

反応場の特性を基盤とする反応制御と実用的試薬の開発研究

国嶋 崇隆

The Studies on Reaction Control and Development of New Practical Reagents Based on Characteristics of Reaction Field

Munetaka KUNISHIMA

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kobe Gakuin University, 1-1-3 Minatojima, Chuo-ku, Kobe 650-8586, Japan

(Received August 28, 2007)

Reaction rates and selectivities can be critically affected by the reaction field. Using a diverse set of reagents and reaction systems, the author reviews a variety of ways to control the reaction field. In the first example, we discuss 4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholinium chloride (DMT-MM), which serves as an exceptionally convenient reagent for dehydrocondensation. In particular, formation of carboxamide by DMT-MM was found to take place even if water or alcohol were used as a reaction medium. Thus, chemical modification of carboxyl groups and/or amino groups of highly polar substrates, such as amino acid derivatives, peptides, glyco-chains, and nucleotides, can be simply effected by mixing them with DMT-MM in aqueous or alcoholic solvents. The author also found that a tertiary amine catalyzes the activation step of carboxylic acid with 2-chloro-4,6-dimethoxy-1,3,5-triazine (CDMT) *via* in situ generation of coupling reagents. Proceeding further in this direction, we determined that artificial acyltransferase and cyclotransferase could be formed by conjugation of a tertiary amine catalyst to host-molecules to mimic a substrate binding site. Finally, the micellar interface, well known for promoting hydrolysis, clearly provides a superior reaction field for dehydrocondensation. When a 1,3,5-triazine-type amphiphilic dehydrocondensing agent was used, bimolecular dehydrocondensation between amphiphilic carboxylate and amines was highly accelerated (2000-fold) in a micellar system. Spontaneous membrane fusion was induced by adoption of the micellar reaction in the ceramide synthesis at the surface of membranes. All together, these diverse findings strongly support the central importance of the reaction field in controlling reaction rates and selectivity.

Key words—reaction field; amide; dehydrating condensation; biomimetic reaction; rate acceleration; polymer

1. はじめに

有機化学反応の促進を主な目的とする場合には、強い反応剤や高反応性の基質を用いたり、加熱や高濃度条件にしたりするなど、厳しい反応条件にすることが通常最も簡単な方法だと考えられる。このような強い条件下では、化学合成上重要となる様々な選択性の低下がしばしば問題となるため、反応制御の工夫が必要になる。また、高反応性の化合物を用いる場合、湿気や酸素等の混入による反応剤や中間体の分解を回避したり、実験者の安全確保のために特別な反応装置や実験設備を用いたり、あるいは試

薬の取り扱いや添加方法などに特段の注意を払うことを余儀なくされたりすることがある。

一方、われわれの生体内で行われている酵素反応では 37°C 常圧という温和な条件下にも係わらず反応は劇的に加速されている。例えばキモトリプシンでは、アスパラギン酸、ヒスチジン、セリンのいわゆる触媒 3 残基の作用によって無触媒時と比べて約 4000 倍の反応加速が認められている (Fig. 1)。¹⁾ カルボン酸、イミダゾール、水酸基という極めて安定で反応性の低い「温和な反応剤」を用いていながら反応は十分に促進されている訳である。その 1 つの理由として、これらの官能基が反応部位において反応の進行に最も都合のよい形 (距離や配向性) に特異的に配置されていることが挙げられる。²⁾ すなわち酵素反応は、反応場が最も効果的に機能しているよい手本であり、これが適切でありさえすれば過酷

神戸学院大学薬学部 (〒650-8586 神戸市中央区港島 1-1-3)

e-mail: kunisima@pharm.kobegakuin.ac.jp

本総説は、平成 19 年度日本薬学会学術振興賞の受賞を記念して記述したものである。

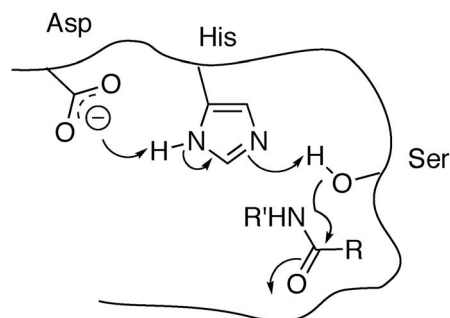


Fig. 1. Charge Relay System of the Catalytic Triad

な条件に付すことなく温和な条件でも著しい反応加速を実現できることを明確に示している。

本総説では、反応溶媒、不均一系、ホスト化合物、分子集合体など、広い意味での反応場に焦点を当てて筆者らが開発してきた反応（剤）について述べたい。

2. トリアジンを基盤とする脱水縮合剤

アミドやエステルは、タンパクや脂質などの生体分子、医薬品などの生理活性物質、さらに化成品やポリマーなど様々な有機化合物中に頻繁に存在する官能基である。中でも、日本の汎用医薬品のおよそ半数がその主要成分の分子構造中にアミドやエステルを有しているということは興味深い。一方、有機合成では、官能基変換のための足場や保護基としてアミドやエステルが利用されることも多く、最終的な製品の構造には現れなくても、それらの合成過程を含めれば潜在的な出現頻度はさらに高いと思われる。したがってこれらの官能基を構築する効率的で優れた反応（剤）の開発には大きな意義がある。このような背景の基に筆者らはその最も一般的で有用性の高い手法の1つとして脱水縮合反応に着目し、新しい機能を有する縮合剤を開発した。

2-Chloro-4,6-dimethoxy-1,3,5-triazine (CDMT) は、カルボン酸の活性化剤として良好な反応性を示すことが知られており、経済的にも優れているが、強い刺激性があり、カップリング剤としてはほとんど利用されていなかった。筆者らは、CDMTの塩素をメチルモルホリンに置換した水溶性の4級アンモニウム塩 4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholinium chloride (DMT-MM)を合成・同定し、これが非常に優れた脱水縮合剤であることを明らかにした (Fig. 2)。^{3,4)} 難揮発性の塩にすることによって CDMT にみられた飛散性や刺激性の間

題が大幅に改善された。加えて顕著な毒性や吸湿性もない安定な固体なので、取り扱いが容易である。反応はいたって簡単であり、基質の混合液に縮合剤を加えるという「混ぜるだけ」の操作で、室温、数十分から数時間でアミドやエステルが得られる。DMT-MMは合成化学で一般に用いられるほとんどの有機溶媒に難溶又は不溶であるが、カルボン酸が溶けてさえいれば、どの溶媒中でも反応は良好な収率で進行する。反応は Fig. 2 に示すような機構で進行し、反応剤に由来して生成する 2-hydroxy-4,6-dimethoxy-1,3,5-triazine (HO-DMT) は、高い水溶性を有するため通常の分液操作によって生成物から簡単に分離除去できる。⁵⁾

奇しくも、筆者らの研究と前後して、ポーランドの Kaminski のグループも DMT-MM に関する報告を発表したが、その脱水縮合反応収率は、筆者らの結果とはかけ離れて低いものであった。⁶⁾ そこで、化合物データを詳細に比較した結果、Kaminski らが DMT-MM として同定していた化合物は実際には脱クロロメチル化によって生じた分解物 (DMTM) であることが明らかになった (Fig. 2)。この分解反応は NMR の測定溶媒である重クロロホルム中で速やかに起こり、生じたクロロメタンの化学シフト (3.06 ppm) が DMT-MM の N-Me 基の化学シフト (3.03 ppm) とほぼ同じ値を示すことから、分解に気付くことなく誤った同定をしたものと推測される。恐らく Kaminski らは DMTM を多量に含む DMT-MM を用いたため、縮合剤としての本来の有用性を見い出すには至らなかったものと思われる。

筆者らは、この分解反応については早い段階から認識しており、Kaminski らの論文を訂正すると同時に、THF 等の有機溶媒中で DMT-MM が優れた縮合能を示すことを報告した。³⁾ この際、水やアルコールのようなプロトン性溶媒中ではこのような脱



国嶋崇隆

神戸学院大学薬学部教授 (2008年3月より金沢大学大学院自然科学研究科教授)。1961年岐阜県生まれ。京都大学大学院薬学研究科薬学専攻博士課程修了。1989年神戸学院大学薬学部助手、1997年講師、2003年助教授、2007年教授。この間ニューヨーク州立大学及びメリランド大学に留学。専門：生物有機化学。

