ラセミ体エステル基質の不斉加水分解反応と制御

(1991 年 10 月 24 日 受理)

上岡 龍一*・矢野 嘉宏・内山 秀直

小山 裕喜・迫口 明浩・加藤 康夫

今回, ラセミ体エステル基質の不斉加水分解を行い, L 体と D 体の加水分解速度定数をシンプレックス法によって解析した。その結果, 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 (Z-PheHisLeu) を用いたミセル系でのフェニルエステル基質の加水分解反応において, エナンチオマー基質を用いた場合と同程度の速度定数が得られ, ラセミ体を用いても高い不斉識別機能 (L/D) を発現できることが明確になった。しかし, 長鎖ヒスチジン誘導体 *N*-テトラデカノイル-L-ヒスチジン (Myr-His) 触媒およびジペプチド触媒 *N*-ベンジルオキシカルボニル-L-フェニルアラニル-L-ヒスチジン (Z-PheHis) を用いた場合にはエナンチオマー基質にくらべ, ラセミ体基質で L/D 選択性を低下させるケースが観測された。

1 緒 言

生体内における化学反応は無数の種類の分子や反応からなり, これらは, 関連しあい, 相補的でもある分子の機能の見事なバランスの上に成り立っている。バイオメティックケミストリーは生体類似化学プロセスの人工的な構築を目指す, 実用化のためには, 超分子レベルでの特異的分子機能に関する知識の膨大な集積が不可欠である¹⁾。

これまで著者らは, 分子集合体機能を用いた人工酵素系での不斉加水分解に関して, エナンチオマー基質を用いた分子レベルでの研究を推進している。不斉識別機能発現のためには, まず i) ペプチド触媒および基質の「鍵と鍵穴」のごとき相補分子設計が重要であること²⁾さらに ii) ミセル系や二分子膜系よりミセルと二分子膜のハイブリッド系分子集合体が高次立体制御に適していること³⁾を明確にした。そして iii) イオン強度や温度の微調節でペプチド触媒の配座が最適化でき L 体基質にのみの触媒作用に成功した⁴⁾。

しかしながら, 今までの不斉加水分解反応の研究はすべて L 体および D 体のそれぞれのエナンチオマーを出発基質とした速度論であり, 両者が共存するラセミ体基質を用いた研究は皆無である。そこで, 今回初めてラセミ体基質を用い, L 体と D 体のそれぞれの加水分解反応速度定数を, シンプレックス法により解析した。本論文ではエナンチオマー基質のみの基質を出発とした場合

の速度定数と比較し, L 体, D 体基質分子が共存する系での不斉識別機構について報告する。

R = PhCH₂O
Z-L(D)-Phe-ONP

R = PhCH₂O
Z-L(D)-Phe-PNP

R = CH₃(CH₂)₁₀
C₁₂-L(D)-Phe-ONP

R = CH₃(CH₂)₁₀
C₁₂-L(D)-Phe-PNP

熊本工業大学工業化学科, 860 熊本市池田

- 1) 村上幸人, 化学と工業, 43, 1222(1990).
- 2) 上岡龍一, 松本陽子, 原田久美子, 杉井 篤, 有合化, 47, 53(1989).
- 3) R. Ueoka, Y. Matsumoto, R. A. Moss, S. Swarup, A. Sugii, K. Harada, J. Kikuchi, Y. Murakami, *J. Am. Chem. Soc.*, 110, 1588(1988).
- 4) R. Ueoka, Y. Matsumoto, T. Yoshino, N. Watanabe, K. Omura, Y. Murakami, *Chem. Lett.*, 1986, 1743.

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-PheHisLeu 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-L-フェニルアラニル-L-ヒスチジン (Z-PheHis) は従来⁵⁾の方法で合成したものを用いた。*N*-テトラデカノイル-L-ヒスチジン (Myr-His) は L-ヒスチジンとテトラデカノイルクロリドから文献⁶⁾の方法に従って合成した。生成物の融点, 元素分析値を以下に示す。

Myr-His ($\text{C}_{20}\text{H}_{35}\text{N}_3\text{O}_3$) mp 195 °C dec.

