

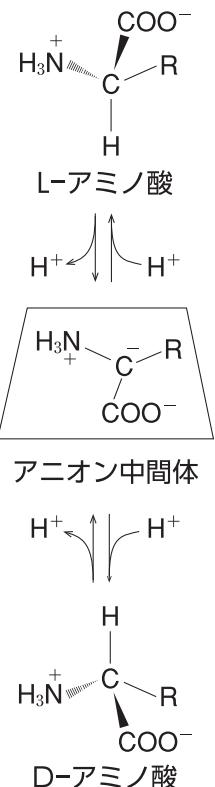
サイエンスネット

(物)(化)(生)(地)…

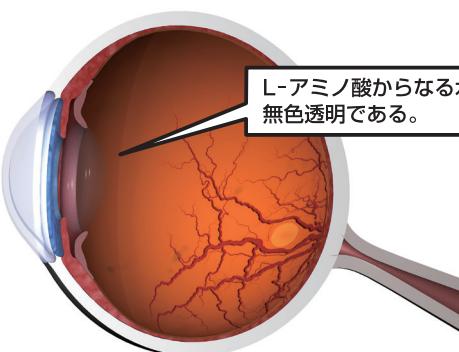
数研出版株式会社

CIENCE NET

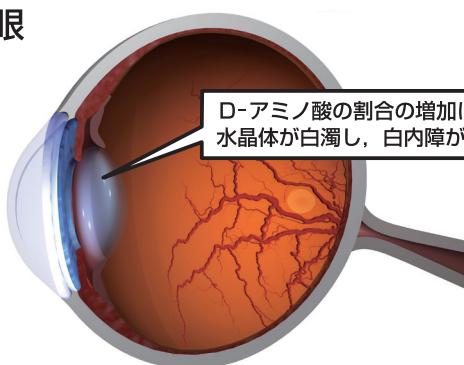
- | | | | |
|--------|-----------|---------------------|---------------|
| ▶ 特集 1 | ／ト部吉庸 …2 | ▶ コラム | ／数研出版 編集部 …14 |
| ▶ 特集 2 | ／鶴谷 要 …6 | ▶ 【数研出版 100 周年】 | |
| ▶ 特集 3 | ／中道範人 …10 | 数研出版・理科教科書発行の歴史 …16 | |



正常な眼



白内障の眼



アミノ酸のラセミ化の反応機構と白内障の発症

上宮太子高等学校 ト部吉庸

アミノ酸を人工合成すると、L型:D型=1:1のラセミ体が得られる。生命誕生以前の原始地球では、アミノ酸はラセミ体として存在していた。しかし、化学進化の過程で、D-アミノ酸が排除され、L-アミノ酸だけが選択されてタンパク質がつくられ生命体が誕生した。この理由は、生命起源の最大の謎とされている。

ヒトの水晶体タンパク質では、加齢とともにL-アスパラギン酸残基のラセミ化が進行する。タンパク質中のD-アミノ酸の割合が増加すると、タンパク質の高次構造が変化して、その安定性が減少し不溶化や機能低下を招く。近年の研究によると、D-アスパラギン酸の割合の増加が白内障の発症と深く関係していることが明らかになっている。

アミノ酸に関する 2 つの課題

上宮太子高等学校 ト部吉庸

1. 含硫アミノ酸の硫黄反応

1. はじめに

含硫アミノ酸の硫黄を検出する反応(以下、硫黄反応という)として次のような実験が知られている。アミノ酸試料に 6mol/L NaOH 水溶液を加え、沸騰水中で加熱し、室温まで冷却した後に、0.1mol/L 酢酸鉛(II)水溶液を加えて PbS の黒色沈殿を確認する、というものである。この実験に関して、システインとシスチンでは PbS の黒色沈殿が生成したが¹⁾、メチオニンでは PbS が生成しなかった¹⁾との報告がある。そこで、これら 3 種の含硫アミノ酸の硫黄反応から、その反応性の違いを調べてみた。

