— 論 文 —

(日本化学会誌, 1989, (2), p. 181~185)

© 1989 The Chemical Society of Japan

ハイブリッド分子集合体における
アミノ酸エステルの不斉加水分解制御

(1988年6月29日受理)

上岡 龍一*・松本 陽子・松尾 成人・田口 貴啓・姥田 伸二

ベシクル分子とミセル分子を混合したハイブリッド分子集合体は素材や組成を変えることにより、活性トリペプチド触媒 (*N*-ベンジルオキシカルボニル-L-フェニルアラニル-L-ヒスチジル-L-ロイシン) によるアミノ酸エステル基質 (*N*-ドデカノイル-D-および-L-フェニルアラニン=*p*-ニトロフェニルエステル) のL体優位の不斉加水分解を制御できることが明確になった。

1 緒 言

バイオテクノロジーの中核の一つである細胞融合技術では、異種細胞の融合による新雑種をハイブリッド細胞と称している。また、タンパク質工学 (プロテイン・エンジニアリング) ではタンパク質を合成高分子などで化学修飾した複合体をタンパク質ハイブリッドと呼んでおり、バイオリクターなどの工業的応用面のみならず制がん剤などとしての医薬への利用も期待されている。

本論文で用いるハイブリッド分子集合体は、二分子膜ベシクルおよびミセルを構成する2種の界面活性剤を混合したものであり、新しい分子集合体機能を期待して考え出されたものである。ハイブリッド分子集合体の構成分子の混合比を制御して不斉加水分解の立体選択性の制御を試み、とくに (a) ハイブリッド分子集合体の大きさに比例する立体識別機能^{1)~3)}, (b) 分子集合体を構成する素材の構造効果⁴⁾, および (c) 100% L-体アミノ酸基質のみを加水分解するシステム系⁵⁾⁶⁾の開発など今まで例のない結果をすでに得ている。

しかしながら、従来のハイブリッド分子集合体はすべてカチオン性二本鎖界面活性剤 (ベシクル分子) を主体とし、種々のミセル分子と組み合わせたものであった。そこで今回は国武らにより開発されたアニオン性ベシクル分子⁷⁾に素材を変え、カチオン性

ミセル分子と組み合わせたハイブリッド分子集合体を用い、不斉加水分解制御を試みカチオン性ベシクル系との比較検討を行なった。

2 実 験

2.1 試 料

N-ベンジルオキシカルボニル-L-フェニルアラニル-L-ヒスチジル-L-ロイシン (以下, Z-Phe-His-Leu と略記する) は市販品 (BACHEM) をそのまま用いた。

N-ベンジルオキシカルボニル-D- (および L-) フェニルアラニン=*p*-ニトロフェニルエステル (D(L)-ZS) は *N*-ベンジルオキシカルボニル-D- (および L-) フェニルアラニンからジシクロヘキシルカルボジイミドを用いたラセミ化をさける方法⁸⁾にしたがい合成し、元素分析値、融点、および旋光度から純粋な目的化合物が得られていることを確認したのち用いた³⁾。*N*-ドデカノイル-D- (および L-) フェニルアラニン=*p*-ニトロフェニルエステル (D(L)-S₁₂) は Ingles ら⁹⁾のラセミ化をさける方法にしたがい合成し、元素分析値その他から純粋な目的化合物が得られていることを確認したのち用いた³⁾。

2-スルホナトコハク酸ジアルキルナトリウム塩 (2C_mSO₃Na; *m*=10, 12) は無水マレイン酸および1-デカノールから国武らの方法⁷⁾にしたがって合成した。元素分析の結果を示す。

7) T. Kunitake, Y. Okahata, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **51**, 1877 (1978).

8) M. Bodanzky, V. du Vigneaud, *J. Am. Chem. Soc.*, **81**, 5688 (1959).

9) D. W. Ingles, J. R. Knowles, *Biochem. J.*, **104**, 369 (1967).

