酸化還元系によるペプチドの新しい合成反応

向山光昭*

A New Method for the Preparation of Peptides by Oxidation-Reduction Condensation.

Teruaki MUKAIYAMA*

ジフェニル水銀，ホスフィンを遊離のカルボン酸と反応させると次式に示すように一挙に対応する酸無水物が収率よく得られる。

この反応は、まずジフェニル水銀がカルボン酸に作用し酢酸フェニル水銀とベンゼンを与え、この酢酸フェニル水銀が酢酸水銀を経由して酸無水物を生じ、一方、同時に生じたジフェニル水銀は再び酸と反応し酢酸水銀になるのでこれが消費されるまで反応が進むものと考えられる。この反応は酢酸以外の種々のカルボン酸についても適用することが可能で、それぞれ対応する酸無水物が高収率で得られる¹⁾。

この反応は次図に示されるようにジフェニル水銀が還元されベンゼンと水銀に変化し、一方同時にトリ-*n*-ブチルホスフィンがホスフィンオキシドに酸化される酸化-還元系の組み合わせと共役して起こる脱水縮合反応とみることができる。

1963年にこの反応を見出し、さらにジフェニル水銀以外の水素受容体を広く検討することにしてたとえばジベンゾイルエチレンがトリフェニルホスフィンと1:1付加物を生成する²⁾ことに着目し、この反応を試みた。この付加物はすでに知られている数多くのカルボニル化合

* 東京工業大学理学部 ()

* Department of Chemistry, Faculty of Science,
Tokyo Institute of Technology ()

物と3価のリン化合物の反応から類推してホスフィンのリン原子がジベンゾイルエチレンのカルボニル基の酸素原子を求核的に攻撃し、もう一方のカルボニル基と共役してホスホニウム塩を形成しているものと考えられる。

これは、エノールホスホニウム塩であるから求核試薬の攻撃を受けやすく、たとえば、水と反応してトリフェニルホスフィンオキシドとジベンゾイルエタンを生成する。したがって、これは前述した水素受容体としてジフェニル水銀のかわりに用い得る可能性を示唆しているものと考えられる。

そこでジベンゾイルエチレン，トリ-*n*-ブチルホスフィン²を2当量の遊離のカルボン酸と反応させたところ，予期したように反応が起こり，ジベンゾイルエタン，トリ-*n*-ブチルホスフィンオキシドと共に対応するカルボン酸無水物が高収率で得られた。

この反応はカルボン酸以外の酸，すなわち，アリーールン酸およびスルホン酸誘導体にも適用でき，モノアリーールホスフェートおよび芳香族スルホン酸からそれぞれ対応する P^1 , P^2 -*sym*-ジアリーールピロホスフェートおよびスルホン酸無水物を高収率で得ることができる⁹⁾。

ジベンゾイルエチレン以外の種々の水素受容体を検討したところ、*p*-キノンベンズイミド ($\text{C}_6\text{H}_5-\overset{\text{O}}{\underset{\text{||}}{\text{C}}}-\text{N}=\text{C}_6\text{H}_4=\overset{\text{O}}{\underset{\text{||}}{\text{N}}}-\text{C}_6\text{H}_5$)⁴⁾ やアゾジカルボン酸ジエチル ($\text{C}_2\text{H}_5\text{O}-\overset{\text{O}}{\underset{\text{||}}{\text{C}}}-\text{N}=\text{N}-\overset{\text{O}}{\underset{\text{||}}{\text{C}}}-\text{OC}_2\text{H}_5$)⁵⁾ がすぐれた水素受容体となり同様な反応で収率よく酸無水物が得られることが明らかとなった。

次に、さらにこの酸化-還元系による反応を展開させるために有機いおう化合物の酸化、還元力を取り入れることを考え、以下に述べる反応を試みたところ、塩化ベンゼンスルフェニルがすぐれた水素受容体になることが分った。すなわち、トリフェニルホスフィンと塩化ベンゼンスルフェニルの反応によって得られるホスホニウム塩にカルボン酸とアミンを共存させ反応させたところ対応するアミドとトリフェニルホスフィンオキシド、チオフェノールおよびフェニルジスルフィドが得られた。

この反応は、ホスフィンがホスフィンオキシドに、また、塩化ベンゼンスルフェニルがチオフェノールになる酸化-還元系を利用した脱水反応による酸アミド結合生成反応とみることができる。この事実に基づいてさらに酸アミド結合を生成する反応の拡大研究を試みた。

上述の塩化ベンゼンスルフェニルと同じスルフェン酸の誘導体であるスルフェンアミドを用い、カルボン酸、ホスフィンを反応させたところ、この場合にも目的のカルボン酸アミドは得られたが、同時にジスルフィドとアミンが生成することがわかった。

ここで副生するジスルフィドとアミンは予期した反応によりアミドと同時に生成するメルカプタンが未反応の出発原料の一つであるスルフェンアミドと反応したためと考えられ、これが目的の酸アミドの収率を低下させていることになる。そこで、この不都合なジスルフィドの副生を防ぐ方法を考案することを種々検討したが、その一つとしてメルカプタンが重金属イオンと反応しやすいことに着目し、カルボン酸を銅塩として用いることによって生じるメルカプタンを銅メルカプチドに誘導し、スルフェンアミドとの副反応を防ぐことを試みた。すなわち、カルボベンゾキシフェニルアラニンの銅塩と *o*-ニトロフェニルスルフェニルグリシンエチルエステルを塩

化メチレン中、トリフェニルホスフィンと室温で 3~5 時間反応させたところ予期したように反応はほとんど定量的に進行し、対応するジペプチドがトリフェニルホスフィンオキシドおよび銅 (*o*-ニトロ) フェニルメルカプチドとともに得られた。

Phe: Phenylalanine
Gly: Glycine

一方、銅以外の重金属塩についても種々検討した結果、水銀(II)や鉛(II)などもこの反応に有用であることが分った。

一般に、*o*-ニトロフェニルスルフェニル基(NPS)はペプチド合成の際にアミノ基の保護基としてしばしば用いられているものであり、この反応によれば活性可能な保護基として利用されることになる。次にこれを長鎖のペプチド合成にも適用することを考えると上述のアミノ酸の銅塩を出発物質として用いることは種々の不都合を伴うので遊離のアミノ酸を出発物質として同様な反応をおこなうことを検討した。すなわち、遊離のカルボキシル基をもつカルボベンゾキシ-L-フェニルアラニンと *o*-ニトロフェニルスルフェニルグリシンエチルエステルにトリフェニルホスフィン、トリエチルアミンおよび 1/2 当量の塩化第二銅を反応させたところ、対応するジペプチドが高収率で得られ、同時にトリフェニルホスフィンオキシド、トリエチルアミン塩酸塩および 1/2 当量の銅ビス(*o*-ニトロフェニル)メルカプチドが得られた。

なお、この反応では銅メルカプチドはトリフェニルホスフィンと錯塩を形成し複雑な生成物になる。そこで、このように出発原料であるトリフェニルホスフィンを過剰に用いなければならない欠点を除くために、スルフェンアミドの代りにジスルフィドを用いる反応を検討した。すなわち、カルボベンゾキシ-L-フェニルアラニンとグリシンエチルエステルに当量のトリフェニルホスフィン、ジフェニルジスルフィド、塩化第二水銀および 2 当量のトリエチルアミンを反応させたところ、カルボベンゾキシ-L-フェニルアラニルグリシンエチルエステルがほぼ定量的に得られ、同時にトリフェニルホスフィンオキシド、水銀ジフェニルメルカプチドおよびトリエチ

ルアミンの塩酸塩が得られた。

この反応は用いる試薬の種類が多くきわめて複雑な反応のように思われるが、実際にはこれらを混合すれば反応はきわめて円滑に進行するので従来知られているペプチド生成反応のうちでも優れた利点を持つものと思われる。

