アジド法によるペプチド合成への添加剤効果¹⁾²⁾

(1982年5月4日受理)

磯川 静子*・新井 弘美・成田 光章

可溶性高分子を支台とするフラグメント縮合によるペプチド合成にアジド法を適用する場合、塩基および添加剤の違いによる収率およびラセミ化、副反応への影響について検討した。ラセミ化度の測定は泉屋法により行ない、副反応量の測定はラセミ化度測定の際生成物中に混在するアミド(Z-Gly-Ala-NH₂)および尿素誘導体(Z-Gly-NHCH(CH₃)NHCO-Leu-OBzl および [Z-Gly-NHCH(CH₃)NH]₂・CO)の定量により行なった。塩基としてトリエチルアミン(TEA)を用いると塩基量の増加にともなうラセミ化が増大し、N-メチルモルホリン(NMM)を用いるとラセミ化はないがTEAの場合より副反応が多かった。添加剤1-ヒドロキシ-1*H*-ベンゾトリアゾール(HOBt)は、N-ヒドロキシスクシンイミド(HOSu)よりもラセミ化抑制効果が大いがいずれの添加剤も副反応の抑制には効果がなかった。可溶性高分子支台上でのフラグメント縮合反応はZ-Gly-Ala-Gly-N₃, Z-Ala₂-Leu₃-N₃ または Z-Ala₂-Leu₃-Pro₂-Leu₃-N₃ と Ile-O-resin または Leu-O-resin の系について検討した。いずれの系でも塩基を過剰に用いた場合TEA-HOBtあるいはNMM-HOBtの組み合わせでほぼ定量的に反応した。ラセミ化抑制の点からもこれらの組み合わせが適しており、副反応の抑制には、TEA-HOBtの系がすぐれていることが明らかとなった。

1 緒 言

固相法によるペプチド合成³⁾はその操作の簡便なことにより比較的短期間に長鎖ペプチドの合成を行ない得るという長所を有している一方、カップリング、脱保護などの各反応段階で反応が定量的に進まない場合、物理的性質の類似した長鎖ペプチドの混合物を生成することが避けられない。この方法を改善する一つの方法として可溶性高分子を支台として用いフラグメント縮合によりペプチドを合成する方法を著者らは検討してきた⁴⁾。カップリング方法の一つであるアジド法はカップリング時のラセミ化を最少におさえ、また、アミノ酸側鎖の保護を最少にして長鎖ペプチドが合成できるという利点がある。またDeGradoらはオキシム樹脂を用いて固相法により保護ペプチドヒドラジドが容易に合成できると報告している⁵⁾。アジド法を固相法に適用した場合、カップリング収率が低いことから、固相法でアジド法を適用した例は多くない⁶⁾。著者らはさきに、可溶性高分子を支台として用いると、可溶性高分子上のアミン成分であるアミノ酸と、N-保護テトラペプチドアジドとを縮合反応させた場合、可溶性高分子支台上のアミノ酸のかさ高さに関係なく、縮合反応がほぼ定量的に行

なわれることを見いだした⁷⁾。

本研究では、可溶性高分子を支台とするフラグメント縮合によるペプチド合成にアジド法を適用するとき、カップリング収率におよぼす塩基および添加剤の効果について検討した。N-保護ペプチドアジドとしては、3, 5および10残基からなるフラグメントを用いた。またそれにさき立って、それらの塩基および添加剤のラセミ化および副反応への影響について検討した。ラセミ化および副反応を最少におさえ、カップリング収率のよい反応条件を見いだすのが本研究の目的である。

2 結果と考察

2.1 ラセミ化におよぼす塩基と添加剤の影響

アジド法においても過剰の塩基の存在下ではかなりのラセミ化が起こることが知られている⁸⁾。本研究では塩基としてトリエチルアミン(以下TEAと略記する)、N-メチルモルホリン(NMM)を用い、添加剤としては1-ヒドロキシ-1*H*-ベンゾトリアゾール(HOBt)、N-ヒドロキシスクシンイミド(HOSu)を用いた。ラセミ化度は泉屋法⁹⁾により測定した。N-(ベンジルオキシカルボニル)グリシル-L-アラニンヒドラジド(Z-Gly-L-Ala-NHNH₂) (2当量)および塩化水素テトラヒドロフラン(THF)溶液(20

東京農工大学工学部工業化学科, 184 小金井市中町

- 1) この報文を“可溶性高分子を支台とするフラグメント縮合によるペプチド合成(第5報)”とする。
- 2) 前報(第4報), M. Narita, K. Kusano, M. Hirata, M. Okawara, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 53, 2405(1980).
- 3) R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.*, 85, 2149(1963).
- 4) M. Narita, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 51, 1477(1978).
- 5) W. F. DeGrado, E. T. Kaiser, *J. Org. Chem.*, 45, 1235(1980).

