[*Nippon Nôgeikagaku Kaishi* Vol. 56, No. 7, pp. 537~543, 1982]

水溶液中での α -オキソ酸からの α -アミノ酸の形成†

江上不二夫, 牧野優美子, 西沢正人, 佐藤一紀
(三菱化成生命科学研究所)

昭和 57 年 2 月 26 日 受 理

Formation of α -Amino Acids from α -Oxo Acids in Aqueous Medium

Fujio EGAMI, Yumiko MAKINO, Masato NISHIZAWA
and Kazuki SATO

*Mitsubishi-Kasei Institute of Life Sciences,
11, Minamiooya, Machida, Tokyo 194*

In the course of experimental studies on chemical evolution in primeval sea, we discovered a novel way for amino acid formation via *N*-acylamino acid from an aqueous mixture of α -oxo acid and ammonium sulfate. Glycine and alanine were produced from glyoxylate and pyruvate through *N*-oxalylglycine and *N*-acetylalanine, respectively.

The process was extended to the formation of other amino acids. Serine, glutamic acid, and phenylalanine were produced from hydroxypyruvate, α -ketoglutarate, and phenylpyruvate, respectively, in aqueous medium under similar conditions. In the case of glutamic acid formation, *N*-succinylglutamic acid, which was partially converted to pyroglutamic acid was found as an intermediate. However, in the case of phenylalanine formation, *N*-phenylacetylphenylalanine-amide (mp 190~191°C) was isolated and identified by IR (3170, 1660, 1640, 1530 cm^{-1}), NMR [δ (ppm)=7.18 (10H, s), 4.45 (1H, m), 3.38 (2H, s), 3.20~2.60 (2H, m)], MS [282 (M^+), 238], and traditional synthesis, as an intermediate, instead of *N*-phenylacetylphenylalanine. From oxaloacetate in similar conditions, alanine was produced instead of the expected aspartic acid. In these reactions, the decarboxylation processes were essential for yielding *N*-acylamino acids when employing α -oxo acids except for glyoxylic acid (R-CO-COOH , $\text{R} \neq \text{H}$).

(Received February 26, 1982)

緒 言

アミノ酸は、その生化学的、栄養学的重要性の故に、その合成、製造は広汎に研究されてきた^(1,2)。われわれはこれとは全く別の立場からアミノ酸の合成を行っている。その発展によっては、従来のアミノ酸合成法に有効な情報を提供する可能性も期待できると考える。

数年来、われわれは、原始海洋における化学進化への実験的接近を試みている。その過程で、ホルムアルデヒドとヒドロキシルアミンを含む「修飾海水⁽³⁾」中の反応から一連のアミノ酸形成を観察した⁽⁴⁾。その形成過程の

一つは、Oró らも指摘しているように、古くから知られている Strecker 合成である⁽⁵⁾。一方、ホルムアルデヒド説によれば、ホルムアルデヒドが容易に重合し、糖および糖類似物を与えることが知られ多くの研究がなされている。そこで、各種の C_n ($n=2\sim7$) 化合物を出発物に選び、糖からのアミノ酸の形成を調べた⁽⁶⁾。そのなかから、Strecker 合成とは違った C_n 化合物から C_n -アミノ酸を得る方法をみつけることができた。すなわち、種々の C_2 化合物とアンモニアの反応でグリシンが容易に得られることを見出した。 C_2 化合物のなかでグリオキシル酸が最も高収量でグリシンを与えた⁽⁶⁾。この系において、グリシンは反応物の加水分解後に多量に検出された。グリシンを与える反応中間体を単離して調べたと

† Dedicated to Academician Professor A. E. Braunstein on his 80 th birthday.

ころ *N*-オキサリルグリシン ($\text{HOOCCONHCH}_2\text{COOH}$) であった. すなわち, グリオキシル酸 2 分子とアンモニア 1 分子が反応し, 最終的にグリシンが形成される反応は, 式 (1) のスキームのように書くことができた^(7,8).

