

②

スルホキシドを用いた新規酸化法による
シスチン及びセレノシスチン含有ペプチドの
合成研究

1994

小出隆規

目次

<理論の部>

	頁
緒言	1
第1章 ジメチルスルホキシド-トリフルオロ酢酸系によるジスルフィド結合形成法の開発	4
第1節 シスチン含有ペプチドの合成に関する従来の研究概要	4
第2節 アミノ酸を用いた基礎実験	7
第1項 システイン及び S-保護システインを用いた基礎実験	7
第2項 反応機構についての考察	8
第3項 副反応について	10
第3節 ジメチルスルホキシド-トリフルオロ酢酸系を用いたシスチン含有ペプチドの合成	10
第1項 遊離のシステイン残基間でのジスルフィド結合形成	10
第2項 S-保護システイン残基間でのジスルフィド結合形成	14
第3項 ジメチルスルホキシド-トリフルオロ酢酸酸化時における S-acetamidomethyl 基の挙動	15
第4項 ジスルフィド結合形成溶媒としてのトリフルオロ酢酸の性質	17
第4節 小括	20
第2章 スルホキシド-シリル化剤-トリフルオロ酢酸系によるジスルフィド結合形成法の開発	21
第1節 S-保護システインからの直接的ジスルフィド結合形成	21
第1項 S-保護システインを用いた基礎実験	21
第2項 反応機構についての考察	24
第2節 スルホキシド-シリル化剤-トリフルオロ酢酸系を用いたシスチン含有ペプチドの合成	26
第1項 オキシトシンの合成	26
第2項 チキンカルシトニン (cCT) の合成	28
第3節 小括	29

第3章	セレノシスチン含有ペプチドの合成とその性質	31
第1節	セレノシスチン含有ペプチドに関する従来の研究概要	31
第2節	セレノシスチン前駆体としての <i>N</i> -9-fluorenylmethoxycarbonyl-Se-4-methoxybenzyl-selenocysteine [Fmoc-Sec(MBzl)-OH] の合成とその性質	32
第1項	Fmoc-Sec(MBzl)-OH の合成	32
第2項	Se-methoxybenzyl 基の性質	32
第3節	モデルペプチドの合成	33
第1項	縮合及び脱保護	33
第2項	ジセレニド結合形成法の検討	34
第4節	セレノシスチン含有ペプチドの酸化還元反応における速度論的解析	36
第5節	小括	39
第4章	ラット心房性ナトリウム利尿ペプチド (rANP) セレンアナログの合成とその生物活性	40
第1節	ANP の構造活性相関に関する従来の研究概要	40
第2節	合成方針	41
第3節	rANP セレンアナログの合成	42
第4節	rANPセレンアナログの生物活性	45
結語		47
<実験の部>		48
第1章に関する実験		50
第2章に関する実験		57
第3章に関する実験		60
第4章に関する実験		64
謝辞		69
発表論文目録		70
引用文献		71

緒言

生理活性ペプチド中のジスルフィド結合はそれらの立体構造を固定し、安定化させることによりその活性の発現に重要な役割を担っている。現在までに単離、構造決定されているシスチン含有ペプチドの中には、オキシトシンをはじめ、カルシトニン、ナトリウム利尿ペプチド、エンドセリン、各種の成長因子など生理的に重要な役割を果たしているものが少なくない。

これらシスチン含有ペプチドの合成において、最終段階であるジスルフィド結合形成は合成の正否を握る重要な反応である。簡便、迅速かつ副反応の少ないジスルフィド結合形成法の開発は上記のようなシスチン含有生理活性ペプチドの合成及び構造機能相関研究において意義がある。

著者はトリフルオロ酢酸(TFA)中ジメチルスルホキシド(DMSO)を用いたジスルフィド結合形成法を開発し、これを数種のシスチン含有生理活性ペプチドの合成に応用した。更に、種々のスルホキシドとシリル化剤の組み合わせにより多様なS-保護基を有する保護ペプチドから直接目的とするジスルフィド体のペプチドが導かれることを見いだした。

また、シスチンホモログであるセレノシスチンを含有するペプチドの合成法を確立し、ジセレニド結合形成においてもDMSO-TFA系が有用であることを確認すると共にペプチド中のジセレニド結合の酸化還元反応における化学的・速度論的挙動を明かにした。これらの知見を基にしてラット心房ナトリウム利尿ペプチドのセレン含有アナログを合成しその生物活性についても検討を加えた。

以下に研究の経緯について詳述する。

(注) 本論文に用いるアミノ酸・ペプチド中のアミノ酸残基は特に記載の無いかぎりL-体である。使用した略号は基本的にIUPAC-IUBの生化学命名委員会勧告¹⁾に従った。

1) アミノ酸(残基)の略号

Ala : alanine	Arg : arginine	Asn : asparagine
Asp : aspartic acid	Cys : cysteine or half cystine	
(Cys) ₂ : cystine	Gln : glutamine	Glu : glutamic acid
Gly : glycine	His : histidine	Met : methionine

Pen : penicillamine Phe : phenylalanine
 Pro : proline Ser : serine
 Sec : selenocysteine or half selenocystine
 (Sec)₂ : selenocystine Thr : threonine
 Trp : tryptophan Tyr : tyrosine
 Val : valine

2) チオール保護基の略号

Acm : acetamidomethyl Ad : 1-adamantyl
t-Bu : *tert*-butyl Bzh : benzhydryl
 Bzl : benzyl Dbs : dibenzosuberyl
 MBzl : 4-methoxybenzyl MeBzl : 4-methylbenzyl
 Trt : triphenylmethyl

3) その他の保護基および固相リンカーの略号

Boc : *tert*-butoxycarbonyl
 DMBHA : 3-(1-amino-4-methoxybenzyl)-4-methoxyphenyl propionyl
t-Bu : *tert*-butyl
 Fmoc : 9-fluorenylmethoxycarbonyl
 Mts : mesitylene-2-sulfonyl
 Mtr : 4-methoxy-2,3,6-trimethyl-benzenesulfonyl
 PAL : Peptide Amide Linker : 5-(4-aminomethyl-3,5-dimethoxyphenoxy)-valeryl
 Pfp : pentafluorophenyl
 Pmc : 2,2,5,7,8-pentamethylchroman-6-sulfonyl
 pMZ : 4-methoxybenzyloxycarbonyl
 Z : benzyloxycarbonyl

4) 縮合剤および関連試薬の略号

DIC : *N,N'*-diisopropylcarbodiimide
 HOBT : *N*-hydroxybenzotriazole

5) 脱保護および関連試薬の略号

EDT : 1,2-ethanedithiol
 TFA : trifluoroacetic acid
 TMSBr : trimethylsilyl bromide
 TMSOTf : trimethylsilyl trifluoromethanesulfonate

6) その他の試薬の略号

DMSO : dimethylsulfoxide
 DTT : dithiothreitol
 Fmoc-OSu : 9-fluorenylmethoxy-*N*-succinimidylcarbonate
 GSH : glutathione (reduced form)
 GSSG : glutathione (oxidized form)
 LAP : leucine aminopeptidase (porcine kidney microsomal)
 MeSiCl₃ : trichloromethylsilane
 MeS(O)Ph : methyl phenyl sulfoxide
 Ph₂S(O) : diphenylsulfoxide
 TEA : triethylamine
 Tl(TFA)₃ : thallic trifluoroacetate
 TMSCl : trimethylsilyl chloride
 TMSO : tetramethylene sulfoxide

7) 溶媒の略号

AcOEt : ethyl acetate
 AcOH : acetic acid
 DMF : *N,N*-dimethylformamide
 MeCN : acetonitrile
 MeOH : methanol

8) その他の略号

FAB-mass : fast atom bombardment mass spectroscopy
 SIMS : secondary ion mass spectroscopy
 HPLC : high performance liquid chromatography

第1章 ジメチルスルホキシド-トリフルオロ酢酸系によるジスルフィド結合形成法の開発

第1節 シスチン含有ペプチドの合成に関する従来の研究概要

シスチン含有ペプチドの化学合成では、通常、液相法あるいは固相法により完全鎖長のペプチド鎖を構築した後システイン残基間でのジスルフィド結合形成を行う。ここで用いられるジスルフィド結合形成法として、現在に至るまでに数多くの手法が報告されているが、実際のペプチド合成に汎用されているものは僅かである²⁾。

塩基性水系溶媒中での空気酸化は1954年の du Vigneaud らによるオキシトシンの合成³⁾に用いられて以来、現在においても最もよく用いられている方法である。この反応は温和な条件で進行するため副反応が少ない。しかしながら、反応の完結までに長時間(数時間-数日)を要し、また、基質となる還元体のペプチドが塩基性、あるいは疎水性の高いものである場合、ペプチドが不溶性の沈殿として析出し、著しい収量低下を招くことがある。

フェリシアン化カリウムなどの金属塩による酸化⁴⁾や、チオール-ジスルフィド交換反応を利用したグルタチオン酸化法⁵⁾もよく用いられている方法であるが、これらの方法も水系溶媒中で行われるため空気酸化同様ペプチドの溶解性の問題をはらんでいる。また、グルタチオン酸化においては目的とするシスチン含有ペプチド以外にグルタチオンの付加物が生成するという報告⁶⁾もあり、詳細な反応条件の検討が必要である。

Kamber らにより開発されたヨウ素を用いたジスルフィド結合形成法⁷⁾もまた優れた方法である。本法を用いると、Acm 基⁸⁾、Trt 基⁹⁾等によってシステイン側鎖を保護したペプチドから直接的かつ短時間でジスルフィド体を得ることができる。S-Trt 基とS-Acm 基のヨウ素との反応性は用いる溶媒の種類によって大きく異なり、これを利用して位置選択的な段階的ジスルフィド結合形成が可能である¹⁰⁾。また、前述の空気酸化やフェリシアン化カリウムによるジスルフィド結合形成法と組み合わせることにより位置選択的なジスルフィド結合の形成にもよく用いられている¹¹⁾。この反応における問題点として Tyr、His、Trp 側鎖官能基のヨウ素化¹²⁾及び Cys 側鎖と Trp 側鎖との間

でのインドール-2-チオエーテルの生成¹³⁾がある。これらの副反応を防ぐためには適切な溶媒と反応時間の選択が必要とされる。

最近、藤井、大高らにより開発された3価のタリウム¹⁴⁾によるジスルフィド結合形成反応及びS-保護システインスルホキシドを用いる反応¹⁵⁾は、ペプチド・蛋白質に対して極めて優れた溶解力を有するTFA中で反応が進行するという利点を持っている。この方法を用いて数種のシスチン含有生理活性ペプチドが合成されている。また、著者らはこの二つの反応を組み合わせることによりTFA中でハチ毒ペプチド、アバミンの2本のジスルフィド結合を選択的に形成させることに成功している¹⁶⁾。

しかしながら、それぞれの方法には一長一短があり、全てのペプチドに応用可能なオールマイティーなジスルフィド架橋法はない。また、分子内に3個以上のジスルフィド結合を有するペプチドの位置選択的なジスルフィド結合形成には、全く異なる反応機構を有する新しいジスルフィド結合形成反応の開発が必要である。

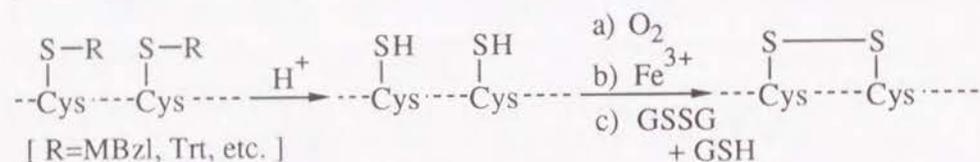
図1にシスチン含有ペプチドの合成に用いられる主なジスルフィド結合形成法をまとめた。

図1 ペプチドのジスルフィド結合形成法

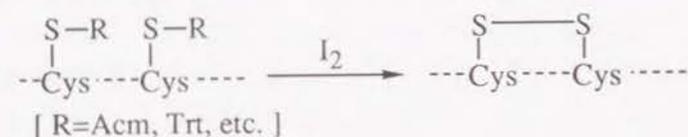
a) air oxidation

b) Fe^{3+} oxidation

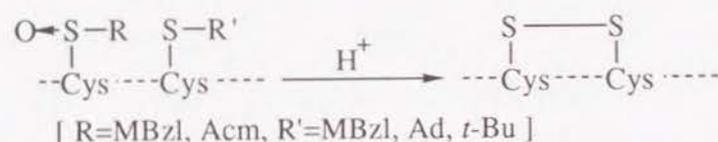
c) glutathione oxidation



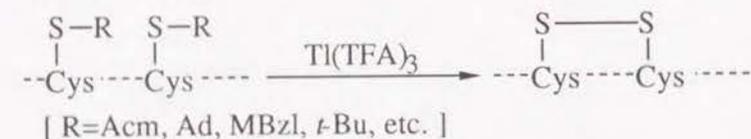
d) I_2 oxidation



e) S-protected cysteine sulfoxide method



f) Tl(III) oxidation



第2節 アミノ酸を用いた基礎実験

第1項 システイン及びS-保護システイン誘導体を用いた基礎実験

1963年 WallaceらはDMSO等のジアルキルスルホキシドが低分子チオール化合物をジスルフィドに酸化する反応を見出した¹⁷⁾。この反応は、塩基性の高いスルホキシドほど反応速度が大きく¹⁸⁾、また、tri(*n*-butyl)amineの様な3級アミンやAcOH等の酸によって触媒されることが明かにされている¹⁹⁾。

著者はこの反応がペプチド合成におけるジスルフィド結合形成においても応用可能ではないかと考え、システインおよび数種のS-保護システイン誘導体を用いた基礎実験を行った。即ち、H-Cys-OHおよびH-Cys(R)-OH; (R=Trt, Dbs²⁰⁾, MBzl²¹⁾, Bzh²²⁾, Ad²³⁾, MeBzl²⁴⁾)をTFA中、カチオンスカベンジャーであるアニソールの存在下10%のDMSOで処理し、生成したシスチンをアミノ酸分析により経時的に定量した。

図2 10% DMSO - TFAによるS-保護システインからのシスチン生成

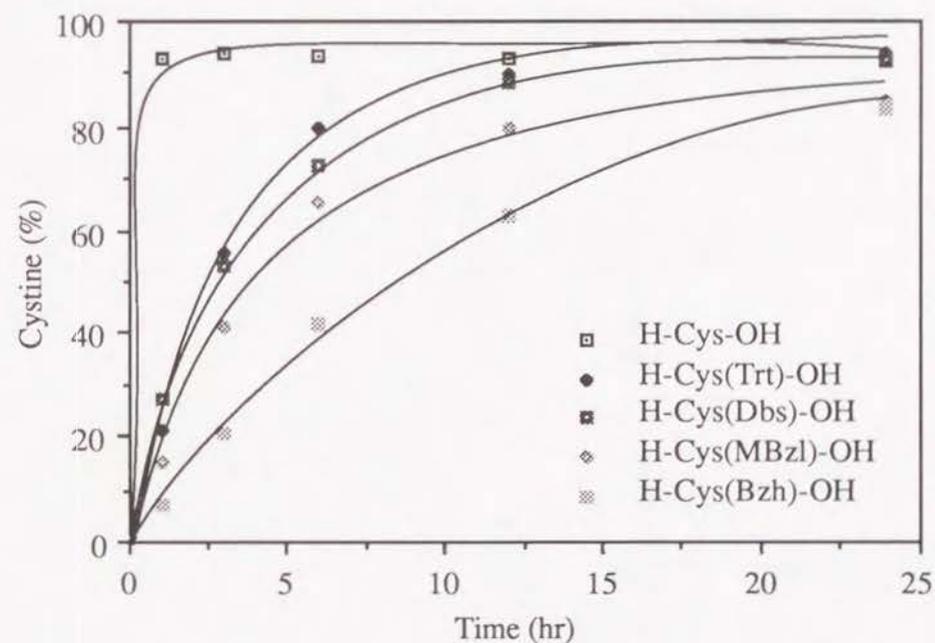


図2に示すように無保護のシステインは、15分以内にはほぼ定量的にシスチンに変換され、DMSOによるチオールのジスルフィドへの酸化がTFAのような強酸性溶媒中で速やかに進行することが明らかになった。H-Cys(Trt)-OH, H-Cys(Dbs)-OH, H-Cys(MBzl)-OH, H-Cys(Bzh)-OHも24時間以内にS-脱保護・ジスルフィド結合形成が進行しシスチンが高収率に生成した。この条件においてS-Ad, S-MeBzl基は安定であった。

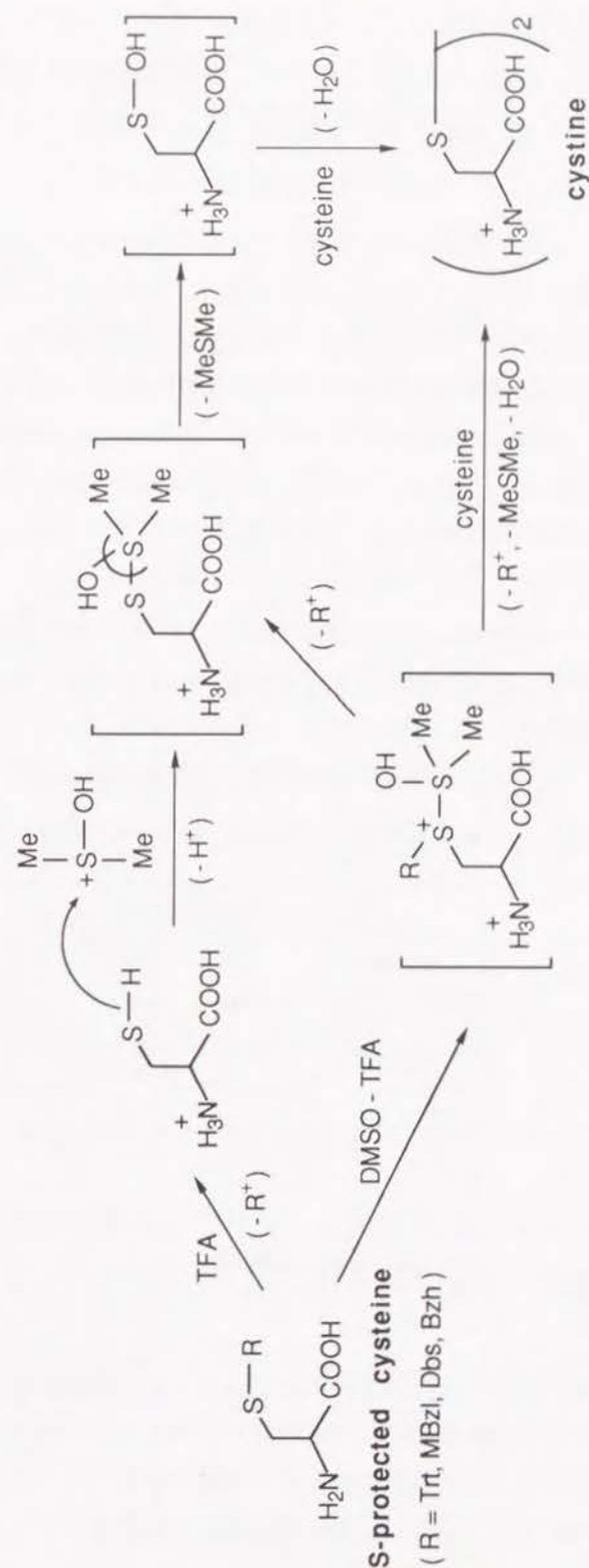
第2項 反応機構についての考察

前項において観察されたTFA中DMSOによるジスルフィド結合形成反応の推定メカニズムを図3に示した。

まず、TFAによって部分的なS-脱保護が起こり、その結果生じたシステインのチオール基がTFA中でO-プロトン化されたDMSOのスルホニウムカチオンの中心硫黄原子を攻撃しDMSO-システイン複合体を形成し、ジメチルスルフィドが脱離した後、他のシステインのチオールによる攻撃を受けジスルフィド結合が形成される。あるいは、S-脱保護の前にS-保護システインの硫黄原子がスルホニウムカチオンに配位し、S-脱保護と同時にジスルフィド結合が形成されるものと考えられる。

