ツノマタより分離した新アミノ酸, S-ヒドロ キシメチル-L-ホモシスチンについて

高木光造・奥村彩子

(1964年7月21日受理)

ON A NEW AMINO ACID, S-HYDROXYMETHYL-L-HOMOCYSTEINE ISOLATED FROM *CHONDRUS OCELLATUS**

Mitsuzō TAKAGI and Ayako OKUMURA**

Using the displacement chromatography of PARTRIDGE and BRIMLEY, authors succeeded in isolating a new amino acid in crystalline form from *Chondrus ocellatus*. Properties and structure of the amino acid have been investigated. Results obtained are as follows;

1) R_f values by paper chromatography in phenol, butanol-acetic acid-water and collidine-lutidine were 0.77, 0.15~0.14 and 0, respectively (Table 1).

2) M. p. 238~239°C, and elementary analysis of the isolate was C, 36.34; H, 6.77; O, 29.51; N, 8.36; and S, 19.02 per cent. Molecular weight determination by cryoscopic method proved 166. The molecular formula based on these values is $C_6H_{11}O_3NS$ (Table 2).

3) α -Amino-N determination by VAN SLYKE's method gave 8.28 per cent, elucidating that nitrogen of the amino acid is in the form of α -amino N.

4) On the basis of the measurement of optical rotation in water ($[\alpha]_D^{25}$ -73) and in 6N HCl ($[\alpha]_D^{25}$ -31), the isolated amino acid is determined to be L-form.

5) PK values of the amino acid were 2.0, 9.1 and 11.4, respectively (Fig. 1).

6) The presence of OH group was inferred from its positive reaction with diazo and NESSLER's reagents and from its infrared spectrum which showed strong absorption at 1020 cm^{-1} (Fig. 2). The OH group was further proved to be primary by CHANCEL reaction.

7) The amino acid could be reduced mainly to α -amino-n-butyric acid by heating at 60~70°C for 13 hours with RANEY nickel (Figs. 3a and b).

8) The reduction product of the amino acid with 66 per cent HI and red phosphorus at 95°C for 4 hours was found to be identical with that obtained from methionine (Figs. 4 and 5).

Ultimately, a new amino acid isolated from *Chondrus ocellatus* could be established as S-hydroxymethyl-L-homocysteine, which is the only one fitting to all the experimental observations.

さらに、著者ら¹⁾はユナ*Chondria crassicaulis*から新アミノ酸²⁾を発見し、その構造式を L-1,4-チアザン-3-カルボン酸-1-オキシドと決定し、ユナの学名にちなみ、コンドリソ (chondrine) と命名した。

その後、著者ら²⁾³⁾の研究により、コンドリソはさらに、ウルシグサ *Desmarestia ligulata* およびツノマタ *Chondrus ocellatus* 中に含まれることがわかり、また、富永と岡⁴⁾はワカメ *Undaria pinnatifida* 中にも存在することを証明した。

さらに、著者ら³⁾はコンドリソの含まれる時期におけるツノマタの遊離アミノ酸を精査したところ、新アミノ酸を発見したので、unknown D と仮称し、一昨秋の長崎大会でその一部を発表した。

* Chemical Studies on Marine Algae. XVII. 海藻に関する化学的研究, 第 17 報 本研究の要は昭和 39 年 4 月, 日本水産学会春季大会において講演発表した。

** 北海道大学水産学部水産食品化学教室 (Lab. of Sea Food Chem., Fac. of Fish., Hokkaido Univ., Hakodate, Japan)

このアミノ酸は六角板状の結晶で, m. p. は 238~239°C (封管) であるが, その後, 元素分析, 分子量, 比旋光度, pK 値, ラネーニッケルおよび沃化水素酸と赤磷による還元生成物のペーパークロマトグラフィーなどの物理的ならびに化学的諸性質を究明し, あわせて, IR 吸収スペクトルによる構造解析の結果, S-ヒドロキシメチル-L-ホモシスティンと決定するにいたつたので, その経過について報告する。

実験方法および結果

新アミノ酸, unknown D の分離ならびに結晶化については, すでに, 前報³⁾に記載したとおりである。まず, 新アミノ酸の各種溶媒にたいする R_f 値ならびに m. p. を示すと Table 1 のとおりである。

Table 1. R_f values and melting point of a new amino acid isolated from *Chondrus ocellatus*.

Phenol water	Butanol : acetic acid : water 4 : 2 : 1	acid : water 4 : 1 : 5 (upper phase)	Collidine : lutidine 1 : 1	M. p. °C
0.77	0.15	0.14	0	238~239

Table 1 より新アミノ酸は水飽和フェノールでよく上がり R_f 値が 0.77 を示した。ブタノール：酢酸：水=4：2：1 では R_f 値が 0.15, 4：1：5 では 0.14 を示したが, コリジン：ルチジン=1：1 では R_f 値が 0 であり, 1：3 の溶媒にたいしても R_f 値は 0 であつた。

また, 新アミノ酸の m. p. は 238~239°C (封管) である。

つぎに, ナトリウム試験をおこない, 含イオウアミノ酸であることがわかつたので, 元素分析をおこなう一方, 氷点降下法によつて分子量を測定し, 分子式を $C_5H_{11}O_3NS$ と決定した。Table 2 はそのときの結果を示したものである。

Table 2. Elementary analysis and molecular weight of a new amino acid isolated from *Chondrus ocellatus*.

