- (4) B. W. Catlin : *Science*, 124, 441 (1956).
 (5) L. Cunningham, B. W. Catlin, M. Privat de Garilhe : *J. A. C. S.*, 78, 4642 (1956).
 (6) B. G. Weckman, B. W. Catlin : *J. Bact.*, 73, 747 (1957).
 (7) A. B. Pardee, I. Williams : *Arch. Biochem. Bioph.*, 40, 222 (1952).
 (8) A. B. Pardee, R. E. Kunkee : *J. Biol. Chem.*, 199, 9 (1952).
 (9) 渡辺健治 : 九大農学芸誌, 17, 253 (1959).
 (10) O. H. Lowry, N. O. Rosebrough, R. J. Randall : *J. Biol. Chem.*, 193, 265 (1951).
 (11) M. Laskowski : *The Enzymes*, 1, 970 (1950).
 (12) 向井純一郎 : 本誌, 33, 733 (1959).
 (13) 大村浩久 : 九大農学芸誌, 17, 197 (1959).
 (14) 柴谷篤弘, 木原弘二 : 酵素研究法 (赤堀四郎編), 2, 172 (1956).

L-アミノ酸の合成に関する研究 (第1報)*

L-グルタミン酸より L-プロリンの合成 (1)

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5月17日受理

アミノ酸の利用の一つの方法として或るアミノ酸を原料とした他のアミノ酸の合成が考えられる。この場合一般のアミノ酸合成の場合と異り、その反応条件如何によってその立体配置を変える事なく他のアミノ酸を合成し得る故、原料として L-アミノ酸を用いれば新しい L-アミノ酸を得る事が出来る。この反応の一つとして本報においては L-グルタミン酸より L-プロリンの合成について検討を行った結果について報告する。グルタミン酸よりプロリン特に L-グルタミン酸より L-プロリンの合成は Fischer による L-ピログルタミン酸の還元による実験以後多くの研究者達によって試みられたが、直接 L-プロリンを得る事には成功していない。ただ最近 Pravda⁽¹⁾ 等によりトシル-L-グルタミン酸を経て7行程を要して L-プロリンに至る反応が報告されているが、この方法は反応行程が長く得量も悪い。著者等は L-グルタミン酸の γ -エステルを水溶液中でナトリウムボロヒドリドで還元する事により、エステル基の還元とピロリジン環への閉環を同時に行なわしめて理論収率の34%の反応率で L-プロリンを得る事が出来た。又その生成条件についても若干の検討を行ったのでこの結果について報告する。

実験結果及び考察

(1) L-グルタミン酸- γ -エステルの還元 ナトリウムボロヒドリドは一般にケトン及びアルデヒド類の還元剤として用いられ、エステル類の還元には用いられた例は僅かであるが⁽²⁾ 水以外の溶媒に難溶性の L-グルタミン酸- γ -エステルのエステル基のみの選択的還元を目的として本還元剤による還元を試みた。

L-グルタミン酸- γ -エステルは常法通り L-グルタミン酸の塩酸含有メタノールによるメチル化及びエタノールによるエチル化によって γ -メチル及びエチルエステルを製し、エタノール中でピリジンにて中和遊離のエステルとして分離し反応に使用した。

このエステルを水に溶解しナトリウムボロヒドリドをそのまま若しくは水溶液として加えるか、或はナトリウムボロヒドリドの水溶液にエステルを加えて反応せしめると、エステルは還元と同時に閉環して L-プロリンを生成する。このプロリンはロダニル酸塩として分離し、ロダニル酸塩、ピクラート或は遊離プロリンとして融点、赤外部吸収、旋光度より L-プロリンである事が確認された。又この反応液のペーパークロマトグラムはグルタミン酸エステル、プロリン及びグルタミン酸以外にニンヒドリン呈色物質の存在を示さず、残存するエステルを酸にて加水分解後グルタミン酸の定量を行うと、その量は未反応のエステル量とよく一致し、ナトリウムボロヒドリドにより起る反応はプロリンへの還元閉環と同時にエステルの加水分解をもともなうものと考えられる。

(2) 反応条件と反応機構

i. 反応濃度 : 本反応の種々の条件について検討を行った結果は以下に示すようである。

第1表はナトリウムボロヒドリド水溶液に L-グルタミン酸- γ -メチルエステルを氷冷下に加えた場合の L-プ

* Studies on the Synthesis of L-Amino Acids. Part I. A Synthesis of L-Proline from L-Glutamic Acid. (1)

By Masao TANAKA, Teruo KISHI and Shukuo KINOSHITA (Tokyo Research Laboratory, Kyowa Fermentation Industry Co., Ltd.)