以上、ウレタン型保護基(Z基)を持つアミノ酸1個をラセミ化なしに延長できることがわかったが、ペプチド鎖同士を反応させるいわゆるフラグメントコンデンセーションに同様にラセミ化を伴わないで適用することができるかどうかという問題が残されていることになる。さて、ペプチドを合成する場合に問題となるラセミ化は次の2つの機構によることが知られている。すなわち、

(1) 不斉炭素に結合する水素の塩基による引きぬきによるものであり、S-ベンジルシステイン、フェニルアラニン等はラセミ化しやすいことが知られている。

(2) アシルペプチドからオキサゾロンを生じこれがラセミ化の中間体になるものであり、フラグメントコンデンセーションの場合に起りやすい。

ペプチド合成を行う場合に主として問題となるラセミ化は(2)のオキサゾロンを経由する場合であり、とくにこれがペプチド鎖同士のカップリングの際の最大の課題である。フラグメントコンデンセーションを行う場合にはアシルペプチドのカルボキシル基(C成分)を活性化し、他の方のペプチドのアミノ基(N成分)と反応させることになるが、この際活性化されたC成分にラセミ化の可能性のあることになり、それがオキサゾロンを経由するものであることは、G.T. Young らにより証明されている⁹⁾。

このオキサゾロンを経由するラセミ化の問題についてここに述べる新しいペプチド合成法が適用可能であるか否かを知るためには、ある特定のラセミ化を起しやすいモデルペプチドを合成しそのラセミ化の程度によってテストすることが必要になる。このために多くの方法が提案されているが Young test⁹⁾ とよばれる方法は、ベンゾイルロイシンとグリシンエチルエステルを縮合させて得られるベンゾイルロイシルグリシンエチルエステルの

旋光度を測定し $[\alpha]_D / -34 \times 100$ の式によって光学純度を求める方法である。この場合のN置換基としてのベンゾイル基は電子吸引性が大きく、アミドのプロトンを脱離しやすくすることによりラセミ化を起しやすくしたモデルであり、実際にアシルペプチドを用いる場合と比較してきびしすぎるといわれているテスト方法である。なお、この Young test による従来法のデータは、Young の報告によると表1のようである。

表1 Young test (Bz-Leu-Gly-OEt の場合) による従来法のデータ

方 法	溶 媒	収率 (%)	$[\alpha]_D^{25}$ (C 3.1 EtOH)	L-isomer (%)
Azide 法	Et ₂ O	87	-34.0	100
"	"	74	-29.8	88
p-Nitrophenyl ester 法	AcOEt	95	-34.3	100
DCC 法	CHCl ₃	86	-32.6	96
"	CH ₂ Cl ₂	84	-18.1	53
"	CH ₂ Cl ₂	74	-18.3	54
Mixed	THF	88	-6.1	18
Anhydride 法	"	85	-7.6	22
Woodward 法	MeCN	77	-32.8	96
"	MeNO ₂	78	-22.5	66

M.W. William, G.T. Young, *J. Chem. Soc.* **1963** 881

注1) L-isomer% はアジド法で得られる旋光度の最高値 -34° を100%として実際に得られた旋光度の%で表わす数値である。

注2) p-nitrophenyl ester の合成はラセミ化の起らないベンジルオキシカルボニル基で保護したエステルを合成し、ベンジルオキシカルボニル基をベンゾイル基に変換する方法で行なわれている。実際にはこの活性エステルを合成する際のラセミ化が問題となる。

注3) DL 体、L 体の赤外線吸収スペクトルを比較すると L 体では NH の吸収が singlet である一方、DL 体では doublet であることを見出し、IR より定性的判定はできることがわかった。

そこで実際にベンゾイル-L-ロイシンと NPS-グリシンエチルエステルを反応させる反応形式[A]および遊離のグリシンエチルエステルを反応させる反応形式[B]について室温、塩化メチレン中で Young test を試みた結果、両者とも完全にラセミ化することが判明した。

このラセミ化について Kemp らは数種のアシルペプチドの活性エステルが塩基の存在下でアミドアニオンとのすみやかな予備平衡を経てオキサゾロンにvariラセミ化することを速度論的に証明している¹⁰⁾。

したがってこの場合のラセミ化に関してはアミド結合からの水素の引きぬきとオキサゾロンからの水素の引きぬきがラセミ化に対して重要な働きをしていると考えられる。そこでアミドプロトンの引きぬき、またはオキサゾロンのプロトンの引きぬきを防止すればラセミ化を防ぐことができると考え以下の実験を進めた。

トリフェニルホスフィン、塩化第二水銀、トリエチルアミンの存在下ベンゾイルロイシンと NPS グリシンエチルエステルを反応させるとほぼ完全にラセミ化が起るのでトリエチルアミンのような塩基を用いないで反応を行なうことができればこの問題が改良されるものと考えベンゾイルロイシンを銅塩にして反応を行なわせたとこ、次式のように多少よい結果が得られた。

さらに酸性の第三物質を共存させることにより反応系を酸性に保てば脱プロトン反応をおさえることができると考え、各種の酸性物質共存下で銅塩を用いる反応を試みた結果を表 2 にまとめて示す。

表から明らかな様に酸性物質の pK_a 値が小さいほどラセミ化が起りにくいという予期した通りの結果が得られた。この場合 N-ヒドロキシコハク酸イミドは pK_a 9.40以上の効果があり、*p*-ニトロフェノールつまり pK_a

表 2 酸性物質共存下の銅塩を用いる反応

酸 性 物 質	pK_a	Crude Bz-L-Leu-Gly-OEt	
		Yield%	L-isomer %
Phenol	9.89	75	0
<i>p</i> -Nitrophenol	7.15	90	11
Pivalic acid	5.01	57	39
2,4-Dinitrophenol	3.96	81	77
Picric acid	0.38	48	80
N-hydroxysuccinimide	9.40	64	84

7.15 以上では効果はなく、逆に好ましくない結果を与えたが、この原因については目下検討中である。

塩化第二水銀、トリエチルアミンの存在下トリフェニルホスフィン、ジスルフィド、ベンゾイルロイシンおよびグリシンエチルエステルを反応させたところ完全にラセミ化が起ることが判明した。そこで反応系に含まれる試薬の塩基性を小さくすれば効果があるものと考え検討した結果が表 3 である。

この反応において用いた塩基は塩化水素捕捉剤であり、表から明かなように反応させるアミンを塩化水素捕捉剤として用いる方法により一部光学純度が保たれる結果が得られたが、塩基が存在する以上抜本的な改良は困難であると考えられる。そこでこれらの塩基の存在しない反応系とするため塩基と塩化第二水銀を用いる代りに表に示す有機金属化合物 (MX_2) を用いれば次式のように塩基を用いなくても反応が進行するものと考えこの検討を行なった。

表 3 用いる塩基の検討

Base	Crude Bz-Leu-Gly-OEt	
	yield %	L-isomer %
Et_3N	90	0
$\text{Me}-\text{N} \begin{array}{c} \diagup \quad \diagdown \\ \text{O} \end{array}$	95	0
$\text{Et}_3\text{N} + \text{ZnCl}_2$	91	0
H-Gly-OEt	76	22

これらの金属化合物としてはメルカプチドに変換した際に同時に水素引きぬきに関与するような塩基性を持つ物質を生じないことが望ましい。この目的のために調製した各種金属化合物についてメルカプチド生成反応を検討したところこれらは次の 2 つのグループに分類されることがわかった。

a) 第四ホスホニウム塩の RS アニオンの直接交換で

以上の各種金属化合物を用いた場合の反応経路をまとめて図示したのが 図 1 である。

以上のようにジ-*p*-アニシル水銀を用いた場合に好結果が得られたので次にこの場合の溶媒の影響について検討を行なった。

遊離のグリシンエチルエステルを反応させる反応式 [B] について検討した結果が 表 7 である。

表から明らかなように用いたすべての溶媒中で反応は円滑に進行し、誘電率の大きい N,N-ジメチルホルムアミド (DMF) およびアセトニトリル中では一部ラセミ化が起るが、N-ハイドロキシコハク酸イミド共存下で反応させるとこれかなり改良できることがわかる。

