活性エステルとして 4-Morpholinyl Ester のペプチド合成への応用 (第 2 報¹⁾)

岡本憲治, 島村真一

京都薬科大学²⁾

4-Morpholinyl Ester as an Activated Ester in Peptide Synthesis. II¹⁾

KENJI OKAMOTO and SHINICHI SHIMAMURA

Kyoto College of Pharmacy²⁾

(Received May 14, 1973)

Following the previous work, several new N-carbobenzoxyamino acid 4-morpholinyl esters (Arg (NO₂), Asp (β-OMe), Glu (γ-OMe), Ile, Leu, Met, Thr, and Trp) were prepared. Their coupling with Gly-OEt gave the corresponding N-carbobenzoxypeptide esters. Reactions of these 4-morpholinyl esters with amino acid sodium salts in aqueous organic solvent gave the corresponding N-carbobenzoxypeptides, while good results were not obtained in the condensations which involved sterically hindered amino acids. Young's racemization test gave a high optical purity of 98%. Further, several reactions of N-benzoylglycine 4-morpholinyl ester were examined, and it was found that the ester was comparatively stable to acetic acid or 25% HBr in acetic acid, giving about 70% recovery in both media.

ペプチド合成に関する活性エステルのなかに, Young ら³⁾による 1-piperidyl ester (RCO₂N $\begin{array}{c} \diagup \diagdown \\ \diagdown \diagup \end{array}$) があるが, 著者らは前報¹⁾でこれと構造の類似する 4-morpholinyl ester (RCO₂N $\begin{array}{c} \diagup \diagdown \\ \diagdown \diagup \end{array}$ O) の活性について報告した. すなわち, N-carbobenzoxy-L-alanine, -β-alanine, -S-benzyl-L-cysteine, -glycine, -N^α-carbobenzoxy-L-lysine, -L-phenylalanine, -L-proline, -L-serine, -L-tyrosine および -L-valine のそれぞれ 4-morpholinyl ester (10 種) を合成した. これら 4-morpholinyl ester はアミノ酸エステルと縮合して, 好収率で対応する N-carbobenzoxypeptide ester を与えること, また Anderson のラセミ化試験⁴⁾にも良好な結果が得られることから, 著者らの 4-morpholinyl ester は活性エステルとして, 1-piperidyl ester に対しそん色のないことが判明した.

今回, さらに別種の N-carbobenzoxyamino acid (9 種) に対し, 前報に準じ, DCC による 4-hydroxymorpholine の縮合を試みたところ, N^α-carbobenzoxy-N^{1m}-benzyl-L-histidine の場合を除き, それぞれ対応する N-carbobenzoxyamino acid 4-morpholinyl ester が得られた. また, 同様にして, glycine を C 末端にする数種の N-carbobenzoxypeptide を 4-morpholinyl ester 化することができた (Table I).

N^α-Carbobenzoxy-N^{1m}-benzyl-L-histidine の場合は, DCC との付加転位体である 1,3-dicyclohexyl-1-(N^α-carbobenzoxy-N^{1m}-benzyl-L-histidyl) urea (収率 22%) が生成し, 目的とする 4-morpholinyl ester は単離できなかった.

ここに新しく得られた 8 種の N-carbobenzoxyamino acid 4-morpholinyl ester は, いずれも glycine ethyl ester と前報のごとく反応し (DMF あるいは dioxane 中, 室温, 24 hr), 対応する N-carbobenzoxypeptide ethyl ester (収率 52—92%) を与えることが判明した. さらに, 今回は数種の N-carbobenzoxyamino acid 4-morpholinyl ester について, 含水溶媒中, アミノ酸との縮合による N-carbobenzoxypeptide の合成も試みた: アミノ酸 (2.4 mmole) の 1N NaOH (2.4 ml) 溶液に水 (3—4 ml) を加えて希釈し, これに N-carboben-

1) 第 1 報: 岡本憲治, 島村真一, 薬誌, 93, 333 (1973). 前報における 4-morpholyl ester を, 今回 4-morpholinyl ester に改めた.

2) Location: Yamashina-Misasagi, Higashiyama-ku, Kyoto.

3) B.O. Handford, J.H. Jones, G.T. Young, T.H.N. Johnson, *J. Chem. Soc.*, 1965, 6814.

