

Title	酵素類似の触媒作用を示すフットプリント触媒
Author(s)	嶋田, 豊司
Citation	大阪大学, 1995, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.11501/3081519
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

酵素類似の触媒作用を示す
フットプリント触媒

(Studies on Footprint Catalysts Mimicking Enzymatic Catalysis)

1994

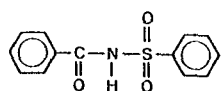
嶋田豊司

公表論文

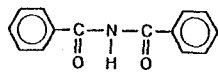
- 1) K. Morihara, E. Tanaka, Y. Takeuchi, K. Miyazaki, N. Yamamoto, Y. Sagawa, E. Kawamoto, and T. Shimada
"Footprint Catalysis. III. Inducible Alteration of Substrate Specificities of Silica (Alumina) Gel Catalysts for 2,4-Dinitrophenolysis of Toluic Anhydrides by Footprint Imprinting."
Bull. Chem. Soc. Jpn., **62**, 499-505 (1989).
- 2) T. Shimada, K. Nakanishi, and K. Morihara
"Footprint Catalysis. IV. Structural Effects of Templates on Catalytic Behavior of Imprinted Footprint Cavities."
Bull. Chem. Soc. Jpn., **65**, 954-958 (1992).
- 3) K. Morihara, M. Kurokawa, Y. Kamata, and T. Shimada
"Enzyme-like Enantioselective Catalysis over Chiral "Molecular Footprint" cavities on a Silica (Alumina) Gel Surface."
J. Chem. Soc. Chem. Commun., **1992**, 358-360.
- 4) T. Matsuishi, T. Shimada, and K. Morihara
"Definitive Evidence for Enantioselective Catalysis over "Molecular Footprint" Catalytic Cavities Chirally Imprinted on a Silica (Alumina) Gel Surface."
Chem. Lett., **1992**, 1921-1924.
- 5) T. Shimada, R. Kurazono, and K. Morihara
"Footprint Catalysis. V. Substituent Effects of Template Molecules on Catalytic Behavior of Imprinted "Molecular Footprint" Cavities."
Bull. Chem. Soc. Jpn., **66**, 836-840 (1993).
- 6) K. Morihara, S. Kawasaki, M. Kofuji, and T. Shimada
"Footprint Catalysis. VI. Chiral "Molecular Footprint" Catalytic Cavities Imprinted by a Chiral Template, Bis(N-benzyloxycarbonyl-L-alanyl)amine, and Their Stereoselective Catalyses."
Bull. Chem. Soc. Jpn., **66**, 906-913 (1993).
- 7) K. Morihara, S. Doi, M. Takiguchi, and T. Shimada
"Footprint Catalysis. VII. Reinvestigation of the Imprinting Procedures for "Molecular Footprint" Catalytic Cavities: The Effects of Imprinting Procedure Temperature on the Catalytic Characteristics."
Bull. Chem. Soc. Jpn., **66**, 2977-2982 (1993).

- 8) K. Morihara, T. Iijima, H. Usui, and T. Shimada
"Footprint Catalysis. VIII. Molecular Imprinting for Footprint Cavities on an Active Clay Surface."
Bull. Chem. Soc. Jpn., **66**, 3047-3052 (1993).
- 9) T. Matsuishi, T. Shimada, and K. Morihara.
"Footprint Catalysis. IX. Molecular Footprint Catalytic Cavities Imprinted with Chiral Hydantoins; Enantioselective Hydantoinase Mimics." *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **67**, 748-756 (1994).
- 10) T. Shimada, R. Hirose, and K. Morihara
"Footprint Catalysis. X. Surface Modification of Molecular Footprint Catalysts and Its Effects on Their Molecular Recognition and Catalysis." *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **67**, 227-235 (1994).
- 11) K. Morihara, M. Takiguchi, and T. Shimada
"Footprint Catalysis. XI. Molecular Footprint Cavities Imprinted with Chiral Amines and Their Chiral Molecular Recognition." *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **67**, 1078-1084 (1994).
- 12) T. Shimada, Y. Deguchi, and K. Morihara
"Footprint Catalysis. XII. Footprint Imprinting using Hammett Indicators as Templates; Basicities of Templates and Characteristics of the Catalytic Cavities."
Bull. Chem. Soc. Jpn., (1994), to be submitted.
- 13) T. Shimada, K. Morihara, H. Taguchi, and S. Yamabe
A Novel Bonding Pattern Composed of the Al-O-C Assisted by Neighboring Hydrogen Bonds for Formation of Cavities with the Adsorption of Imprinted Template Molecule.
J. Chem. Soc. Perkin II, **1994**, to be submitted.

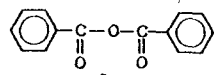
本論文中で用いる化合物の名称、記号およびその構造式



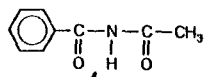
1
N-Benzoylbenzenesulfonamide



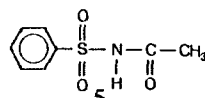
2
Dibenzamide



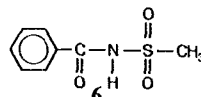
3
Benzoic anhydride



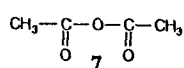
4
N-Acetylbenzamide



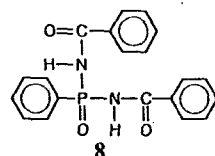
5
N-Acetylbenzenesulfonamide



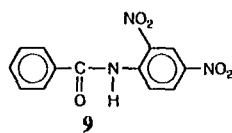
6
N-Methylsulfonylbenzamide



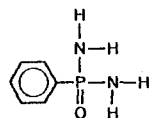
7
Acetic anhydride



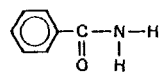
8
N,N'-Dibenzoylbenzenephosphonodiamide



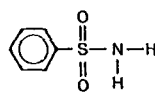
9
N-Benzoyl-2,4-dinitroaniline



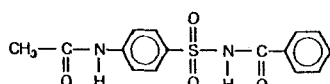
10
Benzenephosphonodiamide



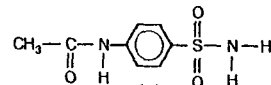
11
Benzamide



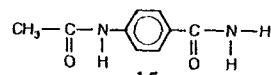
12
Benzenesulfonamide



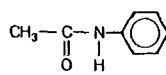
13
N-Benzoyl-4-(acetamido)benzenesulfonamide



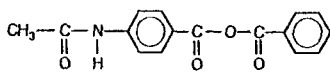
14
4-(Acetamido)benzenesulfonamide



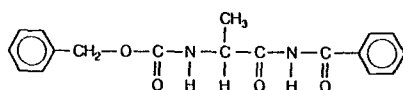
15
4-(Acetamido)benzamide



16
Acetanilide

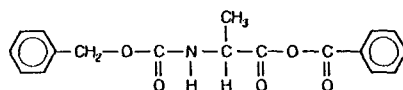


17
4-(Acetamido)benzoic benzoic anhydride



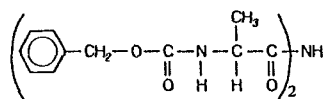
L 18, DL 19

N-Benzoyl-(N^α-benzyloxycarbonyl)-L-alaninamide



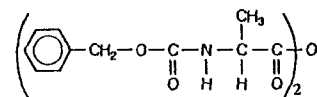
L 20, rac. 21

Benzoic N-benzyloxycarbonylalanine anhydride



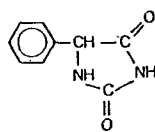
22

Bis-(N-benzyloxycarbonyl-L-alanyl)amine

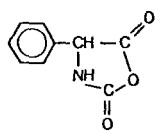


L 23, D24, meso 25

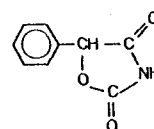
Bis-(N-benzyloxycarbonylalananyl)oxide



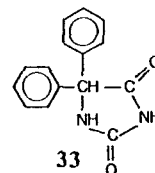
(5R)-26, (5S)-27, rac-28
5-Phenyl-2,4-imidazolidinedione
(5-Phenylhydantoin)



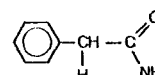
(5R)-29, (5S)-30
N-Carboxy-phenylglycine anhydride



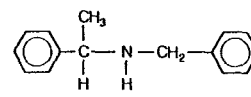
(5R)-31, rac.-32
5-Phenyl-2,4-diketo-tetrahydro-oxazole



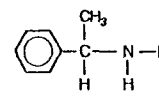
33
5,5-Diphenyl-2,4-imidazolidinedione
(5,5-diphenylhydantoin)



34
2-Phenylacetamide



(R)-35, (S)-36
N-Benzyl-α-methylbenzylamine



(R)-37, (S)-38
α-Methylbenzylamine

目次

	ページ
緒論	1
第1章 フットプリント触媒の調製とその触媒活性の評価	
1-1 序論	6
1-2 実験	7
1-2-1 原料	7
1-2-2 触媒の調製	8
1-2-3 アルミナシリカゲル触媒の酸特性の測定	12
1-2-4 測定機器	12
1-2-5 反応速度の測定法	12
1-2-5-1 標準反応	12
1-2-5-2 阻害反応	13
1-2-5-3 触媒サイトの滴定	13
1-3 結果と考察	15
1-3-1 2,4-ジニトロフェノリシスの分光学的考察	15
1-3-2 速度論的考察	17
1-3-3 触媒サイト濃度の結果と考察	18
1-3-4 2,6-ジメチルピリジンによる触媒サイトの被毒	19
1-3-5 触媒の酸強度	21
1-3-6 触媒作用の動力学パラメーター	21
第2章 鑄型分子の構造に起因するフットプリント触媒の触媒作用	
2-1 序論	23
2-2 実験	23

2-3	結果と考察	24
2-3-1	基質特異性	24
第3章	触媒される反応の遷移状態類似物を鑄型分子として調製した フットプリント触媒の触媒活性について	
3-1	序論	29
3-2	実験	29
3-3	結果と考察	30
3-3-1	鑄型分子中の電子対供与部位の決定	30
3-3-2	フットプリント触媒作用の熱力学的考察	35
第4章	鑄型分子の置換基効果が示すフットプリント触媒への影響	
4-1	序論	39
4-2	実験	39
4-3	結果と考察	41
4-3-1	4-ベンゾイル-4-(アセトアミド)ベンゼンスルホン アミドを鑄型分子に用いたフットプリントキャビティ が示す分子認識力	41
4-3-2	基質特異性に及ぼす置換基効果	45
第5章	フットプリント触媒の表面修飾による分子認識力とその触媒 活性に及ぼす影響	
5-1	序論	49
5-2	実験	49
5-2-1	鑄型分子	49
5-2-2	基質	50

5-2-3	フットプリント触媒の表面修飾	50
5-2-4	触媒表面の分析	52
5-3	結果と考察	52
5-3-1	修飾フットプリント触媒の表面の分析	52
5-3-2	修飾フットプリント触媒の酸強度および酸点の定量	52
5-3-3	フットプリント触媒表面のフットプリントキャビティー の面積比	53
5-3-4	表面修飾によるフットプリント触媒ゲル粒子の特性	52
5-3-5	表面修飾がフットプリントキャビティーの分子認識力に 与える影響	55
5-3-6	表面修飾の触媒作用への効果	59
第6章	キラルなフットプリント触媒サイトにおけるエナンチオ 選択的触媒作用	
6-1	序論	62
6-2	実験	65
6-3	結果	69
6-3-1	アラニン誘導体 (18、19) を鋳型としたフットプリント 触媒のエナンチオ選択的触媒作用	69
6-3-2	アラニン誘導体 (22) を鋳型としたフットプリント触媒 のエナンチオ選択的触媒作用	75
6-3-3	ヒダントイン誘導体 (26、27、28) を鋳型としたフット プリント触媒のエナンチオ選択的触媒作用	89
6-3-3-1	反応生成物の確認	89
6-3-3-2	酸無水物基質 (29、30) に対する触媒作用	89
6-3-3-3	鋳型分子そのもの (26-28) を基質とした触媒作用	93

6-3-3-4	エナンチオ選択的触媒作用の機構	99
6-3-3-5	エナンチオ選択性の温度変化による影響	101
6-3-4	キラルなマンデル酸誘導体である(-)-(5 <i>R</i>)-5-フェニル- 2,4-ジケトテトラヒドロオキサゾール(31)を鑄型とした フットプリント触媒のエナンチオ選択的触媒作用	103
6-3-5	キラルなアミン、(<i>R</i>)-(+)- <i>N</i> -ベンジル- α -メチルベンジル アミン 35, (<i>S</i>)-(-)- <i>N</i> -ベンジル- α -メチルベンジルアミン 36, を鑄型としたフットプリント触媒のエナンチオ選択的触媒 作用	107
第7章 非晶質粘土鉱物である活性白土表面におけるフットプリントキャ ビティの形成		
7-1	序論	118
7-2-1	活性白土	118
7-2-2	鑄型分子	118
7-2-3	基質	118
7-2-4	溶媒および求核剤	119
7-2-5	触媒の調製	119
7-2-6	処理後活性白土の酸強度	121
7-3	結果と考察	121
7-3-1	フットプリントキャビティの形成	121
7-3-2	非晶質粘土触媒調製条件の違いによる特徴	122
7-3-3	フットプリントキャビティが示す触媒作用	125
7-4	原始酵素として機能するフットプリントキャビティ	129
参考文献		131
謝辞		137

緒論

キモトリプシンやパパインなどのタンパク分解酵素の触媒機構が明らかになるにつれて、酵素の高選択的かつ高活性な触媒作用を模倣したいという“模倣の化学”バイオミメティックケミストリーが急速に進歩してきた。これは、最近の包接化合物の化学の体系化とも相俟って、現代化学の大きな分野を確立している。

包接現象そのものについては1927年、Pfeifferが初めて報告しているが”ホストゲストの化学”と命名したのは1974年C r a mが最初である¹⁾。これらのホストは有機ホストと無機ホストに分類されるが、特に前者の報告は多岐にわたっている。Cramer, Bender のシクロデキストリン^{2, 3)}、Pederson のクラウンエーテル⁴⁻⁶⁾、Lehn のクリプタンド⁷⁾、Cram のスフェランド^{8, 9)}、キャビタンド¹⁰⁾などの大環状化合物、また最近ではWatson-Crick 型水素結合とHoogsteen 型水素結合が同時に形成されるJ. Rebeck, Jr. のモレキュラークレフトのように、高度な分子認識が可能になりつつある¹¹⁻¹⁵⁾。しかし生体内分子のレベルにはまだまだ届かないながらも中には天然酵素類似の反応も報告されている。

例えばBreslowは β -シクロデキストリンをビスイミダゾール修飾したホストの合成を行い、このホストがMichaelis-Menten式に従う人工酵素となることを見出し、はじめて”artificial enzyme”と称した¹⁶⁾。他にも18-クラウン-6の側鎖にジヒドロピリジンをもつホストが触媒するNADH-NADP⁺ モデル反応も、Michaelis-Menten式に従う反応である¹⁷⁾。一方、エナンチオ選択性を示すホストや人工触媒も数多く報告されている¹⁸⁻²⁵⁾。例えばビナフチルによる軸不斉を分子内にもつキラルなクラウンエーテル誘導体でアミノ酸の光学分割を行うもの²²⁻²⁵⁾、修飾シクロデキストリンで高い不斉選択性をしめすものなどが報告されている¹⁸⁻²¹⁾。

反面これらのホストへのアプローチには大きな困難が伴う。すなわち多点認識を行う生体内化合物の模倣であるホストの設計と合成は、著しく難しいことである。一般に分子認識は、1)イオン結合、2)イオン-双極子、3) π 電子相互作用、4)配位結合、5)電荷移動相互作用、6)疎水相互作用、7)水素結合、8)ファンデルワールス力 などでおこるとされている²⁶⁾。このような分子認識をもたらす複数の官能基を、ホスト分子内のキャビティーに組み入れ、しかも取り込まれるゲスト分子に対して、相互作用が可能なように厳密に配向させる事は、現在の発展した有機合成の手法を以てしても、至難の技である。その上、ゲストの構造が複雑になればなる程、それに対応するホストの設計と合成が困難になり、また人工酵素の基質特異性が高くなればなる程、扱う基質の数だけ人工酵素の種類が必要となる。ホスト・ゲストによるアプローチには、このような宿命的な困難が付きまとう。

この困難を回避できる、もう一つのアプローチは鑄型(重合)合成を用いる方法である。これはゲスト分子の存在下にホストを重合させて、ゲストに相補的な構造をもつキャビティーを形成させるものである。

1949年F.H.Dickeyは、水ガラスにアゾ色素を鑄型分子として共存させて調製したシリカゲルからアゾ色素を抽出除去し、シリカゲル表面にアゾ色素と相補的なキャビティーを形成させ、そのアゾ色素誘導体の特異的吸着によるメチル、エチル、プロピル、ブチル各官能基の分子認識能を報告している^{27,28)}。これは、Paulingの抗体産生機構のミミックであって、生じたキャビティーは触媒機能をもたず化学量論的な吸着サイトとしてしか作用しない。また、ゲルの乾燥に伴う表面張力の増加によってゲルの表面構造が破壊されるため、これらの相補的キャビティーの安定性は乏しく実験の再現性が著しく低く、この研究はその後発展しなかった。

以後しばらくの間、類似の注目される報告はなかったが、1977年にWulffらはキラルな分子認識能を有する空孔をもつ、高分子の合成を報告

している²⁹⁾。これは、スチレン、アクリレートなどのビニル系モノマーを鑄型分子の共存下で重合させたあと、鑄型分子を抽出除去することにより、鑄型分子と相補的なキャビティを得る方法である。さらに、キラルな鑄型分子を用いて不斉場を作り出すことにも成功しているが、酵素類似の触媒機能を発現させるには、新たに官能基を適切な配向を以て導入しなければならない、これには多くの困難を伴うこと、また鑄型分子の共存下の重合反応が速度論制御で進行するため、厳密な意味での相補性が得られない場合がある。

それに対し、我々は前述した鑄型合成のアプローチをさらに発展させ全く新しい触媒機能と分子認識能をもつテラーメイド（“お誂え”）触媒を独自に開発した。これは鍵を用いて鍵穴をつくる分子刷り込み法によるものである。すなわち、シリカゲルのケイ素原子をアルミニウムイオンで部分的に同形置換して、ルイス酸性点を発生させ³⁰⁾、シリカアルミナゲルを得る。その後、目的とする反応基質の遷移状態類似物をその表面に分子刷り込みした後、メタノールで連続抽出することにより、鑄型分子を取り除くと鑄型分子に相補的な”足跡状の孔”（以下フットプリントキャビティという）が形成される。このフットプリントキャビティの底部にはローンペアアクセプターとなるアルミニウムルイス酸点が存在し、触媒サイトとして作用するため基質特異性を有する酸触媒となる。このフットプリント触媒サイトは、シリカアルミナゲル表面の再構築による熱力学制御で得られるものであり、鑄型分子の選択しだいで”お誂え”の触媒が調製可能となる。フットプリント触媒の分子認識力は基質とフットプリント触媒間の酸塩基相互作用、シラノール基との水素結合、および疎水相互作用を介して発現される。したがって鑄型分子に、反応の遷移状態類似物を用いることにより形成されるフットプリントキャビティは反応の遷移状態を安定化させ、反応を加速する。また酵素反応においてWolfenden が理

論づけたように酵素反応の基質の類似物よりも遷移状態類似物の方が、強い拮抗阻害作用を示す³¹⁾ ことを実験的に証明したことになる。これは天然酵素と基質との間の多点相互作用と類似のものであると考えられる。

最近、Lernerら、Schultzらは、筆者と同様に、Pauling³²⁾、Wolfendenの理論に基づいて、ハプテンに反応の遷移状態類似物を用いたモノクローナル抗体が酵素類似の反応を起こすことを見だし、全く新しい型の触媒である抗体酵素 "catalytic antibody" を報告している。この点からフットプリントキャビティーは、catalytic antibodyの化学版とも言えるものである³³⁻³⁵⁾。

以下に各章の内容について簡単に記す。

第1章ではフットプリント触媒の調製法とその触媒活性の測定について論じる。ここではアルミニウムイオンのドーピングのpH条件および、鋳型分子刷り込み時のpH条件など調製における諸条件と触媒活性の相関について述べる。

第2章では鋳型分子の構造の違いにより生ずる、鋳型分子中の電子対供与原子の変化について、フットプリント触媒が示す基質特異性から論じる。

第3章ではアシル転移反応の遷移状態類似物である、テトラヘドラル中間体類似物の有機リン化合物を鋳型分子に用いて調製を行なったフットプリントキャビティーでは、基質類似の鋳型分子で刷り込んだフットプリントキャビティーに比べ、約10倍の反応加速が確認されたことについて論じる。

第4章では鋳型分子の部分構造の相違により生じる触媒活性の違いについて述べる。ここでは*N*-ベンゾイルベンゼンスルホンアミド及びベンゼンスルホンアミドのpara位アセトアミド置換体を鋳型分子として調製したフットプリント触媒の触媒活性より、鋳型分子の置換基効果について論じる。

第5章ではフットプリント触媒表面のシラノール基をヘキサメチルジシ

ラザンによりトリメチルシリル化した修飾フットプリント触媒の分子認識力と触媒活性について論じる。

第6章では光学活性なアラニン誘導体、ヒダントイン誘導体、マンデル酸の環状誘導体、およびベンジルアミン誘導体を鑄型分子に用いて調製したフットプリント触媒が示すエナンチオ選択的触媒作用について一連の動力学式を求め、速度論的考察を行う。

第7章では非晶質粘土鉱物の活性白土にシリカゲルと同様の分子刷り込み処理を行ったフットプリント触媒がシリカ（アルミナ）ゲルフットプリント触媒と同等な機能を有し得る触媒となることについて報告する。

以上全く新しいシリカアルミナゲル表面を触媒サイトとするフットプリント触媒の基質特異性、触媒活性、分子認識能、および今後の可能性について論じる。

第1章 フットプリント触媒の調製とその触媒活性の評価

1-1 序論

フットプリント触媒は、アモルファスシリカアルミナゲル表面に、酵素類似の分子認識能を有するフットプリントキャビティーをもつ固体酸触媒である。シリカゲル表面は、水溶液中で、pHコントロールによりケイ酸の遊離による解重合とシロキサン結合生成による重合とが繰り返され、平衡状態に達する。したがって鑄型分子を共存させると、鑄型分子のシリカゲル表面への吸着により、鑄型分子を囲むような、シリカゲル表面の再構成が、起こるものと考えられる。そこで筆者は、シリカゲル表面との親和力を増加させると同時に、酸触媒サイトを形成させるため、シリカゲル表面のケイ素原子をアルミニウムイオンで、部分的に同形置換したシリカアルミナゲルを調製し、その表面に分子刷り込み処理、鑄型分子の抽出除去を行い、フットプリント触媒を得ることに成功した³⁶⁻⁴⁸⁾。フットプリント触媒は、鑄型分子の自由な選択により”のぞみ通り”の基質特異性をもつ触媒を、簡易な操作で調製できるテーラーメイド触媒である。

一方、Lernerら、Schultzらは、筆者と同様に、Pauling、Wolfendenの理論に基づいて、ハプテンとして、反応の遷移状態類似物を用いたモノクローナル抗体が酵素類似の反応を起こす触媒となることを見だし、抗体酵素 "catalytic antibody" と命名している³²⁻³⁵⁾。その意味において、フットプリント触媒は、catalytic antibody の化学版ともいえるものである。しかし catalytic antibody は、モノクローナル抗体産生に要する期間が長く、且つ技術的操作も必ずしも容易ではない。フットプリント触媒は、catalytic antibody調製における抗体がアモルファスシリカアルミナゲルに相当し、その表面に酵素類似のフットプリントキャビティーを熱力学的制御

で形成させる^{36,49)}ものであり、調製が極めて容易である。また、F.H.Dickeyの調製した水ガラスを原料とする特異的キャビティ^{-27,28)}では触媒機能をもたせることができないばかりか再現性に乏しく1952年のS.A.Bernhard⁵⁰⁾、同年のR.Curtiら⁵¹⁾の報告及び1955年のR.G.Haldemanら⁵²⁾の同様の報告がある程度で以後報告されていない。

これらの意味においてもMichaelis-Mentenの酵素動力学式に従う基質特異性を有するテラーメイド触媒の開発には大きな意義がある。

1-2 実験

1-2-1 原料

特に指定したもの以外は、Nacalai Tesque Co.Ltd. の特級試薬を用いた。

シリカゲル

Merck Kieselgel 60, art. no. 7754, particle size 0.06-0.20 nm, mesh 70-230.

鑄型分子

N-Benzoylbenzenesulfonamide(Ph-SO₂-NH-Bz, **1**):

Benzenesulfonamideをピリジン存在下通常の方法によりベンゾイル化して得た。融点 148°C(lit,⁵³⁾ 147°C); Calcd for C₁₃H₁₁NO₃S : C, 59.77; H, 4.21; N, 5.36 %. Found: C, 59.51; H, 4.26; N, 5.37%.

Dibenzamide(Bz-NH-Bz, **2**): 融点 145°C (lit,⁵⁴⁾ 148°C); Calcd for C₁₄H₁₁NO₂ : C, 74.67; H, 4.89; N, 6.22 %. Found: C, 74.81; H, 4.88; N, 6.18%.

基質

無水安息香酸(Ph-CO-O-CO-Ph, **3**) : ベンゼンと石油ベンジンにより再

結晶. 融点 42℃ (文献値⁵⁵⁾ 42℃)

溶媒 : アセトニトリル

塩化カルシウムで予備脱水したアセトニトリルに五酸化リンを加えて一昼夜放置する。その後Hempelカラムを用いて分別蒸留する。蒸留アセトニトリルに水素化カルシウムを加え水および酸成分を完全に除去するため蒸留を2回繰り返して行う(沸点 81-82℃) (lit. 81.6℃)。

求核剤 : 2,4-ジニトロフェノールカリウム塩

2,4-ジニトロフェノール (14.68 g、80mmol)を最少量のメタノールに溶かし、濃水酸化カリウム水溶液を加えて中和し、生成するカリウム塩を少量のメタノールで洗浄後、熱水で再結晶し、減圧下130℃で乾燥する。

被毒剤 : ピリジン

炭酸カリウムで予備脱水したものを、更にモレキュラーシーブで乾燥後、蒸留したものをを用いた。沸点 115-116 °C (lit.115.6 °C)

1-2-2 触媒の調製

触媒の調製過程を以下、順を追って示すと同時に、スキーム1-1にも示す。

1. シラノール基 (-Si-OH)を持つ湿潤ゲルの調製

Fritz, King の方法^{56,57)}に従い、Merck Kieselgel 60 reinst 120gを、濃塩酸 500cm³で部分加水分解し、シラノール基を遊離させ、シリカゲル表面を活性化する。イオン交換水で上澄みのpHが6になるまで繰り返し(20回程度)洗浄後、pH 7-8のNH₃水溶液で、3回洗浄し再びイオン交換水で3回洗浄する。この状態で乾燥させたものをブランク触媒と呼ぶ。

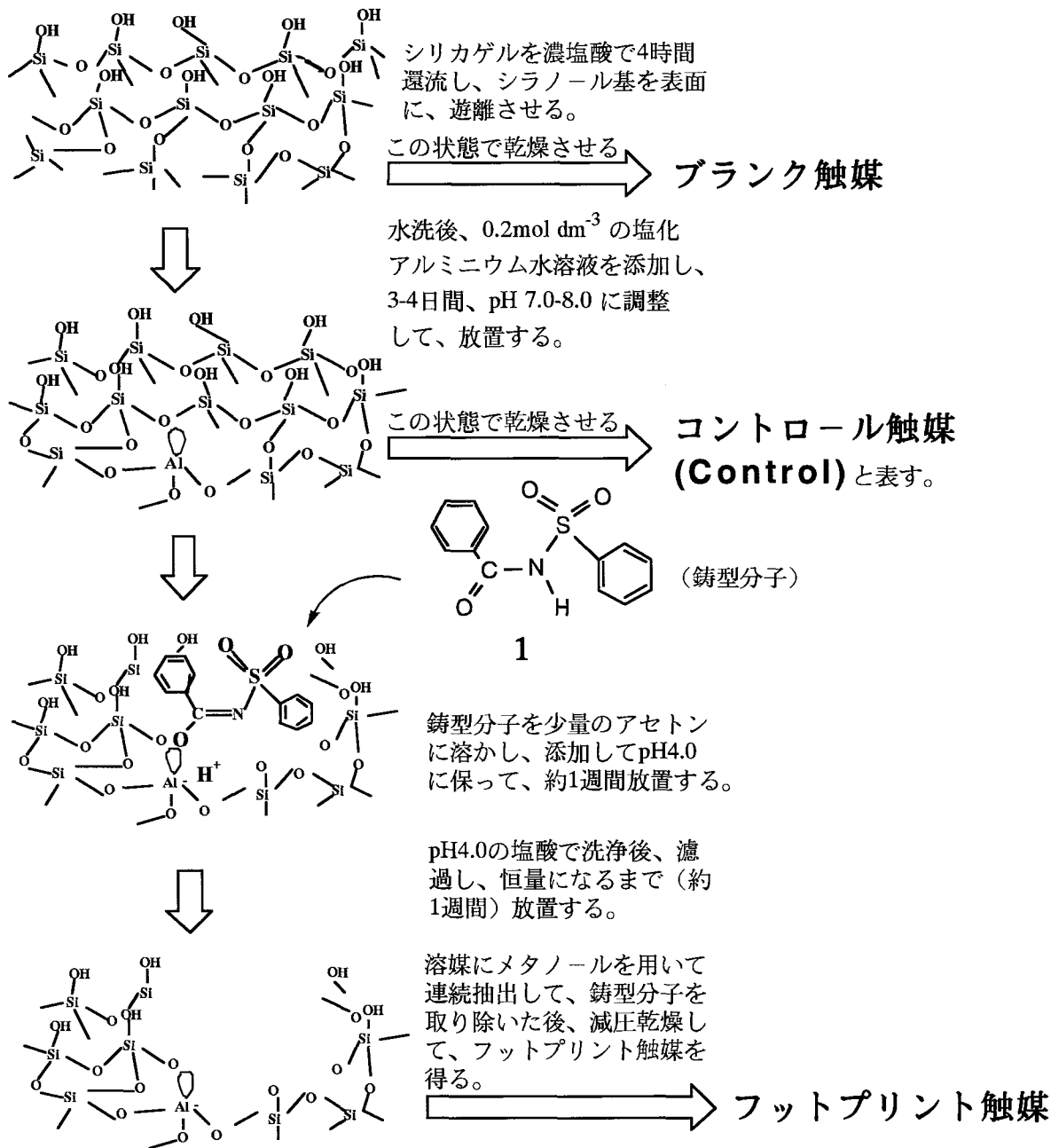
2. ルイス酸点を持つ湿潤ゲル(シリカアルミナゲル)の調製

湿潤ゲルに、シリカゲル乾燥時重量10gにつき、0.2 mol dm⁻³のAlCl₃

(2H₂O)水溶液を 50 cm³ 加える。希アンモニア水でpH7.0-8.0に調製し、常温で3-4日間、放置する。(後の研究で”希アンモニア水を用い、pHを6.5にし、80℃で3時間放置する。”という方法でドーピング処理を行うと、より活性の高いフットプリント触媒の調製が可能となることがわかった⁴²⁾。ここでは前記の条件に従った。)この操作により、活性化したシリカゲルの表面のSiとAl³⁺が同形置換されて、表面部分の一部のみが、シリカアルミナゲルになったゲルが得られる。シリカマトリックスに、取り込まれたアルミネイトは、テトラヘドラルの電子軌道をとるため、空軌道が生じ、ルイス酸性点が発生する。この状態で次の4.の風乾および5.の抽出を施したものを、コントロール触媒と呼ぶ。

3. フットプリントキャビティを有するシリカアルミナゲルの調製

デカンテーションで、シリカアルミナゲル表面上に堆積している水酸化アルミニウムの沈殿を取り除き、pH4.0の塩酸で上澄みが透明になるまで洗浄する。シリカゲル乾燥時重量 10gにつき、 1.5×10^{-3} molの鑄型分子を最少量のアセトンに溶解したものを加える。pH 1.0の希塩酸、pH 10-11のアンモニア水を用いてpH4.0に調整する。毎日pHを合わせながら1週間放置する。3-4日目pHは安定する。



この一連の操作で調製された鑄型分子に相補的なキャビティーをもつ触媒をフットプリント触媒と名付け、**1**を鑄型分子として調製した時、**{1}** と表す。

Scheme 1-1

4. 風乾

ゲルの上澄みと、析出している鑄型分子をデカンテーションで取り除き、直ちに pH4.0 の希塩酸を加えて、10 回 洗浄する。ヌッチェでゲルを、まだ十分水分を含んだ状態でろ過し、シャーレに広げて恒量になるまで室温で約7-10日間風乾する。この間にSi-O-Si 結合の組み替えが起こり、表面構造の再構成が行なわれる。この変化は熱力学制御のため、鑄型分子がゲルと最大の親和力を持つ、最適エネルギー構造で、安定化されるように、酸塩基複合体が形成される。

5. メタノール抽出

風乾によりゲルと最大の親和力を持つように組み込まれた鑄型分子をメタノールで連続抽出することによって、強制的に脱離除去すると、鑄型分子に相補的な構造をもつフットプリントキャビティー が残される。

乾燥したゲルを Soxhlet 連続抽出器に入れ、抽出液中の鑄型分子個々の紫外線吸収極大ピーク (λ_{\max})210-280nmの消失により抽出の完了を確認した。抽出後、円筒ろ紙のまま、塩化カルシウムを入れたデシケーターに移し、一晚減圧乾燥(3-30 mmHg)後、再び塩化カルシウムを入れ直し、シャーレ上で、一晚減圧乾燥(1 mmHg)させた。更に、140℃で減圧乾燥(1mmHg)し、ゲル表面に吸着しているメタノール分子を十分に取り除いた(このとき急激な加温および減圧を行うとフットプリントキャビティーが破壊される)。これが、分子刷り込み処理されたシリカアルミナゲル触媒標品で、フットプリント触媒と呼ぶものである。このゲルは、嚴重に湿気を防いで、密閉して保存した。以上により調製したゲルをフットプリント触媒と呼ぶ。

1-2-3 アルミナシリカゲル触媒の酸特性の測定

酸強度の決定は、Hammett の酸塩基指示薬を用いた Benesi の方法で行い⁵⁸⁾、またルイス酸性点の確認は、Pines と Haag の方法により、フェノールフタレインを用いて行った⁵⁹⁾。

1-2-4 測定機器

赤外線吸収スペクトルは、Perkin-Elmer 1740を用い、KBr法により測定した。¹H NMRスペクトルは、JEOL GX 270 高分解能核磁気共鳴装置を用いて、¹Hの共鳴周波数 270MHzで測定した。

吸光度の測定には、Shimazu UV-160 紫外可視分光光度計を用いた。

pHの測定には、HORIBA F-7 pHメータを用い、電極は、pH複合電極 #6326を用いた。

1-2-5 反応速度の測定法

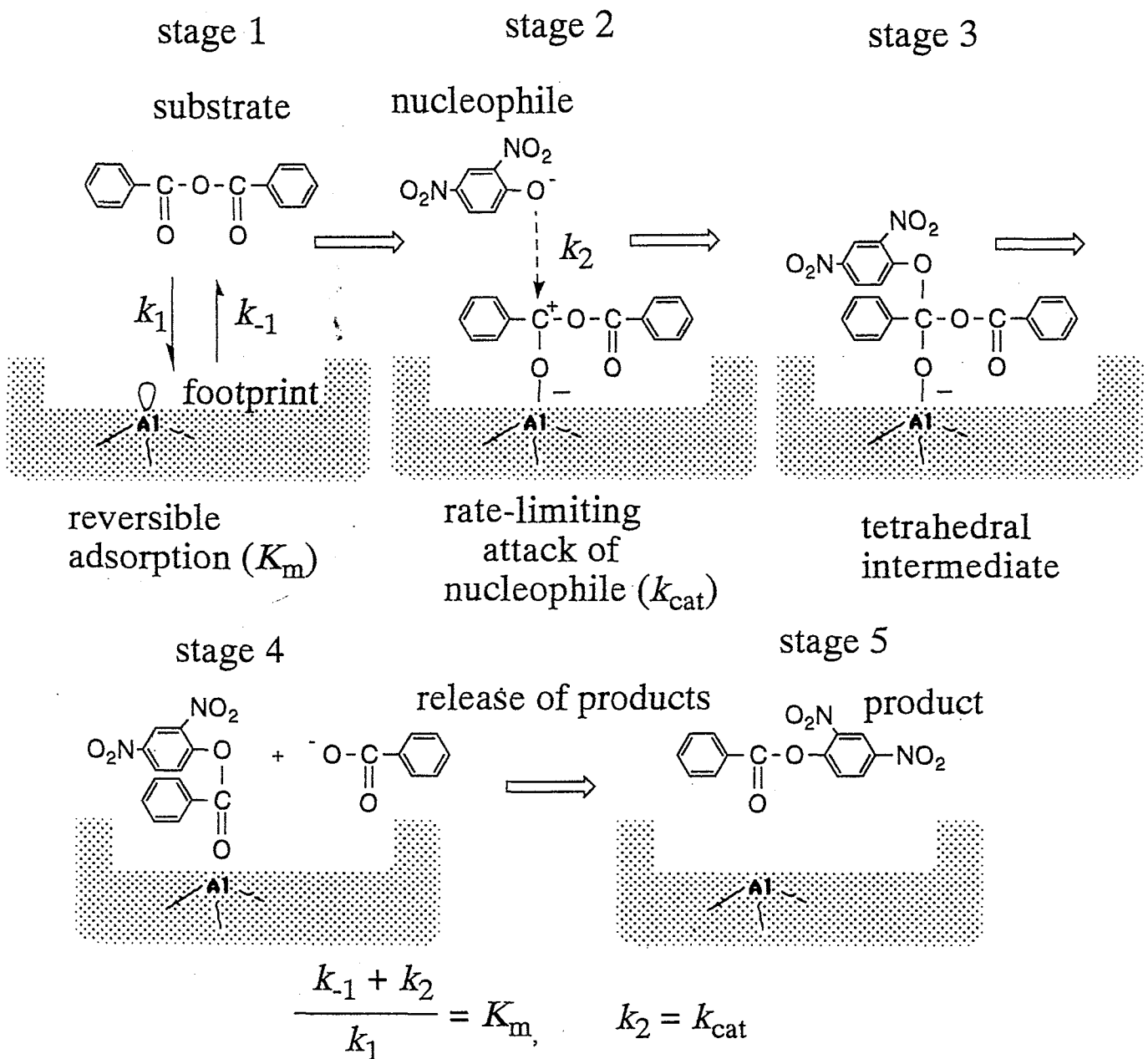
基質溶液；化合物 3を蒸留アセトニトリルに溶かし、 $1.5 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$ とした。

求核剤溶液；2,4-ジニトロカリウム塩を1.2 当量の18-クラウン-6とともに蒸留アセトニトリルに溶かし $8.33 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ とした。

1-2-5-1 標準反応

今回、触媒活性の測定に用いた触媒反応を、スキーム1-2に示す。

基質溶液を蒸留アセトニトリルで 49 cm^3 に希釈した(最終濃度 $1.2-4.5 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$)。この溶液に、50mgずつシリカアルミナゲル触媒を加え、30 °Cで基質と触媒が平衡に達するまで、10分間攪拌する。続いて求核剤を 1 cm^3 加え(最終濃度 $1.67 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$)、反応を開始する。マグネティックスターラーを用いて、激しく攪拌を続けながら、適当な間隔(2-3分)で反応液の一部(約 3 cm^3)をとり、求核剤の吸収極大(430nm)の減少を追



Scheme 1-2 Catalytic process of dinitrophenolysis of benzoic anhydride

跡する。長時間攪拌による測定では、触媒の細粒化により、測定溶液に濁りが生じるため、一波長ではなく、400, 430, 500nmでの三波長測定を行い、濁りの影響を補正した。

図 1-1 に、フットプリント触媒による2,4-ジニトロフェノリスの紫外・可視領域における吸光度変化を示す。この430nmにおけるO.D.の減少か

ら一次速度定数、 k_{obsd} を求める。

1-2-5-2 阻害反応

反応系に阻害剤(誘型分子)を共存させて、標準反応と同様な測定を行う。阻害剤溶液を蒸留アセトニトリル溶液で希釈し、シリカアルミナゲル触媒 50mgを添加し、30 °Cで30 分間、阻害剤と触媒が平衡に達するまで穏やかに攪拌する。その後、基質溶液を加え、さらに10分間攪拌を続ける。それ以後は、標準反応に準じて測定する。これらの測定から動力学パラメータ、Michaelis定数(K_m)、阻害物質定数(K_i)、 $k_{obsd,max}$ (Michaelis-Mentenの動力学式では、最高反応速度 V_{max} に相当する。),それに触媒速度定数 k_{cat} ($k_{obsd,max}$ を考察の項で述べる触媒サイトの滴定により求めた触媒サイトのモル濃度で除して求める。)を求める。

1-2-5-3 触媒サイトの滴定

被毒剤のピリジン濃度を変化させ反応速度定数を測定する。ピリジン溶液(最終濃度 $1-15 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ 、溶媒アセトニトリル)にシリカアルミナゲル触媒 30-50mgを加え、30 °Cで30分間、ピリジンと触媒が平衡に達するまで攪拌する。一定量の基質溶液(無水安息香酸、最終濃度 $2.4 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ 、溶媒 アセトニトリル)を加え、さらに10分間攪拌する。以後、標準反応と同様の測定を行ない k_{obsd} を求めた。これをピリジン濃度に対してプロットし、得られた直線をx軸に外挿し、X切片を求め、これよりシリカアルミナゲル触媒 1gあたりの Lewis 酸点のモル数を求めた。

1-3 結果と考察

1-3-1 2,4-ジニトロフェノリシスの分光学的考察

図1-1に見られるようにこの反応が進行するにつれて可視光領域(376、

430nm)の2,4-ジニトロフェノレートの吸収スペクトルの急速な減少が見られる。同条件で触媒のみを欠いた系ではこの変化は観測されないことから、

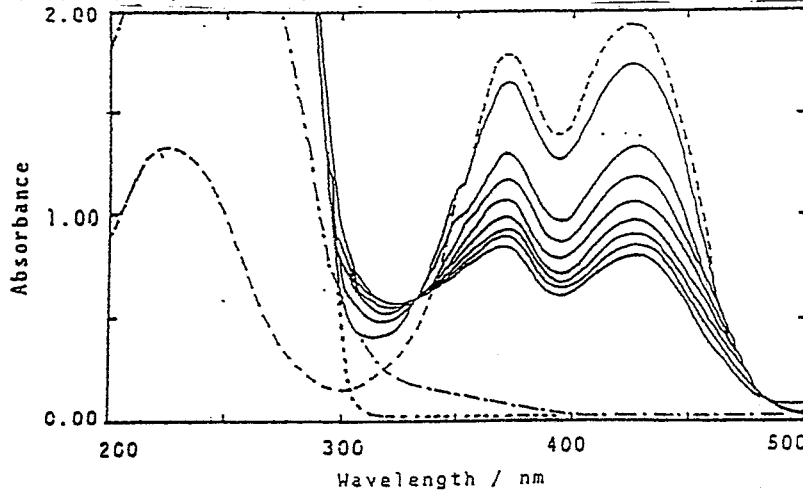


Fig.1-1. Spectra changes in 2,4-dinitrophenolysis of benzoic anhydride by the footprint catalyst {2}.

— : reaction mixture, 4 min intervals. -----: nucleophile, 2,4-dinitrophenolate anion ($1.67 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$).: substrate, benzoic anhydride ($1 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$). -.-.-: product, 2,4- dinitrophenyl benzoate (ca. $1.67 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$).

明らかに2,4-ジニトロフェノリシスの触媒反応が起こっている（用いた全ての基質及び生成物にこの領域に吸収は見られない）。図1-2に見られるように縦軸にO.D.横軸に時間（秒）をプロットすると反応開始後7-10分間はゲル表面への非特異的吸着が本来の反応と共に起こり、下に凸のカーブを描くが、それ以後直線的に変化し半減期あたりまで測定を続ける。この傾きより k_{obs} を求める。これは通常用いる手法であり反応速度は求核剤（2,4-ジニトロフェノレート）の濃度に擬一次となり、図1-3と1-4に示すように基質のモル濃度に対してMichaelis-Mentenの速度式に従う。

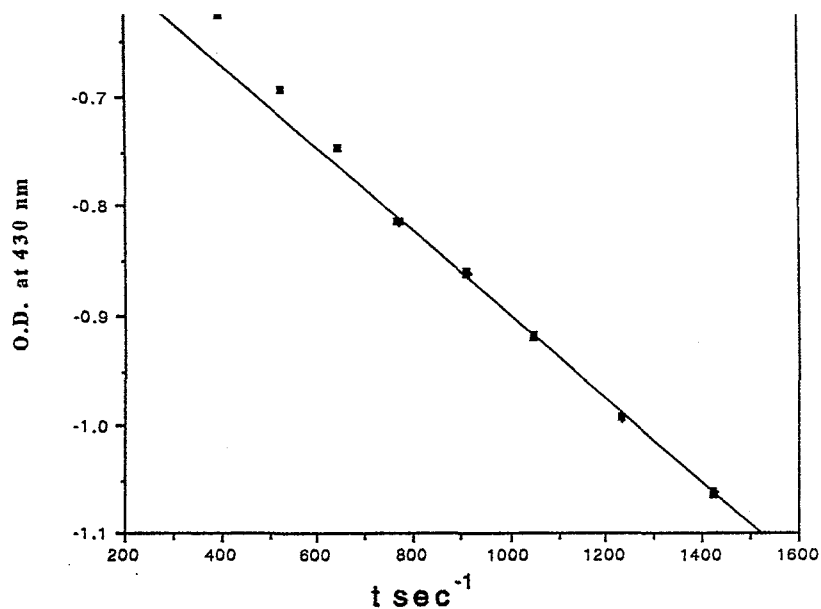


Fig.1-2 Time scan of the catalyzed 2,4-dinitrophenolysis over unmodified footprint catalyst {1}.

