

低力ゼイン，および低大豆たん白質 飼料に対するメチオニンと オリゴメチオニン補足の栄養的相違

DIFFERENTIAL INDUCIBILITY OF THREONINE IMBALANCE OF
L-METHIONINE AND OLIGO-L-METHIONINE SUPPLEMENTED TO
A 8% CASEIN OR 10% SOY PROTEIN ISOLATE DIET IN RATS

桐山修八・葛西隆則・知地英征・原山耕一・西野圭伊子
(北海道大学農学部)

Shuhachi KIRIYAMA, Takanori KASAI, Hideyuki CHIJI,
Koichi HARAYAMA and Keiko NISHINO
Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo 060

ABSTRACT

When a 8% casein basal diet was supplemented with free L-methionine (Met) at the levels of 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.1, 0.2, 0.3 and 0.6% of diet, body weight gain of weanling male rats of the Sprague-Dawley strain was increased with increasing levels of Met, showing a maximal supplementary effect at the 0.2% level. However, Met supplementation to the 8% casein diet consistently produced fatty liver. Liver fat began to accumulate when the Met level added reached 0.1% of diet, resulting in most severe fatty liver at the 0.2% Met level. On the other hand, supplementation of enzymatically synthesized oligo-L-methionine (a mixture of hexa- and hepta-peptides of Met as determined with FAB-MS, abbreviated as OM) to the 8% casein diet did not produce fatty liver due to "threonine imbalance" until the supplementary level was increased up to 0.2% of diet in one experiment and 0.3% of diet in other two experiments, although OM was as effective on body weight gain as free Met at all corresponding supplementary levels. Neither Met nor OM exerted consistent effect on plasma cholesterol concentration. The addition of 3% free Met to a low casein diet usually causes severe growth retardation. Nevertheless, toxicity due to 3% OM addition was very weak. When supplemented to a 10% SPI-based diet, Met significantly improved growth rate of weanling rats to the same extent as observed in the low casein diet. In contrast to the case of low casein diet, supplementary effect of OM was significantly smaller in the SPI diet than that of Met, although the addition of OM improved growth slightly, but significantly above the 0.2% level. OM-supplementation led to decreased plasma cholesterol levels. To improve nutritive value of food proteins, we tried to convert glycine residues in peptide chains to essential amino acids *in situ*. As preliminary experiments, salicylideneglycinatoaquocopper(II) (Sal-Gly-Cu) was heated with various alkyl halides (methyl iodide, isopropyl chloride, isopropyl bromide, isobutyl bromide, benzyl chloride, benzyl bromide, bromoacetic acid, and 2-chloroethyl methyl sulfide) in DMF or DMSO in the presence of KOH or EtONa. Valine produced from Sal-Gly-Cu and isopropyl bromide, the yield becoming higher by EtONa than by KOH (1 to 2% of Gly). Leucine and phenylalanine were obtained from isobutyl bromide and benzyl chloride with yield of about 1%. The conversion into Met was not achieved from a reaction with 2-chloroethyl methyl sulfide. Generally, alkyl bromides seemed to be better reagents than chlorides.

一般に食品たん白質の栄養価は、制限アミノ酸の補足によって飛躍的に改善される¹⁾。補足方法には、Table 1 に示すように、遊離制限アミノ酸の添加¹⁾、制限アミノ酸オリゴマーの添加^{2,3)}、他のたん白質の添加¹⁾、たん白質への制限アミノ酸の化学的導入⁴⁾、同じく酵素的導入⁴⁾、などがあり、従来いろいろ検討されてきた。通常低たん白質条件においてアミノ酸補足が必要となるが、このような条件下で遊離制限アミノ酸を補足すると、アミノ酸インバランスを生じる場合があり⁵⁾、たん白質栄養の改善に際して、一つの問題点である。

大豆たん白質 (SPI) の第一制限アミノ酸はカゼイン同様メチオニン (Met) であり、ともに、低たん白質飼料条件では Met 補足によってスレオニンインバランス (Imb) を誘発することもよく知られている⁶⁻⁸⁾。しかし、Met の補足方法を変えれば Imb の生成を防ぎつつ成長を改善させる可能性もある。

そこで、本研究では、8% カゼイン飼料、10% SPI 飼料を用い、遊離メチオニン (Met) とオリゴメチオニン (OM) の補足効果を、成長を目安として比較するとともに、Imb 誘発の有無を目安として、補足方法の優劣を検討した。

