新規物質創製変換 新規構造をもつ二次元および三次元 π 共役系の創製

化学研究所 小松 紘一



小松 紘一 (こまつ こういち)

昭和17年生。昭和41年京都大学工学部燃料化学科卒業(昭和38年米国 DavidsonCollege 留学)。昭和46年同大学大学院工学研究科博士課程修了。同大学助手、講師、助教授を経て、 平成7年京都大学化学研究所教授、現在に至る。この間、昭和51~52年、米国ウイス コンシン大学博士研究員。その後、σ-π相互作用により安定化した炭素カチオン種の 合成と物性開発ならびにフラーレンの有機化学に従事。平成10年日本化学会学術賞、平 成14年 A.v.Humboldt 賞、平成18年日本化学会賞を受賞。王立化学会フェロー。

本研究では、新しい機能を有する有機材料の開発を目指して、特異な構造、物性をもつπ共役 系有機化合物の設計と合成を行っている。今年度は、(1) 骨格にセレンを含んだ開口フラーレン の合成、(2) 水素分子を内包した開口フラーレンの開口部サイズの微調整、(3) 末端にビシクロ炭 素骨格をもつターチオフェンラジカルカチオンの合成と分子間相互作用などについて検討を行 なった。

(1) 骨格にセレンを含んだ開口フラーレンの合成

先に我々は、フラーレン C₆₀ に開口部を設け、これを拡大した後、高圧水素を作用させること によって水素内包体とし、そのまま開口部を閉鎖して水素内包フラーレンを合成した。今年度は 開口フラーレンの開口部のサイズの拡大を目的として、これまでに用いた硫黄に代わって、炭素

との結合距離のより長いセレンを用いることとした。12員環開口 体1を二電子還元したあと、これに単体セレンを作用させると収率 46%で、開口部にセレンをもつ13員環開口フラーレン2が得られ た。2の詳細な構造はX線結晶解析によって明らかとなり(図1)、 対応する硫黄化合物よりも、その開口部は長軸方向で 5.643 Å から 5.718 Å へ、また短軸方向で 3.753 Å から 3.877 Å へと拡大される ことが示された。





Fig. 1 X-ray structure of compound **2**

(2) 開口フラーレンの開口部サイズの微調整

開口部サイズのさらなる微調整を目的として、化合物1の異性体1'からも同様にしてセレン を含む13員環開口フラーレン2'を合成した。これらと、以前に合成した硫黄を含む同族体3 お よび異性体3'の4種の13員環開口フラーレンに水素を100%導入してH2@2、H2@2'、H2@3、 H2@3'とし、それらを130℃から160℃の温度範囲で加熱して、内包された水素分子の放出され る一次反応速度定数を求めた。

その結果、160°Cにおける水素放出速度は、H₂@3、H₂@2、H₂@3'、H₂@2'の順に k₁=3.54×10⁻⁶、



 3.90×10^{-5} 、 1.05×10^{-5} 、 1.35×10^{-4} s⁻¹ と速くなり、活性化エネルギーも、34.3、32.3、31.4、29.4 kcal/mol と減少し、この順に開口部が拡大されていることが明らかとなった。

(3) 末端にビシクロ炭素骨格をもつターチオフェンラジカルカチオンの合成と性質

オリゴチオフェンのラジカルカチオン種は、p-ドープ状態のポリチオフェンのポラロンやバイ ポラロンのモデルとして重要である。先に我々は、周囲を完全にビシクロ炭素骨格で取り囲んだ ターチオフェン4から導かれる安定なラジカルカチオンでは全く分子間相互作用がないことを認 めているが、末端部のみをビシクロ骨格で修飾した場合5の中心部での挙動に興味が持たれる。



実際にターチオフェン**5**を合成し、1電子酸化したところ、得られた濃青色結晶のX線結晶構 造は図2に示すように、2つのラジカルカチオン結晶塩が、立体障害のない中央部で強いπ-π 相互作用により引きつけ合い、弓なりに曲がっていることが判った。この二量体の KS-HOMO に関する計算結果 (B3LYP/6-31G(d)) も図3に示すように、2つの分子の間で強い相互作用のあ ることを示している。



Fig. 2 X-ray structure of $(5^{\cdot+})_2 \cdot 2SbF_6^{-}$.



Fig. 3 Calculated KS-HOMO of $(5^{+})_2 \cdot 2SbF_6^{-}$.

Research on creation of two-dimensional and three-dimensional π -conjugated systems having novel structures

Koichi Komatsu

Born in 1942. He received his Ph.D. degree from Kyoto University. He was a postdoctoral fellow in USA (1975-1976), a research associate (1971-1984), a lecturor (1984-1989), and an associate professor at the Department of Hydrocarbon Chemistry, Faculty of Engineering, and at the Institute for Chemical Research, both in Kyoto University (1989-1995), and a Professor at the same Institute (1995-). He was also a visiting professor at University of Heidelberg (2003). He is a Fellow of Royal Society of Chemistry (1997-). He received The Divisional Award of the Chemical Society of Japan, Alexander von Humboldt Research Award and the Chemical Society of Japan Award for 2005. He has been working in the filed of structural organic chemistry to create novel π -conjugated systems having σ - π conjugation or three-dimensional π -conjugation.

(1) First synthesis of an open-cage fullerene incorporating a selenium atom in its cage: In order to develop a new method to enlarge the 12-membered-ring opening of an open-cage fullerene 1, twoelectron reduction was conducted upon 1 followed by addition of elemental selenium. This operation was found to give a new open-cage fullerene having a selenium atom at the rim of the 13-membered-ring orifice. The X-ray crystallography indicated that the orifice was enlarged so that the longer axis and shorter axis of the opening are elongated by 0.075 Å and by 0.124 Å, respectively, as compared with the corresponding sulfur analogue.

(2) Fine tuning of the orifice size of open-cage fullerenes: During the process of enlargement of the 8-membered-ring opening by oxidative cleavage of the double bond at the orifice, there were formed two isomers of an open-cage fullerene with a 12-membered-ring orifice. The orifice of each isomer was enlarged into a 13-membered ring by insertion of sulfur and of selenium by the method described above. The resulting four open-cage fullerenes were filled with molecular hydrogen in 100%. The rate of the release of hydrogen was measured at the temperature range of 130 to 160° C. It was shown that the rate is faster for the compounds having selenium at the rim of the orifice indicating that the opening is enlarged by incorporation of selenium, the C-Se bond being longer than the C-S bond.

(3) Synthesis and intermolecular interaction of terthiophene radical cations end-capped with bicyclo[2.2.2]octene: A terthiophene end-capped with two bicyclo[2.2.2]octene units was synthesized and was oxidized to the radical-cation salt, which was air-stable dark blue crystals. The X-ray crystallography indicated that the two units of radical cations are paired with their central part (which is free from steric repulsion) mutually attracted to give two considerably bent structures. This is apparently due to the strong $\pi - \pi$ interaction at the central position, and is supported by theoretical calculations.

Selected Publications

- Presentation & Lectures
- 1. K. Komatsu, "Organic Synthesis of Endohedral Fullerenes Encapsulating Hydrogen Molecule(s) and Their Properties", Forum for Molecular Science, 2006. 6.30-7.1, Xi' an Jiaotong University, China (Plenary).
- 2. K. Komatsu, "Organic Synthesis of Endohedral Fullerenes by Molecular Surgery", The 10th International Kyoto Conference on New Aspects of Organic Chemistry, 2006. 11. 13-17, Kyoto, Japan (Invited).

• Articles

- 1. "Synthesis and Properties of Endohedral C₆₀ Encapsulating Molecular Hydrogen", M. Murata, Y. Murata, K. Komatsu, *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 8024-8033 (2006).
- "Thiophene Radical Cations End-Capped by Bicyclo[2.2.2]octane Units: Formation of Bent π-Dimers Mutually Attracted at the Central Position", D. Yamazaki, T. Nishinaga, N. Tanino, K. Komatsu, J. Am. Chem. Soc., 128, 11470-11471 (2006).
- "Nuclear Relaxation of H₂ and H₂@C₆₀ in Organic Solvents", E. Sartori, M. Ruzzi, N. J. Turro, J. D. Decatur, D. C. Doetschman, R. G. Lawler, A. L. Buchachenko, Y. Murata, K. Komatsu, *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, in press (2006).
- "Photoinduced Charge Separation and Charge Recombination in Terthiophene-Acetylene-Fullerene Linked Dyads", T. Nakamura, Y. Araki, O. Ito, Y. Murata, K. Komatsu, J. Photochem. Photobiol. A: Chem., 178, 242-250 (2006).
- "Rigid Molecular Tripod with an Adamantane Framework and Thiol Legs. Synthesis and Observation of an Ordered Monolayer on Au(111)", T. Kitagawa, Y. Idomoto, H. Matsubara, D. Hobara, T. Kakiuchi, T. Okazaki, K. Komatsu, *J. Org. Chem.*, **71**, 1362-1369 (2006).
- 6. "Synthesis, X-ray, and DFT Study of the Double-Bond Pyramidalization in 1,7,8,9-Tetraphenyl-4,10,10-trimethyl-4-aza-10-silatricyclo[5.2.1.0^{2,6}]deca-8-ene-3,5-dione and Its Germanium Analogue", D. Margetic, Y. Murata, K. Komatsu, M. Eckert-Maksic, *Organometallics*, 25, 111-118 (2006).
- "Alkyl Chain Length Dependent Mobility of Organic Field-Effect Transistors Based on Thienyl-Furan Oligomers Determined by Transfer Line Method", T. Minari, Y. Miyta, M. Terayama, T. Nemoto. T. Nishinaga, K. Komatsu, S. Isoda, *Appl. Phys. Lett.*, 88, 083514-083520 (2006).
- "Cryogenic NMR Spectroscopy of Endohedral Hydrogen–Fullerene Complexes", M. Carravetta, O. G. Johannessen, M. H. Levitt, I. Heinmaa, R. Stern, A. Samoson, A. J. Horsewill, Y. Murata, K. Komatsu, *J. Chem. Phys.*, **124**, 104507 (2006).
- 9. "Fine Tuning of the Orifice Size of an Open-Cage Fullerene by Placing Selenium in the Rim: Insertion/ Release of Molecular Hydrogen", S-C. Chuang, Y. Murata, M. Murata, S. Mori, S. Maeda, F. Tanabe, K. Komatsu, *Chem. Commun.*, in press (2007).
- "Fullerene Reactivity Fullerene Cations and Open-Cage Fullerenes", T. Kitagawa, Y. Murata, K. Komatsu, *Carbon-Rich Compounds — From Molecules to Materials*, M. M. Haley and R. R. Tykwinski Ed, Wiley-VCH Verlag, Weinheim, 383-420 (2006).
- 11. "Novel Aromatics Blended with a σ -Flavor", K. Komatsu, *Pure & Appl. Chem.*, **78**, 685-697 (2006).
- 12. "Super-Stabilization of π -Conjugated Cations by Bicycloannelation", K. Komatsu, ACS Symposium Series, K. Laali, Ed., in press (2007).

新規物質創製変換 精密分子変換法の開発

化学研究所 川端 猛夫



川端 猛夫 (かわばた たけお)

昭和 30 年生。昭和 58 年京都大学薬学研究科博士課程修了、昭和 58-60 年アメリカ Indiana 大学博士研究員、昭和 60 年相模中央化学研究所研究員、平成元年京都大学化 学研究所助手、助教授を経て、平成 16 年京都大学化学研究所教授。Associate Editor of "Chemistry Letters" (平成 17 年~)。日本薬学会奨励賞 (平成 7 年度)・Tetrahedron Letters Most Cited Paper 2003-2006 Award (平成 18 年度)。単位時間内にキラル分子 として存在するエノラートの化学とこれを利用する不斉分子変換、求核触媒を用い る精密分子変換、水素結合を介する軸性不斉化合物の創製、ヘテロキラルオリゴマー の構造・機能解析に取り組んでいる。

(1) ポリオール類の位置選択的官能基化:多官能 基性化合物への位置選択的な置換基導入は次世代 の合成目標のひとつである。例えば糖類への位置 選択的な保護基導入は多糖類の合成や天然物の全 合成、コンビナトリアルライブラリー構築の鍵と なるステップで、通常は保護 - 脱保護の操作を駆 使して行なわれており、このような分子変換を一 段階で行なう方法は未だ存在しない。今回、この 方法論開拓のチャレンジとして、1位をアセター ル保護した糖を基質とし不斉求核触媒を用いる位 置選択的アシル化を行なった。糖の認識部位とし て2つのL-トリプトファン誘導体を側鎖に持つ C₂-



Fig. 1 Regioselective Acylation of Sugars by Nucleophilic Catalysis.

対称不斉求核触媒を設計、合成した。グルコース誘導体のアシル化を1 mol%の触媒、1.1 当量 のイソ酪酸無水物 (R=*i*-Pr)、1.5 等量の2,4,6-コリジンを用いて CHCl₃中 -20°Cで行なうと、4-ア シル化体が98% 収率、99%の選択性で得られた。通常、主生成物となる一級水酸基(6位)のア シル化体やジアシル化体はこの反応では全く得られなかった。同反応を10 mol%の DMAP を用 いて行なうと原料回収を伴いながらジアシル化体が生成し、またモノアシル化体はランダムな位 置異性体の混合物で、全く選択性と反応性を制御できない。即ち今回開発した触媒のL-トリプト ファン側鎖が基質の糖の4つの水酸基を厳密に識別してアシル化を起こす動的分子認識過程に重 要な役割を果したと考えられる。またこの選択性発現が直接的な4位水酸基のアシル化によるも ので、先ず6位アシル化の後に近接する4位へのアシル転移を起こしたものではないことは対照 実験により確認している。

(2) 動的キラリティーを持つ官能基アニオン種を用いる不斉分子変換: N-t-ブトキシカルボニル (Boc)-N-メトキシメチル (MOM)-アミノ酸誘導体の α-アルキル化は外部不斉源なしに高エナン チオ選択的に進行する。この反応で不斉誘導の鍵となる中間体として動的な軸性キラリティーを 持つエノラート A を速度論データに基づき提唱して来た。今回、N-Boc-N-MOM-バリン誘導体 のリチウムエノラートの X-線構造解析に成功し (Figure 2)、C-N 軸性不斉エノラート構造が仮説 の域を超え実体であることがわかった。またキラルエノラート A 自体の光学純度が生成直後に は 99% ee 以上であること、これを中間体とする不斉反応では非線形効果が見られないこと、さ らに軸性不斉エノラートのラセミ化障壁に与える因子をつきとめ、本反応の不斉誘導機構のほぼ 全容を明らかにした。



 ΔG_{rac}° = 16.0 kcal / mol, (R=CH₂Ph, M=K)

これまでに N-Boc-N-ω-ブロモアルキルアミノ 酸誘導体1をDMF中KHMDSで処理すると高 エナンチオ選択的環化が起こり、立体保持で2 を与えることを報告している(式1)。この場合 K⁺をカウンターカチオンとする塩基を高配位性 溶媒中用いることで反応が立体保持で進行する。 さて上述したように本反応の機構がほぼ明らか となったのを契機に、立体反転で環化が進行す るための機構を考察し、Li⁺をカウンターカチオ ンとする塩基を低配位性溶媒中で用いるという 仮説をたてた。実際にL-アミノ酸から得られる 1 (Met, Ala, Phe, n=2,3) を LiTMP/THF で処理す ると、いずれの場合も立体反転で環化が進行し2 が81~91% ee、66~93% 収率で得られた(式1)。 同様に L-リジンから誘導される 3 を NaHMDS/ DMF で処理すると含窒素スピロ環4が99% ee、 立体保持で得られ、一方 LiTMP/toluene 条件下に は4が94% ee、立体反転で得られた(式2)。

この立体化学の逆転現象はキラルエノラート の分子内共役付加でも見られた。アラニンエチ ルエステルから2工程で得られる5をKHMDS/ DMFで処理すると、連続する4置換-3置換炭素



Fig. 2 X-ray structure of a lithium enolate generated from*N*-Boc-*N*-MOM valine ethyl ester and LiHMDS. An enolate unit of the tetrameric enolate is colored. Three Li atoms directly connected to an oxygen atom of the colored enolate unit are colored orange. (b) Schematic view of an enolate unit, indicating axial chirality.

を持つテトラヒドロイソキノリン誘導体 6 が単一のジアステレオマーとして 95% ee で得られた (式 3)。一方、5 を LiTMP/THF で処理すると *ent-6* が単一のジアステレオマーとして 91% ee で 得られた。以上のように、安価に入手容易な L-アミノ酸を任意の立体化学で 4 置換炭素を持つ含 窒素複素環へと変換することができた。





Development of Fine Molecular Transformation Processes

Takeo Kawabata

Born in 1955. He received his Ph.D. degree from Kyoto University. He was a postdoctoral fellow at Indiana University in USA (1983-1985), a research associate in Sagami Chemical Research Center (1985-1989), an assistant professor in Institute for Chemical Research of Kyoto University (1989), associate professor (1998), and currently is professor (2004-). He was awarded the Pharmaceutical Society of Japan award for Young Scientists (1995) and Tetrahedron Letters Most Cited Paper 2003-2006 Award (2006). He is an associate editor of Chemistry Letters. His current research interests include asymmetric synthesis based on "memory of chirality", nucleophilic catalysis for fine organic synthesis, and the structural and functional investigation of heterochiral oligomers

(1) Regioselective Functionalization of Polyols by Nucleophilic Catalysis: Direct regioselective functionalization of multi-functionalized substrates is one of the goals of current research toward the development of advanced molecular transformation for the next generation. Here, we report a highly regioselective acylation of sugars with chiral nucleophilic catalysts. Treatment of a glucose derivative with 1 mol% of a catalyst and 1.1 mol eq. of isobutyric anhydride in chloroform at -20° C gave the 4-acylated glucose derivative and the 3-acylated surrogate in a 99:1 ratio in 98% yield. The corresponding 6-isomer, 2-isomer, and the di-acylated isomers were not detected at all. The corresponding reaction with 10 mol% of DMAP proceeded in a random way, giving 6-, 4-, 3-, and 2-isomer in a ratio of 38:23:38:1 in a combined yield of 69% together with 19% of the di-acylated isomers and 10% recovery. Thus, discrimination of four hydroxyl groups of the glucose derivative has been achieved by the catalyst via fine dynamic molecular recognition.

(2) Asymmetric Molecular Transformation via Functionalized Enolate Intermediates with Dymanic Chirality: We have studied asymmetric synthesis via functionalized chiral enolate intermediates generated from *N*-*t*-butoxycarbonyl(Boc)-*N*-methoxymethyl (MOM)- α -amino acid derivatives and a base. A chiral nonracemic enolate with C-N axial chirality **A** (R=CH₂Ph, M=K) was proposed as the crucial intermediate whose racemization barrier is 16.0 kcal/mol and the corresponding half-life is 22 h at -78 °C. Recently, an X-ray structural analysis of a chiral enolate was achieved, clarifying a chiral C-N axis in a solid state enolate structure (Figure 2). This method was applied to intramolecular alkylation of α -amino acid derivatives. Treatment of (*S*)-*N*-Boc-*N*- ω -bromoalkyl- α -amino acid derivative **1** with potassium hexamethyldisilazide (KHMDS) in DMF at -60 °C gave (*S*)-**2** in up to 98% ee. Contrary to this process, treatment of (*S*)-**1** with lithium 2,2,6,6-tetramethylpiperidide (LiTMP) in THF at 20 °C gave (*R*)-**2** with inversion of the configuration in up to 91% ee (eq. 1). Similarly, **3**, derived from L-lysine, gave spiro compound (*R*)-**4** (retention) in 99% ee by treatment with NaHMDS in THF at 20 °C , while it gave (*S*)-**4** (inversion) in 94% ee by treatment with LiHMDS in toluene at 0 °C (eq. 2). Chirality of the parent amino acids was preserved during enolate-formation and

cyclization to give aza-cyclic amino acids in up to 98% ee with retention of configuration or inversion of configuration, depending on the reaction conditions (eq. 1). This protocol is also applicable to an intramolecular conjugate addition reaction (eq. 3) of α -amino acid derivatives, giving either of the enantiomers of a tetrahydroisoquinoline derivative in up to 95% ee. Thus, an enantiodivergent method for the synthesis of nitrogen heterocyles with a tetrasubstituted carbon center has been developed starting from readily available L- α -amino acids.

Publications

Presentation & Lectures

- 1. T. Kawabata, "Stereochemical Reversal in Asymmetric Cyclization via Memory of Chirality", Pacifichem 2005, 2005. 12. 15-20, Hawaii, USA (Invited)
- T. Kawabata, "Some Aspects of Asymmetric Synthesis under Environmentally Benign Conditions", IUPAC Second International Symposium on Green/Sustainable Chemistry, 2006. 1. 10-13, Delhi, India (Invited)
- 3. T. Kawabata, "Highly Regioselective Acylation of Sugars by Chiral Nucleophilic Catalysts", The 8th International Symposium on Organic Reactions, 2006. 4. 23-26, Kobe, Japan (Invited)
- 4. T. Kawabata, "Regioselective Acylation of Sugars by Nucleophilic Catalysis", 45th Tutzing Symposion: Organocatalysis, 2006. 10. 8-11, Tutzing, Germany (Invited)

Article & Reviews

- 1. Stereochemical Study on α -Alkylation of β -Blanched α -Amino Acid Derivatives via Memory of Chirality. T. Kawabata, J, Chen, H. Suzuki, K. Fuji, *Synthesis*, 1368-1377 (2005)
- 2. Visual Enantiomeric Recognition of Amino Acid Derivatives in Protic Solvents, K. Tsubaki, D. Tanima, M. Nuruzzaman, T. Kusumoto, K. Fuji, T. Kawabata, *J. Org. Chem.*, **70** 4609-4616 (2005)
- Memory of Chirality in Intramolecular Conjugate Addition of Enolates: A Novel Access to Nitrogen Heterocycles with Contiguous Quaternary and Tertiary Stereocenters, T. Kawabata, S. Majumdar, K. Tsubaki, D. Monguchi, *Org. Biomol. Chem.*, 3, 1609 – 1611 (2005)
- 4. Convenient Preparation of Optically Active N,N-Bis(4-substituted-4-aminobutyl)amines, K. Tsubaki, T. Kusumoto, N. Hayashi, D. Tanima, K. Fuji, T. Kawabata. *Tetrahedron: Asymmetry*, **16**, 739-74 (2005)
- Use of Zinc Enolate, Free from Other Metals, in Enantioselective Palladium-catalyzed Allylic Alkylation, N. Kinoshita, T. Kawabata, K. Tsubaki, M. Bando, K. Fuji, K. *Tetrahedron*, 62, 1756-1763 (2006)
- 6. Optical Properties of Oligo(2,3-dioxyfunctionalized)naphthalenes, K. Tsubaki, M. Miura, A. Nakamura, T. Kawabata, *Tetrahedron Letters*, **47**, 1241-1244 (2006)
- Long-Range Exciton-Coupled Circular Dichroism: Application for Determination of Absolute Configuration of Oligonaphthalenes, K. Tsubaki, K. Takaishi, H. Tanaka, M. Miura, T. Kawabata, Org. Lett., 8, 2587-2590 (2006)
- 8. Synthesis and Optical Properties of the Helical Oligonaphthalenes, K. Takaishi, K.Tsubaki, H. Tanaka, M. Miura, T. Kawabata, T. *YAKUGAKU ZASSHI*, **126**, 779-786 (2006)
- 9. Bottom-Up Synthesis of Optically Active Oligonaphthalenes: Three Different Pathways for Controlling Axial Chirality, K. Tsubaki, H. Tanaka, K. Takaishi, M. Miura, H. Morikawa, T. Furuta, K. Tanaka, K.Fuji, T. Samamori, N. Tokitoh, T. Kawabata, *J. Org. Chem.*, **71**, 6579-6587 (2006)
- 10. Suzuki-Miyaura Coupling on the Three Upper Rims of Hexahomotrioxacalix[3]arenas, K. Tsubaki, M. Sakakibara, Y. Nakatani, T. Kawabata, *Tetrahedron*, **62**, 10321-10324 (2006)
- 11. Sterechemical Diversity in Asymmetric Cyclization via Memory of Chirality, T. Kawabata, S. Matsuda, S. Kawakami, D. Monguchi, K. Moriyama, *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 15394-15395 (2006)
- Synthesis and Chiral 1,2-Dihydropyridines and 2,3,4-Trisubstituted Pyridines from α-Amino Acids, D. Monguchi, S. Majumdar, T. Kawabata, *Heterocycles*, 68, 2571-2578 (2006)
- 13. Bidirectional and Colorimetric Recognition of Sodium and Potassium Ions, K.Tsubaki, D. Tanima, Y. Kuroda, K. Fuji, T. Kawabata, *Org. Lett.* **8**, 5797-5800 (2006)

新規物質創製変換。元素相乗系遷移金属錯体の創製と機能

化学研究所 小澤 文幸



小澤 文幸 (おざわ ふみゆき)

昭和 29 年生。昭和 55 年東京工業大学大学院博士課程中退(就職のため)、昭和 55 年東京工業大学資源化学研究所助手、平成元年北海道大学触媒化学研究センター助 教授、平成 6 年大阪市立大学工学部助教授、平成 7 年同教授を経て、平成 15 年より 現職(化学研究所附属元素科学国際科学研究センター)。この間、昭和 62-63 年カリ フォルニア工科大学博士研究員。触媒学会奨励賞(平成4年度)・BCSJ賞(平成16年)。 専門は有機金属化学、分子触媒化学。一貫して反応性有機遷移金属錯体の創製、触 媒反応機構の解明ならびに新錯体触媒の開発に取り組んでいる。

(1)低配位リン/白金 π 共役系錯体の創製:リン-炭素 二重結合化合物であるジホスフィニデンシクロブテン (DPCB-Y; Fig 1)は、一酸化炭素と比べて 2 eV 以上低い エネルギー準位に π * 軌道をもち、遷移金属に対して強い π 受容性を示す。我々は、この特異な電子的性質を利用 して、従来とは大幅に性質の異なる有機遷移金属錯体の 創製を試みている。本研究では、遷移金属に対して π 供 与性を示すジフェニルアセチレンと DPCB-Y とを白金を 介して結合させ、新たな π 共役系分子の構築を試みた。

DPCB-Y はリン上に 2,4,6-トリ*-tert*-ブチルフェニル基 をもつ嵩高い化合物であるが、[Pt(ArCCAr)(cod)] 錯体

と室温付近の穏和な条件下に容易に配位子交換反応を起し [Pt(ArCCAr)(DPCB-Y)] 型錯体 (2) を 高収率で与えた。Fig 2 に、1b と 1d を配位子とするビス (4-メトキシフェニル) アセチレン錯体 (2bq, 2dq)のX線構造を示す。アセチレン配位子の炭素-炭素結合距離はそれぞれ 1.295 Å (2bq) および 1.298 Å (2dq) であり、遊離のジフェニルアセチレン (1.19 Å)と比べて 9% 程長く、対応 する 1,2-ビス (ジフェニルホスフィノ) エタン (dppe) 錯体 (1.297 Å)とほぼ同等であった。アセチ レン炭素間の結合は白金からアセチレン配位子へのπ逆供与によって伸長するものと考えられる ので、この結果は DPCB 配位子が dppe と同程度の強い σ 供与能をもつことを示唆している。こ の DPCB 配位子からアセチレン炭素への σ 電子供与は配位平面内の P-Pt-C 結合を介して起こる。 一方、配位平面の上下では DPCB-Y の π * 軌道と白金の d 軌道間に効果的な π 相互作用が起こ