また、反応途中においてシステインが検出されないことから、この反応の律速段階は、S-保護基の脱離過程であると推察される。

図3 DMSO-TFA系によるジスルフィド結合形成反応の推定メカニズム



第3項 副反応について

酸化剤を用いたペプチドのジスルフィド結合形成では酸化に対して不安定なアミノ酸側鎖の修飾がしばしば問題となる。例えば、 $\text{Ti}(\text{TFA})_3$ による酸化では、Met は対応するスルホキシドに酸化され、Trp は酸化的分解を受ける¹⁴⁾。また、ヨウ素酸化では Tyr, His, Trp 側鎖官能基がヨウ素化されることがある¹²⁾。そこで、10% DMSO - TFA 系を実際のペプチド合成に応用する前に、これら酸化的修飾を受けやすい側鎖官能基に対する DMSO - TFA の影響をアミノ酸レベルで調べた。

H-Tyr-OH, H-Met-OH および H-Trp-OH を前項同様に 10% DMSO - TFA にて室温 12 時間処理し、残存した原料アミノ酸をアミノ酸分析により定量した。表 1 に示したように、H-Tyr-OH はこの条件下において安定であったが、H-Met-OH は部分的に対応するスルホキシドに酸化され、H-Trp-OH も酸化的修飾を受けることが明らかになった。従って、Met を含むペプチドに本法を応用する場合、ジスルフィド結合形成を行った後、 NH_4I 等によるメチオニンスルホキシドの還元²⁵⁾を行う必要がある。また Trp 残基を有するペプチドの場合にはその側鎖インドール基を保護する必要がある。

表 1 10% DMSO-TFA 処理 (室温、12 時間) における H-Tyr-OH, H-Met-OH, H-Trp-OH の安定性

	Recovery (%)
H-Met-OH	78
H-Tyr-OH	97
H-Trp-OH	33

第3節 ジメチルスルホキシド - トリフルオロ酢酸系を用いたシスチン含有ペプチドの合成

第1項 遊離のシステイン残基間でのジスルフィド結合形成

第1節において 10% DMSO - TFA 系によりシステインおよび数種の S-保護システインが効率よくシスチンに変換されることが明らかになった。そこで、この系が実際のシスチン含有ペプチドの合成に応用可能か否かを検討するため、分子内に 1 本のジスル

フィド結合を有する下垂体後葉ホルモン、オキシトシン及びヒト α 型カルシトニン遺伝子関連ペプチド (α -hCGRP) の合成を行った。この項では基礎実験において最も速く反応が進行した遊離のチオール基間での 10% DMSO - TFA によるジスルフィド結合形成を検討した。

(1) オキシトシンの合成

オキシトシンのペプチド鎖の構築は PAL-樹脂²⁶⁾ 上通常の Fmoc 型固相合成法²⁷⁾ により手動で行った。ここで Cys 及び Tyr 残基の側鎖保護基にはそれぞれ MBzl、*t*-Bu 基を用いた。全保護基の除去と樹脂からのペプチドの切断は 1 M TMSBr - *m*-cresol - thioanisole - EDT - TFA 系²⁸⁾ により行った。こうして得られた還元型オキシトシンを 1% アニソール存在下 10% DMSO - TFA で処理することによりジスルフィド結合形成を行った (図 4)。

反応は室温 1 時間以内に完結し、目的とする酸化型オキシトシンが効率よく生成した。粗ペプチドの HPLC 分析結果から、問題となるような副反応はこの条件において起こっていないことが確認された (図 5)。粗生成物は HPLC により精製し、C 末端アミノ酸の導入率から計算して 60% の収率で高純度の目的物を得た。

図 4 オキシトシンの合成スキーム

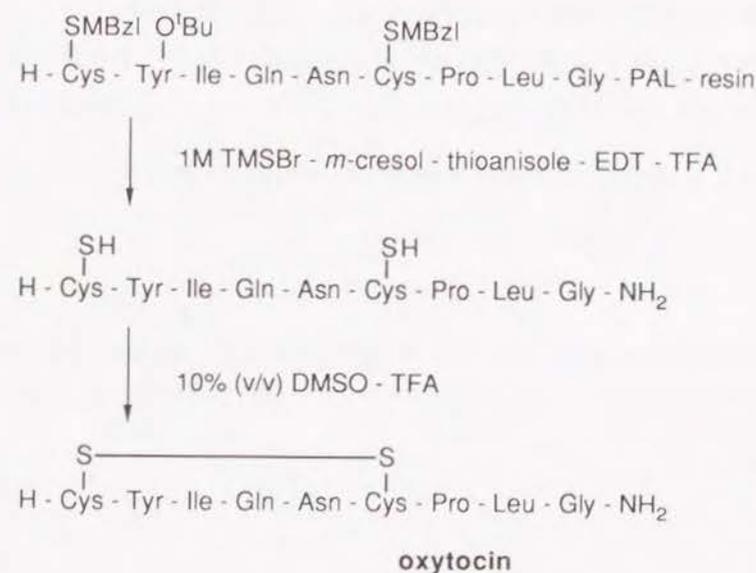
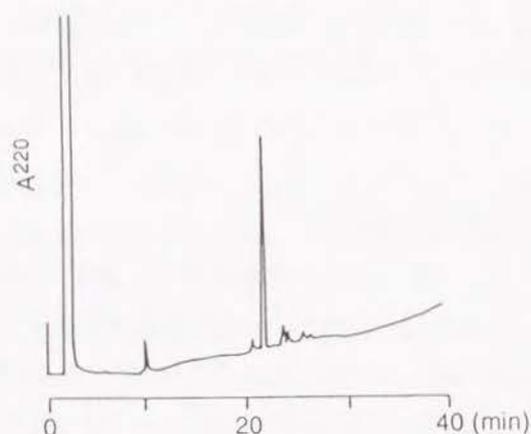


図5 粗オキシトシンのHPLC



Column, Cosmosil C18-AR (0.46 x 15 cm); elution, linear gradient with MeCN (10 - 40% in 30 min) in 0.1% aqueous TFA at a flow rate of 1 ml / min; detection, 220 nm

(2) α -hCGRPの合成

液相法により構築した α -hCGRP の37残基保護ペプチド²⁹⁾の全保護基 (Cys(Ad), Arg(Mts), Lys(Z), Ser(Bzl)) の除去は 1 M TMSOTf - *m*-cresol - thioanisole - TFA 系³⁰⁾により行った。次いで得られた還元型ペプチドを 1%アニソール存在下 10% DMSO - TFAで室温 1時間処理することによりジスルフィド結合形成を行った(図6)。反応後の粗生成物の HPLC 分析結果を図7に示した。主成分はHPLCにより精製し、保護体から計算して 17%の収率で目的とする α -hCGRPを得た。本合成の収率及び粗生成物の HPLC 溶出パターンは、Ti(TFA)₃によるジスルフィド結合形成法を用いた先の藤井らによる α -hCGRP の合成²⁹⁾の結果とほぼ同等のものであった。

図6 α -hCGRPの合成スキーム

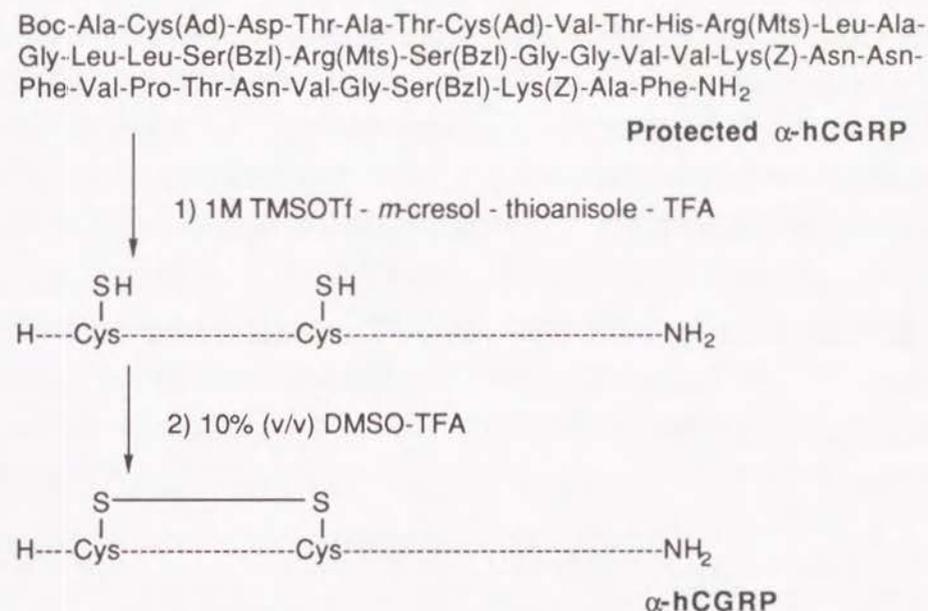
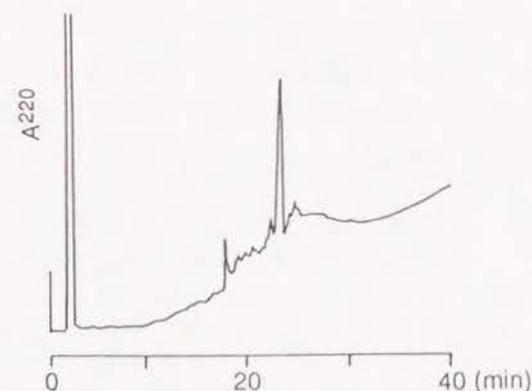


図7 粗 α -hCGRPのHPLC



Column, μ Bondasphere $5\mu\text{C}-18-100\text{\AA}$ (0.39 x 15 cm); elution, linear gradient with MeCN (20 - 50% in 30 min) in 0.1% aqueous TFA at a flow rate of 1 ml / min; detection: 220 nm

第2項 S-保護システイン残基間でのジスルフィド結合形成

一般に、SH 体のペプチドは空気酸化され易く通常の大気存在下ではその取り扱いに注意を要する。従って、SH 体を経由しない S-保護システイン残基間でのジスルフィド結合形成は、特にジスルフィド結合形成前に精製を必要とするような長鎖ペプチドの固相合成に有利であると考えられる。そこで最近のペプチド合成において最も汎用されている S-MBzl および S-Acm 基について、これらの残基間での 10% DMSO - TFA 系を用いた直接的ジスルフィド結合形成を検討した。基質には分子内の 2 個の Cys 残基を上記の保護基で保護した 2 種の S-保護オキシトシンを用いた。

2 種の S-保護オキシトシン誘導体 [Cys(Acm)^{1,6}-oxytocin] および [Cys(MBzl)^{1,6}-oxytocin] のペプチド鎖は Fmoc 型固相法により構築した。この際 Tyr の側鎖は *t*-Bu 基で保護した。S-保護基を除く脱保護とペプチドの樹脂からの切断を TFA - *m*-cresol - thioanisole - EDT - 水 (80:5:5:5:5, v/v) により行った後、主生成物である S-保護オキシトシンを HPLC により精製した。

こうして得られた各々の S-保護オキシトシン誘導体を 1% アニソール存在下 10% DMSO - TFA で室温処理し、反応の進行を HPLC により経時的にモニターした。また、生成したオキシトシンの収率および残存原料量は HPLC のピーク面積より算出した。表 2 に示すように 10% DMSO - TFA 系による処理によって Cys(MBzl) 残基間で直接的かつ効率的にジスルフィド結合形成反応が進行することが分かった。一方、S-Acm 基は 10% DMSO - TFA 系にかなり抵抗することが明らかになった。

表 2 S-保護オキシトシン誘導体からのジスルフィド結合形成

Starting material	Generation of Oxytocin (%) ^{a)}		
	1 h	2 h	12 h
[Cys(MBzl) ^{1,6}]-oxytocin	64 (21)	86 (0)	
[Cys(Acm) ^{1,6}]-oxytocin	<5 (93)	<5 (92)	<5 (92)

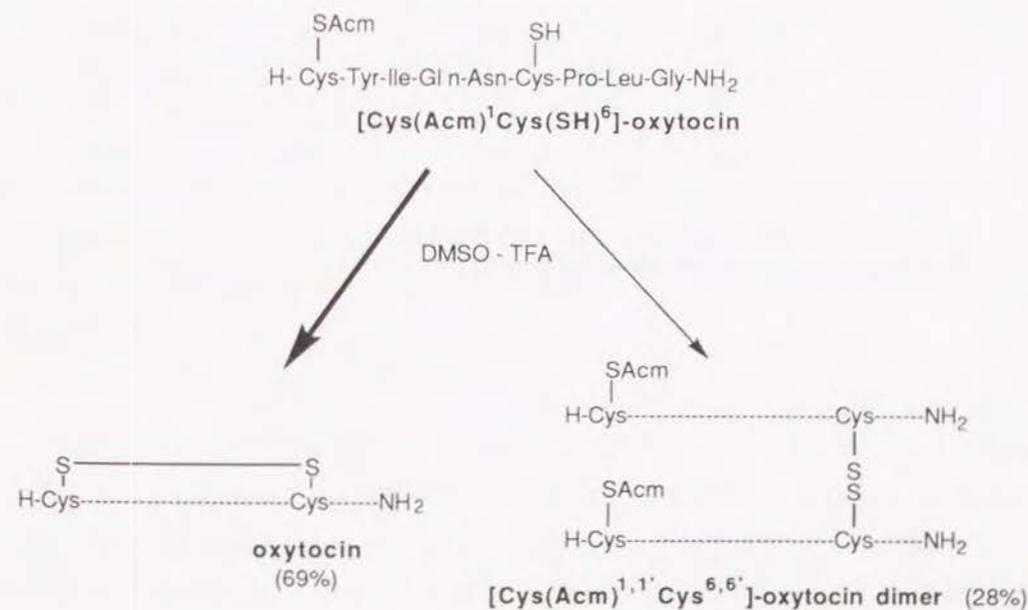
a) Yields were calculated from HPLC peak areas. Recovery (%) of the starting material is shown in parentheses.

第3項 ジメチルスルホキシド-トリフルオロ酢酸酸化時における S-acetamidomethyl 基の挙動

第1項、第2項の結果より遊離の SH 基間と S-Acm 基間で DMSO - TFA 酸化に対する反応性に大きな相違があることが分かった。このことから、DMSO - TFA 系によって S-Acm 基を安定に保ったまま遊離のシステイン残基間で選択的なジスルフィド架橋を形成することができるのではないかと考え、以下に述べるようなオキシトシンの平行ジスルフィド二量体の合成を試みた。

[Cys(Acm)¹,Cys(SH)⁶]-oxytocin のペプチド鎖は前項同様 Fmoc 型固相法により伸長した。6 位の Cys の側鎖保護基には弱い酸により切断される Trt 基を採用した。このペプチド樹脂を TFA - *m*-cresol - thioanisole - EDT - 水 (80:5:5:5:5, v/v) により処理し、S-Acm 基を除く脱保護を行った後、HPLC により精製し、純粋な [Cys(Acm)¹,Cys(SH)⁶]-oxytocin を得た。次に、分子間で遊離の SH 基同士のジスルフィド架橋を行うため本品を 1% アニソール存在下 10% DMSO - TFA で室温 1 時間処理した。しかし、目的とする、Acm-2 量体 (Cys(Acm)^{1,1'}Cys^{6,6'}-oxytocin dimer) の収率は低く (28%)、主生成物としてオキシトシンのモノマーが 69% の収率で得られた。この結果は、DMSO - TFA 酸化において遊離のチオールが存在によって S-Acm 基が切断され易くなることを示唆している (図 8)。

図 8 [Cys(Acm)¹,Cys(SH)⁶]-oxytocin からのオキシトシンの生成



そこで、上の実験において示唆された DMSO - TFA 酸化時における S-Acm 基と SH 基間での相互作用をより詳細に検討するため、H-Cys(Acm)-OH を 1 当量の 2-メルカプトエタノールの存在下および非存在下において 10% DMSO - TFA で処理し、生成物をアミノ酸分析により分離・定量した。

システインと 2-メルカプトエタノールとの mixed ジスルフィド (S-2-hydroxyethylthio cysteine) は、藤井らの S-保護システインスルホキシドを用いるジスルフィド結合形成法¹⁵⁾に従い、H-Cys(Acm)-OH より誘導されるスルホキシドと 2-メルカプトエタノールを TFA 中で反応させることにより合成し、HPLC で精製後、アミノ酸分析の標品とした。表 3 に結果を示す。

以上の結果から S-Acm 基は DMSO - TFA 処理中、遊離のチオールが存在するとその切断が促進され、ジスルフィドを生成することが明かになった。

表 3 H-Cys(Acm)-OH の 2-メルカプトエタノール存在下及び非存在下での DMSO - TFA 処理

2-ME (eq.)	Reaction Time (min)	Yield (% of theoretical) ^{a)}		
		Cys(Acm)	mixed SS ^{b)}	cystine
none	15	89		10
	30	82		18
	60	70		29
1	15	59	30	<2
	30	0	90	8

a) Yields were estimated by amino acid analysis.

b) Mixed SS=S-2-hydroxyethylthio cysteine.

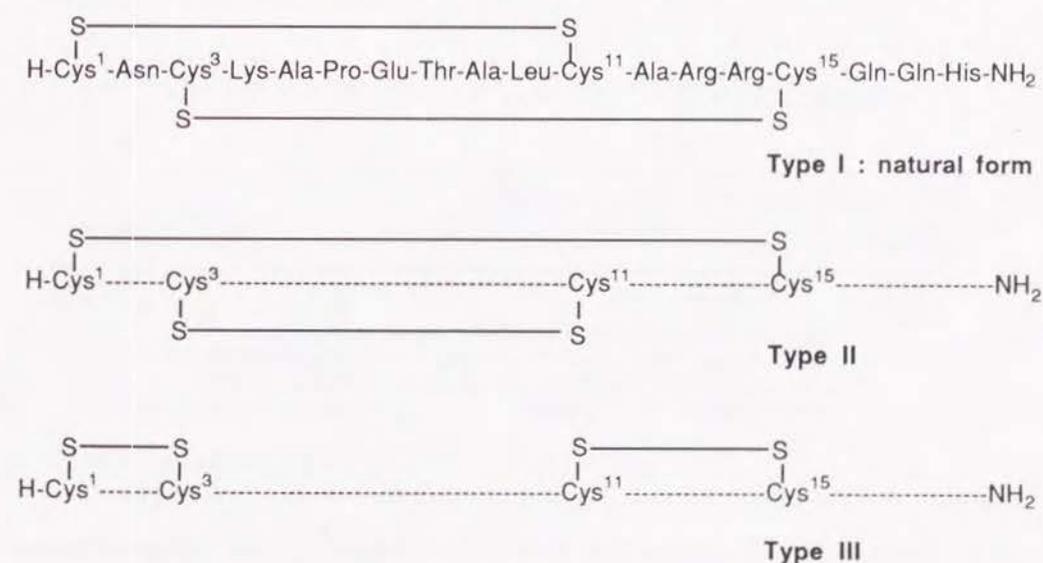
第 4 項 ジスルフィド結合形成溶媒としてのトリフルオロ酢酸の性質

複数のジスルフィド結合をランダムに形成させる場合、ジスルフィド架橋様式の異なる異性体の生成が懸念されるが、一般に、空気酸化では天然型の架橋様式の物が主生成物として得られることが多い。例えば、還元したりボヌクレアーゼ A の空気酸化では可能な 105 種のジスルフィド異性体のうち天然型の架橋様式を有するもののみが得られている³¹⁾。しかし、TFA のような強酸性有機溶媒中でのランダムな複数のジスルフィド結合形成については調べられていない。

ここでは、分子内に 2 本のジスルフィド結合を有するハチ毒ペプチド、アバミンをモデルとして、DMSO - TFA 系のランダムな複数のジスルフィド架橋への応用可能性について検討した。

これに先だって図 9 に示す天然型アバミンおよび 2 種のジスルフィド異性体を、空気酸化とタリウム酸化の組み合わせによる、位置選択的なジスルフィド結合形成法を用いて合成し、これを HPLC による分析の標品とした。

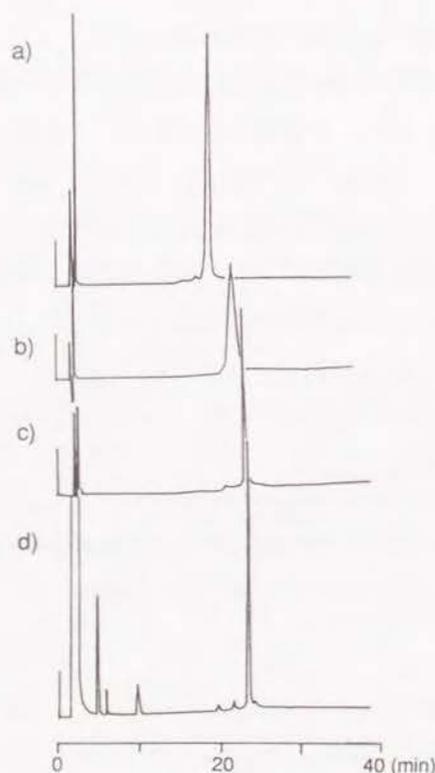
図 9 アバミン及びそのジスルフィド異性体の一次構造



SH 体のアバミンは、先に著者らが合成した天然型のアバミン¹⁶⁾を DTT により還元することによって得た。この SH-アバミンを 10% DMSO - TFA で処理することによりジスルフィド結合形成を行った。しかし、目的とする天然型のアバミンは得られず、HPLC 上 III 型異性体に相当する生成物が高収率に得られた。本品は、FAB-mass によ

りモノマーの分子量を有していることが分かったので、III型ジスルフィド架橋様式を持つ異性体であることが確認された(図10)。

図10 3種のアバミンジスルフィド異性体のHPLC及び還元アバミンの10% DMSO-TFA処理後のHPLC



Column, Cosmosil C18-AR (0.46 x 15 cm); elution, linear gradient with MeCN (10 - 20% in 30 min) in 0.1% aqueous TFA at a flow rate of 1 ml / min; detection, 220 nm. a) Type I. b) Type II. c) Type III. d) Crude product after DMSO-TFA treatment.