同時に、Table 1 の 2 (C) のように、ペプチド中のグリシン残基をその位置で直接、必須アミノ酸へ転換させ、たん白質の栄養価を改善する目的で、基礎的検討を行ったので併せて報告する。

Table 1. Methods of limiting amino acid supplementation

1 Dietary addition of LAA
(a) Free amino acids
(b) Oligopeptides
(c) Other proteins
2 Incorporation of LAA into proteins
(a) Chemical modification
(b) Enzymatic modification
(c) Conversion of glycine residues to EAA in peptide chains

I. カゼインおよび SPI へのメチオニンとオリゴメチオニンの補足効果並びにスレオニンインバランス

実験方法

1. オリゴメチオニン (OM) の調製

荒井ら⁹⁾、Jost ら¹⁰⁾の方法に従い、L-メチオニンエチルエステルから、パパインを触媒として酵素的に合成した。元素分析値 (C, 44.35; H, 5.59; N, 7.60;

S, 22.93%) および FAB-MS (m/z: 832, 963) から主として 6~7 量体からなることを確認した。

2. カゼインおよび SPI への L-メチオニンの導入

カゼイン、SPI への Met 導入は Puigserver ら¹¹⁾の方法に従った。すなわち、L-Met のアミノ基を Boc-ON で保護し、ヒドロキシサクシンイミドでカルボキシル基を活性化させ、アルカリ条件下で両たん白質とそれぞれ反応させた。次いで、ヒドロキシルアミンで Lys 以外のアミノ酸と結合した Met を除去し、透析、凍結乾燥後、トリフルオロ酢酸で Boc 基を除去、透析、凍結乾燥して得た修飾たん白質を試料とした。

原料のビタミンフリーカゼイン中の Met 含量 2.03% に対し、Met 修飾カゼイン (MC) の Met 含量は、風乾標品中 6.48% に増加していた。また Met 修飾 SPI (MS) のアミノ酸分析値は Table 2 のとおりであった。

Table 2. Amino acid composition of soy protein isolate (SPI) and that modified with L-methionine

Amino acid	SPI	Modified SPI
	g/16 g N	
Asp	8.3	9.4
Thr	3.3	3.4
Ser	3.4	3.5
Glu	16.9	18.4
Pro	5.3	5.4
Gly	3.6	3.5
Ala	3.8	3.7
Val	4.0	3.8
Cys	1.6	1.6
Met	1.2	6.1
Ile	3.9	3.9
Leu	6.9	6.6
Tyr	3.3	3.1
Phe	4.8	4.4
Lys	5.9	5.8
His	2.2	2.1
Arg	7.0	6.8

3. 動物実験と分析

(1) 飼料の条件

3 週齢の SD 系 (SPF) 雄ラット (約 50 g) を 3~5 日間、25% カゼイン飼料で標準化し、組分け後、試験食で 2 週間飼育した。実験 1 から 3 で用いた基本飼料は、たん白質源に 8% カゼインを、炭水化物源にショ糖を用い、その他のすべての必須栄養素を十分量含むものである。試験飼料はこの基本飼料に Met または OM を、レベルを変えて添加したものを用いた。

実験 1 では Met を 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.1, 0.2 % 添加し, OM の場合は元素分析の S 含量を基に各 Met 添加量と同量になるように, ショ糖と置換して加えた。

実験 2 では, Met と OM を Met 量として 0.2, 0.3 % となるように添加した。

実験 3 では, 同様に Met を 0.3, 0.6 %, OM を Met 量として 0.3, 0.6, 3 % 添加した。また, MC はアミノ酸分析での Met 含量から, 0.3 % Met 添加量と同量になるように, 原料カゼインで希釈して用いた。

実験 4 では基本飼料としてたん白質源に 10 % 分離大豆たん白質を用い, 試験飼料はそれに Met または OM を Met 量として 0.1, 0.2, 0.3 % になるように添加したものをを用いた。

(2) 分 析

飼育 2 週間後に, ネンプター麻酔下で腹部大動脈

から採血し, 血漿を得た。直ちに放血させ, 肝は液体窒素で凍結, 保存した。

肝総脂質は Folch ら¹²⁾の方法で抽出後, 重量法で, 肝, 血漿コレステロール (P-chol) は久城ら¹³⁾の方法で定量した。血漿アミノ酸は等量の 2 % スルホサリチル酸で除たん白後, アミノ酸分析計で定量した。有意差の検定は Duncan の multiple range test ($P < 0.05$), 2 群間の比較を要するときは t-test によった ($P < 0.05$)。