分析値 C 65.87%, H 9.61%, N 11.30%

計算値 C 65.75%, H 9.59%, N 11.51%

N-ベンジルオキシカルボニル-L-バリン-L-ヒスチジン (Z-ValHis) は従来⁵⁾の方法で合成したものを用いた。

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 (Z-D(L)-Phe-PNP) と *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=*o*-ニトロフェニルエステル (Z-D(L)-Phe-ONP) 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クロヘキシルカルボジイミドを用いた方法⁷⁾に従い合成し, 元素分析値, 融点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⁾。

ラセミ体基質 *N*-ベンジルオキシカルボニル-DL-フェニルアラニン=*p*-ニトロフェニルエステル (Z-DL-Phe-PNP) および *N*-ベンジルオキシカルボニル-DL-フェニルアラニン=*o*-ニトロフェニルエステル (Z-DL-Phe-ONP) もラセミ体原料 *N*-ベンジルオキシカルボニル-DL-フェニルアラニンからエナンチオマーと同様の方法で合成した。生成物の融点および元素分析値を以下に示す。

Z-DL-Phe-PNP ($\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_6$) mp 107.0~109.8 °C.

分析値 C 65.63%, H 4.72%, N 6.68%

計算値 C 65.70%, H 4.78%, N 6.66%

Z-DL-Phe-ONP ($\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_6$) mp 98.2~99.3 °C.

分析値 C 65.89%, H 4.79%, N 6.69%

計算値 C 65.70%, H 4.78%, N 6.66%

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 (C_{12} -D(L)-Phe-PNP) と *N*-ドデカノイル-D- (および L-) フェニルアラニン=*o*-ニトロフェニルエステル (C_{12} -D(L)-Phe-ONP) は Ingles らの方法⁸⁾にしたがい合成し, 元素分析値, 融点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⁾。

ラセミ体基質 *N*-ドデカノイル-DL-フェニルアラニン=*p*-ニトロフェニルエステル (C_{12} -DL-Phe-PNP) および *N*-ドデカノイル-DL-フェニルアラニン=*o*-ニトロフェニルエステル (C_{12} -DL-Phe-ONP) もエナンチオマーと同様の方法で合成した。生成物の融点および元素分析値を以下に示す。

C_{12} -DL-Phe-PNP ($\text{C}_{27}\text{H}_{36}\text{N}_2\text{O}_6$) mp 103.5~106.0 °C.

分析値 C 69.03%, H 7.73%, N 6.20%

計算値 C 69.21%, H 7.74%, N 5.98%

C_{12} -DL-Phe-ONP ($\text{C}_{27}\text{H}_{36}\text{N}_2\text{O}_6$) mp 82.5~83.0 °C.

分析値 C 69.43%, H 7.71%, N 6.10%

計算値 C 69.21%, H 7.74%, N 5.98%

ベンジルヘキサデシルジメチルアンモニウムクロリド (CBz-AC) 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 加水分解反応の測定とエナンチオマー基質の速度論解析

不斉加水分解反応では, 図1に示すようにイミダゾール触媒のアシル化 (k_a) と, その後の脱アシル化 (k_d) 過程が考えられる。本実験ではアシル化過程において遊離するフェラートアニオンの生成量を追跡して基質の脱アシル化 (触媒のアシル化) 速度を求めた。実際には, 日立 150-20 分光光度計を用い遊離する *p*-ニトロフェノラートイオンを 400 nm で, また *o*-ニトロフェノラートイオンは 410 nm で追跡した。

図1の基質の脱アシル化反応は触媒過剰の条件で, 変化率 80% まで擬一次速度式 (1) に従う。

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

ここで, A_∞ は無限反応時間における, A_t は時間 t におけるニトロフェノラートイオンの吸光度である。触媒存在下の擬一次速度定数は k_d で表される。(1) 式によって得られたデータを最小二乗法処理をし, 擬一次速度定数を求めた。

Fig.1 Catalytic cycle for the imidazole catalyzed hydrolysis of *p*-nitrophenyl esters

5) Y. Ihara, N. Kunikiyo, T. Kunimasa, Y. Kimura, M. Nango, N. Kuroki, *J. Chem. Soc., Perkin Trans., 2*, 1983, 1741.

