

# *N*-ビオチニル-アミノ- $\beta$ -シクロデキストリンの合成

高橋 圭子\* 野口 真志\*\*  
服部 憲治郎\*\*\*

## Synthesis of *N*-Biotinyl-amino- $\beta$ -cyclodextrin

Keiko TAKAHASHI, Masashi NOGUCHI,  
Kenijro HATTORI

The fact that  $\alpha$ -biotin serves as a covalently bound "CO<sub>2</sub> carrier" is now unequivocally established. Though model studies such as carboxylation on ureid-1'-*N*-of biotin has been reported, no appropriate biomimetic model study for a "CO<sub>2</sub> carrier" has been carried out. The titled compound (I) in which the biotinyl group is bound to an amide linkage with  $\beta$ -cyclodextrin, was prepared with active-ester method in good yield. Compound I was purified by taking with preparative HPLC. The structure of (I) was provided by <sup>1</sup>H-nmr, <sup>13</sup>C-nmr, elemental analysis, HPLC and the paper chromatography of hydrolyzates, and decided to be 6-(mono-*N*-biotinyl)-amino- $\beta$ -cyclodextrin.

### 1. 序 論

ビオチン酵素はビオチンサブユニット (carboxyl carrier protein : CCP) を中心に CO<sub>2</sub> を固定する炭酸化サブユニット (biotin carboxylase : BC) と CO<sub>2</sub> の転移を行なう炭酸転移サブユニット (carboxy transferase : CTase) より成り、BC, CTase それぞれの特異性により、カルボキシラーゼ、トランスカルボキシラーゼ、あるいはデカルボキシラーゼとして生体内の種々の炭酸移動反応に関与している<sup>1,2)</sup>。d-ビオチンはビオチンサブユニットのリジン残基の  $\epsilon$ -アミノ基に酸アミド結合をしており、BC, CTase 両サブユニット間を激しく運動する、いわゆるピンポン機構

により CO<sub>2</sub> キャリアーとしての機能を発現している。微視的に CO<sub>2</sub> キャリアーの機構をみると、ビチオンのウレイド環の 1 N' 位が、ATP, マグネシウムイオン存在下でカルボキシル化されることが知られている。有機反応では、ウレイド環の N 位よりも、中央の O 位の方が CO<sub>2</sub> 付加の活性が高く、その反応機構は興味深い。現在、ビオチン酵素モデル化のアプローチも、1 N' 位カルボキシル化に集中しており<sup>3)</sup>、CO<sub>2</sub> キャリアーとしてのトータルなモデル化は行なわれていない。

一方、シクロデキストリン (CD) はその疎水性空洞に種々の化合物を基質として取りこみ、有効な酵素モデル化合物として多くの修飾が報告されている<sup>4)</sup>。酵素モデル化合物構築を目的とした修飾は、導入個数と導入位置を厳密に制御すること (controlled stereospecific modification) が必須であり、分離・精製が完全でかつ高収率である

