タフトシン関連ペプチドの合成 (第2報¹⁾)安村貢一, 岡本憲治, 島村真一
京都薬科大学²⁾Synthesis of Peptides related to Tuftsin. II¹⁾KOICHI YASUMURA, KENJI OKAMOTO and SHINICHI SHIMAMURA
Kyoto College of Pharmacy²⁾

(Received November 4, 1976)

Several peptides, H-Arg-Pro-Lys-Thr-OH (I), H-Thr-Arg-Pro-Lys-OH (II), H-Thr-Arg-Pro-Arg-OH (III), H-Thr-Lys-Pro-Lys-OH (IV), H-Thr-Lys-Gly-Arg-OH (V), H-Thr-Lys-Pro-Orn-OH (VI), H-Thr-Orn-Pro-Arg-OH (VII), and H-Thr-Gly-Lys-Pro-Arg-OH (VIII), related to tuftsin were synthesized. I exhibited a phagocytosis-stimulating activity, to the same degree as tuftsin.

Keywords—new tetrapeptides; tuftsin analogues; phagocytosis-stimulating tetrapeptide; new pentapeptide; H-Arg-Pro-Lys-Thr-OH

1972年, Najjar らにより γ -globulin から phagocytosis-stimulating tetrapeptide である tuftsin (H-Thr-Lys-Pro-Arg-OH) の単離と固相法による合成が報告された。³⁾

そこで, 著者らは生物活性のある tuftsin 関連ペプチドを求め, まず前報¹⁾で, tuftsin 鎖の中の塩基性アミノ酸残基の位置を変えた4種のtetrapeptidesを合成したが, このうち H-Lys-Thr-Pro-Arg-OH のみが tuftsin と同程度の活性を示すことを報告した。

さらに今回, tuftsin の retro-peptide である H-Arg-Pro-Lys-Thr-OH (I) およびその他の tuftsin 類似の tetrapeptides 6 種: H-Thr-Arg-Pro-Lys-OH (II), H-Thr-Arg-Pro-Arg-OH (III), H-Thr-Lys-Pro-Lys-OH (IV), H-Thr-Lys-Gly-Arg-OH (V), H-Thr-Lys-Pro-Orn-OH (VI), H-Thr-Orn-Pro-Arg-OH (VII) および pentapeptide である H-Thr-Gly-Lys-Pro-Arg-OH (VIII) を合成し, 生物学的試験に付した。ここに得られた結果を報告する。

まず, IV の合成法を Fig. 1 に図示する。

V, VII および VIII は Fig. 1 に準じ, V は Z-Thr-Lys(Z)-OMe (IVa) と Boc-Gly-Arg(NO₂)-OBzl (Va) から, VII は Z-Thr-Orn(Z)-OMe (VIIa) と Boc-Pro-Arg(NO₂)-OBzl¹⁾ から, VIII は Z-Thr-Gly-OEt (VIIIa) と Boc-Lys(Z)-Pro-Arg(NO₂)-OBzl¹⁾ から合成した。

また, 同様に VI を IVa と Boc-Pro-Orn(Z)-OBzl (VIa) から合成する際, 保護 tetrapeptide, Z-Thr-Lys(Z)-Pro-Orn(Z)-OBzl (VIb) の脱保護の段階でかなりの副生物を生じたので, Fig. 2 に示す合成法により目的を達した。

さらに, I, II および III については, 最後の保護 tetrapeptides をつぎのように合成した。すなわち, Z-Arg(NO₂)-Pro-Lys(Z)-Thr-OBzl (Ic) は, DCC 法で合成した Boc-Lys(Z)-Thr-OBzl (Ia) を脱 Boc 化 (HCl/EtOAc) したものと Z-Arg(NO₂)-Pro-OH とを pentachlorophenyl trichloroacetate (PCP·TCA) 法⁴⁾により縮合して得た。Z-Thr-Arg(NO₂)-Pro-Lys(Z)-OBzl (IIc) は, C 末端から stepwise に DCC 法ついで mixed anhydride 法を用いて PMz-Arg(NO₂)-Pro-Lys(Z)-OBzl (IIb) を合成し, これを脱 PMZ 化 (trifluoroacetic

1) 第1報: 岡本憲治, 島村真一, 薬誌, 96, 315 (1976)。

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

3) K. Nishioka, A. Constantopoulos, P.S. Satoh, V.A. Najjar, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **47**, 172 (1972); K. Nishioka, A. Constantopoulos, P.S. Satoh, V.A. Najjar, *Biochim. Biophys. Acta*, **310**, 217 (1973)。

4) M. Fujino, C. Hatanaka, *Chem. Pharm. Bull.* (Tokyo), **16**, 929 (1968)。

Fig. 1. Synthetic Scheme of H-Thr-Lys-Pro-Lys-OH

Fig. 2. Synthetic Scheme of H-Thr-Lys-Pro-Orn-OH

acid)⁵⁾ したものと Z-Thr-NHNH₂ とを azide 法 (Rudinger の変法⁶⁾) により縮合して得た。Z-Thr-Arg(NO₂)-Pro-Arg(NO₂)-OBzl (IIIb) は、Z-Arg(NO₂)-Pro-OH と H-Arg(NO₂)-OBzl とを PCP・TCA 法により縮合して Z-Arg(NO₂)-Pro-Arg(NO₂)-OBzl (IIIa) を得、これを脱 Z 化 (HBr/AcOH) したものと Z-Thr-NHNH₂ とを azide 法 (Rudinger の変法) により縮合して誘導した。