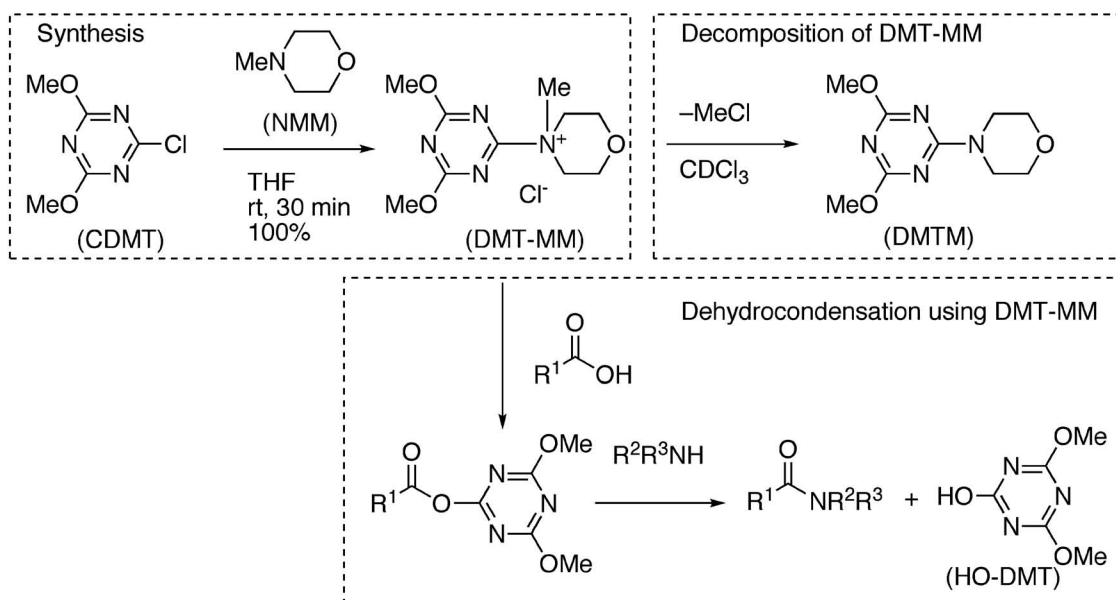


Fig. 2. Synthesis and Reaction of DMT-MM

メチル化が起きず、意外にも加溶媒分解を受けることもなく DMT-MM が安定であることを見出し、以下の研究へと展開するに至った。

2-1. プロトン性溶媒中での脱水縮合反応 一般に脱水縮合反応はカルボン酸の活性化と引き続くアミンやアルコールのアシル化からなる 2 段階反応であり、第 1 段階に用いられる活性化剤（脱水縮合剤やカップリング剤）やこれによって生じた活性化中間体が、水、アルコール、あるいはアミンなどに高い反応性を示す。そのため、一般に反応は乾燥条件下（無水条件下）で行われ、活性中間体が生成したあとにアミンやアルコールを加えるなど、試薬や基質の添加順序にも注意が必要である。

筆者らは前項で述べた通り、DMT-MM がプロトン性溶媒に可溶かつその溶液が思いのほか安定であったことから、カルボン酸とアミンの脱水縮合反応を水やアルコール中で試みたところ、いずれの溶媒中でも収率よくアミドを得ることができた。⁷⁾ 例えば、Fig. 3 に示す 3-フェニルプロピオン酸と 2-フェニルエタンアミンとの反応をメタノール中に行うと、アミド **1** が 98% の収率に対してメチルエステル **2** は 1% しか得られなかった。この結果から、トリアジノエステル中間体のアミノリシス速度はメタノリシス速度の 2 万倍以上大きいことが分かる。一方、同じ反応を 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) を用いて行ったところ、エス

テルがかなりの割合で生成し、実用に耐え得るような結果ではなかった。その他の例を合わせて Fig. 3 に示すが、ジカルボン酸は一般的な有機溶媒に難溶であるため通常のカップリング剤を用いた温和な条件下ではアミドへ直接変換することは容易ではないが、その塩は水溶性が高いため、アミンとの混合物を水やアルコール中で DMT-MM と処理すると収率よくジアミド **3** に変換できる。一般に *N*-アセチル化には塩化アセチルや無水酢酸を用いるが、DMT-MM と酢酸ナトリウムで代用できる。例えばアミノ酸塩酸塩はメタノール中 91% の収率でアセチル化できる。アルコール性の水酸基が邪魔にならないので、糖の水酸基を保護する必要がなく、グルコサミン塩酸塩のアセチル化はアミノ基上において定量的かつ選択的に進行する。

カルボキシル基やアミノ基は極性官能基であり、低極性の有機溶媒に対して難溶なものも多いことを考慮すると、溶媒に水やアルコールが使用できるということは本質的に理に適ったものといえる。DMT-MM は現在、国内外多数のメーカーが製造販売しており、多様な利用が試みられている。その多くは従来の無水条件下では合成できないものであり、例えば、DNA の相補的な結合を利用したアミド化、ヒドロゲルの合成、糖鎖の合成や化学修飾など、水を反応場とする利用例が多くあげられる。⁸⁻¹¹⁾

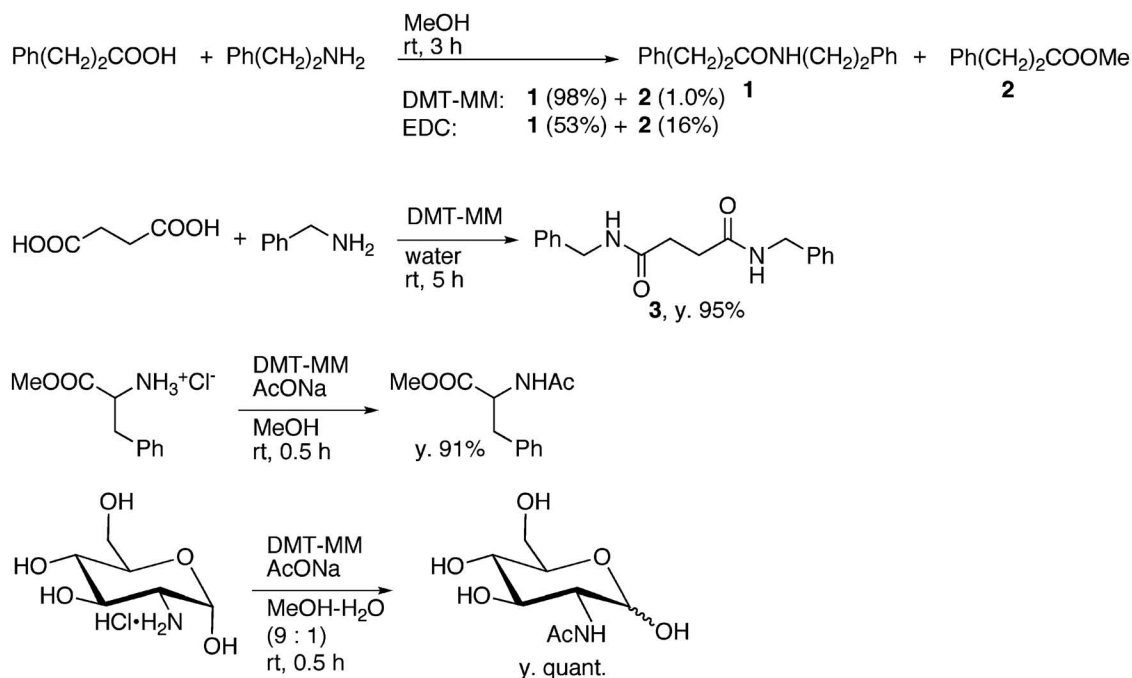


Fig. 3. Dehydrocondensation Using DMT-MM in Protic Solvents

2-2. ペプチド合成とラセミ化 アミド結合を有する最も重要な生体分子はペプチドやタンパク質であり、DMT-MMはペプチド合成試薬の有用な選択肢の1つとしても期待される。Taddeiらは数種のオリゴペプチド**4**の固相合成においてDMT-MMの有用性を評価し、化学収率や純度の点で(benzotriazol-1-yloxy)tripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate (PyBOP)と同等であると結論している (Fig. 4).¹²⁾ 筆者らは、メタノールを溶媒にした液相中でジペプチド**5**の合成を検討した結果、ラセミ化によるエピマーの生成は全く認められず、従来のペプチドカップリング試薬と同様に窒素上にウレタン型の保護基を有するアミノ酸では、カルボキシル基の活性中間体のラセミ化は進行しないことが明らかとなった。⁷⁾ ラセミ化がより大きな問題となるのは2つのペプチド鎖をつなぐいわゆるセグメント結合であり、縮合剤と反応するペプチドC端のアミノ酸のラセミ化を防ぐことは重要な課題である。そこで、DMT-MMを用いたトリペプチド**6**の液相合成をモデルにして、¹³⁾ 各種溶媒中におけるラセミ化について検討した結果、¹⁴⁾ 通常の高極性有機溶媒中ではラセミ化はほとんど起きないことが明らかとなった。これに対しDMT-MMの特性でもある水中では10.5%、メタノール中では3.3%のラセ

