

グルタミン酸誘導体の抗菌性

猿野琳次郎・桑野 栄一*・前川 一之*

(発酵生産学教室)

昭和49年5月30日 受理

Studies on the Antimicrobial Activity of Glutamic Acid Derivatives

Rinjiro SARUNO, Eiichi KAWANO* and Kazuyuki MAEKAWA*

(Laboratory of Applied Microbiology)

Received May 30, 1974

Summary

Several L-glutamic- α and γ -alkylamide-alkylester were synthesized and their antimicrobial activities were studied. It was found that the lipotropic glutamyl compounds had antimicrobial activities against molds, bacteria and yeasts. L-Glutamyl- α -alkylamides were synthesized by the coupling of N-carbobenzoxy-L-glutamyl- γ -methylester with alkylamides, and 1-hydroxy-benzotriazol was a suitable additive in the synthesis of L-glutamylamide using cyclohexylcarbodiimide method.

For biochemical and anticeptical studies these compounds are very interesting materials because they are related to theanine found in tea leaves as a taste enhancing substance and have an antimicrobial activity against several plant pathogens.

結 言

食品添加物、農薬等でその毒性及び残留性などが、最近問題になっていることは周知の通りである。アミノ酸誘導体で抗菌性を示すものがあれば、低毒性および非残留性が予想される。猿野ら¹⁾²⁾はグルタミン酸アルキルアミドの抗菌性について、先に報告したが見里³⁾、佐橋⁴⁾らはN-アルキルグルタミン酸の植物病原菌に対する抗菌性について報告し注目された。L-グルタミン酸- γ -アルキルアミドのうち、L-グルタミン酸- γ -エチルアミド(テアニン)については茶葉中に存在し茶の旨味成分として知られている。著者らは高級アルキル基について、その抗菌効果を検討したところ、特にL-グルタミン酸(α, γ)アルキルアミド-エステルが抗菌性を示したので報告する。これらの化合物は比較的広範囲の抗菌スペクトラムを示し、或種の細菌、酵母、糸状菌に対して抗菌性があった。

L-グルタミン酸アミドの製法については、ペプチドの一般的合成法に従い、アミノ基をカルボベゾキシ基(Z)で保護したのち、DCCと1-BTを用いてアルキルアミンと反応せしめた。アルキルアミンの炭素数が多いので、DCCのみで反応カップリングさせる常法は収率が悪く、WOLFGAND⁵⁾らの方法により1-BTをカルボキシ基活性エステル試薬として用いたが、好収率で

* 九州大学農学部農業薬剤学教室

略号：Z, カルボベゾキシ, Z-Cl, カルボベゾキシクロライド, DCC, ジシクロヘキシルカルボジイミド, 1-BT, 1-ヒドロキシベンゾトリアゾール, DCHA, ジシクロヘキシルアミン, DCU, ジシクロヘキシルウレア, DMF, ジメチルホルムアミド, THF, テトラヒドロフラン。

目的物を調製することができた。グルタミン酸の α または γ カルボオキシ基を保護するためにメチル化を行った。パラトルエンスルホン酸の存在下で、メチル化すると収率良く反応がすすんだ。グルタミン酸のアミドまたはペプチドには α -アミドまたは γ -アミドがあり、それらの化合物を選択的に収量良く調製することは、比較的困難である。

L-グルタミン酸- α -アルキルアミドは L-グルタミン酸- γ -メチルエステルより出発し、アミノ基を Z-Cl で保護したのち、アルキルアミンと DCC, 1-BT を使用して、カップリングを行い、Pd 黒を触媒として水素添加を行い、アミノ基の保護基を除くことによって得られた。L-グルタミン酸- α -アルキルアミド-エステルは、 γ -カルボオキシ基のエステルが除かれやすく、カルボオキシ基とアミノ基が縮合してラクタムを形成すると抗菌性が失われる。L-グルタミン酸- α -アルキルアミドの塩酸塩は比較的安定であり、ラクタムの形成を防ぎ、抗菌性の消失を防止し得る。

