L-アミノ酸の合成に関する研究 (第2報)*

L-グルタミン酸より L-プロリンの合成 (2)

田中正生, 貴志光雄, 木下祝郎 (協和醸酵工業株式会社東京研究所)

昭和 35 年 6 月 15 日 受理

著者等は前報⁽¹⁾において水溶液中で L-グルタミン酸- γ -エステルをナトリウムボロヒドリドにて還元する事で理論量の 34% の収率で L-プロリンを生成せしめる事を報告し, その反応機構として (1) グルタミン酸- γ -エステルより生じた α -ピロリドン-5-カルボン酸の還元, (2) エステルの還元にて生ずるグルタミン酸- γ -セミアルデヒドの閉環で生成する Δ^1 -ピロリン-5-カルボン酸の還元, (3) エステルより還元で生じた α -アミノ- δ -ヒドロキシバレリアン酸の閉環, の三つを推定した(第1図). 本報ではこの点について検討を行い, その結果よりこの反応は L-グルタミン酸- γ -エステルが L-グルタミン酸- γ -セミアルデヒドに還元され, L- Δ^1 -ピロリン-5-カルボン酸に閉環し再び還元され L-プロリンが生ずる (2) の反応経路を通る事を確認したので報告する.

第1図 プロリン合成経路

実験結果並びに考察

1) 反応経路 (1) の可能性 前記三反応中 (1) の L-グルタミン酸エステルが脱水閉環して生ずる L-2-ピロリドン-5-カルボン酸がナトリウムボロヒドリドにより L-プロリンに還元される可能性は 2-ピロリドン-5-カルボン酸が本還元剤によっては全く還元される事がなければ否定される. 所で 2-ピロリドン-5-カルボン酸のエステルをリチウムアルミニウムヒドリドの如き還元剤で還元する場合にはプロリノールを生ずる事は Karrer 等の報告もあり, プロリンの立体配置を決定するのに利用された例もあるし⁽²⁾, 又 Fischer 等のナトリウムアマルガムによる還元の場合も同様プロリノールを生じたものと考えられている. 併し 2-ピロリドン-5-カルボン酸の水溶液を中和した後, ナトリウムボロヒドリドを氷冷下添加し 2 時間反応せしめた反応混合物をブタノール:酢酸:水の溶媒にて展開し, ニンヒドリンにて発色せしめたペーパークロマトグラム上にはグルタミン酸以外にアミノ酸を検出し得なかった. この結果は本処理により 2-ピロリドン-5-カルボン酸の加水分解が起りグルタミン酸を生ずるが, 還元される事がない事実を示したもので, グルタミン酸- γ -エステルのナトリウムボロヒドリドでの還元によるプロリンの生成は 2-ピロリドン-5-カルボン酸を経て進行するものではない.

2) 反応経路 (3) の可能性 (3) の反応機構でグルタミン酸の還元が進行するとすれば中間体として α -アミノ- δ -ヒドロキシバレリアン酸が生ずるが, α -アミノ- δ -ヒドロキシバレリアン酸は中性内至微アルカリ性では安定であって, 濃塩酸と加熱する事によって高収率でプロリンを与える事が知られている⁽³⁾. しかるに本実験の反応液の液性はアルカリ性であり, 安定な状態であるにもかかわらずその反応混合物中には α -アミノ- δ -ヒドロキ

* Studies on the Synthesis of L-Amino Acids. Part II. A Synthesis of L-Proline from L-Glutamic Acid. (2)

By Masao TANAKA, Teruo KISHI and Shukuo KINOSHITA (Tokyo Research Lab., Kyowa Hakko Kogyô Co., Ltd.)