ミ化がそれぞれ起きたが、2-プロパノール中では0.7%まで抑制された。ラセミ化の程度と用いた溶媒の比誘電率との間に若干の相関がみられたため、溶媒の極性が重要な因子と思われる。

2-4. エステル化反応 上述のように、DMT-MMを用いた活性トリアジノエステルのメタノリシス速度はアミノリシスのそれと比べて非常に遅い。しかし、このことはエステル合成ができないことを意味している訳ではない。もし、縮合するアミンが共存しなければアルコール溶媒中で速やかにエステルが生成する。^{4,15)} 反応はFig. 5に示すような機構で進行すると考えられ、その促進にはNMMのような触媒量の塩基が必要である。立体障害の大きな第3級アルキルエステルは酸性条件下でのO-アルキル化によって合成することが多いが、*t*-ブチルアルコール中でDMT-MMとカルボン酸を混ぜるだけで対応する*t*-ブチルエステルを得ることができる。本法はアルコール溶媒中酸性条件下で行うFischer型反応と比べて中性から弱塩基性で進行する相補的方法として有用である。

一方、THF溶媒中化学量論量のアルコールとの反応では反応時間の延長(室温24時間)と若干の収率の低下が認められたものの、エステルを得ることは可能である。トリアジノエステルの反応性が適

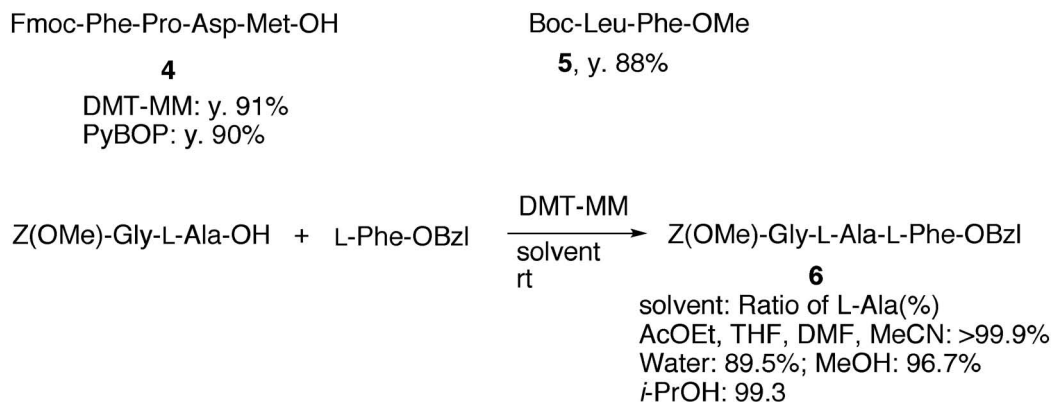


Fig. 4. Racemization Test in Peptide Bond Formation

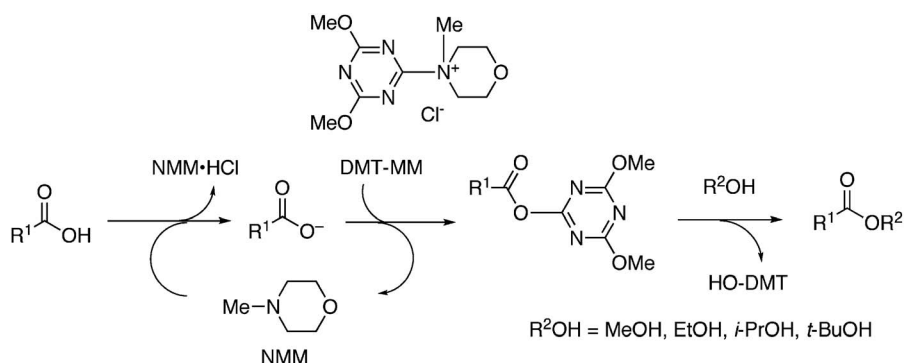


Fig. 5. Reaction Mechanism of Esterification

度に低いために求核性の低いアルコールとの反応が遅いことが収率低下の理由と考えられる。

2-5. 再生と再利用 近年、環境保護に対する意識の高まりとともに、有機合成においても省資源、省エネルギー、廃棄物の削減などが重要な課題となっている。一般に化学量論量の反応剤を用いる脱水縮合反応では、反応剤に由来する副産物の生成が避けられないことから、これらを効果的に回収・再利用することが特に望まれる。反応の進行に伴って DMT-MM から生ずる HO-DMT は、高い水溶性のため水洗によって簡単に生成物から除去できるので dicyclohexylcarbodiimide (DCC) から生ずる尿素誘導体にみられるような分離精製の問題がない。また (benzotriazol-1-yloxy)tris(dimethylamino)phosphonium hexafluorophosphate (BOP) にみられる発がん性物質 hexamethylphosphoramide (HMPA) 生成の問題がないことも大きな利点である。しかしながら、プロセス合成を前提とした場合には上記のような環境面における配慮は必須であり、その回収法の確立と再利用法の開発を行った。¹⁶⁾

DMT-MM の大きな特色でもあるメタノール中での縮合反応をモデルにした場合、反応混合物を 1 M 程度になるまで減圧濃縮するだけでほとんどの HO-DMT が無色固体として析出してくる。単離された HO-DMT はオキシ塩化リン/ジエチルアニリンを用いて CDMT へと変換可能である (Fig. 6)。また、トリフルオロメタンスルホン酸無水物を用いると TfO-DMT へと変換でき、このものは NMM との処理によってトリフラートを対アニオンに持つ縮合剤 DMT-MM (TfO) を与える。上述した通り DMT-MM の安定性に関する最大の問題は、クロロホルムなどの低極性溶媒に懸濁するだけで容易に進行する分解反応であり、対アニオンである塩素イオンによるモルホリニウム上のメチル基への求核攻撃によって引き起こされる。これに対し、求核性の低いトリフラートを対アニオンとする DMT-MM (TfO) は、クロロホルム中でも非常に安定であり、NMM 以外の 3 級アミンをトリアジン環に導入した関連誘導体の合成に有効である。

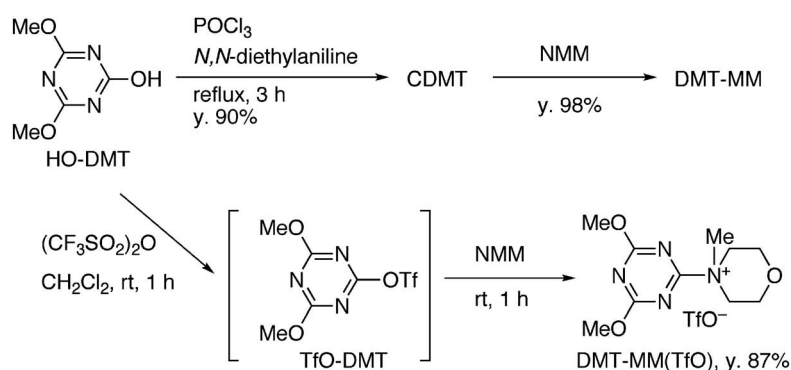


Fig. 6. Regeneration of DMT-MM from HO-DMT (Recycle of DMT-MM)