- 6) a) G. S. Omenn, C. B. Anfinsen, *J. Am. Chem. Soc.*, 92, 1385(1970).
b) G. A. Zheltukhina, M. V. Sidorova, E. I. Filippovich, R. P. Evstigneeva, *Zh. Obshch. Khim.*, 47, 1208(1977).
- 7) M. Narita, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 52, 1229(1979).
- 8) Y. S. Klausner, M. Bodanszky, *Synthesis*, 1974, 549.
- 9) N. Izumiya, M. Muraoka, H. Aoyagi, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 44, 3391(1971).

Table 1 Effects of base contents and additives on racemization in the reaction of Z-Gly-L-Ala-N₃ with LeuOBzl or Leu-O-resin

Amino component	Base	Excess of base (equivalent) ^{a)}	Additive	Amount of additive (equivalent) ^{a)}	Racemization ($\frac{DL}{DL + LL}$)
LeuOBzl	TEA	0	None	0	0.70
"	"	2	"	0	2.8
"	"	6	"	0	4.0
"	"	6	HOBt	12	0.85
"	"	6	HOSu	12	3.5
Leu-O-resin	"	6	HOBt	12	0
LeuOBzl	NMM	0	None	0	0
"	"	2	"	0	0
"	"	6	"	0	0
"	"	6	HOBt	12	0 (trace)
"	"	6	HOSu	12	0
Leu-O-resin	"	6	HOBt	12	0

a) Based on the amino component.

当量)を含む *N,N*-ジメチルホルムアミド (DMF) 溶液を冷却下, 亜硝酸ブチル (2 当量) を用いてアジド化し (−30〜−40°C, 40 分), 添加剤, 塩基, *L*-ロイシンベンジルエステル-*p*-トルエンスルホン酸塩 (Leu-OBzl·TosOH) (1 当量) を加えて −30〜−40°C で 30 分かきまぜたのち, −20〜−30°C で 2 日, 0〜5°C で 2 日反応した。生成物を水素化分解してイオン交換クロマトグラフィーでトリペプチド Gly-L-Ala-L-Leu と Gly-D-Ala-L-Leu を分離定量してラセミ化度を求めた。結果を表 1 に示した。

TEA を塩基として用いた場合には塩基量の増加にともなうラセミ化が増大するが, NMM では 6 当量過剰まで用いてもほとんどラセミ化しないことがわかった。また, 塩基として TEA を用いた場合には, HOBt はかなりラセミ化を抑え, HOSu もわずかにラセミ化を抑えることがわかった。これらの添加剤は反応経路に直接関与する可能性があるが, 他方ではこれらの酸性添加剤は反応液の塩基性を抑え, 過剰塩基の存在によるラセミ化を防止すると考えることができる。HOBt は塩基で脱保護される 9-フルオレニルメトキシカルボニル (Fmoc) 基を *N*-保護基としたアミノ酸活性エステルとアミン成分との反応で, アミン成分の塩基性を抑える添加剤として使用されている¹⁰⁾。

高分子支台上のアミン成分であるアミノ酸, またはペプチドとカルボキシル成分であるオリゴペプチドとの反応は高分子支台上の反応であるため, ここで用いた低分子モデルでの反応と反応速度が異なることが予想される。したがってラセミ化にもその影響が考えられるため, TEA (6 当量過剰)-HOBt (12 当量), NMM (6 当量過剰)-HOBt (12 当量) の系について 2.3 で述べると同じ方法で, Z-Gly-L-Ala-N₃ と高分子支台上のロイシン (Leu-O-resin) を反応させて, 得られたペプチド樹脂の HF による切断で得たトリペプチドのラセミ化度を調べた。その結果, 表 1 に示したようにいずれの系でもラセミ化度は 0 となった。

さらにこれらの系で, 低分子モデルを用いて, さきに述べた場合と同様に Z-Gly-L-Ala-N₃ を合成し, 塩基および添加剤を加え, アミン成分である LeuOBzl·TosOH だけを加えずに −20〜−30°C で 2 日放置したのち, LeuOBzl·TosOH を加えて 0°C で

2 日反応させてラセミ化度を求めた。その結果, TEA-HOBt の系でラセミ化度 9.6%, NMM-HOBt の系でラセミ化度 1.8% となった。これらは低温 (−20〜−30°C) でまったくカップリング反応が起こらず, 0°C に昇温してはじめてカップリング反応が起こる場合に相当する。高分子支台上での反応は, これとは逆の結果を示しており, このことから, ここで用いた高分子支台上ではラセミ化が起こりにくいと考えられることができる。

2.2 副反応

pH 4.25 および pH 9.00 のクエン酸緩衝液を用いて高速液体クロマトグラフィーによりラセミ化度測定に用いた反応生成物中の副反応生成物の検出とその定量を, 塩基量過剰の場合について行なった。その結果, ラセミ化度の測定に用いた反応生成物中にはトリペプチドのほかいくつかの生成物が存在することがわかった。

アジド法では反応操作中にいくつかの望ましくない副反応が起こることが知られている⁸⁾。ラセミ化度の測定に用いた反応に関して図式 1 にアジド法における種々の反応の反応式を示した。

Scheme 1

10) A. Bodanszky, M. Bodanszky, N. Chandramouli, J. Z. Kwei, J. Martinez, J. C. Tolle, *J. Org. Chem.*, 45, 72 (1980).

