

|     |
|-----|
| 新 劑 |
| 藥   |
| 116 |
|     |

京大附図

# マウス上皮細胞増殖因子の合成研究

1984年

赤 路 健 一

# マウス上皮細胞増殖因子の合成研究

1984年

赤路健一

# 目 次

## < 理論の部 >

|  |    |
|--|----|
| 緒 言 .....  | 1  |
| 第 1 章 S-保護システインスルホキシドの酸による脱保護時の挙動 ..   | 4  |
| 第 1 節 S-p-Methoxybenzylcysteine sulfoxide [Cys (MBzl)(O)]<br>の挙動 .....                   | 4  |
| 第 2 節 S-Acetamidomethylcysteine sulfoxide [Cys (Acm)(O)]<br>の挙動 .....                    | 10 |
| 第 2 章 マウス上皮細胞増殖因子 (EGF) の全合成 .....   | 13 |
| 第 1 節 マウス EGF に関する従来の研究概要 .....  | 13 |
| 第 1 項 分離・精製 .....  | 13 |
| 第 2 項 構 造 .....  | 14 |
| 第 3 項 作 用 等 .....  | 15 |
| 第 4 項 合 成 .....  | 15 |
| 第 2 節 マウス EGF の 30-53 位, 保護テトラコサペプチドエ<br>ステル, Boc-(EGF 30-53)-OBzl の合成 .....             | 16 |
| 第 1 項 合成方針 .....   | 16 |
| 第 2 項 マウス EGF の 51-53 位, 保護トリペプチドエ<br>テル, Z(OMe)-(EGF 51-53)-OBzl の合成 .....              | 17 |
| 第 3 項 マウス EGF の 49-50 位, 保護ジペプチド, Boc-<br>(EGF 49-50)-OH の合成 .....                       | 18 |
| 第 4 項 マウス EGF の 46-48 位, 保護トリペプチドヒド<br>ラジド, Boc-(EGF 46-48)-NHNH <sub>2</sub> の合成 .....  | 19 |
| 第 5 項 マウス EGF の 42-45 位, 保護テトラペプチドヒ<br>ドラジド, Boc-(EGF 42-45)-NHNH <sub>2</sub> の合成 ..... | 19 |
| 第 6 項 マウス EGF の 39-41 位, 保護トリペプチドヒド<br>ラジド, Boc-(EGF 39-41)-NHNH <sub>2</sub> の合成 .....  | 20 |
| 第 7 項 マウス EGF の 37-38 位, 保護ジペプチドヒドラ<br>ジド, Boc-(EGF 37-38)-NHNH <sub>2</sub> の合成 .....   | 21 |
| 第 8 項 マウス EGF の 34-36 位, 保護トリペプチドヒド<br>ラジド, Boc-(EGF 34-36)-NHNH <sub>2</sub> の合成 .....  | 21 |

|        |  |    |
|--------|--|----|
| 第 9 項  | マウス EGF の 30-33 位, 保護テトラペプチドヒ<br>ドラジド, Boc-(EGF 30-33)-NHNH <sub>2</sub> の合成 | 22 |
| 第 10 項 | マウス EGF の 30-53 位, 保護テトラコサペプチ<br>ドエステル, Boc-(EGF 30-53)-OBzl の合成             | 23 |
| 第 3 節  | マウス EGF の全合成   | 25 |
| 第 1 項  | マウス EGF の 26-29 位, 保護テトラペプチドヒ<br>ドラジド, Boc-(EGF 26-29)-NHNH <sub>2</sub> の合成 | 25 |
| 第 2 項  | マウス EGF の 23-25 位, 保護トリペプチドヒド<br>ラジド, Boc-(EGF 23-25)-NHNH <sub>2</sub> の合成  | 26 |
| 第 3 項  | マウス EGF の 18-21 位, 保護テトラペプチドヒ<br>ドラジド, Boc-(EGF 18-21)-NHNH <sub>2</sub> の合成 | 28 |
| 第 4 項  | マウス EGF の 14-17 位, 保護テトラペプチドヒ<br>ドラジド, Boc-(EGF 14-17)-NHNH <sub>2</sub> の合成 | 29 |
| 第 5 項  | マウス EGF の 10-13 位, 保護テトラペプチドヒ<br>ドラジド, Boc-(EGF 10-13)-NHNH <sub>2</sub> の合成 | 29 |
| 第 6 項  | マウス EGF の 6-9 位, 保護テトラペプチドヒド<br>ラジド, Boc-(EGF 6-9)-NHNH <sub>2</sub> の合成     | 30 |
| 第 7 項  | マウス EGF の 1-5 位, 保護ペンタペプチドヒド<br>ラジド, Boc-(EGF 1-5)-NHNH <sub>2</sub> の合成     | 31 |
| 第 8 項  | 保護マウス EGF の合成  | 32 |
| 第 9 項  | マウス EGF の全合成   | 35 |
| 第 10 項 | 合成品の生物活性   | 41 |
| 結 語    |  | 43 |
| 謝 辞    |  | 44 |

### ＜ 実 験 の 部 ＞

|             |    |
|-------------|----|
| 第 1 章に関する実験 | 48 |
| 第 1 節に関する実験 | 48 |
| 第 2 節に関する実験 | 54 |
| 第 2 章に関する実験 | 58 |

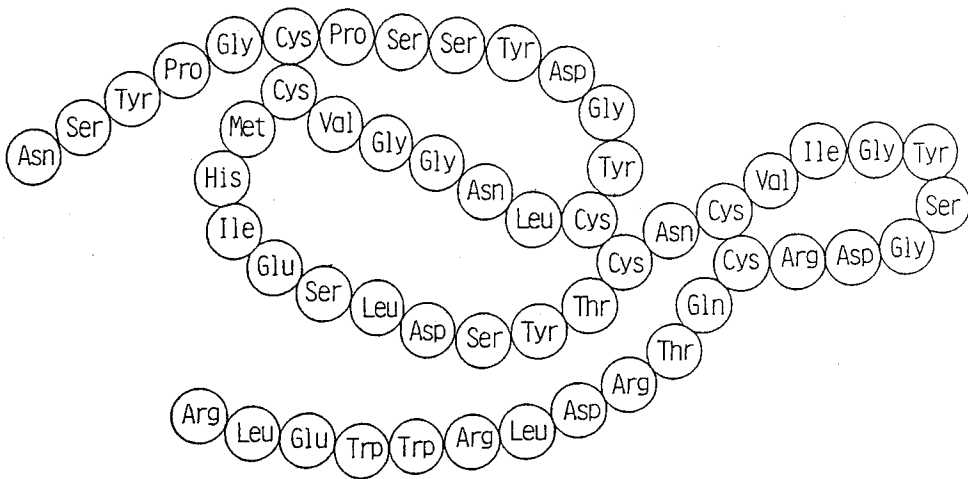
|                   |    |
|-------------------|----|
| 第 2 節に関する実験 ..... | 58 |
| 第 3 節に関する実験 ..... | 70 |
| 引用文献 .....        | 90 |

# 理論の部

## 緒 言

上皮細胞増殖因子 (EGF) は, 1962年 Cohenら<sup>1)</sup> によって雄マウス顎下腺中の神経成長促進因子の分離研究中に発見された因子である。1972年 Cohenらは, 酵素消化, Edman分解により EGF の一次構造を決定し,<sup>2)</sup> ついで1973年, サーマリシン分解によってジスルフィド結合の位置を最終的に決定した<sup>3)</sup> (Fig. 1)。

Fig. 1. Structure of Epidermal Growth Factor



本品は53個のアミノ酸残基より成り, 分子中に3個のジスルフィド結合を有するポリペプチドである。一方1975年, Gregoryら<sup>4)</sup>は, 人尿より胃酸分泌抑制物質として分離した urogastrone の構造を解明し, 本品とEGFとの構造上の類似性を指摘するとともに, EGFにも胃酸分泌抑制作用のあること<sup>5)</sup>を報告した。さらに1983年, Grayら<sup>6)</sup>, Scottら<sup>7)</sup>は, それぞれ独立にEGF前駆体cDNAの塩基配列を解明し, 遺伝子学的にCohen式を支持した。

著者は, EGFが構造の確立した興味ある生物活性を有する分子であることに注目し, ジスルフィド還元体の空気酸化によって活性が再現するというCohenらの知見を参考にしつつ, ここに本品の全合成を計画した。

現在までのところ, EGFの合成に関する報告は見あたらない。関連する合成研究として, Cambleら<sup>8)</sup>のurogastroneの合成があるが未完成である。

著者は, EGFの全合成に先立って, 従来知られていなかったS-保護システ

インスルホキシド誘導体の酸による脱保護時における化学的性質を明らかにし、続いてこの基礎研究をもとに、天然EGFと同一の挙動を示し、強力な胃酸分泌抑制作用を示す合成品を得ることに成功した。

(注) 本論文に用いるアミノ酸・ペプチドとその誘導体はL体である。使用した略号はIUPAC-IUBの生化学命名委員会勧告に従った<sup>9)</sup>

1) アミノ酸の略号 (L記号は全て省略した)

|                     |                     |                  |
|---------------------|---------------------|------------------|
| Ala : alanine       | Arg : arginine      | Asn : asparagine |
| Asp : aspartic acid | Cys : cysteine      | Gln : glutamine  |
| Glu : glutamic acid | Gly : glycine       | His : histidine  |
| Ile : isoleucine    | Leu : leucine       | Lys : lysine     |
| Met : methionine    | Phe : phenylalanine | Pro : proline    |
| Ser : serine        | Thr : threonine     | Trp : tryptophan |
| Tyr : tyrosine      | Val : valine        |                  |

2) アミノ保護基の略号

|        |                              |
|--------|------------------------------|
| Z      | : benzyloxycarbonyl          |
| Z(OMe) | : p-methoxybenzyloxycarbonyl |
| Boc    | : t-butoxycarbonyl           |

3) カルボキシル基の保護基の略号

|                   |  |                    |                |
|-------------------|--|--------------------|----------------|
| -OBzl             | : benzyl ester   | -OMe               | : methyl ester |
| -OBu <sup>t</sup> | : t-butyl ester  | -NHNH <sub>2</sub> | : hydrazide    |
| Troc-NHNH-        | : $\beta, \beta, \beta$ -trichloroethyloxycarbonyl hydrazide |                    |                |

4) 活性エステルの略号

|      |                              |
|------|------------------------------|
| -ONp | : p-nitrophenyl ester        |
| -OSu | : N-hydroxysuccinimide ester |

5) 縮合剤および関連試薬の略号

|      |                            |
|------|----------------------------|
| DCC  | : dicyclohexylcarbodiimide |
| HOBT | : N-hydroxybenztriazole    |

6) アミノ酸誘導体の略号

|                          |   |
|--------------------------|---|
| -Arg(Mts)-               | : N <sup>6</sup> -mesitylene-2-sulfonyl arginine deriv. |
| -Asp(OBzl)-              | : $\beta$ -benzylaspartate deriv.                       |
| -Asp(OBu <sup>t</sup> )- | : $\beta$ -t-butylaspartate deriv.                      |



- Cys (Bzl)- : S-benzylcysteine deriv.
- Cys (MBzl)- : S-p-methoxybenzylcysteine deriv.
- Cys (Acm)- : S-acetamidomethylcysteine deriv.
- Glu (OBzl)- :  $\gamma$ -benzylglutamate deriv.
- Met (O)- : methionine sulfoxide deriv.
- Ser (Bzl)- : O-benzyl serine deriv.
- Ser (Bu<sup>t</sup>)- : O-t-butyl serine deriv.

7) 脱保護試薬の略号

TFA : trifluoroacetic acid

TFMSA : trifluoromethanesulfonic acid

MSA : methanesulfonic acid

HF : hydrogen fluoride

8) 溶媒, その他の略号

DMF : dimethylformamide

DMSO : dimethylsulfoxide

AcOEt : ethyl acetate

MeOH : methanol

AcOH : acetic acid

n-BuOH : n-butanol

EtOH : ethanol

THF : tetrahydrofuran

IAN : isoamylnitrite

EDT : ethanedithiol

Et<sub>3</sub>N : triethylamine

DCHA : dicyclohexylamine

CHA : cyclohexylamine

NMM : N-methylmorpholine

HMPA : hexamethylphosphoric triamide

EDTA : ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt

# 第1章 S-保護システインスルホキシドの 酸による脱保護時の挙動

## 第1節 S-p-Methoxybenzylcysteine sulfoxide [Cys(MBzl)(O)]の挙動

通常ペプチドあるいは蛋白質の酸加水分解には6規定塩酸が用いられる<sup>10)</sup>が、チロシン含有保護ペプチドをアミノ酸分析する場合、この回収率をよくするために、6規定塩酸で酸分解する際フェノールを添加する方法<sup>11)</sup>が用いられる。これは生成するアルキルカチオンをフェノールでtrapし、Tyrに導入されるのを抑制するためである。同条件でCys(MBzl)含有ペプチドを酸分解すると、時によってシステインの回収率の低下とともに、アミノ酸分析計ショートコラム上に未知のピークが出現することを認めた(Fig. 2)。Cys(MBzl)自体は同条件下で酸分解してもこの様な挙動を示さないことから、著者は上記の現象が、合成途

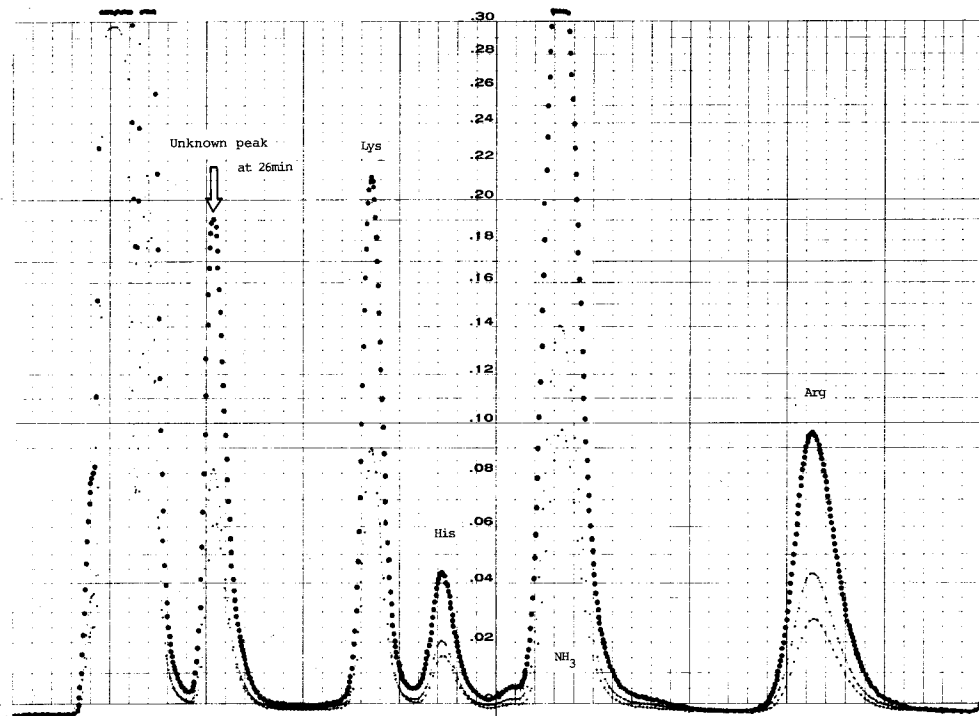


Fig.2.

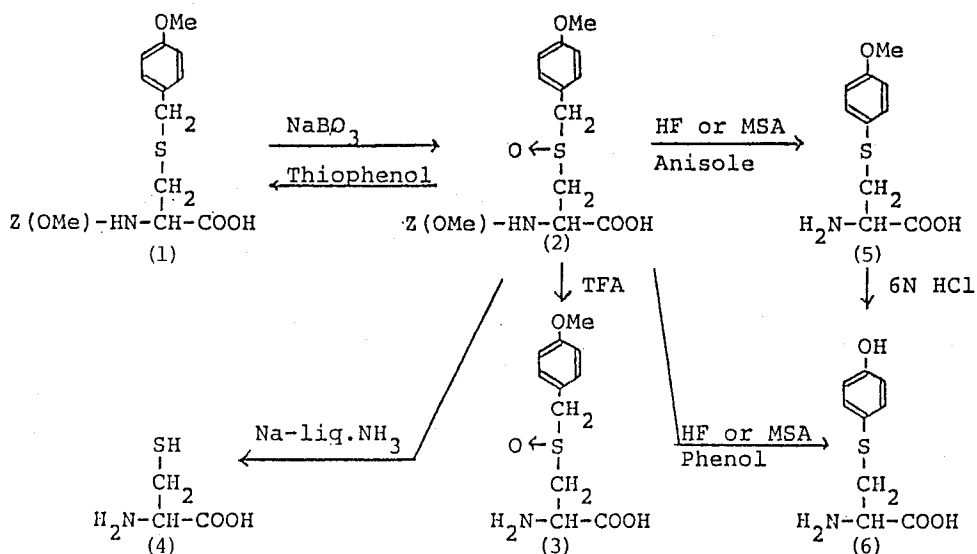
An unknown peak in acid hydrolysate of cysteine-peptides  
(6N HCl-phenol)

上に一部生成する可能性のあるスルホキシド体〔Cys(MBzl)(O)〕に由来するのではないかと考えた。従来、Metは合成途上空気酸化されてスルホキシドを形成しやすいことが知られているが、S-保護システインスルホキシド体の生成に関しては、ほとんど研究がなされておらず、わずかに1977年Liveら<sup>12)</sup>がoxytocinの固相合成の際に、S-methylbenzylcysteine sulfoxideの還元を行なった事を簡単に記載しているのみである。

そこで、著者はEGFの全合成に先立って、S-保護システインスルホキシド体の挙動、特に酸による最終脱保護時の挙動を明らかにする必要があると判断し、まずCys(MBzl)(O)の挙動について検討を加えた。MBzl基<sup>13)</sup>はシステインのSH基の保護基として最も汎用されているものであり、本基はペプチド合成の最終脱保護試薬であるHF<sup>14)</sup>、MSA<sup>15,17)</sup>、TFMSA<sup>16)</sup>で定量的に除去される。

Z(OMe)-Cys(MBzl)-OH<sup>18)</sup>(1)を過ホウ酸ソーダで酸化すると対応するスルホキシド体、Z(OMe)-Cys(MBzl)(O)-OH(2)が定量的に得られる。つぎに、(2)をTFA処理すると、H-Cys(MBzl)(O)-OH(3)が得られる(Fig.3)。このスルホキシド体は、N-保護メチオニンの同試薬による酸化が、2種のジアステレオマーの混合物を与えること<sup>19)</sup>から、同様に2種のジアステレオマーの混合物であると思われる。ここに得られたスルホキシド体(2)を、液体アンモニア中金属ナトリウム<sup>23)</sup>で還元するとシステイン(4)を与えることがわかった

Fig. 3. Chemical Behaviour of Z(OMe)-Cys(MBzl)(O)-OH



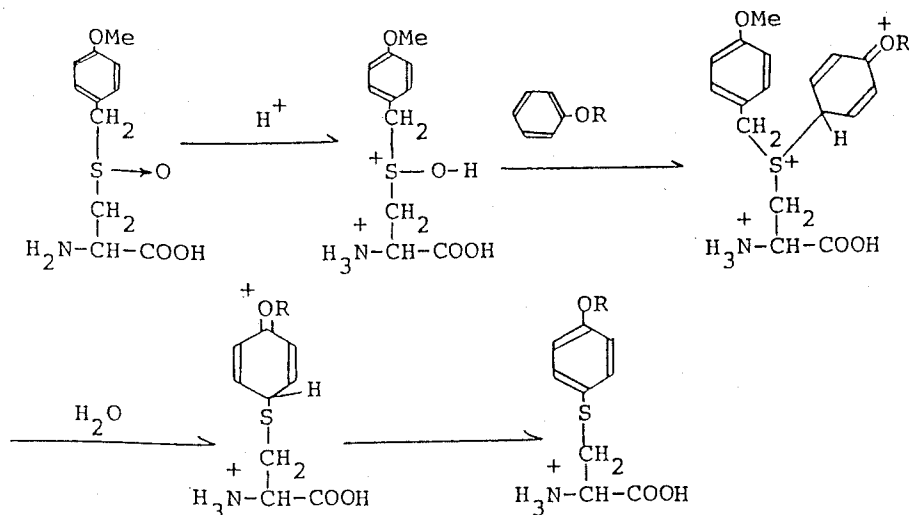
が、酸脱保護条件の一つであるアニソール（カチオンスカベンジャー）存在下 HF<sup>14)</sup> 処理（0°C, 45 分）に付すと、システインの回収は低く、水に難溶の粉末が主生成物として得られた。この粉末は TLC 上 2 種の混合物であったが、主成分を単離し、その構造を 60 MHz <sup>1</sup>H-NMR で調べたところ、methoxy 基に由来する singlet ピークは認められたが、benzyl 位の methylene のピークは認められなかった。この事から本品の構造を S-p-methoxyphenylcysteine (5) と同定した。またスルホキンド体 (2) を MSA-アニソール系<sup>15)</sup> で処理（室温, 60 分）しても主生成物は同一の化合物 (5) であることがわかった。さらにカチオンスカベンジャーとして、アニソールに変えてフェノールを用いて HF あるいは MSA 処理すると、主生成物は S-p-hydroxyphenylcysteine (6) になることがわかった。すなわち、用いたスカベンジャーの p 位にシステインの S が結合した化合物が得られることがわかった。

このスルホキンド体 (2) からの S-p-methoxyphenylcysteine (5), あるいは S-p-hydroxyphenylcysteine (6) の生成機構は次のようなものであると考えられる (Fig. 4.)。

すなわち、スルホキンドのプロトン化によりアニソールあるいはフェノールの p 位が、イオン原子を求核的に攻撃し、続く加水分解によって S 置換反応が

Fig. 4.

Mechanism of the Formation of Compounds (5) and (6)  
from H-Cys(MBzl)(O)-OH



進行すると考えられる。スルホキシドのプロトン化によって始まるS置換反応は、Blackwoodら<sup>20)</sup> Goethals & Radziyky<sup>21)</sup>によってそれぞれ、tetracycline thiocompound, および dimethylsulfoxide について報告されているので、著者の上記システインスルホキシドの挙動についての考察は妥当なものと判断される。

ここで得られた化合物(5)は、アミノ酸分析計のショートカラム上38分に溶出されるが、これを6規定塩酸で加水分解するとp-methoxy基が切断されて(6)になり、26分に溶出される。ここに上記したCys(MBzl)含有ペプチドをフェノール存在下6規定塩酸で加水分解した時に生ずる26分のピークは、そのスルホキシド体の生成によって生ずる(6)であることが明らかとなった。換言すれば、保護基のついたCys(MBzl)含有ペプチドをフェノールの存在下6規定塩酸で加水分解した際、あるいは、アニソール存在下HFあるいはMSAによって処理したペプチドを、6規定塩酸で加水分解した際、ショートカラム26分に溶出される化合物(6)が検出されるか否かが、それぞれもとのペプチド中におけるシステインスルホキシド体の存在の有無を示す有効な指標となる(Fig.2.)。ただこの場合、システインが酸化されてシスチンになったとすると、このシスチンはフェノール存在下6規定塩酸加水分解で5.8%程度(6)を与えることを考慮する必要がある。

続いてCys(Bzl)(O)の挙動についても同様の手法で検討を加えた。Bzl基は、du Vigneaud<sup>22)</sup>によって1930年にペプチド合成に導入されたシステインのSH保護基であるが、本基の除去は主に液体アンモニア中金属ナトリウム法<sup>23)</sup>によって行なわれている。HFによる高級ペプチドからの脱ベンジル化は定量的ではない。

Cys(MBzl)(O)の場合と同様に過ホウ酸ソーダで調整したH-Cys(Bzl)(O)-OHは、アニソール存在下、HFあるいはMSA処理に安定であった。このCys(MBzl)(O)とCys(Bzl)(O)の挙動の差異は、p位の電子供与性置換基、p-methoxy基、の存在の有無によるベンジルカチオンの安定性の差異に由来するものと思われる。

以上の事から、もし合成途上一部Cys(MBzl)(O)、あるいはCys(Bzl)(O)体が生成すれば、これを酸による最終脱保護反応以前に還元しなければ、システインの十分な回収率が望めないことがわかった。そこで数種の還元剤につい

てシステインスルホキンド体の還元能力について検討を加えた。

従来、メチオニンスルホキンドの還元剤として数多くのSH化合物が知られており、<sup>24)</sup>これらはシステインスルホキンドの還元にも使用できるものと思われる。ただ、システインスルホキンドの還元は、上記のように最終脱保護反応以前の保護基のついた状態、従って有機溶媒中で行なう必要があり、水性溶媒中におけるメチオニンスルホキンド体の還元とは、若干の差異が予想される。還元剤として mercaptoethanol, thioglycolic acid, dithiothreitol, ethanedithiol, thiophenol, の5種を選び、各還元剤10当量を用い、70°CでZ(OMe)-Cys(Bzl)(O)-OH, Z(OMe)-Cys(MBzl)(O)-OH, Z(OMe)-Met(O)-OHをDMF中でincubateした。比較のため、H-Met(O)-OHを水溶液中でincubateした所、この還元には有効であった mercaptoethanol, thioglycolic acid, dithiothreitol はシステインスルホキンドを、36時間後で20~40%しか還元せず、むしろこの還元には thiophenol が最も有効であることがわかった (Table. 1.)。Thiophenol を用いると上記の条件下、36時間でほぼ定量的に還元が進行した。さらに thiophenol の当量数を20当量に、反応温度を85°Cにすると6時間以内に還元反応が完全に進行することがわかった。

Table 1. Reduction of Protected Cysteine and Methionine Sulfoxides  
with Thiol Compounds.

| Reagents          | Reduction of<br>(%) |      |      | Z(OMe)-Cys(Bzl)(O)-OH |      |      | Z(OMe)-Cys(MBzl)(O)-OH |      |      | Z(OMe)-Met(O)-OH |      |      | H-Met(O)-OH |      |      |     |     |
|-------------------|---------------------|------|------|-----------------------|------|------|------------------------|------|------|------------------|------|------|-------------|------|------|-----|-----|
|                   | 8 h                 | 24 h | 36 h | 8 h                   | 24 h | 36 h | 8 h                    | 24 h | 36 h | 8 h              | 24 h | 36 h | 8 h         | 24 h | 36 h | 4 h | 8 h |
| Mercaptoethanol   | 8.1                 | 19.5 | 34.6 | 15.7                  | 25.9 | 42.0 | 22.0                   | 31.5 | 42.0 | 22.0             | 31.5 | 42.0 | 72.2        | 98.7 |      |     |     |
| Thioglycolic acid | 7.5                 | 16.4 | 19.9 | 11.8                  | 12.6 | 31.5 | 31.4                   | 60.2 | 100  | 31.4             | 60.2 | 100  | 100         |      |      |     |     |
| Dithiothreitol    | 5.6                 | 16.9 | 23.4 | 13.3                  | 20.2 | 39.6 | 20.4                   | 35.0 | 94.0 | 20.4             | 35.0 | 94.0 | 100         |      |      |     |     |
| Ethanedithiol     | 33.2                | 52.5 | 56.3 | 36.7                  | 55.7 | 67.1 | 25.0                   | 31.0 | 45.6 | 25.0             | 31.0 | 45.6 | 46.7        |      |      |     |     |
| Thiophenol        | 38.6                | 82.0 | 98.1 | 32.0                  | 85.8 | 100  | 67.0                   | 92.0 | 37.9 | 67.0             | 92.0 | 37.9 | 41.5        |      |      |     |     |

Reduction was performed at 70°

以上著者は、Cys(MBzl)あるいはCys(Bzl)を用いるシステイン含有ペプチドの合成、特に合成途上スルホキンド体を生成する可能性の高い長鎖ペプチドの合成に際して、6規定塩酸-フェノール系による酸加水分解後のアミノ酸分析により、システインスルホキンド体の有無を確認できる有効な手段を見出した。さらにシステインスルホキンド体の存在が認められた場合、これを最終脱保護反応以前に還元する必要があること、この還元にはthiophenolが最も有効であることを見出した。著者は、EGFの全合成に際してCys(MBzl)を用い、これを他の保護基と同時に1M TFMSA-thioanisole/TFA系で除去したのであるが、この脱保護系は、MSA脱保護法を改良したものであり、Cys(MBzl)(O)に対する挙動に関する限りMSAと同様と考えられる。従ってこれらの知見は、本論文のEGFの全合成に資するところ大であったと考えている。

## 第2節 S-Acetamidomethylcysteine sulfoxide [Cys(Acm)(O)]の挙動

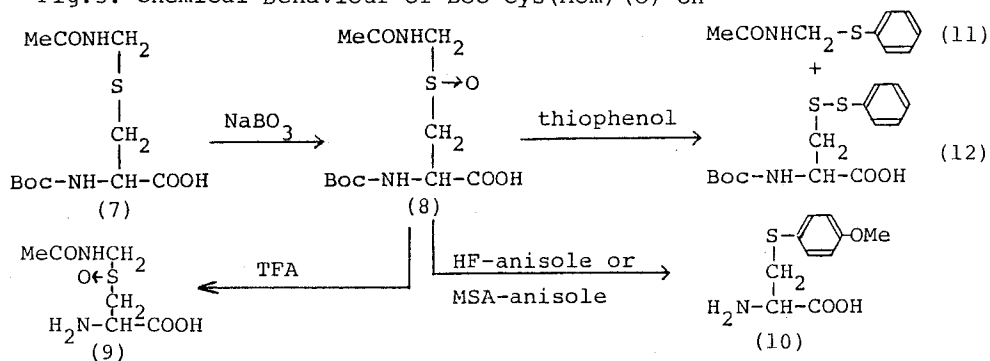
Acetamidomethyl基(Acm基)は、Veberら<sup>25)</sup>によって開発されたシステインチオール基の保護基であり、第1節で述べたMBzl基、Bzl基とともにペプチド合成上有用な保護基である。Acm基は、MBzl基あるいはBzl基の脱保護条件である液体アンモニア中金属ナトリウム、HF、あるいはMSA処理に安定で、ヨード<sup>26)</sup>あるいは酢酸水銀処理<sup>25)</sup>により特異的に除去される。本基はKennerら<sup>27)</sup>によるリゾチーム類縁体の合成、Sieberら<sup>28)</sup>による選択的ジスルフィド形成反応を用いるインシュリンの合成等に利用されたが、特にKennerらは、リゾチーム類縁体の合成において、最終段階におけるAcm基の除去が完全に進行せず、チオールの含量の低いことを述べており、彼らの合成は未だ未完成である。

著者は、Cys(Acm)誘導体を用いるペプチド合成においても、第1節で述べた様な合成途上でのシステインスルホキンド体の一部生成の可能性があるものと考え、Cys(Acm)(O)の化学的挙動についても検討を加えた。

Boc-Cys(Acm)-OH<sup>25)</sup>(7)を過ホウ酸ソーダで処理すると、TLC上定量的にBoc-Cys(Acm)(O)-OH(8)が生成するが、本品の水に対する溶解性が高いため、単離収率は42%にとどまった。このスルホキンド体(8)も、メチオニンスルホキンド体<sup>19)</sup>と同様スルホキンドについての2種のジアステレオマーの混合物であると思われる。スルホキンド体(8)をTFAで処理するとH-Cys(Acm)



Fig.5. Chemical Behaviour of Boc-Cys(Acm)(O)-OH



(O)-OH(9) が得られた (Fig.5.)。

得られた化合物(9)について、まず Acm 基の除去条件下における挙動について検討を加えた。化合物(9)を Veber ら<sup>25)</sup>の方法による酢酸水銀処理、あるいは Kamber<sup>26)</sup>の方法によるヨード処理に付すと、TLC 上変化が認められず、アミノ酸分析計においてもシステインあるいはシスチンの回収が認められなかった。すなわち、もし Cys(Acm) 体が合成途上一部酸化をうけ対応するスルホキシド体を与えると、このスルホキシド体は通常の Acm 基の除去条件でシステインを生成しないことがわかった。

次に、S-MBzl 基の除去条件である HF、あるいは MSA 処理条件下における Boc-Cys(Acm)(O)-OH(8) の挙動について検討を加えた。スルホキシド体(8)を、アニソール存在下 HF で処理(0°C, 60 分)すると、TLC 上スルホキシド体(8)のスポットはほとんど消失し、N<sup>α</sup> 脱保護体(9)に相当するスポットの他に 2 つのスポットが認められた。このうち主生成物は、アミノ酸分析計での溶出時間、60 MHz <sup>1</sup>H-NMR の結果から、第 1 節で述べた Cys(MBzl)(O) 体の同一条件下での処理から得られた S-p-methoxyphenylcysteine(10) であることがわかった。マイナー成分については単離することができなかった。このことから、もし Acm 基を用いたペプチド合成途上、一部酸化が occur 対応するスルホキシド体が生成すれば、普通ならば安全であるべき HF-アニソール処理によって他の保護基を切断した際、同時に大部分が化合物(10)に変換されてしまうことがわかった。

