UDC 547.92.07 : 557.152

81. 野口俊作：麦芽酵素によるステロイドエステル加水分解

その3 反応条件の検討

(ステロイドの研究 第22報^{*1})

Shunsaku Noguchi: Steroids. XXII. Hydrolysis of Steroidal Esters by Malt Enzyme. (3). Optimal Conditions of the Hydrolysis Reaction.

(Research Laboratories, Takeda Chemical Industries, Ltd.^{*2})

Examinations were made on enzymatic properties and reaction conditions for hydrolysis of steroidal esters by malt enzyme and following facts were revealed: (1) Optimal pH is ca. 6.5. (2) Suitable reaction temperature is in the range of 10~30°. (3) Best solvent for the substrate solution is methanol, followed by ethanol. (4) Relationship between enzyme and substrate concentration and reaction time was clarified. (5) The use of diastase (J.P. VI) as the enzyme preparation eliminates adjustment of pH since the enzyme preparation itself has pH-buffering action, and the procedure becomes easier.

(Received June 29, 1960)

前報ではステロイドエステルに麦芽酵素(局方ジアスターゼまたはその原末¹⁾)を希エタノール中で作用させると加水分解が行なわれ、しかもこの反応はエステル基の位置ならびにアシル基の種類によつて興味ある選択性を示すことを報告した。この酵素的加水分解法は選択性の著しい点で化学的方法よりもすぐれ、また反応が非常に緩やかな条件下で行ない得るため、合成化学の分野に有用な応用価値のあるものと思われる。そこで今回この加水分解を実際にステロイド合成に利用する予備手段として、本酵素の諸性質ならびに反応条件等について検討を加えた。

まず基質として 19-hydroxy-Reichstein's substance S (17 α ,19,21-trihydroxypregn-4-ene-3,20-dione) 19,21-diacetate (I) を選び^{*3}, (I) が麦芽酵素によつて 19-acetate (II) へ加水分解される反応¹⁾ (Chart 1) について pH, 温度, 酵素濃度, 基質濃度, 溶媒等の影響を調べた。

酵素剤としては局方ジアスターゼ(ここでは ME-P と略称) またはその原末¹⁾を用いたが、これら粗酵素にはアミラーゼ等の酵素類をはじめその他の蛋白, 炭水化物, 無機塩類等が多量に夾雑し、したがつてこれら夾雑物が何等かの影響を与えている可能性も考えられるので、これら粗酵素について硫酸アンモニウム全飽和塩析処理を行ない蛋白以外の夾雑物をできるだけ除去した後、この酵素(ここでは ME-S と略称)についてもその諸性質をあわせ検討した。

Chart 1.

実験結果ならびに考察

麦芽酵素原末¹⁾の透析ならびに塩析処理^{*4}

原末 50 g を少量の水と充分に混和し、これを冷流水で 20 hr

^{*1} 本研究は、西川正元：ステロイドの研究 (M. Nishikawa: Steroids) の一部である。第22報, その2: 野口: 本誌 81, 373(1961). ^{*2} Juso-nishino-cho, Higashi-yodogawa-ku, Osaka.

1) 野口: 本誌 81, 369(1961).

^{*3} 基質の種類によつて各要因の影響が若干異なるかも知れないが、ここでは (I) を選びこれについて考察した。(I) は反応液に対する溶解度がかなり大きく¹⁾、また加水分解率の測定が PPC²⁾を利用して可能である。

^{*4} 塩析処理に際し種々御教示いただいた当研究所 和田正三博士に感謝します。

セロハン膜透析する。水溶液は遠心分離して不溶物を除去した後、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ を徐々に加え飽和させる。3 hr 後遠心分離して沈殿物を集め、この沈殿物は少量の水に溶解した後混在する $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ を除去するためさらに冷流水で 40 hr 透析。透析後この水溶液を凍結乾燥し白色粉末 (ME-S) 4.1 g を得た。なお上述の操作はすべて 2° 以下で行なった。この ME-S の活性は pH 6.3 において原末の約 3~4 倍である^{*5}。

