol)を DMF(30 ml)に溶かし,

-15℃以下に冷却してWSCl 5.8 ml (31.5 mmol)を滴下し終夜攪はんした。TLCで反応が終了したことを確認後酢酸エチルを加え、1 N HCl, 水, 5 % NaHCO₃, 水で洗い無水硫酸マグネシウムで乾燥した。酢酸エチルを溜去して得られた残さを酢酸エチル/エーテルで処理して粉末とし、同じ溶媒系より再結晶して目的物 16.2 g (89.0 %)を得た。

mp 74-77℃, $[\alpha]_D^{25}$ -26.1° (c 1.14, DMF)

元素分析 C₃₀H₃₈O₈N₃Clとしての計算値

C, 59.65; H, 6.34; N, 6.96%

分析値 C, 59.52; H, 6.42; N, 6.96%

Boc-Val-Lys(C1Z)-Ala-OPac

Boc-Lys(C1Z)-Ala-OPac 14.8 g (25.0 mmol)をTFA(55 ml)で0℃以下10分間、室温50分間処理し、5.1 N HCl/ジオキサン 5.8 ml (30.0 mmol)を加えた後溶媒を減圧溜去した。残さにエーテルを加えて粉末とし、ろ取後水酸化ナトリウム上 2時間減圧乾燥した。この粉末、Boc-Val-OH 5.6 g (26.3 mmol)および HOBt 3.64 g (27.5 mmol)をDMF(40 ml)に溶かし、-15℃以下に冷却してWSCl 4.9 ml (27.5 mmol)を滴下し終夜攪はんした。TLCで反応が終了したことを確認後水を加えて粉末とし、クロロホルム、メタノール/エーテルより再沈殿して目的物 14.9 g (86.0 %)を得た。

mp 160-162℃, $[\alpha]_D^{25}$ -27.9° (c 1.35, DMF)

元素分析 C₃₅H₄₇O₉N₄Clとしての計算値

C, 59.78; H, 6.74; N, 7.97%

分析値 C, 59.83; H, 6.82; N, 7.92%

Boc-Cys(Acm)-Val-Lys(C1Z)-Ala-OPac

Boc-Val-Lys(C1Z)-Ala-OPac 7.88 g (11.2 mmol)をTFA(34 ml)で0℃以下10分間、室温50分間処理し、5.1 N HCl/ジオキサン 2.7 ml (13.4 mmol)を加えた後溶媒を減圧溜去した。残さにエーテルを加えて粉末とし、ろ取後水酸化ナトリウム上2時間減圧乾燥した。この粉末、Boc-Cys(Acm)-OH 3.44 g (11.8 mmol)および HOBt 1.67 g (12.3 mmol)をDMF(20 ml)に溶かし、-15℃以下に冷却してWSCl 2.25 ml (12.3 mmol)を滴下し2.5時間攪はんした。TLCで反応が終了したことを確認後水を加えて粉末とし、クロロホルム、メタノール/エーテルより再沈殿して目的物 9.5 g (96.0 %)を得た。

mp 164-166℃, $[\alpha]_D^{25}$ -24.0° (c 1.03, DMF)

元素分析 C₄₁H₅₇O₁₁N₆SCl · 0.5H₂Oとしての計算値

C, 55.55; H, 6.60; N, 9.48%

分析値 C, 55.30; H, 6.59; N, 9.50%

Boc-Lys(C1Z)-Cys(Acm)-Val-Lys(C1Z)-Ala-OPac

Boc-Cys(Acm)-Val-Lys(C1Z)-Ala-OPac 9.39 g (10.7 mmol)をTFA(40 ml)で0℃以下10分間、室温50分間処理し、5.1 N HCl/ジオキサン 2.6 ml (12.8 mmol)を加えた後溶媒

を減圧溜去した。残さにエーテルを加えて粉末とし、ろ取後水酸化ナトリウム上2時間減圧乾燥した。この粉末、Boc-Lys(C1Z)-OH 4.66 g(11.2 mmol) および HOBt 1.59 g(11.8 mmol)をDMF(20 ml)に溶かし、-15℃以下に冷却してWSCl 2.15 ml(11.8 mmol)を滴下し終夜攪はんした。ゲル状の粉末がわずかに析出していた。TLCで反応が終了したことを確認後水を加えて粉末とし、クロロホルム、メタノール/エーテルより再沈殿して目的物11.0 g(88.0%)を得た。

mp 197-204℃(dec), $[\alpha]_D^{25}$ -25.9° (c 1.18, DMF)

元素分析 $C_{55}H_{74}O_{14}N_8SCl_2$ としての計算値

C, 56.26; H, 6.35; N, 9.54%

分析値 C, 56.00; H, 6.40; N, 9.43%

Boc-Gly-Pro-Lys(C1Z)-Cys(Acm)-Val-Lys(C1Z)-Ala-OPac

Boc-Lys(C1Z)-Cys(Acm)-Val-Lys(C1Z)-Ala-OPac 6.3 g(5.36 mmol)をTFA(25 ml)で0℃以下10分間、室温50分間処理し、5.0 N HCl/ジオキサン 1.3 ml(6.5 mmol)を加えた後溶媒を減圧溜去した。残さにエーテルを加えて粉末とし、ろ取後水酸化ナトリウム上2時間減圧乾燥した。この粉末、Boc-Gly-Pro-OH 1.6 g(5.9 mmol)および HOBt 800 mg(5.9 mmol)をDMF(20 ml)に溶かし、-15℃以下に冷却してWSCl 1.1 ml(6.0 mmol)を滴下し終夜攪はんした。TLCで反応が終了したことを確認後水を加えて粉末とし、クロロホルム、メタノール/エーテルより再沈殿して目的物 6.37 g(89.5%)を得た。

mp 215℃(dec), $[\alpha]_D^{25}$ -47.7° (c 0.83, DMF)

元素分析 $C_{62}H_{84}O_{16}N_{10}SCl_2 \cdot H_2O$ としての計算値

C, 55.31; H, 6.44; N, 10.40%

分析値 C, 55.42; H, 6.45; N, 10.38%

Boc-Ile-Gly-Pro-Lys(C1Z)-Cys(Acm)-Val-Lys(C1Z)-Ala-OPac

Boc-Gly-Pro-Lys(C1Z)-Cys(Acm)-Val-Lys(C1Z)-Ala-OPac 6.2 g(4.67 mmol)をTFA(30 ml)で0℃以下10分間、室温50分間処理し、5.0 N HCl/ジオキサン 1.0 ml(5.0 mmol)を加えた後溶媒を減圧溜去した。残さにエーテルを加えて粉末とし、ろ取後水酸化ナトリウム上2時間減圧乾燥した。この粉末、Boc-Ile-OH \cdot 0.5H₂O 1.2 g(5.13 mmol)にトルエンを加え共沸することにより脱水して得られた油状物およびHOBt 690 mg(5.13 mmol)をDMF(30 ml)に溶かし、-15℃以下に冷却してWSCl 0.94 ml(5.13 mmol)を滴下し終夜攪はんした。TLCで反応が終了したことを確認後水を加えて粉末とし、クロロホルム、メタノール/エーテルより再沈殿して目的物 6.28 g(93.3%)を得た。

mp 224℃(dec), $[\alpha]_D^{25}$ -35.1° (c 0.91, DMSO)

元素分析 $C_{68}H_{95}O_{17}N_{11}SCl_2$ としての計算値

C, 56.66; H, 5.95; N, 10.69%

分析値 C, 56.20; H, 5.98; N, 10.55%

Boc-Lys(C1Z)-Ile-Gly-Pro-Lys(C1Z)-Cys(Acm)-Val-Lys(C1Z)-Ala-OPac

Boc-Ile-Gly-Pro-Lys(C1Z)-Cys(Acm)-Val-Lys(C1Z)-Ala-OPac 6.1 g(4.23 mmol) を TFA(30 ml)で0℃以下10分間、室温50分間処理し、5.0 N HCl/ジオキサン 1.0 ml(5.0 mmol)を加えた後溶媒を減圧溜去した。残さにエーテルを加えて粉末とし、ろ取後水酸化ナトリウム上2時間減圧乾燥した。この粉末、Boc-Lys(C1Z)-OH 1.9 g(4.65 mmol)およびHOBt 630 mg(4.65 mmol)をDMF(30 ml)に溶かし、-15℃以下に冷却して WSCI 0.85 ml(4.65 mmol)を滴下し終夜攪はんした。TLCで反応が終了したことを確認後水を加えて粉末とし、メタノール/エーテルより再沈殿して目的物 6.94 g(94.4%)を得た。

mp 221℃(dec), $[\alpha]_D^{26} -38.0^\circ$ (c 0.49, DMSO)

元素分析 $C_{82}H_{112}O_{20}N_{13}SCl_3 \cdot H_2O$ としての計算値

C, 56.08; H, 6.54; N, 10.37%

分析値 C, 56.25; H, 6.55; N, 10.35%

Boc-Ile-Lys(C1Z)-Ile-Gly-Pro-Lys(C1Z)-Cys(Acm)-Val-Lys(C1Z)-Ala-OPac

Boc-Lys(C1Z)-Ile-Gly-Pro-Lys(C1Z)-Cys(Acm)-Val-Lys(C1Z)-Ala-OPac 6.8 g(3.9 mmol) をTFA(30 ml)で0℃以下10分間、室温50分間処理し、5.0 N HCl/ジオキサン 1.0 ml(5.0mmol)を加えた後溶媒を減圧溜去した。残さにエーテルを加えて粉末とし、ろ取後水酸化ナトリウム上2時間減圧乾燥した。この粉末、Boc-Ile-OH \cdot 0.5H₂O 1.03 g(4.3mmol) にトルエンを加え 共沸することにより脱水して得られた油状物および HOBt 580mg(4.3 mmol)をDMF(40ml)に溶かし、-15℃以下に冷却してWSCI 0.8 ml(4.3 mmol)を滴下し終夜攪はんした。遊離のアミノ基の検出試薬であるフルオレスアミンの反応が陰性であることを確認後水を加えて粉末とし、メタノールに懸濁後エーテルを加えてろ取して目的物 6.7 g(92.8%)を得た。

mp 235℃(dec), $[\alpha]_D^{26} -35.6^\circ$ (c 0.80, DMSO)

元素分析 $C_{88}H_{123}O_{21}N_{14}SCl_3 \cdot H_2O$ としての計算値

C, 57.09; H, 6.70; N, 10.59%

分析値 C, 56.79; H, 6.74; N, 10.50%

Boc-Arg(Tos)-Ile-Lys(C1Z)-Ile-Gly-Pro-Lys(C1Z)-Cys(Acm)-Val-Lys(C1Z)-Ala-OPac

Boc-Ile-Lys(C1Z)-Ile-Gly-Pro-Lys(C1Z)-Cys(Acm)-Val-Lys(C1Z)-Ala-OPac 6.6 g(3.56 mmol)をTFA(30 ml)で0℃以下10分間、室温50分間処理し、5.0 N HCl/ジオキサン 1.0 ml(5.0mmol)を加えた後溶媒を減圧溜去した。残さにエーテルを加えて粉末とし、ろ取後水酸化ナトリウム上2時間減圧乾燥した。この粉末、Boc-Arg(Tos)-OH 1.93 g(3.9 mmol)およびHOBt 526 mg(3.9 mmol)をDMF(40ml)とNMP(20 ml)との混合溶媒に溶かし、-15℃以下に冷却してWSCI 0.71 ml(3.9 mmol)を滴下し終夜攪はんした。遊離のアミノ基の検出試薬であるフルオレスアミンの反応が陰性であることを確認後水を加えて粉末とし、メタノールに懸濁して加温後ろ取して目的物 7.3 g(94.8%)を得た。

mp 239℃(dec), $[\alpha]_D^{26} -33.6^\circ$ (c 1.21, DMSO)

