

PRF

蛋白質研究奨励会ペプチド研究所報 No. 2 1974. 11

苦味ペプチドの話

大阪大学理学部教授 芝 哲 夫

—物質が吾人に喚起する感覚と化学的構造との関係は、尚ほ殆んど全く不明でありまして、吾々が進んで之を闡明するを俟って居るものといはねばなりません。殊に味覚に関する諸問題中には吾々化学者の側より進撃を試み得べき準備の多少整って居るものが少からぬやに見受けられます。—— 池田菊苗

ふとしたことで味のペプチドの研究を始めることになった。3年前の秋、久保田尚志先生が研究室に尋ねてこられて、用件がすんだ後でさりげなく話されたのがカゼインの酵素分解で得られた苦味ペプチドの話であった。チーズの苦味の研究に端を發って、大阪市大の山本武彦教授と南浦能至博士が牛乳カゼインを枯草菌のタンパク分解酵素で処理したものから、苦味成分の一つとしてトリプトファンとロイシンからなる環状ペプチドを単離されたというのである。久保田先生はヤマハッカ属植物のジテルペンについて、苦味と化学構造の関係を調べられ、化学者にも納得がいくきれいな立体化学的關係を見つけ出されている。のみならず、先生は味の化学について深い思索を重ねておられ、御同道する車中などで度々そのお考えを聴かせて頂いたものである。



筆者近影

私の師の金子武夫先生はアミノ酸の味の化学をライフワークとされ、万事に控え目な先生が事アミノ酸の味に関してはこちらがたじたじとなる熱の入れ方であった。私自身不肖の弟子で、先生の味の御研究のお手伝いを余りしなかったのであるが、私にとってきわめて近いこのお二人の先生が味の化学というものになみなみならぬ執念をお持ちであることは理窟を抜きにして考えてみなければならぬ有機化学者の一つの体質の問題であるとかねがね思っていた。

そんなことで久保田先生の苦味ペプチドの話をお忘れられないままに半年が過ぎた春、沼波憲一君が修士の仕事が始めるに当って、是

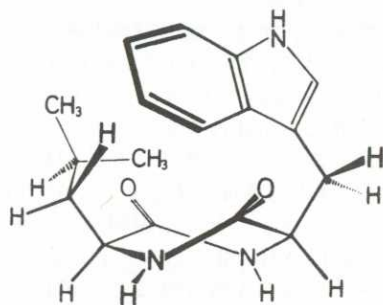
非この研究をやらせて頂けたらと、市大の山本研究室を尋ねた。久保田先生のお口添えがあったに違いない、山本教授は快く貴重な苦味ペプチドのサンプル10数mgを下さり、以後の構造研究をすべて委せて頂くことになった。

合成研究を始める中に、このものの構造は当初予想していたL-トリプトファンとL-ロイシンそれぞれ2残基からなる環状テトラペプチドではなく、その半分のジケトピペラジンであることがわかり、合成品も天然物と完全に一致した。

味の化学というと、池田菊苗博士のグルタミン酸ナトリウムを挙げるまでもなく、現在でも日本人の研究の貢献度の高い領域であると思うが、その中で苦味ペプチドの呈味性と化学構造との相関々係が明らかになってきたのは比較的最近のことで、それもほとんどわが国で行なわれた研究である。東大の藤巻正生教授は、大豆タンパク質をペプシンなどの酵素で水解した時に生じる苦味ペプチドの研究で、C端に…—Tyr-Phe-Leu-OHのような疎水性アミノ酸配列が来ることが苦味発現に必要であることを明らかにされた。広島大学の岡井秀雄博士は系統的に合成オリゴペプチドのアミノ酸配列と苦味との関係を研究され、疎水性アミノ酸、特にロイシンまたはフェニールアラニンがC端に来た時に最も苦味が強くなることを報告されている。又、京大の秦忠夫教授のところでもカゼインのトリプシン水解物から3種の苦味ペプチドを分離され、一般的に疎水アミノ酸からなるペプチドは、そのアミノ酸配列の如何にかかわらず、N端およびC端がブロックされると苦味が増大するという説を提出された。

