ペプチドの合成研究^{*1}

矢 島 治 明^{*2}

I) 序 論

Hofmeister¹⁾ や Fischer²⁾ が、かつて、蛋白質といわれたものが、アミノ酸相互の脱水によって構成されることを推定するに至ったのは、実に Braconnot³⁾ が gelatin の加水分解によって glycine を得てより 80 年もあとのこと、すなわち 1902 年頃のことであった。Fischer²⁾ は、この結合をペプチド結合と呼ぶとともに、これら蛋白質、すなわち、生物活性体の合成を夢みたわけであるが、今日、oxytocin,⁴⁾ vasopressin⁵⁾ の合成、ACTH 活性ペプチド、⁶⁾ ついでその全合成、⁷⁾ insuline 活性体の合成、⁸⁾ 等々により彼の夢は一步現実に近い感がある。

ペプチドと蛋白質の境界は厳密でないが、透析膜を通ずる分子量一万前後までが普通ペプチドと呼ばれている。一般に一つのアミノ酸の α アミノ基が他のアミノ酸の α カルボキシル基との間に脱水して、アミド結合しているのが特徴であり、この動物のアミノ酸は約 20 種の L 型アミノ酸に限定せられる。そして天然の蛋白質、ペプチドは生合成上直鎖状の核酸に支配されて原則的に直鎖状であるが、それが oxytocin のように -S-S- で環状になったり、あるいは分子間、分子内に -S-S- 橋で連っている。このほかバクテリア類の産するペプチドには、D 型アミノ酸を含む以外、たとえば gramicidin のごとく環状であったり、polymixin のごとく diaminobutylic acid の N^γ がペプチド結合に関与せられたりする。一方 glutamic, aspartic acid の α 以外のカルボキシル基がアミド結合に関与しているものも知られている。

これ以外に、peptolide (depsipeptide) と称するオキシ酸とのエステル結合を含む一群が、多数知られてきた。さらに cytochrome C, hemoglobin など prosthetic 基を含む蛋白質の構造も明らかになってきた。

かかる天然ペプチド、蛋白質の構造研究の発達につれてペプチドの合成化学、分析、精製法も進歩し、満足といえないまでも非常に複雑なペプチドを光学的にも純粋に合成しうる段階に達した。

ペプチドの化学が従来の有機化学的方法と異なる点は、その精製、検定の段階にあるといえる。精製に当たって、蒸留方法を用いることはできず、抽出方法も制限を受ける。製品の融点、元素分析より純度を判定することは不充分であるので、したがって蛋白質化学の種々の方法を採用せねばならない。ペプチドの化学はそれ自身アミノ酸残基、アミン、カルボン酸の有機反応に関与するのみならず、究極には有機化学的方法を用いて生物体の構造と作用との関連性を理解しようとする方法である。

多くの可能性を含むペプチドの合成法が報告され、いくつかの総説⁹⁻¹³⁾ もあるが、その中より、重点的に簡単に現在使用されている stepwise な合成方法を取り出し、ペプチド鎖の延長方法の概要をのべたい。

II) 歴史的な方法

遊離ペプチド合成の最初の記録を Emil-Fischer 等¹⁴⁾ の名とともに留めることができる。当時のアミノ保護基の知識では、脱離と同時にペプチド結合の分解を避け得なかったので、彼の研究方針はアミノ基を保護しない合成法であったといえる。しかし彼は diketopiperazine の加水分解法、 α -halofatty acid chloride 法によって 1906 年すでに octadeca ペプチドを合成したが、光学的活性な官能基を有するペプチドを合成するには至らなかった。これより前、保護基をもったペプチド合成の最初の記録は、Curtius¹⁵⁾ によってなされた。彼の発見した azide 法は今日もおペプチド合成にかくことのできないものである(後記)。しかしアミノ保護基を満足に除去し得なかったことは Fischer と同様であった。この後、Fischer の門弟 Bergmann,

^{*1} Synthetic Studies on Polypeptides.

^{*2} Haruaki Yajima: 京都大学薬学部 Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Kyoto, Yoshida, Kyoto.

Zervas¹⁶⁾ は 30 年を経た後 (1932) 接触還元で除去しうるカルボベンゾオキシ基を完成し、先輩の解けなかった N 保護基の緩和な除去法に成功した。かくしてこれまで合成不可能であった光学的活性ペプチドの合成への道が開拓された。このようにして開けたペプチド化学の主要目的は、もっぱら蛋白質分解酵素の基質を合成するにあった。現在みる pepsin, chymotrypsin, trypsin 等の酵素はかくしてその特異性が確立したわけである。Rockefeller Institute において Bergmann が行なった研究に oxytocin の V. du Vigneaud および ACTH 活性体合成の K. Hofmann の名もみられる。

一方ペプチドの合成法として環状中間体を経て合成する方法も種々研究された。たとえば oxazolidone (I) (azlactone) 法,¹⁷⁾ thiothiazolidone (II) 法¹⁸⁾ などがあるが、これらの方法ではいずれも官能基を含む光学的活性ペプチドをうるには至らない。ただ N-carboxyanhydride (III)¹⁹⁾ は高級ポリマーを合成する現在にも使用される方法である。

III) ペプチド合成法の原理

アミノ酸は両性電解質であるので、ペプチド結合の形成に先立って、その反応にあずからない官能基をあらかじめ保護しなければならない。したがって現在のペプチドの合成は Chart 1 に示す段階で行なわれる。

Chart 1.

