

界面を反応場とした触媒的脱水縮合反応

「変換と制御」領域 国嶋 崇隆

要 旨

生体膜周辺で営まれている生体化学反応の効率的な仕組みに倣って、生体膜と類似の機能を有するミセルや2分子膜小胞（リポソーム）を反応場に用いた脱水縮合反応の開発を行った。すなわち、脱水縮合反応の原料となるカルボン酸、アミン、およびアルコールの多くが、反応点となるそれらの極性官能基をミセルや膜などの界面に並べて集積する性質を利用すれば、局所濃縮効果と配向性効果が発現され、脱水縮合反応がきわめて効率的に進行すると考えた。その結果、期待通り次のような研究成果を上げるに至った。(1) 低濃度のため均一な分子分散系では非常に遅い2分子脱水縮合反応が、脂肪酸塩によって形成されるミセル中では最大で2000倍加速された。(2) 電気的に中性の界面活性剤によって形成される分子集合体が、反応場として優れており、両親媒性のカルボン酸やアミンに対する加速の結果、分子選択的な脱水縮合反応が進行することを示した。(3) 界面での脱水縮合反応の応用として、リポソーム(SUV)の膜内でセラミド合成を行うと、SUVの融合が誘起されることを示した。(4) その他、エステル形成、固-液界面や液-液2相界面を利用した反応加速や分子選択的反応を見出した。

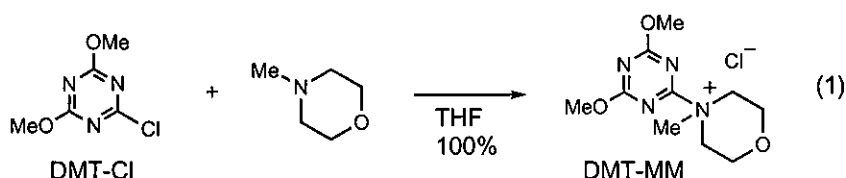
1 研究のねらい

「欲しいものだけを作る」化学合成は、原料や試薬などの資源の節約や、副生成物という無駄な廃棄物の削減を実現できる究極的な生産技術である。一方、実用面からは、特別な設備を必要とせず、常温常圧で迅速かつ安全に進行する化学反応が一貫して望まれている。これらはいずれも生産コストに直結するだけでなく、その両立は、環境保護、省資源、省エネルギーなどの観点からも望ましく、化学反応開発を生業とする研究者の目指すべきところでもある。前者の目的として「選択的反応」が有機合成において重要な課題となって久しく、これまでに非常に多くの方法が開発されてきた。しかし、多くの場合、選択性向上のために様々な障害を導入したり、温度を下げたりして無差別な反応を抑制するという方法論が用いられている。このような反応の抑制は、収率低下や、反応時間のむやみな延長を招くため、

後者の目的からしばしば外れることになる。つまり、選択的という目的から反応抑制が、迅速という観点からは反応促進が鍵となっており、逆のベクトルを持つ反応制御を両立させようとするところに問題がある。本質的な解決策は、不要な反応を抑えるのではなく、必要な反応だけを促すことである。

我々の体の中では、約37℃という一定温度のもと、加熱も冷却も加圧もすることなく、選択的で効率的な反応が行われている。つまり、反応効率化と選択性向上というジレンマが生体反応では見事に解決されており、この仕組みに倣うことは新しい反応システム開発の有力な手段となりうる。生体膜に似た機能を持つミセル-水界面には、両親媒性分子が自発的に集積し（局所濃縮効果）、極性頭部を界面に並べ疎水性部位を内側へ向けて配向する（配向性効果）ので、この現象をうまく利用すれば、化学反応の加速と選択性向上の両方を実現することが理論上は可能であり、古くから多くの研究がなされてきた。しかしながら、主たる溶媒が水であるため、適用できる反応には大きな制約があり、これまでの成功例の多くは加水分解反応、芳香族求核置換反応、光2量反応などに限られている。中でも界面は、水酸化物イオン濃度が高まることから、加水分解反応場として優れていることが広く認められている。

