

消化管ホルモン、
cholecystokinin-33(ヒト)の合成研究

1989年

三 木 史 朗

消化管ホルモン、
cholecystokinin-33(ヒト)の合成研究

1989年

二 木 史 朗

目 次

< 理 論 の 部 >

緒 言	1
第1章 新しいトリプトファン誘導体, N ¹ -mesitylenesulfonyl-tryptophan [Trp(Mts)] の開発とその実用性の検討	5
第1節 トリプトファン含有ペプチド合成上の問題点	5
第2節 Trp(Mts)の合成及びその性質	6
第3節 モデルペプチド, cholecystokinin(CCK)-7 非硫酸化体の合成	8
第4節 モデルペプチド, galaninの合成	9
第1項 galaninについて	9
第2項 合成の概略	10
第3項 保護galaninの合成	11
第4項 galaninの合成	17
第5項 合成galaninの活性	18
第5節 まとめ	19
第2章 ヒト cholecystokinin (CCK)-33の全合成	20
第1節 CCKに関する従来の研究	20
第1項 分離・構造	20
第2項 体内分布・生理作用	21
第3項 CCKの従来 of 合成研究	22
第2節 ヒトCCK-33の合成	25
第1項 合成方針	25
第2項 保護ヒトCCK-33の合成-1, 無保護のチロシンを用いた合成	27
第3項 保護ヒトCCK-33の合成-2, 保護チロシンを用いた合成	33

第4項	ヒトCCK非硫酸化体の合成	35
第5項	CCK硫酸化のための予備実験	36
第6項	ヒトCCK-33の合成	39
第7項	合成ヒトCCK-33の生理活性	41
結語		43
謝辞		44

< 実験の部 >

第1章に関する実験	48
第2節に関する実験	48
第3節に関する実験	51
第4節に関する実験	54
第2章に関する実験	68
第2節に関する実験	68
引用文献	90

理論の部

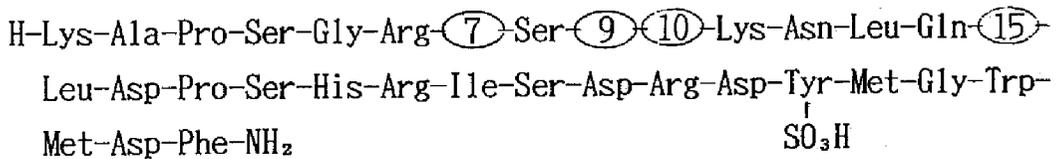


緒 言

cholecystokinin(CCK)-33は、1971年 Mutt, Jorpes¹⁾によりブタの腸から最初に単離構造決定されたアミノ酸33残基よりなるペプチドアミドである。1985年には、Takahashi, Matsubara²⁾により、ヒトCCK-33の構造が遺伝子の塩基配列から解明された。

本品は胆嚢収縮や膵液分泌促進作用を示す代表的な消化管ホルモンであるが、近年本品が消化管のみならず脳内にも存在することが明らかになり、³⁾ その神経伝達物質としての働きも注目されるようになった。⁴⁾ CCKの構造上の特徴は27位に硫酸化チロシン(Tyr(SO₃H))を持つことであり、消化管ホルモンとしての活性発現にはこのTyr(SO₃H)が重要な役割を果たしていると言われている。^{5, 6)} しかし、このTyr(SO₃H)は酸に不安定であり、このことがCCK-33の全合成を非常に困難なものにしている。またヒトCCK-33は未だ天然品が得られておらず、その生理学的、薬理学的作用に対しても興味が持たれている。以上のような観点から、著者はヒトCCK-33の構造が解明されたのを機会に本品の全合成を計画した。

CCK-33 (ヒト, ブタ) の構造



	7	9	10	15
human	Met	Ile	Val	Asn
porcine	Val	Met	Ile	Ser

1987年倉野⁷⁾はSerの水酸基をacetyl誘導体で保護し、Tyrを硫

酸化後、アルカリでこのSerの保護基を除去する手法でブタ C C K を合成したが、著者は彼等とは異なり、Serの水酸基をシリル化合物で保護しTyrを選択的に硫酸化する新しい方法でヒト C C K - 3 3 を全合成した。

また本品のC端部分(30位)には酸に不安定なトリプトファン(Trp)残基が存在し、本品の合成にはその保護が不可欠である。著者は、本合成に先立ちTrpの新しい保護誘導体 N^1 -mesitylenesulfonyltryptophan [Trp(Mts)]を開発し、これを本品の合成に応用した。

(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⁸⁾に従った。

1) アミノ酸の略号 (L-記号は全て省略した。)

Ala(A): alanine	Arg(R): arginine	Asn(N): asparagine
Asp(D): aspartic acid	Cys(C): cysteine	Gln(Q): glutamine
Glu(E): glutamic acid	Gly(G): glycine	His(H): histidine
Ile(I): isoleucine	Leu(L): leucine	Lys(K): lysine
Met(M): methionine	Phe(P): phenylalanine	Pro(P): proline
Ser(S): serine	Thr(T): threonine	Trp(W): tryptophan
Tyr(Y): tyrosine	Val(V): valine	

2) アミノ保護基の略号

Z(OMe): p-methoxybenzyloxycarbonyl
Boc: tert.-butyloxycarbonyl
Fmoc: 9-fluorenylmethoxycarbonyl

3) カルボキシル保護基の略号

-OMe: methyl ester
-OBzl: benzyl ester
-NHNH₂: hydrazide
-NHNH-Troc: 2,2,2-trichloroethoxycarbonyl hydrazide

4) 活性エステルの略号

- ONp: p-nitrophenyl ester
- TCP: 2,4,5-trichlorophenyl ester
- OSu: N-hydroxysuccinimidyl ester
- ONB: N-hydroxy-5-norbornene-2,3-dicarboximidyl ester

5) 縮合剤および関連試薬の略号

- DCC: dicyclohexylcarbodiimide
- HOBt: N-hydroxybenzotriazole

6) アミノ酸誘導体の略号

- Arg(Mts)-: N^G-mesitylene-2-sulfonyl arginine deriv.
- Asp(OBzl)-: β-benzyl aspartate deriv.
- Asp(OChp)-: β-cycloheptyl aspartate deriv.
- Lys(Z)-: N^ε-benzyloxycarbonyl lysine deriv.
- Met(O)-: methionine sulfoxide deriv.
- Ser(Bzl)-: O-benzyl serine deriv.
- Ser(^tBuPh₂Si)-: O-tert.-butyldiphenylsilyl serine deriv.
- Ser(^tBuMe₂Si)-: O-tert.-butyldimethylsilyl serine deriv.
- Ser(Me₃Si)-: O-trimethylsilyl serine deriv.
- Trp(Mts)-: N¹-mesitylene-2-sulfonyl tryptophan deriv.
- Tyr(Cl₂Bzl)-: 2,6-dichlorobenzyl tyrosine deriv.
- Tyr(SO₃H)-: tyrosine sulfate deriv.

7) 脱保護試薬の略号

- TFA: trifluoroacetic acid
- TFMSA: trifluoromethanesulfonic acid
- TMSOTf: trimethylsilyl trifluoromethanesulfonate
- MSA: methanesulfonic acid

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 |

EDT: 1,2-ethanedithiol TEA: triethylamine
NMM: N-methylmorpholine DCHA: dicyclohexylamine
CHA: cyclohexylamine
HMPA: hexamethylphosphoric triamide
EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt
LAP: leucine aminopeptidase
pyridine-SO₃: pyridine-sulfurtrioxide complex
PAS: pyridinium acetyl sulfate
^tBuPh₂SiCl: tert.-butyldiphenylsilyl chloride
Bu₄NF: tetra-n-butylammonium fluoride
TLC: thin layer chromatography
HPLC: high performance liquid chromatography

第1章 新しいトリプトファン誘導体, Nⁱ-mesitylenesulfonyl-tryptophan [Trp(Mts)] の開発とその実用性の検討

第1節 トリプトファン含有ペプチド合成上の問題点

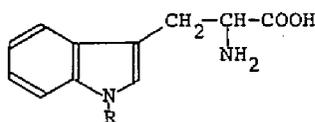
著者はヒトCCKの全合成に先立ち新しいTrp誘導体を開発した。以下にその経過について述べる。

トリプトファン(Trp)含有ペプチドを合成する際、ペプチド鎖延長時のTFA処理によりインドール環に酸化,⁹⁾アルキル化¹⁰⁾等の副反応が生じることが知られている。酸化については1,2-エタンジチオール,¹¹⁾2-メルカプトエタノール¹²⁾等の還元剤を添加することによりある程度抑制可能であるが完全ではない。アルキル化については、Boc基やZ(OMe)基等のNⁱ保護基を酸により除去する際、インドール環のNⁱ位やCⁱ位が^tBu化、あるいはp-methoxybenzyl化されることが知られている。小川らの研究によると、Boc-Trp-OH, Z(OMe)-Trp-OHをアニソール存在下TFAで0°C, 1h処理した時、Trpの回収率はそれぞれ約60%, 30%に留まった。¹³⁾この副反応は1,2-エタンジチオール,¹¹⁾ジメチルスルフィド,¹⁴⁾チオアニソール¹³⁾等の含硫黄化合物をスカベンジャーとして添加することにより、ある程度抑制可能であるが、やはり完全とはいえず、また、これらの添加によりbenzyl系側鎖保護基が脱離される可能性が生じる。¹⁵⁾¹⁶⁾また2-メチルインドール¹⁷⁾等のインドール系スカベンジャーを用いる方法もあるが、近年、TFA中インドール環の二量体化が起こることが下西らにより報告され、¹⁸⁾これは好ましい方法とは言えない。一方、インドール環のNⁱ位が最初に^tBu化を受けることがMasuiらにより報告されている。¹⁴⁾以上のことを考えあわせると、TrpのNⁱ位に電子吸引性の保護基を導入することが上記の副反応の抑制に有効であると言える。

従来発表されているTrpのNⁱ保護基としてはformyl(for)基,¹⁹⁾またbenzyloxycarbonyl(Z)基,²⁰⁾2,4-dichlorobenzyloxycarbonyl(Cl₂Z)基²¹⁾等のZ系の保護基、あるいは2,4,6-trimethoxybenzenesulfonyl(Mtb)基,²²⁾4-methoxy-2,3,6-trimethylbenzenesulfonyl(Mtr)基²²⁾等の置換benzene-

sulfonyl系の保護基, さらに, 2,2,2-trichloroethoxycarbonyl (Troc) 基²³⁾などがあげられる (表 1)。しかしながら, これらの中には安定性に問題のあるものも多く, また矢島, 藤井らにより開発されたTFMSA²⁴⁾,

Table 1.
Various Nⁱⁿ-Protecting Groups
for Tryptophan



R	Ref	Removal
-CHO [for]	19)	pH > 9 NH ₂ NH ₂ HF-EDT
	[z] 20)	NH ₂ NH ₂ H ₂ /Pd HF
	[Mtr] 21)	MSA HF
-C(=O)-O-CH ₂ -CCl ₃ [Troc]	22)	Zn/AcOH 0.01M NaOH
	[Mts]	TFMSA TMSOTf MSA

あるいはTMSOTf²⁵⁾を最終脱保護に用いる合成ストラテジーに適したものは少ない。

著者は, このストラテジーに適したTrpの保護基を探索することを目的とし, Nⁱⁿ-mesitylenesulfonyl (Mts)基を取り上げ, その有用性を検討した。

第2節 Trp(Mts)の合成及びその性質

Mts基は矢島, 武山ら²⁶⁾によりArgのグアニジド基の保護基としてペプチド合成に導入されたが, 著者はこれをTrpのNⁱⁿ保護基に応用した。

Mts基のNⁱⁿへの導入は福田,²²⁾ 木曾²³⁾らと同様にIlli²⁷⁾の方法で行った。すなわち, CH₂Cl₂溶液中NaOH末, cetyltrimethylammonium chloride存在下, Z(OMe)-Trp-OBzlにMtsClを反応させZ(OMe)-Trp(Mts)-

OBzlとした後、けん化によりbenzylエステルを除去しZ(OMe)-Trp(Mts)-OHを得た(図1)。次に同様の操作によりBoc-Trp(Mts)-OBzlをBoc-Trp(Mts)-OHに導きこれをDCHA塩として同定した。さらにZ(OMe)-Trp(Mts)-OHをTFA処理することによりH-Trp(Mts)-OHを得た。

H-Trp(Mts)-OHを用いた予備実験の結果、Trp(Mts)は1N NaOHによるけん化、ヒドラジン処理、あるいはTFA, 4N HCl/dioxaneによる酸処理等、通常のペプチド鎖延長上の諸操作に対して安定であった。さらに本基は接触還元、TFA-thioanisole処理,¹⁵⁾ 25% HBr-AcOH²⁸⁾ に対しても安定であった。一方最終脱保護に用いるMSA,²⁴⁾ 1M TFMSA-thioanisole/TFA,²⁴⁾ 1M TMSOTf-thioanisole/TFA²⁵⁾ 処理によってMts基は容易に除去されることが分かった。またHF³⁰⁾ 処理によってはN¹-MtsはN⁶-Mtsよりも除去されにくいことが分かった(表2)。

Fig. 1. Scheme for the Preparation of H-Trp(Mts)-OH

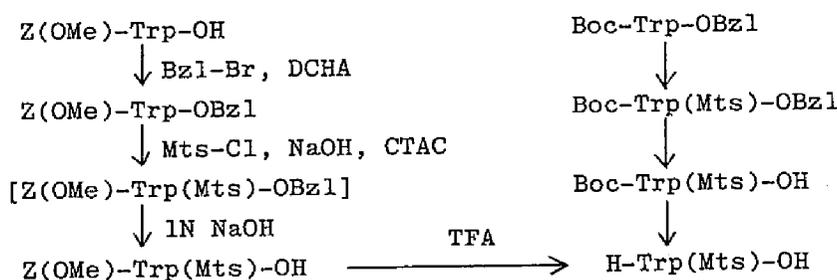


Table 2. Recovery of Trp, after Treatment of H-Trp(Mts)-OH under Various Acid Conditions (0°C, 60 min)

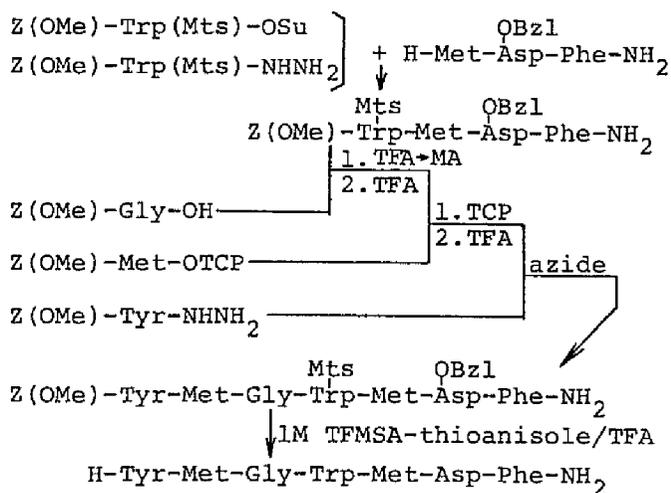
Acid	Adduct	Recovery
1M TFMSA/TFA		83.8%
1M TFMSA/TFA	thioanisole	100 %
1M TMSOTf/TFA		74.7%
1M TMSOTf/TFA	thioanisole	100 %
MSA		94.6%
MSA/TFA (1:1)		95.0%
MSA/TFA (1:1)	thioanisole	100 %
HF		18.3%
HF	thioanisole	63.4%

以上の予備実験によりTrp(Mts)基はTFMSA, TMSOTfを最終脱保護に用いるペプチド合成法に必要な諸条件を満たしていることが分かったので、著者は2つのモデルペプチド, cholecystokinin (CCK)-7 非硫酸化体,³¹⁾ およびgalanin³²⁾の合成を行い、本保護基のペプチド合成における実用性を検討した。

第3節 モデルペプチド, cholecystokinin (CCK)-7 非硫酸化体の合成

CCK-7 非硫酸化体, H-Tyr-Met-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH₂の合成を図2のように行った。最初にZ(OMe)-Trp(Mts)-OH と H-Met-Asp(OBzl)-Phe-NH₂³³⁾との縮合を異なる2つの方法, Su活性エステル法³⁴⁾ およびアジド法³⁵⁾で行った。活性エステル法に必要なZ(OMe)-Trp(Mts)-OSuは-OH体をDCC, HOSuで処理することにより、またアジド法の縮合に必要な

Fig. 2. Synthetic Scheme for CCK-7 Non-sulfate



Z(OMe)-Trp(Mts)-NHNH₂はZ(OMe)-Trp(Mts)-OBzlをヒドラジン処理することにより得られた。2つの方法により得られたZ(OMe)-Trp(Mts)-Met-Asp(OBzl)-Phe-NH₂はTLCのR_f値, 元素分析値, 融点, 旋光度, アミノ酸分析結果により同一であることを確認した。これによってTrp(Mts)は活性エステル法によっても, またアジド法によってもペプチド鎖に容易に

導入できることが分かった。

このテトラペプチドに順次 Z(OMe)-Gly-OH, Z(OMe)-Met-OTCP, Z(OMe)-Tyr-NHNH₂をそれぞれ混酸無水物法,³⁶⁾ TCP活性エステル法,³⁷⁾ アジド法で導入し保護ヘプタペプチドを得た。この際、無保護のMetのS-アルキル化を防ぐためanisoleの代わりに2%EDTを含む3,5-dimethylanisole³⁸⁾をスカベンジャーとしTFA 処理を行い、ペプチド鎖を延長した。合成途中Trpに起因すると思われる副反応はTLC上何ら認められず、容易に合成を進めることができた。

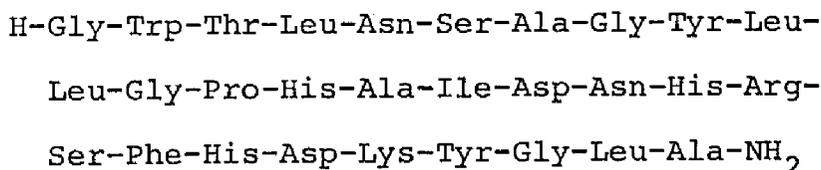
このようにして得られたヘプタペプチドをシリカゲルクロマトグラフィーで精製したのち,m-cresol存在下1M TFMSA-thioanisole/TFA で処理し全保護基を除去した。ついで脱保護体をSephadex LH-20でゲル濾過し精製し、得られたペプチドの純度をTLC,HPLCにより確認した。LAPを用いた酵素消化によって満足なTrpの回収率が得られたことにより、Trp(Mts)の実用性を確かめることができた。

第4節 モデルペプチド, galaninの合成

第1項 galaninについて

galaninは1983年,Tatemoto³²⁾らによりブタの小腸から単離されたアミノ酸残基29個からなるペプチドであり、そのC端はアミド化されている(図 3)。Tatemoto,MuttはC末端アミド構造を有するペプチドを化学的に同定する方法を開発しており,³⁹⁾ galaninもこの方法により構造決定された。生理作用として平滑筋収縮, 持続的な高血糖状態を誘起すると報告されている。³²⁾

Fig. 3. Structure of Galanin

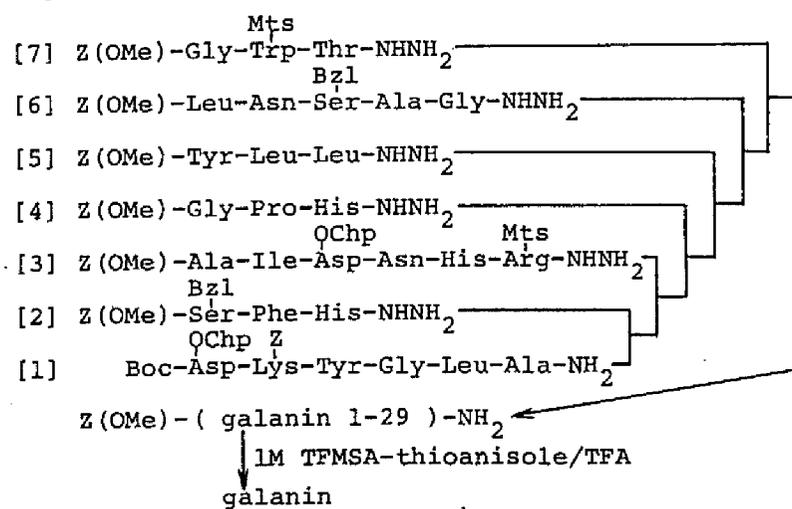


第2項 合成の概略

galaninはN端近くにTrp残基を有しているので、その構造が解明されたのを機会にTrp(Mts)を用いてこの新しい消化管ホルモンを合成することにした。

著者は図4のようにgalaninの液相法による合成を計画した。まず保護基の選択と脱保護であるが、著者は本合成の最終脱保護試薬として、前記CCK-7の合成と同様、矢島らにより開発された1M TFMSA-thioanisole/TFA系を用いることとした。本脱保護系はthioanisoleの反応促進効果^{14, 15)}により温和な条件下で脱保護を行える利点を有している。また中間体のN^o保護基にはTFAにより除去可能なZ(OMe)⁴⁰⁾あるいはBoc⁴¹⁾基を用い、側鎖保護基にはTrp(Mts)のほか、1M TFMSA-thioanisole/TFAで除去可能なLys(Z), Ser(Bzl), Arg(Mts),²⁶⁾ Asp(OChp)⁴²⁾を用いた。このうちAsp(OChp)基は1986年、藤井らによりスクシンイミド化副反応の少ないAspのβ-カルボキシル保護基として開発されたものである。ペプチド鎖の構築については全体を7つの区分ペプチドに分け、これらを合成した後C端から順次ラセミ化の少ないアジド法で縮合する方法を採用した。また、Asp(OChp)を含むフラグメント[3]を通常の水ラジシ処理を用いて合成することはできないので、矢島らにより開発されたTroc-

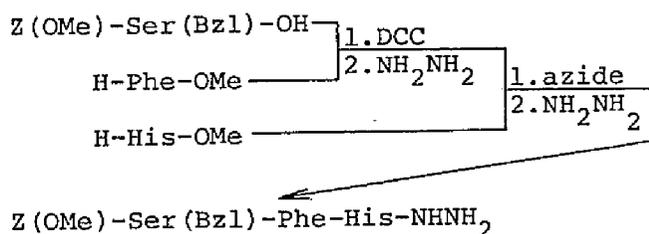
Fig. 4. Synthetic Route to Galanin



(2) galanin 21-23位 保護トリペプチドヒドラジド,
 $Z(\text{OMe})-(\text{galanin } 21-23)-\text{NHNH}_2$ の合成

$Z(\text{OMe})-\text{Ser}(\text{Bzl})-\text{OH}$ と H-Phe-OMe とを $\text{DCC}^{48)}$ で縮合しジペプチドエステルとし, 次いでヒドラジン処理により $Z(\text{OMe})-\text{Ser}(\text{Bzl})-\text{Phe-NHNH}_2$ を得た。これと H-His-OMe とをアジド法で縮合し目的のトリペプチドヒドラジド, $Z(\text{OMe})-\text{Ser}(\text{Bzl})-\text{Phe-His-NHNH}_2$ [2]を得た。

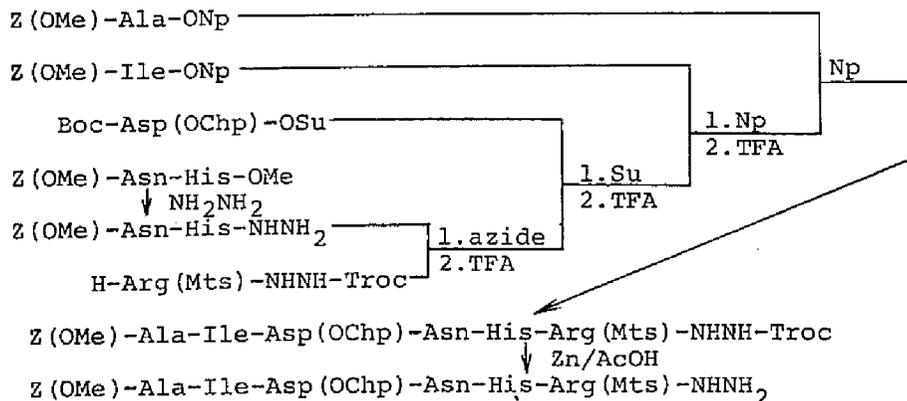
Fig. 6. Synthetic Scheme for the Protected Tripeptide Hydrazide,
 $Z(\text{OMe})-(\text{galanin } 21-23)-\text{NHNH}_2$ [2]



(3) galanin 15-20位 保護ヘキサペプチドヒドラジド,
 $Z(\text{OMe})-(\text{galanin } 15-20)-\text{NHNH}_2$ の合成

次に図 7に示すようにフラグメント [3], $Z(\text{OMe})-\text{Ala-Ile-Asp}(\text{OChp})-\text{Asn-His-Arg}(\text{Mts})-\text{NHNH}_2$ の合成を行った。

Fig. 7. Synthetic Scheme for the Protected Hexapeptide Hydrazide, $Z(\text{OMe})-(\text{galanin } 15-20)-\text{NHNH}_2$ [3]



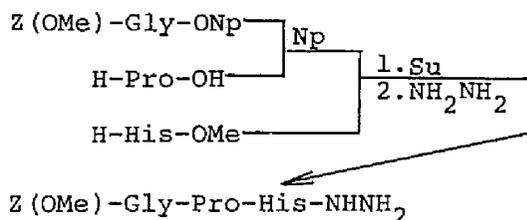
Z(OMe)-Asn-His-OMe⁵¹⁾をヒドラジン処理して得たZ(OMe)-Asn-His-NHNH₂とH-Arg(Mts)-NHNH-Trocとをアジド法で縮合しトリペプチドとした。次いでこれをTFA処理したものにBoc-Asp(OChp)-OSuをSu活性エステル法で導入した。さらに同様にZ(OMe)-Ile-ONp, Z(OMe)-Ala-ONpを順にNp活性エステル法⁴⁹⁾で導入しヘキサペプチド誘導体とした。Asp-Asn配列はスクシンイミド型副反応を起こしやすい配列として知られているが,⁵⁰⁾NMMを塩基とし上記の縮合を行ったところ,TLC上スクシンイミド体と思われるスポットはなんら認められず,容易に合成を進めることができた。また,Asp(OChp)は立体障害が大きく縮合の際,反応の進行が悪くなることが懸念されたが,Asp(OChp)をアシル成分,アミン成分のいずれに用いた場合も,それぞれ満足できる収率が得られた。こうして得られた保護ヘキサペプチド誘導体をZn-AcOHで処理しTroc基を除去し,目的のヘキサペプチドヒドラジド [3] を得た。この一部を1M TFMSA-thioanisole/TFAで処理した後LAP酵素消化したところ,Ile:Aspの割合は1:0.8であり, β -Chp基が上記の酸および塩基処理によるスクシンイミド化副反応に対しかなり抵抗することが分かった。

(4) 保護galanin 12-14位 保護トリペプチドヒドラジド,

Z(OMe)-(galanin 12-14)-NHNH₂の合成

Z(OMe)-Gly-ONpとH-Pro-OHをNp活性エステル法で縮合し Z(OMe)-Gly-Pro-OHをDCHA塩として得た。このジペプチドとH-His-OMeをSu活性エステル法で縮合しトリペプチドエステルとした。これをヒドラジン処理し目的のZ(OMe)-Gly-Pro-His-NHNH₂ [4] に導いた (図 8)。

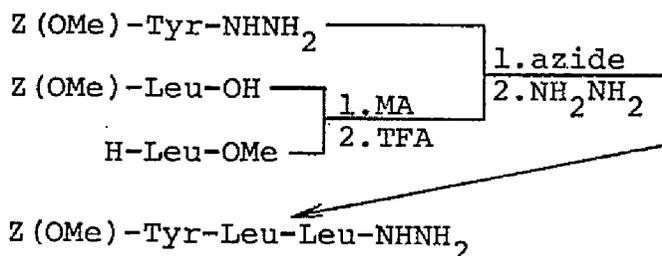
Fig. 8. Synthetic Scheme for the Protected Tripeptide Hydrazide, Z(OMe)-(galanin 12-14)-NHNH₂ [4]



(5) 保護galanin 9-11位 保護トリペプチドヒドラジド,
 $Z(\text{OMe})-(\text{galanin } 9-11)-\text{NHNH}_2$ の合成

$Z(\text{OMe})-\text{Leu}-\text{OH}$ と $\text{H}-\text{Leu}-\text{OMe}$ を混酸無水物法で縮合し $Z(\text{OMe})-\text{Leu}-\text{Leu}-\text{OMe}$ を得た。この $Z(\text{OMe})$ 基をTFAで除去した後, $Z(\text{OMe})-\text{Tyr}-\text{NHNH}_2$ とアジド法で縮合しトリペプチドエステルとした。これをヒドラジン処理し目的の $Z(\text{OMe})-\text{Tyr}-\text{Leu}-\text{Leu}-\text{NHNH}_2$ [5] に導いた (図 9)。