1) アミノ基の保護, 官能基の保護, 2) カルボキシル基の保護, 3) アミノ基, あるいはカルボキシル基いずれかの活性によるペプチド結合の形成, 4) 選択的な保護基の除去, すなわちペプチド鎖を延長する時にはアミノ保護基を除去してその塩とし, 遊離ペプチドを得たい時にはカルボキシル基の除去を先にして最後にアミノ保護基を除去する。5) この間各中間体および最終製品の精製, 純度確定の段階が入る。

VI) α-アミノ基の保護

前記したごとく, はじめペプチド合成の大部分の努力がこの面に注がれた。事実アミノ保護基は導入除去に際してラセミ化のないことと, 除去にあたってペプチド結合を切断しないことが最も大切である。現在よく使用されている保護基とその反応性を示せば Table I のごとくなるが, 構造上より分類すれば urethane 型 (carbobenzoxy=CBZO, *tert*-butoxycarbonyl=*tert*-BOC 等), acyl 型 (formyl, phthalyl, trifluoroacetyl, tosyl 等), alkyl 型 (benzyl, trityl, Schiff base 等), に大別され, 反応除去の条件よりは酸により除去されるもの, アルカリで除去されるもの, 還元的に除去されるものに大別される。その他に酸化的に除去できる thiophenyl carbonyl³⁰⁾ もある。

CBZO 基¹⁶⁾ は導入に際してラセミ化をとまなわないことはよく確立されたところである。しかもカルボキシル基の活性化によるラセミ化に抵抗する点においても優秀である。CBZO 基はアルカリ下, Schotten-Baumann の条件で導入するのであるが, 時々ナトリウム塩が有機溶媒にくることがある。しかるにこれ以外の保護基が求められる理由は lysine の N^ε との間に選択的な除去を必要とする点, イオウを含むペプチドの合成における除去の困難性の 2 点につきる。lysine の N^ε に残した保護基はペプチド合成の最後の除去の条件を決定する。

TABLE I. NH_2 Protection and Removal

Group	Condition							
	$\text{H}_2\text{-Pd}$	Na-NH_3	HBr-AcOH	N HCl 20°, 24 hr.	AcOH 100 15 min.	CF_3COOH	N NaOH	NH_2NH_2
$\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{OCO-}$	+	+	+	slow	—	—	—	—
$(\text{CH}_3)_3\text{COCO-}$	—	—	+	+	partially +	+	—	—
$(\text{C}_6\text{H}_5)_3\text{C-}$	slow	+	+	+	+	+	—	—
$\text{CH}_3\text{-C}_6\text{H}_4\text{-SO}_2\text{-}$	—	+	—	—	—	—	—	—
HCO-	—	—	—	+	—	—	—	—
—	decomp.	—	—	—	—	phthalamic acid	+
$\text{CF}_3\text{CO-}$	—	decomp.	—	—	—	—	+	+

+ : Removed — : Stable

この反応条件にペプチドの結合、官能基が耐えるか否かが高級ペプチド合成成功のカギとなる。かつて Hofmann, Yajima³¹⁾ および Schwyzer³²⁾ はそれぞれ α - および β -MSH を N^ϵ tosyl 基をもって合成し、これらが methionine を含むゆえに液安ナトリウムを作用させたがその保護基の除去とともにペプチドの切断をみて、その最終製品を得なかった事実がある。Schwyzer³³⁾ らは、このため最近 N^ϵ -*tert*-BOC-lysine, *tert*-butyl ester (後記) を利用して、この β -MSH の合成に成功した。この種の方法は、これからよく使用されるものと思われるが、*tert*-BOC 基^{20), 21)} は酸に非常に弱いので、その取り扱いには充分の注意が必要である。

formyl 基²²⁾ は lysine の N^ϵ に入れればペプチド合成上種々の反応条件に耐えるが、⁶⁾ glutamine, asparagine を有するペプチドとの組み合わせには、酸による除去に際して注意を要する。phthalyl 基²³⁾ は導入に際してラセミ化の危険があるため、種々の反応条件が求められた。アルカリ性にすればすぐ phthalamic acid に開環する。

trifluoroacetyl 基²⁴⁾ はそれ自身安定であるが pH 10 以上で不安定である。しかし、Weygand 等³⁴⁾ の多くの研究にもかかわらず、導入に問題がある。

tosyl 基²⁵⁾ はアミノ基を完全に保護しているのではなく、これは mixed anhydride 法 (後記) の反応下に副反応を生ずる。

benzyl 基²⁶⁾ は接触還元で除去されるが特徴が少ない。

trityl 基^{27), 28)} のアミノ酸エステルのケン化は非常に困難であると同時に、trityl アミノ酸を mixed anhydride あるいは *p*-nitrophenol 法 (後記) で活性化して、ペプチドを合成することは、glycine 以外困難である。³⁵⁾ しかも完全にアミノ基は保護されていない。