さらにスルホキシド体(8)をアニソール存在下 MSA 処理(20°C, 80 分)に付すと、TLC 上 3 つの生成物が認められた。このうちマイナー生成物については同定することができなかったが、他の 2 つの生成物は、アミノ酸分析計で

の溶出位置から p-methoxyphenylcysteine (10), およびシスチンであることがわかった。このことから, 他の保護基を除去しようとして Cys (Acm)を含むペプチドを MSA 処理に付すと, もし酸化体が生成していれば, 先の HF 処理の場合と同様, Acm 基を安定に保つことができず, 不完全なシスチンの生成(約 48%) 以外に化合物(10)等の他の化合物に変換されてしまうことがわかった。

これらの事より Acm 基を用いるペプチド合成においても, その合成途上の酸化の有無を確認しつつ合成を進める事が必要であると判断される。このスルホキンド体の検出には第 1 節で述べた 6 規定塩酸-フェノール系を用いる酸加水分解が有効であった。Cys (Acm)(O) 体を 6 規定塩酸-フェノール系で酸加水分解後, アミノ酸分析すると, Cys (MBzl)(O) 体の場合と同様に p-hydroxyphenylcysteine に由来するショートカラム上 26 分のピークを与えるが (Fig. 2), Cys(Acm) 自体はこのピークを与えなかった。

以上の事から, Cys (Acm)(O) が生成すれば, これは本来の脱保護条件で除去できないこと, また他の保護基を除去しようとして HF, あるいは MSA 処理すれば, 化合物(10)等を生成して安定に保つことができないことがわかった。そこで最終脱保護反応以前における Cys (Acm)(O) 体の還元の可能性について検討を加えた。すでに著者は, 第 1 節において thiophenol が Cys (MBzl)(O), Cys (Bzl)(O) の還元の有効なことを見出したが, Boc-Cys (Acm)(O)-OH (8) を thiophenol を用いて 80 °C, 12 時間処理すると, TLC 上原料スルホキンド体のスポットが消失し, あらたに 2 つのスポットが認められた。しかしながら, これらのスポットはいずれも予想された還元体, Boc-Cys(Acm)-OH(7), のそれに一致しなかった。そこで, この 2 つの化合物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより単離し, 60 MHz <sup>1</sup>H-NMR および質量分析によりそれらの構造解析を行なった結果, これらの化合物を acetamidomethyl phenyl sulfide (11), および N<sup>α</sup>-Boc-S-(phenylthio) cysteine (12) と同定した。すなわち, Cys (Acm)(O) 体は, Cys (MBzl)(O), および Cys (Bzl)(O) の場合と異なり, thiophenol 処理によって対応する還元体を与えず, 化合物(11), および(12)に変換されることが明らかとなった。換言すれば, Cys(Acm)を用いてペプチドを合成した場合, もし一部対応するスルホキンド体が生成すれば, 現状適当な還元方法が見出されないで, これよりシステインの十分な回収を得られないことがわかった。

## 第2章 マウス上皮細胞増殖因子 (EGF) の全合成

### 第1節 マウス EGFに関する従来の研究概要

#### 第1項 分離・精製

EGFは、1962年Cohenら<sup>1)</sup>によって雄マウス顎下腺中の神経成長促進因子(NGF)の分離研究中に発見された因子である。彼らはNGFの抽出・精製中、核酸成分を除くため蛇毒のホスホジエステラーゼ粗抽出物を加えたところ、NGFの思わぬ活性上昇を認めた。蛇毒は唾液腺に由来することから、マウスの顎下腺を調べたところ、ここでもNGF活性の上昇が認められた。さらに彼らは、新生マウスにこの雄のマウス顎下腺抽出粗製品を連日投与すると、1)眼瞼の早期破開(12~14日より6~7日に短縮)、2)上下切歯の早期発生(9~10日より6~7日に短縮)を起こすことに気づいた。この現象を指標として活性体の精製を行ない、1962年に本品をtooth lid factor<sup>1)</sup>として報告した。その後、この作用は上皮組織の増殖・角化を促進するためであることがわかり、本品はepidermal growth factor(EGF)と命名された<sup>29)</sup>。EGFの作用には種特異性のないことから、他の種にもEGFが存在することが推定され、1975年、彼らはヒトの尿からEGF様物質を精製することに成功した<sup>30)</sup>が、構造の解明をみていない。

マウスEGFは、1972年、雄のマウス顎下腺ホモジネートを0.05M酢酸pH4.5で抽出し加熱処理後、各種クロマトグラフィーを組み合わせて、化学的に均一な物質として捕捉された<sup>31)</sup>が、その後本品のラジオイムノアッセイ(RIA)が開発されると、本品がポリアクリルアミドの樹脂(Bio-gel P-10)に特異的によく吸着されることがわかり、本法とDEAE-セルロースのカラムで分離する改良精製法が報告された<sup>32)</sup>。

本品の抽出は最初pH4.5で行なわれたのであるが、この条件をpH3.5におとすとC末端よりLeu-Argが除去されたEGF-2が分離してくる。これは粗品の中に存在するcarboxypeptidase様物質によって副生してくるものと考えられるが、活性的にはもとのEGFと異なるところがない。

## 第2項 構造

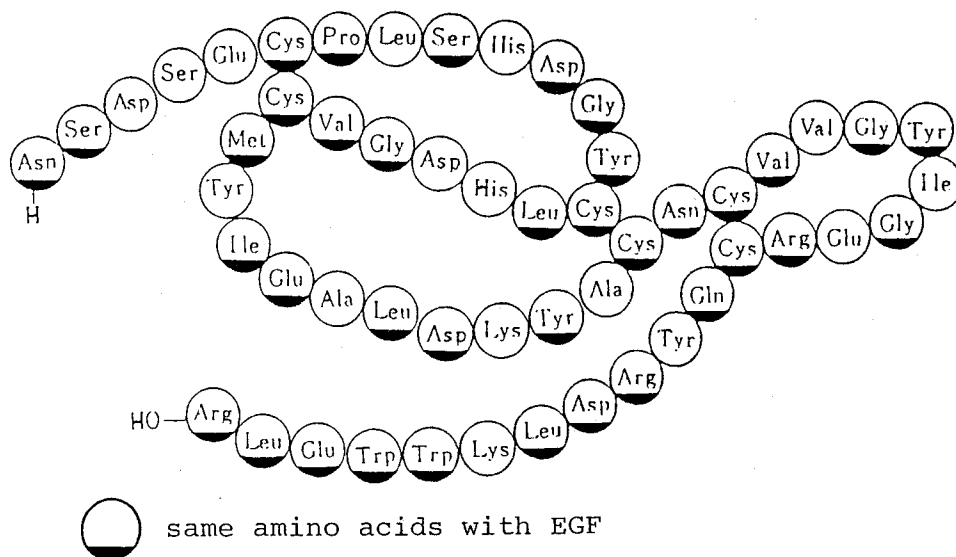
EGFの一次構造はCohenらによって酵素消化, Edman分解により1972年<sup>2)</sup>に, ついでジスルフィド結合の位置はサーモリシン分解により1973年<sup>3)</sup>に決定された(Fig.1.)。

本品のトリプシン処理によりC末端から5個のアミノ酸がはずれたEGF1~48は, in vivoでは活性は失われないが,<sup>32)</sup> in vitroでのヒト線維芽細胞増殖刺激効果は正常の1~5%, また, <sup>125</sup>I-EGF結合阻害能も5%に低下する。<sup>33)</sup>

1975年, Gregory<sup>4)</sup>は男子尿中より分離した2種の胃酸分泌抑制物質 $\beta$ および $\gamma$ -urogastrone( $\gamma$ 体は $\beta$ 体よりC末端Argの欠除したもの)の構造を解明し, 本品とEGFとの構造上の類似性を指摘した(Fig.6.)。両者はともにアミノ酸53残基より成り, このうち37残基が同位置にあり, 3個のジスルフィド結合の位置も同一である。さらにGregoryら<sup>4)</sup>は, urogastroneにもマウス眼瞼の開きを促進する作用のあること, Bowerら<sup>5)</sup>はEGFにも胃酸分泌抑制作用のあることを報告している。またurogastroneはヒト線維芽細胞のマウスEGFレセプターにも同様の親和性で結合する<sup>34)</sup>したがってurogastroneはヒトのEGFと判断されるが, その分泌源は明らかではなく, 上記Cohenの分離したEGF様物質と同一物質であるか否かも現在明らかではない。

1983年Grayら<sup>6)</sup>, Scottら<sup>7)</sup>はそれぞれ独立にEGF前駆体のcDNAの塩基配列を解明することに成功し, EGFが生体内において, アミノ酸残基1168個,

Fig.6. Structure of  $\beta$ -Urogastrone



あるいは1217個より成る前駆体蛋白より合成されることを報告した。これによって化学的手段によって導かれたCohenのEGFの構造式が遺伝子学的手法によって支持されるに至った。

### 第3項 作用等

EGFの作用の特徴は、種特異性がなく種々の動物、および細胞に効果を示すことである。

生体内における作用として、新生マウスにおける皮フ、舌、食道、角膜、口腔などの上皮組織の肥大・角化<sup>35)</sup>、切歯の成長促進<sup>35)</sup>、上皮のケラチン化<sup>36)</sup>、ラット・イヌにおけるhistamine刺激胃酸分泌抑制<sup>5)</sup>、ヒトにおける胃酸分泌抑制<sup>37)</sup>などの作用がある。

培養細胞における作用として、解糖系の促進<sup>38)</sup>、ホスホフルクトキナーゼ活性の上昇<sup>38)</sup>、DNA合成の刺激<sup>39)</sup>、細胞数・コロニーの形成促進<sup>40)</sup>など種々の作用が知られている。

EGFは雄マウス顎下腺1g当り1mgと多量に含まれており、一方雌は、その約 $\frac{1}{15}$ で明らかな性差を有するが、testosterone投与により著しく上昇する。顎下腺中の含量は加齢とともに増加し、50日でほぼ頂値に達する<sup>41)</sup>。顎下腺中の含量は日内変動を示すことが知られている<sup>42)</sup>。他の組織中の濃度は非常に低い<sup>41)</sup>。また蛍光抗体法により、EGFが雄マウスの顎下腺管状組織に局在することが確認された。雌の場合、この管状組織が発育不全であり、testosteroneの投与で細胞の発育に比例してEGFの存在も確認されるようになる。

### 第4項 合成

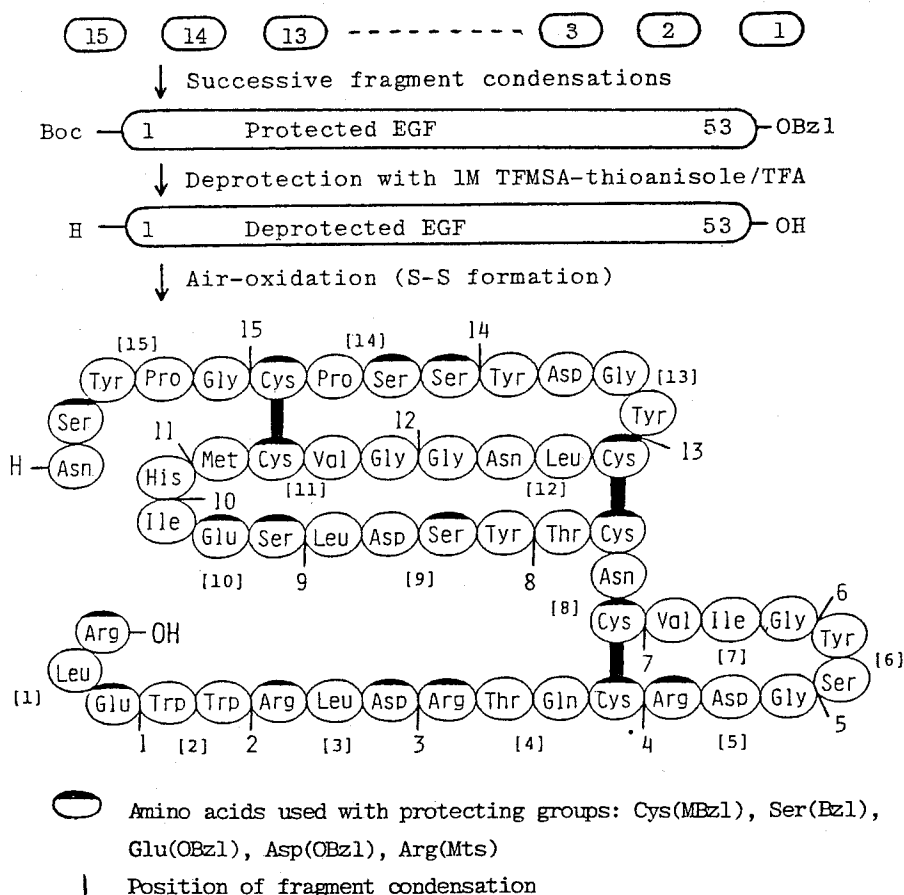
EGFの合成に関する報告はいまだ見あたらない。関連する合成研究として、Cambleら<sup>8)</sup>による樹脂上のフラグメント縮合法によるurogastrone合成の試みがあるが、いまだ完成に至っていない。さらに1983年、Urdeaら<sup>43)</sup>は遺伝子学的手法によるurogastroneの合成を行なったが、最終品を同定するまでに至っていない。

第2節 マウス EGF の 30-53 位, 保護テトラコサペプチドエステル, Boc-(EGF 30-53)-OBzl の合成

第1項 合成方針

1972年 Taylor ら<sup>31)</sup> は天然 EGF の還元・再酸化によって EGF 活性が再現することを報告した。このことは, EGF に対応するトリペンタコンタペプチドを合成すれば, この空気酸化によって活性体を得られることを意味するので, 著者は Fig. 7. に示す scheme に従って EGF の全合成を計画した。

Fig. 7. Synthetic Scheme for EGF



まず保護基の選択と脱保護の問題であるが, 著者は, 本合成の最終段階における脱保護試薬として, 藤井らによって開発された 1M TFMSA-thioanisole/TFA系<sup>16,44)</sup>を用いることとした。本脱保護系は thioanisole による反応促進効

果<sup>45)</sup>によって、温和な条件下で脱保護反応を行なえるという利点を有し、これまでに数種のペプチドの合成に利用されいづれも良好な結果を与えている。<sup>46)</sup> また中間体の $\alpha$ -アミノ( $N^\alpha$ )保護基としてはTFAで除去可能なBoc基、あるいはZ(OMe)基を用い、側鎖官能基を有するアミノ酸誘導体には、上記脱保護試薬系で除去可能な保護基を有するAsp(OBzl), Glu(OBzl), Cys(MBzl), Ser(Bzl), およびArg(Mts)<sup>47)</sup>を採用することとした。しかし、このうち塩基によるサクシンイミド化副反応を起こしやすい特異な配列中<sup>48)</sup>にあるアスパラギン酸 $\beta$ ベンジルエステルについては、区分ペプチドの段階でこれを接触還元により除去してこの副反応を抑制するように考慮した。さらに、EGFはTFAによる脱Z(OMe)、あるいは脱Bocに際してアルキル化されやすいTrpをC端側に2個含んでいる。そこで、このTrpインドール核へのアルキル化副反応<sup>49)</sup>を抑制するため、Trp導入後の $N^\alpha$ 保護基として、この種の副反応がZ(OMe)基よりも少ないことが知られているBoc基を採用し、<sup>50)</sup>さらにこのTFAによる脱保護時にはエタンジチオール(EDT)<sup>51)</sup>含有アニソールをスカベンジャーとして用い、この副反応を抑制することとした。

ペプチド鎖の構築には、15個の比較的小さな区分ペプチドヒドラジドを用い、順次C端側よりラセミ化の少ないアジド法<sup>52)</sup>により縮合する計画をたてた。これは比較的小さな区分ペプチドを縮合に用いた方が縮合率がよく、また目的物の精製が容易と考えられたからである。ただTrpより成る区分ペプチド[2]のみは、そのインドール核のニトロソ化を避けるため、アジド法にかえてGeigerら<sup>53)</sup>の方法によるDCC-HOBT法によりラセミ化を抑制しつつ導入する方針をたてた。またAsp(OBzl)、あるいはGlu(OBzl)残基を含む区分ペプチドヒドラジド体を合成するためには、矢島ら<sup>54)</sup>が開発したTroc-NHNH<sub>2</sub>を用いる置換ヒドラジン法を採用し、亜鉛-酢酸処理<sup>55)</sup>によって選択的にTroc基を除去して対応するヒドラジド体とすることとした。

以上の方針に従ってEGFを全合成することとし、まずEGF 30-53位に相当する保護テトラコサペプチドエステルを、8個の区分ペプチドの縮合によって合成した。

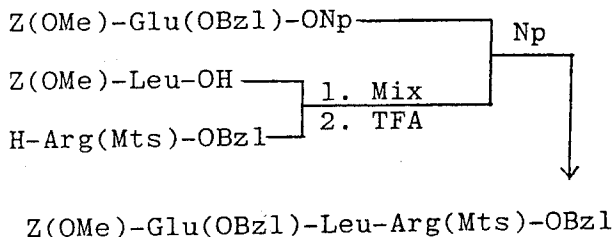
第2項 マウスEGFの51-53位、保護トリペプチドエステル、Z(OMe)-(EGF 51-53)-OBzlの合成

以下に EGF の約半分子にあたるテトラコサペプチドエステル<sup>56)</sup>の合成に用いた 8 個の区分ペプチドの合成について述べる。

Fig. 8. に C 端部保護トリペプチドエステル [1] の合成経路を示した。

Fig. 8.

Synthetic Scheme for the Protected  
Tripeptide Ester, Z(OMe)-(EGF 51-53)-OBzl [1]



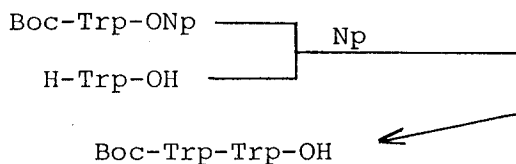
H-Arg(Mts)-OBzl を出発原料とし, Z(OMe)-Leu-OH を混合酸無水物法<sup>56)</sup>で縮合後, その Z(OMe) 基を TFA で除去し, Z(OMe)-Glu(OBzl)-OH を Np<sup>57)</sup>法で縮合して目的のトリペプチドエステル, Z(OMe)-Glu(OBzl)-Leu-Arg(Mts)-OBzl を得た。得られたトリペプチドエステルを AcOEt-isopropylether 系を用いる再結晶法で精製し, その純度を TLC, 元素分析, 酸分解後のアミノ酸分析により確認した。なお, 以下の各区分ペプチドについても, 特に述べない限りその精製を再結晶により行ない, その純度を TLC, 元素分析, 酸分解後のアミノ酸分析により確認した。

第 3 項 マウス EGF の 49-50 位, 保護ジペプチド, Boc-(EGF 49-50)-OH の合成

Fig. 9. に保護ジペプチド [2] の合成経路を示した。

Fig. 9.

Synthetic Scheme for the Protected Dipeptide,  
Boc - (EGF 49-50)-OH [2]





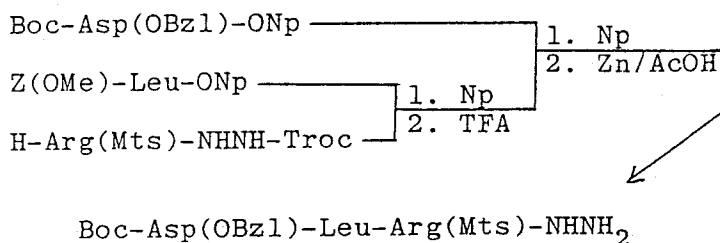
本ペプチドは Trp より成るため、その導入には第 1 項で述べたように DCC-HOBT 法を用いることとした。そのため H-Trp-OH を出発原料とし、Boc-Trp-OH を Np 法により縮合して保護ジペプチドとした。本ペプチドは結晶性に難があったためその DCHA 塩に導き、AcOEt-isopropylether 系で再結晶し精製を行なった。また第 1 項で述べた様に以後の区分ペプチドの N<sup>α</sup>保護基には、Z(OMe)基に変えて Boc 基を用いることとした。

第 4 項 マウス EGF の 46-48 位, 保護トリペプチドヒドラジド, Boc-(EGF 46-48)-NHNH<sub>2</sub> の合成

ついで、保護トリペプチドヒドラジド[3]を Fig. 10. に示す合成経路に従って合成した。

Fig.10.

Synthetic Scheme for the Protected Tripeptide Hydrazide, Boc-(EGF 46-48)-NHNH<sub>2</sub> [3]



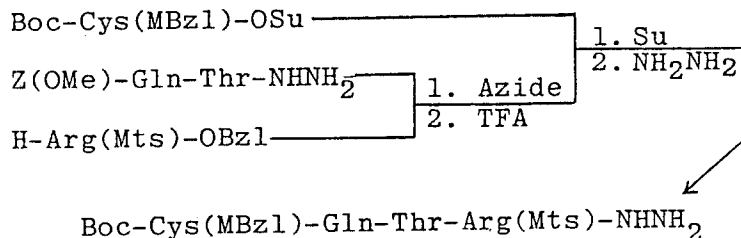
本区分ペプチドは Asp(OBzl) を含むため、通常の水ドラジン処理によってヒドラジド体を合成できない。そこで、前述の Troc-NHNH<sub>2</sub> を用いて合成を進めた。すなわち Z(OMe)-Arg(Mts)-NHNH-Troc より出発し、TFA 処理によってその Z(OMe) 基を除去した後、これに Z(OMe)-Leu-OH, Boc-Asp(OBzl)-OH を順次 Np 法で縮合して Boc-Asp(OBzl)-Leu-Arg(Mts)-NHNH-Troc とした。続いて酢酸-MeOH 混液中 Zn 処理によって Troc 基を選択的に除去し目的の保護トリペプチドヒドラジド[3]とした。

第 5 項 マウス EGF の 42-45 位, 保護テトラペプチドヒドラジド, Boc-(EGF 42-45)-NHNH<sub>2</sub> の合成

Fig. 11. に保護テトラペプチドヒドラジド [4] の合成経路を示した。

Fig. 11.

Synthetic Scheme for the Protected Tetrapeptide Hydrazide, Boc-(EGF 42-45)-NHNH<sub>2</sub> [4]



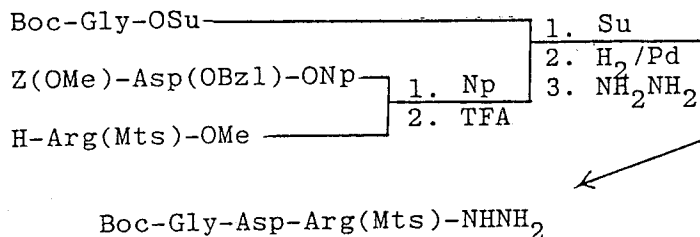
この区分ペプチドの合成中 Z(OMe)-Gln-Thr-NHNH<sub>2</sub><sup>58)</sup> は既知物質である。H-Arg(Mts)-OBzl より出発して、Z(OMe)-Gln-Thr-NHNH<sub>2</sub> をアジド法で縮合後、その Z(OMe) 基を TFA で除去し Boc-Cys(MBzl)-OH を Su 法<sup>59)</sup> にて縮合して Boc-Cys(MBzl)-Gln-Thr-Arg(Mts)-OBzl とした。ついでこれを通常のヒドラジン処理に付し、目的の保護テトラペプチドヒドラジド [4] を得た。

第 6 項 マウス EGF の 39-41 位、保護トリペプチドヒドラジド、Boc-(EGF 39-41)-NHNH<sub>2</sub> の合成

保護トリペプチドヒドラジド [5] の合成経路を Fig. 12. に示した。

Fig. 12.

Synthetic Scheme for the Protected Tripeptide Hydrazide, Boc-(EGF 39-41)-NHNH<sub>2</sub> [5]



本区分ペプチドに含まれる Asp(OBzl)-Arg(Mts) という配列は、予試験において前述のサクシニイミド化副反応を若干起こすことが認められたため、本区

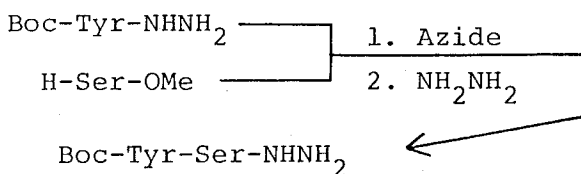
分ペプチドを、その Asp  $\beta$  カルボキシル基を遊離の形で合成することとした。すなわち、まず H-Arg (Mts)-OMe より出発して Z(OMe)-Asp(OBzl)-OH を Np 法で、Boc-Gly-OH を Su 法で順次縮合し、得られた Boc-Gly-Asp(OBzl)-Arg (Mts)-OMe をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製した。続いて接触還元により Asp- $\beta$ -Bzl エステルを除去した後、通常の水ドラジン処理により目的の保護トリペプチドヒドラジド [5] を得ることができた。

第 7 項 マウス EGF の 37-38 位、保護ジペプチドヒドラジド、Boc-(EGF 37-38)-NHNH<sub>2</sub> の合成

保護ジペプチドヒドラジド [6] の合成経路を Fig. 13. に示した。

Fig. 13.

Synthetic Scheme for the Protected Dipeptide Hydrazide, Boc-(EGF 37-38)-NHNH<sub>2</sub> [6]

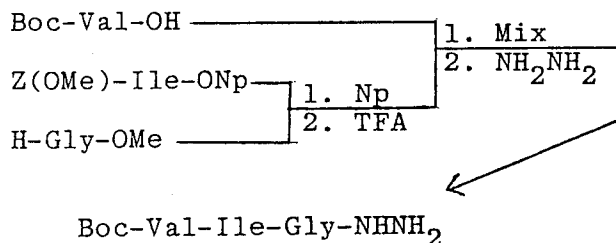


本区分ペプチドは、H-Ser-OMe と Boc-Tyr-NHNH<sub>2</sub> のアジド法による縮合後、通常の水ドラジン処理によって容易に合成することができた。

第 8 項 マウス EGF の 34-36 位、保護トリペプチドヒドラジド、Boc-(EGF 34-36)-NHNH<sub>2</sub> の合成

Fig. 14.

Synthetic Scheme for the Protected Tripeptide Hydrazide, Boc-(EGF 34-36)-NHNH<sub>2</sub> [7]



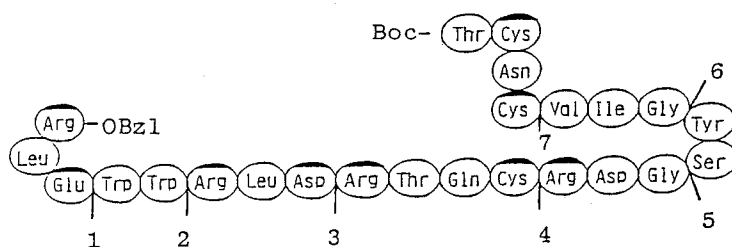
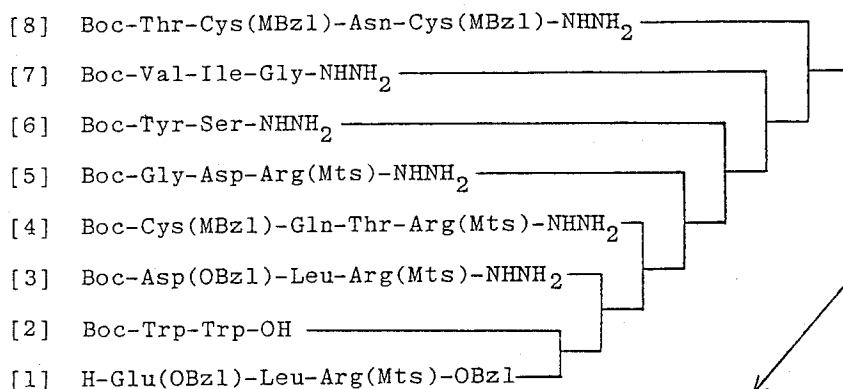


この方法の方がH-Cys(MBzl)-OMe から出発するより中間体の精製が容易であった。

第10項 マウス EGF の 30-53 位, 保護テトラコサペプチドエステル, Boc-(EGF 30-53)-OBzl の合成

続いて, 以上第2項から第9項で得られた8個の区分ペプチドをFig.16.に示す経路に従って順次縮合し, 保護テトラコサペプチドエステルを合成した。

Fig.16. Synthetic Route to the Protected Tetracosapeptide, Boc-(EGF 30-53)-OBzl



○ Protected amino acids: Cys(MBzl), Glu(OBzl), Asp(OBzl), Arg(Mts)  
 | Position of fragment condensation

まず区分ペプチド[1]と[2]の縮合であるが, この縮合反応は合成方針の項で述べたごとくDCC-HOBT法で行なうため, TFA処理によって区分ペプチド[1]からZ(OMe)基を除去した後, これを5%NaHCO<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>Oで洗浄して遊離のアミノ基とし, 区分ペプチド[2](1当量)とDCC-HOBT法で縮合した。本縮合反応では, 塩基としてEt<sub>3</sub>Nを使用しないためTrp残基のラセミ化が抑制されたのみならず, DCC法<sup>60)</sup>の副反応である区分ペプチド[2]のアシルウレア体の副生<sup>61)</sup>も抑制されたと考えられる。<sup>62)</sup> 続いて得られた保護ペンタペプチド

エステルより TFA-anisole-EDT 処理によって Boc 基を除去し、区分ペプチド [3] (1.2 当量) をアジド法により縮合した。この際 Trp に隣接する Boc 基の TFA による除去時に上記スカベンジャー系の存在下においても、インドール核のアルキル化によると思われる多少の副生成物の存在が TLC 上認められたため、区分ペプチド [3] の導入後、シリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製を行なった。この副反応は Trp の N<sup>α</sup> から Boc 基を除去する時に最も多く認められるが、Trp がペプチド鎖の中に入ってしまうとあまり問題でなく、TLC で見る限り上記スカベンジャー系の添加により、この種の副反応はほぼ抑制されるものと判断される。

以後同様に TFA-anisole-EDT 系を用いる脱 Boc 化反応とアジド法による縮合反応により順次区分ペプチド [4] ~ [8] を縮合し、保護テトラコサペプチドエステルとした。各縮合反応の進行を TLC により確認しつつ合成を進め、その完結にはアシル成分 1.4 ~ 2.2 当量を必要とした。各縮合中間体を DMF-MeOH 系を用いる再沈殿法により精製し、さらにその純度を TLC, 元素分析, アミノ酸分析により確認した。ただ、保護テトラコサペプチドエステルについては、その有機溶剤に対する溶解性が低下したため、DMSO-DMF (1 : 1) 混液およ

Table 2. Amino Acid Analysis of the Protected Tetracosapeptide and its Intermediates

| A.A.   | 49-53<br>(5) | 46-53<br>(8) | 42-53<br>(12) | 39-53<br>(15) | 37-53<br>(17) | 34-53<br>(20) | 30-53<br>(24) |
|--------|--------------|--------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| Asp    |              | 0.98(1)      | 1.00(1)       | 1.97(2)       | 2.02(2)       | 2.07(2)       | 3.03(3)       |
| Thr    |              |              | 1.10(1)       | 0.91(1)       | 0.96(1)       | 0.96(1)       | 1.64(2)       |
| Ser    |              |              |               |               | 0.90(1)       | 0.77(1)       | 0.76(1)       |
| Glu    | 1.03(1)      | 1.01(1)      | 2.00(2)       | 2.07(2)       | 2.00(2)       | 2.10(2)       | 2.12(2)       |
| Gly    |              |              |               | 0.95(1)       | 1.00(1)       | 1.96(2)       | 1.98(2)       |
| Cys    |              |              | N.D.          | N.D.          | N.D.          | N.D.          | N.D.          |
| Val    |              |              |               |               |               | 0.88(1)       | 0.74(1)       |
| Ile    |              |              |               |               |               | 0.85(1)       | 0.71(1)       |
| Leu    | 1.00(1)      | 2.00(2)      | 2.00(2)       | 2.00(2)       | 2.00(2)       | 2.00(2)       | 2.00(2)       |
| Tyr    |              |              |               |               | 0.95(1)       | 1.01(1)       | 0.92(1)       |
| Trp*   | 1.87(2)      | 1.95(2)      | 1.31(2)       | 1.72(2)       | 1.65(2)       | N.D.          | N.D.          |
| Arg    | 0.98(1)      | 1.99(2)      | 3.08(3)       | 3.92(4)       | 4.02(4)       | 4.18(4)       | 4.04(4)       |
| Recov. | 90%          | 91%          | 91%           | 88%           | 84%           | 88%           | 96%           |

Numbers in parentheses are theories.

