

β -Tyrosinase 에 관한 연구

제 2 보 β -Tyrosinase 에 의한 Halogen 化 Tyrosine 의 合成

金燦祚, 長次 透*, 谷 吉樹*, 山田 秀明*

忠南大學校 農科大學 食品加工學科, *京都大學 農學部 農藝化學科 醱酵生理 研究室

(1979년 12월 5일 수리)

Studies on the β -Tyrosinase

Part 2. On the Synthesis of Halo-tyrosine by β -Tyrosinase

Chan-Jo Kim, Toru Nagasawa*, Yoshiki Tani*, Hideaki Yamada*

Dept. of Food Sci. & Tech., Coll. of Agri., Chungnam Univ.

*Dept. of Agri. Chem., Faculty of Agri., Kyoto Univ., Japan

Summary

L-Tyrosine, 2-chloro-L-tyrosine, 2-bromo-L-tyrosine, and 2-iodo-L-tyrosine were synthesized by β -tyrosinase obtained from cells of *Escherichia intermedia* A-21, through the reversal of the α, β -elimination reaction, and their molecular structures were analyzed by element analysis, NMR spectroscopy, mass spectrometry and IR spectroscopy. Rates of synthesis and hydrolysis of halogenated tyrosines by β -tyrosinase, inhibition of the enzyme activity by halogenated phenols, and effects of addition of *m*-bromophenol on the synthesis of 2-bromotyrosine were determined. The results obtained were as follows:

- 1) In the synthesis of halogenated tyrosines, the yield of 2-chlorotyrosine from *m*-chlorophenol were approximately 15 per cent, that of 2-bromotyrosine from *m*-bromophenol 13.8 per cent, and that of 2-iodotyrosine from *m*-iodophenol 9.8 per cent.
- 2) Rate of synthesis of halogenated tyrosines by β -tyrosinase was slower than that of tyrosine and the rates were decreased in the order of chlorine, bromine and iodine, that is, by increasing the atomic radius. Relative rate of 2-chlorotyrosine synthesis was determined to be 28.2, that of 2-bromotyrosine to be 8.13, and that of 2-iodotyrosine to be 0.98, respectively, against 100 of tyrosine. However 3-iodotyrosine was not synthesized by the enzyme.
- 3) The relative rate of 2-chlorotyrosine hydrolysis by β -tyrosinase was 70.7, that of 2-bromotyrosine was 39.0, and that of 2-iodotyrosine was 12.6 against 100 of tyrosine, respectively. The rate of hydrolysis appeared to be decreased in the order of chlorine, bromine and iodine, that is, by increasing the atomic radius or by decreasing the electronegativity. But 3-iodotyrosine was not hydrolyzed by the enzyme.

- 4) The activity of β -tyrosinase was inhibited by phenol markedly. Of the halogenated phenols, *o*-, or *m*-chlorophenol and *o*-bromophenol gave marked inhibition on the enzyme action, however inhibition by iodophenol was not strong. Plotting by Lineweaver-Burk method, a mixed-type inhibition by *m*-chlorophenol was observed and its K_i value was found to be $5.46 \times 10^{-4} M$.
- 5) During the synthesizing reaction of 2-bromotyrosine by the enzyme, sequential addition of substrate which was *m*-bromophenol with time intervals and in a small amount resulted in better yield of the product.
- 6) The halogenated tyrosines which were produced by β -tyrosinase from pyruvate, ammonia and *m*-halogenated phenols were analysed to determine their molecular structures by element analysis, NMR spectroscopy, mass spectrometry, and IR spectroscopy. The result indicated that they were 2-chloro-L-tyrosine, 2-bromo-L-tyrosine, and 2-iodo-L-tyrosine, respectively.

緒 論

筆者 등은 前報¹⁾에서 *Escherichia intermedia* A-21(京郭大學 農學部 AKU-0010)의 균체에서 β -tyrosinase(tyrosine phenol lyase)를 結晶狀으로 單離하여 몇가지 효소화학적 성질을 조사하여 발표하였다. 이어서 pyruvic acid, phenol, ammonia 및 각종 halogen化 phenol를 基質로 하고 精製한 β -tyrosinase의 α, β -脫離作用의 逆反應을 이용하여 L-tyrosine과 2-chloro-L-tyrosine, 2-bromo-L-tyrosine 및 2-iodo-L-tyrosine를 새로 합성하였다. 이와같은 halogen化 tyrosine은 근래 生體反應의 情報擔體로 그 중요성이 논의되고 있는 흥미있는 물질이다.²⁾

이 合成에서 L-tyrosine의 合成속도에 대한 halogen化 tyrosine의 合成속도를 비교하고 β -tyrosinase의 활성에 대한 halogen化 phenol의 影響을 검토 測定하였다.

그리고 合成한 halogen化 tyrosine을 元素分析하고 또한 NMR-spectrum, Mass-spectrum 및 IR-spectrum 등으로 測定하여 構造解析을 하고 合成물질의 확인을 하였으므로 그 결과를 여기에 보고하는 바이다.

본 연구는 1978년도 문교부 교수 국비 국외의 파견 연구계획에 의하여 日本京都大學 農學部 農藝化學科 醱酵生理學 敎室에서 이루어진 것이다.

實 驗

1) 酵素의 精製: 結晶 β -tyrosinase는 제1보¹⁾에서 記述한 바와 같은 배양 및 정제 조건으로 *Escherichia intermedia* A-21의 細胞抽出액에서 정제하였다.

2) 酵素의 活性 測定: 제1보¹⁾에서와 같이 Friedemann-Haugen의 방법에 따라 測定하였다.

3) Tyrosine의 合成: 山田⁴⁻⁹⁾ 등의 방법에 따라 pyruvate 300 μ moles, 黃酸 ammonium 150 μ moles, phenol 200 μ moles, pyridoxal 磷酸 (PLP) 0.6 μ moles, 鹽化 ammonium 완충액 (pH 9.25) 200 μ moles 과 β -tyrosinase 0.0081~0.034 units를 함유하는 反應액 4ml를 30°C에서 10분간 反應시킨 후 2.5% 過鹽素酸 1ml를 加하여 反應을 停止시켰다. 그리하여 2,500 \times g로 10분간 遠沈시켜 그 上澄액 중의 tyrosine 生成량을 nitrosonaphthole 법³⁾으로 測定하였다.

4) 2-Chlorotyrosine의 合成: 山田¹⁰⁻¹³⁾ 등의 방법을 參考하여 反應액은 500ml로 하고 이 中에 pyruvate 50m moles, PLP 50 μ moles, 鹽化 ammonium 완충액 (pH 9.25) 62.5mmoles, β -tyrosinase 62.5units를 함유케 하고 또한 *m*-chlorophenol 25m moles를 6.25m moles씩 4회로 나누어 12시간마다 첨가하였다. 이것을 30°C에서 48시간 反應시킨 후 鹽酸으로 pH 1이 되게 하여 反應을 停止시켜 이때 沈澱되는 단백질은 12,000 \times g에서 20분간의 遠沈으로 제거시켰다.

