

放射線防護および増感に関する研究 その2

—L-Cysteine, S-Alkylcysteine および
その Hydantoin 誘導体の重水溶液中の配座解析について—

*川崎医療短期大学 臨床検査科, **川崎医療短期大学 放射線技術科

佐藤彰一*, 西村明久**, 下田健治*, 小郷正則*,
紺野勝信**, 上田 智*, 西下創一**

(昭和59年9月17日受理)

Studies of Radioprotective and Radiosensitizing Effects Part II
The conformational analysis of L-Cysteine, S-Alkylcysteine
and their Hydantoin derivatives in D₂O

Shoichi SATO*, Akihisa NISHIMURA**, Kenji SHIMODA*,
Masanori OGO*, Kazunobu KONNO**, Satoshi UEDA*,
Soichi NISHISHITA**

Department of Medical Technology, Radiological Technology**,
Kawasaki College of Allied Health Professions*

(Received on Sept. 17, 1984)

概 要

S-Alkylcysteine, 5-Alkylthiomethylhydantoin および 5-Alkylthiomethyl-5-methylhydantoin の放射線防護および増感効果をマウスに投与し検討する上でこれら化合物の体内での配座構造は、放射線照射時に生じるラジカル等の有害物質との反応に関連が深いと考えられる。

そこでこれら化合物の重水溶液、蛋白溶液の NMR スペクトルを測定し、立体配座の検討をした。用いた化合物は S-Alkylcysteine として L-Cysteine, S-Propylcysteine, 5-Alkylthiomethylhydantoin として 5-Propylthiomethylhydantoin, 5-Alkylthiomethyl-5-methylhydantoin として 5-Propylthiomethyl-5-methylhydantoin である。

NMR の結合定数より L-Cysteine は C—2 位の水素と C—3 位の二つの水素の間の二面体角がそれぞれ約 120° となる配座をとることが推定された。また、5-Propylthiomethylhydantoin もほぼ同様の配座構造をしていることが推定された。さらに、強い放射線防護効果が報告されている 5-Propylthiomethylhydantoin は 10°C から 80°C までの温度変化 NMR 測定を行っても結合定数に変化がみられず非常に安定な配座をしていることが考えられた。また、牛アルブミンを加え、蛋白質との相互作用について検討し、本実験で添加したアルブミン量では結合定数に変化がないことを確認した。これはこの化合物の安定な配座がアルブミンの影響を受けないことを推定させるものである。

Abstract

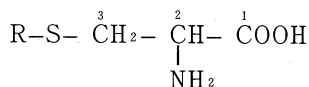
It might be considered that the conformations of S-Alkylcysteine, 5-Alkylthiomethylhydantoin and 5-Alkylthiomethyl-5-methylhydantoin in mice had a close relation to the reaction of noxious substances such as radicals which were produced in the γ -ray irradiation on the investigation of Radioprotective and Radiosensitizing effects of these compounds with mice. Then, the conformations were examined by measuring NMR spectra in D_2O and D_2O added by protein of these compounds L-Cysteine and S-Propylcysteine as S-Alkylcysteine and 5-Propylthiomethylhydantoin as 5-Alkylthiomethylhydantoin were used. It was presumed that each dihedral angles between C—2 H and C—3 H in L-Cysteine angled 120° conformation by coupling constant of NMR spectrum. It was also presupposed that the conformation of 5-Propylthiomethylhydantoin angled the same degrees.

We measured NMR spectra by changing the temperature of 5-Propylthiomethylhydantoin, which was reported of its large radioprotective effect, from $10^\circ C \sim 80^\circ C$. But it was found that the coupling constants were changeless, so that we might say that its conformation was very stable. We also examined its interaction on protein, adding to Bovine Serum Albumin, but the result showed that its coupling constants didn't change. Therefore we concluded that its stable conformation was not influenced by Bovine Serum Albumin.