\* 非常勤助手

\*\* 昭和 57 年度卒研生・現在 (株) 井上香料

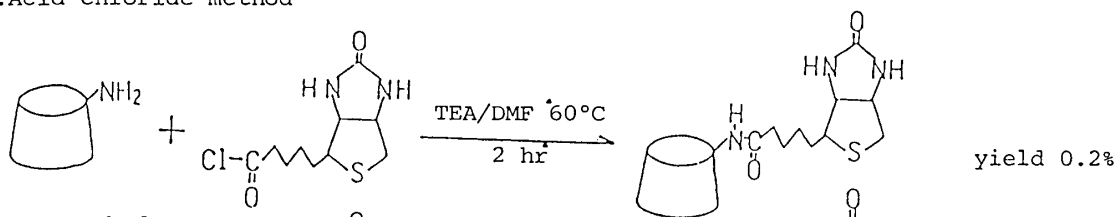
\*\*\* 工業化学科助教授

昭和 59 年 9 月 29 日受理

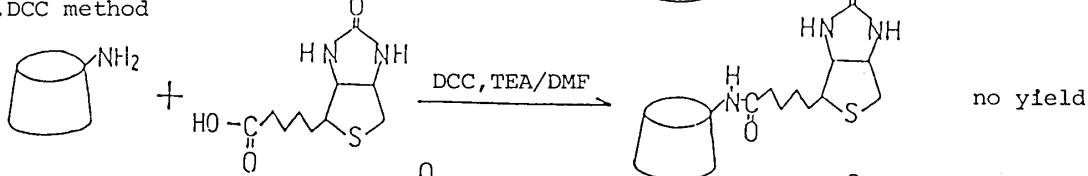
ことが要求される. CD への機能性基導入の第一段階としてトシル基 (p-tolylsulfonyl group) の導入が一般的である. 我々は既にアルカリ水溶液中, トシルクロリドを用いて1分子のトシル基を位置特異的にシクロデキストリンに導入している<sup>5,6)</sup>. この手法で得た 6-monotosyl- $\beta$ -CD をアミノ化し, さらにアミド結合で機能性基 (例えばニコチンアミド基<sup>7)</sup>) を導入すると, トシル体の際の

修飾位置がそのまま保持され厳密に構造が規制されたモデル化合物が得られる. そこで, あらたに CO<sub>2</sub> キャリアーモデル化反応の実現を意図して d-ビオチンをアミド結合で CD に導入した N-ビオチニル-アミノ- $\beta$ -CD (I) (Fig. 1) の合成を行った. I は結合部位 (CD 内孔) と触媒部位 (d-ビオチン) をあわせもち, 良好なモデル化合物となることが期待できる. 本報では I の合成法

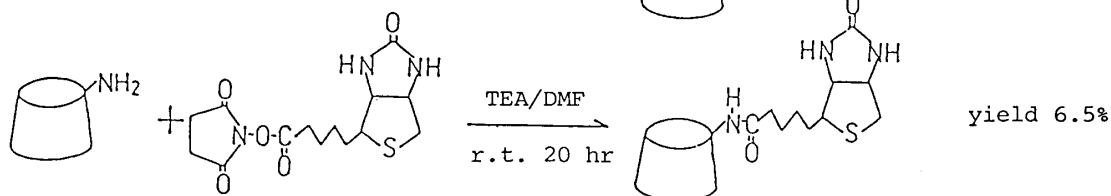
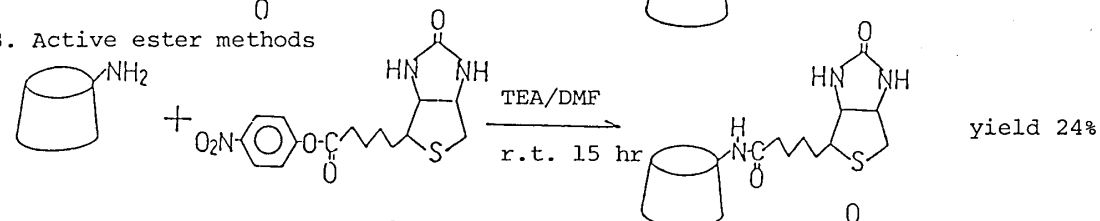
### 1. Acid chloride method



### 2. DCC method



### 3. Active ester methods



スキーム 1

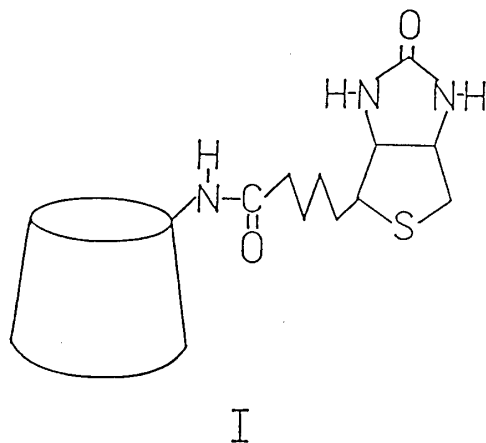


Fig. 1 N-biotinyl-amino- $\beta$ -cyclodextrin

の検討を行い、高収率で得ることができたので、その合成方法および **I** の構造決定について報告する。

## 2. 実 験

用いたアミノ-β-CD は、6-トシル-β-CD を耐圧容器中、アンモニア-メタノール混液にて反応させ、得られた粗生成物を pH 6.80 のリン酸緩衝液を溶離液とし、CM-セファデックスを担体としたカラムクロマトグラフィーにより精製した。このアミノ-β-CD は <sup>13</sup>C-nmr およびペーパークロマトグラフィー等の検討により、グルコースの C-6 位にアミノ基が導入されている事を確認している。ジメチルホルムアミド (DMF)、トリエチルアミン (TEA) は通常の方法に従い脱水精製を行った。