り、DPCB-Y/白金/ジフェニルアセチレ ンにまたがる広範なπ共役系が形成される ことが分かった (Fig 3)。これによりアセチ レン炭素上の二つのフェニル基が配位平面 に沿って配向する。この傾向は DPCB-phen 配位子をもつ 2dq において特に顕著であり、 A-BおよびA-C間の二面角はそれぞれ6.7°、 5.4°と小さかった。また、この錯体は 575 nm 付近にπ-π* 遷移に基づく強い吸収を 示した。吸収波長はアセチレン炭素の置換 基に鋭敏であり、π軌道レベルの高いアセ チレンをもつ錯体ほど長波長側に吸収が観



1a: DPCB-OMe (Y = OMe) **1b**: DPCB (Y = H) **1c**: DPCB-CF₃ (Y = CF₃)

- 1d: DPCB-phen
- Fig. 1 Diphosphinidenecycobutene ligands (Mes* = 2,4,6-tri-*t*butylphenyl)



Fig. 2 X-ray structures of $Pt(MeOC_6H_4C) \equiv$ CC₆H₄OMe)(DPCB) (**2bq**) and $Pt(MeOC_6H_4C) \equiv$ CC₆H₄OMe)(DPCB-phen) (**2dq**)

察された。

(2) DPCB-Y 錯体の触媒機能:DPCB-Y 配位子の特異な電子的性質を利用して新たな錯体触媒を開発した。まず、カチオン性パラジウム錯体(3a-c)およびロジウム錯体(4a-c)を合成した。ロジウム錯体4は置換活性が低く反応性に乏しかったが、パラジウム錯体3は活性が高く、溶液中において MeCN 配位子の速い解離平衡が観察された。







錯体 3 は高いルイス酸性を示し、共役エノンに対するカルバミン酸ベンジル (CbzNH₂)の付加 (ヒドロアミド化反応) に高い触媒活性を示した。反応性は 3a < 3b < 3cの順に向上した。特に、 3b および 3c は、支持配位子をもたない [Pd(MeCN)₄]²⁺に比べて活性と安定性の両面で優れていた。 本触媒反応は dppe や dppf 等のジホスフィンの添加により完全に阻害されるので、この結果は低 配位リン化合物である DPCB-Y の特異性を示すものである。



また、π-アリル錯体 **5a** を触媒に用いて、2-ブテン-1,4-ジオール と活性メチレン化合物との脱水環化反応を効率的に行えることを 見いだした。この反応は、通常のホスフィン錯体では起こらない。

HO OH + O O pyridine (10 mol%) toluene, 100 °C, 4.5 h

(3) 官能基化 [4Fe-4C] クラスターの合成と応用: [Cp₄Fe₄(HCCH)₂] (6) は三段階の可逆あるいは準可逆な一電子酸化をうける。このような、遷移金属クラスターの多段階酸化還元特性を活かした機能性分子の構築研究が、近年注目を集めている。本研究では、レドックス活性な [4Fe-4C] 骨格を置換基としてもつリン配位子の合成を行なった。6と NBS との反応により得られる7と LiPPh₂ との反応をアセトニトリル中で行ない、さらに Cp₂Co で1電子還元することで、クラスター配位子8がほぼ定量的に得られた。セレン付加体の³¹P NMR スペクトルにおける¹*J*_{P-Se} 値から、8の非共有電子対のs 性は P'Bu₃ や PCy₃ よりも低く、極めて電子供与性の強いホスフィ



Fig. 4 X-ray structure of 9

ンであることが分かった。8は [AuCl(SMe2)]と速やかに反応して配位錯体9を定量的に与えた。



Creation and Catalytic Applications of Reactive Organotransition Metal Complexes

Fumiyuki Ozawa

Born in 1954. Fumiyuki Ozawa did his graduate studies at Tokyo Instituted of Technology under the supervision of Professor Akio Yamamoto and received Ph.D. of Engineering in 1984. He was appointed in 1980 as an Assistant Professor at Research Laboratory of Resources Utilization, Tokyo Institute of Technology. He spent the year 1987–1988 as a postdoctoral fellow at California Institute of Technology with Professor Robert H. Grubbs, and moved in 1989 to Hokkaido University as an Associate Professor to study with Professor Tamio Hayashi. He was promoted to a full Professor in Osaka City University in 1995, and joined the International Research Center for Elements Science, which was established in 2003 as a division of Institute for Chemical Research, Kyoto University. He received the Promotion Award from the Catalysis Society of Japan in 1992 and the BCSJ award from the Chemical Society of Japan in 2004. His research is focused on fundamental aspects of organometallic catalysis and development of new catalytic reactions for organic and polymer syntheses.

(1) π -Conjugated organometallic complexes with strong d π -p π interaction between platinum and low-coordinate phosphorus: Organotransition metal complexes with an extended π -conjugation system have attracted continuous research interest because of their novel chemical and physical properties derived from d π –p π interaction. We herein describe a new approach to such molecules using 1,2-diaryl-3,4-bis(2,4,6-tri-t-butylphenylphosphinidene)cyclobutenes (DPCB-Y). The DPCB-Y ligands bear extremely low-lying π^* orbitals mainly located around the low-coordinate phosphorus atoms and have a marked tendency to engage in metal-to-phosphorus π -back-bonding. Platinum(0) complexes of the formula Pt(alkyne)(DPCB-Y) have been prepared by the treatment of Pt(cod)-(alkyne) with DPCB-Y in CH₂Cl₂ at room temperature. X-ray structural analysis has been performed for bis(p-methoxyphenyl)acetylene complexes. The C-C bond distances of alkyne ligands (ca. 1.30 Å) are almost identical with that of dppe analogue, showing comparable σ -donating ability of DPCB-Y ligands to diphosphines. The complexes adopt a planar structure including DPCB-Y, platinum, and the diphenylacetylene skeleton, which is due to the formation of a widely spread π -conjugation system over the molecule. The UV-vis spectra exhibit strong $\pi - \pi^*$ transition at 500-650 nm. MO calculations have suggested the occurrence of push-and-pull interaction between the π -conjugation systems of alkynes and DPCB-Y ligands through the $d\pi$ orbitals of platinum.

(2) Catalytic applications of 1,2-diaryl-3,4-diphosphinidenecyclobutene (DPCB-Y) complexes: The unique electronic properties of DPCB-Y have been applied to the following catalytic reactions. $(\pi$ -Allyl)palladium triflate bearing DPCB-OMe ligand is a highly active catalyst for cyclodehydration of *cis*-2-butene-1,4-diol with active methylene compounds to give 2-vinyl-2,3-dihydrofurans. Dicationic palladium complex [Pd(MeCN)₂(DPCB)](OTf)₂ catalyzes conjugate addition of benzyl carbamate to α , β -unsaturated ketones. Ruthenium complex bearing DPCB-OMe ligand causes highly stereoselective hydrosilylation of diethynylarenes with HSiMe₂Ph to give (*Z*,*Z*)-bis(2-silylethenyl)-arenes, which are useful starting materials of all-cis poly(arylene vinylene)s with novel photochemical properties.

(3) Introduction of functional groups onto the [4Fe-4C] cluster and its application to the cluster

ligand: Over the past few years, a number of studies have been made on transition-metal complexes bearing ligands with functionality not accessible for coordination to the metal center. What seems to be lacking, however, is functionalization of redox-active transition-metal cluster. We herein report the functionalization of the [4Fe-4C] core in $Cp_4Fe_4(HCCH)_2$ through bromination of acetylenic protons. Reaction of the bromoacetylene-coordinated clusters $[Cp_4Fe_4(HCCH)(HCC-Br)]^+$ with LiPPh₂, followed by treatment of Cp_2Co , gave $[Cp_4Fe_4(HCCH)(HCC-PPh_2)]$ in moderate yield. The resulting compound smoothly reacts with AuCl(SMe₂) to give $[Cp_4Fe_4(HCCH)(HCC-PPh_2 \cdot AuCl)]$ (4), quantitatively.

Selected Publications

• Invited Lectures

- 1. Diphosphinidenecyclobutene-coordinated Complexes: Structures and Catalysis: F. Ozawa, The 3rd RIKEN Symposium on the Frontiers of Organometallic Chemistry, October 6, 2006, Wako, Saitama.
- 2. Stereocontrolled Synthesis and Optical Properties of All-cis Poly(arylene vinylene)s: F. Ozawa, Lectureship of the Chemistry Research Promoton Center, National Science Council, Republic of China, November 8, 2006, Institute of Chemistry, Academia Sinica, Taipei, Taiwan.
- 3. Highly Active Catalysts bearing Diphosphinidenecyclobutene Ligands (DPCB): F. Ozawa, Lectureship of the Chemistry Research Promoton Center, National Science Council, Republic of China, November 9-10, 2006, National Tsing Hua University, Hsinchu, and National Taiwan University, Taipei, Taiwan.
- 4. Highly Active Catalysts Bearing Diphosphinidenecyclobutene Ligands: F. Ozawa, The 6th JOM Symposium, December 16-17, 2005, Honolulu, Hawaii, USA.
- 5. Alkyne-insertion into Pt(ER₃)(SnMe₃)L₂ Complexes (E=Si, Ge): F. Ozawa, PACIFICHEM2005, December 15-20, 2005, Honolulu, Hawaii, USA.

• Articles

- 1. Catalytic Applications of Transition Metal Complexes Bearing Diphosphinidenecyclobutenes (DPCB), F. Ozawa and M. Yoshifuji, *Dalton Trans. (Perspective)*, **2006**, 4987-4995.
- 2. Synthesis and Catalytic Properties of Cationic Palladium(II) and Rhodium(I) Complexes Bearing Diph-osphinidinecyclobutene Ligands, R. S. Jensen, K. Umeda, M. Okazaki, F. Ozawa, and M. Yoshifuji, *J. Organomet. Chem.*, in press.
- 3. Cyclodehydration of *cis*-2-Butene-1,4-diol with Active Methylene Compounds Catalyzed by a Diphosphinidenecyclobutene-coordinated Palladium Complex, H. Murakami, Y. Matsui, F. Ozawa, and M. Yoshifuji, *J. Organomet. Chem. (Special Issue for the 6th JOM Symposium)*, **691**, 3151-3156 (2006).
- 4. Stereoselective Synthesis of *cis* and *trans*-Oligo(phenylenevinylene)s via Palladium-Catalyzed Cross-Coupling Reactions, H. Katayama, M. Nagao, F. Ozawa, M. Ikegami, and T. Arai, *J. Org. Chem.*, **71**, 2699-2705 (2006).
- Thermal, Structural, and Viscoelastic Characterization of *cis*-Poly(phenylene vinylene) Related to its Photo-Isomerization, H. Katayama, F. Ozawa, Y. Matsumiya, and H. Watanabe, *Polymer J.*, 38, 184-189 (2006).
- 6. Stereocontrolled Synthesis and Characterization of *cis*-Poly(arylenevinylene)s, H. Katayama, M. Nagao, T. Nishimura, Y. Matsui, M. Wakioka, and F. Ozawa, *Macromolecules*, **39**, 2039-2048 (2006).
- Highly (Z)-Selective Hydrosilylation of Terminal Alkynes Catalyzed by a Diphosphinidenecyclobutene-coordinated Ruthenium Complex: Application to the Synthesis of (Z,Z)-Bis(2bromoethenyl)arenes, M. Nagao, K. Asano, K. Umeda, H. Katayama, and F. Ozawa, J. Org. Chem., 70, 10511-10514 (2005).

新規物質創製変換 リビングラジカル重合による新しい機能材料の創製

化学研究所 福田 猛



福田 猛(ふくだ たけし)

昭和18年生。昭和42年京都大学工学部高分子化学科卒業。同大学大学院工学研究 科高分子化学専攻修士課程および博士課程修了。京大工博。昭和48-50年英国マン チェスター大学博士研究員。京都大学化学研究所教務職員、同助手、助教授を経て現、 同教授。専門は高分子化学、特にラジカル重合の反応速度論と高分子材料の物理化 学的研究。近年、表面開始リビングラジカル重合による新機能表面の開発研究を展開。 平成5年度高分子学会賞。平成17-20年度文部科学省特別推進研究「濃厚ポリマーブ ラシの科学と技術」の研究代表者。

(1) ゲルマニウムおよびスズを触媒とする新しいリビング ラジカル重合の開発:高分子の分子量や分子量分布を制御 し、汎用性に富む優れた精密重合法としてリビングラジカ ル重合(LRP)が注目されている。本研究では、ゲルマニ ウムおよびスズを触媒とする新しいタイプのLRPを開発 し、スチレンおよびメタクリレート類の重合の制御に成功 した。例えば、スチレンの場合、ヨウ化アルキルとして 1-phenylethyl iodide、ラジカル開始剤として過酸化ベンゾ イル、触媒として GeI4を用いることにより、重合初期から 分子量分布の狭いポリマーを得ることができた(図1)。ま た、エポキシ基や水酸基を有する機能性メタクリレート類 の重合を制御することもできた。

本重合は、触媒に非遷移金属を用いたはじめての LRP である。本重合の特徴として、(1) 比較的温和な重合温度 (60-80°C)、(2) 低触媒量 (1-5 mM)、(3) (触媒の溶解に) 配 位子が不要、(4) 触媒のよい空気安定性(簡便な操作)、(5) 無着色・無臭、(6) ゲルマニウム化合物の低毒性が挙げられ る。

(2) 濃厚微粒子を付与した単分散中空微粒子の創製:オキ

セタン環を有するメタクリル酸誘導体である3-エチル-

Fig. 1 Plots of M_n and M_w/M_n vs monomer conversion for the polymerization of styrene (80 °C):[1-phenylethyl iodide]₀=80 mM; [benzoyl peroxide]₀=20 mM; [GeI₄]₀=5 mM.

3 - メタクリロキシメチルオキセタン (EMO) の原子移動ラジカル重合 (ATRP) を単分散シリカ微 粒子 (SiP) 表面から行った。重合はリビング的に進行し、分子量が約 40 万までの構造の明確な PEMO を 0.36 chains/nm² の密度で SiP 表面にグラフトすることに成功した。PEMO をグラフトし た SiP をマクロ開始剤として用い、メタクリル酸メチル (MMA) の表面開始 ATRP を行うことに よりブロック共重合体 (PEMO-*b*-PMMA) を SiP 表面にグラフトした。

この複合微粒子((PEMO-*b*-PMMA)-SiP)のSiPコア部とPMMAシェル層の間に位置する PEMO層を、EMO側鎖にあるオキセタン環のカチオン開環反応により架橋した。その後、フッ 酸によりSiPコア部を取り除くことにより、大きさが均一かつ溶媒分散性に優れる高分子中空微 粒子を創製した(図2)。本系は、空洞サイズやシェル層膜厚の制御に加え、種々のモノマーを用 いることにより中空微粒子に各種の機能を付与しうる特徴を有する。



Fig. 2 Schematic representation for the synthesis of polymeric hollow spheres and their scanning electron microscopic image. The particles were treated by a mortar prior to the measurement for the direct observation of hollow structure. The diameter of the silica particle used for the fabrication of the hollow spheres was 740 nm.

(3) 膨潤濃厚ポリマーブラシの極低摩擦特性: 良溶 媒で膨潤したポリマーブラシ表面間の摩擦特性を、 原子間力顕微鏡 (AFM)を用いたマイクロトライボ ロジー測定 (図3参照)により評価した。図4に、 PMMA ブラシ間における荷重と摩擦係数(µ)の関 係を示す。準希薄ブラシ間では、荷重の増大に伴っ て低摩領域からこれより約3桁も摩擦係数の大きい 領域への転移を示すのに対し、濃厚ブラシ間では、 高荷重においても摩擦係数が0.0005以下という極 めて小さな値を示し、驚くべき極低摩擦特性が発現 することを発見した。

この極低摩擦特性は、濃厚ブラシに特有な非 貫入性相互作用により理論的に説明すること ができる。すなわち、濃厚ブラシ系は、膨潤ブ ラシ層が濃厚溶液層となるために生じる異常に 大きな浸透圧が大きな荷重を支え得ることに加 え、いかなる圧縮状態でも(無溶媒状態でさえ) ランダムコイルより大きく伸張した形態をとる ため、このブラシを互いに圧縮しても、主には 形態エントロピー増大を駆動力としてブラシは 互いに収縮し、相互貫入せず、あらゆる荷重下 で低摩擦を示すと理解される。得られる摩擦係 数は、これまでに報告された中でも最も低い値 であり、学術上のみならず、実際的にも幅広い 分野での応用が期待される。



Fig. 3 AFM study on microtribology.



Fig. 4 Plot of frictional coefficient μ vs. load for concentrated and semi-dilute PMMA brushes in Toluene.

Creation of New Functional Materials by Use of Living Radical Polymerization

Takeshi Fukuda

Born in 1943. Graduated from Department of Polymer Chemistry, Faculty of Engineering, Kyoto University in 1967, and received a Ph. D. from Kyoto University in 1973. Postdoctoral fellow at Manchester University, UK (1973-1975). Has been, since 1973, instructor, assistant professor, associate professor and full professor at the Institute for Chemical Research, Kyoto University. Major field: polymer chemistry, in particular, fundamentals and applications of conventional and living radical polymerizations and physicochemical studies of polymer materials. Extensively developing new functional surfaces on the basis of surface-initiated living radical polymerization. Received the Award of the Society of Polymer Science, Japan (1993). Research leader of Specially Promoted Research "Science and Technology of Concentrated Polymer Brushes" supported by Ministry of Education, Science, Sports and Culture, Japan (2005-2009).

(1) Development of Novel Living Radical Polymerizations Catalyzed by Germanium or Tin Iodides: Ge and Sn (non-transition-metal) catalyzed living radical polymerizations (LRPs) were developed as novel and robust LRPs. The LRPs were successfully applied to styrene, methyl methacrylate, and functional methacrylates with an epoxide and a hydroxyl group. For example, the polymerization of styrene with 1-phenylethyl iodide as a low-mass alkyl iodide, benzoyl peroxide as a conventional radical initiator, and GeI₄ as a catalyst at 80°C provided low-polydispersity ($M_w/M_n \sim 1.1-1.2$) polymers with predicted molecular weights, as shown in Figure 1. Attractive features of the Ge and Sn catalysts include their *high reactivity* hence small amounts (1–5 mM) being required under a mild condition (at 60–80 °C), *high solubility* in organic media without ligands, *insensitivity to air* hence sample preparation being allowed in air, and virtually *no color and smell*. The Ge catalysts may also be attractive for their *low toxicity*.

(2) Fabrication of Monodisperse Hollow Spheres Grafted with Concentrated Polymer Brushes: An oxetane group-carrying methacrylate, 3-ethyl-3-(methacryloyloxy)methyloxetane (EMO), was polymerized via copper-mediated atom transfer radical polymerization (ATRP) initiated from the surface of monodisperse silica particles (SiPs). The polymerization proceeded in a living manner producing SiPs grafted with well-defined poly(EMO) (PEMO) of target molecular weight up to about 400K with a graft density (σ) as high as 0.36 chains/nm². The surface-initiated ATRP of methyl methacrylate (MMA) with PEMO-grafted SiPs as macroinitiator afforded SiPs grafted with block copolymer of the type PEMO-*b*-PMMA ((PEMO-*b*-PMMA)-SiPs). The PEMO layer of (PEMO-*b*-PMMA)-SiPs, located between the PMMA shell and the SiP core, was cross-linked by cationic ring opening reaction of the oxetane groups of the EMO moieties. The removal of the SiP core of the crosslinked (PEMO-*b*-PMMA)-SiPs by HF etching gave polymeric hollow spheres having size uniformity and good dispersibility in organic solvents (Figure 2).

(3) Ultra-low Frictional Coefficients between Solvent-Swollen Concentrated Polymer Brushes: The interaction forces between surfaces modified with PMMA brushes were measured in good solvent by atomic force microscopy. The semi-dilute brush ($\sigma = 0.024$ chains nm⁻², $M_n = 90,000$, $M_w/M_n = 1.27$) had two different regimes of friction (see Figure 4): at low applied loads, the frictional coefficient μ was very low (< 0.001), and in the threshold region, it steeply increased with increasing applied load, approaching the limiting constant value of about 0.1. This transition was ascribed to the interpenetration of the brushes at high loads. Most interestingly, the μ value between concentrated brushes ($\sigma = 0.53$ chains nm⁻², $M_n = 88,000$, $M_w/M_n = 1.17$) showed no such transition, staying at low values, lower than 5 x 10⁻⁴, in the whole range of loads studied. This μ value is one of the lowest of all materials and comparable to that achieved for polyelectrolyte semi-dilute brushes with the help of a charge effect. This extremely low frictional property was reasonably ascribed to the fact that swollen concentrated brushes would hardly interpenetrate each other due to the large osmotic pressure and highly stretched chain conformation (entropic interaction). This mechanism of "super lubrication" of concentrated brushes should be effective not only in a microscopic scale but also in a macroscopic scale.

Selected Publications

Presentation & Lectures

- 1. T. Fukuda, "Concentrated Polymer Brushes: Striking New Surfaces Created by Living Radical Polymerization", 28th Australasian Polymer Symposium (APS2006), 2006.2.5-9, Rotorua, New Zealand (Invited Keynote).
- 2. T. Fukuda, "Concentrated Polymer Brushes: New and Surprising Surfaces Created by Living Radical Polymerization", 4th IUPAC International Symposium on Radical Polymerization: Kinetics and Mechanism, 2006.9.3-8, Lucca, Italy (Invited).

Articles & Reviews

- "Suspensions of Silica Particles Grafted with Concentrated Polymer Brush. A New Family of Colloidal Crystals", K. Ohno, T. Morinaga, S. Takeno, Y. Tsujii, T. Fukuda, *Macromolecules*, **39**, 1245-1249 (2006).
- "Protein Repellency of Well-Defined, Concentrated Poly(2-hydroxyethyl methacrylate) Brushes by Size-Exclusion Effect", C. Yoshikawa, A. Goto, Y. Tsujii, T. Fukuda, T. Kimura, K. Yamamoto, A. Kishida, *Macromolecules*, **39**, 2284-2290 (2006).
- "Structure and Properties of High-Density Polymer Brushes Prepared by Surface-Initiated Living Radical Polymerization", Y. Tsujii, K. Ohno, S. Yamamoto, A. Goto, T. Fukuda, *Adv. Polym. Sci.*, 197, 1-45 (2006).
- 4. "Germanium- and Tin-Catalyzed Living Radical Polymerizations of Styrene", A. Goto, H. Zushi, Y. Kwak, T. Fukuda, *ACS Symp. Ser.*, **944**, 595-603 (2006).
- 5. "Two-Dimensional Ordered Arrays of Monodisperse Silica Particles Grafted with Concentrated Polymer Brushes", T. Morinaga, K. Ohno, Y. Tsujii, T. Fukuda, *Eur. Polym. J.*, in press (2006).
- "A Systematic Study on Activation Processes in Organotellurium-Mediated Living Radical Polymerizations (TERPs) of Styrene, Methyl Methacrylate, Methyl Acrylate, and Vinyl Acetate", Y. Kwak, A. Goto, T. Fukuda, Y. Kobayashi, and S. Yamago, *Macromolecules*, **39**, 4671-4679 (2006).
- "(Highlight Article) Mechanism and Kinetics of Dithiobenzoate-Mediated RAFT Polymerization, 1: The Current Situation", C. Barner-Kowollik, M. Buback, B. Charleux, M. L. Coote, M. Drache, T. Fukuda, A. Goto, B. Klumperman, A. B. Lowe, J. B. MaCleary, G. Moad, M. L. Monteiro, R. D. Sanderson, M. P. Tonge, P. Vana, *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.*, 44, 5809-5831 (2006).
- 8. "Re-evaluation of Persistent Radical Effect in NMP", W. Tang, T. Fukuda, K. Matyjaszewski, *Macromolecules*, **39**, 4332-4337 (2006).
- 9. "Kinetic Study on the Termination Process in Surface-Initiated Living Radical Polymerization", A. Goto, Y. Tsujii, T. Fukuda, *Secchaku*, **50**, 14-18 (2006).
- 10. "Structure and Properties of Concentrated Polymer Brushes" : T. Fukuda, Y. Tsujii, K. Ohno, A. Goto, *Ann. Rep. Res. Inst. Chem. Fib.*, **63**, 61-68 (2006).
- 11. "Assembled Films of Functional Substances and Their Applications", CMC, Tokyo, 2006, Y. Tsujii, T. Fukuda (Chap. 8: "Synthesis and Properties of Concentrated Polymer Brushes")

新規物質創製変換 遷移金属錯体を用いた新規触媒的不斉合成反応の開発

理学研究科 化学専攻 林 民生



林 民生(はやし たみお)

1948年生まれ。1975年工学博士(京都大学)。京都大学工学部助手、北海道大学触 媒化学研究センター教授を経て、1994年京都大学大学院理学研究科教授就任。この間、 1976 - 1977年コロラド州立大学化学科博士研究員.遷移金属錯体触媒反応、特に触 媒的不斉合成反応の開発に従事。1983年有機合成化学奨励賞、1991年日本 IBM 科 学賞、2003年日本化学会賞、2004年 Thomson Scientific Research Front Award 受賞。 2005年 Molecular Chirality Award 受賞

新規不斉配位子の開発と新規触媒的不斉合成反応の開発に重点を置き、触媒的不斉合成の研究 に取り組んだ。どちらの開発においても良好な成果を得た。例えばロジウム錯体触媒を用いた不 斉1,4 - 付加反応に、従来用いてきた有機ボロン酸に加えて、有機チタン試薬や有機亜鉛試薬も 使用できることを見出した。またイミンへの不斉付加による光学活性なジアリールメチルアミン の不斉合成にも成功した。さらに前例の全くない新規不斉配位子として、ノルボルナジエン(nbd) やジシクロオクタジエン(bod) 骨格をもつ不斉ジエン配位子を合成し、これらのロジウム錯体が 触媒的不斉付加反応で、従来の不斉ホスフィン配位子より高い触媒活性と高いエナンチオ選択性 を示すことを明らかにした。今年度の報告書ではこの不斉ジエン配位子について、これらを用い たイミンの不斉アリール化によるジアリールメチルアミン類の触媒的不斉合成を中心に解説する。

触媒的不斉合成の研究を行う上で最も重要な課題の一つとして触媒活性と立体選択性の向上が ある。そのためには適切な反応温度や溶媒など反応条件の選択も重要であるが、最も決定的な要 素は触媒金属を取り巻く不斉配位子にある。中心金属の周りに反応基質の立体認識に必要な不斉 環境を構築しまた反応を速やかに進行させるための適切な電子的効果を触媒金属に与える不斉配 位子の設計・合成が重要課題となる。われわれは全く前例のない新規な不斉配位子としてキラル な構造をもつジエンに着目し、実際にその光学活性体を合成した。bicyclo[2.2.1]hepta-2,5-diene ((*R*,*R*)-nbd*), bicyclo[2.2.2]octa-2,5-diene ((*R*,*R*)-bod*), bicyclo[3.3.1]nonadiene ((*R*,*R*)-bnd*) など の骨格をもつ C_2 対称な2環状ジエンである。これらのキラルジエンはいずれも1価のロジウム に配位して安定な錯体を形成する。代表的なロジウム錯体のX線結晶構造をFigure 1に示す。



Fig. 1 Chiral Dienes and Their Rhodium Complexes

光学活性なジアリールメチルアミン類は重要な生理活性化合物であり、その不斉合成が活発に 研究されている。芳香族アルデヒドとスルホンアミドとからなるイミンへの有機金属試薬の不斉 付加反応がキラルホスフィンーロジウム錯体により触媒されることが知られているが、触媒活性 や立体選択性、基質の汎用性を同時に満足する反応系はなかった。トシルイミン1とフェニル ボロキシン (PhBO)³ 2 との反応によるアミン3の不斉合成について様々な反応条件、キラル配位 子を調べた結果、この触媒反応においてはキラルジエン配位子がキラルホスフィン配位子よりは るかに高いエナンチオ選択性を示すことが分かった。また触媒活性もジエン配位子錯体が高い。 Scheme 1 に不斉配位子の比較結果の一部を示す。ジエン配位子の中で特に (*R*,*R*)-Ph-bod*の立体 区別能力は高く、様々な置換基をもつジアリールメチルアミンを 96% ee 以上のエナンチオ選択 性で与えた。



キラルジエン配位子は他の数多くの電子不足オレフィンへのロジウム触媒不斉付加反応でも高い触媒活性と高いエナンチオ選択性を示した。従来の不斉ホスフィン配位子の代表として binap と Bn-bod* との比較のデータを Scheme 2 にまとめた。 α , β -不飽和の Weinreb アミドやアルデヒ ドへのフェニルボロン酸の共役付加のエナンチオ選択性はキラルジエン配位子で 90% ee 程度であ り特別高くはないが、binap と比較すればその触媒活性も立体選択性もはるかに優れている。また β -シリルエノンへの共役付加では Bn-bod* を用いると 99% ee のフェニル化生成物を与えた。



キラルジエン配位子の優位性は、アルデヒドまたは α , β -不飽和エステルとアルキンを同一分 子内にもつ反応基質とフェニルボロン酸との反応による分子内環化反応を含む付加反応でも顕著 である (Scheme 3)。環化生成物の収率、鏡像異性体過剰率ともに Bn-bod* が binap よりはるか に優れている。

さらに高い立体選択性を目指して、他の置換基や他の基本骨格をもつキラルジエンも合成中で

ある。また他の遷移金属錯体触媒反応への応用でも良好な結果が得られている。シクロオクタジ エンやノルボルナジエンが後周期遷移金属錯体の良好な配位子となることは良く知られてたが、 これらに不斉構造を導入して触媒的不斉合成のキラル配位子として用いた例は全くなく、ここに 報告したキラルジエン配位子は、触媒的不斉合成に新しい概念を導入したものとして高く評価さ れている。



Development of New Catalytic Asymmetric Reactions Catalyzed by Transition Metals

Tamio Hayashi

Born in 1948. He received his Ph.D. degree in 1975 from Kyoto University under the direction of Professor Makoto Kumada. Then he was appointed as a Research Associate in Faculty of Engineering, Kyoto University. He spent the year 1976-1977 as a postdoctoral fellow at Colorado State University with Professor Louis S. Hegedus. He was promoted to Full Professor in 1989 in the Catalysis Research Center, Hokkaido University. Since 1994, he has been Full Professor in the Faculty of Science, Kyoto University. His awards include the Award for Young Chemists of the Society of Synthetic Organic Chemistry, Japan in 1983, the IBM (Japan) Prize in 1991, The Chemical Society of Japan Award in 2003, Thomson Scientific Research Front Award in 2004, and Molecular Chirality Award in 2005. He has been interested in the development of new reactions catalyzed by transition metal complexes, especially in catalytic asymmetric reactions.