Shiff base²⁹⁾ は除去の点よりは一番よいわけであるが、酸にあまりにも不安定である。ただ *o*-hydroxybenzaldehyde の縮合型のものが、比較的安定である。

phenylthiocarbonyl 基³⁰⁾ は構造上 CBZO 基に似るが、四酢酸鉛などで酸化的に除去されるのみで一般的でない。

このほか、benzylsulfonyl 基はラネー・ニッケル、液安ナトリウム、氷酢酸中塩酸で除去される。また *o*-nitrophenoxycarbonyl chloride を導入する方法は考えとして興味あるものであるが、高級ペプチドの合成に利用された例はない。最近の tritylsulfonyl, *o*-nitrophenylsulfonyl 基³⁵⁾ はこれからよく検討されるであろう。

V) カルボキシル基の保護

最も簡単には反応中塩として、たとえば mixed anhydride 法中トリエチルアミンなどで保護しておくだけでよい場合がある。この際生成したアミノ保護基をもったペプチドと、原料の保護基を持ったアミノ酸がいずれも酸であるため、製品は溶解度の差による再結晶で分離精製しなければならない。現在一般に使用されているカルボキシル保護基と除去の条件を Table II に示す。

TABLE II. COOH Protection and Removal

Group	Condition						
	H ₂ -Pd	Na-NH ₃	HBr-AcOH	N HCl 20°, 24 hr.	CF ₃ COOH	N NaOH 20°, 1 hr.	NH ₂ NH ₂
-COOCH ₃ } -COOC ₂ H ₅ }	—	NH ₂	—	—	—	+	-NHNH ₂
-COOCH ₂ C ₆ H ₅	+	NH ₂	+	-OCH ₃	—	+	-NHNH ₂
-COOCH ₂ C ₆ H ₄ NO ₂	+	—	—	—	—	+	—
-COOC(CH ₃) ₃	—	—	+	-OCH ₃	+	—	—

+ : Removed — : Stable

最も普通の保護基は、メチル、エチル³⁶⁾ およびベンジルエステル³⁷⁾ である。これらは1モルよりやや多いアルカリで常温あるいは、冷却下でケン化されるわけであるが、反応速度はその残基 R によって支配され glycine でもっとも早く, isoleucine, valine 等では非常におそくなる。この際存在する N 保護基の性質も大切であって、たとえば phthalyl 基は phthalamic acid に開環, CF₃CO 基は除去される。

エステルのアルカリケン化に際しては、種々の副反応の危険があるので注意しなければならない。

1) ラセミ化の問題

アルカリを 50% の水溶性有機溶媒で作用させてラセミ化がなかったのに、90% または無水の溶媒ではラセミ化したような報告が数多くある。³⁸⁾

2) transpeptidation

glutamic acid γ -ester, aspartic acid β -ester, glutamine, asparagine を含むペプチドは、アルカリでイミド体を経過しこの転移を生ずる。³⁹⁾

3) rearrangement

glycine が CBZO アミノ酸に連っている場合、これをアルカリで取り扱うと転移して urea 結合を生ずる。⁴⁰⁾

4) β -elimination

水酸基を保護した serine, threonine,^{38,41)} SH を保護した cysteine²⁴⁾ を含むペプチドはアルカリの作用で脱水を生じ dehydro ペプチドを形成する場合がある。

上記ラセミ化の問題はアルカリの使用に際してたえず念頭におかねばならず、高級のペプチド合成に、最後でこの操作を行なうことは極めて危険の多いことであり、現在メチル、エチルエステルを使用することはない。この結果、酸で除去できる *tert*-butyl (*tert*-Bu) エステルがよく利用されるようになった。直接, isobutylene の作用,^{43,44)} あるいは *tert*-butylacetate⁴⁵⁾ と過塩素酸で導入される。トリフルオロ酢酸での除去速度は *N*-*tert*-BOC よりもおそい。

ベンジル基は接触還元でも除去できるので有利である。しかしこのエステルを残すためには CBZO を臭化水素酸で切ればよいが、しばしば同時にベンジルも除去される。このため、*p*-nitrobenzyl 基⁴⁶⁾ が利用されるようになった。この利用は angiotensin の合成⁴⁷⁾ 例にみられる。また、カルボキシル基を phenylhydrazide にし酸化マンガンで除去する方法も報告された。⁴⁸⁾

これ以外 amide が C 末端の保護に使用された例は α -MSH の合成³¹⁾ にみられる。

VI) 官能基の保護

1) 酸性アミノ酸

glutamic acid, aspartic acid のカルボキシル基を選択的に保護する方法は CBZO-glutamic, CBZO-aspartic acid を無水酢酸で取り扱い、対応の anhydride をアルコール類で分解して生成する半エステルを分別する方法であるがこの分離法が完全でなかったために、これを使用したペプチド間に、物理化学的性質が異なることがあった。⁴⁹⁾ しかし最近にはこの分離に dicyclohexylamine 塩⁵⁰⁻⁵²⁾ を利用する方法が採用された結果 (Chart 2), 分別再結晶によって半エステルを純粋に捕捉することができるようになり、したがってこれらを含むペプチドの技術上の困難は解決したと考えられる。

Chart 2.