さらに, アンモニアのかわりにメチルアミンを用いることにより *N*-オキサリルサルコシンを経て, サルコシンを合成できることがわかった. また, グリオキシル酸のかわりにピルビン酸を用いることにより *N*-アセチアラニンを経てアラニンを合成することも知った^(7,8). なお, われわれの化学進化の研究において, 簡単な化合物から原始細胞様構造体へと至る一連の過程を一貫して行うために, 触媒として作用したと考えられるいくつかの遷移金属イオンを強化した修飾海水を用いて, 脱気封管中に行っている. しかし, ここで述べるアミノ酸形成

は, 中性付近水溶液中で酸素の存在に影響されことなく収率良く行われることがわかった. われわれは, この方法を他の若干のアミノ酸合成に試みたのでここに報告する.

1. グルタミン酸の形成反応

α -ケトグルタル酸 (0.5 M) と硫酸アンモニウム (0.25 M) とを反応させた場合, 6 N 塩酸加水分解後に, 多量のグルタミン酸が検出された. また, 反応混合物の加水分解サンプルからグルタミン酸を単離し, アミノ酸分析, NMR, IR, MS の測定により同定できた. 反応液の高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により別に合成した *N*-スクシニルグルタミン酸 (1a) に対応するピークが確認できた. (1a) の水溶液を 105°C で 1 日加熱した場合, ピログルタミン酸 (1b) とコハク酸が生じることが HPLC で確認された. また反応液の HPLC でも (1b) およびコハク酸のピークが認められることから, α -ケトグルタル酸とアンモニアの反応経路は, Fig. 1 のように

Fig. 1. Plausible Reaction Pathway on the Reaction between General α -Oxo Acid and Ammonium Sulfate in Aqueous Medium. $\text{R} = -\text{CH}_3, -\text{CH}_2-\text{CH}_2\text{COOH}, -\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_5$

Table I. Synthesis of Various α -Amino Acids in Open System at 90°C (pH 4)

		Amino acid	Before hydrolysis (%) ^b	After hydrolysis (%) ^b
CH ₃ NH ₂	+ $\begin{array}{c} \text{CHO} \\ \\ \text{COOH} \end{array}$ ^a	Sar	0	4.8
(NH ₄) ₂ SO ₄	+ $\begin{array}{c} \text{CHO} \\ \\ \text{COOH} \end{array}$ ^a	Gly	4.4	21.8
	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{C=O} \end{array}$ ^a	Ala	2.0	9.8
	$\begin{array}{c} \text{COOH} \\ \\ \text{CH}_2\text{OH} \\ \\ \text{C=O} \end{array}$	Gly	0.46	0.82
	$\begin{array}{c} \text{COOH} \\ \\ \text{C=O} \end{array}$	Ser	0.09	0.11
	$\begin{array}{c} \text{COOH} \\ \\ \text{C=O} \end{array}$	Ala	0.09	0.16
	$\begin{array}{c} \text{COOH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C=O} \end{array}$	Ala	3.7	9.0
	$\begin{array}{c} \text{COOH} \\ \\ \text{COOH} \\ \\ (\text{CH}_2)_2 \\ \\ \text{C=O} \end{array}$	Glu	0	11.1
	$\begin{array}{c} \text{COOH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C=O} \end{array}$	Phe	0(0)	3.0 ^c (16.5) ^d

^a The reactions using glyoxylate or pyruvate were reinvestigated at the general procedures (20 ml scale including 0.5M of α -oxo acid and 0.25M of ammonium sulfate) for comparing the results of other columns.

^b Yields calculated based upon that one mole of amino acid was synthesized from two moles of α -oxo acid.

^c Yield resulted from supernatant after filtrating off the precipitates.

^d Total yield calculated from all of the reaction mixture.

考えられる。すなわち、 α -ケトグルタル酸2分子とアンモニア1分子が反応し、脱炭酸を伴い(1a)が形成する。さらに、反応系中では、形成した(1a)から(1b)とコハク酸を生じるものと考えられる。グルタミン酸形成の収量について、Table I に示した。また、種々の条件下でのデータを Table II にまとめた。

2. フェニルアラニンの形成反応⁽⁹⁾

フェニルピルビン酸(0.5M)と硫酸アンモニウム(0.25M)を反応させ6N塩酸加水分解後に、フェニルアラニンを確認した。この系においては、24時間反応後に多量の沈殿が析出した。この沈殿を濾取しメタノールから再結晶を行い白色針状晶が得られた。UVスペクトルでモニターしながら再結晶を繰り返した結果、一定のスペクトルを得ることができた。その吸収極大と分子吸