\* Trp was determined by 4M CH<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>H hydrolysis.

び MeOH を用いる再沈殿法により精製し、その純度検定には 6 規定塩酸-フェノール系による酸分解後のアミノ酸分析が特に有効であった。そのアミノ酸分析値、および各縮合中間体のアミノ酸分析値を Table. 2. に示した。ここで Trp のみは 6 規定塩酸を用いて酸分解を行なうと、その大部分が分解してしまうため、Liu ら<sup>63)</sup>の方法に従って 4 規定 MSA を用いる酸分解によってその分析値を得た。分析値は、合成を通じて Leu を計算の基準とし、その回収率とあらたに導入されたアミノ酸の回収率とを比較することにより、容易に各縮合体の純度を検定することができた。また、第 8 項で述べた Val-Ile は立体障害のため、24 時間の酸加水分解では完全に水解されず、アミノ酸の回収率は多少低い値となっているが、72 時間水解するとほぼ定量的な値が得られた。

以上著者は、ここに高純度の保護テトラコサペプチドエステルを合成することに成功し、以後さらにペプチド鎖を延長し、保護 EGF とした後、脱保護、空気酸化により EGF の全合成を行なうこととした。

### 第 3 節 マウス EGF の全合成

#### 第 1 項 マウス EGF の 26-29 位、保護テトラペプチドヒドラジド、Boc-(EGF 26-29)-NHNH<sub>2</sub> の合成

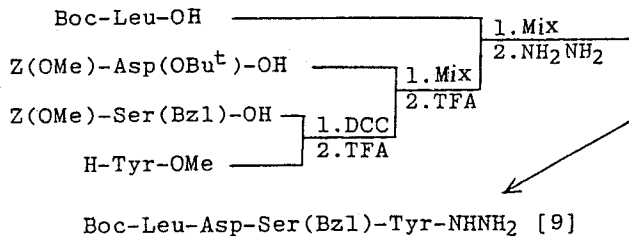
以下に、先に得た保護テトラコサペプチドエステルの延長に必要な各区分ペプチドの合成を示す。

まず、EGF 26-29 位に相当する保護テトラペプチドヒドラジド [9] の合成であるが、本区分ペプチドは、塩基によるサクシンイミド化副反応を起こしやすい Asp-Ser という配列を含んでいるため、すでに合成方針の項で述べたように Asp の  $\beta$ -カルボキシル基を遊離の形で合成することとした。すなわち Asp  $\beta$ -カルボキシル基の保護基として Bu<sup>t</sup> 基を採用し、Asp 残基の導入後直ちにこれを N<sup>α</sup> 保護基の Z(OMe) 基とともに TFA で除去することとした。また本区分ペプチドに隣接する EGF 22 位には His 残基が位置しており、すでに武山ら<sup>64)</sup>は、消化管ホルモンの一種である VIP (vasoactive intestinal polypeptide) の合成において、この His と本区分ペプチド中に含まれる Ser および Asp を含むテトラペプチドヒドラジド、Z(OMe)-His-Ser-Asp-Ala-NHNH<sub>2</sub> のアジド反応が、Ser 水酸基が遊離の形では満足に進行しないことを報告している。この場

合, His, Ser, Asp の組み合わせは, ちょうど serine protease<sup>65)</sup> の active triad の組み合わせであり, この様な現象の見られる原因ではないかと説明されている。そこで著者は, 本 EGF の合成研究においても His に隣接する Ser の水酸基についてはこれを Bzl 基で保護して合成を進めることとした。

以上の方針に従い, 本区分ペプチド, 保護テトラペプチドヒドラジド [9] の合成を Fig. 17. に示す経路に従って行なった。

Fig. 17. Synthetic Scheme for the Protected Tetrapeptide Hydrazide, Boc-(EGF 26-29)-NHNH<sub>2</sub>



H-Tyr-OMe を出発原料とし, Z(OMe)-Ser(Bzl)-OH を DCC 法で縮合後, その Z(OMe) 基を TFA により除去し, Z(OMe)-Asp(OBu<sup>t</sup>)-OH を混合酸無水物法で導入した。得られた Z(OMe)-Asp(OBu<sup>t</sup>)-Ser(Bzl)-Tyr-OMe を TFA 処理に付し, その Z(OMe) 基, および Bu<sup>t</sup> 基を完全に除去した後, Boc-Leu-OH を混合酸無水物法で導入した。続いて, 得られた Boc-Leu-Asp-Ser(Bzl)-Tyr-OMe を通常のヒドラジン処理によって目的のテトラペプチドヒドラジド [9] に導いた。

## 第 2 項 マウス EGF の 23-25 位, 保護トリペプチドヒドラジド, Boc-(EGF 23-25)-NHNH<sub>2</sub> の合成

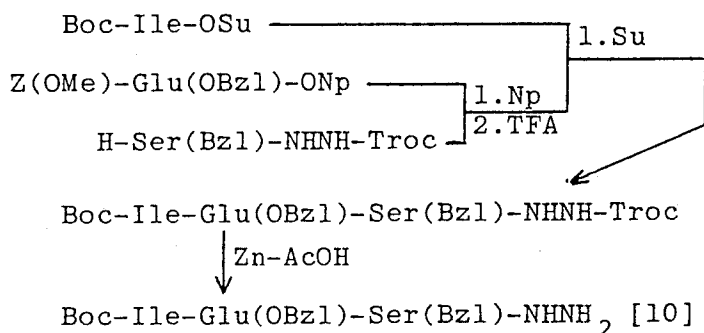
ついで 23-25 位に相当するトリペプチドヒドラジドの合成であるが, 当初この区分ペプチドは, 22 位の His を含めたテトラペプチドヒドラジド, Boc-His-Ile-Glu(OBzl)-Ser(Bzl)-NHNH<sub>2</sub>, の形で導入する計画であった。しかしながら, 予試験において, このテトラペプチドの導入は, 15 当量の過剰を用いても約 30% しか進行しなかった。そこでこの部位での導入を 23-25 位に相当するトリペプチドと 22 位の His の 2 段階に分けて行なうこととした。問題はなぜこのような現象が生ずるかという理由であるが, かつて Camble, Petter は<sup>8)</sup> urogastrone を合成しようとした際 His を含んだペプチド, たとえば Boc-Leu-



Ser(Bu<sup>t</sup>)-His-Asp(OBu<sup>t</sup>)-Gly-OH (8-12位),あるいはこれより大きいN端側の区分ペプチドとアミン成分(13-47位)とをDCC等で縮合しようとした場合,この反応はたとえ過剰のアシル成分を使用しても,また固相反応でも,液相反応でも満足に進行しないことを述べ,この時点で本品の合成を断念している。著者の場合Ser(Bzl)を用いても,また上記Camble, Petterの場合Ser(Bu<sup>t</sup>)を用いても,この様にアシル成分の反応性が乏しいことは,有機溶媒中におけるアミン成分のコンホーメーションが関与しアミン成分中の $\alpha$ -アミノ基が,かなりマスクされた状態にあるのではないかと考えられる。著者の場合,Aspの $\beta$ -カルボキシル基を無保護にしているので,武山らの指摘した要素も完全に無視することはできない。ペプチド合成上,このような現象はまれであり,従って保護基のついたペプチドの有機溶媒中でのコンホーメーションに関する組織的な研究は見あたらない。著者は,ペプチドのアジドよりアミノ酸のアジドの方が反応性が高いと判断し,この22-25位を上記のように2段に分けて反応してみた所,高級ペプチド合成法としては異例であるが,満足に反応が進行することを認め,その理由の説明には将来の問題を残しつつもEGFのペプチド鎖の延長が可能であることがわかった。

Fig.18.に23-25位に相当する保護トリペプチドヒドラジド[10]の合成経路を示した。

Fig.18. Synthetic Scheme for the Protected Tripeptide Hydrazide, Boc-(EGF 23-25)-NHNH<sub>2</sub>



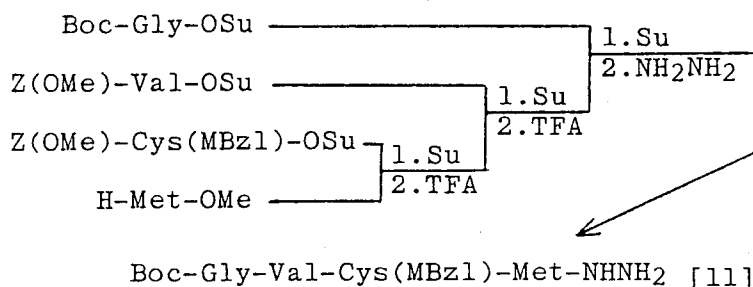
本区分ペプチドの合成においても,第1項で述べた理由によりSerの水酸基をBzl基で保護して用いた。またGlu(OBzl)を含むため,Troc-NHNH<sub>2</sub>を用いる置換ヒドラジン法による合成法を採用した。すなわちZ(OMe)-Ser(Bzl)-

NHNH-Troc より出発して、その Z(OMe) 基を TFA で除去後、Z(OMe)-Glu(OBzl)-OH を Np 法で、Boc-Ile-OH を Su 法で順次縮合し、Boc-Ile-Glu(OBzl)-Ser(Bzl)-NHNH-Troc とした。続いて、これより通常の Zn 処理により Troc 基を選択的に除去し、目的の保護トリペプチドヒドラジド [10] を得ることができた。

### 第 3 項 マウス EGF の 18-21 位、保護テトラペプチドヒドラジド、Boc-(EGF 18-21)-NHNH<sub>2</sub> の合成

つぎに、保護テトラペプチドヒドラジド [11] を Fig. 19. に示す合成経路に従って合成した。

Fig. 19. Synthetic Scheme for the Protected Tetrapeptide Hydrazide, Boc-(EGF 18-21)-NHNH<sub>2</sub>

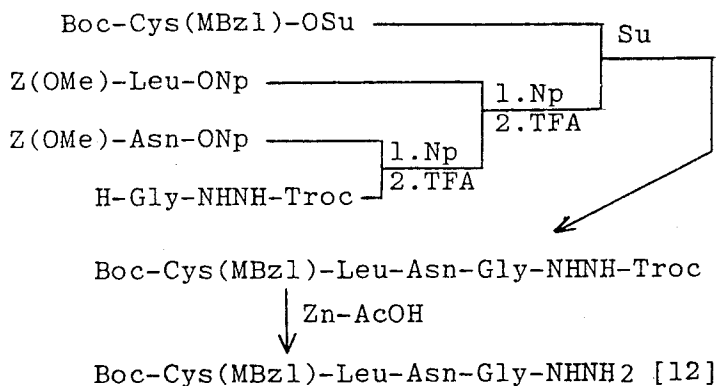


この区分ペプチドには Met が 1 個含まれているが、著者は、第 1 章で述べたごとく本合成では最終脱保護反応以前に thiophenol による還元操作を行なう必要があり、この時点で生成の可能性のある Met(O) 体<sup>66)</sup> も同時に還元できること、また Met の副反応としてよく知られている S-アルキル化副反応<sup>67)</sup> は、TFA 処理時に EDT を添加することによってほぼ抑制できること等を考慮し、本合成においては Met を無保護の形で合成を進めることとした。これによって区分ペプチド合成での中間体が水に易容になることを避けることができ、その精製が非常に容易となった。まず H-Met-OMe より出発し Z(OMe)-Cys(MBzl)-OH を Su 法で導入し、その Z(OMe) 基を TFA-anisole-EDT 系で除去後順次 Z(OMe)-Val-OH, Boc-Gly-OH を同様に Su 法で導入した。得られたテトラペプチドメチルエステルをヒドラジン処理により、容易に目的の保護テトラペプチドヒドラジド [11] を得ることができた。

第4項 マウス EGF の 14-17 位, 保護テトラペプチドヒドラジド, Boc-(EGF 14-17)-NHNH<sub>2</sub> の合成

続いて保護テトラペプチドヒドラジド [12] を Fig. 20. に示す合成経路に従って合成した。

Fig. 20. Synthetic Scheme for the Protected Tetrapeptide Hydrazide, Boc-(EGF 14-17)-NHNH<sub>2</sub>



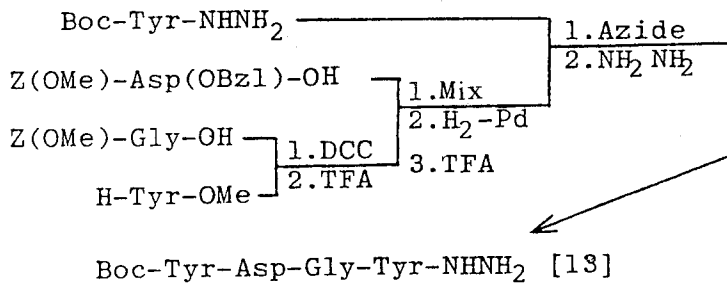
本区分ペプチドは Riniker ら<sup>68)</sup> が指摘した塩基による deamidation を起こしやすいたん Asn-Gly という配列を有している。そこで通常のカドラジン処理を避けるため、Troc-NHNH<sub>2</sub> を用いる置換ヒドラジン法により合成を行なった。すなわち、既知物質である Z(OMe)-Asn-Gly-NHNH-Troc<sup>69)</sup> より出発し、その Z(OMe) 基を TFA で除去した後、Z(OMe)-Leu-OH を Np 法で、Boc-Cys(MBzl)-OH を Su 法で順次縮合し Boc-Cys(MBzl)-Leu-Asn-Gly-NHNH-Troc とした。つぎに DMF-AcOH 混液中 Zn 処理によって Troc 基を選択的に除去して目的の保護テトラペプチドヒドラジド [12] とした。

第5項 マウス EGF の 10-13 位, 保護テトラペプチドヒドラジド, Boc-(EGF 10-13)-NHNH<sub>2</sub> の合成

Fig. 21. に、保護テトラペプチドヒドラジド [13] の合成経路を示した。

本区分ペプチドは、塩基によるサクシンイミド化副反応を起こしやすい Asp-Gly という配列を有している。そこで第2章第2節第1項で述べたごとく、その β-カルボキシル基を遊離の形で合成することとした。すなわち H-Tyr-OMe より出発して Z(OMe)-Gly-OH を DCC 法で、Z(OMe)-Asp(OBzl)-OH を混合

Fig.21. Synthetic Scheme for the Protected Tetrapeptide Hydrazide, Boc-(EGF 10-13)-NHNH<sub>2</sub>

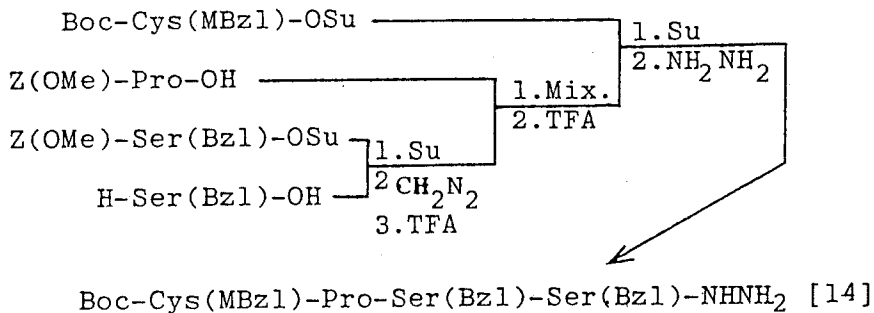


酸無水物法で導入後、直ちにその Asp-β-Bzlエステルを接触還元により除去した。続いてTFA処理によりN<sup>α</sup>保護基, Z(OMe)基, を除去し Boc-Tyr-NHNH<sub>2</sub>をアジド法で導入後、通常の水ラジジン処理によって目的の保護テトラペプチドヒドラジド [13]とした。

第6項 マウス EGFの 6-9位, 保護テトラペプチドヒドラジド, Boc-(EGF 6-9)-NHNH<sub>2</sub>の合成

つぎに保護テトラペプチドヒドラジド [14]を Fig.22.に示す合成経路に従って合成した。

Fig.22. Synthetic Scheme for the Protected Tetrapeptide Hydrazide, Boc-(EGF 6-9)-NHNH<sub>2</sub>



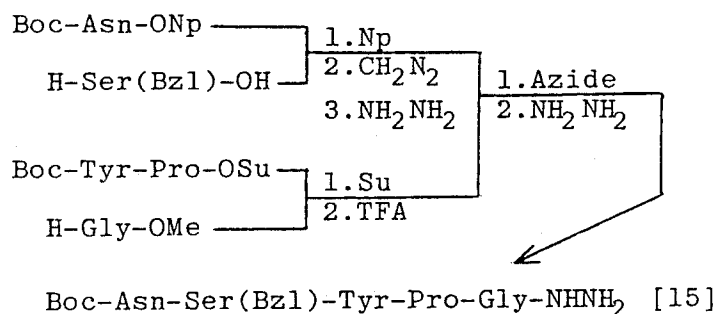
この区分ペプチドは Ser 残基をその C端側に 2個有しているが、区分ペプチド合成中間体の精製を容易にするため、その水酸基を Bzl 基で保護することとし、さらに中間体ジペプチド Z(OMe)-Ser(Bzl)-Ser(Bzl)-OHを C端側のカ

ルポキシル基が遊離の形で合成することとした。すなわち、H-Ser(Bzl)-OHを出発原料とし、Z(OMe)-Ser(Bzl)-OHをSu法で導入後ジアゾメタン処理によってジペプチドエステル、Z(OMe)-Ser(Bzl)-Ser(Bzl)-OMeに導いた。続いて、得られたジペプチドエステルよりTFA処理によってそのZ(OMe)基を除去し、Z(OMe)-Pro-OHを混合酸無水物法で、Boc-Cys(MBzl)-OHをSu法で順次導入して保護テトラペプチドエステルを得た。得られたテトラペプチドエステルはoilであったが、これを結晶化させることなくヒドラジン処理に付し、生成するヒドラジド体を、シリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製して目的の保護テトラペプチドヒドラジド[14]を得ることができた。

第7項 マウスEGFの1-5位、保護ペンタペプチドヒドラジド、Boc-(EGF 1-5)-NHNH<sub>2</sub>の合成

最後に、N末端1-5位に相当する保護ペンタペプチドヒドラジド[15]をFig. 23.に示す合成経路に従って合成した。

Fig.23. Synthetic Scheme for the Protected Pentapeptide Hydrazide, Boc-(EGF 1-5)-NHNH<sub>2</sub>



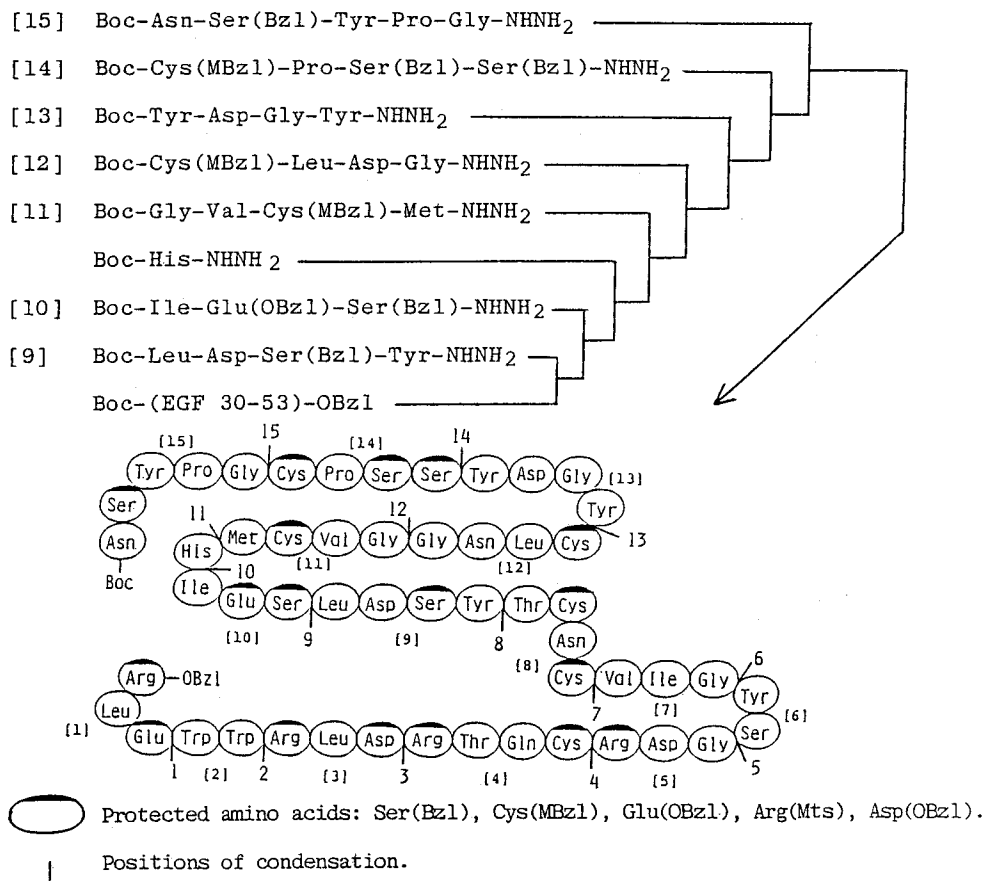
まずH-Gly-OMeより出発して、既知物質であるBoc-Tyr-Pro-OH<sup>70)</sup>をSu法により縮合してトリペプチド、Boc-Tyr-Pro-Gly-OMeとした。つぎにH-Ser(Bzl)-OHにBoc-Asn-OHをNp法で導入し、得られたジペプチドをジアゾメタン処理によってメチルエステルとした後、ヒドラジン処理によってジペプチドヒドラジド、Boc-Asn-Ser(Bzl)-NHNH<sub>2</sub>を得た。ついでトリペプチドメチルエステル、Boc-Tyr-Pro-Gly-OMe、よりBoc基をTFAで除去し、これにジペプチドヒドラジド、Boc-Asn-Ser(Bzl)-NHNH<sub>2</sub>、をアジド法で導入した。

ここに得られたペンタペプチドメチルエステル, Boc-Asn-Ser(Bzl)-Tyr-Pro-Gly-OMe, をヒドラジン処理によって容易に目的の保護ペンタペプチドヒドラジド [15] に導くことができた。

### 第8項 保護マウス EGF の合成

ついで, 以上第1項より第7項で合成した7個の区分ペプチド [9] ~ [15] を Fig. 24. に示す経路に従って, 第2節第10項で合成した保護テトラコサペプチドエステル上に, 順次アジド法を用いて導入した。ただ, EGF 22位の His のみを, 第2項で述べたごとく1個のアミノ酸誘導体として導入した。

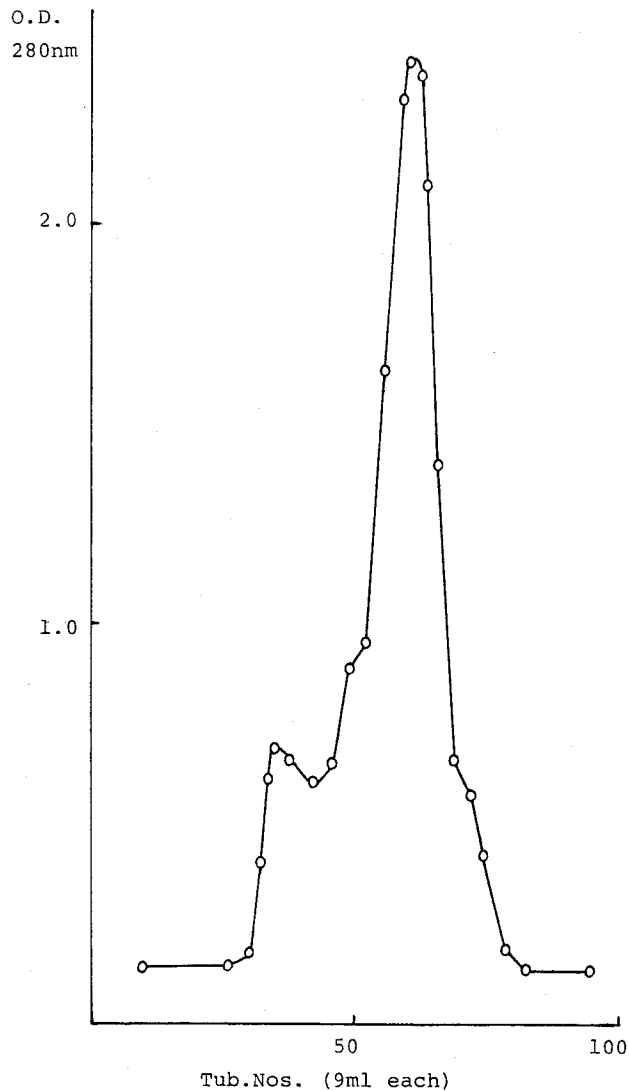
Fig. 24. Synthetic Route to the Protected Tripentacontapeptide Corresponding to EGF



各縮合反応に先だち, N<sup>α</sup>保護基 (Boc 基) を TFA-anisole-EDT系を用いて除去したが, このスカベンジャー系 (anisole-EDT) は, 第2節第10項で述べ

たごとく Trp インドール核へのアルキル化副反応<sup>49)</sup>の抑制に有効であるのみならず、区分ペプチド[11]の導入後における Met 残基での S-アルキル化副反応<sup>67)</sup>の抑制にも効果的であった。また本項に述べた保護テトラコサペプチドエステル以降の各縮合中間体は、有機溶剤に対する溶解性が低く、そのため DMSO-DMF (1:1) 混液を反応溶媒として用いた。各縮合反応の進行をニンヒドリン発色の消失によって確認したが、TLC 上でニンヒドリン発色が消失した時点でさらに 1~4 当量のアシル成分を追加し、反応の完結に努めた。問題の Boc-His-NHNH<sub>2</sub> の導入のみならず、区分ペプチド[9]~[12]の導入までは、2回

Fig.25. Gel-Filtration of Boc-(EGF 1-53)-OBzl on Sephadex LH-60



のアシル成分の添加，すなわち計 2～3 当量で反応が完結したが，区分ペプチド [13]～[15] の導入には計 7～10 当量のアシル成分を必要とした。各縮合中間体を DMSO-DMF (1:1) 混液/MeOH 系による再沈殿法で精製したが，保護 EGF に相当するトリペントコンタペプチドエステルについては，さらに DMSO-DMF (3:7) 混液を溶出液とする Sephadex LH-60 上でのゲル濾過法によって精製を行なった (Fig.25.)。ここで主ピークの前に現われる shoulder ピークは，恐らく Trp 修飾体由来するものと思われるが，精査は行っていない。

各縮合中間体，および保護 EGF の純度を元素分析，およびアミノ酸分析によって確認した。そのアミノ酸分析値を Table. 3. に示したが，第 2 節第 10 項で述べたごとく全合成を通じて Leu を計算の基準としており，システインを除くいずれのアミノ酸の組成比もほぼ理論値と一致する値を示している。ただ Val および Ile の値が少し低いが，これは前述したように立体障害の大きい Val-Ile という結合が酸分解に低抗するためである。システインの回収率については次頁で述べる。

Table 3. Amino Acid Ratios in 6N HCl Hydrolysate of Boc-(EGF 1-53)-OBzl and its Intermediates

| A.A.   | Protected peptides |               |               |               |               |               |              |              |
|--------|--------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|--------------|--------------|
|        | 26-53<br>(28)      | 23-53<br>(31) | 22-53<br>(32) | 18-53<br>(36) | 14-53<br>(40) | 10-53<br>(44) | 6-53<br>(48) | 1-53<br>(53) |
| Asp    | 4.17(4)            | 4.35(4)       | 4.23(4)       | 4.16(4)       | 5.25(5)       | 6.35(6)       | 6.27(6)      | 7.31(7)      |
| Thr    | 1.76(2)            | 1.91(2)       | 1.87(2)       | 1.76(2)       | 1.92(2)       | 2.07(2)       | 1.87(2)      | 1.84(2)      |
| Ser    | 1.69(2)            | 2.56(3)       | 2.38(3)       | 2.46(3)       | 2.51(3)       | 2.62(3)       | 4.34(5)      | 4.82(6)      |
| Glu    | 2.15(2)            | 3.31(3)       | 3.18(3)       | 3.13(3)       | 3.00(3)       | 3.17(3)       | 3.19(3)      | 3.20(3)      |
| Pro    |                    |               |               |               |               |               | 1.29(1)      | 2.32(2)      |
| Gly    | 2.13(2)            | 2.12(2)       | 2.15(2)       | 3.12(3)       | 3.99(4)       | 4.82(5)       | 4.77(5)      | 5.74(6)      |
| Cys    |                    |               |               |               |               |               |              | 2.20(3)      |
| Val    | 0.91(1)            | 0.71(1)       | 0.80(1)       | 1.90(2)       | 1.63(2)       | 1.48(2)       | 1.60(2)      | 1.57(2)      |
| Met    |                    |               |               | 0.75(1)       | 0.76(1)       | 0.54(1)       | 0.63(1)      | 0.49(1)      |
| Ile    | 0.86(1)            | 1.65(2)       | 1.71(2)       | 1.77(2)       | 1.67(2)       | 1.58(2)       | 1.61(2)      | 1.63(2)      |
| Leu    | 3.00(3)            | 3.00(3)       | 3.00(3)       | 3.00(3)       | 4.00(4)       | 4.00(4)       | 4.00(4)      | 4.00(4)      |
| Tyr    | 1.77(2)            | 1.91(2)       | 1.89(2)       | 1.74(2)       | 1.83(2)       | 3.86(4)       | 3.82(4)      | 4.68(5)      |
| Trp    | N.D.               | N.D.          | N.D.          | N.D.          | N.D.          | N.D.          | N.D.         | 1.02(2)      |
| His    |                    |               | 0.87(1)       | 0.85(1)       | 1.13(1)       | 0.67(1)       | 0.56(1)      | 0.62(1)      |
| Arg    | 4.28(4)            | 4.36(4)       | 4.26(4)       | 4.31(4)       | 4.20(4)       | 4.16(4)       | 4.25(4)      | 4.30(4)      |
| Recov. | 88%                | 77%           | 91%           | 90%           | 88%           | 82%           | 75%          | 79%          |

\* Trp was determined by 4N MSA hydrolysis

\*\* Determined after thiophenol treatment



以上ここに著者は、マウス EGF の全アミノ酸配列を有する高純度の保護トリペプチドエステルを得ることができた。

### 第9項 マウス EGF の全合成

続いて第8項で得た保護 EGF の脱保護であるが、保護 EGF は6規定塩酸-フェノール系を用いる酸分解後のアミノ酸分析で、第1章で述べた p-hydroxyphenylcysteine によるショートカラム上 26 分の溶出ピークを与えた。そこで、第1章で得られた知見に基づき、保護 EGF を、脱保護反応以前に還元操作に付すこととした。すなわち、保護 EGF を HMPA-DMF (1:1) 混液中、40°C で4日間 thiophenol とともにインキュベートした。この還元処理によってシスチンのアミノ酸分析値は 1.91 より 2.20 (理論値 3) に上昇した。さらにこの還元処理は、一部生成の可能性のある Met(O) の還元にも有効であったと判断される。

ついで Fig. 26. に要約した経路に従ってこの還元保護 EGF の脱保護、精製を行なった。

Fig.26.

