

N-ホルミル-L-グルタミル-L-セリン メチルエステルの合成とその性質につ いて

大 野 進 通

1. 緒 言

酵素タンパク質が生物学的活性を示すとき、全ポリペプチド鎖が関係するのではなく、ペプチド鎖のなかの数個のアミノ酸残基が形成する活性点だけが、触媒作用に関与すると考えられる。この活性は、酵素タンパク質の活性点と受容部との特別な空間構造に起因するものと思われる。このような活性点の構造と触媒機能との関係をしらべるには、酵素タンパク質の活性点と思われるフラグメントを合成し、これについて考察することが有効な手段となる。

フラグメント合成に関しては、1965年頃から報告が現われ、たとえば、Sheehanら¹⁾はキモトリプシンのモデルとして、活性点を構成するL-セリンを含むペプチドを合成し、これが、かなりの触媒活性があることを示している。

本研究では、加水分解酵素の活性点として、ポリペプチド分子内のL-グルタミン酸とL-セリンに注目し、隣接するこれらの側鎖が、希薄水溶液中で、どのような相互作用を示すかを調べる目的で、L-セリンの α 位のカルボキシル基とL-グルタミン酸のアミノ基を保護した形の、N-ホルミル-L-グルタミル-L-セリンメチルエステルを合成し、この試料について電位差滴定を行った。その結果をもとにしてL-グルタミン酸の側鎖のカルボキシル基とL-セリンの側鎖の水酸基との間に、水溶液中で水素結合ができるかどうかを検討してみた。

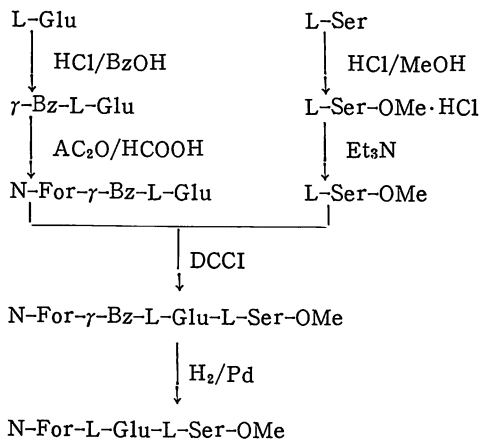
2. 実験及び結果

2.1 N-ホルミル-L-グルタミル-L-セリンメチルエステルの合成

市販のL-グルタミン酸(L-Glu)、L-セリン(L-Ser)を用い下記の経路で合成した。

メタノール(MeOH)、ベンジルアルコール(BzOH)、トリエチルアミン(Et₃N)、無水酢酸(AC₂O)、蟻酸(HCOOH)は、すべて常法により精製したものを、

ジシクロヘキシルカルボジイミド(DCCI)は市販の特級試薬をそのまま使用した。



以下順を追って合成法について述べる。

2.1.1 L-セリンメチルエステル塩酸塩の合成

Harrisら²⁾の方法を参考にして、メタノール40mlにL-セリン5gを懸濁し、0°C~5°Cに冷却しながら、L-セリンが完全に溶解するまで乾燥塩化水素を通じる。つぎに、この溶液を室温のもとに3~4時間放置した後、減圧にて濃縮しエーテルを加えて析出する結晶を口取し

表 1

	実 験 値	文 献 値 ²⁾
収 率 %	81.0	81.0
融 点 °C	164	165~166
比 旋 光 度* $[\alpha]_D^{24}$ 度	+1.0	+0.9
塩 素 化 度	0.997	1

* 6%水溶液

た。メタノール—エーテルで再結晶を行い、得られた白色粉末状結晶はカセイソーダ上、デシケーター中で乾燥させた。収率、融点および比旋光度の値を表1に示す。

このものの塩素化度はVolhardの余剰滴定法により、試料30mgを純水10mlに溶解し、硝酸銀標準液、チオシアン酸アンモニウム標準液および指示薬として鉄明パンを用いて滴定を行いもとめた。結果を表1に示す。