私達が構造を明らかにしたL-トリプトファンとL-ロイシンのジケトピペラジンもこれ

らの研究グループの結果と考え方に矛盾しない。しかし、これまではアミノ酸配列順序または官能基の状態など平面的な構造だけが論議されていたのに対して、私達はNMRスペクトルの観察から、はからずもこの苦味ペプチドの三次元構造を考えてみる機会に恵まれた。合成cyclo(L-Trp-L-Leu)のDMSO-d₆中の100MHzでのNMRスペクトルを一見して驚いたことには、負の δ 値という高磁場領域に明瞭にメチレン基の



cyclo(L-Trp-L-Leu)の立体構造

シグナルが認められた。これはロイシンの β -メチレン基がトリプトファンのインドール核にきわめて近接した位置に存在していて、その環電流の影響で異常に高磁場側にシフトしたとしか思えない。さらに各プロトンのカップリング定数から図のような形を最も可能性のある三次元構造として推定することができた。ジケトピペラジンのねじれまたはたわみの程度はまだ決定的なものではなく、正確な形はX線解析を待たねばならないが、両アミノ酸の側鎖がジケトピペラジン環の一方の側に集まって近接した位置にあることは疑う余地がない。

この立体構造は水素結合能を持つNH、CO基が分子の外側に向った一つの面を形成し、この面があたかも月着陸船の脚部のように味蕾上の絨毛部に降り立つ姿を想像すると、分子の他の部分の疎水性集団の形が苦味を発現する活性部位に相当すると考えられ酵素の活性化機構との類似からいかにももっともらしく思えてくる。これこそ呈味性という生理作用発現機構を化学的に解明する有力な材料をつかんだのかもしれないと、ひそかに得意な気になった。

呈味試験という官能テストはやってみるまでは個人差や精度の点で不信感を抱いていた。20才前後の女性の舌の感度が最も鋭敏であるという云い伝えを何処からか聞き込んできて、沼波君は理学部内の美人を何人も集めてきた。毎夜酒をたしなむ私は最も悪い感度の例としてテストグループに入れてくれたらしい。しかし、現在まで20数種の合成サンプルのテストを数人で行なった結果は予想以上に精度の良いデータを示し、私の舌も信頼を獲得した。

cyclo(L-Trp-L-Leu)の苦味はカフェインの約70倍の強さで、さわやかな後味のよい苦味である。ビールに苦味はつきものであるが、その他の食品の苦味は一般に歓迎されないものと単純に考えていたのであるが、この頃より苦味びいきになって、注意して味わってみると、ウィスキーやチーズはもとより苦味が不可欠の食品が案外多いと思う