### N-ビオチニル-アミノ-β-CD の調製：

d-ビオチン 0.1 g と p-ニトロフェノール 0.6 g を DMF 中、DCC 法により活性エステル型ビオチンを定量的に得た。エステルの生成は IR スペクトルにより確認した：1740 cm<sup>-1</sup> (=C=O 伸縮)。これに 0.15 g のアミノ-β-CD を加え、DMF 中トリエチルアミン存在下室温で 15 時間反応させた。反応混合物をアセトン中に沈殿させ、沈殿物を分取型高速液体クロマトグラフィーにて分取精製を繰り返して、42.7 mg の生成物を得た。全収率 23.6%，元素分析(S)：2.23% (計算値 2.25%)。

### 高速液体クロマトグラフィー (HPLC)：

分取精製には東洋曹達 HLC-827 型を用いた。カラムはアミノシリカゲル型 LS-450 NH<sub>2</sub> (φ：2.5×30 cm) を用い、60% アセトニトリル水溶液を溶離液とし、示差屈折計にて検出した。

### 加水分解：

部分加水分解は 1 N-HCl 中、80°C にて 6 時間加熱した。完全加水分解は 6 N-HCl 中 150°C にて 10 時間加熱した。加水分解物の分析は DMF：ブタノール：水=2：1：1 を展開溶媒としたペーパークロマトグラフィーにて行った。

<sup>1</sup>H-nmr および <sup>13</sup>C-nmr スペクトルは、DMSO-d<sub>6</sub> 溶媒で TMS 基準とし、JEOL FX-90 Q および JEOL JNM-MH-100 にて測定を行った。

## 3. 結果と考察

### 3.1 合成方法の検討

合成法は、酸クロリド法、DCC 直接縮合法、活性エステル法について検討を行った (スキーム 1)。当研究室では既にアミノ-CD に酸クロリド法、あるいは DCC 法でニコチンアミド基を導入し、ニコチンアミドシクロデキストリンを得ている<sup>6)</sup>。そこでビオチンをチオニルクロリドでビオチンクロリドとし、TEA 存在下 DMF 中で反応させた。粗生成物の HPLC チャートを Fig. 2 に示す。エステル結合型ビオチン CD をはじめとして副生成物が多く、目的の N-ビオチニル-CD (成分 **I**) は HPLC による分取後の最終精製段階でわずか 0.2% であった。またこの手法では、酸クロリド型ビオチンクロリドの活性が非常に高いため、取り扱いに難がありまたアミノ CD に対し過剰のビオチンを必要とし、精製において未反応のビオチンが障害となりやすい。次に DCC を用いての直接的縮合を試みたが、**I** は全く生成しなかった。DCC による縮合においては、DCC の中央の炭素原子とカルボキシル基の O 原子が結合し、アミノ基を攻撃するが、高い両端のシクロヘキシル基が、シクロデキストリン上アミノの基へ