最後に得られた tetra- および pentapeptide 誘導体を anisole 存在下、MeOH-H₂O-AcOH (1:1:1) を溶媒とし、7—8 hr 接触還元して tetra- および pentapeptide に導き、CM-Sephadex C-25 を用い H₂O と 0.3M ammonium acetate buffer (pH 7.0) で gradient elution を行なって精製。さらに、Sephadex G-10 を用い 0.1M AcOH で溶出して脱塩したのち凍結乾燥して対応する 8 種の peptides を吸湿性粉末として得た。これらの peptides はいずれも、薄層クロマトグラフィー (TLC)、ペーパークロマトグラフィー (PPC) および高圧紙電気泳動で単一のスポットを示し、また元素分析も満足な結果を与えた。

ここに合成した 8 種の peptides につき、本学微生物学教室 中沢昭三教授らにより生物学的試験が行なわれた。⁷⁾ その結果、H-Arg-Pro-Lys-Thr-OH (I) が 0.01 μg/ml および 0.1 μg/ml の各濃度で tuftsin とほぼ同程度の活性を有することが示された。なお、I 以外の上記 7 種の peptides にはほとんど活性が認められなかった。詳細については、中沢教授らにより報告される予定である。

実験の部⁸⁾

旋光度は Rex Photoelectric Polarimeter で、⁹⁾ 融点は Yamato Melting Point Apparatus Model MP-21 で測定。融点はすべて未補正。TLC は silica gel (Kieselgel G, Merck) を用い、つぎの溶媒系で展開; R_{f1} CHCl₃-MeOH (9:1), R_{f2} CHCl₃-MeOH (15:1), R_{f3} (CHCl₃-MeOH (40:1), R_{f4} *n*-butanol-AcOH-pyridine-H₂O (15:3:10:12)。また PPC は Whatman 3 M を用い、*n*-butanol-AcOH-pyridine-H₂O (15:3:10:12) で展開 (R_{f5})。高圧ろ紙電気泳動は Toyo 高圧ろ紙電気泳動装置 HPE-V (東洋ろ紙 No. 51) を用い、0.75M ギ酸 (pH 1.9), 33.3 V/cm で 60 min 行なった。泳動距離は L-リジン塩酸塩の泳動距離¹⁰⁾ を 1 としたときの数値で示した。シリカゲルカラムクロマトには、silica gel (100 mesh, Mallinckrodt) を用いた。また、溶媒はロータリーエバポレーター (40—50°) で留去。

(1) H-Arg-Pro-Lys-Thr-OH (I) i) Boc-Lys(Z)-Thr-OBzl (Ia) : H-Thr-OBzl·TosOH (1.8 g, 4.8 mmol) を THF (5 ml) 中、Et₃N (0.67 ml) で中和したのち、氷冷下 Boc-Lys(Z)-OH (1.5 g, 4 mmol) の THF (5 ml) 溶液および DCC (1.8 g, 4.4 mmol) を加えて 3 hr、さらに室温で 20 hr 反応。Dicyclohexylurea をろ去したの

5) F. Weygand, K. Hunger, *Chem. Ber.*, **91**, 1 (1962).

6) J. Honzl, J. Rudinger, *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **26**, 2333 (1961).

7) 黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus* 209-P JC) を検定菌として、モルモット腹腔内多核白血球およびヒト多核白血球による貪食能 (ingestion) に及ぼす影響を検討。

8) 使用したアミノ酸はすべて L 型である。また次の略号を使用: Z=carbobenzoxy, Boc=*tert*-butyloxycarbonyl, PMZ=*p*-methoxybenzyloxycarbonyl, Bzl=benzyl, DCC=N,N'-dicyclohexylcarbodiimide, TosO-H=*p*-toluenesulfonic acid, THF=tetrahydrofuran, DMF=N,N-dimethylformamide.

9) 記載なき場合は 10 cm セルを使用 ($l=1$)。

10) -24.5 cm。なお、合成 tuftsin の対 Lys 比は 1.03。

ち、ろ液を減圧下濃縮。残渣を EtOAc で抽出し、0.5M クエン酸、5% NaHCO₃ について飽和 NaCl 水で洗浄。EtOAc 層を Na₂SO₄ で乾燥。減圧下 EtOAc 留去。残渣を EtOAc-Pet. ether から再結晶。結晶性粉末、収量 1.2 g (52%), mp 80—81°, $[\alpha]_D^{25}$ -8.5° ($c=1.1$, DMF), lit.¹¹⁾ mp 74—76°, $[\alpha]_D^{25}$ -10.5° ($c=1.05$, DMF)。