ようになってきた。

さて次に、アミノ酸の種類を変えて合成したcyclo(L-Trp-L-Trp), cyclo(L-Leu-L-Leu), cyclo(L-Trp-Gly), cyclo(L-Leu-Gly)は何れも苦味はあることはあるが、cyclo(L-Trp-L-Leu)に比べてこの順序にかなり弱くなる。アミノ酸、オキシ酸では対掌体は全く異なる呈味性を示すことはよく知られている。念のためにcyclo(D-Trp-D-Leu)を合成し調べると、意外にもD-D体はL-L体よりもむしろ強い同種の苦味を与えた。D-D体はL-L体の対掌体であるから、前に述べたような固定した立体構造を呈味性発現の機構と結びつけることでは説明がつかない。しかし、分子モデルで調べると、D-D体はL-L体のCOとNHの並べ方が入れかわっただけで分子全体の空間的原子配列は全く同じコンホメーションを取り得ることがわかった。これは恐らく疎水性集団の形が苦味発現に最も重要な因子であって、親水性基の並び方にはある程度の自由度が許されるのであろうと、やや苦しくなってきたが一応説明し得た積りでいた。ところが、次にcyclo(L-Trp-D-Leu), cyclo(D-Trp-L-Leu)が元のL-L体とほぼ同じ強さの苦味を呈することを知るに及んで、単純に立体構造と呈味性とを結びつけることが如何に困難であるかをしみじみと思い知らされたのである。しかし、一歩退いて、親水性基と疎水性基の局在化という構造は生理活性ペプチド、特に抗生ペプチドにしばしば見られる特長であることと考え合わせて、この方面から苦味の固い扉を少しでも押し開くことができるのではないかと考えた。まず試みたのはCOやNHを修飾してその水素結合能力を別々に消滅させていけばどうなるかということである。現在この方針での種々の誘導体の合成を修士の浦谷宏君が始めている。しかし、またもや予想を裏切って一つのNHの水素をメチル基で置換したcyclo(L-Trp-L-N-methyl-Leu)はメチル基のないものよりさらに強い苦味を示す結果を得た。さらに種々の修飾を行なうためには合成過程の面倒なトリプトファンに代えてフェニールアラニンを用いるのが楽であろうと考えて、試みにcyclo(L-Phe-L-Leu)を合成すると、これがまた意外にも全く無味であった。人間の智慧を嘲笑っているかのような逆々の結果の続出である。

その頃、赤堀四郎先生が私達の仕事を聞き伝えられて久保田先生と御一緒にわざわざ私の部屋にお見えになった。私は恐縮して以上の経過を分子モデルを使って説明申し上げた。丁度この時、理学部の各入口を機動隊が固めるという突発事件が起こり先生の御意見を十分にお聞きすることができなかつたのはかえすがえすも残念であったが、この時に赤堀先生が示された若々しい御関心と、わざわざ私の処まで全くこの仕事の話聞くためだけに来られたという先生の学問に対するお気持ちを、私は生涯忘れられぬ教えとして受け取ることができた。のみならず、先生はトリプトファンのインドール核の存在の重要性を指摘してお帰りになった。

トリプトファンをフェニールアラニンに代えたりしてインドール核を軽視していた私は誠に恥づかしい気持ちになり、早速トリプトファンに改めて注意を向け直すことになった。浦谷君に頼んでまずインドール核と空間的にはほぼ等価である α -ナフチルアラニンとL-ロイシンのジケトピペラジンを合成して貰ったが、これは全く無味であった。やはりインドール核の窒素が何か重要な役割を持っているのではないかという赤堀先生のお考えが的を射ているように思われてきて、現在ピロールアラニンのジケトピペラジンの合成を急いでいる。というわけで苦味ペプチドの化学は決して甘いものではないことを近頃は痛感しているが、味覚に対して化学の側からの一つの拠点をつくるためにさらに進撃を続けるつもりである。

蛋白研メモ

●ひとの動き

- 中川八郎代謝部門助教授は、8月1日付けをもって、教授に昇任されました。
- 永井克也代謝部門助手は、8月15日より1年間の予定で米国へ出張されました。
- 角野富三郎酵素部門助手は、8月31日より1年間の予定で米国へ出張されました。
- 外国人共同研究員
 - ・ オーストラリア キーンズランド大学高級講師 Colin H. L. Kennard氏は、9月1日より12月31日まで物理構造部門で研究されます。
 - ・ 米国南東マサチューセッツ大学副教授 George J. Thomas氏は、9月1日より1年間溶液部門で研究されます。
 - ・ 西独ミュンヘン大学臨床生化学研究所講師 Hans Fritz氏は、11月1日より50年2月28日まで血液蛋白部門で研究されます。