光係数は、247, 252, 257.5, 264 nm についてそれぞれ 264, 331, 398, 304 cm⁻¹ m⁻¹ であった。この結晶を6N塩酸で加水分解したところ約40%(w/w)のフェニルアラニンが得られた。また、この結晶のIRスペクトルは、3370, 3280, 3170, 3050, 3030, 1660, 1640, 1560, 1530 cm⁻¹ にピークを示し、アミドの吸収に相当するピークが確認された。

さらに、MSの測定から M⁺ 282 (5%) が見られ、m/z 238(M⁺-CONH₂, 50) のフラグメントピークが得られた。また、C: 72.18, H: 6.45, N: 9.89% の元素分析値はこの結晶の組成が C₁₇H₁₈N₂O₂ であることを支持する。NMR スペクトルは、 $\delta_{\text{Me}_4\text{Si}}^{\text{DMSO}-d_6}$: 7.18(10H, s), 4.45(1H, m), 3.38(2H, s), 3.20~2.60(2H, m) にシグナルを与えた。これらのデータは、析出した反応

Table II. Amino Acid Production at Different Conditions in Closed System

	pH	Temp. (°C)	Amino acid	Before hydrolysis (%) ^d	After hydrolysis (%) ^d
Glyoxylic acid + CH ₃ NH ₂ ^a	4	27	Sar	0	16.4
	4	105		4.2	13.8
Glyoxylic acid + (NH ₄) ₂ SO ₄ ^a in H ₂ O	4	27	Gly	0.4	39.4
	4	105		7.2	20.0
	8	27		0.8	5.0
	8	105		5.2	8.2
Glyoxylic acid + (NH ₄) ₂ SO ₄ ^b in MSM ^c	4	27	Gly	0.2	17.6
	4	105		—	9.2
	8	27		0.9	1.0
	8	105		—	4.1
Pyruvic acid + (NH ₄) ₂ SO ₄	4	27	Ala	1.4	5.4 ^a
	4	105		7.6	13.8 ^a
	8	105		6.3	9.7
α -Ketoglutarate + (NH ₄) ₂ SO ₄ in H ₂ O	2	105	Glu	6.6	21.6
	4	105		6.7	12.2
	6	105		3.7	9.2
	8	105		0.3	9.5
	10	105		0.5	22.4
in MSM ^c	8	105	Glu	5.1	11.7

^a Reference (7), (8). ^b Reference (7). ^c Modified sea medium. ^d Yields calculated based upon that one mole of amino acid was synthesized from two moles of α -oxo acids.

形成物が、*N*-フェニルアセチルフェニルアラニンアミド (2b) であることを示唆し、フェニルアラニン中間体として単離することができた。*N*-フェニルアセチルフェニルアラニン (2a) とアンモニアとから縮合剤を用いて合成した (2b) と一致した性状を示した。

ところで、フェニルピルビン酸 (0.15M) と硫酸アンモニウム (0.075M) とを室温で、10時間反応後には沈殿は析出しなかった。しかし、薄層クロマトグラフィー (TLC) により (2a) および (2b) を確認することはできたが、反応液中から (2a) を単離することはできなかった。これは反応液中で (2a) とアンモニアとが反応し、容易に (2b) に変化することによるもので、IR 測定により確認することができた。この経路を Fig. 1 に示した。(2b) が反応液中から容易に分離できるのは、その低溶解性によるものと考えられる。硫酸アンモニウムのかわりに塩化アンモニウムを用いた場合も同等の収量を与え、アニオンの影響はなかった。反応式は、

Fig. 2. Effect of [(NH₄)₂SO₄] on Weight of Precipitates Resulted. Phenylpyruvate (0.5M) and ammonium sulfate system (pH 6) was reacted at 105°C in deaerated condition. ●, after 40 hr; ▲, after 110 hr.