今回演者らは、この加水分解反応の最も対極にある脱水縮合反応が、実はミセルの効果を最大限に活用するのに非常に適していることを初めて明らかにした。つまり、脱水縮合反応の基質となるカルボン酸やアミンの多くが元来、界面集積性を有しており、その反応点が極性頭部として界面に並ぶことに着目して、この性質を利用して反応を促進させることに成功した。脱水縮合反応は、非常に古典的な反応であるが、その生成物であるアミドやエステルは、医薬品、化成品、さらには高分子化合物と、我々の生活を取り巻く製品の中に幅広く存在しており、その効率的な合成法を開発することには非常に大きな意味がある。



研究の企画立案にあたっては、演者らが見出した水中で利用できる脱水縮合剤 4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholinium chloride (DMT-MM) の開発のなかで明らかにしてきた1,3,5-トリアジン型化合物の特徴的な反応性を利用した(式1)。演者らは、これまで2-chloro-4,6-dimethoxy-1,3,5-triazine (DMT-Cl) にある種の3級アミ

ンを触媒として混ぜると、これらが結合した4級アンモニウム塩が発生し、これが水中でカルボン酸とアミンの脱水縮合反応を効率よく起こすことを見出している。そこでこの反応の化学的特徴に基づいて、図1のような界面での脱水縮合反応をデザインした。即ち、両親媒性の脂肪酸塩 A、アミン E、および3級アミン触媒 Bは、いずれも水中に形成されたミセルの界面に自発的に集積する。一方、脂溶性の DMT-Cl は疎水性効果でミセル内部に取り込まれるので、アミン触媒 B が非電離型としてミセル内に潜り込めば、両者の濃度が局所的に上がり、それらのカップリング反応が加速される (Step 1: 局所濃縮効果)。次に脂肪酸塩 A と得られた縮合剤 C は、それぞれ反応点に負および正電荷を有するのでミセル界面に互いに引き合いながら密集して並ぶ (Step 2)。そのため、局所濃縮効果に加えて、この配向性効果によってさらに反応は加速される。最後のアミド生成段階でも同様の局所濃縮効果が期待される (Step 3)。