●蛋白研セミナー

i) 50年3月までに予定されるセミナー

題 目	開催予定日	担 当 者	担 当 部 門
微生物の温度適応機構	11. 25	大島泰郎、京極好正	溶 液
コラーゲン研究会第24回シンポジウム	11. 30	榊原俊平	溶液、奨励会
植物酵素の精製	12. 9～ 12. 10	森田雄平、浅田浩二 新 勝光	酵 素
酵素分子の触媒部位のマイクロ環境 解明へのアプローチ	1. 13～ 1. 14	崎山文夫	化学構造
リボゾーム蛋白質	1. 27	岡田吉実、大沢省三	化学構造
免疫担当細胞の膜構造と機能	1月中	北川正保	生理機能
ペプチド抗生物質	2. 13	梅沢浜夫、芝 哲夫	ペプチド
ペプチドホルモンの合成と作用	2月中	芝 哲夫、下西康嗣	ペプチド

ii) “微生物の温度適応機構” プログラム

- 1) 胞子の耐熱機構、内田有恒(京大農)
- 2) 好熱菌の菌学的性質と耐熱機構 大島泰郎(菱化、生科研)
- 3) 好熱菌膜の分析 — 生体膜の好熱性と脂質 — 大島美恵子(北里大医)
- 4) 好熱菌の無細胞蛋白合成系について 岩下淑子(東大農)
- 5) 特殊環境における生物の存在様式と tRNA の化学構造 西村進(国立ガンセンター)

- 6) 好熱菌のアロステリック酵素 齊木隆 (東大農)
- 7) グリセリン酸キナーゼおよびグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼの構造と活性 鈴木紘一 (東大農)
- 8) 好熱菌の産出した α -アミラーゼ分子の安定性について 油谷克英 (阪大蛋白研)
- 9) 好熱菌酵素の温度による構造変化と耐熱性との関係 野宗嘉明 (東工大天然物化学)
- 10) 総論 今堀和友 (東大農)

iii) “コラーゲン研究会第24回シンポジウム” プログラム

- 1) 結合組織研究をめぐる最近の話題 永井裕 (東医歯大)
- 2) Ehlers-Danlos syndrome の培養線維芽細胞における procollagen peptidase について 新海法、平林修、玉置昭治、平戸益代 (神大)
- 3) 動物コラーゲナーゼの合成基質とその応用 永井裕、堀久枝 (東医歯大) 榊井美弘、楠原俊平 (奨励会)
- 4) 消化管におけるコラーゲナーゼ活性 宇宿源太郎、小山田郁子 (熊大)
- 5) 線維肝とコラーゲナーゼ 堺隆弘 (東大医)
- 6) 線維肝における硫酸酸性ムコ多糖の異常 中村允人 (大阪府成人病センター)

iv) “ペプチド抗生物質” プログラム

- 1) 微生物がつくる生物活性ペプチドの意義 梅沢浜夫 (微化研)
- 2) セファロsporin C 生合成に関する二三の知見 神崎俊彦 (武田研)
- 3) ヌクレオシドペプチド抗生物質ポリオキシシンの生合成 磯野清 (理研)
- 4) 抗生ペプチドの無細胞合成系—バシトラシンを中心として— 志村憲助 (東北大農)
- 5) ペプチド抗生物質の溶液中の構造 —チロシジンを例として— 京極好正 (阪大蛋白研)
- 6) 合成的アプローチによるグラミシジンSの構造と機能研究 泉屋信夫 (九大理)
- 7) プレオマイシンの化学 滝田智久 (微化研)
- 8) ツベラクチノマイシンの化学 芝哲夫 (阪大理)

最近の話題

●異常プロスロンピン

ビタミンK欠乏によって血液凝固因子のプロスロンピンレベルの下がることは古くから知られていた。ビタミンK拮抗体のダイクマロールを牛に投与すると出血傾向になる原因は、血中に異常プロスロンピンができるからである。1972年に、StenfloとSuttie一派が単離に成功した異常プロスロンピンは、生理的条件下で活性化しにくい事とCa結合能力が欠除している事以外は正常なものと蛋白質化学的に同一であった。正常プロスロンピンのN末端側配列は、Ala-Asn-Lys-Gly-Phe-Leu-Glx⁷-Glx⁸……であるが、Stenfloは、7と8番目のアミノ酸は γ -carboxyl-glutamic acidであることを明らかにした。又、Magnussonは、