2) 塩基性アミノ酸

i) arginine: このカルボキシル基を直接活性化する際, guanido 基の塩基性をおさえるため, nitro 基,⁵³⁾ CBZO 基⁵⁴⁾ tosyl 基⁵⁵⁾ を導入する方法が普通である. 前者 2 つは接触還元で, 後者は液安ナトリウムで除かれる. arginine を含むペプチドが acid あるいは amino component として使用される場合, guanido 基はいずれも塩酸でプロトン化すればよい. mixed anhydride 法の場合は酢酸でも差支えない.

ii) lysine: ε のアミノ基の保護は前述したごとく α のアミノ基との間に選択的除去が行なえるように考慮されねばならない. 一般のアミノ保護基はいずれも導入されるわけであるが, 選択的には, その銅塩 (I) を経て反応し, その後硫化水素で銅を除去するのが一般である⁵⁶⁾ (Chart 3). ornithine 誘導体の合成も同様である.

lysine の di-CBZO (II) を五塩化リンで anhydride (III) にし, これを塩酸, アルコールで開いて N^ε CBZO 体をつくる方法は, そのエステル (IV) の中に diketopiperazine および polymer を含んでいる.⁵⁸⁾

Chart 3.

iii) histidine: CBZO-his-hydrazide⁵⁹⁾ はよい結晶性の物質であるので, これを azide 法で反応するのが良好である. この際, imidazole の窒素を保護する必要はない. しかし他の方法でカルボキシル基を活性化する場合には, ベンジル,⁶⁰⁾ CBZO⁶¹⁾ 等で保護しなければならない. この保護基は酸に対しては N^α 位の同保護基よりも安定であるが, アルカリによって除去される.

3) 水酸基の保護

serine, threonine は水酸基の保護を必要としない azide 法をもって結合される例が多い. しかし, これらの azide は反応温度が上ると oxazolidone に転位する傾向が強い.⁶²⁾ 水酸基の保護には, アセチル以外 benzyl 基⁶³⁾ が接触還元で除去される点より応用されている. threonine は水酸基の保護なく DCC (後記) でペプチド結合に入る.

tyrosine は普通保護を必要としないが, *p*-nitrophenol 法によっては, 副反応をとまなうことがしられてきた.⁶⁴⁾ このため本法の使用をさけるか, アセチル基等⁶⁵⁾ を導入することが考慮される.

4) cysteine

純粋な原料 cysteine は cystine を塩酸亜鉛で還元し, トルエンスルホン酸塩として精製し合成に利用するのが最もよい.⁶⁶⁾ この保護に最もよく使用される S-benzyl 基は液安ナトリウムで cystine を還元した後に benzyl chloride を作用せしめて製する.⁶⁷⁾ この除去も液安中, ナトリウムで行なわなければならない. 現在まで oxytocin,

vasopressin の合成の最終段階は、いずれもこの方法で行なわれた。このほか trityl^{68,69)} diphenylmethyl⁶⁸⁾ はそれぞれクロロホルム中塩酸、あるいは銀塩、水銀塩で除去され、これらを利用して新しい oxytocin 等の合成が可能となる。最近 insuline の A 鎖の -S-S- を含むペプチドがこれらを利用して合成せられた。⁷⁰⁾

これ以外 dihydropyran 誘導体⁷¹⁾ あるいはアセトン付加体の thiazoline⁷²⁾ を利用する方法があるが欠点が多い。

5) amide の保護

asparagine のアミドは特に glutamine より活性試薬によっては脱水され、ニトリルになる可能性が強い。⁷³⁾ このため最近 xanthidrol 基が紹介された。⁷⁴⁾

VII) ペプチド形成反応

ペプチド結合の形成のために、アミノ基を活性化する方法がある。たとえば Goldschmidt 等⁷⁵⁾ によって行なわれた phosphorazo 法と呼ばれるアミンをホスゲンで isocyanate にする反応などがあるが、いずれもラセミ化を生ずることが判明し、現在のペプチド合成はカルボキシル基の活性化を経て合成を進めるのが常法である。

カルボキシル基の活性には、いずれにせよカニボニル炭素原子の電気的陽性度を高めることが必要で、この結果求核反応により amide 結合が形成されるわけである。

1) 活性エステル法 (active ester 法)

cyanomethyl,⁷⁶⁾ *p*-nitrophenyl,⁷⁷⁾ thiophenyl,⁷⁸⁾ adenylic acid⁷⁹⁾ 等各種活性エステルに関する文献があるが、この中 cyanomethyl ester は MSH の his•phe•arg•try•gly• の合成に使用された。⁸⁰⁾ 特に *p*-nitrophenol は、Chart 4 で示される反応に従い、oxytocin の合成⁸¹⁾ に使用せられた結果、高級ペプチドの合成に耐えることが証明され、現在非常に多く使用されるものの1つとなった。*p*-nitrophenol を製品から抽出あるいは再結晶で完全に除去することが大切である。

Chart 4.

