[農化 第 37 卷, 第 9 号, p. 539~542, 1963]

ミロシナーゼに関する研究 (第 7 報)*

2, 3 の glucotropaeolin 糖類縁体の合成及びミロシナーゼの作用

内 山 正 昭 (東京大学農学部農芸化学教室)

昭和 38 年 4 月 25 日 受 理

緒 言

いわゆる辛子油配糖体と称せられる化合物は、一般式 (A) で示される構造式を持つ配糖体で、十字花科植物中に広く存在している。現在、辛子油配糖体としておおよそ 30 種程度知られている⁽¹⁾。いずれもグルコシドであって他の糖のグリコシドは報告されていない。これらの配糖体は、同じ植物中に存在している分解酵素ミロシナーゼの作用によって分解され、それぞれ相当する辛子油 (B) を生ずるものである。

著者は、さきに酵素ミロシナーゼに関する一連の研究を行い、その結果、本酵素は本質的には β -チオグルコシダーゼと考えられる単一酵素であること、及びグルコース基が離脱した非糖残基からの辛子油の生成は、ヒドロキザム酸における Lossen 転位と同一の反応機作によって、非酵素的に行われるものであることを明かにした^(2~7)。

Pigman はチオグルコシダーゼは本質的には β -グルコシダーゼであって、おそらく thioxyloside をも加水分解するだろうと述べているが実験的根拠があるわけではない。また、ミロシナーゼの基質特異性に関する報告は、なんら行われていない。よって、著者はミロシナーゼの基質特異性を検討する目的で 2, 3 の glucotropaeolin 糖類縁体を合成して、ミロシナーゼ活性をしらべた。

辛子油配糖体の合成については、Ettlinger ら⁽⁹⁾によって glucotropaeolin (IVa) の合成が報告されているが、その詳細に接する機会を得ていない。著者も生成物の確認の容易さ、原料の入手等から R として $\text{C}_6\text{H}_5\cdot\text{CH}_2$ -を選び非天然配糖体として galactoside (IVb)**、xyloside (IVc)***を合成した。また glucoside (glucotropaeolin) についても Ettlinger らの結果を確認することができた。合成経路は次のごとくである。

なお、Koenig-Knorr 法、Helferich 法によってマンノシドを合成する場合には anomeric replacement が起ることが知られている⁽¹⁰⁾。辛子油配糖体についても試みたが、目的の β -D-mannoside は分離できなかった。下記実験で述べるごとく、合成 glucotropaeolin 及びそのガラクトース、キシロース類縁体はいずれもミロシナーゼによって作用されてグリコシド結合が切れ、同時にベンジル辛子油 (ベンジルイソチオシアナート) を生成することが認められた。しかしガラクトシド及びキシロシドに対する活性は天然形のグルコシドに比し遙かに低く、配糖体の糖の種類が酵素活性に大きな影響を及ぼすことが観察された。

* Studies on Myrosinase. Part VII. Synthesis of Sugar Analogs of Glucotropaeolin and their Enzymic Cleavage by Myrosinase.

By Masaaki UCHIYAMA (Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture, the University of Tokyo,)

**galactotropaeolin, ***xylotropaeoline と仮称する。

実 験 及 び 検 討

1. 基質の合成

Phenylacetothiohydroxamic acid (I) : 常法に従ってベンジルクロリド 42 g, マグネシウム 8.5 g, 及び無水エーテル 150 ml より製したグリニアル試薬⁽¹¹⁾を, 二硫化炭素 40 g と無水エーテル 75 ml との混合溶液に, 氷冷下で充分攪拌しながら滴下する. さらに 2 時間攪拌後, 混液を 5~10° で 1 晩放置する. 反応液を 200~250g の碎氷上に注ぎ分解する. 水層を分取, 少量のエーテルで振り可溶物を除く. ジチオ酸塩の赤色水溶液が得られる. これにヒドロキシルアミン塩酸塩 (24 g) の水溶液 (約 50 ml) を加える. ただちに硫化水素の発生が認められ, 赤色の油状物が分離してくる. 2~2.5 時間 0~5° で攪拌後, 油層を分離する. 水層はほとんど無色となる. 水層はさらに 1 回エーテルで抽出する. 油層, エーテル抽出液を合し, 氷冷重曹水, 冷水で洗滌, 無水芒硝で乾燥する. エーテルを室温で溜去, 赤色の油状物質を得る. 析出する硫黄を濾別, 濾液に石油エーテルを加え, 氷室中に放置すれば油状物は結晶化する. 結晶を濾別, 石油エーテルで洗い, ベンゼン-石油エーテルから再結晶する. 無色板状結晶 10~12 g が得られる. m. p. 73~74°⁽¹²⁾. 氷室中 0° 以下で保存する.

