

主論文

新	制
薬	
93	函

グルカゴン(アヒル)の全合成研究

1979

小川博

目 次

<理 論 の 部>

緒 言	1
第 1 章 ペプチド合成に伴う Trp 残基の副反応とその抑制	4
第 1 節 脱保護反応に伴う Trp 残基の副反応	4
第 1 項 Boc-Trp-OH の TFA 処理の際の 副反応物の検討	6
第 2 項 Z(OMe)-Trp-OH の TFA 処理の 際の副反応物の検討	8
第 2 節 希釈スルホン酸による α -アミノ保護基脱保護と Trp 残基における副反応抑制法の検討	14
第 1 項 希釈スルホン酸類による α -アミノ保護基 脱保護の検討	14
第 2 項 Trp 残基における副反応の抑制法の検討	19
第 2 章 グルカゴン (アヒル) の全合成	22
第 1 節 グルカゴンに関する従来の研究概要	22
第 1 項 構 造 研 究	22
第 2 項 作用・活性および構造活性相関	23
第 3 項 グルカゴンに関する従来 of 合成研究	25
第 4 項 合 成 方 針	28
第 2 節 グルカゴン (アヒル) の 13-29 位 保護 heptadecapeptide の合成	30
第 1 項 グルカゴン (アヒル) の C 末端部 24-29 位 保護 hexapeptide (A) の合成	30

第 2 項	グルカゴン(アヒル)の20-23位保護 tetrapeptide(B)の合成	32
第 3 項	グルカゴン(アヒル)の15-19位保護 pentapeptide(C)の合成	33
第 4 項	グルカゴン(アヒル)の13-14位保護 dipeptide(D)の合成	34
第 5 項	グルカゴン(アヒル)の13-29位保護 heptadecapeptideの合成	35
第 3 節	グルカゴン(アヒル)の全合成	37
第 1 項	グルカゴン(アヒル)の9-12位保護 tetrapeptide(E)の合成	37
第 2 項	グルカゴン(アヒル)の5-8位保護 tetrapeptide(F)の合成	38
第 3 項	グルカゴン(アヒル)の1-4位保護 tetrapeptide(G)の合成	39
第 4 項	保護グルカゴン(アヒル)の合成	39
第 5 項	グルカゴン(アヒル)の全合成 一脱保護と精製	41
第 6 項	合成グルカゴン(アヒル)の生物活性	47
結 語		49
謝 辞		51

<実験の部>

第 1 章 に関する実験	54
第 1 節 に関する実験	54
第 2 節 に関する実験	58
第 2 章 に関する実験	68
第 2 節 に関する実験	68
第 3 節 に関する実験	79
引 用 文 献	91

理 論 の 部

膵臓ホルモンの一種であるグルカゴンの構造研究は、1957年Bromerら¹⁾が、29個のアミノ酸残基よりなるブタのグルカゴンの構造を決定したのに始まる。その後、ウシ²⁾、ラット³⁾、ヒト⁴⁾、ウサギ⁵⁾のグルカゴンも同一構造であることがわかり、現在のところ、各哺乳動物グルカゴンは共通と考えられている。しかし、近年鳥類は多少構造の異なるグルカゴンを有することが知られてきた。すなわち、Markussenら(1972年)⁶⁾、Kimmelら(1975年)⁷⁾、Sundbyら(1972年)⁸⁾は、それぞれ、七面鳥、ニワトリ、アヒルのグルカゴンの構造を決定したが、Fig. 1に示すように、前2者は、C末端部28位においてのみ、哺乳動物グルカゴンと異なり、また、アヒルのグルカゴンは、16位、28位の2箇所で見違っていることが明らかとなった。

Fig. 1

The structures of glucagons from various species

H-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-
Tyr-Leu-Asp-(16)-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-
Trp-Leu-Met-(28)-Thr-OH

	(16)	(28)
mammalian glucagon	Ser	Asn
turkey, chicken glucagon	Ser	Ser
duck glucagon	Thr	Ser

ブタグルカゴンの全合成は、1968年になってようやくWünschら⁹⁾によって報告された。合成がこのように遅れた理由は、分子のC末端部に接触還元を妨げるMet残基、および、酸による α -アミノ保護基の脱保護の際、副反応を生ずるTrp残基が存在するためである。このため、Wünschら⁹⁾は、*o*-nitrophenylsulfenyl (NPS) 基¹⁰⁾を α -アミノ保護基とし、最終段階でトリフルオロ酢酸を脱保護剤として、本合成を行った。また、1975年、中国上海研究所¹¹⁾は、矢島、木曾¹²⁾の開発した固相上の区分縮合法を採用し、

最終段階の脱保護剤としてHFを使用し、ブタグルカゴンの全合成を報告している。

著者は、上記の研究経過を考慮し、今回、未合成のグルカゴン（アヒル）を methanesulfonic acid (MSA) を最終脱保護剤とする従来にない方法で全合成した。特に、合成途上、Trp の酸処理にともなう副反応を解明するとともに、その抑制法に検討を加え、本合成に適用した。

(注) 本論文に用いるアミノ酸、ペプチドおよびその誘導体はL-体である。

使用した略号は、IUPAC-IUB の Commission on Biochemical Nomenclature¹³⁾ に従った。

1) アミノ酸の略号

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

2) アミノ保護基の略号

benzyloxycarbonyl : Z
p-methoxybenzyloxycarbonyl : Z(OMe)
t-butyloxycarbonyl : Boc
o-nitrophenylsulfenyl : NPS

3) カルボキシル保護基の略号

benzyl ester : -OBzl methyl ester : -OMe
 β, β, β -trichlorethyloxycarbonyl hydrazide : -NHNH Troc
hydrazide : -NHNH₂

4) 活性エステルの略号

p-nitrophenylester : ONP
pentachlorophenyl ester : OPCP

5) アミノ酸誘導体の記号

N^G -*p*-methoxybenzenesulfonyl arginine deriv.: -Arg(MBS)-

β -benzylaspartate deriv.: -Asp(OBzl)-

N^ϵ -benzyloxycarbonyl lysine deriv.: -Lys(Z)-

methionine sulfoxide deriv.: -Met(O)-

6) 試薬および溶媒の略号

N-hydroxybenzotriazole : HOBT

ethanedithiol: EDT

dicyclohexylcarbodiimide : DCC

trifluoroacetic acid : TFA

methanesulfonic acid : MSA

ethanesulfonic acid : ESA

hydrogen fluoride : HF

dimethylformamide : DMF

ethyl acetate : AcOEt methanol : MeOH

ethanol : EtOH *n*-butanol : *n*-BuOH

N-methylpyrrolidone : NMP

acetic acid : AcOH

tetrahydrofuran : THF

ethylenediamine tetraacetate : EDTA

第 1 章 ペプチド合成に伴う Trp 残基の副反応とその抑制

第 1 節 脱保護反応に伴う Trp 残基の副反応

ペプチドの化学合成において、ペプチド鎖を延長しようとする場合、まず、アミノ成分中に存在する各種アミノ酸側鎖官能基の保護基が安定な状態で、 α -アミノ保護基のみを選択的に除去することが必要である。現在のところ、これには大別して二種の方法があげられる。

第一の方法は、 α -アミノ保護基に接触還元で除去できる保護基、すなわち benzyloxycarbonyl (Z) 基¹⁴⁾を使用し、側鎖官能基には接触還元で安定な保護基、たとえば、*t*-butyloxycarbonyl (Boc) 基¹⁵⁾、*t*-butylester (OBu^t) 基¹⁶⁾、*t*-butylether (Bu^t) 基¹⁷⁾などを用い、選択的に α -アミノ保護基を接触還元的に除去する方法である。しかし、本法は、イオウがパラジウムの触媒毒であることから、含硫アミノ酸を含むペプチドへの適用が困難である。特に、C 末端部分に、Met や Cys を含有するペプチドの場合、現在のペプチド合成法にのつとつてラセミ化を抑制しつつ C 端部より順次ペプチド鎖を延長するには、以下に述べる第二の方法を取らざるを得ない現状である。

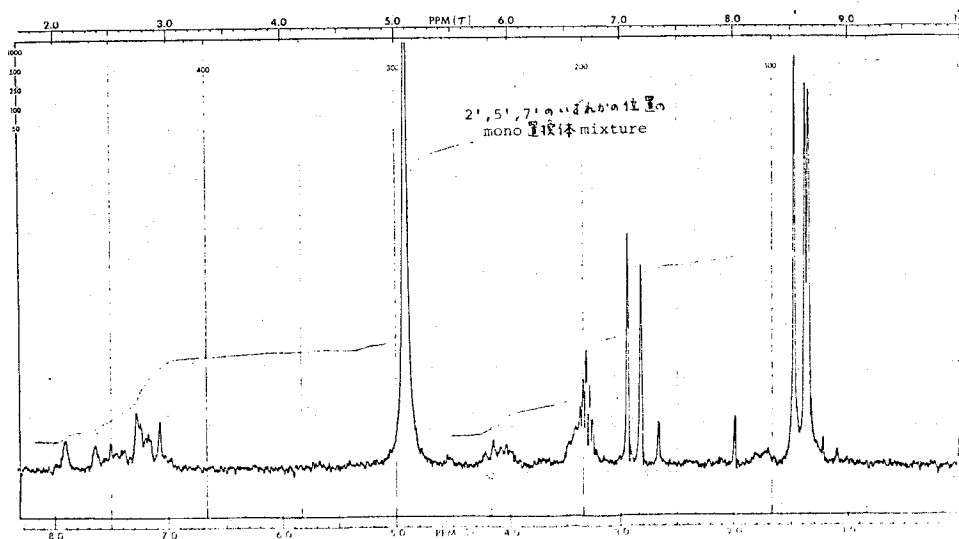
第二の方法は、trifluoroacetic acid (TFA) や希塩酸による緩やかな酸処理によって、 α -アミノ保護基を選択的に除去する方法で、 α -アミノ保護基として、通常、Boc 基や *p*-methoxybenzyloxycarbonyl [Z (OMe)] 基¹⁸⁾を使用し、側鎖保護基として本条件下安定とされる、Z 基、benzylester (OBzl) 基¹⁹⁾、benzylether (Bzl) 基²⁰⁾等を用いる方法である。本法によって Met 含有ペプチドの合成が可能になるのであるが、グルカゴンの様に酸処理に不安定な Trp 残基が共存する場合、新たに困難な問題が生ずる。たとえば、Trp を希塩酸中に放置すると、著しいピンク色の着色が認められる。そして、1959 年 Uphaus ら²¹⁾は、N-acetyltryptophan (Ac-Trp-OH) の TFA 処理による β -carboline 誘導体の生成を報告し、1962 年 Theodoropoulos ら²²⁾は、Z-Tryptophan peptide の HBr-AcOH 処理による β -oxindolyl alanine 誘導体の生成を報告している。最近では、下西ら²³⁾の N-acetyltryptophan methyl ester の、TFA あるいは

フッ化水素 (HF) ²⁴⁾ 処理の際の二量体生成等, そのインドール核の反応性に起因する多くの報告がある。以上の反応の多くは, Trp が酸性条件下に酸化に対して鋭敏であることを示しており, このため還元剤, たとえば mercapto ethanol や, ethanedithiol (EDT) の添加が, この着色の防止に有効であることが報告されている ²⁵⁾。事実, Trp 自体をこのようなチオール類を添加した希塩酸, TFA 中で室温下数時間放置しても着色をみないのであるが保護基のついた Trp, たとえば, Boc-Trp-OH または Z(OMe)-Trp-OH をこれらの酸で脱保護する場合, 生成するカチオンの除去剤として, アニソール以外に, これらのチオールを添加しても, 薄層クロマト (TLC) 上, 依然として数種の副反応物の生成が認められる。この場合, この副反応の本体が少なくとも保護基に起因することを最初に指摘したのは Alakhov ら ²⁶⁾ である。彼らは, Boc-Trp-Gly-OH を TFA により脱保護して得られた生成物の質量分析 (mass) を行った結果, 親ピーク (M^+) 以外に, 明らかに *t*-butyl 基の増加したピーク ($M+56$) を検出している。ついで, 1977年 Wünsch ら ²⁷⁾ は, Boc-Trp-OH の TFA 処理による α -アミノ保護基 (Boc 基) の脱保護反応の際の副反応物を実際に分離し, このうちの2種, H-Trp ($1'$ -Bu^t)-OH, H-Trp ($2', 5', 7'$ -tri-Bu^t)-OH を構造決定した。続いて, 榊原ら ²⁸⁾ も同様に, Boc-Trp-OH の TFA 処理により, H-Trp ($1'$ -Bu^t)-OH, H-Trp ($2'$ or $5'$ or $7'$ -Bu^t)-OH ($2'$ 位又は $5'$ 位又は $7'$ 位におけるモノ Bu^t 置換 Tryptophan の混合物) を分離している。これらは, 明らかに酸によって保護基から生じた *t*-butyl カチオンが Trp のインドール核を攻撃して生じたものであり, 上記のアニソールの添加もこの副反応を十分に抑制しうるものでない。そこで著者は, α -脱保護に際する Trp 残基における副反応の抑制を目的とし, α -アミノ保護基として Z(OMe) 基と Boc 基の二面よりの副反応の検討を行った。そして, Boc-Trp-OH に関し, 前記副反応物を追試するとともに, Z(OMe)-Trp-OH についても同様 TFA 処理し, 生成する副反応物を単離し, それらの構造を決定した。以上の基礎研究は, 高純度のグルカゴンの合成のみならず, 一般に, Met, Trp 含有ペプチドの合成のために重要と考える。

第1項. Boc-Trp-OHのTFA処理の際の副反応物の検討

Boc-Trp-OHのTFA処理の際の副反応物の生成は、前記したように、最初、1970年 Alakhovら²⁶⁾により、mass分析データから指摘され、その後、Wünschら²⁷⁾、榊原ら²⁸⁾により副反応物が単離構造決定された。著者は、本実験を、反応の際の着色を防止するため、少量のEDT含有アニソール(2当量、通常の反応の約1/5)を加えてWünschらと同様TFA処理を行った後、シリカカラムクロマトにより、クロロホルム：メタノール：水=8：3：1の系で溶出を繰り返し、4種の副反応物を単離精製した。得られた副反応物を、TLCにおいて前記の8：3：1の系で展開し、Rf値の低いものから順に、B₁, B₂, B₃, B₄と命名し、各々についての構造を決定あるいは同定した。このうちB₂は最も多い副反応物である。その結果、B₁はmass分析よりt-Buのmono-置換体であること、H¹-NMR(60MHz, CD₃OD)よりt-Buピークが不規則に3本観察され(Fig. 2), また積分比が一致しないことより、Trpのインドール核の2', 5', 7'位のいずれかの位置がt-Bu基で置換された3種の混合物であろうと推定した。置換位置は、後述するB₂, B₃のt-Buのピークのδ値を考慮して決めた。以上のデータから、本物質は、榊原ら²⁸⁾の分離したH-Trp(2' or 5' or 7'-Bu^t)-OHに一致するものと考えられる。

Fig. 2 NMR spectrum of B₁ in CD₃OD (60MHz)



B_2 は、物理定数および IR (KBr), H^1 -NMR (60 MHz, DMSO- d_6 , CD_3OD), mass 分析のデータが Wunsch ら²⁷⁾, 榊原ら²⁸⁾の得た H-Trp ($1'-Bu^t$)-OH のデータに完全に一致し、本物質と同定した。 B_2 の H^1 -NMR を Fig. 3 に示す。

Fig. 3. a) NMR spectrum of B_2 in DMSO- d_6 (60 MHz)

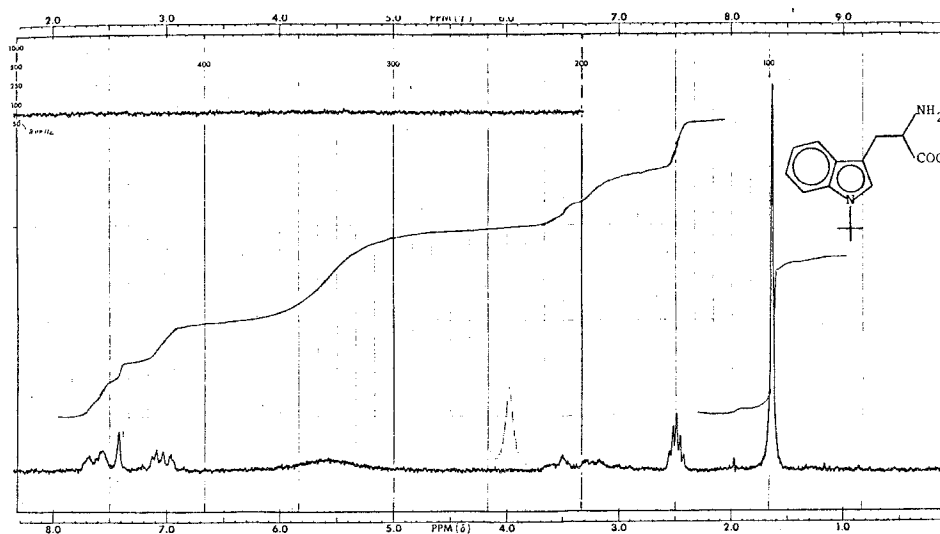
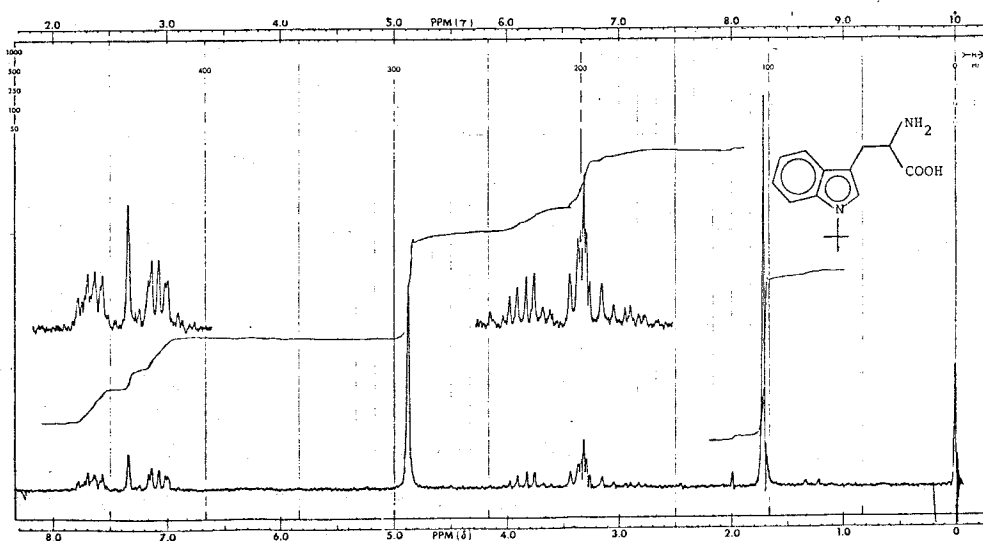


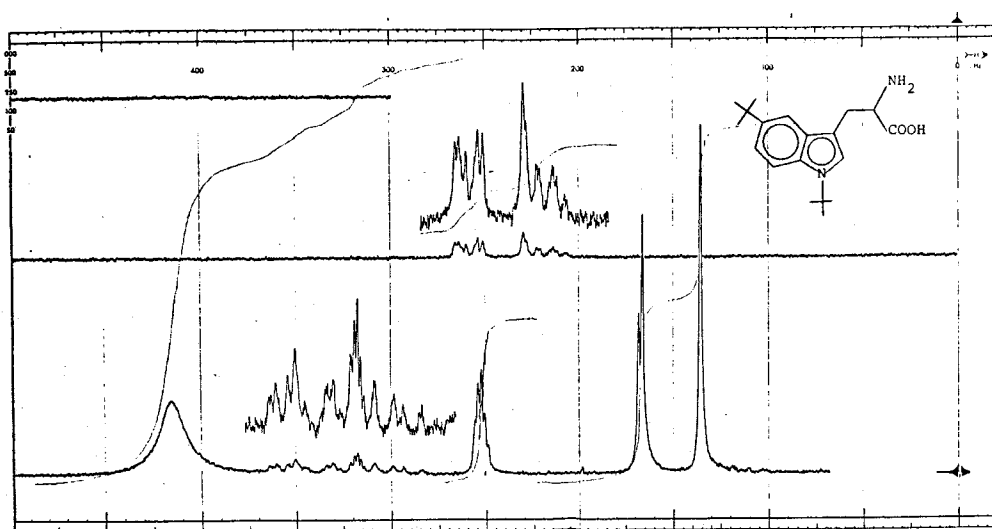
Fig. 3. b) NMR spectrum of B_2 in CD_3OD (60 MHz)



B_3 は, mass 分析より di- Bu^t 置換体であること, IR(KBr) によりインドール NH の無いこと, H^1 -NMR (100MHz, DMSO- d_6 - CD_3OD) では, アロマティック位のプロトンピークに, 2種の rotationaly isomer²⁹⁾ の存在が考えられることから, H-Trp(1', 5'-di- Bu^t)-OH と構造を決定した。本物質の H^1 -NMR を Fig. 4 に示す。

Fig. 4.

NMR spectrum of B_3 in DMSO- d_6 - CD_3OD mixture (100MHz)



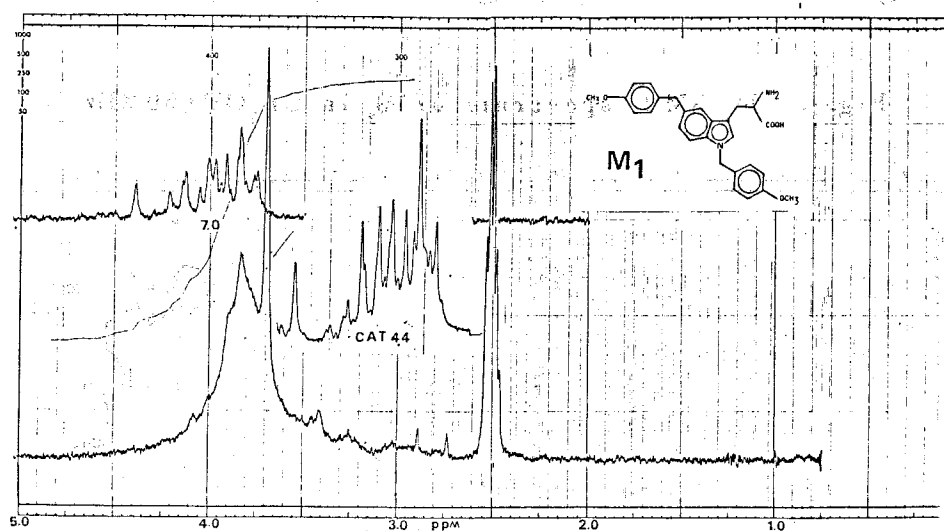
B_4 は, 通常 TFA 処理時にはみられず, 反応の後処理の際生成する非常に minor な物質であり, 完全な構造決定を行うことはできなかったが, mass 分析によると t -Bu 基の tri-置換体であることは明らかであり, したがって Wünsch ら²⁷⁾ の報告した H-Trp(2', 5', 7'-tri- Bu^t)-OH と同一物質と推定した。

第2項 Z(OMe)-Trp-OH の TFA 処理の際の副反応物の検討

ペプチド合成において, TFA で選択的に除去されうる α -アミノ保護基として, 前述の Boc 基とともに Z(OMe) 基が繁用されている。これら両者は, ほぼ同程度の切断されやすさを有しているが, Z(OMe)-Trp-OH に対する

TFA 処理の副反応については未だ報告がない。そこで $Z(\text{OMe})\text{-Trp-OH}$ に対しても第 1 項と同様の実験を行い、両者の反応性の比較検討を行った。方法は、 Boc-Trp-OH の場合に準じて行った。すなわち、 $Z(\text{OMe})\text{-Trp-OH}$ に 2% EDT 含有アニソール (2 当量、通常の約 $1/5$ 量) を加えた後、 0°C 、60 分 TFA 処理を行い、室温で TFA を留去し、シリカカラムクロマトを通して前項と同系の溶媒で溶出を繰り返して分離精製して、4 種の副反応物を得た。そして、前項と同様 TLC の Rf 値の低いものから M_1 , M_2 , M_3 , M_4 と命名し、各々の構造を決定、あるいは推定した。このうち M_2 が最も多い副反応物である。すなわち、 M_1 は、mass 分析により、 p -methoxybenzyl (MBzl) の di-置換体であること、IR によりインドール NH の吸収 (3380 cm^{-1} , KBr) が無いこと、そして $^1\text{H-NMR}$ (100 MHz , $\text{DMSO}-d_6$) の芳香核 (Trp) の部位のプロトンピークから、 $\text{H-Trp}(1', 5'\text{-di-MBzl})\text{-OH}$ と判断した。 M_1 の NMR スペクトルを Fig. 5 に示す。

Fig. 5. NMR spectrum of M_1 in $\text{DMSO}-d_6$ (100 MHz)



M_2 は、mass 分析から MBzl の mono-置換体であること、IR にインドール NH の吸収 (3380 cm^{-1} , KBr) があること、そして $^1\text{H-NMR}$ (60 MHz , CD_3OD , $\text{DMSO}-d_6$) より $\text{H-Trp}(2'\text{-MBzl})\text{-OH}$ と決定した。 M_2 の

NMRスペクトルをFig. 6に示す。なおMBzlのmono-置換体であることは元素分析によっても確認した。

Fig. 6. a) NMR spectrum of M_2 in $DMSO-d_6$ (60MHz)

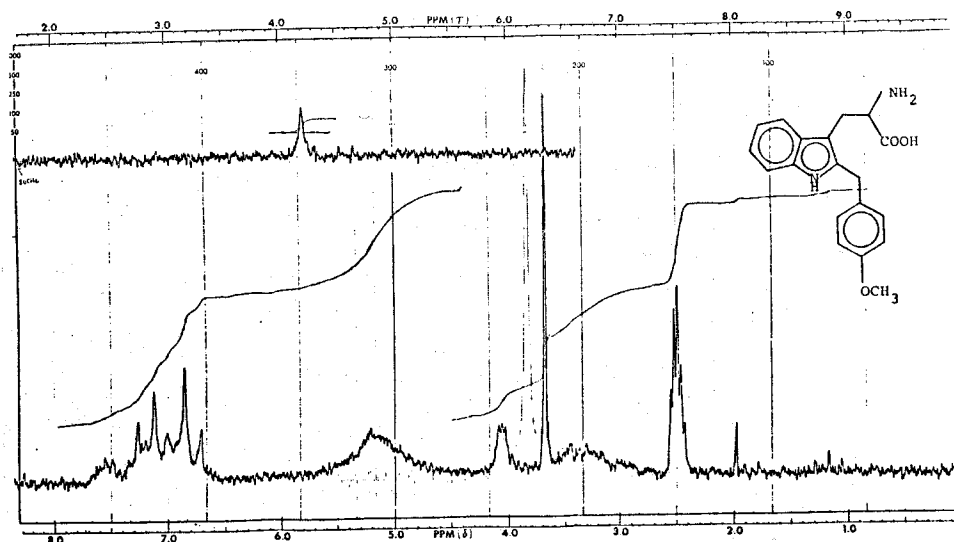
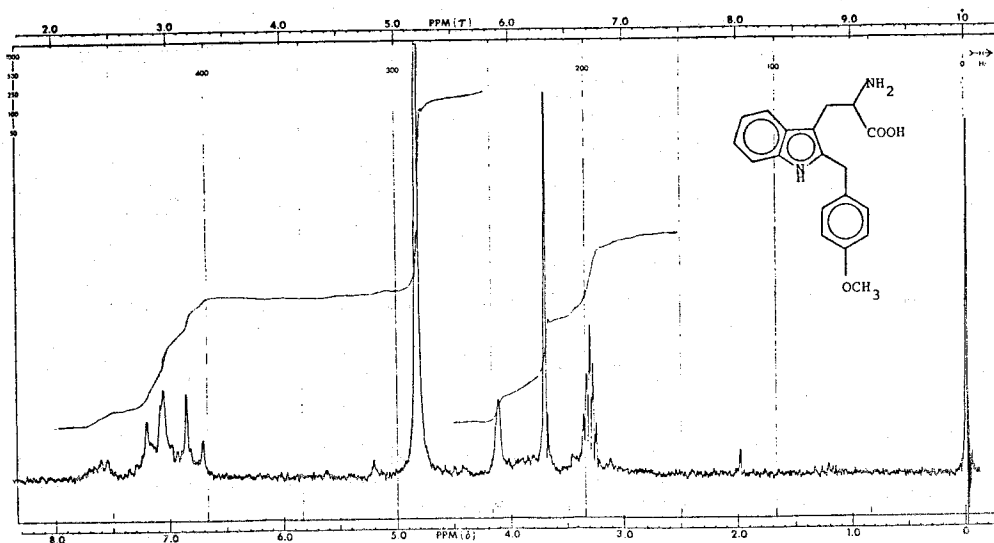