熊本工業大学工業化学科, 860 熊本市池田

- 1) R. Ueoka, R. A. Moss, S. Swarup, Y. Matsumoto, G. Strauss, Y. Murakami, *J. Am. Chem. Soc.*, **107**, 2185 (1985).
- 2) R. Ueoka, Y. Matsumoto, T. Yoshino, T. Hirose, R. A. Moss, K. Y. Kim, S. Swarup, *Tetrahedron Lett.*, **27**, 1183 (1986).
- 3) R. Ueoka, Y. Matsumoto, R. A. Moss, S. Swarup, S. Sugii, K. Harada, J. Kikuchi, Y. Murakami, *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 1588 (1988).
- 4) 上岡龍一, 北原一太, 岩原正宜, 松本陽子, 川田敏博, 小山裕喜, 油化学, **36**, 808 (1987).
- 5) R. Ueoka, Y. Matsumoto, T. Yoshino, T. Hirose, J. Kikuchi, Y. Murakami, *Chem. Lett.*, **1986**, 127.
- 6) R. Ueoka, Y. Matsumoto, T. Yoshino, N. Watanabe, K. Omura, Y. Murakami, *ibid.*, **1986**, 1743.

D(L)-ZS (R=PhCH₂O)D(L)-S₁₂ (R=CH₃(CH₂)₁₀)2 C₁₀SO₃Na (C₂₄H₄₅O₇SNa)

分析値 C 57.13%, H 9.36%

計算値 C 57.58%, H 9.06%

2 C₁₂SO₃Na (C₂₈H₅₃O₇SNa)

分析値 C 60.32%, H 9.78%

計算値 C 60.39%, H 9.61%

ジアルキルジメチルアンモニウムブロミド (2 C_mBr; m=14, 16) は, N,N'-ジメチルアルキルアミンおよび臭化アルキルから文献¹⁰⁾にしたがい合成した。合成物の元素分析の分析値および計算値を以下に示す。

2 C₁₄Br (C₃₀H₆₄NBr)

分析値 C 69.03%, H 12.32%, N 2.98%

計算値 C 69.44%, H 12.46%, N 2.70%

2 C₁₆Br (C₃₄H₇₂NBr)

分析値 C 70.72%, H 12.60%, N 2.54%

計算値 C 71.02%, H 12.65%, N 2.44%

ヘキサデシルトリメチルアンモニウムブロミド (CTABr) は市販品(東京化成)を無水エタノール-エーテルで再結晶して用いた。

2.2 加水分解反応速度の測定

トリペプチド (Z-Phe-His-Leu) によるアミノ酸エステルの不斉加水分解反応は加水分解生成物として遊離する p-ニトロフェノラートイオン量を 400 nm で日立 150-20 分光光度計を用いて追跡した。既報¹¹⁾と同様の反応過程にしたがっていると考え、加水分解(基質の脱アシル化)速度を求めた。触媒過剰の条件で変化率約 80% 以上まで擬一次速度式(1)にしたがった。

$$\log(A_\infty - A_t) = -k_t \cdot t / 2.303 + \log A_\infty \quad (1)$$

ここで, A_∞ は無限反応時間における, A_t は時間 t における p-ニトロフェノラートイオンの吸光度である。加水分解二次速度定数, k_{a,obsd} は式(2)から求めた。

$$k_{a,obsd} = (k_t - k_a) / [\text{Cat}] \quad (2)$$

ここで, k_t は触媒存在下の, k_a は緩衝液のみによる擬一次速度定数である。また [Cat] は触媒の初濃度である。

緩衝液はトリス(ヒドロキシメチル)メタンアミン水溶液(Tris)を用い, イオン強度を一定にするために塩化カリウムを加えた。反応条件は 25°C, pH 7.6, 0.08 mol·dm⁻³ Tris 緩衝液(0.08 mol·dm⁻³ 塩化カリウム)中 3 vol% アセトニトリル水溶液中であり, Z-Phe-His-Leu 触媒は 1×10⁻⁴ mol·dm⁻³ とした。

10) Y. Okahata, R. Ando, T. Kunitake, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **52**, 3647(1979).

11) 上岡龍一, 森 秀美, 米沢香一郎, 加藤正巳, 大津家裕司, 山田仁穂, 日化, 1979, 522.

