

オリゴ糖への各種官能基の導入並びに
諸機能の開発

木野村 圭右

①

オリゴ糖への各種官能基の導入並びに 諸機能の開発

| | | |
|------|-------------------------|----|
| 第一章 | 総論 | 1 |
| 第二章 | アミノアシル化反応の全般的な概観並びにその特長 | 4 |
| 第三章 | オリゴ糖への各種官能基の導入並びに諸機能の開発 | 8 |
| 第四章 | アミノアシル化反応の全般的な概観 | 8 |
| 第五章 | アミノアシル化反応の全般的な概観 | 9 |
| 第六章 | アミノアシル化反応の全般的な概観 | 13 |
| 第七章 | アミノアシル化反応の全般的な概観 | 19 |
| 第八章 | アミノアシル化反応の全般的な概観 | 21 |
| 第九章 | アミノアシル化反応の全般的な概観 | 24 |
| 第十章 | アミノアシル化反応の全般的な概観 | 26 |
| 第十一章 | アミノアシル化反応の全般的な概観 | 27 |
| 第十二章 | アミノアシル化反応の全般的な概観 | 29 |
| 第十三章 | アミノアシル化反応の全般的な概観 | 33 |
| 第十四章 | アミノアシル化反応の全般的な概観 | 34 |
| 第十五章 | アミノアシル化反応の全般的な概観 | 37 |
| 第十六章 | アミノアシル化反応の全般的な概観 | 43 |
| 第十七章 | アミノアシル化反応の全般的な概観 | 43 |
| 第十八章 | アミノアシル化反応の全般的な概観 | 44 |

目 次

| | |
|--|----|
| 序 論 | 1 |
| 序 章 アミノアシル化糖の合成並びにその機能 | 4 |
| 第一節 緒論 | 5 |
| 第二節 原料となるグルコース誘導体の合成 | 5 |
| 第三節 アミノアシル化糖の合成 | 6 |
| 第四節 アミノアシル化糖のアルカリによる加水分解 | 9 |
| 第五節 アミノアシル化糖の蛋白分解酵素による加水分解 | 13 |
| 第六節 糖水酸基保護基としての機能 | 19 |
| 第七節 アミノアシル化糖の呈味挙動 | 21 |
| 第八節 総括 | 24 |
| 第一章 アリールおよびアルキルグリコシド類の合成と その機能 | 26 |
| 第一項 ヘテロポリ酸触媒によるグリコシル化方法の開発 | |
| 第一節 緒論 | 27 |
| 第二節 アセチル化糖を出発原料としたアルキルグリコシドの 合成 | 29 |
| 第三節 アセチル化糖を出発原料としたアリールグリコシドの 合成 | 33 |
| 第四節 グリコシル化反応に於けるヘテロポリ酸の酸強度変化と アノマー化に及ぼす影響 | 34 |
| 第五節 1-チオグルコシドおよび1-チオマルトシドの合成 | 37 |
| 第六節 未保護糖のアルコールシスによるグリコシドの合成 | 42 |
| 第七節 1,2-オルトエステル誘導体を經由したアルキル グリコシドの合成 | 42 |
| 第八節 総括 | 44 |

第二項 アルキル-O-グリコシド類の界面科学的性質およびリパーゼに対する機能

| | | |
|-----|-----------------------------------|----|
| 第一節 | 緒論----- | 46 |
| 第二節 | アルキルグリコシドの界面科学的性質----- | 46 |
| 第三節 | アルキルグリコシドのケラチン、セルロースに対する相互作用----- | 49 |
| 第四節 | 界面活性剤共存下に於けるリパーゼの構造変化----- | 51 |
| 第五節 | アルキルグリコシドがリパーゼ活性に与える影響----- | 53 |
| 第六節 | 総括----- | 56 |

第三項 アルキルチオグリコシド類の界面科学的性質および膜蛋白可溶化剤としての機能

| | | |
|-----|--------------------------|----|
| 第一節 | 緒論----- | 58 |
| 第二節 | アルキルチオグリコシドの界面科学的性質----- | 59 |
| 第三節 | 腸炎ビブリオ膜蛋白の可溶化----- | 60 |
| 第四節 | 可溶化蛋白の活性に関する考察----- | 65 |
| 第五節 | 総括----- | 65 |

第二章 重合性基を有する糖誘導体の合成およびその機能---- 68

第一項 ビニル基を側鎖に有するグリコシド類の合成

| | | |
|-----|---|----|
| 第一節 | 緒論----- | 69 |
| 第二節 | (メタ) アクリル基をアグリコンに有するグリコシド類の合成----- | 70 |
| 第三節 | (メタ) アクリル基をアグリコンに有するグリコシド類の毒性、変異原性----- | 74 |
| 第四節 | 総括----- | 75 |

第二項 糖含有ビニルモノマーの重合特性

| | | |
|-----|----------------------------------|----|
| 第一節 | 緒論----- | 76 |
| 第二節 | ラジカル開始剤を用いた溶液重合によるホモポリマーの調製----- | 77 |
| 第三節 | 他のビニルモノマーとの共重合体の調製----- | 78 |

| | | |
|-------------------------------------|---|-----|
| 第四節 | 共重合体におけるモノマーの反応性比----- | 81 |
| 第五節 | 共重合体の表面の自由エネルギー----- | 84 |
| 第六節 | 総括----- | 87 |
| 第三項 糖含有ビニルモノマーより誘導されるポリマーの機能 | | |
| 第一節 | 緒論----- | 88 |
| 第二節 | ホモポリマーの熱分解挙動----- | 88 |
| 第三節 | ホモポリマーの生分解性----- | 89 |
| 第四節 | ホモポリマーの湿度に対する挙動----- | 91 |
| 第五節 | 抗原-抗体反応を利用した体外診断薬へのホモポリマー の添加効果----- | 98 |
| 第六節 | 共重合体の溶媒への溶解性----- | 99 |
| 第七節 | 共重合体の医療用途への適性----- | 102 |
| 第八節 | 総括----- | 103 |
| 結 論 ----- | | 106 |
| 謝 辞 ----- | | 108 |
| 参考文献 ----- | | 109 |
| 公表論文 ----- | | 113 |
| 参考論文 ----- | | 116 |

序 論

製品が末端のユーザーへ直接供給される機会の少ない化学会社に所属し新規製品の研究開発業務に携わっていると、研究の命題は「如何にして入手可能な原料を付加価値のある誘導体へ加工するか」というこに集約されてくる。特に、基幹となる出発原料（この場合、出発となる天然素材を意味するが）の生産機能を自社組織内に持たない化学会社においては、特徴ある加工技術、合成技術の開発とその技術によって産み出された中間製品の機能発見という取り組みが不可欠である。このサイクルを円滑に回していくために適切な出発原料の選択が重要になるが、中間製品が配合された製品を直接用いることになる最終消費者のイメージも決して無視できないことは確かである。以前にも増して化学品には天然、安全というイメージが特に強く要求されるようになってきており、天然素材を出発原料に選択するというのがまず妥当な判断であろう。

化学修飾のための素材という観点から天然原料を見つめてみると、潜在的に十分な供給能力を有する脂質、蛋白質、糖質が過去から変化無く候補として挙げられる。中でも糖質は、生体維持のエネルギー源から細胞認識を司る鍵化合物まで多岐にわたる機能を果たし、欠くことのできない物質であるという認識がますます高まってきている。これに呼応して糖質の機能を精査に解明しようとする研究や、糖質を出発原料として化学的、生化学的な手法による修飾を加え、有用な機能を引き出そうという試みが盛んになされるようになってきた。後者の検討では、ネブラスカ州立大のグループが中心となり、糖残基を親水性のポリオール骨格としてとらえ、ここに疎水性の脂肪酸をエステル結合させることにより新規な界面活性剤を産み出したことを産業上の有効な利用例として挙げるができる。この化合物群は低毒性でありFDA(Food and Drug Administration)より食品添加が認められたことを見ても時代の要求に適した選択であ

ることがうかがわれる。

著者は、広島大学工学部の岡井研究室配属時に糖およびアミノ酸をキーワードとしてテーマ設定を行なうよう恩師の指示を受け、天然にはその存在が稀であるアミノ酸の糖エステルすなわちアミノアシル化糖に着目した。この化合物は通常のエステル加水分解条件にて分解される他に、ある種の蛋白分解酵素によっても加水分解が可能であり、糖質の化学合成の際に必須である保護基として使用した場合に、生化学的な手法による脱保護という新たな方法論を提供することができた。その後、この化合物自身が有する生理活性へと検討が拡大され、田村らによって提唱されている甘味発現の必須構造に従って分子設計を行なった結果、ショ糖の数十倍の域値を有する新たな甘味物質としての特性が明かとなった。このことは、本研究の骨子である「ある種の官能基を導入することで糖質は様々な有用物質へ変化させうる潜在能力を持っている」ということを強く印象付けるきっかけとなった。

著者はこの後、日本精化株式会社に入社するが、新規中間製品の開発を担当するにあたりさいわいにも既存の製品群にとらわれることなく探索を実行する機会を与えられた。そこで、これまでの知見を実証すべく糖質への官能基の導入とその機能開発をテーマとして企画し、産業上有用な糖質誘導体の開発をスタートした。

糖質の被修飾素材としての利用は他の2つの生体構成成分と比較して著しく遅れているといっても過言では無いだろう。この要因を分析すると最終的には合成の煩雑さという課題に到達する。反応性の類似した水酸基が複数ありしかも使用できる溶媒が限られている、構造が複雑であり均質な誘導体が得られ難いといった要素が災いして、代表的な修飾方法であるグリコシル化を例にとっても、20世紀初頭に報告された方法論が未だに主流をなしており、プラクティカルな面での改良にあまり注意が向けられていないという現状がある。また、この遠因には魅力ある合成のターゲットに乏しいとい

うことも付加される。しかし、シュガーエステル の例からも推測されたように糖に官能基を導入することは、その官能基が有する毒性を低減する、親水性を付与する延いては生体に対する親和性を向上させる手段として極めて優れた方法ということが理解できる。従って、産業上も有用な糖誘導体を産み出すという命題には合成方法の改良と機能開発という2面からのアプローチが必須であった。

本論文ではこの観点に立って、触媒を探索することによって簡便かつスケールアップが容易な合成方法を開発すること、およびその方法論によって調製される糖誘導体の有用な特性を引き出すことを目的としている。

本論文は3つの章からなり、序章ではこの一連の研究の基礎となったアミノアシル化誘導体の合成と保護基としての機能を明かにした。次いで1章においてはヘテロポリ酸というこれまでグリコシル化には適用例が無い触媒を用いることによって容易にグリコシドが調製できることを明かにし、主として界面化学的な検討により蛋白に対する緩和な作用を実証した。また、第二章では、この検討で新たに調製が可能となった重合性基を有するグリコシドについて、その重合特性とポリマーの有用な機能を生体材料との相互作用から明かにした。

本研究に見られるように、適切と思われる被修飾対象素材を予測し、その修飾方法と同時に機能を検証していく一連の取り組みが素材設計を行なっていく上でもっとも確実な手段であること、また、安全な素材を開発するという実地的な要求に答えるための有効な手段であることを実証した。

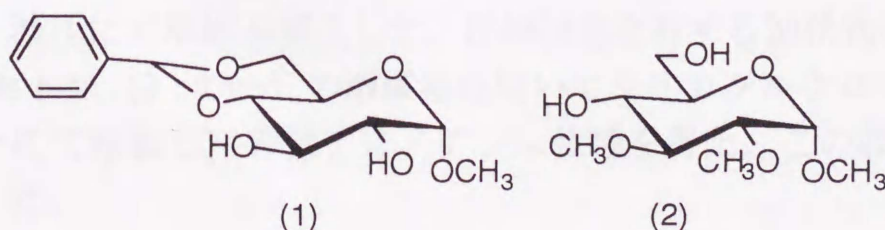
第一節 緒論

糖およびアミノ酸よりなる複合化合物は自然界に広く存在することが知られており、糖ペプチド（タンパク）がその代表として挙げられる。これらの化合物はセリンの側鎖水酸基を介して糖とグリコシド結合しているか、アスパラギンを介したN-グリコシドが大半である。一方、この二つの生体構成物質の組み合わせの中で一見最も一般的な結合様式と思われるエステル結合を有する誘導体、すなわち、アミノアシル化糖の存在は非常に稀であり、この誘導体の物性や生理活性に興味を持たれる。

本研究では遊離水酸基を有する数種の糖モデルに対してアミノアシル化条件を検討することを皮切りに、得られたアミノアシル化糖の分解条件の検討、アミノアシル化糖の呈味についての検討を行なった。本章では特異な脱離条件を有する糖水酸基の新たなタイプの保護基としての機能を中心に報告する。

第二節 糖モデルの合成

アミノアシル基を導入する糖モデルとしてはMethyl 4,6-O-benzylidene- α -D-glucopyranoside(1)およびMethyl 2,3-di-O-methyl- α -D-glucopyranoside(2)を導入、脱離時における糖水酸基の反応性差による選択性あるいは位置選択性の有無を検討するために選択した。



これらの糖モデルの合成は、無水グルコースを大過剰の無水メ

タノール性塩酸中でリフラックスしてMethyl α -D-glucopyranosideとした後、塩化亜鉛触媒存在下にベンズアルデヒドを作用させて化合物(1)へ導いた。化合物(2)は(1)を酸化銀存在下にヨウ化メチルを用いてC2およびC3位の水酸基をメチルエーテル化後、90%酢酸によりアセタール保護基を除去して得た。それぞれの化合物の同定は融点、比旋光度、スペクトルデータを文献値と比較することにより行ない¹⁻³⁾、いずれも液体クロマトグラフィーにて不純物が検出されない純度の結晶を得た。

第三節 アミノアシル化糖の合成

アミノアシル化糖の合成は、基本的にはウレタン型N-保護アミノ酸と糖モデルとをDCCにより縮合することにより行なった。まず、アミノアシル基の導入の容易さを考察するため、図1に示したように中性、酸性および塩基性アミノ酸の導入の予備評価を試みた。典型的な反応操作を以下に示す。

糖モデル1あるいは2(0.5mmol)およびDMAP(16mg)をクロロホルム(2ml)に溶解し、ここに常法により合成した⁴⁻⁵⁾、Z-あるいはBoc-アミノ酸(1.5mmol)およびDCC(309mg)のクロロホルム(2ml)溶液を攪拌下に室温にて滴下し、攪拌をさらに4時間継続した。生成したDCUreaを濾去し、濾液は減圧濃縮した。得られた残渣を酢酸エチルに溶解し、これを4%炭酸水素ナトリウム水溶液、4%クエン酸、水の順で洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウム上で乾燥した後、減圧にて溶媒を留去した。目的物を含有する油状物をベンゼン-アセトン(9:1 v/v)の溶媒系を用いてシリカゲルクロマトグラフィーにて精製しN-保護アミノアシル化糖を得た。この収率を表1に示した。

Val、Ile等の側鎖立体障害の大きなアミノ酸を除いて、本条件下で比較的容易に糖モデルの遊離水酸基に定量的に導入することが

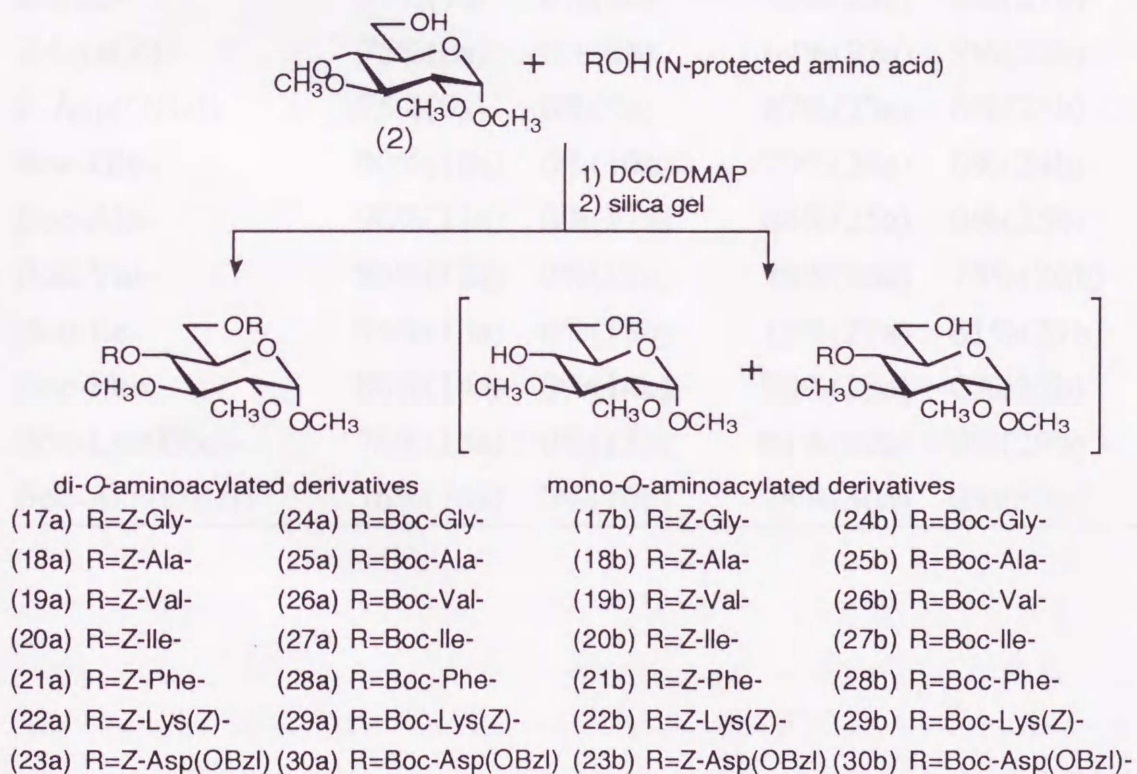
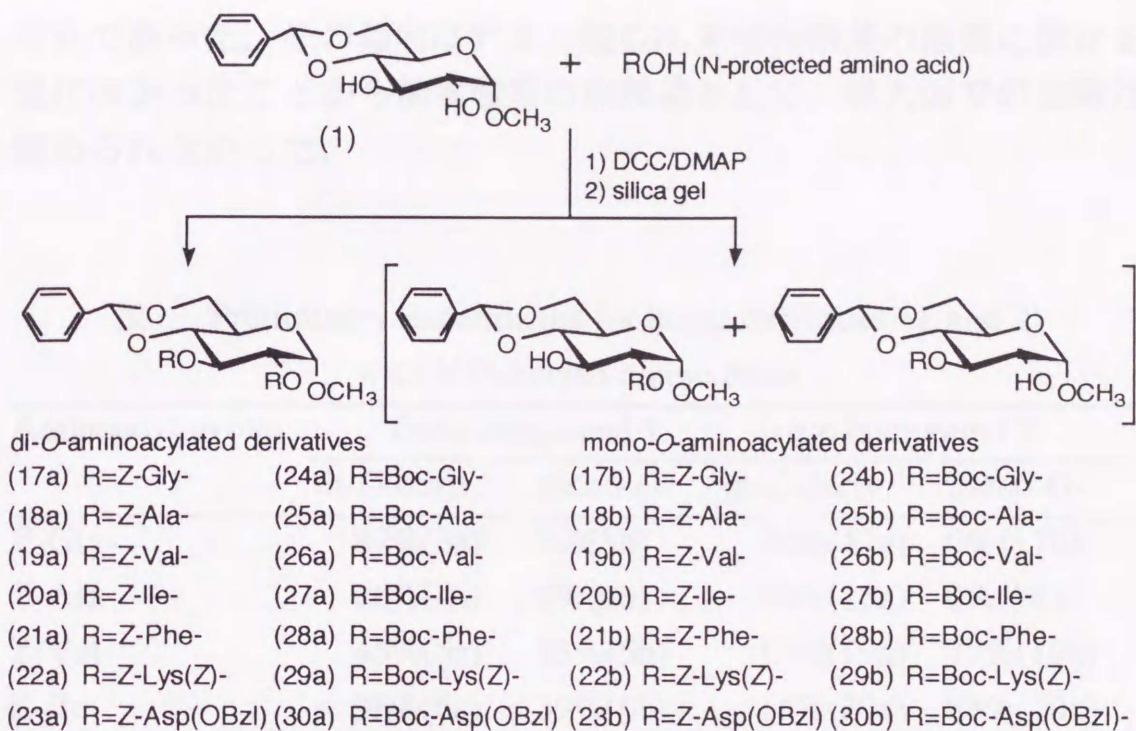


図1 N-保護アミノ酸の糖モデルへの導入

可能であった、その傾向はアミノ酸のN-末端保護基の種類に依存を受けなかったことから糖水酸基の保護基として、導入面での支障は認められなかった。

表1 Preliminary experiments for sugar derivatives (1 and 2)
with N-Protected amino acids

| Aminoacyl group | from compound 1 | | from compound 2 | |
|-----------------|----------------------|------------------|----------------------|------------------|
| | di- <i>O</i> -deriv. | mono- <i>O</i> - | di- <i>O</i> -deriv. | mono- <i>O</i> - |
| Z-Gly- | 87%(3a) | 0%(3b) | 72%(17a) | 0%(17b) |
| Z-Ala- | 86%(4a) | 0%(4b) | 76%(18a) | 0%(18b) |
| Z-Val- | 45%(5a) | 33%(5b) | 17%(19a) | 77%(19b) |
| Z-Ile- | 38%(6a) | 39%(6b) | 14%(20a) | 83%(20b) |
| Z-Phe- | 77%(7a) | 0%(7b) | 89%(21a) | 0%(21b) |
| Z-Lys(Z)- | 75%(8a) | 0%(8b) | 64%(22a) | 8%(22b) |
| Z-Asp(OBzl)- | 75%(9a) | 0%(9b) | 67%(23a) | 6%(23b) |
| Boc-Gly- | 90%(10a) | 0%(10b) | 79%(24a) | 0%(24b) |
| Boc-Ala- | 90%(11a) | 0%(11b) | 84%(25a) | 0%(25b) |
| Boc-Val- | 86%(12a) | 0%(12b) | 20%(26a) | 75%(26b) |
| Boc-Ile- | 74%(13a) | 0%(13b) | 15%(27a) | 81%(27b) |
| Boc-Phe- | 80%(14a) | 0%(14b) | 90%(28a) | 0%(28b) |
| Boc-Lys(Boc)- | 78%(15a) | 0%(15b) | 81%(29a) | 0%(29b) |
| Boc-Asp(OBzl)- | 76%(16a) | 0%(16b) | 78%(30a) | 0%(30b) |

次に、図2および図3に示したように量的スケールでの合成を行なった。N-保護アミノ酸と糖モデルとの縮合は基本的に予備評価と同一であるが、目的物の精製はクロマトグラフィーによらず、エーテル-石油エーテルにて結晶化することによって行なった。化合物31、32、33、34、および35はこの方法により微細な粉末として得られた。これらの化合物は90%の酢酸中、75°Cで2.5時間加熱しアセタール保護基を脱離して無色の油状物を得た後、更にパラジウム黒存在下に接触還元を行なって化合物45、46、49、50、51を得た。

Boc-基を有する誘導体36、37、38、39、40、41は糖モデル1と相当するBoc-アミノ酸から容易に調製され、塩酸を含有するジオキサン中で処理することでダイレクトに化合物45、46、49、50、51が得られた。

化合物42は糖モデル1とBoc-Asp(OBzl)-OHとを縮合したのち、酸分解-接触還元あるいは接触還元-酸分解により調製された。同様の方法にて図に示した化合物の合成を行った。それぞれの化合物の収率、融点、比旋光度、赤外吸収スペクトル、元素分析を表2に示した。

第四節 アミノアシル化糖のアルカリによる加水分解

アミノアシル化糖は基本的に糖のアシル保護誘導体に分類することができる。従って前節で調製したアミノアシル化糖のアルカリ加水分解による脱離状況をまず考察した。アスパラギン酸誘導体を除く各アミノアシル化糖(0.2mmol)の水溶液に対して1/10当量のN-メチルモルホリンを添加し、続いてエステル結合あたり1.2当量、総量として2.4当量の1M-NaOHを加え、この混合物を室温に保った。加水分解状況はTLC(Merck60 F254, 展開溶媒n-butanol-acetic acid-pyridine-water=4:1:1:2)にてモニターし、2つのアミノアシル基が完全に脱離するのに要する時間を比較した。この結果を表3に

