PRF
蛋白質研究奨励会ペプチド研究所報 No. 3 1975. 3

固相法の限界と医薬

奨励会ペプチド研究所長 榊原 俊平

本誌の創刊号に田辺製薬の三好さんが書いておられるように、ヨーロッパには固相法に対して強いアレルギーを持っている人がかなり多くいるように思われる。彼らには、“ペプチド合成化学を育てたのは我々だ”という強い自負心があつて、苦労せずに機械にペプチドを作らせようなどという考え方そのものが気に入らないのである。国際学会などで、ヨーロッパの人が、「時間がなかったので液相法で合成することにした」といって人を笑わせるというようなことはよく耳にする話である。

私もどちらかといえば固相法に対していささか疑問を懐いている方の人間である。5個や10個のアミノ酸からなるペプチドを合成するのなら問題はなかろうが、その程度のペプチドなら液相法の方が断然早く、しかもより確実に合成することができるものと信じている。しかし、固相法の存在意義は、現在の液相法で合成することのできないような複雑なもの――例えば酵素とか蛋白質モデルのようなもの――をとにかく作ることができるところにあるのであって、そこでは生成物の純度とか収率とかいった細かいことを問題にすべきではないというのが私の持論である。

十分な知識と高度の技術がなければ液相法を使いこなすことはできないと反論する人が多い。しかし、固相法においても只一回の機械的な操作だけで、誰にでも良いペプチドが合成できるというものではない。注意すべき点は注意し、押えるべき点は押えて初めて満足すべき結果が得られるのであって、同じ合成を少なくとも3回は繰り返すつもりでなければ自信のあるものは得られないと思う。そこに要求される知識と技術が、液

相法を駆使するのに要するものと比較して、次元の低いもので十分であるなどとは決していうべきではない。言葉を変えていえば、液相法の達人にして初めて固相法もうまくコントロールすることができるといつても過言ではない。 Merrifieldは、固相法に転換する前に、クラシカルなペプチド合成の分野においても随分苦労した人であることを忘れてはならない。

筆 者 近 影

昨年の夏、機会があってサンフランシスコからシカゴ、ニューヨーク、ワシントンあたりを1ヶ月ばかり旅行した。その途中、できればペプチドの研究を行なっている会社を訪ねてみたいと思い旅先から数社にアポイントメントをとってみた。初めから計画していたわけではなかったので果して見学させてもらえるものかどうか多少気がかりではあったけれど、幸い各社とも快く迎えてくれたのは有難かった。

それぞれの会社の研究グループの人達と丸1日ずつじっくり話しあうことができたが、それらの会話を通じて得た共通の印象は、彼らはどうも固相法でなければペプチドの合成コストを安くすることはできないと頭から決めてしまっているようだ—ということであった。驚いたことには、今回訪問した会社のうちの2ヶ所ではもうすでに大型の固相合成機械を動かしており、ACTHやカルシトニンのような複雑なペプチドを100gスケールで合成するテストを繰り返していた。それらの大型反応装置は、Schwarz や Beckmanから市販されている全自動合成機のコントロール部分をうまく利用して2ℓから3ℓの反応器が扱えるように各社で改造したもので、1回の反応にアミノ酸樹脂100gから200g位を仕込むことができるように設計されていた。樹脂のアミノ酸導入量は普通0.5mmol/g前後だから、合成に要する試薬や溶媒の量は容易に計算することができる。もしアミノ酸数32個のカルシトニンを合成しようとすると、総計2kg前後のBoc-アミノ酸と200ℓ入りのドラム缶に2～3杯のメチレンクロリドを必要とする計算になる。この時得られる精製物の量はせいぜい20g 前後であろうから、いくら人件費が節約できるといっても、それらのペプチドがそれ程安く合成できるとは思えないのであるが。

さすがに反応条件や収率などを事細かに聞くことはさしひかえたが、「HF法を利用して初めて活性の高いACTHやカルシトニンが合成できるようになった」とのことであった。

彼らの使っていたＨＦ反応装置は、奨励会の大型反応装置とRobinsonの設計した反応装置をやや大型化したものとであった。しかし、大型の固相合成機を持っていない他の会社では、今もつて窒素ガスを吹きつけて使用済みのＨＦを吹き飛ばす式の簡単な装置を使っていた。