第 1 表 α -アミノ- δ -ヒドロキシバレリアン酸よりプロリンの生成

処理条件(反応溶液)*	プロリン生成量 (対理論量%)
水 溶 液	5.0
ナトリウムボロヒドリド溶液	5.7
硼酸ナトリウム溶液	5.4
水酸化ナトリウム溶液	5.7
濃 塩 酸	48.5

* 溶質濃度等の反応条件は実験方法の部に記載する。

シバレリアン酸は認められないし、反応混合物を濃塩酸と加熱してもプロリンの生成は見られない。一方ナトリウムボロヒドリド、水酸化ナトリウム或は硼酸ナトリウム溶液中にて α -アミノ- δ -ヒドロキシバレリアン酸を処理しても、濃塩酸処理と異り、プロリンの生成は殆んど見られない(第 1 表)。これ等の事実より本反応が α -アミノ- δ -ヒドロキシバレリアン酸を経て進行したとは考えにくい。つまりグルタミン酸エステルのナトリウムボロヒドリド処理によるプロリンの生成収率は 35% 前後であるに対し、この

処理で生ずる可能性のある諸条件下で α -アミノ- δ -ヒドロキシバレリアン酸はプロリンを僅かに 5% 前後しか与えぬことは、この還元反応が (3) の経路を通らぬと考えてさしつかえない。なお α -アミノ- δ -ヒドロキシバレリアン酸はオルニチン銅塩の亜硝酸処理⁽⁴⁾により得たものである。

3) 反応経路 (2) の可能性 この反応により生ずると想定しているグルタミン酸- γ -セミアルデヒドは生体内でのプロリン合成のグルタミン酸よりの中間体として知られており⁽⁵⁾、又この化合物は容易に Δ^1 -ピロリン-5-カルボン酸に閉環すること、 Δ^1 -ピロリン-5-カルボン酸の接触還元がプロリンを与えることも報告されている⁽⁵⁾。一方ナトリウムボロヒドリドは Schiff 塩基型の結合を還元して $-\text{CH}_2\text{-NH}-$ 型の化合物を与えることが知られている⁽⁶⁾。併し実際の実験においてはグルタミン酸- γ -セミアルデヒドは前記の如く直ちに閉環して Δ^1 -ピロリン-5-カルボン酸となるため、セミアルデヒドとして純粋に分離し合成試料として使用することは困難である。このため本報においては Vogel 等⁽⁵⁾の報告に従って一応グルタミン酸- γ -セミアルデヒドを経て得られると考えられる方法にて DL- Δ^1 -ピロリン-5-カルボン酸を合成して、これを使用して検討を行った。ただこの方法によればグルタミン酸エステルよりプロリンの生成が γ -セミアルデヒドを通るかどうかについては何等確証を与える事は出来ない。併しカルボン酸又はそのエステルがボロヒドリドにより還元されアルデヒドを経て容易にアルコールとなることはすでに数多くの例も知られているし、この際グルタミン酸エステルの場合はセミアルデヒドの生成と同時に閉環する可能性の方が強くグルタミン酸エステルよりここまでの反応は非常に速いと思われる故、これで生ずる Δ^1 -ピロリン-5-カルボン酸を試料として検討を行い、この物質のナトリウムボロヒドリドによる還元でプロリンを収率よく生成せしめることが出来ればグルタミン酸エステルよりプロリンの生成は一応この経路によるものと考えて大きな誤りはないと言える。

合成により γ , γ -ジカルボエトキシ- γ -アセトアミドブチルアルデヒドを経て得た Δ^1 -ピロリン-5-カルボン酸を水溶液中でナトリウムボロヒドリドにより還元することにより理論量の 45% 以上に当たる収率でプロリンを得ることが示された。この収率は γ , γ -ジカルボエトキシ- γ -アセトアミドブチルアルデヒドよりの値であり、 Δ^1 -ピロリン-5-カルボン酸よりの収率は更に高いと考えられる故、本反応はその経路として L-グルタミン酸- γ -エステルが L-グルタミン酸- γ -セミアルデヒドに還元されると同時に L- Δ^1 -ピロリン-5-カルボン酸となり、更に還元されて L-プロリンを与えたものと考えられる。

この事実はこの反応がプロリンの生合成経路と類似しており、その立体配置の変化なく反応の進行する点興味のあることと同時に、この方法は種々の含窒素異項環状化合物の合成にも応用出来ると考えられ、今後の検討に興味もたれる。