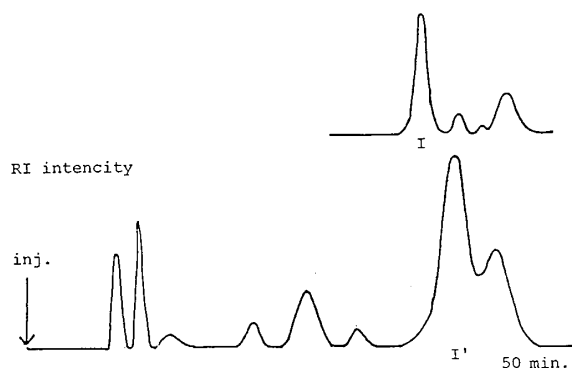
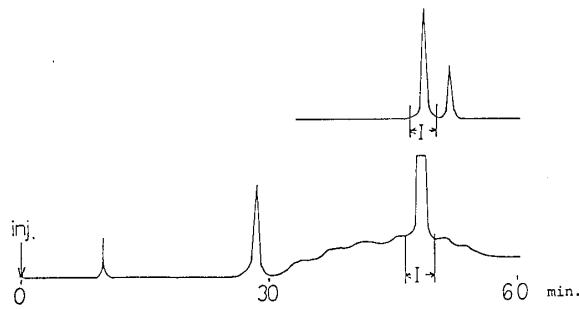


Fig. 2 Preparative HPLC data of crude **I**  
Instrument: HLC-827 (Toyo Soda), column:  
LS-450 NH<sub>2</sub> (φ: 2.5×30 cm), eluent: 60%  
acetonitrile in water, temperature: 38°C.

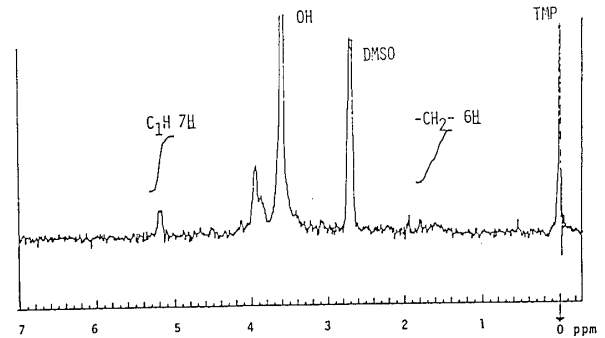


**Fig. 3** Preparative HPLC data of crude **I**  
Instrument: HLC-827 (Toyo Soda), column:  
LS-450 K ( $\phi$ : 2.5 $\times$ 30 cm) eluent: 65% ace-  
tonitrile in water, temperature 40°C.

の攻撃を妨げ、反応が進行しなかったと考えられる。次に *d*-ビオチンを活性エステル型化合物としたのちにアミノ-CD と縮合する方法を行った。活性エステル法はオリゴペプチドにビオチン基を導入する際用いられている手法であり<sup>8,9)</sup>, Bodanszky らはピリジン溶媒中, *p*-ニトロフェノールとビオチンより, ビオチン-*p*-ニトロフェニルエステルを合成しビオチン含有ペプチドを合成している<sup>8)</sup>。本研究では, DCC 存在下, DMF 中で *p*-ニトロフェノールと反応させたところ, ほぼ定量的にビオチン-*p*-ニトロフェニルエステルを得ることができた。このエステルとはほぼ当量のアミノ-CD を TEA 存在下, 室温で 15 時間反応させた後の粗生成物の HPLC チャートを Fig. 3 に示した。酸クロリド法の場合に比べ, スペクトルは単純であり, また遊離ビオチンのピークは全く観察されなかった。成分 **I'** を分取し, 再び精製のため分取を繰り返した。精製収率は 24% であり, 飛躍的に収率の向上をみた。また活性エステル残基として一般的である *N*-コハク酸サクシンイミドとのエステルを合成し, 同様に縮合を試みた。この場合, 収率は 6.4% で, 酸クロリド法よりは良好であったが, *p*-ニトロフェニルエステルを中間体とした方法には及ばなかった。アミノ基に対する反応性は同程度であるが, CD 環との立体的要因で, 収量に差がでたと考えられる。

### 3.2 *N*-ビオチニル-アミノ- $\beta$ -CD の同定

HPLC による分取を繰り返して精製した **I** を DMF : ブタノール : 水 = 2 : 1 : 1 の展開溶媒にてペーパークロマトグラフィーに付すと *R<sub>f</sub>* 値 0.30 に単一スポットが観測された。また, DMSO-*d*<sub>6</sub>-D<sub>2</sub>O 溶媒中 100°C にて <sup>1</sup>H-nmr を測定した結果, シクロデキストリンとビオチンのメチレン基由来のピークが 5.1 ppm と 1.7 ppm にそれぞれ観測され, 積分比は 7 対 6 である。ゆえにシクロデキストリンとビオチン基は 1 : 1 で結合している (Fig. 4)。この事実は元素分析の結果と一致している。さらに Fig. 5 に <sup>13</sup>C-nmr スペクトルを示した。ビオチン自身の <sup>13</sup>C-nmr シフトの帰属は