元素分析 $C_{101}H_{141}O_{24}N_{19}S_2Cl_3 \cdot 1.5H_2O$ としての計算値

C, 55.42; H, 6.63; N, 11.52%

分析値 C, 55.48; H, 6.58; N, 11.34%

Boc-Ala-Arg(Tos)-Ile-Lys(C1Z)-Ile-Gly-Pro-Lys(C1Z)-

Cys(Acm)-Val-Lys(C1Z)-Ala-OPac

Boc-Arg(Tos)-Ile-Lys(C1Z)-Ile-Gly-Pro-Lys(C1Z)-Cys(Acm)-Val-Lys(C1Z)-Ala-OPac 7.1 g(3.28 mmol)をTFA(30 ml)で0℃以下10分間、室温50分間処理し、5.0 N HCl /ジオキサン 1.0 ml(5.0mmol)を加えた後溶媒を減圧溜去した。残さにエーテルを加えて粉末とし、ろ取後水酸化ナトリウム上2時間減圧乾燥した。この粉末、Boc-Ala-OH 630 mg(3.61 mmol)およびHOBt 490 mg(3.61 mmol)をDMF(30ml)とNMP(30 ml)との混合溶媒に溶かし、-15℃以下に冷却してWSCl 0.66 ml(3.61 mmol)を滴下し終夜攪はんした。遊離のアミノ基の検出試薬であるフルオレスアミンの反応が陰性であることを確認後水を加えて粉末とし、メタノールに懸濁して加温後ろ取して目的物 6.7 g(91.8%)を得た。

mp 248℃(dec), $[\alpha]_D^{26} -34.4^\circ$ (c 0.82, DMSO)

元素分析 $C_{104}H_{146}O_{25}N_{19}S_2Cl_3$ としての計算値

C, 55.94; H, 6.59; N, 11.92%

分析値 C, 55.75; H, 6.71; N, 11.84%

Boc-Ala-Arg(Tos)-Ile-Lys(C1Z)-Ile-Gly-Pro-Lys(C1Z)-

Cys(Acm)-Val-Lys(C1Z)-Ala-OH

Boc-Ala-Arg(Tos)-Ile-Lys(C1Z)-Ile-Gly-Pro-Lys(C1Z)-Cys(Acm)-Val-Lys(C1Z)-Ala-OPac 3.3 g(1.5 mmol)を酢酸 110 mlとNMP 3 mlに溶かし、窒素気流下、47℃の湯浴上亜鉛末 8 g(120 mmol)を加えて攪はんした。30分後亜鉛末 4 g(60 mmol)を追加し更に30分間攪はんした。亜鉛末をろ別後酢酸を溜去し、残さに水を加えて粉末とした。ろ取後トリフルオロエタノール、クロロホルム/エーテルより粉末とし、目的物2.8 g(88.6%)を得た。

mp 230℃(dec), $[\alpha]_D^{26} -31.1^\circ$ (c 0.19, DMSO)

元素分析 $C_{96}H_{140}O_{24}N_{19}S_2Cl_3 \cdot 4H_2O$ としての計算値

C, 52.73; H, 6.82; N, 12.17%

分析値 C, 52.65; H, 6.67; N, 11.99%

アミノ酸分析(6 N HCl + PhOH, 108℃, 22時間)

Pro 0.99, Gly 1.00, Ala 1.00X2, Cys 小ピーク, Val 0.97, Ile 0.94X2,
Lys 1.02X3, Arg 0.90

(33-38)位のペプチドの合成

Boc-Glu(OHex)-Arg(Tos)-Ala-OPac

Boc-Arg(Tos)-Ala-OPac 14.0 g(22.7 mmol)をTFA(40 ml)で0℃以下10分間、室温40

分間処理し、5.1 N HCl/ジオキサン 6.6 ml (34.0 mmol)を加えた後溶媒を減圧溜去した。残さにエーテルを加えて粉末とし、ろ取後水酸化ナトリウム上2時間減圧乾燥した。この粉末、Boc-Glu(OHex)-OH 8.23 g (25.0 mmol)および HOBt 3.4 g (25.0 mmol)をDMF (40 ml)に溶かし、-15℃以下に冷却してWSCl 4.6 ml (25.0 mmol)を滴下し3時間攪はんした。TLCで反応が終了したことを確認後酢酸エチルを加え、1 N HCl, 水, 5 % NaHCO₃, 水で洗い無水硫酸マグネシウムで乾燥した。酢酸エチルを溜去して得られた残さをメタノール/エーテルで処理して粉末とし、同じ溶媒系より再沈殿して 目的物 16.3 g (86.7 %)を得た。

mp 93℃ (dec), $[\alpha]_D^{26} -20.4^\circ$ (c 0.53, DMF)

元素分析 C₄₀H₅₆O₁₁N₆Sとしての計算値

C, 57.95; H, 6.81; N, 10.14%

分析値 C, 57.77; H, 6.88; N, 10.05%

Boc-Glu(OHex)-Glu(OHex)-Arg(Tos)-Ala-OPac

Boc-Glu(OHex)-Arg(Tos)-Ala-OPac 15.0 g (18.1 mmol)を TFA (50 ml)で 0℃以下10分間、室温40分間処理し、5.1 N HCl/ジオキサン 5.3 ml (27.2 mmol)を加えた後溶媒を減圧溜去した。残さにエーテルを加えて粉末とし、ろ取後水酸化ナトリウム上2時間減圧乾燥した。この粉末、Boc-Glu(OHex)-OH 6.55 g (19.9 mmol)および HOBt 2.7 g (19.9 mmol)をDMF (40 ml)に溶かし、-15℃以下に冷却してWSCl 3.64 ml (19.9 mmol)を滴下し終夜攪はんした。TLCで反応が終了したことを確認後水を加えて粉末とし、ろ取後メタノール/エーテルより再沈殿して目的物 16.3 g (86.7 %)を得た。

mp 95℃ (dec), $[\alpha]_D^{26} -20.0^\circ$ (c 0.66, DMF)

元素分析 C₅₁H₇₃O₁₄N₇Sとしての計算値

C, 58.89; H, 7.07; N, 9.43%

分析値 C, 58.68; H, 7.20; N, 9.38%

Boc-Cys(Acm)-Glu(OHex)-Glu(OHex)-Arg(Tos)-Ala-OPac

Boc-Glu(OHex)-Glu(OHex)-Arg(Tos)-Ala-OPac 10.0 g (9.82 mmol)を TFA (30 ml)で 0℃以下10分間、室温40分間処理し、5.1 N HCl/ジオキサン 2.8 ml (14.4 mmol)を加えた後溶媒を減圧溜去した。残さにエーテルを加えて粉末とし、ろ取後水酸化ナトリウム上2時間減圧乾燥した。この粉末、Boc-Cys(Acm)-OH 3.1 g (10.6 mmol)および HOBt 1.43g (10.6 mmol)をDMF (50 ml)に溶かし、-15℃以下に冷却してWSCl 1.94 ml (10.6mmol)を滴下し終夜攪はんした。TLCで反応終了を確認後水を加えて粉末とし、ろ取後メタノール/エーテルついで酢酸エチルより再沈殿して目的物 7.9 g (67.5 %)を得た。

mp 105℃ (dec), $[\alpha]_D^{26} -19.4^\circ$ (c 0.52, DMF)

元素分析 C₅₇H₈₃O₁₆N₉S₂ · H₂Oとしての計算値

C, 55.55; H, 6.95; N, 10.23%

分析値 C, 55.58; H, 6.90; N, 10.20%

Boc-Thr(Bzl)-Cys(Acm)-Glu(OHex)-Glu(OHex)-Arg(Tos)-Ala-OPac

Boc-Cys(Acm)-Glu(OHex)-Glu(OHex)-Arg(Tos)-Ala-OPac 7.7 g(6.35 mmol)を TFA(30 ml)で0℃以下10分間、室温40分間処理し、5.1 N HCl/ジオキサン 1.87 ml(9.5 mmol)を加えた後溶媒を減圧溜去した。残さにエーテルを加えて粉末とし、ろ取後水酸化ナトリウム上2時間減圧乾燥した。この粉末、Boc-Thr(Bzl)-OH 2.26 g(7.3 mmol)およびHOBt 986 mg(7.3mmol)をDMF(30 ml)に溶かし、-15℃以下に冷却してWSCl 1.4 ml(7.3 mmol)を滴下し4時間攪はんした。TLCで反応が終了したことを確認後水を加えて粉末とし、ろ取後メタノール/エーテルより再沈殿して目的物 7.7 g(86.5 %)を得た。

mp 180℃(dec), $[\alpha]_D^{26}$ -15.3° (c 0.72, DMF)

元素分析 C₆₈H₉₆O₁₈N₁₀S₂としての計算値

C, 58.10; H, 6.88; N, 9.96%

分析値 C, 58.00; H, 7.04; N, 9.91%

アミノ酸(6 N HCl + PhOH, 108℃, 22時間)

Thr 0.96, Glu 1.00X2, Ala 1.00, Cys 小ピーク, Arg 0.96

(26-32)位のペプチドの合成

Boc-Asp(OHex)-Glu(OHex)-OPac

Boc-Glu(OHex)-OPac 12.0 g(26.9 mmol)をTFA(40 ml)で0℃以下10分間、室温30分間処理し、5.1 N HCl/ジオキサン 7.9 ml(40.0 mmol)を加えた後溶媒を減圧溜去した。残さにエーテルを加えて粉末とし、ろ取後水酸化ナトリウム上2時間減圧乾燥した。この粉末、Boc-Asp(OHex)-OH 8.9 g(28.2 mmol)およびHOBt 3.8 g(28.2 mmol)をDMF(30 ml)に溶かし、-15℃以下に冷却してWSCl 5.2 ml(28.2 mmol)を滴下し4時間攪はんした。TLCで反応が終了したことを確認後水を加えて粉末とし、ろ取後メタノールより再結晶して目的物 14.3 g(83.1 %)を得た。

mp 119-121℃, $[\alpha]_D^{26}$ -21.1° (c 0.61, DMF)

元素分析 C₃₄H₄₈O₁₀N₂としての計算値

C, 63.34; H, 7.50; N, 4.34%

分析値 C, 63.08; H, 7.57; N, 4.12%

Boc-Asp(OHex)-Asp(OHex)-Glu(OHex)-OPac

Boc-Asp(OHex)-Glu(OHex)-OPac 14.0 g(21.7 mmol)をTFA(40 ml)で0℃以下10分間、室温30分間処理し、5.1 N HCl/ジオキサン 6.4 ml(32.5 mmol)を加えた後溶媒を減圧溜去した。残さにエーテルを加えて粉末とし、ろ取後水酸化ナトリウム上2時間減圧乾燥した。この粉末、Boc-Asp(OHex)-OH 7.6 g(24.0 mmol)およびHOBt 3.3 g(24.0 mmol)をDMF(60 ml)に溶かし、-15℃以下に冷却してWSCl 4.4 ml(24.0 mmol)を滴下し4時間攪はんした。TLCで反応が終了したことを確認後酢酸エチルを加え、1 N HCl, 水, 5 % NaHCO₃, 水で洗い無水硫酸マグネシウムで乾燥した。酢酸エチルを溜去して得られた残さを酢酸エチル/n-ヘキサンより再結晶して目的物 17.3 g(95.1 %)を得た。

mp 64–67°C, $[\alpha]_D^{25}$ -29.9° (c 0.79, DMF)

元素分析 C₄₄H₆₃O₁₃N₃としての計算値

C, 62.76; H, 7.54; N, 4.99%

分析値 C, 62.71; H, 7.46; N, 4.83%

Boc-Asn-Asp(OHex)-Asp(OHex)-Glu(OHex)-OPac

Boc-Asp(OHex)-Asp(OHex)-Glu(OHex)-OPac 16.0 g(19.0 mmol)をTFA(50 ml)で0℃以下10分間, 室温30分間処理し, 5.1 N HCl/ジオキサン 5.5 ml(28.0 mmol)を加えた後溶媒を減圧溜去した。残さにエーテルを加えて粉末とし, ろ取後水酸化ナトリウム上2時間減圧乾燥した。この粉末, Boc-Asn-OH 5.1 g(28.0 mmol)およびHOBt 3.0 g(22.0 mmol)をDMF(50ml)に溶かし, -15℃以下に冷却してWSCl 4.1 ml(22.0 mmol)を滴下し4時間攪はんした。TLCで反応が終了したことを確認後酢酸エチルを加え, 1 N HCl, 水, 5% NaHCO₃, 水で洗い無水硫酸マグネシウムで乾燥した。酢酸エチルを溜去して得られた残さをクロロホルム/エーテルより再沈殿して目的物 15.3 g(84.5%)を得た。

mp 112°C(dec), $[\alpha]_D^{25}$ -33.6° (c 0.55, DMF)

