

人工酵素を用いたグルタミン酸のカルボキシル化の検討

杉山信之^{*1}、角田有紀^{*2}、木村與司雄^{*1}、近藤徹弥^{*1}、鳥居貴佳^{*1}、竹内啓子^{*1}

Carboxylation of Glutamic Acid Using Artificial Enzyme

Nobuyuki SUGIYAMA^{*1}, Yuki KAKUDA^{*2}, Yoshio KIMURA^{*1}, Tetsuya KONDO^{*1}, Takayoshi TORII^{*1} and Keiko TAKEUCHI^{*1}

Food Research Center, AITEC^{*1*2}

人工酵素を用いて、カルボキシグルタミン酸を合成することを目的とした。グルタミン酸を配位子とする金属錯体を合成した。pH5 以上のアルカリ性領域で金属錯体から水素イオンを脱離させることができた。さらに、二酸化炭素雰囲気下で金属錯体の溶液に水素イオンの脱離を促進する試薬を加えて攪拌したところ、なんらかの反応が進行した。しかし、カルボキシグルタミン酸が得られたという直接的な証拠は得られず、別のアプローチが必要と思われた。

1. はじめに

生体内で様々な化学反応を担う酵素は、比較的温和な条件にて特定の基質のみと結合し、主反応のみ進行させるという特徴を持っている。その反面、安定 pH や安定温度の範囲外では失活するなどの弱点も持っている。一方で、人工的な触媒では多くの場合、目的とする反応のみ進行させることは困難であり、目的の物質を合成するために多くの工程が必要となる。

ところで、生体内ではカルボキシグルタミン酸を含んだタンパク質が存在し、血液凝固反応や骨形成反応に関与している。生体内のカルボキシグルタミン酸はグルタミン酸カルボキシラーゼによって図 1 に示す反応機構で合成されている。カルボキシグルタミン酸を人工的に合成できれば、人工的な血液凝固剤や生体への負担の少ない人工骨の実現が可能となる。

近年、酵素と人工的な触媒の 2 種類の触媒の利点を併せ持つ人工酵素について研究開発が推進されている。特に、金属酵素を模倣した有機金属化合物を利用した人工酵素の構築の研究が推進されている。

そこで、本研究では、これらの人工酵素の構築技術を応用し、天然酵素のグルタミン酸カルボキシラーゼを模倣した、グルタミン酸の活性化及び活性部位のカルボキシル化を実現することを目的とした。

2. 実験方法

2.1 グルタミン酸のカルボキシル化

生体内では図 1 に示すように、グルタミン酸のカルボ

キシル化はグルタミン酸からの水素の脱離反応とカルボキシル基の付加反応の 2 段階反応で進行する。従って、本研究においてもこれを模倣し、第 1 段階として水素の脱離反応の活性化エネルギーを低下させるためにグルタミン酸を捕獲する金属錯体を合成し、第 2 段階として捕獲されたグルタミン酸からの水素の脱離と二酸化炭素付加によるカルボキシル化を試みた。

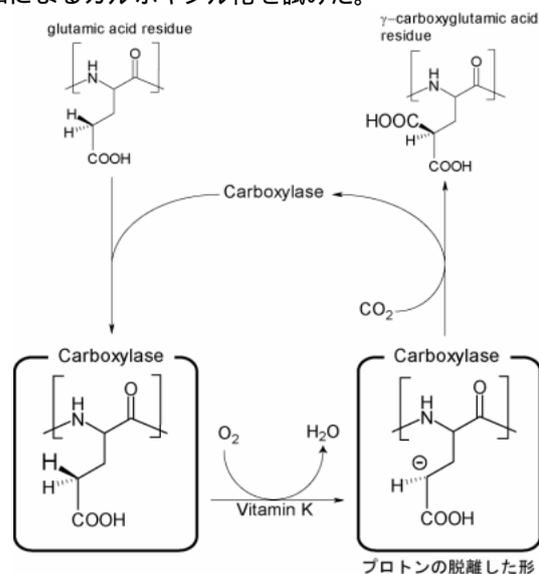


図 1 グルタミン酸カルボキシラーゼの反応機構

2.1.1 錯体の合成方法

室温条件下、硝酸銅 1 水和物 1.096g (4.536mmol) を水 50mL に溶解し、ピピリジン (bpy) を 0.708g (4.533mmol, 1eq) 加え、さらにグルタミン酸 (glu) を 1.021g