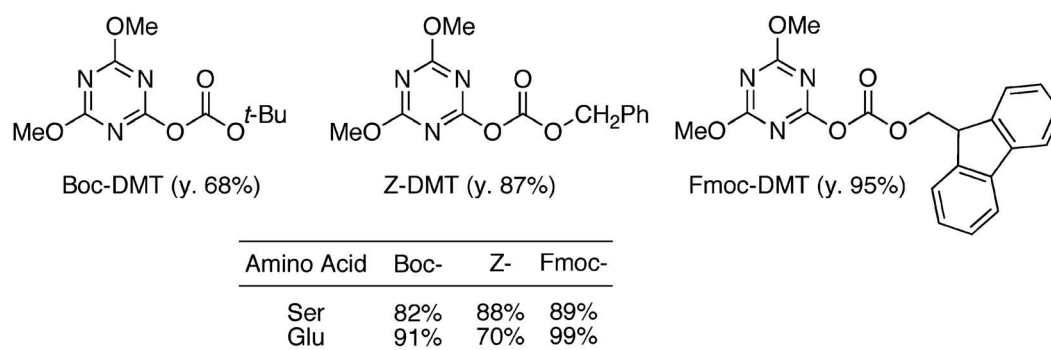


Fig. 7. Preparation and Reactions of Boc-, Z-, and Fmoc-DMT

3. アミノ基保護基導入剤

前項で述べた HO-DMT の DMT-MM への再生以外の有効利用として筆者らは、アミノ基の代表的なウレタン型保護基導入剤として、*t*-butoxycarbonyl (Boc), 9-fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc), 及び benzyloxycarbonyl (Z) 誘導体を開発した (Fig. 7).^{17,18)} これらは HO-DMT にそれぞれ対応する炭酸エステル誘導体を作用させることにより簡単に合成できる。トリアジニルオキシ基の有する適度な脱離性と安定性の結果、DMT-MM と同様に水系溶媒中で利用することが可能であり、アミノ酸のような水溶性化合物の保護に有効である。

4. 固定化脱水縮合剤

医薬品のハイスループット合成など、反応の自動化やコンビナトリアル合成の観点から反応剤を固相担体に結合して不溶化したいわゆる固定化試薬の開発が最近盛んである。反応剤を固定化することによって、生成物の単離精製と反応剤の回収が簡便になることはもちろんであるが、それ以外にも反応剤が刺激性や特異臭を持つ場合にはこれらを大幅に改善

することができる。固定化脱水縮合剤においてもカルボジイミドなど代表的な反応剤を担持したものがいくつか開発されているが、それらは、高価な化合物を用いたり、担持のための化学修飾や不均一な固相上での化学変換が必要であったりと、大量合成に耐え得るものとは言い難い。¹⁹⁻²⁴⁾

そこで筆者らは DMT-MM や塩化シアヌルに特有の性質をうまく利用してこれらの問題を解決した新しい固定化縮合剤を開発した。

4-1. 固相吸着型縮合剤 DMT-MM が水溶性でかつ水中でアミド合成に利用できる性質を利用すれば、化学修飾を必要とせず共有結合を介することもなく、その水溶液を親水性の固体粉末の表面に吸着させるだけで事実上固定化することができる。²⁵⁾ この粉末をカルボン酸とアミンを溶解させた塩化メチレン溶液中に懸濁・振とうし、ろ過するだけで目的物を収率よく得ることができる。Fig. 8 に示すように、カルボキシル基やアミノ基は本来親水性の官能基であり、またカルボン酸とアミンは互いに塩を形成して親水性が高まることから、水相中又は有機

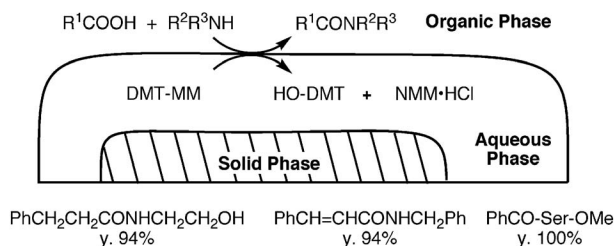


Fig. 8. Reaction in a Liquid-liquid Biphasic System on a Solid Surface

相と水相の境界で DMT-MM と反応すると考えられる。反応によって生じた HO-DMT やメチルモルホリン塩酸塩は水溶性なので、過剰の DMT-MM とともに固相表面の水相に留まる。一方、生成したアミドは脂溶性であれば有機相へ移行する。そこで、ろ過によって固相と分離だけで、抽出操作に相当する精製が可能である。

固相には、アルミナ、珪藻土、セライトなど安価な粉末を用いることができ、比表面積が $1 \text{ m}^2/\text{g}$ 以上、懸濁液の pH が中性から弱アルカリ性の粉末であれば十分な加速が得られる。例えば市販のアルミナ B を用いた場合、室温短時間 (30 分から数時間) に高収率でアミドが得られた。興味深いことに不均一系でありながら本方法では逆に反応は促進され、固体粉末の非存在下での液-液二相系や、塩化メチレン又は水を単独溶媒として用いた均一系での反応と比べ、短時間、高収率にアミドが生成した。これは粉末の表面積に匹敵する液-液界面の大きな面積に起因すると考えられる。

4-2. ポリマー縮合剤 前項で述べた固相吸着型反応剤では生成物が脂溶性の場合に有効であるが、水溶性の化合物ではろ過による単離が困難と考えられる。特に水やアルコールを溶媒とする DMT-MM の特性を十分に利用するには、やはり共有結合を介して固定化する必要がある。一般に固相担体に反応剤を担持する場合、固定化反応剤の全重量に占める固相担体の割合が非常に大きくなり、その導入率は 1 meq/g に満たない低いものが多い。^{26,27)} 一方、不均一系反応を完結させるために固定化反応剤は通常過剰に用いられる。つまり、化学量論的反応である脱水縮合反応では、結局大量の固定化縮合剤を使用することが必然的となり、それに伴って大量の廃棄物が生じることも避けられない。このような

大量合成 (使用)・大量廃棄は化学量論的反応剤の固定化に共通の問題であり、経済面や環境面からもその解決が望まれている。

固相に担持するという従来型の方法を用いる限りこの導入率低下=廃棄物増化の問題を解決することは難しい。筆者らは、トリアジン自身をモノマーとして重合反応によって不溶化したポリマー試薬を開発した。^{28,29)} すなわち DMT-MM の 2 つのメトキシ基を適当なリンカーに置き換えて相互に連結すれば、大幅な分子量の増加を避けて固定化することができる。

そこで、両端にジクロロトリアジンをもつテトラエチレングリコールを 3 つの 1 級アミノ基をもつテトラミンで架橋重合した。¹²⁾ 重合反応は THF 中低温で進行し、一定の重合度に達すると不溶性の固体 (Poly-Trz-Cl) が沈殿してきた (Fig. 9)。均一反応のため効率がよく、塩化シアヌルの置換反応という点では該当するモノマー試薬と同じ工程数で合成できるため、固定化のための余分な手間が不要といえる。Poly-Trz-Cl を NMM と処理すると DMT-MM に相当する活性化体 Poly-Trz-MM が得られ、このとき遊離した塩素イオンから導入率を求めると、 2.9 meq/g とかなり大きく、単位活性当たりの平均分子量を 300 前後まで抑えることができた。

合成したポリマー型脱水縮合剤 Poly-Trz-Cl を NMM の共存下カルボン酸とアミンの混合溶液と室温で振とうするだけで反応が進行した。これらのポリマー反応剤は DMT-MM と同様に一般的な中性溶媒中で用いることができるが、ポリマーの膨潤度が収率に影響することが大きな相違点で、膨潤度の小さな水中では収率が低下がみられたのに対し、膨潤度の高い塩化メチレン中で最もよい結果が得られた。反応後は溶液をイオン交換樹脂で処理するか、抽出によって未反応の原料や NMM を除去するだけで純度よくアミドを得ることができた。

5. ホスト化合物を用いた人工アシル基転移酵素

ホスト-ゲスト間の特異的な親和性を酵素-基質相互作用に見立てた人工酵素研究は古くから行われてきた。シクロデキストリン (CD) を用いた加水分解酵素 (キモトリプシン) モデルの開発は 1960 年代以降、多くの研究者によって精力的に行われてきたが、これが十分な反応加速と代謝回転能力を有する触媒に発展するにはかなり長い歳月を要してい