次に、DMSO-TFA酸化によってIII型アバミンが選択的に生成する原因を明らかにするため、別のジスルフィド結合形成法である空気酸化、10% DMSO-水系³²⁾による酸化、Ti(TFA)₃-TFA系¹⁴⁾による酸化を用いて同様にSH-アバミンのランダムなジスルフィド架橋を行った。各反応の終了時点での粗生成物をHPLCにより分析し、対応するピーク面積から各々のジスルフィド異性体の生成比を求めた。結果を表4に示す。

Ti(TFA)₃-TFA系による酸化は、DMSO-TFA酸化同様、III型アバミンのみを与えた。このことから、非天然のIII型アバミンの生成は、酸化剤に依存するものでなく、溶媒として用いたTFAの性質によるものであること、即ち、TFA中ではペプチド鎖の立体構造が水系溶媒中でのそれと大きく異なることが強く示唆された。

ペプチドの立体構造に最も大きな影響を与えるファクターの一つは溶媒の疎水性度である。疎水性を示すパラメーターである溶媒の誘電率は20℃において水 80.1、DMSO 48.9、TFA 8.55である。従ってTFAのような非常に疎水性の高い溶媒中ではペプチドの疎水部分が表面に露出した状態、言い換えると高度に変性した状態をとっており、このことが、TFA中のジスルフィド結合形成において非天然ジスルフィド異性体の生成の原因となっているものと考えられる。

また、アバミンの10% DMSO-水系による酸化における3種のジスルフィド異性体の生成もDMSOの添加による溶媒の疎水性の上昇によるものと推察される。

最近、Tamらは、DMSO-水系を用いて抗菌ペプチド、ディフェンシンの3つのジスルフィド結合を形成したと報告している³²⁾。しかし、上述したアバミンの結果から考えると、彼らの合成法が他のペプチドにおいても天然型のジスルフィド架橋様式を与えるかどうかについては疑問の残るところである。

表4 種々の酸化法によるアバミンのジスルフィド結合形成

Oxidation System	Relative peak areas of the three disulfide isomers (%)		
	Type I	Type II	Type III
10% (v/v) DMSO - TFA	0	0	100
Ti(TFA) ₃ (5eq) - TFA	0	0	100
10% (v/v) DMSO - water	58	33	9
Air oxidation (pH 8)	100	0	0

第4節 小括

以上の研究により、10% DMSO - TFA 系によりシステインおよび数種の S-保護システインがシスチンに変換されることが明かになった。また、この反応系は実際のシスチン含有ペプチドの合成にも有用であることが証明された。本法を用いると、遊離のシステイン残基間のみならず MBzl 基によって側鎖を保護したシステイン残基間においても効率的にジスルフィド架橋を行うことが可能である。

また、それ自身では DMSO - TFA 酸化にかなり抵抗する S-Acm 基が、遊離のチオール基の存在によって速やかに切断されジスルフィドを与えることも分かった。

TFA をジスルフィド結合形成の溶媒として用いることは、ペプチドの溶解性の問題を解決したが、その反面ランダムなジスルフィド結合形成ではその変性作用により非天然型のジスルフィド異性体を与える恐れのあることが明かになった。

第2章 スルホキシド-シリル化剤-トリフルオロ酢酸系によるジスルフィド結合形成法の開発

第1節 S-保護システインからの直接的ジスルフィド結合形成

第1項 S-保護システインを用いた基礎実験

前章において著者は、DMSO - TFA 系がペプチドのジスルフィド結合形成に有用であることを示した。しかし、この方法では、S-Acm、S-MeBzl、S-*t*-Bu³³⁾ 基などにより保護されたシステイン残基はシスチン残基に変換されなかった。より多様な S-保護様式を有する保護システイン残基から直接的にジスルフィド結合形成を行うためには、S-保護システインの硫黄原子に対する反応性がより大きい反応種を用いることが必要であると考えられる。

1979年 Numata らは TMSCl とチオール化合物を用いることにより効率よくスルホキシドあるいはスルフィドがスルフィドに還元されることを見いだした³⁴⁾。この反応においてスルホキシドの還元はチオールのジスルフィドへの酸化とカップリングしているので、DMSO - TFA 系においてもスルホキシドの O-シリル化によってジスルフィド結合形成反応も促進されるのではないかと考え、TFA 中、種々のスルホキシドとシリル化剤の組み合わせ試剤による S-脱保護・酸化を検討した。

5種の S-保護システイン H-Cys(R)-OH; (R = Acm, Bzl³⁵⁾, MBzl, MeBzl, *t*-Bu) を、4種のスルホキシド (DMSO, TMSO, Ph₂S(O), MeS(O)Ph) と4種のシリル化剤 (TMSCl, MeSiCl₃, SiCl₄, TMSOTf) の組み合わせ試剤により TFA 中処理し、シスチンの生成をアミノ酸分析により定量した。結果を表5に示す。

H-Cys(Acm)-OH および H-Cys(MBzl)-OH は、0.4 M DMSO - 1 M TMSCl - TFA 系で1時間以内にはほぼ定量的にシスチンを与えた。また、H-Cys(Acm)-OH は TMSO と TMSCl の組み合わせでも高収率にシスチンに変換された。これらの条件において、H-Cys(Bzl)-OH は安定であった。

MeS(O)Ph と TMSCl を組み合わせた場合には、H-Cys(Acm)-OH と H-Cys(*t*-Bu)-OH から収率よくシスチンが生成した。

TMSO - TMSOTf - TFA 系もまた、ジスルフィド結合形成に有用であると考えられる。H-Cys(*t*-Bu)-OH は、この系で処理することにより高収率にシスチンに変換される。そ

れに対して H-Cys(Acm)-OH および H-Cys(Bzl)-OH は、この反応に抵抗し、アミノ酸分析上、原料のピークのみが観察された。しかし、この系での S-*t*-Bu 基間でのジスルフィド結合形成反応の完結には、比較的長い時間（4時間）を要した。これは S-*t*-Bu 基が、酸による脱保護を非常に受けにくいことが一因として考えられる。

Ph₂SO と MeSiCl₃ あるいは SiCl₄ との組み合わせは、最近、Akaji ら³⁶⁾により開発された反応系であるが、この系では調べた全ての S-保護システインが、ほぼ定量的にシスチンに変換された。また、種々の反応系に対して極めて安定で、従来液体アンモニア中ナトリウムを用いなければ定量的に脱保護されなかった S-Bzl 体からも、反応時間を延長することにより収率よくジスルフィド結合が形成された。

その他のスルホキシド-シリル化剤の組み合わせでは、種々の副反応物と思われるピークが、アミノ酸分析上認められ、満足できる結果は得られなかった。また、シリル化剤として TMSBr を用いても同様の実験を行ったが、どのスルホキシドの組み合わせからも定量的なシスチンの生成は観察されなかった。

表5. 種々の組み合わせの 0.4 M スルホキシド - 1 M シリル化剤 - TFA 系 (4 °C, 1 時間) による S-保護システインからのシスチン形成

	R	TMSCl	MeSiCl ₃	SiCl ₄	TMSOTf
DMSO	Acm	98	75 ^a	68 ^a	< 5
	Bzl	< 5	10 ^a	7 ^a	< 5
	MBzl	90	39 ^a	41 ^a	< 5 ^a
	MeBzl	24 ^a	17 ^a	31 ^a	< 5
	<i>t</i> -Bu	77 ^a	16 ^a	26 ^a	< 5
TMSO	Acm	90	42	68 ^a	< 5 ^b
	Bzl	< 5	< 5	< 5	< 5 ^b
	MBzl	68 ^a	29 ^a	48 ^a	32 ^a
	MeBzl	15 ^a	10 ^a	25 ^a	9 ^a
	<i>t</i> -Bu	52 ^a	23 ^a	33 ^a	87 ^b
Ph ₂ SO	Acm	10	87	90	< 5
	Bzl	< 5	94 ^b	96 ^b	< 5
	MBzl	11	87	91	< 5 ^a
	MeBzl	9	86	87	< 5
	<i>t</i> -Bu	14	90	96	< 5
MeS(O)Ph	Acm	94	34 ^a	38 ^a	8
	Bzl	33 ^a	24 ^a	24 ^a	9
	MBzl	63 ^a	31 ^a	34 ^a	23 ^a
	MeBzl	77 ^a	25 ^a	34 ^a	< 5
	<i>t</i> -Bu	93	31 ^a	37 ^a	14 ^a

^a peaks of unknown side products were detected on amino acid analysis, ^b 4 °C, 4hr.

第2節 スルホキド-シリル化剤-トリフルオロ酢酸系を用いたシスチン含有ペプチドの合成

シスチン含有ペプチドの合成におけるスルホキド-シリル化剤-TFA系の有用性を評価するため、これら種々の組み合わせ試剤によるS-保護システイン残基間での直接的ジスルフィド結合形成反応を用いてオキシトシンおよびチキンカルシトニン(cCT)を合成した。

第1項 オキシトシンの合成

図12に示す4種のS-保護オキシトシン誘導体は、Fmoc型固相法あるいは液相法にて合成した。これらを先のS-保護システインを用いた実験で良好な結果を与えた4通りの0.4 M スルホキド-1 M シリル化剤-TFA系(DMSO-TMSCl-TFA, MeS(O)Ph-TMSCl-TFA, TMSO-TMSOTf-TFA, Ph₂SO-SiCl₄-TFA系)で処理し、ジスルフィド結合形成を行った。結果を図13および表6に示した。

図12 オキシトシンの合成スキーム

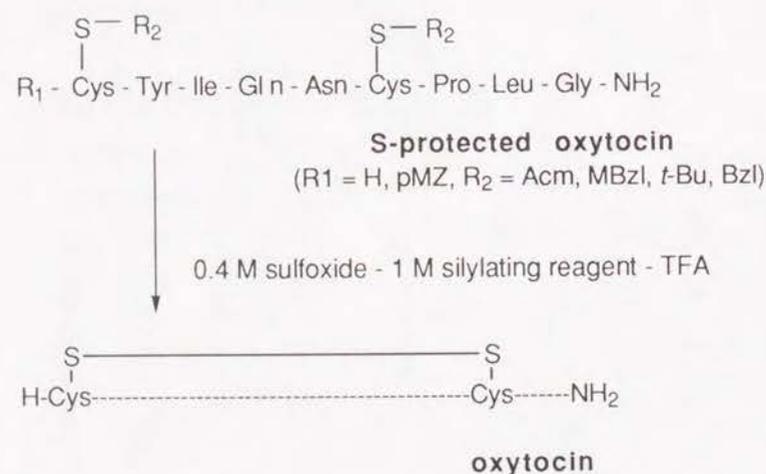
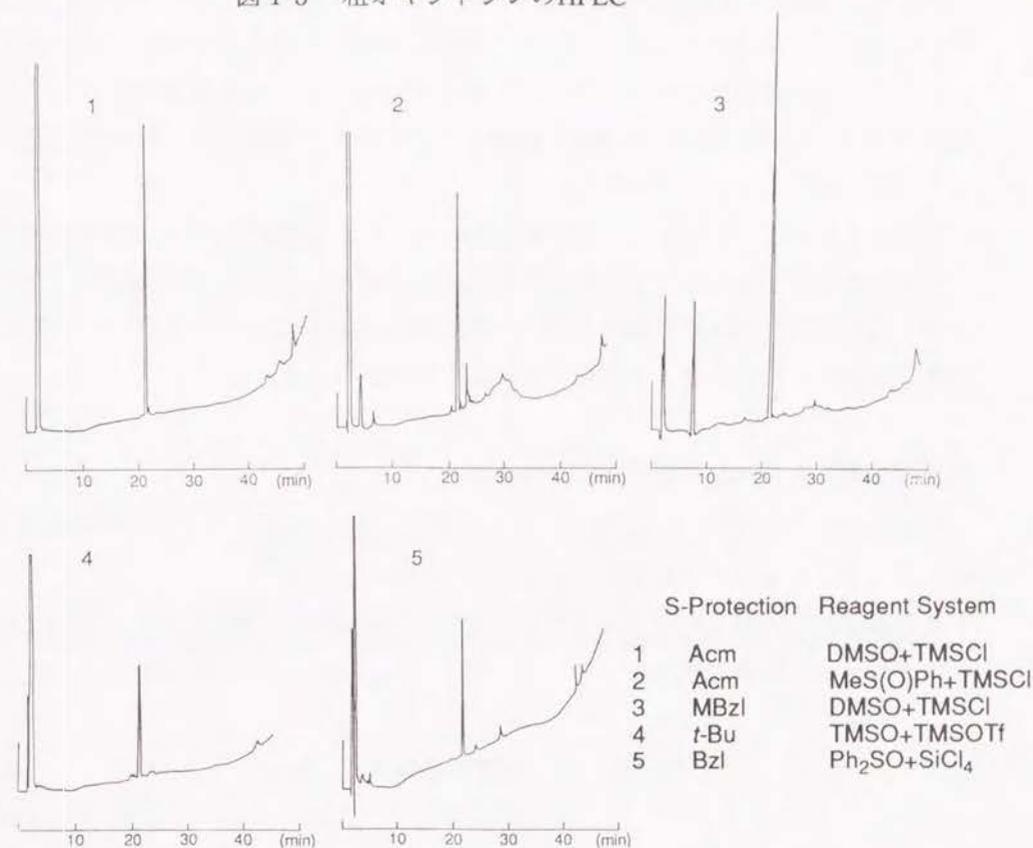


図13 粗オキシトシンのHPLC



Column, Cosmosil C18-AR(0.46 x 15 cm); elution, linear gradient with MeCN (10-40% / 0-30 min, 40-70% / 30-40%) in 0.1% aqueous TFA at a flow rate of 1 ml/min; detection, 220 nm

表6 オキシトシンの合成収率

S-Protection	Reagent System	Reaction Time	Yield
Acm	DMSO+TMSCl	1 h	83 %
Acm	MeS(O)Ph+TMSCl	15 min	22 %
MBzl	DMSO+TMSCl	15 min	64 %
t-Bu	TMSO+TMSOTf	4 h	78 %
Bzl	Ph ₂ SO+SiCl ₄	4 h	74 %

TFA 中 DMSO と TMSCl の組み合わせでは 2 つの Cys 残基側鎖を MBzl 基で保護したオキシトシン誘導体から先の DMSO - TFA 系を用いた場合に比べ短時間で酸化型のオキシトシンが得られた。また DMSO - TFA 系では定量的な脱保護が不可能であった AcM 基でシステイン側鎖を保護したオキシトシンからも短時間で、かつ高収率に目的とする酸化型オキシトシンが得られた。

S-*t*-Bu あるいは S-Bzl 基により保護したオキシトシン前駆体からも適切な試薬の組み合わせを選択することにより高収率に目的物を得た。しかし、MeS(O)Ph と TMSCl の組み合わせでは HPLC 上種々の副反応物が検出され、実際のペプチドのジスルフィド結合形成に応用することは困難であることがわかった。

第 2 項 チキンカルシトニン (cCT) の合成

[Cys(AcM)^{1,7}]-cCT³⁷⁾ を 0.4 M DMSO - 1 M TMSCl - TFA で氷冷下 1 時間処理することによりジスルフィド結合形成を行った (図 14)。

粗生成物の HPLC 分析において主生成物は cCT の標品と HPLC 上共に溶出し、その収率はピーク面積より 76% であった (図 15)。

図 14 cCT の合成スキーム

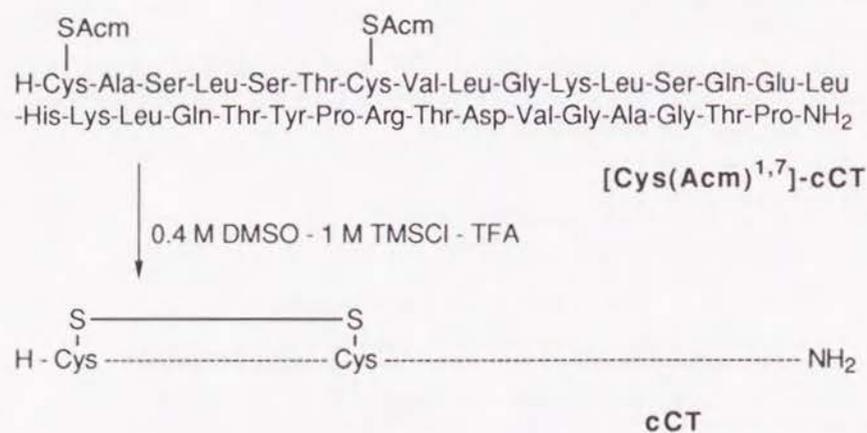
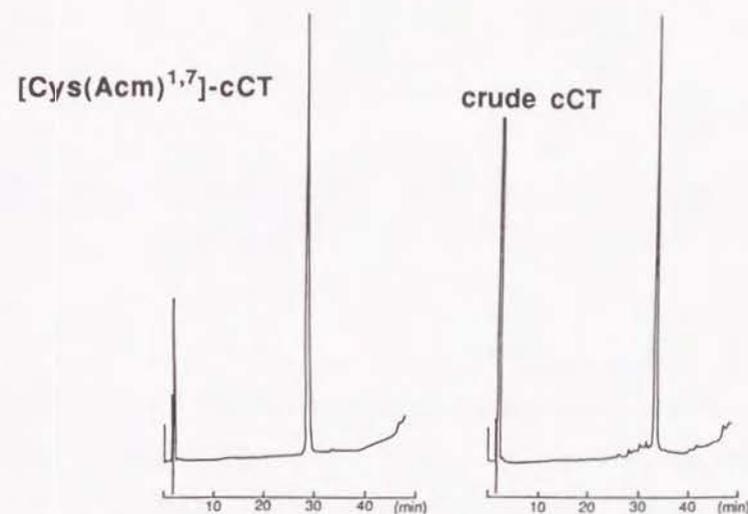


図 15 粗 cCT (SS 体) の HPLC



Column, Cosmosil C18 AR (0.46 x 15 cm), elution, linear gradient with MeCN (20 - 40% / 0-30 min, 40-70% / 30-40 min) in 0.1% aqueous TFA at a flow rate of 1 ml / min; detection, 220 nm

第 3 節 小括

本章において著者は DMSO - TFA 系によるジスルフィド結合形成法を更に発展させたスルホキド - シリル化剤 - TFA 系を開発し、そのシスチン含有ペプチドの合成における有用性を確認した。これらの試薬系を用いると種々の S-保護基を持つペプチドを、遊離の SH ペプチドを扱うことなく直接対応するジスルフィドペプチドに変換することができる。