*1 食品工業技術センター 応用技術室

*2 食品工業技術センター 応用技術室 (現環境部 水地盤環境課)

(5.456mmol、1.2eq) 加えたところ、瞬時に濃青色溶液が生成した。銅の代わりにニッケル、鉄、亜鉛を用い、ピピリジンの代わりにイミダゾール(im)とフェナントロリン(phen)も用いて、表1に示すような組み合わせを試行した。

表1 金属と配位子の組み合わせ (: 実施 - : 未実施)

配位子	金属			
	Cu	Fe	Ni	Zn
bpy(ピピリジン)				
im(イミダゾール)		-		-
phen(フェナントロリン)				-

2.1.2 水素の脱離反応と二酸化炭素の付加反応

二酸化炭素で置換した容器内で、水素脱離促進試薬を加えた状態の錯体の溶液を室温で約1日間攪拌させ、水素の脱離と二酸化炭素の付加を試みた。

2.2 錯体及び反応物の評価方法

2.2.1 可視光部吸収スペクトルの測定

錯体や反応物の溶液を適当な希釈倍率で希釈し、紫外・可視吸光度計 UV-160A (株島津製作所) にて可視光部吸収スペクトルを測定した。

2.2.2 赤外部吸収スペクトルの測定

溶液状態の試料は乾熱乾燥機で乾固した後、KBr錠剤法を用いてフーリエ変換赤外分光光度計 FT/IR-8000 (日本分光株) を用いて赤外部吸収スペクトルを測定した。

2.2.3 薄層クロマトグラフィーによる分析

錯体に捕獲されたグルタミン酸への修飾反応の進行を確認するため、薄層クロマトグラフィーによる分析を行った。即ち、金属イオンのキレート剤であるエチレンジアミン四酢酸(EDTA)を適量加えて配位子を遊離させた溶液について、シリカゲルを固定相とした薄層クロマトグラフィー分析を行った。移動相には pH10.5 に調整した 0.2M リン酸緩衝液とエタノールの 4:6 混合液を用い、検出にはニンヒドリン反応を利用した。

3. 実験結果及び考察

3.1 錯体の合成

錯体の合成を確認するために、硝酸銅水溶液にピピリジンとグルタミン酸を加えた溶液、硝酸銅水溶液にグルタミン酸のみを加えた溶液、硝酸銅水溶液にピピリジンのみを加えた溶液の、可視光部吸収スペクトルを測定した。結果を図2に示す。硝酸銅とピピリジン、または硝酸銅とグルタミン酸を加えた溶液の最大吸収波長は 720nm 付近であるのに対し、3種類を混ぜた溶液の最大吸収波長は 620nm 付近にシフトしており、グルタミン酸銅

錯体の形成反応が進行したものと推察される。また、得られた錯体の溶液を乾固し、赤外部吸収スペクトルを測定したところ、図3のスペクトルが得られた。もとのグルタミン酸のスペクトルと比較してカルボニルに由来するシグナルが 1642cm^{-1} から 1607cm^{-1} までシフトした。このことも同様に錯体形成反応の進行を支持している。これらの特徴や文献¹⁾に書かれている構造式から、得られた錯体は図4の構造を持つと推定された。