元素分析 C₄₈H₆₉O₁₅N₅・0.5H₂Oとしての計算値

C, 59.74; H, 7.31; N, 7.26%

分析値 C, 59.44; H, 7.19; N, 7.07%

Boc-Arg(Tos)-Asn-Asp(OHex)-Asp(OHex)-Glu(OHex)-OPac

Boc-Asn-Asp(OHex)-Asp(OHex)-Glu(OHex)-OPac 14.0 g(14.6 mmol)をTFA(50 ml)で0℃以下10分間, 室温40分間処理し, 5.1 N HCl/ジオキサン 4.3 ml(21.9 mmol)を加えた後溶媒を減圧溜去した。残さにエーテルを加えて粉末とし, ろ取後水酸化ナトリウム上2時間減圧乾燥した。この粉末, Boc-Arg(Tos)-OH 7.94 g(16.8 mmol)およびHOBt 2.3g(16.8 mmol)をDMF(60ml)に溶かし, -15℃以下に冷却してWSCl 3.1 ml(16.8 mmol)を滴下し5時間攪はんした。TLCで反応終了を確認後酢酸エチルを加え, 1 N HCl, 水, 5% NaHCO₃, 水で洗い無水硫酸マグネシウムで乾燥した。酢酸エチルを溜去して得られた残さをクロロホルム/エーテルより再沈殿して目的物 16.8 g(90.8%)を得た。

mp 106°C(dec), $[\alpha]_D^{25}$ -26.9° (c 0.51, DMF)

元素分析 C₆₁H₈₇O₁₈N₉としての計算値

C, 57.85; H, 6.92; N, 9.95%

分析値 C, 57.56; H, 6.95; N, 9.87%

Boc-Tyr(BrZ)-Arg(Tos)-Asn-Asp(OHex)-Asp(OHex)-Glu(OHex)-OPac

Boc-Arg(Tos)-Asn-Asp(OHex)-Asp(OHex)-Glu(OHex)-OPac 15.0 g(11.8 mmol)をTFA(70 ml)で0℃以下10分間, 室温40分間処理し, 5.1 N HCl/ジオキサン 3.4 ml(17.0 mmol)を加えた後溶媒を減圧溜去した。残さにエーテルを加えて粉末とし, ろ取後水酸化ナトリウム上2時間減圧乾燥した。この粉末, Boc-Tyr(BrZ)-OH 6.4 g(13.0 mmol)お

よびHOBt 1.8 g(13.0 mmol)をDMF(70ml)に溶かし, -15℃以下に冷却して WSCI 2.4 ml (13.0 mmol)を滴下し5時間攪はんした。TLCで反応が終了したことを確認後氷冷水を加えて粉末とし, ろ取後クロロホルム/エーテルより再沈殿して 目的物 17.1 g(88.1%)を得た。

mp 126-128℃(dec), $[\alpha]_D^{25}$ -20.8° (c 0.53, DMF)

元素分析 $C_{78}H_{101}O_{22}N_{10}SBr \cdot 3H_2O$ としての計算値

C, 55.21; H, 6.36; N, 8.26%

分析値 C, 55.24; H, 6.11; N, 8.12%

Boc-Ala-Tyr(BrZ)-Arg(Tos)-Asn-Asp(OHex)-Asp(OHex)-Glu(OHex)-OPac

Boc-Tyr(BrZ)-Arg(Tos)-Asn-Asp(OHex)-Asp(OHex)-Glu(OHex)-OPac 15.0 g (9.14 mmol)を TFA(60 ml)で0℃以下10分間, 室温40分間処理し, 5.1 N HCl/ジオキサン 2.7 ml(13.7 mmol)を加えた後溶媒を減圧溜去した。残さにエーテルを加えて粉末とし, ろ取後水酸化ナトリウム上2時間減圧乾燥した。この粉末, Boc-Ala-OH 1.98 g(10.5 mmol)およびHOBt 1.42 g(10.5 mmol)をDMF(50ml)に溶かし, -15℃以下に冷却して WSCI 1.92 ml(10.5mmol)を滴下し終夜攪はんした。TLCで反応が終了したことを確認後氷冷水を加えて粉末とし, ろ取後クロロホルム/エーテルより再沈殿して 目的物 14.2 g(90.4%)を得た。

mp 155℃(dec), $[\alpha]_D^{25}$ -25.2° (c 0.48, DMF)

元素分析 $C_{81}H_{106}O_{23}N_{11}SBr \cdot 1.5H_2O$ としての計算値

C, 55.89; H, 6.31; N, 8.85%

分析値 C, 55.93; H, 6.27; N, 8.90%

Boc-Ala-Tyr(BrZ)-Arg(Tos)-Asn-Asp(OHex)-Asp(OHex)-Glu(OHex)-OH

Boc-Ala-Tyr(BrZ)-Arg(Tos)-Asn-Asp(OHex)-Asp(OHex)-Glu(OHex)-OPac 9.2 g(5.37 mmol)を酢酸 100 mlに溶かし, 亜鉛末 10.0 g(153.0 mmol)を加えて45℃の湯浴上50分間攪はんした。亜鉛末をろ去後酢酸を減圧溜去し, 残さに氷冷水を注ぎ粉末とした。ろ取後水でよく洗い, メタノール/エーテルより再沈殿して目的物7.3 g(85.2%)を得た。

mp 132℃(dec), $[\alpha]_D^{25}$ -20.9° (c 0.65, DMF)

元素分析 $C_{73}H_{100}O_{22}N_{11}SBr \cdot H_2O$ としての計算値

C, 54.34; H, 6.37; N, 9.55%

分析値 C, 54.32; H, 6.46; N, 9.39%

アミノ酸分析(6 N HCl + PhOH, 108℃, 22時間)

Asp 0.99X3, Glu 1.00, Ala 1.00, Tyr 0.87, Arg 0.96

(17-25)位のペプチドの合成

Boc-Asp(OHex)-Gly-OPac

Boc-Asp(OHex)-OH 12.6 g(40.0 mmol)と H-Gly-OBzl·TosOH 14.8 g(44.0 mmol)をジクロロメタンに懸濁し、-15℃以下に冷却してWSCl 8.05 ml(44.0 mmol)を滴下し終夜攪はんした。ジクロロメタンを溜去後酢酸エチルに溶かし、1 N HCl, 水, 5 % NaHCO₃, 水で洗い無水硫酸マグネシウムで乾燥した。酢酸エチルを溜去して得られた残さをメタノールに溶かしPd-Cの存在下4時間水素を通じた。触媒をろ去後メタノールを溜去し、残さを5 % NaHCO₃に溶かして酢酸エチルで洗浄した。ついで水層に3 N HClを加えてpHを2として酢酸エチルで抽出し、水洗後無水硫酸ナトリウムで乾燥した。酢酸エチルを溜去して得られた油状物をDMF 50 mlに溶かし、-10℃以下に冷却して臭化フェナシル6.0 g(30 mmol)とトリエチルアミン 4.2 ml(30 mmol)を加えて終夜攪はんした。反応液に酢酸エチルを加え、1 N HCl, 水, 5 % NaHCO₃, 水で洗い無水硫酸マグネシウムで乾燥した。酢酸エチルを溜去して得られた残さにn-ヘキサンを加えて固化し、エーテル/n-ヘキサンより再び固化して目的物13.5 g(68.9 %)を得た。

Boc-Tyr(BrZ)-Asp(OHex)-Gly-OPac

Boc-Asp(OHex)-Gly-OPac 13.0 g(26.5 mmol)をTFA(50 ml)で0℃以下10分間、室温40分間処理し、5.1 N HCl/ジオキサン 7.7 ml(39.0 mmol)を加えた後溶媒を減圧溜去した。残さにエーテルを加えて粉末とし、ろ取後水酸化ナトリウム上2時間減圧乾燥した。この粉末、Boc-Tyr(BrZ)-OH 13.3 g(27.0 mmol)およびHOBt 3.65 g(27.0 mmol)をDMF(50ml)に溶かし、-15℃以下に冷却してWSCl 4.94 ml(27.0 mmol)を滴下し終夜攪はんした。TLCで反応が終了したことを確認後水を加えて粉末とし、ろ取後メタノールより再結晶して目的物 21.0 g(91.7 %)を得た。

mp 129-131℃, $[\alpha]_D^{25} -10.0^\circ$ (c 0.65, DMF)

元素分析 C₄₂H₄₉O₁₂N₃Brとしての計算値

C, 58.20; H, 5.58; N, 4.85%

分析値 C, 58.27; H, 5.52; N, 4.84%

Boc-Cys(Acm)-Tyr(BrZ)-Asp(OHex)-Gly-OPac

Boc-Tyr(BrZ)-Asp(OHex)-Gly-OPac 12.0 g(13.8 mmol)をTFA(40 ml)で0℃以下10分間、室温40分間処理し、5.1 N HCl/ジオキサン 4.1 ml(20.7 mmol)を加えた後溶媒を減圧溜去した。残さにエーテルを加えて粉末とし、ろ取後水酸化ナトリウム上2時間減圧乾燥した。この粉末、Boc-Cys(Acm)-OH 4.4 g(15.1 mmol)およびHOBt 2.04 g(15.1 mmol)をDMF(40ml)に溶かし、-15℃以下に冷却してWSCl 2.8 ml(15.1 mmol)を滴下し3時間攪はんした。TLCで反応が終了したことを確認後水を加えて粉末とし、ろ取後メタノールより再結晶して目的物 12.1 g(84.0 %)を得た。

mp 182–185°C (dec), $[\alpha]_D^{25}$ -15.6° (c 0.63, DMF)

元素分析 $C_{48}H_{58}O_{14}N_5SBr$ としての計算値

C, 55.38; H, 5.62; N, 6.73%

分析値 C, 55.40; H, 5.51; N, 6.78%

Boc-Cys(Acm)-Cys(Acm)-Tyr(BrZ)-Asp(OHex)-Gly-OPac

Boc-Cys(Acm)-Tyr(BrZ)-Asp(OHex)-Gly-OPac 10.0 g(9.62 mmol)をTFA(40 ml)で0°C以下10分間、室温40分間処理し、5.1 N HCl/ジオキサン 2.8 ml(14.0 mmol)を加えた後溶媒を減圧溜去した。残さにエーテルを加えて粉末とし、ろ取後水酸化ナトリウム上2時間減圧乾燥した。この粉末、Boc-Cys(Acm)-OH 3.1 g(10.5 mmol)および HOBt 1.42 g(10.5 mmol)をDMF(60ml)に溶かし、-15°C以下に冷却してWSCl 1.93 ml(10.5 mmol)を滴下し4時間攪はんした。TLCで反応が終了したことを確認後水を加えて粉末とし、ろ取後DMF、メタノール/エーテルより再沈殿して目的物 10.6 g(90.6%)を得た。

mp 196°C (dec), $[\alpha]_D^{25}$ -16.2° (c 0.56, DMF)