つぎに L-グルタミン酸- γ -アルキルアミドの調製法であるが、二種類の製造法がある。一つはグルタミン酸無水物を DCC 法または無水酢酸を用いて調製し、この無水物に DCC と 1-BT を用いて開環縮合せしめる方法であり、本法により簡易に収率良く調製できた。一般に L-グルタミン酸- γ -アルキルアミドまたは L-グルタミン酸- γ -ペプチドを製造するのは困難で、また α -アミドが混入し易いのであるが、この方法により好収率で調製できた。さらに他の一つの方法は、グルタミン酸無水物をメタノールとエーテル混液に溶解したのち、DCHA を添加して L-グルタミン酸- α -メチルエステルの DCHA 塩となしたのち、酢酸で加水分解し、L-グルタミン酸- α -メチルエステルを調製し同様にアルキルアミンをカップリングさせ、L-グルタミン酸- γ -アルキルアミド- α -アルキルエステルを調製する法である。両法を比較すると前法が操作が簡単で L-グルタミン酸- α -アルキルアミドの混入もほとんどない点ですぐれている。

実験の部

I L-Glutamyl- α -n-Laurylamide- γ -Butylester の製造

1) N-Z-Glutamyl- γ -Methylester (a) の製造. L-グルタミン酸- γ -メチルエステルより出発し Z-Cl を用いて常法により製造した。

2) N-Z-Glutamyl- α -N-Laurylamide- γ -Methyl ester (b) の製造. 1.5 g の (a) と 0.7 g の 1-BT と 1g のラウリルアミンを THF にとかし、1.1 g の DCC を加え 0°C で 1 時間かきまぜる。室温で一夜おいたのち、析出した DCU をろ別し、ろ液を減圧濃縮し残渣は酢酸エチルに溶解した。4%重曹水溶液と 4%クエン酸水溶液で洗ったのち、さらに水洗した。無水芒硝で脱水したのち、減圧乾固し残渣はメタノールに溶し生じた不溶物はろ別した。ろ液は冷室に放置し、析出した結晶をろ別して採取しさらにエタノールより再結して精製した。このものの mp は 110°C で、収量は 1 g であった。

元素分析(%)	C	H	N	分子式	$C_{26}H_{42}O_5N_2$
理論値	67.50	9.15	6.06	分子量	462
分析値	67.44	9.36	5.96		

元素分析の結果は以上のごとくで分析値は理論値に一致した。

3) N-Z-Glutamyl- α -N-Laurylamide- γ -Butylester (c) の製造.

(b) を 20 ml のブタノールにとかし、0.05 g の p-トルエンスルホン酸を加えて、80°~90°C で 5 時間加熱しさらに 7 時間減圧下に加温し、エステル交換を行わせた。反応の進行状況は薄層クロマトグラフィーで時々試験した。得られた濃縮物は重曹水溶液で洗い、つぎに水洗したのち、減圧濃縮し残渣はヘキサンより結晶させた。mp 78°C, 収量 1.1 g.

元素分析(%)	C	H	N	分子式 $C_{29}H_{48}O_5N_2$
	69.05	9.52	5.56	
	69.01	9.53	5.58	

4) L-Glutamyl- α -n-Laurylamide- γ -Butylester (d) の製造 1g の (c) をメタノールに溶し, Pd 黒を触媒として水素を通じて還元し, Z 基を除去した. Pd 黒はろ別して除き, ろ液は減圧濃縮した. Pd 黒は常法のごとく Pd-Cl よりギ酸を用いて調製した. (d) の mp は 28°C であった.

元素分析(%)	C	H	N	分子式 $C_{21}H_{42}O_3N_2$
理論値	68.06	11.42	7.56	
分析値	67.91	11.21	7.68	

5) ラクタムの形成

上記の化合物は常温で放置するとき, または氷室においても, L-グルタミン酸の γ -カルボキシル基のエスターがとれて, アミノ基と閉環縮合してラクタムを形成しやすい. ラクタムになるとニンヒドリン試薬で発色せず, 有機溶媒に難溶となり, 抗菌性は消失した. ラクタムになると mp が上昇し, 赤外線吸収スペクトルをとると第 1 図に示すように波数 $1,700\text{ cm}^{-1}$ $1,660\text{ cm}^{-1}$ に吸収帯を新に生じた. 上述のようにラクタムの形成はこのアミドを塩酸塩にすることにより防止することができた.

