

加水分解酵素と無機ナノシートの複合触媒を用いた高効率合成反応

2020年2月

長崎大学大学院工学研究科

山田 あかね

目次

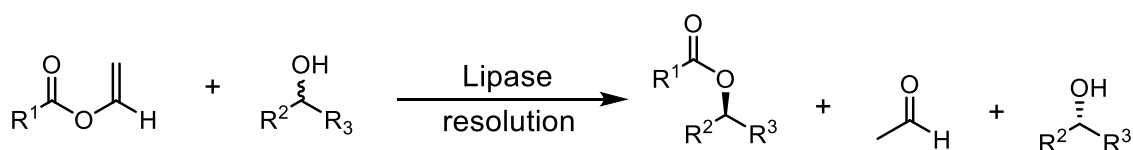
第1章 緒言	4
1-1. 酵素を触媒とした有機合成反応.....	4
1-2. 無機層状材料のタンパク質固定化への利用.....	5
1-3. 遷移金属触媒を用いたアシルアニオン等価体のアリル化反応.....	6
1-4. 本研究の目的	8
第2章 リパーゼ-TNS 複合体によるエステル加水分解反応	10
2-1. TNS およびリパーゼ - TNS 複合体の物性評価.....	10
2-2. リパーゼ - TNS 複合体作成の pH の検討	11
2-3. エステル加水分解反応におけるリパーゼ - TNS 複合体の触媒能評価	13
2-4. リパーゼ - TNS の熱安定性の評価	15
2-5. 実験項	16
2-5-1. TNS コロイド溶液の合成および物性評価	16
2-5-2. リパーゼの TNS に対する結合量評価.....	17
2-5-3. <i>p</i> NPA 加水分解反応におけるリパーゼ - TNS 複合体の触媒能評価.....	18
2-5-4. リパーゼ - TNS 複合体の熱安定性の評価	18
第3章 リパーゼ- α -ZrP NS 複合体によるエステル交換反応の効率化	20
3-1. 最適条件の検討.....	20
3-2. 基質適用範囲の検討.....	21
3-3. 実験項	25
3-3-1. α - ZrP NS ($Zr(HP0_4)_2 \cdot H_2O$) の合成および剥離.....	25
3-3-2. ラセミ体アリルアルコールの合成.....	26
3-3-3. リパーゼによるアリルアルコールのエステル交換反応.....	26
3-3-4. スペクトルデータ.....	27

第4章 アリルアルコール誘導体の遷移金属触媒反応による有用化合物への変換.....	32
4-1. TBS 保護シアノヒドリンの合成.....	32
4-2. 第2級アリルカーボネートを基質とした Rh 触媒による変換反応.....	33
4-3. Rh 触媒を用いた第2級アリルアセテートのアリル位置換反応.....	34
4-3-1. 配位子の検討.....	34
4-3-2. TBS 基の脱保護条件の検討.....	35
4-4. 実験項.....	36
4-4-1. TBS 保護シアノヒドリンの合成.....	36
4-4-2. 第2級アリルアルコールのカーボネートへの変換.....	37
4-4-3. 第2級アリルアセテートの合成.....	37
4-4-4. 第2級アリルアセテートの TBS 保護シアノヒドリンを求核剤とした Rh 触媒ア リル位置換反応.....	38
4-4-5. スペクトルデータ.....	38
第5章 結論・総括.....	40
参考文献.....	43
Supporting Information.....	45

第 1 章 緒言

1-1. 酵素を触媒とした有機合成反応

現代の有機合成化学において、酵素は基質および反応特異性の高い触媒として金属触媒と同様に注目を集めている。また、環境負荷の少ない合成法 (遷移金属触媒や重金属を使用しない、反応溶媒として水系溶媒を用いるなど) の開発は現代の化学産業や薬剤合成において強く求められており、酵素を触媒とした有機合成反応は穏やかな反応条件下で反応が進行するため、このような環境負荷の少ないクリーンな合成法の実現に大きく貢献し得る¹。特に、消化酵素の一種であるリパーゼによるエステル加水分解およびエステル交換反応は、速度論的ラセミ分割により容易に光学活性化合物の合成が可能である為、合成化学的有用性が高く近年期待が高まっている (Scheme 1-1)²⁻⁷。この酵素触媒合成反応は、反応基質の一方のエナンチオマーが優先的に不斉空間であるリパーゼの活性中心部位に適合し、加水分解およびエステル化反応を受けることで速度論的ラセミ分割が可能であり、光学活性化合物の合成が達成できる (Fig. 1-1)⁸。しかしながら、酵素は生体高分子であるが故に、一般的に非生理的条件下 (高温、酸性および塩基性溶液中、有機溶媒中など) においては化学的安定性が低い。この問題点を解決するために、酵素を触媒とした合成反応では酵素の安定性向上のためにこれを化学的に安定な無機物等の表面に結合させた固定化酵素がよく用いられる。固定化により酵素の安定性向上が期待できるが、その一方では酵素の分子運動が制限され、見かけの酵素活性の低下を招くという新たな問題が生じている。これら大きな課題のために、現在では酵素を触媒とした有機合成反応は、遷移金属錯体等の金属触媒合成反応に比べて一般化されておらず、本格的な実用化は達成されていない。