元素分析 $C_{54}H_{68}O_{16}N_7S_2Br$ としての計算値

C, 53.37; H, 5.64; N, 8.07%

分析値 C, 53.33; H, 5.63; N, 8.27%

Boc-Lys(ClZ)-Cys(Acm)-Cys(Acm)-Tyr(BrZ)-Asp(OHex)-Gly-OPac

Boc-Cys(Acm)-Cys(Acm)-Tyr(BrZ)-Asp(OHex)-Gly-OPac 10.0 g(8.23 mmol)をTFA(30 ml)で0°C以下10分間、室温40分間処理し、5.1 N HCl/ジオキサン 2.1 ml(10.7 mmol)を加えた後溶媒を減圧溜去した。残さにエーテルを加えて粉末とし、ろ取後水酸化ナトリウム上2時間減圧乾燥した。この粉末、Boc-Lys(ClZ)-OH 3.76 g(9.06 mmol)および HOBt 1.23 g(9.06 mmol)をDMF(40ml)に溶かし、-15°C以下に冷却してWSCl 1.7 ml(9.06 mmol)を滴下し4時間攪はんした。TLCで反応が終了したことを確認後水を加えて粉末とし、ろ取後メタノールより再沈殿して目的物 12.0 g(96.7%)を得た。

mp 202°C (dec), $[\alpha]_D^{25}$ -21.6° (c 0.51, DMF)

元素分析 $C_{68}H_{85}O_{19}N_5S_2ClBr$ としての計算値

C, 54.02; H, 5.67; N, 8.34%

分析値 C, 54.02; H, 5.63; N, 8.43%

Boc-Lys(ClZ)-Lys(ClZ)-Cys(Acm)-Cys(Acm)-Tyr(BrZ)-Asp(OHex)-Gly-OPac

Boc-Lys(ClZ)-Cys(Acm)-Cys(Acm)-Tyr(BrZ)-Asp(OHex)-Gly-OPac 11.8 g(7.8 mmol)をTFA(40ml)で0°C以下10分間、室温40分間処理し、5.1 N HCl/ジオキサン 2.0 ml(10.1 mmol)を加えた後溶媒を減圧溜去した。残さにエーテルを加えて粉末とし、ろ取後水酸化ナトリウム上2時間減圧乾燥した。この粉末、Boc-Lys(ClZ)-OH 3.6 g(8.6 mmol)、およびHOBt 1.16g(8.6 mmol)をDMF(60ml)に溶かし、-15°C以下に冷却してWSCl 1.6 ml(8.6 mmol)を滴下し4時間攪はんした。TLCで反応が終了したことを確認後水を

加えて粉末とし、ろ取後DMF/メタノールより再沈殿して目的物 12.5 g(88.6 %)を得た。

mp 200°C(dec), $[\alpha]_D^{25}$ -24.2° (c 0.50, DMF)

元素分析 $C_{82}H_{102}O_{22}N_{11}S_2Cl_2Br$ としての計算値

C, 54.45; H, 5.68; N, 8.52%

分析値 C, 54.32; H, 5.58; N, 8.50%

Boc-Leu-Lys(ClZ)-Lys(ClZ)-Cys(Acm)-Cys(Acm)-Tyr(BrZ)-Asp(OHex)-Gly-OPac

Boc-Lys(ClZ)-Lys(ClZ)-Cys(Acm)-Cys(Acm)-Tyr(BrZ)-Asp(OHex)-Gly-OPac 12.0 g (6.63 mmol)をTFA(60ml)で0°C以下10分間、室温40分間処理し、5.1 N HCl/ジオキサン 1.7 ml(8.7 mmol)を加えた後溶媒を減圧溜去した。残さにエーテルを加えて粉末とし、ろ取後水酸化ナトリウム上2時間減圧乾燥した。この粉末、Boc-Leu-OH·H₂O 1.98 g (7.96 mmol)にトルエンを加え共沸することにより脱水して得られた油状物および HOBt 1.08g(7.96 mmol)をDMF(60ml)に溶かし、-15°C以下に冷却してWSCl 1.5 ml(7.96 mmol)を滴下し4時間攪はんした。TLCで反応が終了したことを確認後水を加えて粉末とし、ろ取後DMF/メタノールより再沈殿して目的物 12.2 g(96.1 %)を得た。

mp 228°C(dec), $[\alpha]_D^{25}$ -22.0° (c 0.65, DMF)

元素分析 $C_{88}H_{113}O_{23}N_{12}S_2Cl_2Br$ としての計算値

C, 55.00; H, 5.93; N, 8.75%

分析値 C, 54.89; H, 5.94; N, 8.75%

Boc-Met-Leu-Lys(ClZ)-Lys(ClZ)-Cys(Acm)-Cys(Acm)-Tyr(BrZ)-Asp(OHex)-Gly-OPac

Boc-Leu-Lys(ClZ)-Lys(ClZ)-Cys(Acm)-Cys(Acm)-Tyr(BrZ)-Asp(OHex)-Gly-OPac 12.0 g(6.24 mmol)をTFA(40 ml)で0°C以下10分間、室温40分間処理し、5.1 N HCl/ジオキサン 1.6 ml(7.49 mmol)を加えた後溶媒を減圧溜去した。残さにエーテルを加えて粉末とし、ろ取後水酸化ナトリウム上2時間減圧乾燥した。この粉末、Boc-Met-OH 1.86 g (7.49 mmol) およびHOBt 1.02g(7.49 mmol)をDMF(40ml)とNMP(20 ml)との混合溶媒に溶かし、-15°C以下に冷却してWSCl 1.4 ml(7.49 mmol)を滴下し4時間攪はんした。アミノ基の検出試薬であるフルオレスアミンの反応が陰性であることを確認後水を加えて粉末とし、ろ取後DMF/メタノールより再沈殿して目的物 11.2 g(87.5 %)を得た。

mp 237°C(dec), $[\alpha]_D^{25}$ -17.4° (c 0.66, DMSO)

元素分析 $C_{93}H_{122}O_{24}N_{13}S_3Cl_2Br$ としての計算値

C, 54.44; H, 5.99; N, 8.87%

分析値 C, 54.23; H, 5.95; N, 8.86%

アミノ酸分析(6 N HCl + PhOH, 108°C, 22時間)

Asp 1.00, Gly 1.02, Cys 小ピーク(X2), Met 0.76,

Leu 0.96, Tyr 0.87, Lys 0.99X2

(11-16)位のペプチドの合成

Boc-Tyr(BrZ)-Ala-OPac

Boc-Ala-OPac 7.68 g(25.0 mmol)をTFA(60 ml)で0℃以下10分間、室温50分間処理し、5.1 N HCl/ジオキサン 7.5 ml(38.3 mmol)を加えた後溶媒を減圧溜去した。残さにエーテルを加えて粉末とし、ろ取後水酸化ナトリウム上2時間減圧乾燥した。この粉末、Boc-Tyr(BrZ)-OH 13.1 g(26.5 mmol)およびHOBt 3.58 g(26.5 mmol)をDMF(70ml)に溶かし、-15℃以下に冷却してWSCl 4.84 ml(26.5 mmol)を滴下し終夜攪はんした。TLCで反応が終了したことを確認後酢酸エチルを加え、1 N HCl, 水, 5 % NaHCO₃, 水で洗い無水硫酸マグネシウムで乾燥した。酢酸エチルを溜去して得られた残さにn-ヘキサンを加えて粉末とし、酢酸エチル/エーテル, n-ヘキサンより2回再結晶して目的物 12.5 g(73.0 %)を得た。

mp 140-142℃, $[\alpha]_D^{25}$ -12.5° (c 0.52, DMF)

元素分析 C₃₃H₃₅O₉N₂Brとしての計算値

C, 57.99; H, 5.16; N, 4.10%

分析値 C, 58.07; H, 5.08; N, 4.15%

Boc-Lys(ClZ)-Tyr(BrZ)-Ala-OPac

Boc-Tyr(BrZ)-Ala-OPac 12.0 g(17.5 mmol)をTFA(60 ml)で0℃以下10分間、室温40分間処理し、5.1 N HCl/ジオキサン 5.0 ml(25.5 mmol)を加えた後溶媒を減圧溜去した。残さにエーテルを加えて粉末とし、ろ取後水酸化ナトリウム上2時間減圧乾燥した。この粉末、Boc-Lys(ClZ)-OH 7.63 g(18.4 mmol) およびHOBt 2.49 g(18.4 mmol)をDMF(100 ml)に溶かし、-15℃以下に冷却してWSCl 3.37 ml(18.4 mmol)を滴下し終夜攪はんした。TLCで反応が終了したことを確認後酢酸エチルを加え、1 N HCl, 水, 5 % NaHCO₃, 水で洗った。酢酸エチルを溜去して得られた油状物にn-ヘキサンを加えて粉末とし、クロロホルム, メタノール/エーテルより2回再結晶して目的物 15.6 g(90.9 %)を得た。

mp 159-161℃, $[\alpha]_D^{25}$ -24.2° (c 0.55, DMF)

元素分析 C₄₇H₅₂O₁₂N₄ClBrとしての計算値

C, 57.59; H, 5.35; N, 5.72%

分析値 C, 57.43; H, 5.24; N, 5.71%

Boc-Tyr(BrZ)-Lys(ClZ)-Tyr(BrZ)-Ala-OPac

Boc-Lys(ClZ)-Tyr(BrZ)-Ala-OPac 15.4 g(15.7 mmol)をTFA(60 ml)で0℃以下10分間、室温60分間処理し、5.1 N HCl/ジオキサン 4.0 ml(20.4 mmol)を加えた後溶媒を減圧溜去した。残さにエーテルを加えて粉末とし、ろ取後水酸化ナトリウム上2時間減圧乾燥した。この粉末、Boc-Tyr(BrZ)-OH 8.16 g(16.5 mmol)およびHOBt 2.27 g(16.5 mmol)をDMF(110ml)に溶かし、-15℃以下に冷却してWSCl 3.01 ml(16.5 mmol)を滴下し終夜攪はんした。TLCで反応が終了したことを確認後氷冷水を加えて粉末とし、ろ取後クロロホルム, メタノール/エーテルより2回再結晶して目的物 20.5 g(96.2 %)を得た。

mp 171–173°C (dec), $[\alpha]_D^{25}$ -18.0° (c 0.54, DMF)

元素分析 $C_{64}H_{66}O_{16}N_5ClBr_2$ としての計算値

C, 56.67; H, 4.90; N, 5.16%

分析値 C, 56.77; H, 4.84; N, 5.26%

Boc-Lys(ClZ)-Tyr(BrZ)-Lys(ClZ)-Tyr(BrZ)-Ala-OPac

Boc-Tyr(BrZ)-Lys(ClZ)-Tyr(BrZ)-Ala-OPac 20.3 g (14.9 mmol)をTFA(100 ml)で0℃以下10分間、室温50分間処理し、5.1 N HCl/ジオキサン 4.0 ml (20.4 mmol)を加えた後溶媒を減圧溜去した。残さにエーテルを加えて粉末とし、ろ取後水酸化ナトリウム上2時間減圧乾燥した。この粉末、Boc-Lys(ClZ)-OH 6.47 g (15.6 mmol)およびHOBt 2.11 g (15.6 mmol)をDMF(100ml)に溶かし、-15℃以下に冷却してWSCl 2.86 ml (15.6 mmol)を滴下し終夜攪はんした。TLCで反応が終了したことを確認後氷冷水を加えて粉末とし、ろ取後クロロホルム、メタノール/エーテルより2回再結晶して目的物 24.0 g (97.5%)を得た。

mp 176–178°C (dec), $[\alpha]_D^{25}$ -21.7° (c 0.48, DMF)

元素分析 $C_{78}H_{83}O_{19}N_7Cl_2Br_2$ としての計算値

C, 56.67; H, 5.06; N, 5.93%

分析値 C, 56.61; H, 5.02; N, 5.87%

Boc-Ala-Lys(ClZ)-Tyr(BrZ)-Lys(ClZ)-Tyr(BrZ)-Ala-OPac

Boc-Lys(ClZ)-Tyr(BrZ)-Lys(ClZ)-Tyr(BrZ)-Ala-OPac 23.5 g (14.2 mmol)をTFA(100 ml)で0℃以下10分間、室温50分間処理し、5.1 N HCl/ジオキサン 4.0 ml (20.4 mmol)を加えた後溶媒を減圧溜去した。残さにエーテルを加えて粉末とし、ろ取後水酸化ナトリウム上2時間減圧乾燥した。この粉末、Boc-Ala-OH 2.82 g (14.9 mmol)およびHOBt 2.01 g (14.9 mmol)をDMF(200ml)に溶かし、-15℃以下に冷却してWSCl 2.72 ml (14.9 mmol)を滴下し終夜攪はんした。TLCで反応が終了したことを確認後氷冷水を加えて粉末とし、ろ取後クロロホルム、メタノール/エーテルより2回再結晶して目的物 23.6 g (96.7%)を得た。

mp 209°C (dec), $[\alpha]_D^{25}$ -24.4° (c 0.52, DMF)