元素分析(%)	C	H	N	分子式 $C_{17}H_{32}O_2N_2$
理論値	68.87	10.88	9.45	
分析値	69.05	11.03	9.25	分子量 296

II L-Glutamyl- γ -n-Laurylamide- α -Butylester の製造

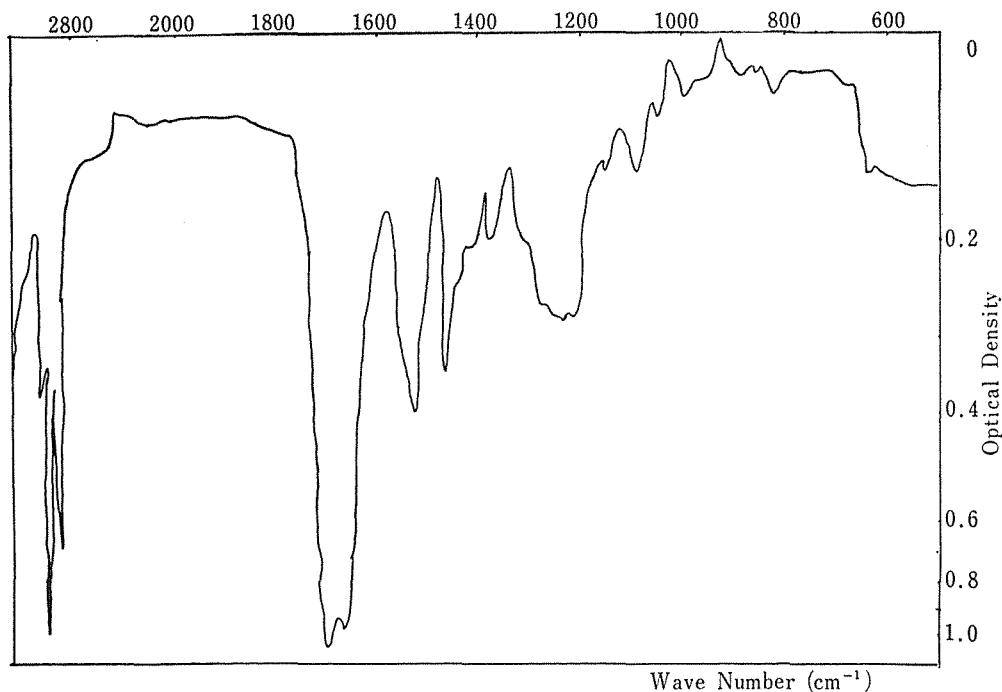


Fig. 1. IR Spectrum of Lactam of L-Glutamyl - α - Laurylamide

1) N-Z-Glutamic Acid Anhydride (e) の製造

N-Z-グルタミン酸 20 g を無水酢酸 50 ml に溶かしときどきかきまぜて反応させたのち濃縮し濃縮物はクロロホルムとエーテルの混液より結晶せしめた. 収量 13.0 g, mp 93~94°C.

2) L-Glutamyl- γ -Laurylamide (f) の製造.

(e) 1.37 g, ラウリルアミン 0.93 g, 1-BT 0.87 g, DCC 1.13 g を DMF 40 ml に溶かし 0°C で 1 時間室温で 1 時間かきまぜて不溶物 (DCU) をろ別して, ろ液を減圧濃縮し残留物を酢酸エチルに溶し 4% 重曹水溶液, 4% クエン酸水溶液で洗滌しつぎに水洗した. 酢酸エチル層は無水芒硝で脱水したのち酢酸エチルを溜去し, メタノールに溶かして結晶せしめた. 次に前述のように Pd 黒を触媒として水素添加を行い, アミノ基を保護している Z 基を除いて, L-グルタミル- γ -ラウリルアミドを調製した. 収量 1.25 g.

別法, N-Z-Glutamic acid anhydride 11.2 g をエーテルとメタノール混液に溶し, 4 ml の DCHA を含む 15 ml のエーテルを加え, 室温で一晩かきまぜて DCHA 塩をつくらしめ, ろ別してエーテルで洗滌し乾燥せしめた. 収量 4 g, mp 172°C. つぎに 6N-HCl 1 ml を含む酢酸 20 ml に溶かし, 2 時間保ち反応生成物はろ別して除き, ろ液は酢酸エチルで抽出したのち無水芒硝で脱水減圧濃縮乾固した. 得られた赤色 N-Z-グルタミル- α -メチルエステルは 20 ml の THF に溶かし 1-BT (0.4 g) の存在のもとでラウリルアミン (0.5 g) と DCC 0.6 g を加え 0°C で 2 時間かきまぜたのち室温で一晩放置した. 生成した DCU をろ別して除きろ液は減圧濃縮し, 濃縮物はエーテルに溶し, 冷却して結晶を生ぜしめた. 収量 1 g, mp 73~75°C.

