

## 論文の内容の要旨

論文題目 呼吸系モデルとしての酸化的チオールエステル生成反応系の構築

氏名 景山 義之

### 1. 序

両親媒性分子が水中で集合化して生じたベシクルは、中空状の細胞膜類似様の構造を有し、小胞輸送システムの構築や、細胞機能の再構築などの研究領域で興味を持たれている超分子集合体である。近年、このベシクルに各種の機能性分子を内包させたり、分子組成を制御したりすることによって、機能性ベシクルの構築や、構造変化の研究が活発に展開されている。ベシクルは、両親媒性分子が構築する他の集合体と同様、その形態は準安定状態にある。また、ベシクル膜の中においては、非常に速い側方拡散や、膜に対して垂直方向の拡散が絶えず行われている。筆者は、このようなベシクルの特性の理解に基づいた、細胞類似様システム(人工生命体)の構築を目指し、*N*-ドデシルニコチンアミドブロミド( $C_{12}NA^+Br^-$ )とその還元体である  $C_{12}NAH$  の混合ベシクル(第 5 章: Fig. 1)の、フローサイトメトリーを用いた計測、および、生体反応を模倣した呼吸モデル反応系のベシクル膜中への構築(第 2-4 章)を行った。

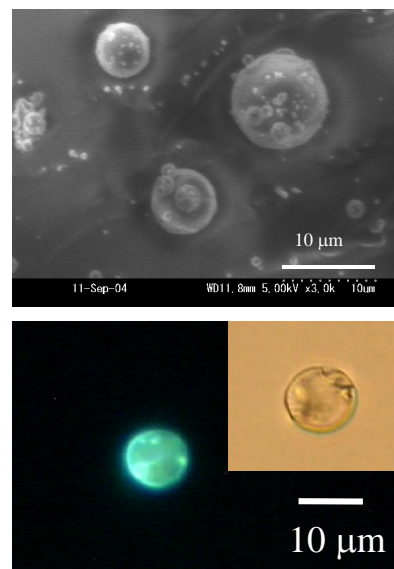


Fig. 1. Microscopic images of  $C_{12}NA^+$  and  $C_{12}NAH$  mixed vesicle: (upper) Cryo-SEM image; (lower) Fluorescent and DIC microscopic image.

## 2. 呼吸モデル反応としての酸化的チオールエステル生成反応(第1章)

生体中の呼吸反応経路においては、物質の酸化に伴うエネルギーの獲得が行われている。呼吸系の一つ、ピルビン酸からのアセチル CoA 生成過程では、 $\text{NAD}^+$ を電子受容体としたピルビン酸の酸化的分解によって、高エネルギー結合としてのチオールエステル結合をもつアセチル CoA を生成している。このアセチル CoA 生成反応を触媒している酵素は、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体(PDC)である。その反応は、チアミンニリン酸(TPP)によってピルビン酸が活性化され、酸化、アセチル基転移を経て、アセチル CoA が生成するという機構で進行している(Fig. 2)。こうして生成したアセチル CoA のチオールエステル結合の、生理条件下における加水分解に伴う自由エネルギー変化は、 $\Delta G = -7.5 \text{ kcal mol}^{-1}$ であり、ATP に匹敵し、アセチル CoA は高エネルギー活性型運搬体の一つとして数えられる。すなわち、アセチル CoA 生成反応は、呼吸反応の一部でありながら、グルコースの酸化に伴うエネルギーを ATP(高エネルギー活性型運搬体)に変換する呼吸反応の全体を反映・凝縮している反応といえる。