表 7 Young test における溶媒の影響

溶 媒	誘電率	Crude Bz-L-Leu-Gly-OEt	
		Yield%	L-isomer%
Benzene	2.2	91	95
Dioxane	2.3	89	89
CHCl ₃	4.9	96	96
AcOEt	6.0	94	90
THF	7.0	91	89
CH ₂ Cl ₂	9.1	92	95
ClCH ₂ CH ₂ Cl	10.5	94	88
DMF	37.0	86	37
CH ₃ CN	37.5	88	66
CH ₃ CN + HO-N	"	87	86

N-ハイドロキシコハク酸イミドまたその水銀塩が pK_a 値から期待される酸性物としての効果以上にラセミ化防止に対する効果があることが判明したので次にこの点について尿素水銀を用いる次式の反応をモデルとして 2, 3 の検討を行なった。

この反応においてはペプチドと共に 1832 cm^{-1} に赤外吸収を持つ mp $54.5\sim 5^\circ\text{C}$ のオキサゾロンが一部単離されるところから、ラセミ化は Young の報告通りオキサゾロンを中間体として進行していることが予想される。そこで上記反応系に立体障害で反応性が小さく酸性

効果のみが期待されるピパリン酸およびラセミ化防止効果の大きかった N-ハイドロキシコハク酸イミドを共存

させ反応を行なった。その結果が 表 8 である。

表 8 N-ハイドロキシコハク酸イミドのラセミ化防止効果

酸 性 物 質	pK_a	Bz-Leu-Gly-OEt	
		Yield %	L-isomer %
な し	—	81	23
$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \text{CH}_3 \\ \text{CH}_3 \end{array} \text{C-COOH}$	5.01	76	60
$\begin{array}{c} \text{O} \\ \text{O} \end{array} \text{N} \begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \end{array}$	9.40	89	92

この反応においてはピパリン酸を加えるとラセミ化防止に効果があり、これよりも酸性の弱い N-ハイドロキシコハク酸イミドの場合によりよい結果を与えることがわかる。したがってこれは酸性効果以上の特別な効果があるものと考えられ、これに関連して Goodman らはヒドラジン、ハイドロキシコハク酸イミドのような 1,2-dinucleophile はオキサゾロンをラセミ化しないで開環する効果があると報告している¹²⁾。

以上の結果をまとめるとフラグメントコンデンセーションによるペプチド合成の際の中心的課題であるラセミ化の問題についてはアニシル水銀を用いて反応を行なうことにより各種の有機溶媒中で光学純度の高いペプチドが得られることがわかった。

次に均一系によるペプチド合成反応¹³⁾を検討した。すなわち、トリフェニルホスフィン、金属化合物の存在下、アミノ基を保護した遊離のアミノ酸 (またはペプチド) と *o*-ニトロフェニルスルフェニルアミノ酸エステル (またはペプチドエステル) とを反応させる (反応形式 [A]) か、または遊離のアミノ酸エステル (またはペプチドエステル) とを反応させる (反応形式 [B]) ことにより、高収率でペプチドが得られ、また金属化合物としてジ-*p*-アニシル水銀を用いる場合にはラセミ化の厳しいテストとして知られている Young test においても光学純度の高いペプチドが生成することを述べた。したがってこれらの反応は一般のペプチド合成におけるバッチ式の液相法に用いる場合には何ら不都合な点はないが、現在ペプチド合成のもう 1 つの有力な手段として広く用いられている固相法に適用するためには不溶性金属メルカプチドが同時に生成することは非常に不都合な点になると考えられる。そこでさらに改良して固相法に適用可能な反応にするためにこれらの不溶物の生成を防ぐことを主眼として次の検討を行なった。すなわち、上記の反応では不溶性金属メルカプチドを生成することによりメルカプタンを捕捉したが、均一系で反応を行うためにメルカプタン捕捉剤としてスルフェン酸エステルおよ

びオレフィンを選びラセミ化の問題の検討も兼ね、Young test を用いてこれらの試剤の開発を試みた。

さて、Pearson の Hard-Soft 理論¹⁴⁾によれば代表的 Soft 塩基であるメルカプチドアニオンと容易に反応するものは Soft 酸である。したがって必ずしも金属化合物を用いなくても Soft な酸に属する有機化合物を用いることによりメルカプチドアニオンを捕捉することは可能であると考えられる。スルフェン酸エステルのようなスルフェニウムカチオンを生じやすい化合物はメルカプチドアニオンと容易に反応してジスルフィドを与えることが知られているのでスルフェン酸エステルを選びその可能性を検討した。この場合にはペプチドと同時に生成するメルカプタンはジスルフィドとアルコールに交換されるので均一系で反応を行なうことができる。反応形式 A) および B) による結果が表 9 および表 10 である。

表 9 スルフェン酸エステルを用いる反応 (反応形式 A))

スルフェン酸エステル	Crude Bz-Leu-Gly-OEt	
	Yield %	L-isomer %
NPS-OMe	95	37
NPS-OEt	72	56
NPS-O- <i>t</i> -Bu	87	73
DNPS-OMe	92	92
DNPS-O- <i>t</i> -Bu	93	82
DNPS-O- <i>t</i> -Bu +	91	95

表 10 スルフェン酸エステルを用いる反応 (反応形式 B))

スルフェン酸エステル	Crude Bz-Leu-Gly-OEt	
	Yield %	L-isomer %
NPS-OMe	84	55
DNPS-O- <i>t</i> -Bu	85	78
DNPS-O- <i>t</i> -Bu +	84	95

これらの場合一部ラセミ化が起ることが表からわかるが、これはトリフェニルホスフィンとスルフェン酸エステルが反応して生成するアルコキシアニオンが塩基として作用し、オキサゾロンを生成してラセミ化を起すものと考えられる。これらの場合にも N-ヒドロキシコハク酸イミドを共存させて反応を行なうと光学純度の高いペプチドが得られることが明らかに一応の目的を達

することができた。

2,3-ジヒドロピランはシステインの S-H 基の保護基に用いられており、フッ化ホウ素エーテラートを触媒として容易にメルカプタンが付加することが知られている¹⁵⁾。そこでメルカプタンの捕捉剤としてこの 2,3-ジヒドロピランを用い、触媒としてルイス酸を種々検討した結果、塩化亜鉛を用いて反応させることにより可溶性のスルフィドに導くことができることがわかった。この反応系では均一系で反応が進行し、反応形式 [A], [B] とも収率および光学純度の高いペプチドを得ることができた。

用いるオレフィンとしてはこの他 *n*-ブチルビニルエーテルも同様に好結果を与えることがわかった。この反応系においては反応途中に *o*-ニトロチオフェノールが生成するのでこれによる副反応が考えられる。含硫アミノ酸のシステイン、メチオニンを用いる反応を検討したところ、システインの場合には目的とするベンジルオキシカルボニル (*S*-ベンジル)-L-システニルグリシンエチルエステルを 82% の収率で得ることができた。しかし、メチオニンの場合には目的とするベンジルオキシカルボニル-L-メチオニルグリシンエチルエステルは 50% しか得られず、チオールエステルが副生することが判明した。

このチオールエステルの副生は反応の重要な中間体と考えられるアシルオキシホスホニウム塩において下図のようにメルカプチドアニオンがカルボニル炭素を攻撃して生成するものとしてよく説明される。

したがってこのチオールエステルの副生を防止するためにはメルカプチドアニオンの安定性を増し、求核性を小さくすれば良いと考え、 α, α' -ジニトロフェニルジスルフィド ((NPS)₂) の代りにビス (2,4-ジニトロフェニル) ジスルフィド ((DNPS)₂) を用いて反応させたところ次式のようにチオールエステル副生は認められずベンジルオキシカルボニル-L-メチオニルグリシンエチルエステルのみを 88% の収率で得ることができた。