S-β-D-(tetraacetylglucopyranosyl)-phenylacetothiohydroxamic acid (IIa) : Phenylacetothiohydroxamic acid (I) 5 g をアセトン 30 ml に溶かした溶液に, 苛性カリ 1.6 g をメタノール 10 ml と溶かした溶液を加える. これにアセトブロモグルコース⁽¹³⁾ 12 g をアセトン 30 ml に溶かした溶液を加え, よく攪拌した後, 室温で 1 晩放置する. 析出する臭化カリを濾別, 濾液を減圧濃縮, シラップにエタノールを加え, 冷所に放置すれば絹糸状の結晶となる. エタノールで再結晶を繰返えし, m. p. 162~163° の結晶 6.7 g を得る (アセトブロモグルコースに対する収率約 45%).

$C_{22}H_{27}O_{10}NS$ として 計算値 : C 53.11, H 5.47, N 2.81%.

分析値 : C 53.71, H 5.47, N 2.85%.

S-β-D-(tetraacetylgalactopyranosyl)-phenylacetothiohydroxamic acid (IIb) : Phenylacetothiohydroxamic acid (I) 7.0 g をアセトン 30 ml に溶かした溶液に苛性カリ 1.2 g をメタノール 10 ml に溶かした溶液を加え, これに新たに調製したアセトブロモガラクトース⁽¹⁵⁾ 16 g をアセトン 30 ml に溶かした溶液を加えて, 上記と同様に反応処理せしめて得られたシラップを 70% エタノールに溶かし, 少量の脱色炭で処理した濾液を室温, 減圧で徐々に濃縮すれば結晶が析出し始める. 1 晩冷所に放置, 濾過, 冷 70% エタノールで洗滌後減圧乾燥する. 収量 4.3 g, m. p. 128~9°. 母液を濃縮しさらに 0.5 g の結晶が得られる. 全収量 4.8 g, 57% (アセトブロモガラクトースに対し).

$C_{22}H_{27}H_{10}NS$ として 計算値 : C 53.11, H 5.47, N 2.81%.

分析値 : C 53.33, H 5.15, N 2.35%.

S-β-D-(triacetylxylopyranosyl)-phenylacetothiohydroxamic acid (IIc) : Phenylacetothiohydroxamic acid (I) 5.2 g をアセトン 45 ml に溶かした溶液に, 苛性カリ 1.5 g をメタノール 10 ml に溶かした溶液を加え, これに新たに調製したアセトブロモキシロース⁽¹⁴⁾ 10 g をアセトン 45 ml に溶かした溶液を加えて前記同様処理する. 反応液を減圧濃縮すればキシロシドの針状結晶が析出して来る. 濾別, 90% エタノールから再結晶. 収量 6.3 g, 50% (アセトブロモキシロースに対し), m. p. 160~161°.

$C_{19}H_{23}O_8NS$ として 計算値 : C 53.63, H 5.40, N 3.29%.

分析値 : C 53.86, H 5.90, N 3.01%.

Potassium-tetraacetylglucotropaeolate (IIIa) : 前記グルコシド (IIa) 2.5 g を乾燥ピリジン 10 ml に溶かし, これに新たに調製したピリジン-無水硫酸付加物⁽¹⁶⁾ 2.0 g を加える. 時々振盪しながら 1 晩室温に放置後, 反応物を冷水中に注ぎ炭酸カリで中和する. 濾液を減圧, 濃縮, 残渣を 90% エタノールから再結晶し, 白色針状結晶 1.5 g を得る. m. p. 186~8° (分解).

$C_{22}H_{26}O_{13}NS_2K \cdot H_2O$ として 計算値 : C 41.69, H 4.45, N 2.20%.

分析値 : C 41.89, H 4.80, N 2.10%.