実 験 方 法

1) 定性及び定量方法： 定性におけるペーパークロマトグラフ、プロリン、グルタミン酸の定量その他は総て第 1 報における同じ方法により行った⁽¹⁾。

2) DL-2-ピロリドン-5-カルボン酸の還元： L-グルタミン酸より Beecham⁽⁷⁾の方法に従って製した DL-2-ピロリドン-5-カルボン酸 5g を 30 ml の水に溶解し、当量の炭酸水素ナトリウムで中和した後、氷冷下攪拌しつつ、ナトリウムボロヒドリド 2.1g を徐々に加え、加え終った後、そのまま 2 時間、更に室温にもどして 2 時間反応せしめた後、塩酸にて弱酸性としてこの試料をペーパークロマトグラフィーにて定性的に生成物を固定した。この結果はグルタミン酸以外にはニンヒドリン呈色物質は認められず、又イサチンによる呈色も示されなかった。すなわち、2-ピロリドン-5-カルボン酸よりはプロリンは生成せぬことが明かとなった。

3) L-グルタミン酸- γ -メチルエステル還元反応液の塩酸処理： L-グルタミン酸- γ -メチルエステル 3g を

氷冷攪拌下ナトリウムボロヒドリド 1 g を含む水溶液 20 ml に加え, 氷冷下で 2 時間, 常温で 2 時間攪拌した後塩酸弱酸性として全容を 100 ml としてその 1 ml をとりプロリンを定量した. 残液は減圧下で濃縮後, 濃塩酸を加えて 5 ml とし, 油浴にて 160°~170° で 3 時間冷却管を附して加熱, 反応後塩酸を溜去し, 残渣を 99 ml の水に溶解し, そのプロリン含量を同様に定量した. 還元反応液のプロリン: 6.9 mg/ml (理論量の 32%), 塩酸加熱処理液のプロリン: 6.5 mg/ml (理論量の 31%) であった. 塩酸加熱によってプロリン含量は増加せず, 反応液中に α -アミノ- δ -ヒドロキシバレリアン酸の如き塩酸加熱によりプロリンを与える物質を含んでいない事を示している.

4) α -アミノ- δ -ヒドロキシバレリアン酸の合成: L-オルニチン塩酸塩 42.5 g を 250 ml の水に溶解し, 炭酸水素ナトリウム 23.1 g を加えて塩酸を中和後, 40 g の塩基性炭酸銅を加え 15 分煮沸後, 濾過し濾液に亜硝酸ナトリウム 27.5 g を加え 50°~60° で攪拌しつつ 25 ml の酢酸を徐々に加える. 3 時間で酢酸添加を終え 4 時間更に反応せしめた後, 強酸性陽イオン交換樹脂アンバーライト IR-120 に陽イオンとアミノ酸を吸着し, 2 N アンモニア水で溶離して, α -アミノ- δ -ヒドロキシバレリアン酸の区分を取り, 減圧濃縮後, アルコールを加え粗 α -アミノ- δ -ヒドロキシバレリアン酸の沈澱を得る. 9 g (理論量の 27%), m. p. 220°~222° (分解). 含水アルコールより再結したものをプロリンの生成反応機構の検討に用いた. 尚本品はペーパークロマトグラフィーによって少量のプロリンと α -ヒドロキシ- δ -アミノバレリアン酸を含んでいるが, α -ヒドロキシ- δ -アミノバレリアン酸は塩酸加熱処理によってもプロリンは生じない.

5) α -アミノ- δ -ヒドロキシバレリアン酸のナトリウムボロヒドリド等による処理

(i) L- α -アミノ- δ -ヒドロキシバレリアン酸 503 mg (3.78 mM) を水に溶解し全容 25 ml にした溶液. (ii) 同量の L- α -アミノ- δ -ヒドロキシバレリアン酸とナトリウムボロヒドリド 200 mg (5.3 mM) を全容 25 ml にした溶液. (iii) 硼酸ナトリウム 1 g (2.65 mM) と同量の L- α -アミノ- δ -ヒドロキシバレリアン酸を水に溶解し 25 ml としたもの. (iv) L- α -アミノ- δ -ヒドロキシバレリアン酸と同量の N-苛性ソーダ 5.3 ml を全容 25 ml とした水溶液. (v) L- α -アミノ- δ -ヒドロキシバレリアン酸 251.5 mg を 6 N 塩酸 10 ml と 170°, 3 時間加熱し, 塩酸を溜去後全容を再び 25 ml にした水溶液. これ等それぞれについてプロリンを定量した結果が前記第 1 表である. この結果の如く塩酸処理以外ではプロリンは生成しない.