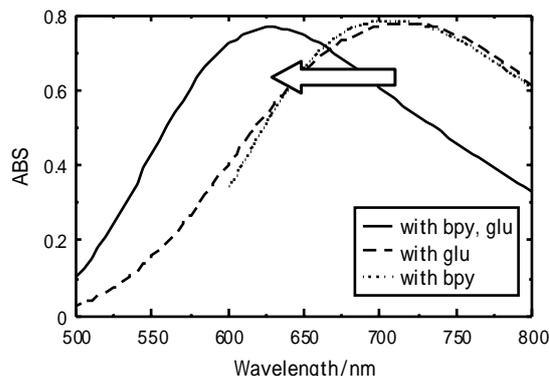


図2 各硝酸水溶液の可視光部吸収スペクトル

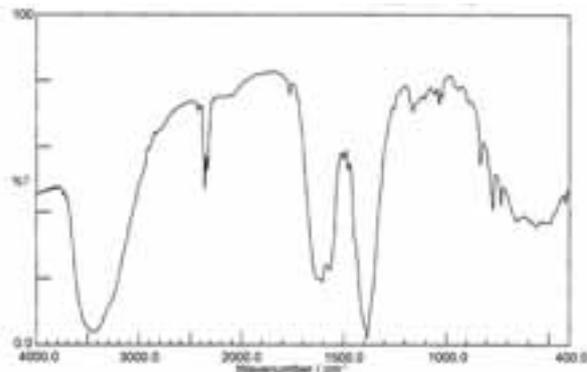


図3 錯体の赤外部吸収スペクトル

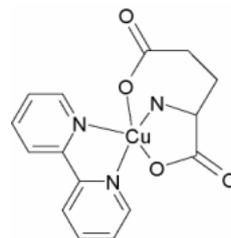


図4 錯体の推定構造式

この錯体から水素の脱離反応が進行するか確認するため、溶液の pH を酸性側からアルカリ性に変えて可視光部吸収スペクトルを測定した。結果を図5に示す。pH4 と pH5 の間で最大吸収波長がシフトしたこと、及び可視光部吸収スペクトルのシフトが可逆的であったことから、水素の脱着等の可能性が示唆された。

類似の錯体の反応性も検討するため、表1に示す組み

合わせの錯体の合成を試みた。表 2 にその結果を示す。なお、錯体の形成は銅の場合で述べたように可視光部吸収スペクトルと赤外部吸収スペクトルで確認した。この結果を基に、いずれの配位子でも錯体の形成が確認され、合成された錯体の溶解性が良好で、合成や精製が容易な銅とニッケル錯体を対象にカルボキシル化反応の反応性の検討を行うこととした。

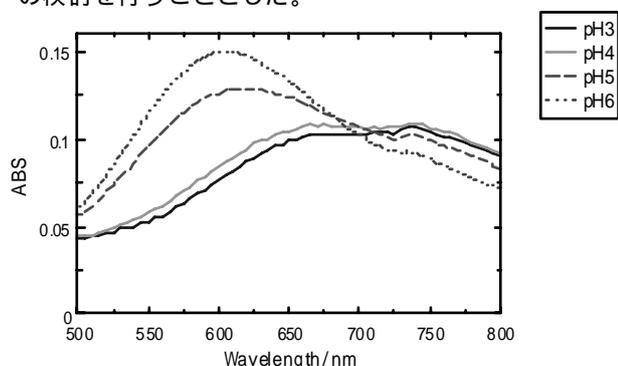


図5 錯体の pH による吸光度の違い

表 2 様々な中心金属と配位子を利用した場合の錯体の生成状況

配位子	金属			
	Cu	Fe	Ni	Zn
bpy(ピピリジン)				?
im(イミダゾール)		-		-
phen(フェナントロリン)		x		-

- : 錯体の生成を確認
- x : スペクトルで反応の確認ができず
- ? : スペクトルでの確認ができず
- : 反応の未実施

3.2 反応性の検討

3.2.1 銅錯体の反応性の検討

生成した銅グルタミン酸錯体に対する反応性を検討した。溶媒と水素脱離促進試薬を表 3 に示した量加え、室温下、約 1 日間攪拌させて反応させた。ただし、NHPI は N-ヒドロキシフタルイミドの略であり、水素を取り除くラジカル発生剤である²⁾。反応前後における溶液の色の変化や沈殿物の有無、乾固した溶液の赤外部吸収スペクトルの変化の有無、EDTA を加えて中心金属を取り除いた状態における薄層クロマトグラフィーの分析結果について検討した。分析結果のうち、色調変化と赤外スペクトル変化を表 3 に示す。

表 3 に示すように、いくつかの試験区において、溶液の色調や赤外部吸収スペクトルによって元の錯体から変化していた。しかしながら、現在までの検討範囲では、いずれの試験区においても、薄層クロマトグラフィーでの分析結果ではカルボキシル化反応の進行は確認されなかった。本研究で検討した反応条件では、カルボキシル化反応は進行していないか、あるいは収率が低く薄層クロマトグラフィーでは検出不可能であったためと考えられる。