#### Deprotection and Purification Procedure of EGF

Boc-Protected EGF 1-53-OBzl

- 1) Reduction of Cys(MBzl)(O) with thiophenole
- 2) 1M  $\text{CF}_3\text{SO}_3\text{H}$ -thioanisole/TFA + m-cresol, EDT

Deprotected EGF

- 1) Dithiothreitol reduction  
(6M guanidine-0.1M Tris, pH 8.0)
- 2) Sephadex G-10 (2N AcOH)
- 3) Air-oxidation, pH 8.2 (0.07mg/ml)
- 4) Lyophilization, Sephadex G-10 (2N AcOH)

Crude EGF

- 1) DEAE-cellulose (0.02M  $\rightarrow$  0.2M  $\text{AcONH}_4$ , pH 5.6)
- 2) HPLC on Cosmosil 5C<sub>18</sub> (4.6 x 150mm)<sup>4</sup>  
 $\text{CH}_3\text{CN}/0.05\text{M AcOH-Et}_3\text{N}$  (pH 5.6)  
= 30 : 70

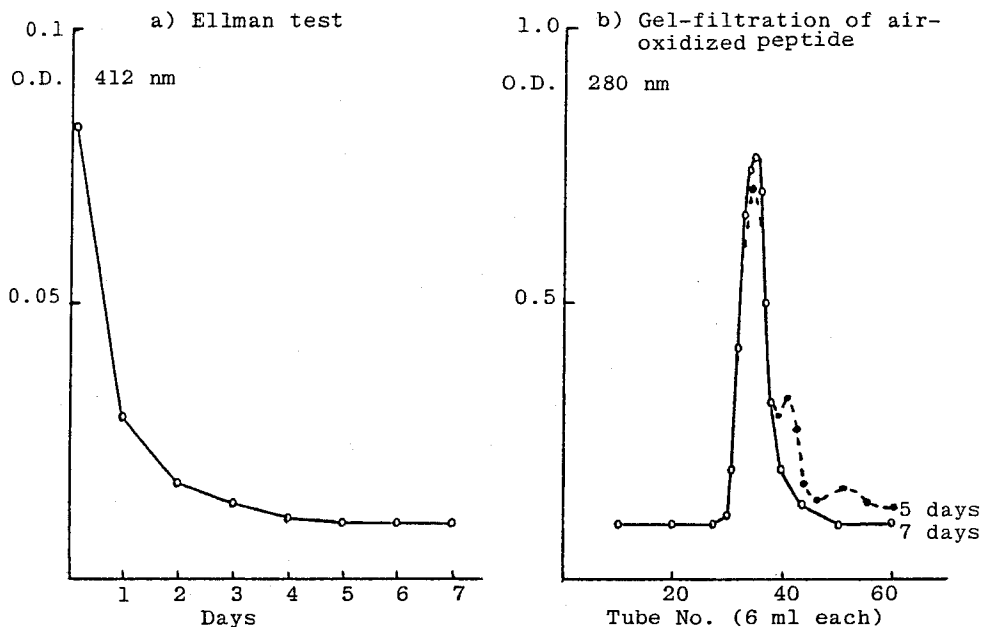
Purified EGF

まず、還元保護 EGF より全保護基を除去するため、m-cresol, EDT の存在下 1M TFMSA-thioanisole/TFA 系で 0°C, 2時間処理を行なった。この際

スカベンジャーとして用いた *m*-cresol は、特に Arg の Mts 基による Tyr の O-スルホン化副反応<sup>71)</sup> の抑制に、また EDT は Trp インドール核のアルキル化抑制に有効<sup>51)</sup> であることがすでに報告されている。また thioanisole の反応促進効果についてはすでに第 2 章第 2 節第 1 項でふれたとおりである。しかし、高分子ペプチドの合成においては、上記脱保護条件下でも多少の除去不完全なペプチドの残存が考えられるため、脱保護反応を完全に行なう意味で、上記脱保護反応をさらに 2 回繰り返した。そして、氷冷下にて反応液にエーテルを加えて生成物を沈殿させ、エーテルで洗浄後、この脱保護体を 0.1 M Tris·HCl-6 M guanidine·HCl (pH 8.0) 溶液中 dithiothreitol で還元した。この還元条件は、Taylor ら<sup>31)</sup> が天然 EGF のジスルフィド結合の還元開裂に用いた条件と同一である。また、この還元操作は塩基性条件下で行なうため、酸処理に際し可能性のある Ser, Thr 残基での N→O shift<sup>72)</sup> をもどすためにも有効であると考えられる。さらに dithiothreitol 処理によって、もし脱保護時において、Met の S-アルキル化による S-sulfonium 化合物が生成していたとしても、これを Met にもどすことができる。<sup>73)</sup>

ついで、得られた還元 EGF を 2N AcOH を溶出液とする Sephadex G-10 カラムに apply して還元剤を除去した後、目的物を含む画分を氷冷下、蒸留水で 0.07

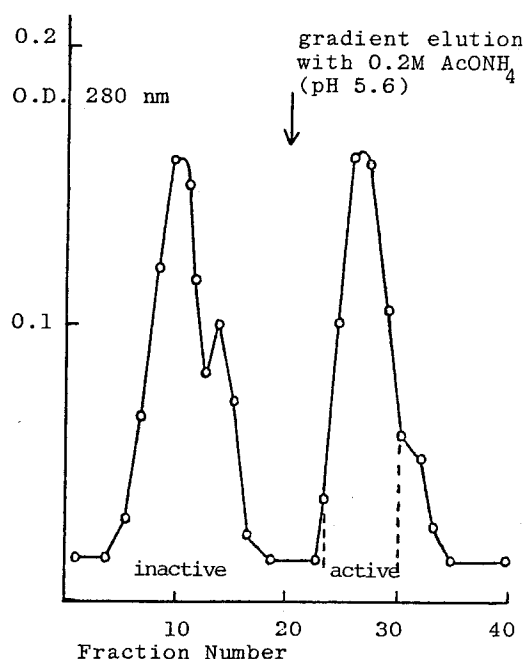
Fig.27. Air-Oxidation of Deprotected EGF



mg/ml のペプチド濃度となるまで希釈した。この希釈液の pH を 28% アンモニア水で 8.2 に調整した後、25°C で 7 日間放置し空気酸化法によるジスルフィド結合形成反応を行なった。反応の進行を Ellman test<sup>74)</sup> で追跡した (Fig. 27-a)。室温 5 日間放置後、Ellman test による 412 nm の吸収は一定値に落ちついたが、酸化反応の完結を期するためさらに 2 日間ゆるやかに攪拌した。7 日間の酸化反応後、反応液は多少白濁し不溶性の polymer の生成が認められた。反応液を凍結乾燥し、残渣に 2N AcOH を加えてこの不溶性 polymer を遠心沈降によって除去した後、上澄液を 2N AcOH を溶出液とする Sephadex G-10 カラムクロマトグラフィーにかけた (Fig. 27-b)。5 日間の酸化反応では目的物ピークの後には 2 つの小さな shoulder ピークが見られたが、7 日間の酸化反応を行なった場合にはほぼ単一の溶出ピークが得られた。

ついで得られた酸化体の精製方法であるが、天然 EGF については、Bio-gel 法、DEAE 法の 2 法が報告されている<sup>32)</sup>。そこで、この 2 法の比較実験を行ない、それぞれの精製効果を disk 等電点電気泳動 (pH 3-10) によって調べたところ、合成品については、DEAE 法が非常に有効であることがわかった。Fig. 28.

Fig. 28. DEAE-Cellulose Purification of Air-Oxidized Product



に DEAE-セルロースイオン交換クロマトグラフィーの溶出パターンを示した。0.02M AcONH<sub>4</sub>, pH 5.6 溶液で溶出される素通り画分は不活性であったが, 0.2 M AcONH<sub>4</sub>, pH 5.6 溶液との gradient 溶出によって活性体が溶出された。この溶出位置は, 報告<sup>32)</sup>に見られる同一条件での天然品の溶出位置とほぼ同じであると判断される。

この DEAE-セルロースによる精製品には, disk 等電点電気泳動 (pH 3-10) による純度検定で多少の不純物の混在が認められたため (Fig. 30-a), さらに Matrisian ら<sup>75)</sup>の方法に従って, Cosmosil 5 C<sub>18</sub>を用いる高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による精製を行なった。溶出液として CH<sub>3</sub>CN/0.05N AcOH-Et<sub>3</sub>N (pH 5.6) = 30/70 を用いた。DEAE により精製した sample は, disk 等電点電気泳動の結果から予想されたごとく, HPLC 上主ピークの後ろに shoulder ピークを与えたが (Fig. 29-a), 主ピーク画分を分取し凍結乾燥することによって, HPLC 上単一ピークを示す (Fig. 29-b) 白色羽毛状粉末を得ることができた。東洋ソーダより購入した天然 EGF は HPLC 上同条件下に多少早く溶出されるように思われたが, ここに得られた合成品を天然 EGF と混合すると HPLC 上単一ピークが得られた (Fig. 29-c)。なお, Fig. 29 の HPLC の溶出パタ

Fig. 29. HPLC of Synthetic EGF on Cosmocil 5C<sub>18</sub>

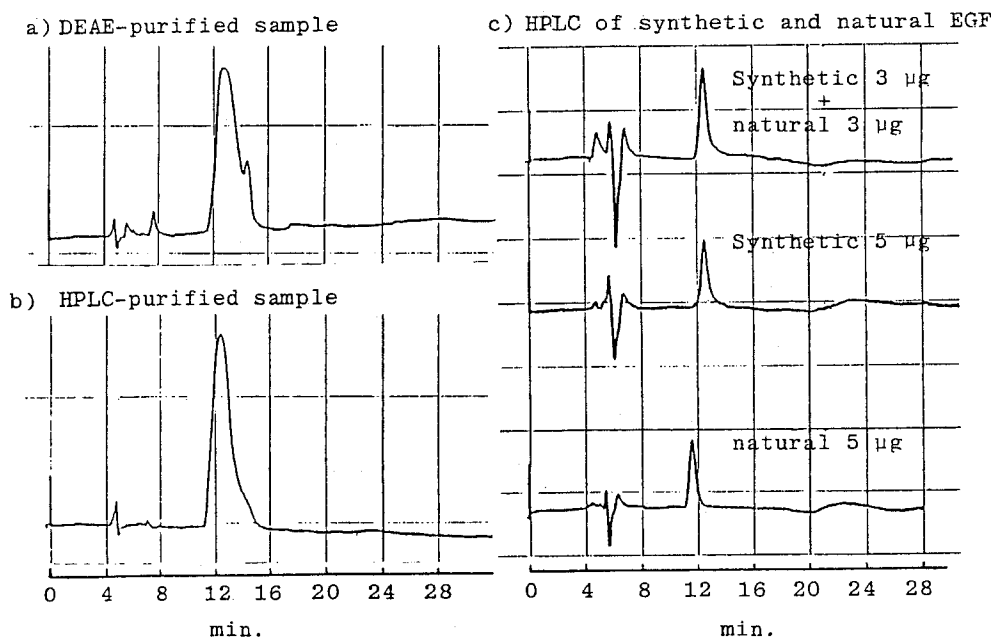
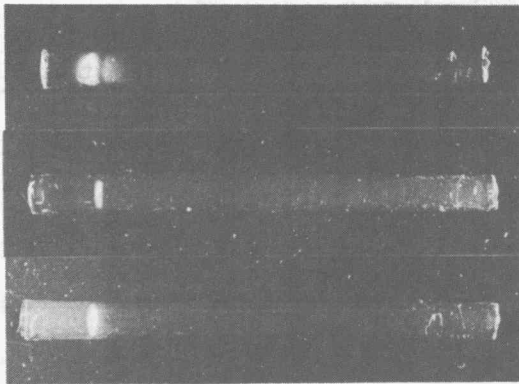


Fig.30.

Disk Isoelectrofocusing of Synthetic EGF

pH 3

pH 10



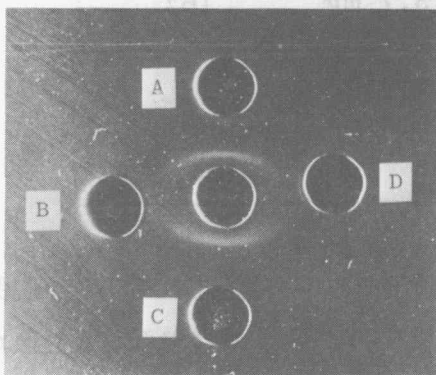
(a) DEAE-purified synthetic EGF

(b) HPLC-purified synthetic EGF

(c) Synthetic EGF + natural EGF

ーン上、溶出時間4～8分に見られるピークは、実験に用いた溶媒の効果によるものである。また、この精製品は、Fig.30-bに示すように disk 等電点電気泳動においても単一のバンドを示し、天然EGFと混合しても単一のバンドが得られた (Fig.30-c)。以上 合成品は、HPLC上、および disk 等電点電気泳動上天然品と同一の挙動を示すことが確認できた。

Fig.31. Immunodiffusion of Synthetic EGF in Agar Gel



A: Synthetic EGF 5µg

C: Synthetic EGF 10µg

B, D: Blank

Central well: Anti EGF sera

また、合成EGFは、Fig.31. に示すごとく、岐阜薬科大学、林教授より御供与いただいた天然EGF抗血清<sup>76)</sup>と明瞭な免疫沈降線を示した。さらに合成品のアミノ酸分析値と280nmにおけるUV吸収係数をTable. 4. に示したが、合成

EGFは、理論値とほぼ一致するアミノ酸組成を示し、その280 nmでの吸収係数も文献値<sup>31)</sup>とほぼ一致する値を示した。

Table. 4.

Amino Acid Ratios and Physical Constants of Synthetic EGF

| Amino Acid Ratios in 6N HCl Hydrolysate of Synthetic EGF |  |
|--|--|
| Asp  | 7.08(7), Thr 2.08(2), Ser 5.32(6), Glu 3.26(3),<br>Pro 2.04(2), Gly 5.71(6), Cys 2.17(3), Val 1.24(2),<br>Met 0.66(1), Ile 1.54(2), Leu 4.00(4), Tyr 4.59(5),<br>Trp*1.05(2), His 0.76(1), Arg 4.11(4). (Recov. 73%) |
| * Trp was determined by 4N MSA hydrolysis                |  |
| U.V.; $E_{1\text{cm}}^{1\%}$                             | (at 280nm) 30.1 (lit. <sup>31</sup> 30.9)  |
| $[\alpha]_D^{20}$  | -105.9° (c=0.2, 2N AcOH)   |

Table. 5.

Deprotection and Purification of Synthetic EGF

| Protected EGF                  | 100 mg | Yield       |
|--------------------------------|--------|-------------|
| Air Oxidation<br>Sephadex G-10 | 23 mg  | 32%         |
| DEAE-cellulose                 | 3.7 mg | 16%         |
| HPLC<br>purification           | 3.0 mg | 80%         |
|                                |        | (o.a. 4.1%) |

Table. 5. に脱保護過程における各精製段階の収率を要約して示した。脱保護過程における overall yield は4.1%にとどまり、収率においては満足な数値が得られなかったが、この収率の低下の最大の原因は、やはり正しいジスルフィド結合の形成段階における困難さにあると判断している。すなわち、一般にジスルフィドの形成は、一次構造に支配されるとはいえ、特にEGFのようなコンパクトな分子におけるジスルフィド形成は困難と判断せざるを得ない。おそらく、

生体内においては前駆体の段階でジスルフィド形成が行なわれ、その後のプロセッシングによって、このようなコンパクトな分子が生合成されるものと思われる。この点で興味あることに、Schragaら<sup>77)</sup>のグルタチオン共存下でのジスルフィド形成法に従って還元EGFの酸化を行なうと、Sephadex G-10によるゲル濾過、DEAE-セルロースによるイオン交換クロマト後の主生成物は、EGF 1分子とグルタチオン2分子の付加体であった。この付加体のヒスタミン刺激による胃酸分泌の抑制活性は、天然品のその約1/5であった。

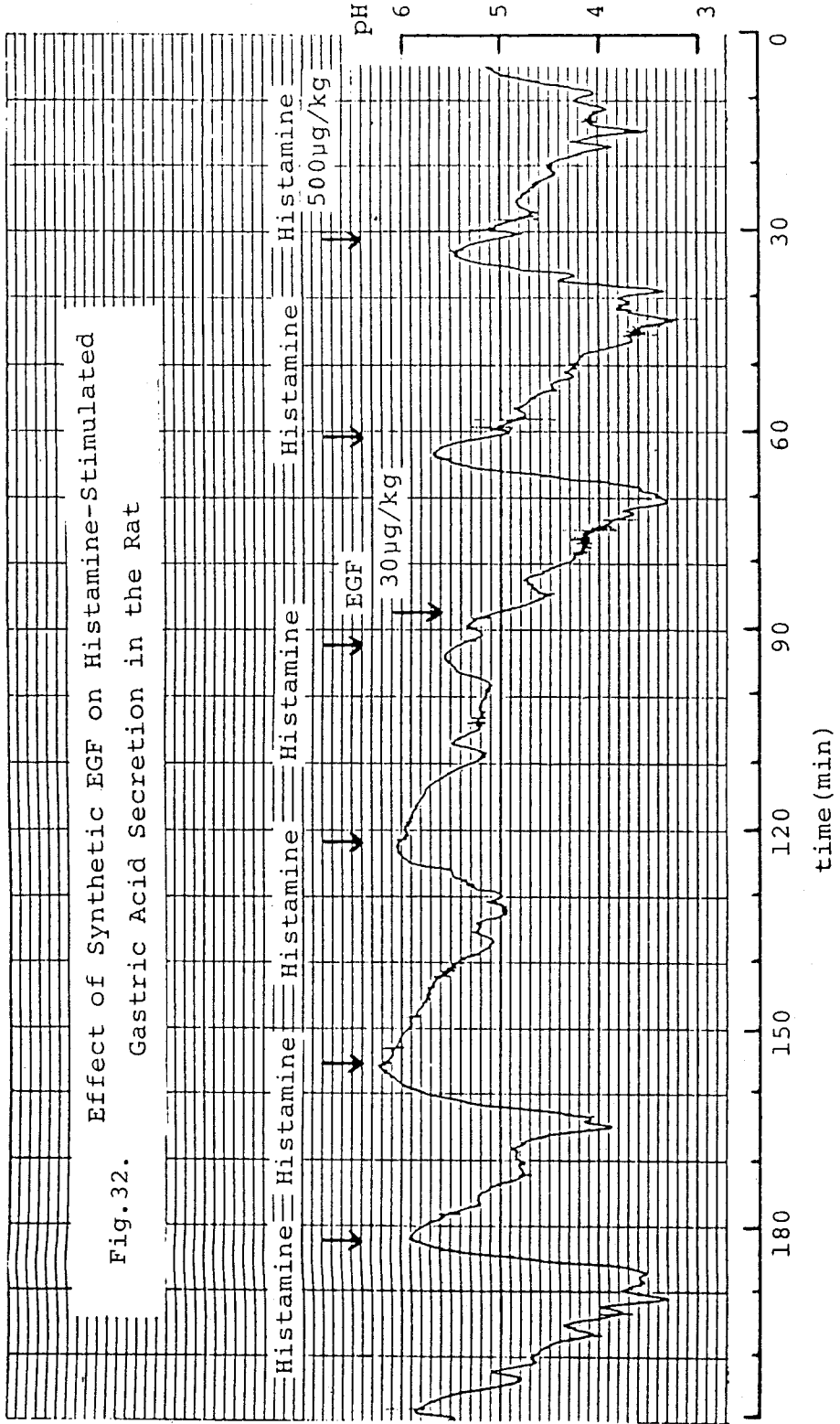
#### 第10項 合成品の生物活性

第9項で得た合成EGFについてShild法<sup>78)</sup>によって、ラット(n=6)におけるヒスタミン(500 µg/kg)刺激による胃酸分泌の抑制活性を調べた。その一例をFig. 32. に示した。

合成EGFは、ヒスタミン刺激による胃酸分泌を100%とした場合、30 µg/kgの投与で、66.5%にまで胃酸分泌を抑制した。天然EGFが、同一条件下16 µg/kg投与で78.8%、30 µg/kg投与で68.6%、64 µg/kg投与で43.8%に胃酸分泌を抑制することから、合成品の胃酸分泌抑制活性は、天然品のそれに匹敵するものであると判断される。

以上ここに著者は、マウスEGFに対応する強力な胃酸分泌抑制活性を有する高純度のトリペントコンタペプチドを合成することができた。

Fig. 32. Effect of Synthetic EGF on Histamine-Stimulated Gastric Acid Secretion in the Rat





## 結 語

著者は、従来知られていなかったS-保護システインスルホキシド体の化学的挙動を解明するとともに、その知見をもとに、マウス上皮細胞増殖因子に対応するトリペントコンタペプチドの最初の全合成を達成することができた。

上述の研究は、特にシステインを含む高級ペプチドの合成化学の発展に資するものがあると考ええる。

## 謝 辞

終りに臨み、本研究に際して終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜った恩師京都大学矢島治明教授に心から感謝の意を表します。

また種々有益な御助言、御鞭撻を賜った長崎大学入江寛教授、京都大学藤井信孝助教授に深く感謝いたします。

さらに実験の一部に協力していただきました京都大学船越奨助手をはじめ京都大学薬学部薬品製造学教室の諸氏に深く感謝いたします。

天然EGFに対する抗血清を御供与いただいた岐阜薬科大学林恭三教授、ならびに合成EGFの胃酸分泌抑制活性を測定していただいた京都大学医学部第一内科森賀本幸講師、日本新薬(株)青柳良明博士に感謝いたします。

Massスペクトルを測定された京都大学秋元直茂助手、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。

# 実 験 の 部

## 実 験 の 部

融点 (mp.) は、柳本微量融点測定器で測定し、すべて未補正。旋光度は Union Automatic Digital Polarimeter PM101 で測定した。ペプチドの加水分解は以下の 3 つの方法、a), b), c) で行ない、酸加水分解物のアミノ酸組成は、Moore ら<sup>10)</sup>の方法に従って Hitachi Amino Acid Analyzer 835 型、あるいは KLA-5 型で測定した。

- a) 6N HCl 加水分解；3 回蒸留した定沸点塩酸 (b.p. 110°C, 6 規定) を使用し、封管中で 110°C, 18-72 時間保った。
- b) 6N HCl-phenol 加水分解；Sanger らの方法<sup>11)</sup>に従って、a) の条件に phenol を添加した。
- c) 4N MSA 加水分解；a), b) いずれの条件下においても Trp はほとんど分解するため検出不可能であるので、Liu らの方法<sup>63)</sup>に従い減圧封管後 110°C, 24 時間保って加水分解し Trp を定量した。

NMR スペクトル測定には、日本電子 JNM-FMX-60 Spectrometer を使用し、tetramethylsilane (TMS) を内部標準として測定した。

Mass スペクトルの測定には、日本電子 JEOL-O1SG-2 Spectrometer を用いた。

薄層クロマトグラフィ (TLC) には Kiesel gel G nach Stahl (Merk 社) を用い、以下の溶媒系 (v/v) で展開した。

- Rf<sub>1</sub> CHCl<sub>3</sub> : MeOH = 10 : 0.5  
Rf<sub>2</sub> CHCl<sub>3</sub> : MeOH : H<sub>2</sub>O = 8 : 3 : 1  
Rf<sub>3</sub> CHCl<sub>3</sub> : MeOH : AcOH = 9 : 1 : 0.5  
Rf<sub>4</sub> CH<sub>3</sub>CN : H<sub>2</sub>O = 3 : 1  
Rf<sub>5</sub> n-BuOH : AcOH : H<sub>2</sub>O = 4 : 1 : 5  
Rf<sub>6</sub> n-BuOH : AcOH : AcOEt : H<sub>2</sub>O = 1 : 1 : 1 : 1  
Rf<sub>7</sub> n-BuOH : AcOH : H<sub>2</sub>O = 10 : 2 : 3  
Rf<sub>8</sub> n-BuOH : AcOH : pyridine : H<sub>2</sub>O = 4 : 1 : 1 : 2

TLC のニンヒドリンによる発色の定量には、Shimadzu Dual-wavelength TLC scanner CS-900, recorder U-225MCS を使用した。

シリカゲルカラムクロマトグラフィには、Kiesel gel 60 (Merk 社) を、

イオン交換カラムクロマトには DEAE-cellulose (Brown 社) を, ゲル濾過カラムクロマトには Sephadex G-10, Sephadex LH-60 (Pharmacia 社) を用い, 東洋科学製フラクシ ョンコレクター SF-200A, あるいは, 大日本精機製フラクシ ョンコレクター DFC-100 で分画し, 吸光度を Hitachi Model 100-20 Spectrometer で測定した。

高速液体クロマトグラフィーには, Waters 社製のクロマトグラフィーを用い, Cosmosil 5 C<sub>18</sub> (4.6×150mm) カラムを使用した。溶出には, CH<sub>3</sub>CN : 0.05 N AcOH-Et<sub>3</sub>N (pH 5.6) = 30 : 70 を用いた。

Disk 等電点電気泳動には, Pharmalyte (Pharmacia 社, pH 3-10) を含む 7.5% ポリアクリルアミドゲルを用い, 200V 定電圧で 4°C, 4 時間泳動した。

天然 EGF (lot. 4112) を, 東洋ソーダ(株)より購入した。

各縮合反応に先だち, N<sup>α</sup> 保護基, Boc 基, あるいは Z(OMe) 基を除去するため, TFA 処理を, アニソールあるいはアニソール-EDT 存在下 0°C で, 特に記載のない限り 1 時間行なった。

DCC, および活性エステル縮合反応を, 室温 (17~25°C) で行なった。

アジド法をすべて Rudinger の変法<sup>52)</sup>に従って行なった。: ヒドラジドを DMF に溶解させ寒剤冷却下 HCl-DMF (2 当量), 続いて IAN (1.1 当量) を加え 15-20 分攪拌し, ヒドラジンテスト<sup>79)</sup> が陰性になった事を確認後, Et<sub>3</sub>N (2 当量) で中和した。この溶液に寒剤で冷却したアミン成分, および Et<sub>3</sub>N (1 当量) を加えた。

混合酸無水物法を Vaughan & Osato の方法<sup>56)</sup>に従って行なった。: carboxyl component を THF に溶解させ, Et<sub>3</sub>N (1 当量) を加えた後, 寒剤冷却下 isobutyl chloroformate (1.1 当量) を加え, 20 分攪拌した。この反応液に寒剤で冷却したアミン成分の DMF 溶液を加えた。

特に記載のない限り, 生成物の精製は以下の 3 つの方法 A.B.C. のいずれかによった。

A 法; AcOEt に易容の保護ペプチドエステルを精製するため, AcOEt 抽出層を 5% クエン酸溶液, 5% NaHCO<sub>3</sub> 溶液, 飽和食塩水で順次洗浄後 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 上乾燥させ濃縮した。残渣を適当な溶媒より再結晶あるいは再沈殿させた。

B 法; AcOEt に難溶の保護ペプチドエステルの精製の場合には, 粗生成物をエーテル-5% クエン酸混液で処理し, 得られる粉末を 5% クエン酸, 5% NaHCO<sub>3</sub>,

H<sub>2</sub>Oで順次バッチ法で洗浄後、適当な溶媒を用いて再結晶，あるいは再沈殿した。

C法；遊離のカルボキシル基をもつ保護ペプチドを精製する場合には，粗生成物を3%アンモニア水に溶解させ，これをAcOEtで洗浄した。水層をクエン酸で酸性とし生ずる粉末（生成物がoilの場合はAcOEtで抽出）を5%クエン酸とH<sub>2</sub>Oで洗浄し，適当な溶媒を用いて再結晶，あるいは再沈殿した。

エーテル，THF，ジオキサン等，過酸化物を含み易い溶媒については，LiAlH<sub>4</sub>を加えて蒸留し，さらにFeSO<sub>4</sub>を加え，窒素ガスで封じたものを使用した。

## 第 1 章に関する実験

### 第 1 節に関する実験

#### (1) Z(OMe)-Cys(MBzl)(O)-OH

Z(OMe)-Cys(MBzl)-OH (3.95 g, 9.8 mmol) を AcOEt (40 ml) に溶解し、 $\text{NaBO}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (1.65 g, 1.1 equiv.) の  $\text{H}_2\text{O}$  (20 ml) 溶液を加え、室温で一晩攪拌した。これにクエン酸を加えて酸性にし、析出した沈殿を濾取し、 $\text{H}_2\text{O}$ -NaCl で洗浄した。濾液の AcOEt 層を、5% クエン酸、 $\text{H}_2\text{O}$ -NaCl で順次洗浄後、 $\text{Na}_2\text{SO}_4$  で乾燥し濃縮乾固した。この固体残渣と先に得られた沈殿物を合わせ、THF と ether で再結晶した。

収量 3.43 g (84%), mp. 148–151°C

$[\alpha]_D^{22}$  -72.8° (c = 1.1, DMF). Rf<sub>2</sub> 0.34, Rf<sub>3</sub> 0.59

Anal. Calcd. for  $\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{NO}_7\text{S}$ :

C, 56.99; H, 5.50; N, 3.32.

Found: C, 56.89; H, 5.53; N, 3.33.

#### (2) Boc-Cys(MBzl)(O)-OH

Boc-Cys(MBzl)-OH より上記と同様に反応、処理して目的物を得た。

収量 73%, mp. 176–177°C

$[\alpha]_D^{22}$  -71.6° (c = 1.4, DMF), Rf<sub>3</sub> 0.43

Anal. Calcd. for  $\text{C}_{16}\text{H}_{23}\text{NO}_6\text{S}$ :

C, 53.76; H, 6.49; N, 3.92.

Found: C, 53.93; H, 6.58; N, 3.67.

#### (3) Z-Cys(MBzl)(O)-OH

Z-Cys(MBzl)-OH より上記と同様に反応、処理して目的物を得た。

収量 73%, mp. 133–135°C

$[\alpha]_D^{22}$  -54.1° (c = 1.0, DMF), Rf<sub>3</sub> 0.38

Anal. Calcd. for  $\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{NO}_6\text{S} \cdot \text{H}_2\text{O}$ :

C, 55.73; H, 5.66; N, 3.42.

Found: C, 55.67; H, 5.45; N, 3.33.

#### (4) H-Cys(MBzl)(O)-OH

Z(OMe)-Cys(MBzl)(O)-OH (3.03 g, 7.2 mmol) を氷冷下 60 分、TFA-

anisole (6 ml-1.6 ml) で処理した。これに, dry ether を加え, 得られた粉末を 5% NH<sub>4</sub>OH に溶解し, 1 N HCl で pH 6 に調整したところ, 白色沈殿を得た。これを 5% NH<sub>4</sub>OH に溶かし, ついで 1 N HCl で pH 6 に調整し析出させた。

収量 1.48 g (80%), mp. 176-177°C

$[\alpha]_D^{22} + 6.7^\circ$  (c = 0.7, 50% AcOH), Rf<sub>4</sub> 0.47.

<sup>1</sup>H-NMR (CF<sub>3</sub>COOD): δ 3.72 (2H, d, β-CH<sub>2</sub>), 3.97 (3H, s, OMe), 4.47 (2H, s, benzyl CH<sub>2</sub>), 5.02 (1H, t, α-CH), 7.14 (2H, d, aromatic H), 7.44 (2H, d, aromatic H).

Anal. Calcd. for C<sub>11</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>4</sub>S:

C, 51.34 ; H, 5.88 ; N, 5.44.

Found : C, 51.55 ; H, 5.88 ; N, 5.33.

#### (5) S-p-Methoxyphenylcysteine

(a) H-Cys (MBzl) (O)-OH の HF-anisole による処理

H-Cys (MBzl) (O)-OH (105 mg) を氷冷下 45 分, HF-anisole [ 4 ml-1 ml (25 equiv.) ] で処理後, 過剰の HF を留去し, 残渣に ether を加えたところ沈殿が析出した。これを濾取し, H<sub>2</sub>O (4 ml) に溶解し, dil. NH<sub>4</sub>OH を加えて pH 6 に調整すると, 白色沈殿が析出した。これを濾取し H<sub>2</sub>O で洗浄した。

収量 47 mg (54%), mp. 189-190°C

$[\alpha]_D^{22} + 11.8^\circ$  (c = 0.5, 50% AcOH). Rf<sub>4</sub> 0.59

<sup>1</sup>H-NMR (CF<sub>3</sub>COOD): δ 3.62 (2H, d, β-CH<sub>2</sub>), 3.96 (3H, s, OMe), 4.48 (1H, t, α-CH), 7.06 (2H, d, aromatic H), 7.51 (2H, d, aromatic H).

Anal. Calcd. for C<sub>10</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>3</sub>S:

C, 52.84 ; H, 5.77 ; N, 6.16 ; S, 14.11.

Found : C, 53.12 ; H, 5.90 ; N, 5.93 ; S, 13.83.

(b) Z (OMe)-Cys (MBzl) (O)-OH の MSA-anisole による処理

Z (OMe)-Cys (MBzl) (O)-OH (3.43 g) を anisole (3.5 ml, 4 equiv.) の存在下 MSA (14 ml) で, 室温で 60 min 処理後 dry ether を加えると, 油状物質が生成した。これを ether で洗浄し水に溶解後, Et<sub>3</sub>N を加えて中和すると白色沈殿が得られた。これを濾取し n-BuOH-AcOH-H<sub>2</sub>O (4:1:5) の上層で洗浄した。

収量 0.77 g (42%), mp. 189-190°C



$[\alpha]_D^{22} + 10.6^\circ$  ( $c = 0.4$ , 50% AcOH),  $R_f 0.59$ .