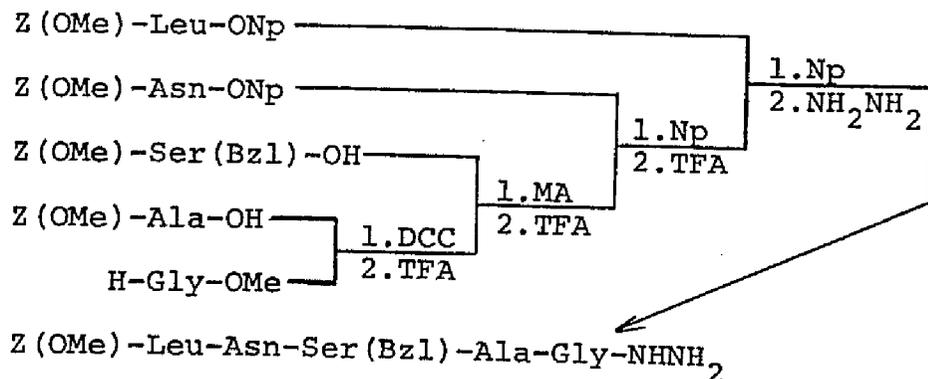
Fig. 9. Synthetic Scheme for the Protected Tripeptide Hydrazide, $Z(\text{OMe})-(\text{galanin } 9-11)-\text{NHNH}_2$ [5]



(6) 保護galanin 4-8位 保護ペンタペプチドヒドラジド,
 $Z(\text{OMe})-(\text{galanin } 4-8)-\text{NHNH}_2$ の合成

$Z(\text{OMe})-\text{Leu}-\text{Asn}-\text{Ser}(\text{Bzl})-\text{Ala}-\text{Gly}-\text{NHNH}_2$ [6] の合成を図 10のスキームに従って合成した。

Fig. 10. Synthetic Scheme for the Protected Pentapeptide Hydrazide, $Z(\text{OMe})-(\text{galanin } 4-8)-\text{NHNH}_2$ [6]



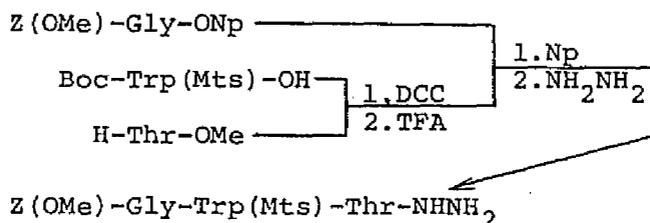
まず Z(OMe)-Ala-OH と H-Gly-OMe を DCC で縮合しジペプチドエステルとした。次いでこれに順次, Z(OMe)-Ser(Bzl)-OH を混酸無水物法で, Z(OMe)-Asn-ONp, Z(OMe)-Leu-ONp を Np 活性エステル法で導入しペンタペプチドエステルとした。これをさらにヒドラジン処理し目的のヒドラジドとした。

(7) 保護galanin 1-3 位 保護トリペプチドヒドラジド,

Z(OMe)-(galanin 1-3)-NHNH₂ の合成

Z(OMe)-Gly-Trp(Mts)-Thr-NHNH₂ [7] を図 11 に示した方法に従い合成した。

Fig. 11. Synthetic Scheme for the Protected Tripeptide Hydrazide, Z(OMe)-(galanin 1-3)-NHNH₂ [7]



Boc-Trp(Mts)-OH と H-Thr-OMe を DCC で縮合しジペプチドとした。次いで通常の TFA-anisole 処理で Boc 基を除去した。この際, EDT 等のチオール系スカベンジャーを添加することなしに酸処理を行ったが, Trp に起因する副生成物のスポットは TLC 上認められなかった。また, 通常 N¹ 無保護の Trp 誘導体を酸処理する際には反応液が赤紫色を呈するが, 本合成では酸処理液は何ら異常な色を示さなかった。次にこれに Z(OMe)-Gly-ONp を Np 法で導入しトリペプチドエステルとした後, ヒドラジン処理により目的のトリペプチドヒドラジドとした。

(8) 保護galanin 1-29 位 保護ノナコサペプチドアミド,

Z(OMe)-(galanin 1-29)-NH₂ の合成

こうして得られた 7 つのフラグメントを C 端から順次アジド法で縮合した。ペプチド鎖が延長されるに従い, 加えるアシル成分の量も 1.5 当

量から3当量へと増加させた。またペプチド鎖延長時、ペプチドの溶解性についても何ら問題は生じなかった。比較的長い2つのフラグメント [3] と [6] の縮合後の精製をSephadex LH-60を用いるゲル濾過で行ったが、その他の中間体の精製にはMeOHあるいはDMF-AcOEtによる再沈殿法を用いた。各フラグメントの縮合後、酸分解を行い、Lys を基準とする各アミノ酸の回収率を縮合の前後で比較することによりフラグメントの導入率を検定した (表 3)。これによって各段階の生成物の純度を確認した。

Fig. 12. Synthetic Scheme for the Protected Galanin

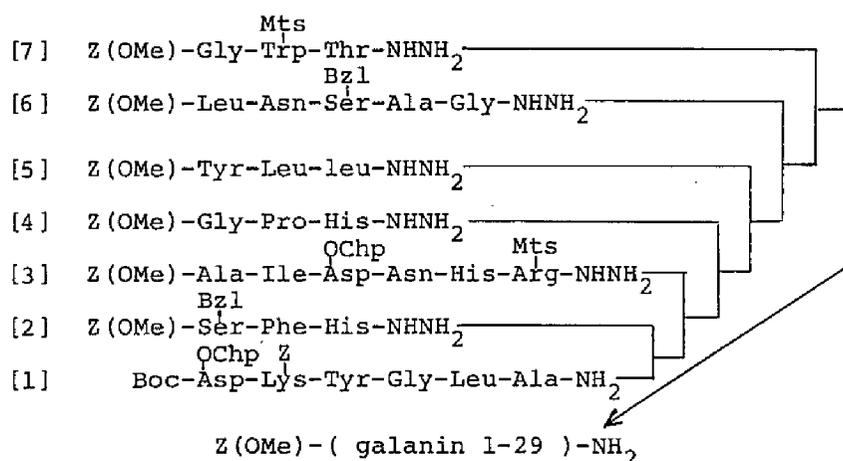


Table 3. Amino Acid Ratios in 6N HCl Hydrolysates of Synthetic Galanin and its Intermediates

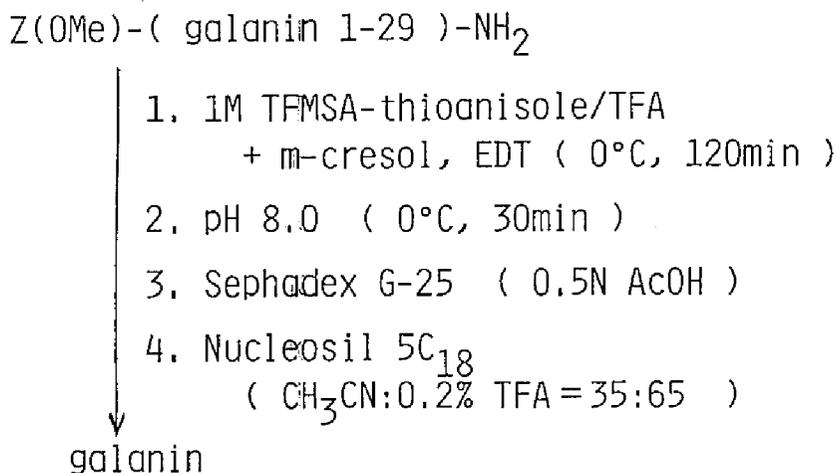
	Protected Peptides							Synthetic Galanin
	24-29 (6)	21-29 (9)	15-29 (15)	12-29 (18)	9-29 (21)	4-29 (26)	1-29 (29)	
Asp	0.99	1.02	3.16	3.06	3.07	3.97	3.95	3.87(4)
Thr							1.01	0.93(1)
Ser		0.94	0.87	0.89	0.89	1.81	1.78	1.82(2)
Pro				0.95	1.00	0.83	0.86	0.97(1)
Gly	0.94	1.01	0.99	1.88	1.88	2.85	3.90	3.96(4)
Ala	0.90	1.06	2.13	2.06	2.06	3.19	3.21	3.09(3)
Ile			1.06	0.99	0.99	0.96	0.97	0.97(1)
Leu	0.98	1.06	1.00	0.98	3.00	3.81	3.77	4.04(4)
Tyr	0.84	0.90	0.93	0.93	1.86	1.68	1.66	2.05(2)
Phe		0.98	0.96	0.96	0.97	0.95	0.95	0.99(1)
Trp*							0.90	0.75(1)
Lys	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00(1)
His		0.97	1.98	2.77	2.76	2.77	2.76	2.89(3)
Arg			1.02	0.98	0.99	0.95	0.99	0.94(1)
Recov.	70%	85%	84%	83%	75%	90%	89%	74%

* Determined by 4N MSA hydrolysis

第4項 galaninの合成

保護galaninの脱保護・精製法を図13に示す。保護galanin, Z(OMe)-(galanin 1-29)-NH₂をm-cresolおよびEDT存在下, 1M TFMSA-thioanisole/TFAで氷冷下120分処理した。このうちEDTは酸による最終脱保護の際のインドール環の修飾を抑制するために用いた。^{11, 51)} 次いでSer, Thr残基に起こりうるN→Oアシル転位⁵²⁾を戻すためNH₄OHでpH 8とし, 氷冷下30分攪拌した。さらにpH 4に戻し, これを0.5N AcOHを溶出液とするSephadex G-25でゲル濾過した(図14-a)。さらにNucleosil 5C₁₈カラムを用いるHPLCで精製した後, Sephadex G-25で脱塩した(図14-b)。

Fig. 13.
Deprotection and Purification Procedure



こうして得られたサンプルは TLCで単一スポットを示し, ディスク等電点電気泳動 (Pharmalyte pH 3-10)でも単一バンドを示した(図14)。また合成galaninはHPLC上で, Tatemoto博士の天然品と保持時間が完全に一致することが確認された(図15)。さらに酸分解, 酵素消化後のアミノ酸分析値もそれぞれ理論値と良く一致しており, 特に酵素消化後のTrpの回収率は満足できる値であった。FAB(fast atom bombardment)-質量分析でも理論値と一致した測定値が得られた。

Fig. 14. HPLC and Disk Isoelectrofocusing of Synthetic Galanin

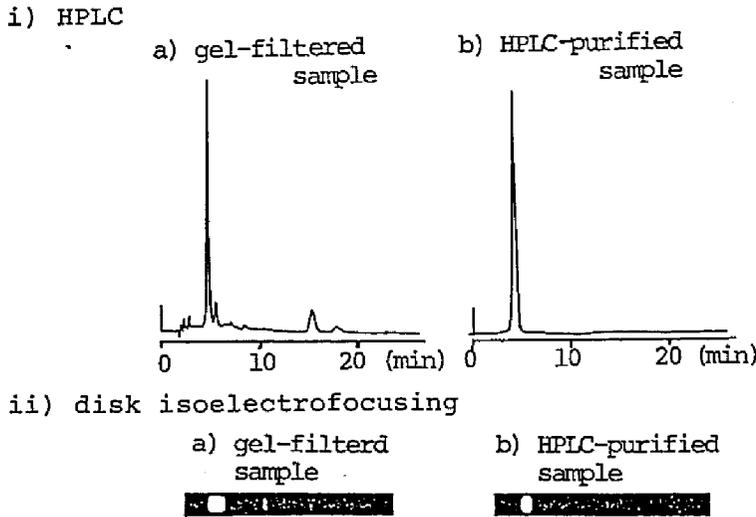
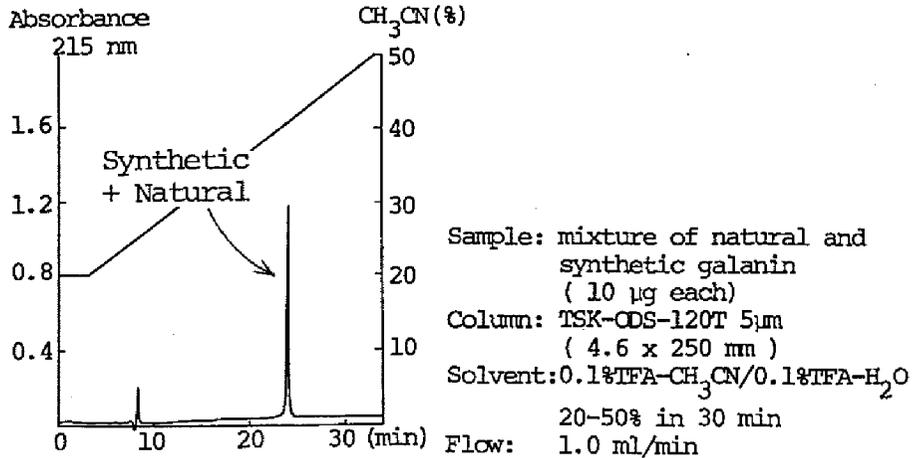


Fig. 15. HPLC of a Mixture of Natural and Synthetic Galanin

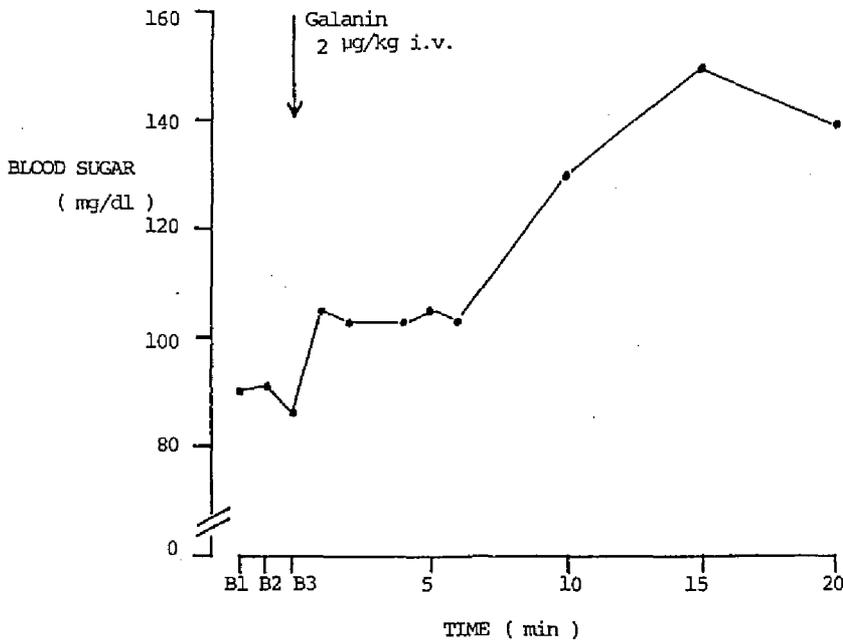


第5項 合成galaninの活性

galaninはイヌで平滑筋収縮，持続的高血糖状態を示すことが報告されている。³⁹⁾ 瀬川教授によって検定された結果，合成galaninはラット回腸に対しサブスタンスPの5倍の収縮活性を示したが，モルモット回腸に対しては 3×10^{-5} Mの濃度でも収縮活性を示さなかった。このことか

ら、galaninの活性は種特異性を示すことが示唆された。また、井上講師らによって検定された結果、合成galaninをイヌに(2 μ g/kg)の割合で静脈注射したところ図 16に示すように顕著な高血糖状態が引き起こされた。このように合成galaninは天然品と同様の生理活性を示すことがわかった。

Fig. 16.
Effect of galanin on plasma glucose levels

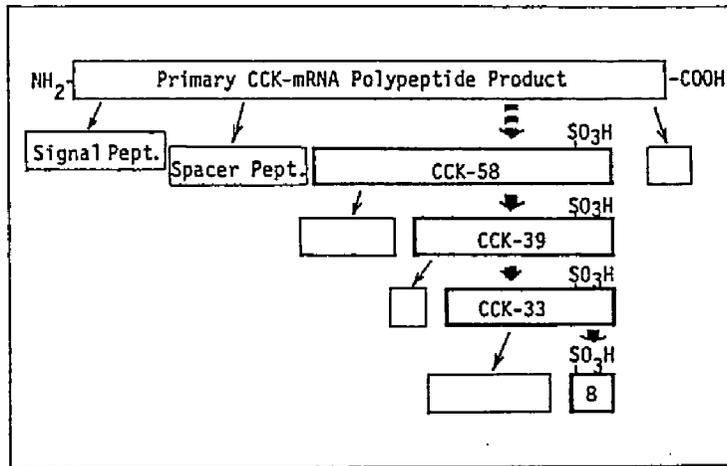


第5節 まとめ

以上, Trp(Mts)基を用いて2つのモデルペプチドを合成したが、合成途中Trpに起因する副反応は何ら認められず容易に合成を進められた。これらの合成を通じ, Trp(Mts)基がTFMSAを最終脱保護に用いる実際のペプチド合成に有効であることが確認できたので、筆者はこれをヒトCCK-33の合成に適用した。

(Tyr(SO₃H))をもち、消化管ホルモンとしての活性発現にはこのTyr(SO₃H)が重要な働きを果たしている。^{5, 6)}

Fig. 18. General Scheme of the Present Concept of the Posttranslational Processing of the CCK Precursor (from Ref. 4.)



現在までにブタ CCK-58,⁵⁸⁾ -39 (CCK-variant),⁵⁹⁾ -33,¹⁾ ウシ CCK-39⁶⁰⁾ がそれぞれ単離構造決定され、また、イヌ,⁶¹⁾ ラット,⁶²⁾ モルモット⁶³⁾ の CCK の部分構造が決定されている。さらに、近年、遺伝子操作を用いる方法により、ヒト²⁾ をはじめとしブタ,⁶⁴⁾ ラット,⁶⁵⁾ マウス⁶⁶⁾ の CCK の構造が相次いで解明された (図 17)。

また1968年 Erspamer 等によりカエルの皮膚より単離された caerulein (Pyr-Gln-Asp-Tyr(SO₃H)-Thr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH₂)⁵⁷⁾ はその10個のアミノ酸残基中5位のThrを除いてC端側オクタペプチドがCCKと同一であり、やはりTyr(SO₃H)が活性発現に重要である。

第2項 体内分布・生理作用

CCKは消化管から最初に単離されたペプチドであるが、その後の研究により脳内にも存在することが明かとなり、^{3, 67)} CCKはいわゆる脳-腸管ペプチドの一種と考えられるようになった。

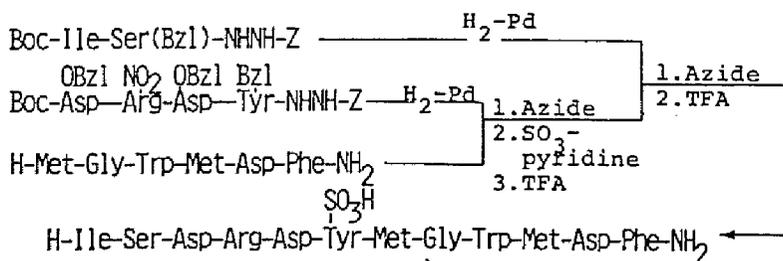
消化管において、CCK-33とCCK-8はほぼ同量存在し、⁶⁸⁾腸外分泌(消化酵素, NaCl分泌)促進, 胆嚢収縮(胆汁分泌)促進等の作用を持つことが知られている。⁶⁹⁾

脳内では、CCKは90%以上がCCK-8の形で存在し、⁷⁰⁾大分子CCKのほか、さらにCCK-5, CCK-4も存在することが明らかになった。⁷¹⁾ 脳内ではCCKは大脳皮質をはじめとし、海馬, 視床, 視床下部, 扁桃などの神経細胞や神経繊維に存在し、⁷²⁾神経伝達物質あるいは神経調節物質^{4, 73)}として摂食,⁷⁴⁾体温,⁷⁵⁾脳内アミンの遊離⁷⁶⁾等に関与していると言われている。

第3項 CCKの従来の合成研究

前述のとおり、CCKの構造的な特徴はそれらの分子内に Tyr(SO₃H)を含むことである。化学的にTyr(SO₃H)は塩基には比較的安定であるが、酸には不安定であるという特性を有している。一方、現在ペプチド合成においては、TFA等の酸でN^o保護基を除去しペプチド鎖を延長し、TFMSA, TMSOTf, HF等の強酸を用いて最終脱保護を行う方法が一般に用いられている。N^o脱保護剤としてTFAを用いるこの方法で、酸に不安定なTyr(SO₃H)を含むペプチド鎖を延長させることは、したがって困難であると考えられる。1970年、Ondettiら⁵⁾はCCK-12の合成を報告したが(図19)、彼等はTyrをデカペプチドの段階で硫酸化し、TFAでBoc基を除去しつつCCK-12に導いた。この際、デカペプチドの硫酸化の段階の収率は8%、保護デカペプチドからCCK-12までの全収率は4%であった。こ

Fig. 19. Synthetic Scheme for CCK-12 (Ondetti, Ref. 5)

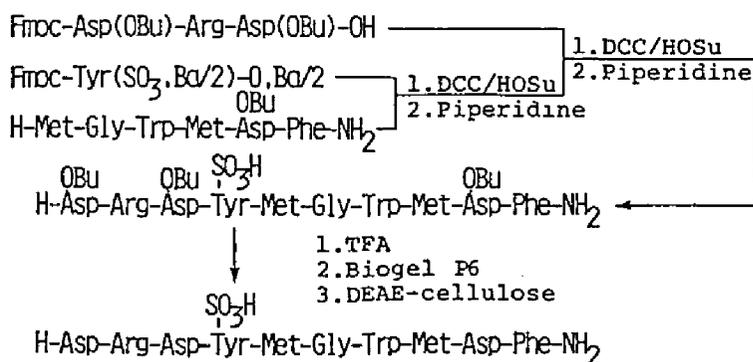


の例からわかるように、この酸処理を繰り返す方法によってCCKを全合成することは困難と判断せざるを得ない。

そこで、本品の合成的アプローチとして、1) 最初からTyrをTyr(SO₃H)の形で導入し酸処理を避けて合成を進める方法、および、2) 常法を用いてペプチド鎖を構築後Tyrのフェノール性水酸基を選択的に硫酸化する方法、の2つが考えられる。

1) のアプローチに沿った合成にはWünschら⁷⁷⁾のCCK-10の合成があげられる(図20)。彼等は最初、Z-Tyr(SO₃·Ba/2)誘導体を用いて合成を進めたが、CCKのC端部分にMetが存在しZ基の除去が困難なために、塩基により脱保護可能なFmoc基をN^o保護基とし合成を進めた。また、最終脱保護にはTFAを用いた。しかし、この方法を用いた更に長

Fig. 20. Synthetic Scheme for CCK-10 (Wünsch, Ref.78)



鎖のCCKの合成については未だ報告がない。なお、彼等はZ基をN^o保護基とし、Tyr(SO₃·Ba/2)を用いる方法で、Metをnorleucine(Nle)に置換したヒト [15-Nle]little-gastrin-II (Pyr-Gly-Pro-Tyr-Leu-[Glu]₅-Ala-Tyr(SO₃H)-Gly-Trp-Nle-Asp-Phe-NH₂)の合成⁷⁸⁾を行っている。

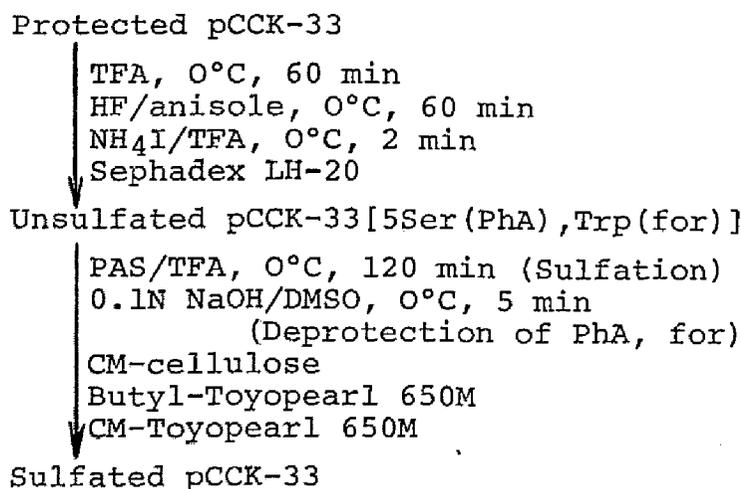
2) のアプローチを採用する場合に留意せねばならない点として、pyridine-SO₃錯体⁷⁹⁾やPAS,⁸⁰⁾濃硫酸⁸¹⁾等の硫酸化試薬は一般にTyrのフェノール性水酸基よりもSer, Thrのアルコール性水酸基を優先的に硫酸化することが挙げられる。このため、2) のアプローチにより合成を行うときにはSer, Thrを保護した上で硫酸化を行い、その後、これらの保護基を酸でなく塩基性条件化で除去することが必要である。これを如

何に行うかは困難な問題である。先に述べたOndettiらによるCCK-12の合成で、彼等がTyrをSer導入前のデカペプチドの段階で硫酸化したのは上記の理由によるものであり、Serを含有するCCK-12の合成すら非常に困難な問題を抱えていたのである。

1987年の倉野ら⁷⁾によるブタCCK-33の全合成は保護Serを用いるこのアプローチを採用したものである。彼らの方法はSer残基をphenoxyacetyl(PhA)基で保護しペプチド鎖を構築し、HFでPhA基以外の全保護基を除去後、PASにより硫酸化を行ったものである(図21)。しかしながら、この方法でもペプチド鎖構築中にPhA基の脱離が生じたり、また、最終段階の0.1M NaOH/DMSOによる脱PhAの際にSerのデヒドロアラニン化⁸²⁾が起こる可能性がある。報告によれば、保護ブタCCK-33からの収率は5%に留まっている。またPenkeら⁸³⁾もSerの水酸基をacetyl基で保護しブタCCK-33の合成を試みているが詳細はない。このように、保護Serを用いるCCKの全合成にもTyrの硫酸化後の脱保護に問題を残しているように判断される。

なお、1976年、矢島ら⁶⁾は、ブタCCK-33非硫酸化体を合成したが、Tyrの硫酸化には成功しなかった。

Fig. 21. Procedure for Conversion of Protected Porcine CCK-33 to Sulfated Porcine CCK-33 (Kurano, Ref. 7)



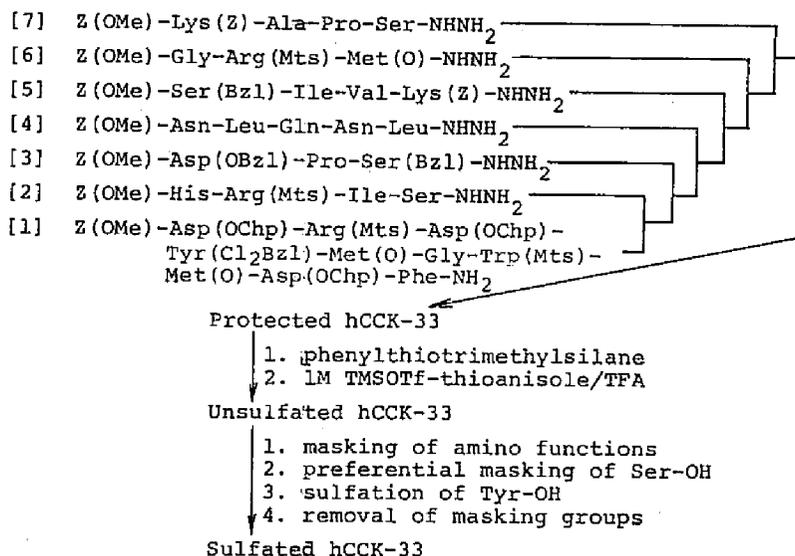
第2節 ヒトCCK-33の合成

第1項 合成方針

前述のとおり、倉野ら、PenkeらのブタCCK-33の合成ではSerのアルコール性水酸基をphenylacetyl基、あるいはacetyl基で保護したため、最終段階での希NaOH処理の際Serがデヒドロアラニン化を起こした可能性があり、これが最終精製の際の低収率の原因の一つとなっていると考えられる。また、一般にペプチドを強アルカリ処理することは好ましいことではない。

著者はヒトCCK-33を合成するにあたり、彼らの合成法とは全く異なる新しい方法による合成を検討した。すなわち、CCK-33非硫酸化体を合成し、そのアミノ基をFmoc基⁸⁴⁾で、Serの水酸基をシリル系保護基で可逆的に再保護した後、pyridine-SO₃錯体を用いTyrの水酸基を硫酸化する方法である(図22)。

Fig. 22. Synthetic Route to hCCK-33



最初に液相法でヒトCCK-33非硫酸化体を合成することにした。まず、保護基の選択と脱保護の問題であるが、著者は本品の最終段階における脱保護試薬として藤井、矢島らにより近年開発された 1M TMSOTf-

thioanisole/TFA系²⁵⁾を用いることとした。矢島、藤井らが以前に発表した1M TFMSA-thioanisole/TFA系^{24, 85)}はBrønsted酸のTFMSAによる脱保護系であるのに対し、この脱保護系はLewis酸に分類されるTMSOTf^{86, 87)}によるものであり、新しい概念にもとづく脱保護系であるといえる。このsuper hard acid⁸⁸⁾の作用とsoft baseであるthioanisoleによる反応促進効果^{15, 16)}により、1M TMSOTf-thioanisole/TFA系はTFMSAを用いる系よりもさらに強力な脱保護能を持つとされている。この脱保護系を用いて現在までにすでに数種のペプチドが合成されており、いずれも良好な結果が得られている。⁸⁹⁾