Scheme 1-1 リパーゼを触媒とした不斉エステル交換反応

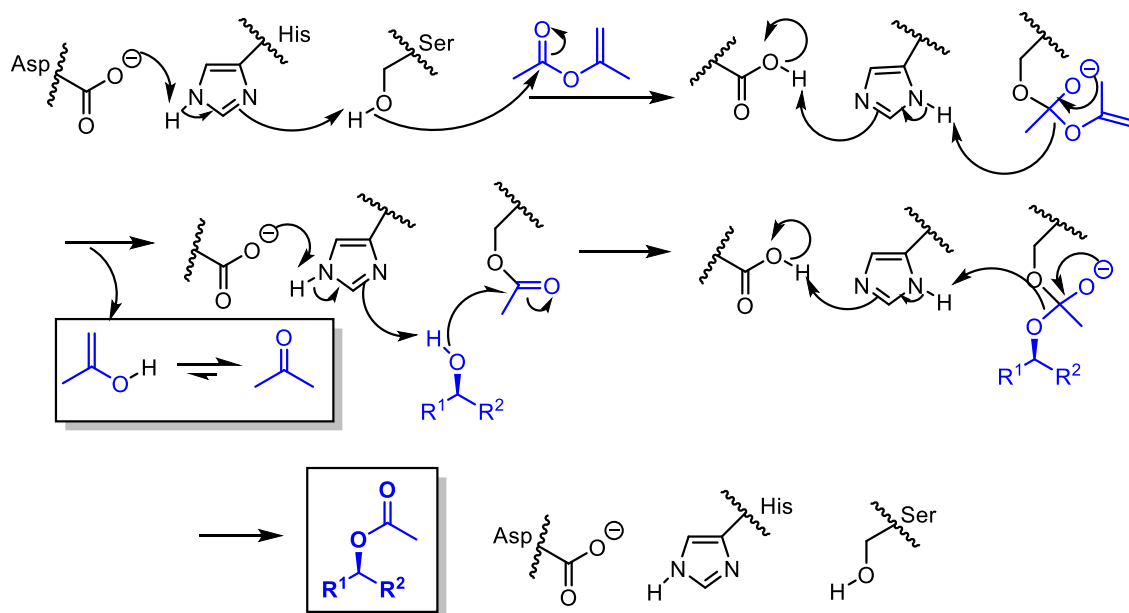


Fig. 1-1 リパーゼによるエステル交換反応のメカニズム

1-2. 無機層状材料のタンパク質固定化への利用

無機層状材料は、高い化学的安定性およびナノサイズ効果に基づく特異的な物性のために注目を集めている。近年では電極へのタンパク質固定化などに用いられており、バイオセンサ分野において盛んに研究が進められている⁹。無機層状材料の層間にタンパク質をインターカレートすることによって、タンパク質の安定性の向上および電極触媒作用の向上が期待される。無機層状材料の一種であるチタン酸ナノシート (Ti₄O₉²⁻: TNS) は、高い化学的安定性に加え優れた液相分散性を持つことが知られている。以前、筆者の研究では西洋わさび由来酸化還元酵素 (HRP) の TNS への固定化により、新規な HRP-TNS 固定化酵素を開発した。この固定化酵素を触媒とした水系溶媒中における酸化反応において、遊離 HRP (free HRP) の約 2.5 倍の著しい反応速度向上を報告した^{10,11}。HRP-TNS 固定化酵素では、HRP と TNS を静電的相互作用によって結合させるこ