4) R. Paul, G.W. Anderson, *J. Am. Chem. Soc.*, 82, 4596 (1960).

TABLE I. 4-Morpholinyl Esters of N-Carbobenzoxyamino Acids and N-Carbobenzoxydipeptides

No.	Parent amino acid or dipeptide ^{a)}	Yield (%)	mp ^{b)} (°C)	[α] _D ^{c)} (Temp.)	Analysis (%)		
					Calcd. (Found)	C	H N
1	Arg(NO ₂)	89	— ^{d)}	−30.3(24)	49.31 (49.23)	5.98 (6.17)	19.17 (18.72)
2	Asp (β-OMe)	76	93—94	−3.1(23)	55.73 (55.76)	6.05 (6.05)	7.65 (7.57)
3	Glu (γ-OMe)	58	90.5—91	−1.1(23)	56.83 (56.90)	6.36 (6.22)	7.36 (7.33)
4	Ile	46	71—72	+3.2(23)	61.70 (61.89)	7.48 (7.58)	7.99 (7.87)
5	Leu	68	— ^{e)}	−4.4(24)	—	—	—
6	Met	58	78—79	+1.3(22)	55.42 (55.71)	6.57 (6.54)	7.60 (7.42)
7	Thr	53	91—93	−20.6(22)	56.80 (56.99)	6.55 (6.36)	8.28 (7.83)
8	Trp	62	110—111.5	+5.0(21)	65.24 (65.09)	5.95 (5.82)	9.92 (9.76)
9	Leu-Gly	55	115.5—117	−26.0(24)	58.95 (59.19)	7.17 (7.21)	10.31 (10.28)
10	Phe-Gly	77	145.5—146.5	−3.9(24)	62.57 (62.75)	6.16 (6.07)	9.52 (9.45)
11	Pro-Gly	53	81.5—84	−67.3(24.5)	58.30 (58.01)	6.44 (6.47)	10.74 (10.80)
12	Val-Gly	56	150—151.5	−15.9(24)	58.00 (58.27)	6.92 (7.06)	10.68 (10.50)

^{a)} The optically active amino acids are of L-configuration.

^{b)} Recrystallized from EtOAc-pet. ether, except No. 12 (from CHCl₃-pet. ether). All the melting points are uncorrected.

^{c)} C=2 in CHCl₃, except No. 5 (C=3.85 in CHCl₃)

^{d)} semi-solid

^{e)} viscous oil

zoxyamino acid 4-morpholinyl ester (2.0 mmole) の dioxane (あるいは DMF) 溶液 (5—6 ml) を加え、室温下、48 hr 反応させた。Table II にその結果を示すが、反応成分のどちらかに立体障害性のアミノ酸が含まれていると、目的物は得られないか、または収率がきわめて低かった。そして原料の 4-morpholinyl ester を一部回収するか、またはその加水分解物である N-carbobenzoxyamino acid が得られ、このような立体障害の影響は有機溶媒中の反応より顕著に認められる。なお上記のように、含水溶媒中では使用する塩基のためエステルが一部加水分解するので、さらに 4-morpholinyl ester の NaOAc による加水分解についてしらべた。すなわち、N-carbobenzoxyamino acid 4-morpholinyl ester (1.0 eq) に対し、NaOAc (1.2 eq) を含水溶媒中作用させたところ、N-carbobenzoxyglycine 4-morpholinyl ester の場合は、同エステル (54%) を回収し、同時に N-carbobenzoxyglycine (26%) が得られ、また N-carbobenzoxy-L-valine 4-morpholinyl ester の場合には、同エステル (84%) を回収するのみで、N-carbobenzoxy-L-valine は単離されなかった。すなわち、弱塩基によっても一部加水分解が生じるが、立体障害の大きな valine では加水分解が阻害されることがわかった。

つぎに、さらに 4-morpholinyl ester のアルカリや酸などに対する挙動をみるため、N-benzoylglycine 4-morpholinyl ester を (i) 1N NaOH, (ii) AcOH, (iii) CF₃CO₂H, (iv) 2.9N HCl/MeOH, (v) 5.9N HCl/dioxane および (vi) 25% HBr/AcOH で処理 (ii を除き、いずれも室温下)、また (vii) 接触還元 (触媒、Pd 黒) に付した。その結果、i では 20 min 以内にエステル加水分解が完了し、vii ではエステル開裂 (N-benzoylglycine の生成) のみが見られた。iii と v でも少なからずエステル開裂が起り、また、iv では顕著なエステル交換の結果、N-benzoylglycine methyl ester を生成した。しかし、ii の AcOH 処理 (50°, 2 hr) と vi の 25% HBr/AcOH