Fig. 6. b) NMR spectrum of M_2 in CD_3OD (60MHz)



M_3 は、mass 分析より MBzl の di-置換体であること、IR にインドール NH の吸収が認められること、そして H^1 -NMR (60MHz, CD_3OD , $DMSO-d_6$) より、H-Trp(2', 5'-di-MBzl)-OH と構造を決定した。 M_3 の NMR スペクトルを Fig. 7 に示す。さらに、di-置換体であることは、元素分析によっても確認した。

Fig. 7. a) NMR spectrum of M_3 in $DMSO-d_6$ (60MHz)

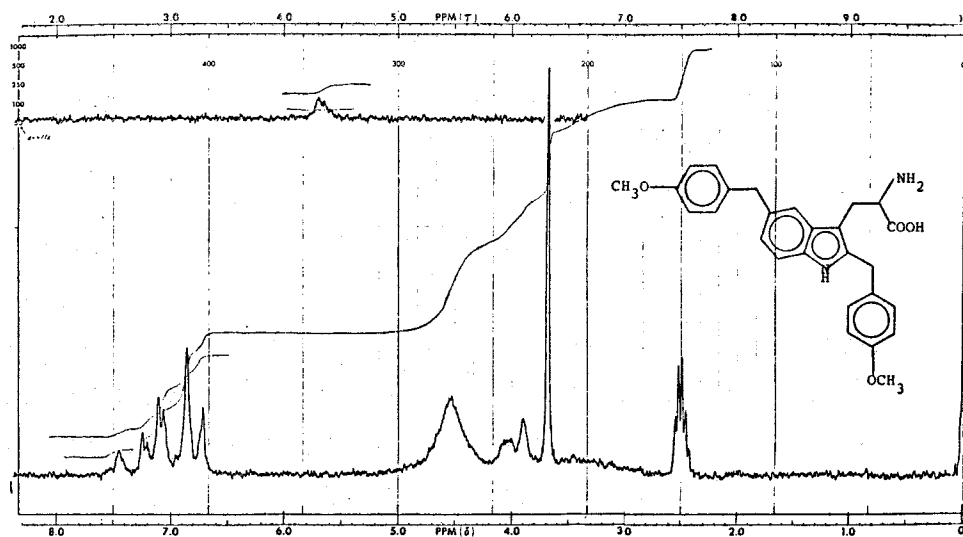
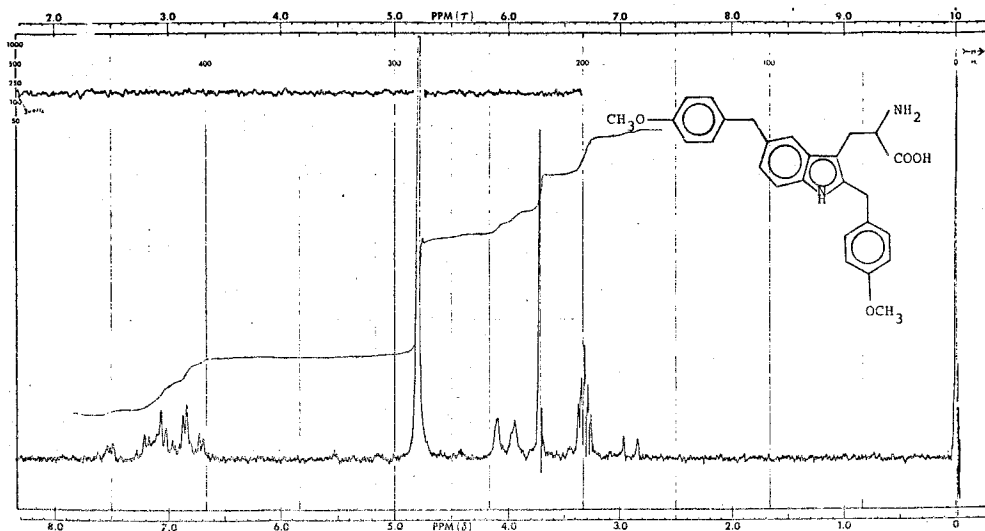


Fig. 7. b) NMR spectrum of M_3 in CD_3OD (60MHz)



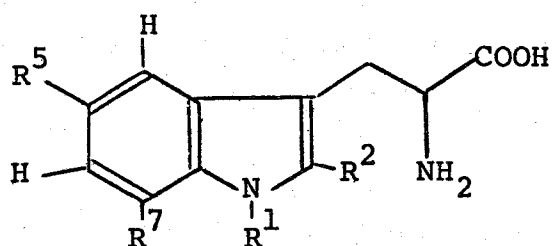
M_4 は、後処理の段階で生成する非常にminorな物質であり、完全な構造決定には至っていないが、IRによりインドールNHの吸収があること、mass分析よりtri-置換体であること、さらに、今までのmass分析の脱炭酸の解裂パターンの規則性、すなわち1'置換体では、 $M^+ - 74$ ($M^+ - CH(NH_2)COOH$) がみられ、その他の位置の置換体では、 $M^+ - 44$ ($M^+ - CO_2$) がみられたこと、から判断するとH-Trp(2', 5', 7'-tri-MBzl)-OHと推定される。

ここで、今までの構造決定あるいは推定に役立った大きなファクターを、あらためてまとめてみると、IRにおいては、インドールNH (3380 cm^{-1} , KBr)の有无、 $^1\text{H-NMR}$ においては、インドールNH (1'-H)のシグナル (δ : 10.7 ~ 10.8 ppm, DMSO- d_6), 2'-Hのシグナル (δ : 7.26 ~ 7.33 ppm, CD_3OD), 5'-位が置換された際の4'-Hの singlet peak, そして、mass分析においては、 M^+ およびその解裂パターンに、ある規則性がみられたことである。特にmass分析においては、すでに上述したように、1'-位に置換がおこった場合は、他の部位の置換の有無にかかわらず、 M^+ がsharpに出現し、脱炭酸した $M^+ - 44$ が現われない。しかし、1'-位以外のインドール核に置換がおこった場合は、 M^+ は非常に弱く、 $M^+ - 44$ がsharpに出現した。

以上第1節において得られたBoc-Trp-OH, Z(OMe)-Trp-OHのTFA処理の際の副反応物をまとめて、Fig. 8に示した。

以上の副反応のうち、 B_2 , M_2 はこれらの副反応物の主成分であるが、 B_2 が1'-Bu^t置換体であるのに比し、 M_2 は、2'-MBzl置換体であり、*t*-BuとMBzlのカチオンの反応性に大きな違いが認められた。

Fig. 8. Assigned formula of by-products derived from
Z(OMe)-Trp-OH and Boc-Trp-OH by trifluoroacetic acid.



	R ¹	R ²	R ⁵	R ⁷
M ₁	MBzl	H	MBzl	H
M ₂	H	MBzl	H	H
M ₃	H	MBzl	MBzl	H
M ₄	H	MBzl	MBzl	MBzl
B ₁ *	H	H	Bu ^t	H
B ₂	Bu ^t	H	H	H
B ₃	Bu ^t	H	Bu ^t	H
B ₄	H	Bu ^t	Bu ^t	Bu ^t

* B₁ seems to be a mixture of three mono-substituted derivatives at 2^u, 5^u and 7^u.

第2節 希釈スルホン酸による α -アミノ保護基脱保護と

Trp 残基における副反応抑制法の検討

第1節で述べたごとく、Trp 残基には、酸処理による脱保護の際、種々の副反応物の生成がみられる。従来この様な副反応を無視して各種の Trp 含有ペプチドの合成の報告があるのであるが、より純粋なペプチドを合成するには、この様な副反応を抑制することが必要である。第1節の知見をもとに、この副反応の抑制について2方面から検討を行った。すなわち、従来使用されてきた TFA や希塩酸などにかわる新しい α -アミノ保護基の選択的除去試薬を検索すること、および副反応物の構造から明らかなごとく、副反応は、脱保護の際生成するカチオンが主因であり、このカチオンを捕捉除去するため、アニソールより有効なカチオン除去剤（スカベンジャー）を検討すること、の2つである。

第1項 希釈スルホン酸類による α -アミノ保護基脱保護の検討

Liu ら^{30) 31)}は、1971年、3M *p*-toluenesulfonic acid (Tos-OH), ついで1976年、4M MSA によって Trp 含有ペプチドあるいは蛋白質を酸加水分解すると、Trp はほぼ完全に回収されることを報告した。また、矢島ら³²⁾は、1975年、ペプチド合成の最終段階における全保護基の除去試薬としてMSAを報告した際、MSA処理下、Trp は安定であることを報告しており、ここに、Trp は各種スルホン酸類には比較的安定であるように判断される。かつて、TFA、希塩酸にかわる脱Boc化剤として、ギ酸類^{33) 34)}、BF₃ etherate³⁵⁾等を用いた例もあるのであるが、著者はやはりこの際、酸として各種スルホン酸類を選び、その希釈溶液の選択的な脱 α -アミノ保護試薬としての有用性を検討した。スルホン酸としては、ESA、MSA、はじめ Tos-OH、benzenesulfonic acid (BSA)、mesitylenesulfonic acid (Mes-SA)、3-bromocamphor-8 or 10-sulfonic acid (Be-8 or 10-SA)等を選び、AcOH、あるいは比較のためAcOH-塩化メチレン(1:1)溶液を溶媒とし、各種濃度の希釈溶液を調製した。なお、Trp を考慮したわけではないが、希0.01M Tos-OHを用いての脱Boc反応の報告がある³⁶⁾が、後述するようにこの濃度では、完全に脱Boc化するこ

とはできない。そして、 α -アミノ保護基の選択的除去を目的とし、Z(OMe)-Lys(Z)-OH³⁷⁾, Boc-Lys(Z)-OH³⁸⁾, Z(OMe)-Asp(OBzl)-OH³⁹⁾をモデル物質として検討を行った。その結果をTable 1~3に示した。

TABLE I. Removal of the Z(OMe) Group from Z(OMe)-Lys(Z)-OH

in AcOH		Product								
		60 min			3 hr			24 hr		
		Z	Z	Lys	Z	Z	Lys	Z	L	Lys
		pMZ-Lys	Lys		pMZ-Lys	Lys		pMZ-Lys	Lys	
MSA	4 N	0	100	0	0	100	0	0	47.4	52.6
	2 N	0	100	0	0	100	0	0	72.9	27.1
	1 N	0	100	0	0	100	0	0	92.2	7.8
	0.5 N	0	100	0	0	100	0	0	0	0
	0.1 N	23.6	76.4	0	6.6	93.4	0	0	100	0
	0.05 N	58.5	41.5	0	11.5	88.5	0	0	100	0
	0.01 N	66.7	33.3	0	44.6	55.4	0	24.5	75.5	0
ESA	4 N	0	100	0	0	100	0	0	90.0	10.0
	2 N	0	100	0	0	100	0	0	98.0	2.0
	1 N	0	100	0	0	100	0	0	100	0
	0.5 N	0	100	0	0	100	0	0	100	0
	0.1 N	33.3	66.7	0	26.8	73.2	0	2.1	97.9	0
	0.05 N	70.9	29.1	0	51.4	48.6	0	23.1	76.9	0
	0.01 N	77.1	22.9	0	62.8	37.2	0	49.2	50.8	0
BSA or	2 N	0	100	0	0	100	0	0	100	0
Tos-OH or Mes-SA	1 N	0	100	0	0	100	0	0	100	0
Bc-8-SA or	1 N	0	100	0	0	100	0	0	100	0
Bc-10-SA										

MSA= methanesulfonic acid, ESA= ethanesulfonic acid, BSA= benzenesulfonic acid, Tos-OH= toluenesulfonic acid, Mes-SA=mesitylenesulfonic acid, Bc-8 or 10-SA= 8 bromocamphore-8 or 10-sulfonic acid

TABLE 2. Removal of the Boc Group from Boc-Lys(Z)-OH

in AcOH		Product								
		60 min			3 hr			24 hr		
		Z	Z	Lys	Z	Z	Lys	Z	Z	Lys
		Boc-Lys	Lys		Boc-Lys	Lys		Boc-Lys	Lys	
MSA	1 N	0	100	0	0	100	0	0	87.5	12.5
	0.5 N	0	100	0	0	100	0	0	100	0
	0.1 N	34.4	65.6	0	16.9	83.1	0	13.2	86.8	0
	0.05 N	52.0	48.0	0	39.1	60.9	0	20.3	79.7	0
	0.01 N	78.7	21.3	0	50.3	49.7	0	32.3	67.3	0
ESA	1 N	0	100	0	0	100	0	0	100	0
	0.5 N	32.4	67.6	0	0	100	0	0	100	0
	0.1 N	43.2	56.8	0	33.7	66.3	0	6.4	93.6	0
	0.05 N	74.5	25.5	0	46.7	53.3	0	10.1	89.9	0
	0.01 N	91.7	8.3	0	60.5	39.5	0	20.8	79.2	0
BSA or	2 N	0	100	0	0	100	0	0	100	0
Tos-OH or Mes-SA	1 N	0	100	0	0	100	0	0	100	0
Bc-8-SA or	1 N	0	100	0	0	100	0	0	100	0
Bc-10-SA										

TABLE 3. Removal of the Z(OMe) Group from Z(OMe)-Asp(OBzl)-OH

in AcOH		Product								
		60 min			3 hr			24 hr		
		OBzl		Asp	OBzl		Asp	OBzl		Asp
		pMZ-Asp	Asp		pMZ-Asp	Asp		pMZ-Asp	Asp	
MSA or ESA	4 N	0	100	0	0	100	0	0	100	0
	2 N	0	100	0	0	100	0	0	100	0
	1 N	0	100	0	0	100	0	0	100	0
BSA or Tos-OH or Mes-SA	4 N	0	100	0	0	100	0	0	100	0
	2 N	0	100	0	0	100	0	0	100	0
	1 N	0	100	0	0	100	0	0	100	0

Table より, 芳香族スルホン酸は, かなり選択性の高い良好な結果を示したが, これらは一般に結晶性の物質であり, 後処理の段階でメチレンクロリド, エーテル等で除去していく, このため, 後処理の容易さの面から 2 ~ 4 M ESA ないし MSA が良好と考えられる。これらの酸濃度で, Boc 基, Z(OMe) 基は, 室温 60 分処理で完全に除去され, この間, 側鎖官能基の保護基, Z, OBzl 基は全く安全であること, そして, これらの酸のより薄い濃度, たとえば, 0.5 M 以下では, Boc, Z(OMe) 基とも室温 60 分処理では完全に除去できない危険があることがわかった。さらに, MSA と ESA を比較した場合, ESAの方が, MSA より酸性度が多少低いので, 側鎖官能基への影響を少なくするためには, 2 ~ 4 M ESAの方が良好と判断される。続いて, 本試薬の実際のペプチド合成への応用性を検討するため, モデルペプチドとして, 1975 年, Hughes ら⁴⁰⁾により脳内モルヒネ様作用物質として発見された, 分子内に Met を含む Met-Enkephalin, および Met が Leu に置換された Leu-Enkephalin, ならびに, Lys の ε-アミノ保護基 (Z 基) との選択性を考慮して, 同年 Goldstein ら⁴¹⁾により, モルヒネ様作用物質のモデルペプチドとして Endorphin と命名された。H-Tyr-Gly-Gly-Gly-Lys-Met-Gly-OH を選り, それぞれの合成を行った。合成経過は, Fig 9, 10 に示すとおりである。

Fig. 9. Synthetic Scheme of Enkephalin

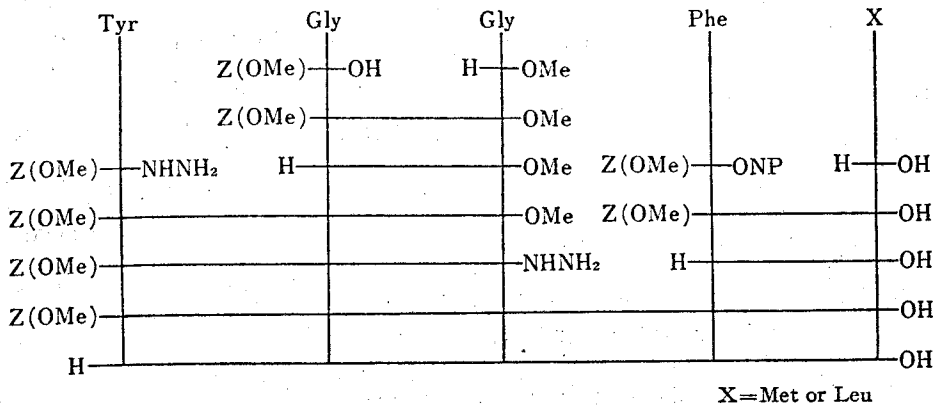
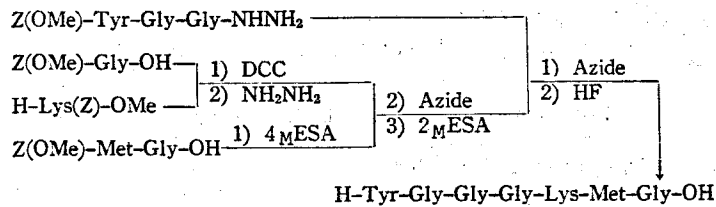


Fig. 10. Synthetic Scheme of Endorphin



すなわち、Enkephalin 類に関しては、 α -アミノ保護基として Z(OMe) 基を用い、まず、Z(OMe)-Gly-Gly-OMe を DCC 法⁴²⁾で合成し、Z(OMe) 基を 4 M ESA 処理により除去した後、Z(OMe)-Tyr-NHNH₂⁴³⁾ をアジド法⁴⁴⁾で縮合し、ついでヒドラジン処理して hydrazide とした。ここに得られた保護 tripeptide hydrazide を H-phe-X-OH (X=Met or Leu), すなわち *p*-nitrophenyl ester 法 (ONP 法)⁴⁵⁾で得た Z(OMe)-phe-X-OH を同様脱保護して得た C 末端部 dipeptide, とアジド法で縮合し、保護 Enkephalin を得た。続いて、同様に 4 M ESA 処理し、Z(OMe) 基を除去した後、陰イオン交換樹脂処理 (CG-4B, acetate form) し、酢酸塩とし、DEAE-cellulose カラムクロマトで精製して、好収率で Met および Leu-Enkephalin を得た。

Endorphin は、分子中に Lys を含み、選択的な脱 α -アミノ保護基反応を

検討するのに適当なモデルペプチドである。合成は、Fig. 10 に示したごとく、まず DCC 法により $Z(OMe)-Gly-Lys(Z)-OMe$ を合成し、ヒドラジン処理して、hydrazide とした後、これと pentachlorophenyl ester 法 (OPCP 法)⁴⁶⁾ により得た $Z(OMe)-Met-Gly-OH$ を、4 M ESA 処理して脱 $Z(OMe)$ 基した free dipeptide とを、アジド法で縮合し、保護 tetrapeptide とした。続いて、本保護 tetrapeptide より $Z(OMe)$ 基を除去するわけであるが、本品は $Lys(Z)$ を含有しているので、濃度を下げた 2 M ESA 処理で TLC 上で反応を検討しつつ $Z(OMe)$ 基を除去した。そして次に、Enkephalin 合成の際使用した $Z(OMe)-Tyr-Gly-Gly-NHNH_2$ とアジド法で縮合し、保護 Endorphin とした。続いて、HF²⁴⁾ 処理により全保護基を除去し、Amberlite CG-4B (acetate form) 処理して酢酸塩とした後、CM-cellulose カラムクロマトにて精製し、ついで Sephadex G-10 で脱塩して Endorphin を得た。

得られた合成 Met ならびに Leu-Enkephalin, Endorphin の純度をそれぞれ TLC, 元素分析, 酸分解および aminopeptidase M (AP-M)⁴⁷⁾ 酵素消化後のアミノ酸分析により確認した。又、合成品の生理活性は、京大薬学部薬理学教室の高木教授のもとで測定された結果、モルモット回腸において文献値⁴⁰⁾ とほぼ同等のものであることが判明した。

なお本合成において、2~4 M ESA の有用性を証明したわけであるが、合成上さらに新たに得られた知見として、ペプチド鎖が延長するにつれ、溶解性が低下してくると、使用してきた 2~4 M ESA の酢酸溶液では難溶となるものが生じてくる。したがって、ペプチド鎖の溶解性に応じて、種々溶媒を変化させることにより、本系を巧みに使い分けることも可能であると考えている。たとえば、Riniker ら⁴⁸⁾ は、trifluoroethanol (TFE) がペプチドの良い溶媒であることを報告しているので、後述するグルカゴン (アヒル) の合成の一部には TFE を溶媒とする 4 M ESA 系を利用した。しかし、さらに高級ペプチドに対しては、同溶媒系も溶解性が不十分であり、実用面ではなお検討の余地を残しているのが現状である。

第2項 Trp 残基における副反応の抑制法の検討

通常の希塩酸やTFAによる α -アミノ保護基脱保護の際のカチオン除去剤として、一般に用いられているのは、アニソールである。しかし、Boc-Trp-OHあるいはZ(OMe)-Trp-OHを同条件下に処理を行うと、前述したように、ピンク色の着色とともに各種の副反応物の生成がみられる。ピンク色の着色は、前述のごとくチオール類、特にEDTの添加で防止できるが、副反応の完全な抑制には至らない。そこで、前項に示した4M ESA/TFE および、比較としてTFAを用い、Boc-Trp-OHとZ(OMe)-Trp-OH 処理の際の各種スカベンジャー(10当量)の副反応抑制の添加効果を島津2波長クロマトスキャンナーで定量した。その結果をTable 4, 5に示す。なおM₁~M₃ およびB₁~B₃は、前節で述べた副反応物に相当する記号である。

Table 4. By-products derived from Boc-Trp-OH by acids.

acid	scavenger	adduct		Trp	B ₁	B ₂	B ₃	
		2% EDT	skatole					
TFA	anisole	-	-	59.4	18.9	21.9	trace	
		+	-	72.0	14.0	14.0		
		+	2 eq.	80.0	6.4	13.5		
		+	10 eq.	80.8	5.3	14.0		
	o-cresole	-	-	51.2	18.0	30.7	trace	
		+	-	61.6	15.8	22.5		
	thioanisole	-	-	67.6	9.9	22.5		
		+	-	73.6	9.7	16.7		
		+	2 eq.	80.7	5.3	18.2		
		+	10 eq.	83.5	5.0	11.5		
	dimethyl-sulfide	-	-	80.4		19.6		
		+	-	81.5		18.5		
		+	2 eq.	81.7		18.3		
4 ^M ESA	anisole	-	-	66.1	7.4	26.5	trace	
		+	-	77.3		22.7		
		+	2 eq.	79.9		20.1		
		+	10 eq.	80.2		19.8		
	thioanisole	-	-	83.9	2.7	13.5		
		+	-	96.6		3.4		
		+	2 eq.	96.8		3.2		
		+	10 eq.	97.5		2.5		
	dimethyl-sulfide	-	-	87.2		12.8		
		+	-	87.7		12.3		
		+	2 eq.	97.3		2.7		
		+	10 eq.	99.0		1.0		
				Rf	0.56	0.66	0.68	0.75

Rf; n-BuOH:AcOH:Pyr:H₂O=4:1:1:2

Table から明らかなごとく、アニソールや *o*-クレゾール系よりも thio-ether 化合物、すなわち、チオアニソールや、榊原ら²⁸⁾の推奨している dimethylsulfide が良好な結果を与えた。又、副反応物が、Trp のインドール核がカチオン等により修飾をうけることに起因することから、逆に、インドール化合物もスカベンジャー作用を有すると考えられ、3-methylindole (スカトール) をさらに添加したところ、少しではあるが抑制に改善がみられた。したがって、単一で強力なスカベンジャーの見当らない現在、各種スカベンジャーを混合して、その効果を期待するのが最良であると考えられ、EDT 含有チオアニソール (又はアニソール) + スカトール、あるいは、榊原ら²⁸⁾の EDT 含有 dimethylsulfide に、さらにスカトールを加えたスカベンジャーが適当と判断した。

さらに、作用させる酸については、4 M ESA は、TFA よりかなり良好と判断され、上記スカベンジャーを用いた場合、Boc-Trp-OH の副反応は、ほ

Table 5. By-products derived from Z(OMe)-Trp-OH by acids.