元素分析 $C_{81}H_{88}O_{20}N_8Cl_2Br_2$ としての計算値

C, 56.42; H, 5.14; N, 6.50%

分析値 C, 56.42; H, 5.16; N, 6.53%

Boc-Ala-Lys(ClZ)-Tyr(BrZ)-Lys(ClZ)-Tyr(BrZ)-Ala-OH

Boc-Ala-Lys(ClZ)-Tyr(BrZ)-Lys(ClZ)-Tyr(BrZ)-Ala-OPac 5.2 g (3.0 mmol)を酢酸 100 mlに溶かし、亜鉛末 3.9 g (60.0 mmol)を加え43℃の湯浴上80分間攪はんした。亜鉛末をろ去後酢酸を減圧溜去し、残さに氷冷水を注ぎ粉末とした。ろ取後水でよく洗い、クロロホルム、メタノール/エーテルより再沈殿して目的物4.29 g (89.4%)を得た。

mp 225°C (dec), $[\alpha]_D^{25}$ -21.7° (c 0.52, DMF)
元素分析 $C_{73}H_{82}O_{19}N_8Cl_2Br_2 \cdot 0.5H_2O$ としての計算値
C, 54.28; H, 5.18; N, 6.94%
分析値 C, 54.22; H, 5.24; N, 6.78%
アミノ酸分析 (6 N HCl + PhOH, 108°C, 22時間)
Ala 0.98X2, Tyr 1.00X2, Lys 1.01X2

(1-10)位のペプチドの合成

Boc-Glu(OHex)-Ala-OPac

Boc-Ala-OPac 21.5 g (70.0 mmol)をTFA(60 ml)で0°C以下10分間、室温25分間処理し、5.1 N HCl/ジオキサン 16.5 ml (84.0 mmol)を加えた後溶媒を減圧溜去した。残さにエーテルを加えて粉末とし、ろ取後水酸化ナトリウム上1時間減圧乾燥した。この粉末、Boc-Glu(OHex)-OH 23.1 g (70.0 mmol)およびHOBt 9.9 g (73.5 mmol)をDMF(60 ml)に溶かし、-15°C以下に冷却してWSCl 13.5 ml (73.5 mmol)を滴下し終夜攪はんした。TLCで反応終了を確認後酢酸エチルを加え、1 N HCl, 水, 5 % NaHCO₃, 水で洗い無水硫酸ナトリウムで乾燥した。酢酸エチルを溜去して得られた残さにn-ヘキサンを加えて粉末とし、酢酸エチル/エーテル, n-ヘキサンより2回再結晶して目的物 27.3 g (75.2%)を得た。

mp 106-108°C, $[\alpha]_D^{25}$ -28.8° (c 0.64, DMF)
元素分析 $C_{27}H_{38}O_8N_2$ としての計算値
C, 62.53; H, 7.39; N, 5.40%
分析値 C, 62.40; H, 7.42; N, 5.35%

Boc-Glu(OHex)-Glu(OHex)-Ala-OPac

Boc-Glu(OHex)-Ala-OPac 26.0 g (50.1 mmol)をTFA(80 ml)で0°C以下10分間、室温35分間処理し、5.1 N HCl/ジオキサン 11.8 ml (60.1 mmol)を加えた後溶媒を減圧溜去した。残さにエーテルを加えて粉末とし、ろ取後水酸化ナトリウム上1時間減圧乾燥した。この粉末、Boc-Glu(OHex)-OH 17.3 g (52.6 mmol) および HOBt 7.4 g (55.1 mmol)をDMF (70 ml)に溶かし、-15°C以下に冷却してWSCl 10.1 ml (55.1 mmol)を滴下し終夜攪はんした。TLCで反応が終了したことを確認後酢酸エチルを加え、1 N HCl, 水, 5 % NaHCO₃, 水で洗い無水硫酸ナトリウムで乾燥した。酢酸エチルを溜去して得られた残さにn-ヘキサンを加えて粉末とし、酢酸エチル/エーテル, n-ヘキサンより2回再沈殿して目的物 33.9g (92.6 %)を得た。

mp 75-78°C (dec), $[\alpha]_D^{25}$ -26.6° (c 0.68, DMF)
元素分析 $C_{38}H_{55}O_{11}N_3$ としての計算値
C, 62.53; H, 7.60; N, 5.76%
分析値 C, 62.39; H, 7.60; N, 5.51%

Boc-Glu(OHex)-Glu(OHex)-Glu(OHex)-Ala-OPac

Boc-Glu(OHex)-Glu(OHex)-Ala-OPac 21.9 g(30.0 mmol)をTFA(70 ml)で0℃以下10分間、室温45分間処理し、5.1 N HCl/ジオキサン 7.1 ml(36.0 mmol)を加えた後溶媒を減圧溜去した。残さにエーテルを加えて粉末とし、ろ取後水酸化ナトリウム上1時間減圧乾燥した。この粉末、Boc-Glu(OHex)-OH 10.4 g(31.5 mmol)およびHOBt 4.5 g(33.0 mmol)をDMF(60 ml)に溶かし、-15℃以下に冷却してWSCl 6.0 ml(33.0 mmol)を滴下し終夜攪はんした。TLCで反応が終了したことを確認後氷冷水を注ぎ粉末とし、ろ取後酢酸エチル、メタノール/エーテルより2回再沈殿して目的物 22.8g(80.9%)を得た。

mp 120-122℃(dec), $[\alpha]_D^{25}$ -24.9° (c 0.49, DMF)

元素分析 C₄₉H₇₂O₁₄N₄としての計算値

C, 62.53; H, 7.71; N, 5.95%

分析値 C, 62.34; H, 7.70; N, 5.96%

Boc-Ile-Glu(OHex)-Glu(OHex)-Glu(OHex)-Ala-OPac

Boc-Glu(OHex)-Glu(OHex)-Glu(OHex)-Ala-OPac 17.0 g(18.1 mmol)をTFA(50 ml)で0℃以下10分間、室温45分間処理し、5.1 N HCl/ジオキサン 4.3 ml(21.7 mmol)を加えた後溶媒を減圧溜去した。残さにエーテルを加えて粉末とし、ろ取後水酸化ナトリウム上1時間減圧乾燥した。この粉末、Boc-Ile-OH·0.5H₂O 4.8 g(19.9 mmol)にトルエンを加え共沸することにより脱水して得られた油状物およびHOBt 2.7 g(19.9 mmol)をDMF(50 ml)に溶かし、-15℃以下に冷却してWSCl 3.6 ml(19.9 mmol)を滴下し終夜攪はんした。反応液全体が固化したが、遊離のアミノ基の検出試薬であるフルオレスアミンの反応が陰性であることから反応が終了したことを確認した。氷冷水を注ぎ粉末を細かく碎き、ろ取後クロロホルム、メタノール/エーテルより2回再沈殿して目的物 18.8g(98.4%)を得た。

mp 204-206℃(dec), $[\alpha]_D^{25}$ -26.7° (c 0.51, DMF)

元素分析 C₅₅H₈₃O₁₅N₅·2H₂Oとしての計算値

C, 60.59; H, 8.04; N, 6.42%

分析値 C, 60.38; H, 7.62; N, 6.34%

Boc-Lys(ClZ)-Ile-Glu(OHex)-Glu(OHex)-Glu(OHex)-Ala-OPac

Boc-Ile-Glu(OHex)-Glu(OHex)-Glu(OHex)-Ala-OPac 11.6 g(11.0 mmol)をTFA(35 ml)で0℃以下10分間、室温35分間処理し、5.1 N HCl/ジオキサン 2.6 ml(13.2 mmol)を加えた後溶媒を減圧溜去した。残さにエーテルを加えて粉末とし、ろ取後水酸化ナトリウム上1時間減圧乾燥した。この粉末、Boc-Lys(ClZ)-OH 5.0 g(12.1 mmol)およびHOBt 1.6 g(12.1 mmol)をDMF(30 ml)に溶かし、-15℃以下に冷却してWSCl 2.2 ml(12.1 mmol)を滴下し終夜攪はんした。反応液全体が固化したが、遊離のアミノ基の検出試薬であるフルオレスアミンの反応が陰性であることから反応が終了したことを確認した。氷冷水を注ぎ粉末を細かく碎き、ろ取後クロロホルム、メタノール/エーテルより2回再沈殿

して目的物 13.3g (89.3 %)を得た。

mp 224°C (dec), $[\alpha]_D^{25}$ -23.7° (c 0.63, DMF)

元素分析 $C_{69}H_{100}O_{19}N_7Cl \cdot H_2O$ としての計算値

C, 60.53; H, 7.51; N, 7.16%

分析値 C, 60.49; H, 7.45; N, 7.08%

Boc-Lys(C1Z)-Lys(C1Z)-Ile-Glu(OHex)-Glu(OHex)-Glu(OHex)-Ala-OPac

Boc-Lys(C1Z)-Ile-Glu(OHex)-Glu(OHex)-Glu(OHex)-Ala-OPac 13.0 g (9.6 mmol) を TFA (40 ml) で 0°C 以下 10 分間、室温 35 分間処理し、5.1 N HCl/ジオキサン 2.3 ml (11.5 mmol) を加えた後溶媒を減圧溜去した。残さにエーテルを加えて粉末とし、ろ取後水酸化ナトリウム上 2 時間減圧乾燥した。この粉末、Boc-Lys(C1Z)-OH 4.4 g (10.6 mmol) および HOBt 1.4 g (10.6 mmol) を DMF (40 ml) に溶かし、-15°C 以下に冷却して WSCI 1.93 ml (10.6 mmol) を滴下し終夜攪はんした。反応液全体が固化したが、遊離のアミノ基の検出試薬であるフルオレスアミンの反応が陰性であることから反応が終了したことを確認した。氷冷水を注ぎ粉末を細かく砕き、ろ取後クロロホルム、メタノール/エーテルより 2 回再沈殿して目的物 15.1g (95.6 %)を得た。

mp 240°C (dec), $[\alpha]_D^{25}$ -23.5° (c 0.55, DMF)

元素分析 $C_{83}H_{117}O_{21}N_9Cl_2 \cdot H_2O$ としての計算値

C, 59.84; H, 7.20; N, 7.57%

分析値 C, 59.80; H, 7.27; N, 7.54%

Boc-Gln-Lys(C1Z)-Lys(C1Z)-Ile-Glu(OHex)-Glu(OHex)-Glu(OHex)-Ala-OPac

Boc-Lys(C1Z)-Lys(C1Z)-Ile-Glu(OHex)-Glu(OHex)-Glu(OHex)-Ala-OPac 11.7 g (7.1 mmol) を TFA (35 ml) で 0°C 以下 10 分間、室温 35 分間処理し、5.1 N HCl/ジオキサン 1.7 ml (8.5 mmol) を加えた後溶媒を減圧溜去した。残さにエーテルを加えて粉末とし、ろ取後水酸化ナトリウム上 2 時間減圧乾燥した。この粉末、Boc-Gln-OH 1.1 g (7.8 mmol)、HOBt 1.1 g (8.2 mmol) を DMF (30 ml) と DMSO (10 ml) との混合溶媒に溶かし、-15°C 以下に冷却して WSCI 1.5 ml (8.2 mmol) を滴下し終夜攪はんした。反応液全体が固化したが、遊離のアミノ基の検出試薬であるフルオレスアミンの反応が陰性であることから反応が終了したことを確認した。氷冷水を注ぎ粉末を細かく砕き、ろ取後クロロホルム、メタノール/エーテルより 2 回再沈殿して目的物 12.3g (97.6 %)を得た。

mp 250°C (dec), $[\alpha]_D^{25}$ -21.7° (c 0.47, DMF)