그 上澄액을 分液여두에 취하고 toluene 350ml를 加하여 殘存하는 *m*-chlorophenol를 추출 제거하는 조작을 3회 반복하였다. 그 水層液을 amberlite CG-120의 Column(H+型 2.5 \times 20cm)에 통과시키고 잘 水洗한 후 0.3N-NH₃로 溶出하였다 이것을 butanol: acetic acid: H₂O=4:1:1의 溶媒系로 silica gel의 TLC로 展開시켜 $R_f=0.53$ 의 ninhydrin 陽性劃分을 모아 眞空 농축하였다. 농축액을 4°C에 방치하여 結晶을 析出시키고 다시 그 結晶을 4°C에서 물로 再結晶시켜 P₂O₅을

사용하여 건조시켰다.

5) **2-Bromotyrosine**의 **合成**: 반응액은 800ml로 하고 이 중에 pyruvin酸소다 80m moles, PLP 80 μ moles, 鹽化 ammonium 완충액 (pH9.25) 100m moles 및 β -tyrosinase 100units를 함유케 하고 *m*-bromophenol은 40m moles를 10m moles씩 4회에 나누어 12시간마다 첨가하여 30°C에서 48시간 반응시켰다. 以下 結晶을 얻기까지는 2-chlorotyrosine의 경우와 같이 하였다. 但 過剩의 *m*-bromophenol은 560ml식의 tolnene을 가하여 3회 추출 제거하였다.

6) **2-Iodotyrosine**의 **合成**: 반응액은 1l로 하고 이 중에 pyruvin酸소다 100m moles, PLP 100 μ moles, 鹽化 ammonium 완충액 (pH9.25) 125m moles 및 β -tyrosinase 125units를 함유케 하고 *m*-iodophenol 50m moles를 12.5m moles씩 4회에 나누어 12시간마다 첨가하여 30°C에서 48시간 반응시켰다. 以下 結晶을 얻기까지는 上述한 바와 같다. 但 殘存하는 *m*-iodophenol은 700ml식의 toluene을 가하여 3회 추출 제거하였다.

7) **Halogen化 tyrosine**의 **合成速度**: pyruvin酸소다 10m moles, PLP 10 μ moles, 鹽化 ammonium (pH9.25) 12.5m moles, halogen化 phenol 5m moles 및 β -tyrosinase 6.75units를 함유하는 반응액 100ml를 30°C에서 6시간 반응시킨 후 100°C에서 10분간 가열하여 반응을 中止시키고 變性단백을 제거하고 paper chromatography에 의하여 생성된 tyrosine 및 halogen化 tyrosine를 分離同定하고 cadmium ninhydrin법¹⁴⁾으로 그 생성량을 定量 비교하여 합성속도를 측정하였다.

8) **Halogen化 tyrosine**의 **分解速度**: 합성한 halogen化 tyrosine의 β -tyrosinase에 의한 분해속도를 Friedemann 등의 방법¹⁵⁾에 따라 분해에서 생성되는 pyruvic acid를 定量하여 측정하였다.

9) **β -Tyrosinase**에 대한 **halogen化 phenol**의 **阻害**: L-tyrosine 2.5 μ moles, PLP 0.4 μ moles, 磷酸카리 완충액 (pH 8.0) 200 μ moles 및 β -tyrosinase 0.137units를 함유하는 반응액 4ml에 각종 halogen化 phenol 10 μ moles를 첨가하였다. halogen化 phenol은 물에 잘 용해하지 않으므로 ethanol에 용해시켜 첨가하였으며 ethanol의 最終농도는 반응액에 대하여 0.5%로 하였다. 이 반응액을 30°C에서 20분간 반응시킨후 pyruvic

acid의 생성량을 Friedemann 등의 방법¹⁵⁾으로 측정하여 阻害효과를 조사하였다.

10) **2-Bromotyrosine**의 **合成**에서 ***m*-bromophenol**의 **經時的 添加効果**: pyruvin酸소다 0.7m moles, PLP 0.7 μ moles, 鹽化 ammonium (pH 9.25) 0.875m moles 및 β -tyrosinase 0.875units를 함유하는 반응액 7ml에 *m*-bromophenol을 plot (1)에는 0.18m moles, (2), (3)에는 0.35m moles를 함유하는 조건으로 반응을 시켜 10시간 후 (1)에는 다시 0.18m moles의 *m*-bromophenol을 첨가하고 (2)에는 0.875units의 β -tyrosinase를 첨가하여 반응시켰다. 그리하여 2-bromotyrosine의 생성량을 butanol : acetic acid : H₂O = 4 : 1 : 1의 開展溶媒를 써서 ninhydrin법¹⁴⁾으로 定量하여 비교 측정하였다.

11) **Halogen化 tyrosine**의 **元素分析**: 합성한 halogen化 tyrosine 약 3mg를 시료로 하여 柳本 C.H.N. Recorder MT-1를 사용하여 분석하였다 Cl, I, 및 Br 등은 Na 選擇性銀滴定法으로 약 8mg의 시료를 사용하여 분석하였다.

12) **Halogen化 tyrosine**의 **nuclear magnetic resonance (NMR)-spectrum**의 측정: 10mg의 halogen化 tyrosine를 0.1M-NaOD 0.4ml에 녹여 Varian A-90의 spectrometer로서 그 spectrum을 측정하였다.

13) **Halogen化 tyrosine**의 **mass-spectrum**의 측정: 日本電子 JMS-OISG를 사용하여 측정하였다.

14) **Halogen化 tyrosine**의 **IR-spectrum**의 측정: 日立 EPI-S2로서 측정하였다.

15) **TLC**에 의한 **tyrosine** 및 **halotyrosine**의 **효소합성에 대한 검토**: 반응액을 一定 시간 작용시킨 후 沸騰水중에 2분간 침지하여 침전하는 단백질을 3,500 \times g에서 10분간 遠沈시켜 제거하고 上澄액의 一部를 silica gel의 TLC (Merck, Kiesel gel 60 F 254)를 하여 (展開溶媒; n-butanol : acetic acid : H₂O = 4 : 1 : 1) 0.5% ninhydrin-acetone 용액으로 發色시켜 tyrosine 및 halotyrosine의 효소합성을 검토하였다.

16) **PPC**에 의한 **tyrosine** 및 **halotyrosine**의 **定量**: 효소합성에 의하여 생성된 tyrosine 및 halotyrosine은 東洋濾紙 No. 53, 展開溶媒 n-butanol : acetic acid : H₂O = 4 : 1 : 1 또는 n-propanol : NH₃ : H₂O = 20 : 15 : 3으로 한 PPC로 분리시킨 후 cadmium-ninhydrin 용액에 침지하

여 건조시키고 紅色으로 呈色한 spot 를 切取하고 0.001% Cd-acetate 를 함유하는 75% ethanol 로 추출한 후 500nm 에서 吸光度를 측정하여 定量하였다.¹⁴⁾

Cadmium-ninhydrin 용액은 Cd-acetate 100mg 을 50% 醋酸 10ml 에 용해시켜 acetone 으로 100ml 로 하고 여기에 ninhydrin 1g 를 용해시킨 것이다.

