ビス第四級アンモニウム塩型加水分解酵素モデル —基質の識別—

竹澤恒雄・依田由紀・小山裕介・大勝靖一

工学院大学工学部応用化学科 (〒163-8677 東京都新宿区西新宿 1-24-2)

Hydrolase Models of Bis-Quaternary Ammonium Salts —Recognition of Substrate

Tsuneo TAKEZAWA, Yuki YODA, Yusuke KOYAMA, and Yasukazu OHKATSU

Department of Applied Chemistry, Faculty of Engineering, Kogakuin University

(1-24-2, Nishishinjuku, Shinjuku-ku, Tokyo 163-8677)

Abstract : In this study, amphiphiles possessing two equivalent ammonium groups substituted with one methyl and two dodecyls, and a connecting chain were synthesized ; the connecting chain consisting of such hydrophilic group that hydroxyl group and ether linkage were introduced on and into the alkanediyl chain. This paper reports the structural effects of a segment connecting two quaternary ammonium salts on the recognition of amino acids in the hydrolysis of amino acid esters using bis-quaternary ammonium salts as catalysts. The hydrophilic nature of the connecting chain was found to have effect on substrate recognition. A connecting chain with high HLB (Hydrophile-Lipophile Balance) increased the hydrolyzing rate of a hydrophilic substrate but decreased that of a hydrophobic substrate. From the relationship between the rate constant k_2 and Michaelis constant K_m in the hydrolysis of amino acid esters, clearly shows that the uptake process of substrate is a rate-determining step, that is, a substrate is recognized by connecting chain in the uptake step. The connecting chain may thus be considered to form a pocket capable of discerning the hydrophilic nature of a substrate.

Key words : bis-quaternary ammonium salt, hydrolase model, connecting chain, amino acid ester, recognition

1 緒 言

酵素は多くの生体内反応を温和な条件下でスムーズに進行させる優れた触媒であり、多くはタンパク質からなる。しかしこれは分離の煩雑さ、異なる環境での不安定さ、高価格などの欠点をもっている。最近、酵素の示す欠点を持たない酵素モデルの研究が活発に行われて来ている。一般に酵素モデル系を構築する場合、酵素モデルは、それを働かせる反応場となるアルキルトリメチルアンモニウム塩やジアルキルジメチルアンモニウム塩などの第四級アンモニウム塩類からなる分子集合体のミセルやベシクルと組み合わせて用いられる^{2)~5)}。著者らは糖質の持つ基質識別能と親水性とを利用して自己ミセル・ベシクル能を有する糖脂質を合成し、加水分解酵素モデルとして種々検討している^{6)~12)}。

また一方著者らは、最近 Fig. 1 に示す構造の四本の長いアルキル鎖を有するビス第四級アンモニウム塩 $[C_m\text{-Bis (N-2C}_{12})]$ の分子集合体であるベシクルが、それ自体でアミノ酸エステルを加水分解することを見出した¹⁾。その加水分解活性は連結鎖のアルカンジイル鎖長(m)によって変わり、 m が 12~14 で最大となった。ベシクル膜の流動性もまた m が 12~14 で最も大きくな

Alkanediyl-1, ω -bis(didodecylmethylammonium bromide)

$C_m\text{-Bis(N-2C}_{12})$ ($m=2\sim 20$)

Fig. 1 Bis-Quaternary Ammonium Salts.

注1) 前報: *J. Jpn. Oil Chem. Soc.*, 47, 149 (1998)

連絡者: 竹澤恒雄

Symbol	Connecting chain
(a)	$-\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2-$
(b)	$-\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2-$
(c)	$-\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2-\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_2-\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2-$
(d)	$-\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2-\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_3-\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2-$
(e)	$-\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2-\text{O}(\text{CH}_2)_6\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2-$

Fig. 2 Bis-Quaternary Ammonium Salts Possessing Hydrophilic Connecting Chain.