元素分析 $C_{88}H_{125}O_{23}N_{11}Cl_2 \cdot H_2O$ としての計算値

C, 58.92; H, 7.14; N, 8.59%

分析値 C, 58.97; H, 7.30; N, 8.66%

Boc-Leu-Gln-Lys(C1Z)-Lys(C1Z)-Ile-Glu(OHex)-Glu(OHex)-Glu(OHex)-Ala-OPac

Boc-Gln-Lys(C1Z)-Lys(C1Z)-Ile-Glu(OHex)-Glu(OHex)-Glu(OHex)-Ala-OPac 12.0 g (6.8mmol)をTFA(40 ml)で0℃以下10分間、室温35分間処理し、5.1 N HCl/ジオキサン 1.6 ml(8.2mmol)を加えた後溶媒を減圧溜去した。残さにエーテルを加えて粉末とし、ろ取後水酸化ナトリウム上2時間減圧乾燥した。この粉末、Boc-Leu-OH・H₂O 2.0 g (8.2 mmol)にトルエンを加え共沸することにより脱水した油状物およびHOBt 1.0 g(7.5 mmol)をDMF(40 ml)とDMSO(10 ml)との混合溶媒に溶かし、-15℃以下に冷却してWSC1 1.4 ml (7.5 mmol)を滴下し終夜攪はんした。遊離のアミノ基の検出試薬であるフルオレスアミンの反応が陰性であることから反応が終了したことを確認後氷冷水を注いで粉末とし、ろ取後クロロホルム、トリフルオロエタノール/エーテルより2回再沈殿して目的物11.4g(89.2%)を得た。

mp 235℃(dec), $[\alpha]_D^{25}$ -19.2° (c 0.66, DMF)

元素分析 C₉₄H₁₃₆O₂₄N₁₂Cl₂・1.5 H₂Oとしての計算値

C, 58.92; H, 7.31; N, 8.77%

分析値 C, 59.18; H, 7.30; N, 8.78%

Boc-Met-Leu-Gln-Lys(C1Z)-Lys(C1Z)-Ile-Glu(OHex)-Glu(OHex)-Glu(OHex)-Ala-OPac

Boc-Leu-Gln-Lys(C1Z)-Lys(C1Z)-Ile-Glu(OHex)-Glu(OHex)-Glu(OHex)-Ala-OPac 11.0 g(5.8mmol)をTFA(40 ml)で0℃以下10分間、室温45分間処理し、5.1 N HCl/ジオキサン1.4 ml(7.0mmol)を加えた後溶媒を減圧溜去した。残さにエーテルを加えて粉末とし、ろ取後水酸化ナトリウム上終夜減圧乾燥した。この粉末、Boc-Met-OH 1.6 g(6.4 mmol),およびHOBt 862mg(6.4 mmol)をDMF(30 ml)とDMSO(25 ml)との混合溶媒に溶かし、-15℃以下に冷却してWSC1 1.17 ml (6.4 mmol)を滴下し終夜攪はんした。わずかにゲルが析出したが、遊離のアミノ基の検出試薬であるフルオレスアミンの反応が陰性であることから反応が終了したことを確認した。氷冷水を注いで粉末とし、ろ取後クロロホルム、トリフルオロエタノール/エーテルより2回再沈殿して目的物 10.5g(90.1%)を得た。

mp 240℃(dec), $[\alpha]_D^{25}$ -19.1° (c 0.65, DMF)

元素分析 C₉₉H₁₄₅O₂₅N₁₃SCl₂・H₂Oとしての計算値

C, 58.33; H, 7.27; N, 8.93%

分析値 C, 58.33; H, 7.32; N, 8.85%

Boc-Met-Leu-Gln-Lys(C1Z)-Lys(C1Z)-Ile-Glu(OHex)-Glu(OHex)-Glu(OHex)-Ala-OH

Boc-Met-Leu-Gln-Lys(C1Z)-Lys(C1Z)-Ile-Glu(OHex)-Glu(OHex)-Glu(OHex)-Ala-OPac 3.0g(1.5 mmol)を酢酸(60 ml)とトリフルオロエタノール(5 ml)との混合溶媒に溶かし、亜鉛末 3.9 g(60.0 mmol)を加えて窒素気流下44℃の湯浴上60分間攪はんした。亜鉛末をろ去後溶媒を減圧溜去し、残さに氷冷水を注ぎ粉末とした。ろ取後水でよく洗い、トリフルオロエタノール/メタノールより再沈殿して目的物 2.54 g(89.1%)を得た。

mp 231°C(dec), $[\alpha]_D^{25}$ -16.5° (c 0.54, DMF)

元素分析 $C_{91}H_{139}O_{24}N_{13}SCl_2 \cdot H_2O$ としての計算値

C, 56.92; H, 7.40; N, 9.48%

分析値 C, 56.90; H, 7.38; N, 9.25%

アミノ酸分析(6 N HCl + PhOH, 108°C, 22時間)

Glu 1.02X4, Ala 1.00, Met 0.61, Ile 0.97, Leu 1.02, Lys 1.03X2

6-2 セグメント縮合による保護ブタ[Gln⁶⁵]C5a-アナフィラトキシンの合成

Boc-(51-63)-OPacの合成

Boc-(59-63)-OPac 2.4 g(2.5 mmol)をTFA(10 ml)で0°C以下10分間、室温40分間処理し、5.1 N HCl/ジオキサン 0.6 ml(3.0 mmol)を加えた後溶媒を減圧溜去した。残さにエーテルを加えて粉末とし、ろ取後水酸化ナトリウム上2時間減圧乾燥した。この粉末、Boc-(51-58)-OH 4.2 g(2.5 mmol)およびHOOBt 429mg(2.63 mmol)をDMF(15 ml)とNMP(30 ml)の混合溶媒に溶かし、-15°C以下に冷却してWSCl 0.48 ml(2.63 mmol)を滴下し終夜攪はんした。全体にゲルが析出したが、遊離のアミノ基の検出試薬であるフルオレスアミンの反応が陰性であることから反応が終了したことを確認した。氷冷水を注いで粉末とし、ろ取後DMFに懸濁しメタノールで細かく砕いた後再びろ取して目的物 6.0 g(95.7%)を得た。

mp 239°C(dec), $[\alpha]_D^{25}$ -18.8° (c 0.41, DMSO)

元素分析 $C_{114}H_{153}O_{30}N_{21}S_3ClBr \cdot H_2O$ としての計算値

C, 54.18; H, 6.18; N, 11.64%

分析値 C, 53.85; H, 6.37; N, 12.04%

アミノ酸分析(6 N HCl + PhOH, 108°C, 22時間)

Asp 1.05X2, Glu 1.01, Ala 1.00X2, Cys 小ピーク(X2), Val 0.94,

Ile 1.01, Tyr 0.83, Phe 1.06, Lys 1.28, Arg 0.91

Boc-(51-63)-OHの合成

Boc-(51-63)-OPac 5.0 g(2.0 mmol)をDMSO(40 ml)に溶かしてピリジン 1.6 ml(20 mmol)とアセチルアセトン 9.5 ml(100 mmol)を加え、次いで亜鉛末 6.5 g(100 mmol)を加えて45°Cの湯浴上2時間10分攪はんした。亜鉛末をろ去後ろ液を0.1 N HClの中に注いで粉末とした。ろ取後HPLCで分析するとフェナシルエステルの脱離が完結していないことがわかり、同様の操作を2回繰り返してエステルの脱離を完結させた。ろ取後DMFに懸濁しメタノールで細かく砕いた後ろ取して目的物 3.5 g(73.1%)を得た。

mp 222°C (dec), $[\alpha]_D^{25}$ -13.7° (c 0.51, DMSO)

元素分析 $C_{106}H_{147}O_{29}N_{21}S_3ClBr \cdot H_2O$ としての計算値

C, 52.85; H, 6.23; N, 12.21%

分析値 C, 52.85; H, 6.39; N, 12.18%

アミノ酸分析 (6 N HCl + PhOH, 108°C, 22時間)

Asp 1.03X2, Glu 0.97, Ala 1.00X2, Cys 小ピーク (X2), Val 0.94,

Ile 1.00, Tyr 0.98, Phe 1.06, Lys 1.14, Arg 0.91

Boc-(26-38)-OPacの合成

Boc-(33-38)-OPac 4.22 g (3.0 mmol) を TFA (30 ml) で 0°C 以下 10 分間、室温 40 分間処理し、5.1 N HCl/ジオキサン 0.88 ml (4.5 mmol) を加えた後溶媒を減圧溜去した。残さにエーテルを加えて粉末とし、ろ取後水酸化ナトリウム上 2 時間減圧乾燥した。この粉末、Boc-(26-32)-OH 5.03 g (3.15 mmol) および HOOBt 522 mg (3.2 mmol) を DMF (30 ml) に溶かし、-15°C 以下に冷却して WSCI 0.59 ml (3.2 mmol) を滴下し 4 時間攪はんした。遊離アミノ基の検出試薬であるフルオレスアミンの反応が陰性であることから反応が終了したことを確認し、氷冷水を注いで粉末とした。ろ取後 DMF/メタノールより再沈殿して目的物 8.3 g (95.4%) を得た。

mp 238°C (dec), $[\alpha]_D^{25}$ -21.6° (c 0.55, DMF)

元素分析 $C_{136}H_{186}O_{37}N_{21}S_3Br \cdot 3H_2O$ としての計算値

C, 55.61; H, 6.59; N, 10.01%

分析値 C, 55.57; H, 6.61; N, 10.43%

アミノ酸分析 (6 N HCl + PhOH, 108°C, 22時間)

Asp 1.00X3, Thr 0.70, Glu 1.00X3, Ala 0.99X2,

Cys 小ピーク, Tyr 0.90, Arg 0.99X2

Boc-(26-38)-OHの合成

Boc-(26-38)-OPac 4.3 g (1.5 mmol) を酢酸 (100 ml) に溶かし、亜鉛末 3.9 g (60.0 mmol) を加えて窒素気流下 44°C の湯浴上 60 分間攪はんした。亜鉛末をろ去後溶媒を減圧溜去し、残さに氷冷水を注ぎ粉末とした。ろ取後水でよく洗い、クロロホルム、トリフルオロエタノール/エーテルより再沈殿して目的物 3.71 g (89.4%) を得た。

mp 236°C (dec), $[\alpha]_D^{25}$ -20.7° (c 0.43, DMF)

元素分析 $C_{128}H_{180}O_{36}N_{21}S_3Br \cdot 3H_2O$ としての計算値

C, 54.53; H, 6.66; N, 10.43%

分析値 C, 54.73; H, 6.58; N, 10.43%

アミノ酸分析 (6 N HCl + PhOH, 108°C, 22時間)

Asp 1.01X3, Thr 0.62, Glu 1.00X3, Ala 0.98X2,

Cys 小ピーク, Tyr 0.93, Arg 0.99X2

Boc-(11-25)-OPacの合成

Boc-(17-25)-OPac 4.1 g (2.0 mmol)をTFA(15 ml)で0℃以下10分間、室温40分間処理し、5.1 N HCl/ジオキサン 0.47 ml (2.4 mmol)を加えた後溶媒を減圧溜去した。残さにエーテルを加えて粉末とし、ろ取後水酸化ナトリウム上終夜減圧乾燥した。この粉末、Boc-(11-16)-OH 3.3 g (2.06 mmol)およびHOObt 360 mg (2.2 mmol)をDMF(16 ml)とDMSO(15 ml)との混合溶媒に溶かし、-15℃以下に冷却してWSCl 0.4 ml (2.2 mmol)を滴下し終夜攪はんした。遊離のアミノ基の検出試薬であるフルオレスアミンの反応が陰性であることから反応が終了したことを確認し、氷冷水を注いで粉末とした。ろ取後クロロホルムとメタノールとの混合溶媒に溶かし更にメタノールを追加して粉末とし目的物 6.7 g (94.5 %)を得た。

mp 239℃ (dec), $[\alpha]_D^{25} -13.8^\circ$ (c 0.47, DMSO)