元素分析(%)	C	H	N	分子式 $C_{26}H_{42}O_5N_2$
理論値	67.50	9.15	6.06	
分析値	67.44	9.36	5.96	分子量 462

3) N-Z-Glutamyl- γ -Laurylamide- α -Butylester (g) の製造.

N-Z-グルタミル- γ -ラウリルアミド- α -メチルエステルはエステル交換法によりブチルエステルにする. すなわちメチル誘導体をブタノールに溶かし p-トルエンスルホン酸の存在下で 80°~90°C で 8 時間加熱しさらに減圧下に 16 時間加熱したのちブタノールを溜去し酢酸エチルに溶し, 5% NaHCO_3 液で洗いつぎに水洗した. 酢酸エチル層は濃縮乾固して少量のベンゼンに溶しシリカゲルカラム (27×120 mm) を用いて吸着クロマトグラフィーを行った. 50 ml のベンゼンでカラムを洗ったのち, ベンゼン-エーテル混液 (3:1) 100 ml を流すと目的物が溶出された. この区分はヘキサンより再結した. 収量 0.6 g (61%)

元素分析(%)	C	H	N	分子式 $C_{29}H_{48}O_5N_2$
理論値	69.05	9.52	5.56	
分析値	69.04	9.54	5.44	分子量 504

また (f) は p-トルエンスルホン酸を触媒として常法のようにブチルエステル化することができた.

4) Z 基の除去

(g) 0.5 g をメタノールに溶し 0.1 g の Pd 黒の存在下で 4 時間水添し Z 基を除き, Pd 黒をろ別してろ液は減圧乾固し, 残留物はヘキサンより精製した. 収量 0.2 g, mp 38°C.

元素分析(%)	C	H	N	分子式 $C_{21}H_{41}O_3N_2$
理論値	68.06	11.42	7.56	
分析値	67.77	11.47	7.36	分子量 370