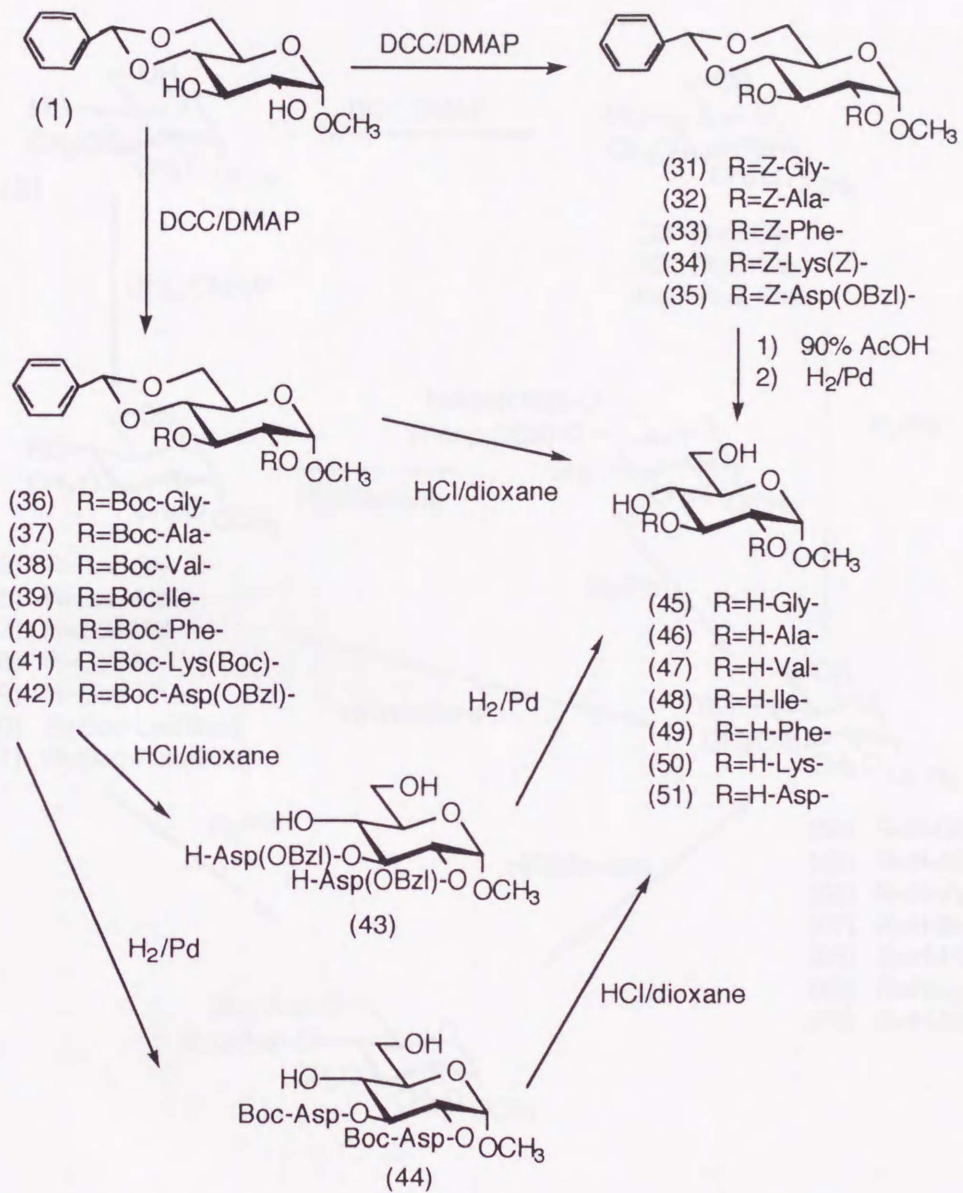


图2 合成甲基 2,3-二-O-氨基酰- α -D-葡萄糖苷。

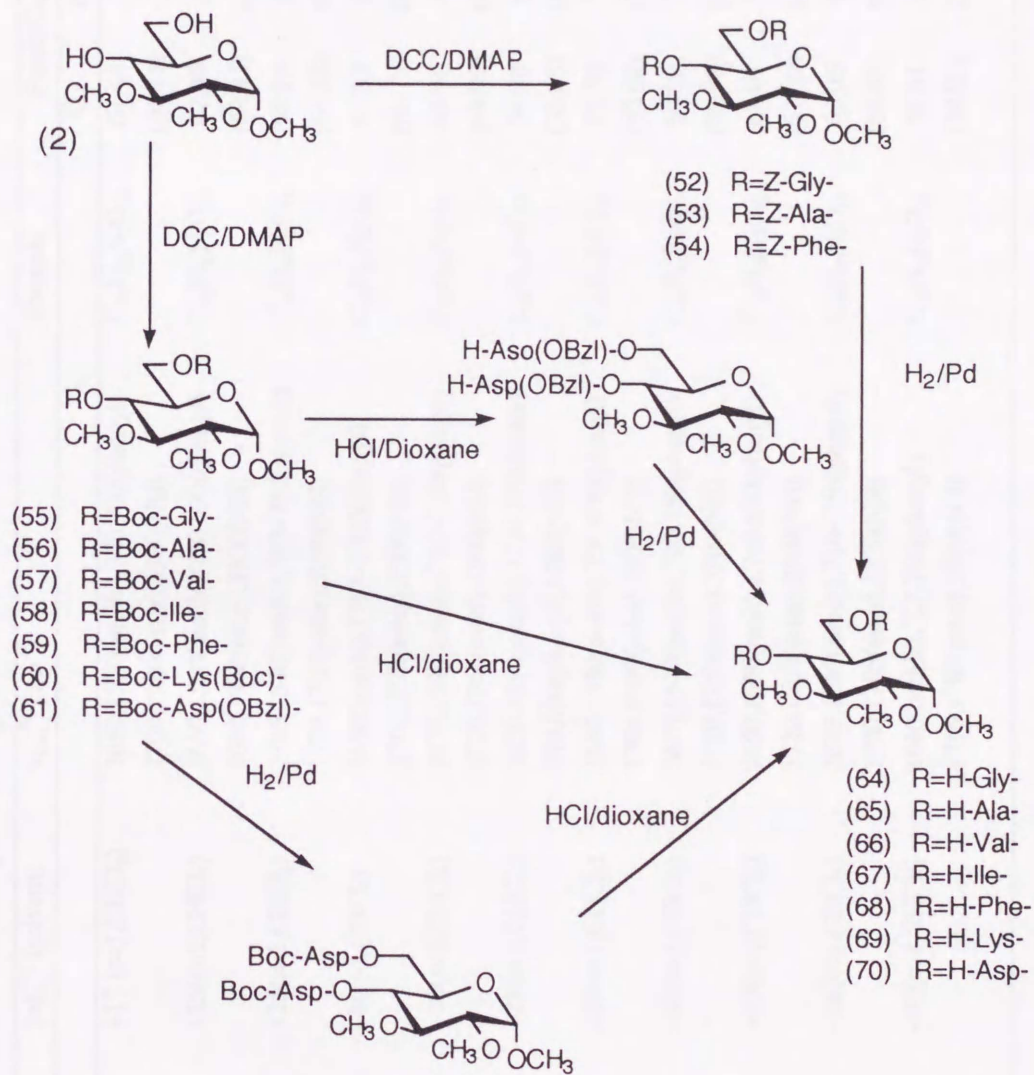


图3 合成甲基 4,6-二-O-氨基酰-2,3-二-O-甲基- α -D-葡萄糖苷。

表2 Yield and analytical data of *O*-aminoacylated sugars

| Compound No. | Yield(%) | mp(°C) | $[\alpha]_D^{25}$ (solvent) | ν_{\max}^{KBr} (cm ⁻¹) | Formula | Found(Calcd.)(%) | C | H | N |
|--------------|----------|---------|-------------------------------|--|--|------------------|----------------|----------------|---|
| 31 | 82 | 69~70 | +17 (c=1, CHCl ₃) | 1650, 1550(amide), 760, 700(phenyl) 1700, 1980(ester), 3300(NH) | C ₃₄ H ₃₆ N ₂ O ₁₂ | 61.44 (61.44) | 5.80 (5.72) | 4.22 (4.19) | |
| 32 | 80 | 62~63 | +25 (c=1, CHCl ₃) | 1650, 1550(amide), 750, 690(phenyl) 1690, 1980(ester), 3300(NH) | C ₃₆ H ₄₀ N ₂ O ₁₂ | 62.39 (62.42) | 5.80 (5.82) | 4.06 (4.05) | |
| 33 | 71 | 180~181 | +25 (c=1, CHCl ₃) | 1765, 1540(amide), 710~750(phenyl) 1720, 1755(ester), 3290(NH) | C ₄₄ H ₄₈ N ₂ O ₁₂ | 66.36 (66.32) | 6.03 (6.02) | 3.52 (3.52) | |
| 34 | 69 | 126~128 | +8 (c=1, CHCl ₃) | 1650(amide), 1717~1760(phenyl) 1710, 1770(ester), 3300(NH) | C ₅₈ H ₆₆ N ₄ O ₁₆ | 64.83 (64.79) | 6.16 (6.19) | 5.12 (5.12) | |
| 35 | 68 | 126~127 | +18 (c=1, CHCl ₃) | 1670, 1540(amide), 710~750(phenyl) 1720, 1760(ester), 3300(NH) | C ₅₅ H ₅₂ N ₂ O ₁₆ | 64.96 (64.99) | 5.45 (5.45) | 2.90 (2.92) | |
| 36 | 86 | 88~90 | +21 (c=1, CHCl ₃) | 1650, 1550(amide), 1720, 1700(ester) 740, 690(phenyl), 3280(NH) | C ₂₈ H ₄₀ N ₂ O ₁₂ | 56.98 (56.05) | 6.71 (6.58) | 4.66 (4.61) | |
| 37 | 85 | 85~87 | +24 (c=1, CHCl ₃) | 1650, 1550(amide), 750, 690(phenyl) 1700, 1980(ester), 3300(NH) | C ₃₀ H ₄₄ N ₂ O ₁₂ | 57.70 (57.68) | 7.11 (7.10) | 4.47 (4.49) | |
| 38 | 79 | 160~162 | +31 (c=1, CHCl ₃) | 1670, 1540(amide), 720, 750(phenyl) 1720, 1750(ester), 3300(NH) | C ₃₄ H ₅₂ N ₂ O ₁₂ | 60.00 (59.98) | 7.67 (7.70) | 4.11 (4.12) | |
| 39 | 69 | 88~90 | +10 (c=1, CHCl ₃) | 1650, 1550(amide), 740, 690(phenyl) 1720, 1700(ester), 3300(NH) | C ₃₆ H ₅₆ N ₂ O ₁₂ | 61.04 (61.00) | 7.93 (7.96) | 3.94 (3.95) | |
| 40 | 79 | 97~100 | +31 (c=1, CHCl ₃) | 1675, 1540(amide), 710~750(phenyl) 1720, 1755(ester), 3290(NH) | C ₄₂ H ₅₂ N ₂ O ₁₂ | 65.05 (64.83) | 6.56 (6.75) | 3.58 (3.61) | |
| 41 | 77 | 84~86 | +30 (c=1, CHCl ₃) | 1640(amide), 725, 760(phenyl) 1715, 1780(ester), 3300(NH) | C ₄₆ H ₇₄ N ₄ O ₁₆ | 58.61 (58.83) | 8.46 (7.94) | 5.78 (5.97) | |

示した。

汎用される保護基であるアセチル基が切断に要する時間を100として相対比較を行なうと、グリシン、アラニンなど炭素数の少ないアミノ酸残基を有する誘導体は比較的短時間で脱保護され、側鎖立体障害の大きいバリン、イソロイシン残基を有する誘導体は加水分解に対する抵抗性を示した。これらの切断に要する時間を直鎖アシル基のそれと比較するとグリシン、アラニン、リジン残基ではプロピオニルないしはブタノイル基と同等であり、フェニルアラニン、アスパラギン酸残基はヘキサノイル残基に相当する。しかしながら、いずれのアミノアシル基も5時間以内で完全に脱離が完了しており、本質的にアルカリによる脱保護が可能であった。

この中で、化合物45~51については(1.00g)のスケールにてアルカリ加水分解を行ない、糖モデルの回収状況を考察した。相対比較を行ったのと同条件にて加水分解した後、この反応液を陽イオン交換樹脂(Amberlite CG-120, H⁺ form, 1.2cm i.d. x 50cm)のカラムに導入し、さらに水洗を行った。溶出画分を濃縮した結果Methyl α -D-glucopyranosideがほぼ定量的に回収された。

一方、酸条件下での安定性を考察する目的で2M-HClをエステル結合に対して10当量含有する水溶液に室温で24時間静置したエステル結合の切断は認められなかった。以上の結果から糖水酸基に導入されたアミノアシル基の酸、アルカリに対する挙動は、本質的に従来用いられているアセチル基やベンゾイル基などアシル型保護基と類似していると言えるだろう。

第五節 アミノアシル化糖の蛋白分解酵素による加水分解

ある種の蛋白分解酵素がアミノ酸エステルあるいはペプチドエステルをアミド結合同様に加水分解する活性を有することは良く知られている。また、酵素による加水分解は、化学的な処理と比較

表3 Times for complete hydrolysis of *O*-aminoacyl sugars

| OH position | Acyl | Comp. No. | Time(min) | Relative rate |
|--------------------|--------------|-----------|-----------|---------------|
| 2,3-di- <i>O</i> - | Acetyl | | 40 | 100 |
| | Glycyl | (45) | 70 | 57 |
| | Alanyl | (46) | 90 | 44 |
| | Valyl | (47) | 240 | 17 |
| | Isoleucyl | (48) | 225 | 18 |
| | Phenylalanyl | (49) | 120 | 33 |
| | Lysyl | (50) | 90 | 44 |
| | Aspartyl | (51) | 130 | 31 |
| 4,6-di- <i>O</i> - | Acetyl | | 60 | 67 |
| | Glycyl | (64) | 120 | 33 |
| | Alanyl | (65) | 130 | 31 |
| | Valyl | (66) | 310 | 13 |
| | Isoleucyl | (67) | 260 | 15 |
| | Phenylalanyl | (68) | 180 | 22 |
| | Lysyl | (69) | 160 | 25 |
| | Aspartyl | (70) | 200 | 20 |

して選択性が高く、温和な条件で進行するため合成の手法として用いた場合に対象化合物を変性させ難いという利点が予想される。そこで、第三節で述べたアミノアシル化糖について酵素的な加水分解による脱保護を試みた。この検討では、基質特異性がブロードな酵素としてプロナーゼE、ペプシン、パパインを、また、基質特異性がシャープな酵素としてトリプシン、キモトリプシンを選択した。

まず、C2、C3位にアミノアシル基を有する糖誘導体45~51の7種について、プロナーゼEを用いての加水分解を行った。各アミノアシル化糖(100mg)を塩化カルシウムを含有する0.5M Tris-HCl緩衝液(pH8.0, 4.00ml)に溶解し、ここに1.0%のプロナーゼE溶液(0.2ml)を加えて20mlにメスアップ後、37°Cでインキュベートした。経時的に加水分解の状況をTL Cおよび遊離アミノ酸定量により考察し、その結果を図4に示した。

この検討で用いた6種のアミノアシル化糖のうち、アスパラギン酸残基を有する51を除いて約4時間で完全に加水分解が終了した。一方、パパイン、ペプシンを用いた脱保護では、それぞれの酵素の至適条件にて加水分解を試みたが、完全にアミノアシル基を遊離させることは困難であった。

次に、基質特異性のシャープな酵素であるトリプシン、キモトリプシンを用いて化合物45、49、および50の加水分解を行った結果を図5および図6に示した。両酵素ともに対象となる基質であるリジン誘導体あるいはフェニルアラニン誘導体のみを選択的に加水分解し、基質特異性がこの脱保護場面においても機能することが示唆された。このことは同一分子内に異なる基質特異性のアミノアシル基を有する誘導体の場合、選択的な脱保護が可能であることを意味する。そこで、Methyl 4,6-di-O-glycyl-2,3-di-O-phenylalanyl- α -D-glucopyranoside(73)を化合物33から3ステップで合成し、これにキモトリプシンを作用させた。酵素反応液は活性炭処理にて蛋白を除去した後、陰イオン交換樹脂(Amberlite CG-400)を通し、目的である

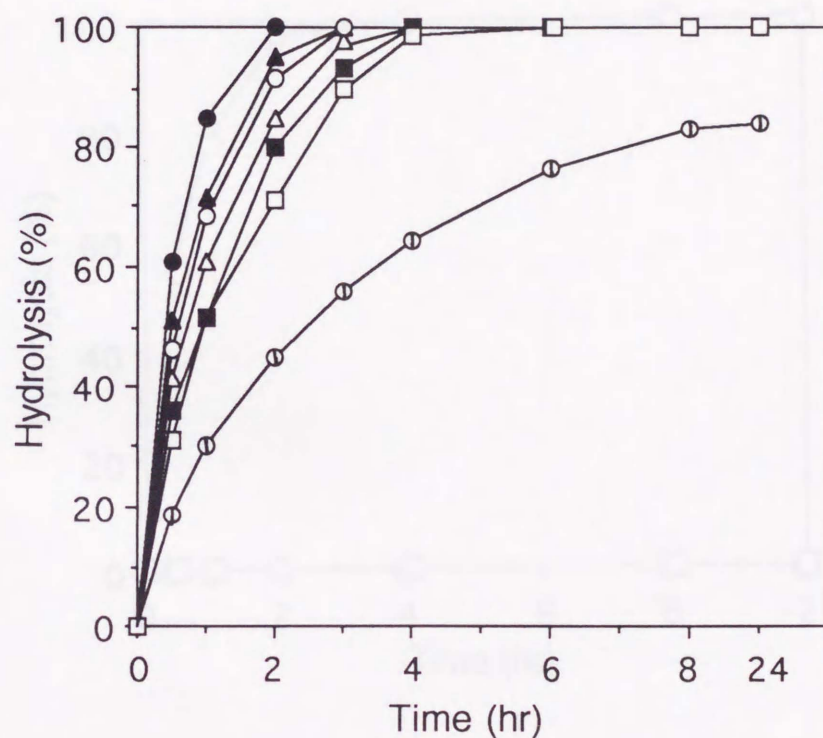
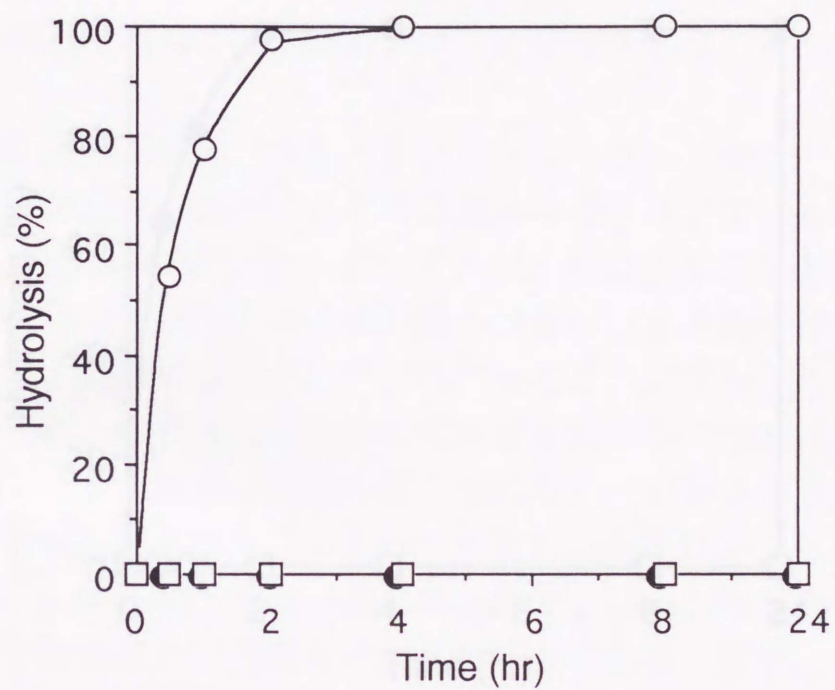


図4 Enzymatic hydrolysis of *O*-aminoacyl sugars by pronase E.
 (□) 2,3-di-*O*-Gly-(45), (■) 2,3-di-*O*-Ala-(46), (△) 2,3-di-*O*-Val-(47),
 (▲) 2,3-di-*O*-Ile-(48), (●) 2,3-di-*O*-Phe-(49), (○) 2,3-di-*O*-Lys-(50),
 (⊖) 2,3-di-*O*-Asp-(51).



⊠5 Enzymatic hydrolysis of *O*-aminoacyl sugars by trypsin.
 (□) 2,3-di-*O*-Gly-(45), (●) 2,3-di-*O*-Phe-(49), (○) 2,3-di-*O*-Lys-(50).

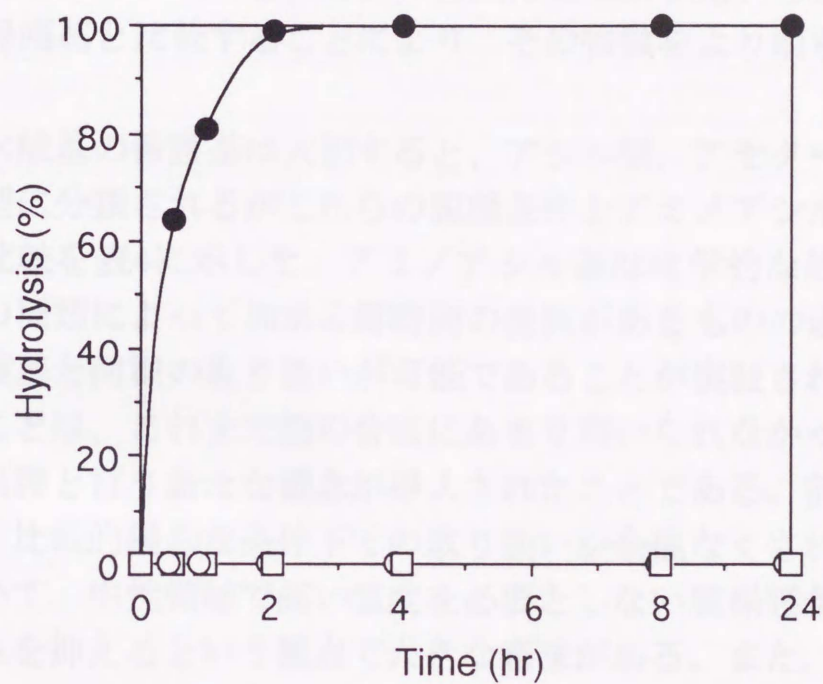


図6 Enzymatic hydrolysis of *O*-aminoacyl sugars by chymotrypsin.
 (□) 2,3-di-*O*-Gly-(45), (●) 2,3-di-*O*-Phe-(49), (○) 2,3-di-*O*-Lys-(50).

Methyl 4,6-di-Oglycyl- α -D-glucopyranosideを82%の収率で回収し、選択的な脱保護が可能であることが証明された。

第六節 糖水酸基保護基としての機能

第四節および第五節でアミノアシル化糖の脱離条件について詳細を検討したが、この結果を糖の合成に従来より用いられている水酸基の保護基と比較することにより、その特徴をより明らかにしてみたい。

糖水酸基の保護基は大別すると、アシル型、アセタール型、エーテル型に分類されるがこれらの脱離条件とアミノアシル基の脱離条件の比較を表4に示した。アミノアシル基は化学的な処理においてはその種類によって加水分解時間の差異があるものの通常のアシル型保護基と同様の取り扱いが可能であることが実証された。より重要なことは、これまで糖の合成にあまり用いられなかった生化学的な脱保護と言う新たな概念が導入されたことである。前節でも述べたが、比較的緩和な条件下での取り扱いが余儀なくされる糖の合成において、中性領域で高い温度を必要としない脱保護条件は目的物の変性を抑えるという観点で大きな意味がある。また、化学的な条件では同一の働きをする保護基であっても、酵素の基質特異性を利用することで別々に脱保護できるという利点も新たに見いだされた。さらに、アミノアシル化糖はイオン性基を有するため、中性の糖誘導体の合成においてもこれを利用した分離、同定手段として用いることも可能であろう。

表4 Comparison of the deblocking conditions between aminoacyl and usual protecting groups

| Protecting group | Deblocking conditions | | | | | |
|------------------|-----------------------|----------------|--------------------|----------|--------------|---------|
| | OH | H ⁺ | H ₂ /Pd | PronaseE | Chymotrypsin | Trypsin |
| Acetyl | ++ | ± | - | - | - | - |
| Benzoyl | ++ | - | - | - | - | - |
| Benzyl | - | - | ++ | - | - | - |
| Benzylidene | - | ++ | + | - | - | - |
| Tryl | - | ++ | - | - | - | - |
| Glycyl | ++ | - | - | + | - | - |
| Alanyl | ++ | - | - | + | - | - |
| Valyl | + | - | - | + | - | - |
| Isoleucyl | + | - | - | + | - | - |
| Phenylalanyl | + | - | - | + | ++ | - |
| Lysyl | + | - | - | + | - | ++ |
| Aspartyl | + | - | - | ± | - | - |

第七節 アミノアシル化糖の呈味挙動

これまでの各節ではアミノアシル化糖の糖水酸基の保護基としての特性について述べたが、次のステップとしてこの誘導体自身の機能、とりわけ生理活性という面に興味を持たれた。物質を構成する要素から考えるとこのタイプの化合物が天然に存在しそうなことは容易に類推できるし、不安定が故に存在し得ないということは著者らのこれまでの検討により否定される。しかし、実際にはその存在が稀であり、新たな機能を見いだすことが可能であると推定した。

生理活性の検討の中で、まず着目したのは呈味物質としての挙動である。これまで著者の所属した研究室ではアミノ酸、およびペプチドに関する呈味挙動解析の蓄積があり、構造相関が類推できるというのが一因である。それにも増して基本的に甘味物質である糖に官能基が導入されたことで糖骨格とは比較にならない甘味強度を有する物質がグリチルリチンを始めとして天然に数多く見つまっていることや、親水性ドメインを導入することで不溶性アグリコンを可溶化し、その呈味を検討することができるという着想に基づいている。

本検討については既に田村らによりその詳細が報告されているため、得られた結果のみを表5～8にまとめた⁶⁻¹¹⁾。この結果から以下のことが明かとなった。

- 1) アミノアシル化糖はいずれも呈味を有している。
- 2) アミノ酸側鎖の炭素数と呈味との間には相関が認められ、鎖長の増加とともに呈味は甘味から苦味に転ずる。
- 3) モル濃度比較においてショ糖の約16倍の甘味域値を有する誘導体およびカフェインの500倍の苦味域値を有する誘導体が見いだされた。

これらの化合物は代謝系では容易に加水分解することが予想さ

表5 Tastes of Methyl 2,3-di-*O*-aminoacyl- α -D-glucofuranosides

| Compound (2,3-substituent) | Taste | T.V. (mM) ^a | Note ^b |
|-------------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------------|
| (H-Gly-) | Sweet | 2.10 | <i>R</i> _{suc} = 2.3 |
| (H-Ala-) | Sweet | 0.32 | <i>R</i> _{suc} = 15.6 |
| (H-Val-) | Sweet | 0.41 | <i>R</i> _{suc} = 12.2 |
| (H-Leu-) | Bitter | 0.08 | <i>R</i> _{caf} = 12.5 |
| (H-Ile-) | Bitter/Sweet ^c | 0.20 | |
| (H-Tle-) | Bitter | 0.18 | <i>R</i> _{caf} = 5.6 |
| (H-Phe-) | Bitter | 0.05 | <i>R</i> _{caf} = 20.0 |
| (H-D-Phe-) | Bitter/Sweet ^c | 0.12 | |
| (H-Pro-) | Sweet | 1.50 | <i>R</i> _{suc} = 3.3 |
| (H-Lys-) | Umami ^d | 0.50 | |
| (H-Orn-) | Umami ^d | 0.20 | |
| (H-Tyr-) | Bitter | 0.04 | <i>R</i> _{caf} = 25.0 |
| (H-Thr-) | Bitter/Sweet ^c | 0.70 | |
| (H-Asp-) | Sour/Sweet ^e | 0.10 | |
| (H-Asp(OBzl)-) | Bitter | 0.12 | <i>R</i> _{caf} = 8.3 |
| (H-Glu(OBzl)-) | Bitter | 0.10 | <i>R</i> _{caf} = 10.0 |

a Threshold value.

b *R*_{suc}, ratio to the value of sucrose; *R*_{caf}, ratio to the value of caffeine.

c Bitter taste with weakly sweet taste.

d Monosodium glutamate-like taste.

e Sour taste with sweet taste.

表6 Taste of *O*-aminoacyl sugars composed of phenylalanine

| Compound | Taste | T.V. ^a (mM) | Rcaf ^b |
|---|--------|------------------------|-------------------|
| Methyl 2,3-di- <i>O</i> -(L-phenylalanyl)- α -D-glucopyranoside | Bitter | 0.05 | 20 |
| Methyl 2,3-di- <i>O</i> -(L-phenylalanyl- L-phenylalanyl)- α -D-glucopyranoside | Bitter | 0.003 | 333 |
| Methyl 2,3-di- <i>O</i> -(L-phenylalanyl- L-phenylalanyl-L-phenylalanyl)- α -D-glucopyranoside | Bitter | 0.002 | 500 |
| Methyl 2,3-di- <i>O</i> -(D-phenylalanyl)- α -D-glucopyranoside | Bitter | 0.12 | 8 |
| 3- <i>O</i> -(L-phenylalanyl)-D-glucose | Bitter | 0.09 | 11 |

a Threshold value. *b* Ratio to the value of caffeine.

表7 Taste of Methyl 2,3-di-*O*-aminoacyl- α -D-glucopyranoside
composed of neutral amino acids other than phenylalanine

| Compound | Taste | T.V. ^a (mM) | Rcaf ^b | Rsuc ^c |
|--|---------------------------|------------------------|-------------------|-------------------|
| Methyl 2,3-di- <i>O</i> -(L-leucyl)- α -D-glucopyranoside | Bitter | 0.08 | 12.5 | - |
| Methyl 2,3-di- <i>O</i> -(L-isoleucyl)- α -D-glucopyranoside | Sweet/Bitter ^d | 0.2 | - | - |
| Methyl 2,3-di- <i>O</i> -(L-valyl)- α -D-glucopyranoside | Sweet | 0.41 | - | 12.2 |
| Methyl 2,3-di- <i>O</i> -(L-alanyl)- α -D-glucopyranoside | Sweet | 0.32 | - | 15.6 |
| Methyl 2,3-di- <i>O</i> -glycyl- α -D-glucopyranoside | Sweet | 2.1 | - | 2.3 |

a Threshold value. *b* Ratio to the value of caffeine.

c Ratio to the value of sucrose. *d* Bitter taste with weak sweet taste.