第 1 表 エステル濃度とプロリン生成量

L-グルタミン酸- γ-メチルエステル 濃度 (mg/ml)	モル比 NaBH ₄ / エステル	生成率 (対理論量%)
4	1	0
20	1	12
200	1	24
300	1	21

反応条件：反応温度；0°，反応時間；4 時間，溶媒；水

第 2 表 反応モル比とプロリン生成量

モル比 NaBH ₄ /エステル	生成量 (対理論量%)
0.6	20.0
1.0	24.0
1.2	29.0
1.4	32.0
1.6	34.5
2.0	33.0

反応条件：エステル濃度；200mg/ml，
反応温度；0°，反応時間；4 時間，
溶媒；水

第 3 表 反応最適温度

反応温度	プロリン生成量 (対理論量%)
-5°	34.0
0	34.5
15	22.5
70	12.0

反応溶媒；水

第 4 表 試薬添加条件

条 件	プロリン生成量 (対理論量%)
エステル添加	34.5
NaBH ₄ 添加	33.5

反応条件：反応温度；0°，反応溶媒；水

第 5 表 アルカリ濃度の影響

NaOH 濃度 (N)	プロリン生成量 (対理論量%)
0	32.0
0.1	32.0
0.5	24.0
1.0	7.0
3.0	0.0

反応条件：反応温度；0°，反応溶媒；水

第 6 表 反応溶媒の影響

反 応 溶 媒	プロリン生成量 (対理論量%)
水	34.5
50% エタノール	3.0
エタノール	7.0
テトラヒドロフラン	6.0

反応温度；0°

第 7 表 添加物の影響

添加物	プロリン生成量 (対理論量%)
な し	34.5
LiCl	24.5
CaCl ₂	13.0

反応条件：反応温度；0°，反応溶媒；水

ロリンの生成量とエステル濃度（全エステル添加後のエステルの反応初濃度）との関係であり，反応時間はエステル添加後 4 時間で定量した。この実験の結果よりエステルの濃度は 200 mg/ml でも充分反応が進行し，むしろ高濃度の方が反応収率が良い事が明かとなった。併し 200 mg/ml 以上では生成量はそれ以上良くはならなかったが，これは還元剤とエステルの溶解度のためではないかと考えられる。次いでナトリウムボロヒドリドとエステルのモ

ル比について検討したが，その結果は第 2 表に示されるように NaBH₄/エステルの比が 1.4~1.6 で最高となりそれ以上では変化しないことが明かとなり，その場合の生成量は対理論収率 34% 前後であった。以下の実験は特記せぬ限りこのエステル濃度及びモル比 (1:1.4) において行った。

ii. 反応温度及び反応時間：反応時間についてはペーパークロマトグラフによる検討の結果，反応開始後 1~2 時間でプロリンの量は恒量となり，その後変化がないので本報における実験は総て反応時間 4 時間として行った。

反応の温度と L-プロリンの生成量の関係は第 3 表に示すようであって，反応試薬の混合時の温度は低いほど収率は良い，これは温度が高いとグルタミン酸エステルの加水分解反応の方が急速に進行するためと考えられ，ペーパークロマトグラフの結果もこの推察に矛盾しない。尚試薬の混合の際ナトリウムボロヒドリド水溶液にエステルを加えるか，或はその逆を行うかは第 4 表に示したようにプロリンの生成量には全く無関係であった。

iii. 反応溶媒及び添加物の影響：前記の如く本反応ではエステルの還元閉環と同時にその加水分解が起るため，プロリンの収量を増加せしめるにはエステルの加水分解を防ぐ事が必要と思われる。このエステルの加水分解によるプロリン収量の減少は反応液のアルカリ濃度が増加する時に第 5 表に示した如くプロリンの生成が急速に低下する事で明かである。そこでこの加水分解を防ぐ目的で反応溶媒として水以外の溶媒を使用するか，或は反応液に塩化リチウムや塩化カルシウムを添加し，リチウムボロヒドリド，カルシウムボロヒドリドの生成により還元力を増加せしめる事でプロリンの生成を増す事が出来るのではないかと考え，二，三の実験を行った。