結果と考察

8 % カゼイン飼料に Met, OM をそれぞれ添加した実験 1 から 3 の結果を Table 3 にまとめて示した。

まず, 実験 1 でみられるように体重増加量は Met 添加量が増すにつれて大きくなり, 0.08 % 以上で基本飼

Table 3. Effect of L-methionine supplemented by 3 different forms to a 8 % casein diet on body weight, PER, liver weight and tissue lipids (experiments 1, 2, and 3)¹

Exp. No.	Diet	Body wt. gain for 2 weeks	PER	Liver wt.	Liver		Plasma cholesterol
					Total lipids	Cholesterol	
		g		g	mg/g		mg/100 ml
1	Basal	29.5 ± 3.7 ^{a, 2}	3.35 ± 0.23 ^a	4.20 ± 0.40 ^a	58.8 ± 4.3 ^a	2.7 ± 0.2 ^a	70.2 ± 1.8 ^{abc}
	M _{0.02}	31.3 ± 2.8 ^a	3.76 ± 0.19 ^{abc}	4.59 ± 0.23 ^{ab}	58.7 ± 3.0 ^a	2.7 ± 0.1 ^a	74.3 ± 4.6 ^{abc}
	M _{0.04}	35.0 ± 1.2 ^{abc}	3.95 ± 0.12 ^{bcd}	4.50 ± 0.16 ^{ab}	53.3 ± 1.9 ^a	2.8 ± 0.1 ^{abc}	74.2 ± 3.6 ^{abc}
	M _{0.06}	36.9 ± 2.9 ^{abc}	4.20 ± 0.19 ^{cde}	5.01 ± 0.20 ^{ab}	55.0 ± 1.9 ^a	2.9 ± 0.1 ^{abcd}	64.3 ± 2.8 ^a
	M _{0.08}	42.3 ± 3.7 ^{bcd}	4.34 ± 0.20 ^{de}	5.20 ± 0.31 ^{bc}	77.5 ± 15.9 ^{ab}	3.3 ± 0.4 ^{cdef}	79.3 ± 8.3 ^{bc}
	M _{0.1}	41.1 ± 2.4 ^{bcd}	4.35 ± 0.16 ^{de}	5.21 ± 0.23 ^{bc}	91.6 ± 8.9 ^{bc}	3.5 ± 0.04 ^{def}	76.3 ± 4.8 ^{abc}
	M _{0.2}	43.2 ± 1.3 ^{cd, A}	4.48 ± 0.10 ^{de}	6.16 ± 0.39 ^d	154.4 ± 16.9 ^d	3.7 ± 0.1 ^{ef}	79.5 ± 5.7 ^{bc}
	OM _{0.02}	31.3 ± 2.3 ^a	3.45 ± 0.14 ^{ab}	4.20 ± 0.14 ^a	60.4 ± 3.6 ^a	3.2 ± 0.2 ^{abcde}	66.8 ± 5.3 ^{ab}
	OM _{0.04}	34.7 ± 2.0 ^{ab}	3.75 ± 0.15 ^{abc}	4.34 ± 0.10 ^{ab}	61.7 ± 3.6 ^a	3.1 ± 0.2 ^{abcd}	66.8 ± 2.3 ^{ab}
	OM _{0.06}	34.2 ± 2.8 ^{ab}	3.77 ± 0.19 ^{abc}	4.53 ± 0.29 ^{ab}	60.7 ± 3.7 ^a	3.1 ± 0.2 ^{abcd}	71.3 ± 4.0 ^{abc}