ii) Z-Arg(NO₂)-Pro-OPCP (Ib) : Z-Arg(NO₂)-Pro-OBzl¹¹⁾ (6.1 g, 11.26 mmol) を dioxane (34 ml) に溶かし、1N NaOH (33.8 ml) を加え室温で 3 hr 攪拌。4N HCl で中和後、減圧下溶媒留去。残渣を 5% NaHCO₃ で抽出し、EtOAc で洗浄。水層を 4N HCl で酸性にし、0° で一夜放置。生じる固体をろ取。乾燥。MeOH から再結晶。結晶性粉末、Z-Arg(NO₂)-Pro-OH を得た。収量 4.0 g (79%), mp 110—111°, lit.¹²⁾ mp 115—117°。つぎに、Z-Arg(NO₂)-Pro-OH (1.8 g, 4.0 mmol) を藤野らの方法⁴⁾に従って、pentachlorophenyl trichloroacetate (1.82 g, 4.4 mmol) により PCP 化。EtOH から再結晶。結晶性粉末、収量 1.8 g (65%), mp 121—124°, lit.¹²⁾ mp 125—127°。

iii) Z-Arg(NO₂)-Pro-Lys(Z)-Thr-OBzl (Ic) : Ia (1.1 g, 1.9 mmol) を anisole (1.04 ml) 存在下、4.5N HCl/EtOAc (3.4 ml) に溶かし、室温で 1 hr 攪拌。無水エーテルを加え生じる沈殿物をろ取、無水エーテルで洗浄。減圧下 KOH 上で乾燥。粉末 (0.9 g) を DMF (15 ml) に溶かし、Et₃N (0.6 ml) および Ib (1.37 g, 1.96 mmol) を加え、室温で 67 hr 反応。減圧下溶媒留去。残渣を EtOAc で抽出し、5% NaHCO₃, 2N HCl について飽和 NaCl 水で洗浄。EtOAc 層を Na₂SO₄ で乾燥。EtOAc 留去。残渣をシリカゲルカラムクロマト (溶出液 CHCl₃-MeOH (30:1)) で精製。無定形粉末、収量 0.43 g (27%), $[\alpha]_D^{25}$ -28.9° ($c=1.1$, CHCl₃), R_f 0.41. Anal. Calcd. C₄₄H₅₇O₁₂N₉: C, 58.46; H, 6.36; N, 13.95. Found: C, 58.47; H, 6.30; N, 13.68.

iv) H-Arg-Pro-Lys-Thr-OH (I) : Ic (367 mg, 0.41 mmol) を MeOH (7 ml), H₂O (7 ml) および AcOH (7 ml) の混液に溶かし、anisole (0.47 ml) 存在下、Pd 黒 (約 200 mg) を触媒として、7 hr 接触還元。触媒をろ去し、減圧下溶媒留去。減圧下 KOH 上で一夜乾燥。CM-Sephadex C-25 を用い、H₂O (300 ml) と 0.3M ammonium acetate buffer (pH 7.0) で gradient elution を行ない、ニンヒドリンおよび坂口反応陽性の fraction を集め、減圧下濃縮。Sephadex G-10 (溶出液 0.1M AcOH) で脱塩したのち、凍結乾燥。吸湿性粉末、収量 211 mg (84%), $[\alpha]_D^{25}$ -52.6° ($c=0.58$, 5% AcOH, $l=0.5$). R_f 0.08, R_f 0.11. 電気泳動: 1.04. Anal. Calcd. C₂₁H₄₀O₆N₈·2AcOH·1/2 H₂O: C, 47.68; H, 7.84; N, 17.79. Found: C, 47.95; H, 7.78; N, 17.89.

(2) H-Thr-Arg-Pro-Lys-OH (II) i) Boc-Pro-Lys(Z)-OBzl (IIa) : H-Lys(Z)-OBzl·TosOH (2.71 g, 5 mmol) を THF (5 ml) 中 Et₃N (0.7 ml) で中和。氷冷下 Boc-Pro-OH (1.08 g, 5 mmol) および DCC (1.03 g, 5 mmol) を加え 3 hr さらに室温で 15 hr 反応。1-i に準じ処理。シリカゲルカラムクロマト (溶出液 CHCl₃) で精製。油状物、収量 2.5 g (88%), R_f 0.49, $[\alpha]_D^{25}$ -44.5° ($c=1.2$, CHCl₃)。

ii) PMZ-Arg(NO₂)-Pro-Lys(Z)-OBzl (IIb) : IIa (2.2 g, 3.88 mmol) を anisole (2.1 ml) 存在下 4.5N HCl/EtOAc (6.9 ml) で室温、1 hr 処理。無水エーテルを加えて生じる油状物をデカンテーションにより無水エーテルで洗浄。KOH 上で減圧乾燥。無定形粉末 (1.1 g) を DMF (5 ml) 中 Et₃N (0.31 ml) で中和。一方、PMZ-Arg(NO₂)-OH (0.83 g, 2.18 mmol) を DMF (5 ml) および Et₃N (0.31 ml) の混液に溶かし、-10° に冷却下 isobutyl chloroformate (0.30 g, 2.18 mmol) を加え 10 min 攪拌。これを上記 H-Pro-Lys(Z)-OBzl の DMF 溶液に加え、室温で 16 hr 反応。減圧下溶媒留去。残渣を EtOAc で抽出し、0.5M クエン酸、5% NaHCO₃ について飽和 NaCl 水で洗浄。EtOAc 層を Na₂SO₄ で乾燥。減圧下 EtOAc 留去。残渣をシリカゲルカラムクロマト (溶出液 CHCl₃-MeOH (30:1)) で精製。無定形粉末、収量 1.2 g (66%), $[\alpha]_D^{25}$ -10.8° ($c=0.6$, CHCl₃), R_f 0.62. Anal. Calcd. C₄₁H₅₃O₁₁N₈: C, 59.05; H, 6.41; N, 13.44. Found: C, 58.80; H, 6.70; N, 13.57.