2. 1. 2 γ -ベンジル-L-グルタメートの合成

L-グルタミン酸10gをベンジルアルコール100ml中に懸濁し、濃塩酸16.5mlを加え攪拌しながら95°Cに30分間加熱する。冷却しても、もはや二層に分離しなくなってから攪拌をやめ、重曹16.5gの水溶液を、徐々に加え中和させた後、エーテル170mlを加え充分に攪拌すると、白色の沈澱が生じる。これを口取し少量のエタノール、エーテルで洗浄した後、試料の20倍量の熱水を用いて再結晶し、白色板状結晶として得た。収率52.7% (文献値³⁾53%)、融点175.3°C (文献値³⁾173°C)。

2. 1. 3 N-ホルミル- γ -ベンジル-L-グルタメートの合成

γ -ベンジル-L-グルタメート4.74gを蟻酸31ml中に溶解し、この溶液を5°Cに保ちながら、無水酢酸12mlを5分に1mlの割合で加え、室温で2時間反応させた後、この溶液を減圧にて濃縮し乾燥する。得られた白色粉末状結晶を、アセトン—石油エーテルで再結晶した。収率、融点および比旋光度を表2に示す。

表 2

	実験値	文献値 ⁴⁾
収 率 %	69.8	—
融 点 °C	130	130~131
比 旋 光 度* $[\alpha]_D^{25}$ 度	+17.2	+17.9

* 0.5%水溶液

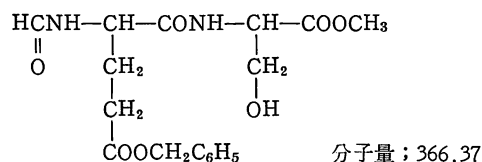
2. 1. 4 N-ホルミル- γ -ベンジル-L-グルタミル-L-セリンメチルエステルの合成

N-ホルミル- γ -ベンジル-L-グルタメート2.65gをアセトニトリル40mlに懸濁し、これにトリエチルアミン1.4mlを加えると無色透明の溶液となる。つぎに、この溶液にL-セリンメチルエステル塩酸塩1.55gを加え、氷浴にて冷却しながら、ジシクロヘキシルカルボジイミド2.5gのアセトニトリル溶液10mlを加える。室温で2時間攪拌しながら反応させた後、ジシクロヘキシルカ

ルボジイミド誘導体をロ別し、ロ液を減圧にて濃縮し石油エーテルを加えて淡黄色結晶を得た。

つぎに、この結晶を酢酸エチル60mlに溶解し、分液ロートを用いて水20mlで洗浄した後、1Nの塩酸で3回、1Nのアンモニア水で2回、さらに0.1Nの塩酸で1回、水で1回洗浄した。これに硫酸ナトリウム10gを加えて有機溶液中の水分を除去し、0°Cで24時間放冷した後、減圧にて濃縮し、エーテルを加えて白色粉末状の結晶を得た。これを酢酸エチル—エーテルで再結晶した。収率38.3%、融点117.5~118.5°C。

ここで得られた試料の構造式は、つぎのように考えられる。



これをもとにした計算値と、CHN元素分析値を表3に示す。

表 3

	分析値* mol%	計算値 mol%
C	56.00	55.73
H	6.08	6.05
N	7.78	7.65

* 装置; 柳本MT-2型CHN分析計

2. 1. 5 脱ベンジル化

N-ホルミル- γ -ベンジル-L-グルタミル-L-セリンメチルエステル1.22gをメタノール20mlに溶解し、パラジウム黒を触媒として接触還元法により脱ベンジル化を行った。パラジウム黒は、Willsätterの方法⁵⁾に従って精製したものをを用いた。反応は室温、大気圧のもとで行い、反応時間2時間、消費された水素ガス量は75ml (計算値74ml)である。反応終了後、パラジウム黒を除去し、溶液を減圧にて濃縮した後、エーテルを加えて白色粉末状の結晶を得た。再結晶は、メタノール—エーテルを用いて行い、得られた結晶を減圧下、シリカゲル上で乾燥した。収率97.8%、融点152.5~153.5°C、比旋光度 $[\alpha]_D^{25}$ -46.0° (1%水溶液)、-25.5° (1%メタノール溶液)。