一般的反応条件ならびに加水分解率の測定 (I) を EtOH 等の溶媒にとかし基質溶液とした。酵素溶液は前記 ME-S または局方ジアスターゼ (ME-P) またはその原末を水、あるいはリン酸塩緩衝液 (1/15M) に溶かし調製した。反応は基質溶液へ酵素溶液を加え恒温に放置して行なう。各時間毎に反応液から 5 cc ずつ取出し AcOEt で抽出、抽出物はプロピレングリコール・トルエン溶媒系による上昇 PPC²⁾ で展開した後、(I) (Rf 0.6) および (II) (Rf 0.1) の部分を切りとり、各部分はさらに EtOH で抽出、抽出液をそれぞれ UV 吸収で定量しその定量値の比から加水分解率を求めた。

至適 pH ME-S の至適 pH は約 6.5 を示した (Fig. 1)。

至適温度 ME-S の至適温度 (pH 6.3, 反応時間 10 hr) は 28° 付近を示した (Fig. 2)。

熱安定性 ME-S は 80° , 10 min の加熱で完全に失活した。すなわち：(I) の 0.4% EtOH 溶液 1.0 cc へ、予かじめそれぞれ 40° , 60° , 80° で 10 min 加熱処理した ME-S の 0.08% 水溶液 (pH 6.2) 5.0 cc を加え 28° に放置、20 hr 後の (I) の加水分解率を求めた。結果はそれぞれ 83% (40°), 28% (60°), 0% (80°) でありこれに対し熱処理しない対照実験は 81% であった。

ME-S と麦芽酵素原末との比較 ME-S を用いた場合、反応に至適 pH に保つため酵素溶液は緩衝液にする必要がある。これに対し原末はそのまま水に溶かしただけで偶然にもほぼ至適 pH 値を示し、この溶液を基質溶液に加えて反応を行なつても pH は大体この付近に保持される。これは原末が酵素以外に塩類等を多量に含み、それ自身かなりの緩衝作用があるためと思われる。故に実用的には原末またはこれから作られた ME-P の使用が、緩衝液を用いる必要がないので反応操作が容易である。ただし ME-P, 原末, ME-S の活性比は ME-P を 1 とした場合 1:8:30 である。すなわち：pH 6.2 に調整した ME-P 1.2% 水溶液, 原末 0.16% 水溶液および ME-S 0.04% 水溶液の 5.0 cc ずつをいずれも (I) の 0.4% EtOH 溶液 1.0 cc へ加え 28° で放置、24 hr 後の (I) の加水分解率を求めたが、その結果はそれぞれ 60, 62, 57% であった。以上の事実から反応におよぼす温度、酵素濃度、基質濃度、溶媒等の影響はすべて実際に反応を行なう場合を考慮し、ME-P を用いて検討することとした。

温度の影響 ME-P について各温度における反応時間と加水分解率との関係を求めた (Fig. 3)。その結果反応は $10\sim 30^\circ$ の範囲で行なうことが望ましく、低温 (10° 以下) では反応中に基質が一部分析出し反応が円滑に進行せず、また 40° 以上では反応が大きく阻害された。

酵素濃度および基質濃度の影響 酵素濃度および基質濃度をいろいろ変えて反応を行なつた (Fig. 4, 5)。反応に際し基質濃度はできるだけ高いことが望ましいが、しかし基質濃度を大にすれば反応時基質の析出が起こり未反応のまま残ることになる。(I) を基質とした場合、基質のアルコール溶液 1 容に対し酵素水溶液 5 容を用させる反応条件下^{*6} では基質溶液中の (I) の濃度は約 0.4% が適当である。

溶媒の影響 前述のように本反応は基質溶液へ酵素水溶液を添加して行なうが、この際基質溶液の溶媒は本反応に重要な影響をおよぼすものと考えられ、溶媒はできるだけ反応阻害の少ないものが要求される。このため EtOH のほか各種溶媒についてその可否を検討した (Table I)。その結果 MeOH が最もすぐれ EtOH がこれにつき、その他では著しく劣ることがわかった。さらに反応液中のアルコール濃度をいろいろ変えて MeOH と EtOH とを比較したが、MeOH はかなり高濃度に用いてもよいことがわかった (Fig. 6)。EtOH を基質溶媒に用いた場合は反応液中の EtOH 濃度は 20% 以下でなければならず、それ以上になると反応は殆んど進行しない。これに対し MeOH では 20% 以上の濃度に用いても反応が進行し、このような高濃度 MeOH 性反応液は前記 EtOH 性反応液 (たとえば基質の EtOH 溶液 1, 酵素水溶液 5 の反応液^{*6}) に難溶なエステル^{*1,1)} の加水分解に有効である。実際に hydrocortisone acetate の加水分解は 33% の MeOH 性反応液 (基質の MeOH 溶液 1, 酵素水溶液

*5 “ME-S と原末との比較” の項参照

2) A. Zaffaroni: Recent Progress in Hormone Research 8, 51(1953).