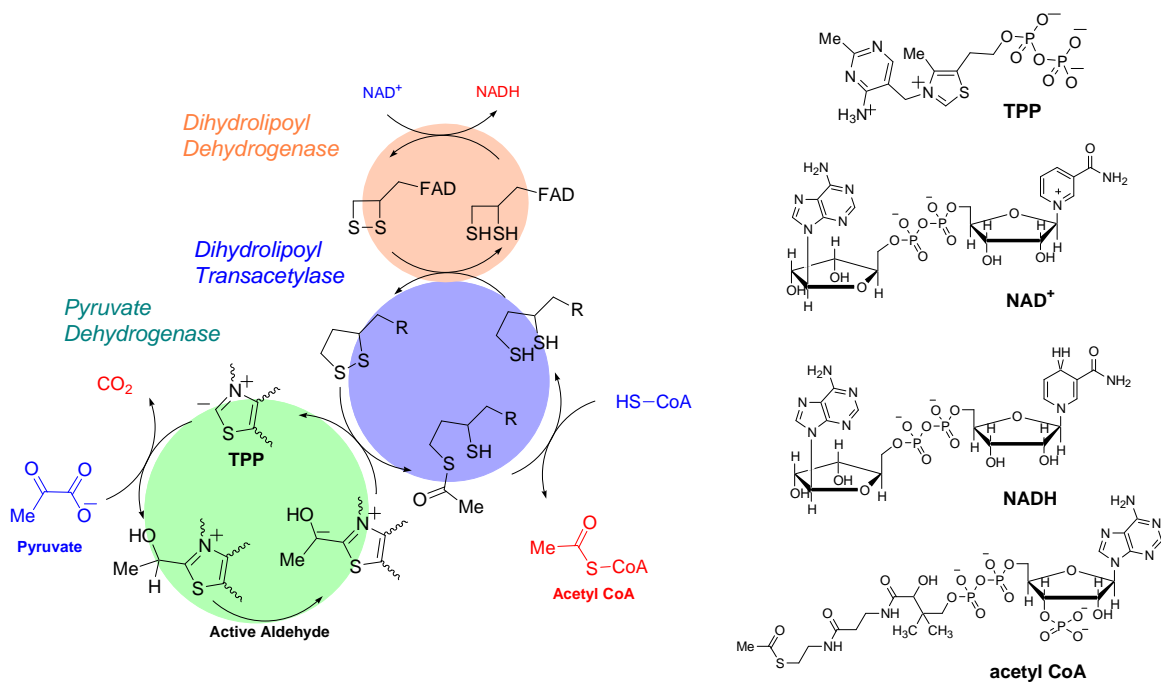


Fig. 2. Cellular oxidative thiolester formation catalyzed by pyruvate dehydrogenase complex.

### 3. 均一有機溶媒中における酸化的チオールエステル生成反応系の構築 (第2章)

PDC の活性中心であるチアゾリウム塩が触媒するアルデヒドの生体模倣反応として、ベンゾイン縮合反応と酸化反応・酸化的エステル化反応が知られている。特に、ベンゾイン縮合反応は、シアン化物イオンを用いないベンゾイン合成反応として注目され、キラルなベンゾイン合成法の開拓、そしてその反応機構に関する議論も活発に行われてきた。また、チアゾリウム塩を用いたカルボン酸の生成反応や、エステル生成反応についても報告されてきた。しかし、高エネルギー分子であるチオールエステル生成反応については、副反応が進行するために、これまで実現されていない。

そこで筆者は、生体反応を模倣した酸化的チオールエステル生成反応系の構築を、有機溶媒中で行わせることを検討した。各種条件を検討したところ、4-置換ベンズアルデヒド(1)と *n*-オクチルチオール(2)から、チアゾリウム塩(BTz<sup>+</sup>Br<sup>-</sup>)を触媒に、アゾベンゼン(3)を酸化剤に用いることによって、効率よく相当するチオールエステルを得ることを見出した。この反応は、Fig. 3 に示した反応で進行しているものと考えられる。