反応溶媒に関してはグルタミン酸エステルは水以外の溶媒に難溶若しくは不溶性であるため，当然他の有機溶媒では好結果は望めないと考えられたが，実験の結果は第 6 表の如く水以外の溶媒では非常にプロリンの生成は悪く問題とならなかった。又塩化リチウム，塩化カルシウムの添加もむしろプロリン生成を減少せしめる結果が第 7 表に示すように得られた。尚この際同一条件でグルタミン酸-γ-メチルエステルとエチルエステルについて実験を行ったが，収率は殆んど同じであった。

iv. 反応機構：以上の如くグルタミン酸の γ-エステルをナトリウムボロヒドリドで還元する事により，最高収率 34% 程度でその立体配置を変える事なしにプロリンとする事が出来たが，この還元閉環の機構としては次の三つの反応が考えられる。(1) グルタミン酸-γ-エステルが閉環して 2-ピロリドン-5-カルボン酸となり，これが還元されてプロリンとなる。(2) グルタミン酸-γ-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，同時に閉環して Δ¹-ピロリン-5-カルボン酸となり，再び還元されてプロリンとなる。(3) グルタミン酸-γ-エステルの還元により α-アミノ-δ-ヒドロキシバレイアン酸を生じ，これが閉環してプロリンとなる。この内 (1) の反応

は 2-ピロリドン-5-カルボン酸はグルタミン酸-γ-エステルより容易に生ずるがナトリウムボロヒドリドでは還元をうけないので、これ以外の反応について検討を要する。この反応機構についての検討は別報で報告する(第1図)。

実験方法

1) 定性及び定量方法 定性はペーパークロマトグラフによったが、展開はブタノール：酢酸：水=4：4：1 による室温展開により、発色は 0.2% ニンヒドリン含水ブタノール溶液及び 0.2% イサチン 4% 酢酸アセトン溶液によった。プロリンの定量は Chinard⁽³⁾の方法により比色定量した。尚反応液ではプロリン以外の物質の発色阻害等が考えられるので、この有無を知るためペーパークロマトグラフにより展開後プロリン部分を抽出し発色比較したが影響がなかった。グルタミン酸の定量は反応液では副生する硼酸の影響で微生物若しくは酵素法による定量が出来ないので、高温クロマトグラフ⁽⁴⁾により *tert*-ブタノール：メタノール：水=5：4：1 にて 60°, 2 時間展開後、0.2% ニンヒドリン-アセトン溶液にて 60° にて発色、0.04% 硝酸銅含有メタノールにて抽出⁽⁵⁾、506 mμ の吸光度にて比色定量した。旋光度はルドルフ光電偏光計 200-80 型にて 5% 水溶液、15° にて測定した。

2) L-グルタミン酸-γ-エステル L-グルタミン酸 74 g を塩酸 36.5 g を含むメタノール 500 ml に溶解し直ちに 40° 以下で減圧濃縮して、析出する L-グルタミン酸-γ-メチルエステル塩酸塩を濾別し、これを再びメタノールに溶解エーテルを加えて再結し、L-グルタミン酸-γ-メチルエステル塩酸塩 90 g を得る。m. p. 145~148°。この結晶をエタノールに溶解しピリジンを滴下して中和すれば遊離 γ-メチルエステルが析出しはじめる。これを一夜冷却放置した後、結晶を濾取してエタノールで洗滌、乾燥して L-グルタミン酸-γ-メチルエステル 59 g を得る(理論量の 73%)。m. p. 167~169°(分解)。

γ-メチルエステルの場合と同様にして L-グルタミン酸 74 g より L-グルタミン酸-γ-エチルエステル 66 g (理論量の 75%) を得る。m. p. 176~178°(分解)。

3) L-グルタミン酸-γ-エステルのナトリウムボロヒドリドによる還元 種々の条件で反応を行ったが最高の生成量を得た一例を示す。ナトリウムボロヒドリド 1.31 g を 20 ml の水に溶解し、氷冷攪拌しつつ L-グルタミン酸-γ-メチルエステル 4 g を少量ずつ加える。所要時間 15 分。加え終って後氷冷のまま 2 時間反応せしめ更に常温にて 2 時間反応を続ける。反応終了後塩酸にて微酸性とし過剰のボロヒドリドを分解、容量を 100 ml としてプロリンを定量すれば生成プロリン総量は 990 mg (理論量の 34.5%) であった。