と書ける。また、フェニルピルビン酸に対するアンモニア濃度変化を調べた (Fig. 2)。沈殿、すなわち (2b) は、アンモニアの濃度および反応時間の長さが大きいほど多くなった。このときのフェニルアラニンの最大収量は、約 44% にのぼった。この (2b) の形成では、2分子のフェニルピルビン酸から1分子のフェニルアラニンが形成したが、同様のピルビン酸とアンモニアの反応に比べ

て、約 2 倍 (Phe/Ala) の収量のアミノ酸が得られた。これは、Phe-CH₂-基の立体障害のため脱炭酸を容易にしたことによると考えられる。

3. その他の α -オキソ酸を用いた場合の反応

オキサロ酢酸 (0.5M) と硫酸アンモニウム (0.25M) を反応させた場合、6N 塩酸加水分解後にアラニンが得られた。一連のオキソ酸とアンモニアの反応からは、アスパラギン酸が予想された。しかし、アスパラギン酸は全く形成が認められなく、アラニンが形成された。すなわち、複数の脱炭酸過程が考えられる。この中間体および反応経路については、現在検討中である。

ヒドロキシビルビン酸 (0.5M) と硫酸アンモニウム (0.25M) を反応させた場合、セリンのほか、グリシンおよびアラニンの形成もみられた。ヒドロキシビルビン酸の精製が困難であったこと、および反応中に著しく着色したことにより、副反応が主に進行したものと推測された。また、中間体は確認することができなかった。

考 察

本研究の特徴は、中性付近の水溶液において、特別の還元剤を加えることなくオキソ酸から *N*-アシルアミノ酸を経てアミノ酸を得ることができる点にある。別に報告した⁽⁷⁾ように、グリオキシル酸 (HCOCOOH) を用いた場合には、Fig. 3 のような分子内不均化反応を経て *N*-オキサリルグリシンに至るものと考えられた。

一方、一般的なオキソ酸 ($R-CO-COOH$, $R \neq H$) の場合には、Fig. 1 のように書くことができ、特徴的なことは脱炭酸が伴うことである。グリオキシル酸の反応については、*N*-オキサリルグリシンの形成の最適 pH が存在 (pH $\sim$ 3) していたことより、カルボニル付加反応の特徴をよく表わしている。pH 10 においては、最適 pH での値の 1/10 以下の収量であった。

Fig. 3. Plausible Reaction Pathway on the Reaction between Glyoxylate and Ammonium Sulfate in Aqueous Medium.

一方、 α -ケトグルタル酸とアンモニアの反応においては、pH 2 $\sim$ 10 の領域でまんべんなく最終的にグルタミン酸が得られた。また、pH 2 および 10 において、いっそう収量があがっていた。酸、塩基のはたらきは、途中の段階でつくられる炭酸ガスを反応系から除くことなどが考えられ、アミノ酸形成に有利に働くものと思われる。修飾海水中での実験結果との比較においては、グリオキシル酸の反応では、修飾海水の効果が全くみられなかった。しかし、 α -ケトグルタル酸の反応においては、若干の効果がみられた。脱炭酸過程に金属イオンが影響を及ぼすことが予想される。このように、中性付近の水溶液においてアミノ酸形成反応が進行することは、原始海洋における化学進化を研究する場合、重要なことであると考えられる。

Borch は、中性付近水溶液において有効な還元剤 NaBH₃CN を用いて、オキソ酸とアンモニアから導いたイミンを還元することによりアミノ酸を合成した⁽¹⁰⁾。この反応に比較して、*N*-アシルアミノ酸を経由する反応は、分子内不均化反応または脱炭酸過程を経ることにより反応物自身で前生物学的アミノ酸合成に関して還元過程をまかなっていることに意義がある。いっそう単純で合理的な系と考えられる。このような関連において、フェニルビルビン酸と硫酸アンモニウムの反応は、注目に値する。単に、水溶液中で加熱するのみで、*N*-フェニルアセチルフェニルアラニンアミド (2b) を得ることができた。水溶液中において、形成がエネルギー的に不利なアミド結合を 2 種含む化合物を容易につくることができ、また単離することができた。さらに、この系はペプチド合成にも適用できることが示されている⁽¹¹⁾。

以上のように、化学進化の実験を通して、中性水溶液中という生物にとってなじみ深く、有機化学的には新しい場を用いて *N*-アシルアミノ酸を中間体としてアミノ酸に至る経路を見出すことができた。