表8 Tastes of *O*-aminoacyl sugars composed of L-alanine

| Compound | Taste | T.V. ^a (mM) |
|--|---------------------------|------------------------|
| Methyl 2,3-di- <i>O</i> -(L-alanyl)- α -D-glucopyranoside | Sweet | 0.32 |
| Methyl 2,3-di- <i>O</i> -(L-alanyl)- L-alanyl)- α -D-glucopyranoside | Sweet/Bitter ^b | 0.63 |
| Methyl 2,3-di- <i>O</i> -(D-alanyl)- α -D-glucopyranoside | Bitter | 0.18 |
| 3- <i>O</i> -(L-alanyl)-D-glucose | Sweet | 2.3 ^c |
| Methyl 2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -(L- alanyl)- α -D-glucopyranoside | Sweet | 2.3 ^c |

a Threshold value. *b* Bitter taste with weak sweet taste.

c The sweetness is about twice as strong as that of sucrose.

れ、また、分解されたものはいずれも我々が常食しているものであることから、安全性の高い新たな甘味料や調味料としての機能が期待される。

第八節 総括

アミノアシル化糖を合成しその特性を系統的に追跡した結果以下のことが明かとなった。第一にN-保護アミノ酸は種類を選択することにより糖の水酸基に定量的に導入することが可能である。すなわち導入という観点で従来のアシル型保護基と同様に取り扱いが可能である。第二に得られたアミノアシル化糖はアシル型保護基の脱離条件であるアルカリでの加水分解で容易に切断され、脱保護と言う側面においても差異なく使用することが可能である。これに加え

て、アミノ酸エステルを加水分解する活性を有する酵素を用いることにより温和な条件下で脱離が可能であるという新たな方法論が提供された。この生化学的な脱離に関しては、酵素の基質特異性を利用して、従来のアシル型保護基とアミノアシル基あるいは異なる複数のアミノアシル基の組み合わせで保護した糖誘導体から特定のアミノアシル基のみを選択的に脱離させるという手段が可能となった。

一方、この一連の化合物自身が有する生理活性としては、ショ糖の16倍の甘味域値を有する誘導体や強苦味物質が見いだされ、呈味物質として機能しうることが示唆された。

本章で著者らが指摘したいのは、このように比較的シンプルな修飾を糖に加えることで、予想以上の機能が期待できる点にある。糖を修飾するあるいは糖で修飾するという手段が親水性の導入を始めとして我々に多くのメリットを与えてくれる選択枝として産業上も重要な位置を占めることになろう。

第一章 ハテロポリシリケートによるシリコン化反応の概観

第一節 概観

最初に官能基を導入すると言うことを念頭に置いて考えてみると、中心の酸素の場合には本質的に水酸基との反応ということに集約される。従来にも同様のエスデル化やエーテル化が盛んであった。

第一章 アルキルおよびアリールグリコシド類の合成とその機能

が存在する。エーテル化やシリコン化などについてはこのシリケート結合により制御がつかない限り、液を蒸留していくことで反応を生成させる反応すなわちグリコシ化反応には避けて通ることのできな反応と捉えても過言ではないだろう。

シリコン化反応そのものの歴史は非常に長く、今世紀の始めには既に遊離の酸と遊離アルコールとの存在下に加熱するとグリコシドが生成することが知られていた¹⁾。以来この反応については様々な方法が提案され近年では相当複雑な構造を有するオリゴ糖も合成可能となってきた。これらの方法を大別すると第7の表のように集約されるが、ヘミアセタール状態をクロザン化した後、第2あるいは水酸基をスカルベンジャーとして用いてシリコンを導入する方法やトリフレーとのような遊離酸を用いて導入する方法が代表的例として挙げられる²⁾。しかし、「遊離酸を触媒として用いる」という観点からこれまで紹介された方法を眺めてみると非常に試薬を必要とするあるいは取り扱い、廃棄が困難な物質を使用するなど実用的なスケールに対応していく上で充分な足掛かりのものではなかった。

従来からは大量スケールにおいても合成が容易で安定性の高い糖の完全アシル保護が単体を触媒主体として、この化遊離酸の存在下にシリコンを導入するKobayashiらの方法が長年の目的に達していると言え³⁾。この反応における触媒を選択することによって新たな

第一項 ヘテロポリ酸触媒によるグリコシル化方法の開発

第一節 緒論

糖類に官能基を導入するということを突き詰めて考えてみると、中性の糖質の場合には本質的に水酸基との反応ということに集約される。前章にも関わるエステル化やエーテル化がまず思い浮かぶ訳であるが、糖質には別にアセタール結合が介在するグリコシド結合が存在する。オリゴ糖やポリサッカライドなどはいずれもこのグリコシド結合により単糖がつながっており、糖を修飾していく上でこの結合を生成させる反応すなわちグリコシル化反応は避けて通ることのできない反応といっても過言ではないだろう。

グリコシル化反応そのものの歴史は非常に古く、今世紀の始めには既に遊離の糖と低級アルコールとを酸の存在下に加熱するとグリコシドが生成することが知られていた¹²⁾。以来この反応については様々な方法が提案され近年では相当複雑な構造を有するオリゴ糖類も合成可能となってきた。これらの方法を大別すると図7のように集約されるが、ヘミアセタール炭素をハロゲン化した後、銀あるいは水銀をスカベンジャーとして用いてアグリコンを導入する方法やトリフレートのような超強酸を用いて導入する方法等が代表例として挙げられる¹³⁻¹⁹⁾。しかし、「糖誘導体を素材として用いる」という観点からこれまで開発された方法を眺めてみると高価な試薬を必要とするあるいは取り扱い、廃棄が困難な物質を使用するなど実用的なスケールに対応していく上で充分満足のいくものではなかった。

著者らは大量スケールにおいても合成が容易で安定性の高い糖の完全アシル保護誘導体を糖供与体として、ここに酸触媒の存在下にアグリコンを導入するHerferichらの方法が我々の目的に適していると考え²⁰⁾、この反応における触媒を選択することによって新たな

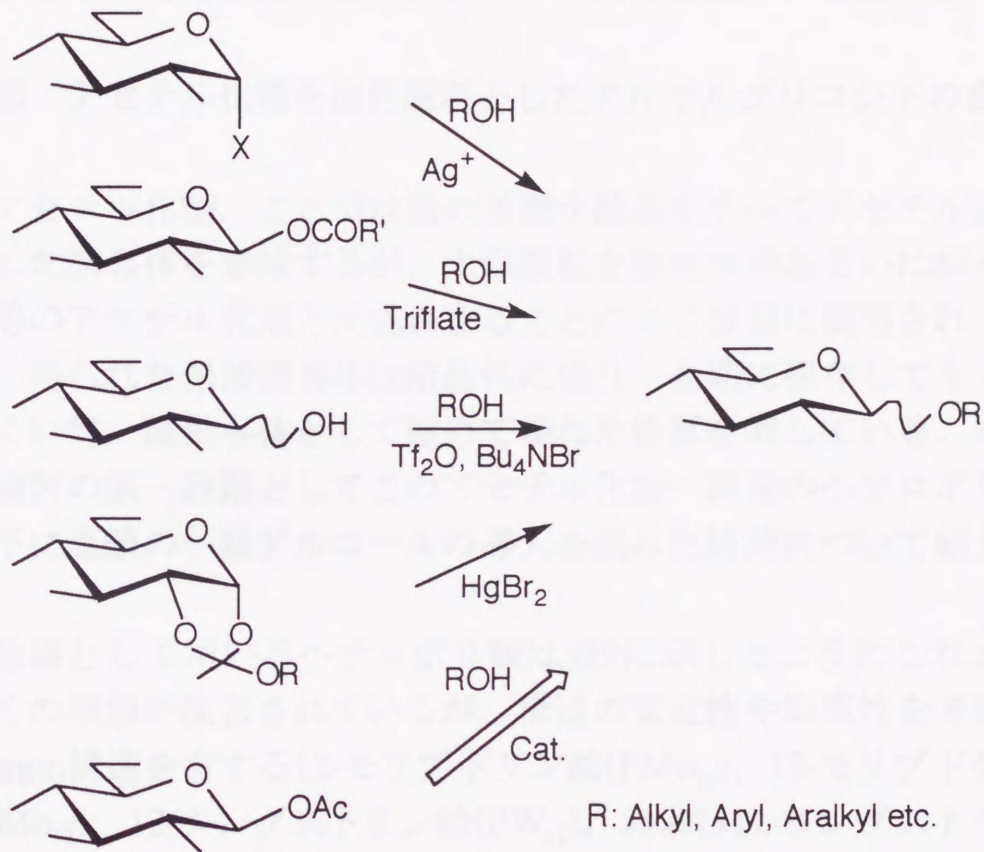


図7 Typical synthetic methods of glycoside.

方法論を提供することを試みた。

予備的な触媒のスクリーニングを行った際、従来この種の反応に用いられたことの無いヘテロポリ酸が各種のアグリコンの導入に対して優れた活性を示すことが示唆された²¹⁾。本項では、このヘテロポリ酸触媒を用いた各種のグリコシドの合成について述べる。

第二節 アセチル化糖を出発原料としたアルキルグリコシドの合成

アセチル化糖、ここでは糖の遊離水酸基をすべてアセチル基で保護した誘導体を意味するが、未保護糖を酸無水物あるいは酸ハライド等のアセチル化剤と反応させることにより容易に調製される。また、得られた保護誘導体は結晶性に優れ、長期に保存しても分解しにくい等、糖供与体として極めて優れた性質を有している。本節では検討の第一段階としてこのアセチル化糖へ数種のヘテロポリ酸存在下に直鎖の一級アルコールの導入を試みた結果について紹介する。

触媒として用いるヘテロポリ酸は表9に示したようにこれまで数多くの種類が報告されているが、構造の安定性や均質性を考慮してKeggin構造を有する12-モリブドリン酸(PMo_{12})、12-モリブドケイ酸(SiMo_{12})、12-タングストリン酸(PW_{12})、および12-タングストケイ酸(SiW_{12})を選択した²²⁾。

検討を行った際の反応条件を図8に示した。アセチル化糖に対して2当量の直鎖一級アルコールおよび0.2モル%のヘテロポリ酸をトルエン溶媒中で80℃にて2.5時間攪拌した。この反応液を4%の炭酸水素ナトリウム水溶液、次いで水にて洗浄し、有機層を減圧下に濃縮した。得られた油状物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（ヘキサン-酢酸エチル溶媒系）にて精製してアルキルグルコシドのテトラアセテートを得た。この際のグルコシドの単離収率、アノマー比率の例を表10に示した。アルキル基の鎖長が長くなるにつれ

表9 Some examples of heteropoly molybdates

| Composition | Typical hetero atoms | Formula |
|-------------|---|---|
| 1 : 12 | Type A (Keggin anion) | P^{5+}, Si^{4+} $[X^{n+}Mo_{12}O_{40}]^{(8-n)}$ |
| | Type B (Icosahedral) | Ce^{4+}, Th^{4+} $[X^{4+}Mo_{12}O_{42}]^{-8}$ |
| 1 : 11 | Keggin deform | P^{5+}, As^{5+}, Ge^{4+} $[X^{n+}Mo_{11}O_{39}]^{(12-n)}$ |
| 2 : 18 | Keggin analogue | P^{5+}, As^{5+} $[P_2Mo_{18}O_{62}]^{-6}$ |
| 1 : 9 | Asymmetric | Mn^{4+}, Ni^{4+} $[X^{4+}Mo_9O_{32}]^{-6}$ |
| 1 : 6 | Type A | Te^{5+}, I^{7+} $[X^{n+}Mo_6O_{24}]^{(12-n)}$ |
| | Type B | $Co^{3+}, Al^{3+}, Cr^{3+}$ $[X^{n+}Mo_6O_{24}H_6]^{-(6-n)}$ |
| 4 : 12 | | As^{5+} $[H_4As_4Mo_{12}O_{52}]^{-4}$ |
| 2 : 5 | | P^{5+} $[X_2Mo_5O_{23}]^{-6}$ |
| 1m : 6m | $Co^{2+}, Mn^{2+}, Cu^{2+}, Se^{4+}, As^{3+}$ | $[X^{n+}Mo_6O_x]^{m-(2x-36-n)}$ |

Typical Procedure

| | |
|--|-----------|
| Penta <i>O</i> -acetyl- β -D-glucopyranose | (100mmol) |
| 1-Alcohol | (200mmol) |
| Heteropoly acid | (0.2mmol) |
| Solvent | (50ml) |

Stirred at 80°C for 2.5 h

Washed with NaHCO₃ aq. soln. then water

Evaporation *in vacuo*

Purified on silica-gel chromatography
or solvent extraction

||
Alkyl 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-D-glucopyranoside

☒8 Heteropoly acid catalyzed glycosylation of some alcohols.

表10 Yield and anomer ratio of alkyl glucoside tetra acetates by heteropoly acid catalyzed glycosylation of 1-alcohols

| ROH | Catalyst | Yield ^a (%) | Anomer ratio ^b (α/β) |
|------------|--------------------|------------------------|--|
| Butyl- | PMo ₁₂ | 75 | 41/59 |
| Octyl- | ZnC ₁₂ | 46 | 73/27 |
| | <i>p</i> -TsOH | 19 | 46/54 |
| | PMo ₁₂ | 76 | 39/61 |
| | SiMo ₁₂ | 74 | 40/60 |
| | PW ₁₂ | 73 | 73/27 |
| | SiW ₁₂ | 71 | 75/25 |
| Hexadecyl- | PMo ₁₂ | 62 | 40/60 |

a Isolation yields of alkyl 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-D-glucopyranoside.

b Determined by ¹³C-NMR.

てアグリコンの求核性が低下するために長鎖アルキル基を用いた場合の収率低下は認められるが、ヘキサデカノールとの縮合においても60%以上の収率で目的物を与えた。収率に関してはこの検討で用いた4種のヘテロポリ酸間で大幅な差異は認められなかったが、生成したグルコシドのアノマー比率はヘテロポリ酸を構成するポリ原子に依存し、モリブデン系では反応速度論的に優位な β -アノマーを、また、タングステン系では熱力学的に優位な α -アノマーをそれぞれ多く与えた。

同一反応条件においてヘテロポリ酸を従来から用いられているパラトルエンスルホン酸や塩化亜鉛に換えて合成を実施すると特に長鎖アルコールでの収率低下が著しく、ヘテロポリ酸触媒の触媒活性の優位性が確認された。

この反応を単糖のアセチル化物のみならずグルコ系列のオリゴ糖であるマルトースやラクトースアセテートに対しても実施したがグルコースの場合と同様に従来の触媒と比較すると大幅な収率向上が認められた。この際、副反応として従来の触媒の欠点であった非還元末端糖の脱離がヘテロポリ酸を用いた場合に抑えられていることが新たに判明した。ヘテロポリアニオンのイオン半径は5 Åと従来の触媒と比較して非常に大きく、また、酸点が疎にある所謂ソフトな性質が生かされたものと推定している。

第三節 アセチル化糖を出発原料としたアリアルグリコシドの合成

Herferichらのアセチル化糖を糖供与体としたグリコシル化の方法は元々アリアルグリコシドの合成が目的であったが、前節のアルコールとの反応で収率の大幅な向上が認められたことから、この方法を、より求核性の高いアグリコンであるフェノール類とのグリコシル化へ拡大することを試みた。

方法は本質的には前節で述べたものと変わりはないが、

Herferichら熔融反応に準ずるためグリコールエーテル等の高沸点溶媒を用いて100~110°C、20mmHgの減圧下に生成する酢酸を留去しながら反応を行った。この場合の収率アノマー比率を表11に示したが、アルコールの場合とは異なりアグリコンの求核性が高いためか反応速度論的に優位なβ-アノマーが主生成物となり、特にその選択性が収率とともに優れていることが明かとなった。

天然物、特に植物中には各種のフェノール類グリコシドの存在が認められ、生薬などの有効成分として同定されてその機能が実際に利用されている²³⁾。これらは植物中でのアグリコンの貯蔵型として考えられるが、植物の生合成機能からも推定できるように大半がβ-グリコシドとして存在している。今後、これらの有用物質を化学的に大量に合成し利用する際にこのヘテロポリ酸触媒法は有利な方法といえることができるだろう。

第四節 グリコシル化反応に於けるヘテロポリ酸の酸強度変化とアノマー比に及ぼす影響

前二節の反応でヘテロポリ酸、特に有色化合物である12-モリブドリン酸は反応初期に黄色であったものが経時的にヘテロポリブルーと呼ばれる濃青色への変化を見せた。ヘテロポリ酸は穏やかな還元剤によって最大12電子の還元を受け、ヘテロポリブルーは還元の定性的確認方法として知られてる。また、還元によってヘテロポリ酸の酸強度が低下することが知られているためモデル系での酸強度変化を考察した。

オクタノール中に12-モリブドリン酸を溶解し80°Cで加熱しながら経時的に触媒を抽出してその酸強度変化を氷酢酸中でHammettの指示薬を用いて推定した。図9にその推定値を*p*-トルエンスルホン酸との対比でプロットしたが、反応初期には非常に強い酸強度を有しているが経時的に低下していることが示唆された。反応前後

表11 Glycosylation of some alcohols and phenols
with per-acetylated aldoses

| Aldose | ROH | Catalyst | Reaction time | Yield ^a | Anomer ^b | |
|-----------------|-------------------|-------------------|-------------------|--------------------|---------------------|---------|
| | | | (h) | (%) | (β/α) | |
| Glucose | 2-ethylhexyl | PMo ₁₂ | 3.0 | 72 | 61 : 39 | |
| | cyclohexyl | PMo ₁₂ | 4.0 | 66 | 59 : 41 | |
| | menthyl | pMo ₁₂ | 4.0 | 63 | 32 : 68 | |
| | benzyl | PMo ₁₂ | 2.0 | 78 | 68 : 32 | |
| | phenyl | | ZnCl ₂ | 0.5 | 52 | 77 : 23 |
| | | | ZnCl ₂ | 1.5 | 49 | 63 : 37 |
| | | | <i>p</i> -TsOH | 1.5 | 49 | 81 : 19 |
| | | | PMo ₁₂ | 0.5 | 69 | 96 : 4 |
| | | | PMo ₁₂ | 1.5 | 81 | 92 : 8 |
| | 4-nitrophenyl | PMo ₁₂ | 1.0 | 76 | 90 : 10 | |
| 4-hydroxyphenyl | PMo ₁₂ | 1.0 | 77 | 92 : 8 | | |
| Maltose | dodecyl | ZnCl ₂ | 2.0 | 38 | 33 : 67 | |
| | | PMo ₁₂ | 2.0 | 64 | 61 : 39 | |

a Isolation yields of anomer mixture of alkyl(aryl) 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-D-glycopyranoside.

b Determined by ¹³C-NMR.

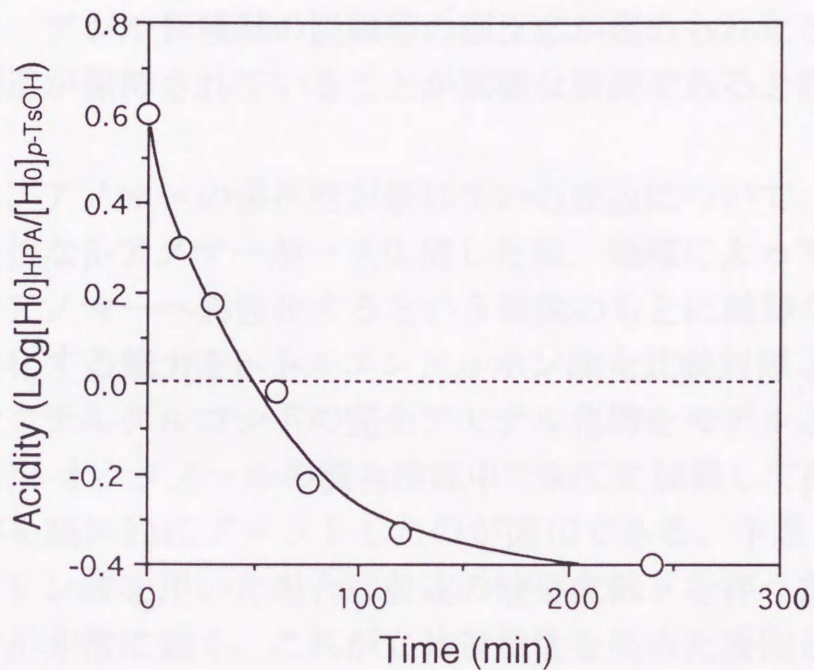


図9 Acidity conversion of HPA(PMo₁₂) in 1-octanol.

でのIRを比較してみると、特性吸収のP-Oコア、Mo-OターミナルおよびMo-O-Moブリッジが吸収強度の相対変化はあるものの保持されていること²⁴⁾、また、このモデル実験に使用した触媒を過酸化水素により酸化すると反応前の吸収に戻ることからKeggin構造を保持したまま徐々に還元を受けながら作用していると考えられる。さらに、12-モリブドリン酸とヘテロ原子、ポリ原子の組成が等しくなるよう金属酸化物を混合して第二節の反応に供したが収率は大幅に低下し、アシル保護基の脱離等の副反応が認められたことから本触媒の構造が保持されていることが重要な要素であると言えるだろう。

次に、アノマーの選択性が優れている要因について、反応速度論的に優位な β -アノマーが一旦生成した後、触媒によって熱力学的に安定なアノマーへ異性化するという仮説のもとに純粋な β -アノマーを異性化する能力を*p*-トルエンスルホン酸を比較対照として考察した。オクチルグルコシドの完全アセチル化物をモデルとし、これをトルエン-オクタノールの混合溶媒中で80°Cに加熱して β -アノマーの残存率を経時的にプロットしたのが図10である。予想どおり12-モリブドリン酸を用いた場合は前述の酸強度低下を伴うためか異性化の速度が非常に遅く、これが立体選択性を高めた要因と推定された。

第五節 1-チオグルコシドおよび1-チオマルトシドの合成

これまでの検討はO-グリコシドを合成するものに向けられていたが、グリコシド結合に介在する元素としてこの他にS、N、Cを有するものが知られている。この中でチオグリコシドは基本的な機能や物性面でO-グリコシドに類似している。ただし、加水分解等に対する安定性はO-グリコシドと比較してかなり高く、素材としての使用場面で安定性が要求される分野では選択の対照になりうるもので

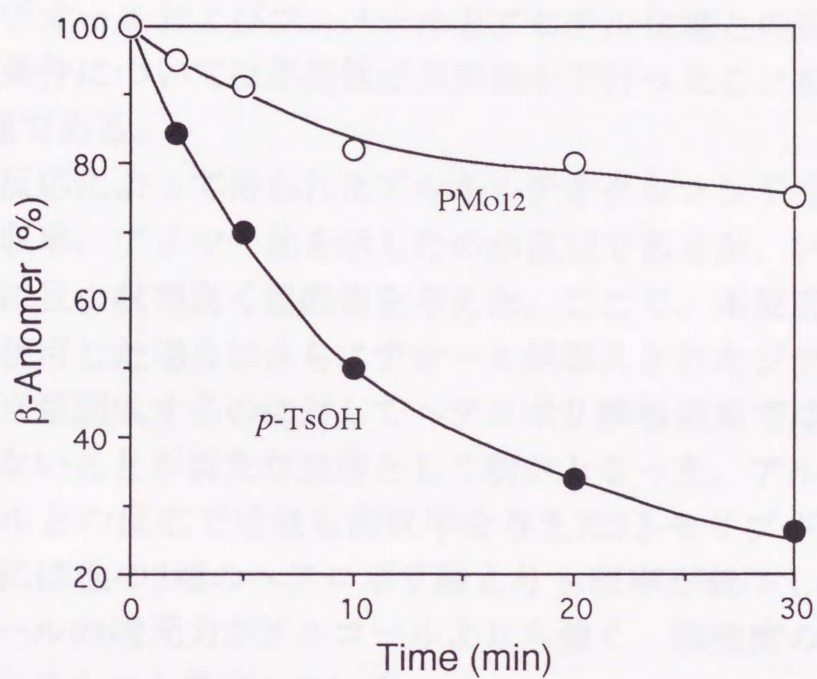


図10 Anomerization of Octyl 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-glucopyranoside in the presence of acid catalyst.

ある。また、これらの化合物は近年のグリコシル化の検討の中で安定な糖供与体として優れた特徴を有していることが明らかになってきている²⁵⁻²⁸⁾。

これまで述べたグリコシル化の方法は、本質的には求核試薬とアセチル化糖とを縮合することによって目的物を得るというシンプルな方法であり、アルコール、フェノールをチオールに換えることで容易に1-チオグリコシドが得られると推定された。そこで数種のアルカンチオールおよびフェノールとアセチル化糖との反応を試みた。反応条件については不活性ガス気流中で行ったことを除けば第2節と同様である。

この反応によって得られたアルキルチオグルコシド完全アセチル化物の収率、アノマー比を示したのが表12であるが、いずれも立体選択的に且つ収率良く目的物を与えた。ここで、本反応中に従来の触媒を使用した場合はさらにチオールが導入されたジチオアセタールが相当量副成するのに対してヘテロポリ酸触媒系ではほとんど認められないことが新たな長所として明かとなった。アルコール、フェノールとの反応では最も高収率を与えた12-モリブドリン酸がこの場合には他の3種のヘテロポリ酸よりも収率が低下したが、これはチオールの還元力がアルコールよりも強く、酸強度の低下が速いことによるものと推定している。

表13にはアルキルチオマルトシドの合成結果を示したが単糖と同様に収率良く目的物を与えることが確認された。この合成において12-タンゲストケイ酸をシリカゲル上に担持した不溶性触媒を調製し、同様に反応に用いたが均一系と同等以上の結果が得られた。

以上のようにこのグリコシル化方法はO-グリコシドの合成のみならずチオグリコシドの合成においても適用可能であることが明かとなった。

表12 Glycosylation of some thiols with glucose penta-acetate in the presence of acid catalyst

| RSH | Catalyst | Yield ^a (%) | Anomer ratio ^b (β/α) | Dithioacetal(%) |
|----------|--------------------|------------------------|---------------------------------|-----------------|
| Octyl- | ZnCl ₂ | 54 | 90 : 10 | 28 |
| | <i>p</i> -TsOH | 62 | 86 : 14 | 11 |
| Dodecyl- | SiW ₁₂ | 86 | 99 : 1 | 2 |
| | PW ₁₂ | 79 | 98 : 2 | 2 |
| Dodecyl- | SiMo ₁₂ | 66 | 98 : 2 | 1 |
| | PMo ₁₂ | 62 | 97 : 3 | 1 |
| Decyl- | SiW ₁₂ | 84 | 98 : 2 | 2 |
| Dodecyl- | SiW ₁₂ | 81 | 97 : 3 | 1 |
| Phenyl- | SiW ₁₂ | 92 | 98 : 2 | 2 |

a Isolation yield of pure alkyl 2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-glucopyranoside by recrystallization.

b Anomer ratio in the reaction mixture determined by ¹³C-NMR.