この試料の0.2%メタノール溶液を用いて、240m μ ~280m μ 領域で吸収を測定した。結果を図1に示す。ベ

ンジルエステルに特有な 260 $m\mu$ 付近の吸収が見られないことから、脱ベンジル化反応は、完全に行われたものと考えられる。

また、この試料を加水分解した後ペーパークロマトグラフィーにより L-グルタミン酸と L-セリンが、1 対 1 で存在することを確認した（展開剤；ブタノール/酢酸/水、容量比 4 : 1 : 5, $R_f = 0.27, 0.34$ ）。

これらの結果と、CHN 元素分析および次に述べる赤外線吸収スペクトルの結果から、N-ホルミル-L-グルタミン-L-セリンメチルエステルが、合成されたと判断した。

つぎに、この試料の溶解性は、水、メタノール、エタノールなどに可溶で、四塩化炭素、クロロホルム、塩化メチレンなどには不溶となった。

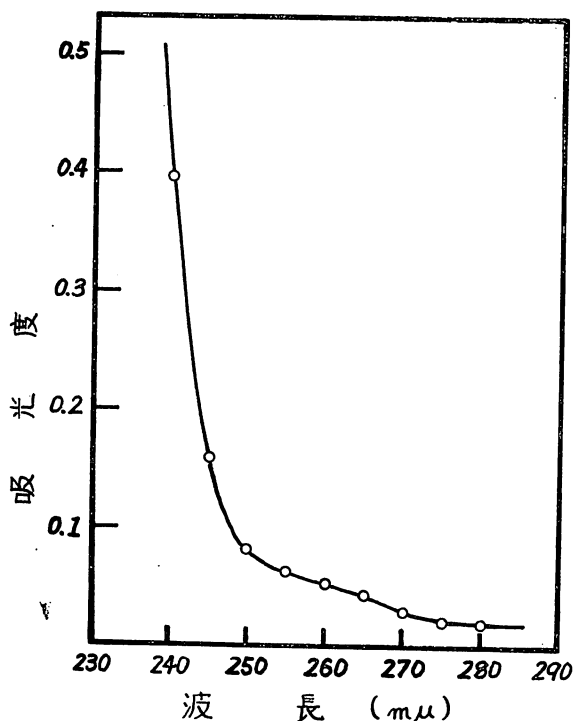


図 1 紫外部吸収スペクトル
試料；N-For-L-Glu-L-Ser·OMe 0.2% メタノール溶液
装置；日立分光光度計 139 型
セル；10mm 石英

2.2 赤外線吸収スペクトル

N-ホルミル- γ -ベンジル-L-グルタミン-L-セリンメチルエステルと N-ホルミル-L-グルタミン-L-セリン

メチルエステルの赤外線吸収スペクトルの比較を行った。

この結果、前者では、波数 693, 750 および 1440, 1485 cm^{-1} にベンジル基に特有の吸収ピークが現われているが、これらの波数における吸収ピークは、脱ベンジル化した N-ホルミル-L-グルタミン-L-セリンメチルエステルの吸収スペクトル上には、見いだされない。後者では波数 1675, 1680 cm^{-1} にカルボン酸の C=O 伸縮振動と思われる吸収が現われ、さらに 1720 cm^{-1} に飽和脂肪酸の吸収が現われている。これらの波数における吸収は、N-ホルミル- γ -ベンジル-L-グルタミン-L-セリンメチルエステルの吸収スペクトル上には現われていない。図 2 に波数 1850~1650 cm^{-1} 領域、1550~1350 cm^{-1} 領域および 850~650 cm^{-1} 領域の吸収スペクトルを示す。

2.3 電位差滴定

N-ホルミル-L-グルタミン-L-セリンメチルエステル 13.4mg を蒸留水 10ml に溶解し、これを試料として電位差滴定を行った。塩基は 0.1 N カセイソーダを用い、測定温度は恒温水槽を使用して 20°C に規正した。また、測定容器中の空気は、窒素ガスで置換した。中和点は、中和点付近のカセイソーダ滴下量を、こま切れにとり pH の増加が極大になる点とした。実験結果を表 4 に示し、その滴定曲線を図 3 に示す。