One of the significant subjects for developing catalytic asymmetric reactions is the design and preparation of a chiral ligand which will fit in with a given reaction efficiently in catalytic activity and enantioselectivity. A number of chiral molecules containing phosphorus and/or nitrogen atoms have been prepared and used for transition metal-catalyzed asymmetric reactions. Recently we have been developing chiral dienes as chiral ligands for the asymmetric catalysis. The C_2 -symmetric chiral dienes, whose backbone is based on bicyclo[2.2.1]hepta-2,5-diene (nbd*) or bicyclo[2.2.2]octa-2,5-diene (bod*) skeleton, are prepared and used successfully for the rhodium-catalyzed asymmetric carbon-carbon bond forming reactions. High enantioselectivity as well as high catalytic activity was observed in the asymmetric addition of organoboron reagents to α , β -unsaturated ketones, esters, and *N*-sulfonylimines. Arylative cyclization reactions of alkene-aldehyde and alkene-enoate is another example where the chiral diene ligands show high performance with respect to both enantioselectivity and catalytic activity.

Publications

- 1. Catalytic Asymmetric Arylative Cyclization of Alkynals: Phosphine-Free Rhodium/Diene Complexes as Efficient Catalysts. Shintani, R.; Okamoto, K.; Otomaru, Y.; Ueyama, K.; Hayashi, T. J. Am. Chem. Soc. 2005, 127, 54-55.
- Rhodium-Catalyzed Isomerization of α-Arylpropargyl Alcohols to Indanones: Involvement of an Unexpected Reaction Cascade. Shintani, R.; Okamoto, K.; Hayashi, T. J. Am. Chem. Soc. 2005, 127, 2872-2873.
- 3. Highly Chemo- and Enantioselective Arylative Cyclization of Alkyne-Tethered Electron-Deficient Olefins Catalyzed by Rhodium Complex with Chiral Dienes. Shintani, R.; Tsurusaki, A.; Okamoto, K.; Hayashi, T. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 3909-3911.
- 4. Rhodium-Catalyzed Asymmetric 1,6-Addition of Arylzinc Reagents to Dienones. Hayashi, T.; Yamamoto, S.; Tokunaga, N. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 4224-4227.
- 5. Chiral Phosphine-Olefin Bidentate Ligands in Asymmetric Catalysis: Rhodium-Catalyzed Asymmetric 1,4-Addition of Arylboronic Acids to Maleimides. Shintani, R.; Duan, W.-L.; Nagano, T.; Okada, A.; Hayashi, T. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 4611-4614.
- 6. Arylmagnesiation of Alkynes Catalyzed Cooperatively by Iron and Copper Complexes. Shirakawa, E.; Yamagami, T.; Kimura, T.; Yamaguchi, S.; Hayashi, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 17164-17165.
- 7. High Performance of a Chiral Diene-Rhodium Catalyst for the Asymmetric 1,4-Addition of Arylboroxines to *α*, *β*-Unsaturated Ketones. Chen, F.-X.; Kina, A.; Hayashi, T. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 341-344.
- 8. Rhodium-Catalyzed Asymmetric Hydroarylation of Diphenylphosphinylallenes with Arylboronic Acids. Nishimura, T.; Hirabayashi, S.; Yasuhara, Y.; Hayashi, T. J. Am. Chem. Soc. **2006**, *128*, 2556-2557.
- Asymmetric Addition of Dimethylzinc to N-Tosylaryimines Catalyzed by a Rhodium-Diene Complex Toward the Synthesis of Chiral 1-Arylethylamines. Nishimura, T.; Yasuhara, Y.; Hayashi, T. Org. Lett. 2006, 8, 979-981.
- Rhodium-Catalyzed Asymmetric Synthesis of Indanones: Development of a New "Axially-Chiral" Bisphosphine Ligand. Shintani, R.; Yashio, K.; Nakamura, T. Okamoto, K.; Shimada, T.; Hayashi, T. J. Am. Chem. Soc. 2006, 128, 2772-2773.
- A Kinetic Study on Rh/Binap-Catalyzed 1,4-Addition of Phenylboronic Acid to Enones: Negative Nonlinear Effect Caused by Predominant Homochiral Dimer Contribution. Kina, A.; Iwamura, H.; Hayashi, T. J. Am. Chem. Soc. 2006, 128, 3904-3905.
- 12. Rhodium-Catalyzed Asymmetric Addition of Aryl- and Alkenylboronic Acids to Isatins. Shintani, R.; Inoue, M.; Hayashi, T. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 3353-3356.
- 13. Rhodium-Catalyzed Asymmetric Construction of Quaternary Carbon Stereocenters: Ligand-Dependent Regiocontrol in the 1,4-Addition to Substituted Maleimides. Shintani, R.; Duan, W.-L.; Hayashi, T. J. Am. Chem. Soc. 2006, 128, 5628-5629.
- 14. Palladium-Catalyzed [3+3] Cycloaddition of Trimethylenemethane with Azomethine Imines. Shintani, R.; Hayashi, T. J. Am. Chem. Soc. 2006, 128, 6330-6331.
- Highly Selective 1,6-Addition of Arylboronic Acids to α, β, γ, δ-Unsaturated Carbonyl Compounds Catalyzed by an Iridium Complex. Nishimura, T.; Yasuhara, Y.; Hayashi, T. Angew. Chem. Int. Ed. 2006, 45, 5164-5166.
- 16. Rhodium-catalyzed isomerization of unactivated alkynes to 1,3-dienes. Shintani, R.; Duan, W.-L.; Park, S.; Hayashi, T. *Chem. Commun.* **2006**, 3646-3647.
- 17. Rhodium-Catalyzed Multi-Component-Coupling Reactions Involving a CarborhodationCross-Coupling Sequence. Shintani, R.; Yamagami, T.; Hayashi, T. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 4799-4801.
- Expanding the C₂-Symmetric Bicyclo[2.2.1]hepta-2,5-diene Ligand Family. Concise Synthesis and Catalytic Activity in Rhodium-Catalyzed Asymmetric Addition. Berthon-Gelloz, G.; Hayashi, T. J. Org. Chem. 2006, 71, 8957-8960.
- Kinetic Studies Proving High Catalytic Activity of a Diene-Rhodium Complex in 1,4-Addition of Phenylboronic Acid to α,β-Unsaturated Ketones. Kina, A.; Yasuhara, Y.; Nishimura, T.; Iwamura, H.; Hayashi, T. *Chem. Asian J.* 2006, 1, 707-711.
- 20. Chiral Phosphine–Olefin Ligands in the Rhodium-Catalyzed Asymmetric 1,4-Addition Reactions. Duan, W.-L.; Iwamura, H.; Shintani, R.; Hayashi, T. J. Am. Chem. Soc. **2006**, *128*, in press.

新規物質創製変換 精密酸塩基触媒を用いる触媒的不斉合成反応の開発

理学研究科 化学専攻 丸岡 啓二



丸岡 啓二 (まるおか けいじ)

1953年三重県生。1976年京都大学工学部工業化学科卒業。1980年ハワイ大学大学院化学科終了、 Ph. D.。1980年名古屋大学工学部助手。1985年、同講師、1990年、同助教授。1995年、北海 道大学大学院理学研究科教授。2000年、京都大学大学院理学研究科教授、現在に至る。新し い概念に基づく新規有機合成反応の開発に従事。1985年日本化学会進歩賞、2000年井上学術賞、 2002年市村学術賞、2003年有機合成化学協会賞、2004年名古屋メダル、2007年日本化学会 賞受賞。有機合成化学の広範囲に興味を持っており、最近では二点配位型ルイス酸の化学、半 球型有機金属分子を用いる新しい分子認識化学、キラル有機分子触媒としての環境調和型キラ ル相間移動触媒やキラルアミン触媒を用いる実践的不斉合成手法の開拓に取り組んでいる。

近年、地球規模で広がる環境への負荷をできるだけ軽減し、いわゆる環境に優しい化学合成、 環境に優しい分子・反応の設計を目指してより良い環境を作るための取り組みが進んでいる。必要 な物を望むだけ作ることを主に目指してきた有機合成化学の分野でも、21世紀になると、資源を 無駄遣いし環境汚染を広げてきた 20世紀の化学から質の転換が求められている。こういった観点 から、[1] 概念的に新しい二点配位型キラルルイス酸触媒の合理的なデザインと触媒的不斉合成手 法の開拓;[2] 金属を使わない環境調和型の不斉有機分子触媒としてキラル相間移動触媒やキラル アミン触媒の開発に取り組んでおり、それらの実践的不斉合成への応用に関する成果を報告する。

(1) 二点配位型キラルルイス酸触媒のデザイン

既に本研究室では有機アルミニウムの化学で、MAO 並びにビス (ジメチルアルミノキサン)の 共通項である Al-O-Al ユニットの重要性を認識しており、この知見をもとに Ti-O-Ti ユニットを 有する μ-オキソ構造が実際に高い反応性を示すのかどうかについて検討した。そこで、塩化チ タントリイソプロポキシドと酸化銀を混ぜることによって、所望のビス (トリイソプロポキシチ タン)オキシドをほぼ純粋に調製することができた。続いて光学活性ビナフトールを加えること により配位子交換が円滑に起こり、μ-オキソチタン構造を有する光学活性ビス (チタン)オキシ ド1を合成できた。このように調製した光学活性ビス (チタン)オキシド (S,S)-1 を触媒として、



ジアゾ酢酸エステルとα-置換型アクロレインとの不斉1,3-双極子環状付加反応を行うと高い選択 性が得られた。ところが、触媒(*S*,*S*)-1の半分の構造を持つと考えられる、一点配位型の光学活 性ビナフトキシチタンジイソプロポキシド(*S*)-2を同様の条件下で不斉1,3-双極子環化反応に用 いると、低収率となり選択性も低下してしまった。この不斉合成手法を天然物であるマンザシジ ンAの短段階合成へ適用したところ、わずか5段階で光学活性マンザシジンAを不斉合成する ことができた。

(2) 環境調和型キラル相間移動触媒のデザイン

相間移動反応は、水溶液中、常温、常圧、開放系で行なえるため、極めて工業化しやすい反応 システムである。しかも、金属を使わないテトラアルキルアンモニウム塩 (R4N⁺X⁻) を触媒とし て用いるため、地球環境にやさしい無公害型反応プロセスとなる。本研究室では、最近、触媒的 不斉合成のための極めて高い活性を有するキラル相間移動触媒 (S)-3 の合成に成功した。この触 媒 (S)-3 は、従来型の触媒と異なり、通常の相間移動条件下、わずか 0.05 モル%の量でグリシン 誘導体の不斉モノアルキル化が円滑に進行し、高エナンチオ選択的にα-アルキルアミノ酸が得 られた。また、アラニン誘導体の不斉アルキル化も同様の条件下で進行し、α,α-ジアルキルアミノ酸の実用的不斉合成が可能になった。

こういったキラル相間移動触媒を用いるグリシン誘導体の不斉アルキル化反応は、各種α-ア ルキルアミノ酸の効率的な触媒的不斉合成手法を提供するが、唯一の欠点として、かさ高いα-アルキルアミノ酸の合成が困難であるという点が挙げられる。この問題を克服するため、そういっ たかさ高いα-アルキルアミノ酸の合成が可能になるような相間移動条件下での不斉ストレッカー 反応の開発に取り組んだ。その結果、らせん型構造を有するキラル相間移動触媒(*R,R,R*)-4 を新 たに考案し、*N*-スルホニルイミン基質の不斉シアノ化反応に適用したところ、ストレッカー生成 物が高いエナンチオ選択性で得られてくることを見いだした。



Development of Catalytic Asymmetric Reactions with Sophisticated Acid Base Catalysts

Keiji Maruoka

Keiji Maruoka was born in 1953 in Mie, Japan. He graduated from Kyoto University (1976) and received his Ph.D. (1980) from University of Hawaii. He became an assistant professor of Nagoya University (1980) and promoted to a lecturer (1985) and an associate professor (1990) there. He moved to Hokkaido University as a full professor (1995-2001), and currently is a professor of chemistry in Kyoto University since 2000. He was awarded the Japan Chemical Society Award for Young Chemist (1985), the Inoue Prize for Science (2000), the Ichimura Prize for Science (2001), the Japan Synthetic Organic Chemistry Award (2003), Nagoya Medal (2004) and the Japan Chemical Society Award (2007). He is an associate editor of Chemistry Letters, and is a member of the international advisory editorial board of Organic & Biomolecular Chemistry. He has a wide range of research interests in synthetic organic chemistry. His current research interests include bidentate Lewis acids in organic synthesis, molecular recognition with bowl-shaped molecules, and practical asymmetric synthesis with chiral C_2 -symmetric spiro-type phase-transfer catalysts and chiral amine catalysts as chiral organocatalysts.

Apart from enzymes as biocatalysts, a broad repertoire of chiral reagents, auxiliaries, and catalysts can be developed in recent years. In this respect, the design of new catalysts and new reactions in an environmentally benign manner is increasingly important in the 21st century for the construction of new and useful molecules. Accordingly, we have developed new catalytic asymmetric reactions based on (1) the rational design of conceptually new, chiral bidentate Lewis acids in catalytic asymmetric synthesis; (2) the design of environmentally benign chiral phase-transfer catalysts and chiral binaphthyl-modified amine catalysts as chiral organocatalysts.

(1) Design of Chiral Bidentate Lewis Acids in Catalytic Asymmetric Synthesis

Enantioselective activation of carbonyl groups with certain chiral Lewis acids is a wellestablished method for enhancing their reactivity and selectivity toward asymmetric nucleophilic addition. Previous asymmetric strategies with such chiral Lewis acids utilize a single coordination complex between aldehyde and chiral monodentate Lewis acids which inevitably causes free rotation at the M-O bond, lowering the enantioselectivity of the asymmetric reactions, and it seems difficult to overcome this intrinsic problem by the approaches currently known, in order to attain uniformly high asymmetric induction. In this context, we are interested in the possibility of forming double coordination complex with chiral bidentate Lewis acids, thereby allowing more precise enantioface discrimination as well as more effective activation of aldehyde carbonyl. Accordingly, we have developed a new catalytic, practical enantioselective 1,3-dipolar cycloaddition reaction of diazoacetates and α -substituted acroleins using a newly designed, chiral bidentate Ti(IV) complex, and applied to the short-step synthesis of naturally occurring Manzacidin A. Several characteristic features and further scope of the asymmetric 1,3-dipolar cycloaddition reaction including the catalyst design was elucidated in this research.

(2) Design of Environmentally Benign Chiral Phase-Transfer Catalysts

Phase transfer catalysis (PTC) has been recognized as a convenient and highly useful synthetic tool in both academia and industry because of several advantages of PTC (operational simplicity, mild reaction conditions with aqueous media, environmental consciousness, suitability for large-scale reactions, etc.), which meet the current requirement for practical organic synthesis. For example, exploitation of efficient methods for the preparation of both natural and unnatural α -alkyl- and α , α -dialkyl- α -amino acids, especially in enantiomerically pure form by asymmetric PTC, has become of great importance due to the high synthetic utility. Accordingly, several phase transfer catalysts

have been developed that lead to products with excellent enantioselectivity in high yields. However, despite numerous studies, truly efficient catalytic systems with high enantioselection at very low catalyst loading (e.g., <0.1 mol%) are still rare in asymmetric carbon-carbon bond formation, and major progress in terms of catalyst loading is still most desirable for practical asymmetric synthesis. Since our recently developed, chiral spiro-type (*R*,*R*)- or (*S*,*S*)-3,4,5-trifluorophenyl-NAS bromide shows exceedingly high enantioselectivity in asymmetric alkylation of α -amino acid derivatives, our next target is focused on the design of a very active phase transfer catalyst. Considering the highly lipophilic nature of 3,4,5-trifluorophenyl-NAS bromide and generation of a metal enolate in an interfacial layer, such lipophilic 3,4,5-trifluorophenyl-NAS bromide must move to the interfacial layer to induce a facile exchange reaction with a metal enolate. Based on this assumption, our strategy is to replace a rigid binaphthyl moiety in 3,4,5-trifluorophenyl-NAS bromide by flexible straight-chain alkyl groups to furnish a new catalyst of type **3**, which substantially accelerates the enolate exchange with **3** due to the increasing polarity of dialkylammonium moiety. We have found that such a designer chiral quaternary ammonium salt **3** behaves as a very powerful chiral phase transfer catalyst for the highly practical, enantioselective alkylation of protected glycine and α -alkyl- α -amino acid derivatives.

One disadvantage of the asymmetric phase transfer alkylation of glycine derivative for the synthesis of α -alkyl- α -amino acids is the difficulty of preparaing sterically hindered α -alkyl- α -amino acids. Accordingly, we are intrigued for the development of asymmetric Strecker reactions under phase transfer conditions. The Strecker reaction, catalytic asymmetric cyanation of imines represents one of the most direct and viable methods for the asymmetric Strecker reaction under phase transfer conditions. However, there is no example for asymmetric Strecker reaction under phase transfer conditions. By designing helical chiral phase transfer catalysts of type **3**, catalytic asymmetric Strecker reaction of sulfonyl imines can be realized under phase transfer conditions to furnish protected amino nitriles with excellent enantioselectivity.

Publications

- "Highly Enantioselective Phase-Transfer-Catalyzed Alkylation of Protected α -Amino Acid Amides toward Practical Asymmetric Synthesis of Vicinal Diamines, α -Amino Ketones, and α -Amino Alcohols", T. Ooi, M. Takeuchi, D. Kato, Y. Uematsu, E. Tayama, D. Sakai, K. Maruoka, J. Am. Chem. Soc., 127, 5073-5083 (2005).
- "Design of an Axially Chiral Amino Acid with a Binaphthyl Backbone as an Organocatalyst for a Direct Asymmetric Aldol Reaction", T. Kano, J. Takai, O. Tokuda, K. Maruoka, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 44, 3055-3057 (2005).
- 3. "Chiral Designer Phase Transfer Catalysts for Practical Asymmetric Synthesis", K. Maruoka, *Pure Appl. Chem.*, 77, 1285-1296 (2005).
- 4. "Design of Next Generation Chiral Acid-Base Catalysts and Application to Fine Organic Synthesis", K. Maruoka, J. Synth. Org. Chem., Jpn., 63, 686-695 (2005).
- "Importance of Chiral Phase-Transfer Catalysts with Dual Functions in Obtaining High Enantioselectivity in the Michael Reaction of Malonates and Chalcone Derivatives", T. Ooi, D. Ohara, K. Fukumoto, K. Maruoka, Org. Lett., 7, 3195-3197 (2005).
- "Convenient Preparation of Highly Active Phase-Transfer Catalyst for Catalytic Asymmetric Synthesis of α -Alkyl- and α, α -Dialkyl- α -amino Acids: Application to the Short Asymmetric Synthesis of BIRT-377", Z. Han, Y. Yamaguchi, M. Kitamura, K. Maruoka, *Tetrahedron Lett.*, 46, 8555-8558 (2005).
- "N-Spiro Chiral Quaternary Ammonium Bromide Catalyzed Diastereo- and Enantioselective Conjugate Addition of Nitroalkanes to Cyclic α, β-Unsaturated Ketones Under Phase Transfer Conditions", T. Ooi, S. Takada, S. Fujioka, K. Maruoka, Org. Lett., 7, 5143-5146 (2005).
- 8. "Asymmetric 1,3-Dipolar Cycloaddition Reaction of Nitrones and Acrolein with a Bis-Titanium Catalyst as Chiral Lewis Acid", T. Kano, T. Hashimoto, K. Maruoka, J. Am. Chem. Soc., 127,

11926-11927 (2005).

- 9. "*anti*-Selective Direct Asymmetric Mannich Reactions Catalyzed by Axially Chiral Amino Sulfonamide as an Organocatalyst", T. Kano, Y. Yamaguchi, O. Tokuda, K. Maruoka, J. Am. Chem. Soc., **127**, 16408-16409 (2005).
- 10. "Asymmetric Michael Addition of Silyl Nitronates to Cyclic α,β -Unsaturated Ketones Catalyzed by Chiral Quaternary Ammonium Bifluorides: Isolation and Selective Functionalization of Enol Silyl Ethers of Optically Active γ -Nitro Ketones", T. Ooi, K.Doda, S. Takada, K. Maruoka, *Tetrahedron Lett.*, **47**, 145-148 (2006).
- "Enantioselective 1,3-Dipolar Cycloaddition Reaction between Diazoacetates and α-Substituted Acroleins: Total Synthesis of Manzacidin A", T. Kano, T. Hashimoto, K. Maruoka, J. Am. Chem. Soc., 128, 2174-2175 (2006).
- 12. "Asymmetric Strecker Reaction of Aldimines Using Aqueous Potassium Cyanide by Phase-Transfer Catalysis of New Chiral Quaternary Ammonium Salts with Tetranaphthyl Backbone", T. Ooi Y. Uematsu, K. Maruoka, *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 2548-2549 (2006).
- 13. "Highly Enantioselective Monoalkylation of *p*-Chlorobenzaldehyde Imine of Glycine *tert*-Butyl Ester under Mild Phase-Transfer Conditions", T. Ooi, Y. Arimura, Y. Hiraiwa, L. M. Yuan, T. Kano, T. Inoue, J. Matsumoto, K. Maruoka, *Tetrahedron: Asymmetry*, **17**, 603-606 (2006).
- 14. "Organocatalytic Oxy-Michael Addition of Alcohols to α , β -Unsaturated Aldehydes", T. Kano, Y. Tanaka, K. Maruoka, *Tetrahedron Lett.*, **47**, 3039-3041 (2006).
- 15. "Direct Asymmetric Hydroxyamination Reaction Catalyzed by an Axially Chiral Secondary Amine Catalyst", T. Kano, M. Ueda, K. Maruoka, *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 6046-6047 (2006).
- "Construction of Enantiomerically Enriched Tertiary α -Hydroxycarboxylic Acid Derivatives by Phase-Transfer-Catalyzed Asymmetric Alkylation of Diaryloxazolidin-2,4-diones", T. Ooi, K. Fukumoto, K. Maruoka, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 45, 3839-3842 (2006).
- 17. "*exo*-Selective Asymmetric Diels-Alder Reaction Catalyzed by Diamine Salts as Organocatalysts", T. Kano, Y. Tanaka, K. Maruoka, *Org. Lett.*, **8**, 2687-2689 (2006).
- "Highly Efficient Trialkylsilylcyanation of Aldehydes, Ketones and Imines Catalyzed by a Nucleophilic *N*-Heterocyclic Carbene", T. Ooi, K. Sasaki, T. Konishi, H. Mii, K. Maruoka, *Tetrahedron Lett.*, 47, 4615-4618 (2006).
- 19. "Design of a Binaphthyl-Based Axially Chiral Amino Acid as an Organocatalyst for Direct Asymmetric Aldol Reaction", T. Kano, O. Tokuda, J. Takai, K. Maruoka, *Chem. Asian J.*, **1-2**, 210-215 (2006).
- 20. "Asymmetric Synthesis of α -Acyl- γ -butyrolactones Possessing All-Carbon Quaternary Stereocenters by Phase-Transfer-Catalyzed Alkylation", T. Ooi, T. Miki, K. Fukumoto, K. Maruoka, *Adv. Synth. Catal.*, **348**, 1539-1542 (2006).
- 21. "Synthesis of a Binaphthyl-Based Axially Chiral Amino Acid as a Highly Efficient Catalyst for the direct Asymmetric Aldol Reaction", T. Kano, O. Tokuda, K. Maruoka, *Tetrahedron Lett.*, **47**, 7423-7426 (2006).
- 22. "Design of Chiral Tin(IV) Aryloxide as a Novel Lewis Acid Catalyst for Enantioselective Diels-Alder Reaction", T. Kano, T. Konishi, S. Konishi, K. Maruoka, *Tetrahedron Lett.*, **47**, 873-875 (2006).
- "Asymmetric Phase-Transfer Catalysis of Homo- and Heterochiral Quaternary Ammonium Salts: Development and Application of Conformationally Flexible Chiral Phase-Transfer Catalysts", T. Ooi, S. Takada, K. Doda, K. Maruoka, *Tetrahedron*, 62, 11425-11436 (2006).
- 24. "Highly Diastereo- and Enantioselective Formal Conjugate Addition of Nitroalkanes to Nitroalkenes by Chiral Ammonium Bifluoride Catalysis", T. Ooi, S. Takada, K. Doda, K. Maruoka, *Angew. Chem. Int. Ed.*, in press.
- 25. "Design of Chiral Phase Transfer Catalysts with Conformationally Fixed Biphenyl Core: Application to Asymmetric Alkylation of Glycive Derivative", Y.-G. Wang, K. Maruoka, *Org. Proc. Res. Devel.*, in press.