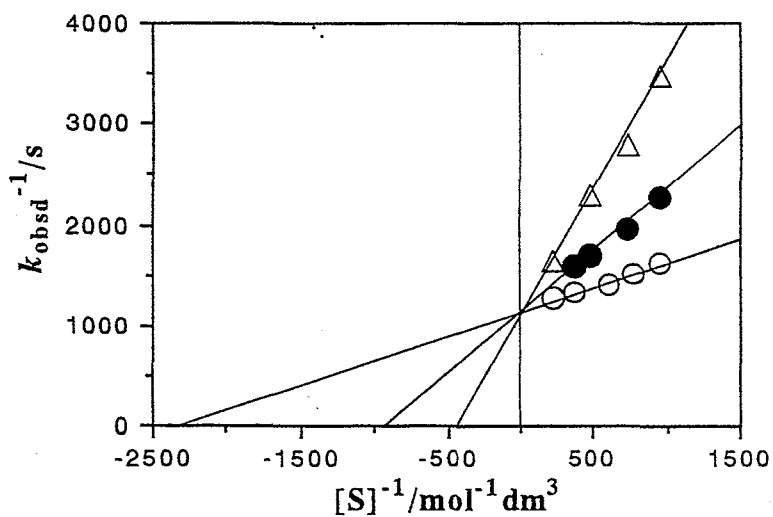


Fig.1-3. Lineweaver-Burk plots for 2,4-dinitrophenolysis of benzoic anhydride catalyzed by the footprint catalyst {2}.

[S]: benzoic anhydride concentration.

[I]: inhibitor 2 concentration. ○ : [I]=0.

● : [I]= 2.89×10^{-7} M. Δ : [I]= 5.78×10^{-7} M.

$K_i = 1.88 \times 10^{-7}$ M. $K_m = 4.14 \times 10^{-4}$ M.

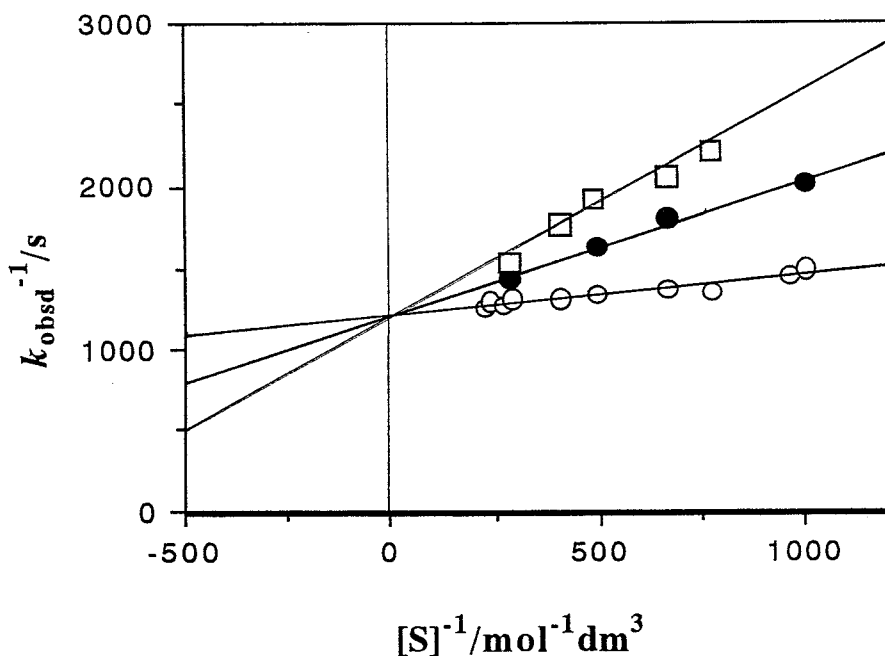


Fig.1-4. Lineweaver-Burk plots for 2,4-dinitrophenolysis of benzoic anhydride catalyzed by the footprint catalyst {1}.

[S]: benzoic anhydride concentration.

[I]: inhibitor, 1, concentration. ○: [I]=0.

●: [I]= 3.14×10^{-7} M. □: [I]= 7.48×10^{-7} M.

$K_m = 2.22 \times 10^{-4}$ M $K_i = 2.30 \times 10^{-7}$ M

この反応の律速段階は、森原らが報告したフットプリント触媒が触媒する無水安息香酸のブタノール分解と同様に求核剤の攻撃である³⁶⁾。またこの反応は吸着した反応物質（基質）が吸着していない界面付近に存在する反応物（求核剤）と反応するRideal-Eley機構で進行する（スキーム1-2）。

1-3-2 速度論的考察

上で述べた事実を反応速度式で表すと次のようになる。

$$\text{Rate} = \frac{k_{\text{cat}}[E]_0[\text{substrate}]_0[\text{Nu}]}{K_m + [\text{substrate}]_0}$$

K_m : Michaelis定数、 $k_{\text{cat}}[E]_0 = k_{\text{obsd. max}}$ 、 $[E]_0$ = 触媒サイトのモル

数、 $[Nu]$ = 求核剤(2,4-dinitrophenolate)のモル濃度を示す。そこで基質濃度を求核剤濃度より十分大きくとると、前式で反応速度は $[Nu]$ に比例し、擬一次式となる。したがって、 $k_{obsd.}$ を見かけの反応速度定数として、次のように書く。すると、

$$k_{obsd.} = \frac{k_{cat}[E]_0[substrate]_0}{K_m + [substrate]_0}$$

であり、 $k_{obsd.}$ および $substrate$ の逆数の形に変形して

$$\frac{1}{k_{obsd.}} = \frac{1}{k_{obsd.max}} + \frac{K_m}{k_{obsd.max}} \times \frac{1}{[substrate]_0}$$

となる。

一方阻害剤を共存させたとき図1-3、1-4に見られるとおりY軸切片が一致する典型的な完全拮抗阻害がおこる。これは基質と阻害剤が同一触媒サイトを奪い合う競争反応であり速度式は次のようになる

$$Rate = \frac{k_{cat}[E]_0[substrate]_0[Nu]}{K_m(1 + \frac{[I]_0}{K_i}) + [substrate]_0}$$

ここで K_i : 阻害剤の解離定数、 $[I]_0$: 阻害剤の初濃度である。

これを变形して

$$\frac{1}{k_{obsd.}} = \frac{1}{k_{obsd.max}} + \frac{K_m(1 + \frac{[I]_0}{K_i})}{k_{obsd.max}} \times \frac{1}{[substrate]_0} \quad \text{となる。}$$

このX軸切片より K_i を求める。

1-3-3 触媒サイト濃度の結果と考察

ピリジンを反応系に加えると図1-5に示すように、x軸上の一点で交わる典型的な非拮抗阻害が見られる。これは触媒サイトのアルミニウムルイス

酸点とピリジンとが1対1に不可逆的に結合するためである。したがってピリジン濃度を変化させて、ピリジン被毒をおこないその濃度に対する、残存する触媒活性が示す、反応速度 k_{obsd} をプロットすると図1-6のようなグラフが得られる。これを外挿したX軸切片の値より触媒サイトのモル数を求めることができる。その結果{2}では30mgの触媒量の時 1.03×10^{-5} mol/g、40mgのときの計算からも実験誤差の範囲で等しい 9.96×10^{-6} mol/gの値が得られた。

1-3-4 2,6-dimethylpyridineによる触媒サイト被毒についての考察

ピリジンの2位と6位にメチル置換基をもつ2,6-dimethylpyridineでは図1-6に見られるように触媒サイトの被毒は起こらない。この事実は触媒サイトがブレンステッド酸点ではなくルイス酸点であることを示唆している。もしも、ルイス酸点でなく、ブレンステッド酸点であるならば、ピリジンと同様に阻害が見られるはずである。すなわち、このように活性であるルイス酸点と2,6-dimethylpyridineが複合体をつくらないのは2位と6位のメチル基による立体障害のためと考えられる。これは一般に酸化剤と還元剤、酸と塩基のように互いに、直ちに反応する化学種が、立体障害などの微視的化学環境の影響によって、安定に共存し得る状態であり、Patchornikによって“wolf and lamb”反応⁶⁰⁾と名付けられた場合と類似した特殊な反応条件である。

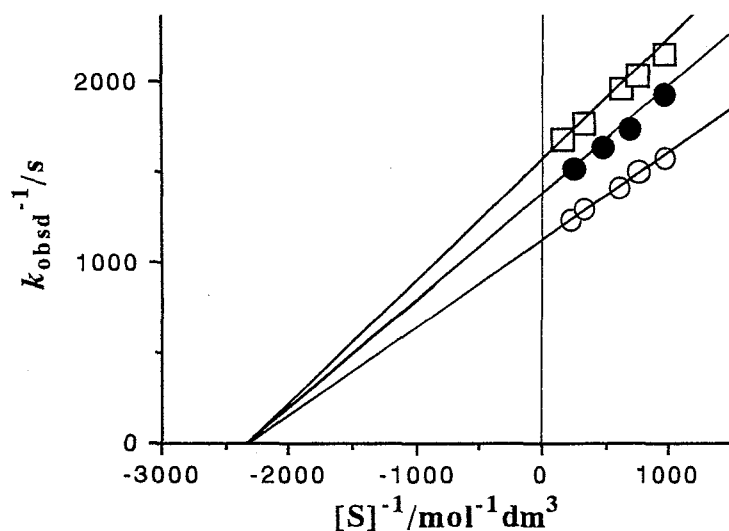


Fig.1-5. Poisoning of the footprint catalyst {2} by pyridine; irreversible inhibition.

[S]: benzoic anhydride concentration.

[I]: pyridine concentration. ○: [I]=0.

●: [I]= 1.28×10^{-6} M. □: [I]= 2.56×10^{-6} M.

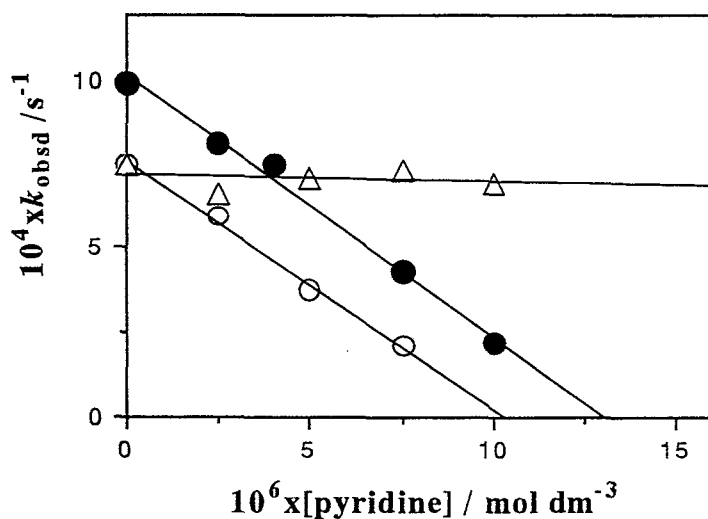


Fig.1-6. Catalytic site titration of the footprint catalyst {2} by pyridine poisoning in 2,4-dinitrophenolysis of benzoic anhydride.

[S]: benzoic anhydride concentration (2.5×10^{-3} mol dm⁻³).

○: 30 mg catalyst. Titre; 1.03×10^{-5} mol per g.

●: 40 mg catalyst. Titre; 9.96×10^{-6} mol per g.

△: 2,6-dimethylpyridine to 30 mg catalyst (no inhibitory effect).

1-3-5 触媒の酸強度の考察

ブランクゲル、コントロール触媒及びフットプリント触媒について Benesi法⁵⁸⁾により Hammett指示薬に対して、表1-1に示したような結果を得た。また、ルイス酸点の確認はフェノールフタレインを用いて Pinesと Haggの方法⁵⁹⁾で行った。

Table 1-1 Acidic Properties and Catalytic Activity

Catalysts	Acid site above pK_a ;			Lewis acid site ^{d)}
	+1.5 ^{a)}	+4.8 ^{b)}	+6.8 ^{c)}	
Footprint catalyst				
not dried	+	+	+	-
dried ^{e)}	+	+	+	+ ^{f)}
Control catalyst				
not dried	+	+	+	-
dried ^{e)}	+	+	+	+
Blank gel				
dried ^{e)}	-	-	-	-

a) Determined with 4-(phenylazo)diphenylamine. b) With Methyl Red. c) With Neutral Red. d) Detected with phenolphthalein. e) Dried in vacuo at 140°C. f) Decolorized by didenzamide addition.

これらの結果から、アルミニウムイオンのドーピング、それに引き続く風乾、メタノール抽出によって、少なくとも pK_a が+1.5の酸強度をもつ酸点が発生し、しかもそれが、Lewis酸性点であることが確認でき、2,6-ジメチルピリジンの挙動と矛盾しないことが、明らかとなった。

1-3-6 触媒作用の動力学パラメーター

表1-2に動力学パラメーターを示した。また比較のため基質である無水安息香酸のブタノール分解の動力学パラメーターを併記した。

これらから2,4-ジニトロフェノリシスとブタノリシスの間に、吸着過程

10³オーダーの取り込みの増大がみられると共に、触媒過程でも10³のオーダーの加速が見られる。これはプロトン性溶媒であるブタノールと非プロトン性溶媒であるアセトニトリルの差と考えられる⁶¹⁾。すなわちアセトニトリル中で2,4-ジニトロフェノールカリウム塩のカリウムイオンを18-Crown-6で包接することでいわゆる”裸のアニオン”2,4-ジニトロフェノレートを求核剤とすることができたため、溶媒和の影響の少ない動学パラメーターの測定が可能である。またこれらの値よりフットプリン効果論を論じることができ、この点に関しては2章以下で詳しく考察する。

Table 1-2. Kinetic Parameters of the Catalyzed Reactions by Footprints Catalysts and Control Catalyst.

Footprint Catalysts	$\frac{k_{cat}[\text{cat}]}{\text{s}^{-1}}$	$\frac{k_{cat}^a)}{\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}}$	$\frac{K_m}{\text{M}}$	$\frac{k_{cat}[\text{cat}]/K_m}{\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}}$	$\frac{k_{cat}/K_m}{\text{M}^{-2}\text{s}^{-1}}$	$\frac{K_i}{\text{M}}$	$\frac{K_m}{K_i}$
2,4-Dinitrophenolysis of benzoic anhydride in acetonitrile at 30°C.							
h-SO ₂ -NH-Bz,1 ^{b)}	2.9x10 ⁻²	1.5x10 ³	4.5x10 ⁻⁴	6.5x10	3.2x10 ⁶	1.8x10 ⁻⁷	2580
{Bz-NH-Bz,2} ^{c)}	2.9x10 ⁻²	2.8x10 ³	4.1x10 ⁻⁴	7.1x10	6.9x10 ⁶	1.9x10 ⁻⁷	2220
Control	2.8x10 ⁻²		1.8x10 ⁻³	1.6x10		d)	
Butanolysis in 1-butanol-benzene (30:70, v/v) at 55°C.							
{Ph-SO ₂ -NH-Bz,1}	5.4x10 ⁻⁷		2.0x10 ⁻¹	2.7x10 ⁻⁶		2.0x10 ⁻⁴	970
{Bz-NH-Bz,2}	4.9x10 ⁻⁷		1.6x10 ⁻¹	3.0x10 ⁻⁶		e)	
{Bz-NH-Bz,2}	4.8x10 ⁻⁷		1.3x10 ⁻¹	3.7x10 ⁻⁶		4.7x10 ⁻⁵	2770
Control 1	1.6x10 ⁻⁶		1.7	9.8x10 ⁻⁷		d)	
Control 2	5.7x10 ⁻⁷		1.3	4.6x10 ⁻⁷		d)	

a) Calculated with the molarities of catalytic sites per g determined by titration.

b) Molarity of catalytic sites, 2.01 x 10⁻⁵ mol per g. c) Molarity of catalytic sites, 1.03 x 10⁻⁵ mol per g. d) No inhibition observed. e) value not determined.

第2章 鑄型分子の構造に起因するフットプリント触媒の触媒作用³⁹⁾

2-1 序論

酵素反応機構に関する”鍵と鍵穴”説は、言うまでもなく、酵素が基質と複合体を形成するとき酵素の活性部位は基質に対して相補的であると言う意味であり、基質は鍵が鍵穴にはまり込むように結合する。フットプリント触媒は、鑄型分子と相補的な活性部位をシリカアルミナゲル表面に形成しようという試みである。しかし、ここでいう相補的という語には二つの意味がある。その一つは"electronic"であり、もう一つは"geometric"である。前者はルイス酸の特性に由来し、塩基に対して相補的であり、フットプリントの酸触媒能を支配する。後者は分子の形状に対して立体的に相補的であり、包接の程度を支配する。フットプリントの構造を考えると、鑄型分子中に電子対供与原子が複数存在する場合、電子対受容ルイス酸点とどの原子が、酸塩基複合体を形成しているかを探る必要がある。これは、ルイス酸点を中心に周りのシリカアルミナゲル表面の構造の再構築がおこると考えられるので、"electronic"にも"geometric"にも極めて重要なこととなる³⁶⁾。この章では上記に述べた真のフットプリントの”かたち”を探るため、2種の基質(3、7)を用いたその基質特異性の考察と鑄型分子の部分構造をもつ阻害分子を阻害剤として反応系に添加した阻害作用の考察から動力学パラメーターを求め検討する。

2-2 実験

2-2-1 鑄型分子： *N*-Acetylbenzamide(Ph-CONHCOCH₃, 4): 融点 116-117°C (lit,⁶²⁾ 115°C); Calcd for C₉H₉NO₂ : C, 66.25; H, 5.52; N,

8.59 %. Found: C, 66.25; H, 5.52; N, 8.58%.

N-Acetylbenzenesulfonamide(Ph-SO₂NHCOCH₃, **5**): 融点 125-126°C;
¹H NMR (CDCl₃) δ = 9.47 (s, 1H, -NH-), 7.96 (m, 2H, ArH), 7.61 (m, 3H, ArH), 2.05(m, 3H, CH₃CO-); Calcd for C₈H₉NO₃ : C, 48.24; H, 4.52; N, 7.04 %. Found: C, 48.38; H, 4.57; N, 7.00%.

N-Methylsulfonylbenzamide(Ph-CONHSO₂CH₃, **6**): メチルスルホニルアミドを水素化ナトリウムでナトリウム塩とし塩化ベンゾイルでアシル化して得られる粗結晶を水で再結晶した。収率15%、融点 153-156°C;

IR (KBr) 3235(N-H), 1680(C=O), 1247(amideIII), 1175(SO₂);

¹H NMR(CDCl₃) δ = 8.59 (s, 1H, NH), 7.87-7.49 (m, 5H, ArH), 3.45 (s, 3H, CH₃-); Calcd for C₈H₉NO₃ : C, 48.24; H, 4.52; N, 7.04 %. Found: C, 47.71; H, 4.55; N, 7.35%.

2-2-2 基質

無水安息香酸(Ph-CO-O-CO-Ph, **3**): ベンゼンと石油ベンジンにより再結晶. 融点 42°C (文献値 42°C)

無水酢酸(CH₃-CO-O-CO-CH₃, **7**): 無水酢酸 1 dm³あたり20 gの無水酢酸ナトリウムを加えて減圧蒸留し、すぐに用いる。

2-2-3 他の実験項目は第1章に準ずる。

2-3 結果と考察

2-3-1 基質特異性

フットプリント触媒、{**4**}, {**5**}, {**6**}, の無水安息香酸および無水酢酸、両基質に対する基質特異性(k_{cat}/K_m)は表2-1のように求められた。本研究はフットプリント触媒のフットプリントキャビティーがメチル基とフェニル基の違いを認識できることに基づく³⁷⁾。したがってこの分子認識力が触

媒の基質特異性に反映する。そこで今回ルイス塩基として作用するカルボニル基およびスルホニル基を部分構造に含むベンゾイル基、ベンゼンスルホニル基、アセトアミド基、メチルスルホンアミド基、各基を組み合わせとして考えた鑄型分子**4-6**を合成し用いた。

Table 2-1. Kinetic Parameters for 2,4-Dinitrophenolysis of Benzoic Anhydride and Acetic Anhydride Catalyzed by Footprint Catalysts {**4**}, {**5**}, {**6**}.

Footprint Catalysts	Substrates	$10^{-2} \times k_{\text{cat}}$	$10^4 \times K_m$	$10^{-5} \times k_{\text{cat}} / K_m$	$10^4 \times k_{\text{obsd.max}}^{\text{b)}$
		$\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$	M	$\text{M}^2 \text{s}^{-1}$	s^{-1}
{Ph-CO-NH-CO-CH ₃ , 4 }	3	1.89	2.70	7.00	6.62
	7	2.38	6.31	3.77	8.33
{Ph-SO ₂ -NH-CO-CH ₃ , 5 }	3	2.66	8.51	3.13	9.30
	7	2.77	5.72	4.84	9.67
{Ph-CO-NH-SO ₂ -CH ₃ , 6 }	3	2.45	5.54	4.42	8.57
	7	2.40	4.03	5.96	8.38
Control	3	1.86	7.91	2.35	6.51
	7	2.01	7.83	2.57	7.03

Footprint Catalysts	Substrates	$k_{\text{obsd.max}} / K_m$	$(K_m)^{\text{c)}$	$(k_{\text{cat}} / K_m)^{\text{c)}$
		$\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$		
{Ph-CO-NH-CO-CH ₃ , 4 }	3	2.45	(0.34)	(2.98)
	7	1.32	(0.80)	(1.47)
{Ph-SO ₂ -NH-CO-CH ₃ , 5 }	3	1.09	(1.08)	(1.33)
	7	1.69	(0.73)	(1.88)
{Ph-CO-NH-SO ₂ -CH ₃ , 6 }	3	1.55	(0.70)	(1.88)
	7	2.08	(0.51)	(2.32)
Control	3	0.82	(1.00)	(1.00)
	7	0.90	(1.00)	(1.00)

a) Calculated with the molarities of catalytic sites per g determined by titration using pyridine poisoning.

b) The values of $k_{\text{obsd.max}}$ indicate the intercepts of Lineweaver - Burk plots on the ordinate .

c) Figures in parentheses mean normalized values obtained by dividing with the corresponding values of the Control catalyst.

表2-1に示したようにコントロール触媒が触媒する無水安息香酸**3**と無水酢酸**7**の2,4-ジニトロフェノリシスでは、触媒活性(k_{cat}/K_m)にほとんど差

がないのに比べて、フットプリント触媒{4}、{5}、{6}の3と7との触媒活性の比には明らかな差異が見られる。この結果は、{4}は3に対して特異的で、逆に{5}、{6}は7に対して特異的であることを示している。これらの差異は k_{cat} よりもむしろ K_m に顕著であり、フットプリントキャビティーが示す基質分子の基底状態における分子認識力に起因することがわかる。すなわち{4}のルイス酸点近傍のサブサイトがフェニル基に相補的であり、{5}、{6}のそれは反対にメチル基に相補的であることを示している。

したがってこの結果から、フットプリントキャビティーの形成時、各鑄型分子中の非共有電子対を持つどの原子が、アルミニウムルイス酸に対するルイス塩基になったのかを確認することができる。鑄型分子中にルイス塩基に成り得る原子は、カルボニル基の酸素原子、スルホニル基の酸素原子そしてイミノ基の窒素原子である。しかし、イミノ基の窒素原子の可能性は、ジベンズアミドを鑄型分子として調製したフットプリント触媒{2}が、イミノ基を欠くジベンゾイルメタン ($\text{Ph-CO-CH}_2\text{-CO-Ph}$)で阻害作用を受けることから除外して考えてよい。それ故、鑄型分子4中では、ベンゾイル基のカルボニル酸素原子が電子対供与原子と考えると、ルイス酸近傍の触媒サイトと相補性の高い基質である無水安息香酸3に特異的であるという結果をよく説明できる。同様の考察を行うと、鑄型分子5では、アセチル基のカルボニル酸素原子が、また6ではメチルスルホニル基のスルホニル酸素原子が電子対供与原子であることがわかる。

これらの事実から、カルボニル基およびスルホニル基の酸素原子のルイス酸塩基複合体形成は、それら酸素原子の塩基性のみ支配されるのではなく、形成された酸塩基複合体の共鳴による安定化、および鑄型分子の電子対供与原子近傍の官能基の嵩だかさ、およびシリカアルミナゲル表面との親和力（水素結合、疎水-疎水相互作用、等）の程度により大きく支配され、一義的には定まらないことを強く示唆している。換言すれば、フットプリ

ントキャビティの形成は、酸塩基複合体形成による親和力の他に水素結合などの副次的相互作用が大きく支配していると思われる。

付記

フットプリント触媒表面の立体構造の推定は、分子軌道計算による構造最適化により行うことが可能である。

分子軌道計算には、MOPACなどの半経験的計算法と、Gaussian 92 に代表される非経験的計算法がある。そこで、現在MOPAC(PM3)法とGaussian 92の両法を用いてフットプリント触媒表面の構造について検討中である。まず、アルミニウム原子（ルイス酸点）1単位とケイ酸4単位からなる表面構造と、鑄型分子1のフェニル基をメチル基に置換し単純化した、*N*-アセチルメタンスルホニルアミドを鑄型分子として、*N*-アセチルメタンスルホニルアミドのカルボニル酸素原子と酸塩基複合体を形成させた構造の最適化をMOPAC(PM3)法により行った。その結果、*N*-アセチルメタンスルホニルアミドのスルホニル酸素原子と表面のシラノール基の水素原子間に水素結合が形成された（図2-1）。このことは、フットプリントキャビティの形成には、鑄型分子の酸塩基結合形成部位に加えて、それ以外の部分での水素結合が重要な役割を果たしていることを示唆している。この推論の妥当性を探るためには、更に表面を拡大した構造（分子模型から考察した大きさの表面構造（図2-2））での評価をMOPAC (PM3)法で再評価し、必要ならば加えて、ab initio 法であるGaussian 92を用いて分子計算するのが適切であると考え、現在進行中である。

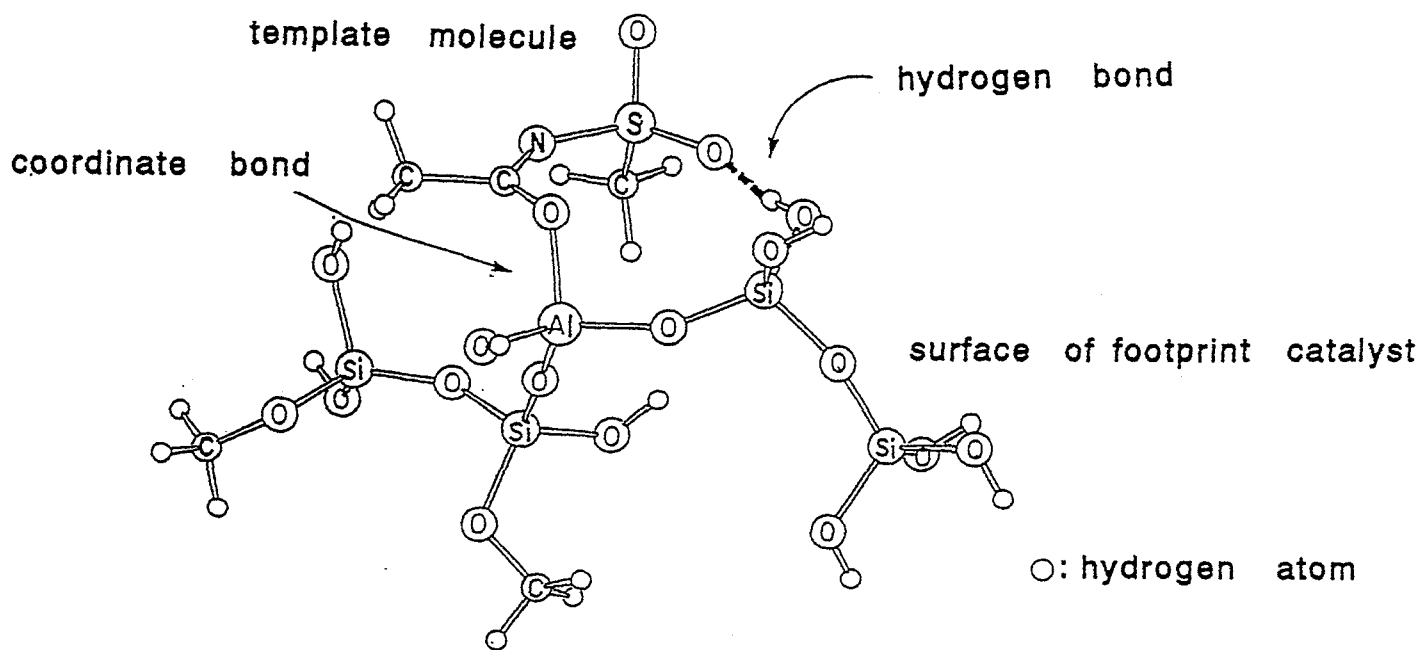


Fig. 2-1. Structure of the footprint surface calculated using the PM3 method of version 6 MOPAC installed at CONVEX C-220 at Processing Center of Nara University of Education.

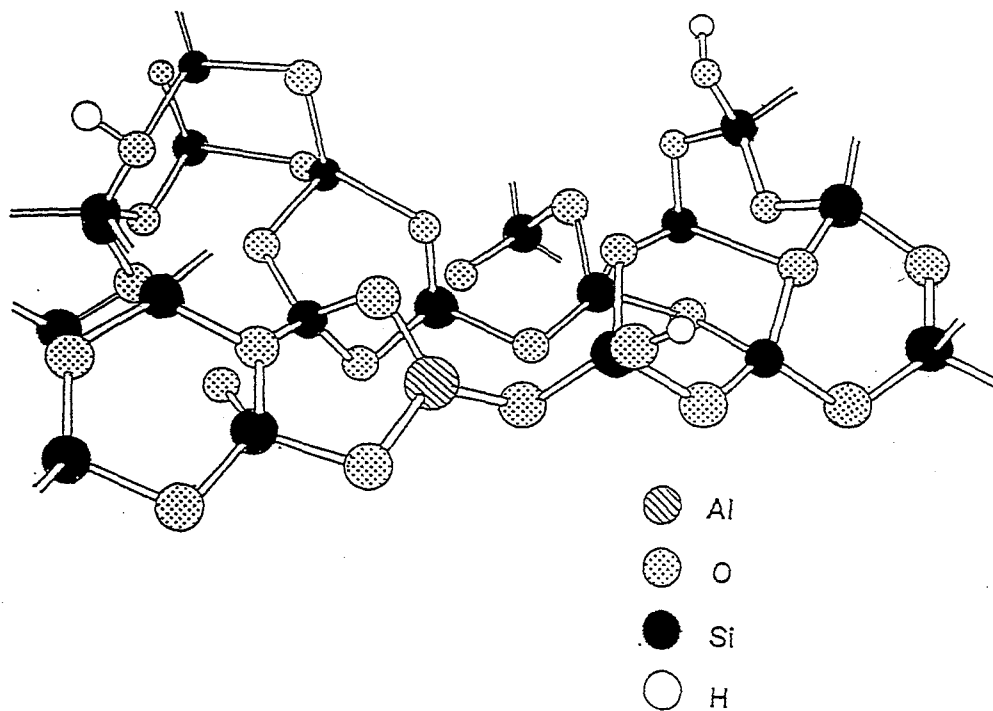


Fig. 2-2. Structure of the footprint surface examined by molecular model.

第3章 触媒される反応の遷移状態類似物を鑄型分子として調製したフットプリント触媒の触媒活性について

3-1 序論

Pauling の酵素触媒作用に関するアイデア ” 酵素表面の触媒サイトの立体構造は特異的基質の構造よりもその反応の "activated complex" に相補的である ” に基づいて、Wolfenden は、遷移状態類似物による酵素反応の拮抗阻害を理論づけた³¹⁾。これによると、酵素反応の基質の類似物よりも、遷移状態の類似物の方がより強い拮抗阻害作用を示すことになり、これは実験的にも証明された。この理論を逆に触媒設計に適應し、ある反応の遷移状態類似物を鑄型分子に用いてフットプリントキャビティを形成させる。そのフットプリントキャビティは、その反応の遷移状態と相補的であるため、その遷移状態を安定化することによって活性化エネルギーを低下させる。その結果、反応を加速させること、すなわち触媒作用を示すことになる。

筆者は、この仮説に基づき、種々の鑄型分子を用いて、フットプリントキャビティを形成し、基質特異的触媒作用の動力学的及び熱力学的考察を行っている。この章ではアシル転移反応の遷移状態類似物に似たテトラヘドラル中間体類似物である有機リン化合物を鑄型分子に用いて調製を行なったフットプリント触媒での反応加速について論じる。

3-2 実験

3-2-1 鑄型分子

N, N'-Dibenzoylbenzenephosphonediarnide(Ph-PO(NHCOPh)₂, **8**): ベンゼンホスホンジアミド (7.80 g、50.0mmol)をTHF 200cm³に溶かしその溶液を50℃で攪拌しながら水素化ナトリウム (5.0 g、125mmol、60%純度のオイルサスペンション)を加える。10分後、精製した無水安息香酸

22.6 g (100mmol) を加え、常温で12時間攪拌し続ける。減圧濃縮後、残さを300cm³の水にとかしてpHを5まで下げ、粗結晶を得る。エタノールで再結晶。収率35%。融点 211°C; IR (KBr) 3232(N-H), 1685(C=O), 1195(P=O); ¹H NMR (CDCl₃-DMSO-*d*₆=9:1) δ =10.5 (d, 2H, -NH-), 8.02(m, 6H, ArH), 7.56(m, 9H, ArH); Calcd for C₂₀H₁₇N₂O₃P: C, 65.93; H, 4.67; N, 7.69%. Found: C, 65.83; H, 4.79; N, 7.79%.

N-Benzoyl-2,4-dinitroaniline(Ph-CONH(2,4-NO₂)Ph, **9**): 触媒量の濃硫酸を加えて塩化ベンゾイルで2,4-ジニトロアニリンをアシル化する。酢酸で再結晶。融点 206-208°C(lit,⁶³) 201-202°C); ¹H NMR (CDCl₃) δ =11.66(s, 1H, NH), 9.35-7.57(m, 8H, ArH).

3-2-2 阻害剤

Benzenephosphonediarnide(Ph-PO(NH₂)₂, **10**): 二塩化フェニルホスホニルを濃アンモニア水でアンモノリシスし、エタノールで再結晶する。融点 191°C(lit,⁶⁴) 189°C).

Benzamide(Ph-CO-NH₂, **11**)

Benzenesulfonamide(Ph-SO₂-NH₂, **12**)

11と**12** はNacalai Tesque Co.,Ltd.の市販品特級試薬をそのまま用いた。他の実験項目については第1章に準ずる。

3-3 結果と考察

3-3-1 鑄型分子中の電子対供与部位の決定 (阻害作用の検討)

鑄型分子中の電子対供与部位は鑄型分子**9**ではカルボニル基の酸素原子であるが、アセチル基をもたない**1**および**8**については、第2章の基質特異性からの考察では決定できない。そこで別法として**1**、**8**の部分構造を有する化合物 (**10**, **11**, **12**) を阻害剤として{**1**}, {**8**} が触媒する無水安息香酸

の2、4-ジニトロフェノリス反応系に加え検討を行った。その動力学パラメーターを表3-1に示す。

Table 3-1. Kinetic Parameters of the Catalyzed Reactions by Footprint Catalysts {1}, {2}, {8}, {9}.

Footprint Catalysts	Substrate	$\frac{10^{-2} \times k_{\text{cat}}}{\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}}$	$\frac{10^4 \times K_m}{\text{M}}$	$\frac{10^{-5} \times k_{\text{cat}} / K_m}{\text{M}^2 \text{s}^{-1}}$	$\frac{10^6 \times K_i \text{ by } 1}{\text{M}}$
Control	3	3.41	11.38	3.00	No inhibition
{Ph-CO-NH-SO ₂ -Ph,1}	3	3.27	3.78	8.64	2.22
{Ph-PO(NH-CO-Ph) ₂ ,8}	3	33.36	4.06	82.23	1.99
{Ph-CO-NH(2,4-NO ₂)Ph,9}	3	4.31	4.07	10.06	-
{Ph-CO-NH-CO-Ph,2}	3	2.81	2.64	10.66	-

Footprint Catalysts	Substrate	$\frac{10^6 \times K_i \text{ by } 8}{\text{M}}$	$\frac{10^6 \times K_i \text{ by } 11}{\text{M}}$	$\frac{10^6 \times K_i \text{ by } 12}{\text{M}}$	$\frac{10^6 \times K_i \text{ by } 10}{\text{M}}$
Control	3	No inhibition by 1,2,8,9,10,11,12.			
{Ph-CO-NH-SO ₂ -Ph,1}	3	n.d.	2.91	6.68	6.40
{Ph-PO(NH-CO-Ph) ₂ ,8}	3	20.5	8.30	n.d.	3.80
{Ph-CO-NH(2,4-NO ₂)Ph,9}	3	-	-	-	-
{Ph-CO-NH-CO-Ph,2}	3	-	-	-	-

n.d. : not determined.

当初筆者は鑄型分子1はアシル転移反応の遷移状態類似物と考えてきた。すなわち1のスルホニル酸素が、電子対供与原子となると推論した。もしそうであるならば、スルホニル酸素とアルミニウムルイス酸性点間で酸塩基複合体ができ、その酸塩基複合体を中心に、シリカアルミナゲルの構造が再構築される。これにより、アシル転移反応の遷移状態（正四面体構造）との相補性のあるフットプリントキャビティーが得られ、遷移状態が安定化して、反応加速が得られるはずである。

しかし期待される程の反応加速は得られず、再検討を強いられた。もし上述した結合点とは逆に、1のカルボニル酸素原子が、電子対供与原子となりフットプリントを形成するのであれば、鑄型分子1は基質類似物となる。また、2も基質類似物である。

次に鑄型分子**8**は、**1**のスルホニル基をホスホニル基に置き換えた化合物であり、もし**8**のホスホニル酸素原子が電子対供与原子であるならば、**8**は、真に遷移状態類似物となる。また、**9**は生成物類似物である。一方、阻害剤である**11**は、**1**、**2**、**8**、**9**の部分構造分子であり、**12**は**1**の、**10**は**8**の、それぞれ部分構造分子である。そこで、阻害実験の結果を図3-1と図3-2に示すが、すべてのLineweaver-Burk plotsがY切片を共有する典型的な完全拮抗阻害であることがわかる。すなわち、これは阻害剤の構造がことなるにも拘わらず、阻害剤が同一触媒サイトに結合することを表している。

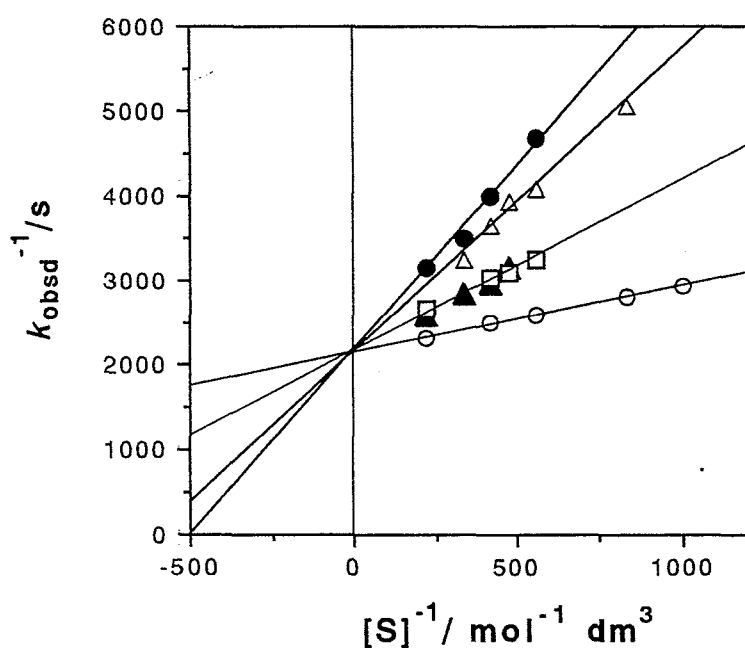


Fig. 3-1. Competitive inhibition by **1**, **10**, **11**, **12**, on the catalyzed reaction of **3** over the cavities {**1**}.

[S] : Benzoic anhydride concentration. [I] : Inhibitor concentration.

○ : [I] = 0. ● : [I] = 1.0×10^{-5} mol dm⁻³ (**1**) □ : [I] = 1.0×10^{-5} mol dm⁻³ (**10**)
 △ : [I] = 1.0×10^{-5} mol dm⁻³ (**11**) ▲ : [I] = 1.0×10^{-5} mol dm⁻³ (**12**)

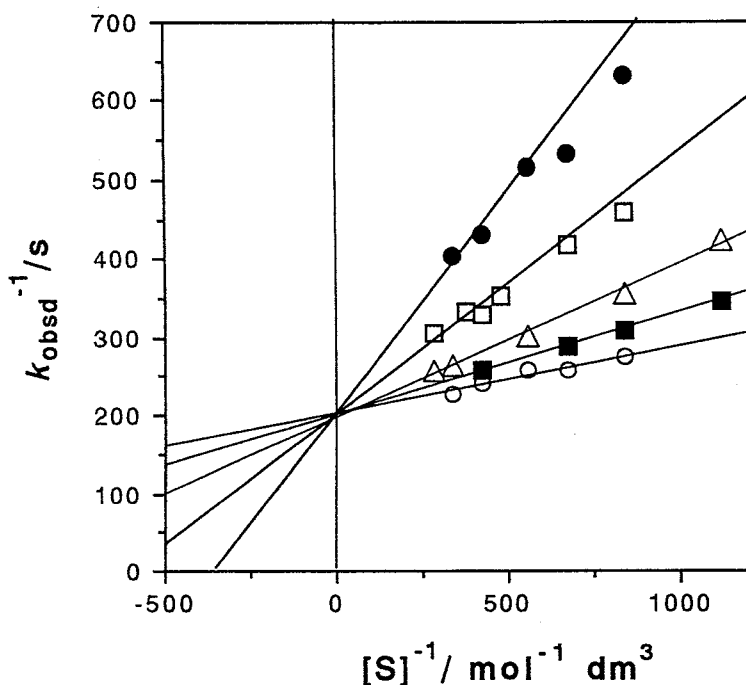


Fig. 3-2. Competitive inhibition by **1**, **8**, **10**, **11** on the catalyzed reaction of **3** over the cavities {**8**}.

[S] : Benzoic anhydride concentration. [I] : Inhibitor concentration.

