

PRF

蛋白質研究奨励会ペプチド研究所報 Vol. 2 No. 3 1976. 4

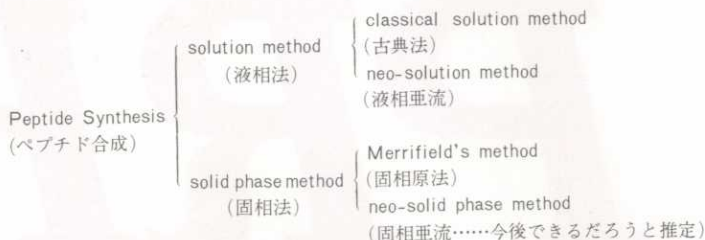
ペプチド合成の難しさ

武田薬工・中央研 藤野 政彦

昨今のペプチド化学、特に生理活性ペプチドの単離、構造決定の技術面の進歩は本当に驚く程である。それに伴ってペプチドの合成技術も確実に進歩しているのであろうかと、時折思うことがある。構造決定と合成との本質的な違いは、構造決定の場合はどんな道を通っても、そしてある程度の不確定要素が入り込んだとしても、結果としての答が正しければそれはやはり正しいのである。ところが、ペプチド合成となると、アミノ酸の配列ができただけでは完成ではないのである。アミノ酸の配列に1%の誤りがあったとしても、またアミノ酸の一部にラセミ化が起こっていたとしても、正確な意味での有機化学的な合成とはいえないとさえ言う人もいる。しかし、現状では合成されたペプチドが本当に1%の配列の狂いも、またラセミ化も起こっていないと断言できる研究者は誰もいないと思うし、ここに技術としてのペプチド合成が研究とはまた違った意味での難しさを抱え込む所以があると思われる。NASAの月ロケット打ち上げでは9桁の精度が要求されたと聞いているが、ペプチドを医薬として人体に送り込む場合にもこの程度の純度が欲しいところである。しかし、現在の分析技術からして3桁の純度の保証が限界であろう。よく高純度のペプチドを得たと報文にあるが、これはhighly purifiedと書くべきであると思う。従って、合成面での方法論が大切になってくる。分析の不備を方法論で補う必要がある訳である。

さて、方法論的にペプチド合成を展望してみると図のように分類することができるかと思われる。ここでneo-solution法とは古典的な液相法に対する意味で使ってみたが、Weygandらによって導入されたHOSu/DCC法の流れを示したものである。固相法でも

色々と新しい試みがなされているがまだ neo-solid-phase 法といえるものはない様に見える。いずれにしても Bergmann から始まって du Vigneaud、Hofmann、



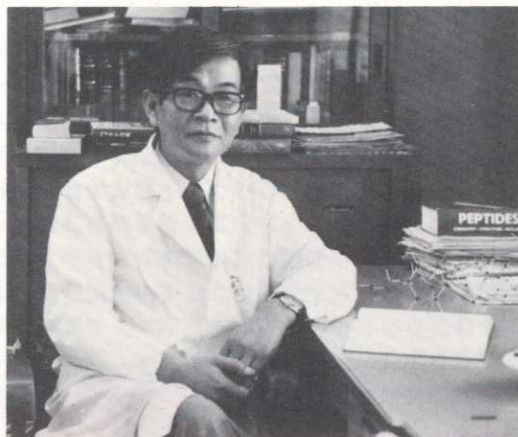
ペプチド合成展望

Bodanszkyと連なる流れの中で、ペプチド合成は10~100mg、せいぜい1g程度の合成が目的であったであろう。しかし、医薬工業という観点から長鎖ペプチドの製造を考えると、毒性試験や物性、純度検定だけでも100g、時にはkgにも及ぶペプチドを必要とする。この様な量は現在 大学でペプチド合成を学んでいる学生諸氏には気の遠くなるような量であろうとは思いますが、現実企業研究所ではこれが要求される訳で、こんな大量のペプチド合成はclassic法ではどう考えても困難を極めることは想像に難くないであろう。したがって、米国系の製薬企業では自動車文明、合理主義のお国柄を反映して、また、米国人一流の愛国主義のせいもあってか、自国産の固相法を中心にペプチドの製造を考えている。例えば、Armour社の研究陣による人型ACTHの固相合成がその好例であろう。これは英国で既に発売許可を得たとのことであるが、GMPの本案であるFDAの許可が得られるかどうかは今後の固相法発展に大きな影響を与えることと思われる。固相法に関しては本誌Vol. 1, No. 3で榊原先生が詳しく書かれているので、ここでは主としてneo-solution法について所感を述べたい。