$^1\text{H-NMR}$ : (a)の方法で得られた化合物と一致した。

アミノ酸分析計 short column の溶出時間: 38 分

## (6) S-p-Hydroxyphenylcysteine

(a) Z(OMe)-Cys(MBzl)(O)-OH の MSA-phenol による処理

Z(OMe)-Cys(MBzl)(O)-OH (420 mg) を phenol (370 mg, 4equiv.) の存在下 MSA (0.8 ml) で、氷冷下で 15 分、室温で 45 分処理後 dry ether を加えた。生成した油状物を  $\text{H}_2\text{O}$  (2 ml) に溶解し 5%  $\text{NH}_4\text{OH}$  を加えて中和し、ゴム状沈殿物を得た。この沈殿物に EtOH を加え、固体を得た。( $R_f 0.44$ ; main, 0.51; faint)。この物質を Sephadex G-15 を用いる分配クロマトグラフィ<sup>80)</sup> に付し、 $n\text{-BuOH-AcOH-H}_2\text{O}$  (4:1:5) で溶出し、 $R_f 0.44$  の物質を含むフラクションを集め濃縮した。残渣を EtOH で再結晶した。

収量 100 mg (47%), mp. 199–201°C

$[\alpha]_D^{22} + 7.8^\circ$  ( $c = 0.4$ , 50% AcOH),  $R_f 0.44$ .  $R_f 0.51$ .

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CF}_3\text{COOD}$ ):  $\delta$  3.59 (2H, d,  $\beta\text{-CH}_2$ ), 4.47 (1H, t,  $\alpha\text{-CH}$ ),

7.00 (2H, d, aromatic H), 7.52 (2H, d, aromatic H).

Anal. Calcd. for  $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{NO}_3\text{S}$ :

C, 50.69; H, 5.20; N, 6.57.

Found: C, 50.54; H, 5.13; N, 6.29.

(b) Z(OMe)-Cys(MBzl)(O)-OH の HF-phenol による処理

Z(OMe)-Cys(MBzl)(O)-OH (420 mg) を, phenol (370 mg, 4 equiv.) の存在下, S-p-methoxyphenylcysteine の場合と同様に HF で処理し, 得られた反応産物を上記(a)と同様に精製し, 単離した。

収量 89 mg (42%),

$^1\text{H-NMR}$ : (a)の方法で得られた化合物と一致した。

アミノ酸分析計 short column の溶出時間: 26 分

## (7) S-p-Methoxyphenylcysteine の 6N HCl による加水分解

S-p-Methoxyphenylcysteine (258 mg) に 6N HCl を加え 110°C で 24 時間, 封管中で反応した。溶媒を留去し, 残渣を 5%  $\text{NH}_4\text{OH}$  で中和したところ, 白色沈殿を得た。これを 50% MeOH, 次いで EtOH で再結晶した。

収量 70 mg (29%), mp 196–200°C

この化合物を、 $^1\text{H-NMR}$  スペクトルの比較により、S-p-hydroxyphenylcysteine と同定した。

**(8) H-Cys(MBzl)(O)-OH の 6N HCl または 3N p-Toluenesulfonic Acid による加水分解**

H-Cys(MBzl)(O)-OH (1.12 mg) を 6N HCl (1 ml) で、 $110^\circ\text{C}$  20 時間加水分解し、得られた加水分解物をアミノ酸分析した。

cysteic acid ; 12.9%, cysteine+cystine ; 82.1% 回収

3N p-Toluenesulfonic acid を用いた場合 :

cysteic acid ; 5.8%, cysteine+cystine ; 94.2% 回収。

**(9) Z(OMe)-Cys(MBzl)(O)-OH の 6N HCl-phenol による加水分解**

Z(OMe)-Cys(MBzl)(O)-OH (1.4 mg) を phenol (1.2 mg, 4 equiv.) の存在下、 $110^\circ\text{C}$  で 24 時間、6N HCl (1 ml) で加水分解した。得られた加水分解物をアミノ酸分析したところ、次の諸ピークが検出されたが定量はできなかった。

short column : 26 min (S-p-hydroxyphenylcysteine )

long column : 28 min (cysteic acid ), 114 min (cystine)

**(10) Cystine の 6N HCl-phenol による加水分解**

Cystine (8 mg) を、phenol (15 mg, 4 equiv.) 存在下 6N HCl (2 ml) で加水分解し、得られた加水分解物をアミノ酸分析した。

short column : 26 min (5.8%, S-p-hydroxyphenylcysteine)

long column : 114 min (92.4%, cystine)

**(11) Z(OMe)-Cys(MBzl)(O)-OH の液体アンモニア中の金属ナトリウムによる処理**

Z(OMe)-Cys(MBzl)(O)-OH (99 mg, 0.24 mmol) を液体アンモニアに溶解し、金属ナトリウム (22 mg, 4 equiv.) を 10 秒間青色が消えなくなるまで、加えた。NH<sub>4</sub>Cl (10 mg) を加えた後、アンモニアを蒸発させ残渣をアミノ酸分析した。

long column : 28 min (未同定, 小ピーク, cysteic acid?)

114 min (68%, cystine)

**(12) Z(OMe)-Cys(Bzl)(O)-OH**

Z(OMe)-Cys(Bzl)-OH (17.39 g, 46 mmol) を AcOEt (170 ml) に溶解し、NaBO<sub>3</sub>·4H<sub>2</sub>O (7.84 g, 1.1 equiv.) の H<sub>2</sub>O (85 ml) 溶液を加え、室温で一晩攪

拌した。これに 5%クエン酸を加えて酸性とし AcOEt で抽出した。AcOEt 層を、5%クエン酸、H<sub>2</sub>O-NaCl で順次洗浄し、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> で乾燥後濃縮した。残渣に ether を加えて沈殿を得、MeOH と ether で再結晶した。

収量 13.01 g (71%), mp. 161-163°C

$[\alpha]_D^{22}$  -19.8° (c=0.8, DMF), Rf<sub>3</sub> 0.42.

Anal. Calcd. for C<sub>19</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>6</sub>S:

C, 58.30 ; H, 5.41 ; N, 3.58.

Found : C, 58.06 ; H, 5.35 ; N, 3.60.

### (13) Boc-Cys(Bzl)(O)-OH

Boc-Cys(Bzl)-OH より上記と同様に反応、処理して目的物を得た。

収量 70%, mp. 176-177°C

$[\alpha]_D^{22}$  -40.8° (c=1.1, DMF), Rf<sub>3</sub> 0.37.

Anal. Calcd. for C<sub>15</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>5</sub>S:

C, 55.03 ; H, 6.47 ; N, 4.28.

Found : C, 55.22 ; H, 6.56 ; N, 4.18.

### (14) Z-Cys(Bzl)(O)-OH

Z-Cys(Bzl)-OH より上記と同様に反応、処理して目的物を得た。

収量 76%, mp. 161-163°C

$[\alpha]_D^{22}$  -46.7° (c=0.8, DMF), Rf<sub>3</sub> 0.47,

Anal. Calcd. for C<sub>18</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>5</sub>S:

C, 59.82 ; H, 5.30 ; N, 3.88.

Found : C, 60.03 ; H, 5.51 ; N, 4.02.

### (15) H-Cys(Bzl)(O)-OH

Z(OMe)-Cys(Bzl)(O)-OH(9.07g) を氷冷下 60 分、TFA-anisole (20 ml-5 ml) で処理後、dry ether を加え、沈殿を得た。これを H<sub>2</sub>O (20 ml) に溶解し、5% NH<sub>4</sub>OH で pH 6 に調整した。得られた結晶を濾取し、5% NH<sub>4</sub>OH-1N HCl から再沈殿した。

収率 3.43 g (65%), mp. 170-171°C

$[\alpha]_D^{22}$  -24.7° (c=0.8, 50% AcOH). Rf<sub>4</sub> 0.57.

Anal. Calcd. for C<sub>10</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>3</sub>S:

C, 52.84 ; H, 5.77 ; N, 6.16.

Found : C, 53.02 ; H, 5.76 ; N, 6.17.

#### (16) H-Cys(Bzl)(O)-OHのHF処理

H-Cys(Bzl)(O)-OH(102mg, 0.45mmol)をanisole(1.2ml, 25equiv.)の存在下, 氷冷下45分HF(約5ml)で処理した。過剰のHFを留去し, 残渣をetherで洗浄した後H<sub>2</sub>Oに溶解させた。この水溶液のpHを5%NH<sub>4</sub>OHで6に調整し, 生ずる白色沈殿を濾取した。

収量 77mg(回収率75%),

mp. 170-172°C, R<sub>f</sub> 0.57

アミノ酸分析計 long column での溶出時間:

127分(H-Cys(MBzl)(O)-OHの標品と同一)

母液をアミノ酸分析計にかけると long column 119分に未知ピークが検出された。

#### (17) H-Cys(Bzl)(O)-OHのMSA処理

H-Cys(Bzl)(O)-OH(239mg, 1.05mmol)をanisole(1.1ml, 10equiv.)の存在下, MSA(5.7ml)で, 氷冷下15分, 室温で60分処理した。反応液にdry etherを加え, 生ずる残渣oilをH<sub>2</sub>Oに溶解させ, そのpHを5%NH<sub>4</sub>OHにて6に調整した。生成する粉末(194mg, 81%)のR<sub>f</sub>値(0.57)は出発物質と同一であった。

#### (18) Z(OMe)-Cys(Bzl)(O)-OHの6N HClによる加水分解

加水分解物をアミノ酸分析計にかけると, cysteic acid(0.5%), cystine(21.1%), および大量のアンモニアが検出された。

#### (19) H-Cys(Bzl)(O)-OHの液体アンモニア中金属ナトリウム処理

H-Cys(Bzl)(O)-OH(313mg)を液体アンモニア(約30ml)中金属ナトリウム(約300mg)で, 溶液の青色が5秒間持続するまで処理した。反応液にNH<sub>4</sub>Cl(20mg)を加えた後, アンモニアを蒸発させ, 残渣をH<sub>2</sub>Oに溶解させた。この水溶液をアミノ酸分析計にかけたところ, cystine(114分, 56.5%)とcysteine(90分, 4%)が検出された。水溶液中少量の不溶物が認められた。

#### (20) 保護システインスルホキシドの種々のチオール化合物による還元

Z(OMe)-Cys(MBzl)(O)-OH, およびZ(OMe)-Cys(Bzl)(O)-OH(各100mg)をDMF(1ml)中種々の還元剤(10equiv.)の存在下, 70°Cでインキュベートした。経時的にサンプリングし, CHCl<sub>3</sub>-MeOH-AcOH(9:1:0.5)系を展開

溶媒とする TLC を行ないニンヒドリン発色後、島津二波長クロマトスキャナーを用いて定量した。結果を Table. 1 に示した。DMF 中での Z(OMe)-Met(O)-OH の還元、および H<sub>2</sub>O 中での H-Met(O)-OH の還元を比較のため同時に行なった。

#### (21) Z(OMe)-Cys(MBzl)(O)-OH の thiophenol による還元

Z(OMe)-Cys(MBzl)(O)-OH (2.08 g, 4.8 mmol) を DMF (10 ml) に溶解させ、thiophenol (9.8 ml, 20 equiv.) を加えて 85°C で 6 時間加熱した。TLC 上出発物質は消失し、R<sub>f</sub> 0.62 に新しい spot が認められた。溶媒を留去し、残渣を 5% NH<sub>4</sub>OH に溶解させ、その水層を ether で洗浄した。水層を 5% クエン酸で酸性とし、生ずる沈殿を AcOEt 抽出した。この AcOEt 層を H<sub>2</sub>O-NaCl で洗浄後、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 上乾燥させ AcOEt を留去した。残渣を n-hexane より粉末とし、これを、AcOEt-n-hexane で再結晶した。得られた結晶は Z(OMe)-Cys(MBzl)-OH の標品と一致した。

収量 1.86 g (97%), mp. 78-80°C

$[\alpha]_D^{22}$  -36.9° (c=1.0, MeOH)

R<sub>f</sub> 0.62, R<sub>f</sub> 0.72

Anal. Calcd. for C<sub>20</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>6</sub>S:

C, 59.24; H, 5.72; N, 3.45.

Found: C, 59.15; H, 5.62; N, 3.41.

### 第 2 節に関する実験

#### (1) Boc-Cys(Acm)(O)-OH

Boc-Cys(Acm)-OH (4.0 g, 13.7 mmol) を AcOEt (30 ml) に溶解し、NaBO<sub>3</sub>·4H<sub>2</sub>O (2.32 g, 1.1 equiv.) の H<sub>2</sub>O (10 ml) 溶液を加え、室温で一晩攪拌した。TLC 上原料の消失を確認した後、水層と AcOEt 層とを分離し、水層を AcOEt で洗浄後、クエン酸を加え酸性とした。この際、沈殿は得られず、有機溶媒で目的のスルホキッドを抽出することも成功しなかった。水層を 2 日間、4°C で放置したところ結晶を得、MeOH と EtOH から 2 回再結晶をくり返した。

単離収量 1.79 g (42%), mp. 159.5-161°C

$[\alpha]_D^{18}$  -46.3° (c=1.1, MeOH), R<sub>f</sub> 0.20

Anal. Calcd. for  $C_{11}H_{20}N_2O_6S$ :

C, 42.84 ; H, 6.54 ; N, 9.09 .

Found : C, 42.58 ; H, 6.69 ; N, 8.91 .

## (2) H-Cys(Acm)(O)-OH

Boc-Cys(Acm)(O)-OH(400 mg, 1.3 mmol) を TFA-anisole (1.1 ml-0.3 ml) で,  $0^{\circ}C$ , 60 分間処理した。過剰の TFA を留去後 dry ether を加え, 沈殿を得た。これを濾取し,  $H_2O$  (3 ml) に溶解し,  $Et_3N$  で中和した後溶媒を留去し, 残渣に EtOH を加え, 2 回再結晶をくり返した。

収量 167 mg (62%), mp.  $168^{\circ}C$  以上分解

$[\alpha]_D^{18}$   $-9.4^{\circ}$  ( $c=0.9, H_2O$ ),  $Rf_6$  0.34,  $Rf_7$  0.24,  $Rf_8$  0.29 .

アミノ酸分析計 long column の溶出時間 : 49 分

Anal. Calcd. for  $C_6H_{12}N_2O_4S \cdot \frac{1}{4} H_2O$ :

C, 33.87 ; H, 5.92 ; N, 13.17 .

Found : C, 34.01 ; H, 5.92 ; N, 13.20 .

## (3) H-Cys(Acm)(O)-OH の酢酸水銀処理

Veber ら<sup>25)</sup> の方法に従い処理した。すなわち, H-Cys(Acm)(O)-OH (100 mg, 0.48 mmol) を  $H_2O$  (10 ml) に溶解し, AcOH を加えて pH 4.0 に調整した。これに酢酸第二水銀 (153 mg, 0.48 mmol) を加え, pH 4.0 に調整した後, 室温で 60 分攪拌した。TLC 上変化は認められなかった ( $Rf_7$  0.24)。これをアミノ酸分析したところ, cysteine および cystine は検出されなかった。

## (4) H-Cys(Acm)(O)-OH のヨウ素による処理

Kamber<sup>26)</sup> の方法に従って, H-Cys(Acm)(O)-OH (50 mg, 0.24 mmol) を  $H_2O$ -MeOH (1:1, 4 ml) に溶解し,  $I_2$  (76 mg, 2.5 equiv.) の MeOH (2.4 ml) 溶液を  $20^{\circ}C$  で攪拌しながら 30 分にわたり滴下した。45 分間攪拌を続けたが TLC 上, 何の変化も認められなかった ( $Rf_6$  0.34,  $Rf_7$  0.29)。これをアミノ酸分析したところ, cysteine および cystine は検出されなかった。

## (5) Boc-Cys(Acm)(O)-OH の HF による処理

Boc-Cys(Acm)(O)-OH (500 mg, 1.62 mmol) に anisole (0.35 ml, 2 equiv.) の存在下, HF (4 ml) を加え  $-5^{\circ}C$  で 60 分間反応した。過剰の HF を留去後, 残渣を ether で洗浄し,  $H_2O$  (5 ml) に溶解した。この溶液に 5%  $NH_4OH$  を加えて pH 7.0 に調整し, 島津 2 波長 TLC スキャナーで調べたところ, 3 化合

物が検出された。1つは  $R_f$  0.63 (72.5%, 単離方法は以下に述べる) に, 1つは,  $R_f$  0.52 (8.4%, 同定せず), 残る1つは  $R_f$  0.23 (10%, H-Cys(Acm)(O)-OH) に認められた。この溶液を一晩 4°C で放置し, 析出した粉末をろ取り, n-BuOH-AcOH-H<sub>2</sub>O (4:1:5) の上層で洗浄後 40% AcOH で再結晶し,  $R_f$  0.63 の化合物を単離した。

収量 100 mg (27%), mp. 190-192°C

$[\alpha]_D^{18} + 10.1^\circ$  ( $c = 0.6$ , 50% AcOH),  $R_f$  0.63,  $R_f$  0.59.

<sup>1</sup>H-NMR (CF<sub>3</sub>COOD):  $\delta$  3.60 (2H, d,  $\beta$ -CH<sub>2</sub>), 3.96 (3H, s, OMe), 4.45 (1H, t,  $\alpha$ -CH), 7.03 (2H, d, aromatic H), 7.55 (2H, d, aromatic H)

これらスペクトルデータより, この化合物を, S-p-methoxyphenylcysteine と同定した。

アミノ酸分析計 short column の溶出時間: 38 分

Anal. Calcd. for C<sub>10</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>3</sub>S:

C, 52.84; H, 5.77; N, 6.16.

Found: C, 52.58; H, 5.80; N, 5.90.

#### (6) Boc-Cys(Acm)(O)-OH の MSA による処理

Boc-Cys(Acm)(O)-OH (800 mg, 2.60 mmol) に, anisole (0.56 ml, 2 equiv.) の存在下 MSA (2.3 ml) を加え, 20°C, 80 分反応した後, dry ether を加えて得られた沈殿を H<sub>2</sub>O (7 ml) に溶解した。この溶液を, TLC, およびアミノ酸分析計に付したところ 3 つの化合物が検出された。 $R_f$  0.63 (short column からの溶出時間, 38 分) の化合物は, S-p-methoxyphenylcysteine と同定した。 $R_f$  0.52 の化合物は未同定。 $R_f$  0.36 (47.6%, long column からの溶出時間, 116 分) は cystine と同定した。

#### (7) H-Cys(Acm)(O)-OH の液体アンモニア中金属ナトリウムによる処理

H-Cys(Acm)(O)-OH (40 mg, 0.19 mmol) を, 液体アンモニア (5 ml) に溶解し, 金属ナトリウム (18 mg, 4 equiv.) を 10 秒間, 青色が消えなくなるまで加えた。これに NH<sub>4</sub>Cl (10 mg) を加え, アンモニアを蒸発させ残渣をアミノ酸分析した。long column を用い, 次の諸ピークが認められた。30 分 (cysteic acid, 19%), 49 分 (H-Cys(Acm)(O)-OH, 少量), 56 分 (H-Cys(Acm)-OH, 21%), 62 分 (未知, 少量), 77 分 (未知, 少量), 99 分 (cysteine, 少量), 106 分 (未知, 少量), 116 分 (cystine, 10%)。

**(8) Boc-Cys(Acm)(O)-OH の 6N HCl による加水分解**

Boc-Cys(Acm)(O)-OH(0.198mg) に 6N HCl(1ml) を加え、封管中、110°C, 24時間、加水分解を行ない、アミノ酸分析した。long column で、溶出時間 116 分 (cystine) にのみ少量のピークが検出された。

**(9) Boc-Cys(Acm)(O)-OH の phenol 存在下の 6N HCl による加水分解**

Boc-Cys(Acm)(O)-OH(0.248mg) を phenol (0.3 mg, 4 equiv.) の存在下、6N HCl(1ml) 中で、110°C, 24時間、加水分解した。アミノ酸分析したところ、次のピークが検出された。

short column : 26 min (41%, S-p-hydroxyphenylcysteine)

long column : 116 min (16%, cystine)

**(10) Boc-Cys(Acm)(O)-OH の thiophenol による処理**

Boc-Cys(Acm)(O)-OH(200 mg, 0.65 mmol) の DMF 溶液を thiophenol (1.33 ml, 20 equiv.) で、80°C, 12時間処理した。この際、TLC 上では、原料の消失と共に、Ce(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> に感応する 2 つの新しい spots (R<sub>f1</sub> 0.32, R<sub>f1</sub> 0.48) が認められた。反応液の溶媒を留去し、残渣を ether に溶解させ H<sub>2</sub>O で洗浄後、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> で乾燥し、濃縮した。得られた残渣を少量の CHCl<sub>3</sub> に溶解し、シリカゲルカラムクロマトグラフィ (1.8×19 cm) に付し、CHCl<sub>3</sub>(100ml), CHCl<sub>3</sub>-MeOH(20:0.5 v/v, 50ml), CHCl<sub>3</sub>-MeOH(10:0.5, 150ml) で順次溶出し、2 つの新化合物を単離した。

R<sub>f1</sub> 0.48 の化合物 ; acetamidomethylphenylsulfide (oil)

収量 35 mg (30%), MS m/e : 181 (M<sup>+</sup>, C<sub>9</sub>H<sub>11</sub>NOS)

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 1.90 (3H, s, Me), 4.62 (2H, d, CH<sub>2</sub>), 7.16-7.45 (5H, aromatic H)

R<sub>f1</sub> 0.32 の化合物 ; N<sup>α</sup>-Boc-S-(phenylthio) cysteine (oil)

収量 44 mg (22%), MS m/e : 329 (M<sup>+</sup>, C<sub>14</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>4</sub>S<sub>2</sub>)

[α]<sub>D</sub><sup>18</sup> -14.8° (c = 1.6, CHCl<sub>3</sub>),

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 1.43 (9H, s, Boc), 3.18 (2H, d, β-CH<sub>2</sub>), 4.56 (1H, m, α-CH), 7.19-7.69 (5H, m, aromatic H)



## 第 2 章に関する実験

### 第 2 節に関する実験

#### (1) Z(OMe)-Arg(Mts)-OBzl

Z(OMe)-Arg(Mts)-OH<sup>71)</sup> [20.29 g (32.7 mmol) の CHA 塩から調製] に DC HA (9.1 ml, 45.7 mmol) と benzylbromide (5.4 ml, 45.7 mmol) を加え、室温で 24 時間攪拌し、エステル化した。反応液を濃縮し、残渣を A 法により精製後、AcOEt-isopropyl ether で再結晶した。

収量 19.12 g (96%), mp. 50~52°C

$[\alpha]_D^{20} +1.4^\circ$  (c=0.7, MeOH), Rf<sub>1</sub> 0.38.

Anal. Calcd. for C<sub>31</sub>H<sub>38</sub>N<sub>4</sub>O<sub>7</sub>S :

C, 60.96 ; H, 6.27 ; N, 9.17.

Found : C, 61.06 ; H, 6.32 ; N, 8.88.

#### (2) Z(OMe)-Leu-Arg(Mts)-OBzl

Z(OMe)-Arg(Mts)-OBzl (18.55 g, 30.4 mmol) に anisole (9.9 ml) を加え、氷冷下 60 分 TFA (39.5 ml) 処理後、過剰の TFA を減圧留去し、n-hexane を加えると oil 状の物質が得られた。これを KOH 上 3 時間減圧乾燥後 DMF (50 ml) に溶解し、Et<sub>3</sub>N (4.3 ml, 30.4 mmol) を加えて中和し、続けて、Z(OMe)-Leu-OH·DCHA 塩 (17.37 g, 36.4 mmol) から調製した Z(OMe)-Leu-OH の混合酸無水物を加え、氷冷下 4 時間攪拌した。この反応液を濃縮後、A 法により精製し AcOEt-isopropyl ether から再結晶した。

収量 20.53 g (93%), mp. 60-62°C

$[\alpha]_D^{20} -9.0^\circ$  (c=0.6, MeOH), Rf<sub>1</sub> 0.52.

Anal. Calcd. for C<sub>37</sub>H<sub>49</sub>O<sub>5</sub>N<sub>8</sub>S :

C, 61.39 ; H, 6.82 ; N, 9.68.

Found : C, 61.51 ; H, 7.12 ; N, 9.48.

#### (3) Z(OMe)-Glu(OBzl)-Leu-Arg(Mts)-OBzl [1]

Z(OMe)-Leu-Arg(Mts)-OBzl (19.34 g, 26.7 mmol) を、TFA-anisole (46 ml-11.6 ml) で処理し、過剰の TFA を減圧留去後、その残渣に n-hexane を加えると沈殿が得られた。これを濾取し、KOH 上 4 時間減圧乾燥し、DMF (100 ml) に溶解し、Et<sub>3</sub>N (7.4 ml, 53.4 mmol) と Z(OMe)-Glu(OBzl)-

ONp (15.35 g, 29.4 mmol) を加えて室温で 24 時間攪拌した。溶媒留去後、残渣を A 法により精製し、AcOEt と isopropyl ether から再結晶した。

収量 22.20 g (88%), mp. 71–73°C

$[\alpha]_D^{26}$   $-6.5^\circ$  ( $c=0.5$ , MeOH),  $Rf_1$  0.40.

6 N HCl 酸分解後のアミノ酸分析値:

Glu 1.05, Leu 1.00, Arg 1.01 (Leu の回収率, 97%)

Anal. Calcd. for  $C_{49}H_{62}N_6O_{11}S$ :

C, 62.40; H, 6.63; N, 8.91.

Found: C, 62.56; H, 6.69; N, 8.67.

#### (4) Boc-Trp-Trp-OH · DCHA [2]

Boc-Trp-ONp (15.41 g, 36.2 mmol) を THF (50 ml) に溶解し、H-Trp-OH (18.49 g, 90.5 mmol) の  $H_2O$  (100 ml) 溶液と、 $Et_3N$  (17.7 ml, 126.4 mmol) を加え、室温で 12 時間攪拌した。溶媒を留去し、残渣を C 法により精製後、その DCHA 塩に誘導した。この DCHA 塩を AcOEt と isopropylether で再結晶した。

収量 18.98 g (78%), mp. 183–185°C

$[\alpha]_D^{26}$   $-3.6^\circ$  ( $c=0.6$ , MeOH),  $Rf_3$  0.59.

Anal. Calcd. for  $C_{39}H_{53}N_5O_5$ :

C, 69.72; H, 7.95; N, 10.42.

Found: C, 70.00; H, 7.97; N, 10.39.

#### (5) Z(OMe)-Leu-Arg(Mts)-NHNH-Troc

Z(OMe)-Arg(Mts)-NHNH-Troc<sup>67)</sup> (13.84 g, 19.5 mmol) を TFA-anisole (31.6 ml–6.3 ml) で処理後、過剰の TFA を減圧留去した。残渣に n-hexane を加えたところゴム状物質を得た。これを KOH 上 3 時間減圧乾燥後、DMF (70 ml) に溶解し、 $Et_3N$  (5.4 ml, 39 mmol) と Z(OMe)-Leu-ONp (8.12 g, 19.5 mmol) を加え、室温で 24 時間攪拌した。反応液を減圧濃縮後、残渣を方法 A により精製し ether を加えると結晶が析出した。これを AcOEt と ether で再結晶した。

収量 11.23 g (70%), mp. 104–107°C

$[\alpha]_D^{20}$   $-24.6^\circ$  ( $c=0.6$ , MeOH),  $Rf_1$  0.39.

Anal. Calcd. for  $C_{33}H_{46}N_7O_9SCl_3$ :

C, 48.15 ; H, 5.63 ; N, 11.91 .

Found : C, 48.24 ; H, 5.39 ; N, 11.75 .

**(6) Boc-Asp(OBzl)-Leu-Arg(Mts)-NHNH-Troc**

Z(OMe)-Leu-Arg(Mts)-NHNH-Troc (7.85 g, 9.5 mmol) を TFA-anisole (21 ml-4.2 ml) で処理して得た N<sup>α</sup>脱保護ペプチドを, DMF (40 ml) に溶解させ, Et<sub>3</sub>N (2.7 ml, 19.1 mmol) と Boc-Asp(OBzl)-ONp (4.24 g, 9.5 mmol) を加え, 室温で 24 時間攪拌した。溶媒を減圧留去し, 残渣を A 法に従って精製後, AcOEt と isopropyl ether で再結晶した。

収量 7.38 g (80%), mp. 102-105°C

$[\alpha]_D^{20}$  -30.8° (c=0.6, MeOH), Rf<sub>1</sub> 0.41 .

Anal. Calcd. for C<sub>40</sub>H<sub>57</sub>N<sub>8</sub>O<sub>11</sub>SCl<sub>3</sub> :

C, 49.82 ; H, 5.96 ; N, 11.62 .

Found : C, 49.73 ; H, 6.19 ; N, 11.33 .

**(7) Boc-Asp(OBzl)-Leu-Arg(Mts)-NHNH<sub>2</sub> [3]**

Boc-Asp(OBzl)-Leu-Arg(Mts)-NHNH-Troc (7.68 g, 8.0 mmol) を AcOH-MeOH (1:1, 40 ml) に溶解し, 亜鉛末 (10.4 g, 160 mmol) を加え室温で 12 時間攪拌後, さらに fresh 亜鉛末 (5.2 g, 80 mmol) を加え, 5 時間攪拌を続けた。反応液を濾過し, 濾液を濃縮し残渣を AcOEt に溶解させた。AcOEt 層を 3% EDTA 溶液, 5% NaHCO<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>O で順次洗浄後, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> で乾燥し濃縮乾固した。この残渣に isopropyl ether を加え結晶を得た。

収量 5.96 g (94%), mp. 98-100°C

$[\alpha]_D^{26}$  -14.1° (c=0.6, MeOH), Rf<sub>2</sub> 0.69 .

6 N HCl 酸分解後のアミノ酸分析値:

Asp 1.00, Leu 1.06, Arg 1.00 (Asp の回収率, 88%)

Anal. Calcd. for C<sub>37</sub>H<sub>56</sub>O<sub>8</sub>N<sub>9</sub>S :

C, 56.32 ; H, 7.15 ; N, 14.22 .

Found : C, 55.92 ; H, 7.32 ; N, 14.52 .

**(8) Z(OMe)-Gln-Thr-Arg(Mts)-OBzl**

Z(OMe)-Arg(Mts)-OBzl (11.38 g, 18.6 mmol) に, TFA-anisole (24.2 ml - 6.0 ml) を加え, 氷冷下 80 分攪拌後, 過剰の TFA を減圧留去した。残渣を n-hexane で洗浄後, KOH 上 3 時間減圧乾燥し, Et<sub>3</sub>N (2.6 ml, 18.6 mmol) を含

む DMF (60 ml) に溶解した。この溶液に Z(OMe)-Gln-Thr-NHNH<sub>2</sub><sup>58)</sup> [9.51 g (22.4 mmol)] より調製したアジドの DMF (50 ml) 溶液と Et<sub>3</sub>N (3.4 ml, 24.6 mmol) を加えて 4°C で 12 時間攪拌した。さらに上記ヒドラジド [1.58 g (3.7 mmol)] より調製したアジドの DMF (10 ml) 溶液と Et<sub>3</sub>N (0.5 ml, 3.7 mmol) を加え、12 時間攪拌を続けた。溶媒を留去後、得られた残渣を A 法により精製し、MeOH と AcOEt で再結晶した。

収量 11.58 g (74%), mp. 110–113°C

$[\alpha]_D^{20}$  -3.0° (c=0.7, DMF), R<sub>f</sub> 0.55.

Anal. Calcd. for C<sub>40</sub>H<sub>53</sub>N<sub>7</sub>O<sub>11</sub>S :

C, 57.19 ; H, 6.36 ; N, 11.67.

Found : C, 57.26 ; H, 6.46 ; N, 11.69.

#### (9) Boc-Cys(MBzl)-Gln-Thr-Arg(Mts)-OBzl

Z(OMe)-Gln-Thr-Arg(Mts)-OBzl (8.60 g, 10 mmol) を TFA-anisole (16.6 ml - 3.3 ml) で処理後、過剰の TFA を留去し残渣に ether を加えたところ、結晶化した。これを濾取し KOH 上 3 時間減圧乾燥後 DMF (50 ml) に溶解させ、Et<sub>3</sub>N (1.4 ml, 10 mmol), Boc-Cys(MBzl)-OSu (4.94 g, 11 mmol) と NMM (1.1 ml, 11 mmol) を加え、室温で 12 時間攪拌した。溶媒を留去し、残渣を A 法により精製し、続いて MeOH と ether で再結晶した。

収量 9.58 g (94%), mp. 94–97°C

$[\alpha]_D^{20}$  -15.0° (c=0.4, DMF), R<sub>f</sub> 0.58

Anal. Calcd. for C<sub>47</sub>H<sub>66</sub>O<sub>8</sub>N<sub>12</sub>S<sub>2</sub> :

C, 56.49 ; H, 6.66 ; N, 11.22.

Found : C, 56.23 ; H, 6.71 ; N, 10.98.