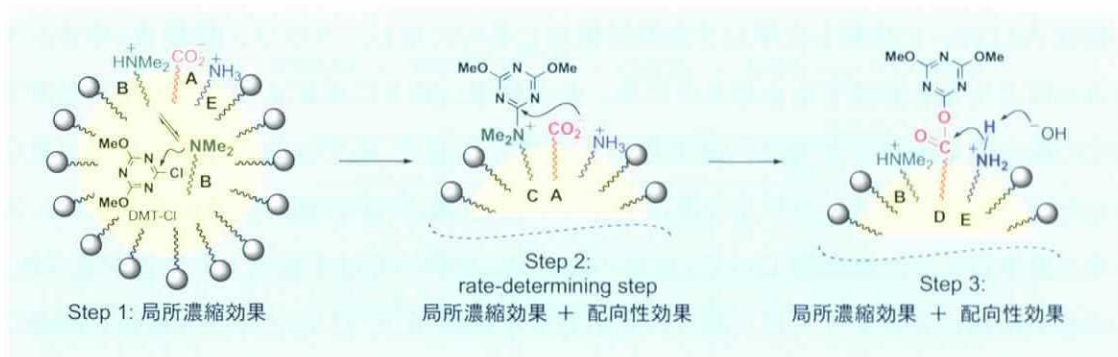


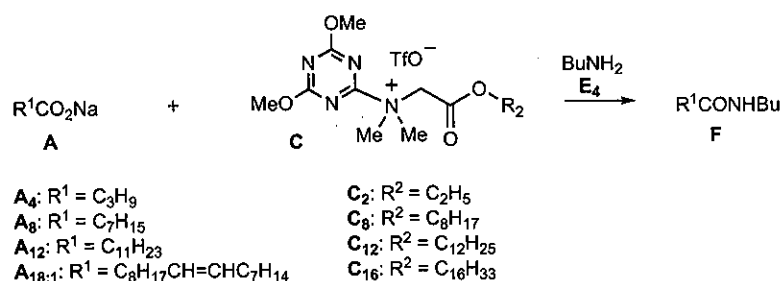
図1 ミセル界面を反応場とする脱水縮合反応の加速効果

2 研究成果

2-1 脂肪酸塩の形成するミセル中での反応加速

界面の効果を利用して脱水縮合反応を大きく加速した例は報告されていなかったので、ミセルによる局所濃縮効果と配向性効果によって2分子脱水縮合反応の加速がもたらされるかどうかを検討した。まず反応系を単純化するために、基質となる脂肪酸塩の形成するミセルを用いて一連の反応の中で律速段階である Step 2について加速を検討した。同じ脂肪酸塩を用いてその分子集合状態を変化させるには、濃度と温度を変える必要があるが、これらの因子は反応速度に直接影響するので、速度を比較するには大きな問題となる。そこでアルキル鎖長だけが異なる脂肪酸塩 A₄~A_{18:1}と脱水縮合剤 C₂~C₁₆を用いて、同温、同濃度でブチルアミン E₄との縮合反応の速度を比較した。設定した反応条件下において、酪酸塩 A₄とオク

Table 1. Relative Rates for Stoichiometric Reaction of A and C^a.



C	A ₄	A ₈	A ₁₂	A _{18:1}
C ₂	1.0 ^b	1.1	56	63
C ₈	0.7	3.0	1200	830
C ₁₂	21	280	860	840
C ₁₆	30	340	1400	690

^a Reaction conditions: A (15 mM), C (1.5 mM), E₄ (20 mM), NaPi (20 mM; pH 8); 25°C. ^b Pseudo first-order rate constant: $k = 1.0 \times 10^{-3} \text{ (min}^{-1}\text{)}$.

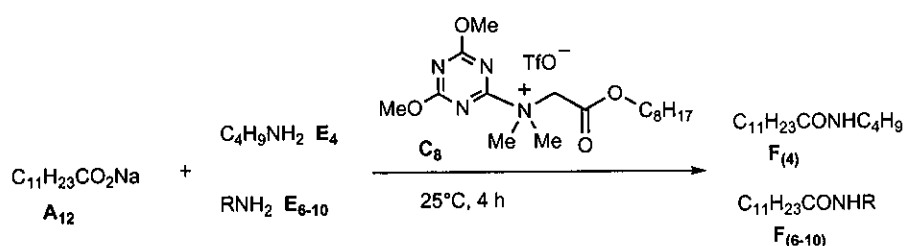
タン酸塩 A₈は均一に溶解した単分子分散状態をとるのに対し、ラウリン酸塩 A₁₂やオレイン酸塩 A_{18:1}はミセルを形成すると考えられる。その結果、表1に示すようにエチル基を有する水溶性の縮合剤 C₂を用いた場合、炭素数の4つ異なる A₄と A₈では速度に全く変化が見られなかったが、さらにメチレンが4つ多いラウリン酸塩 A₁₂では56倍の加速が見られた。次にアルキル基を長くした縮合剤 C₈~C₁₆を用いると A₁₂においては千倍以上の加速が見られた。カルボキシル基によるトリアジノ基への反応速度定数は A や C のアルキル鎖長に関係なく同じであると仮定すると、観察された加速はミセル形成によるものと結論できる。実際、A₁₂をさらに6つ炭素鎖の長い A_{18:1}に変えても加速は見られないとおり、単なる炭素鎖長ではなく、ミセル形成の有無と縮合剤の両親媒性が速度に直接影響をしていることがわかる。シクロデキストリンを用いた疎水性相互作用に基づく反応加速が十数倍であることを考えると、観察された最大2000倍の加速には Step 2のような界面での配向性効果の寄与が特に大きいと結論できる。この加速によって律速段階は Step 2から Step 3のアミノリシスへ移行しており、これがミセル系では臨界ミセル濃度 (cmc) や炭素鎖長によって大きな速度変化が見られなかった原因の一つと考えられる。