Table 2 Effects of base contents and additives on side reactions

Base	Excess of base (equivalent) ^{a)}	Additive	Amount of additive (equivalent) ^{a)}	Yield of Gly-Ala-Leu (%) ^{a)}	Amounts of by-products (%) ^{a)}		
					[1']	[2']	[3']
TEA	6	None	0	81.0	0 (1.9)	1.1	0
"	6	HOBt	12	91.3	0 (0.4)	9.8	0
"	6	HOSu	12	86.4	0.6 —	14.5	0.6
NMM	6	None	0	85.6	0.3(2.6)	8.7	3.1
"	6	HOBt	12	79.0	1.0(3.0)	19.4	3.0
"	6	HOSu	12	74.6	0.1(3.7)	6.8	3.5

[1'] : Gly-NHCH(CH₃)NHCO-Leu, [2'] : [Gly-NHCH(CH₃)NH]₂CO, [3'] : Gly-Ala-NH₂

a) Based on the amino component.

(1), (2), (3), (5)式によって目的のトリペプチドが合成されるが, (4)式によるアミドの生成, アジドの Curtius 転位によるイソシアナートの生成と, そのアミン成分との反応による尿素の生成 [(6), (7)式], (8), (9)式による対称型尿素の生成などがおもな副反応であることがすでに報告されている⁸⁾¹¹⁾。

ここではラセミ化度測定に用いた反応生成物中に存在すると考えられる *N*-(ベンジルオキシカルボニル)グリシルアラニンアミド, Z-Gly-Ala-NH₂ [3], 1-[*N*-(ベンジルオキシカルボニル)グリシルアミノ]エチルカルバモイルロイシン=ベンジルエステル, Z-Gly-NHCH(CH₃)NHCO-Leu-OBzl [1], *N,N'*-ビス[1-[*N*-(ベンジルオキシカルボニル)グリシルアミノ]エチル]尿素, [Z-Gly-NHCH(CH₃)NH]₂CO [2] の水素化分解生成物であるグリシルアラニンアミド, Gly-Ala-NH₂ [3'], 1-(グリシルアミノ)エチルカルバモイルロイシン, Gly-NH(CH₃)CHNHCO-Leu [1'], *N,N'*-ビス[1-(グリシルアミノ)エチル]尿素[Gly-NH(CH₃)CHNH]₂CO [2'] の検出と定量を行なった。また, トリペプチドの定量を行ない収率を求めた。

副反応生成物を単離するため 2.1 で用いたと同様の条件で *N*-(ベンジルオキシカルボニル)グリシル-L-アラニンアジド, Z-Gly-L-Ala-N₃ (1 当量) を合成し NMM を 4 当量過剰に加えたのち, -10~0°C で 2 日間放置したのち, Leu-OBzl·TosOH (1 当量) を加え, 0°C で 3 日間反応した。生成物はトリペプチド, Z-Gly-Ala-Leu-OBzl (収率 39%, ラセミ化度 24.3%) および [2] (収率 11.5%) であった。[1] は分離されなかった。ここで得た [2] を水素化分解して [2'] の同定, 定量用の標準試料とした。[1] および [3] は実験の項で述べるように別に合成し水素化分解して標準試料とした。これらの試料を実験の項で述べる条件で液体クロマトグラフィーにかけ溶出流量とピーク面積により同定と定量を行なった。

Inouye らは尿素誘導体は酸によって容易に分解されると報告している¹²⁾。Inouye らによれば酢酸中では比較的安定であると報告されているが¹²⁾, 溶媒に 95% 酢酸を用いて行なった [1] から [1'] への水素化分解反応の収率は 39% と低かった。そこで単離した [1'] を 95% 酢酸中 70°C で 2 時間処理したところ [1'] の残存量が 7% となり, 溶出流量 17.0 ml に新たなピークが検出された。このピークは酸による [1'] の分解生成物によるものと考えられ [1'] の 93% がこの物質に変化したと仮定した。すなわ

ち, 新たなピークを, 酢酸処理に用いた [1'] の使用量の 93% に相当する量に対応するピークと見なし, それを基準として, 未知試料中の同一溶出量におけるピークを定量した。副反応生成物の定量を行なった試料には, ほとんどすべての場合, この溶出流量にピークが検出され, その定量によって得られた値を表 2 のカッコ内に示した。