	C	H	O	N	S	Mol. wt.
Estimated	36.34	6.77	29.51	8.36	19.02	166
Calculated as $C_5H_{11}O_3NS$	36.36	6.71	29.07	8.48	19.38	165

つぎに, VAN SLYKE 法により, 新アミノ酸の α -アミノ窒素を測定した結果は 8.28 % で, 窒素の形態は α -アミノ窒素であることがわかつた。

つぎに, 新アミノ酸の水および 6N HCl 溶液における比旋光度を測定した結果はつぎのとおりで L-型と決定された。

$$[\alpha]_D^{20} = -73 \text{ (C=1, H}_2\text{O)}. \quad [\alpha]_D^{20} = -31 \text{ (C=1, 6N HCl)}$$

つぎに, 新アミノ酸 20.8 mg を pH 7.0 に調整した再蒸溜水 1 ml に溶かし, N/10 H_2SO_4 と N/10 NaOH にて滴定曲線をつくり, それより pK 値を求めた結果は Fig. 1 のとおりである。

Fig. 1 より新アミノ酸の pK_1 , pK_2 および pK_3 値はそれぞれ 2.0, 9.1 および 11.4 であることがわかつた。したがつて, この滴定曲線より新アミノ酸は NH_2 基, $COOH$ 基および OH 基を各々 1 つずつもっているアミノ酸であることがわかつた。

つぎに, 新アミノ酸についてジアゾ反応, NESSLER 試薬による反応を検したところ, いずれも陽性で OH 基の存在を確認した。さらに, CHANCEL 反応をおこない, 第 1 級アルコールであることが証明された。

さらに, 新アミノ酸の IR 吸収スペクトルを測定した結果は Fig. 2 のとおりである。

Fig. 2 によつても新アミノ酸は 1020 cm^{-1} に OH 基の強い吸収のあることがわかる。

Fig. 1. Potentiometric titration curve of a new amino acid isolated from *Chondrus ocellatus*.

Fig. 2. Infrared spectrum of a new amino acid isolated from *Chondrus ocellatus*.

つぎに、新アミノ酸のラネーニッケルによる脱硫還元をおこなった。すなわち、アミノ酸 5 mg にたいし、ラネーニッケル約 1.2 g と 70 % エタノール 10 ml を加え、60~70°C で 13 時間加温しながら脱硫還元をおこない、生成物をペーパークロマトグラフィーで調べた結果は Figs. 3 a および b のとおりである。

Figs. 3 a および b より新アミノ酸の脱硫還元生成物は主として α -アミノ- n -酪酸であることがわかり、メチオニンの脱硫還元生成物と全く一致した。しかし、新アミノ酸の脱硫還元生成物としてアラニン、スレオニンおよびホモセリンはいずれも得られなかった。

つぎに、新アミノ酸の沃化水素酸と赤燐による還元をおこなった。すなわち、アミノ酸 10 mg をとり、沃化水素酸 3 ml と赤燐 3 mg を加え、95°C で 4 時間加温しながら還元をおこない、還元生成物をペーパークロマトグラフィーで調べた結果は Figs. 4 a および b のとおりである。

Figs. 4 a および b より新アミノ酸の沃化水素酸と赤燐による還元生成物はメチオニンの同じ還元生成物と全く一致した。しかし、水飽和フェノールを溶媒としたときに還元生成物の R_f 値はメチオニンと同一

Fig. 3a

Fig. 3b

Figs. 3a and b. Chromatograms of a new amino acid, its reduction product with RANEY nickel, and some related amino acids.

A, new amino acid; B, reduction product of a new amino acid; C, alanine; D, threonine; E, homoserine; F, methionine; G, reduction product of methionine; H, α -amino-*n*-butyric acid.

Fig. 4a

Fig. 4b

Figs. 4a and b. Chromatograms of a new amino acid, methionine, and their reduction product with 66 per cent HI and red phosphorus.

A, new amino acid; B, reduction product of a new amino acid; C, methionine; D, reduction product of methionine.