特に S-AcM 基はその特異な性質ゆえにペプチド合成において非常に重要な位置を占める保護基であり、従来タリウム塩や水銀塩^{8,38)}等の重金属塩類あるいはヨウ素によってのみ定量的な脱保護が可能であった。DMSO - TMSCl - TFA 系および Ph₂SO - SiCl₄ (あるいは MeSiCl₃) - TFA 系による直接的な S-AcM 基からのジスルフィド結合形成はこれらの方法に代わるものである。また本法は、得られたペプチドの残存重金属による生体に対する毒性の懸念も無い為、シスチン含有ペプチド性医薬品の合成という観点からも有用なものであると考えられる。

それに加えて、アミノ酸を用いた実験で観察された S-保護基選択的なジスルフィド

結合形成は位置選択的な複数のジスルフィド架橋法への応用可能性を示すものである。

第3章 セレノシスチン含有ペプチドの合成と その性質および生物活性

第1節 セレノシステインおよびセレノシスチン含有ペプチドに関する 従来の研究概要

セレノシステインは天然に存在するアミノ酸(残基)であり、その側鎖セレノール基は glycine reductase, formate dehydrogenase, glutathione peroxidase 等、酸化還元に係わる酵素の触媒中心を形成している³⁹⁾。また、セレノシステインは、その構造、化学的挙動がシステインと類似している。両者は還元能力を有し、自身は酸化されて2量体(セレノシスチンおよびシステイン)を形成する。

一方、セレノシステイン側鎖のセレノール基は対応するシステインのチオール基よりも酸性度が高くセレノシステイン側鎖の pKa は 5.73、システインは 8.53である⁴⁰⁾。また、一般にセレノールは対応するチオールよりもかなり低い酸化還元電位を有し⁴¹⁾、このことが上記のようなセレノシステイン含有酵素の活性発現に重要であると考えられている。

生理活性ペプチドではセレノシステインあるいはセレノシスチンを含むものは現在までには知られていないが、後述するようにシステインあるいはシスチン含有ペプチドの構造活性相関研究の一環として数種が化学合成されている。

セレノシステインあるいはセレノシスチン含有ペプチドの合成においては、最初セレノール保護基として Bzl 基を用い、液体アンモニア中金属ナトリウムを最終脱保護試薬とする手法が導入され、この方法を用いてグルタチオン⁴²⁾、オキシトシン⁴³⁾、ソマトスタチン⁴⁴⁾のセレンアナログが合成された。しかし、液体アンモニア中金属ナトリウムを用いる脱保護は、種々の副反応を伴うため現在のペプチド合成にはほとんど用いられることがなくなっている。最近 Soda らは、新しいセレノール保護基として MeBzl 基を用い Boc 型固相合成法によるアミノ酸の縮合、引き続き HF による脱保護によりメタロチオネインのセレンアナログ、メタロセレノネインを合成した⁴⁵⁾。

しかしながら、セレノシステインおよびセレノシスチン含有ペプチドに関する詳細な合成研究はほとんどなされていないのが現状である。

第2節 セレノシスチン前駆体としての

N-9-fluorenylmethoxycarbonyl-Se-4-methoxybenzyl-selenocysteine [Fmoc-Sec(MBzl)-OH] の合成とその性質

著者は現在最も普及している Fmoc 型固相合成法への応用が可能なセレノール保護基の開発とそれを用いたセレノシスチン含有ペプチドの簡便かつ高収率な合成法の確立を目的として以下に述べるような研究を行った。

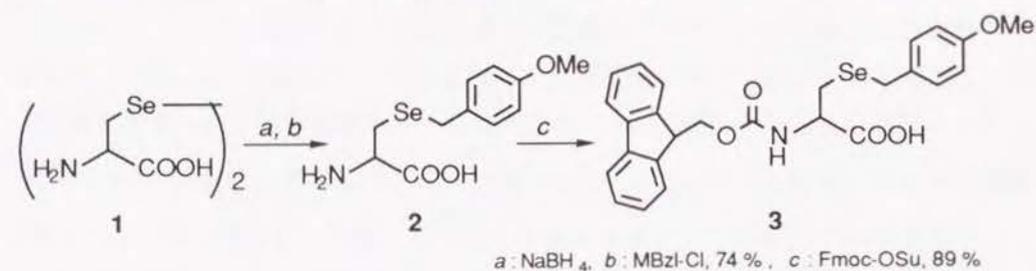
第1項 Fmoc-Sec(MBzl)-OH の合成

セレノシスチンのセレノール保護基には、セレン原子の硫黄原子との類似性および Fmoc 型固相合成系への応用性を考慮にいれ、MBzl 基を選択した。

セレノシスチンは、Chocat らの文献⁴⁶⁾に従いセリンより誘導される β -chloroalanine と Na_2Se_2 より調製した。次いで、これを水酸化ナトリウム水溶液中 NaBH_4 にて還元し、セレノシスチンとした。一般に、遊離のセレノールは、大気中の酸素により容易に酸化されるのでセレノシスチンは単離せず、同一反応系に直接 MBzl-Cl を加えることにより 1 ポットで Se-MBzl 化を行った。

Fmoc-Sec(MBzl)-OH は、H-Sec(MBzl)-OH に Fmoc-OSu を塩基存在下作用させることにより容易に得られた。

図16 Fmoc-Sec(MBzl)-OH の合成



第2項 Se-methoxybenzyl 基の性質

次に Se-MBzl 基の安定性および脱保護条件を検討するため、H-Sec(MBzl)-OH を通常のペプチド合成において用いられる種々の試薬系で処理した後、アミノ酸分析を行った。尚、アミノ酸分析上セレノシスチンおよび H-Sec(MBzl)-OH はそれぞれ Val (44.9 min)、Arg (92.6 min) の位置に溶出され、また H-Sec-OH はアミノ酸分析中ほとん

どがセレノシスチンに空気酸化された。表7に示すように Se-MBzl 基は、90% TFAaq、TFA - *m*-cresol - thioanisole - EDT - 水 (80:5:5:5:5,v/v) および 20% ピペリジン - DMF には安定であったが、1M TMSBr - *m*-cresol - thioanisole - TFA あるいは 1M TMSOTf - *m*-cresol - thioanisole - TFA によって切断された。このことから Se-MBzl 基は S-MBzl 基とよく似た性質を有しているものと判断される。

表7 Se-MBzl 基の安定性および脱保護条件

Reagents	Temperature ^{a)}	Time (h)	Stability
TFA - water (9:1)	r.t.	2	Stable
TFA-thioanisole- <i>m</i> -cresol-EDT-water (80:5:5:5:5)	r.t.	2	Stable
20% piperidine - DMF	r.t.	4	Stable
1M TMSBr-thioanisole- <i>m</i> -cresol-TFA	4°C	1	Cleavable
1M TMSOTf-thioanisole- <i>m</i> -cresol-TFA	4°C	1	Cleavable

a) r.t., room temperature

第3節 モデルペプチドの合成

第1項 縮合および脱保護

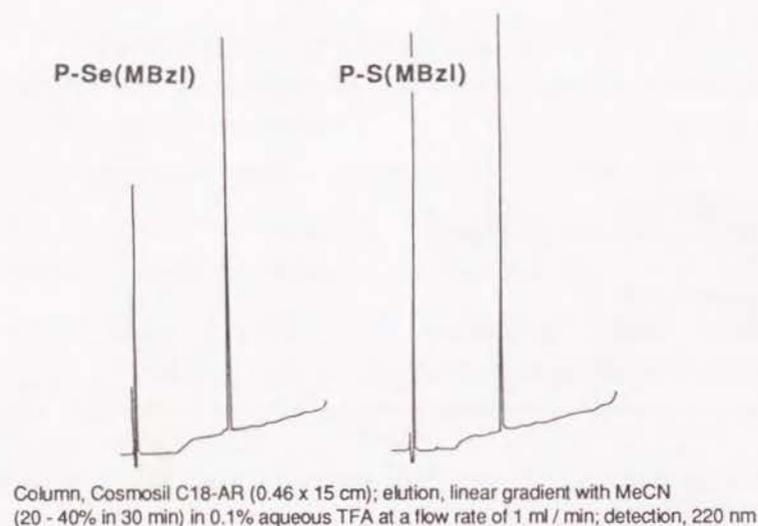
Fmoc-Sec(MBzl)-OH がセレノシスチン前駆体として、Fmoc 型ペプチド合成に使用可能かどうかを調べるため、モデルペプチド、H-Leu-Lys-Gly-Sec(MBzl)-Ala-OH: P-Se(MBzl) の合成を試みた。対照として Sec(MBzl) を Cys(MBzl) に置換したペプチド: P-S(MBzl) も同様に合成した。

ペプチド鎖の構築は *p*-benzyloxybenzyl alcohol 樹脂⁴⁷⁾上、DIC - HOBt による縮合により手動で行った。Lys の側鎖保護基には Boc 基を使用した。

得られたペプチド樹脂を TFA - *m*-cresol - thioanisole - EDT - 水 (80:5:5:5:5,v/v) で処理した後 HPLC で分析した。この脱保護条件において S- および Se-MBzl 基は安定であり、P-Se(MBzl) および P-S(MBzl) がシャープな単一ピークとして現われた。粗生成物中の P-Se(MBzl) と P-S(MBzl) がほぼ同等の純度 (>90%) であることから、縮合反応中

セレン原子の関与する副反応はほとんど起こっていないことが分かった(図17)。以上のことから Fmoc-Sec(MBzl)-OH は通常の Fmoc 型固相法への応用に充分耐えることが明かになった。

図17 粗 P-Se(MBzl) および P-S(MBzl) の HPLC



第2項 ジセレニド結合形成法の検討

有機化合物中のセレン原子は、一般に、対応する硫黄原子に比べソフト塩基としての性質が大きい。従ってセレノシスチン含有ペプチドの合成において、セレノール保護基を含む全ての保護基を一挙に切断した場合、Sec 残基のセレノールがカチオンスカベンジャーとして働き Sec の側鎖がアルキル化されることが懸念される。また、遊離のセレノールは空気酸化を受けやすく大気存在下では取り扱いに注意を要する。よって、セレノシスチン含有ペプチドの合成にはセレノール保護基を除く全保護基を除去した後、保護 Sec 残基間で直接的なジセレニド結合形成を行うルートが有効であると考え、モデルペプチド P-Se(MBzl) を用いて種々の試薬系による直接的なジセレニド結合形成法を検討した。また、ジスルフィド結合形成と比較するため P-S(MBzl) を用いても同様の実験を行った。

ジセレニド結合形成のための試薬系として、直接的ジスルフィド結合形成によく用いられるヨウ素、 $Ti(TFA)_3$ および、著者が開発した DMSO - TFA、DMSO - TMSCl - TFA 系を検討した(図18)。

反応液は HPLC で分析し、ジセレニド結合形成収率を 2 量体 P-SeSe-P に対応するピークの面積から算出した。

表8に示すように、ヨウ素を用いた場合 Sec(MBzl) 間でのジセレニド結合形成はほぼ定量的に進行し、高収率に 2 量体 P-SeSe-P が生成した。興味深いことに、P-S(MBzl) を基質とした場合には、反応は全く進行せず、HPLC 上原料のピークのみが観察された。このヨウ素酸化における選択性はセレン原子の高い求核性とソフト性に起因しているものと考えられる。また、この結果は、分子内にシスチン残基とセレノシスチン残基の両方を有するペプチドの合成において選択的なジセレニドおよびジスルフィド結合形成の可能性を示すものである。

10% DMSO - TFA 系及び 0.2 M DMSO - 1 M TMSCl - TFA 系では、ジセレニド結合、ジスルフィド結合共に効率よく形成され、これらの酸化系はジスルフィド結合形成のみならずジセレニド結合形成においても有用であることが分かった。

一方、 $Ti(TFA)_3$ による酸化では、HPLC 分析上目的とする 2 量体のピークよりも早く溶出される副反応物が検出された。この副反応物は、その不安定性のために同定は出来なかったが、0.2 M DMSO - 1 M TMSCl - TFA による処理の時間を延長した時にも同じピークが出現したことから、恐らく over-oxidize されたペプチドであると思われる。

図18 Sec(MBzl) (Cys(MBzl)) 残基間での直接的ジセレニド (ジスルフィド) 結合形成

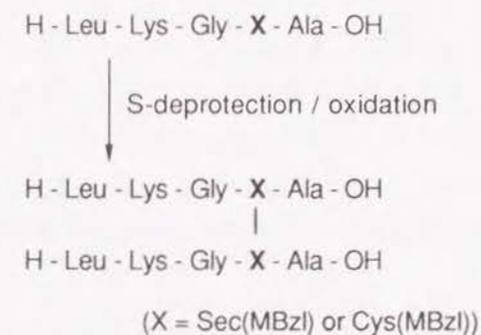


表8 種々の酸化試薬系によるジセレニド結合及びジスルフィド結合形成収率

Reagents	Temperature ^{a)}	Time (min)	Yield of dimer (%)	
			P-SeSe-P	P-SS-P
I ₂ (10eq, in 80% AcOH)	r.t.	15	98	0
I ₂ (10eq, in 50% MeOH)	r.t.	15	101	0
Π(TFA) ₃ (2eq, in TFA)	4°C	2	50	69
10% (v/v) DMSO - TFA	r.t.	15	94	102
0.2M DMSO - 1M TMSCl - TFA	4°C	2	82	88

a) r.t., room temperature

第4節 セレノシスチン含有ペプチドの酸化還元反応における速度論的解析

細胞内の酸化還元反応の制御にはグルタチオンや補酵素 A、および様々なシステイン含有蛋白質が関与するチオール-ジスルフィド交換反応が重要な役割を果たしている⁴⁸⁾。また、セレノシスチン含有酵素の働きには、セレノシスチン残基のセレノール基の求核性の強さおよび高い脱離性が大きく寄与していると考えられている⁴⁹⁾。

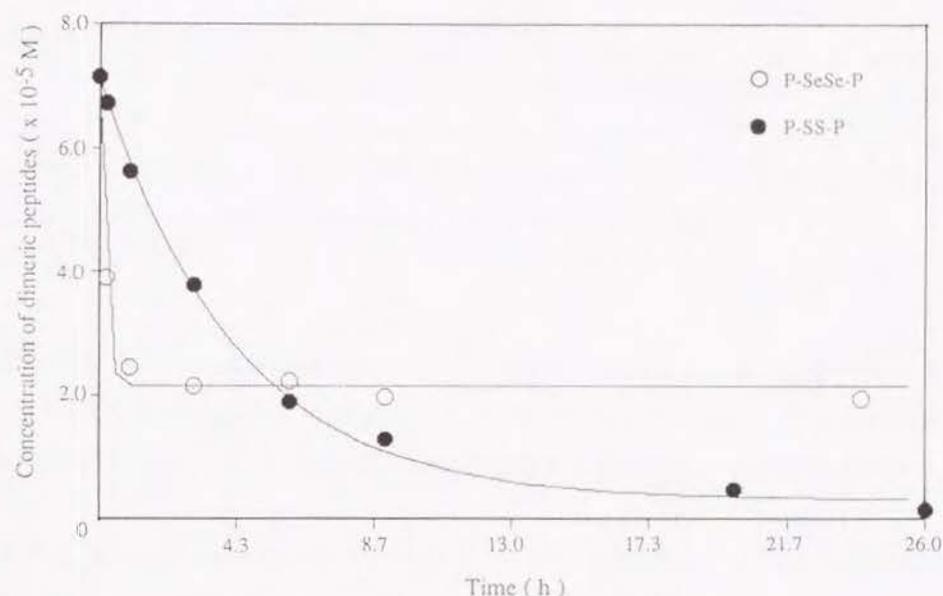
これらの生理的な酸化還元反応のメカニズムを明らかにするため、チオール-ジスルフィドあるいはセレノール-ジセレニド交換反応の速度論に関する基礎的な研究が非ペプチド性の低分子を用いて行われている⁵⁰⁾。しかしペプチド中のジセレニド結合が生理的条件下においていかなる挙動を示すかについては不明な点が多い。

そこで著者は、ペプチド中のジセレニド結合の性質についての基礎的な知見を得るために GSH に対するモデルペプチド P-SeSe-P と P-SS-P との反応性の相違、すなわちチオール-ジセレニド交換反応とチオール-ジスルフィド交換反応の速度論的相違について検討を行った。

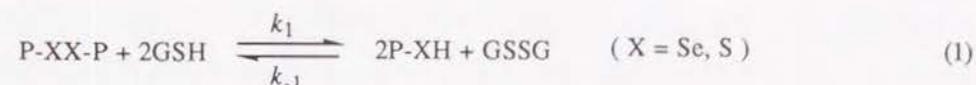
2量体のモデルペプチド: P-SeSe-P あるいは P-SS-P (最終濃度 7.14×10^{-5} M) を 0.1 M GSH の存在下 pH 7.5 のトリス-塩酸バッファー中、37°C でインキュベートした。経時的に反応液の一部を HPLC で分析し、反応液中の 2量体ペプチドの濃度をそのピーク面積から算出した。尚、空気酸化を防ぐため反応はアルゴン置換下で行った。

図19に示すように、見かけ上反応開始後 P-SeSe-P は速やかに還元され1時間以内に平衡に達した。それに対し、P-SS-P は徐々に還元され、平衡に達するまでに長時間を要した。また、平衡状態においてセレノシスチン含有ペプチドは対応するシスチン含有ペプチドよりも酸化型で存在する割合が大きいことが明らかになった。

図19 P-SeSe-P 及び P-SS-P の GSH による還元



次に、この実験結果をもとに、より詳細な速度論的解析を試みた。反応途上の HPLC 分析では、原料の 2 量体ペプチドと還元体ペプチド (P-SeH または P-SH) のみが観察され、還元反応の中間体と考えられるグルタチオン付加体 P-SeSG あるいは P-SSG のピークは検出されなかった。従ってこの反応は、単純に式 (1) のように記述できる。



$$\begin{aligned} \frac{d[\text{P-XX-P}]}{dt} &= -k_1[\text{P-XX-P}][\text{GSH}]^2 + k_{-1}[\text{P-XH}]^2[\text{GSSG}] \\ &= -k_1[\text{P-XX-P}]\{0.1 - 2(7.14 \times 10^{-5} - [\text{PXXP}])\}^2 \\ &\quad + 4k_{-1}(7.14 \times 10^{-5} - [\text{P-XX-P}])^3 \end{aligned} \quad (2)$$

$$K_{\text{eq}} = \frac{k_1}{k_{-1}} = \frac{[\text{P-XH}]^2[\text{GSSG}]}{[\text{P-XX-P}][\text{GSH}]^2} \quad (3)$$

式(1)から導かれる速度式(2)の見かけの速度定数 $k_1(\text{obsd})$ および $k_{-1}(\text{obsd})$ は、Runge-Kutta-Gill の方法に基づいた非線形最小2乗法プログラム、MULTI(RUNGE)⁵¹⁾ によるカーブフィッティングにより求めた。また、平衡定数 K_{eq} は、式(3)より求めた。

表9 酸化還元反応(式1)における速度定数および平衡定数

X	$k_1(\text{obsd}) (\text{M}^{-2}\text{sec}^{-1})$	$k_{-1}(\text{obsd}) (\text{M}^{-2}\text{sec}^{-1})$	K_{eq}
Se	8.8×10^{-2}	3.8×10^4	2.3×10^{-6}
S	6.1×10^{-3}	1.5×10^2	4.1×10^{-5}

以上の結果より、セレノシスチン含有ペプチドの速度論的挙動はシスチン含有ペプチドの挙動と大きく異なることが明らかになった。P-SeSe-P の速度定数は P-SS-P のそれよりもはるかに大きく、その比は正反応で 14.4 倍、逆反応においては 253 倍であった。

Se-Se 結合のエネルギー (46 kcal/mol) は、S-S 結合エネルギー (64 kcal/mol) よりも小さく⁵²⁾、またセレノレートは対応するチオレートよりも良い脱離基になる⁵³⁾ことが知られている。このことが正反応において $k_1(\text{obsd})^{\text{Se}} > k_1(\text{obsd})^{\text{S}}$ となる原因になっているものと考えられる。