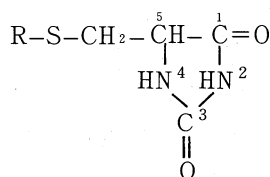
はじめに

含硫化合物である Cysteine の放射線防護効果について¹⁾はすでに報告されている。さらに、S-Alkylcysteine およびその Hydantoin 誘導体を用いた γ 線照射による E. Coli の生存率に関する田原ら²⁾の研究は遊離アミノ酸より Hydantoin 誘導体のほうが放射線防護効果が大きであると報告している。これら化合物の Degradation mechanism については西村ら³⁾により報告されている。また、西村ら⁴⁾は S-Alkylcysteine およびその Hydantoin 誘導体のマウスについての γ 線照射に対する防護増感効果を検討し、Hydantoin 誘導体とくに 5-Propylthiomethylhydantoin および 5-Allylthiomethyl-5-methylhydantoin の放射線防護効果が最も大きいと報告している。

そこで、我々はこれら興味ある化合物の防護および増感効果を検討するために S-Alkylcysteine [I] およびその Hydantoin 誘導体 [II] を Dakin ら⁵⁾の方法を応用した田原ら⁶⁾および水谷ら⁷⁾の反応条件を検討し、収率よく合成した⁸⁾。



〔I〕 S-Alkylcysteine



〔II〕 5-Alkylthiomethylhydantoin

これら化合物の配座解析には NMR スペクトルより得られる知見が有用である。とくに水溶液およびアルブミン添加溶液中の配座解析をすることは γ 線照射時のマウス体内での分子の配座を検討することになると考えられる。以上のことから、これら化合物の重水溶液および牛血清アルブミン添加溶液の NMR スペクトルを測定し、検討を行った。

実 験

1. NMR測定

NMR 測定には Varian XL-200 NMR Spectrometer を用いて行った。また、溶媒としては重水 (D_2O)、測定温度は通常室温 (約25°C)、内部標準としては DSS を用いた。

2. 合成法

2-1 S-Propylcysteine

無水 Ethanol 500ml に金属 Na 10 g を加え、Sodium ethylate ethanol 液を調製した。これに L-Cysteine 塩酸塩 17.5 g (0.1mol) を加え、さらに 1-Bromopropane 12.3 g (0.1mol) を約10分間で滴下し、ついで30分間攪拌した。減圧下で Ethanol 除去後少量の水で懸濁させ吸引濾過し、S-Propylcysteine の粗結晶 14.1 g (収率85%) を得た。再結晶は Ethanol 水溶液で行った。

MS m/e : M^+ 163, 118, 89 (base), 74, 61, 43

IR ν_{\max}^{KBr} cm^{-1} : 1610, 1580, 1480, 1405, 1340, 1300, 850

NMR $\delta_{DSS}^{D_2O}$: 0.93 (3 H, t, $J=7.3Hz$), 1.58 (2 H, sex, $J=7.3Hz$), 2.56 (2 H, t, $J=7.3Hz$), 2.97 (1 H, d.d, $J=7.3, 15.0Hz$), 3.10 (1 H, d.d, $J=4.2, 15.0Hz$), 3.90 (1 H, d.d, $J=4.6, 7.4Hz$)

2-2 5-Propylthiomethylhydantoin

シアン酸カリウム 9.7 g (0.12mol) を水 100ml に溶解し、S-Propylcysteine 16.3 g (0.1mol) を加え攪拌した。これに 10% HCl 水溶液を滴下し、生じる沈殿量が最も多くなる点 (約150ml) でやめ吸引濾過を行い N-Carbamyl-S-propylcysteine の結晶を得た。ついでこの結晶を 10% HCl 水溶液に溶解させ 90°C, 20分間加温した。反応液を氷冷した後折出する結晶を吸引濾過し、5-Propylthiomethylhydantoin の粗結晶 14.9 g (収率79%) を得た。この再結晶には Ethanol 水溶液を用いた。

MS m/e : M^+ 188, 89 (base), 61, 47, 41

IR ν_{\max}^{KBr} cm^{-1} : 3300, 1690, 1310, 1180, 1080, 770, 630, 550

NMR $\delta_{DSS}^{D_2O}$: 0.93 (3 H, t, $J=7.4Hz$), 1.58 (2 H, sex, $J=7.4Hz$), 2.61 (2 H, t, $J=7.4Hz$), 2.96 (1 H, d.d, $J=4.8, 14.5Hz$), 3.08 (1 H, d.d, $J=4.2, 14.5Hz$), 4.53 (1 H, d.d, $J=4.2, 4.8Hz$)