り、加水分解活性はベシクル膜の流動性と深く関係していることが認められた。さらに、二つのアンモニウム窒素を連結する長いアルカンジイル鎖によってベシクル膜の表面に形作られる凹み(“ポケット”)が基質の取り込みに寄与していることが推定できた。

そこで本報では、四本のドデシル鎖を有するビス第四級アンモニウム塩の連結鎖による基質の認識、取り込みを明らかにする目的で、連結鎖として水酸基やエーテル結合を有する親水性の異なるアルカンジイル鎖の四鎖ビス第四級アンモニウム塩 [(a), (b), (c), (d), (e)] を

合成し、それらのベシクルを用いて、疎水性の異なるアミノ酸エステルの加水分解反応を検討し、連結鎖の形成するポケットが基質のアミノ酸エステルの識別にどのように関係するかを検討した。

2 実 験

エピクロロヒドリン、グリシドール、エチレングリコール、ジエチレングリコール、トリエチレングリコール、1,6-ヘキサジオール、ドデシルアミン、ドデシル=プロミド、トリオクチルメチルアンモニウム=クロリド、テトラヘキシルアンモニウム=プロミド、硫酸水素テトラブチルアンモニウム、過塩素酸ナトリウム(無水物)、水酸化ナトリウム、アセトニトリル、エタノール、メタノール、クロロホルムなどの試薬は市販品をそのままあるいは常法により精製して用いた。測定装置および実験方法は前報¹⁾と同様である。

2・1 四鎖ビス第四級アンモニウム塩の合成

親水性の連結鎖を持つ四鎖ビス第四級アンモニウム塩はScheme 1に従って合成した。

ビス(2,3-エポキシプロピル)エーテルおよびグリコールジグリシジルエーテル [I]

岡原ら¹³⁾の方法にならって相間移動触媒(PTC)としてトリオクチルメチルアンモニウム=クロリド、テトラヘキシルアンモニウム=プロミドあるいは硫酸水素テトラブチルアンモニウムを用いてグリシドール、オリゴ(エチレングリコール)あるいは1,6-ヘキサジオールとエピクロロヒドリンとを反応させて合成した。

ビス(2,3-エポキシプロピル)エーテル [I a] (60℃/

Scheme 1 Syntheses of Bis-Quaternary Ammonium Salts Possessing Hydrophilic Connecting Chain.

0.8 mmHg, 収率; 15%), エチレングリコールジグリシジルエーテル [I b] (90°C/0.3 mmHg, 収率; 46%), ジエチレングリコールジグリシジルエーテル [I c] (131°C/0.5 mmHg, 収率; 55%), トリエチレングリコールジグリシジルエーテル [I d] と 1,6-ヘキサンジオールジグリシジルエーテル [I e] は後処理後, 溶媒および過剰のエピクロロヒドリンを完全に留去し, そのまま 1, ω -ビス(ドデシルアミノメチル)-1, ω -アルカンジオール [II] の合成に用いた。

1, ω -ビス第二アミン [II]

アセトニトリル中, 無水の過塩素酸ナトリウムの存在下でジエポキシ化合物 [I] とドデシルアミンとの反応により合成した¹⁴⁾。

1,5-ビス(ドデシルアミノメチル)-3-オキサ-1,5-ペンタンジオール [II a] 収率; 45%, mp; 95.6°C, IR (ν , cm^{-1}) 3450, 2980, 2850, 1460, 1100, ¹H-NMR (CDCl_3 , TMS, δ , ppm) 0.88 (t, 6H), 1.20~1.30 (m, 36H), 1.45 (m, 4H), 3.90 (m, 2H)。1,8-ビス(ドデシルアミノメチル)-3,6-ジオキサ-1,8-オクタンジオール [II b] 収率; 43%, mp; 86~87°C。1,11-ビス(ドデシルアミノメチル)-3,6,9-トリオキサ-1,11-ウンデカンジオール [II c] 収率; 35%, mp; 76~77°C。1,14-ビス(ドデシルアミノメチル)-3,6,9,12-テトラオキサ-1,14-テトラデカンジオール [II d] 収率; 44%, mp; 72.5~73°C。1,12-ビス(ドデシルアミノメチル)-3,10-ジオキサ-1,12-ドデカンジオール [II e] 収率; 33%, mp; 83.0~84.5°C。