最近 Boissonnas 等⁸²⁾ により、この種の活性エステルが広範囲に検討された結果、2,4,5-trichlorophenol もまた優秀であることが認められた。

2) 酸無水物法 (mixed anhydride 法)

i) 無機酸との混合無水物：チオカルボン酸、各種のリン酸のみならず硫酸、亜硫酸と酸クロリドを経て、無水物を形成するが、このために五塩化リンを使用すること自体すでに好ましくない。

ii) 有機酸との混合無水物：acyl アミノ酸のトリエチルアミン塩に alkyl chloroformate を作用せしめると酸無水物を形成し、これが Chart 5 に示すようにアミンと作用して amide を形成する。しかし一般にこの型の無水物がいずれの方向に反応するかが問題であるが、Vaughan, Osato⁸³⁾ により種々の有機酸について検討された結果、特に ethyl および isobutyl chloroformate が良好であった。また pivaloyl chloride 等の酸クロライドもまた使用される。⁸⁴⁾ 反応自体は非常にすみやかであり、反応生成物も精製しやすい。しかし収率がやや落ちる。

Chart 5.

3) 結合試薬

i) carbonyldiimidazole (CDI)：生体内の acyl 転位が histidine の imidazole 基の acyl 化を経て起こる反

応に注目して Anderson 等⁸⁵⁾ は本試薬を紹介した. Chart 6 にしたがって試薬と acyl アミノ酸とを冷時反応させると炭酸ガスが発生し, その後アミノ component を加える. 未反応の acylimidazole は水で分解される.

Chart 6.

ii) dicyclohexylcarbodiimide (DCC) およびその同属体: Sheehan 等⁸⁶⁾ により紹介された試薬であり, 取り扱いの容易なため, 広く使用される. Chart 7 の反応より生ずる urea は一般に難溶であるが, 少しは製品に入ってくるし, 反応液の塩基性が高いと acyl urea を副生する. この反応機構は Khorana 等⁸⁷⁾ が提唱したよりも村松等⁸⁸⁾ の研究になる acyl アミノ酸の無水物が中間体であることは確かであろう.

Chart 7.

iii) Woodward 法⁸⁹⁾: 本試薬は未だ高価なため一般に広く使用されないが, Chart 8 に示すごとく反応し, carbonyldiimidazole のように使用できる.

Chart 8.

4) azide 法

本法はすでに 1904 年 Curtius¹⁵⁾ によって開拓されたものであるが, 今なお, ラセミ化を生じない唯一の方法である. したがってペプチド間の結合に利用すべき最善の方法である (Chart 9). ただ 2, 3 の問題があって, tyrosine, methionine を含むペプチドには注意して, 定量的に亜硝酸を作用せしめるべきであり, tryptophan を含むペプチドには使用できない. arginine を含むペプチドへの使用は検討を要する.

Chart 9.

この azide 反応中に溶媒, 温度の影響によって, 副反応を生ずることがある. たとえば, Hofmann, Yajima 等⁹⁰⁾ は CBZO・ser・tyr・CON₃ が ether 中では正常に進行するが, エチルアセテート中では, Chart 10 のごとく urea 結合になることを経験したし, また, amide 形成⁹¹⁾ に終わることも知られている.

Chart 10.

この変法として CBZO-hydrazide を使用し窒素の保護基との間に選択的な保護基の除去を行ない, ペプチドを任意の方向に延長する方法が Hofmann 等⁹²⁾ によって紹介された (Chart 11).

Chart 11.

また azide 法ではないが, この hydrazide を pyrazolon に導きこれに amine を作用させてペプチド結合を形成させる方法がある.⁹³⁾

ペプチド形成反応はこれ等以外に多くの方法があるが, 他の成書^{9~13)} にゆずりたい.

VIII) ペプチド鎖の延長法

以上の保護基, 結合方式を利用してペプチドを延長する方法として最も注目すべきはラセミ化の問題である. Young 等⁹⁴⁾ が種々溶媒の影響などを検討しているが, それより大切な条件は acyl ペプチドを azide 以外の方法で結合する場合である. この際にラセミ化を生ずることは数多くの文献で明らかになった. これは中間体として oxazolidone を経過するものと考えられ, 最近, 彼等によってこの中間体が指摘された.⁹⁵⁾ したがってこの影響を受けない glycine およびこれを形成しにくい proline を C 末端に持つペプチドは, いずれの方法で活性化されてもよいと考えられる. この実例は Chart 12 に示すように Hofmann, Yajima 等の ACTH 活性体の合成⁶⁾ に見られるし, ついで, Schwyzer 等⁷⁾ による全合成にもそのまま用いられている. また, Guttman 等⁹⁶⁾ の最近の bradykinine の合成もその一例である.