また、逆反応において $k_{-1}(\text{obsd})^{\text{Se}}$ が非常に大きな値を示すことにはセレノールの高い解離性が大きく寄与しているものと考えられる。つまり、セレノール基は対応するチオールよりも解離定数が小さく (セレノシステインおよびシステイン側鎖の pKa はそれぞれ 8.53、5.73⁴⁰⁾) pH 7.5 においてはセレノール基のほとんどが高い求核性を有するセレノレートアニオンの形で存在しているため、式(1)の逆反応即ち再酸化反応が速やかに進行するものと考えられる。

第5節 小括

本章において著者は、セレノシスチン前駆体となる Fmoc-Sec(MBzl)-OH を合成し、この誘導体が、一般的に用いられている Fmoc 型固相法に応用可能であることを示した。また、Se-MBzl 基は S-MBzl 基同様 DMSO - TFA 系及び DMSO - TMSCl - TFA 系により直接ジセレニドに変換されることを明かにし、一方、ヨウ素を用いた酸化では Se-MBzl 基のみが選択的に反応することを見いだした。

モデルペプチドを用いた酸化還元反応における速度論的解析の結果から、ペプチド中のジセレニド結合は対応するジスルフィド結合よりもグルタチオンのようなチオールに対する反応性が高く、交換反応を起こしやすいが、その平衡状態においてはジスルフィドペプチドよりもより酸化型に片寄って存在することが明らかになった。

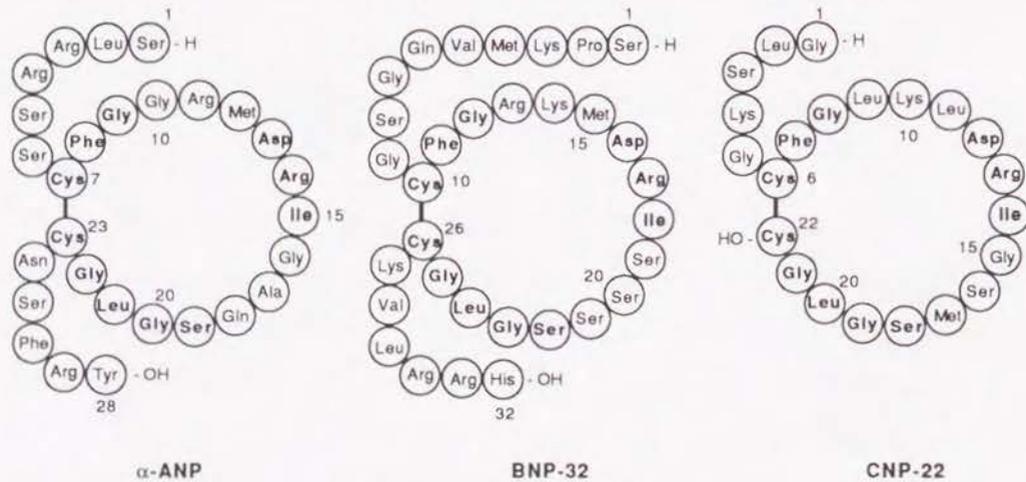
第4章 ラット心房性ナトリウム利尿ペプチド (rANP) セレンアナログの合成とその生物活性

第1節 ANP の構造活性相関に関する従来の研究概要

心房性ナトリウム利尿ペプチド (ANP) は 1983 年 Flynn らによりラットから⁵⁴⁾、1984 年 Kangawa ら⁵⁵⁾によりヒト心房より単離・構造決定されたペプチドで、主要な分泌型は α -ANP と呼ばれる 28 アミノ酸残基から構成され、分子内に 1 本のジスルフィド結合を有する環状ペプチドである。

本ペプチドはナトリウム利尿、血圧降下、血管平滑筋弛緩、アルドステロン分泌抑制等の生理作用を有し⁵⁶⁾、後に発見された脳性ナトリウム利尿ペプチド (BNP)⁵⁷⁾、C-型ナトリウム利尿ペプチド (CNP)⁵⁸⁾ と共に体液の恒常性の維持および血圧の調節に重要な役割を果たしていると考えられている (図 2 0)。

図 2 0 ナトリウム利尿ペプチド (ヒト型) の構造



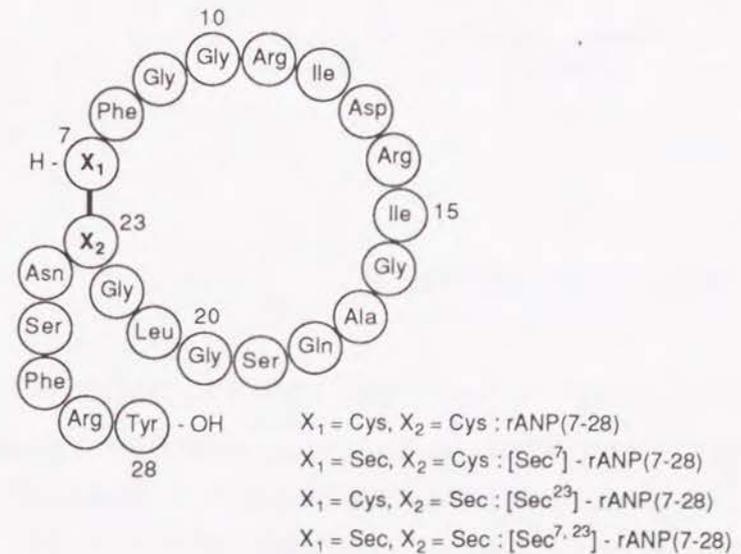
ANP の発見以後精力的な構造活性相関研究がなされ、N 末端環外部は生理活性発現には不要で、ANP(7-28) でフルアゴニスト活性を有することが分かっている⁵⁹⁾。また、環状構造をなくした直鎖アナログでは顕著な生理活性の低下を示し⁶⁰⁾、7 位の Cys の

かわりにメルカプト酢酸、メルカプトプロピオン酸、メルカプト酪酸を導入し環サイズを変化させたアナログ⁶¹⁾を用いた研究から、ジスルフィド結合によって形成される 53 員環が ANP の活性発現に重要な役割を果たしていることが示唆された。しかし、ジスルフィド結合 (-S-S-) をエチレンユニット (-CH₂-CH₂-) に変換した誘導体は、53 員環を有しているにもかかわらず著しい利尿活性の低下を示した⁶²⁾。同様の置換はオキシトシン⁶³⁾あるいはウナギカルシトニン⁶⁴⁾の生理活性にはさほど大きな影響を与えないことが既に分かっている。Minamitake らは hANP(7-28) の Cys を D-Cys、L-Pen、あるいは D-Pen に置換したアナログを合成し、血管平滑筋弛緩活性は 23 位の Cys 側鎖の configuration と flexibility によって大きく影響されることを明かにしている⁶⁵⁾。

第2節 合成方針

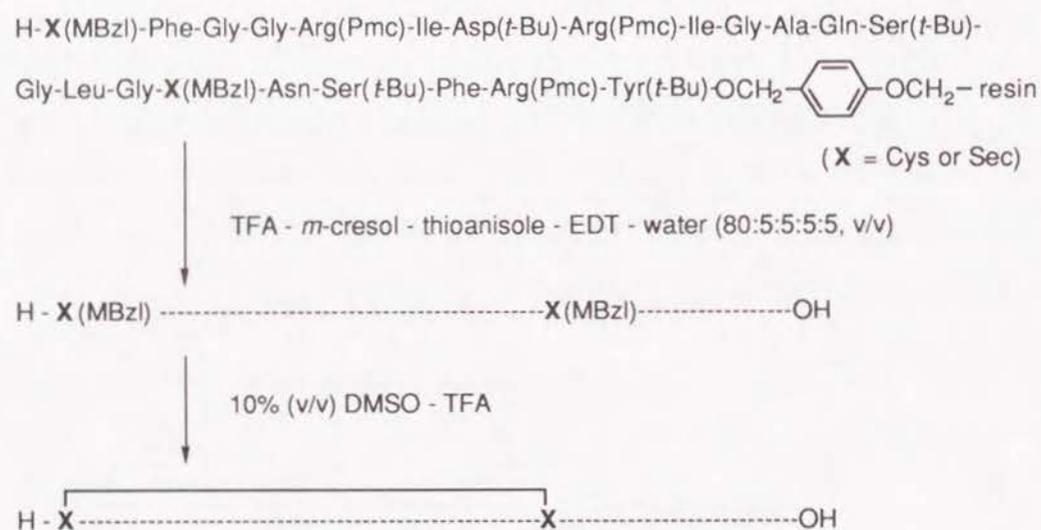
著者は、ANP の活性発現にジスルフィド結合が重要な役割を果たしていることに着目し、フルアゴニスト活性を有するラット ANP(7-28) (rANP(7-28)) 及びそのジスルフィド結合中の硫黄原子をセレン原子に置換した 3 種の誘導体 ([Sec⁷]-rANP(7-28), [Sec²³]-rANP(7-28), [Sec^{7,23}]-rANP(7-28)) の合成を計画した (図 2 1)。

図 2 1 rANP(7-28) とそのセレン誘導体の構造



rANP(7-28) 誘導体のペプチド鎖の構築には先のモデルペプチドの合成において良好な結果を与えた Fmoc 型固相法を採用することにした。従来 Fmoc 法では Arg 側鎖保護基には Mtr 基⁶⁶⁾を用いることが多かったが、この基は TFA による脱保護に長時間を要するため、本合成においては S- 及び Se-MBzl が一部切断される危険性がある。従って3個の Arg 残基の側鎖保護には Mtr よりも酸による脱保護を受けやすいとされている Pmc 基⁶⁷⁾を用いることにした。環化には S-MBzl, Se-MBzl 基両方に反応する DMSO - TFA 系を用い、保護システイン及び保護セレノシステイン残基間で直接的に行うことにした (図 2 2)。

図 2 2 rANP(7-28) 及びそのセレン誘導体の合成スキーム



第 3 節 rANP セレンアナログの合成

rANP(7-28) およびそのセレンアナログ [Sec⁷]-rANP(7-28)、[Sec⁷]-rANP(7-28)、[Sec⁷]-rANP(7-28) のペプチド鎖の構築は、*p*-benzyloxybenzylalcohol 樹脂上 Fmoc 型固相法により手動で行った。この際 Cys および Sec 残基の前駆体として Fmoc-Cys(MBzl)-OH、Fmoc-Sec(MBzl)-OH をそれぞれ用いた。Arg の側鎖保護基には Pmc 基を、その他アミ

ノ酸の側鎖保護には *tert*-butyl alcohol 型の保護基を用いた。

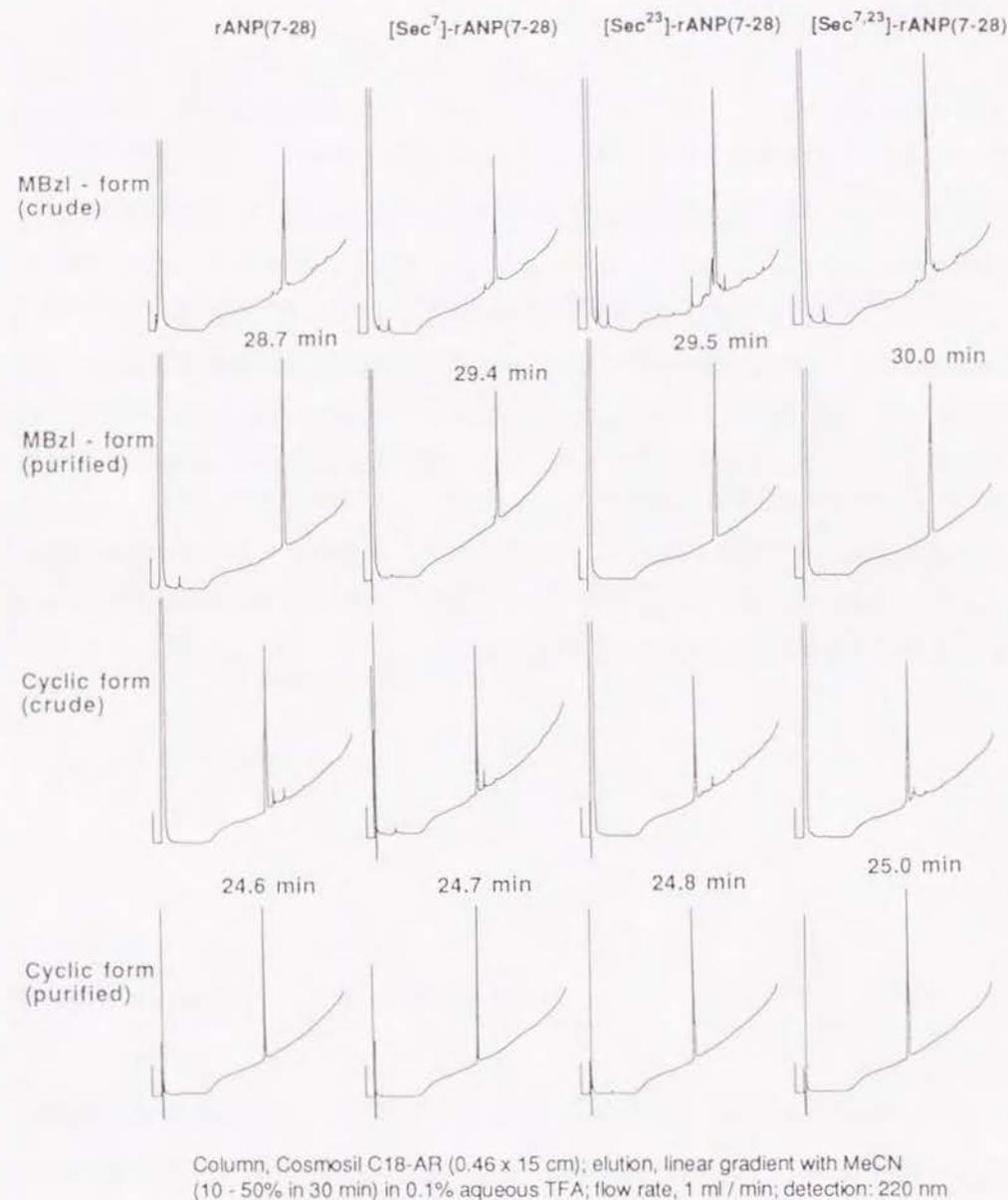
得られた各々のペプチド樹脂は TFA - *m*-cresol - thioanisole - EDT - 水 - TFA (80:5:5:5:5, v/v) で処理しペプチドの樹脂からの切断と側鎖保護基の除去を行った。この処理において S- および Se-MBzl 基は安定に保たれた。各 MBzl 体ペプチドは HPLC 上シャープなピークとして現われたが (図 2 3)、最終生成物の精製を容易にするため更に HPLC による精製を行った。

次にこれらの MBzl 体ペプチドを 10% DMSO - TFA で処理し環化を行った (ペプチド濃度: 約 1 mg/ml)。この処理によって、Se- および S-MBzl 基は切断され同時に S-S, Se-Se, および S-Se 結合が形成された。この環化反応の完結に要した時間はペプチドによって異なり、rANP(7-28) には 60 分、[Sec²³]-rANP(7-28) には 120 分、[Sec⁷]-rANP(7-28) および [Sec^{7,23}]-rANP(7-28) には 15 分を要した。本反応中、副反応物あるいは多量体に相当すると思われるピークは HPLC 上観察されず、目的物はシャープなピークとして現われた。主生成物は HPLC にて分取し高純度の目的物を得た。

rANP(7-28)、そのセレンアナログ、およびそれぞれの合成中間体の HPLC プロファイルを図 2 3 に示す。各々のペプチドは、アミノ酸分析および FAB-mass により同定した。

以上の結果は合成化学的に満足できるものであり、本合成ルートの有用性が証明された。また、DMSO - TFA 系による酸化は S-S 結合のみならず Se-Se あるいは S-Se 結合形成においても有用であることが明らかになった。

図 2 3 rANP(7-28)、そのセレン誘導体及びそれらの合成中間体のHPLC



第 4 節 rANP セレンアナログの生物活性

rANP(7-28)の硫黄原子のセレン原子への置換がその生物活性に及ぼす影響を及ぼすのかを調べるため rANP(7-28) およびそのセレンアナログ [Sec⁷]-rANP(7-28)、[Sec²³]-rANP(7-28)、[Sec^{7,23}]-rANP(7-28) についてレセプター結合活性および血管弛緩活性発現の為の2次メッセンジャーと考えられているサイクリックGMP (cGMP)の細胞内での蓄積を調べた。

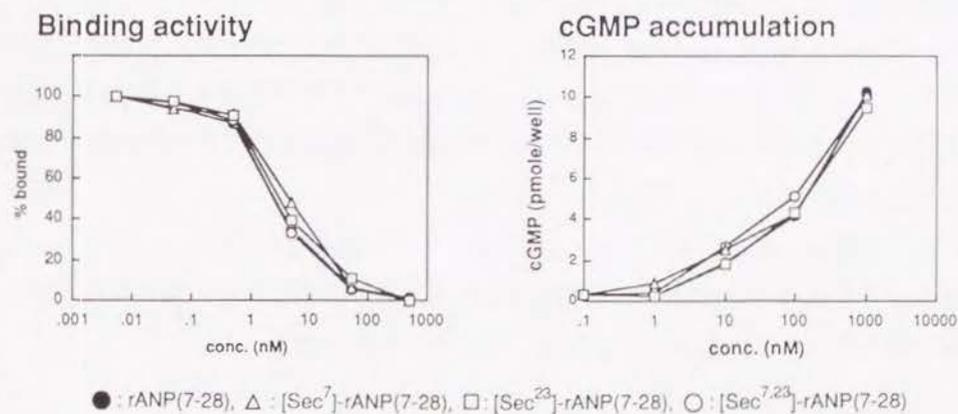
(1) ANP 誘導体のレセプター結合能

ラット培養血管平滑筋細胞 (Vascular Smooth Muscle Cells; VSMC) と標識ヒト型 α -ANP (¹²⁵I- α -hANP) の特異的結合に対する ANP 誘導体の競合的拮抗能をレセプター結合活性として評価した。尚、VSMC はクリアランスレセプター (C-receptor) の含有率が高く (~90%)、このアッセイの結果は、C-レセプター結合能を反映しているものと考えられる⁶⁵⁾。結果を図 2 4、表 1 0 に示した。

(2) ANP 誘導体の VSMC 内 cGMP 産生能

ANPの血管弛緩活性は ANP が B-レセプター (Biological receptor) に結合した後に起こる細胞内 cGMP の増加によって引き起こされるものと考えられている。従って、ここでは、培養 VSMC における cGMP 産生を ANP 誘導体の生物活性の指標とした⁶⁵⁾。結果を図 2 4 および表 1 0 に示した。

図 2 4 rANP セレンアナログのレセプター結合能および cGMP産生能



Values are the means of two experiments.