1, ω -ビス第三アミン [III]

それぞれの 1, ω -ビス第二アミンを N-メチル化⁵⁾して, 定量的な収率で 1, ω -ビス第三アミンの 1,5-ビス(N-ドデシル-N-メチルアミノ)-3-オキサ-1,5-ペンタンジオール [III a], 1,8-(N-ドデシル-N-メチルアミノメチル)-3,6-ジオキサ-1,8-オクタンジオール [III b], 1,11-ビス(N-ドデシル-N-メチルアミノメチル)-3,6,9-トリオキサ-1,11-ウンデカンジオール [III c], 1,14-ビス(N-ドデシル-N-メチルアミノメチル)-3,6,9,12-テトラオキサ-1,14-テトラデカンジオール [III d], 1,12-ビス(N-ドデシル-N-メチルアミノメチル)-3,10-ジオキサ-1,12-ドデカンジオール [III e] を合成した。

四鎖ビス第四アンモニウム塩

1,7-ビス(ジドデシルメチルアンモニオ)-4-オキサ-2,6-ヘプタンジオール=ジプロミド (a)

還流冷却器を備えた 200 mL ナス型フラスコに 1,5-ビス(N-ドデシル-N-メチルアミノメチル)-3-オキサ-1,5-ペンタンジオール [III a] (0.017 mol, 9.0g), ドデシル=プロミド (0.14 mol, 34.9 g) およびエタノール 90 mL を加え, 窒素下でかきまぜながら還流して反応させた。反応は TLC (メルク, キーゼルゲール 60F₂₅₄ シー

ト, MeOH : CHCl_3 =1 : 1, v/v) で追跡し, 原料の [III a] のスポットが消失するまで 24~30 時間反応させた。その後溶媒などを留去し, 粗生成物を得, それをカラムクロマトグラフィーによって精製した。カラム (52 mm ϕ ×200 mm, ワコーゲル C-300), 溶出液 (クロロホルム) を用いて過剰のドデシル=プロミドを溶出して分け, カラムの原点近くの (a) は押し出してメタノールで抽出し, 濃縮してからシリカゲルを濾別し, メタノールを減圧下で留去し, ベンゼンと共沸させて水分を完全に除去した後減圧乾燥してペースト状の (a) 7.5 g を得た (III a からの収率; 43%)。TLC (MeOH : CHCl_3 =1 : 1, R_f=0.63)。IR (neat, ν , cm^{-1}); 3300, 2950, 2850, 1460, 1120, 750。¹H-NMR (CDCl_3 , TMS, δ , ppm) ; 0.80~1.00 (t, 12H), 1.10~1.50 (m, 80H), 2.90 (s, 2H), 3.30~3.80 (m, 24H)。

(b), (c), (d) および (e) は (a) と同様に合成, 精製 (TLC, MeOH : CHCl_3 =1 : 1~4, v/v, 単一スポット) し, IR, ¹H-NMR によって同定した。

2.2 比較の触媒としての両親媒性化合物

4-ジドデシルカルバモイル-2-(D-マンノ-ペンタヒドロキシペンチル)チアゾリジン [Man (Lau)₂]

アミノ酸エステルを加水分解する酵素モデルとなる親水部として糖残基をそして疎水部としてジドデシルアミン残基を有し自己-ベシクルを形成する性質の糖脂質 Man (Lau)₂ は既報^{15), 16)}に準じて合成して用いた。

アルカンジール-1, ω -ビス(ジドデシルメチルアンモニウム=プロミド) [C_m -Bis (N-2C₁₂)]

二つの第四級アンモニウム基がそれぞれ一個のメチル基と二本のドデシル基を有し, それらが疎水性のアルカンジール鎖 $[-(\text{CH}_2)_m-]$, m : 6, 12] により連結された形の両親媒性化合物 C_m -Bis (N-2C₁₂) を前報¹⁾に従って合成し, アミノ酸エステルの加水分解反応において連結鎖の疎水性-親水性の差が基質の取り込みに及ぼす影響を検討した。