3.2.2 ニッケル錯体の反応性の検討

ニッケル錯体についても、銅錯体の場合と同様の検討を行った。その結果を表 4 に示す。銅錯体の結果と同様に、溶液の色調や赤外部吸収スペクトルによって元の錯体から変化していることを確認した。しかしながら、薄層クロマトグラフィーではカルボキシル化反応の進行は確認されなかった。

表 3 銅錯体の反応性の検討

錯体	錯体量 (mg)	反応溶媒	溶媒量 (mL)	水素脱離促進試薬	試薬量 (mg)	色調変化	赤外スペクトル変化	
1	Cu+bpy+glu	100	水 (pH10)	40	なし	+	+	
2	Cu+bpy+glu	80	エタノール	10	VitaminK	22	-	-
3	Cu+bpy+glu	100	エタノール	10	NaOEt	34.8	+	+
4	Cu+bpy+glu	100	メタノール	10	NaBH ₄	19.4	-	-
5	Cu+bpy+glu	100	水 (pH10)	10	NHPI	37	-	+
6	Cu+bpy+glu	50	アセトニトリル	10	NHPI	17.4	+	+
7	Cu+bpy+glu	100	メタノール	20	NHPI	28	+	+
8	Cu+im+glu	100	水 (pH10)	20	なし	-	+	
9	Cu+im+glu	50	エタノール	30	VitaminK	34	+	+
10	Cu+im+glu	100	エタノール	20	NaOEt	35	-	-
11	Cu+im+glu	100	アセトニトリル	20	NHPI	37	+	+
12	Cu+phen+glu	50	水 (pH10)	10	なし	-	+	
13	Cu+phen+glu	50	エタノール	30	VitaminK	34	-	-
14	Cu+phen+glu	100	水 (pH10)	20	NHPI	38	+	+
15	Cu+phen+glu	100	アセトニトリル	20	NHPI	37	+	+
16	Cu+phen+glu	100	メタノール	20	NHPI	37	+	+

表4 ニッケル錯体の反応性の検討

	錯体	錯体量 (mg)	反応溶媒	溶媒量 (mL)	水素脱離 促進試薬	試薬量 (mg)	色調変化	赤外スペクトル 変化
1	Ni+bpy+glu	50	水 (pH10)	20	なし		-	+
2	Ni+bpy+glu	100	水 (pH10)	20	NHPI	40	-	+
3	Ni+bpy+glu	50.3	アセトニトリル	10	NHPI	17.5	+	+
4	Ni+bpy+glu	100	メタノール	20	NHPI	33	+	+
5	Ni+im+glu	100	水 (pH10)	20	なし		+	-
6	Ni+im+glu	100	メタノール	20	VitaminK	30	+	+
7	Ni+im+glu	100	エタノール	20	NaOEt	35	-	-
8	Ni+im+glu	15	水 (pH10)	10	NHPI	10	+	+
9	Ni+im+glu	50	アセトニトリル	10	NHPI	17	+	-
10	Ni+phen+glu	100	メタノール	20	VitaminK	30	-	-
11	Ni+phen+glu	100	水 (pH10)	20	NHPI	37.9	+	+
12	Ni+phen+glu	50	アセトニトリル	10	NHPI	17.5	+	-
13	Ni+phen+glu	100	メタノール	20	NHPI	36.4	+	+

4. 結び

生体内のグルタミン酸カルボキシラーゼの反応を模倣して、カルボキシグルタミン酸を合成することを目的として実験を行った。その結果、グルタミン酸を金属に配位させることができた。さらに、その状態においてアルカリ性にすることで、分子内の水素が脱離していることが示唆された。錯体溶液に水素の脱離を促進させる物質と二酸化炭素を加えることで、何らかの反応が進行して

いることが判明した。しかしながら、カルボキシル化反応の進行は確認できず、更に検討を要することがわかった。

文献

- 1) L. Menabue *et al.*: *Inorg.Chem.*, **24**, 3621(1985)
- 2) Y.Ishii, S.Sakaguchi, T.Iwahama: *Adv. Synth. Catal.*, **343**, 393(2001)