なお, 触媒液は, BRANSONIC MODEL B-3200 を用いて, 90 W, 50°C で 1 時間超音波照射し, 均一な透明溶液が得られたことを確認したのち反応速度の実験に用いた。

2.3 相転移温度の測定

ハイブリッド分子集合体の相転移温度 (T_c) は CM-60 S 導電率計(東亜電波)を用いて電気伝導度法により求めた。電気伝導度法により得られた T_c 値は走査型示差熱量計により求められた T_c 値とよく一致することがすでにわかっている¹²⁾。

3 結果と考察

3.1 アニオン性ベシクルとカチオン性ミセルのハイブリッド分子集合体を用いる不斉加水分解制御反応

今回用いたアニオン性ベシクル分子の基本骨格は, エステル部位をもち天然リン脂質の一般構造式により近い構造を有してい

2C₁₀SO₃Na (R=CH₃(CH₂)₉)2C₁₂SO₃Na (R=CH₃(CH₂)₁₁)

天然リン脂質の一般構造式

る。これらアニオン性ベシクル分子は単独ではきわめて水に対する溶解度が小さく, 反応系に不適である。しかし, カチオン性ミセル分子(以下, CTABr と略記する)の添加量を多くしたハイブ

リッド分子集合体になると溶解度が増大し, 2C₁₀SO₃Na+CTABr 系ではミセル含有量が 60~100 mol%, 2C₁₂SO₃Na+CTABr 系では 70~100 mol% の領域で不斉加水分解を試みることができた。結果をそれぞれ表 1 と図 1 および表 2 と図 2 にまとめた。

Table 1 Rate constants (k_{a,obsd}, mol⁻¹·dm³·s⁻¹) and enantioselectivity (k_{a,obsd}^L/k_{a,obsd}^D) for the hydrolysis of D(L)-S₁₂ and D(L)-ZS by Z-Phe-His-Leu in the coaggregate systems of 2 C₁₀SO₃Na + CTABr^{a)}

[CTABr] [2 C ₁₀ SO ₃ Na] +[CTABr] (mol%)	L-ZS	D-ZS	L/D	L-S ₁₂	D-S ₁₂	L/D
60	110	24	4.6	680	33	21
67	150	32	4.7	1200	45	27
75	100	21	4.8	1000	26	38
85	42	10	4.2	340	12	28
100 ^{b)}	30	10	3.0	290	16	18

a) pH 7.6, 25°C, 0.08 mol·dm⁻³ Tris buffer, 0.08 mol·dm⁻³ KCl, 3% (v/v) CH₃CN-H₂O, [Sub]=1×10⁻⁵ mol·dm⁻³, [Cat]=1×10⁻⁴ mol·dm⁻³, [2 C₁₀SO₃Na]=1×10⁻³ mol·dm⁻³.

b) [CTABr]=3×10⁻³ mol·dm⁻³.

12) R. Ueoka, Y. Matsumoto, *J. Org. Chem.*, **49**, 3774 (1984).

Table 2 Rate constants ($k_{a,obsd}$, $\text{mol}^{-1}\cdot\text{dm}^3\cdot\text{s}^{-1}$) and enantioselectivity ($k_{a,obsd}^L/k_{a,obsd}^D$) for the hydrolysis of D(L)-S₁₂ and D(L)-ZS by Z-Phe-His-Leu in the coaggregate systems of 2 C₁₂SO₃Na + CTABr^{a)}

[CTABr] [2 C ₁₂ SO ₃ Na] + [CTABr] (mol%)	L-ZS	D-ZS	L/D	L-S ₁₂	D-S ₁₂	L/D
70	170	41	4.1	540	37	15
75	95	22	4.3	490	30	16
85	40	11	3.6	350	13	27
100 ^{b)}	30	10	3.0	290	16	18

a) pH 7.6, 25°C, 0.08 mol·dm⁻³ Tris buffer, 0.08 mol·dm⁻³ KCl, 3% (v/v) CH₃CN-H₂O, [Sub]=1×10⁻⁵ mol·dm⁻³, [Cat]=1×10⁻⁴ mol·dm⁻³, [2 C₁₂SO₃Na]=1×10⁻³ mol·dm⁻³.

b) [CTABr]=3×10⁻³ mol·dm⁻³.