TABLE II. Reactions^{a)} between N-Carbobenzoxymino Acid 4-Morpholinyl Esters (A) and Sodium Salts of Amino Acids (B)

No.	(A)	(B)	Isolated substances (yield %)
1	Z-Gly-OMor*	H-Gly-OH	Z-Gly-Gly-OH ^{b)} (60), Z-Gly-OH(5)
2	Z-Leu-OMor	H-Gly-OH	Z-Leu-Gly-OH ^{c)} (35), Z-Leu-OMor(50)
3	Z-Phe-OMor*	H-Gly-OH	Z-Phe-Gly-OH ^{d)} (69)
4	Z-Pro-OMor	H-Gly-OH	Z-Pro-Gly-OH ^{e)} (38), Z-Pro-OMor(25)
5	Z-Val-OMor	H-Gly-OH	Z-Val-Gly-OH ^{f)} (7), Z-Val-OMor(51)
6	Z-Gly-OMor	H-Leu-OH	Z-Gly-Leu-OH·DCHA ^{g)} (6), Z-Gly-OH(21)
7	Z-Gly-OMor*	H-Phe-OH	Z-Gly-Phe-OH ^{h)} (53)
8	Z-Gly-OMor	H-Pro-OH	Z-Gly-OH(58)
9	Z-Gly-OMor	H-Val-OH	Z-Gly-Val-OH·DCHA ^{h)} (21), Z-Gly-OH(22)

The optically active amino acids are of L-configuration, Z: carbobenzoxy, Mor: 4-morpholinyl

a) A solution of 4-morpholinyl ester (2.0 mmole) in dioxane or DMF* was added into a solution of the amino acid (2.4 mmole) in 1N sodium hydroxide (2.4 ml) and water (3—4 ml), and stirred at room temperature for 24 hr.

b) O. Süss, *Ann.*, **572**, 96 (1951)

c) S. Sakakibara, Y. Nagai, *Bull. Chem. Soc. Jap.*, **33** 1537 (1960)

d) G. Losse, E. Demuth, *Chem. Ber.*, **94**, 1762 (1961)

e) W. Grassmann, E. Wunsch, *Chem. Ber.*, **91**, 449 (1958)

f) mp 154—155.5°, $[\alpha]_D^{25}$ -5.0° (c=1, MeOH). Calcd. C₁₈H₁₈O₅N₂ 1/2 H₂O: C, 65.86; H, 8.68; N, 8.23. Found: C, 66.28; H, 9.09; N, 8.28

g) K. Hofmann, M. Bergmann, *J. Biol. Chem.*, **134**, 225 (1940)

h) mp 157—158°, $[\alpha]_D^{25}$ +5.5° (c=1, MeOH). Calcd. C₂₁H₂₁O₅N₂: C, 66.50; H, 8.48; N, 8.62. Found: C, 66.27; H, 8.75; N, 8.63

処理 (室温, 1 hr) では, 他の場合に比べ比較的安定で約 70% の原料を回収した.⁵⁾

おわりに, Young 法⁶⁾ によるラセミ化試験を試みたところ, N-benzoyl-L-leucylglycine ethyl ester の光学純度は 98% であった.

前報ならびに本報で述べたように, 本エステルにはラセミ化の抑制効果が期待出来るので現在 4-morpholinyl ester を利用するフラグメント縮合に関して検討中である. なお本報ではつぎの略名を使用. DCC: dicyclohexylcarbodiimide, DCHA: dicyclohexylamine, DMF: dimethylformamide, Mor: 4-morpholinyl, THF: tetrahydrofuran, Z: carbobenzoxy.

実験の部

旋光度は ReX Photoelectric Polarimeter NEP-2-541 により, また, 融点は Yamato Melting Point Apparatus Model MP-21 により測定した. 融点はすべて未補正. 溶液は無水芒硝で乾燥. ロータリーエバポレーターで溶媒留去.

