水溶性高分子ならびに合成二分子膜の触媒機能に関する研究

国武 豊喜

Toyoki Kunitake, 九州大学 工学部合成化学科

1. 研究の端緒

水溶性高分子の触媒機能を研究するに当たっては、温和な条件下での高い触媒効率、高選択性など酵素作用に特徴的な触媒機能を実現することが一つの目標となる。われわれがこの分野に興味をもち、実際に仕事を始めたのは1964年の4月であった。当時の状況は、酵素の触媒機構に対する有機化学的なアプローチが加水分解酵素を中心によく盛んとなり、Bender一派の活発な研究がキモトリプシンを用いて行なわれていた。他方、W. Kauzmann は、1950年代の終りに疎水性相互作用の重要性を明快に指摘していたが、この概念が酵素化学者の関心を集めはじめたのもこの頃であった。すでに、Overbergerらの合成高分子を用いて酵素モデルを得ようとする試みが実を結んでおり、1963年にはポリビニルイミダゾールの触媒作用に関する最初の報文が出された。また Letsinger ともポリビニルピリジンがフェニルエステルの分解反応でベル型の pH-速度曲線を与えることを発表していた(1962年)。

われわれの目標は、基質とりこみ機能と触媒機能を併せもつ高分子触媒を得ることであった。とりこみ機能を与えるためには、一般的な重要性をもつと思われる疎水性相互作用を用いることにした。当初、とりこみ部位と触媒基が酵素における同じように固定した位置関係にあらねばならぬと考え、イミダゾールやピリジン環を含むナフタレン化合物、フェナントレン化合物をモノマーへと誘導することを試みていたが、いずれも成功にはいたらなかった。数年間、いくつかの試みを行なった果てに策が尽きて、ヘモグロビンのモデルとして使うために合成していた *N*-ビニルイミダゾールと *N*-ビニルピロリドン (いずれも市販されていた) のコポリマー1を触媒として用い、フェニルエ

ステルの加水分解を行なったところ、基質のとりこみによる酵素反応類似の Michaelis-Menten の動力学 [(1) 式] が見いだされ、研究展開の緒となった(1967年)¹⁾。ほぼ同時期に米国の Kopple も同じポリマーを触媒とするフェニルエステルの加水分解を検討しているが、基質のとりこみは観察していない²⁾。この相違は Kopple が、加水分解酵素系における非特異基質としてしばしば用いられていた、酢酸 *p*-ニトロフェニル (PNPA) を基質としており、これが水不溶性であり、かつ可視スペクトルで反応を追跡するために低基質濃度を用いざるをえなかったためではないかと思われる。

当時は基質とりこみ機能に対する関心が高まった時期であった。1968年、Overberger ともポリビニルイミダゾール触媒による NABS 基質のとりこみ現象 (Michaelis-Menten 動力学) を報告した³⁾ が、後に撤回され⁴⁾、1971年の長鎖フェニルエステルを用いた研究を待ってポリビニルイミダゾールによる酵素型動力学が確立された。また1960年代末より、Kabanovらは四級化ポリビニルピリジンが酵素類似の高い加水分解活性をもつことを発表して大きな注目をあびていたが、数年後に不純物の影響によるものと訂正された⁵⁾。

フェニルエステル基質

2. 高分子触媒のマイクロ環境

最初の報告に引き続き、適当な疎水領域を含む水溶性高分子触媒を合成してそれらの機能を検討した。フ

エニルイミダゾール基やベンズイミダゾール基を含むモノマーを水溶性モノマーと共重合して触媒を得た。水溶性モノマーとしてアクリルアミドやビニルピロリドンを選ぶと、フェニルエステル基質 ABA の加

水分解で主として疎水性相互作用に基づくとりこみがえられる。このことは反応の ΔS , ΔS^* 値とも矛盾しない。ところが、種々の高分子触媒を用いた系統的な実験より、触媒の疎水性が高まって基質とりこみが起こりやすくなるほど、イミダゾール基ととりこまれた基質の反応が遅くなるという補償の関係が見いだされ、そのために全体的な触媒効率の向上には限度があることが明らかとなった。これを乗り越えるための方向として選んだのは第一に触媒部位のマイクロ環境の調節であった。すなわち、触媒部位に疎水的环境とイオンのふんい気の両者を与えるためにイオン性高分子触媒 **4**, **5** を合成し、それぞれ反対荷電をもつフェニル

エステル基質の加水分解反応を検討した。これらの組み合わせではいずれも基質とりこみ定数の増大とともにコンプレックス内反応速度 [(1) 式における k_{cat}] も大きくなり、相乗的に触媒活性が上昇するという結果が得られた。たとえば、触媒 **4** とカチオン性基質 ANTI の反応では低分子イミダゾールに比べ数百倍の触媒効率を得られた。