Ciba、Hoechtを中心とするヨーロッパ系の製薬企業研究陣は、最近、HOSu/DCCあるいはHOBt/DCC法を盛んに利用するようになってきた。これは前記の困難を予想してのことと思うが、確かに現状で大量の長鎖ペプチドを製造する道はneo-solution法以外にはないのではと思われる。勿論、ペプチドの種類にもよることであり、一般論として話である。ACTH(1-24)などは、グリシンやプロリンが適当に分布しているので古典法でも製造可能であろう。実際にCiba社では古典法で製造販売している訳である。

Neo-solution法の問題点は、なんと言ってもラセミ化の問題であろう。この問題は常に古くして新しい問題ではある。現在入手できる原料アミノ酸は、主として醗酵法で造られるためか光学的にも純度はよく、この点は問題はないとして、合成途中でのラセミ化は、例え古くから信仰されているアジド法ですら危険なしといえないことは、Ciba社研究陣によるカルチトニンの合成研究からも明らかである。まして新しい縮合法を開発した場合、ジペプチドやトリペプチドを使うYoung testやAnderson test程度のラセミ化の検討でよしとするのは誠に危険千万であろうし、また、新しい縮合法の論文を無批判に、勝手に拡大解釈して安易に利用するのは止めた方がよいと思う。最近固相法の影響で早く合成することだけにあまりに熱心になりすぎている傾向がないとは言え

ないと思う。研究者としてこの点をよく心に留めておくべきだと反省することがある。何故なら、一度ペプチドに組み込まれたD-アミノ酸を検出することは大変な努力を必要とするからである。我々は以前LH-RHのアナログ合成研究中、誤ってDL-アミノ酸を組み込み、これが非常に強い生理活性を示したが、その原因の追求に3カ月を要した苦い経験がある。この誤りによって高活性アナログの道が開かれたのは幸運ではあったが、その時、つくづくD-アミノ酸の混入を検出することの難しさを感じたものである。



筆者近影

現在、私なりに合成ペプチドでのラセミ化が許される限度は、D-アミノ酸として1/100以下と思っている。勿論これは1箇所かせいぜい2箇所についての話である。これは原料アミノ酸でもD-体の検出限界がこの程度だと思うからであって、深い根拠がなくて言っている訳ではなく、むしろ少なければ少ない程よいのは当然である。さて、ラセミ化を抑制して縮合できる方法としては、古典的アジド法を別としても、WeygandらのHOSu/DCC法、GeigerらのHOBt/DCC法、我々の報告したHONB/DCC法、さらにEEDQ法、向山らの酸化還元法、山田らのDPPA法など色々と報告されている。我国でも色々の面白い縮合反応が見い出されてきたことは誠に心強い限りであり、今後多くの画期的な方法が開発されることが大いに期待される。しかし、モデル実験での結果から実際のペプチド合成に応用した場合のラセミ化の割合を類推することは簡単でない。モデル実験で完全にラセミ化を抑制する方法は、ラセミ化が見られる方法より有望であり、使い方によっては実用に耐える可能性はあるが、その使い方が問題である。ここで、最近我々の研究室の北田女史が行なったラセミ化に関する実験を簡単に紹介したい。事の起りは、pancreatic polypeptideのC端ペンタデカペプチドの合成である。このAla-Asn-Leu-Arg-Arg-Tyr-Ile-Asn-Met-Leu-Thr-Arg-Pro-Arg-Tyr-NH₂をイソロイシンとアスパラギンとの間で色々の縮合法で合成してみたが、その場合、イソロイシンのラセミ化に起因するD-アロイソロイシンが、HOSu/DCC法：9.1%、HOBt/DCC法：19.7%、DPPA法：21.3%、(Ph)₃P法：40%の割合で生成することが認められた。また、HONB/DCC法でも、室温では7.8%のD-アロイソロイシンが検出され、低温で反応した場合のみ1%以下に抑制することができた訳である。しかも、7.8%のD-体を含むペプチドをアミノペプチダーゼM(APM)で消化してみると、驚いたことに酸加水分解のアミノ酸分析値と見分けのつかない結果を与えるのである。このことは15%程度のラセミ化はAPMの消化実験だけでは検出できないことを意味しており、現在一般に行なわれている光学純度の保証がかなり曖昧なものであることを示

