

Readout

HORIBA Technical Reports

特集 赤外線ではかる

July 1993 ■ No.7

旋光計によるアミノ酸、ペプチド およびタンパク質の研究

Studies of Amino Acids, Peptides and Proteins
By Polarimeter

泉屋信夫

Nobuo IZUMIYA

(Pages 81-87)

株式会社 堀場製作所

旋光計によるアミノ酸、ペプチドおよびタンパク質の研究

Studies of Amino Acids, Peptides and Proteins by Polarimeter



九州産業大学教授

泉屋 信夫

Nobuo Izumiya, Dr.Sci.

理学博士

九州大学名誉教授

<略歴>

1944年 九州帝国大学理学部
卒業
1945年 海軍技術中尉
1946年 同大学医学部助手
1956年 九州大学理学部助教授
1962年 同大学理学部教授
1985年 同大学名誉教授
久留米工業大学教養部
教授
1989年 九州産業大学工学部
教授

<主要職, 授賞>

日本生化学会常務理事(1978)
日本化学会理事(1980)
日本化学会賞(1983)

<主な著書>

ペプチド合成の基礎と実験
(丸善)
生物化学序説(化学同人)

1. はじめに

私はちょうど40年前の1953年にJ P Greenstein研(米国NIH)に留学した。彼の光学分割(酵素利用)によるタンパク性アミノ酸の合成研究は、当時世界一に活発なものであった。彼はこれらL-アミノ酸を栄養化学(必須アミノ酸の正確な必要量決定)やオリゴペプチド合成の材料としていた。さっそく私に与えられたテーマはDL-tLeu(図1)の光学分割であった。このtLeu(非タンパク性アミノ酸)には不斉炭素(C*)が1つあるので、L-tLeuとD-tLeuの光学対称体が存在することになる。当時この2種類は誰も合成していなかった。ただKnoop(1923)はDL-tLeuをイヌに食べさせ、その尿より光学活性tLeu($[\alpha]_D^{20} - 10$ (水))を分離し、それは不消化物なのでD-tLeuと推定していた。私はAc-DL-tLeu(Ac, アセチル)にアシラーゼを反応させ、L-tLeu($[\alpha]_D^{20} - 9.5$ (c2, 水))とAc-D-tLeuを分別した。このAc-D-tLeuを熱HClで脱Ac化して、D-tLeu($[\alpha]_D^{20} + 9.5$)を結晶化した。この結果はKnoopの推定をくつがえすものであり、決め手となったのは旋光計による $[\alpha]_D^{20}$ である¹⁾。

昭和20年代の留学生は米国の豊富さに圧倒されたわけであるが、私にとっても次の二つは驚くべきことであった。一つはGreensteinよりLとDのtLeuを100g程度合成せよ、と言われたことだった。当時、日本のアミノ酸合成屋は0.1~1gを合成(低研究費のため)しては、せっせと論文を書いていた。第二は旋光計の大型のことであった。日米とも原理は同一の直視式(半影式)で、暗室での実験が必要であった。私が九大で使用した試料管(セル)は長さ10cm, 直径3mm程度であったが、米国のは管長40cm, 直径1cmのセルで正確な $[\alpha]_D^{20}$ 測定が可能であった。

直視式旋光計は光学的測定装置としては最も早く完成し(1800年初め)、有機化学の発展に重要な役割を演じてきた。近年では物理的測定として赤外分光光度計やNMR装置などが活躍しているが、旋光計は依然として他の方法では得られないユニークな結果を与える。以下には、アミノ酸に重点をおいて旋光計の有用性を説明する。

2. 比旋光度と分子旋光度

光学活性物質を含む溶液をセルにつめて平面偏光を通過させると、その偏光面は回転するが、その値を α (旋光度)とする。この α はセル長(l)と溶質の濃度(c)に正比例するので、比例定数はその物質にとって一定となり、これを比旋光度と称する。