2.3 基質

基質のカルボベンゾキシ-L-アラニン p-ニトロフェニルエステル (Z-L-Ala-ONp) mp; 75°C, カルボベンゾキシ-L-メチオニン p-ニトロフェニルエステル (Z-L-Met-ONp) mp; 93°C, カルボベンゾキシ-L-バリン p-ニトロフェニルエステル (Z-L-Val-ONp) mp; 66°C, カルボベンゾキシ-L-ロイシン p-ニトロフェニルエステル (Z-L-Leu-ONp) mp; 95°C, カルボベンゾキシ-L-フェニルアラニン p-ニトロフェニルエステル (Z-L-Phe-ONp) mp; 126°C は前報¹⁶⁾に準じて合成し, 再結晶して得た。各基質の構造と側鎖の疎水性を示す疎水性パラメーター¹⁷⁾を Table 1 に示す。

2.4 加水分解反応

触媒となる両親媒性化合物のベシクル溶液は薄膜法に

Table 1 Chemical Structure and Hydrophobicity Parameters of Substrates.

Substrates

Symbol	R	Hydrophobicity parameters ΔG_f (Kcal/mol)
Ala	CH ₃ -	0.5
Met	CH ₃ -S-(CH ₂) ₂ -	1.3
Leu	(CH ₃) ₂ CHCH ₂ -	1.8
Phe	-CH ₂ -	2.5

より調製した。試験管に両親媒性化合物 [(a), (b), (c), (d), (e) および Man (Lau)₂] のクロロホルム溶液 50 μ L (0.01 M) を取り、約 1 mL のクロロホルムで希釈した後減圧下でクロロホルムを留去して試験管内壁に薄膜を形成させ、これにトリス緩衝液 [塩酸で pH=8.0 に調節したトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン 0.050 mol/L 溶液] 30 mL を加え、25°C で超音波処理を 15 分間行い触媒溶液とした。他方比較のため用いた両親媒性化合物 C_m-Bis (N-2C₁₂) はそれぞれの相転移温度より約 10°C 高い温度で同様に処理して調製し、25°C まで冷却して用いた。

このように調製した触媒溶液 3.0 mL をガラスセル (10×10×45 mm) に取り、それに所定量の基質 [Z- α -アミノ酸エステル (0.001 M アセトン溶液)] を注入し、加水分解によって遊離する p-ニトロフェノールの量を JASCO V-520 型分光光度計を用いて 400 nm における吸光度を追跡して求めた。測定データは一般の酵素反応と同様、ミカエリス-メンテンの式によって整理することができた。

オーバーオール速度定数である二次速度定数 k_2 によって触媒活性を評価し、また触媒と基質との親和の度合いを示すミカエリス定数 K_m は Lineweaver-Burk プロットより求めた¹⁶⁾。

3 結果および考察

ビス(2,3-エポキシプロピル)エーテルは、PTC として硫酸水素テトラブチルアンモニウムを用いた場合目的物がほとんど得られなかったが、トリオクチルメチルアンモニウム=クロリドに変えることによって 15% 程度の収率で得られた。エピクロヒドリンとグリコール類の反応はグリコール類の鎖長の増大と共に反応は比較的容易になるが、沸点が上昇するため蒸留中に分解が起こり収率はよくなかった。また、[Id] と [Ie] は蒸留しないで粗生成物をドデシルアミンと反応させ、1, ω -ビス第二アミン [II] として後に再結晶して精製した。1, ω -ビス第二アミン [II] を N-メチル化した後、各 1, ω -

Table 2 Phase Transition Temperature (T_c) and Hydrophile-Lipophile Balance (HLB).