この結果に基づいて、A₄、A₈、A₁₂の内、2者の等モル混合物を用いて競合的アミド化反応を行ったところ、表2に示す通り表1で観察された速度比を良く反映した選択性でアミドが得られた。特に F₁₂が短時間に高収率および高選択性で得られたことから、長鎖脂肪酸 A₁₂に対する反応促進が分子選択性向上の直接的原因であり、反応促進と選択性向上というジレンマが見事に解消されていることがわかる。

鎖の長い F₈が99%以上の選択性で得られた。

一方、Step 3に示す長鎖アミンに対する分子選択性の発現も観察された。すなわち、カルボン酸にラウリン酸 A₁₂を用いて triton X-100の存在下、2種のアミンとの競合的な縮合反応を検討した。脂溶性の低いアミンとしてブチルアミン E₄を用い、これより疎水性の高いアミン E₆~E₁₀との競合反応を行ったところ、いずれも後者のアミンに対する高い選択性が観察された(表4)。なかでも炭素数がわずか2つ違うヘキシルアミンが96%の高い選択性で反応したことは非常に興味深い。

Table 4. Molecular selectivity for amine in a competitive reaction.



脂肪酸塩	収率	生成比
E ₄ vs E ₆	56%	F ₍₄₎ : F ₍₆₎ = 4 : 96
E ₄ vs E ₈	64%	F ₍₄₎ : F ₍₈₎ = 3 : 97
E ₄ vs E ₁₀	76%	F ₍₄₎ : F ₍₁₀₎ = 1 : 99

最後に、図2のように長短2種類ずつのカルボン酸 (A₄, A₁₂) とアミン (E₄, E₁₀) を用いた4成分での競合反応を行ったところ、両親媒性の長鎖カルボン酸と長鎖アミンの反応だけが著しく加速され、アミド F₁₂₍₁₀₎が高い選択性で得られた。メタノールを溶媒に用いた分子分散系を対照実験として検討したところ、有意な選択性は観察されなかった。

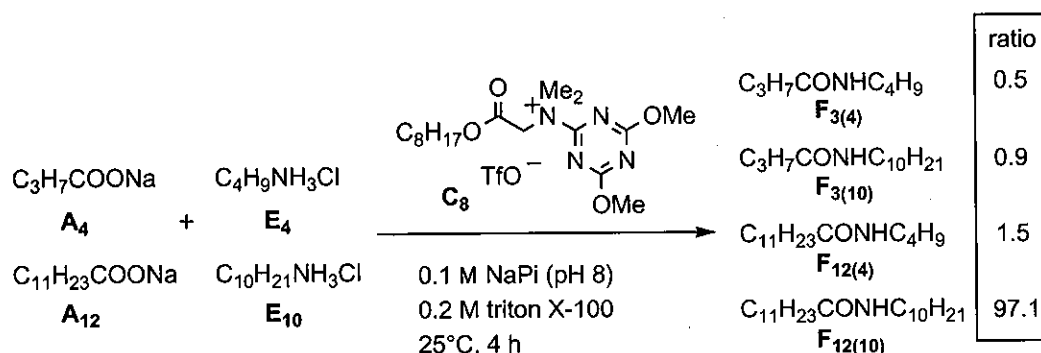


図2 ミセルを反応場とした4成分系での競合的脱水縮合反応

2-3 セラミド合成によって誘起される膜融合

界面活性剤が水中で形成する様々な分子集合状態は、それらを構成する界面活性剤分子の臨界充填パラメーターに依存することが知られている。たとえば、2分子膜小胞（リポソーム）を構成する脂質成分を膜内に留めたまま化学反応によって他の脂質分子へと変換すれば、このパラメーターが同時に変化し、結果として曲率の変化したりリポソームは自発的に融合や分裂などの形態変化を起こすと期待される。そこで、界面での脱水縮合反応を利用して、スフィンゴシン *N*-アシル基転移酵素モデルを構築し、このモデルによるセラミド合成をリポソーム中で行うことによって融合を誘起させることを計画した。図3のように脂質分子の構造的变化によってリポソームの外葉の脂質密度が疎になると同時に、電荷の消失によって、リポソームの凝集と引き続く融合が誘起されると期待した。