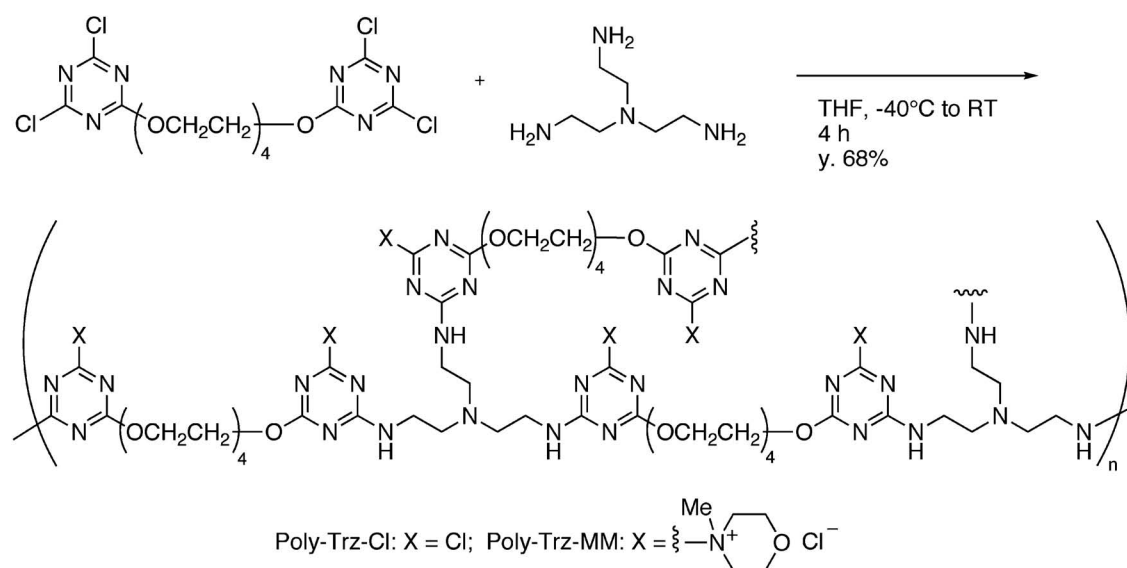


Fig. 9. Preparation of Polymer Dehydrocondensing Reagent Comprised of Triazine

る。³⁰⁾ 水中での加水分解は、熱力学的にも有利で、どちらかと言えば条件設定が簡単な反応であることを考えると、化学反応を通して酵素の優れた機能をモデル化することがいかに困難であるかが分かる。また同時にその逆反応、つまり2分子縮合反応を触媒するアシル基転移酵素モデルの開発がさらに難しいことも容易に理解できる。事実、これまでに報告された優れたアシル基転移酵素モデルはいずれも本質的には共通した原理に基づいている。³¹⁻³⁴⁾ すなわち、あらかじめ活性化しておいたカルボン酸の誘導体とアミン類又はアルコール類を同時に結合した3成分複合体の形成を通して、近接効果によってその反応を促進する方法である。筆者らはDMT-MMの開発に伴って見出した「水中で進行する触媒的脱水縮合反応」を基盤として全く新しい原理によるアシル基転移酵素モデルを開発した。

5-1. 水中で進行する触媒的脱水縮合反応 筆者らはDMT-MMの前駆体であるCDMTとカルボン酸との反応について調べたところ、カルボキシル基のCDMTへの直接的な攻撃による活性エステル生成反応はほとんど進行せず、NMMを加えると速やかにアミドが得られることが明らかとなった。このことはDMT-MMが必須の反応中間体であることを示しているが、同時に、CDMTとカルボン酸から活性エステルを作る反応においてNMMが触媒として作用し得ることを意味している。そこでNMMの代わりにジメチルグリシン(DMG)に着

目し、そのエチルエステル(DMGE)を用いて実験を行った。³⁵⁾

Figure 10に示す通り、DMGEを加えない場合、縮合反応は室温48時間でもほとんど進行しなかったが、1当量のDMGEを加えると76%の収率でアミドが得られた。DMGEを0.2当量に減らしても同程度の収率で進行したことから確かにDMGEが触媒的に反応を促進していることが示された。反応系にはカルボン酸、アミン、3級アミン、溶媒としての水やアルコールと多くの求核性物質が存在しているにも拘わらず、求電子性のCDMT、縮合剤、活性エステルに対してそれぞれ反応すべきものが高い選択性で都合よく反応している点が特に興味深い。このDMGのカルボキシル基に様々な官能基を導入することによって新しい機能を付与することが可能である。そこで次項に示すようにシクロデキストリン(CD)やクラウンエーテルのようなホスト化合物を導入して人工酵素の開発を行った。

5-2. シクロデキストリンを用いた人工アシル基転移酵素 CDは、主に疎水性相互作用によってその内孔にフィットする脂溶性化合物をゲスト分子として特異的に取り込み、CD包接複合体を形成する。この形成は疎水性相互作用が強く発現される水中で促進されるため、CDを用いた人工酵素が触媒する反応は水中で進行することが条件となる。この制約がCD型酵素モデルにおいて加水分解酵素の開