なので、還元生成物がメチオニンでないことを確かめるため、還元生成物を単離し、IR 吸収スペクトルによる同定をおこなった。すなわち、アミノ酸 100 mg をとり、沃化水素酸 17 ml と赤磷 30 mg を加え、95°C で 4 時間加熱しながら還元をおこなうとアミノ酸は完全に還元される。ついで、沃化水素酸を湯浴上で蒸発させ、赤磷を除き、減圧濃縮してシラップ状とし、無水エタノールを加えると還元生成物は析出するので、これを真空デシケーター中で乾燥した。ここに得られた還元生成物の IR 吸収スペクトルを測定した結果は Fig. 5 のとおりで、新アミノ酸の還元生成物はメチオニンから得られた還元生成物と全く同一であることが確認された。

Fig. 5. Infrared spectra of reduction product of a new amino acid with 66 per cent HI and red phosphorus. Some related amino acid are included for reference.

I, methionine; II, reduction product of a new amino acid; III, reduction product of methionine.

考 察

新アミノ酸は元素分析および分子量測定から、分子式を $C_5H_{11}O_3NS$ と決定し、滴定曲線から、 NH_2 基、 $COOH$ 基、および OH 基を各々 1 つずつ有し、さらに、VAN SLYKE 法によつて α -アミノ酸であることが確定された。

また、ジアゾ反応、NESSLER 試薬による反応がいずれも陽性、IR 吸収スペクトルでは 1020 cm^{-1} に強い吸収が認められることから OH 基の存在は確実で、S-オキシドの構造は考えられない。

また、ラネーニッケルによる脱硫還元によつて、主として α -アミノ- n -酪酸を生ずることから、炭素の直鎖が 4 つの基本構造、すなわち、メチオニンの誘導体と考えられる。しかして、 OH 基の位置はラネーニッケルによる脱硫還元によつてスレオニンおよびホモセリンが得られないことから、 β および γ の炭素原子に結合しておらず、イオウ原子に隣接するもう 1 つの炭素原子に結合しているものと考えられる。新アミノ酸は CHANCEL 反応によつて、第 1 級アルコールであることが確認されたが、その結果と矛盾がない。

また、新アミノ酸の沃化水素酸と赤磷による還元生成物はメチオニンから得られた還元生成物と全く同一であり、これはおそらくホモシスチンのチオラクトンと推定される⁵⁾。

したがつて、ツノマタより分離した新アミノ酸、unknown D の構造式はつぎのとおりメチオニンにきわめて類似し、その末端の炭素原子に OH 基の結合した S-ヒドロキシメチル-L-ホモシスチンと決定された。

要 約

ツノマタより分離した新アミノ酸について諸性質ならびに構造が究明された。

1) 水飽和フェノール, ブタノール:酢酸:水, コリジン:ルチジンにたいする R_f 値はそれぞれ0.77, 0.15~0.14 および0である。

2) m. p. は 238~239°C, 元素分析の結果は C 36.34 %, H 6.77 %, O 29.51 %, N 8.36 %, S 19.02 %であり, 分子量は氷点降下法により 166 で, 分子式を $C_8H_{11}O_3NS$ と決定した。

3) VAN SLYKE 法による α -アミノ窒素は 8.28 % で, 窒素の形態は α -アミノ窒素である。

4) 水および 6N HCl 溶液における比旋光度は

$$[\alpha]_D^{20} = -73 (C=1, H_2O). \quad [\alpha]_D^{20} = -31 (C=1, 6N HCl)$$

で, L-型と決定した。

5) pK 値は pK₁, pK₂ および pK₃ 値がそれぞれ 2.0, 9.1 および 11.4 である。

6) ジアゾ反応, NESSLER 試薬による反応はいずれも陽性で OH基を有し, IR 吸収スペクトルは 1020 cm^{-1} に OH基の強い吸収が認められる。さらに, CHANCEL 反応により第1級アルコールであることが確認された。

7) ラネーニッケルによる脱硫還元によつて主として α -アミノ- n -酪酸を生ずる。

8) 沃化水素酸と赤燐による還元生成物はメチオニンから得られた還元生成物と全く同一である。

したがつて, ツノマタより分離した新アミノ酸は S-ヒドロキシメチル-L-ホモシスティンと決定された。

終わりに有益な助言をいただいた本学村田喜一教授ならびに辻野 勇博士に, また, 元素分析を心よく承諾下された京都大学三井研究室および武田薬品研究室に, また, 本研究に協力された橋本泰二, 吉川正彦両君にあわせて深い謝意を表する。

なお, 本研究の一部は昭和 38 年度文部省科学研究費によつたことを付記して謝意を表する。

文 献

- 1) KURIYAMA, M., TAKAGI, M. and MURATA, K.: *Bull. Fac. Fish., Hokkaido Univ.*, **11**, 58 (1960).
- 2) 高木光造・中村昭三郎: 本誌, **30**, 279 (1964).
- 3) 高木光造・石原純夫・西出弘光・山田幸彦・村山花子: 本誌, **30**, 284 (1964).
- 4) TOMINAGA, F. and OKA, K.: *J. Biochem.* **54**, 222 (1963).
- 5) 赤堀四郎・水島三一郎編: 蛋白質化学, **1**, 551.