

Title	アセチルコエンザイムAカルボキシラーゼの基質および活性調節因子類縁体に関する研究
Author(s)	仁川, 純一
Citation	大阪大学, 1979, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/24588
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

アセチルコエンザイム A カルボキシラーゼの
基質および活性調節因子類縁体に関する研究

仁川 純一

アセチルコエンザイム A カルボキシラーゼの
基質および活性調節因子類縁体に関する研究

仁 川 純 一

目次

第1章 序論	1
第2章 アセチル-CoA カルボキシラーゼの精製および酵素活性の測定法	5
2-1 アセチル-CoA カルボキシラーゼの精製	
2-2 酵素活性の測定	6
第3章 アセチル-CoA カルボキシラーゼに対するアセトニルデナオ-CoAの効果	7
3-1 アセトニルデナオ-CoAの酵素反応	8
3-2 酵素反応生成物の確認のためのモデル反応	13
3-3 酵素反応生成物の構造確認	16
第4章 アセチル-CoA カルボキシラーゼに対する長鎖脂肪酸-CoAの阻害効果	20
4-1 長鎖脂肪酸-CoA類縁体の調製	21
4-2 Dixonの作図法による長鎖脂肪酸-CoA類縁体の阻害定数の測定	21
4-3 長鎖脂肪酸-CoAによる阻害効果と構造との相関関係についての考察	25
第5章 光アフィニティラベリングの試み	27
5-1 アジド脂肪酸の合成	29
5-2 $[^3\text{H}]$ 標識 ω -アジド脂肪酸の合成	35
5-3 ω -アジドパルミチン酸メチルエステルの光反応	37
5-4 血清アルブミンの光アフィニティラベリング	39
5-5 アセチル-CoA カルボキシラーゼの光アフィニティラベリング	41

第6章	アセチル-CoA-カルボキシラーゼに対するメチルパラ コン酸誘導体の効果	45
6-1	メチルパラコン酸誘導体の合成	46
6-2	アセチル-CoA カルボキシラーゼに対するメチル パラコン酸誘導体の効果	49
第7章	ユハク酸イミドエステルの還元によるアルコールの合 成反応	51
第8章	実験の部	54
	Abbreviations	72
	References	73
	謝辞	75

第1章 序論

生体の脂質の主構成成分である直鎖飽和脂肪酸の *de novo* での合成は2つの酵素系, アセチルコエンザイム A (アセチル-CoA) カルボキシラーゼ* と, 脂肪酸合成酵素とによって触媒される¹⁾。生成した脂肪酸の全ての炭素原子はアセチル-CoA (Fig. 1-1) の酢酸分子か

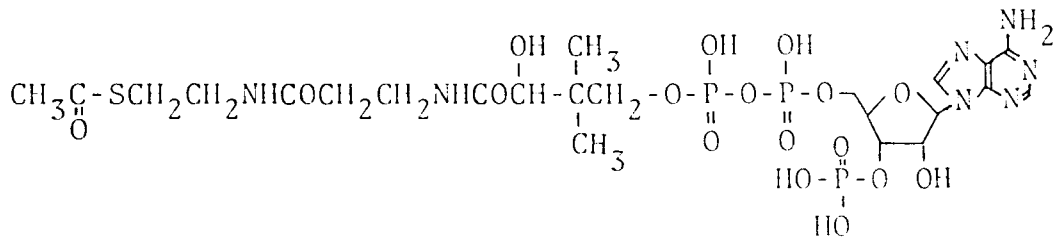


Fig. 1-1

ら由来するもので, 例えばパルミチン酸の合成に必要な成分は Fig. 1-2 の様にまとめられる。

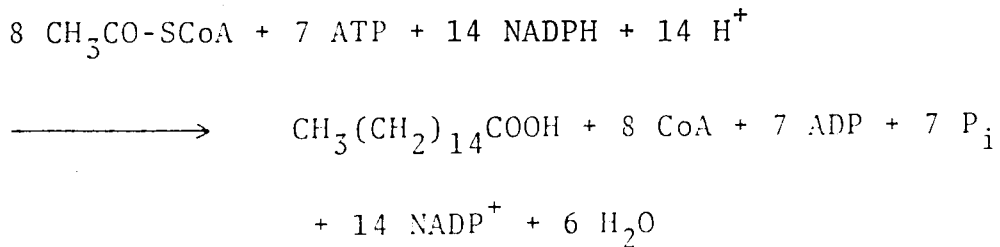


Fig. 1-2

動物における脂肪酸合成の最終生成物は遊離の脂肪酸であって, パルミチン酸(炭素鎖長 16)を主生成物とする。しかし酵母の場合には脂肪酸-CoAが最終生成物となる。生体における脂肪酸合成は途中にアセチル-CoAから導かれたマロニル-CoAを中間体として經由することが知られており²⁾, このアセチル-CoAからマロニル-CoAへの合成過程を触媒する酵素がアセチル-CoA カルボキシラーゼである。マロニル-CoAから長鎖脂肪酸への合成は脂肪酸合成酵素によって触媒される。つまり

*Acetyl-CoA carboxylase or acetyl-CoA:CO₂ ligase(ADP)
(EC 6.4.1.2)

アセチル-CoA カルボキシラーゼは脂肪酸生合成の第一段階の反応を触媒する酵素として重要であり、その活性中心にはビオチン (Fig. 1-3) を含み、ビオチン依存性の炭酸化反応 (第2章参照) によってアセチル-CoA からマロニル-CoA の合成を触媒する^{3,4)}。その反応は Fig. 1-4 に示した様に二つの部分反応により進行する。このようにして生成したマロニル-CoA が次に脂肪酸

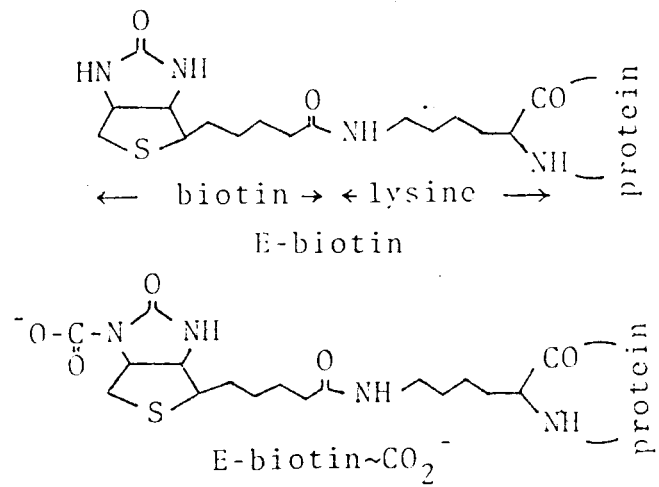


Fig. 1-3

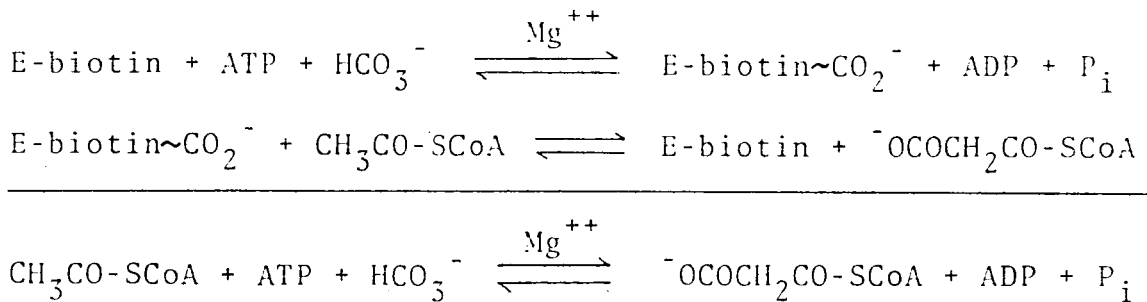


Fig. 1-4

合成酵素の作用によって長鎖脂肪酸に導かれる (Fig. 1-5)。この脂肪酸合成酵素は多くの種類の触媒能を有する多酵素複合体である。

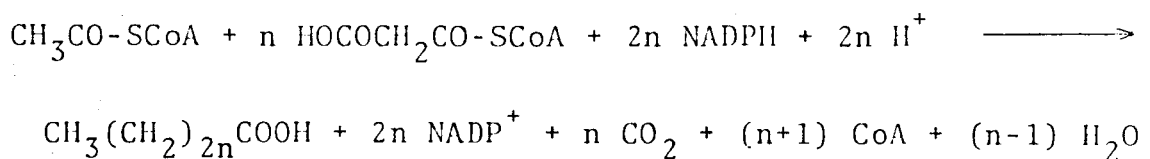


Fig. 1-5

さて、アセチル-CoA カルボキシラーゼは脂肪酸生合成の律速酵素として重要であり、その活性は酵素量の変化および酵素の触媒能の変化によって調節される⁴⁾。酵素量の変化については食餌条件の変化や病的条件下において酵素蛋白の合成速度ならぬに分解速度が変化し酵素

量が変化することにより長期的な酵素活性の調節がなされる。これに対し短期的な調節は酵素分子の触媒能の変化によるもので、アセチル-CoAカルボキシラーゼはアロステリック酵素であってアセチル-CoAの生体内での前駆物質であるクエン酸やイソクエン酸等により活性化され、

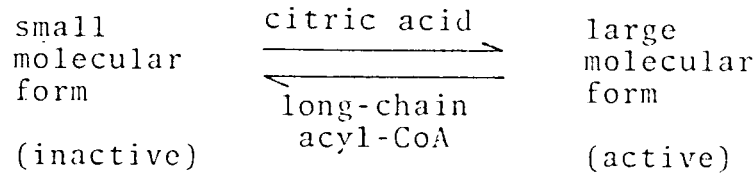


Fig. 1-6

脂肪酸生合成の終末産物である長鎖脂肪酸-CoAによって著しく阻害される (Fig. 1-6)。クエン酸の活性化作用は、アセチル-CoAカルボキシラーゼの不活性型蛋白分子が活性型のポリマー (10~20個の蛋白分子が鎖状に連ったもの) に変化する過程に作用し、長鎖脂肪酸-CoAは逆に活性型ポリマーを不活性型へ解離させることにより酵素活性を阻害する。なおこのクエン酸による活性化には数分間の保温が必要である。以上の脂質生合成経路をまとめると Fig. 1-7 に示したようになる。このことか

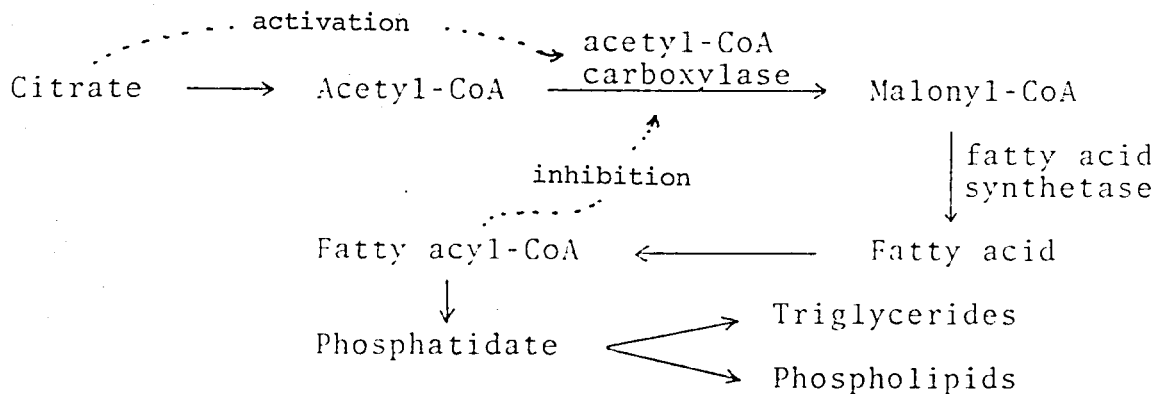


Fig. 1-7

らわかるようにアセチル-CoAカルボキシラーゼは脂肪酸生合成の律速酵素として生理学的にまわめて重要であるのみならず、種々の因子によってその活性が調節される代表的なアロステリック酵素であるために、酵素学的にも非常に興味深い酵素である。しかしながらこの酵素の反応機構やアロステリック因子による調節の分子機構については現在ほ

ほとんど不明のまま残されている。本研究ではこのアセチル-CoA カルボキシラーゼの調節機構を解明する目的で 酵素学的方法に有機化学的手法を取り入れ種々の面からのアプローチを試みたものである。

本論文ではまず第2章においてラット肝からの本酵素の精製, および活性測定法について述べた後 第3章では基質であるアセチル-CoAの構造類似体 すなわちアセチルデヒド-CoAの本酵素に対する作用について述べる。第3章では本酵素の阻害剤である長鎖脂肪酸-CoAによる阻害の際の構造特異性を調べる目的で 種々の脂肪酸-CoA類縁体の阻害定数を測定したのでその結果について述べる。第5章ではこの長鎖脂肪酸-CoAの本酵素に対する結合部位の性質を明らかにするために、光アフィニティラベリングを用いてその結合部位の標識を試みた結果を述べる。第6章では本酵素の活性化因子であるクエン酸の誘導体の一つで、阻害作用を示すパラコン酸誘導体に関して述べる。最後に第7章で、光アフィニティラベリングのための標識化合物合成中に見出した新しいアルコールの合成法について述べる。

第2章 アセチル-CoA カルボキシラーゼの精製および 酵素活性の測定法

2-1 アセチル-CoA カルボキシラーゼの精製

ラット肝から 基本的には 橋本, 沼⁵⁾の方法に従ってアセチル-CoA カルボキシラーゼを精製した。精製酵素の純度はラウリル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により検定した。一例としてラット30匹を用いて行った精製の結果を Table 2-1 に示す。37°Cで、1分間に1 μmol の生成物を生じる酵素活性を1単位と定義する。

Table 2-1 Purification of acetyl-CoA carboxylase from rat liver

Fraction	Protein (mg)	Total activity (units)	Specific activity (units/mg)	Yield (%)
Crude extract	13000	120	0.0094	-
1st $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1300	140	0.11	100
$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ gel	400	70	0.17	49
2nd $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ & DEAE-cellulose	60	38	0.63	26
3rd $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ & Sephacrose 2B	5.5	35	6.4	24
4th $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	3.7	22	5.9	15

2-2 酵素活性の測定⁶⁾

アセチル-CoA カルボキシラーゼの酵素活性の測定は全て 37 °C において行った。測定法にはアイソトープ法および分光学的方法とがあり、後者はさらにピルビン酸キナーゼと乳酸デヒドロゲナーゼとの組み合わせによる方法、ならびに脂肪酸合成酵素との組み合わせによる方法とがある⁶⁾。以下にこれらの方法の概略を述べる。

i) アイソトープ法：アセチル-CoA カルボキシラーゼによる炭酸固定の反応に [¹⁴C]炭酸水素カリウムを用い、生成したマロニル-CoA に含まれる炭酸由来の放射活性を測定する方法 (Fig. 2-1)。ATP 加



Fig. 2-1

水分解酵素などの混入している粗酵素標品 (リン酸カルシウムゲル分画まで) に対してはこのアイソトープ法を用いなければならないが、それ以後の分画では次の分光学的方法が使用できる。

ii) 分光学的方法 a) ピルビン酸キナーゼと乳酸デヒドロゲナーゼを共役させる方法：アセチル-CoA カルボキシラーゼの反応によって生成した ADP をピルビン酸キナーゼと乳酸デヒドロゲナーゼの組み合わせによって定量するもので (Fig. 2-2) 最終的には NADH の消費量を 334 nm の吸収の減少により測定する。なおこの時 ADP⁺ はピルビン酸キナーゼによりもとの ATP にもどる。

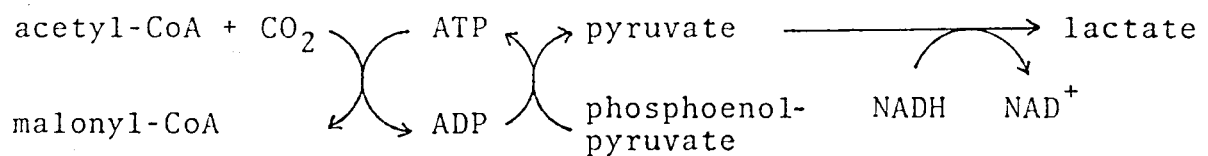


Fig. 2-2

b) 脂肪酸合成酵素と共役させる方法：アセチル-CoA カルボキシラーゼの反応によって生成したマロニル-CoA を酵母より得た脂肪酸合成酵素により脂肪酸-CoA にまで導き、その時消費される NADPH の量を 334 nm の吸収の減少により測定する (Fig. 1-5 参照)。

第3章 アセチル-CoA カルボキシラーゼに対するアセチル デオキシ-CoAの効果

アセチル-CoA カルボキシラーゼはアセチル-CoA からマロニル-CoAを合成する酵素で、チオエステルにより活性化されたアセチル基のメチル基にカルボキシル基を導入する反応を触媒する (Fig. 3-1)。

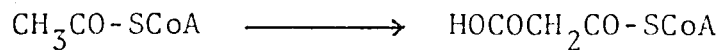


Fig. 3-1

類似の反応を触媒する酵素としては、プロピオニル-CoA カルボキシラーゼ、 β -メチルクロトニル-CoA カルボキシラーゼ、およびゲラニル-CoA カルボキシラーゼが知られている³⁾ (Fig. 3-2)。

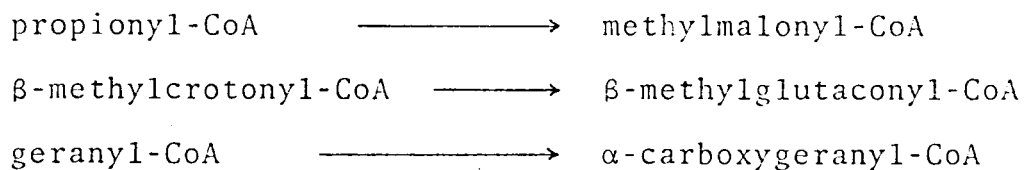


Fig. 3-2

アセチル-CoA カルボキシラーゼに代表される 活性メチル、またはメチレンに炭酸化反応を行う酵素はいずれもピオチン酵素であって、酵素中のピオチンがまずカルボキシピオチン (Fig. 3-3) となった後基質と反応する³⁾。この反応は有機

化学的にも興味のある反応で、酵素類似機能をもつモデル反応として、塩基触媒による活性メ

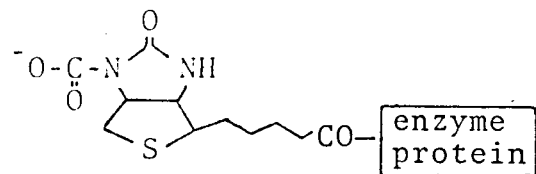


Fig. 3-3

チル、またはメチレンの炭酸化

反応が種々の化合物および触媒を用いて研究されており^{7,8)}、例えばアセチル-CoA と類似の構造を有する酢酸のチオエステルから、フェノキシドアニオンの触媒作用によりマロン酸誘導体が合成されている (Fig. 3-4)。

ところで、このモデル反応では活性化されたチオエステル部分を有しな

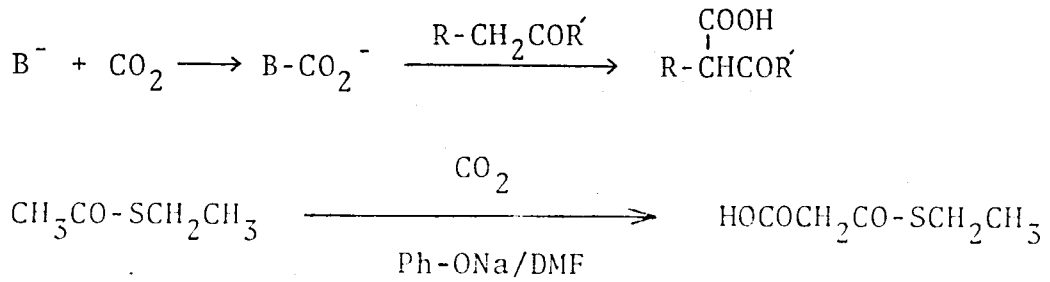


Fig. 3-4

いカルボニル化合物でも反応が十分進行することがわかっているのので、実際の酵素反応においてもアセチル-CoA のチオエステルをカルボニルに置換した化合物を アセチル-CoA カルボキシラーゼの基質として用いた場合に酵素反応にどのような効果を与えるかという興味をもたれた。そこで実際に アセチル-CoA 分子中のチオエステルのイオウ原子をメチレンに置換えたアセトニルデチオ-CoA (Fig. 3-5) の本酵素に対する影響を調べた。アセトニルデチオ-CoA は C. J. Stewart と T. Wieland により アセチル-CoA の類縁体として合成されたものを使用した⁹⁾。

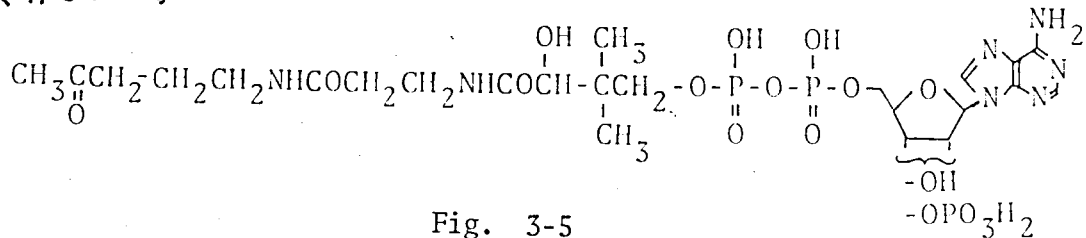


Fig. 3-5

3-1 アセトニルデチオ-CoA の酵素反応

アセチル-CoA カルボキシラーゼのアイソトープ法による活性測定に用いられる反応液を使用して、アセチル-CoA の代わりにアセトニルデチオ-CoA 0.42 mM を用いて 20 分間酵素反応を行わせた。炭酸ガスを通じて未反応の [¹⁴C]炭酸を追い出した後、残存する放射能を測定して Table 3-1 に示す結果を得た。酵素反応に必要な全ての成分を含む反応液中で酵素反応させると残存放射能が検出されるが、アセトニルデチオ-CoA または酵素を除いた系、あるいは加熱により酵素を失活させた

Table 3-1 Cofactor requirement for the carboxylation of acetylthio-CoA by acetyl-CoA carboxylase(1)

System	$H^{14}CO_3^-$ fixed (cpm)
Complete	634
ATP omitted	10
Mg ⁺⁺ omitted	12
Acetylthio-CoA omitted	22
Enzyme omitted	10
Zero time (immediate termination)	10
Complete, but enzyme boiled	6