とで、HRP の液相分散性向上によって反応基質との親和性が向上し、それにより HRP の酵素活性が大きく向上したと考えている (Fig. 1-2)。また、発光生体分子イクオリン (AEQ) とユウロピウム含有蛍光性 TNS (ETNS) を同様に静電的相互作用により結合させることで (AEQ-ETNS)、AEQ のカルシウムによる発光により生じた青色光を赤色光へ変換することができた。この AEQ-ETNS 複合体では、イクオリンの青色光を励起光として ETNS が赤色蛍光を放出することで、光波長の変換が可能であった。このような研究結果より、無機層状材料は、酵素触媒反応さらには光化学分野においても極めて有用であり、酵素触媒合成反応の一般化に大きく寄与する可能性があるものといえる。

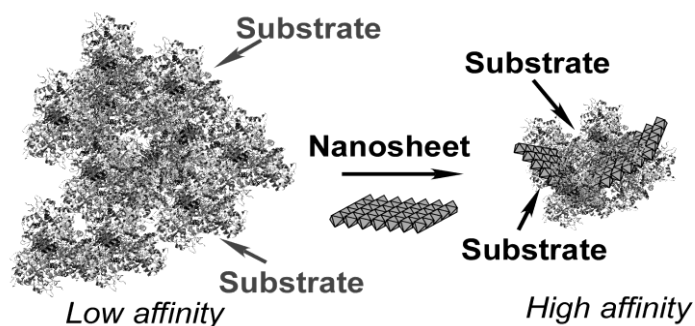


Fig. 1-2 ナノシートとの複合化によるタンパク質の分散性・反応性向上

1-3. 遷移金属触媒を用いたアシルアニオン等価体のアリル化反応

β,γ -不飽和ケトンとりわけ α 位にキラル中心を持つものは、種々の薬剤および医薬品としての利用が期待できる化合物の部分骨格となりうる (Fig. 1-3)^{12,13}。そのため、これら不飽和ケトン類の優れた合成法の開発は有機合成化学における重要な課題となっている。例えば、P.A. Evans らは 2012 年から 2017 年にかけてアシルアニオン等価体すなわち求核剤として TBS 保護シアノヒドリンを用いた Rh 触媒によるアリルカーボネートのアリル位置換反応を報告しており、特に 2013 年に報告したキラルな芳香族アリルカーボネートを基質とした反応ではこの触媒反応が立体特異的に進行し、光学活性な β,γ -不飽和ケトンの合成が可能であることが明らかにされた (Scheme 1-2)¹⁴⁻¹⁷。この合成

法は、キラルなアリルカーボネートを基質とした二重反転プロセスによる立体特異的炭素-炭素結合生成反応であり、幅広い α 位置換 β,γ -不飽和ケトンの高い位置選択性および立体保持率での合成を可能にした。さらに、2017年には S. E. Shockley らにより Ir 触媒を用いた MOM 保護アシルシアニドのアリル化反応による α 位置換 β,γ -不飽和カルボン酸の合成を報告しており、これまで困難であった第 4 級炭素立体中心の構築に成功している^{18,19}。このような遷移金属触媒を用いたアシルアニオン等価体のアリル化反応は α 位置換 β,γ -不飽和ケトン類の極めて有用な合成法であるといえるが、出発物として第 3 級および一部の第 2 級アリルカーボネートのみが適用されており、適用基質範囲の拡大が今後の最大の課題であるといえるだろう。また、立体特異的アリル位置換反応の基質である光学活性なアリルエステルの調製においては、しばしば反応系が煩雑となる傾向があるため、より容易で簡便な合成法の開発も課題である。