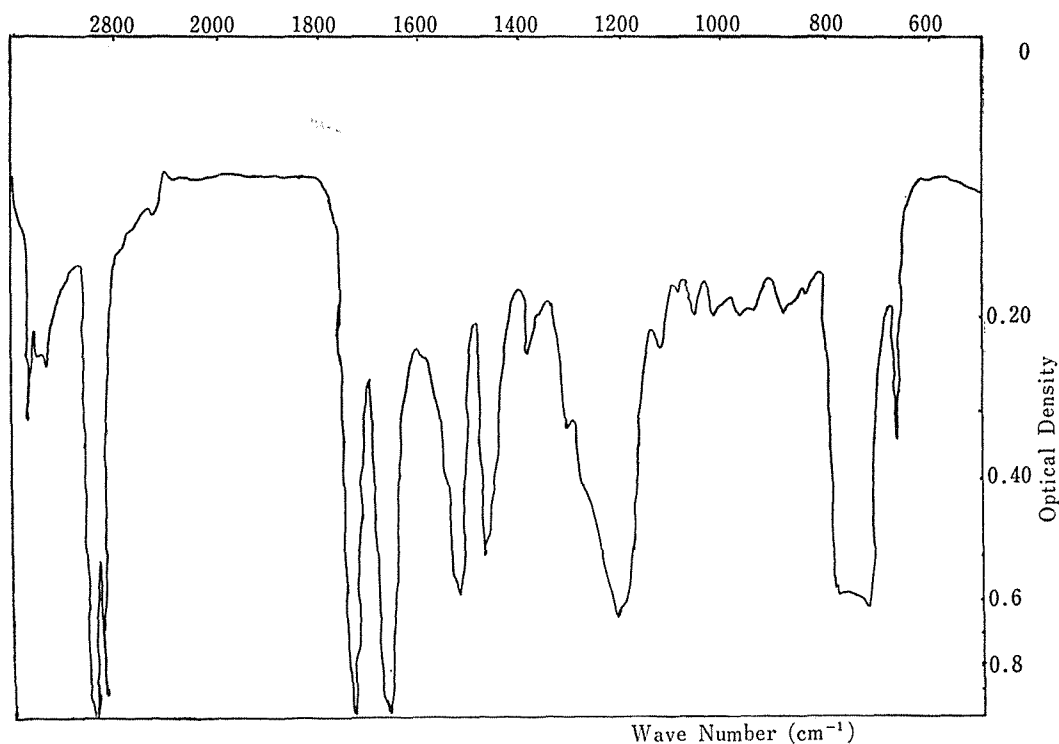


Fig. 2. IR Spectrum of L-Glutamic- γ -Lauryl- α -Butylester

III L-Glutamyl- γ -Laurylamide- α -Octylester の製造

(f) 0.24 g, p-トルエンスルホン酸 0.14 g をオクチルアルコール 20 ml に溶し、ベンゼン 50 ml を加えて 40 時間エステル化を行った。反応液は減圧濃縮し残渣はブタノールに溶し 4% 重曹水溶液で洗いつぎにブタノールを溜去した。残留物はメタノールに溶して精製した。この化合物は *E. coli* に対して抗菌性は無かったが、*Staphylococcus aureus* に対して 20 $\mu\text{g/ml}$ で抗菌性を示した。

IV L-Glutamyl- γ -n-nonylamide の製造

N-Z-グルタミン酸無水物 0.22 g, N-ノニルアミン 0.1 g, 1-BT 0.14 g DCC 0.177 g, DMF 20 ml を使用し前と同様な方法で製造した。本化合物は *Staphylococcus aureus* に対して 150 $\mu\text{g/ml}$, *E. coli* に対して 150 $\mu\text{g/ml}$ で抗菌力があった。

V 抗菌力試験

合成化合物の抗菌力は最少阻止濃度法により測定した。抗菌力は α -ラウリルアミド型が γ -ラウリルアミド型より強く、L-グルタミル- α -ラウリルアミド-アルキルエステルとしてはブチルエステルが最も強い。

L-グルタミル- α -ラウリルアミド- γ -ブチルエステルの抗菌力を次表に示した。

Table 1 にみられるように細菌, 糸状菌, 野生酵母のある種のものに対して抗菌性があり広範囲の抗菌スペクトラムを示す。植物病原細菌に対して抗菌性を示したことは農薬の残留性などが問題になっているだけに興味深いことである。また細菌の中には清酒の火落菌が含まれており、サルチル酸より極めて低濃度で発育阻止効果があることは、サルチル酸に代る食品添加物が求められ

Table 1. Antimicrobial Activity of L-Glutamyl- α -Lauryl- γ -Butylester.

Microorganismus	Minimum Inhibition Concentration (MIC)
	$\mu\text{g/ml}$
<i>Aspergillus niger</i>	40
<i>Xanthomonas citri</i>	20
<i>Xanthomonas oryzae</i>	20
<i>Pellicularia sasaki</i>	25
<i>Escherichia coli</i>	20
<i>Staphylococcus aureus</i>	15
<i>Lactobacillus homohiochi</i>	20
<i>Pichia membranefaciens</i>	30
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	20
<i>Botrytis cinera</i>	50

ているときだけに注目すべきであろう。清酒に対して 20 $\mu\text{g/ml}$ 程度の添加であれば香味に対する影響は少ないので、今後さらに検討したい。またしょう油の防腐に対しても有効であり、パラオキシ安息香酸ブチルエステルに代替出来ると思われる。

VI 合成物の確認

合成化合物の確認としては、合成化合物が長鎖アルキル基を有し mp が低いため、主として元素分析、赤外線吸収スペクトル、薄層クロマトグラフィー法によった。赤外線吸収スペクトル、

Table 2. Elementary Analysis and IR Spectrum.

$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{R}_2 \\ \\ \text{R}_1-\text{C}-(\text{CH}_2)_2 \\ \parallel \\ \text{O} \end{array}$		MP	Analysis (found)			Formula	IR (cm^{-1})	Anti- microbial Activity
R ₁	R ₂		C	H	N			
Buo-	-NH-Lauryl	28°	68.06 (67.11)	11.42 (11.21)	7.56 (7.68)	C ₂₁ H ₄₂ O ₃ N ₂	1720, 1655, 1520, 1465 1375, 1235, 1175, (Abb. 2-1)	Strong
Buo-	-NH-N-Octyl	40°#	64.93 (64.98)	10.90 (10.96)	8.91 (8.65)	C ₁₇ H ₃₄ O ₃ N ₂	1720, 1655, 1520, 1460 1365, 1220, 1165,	Medium
Buo-	-NH-sec-Octyl	42°#	64.93 (63.84)	10.90 (10.87)	8.91 (8.92)	C ₁₇ H ₃₄ O ₃ N ₂	1720, 1655, 1515, 1455 1365, 1225, 1165, 660	Weak
Lauryl-NH-	-OBu	38°	68.06 (67.77)	11.42 (11.47)	7.56 (7.36)	C ₂₁ H ₄₂ O ₃ N ₂	1725, 1660, 1520, 1465 1380, 1210, 780, 725 665 (Abb. 2-2)	Medium
Lactam -NH-Lauryl		98°	68.86 (69.05)	10.88 (11.03)	9.45 (9.25)	C ₁₇ H ₃₂ O ₂ N ₂	1700, 1660, 1525, 1460 1380, 1240, 1210 (Abb. 3)	None