[2'] および [3'] はそれぞれ水素化分解前の [2] および [3] を基準にして求めた。トリペプチドは文献⁹⁾ にしたがって合成した Gly-L-Ala-Leu を基準に用いた。塩基を 6 当量過剰に用いた場合について塩基と添加剤の組み合わせによる副反応生成物の生成量の違いと収率を表 2 に示した。

TEA だけを用いた場合には 6 当量過剰に用いても副反応生成物 [1]~[3] はいずれもわずしか生成しないが, HOSu あるいは HOBt を添加すると [2] がいちじるしく増加した。NMM だけを用いた場合には [1] および [3] はいずれも TEA の場合より多く生成した。添加剤 HOBt および HOSu は副反応に関して抑制効果はないと思われる。TEA だけを使用した場合を除いて [2] の生成が多いのは過剰に用いたアジドがカップリング反応後に Curtius 転位を起こした結果であると考えられる。

しかし, 前に述べたように NMM を過剰に用いてアジドを比較的高温 (0~5°C) にたもったのち, Leu-OBzl·TosOH を当量加えて反応させた実験でも [2] のみが単離され [1] は単離できなかったことから, ここで用いた反応条件では [1] に比較して [2] が生成しやすいことも考えられる。TEA だけを用いた場合, [1']~[3'] 以外の二, 三の微小なピークを検出したが同定はできなかった。Okada らは *N*-保護アラニンアジドの Curtius 転位を行ない, 生じたイソシアナート溶液に TEA, HOBt または HOSu を添加するとイソシアナートが漸次減少していくと報告している¹³⁾。とくにイソシアナートに TEA を加えると室温 10 分でイソシアナートが消失したと報告している。表 2 の結果から TEA だけを用いた場合にはイソシアナートが生成しても [1] あるいは [2] へ移行する反応が主とはならないと考えることができる。

ペプチド合成においては [1] の生成がもっとも望ましくないのであるが, 上の結果から塩基として TEA を用いた場合には HOBt を添加剤として用いると, [1] の生成が無視できる程度であることがわかった。塩基として NMM を用いた場合には 6 当量過剰に用いてもラセミ化はなく, [1] の生成は 3~4% であ

11) K. Inouye, K. Watanabe, M. Shin, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 1977, 1905.

12) K. Inouye, K. Watanabe, *ibid.*, 1977, 1911.

13) Y. Okada, Y. Tsuda, M. Yagyu, *Chem. Pharm. Bull.*, 28, 2254(1980).

った。

t-ブトキシカルボニルペプチドアジドを用いて高分子支台上でフラグメント縮合を行なう場合副生する〔2〕および〔3〕に対応する生成物は、洗浄の段階で除去される。また〔1〕に対応する尿素誘導体は、目的ペプチドとともに高分子支台上に残るが、*t*-ブトキシカルボニル基 (Boc 基) 除去のさい、酸により尿素結合で切断が起こると考えられる¹²⁾。したがってそれらは長鎖フラグメントの欠けた欠陥ペプチドとなり、目的ペプチドとの物理的性質の違いから精製段階で分離可能である。したがって、ラセミ化防止を重点に考えれば、NMM を単独で用いるか、あるいは HOBt または HOSu と組み合わせて用いることも可能である。

2.3 カップリング収率

可溶性高分子支台上のアミン成分であるアミノ酸と種々のペプチドアジドとのカップリングを行ない、塩基および塩基量、および添加剤の違いによる収率への影響について検討した。アミン成分としてペプチドフラグメントを用いた場合には、そのペプチドフラグメントの二次構造の違いによって、カップリング反応に影響があると考えられるので、ここではランダムコイルの場合として、高分子支台上のアミン成分としてはアミノ酸を用いて検討を行なった。

可溶性高分子支台としてはスチレン-(クロロメチル)スチレン共重合体を合成し¹⁴⁾、これにイソロイシンまたはロイシンをエステル結合させたものを用いた (Ile-*O*-resin または Leu-*O*-resin)⁴⁾。*t*-ブトキシカルボニルペプチドアジドとしては、*t*-ブトキシカルボニルトリペプチドアジド, Boc-Ala-Gly-Ala-N₃, *t*-ブトキシカルボニルペンタペプチドアジド, Boc-Ala₂-Leu₃-N₃, *t*-ブトキシカルボニルデカペプチドアジド, Boc-Ala₂-Leu₃-Pro₂-Leu₃-N₃ を用いた。溶媒は DMF を用い、高分子の濃度は 1g/100ml とした。この濃度では低温においても高分子の存在による顕著な粘性の増加はなかった。その他の反応条件、塩基および添加剤は 2.1 と同様である。HOSu は橋かけ高分子を支台としたアジド法によるフラグメント縮合反応に添加剤として用いられ、カップリング収率の増加をもたらしたと報告されている^{6b)}。