Potassium-tetraacetylgalactotropaeolate (IIIb) : 前記ガラクトシド (IIb) 2.5 g を乾燥ピリジン 10 ml に溶かし, これに新たに調製したピリジン-無水硫酸付加物 2.0 g を加え, 時々振盪して 2 日間室温に放置する. 反応液に少量の氷水を加え, さらに粉末炭酸カリで中和する. エタノールを加え, カリ塩を沈澱せしめる.

濾過, エタノール洗滌, 90% エタノールから再結晶, 白色絹糸状結晶 1.0 g を得る. m. p. 193~4° (分解).

$C_{22}H_{26}O_{18}NS_2K \cdot H_2O$ として 計算値: C 41.69, H 4.45, N 2.20%.

分析値: C 41.38, H 4.80, N 2.01%.

Potassium-triacetylxyloctropaeolate (IIIc): 前記キシロシド (IIc) 2.5 g を乾燥ピリジン 16 ml に溶かす. これに新たに調製したピリジン-無水硫酸付加物 2.0 g を加え, 時々振盪しつつ 1 晩室温に放置する. 反応液を上記同様処理し, 白色針状結晶 0.9~1.0 g を得る. m. p. 187~8° (分解).

$C_{19}H_{22}O_{11}NS_2K \cdot H_2O$ として 計算値: C 41.36, H 4.38, N 2.53%.

分析値: C 41.55, H 4.59, N 2.33%.

脱アセチル: アセチル化辛子油配糖体をアンモニア性メタノールでアンモノリシスするときはアセチル基の鹼化以外の変化が認められないことが知られている⁽¹⁷⁾. すなわち上記の合成アセチル化配糖体 0.1 g を無水メタノール 10 ml に溶かし, これに 0° で乾燥アンモニアガスを飽和した無水メタノール 10 ml を加え, 室温で 2 時間または 0° で 1 晩放置する (脱アセチルがこの条件で完全なことはペーパークロマトグラフィーで確認した). 溶媒を減圧溜去, 乾固する. 白色無定形の粉末 0.6~0.7 g が得られる. glucotropaeolin は結晶状には得られていない⁽¹⁸⁾.

Galactotropaeolin, xyloctropaeolin についても結晶としては得られていないが, ペーパークロマトグラフィーではそれぞれ単一スポットを与える. 乾燥粉末を次の酵素反応に供した.

II. 合成辛子油配糖体に対するミロシナーゼの作用

(1) 生成辛子油 (ベンジルイソチオシアナート) の確認: 前記のごとくして合成した glucotropaeolin を用い, ミロシナーゼ作用の結果生成するベンジルイソチオシアナートをベンジルチオ尿素に導いて確認した. 酵素反応液の組成は次のごとくした.

基質溶液 (glucotropaeolin 18.4 mg/ml) ..... 25 ml

酵素液 (ミロシナーゼ粗粉末 20 mg/ml) ..... 25 ml

緩衝液 (pH 5.2, 0.5 M 酢酸緩衝液) ..... 25 ml

反応液を 40~45° に保つ. 直ちに特有の刺激臭を持つ辛子油を生成し, 反応液は白濁してくる. 30 分反応後, 生成した辛子油を 50~60 ml のエーテルで抽出する. エーテル溶液にメタノール-アンモニア (1:1) 混液 20 ml を加え, 室温で 1 晩放置する. 溶媒を減圧溜去, 乾固する. 残渣を熱水から再結晶, 小針状結晶 89 mg を得た. m. p. 161~2° (文献値⁽¹⁹⁾に一致する).

第 1 図 各基質に対するミロシナーゼ活性

○—○ グルコシド   △—△ ガラクトシド
□—□ キシロシド

(2) 糖類縁体に対するミロシナーゼ活性の比較

上記の合成グルコシド, ガラクトシド, キシロシドを基質として用い, ミロシナーゼ活性を比較測定した. 酵素反応液の組成は次のごとくした.

基質液 (各基質とも 4×10^{-2} M) ..... 2 ml

酵素液 (ミロシナーゼ精製標品 1 mg/ml) ..... 1 ml

緩衝液 (pH 5.2, 0.5 M 酢酸緩衝液) ..... 1 ml

37° で反応せしめ, 経時的に反応液の一定量を採って還元力の増加を測定した. 生成糖の量は, 各糖についてジニトロサリチル酸比色法であらかじめ作製した検量線と照合し, 0 分作用後の値を差引いて求めた. 第 1 図に反応時間とミロシナーゼ活性 [糖の生成量 (mg) で表わす] との関係を示す.