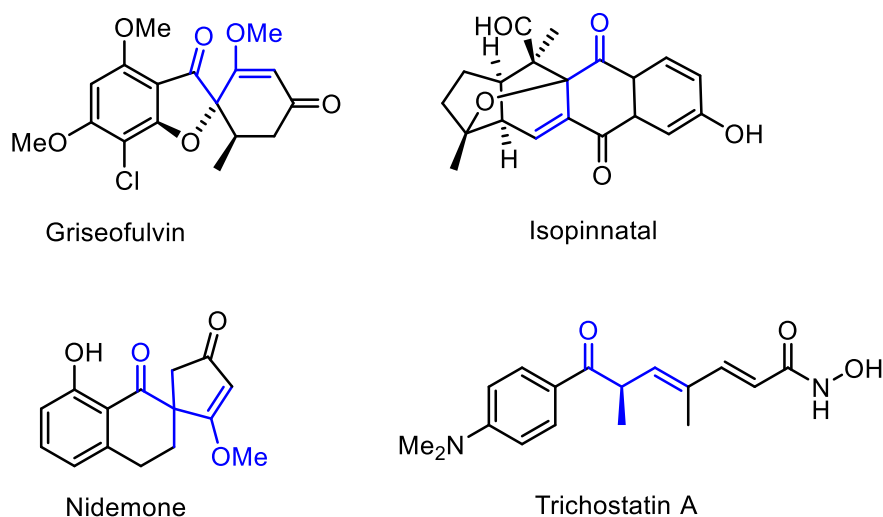
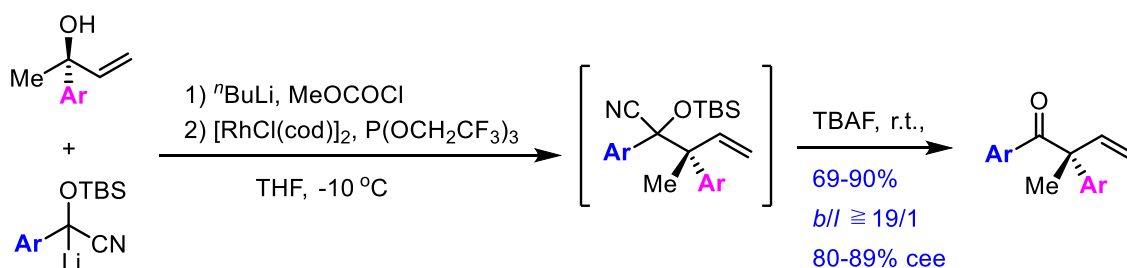


Fig. 1-3 β,γ -不飽和ケトン骨格を含む薬剤の例



Scheme 1-2 第3級キラルアリルカーボネートの Rh 触媒立体特異的変換反応

1-4. 本研究の目的

上述の通り、酵素 - 無機ナノシート複合体は、酵素の液相分散性向上による高い触媒活性を示すことがこれまでの筆者の研究により明らかにされた。しかしながら、これまで筆者が用いてきた HRP は、酸化反応触媒としてのみ利用可能である為、酵素触媒合成反応における有用性が限定されるのが現状である。また、遷移金属触媒反応による α 位置換 β,γ -不飽和ケトン類の合成においては、基質適用範囲が狭いのが最大の欠点である。

そこで本研究では、酵素触媒合成反応において極めて有用性が高いリパーゼと、無機ナノシートを結合し、新規リパーゼ - 無機ナノシート複合触媒を開発することを目的とした。リパーゼを HRP 同様に静電的相互作用により無機ナノシートと結合させることで、リパーゼ分子の液相分散性の向上による触媒活性向上が期待できると考え、それによるリパーゼを触媒としたエステル加水分解反応およびエステル交換反応の効率化が期待できると考えた。特に、エステル交換反応においては、より一般的な有機反応系 (非極性有機溶媒中における反応) に酵素 - 無機ナノシート複合体触媒を適用することを目的とした。筆者がこれまで利用してきたチタン酸ナノシートはじめ無機ナノシートは親水性が高いために、一般的には有機溶媒中での分散安定化は困難であると考えられており、有機溶媒中での酵素固定化へ利用された例はない。また、このエステル交換反応の反応基質としてラセミ体アリルアルコールを用いることで、立体特異的アリル位置換

反応の基質として有用な光学活性なアリルアルコール誘導体の簡便で効率的な合成を目指した。さらに、リパーゼ触媒エステル交換反応により得られた第2級アリルエステルを P. A. Evans らによるアシルアニオン等価体のアリル化反応に適用することにより、この触媒反応の基質適用範囲の拡大とともに得られたアリルエステルの合成化学的有用性を高めることを目的とした。

本研究が完成すれば、高い活性と安定性を併せ持つ新規リパーゼ - 無機ナノシート固定化酵素が開発されるだろう。この固定化酵素は、酵素触媒合成反応の一般性拡大に貢献し、合成化学における酵素触媒の利用がより容易になるものと考えている。

それに留まらず、本研究のリパーゼ触媒エステル交換反応により得られたキラルな第2級アリルエステルの Rh 触媒アリル位置換反応への適用により、この触媒反応の基質一般性の拡大が期待できる。これにより、多様な分子への β,γ -不飽和ケトン骨格の導入が可能となり、薬剤全合成における有用な合成ルートの開発に繋がると考えている。