実験の部

1. 試 薬

反応原料には、 α -ケトグルタル酸ナトリウム (Merck)、フェニルビルビン酸ナトリウム、ヒドロキシビルビン酸 (Sigma)、オキサロ酢酸、硫酸アンモニウム (和光純薬) を使用した。さらに、加水分解用 6N 塩酸は、精密分析用 (和光純薬) を用いた。また、アミノ酸のシリル化剤の *N*, *O*-ビス (トリメチルシリル) トリフルオロアセト

アミド (BSTFA) は, Pierce Chemical Co. のものを用いた。アセトニトリルは, 五酸化リンとともに還流した後, 蒸留した。その他の試薬は市販品をとくに精製せずに使った。

2. 標準物質の有機合成

2-1. *N*-スクシニル-L-グルタミン酸 L-グルタミン酸- α , γ -ジベンジルエステルパラトルエンスルホン酸塩 5g (10 mmol とトリエチルアミン 1.4 ml (10 mmol)) を含むテトラヒドロフラン溶液 20 ml に氷冷下, 無水コハク酸 2g (20 mmol) のテトラヒドロフラン溶液 10 ml を少量ずつ滴下し, さらに室温で 24 時間反応させた。濃縮後, 残渣を酢酸エチルに溶かし, 水洗後, 乾燥した。酢酸エチルを減圧濃縮し, 得られた油状物にエーテルと石油エーテルを加えて結晶化し, *N*-スクシニル-L-グルタミン酸- α , γ -ジベンジルエステル 3.38g (収率 79%) を得た。Found: C, 64.10; H, 6.02; N, 3.14, Calcd. for $C_{23}H_{25}O_7N \cdot 1/4 H_2O$: C, 63.93; H, 5.95; N, 3.24%, NMR $\delta_{Me_4Si}^{DMSO-d_6}$: 7.35(10H, s), 5.25~5.04(4H, d), 4.60~4.10(1H, m), 2.50~2.20(6H, m), 2.20~1.75(2H, m)。

その結晶 1.28g (3 mmol) を *tert* ブタノール 10 ml に溶かし, 接触還元 (5% Pd-C 200mg: H_2) によりベンジル基を除去し, *N*-スクシニル-L-グルタミン酸を油状物として得た。収量 0.74g (収率 100%)。 *N*-スクシニル-L-グルタミン酸ジメチルエステル, MS m/z : 289 (M^+), 230($M^+ - COCH_3$), 198, 174, 115, 84。

2-2. *N*-フェニルアセチル-L-フェニルアラニンアミド *N*-フェニルアセチル-L-フェニルアラニン⁽¹²⁾ 567 mg (2 mmol) のテトラヒドロフラン溶液 5 ml に, 1.5M アンモニア水 2 ml (3 mmol), 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩 575 mg (3 mmol) を加え, 氷冷下 1 時間, 室温で 24 時間反応させた。反応液を濃縮し, 水を加えて生じた沈殿を濾取し, 4% 炭酸水素ナトリウム, 0.5M 塩酸で洗い, 乾燥後エタノールから再結晶して *N*-フェニルアセチル-L-フェニルアラニンアミドを針状結晶として得た。収量 330 mg (収率 58%)。融点 190~191°C, NMR $\delta_{Me_4Si}^{DMSO}$: 7.18(10H, s), 3.38 (2H, s), 3.20~2.60 (2H, m), Found: C, 72.07; H, 6.37; N, 9.94, Calcd. for $C_{17}H_{18}O_2N_2$: C, 72.32; H, 6.43; N, 9.92%。

3. 反応および分析方法

3-1. 一般的方法 種々のオキシ酸と硫酸アンモニ

ウムとの反応を試みた。 α -オキシ酸として, α -ケトグルタル酸ナトリウム, フェニルビルビン酸ナトリウム, オキサロ酢酸, ヒドロキシビルビン酸をそれぞれ 0.5M に対し硫酸アンモニウム 0.25M とし, pH 4 に 5N 水酸化カリウムまたは 1% 硫酸で調製し, 全体量を 20 ml とした。なお, フェニルビルビン酸は, 加熱しながら調製し, とくに pH 調製は行わなかった (pH 6.4)。また, グリオキシル酸 1 水和物, ビルビン酸ナトリウムも別報^(7,8)と比較するために行った。