○ : [I] = 0. ● : [I] = 1.0×10^{-5} mol dm⁻³ (**1**) □ : [I] = 1.0×10^{-5} mol dm⁻³ (**10**)
 △ : [I] = 1.0×10^{-5} mol dm⁻³ (**11**) ■ : [I] = 1.0×10^{-5} mol dm⁻³ (**8**)

したがって、フットプリントキャビティーへの阻害剤の親和力を定量的に扱うことができるわけで、阻害剤それぞれに対するフットプリント触媒の分子認識力を、次の式よりもとめることができる。

$$-\Delta G^0 = RT \ln(1/K_i)$$

その結果、表3-1に示したとおり、{**1**}への阻害剤の親和力の大きさは $1 > 11 > 12 = 10$ であり、**1**で形成したフットプリントキャビティーに対し、**1**が最大の親和力を示している。これは、{**1**}が**1**とよい相補性をもっているという論拠となる。また、 $11 > 12 = 10$ であることは、**1**よりは親和力が小さいが、**11**、**12**、**10**が{**1**}のフットプリントキャビティーの一部（サブサイト）と、部分的相互作用を起こした結果と考えられ、その大小を評

価できる（部分的フットプリント効果と呼ぶ）。その親和力の大きさの相違はルイス酸点近傍のシリカゲルで構築されている空間（キャビティ）が、阻害剤**10**、**11**、**12**の構造と、いかにフィットし、安定化されるかによる。すなわち**11**が**12**および**10**より{**1**}のフットプリントキャビティにフィットすることを示唆している。言い換えれば、{**1**}のフットプリントキャビティの形成は、鑄型分子**1**中のカルボニル酸素により誘導されたためであり、スルホニル酸素ではないということの意味する。これはカルボニルの炭素原子が sp^2 混成立体配置をとるため、{**1**}のフットプリントキャビティの酸点近傍は、平面型の分子に対応する空間をもち、アシル転移反応の中間体である sp^3 混成立体配置に対応するものではなく、基質類似の相補性を有することになる。また**10**は、ホスホニル基のリン原子が、**12**と同様に、正四面体型立体配置をとるため、**11**とのような適合性は生じない。また阻害剤がルイス酸と酸塩基複合体を形成せず、相補性のみで、フットプリントキャビティの他方のサイトに吸着することはありえない。なぜなら、酸塩基相互作用が最も大きい親和力を示して、吸着の際の駆動力になるからである。一方{**2**}を形成させた**2**は、明らかに基質類似物であり、{**1**}と同結果と考えられる。

次に{**8**}について、同様の考察を行ったところ、表3-1、図3-2に見られるように、各々の阻害剤と{**8**}の間の親和力の大きさは、 $1 > 10 > 11 > 8$ であった。 $10 > 11$ という結果は、{**1**}のときとは全く逆である。鑄型分子**8**のCPKモデルによる考察を行うと、分子刷り込み時および、阻害作用時ともに、二通りの吸着型があることがわかる。その一方は、Bz-NH-PO-NH-Bzの部分で吸着する場合、もう一方はPh-PO-NH-Bzの部分で吸着する場合である。後者の型は鑄型分子**1**、および基質の無水安息香酸**3**と類似している。そのことは、{**8**}に対する親和力は**1**が最も大きいことをよく説明している。またこれは、{**8**}のルイス酸点近傍は、正四面

体型のホスホニル基に相補的であるということである。したがって、{8}はアシル基転移反応の遷移状態を安定化させることにより、表3-1に示す顕著な反応加速を示したことがわかる ($k_{cat}/K_m = 8.22 \times 10^6 \text{M}^{-2} \text{s}^{-1}$)。

ここで特筆したいことは、この反応加速が吸着過程 (K_m)ではなく、主に触媒過程 (k_{cat})によって、もたらせられることであり、酵素触媒作用に特有のものである^{65,66})。

しかし一方で、{8}と親和力が最も大きいはずの8の親和力が小さ過ぎることへの疑問が一点残るが、これは、8の1分子中に2個存在する-NH-Bz基の一方はフットプリントキャビティーに取り込まれているのに対して、他方はバルクのアセトニトリル中に突き出し溶媒和されることにより解離平衡がバルク層に偏り、{8}表面との親和力が小さくなったと考えられる。

3-3-2 フットプリント触媒作用の熱力学的考察

{1}, {8}, {9}, およびコントロール触媒の触媒過程における活性化パラメーター (E_a , ΔH^\ddagger , ΔS^\ddagger , ΔG^\ddagger) と、オーバーオールでの活性化自由エネルギー変化 ($\Delta G_{total}^\ddagger$)、および吸着過程における標準自由エネルギー変化 (ΔG_{ass}^0)を 9°C-35°Cの範囲による温度変化の測定から、表3-2のように求めた。ここで標準自由エネルギー変化 (ΔG_{ass}^0)は $K_m = K_s$ とし、 $-\Delta G_{ass}^0 = RT \ln(1/K_m)$ から近似できる。これらの結果から、基質は明らかにコントロール触媒より{1}, {8}, {9}のフットプリント触媒に強く吸着しているということがわかる (2.59-2.77kJmol⁻¹)。

これはフットプリント効果が作用したためである。しかし{1}, {8}, {9}間での ΔG_{ass}^0 の差はコントロール触媒との差 (2.59-2.77kJmol⁻¹) よりかなり小さいのに対し、オーバーオールでの活性化自由エネルギー変化 ($\Delta G_{total}^\ddagger$) で見られる差 (-2.66から-8.34kJmol⁻¹) はかなり分散している。

Table 3-2. Activation Parameters for 2,4-dinitrophenolysis of Benzoic Anhydride

Footprint Catalysts	Substrate	E_a	$\Delta H^{\ddagger a)}$	$-\Delta S^{\ddagger a,b)}$	$\Delta G^{\ddagger a)}$
		$\text{kJ K}^{-1} \text{mol}^{-1}$	kJ mol^{-1}	$\text{J K}^{-1} \text{mol}^{-1}$	kJ mol^{-1}
Control	3	19.31	16.79	141.0	59.56
{Ph-CO-NH-SO ₂ -Ph, 1 }	3	16.56	14.04	151.0	59.67
{Ph-PO(NH-CO-Ph) ₂ , 8 }	3	12.41	9.89	145.0	53.81
{Ph-CO-NH(2,4-NO ₂)Ph, 9 }	3	7.67	5.15	178.0	58.97

Footprint Catalysts	Substrate	$\Delta G^{\ddagger}_{\text{total}} c)$	$-\Delta G^0_{\text{ass}} d)$
		kJ mol^{-1}	kJ mol^{-1}
Control	3	42.48	17.08
{Ph-CO-NH-SO ₂ -Ph, 1 }	3	39.82	19.85
{Ph-PO(NH-CO-Ph) ₂ , 8 }	3	34.14	19.67
{Ph-CO-NH(2,4-NO ₂)Ph, 9 }	3	39.30	19.67

a) Activation parameters for the catalytic step. b) Calculated by the values of ΔH^{\ddagger} and ΔG^{\ddagger} .

c) $\Delta G^{\ddagger}_{\text{total}}$ s mean activated free energy for the overall reactions and each value is calculated by the following equation ; $\Delta G^{\ddagger}_{\text{total}} = -RT \ln k_{\text{cat}}/K_m + RT \ln kT/h$. ($\Delta \Delta G^{\ddagger}_{\text{total}} (1\text{-control}) = -2.66 \text{ kJmol}^{-1}$, $\Delta \Delta G^{\ddagger}_{\text{total}} (8\text{-control}) = -8.34 \text{ kJmol}^{-1}$, $\Delta \Delta G^{\ddagger}_{\text{total}} (9\text{-control}) = -3.18 \text{ kJmol}^{-1}$)

d) $-\Delta G^0_{\text{ass}}$ s mean standard free energy change in the binding step and each value is calculated by the following equation ; $-\Delta G^0_{\text{ass}} = RT \ln 1/K_m$. ($\Delta \Delta G^0_{\text{ass}} (\text{control-1}) = 2.77 \text{ kJmol}^{-1}$)

{1}とコントロール触媒との $\Delta G^{\ddagger}_{\text{total}}$ の差 (-2.66 kJmol^{-1} となり、) は、 ΔG^0_{ass} における差 ($-2.77 \text{ kJmol}^{-1} = 17.08 - 19.85 \text{ kJmol}^{-1}$) と同様、僅かな差である。このことは{1}が基質の吸着過程において、主に触媒作用を示す触媒であることを示唆している。それに対して{8}とコントロール触媒との $\Delta G^{\ddagger}_{\text{total}}$ の差は -8.34 kJmol^{-1} と大きく、吸着過程における ΔG^0_{ass} の差 (-2.59 kJmol^{-1}) と比べ、明らかな差が認められる。このことは、{8}が触媒過程において触媒活性を示す、本来の触媒としての特徴を備えているといえる。すなわち反応経路に沿って、基質の構造が遷移状態へ変化すると、結合エネルギーが増加して触媒過程の活性化エネルギーが低下するわけである。また{9}でも、 $\Delta G^{\ddagger}_{\text{total}}$ 、 ΔG^0_{ass} においては、{1}と大きな差異は見られない。

次に上記の考えに沿って活性化パラメータ (ΔH^{\ddagger} , ΔS^{\ddagger} , ΔG^{\ddagger}) の検討

を加えてみたい。

まず、最初にコントロール触媒で触媒される反応と、{1}によって触媒される反応の ΔG^\ddagger を比較してみると、実験誤差の範囲でほとんど差はないと言える。しかし、その活性化自由エネルギーのエンタルピー項と、エントロピー項には、大きな相違が見られることに注目したい。{1}は、 $\Delta \Delta H^\ddagger$ が 2.75kJmol^{-1} でありエンタルピー項では有利であるが、不利なエントロピー項、 $\Delta \Delta S^\ddagger$ ($10\text{JK}^{-1}\text{mol}^{-1}$)で相殺されている。これは{1}のフットプリントキャビティの存在により、基質分子がより束縛された状態になるが、遷移状態ではあまり大きな吸着は期待できなく、 ΔH^\ddagger で不利な ΔS^\ddagger を十分に補償できないためと考えられる。

第2に、{8}はコントロール触媒と比べ、 ΔH^\ddagger で 6.90kJmol^{-1} も有利であるうえ、エントロピー (ΔS^\ddagger) の損失も $4\text{JK}^{-1}\text{mol}^{-1}$ と小さい。したがって、触媒過程において明らかな反応速度の増加を生み出す。このことは、効果的な触媒作用をつくり出すために、 sp^3 混成立体配置にフィットするフットプリントキャビティが、遷移状態の正四面体中間体を安定化させるという推論を矛盾なく説明している。

第3に、最も有利な $\Delta \Delta H^\ddagger$ 値 ($-11.64\text{kJmol}^{-1}=5.15-16.79\text{kJmol}^{-1}$)を有するのは{9}であるが、そのほとんどが不利な $\Delta \Delta S^\ddagger$ ($37\text{JK}^{-1}\text{mol}^{-1}$)によって相殺されてしまっている。これは、基質と求核剤の複合体の極性基ジニトロフェノレート部分が、生成物類似の遷移状態キャビティに強く取り込まれて結合することによって、有利な ΔH^\ddagger 値を生むが代償に非常に束縛された状態による不利な ΔS^\ddagger 値を抱えることにもなっていると考えられる。

これらを総合すると、このような特異的触媒作用は、フットプリントキャビティの有する精密な分子認識力に基づいて発生するものであるといえる。このような触媒作用は天然酵素やCatalytic antibodyで見られるも

のであるが、非生物的触媒としては先例を見ない。また、前章までで述べたフットプリント触媒³⁶⁻³⁸⁾より約10倍活性が高い8を鑄型としたフットプリント触媒³⁹⁾を調製できたことから、より高活性なフットプリント触媒を調製するための基礎的指針を得たと言える。

第4章 鑄型分子の置換基効果が示すフットプリント触媒への影響⁴⁰⁾

4-1 序論

鑄型分子の構造により、フットプリント触媒の示す触媒作用に差異が生じることは、今までの章でも述べてきた³⁶⁻³⁹⁾。特に前章では、ルイス酸点近傍の鑄型分子との相補的構造が触媒作用にもたらす影響について論じてきた^{38,39)}。しかしルイス酸点から離れた位置での鑄型分子との相補的構造については、論じていない。そこで、この章ではベンゼンスルホンアミドおよびベンズアミドのパラ位アセトアミド置換体4種を、鑄型分子として選択し、それらにより調製されたフットプリント触媒の触媒活性を検討することで、鑄型分子の置換基効果について論じる。アセトアミド基は、種々の化合物のアミノ基保護に利用されてきたし、天然酵素に対する合成基質の側鎖にも多く見られ、*N*-アセチルグルコサミンなどの形でも自然界に広く分布している。また、 β 遮断薬やキノロン薬などの合成薬品の側鎖にも見られる。一方、アセトアミド基は、Hammettの置換基定数(σ 値)がほぼ0であり、電子対供与原子の塩基性にあまり影響を及ぼさないと考えられることから、アセトアミド基をフットプリント触媒の立体的な置換基効果の検討に用いるのは妥当であると考えられる。

4-2 実験

4-2-1 鑄型分子

N-Benzoylbenzenesulfonamide (Ph-SO₂-NH-Bz, **1**): Benzenesulfonamideをピリジン存在下通常の方法によりベンゾイル化して得た。融点 148°C (lit⁵⁴⁾, 147°C).

N-Benzoyl-4-(acetamido)benzenesulfonamide
(*p*-(AcNH-)C₆H₄-SO₂-NH-Bz, **13**): 融点 257°C; IR (KBr) 3315, 3274 (-NH-), 1674(C=O), 1538(amide I), 1354, 1165cm⁻¹ (S=O); ¹H NMR

(CDCl₃) δ = 7.22 (m, 9H, ArH), 1.47(s, 3H, CH₃-); Calcd for C₁₅H₁₄N₂O₄S : C, 56.60; H, 4.40; N, 8.80%. Found: C, 56.47; H, 4.32; N, 9.28%.

4-(Acetamido)benzenesulfonamide(*p*-(AcNH-)C₆H₄-SO₂-NH₂, **14**): 融点 219.5°C (lit,⁶⁷⁾ 219°C).

4-(Acetamido)benzamide (*p*-(AcNH-)C₆H₄-CO-NH₂, **15**): 融点 277-278°C; IR (KBr) 3270(-NH-), 3243(NH₂), 1650(C=O), 1540 cm⁻¹(amide II); ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ = 7.50-7.89 (m, 4H, ArH), 2.19(s, 3H, CH₃-); Calcd for C₉H₁₀N₂O₂ : C, 60.67; H, 5.62; N, 15.73%. Found; C, 60.69; H, 5.48; N, 15.80%.

Benzamide(Ph-CO-NH₂, **11**)

Benzenesulfonamide(Ph-SO₂-NH₂, **12**)

Acetanilide(Ph-NH-CO-CH₃, **16**)

11、**12**、**16**、はNacalai Tesque Co., Ltd. の市販品特級試薬をそのまま用いた。

4-2-2 基質

無水安息香酸(Ph-CO-O-CO-Ph, **3**) : ベンゼンと石油ベンジンにより再結晶。融点 42°C (文献値 42°C)

4-(Acetamido)benzoic benzoic anhydride

(*p*-(AcNH-)C₆H₄-CO-O-CO-Ph, **17**) : 通常の方法に於いて通常の方法にしたがって調製した。すなわち4-(Acetamido)benzoic acid(融点 271-272°C)の8.95 g とトリエチルアミン5.05 g をジクロロメタン50cm³にとかしてその溶液に塩化ベンゾイル7.03 g を激しく攪拌しながら0°C以下で25分間かけて滴下する。3時間攪拌を続けた後ベンゼン50cm³を加えてトリエチルアミン塩酸塩の沈殿を濾過により除去する。濾液を濃縮し再び生じた沈殿を

除去後石油ベンジンを加えると固化し粗結晶を得る（98-100℃）。続いて酢酸エチルで再結晶し純結晶を得る（融点 113-114℃、収率 65%）。IR(KBr) 3324(-NH-), 1779, 1712(C=O anhydride), 1678(C=O amide I), 1598(C=C arom.), 1536(amide II), 1453, 1373(CH₃-), 1226(C-O-C amide III), 709, 700 cm⁻¹(C-H arom.); ¹H NMR(CDCl₃-DMSO-*d*₆=6:1) δ =10.0(s, 1H, -NH-), 8.15-7.53(m, 9H, ArH), 2.18(s, 3H, CH₃-); Calcd for C₁₆H₁₃NO₄ : C, 67.84; H, 4.59; N, 4.95%. Found: C, 67.40; H, 4.67; N, 5.08%.

4-2-3 他の実験項目は第1章に準ずる。

4-3 結果と考察

4-3-1 13を鑄型分子に用いたフットプリントキャビティーが示す分子認識力

13を鑄型分子に用いて調製したフットプリントキャビティーのルイス酸点の位置と、その周りに形成されるキャビティーの形状を調べるために阻害剤、1, 11, 12, 13, 14の阻害効果について検討した。その結果、図4-1(1, 11, 12, 13の結果を示した)のように基質無水安息香酸の2,4-ジニトロフェノリシスにおいて、それぞれ典型的な完全拮抗阻害を示した。これらのLineweaver-BurkプロットはY切片を共有し、阻害剤が異なった構造であるにもかかわらず、同一触媒サイトで競争的に結合することを表している。したがって{13}のフットプリントキャビティーへの阻害剤それぞれの親和力(-Δ*G*_{ass}⁰)が、次式によって求められる。

$$-\Delta G_{\text{ass}}^0 = RT \ln K_i^{-1}$$

その結果、阻害剤、1, 11, 12, 13, 14の{13}への親和力の大きさは13 > 1 > 11 > 14 > 12となり、それらの値を表4-1に示した。

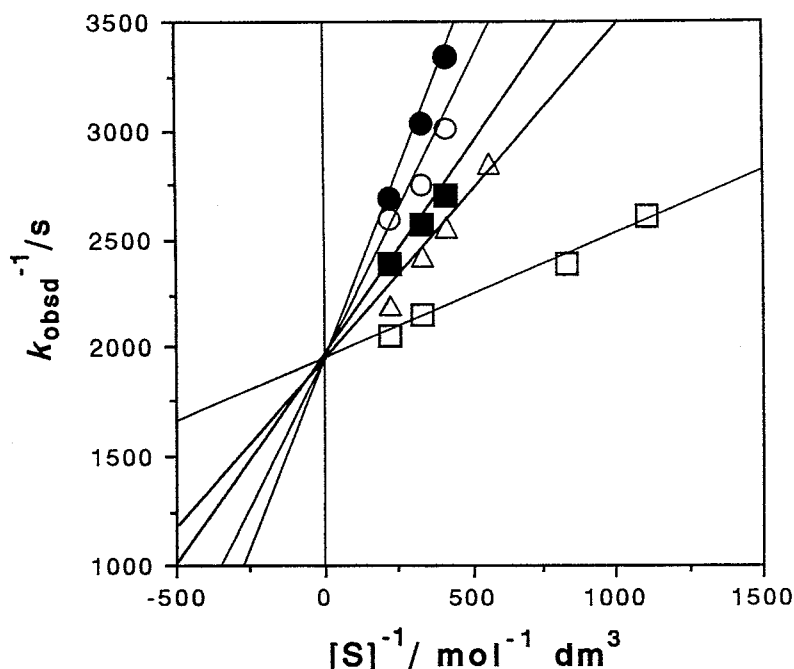


Fig.4-1. Competitive inhibition by **1**, **11**, **12**, **13** on the catalyzed reaction of **3** over the cavities {**13**}.

[S] : Benzoic anhydride concentration. [I] : Inhibitor concentration.

□ : [I] = 0. ○ : [I] = 1.0×10^{-5} mol dm⁻³ (**1**) ■ : [I] = 1.0×10^{-5} mol dm⁻³ (**11**)
 △ : [I] = 1.0×10^{-5} mol dm⁻³ (**12**) ● : [I] = 1.0×10^{-5} mol dm⁻³ (**13**)

Table 4-1 K_i Values and the Affinities of Inhibitors to {**13**} for the Reaction toward Substrate, **3**, Catalyzed by {**13**}.

Inhibitors	$10^6 \times K_i$ ^{a)}	$-\Delta G_{\text{ass}}^0$	$-\Delta \Delta G_{(\text{13-1}) \text{ ass}}^0$
	M	kJ mol ⁻¹	kJ mol ⁻¹
Ph-CO-NH-SO ₂ -Ph, 1	3.23	31.85	
<i>p</i> -AcNH-Ph-SO ₂ -NH-CO-Ph, 13	2.25	32.76	0.91
<i>p</i> -AcNH-Ph-SO ₂ -NH ₂ , 12	4.68	30.92	
Ph-CO-NH ₂ , 11	4.54	30.99	
Ph-SO ₂ -NH ₂ , 12	6.81	29.97	

a) K_i indicates the average of the K_i measured in each case.

第3章で論じたように**11** > **12** という結果は、**13**の電子対供与原子がベンゾイル酸素原子であることを示唆している。すなわち、{**1**}のルイス酸点近傍のフットプリントキャビティーが、取り込まれる分子のsp²立体配置とsp³立体配置を正確に識別する分子認識力をもつことに基づく³⁸⁾。

一方、{14}に対する14の、{15}に対する15の阻害実験の結果、前者は $K_i=3.61 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ 、後者は $K_i=2.73 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ の阻害定数が得られフットプリントキャビティ-の存在を確認した。しかし{14}、{15}に対して、16の阻害作用は認められなかった。このことは14の電子対供与原子はスルホニル酸素原子であり、15のそれはベンズアミド基のカルボニル酸素原子であることを意味している。

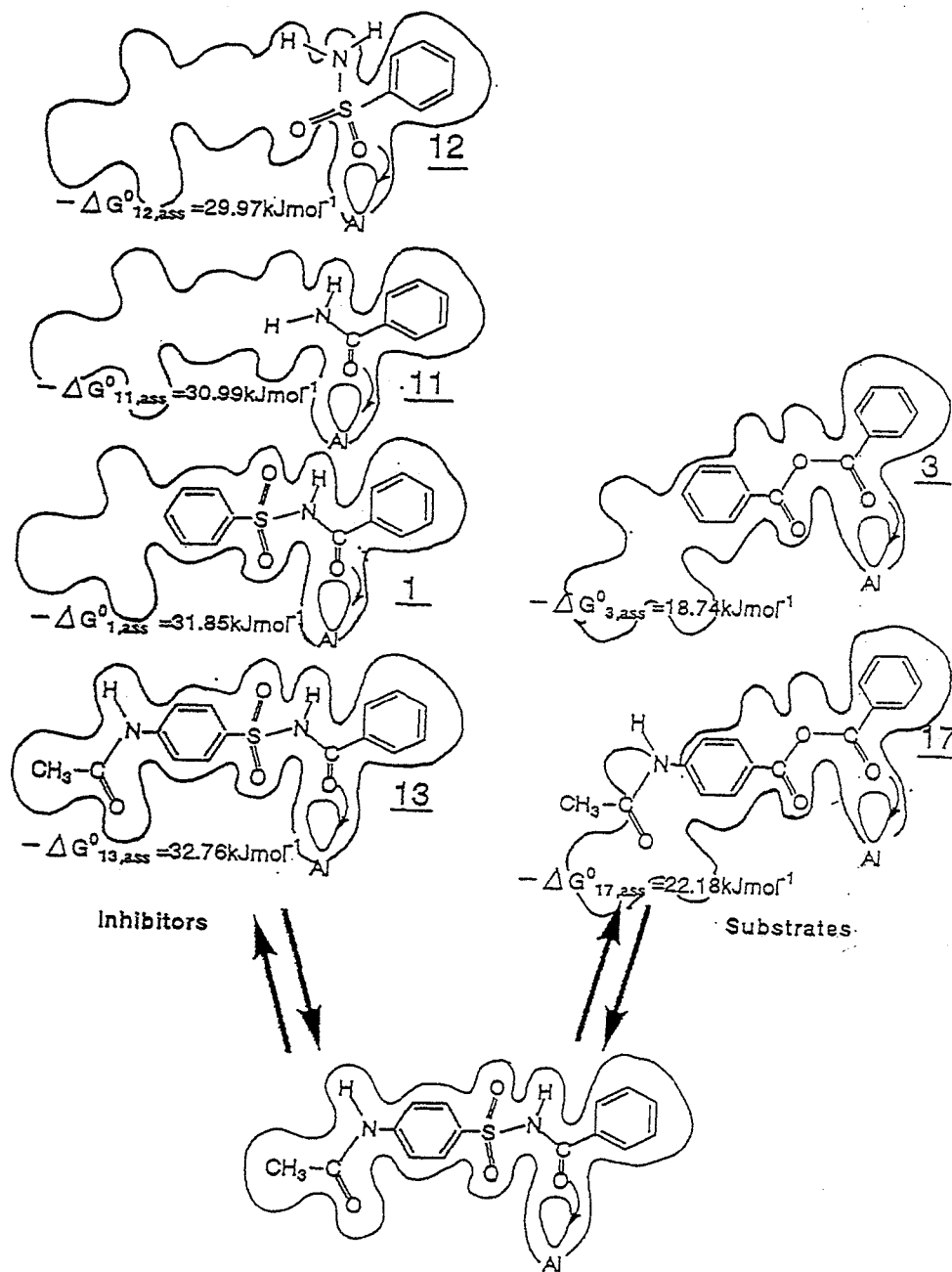
また、 $13 > 1 > 11$ という阻害作用の結果は、{13}のフットプリントキャビティ-のサブサイトの分子認識力についての知見を与えてくれる。これら3種の阻害剤は、いずれも部分構造にベンズアミド基をもっており、{13}に対するそれぞれ固有の親和力を示す。すなわち{13}の3部分（アセトアミド基、ベンゼンスルホニル基、ベンズアミド基）への親和力の和と近似できる。

したがって、 $-\Delta \Delta G^0_{(1-11), \text{ass}} = -\Delta G^0_{1, \text{ass}} - (-\Delta G^0_{11, \text{ass}}) = 0.86 \text{ kJmol}^{-1}$ という値は、ベンゼンスルホニル基の親和力を表していることになる。同様に $-\Delta \Delta G^0_{(13-1), \text{ass}} = 0.91 \text{ kJmol}^{-1}$ は、アセトアミド基の親和力を表していることになる。

これらの事実は{13}のルイス酸点から離れた位置にあるアセトアミド基に相補的なフットプリントキャビティ-も、特異的分子認識力をもつという証拠である。

しかしその値は小さすぎる。それは次のような理由によると思われる。すなわち、阻害剤13がフットプリントキャビティ-と複合体（{13}-13 complex）を形成するとき失われる並進のエントロピーは、13をアセトアミドと1に分割して考えて、アセトアミドと1のそれぞれが、{13}と結合して複合体（{13}-アセトアミド-1）を形成するとしたとき失われる並進のエントロピーより少ないからである。結局、 $-\Delta G^0_{13, \text{ass}}$ は $-\Delta G^0_{1, \text{ass}}$ と $-\Delta G^0_{\text{CH}_3\text{CONH}_2, \text{ass}}$ の合計より小さく、 $-\Delta \Delta G^0_{(13-1), \text{ass}}$ は過小評価される

68). したがって、正確にいえば 0.91kJmol^{-1} はアセトアミド基の親和力の最小限界値であり、 0.86kJmol^{-1} はベンゼンスルホニル基の親和力の最小限界値であるといえる。



Scheme 4-1

4-3-2 基質特異性に及ぼす置換基効果

鋳型分子 **1**, **13**, **14**, **15** を分子刷り込みして調製したフットプリント触媒 {**1**}, {**13**}, {**14**}, {**15**} の基質特異性を明らかにするため、基質の無水安息香酸, **3**, および 4-(Acetamido)-benzoic benzoic anhydride, **17**, の 2,4-ジニトロフェノリシスを行った。基質 **17** のパラ位アセトアミド基は、Hammett 置換基定数がゼロであるため、**17** 中の 2 個のカルボニル炭素原子は等しい塩基性を持つと考えられる。したがって **17** と {**13**} とが最大の相互作用をするように、**17** のアセトアミド基は {**13**} のアセトアミド基と相補的な触媒サイトに取り込まれるように結合する。それに対して、前後を逆にした結合は、アセトアミド基の立体障害により起こりそうにないといえる。それ故、このような検討は、**17** のパラ位のアセトアミド基の置換基効果を探るには極めて明快な手法である。前項までと同様にして得たこの反応系の動力学パラメーターを表 4-2 に示す。

この中で K_m 値は、フットプリントキャビティーと基質との解離定数に近似的に等しく、基質のフットプリントキャビティーへの親和力の大きさを評価する値としてよい。フットプリントキャビティーをもたないコントロール触媒での K_m 値は、実験誤差の範囲内で等しく、コントロール触媒に基質特異性は存在しない。しかし他の 4 種のフットプリント触媒は、基質 **3**、**17** に対してコントロール触媒より強い親和力と明らかな基質特異性を示す。この基質特異性は疑いなくフットプリントキャビティーに対する **17** のパラ位アセトアミド基の親和力に由来するものであり、その大きさは $-\Delta\Delta G^0_{(17-3),ass} = -\Delta G^0_{17,ass} - (-\Delta G^0_{3,ass})$ から求められる。{**1**} では -1.50kJmol^{-1} 、{**13**} では 3.44kJmol^{-1} 、{**14**} では 4.08kJmol^{-1} 、{**15**} では 3.06kJmol^{-1} 、そしてコントロール触媒では -0.16kJmol^{-1} である。ここで、{**1**} の -1.50kJmol^{-1} の負の値は {**1**} のフットプリントキャビティーによる排斥効果と考えられ、フットプリントキャビティーが存在しない場合の値

Table 4-2. Kinetic Parameters of the Catalyzed Reactions by Footprint Catalysts {4}, {5}, {6}.

Footprint Catalysts	Substrates	$\frac{10^4 \times K_m}{M}$	$(K_m)^a$	$\frac{-\Delta G^{(b)}}{kJ\ mol^{-1}}$	$\frac{-\Delta\Delta G^{(c)}}{kJ\ mol^{-1}}$
{Ph-CO-NH-SO ₂ -Ph,1}	3	3.36	(0.19)	20.15	-1.50
	17	6.09	(0.32)	18.65	
{ <i>p</i> -AcNH-Ph-SO ₂ -NH-CO-Ph,13}	3	5.88	(0.33)	18.74	3.44
	17	1.50	(0.08)	22.18	
{ <i>p</i> -AcNH-Ph-SO ₂ -NH ₂ ,14}	3	15.77	(0.88)	16.25	4.08
	17	3.13	(0.16)	20.33	
{ <i>p</i> -AcNH-Ph-CO-NH ₂ ,15}	3	11.40	(0.63)	17.07	3.06
	17	3.39	(0.18)	20.13	
Control	3	18.00	(1.00)	15.92	-0.16
	17	19.20	(1.00)	15.76	
{Ph-PO(NH-Bz) ₂ ,8} ^{e)}	3	4.06	(0.23)	19.36	

Footprint Catalysts	Substrates	$\frac{10^{-2} \times k_{cat}^{(d)}}{M^{-1}\ s^{-1}}$	$\frac{10^{-5} \times k_{cat}/K_m}{M^{-2}\ s^{-1}}$	$(k_{cat}/K_m)^a$
{Ph-CO-NH-SO ₂ -Ph,1}	3	4.04	12.02	(3.19)
	17	5.45	8.95	(1.34)
{ <i>p</i> -AcNH-Ph-SO ₂ -NH-CO-Ph,13}	3	3.19	5.43	(1.44)
	17	4.45	30.33	(4.53)
{ <i>p</i> -AcNH-Ph-SO ₂ -NH ₂ ,14}	3	4.29	2.72	(0.72)
	17	3.80	12.14	(1.81)
{ <i>p</i> -AcNH-Ph-CO-NH ₂ ,15}	3	5.84	5.12	(1.36)
	17	5.96	17.58	(2.62)
Control	3	6.79	3.77	(1.00)
	17	12.87	6.70	(1.00)
{Ph-PO(NH-Bz) ₂ ,8}	3	33.36	82.23	(21.81)

- a) Figures in parentheses mean normalized values obtained by dividing with the corresponding values of the control catalyst. b) Standard free energy change in the binding step ($-\Delta G^0 = RT \ln K_m^{-1}$). c) The differences of the affinities between $-\Delta G_{3, ass}^0$ and $-\Delta G_{17, ass}^0$. d) Calculated with the molarities of catalytic sites per g determined by titration using pyridine poisoning. e) These data are quoted from Table 3-1.

($-0.16\ kJ\ mol^{-1}$) と比べて重要な意味がある。また他の正の値は、逆にフットプリントキャビティへのアセトアミド基の包接によるものであ

る。しかしこれらの中で{14}、{15}への17の親和力は、アセトアミド基の包接だけでなくベンゾイル基の排斥に起因する立体障害の反発をも含む。これらのことはアセトアミド基は、ルイス酸点より離れているにも拘わらず、この親和力がベンゾイル基の立体反発による負の効果より勝っているということである。したがって、これらのアセトアミド基に対する真の親和力の大きさは、ここでの見かけの親和力より大きいと思われる。

一方、{13}への17の包接でも近い値が求められているが、この時は、反発はなく、包接のみの値である。この場合17のアセトアミド基はルイス酸点より遠くに結合するが、明らかに{13}のフットプリントキャビティー効果が触媒作用の吸着過程すなわち、 K_m 値に現われている。表4-2に見られるように、フットプリント触媒での k_{cat} 値に違いが見られるが、 K_m 値の違いに比べればかなり小さい。このことはフットプリントキャビティーの効果は触媒過程にではなく、吸着過程で現われることを示しており、それはこの章で選択した鑄型分子はすべて反応の遷移状態類似物ではなくて基質類似物であるからである。

3章で述べたように触媒する反応の遷移状態類似物 *N,N'*-Dibenzoylbenzenephosphonediarnide(Ph-PO(NHCOPh)₂, **8**, を鑄型分子として分子刷り込みしたフットプリント触媒では、オーバーオールでの触媒活性 (k_{cat}/K_m) の増大は触媒過程すなわち k_{cat} の増大によって得られるのに対し、今回のような基質類似の鑄型分子によるフットプリント触媒では K_m によって引き起こされる。ということは、天然酵素と同様にフットプリント触媒の触媒活性の評価を k_{cat}/K_m で行ってよいということであり、鑄型分子の選択により、推論どおりのフットプリント触媒が調製できるわけである。

一方、基質3、17共に{1}, {13}, {14}, {15}で触媒されるときの k_{cat} 値は、コントロール触媒の k_{cat} 値よりも小さい。しかし、それらを補償するのに十分な K_m 値をもち、その結果、より活性な触媒作用を示す。 K_m に顕著

に発現されるパラ位アセトアミド基効果は、17を触媒する{13}, {14}, {15}の k_{cat}/K_m 値(それぞれ, 30.33×10^5 、 12.14×10^5 、 $17.58 \times 10^5 \text{mol}^{-2} \text{dm}^6 \text{s}^{-1}$)に直接的に現われ、これまでのフットプリント触媒と比べても十分に大きい。このように、フットプリント触媒の活性は、鑄型分子の置換基効果によっても、操作することができ、第3章で示した吸着過程で現わされる効果と相俟った効果が期待できる鑄型分子の設計が可能であることが示唆された。

第5章 フットプリント触媒の表面修飾による分子認識力とその触媒活性に及ぼす影響

5-1 序論

今までの章で述べてきたように、フットプリント触媒は鑄型分子に相補的なキャビティーをもち、その底部にはアルミニウム原子のルイス酸性点触媒サイトが存在する、酵素類似の挙動を示す酸触媒である。したがって、フットプリント触媒は、フットプリントキャビティーが有する分子認識能に注目して、アフィニティークロマトグラフィーや化学センサー等の実用的な用途に応用することができる。しかし、それには触媒の安定性が必要である。フットプリントキャビティーの安定性は、言い換えれば、触媒の安定性でもある。遊離のシラノール基があるシリカゲルの表面は、極性分子の吸着等により必ずしも安定ではないため、そのシラノール基を疎水基で、修飾することにより分子認識能を保持したままで、安定化することについて、検討した。

J.P.Blitz らは、Cab-O-Sil シリカゲルの表面のトリメチルシリル化について報告している⁶⁹⁾が、分子認識能を持つフットプリントキャビティーを保持した触媒としては、著者らの試みが初めてである。

そこで、著者らは、トリメチルシリル化剤であるヘキサメチルジシラザンを用いて、シリカアルミナゲル表面のシラノール基をトリメチルシリル化した。この修飾によりフットプリントキャビティー以外の触媒表面のシラノール基がトリメチルシリル化され、よりリジッドで安定な、しかも疎水性が増大し、分子認識力は保持されるという実用的価値の高いフットプリント触媒の調製に成功した。

5-2 実験

5-2-1 鑄型分子

N-Benzoylbenzenesulfonamide(Ph-SO₂-NH-Bz, **1**):

Benzenesulfonamideをピリジン存在下通常の方法によりベンゾイル化して得た。融点 148°C(lit⁵³). 147°C)

N-Benzoyl-4-(acetamido)benzenesulfonamide(*p*-(AcNH-)C₆H₄-SO₂-NH-Bz, **13**): 融点 257°C; IR (KBr) 3315, 3274 (-NH-), 1674(C=O), 1538(amide I), 1354, 1165cm⁻¹ (S=O); ¹HNMR(CDCl₃) δ =7.22 (m, 9H, ArH), 1.47(s, 3H, CH₃-); Calcd for C₁₅H₁₄N₂O₄S : C, 56.60; H, 4.40; N, 8.80%. Found: C, 56.47; H, 4.32; N, 9.28%.

4-(Acetamido)benzenesulfonamide(*p*-(AcNH-)C₆H₄-SO₂-NH₂, **14**): 融点 219.5°C(lit⁶⁷), 219°C).

5-2-2 基質

無水安息香酸：ベンゼンと石油ベンジンにより再結晶。融点 42°C (lit. 42°C)

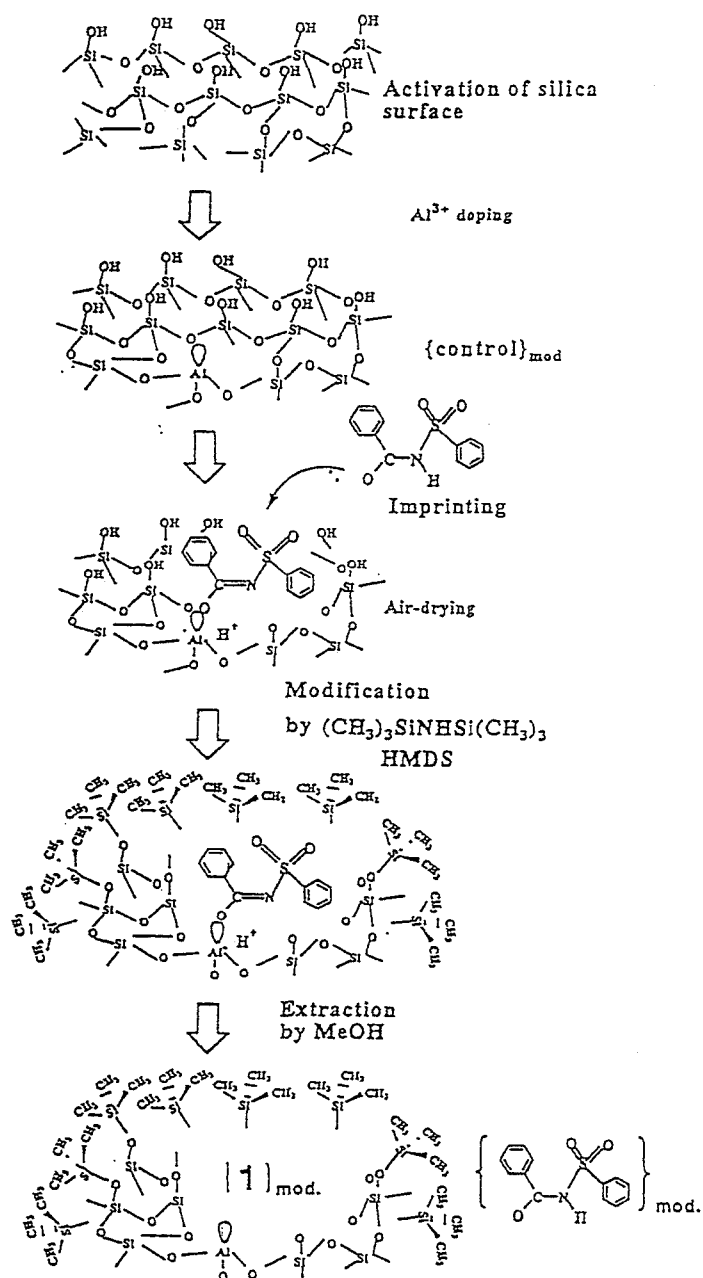
5-2-3 フットプリント触媒の表面修飾

第1章に述べた触媒調製法に従い、鑄型分子 **1**, **13**, **14**をシリカアルミナゲル表面に吸着させた状態で、風乾させたゲルを以下に示すBohemenらの方法⁷⁰)に従いヘキサメチルジシラザン (HMDS)により修飾処理する。

試料ゲル(5 g)を、130-150°C、1mmHgの減圧下2時間乾燥させる。その後、湿気を避けるため熱いうちに、3cm³のHMDSを含む石油ベンジン20cm³中に加える。その混合物を1時間還流した後、過剰のHMDSを分解するために2.0cm³の1-プロパノールを加えて、2日間放置する。その後、HMDSを完全に分解するため、4-5時間還流を続ける。

この表面修飾されたゲルを30cm³の石油ベンジンで2回、30cm³の1-プロパノールで2回、最後に再度30cm³の石油ベンジンで2回洗浄してデカ

ンテーションで回収後、減圧下2日間デシケーター中で乾燥させる。それに続く処理は表面修飾処理を施していないゲルと同様に、メタノールによる連続抽出で鑄型分子を除去し減圧乾燥した。以後表面修飾したフットプリント触媒を{1}_{mod.}(鑄型分子に1を用いたとき)と表す(スキーム5-1)



Scheme 5-1. Preparation of Modified Footprint Catalyst by HMDS

5-2-4 触媒表面の分析

触媒表面の分析にはパーキンエルマ-1740FT-IRによる拡散反射赤外フーリエ変換スペクトルコピーを用いた。また、そのスペクトルはパーキンのKUBEL.OYプログラムによりKubelka-Munk関数に変換した。

5-3 結果と考察

5-3-1 修飾フットプリント触媒の表面の分析

フットプリント触媒, {1} の拡散反射スペクトルでは、 $4000-1500\text{cm}^{-1}$ の領域にいく本かの特徴的なピークが見られる。HMDSによる表面修飾で、それらのうちの数本のピークに変化が生じた。すなわち、修飾前に認められる隣接するシラノール基相互に水素結合しているO-Hの特性ピークである 3654cm^{-1} のピークは修飾後消失し、触媒表面への吸着水の 3452cm^{-1} のピークも修飾後非常に小さく変化した⁷¹⁾。それに代わり 2967cm^{-1} にはっきりしたメチル基のC-Hの伸縮振動のピークが現われた⁶⁹⁾。これらのことよりこの条件で触媒表面のシラノール基のトリメチルシリル化は、うまく行われていることがわかる。

5-3-2 修飾フットプリント触媒の酸強度および酸点の定量

修飾フットプリント触媒についても、第1章に記したHammettの指示薬を用いたBenesi法により酸点の酸強度を調べた結果、次の3指示薬にいずれも呈色反応を示した。ニュートラルレッド ($\text{pK}_a + 6.8$), メチルレッド ($\text{pK}_a + 4.8$), 4-(フェニルアゾ)ジフェニルアミン ($\text{pK}_a + 1.5$)。またフェノールフタレインに対しても呈色したため、ルイス酸であることが確認できた。一方、修飾フットプリント触媒の触媒サイトの滴定を第1章の実験項に準じてピリジン被毒法で行ったプロットを図5-1に示した。そのX軸切片の値からフットプリント触媒1gあたりの触媒サイトのモル数を求めると、

{1}_{mod.}では 2.37×10^{-5} mol, {13}_{mod.}では 2.38×10^{-5} mol, {14}_{mod.}では 2.62×10^{-5} molとなる。これらの値は表面修飾によりほとんど変化はなく、明らかにルイス触媒サイトの量および質は保たれていると考えられる。したがって触媒表面を除いてアルミナシリケート全体の構造変化はないと言える。

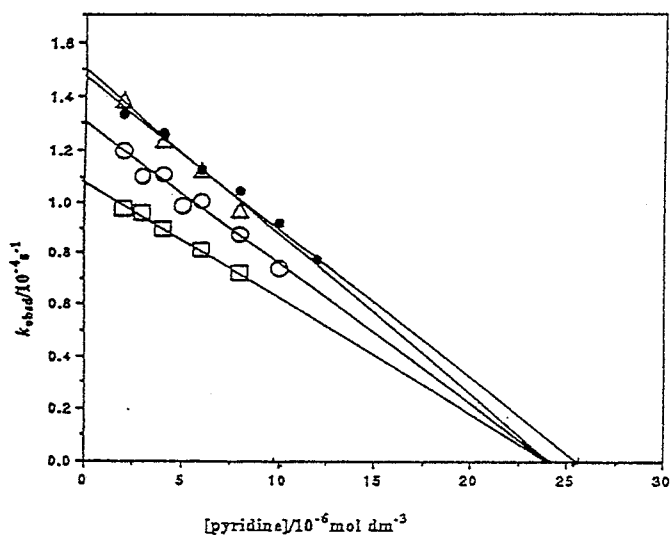


Fig. 5-1- Catalytic sites titration of the modified control and three footprint catalysts by pyridine poisoning in 2,4-dinitrophenolysis of benzoic anhydride.
 [benzoic anhydride]: 3.0×10^{-3} mol dm⁻³
 Catalyst: 50 mg in 50 cm³ of pyridine-acetonitrile solution.
 □: The control catalyst, titre; 2.38×10^{-5} mol per 1 gram catalyst.
 △: The imprinted catalyst, {1}_{mod} titre; 2.37×10^{-5} mol per 1 gram catalyst.
 ○: The imprinted catalyst, {13}_{mod} titre; 2.38×10^{-5} mol per 1 gram catalyst.
 ●: The imprinted catalyst, {14}_{mod} titre; 2.62×10^{-5} mol per 1 gram catalyst.