iii) Z-Thr-Arg(NO₂)-Pro-Lys(Z)-OBzl (IIc) : IIb (1.3 g, 1.56 mmol) を anisole (0.5 ml) 存在下、trifluoroacetic acid (1 ml) で 0°, 1 hr 処理。無水エーテルを加えて生じる沈殿物をろ取り無水エーテルで洗浄。KOH 上で減圧乾燥。この粉末 (0.6 g) を DMF (3 ml) 中 Et₃N (0.11 ml) で中和。一方、Z-Thr-NHNH₂ (0.21 g, 0.77 mmol) を 2.0N HCl/DMF (0.77 ml) と DMF (3 ml) に溶かし、-10° に冷却下 isoamyl nitrite (0.09 g, 0.77 mmol) を加え 10 min 後 Et₃N (0.22 ml) で中和。この azide 溶液を上記 H-Arg(NO₂)-Pro-Lys(Z)-OBzl の DMF 溶液に加え 5° で 42 hr 反応。減圧下溶媒留去。残渣を EtOAc で抽出し 2N HCl, 5% NaHCO₃ について飽和 NaCl 水で洗浄。EtOAc 層を Na₂SO₄ で乾燥。減圧下 EtOAc 留去。残渣 (538 mg) をシリカゲルカラムクロマト (溶出液 CHCl₃-MeOH (30:1)) で精製。無定形粉末、収量 310 mg (45%), $[\alpha]_D^{25}$ -9.38° ($c=0.8$, CHCl₃), R_f 0.41. Anal. Calcd. C₄₄H₅₇O₁₂N₉: C, 58.46; H, 6.36; N, 13.95. Found: C, 58.40; H, 6.51; N, 13.76.

iv) H-Thr-Arg-Pro-Lys-OH (II) : IIc (115 mg, 0.127 mmol) を 1-iv に準じ接触還元 (8 hr) および精製。吸湿性粉末、収量 44 mg (57%), $[\alpha]_D^{25}$ -87.0° ($c=0.46$, 5% AcOH, $l=0.5$), R_f 0.08, R_f 0.14. 電気泳動: 1.07. Anal. Calcd. C₂₁H₄₀O₆N₈·2AcOH·1/3H₂O: C, 47.91; H, 7.83; N, 17.83. Found: C, 48.20; H, 7.88; N, 17.90.

(3) H-Thr-Arg-Pro-Arg-OH (III) i) Z-Arg(NO₂)-Pro-Arg(NO₂)-OBzl (IIIa) : H-Arg(NO₂)-OBzl·2-TosOH (1.3 g, 2 mmol) を DMF (5 ml) に溶かし、Et₃N (0.85 ml) および Ib (1.4 g, 2 mmol) を加え室温で 50 hr 反応。減圧下溶媒留去。残渣を CHCl₃ で抽出し、5% NaHCO₃, 2N HCl について飽和 NaCl 水で洗浄。CHCl₃ 層を Na₂SO₄ で乾燥。減圧下 CHCl₃ 留去。残渣をシリカゲルカラムクロマト (溶出液 CHCl₃-MeOH

11) E. Schnabel, H. Klostermeyer, H. Berndt, *Ann.*, **749**, 90 (1971).

12) H. Yajima, K. Kitagawa, T. Segawa, *Chem. Pharm. Bull.* (Tokyo), **21**, 2500 (1973).

(40 : 1)) で精製. 無定形粉末, 収量 1.2 g (81%), $[\alpha]_D^{25} -27.6^\circ$ ($c=1.1$, CHCl_3), R_f 0.39. *Anal.* Calcd. $\text{C}_{32}\text{H}_{43}\text{O}_{10}\text{N}_{11}$: C, 51.82; H, 5.84; N, 20.77. Found: C, 51.76; H, 6.14; N, 20.55.

ii) Z-Thr-Arg(NO_2)-Pro-Arg(NO_2)-OBzl (IIIb) : IIIa (1.1 g, 1.48 mmol) を anisole (0.8 ml) 存在下 25% HBr/AcOH (3.7 ml) で室温, 1 hr 処理. 無水エーテルを加えて生じる沈殿物をろ取り無水エーテルで洗浄. KOH 上で減圧乾燥. この粉末 (1.0 g) を DMF (5 ml) 中 Et_3N (0.2 ml) で中和, これと, DMF (5 ml) 中 Z-Thr-NHNH₂ (0.39 g, 1.45 mmol) を 2-iii に準じ azide 化 (2N HCl/DMF 1.46 ml, isoamyl nitrite 0.17 g, Et_3N 0.4 ml) したものを加え 5° で 46 hr 反応. 減圧下溶媒留去. 残渣をシリカゲルカラムクロマト (溶出液 CHCl_3 -MeOH (5:1)) で精製. 吸湿性粉末, 収量 0.6 g (49%), $[\alpha]_D^{25} -23.0^\circ$ ($c=1.1$, CHCl_3), R_f 0.45. *Anal.* Calcd. $\text{C}_{36}\text{H}_{50}\text{O}_{12}\text{N}_{12} \cdot 1/2 \text{H}_2\text{O}$: C, 50.76; H, 6.03; N, 19.73. Found: C, 50.67; H, 6.18; N, 19.45.