表10 rANP(7-28) セレン誘導体のレセプター結合能における IC₅₀ 値及び
VSMC 内 cGMP 産生能における EC₅₀ 値

	Receptor binding IC ₅₀ (x 10 ⁻⁹ M) ^{a)}	cGMP accumulation EC ₅₀ (x 10 ⁻⁷ M) ^{b)}
rANP ⁷⁻²⁸	2.3	1.4
[Sec ⁷]-rANP ⁷⁻²⁸	4.9	1.3
[Sec ²³]-rANP ⁷⁻²⁸	3.7	1.8
[Sec ^{7,23}]-rANP ⁷⁻²⁸	2.8	1.0

Values are the means of two experiments. a) The concentration of the peptide inhibiting specific binding of [¹²⁵I]-α-hANP by 50% (IC₅₀) was derived from an analysis plots of the percentage of specific binding vs. the log concentration of the peptide. b) The concentration of the peptide required for half-maximum accumulation of cGMP (EC₅₀) was derived from an analysis of plots of cGMP contents vs. log concentration of the peptide.

rANP(7-28) の3種のセレンアナログ ([Sec⁷]-rANP(7-28)、[Sec²³]-rANP(7-28)、[Sec^{7,23}]-rANP(7-28)) は rANP(7-28) とほぼ同等のレセプター結合能および cGMP 産生能を有していた。

以上の結果は同様の置換をオキシトシン⁴³⁾およびソマトスタチン⁴⁴⁾に施した誘導体が天然品とほぼ同等の生理活性を示すという以前の報告の結果に類似している。このことは、ペプチド中の Sec 残基の化学的性質および立体的な構造が Cys 残基のそれと非常に似ており、Cys 残基の Sec 残基への置換は近傍の立体構造をほとんど変化させていないことを示している。しかし、オキシトシン⁶³⁾およびウナギカルシトニン⁶⁴⁾のジスルフィド結合をエチレンユニットに変換したアナログはそれらの生理活性をかなり保持するのに対して同様の置換を hANP に適用した場合にはその利尿活性が激減することが報告されている⁶²⁾。

これらの事実を総合すると、ANP のジスルフィド結合自身、あるいはジスルフィド結合により立体構造を固定された架橋部近傍のアミノ酸残基がその機能レセプターに直接相互作用してその生理活性を発現していることが示唆される。

結語

著者は、シスチン含有ペプチドの合成における key-step であるジスルフィド結合形成にスルホキシドの酸化力を利用した新しい2つの反応系：DMSO-TFA 系及びスルホキシド-シリル化剤-TFA 系を導入し、これらの方法を用いて幾つかの生理活性ペプチドを合成した。本法は以下に述べるような優れた特徴を有している。

- 1) 溶媒として用いる TFA はペプチドに対して高い溶解力を有しているため、水系溶媒に難溶性疎水性のペプチドあるいは保護ペプチドに対しても使用可能である。
- 2) 種々の S-保護システイン残基からの直接的なジスルフィド結合形成が可能である。
- 3) 空気酸化法に比べ反応時間が短い。
- 4) S-脱保護に毒性の高い重金属を用いないため生体に対する安全性も高く、ペプチド性医薬品の合成にも用いることができる。

著者はまた、Fmoc 型固相合成に適用できるセレンシステイン誘導体 Fmoc-Sec(MBzl)-OH を開発し、スルホキシドによる酸化法を用いたセレンシスチン含有ペプチドの新しい合成ルートを確立した。

セレンシスチンを含有するモデルペプチドの酸化還元反応における速度論的解析は、ペプチド中のジセレニド結合の性質について興味ある基礎的知見を与えた。

上記の方法を用いて、rANP のセレン誘導体の簡便かつ高効率な合成に成功し、本合成法の有用性を証明すると共に、その生物活性の結果から、システイン残基のセレンシステイン残基への置換は元の立体構造を大きく変化させないことが示唆された。また、この合成法を用いてセレンシスチン残基に⁷⁷Seを導入することも可能であるため、システイン残基のセレンシステイン残基への置換はシスチン含有ペプチドのNMRによる構造学的研究にも役立つものと考えられる。

以上の研究によって得られた成果はシスチン含有ペプチドの合成および構造活性相関研究に有用な知見を提供するものであり、ペプチド化学の進展に資するものがあると考えられる。

実験の部

融点 (mp) は柳本微量融点測定器で測定し、全て未補正。旋光度は JASCO DIP-360 デジタル旋光度計で測定した。ペプチドの加水分解は以下の2つの方法 1), 2) で行い、加水分解物のアミノ酸組成は、日立 835 型アミノ酸分析計で測定した。

1) 6 N HCl 加水分解：約 0.1 μmol のペプチドを 1% フェノールを含む 6 N HCl (500 μl) を用いて減圧封管中 110°C で 20 時間反応させた。

2) LAP 消化：約 60 nmol のペプチドを 100 μl の 50 mM トリシュー塩酸バッファー中、1 unit の LAP で 37°C、15-20 時間インキュベートした。

$^1\text{H-NMR}$ スペクトルの測定には Bruker AC-300 spectrometer を使用し、テトラメチルシランを内部標準として測定した。

FAB-mass スペクトルの測定には、VG Analytical ZAB-SE を使用し、SIMS スペクトルの測定には、日立 M-90 質量分析機を用いた。

薄層クロマトグラフィー (TLC) は、Kieselgel 60G (Merck) を用い、 CHCl_3 -MeOH-水 (8:3:1, v/v) の下層によって展開した。発色はニンヒドリンあるいは硫酸セリウムを用いて行った。

HPLC には Waters 600E System Controller あるいは Waters 600 Multisolvant Delivery System を用い、UV 検出器としてそれぞれ Waters 484 Tunable Absorbance Detector または Lambda-Max Model 481 Spectrometer を接続した。ピーク面積は、日立 D-2500 chromat integrator を用いて算出した。溶出は 0.1% (v/v) TFA - 水と 0.1% (v/v) TFA - MeCN の直線濃度勾配により行った。また、分析には Cosmosil C18-AR (0.46 x 15 cm) カラムあるいは $\mu\text{Bondasphere } 5\mu\text{C18-100}\text{\AA}$ (0.39 x 15 cm) カラムを流速 1 ml/min で用いた。分取には Cosmosil C18-AR (2.0 x 25 cm) 及び YMC PACK D-ODS-5 (2.0 x 25 cm) をそれぞれ流速 8 ml/min、10 ml/min で使用した。

ペプチドの固相合成は特に記載のないかぎり Fmoc 型固相法を用いて手動で行った。また、特に記載のないかぎりアミノ酸の側鎖アミノ基、水酸基、カルボキシル基、イミダゾール基には *tert*-butyl alcohol 型の保護基を有する N^α -Fmoc アミノ酸を使用した。表 1 1 に固相合成の手順を示した。

表 1 1 固相合成手順

Step	Reagent	Time	Operation
1. N ^α -deprotection	20% piperidine/DMF	2 min	Elution (x 1)
	20% piperidine/DMF	10 min	Shaking
2. Washing	DMF	5 min	Elution (x 8)
3. Coupling*	Fmoc-AA-OH (5eq)	1 - 2 h	Shaking
	HOBt (5eq)		
	DIC (5eq)		
	DMF		
4. Washing	DMF	3 min	Elution (x 5)
5. Kaiser test ⁶⁸⁾		3 min	

* Fmoc-AA-OPfp (5 eq) was also used in the absence of DIC.

試薬類は特に精製せず市販品をそのまま使用した。また実験に使用した全ての水は、蒸留した後、Milli-Q SP (Millipore) により脱イオンしたものである。

第 1 章に関する実験

第 2 節に関する実験

(1) システインおよび S-保護システイン誘導体からの 10% DMSO - TFA 系によるシスチン形成

HCl · H-Cys-OH および H-Cys(R)-OH; (R = Trt, Dbs, MBzl, Ad, MeBzl) 各 20 μmol を H-Gly-OH (内部標準、20 μmol) と共に 1% アニソールを含む 10% (v/v) DMSO - TFA (1 ml) で室温処理した。経時的に 50 μl をサンプリングし、直ちに 10 ml の水に希釈、メンブランフィルターで濾過した後アミノ酸分析によりシスチンを定量した。結果を図 2 に示した。

(2) 副反応についての検討

H-Tyr-OH, H-Met-OH および H-Trp-OH, 各々 20 μmol を H-Gly-OH (内部標準、20 μmol) と共に 1% アニソールを含む 10% (v/v) DMSO - TFA (1 ml) で室温 12 時間処理し、残存原料を (1) 同様アミノ酸分析により定量した。結果を表 1 に示した。

第 3 節に関する実験

(3) S-保護オキシトシン誘導体の固相合成

3 種の S-保護オキシトシン誘導体のペプチド鎖は、PAL-樹脂 (Millipore, 0.33 mmol/g) 上、0.1 mmol スケールで Fmoc 型固相合成によって構築した。2 つの Cys 残基には以下に述べる 3 種の異なる S-保護スキームを採用した。

樹脂 A: 2 個の Cys 側鎖保護基には MBzl 基を用いた。

樹脂 B: 2 個の Cys 側鎖保護基には Acn 基を用いた。

樹脂 C: Cys¹ には Acn、Cys⁶ には Trt 基を用いた。

(4) オキシトシン (遊離のシステイン残基間でのジスルフィド結合形成)

樹脂 A (23.0 mg, 5.3 μmol) を *m*-cresol (61 μl) - thioanisole (150 μl) - EDT (25 μl) - TFA (940 μl) - TMSBr (165 μl) で氷冷下 1 時間処理した。生じた HBr ガスをロータリーエバポレーターで除去した後、グラスフィルターで樹脂を濾去した。濾液に冷エーテルを加え析出したペプチドを遠心によって集め、これをエーテルでよく洗浄した後、窒素気流下乾燥させた。次に、得られた SH-オキシトシンの沈殿に 1% アニソールを含む 10% (v/v) DMSO - TFA (2 ml) を加え室温 1 時間反応させた。反応液

に冷エーテルを加えてペプチドを沈殿させた。主生成物は HPLC により精製後、凍結乾燥し、オキシトシンの羽毛状粉末を得た。

収量 3.2 mg (60% based on the C-terminal amino acid).

SIMS m/z: Found 1007 (M+H)⁺; Calcd. for C₄₃H₆₇N₁₂O₁₂S₂; 1007.44.

6 N HCl 加水分解物のアミノ酸組成 (括弧内は理論値);

Asx 0.75 (1), Glx 0.91 (1), Pro 1.25 (1), Gly 1.05 (1), (Cys)₂ N.D. (1), Ile 1.00 (1), Leu 1.06 (1), Tyr 0.89 (1)

(5) α-hCGRP

液相法で合成した保護 α-hCGRP²⁹⁾ (20.5 mg, 4.05 μmol) を *m*-cresol (244 μl) - thioanisole (600 μl) - TFA (3.45 ml) - TMSOTf (970 μl) で氷冷下 2 時間処理した。反応液に冷エーテルを加え、生じた沈殿を遠心によって集めた。沈殿はエーテルで洗浄した後、窒素気流下乾燥し、これに 1% アニソールを含む 10% (v/v) DMSO - TFA (5 ml) を加え室温 1 時間反応させた。反応液に冷エーテルを加え析出した粗ペプチドを遠心沈降した。得られたペプチドは HPLC により精製し、凍結乾燥した。

収量 2.7 mg (17% based of the protected peptide).

SIMS m/z: Found 3788 (M+H)⁺; Calcd. for C₁₆₃H₂₆₈N₅₁O₄₉S₂; 3787.95.

6 N HCl 加水分解物のアミノ酸組成 (括弧内は理論値);

Asx 4.08 (4), Thr 3.71 (4), Ser 2.73 (3), Pro 1.02 (1), Gly 4.07 (4), Ala 4.25 (4), (Cys)₂ N.D. (1), Val 4.45 (5), Leu 3.13 (3), Phe 2.00 (2), Lys 1.68 (2), His 0.97 (1), Arg 2.03 (2)

(6) S-保護オキシトシン誘導体: [Cys(MBzl)^{1,6}]-oxytocin, [Cys(Acm)^{1,6}]-oxytocin, 及び [Cys(Acm)¹,Cys(SH)⁶]-oxytocin

樹脂 A, B, あるいは C (120 mg) を TFA - *m*-cresol - thioanisole - EDT - 水 (80:5:5:5:5, v/v, 2.5 ml) で室温 1 時間処理した後、樹脂をガラスフィルターで除去した。濾液に冷エーテルを加え、粗ペプチドを沈殿させた。主生成物を HPLC にて精製し、凍結乾燥すると白色羽毛状粉末が得られた。

収量、収率及び物理化学的同定の結果を表 1 2 - 1 4 に示す。

表 1 2 [Cys(MBzl)^{1,6}]-oxytocin, [Cys(Acm)^{1,6}]-oxytocin, 及び [Cys(Acm)¹,Cys(SH)⁶]-oxytocin の収量と収率

	収量	収率
[Cys(MBzl) ^{1,6}]-oxytocin	23 mg	67%
[Cys(Acm) ^{1,6}]-oxytocin	29 mg	88%
[Cys(Acm) ¹ ,Cys(SH) ⁶]-oxytocin	30 mg	79%

表 1 3 [Cys(MBzl)^{1,6}]-oxytocin, [Cys(Acm)^{1,6}]-oxytocin, 及び [Cys(Acm)¹,Cys(SH)⁶]-oxytocin の SIMS

	Formula	SIMS m/z,(M+H) ⁺	
		Found	Calcd.
[Cys(MBzl) ^{1,6}]-oxytocin	C ₅₉ H ₈₅ N ₁₂ O ₁₄ S ₂	1249	1249.57
[Cys(Acm) ^{1,6}]-oxytocin	C ₄₉ H ₇₉ N ₁₄ O ₁₄ S ₂	1151	1151.53
[Cys(Acm) ¹ ,Cys(SH) ⁶]-oxytocin	C ₄₆ H ₇₄ N ₁₃ O ₁₃ S ₂	1080	1080.49

表 1 4 [Cys(MBzl)^{1,6}]-oxytocin, [Cys(Acm)^{1,6}]-oxytocin, 及び [Cys(Acm)¹,Cys(SH)⁶]-oxytocin の 6 N HCl 加水分解後のアミノ酸組成

	[Cys(MBzl) ^{1,6}]-oxytocin	[Cys(Acm) ^{1,6}]-oxytocin	[Cys(Acm) ¹ ,Cys(SH) ⁶]-oxytocin	理論値
Asx	0.93	0.95	0.94	1
Glx	1.02	1.03	1.03	1
Pro	1.29	1.29	1.04	1
Gly	1.08	1.06	1.07	1
Cys	N.D.	N.D.	N.D.	2

表 1 4 (続き)

Ile	1.00	1.00	1.00	1
Leu	1.05	1.05	1.05	1
Tyr	1.03	0.97	0.98	1

(7) オキシトシン (S-保護システイン残基間でのジスルフィド結合形成)

2種の S-保護オキシトシン ([Cys(MBzl)^{1,6}]-oxytocin 及び [Cys(Acm)^{1,6}]-oxytocin) 各 5 μmol を 1% アニソールを含む 10% (v/v) DMSO - TFA (2 ml) で室温処理し、反応の進行は、経時的に反応液を採取し HPLC で分析することによりモニターした。オキシトシンの生成収率及び残存原料は、HPLC のピーク面積より求めた。結果は表 2 に示した。

(8) [Cys(Acm)¹,Cys(SH)⁶]-oxytocin の 2 量体化 ([Cys(Acm)^{1,1'}Cys^{6,6'}]-oxytocin dimer)

[Cys(Acm)¹,Cys(SH)⁶]-oxytocin (2.4 mg) を 50 mM トリブス塩酸バッファー (pH 8, 240 μl) に溶解し室温 2 日間放置した。AcOH を加えて酸性にした後 HPLC により主生成物を精製した。本品は実験 (9) における HPLC 分析の標品として使用した。

収量 1.6 mg (67%)

SIMS m/z: Found 2158 (M+H)⁺; Calcd. for C₉₂H₁₄₅N₂₆O₂₆S₄; 2157.97.

(9) [Cys(Acm)¹,Cys(SH)⁶]-oxytocin の DMSO - TFA 処理

[Cys(Acm)¹,Cys(SH)⁶]-oxytocin (5 μmol) を実験 (7) 同様処理した。粗生成物中のオキシトシンモノマーと [Cys(Acm)^{1,1'}Cys^{6,6'}]-oxytocin dimer の収率は HPLC 上、対応するピーク面積より算出した。

(10) S-2-hydroxymethylthio cysteine

氷冷した S-acetamidomethyl cysteine sulfoxide (68 mg, 0.21 mmol) の TFA 溶液 (1.36 ml) に 2-メルカプトエタノール (22.3 μl, 0.32 mmol) を加え、室温 5 時間攪拌した。

反応液に冷エーテルを加え生成物を沈殿させ、この沈殿を遠心により集めた。粗生成物の一部を HPLC にて精製し、凍結乾燥することにより吸湿性の粉末を得た。

SIMS m/z: Found 198 (M+H)⁺; Calcd. for C₅H₁₂NO₃S₂; 198.03.

尚、本品は大過剰の DTT による還元後に生成するシステインをアミノ酸分析で定量することによりその絶対量を決定した後、実験 (11) におけるアミノ酸分析の標品として用いた。

(11) 2-メルカプトエタノール存在下および非存在下での H-Cys(Acm)-OH の DMSO - TFA 酸化時における挙動

H-Cys(Acm)-OH (20 μmol) を H-Gly-OH (内部標準、20 μmol) と共に、2-メルカプトエタノール (20 μmol) の存在下および非存在下で 10% (v/v) DMSO - TFA (1 ml) で室温処理した。経時的に 50 μl をサンプリングし、直ちに 10 ml の水に希釈、メンブランフィルターで濾過した後アミノ酸分析により H-Cys-OH、S-2-hydroxyethylthio cysteine およびシスチンを定量した。結果を表 3 に示した。

(12) アバミンおよびそのジスルフィド異性体

ペプチド鎖の構築は、DMBHA 樹脂⁶⁹上 Fmoc 型固相法により行った。Arg 側鎖保護基には Mtr を使用した。4 個の Cys 残基の側鎖保護には 3 つの異なる保護スキームを用いた。I 型アバミンには 1 位および 11 位に Cys(Trt)、3 位および 15 位に Cys(Acm) を、II 型には 1 位および 15 位に Cys(Trt)、3 位、11 位に Cys(Acm) を採用した。また、III 型の合成には、1 位と 3 位に Cys(Trt) を、11 位と 15 位に Cys(Acm) をそれぞれ用いた。

各ペプチド樹脂 (50 mg) を *m*-cresol (122 μl) - thioanisole (300 μl) - EDT (50 μl) - TFA (1.88 ml) - TMSBr (330 μl) で氷冷下 3 時間処理した。反応後 HBr ガスをエバポレーションにより除き、樹脂を濾去した。濾液に冷エーテルを加えペプチドを沈殿させた。得られた SH 体粗ペプチドは Sephadex G-25 (3.5 x 50 cm) カラムにアプライし 1 N AcOH で溶出した。最も速く溶出するピークのフラクションを集めアンモニア水で pH 7.5 とした。これに水を加えて液量を 200 ml とした後、4℃で 2 日間放置することにより 1 本目のジスルフィド結合を形成させた。反応液は凍結乾燥によって濃縮し、Sephadex G-25 (3.5 x 50 cm) を用いたゲル濾過により脱塩したのち再度

凍結乾燥した。

得られたパウダーを MeOH - 水 (4:1, v/v, 10 ml) に溶解し、ヨウ素 (46 mg) を含む MeOH - 1 N HCl (4:1, v/v, 10 ml) に室温で滴下後 30 分間放置した。アスコルビン酸を反応液の色が無色になるまで加えることにより反応を停止し、室温で MeOH を溜去した。残渣を Sephadex G-25 (3.5 x 50 cm) カラムにアプライし 1 N AcOH で溶出し、メインピークを含むフラクションを凍結乾燥した。目的物は更に HPLC で精製した。

収量 I 型: 1.1 mg (6% based on the C-terminal amino acid)

II 型: 1.8 mg (9%)

III 型: 1.9 mg (9%)

FAB-mass m/z: I 型: Found 2027.1 (M+H)⁺; Calcd. for C₇₉H₁₃₂N₃₁O₂₄S₄; 2026.89.

II 型: Found 2026.7 (M+H)⁺; Calcd. for C₇₉H₁₃₂N₃₁O₂₄S₄; 2026.89.

III 型: Found 2027.8 (M+H)⁺; Calcd. for C₇₉H₁₃₂N₃₁O₂₄S₄; 2026.89.

(13) 還元型アバミンの DMSO - TFA による酸化

還元型アバミンは合成 I 型アバミン¹⁶⁾を 50 mM トリシュー塩酸バッファー (pH 8) 中 DTT (50 eq) と共に 37 °C 1 時間処理した後、SEP-PAK (Millipore) で精製することにより得た。凍結乾燥した還元型アバミン (約 500 μg) は、10% (v/v) DMSO - TFA (0.5 ml) で室温 2 時間処理し、反応液に冷エーテルを加えペプチドを沈殿させた。主生成物は HPLC により精製し、凍結乾燥することにより白色のパウダーを得た。

FAB-mass m/z: Found 2027.26 (M+H)⁺; Calcd. for C₇₉H₁₃₂N₃₁O₂₄S₄; 2026.89.