高価なスフィンゴシンの代わりに、アルキル鎖長の異なる誘導体の合成が容易で、同様の効果が期待できる化合物 P を擬似スフィンゴシンとして用い、この P と脂肪酸 A との脱水縮合反応を膜界面で行った。反応は、同様に膜内に埋め込んだ3級アミン 触媒 B（非活性化アシル基転移酵素）と水中に添加した DMT-Cl とのカップリングによって界面で発生させた脱水縮合剤 C によって進行し、最終的に擬似セラミド Q が生成する。

リポソームには、レシチン、反応基質（A 及び P）、および界面集積型3級アミン触媒 B

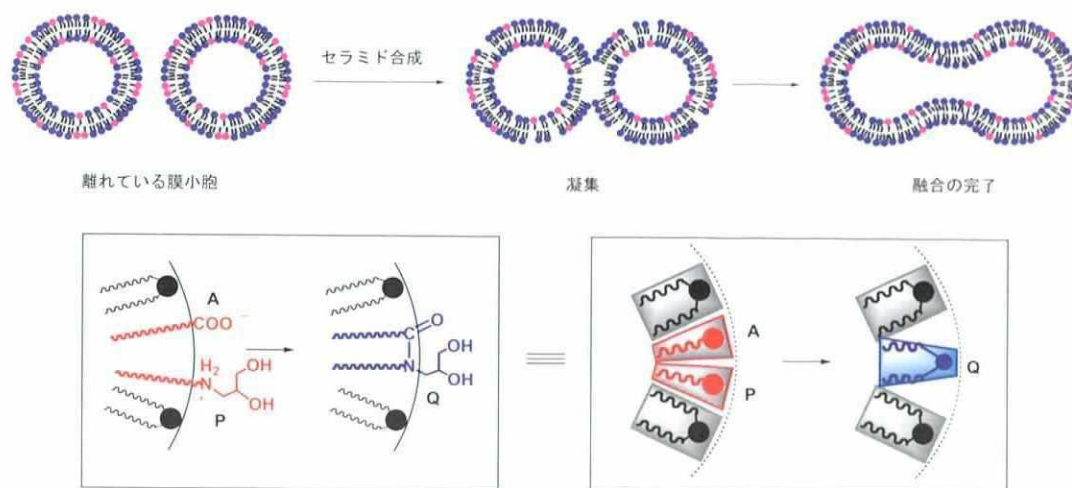


図3 擬似セラミド合成と膜融合

を構成要素に持つ SUV（small unilamellar vesicle）を調製し、融合は市販のリン脂質型蛍光プローブ（NBD-PE および Rh-PE）を用いたプローブ混合法およびプローブ希釈法、粒子径測定、擬似セラミドの定量、さらに透過型電子顕微鏡によって評価した。プローブ混合法では、上記のリポソームに微量の NBD-PE を導入したりリポソームと、Rh-PE を導入した

リポソームとを混合し、これらのリポソームの融合が起きることによって両プローブが混合し、その結果誘起される蛍光エネルギーの転移（Förster 転移）を観察する方法である。プローブ希釈法はその逆で、両プローブを予め混合したりリポソームとプローブを含まないリポソームの融合によって、解消されるエネルギー転移を評価する方法である。膜融合実験は、2種類のリポソーム水溶液を混和し、CDMT を添加後、室温で静置し、所定の時間毎に必要な機器分析を行った。

その結果、ラウリン酸 A_{12} およびそれ以上の炭素鎖を有するカルボン酸を含む反応系において、室温 3 時間以内に顕著な蛍光変化が見られたが、オクタン酸 A_8 を用いたりリポソームでは殆ど変化は見られなかった。この結果は表 1 の反応速度比をよく反映している。また、界面集積性の縮合剤 C_{16} を発生させる代わりに、界面集積性のない水溶性脱水縮合剤 DMT-MM を用いた場合には、蛍光は殆ど変化しなかった。さらに、蛍光変化に伴う粒子径の増大や、蛍光変化に先立つ擬似セラミド Q の生成が確認され、いずれの結果も人工 *N*-アシル基転移酵素によって触媒される脂質 2 分子膜-水界面での効率的な脱水縮合反応によって、膜融合が誘起されたことを示している。