iii) H-Thr-Arg-Pro-Arg-OH (III) : IIIb (207 mg, 0.25 mmol) を 1-iv に準じ接触還元 (8 hr) および精製. 吸湿性粉末, 収量 101 mg (65%), $[\alpha]_D^{25} -128.2^\circ$ ($c=0.55$, 5% AcOH, $l=0.5$), R_f 0.08, R_f 0.14. 電気泳動: 1.00. *Anal.* Calcd. $\text{C}_{21}\text{H}_{40}\text{O}_6\text{N}_{10} \cdot 2\text{AcOH} \cdot 1/2 \text{H}_2\text{O}$: C, 45.65; H, 7.51; N, 21.30. Found: C, 45.93; H, 7.47; N, 21.29.

(4) H-Thr-Lys-Pro-Lys-OH (IV) i) Z-Thr-Lys(Z)-OMe (IVa) : H-Lys(Z)-OMe·HCl (6.62 g, 20 mmol) を DMF (20 ml) 中 Et_3N (2.78 ml) で中和. これと, 2-iii に準じ DMF (20 ml) 中で Z-Thr-NHNH₂ (5.34 g, 20 mmol) を azide 化 (3.2N HCl/DMF 12.52 ml, isoamyl nitrite 2.34 g, Et_3N 5.56 ml) したものを 5° , 48 hr 反応. EtOAc-Pet. ether から再結晶. 結晶性粉末, 収量 7.9 g (75%), mp 108—109°, $[\alpha]_D^{25} -13.35^\circ$ ($c=1.0$, CHCl_3), R_f 0.27. *Anal.* Calcd. $\text{C}_{27}\text{H}_{35}\text{O}_8\text{N}_3$: C, 61.24; H, 6.66; N, 7.93. Found: C, 61.51; H, 6.89; N, 8.02.

ii) Z-Thr-Lys(Z)-NHNH₂ (IVb) : IVa (7.3 g, 13.8 mmol) を MeOH (50 ml) に溶かし, $\text{NH}_2\text{NH}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (3.5 g, 69 mmol) を加え室温で 24 hr 放置. 析出する結晶をろ取. MeOH から再結晶. 結晶性粉末, 収量 6.1 g (84%), mp 157—159°. *Anal.* Calcd. $\text{C}_{26}\text{H}_{35}\text{O}_7\text{N}_5$: C, 58.97; H, 6.66; N, 13.22. Found: C, 58.72; H, 6.95; N, 13.38.

iii) Z-Thr-Lys(Z)-Pro-Lys(Z)-OBzl (IVc) : IIa (2.2 g, 3.88 mmol) を 2-ii に準じ脱 Boc 化して得られる粉末 (1.1 g) を DMF (5 ml) 中 Et_3N (0.31 ml) で中和. これと, 2-iii に準じ DMF (5 ml) 中 IVb (1.16 g, 2.19 mmol) を azide 化 (2N HCl/DMF 2.2 ml, isoamyl nitrite 0.26 g, Et_3N 0.61 ml) したものを加え 5° , 45 hr 反応. 粗製品 (2 g) をシリカゲルカラムクロマト (溶出液 CHCl_3 -MeOH (80:1)) で精製. 無定形粉末, 収量 1.1 g (52%), $[\alpha]_D^{25} -24.25^\circ$ ($c=1.0$, CHCl_3), R_f 0.53. *Anal.* Calcd. $\text{C}_{52}\text{H}_{64}\text{O}_{12}\text{N}_6$: C, 64.71; H, 6.68; N, 8.71. Found: C, 65.00; H, 6.68; N, 8.77.

iv) H-Thr-Lys-Pro-Lys-OH (IV) : IVc (246 mg, 0.26 mmol) を 1-iv に準じ接触還元 (8 hr) および精製. 吸湿性粉末. 収量 96 mg (65%), $[\alpha]_D^{25} -64.9^\circ$ ($c=0.57$, 5% AcOH, $l=0.5$). R_f 0.06, R_f 0.10. 電気泳動: 1.06. *Anal.* Calcd. $\text{C}_{21}\text{H}_{40}\text{O}_6\text{N}_6 \cdot 2\text{AcOH} \cdot 1/3 \text{H}_2\text{O}$: C, 50.15; H, 8.19; N, 14.04. Found: C, 50.59; H, 8.23; N, 14.08.