新規物質創製変換

環拡張ポルフィリン金属錯体を基本骨格とする 高機能性分子素材の設計と合成

理学研究科 化学専攻 大須賀 篤弘



大須賀 篤弘 (おおすか あつひろ)

1954 年愛知生。1977 年京都大学理学部化学科卒業、1979 年同大学院理学研究科修 士課程修了。1982 年理学博士(京都大学)。1979 年愛媛大学理学部助手。1984 年京 都大学理学部助手、1987 年同助教授を経て、1996 年京都大学理学研究科教授、現在 に至る。1988 年日本化学会進歩賞。1999 年光化学協会賞。2001 年より科学技術振 興機構・戦略的基礎研究推進事業(CREST)の研究代表者。ポルフィリン関連化合物 の新規開発・新しいポルフィリン多量体の合成・光合成モデルの開発と研究などを 展開している。

(1) 環拡張ポルフィリンの合成:環拡張ポルフィリンとは5個以上のピロールが結合してπ共役でつながった環状化合物である。これらは巨大で柔軟な環構造をとり、共役サーキットが大きく広がっていることから多くの酸化還元状態を持つ。そのため、構造化学・錯体化学・電気化学などあらゆる観点に置いて興味深く、環拡張ポルフィリン特有の性質や反応性について研究がなされている。



Fig. 1 Structures of *meso*-aryl expanded porphyrins.

我々は独自の方法で一連の環拡張ポルフィリンが 得られることを見出した (Figure 1)。ここで得られ

た環拡張ポルフィリンは、ピロールとメチン炭素が交互に結合した真のポルフィリンのホモロー グといえる世界で初めての化合物群であり、研究を始めた当初は関連化学が全く未開拓であった。 その独創性・学問的意義は大きく、国際的な関心も次第に高まっている。

本研究では、環拡張ポルフィリンの最も重要かつ特徴的な性質の一つである遷移金属複核錯体 を合成し、その触媒機能や光化学特性について精査している。その結果、我々はこれまでに、ペ ンタフィリン、ヘキサフィリン、オクタフィリン、デカフィリンの合成とその金属錯体の性質に ついて明らかにしてきた。ピロールの数が偶数からなる環拡張ポルフィリンは合成ルートを確立 することに成功したため、すでにその諸性質を明らかにしつつあるが、本年度はピロールの数が 奇数からなる環拡張ポルフィリンの研究を大きく展開した。

(2) ノナフィリンの合成とその金属錯体の性質: ピロール9 個からなるノナフィリン1 の合成は、 対応するトリピランとペンタフルオロベンズアルデヒドから 15% の収率で達成し、その構造を 高分解能質量分析、[']H NMR 及びX線構造解析によって明らかにした。8 の字にねじれ、ポルフィ リンに似た骨格とヘキサフィリン骨格を合わせたような構造になっており、これは NMR の結果 とも一致した (Figure 2)。1 は NaBH₄ によって定量的に還元され、X 線構造解析からその構造が 大きく変化していることを見出した (Figure 3)。1 に酢酸亜鉛を反応させると、ポルフィリン骨 格にのみ亜鉛イオンが錯化した亜鉛単核錯体 3 が 75% の収率で得られた (Figure 4)。同様に酢酸 銅によって銅単核錯体 4 を 27% の収率で得ることにも成功した (Figure 4)。さらなる金属錯化を 検討し、酢酸パラジウムとの反応を試みたところ反応は進行し、銅 - パラジウム - パラジウムの 異核 3 核錯体 5 を定量的に得ることに成功した (Figure 5)。興味深いことに、片方のパラジウム は C-H 結合の活性化の結果 2 つの金属 – 炭素結合を持ち、もう一方のパラジウムはアゴスティッ ク相互作用によって配位を満たしていた。



Fig. 2 X-Ray crystal structure of 1; a) top view and b) side view. Peripheral substituents at *meso*-position and hydrogen atoms at β -positions are omitted for clarity. c) Formal structure of 1.



Fig. 4 X-Ray crystal structures of a) 3 and b) 4. Peripheral substituents at *meso*-position and hydrogen atoms at β -positions are omitted for clarity.



Fig. 3 a) X-Ray crystal structure of 2. Peripheral substituents at *meso*position and hydrogen atoms at β -positions are omitted for clarity. b) Formal structure of 2.



Fig. 5 X-Ray crystal structures of 5; a) top view and b) side view. Peripheral substituents at *meso*position and hydrogen atoms at β -positions (except H1) are omitted for clarity.

(3) ヘプタフィリンの合成とホウ素錯化: ピロール数が7つのヘプタフィリンは、これまで効率 的な合成ルートが無かったためにその性質についてはほとんど明らかにされていなかった。今 回、トリピランジカルビノールとテトラピランとの反応により、39%の収率でヘプタフィリン6 を得ることに成功し、その構造をX線結晶構造解析によって明らかにした。これを溶液状態で保 存することで定量的に縮環ヘプタフィリン7が得られることを見出し、さらにこれをトルエン中 で還流することで2重縮環ヘプタフィリン8が得られることを明らかにした。驚いたことに8は DMF中で水素化ナトリウムと反応させることにより4重縮環ヘプタフィリン9になった (Scheme 1)。9は BBr₃ との反応でホウ素錯体となり、これは近赤外領域に蛍光を示した。



Scheme 1 Synthesis of N-fused heptaphyrins.

Design and Synthesis of Excellent Functional Materials Based on Expanded Porphyrin Metal Complexes

Atsuhiro Osuka

Atsuhiro Osuka was born in Gamagori, Aichi in 1954. He received his PhD degree from Kyoto University in 1982 on the photochemistry of epoxyquinones. In 1979, he started an academic career at the Department of Chemistry of Ehime University as an assistant professor. In 1984, he moved to the Department of Chemistry of Kyoto University, where he became a professor of chemistry in 1996. He was awarded the CSJS Award for Young Chemists in 1988 and the Japanese Photochemistry Association Award in 1999. His research interests cover many aspects of synthetic approaches toward the artificial photosynthesis and development of porphyrin-related compounds with novel structures and functions. He was selected as a project leader of Core Research for Evolutional Science and Technology (CREST) of JST in 2001.

In recent years, increasing attention has been focused on the study of so-called expanded porphyrins that consist of five or more conjugated pyrrolic subunits. Our own activity in this area has been triggered by our unexpected finding that a series of *meso*-aryl-substituted expanded porphyrins can be prepared in a simple one-pot reaction of a 2,6-substituted aryl aldehyde with pyrrole under modified Rothemund-Lindsey conditions. *meso*-Aryl-substituted expanded porphyrins can be regarded as real homologues of *meso*-tetraaryl porphyrins. This new class of molecules exhibits interesting spectral, electrochemical, and coordination properties.

(1) meso-Aryl Expanded Porphyrins: A series of meso-aryl expanded porphyrins were prepared from the acid catalyzed one-pot synthesis of pyrrole and pentafluorobenzaldehyde (Figure 1). Expanded porphyrins are interesting from the viewpoint of the annulene chemistry, since the number of π electrons in the conjugated circuit usually determines the aromaticity of the macrocycles.

(2) Nonaphyrin and its Metal Complexes: *meso*-Pentafluorophenyl-substituted [40]nonaphyrin(1.1. 1.1.1.1.1.1.1) was prepared by stepwise ring-size selective synthesis and was reduced with NaBH4 to [42]nonaphyrin(1.1.1.1.1.1.1.1). The structures of both forms have been structurally characterized to be a figure-eight shape consisting of a porphyrin-like tetrapyrrolic segment and a hexaphyrin-like hexapyrrolic segment and a distorted nonplanar butterfly-like shape, respectively. In mono-metal complexes, Zn^{II} or Cu^{II} ion is bound in the porphyrin-like tetrapyrrolic segment with maintenance of the overall structure of 1. Similar to 1, the complexes 3 and 4 are interconvertible with corresponding reduced froms via two-electron reduction with NaBH4 and oxidation with DDQ. The metal-free hexaphyrin-like segments of 3 and 4 have been shown to serve as a nice platform for complexation of two palladium ions, providing hetero-trinuclear metal complexes (Zn^{II} -Pd^{II}-Pd^{II}-Pd^{II}-Pd^{II}-Pd^{II}-Pd^{II}) in high yields, in which Zn and Cu ion each resides at the same porphyrin-like segment and one Pd ion is bound with a NNCC fashion through double C — H bond activation and the other Pd ion is bound with a NNC fashion with single C — H bond activation. Multi-metal complexes exhibit small electrochemical HOMO-LUMO gaps (< 0.6 eV), despite their nonplanar conformations.

(3) Heptaphyrin and a Boron Complex of Quadruply N-fused Heptaphyrin: *meso*-Heptakis (pentafluorophenyl)heptaphyrin(1.1.1.1.1) 6 was prepared by a stepwise route in 39% yield and its unique *N*-fusion reaction (NFR) sequence has been revealed; this reaction leads to singly-, doubly-, and quadruply *N*-fused heptaphyrins (7, 8, and 9) in good yields. These transformations are facilitated by the inherent conformational distortion of 6 as well as the distorted, folded conformations of *N*-fused heptaphyrins 7 and 8. The proximate arrangement of the three pyrrole units in 9 allowed for the

formation of the tripyrrolyl boron-(III) complex 10 with unique coordination features. Molecules 6, 8, and 10 were structurally characterized by X-ray crystallography. In addition, the boron complex 10 displayed weak but distinct fluorescence in the near infrared region.

Publications

- 1. Syntheses of 2-Arylated Corroles, a Directly Linked Corrole–Porphyrin Hybrid, a 1,4-Phenylenebridged Corrole Dimer, and 2-Hydroxycorrole via Regioselective Ir-Catalyzed Direct Borylation of Corrole, S. Hiroto, I. Hisaki, H. Shinokubo, A. Osuka, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **44**, 6763-6766 (2005), selected as a HOT paper.
- 2. Internally 1,4-Phenylene-bridged *meso*-Aryl Substituted Expanded Porphyrins; The Decaphyrin and Octaphyrin Cases, V. G. Anand, S. Saito, S. Shimizu, A. Osuka, *Angew. Chem. Int. Ed.* 44, 7244 (2005).
- 3. Oxidation of Hydroquinones with *meso*-Hexakis- pentafluorophenyl [26]hexaphyrin(1.1.1.1.1), C. Maeda, H. Shinokubo, A. Osuka, *Org. Biomol. Chem.*, **4**, 200-202 (2006).
- 4. Tribenzosubporphyines: Synthesis and Characterization, Y. Inokuma, J. H. Kwon, T. K. Ahn, M.-C. Yoon, D. Kim, A. Osuka, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **45**, 961-964 (2006) (VIP paper).
- A New Entry to Doubly N-Confused [26]Hexaphyrins(1.1.1.1.1) from Normal [26]Hexaphyrins (1.1.1.1.1) via an Unprecedented Double Pyrrolic Rearrangement, M. Suzuki, M.-C. Chul, D. Y. Kim, J. H. Kwon, H. Furuta, D. Kim, A. Osuka, *Chem. Eur. J.*, 12, 1754-1759 (2006).
- 6. Regioselective vicinal-Dichlorination of *meso*-Aryl [26]Hexaphyrin(1.1.1.1.1), K. Youfu, A. Osuka, *Tetrahedron Lett.*, **47**, 1381-1384 (2006).
- 7. Synthesis of Pyrrolidine-Fused [34] and [36]Octaphyrins via 1,3-Dipolar Cycloaddition, H. Hata, Y. Kamimura, H. Shinokubo, A. Osuka, *Org. Lett.*, **8**, 1169-1172 (2006).
- 8. Porphyrin Synthesis in Water Provides New Expanded Porphyrins with Direct Bipyrrole Linkages: Isolation and Characterization of Two Heptaphyrins, S. Hiroto, H. Shinokubo, A. Osuka, *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 6568-6569 (2006).
- 9. *meso*-Trifluoromethyl Substituted Expanded Porphyrins, S. Shimizu, N. Aratani, A. Osuka, *Chem. Eur. J.*, **12**, 4909-4918 (2006).
- Comparative Photophysical Properties of Free-base, bis-Zn(II), bis-Cu(II), and bis-Co(II) Doubly N-Confused Hexaphyrins(1.1.1.1.1), J. H. Kwon, T. K. Ahn, M.-C. Yoon, D. Y. Kim, M. K. Koh, D. Kim, H. Furuta, M. Suzuki, A. Osuka, J. Phys. Chem. B, 110, 11683-11690 (2006).
- 11. Synthesis and Biradicaloid Character of Doubly Linked Corrole Dimers, S. Hiroto, K. Furukawa, H. Shinokubo, A. Osuka, *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 12380-12381 (2006).
- 12. Nonlinear Optical Properties and Excited-State Dynamics of Highly Symmetric Expanded Porphyrins, Z. S. Yoon, J. H. Kwon, M.-C. Yoon, M. K. Koh, S. B. Noh, J. L. Sessler, J. T. Lee, D. Seidel, A. Aguilar, S. Shimizu, M. Suzuki, A. Osuka, D. Kim, *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 14128-14134 (2006).
- 13. *N*-Fusion Reaction Sequence of Heptaphyrin(1.1.1.1.1.1); Singly, Doubly, and Quadruply *N*-Fused Heptaphyrin, S. Saito, A. Osuka, *Chem. Eur. J.*, **12**, 9095-9102 (2006).
- 14. Conformational Control of [26]Hexaphyrins(1.1.1.1.1) by *meso*-Thienyl Substituent, M. Suzuki, A. Osuka, *Chem. Eur. J.*, **13**, 196-202 (2007).
- 15. [40]Nonaphyrin(1.1.1.1.1.1.1) and Its Hetero-metallic Complexes with Palladium Carbon Bonds, Y. Kamimura, S. Shimizu, A. Osuka, *Chem. Eur. J.* **13**, 1620-1628 (2007).
- 16. Cross-Bridging Reaction of 5,20-Diethynyl Substituted Hexaphyrins to Vinylene-Bridged Hexaphyrins, M. Suzuki, A. Osuka, J. Am. Chem. Soc., **129**, 464-465 (2007).

新規物質創製変換 新規含高周期典型元素化学種の創製

化学研究所 時任 宣博



時任 宣博(ときとう のりひろ)

1957 年生まれ。1979 年東京大学理学部化学科卒業。1985 年同大大学院博士課程修了。理学博士(東 京大学)。筑波大学化学系助手、東京大学理学部助手、同大大学院理学系研究科助教授、九州大学有 機化学基礎研究センター教授などを経て、2000 年京都大学化学研究所教授、現在に至る。この間、 2001 年4月より2年間分子科学研究所客員教授を併任。2005 年4月より京都大学化学研究所副所長。 Associate Editor of "*the Journal of Physical Organic Chemistry*", Editorial Board of "*Journal of the Sulfur Chemistry*"。専門:有機元素化学。速度論的安定化を利用することにより、新規な結合様式を有する 化合物を創製し、その構造・性質の解明を行っている。1992 年度有機合成化学奨励賞、1998 年第12 回日本 IBM 科学賞、2003 年日本化学会第20 回学術賞、2003 年 Humboldt Research Award などを受賞。

新規な結合様式を有する化学種を創製し、その性質を解明すること は、新規反応や新規機能性物質の開発に繋がる極めて重要な研究であ る。我々は、かさ高い置換基を導入して高反応性の部分を保護するこ と(立体保護)により高反応性化学種を安定な化合物として合成・単離 し、その構造・反応性等の性質を明らかにすることを目的として研究 を行なっている。これまでに我々は、立体保護基として独自に 2,4,6-トリス[ビス(トリメチルシリル)メチル]フェニル基(Tbt 基)および 2.6-



Tbt: R = H; Bbt: $R = SiMe_3$

ビス [ビス(トリメチルシリル)メチル]-4-[トリス(トリメチルシリル)メチル] フェニル基 (Bbt 基) を開発し、これらの置換基を用いることにより様々な新規含高周期典型元素化学種を合成するこ とに成功している。本年度は、Tbt 基や Bbt 基を利用した安定な含ゲルマニウム芳香族化学種の 合成、および Tbt 基を有する β-ジケチミナート配位子を用いた 4 族金属錯体の合成と性質につい て検討を行ったので、以下報告する。

(1) 初めての安定な 9-ゲルマアントラセンおよび 9-ゲルマフェナントレンの合成

含高周期 14 族元素芳香族化合物の化学は、有機化学において 最も重要な概念の一つである芳香 族性を理解する上で重要である。 我々はこれまでに、Tbt 基を用い ることにより速度論的に安定化さ れたケイ素、ゲルマニウム、また はスズ原子を環内に有する種々の 含高周期 14 族元素芳香族化合物 を合成・単離し、その分子構造、 分光学的性質および反応性からこ



Fig. 1 Synthesis of 9-germaanthracene 1 and 9-germaphenanthrene 2.

れらの化合物がかなりの芳香族性を有することを明らかにしてきた。

本研究では、含ゲルマニウム 14π電子共役芳香族化合物として、初めての安定な 9-ゲルマア ントラセンおよび 9-ゲルマフェナントレン誘導体を合成し、それらの性質を比較することで、含 ゲルマニウム芳香族化合物の共役拡張の本質を解明した。立体保護基として Bbt 基または Tbt 基 を用い、それぞれ対応する前駆体 3 および 4 と LDA との反応により、初めての安定な 9-ゲルマ アントラセン 1 および 9-ゲルマフェナントレン 2 の合成に成功した。¹H- および ¹³C-NMR 測定

から1および2において、含ゲルマニウ ム環状14π電子系としての環電流効果が 存在することが示唆された。また、X線 結晶構造解析から、1および2の含ゲルマ ニウム芳香環は共に平面構造であること が明らかとなった。さらに、1 および2の ヘキサン中での紫外可視吸収スペクトル を測定したところ、最長の吸収極大波長 はそれぞれ 520 nm および 409 nm であり、 9-ゲルマアントラセン1の方が同じ 14π 電子環状共役系である 9-ゲルマフェナン トレン2よりも、共役拡張の効果が大き いことが判った。実際、1は赤色の化合物 であるのに対し、2は薄黄色の化合物で あった。すなわち、高周期14族元素であ るゲルマニウムを含む芳香族化合物の場



Fig. 2 Structure of 9-germaanthracene 1 (a) and 9-germaphenanthrene 2 (b).

合でも、炭素の系と同様に、直線的に共役を拡張したアセン系の方が、ジグザグ型に共役拡張したフェン系よりも効率よくその共役が拡張されていることが明らかとなった。

(2)かさ高い置換基を有するβ-ジケチミナート配位子の合成とその応用

β-ジケチミナート配位子は、窒素上の 置換基を換えることにより様々な配位環 境を構築できるという特徴を持つ。既に 我々は、Tbt 基を窒素上に導入した新規な リチウムβ-ジケチミナート5を合成し報 告している。本研究では、かさ高いβ-ジ ケチミナート配位子を有する4族遷移金 属錯体の合成とその性質の解明を目的と して以下の検討を行った。5に対し、各種 4族金属塩化物を作用させることにより、 対応する4価4族金属錯体6を合成した。 これらの構造は各種スペクトルおよび X 線結晶構造解析により解明した。低原子 価4族金属錯体の合成を目的として 6a-c の還元反応を行ったところ、4族金属―イ ミド錯体 7a-c がそれぞれ生成することを





明らかにした。7は、対応する2価4族金属錯体を経由して生成したと考えられる。また、7は エチレン/1-ヘキセン共重合反応において触媒活性を示し、超高分子量ポリマーを生成することを 明らかにした。

Synthesis of Novel Species Containing Heavier Main Group Elements

Norihiro Tokitoh

Norihiro Tokitoh, born in 1957, received his Ph. D. at The University of Tokyo in 1985. He became Research Associate (1986) and Assistant Professor (1987) at Tsukuba Univ., and then Assistant Professor (1989) and Associate Professor (1994) at The University of Tokyo. He was promoted to Professor of Chemistry at the Institute for Fundamental Research of Organic Chemistry, Kyushu University in 1998, and moved to Kyoto University as Professor of Organoelement Chemistry Laboratory at the Institute for Chemical Research in 2000. He was Visiting Professor of Coordination Chemistry Laboratories at the Institute for Molecular Sciences during the period of 2001-2003. He is now Vice-Director of Institute for Chemical Research, Kyoto University from April 2005. He received the Progress Award in Synthetic Organic Chemistry of Japan in 1992, the Japan IBM Science Award in 1998, the CSJ (Chemical Society of Japan) Award for Creative Work in 2003, Humboldt Research Award in 2003 and so on. His main research fields are organoheteroatom and organometallic chemistry, and his current research interests are focused on the kinetic stabilization of highly reactive, low-coordinate compounds of heavier main group elements.

It is very important to synthesize compounds having novel structures and to elucidate their properties, since such studies may lead to the developments of novel reactions and novel functional materials. We are studying the synthesis and isolation of highly reactive species as stable compounds by introducing bulky substituents to protect the reactive cites (steric protection) and the elucidation of their properties. We have already developed effective protection groups, 2,4,6-tris[bis(trimethylsilyl)methyl]phenyl (Tbt) and 2,6-bis[bis(trimethylsilyl)methyl]-4-[tris(trimethylsilyl)methyl]phenyl (Bbt), which are successfully applied to the synthesis of a variety of novel compounds containing heavier main group elements. In this project, we examined the syntheses of novel metallaaromatic compounds containing a germanium atom (9-germaanthracene and 9-germaphenanthrene) and titanium, zirconium, and hafnium complexes with new overcrowded β -diketiminato ligand bearing a Tbt group.

(1) Synthesis of the First Stable 9-Germaanthracene and 9-Germaphenanthrene: The chemistry of aromatic compounds containing a heavier group 14 element is important to understand the concept of "aromaticity", which has been one of the fascinating topics in organic chemistry. We have succeeded in the synthesis and isolation of kinetically stabilized sila-, germa-, and stannaaromatic compounds by taking advantage of an efficient steric protection group, Tbt group, and revealed their considerable aromaticity based on their molecular structures, spectroscopic properties, and reactivities. In this project, we succeeded in the synthesis of a new family of stable germaaromatics, the first stable 9-germaanthracene 1 and 9-germaphenanthrene 2, both of which are isomers of the 14π electron conjugated systems containing a germanium atom. Compounds 1 and 2 were synthesized by the reaction of the corresponding precursors 3 and 4 with LDA, respectively. Their ¹H and ¹³C NMR spectra indicate the ring current effect on the 14π -electron-germaaromatic rings of 1 and 2. The X-ray crystallographic analyses of 1 and 2 revealed their planar geometries of the germaaromatic skeleton. The longest λ_{max} of 9-germaanthracene 1 is apparently longer than that of 2, as expected by their colors in solution (red for 1 and pale yellow for 2). Hence, it is evidenced that the 14π -electron systems of germaaromatics can be extensively conjugated in the linear type but not so effectively in the zigzag type.

(2) Synthesis and Applications of a New β -Diketiminato Ligand Bearing Bulky Substituents: The chemistry of β -diketiminato ligands has been extensively studied, and it has been revealed that they can stabilize the metals with unusual valency, such as group 4 metals. In this project, we have studied the synthesis of a new lithium β -diketiminate 5 bearing an extremely bulky substituent, a Tbt group, and its application toward complexation with group 4 metals. Reactions of 5 with [MCl₄(thf)₂] (M = Ti, Zr, Hf) gave the corresponding trichlorides **6a-c**. The structures of **6a-c** were definitively determined by the spectroscopic and X-ray crystallographic analyses. In the hope of obtaining the corresponding low-valent compounds of the group 4 metals, the reductions of **6a-c** were attempted. The reaction of **6a-c** with KC₈ in the presence of TMEDA and LiCl resulted in the formation of unexpected imido complexes **7a-c**, respectively.

Publications

- 1. Synthesis and Properties of η^6 -Silabenzene-M(CO)₃ Complexes (M= Cr and Mo), A. Shinohara, N. Takeda, T. Sasamori, T. Matsumoto, and N. Tokitoh, *Organometallics*, **24**, 6141-6146 (2005).
- 2. Unusual Carbon-Sulfur Bond Cleavage in the Reaction of a New Type of Bulky Hexathioether with a Zerovalent Palladium Complex, D. Shimizu, N. Takeda, and N. Tokitoh, *Chem. Commun.*, 177-179, (2006).
- 3. Bis[2-(phenylsulfanyl)benzenethiolato]palladium(II), D. Shimizu, N. Takeda, T. Sasamori, and N. Tokitoh, *Acta Cryst. E*, **62**, m166-m167 (2006).
- 4. Synthesis of Bis(germacyclopropa)benzenes and Structures of Their Annelated Benzene Rings, T. Tajima, T. Sasamori, N. Takeda, N. Tokitoh, K. Yoshida, and M. Nakahara, *Organometallics*, **25**, 230-235 (2006).
- Synthesis and Properties of a New Kinetically Stabilized Digermyne: New Insights for a Germanium Analogue of an Alkyne, Y. Sugiyama, T. Sasamori, Y. Hosoi, Y. Furukawa, N. Takagi, S. Nagase, and N. Tokitoh, *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 1023-1031 (2006).
- 6. Syntheses, Structures, and Properties of the First Stable 1,1'-Bis(diphosphenyl)ferrocenes, N. Nagahora, T. Sasamori, and N. Tokitoh, *Chem. Lett.*, **35**, 220-221 (2006).
- 7. A Stable Neutral Stannaaromatic Compound: Synthesis, Structure and Complexation of a Kinetically Stabilized 2-Stannanaphthalene, Y. Mizuhata, T. Sasamori, N. Takeda, and N. Tokitoh, *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 1050-1051 (2006).
- Photophysical and Photochemical Processes of 9,10-Dihydro-9-silaphenanthrene Derivatives: Photochemical Formation and Electronic Structure of 9-Silaphenanthrenes, H. Hiratsuka, H. Horiuchi, Y. Furukawa, H. Watanabe, A. Ishihara, T. Okutsu, S. Tobita, T. Yoshinaga, A. Shinohara, N. Tokitoh, M. Oba, and K. Nishiyama, J. Phys. Chem. A, 110, 3868-3874 (2006).
- Reduction of Tetravalent Group 4 Metal Complexes Supported by an Extremely Bulky, Unsymmetrically Substituted beta-Diketiminato Ligand Leading to the Regioselective C=N Bond Cleavage Giving Ring-Contracted Metal-Imido Complexes, H. Hamaki, N. Takeda, and N. Tokitoh, *Organometallics*, 25, 2457-2464 (2006).
- Synthesis and Characterization of Two Isomers of 14π-electron Germaaromatics: Kinetically Stabilized 9-Germaanthracene and 9-Germaphenanthrene, T. Sasamori, K. Inamura, W. Hoshino, N. Nakata, Y. Mizuhata, Y. Watanabe, Y. Furukawa, and N. Tokitoh, *Organometallics*, 25, 3533-3536 (2006).
- 11. A Kinetically Stabilized Stannanetellone, a Tin-Tellurium Double-Bond Compound, T. Tajima, N. Takeda, T. Sasamori, and N. Tokitoh, *Organometallics*, **25**, 3552-3553 (2006).
- 12. Effect of Structural Change in Viologen Acceptors on the Rate of Single Electron Transfer from Tributylphosphine, S. Yasui, K. Itoh, A. Ohno, and N. Tokitoh, *Org. Biomol. Chem.*, **4**, 2928-2931 (2006).
- Bottom-Up Synthesis of Optically Active Oligonaphthalenes: Three Different Pathways for Controlling Axial Chirality, K. Tsubaki, H. Tanaka, K. Takaishi, M. Miura, H. Morikawa, T. Furuta, K. Tanaka, K. Fuji, T. Sasamori, N. Tokitoh, T. Kawabata, *J. Org. Chem.*, 71, 6579-6587 (2006).
- 14. Synthesis and Spectroscopic Properties of Novel Silacyclic Compounds Containing a Titanium and Some Chalcogen Atoms, N. Takeda, T. Tanabe, and N. Tokitoh, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **79**, 1573-1579 (2006).
- One-electron Reduction of Kinetically Stabilized Dipnictenes: Synthesis of Dipnictene Anion Radicals, T. Sasamori, E. Mieda, N. Nagahora, K. Sato, D. Shiomi, T. Takui, Y. Hosoi, Y. Furukawa, N. Takagi, S. Nagase, and N. Tokitoh, *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 12582-12588 (2006).
- 16. Sila- and Germacyclopropabenzenes, T. Sasamori and N. Tokitoh, Organometallics, 25, 3522-3532 (2006).
- 17. Synthesis and Properties of 9-Anthryldiphosphene, T. Sasamori, A. Tsurusaki, N. Nagahora, K. Matsuda, Y. Kanemitsu, Y. Watanabe, Y. Furukawa, and N. Tokitoh, *Chem. Lett.*, **35**, 1382-1383 (2006).
- Synthesis and Properties of Alkaline Metal Complexes with New Overcrowded β-Diketiminato Ligands, H. Hamaki, N. Takeda, T. Yamasaki, T. Sasamori, and N. Tokitoh, J. Organomet. Chem., in press.
- 19. Synthesis, Structures, and Properties of Meso-Phosphorylporphyrins: Self-organization through P-oxoto-Zinc Coordination, Y. Matano, K. Matsumoto, Y. Terasaka, H. Hotta, Y. Araki, O. Ito, M. Shiro, T. Sasamori, N. Tokitoh, and H. Imahori, *Chem. Eur. J.*, in press.
- 20. Synthesis and Characterization of Functionalized Ferrocenylsilanes Bearing a Bulky Substituent, T. Sasamori, M. Kobayashi, N. Nagahora, Y. Sugiyama, and N. Tokitoh, *Silicon Chem.*, in press.
- Coordination Chemistry of a Kinetically Stabilized Germabenzene: Syntheses and Properties of Stable η⁶-Germabenzene Complexes Coordinated with Transition Metals, N. Tokitoh, N. Nakata, A. Shinohara, N. Takeda, and T. Sasamori, *Chem. Eur. J.*, in press.
- 22. Atoms-in-Molecules Analysis of Extended Hypervalent 5c–6e C₂Z₂O Interactions at the 1,8,9-Positions of Anthraquinone and 9-Methoxyanthracene Systems, W. Nakanishi, T. Nakamoto, S. Hayashi, T. Sasamori, and N. Tokitoh, *Chem. Eur. J.*, in press.
- 23. Nucleophilic Attack toward Group 4 Metal Complexes Bearing Reactive 1-Aza-1,3-butadienyl and Imido Moieties, H. Hamaki, N. Takeda, and N. Tokitoh, *Inorg. Chem.*, in press.