(1) N-Carbobenzoxymino Acid 4-Morpholinyl Ester および N-Carbobenzoxydipeptide 4-Morpholinyl Ester (Table I) 前報に準じ, DCC ((1.0 eq) により N-carbobenzoxymino acid または N-carbobenzoxydipeptide (1.0 eq) を 4-hydroxymorpholine (1.2 eq) とエステル化. 反応条件: THF 中, 0—4° で 18—20 hr 攪拌. 再結: EtOAc-pet. ether (ただし, No. 12 は除く).

(2) 1,3-Dicyclohexyl-1-(N^α-carbobenzoxymino-N^{1m}-benzyl-L-histidyl) Urea N^α-Carbobenzoxymino-N^{1m}-benzyl-L-histidine (0.76 g, 2.0 mmole) を温時 DMF (50 ml) にとかし, 氷冷下, 4-hydroxymorpholine (0.41 g, 4.0 mmole) を, つづいて DCC (0.41 g, 2.0 mmole) を加え, 氷冷下 4 hr, さらに室温で 16 hr 攪拌. 微量の不溶物をろ去し, ろ液を減圧下蒸発乾固. 残渣を CHCl₃ 抽出. CHCl₃ 層を順次 5% KHCO₃, 飽和, NaCl 水で洗浄. 乾燥後, 減圧下 CHCl₃ 留去. 油状残渣に EtOAc-pet. ether を加えて結晶化. 収量 0.5 g, mp 128—132°. EtOAc-pet. ether から, さらに EtOAc から再結. 収量 0.2 g (22%), mp 140.5—142.5°, $[\alpha]_D^{25}$ +0.9° (c=2, CHCl₃). Anal. Calcd. C₃₄H₄₁O₄N₃: C, 69.96; H, 7.08; N, 12.00. Found: C, 69.90; H, 7.54; N, 11.85.

(3) N-Carbobenzoxymino Acid 4-Morpholinyl Ester 類と Glycine Ethyl Ester との反応 (N-Carbobenzoxydipeptide Ethyl Ester の合成) 前報に準じ, 上記合成した N-carbobenzoxymino acid 4-morpholinyl ester (2.0 mmole), glycine ethyl ester HCl 塩 (2.4 mmole) および NaOAc·3H₂O (2.4 mmole) を DMF 中または dioxane*

5) (vi) 法により N-carbobenzoxymino acid 4-morpholinyl ester から amino acid 4-morpholinyl ester を製出する可能性があり, 現在検討中.

6) M.W. Williams, G.T. Young, *J. Chem. Soc.*, **1963**, 881.

中室温 (15—17°) で 24 hr 攪拌。つぎに、生成物とその収率 (%) を記す。再結は文献記載による。Z-L-Arg (NO₂)-Gly-OEt⁷⁾ (52)*, Z-L-Glu(γ-OMe)-Gly-OEt⁸⁾ (80), Z-Ile-Gly-OEt⁹⁾ (61), Z-L-Leu-Gly-OEt¹⁰⁾ (93)*, Z-L-Met-Gly-OEt¹¹⁾ (74)*, Z-L-Thr-Gly-OEt¹²⁾ (69), Z-L-Trp-Gly-OEt¹³⁾ (77), および Z-L-Asp-(β-OMe)-Gly-OEt (82), mp 99—101° (EtOAc-pet. ether から再結.), $[\alpha]_D^{25} -7.8^\circ$ (c=2, AcOH). Anal. Calcd. C₁₇H₂₃O₇N₂: C, 55.73; H, 6.05; N, 7.65. Found: C, 55.60; H, 5.95; N, 7.68.