#### (10) Boc-Cys(MBzl)-Gln-Thr-Arg(Mts)-NHNH<sub>2</sub> [4]

Boc-Cys(MBzl)-Gln-Thr-Arg(Mts)-OBzl (9.58 g, 9.6 mmol) を DMF (50 ml) に溶解させ、80% hydrazine hydrate (4.8 ml, 96 mmol) を加えて 12 時間放置した。溶媒を留去し残渣に ether を加えて粉末とした後、DMF と ether から再結晶した。

収量 8.81 g (99%), mp. 179–181°C

$[\alpha]_D^{26}$  -7.0° (c=0.6, DMSO), R<sub>f</sub> 0.32

6N HCl 酸分解後のアミノ酸分析値 :

Glu 1.12, Thr 1.03, Arg 1.00 (Argの回収率, 98%)

Anal. Calcd. for  $C_{40}H_{62}N_{10}O_{11}S_2$  :

C, 52.04 ; H, 6.77 ; N, 15.17

Found : C, 52.05 ; H, 6.81 ; N, 15.32

#### (11) Z(OMe)-Asp(OBzl)-Arg(Mts)-OMe

Z(OMe)-Arg(Mts)-OMe (8.89 g, 17.0 mmol) を TFA-anisole (18 ml - 3.6 ml) で処理し, 過剰の TFA を減圧留去後, 残渣を n-hexane で洗浄した。この油状残渣を KOH 上 3 時間減圧乾燥後, DMF (40 ml) に溶解させ,  $Et_3N$  (4.6 ml, 34.0 mmol) と Z(OMe)-Asp(OBzl)-ONp (7.61 g, 15.0 mmol) を加え,  $4^\circ C$  で 12 時間攪拌した。AcOH を数滴加えた後溶媒を留去した。反応生成物を A 法に従い精製し, AcOEt と isopropyl ether で再結晶した。

収量 9.41 g (85%), mp.  $49-52^\circ C$

$[\alpha]_D^{25}$   $-4.3^\circ$  (c = 0.9, MeOH),  $R_f$  0.88

Anal. Calcd. for  $C_{36}H_{45}N_5O_{10}S$  :

C, 58.44 ; H, 6.13 ; N, 9.47

Found : C, 58.54 ; H, 6.41 ; N, 10.03

#### (12) Boc-Gly-Asp(OBzl)-Arg(Mts)-OMe

Z(OMe)-Asp(OBzl)-Arg(Mts)-OMe (5.09 g, 6.9 mmol) を TFA-anisole (11.2 ml - 2.2 ml) で処理後, 得られた  $N^\alpha$  脱保護ペプチドを DMF (30 ml) に溶解させ,  $Et_3N$  (0.96 ml, 6.9 mmol), Boc-Gly-OSu (1.87 g, 6.9 mmol), および NMM (0.70 ml, 6.9 mmol) を加えて室温で 24 時間攪拌した。溶媒を留去し得られた反応生成物を A 法に従い精製した後, シリカゲルカラムクロマトグラフィ (7.2 × 10 cm) に付し  $CHCl_3$ -MeOH (10 : 0.5) で溶出した。目的物を含むフラクションを濃縮し, AcOEt と isopropyl ether で再結晶した。

収量 3.30 g (65%), mp.  $59-62^\circ C$

$[\alpha]_D^{25}$   $-24.3^\circ$  (c = 0.5, MeOH),  $R_f$  0.21

Anal. Calcd. for  $C_{34}H_{48}N_6O_{10}S$  :

C, 55.72 ; H, 6.60 ; N, 11.47

Found : C, 55.68 ; H, 6.90 ; N, 11.77.

#### (13) Boc-Gly-Asp-Arg(Mts)-NHNH<sub>2</sub> [5]

Boc-Gly-Asp(OBzl)-Arg(Mts)-OMe (2.63 g, 3.6 mmol) を MeOH-H<sub>2</sub>O 混

液(9:1, 30ml)に溶解させ, AcOH数滴を加え, Pd触媒上水素気流下で1時間攪拌して接触還元を行なった。反応液を濾過し, 濾液を濃縮して得られた残渣を MeOH (20 ml) に溶解させた。この溶液に hydrazine hydrate (2.2ml, 36ml) を加えて室温で一晩放置した。溶媒を留去し, 残渣を n-BuOH に溶解させ H<sub>2</sub>O で洗浄後, 濃縮乾固した。残渣に ether を加え, 得られた粉末を MeOH と ether で再結晶した。

収量 1.87 g (81%), mp. 130–133°C  
[ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>26</sup> –26.3° (c=0.8, MeOH), R<sub>f</sub> 0.22.

6N HCl 酸分解後のアミノ酸分析値:

Gly 1.00, Asp 1.02, Arg 0.90. (Gly の回収率, 62%)

Anal. Calcd. for C<sub>26</sub>H<sub>42</sub>N<sub>8</sub>O<sub>9</sub>S · 4.5H<sub>2</sub>O:

C, 43.14; H, 7.10; N, 15.48.

Found: C, 43.36; H, 7.19; N, 14.97.

#### (14) Boc-Tyr-Ser-OMe

Boc-Tyr-NHNH<sub>2</sub> (6.0 g, 20.3 mmol) から調製したアジドの DMF (60 ml) 溶液に, Et<sub>3</sub>N (3.1 ml, 22.4 mmol) と H-Ser-OMe [その塩酸塩 4.74 g (30.5 mmol) から調製] の DMF 溶液 (40 ml) を加え, 4°C で 12 時間攪拌した。反応液を濃縮後, 残渣を方法 A に従い精製し, AcOEt と n-hexane で再結晶した。

収量 5.10 g (66%), mp. 64–66°C  
[ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>15</sup> +1.5° (c=0.7, MeOH), R<sub>f</sub> 0.68.

Anal. Calcd. for C<sub>18</sub>H<sub>26</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub>:

C, 56.53; H, 6.85; N, 7.33.

Found: C, 56.37; H, 6.98; N, 7.36.

#### (15) Boc-Tyr-Ser-NHNH<sub>2</sub> [6]

Boc-Tyr-Ser-OMe (4.13 g, 11.3 mmol) を MeOH (20 ml) に溶解し, 80% hydrazine hydrate (7.1 ml, 110 mmol) を加え室温で一晩放置した。溶媒を留去し, 残渣に ether を加え, 得られた粉末を MeOH と ether で再結晶した。

収量 2.53 g (59%), mp. 169–172°C  
[ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>26</sup> +5.1° (c=0.6, DMF), R<sub>f</sub> 0.36.

6N HCl 酸分解後のアミノ酸分析値:

Tyr 0.89, Ser 1.00 (Ser の回収率, 90%)

Anal. Calcd. for  $C_{17}H_{26}N_4O_6 \cdot 0.5H_2O$  :

C, 52.16 ; H, 6.95 ; N, 14.32.

Found : C, 52.50 ; H, 6.81 ; N, 14.62.

#### (16) Z(OMe)-Ile-Gly-OMe

Z(OMe)-Ile-ONp (9.67 g, 23.0 mmol) と H-Gly-OMe [その塩酸塩 4.66 g (37.1 mmol) から調製] を原料とし、Np 法により合成した。得られた反応残渣を A 法に従い精製後、AcOEt と ether によって再結晶した。

収量 6.89 g (81%), mp. 137–139°C

$[\alpha]_D^{15}$   $-25.0^\circ$  (c=0.5, MeOH), Rf<sub>1</sub> 0.68.

Anal. Calcd. for  $C_{18}H_{26}N_2O_6$  :

C, 59.00 ; H, 7.15 ; N, 7.65.

Found : C, 59.01 ; H, 7.22 ; N, 7.61.

#### (17) Boc-Val-Ile-Gly-OMe

Z(OMe)-Ile-Gly-OMe (6.76 g, 18.5 mmol) を TFA-anisole (16 ml–4 ml) で処理後、過剰の TFA を留去し、残渣に n-hexane を加えると油状物質が得られた。これを KOH 上 3 時間減圧乾燥後、DMF (30 ml) に溶解し、Et<sub>3</sub>N (2.6 ml, 18.5 mmol) と Boc-Val-OH·DCHA (8.83 g, 22.2 mmol) より調製した混合酸無水物の THF (50 ml) 溶液を加え、0°C で 12 時間攪拌した。溶媒を留去し、残渣を B 法に従い精製後、MeOH と ether で再結晶し粉末を得た。

収量 5.08 g (69%), mp. 174–176°C

$[\alpha]_D^{15}$   $-13.8^\circ$  (c=0.5, DMF), Rf<sub>2</sub> 0.65.

Anal. Calcd. for  $C_{19}H_{35}N_3O_6$  :

C, 56.84 ; H, 8.79 ; N, 10.47.

Found : C, 56.65 ; H, 8.71 ; N, 10.40.

#### (18) Boc-Val-Ile-Gly-NHNH<sub>2</sub> [7]

Boc-Val-Ile-Gly-OMe (2.85 g, 7.1 mmol) を MeOH (30 ml) に溶解し、80 % hydrazine hydrate (4.4 ml, 71 mmol) を加えて室温で一晩放置した。反応液を濃縮し、残渣に H<sub>2</sub>O を加え粉末を得た。これを H<sub>2</sub>O で洗浄後、MeOH と ether で再結晶した。

収量 1.54 g (54%), mp. 184–186°C

$[\alpha]_D^{26}$   $-5.5^\circ$  (c=0.5, DMSO), Rf<sub>2</sub> 0.50.

6N HCl 酸分解後のアミノ酸分析値：

Val 0.91, Ile 0.85, Gly 1.00 (Glyの回収率, 98%)

Anal. Calcd. for  $C_{18}H_{35}N_5O_5$  :

C, 53.84 ; H, 8.79 ; N, 17.44.

Found : C, 53.96 ; H, 8.92 ; N, 17.63.

#### (19) Z(OMe)-Asn-Cys(MBzl)-OH

Z(OMe)-Asn-ONp (17.30 g, 42 mmol) と  $Et_3N$  (5.8 ml, 42 mmol) を, H-Cys(MBzl)-OH (5.0 g, 21 mmol) と  $Et_3N$  (2.9 ml, 21 mmol) の DMF- $H_2O$  (1:2, 120 ml) 溶液に加え, 室温で 24 時間攪拌した。溶媒を留去し, 残渣に 5% クエン酸を加えて得られた粉末を 0.1 N HCl と  $H_2O$  で洗浄し, 続いて, DMF-AcOEt で再沈殿した。

収量 6.17 g (57%), mp. 185–187°C

$[\alpha]_D^{25} +6.4^\circ$  ( $c=0.5$ , DMSO),  $Rf_3$  0.27.

Anal. Calcd. for  $C_{24}H_{29}N_3O_8S \cdot 0.5H_2O$  :

C, 54.53 ; H, 5.72 ; N, 7.95.

Found : C, 54.70 ; H, 5.95 ; N, 7.81.

#### (20) Z(OMe)-Cys(MBzl)-Asn-Cys(MBzl)-OH

Z(OMe)-Asn-Cys(MBzl)-OH (3.86 g, 7.4 mmol) を TFA-anisole (8.0 ml – 1.6 ml) で処理し, 過剰の TFA を留去後, n-hexane を加えて粉末を得た。これを KOH 上 3 時間減圧乾燥後 DMF (20 ml) に溶解させ,  $Et_3N$  (1.0 ml, 7.4 mmol) と Z(OMe)-Cys(MBzl)-OSu (4.48 g, 8.9 mmol), および  $Et_3N$  (1.2 ml, 8.6 mmol) を加えて室温で 12 時間攪拌した。溶媒を留去し, 残渣に 5% クエン酸を加え, 得られた粉末を 5% クエン酸, 続いて  $H_2O$  で洗浄後, DMF-AcOEt で再沈殿した。

収量 4.54 g (82%), mp. 191–193°C.

$[\alpha]_D^{25} -33.6^\circ$  ( $c=0.7$ , DMSO),  $Rf_2$  0.26.

Anal. Calcd. for  $C_{35}H_{42}N_4O_{10}S_2$  :

C, 56.59 ; H, 5.70 ; N, 7.54.

Found : C, 56.83 ; H, 5.93 ; N, 7.34.

#### (21) Z(OMe)-Cys(MBzl)-Asn-Cys(MBzl)-OMe

Z(OMe)-Cys(MBzl)-Asn-Cys(MBzl)-OH (7.68 g, 10.3 mmol) を DMF (70



ml)に溶解させ、ジアゾメタンのエーテル溶液を加え、常法に従いメチル化した。DMFを留去し、残渣にAcOEtを加えて粉末を得た。これを5% NaHCO<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>Oで洗浄後、DMF-MeOHから、再沈殿した。

収量 6.91 g (88%), mp. 179–181°C.

$[\alpha]_D^{25}$  -22.6° (c = 0.8, DMSO), R<sub>f</sub> 0.74.

Anal. Calcd. for C<sub>36</sub>H<sub>44</sub>N<sub>4</sub>O<sub>10</sub>S<sub>2</sub>:

C, 57.12 ; H, 5.86 ; N, 7.40.

Found : C, 56.90 ; H, 5.93 ; N, 7.56.

### (22) Boc-Thr-Cys(MBzl)-Asn-Cys(MBzl)-OMe

Z(OMe)-Cys(MBzl)-Asn-Cys(MBzl)-OMe (3.90 g, 5.2 mmol) を TFA-anisole (9 ml – 2.2 ml) で処理後、etherを加え、得られた粉末をKOH上3時間減圧乾燥し、DMF (20 ml) に溶解させ Et<sub>3</sub>N (0.7 ml, 5.2 mmol) を加えた。これに、Boc-Thr-NHNH<sub>2</sub> (2.40 g, 10.3 mmol) から調製したアジドのDMF (15 ml) 溶液と Et<sub>3</sub>N (1.6 ml, 11.4 mmol) を加え、4°C で48時間攪拌した。さらに、アジド〔上記のヒドラジド (0.60 g, 2.6 mmol) から調製したもの〕を Et<sub>3</sub>N (0.36 ml, 2.6 mmol) と共に加え、ひき続き12時間攪拌した。ニンヒドリン陰性となった反応液を濃縮し、残渣をB法によって精製後DMF-MeOHで再沈殿した。

収量 2.65 g (65%), mp. 136–139°C.

$[\alpha]_D^{20}$  -16.6° (c = 0.7, DMSO), R<sub>f</sub> 0.66.

Anal. Calcd. for C<sub>36</sub>H<sub>51</sub>N<sub>5</sub>O<sub>11</sub>S<sub>2</sub>:

C, 54.46 ; H, 6.48 ; N, 8.82.

Found : C, 54.16 ; H, 6.62 ; N, 8.74.

### (23) Boc-Thr-Cys(MBzl)-Asn-Cys(MBzl)-NHNH<sub>2</sub> [8]

保護基のついた上記テトラペプチドエステル (3.00 g, 3.8 mmol) を DMF-MeOH (1 : 1, 30 ml) に溶解させ 80% hydrazine hydrate (2.4 ml, 38 mmol) を加え室温で一晩放置した。溶媒を留去し、得られた固体の残渣をDMF-MeOHで再沈殿した。

収量 2.40 g (80%), mp. 201–204°C

$[\alpha]_D^{26}$  -39.5° (c = 0.5, DMSO), R<sub>f</sub> 0.57.

6N HCl 酸分解後のアミノ酸分析値 :

Asp 1.00, Thr 0.80 (Aspの回収率, 90%)

Anal. Calcd. for  $C_{35}H_{51}N_7O_{10}S_2 \cdot H_2O$ .

C, 52.35 ; H, 6.53 ; N, 12.21.

Found : C, 52.28 ; H, 6.51 ; N, 12.34.

(24) Boc-Trp-Trp-(51-53)-OBzl

[Boc-(EGF 49-53)-OBzl]

Z(OMe)-Glu(OBzl)-Leu-Arg(Mts)-OBzl (12.04 g, 12.8 mmol) に TFA-anisole (20.7 ml - 4.1 ml) を加え, 0°C で 80 分間反応後, 過剰の TFA を留去し, 残渣に n-hexane を加えた。得られた油状物を n-hexane で洗浄後, 5% NaHCO<sub>3</sub> を加え粉末を得た。これを H<sub>2</sub>O で洗浄し, KOH 上 3 時間減圧乾燥後, DMF (50 ml) に溶解させ, Boc-Trp-Trp-OH [その DCHA 塩 (8.57 g, 12.8 mmol) から調製] と, HOBT (1.95 g, 12.8 mmol) および DCC (3.95 g, 19.1 mmol) を加え, 4°C で 12 時間攪拌した。さらに, DCC (1.32 g, 6.4 mmol) を加え, 12 時間攪拌を続けた。ニンヒドリン陰性の反応液をろ過し, 濾液を濃縮し, 残渣を A 法により精製後 AcOEt と isopropyl ether で再結晶した。

収量 14.09 g (88%), mp. 99-102°C.

$[\alpha]_D^{26}$  -32.3° (c = 0.7, MeOH), R<sub>f</sub> 0.48.

Anal. Calcd. for  $C_{67}H_{82}N_{10}O_{12}S \cdot 0.5H_2O$  :

C, 63.84 ; H, 6.64 ; N, 11.11.

C, 63.83 ; H, 6.77 ; N, 11.41.

(25) Boc-Asp(OBzl)-Leu-Arg(Mts)-(49-53)-OBzl

[Boc-(EGF 46-53)-OBzl]

保護基のついた上記ペプタドエステル (11.0 g, 8.8 mmol) を氷冷下 80 分, TFA-anisole-EDT (22.5 ml - 3.8 ml - 0.7 ml) で処理後, TFA を留去し, 残渣に ether を加えて粉末を得た。これを KOH 上 3 時間減圧乾燥後, DMF (50 ml) に溶解させ Et<sub>3</sub>N (1.2 ml, 8.8 mmol) を加えた。この溶液に Boc-Asp(OBzl)-Leu-Arg(Mts)-NHNH<sub>2</sub> (6.94 g, 8.8 mmol) から調製したアジドの DMF (50 ml) 溶液と Et<sub>3</sub>N (1.4 ml, 10 mmol) を加えて, 4°C で 12 時間攪拌した。さらに同アジド [ヒドラジド (1.39 g, 1.8 mmol) から調製] と, Et<sub>3</sub>N (0.25 ml, 1.8 mmol) を加え, 12 時間攪拌を続けた。AcOH 数滴を加えた後, 溶媒を留去し, 得られた残渣を B 法により精製後, シリカゲルカラムクロマトグラフィー (7.2 × 17 cm) に付し, CHCl<sub>3</sub>-MeOH (40 : 1) で溶出した。目的物を含

むフラクション (Rf<sub>1</sub> 0.32) を集め、溶媒を留去後残渣を AcOEt と ether で再結晶した。

収量 8.89 g (53%), mp. 156–159°C.

$[\alpha]_D^{28}$  -26.7° (c = 0.4, DMSO), Rf<sub>1</sub> 0.32.

Anal. Calcd. for C<sub>99</sub>H<sub>126</sub>N<sub>16</sub>O<sub>19</sub>S<sub>2</sub> :

C, 62.31 ; H, 6.66 ; N, 11.75.

Found : C, 62.09 ; H, 6.69 ; N, 11.56.

**(26) Boc-Cys(MBzl)-Gln-Thr-Arg(Mts)-(46-53)-OBzl**

[ Boc-(EGF 42-53)-OBzl ]

保護基のついた上記オクタペプチドエステル (7.66 g, 4.0 mmol) を TFA-anisole-EDT (20.7 ml – 3.5 ml – 0.7 ml) で処理後、得られた N<sup>α</sup>-脱保護ペプチドを DMF (40 ml) に溶解させ、Et<sub>3</sub>N (0.56 ml, 4.0 mmol) を加え、続いて、Boc-Cys(MBzl)-Gln-Thr-Arg(Mts)-NHNH<sub>2</sub> (5.56 g, 6.0 mmol) から調製したアジドの DMF 溶液 (50 ml) を Et<sub>3</sub>N (0.93 ml, 6.6 mmol) と共に加えて、4°C、12 時間攪拌した。さらに、同アジド〔ヒドラジド (1.11 g, 1.2 mmol) から調製〕を Et<sub>3</sub>N (0.17 ml, 1.2 mmol) と共に加え、12 時間攪拌を続けた。溶媒を留去し、残渣を B 法により精製後、DMF-MeOH で 2 回再沈殿をくり返した。

収量 7.16 g (66%), mp. 211–214°C.

$[\alpha]_D^{28}$  -13.5° (c = 0.5, DMSO), Rf<sub>2</sub> 0.69.

Anal. Calcd. for C<sub>134</sub>H<sub>176</sub>N<sub>24</sub>O<sub>28</sub>S<sub>4</sub> :

C, 59.62 ; H, 6.57 ; N, 12.46.

Found : C, 59.74 ; H, 6.57 ; N, 12.17.

**(27) Boc-Gly-Asp-Arg(Mts)-(42-53)-OBzl**

[ Boc-(EGF 39-53)-OBzl ]

保護基のついた上記ドデカペプチドエステル (7.5 g, 2.8 mmol) を TFA-anisole-EDT (17 ml – 3.6 ml – 0.7 ml) で処理後、得られた N<sup>α</sup>-脱保護ペプチドを DMF (70 ml) に溶解させ、Et<sub>3</sub>N (0.39 ml, 2.8 mmol) を加えた。この混合液に、Boc-Gly-Asp-Arg(Mts)-NHNH<sub>2</sub> (1.96 g, 3.1 mmol) から調製したアジドの DMF (5 ml) 溶液と Et<sub>3</sub>N (0.47 ml, 3.4 mmol) を加えて、4°C で 12 時間攪拌した。さらに、同アジド〔ヒドラジド (0.54 g, 0.8 mmol) から調製〕と Et<sub>3</sub>N (0.12 ml, 0.8 mmol) を加え 12 時間攪拌を続けた。AcOH 数滴を加えた後、溶媒を

留去し、得られた反応産物をB法により精製後、DMF-MeOHで3回再沈殿をくり返した。

収量 7.03 g (79%), mp. 221–224°C.

$[\alpha]_D^{28}$   $-14.4^\circ$  ( $c=0.7$ , DMSO),  $R_f$  0.54.

Anal. Calcd. for  $C_{155}H_{206}N_{30}O_{35}S_5 \cdot H_2O$ :

C, 57.67; H, 6.50; N, 13.02.

Found: C, 57.56; H, 6.44; N, 13.00.

## (28) Boc-Tyr-Ser-(39-53)-OBzl

[Boc-(EGF 37-53)-OBzl]

保護基のついた上記ペンタデカペプチドエステル(6.87 g, 2.1 mmol)をTFA-anisole-EDT(16.7 ml–2.8 ml–0.54 ml)で処理後、得られた $N^\alpha$ -脱保護ペプチドをDMF(60 ml)に溶解させ、 $Et_3N$ (0.30 ml, 2.1 mmol)を加えた。この混合液に、Boc-Tyr-Ser-NHNH<sub>2</sub>(0.98 g, 2.6 mmol)から調製したアジドのDMF(5 ml)溶液を $Et_3N$ (0.40 ml, 2.9 mmol)と共に加え、4°Cで12時間攪拌した。さらに、同アジド〔ヒドラジド(0.25 g, 0.6 mmol)から調製〕を $Et_3N$ (0.09 ml, 0.6 mmol)と共に加え、12時間攪拌を続けた。溶媒を留去し、残渣を方法Bにより精製した後、DMF-MeOHで2回再沈殿をくり返した。

収量 7.08 g (96%), mp. 225–228°C.

$[\alpha]_D^{28}$   $-10.4^\circ$  ( $c=0.4$ , DMSO),  $R_f$  0.47.

Anal. Calcd. for  $C_{167}H_{220}N_{32}O_{39}S_5 \cdot 2H_2O$ :

C, 57.37; H, 6.46; N, 12.82.

Found: C, 57.45; H, 6.37; N, 12.70.

## (29) Boc-Val-Ile-Gly-(37-53)-OBzl

[Boc-(EGF 34-53)-OBzl]

保護基のついた上記ヘプタデカペプチドエステル(7.08 g, 2.1 mmol)をTFA-anisole-EDT(17.0 ml–3.5 ml–0.69 ml)で処理、得られた $N^\alpha$ -脱保護ペプチドをDMF(70 ml)に溶解させ、 $Et_3N$ (0.29 ml, 2.1 mmol)を加えた。この混合液にBoc-Val-Ile-Gly-NHNH<sub>2</sub>(0.99 g, 2.5 mmol)から調製したアジドのDMF(5 ml)溶液と共に $Et_3N$ (0.38 ml, 2.7 mmol)を加え、12時間攪拌した後、さらに同アジド〔ヒドラジド(0.33 g, 0.8 mmol)から調製〕と $Et_3N$ (0.11 ml, 0.8 mmol)を加え、12時間攪拌を続けた。溶媒を留去し、残渣をB法により精製

後、DMF-MeOHで2回再沈殿をくり返した。

収量 7.13 g (93%), mp. 257-260°C.

$[\alpha]_D^{28}$  -19.4° (c=0.4, DMSO),  $R_f$  0.43.

Anal. Calcd. for  $C_{180}H_{243}N_{35}O_{42}S_5 \cdot 2H_2O$  :

C, 57.41 ; H, 6.61 ; N, 13.02.

Found : C, 57.37 ; H, 6.91 ; N, 12.96.

### (30) Boc-Thr-Cys(MBzl)-Asn-Cys(MBzl)-(34-53)-OBzl

[ Boc-(EGF 30-53)-OBzl ]

保護基のついた上記エイコサペプチドエステル(6.74 g, 1.8 mmol)をTFA-anisole-EDT(18.0 ml - 3.1 ml - 0.61 ml)で処理後、得られた脱保護ペプチドを単離し、これをDMF-DMSO(1:1, 70 ml)に溶解させ、 $Et_3N$ (0.25 ml, 1.8 mmol)を加えた。この混合液にBoc-Thr-Cys(MBzl)-Asn-Cys(MBzl)- $NHNH_2$ (1.87 g, 2.4 mmol)から調製したアジドのDMF(10 ml)溶液と $Et_3N$ (0.36 ml, 2.6 mmol)を加え、4°Cで12時間攪拌した。さらに同アジド〔ヒドラジド(1.15 g, 1.5 mmol)から調製〕と $Et_3N$ (0.20 ml, 1.5 mmol)を加え、12時間攪拌を続けた。溶媒を留去し、残渣を方法Bにより精製後、DMSO-DMF(1:1)とMeOHから2回、再沈殿をくり返した。

収量 7.10 g (90%), mp. 263°C以上分解

$[\alpha]_D^{28}$  -17.2° (c=0.4, DMSO),  $R_f$  原点

Anal. Calcd. for  $C_{210}H_{282}N_{40}O_{50}S_7 \cdot 3H_2O$  :

C, 56.74 ; H, 6.53 ; N, 12.61.

Found : C, 56.71 ; H, 6.62 ; N, 12.67.

## 第3節に関する実験

### (1) Z(OMe)-Ser(Bzl)-Tyr-OMe

H-Tyr-OMe〔その塩酸塩(6.95 g, 30 mmol)から調製〕とZ(OMe)-Ser(Bzl)-OH〔そのCHA塩(13.76 g, 30 mmol)から調製〕とをDMF-AcOEt(1:1, 200 ml)に溶解させ、DCC(7.43 g, 36 mmol)を加えて室温12時間攪拌した。反応液をろ過後、ろ液を濃縮し、得られた残渣をA法により精製し、MeOHとetherで再結晶した。

収量 9.75 g (61%), mp. 85-88°C.

$[\alpha]_D^{20} +10.8^\circ$  ( $c=0.7$ , MeOH),  $Rf_1$  0.58.

Anal. Calcd. for  $C_{29}H_{32}N_2O_8$  :

C, 64.91 ; H, 6.01 ; N, 5.22.

Found : C, 65.19 ; H, 6.09 ; N, 5.30.

## (2) Z(OMe)-Asp(OBu<sup>t</sup>)-Ser(Bzl)-Tyr-OMe

Z(OMe)-Ser(Bzl)-Tyr-OMe (4.20 g, 7.8 mmol) を、氷冷下 60 分, TFA-anisole (8.5 ml - 1.7 ml) で処理後, n-hexane を加えて粉末を得た。これを KOH 上 3 時間減圧乾燥後, DMF (20 ml) に溶解させ, Et<sub>3</sub>N (1.1 ml, 7.8 mmol) を加えた。この混合液に Z(OMe)-Asp(OBu<sup>t</sup>)-OH · DCHA (4.39 g, 8.2 mmol) から調製した混合酸無水物の THF (30 ml) 溶液を加え, 氷冷下 4 時間攪拌した。反応液を濃縮し, 残渣を A 法により精製後, AcOEt と isopropyl ether から再結晶した。

収量 4.15 g (75%), mp. 54-56°C.

$[\alpha]_D^{20} -2.7^\circ$  ( $c=0.7$ , MeOH),  $Rf_1$  0.33.

Anal. Calcd. for  $C_{37}H_{45}N_3O_{11}$  :

C, 62.79 ; H, 6.41 ; N, 5.94.

Found : C, 63.06 ; H, 6.54 ; N, 5.94.

## (3) Boc-Leu-Asp-Ser(Bzl)-Tyr-OMe

Z(OMe)-Asp(OBu<sup>t</sup>)-Ser(Bzl)-Tyr-OMe (3.20 g, 4.5 mmol) を氷冷下 30 分, 次に室温で 3 時間, TFA-anisole (7.3 ml - 1.5 ml) で処理し, Z(OMe) 基と Bu<sup>t</sup> エーテルを切断, 除去した。得られた H-Asp-Ser(Bzl)-Tyr-OMe を DMF (20 ml) に溶解させ, Et<sub>3</sub>N (0.6 ml, 4.5 mmol) を加え, さらに, Boc-Leu-OH · DCHA (1.96 g, 4.8 mmol) から調製した混合酸無水物の THF (20 ml) 溶液を加え, 氷冷下 4 時間攪拌した。反応液を濃縮し, 残渣を方法 C により精製後, シリカゲルカラムクロマトグラフィー (3.0 × 20 cm) に付し, CHCl<sub>3</sub>-MeOH-AcOH (9 : 1 : 0.5) で溶出した。目的物を含むフラクションを集め, 溶媒を留去後, 残渣に ether を加えて粉末を得た。

収量 1.91 g (60%), mp. 98-101°C.

$[\alpha]_D^{20} -21.3^\circ$  ( $c=0.7$ , MeOH),  $Rf_3$  0.57.

Anal. Calcd. for  $C_{35}H_{48}N_4O_{11}$  :

C, 59.98 ; H, 6.90 ; N, 8.00.

Found : C, 59.72 ; H, 7.14 ; N, 7.80.

(4) Boc-Leu-Asp-Ser(Bzl)-Tyr-NHNH<sub>2</sub> [9]

Boc-Leu-Asp-Ser(Bzl)-Tyr-OMe (1.58 g, 2.3 mmol) を MeOH (15 ml) に溶解させ、80% hydrazine hydrate (1.4 ml, 23 mmol) を加え一晩放置した。溶媒を留去して残渣を n-BuOH に溶解させ、5% AcOH, および H<sub>2</sub>O で洗浄後、濃縮した。この残渣に ether を加え粉末を得、MeOH と isobutyl alcohol から再結晶した。

収量 1.30 g (83%), mp. 168–170°C.

$[\alpha]_D^{26}$  -30.0° (c=0.8, DMF), R<sub>f2</sub> 0.35.

6N HCl 酸分解後のアミノ酸分析値 :

Asp 1.07, Ser 0.80, Leu 0.95, Tyr 1.00. (Tyr の回収率, 92%).

Anal. Calcd. for C<sub>34</sub>H<sub>48</sub>N<sub>6</sub>O<sub>10</sub> :

C, 58.27 ; H, 6.90 ; N, 11.99.

Found : C, 58.30 ; H, 6.99 ; N, 11.86.

(5) Z(OMe)-Ser(Bzl)-NHNH-Troc

Z(OMe)-Ser(Bzl)-OH [その CHA 塩 (15.0 g, 32.7 mmol) から調製] の混合酸無水物の THF 溶液 (100 ml) と Troc-NHNH<sub>2</sub> (7.43 g, 35.9 mmol) とを反応させ、目的物を A 法によって精製し、MeOH と ether から再結晶した。

収量 13.5 g (75%), mp. 91–92°C.

$[\alpha]_D^{15}$  -3.5° (c=0.6, MeOH), R<sub>f1</sub> 0.76.

Anal. Calcd. for C<sub>22</sub>H<sub>24</sub>N<sub>3</sub>O<sub>7</sub>Cl<sub>3</sub> :

C, 48.14 ; H, 4.41 ; N, 7.66.

Found : C, 48.06 ; H, 4.23 ; N, 7.75.