(5) H-Thr-Lys-Gly-Arg-OH (V) i) Boc-Gly-Arg(NO_2)-OBzl (Va) : 2-i に準じ, H-Arg(NO_2)-OBzl (H-Arg(NO_2)-OBzl·2TosOH (9.80 g, 15 mmol) を Et_3N (4.18 ml) で中和と Boc-Gly-OH (2.63 g, 15 mmol) を THF (30 ml) 中 DCC (3.40 g, 16.5 mmol) で縮合 (氷冷下 3 hr, 室温で 12 hr). EtOH から再結晶. 結晶性粉末, 収量 4.6 g (66%), mp 137—138°, $[\alpha]_D^{25} -15.7^\circ$ ($c=1.1$, MeOH), R_f 0.37. *Anal.* Calcd. $\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}_7\text{N}_6$: C, 51.49; H, 6.48; N, 18.02. Found: C, 51.20; H, 6.70; N, 18.16.

ii) Z-Thr-Lys(Z)-Gly-Arg(NO_2)-OBzl (Vb) : Va (2.33 g, 5 mmol) を anisole (5.4 ml) 存在下 3.1N HCl/EtOAc (13 ml) で室温, 1 hr 処理. 無水エーテルを加えて生じる沈殿物をろ取り無水エーテルで洗浄. KOH 上で減圧乾燥. この粉末 (1.8 g) を DMF (5 ml) 中 Et_3N (0.62 ml) で中和. これに, DMF (5 ml) 中 IVb (2.36 g, 4.46 mmol) を 2-iii に準じ azide 化 (2.0N HCl/DMF 4.47 ml, isoamyl nitrite 0.53 g, Et_3N 1.24 ml) したものを加え, 5° で 48 hr 反応. MeOH から再結晶. 結晶性粉末, 収量 3.5 g (92%), mp 105—107°, $[\alpha]_D^{25} -16.1^\circ$ ($c=1.1$, MeOH), R_f 0.18. *Anal.* Calcd. $\text{C}_{41}\text{H}_{53}\text{O}_{12}\text{N}_9$: C, 57.00; H, 6.18; N, 14.59. Found: C, 57.03; H, 6.15; N, 14.34.

iii) H-Thr-Lys-Gly-Arg-OH (V) : Vb (582 mg, 0.68 mmol) を 1-iv に準じ接触還元 (8 hr) および精製. 吸湿性粉末, 収量 301 mg (77%), $[\alpha]_D^{25} -9.4^\circ$ ($c=0.35$, 5% AcOH, $l=0.5$), R_f 0.08, R_f 0.09. 電気泳動: 1.03. *Anal.* Calcd. $\text{C}_{18}\text{H}_{36}\text{O}_6\text{N}_8 \cdot 2\text{AcOH} \cdot 1/2 \text{H}_2\text{O}$: C, 44.81; H, 7.69; N, 19.00. Found: C, 45.07; H, 7.81; N, 18.58.

(6) H-Thr-Lys-Pro-Orn-OH (VI) i) Boc-Pro-Orn(Z)-OBzl (VIa) : 2-i に準じ, H-Orn(Z)-OBzl (H-Orn(Z)-OBzl·HCl (1.97 g, 5 mmol) を Et_3N (0.7 ml) で中和と Boc-Pro-OH (1.08 g, 5 mmol) を THF (10 ml) 中 DCC (1.03 g, 5 mmol) で縮合 (氷冷下 3 hr, 室温で 20 hr). シリカゲルカラムクロマト (溶出液 CHCl_3) で精製. 油状物, 収量 1.7 g (61%), $[\alpha]_D^{25} -42.3^\circ$ ($c=1.4$, CHCl_3), R_f 0.53.

ii) Z-Thr-Lys(Z)-Pro-Orn(Z)-OBzl (VIb) : VIa (1.38 g, 2.5 mmol) を anisole (2.7 ml) 存在下 3.1N HCl/EtOAc (6.5 ml) で室温, 1 hr 処理. 無水エーテルを加えて生じる油状物をデカンテーションにより無水エーテルで洗浄. KOH 上で減圧乾燥. 得られた粉末 (0.74 g) を DMF (3 ml) 中 Et_3N (0.21 ml) で中和. これに, DMF (3 ml) 中 2-iii に準じ IVb (0.79 g, 1.5 mmol) を azide 化 (2.0N HCl/DMF 1.5 ml, isoamyl nitrite 0.18 g, Et_3N 0.42 ml) したものを加え 5° で 46 hr 反応. EtOH から再結晶. 結晶性粉末, 収量 0.92 g (64%), $[\alpha]_D^{25} -31.0^\circ$ ($c=1.1$, CHCl_3), R_f 0.41. *Anal.* Calcd. $\text{C}_{51}\text{H}_{62}\text{O}_{12}\text{N}_6$: C, 64.41; H, 6.57; N, 8.84. Found: C, 64.27; H, 6.73; N, 9.03.

iii) Boc-Pro-Orn(Z)-OMe (VIc) : 2-i に準じ, H-Orn(Z)-OMe (H-Orn(Z)-OMe·HCl (3.17 g, 10 mmol) を