Bis-Quaternary Ammonium Salt	T_c (°C)	HLB of Connecting Chain
(a)	4.8	9.25
(b)	5.4	9.58
(c)	5.9	9.91
(d)	6.4	10.24
(e)	4.1	7.70
<hr/>		
(m=12) ^{a)}	18	1.30
(m=6) ^{a)}	41	4.15

T_c : (Bis-Quaternary Ammonium Salt/Water System)

a): C_m-Bis (N-2C₁₂)

-ビス第三アミン [III] は後処理後精製しないでドデシル=プロミドとの四級化反応に用い、1, ω -ビス第四級アンモニウム塩 [(a), (b), (c), (d), (e)] の段階でカラムクロマトグラフィーにより精製した。それはカラムへの吸着性が大きいために収率が低下し、約 45% 程度となった。各 [(a), (b), (c), (d), (e)] はペースト状態で、水系での相転移温度 (T_c) は、連結鎖の親水性の増加する事から期待されるように C_m-Bis (N-2C₁₂) 系より大きく低下している (Table 2)。

また、表には各ビス第四級アンモニウム塩の HLB (Hydrophile-Lipophile Balance) 値を示す。この連結鎖の HLB 値はつぎの式によって HLB 基数から求めた¹⁸⁾。

$$HLB = \Sigma (\text{親水基の基数}) + \Sigma (\text{親油基の基数}) + 7$$

四本の長いアルキル鎖を有するビス第四級アンモニウム塩 [C_m-Bis (N-2C₁₂)] の分子集合体であるベシクルは、それ単独でアミノ酸エステルを加水分解し、その加水分解活性が連結鎖としてのアルカンジイル鎖長 (m) に依存した¹⁾。これは α -キモトリプシン類似の基質選択性を示し、二つのアンモニウム窒素を連結する長いアルカンジイル鎖の形成する凹み(“ポケット”)が基質のアミノ酸エステルの識別、取り込みに寄与していることを示唆した¹⁾。ビス第四級アンモニウム塩類 [C_m-Bis (N-2C₁₂)] の例として [C₆-Bis (N-2C₁₂): $m=6$]、[C₁₂-Bis (N-2C₁₂): $m=12$] および糖脂質の Man (Lau)₂⁶⁾ の分子集合体であるベシクルによる各種アミノ酸エステルの加水分解結果を Fig. 3 に示す。

縦軸は二次速度定数、横軸はアミノ酸側鎖の疎水性パラメーターであり、このパラメーターはその値が大きいほど疎水性の度合いが大きくなることを示す。Figure 3 から分かるように、C_m-Bis (N-2C₁₂) および Man (Lau)₂ 触媒による加水分解速度は、アミノ酸側鎖が疎水性であるほど大である。この傾向は、基準として示し

Fig. 3 Recognition of Amino Acids by C_m -Bis (N - $2C_{12}$) and Man (Lau) $_2$.

た α -キモトリプシンの触媒活性に対応していることが分かる。それぞれの直線部分の傾きについて、 α -キモトリプシンの勾配を1としたときの、各触媒のそれをアミノ酸基質選択性として比較すると、 C_{12} -Bis (N - $2C_{12}$)は0.27、 C_6 -Bis (N - $2C_{12}$)は0.17でMan(Lau) $_2$ の0.11より大きく、 α -キモトリプシンのそれと同様にアミノ酸の種類を識別することが分かった。

そこで四鎖ビス第四級アンモニウム塩の二つのアンモニウム窒素を結び付ける連結鎖の役割をより明確にするために連結鎖のアルカンジール鎖に親水性の水酸基やエーテル結合を導入し、それらのアミノ酸エステルの加水分解反応に及ぼす影響を検討した。

Figure 4に、連結鎖に親水性の水酸基やエーテル結合を導入した四鎖ビス第四級アンモニウム塩[(a), (b), (c), (d), (e)]による各種アミノ酸エステルの加水分解反応における二次速度定数とアミノ酸側鎖の疎水性パラメーターとの関係を示す。

Figure 3のプロットと比較してみると、これらは曲線で表され、その傾向は親水性の大きい連結鎖をもつ(d)において特に著しかった。このことは、二つのアンモニウム窒素を結ぶ長い連結鎖が基質認識に大きく関係し、興味深いことに、連結鎖の親水性が基質認識に影響していることを示す。Figure 5に各基質に対する加水分解反応の二次速度定数 k_2 と四鎖ビス第四級アンモニウム塩の連結鎖のHLBとの関係を示す。

Fig. 4 Relationship between Rate Constant k_2 and Hydrophobicity Parameters of Amino Acid.