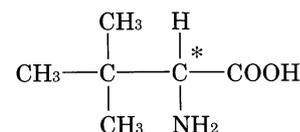


図1 tertロイシン
tertLeucine (tLeu)

$$[\alpha]_{\lambda}^t = \frac{\alpha}{l \times c} \times 100 \quad \dots\dots\dots(1)$$

$$[\alpha]_D^{20} = \alpha \times \frac{100 \text{ g}}{c \text{ g}} \quad \dots\dots\dots(2)$$

$$[M]_{\lambda}^t = [\alpha]_{\lambda}^t \times \frac{MW}{100} \quad \dots\dots\dots(3)$$

$$[M]_D^{20} = \alpha \times \frac{10 \text{ M}}{z \text{ M}} \quad \dots\dots\dots(4)$$

(1)式は比旋光度の定義であり t は温度(°C), λ は単色光の波長, l はセル長(10cmのとき l とする), c は溶液100ml中の溶質のg数である。(2)式は測定に便利なものであり, D はNaの単色D線, l は10cmである。(3)式は分子旋光度の定義であり, MW は分子量である。(4)式(泉屋の式)において試料は zM として作製され, l は10cmである。 $[\alpha]_D$ あるいは $[M]_D$ の数値には, c と溶媒の種類(これは絶対に必要)を括弧内に記述する。

実験に際して, 観測する眼の位置から見て, 平面偏光が時計方向にまわるとき右旋性((+)-, $d-$ とも言う), 反時計のときは左旋性((-)-, $l-$)となる。アミノ酸のように, 同種族であるが分子量の異なる化合物の旋光性を比較・議論するには, 分子旋光度が便利である。他の方向からの分子旋光度の有用性を, 実例について説明しよう。L-リシンには純粋物質として3種類のL-Lys, L-Lys·HClおよびL-Lys·2HClが存在するが, それらの $[\alpha]_D^{20}$ (5M HCl)は+25.9, +20.7および+17.3である。しかし $[M]_D^{20}$ (5M HCl) はいずれも同一の+37.8となり, 取り扱いが簡単となる。ただし, 光学活性物質の構造式が不明(したがって分子量も不明)のときは, $[\alpha]_D$ を測定せざるを得ない。この $[M]_D^{20}$ 測定に便利なものとして, 私は数年前に(4)式を導入したが, 最近では日米の研究室で採用されつつある。この式からわかるように, $[M]_D^{20}$ とは理論の上で試料管(長さ10cm, 容積100ml)に溶質の10M溶液をつめたときの α であり, これは1個の不斉分子と偏光との干渉値の総和(6×10^{23} 倍)となる。

装置として長い間(1800~1965頃), 直視式旋光計が使われてきた。私の昔の論文(日化誌, 1951)に, L-メチオニンの $[\alpha]_D^{20} + 23.4$ (5M HCl)の記述がある。渡米してGreensteinと雑談中, 彼はこの論文を読んでいたらしくどうして10°Cで実験したか, の質問を受けた。これに対し, 冬期の測定で暖房も無く, 眼が暗闇に慣れるまで30分間ふるえていたことを話した。やがて1965年頃よりは, ずいぶん便利になった。それは光電式旋光計の開発であり, 暗室より解放されることになった。精度は直視式の0.01°にくらべて, 1けた上の0.001°に上昇したのもありがたかった。現在良く使われているのは米国ではPerkin-Elmerの旋光計, 日本では堀場の旋光計SEPA-200型であろう。最近では改良型(SEPA-300)が開発された。この旋光計の原理などについて, わかりやすい解説がある²⁾。

3. アミノ酸の研究

この地球上には何千～何万種という、異なる分子構造の天然アミノ酸が存在する。それらのうち結晶として単離され、構造の決定したものは千種以上に及んでいるが、タンパク性アミノ酸(L-リシンなど21種)は特別に重要である³⁾。これらタンパク性アミノ酸は分子状(例、尿中)あるいはペプチド・タンパク質の構成ユニットとして存在する(図7を参照)。その大きな特徴として α -炭素は不斉であるが、21種分子は全て同一のL型という立体構造(図2)をとることである(Rを側鎖という)。

これらアミノ酸の旋光性については1800年代より多くの研究があるが、Lutzの法則(1930)が特に有名である。これは「タンパク性L-アミノ酸や他の非タンパク性L- α -アミノ酸も、酸性溶液の $[\alpha]_D$ は水溶液のそれよりもプラスに移動する」というものである。その理由は、図3のように分子のイオン状況が水溶液中と酸性中では違うためである。