第2章 リパーゼ-TNS 複合体によるエステル加水分解反応²⁰

本章では、以前報告した HRP-TNS 系同様に、リパーゼと TNS を緩衝液中で静電的相互作用により結合し、リパーゼ - TNS 新規固定化酵素を開発することを目的とした。加えて、エステル加水分解反応におけるこの新規固定化酵素の触媒活性を評価し、TNS のリパーゼ固定化担体としての有用性を明らかにすることを目的とした。

2-1. TNS およびリパーゼ - TNS 複合体の物性評価

TNS の動的光散乱法 (DLS) による粒径分布測定結果を Fig. 2-1 に示す。Fig. 2-1 より、単一粒径分布を示していることが確認できる。これより、分散安定性の高いナノシートコロイド溶液が得られたといえる。測定結果より、この TNS の平均粒径は約 5.6 nm と求められた。また、TNS およびリパーゼ-TNS 複合体の X 線回折 (XRD) パターンを、Fig. 2-2 に示す。テトラチタン酸 ($\text{Ti}_4\text{O}_9^{2-}$) の (200) 回折ピークが、シャープなピークとして観察できる。この結果より、 $2\theta = 5^\circ$ にテトラブチルアンモニウムイオン (TBA^+) をインターカレートした層状チタン酸が生成したことが明らかになった。また、リパーゼ-TNS においても同様に XRD 測定を行ったところ、チタン酸の (200) 回折ピークが消失した。これは、リパーゼと TNS が強く結合し、TNS の結晶性が消失したためであると考えられる。

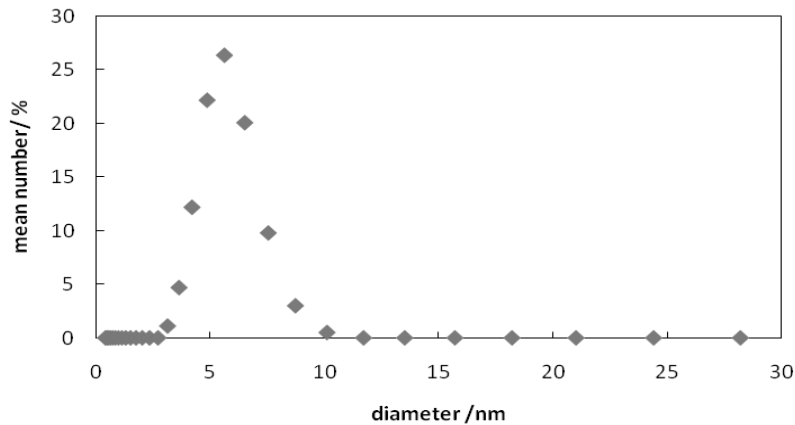


Fig. 2-1 DLS法によるTNSの粒径分布測定結果

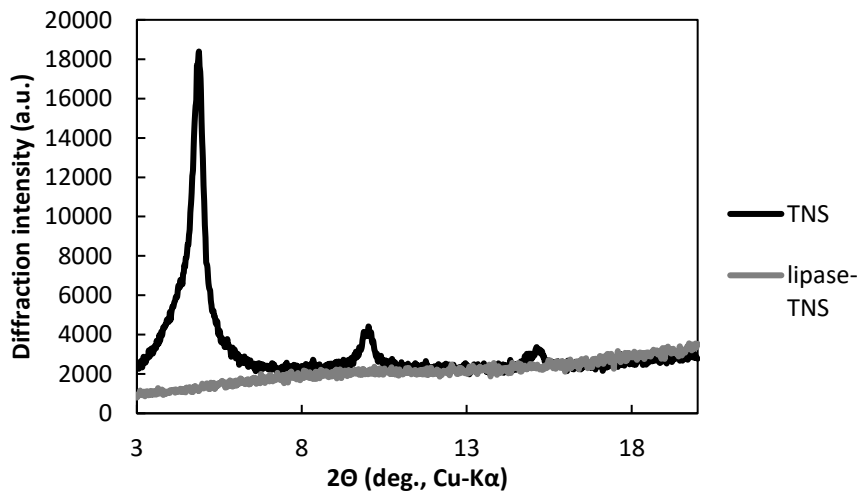


Fig. 2-2 TNSおよびリパーゼ-TNSのXRDパターン

2-2. リパーゼ-TNS複合体作成のpHの検討

Fig. 2-3に、リパーゼのTNSへの結合量のpH依存性を示す。Fig. 2-3より、pH = 4.0において、結合量が著しく増加した。これは、TNSとリパーゼがこのpH領域において逆符号の電荷をもつためである。本章で用いたリパーゼ (*Candida antarctica* Lipase B) の等電点はpI = 5.2であり、TNSの等電点はpI = 約2.0であるため、pH = 4.0においてはTNSは負電荷、リパーゼは正電荷を持つ。そのため、これらの間に強い静電的相互作用が働き (Fig. 2-4)、結合量が大きく増大したと考えられる。一方で、pH = 5.0以上におい