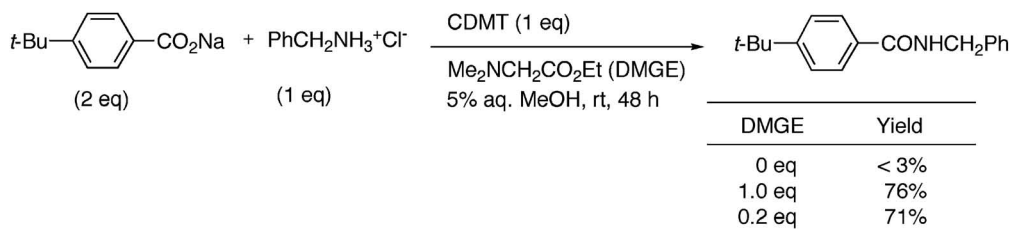


Fig. 10. Catalytic Amide-forming Reaction in an Aqueous Solution

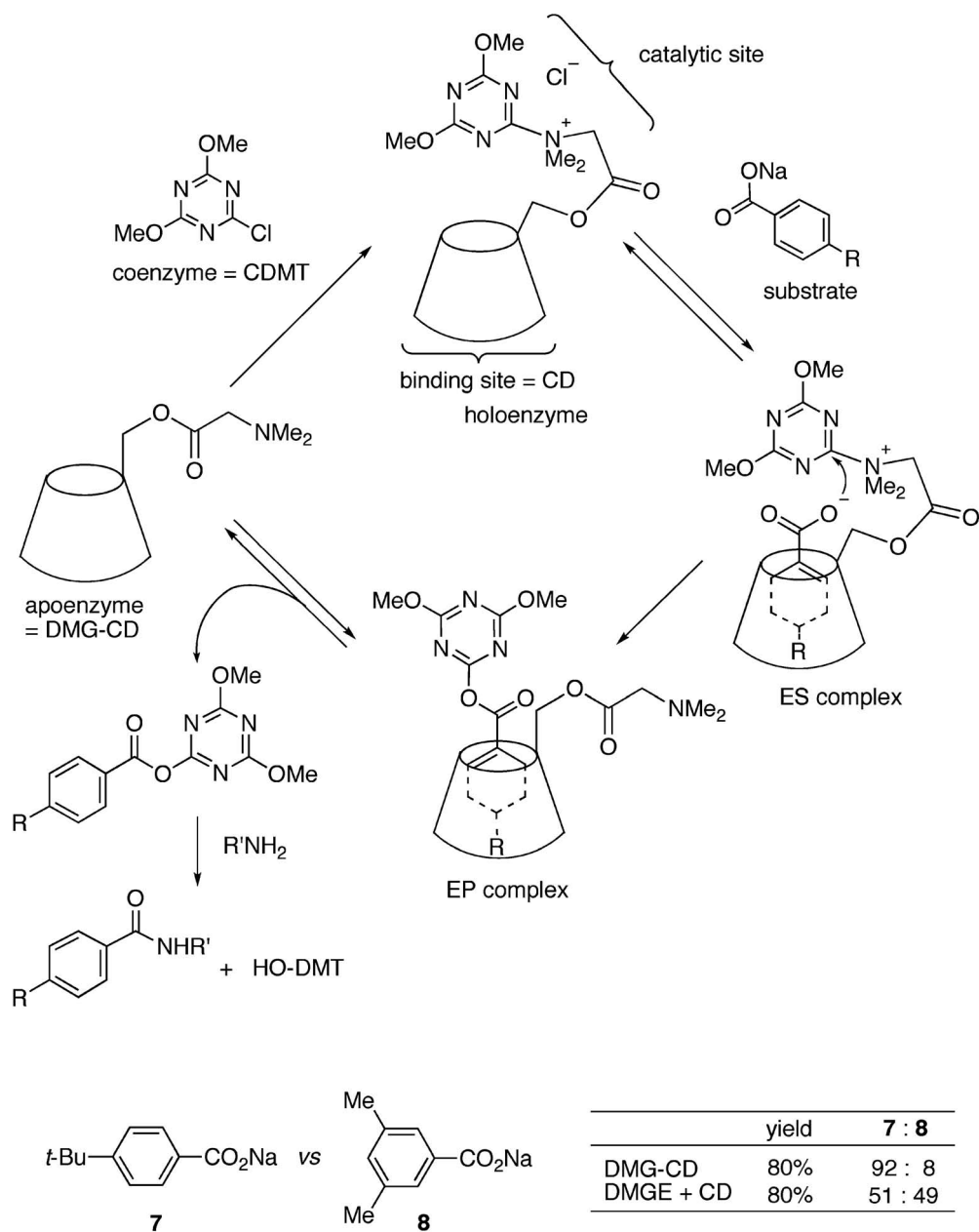


Fig. 11. Artificial Acyltransferase Based on CD

発が主流であったことの大きな理由だと思われる。筆者らは前項で見出した反応はまさにこの水中で進行することから、DMGにCDを導入して全く新

しいタイプのアシル基転移酵素モデルを開発した (Fig. 11).³⁵⁾

DMGを有するCD (DMG-CD)は、文献記載の

方法に従って簡単に合成できる。この化合物はそれ自身単独では縮合活性を持たないが、CDMTと反応することによって縮合能を獲得することから、それぞれアポ酵素及び補酵素と位置付けることができる。得られた脱水縮合剤はホロ酵素に相当し、ここでもし芳香族カルボン酸のようにCDの空孔に高い親和性を持つ基質が存在すると、水中では安定な包接複合体を形成する。これはつまりES複合体に相当し、このときカルボン酸は近接効果によって速やかにトリアジノ基を攻撃しEP複合体へと変化する。得られた活性エステルは系内に存在するアミンと反応してアミドを与える。CDと親和性のあるアミドは疎水性が高く沈殿として系外に落ちるので、結果的にEP複合体はほとんど解離側へ平衡が傾き、遊離したCD触媒は再び次の反応へと利用され、触媒サイクルが確立される。

実際に、2種の安息香酸ナトリウム7と8の等モル混合物を用いた競合実験において、0.2当量のCD触媒を加えると、CDと安定な複合体を形成する7が、収率80%、92:8の選択性でベンジルアミンと反応した。一方、対照実験としてDMGEとCDの組み合わせを用いた系ではアミド比は51:49となり、全く選択性は発現されなかった。このことは触媒部位が基質結合部位を分子内に有することが選択性発現のための必須条件であることを示している。また、触媒は少なくとも4回以上のターンオーバーをしていることも明らかである。

5-3. クラウンエーテルを用いた人工シクロトランスフェラーゼ 代表的なクラウンエーテルである18-crown-6はカリウムイオンを特異的に結合するが、同時に1級アンモニウムに対しても親和性を有する。この複合体形成はメタノール中で最も安定であり、2級のアンモニウムと比べ結合定数は2桁ほど大きい。³⁶⁾ 筆者らの触媒反応はメタノール中でも進行可能なことからDMG-crownを用いて ω -アミノ酸に特異的なシクロトランスフェラーゼの開発を行った。³⁷⁾

反応系の概略をFig. 12に示す。アポ酵素は市販のヒドロキシメチル化18-crown-6にDMGを縮合させるだけで簡単に調製できる。この化合物は反応点から最も離れた ω 位に第1級アミノ基を持つカルボン酸に特異性を示し、得られた活性エステルは分子内のアミノ基の攻撃を受けラクタムを与える。

実際にアミノカプロン酸9と、そのアミノ基上にメチル基を1つ有する誘導体10の等モル混合物を用いて競合反応を行ったところ、室温10分で収率89%、92:8の選択性で9が優位に反応した。クラウンエーテルを持たず、代わりにエチル基を有するDMGEでは比率が55:45であり、選択性はほとんどみられなかった。この反応はリチウムイオンの添加の影響はほとんど受けないが、カリウムイオンを添加すると選択性が消失したことから、クラウン環と第1級アンモニウム塩との複合体形成によって選択性が発現されていると結論できる。

このクラウン型酵素はアミノ基とカルボキシル基をつなぐメチレン鎖の長さも認識する。すなわち4-アミノ酪酸と6-アミノカプロン酸との競合反応では速度論的に生成し難い7員環カプロラクタムが優位に得られた。

一般にホスト化合物を酵素、ゲスト化合物を基質に用いた人工酵素では、生成物もまた基質と類似の構造を有するためゲスト分子として働くことが多い。そのため反応の進行に伴って生成物濃度が増加すると、これによる競合的な反応阻害が問題となる(生成物による競合阻害)。本反応ではラクタムの形成によって生成物は被認識部位であるアミノ基を失うため、もはやDMG-crownに対する結合能を持たない。実際にFig. 12の反応系に主生成物であるピペリドンを添加しても、選択性及び収率に何の影響も及ぼさなかった。

6. 界面を反応場とする脱水縮合反応

水中に溶解した界面活性剤は、臨界ミセル濃度(cmc)以上で自発的に集合しミセルなどの分子集合体を形成する。脂溶性分子はこの形成された分子集合体の内部に、両親媒性分子は一定の配向性を持って界面にそれぞれ取り込まれる。これらの現象は局所濃縮効果や前配向性効果としてよく知られ、反応の促進に都合がよく、特にミセル界面では加水分解が大きく加速されることが古くから知られている。³⁸⁾ 筆者らは、この界面効果が、加水分解の逆反応である脱水縮合反応にも非常に有効であることを初めて見出した。すなわち、トリアジン型縮合剤が反応点に4級アンモニウムの正電荷を有している点に着目し、脂溶性の3級アミン触媒を用いて両親媒性にすることによって、縮合剤も含めて反応に係わるすべての官能基(カルボキシル基やアミノ基)