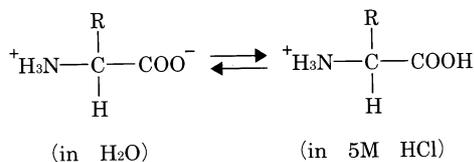


図3 水と酸性溶液中のアミノ酸分子のイオンの構造
Ionic structures of amino acid molecule in aqueous and acidic solution

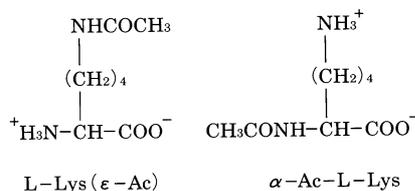


図4 アセチル-L-リシンの異性体
Isomers of acetyl-L-lysine

私らは最近、新しい方法(銅塩法)でL-Lys(ϵ -Ac)(図4)など多くのL-Lys(ϵ -acyl)を高収率で合成し、 $[\text{M}]_D^{20}$ を測定した¹⁾。acylとしてはAc以外に、プロパノイル、ベンゾイルなど7～8種のL-リシン誘導体を合成した。例として、表1にL-Lys(ϵ -Ac)について試料溶液の作り方や、 $[\text{M}]_D^{20}$ 測定の実際を示す。表1の $[\text{M}]_D^{20}$ (水～HCl)をグラフにすると図5のようになり、Lutzの法則にしたがうことがわかる。D-Lys(ϵ -Ac)の $[\text{M}]_D^{20}$ カーブは、L体と対称になった。ところが、 α -Ac-L-Lys(図4)の $[\text{M}]_D^{20}$ カーブは、意外な形となり(図5)、むしろD-アミノ酸に類似である。ここに、Lutzの法則に例外が生じたことになる。その理由を考えあぐねたが、最近にいたり分子の立体構造(図6)より合理的に説明できるようになった。すなわち、 α -Ac-L-Lys分子は両性イオンとして(D)(あるいは(C))であるが、これはD-アミノ酸(B)と立体的に類似だからである。

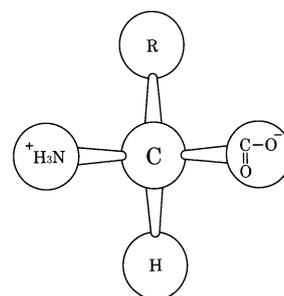


図2 L-アミノ酸の立体構造
Conformation of L-amino acid

a) HClの当量	1M HClのml	5M HClのml	b) α (測定旋光度)	c) $[M]_D^{20}$
0	0	0	+0 026	+5 2
1	0 25	0	+0 159	+31 8
2	0 5	0	+0 189	+37 8
3	0 75	0	+0 190	+38 0
5	1 25	0	+0 191	+38 2
100	0	5	+0 202	+40 4

- a) 例, HCl当量が1の場合の溶液の調製法 L-Lys(ϵ -Ac)の47 1mg(0 25mmol)を5ml定容フラスコに入れ, 1 M HClの0 25mlを加え, 水で5mlにする 試料について0 05Mとなる
b) ミクロセル(長さ10cm, 2ml)に試料溶液を加え測定
c) (4)式により計算

表1 L-Lys(ϵ -Ac)の $[M]_D^{20}$ 測定の実験表
Experimental sheet of $[M]_D^{20}$ determination of L-Lys (ϵ -Ac)

