

氏名(本籍)	しまだあきひこ (広島県)		
学位の種類	農学博士		
学位記番号	博乙第590号		
学位授与年月日	平成2年3月23日		
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当		
審査研究科	農学研究科		
学位論文題目	OPTICAL RESOLUTION OF DL-AMINO ACIDS ON CELLULOSE AND ITS APPLICATIONS (セルロースによるDL-アミノ酸の光学分割とその応用)		
主査	筑波大学教授	工学博士	中村以正
副査	筑波大学教授	農学博士	高橋穰二
副査	筑波大学教授	農学博士	村上和雄
副査	筑波大学教授	農学博士	井上嘉幸

### 論文の要旨

光学異性体を研究対象に選ぶ場合の障害の一つとして、光学異性体の分割方法の問題があげられる。すなわち、従来の方法は、材料や担体に化学修飾を施したり、酵素反応後の異性体の結晶分離を必要とするなど種々の難点がある。したがって、比較的容易に光学分割ができ、しかも応用範囲の広い方法が確立できるならば、農学、生物学等の分野の研究の進展に寄与するところが大きいと考えられる。

本研究は、市販品で広く普及しているセルロースを用いてアミノ酸ラセミ体の簡便な光学分割法を確立することを主たる目的とし。すなわち、担体の前処理、溶媒系の選択等により、23種類のアミノ酸の完全分割を可能にした。さらに、光学分割の機構について考察を加えるとともに、分割したアミノ酸が生化学的研究の材料として十分活用できることを明らかにした。

#### (I) セルロースを用いたアミノ酸の光学分割法

セルロースを用いた分割法は、冒頭に述べた難点を克服できるのみならず、以下の点で従来の方法より優れている。すなわち、(1) アミノ酸や担体を修飾せずに使用できること、(2) 担体の再活性化が容易なこと、(3) 溶離剤として水や有機溶媒が使えるので、調製や濃縮が容易で再使用できることがあげられる。

まず、薄層クロマトグラフィー (TLC) によって本法を予備的に検討した。その結果、明瞭に分割できたのは DL-トリプトファンほか3種類の比較的側鎖が大きなアミノ酸で、さらに多くのアミノ酸を分割するためにはカラムによる分割法を検討する必要がある。TLCの実験から、展開溶媒

は「ピリジン／エタノール／水」系が良好なこと、および結晶性のよい未修飾のセルロースで分割が可能ながわかった。これらを参考にカラムクロマトグラフィーによる方法を詳細に検討した。その結果、DL-アラニンを含む13種類のタンパク質アミノ酸とDL- $\alpha$ -アミノラク酸を含む4種類の非タンパク質アミノ酸を分割できる条件を確立した。一般に、フェニールアラニンのように側鎖が大きなアミノ酸はアラニンなどのようにコンパクトな側鎖をもつアミノ酸よりも分割が良好であった。DL-アスパラギン酸を含む6種類の極性アミノ酸については上記の展開溶媒系では分割が困難であったが、エタノールの代わりにアセトニトリルを用いて溶媒のpHをアミノ酸の等電点付近に調整することによって、これらアミノ酸の分割も可能になった。

以上、セルロースカラムを用いることにより、TLCでは不可能であった19種類のタンパク質アミノ酸と4種類の非タンパク質アミノ酸の分割が可能となった。さらに、本法をアミノ酸分析器と連動させることにより、混合試料中のアミノ酸の種類と光学異性体型を決定できるという利点かえられた。

## (Ⅱ) セルロースによる光学分割の機構

本研究において以下の事実すなわち、(1) 溶媒の疎水度が増したときアミノ酸とくに側鎖の大きなアミノ酸の分割率が向上すること、(2) セルロースを構成するD-グルコース分子の水酸基を修飾すると分割率が低下すること、(3) 温度の上昇とともに分割率が低下することが注目された。これらの事実から、セルロース分子内のグルコース分子の水酸基がまわりの溶媒と相互作用することによりグルコース分子の立体配座が決定され、これがセルロース全体の立体構造に影響して分割を支配することが示唆された。

そこで、親水的环境下では水酸基をセルロースの中心軸に対して equatorial な位置関係に、疎水的环境下では逆に axial な位置関係に置いてセルロース分子の立体構造を検討した結果、親水的环境下ではセルロースは平面的で滑らかな構造をとるが、疎水的环境下では非常に凹凸のある構造をとることが明らかとなった。このような周囲の環境の相違によるセルロースの立体構造の変化がD-アミノ酸とL-アミノ酸の間に及ぼす影響の差を増幅させ、光学分割を可能にすると結論した。一方、アミノ酸の構造の側面からも考察を加え、修飾の有無による活性型の溶出の差異から、アミノ酸のカルボキシル基の立体障害の相違が対掌体間でエネルギー差を生じさせ良好な分割が得られるものと結論した。

## (Ⅲ) セルロースによるアミノ酸の光学分割法の実用

生化学の分野では放射活性を有するアミノ酸が広く用いられているが、市販の放射性DL-アミノ酸を分割して供試できれば有益であるので、放射性同位体アミノ酸の分割と生体への取り込みについて検討した。<sup>14</sup>C-DL-トリプトファン、<sup>14</sup>C-DL-フェニールアラニン、および<sup>35</sup>S-DL-メチオニンを用い、〔ピリジン／エタノール／水〕系で溶出液の放射活性を測定した結果、いずれも良好な分割を示した。ついで、分割した放射性アミノ酸の生理活性について新たに分離した-L-トリプトファン代謝性大腸菌 *Escherichia coli* VO 201を用いたD-, L-トリプトファンの取り込み実験により検討した結果、いずれの型も濃度に依存して細胞内に取り込まれることがわかった。さらに、これがポリ

ペプチド中への取り込みについて調べたところ、D-トリプトファンは全く取り込まれないのに対し、アラニンは両型ともポリペプチド内に取り込まれることが明らかになった。これらの結果をアミノ酸の構造と酵素の選択機構と関連付けて論議した。

以上の研究結果から、ここで開発した光学分割法は極めて簡単な系であり、且つ、えられた光学活性アミノ酸を生化学的研究に供試できることが明らかになった。今後、さらに多方向への応用の展開が期待される。

## 審 査 の 要 旨

本論文は、従来極めて困難であったDL-アミノ酸の光学分割について、市販のセルロースを担体として用い簡便な分割法を確立したものである。すなわち、長管カラムと溶媒系の選択等により23種類のアミノ酸の完全分割を可能にし、さらに分割アミノ酸が生化学的研究の材料として活用できることを明らかにした。このように、優れた着想と豊富な検証によりアミノ酸ラセミ体の簡便な分割法をはじめて開発したことは、非常に高く評価できるものである。

よって、著者は農学博士の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。