新規物質創製変換 ナノ構造を制御した人工光合成系の構築

工学研究科 分子工学専攻 今堀 博



今堀 博(いまほり ひろし)

昭和36年生。平成2年京都大学理学研究科博士後期課程修了、平成2-4年米国ソー ク生物学研究所博士研究員、平成4年大阪大学産業科学研究所助手及び平成11年大 阪大学大学院工学研究科助教授を経て、平成14年京都大学工学研究科教授、平成 13-17年科学技術振興機構さきがけ研究「変換と制御」研究代表者(兼任)。平成14年 ポルフィリン・フタロシアニン国際学会奨励賞、平成16年光化学協会賞、平成18 年日本学術振興会賞、日本化学会学術賞受賞。フラーレン・ナノチューブ・ナノ微 粒子などのナノ材料を用いた人工光合成の実現に取り組んでいる。

(1) 色素増感・バルクヘテロ接合太陽電池における ポルフィリンの置換基効果:我々はポルフィリンと フラーレンを SnO₂ 半導体電極上へ逐次組織化する ことにより、新規な有機太陽電池を構築することに 既に成功している。特に、ポルフィリンを金属・シ リカ微粒子、デンドリマー、ポリマーなどのナノ土 台を用いて組織化することで、最高 54%の光電流 発生の IPCE 値 (外部量子収率)を達成している。し かしながら、これらの前駆組織体の合成は容易では なく、将来の応用も考慮すれば、電極上への組織化 はできるだけ簡便であることが望ましい。

そこで、ポルフィリンに種々の置換基を導入する







サンドイッチする形で1:2の錯体を形成 していること、ii) ポルフィリンとフラー レンが交互に積層して層状構造を形成して



いること、iii) ポルフィリン層では、最近接のポルフィリンは1次元状にJ会合体を形成して配列していること、iv) フラーレン層では、最近接のC₆₀は2次元状のシート構造を形成していること、がわかった。また、種々の分光測定・表面解析から、電極上の混合膜中でも共単結晶中に類似の構造が含まれていることがわかった。すなわち、電極上の混合膜中で光照射によるポルフィリン・C₆₀ 錯体内での超高速電荷分離後、ホールはポルフィリンのナノ1次元経路を、電子はC₆₀の2次元シートを輸送されることで、高い光電変換特性が得られたと考えられる。いままで、バルクヘテロ接合太陽電池で、このような相互に入り組んだホール・電子輸送ナノ経路が高い光電変換特性を発現するために重要であることが示唆されていたが、実験的には証明されていなかった。本成果はこのような構造の重要性を分子レベルで解明した初めての例であり、今後の有機太陽電池の設計に重要な指針を与えると考えられる。

(2)電子供与性のペリレンを用いた連結系の合成と光物性:我々は今までにポルフィリンとフ ラーレンを用いた人工光合成系を構築してきた。特に、フラーレンが小さな再配列エネルギーを 持つために、高効率・長寿命の電荷分離状態を生成できることを明らかにしてきた。しかしなが ら、太陽光の分布に従った高効率な光捕集を考えた場合、ポルフィリン・フラーレンの組み合わ せは必ずしも満足のいく系ではない。そこで、ポルフィリンに代わり、ドナーとして、ペリレン 骨格に着目した。ペリレンは長波長領域まで良好な光捕集特性を示すが、通常は電子を受け取り やすいために、アクセプターとして用いられることが多い。しかし、大きなパイ電子系を有して いるので、適切な電子供与基を導入することで、ドナーとして働く可能性がある。そこで、ペリ レンジイミド骨格に電子供与性のピロリジン環を導入し、C₆₀ と連結すること (PIm-C₆₀) で、新規 な光電荷分離系の構築を試みた。ベンゾニトリル中での時間分解過渡吸収スペクトル測定より、 PIm-C₆₀ は、PIm の励起 1 重項状態から、PIm ラジカルカチオン、C₆₀ ラジカルアニオンを生成す

ることがわかった。その光電荷分離速度は、逆 電子移動速度よりも小さく、通常のフラーレン を用いた系と逆である。この挙動は、本ペリレ ンジイミドが大きな再配列エネルギーを有して いることを示している。以上、ペリレンジイミ ドをドナー、C60をアクセプターとした新規な光 電荷分離系の開発に成功し、光電変換系へ適用 可能であることを明らかにした。



Creation of Nanostructured Artificial Photosynthesis

Hiroshi Imahori

Born in 1961. He received his Ph.D. degree from Kyoto University (1990). He was a postdoctoral fellow in the Salk Institute for Biological Studies, USA (1990-1992), a research associate in the Institute of Scientific and Industrial Research (1992-1999), an associate professor in Graduate School of Engineering, Osaka University (1999-2002). Now he has been a professor in the Department of Molecular Engineering, Graduate School of Engineering, Kyoto University (2002-). He got the Young Investigator Award from the Society of Porphyrins and Phthalocyanines (2002), the Japanese Photochemistry Association Prize (2004), JSPS Prize (2006), and the CSJ Award for Creative Work (2006). He has been devoted in the development of artificial photosynthetic systems based on porphyrins, fullerenes, nanotubes, and nanoparticles.

(1) Substituent effects of porphyrins on photoelectrochemical properties of dye-sensitized bulk heterojunction solar cell: We examined substituent effect of *meso*-tetraphenylporphyrins (TPP) on

the nanostructure and photoelectrochemical properties of SnO₂ electrodes modified electrophoretically with the composite clusters of TPP and C_{60} . The maximum IPCE value (59% at 425 nm) of ITO/ $SnO_2/(3,5-TPP+C_{60})_m$ device is much larger than those of $ITO/SnO_2/(3,4,5-TPP+C_{60})_m$ (10%), $ITO/(3,5-TPP+C_{60})_m$ $SnO_2/(2,6-TPP+C_{60})_m$ (5.7%), and other related porphyrin and C_{60} single component composite devices (1-17%). It should be emphasized here that the simple substituent of methoxy groups onto the *meta*-positions of the *meso*-phenyl groups at the porphyrin ring is responsible for the efficient photocurrent generation, which is much superior to the systems from the more complex, timeconsuming pre-organized porphyrin molecular assemblies and C₆₀. Various spectroscopic and surface analyses revealed that the molecular arrangement of 3,5-TPP and C₆₀ composite clusters on the SnO₂ electrode involves the similar specific molecular packing of single crystal 3,5-TPP • $2C_{60}$ • toluene in which the porphyrin and C_{60} make an alternative layer structure where the closest porphyrin moieties are arranged in a one-dimensional chain, while the closest C60 moieties in a two-dimensional sheet with sandwiching 3,5-TPP between two C_{60} molecules. The segregated nanoarrays of porphyrin and fullerene on the SnO₂ electrode allow the system to undergo ultrafast electron transfer within the supramolecular complex of the porphyrin and C_{60} molecules, followed by hole and electron relay through the nanostructured one-dimensional porphyrin chains and two-dimensional C_{60} sheets, leading to the efficient photocurrent generation. In bulk heterojunction solar cells many researchers have suggested the importance of nanostructured electron and hole transporting pathways which have never been confirmed experimentally. Our finding is the first demonstration for the hypothesis. Such results provide valuable information on the design of molecular photovoltaics in nanoscale.

(2) Synthesis and photophysical properties of electron-donating pyrenediimide- C_{60} dyad: An electron-rich perylenediimide- C_{60} dyad has been prepared to explore a new type of donor-acceptor system. Time-resolved absorption measurements in benzonitrile revealed unambiguous evidence for the formation of a charge-separated state consisting of perylene diimide radical cation and C_{60} radical anion via photoinduced electron transfer, showing a new class of artificial photosynthetic models in term of charge separation.

Publications

- 1. Synthesis of Dendritic Branches with Peripheral Fullerene Subunits, U. Hahn, K. Hosomizu, H. Imahori, J-F. Nierengarten, *Eur. J. Org. Chem.*, 85-91 (2006).
- Efficient Photocurrent Generation by SnO₂ Electrode Modified Electrophoretically with Composite Clusters of Porphyrin-Modified Silica Microparticle and Fullerene, H. Imahori, K. Mitamura, T. Umeyama, K. Hosomizu, Y. Matano, K. Yoshida, S. Isoda, *Chem. Commun.*, 406-408 (2006).
- Structure and Photoelectrochemical Properties of Nanostructured SnO₂ Electrodes Deposited Electrophoretically with the Composite Clusters of Porphyrin-Modified Gold Nanoparticle with a Long Spacer and Fullerene, H. Imahori, A. Fujimoto, S. Kang, H. Hotta, K. Yoshida, T. Umeyama, Y. Matano, S. Isoda, *Tetrahedron*, 62, 1955-1966 (2006).
- Structure and Photoelectrochemical Properties of Phthalocyanine and Perylene Diimide Composite Clusters Deposited Electrophoretically on Nanostructured SnO₂ Electrodes, A. Kira, T. Umeyama, Y. Matano, K. Yoshida, S. Isoda, M. Isosomppi, N. V. Tkachenko, H. Lemmetyinen, H. Imahori, *Langmuir*, 22, 5497-5503 (2006).
- A Photoelectrochemical Device with a Nanostructured SnO₂ Electrode Modified with Composite Clusters of Porphyrin-Modified Silica Nanoparticle and Fullerene, H. Imahori, K. Mitamura, Y. Shibano, T. Umeyama, Y. Matano, K. Yoshida, S. Isoda, Y. Araki, O. Ito, *J. Phys. Chem. B*, 110, 11399-11405 (2006).
- 6. Ordered Supramolecular Assembly of Porphyrin-Fullerene Composites on Nanostructured SnO₂ Electrodes, S. Kang, T. Umeyama, M. Ueda, Y. Matano, H. Hotta, K. Yoshida, S, Isoda, M. Shiro, H.

Imahori, Adv. Mater., 18, 2549-2552 (2006).

- 7. A Convenient Method for the Synthesis of 2,5-Difunctionalized Phospholes Bearing Ester Groups, Y. Matano, T. Miyajima, T. Nakabuchi, Y. Matsutani, H. Imahori, *J. Org. Chem.*, **71**, 5792-5795 (2006).
- Phosphole-Containing Hybrid Calixpyrroles: A New Multifunctional Macrocyclic Ligand for Platinum(II) Ions, Y. Matano, T. Nakabuchi, T. Miyajima, H. Imahori, *Organometallics*, 25, 3105-3107 (2006).
- 9. Electrospray Mass Spectrometry Analysis of Dendritic Branches Bearing Peripheral Fullerene Subunits, H. Herschbach, K. Hosomizu, U. Hahn, E. Leize, A. V. Dorsselaer, H. Imahori, J.-F. Nierengarten, *Anal. Bioanal. Chem.*, **386**, 46-51 (2006).
- Phosphorus-Containing Hybrid Calixphyrins: Promising Mixed-Donor Ligands for Visible and Efficient Palladium Catalyst, Y. Matano, T. Miyajima, T. Nakabuchi, H. Imahori, N. Ochi, S. Sakaki, J. Am. Chem. Soc., 128, 11760-11761 (2006).
- Synthesis and Photophysical Properties of Electron-Rich Perylenediimide-Fullerene Dyad, Y. Shibano, T. Umeyama, Y. Matano, N. V. Tkachenko, H. Lemmetyinen, H. Imahori, *Org. Lett.*, 8, 4425-4428 (2006).
- 12. External Electric Field Effects on Absorption and Fluorescence Spectra of a Fullerene Derivative and Its Mixture with Zinc-tetraphenylporphyrin Doped in a PMMA Film, M. Wahadoszamen, T. Nakabayashi, S. Kang, H. Imahori, N. Ohta, *J. Phys. Chem. B*, **110**, 20354-20361 (2006).
- Comparison of Electrode Structure and Photovoltaic Properties of Porphyrin-Sensitized Solar Cells with TiO₂ and Nb, Ge, Zr-added TiO₂ Composite Electrodes, H. Imahori, S. Hayashi, T. Umeyama, S. Eu, A. Oguro, S. Kang, Y. Matano, T. Shishido, S. Ngamsinlapasathian, S. Yoshikawa, *Langmuir*, 22, 11405-11411 (2006).
- Synthesis, Structures, and Properties of *meso*-Phosphorylporphyrins: Self-Organization through P-Oxo-Zinc Coordination, Y. Matano, K. Matsumoto, Y. Terasaka, H. Hotta, Y. Araki, O. Ito, M. Shiro, T. Sasamori, N. Tokitoh, H. Imahori, *Chem. Eur. J.*, 13, 891-901 (2007).
- 15. Synthesis of a Phosphorus-Containing Hybrid Porphyrin, Y. Matano, T. Nakabuchi, T. Miyajima, H. Imahori, H. Nakano, *Org. Lett.*, **8**, 5713-5716 (2006).
- 16. Creation of Fullerene-Based Artificial Photosynthetic Systems, H. Imahori, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* (Award Accounts), in press.
- 17. Electrophoretic Deposition of Donor-Acceptor Nanostructures on Electrodes for Molecular Photovoltaics, H. Imahori, *J. Mater. Chem.* (Future Article), **17**, 31-41 (2007).
- Coherent Nuclear Dynamics in Ultrafast Electron Transfer in a Porphyrin-Ferrocene Dyad, M. Kubo, Y. Mori, M. Otani, M. Murakami, Y. Ishibashi, M. Yasuda, K. Hosomizu, H. Miyasaka, H. Imahori, S. Nakashima, *Chem. Phys. Lett.*, **429**, 91-96 (2006)
- 19. Effects of 5-Membered Heteroaromatic Spacers on Structures of Porphyrin Films and Photovoltaic Properties of Porphyrin-Sensitized TiO₂ Cells, S. Eu, S. Hayashi, T. Umeyama, A. Oguro, M. Kawasaki, N. Kadota, Y. matano, H. Imahori, *J. phys. Chem. C*, in press.
- 20. Dendritic Effects on Structure and Photophysical and Photoelectrochemical Properties of Fullerene Dendrimers and Their Nanoclusters, K. Hosomizu, H. Imahori, U. Hahn, J.-F. Nierengarten, A. Listorti, N. Armaroli, T. Nemoto, and S. Isoda, *J. Phys. Chem. C*, in press.

生体関連物質化学 エナンチオ選択的炭素 – 炭素結合切断による不斉4級炭素の構築

工学研究科 合成・生物化学専攻 村上 正浩



村上 正浩(むらかみ まさひろ)

1956年生まれ。1979年東京大学理学部卒。1984同大大学院博士課程修了。理学博士(東京大学)。1984年東京大学理学部助手、1987年京都大学工学部助手、1993年同助教授を経て、2002年1月より同大学大学院工学研究科合成・生物化学専攻教授、現在に至る。日本化学会進歩賞(平成元年度)。日本化学会学術賞(平成16年度)。

不斉4級炭素は天然物や医薬品に多く 見られる重要な構造モチーフであり、今 なお効率的な不斉4級炭素の構築法が求 められている。不斉4級炭素の構築とし ては非対称 gem-二置換 sp²炭素への付加 (Scheme 1, A)、4級 sp³炭素への置換(B) などが挙げられるが、これらの場合、立 体的に混み合った炭素に立体を制御して 新たな炭素-炭素結合を導入する必要が

Scheme 1.



ある。一方、このような立体的な制約を回避する構築法として、既にあるアキラル4級炭素の非 対称化による不斉4級炭素の構築(C)が挙げられる。

筆者らは以前にロジウム触媒によるアリールボロン酸とシクロブタノンの分子間付加/開環反応を行うと、ロジウムシクロブタノラートからのβ炭素脱離を経由してアリールケトンが生成することを見出した。対称なシクロブタン骨格のエナンチオ選択的な炭素-炭素結合切断を行えば、 不斉4級炭素を構築できるのではないかと考え、光学活性ロジウム触媒によるボリル置換シクロブタノンの分子内不斉付加/開環反応による不斉4級炭素構築反応について検討した。

2-ボリルフェニル基を有するシクロブタノン 1a を 1,4-ビス (ジフェニルホスフィノ) ブタンを配 位子として持つロジウム (I) 錯体触媒存在下、1,4-ジオキサン-水 (20:1) 中 100 ℃で加熱したと ころ、分子内付加/開環反応が進行し、3-エチル-3-メチル-1-インダノン 2a を 87% 収率で与えた (Scheme 2)。この反応の機構は、(i) トランスメタル化によるアリールロジウム種 3 の生成、(ii)

シクロブタノンのカルボニル結合への分 子内付加による対称なビシクロ [2.1.1] 骨 格4の形成、(iii) β炭素脱離によるシクロ ブタノラート部位の開環によるアルキル ロジウム種5の生成、(iv) プロトノリシス によるメチル基の生成を含んでいる。元々 あったベンジル位の4級炭素はβ炭素脱 離プロセスによって非対称化している。

そこで、次に本反応の不斉化を行った。 様々な光学活性ホスフィン配位子を検討 した結果、ビアリール二座ホスフィン配 位子が良好な結果を与えることがわかっ

Scheme 2.



た (Table 1)。基質として **1a** を用い、(*S*)-SEGPHOS を配位子として反応を行うと、**2a** を 96% 収率、 95%ee で与えた。SEGPHOS (67.2°) よりも広い bite angle を持つ MeO-BIPHEP (72.3°)、BINAP (86.2°) を配位子として用いると、ee はそれぞれ 75%、69% と低下したことから、本反応におい て高い光学収率を得るためには bite angle の狭い配位子の利用が適していることがわかった。ま た、ベンジル位の置換基 R として Ph、*i*-Pr 基を持つ基質も同様に反応し、それぞれ対応する生 成物を 79%ee、94%ee で与えた。R=H の基質 **1d** を用いて反応を行ったところ、ベンジル位に 3 級不斉炭素を有する 1-インダノン **2d** が 94% 収率、83%ee で得られた。

本不育 β 炭素脱離による不育 4 級炭素構築反応の合成化学的な利用として、セスキテルペンの一



Scheme 3.



種である $\alpha - \alpha \nu \kappa \nu \tau J - \nu 11$ の全合成を行った (Scheme 3)。シクロブタノン 6 を出発物質として、不斉付加/開環により 1-インダノン 7 を 94%ee で合成し、mCPBA による Baeyer–Villiger酸化によりラクトン 8 を得た。塩基によるエステル結合の分解、続くメチル化によって 9 へと変換

Enantioselective C–C Bond Cleavage Creating Chiral Quaternary Carbon Centers Masahiro Murakami

Born in 1956. He received his Ph.D. from The University of Tokyo under the direction of Professor T. Mukaiyama in 1984. He held the position of Assistant Professor at the University of Tokyo (1984-1987) and Kyoto University (1987-1993). From 1991 to 1992, he worked as a postdoctoral fellow with Professor A. Eschenmoser at ETH Zürich, Switzerland. He was promoted to Associate Professor in 1993 and full Professor in 2002 at Kyoto University. He received The Chemical Society of Japan Award for Young Chemists for 1989 and The Chemical Society Award for Creative Work for 2004.

Chiral all-carbon quaternary centers are often contained in natural products and pharmaceuticals, yet the synthesis of such centers with control of asymmetry remains a significant challenge for synthetic chemists. A few methods can be envisaged for the asymmetric construction of chiral quaternary centers (Scheme 1). A direct method to achieve this transformation is by the stereoselective introduction of a carbon–carbon bond onto an unsymmetrically *gem*-disubstituted sp² carbon of an olefin (**A**), or onto a quaternary sp³ carbon with resident chirality (**B**). In these carbon–carbon bond forming methods, the stereochemical information is installed at a highly sterically congested carbon. The desymmetrization of a pre-installed symmetrically substituted quaternary carbon center would also provide convenient access to chiral quaternary centers. This alternative pathway, (**C**), dispenses with the need to form a carbon–carbon bond with control of asymmetry in the midst of significant steric congestion.

We previously reported the rhodium-catalyzed intermolecular reaction of arylboronic acids with cyclobutanones, which produces arylated ketones through a 1,2-addition to the carbonyl group and subsequent ring-opening of the resulting rhodium cyclobutanolates by β -carbon elimination. We envisioned that selective cleavage of one of the two prochiral carbon–carbon single bonds of a symmetrical cyclobutane skeleton would open an avenue for the asymmetric synthesis of chiral quaternary carbon centers via pathway **C** in Scheme 1. Herein, we describe the rhodium-catalyzed asymmetric synthesis of 1-indanones having benzylic quaternary carbon centers and the application of this method to a synthesis of a naturally occurring sesquiterpene, (–)- α -herbertenol.

In order to achieve the desymmetrization reaction, we prepared cyclobutanone **1a** having a 2-borylphenyl group at the 3-position. An *o*-bromostyrene derivative was prepared by methylenation of 2-bromophenyl ethyl ketone with the Petasis reagent. Subsequent [2+2] cycloaddition with dichloroketene followed by dechlorination with zinc afforded cyclobutanone. After protecting the carbonyl group as a cyclic ketal, the *ortho*-bromo group was transformed into a boronic acid functionality. Deprotection of the ketal group, followed by treatment with pinacol furnished **1a**, equipped with a symmetrically substituted quaternary center and two prochiral carbon–carbon single bonds which were potentially amenable to enantioselective cleavage.

When boryl-substituted cyclobutanone **1a** was heated in 1,4-dioxane–H₂O (20:1) in the presence of a rhodium(I) catalyst (10 mol % Rh, Rh:DPPB = 1:1) at 100 °C for 6 h, an intramolecular addition/ ring-opening reaction occurred to afford 3-ethyl-3-methyl-1-indanone (**2a**) in 87% yield (Scheme 3). Mechanistically, the reaction proceeds via (i) transmetalation of the boryl group of **1a** with rhodium(I), (ii) intramolecular addition of the arylrhodium species **3** to the carbonyl group, forming a symmetrical bicyclo[2.1.1]hexane skeleton **4**, (iii) ring-opening of the cyclobutanolate moiety by β -carbon elimination, and (iv) protonolysis of the resulting alkylrhodium **5** to furnish a methyl group. Thus, the original symmetrically substituted quaternary carbon center at the benzylic position of **1a** was desymmetrized in **2a**. Our attention was then focused on an asymmetric version of the ring-opening reaction. Various chiral phosphine ligands were examined, and good enantioselectivities were observed with chiral biaryl diphosphine ligands. Representative results are listed in Table 1. The (*S*)-SEGPHOS ligand induced the best enantioselectivity of 95% ee for the reaction of **1a** (entry 1). The use of diphosphine ligands possessing a wider bite angle than SEGPHOS resulted in a decrease in enantioselectivity (entries 2 and 3). The same trend was observed among the three chiral ligands in the reaction of **1b**, and product **2b** was obtained in 79% ee with SEGPHOS (entries 4–6). Cyclobutanone **1c**, having a bulky isopropyl group at the 3-position, also yielded **2c** in 94% ee although the reaction required higher catalyst loading and longer reaction time (entry 7). Even cyclobutanone **1d** with the 3-position monosubstituted afforded 3-methyl-1-indanone **2d** in 83% ee (entry 8).

The synthetic potential of the intramolecular addition/ring-opening reaction was demonstrated by application in the asymmetric synthesis of a sesquiterpene, (–)- α -herbertenol (11), which exhibits a range of biological properties including antifungal activity. In a manner similar to that for the synthesis of 1a, the symmetrical cyclobutanone 6, armed with an arylboronic acid moiety (Scheme 3), was prepared from 2-bromo-5-methylbenzaldehyde. The rhodium-catalyzed asymmetric addition/ ring-opening reaction of 6 using SEGPHOS afforded indanone 7 in 93.7% ee (84% chemical yield). Subsequent Baeyer–Villiger oxidation with *m*CPBA caused migration of the aryl group to afford lactone 8, whose ester linkage was then cleaved with NaOH. Both hydroxy and carboxy groups were methylated with Me₂SO₄. Finally, the benzyloxy group of 9 was transformed to a bromo group affording 10. The bromoester 10 was transformed to α -herbertenol 11 according to the procedure reported by Mukherjee in order to determine the absolute configuration of the quaternary center. Measurement of the optical rotation of 11 established that the absolute stereochemistry was that of the natural enantiomer.

In summary, we have developed a method for the enantioselective cleavage of a carbon–carbon single bond by β -carbon elimination to create a chiral benzylic quaternary carbon center. The utility of the desymmetrization process was demonstrated by application to a synthesis of (–)- α -herbertenol.