反応は, 冷却器付きの 50 ml のナス型フラスコに入れ, 攪拌しながら 90°C のシリコンオイルバス中で 24 時間反応させた。反応後, 反応液を 3000 rpm, 15 分間遠心し, 沈殿除去後凍結乾燥を行った。得られた粉末に 4 ml の蒸留水を加え溶解した試料およびこの試料の加水分解物 (試料 0.4 ml に 6N 塩酸 1 ml 加え 15×105 mm のバイレックスチューブに入れ脱気封管し, 105°C, 20 時間反応させた後, 塩酸を留去し 0.4 ml の蒸留水を加え調製した) について, アミノ酸分析および HPLC を行った。また, フェニルビルビン酸とアンモニアの系での沈殿についても同様に加水分解しアミノ酸分析をした。なお, アミノ酸分析用サンプルは, 試料溶液 0.2 ml にクエン酸ナトリウム緩衝液 (0.2N Na^+ , pH 2.2) 1.3 ml を加え調製した。

3-2. 反応条件の検討 一般的反応と同様に調製した反応溶液を 5 ml ずつ $\phi 15 \times 165$ mm のバイレックスチューブに入れ脱気封管し, 105°C の Dri Brock DB-3H (M & S Instrument) の 1.7×4.5 cm の穴中で反応させた。開管後, 反応液を凍結乾燥し, 蒸留水 1 ml に溶解し加水分解前後のアミノ酸の形成を調べた。

3-2-1: ビルビン酸と硫酸アンモニウムの系について は, pH 4 および 8 におけるアミノ酸の形成を調べた。また, α -ケトグルタル酸と硫酸アンモニウムの系では, pH 2, 4, 6, 8, 10 において形成するアミノ酸の収量について検討した。さらに, フェニルビルビン酸の場合, 硫酸アンモニウムのかわりに, 塩化アンモニウム (0.5M) と反応させた。 グリオキシル酸および α -ケトグルタル酸と硫酸アンモニウムの系では, 6 種の遷移金属イオン (Mo^{6+} , Fe^{3+} , Co^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , おおの 10^{-4} M) を強化した修飾海水⁽⁴⁾ 中の場合についても比較検討した。

3-2-2: フェニルビルビン酸 0.5M に対して硫酸アンモニウム 0.1, 0.25, 0.5, 1.0M の反応液を調製し,

105°C で 40, 110 時間反応させた。反応後析出した白色沈殿は、3G のグラスフィルターで濾取し減圧乾燥後秤量した。

3-3. グルタミン酸の単離 α -ケトグルタル酸と硫酸アンモニウムからの反応生産物については、加水分解後に単離を行った。等モル量の 0.3N 水酸化バリウム (80ml) を加え攪拌し、遠心 (3000rpm, 15分) 操作により硫酸バリウムを除去した。上清をエバポレートし、残渣を蒸留水 80ml に溶解し、Amberlite IR-120 [H⁺] (100ml, カラム 2.5×30cm) にチャージし、500ml の蒸留水で洗浄後、3N アンモニア水で溶出し、pH 10 の画分から分取 (各 3ml) し、No. 2~23 を濃縮し橙黄色油状物 530mg を得た。30ml の蒸留水で溶解し Dowex 1 [CH₃COO⁻] (7ml, カラム 1×10cm) にチャージし、洗浄後 2N 酢酸で溶出した。酸性分画 (pH 2) No. 5~10 (6ml) を濃縮し、エタノール-水から再結晶した。白色結晶 160mg が得られ精製することができた。NMR, MS, IR, アミノ酸分析によりグルタミン酸と同定した。