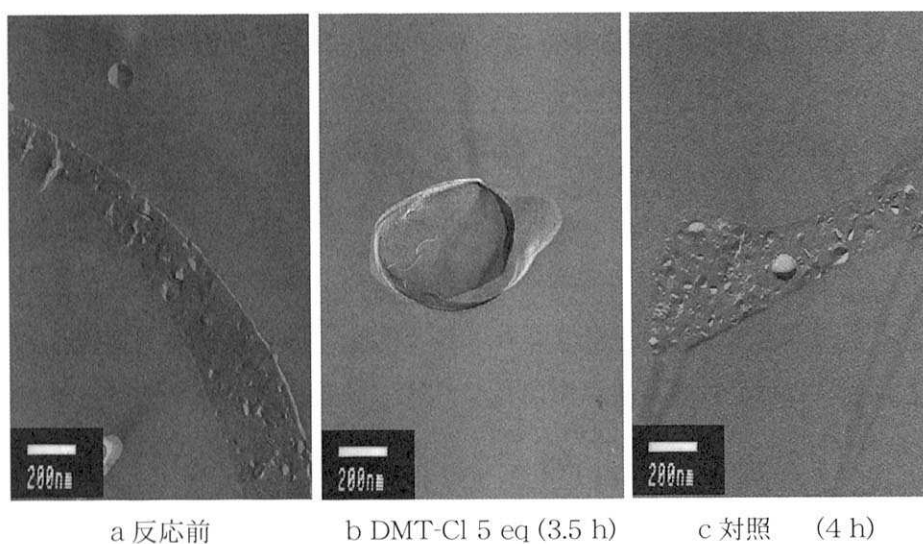


図 4 透過型電子顕微鏡写真

図 4 は凍結切断法による透過型電子顕微鏡の写真であり、蛍光実験の時より高濃度のリポソームを用いたため、最大 20 倍程度の粒径の増大が確認された。このことから、数千個の SUV の融合が起きたことが示唆される。

一般に膜融合は、カルシウムイオンなどの 2 価金属イオン、ポリエチレングリコール、あるいはタンパク質などの、いわゆる膜融合誘起剤と呼ばれる物質を外部から添加することに

よって誘起される。その原理は、膜表面の脱水和や電荷の中和によって膜間の反発を軽減し、あるいは膜間の架橋などによってその凝集を促進することであり、凝集したリポソームは、疎水環境下における2分子膜の乱れによって融合すると考えられている。これらはリポソームの外側から物理的刺激を与えることによって、いわば強制的に融合を引き起こす方法であり、融合を目的とする場合には簡便であるが、生体機能のモデルとしては十分とは言えない。今回見出したセラミド合成による融合方法は、リポソーム内面からの化学的な刺激によって自発的に誘起されるものであり、より生体膜融合に近い現象と考えられる。特に、脂質分子構造の化学変化と膜の形態変化との密接な関連性を証明した点で、生体膜融合の機構解明に役立つ新しいモデルとして期待される。

2-4 その他

上記以外の研究成果として、界面でのエステル化反応、新しい概念に基づく固定化脱水縮合剤の開発とこれを用いた固-液界面での脱水縮合反応、シクロデキストリンを逆相間移動触媒に用いた液-液界面での分子選択的反応などについて重要な成果を得ることができた。

3 今後の展開

2分子反応は1分子反応と比べて低濃度での速度低下の度合いが大きいので、これを加速することは合成化学上特に重要であるが、同時にそれだけに困難な課題でもある。本研究は、ミセル-水界面での脱水縮合反応という点もさることながら、反応物や試薬の化学的特徴を利用して、連続した3つの2分子過程 (Step 1~3) を加熱することなく、すべて加速することに成功した点でも大きな意味を持つ。本研究において界面への分子の自発的な集積と配向を促進するための条件が明らかとなったので、今後はこの現象を利用して、界面に並んだ分子間での非共有結合的相互作用による相互認識を利用して、化学、位置、および立体選択性の発現を目指した反応への展開が可能となる。また、膜融合に関する成果に基づいて、生命活動の中で見られる膜の様々な形態変化に関する機構解明のためのモデル系の構築、ドラッグデリバリーや遺伝子導入のための新しいツールの開発、さらに反応場としてのナノフラスコへの利用など、生命現象の解明から有機合成まで、脱水縮合反応を機軸とする幅広い研究展開の道が拓かれたと考えられる。