元素分析 $C_{161}H_{194}O_{40}N_{21}S_3Cl_4Br_3 \cdot 2H_2O$ としての計算値

C, 54.06; H, 5.58; N, 8.22%

分析値 C, 53.89; H, 5.55; N, 8.20%

アミノ酸分析 (6 N HCl + PhOH, 108℃, 22時間)

Asp 1.01, Gly 1.00, Ala 0.99X2, Cys 0.14X2,

Met 0.30, Leu 1.03, Tyr 0.81X3, Lys 1.09X4

Boc-(1-25)-OPacの合成

Boc-(11-25)-OPac 2.5 g (0.7 mmol)をTFA(10 ml)で0℃以下10分間、室温45分間処理し、5.6 N HCl/ジオキサン 0.15 ml (0.84 mmol)を加えた後溶媒を減圧溜去した。残さにエーテルを加えて粉末とし、ろ取後水酸化ナトリウム上終夜減圧乾燥した。この粉末、Boc-(1-10)-OH 1.4 g (0.72 mmol)およびHOObt 126 mg (0.77 mmol)をDMF(12 ml), DMSO(20 ml)およびNMP(10 ml)との混合溶媒に溶かし、-15℃以下に冷却してWSCl 141 μ l (0.77 mmol)を滴下し終夜攪はんした。遊離のアミノ基の検出試薬であるフルオレスアミンの反応が陰性であることから反応が終了したことを確認し、氷冷水を注いで粉末とした。ろ取後クロロホルム、トリフルオロエタノール/酢酸エチル、エーテルより再沈殿して目的物3.4 g (91.7 %)を得た。

mp 104℃ (dec), $[\alpha]_D^{25} -14.1^\circ$ (c 0.27, DMSO)

元素分析 $C_{247}H_{323}O_{61}N_{34}S_4Cl_6Br_3 \cdot 1.5H_2O$ としての計算値

C, 55.43; H, 6.14; N, 8.90%

分析値 C, 55.45; H, 6.15; N, 8.80%

アミノ酸分析 (6 N HCl + PhOH, 108℃, 22時間)

Asp 1.01, Glu 1.07X4, Gly 1.00, Ala 1.00X3, Cys 0.24X2,

Met 0.58X2, Ile 0.98, Leu 1.02X2, Tyr 0.91X3, Lys 1.06X6

Boc-(1-25)-OHの合成

Boc-(1-25)-OPac 3.4 g(0.64 mmol)をDMSO(65 ml)に溶かして ピリジン 2.6 ml(32.0 mmol)とアセチルアセトン 3.0 ml(32.0 mmol)を加え、ついで亜鉛末 6.5 g(32.0 mmol)を加えて37℃の湯浴上5時間30分攪はんした。亜鉛末をろ去後0.1 N HClの中に注いで粉末とし、ろ取後水でよく洗浄した。トリフルオロエタノール/エーテル, n-ヘキサンより再沈殿して目的物 2.8 g(83.9 %)を得た。

mp 104℃(dec), $[\alpha]_D^{25}$ -14.7° (c 0.34, DMSO)

元素分析 $C_{239}H_{317}O_{60}N_{34}S_4Cl_6Br_3 \cdot 1.5H_2O$ としての計算値

C, 55.13; H, 6.14; N, 9.15%

分析値 C, 55.06; H, 6.20; N, 9.00%

アミノ酸分析(6 N HCl + PhOH, 108℃, 22時間)

Asp 1.01, Glu 1.15X4, Gly 1.00, Ala 1.00X3, Cys 0.24X2,

Met 0.55X2, Ile 0.99, Leu 1.06X2, Tyr 0.92X3, Lys 1.08X6

Boc-(51-74)-OBzlの合成

Boc-(64-74)-OBzl 2.6 g(1.3 mmol)をTFA(15 ml)で0℃以下10分間、室温50分間処理し、5.1 N HCl/ジオキサン 0.62 ml(3.2 mmol)を加えた後溶媒を減圧溜去した。残さにエーテルを加えて粉末とし、ろ取後水酸化ナトリウム上終夜減圧乾燥した。この粉末、Boc-(51-63)-OH 3.1 g(1.3 mmol)およびHOObt 223 mg(1.37 mmol)をDMF(30 ml), DMSO(50 ml)およびNMP(10 ml)との混合溶媒に溶かし、-15℃以下に冷却してWSCl 250 μ l(1.37 mmol)を滴下し終夜攪はんした。遊離のアミノ基の検出試薬であるフルオレスアミンの反応が陰性であることから反応が終了したことを確認し、氷冷水を注いで粉末とした。ろ取後クロロホルム、トリフルオロエタノール/酢酸エチルより再沈殿して目的物 5.2g(93.5 %)を得た。

mp 238℃(dec), $[\alpha]_D^{25}$ -20.5° (c 0.39, DMSO)

元素分析 $C_{195}H_{270}O_{50}N_{41}S_4Cl_2Br \cdot 3H_2O$ としての計算値

C, 54.19; H, 6.30; N, 13.29%

分析値 C, 54.20; H, 6.54; N, 12.96%

アミノ酸分析(6 N HCl + PhOH, 108℃, 22時間)

Asp 1.02X3, Ser 0.84, Glu 0.98X4, Gly 1.00, Ala 1.03X2,

Cys 小ピーク, Val 0.94, Ile 1.06X2, Leu 1.13, Tyr 0.96,

Phe 1.05, Lys 1.12X6, His 1.02, Arg 1.02X2

Boc-(39-74)-OBzlの合成

Boc-(51-74)-OBzl 4.7 g(1.1 mmol)をTFA(20 ml)で0℃以下10分間、室温50分間処理し、5.1 N HCl/ジオキサン 0.52 ml(2.7 mmol)を加えた後溶媒を減圧溜去した。残さにエーテルを加えて粉末とし、ろ取後水酸化ナトリウム上終夜減圧乾燥した。この粉末、Boc-(39-50)-OH 2.4 g(1.13 mmol)およびHOObt 198 mg(1.21 mmol)をDMF(40 ml), DMSO

(15 ml)および NMP(20 ml)との混合溶媒に溶かし、 -15°C 以下に冷却してWSCI 220 μl (1.21 mmol)を滴下し終夜攪はんした。遊離のアミノ基の検出試薬であるフルオレスアミンの反応が陰性であることから反応が終了したことを確認し、氷冷水を注いで粉末とした。ろ取後クロロホルム、トリフルオロエタノール/酢酸エチルより再沈殿して目的物 6.76 g(98.0%)を得た。

mp 245°C (dec), $[\alpha]_{\text{D}}^{25} -23.8^{\circ}$ (c 0.40, DMSO)

元素分析 $\text{C}_{286}\text{H}_{400}\text{O}_{71}\text{N}_{60}\text{S}_6\text{Cl}_5\text{Br} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ としての計算値

C, 53.45; H, 6.56; N, 13.08%

分析値 C, 53.71; H, 6.54; N, 12.69%

アミノ酸分析(6 N HCl + PhOH, 108°C , 22時間)

Asp 1.00X3, Ser 0.84, Glu 0.94X4, Pro 1.26, Gly 1.04X2,

Ala 1.04X4, Cys 0.21X3, Val 1.00X2, Ile 1.04X4, Leu 1.07,

Tyr 0.87, Phe 1.00, Lys 1.15X5, His 1.09, Arg 0.97X3

Boc-(26-74)-OBzlの合成

Boc-(39-74)-OBzl 5.6 g(0.9 mmol)をTFA(20 ml)で 0°C 以下10分間、室温50分間処理し、5.1 N HCl/ジオキサン 0.43 ml(2.2 mmol)を加えた後溶媒を減圧溜去した。残さにエーテルを加えて粉末とし、ろ取後水酸化ナトリウム上終夜減圧乾燥した。この粉末、Boc-(26-38)-OH 2.6 g(0.95 mmol)およびHOOBt 162 mg(0.99 mmol)をDMF(40 ml), DMSO(40 ml)およびNMP(10 ml)との混合溶媒に溶かし、 -15°C 以下に冷却してWSCI 180 μl (0.99 mmol)を滴下し終夜攪はんした。遊離のアミノ基の検出試薬であるフルオレスアミンの反応がわずかに陽性であったが反応を終了とし、氷冷水を注いで粉末とした。粗ペプチドをクロロホルム/トリフルオロエタノール/ピリジン(3/1/0.01)を溶出溶媒としたシリカゲルクロマトグラフィーで精製し、主成分を集めて濃縮後水を加えて粉末とした。ろ取後メタノールに懸濁しエーテルを加えて細かく砕いてから再びろ取して目的物 4.0g(49.7%)を得た。

mp 250°C (dec), $[\alpha]_{\text{D}}^{25} -20.0^{\circ}$ (c 0.42, DMSO)

元素分析 $\text{C}_{409}\text{H}_{570}\text{O}_{104}\text{N}_{81}\text{S}_9\text{Cl}_5\text{Br}_2 \cdot 7.5\text{H}_2\text{O}$ としての計算値

C, 54.30; H, 6.52; N, 12.54%

分析値 C, 54.32; H, 6.59; N, 12.38%

アミノ酸分析(6 N HCl + PhOH, 108°C , 22時間)

Asp 0.97X6, Thr 0.71, Ser 0.86, Glu 1.00X7, Pro 1.47, Gly 1.00X2,

Ala 1.01X6, Cys 0.23X4, Val 0.98X2, Ile 1.00X4, Leu 0.98,

Tyr 0.81X2, Phe 0.99, Lys 1.16X5, His 1.30, Arg 0.97X5

Boc-(1-74)-OBzlの合成

Boc-(26-74)-OBzl 2.27 g(255 μmol)をTFA(10 ml)で 0°C 以下10分間、室温50分間処理し、5.1 N HCl/ジオキサン 0.1 ml(510 μmol)を加えた後溶媒を減圧溜去した。残さ

にエーテルを加えて粉末とし、ろ取後水酸化ナトリウム上終夜減圧乾燥した。この粉末、Boc-(1-25)-OH 1.39 g (268 μ mol)および HOBt 38 mg (281 μ mol)を DMF (10 ml), DMSO (35 ml)および NMP (5 ml)との混合溶媒に溶かし、 -10°C 以下に冷却して WSCI 52 μ l (281 μ mol)を滴下し終夜攪はんした。遊離のアミノ基の検出試薬であるフルオレスアミンの反応が陰性であることにより反応の終了を確認し、氷冷水を注いで粉末とした。ろ取後クロロホルム、トリフルオロエタノール/エーテルより再沈殿して 目的物 3.4 g (95.2%)を得た。

mp 240°C (dec), $[\alpha]_{\text{D}}^{25} -16.8^{\circ}$ (c 0.40, DMSO)

元素分析 $\text{C}_{643}\text{H}_{877}\text{O}_{151}\text{N}_{115}\text{S}_{13}\text{Cl}_{11}\text{Br}_5$ としての計算値

C, 55.16; H, 6.31; N, 11.51%

分析値 C, 55.03; H, 6.35; N, 11.23%

アミノ酸分析 (6 N HCl + PhOH, 108°C , 22時間)

Asp 0.96X7, Thr 0.65, Ser 0.84, Glu 1.03X11, Pro 1.67, Gly 1.00X3,

Ala 1.00X9, Cys 0.33X6, Val 0.97X2, Met 0.65X2, Ile 1.01X5, Leu 1.10X3,

Tyr 0.96X5, Phe 0.98, Lys 1.08X11, His 1.28, Arg 0.94X5

6-3 ブタ [Gln⁶⁵]C5a-アナフィラトキシンの合成

[6AcM]-ペプチドの合成

保護ペプチド 1.54 g (0.11 mmol)を TFA (10 ml)で 0°C 以下10分間、室温50分間処理し、6.0 N HCl/ジオキサン 0.1 ml (0.6 mmol)を加えた後溶媒を減圧溜去した。残さにエーテルを加えて粉末とし、ろ取後水酸化ナトリウム上終夜減圧乾燥した。Boc基のみを除去したペプチドを、p-クレゾール 2.5 ml (22.6 mmol)の存在下無水フッ化水素 22 mlで -4°C , 60分間処理した。残さを 50%酢酸水に溶かしてエーテルで洗浄し、ダウエックス 1 x 2 (酢酸型)のカラム (60 ml)を通過させた後凍結乾燥した。粗ペプチドを CMC カラム (3.1 X 23 cm)に注入し、3 M 尿素を含む 0.05 M (pH 5.3)と 0.45 M (pH 6.0)酢酸アンモニウム緩衝液 (各 700 ml)の直線濃度勾配で溶出した。各画分を HPLC で検定して目的物を集め、ダイアイオン HP-20 (50 ml)で脱塩後凍結乾燥して目的物 250 mg (25.2%)を得た。