Acid	Scavenger	adduct		Trp	M ₁	M ₂	M ₃
		2% EDT	skatole				
TFA	anisole	-	-	32.5	30.0	33.8	3.8
		+	-	51.2	17.3	31.5	
		+	2 eq.	61.5	17.6	20.9	
		+	10 eq.	69.6	17.4	13.0	
	o-cresole	-	-	38.8	23.5	31.7	6.0 4.8
		+	-	42.2	26.5	26.5	
	thioanisole	-	-	71.0	7.0	22.0	
		+	-	76.4	11.8	11.8	
		+	2 eq.	76.6	7.8	15.6	
		+	10 eq.	82.6	4.2	13.2	
	dimethyl-sulfide	-	-	80.8	2.1	17.1	
		+	-	82.7	2.0	15.3	
		+	2 eq.	83.0	1.5	15.5	
4M ESA	anisole	-	-	48.3	17.4	32.0	2.3
		+	-	59.1	20.0	21.0	
		+	2 eq.	60.2	13.6	26.1	
		+	10 eq.	70.6	12.1	17.3	
	thioanisole	-	-	52.6	7.2	37.3	2.9 2.8
		+	-	56.1	2.8	38.3	
		+	2 eq.	66.0	7.0	27.0	
		+	10 eq.	82.4	3.0	15.6	
	dimethyl-sulfide	-	-	67.1	9.2	23.7	
		+	-	78.1		21.9	
		+	2 eq.	85.9	5.1	9.0	
		+	10 eq.	90.5	3.8	5.7	
			Rf	0.56	0.64	0.70	

Rf; *n*-BuOH:AcOH:Pyr:H₂O=4:1:1:2

ほぼ完全に抑制されることがわかった。しかし、 $Z(OMe)-Trp-OH$ の副反応は、上記スカベンジャーを使用しても、およそ90%の抑制にとどまり、 Trp 含有ペプチドの場合は、 Boc 基の方が、 $Z(OMe)$ 基の場合より、副反応の抑制は容易であることがわかった。したがって、後述するように、グルカゴン(アヒル)の合成に際しては、 Trp が比較的C末端部に位置するため、 Trp 含有後のペプチド区分の α -アミノ保護基には、 $Z(OMe)$ 基ではなく Boc 基を用いることとした。そして、脱 Boc 基の条件としては、つとめて4 M Et_3N / THF 系を用いようとしたのであるが、ペプチド鎖の延長とともに、難溶となり、 TFA を脱保護に使用せざるをえなかった。しかし、幸なことに、上記の EDT 含有アニソール-スカトール系を用いると、 EDT の濃度を2%から0.1%に減じたにもかかわらず、スカベンジャー量を増加(20~30当量)することにより、心配していた副反応をほとんど無視できる程度に抑制することができた。ペプチドの分子量の増加に比べ脱離する $t-Bu$ カチオンの相対的なモル濃度が低下することも好都合であった。

第 2 章 グルカゴン (アヒル) の全合成

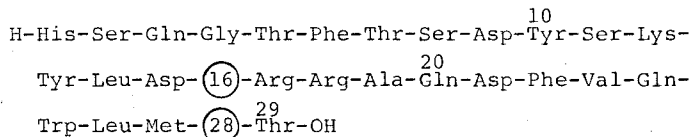
第 1 節 グルカゴンに関する従来の研究概要

第 1 項 構 造 研 究

グルカゴンの研究は、1923年、Murlin ら⁴⁹⁾が、膵臓抽出物中の血糖上昇作用物質の存在に気付く、グルカゴン (Glucagon) と命名したのに端を発し、1953年、Staub ら⁵⁰⁾は、初めて、粗製のブタ膵臓インスリン製剤より、グルカゴンを単離精製、結晶化した。続いて、1957年、Bromer ら¹⁾は、その1次構造を Fig. 11 のごとく決定した。その後、1971年には、Bromer ら²⁾はウシの、1972年には、Sundby ら⁴⁾は人の膵臓グルカゴンの構造を決定した。加えて、ラット³⁾、ウサギ⁵⁾も同一構造であることが報告されている。したがって、現在のところ哺乳動物の膵臓グルカゴンはすべて共通と考えられているが、鳥類はこれとは異なったグルカゴンを有することが明らかになってきた。すなわち、1972年、Markussen ら⁶⁾は、ガチョウグルカゴンの構造を決定し、同年 Sundby ら⁸⁾は、アヒルの、1975年、Pollock ら⁷⁾は、ニワトリのグルカゴンの構造をそれぞれ決定した。これらの構造を Fig. 11 に示すが、ニワトリとガチョウは、哺乳動物グルカゴンの 28 - Asn が Ser に置き換わった構造をしており、アヒルは、28 - Ser に加えて 16 - Ser が Thr に置換された構造となっている。これらの構造上の相違はわずかであるが、以上の研究は、動物臓器としての膵臓の比較内分泌学上に興味ある知見を加えたものである。

Fig. 11

The Structures of Glucagons from various Species



			(16)	(28)
Porcine	(Bromer	1957)	Ser	Asn
Bovine	(Bromer	1971)	Ser	Asn
Human	(Thomsen	1972)	Ser	Asn
Turkey	(Markussen	1972)	Ser	Ser
Chicken	(Kimmel	1975)	Ser	Ser
Duck	(Sundby	1972)	Thr	Ser

最近、ブタのグルカゴンに関しては、その前駆体の可能性が示唆されている⁵¹⁾が、さらに興味ある点は、以上のグルカゴンと構造類似のホルモンが消化管に存在することである。これらは、ブタ secretin⁵²⁾, vasoactive intestinal polypeptide (VIP)⁵³⁾, gastric inhibitory polypeptide (GIP)⁵⁴⁾である。参考までにその構造をFig. 12に示す。さらに免疫学的には、膵臓グルカゴン [glucagon immunoreactivity (GI)] とは異なったグルカゴン様物質 [glucagon-like immunoreactivity (GLI) 又は enteroglucagon]⁵⁵⁾ が消化管に存在することが知られている。

Fig.12. Comparison of the amino-acid sequences of glucagon, secretin, vasoactive intestinal polypeptide (VIP) and gastric inhibitory polypeptide (GIP), all of porcine origin.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13			
Glucagon	His	Ser	Gln	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Tyr	Ser	Lys	Tyr			
Secretin	His	Ser	Asp	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Glu	Leu	Ser	Arg	Leu			
VIP	His	Ser	Asp	Ala	Val	Phe	Thr	Asp	Asn	Tyr	Thr	Arg	Leu			
GIP	Tyr	Ala	Glu	Gly	Thr	Phe	Ile	Ser	Asp	Tyr	Ser	Ile	Ala			
	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29
	Leu	Asp	Ser	Arg	Arg	Ala	Gln	Asp	Phe	Val	Gln	Trp	Leu	Met	Asn	Thr
	Arg	Asp	Ser	Ala	Arg	Leu	Gln	Arg	Leu	Leu	Gln	Gly	Leu	Val		
	Arg	Lys	Gln	Met	Ala	Val	Lys	Lys	Tyr	Leu	Asn	Ser	Ile	Leu	Asn	
GIP---	Met	Asp	Lys	Ile	Arg	Gln	Gln	Asp	Phe	Val	Asn	Trp	Leu	Leu	Ala	Gln
	Gln	Lys	Gly	Lys	Lys	Ser	Asn	Trp	Lys	His	Asn	Ile	Thr	Gln		
																43

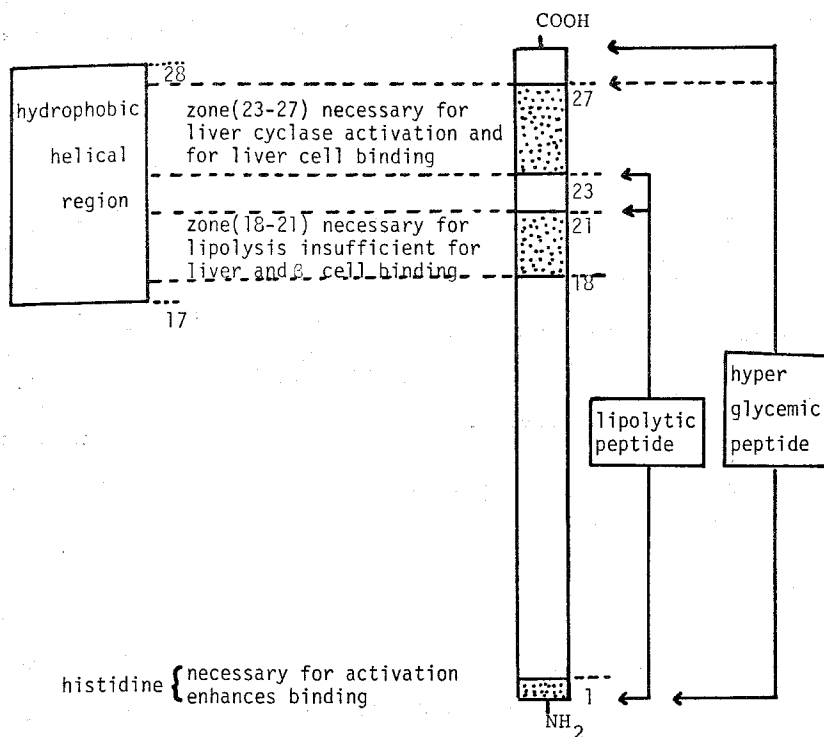
第2項 作用、活性および構造活性相関

膵臓ホルモンの一種インシュリン⁵⁶⁾は、膵臓ランゲルハンス島 β -細胞から分泌されるのに対し、グルカゴンは、同島 α -細胞より分泌される。そして、門脈を経て肝臓に運ばれ、ここにおいて主なグルカゴン作用を発現する。この作用機作に関して指導的な研究をしたのは Sutherland ら⁵⁷⁾であり、彼らは、グルカゴンはまず肝細胞膜リセプターに結合し、adenyl cyclase 活性化により c-AMP の産生を促進し、ついで、c-AMP が glycogen phospho-

rylase を活性化することにより解糖作用が促進されるという説を提唱している。これ以外にグルカゴン作用として、糖新生作用促進による血糖上昇作用、脂肪分解促進作用、心筋への作用による心搏数および心搏出量の増加作用⁵⁸⁾等が知られているが、最近加えられた重要な知見は、グルカゴンが、ランゲルハンス島 β -細胞に直接作用することにより、血糖上昇を介することなくインシュリン分泌を促進する作用⁵⁹⁾を有するらしいことであり、ホルモンとしてのグルカゴンの役割が改めて重要視されつつある。又、最近では、消化管に対する作用も検討されつつあり、同じ消化管ホルモングループの構造類似ホルモンである secretin と類似作用が指摘され、消化管の運動の抑制⁵⁸⁾、brunner 腺分泌促進⁵⁸⁾、および胆汁分泌促進⁵⁸⁾作用が知られている。さらに、gastrin 刺激による胃酸分泌を抑制するが、histamine 刺激によるものは抑制しないと言われる⁶⁰⁾。又、一方では、cholecystokinin - pancreozymin (CCK-PZ)⁶¹⁾や secretin による膵液分泌を抑制する作用を有する⁶²⁾ともいわれており、グルカゴンの作用自体が再検討されつつあるのが現状である。

グルカゴンの構造と活性との関連性に関しては、主に天然品の修飾を通じて得られた知見が多く、グルカゴン活性発現には、1位のHis 残基が重要とされ、Linら⁶³⁾は、ブタ天然グルカゴンをEdman分解⁶⁴⁾でHisを除去すると生物活性が1/50に減少すると報告しており、また、BrCN分解⁶⁵⁾によりC末部²⁸Asn,²⁹Thrを除去して得た〔Des-Asn²⁸, Thr²⁹〕(homoserine²⁷)-glucagonは、活性が1/40 ~ 1/50に低下すると報告している。さらに、Fig. 13に示すように、血糖上昇作用には、24 ~ 27位、脂肪分解促進作用には、19 ~ 21位が重要部位とされる⁶⁶⁾。

Fig. 13 Glucagon : Structure/Function Relationships

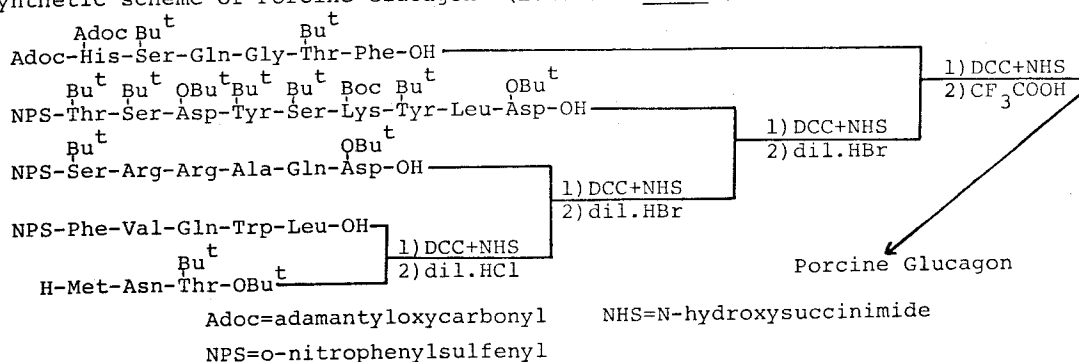


第3項 グルカゴンに関する従来の合成研究

これまでに、アヒルグルカゴン全合成の報告はみあたらないが、哺乳動物のグルカゴンに関しては、1967年 Wünsch ら⁹⁾ によって、ウシのグルカゴンがはじめて合成されている。本品の構造が決定されたのは1957年のことであり、この間、Schröder ら、Weinstein らが本品の合成を企てたが成功しなかった。このように、本品の合成が困難である理由は、接触還元を妨げる Met 残基がC末端部（27位）に存在するため、Z基をα-アミノ保護基として使用できないこと、したがってBoc基を使用して、TFAでこれを除去しつつペプチド鎖を延長するとすれば、前述したように、Trp残基に副反応が生ずることのためである。このためWünsch らは、等量の塩酸で除去できる *o*-nitrophenylsulfenyl (NPS) 基を、α-アミノ保護基として採用し、ついで、この脱離によって生ずる *o*-nitrophenylsulfenyl chloride (NPS-Cl) の Trp への副反応を、2-methylindole⁶⁷⁾ を添加することによって

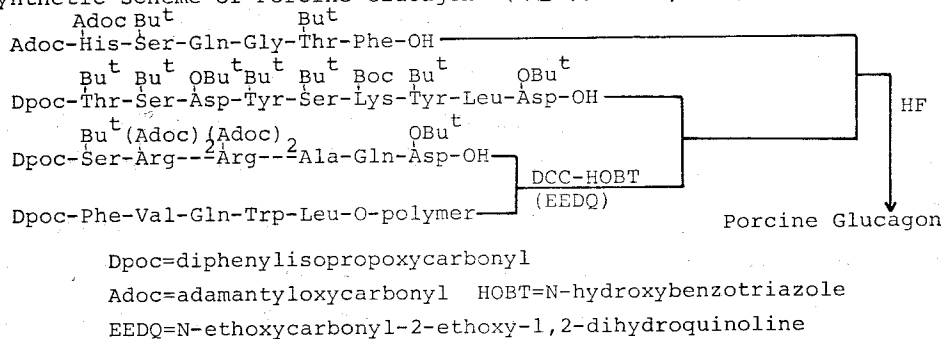
抑制しつつペプチド鎖を延長し、最終的に全保護基を T F A で除去して本品の全合成を成功し、ついでこれを結晶化した。Wünsch らの合成を Fig. 14 に示す。

Fig. 14
Synthetic scheme of Porcine Glucagon (E.Wünsch et al., 1967)



その後、1975年になって、中国上海グループが、グルカゴンの合成を報告したが¹¹⁾、これは固相上でペプチド区分を縮合する矢島、木曾ら¹²⁾の方法を採用し、ついで最終段階に H F を脱保護試薬とする方法で合成されたものである。上海グループの合成図を Fig. 15 に示す。

Fig. 15
Synthetic scheme of Porcine Glucagon (中国上海グループ, 1975)



後述する著者のアヒルのグルカゴンの合成は、矢島ら³²⁾の開発したMSAを最終段階における全保護基脱保護試薬とするものであるが、この試薬を利用し、藤野らもほぼ著者らの合成に前後し、ウシのグルカゴンの⁶⁸⁾、ついで、HF法によって、七面鳥のグルカゴンの合成⁶⁹⁾を報告した。藤野らのブタおよび七面鳥グルカゴンの合成図をFig.16, Fig. 17に示す。

Fig. 16
Synthetic Route to Porcine Glucagon (M.Fujino et al., 1978)

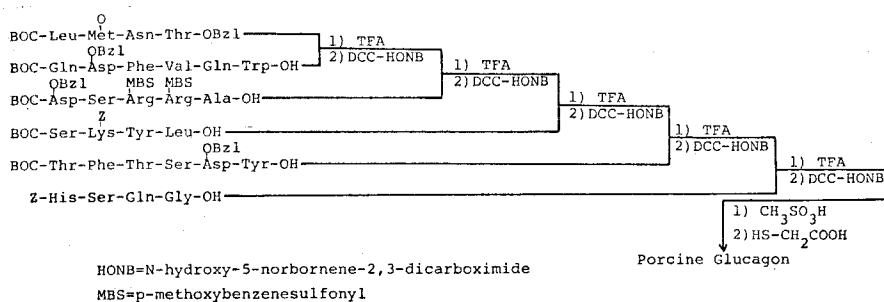
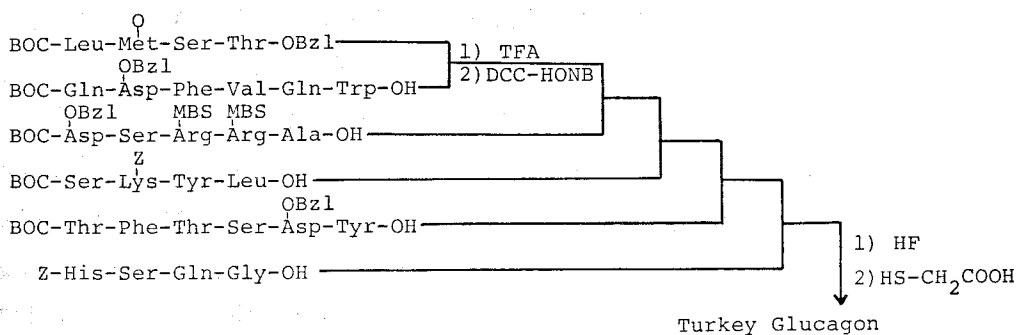


Fig. 17
Synthetic Route to Turkey Glucagon (M.Fujino et al., 1978)



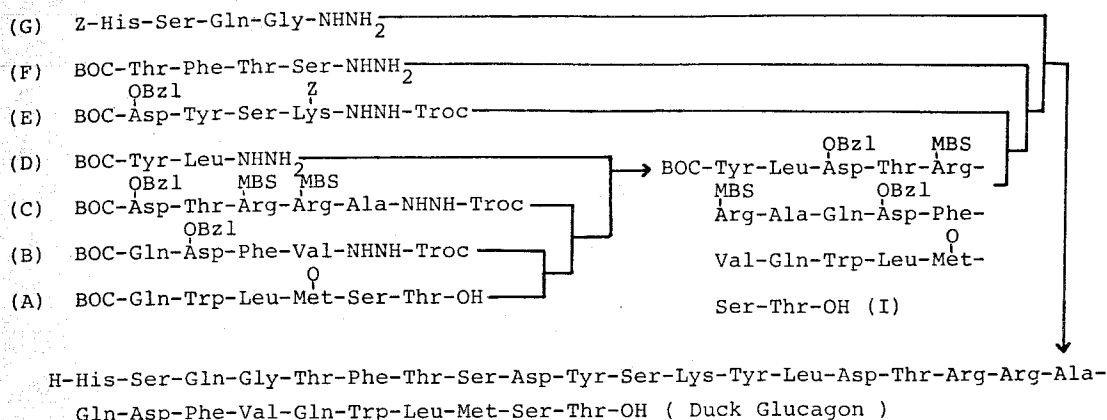
第4項 合 成 方 針

著者のアヒルのグルカゴンの合成は、前項に触れたように、MSAを合成の最終段階での脱保護試薬に用いた点で、Wünschら⁹⁾、中国上海グループ¹¹⁾のウシグルカゴンの合成と本質的に異なるものである。したがって、側鎖官能基を有するアミノ酸原料として、Asp(OBzl)、Lys(Z)を使用した。又、Argのグアニド基の保護には、これまで使用されてきた*p*-toluenesulfonyl(Tos)基⁷⁰⁾は、MSAに多少抵抗を示し、その脱保護には、40°C、60分処理という条件を必要とする³²⁾ことから、MSAによる脱保護が容易(21°C、35~40分)で、 α -アミノ保護基であるBoc、Z(OMe)基との選択性の高い*p*-methoxybenzenesulfonyl(MBS)基⁷¹⁾を採用した。そして、Ser、Thrの側鎖官能基は保護せずに合成を進めた。さらに、Metの側鎖は、MSA-アニソール系でS-アルキル化を受け、S-methyl sulfonium体が生成する副反応⁷²⁾が知られているので、過ホウ酸ナトリウム(NaBO_3)⁷³⁾を用いて、Met-スルホキシド[Met(O)]として保護し、最終的にMetに還元することとした。過ホウ酸ナトリウムは、メタ過ヨウ素酸ナトリウム(NaIO_4)とともに、スルホンを生じないスルホキシドへの良き酸化剤である。Metは、無保護のまま合成を進めると、反応や処理中、部分的な酸化を受けること、また脱保護に際し、多少の、保護基に由来するアルキルカチオンの付加、さらに前述のような副反応をうけるため、これらを防止する点からも、Met(O)として合成を進めるのが得策と判断される。

つぎに、ペプチド鎖を組み上げる方針であるが、本品は、Ser、Thrを多く含有するため側鎖水酸基へのアシル化⁷⁴⁾によるペプチド鎖の分枝を懸念し、活性エステル法による区分ペプチドの縮合法を避け、このような副反応を生ぜず、又、ラセミ化の最も少ないとされる Rudinger 変法のアジド法⁴⁴⁾により区分ペプチドを縮合することとした。そして、反応後の精製除去を容易とするため、Fig. 18に示したごとく、1-4位(フラグメントG)、5-8位(F)、9-12位(E)、13-14位(D)、15-19位(C)、20-23位(B)、そして24-29位(A)の7個の比較的小さい区分ペプチドを選んだ。そして、その中でAsp(OBzl)を含む3個の区分ペプチド(B、C、E)は、普通のエステルのヒドラジン処理により hydrazide に導くことができない⁷⁵⁾ので、これら

の区分ペプチドのC末端には、矢島、木曾によって開発された置換ヒドラジン、trichlorethyloxycarbonyl hydrazine (Troc-NHNH₂)⁷⁵⁾を用いて合成を進め、区分ペプチド合成の最終段階で、Zn-AcOH 処理することにより Troc 基を除去して、hydrazide とした後、縮合に供することとした。

Fig. 18 Synthetic route to duck glucagon



本品は、25 位に Trp を含有し、前章でのべたように Trp 残基には、TFA などの酸処理による脱 α -アミノ保護基の際、副反応が生じ、これは、Z(OMe) 基よりも Boc 基の方がその程度が少ないことがわかったので、各区分ペプチドの N 末保護基としては、フラグメント (G) を除き Boc 基を採用することにした。そして、Trp 含有ペプチド鎖からの脱 Boc 基試薬としては、溶解性の許す範囲内においては、従来の TFA に代えて、第 1 章で述べた 4 M-E SA の TFE 溶液を使用し、ペプチド鎖の延長に伴う溶解度の減少に際しては、TFA を使用することとした。なお、スカベンジャーも、従来の EDT 含有アニソールにスカトールも同時に加え、Trp 残基における副反応を抑制した。しかし、EDT の濃度は、Met(O) の Met への還元を憂慮し、2 % を 0.1 % にまで減少した。

以上のようにして、Trp はじめ各残基における各種副反応を防止しつつ、区

分ペプチドをC末端部より順次, Rudinger 変法によるアジド法で縮合し, 保護アヒルグルカゴンを得, 最終段階でMSAによりMet(O)を除く全保護基を一挙に除去し, まず〔27-Met(O)〕-グルカゴンとすることにした。グルカゴンは生理的条件下では, 溶解性が著しく低い⁷⁶⁾ことが知られているので, 溶解性の比較的高いこの〔27-Met(O)〕-体の段階で十分精製し, 最後にスルホキドを還元して, 目的物アヒルのグルカゴンを得ることとした。以上著者は, 特にTrpの副反応抑制に対して得た基礎的な実験データをもとに本合成を行った。

第2節 グルカゴン(アヒル)の13-29位

保護heptadecapeptideの合成

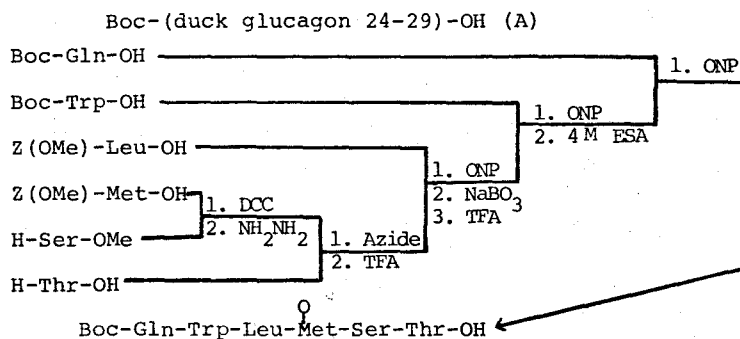
第1項 グルカゴン(アヒル)のC末端部24-29位

保護hexapeptide(A)の合成

まず本グルカゴンの哺乳動物と構造を異にするC末端heptadecapeptideの合成について述べる。本合成は, Fig. 18の(A), (B), (C), (D)の4区分ペプチドの縮合によって合成したのであるが, まず, 各フラグメントの合成について述べる。

C末端部保護hexapeptide(A), Boc-Gln-Trp-Leu-Met(O)-Ser-Thr-OHを, Fig. 19の合成図にしたがって合成した。

Fig. 19
SYNTHETIC SCHEME OF THE PROTECTED HEXAPEPTIDE.



まず、 $Z(OMe)-Met-OH$ と $H-Ser-OMe$ を、酢酸エチル($AcOEt$)-ジメチルホルムアミド(DMF)混液中、 DCC 法⁴²⁾により縮合した後、ヒドラジン処理して保護 dipeptide hydrazide とした。得られたこの hydrazide を含水 DMF 中、 $H-Thr-OH$ とアジド法で縮合し、保護 tripeptide とした。続いて、 TFA により $Z(OMe)$ 基を除去して free とし、 DMF 中で $Z(OMe)-Leu-OH$ と ONP 法⁴⁵⁾により縮合し、tetrapeptide を得た。この際、 ONP 活性エステル反応を促進するため、 N -hydroxybenzotriazole ($HOBT$)⁷⁷⁾を、アミン成分に対し1当量添加した。そして、この段階で、 Met を $Met(O)$ へ変換した。 Met の $Met(O)$ への酸化には、合成の種々の段階が考えられるが、 $Met(O)$ 含有ペプチドは、水溶性が高いこと、又、本品は、 C 末端部に親水性の Ser 、 Thr 残基を含有し、ますます水溶性が増大することから、精製の容易さを考慮して、疎水性基の導入された保護 tetrapeptide の段階を選んだ。スルホキシドへの酸化剤としては、前にも触れたように、スルホンの副生が無く、しかも反応性が高く、後処理の容易なものとして、 $NaBO_3$ ⁷³⁾を使用した。すなわち、保護 tetrapeptide のテトラヒドロフラン(THF)溶液に、 $NaBO_3$ の水溶液を加え、室温で1晩反応することにより、スルホンの副生なく保護 tetrapeptide スルホキシドを得ることができた。次に、 TFA 処理し、 $Z(OMe)$ 基を除去し、 $Boc-Trp-OH$ を DMF 中、 ONP 法で縮合して、保護 pentapeptide とした。この段階で、 α -アミノ保護基として Boc 基を採用した。すなわち、第1章で述べたように、 Trp 導入後の α -アミノ保護基の酸処理による脱保護の際の副反応は、 $Z(OMe)$ 基より Boc 基の方が比較的少ないこと、 $Boc-peptide$ の方が、溶解性が上昇することを考慮したのである。ついで、得られた保護 pentapeptide に、第1章で述べたように、スカベンジャーとして、0.1% EDT含有アニソールと、1.5当量のスカトールを加え、4M ESAの TFE 溶液処理を行い、 Boc 基を除去した後、 DMF 中、 $Boc-Gln-OH$ ⁷⁸⁾と ONP 法により縮合して保護 hexapeptide (A)とした。なお、前述のように EDTの濃度は、スルホキシドの部分還元を防止するため2%より0.1%に減少させた。生成物を TLC で精査した結果、上記条件で Trp 残基における副反応をほぼ完全に抑制することができた。

得られた保護 hexapeptide の純度を、 TLC 、元素分析、酸分解後のアミ

ノ酸分析により確認した。なお、酸分解は、従来の 6 M HCl 法⁷⁹⁾に変え、Trp の回収率を求めるため、すべて、Liu ら³¹⁾ の 4 M MSA 法により行った。さらに、Met (O) は、酸分解中、一部 Met に変換するため、Met + Met (O) の値を求めその回収率の計算を行った。

第2項 グルカゴン (アヒル) の 20 - 23 位

保護 tetrapeptide (B) の合成

ついて、Fig. 20 に示す方法で保護 tetrapeptide hydrazide (B),

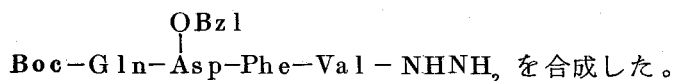
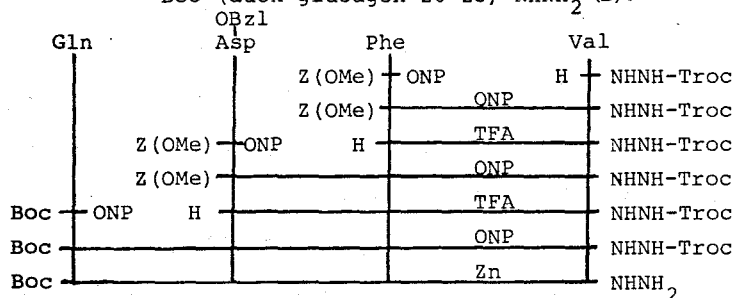


Fig. 20

SYNTHETIC SCHEME OF THE PROTECTED TETRAPEPTIDE HYDRAZIDE,

Boc-(duck glucagon 20-23)-NHNH₂ (B).