Fig. 5 Relationship between Rate Constant k_2 and HLB of Connecting Chain.
● : Z-L-Phe-ONp ▲ : Z-L-Leu-ONp
○ : Z-L-Ala-ONp

このように四鎖ビス第四級アンモニウム塩の連結鎖がより高いHLBを持つにつれて、親水性の基質(Z-L-Ala-ONp)の加水分解速度 k_2 は増大するが、これに反して疎水性の基質(Z-L-Phe-ONp, Z-L-Leu-ONp)に対する k_2 は大きく低下していることが認められる。この結果は連結鎖が基質の取り込みと深く関係していることを示唆する。これを明らかにするために、アミノ酸エステルの加水分解反応における二次速度定数 k_2 とMichaelis定数 K_m との関係を考察した(Fig. 6)。

図より、四鎖ビス第四級アンモニウム塩による加水分解反応は基質の取り込みが律速段階であることが分かる。また、疎水性基質のZ-L-Phe-ONpおよびZ-L-

Fig. 6 Relationship between Rate Constant k_2 and K_m in Hydrolysis of Amino Acid Ester.

● : Z-L-Phe-ONp ▲ : Z-L-Leu-ONp
○ : Z-L-Ala-ONp

Leu-ONp は, (a), (b), (c), (d) と連結鎖の HLB が大きくなるほど, すなわち親水性が増すほど取り込みが弱くなって, k_2 も低下した。一方親水性の Z-L-Ala-ONp では反対の傾向を示した。すなわち, 基質は取り込み段階で連結鎖によって認識され, 連結鎖が基質の親水性を識別するポケットを形成することが明らかになった。以上のことから四鎖ビス第四級アンモニウム塩触媒によるアミノ酸エステルの加水分解は, 一つの可能性としてエステルの塩基触媒による加水分解反応のように Fig. 7 に示す反応機構で進行するものと考えられる。

まず, 二つのアンモニウム窒素を結ぶ長い連結鎖によって形成されるポケットの親水性と基質の親水性またはポケットの疎水性と基質の疎水性との相互作用によるポケットへの基質の取り込みに始まり, アンモニウム窒素 (N^+) との静電的相互作用により基質のアミノ酸エステルのカルボニル酸素がその N^+ に引き付けられ, カルボニル炭素に対する水 (OH^-) の求核的置換反応を促進することによって, 加水分解反応が進行すると考えら

Fig. 7 A Possible Hydrolysis Mechanism.

れる。詳細についてはさらに検討中である。

(受付: 1998年10月30日, 受理: 1998年12月1日)

文 献

- 1) T. Takezawa, T. Kawabe, T. Kajiyama, Y. Ohkatsu, *J. Jpn. Oil Chem. Soc.*, **47**, 149 (1998).
- 2) C. A. Burton, Y. Ihara, *J. Org. Chem.*, **42**, 2865 (1977).
- 3) Y. Ihara, R. Hosaka, M. Nango, *J. Chem. Soc., Perkin Trans., II*, 1983, 5.
- 4) 松本陽子, 上岡龍一, 日本化学会誌, 1983, 901.
- 5) R. Ueoka, Y. Matsumoto, R.A. Moss, S. Swarup, A. Sugii, K. Harada, J. Kikuchi, Y. Murakami, *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 1588 (1988).
- 6) 大勝靖一, 日本油化学会誌, **45**, 3 (1996).
- 7) Y. Ohkatsu, T. Sueyoshi, *J. Jpn. Oil Chem. Soc.*, **45**, 137 (1996).
- 8) Y. Ohkatsu, T. Takezawa, K. Sasaki, T. Anzai, *J. Jpn. Oil Chem. Soc.*, **45**, 243 (1996).
- 9) Y. Ohkatsu, N. Nakamura, *J. Jpn. Oil Chem. Soc.*, **45**, 537 (1996).
- 10) Y. Ohkatsu, M. Ozawa, Y. Numata, N. Nakamura, *J. Jpn. Oil Chem. Soc.*, **45**, 545 (1996).
- 11) Y. Ohkatsu, J. Kubokoya, M. Horibe, *J. Jpn. Oil Chem. Soc.*, **46**, 261 (1997).
- 12) Y. Ohkatsu, K. Saitoh, *J. Jpn. Oil Chem. Soc.*, **46**, 271 (1997).
- 13) Xue-Ping Gu, I. Ikeda, M. Okahara, *Synthesis*, 1985, 689.
- 14) Yun-Peng Zhu, K. Ishihara, A. Masuyama, Y. Nakatsuji, M. Okahara, *J. Jpn. Oil Chem. Soc.*, **42**, 161 (1993).
- 15) Y. Ohkatsu, K. Hamada, M. Saitho, *J. Jpn. Oil Chem. Soc.*, **42**, 359 (1993).
- 16) Y. Ohkatsu, T. Sueyoshi, *J. Jpn. Oil Chem. Soc.*, **43**, 220 (1994).
- 17) Y. Nozaki, C. Tanford, *J. Biol. Chem.*, **246**, 2211 (1971).
- 18) J.T. Davies, "Proc. 2nd Intern. Congress of Surface Activity", Vol. 1, (1957) p. 426.