第6章 水溶性無機アルコーシラン系多孔シリコンドの合成

これまでではアセチル基も含有するα-D-グルコースについて紹介したが、最も単純なアルコーシラン系多孔シリコンドの合成例としてα-D-グルコースにアセチル基を付与したα-D-グルコースヘプタアセテートをアルコーシラン系多孔シリコンドの合成に用いた。この試薬は、α-D-グルコースのアルコーシラン系多孔シリコンドの合成に用いることができる。α-D-グルコースのアルコーシラン系多孔シリコンドの合成に用いることができる。

表13 Preparation of Alkyl thio-β-D-maltoside

| RSH | Catalyst | Yield ^a (%) | Anomer ratio ^b (β/α) | Chemical shift ^c |
|----------|--|------------------------|---------------------------------|-----------------------------|
| Octyl- | SiW ₁₂ | 81 | 98 : 2 | 102.9, 87.2 |
| Nonyl- | SiW ₁₂ | 77 | 98 : 2 | 103.0, 87.3 |
| Decyl- | SiW ₁₂ | 78 | 97 : 3 | 102.8, 87.0 |
| Undecyl- | SiW ₁₂ | 75 | 96 : 4 | 102.9, 87.3 |
| Dodecyl- | SiW ₁₂ | 70 | 97 : 3 | 130.1, 87.5 |
| | SiW ₁₂ /SiO ₂ ^d | 79 | 97 : 3 | |

a Isolation yield of de-protected alkyl thio-β-D-maltoside.

b Anomer ratio of alkyl thio-D-maltoside hepta-acetate in reaction mixture.

c ¹³C-NMR chemical shift from TMS in ppm of C₁ carbon in CDCl₃.

d SiW₁₂ supported on silica-gel (Merck 60).

第六節 未保護糖のアルコールシスによるグリコシドの合成

これまではアセチル化糖を糖供与体に用いた反応について紹介したが、最も単純なグリコシル化方法すなわち大過剰のアルコール存在下に遊離糖を反応させる所謂Fischerのアルコールシスにヘテロポリ酸の適用を試みた¹²⁾。その結果を表14に示した。低級のアルコールに関しては従来の触媒との顕著な差は認められないが、アルコールの鎖長が長くなるにつれて収率面での優位性が明かとなった。また、ヘテロポリ酸系では重合性のアルコールを効率良く導入することが可能であった。この詳細については次章、第一項のビニル基を有するグリコシド類の合成で述べる。

第七節 1,2-オルトエステル誘導体を経由したグリコシドの合成

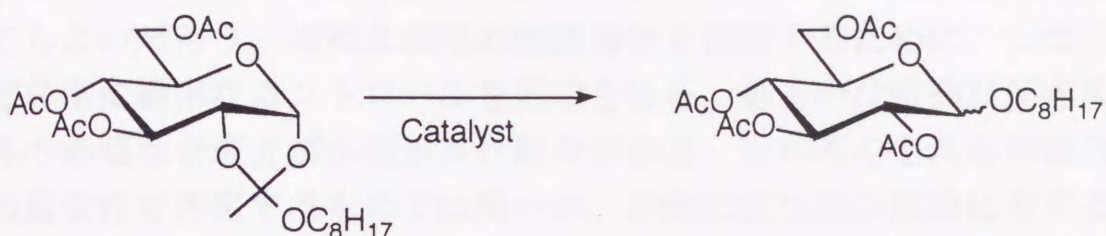
ヘテロポリ酸触媒によるグリコシル化検討の最後の事例としてオルトエステル誘導体を経由したアルキルグリコシドの合成例を紹介する。この中間体は1-ハロ糖を経由してグリコシドを調製する際に生成することが見いだされたものであるが²⁹⁾、求核性の乏しいアグリコンを立体選択的に導入するには適した方法と行うことができるだろう³⁰⁻³²⁾。ただし、オルトエステルからグリコシドへの誘導は水銀塩などが用いられていたため廃棄物の安全性の観点から改良が望まれている。この検討では1,2-(octyl orthoacetate)誘導体をトルエン中で触媒と60°Cに加熱し、生成したオクチルグルコシドの収率、アノマー比を図11に示した。水銀塩と比較しても同等以上の収率で目的物が得られ、特に炭酸リチウムで部分中和したヘテロポリ酸では良好な立体選択性を示した。ここで用いたヘテロポリ酸のを構成する金属は廃棄上の問題も少なく、本グリコシル化適応の制限緩和に役立つものと考えられる。

表14 Direct coupling of alcohol and unprotected glucose in the presence of acid catalyst

| Alcohol | Molar ^a ratio | Catalyst | Reaction temp/°C | Condition time/min | Conversion /mol% |
|-------------------|-----------------------------|-------------------|---------------------|-----------------------|---------------------|
| Methanol | 20:1 | HCl | reflux | 240 | 87 |
| | 20:1 | PMo ₁₂ | reflux | 240 | 90 |
| n-Butanol | 10:1 | <i>p</i> -TsOH | 100 | 180 | 76 |
| | 10:1 | PMo ₁₂ | 100 | 180 | 78 |
| n-Octanol | 10:1 | <i>p</i> -TsOH | 110 | 180 | 42 |
| | 10:1 | PMo ₁₂ | 110 | 180 | 64 |
| Dodecanol | 15:1 | <i>p</i> -TsOH | 110 | 240 | 20 |
| | 15:1 | PMo ₁₂ | 110 | 240 | 45 |
| <i>l</i> -Menthol | 10:1 | ZnCl ₂ | 110 ^b | 240 | 12 |
| | 10:1 | PMo ₁₂ | 110 ^b | 240 | 54 |

a alcohol:glucose ratio in the starting mixture.

b *N*-methyl pyrrolidone was used as a solvent.



| Catalyst | Yield(%) | Anomer ratio(β/α) |
|------------------------------------|----------|--------------------------------|
| HgBr ₂ | 90 | 87 / 13 |
| PMo ₁₂ | 92 | 87 / 13 |
| PMo ₁₂ ,Li | 93 | 93 / 7 |
| PMo ₁₂ ,Li ₂ | 93 | 95 / 5 |

図11 Synthesis of Octyl 2,3,4,6-tetra-O-acetyl-D-glucopyranoside
via 1,2-orthoester derivative

第八節 総括

本項の検討から著者はヘテロポリ酸という新しいタイプの触媒がグリコシル化の場面において様々な利点を有していることを明らかにした。

ここではヘテロポリ酸そのものの物性についてはあまり触れなかったが、揮発性が無く腐食性のガスを発生しないという点でも取り扱いやすい触媒ということが出来るだろう。根底の狙いとしてある「糖誘導体を有用な素材として開発する」という目的のためには

大量スケールにも対応でき、また、コストパフォーマンスに優れている方法論が要求されるが、これを充分満足するものと考えている。実際、ここで紹介したグリコシドのいくつかは既に工業レベルでの合成が行なわれており、良好な結果が得られていることを見ても我々の目的の第一ステップがこの検討によってクリアーできたと言ってもよいだろう。複雑な構造の糖誘導体を調製するために、しばしば非常に緻密なコントロールを要求される、あるいは特殊な反応条件の必要な合成方法が提示され場合がある。もちろんこれらの検討の重要性を否定するものではないが、目的に応じた方法論に対する取り組みという点で「如何にきれいに合成するか」ということに加えて「如何に簡単に作るか」ということにも今後さらに焦点があてられることを望むものである。

次項以降ではこの方法論によって得られたグリコシド類の機能開発についての検討を中心に述べる。

第二項 アルキル-O-グリコシド類の界面科学的性質およびリパーゼに対する機能

第一節 緒論

本章の第一項で著者は各種のグリコシドが簡便にしかも大量スケールで合成できる方法論を見いだしたことを述べた。次なる興味はこのようにして得られた誘導体がいったいどのような機能を発現するかということであるが、第一番目の機能開発の対象に界面活性剤としての特性を取り上げた。アルキルグリコシドの構造を考えると、その化学構造中に親水性の糖残基と疎水性のアルキル基を有しており、まさに界面活性剤の必須構造を満足するものである。一方、世界中で大量に消費される界面活性剤は洗浄性、泡立ちなどの基本性能に加え、その安全性、生分解性などの付随する性質をも満足しておかなければならない。安全性、生分解性についてはアルキルグリコシドの構造から考えて従来の界面活性剤をしのぐことは容易に推定できることから、界面活性剤としての優れた機能が見いだされれば広く展開が可能である。

この項ではアルキル-O-グリコシドの界面化学的性質を確認するとともに、蛋白素材に対する効果を主としてリパーゼをモデルに用いて検討したのでその結果について述べる。

第二節 アルキルグリコシドの界面科学的性質

先にも述べたように、アルキルグリコシドは、糖を親水基、アルキル基を疎水基として両者がグリコシド結合で結ばれた構造を有する。起源は非常に古く、E. Fischerの時代にまで遡り、界面活性剤としても既に基礎物性や液晶形成能、膜蛋白の可溶化などの性質が知られている³³⁻³⁶⁾。これら物性の検討に用いられたアルキルグリ

コシドは多くがKoeigs-knorr法などの多段のステップによって合成された単一アノマーである。前述のごとくこれらの方法は工業的に成り立たないため、著者らが開発したヘテロポリ酸触媒法によって合成されたアルキルグリコシドのアノマー混合物($\alpha:\beta=ca. 2:3$)について、まずその界面科学的な性質を明らかにすることを試みた。

アルキル鎖6から12までのアルキルグルコシドおよびドデシルマルトシドについて臨界ミセル濃度(CMC)を求めた結果を表15に示した。ここで示した数値は表面張力を界面活性剤濃度の対数に対してプロットし、表面張力が界面活性剤濃度に依存せずほぼ一定となる変極点の値であるが³⁷⁾、アルキル鎖長が長くなるにつれてとCMCの値は低下した。これらの値はいずれもmMのレベルとなるが、報告されている代表的な非イオン界面活性剤であるアルコールのアルキレンオキサイド付加物と比較すると1オーダーないし2オーダー高いことが判明した。

表15 CMC values of the alkyl glycoside

| hydrophilic block | alkyl chain | CMC(mM) |
|---------------------|-------------|---------|
| glucose | hexyl- | 39.2 |
| | octyl- | 12.5 |
| | decyl- | 4.3 |
| | undecyl- | 2.5 |
| | dodecyl- | 0.9 |
| maltose | dodecyl- | 5.1 |
| ethylene oxide-8mol | dodecyl- | 0.087 |

これはミセル形成時のミセル分子量が相当低いことを意味しており、特に、生化学領域で使用した場合に多用される透析除去という側面から考えて優れた性質ということができよう。

次に、界面活性剤の基本的な性質としてどのような位置づけにあるのかを起泡力、浸透性、一定濃度における表面張力低下能により考察した。起泡力は一定の高さから界面活性剤を落下させた際の泡の高さおよびその安定性を測定するLoss-Miles法によって³⁸⁾、浸透力は界面活性剤表面に置いた一定面積のキャンバスが沈降するのに要する時間を測定することによって³⁹⁾、また、表面張力低下能は白金リングが界面活性剤表面から離れるのに要するトルクを測定するDuNouy法によってそれぞれ求めた⁴⁰⁾。この結果を表16にまとめた。

表16 Some properties of surfactants

| | AG8 | AG10 | SE | LAS | SDS | D.B. |
|-------------------------|------|------|------|------|------|------|
| Foam height (mm) | | | | | | |
| 0 min | 152 | 251 | 198 | 238 | 235 | 217 |
| 5 min | 133 | 249 | 194 | 235 | 232 | 213 |
| Permeability(sec) | 3h | 26 | 360 | 150 | 58 | 84 |
| Surface tension(dyn/cm) | 43.6 | 28.7 | 33.1 | 30.7 | 35.5 | 32.2 |

AG8: Octyl D-glucopyranoside, AG10: Dodecyl D-glucopyranoside,

SE: Sucrose dodecanoate, LAS: Dodecylbenzene sulfate,

SDS: Sodium dodecyl sulfate, D.B.: Dodecyl bethain.

ほぼ同様の構造を有するシヨ糖脂肪酸エステルやイオン性の汎用される界面活性剤と比較しても、アルキル鎖長を選択することにより起泡力、浸透性、表面張力低下能に優れた界面活性剤を提供することが可能であった。特に、起泡力の無さはこれまで非イオン界面活性剤の無き所であったが、この中では比較的起泡力に優れたシヨ糖脂肪酸エステルをも凌駕する起泡性および安定性を示した。アルキルグルコシドの洗浄力をKoeltzowらの方法に従ってトリオレインの

人工汚染布を用いて比較すると実用的な洗浄力は炭素数8から発現し、11で最大となった³⁵⁾。この傾向はMcGireらによって報告されたアルコールのエチレンオキサイド付加物における洗浄力とアルキル鎖長との関係に近似していた⁴¹⁾。

生体に対する作用という点では皮膚一次刺激性、眼粘膜刺激性ともにアルキル鎖長に若干の変動はあるものの低いスコアを与えており⁴²⁾、使用上も優れた性質を有しているということが明らかとなった。

第三節 アルキルグリコシドのケラチン、セルロースに対する相互作用

アルキルグリコシドが界面活性剤、特に洗浄を目的とした場面で使用されることを考えると、特定の素材に対する相互作用ということを見逃すことはできない。溶液中での蛋白に対する報告例はこれまでいくつか認められるが、固体表面への相互作用という点については明らかになっていなかった。そこで、著者はアルキルグリコシドの固体表面に対する相互作用が、他の界面活性剤と比較して強いものかどうかをケラチン、セルロースをモデルとしてこれらのカラムに対する界面活性剤の保持時間を測定することで推定を試みた。

予め、ステンレス製のカラム(4.6 i.d. x 25 cm)に70~400メッシュの粒度分布を有する羊毛ケラチンあるいは結晶セルロースを2気圧の圧力で充填し、37°C、pH6.8の緩衝液を用いてアルキルグリコシドおよびポリオキシエチレン系界面活性剤、ポリエチレングリコール(#1500)を注入し、それぞれの溶出パターンを示差屈折型を用いてモニターした。図12はケラチンカラムの溶出曲線であるが、アルキルグリコシドはポリエーテルと比較して保持時間が長く、ピーク形状も非常にブロードとなった。このことからアルキルグリコシドとケラチン固体表面との相互作用が強いことが示唆された。ま

た、鎖異なるアルキルグルコシド間ではオクチルグルコシドをピークとして相互作用が弱まる変極現象が認められた。相互作用の要因としては、この場合水素結合を考えるのが最も適当であるが、現在までのところ何故にこの変極現象が生じるのかは不明である。アルキルグルコシドの保持時間が長いという同様の現象がセルロースカラムを用いた場合にも観察されており、この性質が何らかの有用な機能を引き出すのではないかと考えている。

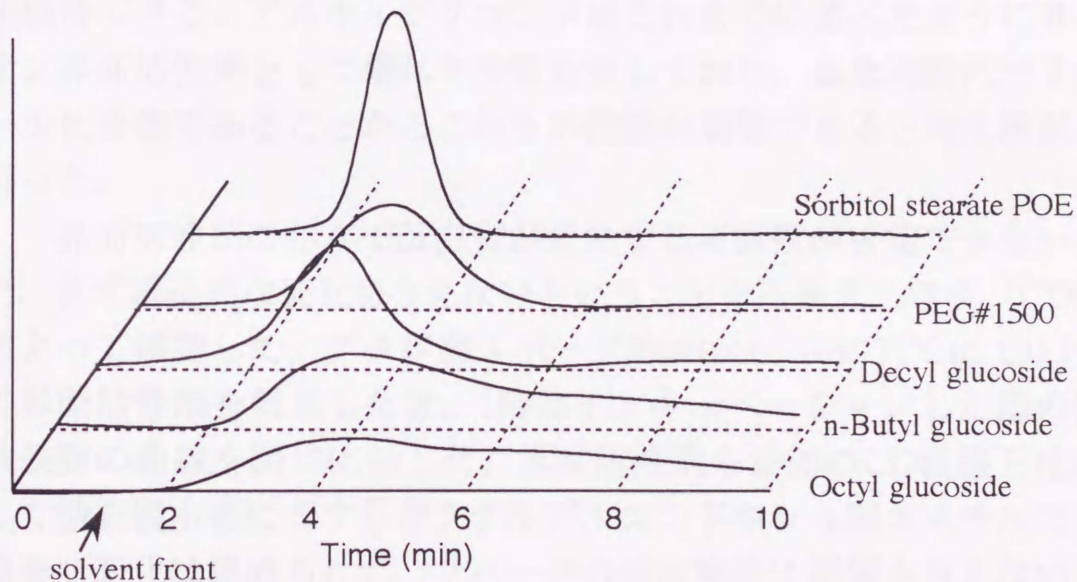


図12 Retention time of polyol compounds on keratin column.

第四節 界面活性剤共存下におけるリパーゼの構造変化

酵素が一般的に物理的、化学的に不安定な物質であることは知られており、中でもリパーゼは他の酵素と比較しても不安定でありこれに関する知見も数多く報告されている⁴³⁻⁴⁵⁾。しかし、この酵素の機能である油脂の分解や合成の触媒機能は工業的にも利用価値が広く、この安定化が可能になれば用途は一気に広がると考えられる。これまで酵素水溶液の安定化に基質やポリオールが有効であることが知られているが、リパーゼの触媒としての反応の場合は本質的に油脂と水層との界面であり、界面活性能を有した安定化剤が開発されれば酵素を安定化させつつ反応界面を広げるという一挙両得の効果が期待できる。アルキルグリコシドはこれまでに述べたように非イオン界面活性剤として優れた性質を有しており、また同時にポリオール化合物であることからこれらの機能が期待できると考え検討を行った。

界面活性剤の存在で蛋白質が変性する可能性が否定できないため、まず構造的な変化を与えないということを円偏光二色性 (CD) によって確認した。ブタ膵臓リパーゼ溶液(pH 5.0)に37°Cにて0.1%の界面活性剤を添加した後、1時間インキュベーションした際の短波長側の曲線を図13に示した。界面活性剤未添加のCD曲線と比較して糖を親水部に有するオクチルグルコシドやショ糖エステルでは顕著な変化は認められず、リパーゼの高次構造に影響を与えないことが示唆された。一方、蛋白の変性剤として知られるSDSでは210nm付近に新たなピークが出現し、このリパーゼに対して構造変化を与えていることが明かとなった。

このような界面活性剤がリパーゼの活性にどのような影響を与えるかについて次に考察を行った。その結果については次節で紹介する。

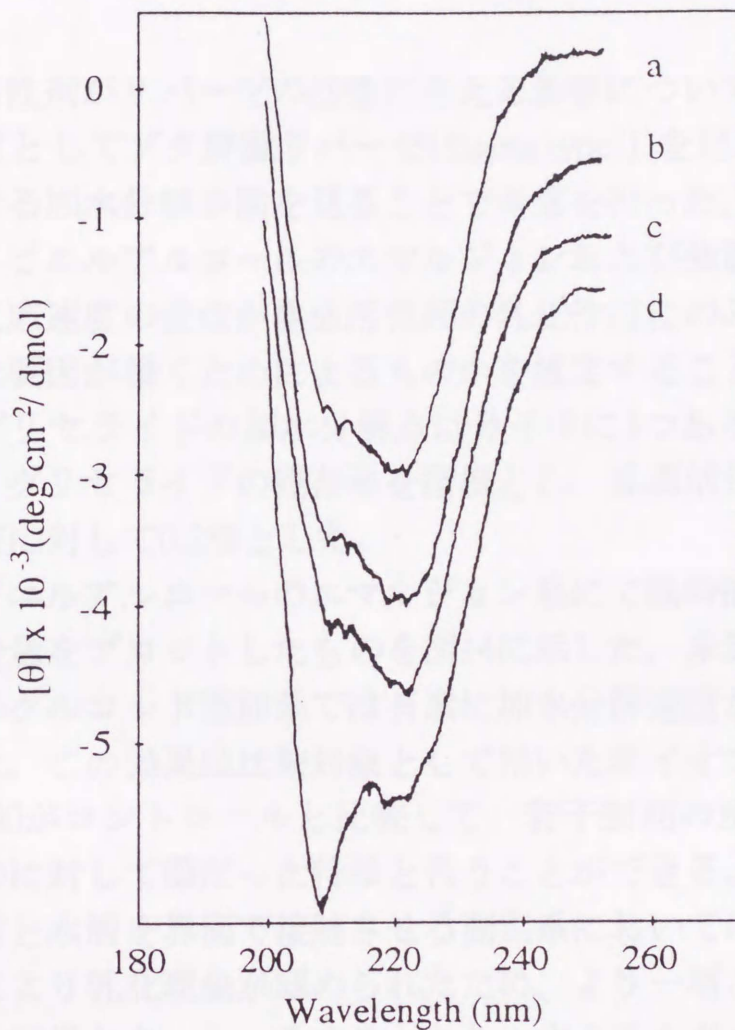


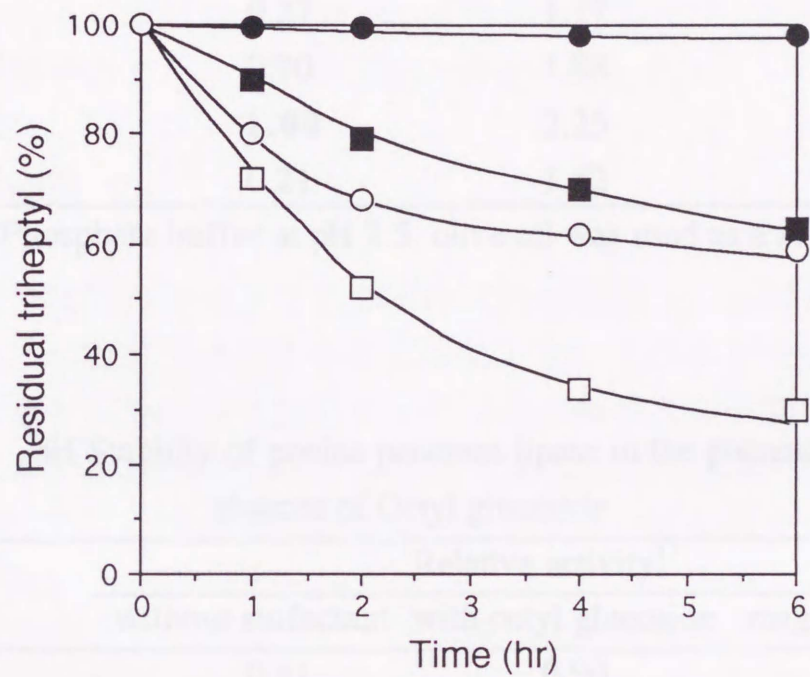
図13 CD spectra of porcine pancreas lipase with and without surfactants.
 (a) without surfactant. (b) with Octyl glucoside.
 (c) with sucrose dodecanoate. (e) with SDS.

第五節 アルキルグリコシドがリパーゼ活性に与える影響

界面活性剤がリパーゼの活性に与える影響について、トリヘプチルを基質としてブタ膵臓リパーゼ(Sigma typeII)を用い、pH5.0、35°Cにおける加水分解挙動を見ることで考察を行った。この際、反応系はポリビニルアルコールのエマルジョンおよび強制攪拌の二系列とし、反応速度の変化が界面活性剤の乳化作用にのみによるものか、安定化要因が働くためによるものかを推定することとした。また、トリグリセライドの加水分解点は分子中に3つあるが、活性としてはトリグリセライドの残存率を指標とし、界面活性剤の添加量は酵素溶液に対して0.2%とした。

ポリビニルアルコールのエマルジョン系にて経時的に残存トリヘプチル含量をプロットしたものを図14に示した。未添加に比較してオクチルグルコシド添加系では有意に加水分解速度が速いことが観察された。この効果は比較対象として用いた非イオン界面活性剤 TritonX-100がコントロールと比較して、若干初期の反応速度を低下させるのに対して際だった特徴とすることができる。強制攪拌すなわち油層と水層を界面で接触させる測定系においては、界面活性剤の存在により乳化現象が認められたため、より一層この速度差が強調される結果となった。このことから、オクチルグルコシドにはリパーゼを安定化する効果があり、それが見かけ上の活性を増強していると推定した。

次に、オクチルグルコシドの添加が酵素のpHあるいは温度安定性にどのように影響を与えるかを温度条件、pHを変化させその環境下での活性を測定することによって考察した。酵素は前述のブタ膵臓リパーゼ(Sigma typeII)を用い、ポリビニールエマルジョン法により1時間インキュベーションした時点の遊離脂肪酸量を中和滴定値によって求め活性の基準とした。この結果を界面活性剤未添加



⊠14 Lipase catalyzed hydrolysis of triheptyl in the absence and presence of surfactant at 35°C, pH 5.0.

(○) control, (□) AG-8, (●) SDS, and (■) Triton X-100.

表17 Temperature stability of pocine pancreas lipase in the presence and absence of Octyl glucoside

| Temp. | Relative activity ¹⁾ | | |
|-------|---------------------------------|----------------------|---------------|
| | without surfactant | with octyl glucoside | magnification |
| 0°C | 0.27 | 1.17 | 4.30 |
| 20°C | 0.90 | 1.88 | 2.09 |
| 40°C | 1.00 | 2.25 | 2.25 |
| 60°C | 0.21 | 1.52 | 7.23 |

1) Phosphate buffer at pH 7.5, olive oil was used as a substrate.

表18 pH Stability of pocine pancreas lipase in the presence and absence of Octyl glucoside

| pH | Relative activity ¹⁾ | | |
|------|---------------------------------|----------------------|---------------|
| | without surfactant | with octyl glucoside | magnification |
| 4.0 | 0.61 | 0.90 | 1.48 |
| 5.0 | 0.63 | 1.19 | 1.89 |
| 6.0 | 0.65 | 2.49 | 3.83 |
| 7.0 | 0.75 | 3.24 | 4.32 |
| 8.0 | 1.00 | 2.85 | 2.85 |
| 9.0 | 0.65 | 2.50 | 2.60 |
| 10.0 | 0.59 | 1.53 | 2.60 |

1) Phosphate buffer at 35°C, olive oil was used as a substrate.