6) 上岡龍一, 松本陽子, 古家義朗, 白石 誠, 日化, 1983, 1412.

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

8) D. W. Ingles, J. R. Knowles, *Biochem. J.*, 104, 396 (1967).

なお、無触媒の加水分解速度定数は触媒存在下のそれ (k_t) にくらべて十分小さく、また、L 体および D 体基質では差異が認められないので、今回の速度解析並びに論議には考慮にいれなかった。

2.3 シンプレックス法によるラセミ体速度論解析

ある現象に対するモデルを定式化し、そのモデルによる計算値と測定値とが最もよく一致するように式中のパラメーターの値を決定する方法のひとつとして、シンプレックス法が多くの分野で用いられている。例えば、Elskens ら⁹⁾は NADPH 存在下での反応において逐次二次反応速度式の三つの反応速度定数を決定するためにシンプレックス法を用いた。

ラセミ体基質の不斉加水分解反応における L 体および D 体基質の反応速度定数もシンプレックス法を用いて求めることができると考えられる。以下にその方法を述べる。

エナンチオマー基質の場合と同様にラセミ体基質の場合でも L 体および D 体基質は触媒過剰の条件下で変化率 80% 以上までそれぞれ擬一次速度式にしたがうと仮定すると次の二つの式が得られる。

$$\log(A_\infty^L - A_t^L) = -k_t^L \cdot t / 2.303 + \log A_\infty^L \quad (2)$$

$$\log(A_\infty^D - A_t^D) = -k_t^D \cdot t / 2.303 + \log A_\infty^D \quad (3)$$

ここで、 k_t^L および k_t^D は、それぞれ L 体および D 体基質の擬一次速度定数である。 A_t^L および A_t^D は、それぞれ L 体および D 体の反応開始後時間 θ におけるニトロフェノラートイオンの吸光度である。 A_∞^L および A_∞^D はそれぞれ L 体および D 体基質の無限反応時間でのニトロフェノラートイオンの吸光度である。さらに、L 体および D 体基質の反応は同時に始まるが、反応開始から分光光度計による吸光度の記録が始まるまでに時間 T の遅れが生ずるとすると式 (2) および (3) は次のようになる。ただし、分光光度計による吸光度の記録が始まってからの経過時間を θ (すなわち $t = \theta + T$ となる) で表す。

$$\log(A_\infty^L - A_{\theta+T}^L) = -k_t^L \cdot (\theta + T) / 2.303 + \log A_\infty^L \quad (4)$$

$$\log(A_\infty^D - A_{\theta+T}^D) = -k_t^D \cdot (\theta + T) / 2.303 + \log A_\infty^D \quad (5)$$

ラセミ体の反応において、測定される吸光度 A_t^R は、L 体および D 体基質の反応に由来する吸光度 A_t^L および A_t^D の和として表される。

$$A_t^R = A_t^L + A_t^D$$

ここで、時間 θ を用いて上式を表すと次式のようにになる。

$$\begin{aligned} A_{\theta+T}^R &= A_{\theta+T}^L + A_{\theta+T}^D \\ &= A_\infty^L \{1 - \exp[-k_t^L(\theta + T)]\} + A_\infty^D \{1 - \exp[-k_t^D(\theta + T)]\} \end{aligned} \quad (6)$$