ペプチド鎖の延長時の一時的なN^o保護基には、TFAで除去可能なZ(OMe)基あるいはBoc基を用いることにした。側鎖官能基を有するアミノ酸誘導体には、TFAに安定で上記最終脱保護系で除去可能な保護基を用いることにした。まず、CCKのC端部分(30位)に存在するTrp残基についてであるが、本品のような長鎖のペプチドを合成する際には合成途上のTrp残基の酸化、アルキル化を防ぐためTrpの保護が必要不可欠である。本合成においては著者の開発したTrp(Mts)を用い、Trpを保護することにした。このほかLys(Z), Arg(Mts), Ser(Bzl), Asp(OBzl)またはAsp(OChp)を用いることにした。また部分的な空気酸化やN^o脱保護に際するS-アルキル化を避けるため、Metをスルホキシドとして保護した。Tyrに関しては最初無保護で合成を進めたが、合成途上Tyrの側鎖にアシル化が起こり収率の低下を招いたので、Tyr(Cl₂Bzl)⁸⁸⁾の形で保護し再度合成を行った。

ペプチド鎖の構築には7個の比較的小さな区分ペプチドヒドラジドを選び、これらをC端から順次ラセミ化の少ないアジド法により縮合する計画を立てた。これは、比較的小さな区分ペプチドを縮合に用いた方が収率がよく、また目的物の精製が容易であると考えたからである。またAsp(OBzl)を含む区分ペプチド[3]を合成するためには、矢島らが開発したTroc-NHNH₂を用いる置換ヒドラジン法を採用し、亜鉛-酢酸処理により選択的にTroc基を除去し対応するヒドラジド体とすることにした。

以上の方針にしたがってヒトCCK-33を合成することにした。

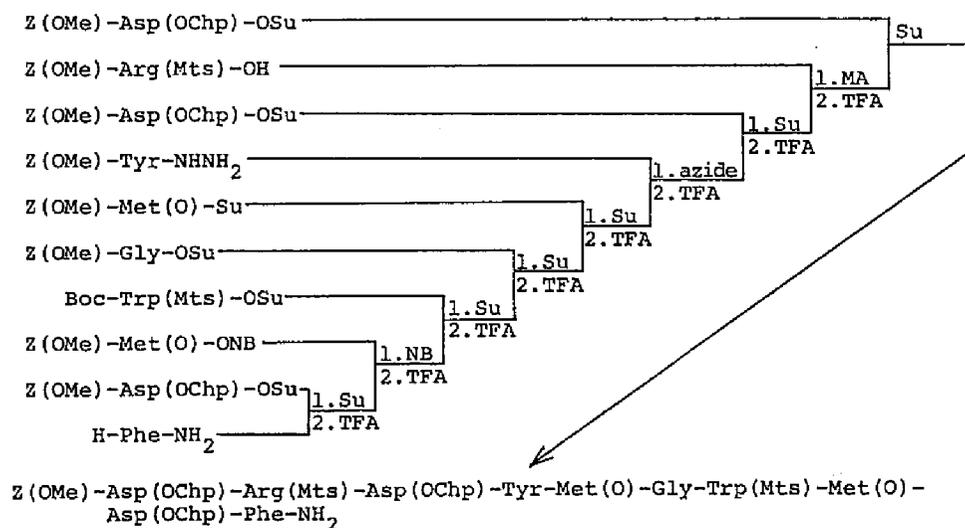
第2項 保護ヒトCCK-33の合成-1, 無保護のチロシンを用いた合成

(1) ヒトCCK 24-33位 保護デカペプチドアミド,

Z(OMe)-(hCCK 24-33, [Tyr-free]²⁷)-NH₂の合成

図 23に示すように、H-Phe-NH₂から出発しステップワイズにC端フラグメント [1] の合成を行った。31位のMet(O)をNB活性エステル法,⁹¹⁾ 25位のArg(Mts)を混酸無水物法で、また、27位のTyrをアジド法で縮合したが、その他はSu活性エステル法で縮合した。こうして得られたフラグメント [1] の純度をTLC, 元素分析, 6N HCl酸分解後のアミノ酸分析によって確認した。他のフラグメントについても同様の手法により純度を確認した。

Fig. 23. Synthetic Scheme for the Protected Decapeptide Amide, Z(OMe)-(hCCK 24-33 [Tyr-free]²⁷)-NH₂ [1]



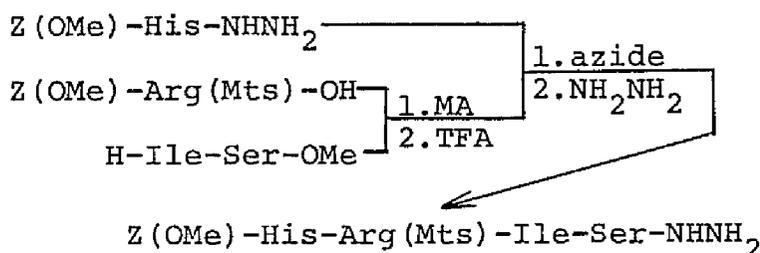
(2) ヒトCCK 20-23位 保護テトラペプチドヒドラジド,

Z(OMe)-(hCCK 20-23)-NHNH₂の合成

フラグメント [2], Z(OMe)-His-Arg(Mts)-Ile-Ser-NHNH₂を図 24に示すスキームにしたがって合成した。まず, Z(OMe)-Ile-Ser-OMe⁹²⁾を

TFA処理した後, Arg(Mts), Hisをそれぞれ混酸無水物法, アジド法でステップワイズに導入しテトラペプチドエステルとし, これをヒドラジン処理して [2] に導いた。

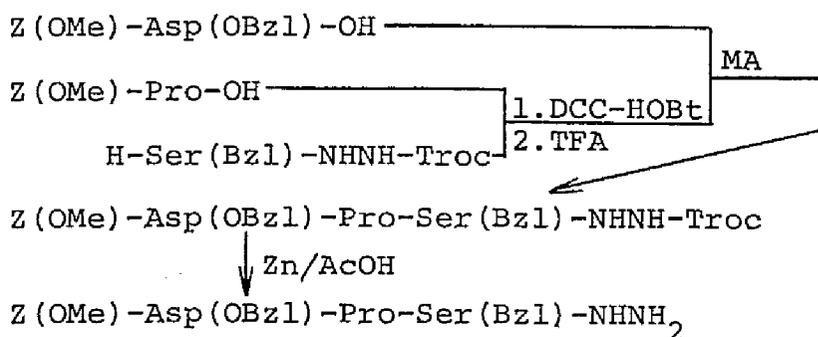
Fig. 24. Synthetic Scheme for the Protected Tetrapeptide Hydrazide, Z(OMe)-(hCCK 20-23)-NHNH₂ [2]



(3) ヒトCCK 17-19位 保護トリペプチドヒドラジド,
Z(OMe)-(hCCK 17-19)-NHNH₂の合成

フラグメント [3] Z(OMe)-Asp(OBzl)-Pro-Ser-NHNH₂は Asp(Bzl)を含む。このため, 図 25に示すように, この合成には置換ヒドラジンTroc-NHNH₂を採用した。

Fig. 25. Synthetic Scheme for the Protected Tripeptide Hydrazide, Z(OMe)-(hCCK 17-19)-NHNH₂ [3]



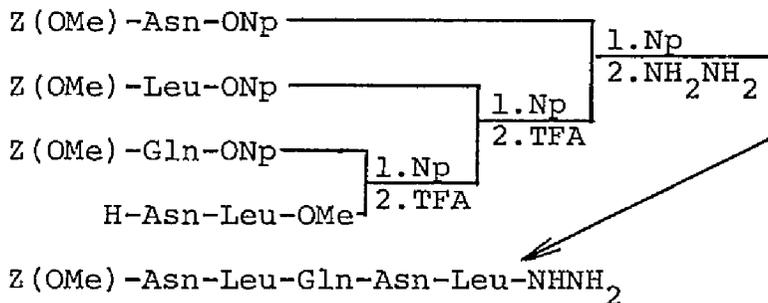
H-Ser(Bzl)-NHNH-Trocに Z(OMe)-Pro-OHをDCC-HOBt法⁹³⁾で, 次いで, Z(OMe)-Asp(Bzl)-OHを混酸無水物法でそれぞれ導入し, トリペプチド誘

導体とし、最後にこれをZn-AcOH処理してTroc基を除去し〔3〕とした。溶解性を増すために、フラグメント〔3〕および、以下に述べる〔5〕に含まれるSerをBzl基で保護し合成を進めた。

(4) ヒトCCK 12-16位 保護ペントペプチドヒドラジド,
Z(OMe)-(hCCK 12-16)-NH₂の合成

Z(OMe)-Asn-Leu-OMe⁹⁴⁾をTFA処理した後、Np法で各アミノ酸をステップワイズに導入しペントペプチドエステルとし、さらにヒドラジン処理により目的のフラグメント〔4〕, Z(OMe)-Asn-Leu-Gln-Asn-Leu-NHNH₂を得た(図 26)。

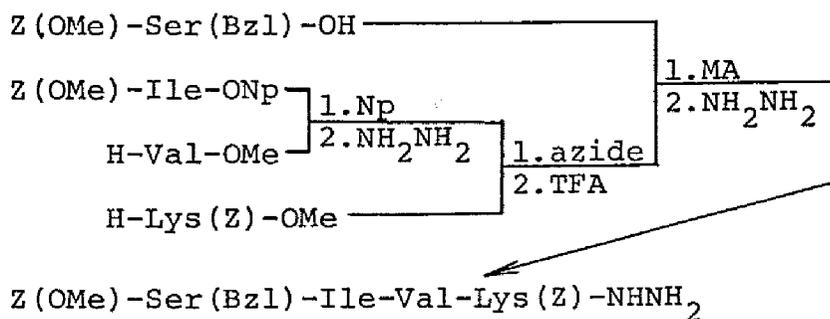
Fig. 26. Synthetic Scheme for the Protected Pentapeptide Hydrazide, Z(OMe)-(hCCK 12-16)-NHNH₂ [4]



(5) ヒトCCK 8-11位 保護テトラペプチドヒドラジド,
Z(OMe)-(hCCK 8-11)-NHNH₂の合成

図 27に示すスキームに従ってフラグメント〔5〕, Z(OMe)-Ser(Bzl)-Ile-Val-Lys(Z)-NHNH₂を合成した。まずかさばりの大きい側鎖を持つジペプチド, Z(OMe)-Ile-Val-OMeをNp法で合成し、次いでこれをヒドラジン処理し対応するヒドラジドとした。さらにこれとH-Lys(Z)-OMeとをアジド法で縮合しトリペプチドエステルとした。これにZ(OMe)-Ser(Bzl)-OHを混酸無水物法で導入し、得られたテトラペプチドエステルをヒドラジン処理し〔5〕に導いた。

Fig. 27. Synthetic Scheme for the Protected Tetrapeptide Hydrazide, Z(OMe)-(hCCK 8-11)-NHNH₂ [5]

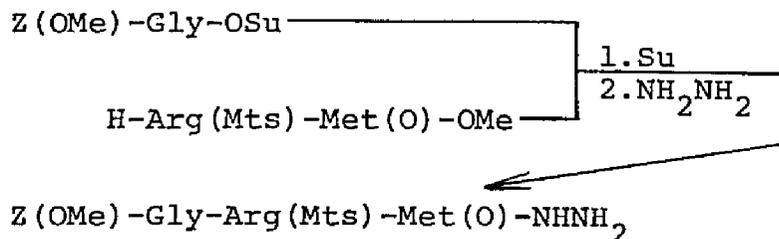


(6) ヒトCCK 5-7位 保護トリペプチドヒドラジド,

Z(OMe)-(hCCK 5-7)-NHNH₂の合成

フラグメント [6], Z(OMe)-Gly-Arg(Mts)-Met(O)-NHNH₂を図 28のスキームに示すように合成した。まず, Z(OMe)-Arg(Mts)-Met(O)-OMe⁹⁵⁾をTFA処理し, これにZ(OMe)-Gly-OHをSu活性エステル法で導入してトリペプチドエステルとした後, ヒドラジン処理することにより [6] を得た。

Fig. 28. Synthetic Scheme for the Protected Tripeptide Hydrazide, Z(OMe)-(hCCK 5-7)-NHNH₂ [6]



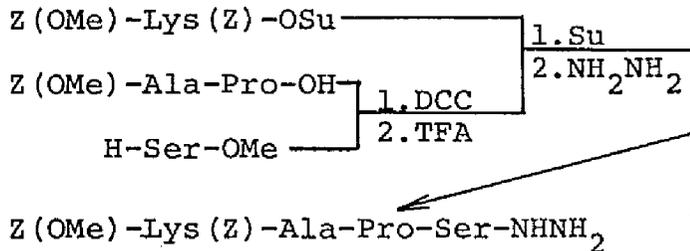
(7) ヒトCCK 1-4位 保護テトラペプチドヒドラジド,

Z(OMe)-(hCCK 1-4)-NHNH₂の合成

N端フラグメント [7], Z(OMe)-Lys(Z)-Ala-Pro-Ser-NHNH₂ を図 29

に示すスキームによって合成した。まず, 既知物質の Z(OMe)-Ala-Pro-OH⁹⁶⁾ を出発物質とし, これと H-Ser-OMe を DCC で縮合してトリペプチドエステルとし, 次にこれを TFA 処理した後, Z(OMe)-Lys(Z)-OH を Su 活性エステル法で縮合して対応するトリペプチドエステルを得, 最後にこれをヒドラジン処理して [7] とした。

Fig. 29. Synthetic Scheme for the Protected Tetrapeptide Hydrazide, Z(OMe)-(hCCK 1-4)-NHNH₂ [7]



(8) 保護ヒト CCK-33 [Tyr-free]²⁷⁾ の合成

こうして得られた7個のフラグメントをC端から順にラセミ化の少ないアジド法を用いて縮合した(図 30)。それぞれの反応の終結をニンヒドリンテストにより確認した。ペプチド鎖の伸長に伴い, アシル成分の量を1.5当量から5当量へと増量した。特にフラグメント [4] の縮合の際には合計8当量(5+3当量)のアシル成分を使用した。このヒドラジドは DMF に難溶でありアジド体に変換する際には DMF-DMSO-HMPA(1:1:1) の混合溶媒を大量に使用しなければならなかった。生成物の精製は DMF-MeOH による再沈殿あるいは DMF を溶出液とする Sephadex LH-20 によるゲル濾過により行った。それぞれの生成物について, C 端の Phe を基準とした酸加水分解後のアミノ酸分析値を求めることにより純度を確認した(表 4)。上記のフラグメント縮合においてアシル成分を過剰に用いたため Tyr 残基がある程度アシル化されることは避けられず, 途中 Sephadex LH-20 を用いるゲル濾過で精製せねばならなかった。このため縮合時の収率は 48%-69% に留まった。Tyr の硫酸化時の困難さを考えると多量の CCK-33

非硫酸化体が必要となる。このため著者はTyrをCl₂Bzl基で保護し、再度保護CCK-33を合成することとした。

Fig. 30. Synthetic Scheme for the Protected hCCK-33 [Tyr-free]²⁷,

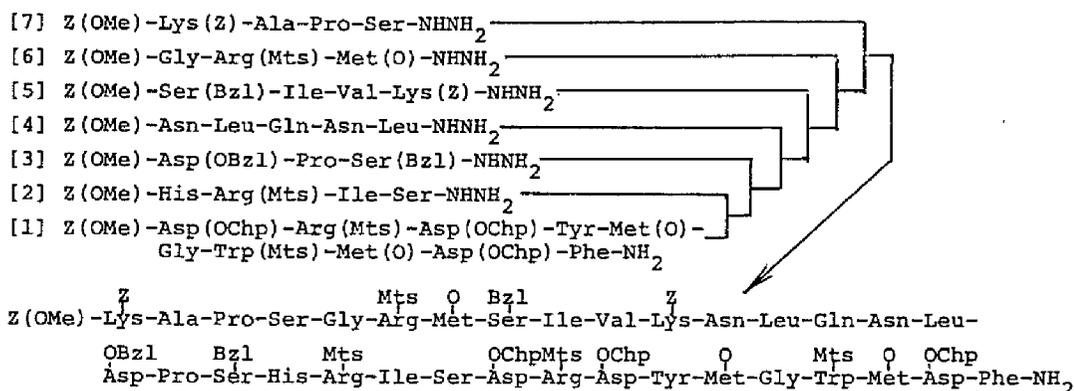


Table 4. Amino Acid Ratios in 6N HCl Hydrolysates of Protected hCCK-33 [Tyr-free]²⁷ and its Intermediates

	24-33 (10)	20-33 (14)	17-33 (17)	12-33 (22)	8-33 (26)	5-33 (29)	1-33 (33)	
Asp	3.05	3.10	3.82	6.01	6.27	6.12	6.01	(6)
Ser		1.00	1.86	1.90	2.82	2.75	3.45	(4)
Glu				1.10	1.08	1.08	1.03	(1)
Pro			1.00	0.82	1.00	1.00	2.01	(2)
Gly	1.12	1.14	1.18	1.05	1.06	1.98	1.95	(2)
Ala							0.99	(1)
Val					0.53	0.72	0.70	(1)
Met	1.88	1.75	1.74	1.58	1.80	2.68	2.50	(3)
Ile		1.03	0.88	0.94	1.42	1.59	1.60	(2)
Leu					2.07	2.04	2.00	(2)
Tyr	0.89	1.07	1.01	1.02	1.00	0.99	0.96	(1)
Phe	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	(1)
Lys					0.92	0.97	1.90	(2)
His		1.01	0.86	0.92	0.88	0.97	0.81	(1)
Trp*	1.21	0.93	0.89	0.85	0.94	1.11	0.88	(1)
Arg	0.98	2.10	1.86	2.00	1.98	2.96	2.86	(3)
Recov.	82%	78%	84%	85%	82%	73%	86%	

* Determined by 4N MSA Hydrolysis

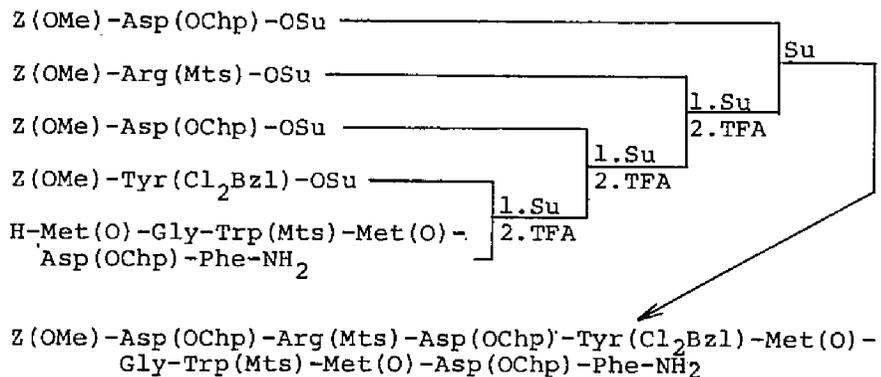
第3項 保護ヒトCCK-33の合成-2, 保護チロシンを用いた合成

(1) ヒトCCK 24-33位 保護デカペプチドアミド,

Z(OMe)-(hCCK 24-33, [Tyr(Cl₂Bzl)]²⁷)-NH₂の合成

図 31に示すとおり, Tyr(Cl₂Bzl)を用いてC端のデカペプチドアミド [1']を別途合成した。前項で述べたZ(OMe)-Met(O)-Gly-Trp(Mts)-Met(O)-Asp(OChp)-Phe-NH₂を常法でTFA処理し, これにZ(OMe)-Tyr(Cl₂Bzl)-OHをSu活性エステル法で導入した。以後のアミノ酸誘導体も同様にSu活性エステル法で導入した。

Fig. 31. Synthetic Scheme for the Protected Decapeptide Amide, Z(OMe)-(hCCK 24-33 [Tyr(Cl₂Bzl)]²⁷)-NH₂ [1']



(2) 保護ヒトCCK-33 [Tyr(Cl₂Bzl)]²⁷の合成

別途合成したC端フラグメント [1']を出発物質とし前項で調製した6つのフラグメントを順次アジド法で導入した(図 32)。フラグメント [4] のアジドの調製にはDMF-DMSO-HMPAを用いたが, それ以外のフラグメントに対しては常用のDMFを溶媒として用いた。ペプチド鎖の延長に伴い, 加えるアシル成分の量を1.5当量から5当量へと増加させた。Tyr(Cl₂Bzl)体を用いたことにより, Tyrの側鎖がアシル化されることがなく容易に反応を進行させることができた。残存するアシル成分の除去のために保護22, 26, 33ペプチドをSephadex LH-60を用いて精製せ

ねばならなかったが、他のものは適当な溶媒による再沈殿で精製可能であった。前項と同様、各縮合中間体および保護ヒトCCK-33の純度を元素分析、酸分解後のアミノ酸分析結果(表5)により確認した。

上記の方法により保護CCKの合成法が確立された。

Fig. 32. Synthetic Scheme for the Protected hCCK-33 [Tyr(Cl₂Bzl)]²⁷

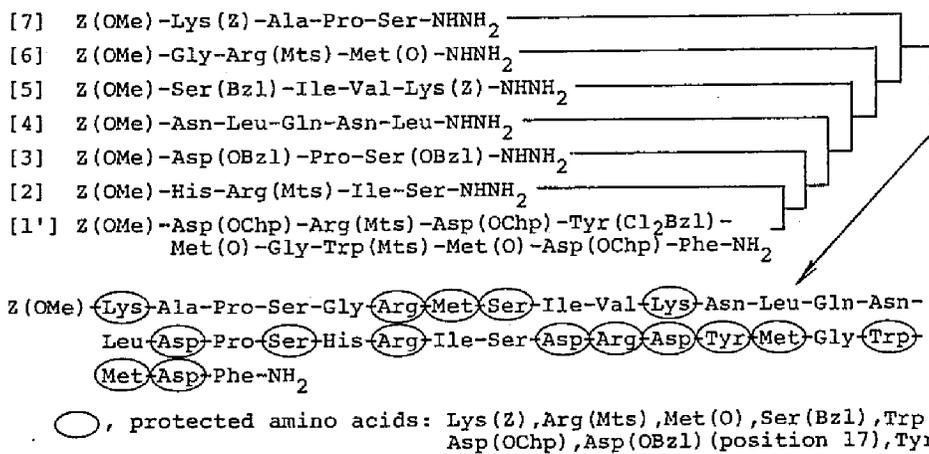


Table 5. Amino Acid Ratios in 6N HCl Hydrolysates of hCCK-33, Unsulfated hCCK-33, and Protected Intermediates

	Protected Peptides							Unsulfated hCCK-33	Sulfated hCCK-33
	24-33 (10)	20-33 (14)	17-33 (17)	12-33 (22)	8-33 (26)	5-33 (29)	1-33 (33)		
Asp	2.81	3.09	4.04	5.71	5.82	5.74	6.53	5.72	5.77(6)
Ser		0.87	1.87	1.57	2.52	2.30	3.69	3.59	3.62(4)
Glu				1.03	1.07	0.92	1.24	1.11	1.05(1)
Pro			0.90	0.89	0.92	0.91	2.32	2.02	1.71(2)
Gly	1.11	1.28	1.11	1.29	1.28	2.28	2.57	2.18	2.09(2)
Ala							1.20	1.11	1.00(1)
Val					0.78	0.70	0.81	0.73	0.71(1)
Met	1.71	1.66	1.82	1.78	1.67	2.33	2.67	2.53	2.86(3)
Ile		1.08	0.97	0.91	1.69	1.69	1.76	1.49	1.67(2)
Leu				1.89	1.99	1.69	2.21	2.10	2.05(2)
Tyr	0.92	1.05	1.04	1.02	1.05	1.03	1.05	0.91	0.94(1)
Phe	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00(1)
Lys					0.81	0.78	2.10	1.75	2.11(2)
His		0.97	0.94	0.80	0.75	0.68	0.73	0.75	0.87(1)
Trp	0.96*	0.86*	0.86*	0.85*	0.72*	0.87*	0.85*	N.D.	N.D.(1)
Arg	0.96	2.17	1.96	1.98	2.06	2.96	3.20	2.69	3.11(3)
Recov.	80%	89%	79%	77%	82%	95%	84%	84%	79%

*Determined by 4N MSA Hydrolysis

第4項 ヒトCCK非硫酸化体の合成

前項で得た保護CCK-33を図33に示すように脱保護，精製した。

まず，保護ペプチド中のMet(O)をphenylthiotrimethylsilane⁸⁷⁾で還元し，次いでこれを氷冷下1M TMSOTf-thioanisole/TFAで120分処理し全保護基を除去した。さらに脱保護体をSephadex G-25を用いるゲル濾過(溶出液：0.5N AcOH)，次いでCM-Trisacryl Mを用いるイオン交換クロマトグラフィー(溶出液：NH₄HCO₃バッファー)で精製した(図34-a)。これをさらにCH₃CN/0.1%TFAを溶出液とし，Synchropak RP-20カラムを用いるHPLCで精製を行い，高純度の合成ヒトCCK-33非硫酸化体を得た(図34-b)。本品の純度を分析HPLC，酸加水分解(表5)，およびLAP酵素消化後のアミノ酸分析，FAB-質量分析等により確認した。

Fig. 33. Deprotection and Purification of Unsulfated hCCK-33

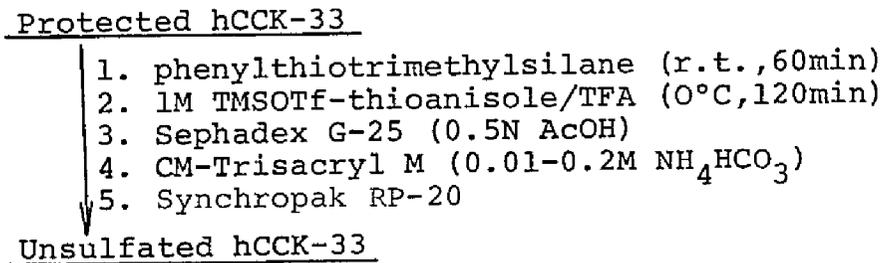
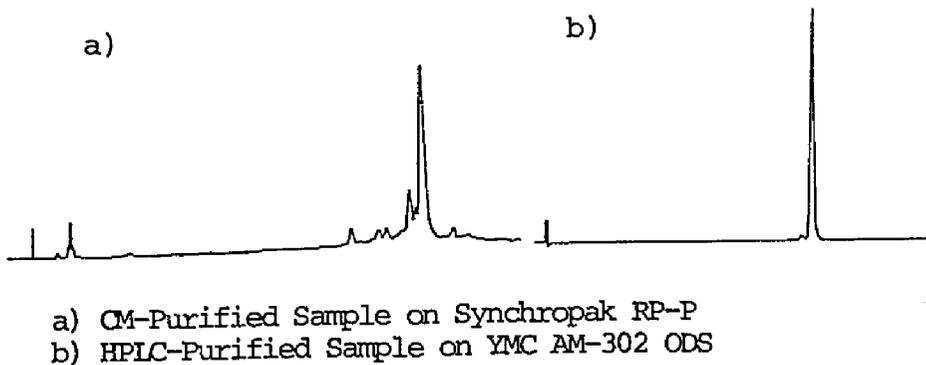


Fig. 34. Purification of Unsulfated hCCK-33



第5項 CCK硫酸化のための予備実験

ヒトCCK-33非硫酸化体のTyr残基をSer残基の存在下に選択的に硫酸化するに先立ち、硫酸化試薬、および硫酸化の際、Ser以外にも留意する必要があるアミノ酸について検討を加えた。

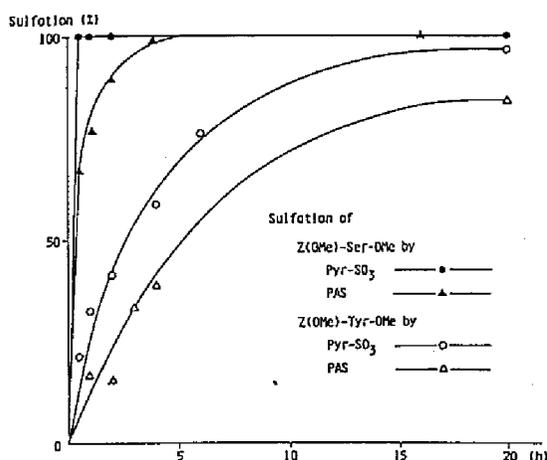
(1) 硫酸化試薬の検討

Tyrの硫酸化試薬として現在までに濃硫酸,⁸¹⁾ PAS,⁸⁰⁾ pyridine-SO₃錯体⁷⁹⁾などが用いられている。

このうち濃硫酸を用いる方法はTyr(SO₃H)と同時に3'-スルホニルチロシンを副生する^{5, 81)}ので好ましい方法とは言えない。

PASはPenkeらにより近年開発された硫酸化試薬であり、倉野らはブタCCK-33の合成に際し、TFA中これを用いてTyrの硫酸化を行った。⁷⁾しかし、Tyr(SO₃H)の酸に対する不安定さ、および著者の合成したヒトCCK-33非硫酸化体中にTFAに不安定な無保護のTrpが存在することを考慮し、著者は弱塩基性条件下にTyrの硫酸化を行うことが好ましいと考えた。一方、PenkeらはDMF-pyridine中でPASによる硫酸化を行った。⁸³⁾しかし、著者の予備実験の結果、DMF-pyridine中ではpyridine-SO₃錯体の方がPASよりも速くZ(OMe)-Tyr-OMeを硫酸化することがわかった(図35)。また、Z(OMe)-Ser-OMeに関しても同様の傾向がみられた。