謝 辞

終わりに臨み、本研究実施の機会をお与え頂くとともに多くの貴重なご意見を頂きました合志領域研究総括ならびに領域アドバイザーの先生方に厚く御礼申し上げます。また、研究を遂行するにあたりご便宜をおはかり頂いた神戸学院大学薬学部 谷昇平教授、紀氏健雄前薬学部長に感謝申し上げます。研究環境に関する相談から励ましに至るまで様々なサポートを頂いた領域事務所の皆様に感謝申し上げます。本研究において多大なご協力を頂いた神戸学院大学薬学部助手 日置和人博士、さらに実験を実施して頂いたグループメンバーの高岡季代博士、松岡圭介博士、西田仁博士、竹中康博士、並びに神戸学院大学薬学部学生諸氏に感謝します。

研究成果リスト

(発表論文)

1. Unusual Rate Enhancement of Bimolecular Dehydrocondensation to Form Amides at the Interface of Micelles of Fatty Acid Salts
Angew. Chem., Int. Ed. Engl. in press
M. Kunishima, H. Imada, K. Kikuchi, K. Hioki, J. Nishida, S. Tani
2. Development of Novel Polymer-type Dehydrocondensing Reagents Comprised of Chlorotriazines
Chem. Commun. 2005, 2698.
M. Kunishima, K. Yamamoto, Y. Watanabe, K. Hioki, S. Tani
3. Substrate-Specific Amidation of Carboxylic Acids in a Liquid-Liquid Two-Phase System Using Cyclodextrins As an Inverse Phase Transfer Catalyst
Eur. J. Org. Chem., 2004, 4535.
M. Kunishima, Y. Watanabe, K. Terao, S. Tani
4. Development of a Simple System for Dehydrocondensation Using Solid-Phase Adsorption of a Water-Soluble Dehydrocondensing Reagent (DMT-MM)
Chem. Pharm. Bull., 2004, 52, 1223.
Y. Watanabe, T. Fuji, K. Hioki, S. Tani, M. Kunishima
5. Preparation of Weinreb Amides Using 4 - (4, 6 - Dimethoxy - 1, 3, 5-triazin - 2 - yl) - 4 - methylmorpholinium Chloride (DMT-MM)
Chem. Pharm. Bull., 2004, 52, 470.
K. Hioki, R. Ohkihara, H. Kobayashi, S. Tani, M. Kunishima

(特許出願)

1. 脱水縮合反応により相転移を生じ得る分子集合体およびその相転移方法, 特願2005-21241・平成17年1月28日, 出願人: 独立行政法人科学技術振興機構, 発明者, 国嶋崇隆
2. 水界面への集積性を有する脱水縮合剤, 特願2004-33284・平成16年2月10日, 出願人: 独立行政法人科学技術振興機構, 発明者, 国嶋崇隆

(国際特許)

1. 水界面への集積性を有する脱水縮合剤
PCT/JP2005/001733・平成17年1月31日,
出願人: 独立行政法人科学技術振興機構, 発明者, 国嶋崇隆

(著書, 総説等)

1. 第5版 実験化学講座 第16巻, 酸アミドおよび酸イミド, 丸善, 国嶋崇隆
2. 第5版 実験化学講座 第16巻, ラクタム, 丸善, 国嶋崇隆
3. メディアとしての水の特性を利用したアミド化反応
ファルマシア, Vol. 41, No. 7, pp. 654-658, 2005. 7, 国嶋崇隆
4. 新規トリアジン型脱水縮合剤の合成と用途開発
和光純報, Vol. 72, No. 2, pp. 8-11, 2004. 4, 国嶋崇隆