(アニオン性ベシクル+カチオン性ミセル) ハイブリッド分子集合体における不斉加水分解は長鎖基質 (D(L)-S₁₂) において 25 mol% 2 C₁₀SO₃Na+75 mol% CTABr および 15 mol% 2 C₁₂SO₃Na+85 mol% CTABr において不斉選択性を最大にする最適組成比があるという共通の特徴が見られた。ただし、トリペプチド (Z-Phe-His-Leu) の触媒機能 (速度定数と立体識別能) は、ベシクル分子の疎水鎖長がわずか 2 個しか違わないにもかかわらず、25 mol% 2 C₁₀SO₃Na+75 mol% CTABr の分子集合体において顕著に大きくなっている。この分子集合体は電子顕微鏡写真からは 500~3000 Å の球状コアセルベート様の形態が考えられるが断定するにはいたっていない。なお、D(L)-ZS 基質においては組成変化による不斉加水分解制御はほとんど観測されなかった。

長鎖エナンチオマー基質 (D(L)-S₁₂) における不斉選択性 (L/D) が標準エナンチオマー基質 (D(L)-ZS) にくらべ顕著に大きいことに関連して速度定数に注目してみると、興味ある実験事実が明らかになった。すなわち、D-体基質においては疎水性の効果がなく D-S₁₂ および D-ZS の $k_{a,obsd}$ 値はほとんど同一であるのに対し、L-体基質においては長鎖 (L-S₁₂) 基質に対する加速効果が L-ZS にくらべ顕著に大きいことである。つまり、長鎖エナンチオマー基質の大きな不斉識別反応は L-S₁₂ と Z-Phe-His-Leu がともに反応点の一致に都合のよい立体配置をとることによって達成されている。

さらに、2 C₁₀SO₃Na+CTABr 系と 2 C₁₂SO₃Na+CTABr 系における長鎖エナンチオマー基質の不斉選択性の差もまた L-体基質に対する反応性の差異に由来していることが明確になった。表 1 および 2 から明らかなように、ZS 基質に関しては 75 mol% ミセル/25 mol% ベシクルおよび 85 mol% ミセル/15 mol% ベシクル組成のいずれのハイブリッド分子集合体においても D-および L-ZS 基質の速度定数に差は見られないが、同一組成 (75 mol% ミセル/25 mol% ベシクル) の 2 C₁₀SO₃Na+CTABr 系および 2 C₁₂SO₃Na+CTABr 系では、L-S₁₂ の $k_{a,obsd}$ 値がそれぞれ 1000 mol⁻¹·dm³·s⁻¹ および 490 mol⁻¹·dm³·s⁻¹ となっており、反応加速性が大きく異なっている。2 C₁₀SO₃Na と 2 C₁₂SO₃Na のわずか 2 個のアルキル鎖 (疎水性) の差異が、疎水性エナンチオマー基質 (D(L)-S₁₂) の不斉加水分解の制御の異なりに鋭敏に効いてくることを示している。天然の生体膜においても、おそら

Fig. 1 Enantioselectivity for the hydrolysis of D(L)-S₁₂ and D(L)-ZS by Z-Phe-His-Leu versus coaggregate composition (mol% CTABr in mixture of 2 C₁₀SO₃Na and CTABr)

Fig. 2 Enantioselectivity for the hydrolysis of D(L)-S₁₂ and D(L)-ZS by Z-Phe-His-Leu versus coaggregate composition (mol% CTABr in mixture of 2 C₁₂SO₃Na and CTABr)

くこのような現象は通常的にくり返し起こっており、膜組成および疎水鎖長などの異なる脂質分子の調節が生命維持 (酵素活性など) や感覚 (味覚や臭覚など) に不可欠となっている可能性を示唆している。

3.2 カチオン性ベシクルとカチオン性ミセルのハイブリッド分子集合体を用いる不斉加水分解制御反応

カチオン性のベシクル分子と種々のミセル分子から構成されるハイブリッド分子集合体に活性ペプチド (Z-Phe-His-Leu) を組み込んだ反応系における不斉加水分解制御についてはすでに報告している¹¹⁻¹³⁾。本節においては、同一カチオン性ミセル分子 (CTABr) とアルキル鎖長の異なるカチオン性ベシクル分子 (2 C₁₄Br および 2 C₁₆Br) を組み合わせたハイブリッド膜の物理