	OM _{0.08}	35.8 ± 1.2 ^{abc}	3.91 ± 0.16 ^{bcd}	4.72 ± 0.20 ^{ab}	62.2 ± 3.2 ^{ab}	3.0 ± 0.1 ^{abcd}	72.1 ± 2.9 ^{abc}
	OM _{0.1}	39.3 ± 1.4 ^{bc}	4.14 ± 0.13 ^{cd}	4.77 ± 0.15 ^{ab}	70.5 ± 6.3 ^{ab}	3.3 ± 0.1 ^{bcdef}	81.5 ± 5.5 ^c
	OM _{0.2}	48.3 ± 1.1 ^{d, B}	4.77 ± 0.14 ^e	6.01 ± 0.36 ^{cd}	106.9 ± 11.4 ^c	3.8 ± 0.2 ^f	84.2 ± 4.4 ^c
2	Basal	14.2 ± 2.0 ^a	2.09 ± 0.26 ^a	3.12 ± 0.17 ^a	63.8 ± 4.8 ^a	—	75.5 ± 3.5 ^a
	M _{0.2}	29.6 ± 2.4 ^b	3.97 ± 0.18 ^b	4.62 ± 0.29 ^b	108.8 ± 10.6 ^b	3.9 ± 0.3 ^a	74.8 ± 2.1 ^a
	M _{0.3}	32.9 ± 1.5 ^b	4.08 ± 0.11 ^b	4.88 ± 0.20 ^b	115.5 ± 9.1 ^{b, A}	3.7 ± 0.2 ^a	78.1 ± 3.4 ^a
	OM _{0.2}	33.1 ± 1.0 ^b	4.21 ± 0.16 ^b	4.32 ± 0.14 ^b	73.7 ± 5.8 ^a	3.3 ± 0.2 ^a	81.7 ± 5.4 ^a
	OM _{0.3}	33.8 ± 2.1 ^b	4.21 ± 0.07 ^b	4.65 ± 0.21 ^b	87.1 ± 8.6 ^{ab, B}	3.3 ± 0.2 ^a	75.1 ± 3.9 ^a
3	Basal	17.3 ± 1.8 ^a	2.02 ± 0.18 ^a	5.61 ± 0.31 ^a	59.3 ± 2.8 ^a	2.7 ± 0.2 ^{ab}	86.0 ± 8.5 ^a
	M _{0.3}	41.8 ± 3.4 ^c	3.86 ± 0.20 ^b	7.61 ± 0.53 ^{bc}	102.7 ± 13.9 ^{bc}	2.8 ± 0.2 ^{ab}	79.5 ± 4.0 ^a
	M _{0.6}	42.8 ± 2.6 ^c	3.70 ± 0.10 ^b	8.41 ± 0.52 ^b	126.9 ± 10.5 ^c	3.2 ± 0.1 ^c	69.6 ± 7.3 ^a
	OM _{0.3}	42.1 ± 4.1 ^c	3.71 ± 0.21 ^b	7.27 ± 0.30 ^{bc}	81.8 ± 6.8 ^{ab}	2.5 ± 0.1 ^a	74.7 ± 7.9 ^a
	OM _{0.6}	42.0 ± 2.2 ^c	3.65 ± 0.16 ^b	7.45 ± 0.26 ^{bc}	126.2 ± 12.3 ^c	3.0 ± 0.1 ^b	55.9 ± 8.7 ^a
	MC	41.6 ± 2.9 ^c	3.77 ± 0.16 ^b	6.87 ± 0.34 ^{bc}	90.9 ± 6.4 ^b	3.1 ± 0.2 ^{bc}	70.2 ± 8.9 ^a
	OM ₃	27.5 ± 2.4 ^b	2.61 ± 0.22 ^c	6.72 ± 0.32 ^c	105.3 ± 5.0 ^{bc}	2.4 ± 0.1 ^a	78.0 ± 11.1 ^a