本品は (12) で合成した III 型アバミンと HPLC 上一致したことより、III 型のジスルフィド架橋様式を有することが確認された。

(14) 種々の試薬によるアバミンのジスルフィド結合形成

還元型アバミン (約 300 μg) を以下の試薬系 (200 μl) で処理した。

- 1) Ti(TFA)₃ (5 eq) - TFA、4 °C、5 分
- 2) 10% (v/v) DMSO - 水、室温、4.5 時間
- 3) 空気酸化: 50 mM トリシュー塩酸バッファー (pH 8)、室温、6 時間

反応液の一部を HPLC により分析し、各ジスルフィド異性体の生成比を対応するピーク面積の比より求めた。結果を表 4 に示す。

第2章に関する実験

第1節に関する実験

(15) S-保護システイン誘導体を用いた基礎実験

H-Cys(R)-OH; (R = AcM, Bzl, MBzl, MeBzl, *t*-Bu) 各々 20 μ mol を H-Gly-OH(内部標準、20 μ mol) と共に TFA 中最終濃度 0.4 M のスルホキシド (DMSO, TMSO, Ph₂SO, MeS(O)Ph) と 1 M のシリル化剤 (TMSCl, MeSiCl₃, SiCl₄, TMSOTf) の各種の組み合わせで氷冷下処理した(反応液量1 ml)。1時間後及び4時間後に各反応液から 50 μ l をサンプリングし、直ちに 10 ml の水に希釈、メンブランフィルターで濾過した後アミノ酸分析によりシスチンを定量した。結果を表5に示した。

第2節に関する実験

(16) N ^{α} -pMZ-[Cys(AcM)^{1,6}]-oxytocin の 0.4 M DMSO - 1 M TMSCl - TFA 系によるジスルフィド結合形成

N ^{α} -pMZ-[Cys(AcM)^{1,6}]-oxytocin¹⁴⁾ (15.2 mg, 12.2 μ mol) を氷冷下 0.4 M DMSO - 1 M TMSCl - TFA (10 ml) で1時間処理した。反応液に冷エーテルを加えると析出する沈殿を遠心沈降し、これをエーテルでよく洗浄した。粗ペプチドは 1 N AcOH に溶解し Sephadex G-10 によるゲル濾過により精製し、オキシトシンを得た。

収量 10.2 mg (83%)

(17) N ^{α} -pMZ-[Cys(AcM)^{1,6}]-oxytocin の 0.4 M MeS(O)Ph - 1 M TMSCl - TFA 系によるジスルフィド結合形成

N ^{α} -pMZ-[Cys(AcM)^{1,6}]-oxytocin (17.1 mg, 13.7 μ mol) を氷冷下 0.4 M MeS(O)Ph - 1 M TMSCl - TFA (10 ml) で 15 分処理した。反応液に冷エーテルを加えると析出する沈殿を遠心沈降し、これをエーテルでよく洗浄した。主生成物は HPLC により精製し酸化型のオキシトシンを得た。

収量 3.0 mg (22%)

(18) N ^{α} -pMZ-[Cys(MBzl)^{1,6}]-oxytocin の 0.4 M DMSO - 1 M TMSCl - TFA 系によるジスルフィド結合形成

N ^{α} -pMZ-[Cys(MBzl)^{1,6}]-oxytocin¹⁴⁾ (16.6 mg, 13.3 μ mol) を氷冷下 0.4 M DMSO - 1 M TMSCl - TFA (10 ml) で 15 分処理した後、反応液に冷エーテルを加え粗ペプチドを得た。主生成物は HPLC で精製し、凍結乾燥することによりオキシトシンを得た。

収量 7.5 mg (64%)

(19) [Cys(*t*-Bu)^{1,6}]-oxytocin 及び [Cys(Bzl)^{1,6}]-oxytocin

ペプチド鎖の構築は PAL 樹脂上 Fmoc 型固相法により行った。得られたペプチド樹脂 ([Cys(*t*-Bu)^{1,6}]-oxytocin-resin: 180 mg, [Cys(Bzl)^{1,6}]-oxytocin-resin: 200 mg) を実験(6)同様に脱保護、精製した。

収量 [Cys(*t*-Bu)^{1,6}]-oxytocin : 60 mg

[Cys(Bzl)^{1,6}]-oxytocin : 59 mg

(20) [Cys(*t*-Bu)^{1,6}]-oxytocin の 0.4 M TMSO - 1 M TMSOTf - TFA 系によるジスルフィド結合形成

[Cys(*t*-Bu)^{1,6}]-oxytocin (10.7 mg, 9.5 μ mol) を氷冷下 0.4 M TMSO - 1 M TMSOTf - TFA (10 ml) で 4 時間処理した。反応液をドライアイス-アセトン冷却下 25% アンモニア水で中和した後、HPLC でメインピークを分取、凍結乾燥しオキシトシンを得た。

収量 7.5 mg (78%)

(21) [Cys(Bzl)^{1,6}]-oxytocin の 0.4 M Ph₂SO - 1 M SiCl₄ - TFA 系によるジスルフィド結合形成

[Cys(Bzl)^{1,6}]-oxytocin (14.6 mg, 12.3 μ mol) を氷冷下 0.4 M Ph₂SO - 1 M SiCl₄ - TFA (10 ml) で 4 時間処理した。反応液に冷エーテルを加えて析出する沈殿を遠心沈降し、これをエーテルでよく洗浄した。沈殿に 1 N AcOH (5 ml) を加え、試薬由来の不溶物をメンブランフィルターで濾過した後、主生成物を HPLC により精製し酸化型のオキシトシンを得た。

収量 9.2 mg (74%)

(22) チキンカルシトニン (cCT)

[Cys(Acm)^{1,7}]-cCT³⁷) (1.3 mg, 0.37 μmol) を 0.4 M DMSO - 1 M TMSCl - TFA (1 ml) で氷冷下 1 時間処理した後、冷エーテルを加えてペプチドを沈殿させた。次いで、得られた粗ペプチドの沈殿を 0.1% TFA (200 μl) に溶解し HPLC で分析した。メインピークは cCT の標品と同一の溶出時間を示した。

収率 76% (calcd. from the peak area)

第 3 章に関する実験

第 2 節に関する実験

(23) H-Sec(MBzl)-OH

セレノシスチンは Chocat らの文献⁴⁶)に従い合成した。氷冷したセレノシスチン (1.9 g, 5.69 mmol) の 0.5 N NaOH 水溶液 (5 ml) に NaBH₄ (1.8 g, 44.9 mmol) を数回に分けて加え、反応液の黄色が消えるまで室温で攪拌した。反応液を氷浴で冷却し 2 N NaOH (15 ml) を加えた後、MBzl-Cl (4.06 ml, 29.9 mmol) を滴下、室温で 4 時間激しく攪拌した。濃塩酸で液性を酸性にすると生じる粗 H-Cys(MBzl)-OH の沈殿を濾取し、エーテルで洗浄後、熱水より再結晶した。

収量 2.44 g (74%), mp 173-176 °C(decomp.),

$[\alpha]_D^{26} +23.5^\circ$ (c = 0.22, 1 N HCl), TLC R_f 0.26

¹H-NMR (0.1 N DCl - D₂O) δ: 2.99-3.15 (m, 2H), 3.86 (s, 3H), 3.94 (s, 2H), 4.16-4.20 (q, 1H), 7.00-7.04 (m, 2H), 7.36-7.40 (m, 2H).

Anal. Calcd. for C₁₁H₁₅NO₃Se: C, 45.84; H, 5.25; N, 4.86.

Found: C, 45.98; H, 5.40; N, 4.82.

(24) Fmoc-Sec(MBzl)-OH

氷冷下 H-Sec(MBzl)-OH (2.0 g, 6.93 mmol) を TEA (967 μl, 6.93 mmol) を含む水 (12 ml) に懸濁し、Fmoc-OSu (2.24 g, 6.65 mmol) の MeCN 溶液 (7 ml) を加え、TEA (967 μl, 6.93 mmol) を追加した後、室温に戻し 1 時間激しく攪拌した。反応液を 1 N HCl で酸性にし、AcOEt で抽出した。有機層は 1 N HCl および飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウム上乾燥させた。AcOH を溜去し、残渣に *n*-ヘキサンを加え目的物の粉末を得た。

収量 3.04 g (89%), mp 138-140 °C(decomp.),

$[\alpha]_D^{26} -33.1^\circ$ (c = 0.87, DMF), TLC R_f 0.67

¹H-NMR (CDCl₃) δ: 2.95 (m, 2H), 3.75 (s, 3H), 4.20-4.45 (m, 4H), 4.60 (m, 1H), 5.50 (m, 1H), 6.75-6.84 (m, 2H), 7.13-7.22 (m, 2H), 7.28-7.44 (m, 5H), 7.53-7.61 (m, 2H), 7.70-7.78 (m, 2H).

Anal. Calcd. for $C_{26}H_{25}NO_5Se$: C, 61.18; H, 4.94; N, 2.74.

Found: C, 61.46; H, 5.10; N, 2.75.

(25) Se-MBzl 基の安定性及び脱保護条件の検討

H-Sec(MBzl)-OH (20 μ mol) を H-Gly-OH (20 μ mol, 内部標準) と共に下記の5つの試薬系(約1 ml) で処理した。

- 1) TFA - 水 (9:1, v/v)、室温 1 時間
- 2) TFA - *m*-cresol - thioanisole - EDT - 水 (80:5:5:5:5, v/v)、室温、2 時間
- 3) *m*-cresol - thioanisole - TFA - TMSBr (50: 120: 750: 132, v/v)、4 $^{\circ}C$ 、1 時間
- 4) *m*-cresol - thioanisole - TFA - TMSOTf (50: 120: 690: 194, v/v)、4 $^{\circ}C$ 、1 時間
- 5) 20% (v/v) piperidine - DMF、室温、4 時間

反応液から 50 μ l をサンプリングし水で 10 ml に希釈、メンブランフィルターで濾過後アミノ酸分析を行った。結果を表7に示した。

第3節に関する実験

(26) モデルペプチド、P-Se(MBzl): H-Leu-Lys-Gly-Sec(MBzl)-Ala-OH 及び P-S(MBzl): H-Leu-Lys-Gly-Cys(MBzl)-Ala-OH の固相合成

P-Se(MBzl) 及び PS(MBzl) のペプチド鎖は Fmoc-Ala-resin (国産化学, 0.45 mmol/g, 0.2 mmol scale) 上、Fmoc 型固相法により伸長した。

各ペプチド樹脂 (P-Se(MBzl), 75 mg; P-S(MBzl), 65 mg) を TFA - *m*-cresol - thioanisole - EDT - 水 (80:5:5:5:5, v/v, 2.5 ml) で 4 $^{\circ}C$ 、1 時間処理した後、樹脂を濾去し濾液を減圧濃縮した。これに冷エーテルを加えペプチドを沈殿させた。粗生成物は水 (1 ml) に溶解し、HPLC で精製した。

収量 P-Se(MBzl): 19 mg (86%), P-S(MBzl): 16 mg (86%)

FAB-mass m/z: P-Se(MBzl): Found 659.3 (M+H)⁺; Calcd. for $C_{28}H_{47}N_6O_7Se$; 659.27

P-S(MBzl): Found 611.3 (M+H)⁺; Calcd. for $C_{28}H_{47}N_6O_7S$; 611.32.

(27) ジセレニド結合形成法の検討

P-Se(MBzl) (200 μ g) を以下の5つの試薬系 (200 μ l) で処理した。

- 1) AcOH - 水 (4:1, v/v) 中 10 eq のヨウ素、室温、15分
- 2) MeOH - 水 (1:1, v/v) 中 10 eq のヨウ素、室温、15分

3) TFA 中 2 eq の $Tl(TFA)_3$ 、4 $^{\circ}C$ 、2分

4) 10% (v/v) DMSO - TFA、室温、15分

5) 0.2 M DMSO - 1 M TMSCl - TFA、4 $^{\circ}C$ 、2分

反応液から 20 μ l を採取し 980 μ l の水で希釈後、直ちに HPLC で分析した。目的物である P-SeSe-P の収率はピーク面積より算出した。同じ実験を P-S(MBzl) についても行った。結果を表8に示す。

尚、本実験における2量体ペプチド (P-SeSe-P および P-SS-P) の標品は以下のように調製した。

P-Se(MBzl) あるいは P-S(MBzl) (各 2.1 mg) を 10% (v/v) DMSO - TFA (500 μ l) で室温 15 分間処理した後、冷エーテルを加えペプチドを沈殿させた。主生成物を HPLC で精製し凍結乾燥することにより目的物のパウダーを得た。

FAB-mass m/z: P-SeSe-P: Found 1097.24 (M+Na)⁺; Calcd. for $C_{40}H_{74}N_{12}O_{12}Se_2Na$; 1097.38.

P-SS-P: Found 979.43 (M+H)⁺; Calcd. for $C_{40}H_{75}N_{12}O_{12}S_2$; 979.51.

LAP による加水分解物のアミノ酸組成 (括弧内は理論値):

P-SeSe-P: Gly 1.03 (1), Ala 1.00 (1), (Sec)₂ 0.52 (0.5), Leu 1.03 (1), Lys 0.97 (1);

P-SS-P: Gly 1.22 (1), Ala 1.00 (1), (Cys)₂ 0.54 (0.5), Leu 1.16 (1), Lys 1.02 (1)

これらの2量体ペプチドは 0.1% TFA に溶解し、一部を 6 N HCl で加水分解しアミノ酸分析によって濃度を決定した後、HPLC の標品として使用した。

第4節に関する実験

(28) P-SeSe-P 及び P-SS-P の GSH による還元

本実験に用いた全ての溶媒は使用直前に脱気しアルゴンで飽和させた。また、全てのトランスファーはガスタイトシリンジを用いて行った。

GSH (11.9 mg, 38.8 μ mol) を 1 mM EDTA を含む 50 mM トリス-塩酸バッファー (pH 7.5) に溶解し、これに 200 μ l の同じ溶媒に溶解した P-SeSe-P あるいは P-SS-P (27.7 μ mol) を加えた。GSH 及びペプチドの最終濃度は、それぞれ 1.00×10^{-1} M、 7.14×10^{-5} M である。反応液は 37 $^{\circ}C$ でインキュベートした。経時的に反応液から 60 μ l を採取し、直ちに 0.1% TFA を加えて pH = 2 に調整することにより反応を止めた後 HPLC で分析した。反応液中の2量体ペプチドの濃度は、対応するピークの面積より

算出した。尚、図 19 に示した結果は 3 回の実験の平均値である。

式 (2) に基づく速度定数は MULTI(RUNGE)⁵¹⁾ を用いた非線形最小 2 乗法によるカーブフィッティングより求めた。結果を表 9 に示す。

第 4 章に関する実験

第 3 節に関する実験

(29) rANP(7-28) 及びそのセレン誘導体の固相合成

rANP⁷⁻²⁸ 及びそのセレン誘導体のペプチド鎖は *p*-benzyloxybenzyl alcohol resin 上各々 0.1 mmol のスケールで、Fmoc 型固相法により構築した。Arg 残基の側鎖は Pmc 基で保護し、Cys および Sec の側鎖保護基には MBzl を用いた。各カップリング反応の完結は Kaiser test により確認した。1 回の反応で完全なカップリングが進行しなかった場合はダブルカップリングを行った。

(30) [Cys(MBzl)^{7,23}]-rANP(7-28)、[Sec(MBzl)⁷,Cys(MBzl)²³]-rANP(7-28)、[Cys(MBzl)⁷,Sec(MBzl)²³]-rANP(7-28)、及び [Sec(MBzl)^{7,23}]-rANP(7-28)

各ペプチド樹脂 (250 mg) を TFA - *m*-cresol - thioanisole - EDT - 水 (80:5:5:5:5, v/v, 12.5 ml) で室温、2 時間処理した。但し、[Sec(MBzl)⁷,Cys(MBzl)²³]-rANP(7-28) に対応するペプチド樹脂に関しては、170 mg を 8.5 ml の同じ試薬で同様に処理した。反応後、樹脂を濾去し、濾液を減圧濃縮した。これに冷エーテルを加えるとペプチドが沈殿した。沈殿はエーテルで洗浄したのち、DTT (50 eq) を含む 50% (v/v) AcOH に溶解し、主生成物を HPLC で精製した。

収量 [Cys(MBzl)^{7,23}]-rANP(7-28) : 67.4 mg (59.6% based on the C-terminal amino acid)
[Sec(MBzl)⁷,Cys(MBzl)²³]-rANP(7-28) : 37.1 mg (47.8% “)
[Cys(MBzl)⁷,Sec(MBzl)²³]-rANP(7-28) : 56.3 mg (49.3% “)
[Sec(MBzl)^{7,23}]-rANP(7-28) : 58.8 mg (51.1% “)

6 N HCl による加水分解物のアミノ酸分析および FAB-mass 分析の結果は、表 15、16 に示した。

表15 Se- および S-保護 ANP 誘導体の 6 N HCl 加水分解物の
アミノ酸組成 (括弧内は理論値)

	[Cys(MBzl) ^{7,23}]-rANP(7-28)		[Sec(MBzl) ⁷ , Cys(MBzl) ²³]-rANP(7-28)		[Cys(MBzl) ⁷ , Sec(MBzl) ²³]-rANP(7-28)		[Sec(MBzl) ^{7,23}]-rANP(7-28)	
	Found	(Theoretical)	Found	(Theoretical)	Found	(Theoretical)	Found	(Theoretical)
Asx	2.03	(2)	1.76	(2)	2.07	(2)	1.75	(2)
Ser	1.67	(2)	1.59	(2)	1.58	(2)	1.58	(2)
Glx	1.03	(1)	0.94	(1)	1.04	(1)	0.90	(1)
Gly	5.03	(5)	4.58	(5)	5.18	(5)	4.63	(5)
Ala	1.00	(1)	1.00	(1)	1.00	(1)	1.00	(1)
Ile	1.94	(2)	1.64	(2)	1.96	(2)	1.61	(2)
Leu	1.03	(1)	0.89	(1)	1.04	(1)	0.86	(1)
Tyr	0.99	(1)	0.87	(1)	1.04	(1)	0.84	(1)
Phe	2.09	(2)	1.83	(2)	2.00	(2)	1.73	(2)
Arg	2.92	(3)	2.61	(3)	3.00	(3)	2.65	(3)
Cys	N.D.	(2)	N.D.	(1)	N.D.	(1)		
Sec			N.D.	(1)	N.D.	(1)	N.D.	(2)

表16 Se- および S-保護 ANP 誘導体の FAB-mass

Formula	FAB-mass m/z, (M+H) ⁺	
	Found	Calcd.
[Cys(MBzl) ^{7,23}]-rANP(7-28)	C ₁₁₇ H ₁₇₃ N ₃₃ O ₃₂ S ₂	2618.6 2619.0
[Sec(MBzl) ⁷ , Cys(MBzl) ²³]-rANP(7-28)	C ₁₁₇ H ₁₇₃ N ₃₃ O ₃₂ SSe	2665.3 2665.9
[Cys(MBzl) ⁷ , Sec(MBzl) ²³]-rANP(7-28)	C ₁₁₇ H ₁₇₃ N ₃₃ O ₃₂ SSe	2665.5 2665.9
[Sec(MBzl) ^{7,23}]-rANP(7-28)	C ₁₁₇ H ₁₇₃ N ₃₃ O ₃₂ Se ₂	2712.1 2712.8

(31) rANP(7-28)、[Sec⁷]-rANP(7-28)、[Sec²³]-rANP(7-28)、及び [Sec^{7,23}]-rANP(7-28)

各 MBzl 体ペプチド (20 mg) を 10% (v/v) DMSO - TFA (20 mg) で室温処理した (反応時間は rANP(7-28): 60 分、[Sec⁷]-rANP(7-28): 15 分、[Sec²³]-rANP(7-28): 120 分、[Sec^{7,23}]-rANP(7-28): 15 分)。反応液に冷エーテルを加え析出した沈殿を遠心により集め、これをエーテルでよく洗浄した。粗ペプチドの沈殿を 50% AcOH に溶解しメインピークを HPLC で分取、凍結乾燥した。

収量 rANP(7-28): 7.5 mg (41.3%)、[Sec⁷]-rANP(7-28): 5.8 mg (31.9%)

[Sec²³]-rANP(7-28): 6.2 mg (34.1%)、[Sec^{7,23}]-rANP(7-28): 7.3 mg (40.1%)