における最大活性を示した温度あるいはpH条件の活性を1として比活性として表したのが表17および表18である。オクチルグルコシドの添加系ではいずれの条件下においても比活性が高くなっており、特に、この酵素の安定条件を外れた領域での活性化倍率が高くなっていることから、オクチルグルコシドが安定化剤として機能していることはほぼ間違いの無いことであろう。このことから、安定化機能を有した界面活性剤の開発という当初の目論見がアルキルグリコシドを利用することによって達成できたと考える。

第六節 総括

本項ではアルキルグリコシドの有用な性質を界面科学の領域とモデル蛋白に対する作用から明らかにした。これらをまとめると、アルキルグリコシドは適当なアルキル基の鎖長、糖の種類を選択することにより従来の非イオン界面活性剤と類似の基本物性を得ることが可能である、生体材料、特に活性タンパク質に対する作用が緩和であるという点に集約される。ここで重要なことは、アルキルグリコシドを構成する要素がいずれも良好な生分解性を有し、かつ毒性が低いという点にある。基本に立ち返って界面活性剤を設計するならば分子内に親水性基と疎水性基を兼ね備えれば所望の基本物性を発現させることはさほど困難では無く、また、その組み合わせも現在の科学を以てすれば無数に考えられる。しかし、食品から工業製品まで界面活性剤は我々の日常に欠くことのできない存在であり、全体の使用量も環境にとって無視できない物量となっている今日、この物質が有する「安全性」や「生体材料に対する作用の緩和性」は何物にも替えがたいものであるといっても良いだろう。

既に、生分解という観点から見れば年間の平均気温が低く、不利な自然環境にある北欧では、これまで非イオン界面活性剤として多用されてきたアルキルフェノール系界面活性剤の使用が規制の方

第三項 アルキルチオグリコシド類の界面科学的性質および膜蛋白可溶化剤としての機能

第一節 緒論

蛋白質の構造や機能を解析する場合、通常それを精製することが必要となる。細胞質などに存在する蛋白質は溶性であり、これを取り出すことにはさほど問題はないが、膜在蛋白、中でも脂質二重層に埋め込まれた蛋白の場合、前もってその蛋白質を緩衝液中に溶解させておく操作が必要となる。通常この種の蛋白の可溶化には界面活性剤が使用されるが、ここで使用される界面活性剤の機能として蛋白を可溶化する能力は勿論のこと、蛋白質を変性させない、可溶化後の除去が容易である、分析上用いられる紫外部に大きな吸収を持たないなど副次的に要求される機能も決して少なくない。この目的に適うものとしてNewmanらがオクチルグルコシドを取り上げ、大腸菌のいくつかの蛋白質を失活させずに取り出すことに成功している⁴⁶⁾。しかしながら、彼らが用いたオクチルグルコシドは β -アノマーの光学的に単一化合物であり、これは現在の技術をもってしても合成するのにかなりの費用を要する。土屋らはこれに代わるものとしてアルキルチオグルコシドが比較的安価に合成でき、機能としてはオクチルグルコシドと同等であり、且つ、加水分解に対する安定性が優れていることを報告している⁴⁷⁻⁴⁹⁾。彼らは5ステップでチオグルコシドを合成したが、著者が本章の第一項で開発した方法によれば不安定な中間体を經由することなく安価に3ステップでの合成が可能である。

この項では親水部の変更による機能差を見る目的で、グルコースからマルトースに変換した数種のアルキルチオマルトシドを合成し、腸炎ビブリオの膜蛋白可溶化を取り上げ検討を行った結果について述べる。

第二節 アルキルチオグリコシドの界面科学的性質

アルキルチオグリコシド類の合成については本章、第一項に述べたのでここでは省略する。得られたアルキルチオグリコシドおよびマルトシドの臨界ミセル濃度を、濃度の異なるチオグリコシド水溶液に蛍光物質である8-anilino-1-naphtalenesulfonic acidを添加して375nmの励起波長により480nmにて蛍光強度を測定して、その変極点から求めた。この結果を表19に示した。

表19 CMC values of the alkyl thiomaltoside and -thioglucoside

| Alkyl-thioglycoside | CMC(mM) | Ratio |
|-----------------------|---------|---------|
| Octyl-thiomaltoside | 8.2(A) | A/B=3.4 |
| Nonyl-thiomaltoside | 2.4(B) | B/C=4.0 |
| Decyl-thiomaltoside | 0.6(C) | C/D=3.0 |
| Undecyl-thiomaltoside | 0.2(D) | D/E=3.3 |
| ----- | | |
| Heptyl-thioglucoside | 30.0(E) | E/F=3.3 |
| Octyl-thioglucoside | 9.0(F) | F/G=3.6 |
| Nonyl-thioglucoside | 2.5(G) | |

鎖長の異なるアルキルチオマルトシド間では炭素数の増加とともに臨界ミセル濃度が低下し、その低下率はほぼ比例関係となっていた。この関係は極性部分の異なるチオグルコシドにも同様に認められた。極性基の差が臨界ミセル濃度に与える影響についてはオクチル基およびノニル基を有するチオグルコシドおよびチオマルトシドの値がほぼ同一であったことから、このような分子構造においてはほとんど関係が無いと結論できる。

次に、アルキルチオマルトシドの透析による除去の可能性について検討を行った。10mM濃度の各アルキルチオマルトシド水溶液1mlを透析チューブに入れ、1Lの50mMリン酸カルシウム緩衝液(pH 7.5)を用いて4°Cにて透析を行ない、経時的にチューブ内の界面活性剤濃度を測定した。この結果を図15に示した。

鎖長の短いアルキルチオマルトシドは比較的短時間にて透析除去され、透析チューブ中の界面活性剤濃度が1/10となるのに要する時間はオクチル基で10時間、ノニル基で20時間であった。これ以上の炭素鎖長を有するものは一昼夜透析を行なっても完全に除去することは困難であり、除去を必要とする可溶化においては選択の範囲から外す必要がある。

このように可溶化剤としての基本的な特徴が明かとなったので次に実際の膜蛋白可溶化を腸炎ビブリオの細胞膜を用いて行った。この詳細については次節で述べる。

第三節 腸炎ビブリオ膜蛋白の可溶化

アルキルチオマルトシドの可溶化剤としての機能を実際に確かめるため、腸炎ビブリオの膜蛋白、特にこれまで活性な形で取り出すのが困難であったプロトン輸送性のATPaseに注目して可溶化を試みた。フレンチプレス処理によって破碎した細胞膜に濃度を変化させたアルキルチオマルトシドを添加し、遠心分離によって可溶画

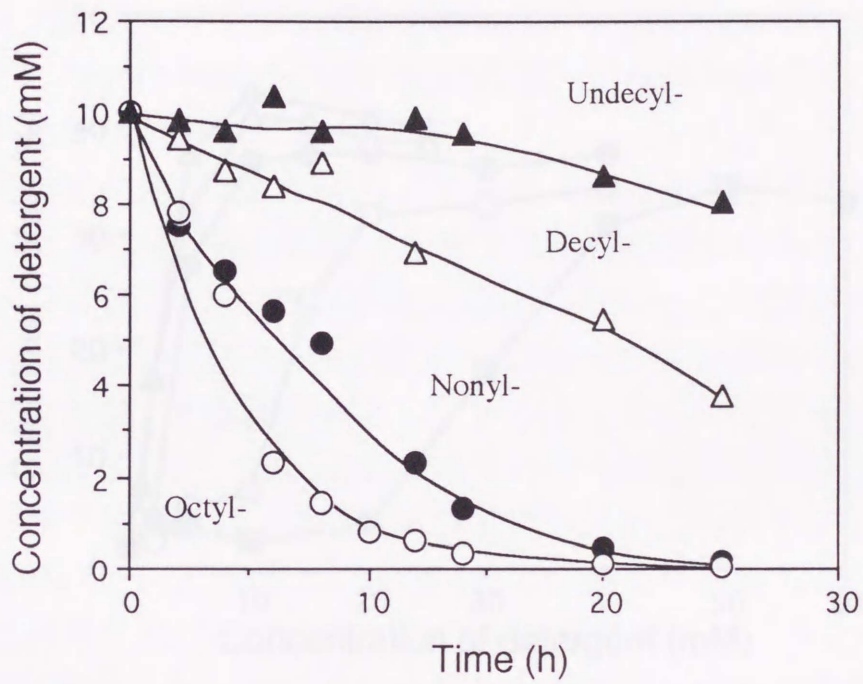


图15 烷基硫代麦芽糖苷的透析去除。
 (○) 辛基硫代麦芽糖苷, (●) 壬基硫代麦芽糖苷,
 (△) 癸基硫代麦芽糖苷, (▲) 十一烷基硫代麦芽糖苷。

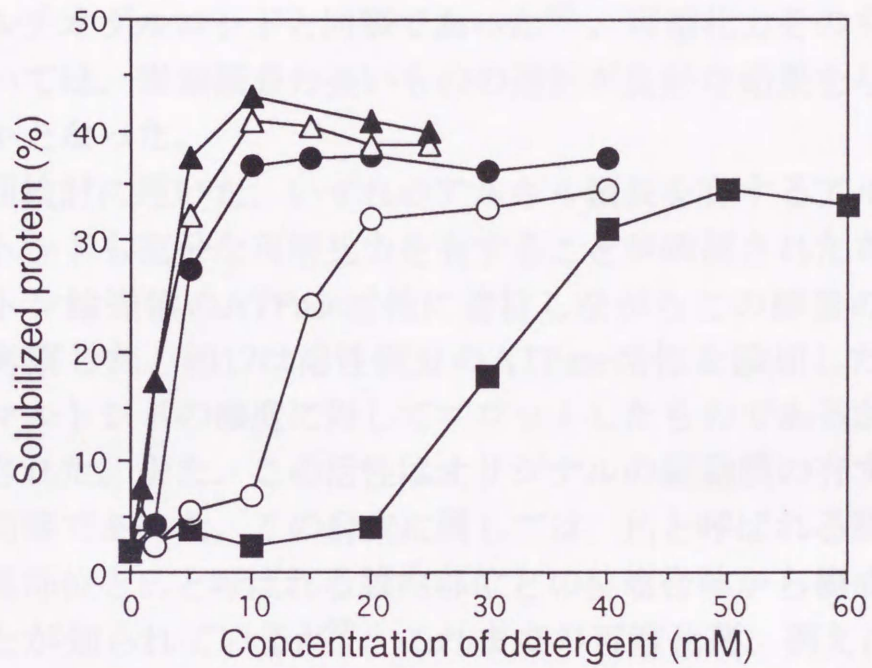


図16 Solubilization of membrane proteins of *V. parahaemolyticus* with alkyl thiomaltoside.

- (○) octyl thiomaltoside, (●) nonyl thiomaltoside,
 (△) decyl thiomaltoside, (▲) undecyl thiomaltoside,
 (■) heptyl thioglucoside.

分とに分離し、溶性画分の蛋白量を測定した。その結果を図16に示した。それぞれの臨界ミセル濃度の数倍の濃度で膜蛋白は良く可溶化されていることが解かる。ウンデシル以上の鎖長では約40%の膜蛋白を10mM以上の濃度にて可溶化し、最も可溶化力の劣るオクチルチオマルトシドにおいても20mM以上の濃度で30%の膜蛋白を可溶化した。この値はこれまで同様の可溶化に用いられた報告のあるヘプチルチオグルコシドと同等であった⁴⁹⁾。可溶化力そのものの比較においては、炭素鎖長の長いものの選択が良好な結果を与えることが明かとなった。

今回検討に用いた、いずれのアルキル鎖長を有するアルキルチオマルトシドも十分な可溶化力を有することが確認されたため、次にプロトン輸送性のATPase活性に着目しながらこの酵素の可溶化状況を考察した。図17は溶性画分のATPase活性を添加したアルキルチオマルトシドの濃度に対してプロットしたものであるが、活性が確認された。また、この活性はオリジナルの細胞膜の有する活性とほぼ同等であった。この酵素に関しては、 F_1 と呼ばれる膜表面にある触媒部位と F_0 と呼ばれる膜内部位との位複合体から構成されていることが知られているが⁵⁰⁾、これまでの可溶化剤、例えばTriton X-100やオクチルグルコシド、ヘプチルチオグルコシド等を用いても非常に低い活性(0.4unit/mg protein)しか得られなかったことから、この可溶化剤が蛋白を失活させ難い特徴を有していることが明かとなった。ただし、界面活性剤濃度がある一定以上となると溶性画分の酵素活性は低下傾向が認められるため適切な濃度を選択することが肝要である。また、この可溶化画分の5'-nucleotidaseの活性についても同様に測定したが、アルキルチオグルコシドと同様活性を保持したまま可溶化されていることが確認された。

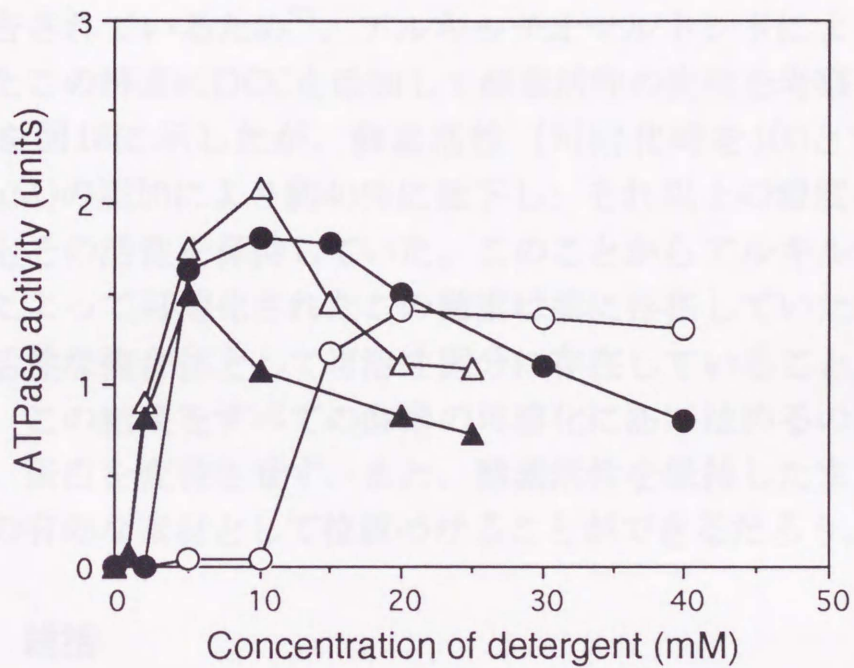


図17 Solubilization of H⁺-translocating ATPase.

(○) octyl thiomaltoside, (●) nonyl thiomaltoside,

(△) decyl thiomaltoside, (▲) undecyl thiomaltoside.

第四節 可溶化蛋白の活性に関する考察

可溶化された腸炎ビブリオのプロトン輸送性ATPaseが活性な F_0F_1 複合体の形で存在しているのか、それとも F_1 として存在するのについて興味を持たれるが、活性測定のみでは判断することが困難である。もし、 F_0F_1 複合体として可溶化されていればこの活性はDCCの添加により阻害され、 F_1 型であれば阻害を受けないということが報告されているため⁵⁰⁾、アルキルチオマルトシドによって可溶化されたこの酵素にDCCを添加して酵素活性の変化を考察した。この結果を図18に示したが、酵素活性（可溶化時を100とする）はDCC(2 μ M)の添加により約40%に低下し、それ以上の濃度の添加によってもその活性を保持していた。このことからアルキルチオマルトシドによって可溶化されたこの酵素は膜に存在していた状態、すなわち活性な複合体として可溶性画分に存在していることが明かとなった。この結果をすべての酵素の可溶化にあてはめるのは早急であるが、蛋白を変性させず、また、酵素活性を保持したまま取り出すための有効な素材として位置づけることができるだろう。

第五節 総括

本項では容易に調製可能となったアルキルチオグリコシド類の蛋白可溶化剤としての機能について、モデル酵素を用いた検討の中から明かにした。アルキルグリコシドの検討でも予測されたことであるが、生体物質に対する作用が緩和であるという裏付けがこの場面でも改めて確認される結果となった。蛋白質の構造、機能や作用の解析において膜蛋白質に関する研究は可溶性蛋白質のそれと比較してやや遅れている感が否めない。その最大の理由は膜蛋白を失活させずに効率良く可溶化するための手段が乏しかったことにあると思われるが、著者らの検討により安価にこの種の誘導体が供給可能

異なる状況で同一成分の濃度を比較し、これをまた比較された濃度の比、
なるから、これは可溶性が容易なものがその対象として取り上げら
れている。しかし、異なる濃度を比較するものであり、必ずしも多く可
溶性でないものが比較対象に入っていないものが多く見られる。行
うべきであると、この濃度の比較が比較対象の濃度である。
結論、これは比較対象に入っていない濃度の比較対象であること
を意味するものである。

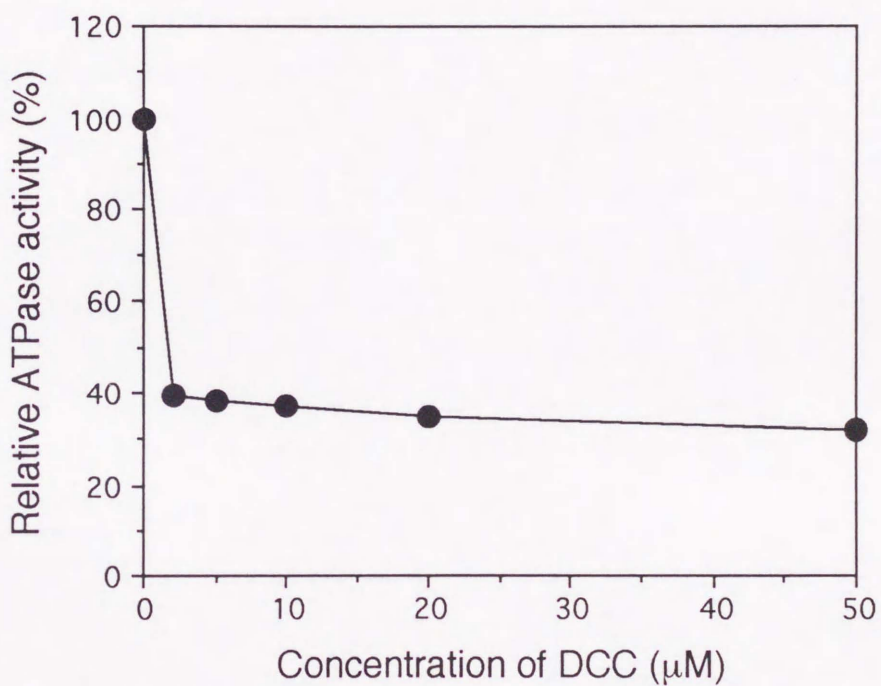


図18 Effect of DCC on the solubilized ATPase activity.

となったことは一つの前進である。これまでに精製された膜蛋白は、どちらかと言えば可溶化が容易なものがその対象として取り上げられている。しかし、重要な機能を有するものでありながらうまく可溶化できないために検討が進んでいないものが数多く残されていることを考えると、この種の誘導体の開発が果たす役割は重要である。今後、これまで困難とされていた膜蛋白の機能解明に寄与できることを期待するものである。

第二章 二ニル基を有するグリコシド類の合成

第一節 緒言

天然における物質は身の多くが糖類を基本骨格とする分子として存在しており、これらの優れた機能が生化学的機能を十分に果たすために具備されるようになってきた。しかしながら、多様な水素結合

第二章 重合性基を有する糖誘導体の合成およびその機能

アプローチが始まっている。このアプローチは重合性基を有する糖類を基本骨格として糖類の単位を有する一連の重合体の合成を意味するが、分子量のコントロールや重合機構を自在に操ることで目的に応じた材料化が可能という大きな利点を有している。糖類を有する合成モノマーを用いることで糖骨格の合成高分子に糖基を付与することや、異性糖を持つ分子認識機能を高分子に備えることとこれらの検討を促進させる契機となっている。小林らによるガラクトース残基を側鎖に有するステレン系ポリマーを用いての肝臓癌のin vivo阻害やLeeらの生体適合性材料としての糖基誘導体などがその代表例として挙げられるだろう。

この類のポリマーを調製するためには重合基を有する糖類単体（糖モノマー）が必要であることは言うまでもないが、残念なことにはこれまで開発された糖モノマーはいずれも多段階のステップを経て合成されており、アプローチの拡大を望む場合には大量のスケールにも対応可能なモノマーの開発が不可欠であった。

著者が開発し報告したグリコシル基を有する重合性のアミノ糖モノマーに対しては有用な糖モノマーと考えられたため、簡便な合成可能な糖モノマーを設計し、合成するとともにその機能を検討した。本項ではこのモノマーの合成について報告する。

第一項 ビニル基を側鎖に有するグリコシド類の合成

第一節 緒論

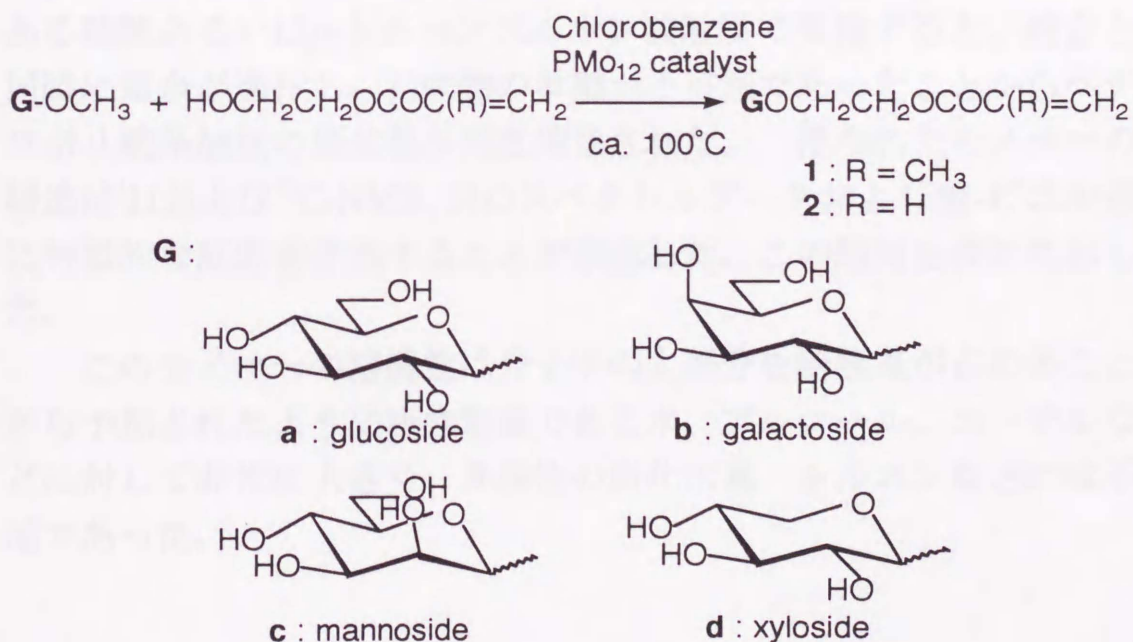
天然における糖質はその多くが糖鎖を基本骨格とする高分子として存在しており、これらの優れた機能が生化学領域を中心にまた新たに見直されるようになってきた。しかしながら、強固な水素結合の故か素材としての自由度に乏しくこれの解消のため最近新たなアプローチが始まっている。このアプローチとは合成高分子を基本骨格にして側鎖部分に糖のユニットを有する一連の化合物の合成を意味するが、分子量のコントロールや重合組成を変化させることで目的に応じた素材化が可能という大きな利点を有している。糖鎖を有する合成モノマーを用いることで疎水性の合成高分子に親水性を付与することや、更に糖が持つ分子認識機能を高分子に備えることもこれらの検討を推進させる要因となっている。小林らによるガラクトース残基を側鎖に有するスチレン系ポリマーを用いての肝細胞の*in vitro*培養やLeeらの生体適合性材料としての機能評価などがその代表例として挙げられるだろう⁵¹⁻⁵²⁾。

この種のポリマーを調製するためには重合基を有する糖誘導体（糖モノマー）が必須であることは言うまでもないが、残念なことにこれまで報告された糖モノマーはいずれも多段のステップを経て合成されており、アプリケーションの拡大を望む場合には大量のスケールにも対応可能なモノマーの開発が不可欠であった。

著者が開発し前章で報告したグリコシル化方法は重合性のアグリコンに対しても適用可能と考えられたため、量的合成可能な糖モノマーを設計し、合成するとともにその機能を検討した。本項ではこのモノマーの合成について報告する。

第二節 (メタ) アクリル基をアグリコンに有するグリコシド類の合成

前節で述べた機能性ポリマーのビルディングブロックとしてのモノマーに関しては、調製のプロセス、量的拡大の容易さとともに得られた誘導体が容易に重合できることが要求される。また、アグリコンとして入手が可能な物質を選ぶことは言うまでもない。著者はこの目的にかなうアグリコンとして水酸基を有する(メタ)アクリル酸エステルである2-hydroxyethyl methacrylate(2-HEMA)および2-hydroxyethyl acrylate(2-HEA)を選択し、これを容易に入手できる未保護単糖とダイレクトに縮合することにより糖モノマーの調製を試みた(スキーム1)。これと同時にMethyl glycosideを出発原料にトランスアセタール化によって重合性基の導入についても考察した。



スキーム1 Synthesis of the glycoside monomers.

合成は基本として前章で述べたヘテロポリ酸を触媒として用い、重合禁止剤の存在下に過剰のアグリコンと糖原料を縮合することで実施した。その典型的な方法を以下に示した。Methyl α -D-glucopyranoside(44.7g, 0.23mol)を2-HEMA(300g, 2.30mol)、12-モリブドリン酸(4.5g, 2.5mmol)、クロロベンゼン(60g)および重合禁止剤である2,4-ジニトロクロロベンゼン(4.5g)の混合物に懸濁し、この混合物を攪拌下に112°Cで約3時間加熱した。TLC(クロロホルム：メタノール=3：1)にて反応の変化が認められなくなった時点で反応液を冷却し炭酸水素ナトリウムを加えて触媒を中和した。この際の目的物への変換率をキャピラリーガスクロマトグラフィーで求めた後、反応粗製物をクロロホルム-メタノール系の溶媒によるシリカゲルクロマトグラフィーにて精製した。この際、目的物はいずれもアノマーの混合物であり、少量のフラノシド骨格を有する糖モノマーを含有する混合物として得られた。この結果を表20に示した。いずれのアグリコン-糖原料の組み合わせにおいても60%以上の変換率で目的の糖モノマーが生成した。しかし、同様の反応をハードな酸である硫酸あるいは*p*-トルエンスルホン酸触媒で実施すると、縮合と同時に重合が進行し、目的物の単離が不可能であったことからヘテロポリ酸系触媒の優位性が再度確認された。得られたモノマーの構造は¹Hおよび¹³C-NMR,IRのスペクトルデータおよび糖-ビニル基に特徴的な反応を実施することで確認した。この結果を表21に示した。

このモノマーの溶解性は分子中の大部分を糖残基が占めることから予想されたように極性溶媒である水、アルコール、エーテルなどに対して非常に大きく、非極性の炭化水素、トルエンなどには不溶であった。

表20 Preparation of glycoside monomers

| Monomer | R | G ^{a)} | Molar ^{b)} ratio | Reaction temp/°C | Condition time/min | Conversion /mol% |
|---------|----|-------------------|------------------------------|---------------------|-----------------------|---------------------|
| 1a | Me | Glc ^{c)} | 10:1 | 112 | 180 | 64 |
| 1b | Me | Gal ^{c)} | 10:1 | 110 | 60 | 72 |
| 1c | Me | Man ^{c)} | 10:1 | 105 | 30 | 67 |
| 1d | Me | Xyl ^{d)} | 10:1 | 105 | 30 | 76 |
| 2a | H | Glc | 10:1 | 110 | 90 | 60 |
| 2b | H | Gal | 10:1 | 107 | 50 | 75 |
| 2c | H | Man | 10:1 | 106 | 20 | 61 |
| 2d | H | Xyl | 10:1 | 105 | 20 | 80 |

a) Monomer produced was a mixture of pyranoside anomer and frano-
side anomers.

b) Hydroxyethyl (meth)acrylate:methyl glucoside ratio in the starting
mixture.

c) α -Glycoside was used as a starting comound.

d) β -Glycoside was used as a starting comound.