1. M = L-methionine, OM = oligo-L-methionine, and MC = L-methionine-modified casein.

Subscripts represent dietary L-methionine levels added as forms of M, OM, or MC.

2. Mean ± SEM ; values sharing common superscript letter are not significantly different ($p > 0.05$).

Small letters represent the results obtained by multiple range test and capital letters, by t-test.

料群より有意に大きくなった。OM でも同様、添加量とともに成長が改善され、0.1%以上で有意となった。成長促進効果は Met と OM で同等と判断したが、0.2%レベルでは Met より OM のほうが有意に大きな効果を示す場合も見られた (Table 3)。PER も体重増加量とほぼ平行した結果であった。

一方、肝脂質の蓄積は実験 1～3 を通じてみると、Met では0.1%を超えると有意な上昇が始まること、OM では0.2%を超えてもなお、肝脂質の蓄積が抑えられていることが明らかとなった。すなわち、OM の補足によって成長では Met 同様の改善が見られるが、Imb は起こりにくいわけで、Met を第一制限アミノ酸とするカゼイン、乳製品などへのアミノ酸強化にとって、OM はより安全な材料と言うことができる。

P-chol に対する影響では、Met、OM ともに一定の傾向はみられなかった。

実験 3 の MC の場合は、成長に対して Met や OM と差はなく、化学的に導入したイソペプチド型 Met も十分な速度で消化、利用されるものと思われる。この場合、最大成長を示すレベル以上の所 (0.3%) で比較したため、補足効果では互いに有意差はみられなかったが、MC の肝脂質蓄積に対する影響は Met と OM の中間であった。

遊離 Met では通常、過剰毒性が出現するレベルであるが、ON は 3%添加しても過剰毒性は非常に弱く、肝脂肪蓄積も0.3% Met 群と同程度であった。

10% SPI 飼料に Met あるいは OM を0.1～0.3%レベルで補足した実験 4 の結果を Table 4 に示した。

8%カゼイン飼料の場合と同様、Met の補足によっ

て成長は有意に改善され、0.2%で体重増加量は最大に達した。しかし、カゼイン飼料時と異なり、SPI への OM 補足では成長も PER も改善はごくわずかしが見られず、Met に比べ有意に低かった。これと同様の結果はすでに木村ら³⁾によっても観察されており、興味深い現象である。ただし、基本飼料に比べると、0.2% OM 添加群の体重増加量は有意に高かった。

肝総脂質蓄積は、Met の添加量とともに、次第に増加し、0.2%では有意に高くなり、すでに報告されているように(野田ら⁸⁾、吉田ら^{6,7)}、SPI への Met 補足でも、カゼイン類似の Imb 現象が起こることが再確認された。しかし OM では0.1～0.3%の範囲で、肝脂質は低く抑えられていた。また、基本飼料に比べ、OM を補足した群はすべて P-chol が低くなり、0.2%、0.3% 補足群では有意に低かった。

血漿遊離アミノ酸パターンを見ると、Met 添加量を増やすにつれて、Thr,Ser,Gly が次第に減少したが、OM 添加群ではほとんど変動しなかった (Table 5)。これは上記の諸現象と関係していると思われる。現在この原因について、検討を進めている。

また、SPI へ Met を化学的に導入した標品についても現在動物実験を行っている段階である。

II. ペプチド中のグリシン残基を必須アミノ酸へ転換させる試み

赤堀¹⁴⁾は原始地球上におけるたん白質の生成は、まずポリグリシンが生成したのち、この α -メチレン炭素に各種の物質が反応した結果、種々の現存アミノ酸が生まれたと推定した。グリシン残基への側鎖導入が一

Table 4. Effect of supplementation of L-methionine or oligo-L-methionine to soy protein isolate (SPI) diet on body weight gain, PER and tissue lipids (experiment 4)

Diet	Body wt. gain for 2 weeks	PER	Liver wt.	Liver		Plasma cholesterol
				Total lipids	Cholesterol	
	g		% body wt.	mg/g tissue		mg/100 ml
1. Basal (10% SPI)	13.8 ± 1.3 ^a	1.59 ± 0.10 ^a	5.82 ± 0.13 ^a	39.0 ± 1.6 ^a	2.1 ± 0.1 ^a	84.0 ± 8.9 ^{ac}
2. M _{0.1}	35.6 ± 3.0 ^b	3.00 ± 0.16 ^b	5.60 ± 0.16 ^a	49.6 ± 5.3 ^{ab}	2.1 ± 0.1 ^a	84.7 ± 6.1 ^{ac}
3. M _{0.2}	50.0 ± 4.4 ^c	3.76 ± 0.14 ^c	5.52 ± 0.25 ^a	63.8 ± 6.5 ^b	2.5 ± 0.1 ^{ab}	86.3 ± 3.7 ^a
4. M _{0.3}	46.3 ± 2.7 ^c	3.57 ± 0.12 ^{bc}	5.42 ± 0.17 ^a	86.5 ± 3.7 ^c	2.9 ± 0.2 ^b	67.9 ± 6.5 ^{bc}
5. OM _{0.1}	20.3 ± 3.6 ^a	1.86 ± 0.22 ^a	5.55 ± 0.14 ^a	45.8 ± 3.6 ^a	2.6 ± 0.2 ^{ab}	72.5 ± 4.2 ^{abc}
6. OM _{0.2}	21.3 ± 1.1 ^{a,A}	2.12 ± 0.11 ^{a,A}	5.89 ± 0.14 ^a	48.9 ± 1.8 ^{ab}	2.4 ± 0.1 ^a	67.0 ± 2.8 ^b
7. OM _{0.3}	21.9 ± 3.9 ^a	2.11 ± 0.20 ^{a,A}	5.61 ± 0.08 ^a	48.7 ± 7.0 ^{ab}	2.1 ± 0.1 ^a	59.2 ± 4.6 ^b