Publications

- 1. Nickel-Catalysed Intramolecular Alkene Insertion into Cyclobutanones, M. Murakami, S. Ashida, *Chem. Commun.* **2006**, 4599–4601.
- 2. Enantioselective C–C Bond Cleavage Creating Chiral Quaternary Carbon Centers, T. Matsuda, M. Shigeno, M. Makino, and M. Murakami, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 3379–3381.
- 3. Synthesis of 3-Acyl-4-alkenylpyrrolidines by Platinum-Catalyzed Hydrative Cyclization of Allenynes, T. Matsuda, S. Kadowaki, M. Murakami, *Helv. Chim. Acta* **2006**, *89*, 1672–1680.
- 4. Two-Carbon Ring Expansion of Cyclobutanone Skeletons by Nickel-Catalyzed Intermolecular Alkyne Insertion, M. Murakami, S. Ashida, T. Matsuda, *Tetrahedron* **2006**, *62*, 7540–7546.
- 5. Construction of Carbon Frameworks through β-Carbon Elimination Mediated by Transition Metals, M. Murakami, M. Makino, S. Ashida, T. Matsuda, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2006**, *79*, 1315–1321.
- 6. Reactions of Cyanoboranes with a Palladium–PMe₃ Complex: Mechanism for the Catalytic Cyanoboration of Alkynes, M. Suginome, A. Yamamoto, T. Sasaki, and M. Murakami, *Organometallics* **2006**, 25, 2911–2913.
- 7. Torque Control by Metal–Orbital Interactions, M. Murakami, Y. Miyamoto, M. Hasegawa, I. Usui, T. Matsuda, *Pure Appl. Chem.* **2006**, *78*, 415–423.
- 8. Vinylcyclopropanation of Olefins via 3-Methoxy-1-propenylrhodium(I), T. Miura, T. Sasaki, T. Harumashi, M. Murakami, J. Am. Chem. Soc. 2006, 128, 2516–2517.
- Eight-Membered Ring Construction by [4+2+2] Annulation Involving β-Carbon Elimination, M. Murakami, S. Ashida, T. Matsuda, J. Am. Chem. Soc. 2006, 128, 2166-2167.
- 10. A Direct Entry to Bicyclic Cyclobutenes via Platinum-Catalyzed Cycloisomerization of Allenynes, T. Matsuda, S. Kadowaki, T. Goya, M. Murakami, *Synlett* **2006**, 575–578.
- 11. Activation of a Cyclobutanone Carbon–Carbon Bond over an Aldehyde Carbon–Hydrogen Bond in the Rhodium-Catalyzed Decarbonylation, T. Matsuda, M. Shigeno, M. Murakami, *Chem. Lett.* **2006**, *35*, 288–289.
- 12. Solvent and Ligand Partition Reaction Pathways in Nickel-Mediated Carboxylation of Methylenecyclopropanes, M. Murakami, N. Ishida, T. Miura, *Chem. Commun.* **2006**, 643–645.

生体関連物質化学 たんぱく質によるたんぱく質修飾の構造生物化学

工学研究科 分子工学専攻 白川 昌宏



白川 昌宏(しらかわ まさひろ)

昭和 35 年生。昭和 63 年大阪大学理学研究科博士後期課程修了、日本学術振興会特 別研究員を経て、平成 1-7 年大阪大学蛋白質研究所助手、平成 7-13 年奈良先端科学 技術大学院大学バイオサイエンス研究科助教授、平成 13-16 年横浜市立大学大学院 総合理学研究科学研究科教授。平成 17 年 1 月から現職。核磁気共鳴法、X 線結晶法 を使った細胞応答に関与するたんぱく質の構造生物化学と磁気共鳴法を使った生体 計測手法の開発に従事。

(1) SUMO 化を受けたたんぱく質の構造生物化学

ユビキチンや SUMO (Small ubiquitin-like modifier)、NEDD8 といったたんぱく質は、その C 末端のカルボキシル基が他のたんぱく質のリジン残基側鎖 ε-アミノ基とイソペプチド結合を形成 することで機能する修飾 (modifier) たんぱく質である。SUMO 化は被修飾たんぱく質のたんぱく 質-たんぱく質、たんぱく質-核酸相互作用を変化させることで、細胞質-核間移行、転写、クロ マチン構造、核小体形成、DNA 修復、細胞膜イオンチャネル活性、生物時計といった様々な細 胞機能の調節を行っていると考えられている。

ユビキチンが確認された生物種においては一種類しか存在しないのに対して、哺乳動物には、 SUMO-1 から SUMO-4 の 4 つの SUMO アイソフォームが見つかっている。SUMO-4 以外の SUMO-1、SUMO-2、SUMO-3 は修飾たんぱく質として機能し、アミノ酸配列の相同性から一般 に SUMO-1 と SUMO-2/3 の 2 つのサブグループに分類されている。

SUMO 化を受けるたんぱく質の一つであるチミン DNA グリコシラーゼ (thymine DNA glycosylase:以下、TDG) は、T-G、U-G ミスマッチを持つ DNA からチミン、ウラシル塩基を切 り取り、脱塩基部位を生成するグリコシラーゼ活性を有する。TDG はこのグリコシラーゼ活性 によって、細胞内の T-G、U-G ミスマッチの塩基除去修復 (Base excision repair) 過程を開始する 可能性が考えられている。TDG はその酵素活性産物である脱塩基部位を持つ DNA に結合する活 性がある。これは細胞内で脱塩基部位を保護する役割を持つと推定されている。Schör らは TDG が細胞内で SUMO 化を受けること、SUMO 化を受けた TDG は脱塩基部位を持つ DNA との結 合活性を持たないことを示した。これから TDG は SUMO 化によって脱塩基部位を持つ DNA か ら解離するというモデルが提出されている。

我々は平成17年度までに、SUMO-1化された TDG 中央領域(残基112-339)の立体構造をX線結晶法により明らかにした(以下、SUMO1-TDG)。このTDG 中央領域は触媒コアドメインと SUMO 化部位である Lys330 を含む。

平成 18 年度には SUMO-3 化された TDG 中 央領域の結晶中での立体構造を報告した(以下、 SUMO3-TDG)。SUMO3-TDG の結晶中では SUMO-3 と TDG 間のイソペプチド結合とその 近傍の電子密度を観察することが出来なかった が、SUMO3-TDG と SUMO1-TDG は極めて似 通った全体構造を持つことが判った。SUMO3-



SUMO-3 化された TDG 中央領域の立体構造

TDG においても TDG の SUMO 化部位近傍の残基 317-329 の領域は、SUMO1-TDG と良く似た 位置にヘリックス (α 7 ヘリックス) を持つことが判った。

また我々は最近、非共役状態、即ち SUMO の C 末端がイソペプチド結合をしていない状態での、 SUMO-1 と TDG 中央領域の複合体の結晶構造解析を行った。非共役型の SUMO-1/TDG 中央領 域複合体は、共役型の SUMO1-TDG と良く似た構造をしていた。しかし SUMO1-TDG では残基 317-329 の領域がヘリックス (α 7 ヘリックス)をとっている電子密度が観察されたのに対して、 非共有型 SUMO-1/TDG 中央領域複合体の結晶ではその C 末端側である残基 327 以降の電子密度 は観察されなかった。

(2)細胞中のユビキチン誘導体の2次元 NMR スペクトルの測定

In cell NMR とは、選択的に安定同位体標識され たたんぱく質の細胞内における NMR スペクトルを 測定する技術である。我々はアフリカツメカエル (*Xenopus laevis*)の卵母細胞を使った in cell NMR を 行った。具体的には以下の手順で実験を行った。メ スのアフリカツメカエルから摘出した卵母細胞に対 して、¹⁵N で均一に安定同位体標識を行ったユビキチ ン、およびユビキチン誘導体の溶液を細胞一個当た り 20 ナノリットル程度ずつ、約 250 個の細胞に注入 した。これらの細胞を NMR 測定管にいれて、2 次 元¹H-¹⁵N 核 異種核一量子相関 (heteronuclear single quantum coherence : HSQC) スペクトルを測定した。

野生型のユビキチンを注入した卵母細胞の¹H-¹⁵N HSQC スペクトルではたんぱく質側鎖に由来する と思われる¹H-¹⁵N 相関シグナルは観測されたが、 主鎖の相関シグナルは微弱であった。一方、ユビキ チンが他のたんぱく質との相互作用に共通して使 われる β シート表面を構成する残基の置換を含む、 (L8A,K48C)-D77、I44A、(K48C,V70A)-D77 といっ



ユビキチン (L8A、I44A、V70A)-D77 変異体を 注入した卵母細胞の¹H-¹⁵N HSQC スペクトル

た変異体では、より強い主鎖の相関シグナルが観測された (ここで -D77 は C 末端の 77 残基目に Asp を持つことを示す)。またβシート上の3つの残基の置換を含む (L8A、I44A、V70A)-D77 変異体では、いっそう強い相関シグナルを検出した。これらから細胞内で野生型ユビキチンでは 内在性たんぱく質との相互作用が in-cell NMR における主鎖シグナルの減弱を起こした可能性が 想定される。

(L8A、I44A、V70A)-D77 変異体は、成熟型ユビキチンと比較してC未端にAsp が付加している。そのためこの変異体はユビキチン前駆体同様に、細胞内の脱ユビキチン化 (deubiquitination: DUB) 酵素群の基質となる可能性が考えられる。興味深いことに、¹⁵N 標識した (L8A、I44A、V70A)-D77 変異体を注入した卵母細胞の¹H-¹⁵N HSQC スペクトルでは、C 末端の Asp77 主鎖アミド基に対応すると思われる¹H-¹⁵N 相関シグナルは観察されず、成熟型ユビキチンのC 末端である Gly76 主鎖アミド基と似通った化学シフトをもつ¹H-¹⁵N 相関シグナルが観察された。これは (L8A、I44A、V70A)-D77 変異体の Gly76-Asp77 間のペプチド結合が内在性の DUB 酵素 群に切断された可能性を示唆する。これを確認するために DUB 酵素群に対する阻害活性を示す ubiquitin aldehyde を前注入した卵母細胞を使って実験を行うと、成熟型ユビキチンのC 末端である Gly76 主鎖アミド基に対応する¹H-¹⁵N 相関シグナルと共にC 末端の Asp77 主鎖アミド基に 対応する¹H-¹⁵N 相関シグナルが観察された。これは ubiquitin aldehyde 処理により、細胞内在性 の DUB 酵素群の活性が部分的に抑制されたことを示唆する。従って、(L8A、I44A、V70A)-D77 変異体の in cell NMR スペクトルにおける Asp77 主鎖アミド基に対応する ¹H-¹⁵N 相関シグナル の消失は、少なくとも部分的には細胞内在性の DUB 酵素群の切断によると考えられる。なお Selenko らによっても、同様なアフリカツメガエルの卵母細胞を使った in-cell NMR が報告され ている。

Structural biochemistry of modifier proteins

Masahiro Shirakawa

Born in 1960. He received his Ph.D. degree from Osaka University. He was a research associate in Institute of Protein Research, Osaka University (1989-1995), an assistant professor in Graduate School of Bioscience, Nara Institute of Science and Technology (1995-2001), a professor in Graduate School of Integrated Science, Yokohama City University (2001-2004). Now he has been a professor in Graduate School of Engineering, Kyoto University (2005-). He has been devoted in structural biology and biochemistry.

SUMO (small ubiquitin-like modifier) family proteins are ubiquitin-like modifier proteins, and can be covalently attached to a lysine residue of target proteins, through an enzymatic pathway similar to that used in ubiquitin conjugation. SUMO-conjugation (SUMOylation) is involved in a impressive range of cellular events, which include transcription, chromatin formation, nuclear transport, DNA repair, and chromosome segregation. Four SUMO isoforms have been identified in mammals, of which SUMO-1 to SUMO-3 are thought to function as protein modifiers.

We have determined the crystal structure of the central region, residues 112-339, of human thymine DNA glycosylase (TDG) conjugated to SUMO-3. The structure is similar to that of the central region of TDG conjugated to SUMO-1.

In-cell NMR is the observation of NMR signals of proteins inside cells. We have measured in-cell NMR spectra of ubiquitin derivatives in oocytes from the African clawed frog *Xenopus* laevis.

Publications

- 1. Goda, N., Tenno, T., Inomata, K., Iwaya, N., Sasaki, Y., Shirakawa, M., Hiroaki, H. LBT/PTD dual tagged vector for purification, cellular protein delivery and visualization in living cells. Biochemica et Biophysica Acta Molecular Cell Research (in press).
- 2. Hara, H., Tenno, T. and Shirakawa, M. Distance determination in human ubiquitin by pulse double electron resonance and double quantum coherence ESR methods. (2007) *Journal of Magnetic Resonance*, 184, 78-84.
- 3. Ki, S., Sugihara, F., Kasahara, K., Tochio, H., Shirakawa, M. and Kokubo, T. Magnetic resonancebased visualization of gene expression in mammalian cells using a bacterial polyphosphate kinase reporter gene. *BioTechniques* (in press).
- 4. Iwaya, N., Goda, N., Unzai, S., Fujiwara, K., Tanaka, T., Tomii, K., Tochio, H., Shirakawa, M. and Hiroaki, H. Fine-tuning of protein domain boundary by minimizing potential coiled coil regions. *Journal of biomolecular NMR* (in press).
- 5. Sakai, T., Tochio, H., Tenno, T., Ito, Y., Kokubo, T., Hiroaki, H. and Shirakawa. In-Cell NMR Spectroscopy of Proteins inside Xenopus laevis Oocytes. (2006) *Journal of biomolecular NMR* 36, 179-188.
- Baba, D., Maita; N., Jee, J.-G., Uchimura, Y., Saitoh, H., Sugasawa, K., Hanaoka, F., Tochio, H., Hiroaki, H, Shirakawa, M. (2006) Crystal structure of SUMO-3-modified thymine-DNA glycosylase. *Journal of Molecular Biology*, 359, 137-147.
- Ki, S., Sugihara, F., Kasahara, K., Tochio, H., Okada-Marubayashi, A., Tomita, S., Morita, M., Ikeguchi, M., Shirakawa, M. and Kokubo, T. (2006) A novel magnetic resonance-based method to measure gene expression in living cells. *Nucleic Acid Research*, 34, e51.
- 8. Ichiyama, S., Oka, Y., Haga, K., Kojima, S., Tateishi, Y., Shirakawa, M., and Haga, T. (2006). The structure of the third intracellular loop of the muscarinic acetylcholine receptor M2 subtype. *FEBS Letter* 580, 23-26.

生体関連物質化学生体機能物質の創製と機能

化学研究所 二木 史朗



二木 史朗(ふたき しろう)

昭和 34 年生。昭和 58 年京都大学薬学部卒業、昭和 60 年京都大学大学院薬学研究科修士課程修了、 昭和 62 年同博士後期課程中退。薬学博士(京都大学)。同年徳島大学薬学部助手(平成元年~3 年 米国ロックフェラー大学博士研究員)、平成 5 年同助教授、平成 9 年京都大学化学研究所助教授を 経て、平成 17 年より同教授、現在に至る。平成 14 年~18 年科学技術振興機構戦略的創造研究推 進事業さきがけ個人研究員、また平成 18 年~同さきがけ発展研究・研究員を併任。主として、機 能性ペプチドの人工設計および細胞機能制御への展開に取り組んでいる。平成 9 年日本ペプチド 学会奨励賞および有機合成化学協会・第一製薬研究企画賞受賞、平成 10 年日本薬学会奨励賞を受賞。

(1) 細胞送達ペプチドベクターの機能解明と設計

近年 HIV-1 Tat をはじめとするアルギニンに富むペプチドをキャリアとして用いた細胞内タン パク質・薬物送達法が注目を浴びている。これらの方法は、細胞を志向する化学やナノ技術など 様々な分野に応用可能であり、関連領域の科学技術の発展に大きなインパクトを与えうる研究で ある。著者は、Tat ペプチドに限らず、アルギニンに富む多くの分子が細胞内タンパク質導入キャ リアとなりうることを見いだし、様々なデザインのキャリア分子が設計可能であることを示して いる。本研究では、ペプチド化学・ペプチド工学的見地から、様々なアルギニンペプチド類縁体 の合成を通してこの効率的輸送を可能とする生理的機序を明らかとするとともに、これにより得 られる情報をもとに、高い膜透過能と細胞選択能を併せ持った新しい概念による高機能性キャリ アペプチドを開発することを目指している。

当初、HIV-1 Tat ペプチドを含めたアルギニンペプチドの膜透過は、通常の細胞の物質取り込み経路であるエンドサイトーシスを介さない未知の機序によるものとされていた。しかし、その

後の研究の進展により、かなりの割合で エンドサイトーシスが寄与することが明 らかになってきた。著者は、マクロピノ サイトーシスと呼ばれる特殊なエンドサ イトーシスが、アルギニンペプチドの細 胞内取り込みに重要な役割を果たしてい ることを見出し、この際、アクチンと呼 ばれる細胞骨格形成タンパク質の形態が 大きく変化することを世界に先駆けて明 らかとした(図1)。これはすなわち、ア ルギニンペプチドとの相互作用により細 胞内に何らかの刺激・情報が伝わり、細 胞膜に影響を及ぼすことで、効率的な細 胞内取り込みが行われる可能性を示唆す る結果である。さらに、著者は、細胞 とアルギニンペプチドとの相互作用に より、アクチンの形態変化を誘導する Rac1 と呼ばれるタンパク質が実際に活 性化されていることを指摘した。また、 ヘパラン硫酸をはじめとする細胞表層の



Fig. 1 Possible involvement of actin rearrangement and macropinocytosis in the internalization processes during the delivery using argininerich peptide vectors.

硫酸化された糖タンパク質とアルギニンペプチドの相互作用がアクチンの形態変化とマクロピノ サイトーシスの誘導には重要であり、これらの糖タンパク質とペプチドが接することで、細胞内 情報伝達系が活性化されることを指摘した。これらの結果は、細胞表層にアルギニンペプチドの 取り込みに関与する受容体の存在の可能性をも示唆するものである。同時に、この取り込み過程 はアルギニンペプチドの鎖長や配列に依存することや、濃度により複数の取り込み経路が活性化 されることを明らかにした。また、血清非存在下において、カルボン酸、リン酸、硫酸などアル ギニンのグアニジノ基と二本の水素結合で結合しうる官能基と pyrene などの疎水性原子団を併 せ持つ両親媒性分子の存在下、アルギニンペプチドの細胞への取り込みが高まり得ることも見出 し、さらにこの方法を用いてタンパク質も細胞に効率的に導入出来ることを見いだした。

(2) 人工受容体型イオンチャネルタンパク質の創出

人工イオンチャネルは、機能性ナノデバイスの開発やイオンチャネルの分子メカニズム解明と いう観点から分子設計における魅力的なターゲットである。人工イオンチャネルの創出における これまでの試みでは、膜内のイオン透過孔(ポア)の設計やチャネル開口部の修飾に重点が置か れてきた。本研究では、膜外ドメインに注目し、リガンドの添加によって構造変化する配列を用 いることにより、膜外構造変化に応じて膜電流も変化する新規人工受容体型イオンチャネルの創 出を目指した。

構造スイッチ可能な膜外ドメインとして、転写調節因子 Fos 由来のロイシンジッパーペプチ ドにビスカルボキシメチルリジン (Ida)を i, i+2 の位置関係で導入した改変体 [Ida]Fos を用いた。 [Ida]Fos は、Fe(Ⅲ)を加えることによりαヘリックス構造が不安定化される。また、膜内ドメイ

ンとして代表的なイオンチャネル形成ペ プチド、アラメチシン由来の配列を用い、 これらの領域をグリシン4残基からなる リンカーで結んだハイブリッドペプチド [Ida]Fos を合成した。

リポソーム存在下での CD スペクト ルの測定の結果、Fe(III)の添加により、 Alm-[Ida]Fos のヘリックス含量は減少 し、Fe(III)との相互作用により膜外構造 が変化しうることが示唆された。チャネ ル電流の測定は、張り合わせ法を用いる 脂質平面膜法により検討した。Fe(III)の 添加によりチャネル電流が増加し、過剰 のEDTAを加えることによりチャネル電 流は再び元の状態に戻ることが確認され、 リガンドとの相互作用による膜外ドメイ ンの構造変化を電流変化として膜内に伝 える人工受容体型イオンチャネルの構築 に成功した。



Fig. 2 Design of ion-channel forming peptide, Alm-[Ida]Fos (A) and structure of Ida (B). Schematic representation of artificial metalgated ion-channel formed by Alm-[Ida]Fos (C).

Investigation and Creation of Biofunctional Materials

Shiroh Futaki

Born in 1959. He received his Ph.D. degree from Kyoto University. He was a postdoctoral fellow in Rockefeller University (USA) (1989-1991), a research associate (1987) and an associate professor (1993) in the Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Tokushima, and an associate professor (1997) in the Institute for Chemical Research, Kyoto University. Now he has been a professor in the Institute for Chemical Research, Kyoto University (2005-). He got the Japanese Peptide Society Award for Young Scientists (1997) and the PSJ (Pharmaceutical Society of Japan) Award for Young Scientists (1998). He has been active in creation of novel bioactive and functional peptides.

(1) Functional elucidation and design of novel peptide vectors for intracellular delivery: Arginine-rich peptides, including octaarginine (R8), HIV-1 Tat, and branched-chain argininerich peptides, belong to one of the major classes of cell-permeable peptides which deliver various proteins and macromolecules to cells. The importance of the endocytic pathways has recently been demonstrated in the cellular uptake of these peptides. We have previously shown that macropinocytosis is one of the major pathways for cellular uptake and that organization of the F-actin accompanies this process. In this study, using proteoglycan-deficient CHO cells, we have demonstrated that the membrane-associated proteoglycans are indispensable for the induction of the actin organization and the macropinocytic uptake of the arginine-rich peptides. We have also demonstrated that the cellular uptake of the Tat peptide is highly dependent on heparan sulfate proteoglycan (HSPG), whereas the R8 peptide uptake is less dependent on HSPG. This suggests that the structure of the peptides may determine the specificity for HSPG, and that HSPG is not the sole receptor for macropinocytosis. Comparison of the HSPG specificity of the branched-chain arginine-rich peptides in cellular uptake has suggested that the charge density of the peptides may determine the specificity. The activation of the Rac protein and the actin organization was observed within a few minutes after the peptide treatment. These data strongly suggest the possibility that the interaction of the arginine-rich peptides with the membrane-associated proteoglycans quickly activates the intracellular signals and induces actin organization and macropinocytotis. We also found a dramatic change in the methods of internalization for these peptides brought about by the presence of pyrenebutyrate, a counteranion bearing an aromatic hydrophobic moiety. In the absence of pyrenebutyrate, endocytosis plays a major role in cellular uptake. However, the addition of pyrenebutyrate results in direct membrane translocation of the peptides yielding diffuse cytosolic peptide distribution within a few minutes. Using this method, rapid and efficient cytosolic delivery of the enhanced green fluorescent protein (EGFP) was achieved in cells including rat hippocampal primary cultured neurons. Enhancement of bioactivity on the administration of an apoptosis-inducing peptide is also demonstrated. Thus, coupling arginine-rich peptides with this hydrophobic anion dramatically improved their ability to translocate cellular membranes, suggesting the great impact of this approach on exploring and controlling cell function.

(2) Creation of artificial ligand-gated ion channel receptor proteins: Ion channels and receptors are among the most biologically important classes of membrane proteins that transmit outside stimuli into cells. The creation of artificial proteins with these functions is a challenge in peptide/protein engineering in view of the creation of novel functional nano-devices as well as understanding the biological machinery. In this study, we have developed a novel Fe(III)-gated ion channel system that is comprised of assemblies of a channel forming peptide alamethicin bearing an extramembrane segment. The extramembrane segment contains a pair of diiminoacetic acid derivatives of lysine (Ida) residues. Interaction with Fe(III) induces the structural alternation of the extramembrane segment via

the chelate formation with Ida residues, which eventually leads to an increased channel current (ion influx). This exemplifies the feasibility of utilizing the conformational switch of the extramembrane segment for the current control in artificial channel systems, a concept that can be applicable for the design of various artificial receptor ion channel systems.

Publications

- 1. Oligoarginine Vectors for Intracellular Delivery: Design and Cellular-uptake Mechanisms, S. Futaki, *Biopolymers (Peptide Science)*, **84**, 241-249 (2006).
- 2. Anion Hopping of (and on) Functional Oligoarginines: From Chloroform to Cells, N. Sakai, S. Futaki, S. Matile, *Soft Matter*, **2**, 636 641 (2006).
- Distribution of Immunoglobulin Fab Fragment Conjugated with HIV-1 REV Peptide Following Intravenous Administration in Rats, S. Kameyama, R. Okada, T. Kikuchi, T. Omura, I. Nakase, T. Takeuchi, Y. Sugiura, S. Futaki, *Mol. Pharm.*, 3, 174-180 (2006).
- Evaluation of the Nuclear Delivery and Intra-nuclear Transcription of Plasmid DNA Condensed with μ (mu) and NLS- μ by Cytoplasmic and Nuclear Microinjection: A Comparative Study with Poly-L-lysine, H. Akita, M. Tanimoto, T. Masuda, K. Kogure, S. Hama, K. Ninomiya, S. Futaki, H. Harashima, J. Gene Med., 8, 198-206 (2006).
- 5. High Density of Octaarginine Stimulates Macropinocytosis Leading to Efficient Intracellular Trafficking for Gene Expression, I. A. Khalil, K. Kogure, S. Futaki, H. Harashima, *J. Biol. Chem.*, **281**, 3544-3551 (2006).
- Intracellular Traffic and Fate of Protein Transduction Domains HIV-1 TAT Peptide and Octaarginine. Implications for their Utilization as Drug Delivery Vectors, S. A. Taei, N. A. Penning, J. C. Simpson, S. Futaki, T. Takeuchi, I. Nakase, A. T. Jones, *Bioconjug. Chem.*, 17, 90-100 (2006).
- 7. Significant and Prolonged Antisense Effect of a Multifunctional Envelope-type Nano Device Encapsulating Antisense Oligodeoxynucleotide, Y. Nakamura, K. Kogure, Y. Yamada, S. Futaki, H. Harashima, *J. Pharm. Pharmacol.*, **58**, 431-437 (2006).
- Delivery of Condensed DNA by Liposomal Non-viral Gene Delivery System into Nucleus of Dendritic Cells, T. Nakamura, R. Moriguchi, K. Kogure, A. Minoura, T. Masuda, H. Akita, K. Kato, H. Hamada, M. Ueno, S. Futaki, H. Harashima, *Biol. Pharm. Bull.* 29, 1290-1293 (2006).
- 9. Transmission of Extramembrane Conformational Change into Current; Construction of Metal-gated Ion Channel, T. Kiwada, K. Sonomura, Y. Sugiura, K. Asami, S. Futaki, *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 6010-6011 (2006).
- Cellular Uptake and Subsequent Intracellular Trafficking of R8-liposomes Introduced at Low Temperature, A. Iwasa, H. Akita, I. Khalil, K. Kogure, S. Futaki, H. Harashima, *Biochim. Biophys. Acta – Biomembranes*, 1758, 713-720 (2006).
- 11. Design, Synthesis, and Membrane-Translocation Studies of Inositol-Based Transporters, K. K. Maiti, O.-Y. Jeon, W. S. Lee, D.-C. Kim, K.-T. Kim, T. Takeuchi, S. Futaki, S.-K. Chung, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **45**, 2907-2912 (2006).
- Effects of Cell-Permeating Peptide Binding on the Distribution of ¹²⁵I-Labeled Fab Fragment in Rats, S. Kameyama, M. Horie, T. Kikuchi, T. Omura, T. Takeuchi, I. Nakase, Y. Sugiura, S. Futaki, *Bioconjug. Chem.*, **17**, 597-602 (2006).
- Direct and Rapid Cytosolic Delivery Using Cell-Penetrating Peptides Mediated by Pyrenebutyrate, T. Takeuchi, M. Kosuge, A. Tadokoro, Y. Sugiura, M. Nishi, M. Kawata, N. Sakai, S. Matile, S. Futaki, *ACS Chem. Biol.*, 1, 299–303 (2006).
- 14. Oligomers of b-Amino Acid Bearing Non-planar Amides Form Ordered Structures, Y. Otani, S. Futaki, T. Kiwada, Y. Sugiura, A. Muranaka, N. Kobayashi, M. Uchiyama, K. Yamaguchi, T. Ohwada, *Tetrahedron*, **62**, 11635-11644 (2006).
- 15. Effects of Na⁺/H⁺ Exchanger Inhibitors on Subcellular Localisation of Endocytic Organelles and Intracellular Dynamics of Protein Transduction Domains HIV-TAT Peptide and Octaarginine, M. Fretz, J. Jin, R. Conibere, N. A. Penning, S. Al-Taei, G. Storm, S. Futaki, T. Takeuchi, I. Nakase, A. T. Jones, J. Control. Release, in press.
- 16. Interaction of Arginine-Rich Peptides with Membrane-Associated Proteoglycans Is Crucial for Induction of Actin Organization and Macropinocytosis, I. Nakase, A. Tadokoro, N. Kawabata, T. Takeuchi, H. Katoh, K. Hiramoto, M. Negishi, M. Nomizu, Y. Sugiura, S. Futaki, *Biochemistry*, in press.