*6 特別の場合を除き一般にこの条件下で加水分解を行なつた。

2 の反応液) を用いて円滑に行なうことができた。すなわち, hydrocortisone acetate 200 mg, MeOH 200 cc 溶液へ ME-P 20 g (または原末 3 g), 水 400 cc 溶液を加え室温に 5 日間放置後抽出し hydrocortisone 160 mg を得。一方 20% 以下の EtOH 性反応液では基質の析出が起こりかなりの未反応 acetate を回収した。

Table I. Solvent Effect of Substrate Solution

Solvent of substrate soln.	MeOH	EtOH	<i>tert</i> -BuOH	Me ₂ CO	dimethyl-formamide	dioxane	pyridine	tetrahydrofuran	AcOH
Hydrolysis % (24 hr.)	100	60	27	14	11	11	6	0	0

Conditions: 1.0 cc. substrate soln. (concn. of (I): 0.4%) + 5.0 cc. aq. enzyme soln. (concn. of ME-P: 1.2%), at 30°.

Fig. 1.

Effect of pH

Conditions: 1.0 cc. ethanolic substrate soln. (concn. of (I): 0.4%) + 5.0 cc. aq. enzyme soln. (concn. of ME-S: 0.04%), 20 hr., 28°.

Fig. 2.

Effect of Temperature

Conditions: 1.0 cc. ethanolic substrate soln. (concn. of (I): 0.4%) + 5.0 cc. aq. enzyme soln. (concn. of ME-S: 0.08%, pH 6.2), 10 hr.

Fig. 3.

Time-Hydrolysis Percent Curves at Different Temperatures

Conditions: 10 cc. ethanolic substrate soln. (concn. of (I): 0.4%) + 50 cc. aq. enzyme soln. (concn. of ME-P: 1.2%, pH 6.2).

** The substrate crystallized out during the reaction.

Fig. 4.

Time-Hydrolysis Percent Curves in Different Enzyme-Concentrations

Conditions: 10 cc. ethanolic substrate soln. (concn. of (I): 0.4%) + 50 cc. aq. enzyme soln. (concn. of ME-P: 0.6%, 1.2% and 2.4%, pH 6.2), 30°.

Fig. 5.

Time-Hydrolysis Percent Curves in Different Substrate-Concentrations

Conditions: 10 cc. ethanolic substrate soln. (concn. of (I): 0.2%, 0.4% and 0.8%) + 50 cc. aq. enzyme soln. (concn. of ME-P: 1.2%, pH 6.2), 30°.

Fig. 6.

Comparison of MeOH with EtOH as a Substrate Solvent

a) Time-Hydrolysis % Curves (Solvent : MeOH)   b) Time-Hydrolysis % Curves (Solvent : EtOH)

Exp. No.	Methanolic or ethanolic substrate soln. (containing 40 mg. of (I))	Aq. enzyme soln. (containing 600 mg. of ME-P)	MeOH or EtOH % in the reaction mixture
1	5 cc.	55 cc.	8.3
2	10 cc.	50 cc.	16.7
3	20 cc.	40 cc.	33.3
4	30 cc.	30 cc.	50.0

at 30°.

結 論

麦芽酵素によるステロイドエステルの加水分解についてその酵素的性質ならびに反応条件等を検討したが、その結果本反応が酵素に起因することを明らかにすると共につぎの事実を知った。(1) 反応の至適 pH は約 6.5 である。(2) 反応温度は 10~30° の範囲がよい。(3) 基質溶液の溶媒はメタノールが最もよくエタノールがこれにつぐ。(4) 酵素および基質の濃度と反応完結時間との関係が明らかになった。(5) 酵素剤として局方ジアスターゼまたはその原末を用いた場合、反応液 pH は緩衝液で調整しなくとも至適 pH 付近に保たれ緩衝液の必要は全くない。故に実用的には酵素剤は精製したものより粗製品の使用が入手の容易さ、反応の簡便さの点で有利である。

なお麦芽抽出物中から本反応のステロイドエステラーゼを分離することは極めて興味ある問題であるが、このことについては他の機会にまつこととしたい。

武田薬品工業株式会社研究所