本区分ペプチドは、Asp(OBzl)を含有するため前述したTroc-NHNH₂³⁹⁾を利用し、AcOEt 中、Z(OMe)-Val-OHとTroc-NHNH₂をDCC法で縮合し、Z(OMe)-Val-NHNH-Trocを合成した。そして、TFA処理により、Z(OMe)基を除去した後、Z(OMe)-Phe-OHとTHF中、ONP

法で縮合し，保護 dipeptide Troc-hydrazide とした。以下同様に，TFA 処理と ONP 法を繰り返し，Z(OMe)-Asp(OBzl)-OH と Boc-Gln-OH⁷⁸⁾ を順次縮合し，保護 tetrapeptide Troc-hydrazide へと，ペプチド鎖を延長した。そして，DMF 中室温で 4 ～ 5 時間 Zn-AcOH 処理を行い Troc 基を除去し，DMF-AcOEt で再沈殿を 2 回くり返し，保護 tetrapeptide hydrazide (B) を得た。なお，Zn-AcOH 処理により Troc 基を除去する際，反応生成物中への Zn の混入が考えられるが，これは，反応溶液の溶媒を濃縮し，炭酸水素ナトリウム (NaHCO₃) 塩基性下，飽和の ethylenediamine tetraacetate (EDTA) 水溶液 (0.1%) 処理することにより除去した。以後，他の区分ペプチド合成の際も，Troc 基除去の際は，すべてこの方法に準じて行うこととした。

第 3 項 グルカゴン (アヒル) の 15 - 19 位

保護 pentapeptide (C) の合成

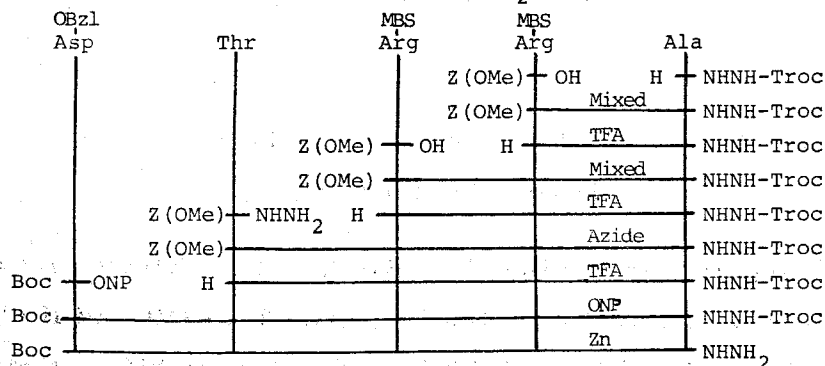
次に，Fig. 21 に，保護 pentapeptide hydrazide (C)，Boc-Asp-^{OBzl}

^{MBS} Thr-^{MBS} Arg-Arg-Ala-NHNH₂ の合成経路を示す。

Fig. 21

SYNTHETIC SCHEME OF THE PROTECTED PENTAPEPTIDE HYDRAZIDE.

Boc-(duck glucagon 15-19)-NHNH₂ (C).



本品もまた Asp(OBzl) を含有するため, Troc-NHNH₂ を利用し, これを THF 中, Z(OMe)-Ala-OH と DCC 法により縮合し, Z(OMe)-Ala-NHNH-Troc を得た。そして, Z(OMe) 基を TFA で除去しつつ, step-wise に, 2 個の Arg(MBS) を, THF 中, isobutylchloroformate を用いた混合酸無水物法 (mixed anhydride 法, MA 法)⁸⁰⁾ により縮合し, 保護 tripeptide Troc-hydrazide とした。なお, 本保護ペプチドは結晶性が悪く, *n*-ブタノール (*n*-BuOH) を用い結晶化を行い, ついで 10% クエン酸水溶液と 5% -NaHCO₃ 水溶液, 水による batchwise 洗浄後, メタノール (MeOH) と *n*-BuOH より再結晶を行って精製することができた。次に, Z(OMe) 基を TFA で除去し, DMF 中, Z(OMe)-Thr-NHNH₂⁸¹⁾ をアジド法で縮合した。この際も結晶性が悪く, *n*-プロパノール (*n*-PrOH) を用いて結晶化を行い, 保護 tripeptide の場合と同様 batchwise に洗浄後, MeOH と *n*-PrOH より再結晶を行った。そして, TFA で Z(OMe) 基を除去後, Boc-Asp(OBzl)-OH を ONP 法で縮合した。ついで, 前項に述べたように, DMF 中, Zn-AcOH 処理することにより Troc 基を除去し, 保護 pentapeptide hydrazide を得た。しかし, 今回は, Zn-AcOH 処理の時間が長くなるにつれ, TLC 上不明の spots が出現した。これは, Arg(MBS) 含有ペプチドの場合に限りみられることから, Arg(MBS) に基因する副反応であると考えられるが詳細は不明である。したがって, 反応時間を 2~3 時間とし, 少量生成する副反応物および未反応物を, THF-AcOEt, ついで THF-エタノール (EtOH) により再沈殿を繰り返すことにより除去し, 57% の収率で, TLC, 元素分析, 酸分解後のアミノ酸分析により, 純度の確立した保護 pentapeptide hydrazide を得た。

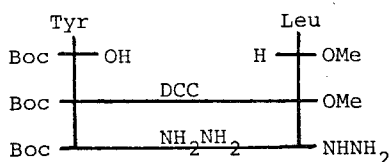
第 4 項 グルカゴン (アヒル) の 13-14 位

保護 dipeptide (D) の合成

保護 dipeptide hydrazide (D), Boc-Tyr-Leu-NHNH₂ の合成は, Fig 22 に示した方法に従って, DMF 中, Boc-Tyr-OH · DCHA⁸²⁾ と HCl·H-Leu-OMe を DCC 法で縮合し, 得られた油状物質を, 精製するこ

となく，MeOHに溶解して，ヒドラジン処理し，得られた結晶をMeOHとEtOHで再結晶して行った。

Fig. 22
SYNTHETIC SCHEME OF THE PROTECTED DIPEPTIDE HYDRAZIDE,
Boc-(duck glucagon 13-14)-NHNH₂ (D).

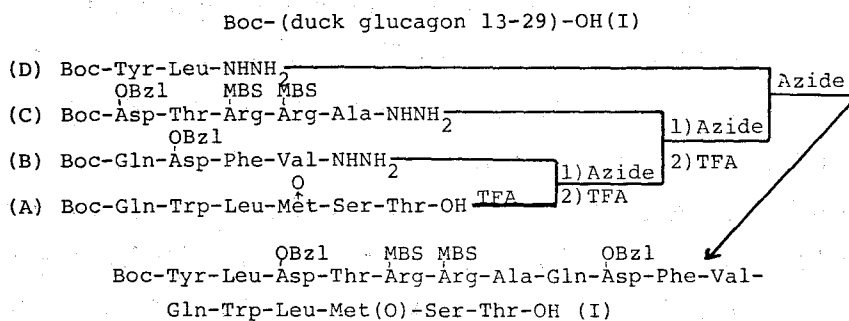


第5項 グルカゴン（アヒル）の13-29位 保護 heptadecapeptide の合成

第1～4項で得られた4個の区分ペプチドをFig. 23に示す方法で順次縮合し，保護 heptadecapeptide (I)とした。まず，第1項で得られた保護 hexapeptide (A)を，前述の4 MESAのTFE溶液によりBoc-基の除去を試みたが，本TFE溶液に区分ペプチド(A)が難溶のため，この方法を断念し，TFA処理によって，Boc基を除去した。この際，第1章で述べた0.1% -EDT含有アニソール(10当量)＋スカトール(1.5当量)系のスカベンジャーを使用すると，着色もなく，又，TLC上副反応なく脱保護反応が進行することが観察された。すなわち，前述のようにペプチドの分子量の増大によって脱離するt-Buカチオンのモル濃度が減少し，これと使用するスカベンジャーの相対的な増加が副反応を抑制するに有効になったものと判断される。こうして得た遊離 hexapeptideを，スカベンジャー等を除去するため，無水エーテルで十分に洗浄した後，第2項で得られた区分ペプチド(B)と，DMF中アジド法で縮合した。そして，5% -クエン酸水溶液と水で，batchwiseに洗浄後，DMF-AcOEtで2回再沈殿を繰り返し，保護 decapeptideを得た。ついで，この保護 decapeptideを，0.1% -EDT含有アニソール(14

当量)ースカトール(1.5当量)存在下, T F A 処理し, Boc 基を除去し, free decapeptide となし, これを第3項で得られた区分ペプチド(C)と, アジド法で縮合した。そして生成物を, 10%クエン酸水溶液と水で batchwise に洗浄後, DMF-EtOHで再沈殿し, 保護 pentadecapeptide を得た。なお, この縮合の際, アミン成分である free decapeptide が難溶なため, N-メチルピロリドン(NMP)とDMFの混液を反応溶媒として使用した。以後, ペプチド鎖の延長につれ溶解度が減少してくることが考えられるので, 区分ペプチド縮合の際には, 本混合溶媒を使用することとした。続いて, この保護 pentadecapeptide を, 0.1%-EDT含有アニソール(30当量)ースカトール(2当量)存在下, T F A 処理して得られた free 体に, 第4項よりの保護 dipeptide (D) をアジド法により縮合し, 常法 batchwise 洗浄後, DMF-AcOEtで2回再沈殿を繰り返し, 保護 heptadecapeptide (I) を得た。なお, 各縮合段階において得られた保護ペプチドの純度を, そのつど, T L C, 元素分析, 酸分解後のアミノ酸分析により確認した。

Fig. 23 Synthetic scheme of the protected heptadecapeptide



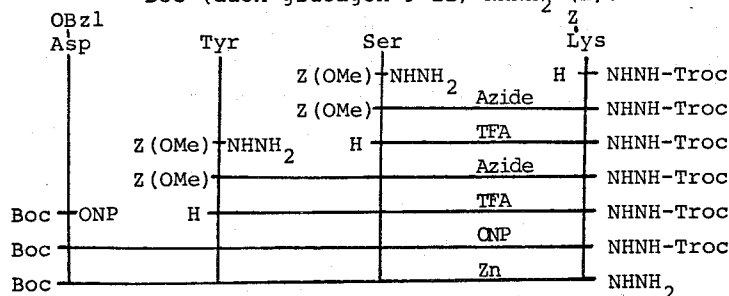
第3節 グルカゴン（アヒル）の全合成

第1項 グルカゴン（アヒル）の9-12位

保護 tetrapeptide (E) の合成

まず、保護 tetrapeptide hydrazide (E) を、Fig. 24 に示す合成図に従って合成した。

Fig. 24
SYNTHETIC SCHEME OF THE PROTECTED TETRAPEPTIDE HYDRAZIDE,
Boc-(duck glucagon 9-12)-NHNH₂ (E).

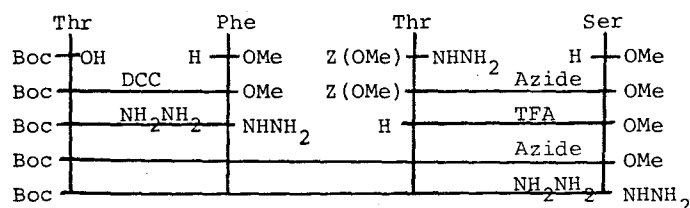


本区分ペプチドは、Asp (OBzl) を含有するため、まず Troc-NHNH₂ を用いて、Z(OMe)-Lys(Z)-NHNH Troc を合成し、これを出発原料とし、合成を進めた。そして、TFA処理により、Z(OMe) 基を選択的に除去しつつ、Z(OMe)-Ser-NHNH₂⁸¹⁾ ついで、Z(OMe)-Tyr-NHNH₂⁴³⁾ をアジド法で、Boc-Asp(OBzl)-OHをONP法で縮合し、保護tetrapeptide Troc-hydrazideとした。次に、DMF中、Zn-AcOH処理し、Troc基を除去して、前述のごとくEDTA水溶液処理後、MeOHより再結晶して、保護tetrapeptide(E)を得た。得られた区分ペプチド(E)の純度をTLC、元素分析、酸分解後のアミノ酸分析で確認し、以下の縮合反応に用いた。

第2項 グルカゴン（アヒル）の5-8位
保護 tetrapeptide (F) の合成

次に, Fig. 25 に示す方法で保護 tetrapeptide hydrazide (F) の合成を行った。

Fig. 25
SYNTHETIC SCHEME OF THE PROTECTED TETRAPEPTIDE HYDRAZIDE,
Boc-(duck glucagon 5-8)-NHNH₂ (F).

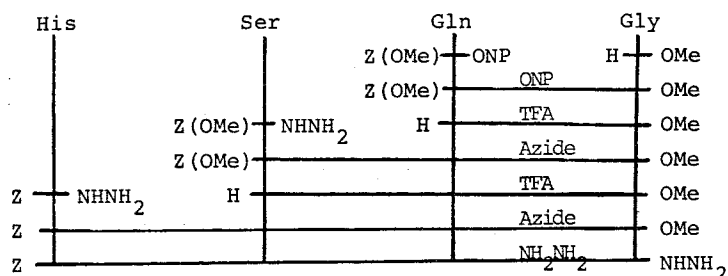


DMF 中, Boc-Thr-OH · DCHA⁸³⁾ と HCl · H-Phe-OMe を DCC 法で縮合し, 精製することなく, EtOH に溶解し, ヒドラジン処理して保護 dipeptide hydrazide とした。この際に, 別法として, Boc-Thr-NHNH₂ と HCl · H-Phe-OMe とのアジド法による合成法も検討を行ったところ, Boc-Thr-OMe (油状物) を MeOH 中, ヒドラジン処理すると, TLC 上に多量の副反応物の生成が認められ, したがって, Boc-Thr-NHNH₂ の収率が悪くこの方法は断念した。しかし, Z(OMe)-Thr-NHNH₂ は収率よく得られるので, DMF 中, Z(OMe)-Thr-NHNH₂ と HCl · H-Ser-OMe をアジド法により縮合し, 保護 dipeptide methyl ester, Z(OMe)-Thr-Ser-OMe を得, ついで TFA 処理し, Z(OMe) 基を除去し free 体とした。そして, 上記の 2 つの dipeptide units を, DMF 中アジド法で縮合し, 生成物を 10% クエン酸と水で batchwise に洗浄後, MeOH-AcOEt で再結晶して精製した。ついで, MeOH に溶解し, ヒドラジン処理して保護 tetrapeptide hydrazide (F) とした。得られた区分ペプチド (F) の純度を, TLC, 元素分析, 酸分解後のアミノ酸分析により確認した。

第3項 グルカゴン（アヒル）の1-4位 保護 tetrapeptide (G) の合成

1-4位の保護 tetrapeptide hydrazide (G) の合成を, Fig. 26 に示す方法で行った。すなわち, 含水DMF中, $\text{HCl} \cdot \text{H-Gly-OMe}$ に Z(OMe)-Gln-OH をONP活性エステル法で縮合し, 保護 dipeptide methyl ester とした。そして, TFAで Z(OMe) 基を除去しつつ, stepwiseに $\text{Z(OMe)-Ser-NHNH}_2^{81)}$, $\text{Z-His-NHNH}_2^{84)}$ を順次, アジド法で縮合した。得られた保護 tetrapeptide methyl ester を, MeOHに溶解し, ヒドラジン処理して相当する hydrazide (G) とした。そして, 純度を確認後, 以下の縮合反応に使用した。

Fig. 26
SYNTHETIC SCHEME OF THE PROTECTED TETRAPEPTIDE HYDRAZIDE,
 $\text{Z-(duck glucagon 1-4)-NHNH}_2$ (G).

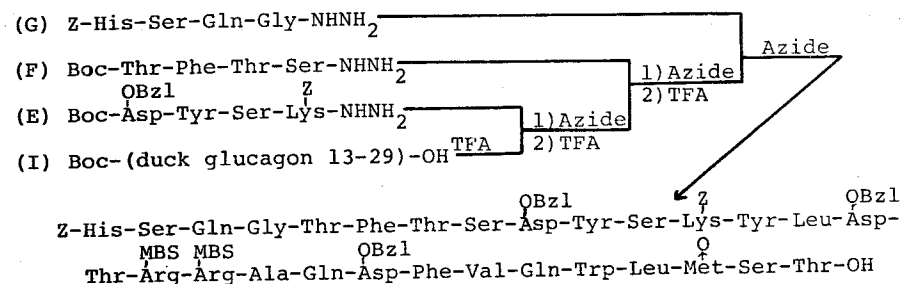


第4項 保護グルカゴン（アヒル）の合成

本項に, 前節で得られた保護 heptadecapeptide (I), Boc-Tyr-Leu-OBzl MBS MBS OBzl
 $-\text{Asp-Thr-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu}-$

$\begin{array}{c} \text{O} \\ | \\ \text{Met-Ser-Thr-OH} \end{array}$ [Boc-(duck glucagon 13-29)-OH], を出発物質とし、これに本節第 1 ~ 3 項に述べた区分ペプチド (E), (F), (G) を順次縮合して得られる保護基のついたグルカゴン (アヒル) について述べる。その合成図を Fig. 27 に示す。

Fig. 27 Synthetic scheme of the protected duck glucagon.



すなわち、前節より得られた保護 heptadecapeptide に、0.1% EDT 含有アニソール (35 当量) - スカトール (2 当量) 系スカベンジャーを添加して TFA 処理し、Boc 基を選択的に除去した後、NMP-DMF 混合溶媒に溶解し、保護 tetrapeptide hydrazide (E) とアジド法で縮合した。ついで、常法通り batchwise 洗浄を行い、DMF-EtOH で再沈殿を繰り返し、TLC 上単一スポット、元素分析、酸分解後のアミノ酸分析が理論値とよく一致する、保護 heneicosapeptide を得た。次に本保護ペプチドを、0.1% EDT 含有アニソール (45 当量) - スカトール (2 当量) 存在下、常法 TFA 処理で Boc 基を除去した後、NMP-DMF 混媒中、第 2 項よりの区分ペプチド (F) とアジド法で縮合した。ついで常法 batchwise 洗浄後、DMF-EtOH で再沈殿を繰り返し、純度の確定した保護 pentacosapeptide を得ることができた。さらに、上記保護 pentacosapeptide を、0.1% EDT 含有アニソール (60 当量) - スカトール (2 当量) 存在下、TFA 処理して free とし、第 3 項よりの区分ペプチド (G) とアジド法で縮合した。そして、生成物を常

法通り batchwise 洗浄後, DMF-EtOH で再沈殿を繰り返し, 保護アヒルグルカゴンを得た。本品は, 各種TLC展開溶媒系において単一スポットを示し, 又, 元素分析, 酸分解後のアミノ酸分析も理論値とよく一致する値を示した。

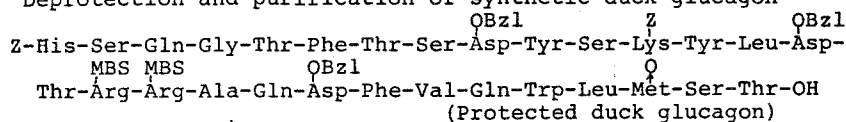
第5項 グルカゴン(アヒル)の全合成

— 脱保護と精製 —

前項で得られた保護グルカゴン(アヒル)に, アニソール(80当量)とスカトール(5当量)をスカベンジャーとして添加し, 全保護基を除去するため, MSA処理を最初氷冷下15分, ついで室温で45分行った。MSAを高級ペプチドの最終段階における全保護基の脱保護試薬として使用するのには, 本実験が最初の例であるが, モデルアミノ酸を用いる基礎実験³²⁾から判断すると, 上記条件下に, Met(O)を除く, 合成に使用したすべての保護基は完全に除去されたと判断される。MSA処理後, 生成物を氷冷下に, エーテルを加えて沈殿させ, エーテルで十分に洗浄後, Fig. 28に示す順序で精製した。

Fig. 28

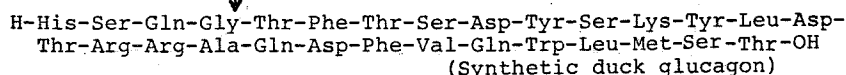
Deprotection and purification of synthetic duck glucagon



- 1) MSA-anisole-skatole
- 2) Amberlite CG-4B (acetate form)
- 3) 0.5 M NH_4OH (0°, 30min)
- 4) Sephadex G-25 fine (0.5% AcOH)
- 5) CM-cellulose (gradient, 0.06M- NH_4OAc , pH6.9)

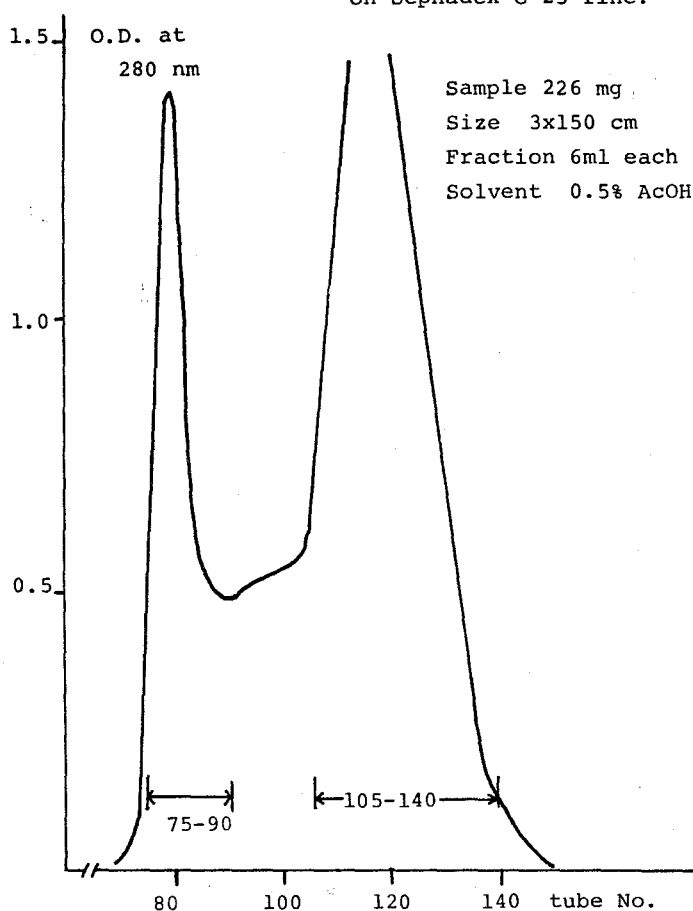
[27-Met(O)]-duck glucagon

- 1) mercaptoethanol (45°, 48hr)
- 2) Sephadex G-25 fine (0.5% AcOH)



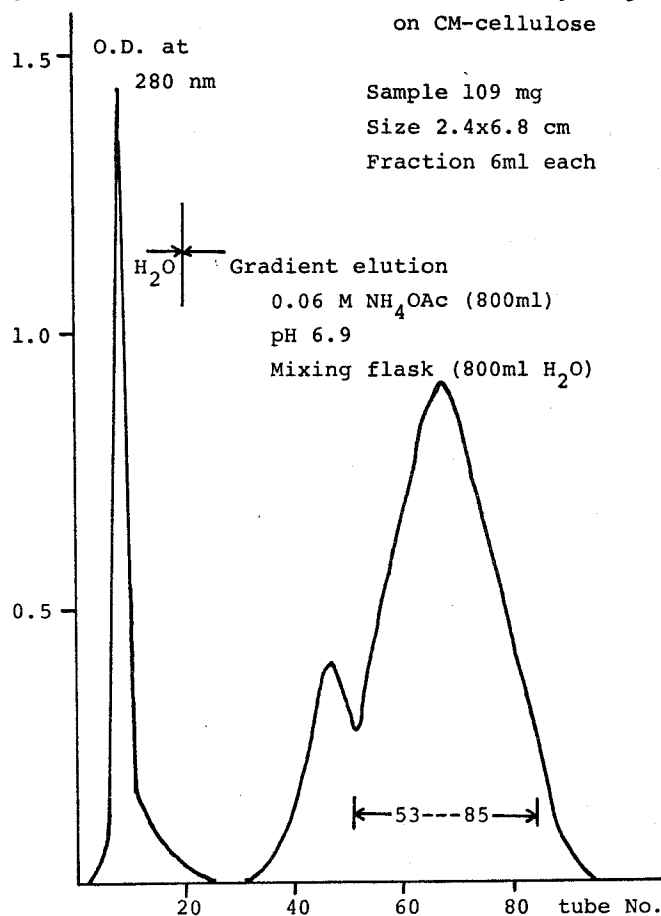
まず、沈殿を水に溶解し、Amberlite CG-4B (acetate form) 処理を行い、酢酸塩に変換した。本品は、Ser, Thr 残基を多く含有しており、MSA 処理の際、これらの残基における $N \rightarrow O$ 転位⁸⁵⁾ が生成する可能性があるが、同様の反応は HF 処理の際にも報告されており、これは、希アルカリの処理で可逆的にもとにもどることも知られている⁸⁶⁾ ので、0.5 M NH_4OH 処理を氷冷下 30 分行った後、直ちに凍結乾燥した。そして、0.5% - AcOH を溶出液として、Sephadex G-25(fine)を通してゲル濾過を行い、280 nm による吸光度測定より、Fig. 29 に示す溶出曲線が得られた。

Fig. 29 Purification of [27-Met(0)]-duck glucagon on Sephadex G-25 fine.