系(酵素を100℃, 3分間加熱したもの)では残存放射能がほとんど測定されなかったことから アセチルデチオ-CoAも アセチル-CoAと同様にアセチル-CoA カルボキシラーゼによる炭酸化反応を受けていることがわかった。なおこの酵素反応には通常のアセチル-CoAの場合と同様に ATP, マグネシウムイオンが必要である。残存放射能の測定に際して過剰の[¹⁴C]炭酸を除くために, 炭酸ガスを通じる方法の他に反応液を塩酸で酸性にした後減圧により除く方法もあわせて行ってみたが, その結果は上と同様であった。以上の結論は分光学的測定法によっても確認された(Table 3-2)。その際, この反応もやはりフェン酸による酵素の活性化が必要であることも確認された。

Table 3-2 Cofactor requirement for the carboxylation of acetylthio-CoA by acetyl-CoA carboxylase(2)

System	NADH oxidized ($\Delta A_{334}/min$)
Complete	0.038
ATP omitted	0
Acetylthio-CoA omitted	0
HCO ₃ ⁻ omitted	0.002
Citrate omitted	0.006

以上のように, アセチルデチオ-CoAが本酵素の基質となり, 炭酸

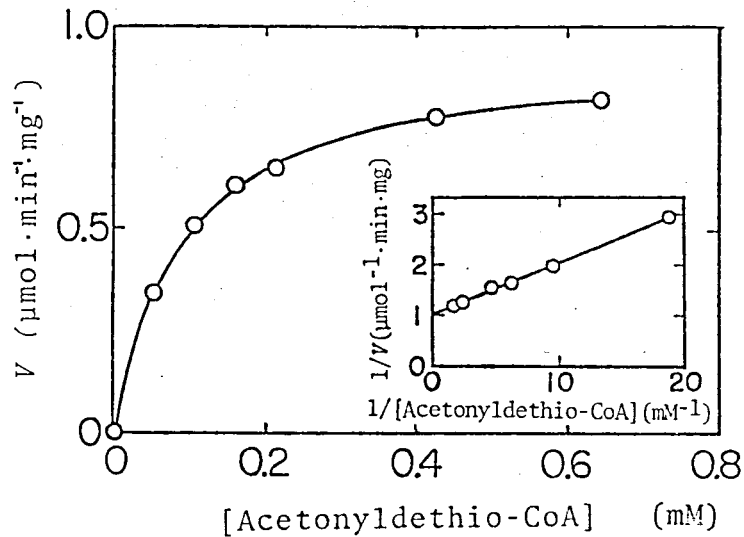


Fig. 3-6

化されることがわかったので、次にアセチルデチオ-CoAの本酵素に対する K_m (Michaelis 定数) および V_{max} (最大速度) を測定した。基質濃度を種々変化させてその時の酵素活性を分光学的方法により求めた結果 Fig.3-6 が得られ、これを Lineweaver-Burk プロットに直した(挿入図)。この図よりアセチルデチオ-CoA の K_m , V_{max} 値として各々 $96 \mu\text{M}$, $1.0 \mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$ 蛋白質 が得られた。比較のためにアセチル-CoA を基質とした場合の K_m , V_{max} を求めるとそれぞれ $20 \mu\text{M}$, $6.8 \mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$ 蛋白質 という値が得られた (Fig. 3-7)。

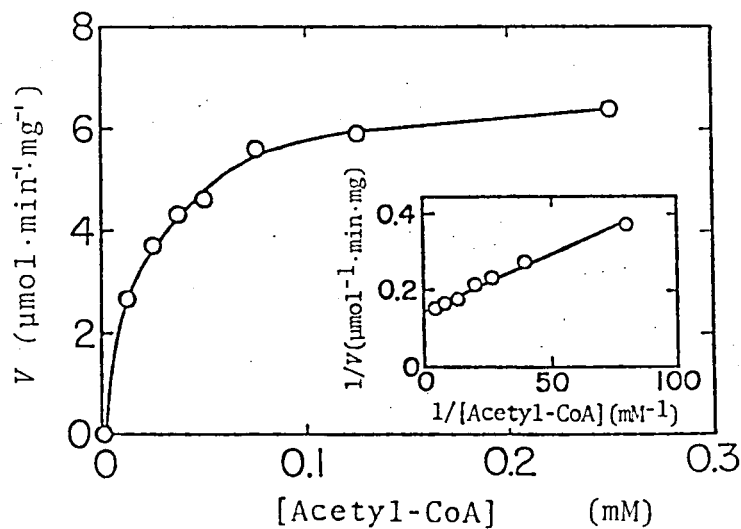


Fig. 3-7

従ってアセトニルデチオ-CoAはアセチル-CoAに比べてアセチル-CoAカルボキシラーゼに対する親和性は約5分の1であり、酵素による炭酸化反応の速度は約7分の1であることがわかった。

第1章で述べたように、脂肪酸合成酵素(酵母)は1個のアセチル-CoA分子をプライマーとして、7~8個のマロニル-CoA分子を縮合して長鎖脂肪酸-CoAを合成する。そこで次にこの脂肪酸合成酵素に対するアセトニルデチオ-CoAの影響を調べた。その結果 Table 3-3に示

Table 3-3 Effect of acetylthio-CoA on the reaction of fatty acid synthetase

System	NADH oxidized ($\Delta A_{334}/\text{min}$)
Complete *	0.140
Acetylthio-CoA added**	0.140
Acetyl-CoA omitted	0.014
Acetyl-CoA omitted, and acetylthio-CoA added**	0.012

* 0.13 mM acetyl-CoA and 0.088 mM malonyl-CoA was used

** 0.11 mM acetylthio-CoA was used

したようにアセトニルデチオ-CoAはアセチル-CoAの代りのプライマーとはならないのみならず 脂肪酸合成酵素の反応に対し阻害作用を示さないことがわかった。ところでアセチル-CoAとマロニル-CoAとから脂肪酸合成酵素の作用によって長鎖脂肪酸が合成される際には まず始めに基質であるアセチル-CoAとマロニル-CoAのチオエステル結合の切断が起こり アセチル基およびマロニル基がそれぞれ酵素蛋白へ転移することが必要である²⁾。ところがアセトニルデチオ-CoA誘導体にはチオエステル基が存在しないため 上の実験でも明らかのように脂肪酸合成酵素に対してはアセチル-CoAの代りにはならない。それのみならずアセチル-CoAカルボキシラーゼの作用により生成するアセトニルデチオ-CoAの炭酸化生成物もやはりマロニル-CoAの代りとはなり得ないことが示唆される。そこでアセチル-CoAとアセトニルデチオ-CoAの共存下で アセチル-CoAカルボキシラーゼと脂肪酸合成酵素とを同時に作用させ、アセチル-CoAカルボキシラーゼの作用による

マロニル-CoAの生成量を 脂肪酸合成酵素の活性により測定した。この場合 アセチルデチオ-CoAの炭酸化反応の分だけマロニル-CoAの生成は抑制されることになる (Fig. 3-8)。アセチル-CoAおよびア

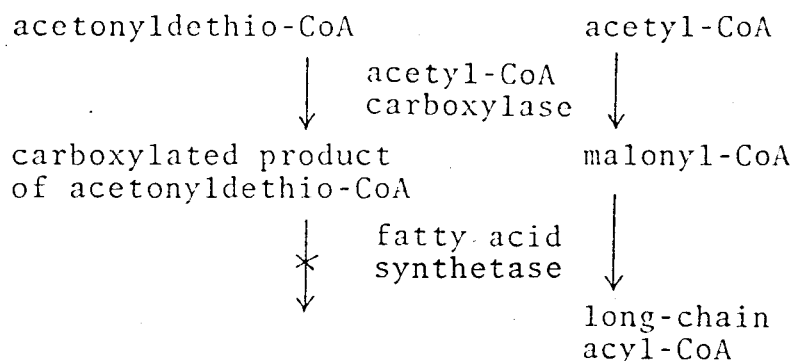
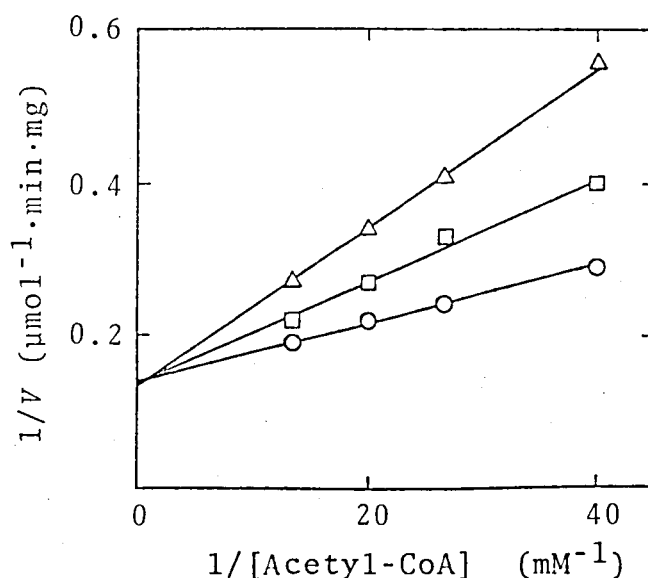


Fig. 3-8

セチルデチオ-CoAの濃度を変化させて酵素活性を測定した結果を Fig. 3-9 に示した。この図から得られる見かけの K_i 値はアセチルデチオ-CoAのアセチル-CoA カルボキシラーゼに対する K_m 値を表わしている。拮抗阻害の場合の計算法を用いて $120 \mu\text{M}$ という値が得られ、先に得たアセチルデチオ-CoAの K_m 値 ($96 \mu\text{M}$) とほぼ同じ値を示した。



○, No acetonyldethio-CoA; □, 0.11 mM acetonyldethio-CoA; Δ, 0.21 mM acetonyldethio-CoA.

Fig. 3-9

3-2 酵素反応生成物の確認のためのモデル反応

アセチル-CoA カルボキシラーゼによる炭酸化反応はカルボニル基に隣接した位置で起こる。従ってアセチルデヒオ-CoA の場合にはアセチル-CoA と異なり炭酸化され得る位置が2カ所存在するので2種類の生成物の可能性がある (Fig. 3-10, A および B)。酵素による炭酸

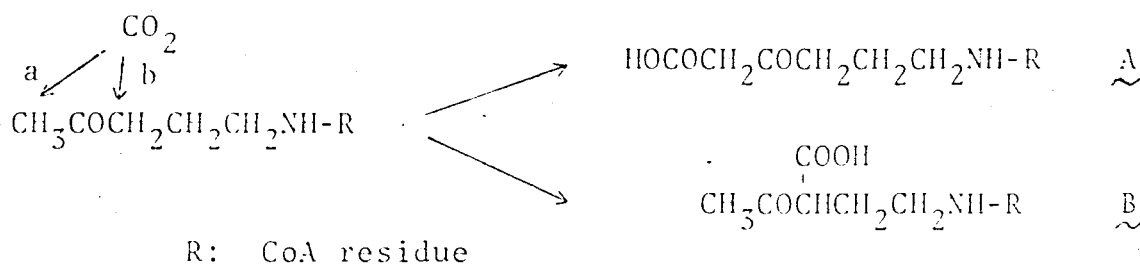


Fig. 3-10

化反応がアセチルデヒオ-CoA のカルボニル基に隣接するメチルまたはメチレンのどちらの位置、または両方の位置で起っているかどうかを調べるために、次に酵素反応生成物の確認を行った。Fig. 3-10 の炭酸化生成物 A および B はそれぞれ γ -置換ならびに α -置換アセト酢酸誘導体である。従って生成物アセト酢酸誘導体の置換基の位置を決定すればよい。しかしながら一般にアセト酢酸誘導体は通常の酸およびアルカリ加水分解の条件下では不安定なためそのまま加水分解して置換基の位置を決めることはできない。そのため、炭酸化生成物を化学変換によりより安定な化合物に導いた後加水分解し、水解物を分析することにより α -置換あるいは γ -置換アセト酢酸誘導体から由来する化合物を同定する方針をとった。

アセト酢酸誘導体の化学変換の反応の一つとして酸分解がよく知られている (Fig. 3-11)。そこで最も簡単なアセト酢酸メチルをモデル化合

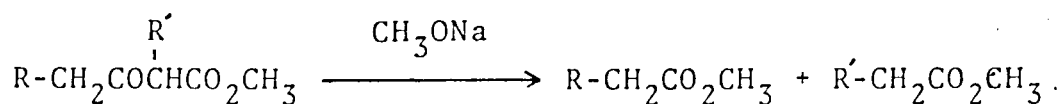


Fig. 3-11

物として、ナトリウム アジドによる酸分解を検討した。しかしながらこの反応はほとんど進行せず また炭酸化生成物がAの場合この酸分解によって生成する酢酸メチルはその揮発性などにより取り扱いが困難であると考えられたのでこの変換反応は断念した。

次に検討したアセト酢酸誘導体の Schmidt 反応はアミノ酸の合成反応として知られているもので¹⁰⁾、生成物がアミノ酸であるため揮発性もなく取り扱い易いと考えられた (Fig. 3-12)。そこでこの方針によって

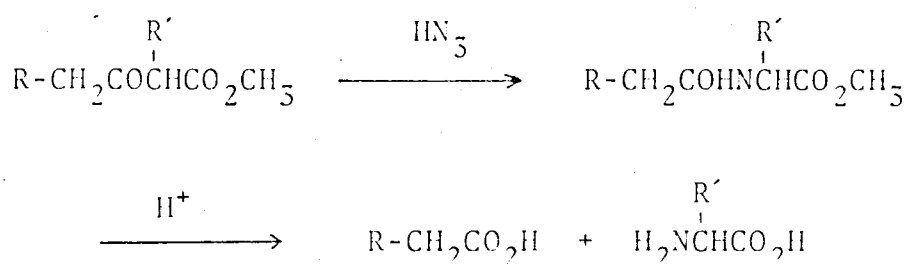


Fig. 3-12

反応条件を種々検討し、改良法によって目的を達することができた。通常の Schmidt 反応は硫酸中アジ化ナトリウムを加えることにより生成したアジドアニオンの作用によって転移反応が起きる。この時硫酸は触媒としても作用する。しかし実際にアセト酢酸メチルを硫酸中アジ化ナトリウムと反応させると、薄層クロマトグラフィー上で多くの生成物が発見された。硫酸中、アジ化水素 (クロロホルム溶液) を作用させても同様の結果を与えた。この様に硫酸中の反応は良い結果が得られず、またアセトニルデヒド-CoA のような複雑な化合物の場合には硫酸は溶媒として適当ではないと考えられたので他の溶媒を検討した。その結果、トリフルオロ酢酸を溶媒として、アジ化水素 (クロロホルム溶液) を作用

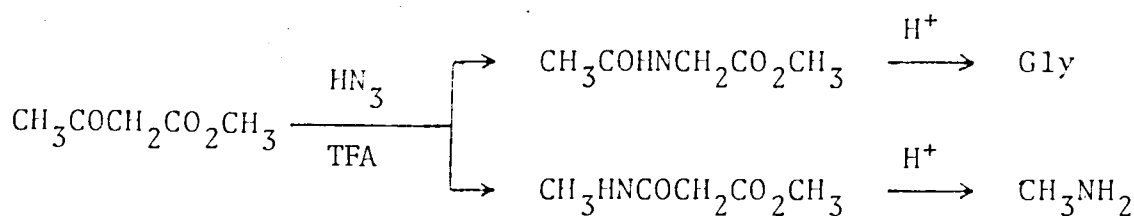


Fig. 3-13

させると 50 °C の加温により反応はすみやかに進行し、薄層クロマトグラフィー上ではほぼ単一の生成物を得た (Fig. 3-13)。このものは標品のアセチルグリシンメチルエステルと Rf 値が一致し、さらにこの反応生成物を加水分解することによりグリシンが得られ、融点、アミノ酸分析、薄層クロマトグラフィーにより確認した。また、Fig. 3-13 に示すように Schmidt 反応の際に転移反応が逆の方向に起きた生成物に由来するメチルアミンも少量であるがアミノ酸分析、薄層クロマトグラフィーにより検出された。なおアセト酢酸メチルにアジ化水素 (クロロホルム溶液) の代わりにアジ化ナトリウムをトリフルオロ酢酸中反応させても反応は全く進行しなかった。次にこの Schmidt 反応の時間経過を加

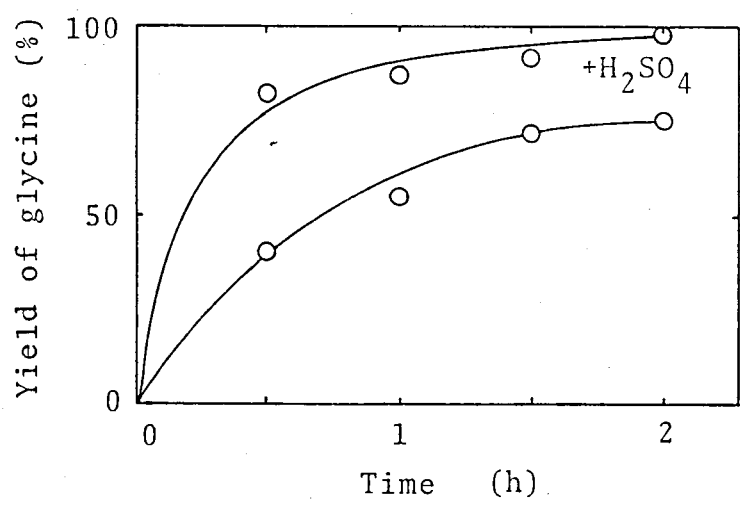


Fig. 3-14

Table 3-4 Schmidt reaction of acetoacetic acid methyl ester

HN ₃ (eq)	Temp (°C)	Time (min)	Solvent (μl)		Yield (%)
			CHCl ₃	TFA	
4	50-55	30	5	50	21
17	50-55	30	20	50	35
40	50-55	30	50	50	30
17	50-55	30	70	10	trace
17	r.t.	30	20	50	16
17	50-55	120	20	50	72

水分解後のグリシンをアミノ酸分析計で定量することにより測定した(Fig. 3-14)。その際 反応系に触媒量の硫酸を添加すると転移反応が速く進行することが明らかになった。また反応条件を検討した結果、反応温度は高い方が反応が速く進み、トリフルオロ酢酸に対するフクロホルムの比が大きくなると反応は遅くなり、アジ化水素は15~20当量存在すれば十分であることがわかった(Table 3-4)。同様の反応をα-ベンジルアセト酢酸メチルを用いて試みた結果、やはり高収率で転移生成物のアセチルフェニルアラニンメチルエステルが得られ(Fig. 3-15) NMRによりその構造を確認した。この生成物の加水分解によりフェニルアラニンが生成し、薄層クロマトグラフィー、アミノ酸分析により純品と比較することにより確認した。

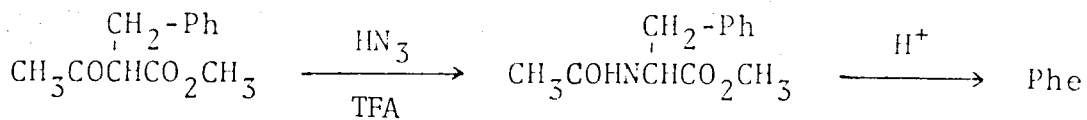


Fig. 3-15

以上のようにここに述べた改良 Schmidt 反応は従来の方法に比べ非常に穏和な条件下で反応が進行するため、複雑な官能基を有する化合物に適用できると考えられた。この改良 Schmidt 反応によって、酵素反応生成物の構造確認のための化学変換が可能となったので、次に実際に酵素反応生成物を用いて反応を行った。

3-3 酵素反応生成物の構造確認

先に述べたようにアセチルデヒオ- CoAには炭酸化され得る位置が2カ所存在するのでその生成物は Fig. 3-16 に示すAとBの2種類が考えられる。この酵素反応の際に¹⁴C炭酸水素カリウムを用いると、生成物A, Bに新たに導入されたカルボキシル基を放射性同位体により標識することができる。このカルボキシル基をメチルエステルにして保護した後、改良 Schmidt 反応を行わせ、さらに加水分解すると放射性同位体で標識された生成物としてはAからはグリシンが、Bからは

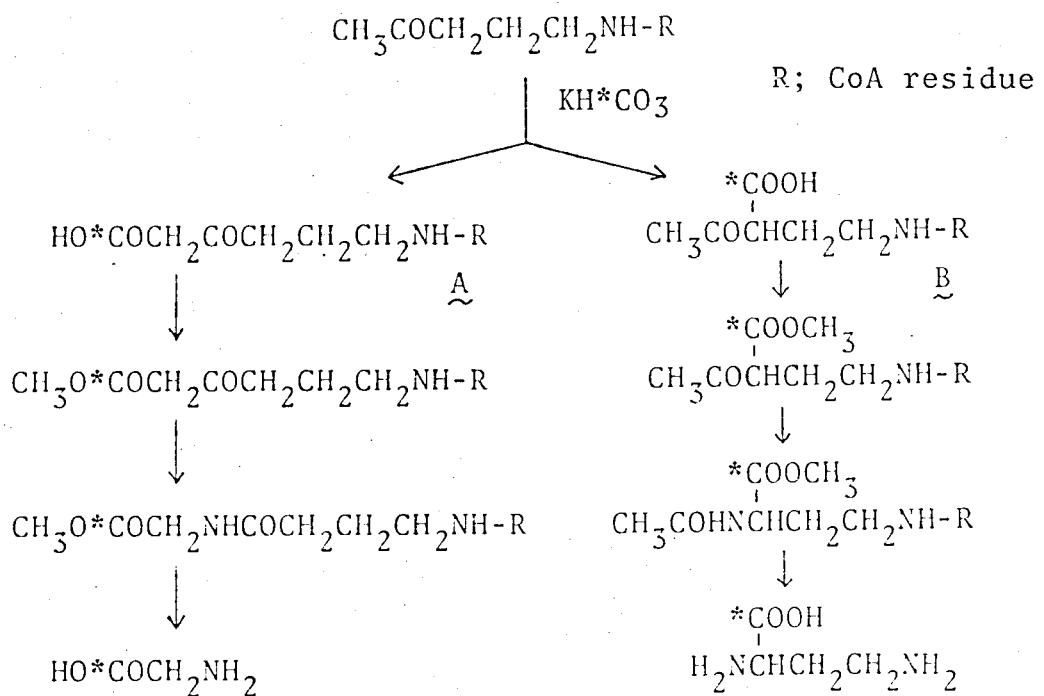


Fig. 3-16

α, δ -ジアミノ酪酸がそれぞれ得られるはずである。従って水解物中の標識化合物を同定することによりその酵素反応による炭酸化生成物が決定できる。そこで実際にアイソトープ法による酵素活性測定法と同じ条件で、 0.125 mCi の $[^{14}\text{C}]$ 炭酸水素カリウム (比放射活性: 5 mCi/mmol) を用いて酵素反応を行わせ、反応生成物を Fig. 3-17 に示したように DEAE-セルロースカラムクロマトグラフにより精製後、ジアゾメタンによってカルボキシル基をメチルエステルにした。次に 3-2 で述べた条件を用いて Schmidt 反応を行わせた。加水分解後 さらに生