**Fig. 4** <sup>1</sup>H-nmr spectra of **I**

引地らにより報告されている<sup>10)</sup>。特徴的シフトは, ウレイド環およびメチレン側鎖末端のカルボニル基由来のシフトと, 40 ppm 以下のメチレン側鎖のシフトである。101.4 (C<sub>1</sub>), 81.8 (C<sub>4</sub>), 72.5 (C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>5</sub>), 60 ppm (C<sub>6</sub>) のシクロデキストリン自体のシフトに加え, 181.8 ppm に C<sub>10'</sub> カルボニル由来のシフトが, 162.4 ppm にウレイド環由来のシフトが, そしてその他のビオチン基に由来するシフトが全て観測され, **I** にビオチン基が存在する事を明示している。100 ppm, 80~60 ppm 付近に小ピークが多数観測されるが, このスペクトル結果だけでは, CD 環のグルコースのどの位置にビオチン基が導入しているか決定する事はできない。すなわち, シクロデキストリンと, *d*-ビオチンが, 1 : 1 で結合している事は明確であるが, シクロデキストリンのアミノ基とアミド結合

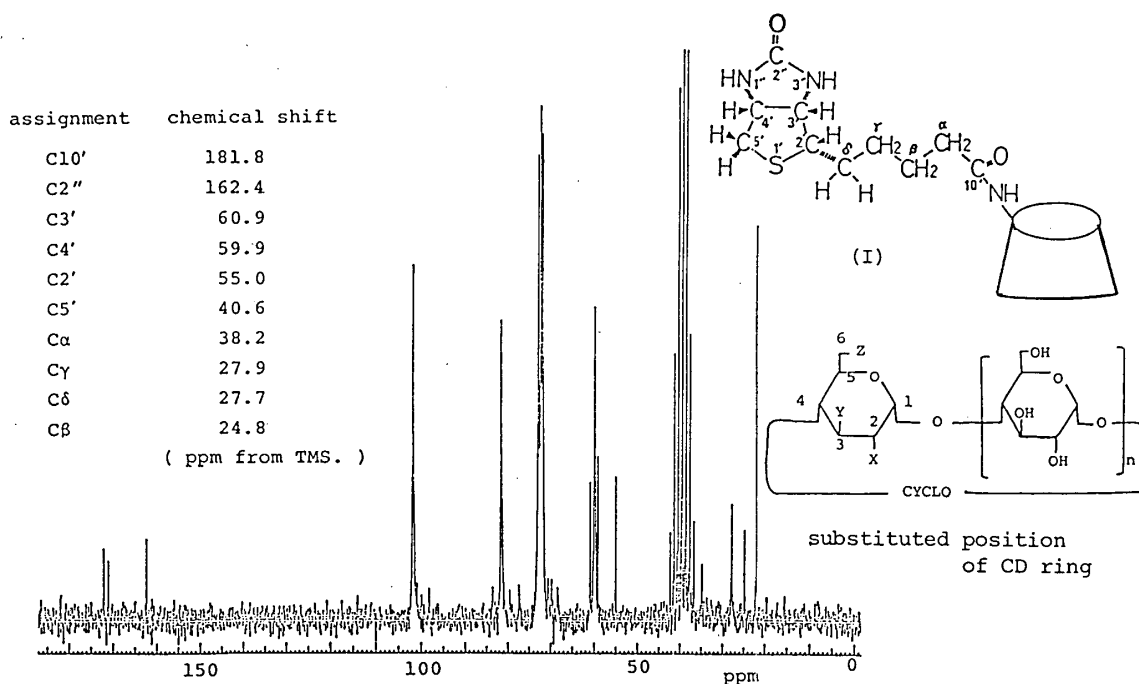


Fig. 5 <sup>13</sup>C-nmr spectra of I; solvent; DMSO-d<sub>6</sub>, temperature: 70°C