17) Nitrosonaphtol 법에 의한 tyrosine 의 定量 : 95% ethanol 에 용해한 0.1% 1-nitroso-2-naphtol 용액과 5배 희석한 HNO₃에 용해한 0.5% NaNO₃ 용액 각각 1ml 씩을 시료 2ml (tyrosine 0.03~0.8 μmoles 를 함유)에 加한다. 이 반응액을 55°C 에서 30 분간 가열한 후 냉각하고 二鹽化 ethylene 10ml 를 加하여 未反應의 nitrosonaphtol 를 추출 제거시킨다. 水溶液 부분을 2,500×g 로서 10분간 遠沈하고 上澄액을 450nm 에서 比色定量하였다.²⁾

結 果

1) Tyrosine 의 합성 : 효소합성에 의하여 생성된 tyrosine 의 量을 nitrosonaphtol 법으로 定量한 결과를 보면 그림 1 과 같다.

그림 1 에서와 같이 효소의 첨가량에 比例하여 tyrosine 의 생성량이 증가됨이 認定되었다.

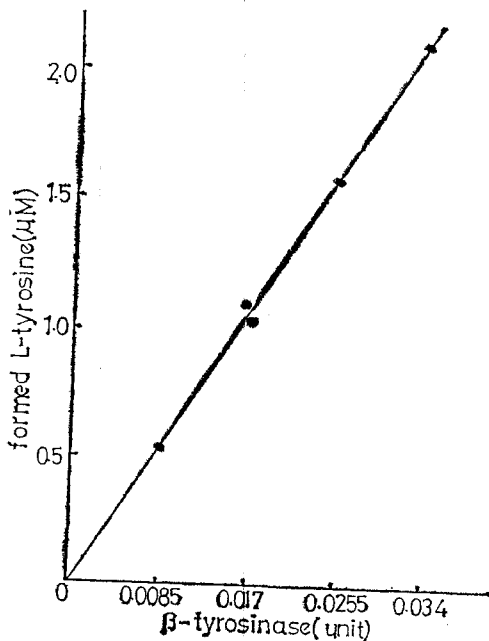


Fig. 1. Formation of L-tyrosine by the α , β -elimination of β -tyrosinase.

2) 2-Chlorotyrosine 의 합성 : *m*-chlorophenol, pyruvin 酸 및 NH₃ 를 基質로 하고 β -tyrosinase 의 α , β -脫離반응의 逆반응을 이용하여 2-chlorotyrosine 의 효소합성을 시도하여 약 3.75m moles 이 반응액 중에 합성되었음이 PPC 법으로 분리하고 cadmium-ninhydrin 법¹⁴⁾으로 定量함으로써 認定되었다.

또한 이 값으로 미루어 *m*-chlorophenol 에서 2-chlorotyrosine 이 합성된 回收率は 약 15.0% 이었다.

3) 2-Bromotyrosine 의 합성 : *m*-bromophenol, pyruvin 酸 및 NH₃ 를 基質로 하고 β -tyrosinase 를 이용하여 2-bromotyrosine 의 효소합성을 시도하였다. 그 결과 반응액 중에 약 5.52m moles 의 2-bromotyrosine 이 합성되었음이 PPC 로 분리하고 cadmium-ninhydrin 법¹⁴⁾으로 定量하는 것으로 認定되었다. 또한 *m*-bromophenol 에서 2-bromotyrosine 이 합성된 回收率は 13.8% 이었다

4) 2-Iodotyrosine 의 합성 : *m*-iodophenol, pyruvin 酸 및 NH₃ 를 基質로 하고 β -tyrosinase 를 이용하여 2-iodotyrosine 의 효소합성을 시도한 결과 약 4.9m moles 의 2-iodotyrosine 이 반응액 중에 합성되었음이 역시 PPC 와 cadmium-ninhydrin 법으로 定量하여 認定할 수 있었다. 또한 *m*-iodophenol 에서 2-iodotyrosine 이 합성된 回收率は 9.8% 이었다.

5) Halogen 化 tyrosine 의 합성 속도 : *m*-halogen 化 phenol, pyruvin 酸 및 NH₃ 를 基質로 하고 β -tyrosinase 의 α , β -脫離作用의 逆반응을 이용하여 halogen 化 tyrosine 이 합성되는 속도를 phenol, pyruvin 酸 및 NH₃ 에서 tyrosine 의 합성속도와 비교 검토하였다. 그 결과 표 1 에 표시한 바와 같이 phenol 에서 tyrosine 의 생성에 비하여 *m*-halogen 化 phenol 에서 2-haloeng 化 tyrosine 의 합성속도는 현저히 저하되었다. 특히

Table 1. Relative rate of halo-tyrosine synthesis from ammonia, pyruvate and halophenol by β -tyrosinase.

Tyrosine derivatives	Synthetic velocity (%)
Tyrosine	100
2-Chlorotyrosine	28.2
2-Bromotyrosine	8.13
2-Iodotyrosine	0.98
3-Iodotyrosine	0.000

鹽素, 臭素, 沃素의 順으로 原子半徑이 증가함에 따라서 halogen化 tyrosine의 融合속도가 低下되는 것이 인정되었다.

6) Halogen化 tyrosine의 분해속도: β -tyrosinase의 α, β -脫離반응에 의한 tyrosine, 2-chlorotyrosine, 2-bromotyrosine 및 2-iodotyrosine의 분해속도를 분해에서 생성되는 pyruvate를 定量하여 檢토했다. 그 결과 표 2에 표시한 바와 같이 鹽素, 臭素, 沃素의 順으로 原子半徑이 크고 電氣陰性度가 적어짐에 따라서 β -tyrosinase의 α, β -脫離반응은 저하되는 것이 뚜렷하였다. 그리고 3-iodotyrosine은 β -tyrosinase의 基質이 되지 않은 것을 알 수 있었다.

Table 2. Relative rate of pyruvate formation from halo-tyrosine derivatives by β -tyrosinase.

Tyrosine derivatives	Degradative velocity (%)
Tyrosine	100
2-Chlorotyrosine	70.7
2-Bromotyrosine	39.0
2-Iodotyrosine	12.6
3-Iodotyrosine	0.0

7) β -Tyrosinase에 대한 halogen化 phenol의 阻害효과: tyrosine을 基質로 하는 β -tyrosinase의 α, β -脫離반응에 대하여 각종 halogen phenol의 영향을 檢토했다. halogen化 phenol의 阻害효과는 표 3에 표시한 바와 같다.

Table 3. Effect of halophenol on the α, β -elimination of β -tyrosinase.

Phenol derivatives	Formed pyruvate(μ mol)	Relative activity
no addition	1,480	100
Phenol	0.235	15.9
<i>p</i> -Chlorophenol	1,250	84.4
<i>o</i> -Chlorophenol	0.980	66.2
<i>m</i> -Chlorophenol	0.950	64.2
<i>p</i> -Bromophenol	1,052	71.1
<i>o</i> -Bromophenol	0.912	61.6
<i>m</i> -Bromophenol	1,332	90.0
<i>p</i> -Iodophenol	1,434	96.7
<i>o</i> -Iodophenol	1,419	95.9
<i>m</i> -Iodophenol	1,336	90.3

표 3에서와 같이 phenol은 현저한 阻害作用을 보였으며 *o*-chlorophenol, *m*-chlorophenol 및 *a*-bromophenol의 阻害도 현저하였다. 반면 iodophenol의 阻害는 僅少하였다.

한편 그림 2는 tyrosine을 基質로 하였을 때 β -tyrosinase의 活性에 대한 *m*-bromophenol의 阻害作用을 Lineweaver-Burk plot에 의하여 표시한 것이다.