この図において、最初のピーク (tube No. 75-90) より得られた物質は水に難溶であり、その本体は不明であるが、このような分離パターンが, Wü-nsch ら⁹⁾ の合成の際にも記載されている。恐らく、合成の際、あるいは脱保護の際十分抑制できなかった Trp 又は, Tyr 残基に起因する副反応物であると考えているが、精査は行わなかった。そして、主フラクション (tube No. 105-140) を集め、凍結乾燥して、〔27-Met(O)〕グルカゴンを得た。続いて、Met(O)を還元してグルカゴン自体として精製するのが一方法であるが、哺乳動物のグルカゴンは多少水に難溶であることが知られており⁷⁰⁾、したがって構造類似の本品についても、その精製に制約が加わることが考えられる。このため、比較的水に溶解性の高い〔27-Met(O)〕体で十分な精製を行うこと

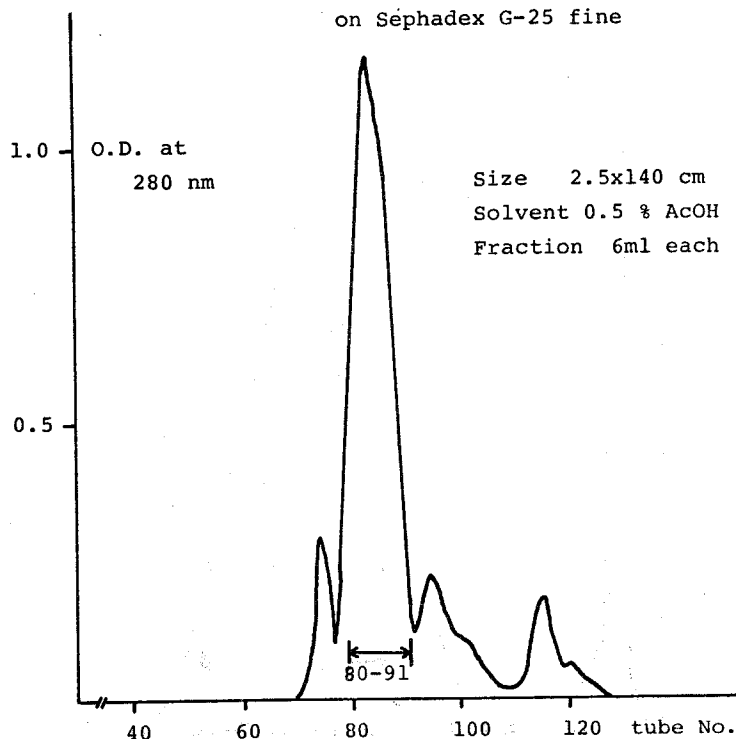
Fig. 30 Purification of [27-Met(O)]-duck glucagon
on CM-cellulose



とした。すなわち、Sephadex G-25 の精製で得られた主画分を水に溶解し、CM-セルロースイオン交換クロマトに apply し、 $0.06\text{M-NH}_4\text{OAc}$ (pH 6.9) buffer の linear gradient により溶出して精製を行った。そして、 280 nm における吸光度測定したところ、Fig. 30 に示す溶出曲線が得られた。

この目的物画分 (tube No. 53-85) を集め、凍結乾燥し、ここに白色羽毛状の [27-Met(O)]-グルカゴン (アヒル) を得た。ついで、Met(O) 残基を還元するため、少量の水に溶解し、メルカプトエタノール⁸⁷⁾で 45°C , 48時間 incubate した。この際の還元の進行を、TLC 上、Met 試薬⁸⁸⁾および Rf 値の変化により追跡した。そして還元終了後、Sephadex G-25 (fine) に apply し、 $0.5\%-\text{AcOH}$ で溶出して、還元剤および塩類を除き、目的物のアヒルグルカゴンを得た。脱塩カラムにおける溶出パターンを Fig. 31 に示す。

Fig. 31 Purification of synthetic duck glucagon
on Sephadex G-25 fine



ついで、得られた合成品を、Wünsch ら⁹⁾の方法にならい、0.02% — NaCl 水溶液に懸濁した後、pH 8.5 に adjust することにより結晶化を行い、Fig. 32 に示す結晶状の合成グルカゴンを得ることができた。

Fig. 32

CRYSTALS OF SYNTHETIC DUCK GLUCAGON.

suspended in 0.02% — NaCl
dissolved by 0.1M NaOH at pH 10.5
adjusted pH 8.5 by 0.1M HCl
stood at room temp. overnight
stored at 4° for 3 days



(x 300)

得られた合成アヒルグルカゴンは、各種TLC展開溶媒上単一スポットを示すとともに、pH2.3における15%一分離用ポリアクリルアミドDisc電気泳動、ならびに、Ampholine(pH3.5-10, LKB)を使用したポリアクリルアミドDisc等電点電気泳動⁸⁹⁾において、鋭い単一バンドを示し(Fig. 33), その純度の高いことを確認した。

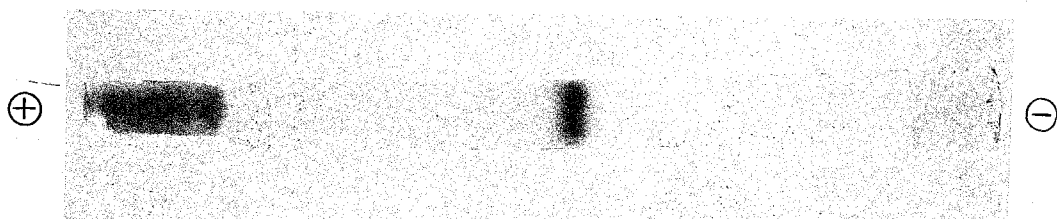
Fig. 33

Disc electrophoresis of synthetic Duck Glucagon

15% polyacrylamide gel (0.5×6.0 cm)

buffer: 0.37M Glycine, pH2.3

5mA/tube, 2hr. Amido black 10B stain.



Disc isoelectrofocusing of synthetic Duck Glucagon

2% Ampholine LKB 1809-101 (pH 3.5-10)

(+) 0.2% H₂SO₄ (-) 0.4% ethylenediamine

1mA/tube, 1hr, 100 v, 1hr,

tube 0.5×6.0 cm, Coomassie Brilliant Blue G-250 stain.

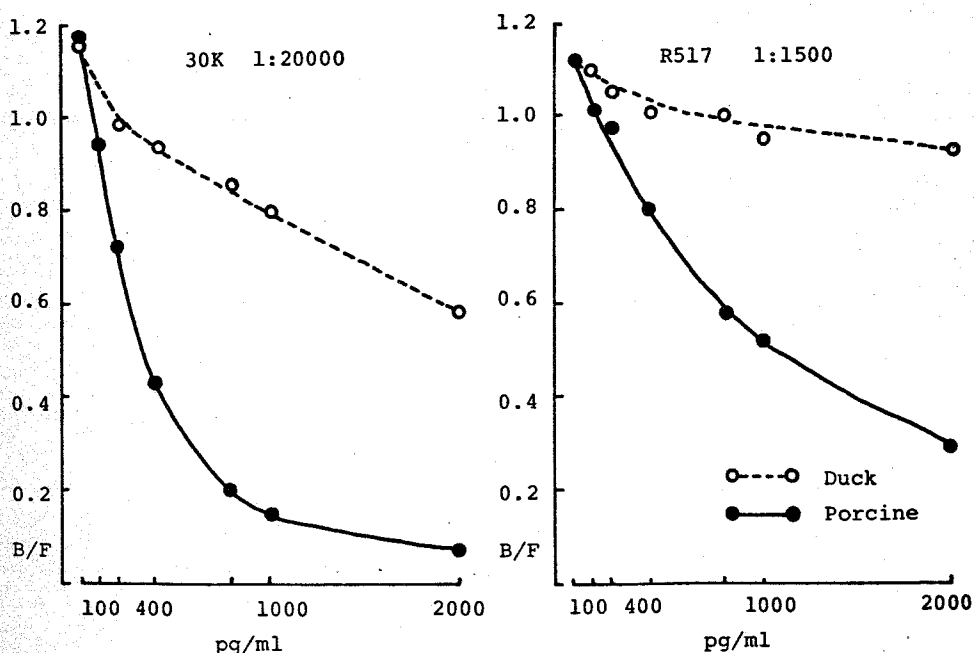


又、4M MSAによる酸分解、および、aminopeptidase M(AP-M) 酵素消化⁴⁷⁾後のアミノ酸分析は、いずれも理論値とよく一致する値を示した。特に、後者の酵素消化後のアミノ酸分析値から、本合成に使用したMSAが、前記の処理中、期待通り各種の保護基を十分に切断除去したことを確認することができた。さらに、本精製品中のTrpの回収率は高く、本合成におけるTrp副反応抑制法の成果をよく物語っていると思われる。

第6項 合成グルカゴン(アヒル)の生物活性

第5項で得られた合成アヒルグルカゴンの生物活性を、ラット(Sprague-Dawley rat)の脂肪組織における脂肪分解促進作用の測定により検討(武田薬工生物研究所, 岩塚博士実施)した結果、天然(ブタ)グルカゴン(Sig-

Fig. 34 Displacement of ^{125}I -Glucagon from Different Antisera by Porcine and Duck Glucagon



ma G-4250)と同程度の活性を有することがわかった。又、免疫学的性質は、天然(ブタ)グルカゴンに対して得られた2種の抗血清(30K⁹⁰, R517)に対する合成グルカゴン(アヒル)の交差反応性を調べた(京都大医学部, 桜井博士実施)結果, Fig. 34 に示すように天然(ブタ)グルカゴンと比較し, その交差反応性は低く, 30Kに対しては, 約46%, R517 に対しては, 約20%であった。すなわち, 哺乳動物と鳥類(アヒル)のグルカゴンは, 構造的に非常に近似したものであるが, 免疫的にはかなり異った性質を示すことがわかった。

結

語

ここに著者は、従来のHF法にかわる最終段階における全保護基の除去試薬として、初めてMSAを使用し、アヒルグルカゴンの全合成に成功することができた。特に、合成途上におけるTrp残基の副反応に関連して、あらかじめ、Trpに生ずる副反応物を解明するとともに、その抑制法に検討を加えたことは、Trp残基を含有する一般のペプチドの合成に有用な知見を加えたものと考ええる。

また、アヒルグルカゴンは哺乳動物グルカゴンと構造が非常に類似しているにもかかわらず、免疫学的挙動が大きく違う点、非常に興味をもたれるところであり、さらに、これらグルカゴン以外に、構造類似の消化管ホルモンとしてGIP, VIP, セクレチン等の存在が知られているので、著者の合成は膵臓消化管系の比較内分泌学的研究に資するところあるものと考えている。

謝 辞

終りに臨み，本研究に際して終始御懇篤なる御指導，御鞭達を賜わった恩師矢島治明教授に心から感謝の意を表します。

また，種々有益な御助言，御便宜を賜わった入江寛助教授，ならびに数多くの御助言，御激励の言葉を賜わった徳島大学薬学部木曾良明助教授に深く感謝いたします。

さらに実験に協力された藤井信孝助手はじめ薬品製造研究室諸氏，ならびに杉浦正典氏に感謝いたします。

Enkephalin 類の生物活性を測定頂いた京都大学薬学部高木博司教授ならびに同教室の諸氏に感謝いたします。

アヒルグルカゴンの生物活性を測定された武田薬品工業生物研究所の藤野博士，岩塚博士，そして radioimmunoassay をしていただいた京都大学医学部桜井英雄，津田謹助両博士に感謝いたします。

さらにまた，mass スペクトルを測定された新潟薬科大学加藤旭助教授，NMR スペクトルを測定された京都大学薬学部黒田義弘助手，山口律子技官，そして元素分析をされた京都大学元素分析センターの方々に感謝いたします。

電気泳動を御指導頂いた京都大学薬学部林恭三助教授，古川昭栄修士に感謝いたします。

実 験 の 部

実 験 の 部

融点 (mp) は、柳本微量融点測定器で測定し、すべて未補正。旋光度は、Union Automatic Digital Polarimeter PM-101 で測定した。

ペプチドの酸加水分解は、第1節では、Liu ら³⁰⁾ の 3M Tos-OH を用い、第2節では、Trp の回収率を知るため、すべて、Liu ら³¹⁾ の、4M MSA を用いて行った。(3M Tos-OH では、減圧封管後、110°C, 18hr 加熱。4M MSA では、減圧封管後、110°C, 22hr 加熱。)

ペプチドの酵素消化には、Röhm & Hass Co. から購入した aminopeptidase M (AP-M) を使用し、窒素置換後、37.5°C, 24hr incubate した。

酸加水分解物および酵素消化物のアミノ酸組成は、Moore らの方法⁹⁾ にしたがって、Hitachi Amino Acid Analyzer KLA-5 型で測定した。

NMR スペクトルは、Varian A-60 Spectrometer, HA-100 Spectrometer を使用し、tetramethylsilane (TMS) を内部標準として測定した。

Mass スペクトルは、TMS-01 SG-2 Spectrometer (Japan Electron Optics), IR スペクトルは、Hitachi Grating Infrared Spectrophotometer 215 を使用して測定した。

薄層クロマトグラフィー (TLC) は、Kiesel Gel G nach Stahl (Merck 社) を用いて調製し、以下の溶媒系で展開した。

Rf₁ : CHCl₃ : MeOH : H₂O = 8 : 3 : 1 ,

Rf₂ : CHCl₃ : MeOH = 9 : 1 ,

Rf₃ : n-BuOH : AcOH : Pyr : H₂O = 4 : 1 : 1 : 2 ,

Rf₄ : n-BuOH : AcOH : Pyr : H₂O = 30 : 6 : 20 : 24 ,

Rf₅ : n-BuOH : AcOH : Pyr : H₂O = 30 : 20 : 6 : 24 ,

Rf₆ : n-BuOH : AcOH : AcOEt : H₂O = 1 : 1 : 1 : 1 ,

Rf₇ : n-BuOH : AcOH : H₂O = 4 : 1 : 5 (上層) .

なお、溶媒比はすべて v/v % であり、CHCl₃ は、EtOH を 2% 含有するものをそのまま使用した。

TLCの発色の定量には、Shimadzu Dualwave length TLC scanner CS-900, recorder U-225 MCSを使用した。

シリカゲルカラムクロマトグラフィーには、Kiesel Gel 60 (Merck 社)を用いた。

イオン交換カラムクロマトには、CM-Cellulose (Whatman CM23) およびDEAE-Cellulose (Brown社 standard) を、ゲル濾過カラムクロマトには、Sephadex G-10 (Pharmacia Co.) ならびにSephadex G-25 fine (Pharmacia Co.)を用い、東洋科学製フラクションコレクターSF-200Aで分画し、吸光度を、Hitachi Model 100-20 Spectrophotometer で測定した。

イオン交換樹脂は、Amberlite CG-4B type II を使用し、Röhm & Hass Co. から購入した。

アジド反応は、すべてRudingerの変法⁴⁴⁾に従って、低温室(4°C)で行った。

4M ESA/TFE ならびにTFA処理は、特記しない場合はすべて、氷冷下無水条件で60min 行った。特に、Trp 含有後の処理はすべて窒素置換して行った。

実験操作中、溶媒の濃縮、留去は、特記しない場合はすべて、40°~50°Cで行った。

エーテル、THF、ジオキサン等過酸化物を含みやすい溶媒は、 LiAlH_4 を加えて蒸留し、 FeSO_4 を加え、窒素ガスで封じたものを使用した。

溶媒の乾燥(抽出時)には、特記しない場合は、すべて無水芒硝(Na_2SO_4)を用いた。

第 1 章 に関する実験

第 1 節 に関する実験

Boc-Trp-OH に由来する副反応物の単離

Boc-Trp-OH (3.04 g) に, 2% EDT 含有アニソール (2.2 ml, 2 eq.) を加え氷冷下常法 TFA 処理を行う。ついで 25°C で TFA を減圧留去。残渣に *n*-hexane を加えて decant. 3 回。残渣を AcOEt に溶解し, 水で 5 回洗浄後, AcOEt 層を乾燥し, ついで減圧留去する。残渣を少量の CHCl_3 : MeOH:H₂O = 8:3:1 の溶媒系に溶解し, シリカゲルカラムクロマト (2.0 × 35 cm) に apply する。同一の溶媒系で溶出し, さらに再クロマトを行って 4 種の副反応物 ($B_1 \sim B_4$) を単離した。

収量 B_1 : 24 mg (R_{f1} 0.31) B_2 : 50 mg (R_{f1} 0.40)
 B_3 : 10 mg (R_{f1} 0.45) B_4 : 1 mg (R_{f1} 0.51)

i) B_1 : H-Trp (2' or 5' or 7'-mono-Bu^t)-OH
(3 種のモノ Bu^t 置換体の混合物)

MeOH-*n*-hexane より再結晶。

mp 205-210°

IR $\frac{\text{KBr}}{\text{Max}}$: 3380 cm⁻¹ (indole-NH).

Mass : m/e 260 (M^+ , C₁₅H₂₀N₂O₂).

NMR (CD₃OD) : δ 1.35 (s, 2' or 7'-Bu^t),
1.37 (s, 5'-Bu^t), 1.47 (s, 2' or 7'-Bu^t),
7.04-7.82 (m, aromatic H).

ii) B_2 : H-Trp (1'-Bu^t)-OH

MeOH-AcOEt より再結晶。

mp 188-190° $[\alpha]_D^{24}$ -30.4° (c=1.7, 80% -EtOH).

(lit.²⁷ mp 177-178° [α]_D²⁰ -31.2° 80%-EtOH)

(lit.²⁸ mp 179° [α]_D^{29.5} -28.9°, 80%-EtOH)

IR (KBr): no indole NH.

Mass: m/e 260 (M^+ , $C_{15}H_{20}N_2O_2$),

186 ($M-C_2H_4NO_2$), 130 ($186-C_4H_8$).

NMR (CD_3OD): δ 1.72 (9H, s, Bu^t),

6.86-7.28 (2H, m, 5', 6'-H),

7.33 (1H, s, 2'-H),

7.53-7.80 (2H, m, 4', 7'-H).

NMR (DMSO- d_6): δ 1.65 (9H, s, Bu^t),

6.91-7.17 (2H, m, 5', 6'-H), 7.42 (1H, s, 2'-H),

7.50-7.75 (2H, m, 4', 7'-H).

iii) B_3 : H-Trp (1', 5'-di- Bu^t)-OH

MeOH-AcOEt より再結晶.

mp 203-204° IR (KBr): no indole NH.

Mass: m/e 316 (M^+ , $C_{19}H_{28}N_2O_2$), 242 ($M-C_2H_4NO_2$),

186 ($242-C_4H_8$), 171 ($186-CH_3$).

NMR (CD_3OD): δ 1.38, 1.39 and 1.72, 1.73

(two pairs of s, total 9H each, $2 \times Bu^t$),

7.10-7.72 (4H, m, aromatic H).

(これらの aromatic H シグナルは, 2種の異なる conformers の平衡にしたがって複雑なパターンに分割している。)

iv) B_4 : H-Trp (2', 5', 7'-tri- Bu^t)-OH

Mass: m/e 372 (M^+ , $C_{23}H_{36}N_2O_2$),

298 ($M-C_2H_4NO_2$).

Z(OMe)-Trp-OH に由来する副反応物の単離

Z(OMe)-Trp-OH (3.68 g) に, 2% EDT 含有アニソール (2.2 ml, 2 eq.) を加え, 氷冷下常法 TFA 処理。Boc-Trp-OH の場合と同様後処理を行った後, 溶媒を留去した残査を少量の $\text{CHCl}_3 : \text{MeOH} : \text{H}_2\text{O} = 8 : 3 : 1$ の溶媒系に溶解し, シリカゲルカラムクロマト (2.0 × 37.5 cm) に apply する。同一の溶出液で分離後, 再クロマトを行って 4 種の副反応物 ($M_1 \sim M_4$) を単離した。収量 M_1 : 18 mg (R_{f_1} 0.20) M_2 : 68 mg (R_{f_1} 0.35)

M_3 : 21 mg (R_{f_1} 0.47) M_4 : 5 mg (R_{f_1} 0.49)

i) M_1 : H-Trp (1', 5'-di-MBzl)-OH

MeOH-AcOEt より再結晶。 mp 185 - 188°

IR (KBr): no indole NH.

Mass : m/e 444 (M^+ , $\text{C}_{27}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_4$),

370 ($M-\text{C}_2\text{H}_4\text{NO}_2$), 250 ($370-\text{C}_8\text{H}_8\text{O}$),

121 (MBzl).

NMR (DMSO- d_6) : δ 3.70 (6H, s, 2×OMe),

7.14 (1H, s, 2'-H), 7.40 (1H, broad s, 4'-H).

ii) M_2 : H-Trp (2'-MBzl)-OH

MeOH-AcOEt より再結晶。 mp 189 - 190°

$[\alpha]_D^{22} -1.9^\circ$ (c=0.8, 80%-EtOH).

IR $\frac{\text{KBr}}{\text{Max}}$: 3370 cm^{-1} (indole NH).

Mass : m/e 324 (M^+ , $\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_3$), 280 ($M-\text{CO}_2$),

250 ($280-\text{CH}_2\text{NH}_2$), 121 (MBzl).

NMR (CD_3OD) : δ 3.70 (3H, s, OMe),

4.10 (2H, s, benzyl H),

6.65-7.80 (8H, m, aromatic H).

NMR (DMSO- d_6) : δ 3.68 (3H, s, OMe),

4.07 (2H, broad s, benzyl H),

6.65–7.77 (8 H, m, aromatic H),

10.8 (1 H, s, indole NH).

Anal. Calcd. for $C_{19}H_{20}N_2O_3 \cdot 1/4 H_2O$:

C, 69.38 ; H, 6.28 ; N, 8.52 .

Found: C, 69.15 ; H, 6.21 ; N, 8.03 .

iii) M_3 : H-Trp (2' , 5' - di-MBzl) - OH

Me OH-ether より再結晶. mp 189 – 190°

$[\alpha]_D^{22}$ – 8.9° (c=0.56, 80% - EtOH).

IR $\begin{smallmatrix} \text{KBr} \\ \text{Max} \end{smallmatrix}$: 3380 cm^{-1} (indole NH).

Mass : m/e 444 (M^+ , $C_{27}H_{28}N_2O_4$), 400 ($M - CO_2$),

370 (400 - CH_2NH_2), 121 (MBzl).

NMR (CD_3OD) : δ 3.72 (6 H, s, 2×OMe),

3.95 , 4.10 (2 H each, broad s, 2×benzyl H),

6.65–7.58 (11 H, m, aromatic H).

NMR ($DMSO-d_6$) : δ 3.68 (6 H, s, 2×OMe),

3.90 (2 H, s, benzyl H),

4.05 (2 H, broad s, benzyl H),

7.45 (1 H, broad s, 4' -H),

10.7 (1 H, s, indole NH).

Anal. Calcd. for $C_{27}H_{28}N_2O_4 \cdot 1/2 H_2O$:

C, 71.50 ; H, 6.45 ; N, 6.18.

Found: C, 71.53 ; H, 6.30 ; N, 5.93.

iv) M_4 : H-Trp (2' , 5' , 7' - tri-MBzl) - OH

Me OH-ether より再結晶. mp 189 – 191°

IR $\begin{smallmatrix} \text{KBr} \\ \text{Max} \end{smallmatrix}$: 3380 cm^{-1} (indole NH).

Mass : m/e 564 (M^+ , $C_{35}H_{36}N_2O_5$), 520 ($M - CO_2$),

490 (520 - CH_2NH_2), 121 (MBzl).

第2節に関する実験

各種希釈スルホン酸によるアミノ酸誘導体の処理

3種のアミノ酸誘導体, $Z(\text{OMe})\text{-Lys}(Z)\text{-OH}$, $\text{Boc-Lys}(Z)\text{-OH}$, $Z(\text{OMe})\text{-Asp}(\text{OBzl})\text{-OH}$ を各々1mmolとり, アニソール(5eq.)存在下, 18°C で各種スルホン酸のAcOH, または, AcOH-塩化メチレン(1:1v/v)溶液で処理した。そして, 1, 3, 24hr後, 反応溶液を各々 $1.2\mu\text{mol}$ ずつサンプリングし, TLCで展開後, ninhydrin試薬で, 90°C , 15min加熱発色させた。発色率を, authentic sampleのものとTLC scannerで比較定量した。使用したスルホン酸類は, MSA, ESA, Tos-OH, benzenesulfonic acid (BSA), mesitylenesulfonic acid (Mes-SA), 3-bromocamphor-8 or 10-sulfonic acid (Be-8 or 10-SA)である。結果は, 理論の部 Table 1, 2, 3 に示すとおりである。なお reference sample の R_{f_1} 値は,

$Z(\text{OMe})\text{-Lys}(Z)\text{-OH}$ 0.58 ; $\text{H-Lys}(Z)\text{-OH}$ 0.25 ;
 H-Lys-OH 0 ; $\text{Boc-Lys}(Z)\text{-OH}$ 0.52 ;
 $Z(\text{OMe})\text{-Asp}(\text{OBzl})\text{-OH}$ 0.55 ;
 $\text{H-Asp}(\text{OBzl})\text{-OH}$ 0.23 ; H-Asp-OH 0 である。

Enkephalin 類の合成

(1) $Z(\text{OMe})\text{-Gly-Gly-OMe}$

$Z(\text{OMe})\text{-Gly-OH}$ (7.50 g) と H-Gly-OMe (4.33 gの塩酸塩と4.8 mlの Et_3N より調製)をAcOEt-DMF(100ml-100ml)の混液に溶解し, DCC (7.12 g)を加え室温24hr攪拌する。生成するdicyclohexylurea (DC urea)を汙去し, 汙液を濃縮。残査をAcOEtに溶解し, 10%-クエン酸, 5%- NaHCO_3 , 飽和食塩水で洗浄して乾燥後AcOEt留去。残査にエーテル加えて結晶化。MeOH-エーテルで再結晶。

収量 6.53 g (67%). mp $97-99^\circ$

R_{f_1} 0.69 .

Anal. Calcd. for $C_{14}H_{18}N_2O_6$:

C, 54.19 ; H, 5.85 ; N, 9.03.

Found : C, 54.38 ; H, 5.70 ; N, 9.00.

(2) Z(OMe)-Tyr-Gly-Gly-OMe

アニソール (4.3ml) 存在下, Z(OMe)-Gly-Gly-OMe (3.10g) に, 2M ESA/AcOH (15ml) を加え, 氷冷下 30min, ついで室温 30min 処理。*n*-Hexane を加えて沈殿を得, decant : で *n*-hexane を除去した後, 油状物沈殿をさらに ether で洗浄し, KOH 粒上減圧乾燥する。これを, Et_3N (1.4ml) を含む DMF (30ml) に溶解する。この溶液に, Z(OMe)-Tyr-NHNH₂ (3.59g) と 3.79M・HCl-DMF (5.80ml), isoamyl nitrite (IAN) (1.48ml), Et_3N (4.5ml) より調製したアジドの DMF 溶液 (40ml) を加えて 48hr アジド反応。溶媒留去後, 残渣を AcOEt に溶解し, 10%-クエン酸, 飽和食塩水で洗浄して, 乾燥後 AcOEt 留去。残渣に ether を加えて結晶化。MeOH-ether より再結晶。

収量 3.94g (83%).

mp 144-146°

$[\alpha]_D^{24} +11.6$ (c=0.3, DMF), Rf_1 0.74.

Anal. Calcd. for $C_{23}H_{27}N_3O_8$:

C, 58.34 ; H, 5.75 ; N, 8.88.

Found : C, 58.60 ; H, 5.70 ; N, 8.98.

(3) Z(OMe)-Tyr-Gly-Gly-NHNH₂

上記 Z(OMe)-Tyr-Gly-Gly-OMe (3.94g) を MeOH (70ml) に溶解し, 室温で 80%-含水ヒドラジン (1.7ml) を加え 1 晩放置。生成するゲルを濾取。DMF-EtOH で再沈殿。

収量 2.62g (66%).

mp 200-204°

$[\alpha]_D^{24} -5.91^\circ$ (c=0.3, DMSO), Rf_1 0.46.

Anal. Calcd. for $C_{22}H_{27}N_5O_7$:

C, 55.80 ; H, 5.75 ; N, 14.79 .

Found: C, 56.05 ; H, 5.77 ; N, 14.64 .

(4) Z(OMe)-Phe-Met-OH

Z(OMe)-Phe-ONP⁹⁴ (10.0 g) の THF 溶液 (40 ml) と H-Met-OH の Et_3N (6.2 ml) を含む水溶液 (40 ml) を混合し、室温 18 hr 攪拌下反応する。溶媒留去し、残渣を水に溶解して ether 洗浄後、10%-クエン酸で酸性とし、生成する沈殿を AcOEt 抽出。AcOEt 層を、10%-クエン酸、飽和食塩水で洗浄し、乾燥後留去。残渣に *n*-hexane を加えて結晶化。MeOH-*n*-hexane で再結晶する。

収量 9.13 g (89%).

mp 148-150°

$[\alpha]_D^{24} -12.4^\circ$ ($c=0.3$, MeOH), Rf_1 0.45.

Anal. Calcd. for $C_{23}H_{28}N_2O_6S$:

C, 59.98 ; H, 6.13 ; N, 6.08 .

Found: C, 59.92 ; H, 6.02 ; N, 6.14 .