塩基に NMM (0~6 当量過剰) を用い、添加剤として HOSu (過剰塩基量の 2 倍当量) を用いて、可溶性高分子上のロイシン (Leu-*O*-resin) と Boc-Ala-Gly-Ala-N₃ との反応を行なった場合、塩基量および添加剤の増加にともなってカップリング収率が增加することがわかった¹⁵⁾。しかしこの系ではカップリング収率は 80% 以下であった。

つぎに、6 当量過剰の塩基と、12 当量の添加剤を用いて Boc-Ala-Gly-Ala-N₃ と Leu-*O*-resin, Boc-Ala₂-Leu₃-N₃ と Ile-*O*-resin, Boc-Ala₂-Leu₃-Pro₂-Leu₃-N₃ と Ile-*O*-resin の反応を行なってカップリング収率を求めた。結果を図 1 に示した。この図から明らかなように、NMM-HOBt, TEA-HOBt の系でいずれもカップリング収率が高いことがわかった。

モデル化合物によるラセミ化に関する検討によって、TEA-HOBt, NMM-HOBt のいずれの系においても、ラセミ化はない

Fig. 1 The amounts of peptide bond formation by azide method on a soluble polymer support (6 equivalent excess of a base and 12 equivalent of an additive were used)

—▲— : Boc-Ala-Gly-Ala-N₃ with Leu-*O*-resin
 ---■--- : Boc-Ala₂-Leu₃-N₃ with Ile-*O*-resin
 ...●... : Boc-Ala₂-Leu₃-Pro₂-Leu₃-N₃ with Ile-*O*-resin

と考えられる。モデル化合物による副反応に関する検討によれば、TEA-HOBt の系では〔1〕の生成がごくわずかであり、NMM-HOBt の系では〔1〕の生成が数パーセントであるが、フラグメント縮合法では〔1〕類似の構造をもつ欠陥ペプチドの分離が精製段階で可能であることを考え合わせると、これら、TEA-HOBt および NMM-HOBt の系が可溶性高分子を支台とするアジド法によるペプチドフラグメントの縮合条件として適当であると考えられる。

3 実 験

3.1 装置および試薬

融点は補正を行っていない。旋光度測定は日本分光工業株式会社製 ORD/UV-5 型を使用し、0.1dm のセルを用いて測定した。ペプチド樹脂などの加水分解は 20~40mg 試料をプロピオン酸-12 mol·dm⁻³ HCl (2:1 v/v) とともに脱気封管して 115°C で 48 時間行なった。ペプチド樹脂、*t*-ブトキシカルボニルペプチドヒドラジド、その他のペプチド誘導体の加水分解物のアミノ酸組成の定量およびトリペプチド Gly-Ala-Leu の DL 体および LL 体の定量は日立液体クロマトグラフ 034 型で行なった。副反応生成物の定量には島津全アミノ酸分析システムを用いた。TLC にはシリカゲルプレート (SPOT FILM) を用い、つぎの溶媒系で行なった。

- A クロロホルム: メタノール (9:1 v/v)
- B クロロホルム: メタノール: 酢酸 (45:4:1 v/v)
- C 1-ブタノール: 酢酸: ピリジン: 水 (4:1:1:2 v/v)

DMF および THF は通常の方法で精製した¹⁴⁾。Leu-*O*-resin (Leu 含量 0.74mmol/g) および Ile-*O*-resin (Ile 含量 0.78mmol/g または 0.68mmol/g) は可溶性ポリ(クロロメチル)スチレン (Cl 含量 0.91mmol/g) から文献記載の方法によって合成した⁴⁾。ラセミ化度測定に使用した Z-Gly-L-Ala-NHNH₂, ラセミ化度測定のさいの標準物質として用いたトリペプチド Gly-DL-Ala-Leu, および Gly-L-Ala-Leu は文献にしたがって合成した⁹⁾。

Z-Gly-NHCH(CH₃)NHCO-Leu-OBzl [1]: Z-Gly-L-Ala-

14) M. Narita, S. Itsuno, M. Hirata, K. Kusano, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 53, 1028(1980).

15) 1979 年 11 月, 第 17 回ペプチド化学討論会講演; S. Isokawa, H. Arai, M. Narita, *Peptide Chemistry*, 1979, 103.