5-3-3 フットプリント触媒表面のフットプリントキャビティの面積比

フットプリントキャビティはシリカアルミナゲル表面の分子レベルのくぼみであるから比較的浅いものである。したがってフットプリントキャビティの面積と鑄型分子の投影面積とは、等しいと近似してよい。

そこで分子刷り込みに用いた鑄型分子のStuartモデルの平面への投影によりフットプリントキャビティのおおよその面積を見積った結果を表5-1

に示した。それらの値とKieselgel 60の1gあたりの表面積(500m²/g)よりフットプリントキャビティ-の面積比を求めた(表5-1)。

Table 5-1. An estimation by the projection of Stuart models of the template molecules on a plane.

Footprint catalysts	Molarity per 1 kilogram of footprint catalysts.		Projection areas of template molecules. Å ²	Coverage percentages of the cavities. %
	mol kg ⁻¹	number / 10 ⁴ Å ²		
{1}	2.37x10 ⁻²	2.85	104.3	2.97
{13}	2.38x10 ⁻²	2.87	123.3	3.54
{14}	2.62x10 ⁻²	3.16	79.7	2.52

しかし500m²/gという値は、窒素ガスの吸着を用いたBET法⁷²⁾によるため、鑄型分子が吸着できない微細なスペースへの吸着もある。したがって、見積ったフットプリントキャビティ-の面積比の値は最小値と考えてよい。しかし大きな誤差はないと考えられるので、フットプリントキャビティ-以外の表面が多いと判断できる。

5-3-4 表面修飾によるフットプリント触媒ゲル粒子の特性

フットプリントキャビティ-以外のシラノール基のトリメチルシリル化により、シリカゲル表面の疎水性(Z値; 80⁷²⁾)が向上した。これは溶媒のアセトニトリル(Z値; 71.3⁷³⁾)よりも疎水的である。それ故、このトリメチルシリル化は触媒の特性に微視的にも、巨視的にも大きく影響する筈である。すなわち、まず反応系の2,4-ジニトロフェノレートアニオンのフットプリントキャビティ-以外の表面への非特異的吸着が減少する。図5-2に反応初期の時間に対するO.D.プロットを示した。

これによると反応開始から約8-10分までの間のプロットに変化が見られる。非修飾フットプリント触媒では、2,4-ジニトロフェノレートアニオンの非特異的吸着に起因すると考えられる下に凸の曲線が観測されたが(図

1-2) 修飾フットプリント触媒では直線でプロットされ、曲線部は見られな

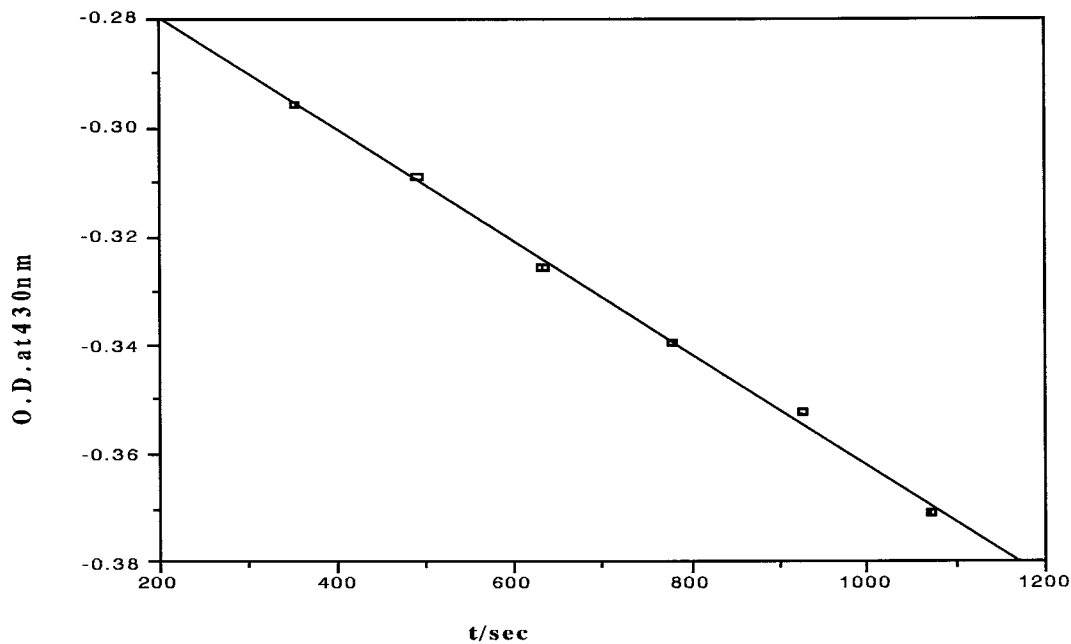


Fig.5-2 Time scan of the catalyzed 2,4-dinitrophenolysis over modified footprint catalyst {1} mod.

くなった（図5-2）。それに加えて、修飾フットプリント触媒では動力学測定中のゲルの機械的細粒化が減少し、より激しい攪拌と1時間を超える測定が可能となった。したがって、フットプリント触媒のトリメチルシリル化により更に信頼性の高いデータを得ることができるようになる。

5-3-5 表面修飾がフットプリントキャビティの分子認識力に与える影響

修飾フットプリント触媒、{1}_{mod}、{13}_{mod}、{14}_{mod} と修飾コントロール触媒の触媒作用と分子認識力を確かめるため、無水安息香酸の2,4-ジニトロフェノリシスを行い、それらの動力学パラメータと阻害剤1、13、14の拮抗阻害定数を求め表5-2に示した。図5-3は、修飾コントロール触媒による阻害作用のLineweaver-Burkプロットを示すが、明らかに拮抗阻害は認められず、阻害剤に対する分子認識は起こっていない。しかし酸塩基

触媒作用は保たれており、HMDSによるトリメチルシリル化はルイス触媒サイトにはほとんど影響していないことがわかる。次に図5-4、5-5、5-6に{1}_{mod}、{13}_{mod}、{14}_{mod}による阻害剤1、13、14の阻害作用のLineweaver-Burkプロットを示した。これらは修飾コントロール触媒と異なり典型的な拮抗阻害作用を示しており、それぞれのX軸切片の値から阻害定数を未修飾コントロール触媒の時用いた方法と同様に求めることができる。

また $-\Delta G^0 = RT \ln K_i^{-1}$ より親和力の大きさを求めた。その結果を表5-2に示したが、{1}_{mod}はそれぞれの阻害剤に対し1 > 13 > 14の順に大きな親和力、すなわち、分子認識力を示した。{13}_{mod}では13 > 1 = 14、{14}_{mod}では14 > 13 > 1となり、未修飾フットプリント触媒と同様の結果を得た。フットプリントキャビティー全体の分子認識力は、その部分分子認識力の合計として表されたので、{13}_{mod}が13に対して示す分子認識力を分割すると未修飾フットプリント触媒と近似した結果を得た。

これは精密な分子認識力が表面修飾後も維持されることを示したものであるが、フットプリントキャビティーへの包接効果が正の親和力を示し、排斥効果が負の親和力を示すことになる。もちろん排斥効果は包接されるときの立体障害により発生するが、それはフットプリントキャビティーの近傍にある嵩高いトリメチルシリル基に起因する。

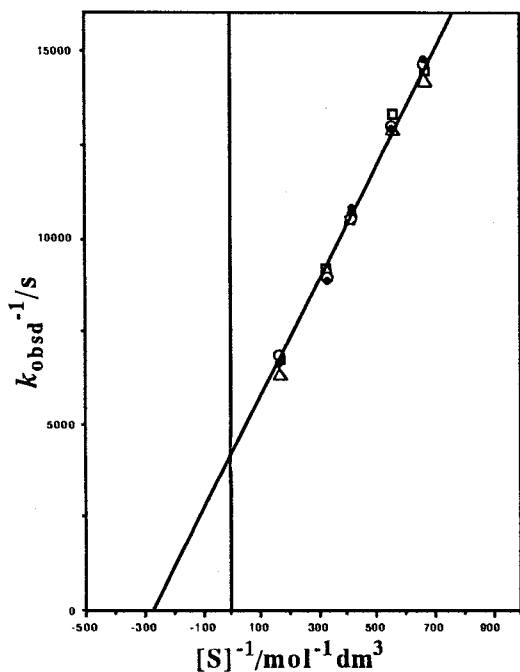


Fig.5-3 Competitive inhibition of a control catalyst by 1, 13, 14.

[S]: benzoic anhydride concentration.

- [I]: 0
- △ [I]: $2.0 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ (1)
- [I]: $2.0 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ (13)
- [I]: $2.0 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ (14)

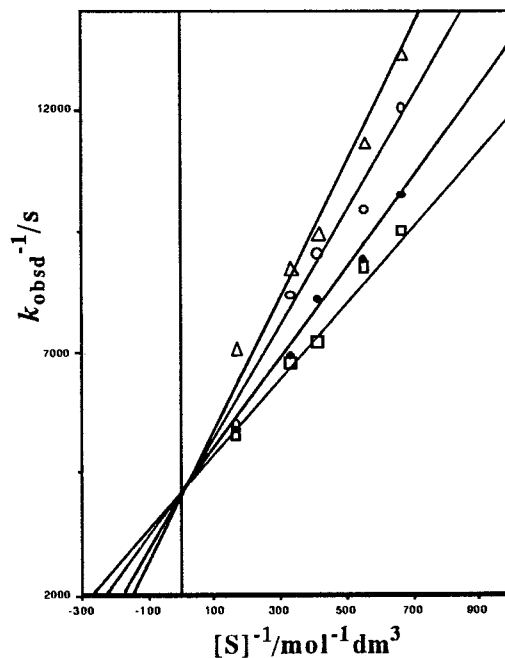


Fig.5-4 Competitive inhibition of a footprint catalyst {1} by 1, 13, 14.

[S]: benzoic anhydride concentration.

- [I]: 0
- △ [I]: $2.0 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ (1)
- [I]: $2.0 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ (13)
- [I]: $2.0 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ (14)

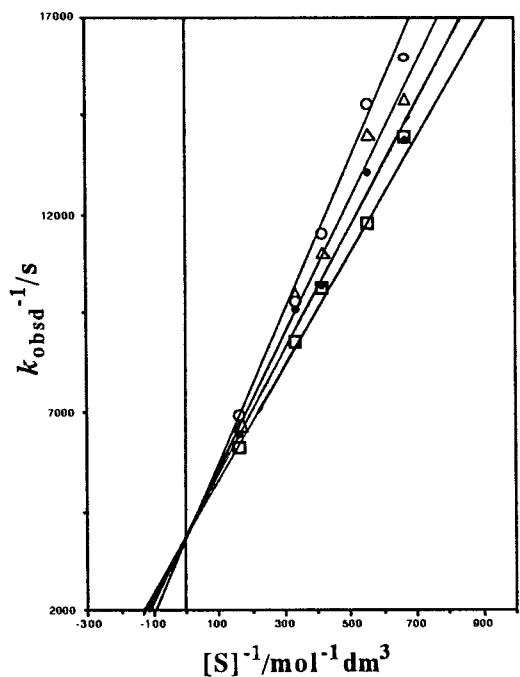


Fig.5-5 Competitive inhibition of a footprint catalyst {2} by 1, 13, 14.

[S]: benzoic anhydride concentration.

- [I]: 0
- △ [I]: $2.0 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ (1)
- [I]: $2.0 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ (13)
- [I]: $2.0 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ (14)

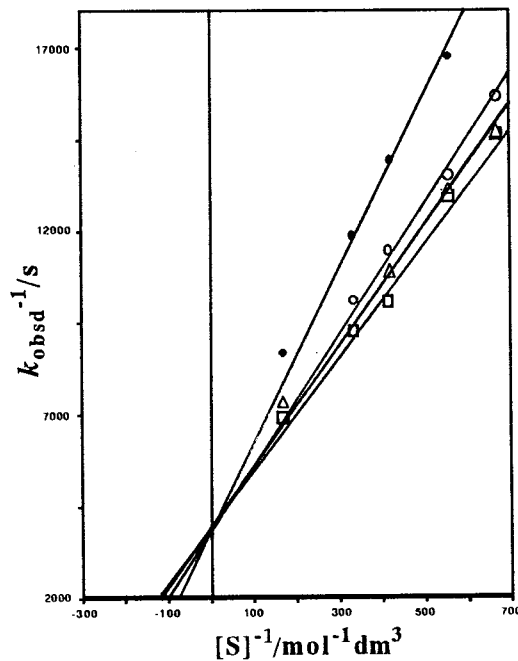


Fig.5-6 Competitive inhibition of a footprint catalyst {14} by 1, 13, 14.

[S]: benzoic anhydride concentration.

- [I]: 0
- △ [I]: $2.0 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ (1)
- [I]: $2.0 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ (13)
- [I]: $2.0 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ (14)

この排斥効果は次に示すように検討した。すなわち、表5-2のように{1}と{1}_{mod}に対する13の阻害定数 ($K_{i,1}$)を比較した。すると、{1}への13の包接ではアセトアミド基の排斥により、{1}への1の包接時の親和力に比べ2.62kJ($-\Delta \Delta G^0=30.17-32.79=-2.62\text{kJ}$)減少する。修飾フットプリント触媒{1}_{mod}では、アセトアミド基が吸着する表面に、トリメチルシリル基が導入されていれば2.62kJという値よりも増加するはずである。しかし、その値は1.26kJ($-\Delta \Delta G^0=30.73-31.99=-1.26\text{kJ}$)であり逆に減少した。このことはHMDSによる表面修飾フットプリント触媒表面と排斥されるアセトアミド基との相互作用を考慮していないためで、未修飾触媒と単純に比較することはできないためであると考えられる。しかし全体での分子認識力が保持されているのは明らかである。

Table 5-2. Kinetic Parameters of the Catalyzed Reactions by Modified Footprint Catalysts.

	$\frac{K_m \times 10^4}{M^1}$	$\frac{k_{cat}}{M^1s^{-1}}$	$\frac{K_{i,1}^2 \times 10^6}{M}$	$\frac{-\Delta G^0}{kJmol^{-1}}$	$\frac{K_m/K_{i,1}}$	$\frac{K_{i,13} \times 10^6}{M}$	$\frac{-\Delta G^0_{13}}{kJmol^{-1}}$	$\frac{K_m/K_{i,13}}$	$\frac{K_{i,14} \times 10^6}{M}$	$\frac{-\Delta G^0_{14}}{kJmol^{-1}}$	$\frac{K_m/K_{i,14}}$	$\frac{k_{cat}/K_m \times 10^4}{M^2s^{-1}}$
{1} _{mod} . ³⁾	22.58	221	3.06	31.99	738	5.04	30.73	448	8.76	29.34	258	9.79
{13} _{mod} .	42.64	233	15.33	27.93	278	6.48	30.09	658	15.74	27.86	270	5.46
{14} _{mod} .	37.49	184	64.79	24.30	58	14.69	28.03	255	4.21	31.18	890	4.91
Control _{mod} . ⁵⁾	38.31	207	no inhibition	—	—	no inhibition	—	—	no inhibition	—	—	5.40
{1}	3.78	321	2.22	32.79	170	6.28	30.17	60.2	n.d. ⁴⁾	n.d.	n.d.	95.5
{13}	5.88	316	3.23	31.85	182	2.25	32.76	261	4.68	30.92	126	53.7
{14}	15.77	429	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	3.98	31.32	396	27.2
Control ⁵⁾	18.00	640	no inhibition	—	—	no inhibition	—	—	no inhibition	—	—	35.6

1) M; mol dm⁻³. 2) $K_{i,1}$; inhibition by 1. 3) { }_{mod}; modified footprint catalyst.

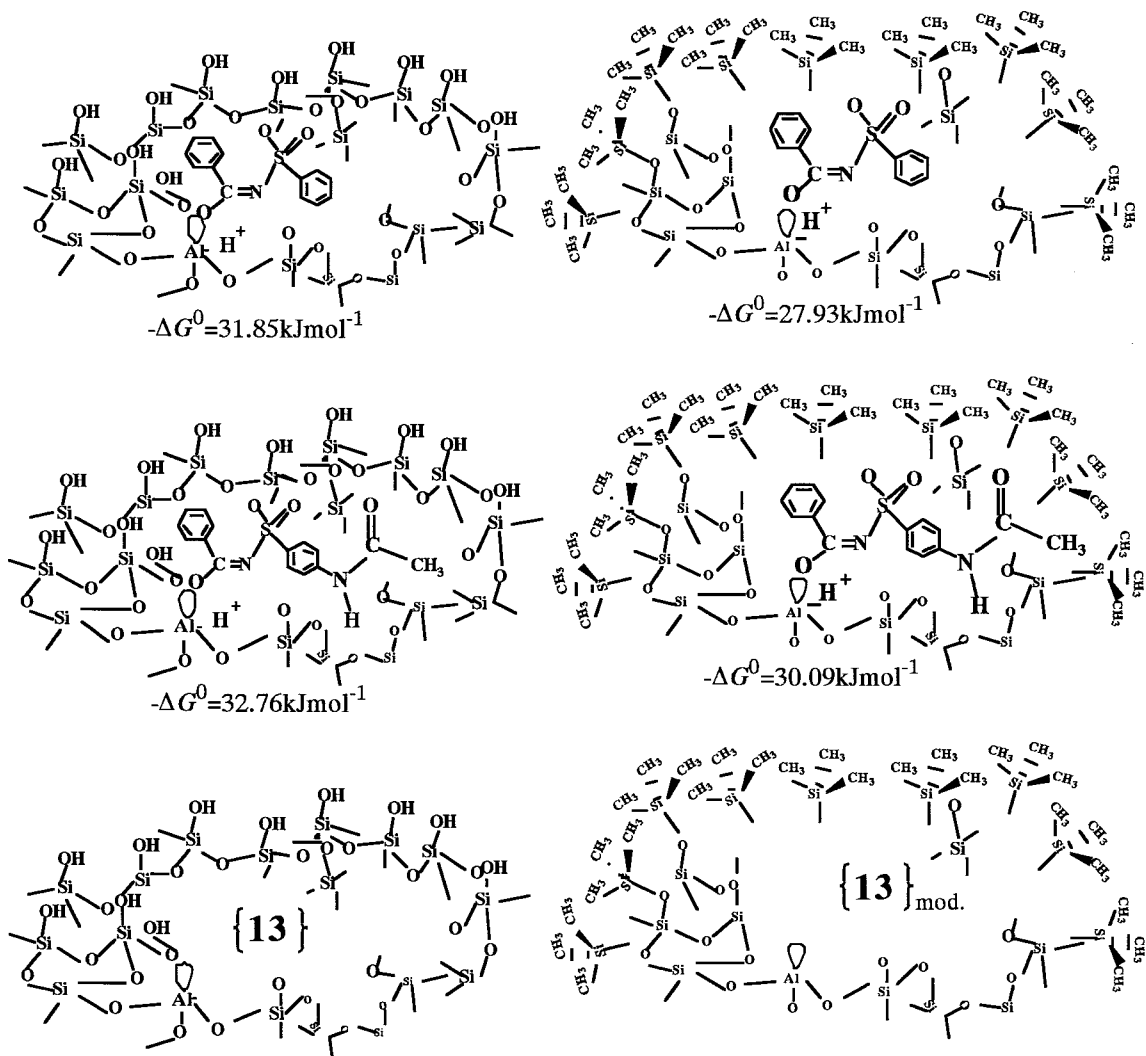
4) n.d.; not determined. 5) Control and Control_{mod}; catalysts without footprint cavity.

5-3-6 表面修飾の触媒作用への効果

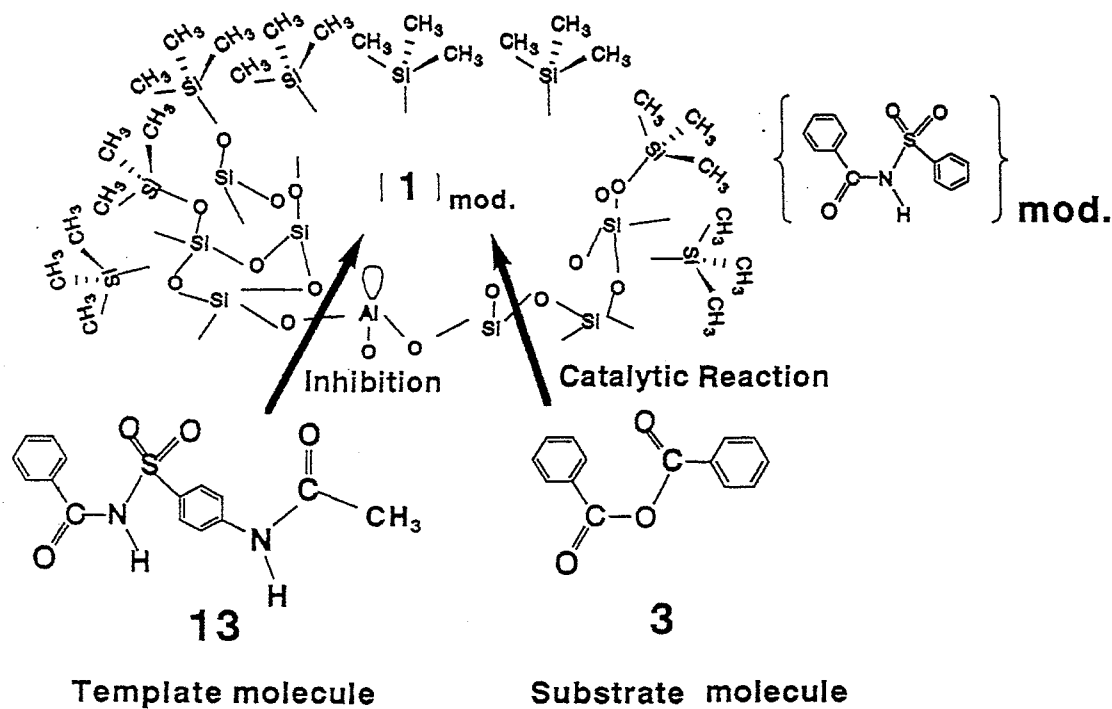
触媒作用に及ぼす表面修飾の効果を明らかにするためには、未修飾フットプリント触媒及び未修飾コントロール触媒と、修飾フットプリント触媒及び修飾コントロール触媒の動力学パラメーターを比較検討すればよく、表5-2にその結果を示している。

これによると修飾フットプリント触媒及び修飾コントロール触媒では、 K_m においていずれも 10^{-3} オーダーであり $2.26 \times 10^{-3} - 3.75 \times 10^{-3}$ と比較的近い値を示している。また k_{cat} についても、ほぼ同様に値の大きなひろがりはない($184-207 s^{-1}$)。一方、未修飾フットプリント触媒及び未修飾コントロール触媒では K_m 値は 10^{-4} オーダーで、その値も $3.36 \times 10^{-4} - 18.0 \times 10^{-4}$ とかなり差がみられる上、 k_{cat} についても同様に比較的それらの値の差がみられる($316 - 640 s^{-1}$)。このことより、表面修飾は触媒活性(k_{cat}/K_m)を減少させるが、これは K_m 値に支配されていることが明らかである。すなわち修飾フットプリント触媒と未修飾フットプリント触媒での K_m 値と k_{cat} 値の違いから判断して、表面修飾はフットプリントキャビティーが示す触媒活性を減少させるが、フットプリントキャビティーから離れている表面のトリメチルシリル化は、直接的に触媒活性に影響はあたえず、またルイス酸強度とも関係しない。故に触媒作用に見られるフットプリント触媒の表面修飾効果は、フットプリントキャビティー近傍に導入された嵩高いトリメチルシリル基の立体効果、特にベンゾイル基と相補的なサブサイトのまわりの立体効果で著しいことがわかる(スキーム 5-3)。

また、表面修飾により基質のフットプリントキャビティーへの取り込みが低下していることが、 K_m の増大からわかるが、これはフットプリントキャビティーによる基質特異性の増大とも言える。すなわち基質分子は、鑄型分子と類似しているが、Stuart modelによる考察では基質分子は鑄型分子と厳密には一致しない(鑄型分子1のスルホニル部分は正四面体型であるの



Scheme 5-2



Scheme 5-3

に対して、基質**3**の対応する構造は sp^3 混成軌道の正三角形型である。)。したがって表面修飾によりフットプリントキャビティーは鑄型分子と基質分子をより認識したと言える(スキーム5-3)。結局、表面修飾により深くなったフットプリントキャビティーは、基質の吸着過程、すなわち K_m 値に大きな効果をもたらし、表面の疎水性を増加させフットプリント触媒表面をよりリジッドで安定にする。それとともに精密な分子認識力が、修飾後も保持された結果フットプリントキャビティーの実用的用途の範囲が広がる。これは単に、フットプリントキャビティーを効果的な触媒サイトとしてではなく、効果的な分子認識サイトたとえばクロマトグラフィーの固定相のようなレセプターサイトに用いる適合性を示したものである。

第6章 キラルなフットプリント触媒サイトにおけるエナンチオ選択的触媒作用

6-1 序論

今までフットプリントキャビティの分子認識能について多くの考察を行ってきた。これらは、メチル基と水素原子との認識が可能であるように精密な分子認識を実現できる。そこで、本章ではフットプリントキャビティを不斉場として提供するエナンチオ選択的触媒作用について検討する。本章ではまずアラニン誘導体である*N*-ベンゾイル-(*N*^α-ベンジルオキシカルボニル)-*L*-アラニンアミド, (*Z*-*L*-Ala-NH-Bz, **18**)を鑄型分子に用いて調製したフットプリント触媒 {**18**} が触媒する、**18**の類似物である酸無水物、無水ベンゾイック*N*-ベンジルオキシカルボニルアラニン (*Z*-*L*-Ala-O-Bz, **20**, *Z*-*DL*-Ala-O-Bz, **21**)、のアシル基転移反応において、反応速度論より明確なエナンチオ選択性が示されたことについて述べる。これは、フットプリントキャビティがメチル基と水素原子を、識別することにより可能になった³⁷⁾。すなわち、水素原子により分子刷り込みされたサイトは、メチル基を排斥する。したがって、アラニンのようなキラルな鑄型分子の分子刷り込みによるフットプリントキャビティは、逆のエナンチオマーを認識できる。

次に、**18**の*Z*-アラニル部分を両方にもつ対称イミド、ビス(ベンジルオキシカルボニル-*L*-アラニル)アミン、((*Z*-*L*-Ala)₂NH, **22**)を鑄型分子に用いたフットプリント触媒 {**22**} が触媒する、対称形酸無水物の基質、ビス(ベンジルオキシカルボニルアラニル)オキシド((*Z*-Ala)₂O)の*L*体(**23**)、*D*体(**24**)およびメソ体(**25**)のアシル基転移反応において、*L*体である**23**に高いエナンチオ選択性が見られた。また**25**についても反応速度論的に*L*体(**23**)、*D*体(**24**)をフットプリントキャビティが認識したことによる興味深い結果が得られた。

一方、**22**中のアラニル部位はいずれもL体であるが、メソ体のビス（ベンジルオキシカルボニルアラニル）オキシドを鋳型分子に用いて調製したフットプリント触媒が示すメソ体基質**25**のアシル基転移反応において、少量のZ-L-アラニネートを反応系に共存させるだけで、キラルな生成物が示すフィードバック阻害作用を増幅させ、反応の進行につれて、エナンチオマーの一方の割合が非直線的に増加する非線形型自己触媒反応を起こす不斉合成反応系の構築が可能となった⁷⁴⁾。

次に、上記のキラルな鋳型分子では、保護基にベンジルオキシカルボニル基を用い、フットプリントキャビティを形成させたが、その部分構造をもつ環状化合物であるフェニルグリシン誘導体、5-フェニルヒダントイン（R体、**26**、S体、**27**、ラセミ体、**28**）を鋳型分子としたフットプリント触媒を調製した。これは鋳型分子を環状化合物にすることで、鋳型分子に対応する環状基質を開環させる反応を触媒させると、{**22**}による**23-25**のアシル基転移反応の時のような、生成物の再吸着による生成物阻害が回避できる上、基質がフットプリントキャビティに取り込まれる際、エントロピーの損失が少なく、反応に有利になる。

一方、**26-28**の原料であるフェニルグリシンは、 α -位にフェニル基をもつため、アラニンよりも大きな分子旋光度をもち、今後、生成物の確認等を行う場合、旋光計、CDスペクトル測定に都合がよい。また、5-フェニルヒダントインは、これまでの鋳型分子よりはるかに容易に合成でき、今まで用いたキラルな鋳型分子として、初めてR(**26**)、S(**27**)、ラセミ(**28**)系が同時に合成が可能であった。したがって、R系、S系のフットプリントキャビティを、並行して調製することができた。

以上の利点に加えて、5-フェニルヒダントインは生体物質であり、動物体内に存在し、それをN-カルバミル-D-アミノ酸に不斉加水分解する酵素、D-立体選択性ヒダントイナーゼは、広範囲に *Pseudomonas*、*Bacillus*、

Agrobacterium などの細菌や *Mycobacterium*、*Nocardia* などの放線菌、さらに *Candida*、*Hansenula* などの酵母に存在することが確認されている⁷⁵⁾。したがって、ヒダントイナーゼのミミック となると考えられる {26}、{27} が示すエナンチオ選択的触媒作用を確認するため、キラルな環状酸無水物、*N*-カルボキシフェニルグリシン無水物 (*R*, 29, *S*, 30) を基質とする、2,4-ジニトロフェノリシスを行なった。

さらに、5-フェニルヒダントインの α -位の-NH-を酸素に置換した5-フェニル-2,4-ジケトテトラヒドロオキサゾール(*R*, 31, *rac*, 32) を鑄型分子として得たフットプリントキャビティーのエナンチオ選択的触媒作用を検討した。

上記の鑄型分子は、アミノ酸およびヒダントイン誘導体であるので、キラルな炭素原子の隣は窒素原子であったが、酸素原子に置換することで、フットプリントキャビティー内の認識点が変わると推察される。このとき、エナンチオ選択的触媒作用は、どのような影響を受けるのかを検討した。それら鑄型分子31, 32の合成過程の出発物質は、オキシ酸のマンデル酸であり、29, 30と同様に31, 32も容易に合成することができる。このように、オキシ酸誘導体を鑄型分子に用いることで、鑄型分子選択の拡大が可能となる。

最後に、上述したカルボニル基を持つ鑄型分子ではなく、カルボニル基を持たず、ルイス塩基として作用する原子が、窒素原子と考えられるキラルなアミン、(*R*)-(+)-*N*-ベンジル- α -メチルベンジルアミン35 (*S*)-(-)-*N*-ベンジル- α -メチルベンジルアミン36を用いて調製したフットプリント触媒によるエナンチオ選択性について検討した。

これら多くのアミン類は、自然界にも存在するとともに生理活性を示す合成医薬品としても重要であり、特にこれらの光学異性体は薬理活性が異なるものも多く、光学純度の向上は創薬化学にとって避けられない重要な

問題である⁷⁶⁾。したがって、これらアミン類によるフットプリントキャビティの形成は応用範囲の広いものとなり実用価値の高いものといえる。

以上この章では数種のキラルなフットプリント触媒の示すエナンチオ選択性について、反応速度論的考察を中心に報告する。

6-2 実験

6-2-1 鑄型分子

N-ベンゾイル-(*N*^α-ベンジルオキシカルボニル)-*L*-アラニンアミド、(Z-*L*-Ala-NH-Bz, **18**): *L*-アラニンを塩化チオニルとエタノールで、常法どおりエステル化し得られた*L*-アラニンエチルエステル塩酸塩を、溶媒に塩化メチレンを用いて、塩化ベンジルオキシカルボニルでカルボベンゾキシ化する。*N*^α-ベンジルオキシカルボニル-*L*-アラニンエチルエステルは結晶化しにくいためシラップ状でアミド化する。アミド化は、溶媒ジオキサン中、濃アンモニア水で行う。融点134℃、赤外線吸収スペクトルで確認後ベンゾイル化に移る。

上記のような操作で調製した*N*^α-ベンジルオキシカルボニル-*L*-アラニンアミド2.22 g (0.01モル)をTHF 60cm³に溶解し、激しく攪拌しながら水素化ナトリウム0.4 g (0.01モル、60%純度)を加えて2-3分で発泡がおさまるので、直ちに無水安息香酸2.26 g (0.01モル)を添加する。その後、THF 40cm³を追加し粘性を減少させ、水素化ナトリウム0.4 gを再度加える。すなわち、水素化ナトリウム0.02モルを2分割して、添加した。そのまま、この溶液を常温で2時間激しく攪拌し続ける。反応後の溶液を約8倍のTHFで希釈し、酢酸でpHを6-7に下げ、混合溶液の体積が2-3cm³になるまで濃縮し、酢酸エチルを加えて懸濁後、水を極く少量加えて、分液漏斗で水層を酢酸エチルで2-3回抽出する。次に、無水硫酸ナトリウムで脱水、濃縮し、シラップ状になれば石油ベンジンで洗浄後、酢酸エチルで再結晶する。収率20.0%、融点(L体, **18**) 122-123℃、(ラセミ体, **19**)

119-121°C、IR (KBr): 3356, 3303 (N-H), 1692, 1677 (amide I), 1524 (amide II), 1454 (CH₃), 1256 cm⁻¹ (amide III); ¹H NMR (CDCl₃): δ=1.49 (d, CH₃), 5.03 (CH), 5.14 (CH₂), 5.37 (NH), 7.2-7.8 (m, ArH), 9.16 (NH); Calcd for C₁₈H₁₈N₂O₄: C, 66.26; H, 5.52; N, 8.59%. Found: (L体) C, 65.0; H, 5.60; N, 8.50% (ラセミ体) C, 64.45; H, 5.69; N, 8.10%. : (L体); [α]_D²¹=-12° (c2, EtOH).

ビス (*N*-ベンジルオキシカルボニル-L-アラニル) アミン ((Z-L-Ala)₂NH, **22**) : *N*-ベンジルオキシカルボニル-L-アラニンアミドの1.11 g を、20 cm³のTHFに溶かして、60%純度の水素化ナトリウム0.20 g (1当量) を室温で約2分攪拌し、水素の発生が終わったらビス (ベンジルオキシカルボニル-L-アラニル) オキシド、((Z-Ala)₂O) のL体(**23**)2.14 g (1当量) を添加し、攪拌を続ける。その後、すぐに水素化ナトリウム0.20 g (1当量) を更に加え、そのまま2時間攪拌を続ける。攪拌後、反応液を酢酸でpH7-8に調整し、45°C以下で減圧濃縮により乾固に近い状態にする。その後、酢酸エチルで抽出し、無水硫酸ナトリウムで脱水後45°C以下でシロップ状になるまで減圧濃縮する。そのシロップに石油ベンジンを加えて70-80°Cで副生成物を除くため数回洗浄するとゴム状になるので、エタノール-水で再結晶して生成物を得る。収率20%、融点135-137°C, [α]_D²⁵=-96° (c2, CH₃CN), IR (KBr) 3294 (N-H), 1682 (amide I), 1531 (amide II), 1455 (CH₃-), 1258 cm⁻¹ (amide III), ¹H NMR(CDCl₃) δ=1.22 (d, 6H, CH₃-), 4.42 (m, 2H, C-H), 5.01(s, 2H, CH₂), 7.32(m, 10H, ArH), 7.64 (d, 2H, CO-NH), 10.81 (s, 1H, CO-NH-CO), Calcd for C₂₂H₂₅N₃O₆: C, 61.83; H, 5.85; N, 9.84%. Found: C, 61.70; H, 5.80; N, 9.80%.

5*R*, 5*S* - フェニルヒダントイン⁷⁷⁾ ((5*R*)-**26**, (5*S*)-**27**): D-, または L-フェニルグリシン (1.51g, 10 mmol) とシアン酸カリウム (0.97g, 1.2当量) を水10 ml に懸濁し、70°Cの湯浴中30分間攪拌しアミノ基をカルバミル化した。反応液に6N塩酸 (6 cm³) を加えて、30分間

還流し環化させた。しばらく放置後、生じた結晶を水で洗浄し、ろ取した。この粗結晶 (収率: (5*R*)-**26**); 84.7%. (5*S*)-**27**); 77.8%.) をエタノール - 水から再結晶した。

収量: (5*R*)-**26**; 0.47g (26.7%), 融点185-186 °C (lit.⁷⁷⁾186°C). (5*S*)-**27**; 0.51g (29.0%), 融点 184.5 -185.5 °C (lit.⁷⁷⁾ 186 °C). IR (KBr): (5*R*)-**26**; 3304, 3213 (amide NH), 1787, 1724 (環式 amide), 742 and 694 cm⁻¹ (CH, phenyl). (5*S*)-**27**; 3303, 3213 (amide NH), 1787,1724 (環式 amide), 742 and 694 cm⁻¹ (CH, phenyl). ¹H NMR (CDCl₃): δ= 4.93 (CH), 7.31 (ArH), 7.61 and 10.27 (NH). ; Calcd for C₉H₈N₂O₂: C, 61.36; H, 4.55; N, 15.91. Found: (5*R*)-**26**; C, 59.83; H, 4.77; N, 15.68%. (5*S*)-**27**; C, 58.31; H, 4.87; N, 15.89%. ((5*R*)-**26**); [α]_D²⁵ = -111.6° (c 2, EtOH). ((5*S*)-**27**); [α]_D²⁵ = +111.6° (c 2, EtOH).

5 - フェニル - 2,4 - ジケト - テトラヒドロオキサゾール⁷⁸⁾, (5*R*)-**31**, *rac*- **32** :

グアニジン塩酸塩 (0.95g ,10 mmol)をエタノール 10 cm³ に溶解し、マンデル酸エチルエステル(1.8 g, 1.0 mmol)を添加した。これにカリウム - *tert* - ブトキシド(1.12g、 10 mmol)をEtOH 5cm³ に溶解したものを加えた。室温で 30分間 攪拌して水酸基をカルバミル化した。生じた塩化カリウムをろ取し、減圧濃縮して得られた結晶を水で洗浄した。収率: ((5*R*)-**31**); 40.3%. (*rac*- **32**); 17.6%. この結晶をエタノールで 5倍に希釈した塩酸に溶解し一夜放置して環化させた。反応液を減圧濃縮し、得られた結晶を水で洗浄し、エタノール - 水から再結晶した。

収量: (5*R*)-**31** ; 0.24g (20.1%), 融点 125-127°C. (*rac*- **32**); 0.12g (10.0%), 融点106-107 °C (lit.108 °C). IR (KBr): (5*R*)-**31**; 3191 (NH), 1827, 1735 (CO-NH-COO), 769 and 697 cm⁻¹. (*rac*- **32**); 3299 (NH), 1824, 1732 (CO-NH-CO-O), 768 and 694 cm⁻¹ (CH, phenyl) ¹H NMR (CDCl₃): δ = 8.52 (CH), 7.41 (ArH), 7.91 (NH). ; Calcd for C₉H₇NO₃: C, 61.00; H, 3.95; N,7.91. Found: (5*R*)-**31**; C, 61.42; H, 4.28; N, 7.71. (*rac*- **32**);; C, 61.34; H, 4.11; N, 7.91. (5*R*)-**31**; [α]_D²⁵ = -23.7° (c 2, EtOH)

(R)-(+)-N-ベンジル- α -メチルベンジルアミン **35**, (S)-(-)-N-ベンジル- α -メチルベンジルアミン **36** はJSPの市販品をそのまま用いた。

阻害剤 : (R)-(+)- α -メチルベンジルアミン **37**, (S)-(-)- α -メチルベンジルアミン **38** はAldrich 社の市販品をそのまま用いた。

5,5-ジフェニルヒダントイン (5,5-ジフェニル-2,4-イミダゾリンジオン, **33** はNacalai Tesque 社の特級試薬を、2-フェニルアセタミド**34** は和光純薬社の特級試薬をそのまま用いた。

基質 : ベンゾイック-N-ベンジルオキシカルボニル-L-アラニン無水物 (Z-L-Ala-O-Bz, **20**)

合成法は混合酸無水物の一般調製法に従った。すなわちD,L,DL-アラニンをカルボベンゾキシ化して得た各N-ベンジルオキシカルボニルアラニン 4.46 g (0.02mol) を塩化メチレン20.0cm³に溶かし、トリエチルアミン 2.02 g (0.02mol) を添加して、氷冷しながら攪拌する。その混合溶液にベンゼン40cm³を加えて、塩化ベンゾイル2.81 g (0.02mol) のベンゼン溶液10.0cm³を数分かけて滴下する。その後、20分攪拌を続け析出するトリエチルアミン塩酸塩を濾別して、酢酸エチル-石油ベンジンで再結晶する。IR(KBr): 3309(N-H), 1820, 1754(C=O, 酸無水物), 1693(amide I), 1542(amide II), 1456(CH₃), 1259(amide III), 1096(C-O-C) cm⁻¹

融点 : L体 107-111°C、D体 103-107°C、DL (ラセミ体) 60-62°C (lit.⁷⁹⁾ 61°C); (L体); $[\alpha]_D^{25} = -20^\circ$ (c 2, EtOH) (D体); $[\alpha]_D^{25} = +10^\circ$ (c 2, EtOH)

ビス (ベンジルオキシカルボニル-アラニル) オキシド、(Z-Ala)₂O、のL体 (**23**)、D体 (**24**)およびメソ体 (**25**)の合成 D、L、DLの各アラニンをベンジルオキシカルボニル化した、ベンジルオキシカルボニルアラニンの2.23 g (2当量) をアセトニトリル

20 cm³ (DL は 100 cm³) に溶解し、0℃以下に冷却しながら、ジヘキシルカルボジイミド 1.03 g (1当量) のアセトニトリル溶液を滴下して、2時間攪拌する⁸⁰⁾。その後、析出したジシクロヘキシル尿素を濾別し、濾液を減圧濃縮して乾固させ、塩化メチレン-石油ベンジンで再結晶して生成物を得る。(L体, **23**) 収率70%、融点122-128℃ (lit.⁷⁹⁾, 131℃)、IR(KBr) 3310(N-H), 1822, 1756(CO-O-CO), 1687(amide I), 1542(amide II), 1456(CH₃-), 1258(amide III), 1013 cm⁻¹, $[\alpha]_D^{25} = -33^\circ$ (c 2, CH₃CN); Calcd for C₁₈H₁₇NO₅: C, 61.68; H, 5.61; N, 6.54%. Found: C, 61.14; H, 5.70; N, 6.42%.

(D体, **24**) 収率70%、融点123-128℃、IRスペクトルはL体に同じ。 $[\alpha]_D^{25} = +31^\circ$ (c 2, CH₃CN)。

(メソ体, **25**) 収率25%、融点144-148℃、IR(KBr) 3335(N-H), 1826, 1756 (CO-O-CO), 1696(amide I), 1535(amide II), 1451(CH₃-), 1259(amide III), 1098, 1065, 1016 cm⁻¹, ¹H NMR(CDCl₃) $\delta = 1.48$ (d, 6H, CH₃-), 4.45(m, 2H, C-H), 5.11(s, 4H, CH₂), 5.20(2H, N-H), 7.25, 7.35(4H, 6H, ArH); Calcd for C₁₈H₁₇NO₅: C, 61.68; H, 5.61; N, 6.54%. Found: C, 61.31; H, 5.70; N, 6.52%.