ここで、ラセミ体基質の場合 $A_\infty^L = A_\infty^D = A_\infty^R / 2$ であるから、式 (6) は次式のようにになる。

$$A_{\theta+T}^R = (A_\infty^R / 2) \{2 - \exp[-k_t^L(\theta + T)] - \exp[-k_t^D(\theta + T)]\} \quad (7)$$

式 (7) で表したラセミ体基質の不斉加水分解反応の機構を図

Fig. 2 Time courses of changes in absorbance of the nitrophenolate ion for the hydrolysis of racemic substrates

2 に示す。

ラセミ体基質の反応において測定された吸光度 A_t^R の経時変化のデータが式 (7) を満足するように、シンプレックス法を用いて式 (7) 中のパラメーター k_t^L , k_t^D , T および A_∞^R を求めた。式 (7) から目的関数を次のようにおいた。

$$f = \sum_i \{A_{\theta+T}^R - (A_\infty^R / 2) \{2 - \exp[-k_t^L(\theta + T)] - \exp[-k_t^D(\theta + T)]\}\}^2 \quad (8)$$

目的関数に含まれる四つのパラメーターの初期値は次のように設定された。まず、 k_t^L および k_t^D の初期値は、それぞれエナンチオマー基質を用いた反応において式 (2) および (3) を仮定して得られた L 体および D 体の反応速度定数である。 T の初期値は、0[s] であり、 A_∞^R の初期値はラセミ体基質を用いた反応において十分時間が経過した時の吸光度の測定値である。

A_∞^R の収束値と測定値とがほぼ一致した場合、得られた k_t^L と k_t^D をラセミ体基質の反応における L 体および D 体の反応速度定数であるとした。

一方、 A_∞^R の収束値と測定値とが一致せず、異常な収束値が得られた場合、式 (8) のパラメーター A_∞^R をラセミ体基質の反応により得られた測定値で固定し、他の三つのパラメーター k_t^L , k_t^D および T を最適化した。この方法は、Z 基をもつ基質や、触媒に Z-Val His を用いた場合など、L 体と D 体の速度比が比較的小さな場合に適用した。

以上の計算は、BASIC 言語で自作したプログラムをパーソナルコンピュータ (PC-9801 RX, 日本電気製) 上で実行した。

3 結果と考察

3.1 エナンチオマー基質とラセミ体基質の加水分解

CBzAC ミセルに活性ペプチド触媒を組み込んだ系において、 C_{12} -DL-Phe-ONP, C_{12} -DL-Phe-PNP, Z-DL-Phe-ONP, Z-DL-Phe-PNP 基質の不斉加水分解反応について実験を行った。それぞれの基質について光学異性体が単独の場合と光学異性体が混合している場合の二つの条件下で L 体、D 体基質の k_t 値、および、 k_t^L/k_t^D を求めた。

加水分解反応の測定のうち L 体、D 体単独 (エナンチオマー) の系では擬一次速度式による通常速度論解析を行い、L 体、D 体が等モル混在した (ラセミ体) 系では新たにシンプレックス法

9) M. Elskens, M. J. Penninckx, R. Vandeloise, E. Vander Donckt, *Int. J. Chem. Kinet.*, **20**, 837(1988).

をもちいたラセミ体速度解析を行ってそれぞれ速度定数 (k_t 値) を確定し結果をそれぞれ表 1 ~ 4 にまとめた。

表 1 は、触媒として Z-PheHisLeu トリペプチドを用いた場合の結果である。Z-PheHisLeu 触媒下では、実験に用いたすべての基質において、エナンチオマーでの L 体とラセミ体の L 体、エナンチオマーでの D 体とラセミ体の D 体で、加水分解速度定数 (k_t 値) がそれぞれほぼ等しい値を示した。この結果から、高い不斉選択能を持つ Z-PheHisLeu 触媒は、ラセミ体基質を用いた