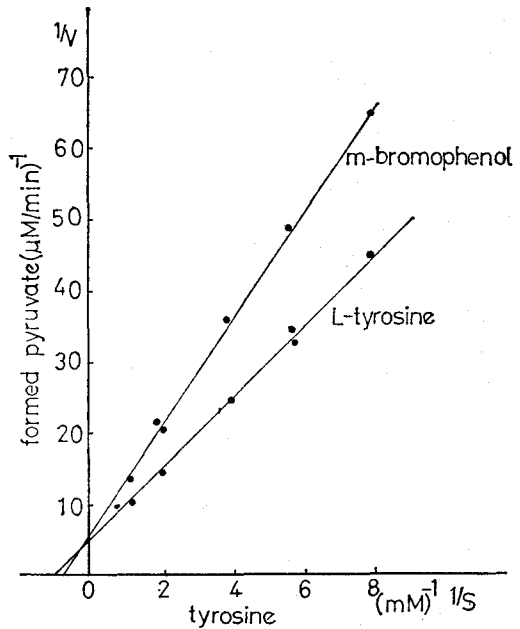


Fig. 2. Inhibition of *m*-bromophenol on the β -elimination reaction of β -tyrosinase.

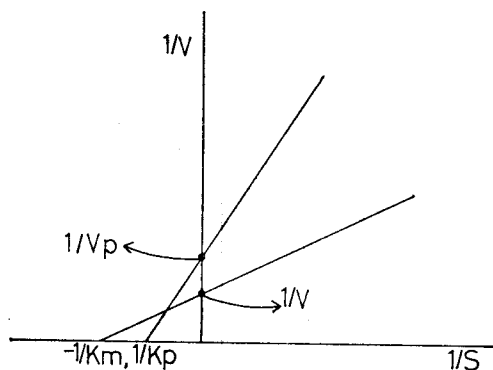
m-bromophenol은 混合型의 阻害型을 나타내었으며 그 K_i 값은 $6.25 \times 10^{-4} M$ 을 보였다. 같은 방법으로 기타의 halogen化 phenol의 K_i 값을 측정하여 표 4에 표시하였다.

Table 4. K_i values of halophenol derivatives for β -tyrosinase

Halophenol derivatives	$K_i (M)$	Type of inhibition
<i>m</i> -Chlorophenol	5.46×10^{-4}	mixed
<i>o</i> -Bromophenol	6.25×10^{-4}	mixed
<i>m</i> -Bromophenol	6.25×10^{-4}	mixed
<i>o</i> -Iodophenol	1.81×10^{-3}	mixed
<i>m</i> -Iodophenol	6.47×10^{-4}	mixed

그리고 K_i 값은 다음 식에 의하여 算出하였다.

$$V_p = \frac{V}{1 + iK_m/K_iK_m'}, \quad K_p = \frac{K_m(1 + i/K_i)}{1 + iK_m'/K_iK_m'}$$



8) 2-Bromotyrosine의 합성에서 *m*-bromophenol의 經濟的 添加效果: β -tyrosinase의 α, β -脫離반응을 이용하여 *m*-bromophenol, pyruvate 및 NH_3 에서 2-bromotyrosine의 합성을 검토한 결과 高濃度의 *m*-bromotyrosine의 존재가 필요하나 同時에 β -tyrosinase는 이로 因하여 變性失活하는 것이 認定되었다.

그림 3에 *m*-bromophenol의 經時的인 첨가 효과를 표시하였다.

그림 3에서와 같이 *m*-bromophenol를 經時的

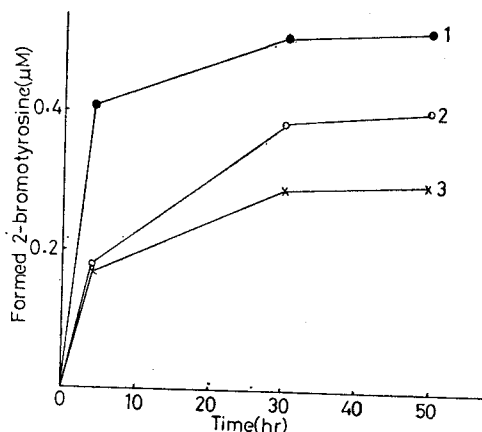


Fig. 3. Effect of feeding of *m*-bromophenol and refreshment of enzyme on the formation of 2-bromotyrosine.

으로 少量씩 첨가하는 것이 2-bromotyrosine의 효소합성에 效果的인 것을 알 수 있었다.

9) Halogen化 tyrosine의 元素分析: β -tyrosinase의 α, β -脫離作用의 逆반응을 이용하여 합성한 halogen化 tyrosine의 C, H, N과 Cl, Br, I의 함량을 분석한 결과를 표 5에 표시하였다.

Table 5. Elemental analyses of 2-chloro-L-tyrosine, 2-bromo-L-tyrosine and 2-iodo-L-tyrosine.

	2-chloro-L-tyrosine				2-bromo-L-tyrosine				2-iodo-L-tyrosine			
Molecular formula	<chem>ClC1=CC=C(C=C1)CC(N)C(=O)O</chem>				<chem>BrC1=CC=C(C=C1)CC(N)C(=O)O</chem>				<chem>IC1=CC=C(C=C1)CC(N)C(=O)O</chem>			
Molecular weight	215.64				260.09				307.09			
Elemental analysis	C%	H%	N%	Cl%	C%	H%	N%	Br%	C%	H%	N%	I%
Calculated	50.13	4.67	6.50	16.44	41.60	3.88	5.39	30.70	35.20	3.28	4.56	41.3
Found	49.32	4.93	6.29	16.09	39.44	4.16	5.15	29.60	33.69	3.62	4.16	39.4

표 5에서와 같이 元素分析한 값은 理論값과 一致되는 결과를 보여 목적한 halo-tyrosine이 正常的으로 합성되었음을 推定하는 한 결과를 보였다.

10) 2-Chloro-L-tyrosine의 構造解析: 효소 합성한 2-chloro-L-tyrosine의 NMR-spectrum를 그림 4에 표시하였다.

그림 4에서와 같이 δ 값 2.84ppm에 ABX의 AB proton(H_A , H_B)에 由來하는 octet의 signal,

δ 값 3.48ppm에 X proton의 quartet의 signal (coupling 定數: $J_{AB}=5.5\text{Hz}$, $J_{AX}=8.5\text{Hz}$ 및 $J_{BX}=8.5\text{Hz}$)이 존재하고 非等價의 methylene proton의 존재를 示唆하고 있다.