2-3 5-Propylthiomethyl-5-methylhydantoin

無水 Ethanol 20ml に金属 Na 0.6 g を加え Sodium ethylate ethanol 溶液を調製し、氷水浴中で Propylmercaptane 1.9 g (0.025mol) を加え、さらに Chloroacetone 2.3 g (0.025mol)

を約30分間で滴下した。これを冷暗所に一夜放置後水を加え生じた NaCl の結晶を溶解し、エーテル抽出を行った。エーテルを減圧下で除去後黄色の油状物 S-Propylthiopropione 2.43 g (収率74%) を得た。この Propylthiopropione 2.0 g を80% Ethanol 水溶液20ml に溶解し、シアン化カリウム1.22 g を加え攪拌した。これに炭酸アンモニウム5.4 g を加え、65°C で4時間、85°C で1時間加温した。Ethanol を減圧下で除去し、茶褐色油状物4.0 g を得た。これにシリカゲル溶出クロマト (5% Methanol Chloroform 溶液) を行い、5-Propylthiomethyl-5-methylhydantoin の白色結晶1.95 g (収率61%) を得た。

MS m/e : M^+ 202, 89, 61 (base), 47, 43

IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 1700, 1400, 1290, 1165, 775, 570

NMR $\delta_{\text{DSS}}^{\text{D}_2\text{O}}$: 0.92 (3 H, t, $J=7.3\text{Hz}$), 1.46 (3 H, s), 1.55 (2 H, sex, $J=7.4\text{Hz}$), 2.59 (2 H, t, $J=7.2\text{Hz}$), 2.95 (2 H, s)

検 討

1. L-Cysteine, S-Propylcysteine および 5-Propylthiomethylhydantoin の配座について L-Cysteine, S-Propylcysteine および 5-Propylthiomethylhydantoin の重水溶液の NMR スペクトルをもとに配座解析を行ってみた。

重水中における L-Cysteine の NMR スペクトルで C-3 位のメチレン基 ($-\text{CH}_2-$) に由来するピークは 3.06ppm に d.d, $J=4.5, 15.1\text{Hz}$, 3.16ppm に d.d, $J=5.3, 15.1\text{Hz}$, C-2 位のメチン基 ($-\overset{|}{\text{C}}\text{H}-$) に由来するピークは 4.26ppm に d.d, $J=4.5, 5.3\text{Hz}$ とそれぞれ 1 H づつのピークがみられる。これは C-2 位の不斉炭素のまわりの置換基の影響で隣接する C-3 位の 2 個の水素が非等価となったため生じたものである。非等価となることにより C-3 位の水素は gem プロトン間でカップリング ($J=15\text{Hz}$) をし、ついでビシナルプロトンとカップリング ($J=4 \sim 5\text{Hz}$) を行っている。ビシナルプロトン間の結合定数が $J=4 \sim 5\text{Hz}$ である場合、これを Karplus の式⁹⁾にこれをあてはめるとビシナルプロトンの二面体角は fig 2 のようにほぼ 120° となることになる。したがって、C-2 位の水素と C-3 位の SH 基との二面体角は 0° すなわち重なり合った配座をとっていることが推定される。

また、5-Propylthiomethylhydantoin の場合も fig 1 にみられるように、 $-\text{CH}_2-\overset{|}{\text{C}}\text{H}-$ の水素間でほぼ同様なスペクトルが観測された。これは 5-Propylthiomethylhydantoin の重水中での配座が fig 2 でみられるように L-Cysteine とほぼ同様であることを示している。

L-Cysteine からの誘導体である S-Propylcysteine の NMR では上記二つの化合物と異なったカップリングがみられる。この場合 $-\text{CH}_2-\overset{|}{\text{C}}\text{H}-$ ビシナルプロトン間は $J=4.2$ および $J=7.3\text{Hz}$ でカップリングをしている。この値を Karplus の式⁹⁾にあてはめると fig 2 のようにビシナルプロトン間の二面体角は $130^\circ, 110^\circ$ 程度となることを示唆した。