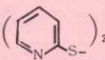
している。

そこで、現在までに知られている縮合法を我々なりにもう一度洗い直す必要を感じ、Boc-Leu-Ile-OHとH-Asn-Leu-O^tBu (free base) とをDMF中で色々の縮合剤の存在下反応を行ない、生成するD-アロイソロイシンの検出を行なってみた訳である。勿論反応はすべて文献記載の最適条件で行なったものであるが、結果は表の通りである。これを見ると、実際のペプチド合成ではYoung test やAnderson testとはかなり異なるラセミ化の度合を示すことが分かる。勿論イソロイシンはアミノ酸の中ではバリンやプロリンと共に側鎖の立体障害が大きいアミノ酸に分類され、縮合反応は遅く、アラニンやフェニールアラニンとは多少状況は異なるものと思われる。しかし、長鎖ペプチドではアラニンやフェニールアラニンでの縮合でも随分と反応の遅い場合がある。これは分子の出合いの確率の外に

他の残基側鎖による遮蔽効果によることも充分考えられることである。いずれにしても、現状でneo-solution法で使用可能な方法は、いささか手前味噌で申し訳ないがHONB/DCC法だけではないかとさえ思えてくる。その他では、HOSu/DCCとHOBt/DCCが縮合箇所注意到し、反応条件をコントロールすれば使用可能であろう。しかし、それとても固相担体上でのfragment condensationなどには使わない方が安全と思われる。EEDQやDPPA法、酸化還元法は、やはり、グリシンやプロリンの箇所での縮合に限定して使うべきかと思われる。古典的アジド法ですら表

に示すように、場合によっては20%程度のラセミ化が起こるのである。アジド法だから安全だとは決していってられない。アジドに対する信仰が根強いだけについて気楽な気持ちで反応することもありうる訳で、危険度はneo-solution法より高いのではなかろうかとさえ思われる。こうして見てくると、practiceとしてのペプチド合成技術には、研究とはまた違った難しさ、問題点があることが分かる。

私は、企業研究所でのペプチド合成は、研究段階は別としても、医学者にペプチドを提供する場合には、光学純度をも含めた純度の検討を厳しくしておく必要があると思っ

ラセミ化度	縮合法	D-allo-Ileの生成率(%) ^{a)}	最高収率(%)
大 ↓ 小	DCC	26.8±1.1	52.0
	(Ph) ₃ P+() ₂	24.7±2.1	46.7
	DPPA (TEA)	14.1±2.1	58.2
	EEDQ	12.2	11.2
	Azide (Curtius) ^{b)}	11.2±0.8	59.3
	HOBt-DCC ^{c)}	7.5±3.0	45.6
	CCBT (NMM)	4.9±0.5	43.2
	HOSu-DCC ^{c)}	2.9±0.5	52.5
	Azide (Rudinger) ^{d)}	1.4±0.4	47.8
	HONB-DCC ^{c)}	0.8±0.4	68.0

a) (D-allo-Ile/Ile+D-allo-Ile)×100, 数回の平均値

b) Azide化もDMF中に行ない。使用した塩酸と等モル量のTEAで中和

c) Additiveは2等モル量, DCCは1.5等モル量

d) 亜硝酸イソアミルを使用

D-allo-Ileの生成率

ている。何故なら生理活性ペプチドは、D型アミノ酸の導入で極端にその活性を変える場合があると同様に、毒性が極端に強くなる場合もあることを経験しているからである。我々は、現在L-アミノ酸化酵素-カタラーゼ系を使用して合成したペプチドの光学純度を調べているが、この酵素は結構高価でもあり、更に全アミノ酸に適用できるものではない。現状ではこの方法で検討可能なアミノ酸でのみ縮合を行なうようにしている。こうしてみると何ととっても簡単なラセミ化検出法、しかも感度のよい分析法の開発が切に望まれるところである。しかし、そう簡単には実用性のある方法は出そうにないので、neo-solution法を利用する研究者や技術者はこの点を充分認識して、注意深く合成を進めて行くことが大切かと思う。さもないと今後の生理活性ペプチドの正常な発展に大きな悪影響を与えるようなアクシデントが無いとは言えないだろう。本当にペプチド合成とは難しいものであるとつくづく感じる近頃である。それにつけても純度のよい合成ペプチドを広く研究者に提供しているPRFの皆さんの御苦勞は大抵のものではないと拝察している昨今である。