NHNH₂ (472 mg) の酢酸溶液 (2 ml) に亜硝酸ナトリウム (128 mg) の水溶液 (1 ml) を加え、5°C で 5 分反応させた。生成したアジドを酢酸エチルで抽出し、酢酸エチル層を 10% 炭酸水素ナトリウム溶液で洗い無水硫酸ナトリウムで乾燥した。濾過後濾液を 60°C のベンゼン (15 ml) 中に滴下し、放冷した。放冷後混液に Leu-OBzl·TosOH (631 mg) と TEA (162.3 mg) の酢酸エチル溶液を加え、室温で 1 晩かきまぜたのち、水 (30 ml×2)、10% クエン酸溶液 (30 ml×2)、水 (30 ml×2) で洗った。溶媒を留去し、残留物を酢酸エチルから再結晶した。収量 483 mg (60.4%), R_f A 0.43, R_f B 0.48, mp 136.5 ~ 138.5°C, $[\alpha]_D^{20} = -17.6^\circ$ (C=1, MeOH)。

分析値 C 62.39%, H 6.82%, N 11.41%

C₂₆H₃₄O₆N₄ としての

計算値 C 62.62%, H 6.87%, N 11.24%

アミノ酸分析値 Gly 0.98, Leu 0.77

理論値 Gly 1.00, Leu 1.00

α -アミノ基が尿素結合している場合、加水分解後のそのアミノ酸の回収率は低い¹¹⁾。

Gly-NHCH(CH₃)NHCO-Leu [1'] : [1] (200 mg) を 95% 酢酸 (6 ml) に溶かして 10% Pd/C の存在下で一晩水素化分解した。触媒を除き溶媒を留去し、少量のメタノールを加えて留去を数回くり返した。残留物をメタノール-水から再結晶した。収量 43 mg (39.1%), R_f C 0.61, mp 213°C。

分析値 C 47.30%, H 8.01%, N 19.88%

C₁₁H₂₂O₄N₄ としての

計算値 C 48.16%, H 8.08%, N 20.43%

[Z-Gly-NHCH(CH₃)NH]₂CO [2] : mp 206 ~ 207°C。

分析値 C 56.74%, H 5.83%, N 15.63%

C₂₅H₃₂O₇N₆ としての

計算値 C 56.81%, H 6.10%, N 15.90%

[Gly-NHCH(CH₃)NH]₂CO [2'] : [1'] の場合と同様に [2] を水素化分解し、生成物を 0.2 mol·dm⁻³ クエン酸緩衝液 (pH 4.25) に溶解し標準溶液とした。溶質含量は水素化分解前の [2] の量を用いて計算した。

Z-Gly-Ala-NH₂ [3] : (1) Z-Gly-Ala-OBzl (320.5 mg) (Z-Gly および Ala-OBzl·TosOH からクロロギ酸イソブチルを用いて混合酸無水物法により合成した) の THF 溶液に、アンモニアを飽和させ、室温で数箇月放置した。生成した結晶を濾取し、メタノール-エーテルから再結晶した。収量 208.6 mg (86.3%), mp 176 ~ 176.5°C, R_f B 0.33, $[\alpha]_D^{20} = -17.25^\circ$ (C=0.4, MeOH)。

分析値 C 55.87%, H 6.15%, N 15.03%

C₁₃H₁₇O₄N₂ としての

計算値 C 55.90%, H 6.14%, N 15.05%

(2) Z-Gly-Ala (Z-Gly と Ala から混合酸無水物法により合成した) の THF 溶液を冷却し (-10 ~ -20°C), クロロギ酸イソブチル (487 mg) を加え、-10 ~ -20°C で 15 分間かきまぜた。アンモニアガスを 30 分間通じたのち、室温で 1 晩かきまぜた。残留物を THF および水で洗い、メタノール-エーテルから再結晶した。収量 300 mg (30.0%), R_f B 0.33, $[\alpha]_D^{20} = -14.75^\circ$ (C=0.4, MeOH)。

Gly-Ala-NH₂ [3'] : [1'] の場合と同様に [3] を水素化分解

し、生成物を 0.2 mol·dm⁻³ クエン酸緩衝液 (pH 4.25) に溶かし標準として用いた。溶質含量は水素化分解前の [3] の量を用いて計算した。

Boc-Ala-Gly-Ala-NHNH₂ [4], Boc-Ala₂-Leu₃-NHNH₂ [5], および Boc-Ala₂-Leu₃-Pro₂-Leu₃-NHNH₂ [6] : Boc-Ala-Gly-Ala-OBzl¹⁶⁾ (1 g) およびヒドラジン水和物 (1.23 g) をメタノールに溶かし、室温で 2 日放置した。生成した固体を濾過し、メタノールで洗い、メタノールから再結晶した。収量 0.6 g (89%), mp 164 ~ 165°C, $[\alpha]_D^{20} = -24.4^\circ$ (C=1.0, AcOH)。