Fig. 3 Enantioselectivity ($k_{a,obsd}^L/k_{a,obsd}^D$) for the hydrolysis of D(L)-S₁₂ by Z-Phe-His-Leu (○, right-hand ordinate) and phase-transition temperature (T_c) of the coaggregates (●, left hand ordinate) versus coaggregate composition (mol% of CTABr in mixture of 2 C₁₄Br and CTABr, abscissa) at 25°C and pH 7.6

0.08 mol·dm⁻³ Tris buffer, 0.08 mol·dm⁻³ KCl, 3% (v/v) CH₃CN-H₂O

的特性 (相転移温度) とエナンチオマー識別能特性について論じる。

図3に(2C₁₄Br+CTABr)系の組成比に対する電気伝導度法から求めた相転移温度(T_c)およびエナンチオマー識別能の尺度となる不斉選択性($k_{a,obsd}^L/k_{a,obsd}^D$)を示した。すでに(1)不斉選択性に関しては動的光散乱法により測定された混合分子集合体(2C₁₄Br+CTABr)の大きさに正比例することや、(2)形態に関しては電子顕微鏡写真や動的光散乱法によるサイズの測定などから、不安定な通常の2C₁₄Brベシクル(380×400Å)がミセル分子を混合することにより長期間安定な大きなベシクル(2C₁₄Br/CTABr=5/2(図3のA):630×700Å)に成長し、さらに2C₁₄Br/CTABr=1/2(図3のB)のハイブリッド分子集合体は600×1600Åと巨大化することを確認している³⁾。図3から明らかなようにCTABrが0~33mol%の領域では不斉選択比($k_{a,obsd}^L/k_{a,obsd}^D$)が26~33倍とあまり変化がなく、41mol%(図3のA)で52倍と顕著に大きくなっている。相転移温度(T_c)に注目してみると、CTABrが0~33mol%では19.6~20.8°Cとほとんど変化がなく、ほぼ同一の形態(ベシクル)であると予測される。事実、電子顕微鏡写真も二分子膜ベシクルであることを支持している。一方、59mol% 2C₁₄Br/41mol% CTABr組成の T_c 値は約16°Cと低くなり、CTABr 0~33mol%のベシクルとは異なることを示唆し、電子顕微鏡観察から1~2枚膜の大きなベシクルであることが明らかになった³⁾。CTABrが67mol%以

Table 3 Rate constants ($k_{a,obsd}$, mol⁻¹·dm³·s⁻¹) and enantioselectivity ($k_{a,obsd}^L/k_{a,obsd}^D$) for the hydrolysis of D(L)-S₁₂ and D(L)-ZS by Z-Phe-His-Leu in the coaggregate systems of 2 C₁₆Br+CTABr^{a)}

$\frac{[\text{CTABr}]}{[2 \text{ C}_{16}\text{Br}] + [\text{CTABr}]} \text{ (mol\%)}$	L-S ₁₂	D-S ₁₂	L/D
0	1500	57	27
10	1700	83	20
20	1600	69	22
30	1500	80	19
40	1400	84	17
70	760	31	24
80	470	17	28
100 ^{b)}	290	16	18

a) pH 7.6, 25°C, 0.08 mol·dm⁻³ Tris buffer, 0.08 mol·dm⁻³ KCl, 3% (v/v) CH₃CN-H₂O, [Sub]=1×10⁻⁵ mol·dm⁻³, [Cat]=1×10⁻⁴ mol·dm⁻³, [2 C₁₆Br]=1×10⁻³ mol·dm⁻³.

b) [CTABr]=3×10⁻³ mol·dm⁻³.

Fig. 4 Enantioselectivity ($k_{a,obsd}^L/k_{a,obsd}^D$) for the hydrolysis of D(L)-S₁₂ by Z-Phe-His-Leu (○, right-hand ordinate) and phase transition temperature (T_c) of the coaggregates (●, left-hand ordinate) versus coaggregate composition (mol% of CTABr in mixture of 2 C₁₆Br and CTABr, abscissa) at 25°C and pH 7.6

上の領域での T_c 値は観測されなかった。CTABrが42~66mol%の領域は相分離状態であった。33mol% 2C₁₄Br/67mol% CTABrの混合分子集合体(図3のB)は電顕写真からは楕円球状の巨大化したベシクルと考えられるが、 T_c 値が観測されず、今までの単純なベシクルとしての定義にあてはまらない新しい分子集合体としてとらえる必要があり、エナンチオマー識別能を最大(L/D=72)にできることも魅力的である。