生体関連物質化学極限環境微生物の工学的応用

工学研究科 合成・生物化学専攻 今中 忠行



今中 忠行(いまなか ただゆき)

昭和20年生。学歴:昭和42年3月大阪大学工学部発酵工学科卒業、昭和44年3月大阪大学大学院 工学研究科修士課程修了、昭和44年12月大阪大学大学院工学研究科博士課程中退。学位:工学博士(昭 和48年2月大阪大学)職歴:昭和45年1月大阪大学工学部助手、昭和48年2月MIT博士研究員(出 張)~49年10月。昭和56年11月大阪大学工学部助教授。平成元年3月大阪大学工学部教授。平成 7年4月大阪大学大学院工学研究科応用生物工学専攻教授(組織替え)。平成8年7月京都大学大学 院工学研究科合成・生物化学専攻教授。平成17年10月より日本学術会議会員(第20期)。専門:生 物工学(遺伝子工学、タンパク質工学、応用微生物学、極限環境微生物学、環境バイオテクノロジー)。

(1) 高温で反応可能な無細胞タンパク合成系の開発

無細胞タンパク合成とは、生細胞由来の抽 出液に mRNA などの鋳型を加えて試験管内 でタンパクを合成する手法である。現在、実 用化されている無細胞タンパク合成系では、 反応は通常、室温付近 (20-40°C) で行われて いる。*Thermococcus kodakaraensis* は、生育温 度が 60-100°Cの超好熱始原菌である。我々 は *T. kodakaraensis* を生物ソースとして用い た、高温でも反応可能な無細胞タンパク合成 系の開発を行った。レポータータンパクとし ては、熱安定性が高い本菌由来のキチナー ゼ変異体 (ChiA Δ 4) を使用した。本菌より調



Fig. 1 Reaction time course of ChiA Δ 4 synthesis.

製した無細胞抽出液に ChiA Δ 4 をコードする mRNA を添加して反応を行った結果、40 ~ 80 °C の温度範囲において活性型の ChiA Δ 4 タンパクが合成されていることを確認した (最適温度は 65 °C)。また耐熱性 T7 RNA ポリメラーゼを添加することで、プラスミド DNA からの転写翻訳カッ プリング反応にも成功した。次に、本系におけるタンパク合成量の増加を目的として、タンパク 合成に関わる各プロセスの改良を試みた。その結果、1) 無細胞抽出液の調製法の改良、2) 反応 溶液中の各添加物濃度の最適化、3) 使用する菌株の分子育種により、合成タンパク量の最大値は 1.3 μ g/mL から 115 μ g/mL へと大きく増加した (約 90 倍の上昇、Fig. 1)。本システムは、常温 菌では生産が難しい好熱菌タンパク質の生産系として、またタンパク質の耐熱化実験におけるス クリーニング系としての応用が期待できる。

(2) 超好熱菌からの新規耐熱性有用酵素の同定

前述の T. kodakaraensis KOD1 株は全ゲノム解析が終了しており、2,306 個の ORF を有している。 全 ORF のうち、機能推定が可能であるものは、約半分の 1,165 個にすぎず、残りの機能未知遺 伝子の機能同定は、本菌の生命戦略の解明や有用遺伝子資源の探索の意味において、非常に重要 である。TK1436 は Glycoside hydrolase, family 57 (GH-57 family) に分類されるタンパク (675aa、 78.5kDa) をコードしていたが、その詳細な機能は不明であった。我々は TK1436 タンパクの機能 解明を目的として、大腸菌を用いて組換えタンパクの調製を行った。組換え TK1436 タンパクが GH-57 family で既知の酵素活性を示すかについて調べたが、Melibiose、Pullulan、Maltoheptaose



Fig. 2 HPAEC analysis. 1) the amylose AS-30 substrate, 2) products after treatment of amylose AS-30 with TK1436 protein, 3) isoamylase-digested products of 2. Peaks eluting at 40-45 min are the substrate (41.4 min, shown as S) and the branched products (43.3 min, shown as P). The numbers on peaks indicate chain lengths. (B) Schematic description of the branching and debranching of α -glucan by BE and isoamylase. The symbols circle, black bar, and red bar stand for glucose, the α -1,4-glucosidic linkage, and the α -1,6-glucosidic linkage, respectively.

を基質として用いた際には反応前後の産物に変化は見られなかった。一方 Amylose を基質とし た場合には、微量ながらも反応後溶液中のマルトオリゴ糖含量が上昇した。Branching enzyme (BE) は、Amylose を基質として、その α -1,4 結合を切断し、 α -1,6 結合に付け替えることで、 Glycogen や Amylopectin の分枝構造を作る酵素である。BE は反応副産物として少量のマルトオ リゴ糖を生成することが知られている。従来、BEとしては、GH-57 familyとは一次構造が異な る GH-13 family に属するタンパクのみが知られていたが、我々は TK1436 が新規 BE である可能 性について検討を行った。TK1436 タンパクと Amylose との反応産物を、さらに α-1,6 結合の切 断を行う Isoamylase で処理を行い、high-performance anion exchange chromatography (HPAEC) で 解析を行った結果、多量のマルトオリゴ糖の生成が確認された (Fig. 2)。Isoamylase 処理後の反 応産物を β -Amylase (Amylose の α -1,4 結合を末端から2 糖単位で加水分解を行う酵素) により処 理を行ったところ、Glucose 及び Maltose にまで完全分解されたことから、TK1436 が精製する 反応産物は α -1,4、 α -1,6 結合のみからなる Glycogen 様物質であることが判明した。次に平均分 子量 3.0×10⁴の Amylose を基質として、反応産物の分子量を Multi-Angle Laser-Light-Scattering photometer (MALLS) により分析した。その結果、反応産物の平均分子量は 3.0 × 10⁶ ~ 3.4 × 10⁶であり、基質の 100 倍以上の高分子であることが判明した。以上の結果より、TK1436 タン パクは構造的に新規な BE であることが明らかとなった。

分泌タンパク質や膜タンパク質が細胞外あるいは細胞膜上で機能発現する際、それぞれのN 末端付近に存在する signal peptide の切断 (signal peptidase)、断片化 (signal peptide peptidase)が 行われる。Signal peptide peptidase は原核細胞では古くからその存在が確認されているにもかか わらず、その機能特性や活性中心残基などは不明のままであった。*T. kodakaraensis* には signal peptide peptidase として機能する可能性のある遺伝子が2種存在する (*sppA1, sppA2*)。SppA1 は 既存の signal peptide peptidase とより高い相同性を示す。SppA1 と SppA2 の組換え型タンパク 質を発現・精製した結果、基質 Ala-Ala-Phe-MCA に対して SppA1 が圧倒的に高い活性を示し たため、SppA1 について詳細な解析を進めた。SppA1 は意外なことにアルカリ性 pH 領域で高 い peptidase 活性を示し、至適は pH10-10.5 であった。高度の耐熱性、耐アルカリ性も認められ、 様々な用途への応用が期待される。基質特異性を検討した結果、SppA1 は P1 部位では比較的側 鎖の小さなアミノ酸、P2 部位の基質特異性は広く、P3 部位では疎水性のアミノ酸をもつペプチ ド鎖を好んで切断することが判明した。酸性アミノ酸を含むペプチドの切断は観察されなかっ た。このような配列的特徴は *T. kodakaraensis* の様々な分泌タンパク質の signal peptide 中に見ら れたので、SppA1 が *T. kodakaraensis* の signal peptide peptidase として機能していることが強く示 唆された。さらに約 16 種の変異体を site-directed mutagenesis により作製し、個々の活性測定を 行ったところ、SppA1 は通常の Ser/His/Asp の catalytic triad ではなく Ser¹⁶² および Lys²¹⁴ からな る catalytic dyad を利用して活性発現していることが判明した。

Industrial application of extremophiles

Tadayuki Imanaka

Born in 1945. He received his Ph.D. degree from Osaka University. He was an assistant professor (1970-1981), an associate professor (1981-1989) and a professor (1989-1996) at the Department of Fermentation Technology, Faculty of Engineering, Osaka University. He was also a postdoctoral fellow at MIT, USA (1973-1974). Now he has been a professor at the Department of Synthetic Chemistry and Biological Chemistry, Graduate School of Engineering, Kyoto University (1996-).

(1) Development of a system for cell-free protein synthesis operated under high temperatures: Cell-free protein synthesis (CFPS) is becoming a center of attention in recent years because CFPS systems can synthesize proteins with high speed and accuracy, regardless of whether they are toxic to cell growth. Conventional CFPS systems available today are usually based on either Escherichia *coli*, wheat embryo or rabbit reticulocyte, and CFPS reactions are performed at moderate temperatures $(26-37^{\circ}C)$. We have developed a novel CFPS system that can be operated at high temperatures using cell-free extracts of a hyperthermophilic archaeon, Thermococcus kodakaraensis. Cell lysate of T. kodakaraensis was prepared by referring to the method of E. coli system with some modifications. ChiA \triangle 4, a truncated form of *T. kodakaraensis* chitinase, was used as a reporter protein. Using *T.* kodakaraensis lysate and mRNA encoding ChiA Δ 4, CFPS reaction was performed on various temperatures between 30°C to 80°C. As a result, synthesis of ChiA Δ 4 was observed from 40 to 75°C, with maximum production at 65 $^{\circ}$ C. The reaction solution after CFPS also contained corresponding chitinase activity as detected by fluorometric substrate. Activity measurements confirmed that the protein was synthesized in an active form, and activity levels indicated the quantity of protein produced was approximately 1.0 μ g/ml. To increase productivity of the system, the following approaches were taken. First, process of lysate preparation was examined. Second, concentrations of each reaction mixture constituent were varied, and their optimum concentrations were determined. Third, a mutant strain of T. kodakaraensis was constructed in which phr encoding a heat shock transcriptional regulator was disrupted. Through these modifications to the system, yield of $ChiA\Delta 4$ was dramatically increased to 115.4 μ g/mL in a batch reaction at 65°C (Fig. 1). Moreover, in the optimized system, a high speed of protein synthesis was achieved: over 100 μ g/mL of ChiA Δ 4 was produced in the first 15 min of reaction. These results indicate that the system for cell-free protein synthesis based on T. kodakaraensis lysate has a high production potential nearly comparable to the E. coli system.

(2) Identification of novel thermostable enzymes from a hyperthermophile: We have identified a novel branching enzyme encoded by an uncharacterized ORF (TK1436) in the hyperthermophilic archaeon, *Thermococcus kodakaraensis* KOD1. TK1436 displayed similarity to members of the glycoside hydrolase family 57 (GH-57 family). Incubation of amylose with recombinant TK1436 protein led to reaction products with molecular weights 100 times larger than that of the substrate. Treatment of the product with isoamylase significantly increased the level of short-chain α -glucans, indicating that the reaction product contained α -glucans with many α -1,6-branching points (Fig. 2). These results clearly indicate that TK1436 encodes a structurally novel, thermostable branching enzyme of the GH-57 family. We have also characterized a signal peptide peptidase from *T. kodakaraensis* (SppA1). The enzyme was highly thermostable and moreover, displayed a remarkable stability and preference for alkaline pH, with optimal activity detected at pH 10. A detailed evaluation *via* site-directed mutagenesis revealed that SppA1 utilized a Ser/Lys catalytic dyad for activity. Intriguingly, a large number of mutations led to an increase in activity levels of the enzyme. In particular, mutations in Ser¹²⁸ and Tyr¹⁶⁵ not only increased activity levels but also broadened the substrate specificity of SppA1, suggesting that the enzyme is a promising target for future engineering and application.

Selected Publications

- "A highly productive system for cell-free protein synthesis using a lysate of the hyperthermophilic archaeon, *Thermococcus kodakaraensis*", T. Endoh, T. Kanai, and T. Imanaka, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, in press (DOI 10. 1007/s00253-006-0753-3)
- "Phosphoenolpyruvate synthase plays an essential role for glycolysis in the modified Embden-Meyerhof pathway in *Thermococcus kodakarensis*", H. Imanaka, A. Yamatsu, T. Fukui, H. Atomi, and T. Imanaka, *Mol. Microbiol.*, 61(4):898-909 (2006)
- "The concept of the α-amylase family: a rational tool for interconverting glucanohydrolases/ glucanotransferases, and their specificities", T. Kuriki, H. Takata, M. Yanase, K. Ohdan, K. Fujii, Y. Terada, T. Takaha, H. Hondoh, Y. Matsuura, and T. Imanaka, *J. Appl. Glycosci.*, 53, 155-161 (2006)
- "A novel branching enzyme of the GH-57 family in the hyperthermophilic archaeon, *Thermococcus kodakaraensis* KOD1", T. Murakami, T. Kanai, H. Takata, T. Kuriki, and T. Imanaka, *J. Bacteriol.*, 188(16):5915-5924 (2006)
- 5. "The ribulose monophosphate pathway substitutes for the missing pentose phosphate pathway in the archaeon *Thermococcus kodakaraensis*", I. Orita, T. Sato, H. Yurimoto, N. Kato, H. Atomi, T. Imanaka, and Y. Sakai, *J. Bacteriol.*, 188(13): 4698-4706 (2006)
- 6. "Cell-free protein synthesis at high temperatures using the lysate of a hyperthermophile", T. Endoh, T. Kanai, Y. T. Sato, D. V. Liu, K. Yoshikawa, H. Atomi, and T. Imanaka, *J. Biotechnol.*, 126(2): 186-195 (2006)
- 7. "Identification of the amino acid residues essential for proteolytic activity in an archaeal signal peptide peptidase", R. Matsumi, H. Atomi, and T. Imanaka, *J. Biol. Chem.*, 281(15): 10533-10539 (2006)
- "Phototrophic growth of a Rubisco-deficient mesophilic purple nonsulfur bacterium harboring a Type III Rubisco from a hyperthermophilic archaeon", S. Yoshida, M. Inui, H. Yukawa, T. Kanao, K. Tomizawa, H. Atomi, and T. Imanaka, *J. Biotechnol.*, 124(3): 532-544 (2006)
- "Isolation and characterization of a novel poly(vinyl alcohol)-degrading bacterium, *Sphingopyxis* sp. PVA3.", A. Yamatsu, R. Matsumi, H. Atomi, and T. Imanaka, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 72(4):804-811 (2006)
- "Cyclization reaction catalyzed by *Bacillus cereus* branching enzyme, and the structure of cyclic glucan produced by the enzyme from amylose" H. Takata, T. Kato, M. Takagi and T. Imanaka, *J. Appl. Glycosci.*, 52(4): 359-365 (2005)
- "Enzymatic and structural characterization of type II isopentenyl diphosphate isomerase from hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakaraensis*", M. A. Siddiqui, A. Yamanaka, K. Hirooka, T. Bamaba, A. Kobayashi, T. Imanaka, E. Fukusaki, and S. Fujiwara, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 331(4):1127-1136 (2005)

生体関連物質化学サイズ制御遺伝子送達の新展開

工学研究科 合成・生物化学専攻 青山 安宏



青山 安宏(あおやま やすひろ)

昭和 20 年生。昭和 49 年京都大学工学研究科博士課程終了。同年九州大学助手(工学 部)、昭和 56 年長岡技術科学大学助教授(工学部)、昭和 63 年同教授、平成 7 年九州 大学教授(有機化学基礎研究センター)、平成 13 年より現職。日本化学会学術賞、フ ルカ賞、新潟日報学術賞を受賞。有機化合物の構造と物性に関する第 2 回ゴードンコ ンファレンス(平成 11 年)、超分子化学に関する第 11 回国際シンポジウム議長(平成 12 年)。ラジカル反応機構、生物有機・無機化学、分子認識・構造有機化学、結晶工学・ 固体触媒・糖鎖工学などを経て現在の専門分野は生体認識化学・化学生物学。

(1) グリコウイルスを用いる遺伝子運搬:エン ドサイトーシスのサイズの効果を詳細に検討 するために CdSe 量子ドットを糖クラスターで 覆った 15 nm の量子ドット糖コンジュゲート (glycoQD)を作成した。これの細胞取り込み能 を糖クラスターのミセル様会合体(5 nm)、グ リコウイルス(50 nm)、会合したグリコウイル ス(≥100 nm)の共存下に競争法で検討したとこ ろ、50 nm のウイルスサイズがエンドサイトー シスには最適であることが分かった。

8個のガラクトース残基をもつグリコウイル スを以前合成していた。このものは会合するこ とから活性が低い。今回、8残基のうち3個を ガラクトース置換した Lac(3) 化合物(図1)を用 いたグリコウイルスを作成した。このものは単 量体(~40 nm)として存在し(図2)、高い活性 と肝細胞指向性を示した。糖置換は会合を促進 し遺伝子発現の効率は低下させるが、肝細胞指 向性は増大し、また細胞毒性も低下する。これ ら種々の因子が3個の糖置換によって最適化さ れることが分かった。

(2) セラソームを用いる遺伝子運搬: カチオン 脂質の集合体 (カチオンリポソーム) を用いる遺 伝子送達システムにおける重大な問題点は、リ ポソーム自体が適切な数十ナノメーターの適切 なサイズを維持したとしても、核酸との相互作 用によりリポソームは融合や架橋を起こし、サ イズが大きくなることである。サイズの巨大化 はエンドサイトーシスの効率を下げ、in vivo の



 $Lac(n): (8 - n)X = NH3^{+}CI^{-}$



Fig. 1 Structure of Lac(3) (n = 3).



Fig. 2 TEM images of Lac(3)-derived glycoviruses.

系ではの抹消血管の透過性を妨げる。一方、サイズが適切であると、いわゆる EPR (enhanced permeability and retention) 効果により癌組織に遺伝子や薬物を選択的に送達できる利点もある。



Fig. 3 Structures of cerasome-forming lipid 1 and its non-silylated reference lipid 2.

末端を trialkoxysilyl 化したカチオン脂質(1、図3)を用いるとリポソームの表面がゾルーゲル 反応により部分的にセラミック(シリカ)架橋されたセラソーム(ceramic-coated liposome)が生成 する。このものは直径数十ナノメーターのウイルスサイズを有するが、核酸(プラスミド DNA) との相互作用により融合することなく(図4)ウイルスサイズを維持し、非常に高い遺伝子導入 (transfection)効率を示すことが明らかとなった。さらに重要なことは、このようなコンパクトサ イズのトランスフェクション系は細胞毒性を殆ど示さないことである。シリル化していない脂質 (2、図3)は核酸との相互作用においてリポソームが融合し、200-300 nmの巨大な複合体を与え、 遺伝子導入効率2桁から3桁低く、また毒性も甚大である。



Fig. 4 Freeze-fracture TEMimages for the cerasome-plasmid DNA complexes. (scale bar = 100 nm)

サイズの制御は非ウイルス的遺伝子運搬の最重要未解決課題の一つである。今回の知見はこれ に対して非常に一般性の高い戦略を提供するものである。用いるのは単純なシリル化脂質であり、 これはリポソームを形成するとともに in situ でゾル-ゲル反応を起こし、融合が起こらないウイ ルスサイズの送達系を自発的に作り出す。

Progress in size-regulated gene delivery

Yasuhiro Aoyama

Born in 1945. He received his Ph.D degree from Kyoto University. He was a research associate in Kyushu University (1974-1981), an associate professor in Nagaoka University of Technology (1981-1988), and professor there (1988-1995). He then moved to Kyushu University as professor in the Institute for Fundamental Research of Organic Chemistry (1995-2001) and moved again to Kyoto University, where he is now professor (2001-) in the Department of Synthetic Chemistry and Biological Chemistry, Graduate School of Engineering. He received the Divisional Award of the Chemical Society of Japan, the Fluka Prize, and the Daily Niigata Cultural Award. He served as Chairman in the 2nd Gordon Research Conference on the Structure and Property of Organic Compounds as well as in the 11th International Synposium on Supramolecular Chemistry. He used to work on reaction mechanisms, bioorganic/bioinorganic chemistry, molecular recognition and structural organic chemistry, crystal engineering, solid catalysis, and glycoengineering and his current research activity is directed to biorecognics and chemical biology.

(1) Gene delivery using glycoviruses: We investigated the transfection properties of singly and triply lactose-functionalized derivatives, Lac(1) and Lac(3), and non-glycosidated one, Lac(0), of calix[4]resorcarene-based amphiphilic octaamine 1 in light of those previously reported for more extensively glycosidated compounds Lac(5) and Lac(8). They all strongly bind to the luciferaseencoding plasmid DNA pCMVluc (7040 base-pairs) with a saturation stoichiometry of Lac(n)/P \cong 0.5 (n = 0, 1, or 3) or 0.7 (n = 5 or 8), where P stands for a phosphate moiety of the plasmid DNA. The resulting carrier-DNA conjugates are positively charged and monomeric (monomolecular with respect to DNA) as such when n = 0 or 1, neutral and monomeric when n = 3, or neutral and aggregated when n = 5 or 8. Transfection of HeLa (uterine) and HepG2 (hepatic) cell lines shows a general trend of decreasing luciferase expression efficiencies (E) in lively cells as well as cytotoxicities with increasing n' s. The cell selectivities for HepG2 over HeLa sharply increase with increasing n's; $E^{\text{HepG2}}/E^{\text{HeLa}} = 0.3$, 0.6, 7, 14, and 120 for Lac(0), Lac(1), Lac(3), Lac(5), and Lac(8), respectively, as a result of specific receptor pathway involving the asialoglycoprotein receptors on the hepatic (HepG2) cell surfaces and clustering lactose moieties of the carrier-DNA conjugates. The toxicity-corrected, overall efficiency of gene delivery to hepatocytes is optimized at Lac(3), which forms compactly packed (~40 nm), charge-masked ($\xi \cong 0 \text{ mV}$), and less toxic virus-like particles capable of receptor-mediated hepatocyte targeting.

(2) Gene delivery using cerasomnes: Alanine-based cationic lipid 1 having a (EtO)₃SiCH₂CH₂CH₂ group on the quarternized ammonium nitrogen forms liposome which self-rigidifies via in-situ solgel processes (Si-OEt + H₂O \rightarrow Si-OH + Et-OH followed by 2Si-OH \rightarrow Si-O-Si + H₂O) on the surface. The resulting cerasome (partially ceramic- or silica-coated liposome) (60-70 nm) retains the integrity of such in the complexation with lucifarase-encoding plasmid DNA pGL3. The resultant pGL3 complex of infusible or monomeric cerasome in a viral size (~70 nm) exhibits a remarkable transfection performance toward HeLa and HepG2 cells with a 10²⁻³-fold higher efficiency (relative to the non-silylated reference lipid 2), minimized cytotoxicity, and serum-compatibility. Reference lipid 2, i.e., alanine-based lipid having a simple quarternized ammonium head group, forms liposome (60-70 nm) which is less self-confined and more mobile undergoes DNA-induced fusion to give endocytosisirrelevant and more toxic bigger (100-300 nm) particles. The silicon strategy thus provides a simple and widely applicable tool to overcome general problems associated with current technology of artificial gene delivery.

Selected Publications

Presentation & Lectures

- 1. Y. Aoyama, "Drug and Gene Delivery Using Macrocyclic Glycoconjugates", 9th Euripean Symposium on Controlled Release, 2006.4.5-7, Noordwijg aan Zee, TheNetherlands (Invited)
- \cdot Articles
- RNAi Silencing of Exogenous and Endogenous Reporter Genes Using a Macrocyclic Octaamine as a "Compact" siRNA Carrier. Studies on the Nonsilenced Residual Activity, K. Matsui, S. Horiuchi, S. Sando, T. Sera, Y. Aoyama, *Bioconj. Chem.*, 17, 132-138 (2006)
- Termination-Free Prokaryotic Protein Translation Using Abticodon-Adjusted E. Coli tRNA^{Ser} as Unified Suppressor of the UAA/UGA/UAG Stop Codons. Read-Through Ribosome-Display of Full-Length DHFR with Translated UTR as a Buried Spacer Arm, A. Ogawa, S. Sando, Y. Aoyama, *ChemBioChem*, 7, 249-252 (2006)
- 3. Cerasome as an Infusible, Cell-Friendly, and Serum-Compatible Translation Agent in a Viral Size, K. Matsui, S. Sando, T. Sera, Y. Aoyama, Y. Sasaki, T. Komatsu, T. Terashima, J. Kikuchi, Trends J. Am. Chem. Soc., **128**, 3114-3115 (2006)
- 4. Visible Sernsing of Nuclei Acid Sequences with a Genetically Encodable Unmodified RNA Probe, A. Narita, K. Ogawa, S. Sando, Y. Aoyama, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **45**, 2879-2883 (2006)
- 5. Inhibition of DNA Replication of Human Pappilomavirus by Artificial Zinc Finger Proteins, T. Mino, T. Hatono, N. Matsumoto, T. Mori, Y. Mineta, Y. Aoyama, T. Sera, *J. Virol.*, **80**, 5405-5412 (2006)
- 6. Systematic Lactose-Functionalization of Amphiphilic Octaamine Macrocycle as a Gene Carrier. Optimization of the Charge, Size, Toxicity, and Receptor Factors for Hepatocyte Targeting, S. Horiuchi, Y. Aoyama, *J. Cotrolled Release*, **113**, in press (2006)
- Cerasome as an Insoluble and Cell-Friendly Gene Carrier. Synthesis of Cerasome-Forming Lipids and Transfection Using Cerasome, Y. Sasaki, K. Matsui, Y. Aoyama, J. Kikuchi, *Nature Protocols*, 1, 1227-1234 (2006)
- 8. In vitro Selection of RNA Aptamers Against Escherichia coli Release factor 1, S. SAndo, A. Ogawa, T. Nishi, M. Hayami, Y. Aoyama, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* in press

生体関連物質化学 カルコゲン機能素子の物性と構築

化学研究所 江崎 信芳



江崎 信芳 (えさき のぶよし)

1949年大阪市生まれ。1973年京都大学農学部農芸化学科卒業、1979年同大学院農 学研究科博士課程修了。京都大学農学博士。同年京都大学化学研究所助手、1989年 同助教授を経て、1996年同教授、現在に至る。1998~2000年および2002~2004 年、日本生化学会理事。1999~2003年、日本農芸化学会理事。1999~2003年、 日本生物工学会理事。2000~2003年、日本学術会議第18期生物工学研究連絡委員。 2001~2004年、科学研究費特定領域研究を推進。2005年~京都大学化学研究所所長。

(1) セレノシステイン挿入配列結合因 子の同定と解析:セレノシステインは ストップコドンの一つである UGA に よってコードされ、位置特異的にポリ ペプチド鎖中に挿入されることから、 第21 番目のアミノ酸と呼ばれている。 セレノシステイン残基を含むタンパク 質(セレンタンパク質)は酸化ストレス の防御やシグナル伝達など生理的に重 要な機能を果たす。哺乳動物における セレノシステイン挿入過程は、多くの 因子が関与した複雑な系であり、その 全貌は未だ不明である。これまでに、





セレノシステイン挿入に必要な因子として、(i) mRNA 上の UGA コドン、(ii) mRNA の 3' 非翻 訳領域に存在するステムループ構造であるセレノシステイン挿入配列エレメント (selenocysteine insertion sequence (SECIS) element)、(iii) SECIS に結合する SECIS-binding protein 2 (SBP2)、(iv) SBP2 と相互作用するセレノシステイル -tRNA 特異的な伸長因子である eEFsec が特定されてい る (Fig. 1)。しかし、これらの因子だけではセレンタンパク質の in vitro 翻訳が困難であること や、SECIS エレメントの二次構造が多様であることなどから、さらに未同定の因子が関与する と考えられる。そこで、セレノシステイン挿入配列結合タンパク質に着目し、セレノシステイ ン残基挿入に関与する新たな因子の探索を試みた。代表的なセレンタンパク質である glutathione peroxidase 3 (Gpx3) と selenoprotein P (SelP)の SECIS 領域の cDNA をクローニングし、in vitro 転写により ³²P 標識された SECIS エレメントを合成した。また、セレノシステイン挿入に重要で ある部位に変異を導入した変異型 SECIS エレメントも作製した (Fig. 2)。マウスの各組織抽出液 とこれらの SECIS エレメントをインキュベーションし、UV cross-linking 法を用いて SECIS エレ メントに結合した³²P標識タンパク質を検出した。その結果、SECISエレメントに結合するタン パク質が複数見出された。組織の違いによって、あるいは SECIS エレメントの種類の違いによっ ても、SECIS に結合するタンパク質のパターンが異なることが示された。Gpx3 の SECIS エレメ ントを用いた場合、脳・脾臓・腎臓・肝臓において 80 kDa 付近に、脳・肝臓において 100 kDa 付近に、野生型 SECIS 特異的に結合するタンパク質が存在した。これらのタンパク質は Gpx3 の 発現に関与している可能性があると考えた。80 kDa 付近の SECIS 結合タンパク質を同定するた め、SP-TOYOPEARL、Q-Sepharoseの各種クロマトグラフィーによりマウスの腎臓抽出液から

の精製を行った。得られた部分精製タンパク質を2次元電気泳動により分離し、UV cross-linking 法により検出されたスポットに対応するタンパク質を MALDI-TOF/MS により解析した。その結 果、核内に多く存在する RNA 結合タンパク質である nucleolin が SECIS 結合タンパク質の一つ である可能性が示唆された。



Fig. 2 Schematic representation of SECIS elements of the GPx1(A), Gpx3 (B), GPx4 (C), and SelP (D). The sequences of SECIS cores, essential for Sec incorporation are depicted with boxes. Point mutations introduced into the SECIS cores are presented.