彼らの合成したACTHやカルシトニンは、一応天然物と同じ活性を示したということのほか、液相法で合成したものと並べてＴＬＣで比較したとき同じような挙動を示したということから一応純粋であると判断されたようであった。しかし、見せてもらったクロマトグラムにはどちらにも、物のスポットの上にもう一つ余分のスポットがあり、まだ問題を残しているように思われた。

固相法は本来純粋なものを合成するのに適した方法ではないと私は考えている。もし純粋なものを得ることができるとすれば、それは数多くの不純物の中から純粋なものを抽出する分離技術が確立されているからである。この間の事情は液相法の場合とて同じことかもしれないが、液相法の場合には、不純物を分離しやすいような合成ルートを選択することができるし、途中の段階で何回も副生物を除去する操作が入るために最終生成物中における不純物の混入量は圧倒的に少なくなっている筈である。従って、中間における精製手段を持たない固相法の限界は、分離法の限界と考えて間違いないものと思われる。たとえば、構成アミノ酸10個のペプチド中に中性アミノ酸１個を欠除した分子が混入していたとして、どうすればその異分子を取り除くことができるのか。多分この場合には、分配クロマトグラフィーとか向流分配法を用いれば、うまく分離することができるであろう。では、アミノ酸20個のペプチドの場合はどうであろうか。抜けた中性アミノ酸の種類と場所によっては異分子の完全な分離は相当困難な仕事となる筈である。こう考えてくると、アミノ酸数32個のカルシトニンや39個のACTHの場合、私にはそれらの異分子すべてが分離可能であるという答を引き出す自信はない。

それでも彼らは合成を試みているのである。まさか生理活性さえ得られれば純度などはどうでもよいと考えているわけではあるまい。この点に関して、彼らの考え方を聞き出そうと随分努力したが、結局、突込んだ意見を交換することはできなかった。そこにはイデオロギーの相違のようなものがあって、あまりしつこく問題点を強調しようとすると彼らのやっていること全てを否定せざるを得なくなるような危険を感じたからである。

固相法においても、私はアメリカ人特有の或種の物質観の存在を痛感する。彼らの哲学によれば、理論上可能なことはすべて実行可能でなければならないのであろうか。私自身“固相法は必ず異分子を副生するもの”という先入観にとらわれているのかもしれないが、彼らには“究極においては異分子の生成は完全に抑えられるべきものであり、

除去しうるべきもの”なのである。そこに価値観の相違が生じ、現実に何十万ドルにおよぶ投資が行なわれているのである。ドラム缶の中に次々と溜まってゆくメチレンクロリドの流れを見ていると、月ロケット発射のシーンを見るまでもなく、何ともいえぬ巨大なエネルギーの流れに圧倒されるのを私自身どうすることもできなかった。しかし、最後に彼らが漏らした言葉にはさすがに現実性がこもっていた。

「我々のＦＤＡは、固相法で合成したという理由だけで、ペプチド医薬の発売をどうしても認めようとはしないのだ」

ここに至って私は、初めて彼らと共通の基盤を見いだすことができた。そして、あらためてアメリカ社会の健全さに敬意を表すると共に、このようなシステムのもとで無限の可能性に挑戦することのできる彼らにある種の羨望を感じつつ帰国の途についたのであった。

後記：最近得た私信によれば、固相法にて合成したペプチド医薬にも、米国にて遂に発売許可が出されたとのことである。この問題は今後数多くの議論を巻き起こすことであろう。

蛋白研メモ

●ひとの動き

- 京極好正溶液部門教授は、12月１日付けをもって、物性部門教授に所属換えになられました。
- 深沢俊夫生合成部門助教授は、11月30日付けをもって、辞職されました。
- 田中信夫物理構造部門助手は、12月１日付けをもって、助教授に昇任されました。
- 加藤久雄血液部門助手は、11月６日米国より帰国復職されました。
- 西川克三酵素部門助手は、11月28日米国より帰国復職されました。
- 貴田嘉一氏（阪大医学部出身）が、12月16日付けをもって、代謝部門助手になられました。
- 網沢進化学構造部門助手が、２月１日より１年間の予定で米国へ出張されました。
- 井口善之庶務掛長が、12月１日付けをもって、理学部人事掛長として転出され、杉山継彦氏が新しく着任されました。
- 鈴木友二血液部門教授は、１月20日付けをもって、日本学術会議第10期７部薬学会員になられました。尚、鈴木教授は、４月１日付けをもって、停年退官されます。