場合も、エナンチオマー基質を単独に用いた場合も大きな不斉識別機能を発現できたことになる。つまり、L 体と D 体基質が共存するラセミ体基質のうち、お互いの光学異性体は阻害的に働くことはないことを示唆している。

表 2 は、触媒として Z-PheHis 触媒を用いた場合の結果である。興味深いことは、C₁₂-Phe-PNP 基質において L 体単独 (エナンチオマー) での L 体の加水分解速度 (k_t 値) と、L 体と D 体が共存するラセミ体中での L 体の加水分解速度 (k_t 値) に差異

Table 1 First-order rate constants (k_t, s^{-1}) for the hydrolysis of enantiomeric substrates and racemic substrates catalyzed by Z-PheHisLeu in the CBzAC micellar system^{a)}.

	<i>p</i> -Nitro substrate	k_t (s^{-1})	k_t^L/k_t^D	<i>o</i> -Nitro substrate	k_t (s^{-1})	k_t^L/k_t^D
Enantiomer	$\begin{cases} C_{12}\text{-L-Phe-PNP} \\ C_{12}\text{-D-Phe-PNP} \end{cases}$	$\begin{matrix} 0.569 \\ 0.0324 \end{matrix}$	18	$\begin{cases} C_{12}\text{-L-Phe-ONP} \\ C_{12}\text{-D-Phe-ONP} \end{cases}$	$\begin{matrix} 0.752 \\ 0.0469 \end{matrix}$	16
Racemate	$\begin{cases} C_{12}\text{-DL-Phe-PNP} \\ \quad \quad \quad (L) \\ \quad \quad \quad (D) \end{cases}$	$\begin{matrix} 0.587 \\ 0.0319 \end{matrix}$	18	$\begin{cases} C_{12}\text{-DL-Phe-ONP} \\ \quad \quad \quad (L) \\ \quad \quad \quad (D) \end{cases}$	$\begin{matrix} 0.762 \\ 0.0450 \end{matrix}$	17
Enantiomer	$\begin{cases} Z\text{-L-Phe-PNP} \\ Z\text{-D-Phe-PNP} \end{cases}$	$\begin{matrix} 0.0563 \\ 0.0129 \end{matrix}$	4.4	$\begin{cases} Z\text{-L-Phe-ONP} \\ Z\text{-D-Phe-ONP} \end{cases}$	$\begin{matrix} 0.0753 \\ 0.0155 \end{matrix}$	4.9
Racemate	$\begin{cases} Z\text{-DL-Phe-PNP} \\ \quad \quad \quad (L) \\ \quad \quad \quad (D) \end{cases}$	$\begin{matrix} 0.0596 \\ 0.0130 \end{matrix}$	4.6	$\begin{cases} Z\text{-DL-Phe-ONP} \\ \quad \quad \quad (L) \\ \quad \quad \quad (D) \end{cases}$	$\begin{matrix} 0.0726 \\ 0.0131 \end{matrix}$	5.5

a) 25 °C, pH 7.6, 0.083 M Tris-KCl buffer, 3%(v/v) CH₃CN-H₂O, [enantiomeric sub]= 1×10^{-5} M, [racemic sub]= 2×10^{-5} M, [Z-PheHisLeu]= 2×10^{-4} M, [CBzAC]= 1×10^{-3} M.

Table 2 First-order rate constants (k_t, s^{-1}) for the hydrolysis of enantiomeric substrates and racemic substrates catalyzed by Z-PheHis in the CBzAC micellar system^{a)}.