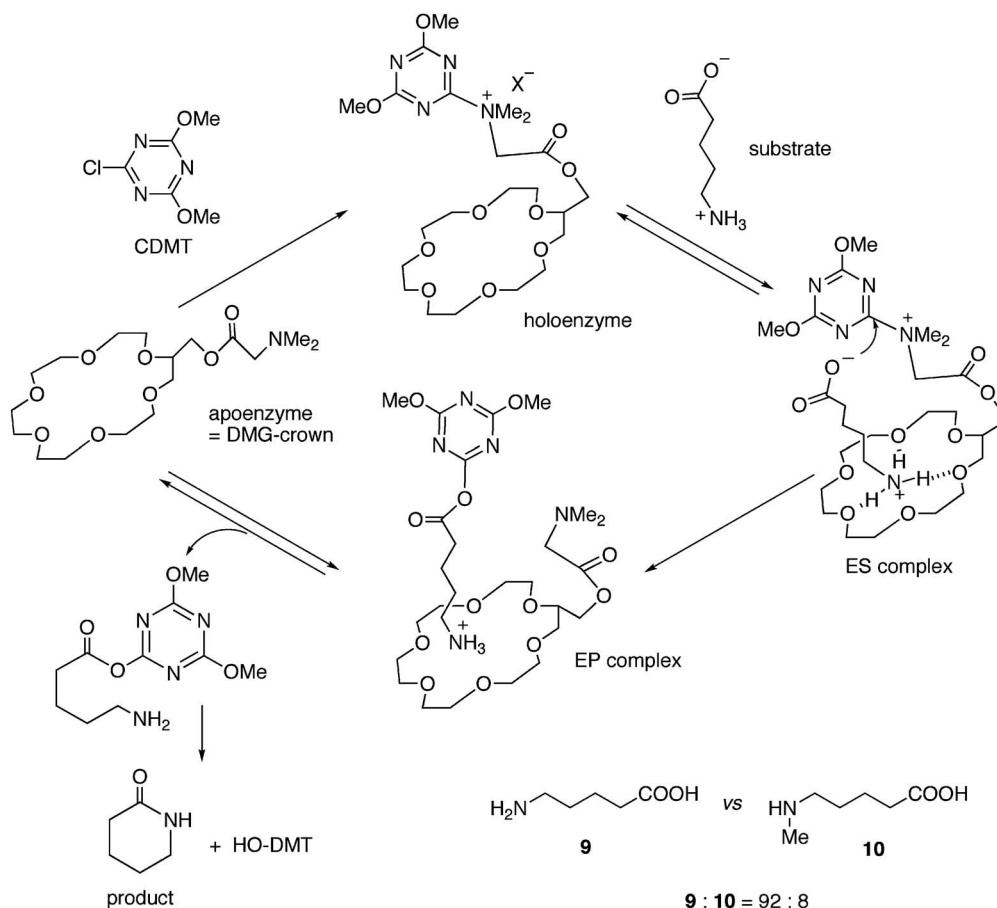


Fig. 12. Substrate-specific Lactamization by Artificial Cyclotransferase

が都合よく界面に集積し、結果的に2分子縮合反応が界面効果によって著しく加速されることを実証した。

反応系を単純にするために基質となる脂肪酸塩自身の形成するミセルを用いて反応速度を測定した (Fig. 13). アルキル鎖長だけが異なる複数の脂肪酸塩について、それらの濃度を、長鎖脂肪酸塩の cmc より若干高く設定すれば、短鎖脂肪酸塩は通常の均一な水溶液 (分子分散系) となるが、長鎖脂肪酸塩はミセルを形成する。一定の炭素数以上の脂肪酸であれば、カルボキシル基と縮合剤の反応速度定数が同じであると仮定できるので、同一の反応条件 (基質濃度と反応温度) において、もし長鎖脂肪酸塩の速度に有意な加速がみられればミセル形成によるものと結論できる。そこで酪酸塩、オクタン酸塩、及びラウリン酸塩のアミド化反応速度について、エステルアルキル基の長さの異なるジメチルグリシンエステルを用いて比較したところ、ミセルを形成していない酪酸やオクタン酸塩のときと比べ

て、ミセル形成しているラウリン酸塩では最大2000倍の反応加速が観察された。³⁹⁾ この結果に基づいて、酪酸塩とオクタン酸塩又はラウリン酸塩との等モル混合物の競合反応をミセル系で行ったところ、前者は収率16%、選択性42:58であったのに対し、後者では収率88%、0.4:99.6であった (Fig. 13). 一般に選択性は、不要なものの生成を抑える抑制的な制御に基づいて発現されることが多いので、選択性と収率の両立は難しい。これに対し、本反応は促進的な反応制御に基づいており、目的物を特異的に与える反応の加速の結果、選択性と収率の両方が同時に大きく改善されている点が特徴である。単純な分子集合相の形成だけでこのような大きな反応加速や基質特異性が発現されることは、合成化学の観点からも大変に魅力的である。

7. 界面でのセラミド合成によって誘起される膜融合

膜融合は、基本的な生命活動現象であり、膜分裂とともに主に生体内での物質の導入、輸送、放出な

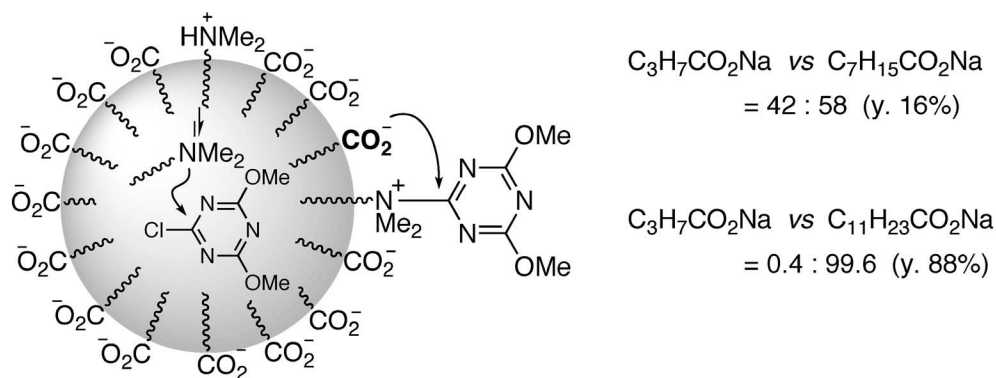


Fig. 13. Rate Enhancement of Dehydrocondensation at the Interface of Micelles

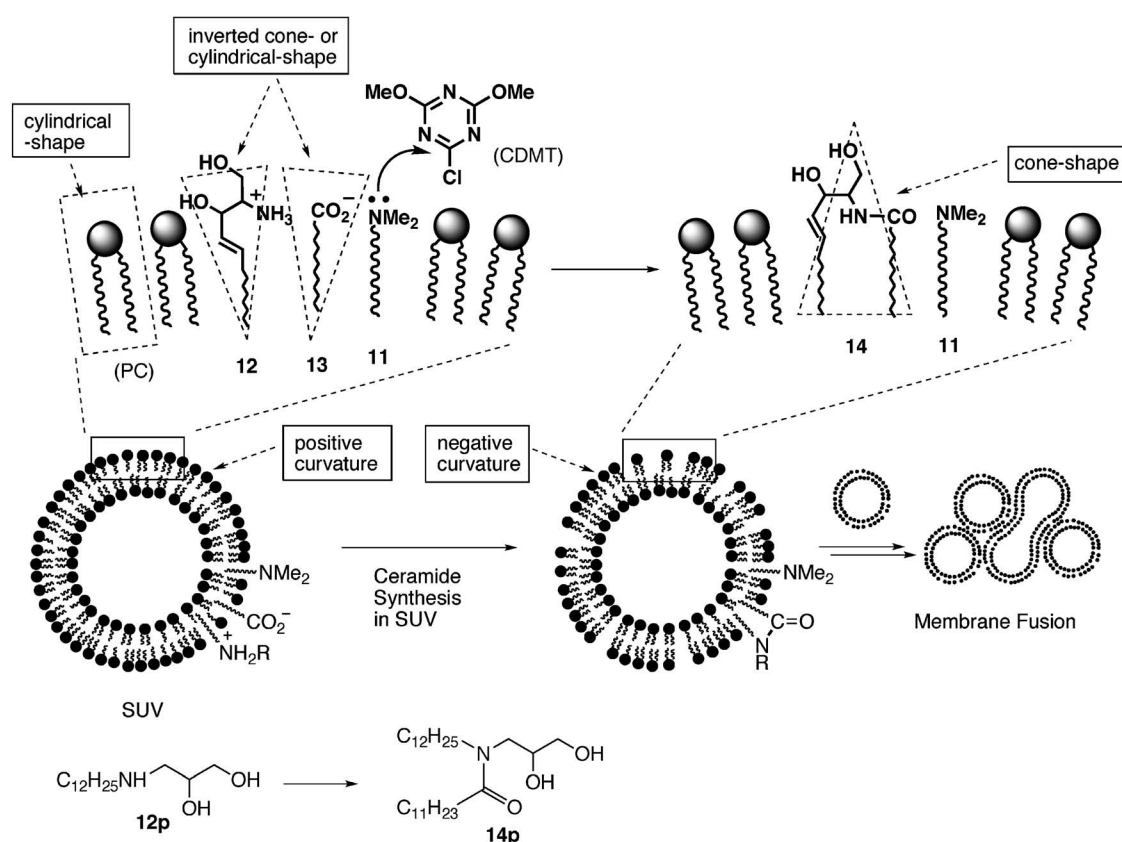


Fig. 14. Membrane Fusion by Ceramide Synthesis

どを担っている。その分子機構ははまだ解明されておらず、特に有機化学的手法に基づいた研究はほとんどなされていない。筆者らは、前章で見出した反応を膜界面で行って膜を構成する脂質分子をそこに留めたままその化学構造を変換すれば、その組織体としての膜の構造に変化をもたらすことができると期待した。生体内での多くの化学反応が膜及びその周辺で行われていることを考えると、反応場とし

ての膜の利用や機能解明の点からも興味深い課題である。

筆者らが立てた作業仮説に基づく概念を Fig. 14 に示す。⁴⁰⁾ リン脂質を主成分とする小さな1枚膜ベシクル (SUV) において、両親媒性の3級アミン触媒 **11** を用いてスフィンゴシン **12** と脂肪酸 **13** からセラミド **14** を合成する反応を行うと、反応前の基質はそれぞれ比較的小さな臨界充填パラメータ

(cpp) を持つ逆コーン型かシリンダー型の分子構造を有しているのに対して、反応後のセラミドはcppの大きなコーン型に変化する。その結果、反応の前後で膜の曲率が低下し膜構造全体に歪みが生ずると考えられる。また、基質電荷の消失によって膜界面の対イオン濃度の低下や脱水和が起きることも期待できる。これらの現象の結果、反応後のベシクルの凝集が促進され、さらに膜の融合によって歪みが解消されると考えられる。