4) L-プロリンの単離と確認 L-グルタミン酸-γ-メチルエステル 20 g とナトリウムボロヒドリド 6.6 g を水溶液 100 ml 中にて反応せしめた反応液を塩酸酸性として後、アンモニウムロザニラート 25 g をメタノール 150 ml に溶解した溶液を加える。一夜冷却放置後析出するプロリンロザニラートを濾取、少量の氷水で水洗し、この結晶をメタノール 150 ml に溶解して 0.5 N 塩酸 300 ml を加えて再結する。プロリンロザニラート 22 g を得る。m. p. 130~135°(分解)。この結晶を水 150 ml, ピリジン 5 ml と共に乳鉢中で破砕溶解し、2 時間

第 2 図 L-プロリンの赤外吸収スペクトル (KBr)

放置後、生じたピリジンロダニラートを濾別する。濾液に氷酢酸を加え濾過後、濾液を減圧で濃縮乾固し、残留物を水に溶解し、再び減圧にて乾固した後、無水アルコールに溶解し再び溶媒を減圧にて除けば L-プロリン粗結晶 4 g を得る (理論量の 28%)。これをアルコールとエーテルより再結をくり返せば無色結晶性の L-プロリンが得られる。m. p. 219~220° (分解), $[\alpha]_D^{15} = -85.6^\circ$ (水溶液)。この結晶の赤外吸収スペクトルは第 2 図に示すように完全に L-プロリンと一致し、氷酢酸中でピクラートとした結晶の融点は 150~151° で標品より同様に製した L-プロリンピクラートと混融して融点の降下は認められなかった。

$C_5H_9NO_2$ 計算値: C 52.16%, H 7.88%, N 12.17% 分析値 C 52.03%, H 7.62%, N 12.06%

要 約

L-アミノ酸の合成に関する研究の一つとして、L-グルタミン酸より L-プロリンの合成について検討し、次のような結果を得た。

(1) L-グルタミン酸の γ -エステルをナトリウムボロヒドリドにて水溶液中で処理する事により還元と同時に閉環が起り、立体配置を変える事なく L-プロリンが生ずる事が明かとなった。

(2) 本反応の諸条件について検討した結果、エステルの種類はメチル、エチル共同じ反応性を示す事、反応溶媒としてはエステルの溶解性の良い水が最適であり、反応温度は低温ほど良い結果が得られる事が明かとなった。又 L-プロリンの生成はエステル濃度が高濃度ほど良いが溶解度の関係で 200 mg/ml 前後が最高反応収率を示し、エステルとナトリウムボロヒドリドのモル比は 1:1.4 で収率は最高に達する。反応液に塩化リチウム或は塩化カルシウムを加えリチウムボロヒドリド又はカルシウムボロヒドリドにする還元を試みたが好結果は得られなかった。この反応の最高反応収率は理論量の 34% であったが、反応混合液にはプロリン以外には未反応のエステルとグルタミン酸のみしか認めず、その定量の結果と反応液のアルカリ性が増すと収率の低下する事等より、収率の 34% 以上にならぬのは還元閉環反応と同時にエステルの加水分解が起るためと考えられる。

(3) この反応の機構としては、i) グルタミン酸- γ -エステルより生じた 2-ピロリドン-5-カルボン酸の還元、ii) エステルの還元により生ずるグルタミン酸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、iii) エステルより還元にて生じた α -アミノ- δ -ヒドロキシバレリアン酸の閉環、の反応が考えられるが、i) の反応は可能性は少い。

本研究に御指導頂いた松井先生に厚く御礼申し上げます。

- (1) Z. Pravda, J. Rudinger: *Chem. listy.*, 48, 1663 (1954); *C. A.*, 14640 (1955).
- (2) L. Berlinguet: *Can. J. Chem.*, 33, 1119 (1955).
- (3) F. P. Chinard: *J. Biol. Chem.*, 199, 91 (1952).

- (4) J. B. Himes, L. D. Metcalfe: *Anal. Chem.*, 31, 1192 (1959).
- (5) G. N. Zaitseva, N. P. Tynleneva: *Lab. Delo.*, 4, (3) 24 (1958); *Anal. Abstr.*, 6, 678 (1959).