●蛋白研セミナー

50年３月までに開催されるセミナー

題目	開催予定日	担当者	担当部門
免疫担当細胞の膜構造と機能	３月25日	北川正保・佐藤　了	生理機能

最近の話題

○Insulin分子再生の新ルート

天然のInsulinは、1本鎖からなるProinsulinがまず合成され、自然のコンフォーメーションをとると共に3組のS－S結合が形成され、ついで中間のC－ペプチド部分が酵素的に切断されることによって生合成される。従って、一旦C－ペプチド部分を失なったInsulinは、A、B両鎖間のS－S結合が開裂されると、再びもとの構造に戻る確率は極めて小さくなり、たとえA、B両鎖が合成できたとしても両者を高収率でInsulinに導くことはできなかった。

Hodgkinらにより解明されたInsulinの結晶構造によれば、A鎖のGly^1のアミノ基とB鎖のLys^{29}のε-アミノ基とは約10Åの距離にあり、それに着目したCarpenterらは、InsulinにCarbonyl-bis-(L-Methionine *p*-Nitrophenylester) を作用させて、これら2つのアミノ基をCarbonyl-bis-Methionyl基で結ぶことに成功した。このCarbonyl-bis-Methionyl基はCNBr処理により選択的に切断されるので、もとのInsulinを高収率で回収することができる。彼らは、この架橋InsulinをスルフィトリシスによりS-スルフォネート体に導き完全に鎖状分子になったことを確認し、ついでDithiothreitolにより還元Insulinに導き、更に空気酸化して75～86%の高収率で元の状態にS－S結合を再生させ、CNBr処理により68%の収率でInsulinに戻すことに成功した。

この実験は、Insulinの化学合成のみでなく、広く人工酵素合成への有力なアイデアを提供するもので、その成功の意義は極めて大きい。（奨励会ペプチド研　本田一郎）

参考文献

W. D. Busse, F. H. Carpenter, *J. Amer. Chem. Soc.*, 96, 5947, 5949 (1974).

○白血球に含まれる酵素によって人血漿より遊離されるキニン様ペプチド

多核白血球の中にキニン遊離酵素が含まれていることはすでに知られているが、最近、Austenのグループは、人の好中球（Neutrophil）から分離した酵素が加熱処理した人血漿から、中性にてキニン様ペプチドを遊離することを報告した。

このペプチドは強い平滑筋収縮作用を持つが、ブラジキニンとは異なり等電点は中性（pH 7.3～7.5)で、トリプシンやキモトリプシンで失活する。分子量は約1000で、多核白血球に含まれる酵素で酸性で遊離される分子量のより大きいロイコキニンとは異なる。一方、このキニン様ペプチドを遊離する酵素はDFPで失活し、リマ豆や大豆のトリプシンインヒビターで阻害されるほか、血中のインヒビターであるantitrypsinによっても阻害される。また、この酵素の基質となるタンパク質は、ブラジキニンのキニノーゲンとは別のタンパク質ではないかと考えられている。

このペプチドの遊離は、炎症時の反応に関与している可能性があり、その構造の解明が待たれる。（蛋白研　加藤久雄）

参考文献

K. F. Austen, *et al., J. Exp. Med.*, 140, 812 (1974).

○グルカゴンの化学的修飾

グルカゴンは29個のアミノ酸よりなり、分子内に4個のカルボキシル基（9，15，21位のAspとC末端のThr）を有する。このものに水溶性カルボジイミドを用いてグリシンアミド、タウリン、エチレンジアミン等を反応させると、理論的には各カルボキシル基（$RCOO^-$）は、$RCONHCH_2$-$CONH_2$，$RCONHCH_2CH_2SO_3^-$，$RCONHCH_2CH_2$-NH_3^+のようにそれぞれ修飾される筈である。しかし、変性剤（グアニジン塩酸塩）が存在しない場合はC末端のカルボキシル基のみ修飾され、変性剤の濃度を上げていくことにより初めて全部のカルボキシル基が修飾される。これらの各誘導体はCDスペクトル的にはnativeのグルカゴンと全く同一であるが、ホルモン活性（adenyl cyclase