このような高分子のマイクロ環境効果はポリソープの触媒作用において一層明確に現われた。ポリビニルピロリジンを長鎖アルキル基で四級化して得た水溶性ポリマーは界面活性剤ミセルと類似した性質を示す。1972 年より 1974 年にかけて、太垣や田伏らは通常の界面活性剤ミセル水溶液中でアニオン性求核剤の活性が著しく上昇することを見いだした。そこで、われわれはこの効果を利用して高活性高分子触媒を得る目的で、長鎖ヒドロキサム酸 **8** や長鎖イミダゾール **9** の PNPA との求核反応をポリソープ **6**, **7** の存在下に行った。その結果、これらアニオン種の求核活性はポリソープのない場合に比べ $10^2 \sim 10^3$ 倍と飛躍的に上昇

した。これらの触媒は活性プロトンの引き抜き反応においてもきわめて有効であり、 pK_a の低下による有効なアニオン種の増加と疎水的マイクロ環境におけるアニオン種の活性化の両方の要因が速度上昇に寄与するものと結論した。これらの結果を統一的に理解するために、「疎水性イオン対」の概念を提出し、新たな高分子触媒の開発に応用した。その第一は双生イオン型求核基を含むポリマーである。ポリビニルイミダゾールや

ポリエチレンイミンより出発して得られる触媒 **10**, **11** はその例であるが、とくに **11** は疎水相互作用に基づく高い基質とりこみ能、双性イオン型ヒドロキサマートの高い求核活性、残留三級アミンによる効率的な脱アシル化が総合されて、PNPA の加水分解に対しては天然酵素である α -キモトリプシンよりも大きい触媒効率を示す。ポリソープ利用の第二の展開は補酵素類の活性化である。補酵素 A, フラビン補酵素 (FMN, FAD), NADH などタンパクに非共有結合的にとりこまれて機能を発揮する補酵素はカルボキシル基、リン酸基をもつポリアニオンである。そこで、これらの補酵素とカチオン性ポリソープの複合系を用いて種々の反応を検討した。多くの場合、従来に例を見ない補酵素作用の大幅な上昇が可能となり、たとえば、補酵素 A のポリソープへのとりこみ定数はアポタンパクの場合と同程度に大きく、チオール基の反応速度は数百倍上昇する。また、カチオン性ポリマーに結合したフラビン基とチオール類, NADH などとの酸化還元反応においていずれも著しい加速が認められた。

マイクロ環境効果に関連して他の反応についてもポリソープの触媒作用を検討し、脱炭酸反応が疎水的环境により加速されること、硫酸エステルの加水分解には

部分四級化ポリエチレンジアミンがとくに有効であることを明らかにした。

3. 多官能性触媒作用

マイクロ環境と並んで触媒活性向上に有効なのは多官能性触媒作用である。エステル加水分解に対する求核的な触媒作用ではアシル中間体の生成、分解の両過程によって触媒効率が定まる。

本研究の初期に用いたイミダゾール触媒基はアシル中間体の生成が律速であるので、これを求核活性の大きいヒドロキサマートアニオンと組み合わせる高分子触媒 **12** を合成し、フェニルエステルの加水分解を行なった。その結果、第1図に示すように、まずヒドロキサマートのアシル化が起こり、生じたアシル中間体が近接するイミダゾール基の触媒作用により容易に加水分解されるという反応経路が確立された。この協同作用により、いずれか一方の触媒基を含む高分子に比べ、100 倍前後の活性上昇が認められた。さらに二官能性高分子 **13** の場合には、イミダゾールの一般塩基作用により非解離のヒドロキサマ酸基

が活性化され、エステルを求核攻撃するという協同的作用が明らかとなった。これはセリンプロテアーゼ類に見いだされた電荷リレー系ときわめて類似した機構であり、合成触媒系で初めて確認されたものである。

これら二官能性触媒作用に対し前述のマイクロ環境効果を応用するためミセル型二官能性触媒 **14** を合成して、カチオン性ミセル、ポリソープ系で用いた。

触媒作用は第1図と同様にヒドロキサマ酸基におけるアシル化-脱アシル化が主経路となるが、両過程ともにミセル的ふんい気内で著しく加速され、総括触媒効率はイミダゾール自体の数十倍に及ぶものであった。

4. 合成二分子膜の構造と触媒作用

上記高分子触媒の研究ではアシル基移動を中心に触媒活性の向上を目標としてきた。酵素反応のもう一つの特性は高選択性である。合成高分子を用いて酵素様の高選択性を可能にするには、一定の空間配置をもった触媒部位を合成することが必要である。このための

第1図 二官能性触媒作用

手段としては、シクロデキストリンなどの環状化合物を高分子に導入する方法、鋳型反応により反応部位を固定化する方法⁹⁾もあるが、タンパク分子のように分子内会合により特定のコンホメーションが固定化できれば新しい展開が可能となる。このような立場から、ポリソープ系について、アルキル側鎖の系統的变化、幹ポリマーの分子量分布の調節などを行なったが思わしい結果は得られなかった。

生体膜はリン脂質二分子膜とタンパク質より構成されているが、組織構造の基本をなすものは前者である。脂質二分子

膜 **15** は高度の異方性を有する液晶構造であるため、反応のマイクロ環境として興味深い特性を

もっている。1974 年頃になると、生体膜(二分子膜)の構造と機能に対するかなり明確な物理化学的説明がなされるようになった。たとえば、Tanford の考え方⁷⁾(現在はこれに全面的に賛成しているわけではない)はわれわれの想像力を大いに刺激した。