6 N HCl 及び LAP による加水分解物のアミノ酸分析の結果および FAB 質量分析の結果は表 17 - 19 に示した。

表17 rANP(7-28) 及びそのセレン誘導体の 6 N HCl 加水分解後の
アミノ酸組成 (括弧内は理論値)

	rANP(7-28)		[Sec ⁷]-rANP(7-28)		[Sec ²³]-rANP(7-28)		[Sec ^{7,23}]-rANP(7-28)	
	Found	(Theoretical)	Found	(Theoretical)	Found	(Theoretical)	Found	(Theoretical)
Asx	2.00	(2)	2.00	(2)	1.98	(2)	1.94	(2)
Ser	1.78	(2)	1.84	(2)	1.74	(2)	1.73	(2)
Glx	1.02	(1)	1.02	(1)	1.02	(1)	1.01	(1)
Gly	5.00	(5)	4.97	(5)	4.93	(5)	4.89	(5)
Ala	1.00	(1)	1.00	(1)	1.00	(1)	1.00	(1)
Ile	1.92	(2)	1.87	(2)	1.91	(2)	1.86	(2)
Leu	1.00	(1)	1.00	(1)	0.99	(1)	0.97	(1)
Tyr	1.00	(1)	1.00	(1)	0.98	(1)	0.92	(1)
Phe	1.97	(2)	2.02	(2)	1.98	(2)	1.87	(2)
Arg	2.88	(3)	2.88	(3)	2.86	(3)	2.78	(3)
(Cys) ₂	N.D.	(1)						
(Sec) ₂							N.D.	(1)
Cys-Sec			N.D.	(1)	N.D.	(1)		

表18 rANP(7-28) 及びそのセレン誘導体の LAP 消化後の
アミノ酸組成 (括弧内は理論値)

	rANP(7-28)		[Sec ⁷]- rANP(7-28)		[Sec ²³]- rANP(7-28)		[Sec ^{7,23}]- rANP(7-28)	
Asp	1.03	(1)	0.97	(1)	1.00	(1)	1.03	(1)
Asn	N.D.	(1)	N.D.	(1)	N.D.	(1)	N.D.	(1)
Ser	2.07	(2)	2.03	(2)	2.03	(2)	2.03	(2)
Gln	N.D.	(1)	N.D.	(1)	N.D.	(1)	N.D.	(1)
Gly	5.12	(5)	4.80	(5)	4.87	(5)	5.18	(5)
Ala	1.00	(1)	1.00	(1)	1.00	(1)	1.00	(1)
Ile	1.97	(2)	1.89	(2)	1.85	(2)	1.91	(2)
Leu	1.03	(1)	0.97	(1)	1.01	(1)	1.02	(1)
Tyr	1.01	(1)	0.92	(1)	0.94	(1)	1.00	(1)
Phe	2.05	(2)	2.04	(2)	1.98	(2)	2.06	(2)
Arg	3.08	(3)	2.83	(3)	2.83	(3)	3.00	(3)
(Cys) ₂	1.03	(1)						
(Sec) ₂							0.95	(1)
Cys-Sec			N.D.	(1)	N.D.	(1)		

表19 rANP(7-28) 及びそのセレン誘導体の FAB-mass

	Formula	FAB-mass m/z, (M+H) ⁺	
		Found	Calcd.
rANP(7-28)	C ₁₀₁ H ₁₅₅ N ₃₃ O ₃₀ S ₂	2376.6	2376.7
[Sec ⁷]-rANP(7-28)	C ₁₀₁ H ₁₅₅ N ₃₃ O ₃₀ SSe	2424.3	2423.6
[Sec(MBzl) ²³]-rANP(7-28)	C ₁₀₁ H ₁₅₅ N ₃₃ O ₃₀ SSe	2424.8	2423.6
[Sec ^{7,23}]-rANP(7-28)	C ₁₀₁ H ₁₅₅ N ₃₃ O ₃₀ Se ₂	2470.9	2470.5

(32) 培養 VSMC における ANP 誘導体のレセプター結合試験⁶⁵⁾

レセプター結合試験にはラット胸部大動脈由来の平滑筋細胞を explant 法によって培養した継代6から9代目の細胞を使用した。24 ウェルマルチウェルプレート上で confluent になった細胞 (約 4×10^5 個) を [¹²⁵I]- α -hANP (5×10^{-10} M) の存在下種々の濃度の rANP 誘導体 (5×10^{-11} — 5×10^{-7} M) と共に 20 mM HEPES, 0.1% ウシ血清アルブミンを含む Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; pH 7.4, 0.25 ml) 中、37 °C、45 分間インキュベートした。細胞を洗浄後、0.5 M NaOH で [¹²⁵I]- α -hANP を可溶化し、細胞に結合していた [¹²⁵I]- α -hANP の放射エネルギーを γ -カウンターで測定した。尚、 5×10^{-7} M の非標識 α -hANP 存在下での [¹²⁵I]- α -hANP の結合量を非特異的結合と見なした。

(33) 培養 VSMC における cGMP 産生量の測定⁶⁵⁾

上記同様に調製した培養 VSMC を種々の濃度の rANP 誘導体 (10^{-9} — 10^{-6} M) と共に 0.5 mM 1-methyl-3-isobutylxanthine, 20 mM HEPES, 0.1% BSA を含む DMEM (pH 7.4, 0.25 ml) 中、37 °C、15 分間インキュベートした。反応液を吸引除去し、6% 過塩素酸を加えることにより反応を停止した。超音波により細胞を破碎した後、cGMP をラジオイムノアッセイキット (ヤマサ醤油) を用いて定量した。

謝 辞

終わりに臨み、本研究の機会を賜り、またその遂行に当たり直接のご指導を賜りました恩師京都大学薬学部藤井信孝教授、矢島治明名誉教授（現新潟薬科大学学長）に心から感謝いたします。

また種々有益な御助言を賜りました京都大学薬学部船越奨助教授、大高章助手、玉村啓和助手に深く感謝します。

更に実験の一部に御協力いただきました伊藤ひろみ修士、安井裕之修士、黒田正孝修士、鈴木寛美学士、志手淳子学士に心からの謝意を表します。

本研究は中下広修士をはじめとする京都大学薬学部薬品製造学教室の諸氏の協力無しには成し遂げ得なかったものであり、ここに感謝致します。

また、本研究をまとめるに当たり有益な御助言を賜りました京都薬科大学赤路健一助教授に深く感謝いたします。

本研究に際し、終始心のこもった叱咤激励を頂きました京都大学薬学部井深俊郎助教授、米国 National Institutes of Health 野水基義博士をはじめとする諸先生、諸先輩、及び友人の方々に感謝の意を表します。

ANP 誘導体の生理活性の測定を行われたサントリー株式会社生物医薬研究所北島安雄博士、古谷真由美博士に感謝いたします。

Mass スペクトルの測定をしていただいた藤沢薬品工業株式会社田中洋和博士、重松伸治博士、塩野義製薬株式会社大川友之修士、ならびに元素分析を施行された京都大学元素分析センターの諸氏に感謝いたします。

最後に、著者に学問の道に進む自由を与え、また良き理解者でもあった、父庸夫、母都美、妻ゆかりに心から感謝いたします。

発表論文目録

本研究の主要部分は以下の雑誌に公表した。

- [1] A. Otaka, T. Koide, A. Side, and N. Fujii
APPLICATION OF DIMETHYLSULPHOXIDE(DMSO) / TRIFLUOROACETIC ACID(TFA) OXIDATION TO THE SYNTHESIS OF CYSTINE-CONTAINING PEPTIDE
Tetrahedron Lett., **32**, 1223 (1991).
- [2] T. Koide, A. Otaka, and N. Fujii
INVESTIGATION OF THE DIMETHYLSULFOXIDE - TRIFLUOROACETIC ACID OXIDATION SYSTEM FOR THE SYNTHESIS OF CYSTINE-CONTAINING PEPTIDES
Chem. Pharm. Bull., **41**, 1030 (1993).
- [3] T. Koide, A. Otaka, H. Suzuki, and N. Fujii
SELECTIVE CONVERSION OF S-PROTECTED CYSTEINE DERIVATIVES TO CYSTINE BY VARIOUS SULPHOXIDE - SILYL COMPOUND / TRIFLUOROACETIC ACID SYSTEMS
Synlett, **1991**, 345.
- [4] T. Koide, H. Itoh, A. Otaka, H. Yasui, M. Kuroda, N. Esaki, K. Soda, and N. Fujii
SYNTHETIC STUDY ON SELENOCYSTINE-CONTAINING PEPTIDES
Chem. Pharm. Bull., **41**, 502 (1993).
- [5] T. Koide, H. Itoh, A. Otaka, M. Furuya, Y. Kitajima, and N. Fujii
SYNTHESES AND BIOLOGICAL ACTIVITIES OF SELENIUM ANALOGS OF ALPHA - RAT ATRIAL NATRIURETIC PEPTIDE
Chem. Pharm. Bull., **41**, 1596 (1993).

引用文献

- 1) IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature, *Eur. J. Biochem.*, **138**, 9 (1984).
- 2) 総説として赤路, 「続医薬品の開発」14巻(広川書店), 1991, p. 233; 大高, 藤井, 有合化, **48**, 658 (1990).
- 3) V. du Vigneaud, C. Ressler, J.M. Swan, C.W. Roberts, P.G. Katsoyanis, *J. Am. Chem. Soc.*, **76**, 3115 (1954).
- 4) D.B. Hope, V.V.S. Murti, V. du Vigneaud, *J. Biol. Chem.*, **237**, 1563 (1962).
- 5) R.R. Hantgan, G.G. Hammes and H.A. Sheraga, *Biochemistry*, **13**, 3421 (1974); T.E. Creighton, *J. Mol. Biol.*, **113**, 329 (1977).
- 6) H. Yajima, K. Akaji, N. Fujii, K. Hayashi, K. Mizuta, M. Aono, and M. Moriga, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1984**, 1103; *idem*, *Chem. Pharm. Bull.*, **33**, 184 (1985); W.F. Heath and R.B. Merrifield, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 6367 (1986).
- 7) B. Kamber, *Helv. Chim. Acta*, **54**, 927 (1971).
- 8) D.F. Veber, D.J. Milkowski, S.L. Varga, D.G. Denkwalter, and R. Hirschmann, *J. Am. Chem. Soc.*, **94**, 5456 (1972).
- 9) G. Amiard, R. Heynes, and L. Velluz, *Bull. Soc. Chim. Fr.*, **1956**, 689.
- 10) H. Immer, I. Eberle, W. Fischer, and E Moser, "Peptides" ed. by G. Jung and E. Bayer, Walter de Gruyter, Berlin, New York, 1988, p. 94.
- 11) S. Kumagaye, H. Kuroda, K. Nakajima, T. Watanabe, T. Kimura, T. Masaki, and S. Sakakibara, *Int. J. Pept. Protein Res.*, **32**, 519 (1988); Y. Nishiuchi and S. Sakakibara, *FEBS Lett.*, **148**, 260 (1982).
- 12) B. Kamber, A. Hartmann, K. Eisler, B. Riniker, H. Rink, P. Sieber, and W. Rittel, *Helv. Chim. Acta*, **63**, 899 (1980).
- 13) P. Sieber, B. Kamber, B. Riniker, H. Rink, and W. Rittel, *ibid.*, **63**, 2358 (1980).
- 14) N. Fujii, A. Otaka, S. Funakoshi, K. Bessho, and T. Watanabe, K. Akaji, and H. Yajima, *Chem. Pharm. Bull.*, **35**, 2339 (1987).
- 15) N. Fujii, A. Otaka, T. Watanabe, H. Arai, K. Bessho, and H. Yajima, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1987**, 1676; N. Fujii, A. Otaka, S. Funakoshi, T. Watanabe, H. Arai, K. Bessho, and H. Yajima, *J. Protein Chem.*, **7**, 151 (1988).
- 16) T. Koide, A. Otaka, H. Arai, S. Funakoshi, N. Fujii, and H. Yajima, "Peptide Chemistry" ed. by N. Yanaihara, Protein Research Foundation, Osaka, 1989, p. 171.
- 17) T.J. Wallace, *J. Am. Chem. Soc.*, **86**, 2018 (1963).
- 18) T.J. Wallace and J.J. Mahon, *ibid.*, **86**, 4099 (1964).
- 19) *idem*, *J. Org. Chem.*, **30**, 1052 (1965).
- 20) J. Press, *Helv. Chim. Acta*, **59**, 499 (1976).
- 21) S. Akabori, S. Sakakibara, Y. Shimonishi, and Y. Nobuhara, *Bull. Chem. Soc., Jpn.*, **37**, 433 (1964).
- 22) L. Zervas, I. Photaki, A. Cosmatos, and D. Borovas, *J. Am. Chem. Soc.*, **87**, 4922 (1965).
- 23) O. Nishimura, C. Kitada, and M. Fujino, *Chem. Pharm. Bull.*, **26**, 1576 (1978).
- 24) B.W. Erickson, and R.B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.*, **95**, 3570 (1973).
- 25) N. Fujii, T. Watanabe, A. Otaka, K. Bessho, I. Yamamoto, T. Noda, and H. Yajima, *Chem. Pharm. Bull.*, **35**, 4769 (1987).
- 26) F. Albericio, N. Kneib-Cordonier, S. Biancalana, L. Gera, R.I. Masada, D. Hudson, G. Barany, *J. Org. Chem.*, **55**, 3730 (1990).
- 27) A. Dryland and R.C. Sheppard, *J. Chem. Soc., Perkin Trans 1*, **1986**, 125; L. Cameron, M. Medal, and R.C. Sheppard, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1987**, 270.
- 28) N. Fujii, A. Otaka, N. Sugiyama, M. Hatano, and H. Yajima, *Chem. Pharm. Bull.*, **35**, 3880 (1987).
- 29) N. Fujii, A. Otaka, S. Funakoshi, M. Nomizu, K. Akaji, H. Yajima, I. Yamamoto, K. Torizuka, K. Kitagawa, T. Akita, K. Ando, T. Kawamoto, Y. Shimonishi, and T. Takao, *ibid.*, **34**, 620 (1986).
- 30) N. Fujii, A. Otaka, O. Ikemura, K. Akaji, S. Funakoshi, Y. Hayashi, Y. Kuroda, and H. Yajima, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1987**, 274.
- 31) C.B. Anfinsen, *Science*, **181**, 223 (1973).
- 32) J.P. Tam, C.R. Wu, W. Liu, and J.W. Zang, *J. Am. Chem. Soc.*, **113**, 6657 (1991).
- 33) J.J. Pastuszak and A. Chimiak, *J. Org. Chem.*, **46**, 1868 (1981).
- 34) T. Numata, H. Togo, S. Oae, *Chem. Lett.*, **1979**, 329.
- 35) F.L. Wood and V. du Vigneaud, *J. Biol. Chem.*, **130**, 109 (1939).
- 36) K. Akaji, T. Tatsumi, M. Yoshida, T. Kimura, Y. Fijiwara, and Y. Kiso, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1991**, 167; *idem*, *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 4137 (1992).

- 37) N. Fujii, A. Otaka, T. Watanabe, A. Okamachi, H. Tamamura, H. Yajima, Y. Inagaki, M. Nomizu, and K. Asano, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1989**, 283.
- 38) L. Zervas and I. Photaki, *J. Am. Chem. Soc.*, **84**, 3887 (1962).
- 39) T. C. Stadtman, *Annu. Rev. Biochem.*, **49**, 93 (1980).
- 40) B. Nygård, *Aktiv for Kemi.*, **27**, 341 (1967).
- 41) R.J.P. Williams, "New Trends in Bioinorganic Chemistry," ed. by R.J.P. Williams and J.R.R.F. da Silva, Academic Press, New York, 1978, p. 253.
- 42) D. Theodoropoulos, I.L. Shuwartz, and R. Walter, *Biochemistry*, **6**, 3927 (1967).
- 43) R. Walter and W.Y. Chan, *J. Am. Chem. Soc.*, **89**, 3892 (1967).
- 44) B. Hartrodt, K. Neubert, B. Bierwolf, W. Blech, and H.D. Jakubke, *Tetrahedron Lett.*, **21**, 2393 (1980).
- 45) T. Oikawa, N. Esaki, H. Tanaka, and K. Soda, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 3057 (1991).
- 46) P. Chocat, N. Esaki, H. Tanaka, and K. Soda, *Anal. Biochem.*, **148**, 485 (1985).
- 47) S.S. Wang, *J. Am. Chem. Soc.*, **95**, 1328 (1973).
- 48) H.F. Gilbert, "Advances in Enzymology," Vol 63, ed. by A. Meister, Interscience Publishers, Inc., New York, 1990, p. 69.
- 49) T.C. Stadtman, *J. Biol. Chem.*, **266**, 16257 (1991).
- 50) G.M. Whitesides, J.E. Lilburn, and R.P. Szajewski, *J. Org. Chem.*, **42**, 332 (1977); R.P. Szajewski and G.M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.*, **102**, 2011, (1980); J.C. Pleasants, W. Guo, and D.L. Rabenstein, *ibid.*, **111**, 6553 (1989); R. Singh, and G.M. Whitesides, *ibid.*, **112**, 1190 (1990); *idem*, *J. Org. Chem.*, **56**, 6931 (1991); D.A. Keire, E. Strauss, W. Guo, B. Nozal, and D.L. Rabenstein, *ibid.*, **57**, 123 (1992).
- 51) K. Yamaoka and T. Nakagawa, *J. Pharmacobio-Dyn.*, **6**, 595 (1983).
- 52) D.A. Johnson, "Sulfur in Organic and Inorganic Chemistry," ed. by A. Senning, Marcel Dekker, New York, 1972, p. 37.
- 53) C.J.M. Stirling, *Acc. Chem. Res.*, **12**, 198 (1979).
- 54) T.G. Flynn, M.L. de Bold, and A.J. de Bold, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **117**, 859 (1983).
- 55) K. Kangawa and H. Matsuo, *ibid.*, **118**, 131 (1984).
- 56) 総説として A. Rosenzweig and C.E. Seidman, *Annu. Rev. Biochem.*, **60**, 229 (1991).
- 57) T. Sudoh, K. Kangawa, N. Minamino, and H. Matsuo, *Nature*, **332**, 78 (1988).
- 58) T. Sudoh, N. Minamino, K. Kangawa, and H. Matsuo, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **168**, 863 (1990).
- 59) G. Thibault, R. Garcia, F. Carrier, N.G. Seidah, C. Lazure, M. Chrétien, M. Cantin, and J. Genest, *ibid.*, **125**, 938 (1984).
- 60) Y. Hirata, M. Tomita, S. Takada, and H. Yoshimi, *ibid.*, **128**, 538 (1985); Y. Kitajima, Y. Minamitake, M. Furuya, M. Takehisa, T. Katayama, and S. Tanaka, *ibid.*, **164**, 1295 (1989).
- 61) P.W. Schiller, L.A. Maziak, T.M.D. Nguyen, J. Godin, R. Garcia, A. Deléan and M. Cantin, *ibid.*, **143**, 499 (1987).
- 62) N. Chino, Y. Nishiuchi, Y. Noda, T.X. Watanabe, T. Kimura, and S. Sakakibara, "Peptides," ed. by C.M. Deber, V. Hruby, and K.D. Kopple, Pierce Chemical Company, Rockford, Illinois, 1985, p. 945.
- 63) T. Yamanaka, S. Hase, S. Sakakibara, I.L. Schwartz, B.M. Dubois, and R. Walter, *Mol. Pharmacol.*, **6**, 474 (1970).
- 64) T. Morikawa, E. Munekata, S. Sakakibara, T. Noda, and M. Otani, *Experientia*, **32**, 1104 (1976).
- 65) Y. Minamitake, M. Furuya, Y. Kitajima, M. Takehisa, and S. Tanaka, *Chem. Pharm. Bull.*, **38**, 1920 (1990).
- 66) M. Fujino, M. Wakimasu, and C. Kitada, *ibid.*, **29**, 2825 (1981).
- 67) R. Ramage and J. Green, *Tetrahedron Lett.*, **28**, 2287 (1987).
- 68) E. Kaiser, R.L. Colescott, C.D. Bossinger, and P.I. Cook, *Anal. Biochem.*, **34**, 595 (1970).
- 69) S. Funakoshi, E. Murayama, L. Guo, N. Fujii, and H. Yajima, *Coll. Czech. Chem. Commun.*, **53**, 2791 (1988).