N-カルボキシフェニルグリシン無水物⁸¹⁾, (5*R*)-**29**, (5*S*)-**30**:

D-, または L-ベンジルオキシカルボニルフェニルグリシン(2.85 g, 10 mmol)を、乾燥ベンゼン 40 cm³ に懸濁し、塩化チオニル(1.46 cm³, 2当量)を、攪拌下に、少量ずつ添加した。45℃の湯浴中、3時間激しく攪拌する。反応液を減圧濃縮し、石油ベンジンを加えて、粗結晶を得、酢酸エチル-石油ベンジンより再結晶した。

収量: (5*R*)-**29**; 1.43g (80.8%)、融点 116-118℃. (5*S*)-**30**; 1.43g (80.8%), 融点 116-119℃. IR (KBr): (5*R*)-**29**; 3235 (NH), 1846, 1783 (CO-O-CO), 762 and 703 cm⁻¹(CH, arom.). ((5*S*)-**30**); 3257 (NH), 1839, 1787 (CO-O-CO), 763 and 703 cm⁻¹(CH, arom.). ¹H NMR (CDCl₃): = 5.37 (CH), 6.29 (NH), 7.54 (ArH).; Calcd for C₉H₇NO₃: C, 61.02; H, 3.95; N, 7.91%. Found: (5*R*)-**29**; C, 61.00; H, 3.95; N, 7.91%;

(5S)-**30**; C, 61.04; H, 4.08; N, 7.97%. (5R)-**29**; $[\alpha]_D^{25} = -125.1^\circ$, (5S)-**30**; $[\alpha]_D^{25} = +137.2^\circ$ (c2, AcOEt)

6-2-3 他の実験項目は第1章に準ずる。

6-3 結果

6-3-1 アラニン誘導体 (18、19) を鋳型としたフットプリント触媒のエナント選択的触媒作用

キラルな分子を鋳型分子に用いて調製したフットプリント触媒が示すエナント選択性は、L体、D体、DL体の鋳型分子を分子刷り込みに用いるか、少なくともその中の2種類を選び、それらの分子の類似物を基質とする触媒反応の検討で、動力学的に証明可能である。ここでは用いたD体の光学純度が十分ではなく、しかも、無水物基質は再結晶を繰り返すことが困難であったため、L体とDL体を用いてフットプリント触媒を調製した。その*N*-ベンゾイル-(*N*^α-ベンジルオキシカルボニル)-L-アラニンアミド **18** とそのラセミ体 **19** を鋳型として調製したフットプリント触媒 {**18**} と {**19**} が、キラルな混合酸無水物、ベンゾイック-*N*-ベンジルオキシカルボニル-L-アラニン無水物 **20** とベンゾイック-*N*-ベンジルオキシカルボニル-DL-アラニン無水物 **21** の2,4-ジニトロフェノリシスを触媒した Lineweaver-Burkプロットを図6-1と図6-2に示した。また、同様にフットプリントキャビティを持たないコントロール触媒では、図6-3に示すように **20**、**21** で差は見られない。

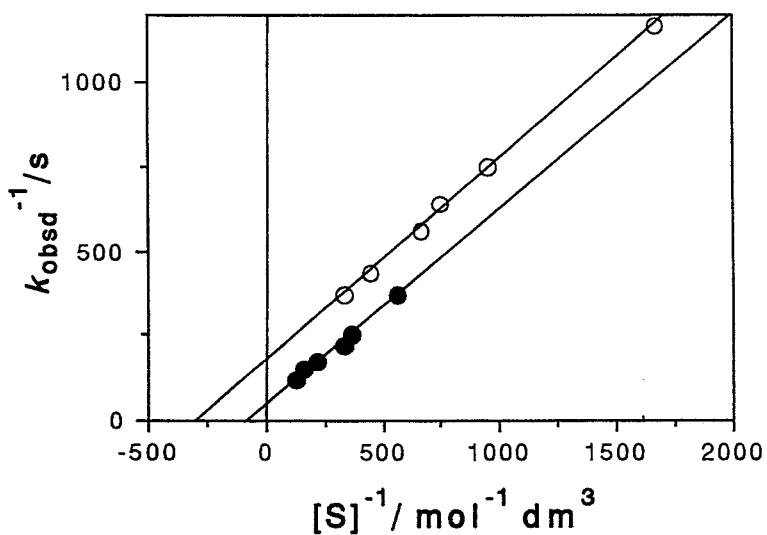


Fig. 6-1. Lineweaver-Burk plots for the catalyzed reactions of L- and DL- forms of the substrate over the molecular footprint catalytic cavities of the imprinted catalyst { **18** }.
The imprinted catalyst; 50 mg. Open circle for the substrate **21**. Closed circle for **20**.

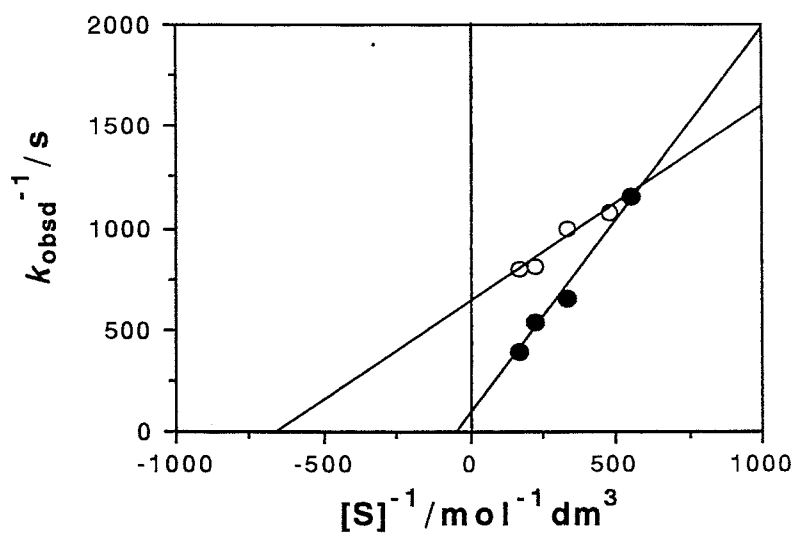


Fig. 6-2. Lineweaver-Burk plots for the catalyzed reactions of L- and DL- forms of the substrate over the molecular footprint catalytic cavities of the imprinted catalyst { **19** }.
The imprinted catalyst; 50 mg. Open circle for the substrate **21**. Closed circle for **20**.

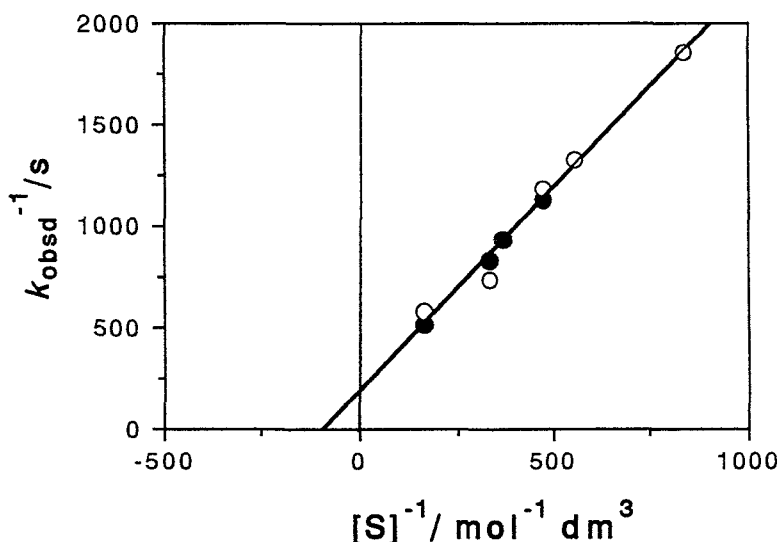


Fig. 6-3. Lineweaver-Burk plots for the catalyzed reactions of L- and DL- forms of the substrate over the molecular footprint catalytic cavities of the control catalyst. The imprinted catalyst; 50 mg. Open circle for the substrate **21**. Closed circle for **20**.

したがって、フットプリント触媒 {18} と {19} は明らかにエナンチオ選択的触媒作用を示している。またそれらの動力学パラメーターを表6-1に示したが、{18} と {19} いずれもが、18、19それぞれを反応系に加えることにより阻害作用を示すため、このエナンチオ選択的触媒作用は、触媒表面に残存する鑄型分子によるのではなく、フットプリントキャビティ自身によるものであることが明らかになった。しかし、これらのメカニズムは鍵と鍵穴説のような単純な排斥効果では説明できない。もし、そのみで説明できるのならば、表6-1の実験1と3また実験2と4ではそれぞれ同じ K_m 値を示さなければならないし、実験3の傾きあるいは $k_{obsd,max}$ は実験4の傾きの半分でなければならない。しかし実際の結果はそうではなく、スキーム6-1のように基質の触媒への吸着様式が2種類あり、1つは吸着後反応により生成物を与える生産的吸着であるが、もう一方は吸着平衡のみで反応に至らないと非生産的吸着が共存していると考えれば、本実験の結果は合理的に説明できる^{82,83}。

Table 6-1 Kinetic Parameters of the Catalyzed Reactions by Footprint Catalysts {L-18}, {DL-19}.

Run	Footprint Catalysts	Substrates	$10^2 \times K_m^a$	$10^2 \times k_{\text{obsd.max}}^b$	$K_m / k_{\text{obsd.max}}^c$
			M	s ⁻¹	Ms
1	{L-18} ^e	{L-20}	1.32	2.35	0.56
2	{L-18}	{DL-21}	0.75	0.62	1.20
		{DL-21}	(0.37) ^g	(0.62)	(0.60)
3	{DL-19} ^e	{L-20}	2.49	1.31	1.90
4	{DL-19}	{DL-21}	0.15	0.16	0.97
5	Control ^e	{L-20}	1.72	0.81	2.10
6	Control	{DL-21}	1.07	0.53	2.02

Run	Footprint Catalysts	Substrates	$10^3 \times k_{\text{cat}}^d$	$10^{-6} \times k_{\text{cat}} / K_m$	$10^3 \times K_i^d$
			M ⁻¹ s ⁻¹	M ² s ⁻¹	M
1	{L-18}	{L-20}	16.38	1.24	(0.0012) ^f
2	{L-18}	{DL-21}	4.30	0.58	
		{DL-21}	(4.30)	-	4.7
3	{DL-19}	{L-20}	4.30	1.72	
4	{DL-19}	{DL-21}	0.52	0.34	1.60
5	Control	{L-20}	2.83	0.16	
6	Control	{DL-21}	1.84	0.17	

a) Apparent K_m . b) $k_{\text{obsd.max}}$ for 50 mg catalyst. c) Slope of Lineweaver-Burk plots. d) K_i , competitive inhibition constants by the antipode of the substrate calculated from eqn.(2) or eqn.(4). e) Amount of catalytic sites, 28.7×10^{-6} mol per gram for {L-18}, 61.1×10^{-6} mol per gram for {DL-19} and 57.5×10^{-6} mol per gram for Control. f) K_i of original template, Z-L-Ala-NH-Bz. g) (Corrected value) according to eqn. (2), wherein intrinsic substrate is L-form and [S] is half of $[S_{\text{DL}}]$.

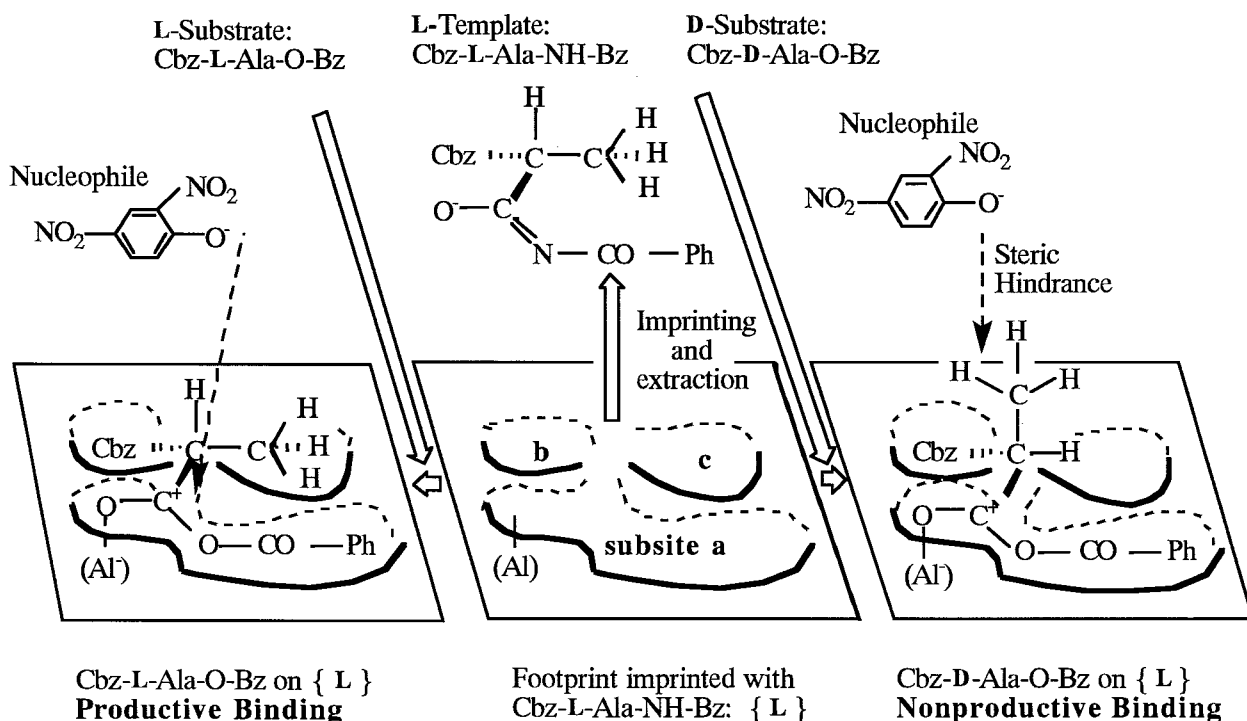
具体的には次のように集約できる。

(i) L体の鑄型分子18の不斉炭素原子のまわりの3部分構造 (-CO-NH-Bz, Z-NH-, CH₃-かH-)が、キラルなフットプリントキャビティの3つのサブサイトを構成している。

(ii) L体の基質分子20が、スキーム6-1のようにサブサイトa, b, cに、 α -炭素の周りの立体配置を保って吸着される(三点吸着⁸⁴)生産的吸着において、活性中心であるアルミニウムルイス酸点によってカルボニル炭素原子が活

性化され、2,4-ジニトロフェノキシド(DNP⁻)の求核攻撃を受け易くなる。

(iii) D体の基質分子は、サブサイトaに-CO-O-Bz, bにZ-NH-, cにL体のメチル基に代わってα-Hが吸着されるもうひとつの三点吸着型をとることが可能である。しかし、その際メチル基は垂直に立ち上がりDNP⁻の求核攻撃の立体障害となり、生成物の生成が妨げられるいわゆる非生産的吸着となる。したがって、L型のフットプリントキャビティーで起こる触媒作用



Scheme 6-1

では、L体の基質の反応において、D体の基質は拮抗阻害剤として作用する。これらの考えにより各Lineweaver-Burkの式は次のように導くことができる。

(実験1) {L} - L基質の系

原形どおりのLineweaver-Burkの式となる。

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{\max}} + \frac{K_m}{V_{\max}[S_I]} \quad (1)$$

(実験2) {L} - DL基質

半量のL基質は生産的吸着で生成物を与えるが、半量のD基質が阻害剤として作用する拮抗阻害の式になる。そのとき $[S]=[S_L]$, $[I]=[S_D]$, $[S_L]=[S_D]$ である。原形のMichaelis-Menten式

$$v = \frac{V_{\max}[S]}{[S] + K_m(1 + \frac{[I]}{K_i})}$$

に代入して整理すると

$$\frac{1}{v} = \frac{1 + \frac{K_m}{K_i}}{V_{\max}} + \frac{K_m}{V_{\max}[S_L]} \quad (2) \quad \text{となる。}$$

(実験3) {DL} - L基質の系

この系では触媒の半量しか使えないため、 V_{\max} も半分になる。

故に

$$v = \frac{\frac{V_{\max}}{2}[S_L]}{[S_L] + K_m}$$

$$\frac{1}{v} = \frac{2}{V_{\max}} + \frac{2K_m}{V_{\max}[S_L]} \quad (3) \quad \text{となる。}$$

(実験4) {DL} - DL基質の系

触媒 {D} にはD基質が作用するが、L基質が拮抗阻害剤となる。反対に {L} にはL基質が作用し、D基質が拮抗阻害剤となる。これは全体で考えれば実験2と同じであると言える。したがって

$$\frac{1}{v} = \frac{1 + \frac{K_m}{K_i}}{V_{\max}} + \frac{K_m}{V_{\max}[S_L]} \quad (4) \quad \text{となる。}$$

表6-1の実験1と実験2の補正值（{L} に対しての基質はL型のみであるとしてLineweaver-Burkプロットの横軸を2倍に補正した値）の比較、同様に実験3と実験4との比較は上記の理論式とよく一致し

ている。すなわち、理論式でも実験1と実験2の傾きは等しく2直線が平行になることを図6-1はよく表しており、また実験3と実験4の直線の傾きは、約2倍であることを図6-2もよく示している。これらから、フットプリント触媒によるエナンチオ選択性が速度論的に説明できる。

6-3-2 アラニン誘導体(22)を鑄型としたフットプリント触媒のエナンチオ選択的触媒作用

コントロール触媒とフットプリント触媒{22}の基質23-25に対する2,4-ジニトロフェノリシスでは図6-4と図6-5に示すように明らかな違いが見られる。すなわち{22}では、図6-4に示したコントロール触媒では見られない何らかのエナンチオ選択性が現われる。ここで用いている鑄型分子は、Z-L-アラニンの対称形イミド22であり、基質は前項のZ-アラニンの混合酸無水物ではなく、Z-アラニンの対称形酸無水物23-25である。すなわち、スキーム6-2に示した操作で調製したフットプリントキャビティーでスキーム6-3に示したように触媒作用が行われる。

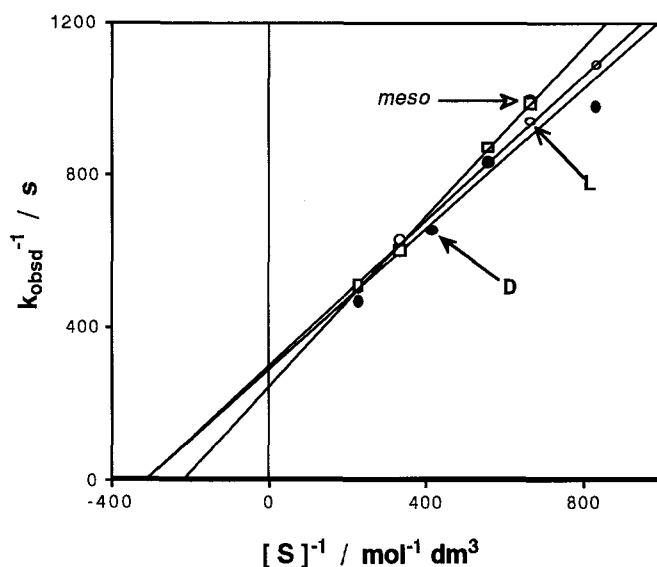


Fig. 6-4. Lineweaver-Burk plots for the catalyzed reactions of L-, D-, and meso-forms of the substrate over the native catalytic sites of the control catalyst.

The control catalyst; 50 mg. Open circle for the substrate 23. Closed circle for 24. Square for 25.

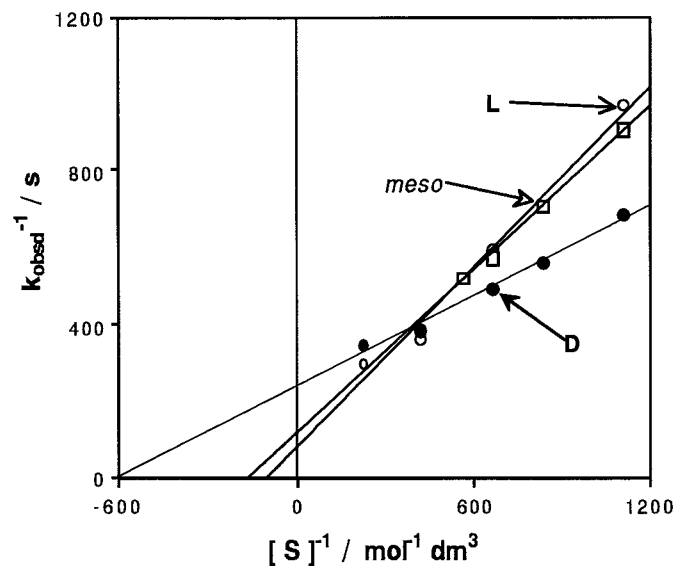
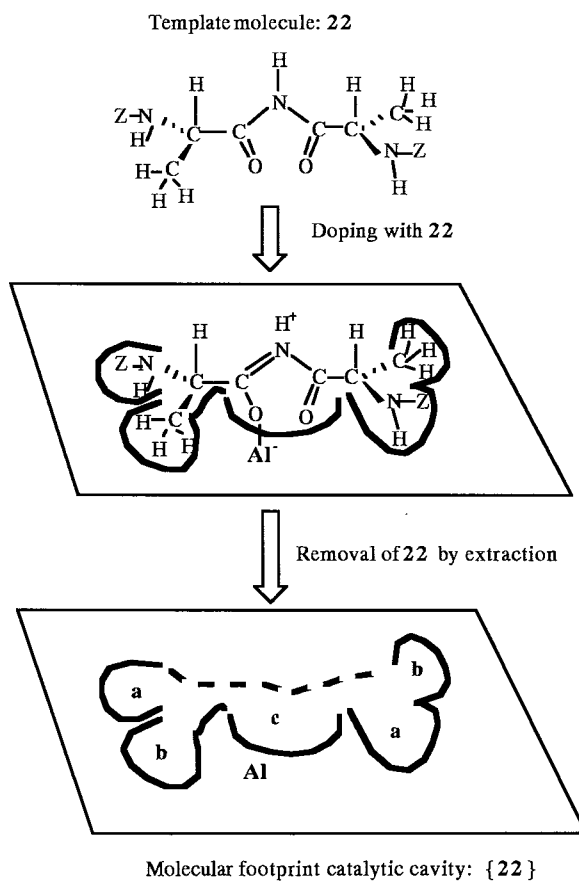
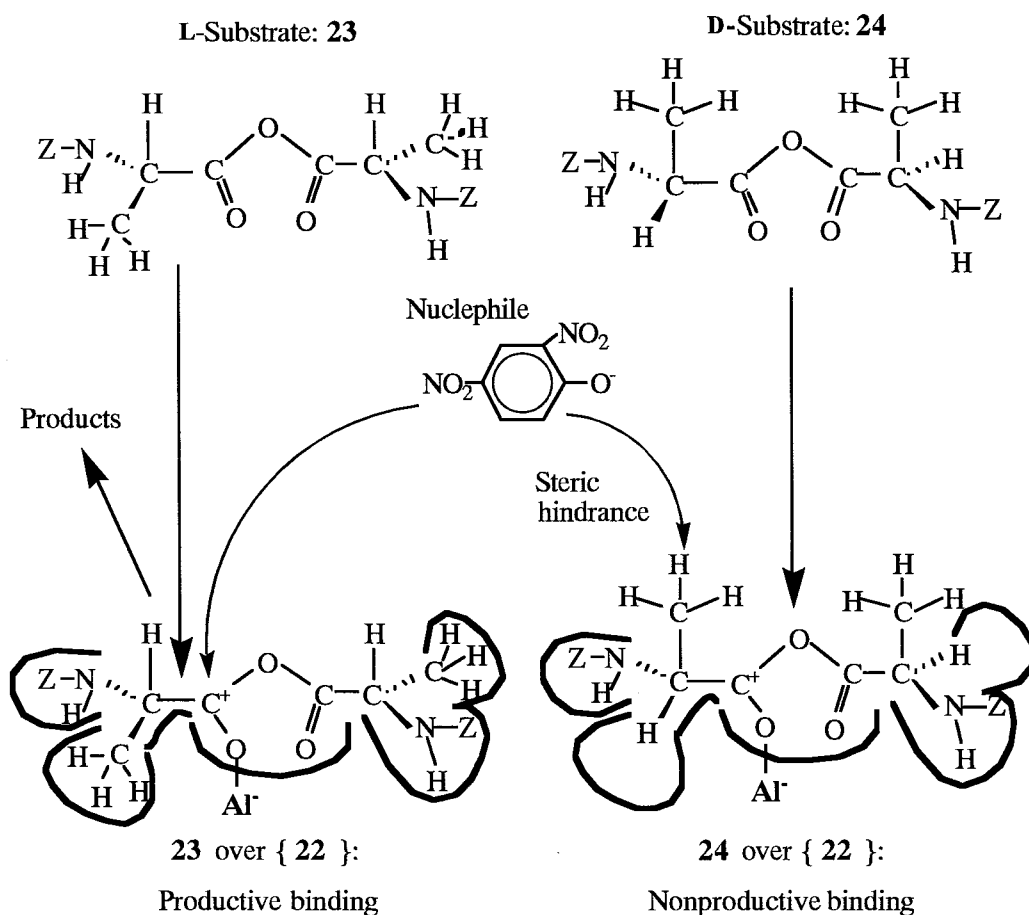


Fig. 6-5. Lineweaver-Burk plots for the catalyzed reactions of L-, D-, and meso-forms of the substrate over the molecular footprint catalytic cavities of the imprinted catalyst { **22** }. The imprinted catalyst; 50 mg. Open circle for the substrate **23**. Closed circle for **24**. Square for **25**.



Scheme 6-2



Scheme 6-3

この場合L体基質（23）は生産的吸着し、D体基質（24）は非生産的吸着を起こす。これは前項の反応と同様であるが、副生成物としてL体基質（23）の反応ではZ-L-アラニネートが、D体基質（24）ではZ-D-アラニネートが生じ{22}を阻害する。すなわち、2種の生成物（Z-L-Ala-O-DNPとZ-L-Ala-O⁻またはZ-D-Ala-O-DNPとZ-D-Ala-O⁻）の内、Z-L-Ala-O⁻またはZ-D-Ala-O⁻が阻害するという生成物阻害作用を

起こす（Z-L-Ala-O-DNP及びZ-D-Ala-O-DNPは生成物阻害を示さない）。この機構を動力的に考察すると以下のようなになる。

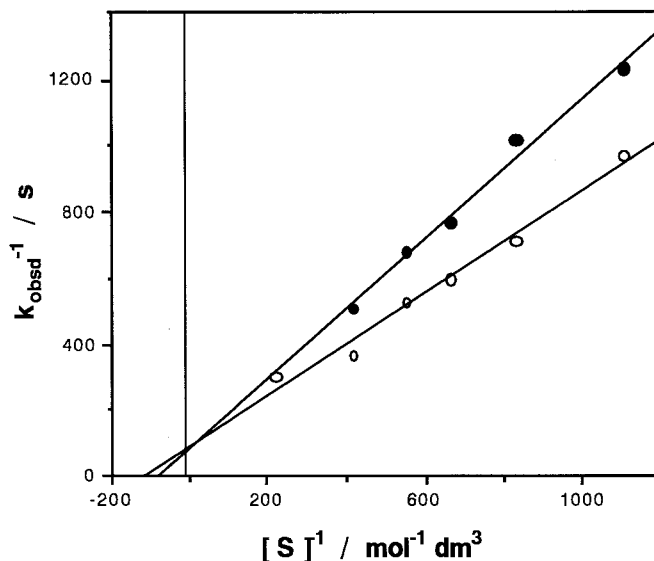


Fig. 6-6. Competitive inhibition by template **22** on the catalyzed reaction of **23** over the cavities { **22** }.

Open circle: No inhibitor **22**. Closed circle: The inhibitor concentration; $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$. $K_i = 2.22 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$. $K_m / K_i = 411.2$.

図6-6に示したように、{**22**}は鑄型分子**22**により阻害されるが、コントロール触媒では阻害作用は見られないことから、エナンチオ選択的触媒作用は触媒表面に残る**22**によるものではない。そこで、この時の反応速度式を示すと、典型的な完全拮抗阻害の式より

$$\text{Rate} (k_{\text{obsd}}) = \frac{k_{\text{cat}}[\text{catalyst}][\text{s substrate}]}{K_m(1 + \frac{[I]}{K_i}) + [\text{s substrate}]} \quad (1)$$

となる。ここで[I]は反応溶液中の阻害剤濃度、 K_i は{**22**}と**22**との拮抗阻害定数である。(1)式に従い、基質**23**に対しては次のようになる。

$$k_{\text{obsd}} = \frac{k_{\text{catLL}}[\text{catalyst}][\mathbf{23}]}{K_{\text{mLL}}(1 + \frac{[I_L]_t}{K_{iL}}) + [\mathbf{23}]} \quad (2)$$

ここで $[I_L]_t$ は、 t 秒後の阻害剤、Z-L-アラニネートの濃度であり、 t 秒後に消費された求核剤の濃度と等しい。また、 K_{iL} は{22}とZ-L-アラニネート(I_L)との拮抗阻害定数、 K_{mLL} は基質23と触媒{22}とのMichaelis定数、 k_{catLL} はこの反応における反応速度定数である。

反応速度の測定は、1-3-2項で示したように、求核剤の濃度の減少を追跡することにより行う。この時、反応速度は求核剤の濃度に比例する擬一次速度式に従うから、次の式が成り立つ。

$$\frac{d[Nu]}{dt} = k_{obsd}([Nu]_0 - [Nu])$$

ここで $[Nu]_0$ は求核剤(2,4-ジニトロフェノレート)の初濃度($1.67 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$)、 $[Nu]$ は反応開始から t 秒間に反応した求核剤の減少量である。

この微分方程式を解くと

$$\ln([Nu]_0 - [Nu]) = -k_{obsd}t + \ln[Nu]_0$$

$[Nu]$ は $[I_L]_t$ に等しいから

$$\ln([Nu]_0 - [I_L]_t) = -k_{obsd}t + \ln[Nu]_0$$

となる。これを変形して

$$[Nu]_0 - [I_L]_t = [Nu]_0 e^{-k_{obsd}t}$$

したがって

$$[I_L]_t = [Nu]_0 \{1 - \exp(-k_{obsd}t)\} \quad (3)$$

を得る。これを(2)式に代入して

$$k_{\text{obsd}} = \frac{k_{\text{catLI}}[\text{catalyst}][\mathbf{23}]}{K_{\text{mLL}}\left(1 + \frac{[\text{Nu}]_0\{1 - \exp(-k_{\text{obsd}}t)\}}{K_{\text{iL}}}\right) + [\mathbf{23}]} \quad (4)$$

となる。

一方、 $\exp(-k_{\text{obsd}}t)$ の項はこの測定条件の1000-1600秒間では、1より十分に小さく無視できる。故にこの式は、次のように近似できる。

$$k_{\text{obsd}} = \frac{k_{\text{catLL}}[\text{catalyst}][\mathbf{23}]}{K_{\text{mLL}}\left(1 + \frac{[\text{Nu}]_0}{K_{\text{iL}}}\right) + [\mathbf{23}]} \quad (5)$$

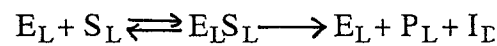
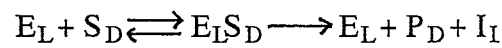
同様にして、基質 $\mathbf{24}$ に対しても次のように書くことができる。

$$k_{\text{obsd}} = \frac{k_{\text{catDD}}[\text{catalyst}][\mathbf{24}]}{K_{\text{mDD}}\left(1 + \frac{[\text{Nu}]_0}{K_{\text{iD}}}\right) + [\mathbf{24}]} \quad (6)$$

更に、メソ体の基質 $\mathbf{25}$ を $\{\mathbf{22}\}$ が触媒するときを考察すると、理論式は(2)(3)式より複雑になる。この理由は、 $\mathbf{25}$ の吸着型が二通り考えられるためである。

その一つは、 $\mathbf{25}$ のZ-L-アラニル部分がルイス触媒サイトに吸着する場合であり、もう一つはZ-D-アラニル部分が同様に吸着する場合である。前者の吸着型は、本来の吸着型であり、この吸着型による触媒作用からは、生成物、Z-L-アラニン2,4-ジニトロフェニルエステルとZ-D-アラニネートを生じる。(この時、Michaelis定数は K_{mL} (前述の K_{mLL} とは区別する。)、触媒過程での速度定数は k_{catL} (前述の k_{catLL} とは区別する。)とする。) 後者の吸着型は、Z-D-アラニン2,4-ジニトロフェニルエステルとZ-L-アラニネートを生じる吸着型である。(この時、Michaelis定数は K_{mD} 、触媒過程での速度定数は k_{catD} である。)したがって、この時の反応速度式は、二基質反応のMichaelis-Menten式として誘導することができる。

すなわち、 E_L は{22}を、 S_L はメソ基質(25)のZ-L-アラニル部分がルイス触媒サイトに吸着する場合の基質を、 S_D はメソ基質(25)のZ-D-アラニル部分がルイス触媒サイトに吸着する場合の基質を、 $E_L S_L$ は E_L と S_L の複合体を、 $E_L S_D$ は E_L と S_D の複合体を、 P_L はZ-L-アラニン2,4-ジニトロフェニルエステルを、 P_D はZ-D-アラニン2,4-ジニトロフェニルエステルを、 I_L はZ-L-アラニネートを、 I_D はZ-D-アラニネートを、 $E_L I_L$ は E_L と I_L の複合体を、 $E_L I_D$ は E_L と I_D の複合体を表すとすると



以上のような平衡式が成立する。また、次の関係も成り立つから

$$[E]_0 = [E_L] + [E_L S_L] + [E_L S_D]$$

$$K_{mL} = \frac{[E_L][S_L]}{[E_L S_L]} \quad K_{mD} = \frac{[E_L][S_D]}{[E_L S_D]}$$

これらの式より、 S_L の吸着時の関係式が求められる。

$$[E]_0 = \frac{[E_L S_L]}{[S_L]} K_{mL} + [E_L S_L] + \frac{[E_L S_L]}{[S_L]} \times \frac{[S_L]}{K_{mD}} K_{mL}$$

$$[E]_0 = [E_L S_L] \left(\frac{K_{mL}}{[S_L]} + 1 + \frac{K_{mL}}{K_{mD}} \right)$$

$$[E_L S_L] = \frac{[E]_0}{\frac{K_{mL}}{[S_L]} + 1 + \frac{K_{mL}}{K_{mD}}}$$

$$[E_L S_L] = \frac{[E]_0 [S_L]}{K_{mL} + \left(1 + \frac{K_{mL}}{K_{mD}}\right) [S_L]}$$

同様にして、 S_D の場合も次のようになる。

$$[E_L S_D] = \frac{[E]_0 [S_D]}{K_{mD} + \left(1 + \frac{K_{mD}}{K_{mL}}\right) [S_D]}$$

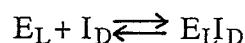
一方、求核剤の濃度の減少の反応速度 (v) は、

$v = (k_{catL}[E_L S_L] + k_{catD}[E_L S_D])([Nu]_0 - [Nu])$ となる (ここで $k_{obsd} = k_{catL}[E_L S_L] + k_{catD}[E_L S_D]$ である。)

ので、この $[E_L S_L]$ 、 $[E_L S_D]$ に上の関係式を代入し、 $[E]_0$ を [catalyst] に、 $[S_L]$ 、 $[S_D]$ を [25] に書き直して、次の (7) 式を得る。

$$k_{obsd} = \frac{k_{catL} [\text{catalyst}][25]}{K_{mL} + \left(1 + \frac{K_{mL}}{K_{mD}}\right)[25]} + \frac{k_{catD} [\text{catalyst}][25]}{K_{mD} + \left(1 + \frac{K_{mD}}{K_{mL}}\right)[25]} \quad (7)$$

また、前述したように、Z-D-アラニネートまたは、Z-L-アラニネートの生成物阻害反応が起こると、更に次の平衡式を考慮しなければならない。



そこで、

$$K_{iL} = \frac{[E_L][I_L]}{[E_L I_L]}$$

$$K_{iD} = \frac{[E_L][I_D]}{[E_L I_D]}$$

であるから、この拮抗阻害定数の関係を考慮して、(7)式の K_{mL} 及び K_{mD} の係数に $\left(1 + \frac{[I_L]_t}{K_{iL}} + \frac{[I_D]_t}{K_{iD}}\right)$ をかけ、次のように示すことができる。

$$k_{obsd} = \frac{k_{catL} [\text{catalyst}][25]}{K_{mL} \left(1 + \frac{[I_L]_t}{K_{iL}} + \frac{[I_D]_t}{K_{iD}}\right) + \left(1 + \frac{K_{mL}}{K_{mD}}\right)[25]} + \frac{k_{catD} [\text{catalyst}][25]}{K_{mD} \left(1 + \frac{[I_L]_t}{K_{iL}} + \frac{[I_D]_t}{K_{iD}}\right) + \left(1 + \frac{K_{mD}}{K_{mL}}\right)[25]} \quad (8)$$

しかし、(8)式は(5)式のように近似はできない。なぜなら $[I_L]_t$ と $[I_D]_t$ は(3)式のように独立に求めることはできず、化学量論的に $[I_L]_t + [I_D]_t = [Nu]_0 \{1 - \exp(-k_{obsd}t)\}$ となる。

また、(5)式と(6)式は、未知数である{22}へのL体基質の真の K_{mLL} 、同様にD体基質の真の K_{mDD} およびZ-L-アラニネートの阻害定数 K_{iL} 、Z-D-アラニネートの阻害定数 K_{iD} を含んでいるため、他の方法でこれらの値を得なければならない。

そこで{22}が24を基質とする触媒作用において、反応系にZ-L-アラニネート I_L を添加する阻害作用の検討を行った。この時の反応速度式は $[I_L] / K_{iL}$ 項を加えて

$$k_{obsd} = \frac{k_{cat}[\text{catalyst}][24]}{K_m \left(1 + \frac{[Nu]_0}{K_{iD}} + \frac{[I_L]}{K_{iL}}\right) + [24]} \quad (9)$$

のように表せる。

これらの阻害作用の大きさについては、次のように考察できる。まず、反応系に添加したZ-L-アラニネート I_L の阻害作用の方が、反応に伴って生じるZ-D-アラニネート I_D の阻害作用より強いと考えられる。なぜなら、{22}のZ-L-Ala-N⁻部分の分子認識力は I_D より I_L の方に有利であるので、L型のフットプリント触媒である{22}への各阻害剤の特異的吸着では、 K_{iL} の値は K_{iD} のそれより小さくなる。一方、 $[I_L]$ は $[Nu]_0$ と同じオーダーであり、 I_D の最終濃度が $[Nu]_0$ と等しい。

この考えに基づくと $[Nu]_0 / K_{iD}$ 項は、 $[I_L] / K_{iL}$ 項に比べ無視できることがわかる。そのため(9)式は(1)式に等しいと近似でき、図6-7に示した阻害作用から求められる見かけの K_i は、 K_{iL} と等しいと考えられる。

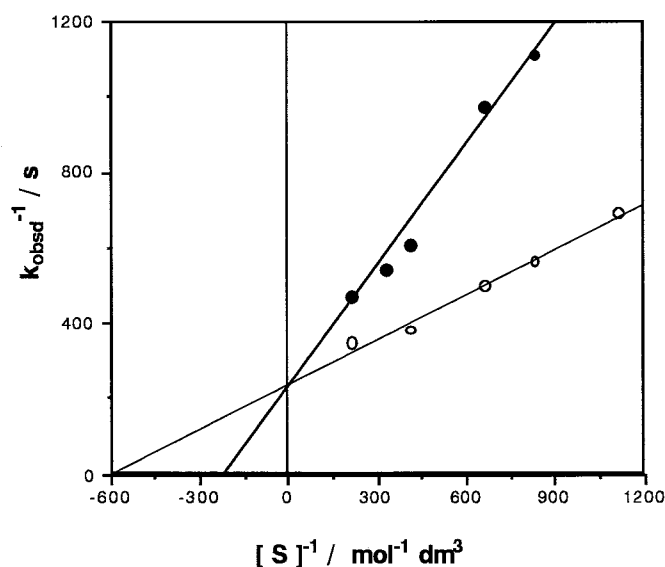


Fig. 6-7. Competitive inhibition by Z-L-alaninate on the catalyzed reaction of **24** over the cavities { **22** }.

Inhibitor: Potassium Z-L-alaninate solubilized with 18-crown-6. Open circle: No inhibitor. Closed circle: Inhibitor concentration, $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$. $K_{iL} = 5.79 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$.

したがって、この図6-7の○印で示したプロットから得た阻害剤濃度 $[I_L]=0$ の直線の x 切片より、見かけの K_m 値を $1.66 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ と求め、●印の阻害剤存在下の直線の x 切片値、-220.9 とから次の関係式を得る。

$$-1.66 \times 10^{-4} \times (1 + [I_L] / K_{iL}) = -1 / 220.9$$

この式に $[I_L]=1.0 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ を代入して、 $K_{iL} = 5.79 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ を求めた。{ **22** } が **23** を基質とする反応系に Z-D-アラニネート I_D を添加する同様な阻害作用検討により、 $K_{iD} = 26.88 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ を得た (図6-8)。

そこで図6-5の基質 **23** 及び **24** のLineweaver-Burk プロットの x 切片値 (それぞれ -108.5、-600.2) $-K_{mLL} (1 + [Nu]_0 / K_{iL})$ 、 $-K_{mDD} (1 + [Nu]_0 / K_{iD})$ に、 $[Nu]_0 = 1.67 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ と $K_{iL} = 5.79 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ 、 $K_{iD} = 26.88 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ を代入して真の $K_{mLL} (2.37 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3})$ 及び $K_{mDD} (1.03 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3})$ を求め表6-2に示した。

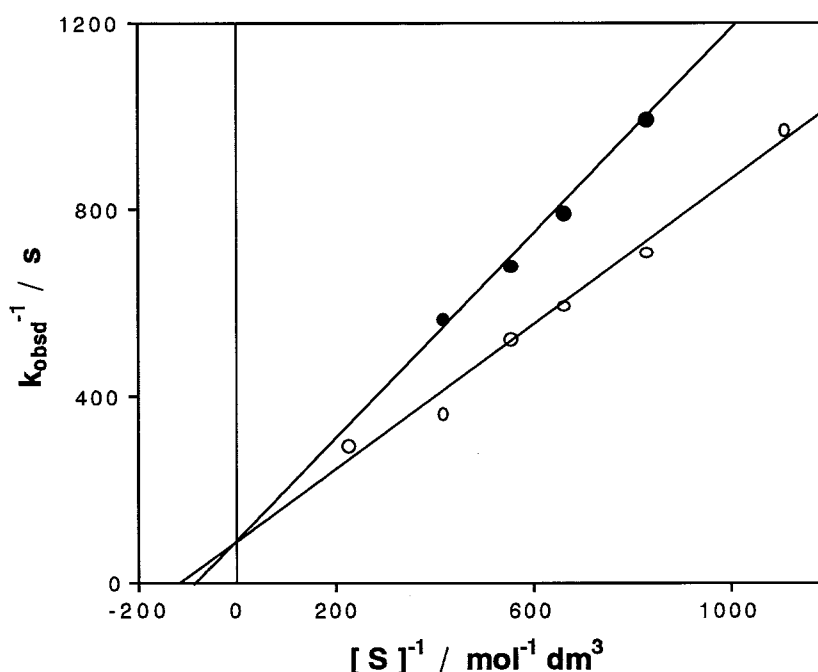


Fig. 6-8. Competitive inhibition by Z-D-alanine on the catalyzed reaction of **23** over the cavities { **22** }.

Inhibitor: Potassium Z-D-alanine solubilized with 18-crown-6. Open circle: No inhibitor. Closed circle: Inhibitor concentration, $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$. $K_{iD} = 2.688 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$.

そこで (5) 式および (6) 式にこの真の値を用いると {**22**} の各々基質 **23**、**24** に対する触媒作用の k_{obsd} の補正ができる。一方、図6-5に示したようにメソ型基質 **25** に対する Lineweaver-Burk プロットはよい直線性を示しており (相関係数=0.994)、基質 **23** に対する Lineweaver-Burk プロットに近い。これらのことよりメソ型基質 **25** のほとんどはL体部分でアルミニウムルイス酸点と結合し、Z-D-アラニネートを生成する吸着型で反応していることがわかる。故に (8) 式の k_{catD} と $[I_L]_i$ を無視して (8) 式は次のように書き換えられる。

$$k_{obsd} = \frac{k_{catL}[\text{catalyst}][\mathbf{25}]}{K_{mL}\left(1 + \frac{[\text{Nu}]_0}{K_{iD}}\right) + \left(1 + \frac{K_{mL}}{K_{mD}}\right)[\mathbf{25}]} \quad (10)$$

Table 6-2. Kinetic Parameters of the Catalyzed Reactions over Molecular Footprint Cavities
{ 22 }.

Catalysts	Substrates	$K_m^a)$	$V_{max}^b)$	$k_{cat}^c)$	k_{cat} / K_m	$K_i^d)$	$K_{ip}^e)$
		$10^{-3} M^f)$	$10^{-3} s^{-1}$	$10^3 M^{-1}s^{-1}$	$10^5 M^{-2}s^{-1}$	$10^{-5} M$	$10^{-5} M$
{ 22 } ^{g)}	23	9.22 (2.37) ⁱ⁾	11.90	7.60	8.25 (30.08)	2.22	26.88 ^{h)}
{ 22 }	24	1.66 (1.03)	4.21	2.69	16.15 (26.09)	-----	5.79 ^{h)}
{ 22 }	25	6.03 (3.72-7.44) ^{k)}	8.56 (8.56-17.11)	5.47 (5.47-10.94)	9.07 (14.70)	-----	
Control ^{l)}	23	3.18	3.33	2.00	6.28	no inhibition	
Control	24	3.20	3.49	2.09	6.51	-----	
Control	25	4.45	4.02	2.41	5.41	-----	

a) Apparent K_m . b) $k_{obsd. max}$ with 50 mg catalyst. c) Divided by molarities of catalytic sites of 50 mg catalyst. d) Competitive inhibition constant with the original template **22**. e) K_i of inhibition by reaction products. f) $M = mol\ dm^{-3}$. g) Catalytic site molarity; 3.13×10^{-5} mol per 1 gram catalyst. h) K_{iD} . i) Figures in parentheses mean the corrected values. See text. j) K_{iL} . k) Lower and upper limits of parameters. See text. l) Molarity; 3.34×10^{-5} mol per 1 gram catalyst.