(招待講演等)

1. Substrate-Specific Amidation of Carboxylic Acids Utilizing Cyclodextrin
The 3rd Asian Cyclodextrin Conference 天津, 中国・2005年5月
2. 古くて新しい脱水縮合反応
第36回若手ペプチド夏の勉強会 神戸・2003年8月
3. 生物学的機能を志向した脱水縮合反応
日本薬学会 第124年会 大阪・2004年3月
4. 新しい脱水縮合反応の開発と応用: 反応場と機能を求めて
徳島大学薬学部特別講演会 徳島・2005年10月
5. トリアジン化合物の特性を利用した新しい脱水縮合反応: 反応場と機能を求めて
日本薬学会東海支部特別講演会 岐阜・2005年11月

(主な学会発表)

1. 脂肪酸塩によって形成される分子集合相中でのアミド化反応
日本薬学会 第124年会 大阪・2004年3月
国嶋崇隆, 今田比呂子, 谷 昇平
2. ポリマー非担持式自己重合型脱水縮合剤の開発

- 日本薬学会 第124年会 大阪・2004年3月
国嶋崇隆, 山本和義, 日置和人, 谷昇平
3. 環境調和を目指した新しいポリマー型脱水縮合剤の開発
第30回 反応と合成の進歩シンポジウム 札幌・2004年10月
国嶋崇隆, 山本和義, 渡辺泰伸, 長谷川ますみ, 日置和人, 谷昇平
4. ミセル水界面を反応場とするカルボン酸とアミンの脱水縮合反応
第54回 日本薬学会 近畿支部 神戸学院大学・2004年10月
国嶋崇隆, 菊池可菜子, 今田比呂子, 谷昇平
5. ROMP を利用した固定化トリアジン型縮合剤の開発
日本薬学会 第125年会 東京 2005年 3月
国嶋崇隆, 日置和人, 近藤智仁, 谷昇平
6. ミセルを反応場とした脱水縮合反応における長鎖アミンの反応加速に関する検討
日本薬学会 第125年会 東京 2005年 3月
国嶋崇隆, 菊池可菜子, 谷昇平
7. 二分子膜-水界面における膜構成分子のアミド化反応により誘起されるリポソーム膜融合法の開発
日本薬学会 第125年会 東京 2005年 3月
国嶋崇隆, 戸梶 雅文, 松岡 圭介, 西田 仁, 谷 昇平
8. 分子集合体中での基質選択的縮合反応
日本化学会第86春季年会 船橋 2005年 3月
西田仁, 菊池可菜子, 日置和人, 谷昇平, 国嶋崇隆
9. 水界面での脱水縮合反応を起動力とする新しい膜融合法の開発
第3回次世代を担う有機化学シンポジウム 東京2005年 5月
国嶋崇隆, 戸梶雅文, 松岡圭介, 西田仁, 日置和人, 谷昇平
10. 分子集合体の形成を利用した基質選択的脱水縮合反応
第58回コロイドおよび界面化学討論会 宇都宮 2005年 9月
西田仁, 菊池可菜子, 竹本淳一, 日置和人, 谷昇平, 国嶋崇隆
11. DEVELOPMENT OF NOVEL POLYMER-TYPE DEHYDROCONDENSING REAGENTS
COMPRISED OF CHLOROTRIAZINES
第42回ペプチド討論会 大阪 2005年 10月
Kazuhito Hioki, Kazuyoshi Yamamoto, Shohei Tani, Munetaka Kunishima
12. 脂肪酸塩によって形成される分子集合相中でのエステル化反応
第55回 日本薬学会 近畿支部 武庫川女子大学 2005年 10月
国嶋崇隆, 萩原裕美, 日置和人, 谷昇平
13. ミセル-水界面を反応場とするカルボン酸とアミンの基質特異的脱水縮合反応
第31回 反応と合成の進歩シンポジウム 神戸 2005年 11月
国嶋崇隆, 今田比呂子, 菊池可菜子, 日置和人, 西田仁, 谷昇平