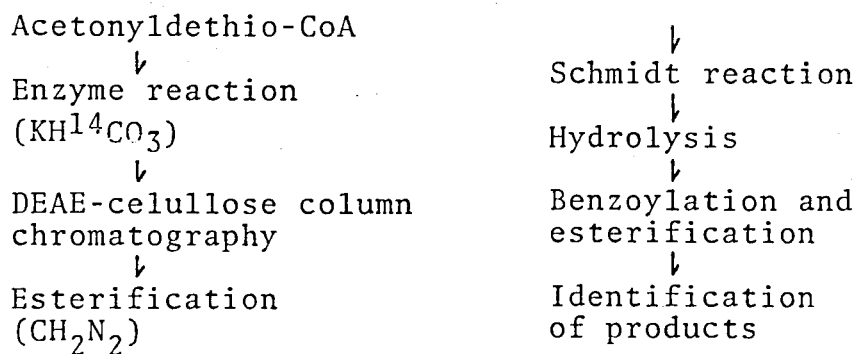


Fig. 3-17

成物の同定を容易にするために 塩化ベンゾイルによる *N*-ベンゾイル化, ジアゾメタンによるエステル化を行った後 シリカゲル薄層フロマトグラフィーにより標品との比較同定を行った (Fig. 3-18, Merck シリカゲル 60 F₂₅₄, 展開溶媒 エーテル)。標品の位置を紫外線ランプ照射により検出し, プレート上のシリカゲルを 1 cm 幅でけずり取り, そこに含まれる放射活性を測定した。その結果, 図に示したように標品の *N*-ベンゾイルグリシン メチルエステル (II) の位置に放射活性が観測され, *N,N*-ジベンゾイル- α,δ -ジアミノ酪酸 メチルエステル (I) の位置には放射活性は認められなかった。展開溶媒としてクロロホルム-メタノール (50:1) を用いても また *N*-ジニトロフェニル誘導体とした場合も同じ結果を与えた。従ってこのことから炭酸化生成物は A の構造の δ -置換アセト酢酸誘導体であったことがわかり, アセチル-CoA カルボキシラーゼによるアセチルデチオ-CoA の炭酸化は アセチル-CoA と同様末端メチルで起きていることが結論された。

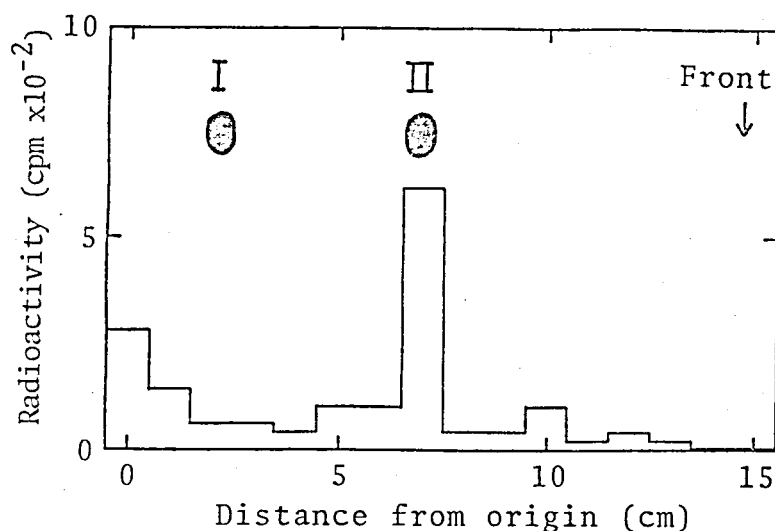


Fig. 3-18

以上のように アセチル-CoA カルボキシラーゼに対してアセチルデチオ-CoA は基質として作用し, この酵素による炭酸化はアセチル-CoA と同様末端のメチル基の位置で起きていることが明らかになった。また アセチルデチオ-CoA は脂肪酸合成酵素に対しては なんら作

用を持たないこともわかったが、その他の酵素に対する作用は T. Wieland
ら^{9,11)}によって調べられており、アセチル-CoA を基質とするクエン酸
合成酵素およびホスホトランスアセチラーゼに対してはアセチルデヒ
ドロキシ-CoA は阻害作用を示し、またアセチル-CoA を活性化因子として要
求するピルビン酸炭酸化酵素に対してはアセチルデヒドロキシ-CoA はアセ
チル-CoA と同様に活性化作用を示すことが報告されている。

第4章 アセチル-CoA カルボキシラーゼに対する 長鎖脂肪酸-CoAの阻害効果

第1章で述べたように アセチル-CoA カルボキシラーゼは脂肪酸合成の律速酵素であり その触媒能はアセチル-CoAの前駆物質であるクエン酸によって活性化され、脂肪酸合成の終末産物である長鎖脂肪酸-CoAによって顕著に阻害される (Fig. 4-1)。両者の作用は互いに

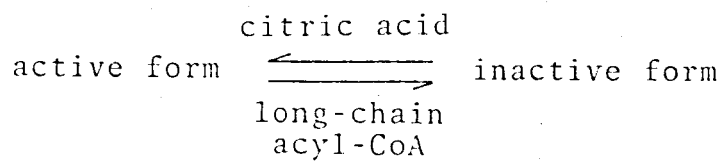


Fig. 4-1

拮抗的である。沼ら¹²⁾による部分精製の酵素を用いた研究で、酵素活性測定の際に反応液中に含まれる血清アルブミン量を減少させると長鎖脂肪酸-CoAによる阻害は強くなることが知られていた (血清アルブミンは酵素の安定化のために添加されるが、長鎖脂肪酸-CoAと強い親和性をもつ)。そこで最近萩原ら¹³⁾によって、精製酵素を用いてしかも血清アルブミンを含まない系でのパルミトイル-CoAの阻害定数 (K_i) が測定された結果 5.5 μM と非常に低い値を示し阻害がまわめて強いことが見出された。またこのパルミトイル-CoAによる阻害はアセチル-CoA カルボキシラーゼ1分子あたりにパルミトイル-CoA1分子が結合して酵素を非活性型にし、この酵素とパルミトイル-CoAの結合は可逆的でありクエン酸の添加によってパルミトイル-CoAは酵素分子から解離し、酵素は再び活性型に戻ることも蔗糖密度勾配遠心法等の実験により明らかにされた。そこで本研究では以上のような事実に基づいて、この長鎖脂肪酸-CoAの構造と阻害の関係を明らかにする目的で、種々の長鎖脂肪酸-CoA類縁体を調製しその阻害定数を測定した。

3-1 長鎖脂肪酸-CoA類縁体の調製

長鎖脂肪酸-CoA類縁体を調製するためのCoA類似体の中で、デホスホ-CoAと1,N⁶-エテノ-CoAは市販のものを用い、合成CoA類縁体、CoA(L), ケト-CoA, イノシノ-CoAおよび4,4'-ジホスホパンテチンは清水博士からいただいた試料を使用した。これらのCoA類縁体または誘導体のアシル化は混合酸無水物法⁽¹⁾あるいはN-ヒドロキシコハク酸イミドの活性エステルを用いる方法⁽²⁾により行った。パルミトイル-4'-ホスホパンテチンの調製は4,4'-ジホスホパンテチンをナトリウムアマルガムにより還元した後アシル化を行った。S-セチル-CoAはヨウ化セチルによりCoAをアルキル化して合成した。パルミトイル-CoA類縁体の構造をFig. 4-2にまとめて示す。

4-2 Dixonの作図法による長鎖脂肪酸-CoA類縁体の阻害定数の測定

通常の酵素反応における阻害定数の測定の際には、使用する阻害剤の濃度に比べ酵素の濃度が低いため酵素濃度を無視して阻害定数を求めることができる。しかし非常に強い阻害の場合には阻害剤の濃度に対して酵素濃度が無視できないためこの酵素濃度も考慮に入れたDixonの作図法⁽³⁾を用いなければならぬ。そこで本実験ではこの方法によりアセチル-CoAカルボキシラーゼに対する長鎖脂肪酸-CoA類縁体の阻害定数を測定した。各長鎖脂肪酸-CoA類縁体の濃度は、核酸塩基部分またはチオエステル基の紫外吸収⁽⁴⁾から、あるいはチオエステルを加水分解後遊離してくるチオール基をジチオビス(オ-ニトロ安息香酸)で定量する方法⁽⁵⁾により求めた。次にDixonの作図法の一例としてパルミトイル-CoAの阻害定数の求め方を示す。Fig. 4-3に示すように、クエン酸濃度を一定にし(図では3.75 mM)種々の濃度のパルミトイル-CoA存在下でのアセチル-CoAカルボキシラーゼの活性を分光学的方法で測定し、その相対活性と阻害剤の濃度をグラフに取った。測定に用いた酵素

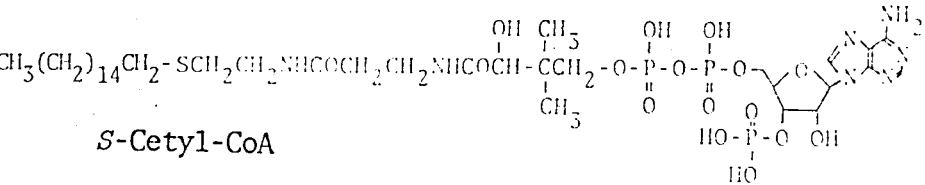
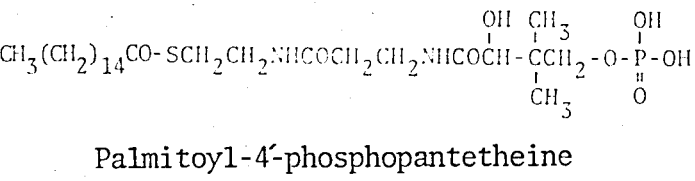
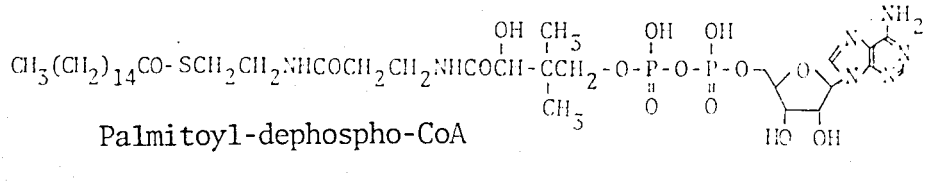
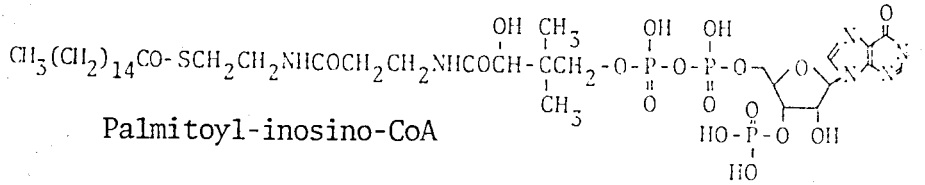
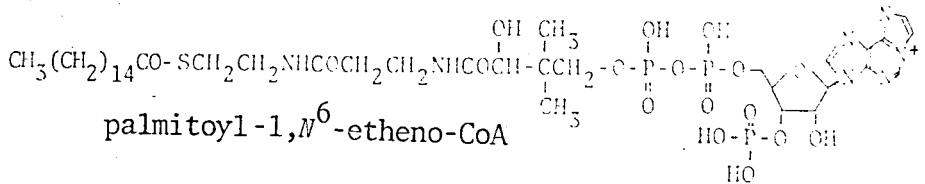
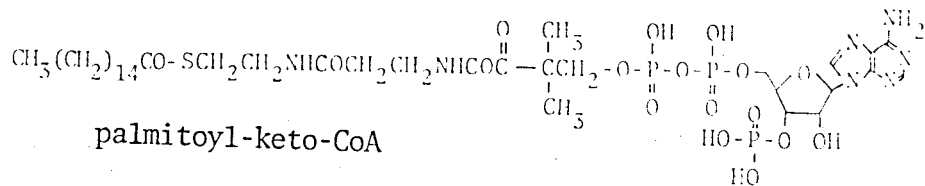
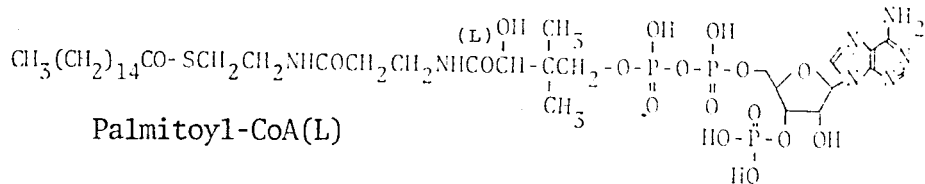
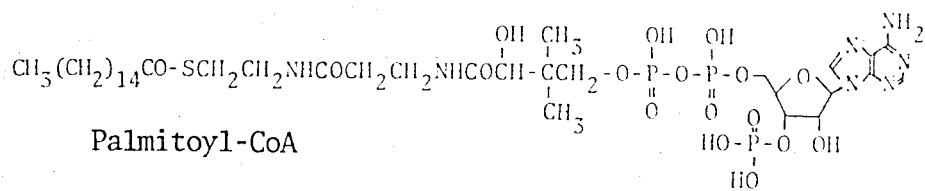


Fig. 4-2

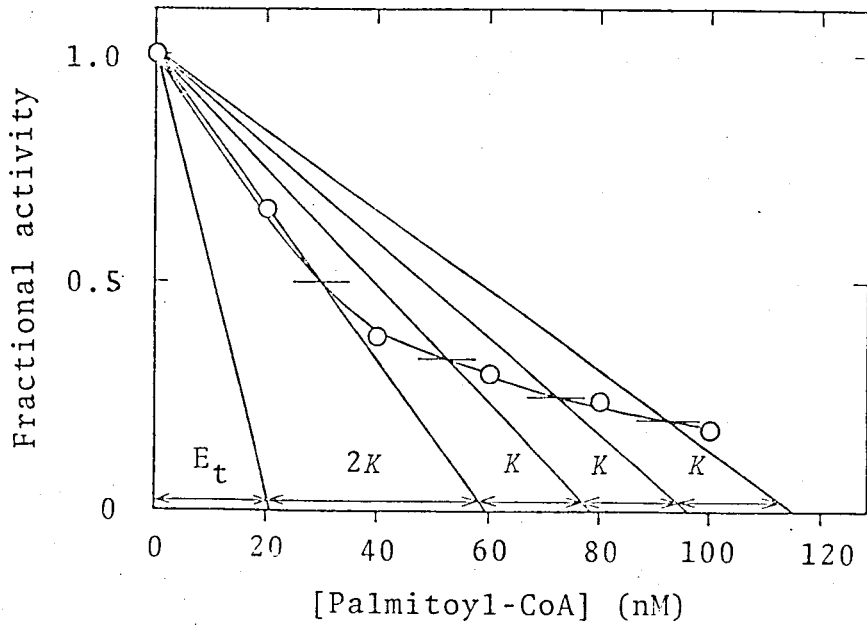


Fig. 4-3

濃度 E_t を横軸に示し、アセチル-CoA カルボキシラーゼのサブユニットの分子量を 230000 として計算した。図では 21 nM) 相対酵素活性が $1/2$, $1/3$, ... となる点を通る直線と横軸との交点を求め、図に示したように K 値を得た。異なるクエン酸濃度において同様の作業

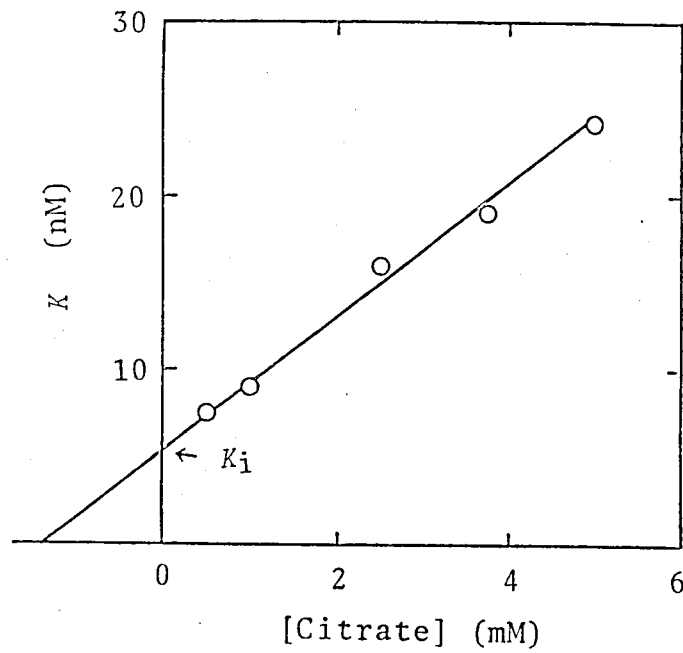


Fig. 4-4

を行い各濃度における K_i の値を求めてこれをプロットした (Fig. 4-4)。この図のプロットから得られた直線をフエン酸濃度零に外挿した時の K_i の値が求める阻害定数 K_i となる。パルミトイル-CoA の場合 K_i 値と

Table 4-1 Inhibition constants of acetyl-CoA carboxylase for palmitoyl-CoA and its analogues

Inhibitor	K_i (nM)
Palmitoyl-CoA	6.5
Palmitoyl-CoA(L)	22
Palmitoyl-keto-CoA	21
Palmitoyl-1, N ⁶ -etheno-CoA	15
Palmitoyl-inosino-CoA	14
Palmitoyl-dephospho-CoA	260
Palmitoyl-4'-phosphopantetheine	650
S-Cetyl-CoA	10

Table 4-2 Inhibition constants of acetyl-CoA carboxylase for CoA thioesters of various fatty acids

Inhibitor	K_i (nM)
Saturated acyl-CoA	
Lauroyl-CoA	-
Myristoyl-CoA	680
Palmitoyl-CoA	6.5
Stearoyl-CoA	1.3
Arachidoyl-CoA	< 1
Docosanoyl-CoA	40
Tetracosanoyl-CoA	150
Unsaturated acyl-CoA	
Palmitoleoyl-CoA	130
Oleoyl-CoA	44
Linoleoyl-CoA	27
Linolenoyl-CoA	66
Arachidonoyl-CoA	48

して 5.5 ~ 6.5 nM という値が得られた。同様の方法を用いて種々の長鎖脂肪酸-CoA 類縁体の阻害定数を測定した。長鎖脂肪酸-CoA の CoA が変化した場合の K_i 値を Table 4-1 に、また脂肪酸部分を変化した場合の K_i 値を Table 4-2 にまとめて示した。阻害定数 K_i はその値が小さいほどその阻害が強いことを意味する。

4-3 長鎖脂肪酸-CoA による阻害と構造との相関関係 についての考察

まず長鎖脂肪酸-CoA の CoA 部分を変化した場合について考えると、パントイン酸部の二級水酸基が天然の D-型に対して L-型のものおよびケトンになったものいずれも阻害定数には顕著な差は生じなかった。また核酸塩基のアデニンが変化したパルミトイル-1, N⁶-エチル-CoA, パルミトイル-イノシノ-CoA 共にやはりその阻害定数には大きな変化はなかった。従ってパントイン酸の部分やアデニン部分は阻害にはそれほど重要ではないと考えられる。それに対し 3'位のリン酸基のなくなったパルミトイル-デホスホ-CoA はもとのパルミトイル-CoA に比べて阻害定数は 40 倍大きい値を示し、阻害が顕著に弱くなった。このことから 3'位のリン酸基は長鎖脂肪酸-CoA が酵素に結合する際に特に重要であることが結論できる。このことに関して、クエン酸合成酵素がステアロイル-CoA によって阻害される際にもやはり 3'位のリン酸基の存在が重要であることが O. Wieland ¹⁹⁾ によって報告されており上の結論を支持する。次に CoA のピロリン酸の間の結合が断裂しヌクレオチド部を欠いたパルミトイル-4'-ホスホパンテテインはパルミトイル-デホスホ-CoA より弱い阻害しか示さなかった。一方チオエステルをチオエーテルに変えた δ -セチル-CoA はもとのパルミトイル-CoA とその阻害の程度に差が認められなかった。従ってこのことは酵素との結合に脂肪酸-CoA のエステル部構造は本質的には関与していないことを示していると考えられる。

次に脂肪酸部の構造変化について考察すると、脂肪酸の鎖長が炭素数

で 14 より短い場合には顕著な阻害がみられず、炭素鎖が 16 から 24 では阻害が強くなり、鎖長 20 において極大を示した。この鎖長と阻害作用との関係を、長鎖脂肪酸-CoA の濃度を一定 (各脂肪酸-CoA 100 nM, フェニ酸 2.5 mM) としたときの相対的な阻害の程度を比較すると Fig 4-5 に示したようになる。次に脂肪酸部分に不飽和結合が存在す

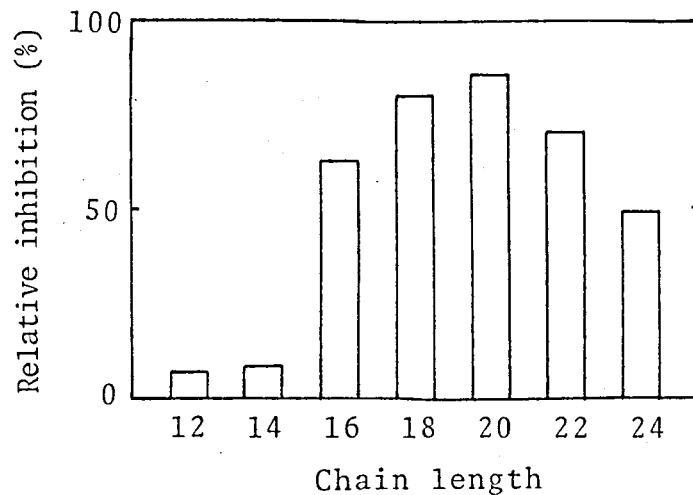


Fig. 4-5

る場合は いずれも対心する飽和のものに比べてその阻害の程度は弱くなった。これは二重結合によるアルキル鎖の折れ曲り構造のためであると考えられる。

以上の結果より、アセチル-CoA カルボキシラーゼと長鎖脂肪酸-CoA との結合には 構造的にみて CoA 部分の 3' 位のリン酸基と、脂肪酸部分が特に重要な役割を果たしていることがわかった。アセチル-CoA カルボキシラーゼが酵素 1 分子当り 1 分子の長鎖脂肪酸-CoA と結合することによってその酵素活性が阻害されることを考え合わせると、その阻害に際して、阻害剤に構造特異性が存在するという事は、長鎖脂肪酸-CoA が本酵素の生理的調節因子であり、酵素の特定の部位に結合してその活性を調節しているという機構を結論することが出来る。