したがってこのオレフィンを用いる反応も均一系で反応させることができ、唯一の副反応であるチオールエステル生成もメルカプチドアニオンを安定化させることにより防止できることがわかり、一応の目的を達することができた。

ペプチドと同時に生成するメルカプタンに注目すれば、 α -または γ 位にメルカプト基を持つピリジン、ピリミジン、プリン等は次図のように固体および溶液状態においてチオール形よりもチオン形として安定に存在することが A.R. Katritzky らにより報告されている¹⁶⁾。

したがってこれらのメルカプタンがペプチドと同時に生成するような反応系を考えれば生成するメルカプタンはただちに安定なチオン形に変換し、前述してきたようにメルカプタン捕捉剤を用いなくても望むペプチド生成反応が十分に進行することが考えられる。そこで 2-クロロピリジンより 2-メルカプトピリジンを合成し、フェリシアン化カリで酸化して得た 2,2'-ジピリジルジス

ルフィドを用いて Young test を検討した。塩化メチレン中、室温で 30 分反応させることにより予期したようにメルカプタン捕捉剤なしで反応が完結し、収率、光学純度とも非常に良い結果を得ることができた¹⁷⁾。

以上述べた 3 つの方法によりペプチドと同時に生成するメルカプタンを金属メルカプチド以外の型で捕捉し、均一系で反応を行なうことができたが、特にチオンへの異性化を利用する方法はメルカプタン捕捉剤を必要としない最も簡単な方法であるところから、さらに検討することとした。

ジスルフィドとして 2,2'-ジピリジルジスルフィドを用いればペプチドと同時に生成するメルカプタンがただちに安定なチオン形に変換するため、メルカプタン捕捉剤を用いなくても反応が進行し、Young test においても高収率で光学純度の高いペプチドが得られることを述べた。この反応を模式的に示したのが 図 3 である。

図 3

そこでこのようなチオン形が安定なチオールを与える各種ジスルフィドの反応を試みた。これらのジスルフィドによる Young test の結果が 表 11 であり、予期したように 4,4'-ジピリジルジスルフィドの場合を除いて好結果を得ることができた。なお表の下欄は同等の pK_a 値を持つチオールでチオンに変換しえないいわゆる通常のチオールのジスルフィドを用いた場合の例であり、ジフェニルジスルフィドを用いた場合にはペプチドは低収率で得られるのみであり、アニシル水銀のようなメルカプタン捕捉剤を用いなければ反応が完結しないことがわかる。

表 11 各種ジスルフィドを用いた場合の結果

ジスルフィド	チオール の pK_a	Bz-L-Leu-Gly-OEt	
		Yield %	L-isomer %
9.8	91	96
6.6	93	95
7.6	87	89
11.1	72	88
8.7	70	60 ¹⁾
8.4	22	78
"	84	87

1) 一部 Oxazolone を単離

2) $(\text{MeO}-\text{C}_6\text{H}_4)_2\text{Hg}$

表 11 に関し特筆すべき点は 2, 2'-ジピリジルジスルフィドは収率、光学純度とも良い結果を与える一方、4, 4'-ジピリジルジスルフィドを用いた場合には一部オキサゾロンが単離され生じるペプチドもラセミ化が起ることである。このことは反応の重要な中間体と考えられるアシルオキシホスホニウム塩はむしろ Pentavalent な性質を持ち (1), 図 4 に示すように反応してくるアミ

図 4

図 5

ンと環状の遷移状態 (2) を経る Concerted Mechanism

で一挙にペプチドを与えると考えれば 2, 2'-ジピリジルジスルフィドの特異的な反応をよく説明することができる。この場合 (1) より 2-ピリジルチオールエステルを与える反応も考えられ、このチオールエステルは G.T. Young らにより活性エステルになりうることが報告されている¹⁸⁾ので 図 5 のようにこれを中間体とする可能性もある。

そこでチオールエステルを G.T. Young の報告にしたがい、DCC 法で合成して反応を検討した。モデルとしてベンジルオキシカルボニルグリシン-2-ピリジルチオールエステルを選び、グリシンエチルエステルとの反応を試みたが、反応が速く直ちにペプチドを与えるためこの問題の検討が困難なことがわかったのでアミンの代りにアルコールとの反応を試みた。アルコールとしてベンジルアルコールを選び反応を試みたところ、チオールエステルとの反応では 3 時間反応を試みても薄層クロマトグラフィーで反応生成物であるベンジルオキシカルボニルグリシンベンジルエステルのスポットは観察されず、5 時間後処理しても 9% の収率でしかベンジルオキシカルボニルグリシンベンジルエステルを得ることができなかった。一方、2, 2'-ジピリジルジスルフィドを用い、ベンジルオキシカルボニルグリシンとベンジルアルコールとを 3 時間反応させると 79% の収率でベンジルオキシカルボニルグリシンベンジルエステルが得られることがわかった。したがって反応はピリジルチオールエステルを中間体とする [B] の経路によるのではなく [A] の環状の遷移状態を経る Concerted Mechanism で進行していると考えるのが妥当であると思われる。また逆の観点から考えると、アシルオキシホスホニウム塩を中間体とする本反応において観察された唯一の副反応である

チオールエステルの生成が仮に起っても、それはきわめて反応し易い活性エステルであり、ただちにアミン成分と反応して結果的にはペプチドのみを与えることになる。以上の観点よりこの 2, 2'-ジピリジルジスルフィドを酸化剤とする本反応はペプチド合成法としてきわめて有用であると考へ、以下詳細に検討することとした。

2, 2'-ジピリジルジスルフィドを用いる反応はきわめて

速く進行し、しかも光学純度の高いペプチドを与えることを述べたが、本反応のペプチド合成における広い適用性を確立するため次に反応温度、水および溶媒等の反応条件について検討を行なった。

i. 反応温度 ペプチド合成法として理想的な条件は反応温度に限定がなく、反応試剤および生成するペプチドの安定性のみを考慮して任意の温度で反応が行なえることである。反応温度の検討を試みた結果を表 12 に示してあるが、Young test において -70°C から塩化メチレンの沸点 (40°C) まで自由に反応温度を選ぶことができることがわかった。

表 12 反応温度の検討

反応温度	反応時間	Crude Bz-Leu-Gly-OEt	
		Yield %	L-isomer %
-70°C	2時間20分	90	95
室温	30分	91	96
40°C	30分	87	92

ii. 水の影響 アミノ酸またはペプチドは結晶水を持つものが多く、結晶水を持ったままで反応が行なえるか否かは広い適用性を確立する上で重要と考え、次に、水の存在下でのこの反応の検討を行なった。ジオキサン中過剰量である 10 倍モルの水の存在下で Young test を試みた結果、表 13 に示すようにそのままでは一部ラセミ化が起り収率も低下するが、同モルの 2-メルカプトピリジンをあらかじめ反応系に加えておけば高収率で光学純度の高いペプチドを与えることが判明した。したがって結晶水を持つアミノ酸の場合でもこのように 2-メルカプトピリジンを添加すれば何ら不都合なくペプチドが合成できることがわかった。

表 13 水共存下の反応

反 応 条 件	Crude Bz-Leu-Gly-OEt	
	Yield %	L-isomer %
当モルの水共存下	66	82
10倍モルの水共存下	64	81
10倍モルの水 + 共存下	90	94

iii. 溶媒の検討 反応溶媒に関しては前にくわしく検討し、あらゆる溶媒中で反応が円滑に進行することを明らかにした。その際極性の大きいアセトニトリル (CH_3CN)、N,N-ジメチルホルムアミド (DMF) 中では一部ラセミ化が起ることが観察されたので再びこの反応系について特にラセミ化防止を中心として以下の検討を行なった。アセトニトリル中および DMF 中ではこの