2. NaOH 水溶液による硫黄反応

- (1) 各試料 0.05g に 6mol/L NaOH 水溶液 3mL と沸騰石 3 粒を加え、1 分間煮沸した。
- (2) (1) の各反応液が熱いままの状態で、0.1mol/L 酢酸鉛(II)水溶液を少量加えた。
- (3) (1) の各反応液を室温まで冷却させてから、0.1mol/L 酢酸鉛(II)水溶液を少量加えた。

結果	システイン	シスチン	メチオニン
実験(2)	黒色沈殿	黒色沈殿	無色溶液
実験(3)	褐色溶液	黒色沈殿	無色溶液

結果より、(2)(3)ともに黒色沈殿が生じたシスチンが最も高い反応性を示し、(3)で褐色溶液となったシステインはやや反応性が劣っていると考えられる。メチオニンでは全く硫黄反応が起らなかった。

また、いずれの反応液の場合でも、冷却せずに熱いうちに酢酸鉛(II)水溶液を加える方が PbS の黒色沈殿が生成しやすかった。

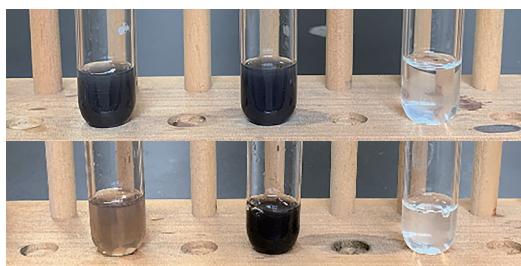


図 1 実験結果 [上:実験(2)／下:実験(3)]
左からシステイン、シスチン、メチオニン

3. NaOH 融解液による硫黄反応

- (4) 各試料 0.05g に NaOH(固)5 粒(約 0.5g)を加え、融解状態(約 300°C)で 1 分間加熱した。

- (5) 生成物に 0.1mol/L 酢酸鉛(II)水溶液を加えた。

結果	システイン	シスチン	メチオニン
実験(4)	白色固体	白色固体	白色固体
実験(5)	黒色沈殿	黒色沈殿	黒色沈殿

NaOH と融解状態で加熱すると、システイン、シスチンだけでなくメチオニンでも黒色沈殿を生じた。

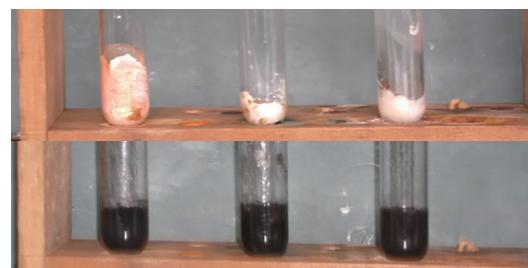


図 2 実験結果 [上:実験(4)／下:実験(5)]
左からシステイン、シスチン、メチオニン

4. システインの硫黄反応の反応機構

システインの NaOH 水溶液による硫黄反応に関して、以下のように反応条件を変更して実験を行った。

- (6) 2mol/L NaOH 水溶液で加熱し、熱いままの状態で Pb²⁺を加えた。

- (7) 2mol/L NaOH 水溶液で加熱し、室温まで冷却させてから Pb²⁺を加えた。

- (8) 2mol/L NaOH 水溶液で加熱し、熱いままの状態で Pb²⁺を加え、その後、溶液を再加熱した。

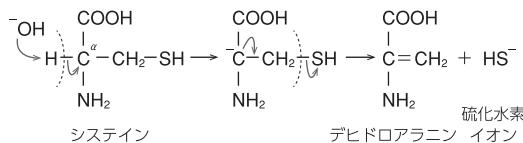
実験(2)	実験(6)	実験(7)	実験(8)
黒色沈殿	褐色溶液	無色溶液	黒色沈殿

NaOH 水溶液の濃度が薄い場合や加熱が十分でない場合は、黒色沈殿は生成せずに、褐色溶液が生成したが、再加熱すれば黒色沈殿に変化した。



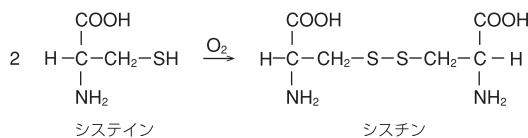
図 3 実験結果 [左から実験(2), (6), (7), (8)]