第5章 光アフィニティラベリングの試み

最近酵素蛋白質などの生体高分子の活性部位の構造を調べるための手法としてアフィニティラベリングがよく利用される。それは基質や阻害剤などとよく似た化学構造をもち、かつ反応性の高い官能基を有する修飾試薬を調製して、蛋白質分子中の親和性の高い結合部位に接近させ化学反応を行わせることにより生体高分子の結合部位を特異的に化学修飾し、この修飾分子を指標にして酵素などの活性部位付近の構造を探ろうとする方法である。しかしながら単なるアフィニティラベリングでは試薬が、高い親和性をもって結合部位に接近するだけでこれと反応し得る適当な官能基が結合部位になければ十分な特異的ラベリングの効果を發揮しない。また修飾試薬が最初から反応性の高い官能基をもっていると、ただちに生体高分子と不可逆的な化学反応を起してしまって不都合な場合がある。たとえば試薬の生体高分子に対する結合定数の測定のような通常の方法論的測定は行えない。これらの欠点を補うものとして最近光アフィニティラベリングという新しい手法が開発され用いられ始めている²⁰⁾。この光アフィニティラベリングのための試薬はジアゾケトンやアジド基を官能基として持ち、これらはこのままでは反応性に乏しく修飾試薬とならないが、光を照射することによりこれらの官能基は非常に反応性の高い化学種となり得る (Fig. 5-1)。従つて暗所で通常の方法論的測

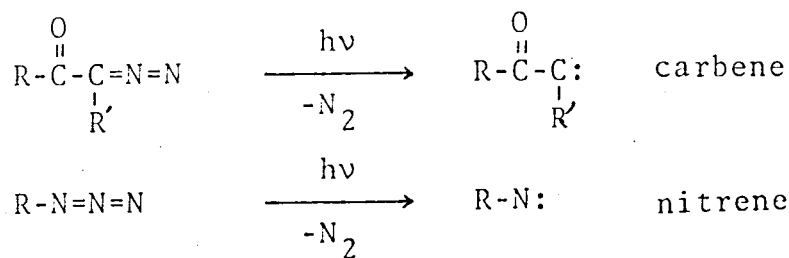


Fig. 5-1

定が可能である。これらの試薬から光照射によって生じる非常に反応性に富むカルベン、ナイトレンはラジカルであるために生体高分子を種々

の反応様式により修飾することができる。ナイトレンの場合の反応例を Fig. 5-2 に示す。また この光アフィニティラベリングの最も特徴的な

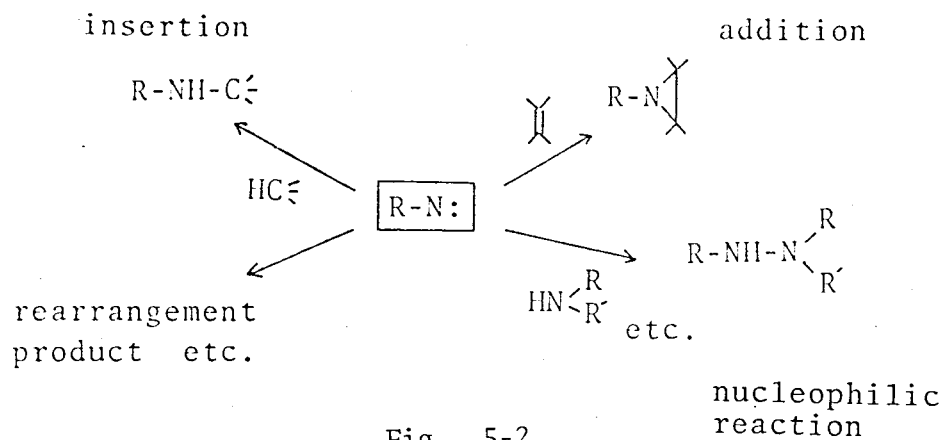


Fig. 5-2

点は C-H 結合にさえ反応することで、このために生体高分子の側に適当な官能基がなくても修飾試薬は生体高分子と反応できる可能性がある。特に生体高分子と基質との相互作用が疎水性親和力に基づく場合、生体高分子の結合部位には通常のアフィニティラベリングの試薬と反応し得る官能基はほとんど存在しないと考えられるため、光アフィニティラベリングは不可欠の手法となる。従って脂質化学の領域におけるように、疎水性親和力が重要な役割を果たしている分野ではこの光アフィニティラベリングの利用が大いに期待される。最近、Khorana²¹⁾ や Stoffel²²⁾ によりジアゾケトンやアジド基を有するリン脂質を用いて、光アフィニティラベリングが種々試みられているが、まだ未解決の問題も多く、実用には至っていない。本研究ではアジド基を官能基として有する長鎖脂肪酸-CoA によるアセチル-CoA カルボキシラーゼの光アフィニティラベリングを計画した。アセチル-CoA カルボキシラーゼと長鎖脂肪酸-CoA の結合は、疎水性親和力が重要な役割を果たしていると考えられるので、この手法が有用であると思われた。アジド基を選んだ理由は、合成の容易さとその官能基による立体障害等の影響を小さくするためで、アジド基はジアゾケトンに比べその官能基導入による影響が小さいと考えられる。前章で述べたように長鎖脂肪酸-CoA はアセチル-CoA カルボキシラーゼと 1:1 のモル比で結合してその酵素活性を強く阻害

する。従ってこの光アフィニティラベリングの利用によりその結合部位の性質を明らかにすることができるとは思えないかと考えた。光アフィニティラベリングのための試薬を合成する際、まず第一に脂肪酸-CoAのどの位置にアジド基を導入するか、ということが問題になる。これは脂肪酸-CoAの構造の中で、阻害に最も重要な役割を果たしている構造部分にアジド基を導入するのが望ましい。それには前章の結果より3'位のリン酸基と脂肪酸部分が最も重要であると考えられるので、リン酸基にアジド基を導入することは合成的に困難であるため、脂肪酸部分にアジド基を導入することにし、まずアジド脂肪酸の合成を行った。

5-1 アジド脂肪酸の合成

光アフィニティラベリングに適したアジド置換脂肪酸の合成に当って次の条件を満たす必要がある。1) アジド基導入による阻害効果への影響がない。2) アジド基は脂肪酸-CoAと酵素の結合に重要な役割を果たす位置に導入されていること。3) ^{14}C または ^3H で標識された任意の鎖長を有すること。4) 合成が容易であること。特に非常に高い比放射活性をもち、しかも微量での合成が必要であるため、反応行程が短く操作ができるかぎり簡便であることが望ましい。リについてはいくつも述べたようにアルキル鎖に直接結合したアジド基は立体障害を少く、阻害効果への影響は小さいと考えられる。脂肪酸の炭素鎖に導入するアジド基の置換位置を大きく3カ所に分けて考えると、カルボキシル基付近、中間部分、アルキル基末端付近となる。このうち2)の条件からは脂肪酸-CoAによるアセチル-CoAカルボキシルラーゼの阻害の際に、チオエステル基は必須ではなく鎖長が重要であることから脂肪酸のアルキル基末端部分がより重要であると考えられる。しかし、3)、4)の観点からはカルボキシル基付近、 α -アジド置換脂肪酸の合成が最も容易であると考えられ、ついでアルキル基末端(ω -置換)、さらに炭素鎖の途中にアジド基が置換した脂肪酸の順に合成が困難になると思われる。そこでまず α -置換脂肪酸の合成を試みた。この目的には市販の放射性同位体

標識脂肪酸を出発原料として用いることができるため 他の置換位置のものに比べ有利である。放射性同位体標識脂肪酸は ^3H 、 ^{14}C -標識はに種々の鎖長のものが市販されている。そこでまずパルミチン酸を出発原料として用いた α -アジド脂肪酸の合成を計画し、Fig. 5-3 に示した経路によって、最初に無標識化合物を用いて以下の予備実験を行った。

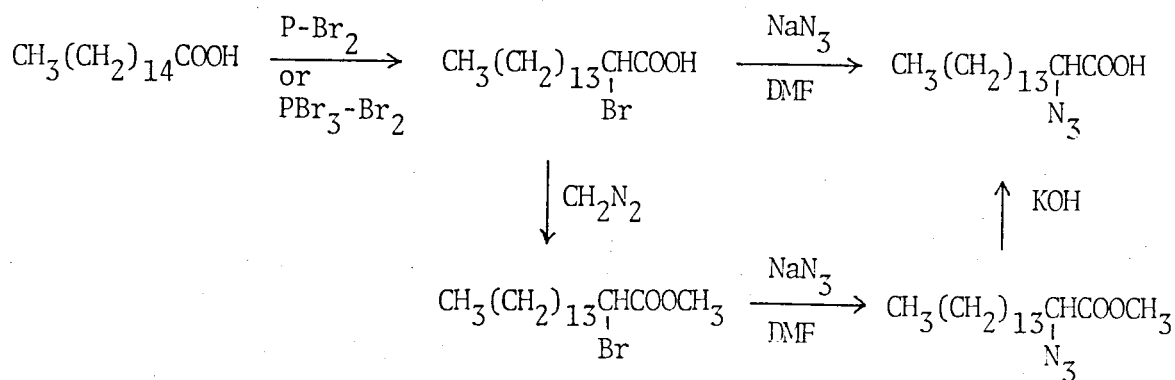


Fig. 5-3

α -ブロムパルミチン酸の合成は常法通り臭素化試薬として 赤リン-臭素を用いて行うことができた(赤リン-臭素の代わりに三臭化リン-臭素を用いると収率が良くなることが後にわかった)。生成した α -ブロムパルミチン酸を N,N -ジメチルホルムアミド中でアジ化ナトリウムと反応させたところ ほぼ定量的に反応は進行した。しかしこの方法では薄層クロマトグラフィー等でパルミチン酸、およびその α -ブロム誘導体、 α -アジド誘導体の3者の区別がつかず 精製、および純度の検定が困難であった。そこでこれらの反応生成物を各々対応するメチルエステルに変えて薄層クロマトグラフィーを行ったところ明確に分離することがわかった(ベンゼン- n -ヘキサン(1:2), R_f 値: パルミチン酸, 0.34 ; α -ブロム体, 0.59 ; α -アジド体, 0.44)。そこで臭素化により得られた α -ブロムパルミチン酸をジアザメタンによりメチルエステルにした後、 N,N -ジメチルホルムアミド中でアジ化ナトリウムと反応させたところ 室温で数分のうちに完全にアジド誘導体に変換されることがわかった。この反応生成物はシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより容易に精製することができたので、放射性同位体標識

化合物を用いる場合 非常に有利になった。精製したメチルエステルはケン化することにより純粋な遊離 α -アジドパルミチン酸に導くことができた。

次に[U- ^{14}C]パルミチン酸 ($1/\mu Ci$, $0.25\mu mol$) を用いて同様の反応を行った。非放射性パルミチン酸 ($2.3\mu mol$) を加え赤リン-臭素を用いて臭素化を行い、生成物をメチルエステルに変換後 シリカゲルカラムクロマトグラフィーによりブロム誘導体を精製した。このものとアジ化ブトリウムとの反応は室温で完全に進行し、シリカゲルカラムクロマトグラフィーにより *N,N*-ジメチルホルムアミドを除き、続いて水酸化カリウムによりケン化して α -アジド-[U- ^{14}C]パルミチン酸を得た。この生成物をシリカゲル薄層クロマトグラフィーを行った後(ベンゼン:酢酸エチル:酢酸 6:4:0.1), クロマトスキャナーにより放射活性を測定した結果単一の放射活性ピークを与えた (Fig. 5-4)。

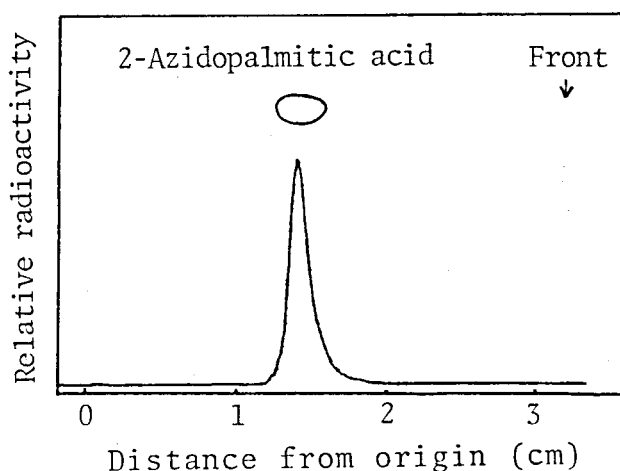


Fig. 5-4

以上の結果, 種々の脂肪酸を出発原料に用いてこの方法により任意の鎖長をもつ放射活性同位体標識 α -アジド脂肪酸が合成できることがわかったが, 本項の始めにも述べたように酪素と

の結合の特異性という観点からは α -置換よりも ω -置換のアジド脂肪酸の方がより望ましいと考えられたので次に後者の合成を検討した。

ω -アジド脂肪酸の合成の場合 まず問題となる点は合成の出発原料となり得る適当な放射活性同位体標識脂肪酸の誘導体が市販されていないことである。従って 合成途中で脂肪酸をなんらかの方法で放射活性同位体による標識を行わなければならない。通常簡便に行い得る標識方法は, 3H_2 ガスを用いた水素添加, $[^3H]$ 水素化ホウ素ナトリウムを用いた還元による方法などがあるが, 3H_2 ガスは取り扱いに注意を要するし, 微量

の化合物の際には触媒への吸着等が生じ不適当であると考えられるので、固型で比較的扱い易い $[^3\text{H}]$ 水素化ホウ素ナトリウムを用いる方針をとった。アジド基は水酸基から変換することが可能であるので放射性同位体で標識された ω -ヒドロキシ脂肪酸が合成できればよい (Fig. 5-5)。

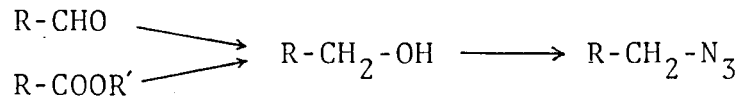


Fig. 5-5

従って適当な脂肪酸誘導体を $[^3\text{H}]$ 水素化ホウ素ナトリウムによって処理し、アルコールに還元すると同時に $[^3\text{H}]$ -標識を行って ω -ヒドロキシ脂肪酸を合成することとし、まず非放射性的の水素化ホウ素ナトリウムを用いて予備実験を行った。

最初にアルデヒドからアルコールへの変換反応を検討した。市販の ω -ヒドロキシパルミチン酸をメチルエステルに変えた後、コリンズ試薬によりアルデヒドに酸化した (Fig. 5-6)。これを水素化ホウ素ナト

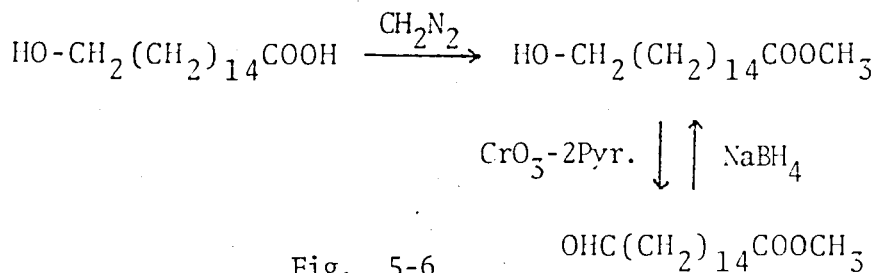


Fig. 5-6

リウムにより還元して再びアルコールに導くことができました。以上の予備実験における反応に $[^3\text{H}]$ 水素化ホウ素ナトリウムを用いることにより、 $[^3\text{H}]$ -標識の ω -ヒドロキシパルミチン酸メチルエステルを得ることができるとは。しかしながらここで用いたアルデヒドは保存中分解しやすい性質があること、他の鎖長の脂肪酸に適用しようとする場合に任意の鎖長の ω -ヒドロキシ脂肪酸は市販されていないことなどの不利な点、が予想されたので、次にカルボン酸誘導体からアルコールへの変換反応、すなわちジカルボン酸から ω -ヒドロキシカルボン酸への変換反応を検討した。

カルボン酸誘導体から直接アルコールへ導く場合には ^3H 原子は 2 原子導入することが可能であり、アルデヒドの還元の場合に比べると、比放射活性が 2 倍高い目的物が得られることになる (Fig. 5-7)。従って

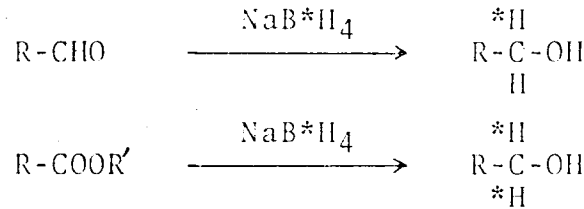


Fig. 5-7

この方法は比放射活性の高い化合物が得られることと、望む鎖長の原料ジカルボン酸が入手可能という点でより望ましい方法と考えられた。以下にジカルボン酸から ω -アジド脂肪酸の合成について述べる。通常遊離のカルボン酸は水素化ホウ素ナトリウムによって還元されず、アルキルエステルに変えてから還元を行う場合も加熱などの過激な条件を必要とする。カルボン酸を一たん酸塩化物、酸アジド、混合酸無水物 (酸無水物) 等に変えてから水素化ホウ素ナトリウムで還元する方法は知られているが いずれも中間体は不安定な化合物であり 保存に耐え得る化合物ではないという欠点を持つ。実際に Fig. 5-8 に示したようにモノ

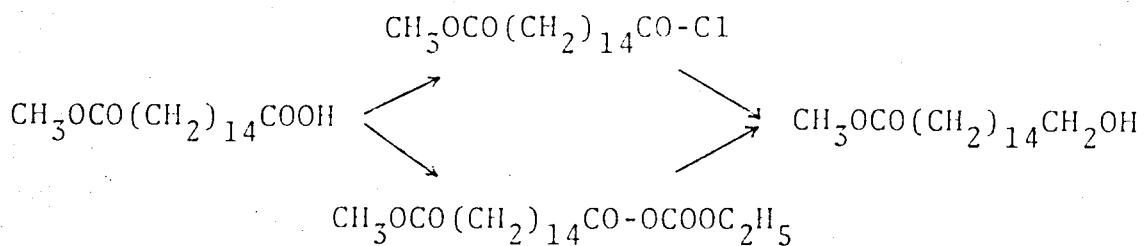


Fig. 5-8

メチルエステルを出発原料として 混合酸無水物法, 酸塩化物法を試みたが, 前者では副生成物を生じ, 後者では水素化ホウ素ナトリウムの添加と同時に激しい発泡がみられた。この発泡は水素化ホウ素ナトリウムの分解により水素が発生したことを示し, $[\text{H}]$ 水素化ホウ素ナトリウムを用いる時には $^3\text{H}_2$ ガスの放出という危険性が予想される。従ってこれ

らの方法はいずれも本研究の目的とする放射性同位体標識のための微量合成には不適當である。そこでこの目的に適したカルボン酸からアルコールへの新しい変換方法を検討した。その結果 *N*-ヒドロキシコハク酸イミド (HONSu) とのエステルが水素化ホウ素ナトリウムにより容易に還元されアルコールに変換されることを見出した (Fig. 5-9)。

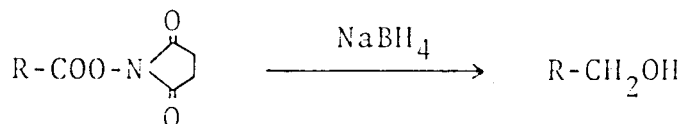
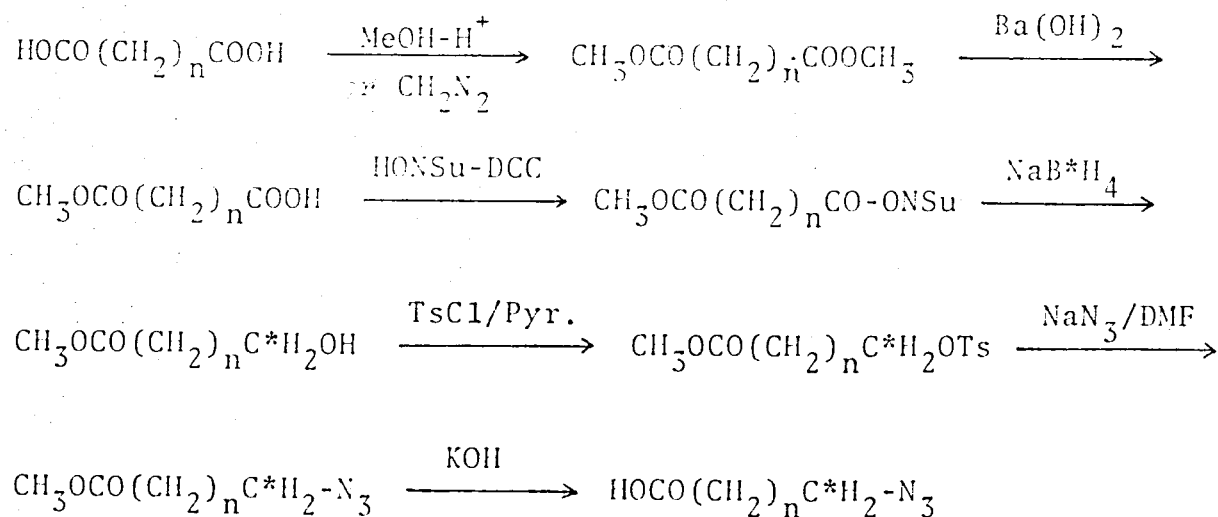


Fig. 5-9

コハク酸イミドエステルはペプチド合成の際しばしば用いられる活性エステルとして知られ、*N*-ヒドロキシコハク酸イミドとカルボン酸から、*N,N'*-ジシクロヘキシルカルボジイミドを用いて脱水することにより容易に得られる。そこでジカルボン酸を *N*-ヒドロキシコハク酸イミドとのエステルにし、これをテトラヒドロフラン中水素化ホウ素ナトリウムと処理して還元し、 ω -ヒドロキシ脂肪酸を得ることができた。すなわち Fig. 5-10 に示したように、まずジカルボン酸をジメチルエステルとした後、等量の水酸化バリウムを用いて半ケン化した後コハク酸イミドエステルに導いた。この活性エステルは安定で、再結晶やカラムクロ



$n=14, 16$

Fig. 5-10

マトグラフィーによる精製が可能であった。続いて水素化ホウ素ナトリウムによって還元してアルコールを得ることができ、後は常法通りピリジン中塩化 *p*-トルエンスルホンと作用させることにより水酸基を *p*-トルエンスルホン化後 *N,N*-ジメチルホルムアミド中アジ化ナトリウムを作用させアジド基に変換し、最後にメチルエステルをケン化して遊離 ω -アジドパルミチン酸 および ω -アジドステアリン酸を得ることができた。なおこの方法では目的のアジド脂肪酸メチルエステルが、シリカゲルカラムクロマトグラフィーにおいて他の全ての未反応化合物よりも先に溶出され精製することができるので微量の放射性同位体標識化合物を取り扱う上で大きな利点であると思われた。この方法を応用して、任意の長さのジカルボン酸を出発原料とし $[^3\text{H}]$ 水素化ホウ素ナトリウムを用いることによって希望する $[^3\text{H}]$ -標識 ω -アジド脂肪酸を得ることができた。実際に $[^3\text{H}]$ -標識 ω -アジドパルミチン酸および ω -ステアリン酸をこの方法により合成した。