場合にも一部ラセミ化が起ることがわかったが、これにあらかじめ 2-メルカプトピリジンを加えて反応を行なうことにより両者とも Young test において高収率で光学純度の高いペプチドが得られることが明らかになった。DMF は精製を行ない塩基性分を除去したものを用い、しかも 2-メルカプトピリジンを添加して DMF の分解を伴わない程度の低温で反応を行なえばアセトニトリル中と同様好結果が得られる。

以上まとめるとできるだけ低温で反応させることがラセミ化防止の第一の解決法であると結論することができ

表 14 極性溶媒中での反応検討

溶 媒		反応温度	Crude Bz-Leu-Gly-OEt	
			Yield %	L-isomer %
CH_3CN	0	室温	80	78
"	1 当量	"	89	94
DMF	0	"	88	32
"	2 当量	"	86	35
"	2 当量	-30°C	88	94

iv. 塩素イオン効果に対する検討 アミノ酸塩酸塩を用いこれを塩基で中和して次の反応に使用すると一般にラセミ化が起りやすいことが知られており、これは塩素イオンの塩基性によるものであると G.T. Young により説明されている⁸⁾。そこでこのような場合のラセミ化の問題についてグリシンエチルエステル塩酸塩と当量のトリエチルアミンを用いクロロホルム中での反応を種々検討した。その結果が表 15 であり、2 倍モルの 2-メルカプトピリジンまたは N-ヒドロキシコハク酸イミド共存下で反応を行えば収率、光学純度とも好結果が得られることがわかった。

表 15 塩素イオン効果の検討

添 加 物	Crude Bz-Leu-Gly-OEt	
	Yield %	L-isomer %
なし	87	62
88	87
91	96

以上述べてきたように 2,2'-ジピリジルジスルフィドを用いる反応は広い反応条件下でペプチド生成反応に適用出来ることがわかった。次に一般のペプチド生成反応の過程でアミノ酸の側鎖にいろいろな副反応の起こることが知られている各種アミノ酸についてこの反応を適用

検討した結果を表 16 に示してある。

不安定なアミノ酸として知られているメチオニン、システイン、トリプトファンの場合にも円滑にペプチドが合成され、チロシン、スレオニン、セリンの水酸基またヒスチジンのイミダゾール基はとくに保護しないで用いることができることがわかった。また従来法ではラクタム生成¹⁹⁾が起りやすいことの知られているアルギニンの場合にも好結果が得られ、また、立体障害により反応性が小さいとされているバリンの場合も円滑に反応が進行する。アスパラギン、グルタミンについてはそれらの側鎖アミドのニトリル化が²⁰⁾重要な問題点であるが、G.T. Gish らによりニトリル化が見い出されたモデルペプチド (Z-Asp-Cys-OMe)²¹⁾を用いて詳細に検討した結果、従来の DCC 法では目的とするジペプチドが 35%、Anhydro 体が 28% 得られるが、ここに述べる酸化還元系によれば目的のジペプチドが 73% で得られ、Anhydro 体はプレパラティブクロマトで分離した結果 1% 以下の微量しか生じないことが明らかになった。また、Z-Glu-Cys-OMe の合成においても全く副反応生成物は得られなかった。またグルタミン、バリン等の場合には反応中にペプチドのみが析出し、ろ取するだけの操作で分析値の一致するペプチドが得られた。反応生成物であるホスフィンオキシド、2-メルカプトピリジン等は極性の小さい溶

媒によく溶けるので長鎖のペプチドになればこの様な簡単な操作でペプチドが単離できると考えられ、難溶性の尿素を伴う DCC 法に比して大きい利点であると考えられる。

フラグメントコンデンセーションの場合に問題となるラセミ化に関してはモデル反応である Young test により詳細に検討し、高収率で光学純度の高いペプチドが得られ、ラセミ化に対しては問題がないことを述べた。したがって本節ではフラグメント間の縮合反応でも円滑に反応するか否かを確かめるために次の実験を行なった。テトラペプチドとアミノ酸エステルおよびジペプチドとヘキサペプチドのフラグメントコンデンセーションを行なった結果、円滑に反応は進行し、反応溶媒を留去して酢酸エチルを加えてオリゴペプチドを析出させるというきわめて簡単な操作でスポットのペプチドを単離でき得られたペプチドはアミノ酸分析により純粋なものであることが確認された。またオリゴペプチドを合成する際、NPS 基を保護基として使用すると同時に新しいペプチド鎖を延長する際の活性点として利用することを考えオキシトシンフラグメントの合成を試みた。

次式に示すように当モルのトリフェニルホスフィンで反応を行なうと NPS 基は反応せず *o*-ニトロフェニルスルフェニル-L-ロイシルグリシンエチルエステルが得られ、これを単離することなく次のベンジルオキシカルボ

表 16 各種アミノ酸を含むペプチドの合成

ペ プ チ ド	反 応 溶 媒	収 率 %	mp (°C) (lit)	[α] _D ²⁵ (lit)	(C 溶 媒)
1. Z-L-Met-Gly-OEt	CH ₂ Cl ₂	92	94~6 (95~6)	[α] _D ²⁵ -19.8 (-20.0)	(C 4.6 EtOH)
2. Z-L-Cys(SBzl)-Gly-OEt	"	91	97~9 (98~9)	[α] _D ²⁵ -27.0 (-26.6)	(C 6 AcOH)
3. Z-L-Try-Gly-OEt	"	92	118~20 (119~20)	[α] _D ²⁵ -19.8 (-20.0)	(C 2 EtOH)
4. Z-L-Tyr-L-Ileu-OMe	"	93	69~70 (70)	[α] _D ²⁵ -4.1 (-4.2)	(C 2.6 DMF)
5. Z-L-Thr-Gly-OEt	"	83	105~7 (—)	[α] _D ²⁵ -13.8 (—)	(C 1 EtOH)
6. Z-L-Ser-Gly-OEt	"	84	98~100 (98~101)	[α] _D ²⁵ -5.5 (-5.5)	(C 1 DMF)
7. Z-L-Glu-Gly-OEt	"	86	168~70 (169~71)	[α] _D ²⁵ -7.3 (-7.2)	(C 1 DMF)
8. Z-L-Asp-Gly-OEt	DMF+CH ₂ Cl ₂	85	185~7 (184~6)	[α] _D ²⁵ -5.6 (-3.8)	(C 1 DMF)
9. Z-L-Arg-Gly-OEt	"	82	119~21 (118~20)	[α] _D ²⁵ -15.4 (-15.8)	(C 2 MeOH)
10. Z-L-His-Gly-OEt	CH ₂ Cl ₂	80	112~3 (113~4)	[α] _D ²⁵ -18.6 (—)	(C 1 EtOH)
11. Z-L-Phe-Gly-OEt	"	90	110~2 (110~3)	[α] _D ²⁵ -16.8 (-16.6)	(C 2 EtOH)
12. Z-L-Val-Gly-OEt	Benzene	92	166~7 (167)	[α] _D ²⁵ -32.0 (-31.3)	(C 1 MeOH)

ニル-L-プロリンと2当量のトリフェニルホスフィンを加えて反応を行なうことにより一挙にベンジルオキシカルボニル-L-プロリロイルシルグリシンエチルエステルを得ることができた。またこのような NPS 基を活性点として利用できる点はアミノ基を遊離にすると脱アンモニアが起りピログルタミンの生成することが知られているグルタミンがアミン末端にある場合に有効に利用できると思われる。N末端のグルタミンを NPS 基で保護したままベンジルオキシカルボニル-L-イソロイシンと反応させたところ、副反応であるピロ化を伴わないで高収率で目的のベンジルオキシカルボニル-L-イソロイシル-L-グルタミル-L-アスパラギン-t-ブチルエステルを高収率で得ることができた。

これらの結果をまとめたのが表 17 である。

したがってフラグメントコンデンセーションの場合にも何ら不都合なくペプチド合成が行なわれ、また、NPS 基は保護基としての働きと同時に新しいペプチド鎖を延長する際の活性点として有効に利用できることがわかった。また、きわめて簡単な操作でペプチドが単離できる点は従来法に比して大きい利点であると考えられる。