また、5-Propylthiomethyl-5-methylhydantoin では上記化合物の部分構造 $-\text{CH}_2-\overset{|}{\text{C}}\text{H}-$

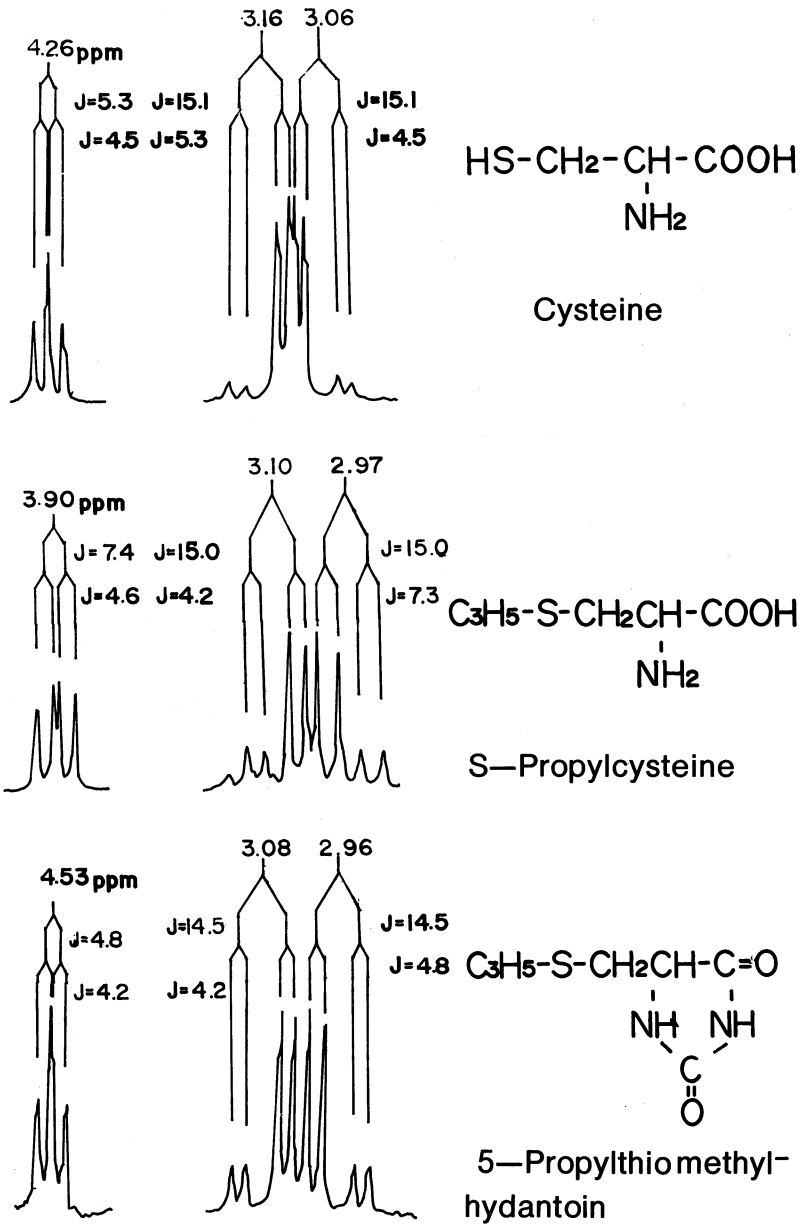
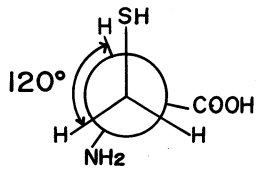
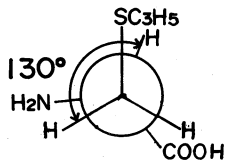


Fig 1. $-\text{CH}_2-\overset{|}{\text{CH}}-$ NMR Spectra of Cysteine, S-Propylcysteine and 5-Propylthiomethylhydantoin at 25°C