Fig. 35. Sulfation of Z(OMe)-Tyr-OMe and Z(OMe)-Ser-OMe in DMF-pyridine with Pyridine-SO₃ Complex or PAS



以上のことから、著者はpyridine-SO₃錯体を用い DMF-pyridine中Tyrの硫酸化を行うのが適当であると判断した。しかし、この試薬も前述のとおりTyrのフェノール性水酸基よりもSerのアルコール性水酸基を選択的に硫酸化する。したがって、この試薬を用いてTyrを硫酸化するためにはSerの水酸基を保護する必要がある。また、この試薬がアミノ基に作用してスルファミン酸を生成する可能性⁹⁾もあるので α -および ϵ -アミノ基の保護も必要となる。その他のアミノ酸残基についてTLCで調べた結果、Hisがこの試薬により部分的にスルホン化されることがわかった。しかし、このHisの反応系にH₂Oを添加すると60分以内にHisが再生されることがわかった。また、反応系にEDTを加えてもTyrの硫酸化には影響しなかったので、CCKの硫酸化の際にはMetの部分的酸化を防ぐためにEDTを添加することにした。

(2) Ser側鎖の選択的保護

著者は、トリアルキルシリルクロライド (R₃SiCl) が一般に硫酸化試薬と同様、フェノール性水酸基よりも1級アルコール性水酸基に対し反応性が高いことに着目し、これをCCKの硫酸化に際して、Serの可逆的な保護基として用いることを検討した。

まず、pyridine-SO₃錯体による硫酸化の条件下に安定なSerのO-トリアルキルシリル誘導体を検索した。Me₃Si基,⁹⁸⁾ ^tBuMe₂Si基,⁹⁹⁾ ^tBuPh₂Si基¹⁰⁰⁾の3種について検討を加えたところ、Ser(^tBuPh₂Si)誘導体がTyrの硫酸化の条件下、24時間後も安定であることがわかった。他の2つの誘導体Ser(Me₃Si), Ser(^tBuMe₂Si)はこの条件下不安定であった。

次に^tBuPh₂SiClを用いimidazole存在下、Z(OMe)-Tyr-OMe, Z(OMe)-Ser-OMeの水酸基のシリル化の選択性を調べたところ、Serのアルコール性水酸基は氷冷下30分で完全にシリル化されたのに対し、Tyrのフェノール性水酸基は4時間後でも46%がシリル化されるにとどまり、この試薬によっても、予想通りTyrよりもSerが優先的にシリル化されることがわかった。さらに、このTyrの部分的なシリル化は反応系にフェノール類を添加することにより効果的に抑制できることがわかった。3種のフェノー

ル化合物を検討したが、この中でフェノールが他に比べ良好な結果を与えた(図 36)。20当量のフェノールを添加した際には4時間後のTyrのシリル化は31%と、不添加時の約 $\frac{1}{3}$ に減少した。

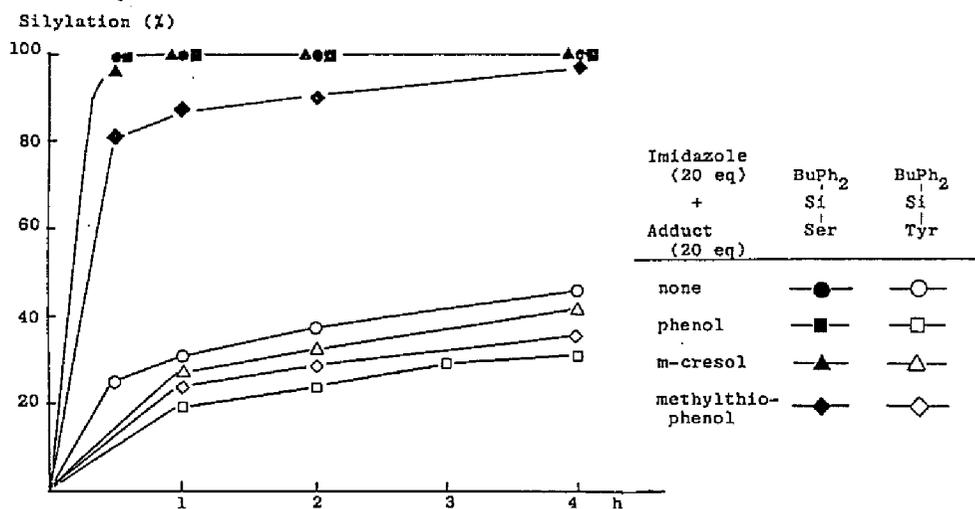


Fig. 36. tert-Butyldiphenylsilylation of Ser and Tyr

つぎに^tBuPh₂Si基の除去が問題になるが、本基は1M Bu₄NF¹⁰¹⁾/DMFにより氷冷下60分で除去可能であった。一方、Tyr(SO₃H)はこの条件下で安定であった。TLCで検定した結果His, Met, Trpはシリル化、脱シリル化の条件下で安定であった。

これらのモデル実験の結果から、Serのアルコール性水酸基を^tBuPh₂Si基で可逆的に保護することが可能であることがわかった。

(3) α-及びε-アミノ基の選択的保護

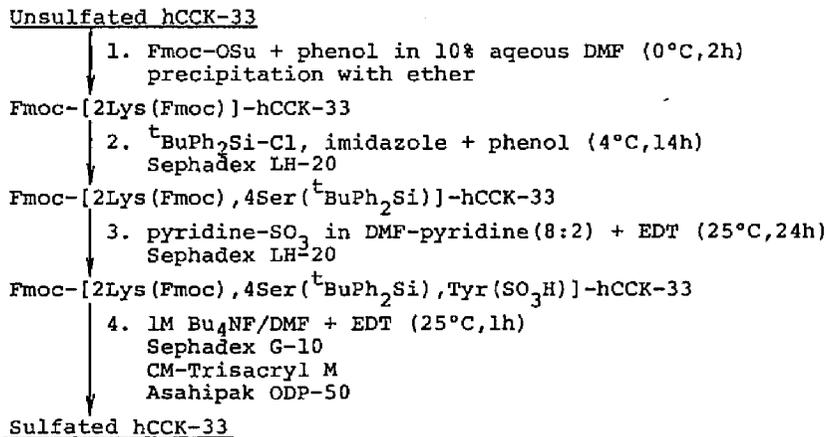
Fmoc基⁸⁴⁾は1970年Carpino, Hanにより塩基で除去可能なアミノ基の保護基として開発された。著者は硫酸化の際の1位と11位のLysのN^εおよびN^α保護にこの保護基を用いることにした。TLCで見ると、Fmoc-OSuによるFmoc化の際に見られるTyrの部分的O-アシル化は、少量のフェノール添加により抑制可能であった。また、この予備実験の過程において著者はFmoc基が^tBuPh₂Si基と同様、1M Bu₄NF/DMFにより氷冷下60分で除去可能であることを見いだした。

第6項 ヒトCCK-33の合成

前項で得たモデル実験の結果をもとに、著者は以下のようにヒトCCK-33非硫酸化体を目的の硫酸化体に変換した(図37)。

1) まず α -, ϵ -アミノ基を保護するためにTEA存在下Fmoc-OSu処理を0°C, 2時間行った。この際, Tyr残基へのFmoc基の導入を避けるためにフェノールを反応系に添加した。2) 次いでSer-OHを選択的に保護するためにイミダゾール存在下, t BuPh₂SiClで4°C, 14時間処理した。この際もTyr残基のシリル化を抑制するためフェノールを添加した。3) さらにこれを, 20%ピリジン含有DMF中でpyridine-SO₃錯体と25°C, 24時間反応させ, Tyrを硫酸化した。この際MetおよびTrp残基の保護のためにEDTを反応系に添加した。4) 最後に1M Bu₄NFで t BuPh₂Si基とFmoc基を同時に除去した。この際Fmoc基除去により生じるdibenzofulvene^{1,2)}を捕獲するためにEDTを添加した。

Fig. 37. Procedure for Conversion of Unsulfated hCCK-33 to Sulfated hCCK-33



このようにして硫酸化されたヒトCCK-33をCM-Trisacryl Mを用いるイオン交換クロマトグラフィーにより精製した(図38-a, b)。この際0.01Mから0.2MのNH₄HCO₃によるグラジエント溶出を行った。さらにこれをHPLCで精製した(図38-c)。この際にはAsahipak ODP-50カラムを用い, 31%CH₃CN/0.1M AcONH₄によるイソクラティック溶出を行った。イオン交換クロマトグラフィーによる精製は過剰に硫酸化されたCCKおよび硫酸化されずに残ったCCKを除去するのに効果的であり, HPLC精

製はMet(O)体の除去に有効であった。非硫酸化体からの収率は15%であった。

こうして得られた合成ヒトCCK-33の純度をHPLC, 6N HClによる酸分解, およびLAPによる酵素消化後のアミノ酸分析により確認した。またLAP消化後のアミノ酸分析によりTyr(SO₃H)の存在も確認できた。

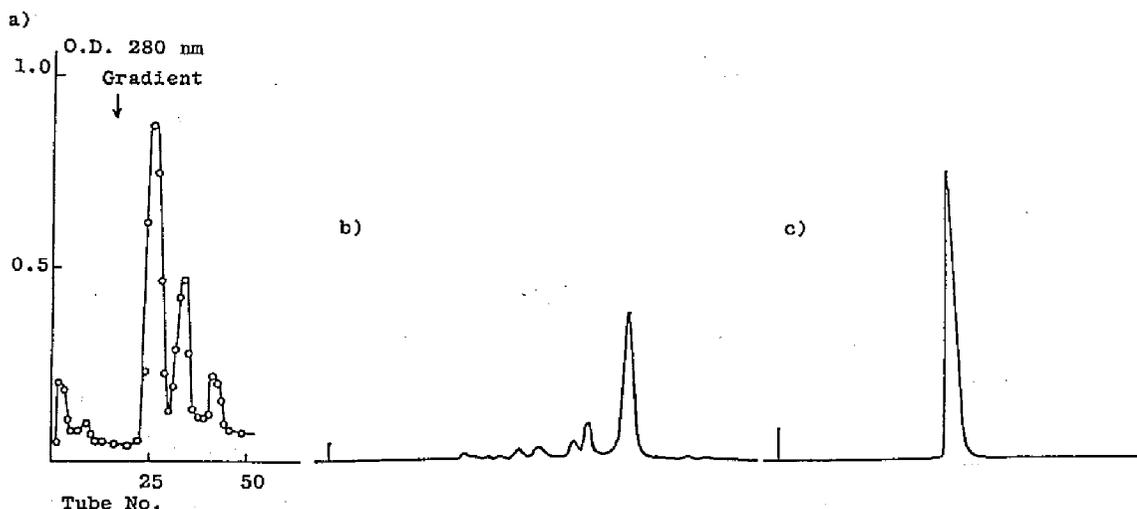


Fig. 38. CM and HPLC Purifications of hCCK-33

- a) CM-Trisacryl M purification
- b) HPLC purification of CM-purified sample on YMC AM-302 ODS
- c) HPLC of purified sample on Asahipak ODP-50

以上、著者は、ペプチドホルモンの合成史上、全合成の困難であったCCKのうち、ヒトCCK-33を、その構造が解明されたのを機会にSerの水酸基を可逆的に保護する手法によって全合成することに成功した。

第7項 合成ヒトCCK-33の生理活性

著者の合成したヒトCCK-33の生理活性は、合成CCK-8との比較により、井上講師、戸部教授らによって検定された。ペントバルビタールにより麻酔されたmongrel犬(n=4)における膵毛細管血流および膵蛋白質放出に対するこれらの活性が比較されたが、この際、膵毛細管血流についてはlaser Doppler perfusion monitor¹⁰³⁾で測定された。また、膵液中の蛋白質濃度についてはLowryらの方法¹⁰⁴⁾が用いられた。

合成ヒトCCK-33およびCCK-8(1.0, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200 pmol/kg of body weight)を60分間隔で腿静脈のカテーテルより静注した際、膵毛細管血流は合成ヒトCCK-33の投与によりdose-dependentに増加した。膵蛋白質放出についても同様に、合成ヒトCCK-33の投与によりdose-dependentに増加した。増加効果は3.125pmol/kgを下限として観察された。また、最大効果は200pmol/kgにおいて観察された。膵毛細管血流と膵蛋白質放出に関しては合成ヒトCCK-33は等モルの合成ヒトCCK-8の92%の活性を持つことが分かった(図39)。

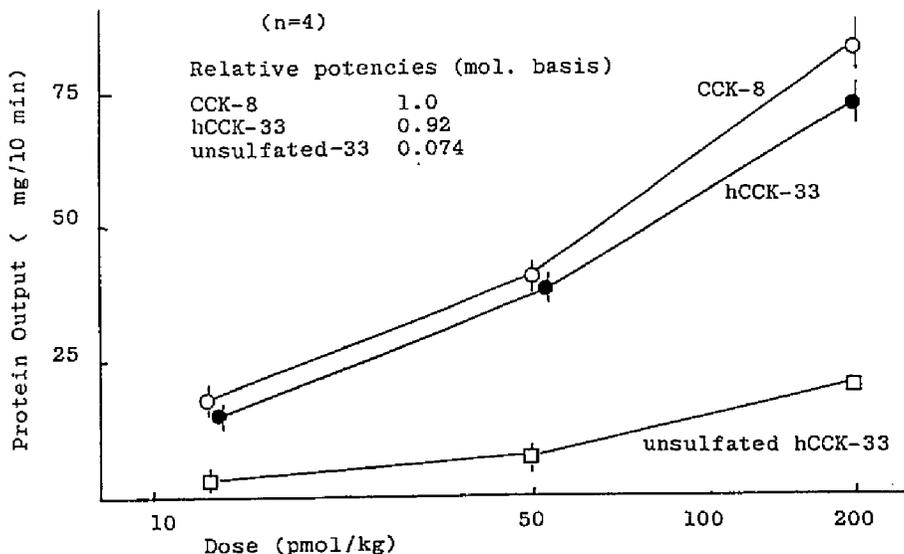


Fig. 39. Increased Pancreatic Protein Output (mg/10 min) in Anesthetized Dogs (n=4) in Response to Three CCK-Peptides

ラットにおける胃酸、ペプシン放出が森賀講師らによって検定された結果、in vivoにおいて合成ヒトCCK-33は等モルの合成ヒトCCK-8の2~3倍の活性をもっていた。モルモット摘出胃からのペプシノーゲン分泌刺激に関しては、合成ヒトCCK-33は等モルの合成ヒトCCK-8とほぼ同等の活性をもっていた。CCK-8は等モルのブタCCK-33の2.5倍の活性を持つと報告されている。¹⁰⁵⁾ したがって、合成ヒトCCK-33は天然ブタCCK-33と比べ同等あるいはそれ以上の活性を持つことがわかった。

さらに井上講師、戸部教授らによって、上記のイヌによるアッセイ系において、合成ヒトCCK-33非硫酸化体の活性は等モルのCCK-8に対し0.074であり、CCKの生理活性に対する硫酸基の重要性が確認された。

結 語

著者は、新しいトリプトファンの保護基，Trp(Mts)を開発し，これがCCKのようなTrp含有ペプチドの合成に実用性のあるものであることを示した。さらに，フッ素イオンにより可逆的に除去可能なシリル化合物によるSer水酸基の保護法，およびFmoc基によるアミノ保護法を見いだした。これらの知見を総合して，Tyrのフェノール性水酸基の選択的な硫酸エステル化を可能にし，ここにヒトCCK-33を全合成することに成功した。この合成によって，未だ天然品の得られていないヒトCCK-33の生理活性についての知見を得ることができた。

上記の研究は，トリプトファン含有ペプチド，および硫酸化チロシン含有ペプチドの合成化学の進歩，ならびに消化管ペプチド研究の発展に寄与するものがあると考えられる。

謝 辞

終わりに臨み、本研究に際して終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました恩師京都大学矢島治明名誉教授（現新潟薬科大学長）、藤井信孝教授に心から感謝の意を表します。

また、種々有益な御指導、御助言を賜りました京都大学船越奨助教授、京都薬科大学赤路健一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安村貢一博士、片倉晋一修士、大高章博士、櫻井満也修士、池村治修士、森本啓氏修士、岡町晃修士、北村優充子学士、森賀三恵学士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。

また、研究に際し終始御激励、御鞭撻を賜りました徳島大学秋田正教授、北川幸己助教授に深く感謝いたします。

合成ガラニンの活性を測定していただきました広島大学医学部瀬川富朗教授に感謝いたします。

合成ヒトCCK-33の活性を測定していただきました京都大学医学部森賀本幸講師に感謝いたします。

合成ガラニン、および合成ヒトCCK-33の活性を測定していただきました京都大学医学部井上一知講師、戸部隆吉教授に感謝いたします。

合成ガラニンと天然品とをHPLCで比較していただきましたスウェーデン、カロリンスカ研究所の立元一彦博士、Viktor Mutt博士に感謝いたします。

合成ガラニン、および合成ヒトCCK-33のFAB-質量分析を行っていただきました大阪大学蛋白質研究所高尾敏文博士、下西康嗣教授に感謝いたします。

元素分析の労を取ら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、柳本融点測定器で測定、全て未補正。旋光度の測定には Union Automatic Digital Polarimeter PM-101 を用いた。

ペプチドの加水分解を以下の3つの方法で行い、加水分解物のアミノ酸組成を Moore¹⁰⁶⁾ らの方法にしたがって Hitachi Amino Acid Analyzer 835 型で測定した。

1) 6N HCl加水分解: 3回蒸留した定沸点塩酸(bp 110°C, 6規定)を使用し、減圧封管中で110°C, 24時間保った。ペプチド中にTyrが存在する場合には、定沸点塩酸にフェノールを添加して水解を行った。

2) 4N MSA加水分解: 1) の条件下ではTrpがほとんど分解され検出不可であるため、Liu¹⁰⁷⁾ らの方法に従い減圧封管後、110°C, 24時間保って加水分解し、Trpを定量した。

3) LAP消化: LAP(Sigma No. 6007)の0.2Mトリス-HCl緩衝液(pH 7.3)溶液(10U/ml)を使用し、37°Cで24時間インキュベートした。

薄層クロマトグラフィー(TLC)には Kieselgel G nach Stahl(Merch)を用い、以下の溶媒系(V/V)で展開した。

Rf₁ CHCl₃-MeOH-H₂O (8:3:1 下層)

Rf₂ CHCl₃-MeOH (10:0.5)

Rf₃ CHCl₃-MeOH-AcOH (9:1:0.5)

Rf₄ n-BuOH-AcOH-pyridine-H₂O (4:1:1:2)

Rf₅ n-BuOH-AcOH-AcOEt-H₂O (1:1:1:1)

Rf₆ CHCl₃-MeOH (9:1)

Rf₇ CHCl₃-MeOH-H₂O (18:3:1)

TLCのニンヒドリン発色の定量には、Shimadzu Dual-wavelength TLC Scanner CS-900(recorder: U-255 MCS)を使用した。

シリカゲルクロマトグラフィーには、Kieselgel 60(Merch)を用いた。ゲル濾過カラムクロマトグラフィーにはSephadex G-10, Sephadex G-25, Sephadex LH-20, Sephadex LH-60を用い、イオン交換カラムクロマトグ

ラフィーには、CM-Trisacryl M(LKB)を用いて 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 204型を使用し、Cosmosil 5C₁₈ (4.6x150mm), Nucleosil 5C₁₈ (4x150mm, 10x250mm), Synchropak RP-P (4x250mm), YMC AM-302 (4x150mm), Asahipak ODP-50 (4x150mm, 10x250mm)カラムを使用した。溶出には、CH₃CN-0.1%TFA系またはCH₃CN-0.1M AcONH₄(pH 6.5)系を用いた。

Disk等電点電気泳動には、Pharmalyte(Pharmacia, pH 3-10)を含む7.5%ポリアクリルアミドを用い、200V低電圧で4℃, 4-5時間泳動した。

脱保護：

各縮合反応に先立ち、N^o保護基(Z(OMe)基あるいはBoc基)を除去するため、TFA処理をアニソール存在下氷冷下1-3時間行った。この際TFA、アニソールの量は保護ペプチド1gに対しそれぞれ 3ml, 1mlを目安として用いた。脱保護後、反応液を室温で濃縮し、得られるオイルをn-hexaneでデカントし、さらにetherでパウダーとなるものに関してはパウダーとした。次いで、このオイルまたはパウダーをKOH上1-2時間減圧乾燥させた。

縮合反応：

- 1) DCCおよび活性エステル縮合反応を室温で行った。
- 2) アジド法を全てRudingerの変法³⁵⁾にしたがって行った。ヒドラジドをDMFあるいはDMF-DMSO-HMPAの混液に溶解させ、寒剤冷却下、HCl-DMF(2.2当量)、亜硝酸イソアミル(1.1当量)を加え 15-20分攪拌し、ヒドラジン試薬¹⁰⁸⁾が陰性になったことを確認後、TEA(2.2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TEAを加えた。
- 3) 混酸無水物法を、Vaughanの方法³⁶⁾に従って行った。アシル成分をTHFに溶解させ、TEA(1.1当量)を加えた後、寒剤冷却下、イソブチルクロロホルメート(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。

精製法：

特に記載のないかぎり、生成物の精製には以下の3つの方法のいずれかを用いた。

- 1) A法： AcOEtに易溶の保護ペプチドを精製するため、反応液を濃縮後、AcOEt抽出し、5%クエン酸水溶液、5%NaHCO₃水溶液、飽和食塩水で順次洗浄し、Na₂SO₄上乾燥させ濃縮した。残渣を適当な溶媒より結晶あるいは沈殿とした。
- 2) B法： AcOEtに難溶の保護ペプチドの精製には、反応液を濃縮後5%クエン酸水溶液で処理し、得られる粉末を5%クエン酸水溶液、5%NaHCO₃水溶液、H₂Oで順次バッチ法で洗浄した。
- 3) C法： 高分子の保護ペプチドでB法のみでは十分な精製ができないものについては、B法による精製を行った後、DMFを溶出液とするSephadex LH-60カラム(3x130cm程度)でゲル濾過し、各フラクション(約10ml)の280nmでの吸収を測定した。次いで目的の部分を集め濃縮後AcOEtで粉末化させた。

第1章に関する実験

第2節に関する実験

1) Z(OMe)-Trp-OBzl

Z(OMe)-Trp-OH(20.0mg, 54.4mmol)をBoc-Trp-OBzl¹⁰⁹⁾と同様にベンジルエステル化し,これをAcOEt-n-hexaneで再結晶した。

収量 21.86g(88%), mp 94-95 °C,

$[\alpha]_D^{25} -16.1^\circ$ (c=0.6, DMF), R_f 0.71.

Anal. Calcd for $C_{27}H_{26}N_5O_5$: C, 70.73; H, 5.72; N, 6.11.

Found: C, 70.80; H, 5.92; N, 6.21.

2) Z(OMe)-Trp(Mts)-OH

Z(OMe)-Trp-OBzl(27.51g, 60mmol)の CH_2Cl_2 溶液(300ml)に氷-食塩冷却下, NaOH末(6.0g, 150mmol), cetyltrimethylammonium chloride(0.19g, 0.6mmol)を加えた。さらにこれに, Mts-Cl(32.85g, 150mmol)の CH_2Cl_2 溶液を滴下した。氷冷却下16h攪拌した後, 1N HClで酸性とした。有機層を H_2O , 5%NaHCO₃, H_2O で洗浄の後, Na₂SO₄で乾燥した。これを濃縮し, EtOH(600ml)に溶かした。これに1N NaOH(90ml)を加え 2.5h攪拌した。溶媒を減圧留去し, H_2O (400ml)を加えた後, 水層をetherで洗浄し, 1N HClで酸性とした。生ずるオイルをAcOEtで抽出し, NaCl水で洗浄した後, Na₂SO₄で乾燥した。これを濃縮し残渣をn-hexaneでパウダーとした。

収量 32.4g(98%), R_f 0.79.

元素分析のためサンプルの一部を $CHCl_3$ -MeOH(40:1)を溶出液とするシリカゲルクロマトグラフィーにより精製した。

mp 77-79 °C, $[\alpha]_D^{25} -10.1^\circ$ (c=1.8, DMF),

Anal. Calcd for $C_{29}H_{30}N_2O_7S$: C, 63.26; H, 5.49; N, 5.09.

Found: C, 63.21; H, 5.42; N, 5.22.

3) H-Trp(Mts)-OH

Z(OMe)-Trp(Mts)-OH(0.55g, 1.0mmol)を常法によりTFA処理した後, TFA

を減圧留去した。残渣をetherで処理しパウダーを得た。これを少量のTEA存在下MeOH-etherで再結晶した。

収量 0.34g(87%), mp 211-213 °C,

$[\alpha]_D^{25}$ -30.0° (c=0.6, DMF), Rf, 0.44.

Anal. Calcd for C₂₀H₂₂N₂O₄S: C, 62.16; H, 5.74; N, 7.25.

Found: C, 61.89; H, 5.74; N, 7.11.

4) Z(OMe)-Trp(Mts)-NHNH₂

Z(OMe)-Trp(Mts)-OBzl(0.50g, 0.78mmol)のEtOH溶液(20ml)に80%抱水ヒドラジン(0.19ml, 5eq)を加え一夜放置した。溶媒を留去し、残渣にH₂Oを加えて得られたパウダーをEtOH-etherで再結晶した。

収量 0.34g(77%), mp 121-123 °C,

$[\alpha]_D^{25}$ -41.3° (c=0.8, DMF), Rf, 0.49.

Anal. Calcd for C₂₉H₃₂N₄O₆S: C, 61.69; H, 5.71; N, 9.92.

Found: C, 61.77; H, 5.75; N, 10.16.

5) Boc-Trp(Mts)-OH·DCHA

氷-食塩冷却下, Boc-Trp-OBzl(3.0g, 7.6mmol)のCH₂Cl₂溶液(50ml)にcetyltrimethylammonium chloride(24.4mg, 76μmol), NaOH末(0.76g, 19mmol), Mts-Cl(4.16g, 19.0mmol)を加え氷冷下5h撹拌した。これをZ(OMe)-誘導体と同様に処理しオイルを得た。常法でDCHA塩化した後, MeOH-etherで再結晶した。

収量 3.76g(74%), mp 154-155 °C,

$[\alpha]_D^{25}$ +19.9° (c=1.0, MeOH), Rf, 0.57.

Anal. Calcd for C₂₅H₃₀N₂O₆S·C₁₂H₂₃N: C, 66.53; H, 8.00; N, 6.29.

Found: C, 66.73; H, 8.13; N, 6.03.

6) H-Trp(Mts)-OHの安定性

H-Trp(Mts)-OH(4.0mg, 10.4μmol)を i)1N NaOH(2eq), 0°C, 60min, ii)80%抱水ヒドラジン(5eq)/MeOH, 25°C, 24h, iii)4N HCl/dioxane(5eq), 0°C,

60min, iv) TFA-thioanisole (0.1ml-10 μ l), 50°C, 30min, v) 25% HBr/AcOH (0.1ml), 0°C, 30min でそれぞれ処理した。いずれの場合も TLC上何ら変化は認められなかった。

7) Boc-Trp(Mts)-OH, Z(OMe)-Trp(Mts)-OHのTFA処理

Boc-Trp(Mts)-OH (10.0mg, 21 μ mol), Z(OMe)-Trp(Mts)-OH (12.3mg, 22 μ mol) をそれぞれTFA-anisole (30 μ l-6 μ l), あるいは2%EDT含有TFA-3,5-dimethyl-anisole (30 μ l-6 μ l) で氷冷下1h 処理した。この間反応液はピンク色を示すことなく, またTLC上H-Trp(Mts)-OH (Rf, 0.44) 以外のスポットは見当らなかった。しかし, anisole非存在下で脱保護を行うと, H-Trp-(Mts)-OHのスポット以外に4個のスポットが認められた。

8) Mts基の除去

H-Trp(Mts)-OH (4.3mg, 11 μ mol) と H-Phe-OH (内部標準 1.2mg, 7.3 μ mol) をm-cresol (23 μ l, 220 μ mol) 存在下, 種々の脱保護試薬で氷冷下60min 処理した。反応液の一部を取りアミノ酸分析機でTrpの回収率を求めた結果を表 2 に示した。

第3節に関する実験

1) Z(OMe)-Trp(Mts)-Met(O)-Asp(OBzl)-Phe-NH₂

a) 活性エステル法: Z(OMe)-Met(O)-Asp(OBzl)-Phe-NH₂ (1.40g, 2.1mmol) を氷冷下, 2%EDT含有TFA-3,5-dimethylanisole(5ml-0.8ml) で処理し, これをDMF(20ml) に溶かし, TEA(0.29ml, 2.1mmol) で中和した。これにZ(OMe)-Trp(Mts)-OSu(2.05g, 3.2mmol), TEA(0.45ml, 3.2mmol) を加え20h 攪拌した。生成物をB法精製の後, DMF-AcOEt で再沈殿した。

収量 1.78g(82%), mp 207-209 °C,

$[\alpha]_D^{25}$ -25.8° (c=0.8, DMF), Rf₆ 0.67.