[報文] ビス第四級アンモニウム塩型加水分解酵素モデル —基質の識別—

竹澤 恒雄・依田 由紀・小山 裕介・大勝 靖一
工学院大学工学部応用化学科 (〒163-8677 東京都新宿区西新宿 1-24-2)

一個のメチル基と二本のドデシル基を有するアミンを一本の連結鎖で結合した四鎖ビス第四級アンモニウム型両親媒性化合物を合成した；その連結鎖はアルカンジイル鎖に水酸基およびエーテル結合を導入して親水性を持たせたものを含む。本報はこれらの四鎖ビス第四級アンモニウム塩を用いるアミノ酸エステルの加水分解において、その連結鎖部位のアミノ酸識別に及ぼす構造効果を検討した。連結鎖の親水性が基質の認識に大きく影響した。高いHLB (Hydrophile-Lipophile Balance) を有する連結鎖は親水性の基質の加水分解速度を増大し、それとは逆に疎水性の基質の加水分解速度を低下させた。この加水分解反応は、アミノ酸エステルの加水分解における速度定数 k_2 とミカエリス定数 K_m との関係から、取り込みの過程が律速段階であることが分かり、すなわち基質の識別は取り込みの段階で連結鎖により行われていることが明らかになった。連結鎖は基質を識別しかつ取り込むポケットを形成していることが推定できる。

(連絡者：竹澤恒雄) Vol. 48, No. 3, 227 (1999)

[報文] 植物ステロールを含むジアシルグリセリンの 血中コレステロール低下作用

後藤 直宏^{*1}・森 秀樹^{*1}・桂木 能久^{*1}・
戸井 知子^{*1}・安川 拓次^{*1}・島崎 弘幸^{*2}

^{*1} 花王株式会社・食品研究所 (〒314-0103 茨城県鹿島郡神栖町東深芝 20)

^{*2} 帝京大学医学部第一生化学教室 (〒173-8605 東京都板橋区加賀 2-11-1)

植物ステロールは古くから医薬品として使用されており、血中の総コレステロール (T-Ch) 値を低下させることが知られている。今回我々は、植物ステロールを含むジアシルグリセリンの T-Ch 値低下効果をヒト臨床試験により調べた。その結果、400 mg の植物ステロールを含むジアシルグリセリン 10 g を 4 週間摂取した場合に、有意に T-Ch 値が 3.4% 低下し、さらに LDL 値が 6.5% 低下することが判明した。またその有効率は 67% であった。

植物ステロールの 1 日 400 mg の摂取はこれまで報告されている量と比較すると最も低い値であり、共存するジアシルグリセリンの効果が T-Ch 低下作用に起因している可能性が示唆された。

(連絡者：後藤直宏) Vol. 48, No. 3, 235 (1999)