システインを NaOH 水溶液に加えて加熱すると、塩基である OH^- がカルボニル基に隣接する α 位の C 原子に結合した H 原子から H^+ を引き抜く。この反応が起こるのは、カルボニル基の電子求引性により α 位の H 原子が少し酸の性質をもつからである²⁾。 H^+ の引き抜き後、電子の移動が起こると、デヒドロアラニンと硫化水素イオン HS^- が生成する。 HS^- は OH^- によって中和されて S^{2-} が生じ、加えた Pb^{2+} と反応して PbS を生成する。

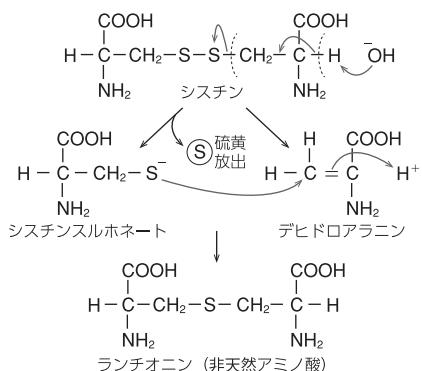


5. シスチンの硫黄反応の反応機構

システインは酸性では安定だが、中・塩基性では微量の重金属イオンの存在により、容易に空気酸化されてシスチンとなる。



シスチンは塩基性条件で加熱すると、 OH^- の求核攻撃により α 位から H^+ が引き抜かれ、その隣の β 位の C-S 結合が切断され、シスチジルホネートとデヒドロアラニンに変化する。このとき、シスチジルホネートの S-S 結合から S 原子が放出され（硫黄放出反応³⁾）、さらに、デヒドロアラニンと結合してランチオニン（シスチンから S 原子が 1 個抜けたアミノ酸）を生成すると考えられている³⁾。これは、ジスルフィド結合-S-S- (269 kJ/mol⁴⁾) から S が放出され、モノスルフィド結合-S- (286 kJ/mol⁴⁾) に変化すると、結合エネルギーが強化されて、生成物が安定化されたと考えれば理解できる。



6. メチオニンの硫黄反応の反応機構

メチオニンを NaOH 水溶液に加えて加熱すると、システインと同様に、塩基である OH^- がカルボニル基に隣接する α 位から H^+ を引き抜き、電子の移動を経て、デヒドロアラニンと硫化ジメチルを生じる。



文献によると、270 ~ 300 °C でシステインやシスチンを熱分解すると硫化水素が生成するが、メチオニンからは硫化ジメチルが生成し、硫化水素は生成しない⁵⁾。しかし、メチオニンを 350 °C で熱分解すると硫化水素が生成する⁶⁾。

以上より、メチオニンの硫黄反応の場合、 NaOH 水溶液では、生成した硫化ジメチルからの硫黄 S の脱離は起こらず、 PbS も生成しない。一方、 NaOH の融解状態（融点 318 °C）では、高温で反応が進行するため、硫化ジメチルからでも硫黄 S の脱離が起こり、 PbS が生成したと考えられる。

7.まとめ

含硫アミノ酸の硫黄反応の反応性は、シスチンが最も高く、システイン、メチオニンの順に低下する。

シスチンを強塩基性で加熱すると、塩基によって α 位から H^+ が引き抜かれ、その隣の β 位の C-S 結合が切断されることで、デヒドロアラニンとシスチジルホネートを生成する。後者から容易に S 原子が放出され、この S と Pb^{2+} から PbS が生成すると考えられる。同様に、システインでは塩基によって α 位から H^+ が引き抜かれ、デヒドロアラニンと HS^- が生成し、後者から生じる S^{2-} と Pb^{2+} とが反応して PbS が生成すると考えられる。

一般的に、硫黄反応は含硫アミノ酸よりもタンパク質の方がかなり穏和な条件で進行する。これは、タンパク質中の S 原子のほとんどはシステインのようなチオール基-SH ではなく、シスチンのようなジスルフィド結合-S-S-で存在するからと考えられる。