(6) Z(OMe)-Glu(OBzl)-Ser(Bzl)-NHNH-Troc

Z(OMe)-Ser(Bzl)-NHNH-Troc (6.78 g, 12.4 mmol) を、TFA-anisole (16.0 ml – 4.0 ml) で処理し、過剰の TFA を留去後、得られた油状残渣を n-hexane で洗浄し、KOH 上で 3 時間減圧乾燥した。これを DMF (50 ml) に溶解させ、Et<sub>3</sub>N (1.7 ml, 12.4 mmol) と NMM (1.4 ml, 13.8 mmol), および Z(OMe)-Glu(OBzl)-ONp (7.10 g, 13.6 mmol) を加え、4°C で 12 時間攪拌した。反応液を濃縮し、目的物を A 法により精製後、MeOH と ether から再結晶した。

収量 7.68 g (81%), mp. 73–75°C.

$[\alpha]_D^{15} -11.9^\circ$  ( $c = 0.6$ , MeOH),  $R_f$  0.41.

Anal. Calcd. for  $C_{34}H_{37}N_4O_{10}Cl_3$  :

C, 53.17 ; H, 4.86 ; N, 7.30.

Found : C, 53.40 ; H, 4.77 ; N, 7.44.

**(7) Boc-Ile-Glu(OBzl)-Ser(Bzl)-NHNH-Troc**

Z(OMe)-Glu(OBzl)-Ser(Bzl)-NHNH-Troc (7.50 g, 9.8 mmol) を TFA-anisole (16 ml - 3.2 ml) で処理後、得られた  $N^\alpha$ -脱保護ペプチドを DMF (50 ml) に溶解させ、 $Et_3N$  (1.4 ml, 9.8 mmol), NMM (1.1 ml, 10.8 mmol), および Boc-Ile-OSu (3.53 g, 10.8 mmol) を加え、 $4^\circ C$  で 12 時間攪拌した。反応液を濃縮し、残渣を A 法により精製後、MeOH と ether で再結晶した。

収量 4.80 g (60%), mp. 178-180 $^\circ C$ .

$[\alpha]_D^{15} -9.4^\circ$  ( $c = 0.4$ , DMF),  $R_{f1}$  0.35.

Anal. Calcd. for  $C_{36}H_{48}N_5O_{10}Cl_3$  :

C, 52.91 ; H, 5.92 ; N, 8.57.

Found : C, 53.05 ; H, 5.89 ; N, 8.80.

**(8) Boc-Ile-Glu(OBzl)-Ser(Bzl)-NHNH<sub>2</sub> [10]**

上記 Troc 誘導体 (4.00 g, 4.9 mmol) を DMF-AcOH (1 : 1, 40 ml) に溶解させ、Zn 粉末 (3.20 g, 10 equiv.) を加えて、室温で一晩攪拌した。反応液を戸越し、戸液を濃縮し、残渣に 5% EDTA を加えて粉末を得た。これを 5% EDTA, 5%  $NaHCO_3$ ,  $H_2O$  で順次洗浄し、MeOH と ether で再結晶した。

収量 1.71 g (54%), mp. 153-155 $^\circ C$ .

$[\alpha]_D^{26} -13.9^\circ$  ( $c = 0.8$ , DMF),  $R_{f1}$  0.30.

6N HCl 酸分解後のアミノ酸分析値 :

Ile 1.00, Glu 0.98, Ser 0.84. (Ile の回収率, 86%).

Anal. Calcd. for  $C_{33}H_{47}N_5O_8 \cdot 2.5H_2O$  :

C, 57.71 ; H, 7.63 ; N, 10.20.

Found : C, 57.81 ; H, 7.15 ; N, 10.22.

**(9) Z(OMe)-Cys(MBzl)-Met-OMe**

Z(OMe)-Cys(MBzl)-OSu (5.03 g, 10 mmol) と H-Met-OMe [その塩酸塩 (3.0 g, 15 mmol) から調製] とを DMF (50 ml) に溶解させ、 $Et_3N$  (3.5 ml, 25 mmol) を加えて室温で 12 時間攪拌した。溶媒を留去し、残渣を A 法で精製後、MeOH



と ether で再結晶した。

収量 3.71 g (67%), mp. 97–99°C.

$[\alpha]_D^{15}$   $-26.1^\circ$  ( $c=0.5$ , MeOH),  $Rf_1$  0.78.

Anal. Calcd. for  $C_{26}H_{34}N_2O_7S_2$  :

C, 56.70 ; H, 6.22 ; N, 5.09.

Found : C, 56.96 ; H, 5.96 ; N, 5.06.

#### (10) Z(OMe)-Val-Cys(MBzl)-Met-OMe

Z(OMe)-Cys(MBzl)-Met-OMe (3.15 g, 5.7 mmol) を TFA-anisole-EDT (8 ml – 1.2 ml – 0.5 ml) で処理し、過剰の TFA を留去後、残渣を n-hexane で洗浄した。これを KOH 上 3 時間減圧乾燥後、DMF (30 ml) に溶解させ、 $Et_3N$  (1.7 ml, 12.0 mmol) と、Z(OMe)-Val-OSu (2.38 g, 6.3 mmol) とを加え、室温で 12 時間攪拌した。溶媒を留去後、残渣を方法 B により精製し、DMF-MeOH で再沈殿した。

収量 2.90 g (78%), mp. 169–170°C.

$[\alpha]_D^{15}$   $-40.3^\circ$  ( $c=0.6$ , DMF),  $Rf_2$  0.90.

Anal. Calcd. for  $C_{31}H_{43}N_3O_8S_2$  :

C, 57.30 ; H, 6.67 ; N, 6.47.

Found : C, 57.55 ; H, 6.54 ; N, 6.34.

#### (11) Boc-Gly-Val-Cys(MBzl)-Met-OMe

Z(OMe)-Val-Cys(MBzl)-Met-OMe (2.48 g, 3.8 mmol) を TFA-anisole-EDT (6.0 ml – 0.8 ml – 0.3 ml) で処理し、過剰の TFA を留去後、残渣に n-hexane を加え粉末を得た。これを KOH 上 3 時間減圧乾燥し、DMF (10 ml) に溶解させ、 $Et_3N$  (1.1 ml, 7.9 mmol) と Boc-Gly-OSu (1.14 g, 4.2 mmol) とを加えて室温で一晩攪拌した。反応液を濃縮し、残渣を方法 B により精製後、MeOH と ether で再沈殿した。

収量 1.91 g (78%), mp. 122–123°C.

$[\alpha]_D^{15}$   $-48.0^\circ$  ( $c=0.6$ , DMF),  $Rf_1$  0.29.

Anal. Calcd. for  $C_{29}H_{46}N_4O_8S_2$  :

C, 54.18 ; H, 7.21 ; N, 8.72.

Found : C, 54.26 ; H, 7.26 ; N, 8.71.

#### (12) Boc-Gly-Val-Cys(MBzl)-Met-NHNH<sub>2</sub> [11]

Boc-Gly-Val-Cys(MBzl)-Met-OMe (1.54 g, 2.4 mmol) を DMF-MeOH (1 : 1, 10 ml) に溶解させ, 80% hydrazine hydrate (1.5 ml, 24 mmol) を加えて室温で一晩放置した。得られた沈殿を DMF-MeOH で再沈殿した。

収量 1.31 g (85%), mp. 209–212°C.

$[\alpha]_D^{26}$   $-18.1^\circ$  ( $c=0.5$ , DMSO),  $R_f$  0.68.

6N HCl 酸分解後のアミノ酸分析値:

Gly 1.00, Val 1.06, Met 0.90 (Gly の回収率, 88%).

Anal. Calcd. for  $C_{28}H_{46}N_6O_7S_2$ :

C, 52.31 ; H, 7.21 ; N, 13.07.

Found : C, 52.56 ; H, 7.02 ; N, 13.28.

### (13) Z(OMe)-Leu-Asn-Gly-NHNH-Troc

Z(OMe)-Asn-Gly-NHNH-Troc<sup>69</sup> (3.03 g, 5.6 mmol) を TFA-anisole (6.0 ml–1.2 ml) で処理後, 得られた  $N^\alpha$ -脱保護ペプチドを DMF (20 ml) に溶解させ,  $Et_3N$  (1.7 ml, 11.9 mmol) と Z(OMe)-Leu-ONp (2.56 g, 6.2 mmol) とを加えて, 室温で 12 時間攪拌した。反応液を濃縮し, 残渣を B 法により精製後, MeOH-ether で再結晶した。

収量 3.38 g (93%), mp. 146–149°C.

$[\alpha]_D^{15}$   $-14.5^\circ$  ( $c=0.8$ , DMSO),  $R_f$  0.68.

Anal. Calcd. for  $C_{24}H_{33}N_6O_9Cl_3$ :

C, 43.94 ; H, 5.07 ; N, 12.81.

Found : C, 44.13 ; H, 5.04 ; N, 12.82.

### (14) Boc-Cys(MBzl)-Leu-Asn-Gly-NHNH-Troc

Z(OMe)-Leu-Asn-Gly-NHNH-Troc (3.38 g, 5.2 mmol) を TFA-anisole (8.4 ml–1.7 ml) で処理後, 得られた  $N^\alpha$ -脱保護ペプチドを DMF (20 ml) に溶解させ,  $Et_3N$  (1.5 ml, 10.6 mmol) と, Boc-Cys(MBzl)-OSu (2.49 g, 5.7 mmol) とを加えて室温で 12 時間攪拌した。反応液を濃縮し, 残渣を B 法により精製後, DMF-AcOEt で再沈殿した。

収量 3.01 g (72%), mp. 142–144°C.

$[\alpha]_D^{15}$   $-23.4^\circ$  ( $c=0.8$ , DMSO),  $R_f$  0.71.

Anal. Calcd. for  $C_{31}H_{46}N_7O_{10}Cl_3S \cdot 0.5H_2O$ :

C, 45.17 ; H, 5.75 ; N, 11.90.

Found : C, 45.15 ; H, 5.73 ; N, 12.11.

**(15) Boc-Cys(MBzl)-Leu-Asn-Gly-NH<sub>2</sub> [12]**

保護基のついた上記テトラペプチド (3.51 g, 4.3 mmol) を DMF-AcOH (1 : 1, 40 ml) に溶解させ Zn 粉末 (2.81 g, 43 mmol) を加えて室温で一晩攪拌した。反応液を濾過し、濾液を濃縮後、残渣に 5% EDTA を加えて粉末を得た。これを 5% EDTA, 5% NaHCO<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>O で順次洗浄し、DMF-MeOH で再沈殿した。

収量 2.15 g (78%), mp. 196–198°C.

$[\alpha]_D^{26}$   $-19.1^\circ$  (c = 0.7, DMSO), R<sub>f</sub> 0.47.

6N HCl 酸分解後のアミノ酸分析値 :

Asp 1.04, Gly 1.00, Leu 1.04 (Gly の回収率, 84%).

Anal. Calcd. for C<sub>28</sub>H<sub>45</sub>N<sub>7</sub>O<sub>8</sub>S · 0.5H<sub>2</sub>O :

C, 51.83 ; H, 7.15 ; N, 15.11.

Found : C, 52.09 ; H, 7.17 ; N, 15.14.

**(16) Z(OMe)-Gly-Tyr-OMe**

Z(OMe)-Gly-OH (14.35 g, 60 mmol) と H-Tyr-OMe [その塩酸塩 (20.85 g, 90 mmol) から調製] とを DMF (300 ml) に溶解させ、DCC (13.62 g, 66 mmol) を加えて室温で一晩攪拌した。反応液を濾過し、濾液を濃縮後、得られた残渣を方法 A により精製し、MeOH と ether で 2 回再結晶をくり返した。

収量 20.10 g (81%), mp. 88–90°C.

$[\alpha]_D^{15}$   $+9.8^\circ$  (c = 0.6, DMF), R<sub>f</sub> 0.27.

Anal. Calcd. for C<sub>21</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub> :

C, 60.57 ; H, 5.81 ; N, 6.73.

Found : C, 60.72 ; H, 6.02 ; N, 7.03.

**(17) Z(OMe)-Asp(OBzl)-Gly-Tyr-OMe**

Z(OMe)-Gly-Tyr-OMe (7.0 g, 16.8 mmol) を TFA-anisole (18 ml–3.6 ml) で処理後、得られた N<sup>α</sup>-脱保護ペプチドを DMF (60 ml) に溶解させ、Et<sub>3</sub>N (2.4 ml, 16.8 mmol) を加えた。この混合液に、Z(OMe)-Asp(OBzl)-OH [その DCHA 塩 (10.0 g, 17.6 mmol) から調製] から調製した混合酸無水物の THF (100 ml) 溶液を加え、4°C で 4 時間攪拌した。溶媒を留去し、残渣を A 法で精製後、MeOH と ether で再結晶した。

収量 8.45 g (81%), mp. 84–86°C.

$[\alpha]_D^{15} -3.2^\circ (c=0.6, \text{DMF}), \quad \text{Rf}_1 \ 0.28.$

Anal. Calcd. for  $\text{C}_{32}\text{H}_{35}\text{N}_3\text{O}_{10}$  :

C, 61.83 ; H, 5.68 ; N, 6.76.

Found : C, 61.78 ; H, 5.96 ; N, 6.58.

**(18) Boc-Tyr-Asp-Gly-Tyr-OMe**

Z(OMe)-Asp(OBzl)-Gly-Tyr-OMe (8.03 g, 12.9 mmol) を MeOH (80 ml) に溶解させ、AcOH を数滴加え、Pd 触媒上水素気流下で 60 分接触還元した。反応液を濾過し、濾液を濃縮後、残渣を TFA-anisole (17 ml - 4.2 ml) で処理した。得られた  $\text{N}^\alpha$ -脱保護ペプチドを n-hexane で沈殿させた。これを DMF (80 ml) に溶解させ、 $\text{Et}_3\text{N}$  (1.8 ml, 12.9 mmol) を加え、さらに、Boc-Tyr-NHNH<sub>2</sub> (3.81 g, 12.9 mmol) から調製したアジドの DMF (30 ml) 溶液と  $\text{Et}_3\text{N}$  (2.0 ml, 14.3 mmol) を加えて、4°C で一晚攪拌した。反応液を濃縮し、残渣を 5% NaHCO<sub>3</sub> に溶解させ、AcOEt で洗浄後、水層をクエン酸で酸性にし、n-BuOH で抽出した。n-BuOH 層を H<sub>2</sub>O で洗浄後、濃縮した。得られた残渣に ether を加え粉末を得、これを MeOH と CHCl<sub>3</sub> から再結晶した。

収量 5.01 g (62%), mp. 127-130°C.

$[\alpha]_D^{15} -9.3^\circ (c=0.5, \text{DMF}), \quad \text{Rf}_3 \ 0.35.$

Anal. Calcd. for  $\text{C}_{30}\text{H}_{38}\text{N}_4\text{O}_{11} \cdot \text{H}_2\text{O}$  :

C, 55.55 ; H, 6.22 ; N, 8.64.

Found : C, 55.37 ; H, 6.47 ; N, 8.80.

**(19) Boc-Tyr-Asp-Gly-Tyr-NHNH<sub>2</sub> [13]**

Boc-Tyr-Asp-Gly-Tyr-OMe (4.85 g, 7.7 mmol) を MeOH (50 ml) に溶解させ、80% hydrazine hydrate (2.5 ml, 77.0 mmol) を加えて 24 時間放置した。溶媒を留去し、残渣に n-BuOH を加え、5% AcOH, H<sub>2</sub>O で順次洗浄後、濃縮した。残渣に ether を加え、粉末を得た。

収量 3.11 g (64%), mp. 205°C 以上分解.

$[\alpha]_D^{26} -147.0^\circ (c=0.5, \text{DMF}), \quad \text{Rf}_2 \ 0.013.$

6N HCl 酸分解後のアミノ酸分析値 :

Asp 1.01, Gly 1.00, Tyr 1.93. (Gly の回収率, 86%)

Anal. Calcd. for  $\text{C}_{29}\text{H}_{38}\text{N}_6\text{O}_{10} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  :

C, 49.56 ; H, 6.60 ; N, 11.96.

Found : C, 49.26 ; H, 6.59 ; N, 11.74.

**(20) Z(OMe)-Ser(Bzl)-Ser(Bzl)-OH · DCHA**

Z(OMe)-Ser(Bzl)-OSu (7.66 g, 16.8 mmol) と Et<sub>3</sub>N (2.4 ml, 17.1 mmol) とを, H-Ser(Bzl)-OH (2.99 g, 15.3 mmol) と Et<sub>3</sub>N (2.1 ml, 15.3 mmol) の DMF (50 ml) 溶液に加え室温で 12 時間攪拌した。溶媒を濃縮し, 残渣を方法 C により精製後, 得られた Z(OMe)-Ser(Bzl)-Ser(Bzl)-OH を DCHA 塩に誘導し, これを MeOH と ether で再結晶した。

収量 7.10 g (87%), mp. 117–120°C.

$[\alpha]_D^{15} +14.1^\circ$  (c=0.3, DMF), Rf<sub>3</sub> 0.75.

Anal. Calcd. for C<sub>41</sub>H<sub>55</sub>N<sub>3</sub>O<sub>8</sub> :

C, 68.59 ; H, 7.72 ; N, 5.85.

Found : C, 68.60 ; H, 7.80 ; N, 5.83.

**(21) Z(OMe)-Ser(Bzl)-Ser(Bzl)-OMe**

Z(OMe)-Ser(Bzl)-Ser(Bzl)-OH [その DCHA 塩 (5.00 g, 7.0 mmol) から調整] を MeOH-DMF (2 : 1, 30 ml) に溶解し, ジアゾメタン処理した。AcOH 数滴を加えた後, 溶媒を留去し, 残渣を方法 A により精製し, MeOH と ether で再結晶した。

収量 3.35 g (87%), mp. 109–111°C.

$[\alpha]_D^{15} +13.8^\circ$  (c=0.7, DMF), Rf<sub>1</sub> 0.85.

Anal. Calcd. for C<sub>30</sub>H<sub>34</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub> :

C, 65.44 ; H, 6.22 ; N, 5.09.

Found : C, 65.47 ; H, 6.16 ; N, 5.11.

**(22) Z(OMe)-Pro-Ser(Bzl)-Ser(Bzl)-OMe**

Z(OMe)-Ser(Bzl)-Ser(Bzl)-OMe (4.30 g, 7.8 mmol) を TFA-anisole (8.4 ml–1.7 ml) で処理し, 得られた N<sup>α</sup>-脱保護ペプチドを DMF (30 ml) に溶解させ, Et<sub>3</sub>N (1.1 ml, 7.8 mmol) を加えた。この混合液に, Z(OMe)-Pro-OH · DCHA 塩 (4.30 g, 9.3 mmol) から調製した混合酸無水物の THF (30 ml) 溶液を加え, 氷冷下, 5 時間攪拌した。反応液を濃縮し, 残渣を方法 A により精製後, MeOH と ether で再結晶した。

収量 3.90 g (77%), mp. 125–127°C.

$[\alpha]_D^{15} -16.2^\circ$  (c=1.0, DMF), Rf<sub>1</sub> 0.61.

Anal. Calcd. for  $C_{35}H_{41}N_3O_9$  :

C, 64.90 ; H, 6.38 ; N, 6.49.

Found : C, 64.96 ; H, 6.36 ; N, 6.55.

**(23) Boc-Cys(MBzl)-Pro-Ser(Bzl)-Ser(Bzl)-NHNH<sub>2</sub> [14]**

Z(OMe)-Pro-Ser(Bzl)-Ser(Bzl)-OMe (2.31 g, 3.6 mmol) を TFA-anisole (5.8 ml - 1.2 ml) で処理後, 得られた  $N^\alpha$ -脱保護ペプチドを DMF (20 ml) に溶解させ, Et<sub>3</sub>N (1.1 ml, 7.5 mmol) と Boc-Cys(MBzl)-OSu (1.72 g, 3.9 mmol) とを加え, 室温で一晩攪拌した。溶媒を留去し, 方法 A により精製後, 得られた油状生成物を MeOH (20 ml) に溶解させ 80% hydrazine hydrate (2.2 ml, 36 mmol) で 24 時間処理した。溶媒を留去し, 残渣を n-BuOH に溶解させ H<sub>2</sub>O で洗浄後, 濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (3×15 cm) に付し, CHCl<sub>3</sub>-MeOH (10 : 0.5) で溶出後, 目的物を含むフラクションを集め濃縮した。残渣に isopropyl ether を加え, 粉末を得た。

収量 1.46 g (51%), mp. 96-99°C.

$[\alpha]_D^{26}$  -4.0° (c = 0.5, DMF), Rf<sub>1</sub> 0.24.

6N HCl 酸分解後のアミノ酸分析値 :

Pro 1.00, Ser 1.81 (Pro の回収率, 77%).

Anal. Calcd. for  $C_{41}H_{54}N_6O_9S \cdot 0.5H_2O$  :

C, 60.35 ; H, 6.79 ; N, 10.30.

Found : C, 60.25 ; H, 6.70 ; N, 10.21.

**(24) Boc-Tyr-Pro-Gly-OMe**

Boc-Tyr-Pro-OH<sup>70)</sup> (7.95 g, 21 mmol) と HOSu (2.66 g, 23.1 mmol) との THF (100 ml) 溶液に, DCC (4.77 g, 23.1 mmol) を加え, 室温で一晩攪拌した。反応液を濾過し, 濾液に H-Gly-OMe [その塩酸塩 (3.96 g, 31.5 mmol) から調整] の DMF (100 ml) 溶液, および Et<sub>3</sub>N (2.9 ml, 21 mmol) を加え, 室温で一晩攪拌した。溶媒を留去し, 残渣を方法 A により精製後, MeOH と isopropyl ether から再沈殿した。

収量 6.41 g (68%), mp. 74-76°C.

$[\alpha]_D^{15}$  -39.5° (c = 0.4, DMF), Rf<sub>1</sub> 0.28.

Anal. Calcd. for  $C_{22}H_{31}N_3O_7 \cdot 0.5H_2O$  :

C, 57.63 ; H, 7.04 ; N, 9.17.

Found : C, 57.96 ; H, 7.30 ; N, 8.57.

**(25) Boc-Asn-Ser(Bzl)-OH**

H-Ser(Bzl)-OH (4.26 g, 21.8 mmol) の DMF (100 ml) 溶液に Boc-Asn-ONp (8.48 g, 24.0 mmol), および Et<sub>3</sub>N (3.4 ml, 24.0 mmol) を加え, 室温で 12 時間攪拌した。溶媒を留去し, 残渣を方法 C により精製後, MeOH と ether で再沈殿した。

収量 6.05 g (68%), mp. 182–184°C.

$[\alpha]_D^{15} +4.9^\circ$  (c = 0.4, DMF), Rf<sub>3</sub> 0.44.

Anal. Calcd. for C<sub>19</sub>H<sub>27</sub>N<sub>3</sub>O<sub>7</sub> :

C, 55.73 ; H, 6.65 ; N, 10.26.

Found : C, 55.86 ; H, 6.65 ; N, 10.36.

**(26) Boc-Asn-Ser(Bzl)-OMe**

Boc-Asn-Ser(Bzl)-OH (7.0 g, 17.1 mmol) を MeOH-DMF (1 : 1, 70 ml) に溶解させ, ジアゾメタン-エーテル溶液を加え, 常法によりメチル化した。AcOH を数滴加えた後, 溶媒を留去し, 残渣を A 法により精製した。これを MeOH と ether から再結晶した。

収量 6.60 g (91%), mp. 97–100°C.

$[\alpha]_D^{15} -14.4^\circ$  (c = 0.6, DMF), Rf<sub>3</sub> 0.66.

Anal. Calcd. for C<sub>20</sub>H<sub>29</sub>N<sub>3</sub>O<sub>7</sub> :

C, 56.72 ; H, 6.90 ; N, 9.92.

Found : C, 56.47 ; H, 6.99 ; N, 9.82.

**(27) Boc-Asn-Ser(Bzl)-NHNH<sub>2</sub>**

Boc-Asn-Ser(Bzl)-OMe (6.5 g, 15.3 mmol) を MeOH (60 ml) に溶解させ, 80% hydrazine hydrate (9.6 ml, 10 equiv.) を加えて室温で一晩放置した。得られた固体残渣を DMF-MeOH で再結晶した。

収量 4.50 g (69%), mp. 173–176°C.

$[\alpha]_D^{15} -15.0^\circ$  (c = 0.4, DMSO), Rf<sub>2</sub> 0.56.

Anal. Calcd. for C<sub>19</sub>H<sub>29</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub> :

C, 53.89 ; H, 6.90 ; N, 16.54.

Found : C, 53.93 ; H, 7.11 ; N, 16.67.

**(28) Boc-Asn-Ser(Bzl)-Tyr-Pro-Gly-OMe**

Boc-Tyr-Pro-Gly-OMe (2.50 g, 5.6 mmol) を TFA-anisole (5.0 ml-1.2 ml) で処理後、得られた  $N^\alpha$ -脱保護ペプチドを DMF (30 ml) に溶解させ、 $\text{Et}_3\text{N}$  (0.78 ml, 5.6 mmol) を加えた。この混合液に Boc-Asn-Ser(Bzl)-NHNH<sub>2</sub> (2.59 g, 6.1 mmol) から調製したアジドの DMF (20 ml) 溶液、および  $\text{Et}_3\text{N}$  (0.94 ml, 6.7 mmol) を加え、4°C で 12 時間攪拌した。溶媒を留去後、残渣を n-BuOH に溶解させ、5% クエン酸、 $\text{H}_2\text{O}$  で順次洗浄後、濃縮した。得られた残渣に ether を加えて沈殿を得、これを MeOH-isopropyl ether から再沈殿した。

収量 3.70 g (90%), mp. 100-103°C.

$[\alpha]_D^{15}$  -41.4° (c=0.3, DMF),  $R_f$  0.59.

Anal. Calcd. for  $\text{C}_{36}\text{H}_{48}\text{N}_6\text{O}_{11} \cdot 0.5 \text{H}_2\text{O}$  :

C, 57.66 ; H, 6.59 ; N, 11.21.

Found : C, 57.59 ; H, 6.50 ; N, 11.30.

#### (29) Boc-Asn-Ser(Bzl)-Tyr-Pro-Gly-NHNH<sub>2</sub> [15]

Boc-Asn-Ser(Bzl)-Tyr-Pro-Gly-OMe (2.70 g, 3.6 mmol) を MeOH (30 ml) に溶解させ、80% hydrazine hydrate (2.3 ml, 10 equiv.) を加えて室温で一晩放置した。溶媒を留去し、残渣を n-BuOH に溶解後、 $\text{H}_2\text{O}$  で洗浄し、濃縮した。得られた粉末の残渣を MeOH と ether で再沈殿した。

収量 2.52 g (93%), mp. 130-133°C.

$[\alpha]_D^{26}$  -10.6° (c=0.9, DMF),  $R_f$  0.42.

6N HCl 酸分解後のアミノ酸分析値 :

Asp 1.09, Ser 0.96, Pro 1.00, Gly 1.00, Tyr 0.94

(Gly の回収率, 74%)

Anal. Calcd. for  $\text{C}_{35}\text{H}_{48}\text{N}_8\text{O}_{10} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  :

C, 52.88 ; H, 6.85 ; N, 14.10.

Found : C, 52.57 ; H, 6.39 ; N, 14.15.

#### (30) Boc-Leu-Asp-Ser(Bzl)-Tyr-(30-53)-OBzl

[ Boc-(EGF 26-53)-OBzl ]

第 2 章第 2 節で得たテトラコサペプチドエステル (3.50 g, 0.80 mmol) を TFA-anisole-EDT (10.0 ml - 2.1 ml - 0.40 ml) で処理後、得られた  $N^\alpha$ -脱保護ペプチドを DMSO-DMF (1:1, 30 ml) に溶解させ、 $\text{Et}_3\text{N}$  (112  $\mu\text{l}$ , 0.80 mmol) を加えた。この混合液に Boc-Leu-Asp-Ser(Bzl)-Tyr-NHNH<sub>2</sub> (0.84 g, 1.20



mmol) から調製したアジドの DMF (7 ml) 溶液と, Et<sub>3</sub>N (184 μl, 1.31 mmol) を加え, 4°C で 12 時間攪拌した。溶媒を留去し, 残渣を方法 B により精製後, DMF-DMSO (1:1) と MeOH で, 2 回再沈殿をくり返した。

収量 3.08 g (78%), mp. 254°C 以上分解。

$[\alpha]_D^{28}$  -36.5° (c=0.2, DMSO), Rf<sub>2</sub> 原点。

Anal. Calcd. for C<sub>239</sub>H<sub>318</sub>N<sub>44</sub>O<sub>58</sub>S<sub>7</sub> · 5H<sub>2</sub>O :

C, 56.84 ; H, 6.55 ; N, 12.21.

Found : C, 56.93 ; H, 6.48 ; N, 12.27.

**(31) Boc-Ile-Glu(OBzl)-Ser(Bzl)-(26-53)-OBzl**

[ Boc-(EGF 23-53)-OBzl ]

上記 Boc-(EGF 26-53)-OBzl (3.08 g, 0.62 mmol) を TFA-anisole-EDT (9 ml - 1.6 ml - 0.31 ml) で処理後, 得られた N<sup>α</sup>-脱保護ペプチドを DMSO-DMF (1:1, 30 ml) に溶解させ Et<sub>3</sub>N (87 μl, 0.62 mmol) を加えた。この混合液に, Boc-Ile-Glu(OBzl)-Ser(Bzl)-NHNH<sub>2</sub> (0.68 g, 1.06 mmol) から調製したアジドの DMF (2 ml) 溶液, および Et<sub>3</sub>N (163 μl, 1.16 mmol) を加え, 4°C で 12 時間攪拌した。さらに同アジド〔ヒドラジド (0.40 g, 0.62 mmol) から調製〕の DMF (1 ml) 溶液と Et<sub>3</sub>N (87 μl, 0.62 mmol) とを加え, 12 時間攪拌を続けた。溶媒を留去し, 残渣を方法 B により精製後, DMSO-DMF (1:1) と MeOH で 2 回再沈殿をくり返した。

収量 3.04 g (89%), mp. 251°C 以上分解。

$[\alpha]_D^{28}$  -23.7° (c=0.3, DMSO), Rf<sub>2</sub> 原点。

Anal. Calcd. for C<sub>267</sub>H<sub>353</sub>N<sub>47</sub>O<sub>64</sub>S<sub>7</sub> · 8H<sub>2</sub>O :

C, 57.12 ; H, 6.62 ; N, 11.73.

Found : C, 57.08 ; H, 6.56 ; N, 11.79.

**(32) Boc-His-(23-53)-OBzl**

[ Boc-(EGF 22-53)-OBzl ]

上記 Boc-(EGF 23-53)-OBzl (3.00 g, 0.55 mmol) を TFA-anisole-EDT (8.5 ml - 1.4 ml - 0.28 ml) で処理後, 得られた N<sup>α</sup>-脱保護ペプチドを DMSO-DMF (1:1, 20 ml) に溶解させ, Et<sub>3</sub>N (77 μl, 0.55 mmol) を加えた。この混合液に, Boc-His-NHNH<sub>2</sub> (0.30 g, 1.10 mmol) から調製したアジドの DMF (3 ml) 溶液と, Et<sub>3</sub>N (169 μl, 1.2 mmol) を加え, 4°C で 12 時間攪拌した。さらに, 同ア

ジド〔ヒドラジド (0.15 g, 0.55 mmol) から調製〕, および  $\text{Et}_3\text{N}$  (77  $\mu\text{l}$ , 0.55 mmol) を加え, 12 時間攪拌を続けた。反応液を濃縮し, 残渣に  $\text{H}_2\text{O}$  を加えて粉末を得, これを DMSO-DMF (1 : 1) と MeOH で再沈殿した。

収量 2.99 g (97%), mp. 254°C 以上分解。

$[\alpha]_D^{28}$  -25.5° (c = 0.4, DMSO),  $\text{Rf}_2$  原点。

Anal. Calcd. for  $\text{C}_{273}\text{H}_{360}\text{N}_{50}\text{O}_{65}\text{S}_7 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  :

C, 57.19 ; H, 6.58 ; N, 12.22.

Found : C, 57.20 ; H, 6.54 ; N, 12.19.