つぎに、ベシクル分子を2C₁₆Brに変え、CTABrとの混合比を変えた分子集合体を反応場として、同様の不斉加水分解を試みた。表3に速度論的結果をまとめ、図4に組成比に対する不斉選択性と相転移温度をプロットした。相分離領域は2C₁₄Br/CTABr系の場合のほとんどが同じであるが、エナンチオマー識別に関し

てはいちじるしく異なることがわかった。 $2\text{C}_{14}\text{Br}/\text{CTABr}$ 混合系では相分離領域付近である 59 mol% $2\text{C}_{14}\text{Br}/41\text{ mol}\%$ CTABr および 33 mol% $2\text{C}_{14}\text{Br}/67\text{ mol}\%$ CTABr で不斉選択性が顕著に大きくなっている。しかし、 $2\text{C}_{16}\text{Br}/\text{CTABr}$ 混合系では相分離領域付近でのエナンチオマー識別能の向上は見られず、20 mol% $2\text{C}_{16}\text{Br}/80\text{ mol}\%$ CTABr 組成比の混合系分子集合体で不斉選択性は極大値を示した。これらのことは、ベシクル分子の疎水鎖長が $2\text{C}_{14}\text{Br}$ と $2\text{C}_{16}\text{Br}$ ではわずかにメチレン鎖 2 個分しか異なっていないにもかかわらず、同一ミセル分子 (CTABr) との混合系分子集合体とした場合、不斉加水分解制御の様相が大きく異なってくることを意味している。とくに $2\text{C}_{16}\text{Br}/\text{CTABr}$ 系における 0~40 mol% CTABr の領域では $2\text{C}_{14}\text{Br}/\text{CTABr}$ 系とは異なり、CTABr の増大とともに不斉選択性が小さくなっている。また、相転移温度 (T_c) も 0~15 mol% で極端に低下し、15~40 mol% ではゆるやかに低下しているが、不斉選択性も T_c 値の変化に対

応して 0~15 mol% で急激に小さくなり、15~40 mol% ではあまり変化が見られなかった。すなわち、 $2\text{C}_{16}\text{Br}/\text{CTABr}$ 系では 0~15 mol% でベシクルの形態が大きく変化し、15~40 mol% の領域ではさほど変化しないことを示唆している。

今回の実験で、ハイブリッド分子集合体の素材としてアニオン性ベシクルを用いた場合もカチオン性ベシクルを用いた場合も、疎水鎖長のわずかな差異により不斉加水分解制御の様相が大きく異なってくるのが明確になった。最近、膜タンパクが機能を発現できるような構造をたもつためには、特別な脂質が必要らしいということがわかってきた。つまり、酵素を代表とする膜タンパクの特異的基質に対する選択性は、環境 (膜組成) の制御に依存する可能性を考えることができる。本論文は、ハイブリッド分子集合体反応場を人為的にわずかに変化させてもペプチド触媒活性を制御できることを実証したものであり、膜タンパク活性化と膜組成変化の密接な関連を支持している。

Enantioselective Hydrolysis of Amino Acid Esters in Organized Hybrid Assemblies

Ryuichi UEOKA*, Yōko MATSUMOTO, Naruto MATSUO,
Takahiro TAGUCHI and Shinji UBATA

*Department of Industrial Chemistry, Kumamoto Institute of Technology;
Kumamoto-shi 860 Japan*

The stereoselective hydrolysis of the long-chain substrate (*p*-nitrophenyl *N*-dodecanoyl-*D*(L)-phenylalaninate) catalyzed by the active tripeptide (*N*-(benzyloxycarbonyl)-*L*-phenylalanyl-*L*-histidyl-*L*-leucine) was found to be controlled by changing the reaction field (the species of surfactants and the composition of coaggregates) in the hybrid aggregates composed of the cationic micellar surfactant (hexadecyltrimethylammonium bromide) and the vesicular surfactants (anionic sodium succinatedialkyl 2-sulfonatosuccinate or cationic dialkyldimethylammonium bromide).