一方、メチオニンの場合、 NaOH (固) の融解液中で加熱しないと硫黄反応は起こらない。これは、反応途中で生成する硫化ジメチル ($\text{CH}_3)_2\text{S}$ からは高温でないと S の脱離が起こらないためである。別の文献には、 NaOH 融解液の代わりに金属 Na を加熱・反応させても PbS が生成すると紹介されている⁷⁾。

2. アミノ酸のラセミ化を利用した年代推定

1. アミノ酸のラセミ化とは

グリシンを除く α -アミノ酸には不斉炭素原子が存在し、D型、L型の鏡像異性体が存在する。

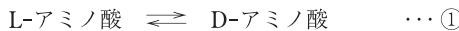
タンパク質が塩基性条件で加水分解されると、アミノ酸が生じ、さらに塩基である OH^- によってアミノ酸の α 位から H^+ が引き抜かれ、中間体である平面構造のカルボアニオン(炭素陰イオン)が生じる。この平面の両側から同じ確率で H^+ が付加すると、D型とL型のアミノ酸の等量混合物(ラセミ体)が生成する。このように、光学活性を示す物質が光学不活性に変化する現象をラセミ化といふ。



アミノ酸のうち、最もラセミ化しやすいのがアスパラギン酸で、最もラセミ化しにくいのがイソロイシンである。この理由は、アスパラギン酸では、 β 位のカルボニル基の電子求引性により、中間体のカルボアニオンの負電荷が非局在化して安定となり、イソロイシンでは、 β 位の2つのアルキル基の電子供与性により、中間体のカルボアニオンの負電荷が局在化して不安定となるためと考えられる。

2. アミノ酸のラセミ化反応の速度式

アミノ酸のラセミ化反応は①式で表され、アミノ酸の濃度の1乗に比例するので、一次反応である。



①式の正反応の速度定数を k_1 、逆反応の速度定数を k_2 とおく。また、時間 $t = 0$ における L-アミノ酸の濃度を a 、D-アミノ酸の濃度を b とする。ここで、時間 t が経過したときの①式の反応による L-アミノ酸の濃度の減少量を x とすると、L-アミノ酸の濃度は $a-x$ 、D-アミノ酸の濃度は $b+x$ となる。以上より、L-アミノ酸の消失速度 V は②式で表される。

$$V = \frac{dx}{dt} = k_1(a-x) - k_2(b+x) \quad \cdots ②$$

なお、不斉炭素原子1個のアミノ酸では、①式の平衡定数 K は1となるので、 $k_1 = k_2$ となり、 k_1 および k_2 をまとめて k とおくと、

$$\frac{dx}{dt} = k(a-b-2x) \quad \cdots ③$$

③式を変数分離して両辺を積分すると⁸⁾、

$$\int \frac{1}{a-b-2x} dx = \int k dt \quad \cdots ④$$

ここで、 $a-b-2x = t$ とおき、左辺を置換積分する。

$x = \frac{a-b-t}{2}$ と変形して、 t について微分すると、

$$\frac{dx}{dt} = -\frac{1}{2} \quad \therefore dx = -\frac{1}{2} dt$$

よって、④式の左辺を0から x まで積分すると、

$$\begin{aligned} (\text{左辺}) &= \int_0^x \frac{1}{t} dx = \int_0^x \frac{1}{t} \left(-\frac{1}{2} dt\right) \\ &= -\frac{1}{2} \int_0^x \frac{1}{t} dt = -\frac{1}{2} \log_t \\ &= -\frac{1}{2} [\log_e(a-b-2x)]_0^x \\ &= -\frac{1}{2} \{\log_e(a-b-2x)_t - \log_e(a-b)_{t=0}\} \\ &= -\frac{1}{2} \left\{ \log_e \frac{(a-b-2x)_t}{(a-b)_{t=0}} \times \frac{(a+b)}{(a+b)} \right\} \\ &= -\frac{1}{2} \left\{ \log_e \frac{(a-b-2x)_t}{a+b} + \log_e \frac{(a+b)}{a-b} \right\}_{t=0}^x \end{aligned}$$

また、④式の右辺を0から t まで積分すると、

$$\begin{aligned} (\text{右辺}) &= \int_0^t k dt = k[t]_0^t = kt \\ &\therefore -\frac{1}{2} \left\{ \log_e \frac{(a-b-2x)_t}{a+b} + \log_e \frac{(a+b)}{a-b} \right\}_{t=0}^t = kt \\ &<\text{第一項}> \quad <\text{第二項}> \end{aligned}$$