한편 低磁場에 나타난 signal은 芳香族의 proton H_a , H_b 및 H_c 에 由來되고 각각 7.02ppm(H_a doublet, coupling 定數 $J_{ab}=8.2\text{Hz}$), 6.52ppm(H_b quartet, coupling 定數 $J_{ab}=8.2\text{Hz}$, $J_{bc}=2.3\text{Hz}$), 6.68ppm(H_c doublet, coupling 定數

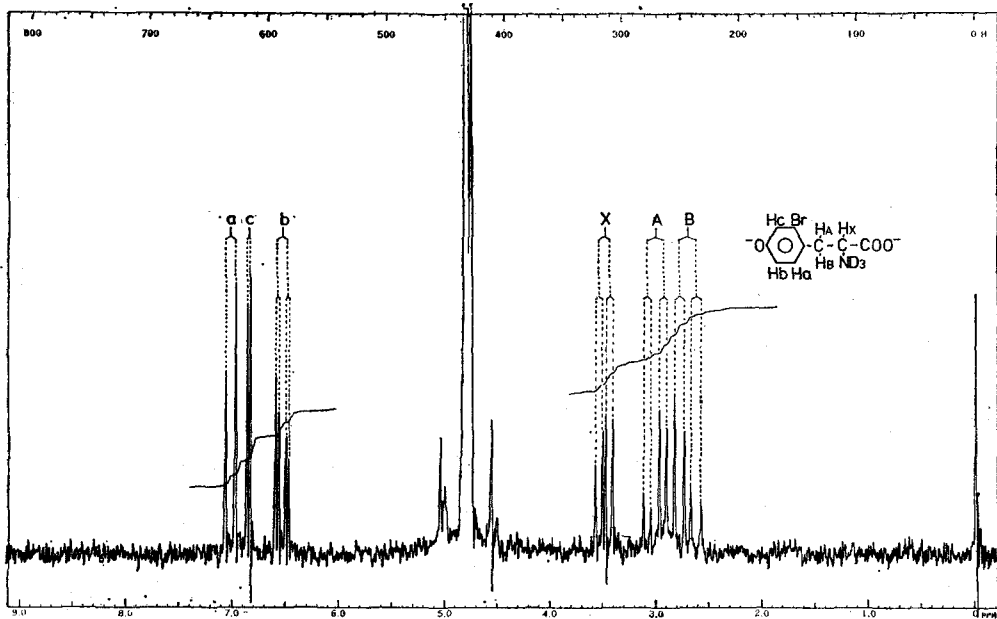


Fig. 4. NMR-spectrum of 2-chloro-L-tyrosine

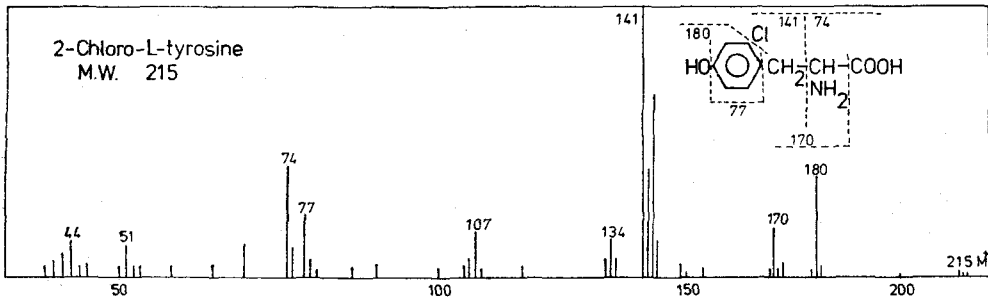


Fig. 5. Mass-spectrum of 2-chloro-L-tyrosine.

$J_{bc}=2.3\text{Hz}$)을 보였다.

그리고 그림 5에 질량 spectrum 을 표시하였다.

m/e 215 에 2-chlorotyrosine 의 분자이온 peak 가 나타나 있다. 분자이온에서 $-\text{COOH}$ 가脫離한

m/e 141 등의 fragment peak 가 强하게 나타나 있음을 볼 수 있다.

한편 IR-spectrum 은 그림 6에 표시하였다.

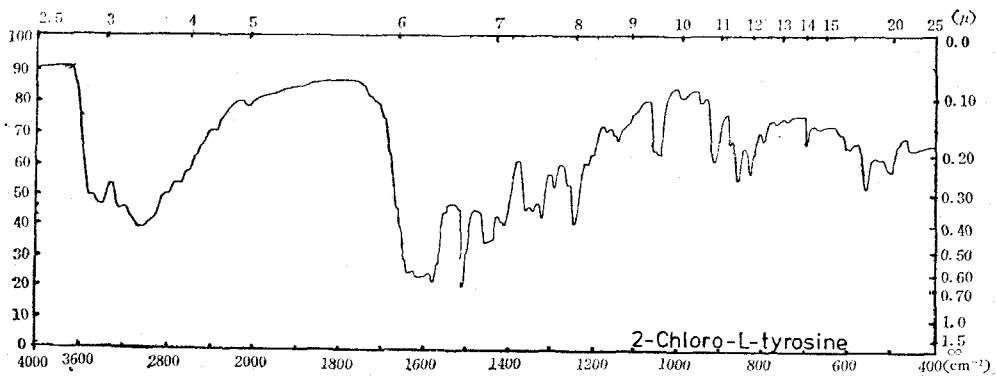


Fig. 6. IR-spectrum of 2-chloro-L-tyrosine

3,400 cm^{-1} 에 $-\text{OH}$, 3,210 cm^{-1} 에 $-\text{NH}$, 3,000 cm^{-1} 에 $-\text{CH}_2\cdot\text{CH}-$, 2,400 cm^{-1} 에 $-\text{COOH}$, 1,630 cm^{-1} 에 $-\text{C}=\text{O}$ 및 1,570 cm^{-1} 에 benzene核에 二重結合의 吸收가 보이며 다시 1,500 cm^{-1} 에 $-\text{NH}$ 에 의한 吸收가 나타나 있다.

그리고 효소합성하여 結晶化시킨 이 物質의 元素分析한 결과는 표 5에 표시한 바와같이 C,N,H 및 Cl의 分析값을 計算값과 잘 一致하였다.

이상의 결과를 綜合하여 *m*-chlorophenol, NH_3 및 pyruvin 酸에서 β -tyrosinase 로 효소합성한 本化合物은 2-chloro-L-tyrosine 으로 同定할 수 있었다.

11) 2-Bromo-L-tyrosine 의 構造解析: 효소합성한 2-bromo-L-tyrosine 의 NMR-spectrum 은 그림 7 과 같다.

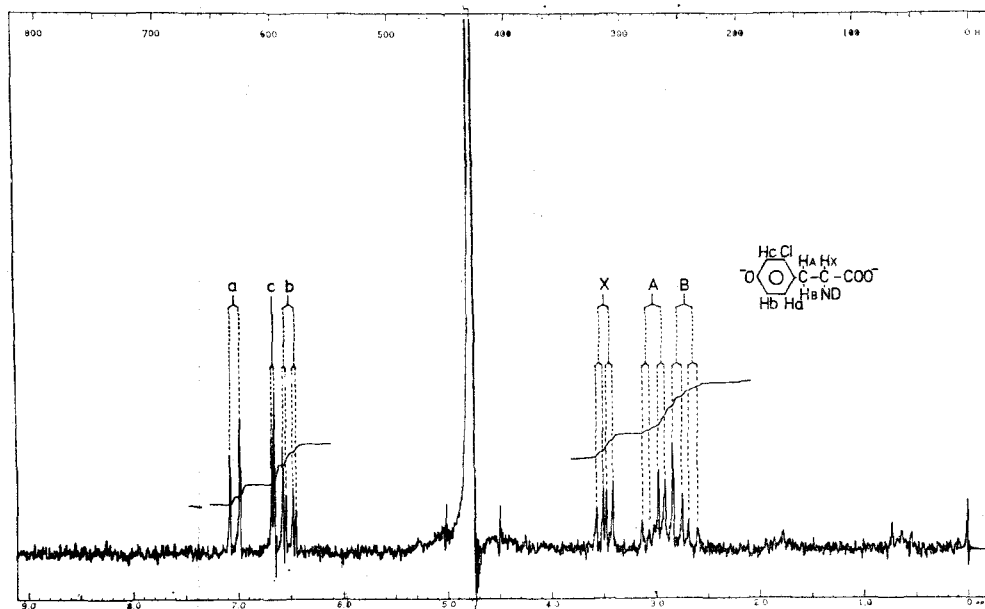


Fig. 7. NMR-spectrum of 2-bromo-L-tyrosine.