増強作用）の強さとか溶解性などの点で非常に異なっている。このことは分子の各カルボキシル基がなんらかの型で細胞膜のreceptor siteとの特異的結合に関与していることを示すもので、グルカゴン分子は高分子の蛋白質と同様に、コンパクトな折りたたまれた立体構造を保持しているものと思われる。（奨励会ペプチド研　江村淳二）

参考文献

G.E. Wheeler, *et al., Biochim. Biophys. Acta.,* 372, 440（1974）.

○トリプトファン を含むペプチドの加水分解

ペプチドや蛋白質の酸加水分解には一般に6N-HCl が用いられるが、トリプトファンは塩酸により分解されて非常に低い回収率しか得られない。この点を改良するため、4％チオグリコール酸を含む6N-HCl を用いる方法（Matsubara ら、1969年）や、0.2％トリプタミンを含む3N-*p*-トルエンスルホン酸を用いる方法（Liuら、1971年）が発表された。前者は、トリプトファンの回収率が約80％でなお改良の余地があること、後者は、回収率は約95％と良好であるが、高純度の試薬を必要とすること、真空で加水分解しなければならないことに問題がある。

Penkeらは、3N-メルカプトエタンスルホン酸を用いて封管中110℃で加水分解後分析したところ、トリプトファンの回収率は24時間後94.5％であった。本法はLiu らの方法に比して、操作がより簡便で、同程度の高いトリプトファン回収率が得られるという点で、今後、トリプトファンを含むペプチドや蛋白質の加水分解に有用であろうと思われる。（奨励会ペプチド研　木曽道子）

参考文献

B. Penke, *et al., Anal. Biochem.* 60, 45（1974）.

○免疫アジュバント活性を有する細菌細胞壁構成ペプチド

結核菌の菌体を他の抗原とともに生体に与えると、その抗原に対する抗体産生をいちじるしく高め、細胞性免疫をもひきおこすことが、1956年にFreundによって見出された。このような作用はアジュバント作用と呼ばれるが、その後の研究からこの活性は菌の細胞壁ペプチドグリカン部に由来し、また、結核菌に限らず他の種々の細菌の細胞壁にも同様の活性が見られることが明らかにされた。一方、これら細菌細胞壁の構造研究も近年非常に発展しており、そのペプチドグリカン部は、GlcNAc-MurNAc-L-Ala-D-isoGln-L-Lys（又はDpm）-D-Ala を繰り返し単位とする網目構造であることが解明されている。

Lederer ら[1]、小谷ら[2]は、それぞれ独立に、細胞壁を酵素分解し活性を発現する構造の解明を試みた。両者とも最終的には純度に疑いの残らない MurNAc-L-Ala-D-Glu-NH_2 の合成品に活性を認め、これがアジュバント活性を有する最小構造であるとの結論に達した。結核菌に端を発したこれらの研究の結果、ペプチド合成の手法で容易に合成できるムラミルジペプチドに免疫機構を増強する作用のあることが明らかになったわけで、今後免疫療法などへの応用にも種々の可能性が期待されている。

ところがこれに対して Fleck ら[3]は、活性発現の最小構造は糖を含まないL-Ala-D-isoGln-L-Lys（又はDpm）-D-Ala のテトラペプチドであるという全く対立する意見を出しており、この点については実験に用いられる抗原の影響や活性試験の方法なども含めて、今後なお検討されるべき問題であると言える。（阪大理　楠本正一）

参考文献

1）E. Lederer, *et al., Biochem. Biophys. Res. Commun.,* 59, 1317（1974）.
2）S. Kotani, *et al., Z. Immun-Forsch.,* in press.
3）J. Fleck, *et al., Nature,* 250, 517（1974）.