第三章 (1) アグリコンをアグリコンに含有するグリコピラノシドの
 合成、特性

前章で報告されたグリコピラノシドは、その構造から推定されるように、
 糖のC1位にアグリコンが結合している。このようなアグリコンを含有するグリコピラノシドは、
 アグリコンの種類によって、その特性が異なる。本報告では、アグリコンの種類が異なる
 グリコピラノシドの合成、特性について報告する。アグリコンの種類が異なるグリコピラノシドの
 合成、特性は、アグリコンの種類によって異なる。本報告では、アグリコンの種類が異なる
 グリコピラノシドの合成、特性について報告する。

表21 Properties of some glycoside monomers

| Monomer | Anomer ratio ^{a)} | Chemical shift ^{b)} | [α] _D ^{20c)} | Coloring reaction ^{d)} |
|-----------|-------------------------------|------------------------------|---|------------------------------------|
| | | ppm | | |
| 1a | 2:1 | 99.6, 103.8 | +75 | 487.6nm |
| 1b | 2:1 | 99.8, 103.4 | +71 | 486.8nm |
| 1c | 3:1 | 100.1, 100.3 | +30 | 488.4nm |
| 1d | 4:1 | 98.8, 103.3 | +63 | 480.4nm |
| 2a | 5:2 | 99.3, 103.4 | +76 | 486.8nm |

a) Anomer ratios (α/β) of purified glycopyranoside.

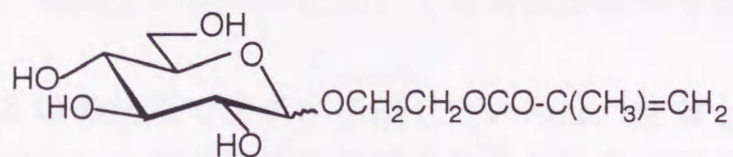
b) ¹³C-NMR chemical shift from TMS in ppm of C₁ carbon in CDCl₃.

c) Specific rotation in methanol (c=3.0).

d) λ_{max} of sample solution after treatment with phenol-sulfuric acid.

第三節 (メタ) アクリル基をアグリコンに有するグリコシド類の毒性、変異原性

前節で調製された糖モノマーは重合によって様々なポリマーへ導かれる訳であるが、どのような重合方法をとっても得られたポリマーは分子量分布を有するし、また、未反応のモノマーがたとえ微量と言えどもポリマー中に混在することは避けられない。この種のポリマーの主用途と考えられる生化学領域では特にモノマーが親水性であるが故に使用場面での溶出という現象が完全には否定できない。従って、モノマー自身の安全性も決して無視できない課題である。そこで、これらモノマーの中から最も汎用性の高いと思われる glucosyloxyethyl methacrylate(GEMA)を選択し、安全性の指標として経口毒性、生分解性、変異原性を化学物質の安全性試験として用いられる標準的な方法により確認した。



Glucosyloxyethyl Methacrylate (GEMA)

急性経口毒性に関しては、OECD(Organization for Economic Cooperation and Development)のガイドラインに沿ってSDラットの100%生存率すなわち(LD₀)を求めると、生存率に影響を与えない投与量は16,300g/Kgであった。これまでに報告されているアグリコンである2-HEMAの急性経口毒性はLD₅₀レベルで11,000 mg/KgあるいはLD₀では5,200mg/Kgであり、重量基準、モル基準のいずれをとってもアグリコンの毒性を下回った。糖を導入することがアグリコンの毒性を低減させる優れた手段とすることができるであろう。

生分解性については、国内の異なる10ヶ所より集められた土壌菌を用いてそれぞれ培養を行った結果、いずれの培養系においても

28日以内に完全に分解が確認された。また、Ames法による変異原性試験においては*E. coli*, *S. typhimurium*を含む5種類のバクテリアに対していずれも陰性であった。また、GEMAはこれらのバクテリアに対して増殖抑止の活性も認められなかった。これらのデータから類推する限り、著者が期待した安全性の高いモノマーを開発するという課題は十分達成されたと考えられる。

第四節 総括

以上のように、前章で開発したヘテロポリ酸触媒を用いたグリコシル化方法を応用することによって著者が意図した機能性高分子開発のための新規なビルディングブロックを組み立てることが可能となった。これらのモノマーはその後の検討により溶媒抽出方法を工夫することでトンスケールでの合成ならびに精製が可能ながことが明かとなり、実用上のレベルにおいても着想が生かされる結果となった。

さらに本項の結果で著者が指摘したいのは、前章と同様に糖質の導入が好ましからざる活性を低減させるという点にある。毒性を始めとして化学物質は両刃の剣であるが、これが為に使用できなかった優れた機能性物質をこれらの修飾により具体化できるということは大きな福音をもたらす可能性を秘めているといっても過言では無いだろう。

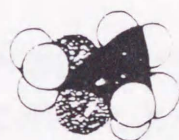
この報告では触れられていないが、ビニル基を含有する物質の欠点として生体に対する皮膚刺激性やアレルギー性がよく問題にされている。これらの評価についても現在進行中であるが、予備段階では良好な結果が得られていることから今後さらにこの種のモノマーを利用した機能性物質設計が活発になると考えられる。

次項ではこのモノマーの重合に関する特性について報告する。

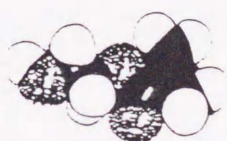
第二項 糖含有ビニルモノマーの重合特性

第一節 緒論

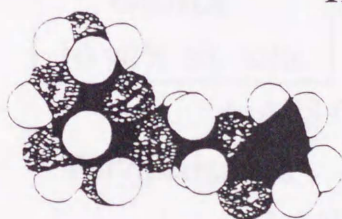
第一項で重合性基を有する糖含有モノマーの調製について述べたが、CPKモデルでその分子構造を確認した段階で、重合性基に対してこれだけバルキーな糖骨格を持つ誘導体が果たして従来のアクリル酸誘導体と同様に支障無く重合できるのかという疑問が残された。



MMA



HEMA



GEMA

場合によっては、ビニル基と糖の間のスペーサー鎖長の再選択すなわちモノマーの再設計という問題をはらんでいるだけに重合特性を明らかにすることはモノマーの調製をすること以上に重要な課題であった。また、ホモポリマーは合成できても他のモノマーとの共重

合が困難であれば素材化という目的の為には著しく不利と考えられる。

これらの懸念を解消するために本項ではラジカル重合によるホモポリマーならびにコポリマーの調製とその際のモノマーの反応性についての検討を行った。また、調製したポリマー表面において糖骨格がどのように存在するかについても解析を行ったのでその結果についても併せて述べる。

第二節 ラジカル開始剤を用いた溶液重合によるホモポリマーの調製

ホモポリマーの調製は、水溶液中でラジカル開始剤として過硫酸アンモニウムを用いて図19に示したように通常の溶液重合条件に従って行った。

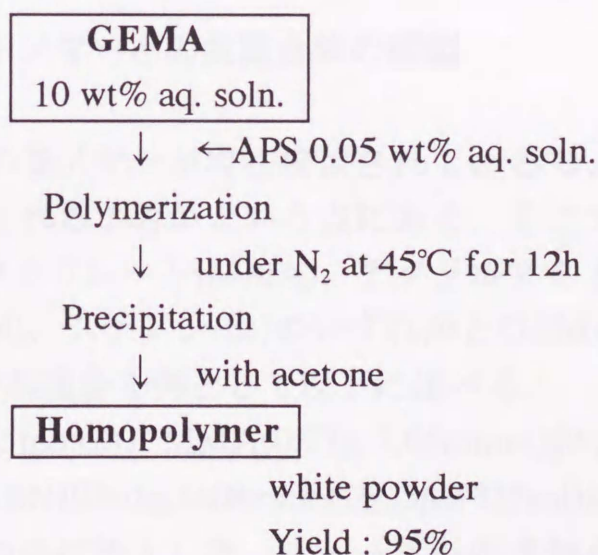


図19 Homopolymerization procedure of GEMA.

反応系は予め窒素で置換し、溶存酸素を除去した後45°CにてTLC上にモノマーの存在が認められなくなるまで穏やかに攪拌を継続し、更に2時間この状態を保った。得られた粘ちような溶液を攪拌下に大量のアセトンに注ぎ込み、生成した沈殿を濾取、乾燥してホモポリマー粉末を得た。このようにして得られたポリマーの分子量をゲル濾過クロマトグラフィーにて求めたが、その際の溶出パターンの一例を図20に示した。上記条件にて算出されたこのホモポリマーの重量平均分子量はポリエチレンオキサイド基準で57万、数平均分子量で79,000であった。

懸念されたバルキーな糖残基による重合の阻害は認められず、従来のアクリル酸系モノマーと同様にこのような条件にて高い分子量を有するポリマーを得ることが可能であった。通常、開始剤量や攪拌速度、温度などにより得られるポリマーの分子量は変化するが、このモノマーについても開始剤量、重合温度の組み合わせにより重量平均分子量で数万から200万レベルのホモポリマーが調製可能であった。

第三節 他のビニルモノマーとの共重合体の調製

次の課題は、このモノマーが現在使用されているモノマーと同一の環境で反応してくれるか否かという点にある。そこで、共重合体の調製をメチルメタクリレート(MMA)、アクリルアミド(AAm)、アクリロニトリル(AN)、スチレン(St)のいずれかとGEMAの共存下に試みた。MMAとの共重合を例として以下に述べる。

GEMA(2.23g, 7.65mmol)、MMA(0.77g, 7.65mmol)および2,2'-azoisobutyronitrile(AIBN)(0.01g, 0.08mmol)をDMF(10ml)に溶解し、これを減圧チューブの中に投入した。チューブの内容物を減圧下に液体窒素で凍結し、窒素を導入して常圧にする操作を3回繰り返した後、60°C窒素気流中で毎分130回の振盪を行ないながら反応を行

った。この重合に関しては、次節で述べる反応性比算出のため30分程度の低重合率の状態では反応を停止し、反応液をアセトン500 mlに注ぎこみ得られた沈殿を濾取した。得られた共重合体ポリGEMA-MMAの構造はIR、¹H-NMRのスペクトルデータによって確認した。他の共重合体成分を含む重合条件を表22に示した。

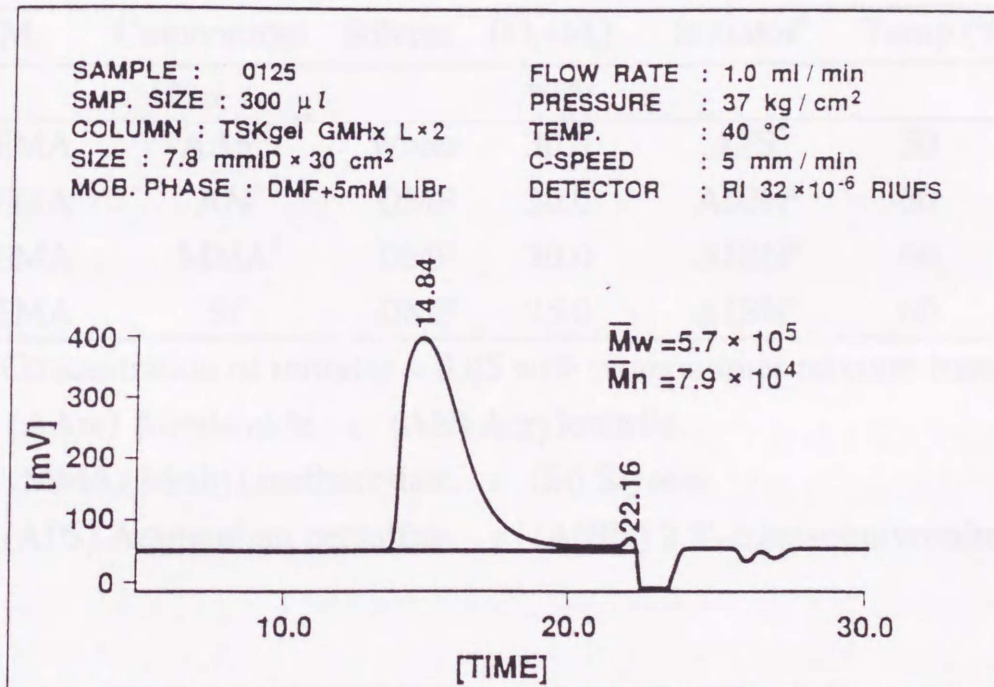


図20 GPC chart of poly[GEMA].

表22 Polymerization conditions of GEMA (M_1) with vinyl monomers(M_2)

| M_1 | Comonomer (M_2) | Solvent | $[M_1+M_2]$ wt% | Initiator ^a | Temp.(°C) |
|-------|---------------------|---------|-----------------|------------------------|-----------|
| GEMA | AAm ^b | Water | 30.0 | APS ^f | 50 |
| GEMA | AN ^c | DMF | 30.0 | AIBN ^g | 60 |
| GEMA | MMA ^d | DMF | 30.0 | AIBN ^g | 60 |
| GEMA | St ^e | DMF | 25.0 | AIBN ^g | 60 |

a Concentration of initiator = 0.05 wt% on monomer mixture bases.

b (AAm) Acrylamide. *c* (AN) Acrylonitrile.

d (MMA) Methyl methacrylate. *e* (St) Styrene.

f (APS) Ammonium persulfate. *g* (AIBN) 2,2'-Azoisobutyronitrile.

この検討で用いた4種の共重合成分とはいずれも容易に重合物を生成し、共重合に支障が無いことが示唆された。また、スケールを1モルに拡大し、表22で示した重合条件に従って反応を継続した結果、いずれのモノマーもTLC上からほぼ消失し、溶媒による沈殿精製でいずれも90%以上の収率でポリマーが得られたことから重合が完結することが確認された。

各モノマーの反応性を詳細に調べるため、反応開始時のモノマー混合組成を種々変化させ、先に述べた低重合率のポリマーを調製した後、これらを用いてモノマー間の反応性を解析した。この結果について次節に述べる。

第四節 共重合体におけるモノマーの反応性比

前節でスケールを拡大して共重合を行った場合、重合がほぼ完結することを述べたが、ここで得られる共重合体における各モノマーの組成は当然のことながら反応開始時点に投入したモノマーの組成比と等しくなる。しかし、各モノマー間の反応性は必ずしも同一とは限らず、ポリマーをミクロな視点でとらえると微小部分の組成が反応開始時点の組成が一致しない、すなわち極在化の現象が起こり得る。この現象の有無を考察することは、重合反応の極く初期のポリマーを取り出し、その組成を調べることで可能となる。著者らは前節で各種モノマー組成の低重合率ポリマーを調製したが、これの組成を解析することで反応性比を求めた。

図21はこれらの共重合体の反応開始時点のモノマー組成をX軸に、共重合体中の各モノマー組成をY軸にプロットしたものである。なお、共重合体中のモノマー組成はGEMA-AAm、GEMA-AN、GEMA-Stについては元素分析から、また、GEMA-MMAについては組成変化に対する元素分析値の変化が小さいため、共重合体を加水分解し遊離するグルコースを定量することで求めた。

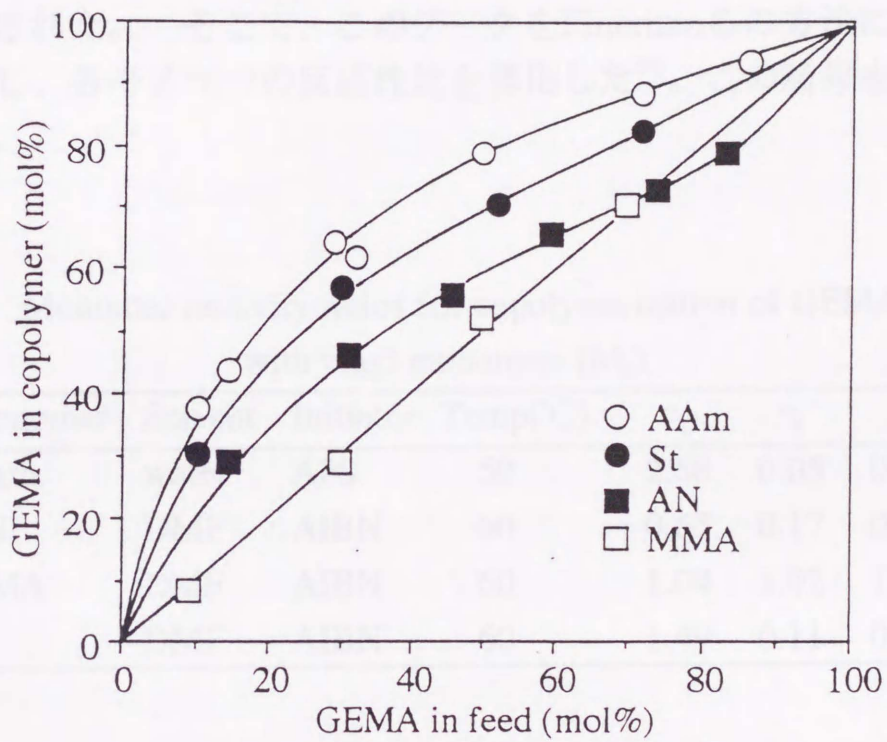


図21 Copolymerization of GEMA with other vinyl monomers.

MMAとの共重合では図21のプロットが完全に比例直線と重なり反応の初期においても開始時点の組成が保持されている。つまり、ランダムに共重合が起こっていることが推察された。一方、他の3種の共重合成分については図21のプロットが比例直線から上方にずれており、冒頭に述べたどちらか一方のモノマー成分の極在化現象が予想された。そこで、このデータをFinemanらの方法によって線形化し、各モノマーの反応性比を算出した⁵³⁾。この結果を表23に示した。

表23 Monomer reactivity ratios for copolymerization of GEMA (M_1) with vinyl monomers (M_2)

| Comonomer | Solvent | Initiator | Temp(°C) | r_1 | r_2 | $r_1 r_2$ |
|-----------|---------|-----------|----------|-------|-------|-----------|
| AAm | water | APS | 50 | 2.68 | 0.05 | 0.13 |
| AN | DMF | AIBN | 60 | 0.65 | 0.17 | 0.11 |
| MMA | DMF | AIBN | 60 | 1.04 | 1.02 | 1.06 |
| St | DMF | AIBN | 60 | 1.49 | 0.11 | 0.16 |

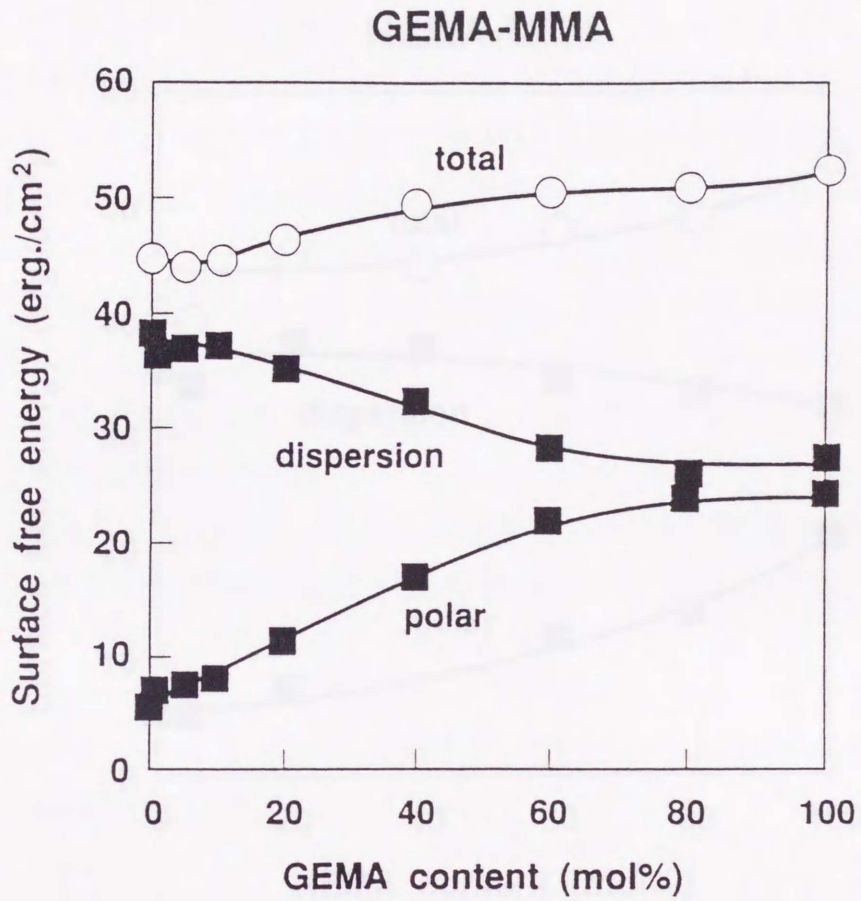
図21から予想されたように、GEMA-MMAの共重合に関しては r_1 、 r_2 およびその積がほぼ1となりランダムに共重合が起こっていることが確認された。他の3種の共重合成分、特にSt、AAmに関しては r_1 の値が r_2 と比較して非常に大きくGEMAとGEMAの反応速度がGEMAと共重合成分との反応速度に対して速いことを示している。従って、得られたポリマーはそれぞれGEMAあるいは共重合成分が微小構造では極在化した共重合体を与えることが明かとなった。

第五節 共重合体の表面自由エネルギー

得られたGEMAを含有するポリマーの機能開発が次のステップであるが、これに先立ってポリマー表面において糖が露出しているかあるいはポリマー内部に埋没しているかという点に興味を持たれた。ポリマーの用途を考えれば溶液としてよりも表面を利用する機会が多く、分子認識が介在する場面での使用を考慮すると表面に糖が露出していることが必須の条件となる。この表面状態の解析の一助として共重合体の表面自由エネルギーの算出を液滴を用いた接触角を測定することによって試みた。

GEMA-MMAをガラス板上にキャストしてフィルムを調製した後、このフィルムに対するヨウ化メチルおよびグリセリンの接触角 θ を求めた。通常、接触角の測定には水が用いられるが、ここで用いた共重合体表面に水が接触すると界面で膨潤現象が認められ、正確な接触角が測定できなかつたために他の液体を利用した。得られた接触角からOwensらの式に従って表面自由エネルギーを算出し、その結果を図22に示した⁵⁴⁾。

共重合体におけるトータルの表面自由エネルギーは共重合体に占めるGEMAの割合が増加するに従って増加している。これを分散力成分と極性力成分に分割してながめてみると、極性力成分は組成の増大とともに増加するのに対して分散力は逆に低下している。従ってトータルの表面自由エネルギーの増大は極性力成分の増加の程度が分散力成分の減少の程度を上回っていることによるものである。また、GEMA組成変化に対する表面自由エネルギー変化はほぼ一定の割合であり、共重合体表面に組成割合に応じて糖残基が露出していることを示唆している。同様の検討をGEMAに換えて2-HEMAで行った際の結果を図23に示した。表面自由エネルギー変化における極性力成分の変化の度合いを比べてみると、一目でGEMAの効果が大きいいことが良く理解された。



☒22 Effect of GEMA content on the surface free energy of GEMA-MMA copolymer films.

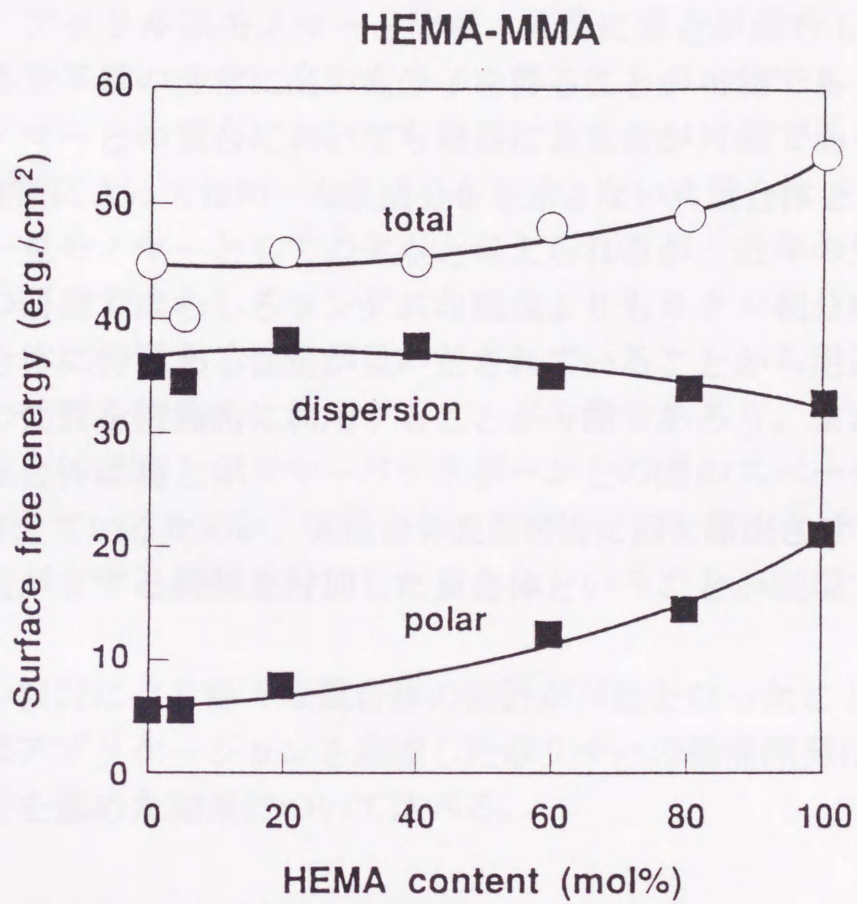


図23 Effect of HEMA content on the surface free energy of HEMA-MMA copolymer films.