(2)硫黄の転移に関与するタンパク質複合体の解析:L-システインは、含硫コファクターである ビオチン、モリブドプテリン、チアミン、鉄硫黄クラスターなどの重要な硫黄源である。近年の研 究から、生体内においては、システインデスルフラーゼがL-システインからこれら補因子への硫 黄の転移の初発段階を担うことが明らかとなってきた。システインデスルフラーゼは、ピリドキサー ル 5'-リン酸依存的にL-システインからL-アラニンを生成する反応を触媒する酵素であるが、L-シ ステインから脱離された硫黄は、本酵素の活性中心システイン残基上に捉えられて、システインペ ルスルフィド中間体を形成する。このペルスルフィドの硫黄は、種々の含硫コファクター生合成経 路へと利用される。Escherichia coil には 3 つのシステインデスルフラーゼが存在し、IscS、SufS、 CsdA と呼ばれている。IscS と SufS が鉄硫黄クラスター形成に関与することは示されているが、 CsdA の生理的機能については未だ不明な点が多い。CsdA をコードする csdA 遺伝子は ygdK 遺伝 子とオペロン様構造をとり、これら 2 つの遺伝子のすぐ下流には、これらと逆向きに転写される ygdL 遺伝子が存在する。我々は、CsdA、YgdK、YgdL を E. coli 内で大量生産させ、各々精製し、

機能解析を行った。CsdAの活性をYgdK あるいはYgdLの共存下で測定したとこ ろ、CsdAの活性がYgdKによって活性 化されることが判明した。一方、YgdL はCsdAの活性に影響を与えなかった。 ゲル濾過解析およびBIACORE解析から、 CsdAとYgdKは比較的弱い力で相互作 用した複合体を形成することが示された。 CsdAとYgdKはタンパク質間相互作用 により会合し、硫黄転移酵素として機能 することが示唆された(Fig.3)。



Fig. 3 A proposed scheme for sulfur transfer from L-cysteine catalyzed by the CsdA-YgdK complex.

Properties and construction of chalcogenic functional materials

Nobuyoshi Esaki

Born in 1949. He received his Ph.D. degree from Kyoto University. He was a research associate (1979-1989), an associate professor (1989-1996) and a professor in the Institute for Chemical Research of Kyoto University (1996-). He was a director of The Japanese Biochemical Society (1998-2000, 2002-2004), a director of Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry (1999-2003) and a director of The Society for Biotechnology, Japan (1999-2003). He promoted researches supported by the Ministry of Education, Science, Sports and Culture, Grant-in-Aid for Scientific Research on Priority Area (2001-2004). He took a director of Institute for Chemical Research, Kyoto University (2005-).

(1) Identification and analysis of selenocysteine insertion sequence binding protein: Selenium is an essential trace element in the diet of many organisms. Unlike other essential dietary trace elements, selenium exerts its biological actions thorough its direct incorporation into selenoproteins, as a nonstandard amino acid, selenocysteine (Sec). While many of the first described selenoproteins were enzymes that used the redox potential of selenium in the enzyme's active sites, the more recently identified selenoproteins in mammals have been suggested to serve a wide variety of physiological functions, including structural, transport, signaling and enzymatic, or undefined roles. Expression of selenoproteins ranges from ubiquitous to tissue specific. Selenocysteine is known as 21st amino acid because it is encoded by a UGA codon, which is usually recognized as a termination signal. While the incorporation of Sec into the *Escharichia coli* formate dehydrogenase isozymes is fairly well characterized, the system which governs mammalian Sec insertion has only partially elucidated. In mammalian, the translational recoding of UGA as Sec is directed by a Selenocysteine Insertion Sequence (SECIS) element in the 3' untranslated region (UTR) of eukaryotic selenoprotein mRNAs. The SECIS is a hairpin structure that contains a non-Watson-Crick base-pair quartet with conserved G.A/A.G tandem in the core of upper helix. Another essential component of the Sec insertion machinery is SECIS-binding protein 2 (SBP2). SBP2 recruits a selenocysteine-specific elongation factor (eEFsec) and Sec-tRNA^{Sec} to the ribosome A site. Recently ribosomal protein L30 was also found as a component of the machinery. It binds SECIS element in vitro and in vivo, stimulates UGA recoding in transfected cells and competes with SBP2 for SECIS binding. With this finding, an updated version of the model of Sec incorporation has been offered, in which L30 was proposed to function as another factor connecting between the SECIS element and ribosome. Thus, until recently, the UGA recoding machinery was thought to be comprised of the two cis-acting factors (UGA and SECIS) and the three trans-acting factors (SBP2, eEFsec, and L30). As previously mentioned, Sec incorporation in vivo is likely to be an efficient event, but to date all studies of efficiency using transfection systems or in vitro translation of reporter mRNAs have produced values in the range of 1-10%. These studies suggest that other factors may be required for efficient Sec incorporation. To investigate the presence of novel SECIS-binding proteins, we employed UV cross-linking assay using crude extracts from mouse various tissues and ³²P-labeled SECIS elements as probes. The results suggested that the 80-kDa protein is involved in a specific recognition of the GPx3 SECIS element. Consequently we performed purification of the 80 kDa protein from the mouse kidney extract, and found that the 80-kDa protein are nucleolin and RAD 17.

(2) Analysis of a protein complex involved in sulfur transfer: Cysteine is an important source of sulfur for the biosyntheses of sulfur-containing cofactors such as biotin, molybdopterin, thiamine, as well as iron-sulfur cluster in proteins. Recent studies have demonstrated that cysteine desulfurase is involved in the initial stages of sulfur transfer in cells. Cysteine desulfurase is a pyridoxal 5'-phosphate

(PLP)-dependent homodimeric enzyme, which catalyzes the conversion of L-cysteine to L-alanine via the formation of a persulfide intermediate on a conserved cysteine residue. The persulfide sulfur is subsequently incorporated into the biosynthetic pathways of a variety of sulfur-containing cofactors. Escherichia coli has three cysteine desulfurases named IscS, SufS, and CsdA. Both IscS and SufS have been shown to participate in the assembly of iron-sulfur cluster. However, physiological function of CsdA remains unknown. CsdA is encoded by the csd gene cluster including the csdA, ygdK and ygdL genes. The *ygdL* gene is transcribed in opposite orientation of *csdA* and *ygdK*. YgdK is a homolog of SufE, which specifically interacts with SufS and enhances its cysteine desulfurase activity. YgdL shows sequence similarity to N-terminal domain of MoeB, an adenylation enzyme, which participates in biosynthesis of molybdopterin. CsdA, YgdK and YgdL were overproduced in E. coli and purified to homogeneity. Activity of CsdA was determined in the presence or absence of YgdK or YgdL. The interaction between CsdA and YgdK was studied by BIACORE and gel filtration analyses. We found that CsdA and YgdK form a weakly associated complex. The cysteine desulfurase activity of CsdA was enhanced by YgdK. But the addition of YgdL had no effect on the activity of CsdA. These results suggest that the CsdA-YgdK complex may function as a sulfur-donating complex. We also found that mRNAs of csdA and ygdK were constitutively transcribed in the wild-type E. coli K-12 (MG1655) strain cultivated in LB medium.

Publications

- 1. Protein interaction between selenophosphate synthetase and IscS, K. Abe, I. Ebata, T. Kazuoka, H. Mihara, T. Kurihara, N. Esaki, Biomed. Res. Trace Elem., 16, 325-327 (2005).
- Crystal structures of Δ¹-piperideine-2-carboxylate/ Δ¹-pyrroline-2-carboxylate reductase belonging to a new family of NAD(P)H-dependent oxidoreductases, M. Goto, H. Muramatsu, H. Mihara, T. Kurihara, N. Esaki, R. Omi, I. Miyahara, K. Hirotsu, J. Biol. Chem., 280, 40875-40884 (2005).
- 3. RNAi-mediated knock down of mammalian selenocysteine lyase, S. Kurokawa, H. Mihara, M. Takehashi, S. Tanaka, T. Kurihara, N. Esaki, Biomed. Res. Trace Elem., 16, 321-324 (2005).
- Enzymatic synthesis of L-pipecolic acid by Δ¹-piperideine-2-carboxylate reductase from *Pseudomonas putida*, H. Muramatsu, H. Mihara, M. Yasuda, M. Ueda, T. Kurihara, N. Esaki, Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 70, 2296-2298 (2006).
- Mechanism of the reaction catalyzed by DL-2-haloacid dehalogenase as determined from kinetic isotope effects, E. Papajak, R. A. Kwiecien, J. Rudzinski, D. Sicinska, R. Kaminski, L. Szatkowski, T. Kurihara, N. Esaki, P. Paneth, Biochemistry, 45, 6012-6017 (2006).
- 6. High-level expression and bulk crystallization of recombinant L-methionine γ -lyase, an anticancer agent, T. Takakura, T. Ito, S. Yagi, Y. Notsu, T. Itakura, T. Nakamura, K. Inagaki, N. Esaki, R. M. Hoffman, A. Takimoto, Appl. Microbiol. Biotechnol., 70, 183-192 (2006).
- Enzymatic synthesis of cyclic amino acids by N-methyl-L-amino acid dehydrogenase from Pseudomonas putida, M. Yasuda, M. Ueda, H. Muramatsu, H. Mihara, N. Esaki, Tetrahedron: Asymmetry, 17, 1775-1779 (2006).
- 8. Physiological role of D-amino acid-N-acetyltransferase of *Saccharomyces* cerevisiae: detoxification of D-amino acids, G.-Y. Yow, T. Uo, T. Yoshimura, N. Esaki, Arch. Microbiol., 185, 39-46 (2006).

生体関連物質化学生体分子間相互作用の構造生物学

理学研究科 化学専攻 三木 邦夫



三木 邦夫 (みき くにお)

1952年生。1978年大阪大学大学院工学研究科博士後期課程中退、1981年工学博士(大阪大学)、 1978年大阪大学工学部助手(1982~1983年マックスプランク生化学研究所博士研究員)、1991 年東京工業大学資源化学研究所助教授,1994年京都大学理学部教授,1995年より現職。1999 年より理化学研究所播磨研究所主任研究員(兼務)。日本化学会進歩賞,日本結晶学会学術賞。 Zeitschrift für Kristallographie, Editor, PROTEINS: Structure, Function and Bioinformatics, Editorial Board, Acta Crystallographica Section D (Biological Crystallography), Co-Editor。現在、文部科学 省タンパク 3000 プロジェクト・個別的解析プロジェクト中核拠点代表者(「タンパク質高次構造 形成と機能発現」領域)。タンパク質結晶学の手法に基づいた構造生物学の研究を行っている。

(1) 古細菌由来 CPD Photolyase (光回復 酵素):紫外線照射によって DNA に生じ た損傷のうち、チミンダイマーに代表さ れるシクロブタン型ピリミジンダイマー 光産物 (CPD) は、可視光エネルギーを 利用する CPD Photolyase (光回復酵素) により修復される。現在までに大腸菌・ ラン藻・好熱菌由来の Photolyase の構造 が明らかになっているが、古細菌由来の Photolyase の解析例はない。われわれは 古細菌 Sulfolobus tokodaii 由来 Photolyase (St-Photolyase) の結晶構造を 2.8 Å 分解 能で決定した。St-Photolyase の結晶構造



Fig. 1 Crystal structure of archaeal photolyase from Sulfolobus tokodaii

は、これまでに解析された Photolyase の構造とよく似ているが、DNA 結合部位には若干の違い が見られた。ラン藻由来の Photolyase とチミンダイマー DNA との複合体構造で、DNA 結合に関 わっている保存アスパラギン残基は St-Photolyase にはなかった。このことから St-Photolyase は 他の Photolyase と若干異なる DNA 結合様式を持つと考えられる。また、Photolyase の 2 つの補 欠分子のうち、触媒補欠分子は他のものと同様 FAD であった。他方の集光補欠分子には、MTHF (5,10-methenyltetrahydrofolate) または 8-HDF (8-hydroxy-5-deazariboflavin) が用いられているが、 今回構造解析した St-Photolyase では、集光補欠分子の結合部位にも FAD が結合していた。St-Photolyase の発現は大腸菌で行ったが、大腸菌 Photolyase の集光補欠分子は MTHF であることか ら、St-Photolyase は MTHF を集光補欠分子として用いないことが示唆される。

(2) リン酸基転位酵素 N-acetylglucosamine-phosphate mutase (AGM1): UDP-*N*- acetylglucosamine (UDP-GlcNAc) は UDP 糖の一種で、解糖系中間生成物であるフルクトース 6-リン酸を起点に合成される。UDP-GlcNAc は生物に必要不可欠な代謝産物であり、真菌の細胞壁合成や真核生物の糖タンパク質合成における前駆体となる。*N*-acetylglucosamine-phosphate mutase (AGM1) は UDP-GlcNAc の合成過程において必要なリン酸基の転位反応を触媒する酵素である。AGM1 の活性を抑制すると UDP-GlcNAc が合成されず、結果それを前駆体とする細胞壁も合成されないので、真菌は死滅してしまう。よって、病原性真菌由来の AGM1 阻害剤は、細胞壁合成阻害を利用した新しいタイプの抗真菌剤候補になると期待される。AGM1 は単糖のリン酸基を転位する *α*-D-phosphohexomutase superfamily に属し、ファミリー内でいくつかの構造解析がなされているが、

AGM1 に関して全体構造の報告例はなかっ た。反応機構ならびにファミリー内の他の 酵素との違い(基質特異性など)を明らかに するため、病原性真菌カンジダ由来 AGM1 の結晶構造を 1.93 Å 分解能で決定した。ま た、基質複合体および生成物複合体の結晶 構造もそれぞれ決定した。AGM1は4つの ドメインから構成され、ドメイン1、2、3 は同じ基本構造を持っていた。ファミリー 内の他の酵素と比較したところ、全体構造 や活性部位はよく似ていたが、ドメイン1 が円循環変異を起こしていることが分かっ た。AGM1の活性部位は各ドメインから1 つずつ計4つのループで構成されており、 反応前後における基質結合の様子から、反 応過程において基質が180°回転すること が示唆された。また基質特異性に関して、



Fig. 2 Crystal structure of *N*-acetylglucosaminephosphate mutase (AGM1) from *Candida*

AGM1 と基質である糖の2位に位置する N-acetyl 基との結合状態から、関与すると思われる2 つのアミノ酸残基を特定した。

(3) AT-rich DNA-binding protein (p25): NAD(H) は 生 物の電子伝達における必須成分であり、酸化的リン酸 化の中心的な役割を担う。解糖系およびクエン酸回路 により糖あるいは脂肪酸は酸化され、得られたエネル ギーは高エネルギー電子の形で NAD⁺ や FAD に渡され、 NADHやFADH2として蓄えられる。NADHは酸素分子 により呼吸鎖上で再び NAD⁺ に酸化され、ここで得られ たエネルギーにより細胞内からプロトンの汲み出しが行 われ最終的に ATP の合成へとつながる。細菌は環境の 様々な酸素レベルに応じて適切な呼吸鎖の発現を調節す る必要に迫られているが、細胞内の NADH/NAD⁺ 濃度バ ランスにより酸化還元レベルを検知し、呼吸鎖関連遺伝 子を発現調節するリプレッサー、Rex タンパク質が最近 報告されている。グラム陽性細菌 Streptomyces coelicolor 由来 Rex は NAD(H) と結合することで NADH/NAD⁺ 濃 度比が上昇して DNA との結合能が失われる。これによ りRexはROPと呼ばれるオペレーターから離脱し、低



Fig. 3 Crystal structure of AT-rich DNA-binding protein (p25) from *Thermus thermophilus* HB8

レベル酸素環境下に対応するための呼吸鎖関連タンパク質の発現が誘導される。高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8 由来 AT-rich DNA-binding protein (p25) は *Streptomyces coelicolor* 由来 Rex と 45% のアミノ酸配列相同性がある。2.16 Å 分解能で決定した p25 ダイマー構造は、N 末 端の winged helix DNA 結合ドメイン、C 末端の NAD(H) 結合ドメイン (Rossmann fold) 、その C 末端にある domain swap dimerization に寄与する α helix に大別でき、各モノマーの NAD(H) 結 合ドメインには NADH が結合していた。上記の構造的特徴はごく最近、構造が明らかになった *Thermus aquaticus* 由来 p25 の結晶構造とほぼ同じであるが、我々の構造では DNA 結合ドメイン に結晶化に用いた硫酸イオンが結合しており、100 以上の水分子の存在が確認できる。

Structural biology of biological intermolecular interactions

Kunio Miki

Born in 1952. He received his Ph.D. degree from Osaka University. He was a research associate in the Faculty of Engineering, Osaka University (1978-1990), an associate professor in the Research Laboratory of Resources Utilization, Tokyo Institute of Technology (1991-1994), and a professor in the Department of Chemistry, Faculty of Science, Kyoto University (1994-1995). Now he has been a professor in the Graduate School of Science, Kyoto University (1995-) and also a chief scientist (a director of laboratory) in the RIKEN Harima Institute at SPring-8 (1999-). He was awarded the Progress Prize of the Chemical Society of Japan and the Academic Prize of the Crystallographic Society of Japan. He has been devoted in the studies of structural biology by means of X-ray crystallography.

(1) Crystal structure of archaeal photolyase from Sulfolobus tokodaii: UV exposure of DNA molecules induces serious DNA lesions. The cyclobutane pyrimidine dimer (CPD) photolyase repairs CPD-type - lesions by using the energy of visible light. Two chromophores for different roles have been found in this enzyme family; one catalyzes the CPD repair reaction and the other works as an antenna pigment that harvests photon energy. The catalytic cofactor of all known photolyases is FAD, whereas several light-harvesting cofactors are found. Currently, 5,10-methenyltetrahydrofolate (MTHF), 8-hydroxy-5-deaza-riboflavin (8-HDF) and FMN are the known light-harvesting cofactors, and some photolyases lack the chromophore. Three crystal structures of photolyases from Escherichia coli (Ec-photolyase), Anacystis nidulans (An-photolyase), and Thermus thermophilus (Tt-photolyase) have been determined; however, no archaeal photolyase structure is available. A similarity search of archaeal genomic data indicated the presence of a homologous gene, ST0889, on Sulfolobus tokodaii strain7. An enzymatic assay reveals that ST0889 encodes photolyase from S. tokodaii (St-photolyase). We have determined the crystal structure of St-photolyase (Fig. 1) to confirm its structural features and to investigate the mechanism of the archaeal DNA repair system with light energy. The crystal structure of the St-photolyase is superimposed very well on the three known photolyases including the catalytic cofactor FAD. Surprisingly, another FAD molecule is found at the position of the lightharvesting cofactor. This second FAD molecule is well accommodated in the crystal structure, suggesting that FAD works as a novel light-harvesting cofactor of photolyase. In addition, two of the four CPD recognition residues in the crystal structure of An-photolyase are not found in St-photolyase, which might utilize a different mechanism to recognize the CPD from that of An-photolyase.

(2) Crystal Structures of *N*-Acetylglucosamine-phosphate Mutase, a Member of the α -D-Phosphohexomutase Superfamily: *N*-Acetylglucosamine-phosphate mutase (AGM1) is an essential enzyme in the synthetic process of UDP-*N*-acetylglucosamine (UDP-GlcNAc). UDP-GlcNAc is a UDP sugar that serves as a biosynthetic precursor of glycoproteins, mucopolysaccharides, and the cell wall of bacteria. Thus, a specific inhibitor of AGM1 from pathogenetic fungi could be a new candidate for an antifungal reagent that inhibits cell wall synthesis. AGM1catalyzes the conversion of *N*-acetylglucosamine 6-phosphate (GlcNAc-6-P) into *N*-acetylglucosamine 1-phosphate (GlcNAc-1-P). This enzyme is a member of the α -D-phosphohexomutase superfamily, which catalyzes the intramolecular phosphoryl transfer of sugar substrates. We have determined the crystal structures of AGM1 from *Candida albicans* (Fig. 2) for the first time, both in the apoform and in the complex forms with the substrate and the product, and discuss its catalytic mechanism. The structure of AGM1 consists of four domains, of which three domains have essentially the same fold. The overall structure is similar to those of phosphohexomutases; however, there are two additional β -strands in domain 4, and a circular permutation occurs in domain 1. The catalytic cleft is formed by four loops from each domain.

The *N*-acetyl group of the substrate is recognized by Val-370 and Asn-389 in domain 3, from which the substrate specificity arises. By comparing the substrate and product complexes, it is suggested that the substrate rotates about 180° on the axis linking C4 and the midpoint of the C5-O5 bond in the reaction.

(3) Crystal structure of AT-rich DNA-binding protein (p25) from *Thermus thermophilus* HB8:

Rex family proteins are bacterial regulators that sense the NADH/NAD⁺ redox state as a signal in the modulation of respiratory gene expression. The crystal structure of AT-rich DNA-binding protein (p25) from *Thermus thermophilus* HB8, one of the homologue proteins of the Rex family, was determined at 2.16 Å resolution (Fig. 3). The structure revealed that p25 bound to NADH contains two main domains, a winged-helix DNA-binding domain and a pyridine-dinucleotide binding domain, as found in the structure of p25 from *Thermus aquaticus*, which was recently determined at 2.9 Å resolution. The present higher-resolution structure revealed that the N-terminal winged helix DNA-binding domain is bound to the well-ordered sulfate anions, providing a structural insight into the DNA recognition by Rex proteins.

Publications

- Crystal Structure of the C2 Domain of Class II Phosphatidylinoside 3-Kinase C2α, L. Liu, X. Song, D. He, C. Komma, A. Kita, J. V. Virbasius, G. Huang, H. D. Bellamy, K. Miki, M. P. Czech, and G. W. Zhou, J. Biol. Chem., 281, 4254-4260 (2006).
- The Crystal Structure of Polyhydroxybutyrate Depolymerase from *Penicillium Funiculosum* Provide insights into Recognition and Degradation of Biopolyesters, T. Hisano, K. Kasuya, Y. Tezuka, N. Ishii, E. Oroudjev, H. Hansma, T. Kobayashi, M. Shiraki, T. Iwata, Y. Doi, T. Saito, and K. Miki, *J. Mol. Biol.*, 356, 993-1004 (2006).
- 3. Purification, Crystallization, and Preliminary X-ray Diffraction Studies of *N*-Acetylglucosaminephosphate Mutase from *Candida albicans*, Y. Nishitani, D. Maruyama, T. Nonaka, A. Kita, T. A. Fukami, T. Mio, H. Yamada-Okabe, T. Yamada-Okabe, and K. Miki, *Acta Crystallogr.*, **F62**, 419-421 (2006).
- Differential Analysis of D-β-Asp-Containing Proteins Found in Normal and Infrared Irradiated Rabbit Lens, T. Takata, T. Shimo-Oka, M. Kojima, K. Miki, and N. Fujii, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 344, 263-271 (2006).
- Crystal Structures of *N*-Acetylglucosamine-phosphate Mutase, a Member of the α-D-Phosphohexomutase Superfamily, and Its Substrate and Product Complexes, Y. Nishitani, D. Maruyama, T. Nonaka, A. Kita, T. A. Fukami, T. Mio, H. Yamada-Okabe, T. Yamada-Okabe, and K. Miki, *J. Biol. Chem.*, 281, 19740-19747 (2006).
- 6. Roles of Conserved Basic Amino Acid Residues and Activation Mechanism of the Hyperthermophilic Aspartate Racemase at High Temperature, T. Yoshida, T. Seko, O. Okada, K. Iwata, L. Liu, K. Miki, and M. Yohda, *Proteins: Struct., Funct., Bioinfo.*, **64**, 502-512 (2006).
- Fate Determination of the Flavin Photoreceptions in the Cyanobacterial Blue Light Receptor TePixD (Tll0078), K. Okajima, Y. Fukushima, H. Suzuki, A. Kita, Y. Ochiai, M. Katayama, Y. Shibata, K. Miki, S. Itoh, and M. Ikeuchi, *J. Mol. Biol.*, 363, 10-18 (2006).
- 8. Purification, Crystallization and Preliminary X-ray Diffraction Studies of UDP-*N*-acetylglucosamine pyrophosphorylase from *Candida albicans*, D. Maruyama, Y. Nishitani, T. Nonaka, A. Kita, T. A. Fukami, T. Mio, H. Yamada-Okabe, T. Yamada-Okabe, and K. Miki, *Acta Crystallogr.*, **F62**, 1206-1208 (2006).
- 9. Purification, Crystallization and Preliminary X-ray Crystallographic Analysis of the Outer Membrane Lipoprotein NlpE from *Escherichia coli*, Y. Hirano, Md. M. Hossain, K. Takeda, H. Tokuda, and K. Miki, *Acta Crystallogr.*, **F62**, 1227-1230 (2006).
- 10. Crystallization and Preliminary X-ray Crystallographic Studies of Oxidative Stress Sensor SoxR and Its Complex with DNA, S. Watanabe, A. Kita, K. Kobayashi, Y. Takahashi, and K. Miki, Acta *Crystallogr.*, **F62**, 1275-1277 (2006).
- 11. Crystal Structure of Archaeal Photolyase from *Sulfolobus tokodaii* with Two FAD Molecules: Implication of a Novel Light-harvesting Cofactor, M. Fujihashi, N. Numoto, Y. Kobayashi, A. Mizushima, M. Tsujimura, A. Nakamura, Y. Kawarabayasi, and K. Miki, *J. Mol. Biol.*, **365**, 903-910 (2007).
- 12. Crystal Structure of TTHA1657 (AT-rich DNA-binding protein; p25) from *Thermus thermophilus* HB8 at 2.16 Å Resolution, A. Nakamura, A. Sosa, H. Komori, A. Kita, and K. Miki, *Proteins: Struct., Funct., Bioinfo.*, **66**, 755-759 (2007).