(5) Z(OMe)-Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-OH

N_2 気流下、Z(OMe)-Phe-Met-OH (0.69 g) にアニソール (0.8 ml) を加え、4 M ESA/AcOH (2.0 ml) で、氷冷下 30 min、ついで室温で 30 min 処理する。Ether を加えて沈殿させた後、decant. で ether を除去。更に ether decant. で沈殿油状物を 2 回洗浄後、KOH 粒上乾燥し、ついで、 Et_3N (0.42 ml) を含む DMF (5 ml) に溶解する。この溶液に、Z(OMe)-Tyr-Gly-Gly-NHNH₂ (3) (0.66 g) と 3.79 M HCl-DMF (0.79 ml), IAN (0.21 ml), Et_3N (0.63 ml) より調製したアジドの DMF 溶液を加え、 N_2 置換後、24 hr 攪拌下アジド反応。溶媒留去後、残渣を 3%-NH₄OH に溶解し、AcOEt で洗浄。ついで、水層を氷冷下 10%-クエン酸で酸性化し、AcOEt 抽出。AcOEt 層を、10%-クエン酸、飽和食塩水で洗浄し、乾燥後 AcOEt 留去。残渣に ether を加えて得られる結晶性粉末を少量の $CHCl_3$:

MeOH : H₂O : DMF = 8 : 3 : 1 : 4 に溶解し、シリカゲルカラムクロマト (2.1 × 13 cm) に apply する。同一溶媒系で溶出し、R_f₁ 0.40 の物質を含むフラクションを集め溶媒留去。残渣に水を加え粉末とし、乾燥後 MeOH-AcOEt で再結晶。

収量 0.54 g (52%).

mp 151-153°

$[\alpha]_D^{24} -18.7^\circ$ (c=0.3, DMF), R_f₁ 0.40.

Anal. Calcd. for C₃₆H₄₃N₅O₁₀S:

C, 58.60 ; H, 5.87 ; N, 9.49 .

Found : C, 58.48 ; H, 5.88 ; N, 9.46 .

(6) H-Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-OH (Met-enkephalin)

N₂気流下、上記保護ペントペプチド(5) (0.20 g) にアニソール (0.3 ml) を加え、氷冷下 30 min, ついで室温 30 min, 4M ESA / AcOH (1.0 ml) 処理を行う。Ether を加えて白色粉末を得、ろ取し、ether で十分に洗浄し乾燥。ついで、水 (30 ml) に溶解して Amberlite CG-4B (acetate form, 湿重量約 1 g) 処理して酢酸塩とし、樹脂をろ去後、凍結乾燥して白色粉末を得た。これを少量の水に溶解し、DEAE-cellulose カラムクロマト (2.2 × 7.0 cm) に apply する。そして、最初、水 (250 ml), ついで、水 (150 ml) - 0.01M NH₄HCO₃ (pH 7.8, 600 ml) の gradient 溶出を行い (1 Frac. 8.5 ml each), 275 nm における吸光度を測定し、目的物画分 (tube No. 28-50) を集め、凍結乾燥して羽毛状白色粉末を得た。

収量 65 mg (40%).

$[\alpha]_D^{24} +17.7^\circ$ (c=0.5, 3% - AcOH)

[lit.⁹² +18° (1M - AcOH) ; lit.⁹³ +31.5° (MeOH)] .

R_f₁ 0.17.

3M Tos-OH 酸分解後のアミノ酸分析値:

Tyr 0.86 , Gly 2.02 , Phe 1.00 , Met 0.81 .

(平均回収率 85%)

AP-M 酵素消化後のアミノ酸分析値:

Tyr 0.98 , Gly 2.17 , Phe 1.00 , Met 0.99 .

(平均回収率 82%)

Anal. Calcd. for $C_{27}H_{35}N_5O_7S \cdot 1\frac{1}{2}H_2O$:

C, 53.98 ; H, 6.38 ; N, 11.66 .

Found : C, 54.09 ; H, 6.05 ; N, 11.62 .

(7) Z(OMe)-Phe-Leu-OH

Z(OMe)-Phe-ONP⁹⁴ (19.9 g) の THF 溶液 (30 ml) と H-Leu-OH (4.37 g) の Et_3N (10 ml) を含む水-ピリジン (10 ml - 20 ml) 溶液を混合し、室温 24 hr 攪拌下反応。溶媒を留去し、残渣を水に溶解して ether で洗浄。次に、氷冷下水層を 10 % - クエン酸で酸性とし、生成する沈殿を AcOEt 抽出する。AcOEt 層を 10 % - クエン酸、飽和食塩水で洗浄し、乾燥後減圧留去。残渣に ether を加えて結晶化し、AcOEt-ether で再結晶する。

収量 7.13 g (73%).

mp 90-93°

$[\alpha]_D^{24} -6.3^\circ$ (c=0.5, MeOH), Rf_1 0.58.

Anal. Calcd. for $C_{24}H_{30}N_2O_6$:

C, 65.14 ; H, 6.83 ; N, 6.33 .

Found : C, 64.87 ; H, 6.74 ; N, 6.35 .

(8) Z(OMe)-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-OH

アニソール (0.8 ml) 存在下、Z(OMe)-Phe-Leu-OH (0.66 g) を、4 M ESA/AcOH (3.0 ml) で氷冷下 30 min、室温 30 min 処理する。*n*-Hexane を加えて沈殿を得、*n*-hexane を decant. で除去した後、ether を加えて粉末化する。これを汙取乾燥後、DMF (3 ml) に溶解し、 Et_3N (0.42 ml) を加える。この溶液に、Z(OMe)-Tyr-Gly-Gly-NHNH₂(3) (0.66 g) と、3.79 M · HCl-DMF (0.79 ml), IAN (0.21 ml), Et_3N (0.63 ml) より調製したアジドの DMF 溶液 (10 ml) を加え攪拌下 48 hr アジド反応を行う。(5) の場合と同様処理を行い、ether を加えて結晶化する。この結晶を、少量の $CHCl_3$: MeOH : H_2O = 8 : 3 : 1 の溶媒系に溶解し、シリカカラムクロマト (2.1 × 15 cm) に apply. 同一溶媒系で溶出を行い Rf_1 0.45 のフラクションを集め、溶媒留去。残渣に水を加えて粉末とし、乾燥後、MeOH-

AcOEt で再結晶。

収量 0.45 g (45%).

mp 142–143°

$[\alpha]_D^{24} -27.9^\circ$ ($c = 0.4$, DMF), Rf_1 0.45.

Anal. Calcd. for $C_{37}H_{45}N_5O_{10} \cdot 1/2 H_2O$:

C, 60.97 ; H, 6.36 ; N, 9.61 .

Found: C, 61.06 ; H, 6.22 ; N, 9.43 .

(9) H-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-OH (Leu-enkephalin)

上記保護ペントペプチド(8) (0.35 g) に, アニソール (0.5 ml) を加え, 4 M ESA / AcOH (1.3 ml) で氷冷下 30 min, 室温 30 min 処理する。Ether を加えて油状物沈殿を得, ether で, decant. により 2 回洗浄後, KOH 粒上乾燥。ついで, 水 (30 ml) に溶解し, Amberlite CG-4 B (acetate form, 湿重量約 1 g) 処理で酢酸塩に変換後, 凍結乾燥して白色粉末を得る。これを, 少量の水に溶解し, DEAE-cellulose カラムクロマト (2.2 × 5.0 cm) に apply。水 (200 ml), ついで水 (100 ml) – 0.01 M NH_4-HCO_3 (pH 7.8, 600 ml) による gradient 溶出を行い (1 Frac. 8.5 ml each), 275 nm における吸光度を測定し, 目的物画分 (tube No. 26–45) を集め, 凍結乾燥して白色羽毛状粉末を得る。

収量 90 mg (32%).

$[\alpha]_D^{24} +18.0^\circ$ ($c = 0.7$, 3% – AcOH).

[lit.⁹³ +31.5° (Me OH)].

Rf_1 0.21.

3 M Tos-OH 酸分解後のアミノ酸分析値:

Tyr 0.97, Gly 2.04, Phe 1.02, Leu 1.00 .

(平均回収率 87%)

AP-M 酵素消化後のアミノ酸分析値:

Tyr 1.00, Gly 1.95, Phe 1.01, Leu 0.96 .

(平均回収率 89%)

Anal. Calcd. for $C_{28}H_{37}N_5O_7 \cdot 1 1/2 H_2O$:

C, 57.72 ; H, 6.92 ; N, 12.02 .

Found : C, 57.99 ; H, 6.82 ; N, 11.87 .

(10) Z(OMe)-Gly-Lys(Z)-OMe

Z(OMe)-Gly-OH(2.29g) と H-Lys(Z)-OMe(3.31g の塩酸塩と 1.52 ml の Et₃N より調製) を THF-DMF 溶液(10ml-10ml) に溶解し, DCC(2.26g) を加え 24hr 攪拌下反応。生成する DCurea を濾去し, 濾液を濃縮。残渣を AcOEt に溶解し, 10%-クエン酸, 5%-NaHCO₃, 飽和食塩水で洗浄し, 乾燥後, AcOEt 留去。残渣に ether を加えて結晶化。AcOEt-ether より再結晶する。

収量 2.72g (53%).

mp 78-82°

$[\alpha]_D^{24} -6.9^\circ$ (c=0.3, MeOH), Rf₁ 0.75 .

Anal. Calcd. for C₂₆H₃₃N₃O₈ :

C, 60.57 ; H, 6.45 ; N, 8.15 .

Found : C, 60.61 ; H, 6.57 ; N, 8.33 .

(11) Z(OMe)-Gly-Lys(Z)-NHNH₂

Z(OMe)-Gly-Lys(Z)-OMe(2.72g) を MeOH(20ml) に溶解し, 室温で 80%-含水ヒドラジン(2.6ml) を加え 1 晩放置する。生成する結晶を濾取し MeOH でよく洗浄後, MeOH より再結晶する。

収量 2.31g (85%).

mp 161-166°

$[\alpha]_D^{24} +3.3$, (c=0.3, DMF), Rf₁ 0.56 .

Anal. Calcd. for C₂₅H₃₃N₅O₇ :

C, 58.23 ; H, 6.45 ; N, 13.59 .

Found : C, 58.40 ; H, 6.34 ; N, 13.69 .

(12) Z(OMe)-Gly-Lys(Z)-Met-Gly-OH

N_2 気流下, Z(OMe)-Met-Gly-OH⁹⁵ (0.74 g) にアニソール (1.1 ml) を加え, 4 M ESA/AcOH 処理を氷冷下, ついで室温で各々 30 min 行い, ether を加えて油状物沈殿を得る。Ether を decant. で除去。油状物を KOH 粒上で乾燥後, DMF (5 ml) に溶解し, Et_3N (0.56 ml) を加える。この溶液に, Z(OMe)-Gly-Lys(Z)-NHNH₂ (0.93 g) と 3.79 M · HCl - DMF (1.0 ml), IAN (0.27 ml), Et_3N (0.78 ml) より調製したアジドの DMF 溶液 (10 ml) を加え, N_2 置換後, 24 hr アジド反応を行う。溶媒留去し, 残査を AcOEt に溶解して, 10 % - クエン酸, 飽和食塩水で洗浄する。乾燥後, AcOEt 留去し, 残査に ether を加えて結晶化。MeOH-AcOEt より再結晶。

収量 1.11 g (80%).

mp 138-139°

$[\alpha]_D^{24} -16.6^\circ$ ($c=0.3$, DMF), Rf_1 0.38.

Anal. Calcd. for $C_{32}H_{43}N_5O_{10}S$:

C, 55.72 ; H, 6.28 ; N, 10.15 .

Found : C, 55.95 ; H, 6.32 ; N, 9.95 .

(13) Z(OMe)-Tyr-Gly-Gly-Gly-Lys(Z)-Met-Gly-OH

上記保護テトラペプチド(12)(1.11 g) に, N_2 気流下, アニソール (1.8 ml) を加え, 2 M ESA/AcOH (8.0 ml) 処理を, 氷冷下 30 min ついで室温 30 min 行い, ether を加えて powder とする。この powder をろ取乾燥後, Et_3N (0.45 ml) を含む DMF (5 ml) に溶解。本溶液に, Z(OMe)-Tyr-Gly-Gly-NHNH₂ (3) (0.71 g) と 3.79 M · HCl - DMF (0.85 ml), IAN (0.22 ml), Et_3N (0.67 ml) より調製したアジドの DMF 溶液 (10 ml) を加え, N_2 置換後, 攪拌下 48 hr アジド反応する。溶媒留去し, 残査に AcOEt と 10 % - クエン酸を加えて 1 晩冷蔵庫に放置し, ゲルを得る。ゲルをろ取し, 10 % - クエン酸, 水で batchwise に洗浄後, MeOH-AcOEt より再結晶する。

収量 1.07 g (69%).

mp 165 - 167°

$[\alpha]_D^{24} -26.6^\circ$ (c=0.4, DMF), Rf_1 0.22 .

3M Tos-OH 酸分解後のアミノ酸分析値:

Tyr 0.80 , Gly 4.07 , Lys 1.00 , Met 0.85 .

(平均回収率 85%)

Anal. Calcd. for $C_{45}H_{58}N_8O_{14}S$:

C, 55.89 ; H, 6.05 ; N, 11.59 .

Found : C, 55.84 ; H, 6.18 ; N, 11.35 .

(14) H-Tyr-Gly-Gly-Gly-Lys-Met-Gly-OH(endorphin)

上記保護ヘプタペプチド(13)(0.58 g)に, 2% EDT 含有アニソール(10 ml)を加え, N_2 置換後, $-5^\circ \sim -10^\circ C$ で 1 hr HF 処理を行う。同温で HF 留去し, ether を加えて沈殿を得る。沈殿油状物を ether で decant. により洗浄後, 水(30 ml)に溶解する。ついで Amberlite CG-4 B (acetate form, 湿重量約 3 g) 処理し, 酢酸塩に変換し, 凍結乾燥する。得られた白色粉末を少量の水に溶解し, CM-cellulose カラムクロマト (2.2×5.0 cm) に apply する。最初, 水(200 ml) ついで水(150 ml)-0.01 M NH_4HCO_3 (pH 7.8, 800 ml) の gradient elution し, 275 nm における吸光度を測定し, 目的物画分 (tube No. 59-110, 1 Frac. 8.0 ml each) を集め凍結乾燥する。つぎに, Sephadex G-10 (3×140 cm) のゲル濾過に apply し, 0.2M-AcOH による溶出により脱塩し, 凍結乾燥して白色羽毛状粉末を得た。

収量 132 mg (33%).

$[\alpha]_D^{24} -3.2^\circ$ (c=0.6, 3%-AcOH)

Rf_3 0.33 , Rf_4 0.52 .

(lit.⁴¹ Rf 0.33 , $n-BuOH:AcOH:H_2O = 8:2:2$)

3M Tos-OH 酸分解後のアミノ酸分析値:

Tyr 0.92 , Gly 4.25 , Lys 1.00 , Met 0.90 .

(平均回収率 85%)

AP-M酵素消化後のアミノ酸分析値：

Tyr 0.94 , Gly 3.91 , Lys 1.02 , Met 1.00 .

(平均回収率 75 %)

Anal. Calcd. for $C_{28}H_{44}N_8O_9S \cdot AcOH$:

C, 49.44 ; H, 6.64 ; N, 15.38 .

Found : C, 49.48 ; H, 6.49 ; N, 14.94 .

(15) Boc-および Z(OMe)-Trp-OH の酸処理の際の
スカベンジャーの添加効果

Boc-Trp-OHあるいはZ(OMe)-Trp-OHを各々10 μ molとり, 理論の部Table 4, 5に示す当量のスカベンジャー(カチオン除去剤)を加え, 0°C, 60min TFA, または4M ESA/TFE溶液(各々0.2ml)で処理した。そして反応液をAmberlite CG-4B(acetate form)で処理後, Rf₃の展開溶媒系でTLCで展開した。TLCを乾燥させた後, Ninhydrinで90°C, 15min加熱発色させ, TLCスキャナーを用い510nmで定量した。結果は, 理論の部Tadle 4, 5に示すとおりである。

(16) スカトールのスカベンジャーとしての効果

Z(OMe)-Gly-OH(0.24g)に, スカトール(0.26g)を加え, 0°C, 60min TFA処理を行った。ついで, 反応液をCHCl₃を溶媒としてTLCで展開後, Ehrlich 試薬⁹⁶⁾, Ce(SO₄)₂で発色させると, スカトール自身以外に, 2つのスカトール由来の不明スポットが生成した。また, 比較として, スカトールのみを同条件下TFA処理してもTLC上不明スポットはみられなかった。

第 2 章 に関する 実験

第 2 節 に関する 実験

(1) Z(OMe)-Met-Ser-OMe

Z(OMe)-Met-OH(47.01 g)と H-Ser-OMe(24.58 g の塩酸塩と 22 ml の Et_3N より調製)の DMF-AcOEt(50 ml-500 ml)混液に, DCC(37.14 g)を加え室温で 48 hr 反応。生成する DC urea を濾去。濾液を濃縮し, AcOEt を加えてゲルを得る。ゲルを濾取し, 食塩飽和の 10 % - クエン酸, 飽和食塩水で batchwise に洗浄。THF-AcOEt で再沈殿を行う。

収量 46.73 g (75%) .

mp 167-168°

$[\alpha]_D^{22} -2.6^\circ$ (c=0.8, DMF), Rf_1 0.72 .

Anal. Calcd. for $\text{C}_{18}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_7\text{S}$:

C, 52.16 ; H, 6.32 ; N, 6.76 .

Found : C, 52.45 ; H, 6.24 ; N, 6.82 .

(2) Z(OMe)-Met-Ser-NHNH₂

Z(OMe)-Met-Ser-OMe(46.73 g)を THF(500 ml)に溶解し, 室温で 80 % - 含水ヒドラジン(30 ml)を加え 1 晩放置する。生成するゲル塊を濾取。THF で十分に洗浄後, DMF-THF で再沈殿を行う。

収量 42.29 g (91%) .

mp 199-203°

$[\alpha]_D^{22} -2.0^\circ$ (c=1.0, DMF), Rf_1 0.55 .

Anal. Calcd. for $\text{C}_{17}\text{H}_{26}\text{N}_4\text{O}_6\text{S}$:

C, 49.26 ; H, 6.32 ; N, 13.52 .

Found : C, 48.98 ; H, 6.12 ; N, 13.43 .

(3) Z(OMe)-Met-Ser-Thr-OH

DMF (200ml) 中, 3.79M·HCl-DMF (30.9ml), IAN (8.2ml), Et₃N (24.2ml) と Z(OMe)-Met-Ser-NHNH₂ (22.95g) より調製したアジド溶液と, Et₃N (8.5ml) を含む H-Thr-OH (7.27g) の DMF-H₂O (10ml-50ml) 溶液を混合し, 48hr アジド反応を行う。次に溶媒留去し, 残査に食塩飽和の 10%-クエン酸と AcOEt を加えて, 1 晩冷蔵庫に放置し結晶化。結晶汙取し, 少量の食塩飽和の 10%-クエン酸, および飽和食塩水で, batchwise に洗浄後, MeOH-AcOEt で再結晶する。

収量 11.24 g (40%).

mp 148-150°

$[\alpha]_D^{22} + 6.4^\circ$ (c=0.8, DMF), Rf₁ 0.21.

Anal. Calcd. for C₂₁H₃₁N₃O₉S · 1 1/2 H₂O

C, 47.73 ; H, 6.48 ; N, 7.95 .

Found : C, 47.73 ; H, 6.35 ; N, 7.91 .

(4) Z(OMe)-Leu-Met-Ser-Thr-OH

Z(OMe)-Met-Ser-Thr-OH (15.05g) にアニソール (16ml) を加え, 常法 TFA 処理。ついで, ether を加えて生成する powder を汉取。減圧乾燥後, DMF (150ml) に溶解する。この溶液に, Et₃N (8.4ml), Z(OMe)-Leu-ONP⁹⁷ (14.37g) そして HOBt (4.59g) を加え完全に溶解し, 室温で 24hr 反応。溶媒留去し, 残査に ether と食塩飽和の 10%-クエン酸を加え冷蔵庫へ 1 晩放置する。生成するゲル汉取し, 食塩飽和の 10%-クエン酸, 食塩水で batchwise に洗浄後, MeOH-AcOEt で再結晶する。

収量 9.70g (53%).

mp 160-161°

$[\alpha]_D^{22} - 3.9^\circ$ (c=1.0, DMF), Rf₁ 0.37.

Anal. Calcd. for C₂₇H₄₂N₄O₁₀S · 1/2 H₂O :

C, 51.99 ; H, 6.95 ; N, 8.98 .

Found : C, 52.14 ; H, 6.89 ; N, 9.07 .

(5) Z(OMe)-Leu-Met(O)-Ser-Thr-OH

Z(OMe)-Leu-Met-Ser-Thr-OH (12.29 g) を THF (80 ml) に溶解し、氷冷した溶液に、 $\text{NaBO}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (3.39 g) の水溶液 (40 ml) を加え、室温にもどして 1 晩攪拌下反応。溶媒を留去し、残渣を MeOH に溶解し、不溶物を汫去する。汫液を濃縮し、生成する結晶を汫取。水で軽く洗い流し、MeOH-AcOEt で再結晶する。

収量 12.70 g (87%).

mp 196-198°

$[\alpha]_D^{22} +13.2^\circ$ (c=1.0, DMF), Rf_1 0.21.

Anal. Calcd. for $\text{C}_{27}\text{H}_{42}\text{N}_4\text{O}_{11}\text{S} \cdot \text{H}_2\text{O}$:

C, 49.99 ; H, 6.84 ; N, 8.63 .

Found: C, 49.99 ; H, 6.56 ; N, 8.57 .

(6) Boc-Trp-Leu-Met(O)-Ser-Thr-OH

Z(OMe)-Leu-Met(O)-Ser-Thr-OH (9.07 g) にアニソール (7.8 ml) を加え常法 TFA 処理を行う。Ether を加え powder とし、powder を汫取乾燥後、DMF (80 ml) に溶解する。この溶液に、 Et_3N (4.2 ml) ついで、Boc-Trp-ONP⁹⁸⁾ (7.35 g) と HOBt (2.21 g) を加え、室温で 1 晩反応。溶媒留去し、残渣を *n*-BuOH に溶解し、10%-クエン酸、水で洗浄後、乾燥し溶媒留去。残渣に AcOEt を加えて結晶化する。DMF-AcOEt で再結晶。

収量 9.86 g (91%).

mp 138-142°

$[\alpha]_D^{22} -12.3^\circ$ (c=0.8, DMF).

Rf_1 0.08, Rf_6 0.82.

酸分解後のアミノ酸分析値:

Trp 1.01, Leu 1.00, Met+Met(O) 0.78,

Ser 0.86, Thr 0.93. (平均回収率 86%)

Anal. Calcd. for $\text{C}_{34}\text{H}_{52}\text{N}_6\text{O}_{11}\text{S} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

C, 51.76 ; H, 7.16 ; N, 10.65 .

Found : C, 51.45 ; H, 7.04 ; N, 11.19 .

(7) Boc-Gln-Trp-Leu-Met(O)-Ser-Thr-OH [A]

上記保護ペンタペプチド(6) (7.53 g) に, 0.1% - EDT 含有アニソール (11 ml) とスカトール (1.97 g) を加え, 氷冷下 30 min 4M ESA/TFE (30 ml) 処理。Ether を加えて powder とし, powder を汙取, KOH 粒上乾燥。ついで, DMF (80 ml) に溶解し, Et_3N (2.80 ml), Boc-Gln-ONP⁹⁹⁾ (4.22 g), そして HOBt (1.53 g) を加え室温で 1 晩攪拌下反応する。次に, 溶媒留去し, 残渣を *n*-BuOH に溶解。*n*-BuOH 層を 10% - クエン酸, 水で洗浄し, 乾燥後 *n*-BuOH を留去する。残渣に AcOEt を加えて結晶化。DMF - AcOEt で再結晶。

収量 7.09 g (80%).

mp 141-145°

$[\alpha]_D^{22} -2.2^\circ$ ($c=0.9$, DMF).

Rf₁ 0.09, Rf₆ 0.85.

酸分解後のアミノ酸分析値:

Glu 1.13, Trp 0.97, Leu 1.00,

Met + Met(O) 0.83, Ser 0.84, Thr 0.90.

(平均回収率 81%)

Anal. Calcd. for $\text{C}_{39}\text{H}_{60}\text{N}_8\text{O}_{13}\text{S} \cdot 3\frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$:

C, 49.62; H, 7.15; N, 11.87.

Found: C, 50.00; H, 6.81; N, 11.46.

(8) Boc-Gln-Asp(OBzl)-Phe-Val-NHNHTroc

Z(OMe)-Asp(OBzl)-Phe-Val-NHNHTroc¹⁰⁰⁾ (17.29 g) にアニソール (12 ml) を加え, 常法 TFA 処理を行う。Ether を加えて粉末とし, 粉末を汉取, 乾燥後, DMF (140 ml) に溶解する。この溶液に, Et_3N (4.4 ml), Boc-Gln-ONP⁹⁹⁾ (8.49 g), そして HOBt (3.22 g) を加え室温で 1 晩反応する。反応液を濃縮後, 残渣に AcOEt を加えて powder とし, powder を汉取。ついで, この powder を 10% - クエン酸, 水で batchwise に洗浄後, DMF - AcOEt で再沈殿する。

収量 16.36 g (88%).

mp 218–222°

$[\alpha]_D^{22} -23.5^\circ$ ($c=0.9$, DMF), Rf_1 0.71 .

Anal. Calcd. for $C_{38}H_{50}N_7O_{11}Cl_3$:

C, 51.44 ; H, 5.68 ; N, 11.05 .

Found : C, 51.49 ; H, 5.80 ; N, 10.92 .

(9) Boc-Gln-Asp(OBzl)-Phe-Val-NHNH₂ [B]

Boc-Gln-Asp(OBzl)-Phe-Val-NHNHTroc (4.44 g) を DMF-AcOH (20ml-20ml) に溶解し, Zn 末 (約 5 g) を加え, 室温で 4 hr 攪拌下反応する。フィルターセルをしいて Zn 末を汫去。汫液を濃縮し, 飽和 EDTA 水溶液を加え, ついで $NaHCO_3$ で中和して powder 化し, 1 晩冷蔵庫に放置する。得られた powder を汫取し, 5% - $NaHCO_3$, 水で batchwise に洗浄後, DMF-AcOEt で再沈殿する。

収量 2.23 g (63%) . mp 222 – 224°

$[\alpha]_D^{25} -24.1^\circ$ ($c=0.8$, DMF), Rf_1 0.65 .

酸分解後のアミノ酸分析値 :

Glu 0.97 , Asp 1.01 , Phe 1.00 , Val 0.90 .

(平均回収率 95%)

Anal. Calcd. for $C_{35}H_{49}N_7O_9$:

C, 59.05 ; H, 6.94 ; N, 13.78 .

Found: C, 59.22 ; H, 7.12 ; N, 13.53 .

(10) Z(OMe)-Ala-NHNHTroc

Z(OMe)-Ala-OH (50.65 g) と Troc-NHNH₂ (41.49 g) を THF (350 ml) に溶解し, この溶液に, DCC (45.39 g) を加え, 20hr 室温で攪拌下反応。生成する DC urea を汫去し, 汫液を濃縮。残査を AcOEt に溶解し, 10% - クエン酸, 5% - $NaHCO_3$, 水で洗浄し, 乾燥後 AcOEt を留去。残査に ether を加えて結晶化。MeOH-AcOEt より再結晶する。

収量 69.01 g (78%) .

mp 142–145°

$[\alpha]_D^{22} -33.8^\circ$ ($c=0.9$, MeOH), Rf_1 0.96 .

Anal. Calcd. for $C_{15}H_{18}N_3O_6Cl_3$:

C, 40.69 ; H, 4.10 ; N, 9.49 .

Found: C, 40.97 ; H, 4.19 ; N, 9.53 .