第六節 総括

本項では著者が合成した新規糖モノマーの重合特性を明らかにした。これらをまとめると、ホモポリマーの調製においては従来の(メタ)アクリル系モノマーと同様、容易に重合が進行し、100万を越える分子量の非常に高い高分子を得ることが可能であった。既存のモノマーとの重合においても容易に共重合が可能であり、モノマーの種類によっては均一な組成分布を示さない共重合体を与えた。これは一見モノマーとしての欠点と考えられるが、近年の生体適合性材料の研究ではむしろランダムな組成よりもミクロ相分離している共重合体に特徴ある性質が見いだされていることから用途によってはこの性質を積極的に利用することが可能であろう。また、得られた共重合体は糖とポリマーバックボーンとの間のスペーサーが柔軟性を与えているためか、共重合体表面付近に糖を露出させており、まさに糖が有する機能を付加した重合体ということが表現できるであろう。

この検討により様々な重合体の設計が可能となったことから、次項ではアプリケーションを意識したポリマーの機能開発に焦点をあて検討を進めた結果について述べる。

第三項 糖含有ビニルモノマーより誘導されるポリマーの機能

第一節 緒論

前項までに著者は糖鎖を含有する合成高分子が容易に調製できることを明らかにしたが、親水ドメインが導入されたことで新たな機能が付与されるのではないかと、あるいは、さらに進めて糖が持っている機能を固定化した素材として生かされるのではないかとというようにこれらのポリマーの特性に対する期待が際限無く沸き上がってくる。この検討によって合成されたGEMAはグルコースという最もポピュラーな中性糖残基を有しているに過ぎないが、多くの潜在能力を秘めているのではないかと推測が本項での検討の原動力となっている。これまで報告された機能性高分子の用途を挙げれば評価すべき項目は数限りないが、機能評価の取り掛かりとして親水化による機能の発見をターゲットとして選択した。

本項では糖を含有するポリマーを親水ドメインとして、あるいはポリオール化合物という観点から、従来用いられてきた親水性高分子と比較することによって新たな特徴を見いだすことが可能であると判断し検討を行った。

第二節 ホモポリマーの熱分解挙動

この種のポリマーと天然糖質高分子との大きな差異は主鎖が合成高分子であるか糖鎖であるかという点にある。天然高分子の場合、リジッドな主鎖で側鎖の自由度はあまり大きくないが、GEMA含有ポリマーは例えて言えば主鎖から糖が一本の糸でぶら下がっているといった分子構造が推定される。加工時に相当の熱処理が行なわれることの多い合成高分子において熱的に安定なことが要求されることは言うまでもないが、分子構造からは一抹の不安が残される。そ

ここで、熱重量分析を手段としてこのポリマーの熱分解挙動を考察した。

重量平均分子量で約100万のGEMAホモポリマーを空気気流下毎分10°Cでの昇温を行った際の熱分解曲線を図24に示した。燃焼によって完全に重量がフラットになるまで2つの重量減少ピークが観察された。90°C付近に吸着水の放出と推定される微小なピークと223°C付近の大幅な重量減少を伴うピークである。後者が熱分解開始温度と見て問題は無いだろう。一般に、天然の糖質高分子は大半が200°C付近から熱分解を開始するがこれと比較しても糖鎖含有高分子が熱的な安定性という点で劣っていないということが明らかとなった。また、微小ピークについては吸着水によるものと推定したが、試験に供したポリマーは恒量となるまで十分乾燥したものをを用いていることから、ポリマーが有する結合水という考え方も否定できない。いずれにしても、生化学領域での使用に必須である滅菌処理などの温度条件にも耐えうるということが明らかとなった。また、この図からは判断し難いが、別途実施したTG-DSCの分析から本ポリマーは室温から熱分解温度まで明確なガラス転移点を持たないということが判明した。

第三節 ホモポリマーの生分解性

GEMAポリマーは分子内にエステル結合およびグリコシド結合を有している。これらの結合は低分子の場合、酸あるいはアルカリの加水分解などによって分解されることは周知である。この性質がポリマーとなることで変化するか否かを生分解性を考察する予備段階として評価した。

ポリGEMA(MW=1x10⁶)の1%水溶液10mlに20%水酸化ナトリウム水溶液1mlを加え室温にて一夜静置した。反応液を陽イオン交換樹脂カラムにかけ、溶出画分を分画分子量1万の限外濾過膜にか

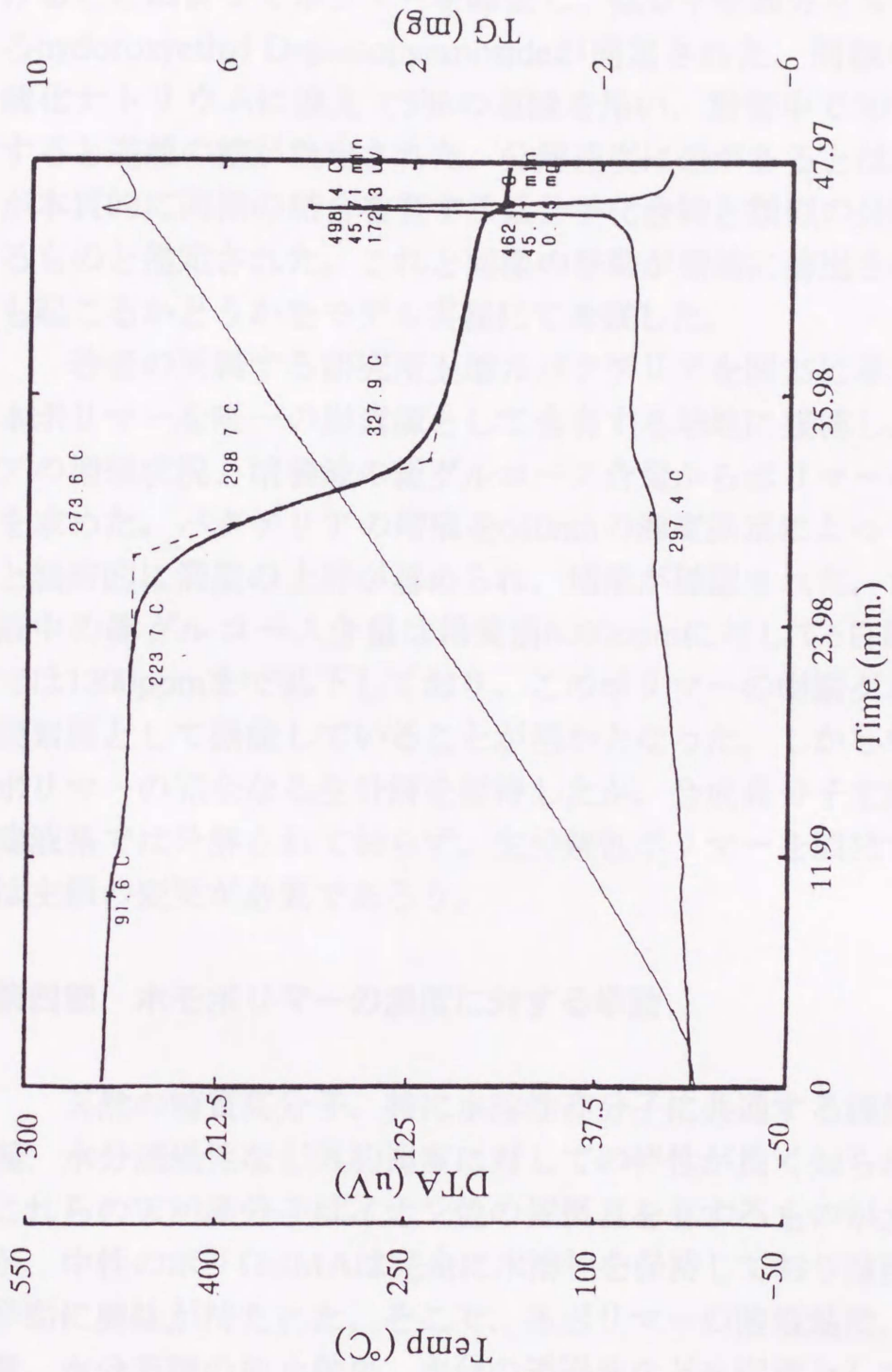


図24 TG/DTA analysis of poly [GEMA].

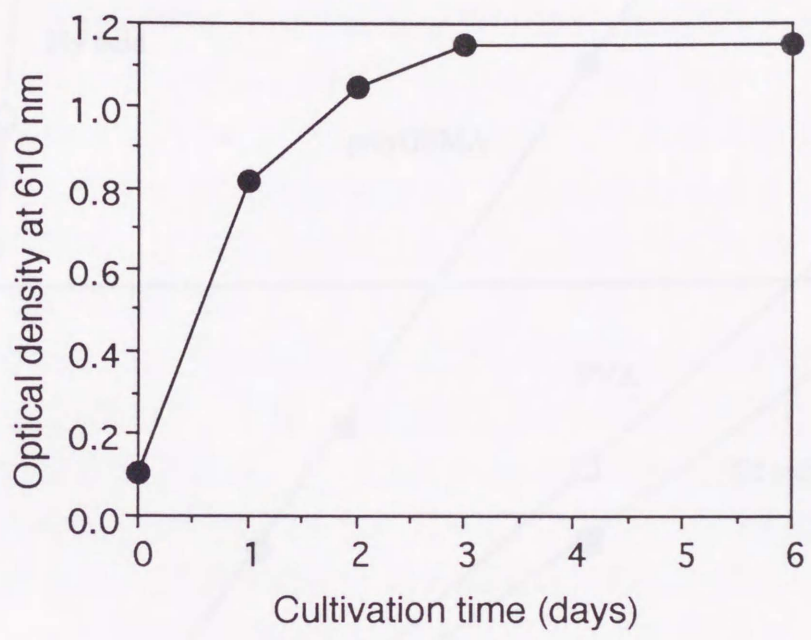
けることによってポリマーを除去し、低分子を部分を分析したところhydroxyethyl D-glucopyranosideが同定された。同様の実験を水酸化ナトリウムに換えて5%の塩酸を用い、封管中で90°C一夜加熱すると遊離の糖が検出された。分解速度に差があるとは考えられるが本質的に同様の結合を有する低分子化合物と類似の分解挙動をとるものと推定された。これと同様の挙動が環境に排出された場合にも起こるかどうかをモデル実験にて考察した。

著者の所属する研究所土壌のバクテリアを図25に示したように本ポリマーを唯一の炭素源として含有する培地に接種し、バクテリアの増殖状況と培養液の総グルコース含量からポリマーの分解状況を求めた。バクテリアの増殖を610nmの濁度測定によって追跡すると経時的に濁度の上昇が認められ、増殖が確認された。また、培養液中の総グルコース含量は培養前6000ppmに対して6日間の培養後では1200ppmまで低下しており、このポリマーの側鎖グルコースが炭素源として機能していることが明かとなった。しかしながら、本ポリマーの完全なる生分解を期待したが、合成高分子主鎖はこの培養液系では分解されておらず、生分解性ポリマーを開発するためには主鎖の変更が必要であろう。

第四節 ホモポリマーの湿度に対する挙動

天然の糖質高分子、特に水溶性高分子に共通する機能として保湿、水分透過性など外的湿度に対しての特性が良く知られている。これらの天然高分子はイオン性の置換基を有するものが大半であるが、中性のポリGEMAは完全に水溶性を保持しており湿度に対する挙動に興味を持たれた。そこで、本ポリマーの溶液粘度、平衡吸湿量、水分蒸発の抑止効果、水分の透過性などを指標として特性を明らかにすることを試みた。

溶液粘度は回転粘度計を用い30分後のトルクから求めた粘度を



Cultivation medium.

| | |
|---|-------|
| NH_4NO_3 | 0.3% |
| K_2HPO_4 | 0.5% |
| NaCl | 0.1% |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 0.02% |
| Yeast extract | 0.05% |
| poly[GEMA] | 1.0% |

pH = 7.0

☒25 Cultivation of soil bacteria in an aqueous medium including poly[GEMA].

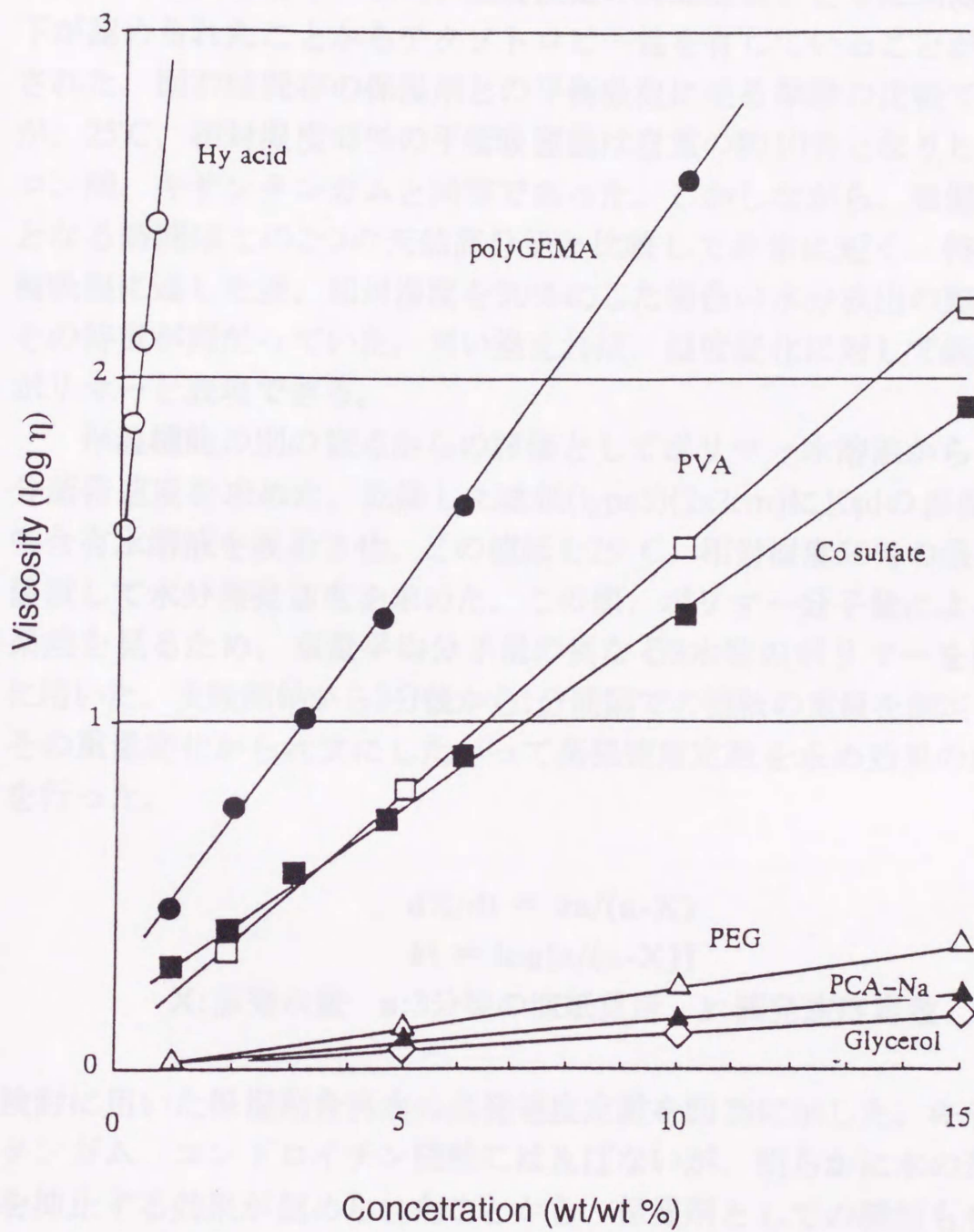


図26 Viscosity of water soluble polymers.

図26に示した。天然高分子の中では水分保持率の高いヒアルロンに次ぐ高い粘度を有し、また、粘度測定の間経過とともに粘度の低下が認められたことからチクソトロピー性を有していることが示唆された。図27は既存の保湿剤との平衡吸湿に至る挙動の比較であるが、25°C、相対湿度65%の平衡吸湿量は自重の約10%となりヒアルロン酸、キサントガムと同等であった。しかしながら、吸湿平衡となる時間はこの2つの天然高分子と比較して非常に短く、特に平衡吸湿に達した後、相対湿度を30%にした場合の水分放出の際にはその特徴が際立っていた。言い換えれば、湿度変化に対して鋭敏なポリマーと表現できる。

保湿機能の別の観点からの評価としてポリマー水溶液からの水分蒸発速度を求めた。乾燥した濾紙(type5)(2x2cm)に10 μ lの保湿剤1%含有水溶液を吸着させ、この濾紙を25°C、相対湿度50%の条件に静置して水分蒸発速度を求めた。この際、ポリマー分子量による効果差を見るため、重量平均分子量の異なる3水準のポリマーを同時に用いた。実験開始から3分後から1分間隔での濾紙の重量を測定し、その重量変化から次式にしたがって蒸発速度定数を求め効果の比較を行った。

$$dX/dt = ka/(a-X)$$

$$kt = \log[a/(a-X)]$$

X:蒸発水量 a:3分後の濾紙重量 k:蒸発速度定数

検討に用いた保湿剤含有水の蒸発速度定数を図28に示した。キサントガム、コンドロイチン硫酸には及ばないが、明らかに水の蒸発を抑止する効果が認められたことから、保湿剤としての機能も有することが判明した。この際GEMAの分子量と蒸発速度の抑止効果との間には負の相関が認められた。

図29はポリマーの水分透過性を考察したものである。乾燥した

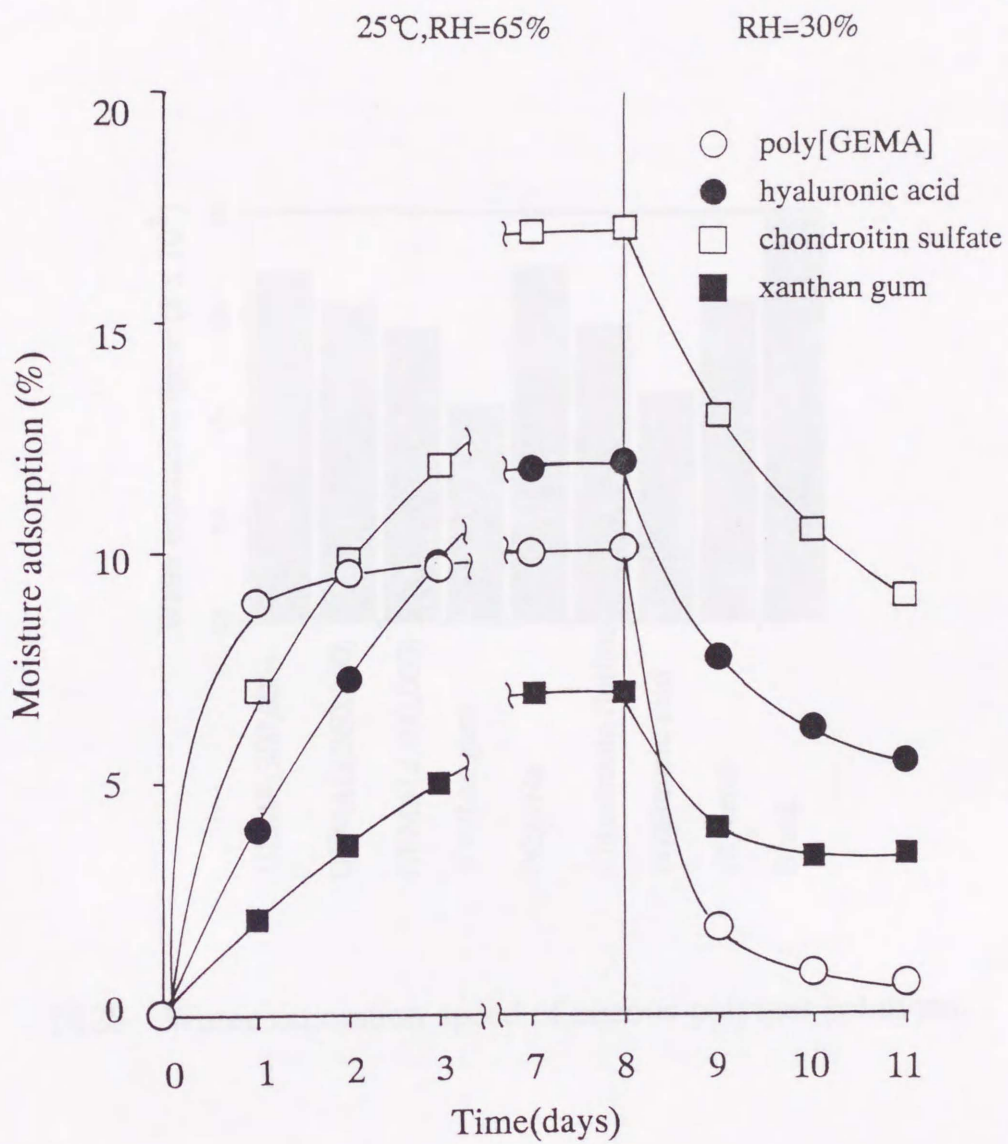
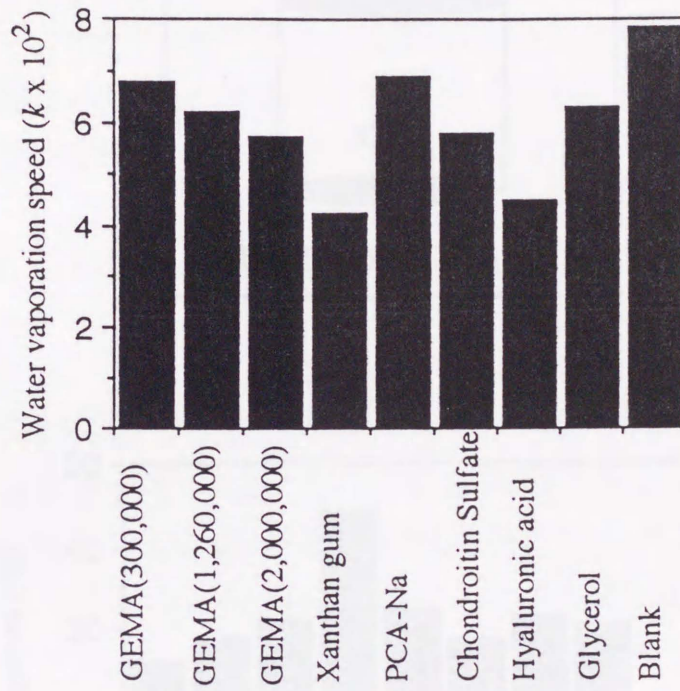
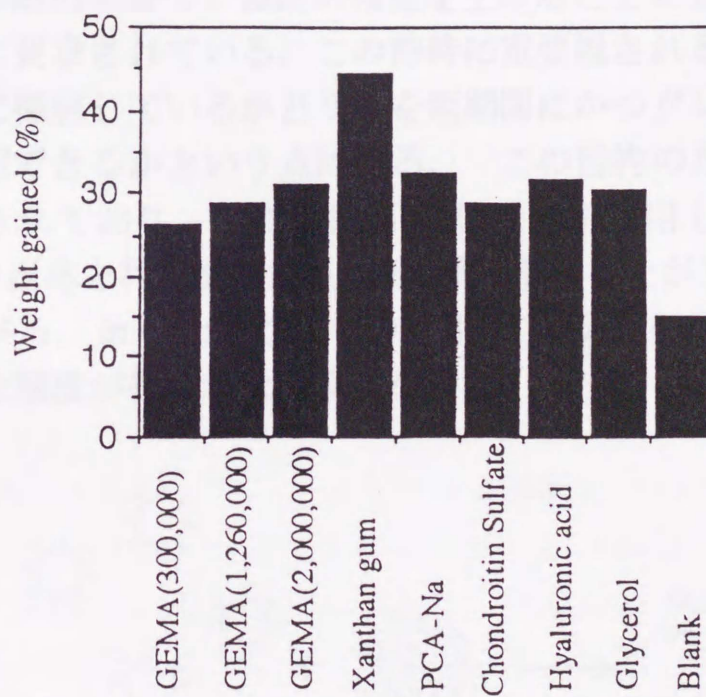
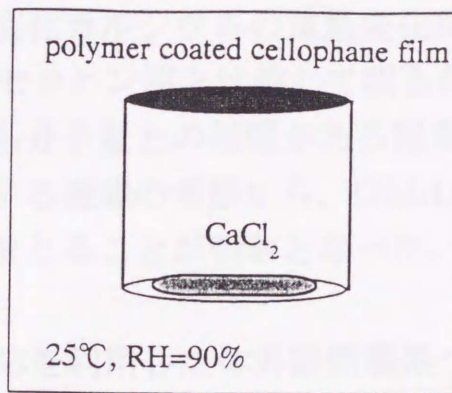


图27 亲水性粉末的吸湿活性。



☒28 Water vaporation speed of aqueous polymer solutions.



☒29 Moisture permeability of polymer coated films.

塩化カルシウムを入れた一定開口面積のガラス容器の口をポリマーを一定重量塗布して乾燥したセロハン膜で密封し、相対湿度90%の雰囲気中に置いた際の塩化カルシウムの重量変化から膜透過水蒸気量を求めた。GEMAはセロハン膜と比較して明らかに水分の透過を促進しており、ここでも分子量との相関がある程度認められた。

以上の湿度に対する機能の考察から、GEMAは天然の糖質高分子にかなり近い挙動をとることが明かとなった。

第5節 抗原-抗体反応を利用した体外診断薬系へのホモポリマーの添加効果

医療診断の分野で、診断の精度を上げることは正しい治療をするため常に要求されている。この際特に重要視されるのは、患者がその疾病に罹病しているかどうかを短期間にかつグレーゾーンを作らずに判定できるかという点にある。この目的のために各種診断薬が開発されており、中でも抗原-抗体反応を利用した診断薬は選択性が高い反応を利用するため診断精度が高いことが知られている。しかしながら、*in vitro*でこれらの抗原-抗体反応を用いた場合必ずしも良好な精度が得られない場合が少なくない。

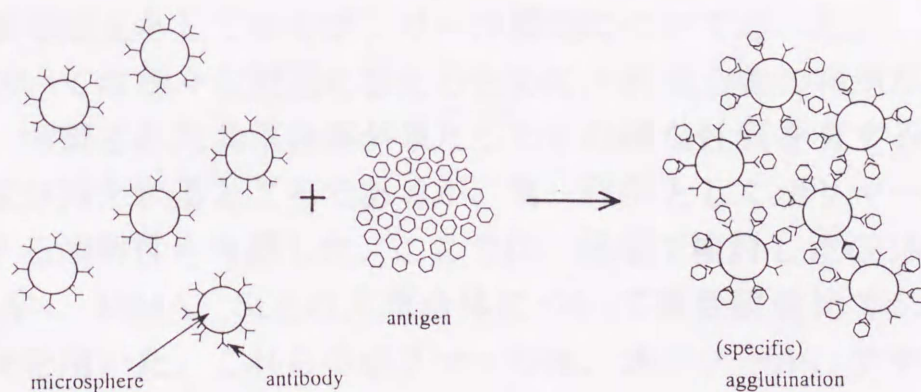


図33 Model of sensitized microsphere agglutination.