4N MSAによる酸分解結果:

Trp 0.73, Met 1.09, Asp 1.14, Phe 1.00 (Pheの回収率, 79%).

Anal. Calcd for C₅₄H₆₀N₆O₁₁S₂: C, 62.77; H, 5.85; N, 8.13.

Found: C, 62.83; H, 6.01; N, 8.17.

b) アジド法: H-Met(O)-Asp(OBzl)-Phe-NH₂ [Z(OMe)-体 (1.80g, 2.7mmol) より調製] のDMF溶液(20ml) とZ(OMe)-Trp(Mts)-NHNH₂ (1.70g, 3.0mmol) から調製したアジドのDMF溶液(10ml), およびTEA(0.42ml, 3.0mmol) を混合し48h 攪拌した。生成物をB法精製の後, DMF-AcOEt で再沈殿した。

収量 2.22g(79%), mp 207-209 °C,

$[\alpha]_D^{25}$ -25.3° (c=1.0, DMF), Rf₆ 0.67(a) のRf値と同一)。

4N MSAによる酸分解結果:

Trp 0.61, Met 1.04, Asp 1.10, Phe 1.00 (Pheの回収率, 71%)

2) Z(OMe)-Gly-Trp(Mts)-Met(O)-Asp(OBzl)-Phe-NH₂

H-Trp(Mts)-Met(O)-Asp(OBzl)-Phe-NH₂ [Z(OMe)-体 (0.60g, 0.58mmol) から調製] のDMF溶液(10ml) に, Z(OMe)-Gly-OH(0.17g, 0.70mmol) から調製した混酸無水物のTHF溶液(10ml) を加え3h 攪拌した。生成物をB法精製の後, DMF-ether で再沈殿した。

収量 0.45g(71%), mp 190-192 °C,

$[\alpha]_D^{25}$ -21.9° (c=0.7, DMF), Rf₆ 0.61.

Anal. Calcd for C₅₆H₆₃N₇O₁₂S₂: C, 61.69; H, 5.82; N, 8.99.

Found: C, 61.88; H, 5.85; N, 8.75.

3) Z(OMe)-Met(O)-Gly-Trp(Mts)-Met(O)-Asp(OBzl)-Phe-NH₂

H-Gly-Trp(Mts)-Met(O)-Asp(OBzl)-Phe-NH₂ [Z(OMe)-体 (0.30g, 0.28 mmol)から調製]のDMF溶液(3ml)にZ(OMe)-Met(O)-OTCP(0.21g, 0.42mmol)およびTEA(67 μ l, 0.42mmol)を加え24h攪拌した。生成物をB法精製の後, DMF-etherで再沈殿した。

収量 0.23g(68%), mp 204-206 °C,

$[\alpha]_D^{25}$ -19.8° (c=0.4, DMF), Rf₆ 0.58.

Anal. Calcd for C₆₁H₇₂N₈O₁₃S₃·H₂O: C, 59.11; H, 6.02; N, 9.04.

Found: C, 59.31; H, 5.84; N, 8.94.

4) Z(OMe)-Tyr-Met(O)-Gly-Trp(Mts)-Met(O)-Asp(OBzl)-Phe-NH₂

H-Met(O)-Gly-Trp(Mts)-Met(O)-Asp(OBzl)-Phe-NH₂ [Z(OMe)-体 (0.20g, 0.16mmol)から調製]のDMF溶液(1ml)に, Z(OMe)-Tyr-NHNH₂(86mg, 0.24mmol)から調製したアジドのDMF溶液(1ml)とTEA(22 μ l, 0.16mmol)を加え, 48h攪拌した。生成物をB法精製の後, DMF-etherで再沈殿した。

収量 0.15g(68%), mp 200-202 °C,

$[\alpha]_D^{25}$ -13.4° (c=0.7, DMF), Rf₆ 0.56.

4N MSA酸分解後のアミノ酸分析値:

Tyr 1.06, Met 1.84, Gly 1.04, Trp 0.98, Asp 1.02, Phe 1.00.

(Pheの回収率, 73%)

Anal. Calcd for C₇₀H₈₁N₉O₁₅S₃: C, 60.72; H, 5.90; N, 9.10.

Found: C, 60.44; H, 5.88; N, 9.13.

5) H-Tyr-Met-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH₂

上記のヘプタペプチドアミド(200mg, 145 μ mol)をm-cresol(0.61ml, 40 eq), EDT(0.12ml, 10eq)存在下, 1M TFMSA-thioanisole/TFA(5.8ml)で氷冷下120min処理した。etherを加え析出するパウダーを遠沈し, これをMeOH(5ml)に溶かした。さらにこれをAmberlite CG-4B (acetate form)で処

理した後、ジチオスレイトール(200mg, 9eq)で室温で一夜還元した。etherを加え得られるパウダーを CHCl_3 -MeOH- H_2O (8:3:1)を溶出液とするシリカゲルクロマトグラフィー(3.3×12cm)で精製した。さらにこれをSephadex LH-20カラム(1.8×60cm)でゲル濾過した。MeOHを溶出液としUV280nmで吸光度を測定し目的の画分(Nos. 22-28, 各5ml)を集め濃縮し、残渣をetherでパウダーとした。

収量 63mg(46%),

$[\alpha]_D^{25}$ -35.7° (c=0.3, MeOH), R_f 0.83, R_f 0.12.

4N MSA酸分解後のアミノ酸分析値:

Tyr 1.05, Met 1.97, Gly 1.08, Trp 1.16, Asp 0.90, Phe 1.00.

(Pheの回収率, 72%)

LAP酵素消化後のアミノ酸分析値:

Tyr 1.02, Met 2.10, Gly 1.15, Trp 1.24, Asp 0.97, Phe 1.00.

(Pheの回収率, 62%)

Anal. Calcd for $\text{C}_{45}\text{H}_{57}\text{N}_9\text{O}_{10}\text{S}_2 \cdot \text{CH}_3\text{COOH} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$:

C, 54.06; H, 6.27; N, 12.07.

Found: C, 54.17; H, 6.24; N, 11.55.

HPLC:retention time 15.2min に単一ピーク(カラム: Nucleosil 5C₁₈ (4×150mm), 流速: 0.5ml/min, グラジエント: $\text{CH}_3\text{CN}/0.2\%\text{TFA}$ (40-50%, 30min), 吸光度: 280nm)。

第4節に関する実験

第3項に関する実験

1) Z(OMe)-Leu-Ala-NH₂

Z(OMe)-Leu-Ala-OMe(5.70g, 15.00mmol)をMeOH(60ml)に溶かし、NH₃ガスを溶解させた。密封の後2日間室温放置した。溶媒を留去の後、etherで結晶化し、DMF-etherで再結晶した。

収量 4.30g(78%), mp 170-172 °C,

$[\alpha]_D^{27} +7.1^\circ$ (c=1.0, DMF), Rf₁ 0.70.

Anal. Calcd for C₁₈H₂₇N₃O₅: C, 59.16; H, 7.45; N, 11.50.

Found: C, 58.88; H, 7.52; N, 11.28.

2) Z(OMe)-Tyr-Gly-Leu-Ala-NH₂

Z(OMe)-Leu-Ala-NH₂(4.20g, 11.50mmol)を常法によりTFA処理し、これをDMF(40ml)に溶かした。TEA(1.75ml, 12.60mmol)を加え、これを中和した後、Z(OMe)-Tyr-Gly-NHNH₂(5.73g, 13.80mmol)より調製したアジドのDMF溶液(60ml)、およびTEA(1.92ml, 13.80mmol)を加え一夜撹拌した。生成物をA法(抽出溶媒: n-BuOH)で精製し、MeOH-AcOEtで再結晶した。

収量 3.95g(59%), mp 161-163 °C,

$[\alpha]_D^{27} -37.9^\circ$ (c=1.0, DMF), Rf₁ 0.66.

Anal. Calcd for C₂₉H₃₉N₅O₈ · 1/2H₂O : C, 58.57; H, 6.78; N, 11.78.

Found: C, 58.68; H, 6.78; N, 11.74.

3) Boc-Asp(OChp)-Lys(Z)-NHNH-Troc

Z(OMe)-Lys(Z)-NHNH-Troc⁴⁷⁾(4.05g, 6.40mmol)を常法によりTFA処理し、これをDMF(40ml)に溶かした。TEA(0.89ml, 6.40mmol)を加え、これを中和した後、Boc-Asp(OChp)-OSu(3.00g, 7.00mmol)、および NMM(0.71ml, 7.00mmol)を加え一夜撹拌した。生成物をA法で精製した後、AcOEt-n-hexaneで再結晶した。

収量 4.51g(90%), mp 61-64 °C,

$[\alpha]_D^{28} -24.4^\circ$ (c=1.0, MeOH), Rf₁ 0.76.

Anal. Calcd for $C_{33}H_{48}N_5O_{10}Cl_3$: C, 50.74; H, 6.19; N, 8.97.

Found: C, 51.00; H, 6.24; N, 8.75.

4) Boc-Asp(OChp)-Lys(Z)-NHNH₂

Boc-Asp(OChp)-Lys(Z)-NHNH-Troc(0.76g, 0.97mmol)のAcOH溶液(6ml)にZn末(1.27g, 20eq)を加え室温で6h撹拌した。不溶物を濾除した後、反応液を濃縮した。残渣をAcOEtに溶かし、5%EDTA および H₂Oで洗浄し、Na₂SO₄上乾燥した。AcOEtを濃縮し、残渣をetherで結晶とした。さらにこれをMeOH-etherで再結晶した。

収量 0.58g(98%), mp 91-93 °C,

$[\alpha]_D^{25}$ -13.2° (c=1.0, DMF), R_f 0.69.

Anal. Calcd for $C_{30}H_{47}N_5O_8$: C, 59.48; H, 7.82; N, 11.56.

Found: C, 59.48; H, 7.82; N, 11.53.

5) Boc-Asp(OChp)-Lys(Z)-Tyr-Gly-Leu-Ala-NH₂ [1]

Z(OMe)-Tyr-Gly-Leu-Ala-NH₂(0.65g, 1.10mmol)を常法に従ってTFA処理し、これをDMF(5ml)に溶かし、TEA(0.15ml, 1.10mmol)で中和した。これにBoc-Asp(OChp)-Lys(Z)-NHNH₂(0.80g, 1.32mmol)より調製したアジドのDMF溶液(2ml), およびTEA(0.18ml, 1.32mmol)を加え24h撹拌した。生成物をA法で精製(抽出溶媒:n-BuOH)した後、MeOH-etherで再結晶した。

収量 0.74g(68%), mp 127-130 °C,

$[\alpha]_D^{25}$ -38.7° (c=1.0, DMF), R_f 0.67.

Anal. Calcd for $C_{50}H_{74}N_8O_{13} \cdot 1/2H_2O$: C, 59.80; H, 7.53; N, 11.16.

Found: C, 59.60; H, 7.56; N, 11.26.

6) Z(OMe)-Ser(Bzl)-Phe-OMe

Z(OMe)-Ser(Bzl)-OH [CHA塩(1.29g, 2.77mmol)より調製] と H-Phe-OMe [HCl塩(0.65g, 2.77mmol)より調製] のDMF溶液(20ml)にDCC(0.63g, 3.05mmol)を加え6h撹拌した。生成物をA法精製の後、MeOH-n-hexaneで再結晶した。

収量 1.35g(86%), mp 97-99 °C,

$[\alpha]_D^{27}$ 1.9° (c=1.0, DMF), R_f : 0.77.

Anal. Calcd for $C_{29}H_{32}N_2O_7$: C, 66.91; H, 6.20; N, 6.20.

Found: C, 66.83; H, 6.28; N, 5.90.

7) Z(OMe)-Ser(Bzl)-Phe-NHNH₂

Z(OMe)-Ser(Bzl)-Phe-OMe(3.00g, 5.76mmol)のMeOH溶液(30ml)に80%抱水ヒドラジン(3.60ml, 10eq)を加え,室温で一夜放置した。析出した結晶をDMF-MeOHで再結晶した。

収量 2.25g(75%), mp 208-210 °C,

$[\alpha]_D^{29}$ -12.4° (c=1.0, DMF), R_f : 0.30.

Anal. Calcd for $C_{28}H_{32}N_4O_6$: C, 64.60; H, 6.20; N, 10.76.

Found: C, 64.82; H, 6.13; N, 10.85.

8) Z(OMe)-Ser(Bzl)-Phe-His-OMe

Z(OMe)-Ser(Bzl)-Phe-NHNH₂(2.00g, 3.84mmol)から調製したアジドのDMF溶液(10ml)にH-His-OMe[その塩酸塩(0.95g, 4.61mmol)から調製]のDMF溶液(5ml), およびTEA(0.59ml, 4.18mmol)を加え12h撪拌した。生成物をA法で精製(抽出溶媒: n-BuOH)した後, MeOH-etherで再結晶した。

収量 2.32g(92%), mp 163-166 °C,

$[\alpha]_D^{29}$ -18.4° (c=1.0, DMF), R_f : 0.65.

Anal. Calcd for $C_{35}H_{39}N_5O_8 \cdot 2H_2O$: C, 60.59; H, 6.25; N, 10.10.

Found: C, 60.83; H, 5.82; N, 10.12.

9) Z(OMe)-Ser(Bzl)-Phe-His-NHNH₂ [2]

上記のメチルエステル(2.22g, 3.38mmol)をDMF-MeOHの混液(1:2, 20ml)に溶かし, 80%抱水ヒドラジン(2.20ml, 10eq)を加え室温で12h放置した。溶媒を留去し, 残渣をEtOHで結晶化させた。さらにこれをDMF-EtOHで再結晶した。

収量 1.54g(69%), mp 165-167 °C,

$[\alpha]_D^{25} +7.1^\circ$ (c=1.0, DMF), Rf, 0.58.

6N HCl酸分解後のアミノ酸分析値：

Ser 0.98, Phe 1.00, His 1.06 (Pheの回収率, 61%).

Anal. Calcd for $C_{34}H_{39}N_7O_7 \cdot 1/2H_2O$: C, 61.25; H, 6.05; N, 14.71.

Found: C, 60.98; H, 6.00; N, 14.89.

10) Z(OMe)-Asn-His-NHNH₂

Z(OMe)-Asn-His-OMe(3.00g, 6.70mmol)をDMF-MeOH(1:1, 30ml)に溶かし80%抱水ヒドラジン(4.20ml, 10eq)を加え室温で一夜放置した。反応液を濃縮しMeOHで結晶化した。生成物をDMF-MeOHで再結晶した。

収量 2.35g(78%), mp 197-199 °C,

$[\alpha]_D^{25} +23.6^\circ$ (c=0.8, DMF), Rf, 0.23.

Anal. Calcd for $C_{19}H_{25}N_7O_6$: C, 51.00; H, 5.63; N, 21.91.

Found: C, 51.03; H, 5.56; N, 22.07.

11) Z(OMe)-Asn-His-Arg(Mts)-NHNH-Troc

Z(OMe)-Asn-His-NHNH₂(1.50g, 3.35mmol)より調製したアジドのDMF溶液(5ml)とH-Arg(Mts)-NHNH-Troc[Z(OMe)-Arg(Mts)-NHNH-Troc^{3*8}](2.86g, 4.02mmol)より調製]のDMF溶液(15ml), およびTEA(0.56ml, 4.02ml)を混合し一夜攪拌した。生成物をA法で精製した後, MeOH-etherで再結晶した。

収量 3.05g(95%), mp 130-132 °C,

$[\alpha]_D^{25} +40.4^\circ$ (c=0.5, MeOH), Rf, 0.59.

Anal. Calcd for $C_{37}H_{48}N_{11}O_{11}Cl_3S$: C, 46.23; H, 5.17; N, 15.63.

Found: C, 46.23; H, 5.03; N, 16.03.

12) Boc-Asp(OChp)-Asn-His-Arg(Mts)-NHNH-Troc

上記のトリペプチド誘導体(2.90g, 3.02mmol)をTFA処理し, これとBoc-Asp(OChp)-OSu(1.54g, 3.62mmol), NMM(0.68ml, 6.84mmol)とをDMF(30ml)中一夜攪拌した。生成物をA法で精製の後, MeOH-etherで再結晶した。

収量 3.09g(92%), mp 136-139 °C,

$[\alpha]_D^{25}$ -13.0° (c=1.0, MeOH), R_f 0.63.

Anal. Calcd for $C_{44}H_{65}N_{12}O_{13}Cl_3S \cdot 2H_2O$: C, 46.17; H, 6.07; N, 14.69.

Found: C, 46.47; H, 5.77; N, 14.48.

13) Z(OMe)-Ile-Asp(OChp)-Asn-His-Arg(Mts)-NHNH-Troc

上記のテトラペプチド誘導体(3.09g, 2.79mmol)をTFA処理し, これと Z(OMe)-Ile-ONp(1.39g, 3.35mmol), NMM(0.62ml, 6.17mmol)とをDMF(30ml)中24h攪拌した。生成物をB法で精製の後, DMF-EtOHで再結晶した。

収量 2.75g(77%), mp 175-178 °C,

$[\alpha]_D^{25}$ -10.6° (c=1.0, MeOH), R_f 0.60.

Anal. Calcd for $C_{54}H_{76}N_{13}O_{15}Cl_3S$: C, 50.44; H, 5.96; N, 14.16.

Found: C, 50.47; H, 6.06; N, 14.16.

14) Z(OMe)-Ala-Ile-Asp(OChp)-Asn-His-Arg(Mts)-NHNH-Troc

上記のペントペプチド誘導体(2.70g, 2.10mmol)をTFA処理し, これと Z(OMe)-Ala-ONp(1.02g, 2.73mmol), HOBt(0.14g, 1.05mmol), NMM(0.50ml, 4.83mmol)とをDMF(30ml)中一夜攪拌した。生成物をA法で精製(抽出溶媒: n-BuOH)の後, DMF-EtOHで再結晶した。

収量 2.33g(82%), mp 169-172 °C,

$[\alpha]_D^{25}$ -10.6° (c=1.0, DMF), R_f 0.55.

Anal. Calcd for $C_{57}H_{81}N_{14}O_{16}Cl_3S$: C, 50.46; H, 6.02; N, 14.45.

Found: C, 50.22; H, 5.99; N, 14.31.

15) Z(OMe)-Ala-Ile-Asp(OChp)-Asn-His-Arg(Mts)-NHNH₂ [3]

上記のヘキサペプチド誘導体(2.30g, 1.69mmol)をDMF-AcOH(1:1, 20ml)に溶かし, Zn末(1.11g, 10eq)を加えた後, 室温で8h攪拌した。反応液を濾過した後, 濃縮した。残渣に5%EDTAを加え, 得られたパウダーをH₂Oで洗浄の後, DMF-MeOHで再結晶した。

収量 1.01g(50%), mp 190-192 °C,

$[\alpha]_D^{25} -12.8^\circ$ ($c=0.6$, DMF), R_f , 0.40.

6N HCl酸分解後のアミノ酸分析値：

Ala 1.06, Ile 1.02, Asp 2.03, His 1.00, Arg 1.00.

(Argの回収率, 80%)

Anal. Calcd for $C_{54}H_{80}N_{14}O_{14}S \cdot 2H_2O$: C, 53.27; H, 6.96; N, 16.11.

Found: C, 53.01; H, 6.71; N, 15.85.

こうして得られた保護ヘキサペプチドヒドラジド(30mg)を *m*-cresol (28 μ l, 10eq)存在下, 1M TFMSA-thioanisole/TFA(1.3ml)で氷冷, 2h処理した。etherを加え析出するパウダーを遠沈し, これをLAPで酵素消化した。

アミノ酸分析値: Ala 1.21, Ile 1.08, Asp 0.86, Asn N.D.,
His 0.98, Arg 1.00 (Argの回収率, 77%).

16) Z(OMe)-Gly-Pro-OH·DCHA

H-Pro-OH(8.63g, 75.00mmol), Z(OMe)-Gly-ONp(18.00g, 50.00mmol), TEA(17.50ml, 125.00mmol)をDMF-H₂O(1:1, 200ml)中一夜撹拌した。反応液を濃縮し, 残渣を5%NaHCO₃に溶かし, etherで洗浄した。さらに水層をクエン酸で酸性にし, 生成物を *n*-BuOHで抽出した後, 有機層をH₂Oで洗浄した。得られた生成物を常法でDCHA塩化し, MeOH-etherで再結晶した。

収量 17.20g(67%), mp 120-122 °C,

$[\alpha]_D^{25} -30.1^\circ$ ($c=1.0$, DMF), R_f , 0.20.

Anal. Calcd for $C_{28}H_{43}N_3O_6S$: C, 64.96; H, 8.37; N, 8.12.

Found: C, 64.77; H, 8.44; N, 8.18.

17) Z(OMe)-Gly-Pro-His-NHNH₂ [4]

Z(OMe)-Gly-Pro-OH[上記DCHA塩(10.40g, 20.00mmol)より調製], HOSu(2.53g, 22.00mmol), DCC(4.54g, 22.00mmol)のTHF溶液(100ml)を4h撹拌し濾過した。濾液とH-His-OMeのDMF溶液(100ml) [そのHCl塩(6.17g, 30.00mmol)より調製], TEA(2.80ml, 20.00mmol)を混合し一夜撹拌の後, 濃縮

した。残渣をn-BuOHに溶かしH₂Oで洗浄した。さらに有機層を濃縮し、残渣をMeOH(50ml)に溶かし、80%抱水ヒドラジン(6.30ml, 5eq)を加え一夜放置した。反応液を濃縮し、残渣をetherで結晶化させ、MeOH-etherで再結晶した。

収量 6.85g(70%), mp 99-102 °C,

$[\alpha]_D^{25}$ -58.3° (c=1.0, MeOH), Rf₁ 0.18.

6N HCl 酸分解後のアミノ酸分析値:

Gly 1.00, Pro 1.18, His 0.93 (Glyの回収率, 82%).

Anal. Calcd for C₂₂H₂₉N₇O₆S·1/2H₂O: C, 53.21; H, 6.09; N, 19.74.

Found: C, 53.55; H, 6.29; N, 19.32.

18) Z(OMe)-Leu-Leu-OMe

Z(OMe)-Leu-OH·DCHA(9.88g, 2.00mmol)を常法により脱塩した後、THF(100ml)に溶かし混酸無水物とした。これに氷-食塩冷却下、H-Leu-OMe [HCl塩(4.00g, 2.00mmol)より調製] のDMF溶液(40ml)を加え4h攪拌した。生成物をA法で精製の後、AcOEt-isopropyletherで再結晶した。

収量 5.71g(62%), mp 62-63 °C,

$[\alpha]_D^{27}$ -38.6° (c=1.0, MeOH), Rf₂ 0.75.

Anal. Calcd for C₂₂H₃₄N₂O₆: C, 62.54; H, 8.11; N, 6.63.

Found: C, 62.47; H, 8.14; N, 6.68.

19) Z(OMe)-Tyr-Leu-Leu-OMe

Z(OMe)-Tyr-NHNH₂(5.35g, 14.90mmol)から調製したアジドのDMF溶液(50ml)とH-Leu-Leu-OMe[Z(OMe)-Leu-Leu-OMe(5.70g, 13.50mmol)より調製] のDMF溶液(20ml)をTEA(2.07ml, 14.90mmol)存在下、一夜反応させた。生成物をA法で精製の後、AcOEt-isopropyletherで再結晶した。

収量 5.70g(72%), mp 70-73 °C,

$[\alpha]_D^{28}$ -27.1° (c=1.0, MeOH), Rf₂ 0.42.

Anal. Calcd for C₃₁H₄₃N₃O₈: C, 63.57; H, 7.40; N, 7.18.

Found: C, 63.80; H, 7.27; N, 6.98.

20) Z(OMe)-Tyr-Leu-Leu-NHNH₂ [5]

上記のトリペプチドエステル(5.50g, 9.39mmol)のMeOH-DMF溶液(1:1, 50ml)に80%抱水ヒドラジン(2.82ml, 5eq)を加え一夜放置した。溶液を濃縮し、残渣をEtOHで結晶化し、DMF-EtOHで再結晶した。

収量 2.86g(52%), mp 220-222°C,

$[\alpha]_D^{20} +5.0^\circ$ (c=1.0, DMF), Rf₁ 0.69.

6N HCl酸分解後のアミノ酸分析値:

Tyr 0.87, Leu 2.00 (Leuの回収率, 95%).

Anal. Calcd for C₃₀H₄₃N₅O₇: C, 61.52; H, 7.40; N, 11.96.

Found: C, 61.62; H, 7.49; N, 11.95.

21) Z(OMe)-Ala-Gly-OMe

Z(OMe)-Ala-OH(19.34g, 71.37mmol), H-Gly-OMe [HCl塩(10.19g, 71.37mmol), DCC(15.78g, 78.51mmol)のDMF溶液(200ml)を18h撹拌した。生成物をB法で精製の後, AcOEt-etherで再結晶した。

収量 18.50g(72%), mp 104-105 °C,

$[\alpha]_D^{22} +5.0^\circ$ (c=1.0, DMF), Rf₂ 0.37.

Anal. Calcd for C₁₅H₂₀N₂O₆: C, 55.55; H, 6.22; N, 8.64.

Found: C, 55.95; H, 6.38; N, 8.72.

22) Z(OMe)-Ser(Bzl)-Ala-Gly-OMe

Z(OMe)-Ser(Bzl)-OH·CHA(9.61g, 21.53mmol)より調製した混酸無水物のTHF溶液(50ml)とH-Ala-Gly-OMe [Z(OMe)-Ala-Gly-OMe (5.82g, 17.94mmol)より調製]のDMF溶液(30ml)とを混合した。生成物をA法で精製した後, AcOEt-etherで再結晶した。

収量 6.98g(78%), mp 110-113 °C,

$[\alpha]_D^{18} -8.3^\circ$ (c=1.0, MeOH), Rf₁ 0.81.

Anal. Calcd for C₂₅H₃₁N₃O₈: C, 59.87; H, 6.23; N, 8.38.

Found: C, 60.14; H, 6.50; N, 8.39.

23) Z(OMe)-Asn-Ser(Bzl)-Ala-Gly-OMe

H-Ser(Bzl)-Ala-Gly-OMe [Z(OMe)-体(5.27g, 10.50mmol)より調製] のDMF溶液(50ml)にZ(OMe)-Asn-ONp(4.82g, 11.00mmol), およびTEA(1.53ml, 11.00mmol)を加え一夜攪拌した。生成物をB法で精製の後, DMF-AcOEtで再結晶した。

収量 6.29g(97%), mp 210-213 °C,

$[\alpha]_D^{25} +6.0^\circ$ (c=1.0, DMF), Rf, 0.67.

Anal. Calcd for $C_{29}H_{37}N_5O_{10}$: C, 56.57; H, 6.06; N, 11.38.

Found: C, 56.65; H, 6.00; N, 11.27.

24) Z(OMe)-Leu-Asn-Ser(Bzl)-Ala-Gly-OMe

H-Asn-Ser(Bzl)-Ala-Gly-OMe [Z(OMe)-体(6.27g, 10.19mmol)より調製] のDMF溶液(60ml)にZ(OMe)-Leu-ONp(6.37g, 15.29mmol)およびTEA(1.42ml, 10.19mmol)を加え一夜攪拌した。生成物をB法で精製の後, DMF-MeOHで再結晶した。

収量 5.63g(76%), mp 231-233 °C,

$[\alpha]_D^{25} -3.0^\circ$ (c=1.0, DMF), Rf, 0.74.

Anal. Calcd for $C_{35}H_{48}N_6O_{11}$: C, 57.68; H, 6.64; N, 11.53.

Found: C, 57.75; H, 6.72; N, 11.48.

25) Z(OMe)-Leu-Asn-Ser(Bzl)-Ala-Gly-NHNH₂ [6]

上記のペンタペプチドエステル(1.50g, 2.05mmol)のDMF溶液(20ml)に80%抱水ヒドラジン(1.29ml, 10eq)を加え24h放置した。残渣を濃縮後, MeOHで結晶化し, DMF-MeOHで再結晶した。

収量 1.21g(81%), mp 119-122 °C,

$[\alpha]_D^{25} -2.9^\circ$ (c=1.0, DMF), Rf, 0.62.

6N HCl酸分解後のアミノ酸分析値:

Leu 1.01, Asp 1.01, Ser 0.94, Ala 0.99, Gly 1.00.

(Glyの回収率, 92%)

Anal. Calcd for $C_{34}H_{48}N_8O_{10} \cdot 1/2H_2O$: C, 55.35; H, 6.69; N, 15.18.

Found: C, 55.36; H, 6.50; N, 15.30.