ブタ [Gln⁶⁵]C5a-アナフィラトキシンの合成

[6AcM]-ペプチド 125 mg (13 μ mol)を 5%酢酸水 (40 ml)に溶解し、窒素気流下酢酸第二水銀 125 mg (0.39 mmol)を加え、室温で 5時間30分攪はんした。 β -メルカプトエタノール (β -ME) 1 ml (14.6 mmol)を添加して沈殿を生じさせ 10°C の部屋に 1夜放置後、セファデックス G-25カラム (2.2 X 64 cm)に注入し、5%酢酸水で溶出した。主画分を凍結乾燥後再び 5%酢酸水 (20 ml)に溶かし、 β -ME 1 mlを添加してセファデックス G-25カラムで同様に精製した。主画分を凍結乾燥して得た粉末を 0.1 M 酢酸アンモニウム

緩衝液 (pH 7.5) 1250 ml に溶かし, 0.1 N アンモニア水で pH を 7.5 に保ちながら 5℃ で 5 日間攪はんした。凍結乾燥した粗ペプチドを Nucleosil 5C₁₈ を担体とした逆相 HPLC カラムに注入し, 0.1 % TFA 水に 20 % から 29 % まで 3 % ずつアセトニトリルの添加量を増やした溶離液で段階的に溶出することにより精製して目的物 12 mg を得た。

$[\alpha]_D^{25} -91.0^\circ$ (C, 0.1, 1 % 酢酸)

6-4 固相法によるペプチド合成

3-5 章および 4 章で使用したブタ C5a-アナフィラトキシントリプシン消化フラグメント関連ペプチドは, アプライドバイオシステム社の 430A 型自動合成装置による固相法で合成した。樹脂は p-ヒドロキシフェニルアセトアミドメチル (Pam) 型を使用した。α 位アミノ基保護基は Boc 基を使用し, 側鎖官能基は本分中表 2-1 に示した保護基と同一なものを使用するとともに システイン残基保護基に 4-MeBzl 基および Npys 基を使用した。グルタミンおよびアスパラギンは HOBt 活性エステル法で 2 回縮合させて導入し, その他のアミノ酸誘導体は対称酸無水物法で導入した。各段階の反応の完結はニンヒドリンテストにより確認した。樹脂からのペプチドの脱離は 10 % アニソール存在下 HF 処理により常法通り行ない, HF を溜去後エーテルで粉末を沈殿させた。ペプチドを 1 N 酢酸に溶解後ダウエックス 1 × 2 カラムを通過させ凍結乾燥して目的物を得た。各ペプチドの純度は HPLC で確認した。下にアミノ酸分析の結果を示す。

Cys(Npys)ValLys : Cys 0.71, Val 1.00, Lys 1.03 (6 N HCl, 108℃, 22時間),

CysCys(Acm)TyrAspGlyAlaTyrArg : Asp 1.00, Gly 0.98, Ala 0.96, Cys 小ピーク,
Tyr 0.88X2, Arg 0.98 (6 N HCl, 108℃, 22時間),

LysCysCys(Acm)TyrAspGlyAlaTyrArg : Asp 1.00, Gly 1.00, Ala 1.02, Cys 小ピーク,
Tyr 0.85X2, Lys 0.98, Arg 0.96
(6 N HCl, 108℃, 22時間),

AlaPheLysAspCysCys(Acm)TyrIleAlaAsnGlnValArg : Asp 1.02X2, Glu 0.99, Ala 1.00X2,
Cys 0.33X2, Val 0.93, Ile 0.96,
Tyr 0.95, Phe 0.96, Lys 1.00,
Arg 0.95 (6 N HCl, 108℃, 22時間),

AsnAspAspGluThrCysGluGluArg : Asp 1.00X3, Thr 0.96, Glu 1.02X3, Cys 小ピーク,
Arg 0.97 (6 N HCl, 108℃, 22時間),

AlaGluGlnSerHisLys: Gln 0.96, Ser 0.97, Glu 1.00, Ala 1.03, Lys 0.98, His 0.97
(AP-M, 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 6.5), 37℃, 17時間)

AlaGluGluSerHisLys : Ser 0.95, Glu 0.99X2, Ala 1.00, Lys 0.98, His 1.02
(AP-M, 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 6.5), 37℃, 17時間)

略記号

Boc	t-ブチルオキシカルボニル
Pac	フェナシル
AcM	アセトアミドメチル
Npys	3-ニトロピリジン-2-スルフェニル
4-MeBzl	4-メチルベンジル
^t Bu	t-ブチル
BrZ	2-ブロモベンジルオキシカルボニル
ClZ	2-クロロベンジルオキシカルボニル
Tos	p-トルエンスルホニル
Bzl	ベンジル
TFA	トリフルオロ酢酸
WSCl	1-エチル-3-(3'-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド
HOBt	1-ヒドロキシベンゾトリアゾール
HOObt	3,4-ジヒドロ-3-ヒドロキシ-4-オキソ-1,2,3-ベンゾトリアジン
AcONp	酢酸p-ニトロフェニル
DMF	N,N-ジメチルホルムアミド
DMSO	ジメチルスルホキシド
NMP	N-メチルピロリドン
TFE	トリフルオロエタノール
CH ₃ CN	アセトニトリル
HPLC	高速液体クロマトグラフィー
HF	無水フッ化水素
Asc	アミノサクシンイミド
hGRF	ヒト成長ホルモン放出因子
hANP	ヒト心房性ナトリウム利尿ペプチド

参考文献

- 1) F.C. McKay and W.F. Albertson, J. Amer. Chem. Soc., 79, 4686(1957).
- 2) S. Sakakibara, Y. Shimonishi, Y. Kishida, M. Okada, and H. Sugihara, Bull. Chem. Soc. Jpn., 40, 2164(1967).
- 3) N. Minamino, K. Kangawa, N. Chino, S. Sakakibara, and H. Matsuo, Biochem. Biophys. Res. Commun., 99, 864(1981).
- 4) K. Kangawa, N. Minamino, N. Chino, S. Sakakibara, and H. Matsuo, Biochem. Biophys. Res. Commun., 99, 871(1981).
- 5) K. Miyamoto, H. Hasegawa, M. Igarashi, N. Chino, S. Sakakibara, K. Kangawa, and H. Matsuo, Life Sciences, 32, 1341(1983).
- 6) C. Gerard and T.E. Hugli, J. Biol. Chem., 255, 4710(1980).
- 7) B. Zimmermann and W. Vogt, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 365, 151(1984).
- 8) R. Huber, H. Scholze, E.P. Paques, and J. Deisenhoffer, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 361, 1389(1984).
- 9) B. W. Erickson and R. B. Merrifield, J. Amer. Chem. Soc., 95, 3750(1973).
- 10) N. Chino, Y. Nishiuchi, Y. Masui, Y. Noda, T. X. Watanabe, T. Kimura, and S. Sakakibara, Peptide Chemistry 1984, 241(1985).
- 11) D.F. Veber, J.D. Milkowski R.G. Denkwalter, and R. Hirshmann, Tetrahedron Lett., 1968, 3057.
- 12) R.G. Hiskey and J.B. Adams, J. Amer. Chem. Soc., 87, 3969(1965); G.C. Stelakatos, A. Paganov, and L. Zervas, J. Chem. Soc., 1966, 1191.

- 13) E. Abderhalden and S. Suzuki, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 176, 101(1928); M. Bergmann, L. Zervas, and L. Schzmann, Chem. Ber., 66, 1288(1933).
- 14) B. W. Erickson and R. B. Merrifield, J. Amer. Chem. Soc., 95, 3757(1973).
- 15) J.P. Tam, T.-W. Wong, M.W. Riemen, F.-S. Tjoeng, and R.B. Merrifield, Tet. Lett., 42, 4033(1979).
- 16) K. Okawa, Bull. Chem. Soc. Jpn., 30, 110, 976(1957).
- 17) D. Yamashiro and C.H. Li, J. Org. Chem., 38, 591(1973).
- 18) R. Schwyzer and C. H. Li, Nature, 181, 1669(1958).
- 19) T. Fujii, T. Kimura, and S. Sakakibara, Bull. Chem. Soc. Jpn., 49, 1595(1976).
- 20) N. Chino, S. Kumagaye, Y. Masui, T. Kimura and S. Sakakibara, Forum Peptides, 86(1984).
- 21) J.C. Sheehan, J. Preston, and P.A. Cruickshan, J. Amer. Chem. Soc., 87, 2492(1965).
- 22) G.W. Anderson, J.E. Zimmerman, and F. Callahan, J. Amer. Chem. Soc., 85, 3039(1963); *ibid.*, 86, 1839(1963).
- 23) W. König and R. Geiger, Chem. Ber., 103, 788, 2024, 2034(1970).
- 24) H. Yajima, S. Funakoshi, N. Fujii, K. Akaji, and H. Irie, Chem. Pharm. Bull., 27, 1069(1979).
- 25) Y. Nakagawa, Y. Nishiuchi, J. Emura, and S. Sakakibara, Peptide Chemistry 1980, 41(1981).
- 26) D. Hagiwara, 私信
- 27) S. Kusumoto, M. Matsukura, and T. Shiba, Chem. Lett., 1981, 1017.

- 28) T. Kimura, M. Takai, Y. Masui, T. Morikawa, and S. Sakakibara, *Biopolymers*, 20, 1823(1981).
- 29) R.L. Noble, D. Yamashiro, and C.H. Li, *J. Amer. Chem. Soc.*, 98, 2324(1976).
- 30) Y. Nishiuchi, K. Kumagaye, Y. Noda, T. Watanabe, and S. Sakakibara, *Biopolymers*, 25, S61(1986).
- 31) J. Takeda, T. Kinoshita, Y. Takata, H. Kozone, E. Tanaka, K. Hong, and K. Inoue, *J. Immunol. Methods*, 101, 265(1987).
- 32) C. Gerard and T. E. Hugli, *J. Biol. Chem.*, 254, 6346(1979).
- 33) R. Matsueda, T. Kimura, E.T. Kaiser, and G.R. Matsueda, *Chem. Lett.*, 1981, 737.
- 34) N. Chino, K.Y. Kumagaye, Y. Noda, T.X. Watanabe, T. Kimura, and S. Sakakibara, *Peptides 1986*, 647(1987); *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 141, 665(1986).
- 35) R. Matsueda, S. Higashida, R.J. Ridge, and G.R. Matsueda, *Chem. Lett.*, 1982, 921.
- 36) O. Ploux, G. Chassaing, and A. Marquet, *Int. J. Pept. Protein Res.*, 29, 162(1987).
- 37) B. Zimmermann, B. Damerau, and W. Vogt, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 361, 915(1980).
- 38) A.B. Robinson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 71, 885(1974).

謝 辞

本研究に際し、終始御懇到な御指導と御鞭達下さいましたペプチド研究所所長榊原俊平博士に心から御礼申し上げます。

本研究を行なうに当たり、御助言を頂き、御協力して頂いた木村皓俊博士、岸田保雄博士、渡辺卓司博士、久保茂氏、熊谷久美子氏、高井道博氏、熊谷伸一郎氏、西内祐二博士、宮本有子氏をはじめペプチド研究所の皆様には深く感謝致します。

また、本研究を行なうに当たりペプチドの一次構造分析をして頂いた宮崎医科大学の松尾寿之教授、寒川賢治博士並びに電気泳動、酵素遊離活性の測定および免疫学的な検討をして頂いた大阪大学医学部の井上公蔵教授、竹田潤二博士に心から感謝致します。