Each value represents the mean ± SEM of six rats. Means with different superscript small letters in a column are significantly different ($p < 0.01$).

A : t-test from basal group ($p < 0.05$)

時期有機化学的に検討され¹⁵⁾, Thr 合成法のように工業的にも確立されているものもある (千畑ら¹⁶⁾)。しかし, 制限アミノ酸になりやすい Met, Lys などについては化学的にも栄養学的にもまったく検討されていない。もし, たん白質中のグリシン残基を, その位置で必須アミノ酸に直接転換することができれば, 遊離アミノ酸添加によるインバランス誘導の危険も防止でき, よりすぐれた栄養価改善法を確立できるかもしれない。まず, 低分子モデル系を用いて, この可能性と反応条件を調べたので, その結果を報告する。

1. Gly-Gly-Cu 錯体とホルムアルデヒドから Ser-Gly の合成

グリシルグリシン (Gly-Gly) 水溶液に, 炭酸ナトリウム存在下で, 硫酸銅とホルムアルデヒド (モル比,

1:2.5:1:8) を加え, 100°Cで30分間還流したのち, イオン交換樹脂で精製し, 針状結晶として, Ser-Gly を得た (収率45%)。FD-MSm/z: 162 (M⁺), 163 (MH⁺) であり, NMR で Ser-Gly と同定した。この方法では N-末端 Gly のみが Ser に転換した。これは野田ら¹⁷⁾と同様の結果であり, N-末端 Gly の α -メチレンのみが活性化していることがわかった。このようなアルデヒドとの反応では Thr や Ser などの β -ヒドロキシアミノ酸しかできないので次の方法を検討した。

2. グリシン-サリチルアルデヒド-銅錯体とアルキルハライドとの反応による生成物の検討

原田と大橋¹⁸⁾は, Gly の α -メチレン基は Cu²⁺のみよりも, サリチリデン化した方が強く活性化されることを報告している。

Table 5. Plasma free amino acid concentrations in rats fed a 10% soy protein isolate (SPI) diet and SPI diets supplemented with L-methionine or oligo-L-methionine¹

Amino acid	Group ²						
	Basal	M _{0.1}	M _{0.2}	M _{0.3}	OM _{0.1}	OM _{0.2}	OM _{0.3}
	$\mu\text{mol}/100\text{ ml plasma}$						
Tau	5.6	4.6	6.0	10.5	5.5	5.6	6.0
Asp	2.9	2.6	3.1	1.9	2.0	2.4	3.7
Pro-OH	+	3.1	3.6	4.2	+	3.0	2.9
Thr	66.4	19.2	5.6	5.0	57.3	53.1	44.6
Ser	72.4	35.4	27.0	22.8	57.3	51.5	49.0
Asn	10.4	10.0	7.3	6.7	9.2	9.0	9.6
Glu	14.7	15.5	13.1	11.0	12.4	11.4	13.1
Gln	83.2	72.7	79.0	77.7	64.0	66.9	72.7
Pro	22.5	23.0	20.9	25.0	22.4	24.3	21.9
Gly	23.2	26.8	20.7	17.3	19.9	19.6	21.4
Ala	76.1	79.8	72.9	70.5	62.6	72.3	69.2
Cit	9.6	8.7	8.6	8.5	8.3	7.4	8.2
Alpha-ABA	0.6	0.8	1.4	1.8	0.9	0.5	0.6
Val	23.7	16.0	13.9	13.3	18.4	17.7	17.7
Met	3.2	3.5	4.2	6.1	2.8	2.8	3.1
Ile	11.4	9.0	8.4	8.1	8.9	9.0	9.1
Leu	17.9	12.2	10.8	10.2	13.5	13.2	13.6
Tyr	6.1	6.9	5.4	5.5	5.2	5.5	4.8
Phe	7.3	5.8	5.3	5.7	5.9	6.1	6.2
EtOH-NH ₂	1.8	1.6	1.7	1.5	1.3	1.6	1.5
Orn	28.8	23.2	19.8	27.4	25.0	24.1	23.6
Trp	7.9	6.1	6.1	5.5	6.0	6.1	5.7
Lys	74.9	43.1	40.8	34.4	59.4	64.6	51.7
His	16.7	10.8	7.2	7.6	14.2	15.2	14.0
Arg	1.1	0.4	1.4	2.1	1.9	1.2	1.6