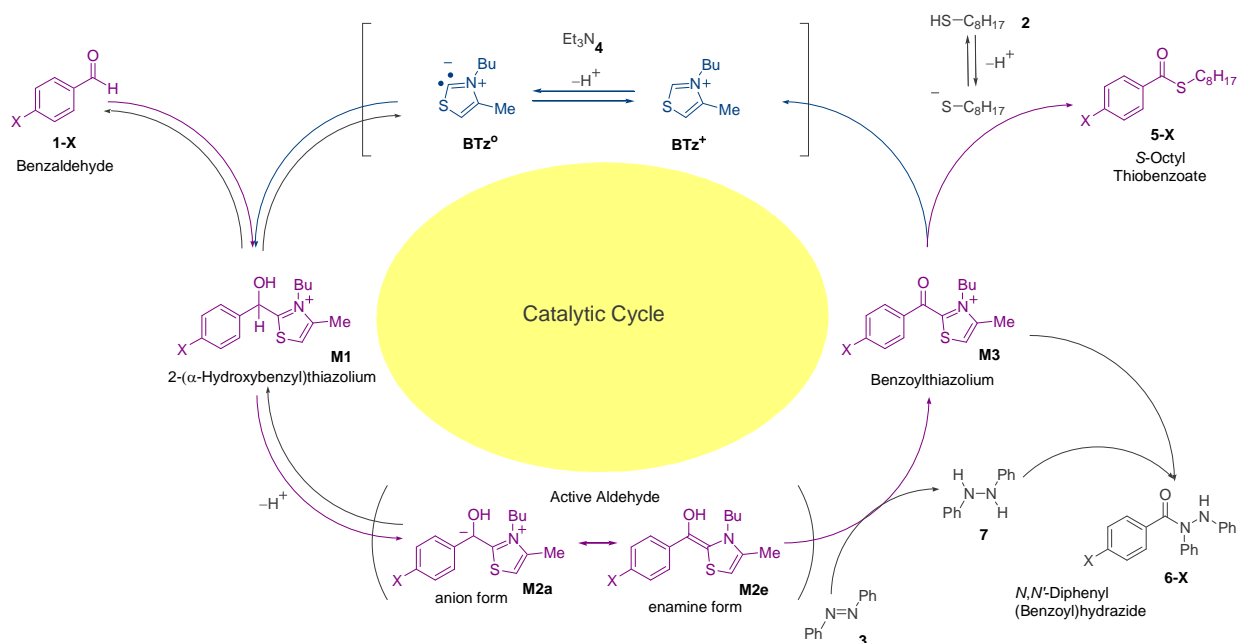


Fig. 3. Reaction scheme of the thiazolium-catalyzed thiolester formation from benzaldehyde using azobenzene as oxidant.

#### 4. 酸化的チオールエステル生成反応の特徴(第2章)

この酸化的チオールエステル生成反応系をベシクル反応場に構築する準備として、反応に関する知見を深めるために、速度論的機構を検討した。

酸化的チオールエステル生成反応における、ベンズアルデヒド(1)の減少速度式を、Fig. 3 を基に解くと、式(1)を得る。

$$v_{\text{obs}} = -\frac{d}{dt}[\text{S}] = \frac{k_1 k_2 k_3 [\text{Az}]_0 k_4 [\text{Th}]_0 [\text{Tz}^\circ]_0 [\text{S}]}{A k_4 [\text{Th}]_0 + B k_1 [\text{S}]} \quad (1)$$

$$A = k_{-1} k_{-2} + k_3 [\text{Az}]_0 (k_{-1} + k_2)$$

$$B = k_2 k_3 [\text{Az}]_0 + k_2 k_4 [\text{Th}]_0 + k_{-2} k_4 [\text{Th}]_0 + k_3 [\text{Az}]_0 k_4 [\text{Th}]_0$$

ここで、 $[\text{S}]$ 、 $[\text{Th}]_0$ 、 $[\text{Az}]_0$ 、 $[\text{Tz}^\circ]_0$  は、それぞれ **1**、**2**、**3**、**BTz<sup>o</sup>** の初期濃度である。また、実験から  $A k_4 [\text{Th}]_0 \gg B k_1 [\text{S}]$  であったことから、観測された  $[\text{S}]$  の減少速度定数  $k_{\text{obs}}$  は、式(2)として表される。

$$k_{\text{obs}} = \frac{k_1 k_2 k_3 [\text{Az}]_0 [\text{Tz}^\circ]_0}{k_{-1} k_{-2} + k_3 [\text{Az}]_0 (k_{-1} + k_2)} \quad (2)$$

各種の4-置換ベンズアルデヒドについて反応速度定数を求め、ハメットの置換基定数に対してプロットを行ったところ、Fig. 4 のように曲線状のハメットプロットを与えた。これは、Fig. 3 に示した多段階反応の反応において、ベンズアルデヒドの置換基によって律速段階が変化するためであると結論づけられた。すなわち、シアノ基などの電子求引性の強い置換基を持つベンズアルデヒドでは、ベンズアルデヒドの減少速度定数が式(2)で表される一方、電子供与性の置換基を持つベンズアルデヒドでは、 $k_{\text{obs}} = k_1 k_2 [\text{Tz}^\circ]_0 / (k_{-1} + k_2)$  として表され、酸化の反応速度( $k_3$ )は反応全体の速度にほとんど影響を及ぼさない。これらのことから、この酸化的チオールエステル生成反応の効率を決めるのは、アルデヒド(1)とチアゾリウム(**BTz<sup>+</sup>**)から活性型アルデヒド(**M2**)を生じる反応ステップであることが分かった。

