

氏名(本籍)                    高橋圭子

学位の種類                    薬学博士

学位記番号                    薬第256号

学位授与年月日                昭和61年3月12日

学位授与の要件                学位規則第5条第2項該当

学位論文題目                    Studies on the Control of Various  
Aqueous Reactions by Host-guest  
Complexation of Cyclodextrins  
(シクロデキストリンのホスト-ゲスト  
コンプレックス形成による各種水溶液反  
応の制御に関する研究)

(主査)

論文審査委員 教授 長            哲郎            教授 南原利夫

教授 鈴木康男

# 論文内容要旨

## 1) 緒言

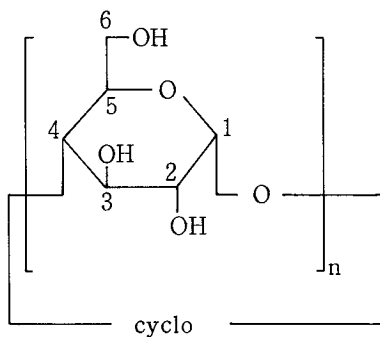
有機化学の分野において、酵素反応や抗原-抗体反応のように、選択的、高収率、鋭敏な反応の要求が益々強くなってきている。この流れは、生体に学び生体を模倣しようとする化学、いわゆる「biomimetic chemistry」の興隆と呼応している。生体のもつ機能を分子レベルでシミュレーションするためのひとつの鍵はいかに分子を認識するかにある。そこで「ホスト-ゲスト現象」が注目を浴びている。元来、ホスト-ゲスト化学の概念は、biomimetic chemistryの分野で合成分子系を対象としてCramにより定義されたが、もっと広義に、包接するものをホスト、包接されるものをゲストと考えると天然には実に多くのホスト-ゲストコンプレックスが存在している。酵素反応における基質と酵素、免疫反応における抗原と抗体、薬物と薬物レセプター、イオンと輸送キャリアー、呈味物質やにおい物質と受容体などの例を挙げることができる。いずれの場合も反応過程においてホスト分子がゲスト分子を認識してホスト-ゲストコンプレックスを形成し、分子相互の位置関係や配向性が決まり、目的とする反応や輸送だけが特異的に速やかに進行する。このような点から、コンプレックス形成過程こそが特異機能発現の根本であり、生体内のすぐれた反応には全てホスト-ゲスト現象がかかわっているとんでも過言ではない。

本研究では、ホスト-ゲスト現象の効果の本質である包接による立体的効果に着目した。そして酵素反応のモデル化反応のわくにとどまらず、通常の有機反応のホスト-ゲスト現象による制御を意図し、包接立体効果でどんな、そしてどれ程の影響を反応が受けるかを明らかにした。

ホスト分子としてはシクロデキストリン (CD)を用いた。CDはグルコースが6~8個、 $\alpha$ -1,4結合で環状に連っており、グルコースの数によりそれぞれ $\alpha$ -CD、 $\beta$ -CD、 $\gamma$ -CDと呼ばれている。いずれも中心に疎水性空洞を有し、空洞直径に応じた分子をゲストとして取りこむ。この空洞は他にも知られているホスト分子(クラウンエーテル、シクロファン)の空洞に比べ堅固で深く、包接立体効果の検討に適している。また空洞の縁に多数の水酸基を有しており、官能基による修飾もたやすく水溶性を有している。ここでは、CDに新たな反応性部位を付する事なく、いわゆる「conformational effector」としてのCDの挙動を評価した。疎水性空洞の大小は、 $\alpha$ -、 $\beta$ -、 $\gamma$ -CDを用いて変化をもたせ、さらにメチル化、アゾベンゼンキャップ化により深さや形に変化をもたせた。

## 2) アルカリ水溶液中反応におけるCDの選択的モノトシル化

環の大きさの異なる $\alpha$ -、 $\beta$ -、 $\gamma$ -CDをそれぞれアルカリ水溶液 (pH 13) 中、過剰のトシルクロリドによりトシル化を行った。その結果、水酸基が多数あるにもかかわらず、モノトシル化CDのみが得られ、 $^{13}\text{C}$ -NMR、 $^1\text{H}$ -NMRの結果から、導入位置は特異的であった。 $\alpha$ -CDで



n = 6 ~ 8

はC-2トシル体が収率16%,  $\beta$ -CDではC-6トシル体が収率28%で得られた。水溶液反応の遷移状態においてCDとトシルクロリドは1:1のホスト-ゲストコンプレックスを形成しており、モノ置換体のみが生成した。また遷移状態コンプレックスのトシルクロリドとCD環の位置関係は環の大きさにより異なるため導入位置特異性に差異が生じた。環の大きな $\gamma$ -CDの場合、トシルクロリド包接はゆるく、C-2位モノトシル体とC-6位モノトシル体が、それぞれ収率約5%で得られている。この水溶液中におけるCDのモノトシル体の合成は、CD環が自らの反応の導入個数、位置を制御した系である。