Chart 12.

IX) ペプチドの検定

保護基を有するペプチドは, 一般に thin layer, ペーパークロマトの上で高い R_F 値を与えるゆえに, この方法で純度を論ずることは危険である. したがって少量保護基を除去して予試験を行なうのがよい.

遊離のペプチドに関しては各溶媒において single spot であることがまず大切である. ただ, arginine を含むペプチドは塩の影響を受けやすいので注意を要する. このほか, 各種 pH におけるペーパー電気泳動以外, セルローズアセテート,⁹⁷⁾ アクリルエイマイド,⁹⁸⁾ スターチジェル⁹⁹⁾ による電気泳動で純度を見るのが有効であ

る。かくて単一と考えられるに至れば、酸分解を行ない、アミノ酸分析機で定量的に正しいモル比であることを定量する。もちろん旋光度測定、元素分析も大切であるがこれ以外に立体的な証明が必要かつ重要である。各種の蛋白質分解酵素¹⁰⁰⁾の証明なしにペプチドの合成はそれ自身正しくない。leucine-aminopeptidase (LAP) によって L 型であることを証明する以外、必要に応じて chymotrypsin, trypsin, carboxypeptidase での証明が大切である。これはペーパークロマトグラフで調べると、消化されない結合があれば検出できるし、またアミノ酸分析機によっても理論上 1 対 1 のモル比を与えない。

LAP の作用に限度のある大きなペプチドでは、酸分解物をバクテリアによって定量するのが望ましい。LAP による場合 glutamine, asparagine は定量できないし、酸分解では tryptophan は失なわれる。cysteine は過ギ酸で酸化し、cysteic acid として定量すればよい。¹⁰¹⁾

X) 結 語

以上の合成知識を利用し天然物を合成の対象とした場合、それと同一のアミノ酸配列に対応したペプチドを合成しても普通の天然物有機化学と異なって直ちに天然物の構造確定となすことは困難である。しかし合成区分を通じて、活性と構造との関連についての理解が得られること、天然品よりは得られない区分や変化のある構造を合成することによって作用との関係を知り得ること、また不純物を含まない合成品によって活性を正確に測定しうること等々が重要な点である。かかる知識を背景にしてこそ、生化学物質の人工合成は重要な意味を持ってくると同時に、これら物質の有機反応を構造のレベルで理解しようとする方向に一步進むことができるのである。

しかしこの目的のためには合成品は光学的にも純粋のものでなくてはならない。したがって合成法の改良、発展のみならずアミノ酸、その残基に起因する興味ある基本的有機反応の研究が期待される。

文 献

- 1) F. Hofmeister : *Ergeb. physiol. I. Abt. Biochemie*, 759 (1902).
- 2) E. Fischer : *Ber.*, **39**, 530 (1906).
- 3) H. Braconnot : *Ann. chim. phys.*, [2] **13**, 113 (1820).
- 4) V. du Vigneaud, C. Rossler, J.M. Swan, C.W. Roberts, P.G. Katsoyannis, S. Gordon : *J. Am. Chem. Soc.*, **75**, 4879 (1953).
- 5) M.F. Bartlett, A. Jöhl, R. Roeske, R.J. Stedman, F.H.C. Stewart, D.N. Ward, V. du Vigneaud : *Ibid.*, **78**, 2905 (1956).
- 6) K. Hofmann, H. Yajima, N. Yanaihara, T. Liu, S. Lande : *Ibid.*, **83**, 487 (1961).
- 7) R. Schwyzer, P. Sieber : *Nature*, **199**, 172 (1963).
- 8) P.G. Katsoyannis, A. Tometsko, K. Fukuda : *J. Am. Chem. Soc.*, **85**, 2863 (1963).
- 9) J.P. Greenstein, M. Winitz : "Chemistry of the Amino Acid," Vol. II (1961). John Wiley & Sons. Inc.
- 10) J.S. Fruton : "Advances in Protein Chemistry," Vol. 5, 1 (1949). Academic Press.
- 11) M. Goodman, G.W. Kenner : *Ibid.*, Vol. 12, 466 (1957). Academic Press.
- 12) A.H. Cook, G. Harris : "Progress in Organic Chemistry," Vol. 4, 140 (1958). Butterworth Scientific Publications.
- 13) R.A. Boissonnas : "Advances in Organic Chemistry," Vol. 3, 159 (1963). Interscience Publisher.
- 14) E. Fischer, E. Forneau : *Ber.*, **34**, 2868 (1901).
- 15) T. Curtius : *J. Prakt. Chem.*, **26**, 175 (1882).
- 16) M. Bergmann, L. Zervas : *Ber.*, **65**, 1192 (1932).
- 17) E. Mohr, F. Stroschein : *Ibid.*, **42**, 2521 (1909).
- 18) A.H. Cook, I. Heilbron, A.L. Levy : *J. Chem. Soc.*, **1948**, 201.
- 19) H. Leuchs : *Ber.*, **39**, 857 (1906).
- 20) F.C. McKay, N.F. Albertson : *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 4686 (1957).
- 21) L.A. Carpino : *J. Org. Chem.*, **28**, 1909 (1963).
- 22) J.C. Sheehan, D.D.H. Yang : *J. Am. Chem. Soc.*, **80**, 1154 (1958).
- 23) D.A. Kidd, F.E. King : *Nature*, **162**, 776 (1948).
- 24) F. Weygand, R. Geier : *Chem. Ber.*, **89**, 647 (1956).
- 25) V. du Vigneaud, O.K. Behrens : *J. Biol. Chem.*, **117**, 27 (1936).
- 26) L. Velluz, G. Amiard, R. Heymes : *Bull. soc. chim. France*, **1954**, 1012.
- 27) G. Amiard, R. Heymes, L. Velluz : *Ibid.*, **1955**, 191.
- 28) L. Zervas, D.M. Theodoropoulos : *J. Am. Chem. Soc.*, **78**, 1359 (1956).