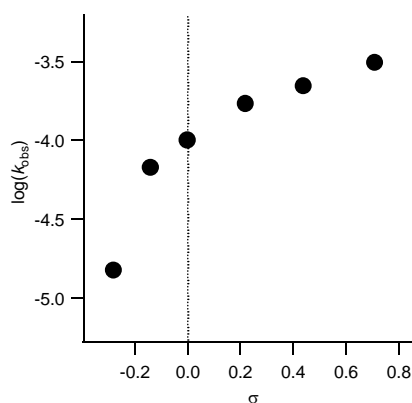


Fig. 4. Log( $k_{\text{obs}}$ ) plot for thiazolium-catalyzed azobenzene oxidation of substituted benzaldehydes against  $\sigma$  value.

## 5. 酵素類似様反応場“ベシクル反応場”における酸化的チオールエステル生成反応系の構築(第3章)

次に、ベシクルへの呼吸モデル反応系を構築するべく、ジメチルジミリスチルアンモニウムブロミド(DMDAB)と、両親媒性触媒である 3-ドデシル-4-メチルチアゾリウムブロミド(DTz<sup>+</sup>Br<sup>-</sup>),そして両親媒性の電子受容体である *N*<sup>1</sup>-ドデシルニコチンアミドブロミド(C<sub>12</sub>NA<sup>+</sup>Br<sup>-</sup>)の混合ベシクル中において、4-メトキシカルボニルベンズアルデヒド(1-COOMe)と *n*-オクチルチオール(2)から、相当するチオールエステル(5)の生成反応を検討した。酸化剤に *N*<sup>1</sup>-ドデシルニコチンアミドブロミド(C<sub>12</sub>NA<sup>+</sup>Br<sup>-</sup>)を用いたのは、還元電位が活性型アルデヒドの酸化電位に近く、マイルドな酸化反応が可能であることが予想されたことに加え、ベシクル膜との親和性が良く、安定なベシクルを構築することができたからである。この反応は顕著な pH 依存性を示し(Fig. 5), pH の増大に伴って、1 の反応率は向上した。一方で、反応 60 分後の 5 の収率は、pH = 8.1 で最大(78%)となり、それよりも pH が低くても高くても、収率は減少した。

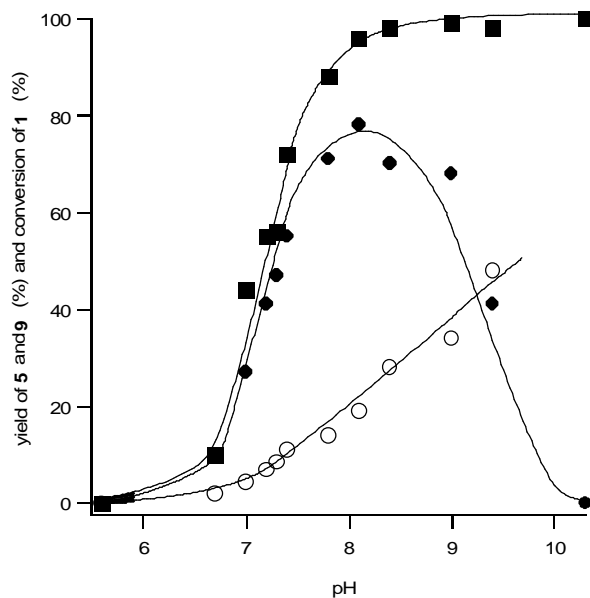


Fig. 5. Effect of pH on the yield of 5 (●) and 9 (○) and conversion of 1 (■) after 60 min reaction inner vesicular membrane.