1 Determined for pooled samples from six rats/group. Blood was withdrawn from the abdominal aorta.

2 M = L-methionine and OM = oligo-L-methionine. Subscripts represent dietary levels of them added.

まず, Gly のアルカリ水溶液に等モルのサリチルアルデヒドと酢酸銅を添加し, 緑色の N-サリチリデン-グリシン銅 (II) を調製した。

この錯体 (Sal-Gly-Cu) をジメチルホルムアミド, またはジメチルスルホキシドに溶解し, アルカリ触媒として KOH または EtONa の存在下, Table 6, 7 に示したような各種ハライドを添加し, 65°C, 3 時間振盪した。酸性にしたのち, H₂S で銅を除去し, イオン交換樹脂で精製し, ペーパークロマト, アミノ酸分析計, 質量スペクトル, NMR スペクトルなどによって生成物の同定, 定量を行った。

Table 6, 7 のように, まだ収率は低いが, Gly の一部が必須アミノ酸へ転換可能であった。この種の合成を検討したものには中原ら¹⁹⁾の研究があるのみで, Cu 錯体に対し, アルキルハライド (RX) を 100 倍量も添加していることから, その量を 1/10 にし, KOH を 1/5 にし, DMF 中で反応させてみた。その結果, Table 6 の

ような生成物が得られた。ヨウ化メチルからは Ala, Ser および α -アミノイソ酪酸が, 臭化イソプロピルからは Val が, 臭化イソブチルからは少量ながら Leu が生成した。

さらに合成条件を検討し, Sal-Gly-Cu 錯体と RX を等モルとし, アルカリ触媒を EtONa に, 溶媒を DMSO に変えて反応させた。

その結果, Table 7 に示したように, 臭化イソプロピルで Val の生成は 2 倍に増加した。ベンジルクロライドからは少量の Phe とフェニルセリンが生成したが, その他の塩化物からは目的のアミノ酸, 例えば 2-メチルチオ塩化エチルから Met は生成せず, 塩化物よりヨウ化物, 臭化物のほうが反応性は高く, EAA 合成には都合がよいものと思われる。

現在, さらに収率を上げる反応条件とオリゴペプチド中の Gly への適用を検討中である。

Table 6. Conditions and yields of target amino acids in reactions of N-salicylidene-glycinatoaquocopper (II), (S-G-Cu) with alkyl halides in dimethylformamide

Alkyl halide	Molar ratio of S-G-Cu : RX : KOH	Amino acid found	Molar ratio of product/Gly	Method of identification ¹
CH ₃ •I	1 : 10 : 4.4	Alanine	0.02	PC, AAA
		Sarcosine	0.07	PC, AAA
		α -Amino-isobutyric a.	0.14	NMR, IR, AAA
		Gly-Et ester	0.03	PC, AAA
(CH ₃) ₂ CH•Br	1 : 14 : 4.5	Valine	0.01	PC, AAA
		Gly-Et ester	0.58	PC, AAA
		Gly-isopropyl ester	0.09	PC, AAA
(CH ₃) ₂ CHCH ₂ •Br	1 : 10 : 4.6	Leucine	0.003	PC, AAA
		Gly-Gly	0.003	AAA

1 PC = paperchromatography, solvent = BuOH : AcOH : H₂O = 4 : 1 : 2, v/v.

2 AAA = High speed amino acid analyzer (Model 835, Hitachi).

Table 7. Reaction products of N-salicylidene-glycinatoaquocopper (II) (S-G-Cu) with alkyl halides in dimethylsulfoxide

Alkyl halide	Molar ratio of S-G-Cu : RX : EtONa	Amino acid formed	Molar ratio of product	Method of identification
(CH ₃) ₂ CHBr	1 : 1 : 10	valine	0.02	PC, AAA
(CH ₃) ₂ CHCl	1 : 1 : 10	—	—*	
 -CH ₂ Cl	1 : 1 : 10	phenylalanine	0.01	PC, AAA
		phenylserine	trace**	PC, NMR, MS
CH ₃ SCH ₂ CH ₂ Cl	1 : 1 : 10	—	—*	

* Valine or methionine was not detected.