蛋白研メモ

ひとの動き

- 白木洋氏は、1月16日付けをもって、代謝部門助手になられました。
- 綱澤進 化学構造部門助手は、2月1日付けをもって、休職されました。
- 栗木芳隆 合成部門助手は、3月1日付けをもって、復職されました。
- 藤井節郎 徳島大学教授は、4月1日付けをもって、血液蛋白部門教授になられました。
- 廣田和弘 有機部門助手は、4月1日付けをもって、復職されました。
- 井村祐二 会計掛長は、4月1日付けをもって、核物理研究センター事務掛長として転出され、戸田二郎氏が新しく着任されました。

蛋白研セミナー

i) 51年7月までに予定されるセミナー

題 目	開催予定	担 当 者	担 当 部 門
核酸-蛋白相互作用の構造化学的基礎	5月	富田研一・京極好正	物 性

ii) 51年8月から52年3月までに予定されるセミナー

- 光浴過法によるタンパク質の高次構造の解析（これに必要な数理のセミナー）（51年8月か10月、物理構造）
- 超分子生物学への展望（51年9月、生理機能）
- 蛋白質立体構造データベースのシステム開発（51年9月か10月、物理構造）

- ゲルの構造とその内部での物質移動—生化学での分離分析手段と関連して—(51年12月、溶液)
- プロティナーゼインヒビターの生体内動態(51年12月、血液蛋白)
- 血液凝固—線溶の制御機構に関するセミナー(51年9月か52年2月、血液蛋白)
- NMRによる生体分子の動的構造の解析(52年1月、物性)
- 物質代謝面からみた動物の行動(52年1月、代謝)
- S-S-結合をもつ蛋白質のシンポジウム(仮題)(52年1月か2月、化学構造)
- 無機化合物(たとえばNO₃、SO₄、金属など)に関する蛋白、酵素のシンポジウム(仮題)(52年1月か2月、生理機能)

最近の話題

新しいアミノ基の保護基: Msc基

アルカリ性にてβ-elimination反応により容易に開裂しうる新しいアミノ基の保護基、methylsulfonylethoxycarbonyl基(Msc基)がTesserらにより報告された。¹⁾ この保護基は酸性では極めて安定で、TFA、HClなどによる脱Bocの条件では全く分解しない。また、接触還元によるBzl、Zなどの脱離も自由に行なわれ、その間に分解はみられない。さらにトリエチルアミンなどを用いる縮合反応にもほとんど問題はない。しかし、ジオキサン-メタノール-4N NaOH(7.5:2.25:0.25; OH⁻ またはMeo⁻濃度0.1N)中では瞬間的に分解が起こりカルバメート型の誘導体となり、酸性に戻した時炭酸ガスを発生してアミノ基を遊離する。

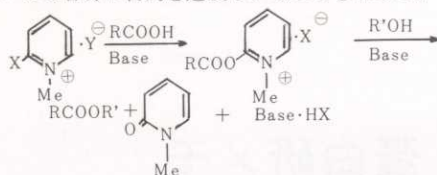
Msc基の導入には、2-methylsulfonylethanolから出発し、通常の方法でMsc-Cl、Msc-N₃、Msc-ONp、Msc-ONSu、Msc-ONPhtなどを合成して適宜利用することができる。強アルカリ性にならないよう注意すれば高収率でMsc-アミノ酸を得ることができる。著者らはこの方法を応用して、ACTHの合成中間体であるPhe-Arg-Trp-Glyを合成し好結果を得ている。(大塚製薬 三原 茂)

1) G. I. Tesser and I. C. Balvert-Geers, *Int. J. Peptide Protein Res.*, **7**, 295 (1975).