では TNS、リパーゼともに負電荷を持つと考えられる。それにも関わらず、若干のリパーゼが TNS と結合していることがわかる。これは、リパーゼ分子全体は負に帯電しているが、分子鎖中の一部のアミノ基は正に帯電しているため、それらが TNS と静電的相互作用により結合するためであると考えられる。また、静電的相互作用以外にリパーゼ分子の疎水性部位と、TNS 層間の TBA⁺イオンのブチル基間に疎水性相互作用が働くことにより若干のリパーゼが TNS へ結合したと考えられる (Fig. 2-5)。この結果より、リパーゼ - TNS 複合体触媒が HRP - TNS 同様に容易に調製可能であることが証明された。結合量が最も高い pH = 4.0 をリパーゼ - TNS 複合体作製における最適 pH と判断し、以後のエステル加水分解反応における触媒能の評価においては、主に pH=4.0 においてリパーゼ - TNS 複合体を作製した。

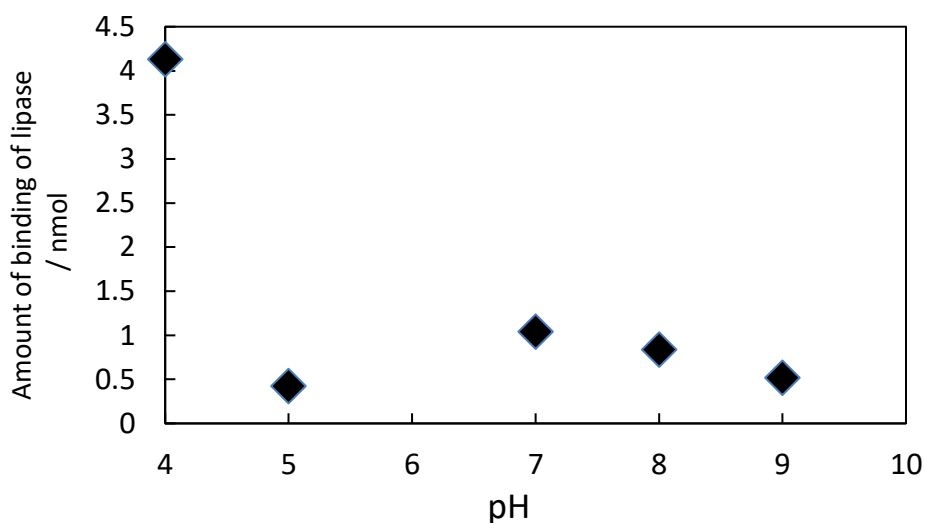


Fig. 2-3 リパーゼの TNS への結合量の pH 依存性

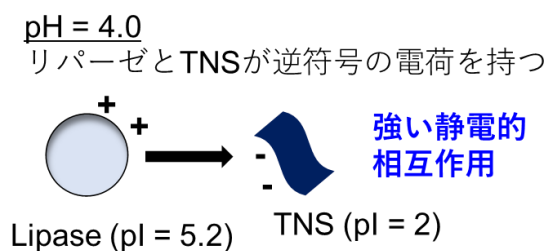


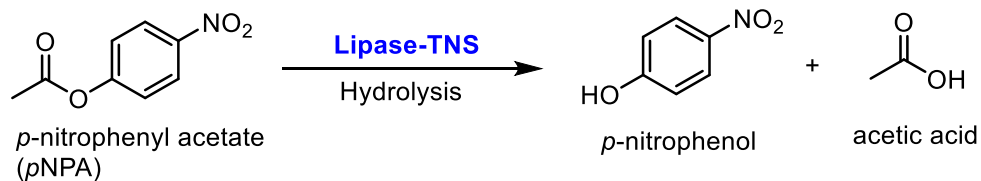
Fig. 2-4 pH = 4.0 におけるリパーゼと TNS 間に働く静電的相互作用