BP at 0.06 mmHg

元素分析値, mp については Table 2 にまとめて記載した. また合成工程の管理のため薄層クロマトグラフィーを用いたが詳細は省略した. L-グルタミル (α , γ)-ラウリルアミドの識別はワゼリンまたはドデカンを含む逆相薄層クロマトグラフィーによった. 展開剤としては10%酢酸水溶液, または酢酸エチルを使用した. またこの識別は, (α , γ)-アルキルアミドをヒドラジン分解後, ペーパークロマトグラフィーで検出区別できるが, これらの方法は L-グルタミル- α 又は γ -ペプチドの分別にも応用できるであろう.

考察と摘要

1. 低毒性及び残留性の少ない Antisepticus, 農薬関連物質の開発を目的として, アミノ酸誘導体の合成を企図し, 微生物の細胞の中に広く存在し安価なグルタミン酸誘導体に親脂性を附与するため長鎖アルキルアミドとカップリングを行わせた. 一方天然には茶葉中に L-グルタミル- γ -エチルアミド (テアニン) が存在し旨味成分として知られている. 著者らはエチルアミンのアルキル基を長鎖アミンに置換することにより抗菌性がでてくることを期待した. 予備実験の結果アルキル基は C₈ 位より抗菌性が出現した.

2. グルタミン酸アルキルアミドを調製する場合, α -アミドと γ -アミドが生成するので選択的にそれらの化合物を調製するために複雑な工程になった. アルキル基の炭素数が増加して長鎖になるとグルタミン酸とアミン成分とのカップリングが困難になり収率が低下するのでその点を改良し, 活性カルボキシル基剤として 1-BT を使用したが収率が向上した.

L-グルタミル- γ -アルキルアミドを調製する場合は N-Z-グルタミン酸無水物から出発し DCC, 1-BT を使用する方法が工程も少く良い結果が得られた. L-グルタミル- α -アルキルアミド- γ -アルキルエステルをつくる場合は常法通りでよく, 最後はメチルエステルをエステル交換法によりブチルエステルとにしたがさらに改良の余地がある. 本報告ではこれらの化合物はペプチド合成法に従い多工程をへて合成したが, さらに工業的方法としてピロリドンカルボン酸を原料として開環縮合する方法を検討したが別報することとする.

3. グルタミン酸の α 又は γ -カルボキシル基に結合するアルキル基の抗菌性に対する効果は菌種より異なり, 一概に云えないが, ブチルエステルが最も抗菌性が強かった. またこれらの化合物はアミノ基が保護されているときは安定であるが, そうでない状態では不安定で, γ -カルボキシル基が遊離となりラクタムを形成し着色し抗菌力を失う. しかしアミノ基を塩酸塩にすると比較的安定となる. またアミノ基が保護されている場合も菌の種類によっては抗菌力が示されたのは注目すべきである. 例えば *Xanthomonas oryzae* に対しては Z 基で保護されている場合も抗菌性を示した.

謝 辞

本実験を行うに当り理工学部近藤助教, 教養部光安助教より有益なご助言を頂き厚くお礼申し上げます. また実験を担当された細川千里, 山下清幸, 柴田正雄の諸氏に謝意を表する次第であります.

文 献

- 1) 猿野琳次郎, 石田賢吾; 昭和 47 年度, 日本農芸化学大会, 講演要旨集 164 頁.
- 2) 猿野琳次郎他一名; 日本特許 526209 号.
- 3) 見里朝正; 現代化学, 4 月号, 21 頁 (1972).
- 4) 高野三郎, 鈴木隆雄, 佐橋佳一; 農化 46 309 (1972).
- 5) W. König, R. Geiger; Chem. Ber. 103 788 (1970).