3-4. 分析方法

3-4-1 ガスクロマトグラフィー (GC): 反応生成物の酸加水分解物および標準アミノ酸を反応試験管 (φ 13×100mm のスクリュ-栓付培養試験管) に入れ完全に乾燥した (70°C, P₂O₅ 中減圧乾燥)。アセトニトリルを 0.5ml 加え、次いで BSTFA 0.5ml を加えた。密栓し 150°C の Dri Brock DB-3H で 1 時間加熱し、GC 用サンプルとした。使用機器は、島津 GC-4CMPF および Suppelcoport (10% OV-11, 100~200 mesh) を充填したカラム (φ 2mm×6m) を用い、温度は 125°C で行った。キャリアーガスの流量は、10 ml/min, 注入口の温度は 200°C で測定した。

3-4-2 質量スペクトル (MS): 島津 GCMS-7000 を用いて、直接導入および GC により分離されたものの MS 測定を行った。

N-フェニルアセチルフェニルアラニンアミド (直接導入) *m/z*: 282 (M⁺), 264, 238, 147, 117, 91. (TMS)₂ Al₃ (GCMS) *m/z*: 233 (M⁺), 218, 190, 147, 116, 73.

3-4-3 高速液体クロマトグラフィー (HPLC): Waters の高速液体クロマトグラフィー (Model ALS/GPC 244) を使用した。カラムは、スルホン酸型陽イオン交換樹脂を充填した Shodex Ionpack C-811 (8×500mm) を用いて、流速 1 ml/min, 60°C で展開した。移動相に

は、0.2% ギ酸溶液 (pH 2.6) を用いた。ピークの検出は、254nm の UV 吸収および RI で行った。標準サンプルの溶出位置は次のようであった。*N*-スクシニルグルタミン酸 (11.8 min), コハク酸 (14.6 min), ピログルタミン酸 (19.4 min)。

3-4-4 その他の機器分析: アミノ酸分析は、日立 KLA 5 型アミノ酸自動分析計を使用した。また、赤外吸収スペクトル (IR) は、JASCO-IR-A1 を用い、KBr (disk) 法により行った。さらに、核磁気共鳴スペクトル (NMR) は、日立 R-24 型 (60 MHz) を用い、紫外吸収スペクトル (UV) は、Cary-17 スペクトロメーターおよび日立 323 型スペクトロメーターを使用し測定した。

3-4-5 薄層クロマトグラフィー (TLC): シリカゲル 60 F₂₅₄ (Merck) を使い、(1) *n*-ブタノール: 酢酸: 水 (2:1:1), (2) クロロホルム: メタノール: 酢酸 (95:5:1) を用いて展開した。ニンヒドリンスプレーおよび UV 光により検出した。溶媒 (1): グルタミン酸 *R_f* 0.45, *N*-スクシニルグルタミン酸 *R_f* 0.46, 溶媒 (2): *N*-フェニルアセチルフェニルアラニン *R_f* 0.32, *N*-フェニルアセチルフェニルアラニンアミド *R_f* 0.43.

- (1) 松本和男, 原田 馨: 化学の領域, **33**, 710 (1979).
- (2) 椎尾 勇: 現代化学, No. 122, 54 (1981).
- (3) F. Egami: *J. Mol. Evol.*, **4**, 113 (1974).
- (4) H. Hatanaka and F. Egami: *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **50**, 1147 (1977).
- (5) J. Oró, A. Kimball, R. Fritz and F. Master: *Arch. Biochem. Biophys.*, **85**, 115 (1959).
- (6) H. Yanagawa, Y. Kobayashi and F. Egami: *J. Biochem.*, **87**, 359 (1980).
- (7) F. Egami, Y. Makino, K. Sato, M. Nishizawa and H. Yanagawa: *Viva Origino*, **9**, 66 (1981).
- (8) H. Yanagawa, Y. Makino, K. Sato, M. Nishizawa and F. Egami: *J. Biochem.*, **91**, 2087 (1982).
- (9) This work was reported preliminarily: F. Egami, Y. Makino, K. Sato and M. Nishizawa: *Proc. Jpn. Acad.*, **57** Ser B, 329 (1981).
- (10) R. F. Borch, M. D. Bernstein and H. D. Durst: *J. Am. Chem. Soc.*, **93**, 2897 (1971).
- (11) M. Nishizawa, Y. Makino and F. Egami: to be submitted.
- (12) N. Lustig, H. Spiegelstein-Klarfeld, E. Schneider and N. Lichtenstein: *Isr. J. Chem.*, **12**, 757 (1974).