分析値 C 47.28%, H 7.55%, N 20.98%

C₁₃H₂₅O₅N₅ としての

計算値 C 47.12%, H 7.60%, N 21.14%

アミノ酸分析値 Gly 0.96, Ala 2.00

[5] および [6] はそれぞれ Boc-Ala₂-Leu₃-OBzl¹⁴⁾, Boc-Ala₂-Leu₃-Pro₂-Leu₃-OBzl¹⁴⁾ から [4] の場合と同様の方法で得た。

[5] : 収率 65%, mp 260°C, $[\alpha]_D^{20} = -52.0^\circ$ (C=0.6, AcOH), R_f B 0.34。

分析値 C 56.48%, H 8.99%, N 15.75%

C₂₉H₅₅O₇N₇ としての

計算値 C 56.75%, H 9.03%, N 15.97%

アミノ酸分析値 Ala 1.00, Leu 3.04

[6] : 収率 82%, mp 220 ~ 222°C, $[\alpha]_D^{20} = -101.3^\circ$ (C=1.0, MeOH), R_f B 0.32。

分析値 C 59.42%, H 8.78%, N 14.78%

C₅₇H₁₀₂O₁₂N₁₂ としての

計算値 C 59.66%, H 8.96%, N 14.65%

アミノ酸分析値 Pro 1.79, Ala 2.00, Leu 6.41

ラセミ化測定法 : (1) Z-Gly-Ala-NHNH₂ (147 mg, 0.5 mmol) を含む DMF 溶液を -30 ~ -40°C に冷却し、HCl (5 mmol) を含む THF 溶液および亜硝酸ブチル (0.5 mmol) を -30 ~ -40°C でかきまぜながら加えた。-30 ~ -40°C で 40 分かきまぜたのち、添加剤および塩基 (5.5 mmol プラス過剰量) および Leu-OBzl·TosOH (98 mg, 0.25 mmol) を加え、-30 ~ -40°C で 30 分かきまぜた。さらに、-20 ~ -30°C で 2 日、0 ~ -5°C で 2 日反応した。反応液は 10% 塩化ナトリウム溶液 (250 ml) に注ぎ、酢酸エチル (50 ml×4) で抽出した。酢酸エチル層は 10% 塩化ナトリウム溶液 (30 ml), 10% クエン酸溶液 (30 ml×4), 10% 塩化ナトリウム溶液 (30 ml), 4% 炭酸水素ナトリウム溶液 (30 ml×4) および 10% 塩化ナトリウム溶液 (30 ml) で順次洗った。溶媒を留去し残留物を 95% 酢酸に溶かし、10% Pd/C の存在下で水素化分解した。水素化分解生成物は 0.2 mol·dm⁻³ クエン酸緩衝液 (pH 4.25) 25 ml に溶解し、イオン交換クロマトグラフィーにかけた。クロマトグラフィーの測定条件は文献⁹⁾にしたがった。

溶媒 : 0.2 mol·dm⁻³ クエン酸緩衝液 (pH 4.25), 流量 : 60 ml/h, ジャケット温度 : 55°C

(2) Z-Gly-Ala-NHNH₂ (0.26 mmol), HCl の THF 溶液 (HCl 2.6 mmol), 亜硝酸ブチル (0.26 mmol), HOBt (1.56 mmol), TEA または NMM (3.51 mmol), Leu-O-resin (Leu 含量 0.74 mmol/g) (17.6 mg, Leu : 0.13 mmol), DMF 25 ml を用

16) 合成については別報に記載の予定。

Table 3 The amounts of peptide-bond formation by azide method on a soluble polymer support (6 equivalent excess of a base and 12 equivalent of an additive were used)

(1) Coupling reactions of Boc-Ala-Gly-Ala-N₃ with Leu-O-resin

Base	Additive	Amino acid content (mmol/g)			Average yield of coupling (%)
		Gly	Ala	Leu	
TEA	—	0.57	1.17	0.59	98
TEA	HOBt	0.59	1.17	0.62	94
NMM	—	0.53	1.11	0.64	85
NMM	HOBt	0.56	1.11	0.59	95
NMM	HOSu	0.56	1.12	0.62	90

(2) Coupling reactions of Boc-Ala₂-Leu₃-N₃ with Ile-O-resin (Ile content, 0.78mmol/g)

		Ala	Leu	Ile	
TEA	—	0.95	1.43	0.48	100
TEA	HOBt	0.98	1.55	0.50	100
NMM	—	1.02	1.56	0.56	92
NMM	HOBt	1.06	1.63	0.54	100
NMM	HOSu	0.88	1.37	0.59	76

(3) Coupling reactions of Boc-Ala₂-Leu₃-Pro₂-Leu₃-N₃ with Ile-O-resin (Ile content, 0.68mmol/g)

		Leu	Ile	
TEA	—	2.17	0.41	89
TEA	HOBt	2.32	0.41	94
NMM	—	2.09	0.41	85
NMM	HOBt	2.07	0.36	95
NMM	HOSu	2.03	0.42	81