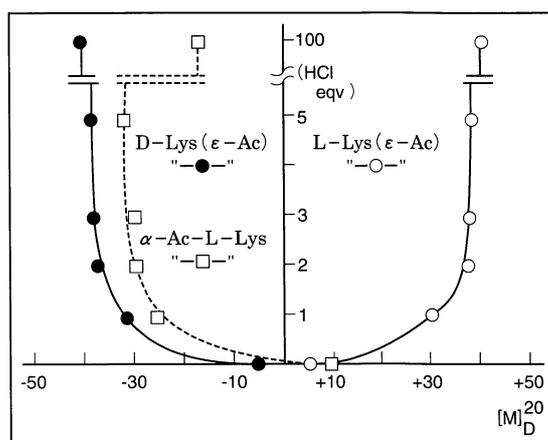


図5 アセチル-リシン異性体の分子旋光度曲線
Curves of molecular rotations of acetyl-lysine isomers

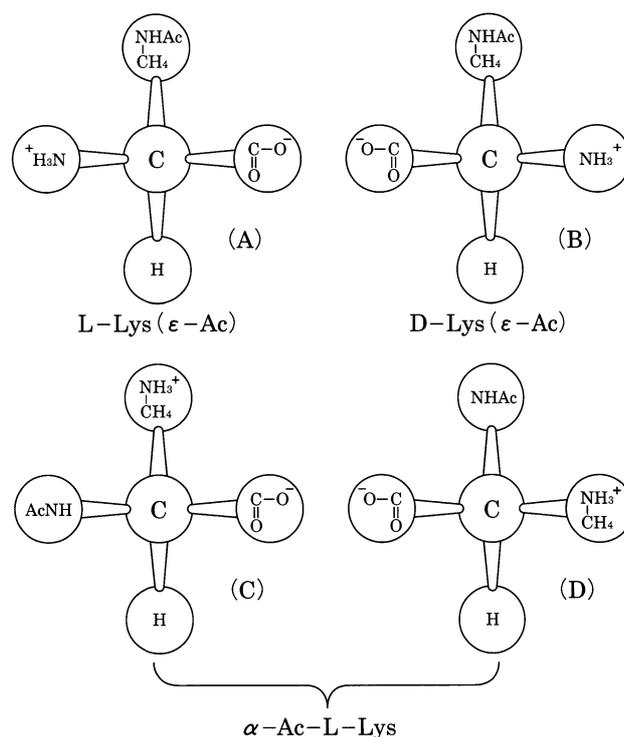


図6 アセチル-リシン異性体の分子の立体構造
Conformations of molecules of acetyl-lysine isomers

最近はこの立体構造(図6)の考察より α -acyl-L-Arg, α -acyl-L-His, L-isoAsn および甘味アスパルテーム(H-L-Asp-L-Phe-OMeで, L-isoAsnと立体構造が類似)の $[M]_D^{20}$ を測定したところ, 予想したようにD-アミノ酸型のカーブを与えた. このように思いがけなく新分野の展開した理由は, 使いやすい光電式旋光計の提供のおかげである.

4. ペプチドとタンパク質の研究

ホルモンペプチドやタンパク質は、タンパク性アミノ酸が逐次結合した化合物である(図7)。旋光計によるペプチドの研究はいくつかあるが、ここには著者らのグラミシジン S (GS) について説明しよう。GSは*B brevis*菌により生合成される抗生ペプチドで、病原性グラム陽性菌を殺菌する。構造は環状デカペプチドで(図8)、天然結晶GS·2HCl·8H₂Oは[M]_D²⁰ - 3680(EtOH)を示す。

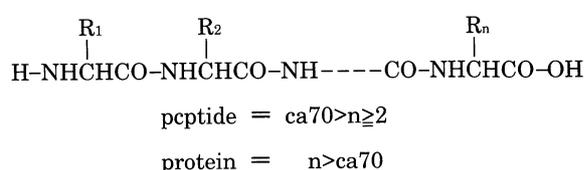


図7 ペプチドおよびタンパク質の定義
Definition of peptide and protein

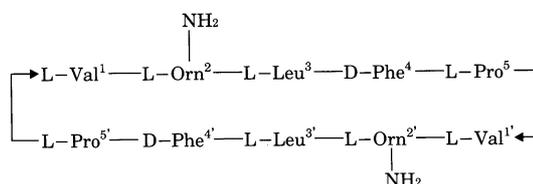


図8 グラミシジン S
Gramicidin S (GS)

GS分子の構成アミノ酸を、他のアミノ酸で置換した合成同族体をアナログというが、私らはすでに100種近くを合成している⁵⁾。それらアナログのうち、5,5'位L-ProをGlyに置換した[Gly^{5,5'}]GS·2HCl·6H₂OはGS同様の抗菌性を示したが、それは[M]_D²⁰ - 3229(EtOH)のように大きい。他方、[Gly^{1,1'}]GS·2HCl·5H₂Oは不活性で、[M]_D²⁰ - 1196(EtOH)と低かった。このような傾向(活性アナログの[M]_DはGSに近く、不活性物は低い値)は合成アナログに共通した事実であり、かくして[M]_DはGSの構造と機能相関の解釈に有用なデータを与えている。