特に $\alpha$ -CDの場合、立体効果が本来の反応性の高低よりも優先してC-2位に導入された事は注目に値する。比較のため、無水ピリジン中トシルクロリドによる反応と、DMF-炭酸緩衝液(pH 10)混液中、m-ニトロフェニルトシルエステルによる反応を行った。前者では多置換体が混在し、導入位置は反応性の高いC-6位であった。後者ではニトロフェニル部分とCDの1:1コンプレックス経路で反応が進行するため導入個数は制御されたが、いずれもC-2トシル体が得られ環の大きさに対する選択依存性は観察されなかった。

### 3) ミクロ反応容器としての $\gamma$ -CDの評価

環が大きく、それ自体では認識能力の低い $\gamma$ -CDに第三の因子を関与させる事により、 $\gamma$ -CDのもつユニークな挙動を明示した。先のトシル化 $\gamma$ -CDもトシル基が $\gamma$ -CD空洞の大きさ、形の調節因子として働き、 $\gamma$ -CDそのものよりも強い包接力と立体選択性を示した。他方、 $\gamma$ -CDの非1:1包接形態の存在が蛍光スペクトルの測定により示された。 $\gamma$ -CD添加に伴い、 $\alpha$ -ナフチル酢酸のエキシマー蛍光の著しい増大が観察され、 $\gamma$ -CD: $\alpha$ -ナフチル酢酸=1:2のコンプレックス形成のみが生じている事が示された。 $\beta$ -CDでは1:1包接のみが生じ、環の小さな $\alpha$ -CDではコンプレックス形成は認められなかった。これは $\gamma$ -CDがゲスト2分子を包接した初めての例である。さらに、異なる2種のゲスト包接から、反応種(C)と基質(S)の2分子取りこみによる反応制御へと研究を展開した。N-ベンジルニコチンアミド還元型とニンヒドリンをそれぞれC、Sとした酸化還元反応系に $\gamma$ -CDを添加したところC-S錯体生成定数が明らかに増大し、逆に $\beta$ -CD添加では減少した。また、N-ベンジルニコチンアミド還元型は、反応に際しニンヒドリンと強く1:1コンプレックスを形成する一方、 $\gamma$ -CDとも非常に強い1:1コンプレックスを形成した。即ち $\gamma$ -CDがN-ベンジルニコチンアミドを包接し、さらにニンヒドリンを包接する「二重包接型ターナリーコンプレックス」形成が明示された。 $\gamma$ -CD中のC-S錯

体は相対的位置関係が多少ずれた形となり生成速度定数が非常に小さくなり、全体としてはわずかな加速のみであるが、マイクロ反応容器としての $\gamma$ -CDの可能性を明示したものである。 $\beta$ -CDはN位ベンジル基をその空洞に取りこみ、ホスト-ゲストコンプレックスがN位の嵩高い立体障害としてニンヒドリンの近接を妨げ、負の conformational effector としての効果をもたらした。

#### 4) シクロデキストリン機能の光制御

光応答性残基としてのアゾベンゼン基のトランス $\rightarrow$ シス光異性化による立体的構造変化とシクロデキストリンの疎水性空洞の変化を結びつけるため、アゾベンゼン基を $\beta$ -CDに共有結合でキャップしたCapped-CDを用い光応答性挙動について検討した。ここで conformational effector であるCDは、光と化学機能の間の mediator となっている。キャップアゾベンゼンのトランス $\rightarrow$ シス光異性化に伴い、CDの疎水性空間が拡大する事を利用し、P-ニトロフェニルアセテートの加水分解活性の光制御を実現した(光により触媒活性が増大する)。この触媒作用はCDのアニオン型2級水酸基の基質カルボニルへの攻撃によるものである。シス体では基質がCD内孔に深くはいりすぎ、触媒作用上有利とは言えないが、コンプレックス生成定数が大きいので結果として増大した加速効果を示す。これは合成分子系において触媒活性を光制御したはじめての系であり、この様な単純な分子系においても単に疎水場の深さを変えるだけで機能制御が可能である事を示したものである。加水分解触媒活性の光制御は未修飾CDと光応答性阻害剤の系でも可能であった。また、CDの疎水性空洞の光による拡大は2分子のゲスト包接に拍車をかけ、2個目のゲスト分子包接の際、不斉選択性が生じた。この選択性は光照射前後で逆転した。疎水性空洞の深さを光異性化により制御する事で、かなり高次機能を認識できる事を示した。