5-2 $[^3\text{H}]$ -標識 ω -アジド脂肪酸の合成

$[^3\text{H}]$ -標識 ω -アジド脂肪酸の合成に比放射活性 $555 \text{ mCi} / \text{mmol}$ の $[^3\text{H}]$ 水素化ホウ素ナトリウムを用いた。これは固型であるが微量であるため秤量せずに、市販のアンプル入り 25 mCi の約 4 分の 1 量を使用した。以後の操作にはできる限り容器の移し変えを避けるために、反応抽出、水洗には磁石による攪拌を使用し、抽出溶媒に CH_2Cl_2 を用いて、上層にくる水層をピペットで除いて水洗等を行った。また乾燥にはエタノール、ベンゼンによる共沸を利用した。

試験管に $[^3\text{H}]$ 水素化ホウ素ナトリウムを取り、大過剰の脂肪酸コハク酸イミドエステル誘導体とテトラヒドロフラン中で反応させた。 $[^3\text{H}]$ 水素化ホウ素ナトリウムに対し活性エステルを過剰に用いて放射性同位体を有効に利用するとともに後処理の段階で未反応の $[^3\text{H}]$ 水素化ホウ素ナトリウムから生じると考えられる $^3\text{H}_2$ ガスの発生を防ぐようにした。さらに $[^3\text{H}]$ 水素化ホウ素ナトリウムを完全に除くために後処理の直前

にグリオキザール(40%水溶液)を加えた。以下 Fig 5-10 に示した方法と同様 還元により得られた ω -ヒドロキシ誘導体を精製することなく *p*-トルエンスルホン誘導体に変換後 続いて *N,N*-ジメチルホルムアミド中アジ化ナトリウムにより ω -アジド誘導体とした。この段階でシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製した。ベンゼン-酢酸エチル(100:1)で溶出し放射活性の高い画分を集めて、最後に水酸化カリウムでケン化することにより $[^3\text{H}]$ -標識 ω -アジドパルミチン酸、および-ステアリン酸を得た。このようにして得た目的物は薄層クロマトグラフィー(クロロホルム:メタノール:酢酸 50:1:0.1)上で標品と比較することにより確認した(Fig. 5-11, 5-12)。

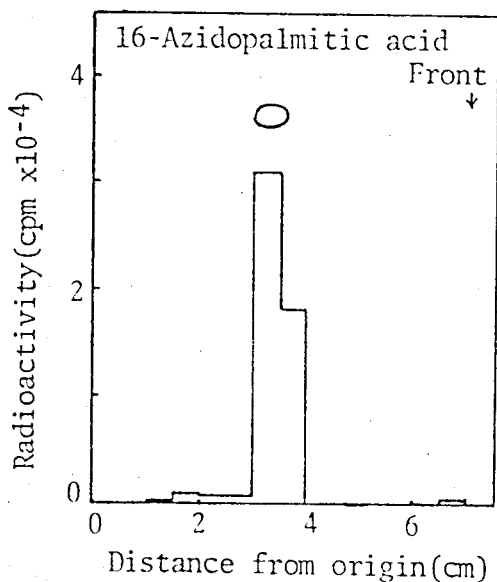


Fig. 5-11

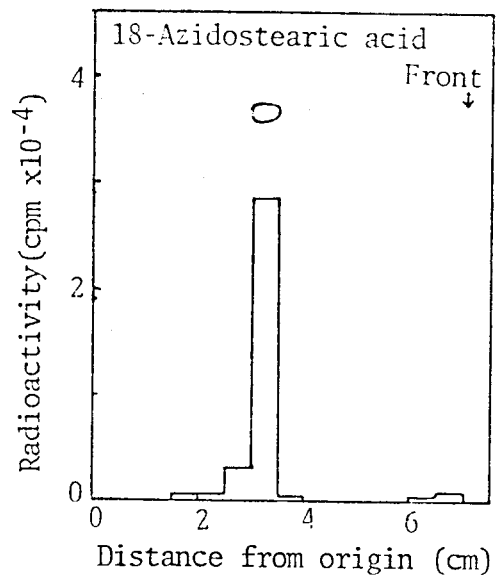


Fig. 5-12

このようにして合成した標識アジド脂肪酸と CoA とを縮合して ω -アジド- $[^3\text{H}]$ 脂肪酸-CoA を得るには 第3章の場合と同様に混合酸無水物法を用いた。すなわち ω -アジド- $[^3\text{H}]$ パルミチン酸をテトラヒドロフラン中 -20°C でトリエチルアミン存在下クロル炭酸エチルと反応させ混合酸無水物とした後 過剰の CoA と反応させ、生成物は過塩素酸の添加により沈澱として精製した。このようにして得た精製物はシリカゲル薄層クロマトグラフィー(メタノール:酢酸:水 5:2:3)により標品と比較することによって確認した(Fig 5-13)。

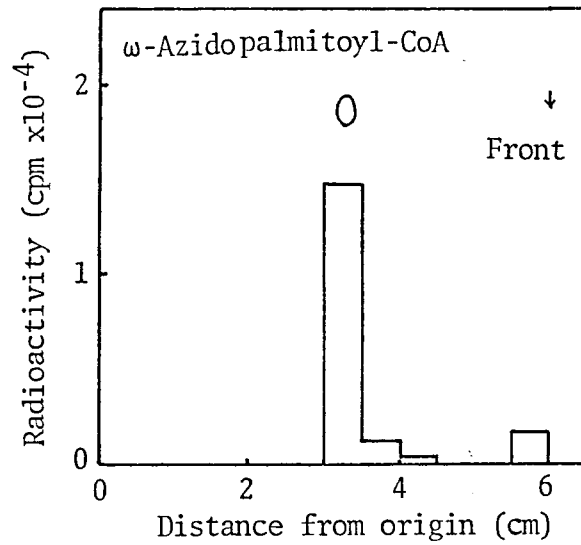


Fig. 5-13

5-3 ω-アジドパルミチン酸メチルエステルの光反応

先に述べたように、アジド基は紫外線照射により分解され N_2 ガスを放出してナイトレニを生成し、これから種々の化学反応を生じる。この光化学反応を ω-アジドパルミチン酸メチルエステルを用いて検討した。まずアジド基の光照射による分解の経時変化を調べた (Fig. 5-14)。ω-アジドパルミチン酸メチルエステルをシクロヘキサンの溶液 (1mg

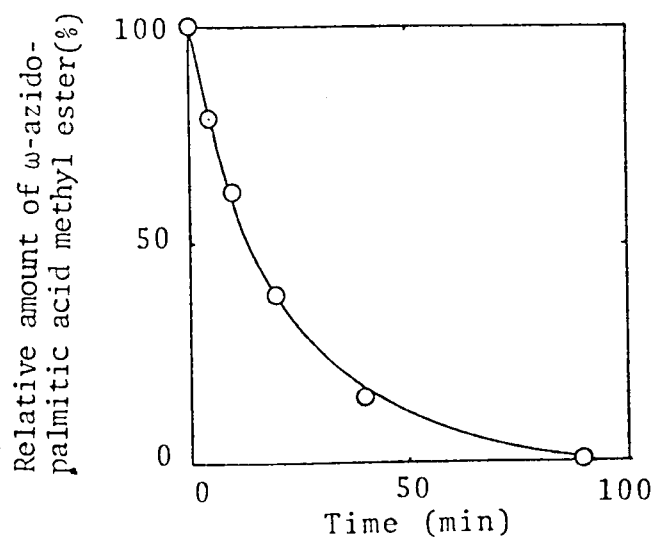
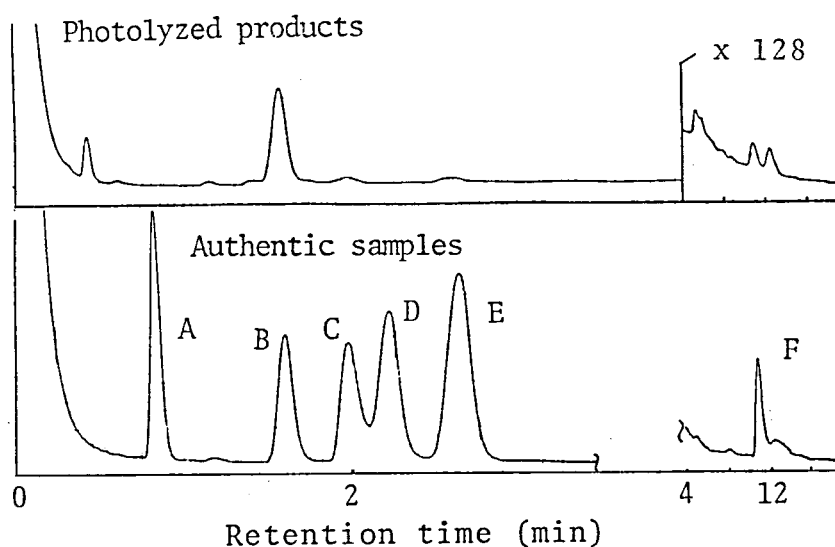


Fig. 5-14

/ml), 100 Wの高圧水銀燈(パイレックスフィルター使用)を用いて光照射を行い, 一定時間後に残存する ω -アジドパルミチン酸メチルエステルをガスクロマトグラフィー(カラム, OV-1, 1m; 検出は水素炎法)により定量した。その結果 Fig. 5-14 に示すように半減期の約14分であった。次にこの光反応の生成物を同じくガスクロマトグラフィーにより調べたところ, 主生成物は ω -オキソパルミチン酸メチルエステルつまりアジド基がアルデヒド基に変化したものであった(Fig. 5-15)。このアルデヒド体はナイトレニの転移反応の結果生じたものである(Fig. 5-16)。一般にアルキルナイトレニは分子内, 分子間の挿



- A, Palmitic acid methyl ester
- B, ω -Oxopalmitic acid methyl ester
- C, ω -Hydroxypalmitic acid methyl ester
- D, Hexadecanedioic acid dimethyl ester
- E, ω -Azidopalmitic acid methyl ester
- F, ω -Cyclohexylaminopalmitic acid methyl ester

Fig. 5-15

入反応の他に, 1,2-水素転移が生じその結果生成したイミンが加水分解を受けるとアルデヒドとアンモニアを生じる。ここで得られた ω -オキソパルミチン酸メチルエステルも同様の経路を経て生成したものと考えられる。なおこのアルデヒド体は水素化ホウ素ナトリウムにより還元す

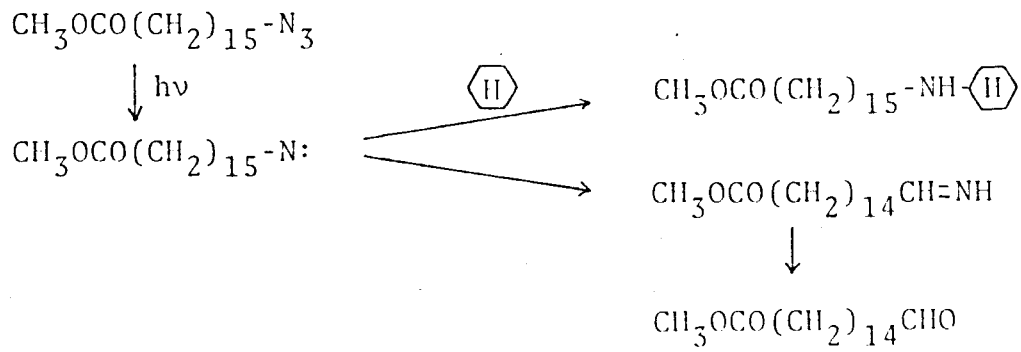


Fig. 5-16

ると ω-ヒドロキシパルミチン酸が生成したことのみならずその構造が確認された。このように ω-アジドパルミチン酸メチルエステルの光反応生成物は転移反応生成物が主ではあったが、その他に構造不明の生成物と共に ナイトレンが溶媒のシクロヘキサノールと挿入反応を生じた結果生成した ω-シクロヘキシルアミノパルミチン酸メチルエステルが検出された (Fig. 5-15)。標品の ω-シクロヘキシルアミノパルミチン酸メチルエステルは Fig. 5-17 に示した経路により合成した。

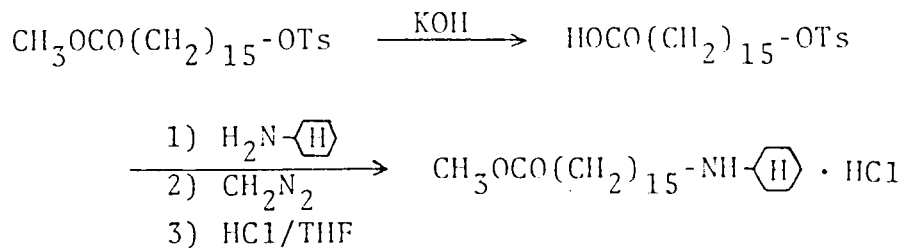


Fig. 5-17

以上の様に ω-アジドパルミチン酸誘導体のアジド基が紫外線照射によりナイトレンを生じることがわかり、このナイトレンが分子内転移反応と競争的ではあるが分子間での挿入反応 (上の例では溶媒との反応) が起こることがわかったので、次に蛋白分子の ω-アジド脂肪酸誘導体による光アフィニティラベリングを検討した。

5-4 血清アルブミンの光アフィニティラベリング

血清アルブミンは血液中でいろいろ作用をしていると考えられてい

3がその最も重要な働きは長鎖脂肪酸の運搬である²²⁾。これまでの研究によって種々の脂肪酸との結合定数や結合部位の数等が測定されており、この血清アルブミンは長鎖脂肪酸と強い親和性を持つことが明らかにされている。そこでまず ω -アジド-[³H]パルミチン酸を用いて、この血清アルブミンの光アフィニティラベリングを検討した。

5 mM リン酸カリウム緩衝液中、ウシ血清アルブミンと13倍当量の ω -アジド-[³H]パルミチン酸とを室温で10分間、高圧水銀燈を用いて光照射を行った(パイレックスフィルター使用)。この反応物を常法通り前処理した後、ラウリル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った(8%ゲル)。蛋白質を染色した後(コマジューブリアントブルーを用いて染色)、ゲルを5 mm幅に切り各放射活性を測定した。その結果、Fig. 5-18に示したように血清アルブミンと ω -アジド-

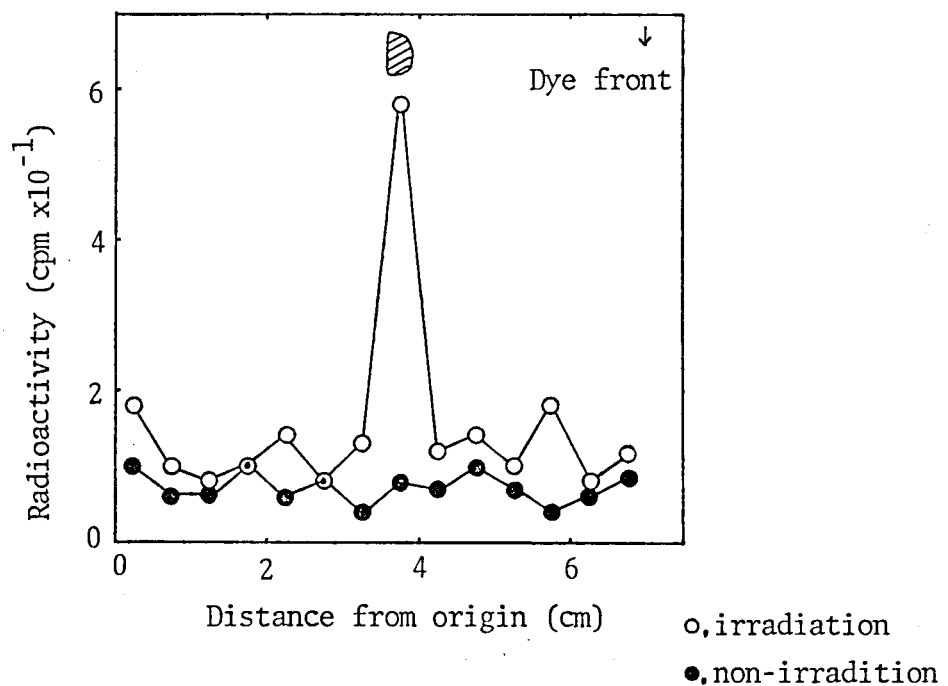


Fig. 5-18

[³H]パルミチン酸とを一緒に光照射した場合には蛋白質のバンドと同じ位置に放射活性が観測されたのに対し、光照射を行わなかった場合には全く放射活性が観測されなかった。また ω -アジド-[³H]パルミチン酸のみを同様の条件で光照射した後、血清アルブミンと混合しゲル電気泳動を行った場合にもやはり蛋白質の位置に放射活性は認められなかった。以

上の結果より、 ω -アジド-[^3H]パルミチン酸が光反応の結果蛋白質と反応し、結合していることが確認された。そこで次に アセチル-CoA カルボキシラーゼの光アフィニティラベリングを検討した。

5-5 アセチル-CoA カルボキシラーゼの光アフィニティラベリング

第3章で述べたように、アセチル-CoA カルボキシラーゼは長鎖脂肪酸-CoAによりその活性は顕著に阻害され、その阻害定数はきわめて低い。そこで光アフィニティラベリングを行うための標識化合物として今回合成した 脂肪酸部にアジド基を有する ω -アジドパルミトイル-CoAのアセチル-CoA カルボキシラーゼに対する阻害定数を非放射性化合物を用いて測定した。その結果、阻害定数は約 6 nMとなり、この ω -アジドパルミトイル-CoAと同程度に本酵素を強く阻害し、アジド基を導入したことによる阻害効果の低下はみられなかった。そこでこの ω -アジドパルミトイル-CoAの [^3H]標識化合物を用いて アセチル-CoA カルボキシラーゼの光アフィニティラベリングを検討した。

まず始めにアセチル-CoA カルボキシラーゼに対する紫外線の影響を調べた。その結果本酵素は光照射により非常に失活し易いことがわかった。パイレッツフスフィルターを通して光照射を行ってもその酵素活性はすみやかに低下し (Fig. 5-19)

そのみならず本酵素蛋白質は光照射により変性を受け高分子重合体になることがゲル電気泳動の結果確認された。そこでさらに長波長の紫外線まで遮断するために、フタル酸モノカリウム塩フィルター (2%水溶液, Fig. 5-20) を用いたところ失活は完全に防ぐ

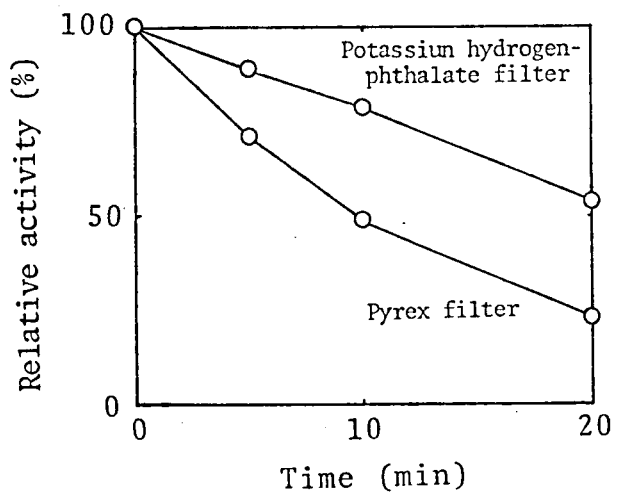


Fig. 5-19

ことはできなかつたが (Fig. 5-19), 蛋白の変性はかなりおこされた。そこで次に 50 mM のリン酸カリウム緩衝液 (pH 7.5) 中で, アセチル CoA カルボキシラーゼと 50 当量の ω -アジド-[H]パルミトイル-CoA とを室温で 30 分間高圧水銀燈を用いて光照射したところ (2% フタル酸モノカルシウム磁フィルター使用), Fig. 5-21 に示すように 血清アルブ

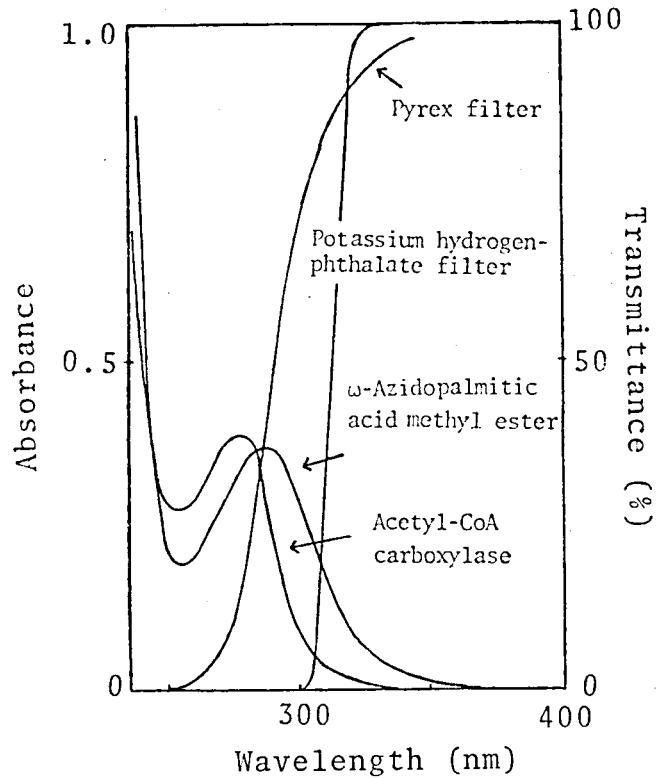


Fig. 5-20

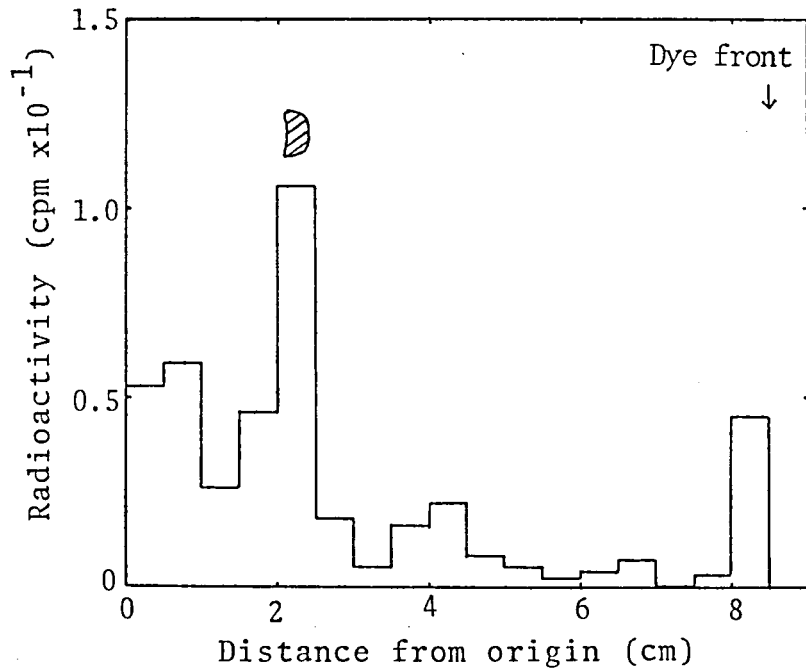


Fig. 5-21

ミンの場合と同様にしてポリアクリルアミドゲル電気泳動で調べた結果蛋白質のバンドと同じ位置に放射活性が観測された。光照射条件を変え

て同様の実験を行い、ゲル電気泳動後 蛋白質のバンドの部分を取り取り、その部分に存在する放射活性を測定した。その結果 Table 5-1に

Table 5-1 Incorporation of ω -azido- $^{3}\text{H}_2$ palmitoyl-CoA into acetyl-CoA carboxylase