(4) N-Carbobenzoxyamino Acid 4-Morpholinyl Ester 類と Amino Acid との反応 (N-Carbobenzoxydipeptide の合成 Table II) アミノ酸 (2.4 mmole) を 1N NaOH (2.4 ml) にとかし、水 (3—4 ml) を加え、これに N-carboboxyamino acid 4-morpholinyl ester (2.0 mmole) の dioxane または DMF (5—6 ml) 溶液を加えて、室温 (10°) 下、48 hr 攪拌。AcOH で中和後、減圧下蒸発乾固。油状残渣に EtOAc (50 ml) と 5% KHCO₃ (100 ml) を加えて振とう。二層を分離し、EtOAc 層を乾燥。減圧下 EtOAc 留去。原料 N-carboboxyamino acid 4-morpholinyl ester を回収 (Table II, No. 2,4,5)。また、上記の水層を 6N HCl で酸性とし、EtOAc と振とう。水層 (原料アミノ酸を含む) を捨て、EtOAc 層を飽和 NaCl 水で洗浄。乾燥。減圧下 EtOAc 留去。ここに得られる残渣を、(i) 再結して N-carboboxy dipeptide を得 (No. 1,2,3,4,5,7)。または (ii) 少量の CHCl₃ にとかし、放置して析出する結晶体 (N-carboboxyglycine; No. 1, 6, 8, 9) をろ取し、CHCl₃ を留去。油状残渣を少量の EtOAc にとかし、過剰の DCHA を加え放置。析出結晶をろ取。MeOH-ether から再結して、N-carboboxydipeptide dicyclohexylammonium salt を得 (No. 6,9)。

(5) N-Carbobenzoxyamino Acid 4-Morpholinyl Ester に対する Sodium Acetate の作用 N-Carboboxyglycine 4-morpholinyl ester (0.59 g, 2.0 mmole) と NaOAc·3H₂O (0.33 g, 2.4 mmole) を 50% dioxane に加え、室温 (10°) で 48 hr 攪拌。減圧下蒸発乾固。残渣に EtOAc (50 ml) と 5% KHCO₃ (100 ml) を加えて振とう。二層を分離し、EtOAc 層より原料エステル (54%) を回収し、水層より N-carboboxyglycine (26%) を得た。同様に N-carboboxy-L-valine 4-Morpholinyl ester に NaOAc·3H₂O を作用させたが、原料エステル (84%) を回収し、N-carboboxy-L-valine は単離されなかった。

(6) N-Benzoylglycine 4-Morpholinyl Ester の合成とその反応 A) N-Benzoylglycine (9.0 g, 50 mmole) と 4-hydroxymorpholine (6.2 g, 60 mmole) を THF (100 ml) と DMF (12 ml) の混液にとかし、冷時、これに DCC (10.3 g, 50 mmole) を加え、以下 (1) に準じて処理。EtOAc-pet. ether から再結。

N-Benzoylglycine 4-Morpholinyl Ester: 収量 10 g (75%). mp 101—102.5°. Anal. Calcd. C₁₃H₁₆O₄N₂: C, 59.08; H, 6.10; N, 10.60. Found: C, 59.04; H, 6.09; N, 10.45.

B) N-Benzoylglycine 4-morpholinyl ester (0.53 g, 2.0 mmole) を下記 i—vii のごとく処理。ただし、ii 以外はすべて室温 (20°) 下反応。

(i)—MeOH (6 ml) にとかし、1N NaOH (3 ml) を加え、1 hr 攪拌。1N HCl で酸性にし、減圧下蒸発乾固。10% EtOH から再結し、N-benzoylglycine (78%) を得。ただし、TLC [Merck's Silicagel G, MeOH-CHCl₃ (1:29)] によれば、20分以内に加水分解完了。

(ii)—AcOH (5 ml) にとかし、50° で 2 hr 攪拌。減圧下 AcOH 留去。油状残渣に CHCl₃ (50 ml) と 5% KHCO₃ (50 ml) を加え、振とう。二層を分離し、CHCl₃ 層は飽和 NaCl 水で洗浄。乾燥。減圧下 CHCl₃ 留去。N-Benzoylglycine 4-Morpholinyl Ester: 0.37 g (70%), mp 97.5—100°. EtOAc-pet. ether から再結。mp 100—102°. 水層を 6N HCl で酸性にし、減圧下蒸発乾固。残渣を EtOH で抽出。減圧下 EtOH 留去。

N-Benzoylglycine: 0.02 g (4%), mp 180—186°.

(iii)—CF₃CO₂H (4 ml) にとかし、1 hr 攪拌。Pet. ether (100 ml) を加え、生じた油状物を ii に準じて処理し、N-benzoylglycine (13%) と原料エステル (47%) を得。

(iv)—2.9N HCl/MeOH (5 ml) にとかし、2 hr 攪拌。減圧下 MeOH 留去。

N-Benzoylglycine Methyl Ester: 0.34 g (87%), mp 79—81° (Lit.¹³⁾ mp 79—81°).