그림 7에서와 같이 δ 값 2.84ppm 에 ABX 型의 AB proton(H_A, H_B)에 由來하는 octet 의 signal, δ 값 3.48ppm 에 X proton 의 quartet 의 signal (coupling 定數 $J_{AB}=5.5\text{Hz}$, $J_{AX}=8.5\text{Hz}$ 및 $J_{BX}=8.5\text{Hz}$)가 존재하며 非等價의 methylene proton 의 존재가 暗示되고 있다.

한편 低磁場에 나타난 signal 은 芳香族의 proton

H_a, H_b 및 H_c 에 由來하고 각각 7.02ppm(H_a , doublet, $J_{ab}=8.1\text{Hz}$) 6.53ppm(H_b , quartet, $J_{ab}=8.1\text{Hz}$, $J_{bc}=2.2\text{Hz}$) 6.85ppm(H_c , doublet, $J_{bc}=2.2\text{Hz}$)이다.

다음 質量分析 spectrum 을 그림 8에 표시하였다.

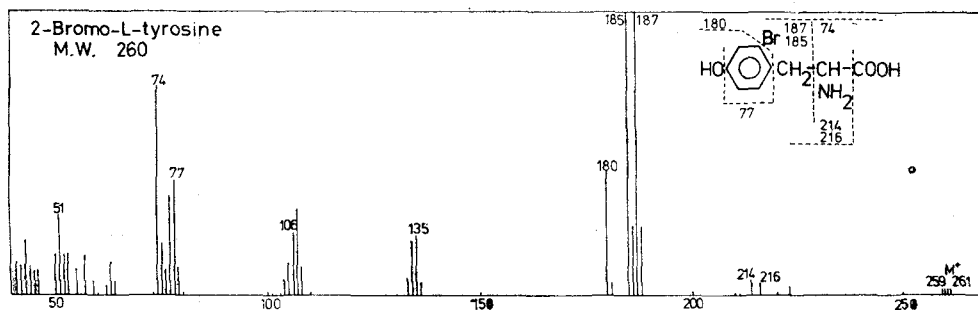


Fig. 8. Mass-spectrum of 2-bromo-L-tyrosine.

m/e 259, m/e 261 에 分子이온 peak 가 2개 나타나 있다. 이것은 Br 의 同位體 peak 에 의한 것이다. 分子이온 peak 에서 $-\text{COOH}$ 가 脫離한 m/e 216, m/e 214, Br 가 脫어진 m/l 180,

$-\text{CH}(\text{NH}_3)\text{COOH}$ 가 脫어진 m/e 187, m/e 185 등의 fragment peak 가 뚜렷이 나타나 있다.

그리고 합성한 2-bromo-L-tyrosine 의 IR-spectrum 을 보면 그림 9 와 같다.

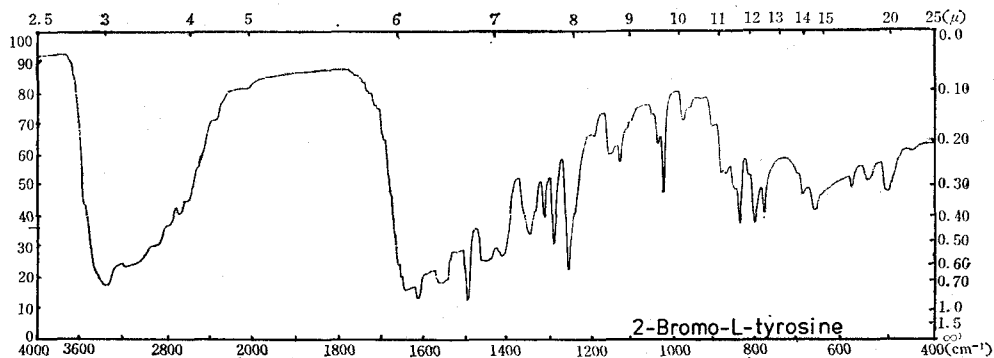


Fig. 9. IR-spectrum of 2-bromo-L-tyrosine

3,400 cm^{-1} 에 $-\text{OH}$, 3,210 cm^{-1} 에 $-\text{NH}$, 3,000 cm^{-1} 에 $-\text{CH}_2\cdot\text{CH}-$, 2,400 cm^{-1} 에 $-\text{COOH}$, 1,630 cm^{-1} 에 $-\text{C}=\text{O}$, 1,570 cm^{-1} 에 benzene 核의 二重結合의 吸收가 나타나 있다. 또한 1,500 cm^{-1} 에 $-\text{NH}$ 에 의한 吸收가 보인다.

本物質의 元素分析 결과는 표 5에서와 같이 C, N, H 및 Br 의 값이 各己의 記算값과 잘 一致하였다.

以上の 결과로 *m*-bromophenol, NH_3 및 pyruvic 酸에서 β -tyrosinase 에 의하여 酵素合成된 本物質은 2-bromo-L-tyrosine 으로 同定할 수 있다.

12) 2-Iodo-L-tyrosine 의 構造解析: β -tyrosinase 의 α, β -脫離作用의 逆反應을 이용하여 합성한 2-iodo-L-tyrosine 의 構造解析을 위하여 측정된 NMR-spectrum 을 그림 10 에 표시하였다.

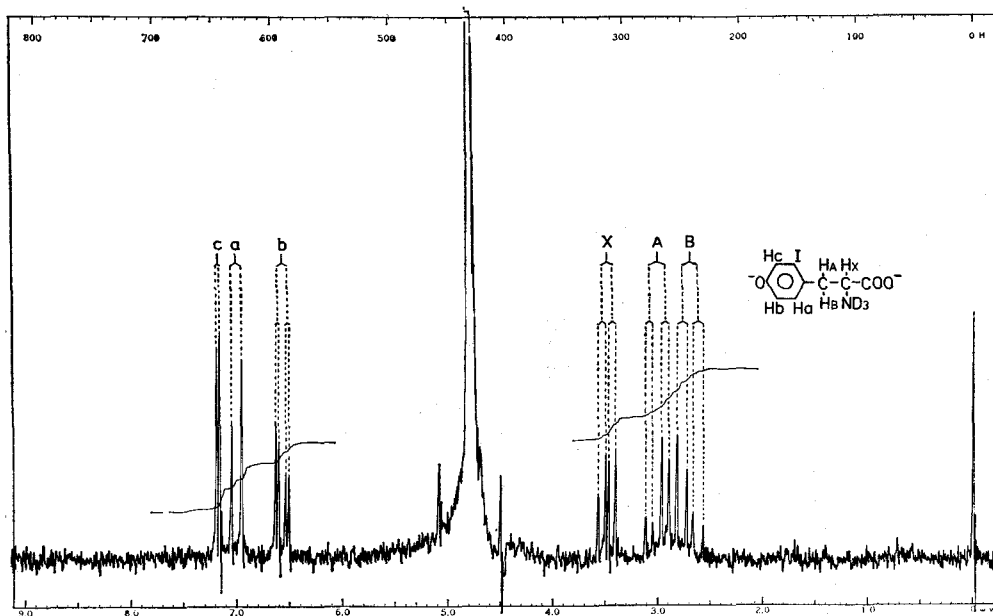


Fig. 10. NMR-spectrum of 2-iodo-L-tyrosine.