- 29) J.C. Sheehan, V.J. Grenda : *Ibid.*, **84**, 2417 (1962).
- 30) J. Kollonitsch, A. Hajós, F. Gábor : *Nature*, **177**, 841 (1956).
- 31) K. Hofmann, H. Yajima, E.T. Schwartz : *J. Am. Chem. Soc.*, **82**, 3732 (1960).
- 32) B. Iselin, R. Schwyzler : *Helv. Chim. Acta*, **45**, 1499 (1962).
- 33) R. Schwyzler, A. Costopanagiotis, P. Sieber : *Ibid.*, **46**, 870 (1963).
- 34) F. Weygand, M. Reiher : *Chem. Ber.*, **88**, 26 (1955).
- 35) L. Zervas, D. Borovas, E. Gazis : *J. Am. Chem. Soc.*, **85**, 3660 (1963).
- 36) M. Brenner, W. Huber : *Helv. Chim. Acta*, **36**, 1109 (1953).
- 37) J.M. Theobald, M.M. Williams, G.T. Young : *J. Chem. Soc.*, **1963**, 1927.
- 38) I. Photaki : *J. Am. Chem. Soc.*, **85**, 1123 (1963).
- 39) B. Iselin, R. Schwyzler : *Helv. Chim. Acta*, **45**, 1499 (1962).
- 40) M. Bodanszky, J.T. Sheehan, M.A. Ondetti, S. Lande : *J. Am. Chem. Soc.*, **85**, 991 (1963).
- 41) G. Riley, J. Turnbull, W. Wilson : *J. Chem. Soc.*, **1957**, 1373.
- 42) M. Sokolovsky, M. Milchek, A. Patchornik : *Bull. Research Council Israel.*, **11A**, 80 (1962).
- 43) R. Roeske : *Chem. & Ind. (London)*, **1959**, 1121; *J. Org. Chem.*, **28**, 1251 (1963).
- 44) G.W. Anderson, F.M. Gallaham : *J. Am. Chem. Soc.*, **82**, 3359 (1960).
- 45) E. Taschner, A. Chimiak, B. Bator, T. Sokolowska : *Ann.*, **646**, 134 (1961).
- 46) H. Schwarz, K. Arakawa : *J. Am. Chem. Soc.*, **81**, 5691 (1959).
- 47) K. Arakawa, F.M. Bumpus : *Ibid.*, **83**, 728 (1961).
- 48) B.B. Kelly : *J. Org. Chem.*, **28**, 453 (1963).
- 49) G.T. Young : *Proc. Symposium on Methods of Peptide Synthesis, Coll. Czech. Chem. Comm.*, **24**, 111 (1959).
- 50) E. Klieger, H. Gibian : *Ann.*, **655**, 195 (1962).
- 51) F. Weygand, K. Hunger : *Z. Naturforschg.*, **13 b**, 50 (1958).
- 52) R. Schweizer, H. Dietrich : *Helv. Chim. Acta*, **44**, 2003 (1961).
- 53) K. Hofmann, W.D. Peckham, A. Rheiner : *J. Am. Chem. Soc.*, **78**, 238 (1956).
- 54) L. Zervas, T. Otani, M. Winitz, J.P. Greenstein : *Ibid.*, **81**, 2878 (1959).
- 55) J. Ramachandran, C.H. Li : *J. Org. Chem.*, **28**, 173 (1963).
- 56) A. Neuburger, F. Sanger : *Biochem. J.*, **37**, 515 (1943).
- 57) R.L.M. Syge : *Ibid.*, **42**, 99 (1948).
- 58) M. Bergmann, L. Zervas, W.F. Ross : *J. Biol. Chem.*, **111**, 245 (1935).
- 59) R.W. Holley, E. Sondheimer : *J. Am. Chem. Soc.*, **76**, 1326 (1954).
- 60) V. du Vigneaud, O.K. Behrens : *J. Biol. Chem.*, **117**, 27 (1936).
- 61) A. Patchornik, A. Berger, E. Katchalski : *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 6416 (1957).
- 62) J.S. Fruton : *J. Biol. Chem.*, **146**, 463 (1942).
- 63) K. Okawa : *Bull. Chem. Soc. Japan*, **31**, 88 (1958).
- 64) J. Ramachandran, C.H. Li : *J. Org. Chem.*, **28**, 173 (1963).
- 65) C.R. Harington, R.V. Pitt Rivers : *Biochem. J.*, **38**, 417 (1944).
- 66) L. Zervas, I. Photaki : *J. Am. Chem. Soc.*, **84**, 3887 (1962).
- 67) V. du Vigneaud, L.F. Audrieth, H.S. Loring : *Ibid.*, **52**, 4500 (1930).
- 68) L. Zervas, D.M. Theodoropoulos : *Ibid.*, **78**, 1359 (1956).
- 69) G. Amiard, R. Heymés, L. Velluz : *Bull. soc. chim. France*, [5], **23**, 97, 698 (1956).
- 70) A. Cosmatos, I. Photaki, L. Zervas : 6th, European Peptide Symposium, (Athens) Sept., 1963.
- 71) G.F. Holland, L.L. Cohen : *J. Am. Chem. Soc.*, **80**, 3765 (1958).
- 72) F. Micheel, H. Emde : *Ber.*, **72**, 1724 (1939).
- 73) D.T. Gish, P.G. Katsoyannis, G.P. Hess, R.T. Stedman : *J. Am. Chem. Soc.*, **78**, 5954 (1956).
- 74) S. Akabori, S. Sakakibara, Y. Shimonischi : *Bull. Chem. Soc. (Japan)*, **34**, 739 (1961).
- 75) St. Goldschmidt, M. Wick : *Ann.*, **575**, 217 (1952).
- 76) R. Schwyzler, M. Feuer, B. Iselin : *Helv. Chim. Acta*, **38**, 83, 1508 (1955).
- 77) M. Bodanszky : *Nature*, **175**, 685 (1955).
- 78) Th. Wieland, W. Schäfer, E. Bökelmann : *Ann.*, **573**, 99 (1951).
- 79) Th. Wieland : *Angew. Chem.*, **71**, 417 (1959).
- 80) R. Schwyzler, C.H. Li : *Nature*, **182**, 1669 (1958).
- 81) M. Bodanszky, V. du Vigneaud : *J. Am. Chem. Soc.*, **81**, 5688 (1959).
- 82) J. Pless, R.A. Boissonnas : *Helv. Chim. Acta*, **46**, 1609 (1963).
- 83) J.R. Vaughan, R.L. Osato : *J. Am. Chem. Soc.*, **73**, 5553 (1951).