Cysteine



S-Propylcysteine

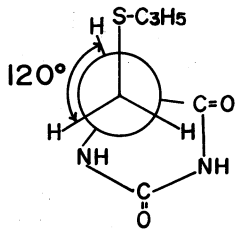
5-Propylthiomethyl-
hydantoin

Fig 2. The preferred Conformations of Cysteine, S-Propylcysteine and 5-Propylthiomethylhydantoin in D₂O at 25°C

が $-\text{CH}_2-\overset{\text{CH}_3}{\underset{|}{\text{C}}}-$ となっているためビシナルプロトン間のカップリングは当然観測されない。 $-\text{CH}_2-$ の gem プロトン間のカップリングもなく 2.95ppm に singlet としてピークがみられた。したがって、5-Propylthiomethyl-5-methylhydantoin の配座については NMR スペクトルからは推測出来なかった。

2. 5-Propylthiomethylhydantoin の温度変化 NMR の解析

5-Propylthiomethylhydantoin の NMR 測定温度を 10°C から 80°C まで変化させ配座に変化があるか検討を行った。

fig 3 に示されるように 10°C から 80°C まで測定温度を変化させても Chemical Shift, 結合定数とも全く変化がなく, fig 2 の 5-Propylthiomethylhydantoin の配座がこの温度範囲では非常に安定であることを示唆した。ただ, H₂O の H の Chemical Shift 値は温度上昇とともに高磁場シフトをすることが観測された。

3. 蛋白質と 5-Propylthiomethylhydantoin との相互作用について

0.5ml の重水に 5mg の 5-Propylthiomethylhydantoin を溶解し, これに牛血清アルブミンを 1, 2, 4, 6, 10mg と添加し NMR スペクトルを測定した。