## 6. ベシクル反応場による酸化的チオールエステル生成反応の高効率化(第3章)

ベシクル中における反応では, Fig. 6 に示すように, 非触媒反応を経由するアルデヒドの酸化反応が副次反応として存在することが分かった。

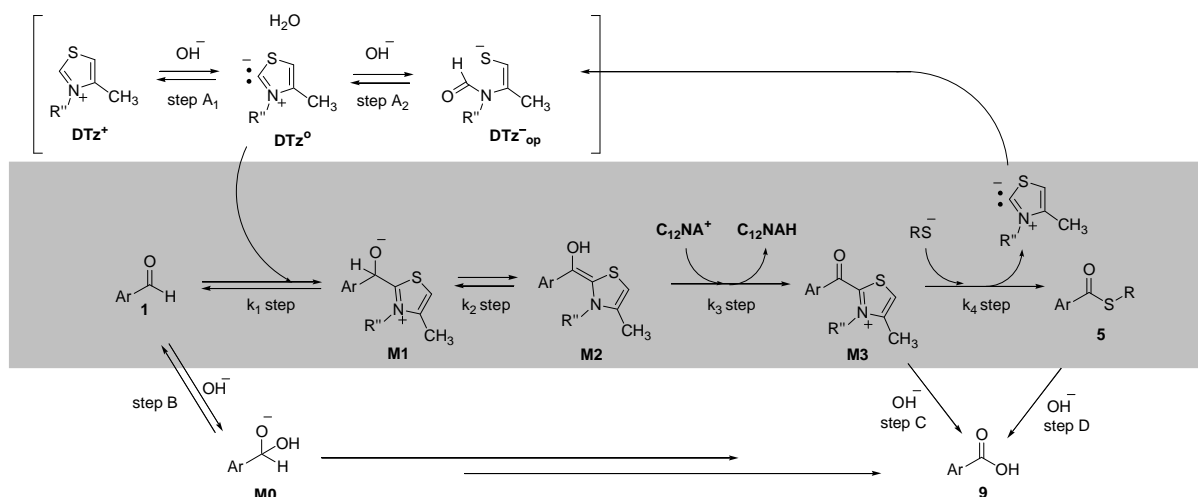


Fig. 6. Scheme of thiazolium ( $\text{DTz}^+$ )-catalyzed oxidative thiolester formation using amphiphilic nicotinamide ( $\text{C}_{12}\text{NA}^+$ ) in vesicular reactor in aqueous solution.

Fig. 6 から, 各基質に関して反応速度式を立てると, 時刻  $t$  での各基質の濃度は, 反応速度定数  $k_\alpha$ ,  $k_\beta$ ,  $k_\gamma$  を用いて, 式(3-5)のように与えられる。

$$[\text{S}] = [\text{S}]_0 \exp^{-(k_\alpha + k_\gamma)t} \quad (3)$$

$$[\text{P}] = \frac{k_\alpha [\text{S}]_0}{k_\beta - (k_\alpha + k_\gamma)} \{ \exp^{-(k_\alpha + k_\gamma)t} - \exp^{-k_\beta t} \} \quad (4)$$

$$[\text{A}] = \frac{[\text{S}]_0}{k_\beta - (k_\alpha + k_\gamma)} \{ -(k_\alpha - k_\beta + k_\gamma) - (k_\beta - k_\gamma) \exp^{-(k_\alpha + k_\gamma)t} + k_\alpha \exp^{-k_\beta t} \} \quad (5)$$

ただし,  $[\text{S}]$ ,  $[\text{P}]$ ,  $[\text{A}]$  は, それぞれ **1**, **5**, **9** の濃度である。  $k_\alpha$ ,  $k_\beta$ ,  $k_\gamma$  は, それぞれ **1** から目的物 **5** の生成, **5** の加水分解による **9** の生成, **1** からの非触媒反応経路による **9** の生成に關与する反応速度定数であるが, 具体的内容については, 本編を参照されたい。この式を実験結果にプロットさせることで, 反応速度定数  $k_\alpha$ ,  $k_\beta$ ,  $k_\gamma$  が見積もられ, その結果, チアゾリウム触媒の活量を向上させることが, 反応の高効率化に直結することが分かった。

本ベシクル反応場による酸化的チオールエステル生成反応系においては, 脂質二分子膜の疎水性環境によって, アルデヒド(**1**)と生成物であるチオールエステル(**5**)の, 水和反応, および加水分解反応を防ぎ, 反応の効率化に寄与していることが推察されるだけでなく, カチオン性の膜分子によって, 膜表面近傍の対アニオン濃度が増大し, 塩基性が増したことで, チアゾリウム環の2位のプロトンの脱離が促進されたために高効率な反応系が構築することができたと考察された。