結局、 K_{mL} は 0 と K_{mD} の間の値であるから $(1 + K_{mL} / K_{mD})$ 項は 1 と 2 の間である。そこで $(1 + K_{mL} / K_{mD})$ 項の値を 1 か 2 に設定し $K_{iD} = 2.688 \times 10^{-4} mol\ dm^{-3}$ を代入すると補正した K_{mL} と k_{obsd} の上限と下限を知ることができる。補正して得たグラフが図 6-9 である。このグラフからわかるように、**{ 22 }** をキラルファクターとするエナンチオ選択性は、ほぼ全濃度範囲において明らかであり、いままで述べてきたメカニズムおよび式の誘導は妥当であると言える。

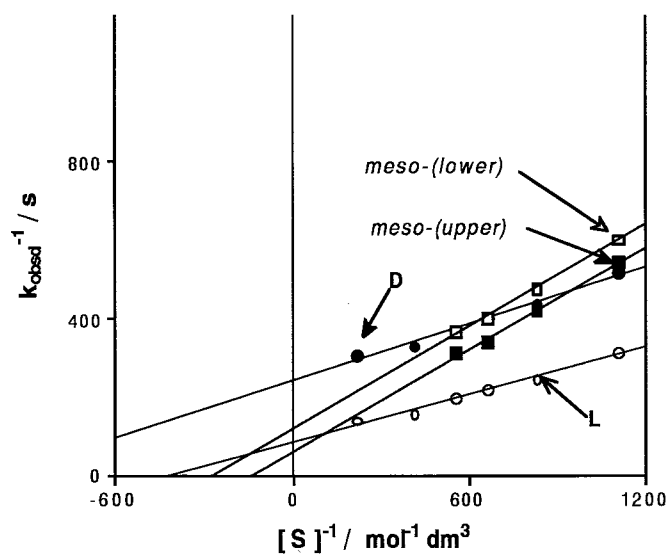


Fig. 6-9. Corrected Lineweaver-Burk plots for the reactions of L-, D-, and meso-forms of the substrate over the cavities{ **22** }.

Corrected k_{obs} s are calculated using Eqs. 5, 6, and 10 (see text). Open circle for **23**. Closed circle for **24**. Open square for **25** (lower limit). Closed square for **25** (upper limit).

6-3-3 ヒダントイン誘導体 (26、27、28) を鑄型としたフットプリント触媒のエナント選択的触媒作用

6-3-3-1 反応生成物の確認

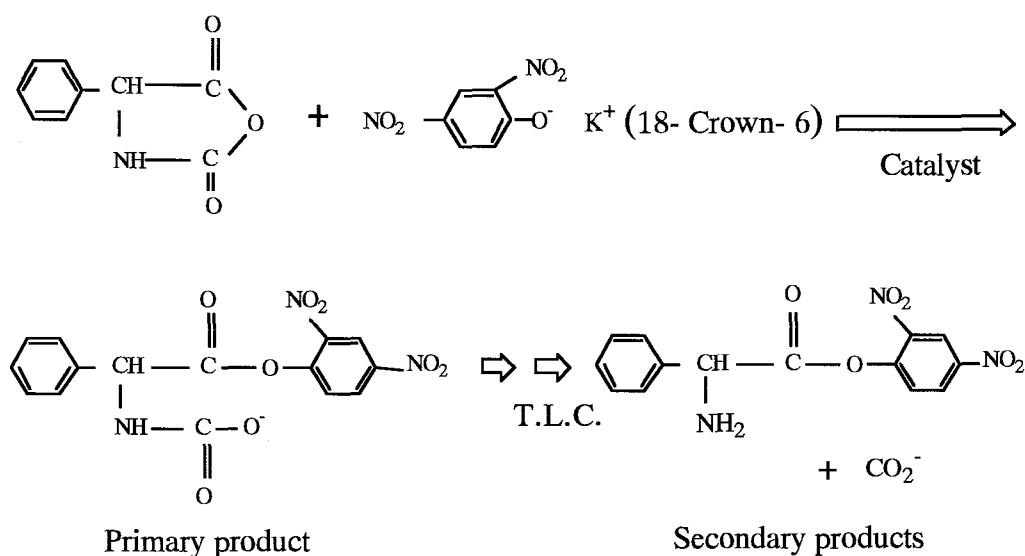
基質として用いる環状化合物**26-30**の2,4-ジニトロフェノリシスを起こすためには、シリカアルミナ触媒または三フッ化ホウ素を添加しなければならず、触媒非存在下では2,4-ジニトロフェノレートのO.D.の変化は見られない。シリカアルミナ触媒を加えることにより進行するこれらの反応では、376と430nmに見られる2,4-ジニトロフェノレートの吸収ピークが減少し、258nmの生成物のピークが現われてくる。また、ベンゼンを展開液に用いた薄層クロマトグラフィーでは、原点近くに紫外線吸収点が見え、アンモニアガス噴霧により黄色に変化する。このスポットが生成物であるならば、極性の高い活性エステルである(スキーム6-5)。そこでこのスポットのエーテル抽出物の赤外線吸収スペクトルによる同定から、生成物の α -フェニルグリシン2,4-ジニトロフェノレートであることを確認した。すなわち、スキーム6-5に示すように**29**、**30**を基質とする触媒反応では脱炭酸し、また**26**、**27**を基質とする反応ではシアン酸イオンを遊離して最終生成物の α -フェニルグリシン2,4-ジニトロフェノレートになる。

6-3-3-2 酸無水物基質 (29、30) に対する触媒作用

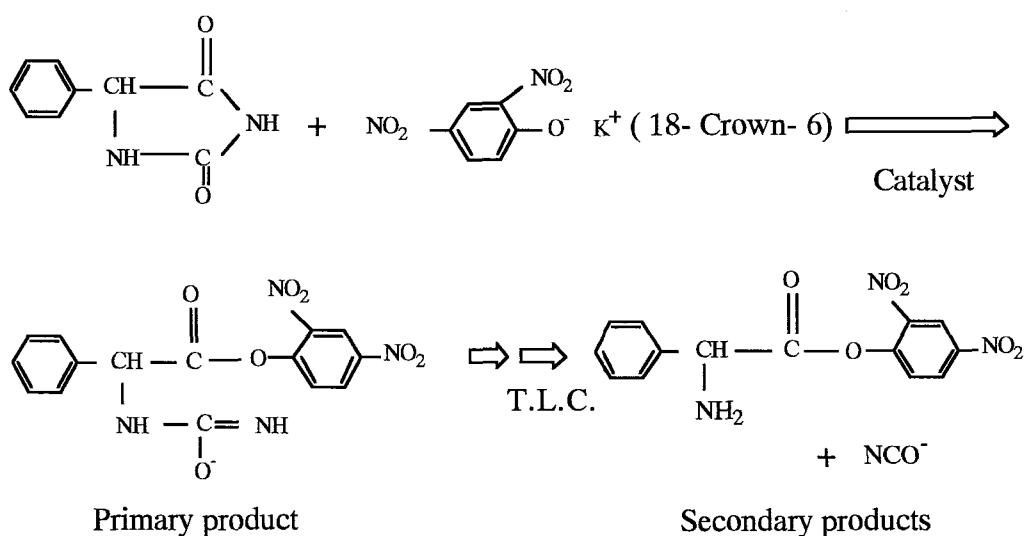
図6-10、6-11に {**26**} および {**27**} が触媒する酸無水物基質 (**29**、**30**) の2,4-ジニトロフェノリシスのLineweaver-Burkプロットを示す。{**26**} が触媒する**29**と**30**の反応では基質の全濃度にわたって、明らかに**30**より**29**に特異的であり、逆に {**27**} が触媒する**29**と**30**の反応では**29**より**30**に特異的である。またラセミ体の**28**を鑄型分子として調製した {**28**} が触

媒する反応では、図6-12に示すように実験誤差の範囲内で**29**と**30**に差は見られない。これらの動力学パラメーターを表6-3に示したが、 k_{cat} および K_m でフットプリント触媒のエナント選択性が明瞭に見られる。

< Catalyzed Reaction of *N*-Carboxy- α -phenylglycine Anhydride **29-30** >



< Catalyzed Reaction of 5-Phenylhydantoin **26-28** >



Scheme 6-5. Catalyzed Reactions of **29-30** and **26-28**.

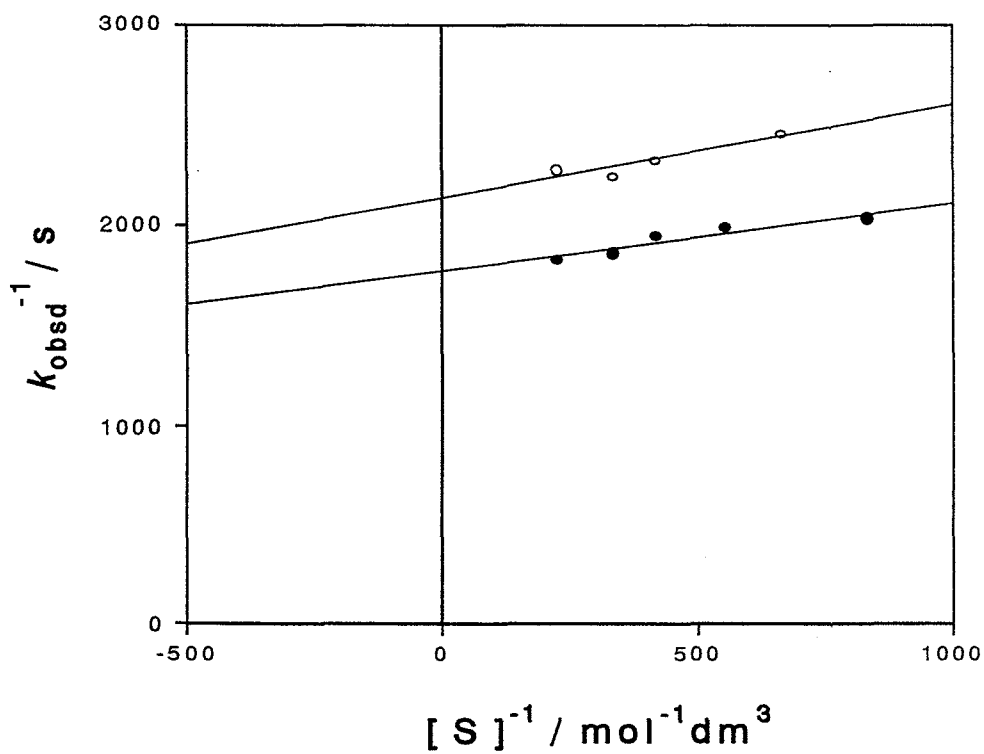


Fig. 6-10. Lineweaver-Burk plots for the catalyzed reactions of (*R*)-, and (*S*)-anhydride substrates over footprint cavities {5R-26}.
Open circle: (*S*)-30. Closed circle: (*R*)-29.

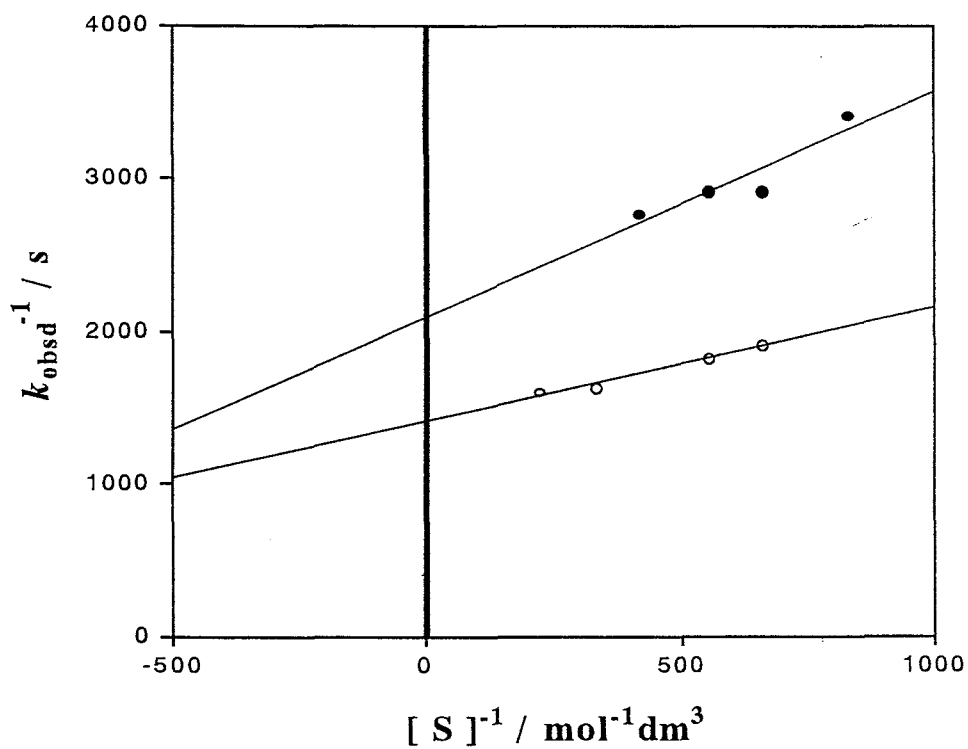


Fig. 6-11. Lineweaver-Burk plots for the catalyzed reactions of (*R*)-, and (*S*)-anhydride substrates over footprint cavities {5S-27}.
Open circle: (*S*)-30. Closed circle: (*R*)-29.

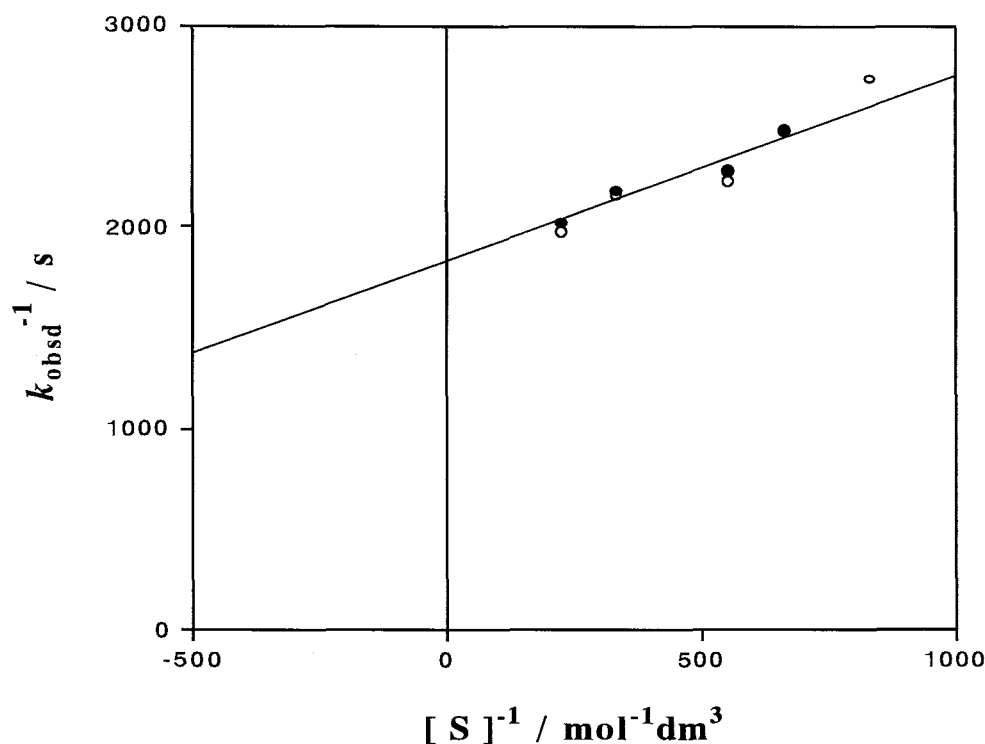


Fig. 6-12. Lineweaver-Burk plots for the catalyzed reactions of (*R*)-, and (*S*)-anhydride substrates over footprint cavities { *RS* -28}.
Open circle: (*S*)-30. Closed circle: (*R*)-29.

Table 6-3. Kinetic Parameters of the Catalyzed Reactions over Footprint Cavities.

Catalysts	Substrates	$\frac{10^4 \times K_m^a}{\text{mol dm}^{-3}}$	$\frac{10^4 \times V_{\max}^b}{\text{s}^{-1}}$	$\frac{10^{-2} \times k_{\text{cat}}^c}{\text{mol}^{-1} \text{dm}^3 \text{s}^{-1}}$	$\frac{10^{-5} \times k_{\text{cat}} / K_m^d}{\text{mol}^{-2} \text{dm}^6 \text{s}^{-1}}$	Enantio-selectivities ^{e)}
{ <i>R</i> -26 } ^{f)}	(<i>R</i>)-29	1.93	5.64	4.29 (1.20) ^{g)}	22.2	1.34
	(<i>S</i>)-30	2.14	4.68	3.56 (1.00)	16.6	
{ <i>S</i> -27 } ^{h)}	(<i>S</i>)-30	5.26	7.13	4.87 (1.48) ^{g)}	9.25	2.01
	(<i>R</i>)-29	7.16	4.82	3.29 (1.00)	4.60	
{ <i>RS</i> -28 } ⁱ⁾	(<i>R</i>)-29	5.02	5.45	4.76	9.48	1.0
	(<i>S</i>)-30	(5.02) ^{j)}	(5.45)	(4.76)	(9.48)	

a) Apparent K_m . b) V_{\max} is $k_{\text{obsd. max}}$. c) Divided by molarities of catalytic sites on 50 mg catalysts. d) Substrate specificities of catalytic sites. e) Ratio (*R*)-26 : (*S*)-27 of k_{cat}/K_m s. f) 2.63×10^{-5} mol per 1 gram catalyst. g) Relative k_{cat} s; enantioselectivity in the catalytic step. h) 2.93×10^{-5} mol per 1 gram catalyst. i) 2.29×10^{-5} mol per 1 gram catalyst. j) Same with (*R*)-29.

このような全基質濃度範囲での触媒活性の相違は、前項の {22} が触媒する23-25の触媒作用の機構とは異なる。それは、基質の29と30が環状化

合物であると同時に、生成物が非環状化合物であるため、生成物阻害作用が起こらないためである。したがって、このような基質の選択は、フットプリントキャビティ-の特性の検討に最適である。

6-3-3-3 鑄型分子そのもの(26-28)を基質とした触媒作用

26-28のヒダントイン類のアミド結合(-CO-NH-)の開裂はシリカアルミナ触媒および三フッ化ホウ素の非存在下では起こらない。しかし{26}、{27}、{28}が触媒する26-28の2,4-ジニトロフェノリシスで起こることが初めて確認された。これらの反応系では、鑄型分子そのものを基質として作用させるものであり、これまでに述べてきたフットプリント触媒を調製した鑄型分子と類似物である基質分子との反応系とは異なる。したがって、いままでの反応系と同様な鑄型分子を阻害剤とする基質との競争反応で、フットプリントキャビティ-の存在を証明する判断基準は用いられない。そこで、26-28の部分構造を持つ分子33,34を阻害剤とする反応系でいままでと同様の阻害反応の検討を行った。

まず、コントロール触媒を用いた時の触媒作用を図6-13に示すが、33,34による阻害作用は認められない。これは、33,34と相補的なフットプリントキャビティ-の存在しないことを意味している。それに対し、フットプリント触媒{26}が触媒する基質26の反応系に33,34を存在させると、明らかな阻害作用が現われる(図6-14)。これは{27}が触媒する基質27の反応系でも同様である(図6-15)。これよりフットプリントキャビティ-の存在は疑いのないところである。したがって、{26}による26-28の触媒作用ではエナンチオ選択性が観測されると期待できるわけで、確かにその結果、26が最も活性で順に27、28と活性が低下するエナンチオ選択性が見られた(図6-16)。

一方、{27}による26-28の触媒作用でも、活性が27>28>26となる

明瞭なエナンチオ選択性を指示する結果を得た（図6-17）。そこで、これらをまとめた動力学パラメーターを表6-4に示したが、逆の立体構造をもつ不斉場を提供する {26} {27} は光学活性体基質26、27に対し全く逆の立体選択性を有し、基質29、30の場合と類似の結果を得た。

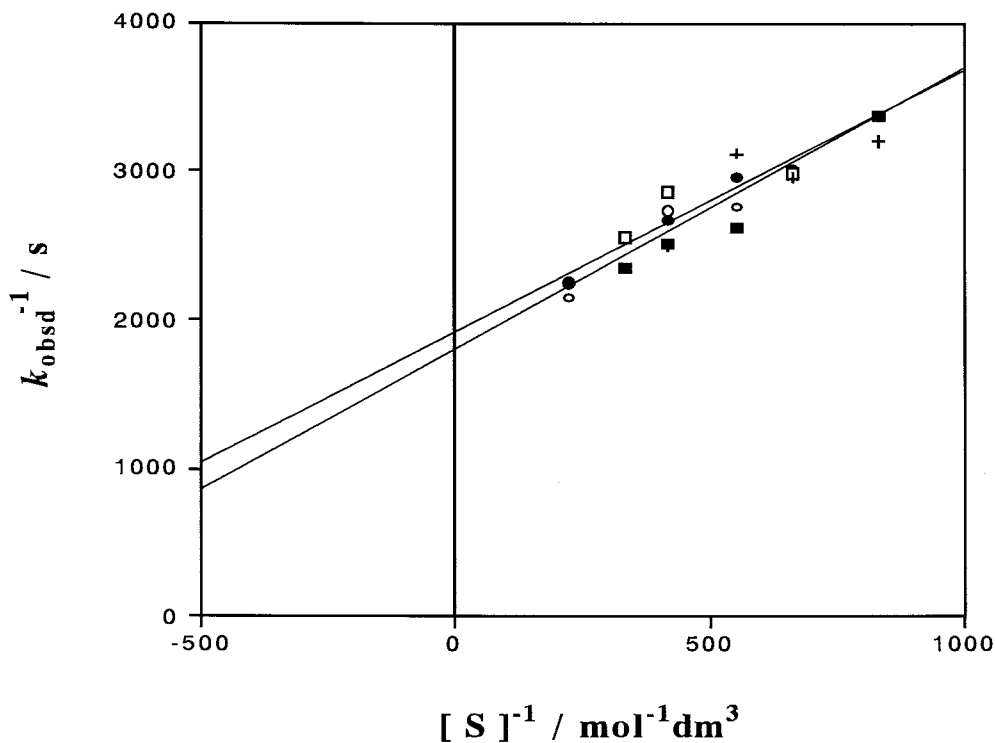


Fig. 6-13. Lineweaver-Burk plots for the catalyzed reactions of (*R*)-, (*S*)-, and (*RS*)-hydantoin substrates over the control catalyst.
 Open circle: (*S*)-27. Closed circle: (*R*)-26. Open square: (*RS*)-28. Closed square: (*R*)-26 with the inhibitor 5,5-diphenylhydantoin, 33 ; $[I] = 2.0 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^3$. Cross: With the inhibitor 2-phenylacetamide, 34 ; $[I] = 2.0 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^3$. Line plottings for open squares, closed squares, and crosses are omitted for simplicity.

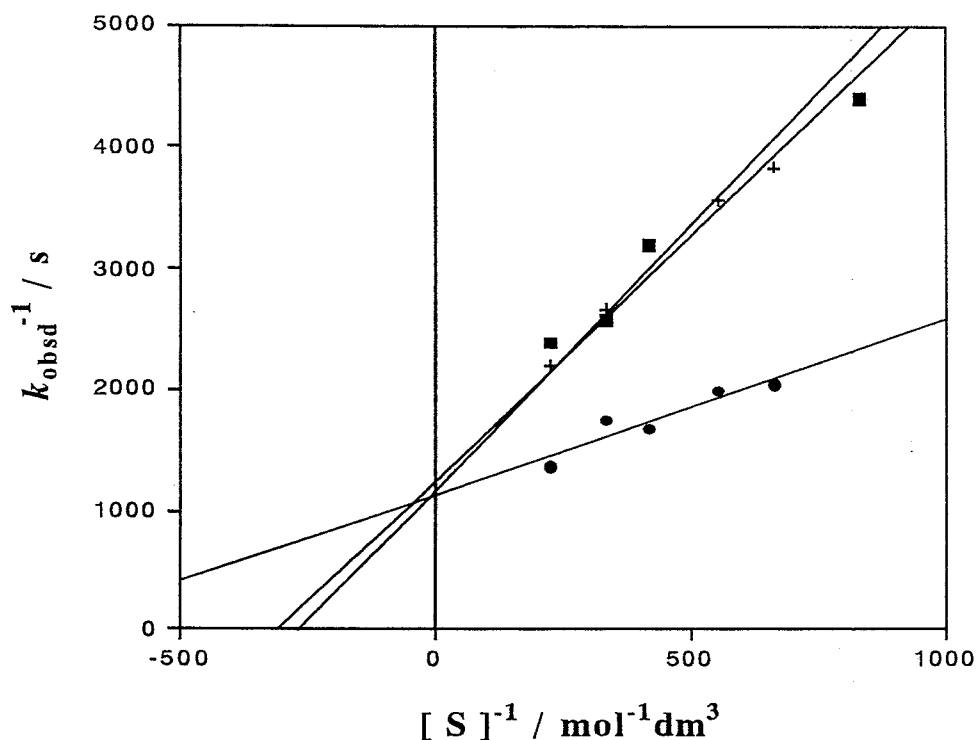


Fig. 6-14. Competitive inhibition over footprint cavities{ 5R-26}.

closed circle: (5R)-26 without an inhibitor. Closed square: (5R)-26 with the inhibitor 33; $[I] = 2.0 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^3$. Cross: With the inhibitor 34; $[I] = 2.0 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^3$.

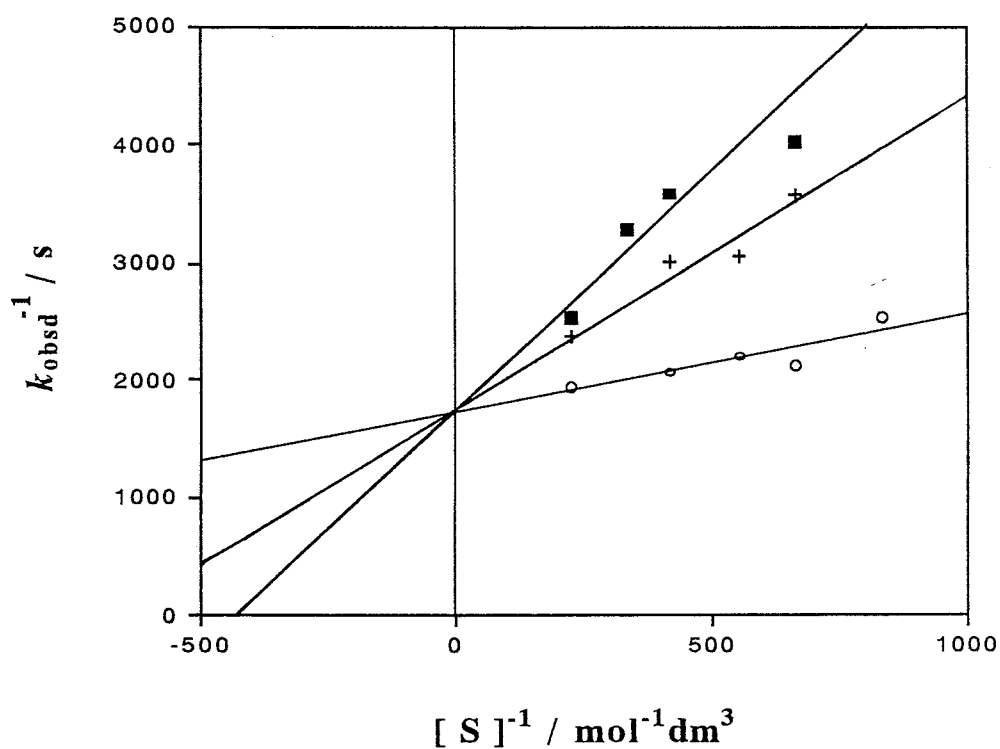


Fig. 6-15. Competitive inhibition over footprint cavities { 5S-27 }.

Open circle: (5S)-27 without an inhibitor. Closed square: (5S)-27 with the inhibitor 33; $[I] = 2.0 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^3$. Cross: With the inhibitor 34; $[I] = 2.0 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^3$.

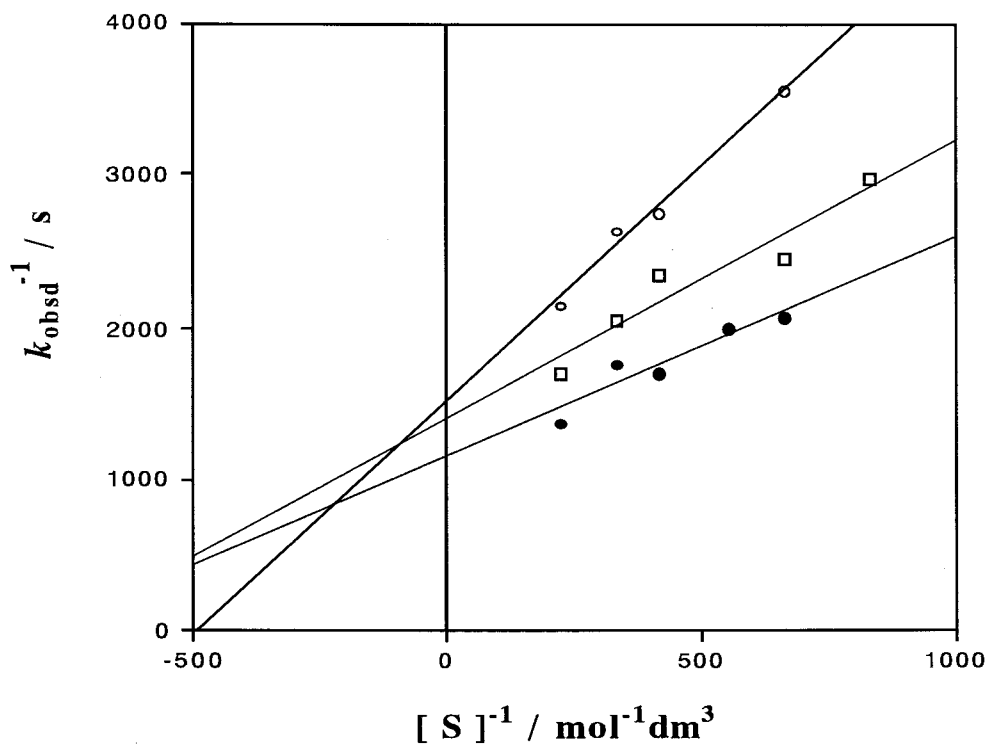


Fig. 6-16. Lineweaver-Burk plots for the catalyzed reactions of (*R*)-, (*S*)-, and *rac*-hydantoin substrates over footprint cavities { 5*R*-26 }.
 Closed circle: (*5R*)-26. Open circle: (*5S*)-27. Open square: *rac*-28.

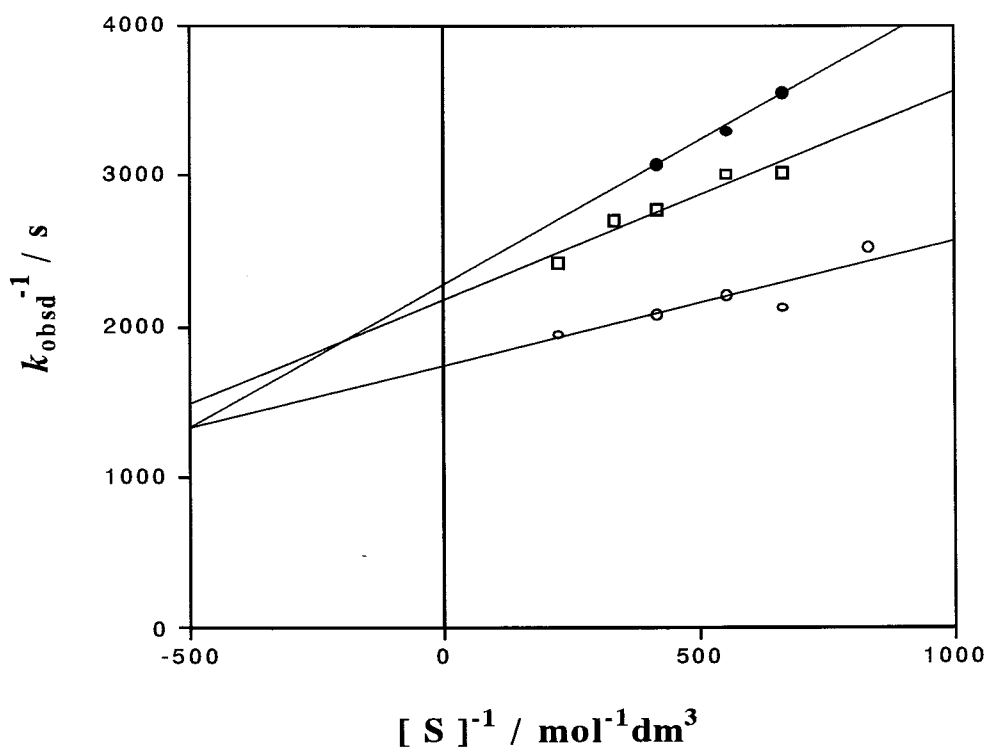


Fig. 6-17. Lineweaver-Burk plots for the catalyzed reactions of (*R*)-, (*S*)-, and *rac*-hydantoin substrates over footprint cavities { 5*S*-27 }.
 Closed circle: (*5R*)-26. Open circle: (*5S*)-27. Open square: *rac*-28.

以上のように、{26} {27} は基質26、27および29、30に明確な立体選択性を示すが、{26} の基質26、27に対する作用と{27} の基質26、27に対する作用、および{26} の基質29、30に対する作用と{27} の基質29、30に対する作用は、原理的には、対称にならなければならない。しかし、完全に対称性を示さないのは次の二通りの理由が考えられる。まず、第一に、鑄型分子の一部が分子刷り込み過程でラセミ化した結果非対称となったこと。第二に、フットプリントキャビティー調製条件の僅かな違いが、フットプリントキャビティーが示す分子認識力に影響することである。

そこで次に、これらの可能性のうちどちらが主な原因になっているかを検討した。その結果、表6-4に示すように33,34による阻害定数 K_i 、すなわち{26} への33の阻害定数は、 $3.22 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ 、また34のそれは、 $1.87 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ である。一方、{27} への33の阻害定数は、 $0.96 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ 、34の阻害定数は $1.09 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ である。33,34は、26,27の不斉炭素原子にそれぞれ、フェニル基または水素原子が二個ずつ結合している光学不活性な分子である。したがって、33は{26} {27} それぞれのキラルファクターとなるフットプリントキャビティーに対して、全く等しい相補性があるはずなので、阻害定数も原理的には等しくならなければならない。またこれは、34に対しても同様である。しかし、大きいものではないにしても、それぞれの阻害定数に差が見られる。これらのことから判断すると、第二の可能性が高いと思われる。つまり、調製条件によりフットプリントキャビティーの分子認識力に若干差が生じると考えられる。

また一方で、26-28が鑄型分子としても、基質としても、作用することへの疑問があるかもしれないが、その解答は簡単である。26-28のヒダントインは酸性溶液中では環化に有利で、塩基性溶液中では開環に有利である。すなわち、フットプリントキャビティー調製は室温でpH4.0の条件で

Table 6-4. Kinetic Parameters of the Catalyzed Reactions over Footprint Cavities and Control Catalyst.

Catalysts	Substrates	$10^4 \times K_m^a$ mol dm ⁻³	$10^4 \times V_{max}^b$ s ⁻¹	$10^{-2} \times k_{cat}^c$ mol ⁻¹ dm ³ s ⁻¹	$10^{-5} \times k_{cat}/K_m^d$ mol ⁻² dm ⁶ s ⁻¹	$10^4 \times K_i^e$ mol dm ⁻³	Enantio- selectivities ^f
{ <i>R</i> -26 } ^g	(<i>R</i>)-26	12.80	8.82	5.11 (1.33) ^h	3.99	3.22, ⁱ 1.87 ^j	2.12
	(<i>S</i>)-27	20.40	7.44	3.84 (1.00)	1.88		
	(<i>RS</i>)-28	13.04	7.15	4.14 (1.07)	3.18		
{ <i>S</i> -27 } ^k	(<i>S</i>)-27	4.79	5.79	3.49 (1.31) ^h	7.28	0.96, ⁱ 1.09 ^j	2.29
	(<i>R</i>)-26	8.37	4.41	2.66 (1.00)	3.18		
	(<i>RS</i>)-28	6.37	4.60	2.77 (1.04)	4.35		
Control ^l	(<i>R</i>)-26	9.12	5.23	4.24	4.65	no inhibition	
	(<i>S</i>)-27	10.60	5.57	4.51	4.25		
	(<i>RS</i>)-28	6.56	4.65	3.77	5.75		

a) Apparent K_m . b) V_{max} is $k_{obs, max}$. c) Divided by molarities of catalytic sites on 50 mg catalyst. d) Substrate specificities of catalytic sites. e) Competitive inhibition constants. f) Ratio (*R*)-26 : (*S*)-27 of k_{cat}/K_m . g) 3.45×10^{-5} mol per 1 gram catalyst. h) Relative k_{cat} s; enantioselectivity in the catalytic step. i) K_i of inhibition by 5,5-diphenylhydantoin **33**. j) K_i of inhibition by 2-phenylacetamide **34**. k) 3.32×10^{-5} mol per 1 gram catalyst. l) 2.47×10^{-5} mol per 1 gram catalyst.

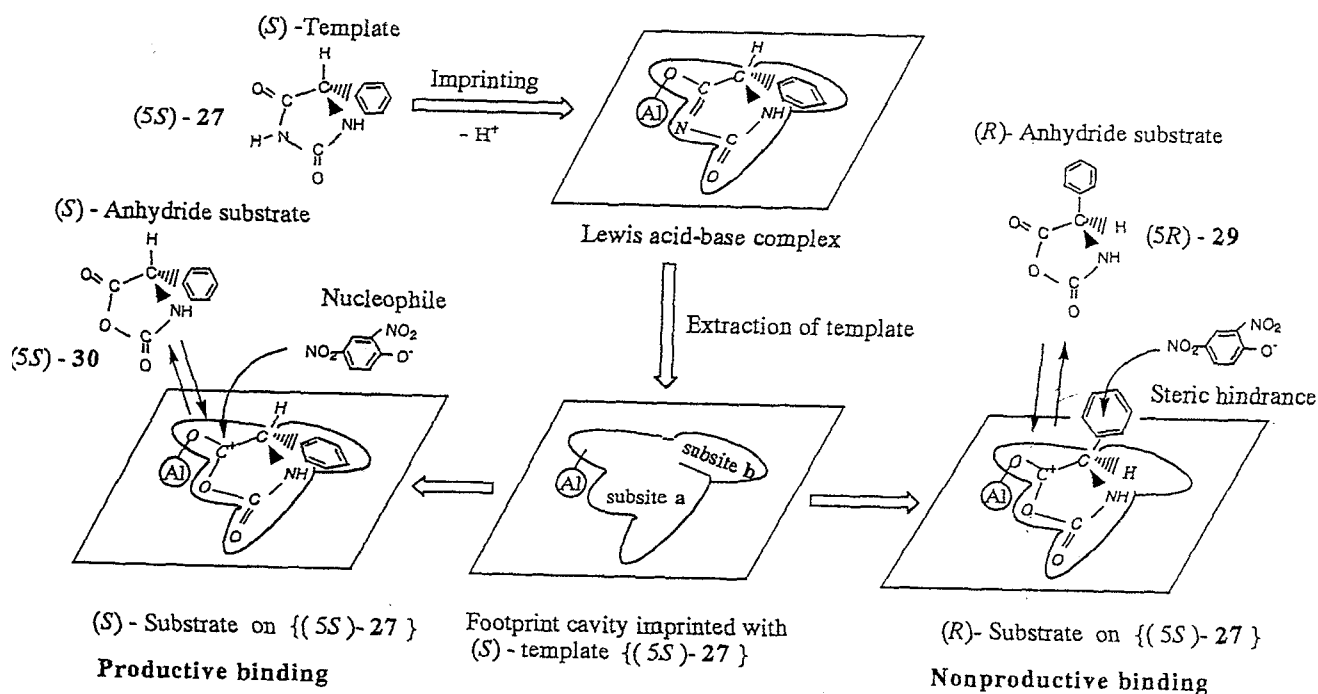
あり、求核種は弱い水分子であるから開環しない。それに対して触媒作用の測定条件は、30℃無水アセトニトリル中で行う。アセトニトリルはアプロティック溶媒であり、求核種は裸の2,4-ジニトロフェノレートであるから、当然水分子より良い求核種である。このような強い求核種はヒダントインの開環を引き起こす。したがって分子刷り込み過程で安定な基質は、基質そのものが鑄型分子になる可能性を示唆するものであり、鑄型分子選択の範囲を拡大するものである。

6-3-3-4 エナンチオ選択的触媒作用の機構

図6-10～図6-17と表6-3と6-4から、明らかな立体選択性を示していることがわかる。勿論、これらは抽出不十分で残存した鑄型分子そのものによ

るキラル認識ではない。もし、鑄型分子がフットプリントキャビティー中
に残っているためであるとすると、強い阻害作用の結果、触媒活性は現わ
れない筈である。故にフットプリントキャビティーが不斉場として提供さ
れているのは自明である。

ところで、フットプリントキャビティーの構造は鑄型分子の刷り込み過
程における二通りの吸着型に左右されることは前にも触れたが、鑄型分子
26-28には水素結合ドナーであるアミドおよびイミドプロトンとアクセプ
ターであるカルボニル酸素原子があり、ルイス酸点をもつシリカマトリッ
クスと最大の相互作用をもつように吸着する。その時、フェニル基がシリ
カアルミナゲル表面から上に向く吸着姿勢と、表面上に吸着する吸着姿勢
をとることができる。



Scheme 6-6. Enantioselective Catalysis over Footprint Cavities {(5S)-27}.

この時、前者はヘテロ環のみで吸着するのに対して、後者はヘテロ環
(サブサイトa)とフェニル基(サブサイトb)の両方で吸着して、ルイス
酸塩基複合体を形成する(スキーム6-6)。

したがって、前者の吸着姿勢で形成されるフットプリントキャビティーは、鍵と鍵穴説にしたがってエナンチオ選択性を示す筈である。これをStuartモデルで考察すると、前者のフットプリントキャビティーは異なる立体配置の基質は排斥するので、"all or nothing" の吸着を行う。すなわち、水素原子と相補的な分子認識サイトであれば、フェニル基は完全に排斥されるを意味する。しかし逆の立体配置の基質もかなり反応するため前者の吸着姿勢によるフットプリントキャビティーでは説明がつかない。更に、前者の吸着姿勢では {26} と {27} に対する27の強い拮抗阻害作用も説明できない。したがって、後者の吸着姿勢をとり、スキーム6-6に示すような機構で触媒作用は進行すると考えるのが合理的である。

この後者の吸着姿勢をとったフットプリントキャビティーによる基質の生産的吸着と非生産的吸着の機構^{83,84)}は、6-3-1および6-3-2節で用いた理論であり十分な妥当性がある。すなわち、サブサイトa および b をもつ {27} のフットプリントキャビティーに27が吸着するとき、サブサイトa および b に27のヘテロ環、フェニル基が各々取り込まれ、ルイス触媒サイトにより活性化されたカルボカチオンに求核剤が攻撃する生産的吸着をする。それとは反対に26が {27} に取り込まれる時は、サブサイトaのみで分子認識され、26は立体配置を保ってフェニル基は上に立ち上がる非生産的吸着をする。したがって {27} への26、27の取り込みにおいて、26の親和力は27のそれより小さくなる。この機構は同様に基質29、30にも適用できる。

表6-3、6-4に示したように {26} の触媒過程にあらわれるエナンチオ選択性は、 $k_{cat}(26)/k_{cat}(27)$ で1.33であり、 $k_{cat}(29)/k_{cat}(30)$ で1.20である。同様に {27} に対しては、 $k_{cat}(27)/k_{cat}(26)$ で1.31、 $k_{cat}(30)/k_{cat}(29)$ で1.48となる。 k_{cat} にあらわれるエナンチオ選択性は、前述した {22} による23、24のエナンチオ選択性 (2.82-3.45) より小さいが、これはメチル

基とフェニル基の立ち上がり方による違いでフェニル基の場合ヘテロ環から54°の角度で立ち上がっているため立体障害の影響がメチル基よりは大きくでないと思われる。また、求核剤の2,4-ジニトロフェニル環と立ち上がっているフェニル基とのスタッキング効果もある程度作用する可能性があると考えられる。

6-3-3-5 エナンチオ選択性の温度変化による影響

生産的吸着と非生産的吸着の機構の仮説を更に確実にするために、触媒作用における温度効果について検討を加えた。{27}が触媒する26および27に対する触媒作用について、反応温度を1℃、9℃、19℃、30℃に設定した。その結果、{27}に対する触媒作用はいずれの場合も27が有利であった。この動力学パラメーターを表6-5に示したが、30℃から1℃への温度変化に伴い、 k_{cat} は半分以上低下し基質の親和力は10倍以上増加した。したがって低温にすることにより、 K_m の変化に起因する触媒活性(k_{cat}/K_m)の向上が得られた。このことは低温において、{27}の26および27に対するエナンチオ選択性が向上したことを示している。

また図6-18は $\ln k_{cat}$ に対する T^{-1} のArrheniusプロットである。これらの直線性から見て、この温度範囲で同じ触媒機構で進行していると考えてよい。これより、活性化エネルギーを求め表6-6にその活性化パラメーターを掲げた。26の活性化エネルギーは20kJ、27のそれは17kJである。この値から求めた活性化エンタルピーの差は、3kJであり大きなエナンチオ選択性には至らなかったことに対応している。

Table 6-5. Temperature Effect on Catalytic Behavior of Footprint Cavities { *S*-27}.^{a)}

Substrates	Temperature	$10^4 \times K_m^{b)}$ mol dm ⁻³	$10^4 \times V_{max}^{c)}$ s ⁻¹	$10^{-2} \times k_{cat}^{d)}$ mol ⁻¹ dm ³ s ⁻¹	$10^{-5} \times k_{cat}/K_m^{e)}$ mol ⁻² dm ⁶ s ⁻¹	Enantio- selectivities ^{f)}
(<i>S</i>)-27	1	1.29	3.10	1.71	13.30	
(<i>R</i>)-26	1	2.15	2.91	1.61	7.50	1.77
(<i>S</i>)-27	9	1.21	3.56	2.40	7.60	
(<i>R</i>)-26	9	5.03	3.72	2.24	4.46	1.70
(<i>S</i>)-27	19	7.25	5.20	2.88	3.97	
(<i>R</i>)-26	19	10.00	4.58	2.54	2.54	1.56
(<i>S</i>)-27	30	13.10	6.71	3.72	2.84	
(<i>R</i>)-26	30	21.60	7.30	4.04	1.87	1.52

a) Catalytic site molarity; 3.61×10^{-5} mol per 1 gram catalyst. b) Apparent K_m . c) V_{max} is $k_{obsd\ max}$. d) Divided by molarities of catalytic sites on 50 mg catalyst. e) Substrate specificities of catalytic sites. f) Ratio (*R*)-26 : (*S*)-27 of k_{cat}/K_m .