プロスロンピンのN末端周辺にある10個のグルタミン酸はすべて γ -carboxyl化されていることを最近報告した。この γ -carboxyl-glutamic acidの位置でCa²⁺を介してりん脂質とプロスロンピンが複合体を形成しているようだ。

プロスロンピン前駆体(異常プロスロンピン)が生合成された後、N末端側部分にあるグルタミン酸の γ -carboxylationにビタミンKがどう働いているかは現在まだ不明であるが、諸外国で大規模な研究が展開されており、今後に残された興味深い問題である。(蛋白研 森田隆司)

参考文献

S. Magnusson, et al., *FEBS Letters*, **44**, 189(1974).

●システインを含むペプチドの接触還元

Benzoyloxycarbonyl (Z)基は接触還元で安全に除去できるのが特長である。しかし、システインを含むペプチドの場合にはSが触媒毒となるために応用できないものとされていた。最近、黒水らは液体アンモニアを溶媒として使用すればSを含むペプチド中のZ基を接触還元にて除去しうることを見出し、Oxytocinの合成に応用して好結果を得た。この方法を利用すれば、Z基と接触還元に安定な *t*-Butyloxycarbonyl (Boc) 基などを組み合わせることにより温和な条件下における保護基の選択的除去が可能となり、複雑なS含有ペプチドの合成にも有用であろうと思われる。

(奨励会ペプチド研 森川忠則)

参考文献

K. Kuromizu, J. Meienhofer, *J. Amer. Chem. Soc.*, **96**, 4978 (1974).

●新しいペプチド合成試薬

伊藤らは、一連のN-ヒドロキシ化合物のスルホン酸エステルを合成して、そのペプチド縮合剤としての適用性を調べ、6-クロロ-1-p-クロルベンゼンスルホンルオキシベンゾトリアゾール (CCBT) が有用であることを見出した。

DCC法で得た生成物の精製に問題のある場合、又、活性エステル法では反応が遅い場合などに特に有用であり、His-OMe, Boc-Asn, Boc-Glnなどを使用した合成例においても好収率であったと報告されている。又、アンダーソン試験ではラセミ化はほとんど認められていない。縮合反応は水、アルコール以外の中性溶媒 (メチレンクロリド等) に、酸、アミンの両成分、および、塩基としてN-メチルモルホリンを当量づつ混合し、冷却下にCCBTを加え1時間反応させた後、室温に戻して反応を完結させればよい。

CCBTは、1年以上保存できる安定な試薬であり、DCC、活性エステル両法の欠点を補う有効な縮合剤として注目されるであろう。

(奨励会ペプチド研 瀬戸保彦)

参考文献

M. Itoh, et al., *Tetrahedron Lett.*, **35**, 3089 (1974).

●Angiotensin II Inhibitors とAngiotensin III について

Angiotensin II は8個のアミノ酸よりなるペプチドで、血管床に作用し血圧を上昇させる他、副腎皮質の球状層に作用し強力な鉱質コルチコイドであるアルドステロンの分泌を刺激する作用を持つ。アルドステロン分泌刺激作用については、[des-Asp¹]-angiotensin II にもほぼ同様の作用があることも認められており、最近この物質をangiotensin III と呼ぶことが提唱されている。¹⁾

Angiotensin IIの作用と分子構造の関係については米国のBumpus一派により多数の誘導体の合成と生理作用の研究がなされ次第に解明されつつある。昇圧、アルドステロン分泌刺激の何れにもC末端の芳香族アミノ酸が必要であり、C末端をロイシン、イソロイシン、アラニンなどの脂肪族アミノ酸に置換することにより両作用に拮抗する物質が得られること、N末端をザルコシンのようなアミノ酸に置換することにより拮抗作用の持続の長いものが得られることが知られている。