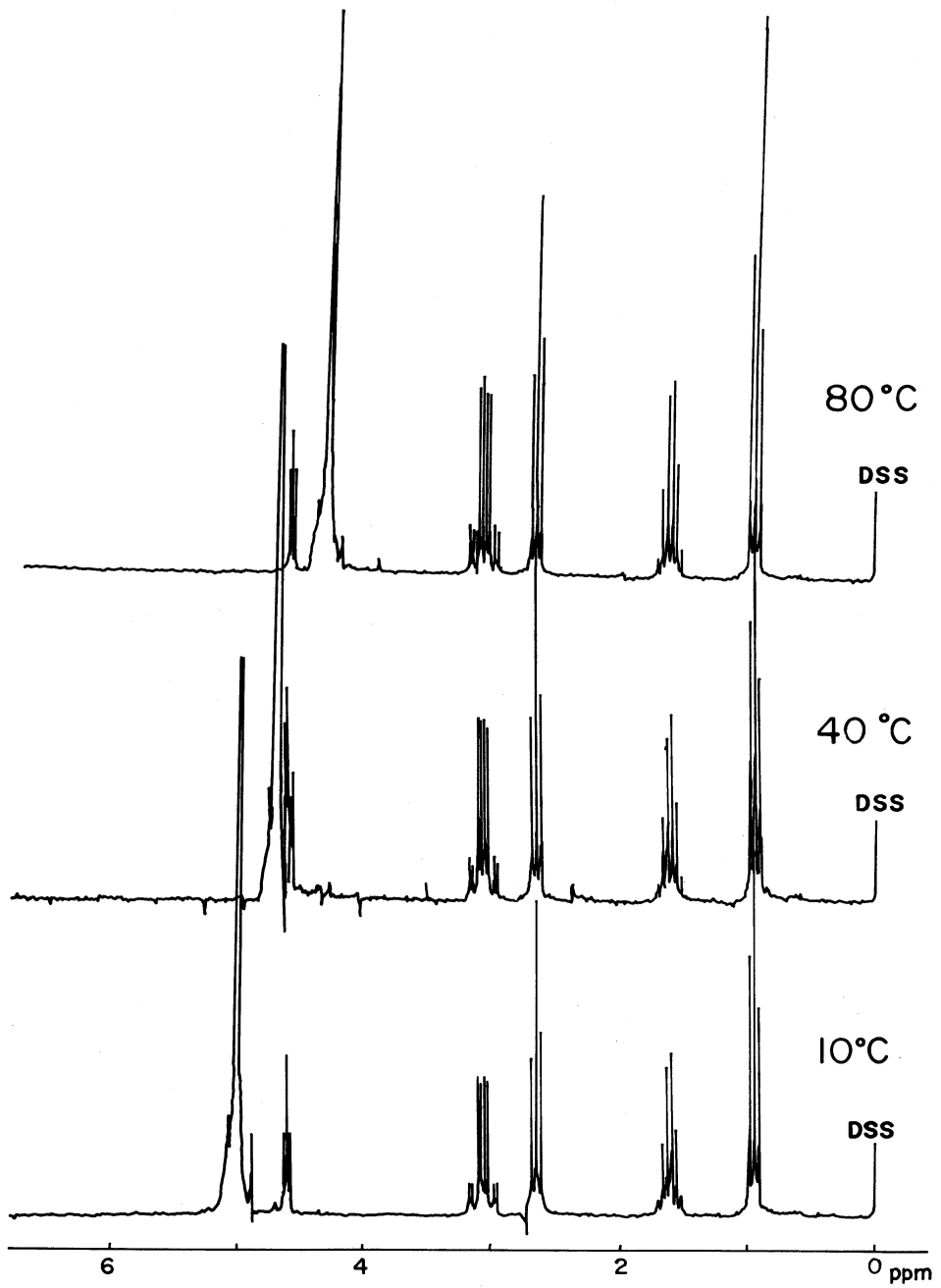


Fig 3. NMR Spectra of 5—Propylthiomethylhydantoin in D₂O at various Temperatures

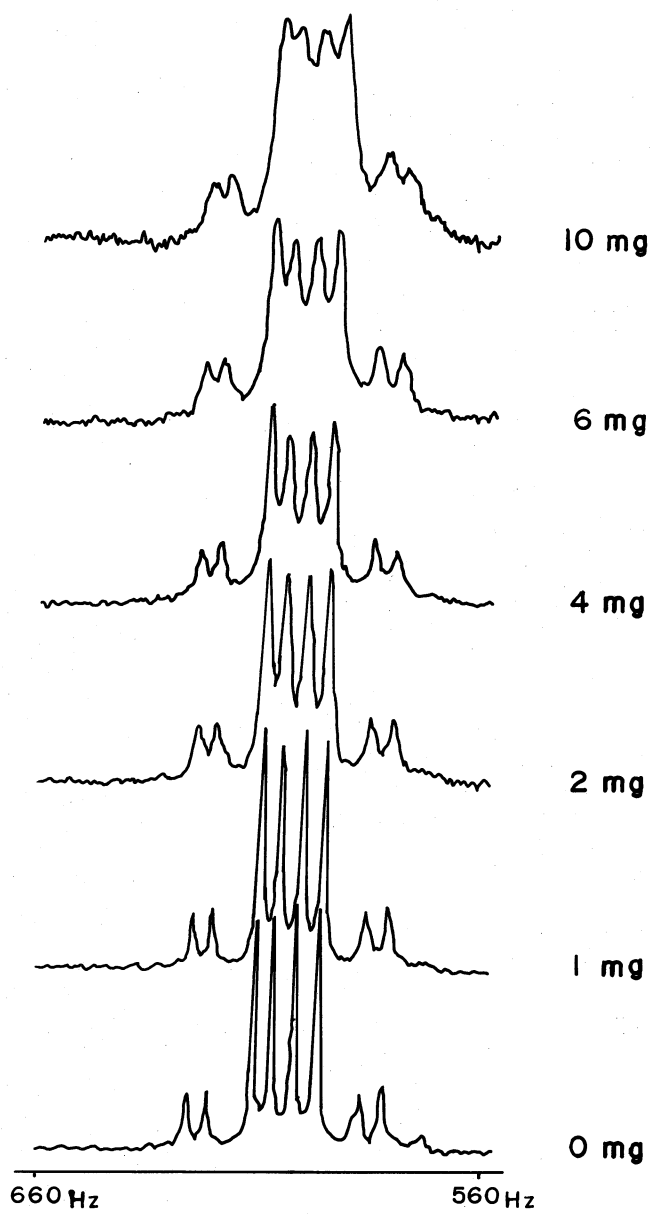


Fig 4 . NMR Spectra of 5—Propylthiomethylhydantoin in the Presence of Bovine Serum Albumin in the Range 560 to 660 Hz at various Concentrations in D₂O