26) Boc-Trp(Mts)-Thr-OMe

Boc-Trp(Mts)-OH [DCHA塩(6.68g, 10.00mmol)より調製] のTHF溶液 (20 ml) と H-Thr-OMe [塩酸塩(2.04g, 12.00mmol)より調製] のDMF溶液(20ml) を混合し, さらにDCC(2.27g, 11.00mmol)を加え一夜攪拌した。DCUreaを濾除した後, 生成物をB法で精製した。さらにこれをAcOEt-n-hexanで再結晶した。

収量 4.90g(81%), mp 88-90 °C,

$[\alpha]_D^{25} -3.7^\circ$ (c=0.3, MeOH), Rf_2 0.33.

Anal. Calcd for $C_{30}H_{39}N_3O_8S$: C, 59.88; H, 6.53; N, 6.98.

Found: C, 60.35; H, 6.86; N, 6.70.

27) Z(OMe)-Gly-Trp(Mts)-Thr-OMe

H-Trp(Mts)-Thr-OMe [Z(OMe)-体(4.75g, 7.89mmol)より調製] のDMF溶液(20ml)にZ(OMe)-Gly-ONp(2.90g, 9.47mmol)およびTEA(1.10ml, 7.89mmol)を加え24h攪拌した。生成物をA法で精製の後, AcOEt-etherで再結晶した。

収量 2.54g(43%), mp 92-94 °C,

$[\alpha]_D^{28} -10.3^\circ$ (c=1.0, MeOH), Rf_2 0.37.

Anal. Calcd for $C_{36}H_{42}N_4O_{10}S$: C, 59.82; H, 5.86; N, 7.75.

Found: C, 59.79; H, 5.90; N, 7.61.

28) Z(OMe)-Gly-Trp(Mts)-Thr-NHNH₂ [7]

上記のトリペプチドエステル(2.43g, 3.36mmol)のMeOH溶液(20ml)を抱水ヒドラジンで一夜処理した。析出した結晶をDMF-MeOHで再結晶した。

収量 2.26g(93%), mp 186-188 °C,

$[\alpha]_D^{29} -7.2^\circ$ (c=1.0, DMF), Rf_1 0.61.

4N MSA酸分解後のアミノ酸分析値:

Gly 1.00, Trp 0.84, Thr 0.91 (Glyの回収率, 95%).
Anal. Calcd for $C_{35}H_{42}N_6O_9S$: C, 58.16; H, 5.86; N, 11.63.
Found: C, 58.39; H, 6.01; N, 11.49.

29) Z(OMe)-Ser(Bzl)-Phe-His-Asp(OChp)-Lys(Z)-Tyr-Gly-Leu-Ala-NH₂, Z(OMe)-(galanin 21-29)-NH₂

Boc-(galanin 24-29)-NH₂ [1] (700mg, 0.70mmol)を常法に従いTFA処理して得たパウダーをDMF(3ml)に溶かし, これをTEA(0.10ml, 0.70mmol)で中和した。この溶液にフラグメント [2] (715mg, 1.08mmol)より調製したアジドのDMF溶液(3ml)およびTEA(0.16ml, 1.17mmol)を加え24h撹拌した。生成物をA法(抽出溶媒: n-BuOH)で精製の後, MeOH-AcOEtで再結晶した。

収量 810mg(76%), mp 180-183 °C,
[α]_D²⁵ -25.0° (c=0.8, DMF), R_f 0.67.

Anal. Calcd for $C_{79}H_{101}N_{13}O_{18} \cdot 4H_2O$: C, 59.57; H, 6.90; N, 11.43.
Found: C, 59.76; H, 6.39; N, 11.23.

30) Z(OMe)-Ala-Ile-Asp(OChp)-Asn-His-Arg(Mts)-Ser(Bzl)-Phe-His-Asp(OChp)-Lys(Z)-Tyr-Gly-Leu-Ala-NH₂, Z(OMe)-(galanin 15-29)-NH₂

フラグメント [3] (900mg, 0.76mmol)より調製したアジドのDMF溶液(5ml)とTEA(0.10ml, 0.73mmol)をH-(galanin 21-29)-NH₂[Z(OMe)-体(770mg, 0.51mmol)から調製]のDMF溶液(3ml)に加え24h撹拌した。生成物をB法, 次いでC法で精製した。

収量 645mg(51%), mp 220-223 °C,
[α]_D²⁵ +6.0° (c=0.5, DMF), R_f 0.48.

Anal. Calcd for $C_{124}H_{169}N_{25}O_{29}S \cdot 2H_2O$: C, 58.59; H, 6.86; N, 13.78.
Found: C, 58.54; H, 6.87; N, 13.74.

31) Z(OMe)-Gly-Pro-His-Ala-Ile-Asp(OChp)-Asn-His-Arg(Mts)-Ser(Bzl)-Phe-His-Asp(OChp)-Lys(Z)-Tyr-Gly-Leu-Ala-NH₂,

Z(OMe)-(galanin 12-29)-NH₂

フラグメント [4] (156mg, 0.32mmol) から調製したアジドのDMF溶液 (3ml) と TEA (49 μ l, 0.35mmol) を H-(galanin 15-29)-NH₂ [Z(OMe)-体 (500mg, 0.20mmol) から調製] の DMF 溶液 (2ml) に加え 12h 攪拌した。生成物を B 法で精製の後, DMF-AcOEt で再沈殿した。

収量 506mg (91%), mp 226-228 °C,

$[\alpha]_D^{25}$ -16.1° (c=0.5, DMF), R_f 0.48.

Anal. Calcd for C₁₃₇H₁₈₆N₃₀O₃₂S·3H₂O: C, 57.71; H, 6.79; N, 14.74.

Found: C, 57.71; H, 6.64; N, 14.93.

32) Z(OMe)-Tyr-Leu-Leu-Gly-Pro-His-Ala-Ile-Asp(OChp)-Asn-His-Arg(Mts)-Ser(Bzl)-Phe-His-Asp(OChp)-Lys(Z)-Tyr-Gly-Leu-Ala-NH₂, Z(OMe)-(galanin 9-29)-NH₂

フラグメント [5] (205mg, 0.35mmol) から調製したアジドの DMF 溶液 (2ml) と TEA (54 μ l, 0.39mmol) を H-(galanin 12-29)-NH₂ [Z(OMe)-体 (490mg, 0.18mmol) から調製] の DMF 溶液 (3ml) に加え 12h 攪拌した。生成物を B 法で精製の後, DMF-AcOEt で再沈殿した。

収量 533mg (96%), mp 228-231 °C,

$[\alpha]_D^{25}$ +5.1° (c=0.4, DMF), R_f 0.48.

Anal. Calcd for C₁₅₈H₂₁₇N₃₃O₃₆S·2H₂O: C, 58.88; H, 6.91; N, 14.34.

Found: C, 58.56; H, 7.02; N, 14.24.

33) Z(OMe)-Leu-Asn-Ser(Bzl)-Ala-Gly-Tyr-Leu-Leu-Gly-Pro-His-Ala-Ile-Asp(OChp)-Asn-His-Arg(Mts)-Ser(Bzl)-Phe-His-Asp(OChp)-Lys(Z)-Tyr-Gly-Leu-Ala-NH₂, Z(OMe)-(galanin 4-29)-NH₂

フラグメント [6] (298mg, 0.41mmol) から調製したアジドの DMF 溶液 (3ml) と TEA (63 μ l, 0.45mmol) を H-(galanin 9-29)-NH₂ [Z(OMe)-体 (521mg, 0.16mmol) から調製] の DMF 溶液 (3ml) に加え 48h 攪拌した。生成物を B 法, 次いで C 法で精製した。

収量 385mg (63%), mp 224-226 °C,

$[\alpha]_D^{25} +3.3^\circ$ (c=0.6, DMF), Rf, 0.57.

Anal. Calcd for $C_{183}H_{253}N_{39}O_{43}S \cdot 5H_2O$: C, 57.70; H, 6.96; N, 14.34.

Found: C, 57.74; H, 6.90; N, 14.28.

34) Z(OMe)-Gly-Trp(Mts)-Thr-Leu-Asn-Ser(Bzl)-Ala-Gly-Tyr-Leu-Leu-Gly-Pro-His-Ala-Ile-Asp(OChp)-Asn-His-Arg(Mts)-Ser(Bzl)-Phe-His-Asp(OChp)-Lys(Z)-Tyr-Gly-Leu-Ala-NH₂,

Z(OMe)-(galanin 1-29)-NH₂ (保護galanin)

フラグメント [7] (170mg, 0.24mmol) から調製したアジドのDMF溶液 (3ml) と TEA (36 μ l, 0.26mmol) を H-(galanin 4-29)-NH₂ [Z(OMe)-体 (350mg, 94 μ mol) から調製] の DMF 溶液 (2ml) に加え 48h 攪拌した。生成物を B 法, 次いで C 法で精製した。

収量 335mg (84%), mp 223-225 °C,

$[\alpha]_D^{25} -11.3^\circ$ (c=1.0, DMF), Rf, 0.64.

Anal. Calcd for $C_{209}H_{283}N_{43}O_{49}S_2 \cdot 3H_2O$: C, 58.38; H, 6.77; N, 14.01.

Found: C, 58.10; H, 6.95; N, 13.90.

第4項に関する実験

1) H-Gly-Trp-Thr-Leu-Asn-Ser-Ala-Gly-Tyr-Leu-Leu-Gly-Pro-His-Ala-Ile-Asp-Asn-His-Arg-Ser-Phe-His-Asp-Lys-Tyr-Gly-Leu-Ala-NH₂ (galanin)

上記の保護29残基ペプチドアミド (100mg, 24 μ mol) を m-cresol (197 μ l, 80eq), EDT (49 μ l, 20eq) 存在下, 1M TFMSA-thioanisole/TFA (6ml) で 120min 処理した。ether を加え析出したパウダーを遠沈した。これを氷冷下 H₂O (10ml) に溶かし, 10%NH₄OH で pH 8.0 とし, 30min 攪拌した。さらに 10%AcOH で pH 4.0 としたのち凍結乾燥した。得られたオイルを 0.5N AcOH (1ml) に溶かし, Sephadex G-25 カラム (3.3 \times 126cm) にアプライした。0.5N AcOH でこれを溶出させ, 各フラクション (7ml) の UV280nm における吸光度を測定し, 目的のフラクション (Nos. 69-91) を集め凍結乾燥して, 白色羽毛状パウダーを得た。収量 66mg (86%)。

このパウダー3mgずつをNucleosil 5C₁₈カラム(10 × 250mm)にアプライし、35%CH₃CN/0.2%TFAを溶出液とし、流速1.4ml/minでisocraticに溶出させた。UV280nmで検出し、目的のピーク(retention time 19.5 min)を集め凍結乾燥した。得られたパウダーを0.5N AcOH(0.5ml)に溶かしSephadex G-25カラムにアプライし、上記と同様に溶出させた。目的のフラクションを凍結乾燥し白色羽毛状パウダーを得た。

収量 25.7mg(保護29残基ペプチドからの収率; 33%)。

$[\alpha]_{D}^{25}$ -61.2° (c=0.1, 0.5N AcOH), Rf₄ 0.29.

FAB-MS: 3209.6 (M+H)⁺.

HPLC精製後のサンプルは分析用HPLCカラムで単一のピークを示した; retention time 4.0 min (Fig. 14-b).

カラム: Nucleosil 5C₁₈ (4×150mm)

溶出液: 35%CH₃CN/0.2%aqTFA (isocratic elution)

流速: 0.8 ml/min

Detection: 280 nm

また Pharmalyte (pH 3-10)を含む7.5%ポリアクリルアミドゲル(0.5×7.3cm)を用いるディスク等電点電気泳動において 200V, 4hの通電後、本品は陽極より6.3cm移動した(Coomassie Brilliant Blue G-250, Sigmaで染色) (図 15)。

6N HClによる酸分解後のアミノ酸分析値: 表 3 参照のこと。

LAPによる酵素消化後のアミノ酸分析値:

2Asp 1.84, 1Thr 0.91, 2Ser 2.01, 1Pro 0.78, 4Gly 3.59,

3Ala 3.02, 1Ile 1.11, 4Leu 3.96, 2Tyr 1.78, 1Phe 1.00,

1Trp 0.73, 1Lys 1.00, 3His 2.70, 1Arg 1.02, 2Asn N.D.

(Lysの回収率90%)

第2章に関する実験

第2節に関する実験

第2項に関する実験

1) Z(OMe)-Asp(OChp)-Phe-NH₂

Z(OMe)-Asp(OChp)-OSu [Z(OMe)-Asp(OChp)-OHのDCHA塩 (25.00g, 44.0 mmol)から調製]のTHF溶液(60ml), およびH-Phe-NH₂ [Z(OMe)-体(14.44g, 44.0mmol)から調製]のDMF溶液(50ml)を混合し, さらにNMM(4.84ml, 44.0 mmol)を加え, 一夜攪拌した。生成物をA法で精製(抽出溶媒: CHCl₃)の後, CHCl₃-MeOHで再結晶した。

収量 16.33g(69%), mp 163-165 °C,

$[\alpha]_D^{20}$ -20.0° (c=1.0, DMF), Rf₁ 0.76.

Anal. Calcd for C₂₉H₃₇N₃O₇: C, 64.54; H, 6.91; N, 7.79.

Found: C, 64.50; H, 7.04; N, 7.78.

2) Z(OMe)-Met(O)-Asp(OChp)-Phe-NH₂

上記のジペプチドアミド(16.33g, 30.3mmol)を常法によりTFA処理し, DMF(300ml)に溶かした。TEA(4.22ml, 30.3mmol)で中和した後, Z(OMe)-Met(O)-ONB [Z(OMe)-Met(O)-OH(10.97g, 33.3mmol)から調製]のDMF-THF溶液(10ml-35ml), およびNMM(3.33ml, 30.3mmol)を加え一夜攪拌した。生成物をB法で精製の後, DMSO-etherで再沈殿した。

収量 13.66g(66%), mp 197-199 °C,

$[\alpha]_D^{20}$ +6.1° (c=1.0, MeOH), Rf₁ 0.60.

Anal. Calcd for C₃₄H₄₆N₄O₉S: C, 59.46; H, 6.75; N, 8.16.

Found: C, 59.21; H, 6.70; N, 8.07.

3) Boc-Trp(Mts)-Met(O)-Asp(OChp)-Phe-NH₂

上記のトリペプチドアミド(5.50g, 8.01mmol)を常法によりTFA処理し, DMF(50ml)に溶かした。TEA(1.11ml, 8.01mmol)を加え中和した後, Boc-Trp(Mts)-OSu [Boc-Trp(Mts)-OH·DCHA(6.42g, 9.61mmol)から調製]のTHF

溶液(30ml), NMM(0.88ml, 8.01mmol)を加え一夜撹拌した。生成物をB法により精製の後, DMF-etherで再沈殿した。

収量 5.20g(66%), mp 152-154 °C,

$[\alpha]_D^{20}$ -32.2° (c=1.0, MeOH), Rf, 0.71.

Anal. Calcd for $C_{50}H_{66}N_6O_{11}S_2$: C, 60.58; H, 6.71; N, 8.48.

Found: C, 60.72; H, 6.72; N, 8.29.

4) Z(OMe)-Gly-Trp(Mts)-Met(0)-Asp(OChp)-Phe-NH₂

上記のテトラペプチドアミド(5.30g, 5.35mmol)を常法によりTFA処理し, DMF(50ml)に溶かした。TEA(0.75ml, 5.35mmol)を加え中和した後, Z(OMe)-Gly-OSu(2.16g, 6.42mmol), NMM(0.59ml, 5.35mmol)を加え48h撹拌した。生成物をB法で精製の後, DMF-etherで再沈殿した。

収量 5.42g(91%), mp 172-175 °C,

$[\alpha]_D^{20}$ -25.0° (c=1.0, DMF), Rf, 0.54.

Anal. Calcd for $C_{56}H_{69}N_7O_{13}S_2 \cdot H_2O$: C, 59.50; H, 6.33; N, 8.68.

Found: C, 59.77; H, 6.42; N, 8.75.

5) Z(OMe)-Met(0)-Gly-Trp(Mts)-Met(0)-Asp(OChp)-Phe-NH₂

上記のペンタペプチドアミド(5.42g, 4.87mmol)を常法によりTFA処理し, DMF(30ml)に溶かした。TEA(0.68ml, 4.87mmol)を加え中和した後, Z(OMe)-Met(0)-OSu [Z(OMe)-Met(0)-OH(1.92g, 5.84mmol)から調製]のTHF-DMF溶液(30ml-2ml), NMM(0.34ml, 4.87mmol)を加え一夜撹拌した。生成物をB法で精製の後, DMSO-AcOEtで再沈殿した。

収量 4.57g(75%), mp 175-178 °C,

$[\alpha]_D^{20}$ +3.1° (c=1.0, DMF), Rf, 0.62.

Anal. Calcd for $C_{61}H_{78}N_8O_{15}S_3 \cdot H_2O$: C, 57.35; H, 6.31; N, 8.77.

Found: C, 57.52; H, 6.26; N, 8.63.

6) Z(OMe)-Tyr-Met(0)-Gly-Trp(Mts)-Met(0)-Asp(OChp)-Phe-NH₂

上記のヘキサペプチドアミド(5.00g, 3.97mmol)を常法によりTFA処理

し、DMF(20ml)に溶かした。TEA(0.55ml, 3.97mmol)を加え中和した後、Z(OMe)-Tyr-NHNH₂(1.71g, 4.76mmol)より調製したアジドのDMF溶液(20ml)、TEA(0.55ml, 3.97mmol)を加え24h撹拌した。生成物をB法で精製の後、DMF-AcOEtで再沈殿した。

収量 4.58g(81%), mp 194-197 °C,

$[\alpha]_D^{25}$ -13.3° (c=1.0, DMF), Rf₁ 0.58.

Anal. Calcd for C₇₀H₈₇N₉O₁₇S₃: C, 58.35; H, 6.16; N, 8.75.

Found: C, 58.53; H, 6.05; N, 8.75.

7) Z(OMe)-Asp(OChp)-Tyr-Met(O)-Gly-Trp(Mts)-Met(O)-Asp(OChp)-Phe-NH₂

常法によりTFA処理した上記のヘプタペプチドアミド(4.50g, 3.16mmol)のDMF溶液(40ml)にTEA(0.44ml, 3.16mmol)を加え中和した後、Z(OMe)-Asp(OChp)-OSu [Z(OMe)-Asp(OChp)-OH·DCHA(2.72g, 4.74mmol)から調製]のTHF溶液(10ml)、NMM(0.35ml, 3.16mmol)を加え一夜撹拌した。生成物をB法で精製の後、DMF-MeOHで再沈殿した。

収量 3.53g(68%), mp 202-204 °C,

$[\alpha]_D^{25}$ -22.6° (c=1.0, DMF), Rf₁ 0.72.

Anal. Calcd for C₈₁H₁₀₄N₁₀O₂₀S₃·H₂O: C, 58.25; H, 6.52; N, 8.39.

Found: C, 58.32; H, 6.32; N, 8.74.

8) Z(OMe)-Arg(Mts)-Asp(OChp)-Tyr-Met(O)-Gly-Trp(Mts)-Met(O)-Asp(OChp)-Phe-NH₂

常法によりTFA処理した上記のオクタペプチドアミド(3.42g, 2.09mmol)のDMF溶液(30ml)にTEA(0.29ml, 2.09mmol)を加え中和した後、Z(OMe)-Arg(Mts)-OH·CHA(2.60g, 3.76mmol)から調製した混酸無水物のTHF溶液(20ml)を加え6h撹拌した。生成物をB法で精製の後、DMF-AcOEtで再沈殿した。

収量 3.34g(81%), mp 189-191 °C,

$[\alpha]_D^{25}$ -17.0° (c=1.0, DMF), Rf₁ 0.65.

Anal. Calcd for $C_{96}H_{126}N_{14}O_{23}S_4 \cdot 2H_2O$: C, 57.41; H, 6.52; N, 9.76.

Found: C, 57.25; H, 6.56; N, 10.03.

9) Z(OMe)-Asp(OChp)-Arg(Mts)-Asp(OChp)-Tyr-Met(O)-Gly-Trp(Mts)-Met(O)-Asp(OChp)-Phe-NH₂ [1]

常法によりTFA処理した上記のノナペプチドアミド(3.30g, 1.67mmol)のDMF(8ml)溶液にTEA(0.23ml, 1.67mmol)を加え中和した後, Z(OMe)-Asp(OChp)-OSu[Z(OMe)-Asp(OChp)-OH·DCHA(1.44g, 1.67mmol)から調製]のTHF溶液(20ml), NMM(0.18ml, 1.67mmol)を加え一夜撹拌した。生成物をB法で精製の後, DMF-AcOEtで再結晶した。

収量 3.11g(85%), mp 203-205 °C,

$[\alpha]_D^{20} -23.6^\circ$ (c=1.0, DMF), R_f: 0.70.

Anal. Calcd for $C_{107}H_{143}N_{15}O_{26}S_4 \cdot 2H_2O$: C, 57.90; H, 6.68; N, 9.47.

Found: C, 57.98; H, 6.79; N, 9.46.

10) Z(OMe)-Arg(Mts)-Ile-Ser-OMe

Z(OMe)-Arg(Mts)-OH·CHA(20.43g, 33.0mmol)から調製した混酸無水物のTHF溶液(60ml)をH-Ile-Ser-OMe[Z(OMe)-体(11.89g, 30.0mmol)から調製]のDMF溶液(100ml)に加え6h撹拌した。生成物をA法で精製の後MeOH-etherで再結晶した。

収量 20.20g(92%), mp 99-101 °C,

$[\alpha]_D^{25} -1.0^\circ$ (c=1.0, MeOH), R_f: 0.75.

Anal. Calcd for $C_{34}H_{50}N_6O_{10} \cdot H_2O$: C, 54.23; H, 6.96; N, 11.16.

Found: C, 54.55; H, 6.62; N, 10.84.

11) Z(OMe)-His-Arg(Mts)-Ile-Ser-NHNH₂ [2]

Z(OMe)-His-NHNH₂(13.61g, 40.8mmol)より調製したアジドのDMF溶液(100ml)とTEA(4.55ml, 32.7mmol)をH-Arg(Mts)-Ile-Ser-OMe[上記のトリペプチドエステル(20.00g, 27.2mmol)より調製]のDMF溶液(50ml)に加え一夜撹拌した。生成物をA法で精製の後, これをMeOH(50ml)に溶かした。こ

れに80%抱水ヒドラジン(6.81ml, 5eq)を加え一夜放置した。得られた沈殿をDMF-MeOHで再結晶した。

収量 14.34g(60%), mp 168-170 °C,
[α]_D²⁷ -1.2° (c=0.8, DMF), Rf₁ 0.36.

6N HCl酸分解後のアミノ酸分析値:

His 0.99, Arg 0.95, Ile 1.00, Ser 0.96 (Ileの回収率, 81%).
Anal. Calcd for C₃₉H₅₇N₁₁O₁₀·1/2H₂O: C, 53.16; H, 6.64; N, 17.49.
Found: C, 53.17; H, 6.68; N, 17.63.

12) Z(OMe)-Pro-Ser(Bzl)-NHNH-Troc

Z(OMe)-Pro-OH[DCHA塩(4.39g, 9.54mmol)から調製]とH-Ser(Bzl)-NHNH-Troc[Z(OMe)-体¹¹⁰](5.54g, 9.54mmol)から調製のDMF溶液(50ml)にDCC(2.39g, 11.5mmol)とHOBt(1.29g, 9.54mmol)を加え18h攪拌した。不溶物を濾除した後、濾液を濃縮した。残渣をA法で精製し、AcOEt-etherで再結晶した。

収量 3.70g(60%), mp 85-87 °C,
[α]_D²⁰ -2.9° (c=1.0, DMF), Rf₁ 0.42.

Anal. Calcd for C₂₇H₃₁N₄O₈Cl₃: C, 50.20; H, 4.84; N, 8.67.
Found: C, 50.35; H, 4.92; N, 8.82.

13) Z(OMe)-Asp(OBzl)-Pro-Ser(Bzl)-NHNH₂ [3]

Z(OMe)-Asp(OBzl)-OH(3.96g, 10.2mmol)から調製した混酸無水物のTHF溶液(30ml)をH-Pro-Ser(Bzl)-NHNH-Troc[上記のジペプチド誘導体(5.50g, 8.51mmol)より調製のDMF溶液(30ml)に加え6h攪拌した。生成物をA法精製の後、得られたオイル(3.66g, Rf₂ 0.48)をAcOH(30ml)に溶かし、Zn末(5.59g, 20eq)を加え25°Cで4h攪拌した。不溶物を濾除し、濾液を濃縮した後、残渣をAcOEtに溶かし3%EDTAで洗浄した。Na₂SO₄上乾燥の後濃縮し、残渣をetherでパウダーとした。次いでMeOH-etherで再結晶した。

収量 2.47g(85%), mp 92-95 °C;
[α]_D²¹ -31.1° (c=0.5, DMF), Rf₂ 0.40.

6N HCl酸分解後のアミノ酸分析値：

Asp 1.04, Pro 1.00, Ser 1.04 (Proの回収率, 77%).

Anal. Calcd for $C_{35}H_{41}N_5O_9 \cdot 1/2H_2O$: C, 61.31; H, 6.18; N, 10.23.

Found: C, 61.69; H, 6.19; N, 10.21.

14) Z(OMe)-Gln-Asn-Leu-OMe

Z(OMe)-Gln-ONp(1.90g, 4.57mmol)とTEA(0.64ml, 6.28mmol)をH-Asn-Leu-OMe[Z(OMe)-体(2.42g, 5.71mmol)より調製]のDMF溶液(30ml)に加え48h撹拌した。生成物をB法で精製の後, DMF-MeOHで再結晶した。

収量 2.20g(70%), mp 259-261 °C,

$[\alpha]_D^{25} -10.9^\circ$ (c=0.5, DMSO), Rf, 0.50.

Anal. Calcd for $C_{25}H_{37}N_5O_9$: C, 54.43; H, 6.76; N, 12.70.

Found: C, 54.63; H, 6.72; N, 12.64.

15) Z(OMe)-Leu-Gln-Asn-Leu-OMe

上記のトリペプチドエステル(2.10g, 3.81mmol)をTFA処理しDMF(20ml)に溶かした。TEA(1.06ml, 7.62mmol)を加えた後, Z(OMe)-Leu-ONp(1.90g, 4.57mmol)を加え一夜撹拌した。生成物をB法で精製の後, DMF-MeOHから再沈殿した。

収量 2.26g(89%), mp 246-248 °C,

$[\alpha]_D^{25} +20.0^\circ$ (c=0.5, DMSO), Rf, 0.66.

Anal. Calcd for $C_{31}H_{48}N_6O_{10}$: C, 56.01; H, 7.28; N, 12.64.

Found: C, 55.93; H, 7.37; N, 12.41.

16) Z(OMe)-Asn-Leu-Gln-Asn-Leu-OMe

上記のテトラペプチドエステル (2.17g, 2.79mmol)をTFA処理しDMF(60ml)に溶かした。TEA(0.78ml, 5.58mmol)を加えた後, Z(OMe)-Asn-ONp(1.40g, 3.34mmol)を加え18h撹拌した。生成物をB法で精製の後, DMSO-MeOHから再沈殿した。

収量 2.03g(80%), mp 261-263 °C,

$[\alpha]_D^{21} -14.0^\circ$ (c=0.5, DMSO), Rf₁ 0.34.

Anal. Calcd for C₃₅H₅₄N₈O₁₂: C, 53.97; H, 6.99; N, 14.39.

Found: C, 53.72; H, 7.02; N, 14.12.

17) Z(OMe)-Asn-Leu-Gln-Asn-Leu-NHNH₂ [4]

上記のペントペプチドエステル(6.72g, 8.63mmol)をDMSO-MeOH(80ml-10ml)に溶かし, 80%抱水ヒドラジン(5.07ml, 10eq)を加え48h放置した。濃縮後, 残渣をMeOHで結晶化の後, DMSO-MeOHから再結晶した。

収量 4.33g(64%), mp 250-253 °C,

$[\alpha]_D^{21} -13.3^\circ$ (c=0.5, DMSO), Rf₁ 0.18.

6N HCl酸分解後のアミノ酸分析値:

Asp 2.01, Glu 1.01, Leu 2.00 (Leuの回収率, 82%).

Anal. Calcd for C₃₄H₅₄N₁₀O₁₁·H₂O: C, 51.30; H, 7.09; N, 17.60.

Found: C, 51.53; H, 7.06; N, 17.38.

18) Z(OMe)-Ile-Val-OMe

Z(OMe)-Ile-ONp(7.05g, 16.9mmol), HCl·H-Val-OMe(2.84g, 16.9mmol), TEA(4.72ml, 33.9mmol)のDMF溶液(70ml)を一夜攪拌した。生成物をB法で精製の後, DMF-etherで再結晶した。

収量 5.11g(74%), mp 116-118 °C,

$[\alpha]_D^{21} +2.0^\circ$ (c=0.5, DMF), Rf₂ 0.81.

Anal. Calcd for C₂₁H₃₂N₂O₆: C, 61.74; H, 7.90; N, 6.86.