**(33) Boc-Gly-Val-Cys(MBzl)-Met-(22-53)-OBzl**

〔Boc-(EGF 18-53)-OBzl〕

上記 Boc-(EGF 22-53)-OBzl (2.93 g, 0.52 mmol) を TFA-anisole-EDT (10 ml - 1.6 ml - 0.31 ml) で処理後, 得られた  $\text{N}^\alpha$ -脱保護ペプチドを DMSO-DMF (1 : 1, 20 ml) に溶解させ,  $\text{Et}_3\text{N}$  (73  $\mu\text{l}$ , 0.52 mmol) を加えた。この混合液に, Boc-Gly-Val-Cys(MBzl)-Met-NHNH<sub>2</sub> (0.67 g, 1.04 mmol) から調製したアジドの DMF (6 ml) 溶液, および  $\text{Et}_3\text{N}$  (161  $\mu\text{l}$ , 1.15 mmol) を加え, 4°C で 12 時間攪拌した。さらに, 同アジド〔ヒドラジド (0.34 g, 0.52 mmol) から調製〕の DMF (3 ml) 溶液と  $\text{Et}_3\text{N}$  (73  $\mu\text{l}$ , 0.52 mmol) とを加え, 12 時間攪拌を続けた。反応液を濃縮し, 残渣に  $\text{H}_2\text{O}$  を加え, 粉末を得た。これを DMSO-DMF (1 : 1) と MeOH から 2 回再沈殿した。

収量 3.10 g (97%), mp. 268°C 以上分解。

$[\alpha]_D^{28}$  -24.8° (c = 0.4, DMSO),  $\text{Rf}_2$  原点。

Anal. Calcd. for  $\text{C}_{296}\text{H}_{394}\text{N}_{54}\text{O}_{70}\text{S}_9 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  :

C, 56.94 ; H, 6.59 ; N, 12.12.

Found : C, 56.90 ; H, 6.62 ; N, 12.03.

**(34) Boc-Cys(MBzl)-Leu-Asn-Gly-(18-53)-OBzl**

〔Boc-(EGF 14-53)-OBzl〕

上記 Boc-(EGF 18-53)-OBzl (3.27 g, 0.54 mmol) を TFA-anisole-EDT (11 ml - 1.9 ml - 0.36 ml) で処理後, 単離した  $\text{N}^\alpha$ -脱保護ペプチドを DMSO-DMF (1 : 1, 20 ml) に溶解させ,  $\text{Et}_3\text{N}$  (75  $\mu\text{l}$ , 0.54 mmol) を加えた。この混合液に, Boc-Cys(MBzl)-Leu-Asn-Gly-NHNH<sub>2</sub> (0.68 g, 1.08 mmol) から調製したアジドの DMF (7 ml) 溶液, および  $\text{Et}_3\text{N}$  (165  $\mu\text{l}$ , 1.18 mmol) を加え, 4°C で 12

時間攪拌した。さらに、1当量の同アジド〔ヒドラジド(0.34 g, 0.54 mmol)から調製〕を加え、12時間攪拌を続けた。溶媒を留去し、残渣にH<sub>2</sub>Oを加え、粉末を得た。これをDMSO-DMF(1:1)とMeOHで再沈殿後、Sephadex LH-60を用い、DMSO-DMF(3:7)を溶出液としゲル透過した。各画分のUV 280 nmの吸収を測定し、目的物を含むフラクションを集めて濃縮し、DMSO-DMF(1:1)とMeOHで再沈殿した。

収量 2.15 g (61%), mp. 252°C 以上分解。

$[\alpha]_D^{28}$  -17.8° (c=0.3, DMSO), Rf<sub>2</sub> 原点。

Anal. Calcd. for C<sub>319</sub>H<sub>427</sub>N<sub>59</sub>O<sub>76</sub>S<sub>10</sub> · 12 H<sub>2</sub>O :

C, 56.00 ; H, 6.65 ; N, 12.08.

Found : C, 55.78 ; H, 6.51 ; N, 11.99.

### (35) Boc-Tyr-Asp-Gly-Tyr-(14-53)-OBzl

[ Boc-(EGF 10-53)-OBzl ]

上記ペプチド, Boc-(EGF 14-53)-OBzl(1.05 g, 0.16 mmol) を TFA-anisole-EDT (5.0 ml - 0.55 ml - 0.11 ml) で処理後, 単離した N<sup>α</sup>-脱保護ペプチドを DMSO-DMF (1:1, 10 ml) に溶解させ, Et<sub>3</sub>N (22 μl, 0.16 mmol) を加えた。この混合液に, Boc-Tyr-Asp-Gly-Tyr-NHNH<sub>2</sub> (0.40 g, 0.64 mmol) から調製したアジドの DMF (4 ml) 溶液, および Et<sub>3</sub>N (98 μl, 0.70 mmol) を加え, 4°C で 12 時間攪拌した。さらに, 同アジド〔ヒドラジド(0.30 g, 0.48 mmol) から調製〕と, Et<sub>3</sub>N (67 μl, 0.48 mmol) とを加え, 12 時間攪拌を続けた。溶媒を留去し, H<sub>2</sub>O を加え, 得られた粉末を DMSO-DMF (1:1) と MeOH から 2 回再沈殿した。

収量 1.11 g (98%), mp. 250°C 以上分解。

$[\alpha]_D^{28}$  -32.3° (c=0.1, DMSO), Rf<sub>2</sub> 原点。

Anal. Calcd. for C<sub>343</sub>H<sub>453</sub>N<sub>63</sub>O<sub>84</sub>S<sub>10</sub> · 12 H<sub>2</sub>O :

C, 56.10 ; H, 6.55 ; N, 12.02.

Found : C, 55.84 ; H, 6.30 ; N, 11.96.

### (36) Boc-Cys(MBzl)-Pro-Ser(Bzl)-Ser(Bzl)-(10-53)-OBzl

[ Boc-(EGF 6-53)-OBzl ]

Boc-(EGF 10-53)-OBzl (0.95 g, 0.13 mmol) を TFA-anisole-EDT (5.0 ml - 0.52 ml - 0.10 ml) で処理後, 単離した N<sup>α</sup>-脱保護ペプチドを DMSO-DMF (1 :

1, 10 ml) に溶解させ,  $\text{Et}_3\text{N}$  (19  $\mu\text{l}$ , 0.13 mmol) を加えた。この混合液に, Boc-Cys(MBzl)-Pro-Ser(Bzl)-Ser(Bzl)-NHNH<sub>2</sub> (0.54 g, 0.67 mmol) から調製したアジドと  $\text{Et}_3\text{N}$  (103  $\mu\text{l}$ , 0.74 mmol) を加え, 4°C で 12 時間攪拌した。さらに同アジド〔ヒドラジド (0.42 g, 0.52 mmol) から調製〕と,  $\text{Et}_3\text{N}$  (73  $\mu\text{l}$ , 0.52 mmol) を加え, 12 時間攪拌した。反応液を濃縮し, 残渣に  $\text{H}_2\text{O}$  を加え沈殿を得た。これを DMSO-DMF (1:1) と MeOH で 2 回, 再沈殿をくり返した。

収量 1.02 g (98%), mp. 242°C 以上分解。

$[\alpha]_D^{28}$  -7.4° (c = 0.1, DMSO),  $\text{Rf}_2$  原点。

Anal. Calcd. for  $\text{C}_{379}\text{H}_{495}\text{N}_{67}\text{O}_{91}\text{S}_{11} \cdot 16\text{H}_2\text{O}$  :

C, 56.29 ; H, 6.57 ; N, 11.61.

Found : C, 56.05 ; H, 6.16 ; N, 11.75.

**(37) Boc-Asn-Ser(Bzl)-Tyr-Pro-Gly-(6-53)-OBzl**

〔Boc-(EGF 1-53)-OBzl〕

上記ペプチド, Boc-(EGF 6-53)-OBzl (1.02 g, 0.13 mmol) を TFA-anisole-EDT (5.0 ml - 0.57 ml - 0.11 ml) で処理し, 得られた  $\text{N}^\alpha$ -脱保護ペプチドを DMSO-DMF (1:1, 10 ml) に溶解させ,  $\text{Et}_3\text{N}$  (18  $\mu\text{l}$ , 0.13 mmol) を加えた。この混合液に, Boc-Asn-Ser(Bzl)-Tyr-Pro-Gly-NHNH<sub>2</sub> (0.58 g, 0.78 mmol) から調製したアジドと,  $\text{Et}_3\text{N}$  (121  $\mu\text{l}$ , 0.86 mmol) を加え, 4°C で 12 時間攪拌した。さらに, 同アジド〔ヒドラジド (0.39 g, 0.52 mmol) から調製〕と  $\text{Et}_3\text{N}$  (73  $\mu\text{l}$ , 0.52 mmol) を加え, 12 時間攪拌を続けた。反応液を濃縮し, 残渣に  $\text{H}_2\text{O}$  を加えて粉末を得, これを DMSO-DMF (1:1) と MeOH で再沈殿した。これを Sephadex LH-60 を用い, DMSO-DMF (3:7) を溶出液としてゲル濾過し, 9 ml ずつ分画した。各画分の 280 nm での UV 吸収を測定し, 目的物を含む画分 (tube Nos. 53-70) を集めて溶媒を留去し, 目的物を DMSO-DMF (1:1) と MeOH から再沈殿した。

収量 0.94 g (85%), mp. 251°C 以上分解。

$[\alpha]_D^{28}$  -40.0° (c = 0.2, DMSO),  $\text{Rf}_2$  原点。

Anal. Calcd. for  $\text{C}_{409}\text{H}_{531}\text{N}_{73}\text{O}_{99}\text{S}_{11} \cdot 15\text{H}_2\text{O}$  :

C, 56.61 ; H, 6.52 ; N, 11.79.

Found : C, 56.34. ; H, 6.14 ; N, 11.90.

### (38) 保護 EGF 中の Cys(MBzl)(O) の還元

保護 EGF (940 mg, 0.11 mmol) を HMPA-DMF (1:1, v/v, 10 ml) 中に溶解させ, thiophenol (6.9 ml, 600equiv.) を加えて, argon 気流下, 40°C にて 4 日間インキュベートした。同一条件下, 対照として用いた Z(OMe)-Cys(MBzl)-(O)-OH, Z(OMe)-Met(O)-OH は完全に還元された。反応液を減圧下濃縮し, AcOEt を加え, 生ずる粉末を HMPA-AcOEt で再沈殿した。

収量 870 mg (93%)。

mp. 255°C 以上分解。

$[\alpha]_D^{20}$  -43.0° (c = 0.1, DMSO)。

アミノ酸分析によるシスチンの回収:

還元前は 1.91, 還元後は 2.20 (理論値, 3)

### (39) 保護 EGF の脱保護・還元

Thiophenol で還元した保護 EGF (100 mg, 11.9 μmol) を, m-cresol (249 μl, 200equiv.) および EDT (50 μl, 50equiv.) の存在下, TFA 中 1M TFMSA-thioanisole (モル比 1:1, 4.2 ml) で氷冷下 120 分処理した。反応液に dry ether を加え生ずる粉末を KOH 上 30 分減圧下乾燥した。得られた粉末について同条件の処理をさらに 2 回繰り返した。得られた脱保護ペプチドを 0.1 M Tris-HCl buffer-6 M guanidine-HCl (5 ml) に溶解させ, 10% MeNH<sub>2</sub> で pH を 8.0 に調整した。この溶液にジチオスライトール (DTT) (550 mg, 300equiv.) を加え, argon 気流下 25°C で一夜攪拌した。

### (40) 脱保護ペプチドの空気酸化

上記の反応液を 1N HCl で pH 4 に調整し, Sephadex G-10 (2.8 × 68 cm) カラムに apply して 2N AcOH で溶出した。各画分 (6 ml) の 280 nm での UV 吸収を測定し, 最初に溶出される主ピーク (tube Nos. 22-40) を集め, 氷で冷却した H<sub>2</sub>O (700 ml) で希釈した。氷冷下ゆるやかに攪拌しながら 28% アンモニア水でこの希釈液の pH を 8.2 にした後, H<sub>2</sub>O で全体を 1,000 ml に調整した (最終ペプチド濃度, 0.07 mg/ml)。この反応液を室温で 5 日間放置した。この間 Ellman test での 412 nm の吸収は 0.082 から 0.014 の一定値に達した (Fig. 27-a)。その後さらに 2 日間, 反応液をゆるやかに攪拌した。反応液の pH を 10% AcOH で 6.6 に調整した後, 全溶液を凍結乾燥した。この残渣に 2N AcOH (5 ml) を加え, 不溶物 (約 7 mg) を遠心沈降により除去した後, 上澄液を Se-

phadex G-10 (2.8×81 cm) のカラムに apply し、2N AcOH で溶出した。各画面分 (6 ml) の 280 nm における UV 吸収を測定し、主ピーク (Fig. 27-b, tube Nos. 31-48) を集め、その溶媒を凍結乾燥により除去して羽毛状粉末を得た。収量 23 mg (32%)。5 日間の酸化反応後の sample では、主ピークの後ろに 2 つの shoulder ピークが認められた (Fig. 27-b. 破線)。

#### (41) G-10 精製 sample の DEAE-Cellulose イオン交換クロマトグラフィーによる精製

上記の 7 日間の酸化後の sample (4.07 mg) を 2N AcOH (0.3 ml) に溶解させ、その pH を 5% NH<sub>4</sub>OH で 7.0 に調整した後、pH 5.6 の 0.02 M AcONH<sub>4</sub> buffer (30 ml) で希釈した。この溶液を pH 5.6 の 0.02 M AcONH<sub>4</sub> buffer で平衡化した DEAE-cellulose カラムに apply した。DEAE-cellulose カラムを上記の出発 buffer (75 ml) で溶出した後、pH 5.6 の 0.2 M AcONH<sub>4</sub> buffer (150 ml) と上記出発 buffer (50 ml) との gradient 溶出を行なった。各画面分 (5.0 ml) を集め、その 280 nm での UV 吸収を測定した。素通り peak (Fig. 28. tube Nos. 4-18) の後に、目的物ピーク (Fig. 28. tube Nos. 23-26) が小さな shoulder ピークとともに gradient 溶出によって溶出された。この目的物ピークの最大吸収位置 (tube No. 25) は、報告<sup>32)</sup>にみられる天然 EGF の同一条件下での溶出位置と一致しているものと判断される。目的物ピークの画面分を集め、溶媒および AcONH<sub>4</sub> を凍結乾燥を繰り返すことによって除去し、白色羽毛状粉末 0.61 mg (15%) を得た。素通り画面からは黄色味を帯びた粉末 0.69 mg が得られたが、胃酸分泌抑制活性を示さなかった。

G-10 により得られた crude sample の残り (18.9 mg) を同様に DEAE-cellulose で精製した。全収量 ; 23 mg より 3.70 mg (16%)

#### (42) DEAE 精製 sample の HPLC による精製

DEAE 精製後の sample を Cosmosil 5C<sub>18</sub> (4.6×150 mm) を用いる逆相高速液体クロマトグラフィーにより精製した。上記 DEAE 精製後の sample (3.65 mg) を 1N AcOH (0.5 ml) に溶解させ H<sub>2</sub>O (1.5 ml) で希釈後、その pH を 1N NH<sub>4</sub>OH で 5.8 に調整した。その溶液より 200 μl をとり、Cosmosil 5C<sub>18</sub> カラムに apply し、40°C で CH<sub>3</sub>CN : 0.05 N AcOH-Et<sub>3</sub>N (pH 5.6) = 30 : 70 溶液を用いて溶出し、目的物ピーク (Fig. 29-a, retention time 12.5 分) 部分を pool した。残りの sample についても同様に溶出を行ない、目的物ピークを集め凍結乾燥後、白色羽毛状

粉末を得た。収量 3.0 mg (80%)。Thiophenol 処理した保護 EGF より収率；4.1%。ここに得られた合成品の純度は HPLC 上 98% 以上 (Fig. 29-b) と算出され、また Cosmosil 5C<sub>18</sub> を用いる HPLC で合成品 (3 μg) と天然品 (3 μg) とを混合しても単一のピークが得られた (Fig. 29-c)。

HPLC 精製後の sample は Pharmalyte (pH 3-10) を含む 7.5% ポリアクリルアミドゲル (0.5 × 7 cm) を用いる disk 等電点電気泳動において、200 V, 4 時間通電後、陽極より 1 cm 移動した (Fig. 30-b)。天然 EGF と合成 EGF (各 20 μg) を混合した sample の disk 等電点電気泳動 (Fig. 30-c) によって、上記の移動度が天然 EGF のそれと一致することが確認された (等電点, 4.6)。

UV ; 280 nm での  $E_{1\text{cm}}^{1\%}$  30.1.

(文献値,<sup>31)</sup> 30.9)

$[\alpha]_D^{20}$  -105.9° (c = 0.2, 2N AcOH)

6 規定塩酸による酸加水分解後のアミノ酸組成を Table 4 に示した。

#### (43) グルタチオン存在下における空気酸化反応

上記の procedure に従い、thiophenol で還元した保護 EGF (100 mg, 11.9 μmol) を脱保護し、0.1 M Tris-buffer-6M guanidine-HCl (5 ml) 中 pH 8.0 で DTT (550 mg, 300equiv.) を用いて還元した。反応液 pH を 1N HCl で 4.0 に調整後、Sephadex G-10 カラム (2.8 × 61 cm) に apply し、2N AcOH で溶出した。各画分の 280 nm における UV 吸収を測定し、主ピークに相当する画分を集め、氷で冷却した H<sub>2</sub>O で 300 ml に希釈した (最終ペプチド濃度 0.24 mg/ml)。この水溶液に還元型グルタチオン (37 mg, 10equiv.) および酸化型グルタチオン (73 mg, 10equiv.) を加えた後、氷冷下 28% アンモニア水でその pH を 8.2 に調整し、25°C で 5 日間放置した。析出する少量の不溶物を遠心沈降により除去した後、全溶液を凍結乾燥した。残渣を 2N AcOH (2 ml) に溶解させ、Sephadex G-10 カラム (2.8 × 61 cm) に apply し、2N AcOH で溶出した。各画分 (6.2 ml) の 280 nm における UV 吸収を測定し、主ピークに相当する画分 (tube Nos. 24-32) を集めて凍結乾燥を行ない吸湿性粉末を得た。混在するグルタチオンを除去するため同一カラムで再クロマトを行ない、羽毛状粉末 8 mg (11%) を得た。この sample (4.6 mg) を DEAE-cellulose イオン交換クロマトグラフィーにより精製し、天然 EGF とほぼ同じ位置に溶出されるピークより白色羽毛状粉末 0.64 mg (14%) を得たが、本品は HPLC 上天然 EGF より遅く溶出される

ことがわかった。

HPLC 溶出時間 ; 39 分 (天然 EGF は 12.5 分)

6 規定塩酸による酸加水分解後のアミノ酸組成 ;

Asp 6.95(7), Thr 2.13(2), Ser 5.43(6), Glu 5.05(3+2), Pro  
1.48(2), Gly 7.10(6+2), Cys 3.10(3+1), Val 1.20(2), Met  
0.51(1), Ile 1.53(2), Leu 4.00(4), Tyr 4.08(5), His 0.72(1),  
Arg 4.52(4)

(Leu の回収率 53%, カッコ内は理論値)



## 引 用 文 献

- 1) S. Cohen, *J. Biol. Chem.*, 237, 1555 (1962).
- 2) C. R. Savage, Jr., T. Inagami, and S. Cohen, *J. Biol. Chem.*, 247, 7612 (1972).
- 3) C. R. Savage, Jr., J. H. Hash, and S. Cohen, *J. Biol. Chem.*, 248, 7669 (1973).
- 4) H. Gregory, *Nature*, 257, 325(1975); H. Gregory and I. R. Willshire, *Z. Physiol. Chem.*, 356, 1765(1975).
- 5) J. M. Bower, R. Camble, H. Gregory, E. L. Gerring, and I. R. Willshire, *Experientia*, 31, 825 (1975).
- 6) A. Gray, T. J. Dull, and A. Ullrich, *Nature*, 303, 722 (1983).
- 7) J. Scott, M. Urdea, M. Quiroga, R. Sanchez-Pescador, N. Fong, M. Selby, W. J. Rutter, and G. I. Bell, *Science*, 221, 236 (1983).
- 8) R. Camble and N. N. Petter, "Peptide 1976" Proceedings of the Fourteenth European Peptide Symposium, Ed by A. Loffet, p. 299 (1976).
- 9) *Biochem. J.*, 102, 23 (1967); *ibid.*, 104, 17 (1967); *ibid.*, 126, 773 (1972); *Eur. J. Biochem.*, 138, 5 (1984); *ibid.*, 138, 9 (1984).
- 10) S. Moore and W. H. Stein, in "Methods in Enzymology Vol. VI." Ed. by S. P. Colowick and N. D. Kaplan, Academic Press, N. Y. 1960, p819.
- 11) F. Sanger and E. O. P. Thompson, *Biochim. Biophys. Acta.*, 71, 468 (1963); B. Iselin, *Helv. Chim. Acta.*, 45, 1510 (1962).
- 12) D. H. Live, W. C. Agosta, and D. Cowburn, *J. Org. Chem.*, 42, 3556 (1977).
- 13) S. Akabori, S. Sakakibara, Y. Shimonishi, and Y. Nobuhara, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 37, 433 (1964).
- 14) S. Sakakibara, Y. Shimonishi, Y. Kishida, M. Okada, and H. Sugihara, *Bull. Chem. Soc. Japan*, 40, 2164 (1967).
- 15) H. Yajima, Y. Kiso, H. Ogawa, N. Fujii, and H. Irie, *Chem. Pharm. Bull.*, 23, 1164 (1975).

- 16) H. Yajima, N. Fujii, H. Ogawa, and H. Kawatani, *J.C.S.Chem.Comm.*, 1974, 107.
- 17) H. Yajima, and N. Fujii, *J. C. S. Chem. Comm.*, 1980, 115.; N.Fujii and H. Yajima, *J.C. S. Perkin I*, 1981, 831.
- 18) N.Fujii and H. Yajima, *Chem. Pharm. Bull.*, 23, 1596 (1975).
- 19) N.Fujii, T.Sasaki, S.Funakoshi, H.Irie and H. Yajima, *Chem. Pharm. Bull.*, 26, 650 (1978).
- 20) R.K.Blackwood, J.J.Beereboom, H.H.Bennhard, M. S. Wittenau, and C.R.Stephens, *J. Am. Chem. Soc.*, 85, 3943 (1963).
- 21) E.Goethals and P.de Radziyzyky, *Bull. Soc. Chem. Belgs.*, 73, 546 (1964).
- 22) V. du Vigneaud, L.F.Audrich, and H.S.Loring, *J. Am. Chem. Soc.*, 52, 4500 (1930).
- 23) C.R.Harington and T.H.Mead, *Biochem. J.*, 30, 1598 (1936); D. G. Large, H. N. Rydon, and J. A. Shofield, *J. Chem. Soc.*, 1951, 1749.
- 24) M.L.Dedman, T.H.Farmer, and C.Morris, *Biochem. J.*, 66, 166 (1957); B. Iselin, *Helv. Chim. Acta*, 44, 61 (1961); J.I.Harris and P.Ross, *Biochem. J.*, 71, 434 (1959); K. P. Polzhofer and K. H. Ney, *Tetrahedron*, 27, 1997 (1971); D. W. Chasar, *J. Org. Chem.*, 36, 611 (1971); R. A. Houghton and C. H. Li, *Proc. Am. Pept. Symp.*, 5th, Ed. M. Goodman and J. Meienhofer, John Wiley, N. Y., 1977, p. 458. ; D.L.J.Clive, W.A. Kiel, S.M.Menchen and C.K.Wong, *J.C.S.Chem.Comm.*, 1977, 657. ; R. G. Nuzzo, H.J.Simon, and J.S.Filippo, Jr., *J.Org.Chem.*, 42, 568 (1977); see other references cited therein.
- 25) D.F.Veber, J.D.Milkowski, R.G.Denkewalter and R.Hirschmann, *Tetrahedron Lett.*, 3057 (1968); D.F.Veber, J.D.Milkowski, S.L.Varga, R. G. Denkewalter, and R. Hirschmann, *J. Am. Chem. Soc.*, 94, 5456 (1972).
- 26) B. Kamber, *Helv. Chim. Acta*, 54, 927 (1971).
- 27) I.J.Galpin, F.E.Hancock, R.K.Handa, A.G.Jackson, G.W.Kenner, R. Ramage, and B.Singh, *Tetrahedron*, 35, 2791 (1979).
- 28) P.Sieber, B.Kamber, A.Hartmann, A.Jöhl, B.Riniker, and W. Rittel, *Helv. Chim. Acta.*, 60, 27 (1977).

- 29) S. Cohen and G. A. Elliot, *J. Invest. Dermatol.*, 40, 1 (1963).
- 30) S. Cohen and G. Carpenter, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 72, 1317(1975).
- 31) J. M. Taylor, W. M. Mitchell, and S. Cohen, *J. Biol. Chem.*, 247, 5928 (1972).
- 32) C. R. Savage, Jr. and S. Cohen, *J. Biol. Chem.*, 247, 7609 (1972).
- 33) S. Cohen, G. Carpenter, and K. J. Lembach, *Adv. Metab. Disord.*, 8, 265 (1975).
- 34) M. D. Hollenberg and H. Gregory, *Life Sci.*, 20, 267 (1976).
- 35) P. T. Blossie, D. C. Edwards, E. L. Fenton, L. M. Parot, and H. Tuchmann, *J. Invest. Dermatol.*, 64, 282 (1975).
- 36) C. Frati, I. Corelli, R. Mozzi, and L. Frati, *Cell. Differ.*, 1, 239(1972).
- 37) J. B. Elder, P. C. Ganguli, I. E. Gillespie, E. L. Gerring, and H. Gregory, *Gut*, 16, 887 (1975).
- 38) I. Diamond, A. Legg, J. A. Schneider, and E. Rozengurt, *J. Biol. Chem.*, 253, 866 (1978).
- 39) S. P. Rose, R. M. Pruss, and H. R. Hershmann, *J. Cell. Physiol.*, 86, 593 (1975).
- 40) J. G. Rheinwald and H. Green, *Nature*, 265, 421 (1977).
- 41) R. L. Byyny, D. N. Orth, and S. Cohen, *Endocrinology*, 90, 1261 (1972).
- 42) D. T. Krieger, H. Hauser, A. Liotta, and A. Zelenetz, *Endocrinology*, 99, 1589 (1976).
- 43) M. S. Urdea, J. P. Merryweather, G. T. Mullenbach, D. Coit, U. Heberlein, P. Valenzuela, and P. J. Barr, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 80, 7461 (1983).
- 44) H. Yajima and N. Fujii, *J. Am. Chem. Soc.*, 103, 5867 (1981).
- 45) Y. Kiso, S. Nakamura, K. Ito, K. Ukawa, K. Kitagawa, T. Akita, and H. Moritoki, *J. C. S. Chem. Comm.*, 1979, 971,
- 46) H. Yajima and N. Fujii, "The Peptides" Vol. 5., p. 65, Ed. by E. Gross and J. Meienhofer, Academic Press, 1983.
- 47) H. Yajima, M. Takeyama, J. Kanaki, and K. Mitani, *J. C. S. Chem. Comm.*, 1978, 482.
- 48) J. Martinez and M. Bodanszky, *Int. J. Peptide Protein Res.*, 12, 277

- (1978) and other references cited therein.
- 49) M. Löw, L. Kisfaludy, E. Jaeger, P. Thamm, S. Knof, and E. Wunsch, *Z. Physiol. Chem.*, 359, 1637(1978); Y. Masui, N. Chino, and S. Sakakibara, *Bull. Chem. Soc. Japan.*, 53, 464(1980) and other references cited therein.
  - 50) H. Ogawa, T. Sasaki, H. Irie, and H. Yajima, *Chem. Pharm. Bull.*, 26, 3144 (1978).
  - 51) J. J. Scharp, A. B. Robinson, and M. D. Kamen, *J. Am. Chem. Soc.*, 95, 6097 (1973).
  - 52) J. Honzl and J. Rudinger, *Coll. Czech. Chem. Comm.*, 26, 2333 (1961).
  - 53) W. König and R. Geiger, *Chem. Ber.*, 103, 788 (1970).
  - 54) H. Yajima and Y. Kiso, *Chem. Pharm. Bull.*, 19, 420 (1971).
  - 55) R. B. Woodward, K. Heusler, J. Gosteli, P. Naegeli, W. Oppolzer, R. Ramage, S. Ranganathan, and H. Vorbrüggen, *J. Am. Chem. Soc.*, 88, 852 (1966).
  - 56) Th. Wieland and H. Bernhard, *Ann. Chem.*, 572, 190(1951); R. A. Boissonnas, *Helv. Chim. Acta.*, 34, 874 (1951); J. R. Vaughan Jr. and R. L. Osato, *J. Am. Chem. Soc.*, 74, 676 (1952).
  - 57) M. Bodaszky and V. du Vigneaud, *J. Am. Chem. Soc.*, 81, 5688(1959).
  - 58) N. Fujii and H. Yajima, *J. C. S. Perkin I*, 1981, 804.
  - 59) G. W. Anderson, J. E. Zimmerman, and F. Callahan, *J. Am. Chem. Soc.*, 85, 3039 (1963); 86, 1839 (1964).
  - 60) J. C. Sheehan, and G. P. Hess, *J. Am. Chem. Soc.*, 77, 1067 (1955).
  - 61) J. C. Sheehan, M. Goodman, and G. P. Hess, *J. Am. Chem. Soc.*, 78, 1367 (1956); H. Schussler and H. Zahn, *Chem. Ber.*, 95, 1067 (1962); K. Hofmann, H. Yajima, and E. T. Schwartz, *J. Am. Chem. Soc.*, 82, 3732(1960).
  - 62) F. Weygand, D. Hoffmann, and E. Wunsch, *Z. Naturforsch.*, 21 b, 426 (1966); E. Wunsch and F. Dress, *Chem. Ber.*, 99, 19 (1966).
  - 63) R. J. Simpson, M. R. Neuberger, and T. Y. Liu, *J. Boil. Chem.*, 251, 1936 (1976).
  - 64) H. Yajima, M. Takeyama, K. Koyama, T. Tobe, K. Inoue, T. Kawano, and H. Adachi, *Int. J. Peptide Protein Res.*, 16, 33 (1980).

- 65) W.W. Bachovchin and J.D. Roberts, *J. Am. Chem. Soc.*, 100, 8041 (1978).  
and other references cited therein.
- 66) B. Iselin, *Helv. Chim. Acta.*, 44, 61 (1961).
- 67) K. Okamoto, K. Yasumura, K. Fujitani, S. Katakura, K. Akalji, H. Yajima, Y. Nakata, A. Inoue, and T. Segawa, *Chem. Pharm. Bull.*, 32, 430 (1984); B. F. Lundt, N.L. Johansen, A. Vølund, and J. Markussen, *Int. J. Peptide Protein Res.*, 12, 258 (1978).
- 68) L. Graf, S. Bajusz, A. Patthy, E. Barat, and G. Cseh, *Acta. Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung.*, 6, 415 (1971); R. Riniker, P. Sieber, W. Rittel, and H. Zuber, *Nature New Biol.*, 235, 114 (1972).
- 69) N. Fujii and H. Yajima, *J. Chem. Soc. Perkin I*, 1981, 811.
- 70) K. Akaji, N. Fujii, H. Yajima, M. Moriga, M. Aono, and A. Takagi, *Int. J. Peptide Protein Res.*, 18, 180 (1981).
- 71) H. Yajima, M. Takeyama, J. Kanaki, and K. Mitani, *J. C. S. Chem. Comm.*, 1978, 482; H. Yajima, M. Takeyama, J. Kanaki, O. Nishimura, and M. Fujino, *Chem. Pharm. Bull.*, 26, 3752 (1978).
- 72) S. Sakakibara, "Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides and Proteins," Vol. 1., Ed. by B. Weinstein, Marcel Dekker, New York, p. 51 (1971).
- 73) W.C. Jones, Jr., T.M. Rothgeb, and F.R.N. Gurd, *J. Biol. Chem.*, 251, 7452 (1976); T.M. Rothgeb, B.N. Jones, D.F. Hayes, and R.S. Gurd, *Biochem.*, 16, 5813 (1977).
- 74) G. L. Ellman, *Arch. Biochem. Biophys.*, 82, 70 (1959).
- 75) L.M. Matrisian, B.R. Larsen, J. S. Finch, and B. E. Magun, *Anal. Biochem.*, 125, 339 (1982).
- 76) K. Hayashi, *Igaku-no-ayumi*, 127, 574 (1983).
- 77) L. G. Chavez, Jr. and H. A. Scheraga, *Biochem.*, 19, 996 (1980); Y. Konishi and H. A. Scheraga, *ibid.*, 19, 1308 (1980).
- 78) M.N. Ghosh and H. O. Schild, *Brit. J. Pharmacol.*, 13, 54 (1958).
- 79) H. E. Ertel and L. Horner, *J. Chromato.*, 7, 268 (1962).
- 80) D. Yamashiro, *Nature*, 201, 76 (1964).