Conditions	Radioactivity* (cpm)
Irradiation (30 min)	221
Non-irradiation	5
Pre-irradiation (30 min)	84

*The mean of two experiments

示したように 光照射によりアセチル-CoA カルボキシラーゼ蛋白質に放射活性の取り込みがみられるのに対し 光を照射しない場合には全く放射活性がみられなかった。さらに ω -アジド- ^{3}H パルミトイル-CoA のみを予め光照射した後酵素蛋白と混合した場合放射活性は認められたがその値は小さく 非特異的な取り込みあるいは光照射による副生成物に由来するものではないかと考えられる。従って以上の結果から、 ω -アジド- ^{3}H パルミトイル-CoA は光反応の結果酵素蛋白と結合することがわかった。なお酵素蛋白質に対し ω -アジド- ^{3}H パルミトイル-CoA が 25 当量以下では明確な放射活性の取り込みは観測されず、また塩化ナトリウムや塩化マグネシウムの添加(一般に疎水性親和力は塩濃度が高くなるに従って強くなる)による効果は現在のところ認められていない。

以上のようにまだまだ検討すべき点は残されているが、アジド脂肪酸誘導体が光アフィニティラベリングの試薬として用いることが可能であることがわかったので、今後さらにこの方法を発展させることにより蛋白質分子中の結合部位の解明等に役立てることができると考える。これまでのところ アルキルアジド誘導体を用いた酵素蛋白質の光アフィニティラベリングは例がほとんどなく、Khorana や Stoffelらにより種々の試みが行われているが、アフィニティラベリングの手法そのものがまだまだ未開拓の分野であるため問題点も多い。特に最近 Khoranaら

によりアジド脂肪酸を含むリン脂質を用いた光アフィニティラベリングの場合に関してアジド誘導体はラベリングの試薬として適当ではないという否定的な結果を出している²¹⁾。しかしながら本研究において、アジド脂肪酸誘導体による光アフィニティラベリングが十分使用可能であることを示すことができ、放射性同位体標識アジド脂肪酸の簡便な合成法ともあわせて今後この方法の発展が期待される。

第6章 アセチル-CoA カルボキシラーゼに対する メチルパラコン酸誘導体の効果

第1章で述べたように クエン酸はアセチル-CoA カルボキシラーゼの活性調節因子であって 本酵素を活性型のポリマーにする作用を有する。同様の作用はイソクエン酸, ヒドロキシクエン酸にも認められるがトリカルバリリン酸にはこの作用はない (Fig. 6-1)。ところがイソクエン酸の類似化合物であって, その化学合成前駆体として知られトリクロロメチルパラコン酸およびそのラクトン環が開いたトリクロロメチルイタマル酸は逆に本酵素の活性を阻害することが田辺らによって見出された²⁴⁾。しかしながら現段階ではこのことはまだ確定的ではなかつたので これらのクエン酸誘導体の構造と酵素阻害作用の関係を明らかにする目的で, 新たにトリクロロメチルパラコン酸およびイタマル酸誘導体を合成し, それらの構造確認を行い, さらに 塩素原子を水素原子に置換したメチルパラコン酸およびメチルイタマル酸も合成して, アセチル-CoA カルボキシラーゼに対する効果を調べた。

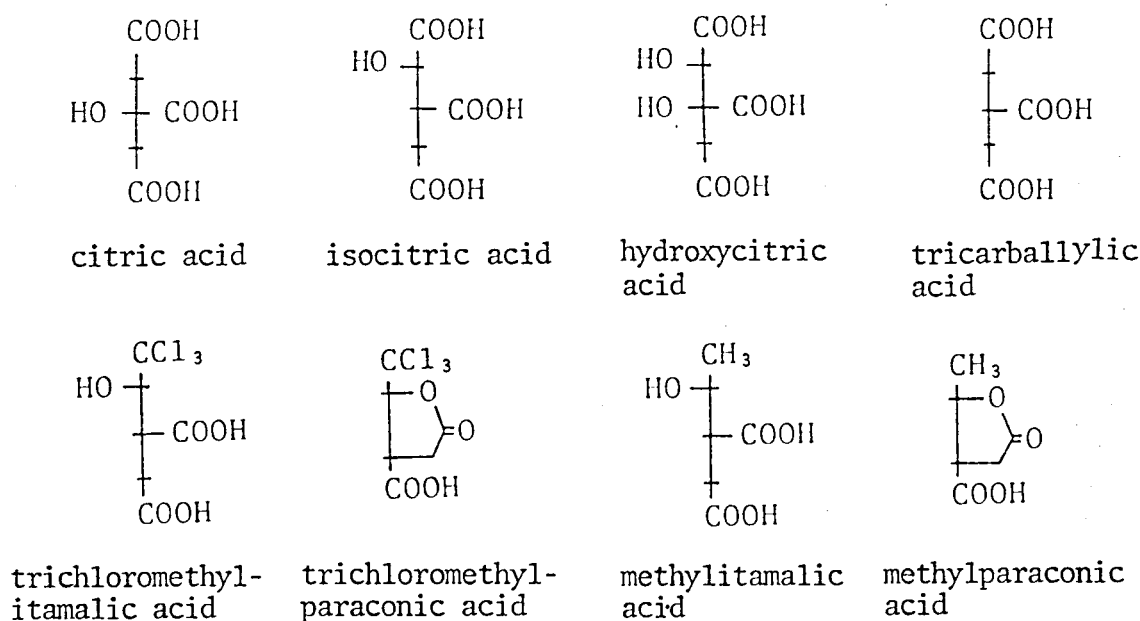


Fig. 6-1

6-1 メチルパラコニ酸誘導体の合成

まずトリクロロメチルパラコニ酸の合成は Vickery²⁵⁾の方法に従って行った (Fig. 6-2)。文献ではこのもののトリクロロメチル基をアルカ

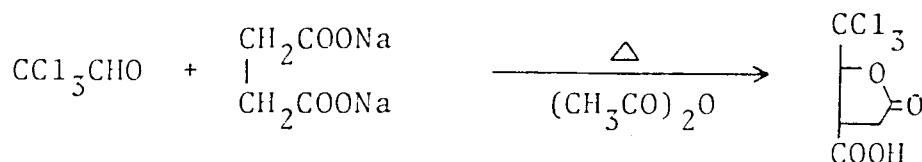


Fig. 6-2

リで加水分解しカルボン酸にすることによりイソクエン酸とアロイソクエン酸を得ているが、このトリクロロメチルパラコニ酸そのものの立体配置は決定されていない。そこでまずこの化合物の立体構造の決定を行った。今回得られたトリクロロメチルパラコニ酸は融点、95-95.5℃の結晶であること、そのメチルエステルはガスクロマトグラフィーで単一のピークを与えること、およびアミン塩として単離後再び遊離カルボン酸に戻しても NMR 等に差が認められないことからこの生成物はシスあるいはトランスいずれか一方の異性体のみであってそれらの混合物ではないと考えられた。この立体配置を決めるために化学変換により立体配置既知の化合物に導くことはできなかつたが NMR の解析からラクトン環中の2つのメチンプロトン間のカップリング定数が 4 Hz と小さいことからその構造はトランスの立体配置であると考えられる (一般に5員環化合物においてトランス配置の隣接するプロトン間のカップリング定数はシス配置のものに比べて小さく 7 Hz 以下である。しかしながらβ-ラクトンの場合、例外もみられるためさらに検討が必要である。) 合成したトリクロロメチルパラコニ酸を2等量の水酸化ナトリウムによりケン化し、ラクトン環を開いてトリクロロメチルイタマル酸ジナトリウム塩を得た (赤外吸収スペクトルにおいてラクトンに由来する吸収がなくなりカルボキシレートによる吸収が観測された)。

次にトリクロロメチルパラコニ酸の塩素原子が水素に置き換ったメチルパラコニ酸の合成を行った。メチルパラコニ酸のエチルエステルの合成は福西²⁶⁾によって報告されておりその方法に従った (Fig. 6-3)。

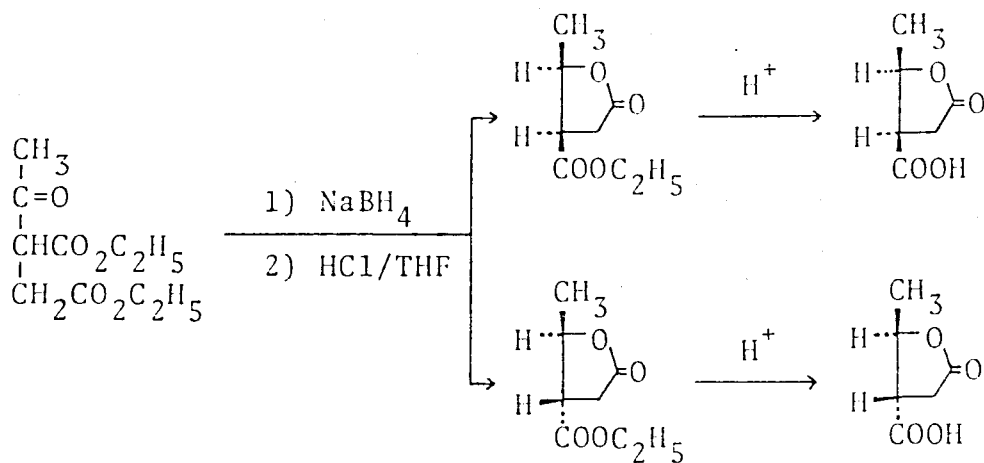
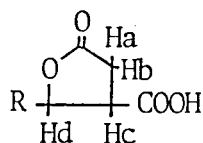


Fig. 6-3

アセチルコハク酸ジエチルエステルを水素化ホウ素ナトリウムで還元した後塩酸処理によりメチルパラコン酸エチルエステルを得た（水素化ホウ素ナトリウムによる還元の際に一部ラクトン体が生成した）。文献ではこのエチルエステルのシス体とトランス体の分離はガスクロマトグラフィーによって行っているが、今回シリカゲルカラムクロマトグラフィーを用いて両者を容易に分離することができた。分離したシスおよびトランスのエチルエステルを 6M 塩酸-ジオキサン (1:1) 中で加水分解することによりそれぞれ対応するシスおよびトランス-メチルパラコン酸を得ることができた。エチルエステルのシスおよびトランスの立体配置の決定は次の根拠に基づいて行われている。まず第一に β -ラクトン環においてカルボキシル基またはアルコキシカルボニル基とシスの配置にある水素あるいはメチル基の水素はトランスの配置にあるものに比べてその NMR の化学シフト値は高磁場へ移動することが知られている。メチルパラコン酸エチルエステルもこのことからシスおよびトランスの立体配置が決定されており、また今回新たに合成することができた遊離のメチルパラコン酸も上の事実を支持している (Table 6-1)。さらに立体配置既知のイソクエン酸ラクトン (シス体) とアロイソクエン酸ラクトン (トランス体) の化学シフト値を比較した結果からも確認された。次に Cram の法則 (一つの不斉中心の隣に新しく不斉中心が導入された場合、生成する異性体の比は置換基の立体障害の大きさにより支配され

Table 6-1 Chemical shifts of γ -lactone derivatives in d_6 -DMSO (δ value)



R		Ha, Hb	Hc	Hd	$J_{Hc, Hd}$
HOCO-	cis	2.75	3.73	5.11	8 Hz
	trans	2.73	3.47	5.08	7 Hz
CH ₃ -	cis	2.69 2.71	3.83	4.86	7 Hz
	trans	2.75 2.76	3.08	4.64	6 Hz
CCl ₃ -	trans	3.07	3.68	5.34	4 Hz
		3.11			

る)からは、水素化ホウ素ナトリウムによる還元生成物はステオ体か優先し、従ってシス-メチルパラコニ酸エチルエステルが主生成物であることが予測される。最後に一般にガスクロマトグラフィ-等においてアルキシルカルボニル基に対しトランスの位置に置換基が存在する場合はシスのもの比べて早く溶出されることが知られている。メチルパラコニ酸誘導体の場合もガスクロマトグラフィ-およびシリカゲルカラムクロマトグラフィ-においてトランス体がシス体よりも早く溶出された。以上の事実に加えてさらにNMR解析の結果から、隣接する2つのメチンプロトン間のカップリング定数はいずれの場合もシスのものよりトランスのものの方が小さいことからこれらの構造が支持された。このようにして得たシスおよびトランス-メチルパラコニ酸を2等量の水酸化ナトリウムでケン化しラクトン環を開いてそれぞれ対応するステオおよびエリスロ-メチルイタマル酸ジナトリウム塩を得た(赤外吸収により確認した)。

6-2 アセチル-CoA カルボキシラーゼに対する
メチルパラコン酸誘導体の効果

合成したトランス-トリクロロメチルパラコン酸を等量の炭酸水素カリウムで中和したもの、およびスレオ-トリクロロメチルイタマル酸ジナトリウム塩を用いて アセチル-CoA カルボキシラーゼに対する阻害効果を調べた。その結果両者に顕著な阻害効果が観測された。また、ラクトン型のトランス-トリクロロメチルパラコン酸よりも開環したスレオ-トリクロロメチルイタマル酸の方が若干その阻害の程度が強くと、Fig. 6-4, 6-5に示したように各々の阻害定数(K_i)は 0.9 mM, および 5 mM と求められた。さらに両者は共にクエン酸に対し拮抗的に作用することがわかり このことからクエン酸が本酵素を活性化のポリマーにするのを妨げることにより阻害するという機構が考えられる。

次に シスおよびトランス-メチルパラコン酸を等モルの炭酸水素カリウムで中和したもの およびスレオ, エリスロ-メチルイタマル酸の

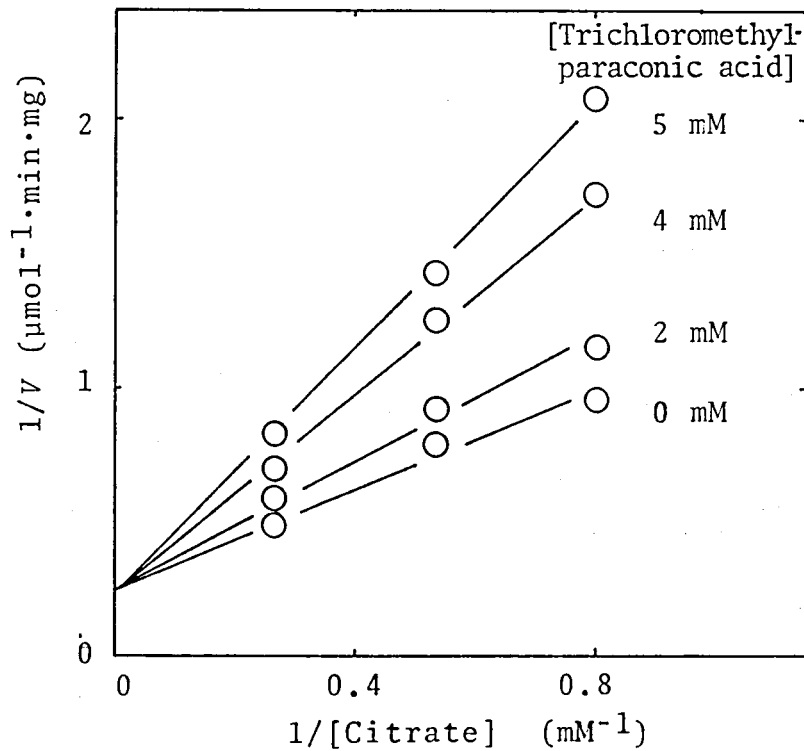


Fig. 6-4

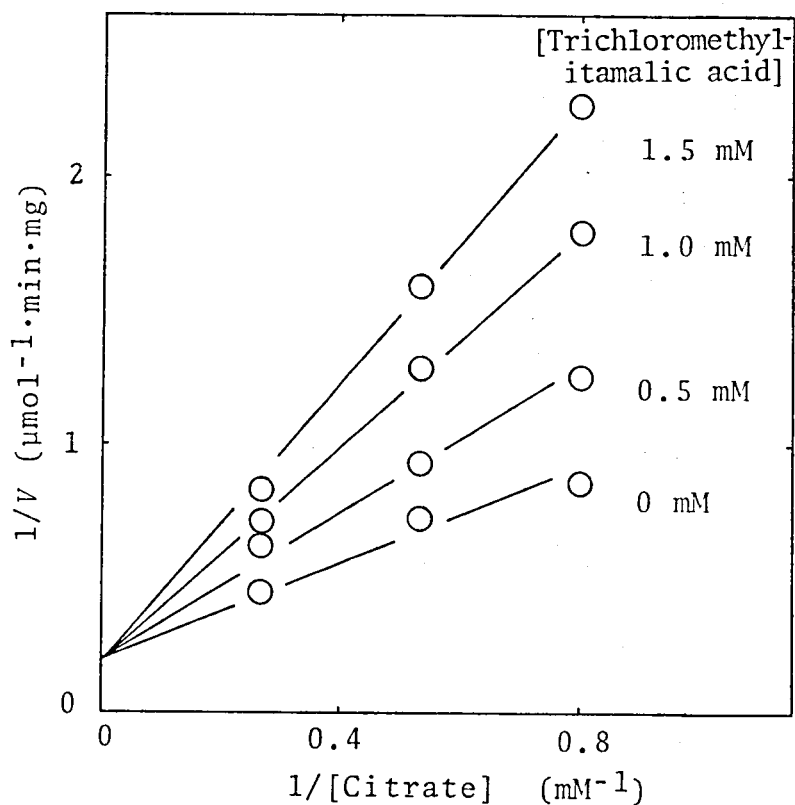


Fig. 6-5

アセチル-CoA カルボキシラーゼに対する効果を調べた。その結果、これら4種の化合物はいずれもアセチル-CoA カルボキシラーゼに対して活性化作用が認められないうばかりでなく(4種の化合物共に2mMの添加によっても酵素活性が観測されなかった), 阻害作用についても、1.25 mMのクエン酸に対し各化合物を5 mM加えても顕微的な阻害効果は認められなかった。

以上の結果から、トランス-トリクロロメチルパラコン酸 およびシス-トリクロロメチルイタマル酸のアセチル-CoA カルボキシラーゼに対する阻害作用はそのトリクロロメチル基の電子的あるいは立体的影響に基因するものであると考えられる。

第7章 コハフ酸イミドエステルの還元によるアルコールの合成反応

水素化ホウ素ナトリウム (NaBH_4) は水素化アルミニウムリチウム (LiAlH_4) やジボラン (B_2H_6) などと比べると安価で取り扱いが容易なため、一般に有機合成反応において多用される還元試薬である。また、カルボン酸からアルコールへの変換反応は合成反応の際にしばしば要求される反応であるが NaBH_4 の還元力は LiAlH_4 などと比べて弱い。そのため通常の条件下ではカルボン酸あるいはアルキルエステルを直接還元することはできない。 NaBH_4 を用いてカルボン酸の還元を行うためには、ルイス酸の添加によって二次的に生成するジボランその他のより活性な化学種を用いることが²⁷⁾、あるいは高い反応温度等を必要とする²⁸⁾。一方、酸塩化物は NaBH_4 により容易にアルコールへ還元されることはよく知られているが²⁹⁾、その調製法に制限があり(酸に対し不安定な官能基を有する化合物には適用できない) また安定性にも欠ける。同様に混合酸無水物法^{30,31)}、酸アジド^{31,32)}も NaBH_4 によって還元されアルコールを生成するが (Fig. 7-1), どちらもきわめて不安定で長期保存ができない(酸アジドは保存中 Curtius 転位を起こす)。既に5章で述べたように本研究で新たに見出した *N*-ヒドロキシコハフ酸イミド (HONSu) とのエステルの NaBH_4 による還元法は、合成上または中間体の取扱いをきわめて簡単で容易であり、一般的にカルボン酸からアルコールへの変換方法として有用であろうと考え、この方法をいくつかのカルボン酸誘導体に適用したのでその結果について以下に述べる。

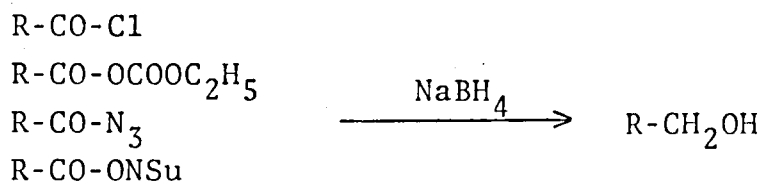


Fig. 7-1

コハク酸イミド (NSu) エステルはペプチド合成によく用いられる活性エステルであって、カルボン酸に HONSu と *N,N'*-ジシクロヘキシルカルボジイミドを中性の穏和な条件下で作用させて容易に合成される。またこの NSu エステルは安定な化合物で長期保存も可能である。この活性エステルをテトラヒドロフラン中室温で約 2.5 倍量の NaBH₄ を用いて還元すると対応するアルコールが得られた。この方法を長鎖脂肪酸やアミノ酸の還元に応用した結果を Table 7-1 にまとめた。生成物は、元素分析、NMR 等により確認した。溶媒としてアルコールの使用は、エステル交換が生じるのでよくないが *N,N*-ジメチルホルムアミドは用いることができる。反応温度は 0°C でも反応は進行するが室温の方が早く反応が進む。ただしアスパラギン酸誘導体では分子内のラクトン化や *N,O*-アシル転位が生じ^{*}、温度を低くして反応を行う必要があったがなおかつ収率は低かった。本法によるアミノ酸の α -カルボキシル基の還元の際にラセミ化を生じていないということはフェニルアラニン誘導体の場合について確認した。すなわち室温で還元して得た *N*-ベンジルオキシカルボニルフェニルアラニノールの保護基を、パラジウム(黒)を用いて接触還元により除去して得たフェニルアラニノールは、融点、旋光度とともに文献値²⁸⁾ とよい一致を示し、さらに光学純度を検定するために生成フェニルアラニノールを精製することなく *N*-ベンジルオキシカルボニルフェニルアラニンと縮合させ、生成したジアステレオアイソ