** Unreacted glycine and phenylserine overlapped each other on aminograms.

文 献

- 1) 芦田淳 (1965): 栄養化学概論, 養賢堂
- 2) 荒井綜一, 木村廣子, 麻生浩 (1983): 酵素修飾タンパク質の構造と栄養特性. 必須アミノ酸研究, No. 98, 1-2.
- 3) 木村廣子, 大貫祐子, 荻原英子, 麻生浩, 荒井綜一 (1984): 酵素合成したポリメチオニンの大豆タンパク質への補足効果. 昭和59年日本栄養・食糧学会講演要旨集, p. 27.
- 4) "Modification of Proteins—Food, Nutritional, and Pharmacological Aspects," (Feeney, R.E. and Whitaker, J.R., eds.), American Chemical Society, (1982) Washington, D.C.
- 5) Harper, A.E., Benevenga, N.J. and Wohlhueter, R.M. (1970): Effects of ingestion of disproportionate amounts of amino acids. *Physiol. Rev.*, **50**, 428-558.
- 6) 吉田昭, 横越英彦 (1982): 分離大豆たん白質への含硫アミノ酸補足とアミノ酸インバランス. 大豆たん白質栄養研究会会誌, **3**, 50-53.
- 7) 吉田昭, 横越英彦 (1983): 分離大豆たん白質に対する含硫アミノ酸補足と脂質代謝の変動. 大豆たん白質栄養研究会会誌, **4**, 75-78.
- 8) Noda, K. and Okita, T. (1980): Fatty liver due to disproportionally added methionine to a low soybean diet and lipotropic action of phosphatides in rats. *J. Nutr.*, **110**, 505-512.
- 9) Arai, S., Yamashita, M. and Fujimaki, M. (1979): A novel one-step process for enzymatic incorporation of amino acids into proteins: papain-catalyzed polymerization of L-methionine ethyl ester and its regulation by adding a protein substrate. *Agric. Biol. Chem.*, **43**, 1069-1074.
- 10) Jost, R., Brambilla, E., Monti, J.C. and Luis, P. L. (1980): Papain catalyzed oligomerization of α -amino acids. Synthesis and characterization of water-insoluble oligomers of L-methionine. *Helv. Chim. Acta*, **63**, 375-384.
- 11) Puigserver, A.J., Sen, L., Clifford, A.J., Feeney, R.E. and Whitaker, J.R. (1979): Covalent attachment of amino acids to casein. 2. Bioavailability of methionine and N-acetylmethionine covalently linked to casein. *J. Agric. Food Chem.*, **27**, 1286-1293.
- 12) Folch, J., Lees, M. and Sloane Stanley, G.H. (1957): A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, **226**, 497-509.
- 13) 久城英人, 水口葉子, 福井巖 (1972): 血清脂質の超微量定量法に関する検討. その1 コレステロール. 臨床病理, **20**, 573-576.
- 14) 赤堀四郎 (1955): アミノ酸の不斉合成と原始蛋白質の生成. 科学, **25**, 54-58.
- 15) Sato, M., Okawa, K. and Akabori, S. (1957): A new synthesis of threonine. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **30**, 937-938.
- 16) 千畑一郎: 特許公報 (1961). a) DL-スレオニン合成に於てスレオ型スレオニンの生成割合を増大せしめる方法. b) ビス (アセトアルデヒド) スレオニン銅の製法.
- 17) Noda, K., Bessho, M., Kato, T. and Izumiya, N. (1970): Reaction of glycylglycine with formaldehyde in the presence of cupric ion. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **43**, 1834-1839.
- 18) Harada, K. and Oh-hashii, J. (1967): On the reactions of carbonyl compounds with N-salicylidene-glycinatoaquocopper (II). Synthesis of β -hydroxy α -amino acid from glycine. *J. Org. Chem.*, **32**, 1103-1106.
- 19) Nakahara, A., Nishikawa, S. and Mitani, J. (1967): The direct derivations of some amino acids from glycine. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **40**, 2212.