PRF・*NEWS*

●新カタログ発行のお知らせ

1975年版PEPTIDE価格表No.10が出来上がりましたのでお届けいたします。
新カタログには下記の新製品が載録されていますのでご利用下さい。

- L-アミノ酸23種
- Benzhydrylamine-Resin
  For Peptide Amide Synthesis
- 6-Chloro-1-*p*-Chlorobenzenesulfonyloxy-Benztriazole (CCBT)
  New Coupling Reagent　cf.) ***PRF*** No. 2, P15
- Bz-Phe-Val-Arg-*p*-Nitroanilide・HCl
  Sensitive Substrate for Thrombin or Plasmin
- Succinyl-Ala-Ala-Ala-*p*-Nitroanilide
  Specific Substrate for Elastase
- DNP-Pro-Leu-Gly-Ile-Ala-Gly-Arg-NH_2
  Specific Substrate for Animal Collagenase
- 〔Val^5〕-Angiotensin Ⅱ
  Asp-Arg-Val-Tyr-Val-His-Pro-Phe
- 〔Sar^1,Ala^8〕—Angiotensin Ⅱ
  Sar-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Ala
  Angiotensin Ⅱ-Specific Inhibitor
- Physalaemin
  Pyr-Ala-Asp-Pro-Asn-Lys-Phe-Tyr-Gly-Leu-Met-NH_2
- N-Acetyl-Muramyl-Ala-D-Glu-NH_2
  Adjuvant Peptide　cf.) ***PRF*** No. 3, P22
- Gly-Gly-His
  Cu-Binding Peptide
- $(Pro\text{-}Hyp\text{-}Gly)_{5,10}$
  Collagen Model Peptides

なお2500番台のBoc-アミノ酸、5000番台のC^{14}-含有Boc-アミノ酸、並びにコード番号1003、3012、3051、4019の品は都合により販売を中止いたしますのでご注意下さい。
新価格は３月10日以降の受注品より適用させていただきます。

●カタログ外在庫品特売

コード番号	化合物	価格（円）	
C－1	Gly-Val	0.1g	1,500
		1g	3,500

- ***PRF*** No. 2に発表した特売品のうち下記コード番号のものは品切れとなりました。
それ以外のペプチドはまだ在庫がありますのでご利用下さい。

品切れ品　A－6，B－1，B－2，B－5
0.1g 包装のみ若干残っているもの　A－3，A－7

●"PEPTIDE情報" いよいよ創刊

本年1月、**ペプチド合成に関する物質検索サービス**がスタートいたしました。400頁にわたる文献目録も完成し、会員の皆様に配布いたしました。このサービス活動の一環として、会員の皆様にお届けする**PEPTIDE情報**も1月創刊となりご好評をいただいております。

文献目録とペプチド情報

PEPTIDE情報は、前々月中に日本に到着した雑誌の中からペプチド合成に関連ありと思われる論文すべてを選び出し（No.1は82編、No.2 156編）、一目で内容がわかるキーワード方式のアブストラクトを添えて毎月編集し発行するもので、会員の皆様には無料でお届けいたします。

このアブストラクトは、おいそがしい皆様方がざっと斜め読みしても内容がつかめるようにデザインされており、あとから必要な論文を探し出すのにも便利です。

★PEPTIDE情報No.1を実費にてお頒けいたします

No.1に限り内容見本として会員外の方にも実費でお頒けいたします。ご希望の方は1部につき500円分の切手（100円切手5枚）を同封のうえ手紙にてお申し込み下さい。折り返し郵送いたします。

★これからの活動予定

"ペプチド関連文献目録"を有効に利用していただくために、本年度は次のような企画を進めています。ご期待下さい。

i) 1974年度中に発表された論文および各年代追加論文目録の編集
ii) Boc-アミノ酸関連全誘導体の恒数表作成
iii) Z-アミノ酸関連全誘導体の恒数表作成

★皆様のご入会をお待ちしております

上記サービスご希望の方は、**ペプチド情報サービスの会**にご入会下さい。入会は随時受け付けております。ご連絡あり次第折り返し案内書と入会申込書とをお送りいたします。

PRF No. 3 1975. 3

編集発行 財団法人 蛋白質研究奨励会
〒562 大阪府箕面市稲476 TEL 0727(29)4121～3