例えば図33に示した抗原-抗体の凝集を利用した診断薬では、非特異的な凝集によって陰性患者を陽性と判断したり、反応が十分進行せず実用感度が得られないといった事象がまま認められる。この課題の解決のために各種の添加剤の使用が検討されており、この中でポリオール化合物であるポリエチレングリコールが感度を上昇させるということが見いだされている⁵⁵⁾。このような系中にポリオール化合物があることによって何故に増感効果が認められるかは不明であるが、蛋白を安定化させるといった前章で述べた効果が機能しているとも考えられる。

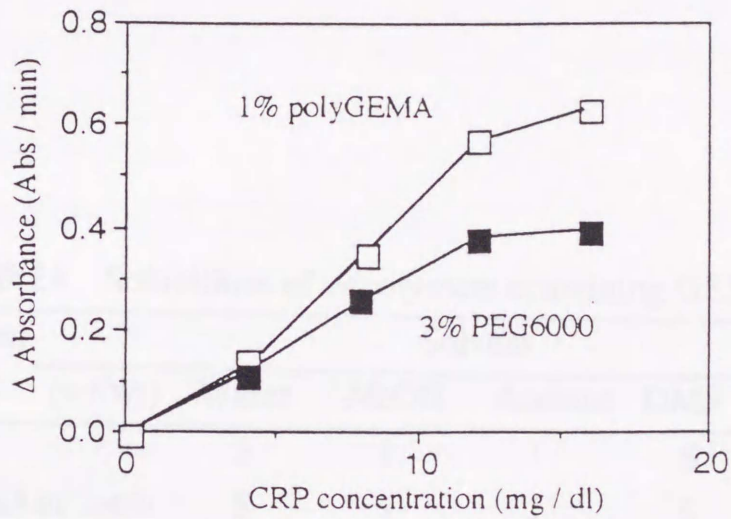
著者はラテックスのマイクロエマルジョンを担体としたこの種の診断薬にGEMAのホモポリマーを添加してその効果を考察した。図30、31はそれぞれC-反応性蛋白、抗ストレプトリジンOの例であるが、いずれの系においても対照としたポリエチレングリコールと比較して少量の添加でより高い感度が得られることが観察された。また、非特異的凝集についてもGEMAを添加したものは良く抑制されており、これらの系への添加剤として非常に優れた特性を有することが明かとなった。

第六節 共重合体の溶媒への溶解性

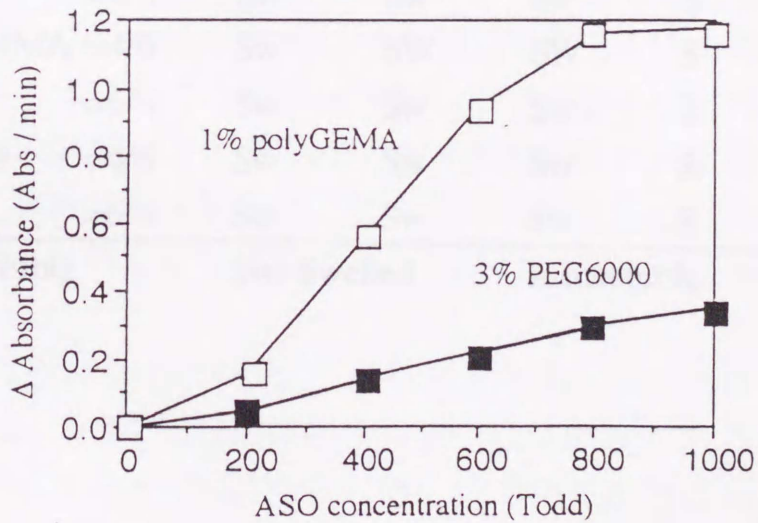
前節までは主としてホモポリマーの機能について述べたが、素材設計においては様々な要望に答えるために、共重合物の利用が要望される。調製された共重合体が果たしたどの様な性質を有するか大いに興味を持たれるところであるが、第一段階としてポリマーの溶媒に対する溶解性を考察した。ここでは、前項で検討したGEMAとAAm、AN、MMA、Stとの共重合体について重量組成比で6/4および4/6を用いた。これらのポリマーの水、メタノール、アセトン、DMF、DMSOに対する溶解性を表したのが表24である。

非プロトン性の極性溶媒に関してはホモポリマーを含むいずれ

Effect of poly[GEMA] on some immunodiagnoses



☒30. Correlation curves with absorbance change and CRP concentration in the presence of poly[GEMA] or PEG



☒31 Correlation curves with absorbance change and ASO concentration in the presence of poly[GEMA] and PEG

共重合体も溶解するが、また、MMA、Stと共重合体はそれ以外の極性溶媒に対して溶解するのみで溶解することはできない。一方、メノマー自身の溶解性が低いAAmとの共重合体の溶解挙動は、水やメノマーの溶解とほぼ一致しており、メノマー溶解あるいは共重合体の溶解を期待できることと予測される。この溶解性の異なる共重合体の調製が可能である。

表24 共重合体の溶解性への対応

表24 Solubilities of copolymers containing GEMA

| Polymer (wt/wt) | Solvent | | | | |
|--------------------|---------|------|---------|-----|------|
| | Water | MeOH | Acetone | DMF | DMSO |
| GEMA | S | I | I | S | S |
| GEMA/AAm =4/6 | S | I | I | S | S |
| =6/4 | S | I | I | S | I |
| GEMA/AN =4/6 | Sw | Sw | Sw | S | S |
| =6/4 | Sw | Sw | Sw | S | S |
| GEMA/MMA =4/6 | Sw | SW | SW | S | S |
| =6/4 | Sw | Sw | Sw | S | S |
| GEMA/St =4/6 | Sw | Sw | Sw | S | S |
| =6/4 | Sw | Sw | Sw | S | S |

S:Soluble Sw: Swelled I: Insoluble

の共重合体も溶解するが、AN、MMA、Stとの共重合体はそれ以外の極性溶媒に対して膨潤するのみで溶解することはできなかった。一方モノマー自体の親水性が高いAAmとの共重合体の溶解挙動はホモポリマーのそれとほぼ一致しており、モノマー組成あるいは共重合の相手を変化させることで用途に応じた溶解性の共重合体の調製が可能であろう。

第七節 共重合体の医療用途への適性

合成高分子を医療用途へ利用しようとする試みが最近数多くなされており、この中でも人工臓器の素材開発ということに多くの研究者が注力している。ここで合成高分子が具備すべき最も重要な性質は生体適合性であろう。従って、この評価のため生体物質とポリマー表面の相互作用を明らかにしておくことはこれらの適性を判断する上で必須のステップといえることができる。特に血漿蛋白質のポリマー表面への吸着挙動は人工臓器表面での凝血を引き起こす因子の一つであることから素材の適性を判断する上で予め明らかにしておく必要がある。そこで著者はGEMA-MMAからなる共重合体表面に対するフィブリノーゲンあるいは γ -グロブリンの吸着を考察することでこの適性判断を試みた。この際、対照としては既にソフトコンタクトレンズ等で使用実績のあるHEMA-MMAの共重合体を用いた。

予め0.1%のヒト-フィブリノーゲンあるいは γ -グロブリンを含有する0.1Mリン酸緩衝液(pH=7.4)を37°Cに保っておき、ここに共重合体のフィルムを5時間浸漬した。ポリマー表面に吸着した血漿蛋白質をBCA試薬により直接定量し吸着量とした。ただしBCA試薬の測定原理は蛋白による還元反応を利用したものであるが⁵⁰⁾、GEMA自身の還元性によって反応が起こることが確認されたためブランクとして血漿蛋白質を含有しない緩衝液中で同一の処理を行った

フィルムを用いた。この結果を図32に示した。

共重合体中の親水成分であるGEMAあるいはHEMAの増加に伴ってフィブリノーゲンのフィルム上への吸着は著しく抑制された。この際、GEMAあるいはHEMAの含有割合に対する吸着抑止効果を比較するとGEMAの方が圧倒的に高いことが明かとなった。一般にポリマー表面に親水基があるとエントロピー的な反発によりポリマーと蛋白の相互作用を抑止することが報告されているが今回の結果はこの事実と良く一致している。ここでは γ -グロブリンのデータは示さなかったが、フィブリノーゲンと同様に親水性のモノマー含量が増加するに従って吸着量が低下する現象が認められた。

第八節 総括

本項では糖モノマーGEMAより誘導される各種ポリマーの物理化学的性質や蛋白との相互作用を明らかにした。これらをまとめると、ホモポリマーは側鎖グルコースの親水性の影響で完全に水溶性であり、アルコールその他の有機溶媒には不溶であった。このポリマーの粉末の平衡吸湿量は自重の約10%であり天然の糖質高分子と比較して外的湿度変化に対する応答が速いという特徴を有していた。

生化学面での特性では、抗原-抗体反応による凝集法を利用した診断薬系に添加すると反応を促進するとともに非特異的凝集を抑制する効果が認められた。また、このモノマーを含有する共重合体の表面は血漿蛋白であるフィブリノーゲンの吸着を抑制し、その効果はアグリコンである2-HEMAを大きく上回り、生体適合性材料としての可能性も示唆された。

考えてみれば、生体の細胞膜すなわち脂質二分子膜表面には各種糖鎖が露出しており、このような環境の下で様々な生命維持活動が行なわれている。合成素材もこのような環境を模倣することで好ましい物性が得られると推定される。著者の合成したポリマー表面

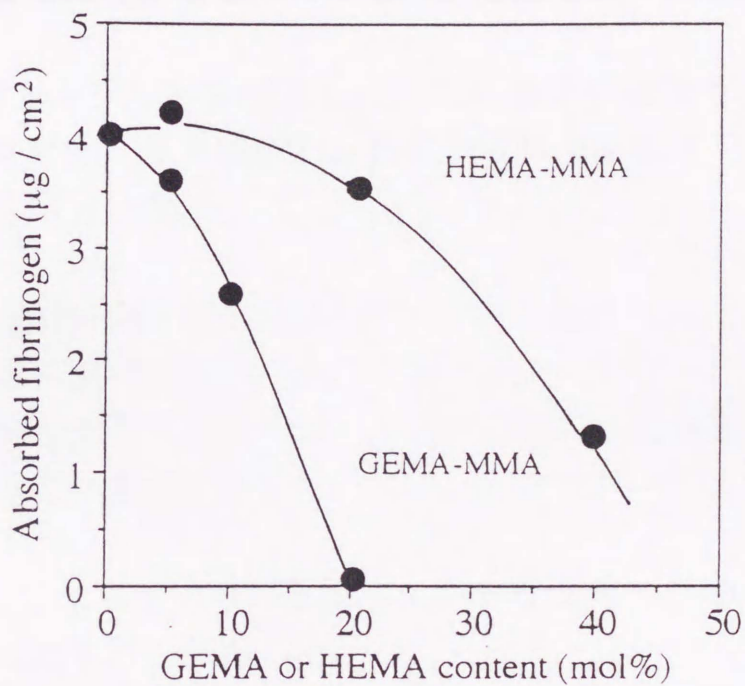


図32 Amount of adsorbed fibrinogen on copolymer surface including hydrophilic domain at 37°C.

はある意味ではbiomimetic materialということができるだろう。

現在これらのポリマーの水酸基をさらに官能基で修飾し、新たな特性を検討しているが硫酸化によるヘパリン類似の活性や繊維芽細胞の増殖を活性化するという機能が示唆されている。このような活性とゲル化やフィルム化により固定化が可能という素材としての長所が今後さらに生かせるのではないかと推定している。

2) アミノアクリル酸類の増強として、これまでの知見をもとに分子設計を行った結果、シオールの反応阻害の阻害効果を示すアミノアクリル酸類が合成された。

3) 従来代表的な修飾方法であるポリエチレン化の阻害を阻害した結果、ヘパリン類似のアミノアクリル酸、アミノアクリル酸などをアミノアクリル酸類を分子設計としてポリエチレン化する際に、立体阻害性、収率ともに優れることを突き付けた。

4) 上記の方法は水溶液系をオルトエーテル系溶液を用いるポリエチレン化反応にも有効であった。

5) この新たな方法により合成されたアミノアクリル酸、アミノアクリル酸ポリエチレン、重合性アミンを有するポリエチレンの合成を阻害し、それぞれ、酵素の安定化効果、タンパク質の加水分解に対する作用が阻害なこと、生体材料に対する親和性に優れることを突き付けた。ポリエチレンへの官能基の導入が素材開発の鍵であった方法であることを突き付けた。

現在、この研究成果から、親水性化剤、生体材料プレコーター、酵素阻害剤、体外診断薬などが期待される素材の開発を主とした形で既に実用化されており、今後さらに親水性化剤、プレコーター

結 論

本研究の成果を要約すると以下の5点となる。

- 1) アミノアシル基を糖水酸基の保護基として用いた場合、生化学的な手法により選択的な脱保護が可能であることを明かにした。
- 2) アミノアシル化糖の機能として、これまでの知見をもとに分子設計を行った結果、ショ糖の20倍程度の甘味域値を有するアミノアシル化糖が合成された。
- 3) 糖の代表的な修飾方法であるグリコシル化の触媒を探索した結果、ヘテロポリ酸がアルコール、フェノール、チオールなどをアセチル化糖を供与体としてグリコシル化する際に、立体選択性、収率ともに優れることを見いだした。
- 4) 上記の方法は未保護糖やオルトエステル誘導体を経由するグリコシル化反応にも有効であった。
- 5) この新たな方法論により合成されたアルキルグリコシド、アルキルチオグリコシド、重合性基を有するグリコシドの機能を検討し、それぞれ、酵素の安定化効果、タンパク質の高次構造に対する作用が緩和なこと、生体材料に対する親和性に優れることを明かにし、オリゴ糖への官能基の導入が素材開発の優れた方法であることを立証した。

現在、これらの結果から、機能性化粧品、香料プレカーサー、酵素繊維処理剤、体外診断薬などが糖の有する優れた機能を生かした形で既に実用化されており、今後さらに糖をキーコンポーネント

とした素材開発が盛んになると考えられる。著者が提供した方法論はこれらの開発の過程でクリアーしておく必要のある技術上の課題に対して、一つの解決策となりうるのではないかと期待している。

清化株式会社 専任技師三巻 正樹 氏、広島大学研究開発本部 共同研究員 長岡村岡和博 氏、河野時憲 氏、博士、ならびに開発を指導していただいた広島大学工学部応用機械工学科 佐藤 浩 氏、また、論文の査読を承めていただいた広島大学工学部宮川郡彦 教授には多大なるご指導と御意見をいただき、厚く御礼申し上げます。

本研究の発想には広島大学における共同研究費として多大なる援助と御礼申し上げます。また、北沢貞典 氏からはじめとする日本清化株式会社研究開発所 諸氏に本研究の全期間を通じて多大なるご協力を得、特に査読も御承知を致す次第です。

謝 辞

本研究を行なうに当たり、研究の許可を与えていただいた日本精化株式会社、宿本哲三社長、広瀬史年研究開発本部長、同研究所長奥村昌和博士、同開発部長榊原敏之博士、ならびに研究を指導していただいた広島大学工学部岡井秀雄助教授に深く感謝致します。また、論文の主査を努めていただいた広島大学工学部宮川都吉教授には多大なるご指導と助言をいただき、厚く御礼申し上げます。

田村正宏博士には広島大学における共同研究者として多大なる援助と助言を得ました。最後に、北沢貞哉博士をはじめとする日本精化株式会社研究所の諸兄には研究の全期間を通じて多大なるご協力を得、併せて深く感謝の意を表す次第です。

参考文献

- 1) N. Richtmyer, *Methods Carbohydr. Chem.*, **I**, 108 (1962).
- 2) D. S. Mathor and G. J. Robertson, *J. Chem. Soc.*, **1933**, 696.
- 3) S. Chaladed and J. Zemlieka, *J. Org. Chem.*, **39**, 2187 (1974).
- 4) M. Bergmann and L. Zervas, *Chem. Ber.*, **65**, 1192 (1932).
- 5) M. Ito, H. Nojima, J. Notani, D. Hasegawa, and K. Takai, *Tetrahedron Lett.*, 3089 (1974).
- 6) M. Tamura, K. Kinomura, M. Tada, T. Nakatsuka, H. Okai, and S. Fukui, *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 891 (1985).
- 7) M. Tamura, T. Nakatsuka, K. Kinomura, and H. Okai "Peptide Chemistry 1984" 329 (1984).
- 8) M. Tamura, M. Shoji, T. Nakatsuka, K. Kinomura, H. Okai, and S. Fukui, *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 2579 (1985).
- 9) M. Tamura, T. Miyoshi, N. Mori, M. Kawaguchi, K. Kinomura, N. Ishibashi, and H. Okai, *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 1401 (1990).
- 10) M. Tamura, K. Nakamura, K. Kinomura, and H. Okai, *Bioschi. Biotechnol. Biochem.*, **57**, 20 (1993).
- 11) I. Azuse, M. Tamura, K. Kinomura, H. Okai, K. Kouge, F. Hamatsu, and K. Koizumi, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **62**, 3103 (1989).
- 12) E. Fischer, *Ber.*, **26**, 2400 (1893).
- 13) W. Koenigs and E. Knorr, *Ber.*, **34**, 957 (1901).
- 14) K. C. Nicolaou, S. P. Seits, and D. P. Papahatjis, *J. Am. Chem. Soc.*, **105**, 2430 (1983).
- 15) T. Inazu, H. Hosokawa, and Y. Satoh, *Chem. Lett.*, 297 (1985).
- 16) R. U. Lemieux, K. B. Hendriks, R. V. Stick, and K. James, *J. Am. Chem. Soc.*, **97**, 4056 (1975).
- 17) J. E. Wallace and L. R. Schroeder, *J. Chem. Soc. Perkin II.*, 1632 (1976).
- 18) M. Kiso and L. Anderson, *Carbohydr. Res.*, **72**, C12 (1979).

- 19) N. K. Kochetokov, A. J. Khorlin, and A. F. Bochkov, *Tetrahedron*, **23**, 693 (1976).
- 20) B. Herferich, E. Bohn, and S. Winkler, *Ber.*, **63**, 989 (1930).
- 21) 木野村圭右、北沢貞哉、榊原敏之、第11回糖質シンポジウム予稿集、pp.19.
- 22) J. F. Keggin, *Nature*, **131**, 908 (1933).
- 23) S. Akiu, Y. Suzuki, Y. Fujinuma, T. Asahara, and M. Fukuda, *Proc. Jpn. Soc. Invest. Dermatol.*, **12**, 138 (1988).
- 24) C. Rocchiccioli-Deltcheff, R. Thaouvenot, and R. Frank, *Spectrochim. Acta.*, **32A**, 587 (1976).
- 25) T. Ogawa and M. Mitsui, *Carbohydr. Res.*, **54**, C17 (1977).
- 26) C. Amatore, A. Jutand, G. Meyer, and P. Sinay, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 718 (1990).
- 27) Y. Ito, T. Ogawa, M. Numata, and M. Sugimoto, *Carbohydr. Res.*, **202**, 165 (1990).
- 28) F. Dasgupta and P. J. Garegg, *Carbohydr. Res.*, **177**, C13 (1988).
- 29) J. Banoub and D. R. Bundle, *Can. J. Chem.*, **57**, 2091 (1979).
- 30) R. U. Lemieux and A. R. Morgan, *Can. J. Chem.*, **43**, 2199 (1965).
- 31) G. Wulff, U. Schroeder, and W. Schmidt, *Angew. chem. Int. Ed. Engl.*, **18**, 309 (1979).
- 32) P. J. Garegg and I. Kvarnstrom, *Acta. Chim. Scand.*, **B31**, 509 (1977).
- 33) K. Shinoda, T. Yamanaka, and K. Kinoshita, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **63**, 648 (1961).
- 34) D. C. Carter, J. R. Ruble, and G. A. Jeffrey, *Carbohydr. Res.*, **102**, 59 (1982).
- 35) D. E. Koeltzow and A. D. Urfer, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **61**, 1651 (1984).
- 36) T. Shimamoto, S. Saito, and T. Tsuchiya, *J. Biochem.* **97**, 1807 (1985).

- 37) M. J. Ortner, R. H. Sik, and C. F. Chignell, *Mol. Pharmacol.*, **15**, 179 (1979).
- 38) G. D. Miles and J. Ross, *J. Phys. Chem.*, **48**, 280 (1944).
- 39) "ASTM Standards 1980, part 30" 1980, pp.184.
- 40) "*Surface and Colloid Science*; Matijevic ed.; Wiley-Interscience: New York, NY, 1969; vol. 1.
- 41) S. McGire and T. Matson, *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, **52**, 411 (1975).
- 42) K. Kinomura and T. Sakakibara, *Trends Glycosci, Glycotechnol.*, **2**, 190 (1990).
- 43) J. V. Fiore and F. F. Nord, *Arch. Biochem.*, **26**, 382 (1950).
- 44) H. E. Longenecker and D. E. Halley, *J. Am. Chem. Soc.*, **59**, 2159 (1937).
- 45) C. V. Ramakrishnan, *Naturwissenschaften*, **41**, 16 (1954).
- 46) M.J. Newman and T. H. Wilson, *J. Biol. Chem.*, **255**, 10583 (1980).
- 47) 土屋友房、島本整、油化学、**37**, 386 (1988).
- 48) S. Saito and T. Tsuchiya, *Chem. Pharm. Bull.*, **33**, 503 (1985).
- 49) T. Shimamoto, S. Saito, and T. Tsuchiya, *J. Biochem.*, **97**, 1807 (1985).
- 50) Y. Sakai, H. Kanazawa, M. Tshuda, and T. Tsuchiya, *Biochim. Biophys. Acta.*, **1018**, 18 (1990).
- 51) K. Kobayashi. H. Sumitomo, and Y. Ina, *Polymer J.*, **17**, 567 (1985).
- 52) P. H. Weigel, E. Schmell, Y. C. Lee, and S. Roseman, *J. Biol. Chem.*, **253**, 330 (1978).
- 53) M. Fineman and S. D. Ross, *J. Polymer Sci.*, **5**, 259 (1950).
- 54) D. K. Owens and R. C. Wendt, *J. Appl. Polym. Sci.*, **13**, 1741 (1969).
- 55) 月向邦彦、蛋白、核酸、酵素、**30**, 1115 (1985).

- 56) P. K. Smith, R. I. Krohn, G. T. Hermanson, A. K. Malia, F. H. Gartner, M. D. Provenzano, E. K. Fujimoto, N. M. Goeke, B. J. Olson, and D. C. Klenk, *Anal. Biochem.*, **150**, 76 (1985).

Protecting Groups of Sugar Hydroxyls

K. Kurokawa, T. Tada, and H. Okai,

Peptide Chemistry 1987 ed. by N. S. Bhattacharya, Protein Research Foundation Osaka, 1987, pp. 75-80.

東京大学大学院理学部化学系

- 2) Syntheses of Methyl 2,3-di-O-glycyl- α -D-glucopyranoside and Methyl 4,6-di-O-glycyl-3,4-di-O-acetyl- α -D-glucopyranoside and Removal of Acetylacetyl Groups from Sugar Molecules.

E. Kurokawa, M. Tamura, T. Ogo, and H. Okai,

J. Carbohydr. Chem., **3**, 229-241 (1984).

東京大学大学院理学部化学系

- 3) Preparation of O-Acetylacetyl Sugars as Enzymatically Removable Protecting Groups for Hydroxyl Groups in Carbohydrates.

M. Tamura, E. Kurokawa, M. Tada, H. Okai, and N. Fukui,

Agri. Biol. Chem., **49**, 2001-2003 (1985).

東京大学大学院理学部化学系

- 4) Syntheses and Properties of Novel Vinyl Monomers Bearing a Glycoside Residue.

K. Kikuzaki, M. Okamoto, H. Kikuchi, and T. Sakai, *Chem. Lett.*, 1998, 1733-1735.

東京大学大学院理学部化学系

東京大学大学院理学部化学系

公表論文

- 1) *O*-Aminoacyl Sugars. A New Utility of Amino Acid Residues as the Protecting Groups of Sugar Hydroxyls.
K. Kinomura, T. Tada, and H. Okai,
"Peptide Chemistry 1982" ed. by S. Sakakibara, Protein Research Foundation Osaka, 1983, pp. 35-40.

序章

- 2) Syntheses of Methyl 2,3-di-*O*-glycyl- α -D-glucopyranoside and Methyl 4,6-di-*O*-glycyl-3,4-di-*O*-methyl- α -D-glucopyranoside and Removal of Aminoacyl Groups from Sugar Moieties.
K. Kinomura, M. Tamura, T. Oga, and H. Okai,
J. Carbohydr. Chem., **3**, 229-241 (1984)

序章

- 3) Preparation of *O*-Aminoacyl Sugars as Enzymatically Removable Protections for Hydroxyl Groups in Carbohydrates.
M. Tamura, K. Kinomura, M. Tada, H. Okai, and S. Fukui,
Agric. Biol. Chem., **49**, 2011-2023 (1985).

序章

- 4) Syntheses and Properties of Novel Vinyl Monomers Bearing a Glycoside Residue.
S. Kitazawa, M. Okumura, K. Kinomura, and T. Sakakibara,
Chem. Lett., **1990**, 1733-1736.

第一章、第二章

- 5) Alkyl Glycosids: Trite Compounds but Novel Materials.
K. Kinomura and T. Sakakibara,
Trends Glycosci. Glycotechnol., **2**, 190-195 (1990).
第一章
- 6) Functions of Alkyl Glucosides and their Application.
K. Kinomura and T. Sakakibara,
Fragrance J., **18**, 62-64 (1990).
第一章
- 7) Potential Application of Some Synthetic Glycoside to Food
Modification.
K. Kinomura, S. Kitazawa, M. Okumura, and T. Sakakibara,
"ACS Symposium Series; Food flavor and Safety, Molecular
Analysis and Design" ed. by A.M. Spanier *et al*, American Chemical
Society, Washington, DC, 1993, pp. 221-228.
第一章、第二章
- 8) Introduction of a Series of Alkyl Thiomaltoside, Useful New Non-
Ionic detergents, to Membrane Biochemistry.
S. Izawa, Y. Tomita, K. Kinomura, S. Kitazawa, M. Tsuda, and T.
Tsuchiya, *J. Biochem.* **113**, 573-576 (1993).
第一章
- 9) Monomer Reactivity of Glucosyloxyethyl Methacrylate, A Vinyl
Monomer Having Carbohydrate Residue on Its Side Chain.
K. Kinomura, S. Yamamoto, S. Kitazawa, M. Okumura, and T.
Sakakibara,
Chem. Express, **7**, 793-796 (1992).
第二章

- 10) Preparation and Some Properties of Glycoside-Bearing Polymer.
S. Kitazawa, M. Okumura, K. Kinomura, T. Sakakibara, K.
Nakamae, T. Miyata, M. Akashi, and K. Suzuki,
"Carbohydrates as Organic Raw Material II" ed. by G. Descotes,
VCH Weinheim, 1993, pp.115-135.

第二章

- 11) Recent Progress of Synthetic Polymer Containing Carbohydrate
Branch.
T. Sakakibara, K. Kinomura, S. Kitazawa, and M. Okumura,
科学と工業, **67**, 166-173 (1993).

第二章

- 12) Surface Characterizations of Copolymer Films Having Pendant
Monosaccharides.
K. Nakamae, T. Miyata, N. Ootsuki, M. Okumura, and K.
Kinomura,
Makromol. Chem., in press.

第二章

参考論文

- 1) Methyl 2,3-di-*O*-(L-alanyl)- α -D-glucopyranoside, A New Sweet Substance.
M. Tamura, K. Kinomura, M. Tada, T. Nakatsuka, H. Okai, and S. Fukui, *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 891-893 (1985).
- 2) Taste Exhibition of *O*-Aminoacyl Sugars.
M. Tamura, T. Nakatsuka, K. Kinomura, and H. Okai, in "*Peptide Chemistry 1984*" ed.by N. Izumiya, Protein Research Foundation Osaka, 1985, pp.329-332.
- 3) Methyl 2,3-di-*O*-(L- α -aminobutyryl)- α -D-glucopyranoside, A New Sweet substance and Tastes of Related Compounds of Neutral Amino Acids and D-Glucose Derivatives.
M. Tamura, M. Shoji, T. Nakatsuka, K. Kinomura, H. Okai, and S. Fukui., *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 2579-2586 (1985).
- 4) Mechanism for the Bitter Tasting Potency of Peptides Using *O*-Aminoacyl Sugars as Model Compounds.
M. Tamura, T. Miyoshi, N. Mori, M. Kawaguchi, K. Kinomura, N. Ishibashi, and H. Okai, *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 1401-1409 (1990).
- 5) Relationship between Taste and Structure of *O*-Aminoacyl Sugars Containing Basic Amino Acids.
M. Tamura, K. Nakamura, K. Kinomura, and H. Okai, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **57**, 20-23 (1993).

6) Preparation and Properties of [*p*-(benzyloxycarbonyl-oxy)phenyl]dimethylsulfonium Methyl Sulfate (Z-ODSP), [*p*-(*t*-Butoxycarbonyl-oxy)phenyl]dimethyl-sulfonium Methyl Sulfate (Boc-ODSP) and [*p*-(9-Fluorenylmethyloxycarobonyloxy)phenyl]dimethyl-sulfonium Methyl Sulfate (Fmoc-ODSP) as Water-Soluble *N*-Acylating Reagent.

I. Azuse, M. Tamura, K. Kinomura, H. Okai, K. Kouge, F. Hamatsu, and K. Koizumi, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **62**, 3103-3108 (1989).