ここで、L-アミノ酸、D-アミノ酸の濃度をそれぞれ $[L]$ 、 $[D]$ とすると、時間 t のとき、

$$\text{第一項の } a+b = [L]+[D], \quad a-b-2x = [L]-[D]$$

また、時間 $t = 0$ のとき、

$$\text{第二項の } a+b = [L]+[D], \quad a-b = [L]-[D]$$

$[D] = 0$ であるから、第二項は $\log_e 1 = 0$ となる。

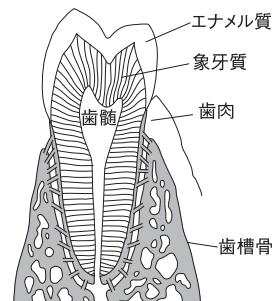
$$-\log_e \frac{[L]-[D]}{[L]+[D]} = 2kt$$

$$\therefore \log_e \frac{[L]+[D]}{[L]-[D]} = 2kt \quad \cdots ⑤$$

3. アスパラギン酸のラセミ化による年齢推定

生体を構成するアミノ酸はすべて L 体として合成される。L 体は D 体へとゆっくり変化するが、通常は、新しく合成される L 体と入れ替わり、D 体として蓄積されることはない。

一方、歯の上部の歯冠と呼ばれる部分の表面のエナメル質やその内部の象牙質は非常に硬く、一旦作られると、アミノ酸の入れ替えは起こらない。したがって、象牙質に含まれるアミノ酸は、最初は L 体のみであるが、時間が経つと徐々に D 体に変化する。このラセミ化の速度は、温度、pH の影響を受けるが、生体内ではほぼ同じ環境に保たれるので、ほぼ一定と考えられる。したがって、歯の象牙質



のアミノ酸のD体とL体の存在比を測定すれば、被験者の年齢推定が可能となる。象牙質はタンパク質のコラーゲンを約20%含むので、酸による加水分解を行うと、容易にアミノ酸を得ることができる。

アミノ酸のD/L比を用いた年齢推定には、ラセミ化の速度がアミノ酸中で最大であるアスパラギン酸がよく使われる。アスパラギン酸のL体からD体への変化は、次に示すような可逆反応である。



k_L, k_D を正・逆反応の速度定数、[L], [D]をL-アスパラギン酸、D-アスパラギン酸のモル濃度とする。

L-アスパラギン酸からD-アスパラギン酸へのラセミ化の反応速度について、次式が成り立つ。

$$\frac{d[L]}{dt} = k_L \cdot [L] - k_D \cdot [D]$$

初期条件として、 $t = 0$ (年)のとき、[D] = 0であるとし、⑤式の形に変形して体温での k_L, k_D の数値を代入すると、⑥式になる(t の単位は年である)。

$$\log_e \frac{[L] + [D]}{[L] - [D]} = 1.48 \times 10^{-3} \times t \quad \dots \text{⑥}$$

(問) 被験者の第1大臼歯の象牙質中のD/L比を測定したら、D-アスパラギン酸はL-アスパラギン酸の $\frac{1}{20}$ であった。これより、この被験者の年齢を⑥式を用いて推定せよ。ただし、アミノ酸のラセミ化が始まるのは、第1大臼歯が完成する生後3年目からであり、 $\log_{10}2 = 0.301$, $\log_{10}3 = 0.477$, $\log_{10}7 = 0.845$, $\log_{10}19 = 1.278$, $\log_{10}e = 0.434$ とする。