以上述べてきたように本反応は均一系、緩和な条件下で進行し、光学純度の高いペプチドを高収率で与えることが確認されたので、液相法に対するもう一つのペプチド合成の有力な手段である固相法により実際にペプチド合成を試みた。t-アミルオキシカルボニルグリシン (AOC-Gly) を 2% ジビニルベンゼン-スチレンコーポリマーに固定したもの 2g を用い、Merrifield の常法²²⁾により 3 倍モルの t-ブチルオキシカルボニル-L-ロイシン・H₂O (BOC-L-Leu-OH・H₂O)、トリフェニルホスフィン、2,2'-ジビリジルスルフィドを用いて反応を行ない次表に示す方法で処理し、アミノ酸分析器にかけてペプチドのピークを標準のロイシルグリシンのピークより定量した結果 99% の収率でペプチドが生成しており、原料であるグリシンのピークは観察されないことがわかった。これをさらに DEAE セルロースで脱塩し、水を留去してアルコールを加え、析出するペプチドをろ取して五酸化リン上 100°C 2 時間乾燥することにより 76 % の収率で無水の H-Leu-Gly-OH を得ることができた。このものは加水分解後のアミノ酸回収率でも良好な結果を与え、固相法によっても本反応によりペプチドが円滑に合成できることが明らかになった。

次に、アミノ酸およびペプチド活性エステルの合成を試みた。酸化還元系によるカルボン酸アミドまたはペプチドの合成反応中のアミノ成分の代りにアルコールを反応させれば同じ形式の反応によってエステル結合の生成ができると考えられる。そこでまず前述した反応形式によ

表 17 オリゴペプチドの合成

ペプチド	反応溶媒	収率 %	mp	
1. Z-Gly-Gly-L-Leu-Gly-L-Leu-OMe	DMF	58	156~7	アミノ酸分析 Gly 2.90, Leu 2.06
2. Z-L-Ala-Gly-L-Leu-Gly-Gly-L-Leu-Gly-NHNHBOC	"	70	213~5	アミノ酸分析 Ala 0.98, Gly 4.99, Leu 2.02
3. Z-L-Pro-[L-Leu]Gly-OEt	CH ₂ Cl ₂	78	150~1.5 (lit 151~2)	[α] _D ²⁵ -82.4° (C2.5 EtOH) (lit -82.6°)
4. Z-L-Ileu-L-Glu-L-Asp-Ot-Bu	DMF + CH ₂ Cl ₂	72	216~7	分析 理論値 C 57.53 H 7.33 N 12.43 測定値 57.28 7.11 12.51
5. Z-L-Cys-Bzl-L-Pro-L-Leu-Gly-NH ₂	DMF	86	169~70 (lit 170~1)	[α] _D ²⁵ -59.4° (C2.5 DMF) (-60.0°)

注 線は反応点を示す。実験 5 は Z-L-Cys-OH と H-L-Pro-L-Leu-Gly-NH₂ を反応させた結果。

リモデル反応であるカルボン酸エステルの合成を試みた。

カプロン酸と各種のアルコールとの反応を試みた結果が表18である。

この場合無水物が同時に生成することが観察されたが、この無水物とアルコールとの反応は非常に遅く、無水物を經由して反応が進行しているとは考えられないところからエステルの生成と無水物の生成が競争的に進行していると考えられる。その際フェノール類は無水物の副生が少なく目的とするエステルが高収率で得られ、この様な酸性物質のエステルはペプチド合成分野において活性エステルとして用いられているものが多いので、本反応をアミノ酸またはペプチドの活性エステル合成に応用しようと考え以下の実験を進めた。

表18 カルボン酸エステルの合成

カルボン酸	アルコール	エステル %	カルボン酸 無水物 %
C ₆ H ₁₁ COOH	<i>t</i> -BuOH	5	90
"	EtOH	30	75
"	(CH ₃) ₂ CHCH ₂ CH ₂ OH	34	60
"	CH ₂ =CH-CH ₂ OH	44	51
"	-CH ₂ OH	80	20
"	-OH	70	32
"	O ₂ N- -OH	85	13
"	Et ₂ NCH ₂ CH ₂ OH	92	0
"	Me ₂ NCH ₂ CH ₂ OH	90	0

これらを実際にアミノ酸またはペプチドの活性エステル合成に適用する際、トリエチルアミンのような塩基を用いない反応が良いと考え有機水銀化合物を用いる反応により合成を試みた。まずアミノ酸活性エステルの例としてベンジルオキシカルボニルフェニルアラニンコハク酸イミドエステルの合成を行ないクロマト処理により目的とする活性エステルを62%の収率で得ることができ、ラセミ化は起こらないことがわかった。

次にペプチドフラグメントの活性エステル合成中のラセミ化を検討するため、Young testを試み

lit. (α)_D²⁵ -17.3° (C2 Dioxane)

る目的でベンジル-L-ロイシンコハク酸イミドエステルの合成を試みたところ、このエステルはクロマトで分離中に一部分解することが判明した。そこで単離することなく直接グリシンエチルエステルを反応させたところ、71%の収率でベンジル-L-ロイシルグリシンエチルエステルが得られ、そのL-isomer含量は96%であり、きわめてよい結果を得ることができた。

したがって活性エステル合成過程およびアミン成分の反応を通じて光学純度が保たれることが明らかとなり、本反応がアミノ酸活性エステル合成のみならずペプチドフラグメントの活性エステル合成にも適用できることが判明した。しかし不安定な活性エステルはホスフィンオキシドの分離操作中分解する点が難点であるため次にこれを解決する目的で水溶性ホスフィンの開発を検討した。

水溶性ホスフィン誘導体を開発する際、酸性の置換基の導入または塩基性の置換基の導入が考えられるが、ラセミ化防止観点から酸性基の導入が良いことが予想される。以上の観点より強酸性のスルホン酸基を導入しこれの強塩基の塩として用いれば目的を達することが可能と考えジフェニルホスフィン-p-ベンゼンスルホン酸N-エチルピペリジン塩を下記の方法で合成した。

	mp 211~212°C		
	C	H	P
Calcd.	47.97	3.36	6.87
Found	48.15	3.50	6.66

このホスフィン誘導体および対応するオキシドは有機

溶媒、水共によくとけ、水でふるだけで簡単に除去できることがわかった。しかし、このホスフィンは酸化に対しては不安定であり、貯蔵中オキシドに変化していくため種々検討を重ねた結果、水銀塩に変換すれば安定に貯蔵できることが明らかになった。この水銀塩は使用時にアミン塩に変換すれば反応に支障がないことがわかったので次にこれを用いて実際に活性エステルの合成を行なった。

合成した水溶性ホスフィンを用いて 2,2'-ジピリジルスルフィドを用いる反応系により次に実際に活性エステルの合成を試みた。

反応後メルカプチドをろ別して除き、溶液を重そう水、水で洗浄し、乾燥後溶媒を留去し1回再結晶することにより表 19 に示すように純粋の各種活性エステルを合成することができ、前に単離することが困難であったベンゾイル-L-ロイシンコハク酸イミドエステルも円滑に合成することができた。

水溶性ホスフィンを用いる活性エステルの合成についてはすでに述べたが、グルタミン、アスパラギン等のエステルは比較的難溶性であるため、トリフェニルホスフィンを用いても簡単に活性エステルだけを析出でき従来法によりアミドのニトリル化の知られているアスパラギン

ン、グルタミン²⁰⁾、またラクタムの生成が知られているアルギニン¹⁹⁾の場合にも表 20 に示すように副反応を伴わずに高収率で活性エステルを合成することができた。

なおベンジルオキシカルボニル-L-グルタミンペンタクロルフェニルエステルは旋光度が文献値と異なるため、また、アスパラギンのペンタクロルフェニルエステルは新規物質であるためグリシンエチルエステルと反応させジペプチドに誘導した結果、文献値および別途合成したものによく一致することがわかり目的の活性エステルであることを確認した。