Found: C, 61.84; H, 8.07; N, 7.07.

19) Z(OMe)-Ile-Val-NHNH₂

上記のジペプチドエステル(5.00g, 12.2mmol)のMeOH溶液(100ml)に80%抱水ヒドラジン(6.13ml, 10eq)を加え48h放置した。析出するパウダーをDMF-MeOHで再結晶した。

収量 2.77g(55%), mp 252-254 °C,

$[\alpha]_D^{30} +0.9^\circ$ (c=1.0, DMF), Rf₁ 0.74.

Anal. Calcd for $C_{20}H_{32}N_4O_5$: C, 58.80; H, 7.90; N, 13.72.

Found: C, 58.90; H, 7.91; N, 13.57.

20) Z(OMe)-Ile-Val-Lys(Z)-OMe

Z(OMe)-Ile-Val-NHNH₂ (2.70g, 6.61ml) から調製したアジドのDMF溶液 (30ml), およびTEA (1.01ml, 6.61ml) をH-Lys(Z)-OMe [その塩酸塩 (2.19g, 6.61mmol) から調製] のDMF溶液 (20ml) に加え一夜撹拌した。生成物をB法で精製の後, DMF-AcOEtで再沈殿した。

収量 3.60g (81%), mp 202-204 °C,

$[\alpha]_D^{20} +1.5^\circ$ (c=1.0, DMF), R_f 0.65.

Anal. Calcd for $C_{35}H_{50}N_4O_9$: C, 62.67; H, 7.51; N, 8.35.

Found: C, 62.44; H, 7.63; N, 8.29.

21) Z(OMe)-Ser(Bzl)-Ile-Val-Lys(Z)-OMe

Z(OMe)-Ser(Bzl)-OH·CHA (2.87g, 6.26mmol) から調製した混酸無水物のTHF溶液 (30ml) にH-Ile-Val-Lys(Z)-OMe [Z(OMe)-体 (3.50g, 5.22mmol) より調製] のDMF溶液 (10ml) を加え6h撹拌した。生成物をB法で精製の後, DMF-MeOHで再沈殿した。

収量 3.25g (69%), mp 179-181 °C,

$[\alpha]_D^{21} -1.1^\circ$ (c=1.0, DMF), R_f 0.90.

Anal. Calcd for $C_{45}H_{61}N_5O_{11} \cdot 1/2H_2O$: C, 63.06; H, 7.29; N, 8.17.

Found: C, 63.18; H, 7.13; N, 7.81.

22) Z(OMe)-Ser(Bzl)-Ile-Val-Lys(Z)-NHNH₂ [5]

上記のテトラペプチドエステル (3.15g, 3.71mmol) のDMF溶液 (100ml) に80%抱水ヒドラジン (0.93ml, 5eq) を加え一夜放置した。析出する結晶をDMF-MeOHで再沈殿した。

収量 2.66g (84%), mp 126-128 °C,

$[\alpha]_D^{21} +12.6^\circ$ (c=1.0, DMF), R_f 0.77.

6N HCl酸分解 (96h) 後のアミノ酸分析値:

Ser 0.87, Ile 0.94, Val 0.92, Lys 1.00 (Lysの回収率, 79%).
Anal. Calcd for $C_{44}H_{61}N_7O_{10}$: C, 62.32; H, 7.25; N, 11.56.
Found: C, 62.44; H, 7.27; N, 11.29.

23) Z(OMe)-Gly-Arg(Mts)-Met(O)-NHNH₂ [6]

Z(OMe)-Gly-OSu(2.07g, 6.16mmol), TEA(1.43ml, 6.16mmol)をH-Arg(Mts)-Met(O)-OMe[Z(OMe)-体(3.50g, 5.13mmol)から調製]のDMF溶液(30ml)に加え48h撪拌した。生成物をA法で精製の後, MeOH-etherから再結晶した。これをMeOH(40ml)に溶かし, 80%抱水ヒドラジン(1.29ml, 5eq)を加えた。24h放置の後, 溶媒を留去し, 残渣をetherで結晶化した。次いでn-BuOH-etherで再沈殿した。

収量 1.91g(51%), mp 93-96 °C,
[α]_D²⁵ -5.5° (c=0.5, DMF), R_f 0.59.

6N HCl酸分解後のアミノ酸分析値:

Gly 1.05, Arg 1.00, Met 0.87 (Argの回収率, 81%).
Anal. Calcd for $C_{31}H_{46}N_8O_9S_2 \cdot 1/2H_2O$: C, 49.78; H, 6.33; N, 14.98.
Found: C, 50.05; H, 6.56; N, 14.70.

24) Z(OMe)-Ala-Pro-Ser-OMe

Z(OMe)-Ala-Pro-OH(6.31g, 18.0mmol)とH-Ser-OMe[塩酸塩(3.36g, 21.6mmol)から調製]のDMF溶液(30ml)にDCC(4.09g, 19.8mmol)を加え一夜撪拌した。不溶物を濾除し濾液を濃縮した。生成物をA法で精製の後, MeOH-AcOEtで再結晶した。

収量 6.69g(82%), mp 109-112 °C,
[α]_D²⁵ -14.5° (c=0.9, MeOH), R_f 0.84.

Anal. Calcd for $C_{21}H_{31}N_3O_9$: C, 55.86; H, 6.47; N, 9.31.
Found: C, 56.11; H, 6.71; N, 9.33.

25) Z(OMe)-Lys(Z)-Ala-Pro-Ser-OMe

上記のトリペプチドエステル(1.75g, 3.88mmol)をTFA処理しDMF(50ml)

に溶かした。TEA(1.08ml, 7.76mmol), Z(OMe)-Lys(Z)-OSu(2.35g, 4.34mmol)を加え一夜撹拌した。生成物をA法で精製の後, MeOH-AcOEtで再結晶した。

収量 1.91g(69%), mp 153-156 °C,
[α]_D²³ -33.5° (c=1.0, DMF), R_f 0.79.

Anal. Calcd for C₃₅H₄₇N₅O₁₁: C, 58.89; H, 6.64; N, 9.81.
Found: C, 58.94; H, 6.80; N, 9.80.

26) Z(OMe)-Lys(Z)-Ala-Pro-Ser-NHNH₂ [7]

上記のテトラペプチドエステル(2.65g, 3.71mmol)のMeOH溶液(30ml)に80%抱水ヒドラジン(2.32ml, 10eq)を加え一夜放置した。析出した結晶をDMF-MeOHで再結晶した。

収量 2.43g(92%), mp 154-159 °C,
[α]_D²⁰ -36.6° (c=1.0, DMF), R_f 0.73.

6N HCl酸分解後のアミノ酸分析値:

Lys 0.98, Ala 1.06, Pro 1.00, Ser 0.95 (Proの回収率, 84%).
Anal. Calcd for C₃₄H₄₇N₇O₁₀: C, 55.80; H, 6.75; N, 13.40.
Found: C, 55.94; H, 6.59; N, 13.25.

27) Z(OMe)-His-Arg(Mts)-Ile-Ser-Asp(OChp)-Arg(Mts)-Asp(OChp)-Tyr-Met(O)-Gly-Trp(Mts)-Met(O)-Asp(OChp)-Phe-NH₂,
Z(OMe)-(hCCK 20-33 [Tyr-free]²⁷)-NH₂

TFA処理したフラグメント [1] (2.18g, 1.00mmol)のDMF溶液(6ml)にTEA(0.14ml, 1.00mmol)を加え, これにフラグメント [2] (1.31g, 1.50mmol)から調製したアジドのDMF溶液(6ml)およびNMM(0.13ml, 1.20mmol)を加え48h撹拌した。生成物をB法で精製の後, DMF-MeOHで再沈殿した。

収量 2.45g(86%), mp 227-230 °C,
[α]_D²⁸ -15.0° (c=1.0, DMF), R_f 0.66.

Anal. Calcd for C₁₃₇H₁₈₈N₂₄O₃₃S₅·3H₂O:

C, 56.48; H, 6.71; N, 11.54.

Found: C, 56.47; H, 6.75; N, 11.33.

28) Z(OMe)-Asp(OBzl)-Pro-Ser(Bzl)-His-Arg(Mts)-Ile-Ser-Asp(OChp)-Arg(Mts)-Asp(OChp)-Tyr-Met(O)-Gly-Trp(Mts)-Met(O)-Asp(OChp)-Phe-NH₂, Z(OMe)-(hCCK 17-33 [Tyr-free]²⁷)-NH₂

TFA処理した上記の14残基ペプチドアミド(1.95g, 0.68mmol)のDMF溶液(10ml)にTEA(0.10ml, 0.68mmol)を加え,これにフラグメント [3] (0.60g, 1.02mmol)から調製したアジドのDMF溶液(3ml),およびNMM(90μl, 0.82mmol)を加え一夜撹拌した。生成物をB法で精製の後,DMF-MeOHで再沈殿した。収量1.90g(84%), mp 230-233 °C,

$[\alpha]_D^{25}$ -15.1° (c=1.0, DMF), Rf₁ 0.60.

Anal. Calcd for C₁₆₃H₂₁₇N₂₇O₃₉S₅·4H₂O:

C, 57.39; H, 6.65; N, 11.09.

Found: C, 57.33; H, 6.56; N, 10.95.

29) Z(OMe)-Asn-Leu-Gln-Asn-Leu-Asp(OBzl)-Pro-Ser(Bzl)-His-Arg(Mts)-Ile-Ser-Asp(OChp)-Arg(Mts)-Asp(OChp)-Tyr-Met(O)-Gly-Trp(Mts)-Met(O)-Asp(OChp)-Phe-NH₂, Z(OMe)-(hCCK 12-33 [Tyr-free]²⁷)-NH₂

TFA処理した上記の17残基ペプチドアミド(975mg, 0.34mmol)のDMF溶液(5ml)にTEA(47μl, 0.34mmol)を加え,これにフラグメント [4] (1.32g, 1.70mmol)から調製したアジドのDMF-DMSO-HMPA溶液(5ml-5ml-5ml),およびTEA(47μl, 0.34mmol)を加え24h撹拌した。さらにアジドとTEA(各3eq)を追加し18h撹拌した。生成物をB法,次いでC法で精製し,DMF-AcOEtで再沈殿した。

収量 642mg(48%), mp 225-228 °C,

$[\alpha]_D^{25}$ -18.0° (c=1.0, DMSO), Rf₁ 0.57.

Anal. Calcd for C₁₈₈H₂₅₉N₃₅O₄₇S₅·7H₂O:

C, 55.78; H, 6.80; N, 12.11.

Found: C, 55.78; H, 6.84; N, 12.40.

30) Z(OMe)-Ser(Bzl)-Ile-Val-Lys(Z)-Asn-Leu-Gln-Asn-Leu-Asp(OBzl)-Pro-Ser(Bzl)-His-Arg(Mts)-Ile-Ser-Asp(OChp)-Arg(Mts)-Asp(OChp)-Tyr-Met(O)-Gly-Trp(Mts)-Met(O)-Asp(OChp)-Phe-NH₂, Z(OMe)-(hCCK 8-33 [Tyr-free]²⁷)-NH₂

TFA処理した上記の22残基ペプチドアミド(638mg, 0.16mmol)のDMF溶液(4ml)にTEA(23 μ l, 0.16mmol)を加え, これにフラグメント [5] (690mg, 0.80mmol)から調製したアジドのDMF溶液(6ml), およびTEA(27 μ l, 0.19mmol)を加え48h攪拌した。生成物をB法, 次いでC法で精製し, DMF-AcOEtで再沈殿した。

収量 459mg(62%), mp 250-252 °C,

$[\alpha]_D^{25}$ -6.7° (c=1.0, DMSO), R_f 0.59.

Anal. Calcd for C₂₂₃H₃₀₈N₄₀O₅₄S₅·8H₂O:

C, 56.77; H, 6.92; N, 11.92.

Found: C, 56.66; H, 6.74; N, 11.97.

31) Z(OMe)-Gly-Arg(Mts)-Met(O)-Ser(Bzl)-Ile-Val-Lys(Z)-Asn-Leu-Gln-Asn-Leu-Asp(OBzl)-Pro-Ser(Bzl)-His-Arg(Mts)-Ile-Ser-Asp(OChp)-Arg(Mts)-Asp(OChp)-Tyr-Met(O)-Gly-Trp(Mts)-Met(O)-Asp(OChp)-Phe-NH₂, Z(OMe)-(hCCK 5-33 [Tyr-free]²⁷)-NH₂

TFA処理した上記の26残基ペプチドアミド(455mg, 0.10mmol)のDMF溶液(1ml)にTEA(14 μ l, 0.10mmol)を加え, これにフラグメント [6] (371mg, 0.50mmol)から調製したアジドのDMF溶液(2ml), およびTEA(17 μ l, 0.12mmol)を加え48h攪拌した。生成物をB法, 次いでC法で精製し, DMF-AcOEtで再沈殿した。

収量 293mg(57%), mp 251-253 °C,

$[\alpha]_D^{25}$ -2.0° (c=1.0, DMF), R_f 0.62.

Anal. Calcd for C₂₄₅H₃₄₂N₄₆O₆₀S₇·11H₂O:

C, 55.37; H, 6.90; N, 12.13.

Found: C, 55.65; H, 6.63; N, 11.86.

32) Z(OMe)-Lys(Z)-Ala-Pro-Ser-Gly-Arg(Mts)-Met(O)-Ser(Bzl)-Ile-Val-Lys(Z)-Asn-Leu-Gln-Asn-Leu-Asp(OBzl)-Pro-Ser(Bzl)-His-Arg(Mts)-Ile-Ser-Asp(OChp)-Arg(Mts)-Asp(OChp)-Tyr-Met(O)-Gly-Trp(Mts)-Met(O)-Asp(OChp)-Phe-NH₂,
Z(OMe)-(hCCK 1-33 [Tyr-free]²⁷)-NH₂

TFA処理した上記の29残基ペプチドアミド(90mg, 18 μ mol)のDMF溶液(3ml)に TEA(3 μ l, 18 μ mol)を加え, これにフラグメント [7] (63mg, 0.09mmol)から調製したアジドのDMF溶液(2ml), およびTEA(5 μ l, 22 μ mol)を加え48h攪拌した。生成物をB法, 次いでC法で精製し, DMF-AcOEtで再沈殿した。

収量 70mg(69%), mp 257-259 °C,

$[\alpha]_D^{25}$ -33.3° (c=1.0, DMF), R_f 0.67.

Anal. Calcd for C₂₇₀H₃₇₇N₅₁O₆₇S₇·5H₂O:

C, 56.65; H, 6.82; N, 12.48.

Found: C, 56.58; H, 6.72; N, 12.61.

第3項に関する実験

1) Z(OMe)-Tyr(Cl₂Bzl)-Met(O)-Gly-Trp(Mts)-Met(O)-Asp(OChp)-Phe-NH₂

Z(OMe)-Met(O)-Gly-Trp(Mts)-Met(O)-Asp(OChp)-Phe-NH₂(4.57g, 3.63mmol)を, 常法にしたがってTFA処理し, 得られたパウダーをDMF(25ml)に溶かしTEA(0.51ml, 3.63mmol)で中和した。これにZ(OMe)-Tyr(Cl₂Bzl)-OSu(2.62g, 4.36mmol), およびNMM(0.40mmol, 4.36mmol)を加え, 一夜攪拌した。生成物をB法で精製し, DMF-AcOEtにより再沈殿した。

収量 5.26g(92%), mp 215-218 °C,

$[\alpha]_D^{25}$ -20.4° (c=1.0, DMF), R_f 0.64.

Anal. Calcd for C₇₇H₉₁N₉O₁₇Cl₂S₃: C, 58.47; H, 5.80; N, 7.97.

Found: C, 58.17; H, 5.96; N, 7.98.

2) Z(OMe)-Asp(OChp)-Tyr(Cl₂Bzl)-Met(O)-Gly-Trp(Mts)-Met(O)-

Asp(OChp)-Phe-NH₂

上記の7残基ペプチドアミド(4.95g, 3.13mmol)を常法に従いTFA処理し、得られたパウダーをDMF(30ml)に溶かしTEA(0.43ml, 3.13mmol)で中和した。これとZ(OMe)-Asp(OChp)-OSu[Z(OMe)-Asp(OChp)-OHのDCHA塩(2.70g, 11.23mmol)より常法にしたがって調製]のTHF溶液(15ml), および NMM(0.41ml, 3.76mmol)を混合し一夜撹拌した。生成物をB法で精製し, DMF-AcOEtより再沈殿した。

収量 5.23g(90%), mp 200-202 °C,

$[\alpha]_D^{25}$ -23.9° (c=1.0, DMF), R_f 0.75.

Anal. Calcd for C₈₈H₁₀₈N₁₀O₂₀Cl₂S₃: C, 58.95; H, 6.07; N, 7.81.

Found: C, 58.66; H, 6.37; N, 7.79.

3) Z(OMe)-Arg(Mts)-Asp(OChp)-Tyr(Cl₂Bzl)-Met(O)-Gly-Trp(Mts)-Met(O)-Asp(OChp)-Phe-NH₂

上記の8残基ペプチドアミド(4.75g, 2.65mmol)を常法に従ってTFA処理し、得られたパウダーをDMF(30ml)に溶かした。これをTEA(0.37ml, 4.75mmol)で中和の後, Z(OMe)-Arg(Mts)-OSu[Z(OMe)-Arg(Mts)-OHのCHA塩(3.28g, 5.30mmol)より常法に従い調製]のTHF溶液(30ml), および NMM(0.35ml, 3.18mmol)と混合した。一夜撹拌の後, 生成物をB法により精製し, DMF-AcOEtより再沈殿した。

収量 4.15g(74%), mp 238-243 °C,

$[\alpha]_D^{25}$ -21.9° (c=1.0, DMF), R_f 0.78.

Anal. Calcd for C₁₀₃H₁₃₀N₁₄O₂₃Cl₂S₄: C, 57.55; H, 6.19; N, 9.12.

Found: C, 57.52; H, 6.31; N, 9.27.

4) Z(OMe)-Asp(OChp)-Arg(Mts)-Asp(OChp)-Tyr(Cl₂Bzl)-Met(O)-Gly-Trp(Mts)-Met(O)-Asp(OChp)-Phe-NH₂ [1']

上記の9残基ペプチドアミド(4.15g, 1.95mmol)を常法に従いTFA処理し、得られたパウダーをDMF(40ml)に溶かし, TEA(0.27ml, 1.95mmol)で中和した。これとZ(OMe)-Asp(OChp)-OSu[Z(OMe)-Asp(OChp)-OHのDCHA塩

(1.68g, 2.95mmol)より常法に従って調製]のTHF溶液(15ml), およびNMM(0.26ml, 2.34mmol)を混合し一夜撹拌した。生成物をB法で精製し, DMF-MeOHより再沈殿した。

収量 3.57g(78%), mp 230-233 °C,

$[\alpha]_D^{20}$ -13.5° (c=1.0, DMF), Rf, 0.70.

Anal. Calcd for $C_{114}H_{147}N_{15}O_{26}Cl_2S_4$: C, 58.45; H, 6.32; N, 8.97.

Found: C, 58.48; H, 6.42; N, 8.94.

5) Z(OMe)-His-Arg(Mts)-Ile-Ser-Asp(OChp)-Arg(Mts)-Asp(OChp)-Tyr(Cl_2 Bzl)-Met(O)-Gly-Trp(Mts)-Met(O)-Asp(OChp)-Phe-NH₂, Z(OMe)-(hCCK 20-33 [Tyr(Cl_2 Bzl)]²⁷)-NH₂

上記の10残基ペプチドアミド(10.73g, 4.58mmol)を常法に従いTFA処理し, 得られたパウダーをDMF(30ml)に溶かし, TEA(0.64ml, 4.58mmol)で中和した。これとフラグメント [2] (7.99g, 9.16mmol)のDMF溶液(40ml)とNMM(0.60ml, 5.50mmol)を混合し一夜撹拌した。生成物をB法で精製し, DMF-MeOHで再沈殿した。

収量 11.99g(87%), mp 234-237 °C,

$[\alpha]_D^{22}$ -17.6° (c=1.0, DMF), Rf, 0.73.

Anal. Calcd for $C_{144}H_{192}N_{24}O_{33}Cl_2S_5 \cdot 4H_2O$:

C, 55.96; H, 6.55; N, 10.88.

Found: C, 55.63; H, 6.47; N, 11.24.

6) Z(OMe)-Asp(OBzl)-Pro-Ser(Bzl)-His-Arg(Mts)-Ile-Ser-Asp(OChp)-Arg(Mts)-Asp(OChp)-Tyr(Cl_2 Bzl)-Met(O)-Gly-Trp(Mts)-Met(O)-Asp(OChp)-Phe-NH₂, Z(OMe)-(hCCK 17-33 [Tyr(Cl_2 Bzl)]²⁷)-NH₂

上記の14残基ペプチドアミド(11.89g, 3.94mmol)を常法に従いTFA処理し, 得られたパウダーをDMF(30ml)に溶かし, TEA(0.55ml, 3.94mmol)で中和した。これとフラグメント [3] (3.46g, 5.91mmol)のDMF溶液(10ml)とNMM(0.52ml, 4.73mmol)を混合し一夜撹拌した。生成物をB法で精製し, DMF-AcOEtで再沈殿した。

収量 8.64g(63%), mp 230-232 °C,
[α]_D²⁵ +8.9° (c=1.0, DMF), R_f 0.71.

Anal. Calcd for C₁₇₀H₂₂₁N₂₇O₃₉Cl₂S₅·6H₂O:

C, 56.62; H, 6.51; N, 10.49.

Found: C, 56.59; H, 6.33; N, 10.61.

7) Z(OMe)-Asn-Leu-Gln-Asn-Leu-Asp(OBzl)-Pro-Ser(Bzl)-His-Arg(Mts)-Ile-Ser-Asp(OChp)-Arg(Mts)-Asp(OChp)-Tyr(Cl₂Bzl)-Met(O)-Gly-Trp(Mts)-Met(O)-Asp(OChp)-Phe-NH₂,
Z(OMe)-(hCCK 12-33 [Tyr(Cl₂Bzl)]²⁷)-NH₂

上記の17残基ペプチドアミド(8.50g, 2.43mmol)を常法に従いTFA処理し、得られたパウダーをDMF(30ml)に溶かし、TEA(0.34ml, 2.43mmol)で中和した。これとフラグメント[4](7.57g, 9.72mmol)のDMF-DMSO-HMPA溶液(1:1:1, 90ml)とTEA(0.41ml, 2.92mmol)を混合し48h攪拌した。生成物をC法で精製し、DMF-AcOEtで再沈殿した。

収量 4.84g(49%), mp 245-248 °C,
[α]_D²⁵ -22.2° (c=1.0, DMF), R_f 0.73.

Anal. Calcd for C₁₉₅H₂₆₃N₃₅O₄₇Cl₂S₅·5H₂O:

C, 56.15; H, 6.60; N, 11.76.

Found: C, 55.96; H, 6.52; N, 11.87.

8) Z(OMe)-Ser(Bzl)-Ile-Val-Lys(Z)-Asn-Leu-Gln-Asn-Leu-Asp(OBzl)-Pro-Ser(Bzl)-His-Arg(Mts)-Ile-Ser-Asp(OChp)-Arg(Mts)-Asp(OChp)-Tyr(Cl₂Bzl)-Met(O)-Gly-Trp(Mts)-Met(O)-Asp(OChp)-Phe-NH₂,
Z(OMe)-(hCCK 8-33 [Tyr(Cl₂Bzl)]²⁷)-NH₂

上記の22残基ペプチドアミド(2.53g, 0.62mmol)を常法に従いTFA処理し、得られたパウダーをDMF(10ml)に溶かし、TEA(86μl, 0.62mmol)で中和した。これとフラグメント[5](2.10g, 2.48mmol)のDMF溶液(20ml)とTEA(0.10ml, 0.74mmol)を混合し一夜攪拌した。生成物ををB法、次いでC法で精製した。

収量 1.95g(67%), mp 265-270 °C,
[α]_D²² -26.0° (c=1.0, DMF), Rf₁ 0.63.

Anal. Calcd for C₂₃₀H₃₁₂N₄₀O₅₄Cl₂S₅·8H₂O:

C, 56.65; H, 6.78; N, 11.49.

Found: C, 56.53; H, 6.78; N, 11.80.

9) Z(OMe)-Gly-Arg(Mts)-Met(O)-Ser(Bzl)-Ile-Val-Lys(Z)-Asn-Leu-Gln-Asn-Leu-Asp(OBzl)-Pro-Ser(Bzl)-His-Arg(Mts)-Ile-Ser-Asp(OChp)-Arg(Mts)-Asp(OChp)-Tyr(Cl₂Bzl)-Met(O)-Gly-Trp(Mts)-Met(O)-Asp(OChp)-Phe-NH₂,
Z(OMe)-(hCCK 5-33 [Tyr(Cl₂Bzl)]²⁷)-NH₂

上記の25残基ペプチドアミド(1.51g, 0.33mmol)を常法に従いTFA処理し, 得られたパウダーをDMF(5ml)に溶かしTEA(46 μ l, 0.33mmol)で中和した。これとフラグメント [6] (0.98g, 1.32mmol)のDMF溶液(5ml)とNMM(0.15ml, 1.32mmol)を混合し一夜攪拌した。生成物をB法で精製し, DMF-MeOHで再沈殿した。

収量 1.45g(86%), mp 260-262 °C,
[α]_D²² -8.0° (c=1.0, DMF), Rf₁ 0.77.

Anal. Calcd for C₂₅₂H₃₄₆N₄₆O₆₀Cl₂S₇·6H₂O:

C, 56.22; H, 6.70; N, 11.97.

Found: C, 56.01; H, 6.35; N, 12.22.

10) Z(OMe)-Lys(Z)-Ala-Pro-Ser-Gly-Arg(Mts)-Met(O)-Ser(Bzl)-Ile-Val-Lys(Z)-Asn-Leu-Gln-Asn-Leu-Asp(OBzl)-Pro-Ser(Bzl)-His-Arg(Mts)-Ile-Ser-Asp(OChp)-Arg(Mts)-Asp(OChp)-Tyr(Cl₂Bzl)-Met(O)-Gly-Trp(Mts)-Met(O)-Asp(OChp)-Phe-NH₂,
Z(OMe)-(hCCK 1-33 [Tyr(Cl₂Bzl)]²⁷)-NH₂ (保護CCK-33)

上記の29残基ペプチドアミド(1.20g, 0.23mmol)を常法に従いTFA処理し, 得られたパウダーをDMF(5ml)に溶かし, TEA(32 μ l, 0.23mmol)で中和した。これとフラグメント [7] (0.81g, 1.15mmol)のDMF溶液(5ml)とNMM

(38 μ l, 1.15mmol)を混合し24h攪拌した。生成物をB法、次いでC法で精製した。

収量 0.76g(58%), mp 215–218 °C,

$[\alpha]_D^{25}$ -20.0° (c=1.0, DMF), Rf, 0.77.

Anal. Calcd for $C_{277}H_{381}N_{51}O_{67}Cl_2S_7 \cdot 6H_2O$:

C, 56.38; H, 6.71; N, 12.10.

Found: C, 56.10; H, 6.71; N, 11.93.

第4項に関する実験

H-Lys-Ala-Pro-Ser-Gly-Arg-Met-Ser-Ile-Val-Lys-Asn-Leu-Gln-Asn-Leu-Asp-Pro-Ser-His-Arg-Ile-Ser-Asp-Arg-Asp-Tyr-Met-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH₂ (CCK-33 非硫酸化体)

保護hCCK-33(317mg, 54.7 μ mol)のDMF溶液(3ml)にphenylthiotrimethylsilane(300 μ l, 30eq)を加え室温で1h攪拌した。溶媒を留去した後, AcOEtでパウダー化した。収量 279mg(89%), Rf, 0.72.

こうして得られた保護hCCK-33還元体(100mg, 17.4 μ mol)をm-cresol(244 μ l, 130eq), およびEDT(38 μ l, 23eq)存在下, 1M TMSOTf-thioanisole/TFA(5ml)で氷冷, 2.5h処理した。etherを加え遠沈して得られたパウダーを氷冷下MeOH-H₂O(1ml-2ml)に溶かし, 2-mercaptoethanol(200 μ l), および1M NH₄F(600 μ l, 36eq)を加えた。さらにTEAでpH 8.0にし30min攪拌した後, AcOHでpH 6.0にした。これをSephadex-G 25カラム(3.3 \times 105cm)にアプライし, 1N AcOHで溶出した。各フラクション(8.6ml)のUV280nmの吸光度を測定しNos. 30-44を集め凍結乾燥した。収量 64.2mg(95%).

この粗精製サンプルを 0.01M NH₄HCO₃バッファー(pH 7.9)で平衡化させたCM-Trisacryl Mカラム(2.0 \times 4.2cm)にアプライした。さらに同バッファー250mlの入ったミキシングフラスコを通し, 0.2M NH₄HCO₃バッファー(pH 8.6)を用いグラジエント溶出を行った。各フラクション(8.2ml)のUV280nmの吸収を測定し, 主画分にあたるNos. 24-31を凍結乾燥した。収量 20.1mg(31%).