fig 4 は $-\overset{1}{\text{C}}\text{H}-$ のメチレン基 ($-\text{CH}_2-$) にあたる部分の NMR を示したものである。これによれば牛血清アルブミンを添加しても結合定数, Chemical Shift 値とも全く変化がないことが判明した。したがって, 牛血清アルブミンには 5-Propylthiomethylhydantoin の重水中での配座を変化させるような相互作用はないことが推測された。このことはマウス体液中の 5-Propylthiomethylhydantoin の配座が fig 2 とほぼ同様なものであることを推定させるものである。

また, 添加牛血清中アルブミン量が増すにつれ NMR スペクトルの分解能の低下が観測されたが, これは牛血清アルブミン添加のため溶液の粘度が著しく増加したためと考えられた。

ま と め

放射線防護作用があるといわれていわれる L-Cysteine, S-Propylcysteine および 5-Propylthiomethylhydantoin の重水中における配座について検討を行った。NMR スペクトルの結合定数から L-Cysteine は fig 2 のような C-2 位のプロトンと C-3 位の S H 基が重なり合った配座をとること, さらに 5-Propylthiomethylhydantoin もほぼ同様な配座をとることを推定し得た。この 5-Propylthiomethylhydantoin の配座は 10°C ~ 80°C の間では安定であり, また, 蛋白溶液中でも同様の配座をとることが推定された。また, S-Propylcysteine は上記の化合物と異なり, 重なり合った配座より多少ずれた配座構造をとることが推定された。これらのことはマウスに投与し放射線照射実験を行う場合, これら化合物が放射線照射時にこのような配座をとっていることをうかがわせるものである。

謝 辞

この研究にあたり終始適切なる御助言をいただいた北海道大学農学部農芸化学科の西村弘行先生に深く感謝致します。

参 考 文 献

- 1) Streffer Christian : Chemical radiation protection : Raising the survival rate of mammalian animals through chemical substances following the influence of ionized rays. Umsch, wiss, Tech., 68(16), 492-496, 1968.
- 2) 田原哲士, 西村弘行, 水谷純行 : 大腸菌の γ 線照射に対する含流アミノ酸の効果. 農化, 47(3), 193-200, 1973.
- 3) H.Nishimura, S.Kawakishi and M.Namiki : Studies on gamma-radiolysis of sulfur containing amino acids : I. Gamma-radiolysis of S-n-Propyl-L-Cysteine sulfoxide and S-Allyl-L-Cysteine sulfoxide in aqueous solution. Arg. Biol. Chem., 34(4), 609-616, 1970.
- 4) A.Nishimura, H.Hashimoto, K.Konno and Y.Ohta: Radioprotective and Radiosensitizing Effects of Sulfur Containing Amino acids Derivatives on Mice. Z.Nuturforish, 35(C), 726-728, 1980.
- 5) H.D.Dakin: Catalytic lacerization of optical active Hydantoin derivatives and of substantive

as result of tautomeric change. *Am. Chem. J.*, 44, 48-60, 1910.

- 6) J.Mizutani, Y.Miura and S.Tahara: Synthesis of Antimicrobial L- 5 -Alkylthiomethylhydantoin S-Oxide and Related Compounds. *J.Pesticide. Sci.*, 4, 17-23, 1979.
- 7) S.Tahara and Y.Obata: Studies on α -Alkyl-L-amino Acids. Part I Synthesis of S-Alkyl-methyl-D,L-cysteines. *Arg.Biol.Chem.*, 35 (1), 53-57, 1971.
- 8) 佐藤彰一, 西村明久, 下田健治, 小郷正則, 紺野勝信, 上田 智: 放射線防護および増感に関する研究その1 S-Alkylcysteine およびその Hydantoin 誘導体の合成について. 3, 1-6, 1983.
- 9) M.Karplus: vicinal Proton Coupling in Nuclear Magnetic Resonance. *J.Am. Chem.Soc.*, 85, 2870-2871, 1963.