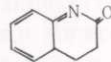
カルボン酸エステルとアミドの新合成法

等モルのHO-化合物とカルボン酸から効率よくエステルを形成する方法は案外知られていない。

向山らは、1-methyl-2-halopyridinium塩を用いれば容易に目的を達成しうることを示した。¹⁾



この反応には、最初 tri-n-butylamine を用いたが、3,4-dihydro-2H-pyrido [1,2-a] pyrimidin-2-one (I) を用いると生成するHXを中性条件で捕えることができ、より温和な条件でエステルを合成しうることを認めた。²⁾



この反応はアミドの形成にも有用で、³⁾ ペプチド合成にも応用可能である。マクロリドや環状ペプチドの合成に有効であろう。

(奨励会ペプチド研 平野要甫)

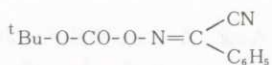
- 1) T. Mukaiyama, M. Usui, E. Shimada, and K. Saigo, *Chem. Lett.*, 1045 (1975).
- 2) T. Mukaiyama, H. Toda, and S. Kobayashi, *ibid.*, 13 (1976).
- 3) T. Mukaiyama, Y. Aikawa, and S. Kobayashi, *ibid.*, 57 (1976).

新しいBoc化剤: Boc-ON

Boc-アミノ酸は、ペプチド合成に欠くことのできないものとして現在広く使用されており、各種の合成法が提案されている。しかし、それらには

欠点もありより簡便な方法の出現が望まれていた。最近、伊藤らは安定で使いやすく、さらに、反応性の良い新しいBoc化剤を開発し発表したので紹介する。¹⁾

この試薬は、入手の容易なbenzylcyanideから得られる2-hydroxyimino-2-phenylacetonitrileにホスゲンと*t*-butanolを働かせて容易に合成することができる。この2-*t*-butyloxycarbonyloxyimino-2-phenylacetonitrile (Boc-ON) は下記の構造を持ち長期間保存に耐える。



アミノ基への導入は、50%アセトンまたはジオキサン中 1.1当量の試薬と 1.5当量のトリエチルアミンを加え、室温にてかきまぜるだけでよく、多くの場合、2~4時間で反応は完結し、80~90%の好収率を与える。

同様な試薬としてはBoc-SDP²⁾が知られているが、着色性副生物の除去に手間どることがありその点ではBoc-ONの方が有利であろう。

(奨励会ペプチド研 大西隆信)

1) M. Itoh, D. Hagiwara, and T. Kamiya,

Tetrahedron Lett., 4393 (1975).

2) T. Nagasawa, *et al.*, *Bull. Chem. Soc.*

Japan, 46, 1269 (1973).

EnkephalinとEndorphin: モルヒネのレセプターと結合するペプチド

動物の脳のみならず回腸や輪精管などの細胞にもモルヒネのレセプターがありその役割を明らかにすることは薬理学的に重要な研究課題となっている。さらに、脳内にはそれらモルヒネレセプター

と結合するペプチド性物質が存在し、endorphinまたはenkephalinと名付けられてその本質の解明が急がれていた。

Goldsteinらは、昨年秋、モルヒネの立体構造から考えてendorphinの構造をTyr-Gly-Gly-Gly-Lys-Met-Glyと推定し、それを合成してモルヒネレセプターとの結合性を調べたところ、約5000分の1ながら明らかに有意の活性を示すことを確認した。¹⁾ その後、Hughesらはブタの脳から活性ペプチドを単離し、エドマン法、質量分析法などによりその構造をTyr-Gly-Gly-Phe-MetとTyr-Gly-Gly-Phe-Leuの混合物であると決定し、それぞれMet-enkephalin, Leu-enkephalinと名付けた。さらに、それらを合成してマウスの輪精管に対する作用を調べた結果、Met-enkephalinはノルモルヒネの21.5倍の活性を持ち、Leu-enkephalinはMet-enkephalinの2分の1の活性を持つことが明らかとなった。²⁾

Met-enkephalinは β -lipotropinの61-65位の構造に相当するためそれが母体と考えられているが、現実にGuilleminらもその61-76位に相当するペプチドを単離し、それがendorphinであることを確認している。³⁾ これらモルヒネ様の活性をもったペプチドの母体がいずれも β -MSH, ACTHなどと関連の深いタンパク質である点はまことに興味深く、それらの生体内における役割の解明が待たれる。(奨励会ペプチド研 茅野直良)

1) A. Goldstein, *et al.*, *Life Sci.*, 17,

1643 (1975).