	<i>p</i> -Nitro substrate	k_t (s^{-1})	k_t^L/k_t^D	<i>o</i> -Nitro substrate	k_t (s^{-1})	k_t^L/k_t^D
Enantiomer	$\begin{cases} C_{12}\text{-L-Phe-PNP} \\ C_{12}\text{-D-Phe-PNP} \end{cases}$	$\begin{matrix} 0.508 \\ 0.0478 \end{matrix}$	11	$\begin{cases} C_{12}\text{-L-Phe-ONP} \\ C_{12}\text{-D-Phe-ONP} \end{cases}$	$\begin{matrix} 0.722 \\ 0.0857 \end{matrix}$	8.4
Racemate	$\begin{cases} C_{12}\text{-DL-Phe-PNP} \\ \quad \quad \quad (L) \\ \quad \quad \quad (D) \end{cases}$	$\begin{matrix} 0.272 \\ 0.0457 \end{matrix}$	5.7	$\begin{cases} C_{12}\text{-DL-Phe-ONP} \\ \quad \quad \quad (L) \\ \quad \quad \quad (D) \end{cases}$	$\begin{matrix} 0.729 \\ 0.0923 \end{matrix}$	8.0
Enantiomer	$\begin{cases} Z\text{-L-Phe-PNP} \\ Z\text{-D-Phe-PNP} \end{cases}$	$\begin{matrix} 0.118 \\ 0.0221 \end{matrix}$	5.3	$\begin{cases} Z\text{-L-Phe-ONP} \\ Z\text{-D-Phe-ONP} \end{cases}$	$\begin{matrix} 0.111 \\ 0.0293 \end{matrix}$	3.8
Racemate	$\begin{cases} Z\text{-DL-Phe-PNP} \\ \quad \quad \quad (L) \\ \quad \quad \quad (D) \end{cases}$	$\begin{matrix} 0.115 \\ 0.0219 \end{matrix}$	5.3	$\begin{cases} Z\text{-DL-Phe-ONP} \\ \quad \quad \quad (L) \\ \quad \quad \quad (D) \end{cases}$	$\begin{matrix} 0.113 \\ 0.0245 \end{matrix}$	4.6

a) 25 °C, pH 7.6, 0.083 M Tris-KCl buffer, 3%(v/v) CH₃CN-H₂O, [enantiomeric sub]= 1×10^{-5} M, [racemic sub]= 2×10^{-5} M, [Z-PheHis]= 2×10^{-4} M, [CBzAC]= 1×10^{-3} M.

Table 3 First-order rate constants (k_t, s^{-1}) for the hydrolysis of enantiomeric substrates and racemic substrates catalyzed by Myr-His in the CBzAC micellar system^{a)}.

	<i>p</i> -Nitro substrate	k_t (s^{-1})	k_t^L/k_t^D	<i>o</i> -Nitro substrate	k_t (s^{-1})	k_t^L/k_t^D
Enantiomer	$\begin{cases} C_{12}\text{-L-Phe-PNP} \\ C_{12}\text{-D-Phe-PNP} \end{cases}$	$\begin{matrix} 0.432 \\ 0.145 \end{matrix}$	3.0	$\begin{cases} C_{12}\text{-L-Phe-ONP} \\ C_{12}\text{-D-Phe-ONP} \end{cases}$	$\begin{matrix} 0.475 \\ 0.222 \end{matrix}$	2.1
Racemate	$\begin{cases} C_{12}\text{-DL-Phe-PNP} \\ \quad \quad \quad (L) \\ \quad \quad \quad (D) \end{cases}$	$\begin{matrix} 0.226 \\ 0.149 \end{matrix}$	1.5	$\begin{cases} C_{12}\text{-DL-Phe-ONP} \\ \quad \quad \quad (L) \\ \quad \quad \quad (D) \end{cases}$	$\begin{matrix} 0.481 \\ 0.215 \end{matrix}$	2.2
Enantiomer	$\begin{cases} Z\text{-L-Phe-PNP} \\ Z\text{-D-Phe-PNP} \end{cases}$	$\begin{matrix} 0.297 \\ 0.120 \end{matrix}$	2.5	$\begin{cases} Z\text{-L-Phe-ONP} \\ Z\text{-D-Phe-ONP} \end{cases}$	$\begin{matrix} 0.205 \\ 0.0906 \end{matrix}$	2.3
Racemate	$\begin{cases} Z\text{-DL-Phe-PNP} \\ \quad \quad \quad (L) \\ \quad \quad \quad (D) \end{cases}$	$\begin{matrix} 0.219 \\ 0.110 \end{matrix}$	2.7	$\begin{cases} Z\text{-DL-Phe-ONP} \\ \quad \quad \quad (L) \\ \quad \quad \quad (D) \end{cases}$	$\begin{matrix} 0.215 \\ 0.0939 \end{matrix}$	2.3