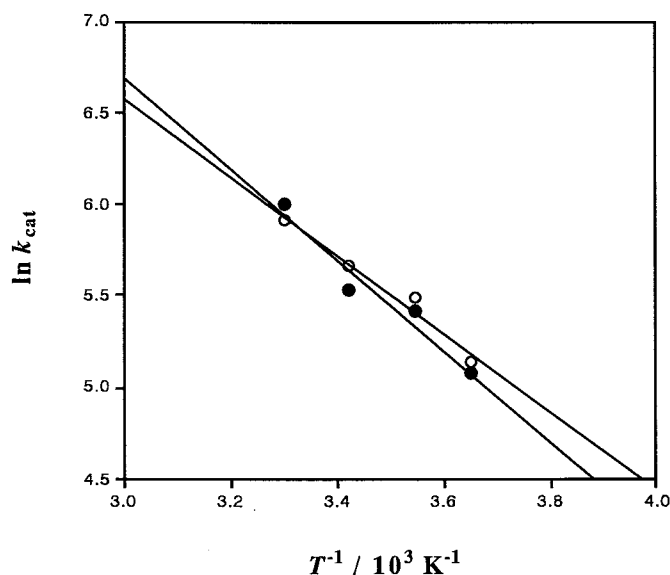


Fig. 6-18. Arrhenius plots for the catalyzed reactions of (*R*)-, and (*S*)-hydantoin substrates over footprint cavities { *S*-27}. Open circle: (*S*)-30. Closed circle: (*R*)-29.

Table 6-6. Activation Parameters of the Catalyzed Reaction over Footprint Cavities { *S*-27}.^{a)}

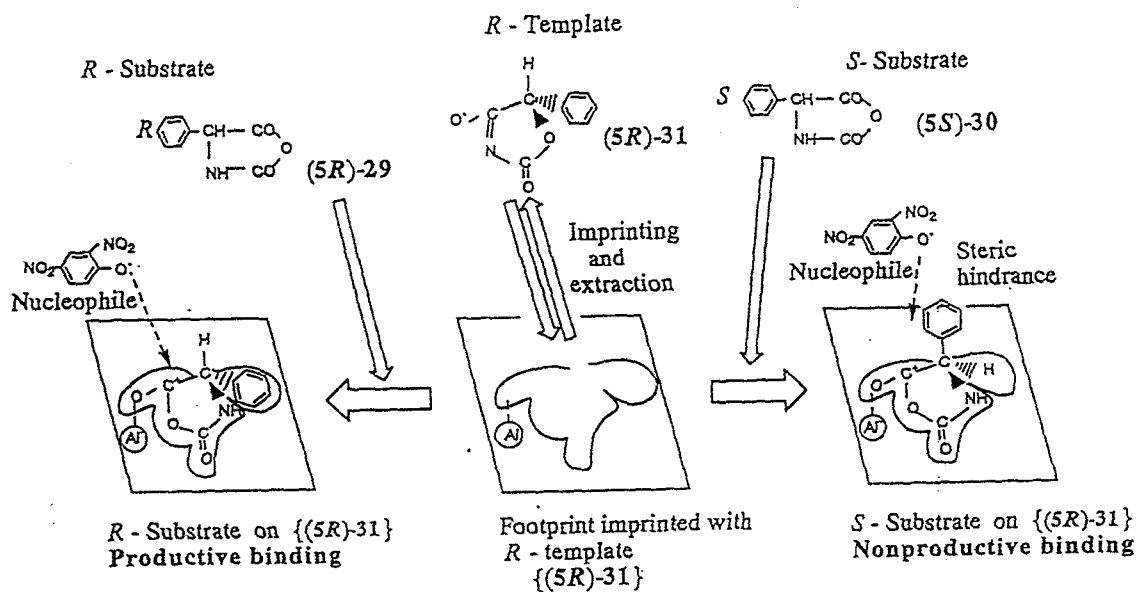
Substrates	E_a kJ	$\Delta H_{298}^{\ddagger b)}$ kJ	$-\Delta S_{298}^{\ddagger b, c)}$ JK ⁻¹	$\Delta G_{298}^{\ddagger b)}$ kJ	$\Delta G_{total}^{\ddagger d)}$ kJ
(<i>S</i>)-27	17	15	146	57	39
(<i>R</i>)-26	20	18	136	57	40

a) Catalytic site molarity; 3.61×10^{-5} mol per 1 gram catalyst. b) Activation parameters for the catalytic step. c) Calculated by the values of ΔH^{\ddagger} and ΔG^{\ddagger} . d) Activation free energy for overall reaction.

6-3-4 キラルなマンデル酸誘導体である(-)-(5*R*)-5-フェニル-2,4-ジケトテトラヒドロオキサゾール(31)を鑄型としたフットプリント触媒のエナンチオ選択的触媒作用

(-)-(5*R*)-5-フェニル-2,4-ジケトテトラヒドロオキサゾール(31)は、26-28のヒダントイン誘導体と同様に5員環をもち、回転のエントロピーが束縛された状態であるので、触媒作用の吸着過程においてエントロピーの損失が少ない上、開環生成物の阻害作用も避けられる。この31を鑄型分子として調製した {31} が触媒する *N*-カルボキシ-(*R*)-フェニルグリシン無水物 (29), *N*-カルボキシ-(*S*)-フェニルグリシン無水物 (30) の2,4-ジニトロフェノリシスを行った。その Lineweaver-Burkプロットを図6-19、6-20、6-21に、動力学パラメーターを表6-7に示した。図6-19は基質を29、阻害剤を31とした反応系であり、明瞭な拮抗阻害が認められ、フットプリントキャビティの存在が示唆される。次に図6-20はコントロール触媒が触媒する29と30の反応であるが、はっきりとした差異がないのに対して図6-21のように触媒を {31} にすると、明らかな相違が現われた。このことは疑いなく {31} によるエナンチオ選択性が起こっていることを示している。このエナンチオ選択性は、触媒表面に残っているキラルな31そのものによって起こっているのではない、というのは、前にも述べたように、もし鑄型分子が残っているのならば、強い阻害作用が現われるからである。この触媒作用の機構も、6-3-4節と同様な生産的吸着と非生産的吸着仮説でスキーム6-7のよ

うに説明できる。しかも、このエナンチオ選択性は触媒作用の触媒過程 (k_{cat}) ではなく吸着過程 (K_m) に大きく現われており、触媒活性に見られるエナンチオ選択性は $k_{cat}/K_m(29) / k_{cat}/K_m(30)$ の比が 2.9 を示す。



Scheme 6-7. Reaction mechanism over the footprint catalytic cavities of $\{R$ -mandelic acid derivative $\}$.

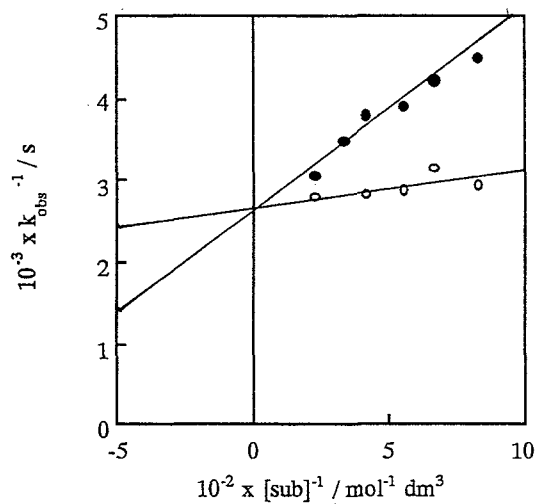


Fig.6-19. Competitive inhibition by (5R)-31 on the catalyzed reaction of (5R)-29 over the cavities {(5R)-31}.

[S] : R-substrate concentration. [I] : Inhibitor concentration.

○ : [I]=0. ● : [I]= 2.0X10⁻⁴ mol dm⁻³ (5R) - 31

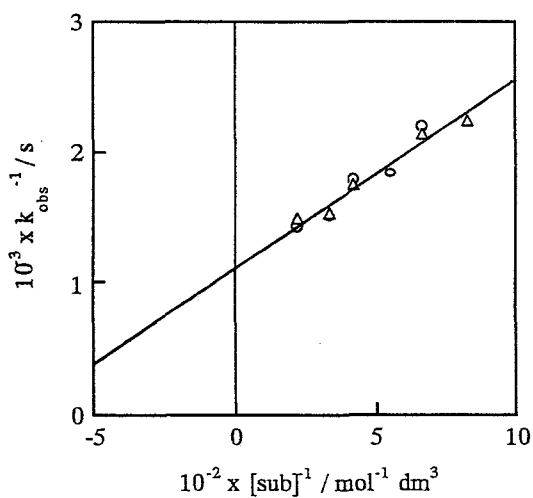


Fig.6-20. Lineweaver-Burk plots over control gel.

[S] : R-substrate concentration. (5R)-29

○ : R-substrate (5R)-29

△: S-substrate (5S)-30

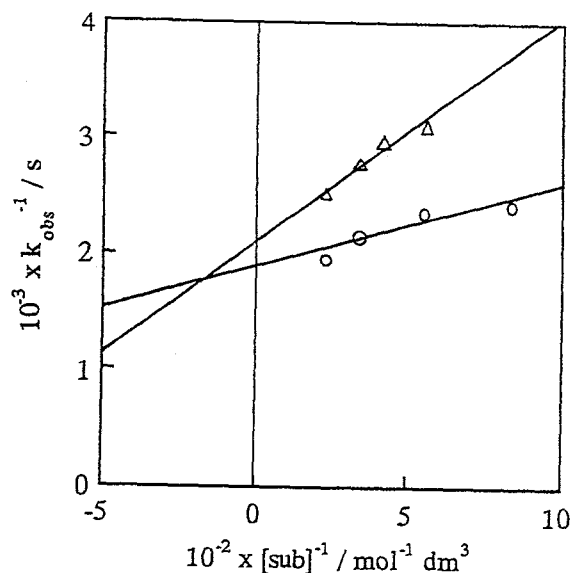
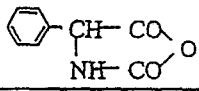
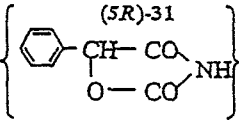


Fig.6-21. Lineweaver-Burk plots over {(5R) - 31}.

[S] : R-substrate concentration. (5R)-29

○ : R-substrate (5R)-29 △ : S-substrate (5S)-30

Table 6-7. Kinetic Parameters of the Catalyzed Reactions over Footprint {(5R)-31}.

Catalysts	Substrates 	$10^4 \times K_m$	$10^4 \times k_{\text{obs max}}$	$10^{-2} \times k_{\text{cat}}^b$	$10^{-5} \times k_{\text{cat}} / K_m^c$	$10^5 \times K_i^d$
		mol dm ⁻³	s ⁻¹	s ⁻¹	mol ⁻¹ dm ³ s ⁻¹	mol dm ⁻³
 (5R)-31	(5R)-29	1.42	3.69	2.80	19.70	3.29
	(5S)-30	3.33	2.96	2.24	6.73	
Control gel ^{a)}	(5R)-29	11.50	8.77	5.48	4.77	no inhibition
	(5S)-30	11.90	8.67	5.42	4.55	

a) Amount of catalytic sites, 2.64×10^{-6} mol per gram for {(5R)-31} and 3.20×10^{-5} mol per gram for control. b) $k_{\text{obs max}}$ / molarity of catalytic sites per gram. c) Substrate specificities of catalytic sites. d) K_i , competitive inhibition constants by the antipode of the substrate.

6-3-5 キラルなアミン、(R)-(+)-N-ベンジル- α -メチルベンジルアミン 35, (S)-(-)-N-ベンジル- α -メチルベンジルアミン 36, を鑄型としたフットプリント触媒のエナンチオ選択的触媒作用

遊離のアミン類を鑄型分子に用いるフットプリント触媒の調製は初めてである。これは窒素原子が電子対供与体、アルミナシリケートのアルミニウム原子が電子対受容体として、酸塩基複合体を形成するときできるフットプリントキャビティ-を不斉場とするエナンチオ選択的触媒作用を狙ったものであり、アミン類の幅広い用途の面から見てたいへん有意義である。このような遊離の塩基を鑄型分子に選択すれば、他の遊離塩基でもフットプリントキャビティ-の調製が可能となりその選択性は拡大する。ここで、鑄型分子に選択したキラルなアミン、(R)-(+)-N-ベンジル- α -メチルベンジルアミン 35, (S)-(-)-N-ベンジル- α -メチルベンジルアミン 36はいずれも高い光学純度を有する市販品が提供されている。また、それらの部分構造である(R)-(+)- α -N-メチルベンジルアミン 37, (S)-(-)- α -N-メチルベンジルアミン 38も提供されており新たなフットプリントキャビティ-調製には簡便且つ実用的と言える。

第一章に準じ、コントロール触媒と {35} および {36} のルイス触媒酸点の滴定を行った。これを示した図6-22のx軸への外挿値から、触媒1g当たりの触媒サイトの量は、コントロール触媒では 2.22×10^{-5} mol/g、{35} では 2.30×10^{-5} mol/g、{36} では 2.67×10^{-5} mol/g と計算される。これは {35} 1g当たりの35のフットプリントキャビティ-への吸着量に換算して4.85mg、{36} 1g当たりの36のフットプリントキャビティ-への吸着量では、5.63mgになりMosbachら⁸⁵⁾のポリメタクリル酸を用いた分子刷り込みで得られた1.5mg(鑄型分子N-フェニル-L-フェニルアラニンアミドに換算)より高い値が得られた。

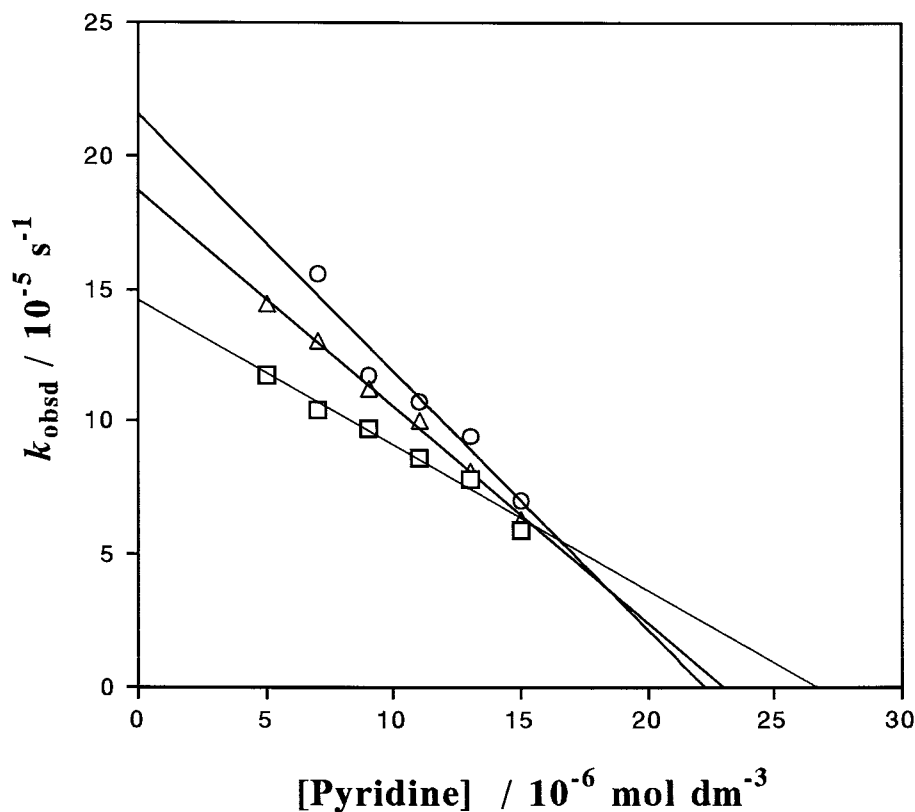


Fig. 6-22 Catalytic site titrations of the control catalyst and the imprinted catalysts, { *R*-35 } and { *S*-36 }. Substrate concentration: $1.8 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$. Catalyst: 50 mg in 50 cm^3 of pyridine-acetonitrile solution. Open circle: The control catalyst, titer; $2.22 \times 10^{-5} \text{ mol/g}$. Open triangle: The imprinted catalyst { *R*-35 }, titer; $2.30 \times 10^{-5} \text{ mol/g}$. Open square: The imprinted catalyst { *S*-36 }, titer; $2.67 \times 10^{-5} \text{ mol/g}$.

しかし、これらアミンによる阻害作用で、フットプリントキャビティの存在を確かめる実験において、今までには観測されなかった現象が見られた。それは、触媒反応の最終段階（30-50分）で、求核剤の2,4-ジニトロフェノールのO.Dが減少せず逆に増加する現象である。蓄積してきた反応生成物が阻害剤のアミンと反応し、2,4-ジニトロフェノールが再び生成してきたためである。これは、これらのアミン自身が求核試薬として作用するためである。そこで、その影響を排除するためアルミニウムイオンのドーピング処理をしていない、したがって酸触媒機能を持たないブランクゲルを反応系に添加した。この目的は、再生成してくる2,4-ジニト

ロフェノレートをブランクゲルへ非特異的吸着させ、溶液中の未反応2,4-ジニトロフェノレート濃度への影響を避けるためである。

図6-23はコントロール触媒による基質無水安息香酸3の2,4-ジニトロフェノリスで阻害剤に35、36を添加した阻害作用の検討結果である。

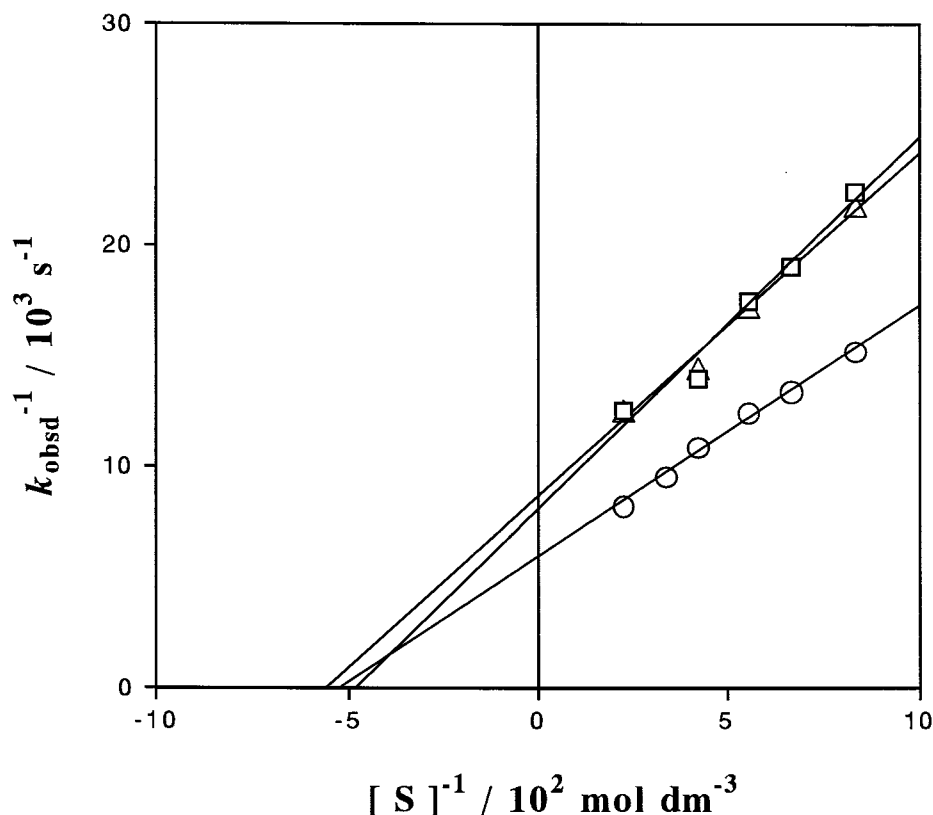


Fig.6-23. Lineweaver-Burk plots for the catalyzed reactions with and without templates over the control gel catalyst. Noncompetitive inhibition.

Open circle: Without the inhibitors. Open triangle: With (*R*)-template(inhibitor) 35 ; [I] = 4.00 x 10⁻⁵ mol dm⁻³. Open square: With (*S*)-template(inhibitor) 36 ; [I] = 4.00 x 10⁻⁵ mol dm⁻³.

これは、今までのコントロール触媒のような阻害作用が見られなかった結果と異なり、明らかに非拮抗阻害を示している。すなわち、遊離アミンである35、36がピリジンの場合と同様に、ルイス触媒サイトに不可逆的に被毒したためと考えられる。しかし、35、36それぞれの阻害作用の大きさの相違は、実験誤差の範囲内で等しい。したがって、コントロール触媒によるエナンチオ選択性は、見られないと考えてよい。

それに比べ、{35}、{36}による35、36を共存させた、基質無水安息香

酸3の2,4-ジニトロフェノリシスでは、明らかに典型的な拮抗阻害のパターンが見られる(図6-24)。

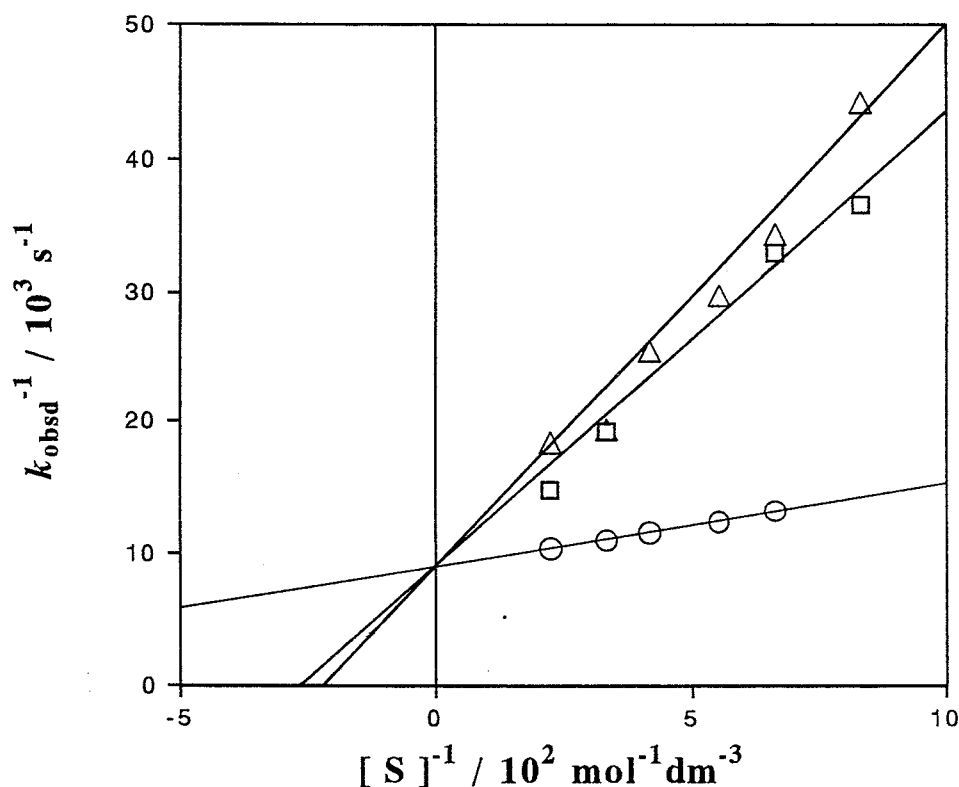


Fig. 6-24. Lineweaver-Burk plots for the catalyzed reactions with and without templates over the footprint cavities{R-35}. Competitive inhibition.

Open circle: Without the inhibitors. Open triangle: With (R)-temple(inhibitor) 35 ; [I] = 4.00 x 10⁻⁵ mol dm⁻³. Open square: With (S)-temple(inhibitor) 36 ; [I] = 4.00 x 10⁻⁵ mol dm⁻³.

すなわち、{35}、{36} いずれもがフットプリントキャビティーが形成され、このフットプリントが分子の形状の似た無水安息香酸基質を十分な親和力をもって取り込むため、遊離の塩基である35、36ももはや単なる被毒剤としてルイス酸点に不可逆に結合できず競争的阻害現象が認められると推定できる。しかも、図6-24、6-25に示したように{35}は、36より35によりフィットし、逆に{36}は35より36によりフィットすることから、{35}、{36}は確実なエナンチオ選択性を有していることがわかる。

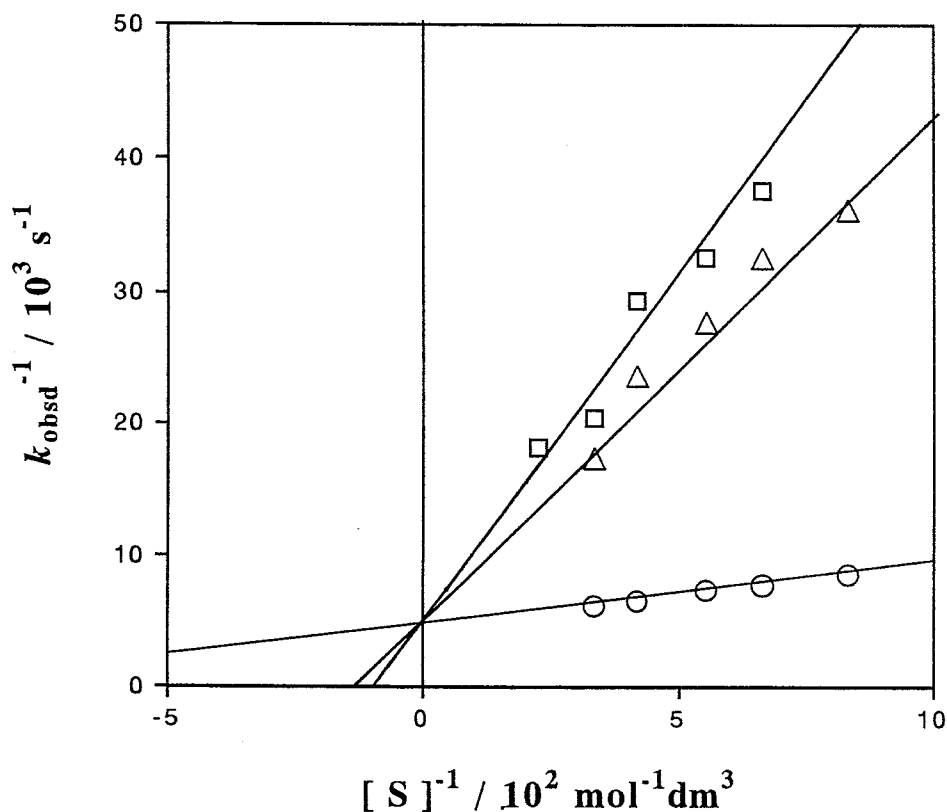


Fig.6-25. Lineweaver-Burk plots for the catalyzed reactions with and without templates over the footprint cavities{S-36}. Competitive inhibition.

Open circle: Without the inhibitors. Open triangle: With (R)-template(inhibitor) 35 ; $[I] = 4.00 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$. Open square: With (S)-template(inhibitor) 36 ; $[I] = 4.00 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$.

これらの動力学パラメーターを表6-8に示すが、{35}の35に対する親和力は0.66kJ、{36}の36に対する親和力は0.41kJと、前述したヒダントイナーゼ類似エナンチオ選択的触媒作用で観察された1.18kJより小さい。これをStuartモデルにより考察すると、フットプリントキャビティー形成のための吸着姿勢に二通り存在することがわかる。これをスキーム6-8に示した。すなわちタイプ1は、ルイス酸点を中心にサブサイトa, b, cを形成するように三点吸着する。このサブサイト中aとcはフェニル基と相補的でありbはメチル基と相補的である。またタイプ2は、サブサイトaとcがフェニル基と相補的であるのはタイプ1と同じであるが、サブサイトb'はメチン基の水素原子と相補的な吸着型である。35がタイプ1の{36}に

吸着したときは、スキーム6-8に示したように、メチル基は立ち上がり、立体的にもエネルギー的にも不利になる。

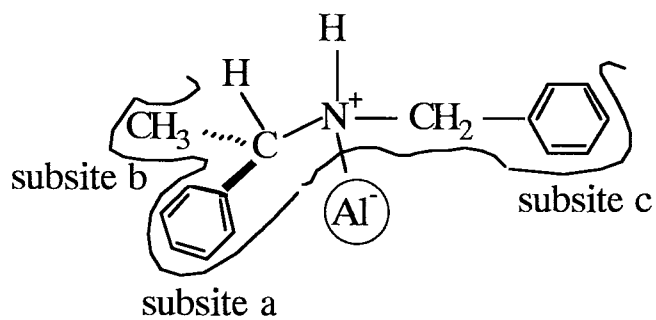
それに対して、タイプ2の{36}に35が吸着したときを考えると、サブサイト b' で立体障害が起こり、排斥効果によりかなり不安定になる。それゆえ、{35}も{36}もメチル基で吸着するタイプ1と推測できる。

Table 6-8. Kinetic parameters of the inhibition reactions with the chiral templates:

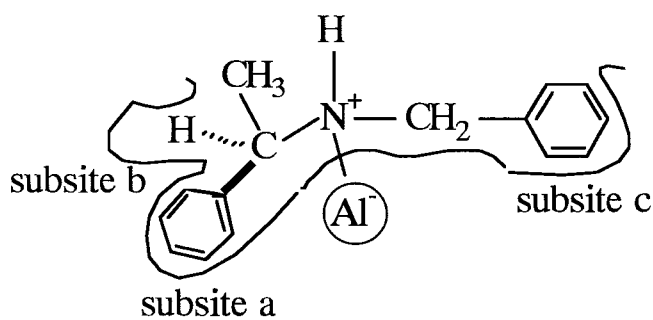
Noncompetitive inhibition and enantioselective competitive inhibitions.

Catalysts	$10^4 \times K_m$	$10^4 \times V_{\max}$ ^{a)}	$10^{-1} \times k_{\text{cat}}$	$10^{-2} \times k_{\text{cat}}/K_m$	Inhibitors	$10^6 \times K_i$	$-\Delta G^{(b)}$	$-\Delta \Delta G^{(c)}$
	M ^{d)}	s ⁻¹	M ¹ s ⁻¹	M ² s ⁻¹		M ⁻¹	kJ	kJ
{ R-35 }	6.98	1.11	9.65	13.8	35 (R) ^{e)}	7.53	29.71	0.66
					36 (S)	9.08	29.05	
{ S-36 }	10.10	2.13	15.96	15.8	35 (R)	4.76	30.87	
					36 (S)	4.05	31.28	0.41
Control	19.5	1.71	15.40	7.90	35, 36 (R),(S)	81.05	----	----

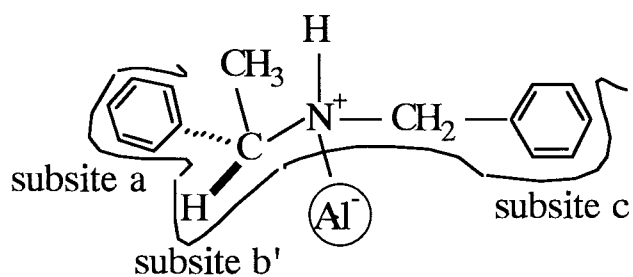
a) Maximum of k_{obsd} . b) Molecular recognition capability. c) Chiral recognition capability. d) M = mol dm⁻³. e) Configuration of the inhibitor molecule. f) Catalytic site molarity; 2.30×10^{-6} mol / g. g) 2.67×10^{-6} mol / g. h) 2.22×10^{-6} mol / g.



(S)-template on { *S* } of type 1

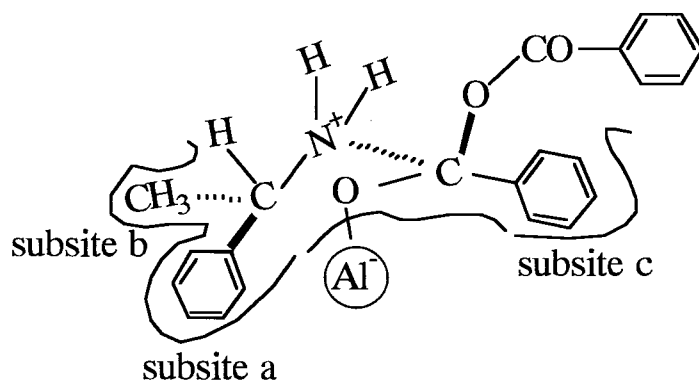


(R)-template on { *S* } of type 1

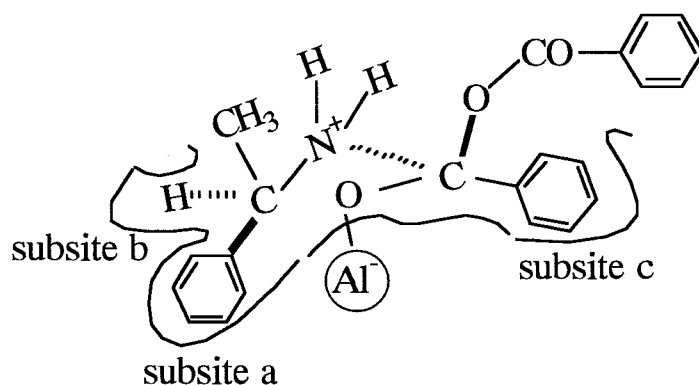


(S)-template on { *S* } of type 2

Scheme 6-8. Binding Postures of Templates and Inhibitor.



(*S*)-inhibitor and substrate on { *S* } of type 1



(*R*)-inhibitor and substrate on { *S* } of type 1

Scheme 6-9. Ternary Complexes in Uncompetitive Inhibition.

次に、**35**および**36**の部分構造である(*R*)-(+)- α -*N*-メチルベンジルアミン **37**、(*S*)-(-)- α -*N*-メチルベンジルアミン **38**を阻害剤とした、{**35**}と{**36**}の触媒作用のLineweaver-Burkプロットを図6-26と6-27に、その動力学パラメーターを表6-9に示す。これは明らかにエナンチオ選択性がみられるが図6-24および図6-25とは異なっていて、それぞれ平行になっている。

この阻害形式は不拮抗阻害であり⁸⁶⁾、フットプリント触媒においては初めて観測された。これは、酵素 (E) と基質 (S) それに阻害剤 (I) が可逆的にE-S-I複合体を形成する形式であり、フットプリントキャビティ-

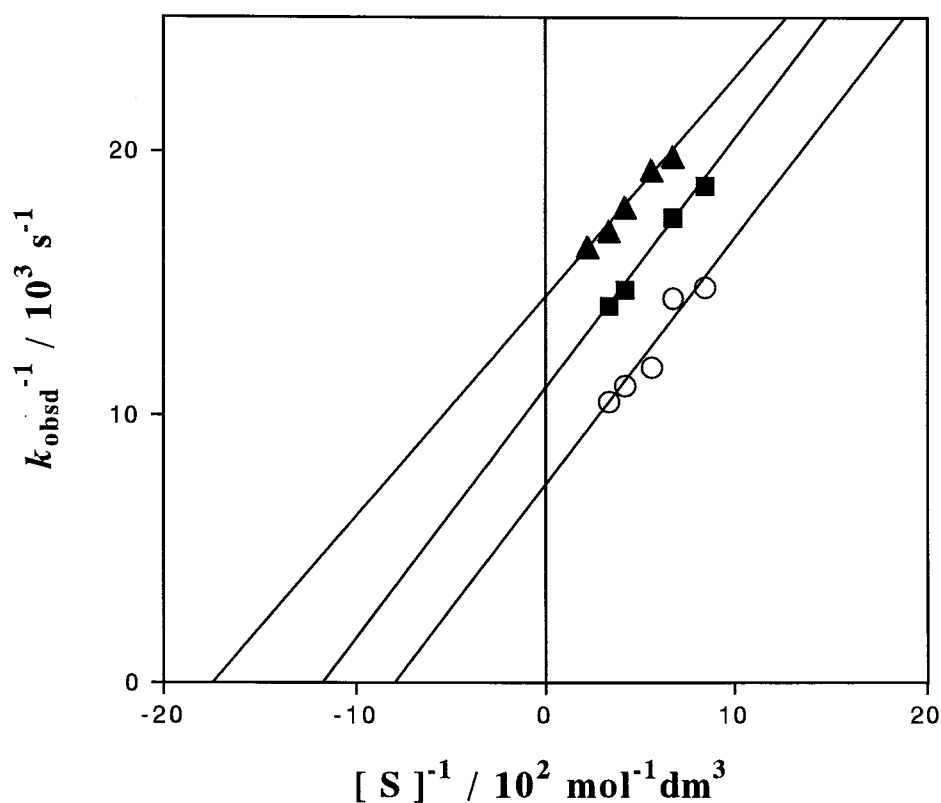


Fig. 6-26. Lineweaver-Burk plots for the catalyzed reactions with and without templates over the footprint cavities{ R-35}. Uncompetitive inhibition.

Open circle: Without the inhibitors. Closed triangle: With (R)-inhibitor 37 ; [I] = 4.00 x 10⁻⁵ mol dm⁻³. Closed square: With (S)-inhibitor 38 ; [I] = 4.00 x 10⁻⁵ mol dm⁻³.

でもこれが成り立っていなければならない。Stuart モデルを用いて検討した結果、スキーム6-9に示したような、E-S-I 複合体が可能であることが明かとなった。

すなわちサブサイトc が、基質 3 のフェニル基と特異的に吸着するとともに、カルボニル酸素原子はアルミニウムルイス酸点と複合体を形成して、カルボカチオンになる。このカルボカチオンと阻害剤のアミノ基が結合した状態は、可逆的な正四面体構造をとる。このような複合体が立体的に可能であることが推定された。したがって、この吸着形式をとると仮定することにより、エナンチオ選択性を含めて、動力学的結果を説明できることがわかった。

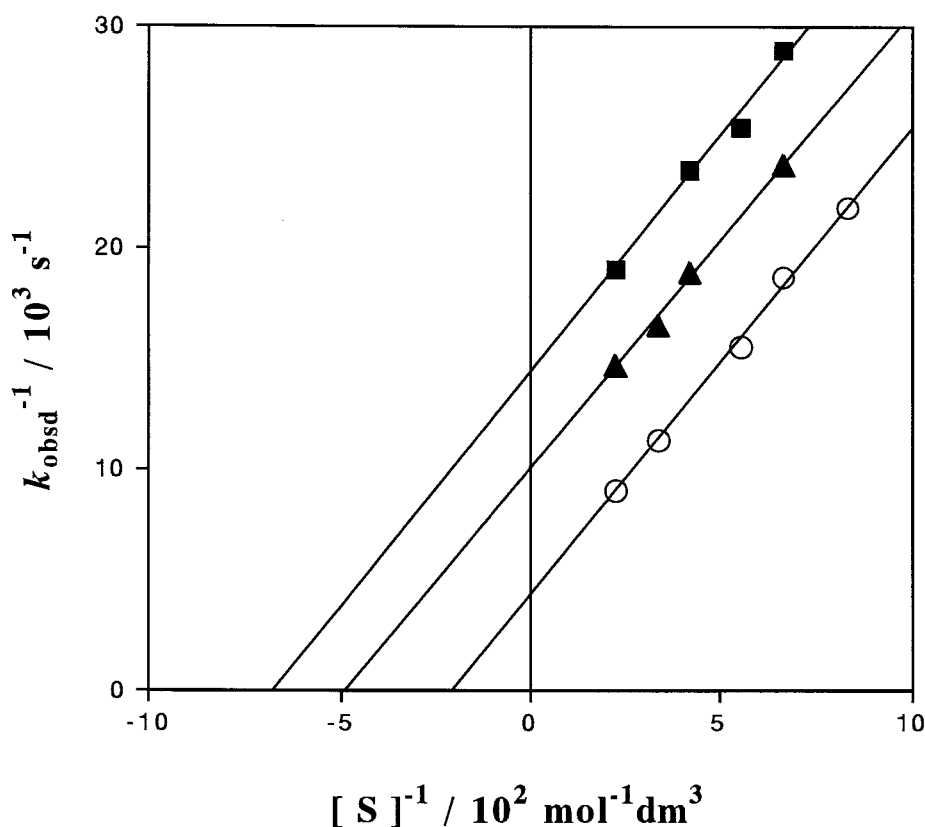


Fig.6-27. Lineweaver-Burk plots for the catalyzed reactions with and without templates over the footprint cavities{**S-36**}. Uncompetitive inhibition.

Open circle: Without the inhibitors. Closed triangle: With (*R*)-inhibitor **37** ; [I] = $4.00 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$. Closed square: With (*S*)-inhibitor **38** ; [I] = $4.00 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$.

Table 6-9. Kinetic parameters of the inhibition reactions with the chiral templates:

Enantioselective uncompetitive inhibitions.

Catalysts	$\frac{10^4 \times K_m}{\text{M}^{\text{d)}}$	$\frac{10^4 \times V_{\text{max}}^{\text{a)}}}{\text{s}^{-1}}$	$\frac{10^{-1} \times k_{\text{cat}}}{\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}}$	$\frac{10^{-2} \times k_{\text{cat}} / K_m}{\text{M}^{-2} \text{s}^{-1}}$	Inhibitors	$\frac{10^6 \times K_i}{\text{M}^{-1}}$	$-\Delta G^{\text{0b)}}$ kJ	$-\Delta \Delta G^{\text{0c)}}$ kJ
{ <i>R</i> - 35 } ^{f)}	10.40	1.25	11.21	10.80	37 (<i>R</i>) ^{e)}	49.7	24.96	1.98
					38 (<i>S</i>)	109.0	22.98	
{ <i>S</i> - 36 } ^{g)}	49.30	2.33	17.68	3.6	37 (<i>R</i>)	28.7	26.35	
					38 (<i>S</i>)	17.3	27.62	1.27

a) Maximum of k_{obsd} . b) Molecular recognition capability. c) Chiral recognition capability. d) M = mol dm⁻³. e) Configuration of the inhibitor molecule. f) Catalytic site molarity; $2.23 \times 10^{-6} \text{ mol / g}$. g) $2.64 \times 10^{-6} \text{ mol / g}$.