表 4 における pH 値は、酢酸を用いて、本実験と同程度の条件下で滴定を行い、補正した値を示す。

pKobs. 値の相加平均から、N-ホルミル-L-グルタミン-L-セリンメチルエステルの解離指数として、 $pK_a = 4.47 \pm 0.06$ を得た。

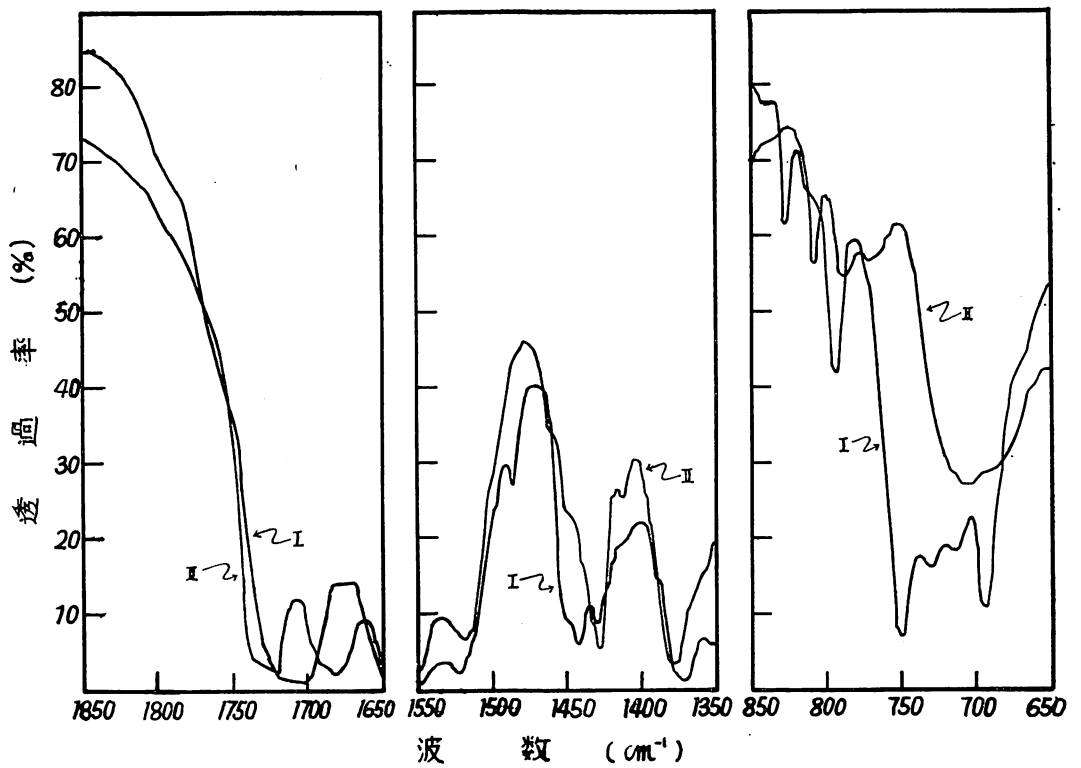


図2 赤外線吸収スペクトル 試料；Ⅰ N-For- γ -Bz-L-Glu-L-Ser·OMe (4mg/400mgKBr) Ⅱ N-For-L-Glu-L-Ser·OMe (2mg/400mgKBr) 装置；日立赤外分光光度計225型 測定方法；KBr錠剤法