以上述べてきたように活性エステルの合成に関してもペプチド合成の場合と同様に副反応を伴わずに目的物が収率よく得られるので本法は従来法に比して大きい利点をもつものと考えられる。

表 20 トリフェニルホスフィンを用いる活性エステルの合成

活性エステル	収率 %	mp (lit)	$[\alpha]_D^{25}$ (C 溶 媒)
NPS-L-Gul-OPCP	74	146~7 (142~6)	$[\alpha]_D^{25}$ -59.8° (-61.3°) (C2 DMF)
Z-L-Glu-OSu	72	182~4.5 (182~7)	$[\alpha]_D^{25}$ -17.3° (11.0°) (C1 DMF)
Z-L-Asp-OPCP	74	167~8.5 ()	$[\alpha]_D^{25}$ -26.7° () (C1 DMF)
Z-L-Arg-OPCP	71	109~111 (109~111.5)	$[\alpha]_D^{25}$ -14.0° (-14.2°) (C1 DMF)

表 19 水溶性ホスフィンを用いる活性エステルの合成

活性エステル	収 率	mp (lit)	$[\alpha]_D^{25}$ (lit) (C 溶 媒)
Z-L-Phe-OSu ¹⁾	75	136~7.5 (134~6)	$[\alpha]_D^{24}$ -54.2° (-53.8°) (C1 DMF)
Z-L-Val-OSu	61	116~7.5 (116~7)	$[\alpha]_D^{25}$ -25.8° (-25.1±2.4°) (C2 Dioxane)
Z-L-Phe-OPCP ²⁾	86	157.5~8 (157)	$[\alpha]_D^{24}$ -51.4° (-49.4°) (C1 DMF)
Z-L-Val-OPCP	82	140 (140~1)	$[\alpha]_D^{24}$ -22.6° (-22.8°) (C1 DMF)
Z-L-Phe-OQ ³⁾	70	138.5~9.5 (139.5~40)	$[\alpha]_D^{25}$ -70.6° (-70.0°) (C2 DMF)
Z-L-Ala-OQ	72	101~2.5 (102~3)	$[\alpha]_D^{25}$ -67.7° (-67.9°) (C1 DMF)
Bz-L-Leu-OSu ⁴⁾	59	168~9 (167~9)

4) H-Gly-OEt と反応させて Young test を試みた結

果、Bz-L-Leu-Gly-OEt 83% yield, L-isomer 95% を与えた。

上述してきた反応を活用して次に生理活性ペプチドの合成を試みた。すなわち、前述した酸化還元系によるペプチド合成反応は酸化剤として 2,2'-ジピリジルジスルフィド、還元剤としてトリフェニルホスフィンを用いる極めて簡単な形にまとめられたがこれらを反応形式別に整理すれば次の3つの反応形式で示される。

タイプA

タイプB

タイプC

これら3形式の反応のうちAタイプの反応は保護基として導入された NPS 基を除去することなく直接次のカップリングを行なえる利点を持ち、Bタイプは遊離の酸成分とアミノ成分とを結合させるため適用範囲が広くさ

らにCタイプは活性エステルを経由するためラセミ化の危険を伴うフラグメントカップリングに有効であるなどそれぞれ優れた特長を持っている。そこで、これらの特長を生かして生理活性ペプチドの合成を試みた。

まず、モデルとしてオキシトシンを選び液相法による合成を検討した。

合成経路は図6に示した通り(2+3)+4のフラグメントコンデンセーションにより行なった。酸化還元系による合成法の利点はトリペプチド Z-Pro-Leu-Gly-OEt および Z-Ileu-Gln-Asn-O-*t*-Bu の合成において顕著に示されている。すなわち、Bタイプの反応により NPS 基で保護したロイシンとグリシンエチルから NPS-Leu-Gly-OEt を合成し、これを単離精製することなく、全く同一の試剤を用いA反応により Z-Pro-OH と反応させ通算して 81% の高率でトリペプチドを合成することができた。また、ピロ化し易いグルタミンの場合にも、NPS-Gln-Asn-O-*t*-Bu から NPS 基を除去することなくA反応で収率よくトリペプチドへ導くことができた。このようにして合成したペプチド(1~5)とテトラペプチド(6~9)のフラグメントコンデンセーションはCタイプの反応により行ない縮合剤を 50% 過剰に用いることにより 91% の高収率でノナペプチドを得ることができた。この結果は Badanszky らの DCC を用いた反応では DCC を 100% 過剰用いてもノナペプチドは 70% しか得られなかった事実と合わせて本反応がアスパラギンペプチドの合成に有用なことを示す好例である。

このようにして得たカルボベンゾキシ(S-ベンジル)-ノナペプチドアミドは HF 処理して全保護基を除き空気酸化してオキシトシンとし、溶液のまま血圧降下活性を測定したところ、保護基の脱離および酸化が定量的に行なわれたと仮定して 104 unit/mg を示した。

次に、酸化還元系による合成法の固相法への応用を検

図 6

Cys	Tyr	Ileu	Gln	Asn	Cys	Pro	Leu	Gly
			NPS-OH 74%				NPS-OH ⑧	
Bzl			HO-Su			Z-OH [NPS ⑨]		H-OEt
Z	H 90%	O ^t Bu	NPS-OSu 85%	O ^t Bu		Z-OH ⑩		OEt
Bzl			①	O ^t Bu		Z-NH ₂ /MeOH		NH ₂
Z		O ^t Bu		O ^t Bu		Z	H ₂ /Pd-C	
Pzl	89%		H ₂ /Pd-C		Bzl		⑪	
Z	CF ₃ COOH			O ^t Bu	Z-OH			NH ₂
Bzl	Su-OH ②	H	65%	O ^t Bu	Bzl			NH ₂
Z		CF ₃ COOH	91%	O ^t Bu	Z	HBr/AcOH		NH ₂
Bzl			Su-OH ③	O ^t Bu	Bzl			NH ₂
Z				OH 91%	H			NH ₂
Bzl								NH ₂
Z			1) HF					NH ₂
H			2) O ₂ (air)					NH ₂

討するため固相法による $\text{Phe}^2\text{-Lys-}$ パソプレシンの合成を試みた。固相法へ応用するに当っては次の3点に主眼をおいて検討を行なった。すなわち、

1. 酸化還元系による合成法では、DCC 法における DCU のような難溶物の生成は見られないので洗浄操作が簡単化される。
2. アスパラギンおよびグルタミンを直接導入できる。
3. フラグメントコンデンセーションを固相法に応用する可能性をもっている。

Stepwise な合成においては縮合反応は Asn および Gln は DMF 中、その他は CH_2Cl_2 中 3 当量の試薬を用い 4 時間行ない、BOC 基の脱離には $\text{TFA}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (1:1 v/v) を用いた。Lys の ϵ -アミノ基の保護基としては Tos および Z を用い、比較検討を行なった。

Fragment condensation は 2+(3+4) の 2 段階で行なった。ヘプタペプチド (3~9) の合成は 2 当量の 2-メルカプトピリジンの存在下 DMF 中 -15°C で行ない、BOC を除いたのちジペプチド (1~2) を CH_2Cl_2 中室温で縮合させた。

このようにして合成したペプチドポリマーは EtOH 中にけんだくさせ、 NH_3 を飽和してアミド化し EtOH を留去後 DMF で溶出し、濃縮して EtOAc および EtOH を加えて析出させ、ろ過、乾燥することにより表 21 に示すように元素分析、アミノ酸分析の一致する目的のノナペプチドアミドを高収率で得ることができた。

なお、得られたノナペプチドアミドについて Stepwise 合成のものと Fragment 縮合によるものを Sephadex

LH-20 にかき DMF で展開したクロマトグラムを比較したのが図 7 であり、両者とも単一な main peak を示し、反応が円滑に進行していることがわかった。