このパウダーをSynchropak RP-P 逆相HPLCカラム(4.0 \times 25cm)を用い1ml/

minの流速で0.1%TFA中25-35%CH₃CN(30min)の直線グラジエント溶出を用い精製した。目的のピーク(retention time 37min, UV280nmで検出)を集め、凍結乾燥し、白色羽毛状パウダーを得た。収量 10.6mg(53%)。

$[\alpha]_D^{25}$ -65.7° (c=0.1, 0.5N AcOH)。

こうして得られた精製hCCK-33非硫酸化体は、YMC AM-302カラム(4×150 mm)を用い0.1%TFA中40-45%CH₃CN(30min)を溶出液とする分析HPLCで、retention time 27minの単一ピークを示した(流速1.0ml/min, UV280nm)。

FAB-MS: (M+H)⁺ 3864.4 (C₁₆₇H₂₆₄N₅₁O₄₉S₃に対する計算値; 3864.9)。

6N HCl 酸分解後のアミノ酸分析値: 表 5を参照のこと。

LAP酵素消化後のアミノ酸分析値(括弧内の数字は理論値):

Asp 3.62(4), Ser 4.53(4), Pro 1.66(2), Gly 2.13(2), Ala 1.18(1), Val 1.10(1), Met 2.70(3), Ile 2.28(2), Leu 2.44(2), Tyr 1.12(1), Phe 1.00(1), Lys 2.14(2), His 1.08(1), Trp 0.99(1), Arg 3.24(3), Asn, Gln N. D. (Pheの回収率 77%)。

第5項に関する実験

1) 硫酸化試薬の検討

Z(OMe)-Tyr-OMe, Z(OMe)-Ser-OMe(各0.05mmol)を20%pyridine/DMF(1ml)に溶かし25°Cでpyridine-SO₃錯体(5eq), 又はPAS(10eq)によりこれらを硫酸化した。TLCスキャナーを用いて経時的に測定した結果を図 35に示す。

Z(OMe)-Trp-OH, Z(OMe)-Met-OH, Z(OMe)-His-OMe(各0.05mmol)をpyridine-SO₃錯体, 又はPASで上記のように硫酸化した際, Trp, Met誘導体に関しては変化がなかったが, Z(OMe)-His-OMeはpyridine-SO₃では32%, PASでは18%硫酸化された。H₂Oを反応液に加えると(pH6.0), 硫酸化されたHis誘導体(Rf, 0.21)は60min以内にZ(OMe)-His-OMeと変化した。

2) Ser側鎖の選択的保護

i) Z(OMe)-Ser-OMeのシリル誘導体のpyridine-SO₃処理に対する安定性

Z(OMe)-Ser-OMe(各14mg, 0.05mmol)のDMF溶液(1ml)をimidazole(20eq)存在下 R-Cl(R=Me₃Si, ^tBuMe₂Si, ^tBuPh₂Si 各10eq)とそれぞれ反応させた。溶媒を留去しn-hexaneで洗浄した。それぞれの生成物(R=Me₃Si, R_f 0.97; R=^tBuMe₂Si, R_f 0.99; R=^tBuPh₂Si, R_f 0.99)をDMF-pyridine(8:2, 1ml)に溶かし, EDT(20μl)存在下pyridine-SO₃錯体(94mg, 10eq)を加え25℃で攪拌した。TLCスキャナーを用い経時的に定量したところ, Me₃Si体は30minで完全に脱シリル化されたのにもかかわらず, ^tBuMe₂Si体は24h後約15%が脱シリル化されただけであり, ^tBuPh₂Si体は24h後もまったく変化がなかった。

ii) Tyrのフェノール性水酸基存在下での^tBuPh₂Si基のSerのアルコール性水酸基への選択的導入

Z(OMe)-Ser-OMeとZ(OMe)-Tyr-OMe(各0.05mmol), およびimidazole(20eq)をDMF(1ml)に溶かし^tBuPh₂SiCl(20eq)を加え4℃, 4h攪拌した。この際種々のphenol誘導体(phenol, m-cresol, p-methylthiophenol 各20eq)を反応液に加え, それらの効果を調べた。TLCスキャナーで測定した結果を図 36に示す。

25℃で4h反応させた場合, Z(OMe)-Tyr-OMeは phenol非存在下では75%が^tBuPh₂Si化されたのに対し, phenol存在下では44%に留まった。

iii) Z(OMe)-Ser(^tBuPh₂Si)-OMeからの^tBuPh₂Si基の除去

Z(OMe)-Ser(^tBuPh₂Si)-OMe(36mg, 68μmol)のDMF溶液(1ml)に1M Bu₄NF/DMF(1ml, 15eq), EDT(20μl)を加え25℃, 60min処理した。その間に出発物質(R_f 0.99)は完全に消失し, Z(OMe)-Ser-OMeに対応するスポット(R_f 0.91)が現れた。

3) α-およびε-アミノ基の選択的保護

H-Lys-OH(14.6mg, 0.1mmol)をH₂O-DMF(1:9, 2ml)に溶かし, Fmoc-OSu(141mg, 4eq), TEA(59μl, 4eq)を加え氷冷下1h攪拌した。反応の進行に従い出発原料, およびモノFmoc体(R_f 0.42)は消失し, ニンヒドリン陰性のス

ポット (Rf; 0.66) が生成した。生成物を A 法で精製の後, DMF (1ml) に溶かし EDT (39 μ l, 10eq) 存在下, 1M Bu₄NF (1ml, 10eq) で 25 $^{\circ}$ C, 60min 処理した。Rf; 0.66 のスポットは消失し, すべて H-Lys-OH に対応するスポット (Rf; 原点) へと変換された。

Z(OMe)-Tyr-OMe (0.1mmol) の DMF 溶液 (2ml) を氷冷下 phenol (30eq) 存在下に Fmoc-OSu (4eq), TEA (4eq) と 1h 処理した。phenol 非存在下では Z(OMe)-Tyr(Fmoc)-OMe が 7.8% 生成したが, phenol 存在下では全く生成しなかった (クロマトスキャナーで定量)。これにより phenol が Tyr の側鎖の Fmoc 化の抑制に有効なことが示された。

Z(OMe)-His-OMe (0.1mmol) を同様に Fmoc-OSu と TEA で処理したとき, Z(OMe)-His(Fmoc)-OMe の生成は無視できた。Fmoc-Lys(Fmoc)-OH (0.1mmol) を DMF-pyridine (8:2, 2ml) に溶かし pyridine-SO₃ 錯体 (10eq) と 25 $^{\circ}$ C, 18h 処理したが, TLC 上何ら変化は認められなかった。

第 6 項に関する実験

氷冷下 hCCK-33 非硫酸化体 (30mg, 7.8 μ mol) を DMF-H₂O (900 μ l-100 μ l) に溶かす。これに phenol (22mg, 30eq), TEA (33 μ l, 30eq), Fmoc-OSu (79mg, 30eq) を順に加え 2h 攪拌した。ether を加え析出するパウダーを DMF-ether で再沈殿した。

こうして得られた Fmoc-誘導体 (Rf; 0.66) を DMF (2ml) に溶かした。これに imidazole (63mg, 120eq), phenol (88mg, 120eq), ^tBuPh₂SiCl (216 μ l, 120eq) を順に加え 4 $^{\circ}$ C で 14h 攪拌した。ether を加え析出するパウダーを DMF-ether で再沈殿した。この生成物 (Rf; 0.77) を Sephadex LH-20 カラム (4 \times 47cm) で精製 (溶出液: DMF) し, 目的のフラクション (各 9.2ml, Nos. 21-29, UV280 nm で検出) を集め減圧濃縮した。

残渣を 20% pyridine/DMF (1ml) に溶かし, EDT (22 μ l), pyridine-SO₃ 錯体 (124mg, 100eq) を加え 25 $^{\circ}$ C, 24h 攪拌した。これを Sephadex LH-20 カラム (4 \times 47cm) にアプライし, DMF で上記のように溶出させた。目的のフラクション (Nos. 20-24) を濃縮し (約 1ml), これに EDT (22 μ l, 30eq), 1M Bu₄NF/DMF (1ml) を加え, 氷冷下 60min, 次いで室温で 60min 攪拌した。その後, 再び

氷冷し, 1M NH_4HCO_3 (4ml) を加えた。遠沈して少量の不溶物を除き, 上清を Sephadex G-10 カラム (2.4×49cm) にアプライした。これを 0.1M NH_4HCO_3 (pH 8.2) で溶出させ, 最初のメインピーク (各 7.8ml, Nos. 11-17) を集め凍結乾燥した。収量 19.2mg (63%)。

この粗精製品を CM-Trisacryl M (1.6×4.5cm) を担体とし, 0.01M NH_4HCO_3 (pH 7.8, 300ml) と 0.2M NH_4HCO_3 (pH 8.4, 500ml) からなる連続濃度勾配を用いたイオン交換クロマトグラフィーにより精製した (図 38-a)。2 番目のピークに対応するフラクション (各 7.8ml, Nos. 21-29) を集め凍結乾燥した。収量 7.5mg (39%, overall yield 25%)。

こうして得られたサンプルを HPLC でさらに精製した。カラムとしては Asahipak ODP-50 (10×250mm) を使い, 2ml/min で 31% CH_3CN / 0.1M AcONH_4 (pH 6.5) を溶出液とする isocratic 溶出を行った。UV280nm で検出し目的のピーク (図 38-b, retention time 42min) を集め凍結乾燥し, 白色羽毛上パウダーを得た。収量 4.1mg (61%, hCCK-33 非硫酸化体からの overall yield 15%)。なお, シリル化を 25°C, 3h で行ったときの overall yield は 13% であった。

$[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ -72.7° (c=0.1, H_2O), R_f 0.42.

HPLC: Asahipak ODP-50 (4×150mm) カラムを用い流速 1ml/min で CH_3CN / 0.1M AcONH_4 (pH 6.5) (20-40%, 30min) の直線グラジエント溶出させた際の retention time 14min (図 38-c)。

6N HCl による酸分解後のアミノ酸分析値: 表 5 参照のこと。

LAP 酵素消化後のアミノ酸分析値 (括弧内の数値は理論値):

Asp 3.49(4), Ser 4.22(4), Pro 1.50(2), Gly 2.12(2), Ala 1.13(1), Val 1.14(1), Met 2.92(3), Ile 1.96(2), Leu 2.07(2), Phe 1.00(1), Lys 2.00(2), His 0.92(1), Trp 0.96(1), Arg 2.87(3), Tyr(SO_3H) 0.91(1), Asn, Gln N.D. (Phe の回収率, 81%)。

引用文献

- 1) V. Mutt and J. E. Jorpes., *Biochem. J.*, 125, 57 (1971).
- 2) Y. Takahashi, K. Kato, Y. Hayashizaki, T. Wakabayashi, E. Ohtsuka, S. Matsuki, M. Ikehara, and K. Matsubara, *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, 82, 1931 (1985).
- 3) M. C. Beinfeld, *Neuropeptides*, 3, 411 (1983).
- 4) J. F. Reinfeld, *J. Neurochem.*, 44, 1 (1985).
- 5) M. A. Ondetti, B. Rubin, S. L. Engel, J. Plusces, and J. T. Sheehan, *Am. J. Digestive Diseases*, 15, 149 (1970); M. A. Ondetti, J. Plusces, E. F. Sabo, J. T. Sheehan, and N. Williams, *J. Am. Chem. Soc.*, 92, 195 (1970).
- 6) H. Yajima, Y. Mori, K. Koyama, T. Tobe, M. Setoyama, H. Adachi, T. Kanno, and A. Saito, *Chem. Pharm. Bull.*, 24, 2794 (1976).
- 7) Y. Kurano, T. Kimura, and S. Sakakibara, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 323 (1987).
- 8) *Biochem. J.* 102, 23 (1967); *ibid.*, 126, 773 (1972); *Eur. J. Biochem.*, 138, 5 (1984); *ibid.*, 138, 9 (1984).
- 9) D. M. Theodoropoulos and J. S. Fruton, *Biochemistry*, 1, 933 (1962).
- 10) Y. B. Alkhov, A. A. Kiryushoin, V. M. Lipkin, and G. W. A. Milne, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 406 (1970); E. Wünsch, E. Jaeger, E. Kisfaludy, and M. Löw, *Angew. Chem.*, 89, 330 (1977); E. Wünsch, E. Jaeger, M. Deffner, and R. Scharf, *Z. Physiol. Chem.*, 353, 1716 (1972); E. Jaeger, P. Thamm, S. Knof, E. Wünsch, M. Löw, and L. Kisfaludy, *ibid.*, 359, 1617 (1978); E. Jaeger, P. Thamm, S. Knof, and E. Wünsch, *ibid.*,

- 359, 1629 (1978); M. Löw, L. Kisfaludy, E. Jaeger, P. Thamm, S. Knof, and E. Wunsch, *ibid.*, 359, 1637 (1978).
- 11) J. J. Sharp, A. B. Robinson, and M. D. Kamen, *J. Am. Chem. Soc.*, 95, 6097 (1973); B. F. Lundt, N. L. Johansen, and A. Vølund, and J. Markussen, *Int. J. Pept. Protein Res.*, 12, 258 (1978).
- 12) C. H. Li and D. Yamashiro, *J. Am. Chem. Soc.*, 92, 7608 (1970).
- 13) H. Ogawa, T. Sasaki, H. Irie, and H. Yajima, *Chem. Pharm. Bull.*, 26, 3144 (1978).
- 14) Y. Masui, N. Chino, and S. Sakakibara, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 53, 464, (1980).
- 15) H. Irie, N. Fujii, H. Ogawa, and H. Yajima, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 922 (1976); H. Yajima, J. Kanaki, M. Kitajima, and S. Funakoshi, *Chem. Pharm. Bull.*, 28, 1214 (1980).
- 16) Y. Kiso, K. Ukawa, and T. Akita, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 101 (1980); Y. Kiso, K. Ukawa, S. Nakamura, K. Ito, and T. Akita, *Chem. Pharm. Bull.*, 28, 673 (1980).
- 17) E. Wunsch, A. Fontana, and F. Drees, *Z. Naturforsch.*, 22b, 607 (1967).
- 18) Y. Omori, Y. Matsuda, S. Aimoto, Y. Shimonishi, and M. Yamamoto, *Chem. Lett.*, 805 (1976); K. Hashizume and Y. Shimonishi, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 54, 3804 (1981).
- 19) M. Ohno, S. Tsukamoto, and N. Izumiya, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 603 (1972).
- 20) M. Chorev and Y. S. Klausner, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 596 (1976).
- 21) Y. S. Klausner and M. Chorev, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I*, 627 (1977).

- 22) T. Fukuda, M. Wakimasu, S. Kobayashi, and M. Fujino, *Chem. Pharm. Bull.*, 30, 2825 (1982).
- 23) Y. Kiso, M. Imai, K. Kitagawa, and T. Akita, *Chem. Lett.*, 739 (1983).
- 24) H. Yajima and N. Fujii, *J. Am. Chem. Soc.*, 103, 5867 (1981).
- 25) N. Fujii, A. Otaka, O. Ikemura, K. Akaji, S. Funakoshi, Y. Hayashi, Y. Kuroda, and H. Yajima, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 274 (1987); N. Fujii, A. Otaka, O. Ikemura, M. Hatano, A. Okamachi, S. Funakoshi, M. Sakurai, T. Shioiri, and H. Yajima, *Chem. Pharm. Bull.*, 35, 3447 (1987).
- 26) H. Yajima, M. Takeyama, J. Kanaki, and K. Mitani, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 482 (1978); H. Yajima, M. Takeyama, J. Kanaki, O. Nishimura, and M. Fujino, *Chem. Pharm. Bull.*, 26, 3752 (1978).
- 27) V. O. Illi, *Synthesis*, 387 (1979).
- 28) D. Ben-Ishai and A. Berger, *J. Org. Chem.*, 17, 1564 (1952); D. Ben-Ishai, *ibid.*, 19, 62 (1954).
- 29) H. Yajima, Y. Kiso, H. Ogawa, N. Fujii, and H. Irie, *Chem. Pharm. Bull.*, 23, 1164 (1975).
- 30) S. Sakakibara, Y. Shimonishi, Y. Kishida, M. Okada, and H. Sugihara, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 40, 2164 (1967).
- 31) D. L. Kaminski, M. J. Ruwart, and M. Jellinek, *Am. J. Physiol.*, 233, E286 (1977).
- 32) K. Tatemoto, Å. Rökaeus, H. Jörnvall, T. J. McDonald, and V. Mutt, *FEBS Lett.*, 164, 124 (1983).
- 33) Y. Mori and H. Yajima, *Chem. Pharm. Bull.*, 24, 2781 (1976).
- 34) G. W. Anderson, J. E. Zimmerman, and F. M. Callahan, *J. Am. Chem. Soc.*, 85, 3039 (1963); *idem*, *ibid.*, 86, 1839 (1964).
- 35) J. Honzl, and J. Rudinger, *Collect. Czech. Chem. Commun.*, 26, 2333 (1961).

- 36) J. R. Vaughan, Jr., J. Am. Chem. Soc., 73, 3547 (1951); T. Wieland, W. Kern, and R. Sehring, Ann. Chem., 569, 117 (1950); R. A. Boissonas, Helv. Chim. Acta., 34, 874 (1951).
- 37) J. Pless and R. A. Boissonas, Helv. Chim. Acta, 46, 1609 (1963).
- 38) K. Okamoto, K. Yasumura, K. Fujitani, S. Katakura, K. Akaji, H. Yajima, Y. Nakata, A. Inoue, and T. Segawa, Chem. Pharm. Bull., 32, 430 (1984).
- 39) K. Tatemoto and V. Mutt, Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 75, 4115 (1978).
- 40) F. Weygand and H. Hunger, Chem. Ber., 95, 1 (1962).
- 41) F. C. McKay and W. F. Albertson, J. Am. Chem. Soc. 79, 4686 (1957).
- 42) N. Fujii, M. Nomizu, S. Futaki, A. Otaka, S. Funakoshi, K. Akaji, K. Watanabe, and H. Yajima, Chem. Pharm. Bull., 34, 864 (1986).
- 43) H. Yajima and Y. Kiso, Chem. Pharm. Bull., 19, 420 (1971).
- 44) R. B. Woodward, K. Heusler, J. Gosteli, P. Naegeli, W. Oppolzer, R. Ramage, S. Ranganathan, and H. Vorbruggen, J. Am. Chem. Soc., 88, 852 (1966).
- 45) K. Koyama, Y. Mori, Y. Kiso, S. Hirabayashi, and H. Yajima, Chem. Pharm. Bull., 23, 2301 (1975).
- 46) M. Kubota, T. Hirayama, O. Nagase, and H. Yajima, Chem. Pharm. Bull., 26, 2139 (1978).
- 47) H. Ogawa, M. Sugiura, H. Yajima, H. Sakurai, and K. Tsuda, Chem. Pharm. Bull., 26, 1549 (1978).
- 48) J. C. Sheehan and G. P. Hess, J. Am. Chem. Soc., 77, 1067 (1955).
- 49) M. Bodanszky and V. du Vigneaud, J. Am. Chem. Soc., 81, 5688 (1959).

- 50) B. Iselin and R. Schwyzer, *Helv. Chim. Acta*, 45, 1499 (1962);
M. Bodanszky and J. Z. Kwei, *Int. J. Pept. Protein Res.*, 12,
69 (1978).
- 51) N. Fujii, S. Futaki, K. Akaji, H. Yajima, A. Inoue, and T.
Segawa, *Chem. Pharm. Bull.*, 33, 3731 (1985).
- 52) S. Sakakibara, in *Chemistry and Biochemistry of Amino Acids,
Peptides and Proteins* (B. Weinstein, Ed.), Marcel Dekker, New
York, Vol. 1, pp. 51, (1971); M. Fujino, M. Wakimasu, S.
Shinagawa, C. Kitada, and H. Yajima, *Chem. Pharm. Bull.*, 26,
539 (1978).
- 53) A. C. Ivy and E. Oldberg, *Am. J. Physiol.*, 86, 599 (1928).
- 54) A. A. Haper and M. S. Raper, *J. Physiol.*, 102, 115 (1943).
- 55) J. E. Jorpes, V. Mutt, and K. Toczko, *Acta Chem. Scand.*, 18,
2408 (1964)
- 56) V. Mutt and J. E. Jorpes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 26,
92 (1968); *idem*, *Eur. J. Biochem.*, 6, 156 (1968).
- 57) A. Anastasi, V. Erspamer, and R. Endean, *Experientia*, 25, 7
(1969).
- 58) K. Tatemoto, H. Jörnvall, S. Siimesmaa, G. Halldén, and V.
Mutt, *FEBS Lett.*, 174, 289 (1984)
- 59) V. Mutt, *Clin. Endocrinol.*, (suppl.)5, 175 (1976).
- 60) M. Carlquist, V. Mutt, and H. Jörnvall, *Regl. Peptides*, 11,
27 (1985).
- 61) V. E. Eysselein, J. P. Reeve, Jr., J. E. Shively, D. Hawke,
and J. H. Walsh, *Peptides*, 3, 687 (1982).
- 62) J. Eng, B.-H. Do, Y.-C. E. Pan, M. Chang, J. D. Hulmes, and
P. S. Yalow., *Peptides*, 5, 1203 (1984).
- 63) Z.-Z. Zhou, J. Eng, Y.-C. E. Pan, M. Chang, J. D. Hulmes,
J.-P. Paufman, and R. S. Yalow., *Peptides*, 6, 337 (1985).
- 64) U. Gubler, A. O. Chua, B. J. Hoffman, K. J. Collier, and J.

- Eng. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 81, 4307 (1984).
- 65) R. J. Deschenes, L. J. Lorenz, R. S. Haun, B. A. Roos, K. J. Collier, and J. E. Dixon, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 81, 726 (1984).
- 66) J. Friedman, B. S. Schneider, and D. Powell., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 82, 5593 (1985).
- 67) G. J. Dockray, Nature, 264, 564 (1976).
- 68) G. J. Dockrey, Nature, 270, 359 (1977).
- 69) V. Mutt, in Gastrointestinal Hormones (G. B. Jerzy, Ed.), pp. 169, Raven, New York, (1980).
- 70) G. J. Dockray, Brain Res., 188, 155 (1980).
- 71) J. F. Rehfeld, J. Biol. Chem., 253, 4022 (1978); P. D. Marley, J. F. Rehfeld, and P. C. Emson, J. Neurochem., 42, 1523 (1984).
- 72) J. E. Rehfeld, Nature, 271, 771 (1978).
- 73) G. J. Dockray, P. R. Dodd, J. A. Edwardson, and J. A. Hardy, J. Physiol. 303, 28 (1980).
- 74) J. Gibbs, R. C. Young, and G. P. Smith, J. Comp. Physiol. Psychol., 84, 488 (1973).
- 75) J. E. Morley, A. S. Levine, and S. Lindblad, Eur. J. Pharmacol. 74, 249 (1981).
- 76) T. Hökfelt, J. F. Rehfeld, L. Skirboll, B. Ivemark, M. Goldstein, and K. Markey, Nature, 285, 476 (1980).
- 77) E. Wunsch, L. Moroder, L. Wikschowitz, W. Göhrich, R. Scharf, J. D. Gardner, Z. Physiol. Chem., 362, 143 (1981).
- 78) G. Borin, A. Calderan, P. Ruzza, L. Moroder, W. Göhring, G. Bovermann, and E. Wunsch, Biol. Chem. Hoppe-Seyler, 368, 1363 (1987).
- 79) H. H. Sisler and L. A. Audrieth, Inorg. Synth., 2, 173 (1946).

- 80) B. Penke, F. Hajnal, J. Lonovics, G. Holzinger, T. Kadar, G. Telegdy, and J. Rivier, *J. Med. Chem.*, 27, 845 (1984).
- 81) H. C. Reitz, R. E. Ferrel, H. Frankel-Conrat, and H. S. Olcott., *J. Am. Chem. Soc.*, 68, 1024 (1946).
- 82) I. Photaki, *J. Am. Chem. Soc.*, 85, 1123 (1963); E. Schnabel, J. Stoltefuß, H. A. Offe, E. Klauke, *Ann. Chem.*, 743, 57 (1971).
- 83) B. Penke, M. Zarandi, J. Zsigo, G. K. Toth, and K. Kovacs, in *Peptide 1986* (D. Theodoropoulos, Ed.), pp. 447, Walter de Gruyter, Berlin (1987).
- 84) L. A. Carpino and G. Y. Han, *J. Am. Chem. Soc.*, 92, 5748 (1970).
- 85) H. Yajima and N. Fujii, in *The Peptides*, Vol. V (E. Gross and Meienhofer, Ed.), pp. 65, Academic Press, New York (1983).
- 86) G. Simchen and W. Kober, *Synthesis*, 259 (1976); H. Ahlbrecht and E. O. Duber, *ibid.*, 630 (1980); H. H. Hergott and G. Simchen, *Ann. Chem.*, 1718 (1980).
- 87) E. Ende, D. Domsch, H. Feger, U. Frick, A. Götz, H. H. Hergott, K. Hofmann, W. Kober, K. Krägeloh, T. Oesterle, W. Steppan, W. West, and G. Simchen, *Synthesis*, 1 (1982).
- 88) R. Noyori, S. Murata, and M. Suzuki, *Tetrahedron*, 37, 3899 (1981).
- 89) K. Akaji, M. Nomizu, K. Watanabe, S. Funakoshi, H. Imura, T. Tsukada, J. Fukata, H. Nakamura, M. Koida, N. Fujii, and H. Yajima, *Chem. Pharm. Bull.*, 35, 3859 (1987); M. Nomizu, K. Akaji, J. Fukata, H. Imura, A. Inoue, Y. Nakata, T. Segawa, N. Fujii, and H. Yajima, *Chem. Pharm. Bull.*, 36, 122 (1988).
- 90) B. M. Erickson and R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.*, 95, 3750 (1973).
- 91) M. Fujino, S. Kobayashi, M. Obayashi, T. Fukuda, S.

- Shinagawa, and O. Nishimura, *Chem. Pharm. Bull.*, 22, 1857 (1974).
- 92) M. Kubota, H. Ogawa, and H. Yajima, *Chem. Pharm. Bull.*, 24, 2435 (1976).
- 93) W. Kong and R. Geiger, *Chem. Ber.*, 103, 788 (1970).
- 94) Y. Mori, K. Koyama, Y. Kiso, and H. Yajima, *Chem. Pharm. Bull.*, 2788 (1976).
- 95) S. Kuno, W. Li, N. Fujii, H. Adachi, K. Bessho, T. Segawa, Y. Nakata, A. Inoue, and H. Yajima, *Chem. Pharm. Bull.*, 34, 4811 (1986).
- 96) H. Yajima, J. Iwai, H. Watanabe, K. Koyama, M. Nakamura, K. Miyata, and H. Yajima, *Chem. Pharm. Bull.*, 25, 2048 (1977).
- 97) N. Fujii, S. Kuno, A. Otaka, S. Funakoshi, K. Takagi, and H. Yajima, *Chem. Pharm. Bull.* 33, 4587 (1985).
- 98) E. J. Corey and B. B. Snider, *J. Am. Chem. Soc.*, 94, 2549 (1972).
- 99) E. J. Corey and A. Venkateswarlu, *J. Am. Chem. Soc.*, 94, 6190 (1972).
- 100) S. Hanessian and P. Lavallee, *Can. J. Chem.*, 53, 2975 (1975).
- 101) E. J. Corey and B. B. Snider, *J. Am. Chem. Soc.*, 94, 2549 (1972).
- 102) E. Atherton, C. J. Logan, and R. C. Sheppard, *J. Chem. Soc.*, Parkin I, 538 (1981).
- 103) M. D. Stern, D. L. Lappe, P. D. Bowen, J. E. Chimosky, G. A. Holloway, Jr., H. R. Keiser, and R. L. Brown, *Am. J. Physiol.*, 232, H441 (1977); M. D. Stern, P. D. Bowen, R. Parma, R. W. Osgood, R. L. Bowman, and J. H. Stein, *ibid.*, 236, F80 (1979).
- 104) O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall, *J. Biol. Chem.*, 193, 265 (1951).

- 105) P. L. Rayford and J. C. Thompson, *Surg. Gynecol. Obstet.*, 145, 257 (1977); J. C. Thompson, *Gastrointestinal Endocrinology*, 213 (1987); G. F. Stening and M. I. Grossman, *Am. J. Physiol.*, 217, 262 (1969).
- 106) S. Moore and W. H. Stein, in *Method in Enzymology*, Vol. VI (S. P. Colowick and N. D. Kaplan, Ed.), pp.819, Academic Press, New Yourk (1960).
- 107) T. Y. Liu and Y. H. Chang, *J. Biol. Chem.*, 246, 2842 (1971); R. J. Simpson, M. R. Neuberger, and T. Y. Liu, *ibid.*, 251, 1936 (1976).
- 108) H. E. Ertel and L. Hornery, *J. Chromato*, 7, 268 (1962).
- 109) V. Bocchi, G. Castani, A. Dossena and R. Marchelli, *Synthesis*, 957 (1979).
- 110) K. Akaji, N. Fujii, H. Yajima, K. Mizuta, M. Aono, and M. Moriga, *Chem. Pharm. Bull.*, 33, 184 (1985).