그림 10에서와 같이 δ 값 2.84ppm에 *ABX*型的 *AB* proton(H_A, H_B)에 由來하는 octet의 signal, δ 값 3.48ppm에 *X* proton의 quartet의 signal(coupling 定數 $J_{AB} \approx 5.5$ Hz, $J_{AX} = 8.5$ Hz 및 $J_{BX} = 8.5$ Hz)이 존재하고, 非等價의 methylene proton의 존재가 示唆되고 있다. 低磁場에 나타난

signal은 芳香族의 proton H_a, H_b 및 H_c 에 由來하고 各各 700ppm(H_a , doublet, $J_{ab} = 8.1$ Hz), 6.57ppm(H_b , quartet, $J_{ab} = 8.1$ Hz, $J_{bc} = 2.2$ Hz) 7.17ppm(H_c , doublet, $J_{bc} = 2.2$ Hz)이다.

그림 11은 本合成物質의 質量分析 spectrum를 표시한 것이다.

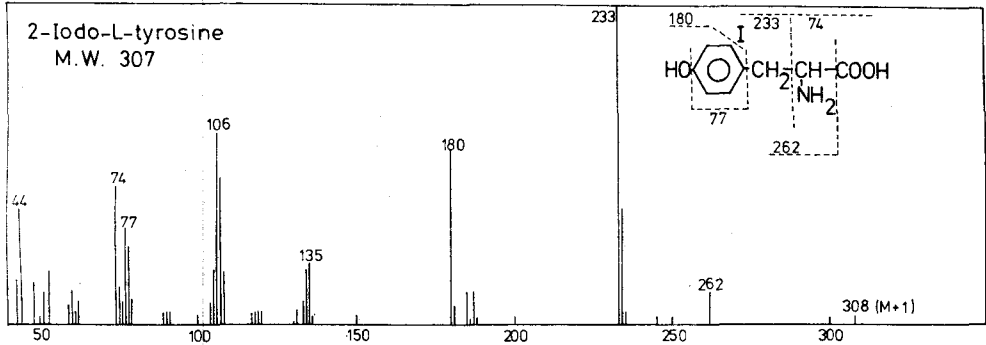


Fig. 11. Mass-spectrum of 2-iodo-L-tyrosine

m/e 308에 $M+1$ 의 이온 peak가 나타나 있다. 分子이온 peak에서 $-\text{COOH}$ 가 떨어진 m/e 262, I 가 떨어진 m/e 180, $-\text{CH}(\text{NH}_2)\cdot\text{COOH}$ 가 떨어진 m/e 233의 fragment peak도 현저히 나타

나 있다.

그리고 그림 12에 本合成物質의 IR-spectrum를 표시하였다.

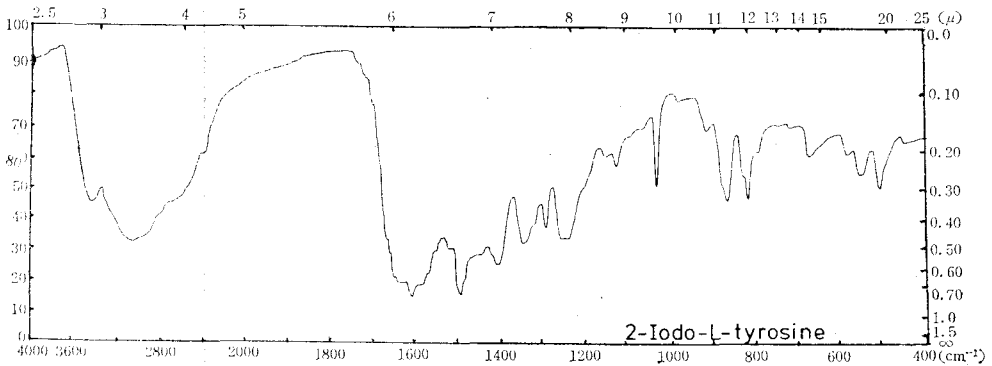


Fig. IR-spectrum of 2-iodo-L-tyrosine.

3,400 cm^{-1} 에 $-\text{OH}$, 3,210 cm^{-1} 에 $-\text{NH}$, 3,000 cm^{-1} 에 $-\text{CH}_2-\text{CH}-$, 2,400 cm^{-1} 에 $-\text{COOH}$, 1,630 cm^{-1} 에 $-\text{C}=\text{O}$, 1,570 cm^{-1} 에 benzene核의 二重結合의 吸收가 보인다. 또한 1,500 cm^{-1} 에 $-\text{NH}$ 에 의한 吸收가 나타나 있다.

한편 結晶化시킨 合成物質의 元素分析을 한 結果는 표 5에서와 같이 C, N, H 및 I의 값은 計算값에 잘 一致되었다.

以上の 結果로서 *m*-iodophenol, NH_3 , pyruvate에서 β -tyrosinase를 利用하여 효소合成한 本化合物은 2-iodo-L-tyrosine으로 同定할 수 있

었다.

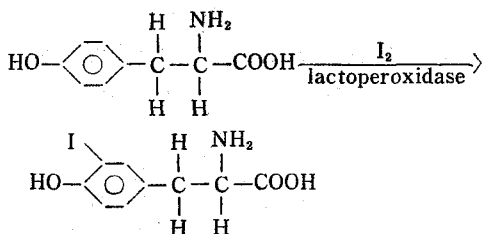
考 察

本研究는 β -tyrosinase에 의한 2-halogen化 tyrosine의 효소合成을 검토하였다.

m-chlorophenol, *m*-bromophenol 및 *m*-iodophenol에서 각각 2-chlorotyrosine, 2-bromotyrosine 및 2-iodotyrosine을 효소合成할 수 있다는 것을 그 반응生成물을 結晶狀으로 單離하여 同定함으로써 알 수 있었다.

한편 halogen化 tyrosine의 효소合成법으로서

는 沃素의 존재하에서 lactoperoxidase의 반응에 의하여 3-iodotyrosine이 합성된다는 것이 報告되어 있다.¹⁶⁻¹⁸⁾



halogen化 tyrosine은 물에 대한 溶解도가 tyrosine에 比하여 相當히 높으므로 phenol에서 tyrosine의 합성에서와 같이 생성물이 반응액 중에析出되어 나오는 일은 볼 수 없다.

그리고 halogen化 phenol에서 halogen化 tyrosine의 生成收率は 첨가한 halogen化 phenol의 約 10%前後이다. 효소합성의 반응에서 phenol에 比하여 halogen化 phenol은 蛋白質變性作用이 강하여 반응시간의 경과와 더불어 變性蛋白質의 침전이 보이게 된다. 그러므로 過多量の halogen化 phenol의 존재하에서 halogen化 tyrosine의 효소합성을 하는 것은 不利한 것이며 halogen化 tyrosine의 합성은 halogen化 phenol과 β -tyrosinase를 서서히 첨가하는 것이 重要하다.