2) J. Hughes, *et al.*, *Nature*, 258, 577 (1975)

3) R. Guillemin, *et al.*, *C. R. Acad. Sci., Ser. D*, 282, (1976).

PRF NEWS

第14回ペプチド化学討論会のお知らせ

- とき 昭和51年11月4日(木)、5日(金)
- ところ 中国新聞ホール 広島市土橋7-1 TEL (0822) 91-1111

- 討論主題
1. ペプチドの合成及び反応 (関連アミノ酸誘導体を含む)
 2. 生理活性ペプチドの化学 (分離精製、構造及び合成)

講演申込及び要旨締切日 講演お申込みの方には当方より所定の原稿用紙をお送りしますので、**6月末日**までにご一報下さい。原稿用紙に題目、所属、氏名（ふりがなをつけること、講演者には○印）、講演要旨（250字程度）を記載して**7月24日（土）**迄にお申込み下さい。

講演時間 20分（講演15分、討論5分の予定）講演にはスライド（35mm、併写可）をご使用下さい。

申込先 〒734 広島市霞1-2-3 広島大学医学部薬学科内 第14回ペプチド化学討論会実行委員会 中嶋 暉躬 宛 TEL (0822) 51-1111 内線 758

新製品のお知らせ

近く発行予定の当会カタログ1976年版には下記の物質をはじめ多くの新製品が含まれています。ご期待下さい。

Boc-Cys(Acm), Boc-D-Ser(Bzl), Boc-Sar, Z-Asu¹⁾, Z-Asu(OBu^t)·DCHA¹⁾, Bz-Ala-OMe, Glu-Glu, Gly-Gly-Tyr(Bzl)-Arg²⁾, Leupeptin³⁾, Asp-Ser-Asp-Pro-Arg⁴⁾, Met-Enkephalin⁵⁾, Leu-Enkephalin⁵⁾

なお、Leupeptinは、先にお知らせしたPepstatinと共に(財)微生物化学研究会との契約に基づき発売するものでありまして、Trypsin, Papain, Kallikrein, Plasminなどの強力な阻害剤として有用な物質であります。

- 1) Synthesis of a Biologically Active Analog of Deamino-8-Arginine-Vasopressin which Does not Contain a Disulfide Bond: S. Hase, T. Morikawa, and S. Sakakibara, *Experientia*, **25**, 1239(1969).
- 2) The Purification of Papain by Affinity Chromatography: S. Blumberg, I. Schechter, and A. Berger, *Eur. J. Biochem.*, **15**, 97(1970).
- 3) Leupeptins, New Protease Inhibitors from Actinomycetes: T. Aoyagi, T. Takeuchi, A. Matsusaki, K. Kawamura, S. Kondo, M. Hamada, K. Maeda, and H. Umezawa, *J. Antibiot.*, **22**, 283(1969).
- 4) Peptide Inhibition of the Prausnitz-Küstner Reaction: R. N. Hamburger, *Science*, **189**, 389(1975).
- 5) Identification of Two Related Pentapeptides from the Brain with Potent Opiate Agonist Activity: T. Hughes, T. W. Smith, H. W. Kosterlitz, L. A. Fothergill, B. A. Morgan, and H. R. Morris, *Nature*, **258**, 577(1975).

お詫び

先日、第13回ペプチド化学討論会要旨集を発送いたしましたでしたが、後になって乱丁本が数冊見つかりました。恐れ入りますが、要旨集を受けとられた方は頁数をお確かめ下さい。もし乱丁が見つかりましたら葉書にてお知らせ下さい。直ちに代品をお送りいたします。当方の不手際のため数名の方にご迷惑をおかけいたしましたことを深くお詫びいたします。

なお、まだ相当数在庫がありますので購入ご希望の方はお申し込み下さい。一冊送料共1600円です。

PRF Vol. 2 No. 3 1976. 4

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