このように遊離のアミン類をルイス塩基としてキラルなフットプリントキャビティを形成できたことは、今までの章で述べたアシルアミン、ジアシルアミン、スルホンアミド誘導体を鑄型分子として調製したフットプリントキャビティに加えて、鑄型分子選択の範囲を大きく拡大したものであると言える。

キラルなアミン類を鑄型分子としたフットプリントキャビティの分子認識能は、光学活性アミン類の光学分割および分析の即戦力として大いに期待できる。フットプリントキャビティ形成は市販のシリカゲルに、分子刷り込みと言う簡単な修飾のみで調製できるので100 g以上のスケールでも容易に調製可能である。またこの分子刷り込み処理はシリカアルミナゲル1 gあたり $2-3 \times 10^{-5} \text{ mol g}^{-1}$ の吸着能力で調製でき、フットプリントキャビティ吸着サイトでの相補的分子との解離定数(K_d)は 10^{-6} オーダーであり、かなり強い。一方、5章で述べたようにシリカアルミナゲル表面のシラノール基をトリメチルシリル化しても、フットプリントキャビティの分子認識能を保持させることに成功しているので、この表面修飾とフットプリントキャビティのキラル分子の分子認識能を組み合わせれば、フットプリントキャビティ以外の表面の非特異的吸着を減少させることができ効率の高い光学分割が可能となる。したがって、Mosbachらのクロマトグラフィーによる分割^{76,85,87-90)}よりも、立体異性体をより特異的に吸着できる担体として提供できると思われる。このような特異的な強い吸着力は少量混在する光学異性体を取り除き光学純度を上げるのに最適である。

また、この6-3-5項で述べたフットプリントキャビティと阻害剤と基質の3者の複合体は、T.R.Kellyらが報告している“ A Bisubstrate Reaction Template ”⁹¹⁾のように二基質反応系の可能性を示すものでもある。

現在これらの応用面について検討中である。

第7章 非晶質粘土鉱物である活性白土表面におけるフットプリントキャビティ-の形成

7-1 序論

今までの章で、シリカアルミナゲル表面に形成されたフットプリントキャビティ-が示す分子認識能について、考察を重ねてきた。シリカアルミナゲルはシリカゲル表面のケイ素原子をアルミニウムイオンで部分的に、同形置換して、ルイス酸点を発生させたものであり、基本的に天然の非晶質粘土鉱物と同様の表面構造を有するものである。したがって、シリカアルミナゲルと、同様に非晶質粘土鉱物の表面にもフットプリントキャビティ-の形成が、可能なはずである。

この考えの基に、本章では、非晶質粘土鉱物である活性白土 (Japanese Active Clay) を用いて、フットプリントキャビティ-形成について検討をした。

7-2 実験

7-2-1 活性白土

和光純薬の "Standard Japanese Active Clay" を用いた。この活性白土は、日本油脂協会の品質基準に基づく、Lot No. EPM 7199、であり、茶灰色の200メッシュの粉末である。また乾燥損失、16%、酸含量は1gあたり水酸化カリウム1.27mgと当量である ($2.26 \times 10^{-5} \text{ mol / g}$)。

7-2-2 鑄型分子

N-Benzoylbenzenesulfonamide (Ph-SO₂-NH-Bz). 融点 148°C
(lit,⁵³) 147°C)

7-2-3 基質

無水安息香酸(Ph-CO-O-CO-Ph, **3**): ベンゼンと石油ベンジンにより再

結晶. 融点 42℃ (lit.42℃)

7-2-4 溶媒および求核剤は第1章に準ずる。

7-2-5 触媒の調製

触媒の調製は以下の2通り(a, b)の方法で行った。

1. 分子刷り込み a 法

この方法は、シリカゲルの場合と同様に行い、出発物質を活性白土としたものである。すなわち、活性白土(100 g)を500cm³の濃塩酸で5時間還流し、表面を活性化させると同時に、不純物として含まれる金属イオン(Fe³⁺, Zn²⁺)を除去する。その後、上澄み液のpHが6-7になるまで、脱イオン水で水洗、デカンテーションを約15回程度繰り返す。それに続いて、希アンモニア水(pH 7-8) 200-300cm³で3回洗浄した後、再び300-500cm³の脱イオン水で、3回水洗して”塩酸処理の活性白土”を得る。この水洗、デカンテーション操作により、非常に細かい粒径の活性白土は、除去でき、粒径を揃えることができる。

次に”塩酸処理の活性白土”の乾燥質量10 gに対して、0.2 mol dm⁻³の塩化アルミニウム水溶液50cm³を加えて、混合物のpHが6.5になるように希アンモニア水で調整し、3時間80℃に保つ。その後、デカンテーションで沈殿している水酸化アルミニウムを除去し、希塩酸(pH 4.0)で3回洗浄し、完全に沈殿を取り除く。このようにして得た“Al³⁺イオンドープ活性白土”に分子刷り込み処理を次のように施す。

すなわち、希塩酸中に懸濁された“Al³⁺イオンドープ活性白土(乾燥重量10 g)”に、2.0 x 10⁻³ molの鑄型分子を溶かしたアセトン溶液5cm³を加え、よく攪拌する。そして、pHを4.0に調整しながら80℃で、1週間放置する。その後、過剰の鑄型分子を除去するため、pH4.0の希塩酸でおよそ3

回洗浄し、表面が湿っている程度に吸引濾過した後、ペトリ皿に移し、質量変化がなくなるまで、室温にて放置する。保存するサンプルは、この状態でサンプル管で、密閉して置く。触媒作用の測定に用いる量だけ、ソックスレー抽出器で、メタノール抽出を行い、鑄型分子を抽出除去する。この時抽出除去の終了は、鑄型分子の光学密度の減少で確認する。このようにして、抽出処理された活性白土は、メタノールの急激な除去によるフットプリントキャビティの破壊に注意するため、徐々に減圧し最終的に1-3mmHgの減圧下、130-140℃で1時間減圧乾燥する。以上の過程で調製した活性白土を、“触媒 a”と名付ける。また“塩酸処理の活性白土”にアルミニウムイオンのドーピング処理をせず、ドーピングの時、脱イオン水のみで処理し、その後同様の処理をして調製した活性白土を“ブランク a”、それに、ドーピング処理と同時に、分子刷り込みも行わず、分子刷り込み時に鑄型分子を溶かすアセトンのみを加えてその他の処理は同様に行って調製した活性白土を“ブランク a2”とした。それにもう1種類“Al³⁺イオンドーブ活性白土”に分子刷り込み処理のみ欠いた“コントロール a”を調製した。これらの活性白土をまとめると次のようになる。

	塩酸処理	Al ³⁺ ドーブ処理	分子刷り込み
“触媒 a”	有	有	有
“ブランク a”	有	無	有
“ブランク a2”	有	無	無
“コントロール a”	有	有	無

2 分子刷り込み b 法

分子刷り込み a 法で行った塩酸による表面の活性化と、アルミニウムイオンのドーピングの両方を行わず、未処理の活性白土そのものの表面に直接分子刷り込み処理を行う方法である。

活性白土 (100 g) を脱イオン水 (200-300cm³) で、徹底的に洗浄し細

かい粒子を除去すると共に、pH4.0の希塩酸（200-300cm³）でも、よく洗浄（約20回）し、酸可溶成分を取り除く。この“洗浄活性白土”に分子刷り込み a 法で示したのと同様に、分子刷り込み処理を行う。このようにして調製した分子刷り込み a 法で“触媒 a”に相当する活性白土を“触媒 b”、“コントロール a”に相当する活性白土を“コントロール b”と名付ける。一見した相違は、“触媒 a”が、灰色でやや粗い粒子であるのに対して、“触媒 b”は、褐色で粒子が細かい。

	塩酸処理	Al ³⁺ ドープ処理	分子刷り込み
“触媒 b”	無	無	有
“コントロール b”	無	無	無

7-2-6 処理後活性白土の酸強度の測定

酸強度の測定は、第一章に準じてHammettの指示薬を用いたBenesiの方法で行った。指示薬としては、Methyl Red, Oil Yellow AB, Methyl Yellow, 4-phenylazodiphenylamine の乾燥ベンゼン溶液を用いた。また、ルイス酸点の確認は、フェノールフタレインの乾燥ベンゼン溶液によるPines と Haag の方法で行った。

7-2-7 反応速度の測定

第1章に準ずる。

7-2-8 触媒サイトの滴定

第1章に準ずる。

7-3 結果と考察

7-3-1 フットプリントキャビティ-の形成

活性白土（Japanese Active Clay）は、非晶質粘土鉱物であり、油脂

の脱色剤等に広く用いられている。天然の粘土鉱物は、混合物であり、産地により品質が異なるため、均一な品質のものを常に入手することは、極めて困難である。したがって、モンモリロナイトを主成分とする粘土鉱物を硫酸処理（25-45%の硫酸で、80-105℃の条件下、6-12時間処理）し、日本油脂化学協会の品質保証のもと、市販されている活性白土（Japanese Active Clay）を非晶質粘土鉱物として用いた。

鑄型分子、*N*-Benzoylbenzenesulfonamide **1**は80℃の分子刷り込み条件でも、安定でありかつ、今までのフットプリント触媒の調製には、しばしば用いてきた分子である。

触媒調製条件は、2通りで行ったが、分子刷り込み **a** 法では、塩酸処理およびアルミニウムイオンのドーピングを施しているため、粘土中に混在する金属イオンの影響は、除外することができる。また原料として、非晶質粘土鉱物を用いるか、シリカゲルを用いるか、の違いであるため、シリカゲルで起こったシリケートマトリックス中での構造変化が、非晶質粘土鉱物でも可能なのかを確認することができる。それと共に、分子刷り込み **b** 法は、塩酸処理およびアルミニウムイオンのドーピングを削除し、そのまま用いているのであるから、分子刷り込み **a** 法は、分子刷り込み **b** 法のコントロールに相当するものと考えてよい。

7-3-2 非晶質粘土触媒調製条件の違いによる特徴

表7-1に触媒 **a** とコントロール **a** の酸特性を示したが、これらは、第6章まで述べてきたシリカアルミナゲルの酸特性と似ていることがわかる。すなわち、同じ酸強度の触媒サイトを持っていることである。また、この触媒サイトは第1章で記したように、ルイス酸の触媒サイトであることが、確認されている。

Table 7-1. Acidic properties of Footprint Cavities.

Samples ^{a)}	Acid sites above pKa				Lewis acid sites ^{b)}	Catalytic activities ^{c)} $V_{\max} / \text{mol}^{-1}\text{dm}^3\text{s}^{-1}$
	+1.5 ^{d)}	+3.3 ^{e)}	+4.0 ^{f)}	+4.8 ^{g)}		
Catalyst a ^{h)}	++	++	++	++	+ ^{j)}	2.78×10^{-4}
Control a ^{h)}	++	++	++	++	+	4.19×10^{-4}
Blank a ^{j)}	+	+	+	+	-	0.00
Blank a2 ^{h)}	+	+	+	+	-	0.00
Catalyst b ^{k)}	++	++	(+) ^{l)}	++	(+) ^{m)}	4.51×10^{-4}
Control b ^{k)}	++	++	(+) ^{l)}	++	(+) ^{m)}	4.70×10^{-4}

a) Dried at 130-140 °C under reduced pressure(3 mHg) for 1 h. b) Detected with phenolphthalein. c) 50 mg catalyst. d) Determined with 4-phenylazodiphenylamine in benzene. e) With Methyl Yellow. f) With Oil Yellow AB. g) With Methy Red. h) Coloration is much clearer than those of Blank **a** and Blank **a2**. i) Purple coloration is positive. j) Corloration is faint. k) Coloration is much clearer than those of Catalyst **a** and Control **a**. l) Determination is difficult due to brown color of the sample. m) Coloration is not purple but pink.

一方、ブランク **a** およびブランク **a2** は、Hammett の指示薬に対しては、やや陽性を示すが、ルイス酸触媒サイトを欠き触媒活性も持たないことから、濃塩酸の還流によって、標準活性白土調製時の硫酸処理では、除去できなかったと考えられる金属イオンも効果的に除去され、活性白土を不活性化したと思われる。それに対して、触媒 **a** とコントロール **a** では、 Al^{3+} のドーピングにより、触媒活性を得たことになる。

次に、図 7-1 に触媒 **a** とコントロール **a** のピリジン被毒による触媒サイトの滴定のグラフを示す。

このように、ピリジン濃度と相関をもつ、良好な直線が得られたことより、触媒表面に存在するピリジン被毒に敏感な触媒サイトがあることがわかる。これは、それらの触媒サイトがブレンステッド酸触媒サイトではなく、ルイス酸触媒サイトであることを示している。このことは、触媒 **a** が 2,6-dimethylpyridine ではメチル基の立体障害により被毒されない事実からも、確認できる。したがって、それらの直線を x 軸に外挿することにより、触媒 **a** 1kg 当たりのルイス酸触媒サイトは、 $2.65 \times 10^{-2} \text{ mol kg}^{-1}$ 、同

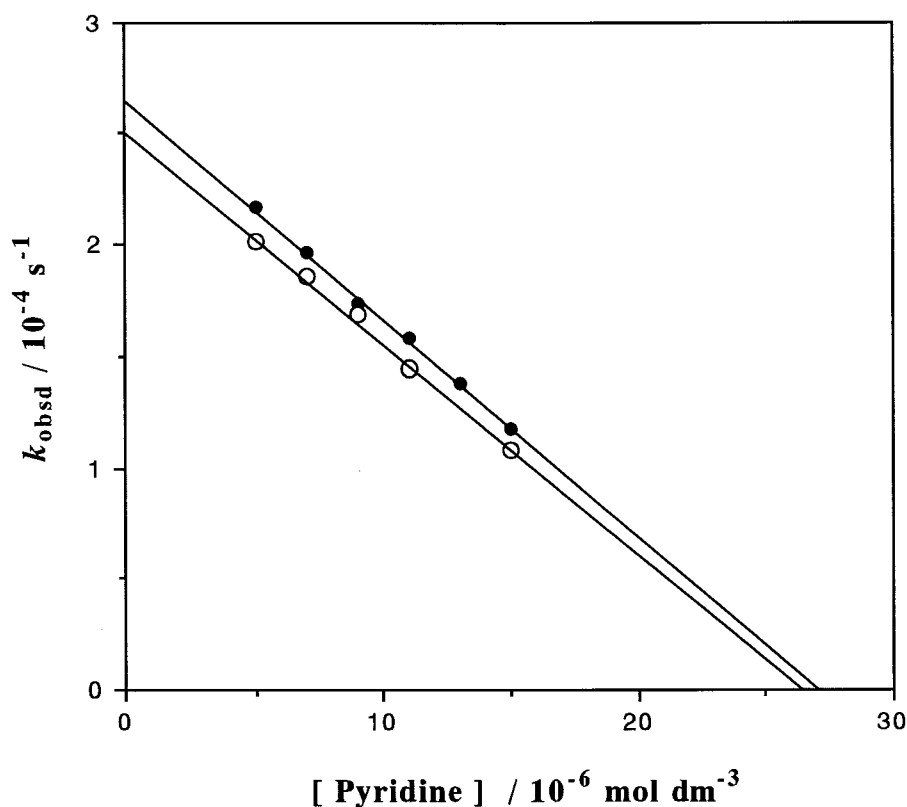


Fig.7-1. Catalytic site titrations of Catalyst a and Control a by pyridine poisoning.

Open circles: Catalyst a, titre; $2.65 \times 10^2 \text{ mol kg}^{-1}$. Closed circles: Control a, titre: $2.70 \times 10^2 \text{ mol kg}^{-1}$.

様に、コントロール a では、 $2.70 \times 10^2 \text{ mol kg}^{-1}$ と求められる。故に、 Al^{3+} のドーピングにより発生したルイス酸触媒サイトは、分子刷り込みによって定量的にフットプリントキャビティーになっていると考えられる。図7-2には、触媒 b とコントロール b の同様なピリジン被毒のグラフを示す。図7-1では非常に良好な直線性が得られたのに対し、図7-2では、明らかにそれらより分散していることがわかる。これは、分子刷り込み a 法では、粘土中の種々の金属イオンを除去しドーピングした Al^{3+} から生じたルイス酸触媒サイトで、単一の動学的関係が成立しているのに比べ、分子刷り込み b 法では、微量のアルミニウム以外の金属イオンによる不安定な触媒サイトが存在し、動学的不均一性がみられると思われる。しかし、これらの触媒サイトの滴定から、興味あることに触媒 a、触媒 b それにコントロール a の酸触媒サイト量 ($2.55\text{-}2.70 \times 10^2 \text{ mol kg}^{-1}$) は、品質表示による酸含量 (水酸化カリウム $2.26 \times 10^2 \text{ mol kg}^{-1}$ と当量) に非常

に近い。これは、明らかに、固有の粘土表面の酸点の殆ど全てがルイス酸触媒サイトに変換したものであるといえる。

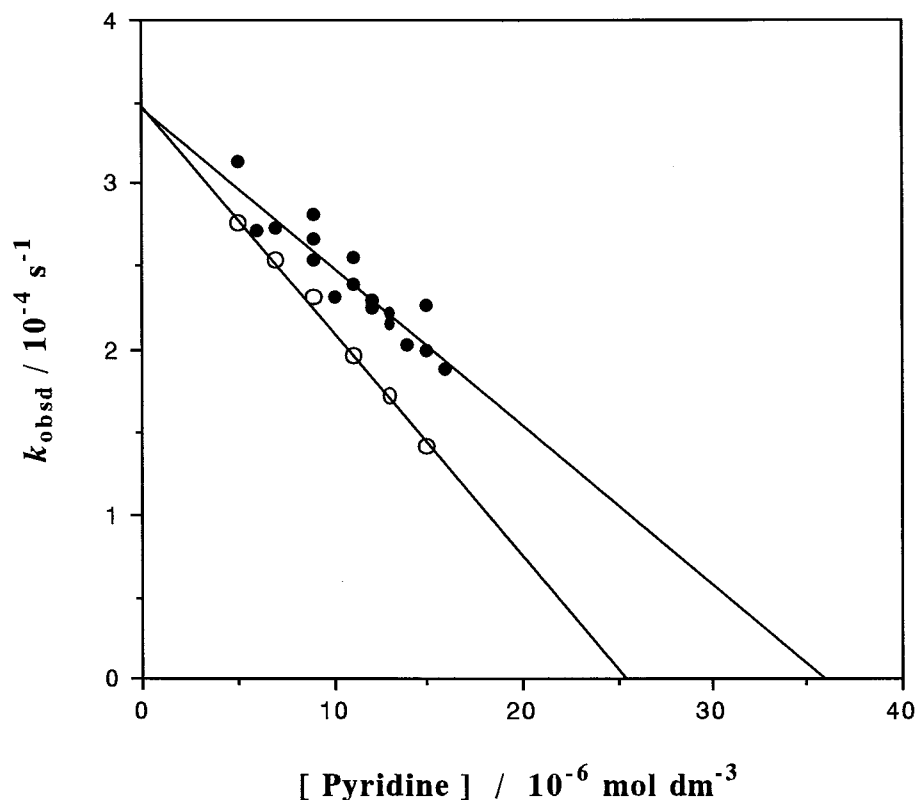


Fig. 7-2. Catalytic site titrations of Catalyst **b** and Control **b**.

Open circles: Catalyst **b**, titer; $2.55 \times 10^{-2} \text{ mol kg}^{-1}$. Closed circles: Control **b**, titer: $3.60 \times 10^{-2} \text{ mol kg}^{-1}$.

7-3-3 : フットプリントキャビティーが示す触媒作用

図7-3には、コントロール **a** が触媒する反応系に鑄型分子が存在する時と、しない時のLineweaver - Burkプロットを示した。これらのプロットは、鑄型分子が反応系に共存しても、阻害作用は、見られないことがわかる。これは、コントロール **a** の表面には鑄型分子を特異的に吸着させる部位は、存在しないことを示している。一方、図7-4には、触媒 **a** が触媒する反応系に、鑄型分子を共存させた時（2種類の濃度）と、させない時のLineweaver - Burkプロットであるが、Y切片が一致する典型的な拮抗阻害が見られる。その動力学パラメータを表7-2に示すが、阻害定数が 10^{-6}

mol dm⁻³ オーダーと強く、粘土表面のフットプリントキャビティーが、形成されていることを示唆している。また、良い直線性が、得られていることから、均一の触媒作用であると判断できる。

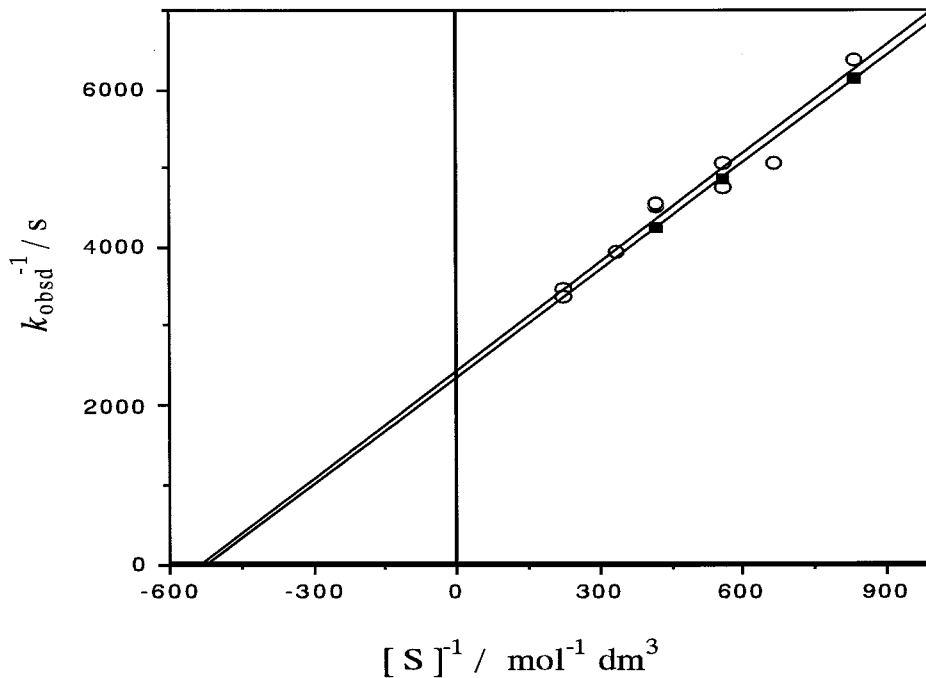


Fig. 7-3. Lineweaver- Burk plots for Control a. No competitive inhibition.

Open circles: Catalyzed reaction without the template compound as an inhibitor.

Closed circles: Catalyzed reaction with the inhibitor; [I] = 2.0 x 10⁻⁵ mol dm⁻³.

次に、図7-5にはコントロール **b** が触媒する反応系に鑄型分子を共存させた時と、共存させない時のLineweaver - Burkプロットであるが、コントロール **a** で見られたのと同様に阻害作用は、確認できず、コントロール **b** の表面にも鑄型分子を特異的に吸着させる部位は、存在しないことを示している。それに対して、触媒 **b** では図7-6に示す通り、明らかな拮抗阻害がみられ、フットプリントキャビティーの形成が確認できた。このように、特別な処理をしない活性白土においても、触媒 **a** と同様の活性を有するフットプリントキャビティーの調製が可能になったわけである（表7-2）。

Table 7-2. Kinetic Parameters

Catalysts	K_m	V_{\max}^a	Acid sites	k_{cat}	k_{cat}/K_m	K_i	$-\Delta G^{0b)}$
	10^{-4}M^c	10^{-4}s^{-1}	$10^{-2} \text{mol kg}^{-1}$	$\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$	$10^5 \text{M}^{-2} \text{s}^{-1}$	10^{-6}M	kJ mol^{-1}
Catalyst a	4.44	2.78	2.65	210.0	4.73	2.93	32.10
Control a	19.84	4.19	2.70	309.6	1.56	-----	-----
Catalyst b	9.54	4.51	2.55	354.5	3.71	1.02	34.75
Control b	8.99	4.70	3.60	261.1	2.90	-----	-----
Silica gel 1 ^{d)}	0.79	5.90	1.95	603.0	76.4	0.05	42.35
Silica gel 2 ^{e)}	3.78	4.69	2.87	326.8	8.64	2.22	32.08

a) $V_{\max} = k_{\text{obsd,max}}$. b) Molecular recognition capability defined as $-\Delta G^0 = RT \ln(K_i^{-1})$. c) $\text{M} = \text{mol dm}^{-3}$.
d) Silica(alumina) gel catalyst imprinted at 75 °C for a week.⁴²⁾ e) Imprinted at room temperature for a week.³⁹⁾

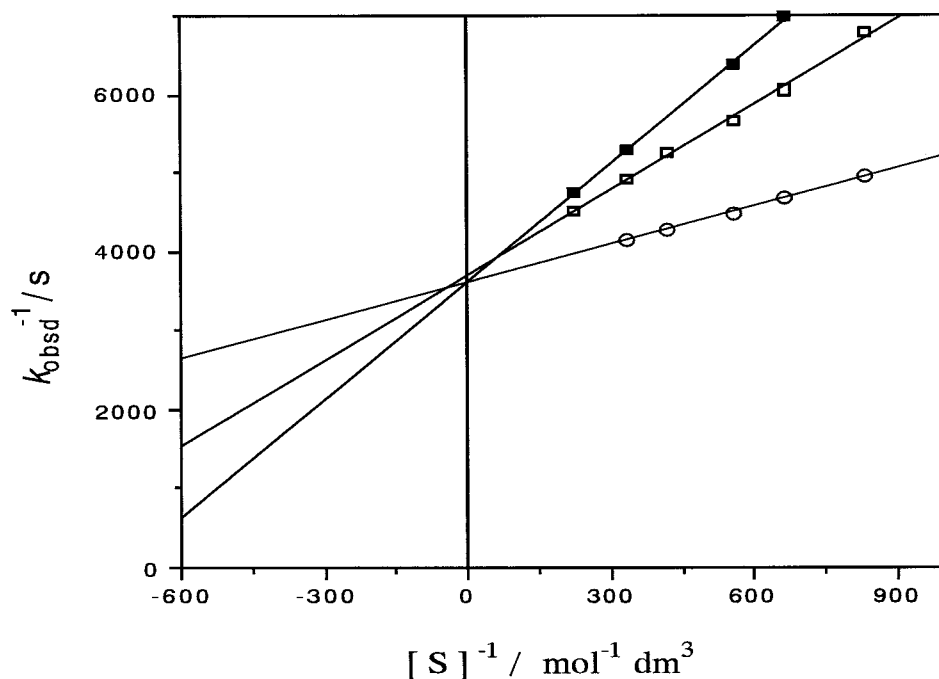


Fig. 7-4. Lineweaver-Burk plots for Catalyst a. Competitive inhibition.

Open circles: Catalyzed reaction without the inhibitor. Open squares: With the inhibitor, $[I] = 4.0 \times 10^{-7} \text{mol dm}^{-3}$. Closed squares: $[I] = 2.0 \times 10^{-5} \text{mol dm}^{-3}$.
 $K_i = 2.93 \times 10^{-6} \text{mol dm}^{-3}$.

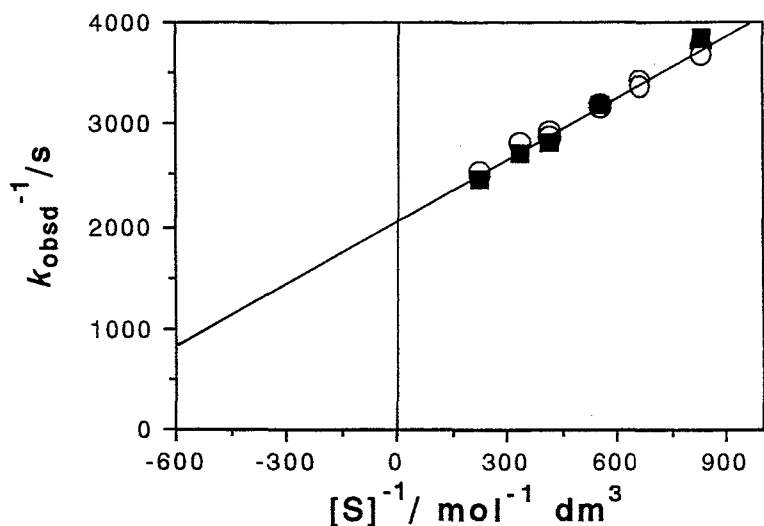


Fig. 7-5. Lineweaver-Burk plots for Control **b**. No competitive inhibition.

Open circles: Catalyzed reaction without the inhibitor.

Closed squares: With the inhibitor; $[I] = 2.0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$.

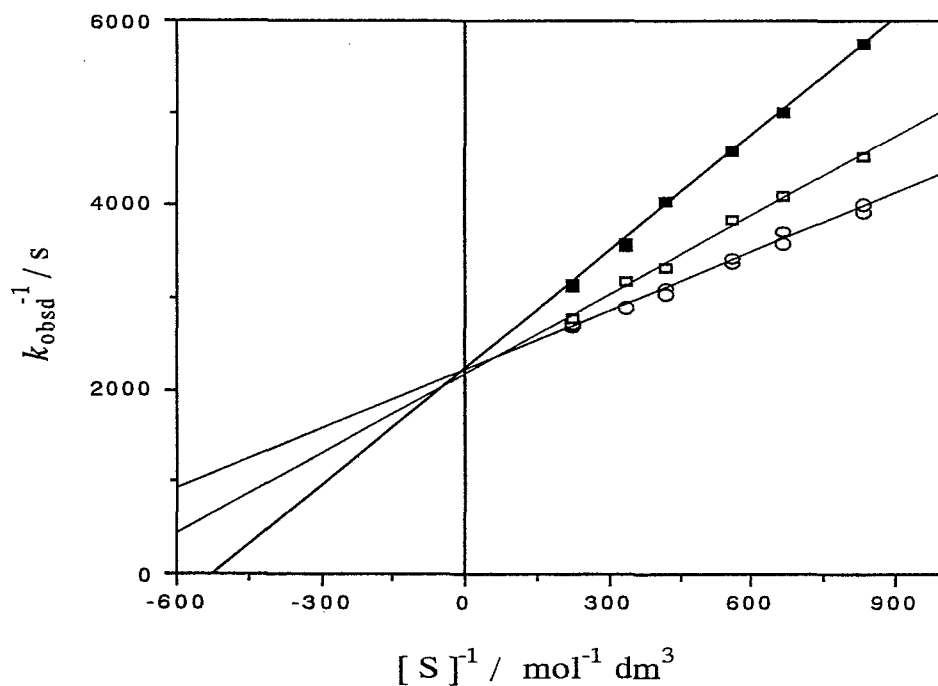


Fig. 7-6. Lineweaver-Burk plots for Catalyst **b**. Competitive inhibition.

Open circles: Catalyzed reaction without the inhibitor.

Open squares: With the inhibitor, $[I] = 4.0 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$.

Closed squares: $[I] = 2.0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$. $K_i = 1.02 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$

表7-2では、比較のため、シリカゲルを出発物質にした従来のフットプリント触媒の動力学パラメータを示したが、触媒 a、触媒 b、シリカゲル 2 は、 K_m , k_{cat} , k_{cat} / K_m 値がよく似ている。したがって、この3種類のフットプリント触媒は、非常に近いものであり、分子認識力は、お互いに類似している (K_i , $-\Delta G^0$ の値)。しかし、シリカゲル 1 のみ、その動力学パラメータに違いが認められた。このシリカゲル 1 の調製条件は75℃で1週間と、最良の分子刷り込み条件を探ったものである。⁴²⁾ これに対してシリカゲル 2 は室温で1週間の処理を行い通常得られる分子認識能をもつフットプリント触媒である。触媒 a、触媒 b の分子刷り込み条件が、80℃で1週間とシリカゲル 1 の調製条件に近く厳しい条件であるが、得られるフットプリント触媒としてはシリカゲル 2 に相当するものであることがわかる。これらの事実は、シリカマトリックスの表面の方が、活性白土表面より、分子刷り込みに対して、より敏感であることを示唆している。しかし活性白土表面にも、シリカゲル同様のフットプリントキャビティの形成が可能で、しかも自然界でもこのようなシリカマトリックスの再構成に起因するフットプリントキャビティの形成が起こる有力な証拠となるものである。

7-4 原始酵素として機能するフットプリントキャビティ

粘土表面に分子刷り込みにより形成されたフットプリントキャビティは、化学進化の面から非常に意義深いものである。生命を効率のよい自己複製する物質代謝系と定義すると、それらの系を構成する全ての物質は、生命誕生以前に地球上で高濃度に濃縮され、蓄積されていなければならない。更に、有機化合物がでたらめに蓄積されるだけでは生命が進化するためには不十分であり、単にタールになってしまうだけである。生命発生以前において自己再生的物質代謝が確立するためには、代謝を起こす物質が

過不足なく揃い、更にそれらの反応を促進する触媒が必要であり、これらの混合物が相互作用や相互変換それに化学平衡等により、自己制御的に存在することが不可欠であろう。この状態は、1種類の酵素が特異的にある一反応を制御すると言う現在の代謝系と基本的に似たものと言えるであろう。こうして、ある特異的触媒に触媒される特異的な反応のいくつかが組み合わせられ、ひとつのある代謝系が成立する。このような生命発生の筋書きを考えるためには、生命発生以前に多種類の酵素類似の機能をもつ無機触媒の存在が必要となる。非晶質粘土表面に形成されるフットプリントキャビティーは正にその無機酵素の最有力候補である。シリカアルミナゲル触媒表面に形成されたフットプリントキャビティーが示した特性、すなわち基質特異性^{36,38,39)}、酵素類似のエナンチオ選択的触媒作用^{41,44,46,47,48)}、自己制御フィードバック機構^{41,74)}は、非晶質粘土表面でも同様に機能すると考えられる。代謝物および代謝中間体に関連する化合物の分子刷り込みにより形成されたフットプリントキャビティーは、それら代謝物の関係する反応に特異的となり得る。結局、数少ない無機化合物が、新たに発生し複雑化していく膨大な数の有機化合物に、如何に特異的触媒として対応できるかを説明できる仮説こそ、フットプリント仮説であると言える。したがって、フットプリント仮説は、J. D. Bernal⁹²⁾ や他の多くの研究者達⁹³⁾ が独立に提起している生命進化における粘土鉱物の役割についての仮説をより拡大するものである。

参考文献

- 1) D. J. Cram, J. M. Cram, *Science*, **183**, 803(1974).
- 2) F. Cramer, W. Saenger, H. Spatz, *J. Am. Chem. Soc.*, **89**, 14(1964)
- 3) R. L. van Etten, J. F. Sebastian, G. A. Clowes, M. L. Bender, *J. Am. Chem. Soc.*, **89**, 3242(1967).
- 4) C. J. Pederson, *J. Am. Chem. Soc.*, **89**, 2495(1967);
- 5) Idem, *ibid.*, **89**, 7017(1967);
- 6) Idem, *Fed. Proc.*, **27**, 1305(1968).
- 7) J. M. Lehn, *Acc. Chem. Res.*, **11**, 49(1978).
- 8) D. J. Cram, T. Kaneda, R. C. Helgeson, and G. M. Lein, *J. Am. Chem. Soc.*, **101**, 6752(1979);
- 9) D. J. Cram, T. Kameda, G. M. Lein, and R. C. Helgeson, *J. Chem. Soc., Chem. Comm.*, **948**(1979);
- 10) J. R. Moran, S. Karbach, D. J. Cram, *J. Am. Chem. Soc.*, **104**, 5826(1982).
- 11) J. Rebek, Jr., L. Marshall, R. Wolak, K. Parris, M. Killoran, B. Askew, D. Nemeth, and N. Islam, *J. Am. Chem. Soc.*, **107**, 7476(1985)
- 12) J. Rebek, Jr., B. Askew, M. Killoran, D. Nemeth, and F. -T. Lin, *J. Am. Chem. Soc.*, **109**, 2426(1987)
- 13) J. Rebek, Jr., B. Askew, P. Ballester, C. Buhr, S. Jones, D. Nemeth, K. Williams, *J. Am. Chem. Soc.*, **109**, 5033 (1987)
- 14) J. Rebek, Jr., *Acc. Chem. Res.*, **23**, 399(1990).
- 15) K. -S. Jeong, A. V. Muehldorf, J. Rebek, *J. Am. Chem. Soc.*, **112**, 6144 (1990)
- 16) R. Breslow, J. B. Doherty, G. Guillet, C. Lipsey, *J. Am. Chem. Soc.*, **100**, 3227 (1978)

- 17) Shinkai et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **106**, 1801 (1984)
- 18) R. Breslow, *Acc. Chem. Res.*, **13**, 170 (1980).
- 19) I. Tabushi, *Acc. Chem. Res.*, **15**, 66 (1982).
- 20) M. L. Bender, M. Komiyama, *Cyclodextrin Chemistry*, Springer-Verlag (1977)
- 21) R. Breslow, M. Hammond, M. Lauer, *J. Am. Chem. Soc.*, **102**, 421 (1980)
- 22) Y. Chao, D. J. Cram, *J. Am. Chem. Soc.*, **98**, 1015 (1976)
- 23) Y. Chao, G. R. Weisman, G. D. Y. Sogah, D. J. Cram, *J. Am. Chem. Soc.*, **101**, 4948 (1979)
- 24) J. P. Behr, J. -M. Lehn, P. Vierling, *J. Chem. Soc., Chem. Comm.*, **1976**, 621.
- 25) D. J. Cram, J. M. Cram, *Acc. Chem. Res.*, **11**, 8(1978).
- 26) W. P. Jencks, "Catalysis in Chemistry and Enzymology", McGrawHill, New York(1969).
- 27) F. H. Dickey, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **35**, 227 (1949).
- 28) F. H. Dickey, *J. Phys. Chem.*, **59**, 695(1955).
- 29) G. Wulff, B. Heide, and G. Helfmeier, *J. Am. Chem. Soc.*, **108**, 1089(1986).
- 30) K. Tanabe, "Solid Acid and Bases", Kodansya, Tokyo Academic press, New York - London(1970).
- 31) R. Wolfenden, *Acc. Chem. Res.*, **5**, 10(1972); *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, **5**, 271(1976).
- 32) L. Pauling, *American Scientists*, **36**, 51-58(1948).
- 33) A. Tramontano, K. Janda, and R. Lerner, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **83**, 6736(1986).

- 34) A. Tramontano, K. Janda, and R. Lerner, *Science*, **234**,1566(1986).
- 35) S. J. Pollack, J. W. Jacobs, P. G. Schultz, *Science*, **234**,1570(1986).
- 36) Part I: K. Morihara, S. Kurihara, and S. Suzuki, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **61**,3991(1988).
- 37) Part II: K. Morihara, E. Nishihata, M. Kojima, and S. Miyake, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **61**, 3999(1988).
- 38) Part III: K. Morihara, E. Tanaka, Y. Takeuchi, K. Miyazaki, N. Yamamoto, Y. Sagawa, E. Kawamoto, and T. Shimada, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **62**, 499 (1989).
- 39) Part IV: T. Shimada, K. Nakanishi, and K. Morihara, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **65**, 954 (1992).
- 40) Part V: T. Shimada, R. Kurazono, and K. Morihara, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **66**, 836 (1993).
- 41) Part VI: K. Morihara, S. Kawasaki, M. Kofuji, and T. Shimada, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **66**, 906 (1993).
- 42) Part VII: K. Morihara, S. Doi, M. Takiguchi, and T. Shimada, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **66**, 2977 (1993).
- 43) Part VIII: K. Morihara, T. Iijima, H. Usui, and T. Shimada, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **66**, 3047 (1993).
- 44) Part IX: T. Matsuihi, T. Shimada, and K. Morihara, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **67**, 748 (1994).
- 45) Part X: T. Shimada, R. Hirose, and K. Morihara, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **67**, 227 (1994).
- 46) Part XI: K. Morihara, M. Takiguchi, and T. Shimada, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **67**, 1078 (1994).

- 47) K. Morihara, M. Kurokawa, Y. Kamata, and T. Shimada, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1992**, 358.
- 48) T. Matsuishi, T. Shimada, and K. Morihara, *Chem. Lett.*, **1992**, 1921.
- 49) 竹本喜一、宮田幹二、木村恵一 "包接化合物" p.81, 東京化学同人 (1989)
- 50) S. Bernhard, *J. Am. Chem. Soc.*, **74**, 4946(1952).
- 51) R. Curti and U. Colombo, *Gazz. chim. ital.*, **82**, 491(1952).
- 52) R. G. Haldeman and P. H. Emmett, *J. Phys. chem.* **59**, 1039(1955).
- 53) "Beilstein Handbuch der Organischen Chemie," **IX**, 43.
- 54) "Beilstein Handbuch der Organischen Chemie," **IX**, 213.
- 55) "Beilstein Handbuch der Organischen Chemie," **IX**, 164.
- 56) J. F. Fritz and J. N. King, *Anal. Chem.*, **48**, 570(1976).
- 57) P. Jundo and P. Venturello, *J. Am. Chem. Soc.*, **101**, 6606(1979).
- 58) H. A. Benesi, *J. Phys. Chem.*, **61**, 970(1957).
- 59) H. Pines and W. O. Haag, *J. Am. Chem. Soc.*, **82**, 2471(1979).
- 60) B. J. Cohen, M. A. Kraus, and A. Patchornik, *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 7620(1981).
- 61) V. Gutmann, "The Donor-Acceptor Approach to Molecular Interaction," Plenum Press, New York(1978).
- 62) "Beilstein Handbuch der Organischen Chemie," **XI**, 213.
- 63) "Beilstein Handbuch der Organischen Chemie," **IX**, 754
- 64) "Beilstein Handbuch der Organischen Chemie," **XVI**, 805
- 65) W. P. Jencks, *Adv. Enzymol.*, **43**, 219(1975).
- 66) A. Fersht, "Enzyme Structure and Mechanizm," Freeman and Co., Ltd., San Francisco(1977).
- 67) "Beilstein Handbuch der Organischen Chemie," **XIV**, 702

- 68) I. V. Berezin, N. F. Kanzanskaya, and A. A. Klyosov, *FEBS Lett.*, **15**, 121(1971).
- 69) J. P. Blitz, R. S. Sheedhara Murthy, and D. E. Leyden, *J. Am. Chem. Soc.*, **109**, 7141(1987).
- 70) J. Bohemen, S. H. Langer, R. H. Perrett, and J. H. Purnell, *J. Chem. Soc.*, **1960**, 2444.
- 71) R. K. Iler, "The Chemistry of Silica," John Wiley and Sons Inc., New York (1979), p.639.
- 72) P. H. Emmett, "Catalysis," Reinhold Publishing Co., New York (1955), Vol.1.
- 73) P. A. Leermakers, H. T. Thomas, L. D. Weis, and F. C. James, *J. Am. Chem. Soc.*, **88**, 5075(1966).
- 74) 酒井晶子、嶋田豊司、森原憲作、日本化学会第66秋季年会、講演番号 3A441.
- 75) 日本化学会編、化学総説、No.6, 光学異性体の分離、p 113 (1989).
- 76) L. Fischer, R. Muller, B. Ekberk, and K. Mosbach, *J. Am. Chem. Soc.*, **113**, 9358 (1991).
- 77) T. Suzuki, K. Igarashi, K. Hasa and K. Tuzimura, *Agr. Biol. Chem.*, **37**(2), 411(1973).
- 78) M. Kobayashi, M. Kitazawa, T. Saito, *YAKUSHI*, **103**, 11195(1983).
- 79) T. Wieland, W. Kern and R. Sehring, *Liebigs Ann. Chem.*, 1950, **569**, 122(1950).
- 80) J. P. Greenstein and M. Winiz, "Chemistry of the Amino Acids," John Wiley and Sons, Inc., New York-London(1961), p. 1016.
- 81) J. P. Greenstein and M. Winiz, "Chemistry of the Amino Acids," John Wiley and Sons, Inc., New York-London(1961), p. 860.

- 82) S. A. Bernhard and H. Gutfreund, *Proc. Intern. Symp. Enzyme Chem.*, Tokyo Kyoto, 1985, p. 124.
- 83) C. L. Hamilton, C. Niemann and G. S. Hammond, *Proc. Natl. Aca. Sci. USA*, 1966, **55**, 664.
- 84) A. G. Ogston, *Nature (London)*, 1948, **162**, 963.
- 85) B. Sellergren, M. Lepistoe, and K. Mosbach, *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 5953 (1988).
- 86) E. Zeffren and P. HALL, " The Study of Ezyme Mechanisms, " John Willey & Sons, Inc., New York (1973), Chapter VI.
- 87) B. Sellergren, B. Ekberk, and K. Mosbach, *J. Chromatogr.*, **347**, 1(1985).
- 88) A. Sarhan, *Makromol. Chem.*, **190**, 2031 (1989).
- 89) L. I. Andersson, and K. Mosbach, *J. Chromatogr.*, **516**, 313(1990).
- 90) L. I. Andersson, A. Miyabashi, D. J. O'Shannessy, and K. Mosbach, *J. Chromatogr.*, **516**, 323(1990).
- 91) T. R. Kelly, C. Zhao, and G. J. Bridger, *J. Am. Chem. Soc.*, **111**, 3744 (1989).
- 92) J. D. Bernal, " The Physical Basis of Life, " Routedge and Kegan Paul Ltd., London (1951).
- 93) B. K. G.Theng, " The Chemistry of Clay Organic Reactions, " Wiley, New York (1974), pp. 274-281.

謝辞

本研究をまとめるに当たり、労を惜しまず懇切丁寧に御指導御鞭撻頂きました大阪大学工学部プロセス工学専攻井上佳久教授に深く御礼申し上げます。また、多数の適切なお助言を頂きました大阪大学工学部プロセス工学専攻柳田祥三教授、城田靖彦教授に感謝いたします。

本研究の遂行に当たり、終始一貫熱誠なる御指導と御鞭撻に加え暖かい励ましを与えて私を支えて下さいました奈良女子大学理学部化学科森原憲作教授に厚く御礼申し上げます。また、NMRの測定をはじめ様々な貴重なお助言を頂きました奈良女子大学理学部化学科中沢隆助教授に感謝致します。

さらに、分子軌道計算では基礎から丁寧に御指導いただきました奈良教育大学教授山辺信一教授および研究室の皆様にお礼申し上げます。

一方、お助言とともに論文作成における多くの手続きなど御協力いただきました大阪大学山本司由子博士に感謝いたします。

最後になりましたが、本研究において様々な協力いただきました奈良女子大学理学部化学科有機化学講座の卒業生および学生の方々に深く御礼申し上げると共に、始終多くの協力し支えてくれました家族に対し深く感謝いたします。