Et₃N (1.39 ml) で中和と Boc-Pro-OH (2.15 g, 10 mmol) を THF (20 ml) 中 DCC (2.06 g, 10 mmol) で縮合 (氷冷下 3 hr, 室温で 15 hr). シリカゲルカラムクロマト (溶出液 CHCl₃) で精製. 油状物, 収量 3.4 g (71%), $[\alpha]_D^{25} -41.6^\circ$ ($c=1.0$, CHCl₃), R_f 0.34.

iv) Z-Thr-Lys(Z)-Pro-Orn(Z)-OMe (VIId) : VIc (2 g, 4.2 mmol) を anisole (2.5 ml) 存在下 2.0N HCl/EtOAc (1.68 ml) で室温, 1 hr 処理. 無水エーテルを加え生じる油状物をデカンテーションにより無水エーテルで洗浄. KOH 上で減圧乾燥. 得られた粉末 (1.2 g) を DMF (10 ml) 中 Et₃N (0.41 ml) で中和. これに, 2-iii に準じ DMF (10 ml) 中 IVb (1.53 g, 2.89 mmol) を azide 化 (2.0N HCl/DMF 2.9 ml, isoamyl nitrite 0.34 g, Et₃N 0.81 ml) したものを加え 5° で 64 hr 反応. 粗製品 (2.2 g) をシリカゲルカラムクロマト (溶出液 CHCl₃-MeOH (100:1)) で精製. 無定形粉末, 収量 1.7 g (67%), $[\alpha]_D^{25} -31.0^\circ$ ($c=1.1$, CHCl₃), R_f 0.58. Anal. Calcd. C₄₅H₅₈O₁₂N₆: C, 61.77; H, 6.68; N, 9.60. Found: C, 61.53; H, 6.73; N, 9.76.

v) H-Thr-Lys-Pro-Orn-OH (VI) : VIId (611 mg, 0.7 mmol) を MeOH (15 ml) に溶かし, 1N NaOH (0.8 ml) を加え室温で 2 hr 反応. 1N HCl で中和後, 減圧下溶媒留去. 残渣を 1N NaOH で抽出し, EtOAc で洗浄. 水層を 1N HCl で酸性にして生じる油状物を EtOAc で抽出し, 飽和 NaCl 水で洗浄. EtOAc 層を Na₂SO₄ で乾燥. 減圧下 EtOAc 留去. 無定形粉末 Z-Thr-Lys(Z)-Pro-Orn(Z)-OH を粗収量 545 mg (91%) で得た. つぎに, この粉末 (310 mg) を粗製のまま 1-iv に準じ接触還元 (8 hr) および精製. 吸湿性粉末, VI を得た. 収量 140 mg (68%), $[\alpha]_D^{25} -57.5^\circ$ ($c=0.53$, 5% AcOH, $l=0.5$), R_f 0.17, R_f 0.22. 電気泳動: 0.77. Anal. Calcd. C₂₆H₃₈O₆N₆·2AcOH·1/2 H₂O: C, 49.05; H, 8.06; N, 14.30. Found: C, 48.87; H, 7.99; N, 14.19.

(7) H-Thr-Orn-Pro-Arg-OH (VII) i) Z-Thr-Orn(Z)-OMe (VIIa) : H-Orn(Z)-OMe·HCl (3.17 g, 10 mmol) を DMF (20 ml) 中 Et₃N (1.39 ml) で中和. これに, DMF (20 ml) 中 2-iii に準じ Z-Thr-NHNH₂ (2.67 g, 10 mmol) を azide 化 (3.2N HCl/DMF 6.26 ml, isoamyl nitrite 1.17 g, Et₃N 2.78 ml) したものを加え 5° で 42 hr 反応. EtOAc-Pet. ether から再結晶. 結晶性粉末, 収量 3.1 g (60%), mp 122—123.5°, $[\alpha]_D^{25} -8.35^\circ$ ($c=1.0$, CHCl₃), R_f 0.32. Anal. Calcd. C₂₆H₃₃O₃N₃: C, 60.57; H, 6.45; N, 8.15. Found: C, 60.27; H, 6.67; N, 7.86.

ii) Z-Thr-Orn(Z)-NHNH₂ (VIIb) : VIIa (2.58 g, 5 mmol) を MeOH (5 ml) 中 4-ii に準じ hydrazide 化. MeOH から再結晶. 結晶性粉末, 収量 2.0 g (78%), mp 172—173°. Anal. Calcd. C₂₅H₃₃O₇N₅: C, 58.24; H, 6.45; N, 13.58. Found: C, 58.40; H, 6.73; N, 13.35.

iii) Z-Thr-Orn(Z)-Pro-Arg(NO₂)-OBzl (VIIc) : Boc-Pro-Arg(NO₂)-OBzl¹⁾ (1.63 g, 3.23 mmol) を anisole (1.8 ml) 存在下 2.0N HCl/EtOAc (12.9 ml) で室温, 1 hr 処理. 無水エーテルを加えて生じる沈殿物をろ取, 無水エーテルで洗浄. KOH 上で減圧乾燥. この粉末 (1.29 g) を DMF (5 ml) 中 Et₃N (0.41 ml) で中和. これに, DMF (5 ml) 中 VIIb (1.5 g, 2.91 mmol) を 2-iii に準じ azide 化 (3.2N HCl/DMF 1.82 ml, isoamyl nitrite 0.34 g, Et₃N 0.8 ml) したものを加え 5° で 43 hr 反応. 粗製品 (2.26 g) をシリカゲルカラムクロマト (溶出液 CHCl₃-MeOH(30:1)) で精製. 無定形粉末, 収量 1.66 g (64%), $[\alpha]_D^{25} -16.0^\circ$ ($c=1.0$, CHCl₃), R_f 0.49. Anal. Calcd. C₄₃H₅₅O₁₂N₉: C, 58.03; H, 6.23; N, 14.16. Found: C, 58.28; H, 6.32; N, 13.88.