* コハク酸イミドエステル 1 を還元して得られたホモセリン誘導体 2 を、含水トリフルオロ酢酸中に放置すると *N,O*-アシル転移生成物であるホモセリンラクトン誘導体 3 が HPLC により確認された。従ってペプチド中のアスパラギン酸残基をこの方法により還元しホモセリン残基に変換した後、*N,O*-アシル転移を行わせることにより選択的なペプチド結合開裂の可能性が考えられる。

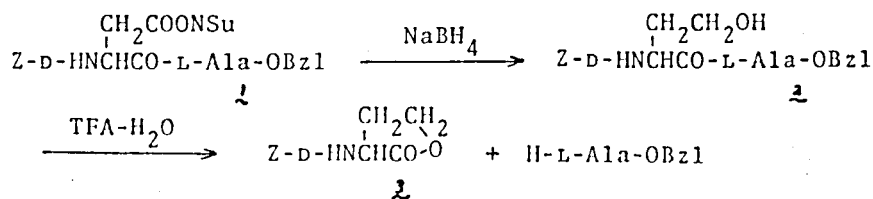


Table 7-1 Reduction of carboxylic acid 1-succinimidyl esters with sodium borohydride in tetrahydrofuran

Ester	Product		
	Temp	Time(h)	Yield(%)
Z-L-Phe-ONSu	r.t.	1	83
Z-L-Leu-ONSu	r.t.	3.5	79
Z-L-Lys(Boc)-ONSu	r.t.	2	98
Boc-L-Ile-ONSu	r.t.	25	93
Boc-D-Asp(ONSu)-OBzl	0°C	6.5	50
Z-D-Asp(ONSu)-L-Ala-OBzl	0°C	2	47
CH ₃ (CH ₂) ₁₄ COONSu	r.t.	5	74
CH ₃ OCO(CH ₂) ₁₄ COONSu	r.t.	1.5	75
CH ₃ OCO(CH ₂) ₁₆ COONSu	r.t.	1.5	70

マー (Fig. 7-2) を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により検出した。その結果一方のアイソマーのみが検出されたことより、本法によるアミノ酸の還元の際にはラセミ化は生じていないことが結論された。

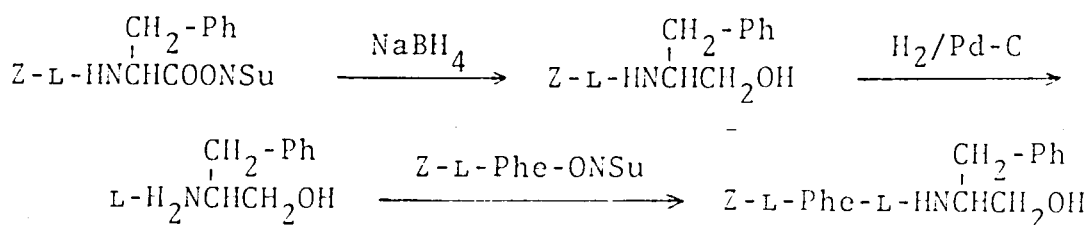


Fig. 7-2

以上のように 本法によるカルボン酸の還元は穏和な条件下で反応が進行するという利点の他に、官能基の多い化合物におけるカルボキシル基の選択的還元反応に利用できる特徴を持っている。

第8章 実験の部

融点は全て補正していない。

各種の物理化学的性質の測定には以下の機器を使用した。

Eppendorf photometer 4412

Hitachi Amino Acid Analyzer KLA-5

Hitachi 124 Spectrophotometer

JASCO Model IR-5 Infrared Spectrophotometer

Perkin-Elmer 141 Polarimeter

Shimazu Gas Chromatograph GC-4CM PF

Varian T-60 NMR Spectrometer

Varian XL-100-15 NMR Spectrometer

Yanaco Liquid Chromatograph Model L-2000

薄層クロマトグラフィーは Merck シリカゲル GF₂₅₄ を、カラムクロマトグラフィーは Merck シリカゲル 60 (0.063~0.200 mm) を用いて行った。ラウリル硫酸ナトリウム (SDS) - ポリアクリルアミドゲル電気泳動は 6% のゲル (厚さ 1mm) を使い、グリシン-トリス塩基 SDS (1.44%, 0.3%, 0.1%) の緩衝液を用いて行った。マーカーストとしてプロモフェノールブルーを用いた。放射活性の測定は、トルエン-トリイトン X 100 のシンチレーション溶液を用いて測定した。光化学反応は、Fuji HL-100 紫外線ランプを用いて行った。

8-1 第2章に関する実験の部

ラット肝アセチル-CoA カルボキシラーゼの精製

本酵素の精製は橋本らの方法に従って行った。最終段階のゲル透過以外はすべて0-4°Cで操作を行った。緩衝液は全て5 mM β -メルカプトエタノールと1 mM エチレンジアミン四酢酸を含むpH 7.5のものを使用した。

体重250~300 gのラット30匹を2日間絶食後、高炭水化物食を2日間摂取させた後肝臓を集めた(340g)。2倍量の0.25 M 蔗糖水とともにテフロン-ガラスホモジナイザーで処理した後、13000×g、45分間遠心分離して得られた上澄みを集めた。さらに100000×g、60分間遠心分離して上澄みを集め粗抽出液とした(全量590 ml)。粗抽出液に固型硫酸アンモニウムを加え30%飽和(176 g/l)にした。pHを5 M水酸化カリウムで7.5に保ち20分間攪拌した後16000×g、20分間遠心分離した。得られた沈澱を10 mM リン酸カリウム緩衝液300 mlに溶かしこれを第一硫酸アンモニウム分画とした。第一硫酸アンモニウム分画に蛋白質の1.8倍量のリン酸カルシウムゲル(13 mg/ml, 170 ml)を加え20分間攪拌後、1000×g、5分間遠心分離した。上澄みを除き、ゲルを33 mM リン酸カリウム緩衝液170 mlで洗い、1000×g、5分間遠心分離した後上澄みを除いた。同じ操作をさらに2回くり返した後0.2 M リン酸カリウム緩衝液170 mlを用いてゲルから蛋白を溶出させた。もう一度同じ操作をくり返し最後に16000×g、20分間遠心分離を行った。溶出液を合わせて、固型硫酸アンモニウムを加え30%飽和にした。pHを7.5に保ち、20分間攪拌後16000×g、20分間遠心分離した。得られた沈澱を10 mM リン酸カリウム緩衝液20 mlに溶かしこれを第二硫酸アンモニウム分画とした。第二硫酸アンモニウム分画を10 mM リン酸カリウム緩衝液に1時間透析した後同液80 mlで希釈し同じく10 mM リン酸カリウム緩衝液で平衡化したDEAE-セルロースカラム(300 ml)にのせ、10-500 mM

のリン酸カリウム緩衝液(各450 ml)の直線濃度勾配により溶出した。比活性が0.6単位/mg蛋白質以上の画分を集め、DEAE-セルロース分画とした(全量138 ml)。DEAE-セルロース分画に、固型硫酸アンモニウムを加え40%飽和(243 g/l)とし、pHを7.5に保ち30分間攪拌した。16000 x g, 20分間遠心分離した後、得られた沈澱を0.25 M蔗糖と10 mMクエン酸を含む0.1 Mリン酸カリウム緩衝液2 mlに溶かした。これを同液250 mlに12時間透析した後、1500 x g, 10分間遠心分離して得られた上澄みを37°C, 30分間保温した。上記の緩衝液で平衡化したSepharose-2Bカラム(300 ml)にのせ25°Cでゲル濾過を行った。比活性が4単位/mg蛋白質以上の画分を集めSepharose-2B分画とした(全量75 ml)。このSepharose-2B分画を0.25 M蔗糖と60%硫酸アンモニウムを含む0.1 Mリン酸カリウム緩衝液375 ml(5倍量)に9時間透析後、40000 x g, 20分間遠心分離した。得られた沈澱を0.25 M蔗糖を含む0.1 Mリン酸カリウム1 mlに溶かし、さらに同液100 mlに5時間透析した。1000 x g, 10分間遠心分離した後上澄みを集め精製酵素標品とした(全量1.65 ml)。3.7 mgの酵素が得られ比活性は5.9単位/mg蛋白質であった。このものはSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動において単一のバンドを示した。

酵素活性の測定

アイソトープ法：全量0.8 ml。トリス-塩酸緩衝液(pH7.5) 40 μmol, 塩化マグネシウム 8 μmol, クエン酸カリウム 8 μmol, グルタチオン(GSH) 4 μmol, ウシ血清アルブミン(BSA) 0.6 mg, ATP 3 μmol, アセチル-CoA 0.1 μmol, [¹⁴C]炭酸水素カリウム(0.25 μCi/μmol) 10 μmol。栓付試験管中、酵素(トリス-塩酸緩衝液, クエン酸カリウム, GSH, BSAを含む反応液中で、予め37°C, 10分間保温したもの)の添加により反応を開始し、37°C, 10分間保温した後6 M塩酸0.2 mlを加えて反応を停止させた。減圧デシケータ中約1時間放置し未反応の[¹⁴C]炭酸

を除いた後 反応液 0.5 ml をバイアルに取り減圧乾燥器中で乾固させた。水 0.5 ml とトルエン-トライトン X 100 シンチレーション溶液 5 ml を加えて放射活性を測定した。

分光学的方法(a) : 全量 0.8 ml. トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.5) 40 μmol , 塩化マグネシウム 8 μmol , グエン酸カリウム 8 μmol , GSH 3 μmol , BSA 0.6 mg, ATP 1.5 μmol , アセチル-CoA 0.1 μmol , 炭酸水素カリウム 20 μmol , ホスホエーデルピルビン酸 0.4 μmol , NADH 0.1 μmol , ピルビン酸キナーゼ, 乳酸デヒドロゲナーゼ 各 3 単位以上。1 ml のセル (光路 1 cm) に上記の反応液から炭酸水素カリウムまたはアセチル-CoA を除いたものを取り, 酵素を加えて 37 °C, 10 分間保温した。残りの成分を加えて反応を開始させ 334 nm の吸収の減少を記録し, その傾きより初速度を求めた。

分光学的方法(b) : 全量 0.8 ml. トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.5) 40 μmol , 塩化マグネシウム 8 μmol , グエン酸カリウム 8 μmol , GSH 3 μmol , BSA 0.6 mg, ATP 3 μmol , アセチル-CoA 0.1 μmol , 炭酸水素カリウム 20 μmol , NADPH 0.09 μmol , 脂肪酸合成酵素 (酵母)。1 ml のセル (光路 1 cm) に上記の反応液から NADPH とアセチル-CoA を除いたものを取り, 酵素を加え 37 °C, 10 分間保温した。残りの成分を加えて反応を開始させ, 334 nm の吸収の減少を記録し, その傾きより初速度を求めた。

脂肪酸合成酵素の活性測定 : 全量 0.8 ml. トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.5) 40 μmol , GSH 3 μmol , BSA 1.2 mg, NADPH 0.12 μmol , 脂肪酸合成酵素。1 ml のセル (光路 1 cm) に上記の反応液と一定量のアセチル-CoA を取り 35 °C でマロニル-CoA の添加により反応を開始させ, 334 nm の吸収の減少により初速度を求めた。

8-2 第3章に関する3実験の部

Acetoacetic acid methyl ester の Schmidt 反応

試験管に acetoacetic acid methyl ester (1.2 μ mol) を取り、トリフルオロ酢酸, クロロホルム, アジ化水素 (1 M, フロロホルム溶液) を加え一定時間加熱し反応させた後減圧濃縮した。6 M 塩酸 0.5 ml を加え脱気, 封管後 110 °C で 14 時間加水分解した。水解物を一定量に希釈した後アミノ酸分析により生成したグリシンの量を定量した。

α -Benzylacetoacetic acid methyl ester

Acetoacetic acid methyl ester 1.0 g (8.6 mmol) を α -キシレン 10 ml に溶かし, 水素化ナトリウム (50%) 420 mg (8.8 mmol) を加えて 110 ~ 150 °C に加熱した後臭化ベンジル 1 ml (8.2 mmol) を加え 15 分間反応させた。生成物を酢酸エチルで抽出し, 水洗後無水硫酸ナトリウムで乾燥した。濃縮して得られた油状物を, シリカゲルカラムフロマトグラフィー (20g) で精製した。ベンゼン-酢酸エチル (100:1) で溶出すると目的物の α -ベンジル体 (0.23 g, 13%) は副生成物の α, α -ジベンジル体 (0.56 g, 46%) の後で溶出され いずれも油状物として得られた。

α -benzylacetoacetic acid methyl ester の化学シフト値 (CDCl_3 中) : δ 2.2 (3H, s), 3.2 (2H, d), 3.7 (3H, s), 3.8 (3H, t), 7.3 (5H, s)

α, α -dibenzylacetoacetic acid methyl ester の化学シフト値 (CDCl_3 中) : δ 1.9 (3H, s), 3.2 (4H, s), 3.7 (3H, s) 7.3 (10H, s)

α -Benzylacetoacetic acid methyl ester の Schmidt 反応

α -Benzylacetoacetic acid methyl ester 80 mg (0.39 mmol) をトリフルオロ酢酸 6 ml に溶かし, アジ化水素 (1.4 M, フロロホルム溶液) 1.5 ml を加えて 50 °C で 5 時間反応した。減圧濃縮後シリカゲ

ルカラムクロマトグラフィー (10g) で精製した。クロロホルム-メタノール (50:1) で溶出し *N*-acetylphenylalanine methyl ester を油状物として得た。収量 68 mg (79%)。化学シフト値 (CDCl₃ 中) : δ 2.0 (3H, s), 3.1 (2H, d), 3.8 (3H, s), 4.9 (1H, t) 6.5 (1H, b), 7.3 (5H, m)

アセチルチオ-6A の酵素反応生成物の同定

アイソトープ法による酵素活性測定と同様にして、全量を 4 ml とし、比放射活性 $5 \mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$ の [¹⁴C]炭酸水素カリウムを用いて アセチルチオ-6A の酵素反応を行った。20 分間反応後 反応液に炭酸ガスを通じ未反応の [¹⁴C]炭酸を追い出した後 減圧下に約 0.5 ml に濃縮した。2M 塩酸により pH を約 6 にした後 Sephadex G-10 カラムクロマトグラフィー (1.8 x 13 cm) により脱塩した。水で溶出し放射活性の高い画分を集め ($1.9 \times 10^5 \text{ cpm}$)、DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィー (1.8 x 10 cm; 3 mM 塩酸で平衡化したもの) により精製した。3 mM 塩酸中の 0.015 M 塩化リチウムによる直線濃度勾配によって溶出し (全量 1 l), 放射活性の高い画分を集めた ($1.2 \times 10^5 \text{ cpm}$)。減圧濃縮後 前と同様に Sephadex G-10 によって脱塩した。90% メタノール中 過剰のジアジメタン-エーテル溶液を加えてエステル化した後 減圧濃縮して得られた残渣を 2 ml のトリフルオロ酢酸に溶かした。0.025 ml の濃硫酸と 0.4 ml のアジ化水素 (1.4 M, フロロホルム溶液) を加えて 50°C, 5 時間反応させた。減圧濃縮して得られた残渣 ($8.9 \times 10^4 \text{ cpm}$) を 2 ml の 6M 塩酸に溶かし 封管中で 110°C, 24 時間加水分解した。濃縮して得られた残渣を水に溶かし ($4.6 \times 10^4 \text{ cpm}$)、一部を取り ($1 \times 10^4 \text{ cpm}$) 標品の非放射活性 glycine および α, γ -diaminobutyric acid と共に常法通り塩化ベンゾイルを用いてベンゾイル化し、続いてジアジメタンによりメチルエステルにした。生成物をシリカゲル 60 F₂₅₄ プレートを用いて展開し (エーテルまたはクロロホルム-メタノール (50:1)), 蛍光により検出後 1 cm 幅に切り放射活性を測定した。

8-3 第5章に関する実験の部

2-Bromopalmitic acid methyl ester

Palmitic acid 100 mg (0.39 mmol) を 80 °C に加熱し溶融させ三臭化リン 0.05 ml (0.5 mmol), 臭素 0.1 ml (1.9 mmol) を加え2時間反応させた。水を加えエーテルで抽出し, エーテル層を水洗, 乾燥, 濃縮後再びエーテルに溶かし過剰のジアゾメタン-エーテル溶液を加えた。室温で1時間反応させた後濃縮して得られた油状物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (10g) によって精製した。ベンゼン-m-ヘキサン (1:3) で溶出し油状物を得た。収量 121 mg (92.4%)。

分析値: C, 58.73; H, 9.66; Br, 22.93 %

C₁₇H₃₃O₂Br としての計算値: C, 58.44; H, 9.52; Br, 22.88 %

Palmitic acid に臭素と赤リンを作用させ, 上と同様の操作を行うことにより 2-bromopalmitic acid methyl ester を得た (40%)。

2-Azidopalmitic acid methyl ester

2-Bromopalmitic acid methyl ester 156 mg (0.447 mmol) を N,N'-ジメチルホルムアミド 1 ml に溶かしアジ化ナトリウム 80 mg (1.23 mmol) を加え室温で1時間反応させた。水を加えクロロホルムで抽出し, 有機層を水洗, 乾燥, 濃縮後残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製した。ベンゼン-m-ヘキサン (1:1) で溶出し油状物 140 mg を得た (収量, 定量的)。

分析値: C, 65.58; H, 10.50; N, 13.44 %

C₁₇H₃₃O₂N₃ としての計算値: C, 65.55; H, 10.68; N, 13.49 %

2-Azidopalmitic acid

2-Azidopalmitic acid methyl ester 140 mg (0.45 mmol)

を 5M 水酸化カリウム - エタノール (1:4) 2 ml に溶かし、室温で 30 分反応後 0.5M 塩酸 8 ml を加えエーテルで抽出した。エーテル層を水洗、乾燥後濃縮すると結晶が得られた。収量 130 mg (98%)。融点, 62 ~ 62.5 °C。m-ヘキサンより再結晶して融点, 62 ~ 63 °C の結晶を得た。

分析値: C, 64.44; H, 10.62; N, 14.39 %

C₁₆H₃₁O₂N₃ としての計算値: C, 64.61; H, 10.51; N, 14.13 %

2-Azido-[U-¹⁴C] palmitic acid

[U-¹⁴C] Palmitic acid (256 mCi/mmol) 1 μCi と 非放射性 palmitic acid 0.6 mg (2.3 μmol) を試験管に取り、赤リン 0.5 mg、臭素 0.01 ml を加えて 80 °C に加熱し 40 分間反応させた。水を加えクロロホルムで抽出し、水洗後濃縮、乾燥した。残渣を少量のエーテルに溶かし過剰のジアジメタン-エーテル溶液を加えて反応させた後減圧濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (0.5 x 12 cm) で精製した。ベンゼン-m-ヘキサン (1:3) で溶出し、最初に溶出されてくる放射活性の高い画分を集めた (収率 51%, 放射化学純度 99%)。濃縮して得られた油状物を N,N-ジメチルホルムアミド 0.1 ml に溶かしアジ化ナトリウムを加えて室温で 1.5 時間反応させた後クロロホルムで抽出し水洗後濃縮乾燥した。シリカゲルカラムクロマトグラフィー (0.5 x 13 cm) を用い、ベンゼン-m-ヘキサン (1:1) で溶出して、放射活性の高い画分を集めた (収率 94%, 放射化学純度 99%)。濃縮して得られた油状物を エタノール 0.4 ml に溶かし 5M 水酸化カリウム 0.1 ml を加えて室温で 40 分間反応させた。塩酸を加え酸性にしアルコールを減圧留去後クロロホルムで抽出した。クロロホルム層を水洗後濃縮、減圧乾燥して目的物を得た (収率 95%, 放射化学純度 99%)。

Long-chain dicarboxylic acid monomethyl ester

Tetradecanedioic acid または hexadecanedioic acid をジアジ

メタンあるいはメタノール中の硫酸触媒の作用によりジメチルエステルとした後 等量の水酸化バリウムにより半ケン化し、モノメチルエステルを得た。

Tetradecanedioic acid methyl 1-succinimidyl ester

Tetradecanedioic acid monomethyl ester 500 mg (1.7 mmol) と *N*-ヒドロキシコハク酸イミド 210 mg (1.8 mmol) をテトラヒドロフラン 10 ml に溶かし、氷冷下 *N,N*-ジシクロヘキシルカルボジイミド 380 mg (1.8 mmol) を加え 5 時間攪拌した。酢酸 0.1 ml を加え 20 分間攪拌した後 不溶物を濾去し 濾液を濃縮して再び酢酸エチルに溶かした。水、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、水で洗った後乾燥後濃縮して得られた固型物を酢酸エチル-*m*-ヘキサンより再結晶した。収量 410 mg (62%)。融点、80-82 °C。さらに酢酸エチル-*m*-ヘキサンより再結晶し 融点、83-85 °C の結晶を得た。

分析値：C, 63.25 ; H, 8.86 ; N, 3.59 %

C₂₁H₃₅O₆N としての計算値：C, 63.45 ; H, 8.88 ; N, 3.52 %

16-Hydroxypalmitic acid methyl ester

Tetradecanedioic acid methyl 1-succinimidyl ester 50 mg (0.13 mmol) をテトラヒドロフラン 2 ml に溶かし、水素化ホウ素ナトリウム 12 mg (0.32 mmol) を加えて室温で 1.5 時間攪拌した。酢酸を 0.1 ml 加えた後酢酸エチルで抽出し、水洗、乾燥した。シリカゲルカラムクロマトグラフィ- (32) を用い、ベンゼン-酢酸エチル (10:1) で溶出して 27 mg の結晶を得た (収率 75%)。これを酢酸エチル-*m*-ヘキサンより再結晶した。融点、56-57 °C。

分析値：C, 71.21 ; H, 12.03 %

C₁₇H₃₄O₃ としての計算値：C, 71.28 ; H, 11.96 %

16-p-Toluenesulfonyloxypalmitic acid methyl ester

16-Hydroxypalmitic acid methyl ester 1.50 g (5.2 mmol)

をピリジン 20 ml に溶かし、氷冷下塩化 p-トルエンスルホニル
1.20 g (6.3 mmol) を加え 2.5 時間攪拌した。酢酸エチルで抽出し有
機層を 水, 1M 塩酸, 水で洗った後無水硫酸マグネシウムで乾燥した。
濃縮して得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精
製した。ベンゼン-酢酸エチル (50:1) で溶出し結晶を得た。収量
1.48 g (64%)。分析用に n-ヘキサンより再結晶した。融点
61.5 - 62 °C。