これら誘導体のうち[Sar¹, Ala⁸]-angiotensin II や[Sar¹, Ile⁸]-angiotensin II は、持続の長いangiotensin II 拮抗物質として臨床応用が試みられ、²⁾ 血漿レニン活性が高値を示すつまりこのような症例では、angiotensin II が増加しており、その為に高血圧が生じている可能性がある一悪性高血圧、腎血管性高血圧症の一部では明らかな降圧反応が見られた。Goldblatt 以来実験的腎血管狭窄による高レニンの高血圧においてレニンが高血圧の発生と維持に関与していることが想像されるが、このようなangiotensin II 拮抗剤を用いることにより、人間で、*in vivo*で、ある種の高血圧症においてangiotensin II の高血圧の維持に関する意義が実証されたわけである。

生体ではこの他多数の未知、既知のペプチドが各種の機能を営んでおり、その作用機序の解明やさらに病気における治療までこのような合成ペプチドの応用範囲は大きい。

(大阪府立成人病センター内分泌 山本智英)

参考文献

1) W. B. Campbell, et al., *Science*, **184**, 994 (1974). 2) J. O. Davis, et al., *Circ. Res.*, **34**, 279 (1974).

PRF・NEWS

12月1日より、ペプチド合成に関する物質検索サービスと“ペプチド情報”の販売を開始いたします。

■血の通った情報を提供します

私達の周囲に渦巻く情報は、年々加速度的にその数を増しつつあります。莫大な数の情報の中から私達の研究に必要なものを欠かさず収集し分類保存することは、もはや個人の力ではどうしようもありません。コンピューターを使えばよいとお考えの方も多いかと思いますが、しかし、コンピューターにインプットするのはやはり人間であり、多様な論文をどういう規準で採集し、誰が分類するかが成否の分れ道となりましょう。莫大な数のノイズの中から必要とするシグナルのみを短時間に抽出することの難かしさは、一度でもコンピューターで打ち出された情報を手に取ったことのある方なら十分におわかりのことと存じます。私達が今最も必要とするのは、専門家の手によって抽出され分類された血の通った情報であって、一般職のライブラリアンによって機械的に整理されたコンピューター情報ではありません。

PRFが保有しているペプチド情報は、100種に及ぶ主要学術雑誌を主な情報源とし、ペプチド合成を専門とする10数名の職員がそれらを毎号欠かさずチェックして一編一編厳密に選択抽出した論文集からなっています。従って、Chemical Abstractsほどの完全さはありませんが、ノイズのない有効なシグナルのみを集めていつでもすぐに取り出せるように整備されているのが特長です。勿論人間のすることですから見落しの可能性は絶対にはないとは言えませんが、毎年2回古いデータの補充と新しい論文の追加を行なってより完全なものに近づけるよう努力しています。

■ご利用は会員制といたします

このようにして収集した論文の中から必要なデータを抽出しカード化したのが今回公開するSubject Indexであります。このIndexの利用は会員制となっております。どうか、この機会に是非ご入会のうえIndexを有効にご利用下さい。会員には、Indexサービスの他、前月までに入手したペプチド合成に関する論文の中から主なものをとりまとめて編集した“ペプチド情報”を毎月お届けいたします。

この検索サービスの利用法その他についてお知りになりたい方は同封の葉書をご利用のうえ当会までお申し込み下さい。折り返し利用案内及び入会申込書をお送りいたします。

●新製品の発売、価格改訂、カタログ外在庫品の特売については別紙をご覧ください。

PRF No.2 1974.11

編集発行 財団法人 蛋白質研究奨励会

〒562 大阪府箕面市稲476 TEL 0727(29)4121~3