이 研究報文中에서는 記述하지 않았으나 3-fluorophenol에서 β -tyrosinase를 이용한 2-fluorotyrosine의 합성도 이루어졌었다. 또 3-halogen化 tyrosine의 합성에 대하여서는 2-halogen化 phenol에서 합성된다는 것이 TLC에 의하여 검토되어 認定되고 있으나 반응시간이 길어짐에 따라 또는 精製單離의 과정에서 3의 위치의 halogen原子가 離脫하여 tyrosine이 생성되어지는 것을 볼 수 있어 새로운 精製單離법이 요망된다. 이와 같은 現象은 3-bromotyrosine 및 3-chlorotyrosine에서 더욱 顯著하다.

한편 3-iodotyrosine은 이 β -tyrosinase의 基質이 되지 않으며 따라서 2-iodophenol에서 3-iodotyrosine의 합성은 되지 않는다. 이것은 tyrosine에 대한 β -tyrosinase의 α, β -脫離반응에는 benzene環의 水酸基가 필요한 것이나 이 近邊에 沃素原子와 같이 큰 原子가 존재하면 水酸基와 酵素와의 상호작용에 立體的인 阻害現象이 나타나는 것으로 생각된다. 故로 3-iodotyrosine은 이 β -tyrosinase의 α, β -脫離반응을 받지 않는 것이라고 생각된다.

要 約

Escherichia intermedia A-21의 菌體에서 얻은 β -tyrosinase의 α, β -脫離作用의 逆반응을 이용하여 L-tyrosine, 2-chloro-L-tyrosine, 2-bromo-L-tyrosine 및 2-iodo-L-tyrosine을 효소합성하고 그들의 元素分析과 NMR-spectrum, Mass-spectrum 및 IR-spectrum을 측정하여 그 構造解析을 하였다. 또한 β -tyrosinase에 의한 各 halogen化 tyrosine의 합성속도와 분해속도 그리고 halogen化 phenol의 β -tyrosinase에 대한 阻害作用 및 2-bromotyrosine의 합성에서 *m*-bromophenol의 經時的 첨가효과 등을 검토하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1) β -tyrosinase를 이용하여 pyruvin酸, NH_3 그리고 *m*-chlorophenol, *m*-bromophenol 및 *m*-iodophenol 등을 기질로 한 各 halogen化 tyrosine의 효소합성에서 *m*-chlorophenol에서 2-chlorotyrosine은 約 15%, *m*-bromophenol에서 2-bromotyrosine은 約 13.8% 그리고 *m*-iodophenol에서 2-iodotyrosine은 約 9.8%의 回收率로 각각 얻어졌었다.

2) β -tyrosinase에 의한 tyrosine 및 halogen化 tyrosine의 합성에서 tyrosine의 합성속도를 100으로 하였을 때 2-chlorotyrosine은 28.2, 2-bromotyrosine은 8.13 그리고 2-iodotyrosine은 0.98의 상대속도를 보여 halogen化 tyrosine의 합성속도가 느렸다. 특히 Cl, Br, I의 順으로 原子半徑이 增加함에 따라서 halogen化 tyrosine의 합성속도가 低下되는 것이 認定되었다.

한편 3-iodotyrosine은 합성이 되지 않았다.

3) β -tyrosinase에 의한 tyrosine의 분해속도를 100으로 하였을 때 2-chlorotyrosine은 70.7, 2-bromotyrosine은 39.0, 2-iodotyrosine은 12.6의 상대적인 분해속도를 보였다. 즉 Cl, Br, I의 順으로 原子半徑이 크고 電氣陰性도가 적어짐에 따라서 분해속도가 低下되는 것이 分明하였다 그리고 역시 3-iodotyrosine은 분해를 받지 않았다.

4) β -tyrosinase의 活性에 대하여 phenol은 현저한 阻害作用을 보였으며 *o*- 및 *m*-chlorophenol과 *o*-bromophenol의 阻害도 현저하였다. 반면 iodophenol의 阻害는 極少하였으며 이들의 阻害作用을 Lineweaver-Burk plot법에 따라 측정한 결과 *m*-chlorophenol은 混合型的 阻害作用을 보

였으며 그 K_i 값은 $5.46 \times 10^{-4} M$ 이었다.

5) β -tyrosinase 에 의한 2-bromotyrosine 의 합성에서 기질인 *m*-bromophenol 은 經時的으로 少量씩 첨가하는 것이 효과적이었다.

6) β -tyrosinase 를 이용하여 pyruvin 酸, NH_3 및 各 halogen 化 phenol 에서 합성한 2-halogen 化 tyrosine 들을 各各 元素分析하고 또한 NMR-spectrum, Mass-spectrum 그리고 IR-spectrum 등으로 측정하여 그들의 構造를 解析한 결과 各各 2-chloro-L-tyrosine, 2-bromo-L-tyrosine 및 2-iodo-L-tyrosine 임을 認定할 수 있었다.

參 考 文 獻

- 1) 金燦祚, 長沢 透, 谷 吉樹, 山田 秀明: 韓農化 **22**, (1), 191(1979)
- 2) 和田 博: 生理活性アミノ酸誘導體の生化學(アミノ酸, アミンと醫藥), 日本農藝化學會 Symposium, 1979年度 講演要旨集 p. 513
- 3) S. Udenfriend and J.R. Copper *J. Biol. Chem.* **196**, 227(1952)
S. Udenfriend: "Method in Enzymology" ed. by S.P. Colowick, N.O. Kaplan, Academic press, New York, Vol. 3 p. 610(1957)
- 4) 山田 秀明: *ビタミン*, **51**, 463(1977)
- 5) H. Yamada and H. Kumagai: "Advances in applied microbiology" Vol. 19, p. 249~288 (1975), Academic Press, INC, New York.
- 6) H. Enei, H. Nakazawa, H. Matsui, S. Okumura and H. Yamada: *FEBS letters*, **21**, 39 (1972)
- 7) H. Nakazawa, H. Enei, S. Okumura and H. Yamada: *Agri. Biol. Chem.*, **36**, 2523(1972)
- 8) H. Yamada and H. Kumagai, et al.: *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **46**, 370(1972)
- 9) 山田 秀明: 日本應用酵素協會誌; No. 12, p. 14 (1977)
- 10) T. Ueno, H. Fukami, H. Ohkishi, H. Kumagai and H. Yamada: *Biochim. Biophys. Acta*, **206**, 476(1970)
- 11) H. Yoshida and H. Yamada: *FEBS letters*, **25**, 43(1972)
- 12) 山田 秀明: *ビタミン*, **53**, 41(1979)
- 13) H. Yamada and H. Kumagai: *Pure & Appl. Chem.*, **50**, 1117(1978)
- 14) 日本生化學會編: 生化學實驗講座11, アミノ酸代謝と生體アミン(上) p. 72~73, 東京化學同人社(1976)
- 15) T.E. Friedemann and G.E.: Haugen *J. Biol. Chem.*, **147**, 415(1943)
- 16) J. Roche, S. Lissitzky, O. Michel and R. Michel: *Biochim. Biophys. Acta.* **7**, 439(1951)
- 17) I. Covelli and J. Wolff: *J. Biol. Chem.*, **241**, 4444(1966)
- 18) J. M. Gleiser and R.L. Blakley: *J. Biol. Chem.*, **250**, 1580(1975)