a) 25 °C, pH 7.6, 0.083 M Tris-KCl buffer, 3%(v/v) CH₃CN-H₂O, [enantiomeric sub]= 1×10^{-5} M, [racemic sub]= 2×10^{-5} M, [Myr-His]= 2×10^{-4} M, [CBzAC]= 1×10^{-3} M.

Table 4 First-order rate constants (k_t, s^{-1}) for the hydrolysis of enantiomeric substrates and racemic substrates catalyzed by Z-ValHis in the CBzAC micellar system^{a)}.

	<i>p</i> -Nitro substrate	k_t (s^{-1})	k_t^L/k_t^D	<i>o</i> -Nitro substrate	k_t (s^{-1})	k_t^L/k_t^D
Enantiomer	$\begin{cases} C_{12}\text{-L-Phe-PNP} \\ C_{12}\text{-D-Phe-PNP} \end{cases}$	$\begin{cases} 0.0494 \\ 0.0211 \end{cases}$	2.3	$\begin{cases} C_{12}\text{-L-Phe-ONP} \\ C_{12}\text{-D-Phe-ONP} \end{cases}$	$\begin{cases} 0.0520 \\ 0.0145 \end{cases}$	3.6
Racemate	$\begin{cases} C_{12}\text{-DL-Phe-PNP} \\ \quad \quad \quad (L) \\ \quad \quad \quad (D) \end{cases}$	$\begin{cases} 0.0332 \\ 0.0215 \end{cases}$	1.5	$\begin{cases} C_{12}\text{-DL-Phe-ONP} \\ \quad \quad \quad (L) \\ \quad \quad \quad (D) \end{cases}$	$\begin{cases} 0.0785 \\ 0.0234 \end{cases}$	3.4

a) 25 °C, pH 7.6, 0.083 M Tris-KCl buffer, 3%(v/v) CH₃CN-H₂O, [enantiomeric sub]= 1×10^{-5} M, [racemic sub]= 2×10^{-5} M, [Z-ValHis]= 2×10^{-4} M, [CBzAC]= 1×10^{-3} M.

が認められた。ラセミ体 C₁₂-Phe-PNP 基質において L 体の k_t 値がエナンチオマー L 体にくらべ顕著に低下している (k_t : 0.508 s⁻¹ (エナンチオマー), 0.272 s⁻¹ (ラセミ体))。一方, D 体基質の反応性低下は見られないことから, L 体基質のみに D 体基質による拮抗的阻害が生じたと考えられる。結果として, k_t^L/k_t^D 値も C₁₂-Phe-PNP ラセミ体基質において低下した。その他の基質については, k_t 値, k_t^L/k_t^D 値とも, エナンチオマーとラセミ体での差異は見られなかった。

表 3 は触媒として Myr-His を用いた場合の結果である。Myr-His 触媒下でも Z-PheHis 触媒を用いたときと同様, C₁₂-Phe-PNP ラセミ体での L 体の k_t 値がエナンチオマー L 体にくらべ低下することが明確になった (k_t : 0.432 s⁻¹ (エナンチオマー), 0.226 s⁻¹ (ラセミ体))。その結果, k_t^L/k_t^D 値も C₁₂-Phe-PNP ラセミ体基質の場合に低下している。その他の基質については, k_t 値, k_t^L/k_t^D 値とも, エナンチオマーとラセミ体とでの差異は見られなかった。Z-PheHis を用いた場合と同様に, D 体基質が拮抗阻害し, L 体基質の反応低下をもたらしたものと考えられる。