いて、(1)と同様に反応を行なった。反応液は 200 ml のメタノール中に注ぎ、塩化ナトリウム水溶液少量を加えてろ過し、水およびメタノールで洗い乾燥した。得られたペプチド樹脂のうち 100 mg に、アニソール (0.25 ml) を加えて、フッ化水素 (約 3 ml) 中で、0°C, 1 時間反応を行なった。フッ化水素を留去したのち、メタノールで残留物を洗い、洗液の溶媒を留去し、トリペプチドを得た。樹脂はさらに水で洗い、洗液をこれに加え、水を留去した。得られたトリペプチドを 0.2 mol・dm⁻³ クエン酸緩衝液 6 ml に溶解し、イオン交換クロマトグラフィーにかけた。また、次項で述べる島津全アミノ酸分析システムによる分析により、トリペプチド、Gly-L-Ala-Leu の収率は、TEA-HOBt の場合、84%, NMM-HOBt の場合 85% であった。

副生成物の定量：ラセミ化度測定に用いた溶液の一部を、島津全アミノ酸分析システムを用いてつぎの条件でイオン交換クロマトグラフィーにかけた。

カラム：ISC-09/S 2504, 溶媒：0.2 mol・dm⁻³ クエン酸緩衝液 (pH 4.25) 15 分, 1.5 mol・dm⁻³ クエン酸緩衝液 (pH 9.00) 25 分, 流速 0.5 ml/min, カラム温度：55°C

各試料のピークはそれぞれつぎの流出量において検出された。

Gly-L-Ala-Leu 12.4 ml, Gly-D-Ala-Leu 12.7 ml, [1'] 13.7 ml, [3'] 16.9 ml, [2'] 19.5 ml

可溶性高分子支台上のフラグメント縮合における縮合収率の測定：L-ブトキシカルボニルオリゴペプチドヒドラジド [4]~[6] (0.25 mmol) を含む DMF 溶液を -30~-40°C に冷却し、HCl (2.5 mmol), THF 溶液および亜硝酸ブチル (0.25 mmol) をかきまぜながら加えた。-30~-40°C で 40 分かきまぜたのち、添加剤および塩基 (2.62₅ mmol プラス過剰量) および Leu-O-resin (または Ile-O-resin) (Leu または Ile 0.125 mmol 相当) を加えた。ラセミ化度測定の場合と同じ条件で反応させたのち、メタノール (200 ml) に注ぎ、飽和塩化ナトリウム水溶液 (30 ml) を加え、得られた沈殿をろ過し、水およびメタノールで順次洗い乾燥した。得られたペプチド樹脂を加水分解し、アミノ酸分析を行なって Leu (または Ile) を基準としてペプチドの縮合反応収率を求めた。これらの結果を表 3 に示した。

(1979 年 11 月, 第 17 回ペプチド化学討論会(一部)発表)

The Effect of Additives on the Peptide Synthesis by Azide Method†

Shizuko ISOKAWA*, Hiromi ARAI and Mitsuaki NARITA

*Department of Industrial Chemistry, Faculty of Engineering,
Tokyo University of Agriculture and Technology ;
Nakamachi, Koganei-shi 184 Japan*

The effect of bases and additives in the azide method were investigated on the yields in the fragment condensation on a soluble polymer support. The effects of them on the racemization and side reactions were also investigated. The amount of racemization was determined by the Izumiya method. Z-Gly-NHCH(CH₃)NHCO-Leu-OBzl [1], [Z-Gly-NHCH(CH₃)NH]₂CO [2], and Z-Gly-Ala-NH₂ [3] were synthesized by different methods and hydrogenated to obtain the standards for determination of the amounts of by-products by use of ion-exchange chromatography.

When triethylamine (TEA) was used as a base in 0~6 equivalent excess, increase in base contents increased the amount of racemization. On the other hand, *N*-methylmorpholine (NMM) was used as a base, no racemization occurred even in the case of 6 equivalent excess. Addition of 1-hydroxy-1*H*-benzotriazole (HOBt) depressed the racemization fairly, and addition of *N*-hydroxysuccinimide (HOSu) slightly. The amounts of by-products [1'] and [3'] were less in the case of TEA used as a base than that of NMM, regardless of an additive. The addition of HOBt and HOSu had no effect on side reactions. In the coupling reactions of Boc-Ala-Gly-Ala-N₃, Boc-Ala₂-Leu₃-N₃, or Boc-Ala₂-Leu₃-Pro₂-Leu₃-N₃ with Leu or Ile bound to a soluble polymer support, almost quantitative yields were achieved by the use of TEA or NMM as a base in 6 equivalent excess and HOBt as an additive in 12 equivalent.

† Liquid Phase Peptide Synthesis by the Fragment Condensation on a Soluble Polymer Support. V.

~~~~~