(11) Z(OMe)-Arg(MBS)-Ala-NHNHTroc

アニソール (7.5ml) 存在下, Z(OMe)-Ala-NHNHTroc (10.18g) を TFA (10ml) 処理。室温で TFA を留去し, 残渣に *n*-hexane を加え decant. により洗浄後, KOH 粒上乾燥する。この油状物を THF (30ml) に溶解する。この溶液を氷冷し, Et_3N (3.2ml) を加えた後, 無水条件下, THF (100ml) 中, Z(OMe)-Arg(MBS)-OH (11.70 g) と Et_3N (3.2ml), isobutylchloroformate (3.2ml) より調製した混合酸無水物を混合し, 同条件下 $0^\circ C$ で 3hr 反応する。溶媒を留去し, 残渣を AcOEt に溶解。AcOEt 層を, 10%-クエン酸, 5%- $NaHCO_3$, 水で洗浄し乾燥後 AcOEt 留去。残渣に ether 加えて結晶化する。この結晶を濾取し, 少量の $CHCl_3$: MeOH = 9:1 の溶媒系に溶解し, シリカゲルカラムクロマト (5.5×10 cm) に apply。同一溶媒系で溶出し, Rf_1 0.81 の目的物画分を集め濃縮。残渣に水を加えて粉末とし, THF-ether で再結晶する。

収量 15.25 g (86%) .

mp $102-106^\circ$

$[\alpha]_D^{22} -9.6^\circ$ ($c=1.0$, MeOH), Rf_1 0.81 .

Anal. Calcd. for $C_{28}H_{36}N_7O_{10}S Cl_3$:

C, 43.73 ; H, 4.72 ; N, 12.75 .

Found : C, 43.75 ; H, 4.96 ; N, 12.47 .

(12) Z(OMe)-Arg(MBS)-Arg(MBS)-Ala-NHNHTroc

Z(OMe)-Arg(MBS)-Ala-NHNHTroc (15.25g) にアニソール (6.5 ml) を加え TFA (15ml) 処理。TFA を室温で留去後, ether を加えて powder とする。この powder を濾取乾燥後, THF (50ml) に溶解し, Et_3N (2.8ml) を加える。氷冷下, 無水条件で, この溶液に, Z(OMe)-Arg(MBS)

-OH (9.66 g) と Et_3N (2.7 ml), isobutylchloroformate (2.75 ml) より調製した混合酸無水物の THF 溶液 (100 ml) を混合し, 同条件下 3hr 攪拌下反応。溶媒留去し, 残渣に $n\text{-BuOH}$ を加えて結晶化。結晶濾取し, 10% - クエン酸, 5% NaHCO_3 , 水で batchwise に洗浄後, $\text{MeOH}-n\text{-BuOH}$ で再結晶する。

収量 14.85 g (68%).

mp 133-136°

$[\alpha]_{\text{D}}^{25} -9.2^\circ$ ($c=1.0$, DMF).

Rf_1 0.74, Rf_2 0.25.

Anal. Calcd. for $\text{C}_{41}\text{H}_{54}\text{N}_{11}\text{O}_{14}\text{S}_2\text{Cl}_3 \cdot \text{C}_4\text{H}_9\text{OH}^{96}$:

C, 46.21 ; H, 5.52 ; N, 13.17 .

Found: C, 46.04 ; H, 5.33 ; N, 13.27 .

(13) Z(OMe)-Thr-Arg(MBS)-Arg(MBS)-Ala-NHNHTroc

アニソール (4.8 ml) 存在下, Z(OMe)-Arg(MBS)-Arg(MBS)-Ala-NHNHTroc (9.72 g) を TFA (15 ml) 処理。TFA を室温で留去し, ether を加えて powder とする。この powder を濾取し, 乾燥後, Et_3N (1.24 ml) 含有 DMF (50 ml) に溶解する。この溶液に, Z(OMe)-Thr-NHNH $^{81}_2$ (3.04 g) と, 5.96 M · HCl-DMF (3.61 ml), IAN (1.51 ml), Et_3N (4.46 ml) より調製したアジドの DMF 溶液 (30 ml) を加え, 48hr アジド反応。溶媒留去し, 残渣に $n\text{-Pr-OH}$ を加え powder とする。この powder を濾取し, 10% - クエン酸, 5% - NaHCO_3 , 水で batchwise に洗浄し, $\text{MeOH}-n\text{-Pr-OH}$ より再結晶する。

収量 8.03 g (75%).

mp 127-130°

$[\alpha]_{\text{D}}^{25} -6.4^\circ$ ($c=1.0$, DMF), Rf_1 0.67 .

酸分解後のアミノ酸分析値:

Thr 1.11, Arg 2.10, Ala 1.00 .

(平均回収率 97%)

Anal. Calcd. for $\text{C}_{45}\text{H}_{61}\text{N}_{12}\text{O}_{16}\text{S}_2\text{Cl}_3 \cdot \text{C}_3\text{H}_7\text{OH}$:

C, 45.88 ; H, 5.53 ; N, 13.88 .

Found : C 45.96 ; H, 5.27 ; N, 13.70 .

(14) Boc-Asp(OBzl)-Thr-Arg(MBS)-Arg(MBS)-Ala-NHNH-
Troc

上記保護テトラペプチド(13)(8.03 g)にアニソール(4.5 ml)を加え, 常法TFA(15 ml)処理。室温でTFA留去後, etherを加えて powderとし, 汙取乾燥する。これをDMF(50 ml)に溶解し, Et₃N(0.94 ml)ついで Boc-Asp(OBzl)-ONP(3.29 g), HOBt(1.03 g)を加え室温で48hr 反応する。溶媒留去し, 残査をAcOEtに溶解し, 5%-クエン酸, 5%-NaHCO₃, 飽和食塩水で洗浄し, 乾燥後AcOEt留去。残査に, ether加えて結晶化。AcOEt-etherより再結晶する。

収量 8.54 g (95%) .

mp 122-124°

$[\alpha]_D^{26} -1.6^\circ$ (c=0.6, DMF), R_f 0.65 .

Anal. Calcd. for C₅₂H₇₂N₁₃O₁₈S₂Cl₃ :

C, 46.69 ; H, 5.43 ; N, 13.61 .

Found : C, 46.46 ; H, 5.49 ; N, 13.32 .

(15) Boc-Asp(OBzl)-Thr-Arg(MBS)-Arg(MBS)-Ala-NHNH₂

[C]

上記保護ペンタペプチド(14)(4.01 g)をDMF-AcOH(20 ml - 20 ml)に溶解し, Zn(約5.0 g)を加えて室温で3hr 攪拌下反応。反応液を汙過し, 汙液を濃縮する。残査に0.1%-EDTA水溶液を加え沈殿を得, NaHCO₃で中和後冷蔵庫に1晩放置する。生成するゲル状沈殿を汉取し, 5%-NaHCO₃, 水で batchwise に洗浄し, THF-AcOEt, ついで THF-EtOHで再沈殿を繰り返す。

収量 1.98 g (57%) .

mp 140-143°

$[\alpha]_D^{25} -4.8^\circ$ ($c=1.3$, DMF), Rf_1 0.53 .

酸分解後のアミノ酸分析値：

Asp 1.18 , Thr 1.00 , Arg 2.06 , Ala 0.92 .

(平均回収率 86 %)

Anal. Calcd. for $C_{49}H_{71}N_{13}O_{16}S_2 \cdot 2H_2O$:

C, 49.11 ; H, 6.31 ; N, 15.20 .

Found : C, 49.15 ; H, 6.24 ; N, 15.31 .

(16) Boc-Tyr-Leu-NHNH₂ [D]

DMF (80ml) 中に, Boc-Tyr-OH · DCHA (8.28 g) と HCl · H-Leu-OMe (3.25 g) を溶解し, DCC (4.25 g) を加え室温で 48hr 反応。生成する DC-urea を除去し, 母液を濃縮する。残渣を AcOEt に溶解し, 10%-クエン酸, 5%-NaHCO₃, 飽和食塩水で洗浄し, 乾燥後 AcOEt 留去する。AcOEt を完全に留去し, 得られる油状物を MeOH (50ml) に溶解し, 室温で 80%-含水ヒドラジン (4.5ml) を加え 1 晩放置後, 室温で MeOH を留去。残渣に EtOH を加えて結晶化し, MeOH-EtOH より再結晶する。

収量 3.25g (44%).

mp 212-214°

$[\alpha]_D^{22} -3.4^\circ$ ($c=0.9$, DMF), Rf_1 0.65 .

Anal. Calcd. for $C_{20}H_{32}N_4O_5$:

C, 58.80 ; H, 7.90 ; N, 13.72 .

Found : C, 59.04 ; H, 7.97 ; N, 13.59 .

(17) Boc-Gln-Asp(OBzl)-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met(O)-

Ser-Thr-OH [Boc-(duck glucagon 20-29)-OH]

0.1%-EDT 含有アニソール (5.5ml), スカトール (0.98 g) 存在下, Boc-Gln-Trp-Leu-Met(O)-Ser-Thr-OH(A) (4.41 g) を, 氷冷下 60min, 4M ESA/TFE (25ml) 処理。Ether を加えて powder とし, ether で powder を十分に洗浄後乾燥する。この powder を Et₃N (1.4ml) を含む DMF (40ml) に溶解する。この溶液に, Boc-Gln-Asp(OBzl)-Phe-Val-

NHNH_2 [B] (4.63 g) と, $5.96\text{M} \cdot \text{HCl} - \text{DMF}$ (2.4 ml), IAN (0.96 ml), Et_3N (2.93 ml) より調製したアジドの DMF 溶液 (40 ml) を加え, 48 hr アジド反応。2 ~ 3 滴の AcOH 加えて中和後, 溶媒を留去。残査を 3 % - AcOH と AcOEt で処理し, 結晶化する。結晶ヲ取し, 5 % - クエン酸, 水で batchwise に洗浄。 $\text{DMF} - \text{AcOEt}$ で再沈殿する。

収量 4.89 g (67%).

mp 238-241°

$[\alpha]_D^{26} -18.7^\circ$ ($c=0.9$, DMF), R_f 0.78.

酸分解後のアミノ酸分析値:

Glu 1.97, Asp 1.21, Phe 1.03, Val 0.85,

Trp 1.05, Leu 1.00, Met + Met(O) 1.03,

Ser 0.81, Thr 0.87. (平均回収率 96 %)

Anal. Calcd. for $\text{C}_{69}\text{H}_{97}\text{N}_{13}\text{O}_{20}\text{S} \cdot \text{H}_2\text{O}$:

C, 56.04 ; H, 6.75 ; N, 12.32 .

Found: C, 56.18 ; H, 6.87 ; N, 12.46 .

(18) Boc-Asp(OBzl)-Thr-Arg(MBS)-Arg(MBS)-Ala-Gln-
Asp(OBzl)-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met(O)-Ser-Thr-OH
[Boc-(duck glucagon 15-29)-OH]

上記保護デカペプチド [Boc-(duck glucagon 20-29)-OH] (17) (1.46 g) に, スカトール (0.2 g) と 0.1 % - EDT 含有アニソール (1.5 ml) を加え, 氷冷下 90 min TFA 処理。Ether を加えて powder とし, powder をヲ取乾燥後, $\text{DMF} - \text{NMP}$ (10 ml - 2 ml) に溶解する。この溶液に, 氷冷下 Et_3N (0.28 ml) を加え, ついで, Boc-Asp(OBzl)-Thr-Arg(MBS)-Arg(MBS)-Ala- NHNH_2 [C] (1.74 g) と $5.96\text{M} \cdot \text{HCl} - \text{DMF}$ (0.53 ml), IAN (0.2 ml), Et_3N (0.67 ml) より調製したアジドの DMF 溶液 (10 ml) を混合し, 48 hr アジド反応。 AcOH を加えて中和後溶媒留去。残査に 10 % - クエン酸と AcOEt を加えて powder とする。この powder をヲ取し, 10 % - クエン酸, 水で batchwise に洗浄後, $\text{DMF} - \text{EtOH}$ で再沈殿する。

収量 1.85 g (74%).

mp 236–240°

$[\alpha]_D^{22} -22.4^\circ$ (c=0.9, DMF), Rf_6 0.76, Rf_7 0.42.

酸分解後のアミノ酸分析値:

Asp 2.29, Thr 1.81, Arg 2.16, Ala 1.00,
Glu 2.03, Phe 1.04, Val 0.92, Trp 0.92,
Leu 0.87, Met+Met(O) 0.87, Ser 0.84.

(平均回収率 81%)

Anal. Calcd. for $C_{113}H_{156}N_{24}O_{34}S_3 \cdot H_2O$:

C, 54.09; H, 6.35; N, 13.40.

Found: C, 53.77; H, 6.32; N, 13.69.

(19) Boc-Tyr-Leu-Asp(OBzl)-Thr-Arg(MBS)-Arg(MBS)-
Ala-Gln-Asp(OBzl)-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met(O)-Ser
-Thr-OH [Boc-(duck glucagon 13-29)-OH]

上記保護ペプタデカペプチド [Boc-(duck glucagon 15-29)-OH]
(18) (2.49 g) にスカトール (0.26 g), 0.1% -EDT 含有アニソール (3 ml)
を加え, TFA (5 ml) 処理。Ether を加えて powder とし, powder を
汙取, ether でよく洗浄し乾燥する。ついで, NMP-DMF (4 ml-6 ml)
の混合溶媒に溶解し, 氷冷下 Et_3N (0.28 ml) ついで, Boc-Tyr-Leu-
NHNH₂ [D] (0.82 g), 5.96M·HCl-DMF (0.75 ml), IAN (0.3 ml),
 Et_3N (0.95 ml) より調製したアジドの DMF 溶液 (5 ml) を加え 48hr アジ
ド反応。AcOH を少量加えて中和後溶媒留去。残渣に 5%-クエン酸と ether
を加え powder とし, 汙取。ついで, 5%-クエン酸, 水で batchwise
に洗浄後, DMF-AcOEt で再沈殿する。

収量 2.32 g (84%).

mp 236–241°

$[\alpha]_D^{22} -11.9^\circ$ (c=1.0, DMF), Rf_7 0.39.

酸分解後のアミノ酸分析値:

Tyr 1.08, Leu 1.95, Asp 2.03, Thr 1.79,

Arg 1.70 , Ala 0.83 , Glu 2.00 , Phe 1.03 ,
 Val 1.00 , Trp 0.90 , Met +Met(O) 0.79 ,
 Ser 0.92 . (平均回収率 81%)

Anal. Calcd. for $C_{128}H_{176}N_{26}O_{37}S_3 \cdot 4H_2O$:

C, 54.14 ; H, 6.53 ; N, 12.83 .

Found : C, 53.91 ; H, 6.54 ; N, 12.93 .

第 3 節 に関する実験

(20) Z(OMe)-Lys(Z)-NHNHTroc

Z(OMe)-Lys(Z)-OH (22.22 g) と Troc-NHNH₂ (11.41 g) を, AcOEt (150 ml) に溶解し, DCC (11.35 g) を加えて室温で一晩反応。生成する DC urea を汙去し, 汙液を 1 M HCl, 5% -NaHCO₃, 水で洗浄。AcOEt 層を乾燥後 AcOEt 留去。残渣に *n*-hexane を加えて結晶化。エーテル-*n*-hexane より再結晶。

収量 30.19 g (90%) .

mp 101-105°

$[\alpha]_D^{22} -30.9^\circ$ (c=1.0, MeOH) , Rf₁ 0.72 .

Anal. Calcd. for $C_{26}H_{31}N_4O_8Cl_3$:

C, 49.26 ; H 4.93 ; N, 8.84 .

Found: C, 49.53 ; H, 4.88 ; N, 8.85 .

(21) Z(OMe)-Ser-Lys(Z)-NHNHTroc

アニソール (8.7 ml) 存在下, Z(OMe)-Lys(Z)-NHNHTroc (16.75 g) を TFA (10 ml) 処理。室温で TFA を留去し, 残渣に *n*-hexane を加え decant. で洗浄後, 油状物を KOH 粒上乾燥し, DMF (20 ml) に溶解。この溶液に氷冷下, Et₃N (3.5 ml) と Z(OMe)-Ser-NHNH₂⁸¹ (7.37 g), 3.79 M · HCl -DMF (14.51 ml), IAN (3.75 ml), Et₃N (11.3 ml) より調製したアジドの DMF 溶液 (60 ml) を混合し, 48 hr 反応する。溶媒留去し, 残渣を AcOEt に溶解。AcOEt 層を 10% クエン酸, 飽和食塩水で洗浄し,

乾燥した後, AcOEt 留去。残渣に ether 加えて結晶化。MeOH-ether より再結晶。

収量 15.86 g (81%) .

mp 147 - 148°

$[\alpha]_D^{22} -15.2^\circ$ (c=1.0, MeOH), Rf_1 0.57 .

Anal. Calcd. for $C_{29}H_{38}N_5O_{10}Cl_3$:

C, 48.81 ; H, 5.03 ; N, 9.71 .

Found : C, 48.51 ; H, 5.11 ; N, 9.66 .

(22) Z(OMe)-Tyr-Ser-Lys(Z)-NHNHTroc

Z(OMe)-Ser-Lys(Z)-NHNHTroc (15.76 g) にアニソール (6.6 ml) を加え TFA 処理。TFA を室温で留去し, 残渣にエーテルを加え decant. で洗浄後, KOH 粒上で乾燥。得られた油状物を Et_3N (2.8 ml) を含む DMF 溶液 (40 ml) に溶解。氷冷下この溶液に, Z(OMe)-Tyr-NHNH₂⁴³ (7.55 g) と, 3.79 M · HCl-DMF (13.2 ml), IAN (3.2 ml), Et_3N (10.5 ml) より調製したアジドの DMF 溶液 (80 ml) を加える。攪拌下 48hr アジド反応後, 溶媒留去し, 残渣に AcOEt と 10%-クエン酸を加え, 1 晩冷蔵庫に放置する。生成するゲルを汙取し, 10%-クエン酸, 水で batchwise に洗浄後, MeOH-AcOEt で再沈殿を行う。

収量 14.13 g (75%) .

mp 183-186°

$[\alpha]_D^{22} -3.7^\circ$ (c=1.1, DMF), Rf_1 0.67 .

Anal. Calcd. for $C_{38}H_{45}N_6O_{12}Cl_3$:

C, 51.62 ; H, 5.13 ; N, 9.51 .

Found: C, 51.62 ; H, 5.31 ; N, 9.25 .

(23) Boc-Asp(OBzl)-Tyr-Ser-Lys(Z)-NHNHTroc

Z(OMe)-Tyr-Ser-Lys(Z)-NHNHTroc (11.54 g) にアニソール (6.7 ml) を加え, 常法 TFA 処理する。Ether を加えて powder とし, 汉取乾燥後, DMF (100 ml) に溶解する。この溶液に, Et_3N (1.7 ml) について Boc

-Asp(OBzl)-ONP¹⁰¹⁾ (6.22 g), HOBt (1.84 g) を加え, 攪拌下 1 晩反応。ついで溶媒留去し, 残渣を AcOEt に溶解し, 10%-クエン酸, 飽和食塩水で洗浄し, 乾燥後, AcOEt 留去する。残渣に ether を加えて結晶化し, EtOH-ether より再結晶する。

収量 7.45 g (61%).

mp 116 - 118°

$[\alpha]_D^{22} -15.1^\circ$ (c=1.1, DMF), Rf_1 0.74 .

Anal. Calcd. for $C_{45}H_{56}N_7O_{14}Cl_3$:

C, 52.71 ; H, 5.51 ; N, 9.56 .

Found: C, 52.51 ; H, 5.44 ; N, 9.36 .

(24) Boc-Asp(OBzl)-Tyr-Ser-Lys(Z)-NHNH₂ (E)

Boc-Asp(OBzl)-Tyr-Ser-Lys(Z)-NHNHTroc (4.10 g) を DMF - AcOH (20ml - 20ml) に溶解し, Zn 末 (約 4 g) を加え室温で 3 hr 攪拌下反応する。フィルターセルをしいて濾過し, Zn を濾去, 濾液を濃縮。残渣に飽和 EDTA 水溶液を加え, NaHCO₃ で中和し, 1 晩冷蔵庫に放置する。生成する沈殿物を濾取し, 5%-NaHCO₃, 水で batchwise に洗浄後, MeOH より再結晶。

収量 2.18 g (64%).

mp 172 - 174°

$[\alpha]_D^{20} -11.8^\circ$ (c=0.8, DMF), Rf_1 0.51 .

酸分解後のアミノ酸分析値:

Asp 1.00, Tyr 1.11, Ser 0.90, Lys 0.94 .

(平均回収率 80%)

Anal. Calcd. for $C_{42}H_{55}N_7O_{12}$:

C, 59.85 ; H, 6.52 ; N, 11.54 .

Found : C, 59.19 ; H, 6.75 ; N, 11.43 .

(25) Z(OMe)-Thr-Ser-OMe

H-Ser-OMe (3.11 g の塩酸塩と 2.8 ml の Et₃N より調製) の DMF 溶液

(30ml)に、氷冷下、Z(OMe)-Thr-NHNH₂⁸¹(5.95g)と、5.96M・HCl-DMF(7.55ml), IAN(2.9ml), Et₃N(9.8ml)より調製したアジドのDMF溶液(50ml)を加え48hrアジド反応。溶媒留去し、残渣にetherと食塩飽和10%-クエン酸を加え冷蔵庫に1晩放置。生成するゲル状結晶を汙取、食塩飽和5%-クエン酸、飽和食塩水でbatchwiseに洗浄。MeOH-AcOEtより再結晶する。

収量 5.29g (69%).

mp 134 - 137°

$[\alpha]_D^{22}$ -6.7° (c=0.9, MeOH), Rf_1 0.60.

Anal. Calcd. for C₁₇H₂₄N₂O₈ :

C, 53.12 ; H, 6.29 ; N, 7.29 .

Found : C, 53.42 ; H, 6.09 ; N, 7.31 .

(26) Boc-Thr-Phe-NHNH₂

Boc-Thr-OH・DCHA(5.0g)とHCl・H-Phe-OMe(3.59g)のDMF溶液(50ml)にDCC(3.94g)を加え、室温で48hr攪拌下反応する。生成するDC-ureaを汉去し、汉液を濃縮。残渣をAcOEtに溶解し、5%-HCl, 5%-NaHCO₃, 飽和食塩水で洗浄し、乾燥後、AcOEtを完全に留去。残渣をEtOHに溶解し(60ml), 室温で80%-含水ヒドラジン(4.0ml)を加え1晩放置する。生成する結晶を汉取、DMF-EtOHより再結晶する。

収量 4.0g (82%).

mp 191 - 195°

$[\alpha]_D^{25}$ -12.3° (c=0.6, DMF), Rf_1 0.64 .

Anal. Calcd. for C₁₈H₂₈N₄O₅・1/4 H₂O :

C, 56.16 ; H, 7.46 ; N, 14.57 .

Found: C, 56.13 ; H, 7.57 ; N, 14.38 .

(27) Boc-Thr-Phe-Thr-Ser-OMe

Z(OMe)-Thr-Ser-OMe(5.77g)をアニソール(8.1ml)の存在下、常法TFA(11ml)処理する。TFAを室温で留去し、残渣にetherを加えて

powderとし、汙取乾燥する。ついでDMF(45ml)に溶解し、氷冷下、 Et_3N (2.1ml)を加えた後、Boc-Thr-Phe-NHNH₂ (3.80g)と5.96 M·HCl - DMF (4.2ml), IAN (1.5ml), Et_3N (5.6ml)より調製したアジドのDMF溶液(30ml)を加えて、48hr アジド反応する。溶媒留去し、残渣をAcOEtと5%-クエン酸で処理し、結晶化。結晶汙取し、5%-クエン酸、水で軽くbatchwiseに洗浄し、MeOH-AcOEtより再結晶。

収量 4.20 g (74%).

mp 169 - 172°

$[\alpha]_D^{26} -3.7^\circ$ (c=0.8, DMF), Rf_1 0.46.

Anal. Calcd. for $\text{C}_{26}\text{H}_{40}\text{N}_4\text{O}_{10} \cdot 1\frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$:

C, 52.42; H, 7.28; N, 9.41.

Found: C, 52.50; H, 7.21; N, 9.46.

(28) Boc-Thr-Phe-Thr-Ser-NHNH₂ [F]

上記保護テトラペプチドメチルエステル(27)(0.7g)をMeOH(7ml)に溶解し、室温で80%-含水ヒドラジン(0.3ml)を加え1晩放置する。生成する結晶汙取し、DMF-MeOHより再結晶する。

収量 0.29 g (42%).

mp 179 - 184°

$[\alpha]_D^{26} -4.4^\circ$ (c=1.1, DMF), Rf_1 0.51.

Anal. Calcd. for $\text{C}_{25}\text{H}_{40}\text{N}_6\text{O}_9 \cdot \frac{1}{4}\text{H}_2\text{O}$:

C, 52.39; H, 7.12; N, 14.66.

Found: C, 52.39; H, 7.20; N, 14.49.

(29) Z(OMe)-Gln-Gly-OMe

H-Gly-OMe(4.14gの塩酸塩と6.3mlの Et_3N より調製)のDMF - 水(80ml-20ml)混液に、Z(OMe)-Gln-ONP¹⁰²⁾(12.94g)を加え、室温で1晩反応する。溶媒を留去し、残渣にAcOEtを加えて結晶化。結晶汙取し、10%-クエン酸、水でbatchwiseに洗浄後、DMF-AcOEtより再結晶する。

収量 10.83 g (95%).

mp 180–181°

$[\alpha]_D^{22} +12.8^\circ$ (c=0.9, DMF), Rf_1 0.59.

Anal. Calcd. for $C_{17}H_{23}N_3O_7$:

C, 53.53 ; H, 6.08 ; N, 11.02 .

Found: C, 53.71 ; H, 5.91 ; N, 11.16 .

(30) Z(OMe)-Ser-Gln-Gly-OMe

Z(OMe)-Gln-Gly-OMe (3.81g) にアニソール (3.3ml) を加え, 常法 TFA (6 ml) 処理する。ついで, ether を加えて powder とし, 汙取乾燥。これを, Et_3N (1.4ml) を含む DMF (20ml) に溶解し, 氷冷下, Z(OMe)-Ser-NHNH₂⁸¹ (2.83 g) と 3.79 M·HCl - DMF (5.8ml), IAN (1.48 ml), Et_3N (4.88ml) より調製したアジドの DMF 溶液 (20ml) と混合し, 48 hr アジド反応を行う。次に溶媒留去し, 残渣に AcOEt を加えてゲルを得る。ゲルを汉取し, 10 % - クエン酸, 水で batchwise に洗浄後, DMF - AcOEt より再沈殿する。

収量 3.46 g (74%) .

mp 156 - 157°

$[\alpha]_D^{22} -1.1^\circ$ (c=0.9, DMF), Rf_1 0.48 .

Anal. Calcd. for $C_{20}H_{28}N_4O_9 \cdot 1/2 H_2O$:

C, 50.80 ; H, 6.12 ; N, 11.74 .

Found : C, 50.46 ; H, 5.98 ; N, 11.64 .

(31) Z-His-Ser-Gln-Gly-OMe

Z(OMe)-Ser-Gln-Gly-OMe (4.78 g) にアニソール (5.4ml) を加え, 常法 TFA (10ml) 処理。室温で TFA 留去し, 残渣に ether を加えて powder とする。この powder を汉取乾燥し, Et_3N (1.4ml) を含む DMF 溶液 (20ml) に溶解する。氷冷下, この溶液に, Z-His-NHNH₂⁸⁴ (3.49 g) と 5.96 M·HCl - DMF (6.7ml), IAN (1.7ml), Et_3N (7.4ml) より調製したアジドの DMF 溶液 (30ml) を加え, 48 hr アジド反応する。ついで, 溶

媒留去し、残渣に AcOEt を加えてゲル状結晶を得る。結晶濾取し、MeOH - AcOEt で再結晶をくり返す。

収量 5.40 g (94%).

mp 118 - 122°

$[\alpha]_D^{24} -6.7^\circ$ (c=1.0, DMF), Rf_1 0.24 .

Anal. Calcd. for $C_{25}H_{33}N_7O_9 \cdot 2\frac{1}{2}H_2O$:

C, 48.38 ; H, 6.17 ; N, 15.80 .

Found: C, 48.32 ; H, 5.92 ; N, 15.77 .