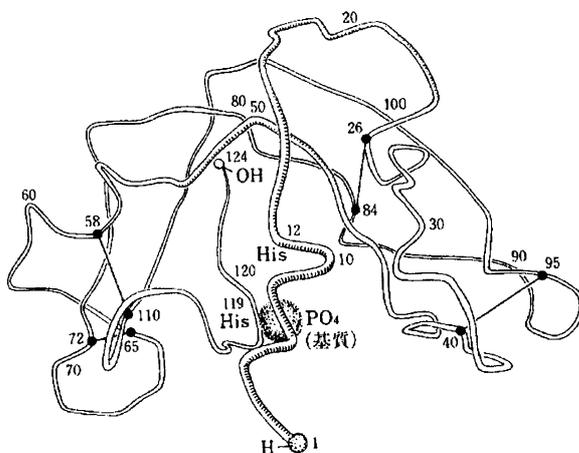


図9 リボヌクレアーゼ A の三次構造
Tertiary structure of ribonuclease A (RNase A)

タンパク質の $[\alpha]_D$ は多くの単行本に実験値がのっている。例えばタンパク質化学2巻(共立出版,1979)には、タカジアスターゼA(Tase A)など約20種について $[\alpha]_D$ のリストがある。ほとんどのタンパク質の $[\alpha]_D$ は $-10 \sim -80$ (水系溶媒)のように、左旋性である。いくらか踏みこんだ実験に、例えばTase Aは $[\alpha]_D -20$ (水)であるが酸性(pH2)にすると $[\alpha]_D$ は -90 に変化し、このタンパク質の空間構造を追跡できる。しかし一般的にタンパク質の旋光性は構成L-アミノ酸の不斉炭素以外に、ペプチド鎖の部分的空間構造(α -ヘリックスなど)も不斉要因となるので、解釈はL-アミノ酸の場合よりも複雑である。最近、矢島名誉教授と藤井教授(京大薬)はペプチド化学・タンパク質化学の分野で大研究を完成した⁶⁾。これはRNaseA(アミノ酸数nは124)(図9³⁾)を化学合成したことであり、世界で初めてのアミノ酸数100以上のタンパク合成に成功した。合成物の結晶形、酵素活性さらに $[\alpha]_D^{20} -69.7$ (0.1M KCl)は、天然物と一致した。この化学合成により構造も確定したので(MWは13700)、分子旋光度は $[M]_D^{20} -9550$ (0.1M KCl)となる。

5. おわりに

以上、旋光計を利用する研究に関して抽象的紹介よりも、むしろ具体的説明を心がけた。この小論文を手がかりとされて、生化学・有機化学の方々が気軽に旋光計を使用されることをおすすめする。他方、医薬品、食品分野などで旋光計をお使いの方々に対し、この小論文が分子旋光度の導入などに、いささかの参考になれば幸いである。

参考文献

- 1) Izumiya, N and Greenstein, J P, J Biol Chem, 205, 221-230 (1953)
- 2) 澤田喜行, Readout, No 5, 81-84 (1992)
- 3) 泉屋信夫, 野田耕作, 下東康幸, "生物化学序説", pp182, 化学同人, 京都 (1987)
- 4) 赤木有, 添嶋康廣, 泉屋信夫, 九産大工学部研究報告, 29, 119-124 (1992)
- 5) Izumiya, N, Kato, T, Aoyagi, H, Waki, M and Kondo, M, "Synthetic Aspects of Biologically Active Cyclic Peptides -Gramicidin S and Tyrocidines-", pp 166, J Wiley & Sons, New York (1979)
- 6) Yajima, H and Fujii, N, J Am Chem Soc, 103, 5867-5871 (1981)

Studies of Amino Acids, Peptides and Proteins by Polarimeter

This paper discusses the present state of studies of amino acids, peptides and proteins by the use of high-sensitive polarimeter. In the field of amino acids, molecular rotations by ϵ -acetyl-L-lysine and α -acetyl-L-lysine are introduced, and unexpected rotation by α -acetyl-L-lysine is explained from the standpoint of conformations of the acetyl-L(or D)-lysine molecules. In the field of peptides, molecular rotations of gramicidin S and its synthetic derivatives are discussed. As a protein, chemical synthesis of ribonuclease A is introduced and it is noted that specific rotations of the synthetic enzyme and natural one are identical.