表 4 は, 触媒として Z-ValHis を用いた場合の結果である。ここでも前記の反応で見られたように, ラセミ体 C₁₂-Phe-PNP 基質の L 体で速度定数が低下した (k_t : 0.0494 s⁻¹ (エナンチオマー), 0.0215 s⁻¹ (ラセミ体))。 k_t^L/k_t^D 値も C₁₂-Phe-PNP 基質において低下している。また, Z-ValHis 触媒を用いた系では, C₁₂-Phe-ONP 基質の場合 k_t^L/k_t^D 値がほぼ同一であるが, エナンチオマーにくらべ L 体, D 体ともにラセミ体基質で加水分解速度 (k_t 値) が加速された。加速反応機構の詳細については, 現在のところ明確ではない。

4 結 論

以上 4 種の触媒を用いた結果から注目すべき点を要約すると, (1) α -ヘリックス様構造をもつ Z-PheHisLeu 触媒³⁾については, ラセミ体基質でも, L 体優先の高い不斉識別が妨げられることなく有効に発現されることが初めて実験的に確認された。(2) α -ヘリックス構造がとれない Z-PheHis, Myr-His, および Z-ValHis では, 基質の構造の違い (長鎖と Z 基, *p*- および *o*-異性体) によりエナンチオマーとラセミ体基質の反応性が異なる場合があることを明確にした。基質の置換基の位置の違いによるわずかな構造上の差異が, 不斉選択に影響を与えることは, エナンチオマー基質を用いてこれまでに知られている¹⁰⁾。今回のように L 体と D 体が等量共存する条件下でも, 不斉識別機能に基質の構造が微妙に影響をおよぼす事実から, 立体選択的反応系を設計する場合, 基質分子の構造にも十分留意する必要があることを示している。

今回, パーソナルコンピュータによってシンプレックス計算を行ったが, 今後さらに, 配座エネルギー計算, 分子モデリング¹¹⁾などの“コンピューター化学”の助けをかりて, ラセミ体のみならず種々の基質の分子集合体系における構造効果と反応特異性の関連がより明らかになるであろう。

10) R. Ueoka, Y. Matsumoto, H. Dozono, Y. Yano, H. Hirasa, K. Goto, Y. Kato, *Tetrahedron Lett.*, **37**, 5311(1990).

11) Y. Ihara, S. Asakawa, K. Igata, Y. Matsumoto, R. Ueoka, *J. Chem. Soc., Perkin Trans.*, **2**, 1991, 543.

Steric Control for the Enantioselective Hydrolysis of Racemic Ester Substrates

Ryuichi UEOKA, Yoshihiro YANO, Hidenao UCHIYAMA, Hiroki OYAMA
Akihiro SAKOGUCHI and Yasuo KATO

Kumamoto Institute of Technology ; Kumamoto-shi 860 Japan

The rate constants for the enantioselective hydrolysis of L- and D-isomers in racemic substrates were determined for the first time by use of the simplex method. The noteworthy aspects are as follows : (a) the rate constants and enantioselectivity for the hydrolysis of the racemic substrates catalyzed by the most active tripeptide *N*-benzyloxycarbonyl-L-phenylalanyl-L-histidyl-L-leucine (Z-PheHisLeu) having the α -helix structure agreed well with those for the hydrolysis of the enantiomer substrates with the same catalyst in the micellar systems ; (b) the enantioselectivity for the hydrolysis of the racemic substrates by the dipeptide *N*-benzyloxycarbonyl-L-phenylalanyl-L-histidine (Z-PheHis) or the long-chained amino acid *N*-tetradecanoyl-L-histidine (Myr-His) catalyst was fairly reduced as compared with that for the hydrolysis of enantiomeric substrates with the same catalyst in the micellar systems.