#### 5) CDによる可逆的リン酸転移反応の誘導

CDとマグネシウムイオン存在下、ADPからATPへの変換がpH7のリン酸緩衝液にて進行した。温度37℃にて約20時間後よりATP生成が認められ、約100時間後ADPとATPはほぼ等量となった。ATPの同定はTLC、イオン交換型カラムを付したHPLCおよび $^{31}\text{P}$ -NMRにより行った。この反応系に不可欠なのはCDと2価金属イオンである。リン酸緩衝液中の無機リン酸イオンは本質ではない。ATPと同量のAMPが生成し、またCDはATPとAMPの混合溶液に対しADP生成を誘導する事より $2\text{ADP} \rightleftharpoons \text{AMP} + \text{ATP}$ なるリン酸転移反応の両方向を促進していると考えられる。平衡状態に達すると3つのヌクレオシドの濃度は変化せず、平衡状態を保つ。平衡定数は0.9~1.3の範囲であり、天然のアデニレートキナーゼの値に近い。円偏光二色性スペクトルによる検討の結果、CDはアデニル部分と強い相互作用を示し、1:1のホスト-ゲストコンプレックス生成が確認された。このコンプレックス生成定数は二価金属イオンの有無あるいは種類によって変化し、コンプレックス生成促進の金属イオンの存在下、リン酸転移反応が

確認された。また、未修飾のCDの水酸基の一部あるいは全てをメチル化したジメチルCDやトリメチルCDでもリン酸転移反応は同程度観察された。従ってこの単純なリン酸転移反応系においては、CDは活性部分としてではなく、金属とヌクレオチドなどの配向や形を規制し、リン酸転移を導く conformational effectorとして関与している。この系は新しい活性基は持たず、非常に単純な分子系ではあるが、単にCDを加えたのみでも難しいと考えられている反応をシミュレートする事が可能である事を示しており、複雑な酵素反応の機構解明の一助となりうる。

以上、水溶液反応において、ホスト-ゲストコンプレックス形成に由来する立体的効果により反応の制御が可能である事を示した。反応への影響は、ホストCDの空洞の大きさ、深さ、形により差異が生じる。またこれまでのいわゆる1:1ホスト-ゲストコンプレックスのみならず、同種あるいは異種の複数分子をゲストとするコンプレックス形成により conformational effectorあるいはmicro reactorとしてのホストCDの可能性を強く前面にうち出すことが出来た。

## 審査結果の要旨

6～8ケのD-グルコースが環状に1,4-グルコシド結合したシクロデキストリン(グルコース6ケを $\alpha$ -, 7ケを $\beta$ -, 8ケを $\gamma$ -CDとそれぞれ呼称)は疎水性の空洞を有し, 種々の有機物をゲストとして包接し, 加水分解などの触媒作用を行うため酵素モデル物質として脚光を浴びている。本論文では特にCDおよび修飾体の空洞の大きさ, 深さ, 形に着目して, 水溶液系でいくつかの反応制御に成功した。

まず, アルカリ水溶液 (pH=13) 中でCDと過剰の tosyl chloride との単純反応系においても, 単離収率は低いが,  $\alpha$ -CDではC-2位トシル体,  $\beta$ -CDではC-6位トシル体 ( $\gamma$ -CDではC-2および6位トシル体で選択性なし) を選択的に生成した。この反応選択性をCDの空洞の形状, ゲストとの包接などから既知のトシル化法と比較しつつ考察した。

空洞が大きく, それ自体では認識能力の低い $\gamma$ -CDに第三の因子を関与させmicro reactorとしての機能を与えた。特に $\gamma$ -CDはゲスト2分子を同時に取込むことをはじめて報告した。そして1) トシル化 $\gamma$ -CDにおいてはトシル基がマイクロ反応場を調節, 2)  $\alpha$ -ナフチル酢酸は2分子包接され, 生ずるエキシマー蛍光の発生の解析, 3) N-ベンジルニコチンアミド還元型とニンヒドリンのレドックス系への $\gamma$ -CDの添加は, このレドックス系の錯生成定数を増大させ ( $\beta$ -CDでは減少), 異種2分子包接の3成分複合系の実現などを行った。

光応答性残基としてアゾベンゼンを $\beta$ -CDに化学結合させた capped- $\beta$ -CDを合成し, 照射によるアゾ基のシス体からトランス体への異性化, それに伴う空洞の形状の変化により, 酢酸p-ニトロフェニルの加水分解速度の増大, フェンコンなどの2分子ゲスト包接と不斉識別などを実現できた。

さらにアデノシンリン酸類について次のリン酸転移反応



の平衡反応速度を $\beta$ -CDは $\text{Mg}^{2+}$ の共存下で促進し ( $\beta$ -CDの水酸基の一部またはすべてをメチルエーテル化しても進行), conformational effectorとしての $\beta$ -CDの機能を実現し, その機構についての考察を加えた。

このように, 本研究はシクロデキストリンを化学修飾するか, または空洞の大きい $\gamma$ -CDを用い水溶液中での種々の反応を試み, micro-reactorあるいはconformational effectorとしての機能を与えることができ, 酵素モデル物質としてのCDの機能を発展させたものであり, 学位論文として相応しい内容を有するものと考えられる。