図に見られるごとく三者とも反応の初期においては反応時間と糖生成量 (活性) との間に直線関係が成立している. 天然のグルコシドに比べ, ガラクトシド, キシロシドの分解速度ははるかに遅いことが

わかる。作図的に三者のおおよその速度勾配を求めると、それぞれグルコシド 10.1, ガラクトシド 1.1, キシロシド 0.3 であった。なお、ガラクトシド、キシロシドも酵素反応の結果ベンジルイソチオシアナートを生成することは辛子油特有の刺激臭でもわかるが、前記のごとくベンジルチオ尿素として確認した。アセチル化及びメチル化した辛子油配糖体にはミロシナーゼは全く作用しないことはすでに報告⁽⁶⁾したが、上記の実験結果からもヘキソズ環の配位が反応速度に大きな影響を及ぼすことがうかがえる。特に C₆ の -CH₂OH を H で置き換えた場合、すなわちキシロシドの場合には特に影響が大であった。以上の事実から、ミロシナーゼの場合にも一般にグルコシダーゼにおけると同様 intact なグルコース環の必要性が推測される。

要 約

- (1) Glucotropaeolin 及びその糖類縁体として galactoside 及び xyloside を合成した。
- (2) 三者はいずれもミロシナーゼによって分解され、辛子油（ベンジルイソチオシアナート）を生成する。
- (3) Glucoside, galactoside 及び xyloside に対するミロシナーゼの活性比はそれぞれおおよそ 10.1 : 1.1 : 0.3 であった。

本実験は、著者が昭和 35 年 5 月から 36 年 2 月にわたって静岡大学から東京大学に内地研究員として派遣中に行ったもので、御指導賜った松井正直先生並びに故長島善次静岡大学助教授に深く謝意を表します。また、元素分析をお願いした東京大学農芸化学科微量分析室の皆さんに感謝いたします。

(1) A. Kjar : <i>Suomen kemistilehti.</i> , A 32 , 53 (1959).	<i>e nat.</i> , 91 , 574 (1957); <i>C. A.</i> , 52 , 11749, 16309 (1958).
(2) 長島善次, 内山正昭 : 本誌, 33 , 478 (1949).	(13) P. G. Scheurer : <i>J. Am. Chem. Soc.</i> , 76 , 3224 (1954); M. Bárczai-Martos : <i>Nature</i> , 165 , 369 (1950).
(3) 長島善次, 内山正昭 : 本誌, 33 , 484 (1959).	(14) B. Helfrich, M. Gendg : <i>Chem. Ber.</i> , 87 , 1488 (1954).
(4) 長島善次, 内山正昭 : 本誌, 33 , 881 (1959).	(15) R. G. Hansen, W. J. Rutter, P. Krickowsky : <i>Biochemical Preparation</i> , 4 , 1 (1955).
(5) 長島善次, 内山正昭 : 本誌, 33 , 980 (1959).	(16) C. M. Suter et al. : <i>J. Am. Chem. Soc.</i> , 60 , 538 (1938).
(6) 長島善次, 内山正昭 : 本誌, 33 , 1068 (1959).	(17) O. E. Schutz, W. Wagner : <i>Arch. pharm.</i> , 288 , 525 (1955).
(7) 長島善次, 内山正昭 : 本誌, 33 , 1144 (1959).	(18) A. Kjar : <i>Acta Chem. Scand.</i> , 6 , 327 (1952).
(8) W. W. Pigman : <i>Advance in Enzymol.</i> , 4 , 41 (1944); <i>J. Research. Natl. Bur. Standards.</i> , 30 , 257 (1943).	(19) A. E. Dixon : <i>J. Chem. Soc.</i> , 59 , 552 (1891).
(9) M. J. Ettlinger, A. J. Lundeen : <i>J. Am. chem. Soc.</i> , 79 , 1764 (1957).	
(10) Eugene et al. : <i>ibid.</i> , 65 , 575 (1943).	
(11) A. Kjar : <i>Acta Chem. Scand.</i> , 6 , 327 (1952).	
(12) T. Bacchetti, A. Alemagna : <i>Attiread. accad. dincei. Rend. Classe. Sci. fis mal</i> ,	