6) Δ^1 -ピロリン-5-カルボン酸の還元: Vogel 等⁽⁵⁾に従って合成し, フェニールヒドラゾンとして精製した γ , γ -ジカルボエトキシ- γ -アセトアミドブチルアルデヒド 1.309 g を 6 N 塩酸 25 ml と還流下 15 分煮沸して加水分解し, 減圧にて蒸発乾固, 生じた粗 Δ^1 -ピロリン-5-カルボン酸をそのまま水 10 ml に溶解し, 炭酸水素ナトリウムで中和後, ナトリウムボロヒドリド 500 mg を加え, 2 時間攪拌後, 全容を 100 ml とし, プロリンを定量する. プロリンの生成量は 246 mg (γ , γ -ジカルボエトキシ- γ -アセトアミドブチルアルデヒドに対する理論量の 45%) であった.

要 約

前報に引続いて L-グルタミン酸- γ -エステルのナトリウムボロヒドリドでの還元による L-プロリンの生成機構について検討して次の結果を得た.

(1) L-グルタミン酸- γ -エステルよりの本反応による L-プロリンの生成は, i) 2-ピロリドン-5-カルボン酸, ii) グルタミン酸- γ -セミアルデヒド及び Δ^1 -ピロリン-5-カルボン酸, iii) α -アミノ- δ -ヒドロキシバレリアン酸のいずれかを経て起るものと考えこの三反応について実験検討を行った.

(2) 2-ピロリドン-5-カルボン酸のナトリウムボロヒドリドによる還元は反応が全く進行せず i) の経路は否定される.

(3) α -アミノ- δ -ヒドロキシバレリアン酸は塩酸酸性で加熱すればプロリンとなるが, グルタミン酸エステルの還元の諸条件下ではプロリンは生成せず, α -アミノ- δ -ヒドロキシバレリアン酸を経てのプロリンへの経路 iii) も否定し得る.

(4) グルタミン酸- γ -セミアルデヒドは容易に閉環して Δ^1 -ピロリン-5-カルボン酸となり, 又 Δ^1 -ピロリン-5-カルボン酸の接触還元はプロリンを与えることも知られているので, 反応経路 ii) の可能性は非常に強いが, 事実グルタミン酸- γ -セミアルデヒドを経て合成された Δ^1 -ピロリン-5-カルボン酸をナトリウムボロヒドリドで還元することによりプロリンの生成することが認められた.

以上の如くグルタミン酸- γ -エステルのナトリウムボロヒドリドでの還元によるプロリンの生成の機構はエステルが還元され、グルタミン酸- γ -セミアルデヒドとなり閉環して Δ^1 -ピロリン-5-カルボン酸を生じ、再び還元されてプロリンを与えられ得る。この反応機構はプロリンの生合成機構に類似している点興味があるのみでなく、今後種々の含窒素異項環状化合物の合成に応用し得ると思えられる。

この研究に御指導を頂いた松井先生に深く感謝する。

-
(1) 田中正生, 貴志光雄, 木下祝郎 : 本誌, 34, 782 (1960).	(5) H. J. Vogel, B. D. Davis : <i>J. Am. Chem. Soc.</i> , 74, 109 (1952).
(2) P. Karrer, P. Portmann : <i>Helv.</i> , 31, 2088 (1948).	(6) J. H. Billman, A. C. Diesing ; <i>J. Org. Chem.</i> , 22, 1068 (1957).
(3) S. P. L. Sørensen : <i>Bull. Soc. Chim.</i> , 33, 1052 (1904).	(7) A. F. Beecham : <i>J. Am. Chem. Soc.</i> , 76, 4613 (1954).
(4) 川崎 博 : 私信.	
-