そこで、従来の高分子触媒には見られない新しい機能を求めて、1976 年春頃より二分子膜の研究に着手した。まず、溶解挙動の異常性が認められていた長鎖ジアルキルアンモニウム塩 **16** の希薄水溶液を試料として電子顕微鏡観察を行なったところ、二分子膜構造を基本とする安定な会合体が生じていることが明らかとなった。これは生体脂質に直接関連しない物質から安定な二分子膜を形成させた最初の例となった。

R : CH₂CH₂OH
CH₂CONH₂
sugar

そこで引き続き、一連の研究を行ない、電顕的に見

て二分子膜を形成するためにはアルキル鎖長は 16 において $C_{10} \sim C_{18}$ が適当であること、一本のアルキル鎖を C_{18} に固定した場合、他方が C_8 以下になると構造形成が見られないことなど、二分子膜形成と化学構造の関連を明らかにした。さらに、親水基として他のカチオン基（スルホニウム基および種々のアンモニウム基 17）、アニオン基（リン酸 18、スルホン酸）、非イオン基（ポリオキシエチレン 19）、双性イオン基 20 のいずれを用いても水溶液中で容易に安定な二分子膜が形成されることを知った。

二分子膜の形成はジアルキル型化合物には限られない。ジアルキル基の疎水性よりも秩序性が重要であるとの立場から、疎水部に一部かたい構造を含むモノアルキル基を用いたところ、やはり、同様な二分子膜の生成が観察された。

これら合成二分子膜を用いると、従来に例を見ない触媒系が実現可能となる。たとえば、コレステロール基を含むイミダゾール触媒と長鎖フェニルエステル基質の組合せでは、二分子膜ベシクル内、ベシクル間の反応速度差は数百倍に達し、ベシクル間の基質の移動が律速となりうる。また、アシル移動、脱炭酸、プロトン引き抜きなどの反応速度は、二分子膜の相転移（液晶-固相）の影響をうける。

二分子膜の生成は非共有結合的ではあっても、会合体の安定性が大きいのでその挙動は水溶性高分子とよく似ている。しかし、生体膜（リン脂質+タンパク）の例を引くまでもなく、膜-高分子複合体は興味ある研究対象である。すでにわれわれは、高分子アニオン添加によりジアルキルアンモニウム二分子膜の形態変化が起こることを確かめているが、今後展開すべき問題は多い。

5. おわりに

基質とりこみ能をもつ高分子触媒を目指してこの分野の研究を始めてすでに 15 年が経過し最近では二分子膜へと研究の重点が移ったが、目標としては高活性、高選択性をもつ高分子（的）反応場の開発を常に念頭に置いてきた。合成二分子膜の研究を進めて行くことにより、さまざまな秩序構造をもつ分子組織を作ることが可能になると思われる。今後、これを利用して分子分散系では実現困難な新しい機能を造り出していきたい。

本研究を遂行するに当たって、数多くの方々のご指導、ご鞭撻、ご協力を賜った。とくに九大名誉教授秋吉三郎先生は、学生時代有機工業化学の講義の際 Biochemie という言葉を連発されていたのが印象深く、生体関連分野への興味を抱く一つのきっかけとなった。前九大教授麻生忠二先生には、本研究を開始したばかりで前途の見通しが暗かった数年間絶えず激励していただいた。その間発表できる成果もなしに努力してくれた学生諸氏、その後の引用文献共著者の諸氏に感謝したい。合成二分子膜の研究に当たっては電子顕微鏡の利用で九大高柳素夫先生に大層便宜を計っていただいた。

文 献

- 1) C. Aso, T. Kunitake, F. Shimada : *Polym. Lett.*, **6**, 467 (1968); *J. Am. Chem. Soc.*, **91**, 2716 (1969)
- 2) K. D. Kopple : *Biopolymers*, **6**, 1417 (1968)
- 3) C. G. Overberger, R. Corett, J. C. Salamone, S. Yaroslavsky : *Macromolecules*, **1**, 331 (1968)
- 4) Y. Okamoto, C. G. Overberger : *J. Polym. Sci., Polym. Chem. Ed.*, **10**, 3387 (1972)
- 5) V. A. Kabanov, Y. E. Kirsh, I. M. Papisov, V. P. Torchilin : *Vysokomol. Soed., ser. B*, **14** [6] 405 (1972); *Chem. Abstr.*, **78**, 102304j (1973)
- 6) G. Wulff, *et al.* : *Makromol. Chem.*, **178**, 2817 (1977)
- 7) C. Tanford : *The Hydrophobic Effect*, Wiley-Interscience, N. Y. (1973) Chapt. 12
本研究の主な内容は次の総説にまとめている。
- 8) T. Kunitake, Y. Okahata : *Adv. Polym. Sci.*, **20**, 161 (1976)
- 9) 国武豊喜 : 合成二分子膜の構造と機能, ミクロシンポジウム 78/3 講演予稿集, 高分子学会, 福岡 (1978 年 12 月)