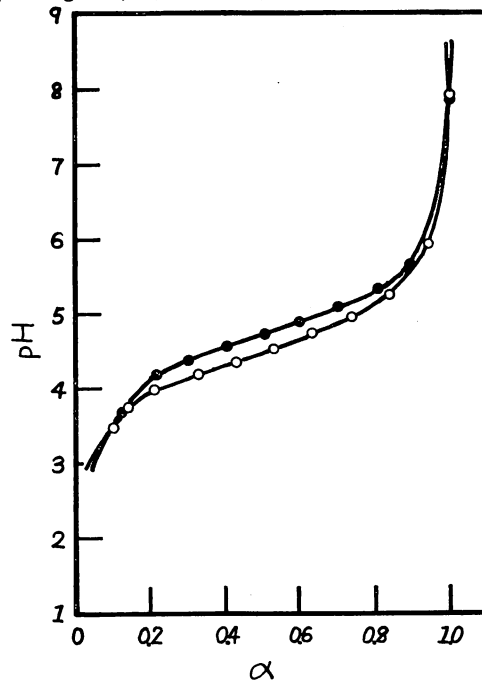


図3 電位差滴定曲線 試料；○ 5×10^{-3} mol/l N-For-L-Glu-L-Ser·OMe ● 5×10^{-3} mol/l CH_3COOH アルカリ；0.1N-NaOH 装置；Radiometer Co. pH meter M-4 測定温度； $20 \pm 0.1^\circ\text{C}$

表 4

0.1N-NaOH 滴 下 量 (ml)	pH	$\log \left(\frac{[\text{HA}] - \{\text{H}^+\}^*}{[\text{A}^-] + \{\text{H}^+\}^*} \right)$	pK obs.**
0.000	3.433		
0.050	3.700	0.767	4.467
0.100	3.938	0.518	4.456
0.150	4.135	0.311	4.446
0.200	4.320	0.127	4.447
0.250	4.497	-0.050	4.447
0.300	4.693	-0.232	4.461
0.350	4.921	-0.439	4.482
0.400	5.243	-0.708	4.535
⋮			
0.479			

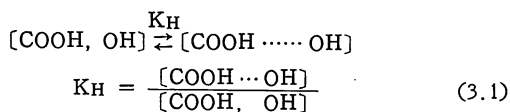
* $\{\text{H}^+\} = \text{antilog}(\text{O-pH})$

** $\text{pK obs.} = \text{pH} + \log \left(\frac{[\text{HA}] - \{\text{H}^+\}}{[\text{A}^-] + \{\text{H}^+\}} \right)$

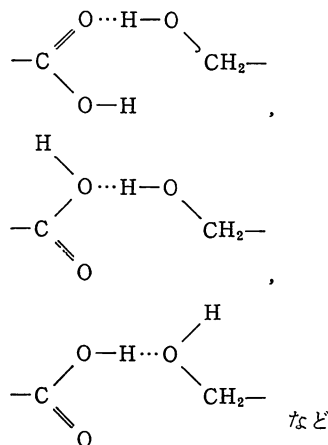
3. 考 察

電位差滴定の結果から、N-ホルミル-L-グルタミル-L-セリンメチルエステルの 5×10^{-3} モル程度の水溶液中で、L-グルタミン酸残基とL-セリン残基との分子内での水素結合の有無を検討してみる。元素分析、ペーパークロマトグラフィーなどの結果から、明らかに試料の分子内には、L-グルタミン酸残基とL-セリン残基が1対1で存在する。したがってカルボキシル基と水酸基も1対1で存在する。

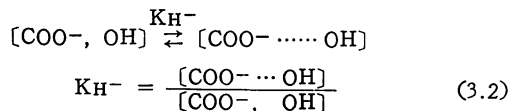
いま、カルボキシル基が未解離状態での水素結合の平衡式を、



とする。ここで $[\text{COOH} \cdots \text{OH}]$ は、カルボキシル基が未解離の状態、水素結合しているものの濃度を表し、つぎのような水素結合が考えられる。



同様に、カルボキシル基が解離状態では、



つぎに解離度を、

$$\alpha = \frac{[\text{COO}^-, \text{OH}] + [\text{COO}^- \cdots \text{OH}]}{[\text{COOH}, \text{OH}] + [\text{COOH} \cdots \text{OH}] + [\text{COO}^-, \text{OH}] + [\text{COO}^- \cdots \text{OH}]} \quad (3.3)$$

とすると,

$$\frac{[\text{COOH}, \text{OH}] + [\text{COOH} \cdots \text{OH}]}{[\text{COO}^-, \text{OH}] + [\text{COO}^- \cdots \text{OH}]} = \frac{1 - \alpha}{\alpha} \quad (3.4)$$