(32) Z-His-Ser-Gln-Gly-NHNH₂ [G]

Z-His-Ser-Gln-Gly-OMe (4.30 g) を MeOH (50ml) に溶解し、80% - 含水ヒドラジン (2.3ml) を加え、1晩放置し、生成する結晶濾取。DMF - MeOH より再結晶する。

収量 3.44 g (80%).

mp 208 - 212°

$[\alpha]_D^{22} -9.9^\circ$ (c=1.3, DMF), Rf_1 0.10 .

酸分解後のアミノ酸分析値:

His 1.19, Ser 0.91, Glu 1.00, Gly 1.00 .

(平均回収率 99%).

Anal. Calcd. for $C_{24}H_{33}N_9O_8 \cdot \frac{1}{4}H_2O$:

C, 49.69 ; H, 5.82 ; N, 21.73 .

Found : C, 49.95 ; H, 6.01 ; N, 21.17 .

(33) Boc-Asp(OBzl)-Tyr-Ser-Lys(Z)-Tyr-Leu-Asp(OBzl)-Thr-Arg(MBS)-Arg(MBS)-Ala-Gln-Asp(OBzl)-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met(O)-Ser-Thr-OH
[Boc-(duck glucagon 9-29)-OH]

Boc-(duck glucagon 13-29)-OH (19) (0.72g) に、スカトール (68

mg) と 0.1% - EDT 含有アニソール (1ml) を加え, 常法 TFA (2ml) 処理する。ついで, ether を加えて powder とし, ether で十分洗浄後, 乾燥する。これを, Et_3N (0.07ml) 含有 NMP-DMF (3ml-2ml) 混液に溶解する。氷冷下, この溶液に, Boc-Asp(OBzl)-Tyr-Ser-Lys(Z)-NHNH₂ [E] (0.40g) と 5.96M · HCl-DMF (0.17ml), IAN (0.07ml), Et_3N (0.21ml) より調製したアジドの DMF 溶液 (5ml) を加え, 48hr アジド反応を行う。反応後, AcOH を加えて中和し溶媒留去。残査に, 5% - クエン酸と AcOEt を加え powder とする。この powder を汙取し, 5% - クエン酸, 水で batchwise に洗浄後, DMF-EtOH で再沈殿する。

収量 0.81g (90%).

mp 247-249°

$[\alpha]_D^{25}$ -3.0 (c=0.7, DMF), Rf_6 0.87, Rf_7 0.41.

酸分解後のアミノ酸分析値:

Asp 3.29, Tyr 1.79, Ser 2.04, Lys 1.01,
Leu 1.74, Thr 1.96, Arg 2.07, Ala 1.00,
Glu 2.09, Phe 1.08, Val 1.03, Trp 0.67,
Met+Met(O) 0.76. (平均回収率 88%)

Anal. Calcd. for. $\text{C}_{165}\text{H}_{219}\text{N}_{31}\text{O}_{47}\text{S}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$:

C, 55.71 ; H, 6.43 ; N, 12.21 .

Found: C, 55.55 ; H, 6.68 ; N, 12.44 .

(34) Boc-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp(OBzl)-Tyr-Ser-Lys(Z)-Tyr-
Leu-Asp(OBzl)-Thr-Arg(MBS)-Arg(MBS)-Ala-Gln-Asp
(OBzl)-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met(O)-Ser-Thr-OH
[Boc-(duck glucagon 5-29)-OH]

Boc-(duck glucagon 9-29)-OH(33) (0.73g) に, スカトール (55mg) と 0.1% - EDT 含有アニソール (1ml) を加え常法 TFA (2ml) 処理する。ついで, ether を加えて powder とし, 汉取乾燥後, NMP-DMF (2ml

-3ml) 混液に溶解する。氷冷下、この溶液に、 Et_3N (0.06ml) を加えた後、 $\text{Boc-Thr-Phe-Thr-Ser-NHNH}_2$ [F] (0.16g), $5.96\text{M} \cdot \text{HCl-DMF}$ (0.16 ml), IAN (0.07ml), Et_3N (0.2ml) より調製したアジドの DMF 溶液 (2 ml) を加えて 48hr アジド反応を行う。反応後、 AcOH を加えて中和し、溶媒留去。残渣に、5%-クエン酸と AcOEt を加えて、powder とする。この powder を汙取し、5%-クエン酸、水で batchwise に洗浄後、 DMF-MeOH で再沈殿を行う。

収量 0.53 g (64%).

mp 235 - 240°

$[\alpha]_D^{26} -19.3^\circ$ (c=0.5, DMF), Rf_6 0.78, Rf_7 0.44.

酸分解後のアミノ酸分析値:

Thr 3.59, Phe 1.85, Ser 2.76, Asp 3.26,

Tyr 2.10, Lys 0.90, Leu 2.08, Arg 1.74,

Ala 1.00, Glu 2.18, Val 1.06, Trp 0.74,

Met+Met(O) 0.83. (平均回収率 99%)

Anal. Calcd. for $\text{C}_{185}\text{H}_{247}\text{N}_{35}\text{O}_{54}\text{S}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$:

C, 55.63 ; H, 6.44 ; N, 12.28 .

Found : C, 55.45 ; H, 6.59 ; N, 12.28 .

(35) Z-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp(OBzl)-Tyr-
Ser-Lys(Z)-Tyr-Leu-Asp(OBzl)-Thr-Arg(MBS)-Arg(MBS)
-Ala-Gln-Asp(OBzl)-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met(O)-Ser-
Thr-OH [Z-(duck glucagon 1-29)-OH]
(protected duck glucagon)

$\text{Boc-(duck glucagon 5-29)-OH}$ (34) (0.48g) に、スカトール (32mg) と 0.1%-EDT 含有アニソール (0.8ml) を加えて、常法 TFA (2ml) 処理。Ether 加えて powder とし、汉取乾燥後、 Et_3N (0.04ml) を含む NMP (3 ml) に溶解する。氷冷下、この溶液に、 $\text{Z-His-Ser-Gln-Gly-NHNH}_2$ [G] (0.17g) と $3.27\text{M} \cdot \text{HCl-DMF}$ (0.31ml), IAN (0.05ml), Et_3N

(0.21ml)より調製したアジドのDMF-NMP(1ml-1ml)溶液を混合し、48hr アジド反応を行う。次に、AcOHを滴下し中和後、溶媒を留去。残査に5%-クエン酸とAcOEtを加えて powder とする。この powder を汙取し、5%-クエン酸、水で batchwise に洗浄し、DMF-EtOH で再沈殿を行う。

収量 0.51g (97%) .

mp 223 - 226°

$[\alpha]_D^{24} + 3.1^\circ$ (c=1.0, DMF), Rf_6 0.72, Rf_7 0.29 .

酸分解後のアミノ酸分析値:

His 1.06, Ser 3.67, Glu 3.12, Gly 1.05,
Thr 3.43, Phe 1.76, Asp 3.16, Tyr 1.94,
Lys 1.01, Leu 1.93, Arg 1.90, Ala 1.00,
Val 1.08, Trp 0.79, Met+Met(O) 0.72 .

(平均回収率 98%)

Anal. Calcd. for $C_{204}H_{268}N_{42}O_{60}S_3 \cdot 5H_2O$:

C, 54.99 ; H, 6.29 ; N, 13.21 .

Found: C, 55.16 ; H, 6.91 ; N, 13.03 .

(36) H-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-
Tyr-Leu-Asp-Thr-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp
-Leu-Met-Ser-Thr-OH
(Duck glucagon)

上記保護アヒルグルカゴン [Z-(duck glucagon 1-29)-OH] (35) (521mg) にアニソール (1ml) とスカトール (80mg, 5eq) を加え、 N_2 置換後、MSA で無水氷冷下 15min, ついで室温で 45min 処理する。そして、反応液を、NaCl-水で充分に冷却後、ether を加えて powder とする。この powder を汉取し、ether でよく洗浄し、KOH 粒上素早く乾燥した後、水 (45ml) に溶解する。この水溶液を、Amberlite CG-4B type II (acetate form, 湿重量約 5g) で、氷冷下 60min 処理し、樹脂を汉去。汉液に、

氷冷下、 $2\text{M}-\text{NH}_4\text{OH}$ (15ml) を加え、氷冷のまま、30min 攪拌し、凍結乾燥を行って白色粉末とする。

収量 472mg

得られた白色粉末 (粗 [27-Met(O)]-duck glucagon) を、 $0.5\%-\text{AcOH}$ (8ml) に溶解。不溶物を汙去し、汙液を Sephadex G-25 fine (3×150cm) のゲルクロマトに apply する。同一溶媒で溶出を行い (1Frac. 6.0ml each), 280nm における吸光度を測定し、理論の部 Fig. 29 に示す溶出曲線を得た。そして、目的物画分 (tube No. 105-140) を集め、凍結乾燥し、白色粉末とする。

収量 207mg (84%)

なお、フロントピーク (tube No. 75-90) の副生成物は、凍結乾燥し、白色粉末として 35mg 得られた。

続いて、上記目的物画分 (109mg) を水 (4ml) に溶解し、CM-セルロース (2.4×6.8cm) のイオン交換クロマトに apply する。そして、最初、水 (120ml) で溶出し、ついで、水 (800ml)- $0.06\text{M}\cdot\text{NH}_4\text{HCO}_3$ (pH 6.9, 800ml) buffer の gradient 溶出 (1Frac. 6.0ml each) を行った。そして、280nm における吸光度を測定し、理論の部 Fig. 30 に示す溶出曲線を得た。目的物画分 (tube No. 53-85) を集め、凍結乾燥を行い白色粉末とした。次に、この粉末を、水 (3ml) に溶解し、2-mercaptoethanol (0.1ml) を加え、 N_2 置換後、 45°C , 48hr, incubate し、還元を行った。すると、TLC 上 Rf_4 0.53 の [27-Met(O)] 体のスポットの消失とともに、 Rf_4 0.56 の Met 試薬陽性の還元体、すなわち目的物アヒルグルカゴンの出現が認められる。完全に Rf_4 0.53 のスポットの消失を確認した後、脱塩のため、本還元液を Sephadex G-25 fine (2.5×140cm) のカラムに apply する。そして、 $0.5\%-\text{AcOH}$ で溶出 (1Frac. 6ml each) を行い、280nm における吸光度を測定し、理論の部 Fig. 31 に示す溶出曲線を得た。目的物主画分 (tube No. 80-91) を集め凍結乾燥して、白色羽毛状のアヒルグルカゴンを得る。

収量 49mg (45%). Rf_4 0.56, Rf_5 0.96.

酸分解後のアミノ酸分析値:

His 0.84, Ser 3.93, Glu 3.06, Gly 1.22,

Thr 3.64, Phe 1.91, Asp 3.14, Tyr 1.85,
Lys 1.11, Leu 1.73, Arg 2.22, Ala 1.11,
Val 1.00, Trp 1.01, Met 0.83.

(平均回収率 83%)

次に、本品の 15mg をとり、0.02% - NaCl 水溶液 (1.5ml) に懸濁し、0.1 M - NaOH を滴下し、pH10.5 に adjust して溶解する。ついで、0.1 M - HCl をゆっくり滴下し、pH を 8.5 まで下げ、そのまま室温で 1 晩、冷蔵庫 (4°C) で 3 日間放置する。生成する白色結晶状沈殿物を遠心して集め、0.02% - NaCl で軽く洗浄し、素早く乾燥する。そして、顕微鏡にて観察し (300 倍)、理論の部 Fig. 32 に示す結晶アヒルグルカゴンを得た。

収量 6.7 mg (45%)

$[\alpha]_D^{24} -32.4^\circ$ (c=0.8, 0.5% - AcOH).

AP-M 酵素消化後のアミノ酸分析値：(カッコ内は予想値)

His 1.17(1), Ser 4.04(4), Gln+Thr 5.88 (3+4),
Gly 1.31(1), Phe 1.97(2), Asp 2.70(3),
Tyr 1.68(2), Lys 1.18(1), Leu 1.75(2),
Arg 2.14(2), Ala 1.14(1), Val 1.00(1),
Trp 0.99(1), Met 0.86(1).

(平均回収率 82%) (Gln は Thr として計算)

15% - 分離用ポリアクリルアミド disc 電気泳動 (0.5×6.0 cm tube) を pH 2.3, 5 mA/tube, 2hr, 0.37 M · glycine - AcOH buffer に行い、Amido Black 10B 染色¹⁰³⁾で、cathode より 1.4 cm の位置に単一バンドを示した。Ampholine (pH 3.5-10, LKB 社) を用いた等電点ポリアクリルアミド disc 電気泳動 (0.5×6.0 cm tube) を、陽極 buffer : 0.2% - H₂SO₄ 陰極 buffer : 0.4% - ethylenediamine にて、1 mA/tube 1 hr そして 100 V const. 1 hr 行い、Coomassie Brilliant Blue G-250 で染色¹⁰⁴⁾を行って、アルカリ側末端に対し、酸性端より 2.9 cm の位置に単一バンドを示した。(理論の部 Fig. 33)

Anal. Calcd. for C₁₅₉H₂₃₈N₄₂O₅₅S · 3CH₃COOH · 16H₂O :

C, 48.49 ; H, 6.91 ; N, 14.94 .

Found: C, 48.19 ; H, 6.83 ; N, 15.47 .

引 用 文 献

- 1) W. W. Bromer, L. G. Dinn and O. K. Behrens,
J. Am. Chem. Soc., **79**, 2807 (1957)
- 2) W. W. Bromer, M. E. Boucher and J. E. Koffenberger Jr.,
J. Biol. Chem., **246**, 2822 (1971)
- 3) F. Sundby and J. Markussen, Horm. Metab. Res., **3**, 184
(1971)
- 4) J. Thomsen, K. Kristiansen, K. Brunfeldt and F. Sundby,
FEBS Lett., **21**, 315 (1972)
- 5) F. Sundby and J. Markussen, Horm. Metab. Res., **4**, 56
(1972)
- 6) H. Markussen, E. Frandsen, L. G. Heding and F. Sundby,
Horm. Metab. Res., **4**, 360 (1972)
- 7) H. G. Pollock and J. R. Kimmel, J. Biol. Chem., **250**,
9377 (1975)
- 8) F. Sundby, E. K. Frandsen, J. Thomsen, K. Kristiansen
and K. Brunfeldt, FEBS Lett., **26**, 289 (1972)
- 9) E. Wünsch and G. Wendlberger, Chem. Ber., **101**, 3659
(1968)
- 10) L. Zervas, D. Borovas and E. Gazis, J. Am. Chem. Soc.,
85, 3660 (1963)
- 11) Synthetic Protein Research Group, China Biochem. Inst.,
Acta Biochim. Biophys. Sinica, **7**, 119 (1975)
- 12) H. Yajima, Y. Kiso, Y. Okada and H. Watanabe, J. Chem.
Soc. Chem. Commun., **1974**, 106.
H. Yajima and Y. Kiso, Chem. Pharm. Bull. (Tokyo), **22**,
1087 (1974)
- 13) Biochem., **5**, 2485 (1966) *ibid.*, **6**, 362 (1967) *ibid.*, **11**,
1726 (1972)

- 14) M. Bergmann and L. Zervas, Chem. Ber., **65**, 1192 (1932)
- 15) F. C. McKay and W. F. Albertson, J. Am. Chem. Soc.,
79, 4686 (1957)
- 16) G. W. Anderson and F. M. Callahan, J. Am. Chem. Soc.,
82, 3359 (1960)
- 17) H. C. Bayerman and J. S. Bontekoe, Proc. Chem. Soc.
(London), **1961**, 249.
- 18) F. Weygand and K. Hunger, Chem. Ber., **95**, 1 (1962)
- 19) M. Bergmann, L. Zervas and L. Schzmann, Chem. Ber.,
66, 1288 (1933)
- 20) K. Okawa, Bull. Chem. Soc. Japan, **30**, 110 (1957)
- 21) R. A. Uphaus, L. I. Grossweiner, J. J. Katz and
K. D. Kopple, Science, **129**, 641 (1959)
- 22) D. M. Theodoropoulos and T. S. Fruton, Biochem., **1**, 933
(1962)
- 23) Y. Omori, Y. Matsuda, A. Aimoto, Y. Shimonishi and
M. Yamamoto, Chem. Lett., 805 (1976)
- 24) S. Sakakibara, Y. Shimonishi, Y. Kishida, M. Okada
and H. Sugihara, Bull. Chem. Soc. Japan, **40**, 2164 (1967)
- 25) J. J. Sharp, A. B. Robinson and M. D. Kamen,
J. Am. Chem. Soc., **95**, 6097 (1973)
- 26) Y. B. Alakhov, A. A. Kuryushkin, V. M. Lipkin and G. W. A.
Milne, J. Chem. Soc. Chem. Commun., **1970**, 406.
- 27) E. Wünsch, E. Jager, L. Kisfaludy and M. Lön, Angew.
Chem., **89**, 330 (1977)
- 28) N. Chino, Y. Masui and S. Sakakibara,
"Peptide Chemistry 1977" ed. by T. Shiba,
Protein Research Foundation, p 27, 1977.
- 29) M. Hanaoka, H. Sassa, C. Shimezawa and Y. Arata, Chem.
Pharm. Bull.(Tokyo), **23**, 2478 (1975)

- 30) T. Y. Liu and Y. H. Chang, *J. Biol. Chem.*, **246**, 2842 (1971)
- 31) R. J. Simpson, M. R. Neuberger and T. Y. Liu, *J. Biol. Chem.*, **251**, 1936 (1976)
- 32) H. Yajima, Y. Kiso, H. Ogawa, N. Fujii and H. Irie, *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, **23**, 1164 (1975)
- 33) B. Halpern and E. Nitecki, *Tetrahedron Lett.*, 3031 (1967)
- 34) H. Kinoshita and H. Kotake, *Chem. Lett.*, 631 (1974)
- 35) R. G. Hiskey, L. M. Beachem, V. G. Matl, J. N. Smith, E. B. Williams, Jr., A. M. Thomas and E. T. Wolters, *J. Org. Chem.*, **36**, 488 (1971)
E. Schnabel, H. Klostermeyer and H. Berndt, *Justus Liebigs Ann. Chem.*, **749**, 90 (1971)
- 36) J. Goodacre, R. J. Ponsford and I. Stirling, *Tetrahedron Lett.*, 3609 (1975)
- 37) H. Yajima, F. Tamura, Y. Kiso and M. Kurobe, *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, **21**, 1380 (1973)
- 38) R. Schwyzer, A. Costopanagiotis and P. Sieber, *Helv. Chim. Acta*, **46**, 870 (1963)
- 39) H. Yajima and Y. Kiso, *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, **19**, 420 (1971)
- 40) J. Hüges, T. W. Smith, H. W. Kosterkitz, L. A. Fothergill, B. A. Morgan and H. R. Morris, *Nature*, **258**, 577 (1975)
- 41) A. Goldstein, J. S. Goldstein and B. M. Cox, *Life Science*, **17**, 1643 (1975)
- 42) J. S. Sheehan and G. P. Hess, *J. Am. Chem. Soc.*, **77**, 1067 (1955)
- 43) N. Fujii and H. Yajima, *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, **23**, 2446 (1975)

- 44) J. Honzl and J. Rudinger, Coll. Czech. Chem. Commun.,
26, 2333 (1961)
- 45) M. Bodanszky and V. du Vigneaud, J. Am. Chem. Soc., **81**,
5688 (1959)
- 46) J. Kovacs and A. Kapoor, J. Am. Chem. Soc., **87**, 118
(1965)
- 47) G. Pfeleiderer and P. G. Celliers, Biochem. Z., **339**,
186 (1963)
- 48) B. Riniker, B. Kamber and P. Sieber, Helv. Chim. Acta,
58, 1086 (1975)
- 49) J. R. Murlin, H. D. Clough, C. B. F. Gibbs and A. M.
Stokes, J. Biol. Chem., **56**, 252 (1923)
- 50) A. Staub, L. Sinn and O. K. Behrens, Science, **117**, 628
(1958)
- 51) H. S. Tager and D. F. Steiner, Proc. Natl. Acad. Sci.
USA, **70**, 2321 (1973)
- 52) J. E. Jorpes, V. Mutt, S. Magnusson and B. B. Steele,
Biochem. Biophys. Res. Commun., **9**, 275 (1962)
V. Mutt, S. Magnusson, J. E. Jorpes and E. Dahl,
Biochem., **4**, 2358 (1965)
- 53) M. Bodanszky, U. S. Klausner and S. I. Said, Proc. Natl.
Acad. Sci. USA, **70**, 382 (1973)
- 54) J. C. Brown and J. R. Dryburgh, Can. J. Biochem., **49**,
867 (1971)
- 55) R. H. Unger, H. Ketterer and A. M. Hisentraut, Metabolism,
15, 865 (1966)
- 56) A. P. Ryle, F. Sanger, L. F. Smith and R. Kitai, Biochem.
J., **60**, 541 (1955)
- 57) J. H. Exton, G. A. Robinson and E. W. Sutherland,
Endocrine Pancreas (ed. by D. F. Steiner and N. Freinkel)
p425 American Physiological Society, Washington, D. C.
(1972)

- 58) A. Farah and R. Tuttle, J. Pharmacol. Exp. Ther.
129, 49 (1960)
- 59) E. Samols, G. Marri and V. Marks, Lancet, **2**, 415 (1965)
- 60) S. J. Konturek, T. Demitrescu, T. Radecki, P. Thor and
A. Pucher, Digest Dis., **19**, 557 (1974)
- 61) V. Mutt and J. E. Jorpes, Biochem. J., **125**, 57p (1971)
- 62) S. J. Konturek, J. Tasler and W. Obtulowicz,
Digestion, **10**, 138 (1974)
- 63) M. C. Lin, D. E. Wright, V. J. Hruby and M. Rodbell,
Biochem., **14**, 1559 (1975)
- 64) P. Edman, Arch. Biochem. Biophys., **22**, 475 (1949)
- 65) E. Gross and B. Witkop, J. Biol. Chem., **237**, 1856 (1962)
- 66) A. Loubatieres, Presse Med., **63**, 1701 (1955)
- 67) E. Wünsch, A. Fontana and F. Dress, Z. Naturforsch.,
22b, 607 (1967)
- 68) M. Fujino, M. Wakimasu, S. Shinagawa, C. Kitada and
H. Yajima, Chem. Pharm. Bull. (Tokyo), **26**, 589 (1978)
- 69) M. Wakimasu and M. Fujino, Chem. Pharm. Bull. (Tokyo),
26, 1522 (1978)
- 70) R. Schwyzer and C. H. Li, Nature, **182**, 1669 (1958)
E. Schnabel and C. H. Li, J. Am. Chem. Soc., **82**, 4576
(1960)
J. Ramachandran and C. H. Li, J. Org. Chem., **27**, 4006
(1962)
- 71) O. Nishimura and M. Fujino, Chem. Pharm. Bull.
(Tokyo), **24**, 1568 (1976)
- 72) H. Irie, N. Fujii, H. Ogawa, H. Yajima, M. Fujino and
S. Shinagawa, J. Chem. Soc. Chem. Commun., **1976**, 922.
idem., Chem. Pharm. Bull. (Tokyo), **25**, 2929 (1977)
- 73) N. Fujii, T. Sasaki, S. Funakoshi, H. Irie and H. Yajima,
Chem. Pharm. Bull. (Tokyo), **26**, 650 (1978)

- 74) P. Sieber, W. Rittel and B. Riniker, *Helv. Chim. Acta*, **55**, 1243 (1972)
M. Bodanszky, M. L. Fink, Y. S. Klausner, S. Natarajan, K. Tatemoto, A. E. Yiotakis and A. Bodanszky, *J. Org. Chem.*, **42**, 149 (1977)
- 75) H. Yajima and Y. Kiso, *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, **19**, 420 (1971)
- 76) A. Staub, L. Sinn and O. T. Behrens, *J. Biol. Chem.*, **214**, 619 (1955)
- 77) W. König and R. Geiger, *Chem. Ber.*, **106**, 3626 (1973)
- 78) E. Schnabel, *Justus Liebig's Ann. Chem.*, **702**, 188 (1967)
- 79) S. Moore, W. H. Stein, "Methods in Enzymology," ed. by S. P. Colowick, N. O. Kaplan, Academic press, New York, Vol. 6, p 819 (1968).
- 80) Th. Wieland and H. Bernhard, *Ann. Chem.*, **572**, 190 (1951)
R. A. Boissonnas, *Helv. Chim. Acta*, **34**, 874 (1951)
J. R. Vaughan, *J. Am. Chem. Soc.*, **73**, 3547 (1951)
- 81) M. Ohno, T. Kato, N. Mitsuyasu, M. Waki, A. Makisumi and N. Izumiya, *Bull. Chem. Soc. Japan*, **40**, 204 (1967)
- 82) T. Nagasawa, K. Kuroiwa, K. Narita and Y. Isowa, *Bull. Chem. Soc. Japan*, **46**, 1269 (1973)
- 83) K. Hofmann, R. Schmichen, R. D. Wells, Y. Wolman and N. Yanaihara, *J. Am. Chem. Soc.*, **87**, 611 (1965)
- 84) R. W. Holley and E. Sondheimer, *J. Am. Chem. Soc.*, **76**, 1326 (1954)
- 85) T. Wakamiya, U. Tarumi and T. Shiba, *Chem. Lett.*, **1973**, 233.
- 86) S. Sakakibara in "Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides and Proteins" ed. by B. Weinstein, Marcel Dekker Inc., New York, 1971, Vol. 1, p51.
- 87) B. Iselin, *Helv. Chim. Acta.*, **44**, 61 (1961)

- 88) G. Toennies and J. J. Kolb, *Anal. Chem.*, **23**, 824 (1951)
- 89) R. G. Finlayson and A. Chrambach, *Anal. Biochem.*, **40**, 292 (1971)
- 90) E. A. Parada, A. M. Eisentraut and R. H. Unger, *Amer. J. Med. Sci.*, **257**, 415 (1969)
- 91) S. Moore, D. H. Speckman and W. Stein, *Anal. Chem.*, **30**, 1185 (1958)
- 92) L. Graf, A. Z. Ronai, S. Bajusz, G. Cseh and J. I. Szekely, *FEBS Lett.*, **64**, 181 (1976)
- 93) W. Voelter, C. Burvenich, H. Horn and H. Kalbacher, *Tetrahedron Lett.*, 2119 (1976)
- 94) E. Klieger, *Justus Liebig's Ann. Chem.*, **724**, 204 (1969)
- 95) Y. Mori and H. Yajima, *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, **24**, 2781 (1976)
- 96) J. R. Spies and D. C. Chambers, *Anal. Chem.*, **20**, 30 (1948) idem, *ibid*, **21**, 1249 (1949)
- 97) H. Yajima, T. Sasaki, H. Ogawa, N. Fujii, T. Segawa and Y. Nakata, *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, **26**, 1231 (1978)
- 98) M. Bodanszky, K. W. Funk and M. L. Fink, *J. Org. Chem.*, **38**, 3565 (1973)
- 99) H. C. Beterman, C. A. M. Boers-Boonekamp and H. Maassen van den Brink-Zimmermannova, *Rec. Trav. Chim. Pays-Bas*, **87**, 257 (1968)
- 100) H. Ogawa, M. Kubota, H. Yajima, T. Tobe, M. Fujimura, K. Henmi, K. Torizuka, H. Adachi, H. Imura and T. Taminato, *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, **24**, 2447 (1976)
- 101) E. Bayer, G. Jung and H. Hagenmeier, *Tetrahedron*, **24**, 4853 (1968)
- 102) F. Vandesande, *Bull. Soc. Chim. Belg.*, **78**, 395 (1969)

- 103) B. J. Davis, Ann. N. Y. Acad. Sci., **121**, 404 (1964)
- 104) W. Diezel, G. Kopperschlager and E. Hofmann, Anal.
Biochem., **48**, 617 (1972)