図 7 クロマトグラム

Tos

これらノナペプチドアミドは Lys-を用いたものは $\text{Na}/\text{liq. NH}_3$ で、Z-のものは HF で全保護基を脱離させ、次いで空気酸化を行なって $\text{Phe}^2\text{-Lys-}$ パソプレシンに誘導した。その溶液のラット血圧上昇作用を測定し、保護基の脱離および酸化が定量的に進行した場合の理論活性に対する測定値の活性収率を求めたのが表 22 である。

なお $\text{Na}/\text{liq. NH}_3$ 還元を行なったものを過酸酸化、加水分解してアミノ酸分析を行なったところ、アスパラギンのニトリル化が起った際に生ずる²³⁾ α, γ -ジアミノ酪酸は検出されず、アスパラギンが副反応を伴うことなく直接導入できることを確認した。表 22 の結果から酸化条件が活性に微妙な影響を与えることがわかるが、ラ

表 21

$\begin{array}{c} \text{Bzl} \quad \quad \quad \text{NH}_2 \quad \text{NH}_2 \quad \text{Bzl} \quad \quad \text{X} \\ \quad \quad \quad \quad \quad \quad \\ \text{Z-Cys-Phe-Phe-Glu-Asp-Cys-Pro-Lys-Gly-NH}_2 \end{array}$		
X	Tolc	Z (monohydrate)
mp (lit ¹⁾)	220~3°C(dec.), (220°C, 222~3°C)	208~213°C (dec.)
$[\alpha]_D^{25}$ (lit ¹⁾)	-48.8° (C 1 DMF) (-50.0±1° (C 1.2 DMF) (-43.0° (C 1 DMF))	-45.6° (C 2 DMF)
Anal. (Calcd.)	C, 59.78(59.62); H, 6.11(6.07) N, 12.09(12.05); S, 6.56(6.37)	*C, 60.63(60.50); H, 6.31(6.21) N, 12.08(12.07); S, 4.26(4.25)
Amino acid ratio	Phe, 2.0; Glu, 1.0 Asp, 1.0; Pro, 0.9 Lys, 1.0; Gly, 1.0 C ₇ SO ₃ H, 1.9; NH ₃ , 3.1	*Phe, 2.1; Glu, 1.0 Asp, 1.0; Pro, 1.0 Lys, 1.0; Gly, 1.1 C ₇ SO ₃ H, 2.0; NH ₃ , 3.1
Total yield	67%	*Stepwise; 71% Stepwise (NPS-Gln); 72% Frag. Condens.; 68%

表 22 血圧上昇作用の測定

合 成 法	保護基の脱離法 (100 mg スケール)	空気酸化 (flow rate)	活性収率 % (測定値 理論値 $\times 100$)
Stepwise	$\begin{array}{c} \text{Z} \\ \\ \text{-Lys-} \end{array}$	HF, r.t. 1.5 hr	1.5 hr (slow) 5
	"	"	3.0 (fast) 65
	"	"	5.0 (") 26
Stepwise	$\begin{array}{c} \text{Tos} \\ \\ \text{-Lys-} \end{array}$	Na/liq. NH_3	5.0 (") 28
Stepwise (NPS-Gln)	$\begin{array}{c} \text{Z} \\ \\ \text{-Lys-} \end{array}$	HF, r.t. 1.5 hr	5.0 (") 22
Frag. Cond.	"	"	3.0 (") 42

* 55 u/mg

ジカル反応の常として最適反応条件の設定はむずかしいが、3時間前後がよく 65% の活性収率が得られた。このものを用いて次に精製を試みた。まず IRC-50 に吸着させ、30% ピリジン-4% 酢酸で溶出、凍結乾燥後1部を Sephadex G-15 カラムにかけ N-AcOH で展開したところ、280 m μ に吸収を持つ2つのピークが現われ、前のピークは活性がなく、後のピークが活性を示した。後のピークを凍結乾燥したところ 38 u/mg (活性純度 75%) の活性を示すものが得られた。このものは貯蔵中徐々に活性が低下し、Sephadex で前のピークが認められた。この前のピークは S-S 結合が分子間で巻直して起ったポリマーと考えられ、これは IRC-50 の処理操作中にも増大して活性が低下することが観察された。これらの知見をもとに精製に関し目下さらに検討中である。

ま と め

以上歴史的に一つの反応開発の過程を述べてきたが、仕事を進める上の仮説はより簡潔な問題、すなわちこの場合は遊離のメルカプタンを捕捉することにしぼり、これに対して多くの可能性を検討し、さらに数多く実験的に追及したことがこの研究の発展に欠くべからざる事であったと思う。ここに述べた研究の基本的な考えは酸化、還元概念を有機化学反応の反応推進力として取り込むことであり当初はより緩和な条件で容易に進行する反応-反応性に富む反応の開発がテーマであったが、これらがある一つの目的-ペプチド合成に指向したとき当然解決しなければならない難かしい制限-ラセミ化防止という問題に当面し、第2の研究段階に入った。第2の問題となった望むものだけができる反応-選択性の高い反応-は有機化学の進歩とともに各分野で強く要求されているが、それだけにより複雑な問題が多くなってきている。この選択性の高い反応の開発がいろいろな意味を含めこれからの新反応の開発に望まれるポイントであると思う。

この研究は植木正彬、松枝 礼、丸山 洋ら三氏をはじめとして後藤邦明、鈴木 学氏らの創意と努力の結果であることを述べあわせて感謝の意を表したい。

(昭和46年6月19日受理)

文 献

- 1) T. Mukaiyama, I. Kuwajima, Z. Suzuki, *J. Org. Chem.* **28** 2025 (1963)
- 2) L. Horner, K. Klüpfel, *Liebigs Ann. Chem.* **591** 69 (1955); cf. F. Ramirez, O.P. Madan, P. Smith, *Tetrahedron Letters* **1965** 201
- 3) T. Mukaiyama, I. Kuwajima, *J. Org. Chem.* **29** 1385 (1964)
- 4) I. Kuwajima, T. Mukaiyama, unpublished.
- 5) O. Mitsunobu, M. Yamada, *Bull. Chem. Soc. Japan* **40** 2380 (1967)
- 6) T. Mukaiyama, M. Ueki, H. Maruyama, R. Matsueda, *J. Am. Chem. Soc.* **90** 4490 (1968)
- 7) L. Zeruas, D. Borovas, E. Gazis, *ibid.* **85** 3660 (1963)
- 8) M.W. Williams, G.T. Young, *J. Chem. Soc.* **1964** 3701; Idem., *ibid.* **1963** 881
- 10) D.S. Kemp, S.W. Chien, *J. Am. Chem. Soc.* **89** 2746 (1967)
- 11) T. Mukaiyama, R. Matsueda, H. Maruyama, *Bull. Chem. Soc. Japan* **43** 1
- 12) H. Goodman, *Chem. Nng. Eews.* 1968 40
- 13) T. Mukaiyama, R. Matsueda, H. Maruyama, M. Ueki, *J. Am. Chem. Soc.* **91** 1554 (1969)
- 14) R.G. Pearson, *J. Am. Chem. Soc.* **84** 16 (1962); **85** 3533 (1963)
- 15) G.F. Holland, L.A. Cohen, *ibid.* **80** 3765 (1958)
- 16) R.A. Jones, A.R. Katritzky, *J. Chem. Soc.* **1958** 3610
- 17) T. Mukaiyama, R. Matsueda, M. Suzuki, *Tetrahedron Letters* **1970** 1901
- 18) K. Lloyd, G.T. Young, *Chem. Commun.* **1968** 1400
- 19) M. Bodanszky, J.T. Sheehan, *Chem. Ind.* **1960** 1268
- 20) C. Ressler, H. Ratzkin, *J. Org. Chem.* **26** 3356 (1961)
- 21) D.T. Gish, P.G. Katsoyannis, G.P. Hess, R.J. Stedman, *J. Am. Chem. Soc.* **78** 5954 (1956)
- 22) G.R. Marshall, R.B. Merrifield, *Biochemistry* **4** 2394 (1965)