Fig. 2-5 リパーゼと TNS 間の疎水性相互作用

2-3. エステル加水分解反応におけるリパーゼ - TNS 複合体の触媒能評価

種々の濃度のリパーゼ (0.05 - 1.0 mg/mL) を用いて TNS 複合体を作製し、エステル加水分解反応における触媒能評価を行った。加水分解反応の基質としては、*p*-ニトロフェニルアセテート (*p*NPA) を用いた (Scheme 2-1)。加水分解生成物である *p*-ニトロフェノールは、波長 400 nm において最大吸収を持っているため、この波長における反応溶液の吸光度の時間変化測定により反応速度すなわちリパーゼ - TNS 複合体の触媒能を評価した。



Scheme 2-1 *p*NPA 加水分解反応

Table 2-1 に、遊離リパーゼ (Free リパーゼ) およびリパーゼ-TNS の加水分解反応速度パラメーターを、Fig. 2-6 にリパーゼ - TNS の触媒能 ($\text{Relative } V = V_{\text{lipase-TNS}} / V_{\text{free lipase}}$) のプロットをそれぞれ示す。低濃度のリパーゼ溶液において、TNS 複合化により遊離

(Free) リパーゼと比較して最大 8 倍以上の著しい活性向上が見られた。これは、筆者の以前の研究において調査した HRP-TNS 複合体触媒の場合 (約 2.5 倍) と比較しても非常に大きな活性向上である。このような著しい触媒能向上は、HRP-TNS 固定化酵素の場合と同様のリパーゼの TNS 複合化による液相分散性の向上に加えて、リパーゼは HRP に比べて疎水性が高いために先述の疎水性相互作用 (Fig. 2-5) がより強く働き、それに伴うリパーゼの親水性の向上により引き起こされたと考えられる。すなわち、リパーゼの TNS 複合化による親水性向上により、Free リパーゼと比較して水系溶媒中における反応基質との接触性が大きく改善したと考えられる。この結果より、リパーゼ - 無機ナノシート複合体の合成化学的有用性が示唆され、無機ナノシートがリパーゼの固定化担体として極めて有用であることが証明された。

Table 2-1 *p*NPA 加水分解反応における Free リパーゼおよびリパーゼ-TNS の触媒能 (反応速度パラメーター)

[lipase] / mg mL ⁻¹	V / nM s ⁻¹		Relative V
	free lipase	lipase-TNS	
1	3.68	4.68	1.27
0.5	2.46	8.67	3.52
0.25	2.03	16.5	8.13
0.1	1.77	13.7	7.74
0.05	1.76	14.1	8.01

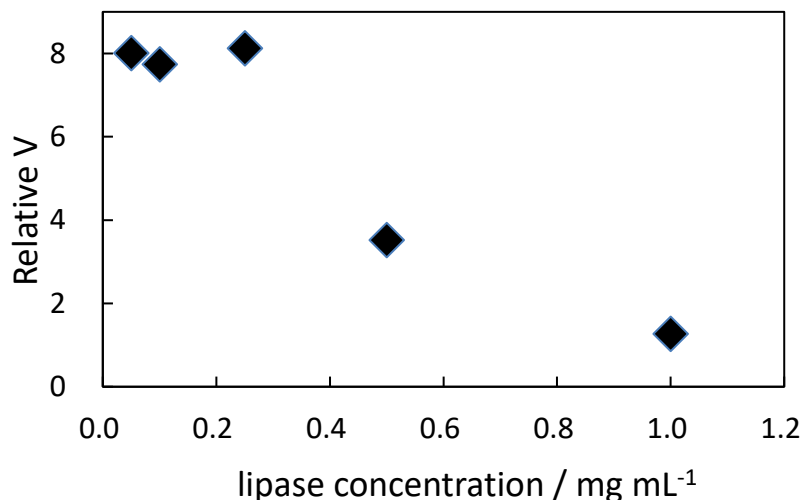


Fig. 2-6 リパーゼ - TNS 触媒による *p*NPA 加水分解反応における反応速度 (pH = 4.0, 310 K, Ti = 2.8 mM, *p*NPA = 1.4 mM)