(解) [L] = 20 mol/L, [D] = 1 mol/Lとして、⑥式の左辺に代入すると、

$$\begin{aligned} \log_e \frac{[L] + [D]}{[L] - [D]} &= \log_e \frac{21}{19} = \frac{\log_{10}3 + \log_{10}7 - \log_{10}19}{\log_{10}e} \\ &= \frac{0.477 + 0.845 - 1.278}{0.434} = 0.101 \end{aligned}$$

$$0.101 = 1.48 \times 10^{-3} \times t \quad t = 68.2(\text{年})$$

第1大臼歯が完成するまでに3年かかるので、この被験者の年齢は、 $68.2 + 3 = 71$ (歳)と推定される。

4. アスパラギン酸のラセミ化による年代測定

放射性同位体¹⁴Cによる年代測定の最大範囲は、¹⁴Cの半減期が約5700年であるため、その10倍程度の約 6×10^4 年である。さらに古い時代までの年代測定には、さらに半減期の長い放射性同位体が必要である。これには¹⁰Beや²⁶Alなどが該当するが、地球上で分布範囲が緯度によって異なるため、地球規模での年代測定の尺度とはなりにくいく⁹⁾。

地球規模での古生物の年代測定においては、アミ

ノ酸のラセミ化がよく利用される。代表的なアミノ酸のラセミ化の半減期は約 $10^3 \sim 10^6$ 年である⁸⁾から、その年代測定の最大範囲は $10^5 \sim 10^6$ 年に及び、¹⁴Cでは測定できない古い年代にも対応している。

ここで注意すべきことは、放射性同位体の崩壊を利用した年代測定は、温度の影響を受けないのでに対して、本方法は、反応速度定数 k が温度とpHの影響を強く受けることである。したがって、試料の温度履歴を正確に把握しておく必要がある。すなわち、温度が一定に保たれていることが明らかな場合、例えば、永久凍土の中から発見されたマンモスの牙は、気温0°Cが保持されていたし、海洋底の堆積物中の貝殻化石は、通常、約4°Cの底層水に接していたので、本方法でかなり正確に古生物の年代測定が可能である⁹⁾。また、アミノ酸のラセミ化と放射性同位体を利用した年代測定の両方が可能な場合、両結果から、古環境の温度を推定することも可能となる。

(問) L-アスパラギン酸のラセミ化の反応速度は、L-アスパラギン酸の濃度の1乗に比例する一次反応であり($V = k \cdot [L]$)、その速度定数 k は、25°Cで 2.0×10^{-4} (年⁻¹)である。ある地層から発見された生物の遺体中のL-アスパラギン酸とD-アスパラギン酸の濃度比が5:1であったとする。これより、この生物の死後経過年数を求めよ。ただし、この地層は常に25°Cに保たれており、 $\log_{10}2 = 0.301$, $\log_{10}3 = 0.477$, $\log_{10}e = 0.434$ とする。

(解) [L] = 5 mol/L, [D] = 1 mol/Lとして、⑤式の左辺に代入すると、

$$\begin{aligned} \log_e \frac{[L] + [D]}{[L] - [D]} &= \log_e \frac{3}{2} = \frac{\log_{10}3 - \log_{10}2}{\log_{10}e} \\ &= \frac{0.477 - 0.301}{0.434} = 0.405 \end{aligned}$$

$$k = 2.0 \times 10^{-4} \text{ (年}^{-1}\text{)} \text{ なので、⑤式より、}$$

$$0.405 = 2 \times 2.0 \times 10^{-4} \times t \quad t = 1.0 \times 10^3 \text{ (年)}$$

参考文献

- 富田友貴, 井上正之 (2017)『アミノ酸・タンパク質中の硫黄の検出』化学と教育 65巻11号 p.585
- 高木俊夫 (1977)『SHとSSの生化学』有機合成化学 35巻5号 p.334-335
- 山下真司, 松井康子 (2012)『毛髪の熱ダメージとその指標』日本化粧品技術者会誌 46巻3号 p.221
- 太智重光 (2014) 日本ゴム協会誌 87巻2号 p.34
- M.Fujimaki *et al.* (1969) *Agr. Biol. Chem.* 33, 1144
- M.Ohosawa *et al.* (1988) *Fresenius Z. Anal. Chem.* 329, 781
- M.S.Dunn *et al.* (1951) *J. Chem. Educ.* 28, 480
- 安部巖, 戸田與志雄 (2008)『アスパラギン酸のラセミ化から推定する古環境温度』大阪府立高専研究紀要 第42巻 p.45-46
- 半田暢彦 (1973)『アミノ酸のラセミ化による年代測定』化学と生物 第18巻10号 p.681