iv) H-Thr-Orn-Pro-Arg-OH (VII) : VIIc (530 mg, 0.60 mmol) を 1-iv に準じ接触還元 (8 hr) および精製. 吸湿性粉末, 収量 306 mg (85%), $[\alpha]_D^{25} -59.1^\circ$ ($c=0.58$, 5% AcOH, $l=0.5$), R_f 0.06, R_f 0.11. 電気泳動: 1.04. Anal. Calcd. C₂₆H₃₈O₆N₈·2AcOH·1/2 H₂O: C, 46.82; H, 7.69; N, 18.20. Found: C, 47.04; H, 7.78; N, 18.04.

(8) H-Thr-Gly-Lys-Pro-Arg-OH (VIII) i) Z-Thr-Gly-OEt (VIIIa) : H-Gly-OEt·HCl (0.7 g, 5 mmol) を DMF (5 ml) 中 Et₃N (0.7 ml) で中和. これに, 2-iii に準じ Z-Thr-NHNH₂ (1.34 g, 5 mmol) を DMF (5 ml) 中で azide 化 (2.0N HCl/DMF 5 ml, isoamyl nitrite 0.6 g, Et₃N 1.4 ml) したものを加え 5° で 48 hr 反応. EtOAc-Pet. ether から再結晶. 結晶性粉末, 収量 1.2 g (71%), mp 107—108°, $[\alpha]_D^{25} -27.1^\circ$ ($c=1.0$, CHCl₃), lit.¹³⁾ mp 105—107°.

ii) Z-Thr-Gly-NHNH₂ (VIIIb) : VIIIa (0.85 g, 2.37 mmol) を MeOH (2.5 ml) 中, 4-ii に準じ hydrazide 化. MeOH から再結晶. 結晶性粉末, 収量 0.75 g (92%), mp 174—175°. Anal. Calcd. C₁₄H₂₀O₅N₄: C, 51.85; H, 6.22; N, 17.27. Found: C, 51.78; H, 6.55; N, 17.06.

iii) Z-Thr-Gly-Lys(Z)-Pro-Arg(NO₂)-OBzl (VIIIc) : Boc-Lys(Z)-Pro-Arg(NO₂)-OBzl¹⁾ (1.6 g, 4.2 mmol) を anisole (2.4 ml) 存在下 4.3N HCl/EtOAc (4.3 ml) で室温, 1 hr 処理. 無水エーテルを加えて生じる沈殿物をろ取り無水エーテルで洗浄. KOH 上で減圧乾燥. 得られた粉末 (1.4 g) を DMF (3 ml) 中 Et₃N (0.3 ml) で中和. これに, 2-iii に準じ DMF (3 ml) 中 VIIIb (0.65 g, 2 mmol) を azide 化 (2.0N HCl/DMF 2 ml, isoamyl nitrite 0.24 g, Et₃N 0.6 ml) したものを加え 5° で 45 hr 反応. 粗製品 (1.7 g) をシリカゲルカラムクロマト (溶出液 CHCl₃-MeOH (35:1)) で精製. 無定形粉末, 収量 1.02 g (53%), $[\alpha]_D^{25} -13.6^\circ$ ($c=1.1$, CHCl₃), R_f 0.33. Anal. Calcd. C₃₆H₆₀O₁₃N₁₀: C, 57.49; H, 6.29; N, 14.57. Found: C, 57.74; H, 6.51; N, 14.27.

iv) H-Thr-Gly-Lys-Pro-Arg-OH (VIII) : VIIIc (201 mg, 0.21 mmol) を 1-iv に準じ接触還元 (8 hr) および精製. 吸湿性粉末, 収量 115 mg (81%), $[\alpha]_D^{25} -56.9^\circ$ ($c=0.48$, 5% AcOH, $l=0.5$), R_f 0.09, R_f 0.12. 電気

13) T. Mukaiyama, R. Matsueda, M. Suzuki, *Tetrahedron Lett.*, 1970, 1901.

泳動 : 0.98. *Anal.* Calcd. $C_{23}H_{49}O_7N_9 \cdot 2AcOH \cdot 1/3 H_2O$: C, 47.43; H, 7.62; N, 18.44. Found: C, 47.66; H, 7.93; N, 18.21.

謝辞 本研究に関し御指導をいただいた京都大学薬学部 矢島治明教授, ならびに生物学的試験を行なわれた本学 中沢昭三教授はじめ山田作夫氏らに厚く感謝致します. また元素分析をお願いした本学 梅本光一郎博士ならびに京都大学分析センターの関係諸氏に感謝します.