(v)—5.9N HCl/dioxane (5 ml) にとかし、1 hr 攪拌。減圧下 dioxane 留去。油状残渣を ii に準じて処理し、N-benzoylglycine (36%) と原料エステル (43%) を得。

(vi)—25% HBr/AcOH (6 ml) に加え、1 hr 攪拌。Pet. ether (100 ml) を加え、生じた油状物を ii に準じて処理し、原料エステル (68%) を回収。N-Benzoylglycine は得られなかった。

(vii)—AcOH (0.34 ml, 6.0 mmole) の存在下、MeOH (10 ml) 中、Pd 黒を触媒とし、接触還元 (4 hr) を行なったのち、減圧下 MeOH 留去。ii に準じて処理し、N-benzoylglycine (78%) を得。原料エステルは回収しなかった。

7) H.O. Van Orden, E.L. Smith, *J. Biol. Chem.*, **208**, 751 (1954).

8) S. Goldschmidt, C. Jutz, *Chem. Ber.*, **89**, 518 (1956).

9) M. Fujino, C. Hatanaka, *Chem. Pharm. Bull.*, **16**, 929 (1968).

10) H.B. Milne, W. Kilday, *J. Org. Chem.*, **30**, 64 (1965).

11) T. Mukaiyama, R. Matsueda, M. Suzuki, *Tetrahedron Letters*, **1970**, 1901.

12) M. Bodanszky, M.A. Ondetti, C.A. Birkhimer, P.L. Thomas, *J. Am. Chem. Soc.*, **86**, 4452 (1964).

13) H. Witte, W. Seeliger, *Ann.*, **755**, 163 (1972).

(7) ラセミ化試験 (Young 法)¹⁴⁾

まず, N-benzoyl-L-leucine 4-morpholinyl ester を製し, これを glycine ethyl ester と縮合させて得られる N-benzoylleucylglycine ethyl ester について Young 法によりラセミ化度を求めた.

(i) **N-Benzoyl-L-leucine 4-Morpholinyl Ester** N-Benzoyl-L-leucine hydrazide¹⁴⁾ (2.5 g, 10 mmole) に THF (11 ml) と 3.22N HCl/THF (6.2 ml), つぎに, ether を加え, そのけんだく液 (-10°) に *t*-butyl nitrite (1.6 ml, 15 mmole) を加えて攪拌 (10 min). さらに 0.4 ml を追加して攪拌 (15 min). 順次, 5% KHCO_3 , 飽和 NaCl 水で洗浄. 乾燥. ろ過. ろ液を 4-hydroxymorpholine (2.1 g, 20 mmole) の ether (20 ml) 冷溶液に加え, $0-4^{\circ}$ で 19 hr, 室温で 6 hr 攪拌. 順次, 1N HCl, 5% KHCO_3 , 飽和 NaCl 水で洗浄. 乾燥. 減圧下 ether 留去. 残渣 (2.6 g, mp $85-89.5^{\circ}$) を EtOAc—pet. ether から再結. 収量 1.9 g (59%), mp $91-93^{\circ}$, $[\alpha]_D^{25} + 0.3^{\circ}$ ($c=4$, CHCl_3). Anal. Calcd. $\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{O}_4\text{N}_2$: C, 63.73; H, 7.55; N, 8.75. Found: C, 64.03; H, 7.75; N, 9.00.

(ii) **N-Benzoylleucylglycine Ethyl Ester** NaOAc $\cdot$ 3H $_2$ O (0.33 g, 2.4 mmole), glycine ethyl ester hydrochloride (0.33 g, 2.4 mmole) および上記 i (0.64 g, 2.0 mmole) を dioxane (3 ml) に加え, 室温で 24 hr 攪拌. 常法により目的物を単離. 収量 0.58 g (91%), mp $154-156^{\circ}$, $[\alpha]_D^{25} - 33.4^{\circ}$ ($c=2$, EtOH). したがって光学純度は 98%. Anal. Calcd. $\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{O}_4\text{N}_2$: C, 63.73; H, 7.55; N, 8.75. Found: C, 63.96; H, 7.62; N, 8.97.

謝辞 本研究にさいし, 種々御助言を頂いた京都大学薬学部 矢島治明教授に深謝します. また元素分析をしていただいた京都大学分析センターの関係諸氏に感謝します.

14) M. Bergmann, L. Zervas, *J. Biol. Chem.*, **113**, 341 (1936).