分析値: C, 65.48; H, 9.18; S, 7.35 %

C₂₄H₄₀O₂S としての計算値: C, 65.43; H, 9.15; S, 7.26 %

16-Azidopalmitic acid methyl ester

16-p-Toluenesulfonyloxypalmitic acid methyl ester 1.00 g
(2.3 mmol) を N,N-ジメチルホルムアミド 10 ml に溶かし、アジ化
ナトリウム 600 mg (9.2 mmol) を加え室温で終夜攪拌した。酢酸エチ
ルで抽出し、水洗後無水硫酸マグネシウムで乾燥した。濃縮して得られ
た残渣をメタノールから再結晶した。0.53 g のパラフィン状の結晶を
得た。母液を濃縮しシリカゲルカラムクロマトグラフィー (10g, ベ
ンゼンで溶出) で精製しさらに 0.12 g を得た。収量, 計 0.65 g
(92%)。赤外吸収, 2120 cm⁻¹, 1745 cm⁻¹。

16-Azidopalmitic acid

16-Azidopalmitic acid methyl ester 500 mg (1.6 mmol)
をエタノール 1 ml に溶かし、1M 水酸化カリウム 2.4 ml を加えて室
温で 3 時間攪拌した。アルコールを減圧留去後 1M 塩酸を加えてクロロ
ホルムで抽出した。水洗後無水硫酸マグネシウムで乾燥し濃縮して得
られた残渣をエタノール-水から再結晶した。収量 360 mg (75%)。
融点 50 ~ 50.5 °C。

分析値: C, 64.73; H, 10.49; N, 13.94 %

C₁₆H₃₁O₂N₃ としての計算値: C, 64.61; H, 10.51; N, 14.13 %

Hexadecanedioic acid methyl 1-succinimidyl ester

Hexadecanedioic acid monomethyl ester 1.00 g (3.0 mmol) を原料として, tetradecanedioic acid methyl 1-succinimidyl ester と同様の操作を行い 0.825 g (64%) の結晶を得た。これを酢酸エチル-*n*-ヘキサンから再結晶した。融点, 87-88 °C。

分析値: C, 65.21 ; H, 9.36 ; N, 3.36 %

C₂₃H₃₉O₆N としての計算値: C, 64.91 ; H, 9.24 ; N, 3.29 %

18-Hydroxystearic acid methyl ester

Hexadecanedioic acid methyl 1-succinimidyl ester 50 mg (0.12 mmol) を用い, 16-hydroxypalmitic acid methyl ester の場合と同様の操作を行い 26 mg の目的物を得た。収率 70%。分析用に酢酸エチル-*n*-ヘキサンから再結晶した。融点, 65-65.5 °C。

分析値: C, 72.40 ; H, 12.20 %

C₁₉H₃₈O₃ としての計算値: C, 72.56 , H, 12.18 %

18-p-Toluenesulfonyloxystearic acid methyl ester

18-Hydroxystearic acid methyl ester 250 mg (0.80 mmol) から, 16-hydroxypalmitic acid methyl ester の場合と同様の操作により 276 mg (76%) の結晶を得た。分析用に *m*-ヘキサンから再結晶した。融点, 68-69 °C。

分析値: C, 66.54 ; H, 9.50 ; S, 6.65 %

C₂₆H₄₄O₅S としての計算値: C, 66.64 ; H, 9.46 , S, 6.83 %

18-Azidopalmitic acid methyl ester

18-p-Toluenesulfonyloxystearic acid methyl ester 260 mg (0.58 mmol) を用いて 16-azidopalmitic acid methyl ester の場合と同様の操作を行い, 184 mg のパウダー状の目的物を得た (収率 94%)。

分析値: C, 67.19 ; H, 11.00 ; N, 12.37 %

C₁₉H₃₇O₂N₃ としての計算値: C, 67.21 ; H, 10.99 ; N, 12.38 %

18-Azidostearic acid

18-Azidostearic acid methyl ester 180 mg (0.53 mmol) と 16-azidopalmitic acid と同様の操作を行い、167 mg (98%) の目的物を得た。分析用にエタノール-水から再結晶した。融点、58-59°C。

分析値: C, 66.29 ; H, 10.83 ; N, 12.89 %

C₁₈H₃₅O₂N としての計算値: C, 66.42 ; H, 10.84 ; N, 12.91 %

16-Azido-[16,16-³H₂] palmitic acid

固型の [³H] 水素化ホウ素ナトリウム (555 mCi/mmol) 約 5 mCi と tetradecanedioic acid methyl succinimidyl ester 27 mg を試験管に取り、テトラヒドロフラン 0.5 ml を加えて 30 °C で終夜攪拌し反応させた。グリオキサール (40% 水溶液) 0.5 ml を加えた後、クロロホルム 1 ml, 1M 塩酸 2 ml を加えよく攪拌し、静置後上層をスポイトで除き、水 2 ml で 2 回洗った。減圧下に空気を吹まつけ濃縮し、エタノール、ベンゼンを加え同様の操作を行い乾固させた。残渣をピリジン 0.5 ml に溶かし、氷冷下塩化 p-トルエンスルホニル 40 mg のピリジン溶液 (0.1 ml) を加えそのまま終夜攪拌した。反応液に氷とクロロホルム 1 ml を加えよく攪拌後、上層をスポイトで除き、続いて 1M 塩酸、水で洗った。濃縮、減圧乾燥後得られた残渣を 0.5 ml の N,N-ジメチルホルムアミドに溶かし、アジ化ナトリウム 20 mg を加えて室温で終夜反応させた。クロロホルム 1 ml を加え水洗した後、有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥し、濃縮して得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (32) により精製した。ベンゼン-酢酸エチル (100:1) で溶出し放射活性の高い画分を集めた。濃縮して得られた残渣をエタノール 0.5 ml に溶かし、6M 水酸化カリウム 0.1 ml を加えて室温で 6 時間攪拌した。クロロホルム 1 ml を加え 1M 塩酸、水で洗った後無水硫酸マグネシウムで乾燥した。溶媒を濃縮して得た生成物はシリカゲル薄層クロマトグラフィー (クロロホルム:エタノール:酢酸、20:1:0.1) 上でその放射活性はほぼ単一のピークを示した。

Hexadecanedioic acid methyl 1-succinimidyl ester を出発原料として、同様の操作を行うことにより 18-azido-[18,18-3H₂]stearic acid を得た。

16-p-Toluenesulfonyloxypalmitic acid

16-p-Toluenesulfonyloxypalmitic acid methyl ester 300 mg (0.68 mmol) を 95% エタノール 4 ml に溶かし、1M 水酸化カリウム 1 ml を加えて室温で 4.5 時間反応させた。1M 塩酸を加えて酸性にした後、クロロホルムで抽出し水洗後無水硫酸マグネシウムで乾燥した。濃縮して得られた残渣を *m*-ヘキサンから再結晶した。収量 0.23 g (79%)。融点 71.5 - 72.5 °C。分析用に一部を *m*-ヘキサンから再結晶した。融点 74 - 74.5 °C。

分析値: C, 64.78; H, 9.14; S, 7.33 %

C₂₃H₃₈O₅S としての計算値: C, 64.56; H, 9.98; S, 7.50 %

16-Cyclohexylaminopalmitic acid methyl ester hydrochloride

16-p-Toluenesulfonyloxypalmitic acid 110 mg (0.26 mmol) にシクロヘキシルアミン 2 ml を加えて室温で終夜反応させた。エーテルを加えて析出した沈澱を集めて少量のメタノールに懸濁した。過剰のジアゾメタン-エーテル溶液を加えてエステル化した後濃縮して得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (5 g) により精製した。クロロホルム-メタノール (10:1) で溶出し得られたアミンを塩化水素-テトラヒドロフラン溶液を用いて塩酸塩とした。収量 65 mg (63%)。分析用にクロロホルム-*m*-ヘキサンから再結晶した。融点 120 °C。

分析値: C, 67.84; H, 11.44; N, 3.48; Cl, 8.60 %

C₂₃H₄₅O₂N · HCl · ¼ H₂O としての計算値: C, 67.61; H, 11.47; N, 3.43; Cl, 8.68 %

8-4 第6章に関する実験の部

Trichloromethylparaconic acid

コハフ酸ナトリウム 45g (0.28 mol), 無水7口ラ-ル 36 ml (0.38 mol), 無水酢酸 30 ml (0.32 mol) を 140-145°C で 70 分間反応させた後, 熱水 400 ml を加え脱色炭処理をし熱時濾過を行った。濾液を濃縮後 200 ml の熱水に溶かし, 濃塩酸 60 ml を加えた。冷却し析出した結晶を濾取した。収量 35.7g (52%)。融点 93.5~95°C。四塩化炭素から再結晶して 融点, 95~95.5°C の無色針状晶を得た。(文献値²⁵⁾ 融点, 97°C)

分析値: C, 29.21; H, 1.96; Cl, 42.80%

$C_6H_5O_4Cl_3$ としての計算値: C, 29.12; H, 2.04; Cl, 42.98%

Trichloromethylitamic acid disodium salt

Trichloromethylparaconic acid 4.0g (0.016 mol) を 20 ml の水に懸濁させ 1M水酸化ナトリウム 32 ml を加えた。室温で 20 分間反応後 減圧濃縮し, 水-エタノールから沈澱させた。収量 3.5g (70%)。融点 235° より徐々に分解。赤外吸収 1570 cm^{-1} 。

Methylparaconic acid ethyl ester

Acetylsuccinic acid diethyl ester 1.00g (4.63 mmol) を, 無水エタノール 30 ml に溶かし氷冷下水素化ホウ素ナトリウム 0.20g (5.3 mmol) を加えて 1.5 時間還元した。希塩酸を加えた後濃縮して得られた残渣を酢酸エチルで抽出し, 飽和食塩水で洗った後 無水硫酸マグネシウムで乾燥した。濃縮して得られた油状物をシリカゲルカラムフロマトグラフィートより分離精製し, 3種の生成物をそれぞれ油状物として得た。溶出液ベンゼン-酢酸エチル (3:1) で行った。

trans-Methylparaconic acid ethyl ester

収量 60 mg (2%)。

分析値：C, 55.80 ; H, 7.13 %

$C_8H_{12}O_4$ としての計算値：C, 55.80 ; H, 7.03 %

cis-Methylparaconic acid ethyl ester

収量 180 mg (23 %).

分析値：C, 55.73 ; H, 7.06 %

$C_8H_{12}O_4$ としての計算値：C, 55.80 ; H, 7.03 %

threo-Methylitamaic acid diethyl ester

収量 280 mg (28 %).

分析値：C, 55.03 ; H, 8.27 %

$C_{10}H_{18}O_5$ としての計算値：C, 55.03 ; H, 8.31 %

この8のベンゾイル体(ピリジン中塩化ベンゾイルを用いて反応, 油状物, 収率71%)はNMR, 高速液体クロマトグラフィーにより単一の異性体であると考えられ, またこのジエチルエステルを塩化水素処理すると*cis*-methylparaconic acid ethyl esterと一致したことからここで得たジエチルエステルはスレオ体であることがわかった。ベンゾイル誘導体の分析値：C, 63.02 ; H, 7.06 %
 $C_{17}H_{22}O_6$ としての計算値：C, 63.34 ; H, 6.88 %

trans-Methylparaconic acid

trans-Methylparaconic acid ethyl ester 770 mg (4.4 mmol) を 6M 塩酸-ジオキサン(1:1) 10 ml に懸濁し 3時間加熱還流した。濃縮して得られた残渣をクロロホルム-m-ヘキサンより再結晶した。収量 430 mg (67%)。融点 82-84 °C。分析用にさらにクロロホルム-m-ヘキサンから再結晶した。融点 84-84.5 °C。
分析値：C, 49.79 , H, 5.55 %

$C_6H_8O_4$ としての計算値：C, 50.00 ; H, 5.60 %

cis - Methylparaconic acid

cis - Methylparaconic acid ethyl ester 1.3 g (7.6 mmol) を 6M 塩酸 - ジオキサン (1:1) 20 ml に溶かして 3 時間加熱還流した。濃縮して得られた残渣をクロロホルム - m-ヘキサンより再結晶した。収量 720 mg (66%)。融点, 107.5 - 108.5 °C。分析用に一部をクロロホルム - m-ヘキサンから再結晶した。融点, 109 - 109.5 °C。
分析値: C, 49.74 ; H, 5.56 %
C₆H₈O₄ とした計算値: C, 50.00 ; H, 5.60 %

8-5 第7章に関する実験の部

N - Benzylloxycarbonyl-L-phenylalaninol

N - Benzylloxycarbonyl-L-phenylalanine 1-succinimidyl ester 200 mg (0.50 mmol) をテトラヒドロフラン 3 ml に溶かし, 水素化ホウ素ナトリウム 48 mg (1.3 mmol) を加えて室温で 1 時間反応させた。反応液を 10% クエン酸水溶液にそそぎ 酢酸エチルで抽出した。有機層を水, 飽和炭酸水素ナトリウム水溶液, 水で洗った後 無水硫酸マグネシウムで乾燥した。濃縮して得られた結晶を酢酸エチル - m-ヘキサンから再結晶した。収量 120 mg (83%)。融点, 94 - 94.5 °C。
[α]_D²⁰ - 41.7° (c 1.00, EtOH)。

分析値: C, 71.30 ; H, 6.71 ; N, 4.88 %

C₁₇H₁₉O₃N とした計算値: C, 71.56 ; H, 6.71 ; N, 4.91 %

その他のコハク酸イミドエステルの還元も上と同様の方法で行った。その物理化学的性質を次に示す。

N - Benzylloxycarbonyl-L-leucinol

融点, 36 - 37 °C。[α]_D²⁰ - 28.5° (c 1.09, EtOH)。

分析値: C, 66.51 ; H, 8.36 ; N, 5.61 %

C₁₄H₂₁N₃O とした計算値: C, 66.90 ; H, 8.42 ; N, 5.57 %

N^α-Benzylloxycarbonyl-*N*^ε-*t*-butoxycarbonyl-*L*-lysine

融点, 50-51°C. $[\alpha]_D^{17} -14.8^\circ$ (c 1.01, EtOH).

分析値: C, 62.31; H, 8.20; N, 7.50%

C₁₉H₃₀O₅N₂ としての計算値: C, 62.27; H, 8.25; N, 7.64%

N-*t*-Butoxycarbonyl-*L*-isoleucine

油状物. $[\alpha]_D^{17} -25.2^\circ$ (c 1.19, EtOH).

分析値: C, 60.57; H, 10.57; N, 6.32%

C₁₁H₂₃O₃N としての計算値: C, 60.80; H, 10.67; N 6.45%

N-*t*-Butoxycarbonyl-*D*-homoserine benzyl ester

融点, 57-58°C. $[\alpha]_D^{17} +39.6^\circ$ (c 1.08, EtOH).

分析値: C, 62.16; H, 7.52; N, 4.48%

C₁₆H₂₃O₅N としての計算値: C, 62.12; H, 7.49; N, 4.53%

N-Benzylloxycarbonyl-*D*-homoserine-*L*-alanine benzyl ester

融点, 129-130°C. $[\alpha]_D^{17} -4.3^\circ$ (c 1.17, EtOH).

分析値: C, 63.90; H, 6.38; N, 6.71%

C₂₂H₂₆O₆N₂ としての計算値: C, 63.76; H, 6.71; N, 6.76%

L-Phenylalanine

N-Benzylloxycarbonyl-*L*-phenylalanine 300 mg (1.1 mmol) をエタノールに溶かし, パラジウム(黒)を用いて接触還元を行った。触媒を濾取し 母液を濃縮して得られた残渣をエーテルから再結晶した。収量 130 mg (82%)。融点, 92.5-93.5°C. $[\alpha]_D^{20} -23.9^\circ$ (c 1.07, EtOH). (文献値²⁰⁾: 融点, 92-94°C. $[\alpha]_D^{25} -25.6^\circ$ (c 1.037, EtOH))

光学純度検定

上で得た *L*-phenylalanine 25 mg (0.17 mmol) をテトラヒドロフラン 2 ml に溶かし *N*-benzylloxycarbonyl-*L*-phenylalanine 1-succinimide

ester 70 mg (0.1 P mmol) を加え室温で2時間反応させた。濃縮して得られた残渣を酢酸エチルに溶かし、希塩酸、水、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、水で洗った後、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。濃縮して得られた結晶を酢酸エチル-*m*-ヘキサンから再結晶した。収量 63 mg (88%)。融点, 166-165°。 *N*-Benzyloxycarbonyl-*D*-phenylalanine 1-succinimidy/ ester を用いて同様の反応を行い *D*-*L* の異性体を得た。融点, 154-156°C。

ここで得られた *L*-*L*, および *D*-*L* の異性体は高速液体クロマトグラフ (HPLC) においてそれぞれ単一の異なる保持時間を持つピークを与え (Nucleosil 7C₁₈, アセトニトリル : 0.1 M 酢酸ナトリウム 1:2) また接触還元により得た *L*-phenylalaninol を精製することなく直ちに *N*-benzyloxycarbonyl-*L*-phenylalanine 1-succinimidy/ ester と反応させて得た粗生成物中にも *L*-*D* の異性体は検出されなかった。

Abbreviations

CoA, SCoA	coenzyme A
ATP	adenosine 5'-triphosphate
ADP	adenosine 5'-diphosphate
NADH	nicotinamide adenine dinucleotide reduced form
NAD ⁺	nicotinamide adenine dinucleotide
NADPH	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced form
NADP ⁺	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
TFA	trifluoroacetic acid
THF	tetrahydrofuran
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamide
DMSO	dimethyl sulfoxide
Gly	glycine
Ala	alanine
Phe	phenylalanine
Leu	leucine
Ile	isoleucine
Lys	lysine
Asp	aspartic acid
Z	benzyloxycarbonyl
Boc	<i>t</i> -butoxycarbonyl
Bzl	benzyl
HONSu	<i>N</i> -hydroxysuccinimide

References

- 1) a) J. J. Volpe and P. R. Vagelos, *Ann. Rev. Biochem.*, 42, 21 (1973). b) D. Vance and K. Bloch, *Ann. Rev. Biochem.*, 46, 263 (1977).
- 2) a) S. J. Wakil, *J. Am. Chem. Soc.*, 80, 6465 (1958). b) S. J. Wakil, *J. Am. Chem. Soc.*, 81, 2597 (1959).
- 3) F. Lynen, *Biochem. J.*, 102, 381 (1967).
- 4) S. Numa, *Ergeb. Phisiol.*, 69, 53 (1974).
- 5) T. Hashimoto and S. Numa, *Eur. J. Biochem.*, 18, 391 (1971).
- 6) S. Nakanishi and S. Numa, *Eur. J. Biochem.*, 16, 161 (1970).
- 7) a) G. Bottaccio and G. P. Chiusoli, *J. Chem. Soc. Chem. Comm.*, 1966, 618. b) G. Bottaccio and G. P. Chiusoli, *Z. Naturforsch.*, 1968, 561. c) G. Bottaccio and G. P. Chiusoli, *Z. Naturforsch.*, 1968, 1016.
- 8) T. Kwan, H. Yamamoto, H. Mori, and H. Samejima, *Kagakukogyo*, 1972, 1618.
- 9) C. J. Stewart and T. Wieland, *Liebigs Ann. Chem.*, 1978, 57.
- 10) K. F. Schmidt, *Chem. Ber.*, 57, 704 (1924).
- 11) H. P. Blaschkowski, J. Knappe, and T. Wieland, *FEBS Lett.*, 98, 81 1979.
- 12) S. Numa, E. Ringelmann, and F. Lynen, *Biochem. Z.*, 343, 243 (1965).
- 13) H. Ogiwara, T. Tanabe, J. Nikawa, and S. Numa, *Eur. J. Biochem.*, 89, 33 (1978).
- 14) D. C. Young and F. Lynen, *J. Biochem.*, 244, 377 (1969).
- 15) A. Al.-Arif and M. Blecher, *J. Lipid Res.*, 10, 344 (1969).
- 16) M. Dixon, *Biochem. J.*, 129, 197 (1972).

- 17) E. R. Stadtman, *Methods Enzymol.*, 3, 931 (1957).
- 18) G. L. Ellman, *Arch. Biochem. Biophys.* 82, 70 (1959).
- 19) O. Wieland, L. Weiss, and I. Eger-Nufeldt, *Biochem. Z.*, 339, 501 (1964).
- 20) J. R. Knowles, *Accounts Chem. Res.* 5, 155 (1972).
- 21) a) P. Chakrabarti and H. G. Khorana., *Biochemistry*, 14, 5021 (1975). b) C. M. Gupta, R. Radhakrishnan, G. E. Gerber, W. L. Olsen, S. C. Qnay, and H. G. Khorana, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76, 2595 (1979). c) C. M. Gupta, C. E. Costello, and H. G. Khorana, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76, 3193 (1979).
- 22) W. Stoffel, W. Darr, and K.-P. Salm, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 358, 453 (1977).
- 23) A. A. Spector, *J. Lipid Res.*, 16, 165 (1975).
- 24) unpublished data.
- 25) H. B. Vickery, *Science*, 132, 892 (1960).
- 26) K. Fukunishi, Y. Inoue, Y. Kishimoto, and F. Mashio, *J. Org. Chem.*, 40, 628 (1975).
- 27) H. C. Brown and S. Krishnamurthy, *Tetrahedron*, 35, 567 (1979).
- 28) H. Seki, K. Koga, H. Matsuo, S. Ohki, I. Matsuo, and S. Yamada, *Chem. Pharm. Bull.*, 13, 995 (1965).
- 29) S. W. Chaikin and W. G. Brown, *J. Am. Chem. Soc.*, 71, 122 (1949).
- 30) K. Ishizumi, K. Koga, and S. Yamada, *Chem. Pharm. Bull.*, 16, 492 (1968).
- 31) Y. G. Perron, L. B. Crast, J. M. Essery, R. R. Fraser, J. C. Godfrey, C. T. Holdrege, W. F. Minor, M. E. Neubert, R. A. Partyka, and L. C. Cheney, *J. Med. Chem.*, 7, 483 (1964).
- 32) G. Ehrhart, W. Siedel, and H. Nahm, *Chem. Ber.*, 90, 2088 (1954).

謝 辞

本研究は大阪大学理学部芝研究室および京都大学医学部沼研究室に於て行われたものであり、終始暖かい御指導を賜りました芝哲夫教授および沼正作教授に心から御礼申し上げます。

また実験上の問題などについて御指導御助言をいただきました田辺忠博士に厚くお礼申し上げます。実際に実験と共に、有意義な討論をしていただきました共同実験者の萩原英男修士に感謝いたします。本研究を行うにあたり御助言をいただき御協力していただきました楠本正一助教授、若宮建昭助手、豊島正助手をはじめとする芝研究室および沼研究室の皆様へ感謝いたします。

本研究に使用したコエンザイムA誘導体を供与していただいた清水博士ならびにアセトニルデナオ-コエンザイムAを供与していただいたT. Wieland 博士に感謝します。比旋光度の測定にあたり御便宜をはかっていただきました乾利成教授に御礼申し上げます。また元素分析をしていただきました奥宮正和氏をはじめとする元素分析室の皆様にお礼申し上げます。