となる。

ここで(3.1), (3.2)式より K_H , および K_{H^-} を用いて表すと, (3.4)式は,

$$\frac{[\text{COOH}, \text{OH}](1 + K_H)}{[\text{COO}^-, \text{OH}](1 + K_{H^-})} = \frac{1 - \alpha}{\alpha} \quad (3.5)$$

となる。

また, 分子内の水素結合を考慮して, 見かけの解離定数を表すと,

$$K_{\text{Obs.}} = \frac{[\text{H}^+]\{[\text{COO}^-, \text{OH}] + [\text{COO}^- \cdots \text{OH}]\}}{[\text{COOH}, \text{OH}] + [\text{COOH} \cdots \text{OH}]} \quad (3.6)$$

となり, (3.4), (3.5)式より,

$$K_{\text{Obs.}} = \frac{[\text{H}^+][\text{COO}^-, \text{OH}](1 + K_{H^-})}{[\text{COOH}, \text{OH}](1 + K_H)} \quad (3.7)$$

ここで,

$$K_o = \frac{[\text{H}^+][\text{COO}^-, \text{OH}]}{[\text{COOH}, \text{OH}]} \quad (3.8)$$

とおくと, (3.7)式は,

$$K_{\text{Obs.}} = \frac{K_o(1 + K_{H^-})}{1 + K_H} \quad (3.9)$$

となる。従ってこれより,

$$pK_{\text{Obs.}} = pK_o + \log \frac{1 + K_H}{1 + K_{H^-}} \quad (3.10)$$

が得られる。

(3.10)式の pK_o 値として, タンパク質中の L-グルタミン酸残基 ($pK_o = 4.6$), ポリ-L-グルタミン酸 ($pK_o = 4.45$) および L-グルタミン酸 ($pK_o = 4.3, 10.0$) などの値が考えられるが, タンパク質中のグルタミン酸残基については, 他の残基の影響が考えられ, また L-グルタミン酸の場合には, α 位のカルボキシル基およびアミノ基の影響が, あるものと考えられる。従って, ここでは, これらの影響がないポリ-L-グルタミン酸の値を用い, $pK_{\text{Obs.}}$ 値として電位差滴定から得られた値を代入すれば, (3.10)式は,

$$4.47 = 4.45 + \log \frac{1 + K_H}{1 + K_{H^-}} \quad (3.11)$$

となる。これより近似的に,

$$\log \frac{1 + K_H}{1 + K_{H^-}} \doteq 0 \quad (3.12)$$

すなわち,

$$\frac{1 + K_H}{1 + K_{H^-}} \doteq 1 \quad (3.13)$$

が得られる。

従って, 分子内の水素結合は $K_H = K_{H^-}$ の条件が成立するときのみみ存在することになるが, 実際には $K_{H^-} > K_H$ と考えられるので, N-ホルミル-L-グルタミン-L-セリンメチルエステルは, 希薄水溶液中で, 水素結合を形成していないものと推定される。

4. 結 言

以上の実験から, N-ホルミル-L-グルタミン-L-セリンメチルエステルの合成方法が確立された。また, この試料は希薄水溶液中で, 分子内での水素結合を形成していないものと判断された。今後, この試料が, 加水分解反応において触媒活性を示すかどうか, 興味ある問題となる。

最後に, この実験を終始御指導下さいました, 北海道大学理学部須貝新太郎教授並びに新田勝利氏に深く感謝致します。

文 献

- 1) J. C. Sheehan, J. Preston,
P. A. Cruickshank, *J. Am. Chem. Soc.*, **87**,
2492 (1965).
- 2) J. I. Harris, J. S. Fruton, *J. Biol. Chem.*,
191, 143 (1951).
- 3) 結城平明, *日化*, **77**, 46 (1956).
- 4) T. Hayakawa, K. Harada, S. W. Fox, *Bull.*
Chem. Soc. Japan, **39**, 393 (1966).
- 5) R. Willstätter, L. E. Waldschmidt. *Ber.*,
54, 113 (1921).