## 7. 細胞類似様システムの構築へ(第4章)

ここまで、3-アルキル-4-メチルチアゾリウム塩が触媒する酸化的チオールエステル生成反応系の構築と反応機構の検討を行い、4-メトキシカルボニルベンズアルデヒド(1)と *n*-オクチルチオール(2)から、相当するチオールエステル(5)を効率よく得ることに成功したことについて述べてきた。これらは、PDC が触媒するアセチル CoA 生成反応の最初の模倣反応系と位置づけることができる。

しかしながら、この反応系の面白さは、単なる酵素類似様反応場における生体模倣反応系に留まらない。酸化的チオールエステル生成反応は、アルデヒドのもつエンタルピーを、酸化によって開放し、生体内で使われるエステル誘導体(酸縮合化合物)を生成するという点で、いわば呼吸モデル反応である。

ところで、反応基質として、ベンズアルデヒド誘導体(1<sup>''</sup>)を、またチオールとして 4-ピリジンエタンチオール塩酸塩(2<sup>''</sup>)を用いると、生成物として両親媒性チオールエステル(5<sup>''</sup>)が得られる。この反応においては、5<sup>''</sup>による自発的なジャイアントベシクルが生成することを見出した(Fig. 7)。筆者が見出したこの自発的ベシクル生成系は、非常に原始的とはいえ、有機化学的に構築した代謝反応によって細胞類似構造が発現する最初のモデル反応系であり、生命が細胞構造をもつに至ったプロセスを、化学的反応モデルから理解するための第一歩といえる。

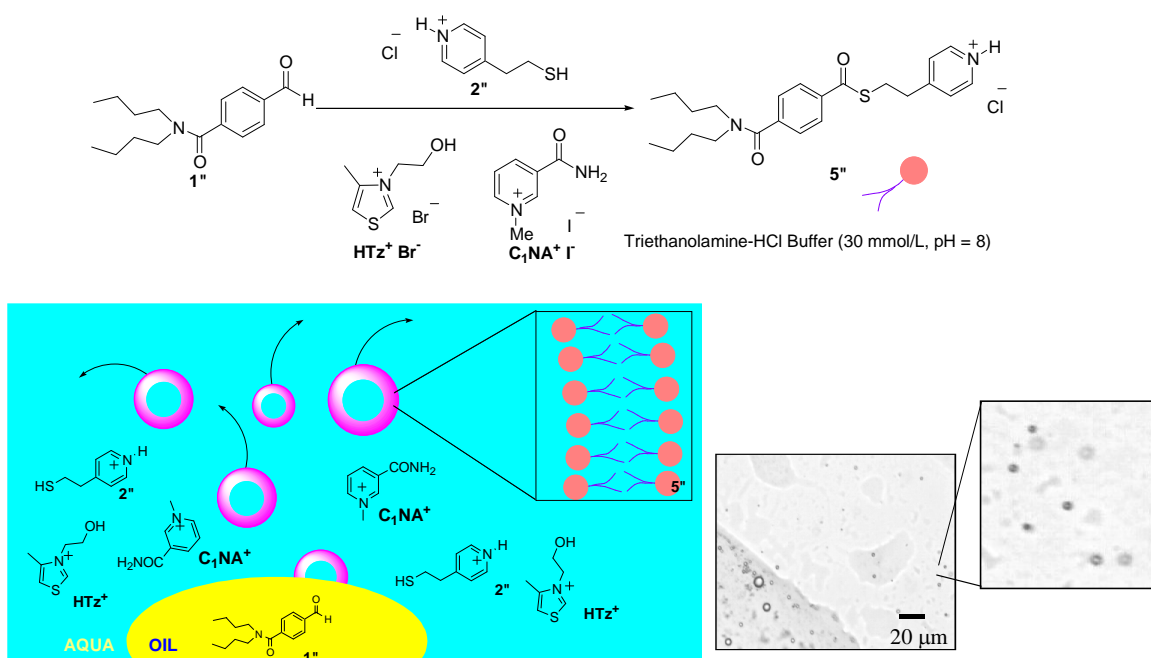


Fig. 7. Spontaneous giant vesicle generation by oxidative formation of an amphiphilic thioester on w/o surface.