Table 1 Paper Chromatography of Hydrolyzate

Coloring reagent (due to the group)	DACA <sup>a)</sup> (ureid)	A-PA <sup>b)</sup> (aldose)	Ninhydrin (amino sugar)	Assignment	
partial hydrolyzate	A	0.42	0.39	0.40	6-(N-biotinyl)-aminoglucose
	B	—	0.61	—	glucose (authentic 0.63)
thorough-hydrolyzate	C	0.79	—	—	d-biotin (authentic 0.79)
	D	—	0.63	—	glucose
	E	—	0.45	0.43	6-aminoglucose (authentic 0.42)

a) *p*-dimethylaminocinnamaldehyde, b) aniline-phthalic acid

をしているのか、あるいは他の水酸基とエステル結合しているのか決定することはできない。そこで塩酸酸性下加水分解を行い、加水分解物の解析を行った。Table 1 に結果を示す。*p*-ジメチルアミノシナムアルデヒド試薬はウレイド環検出試薬であり、アニリン水素フタル酸、ニンヒドリンはそれぞれアルドース、アミノ基検出薬である。部分加水分解において I はペーパークロマトグラフィー上 2 点のスポットを与えた。スポット B は

グルコースと一致し、またスポット A は全ての検出薬に感知されたことより、ビオチニルアミノ糖である。この場合、*d*-ビオチンのスポットおよびアミノ糖のスポットは全く検出されなかった。もしエステル結合型 (CD の水酸基とビオチンカルボン酸間) の化合物であれば、この条件下、結合はたやすく解除され、上記 2 つのスポットもあわせて観測される。ゆえに、I の結合型はエステル結合ではない。次に完全加水分解においては、ス

ポット A は消失し、かわりにウレイド試薬のみ反応するスポット C とニンヒドリン感知のスポット E が観測された。スポット C は *d*-ビオチンであり、E はアミノ糖である。この結果より (I) は、ビオチニル基とシクロデキストリンのアミノ基が、アミド結合している事が明確となった。

#### 4. 結 語

6-N-ビオチニル-アミノ- $\beta$ -CD (I) が活性エステル法で高収率で合成された。I は認識部位 (CD) と触媒部位 (ビオチン) をかねそなえており、適切な基質を用いれば、モデル反応の構築が可能である。

また、I はアミド結合により機能性基が導入されている。アミド結合は次の点で他の結合型よりすぐれている。

- (1) 化学的に安定であるためモデル化反応のシステム化の条件の幅が広く、モデル化合物のさらなる修飾も可能である。
- (2) 機能性基の導入位置がアミノ基部位に制限でき、厳密な構造決定ができる。

ここで示した手法は他の機能性基導入にも応用可能であり、酵素モデル化合物合成の一助となると思われる。

おわりに、本研究にあたり、実験に協力された本学卒研究生 森 仁 君に深謝いたします。

#### 文 献

- 1) J. Moss, D. M. Lane: *Adv. Enzymol.*, **35**, 321 (1971).
- 2) H. G. Wood, R. E. Barden: *Ann. Rev. Biochem.*, **46** (1977).
- 3) Y. Akazaki, A. Ohno: *J. Amer. Chem. Soc.*, **96**, 1957 (1964).
- 4) A. P. Croft, R. A. Bartisch: *Tetrahedron*, **39**, 1417 (1983).
- 5) K. Takahashi, K. Hattori, F. Toda: *Tetrahedron Lett.*, **25**, 3331 (1984).
- 6) K. Takahashi, K. Hattori: *J. Inclusion Phenomena* (1985) in press.
- 7) M. Kojima, F. Toda, K. Hattori: *J. Chem. Soc.*, **1981**, 1647.
- 8) M. Bodanszky, D. T. Fagan: *J. Amer. Chem. Soc.*, **99**, 235 (1977).
- 9) H. Kondo, F. Moriguchi, J. Sunamoto: *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **55**, 1579 (1982).
- 10) M. Ikura, K. Hikichi: *Organic Magnetic Res.*, **20**, 266 (1982).