実際にスフィンゴシンの類似体（擬似スフィンゴシン）**12p** を用いてラウリン酸塩との縮合反応を行ったところ、室温 1 時間及び 3 時間でそれぞれ 48% 及び 77% の収率で対応するセラミド類似体（擬似セラミド：**14p**）が生成した。蛍光エネルギー転移に基づくプローブ混合法で評価した膜融合率は、擬似セラミドの生成に連動して増加し、1 時間ではほとんど変化がなかったのに対し、2 及び 3 時間ではそれぞれ 39% 及び 65% であった。動的散乱法による粒径変化や、透過型電子顕微鏡によっても膜融合の誘起が確認された。縮合剤として水溶性の DMT-MM を用いたり炭素鎖長の短いオクタン酸を用いたりした場合に擬似セラミドはほとんど生成せず膜融合も誘起されなかったことから、脂肪酸や縮合剤が膜内に留まっていること（つまり十分な脂溶性を有すること）が必須条件と考えられる。

融合の詳細な分子機構は不明であるが、本システムが脂質の分子構造の動的変化と膜の動的な形態変化との相関性を解明するための重要なモデルとなることや、エンドサイトーシスに基づく物質の新しい細胞内導入ツールとして利用可能であることが期待できる

8. おわりに

以上の研究は、1,3,5- トリアジン化合物が本来有する反応性を明らかにしつつ、その特性を最大限に利用すべく展開してきたものである。脱水縮合反応はやり尽くされた感が否めない古典的とも言える反応であるが、様々な反応場を開拓することによって、全く新しい研究の展開が可能であることが明らかとなった。一連の研究を通して特に認識を新たにすることは、水の重要性である。水は、環境に優しく安価な溶媒というだけでなく、不均一場、包接複合体、あるいはミセルや膜などの分子集合体の形成に欠かせない中心的な役割を演じている。生命現

象の基盤をなす生体の化学反応は、この水との密接な係わりの中で誘起されるものであり、生体機能の模倣や解明の点でも水は今後さらに注目されるべき溶媒と言える。水中での触媒反応ではまだまだ多様な応用展開が期待でき、筆者らも鋭意推進中である。

終わりに臨み、本研究の一部は日本学術振興会科学研究費補助金、薬学研究奨励財団助成金、並びに科学技術振興機構戦略的創造研究推進事業さきがけ研究の助成により行われたものであり、ここに深謝致します。また、本研究は神戸学院大学薬学部において行われたものであり、研究にご協力頂いた日置和人助教をはじめ、大学院生、学部生、博士研究員の皆さんに感謝致します。

REFERENCES AND NOTE

- 1) Storm D. R., Koshland Jr. D. E., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **66**, 445–452 (1970).
- 2) Voet D., Voet J. G., “Biochemistry,” 2nd ed., Wiley, New York, 1994.
- 3) Kunishima M., Kawachi C., Iwasaki F., Terao K., Tani S., *Tetrahedron Lett.*, **40**, 5327–5330 (1999).
- 4) Kunishima M., Kawachi C., Morita J., Terao K., Iwasaki F., Tani S., *Tetrahedron*, **55**, 13159–13170 (1999).
- 5) Although the stable structure of HO-DMT would be its keto-tautomer, 4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2(H)-one, we use the enol form for convenience.
- 6) Kaminski Z. J., Paneth P., Rudzinski J., *J. Org. Chem.*, **63**, 4248–4255 (1998).
- 7) Kunishima M., Kawachi C., Hioki K., Terao K., Tani S., *Tetrahedron*, **57**, 1551–1558 (2001).
- 8) Gartner Z. J., Kanan M. W., Liu D. R., *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **41**, 1796–1800 (2002).
- 9) Uzagare M. C., Sanghvi Y. S., Salunkhe M. M., *Synthetic Communications*, **34**, 1071–1077 (2004).
- 10) Tachibana Y., Monde K., Nishimura S.-I., *Macromolecules*, **37**, 6771–6779 (2004).
- 11) Ishikawa M., Taura D., Maeda K., Yashima E., *Chem. Lett.*, 550–551 (2004).
- 12) Falchi A., Giacomelli G., Porcheddu A., Taddei M., *Synlett*, 275–277 (2000).
- 13) Kiso Y., Satomi M., Miyazaki T., Hiraiwa H.,

- Akita T., "Peptide Chemistry." ed. by Okawa K., Protein Research Foundation, 1980, pp. 71–74.
- 14) Kunishima M., Kitao A., Kawachi C., Watanabe Y., Iguchi S., Hioki K., Tani S., *Chem. Pharm. Bull.*, **50**, 549–550 (2002).
- 15) Kunishima M., Morita J., Kawachi C., Iwasaki F., Terao K., Tani S., *Synlett*, 1255–1256 (1999).
- 16) Kunishima M., Hioki K., Wada A., Kobayashi H., Tani S., *Tetrahedron Lett.*, **43**, 3323–3326 (2002).
- 17) Hioki K., Fujiwara M., Tani S., Kunishima M., *Chem. Lett.*, 66–67 (2002).
- 18) Hioki K., Kameyama S., Tani S., Kunishima M., *Chem. Pharm. Bull.*, **55**, 825–828 (2007).
- 19) Brown J., Williams R. E., *Can. J. Chem.*, **49**, 3765–3766 (1971).
- 20) Weinshenker N. M., Shen C.-M., *Tetrahedron Lett.*, 3285–3288 (1972).
- 21) Weinshenker N. M., Shen C.-M., Wong J. Y., *Org. Synth., Coll. Vol. VI*, 951–954 (1988).
- 22) Chinchilla R., Dodsworth D. J., Nájera C., Soriano J. M., *Tetrahedron Lett.*, **41**, 2463–2466 (2000).
- 23) Disadee W., Watanabe T., Ishikawa T., *Synlett*, 115–117 (2003).
- 24) Valeur E., Bradley M., *Chem. Commun.*, 1164–1166 (2005).
- 25) Watanabe Y., Fuji T., Hioki K., Tani S., Kunishima M., *Chem. Pharm. Bull.*, **52**, 1223–1226 (2004).
- 26) Tzschucke C. C., Markert C., Bannwarth W., Roller S., Hebel A., Haag R., *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **41**, 3694–4000 (2002).
- 27) McNamara C. A., Dixon M. J., Bradley M., *Chem. Rev.*, **102**, 3275–3300 (2002).
- 28) Kunishima M., Yamamoto K., Watanabe Y., Hioki K., Tani S., *Chem. Commun.*, 2698–2700 (2005).
- 29) Kunishima M., Yamamoto K., Hioki K., Kondo T., Hasegawa M., Tani S., *Tetrahedron*, **63**, 2604–2612 (2007).
- 30) Blesrow R., Dong S. D., *Chem. Rev.*, **98**, 1977–2011 (1998).
- 31) Sasaki S., Shionoya M., Koga K., *J. Am. Chem. Soc.*, **107**, 3371–3372 (1985).
- 32) Cram D. J., Lam P. Y.-S., Ho S. P., *J. Am. Chem. Soc.*, **108**, 839–841 (1986).
- 33) Kemp D. S., Galakatos N. G., Bowen B., Tan K., *J. Org. Chem.*, **51**, 1829–1838 (1986).
- 34) Nowick J. S., Feng Q., Tjivikua T., Ballester P., Rebek Jr. J., *J. Am. Chem. Soc.*, **113**, 8831–8839 (1991).
- 35) Kunishima M., Yoshimura K., Morigaki H., Kawamata R., Terao K., Tani S., *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 10760–10761 (2001).
- 36) Izatt R. M., Pawlak K., Bradshaw J. S., Bruening R. L., *Chem. Rev.*, **91**, 1721–2085 (1991).
- 37) Kunishima M., Hioki K., Moriya T., Morita J., Ikuta T., Tani S., *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **45**, 1252–1255 (2006).
- 38) Fendler J. H., Fendler E. J., "Catalysis in Micellar and Macromolecular Systems," Academic Press, New York, 1975.
- 39) Kunishima M., Imada H., Kikuchi K., Hioki K., Nishida J., Tani S., *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **44**, 7254–7257 (2005).
- 40) Kunishima M., Tokaji M., Matsuoka K., Nishida J., Kanamori M., Hioki K., Tani S., *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 14452–14453 (2006).