- 84) M. Bodanszky, C.A. Birckhimer, S. Lande, M.A. Ondétti, J.T. Sheehan, N.J. Williams : 6th. European Peptide Symposium, (Athens) Sept. 1963.
- 85) G.W. Anderson, R. Paul : J. Am. Chem. Soc., **80**, 4423 (1958).
- 86) J.C. Sheehan, G.P. Hess : *Ibid.*, **77**, 1067 (1955); **78**, 1367 (1956); J.S. Sheehan, J.J. Hlavka : J. Org. Chem., **21**, 439 (1956).
- 87) H.G. Khorana : Chem. & Ind. (London), **1955**, 1087.
- 88) 村松, 萩谷 : 日化, **80**, 1497 (1959).
- 89) R.B. Woodward, R.A. Olofson, H. Mayer : J. Am. Chem. Soc., **83**, 1010 (1961).
- 90) K. Hofmann, T.A. Thompson, H. Yajima, E.T. Schwartz, H. Inouye : *Ibid.*, **82**, 3715 (1960).
- 91) E. Schnabel : Ann., **659**, 168 (1962).
- 92) K. Hofmann, A. Lindenmann, M.Z. Magee, N.H. Khan : J. Am. Chem. Soc., **74**, 470 (1952).
- 93) W. Ried, B. Schleimer : Ann., **619**, 43 (1958).
- 94) M.W. Williams, G.T. Young : J. Chem. Soc., **1963**, 881.
- 95) G.T. Young, A.L. Heard, I. Antonovics : 6th European Peptide Symposium (Athens) Sept. 1963.
- 96) St. Guttman, J. Pless, R.A. Boissonnas : Helv. Chim. Acta, **45**, 170 (1962).
- 97) B.W. Grunbaum, J. Zec, E.L. Durrum : Microchem. J., **7**, 41 (1963).
- 98) R.A. Reisfeld, U.J. Lewis, D.E. Williams : Nature, **195**, 281 (1962).
- 99) O. Smithies : "Advances in Protein Chemistry," Vol. 16, 65 (1959). Academic Press.
- 100) Laboratory Manual of Analytical Method of Protein Chemistry Vol. 2, (1960). P. Alexander, R.J. Block editors, Pergamon Press.
- 101) S. Moore : J. Biol. Chem., **238**, 235 (1963).