2-4. リパーゼ - TNS の熱安定性の評価

TNS のような無機層状材料は先述の通り化学的安定性が高いこともよく知られている。そのため、これらに固定化した生体分子は、液相分散性向上による活性向上のみならず、化学的安定性の向上も期待できる。そこで本研究では、リパーゼ - TNS 複合体のさらなる有用性を証明するために、これの熱的安定性についても評価した。Fig. 2-7 に、熱処理前後の Free リパーゼおよびリパーゼ-TNS の酵素触媒による *p*NPA 加水分解反応速度を示す。熱処理は、90°C、20 分間行った。熱処理後、Free リパーゼについては活性が元の半分以下まで著しく減少した (残存活性: 約 49%)。それに対し、リパーゼ - TNS においては、熱処理前と比較して活性低下が 3 割未満に抑えられ (残存活性: 約 76%)、TNS 固定化によるリパーゼの耐熱性向上が観察できた。この結果より、無機ナノシート複合化による酵素の化学的安定性向上が証明された。以上、本章の研究結果より、リパーゼ - TNS 複合体が HRP-TNS 系と同様に容易に作製可能であることが証明され、高い活性と化学的安定性を兼ね備えた高機能な固定化酵素触媒の開発が示唆された。

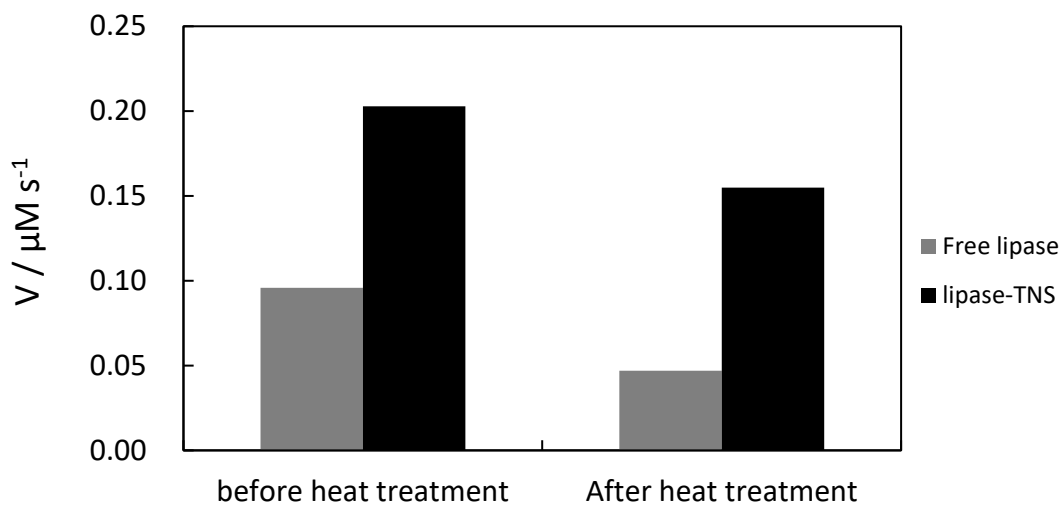


Fig. 2-7 Free リパーゼおよびリパーゼ - TNS 複合体の熱処理前後の酵素活性の変化
(pH = 7.0, 310 K, Ti = 2.8 mM, *p*NPA = 1.4 mM, Lipase = 1.0 mg/mL)

2-5. 実験項

2-5-1. TNS コロイド溶液の合成および物性評価

TNS コロイド溶液は、チタンテトライソプロポキシド (TTIP, $\text{Ti}(\text{OCH}(\text{CH}_3)_2)_4$) の水酸化テトラブチルアンモニウム水溶液 (TBAOH) による加水分解反応により合成した。TTIP、TBAOH および純水を室温で混合・攪拌し加水分解した。TBA/Ti のモル比は 1:1 とした。この混合溶液を 60°C で 2 h 強く攪拌した。無色の TNS コロイド溶液が得られた。その後限外ろ過フィルター (Amicon® Ultra 遠心フィルター) に TNS 分散液を入れ、限外濾過 (14000 × g, 60 min) によりイソプロパノール等の副生成物および過剰の TBAOH を除去した。続いて純水を濃縮されたコロイド溶液に加え、再び同様の操作を行った。これを TNS コロイド溶液の pH が 9.0-10.0 付近になるまで繰り返した。最後に逆遠心 (1000 × g, 10 min) によって TNS コロイド溶液を回収した。無色透明の TNS コロイド溶液が得られた。

TNS の粒径は動的光散乱 (DLS) 法により評価した。TNS コロイド溶液を純水で 100

倍希釈し、Sysmex 社の HPPS 粒子解析装置を用いて動的光散乱法 (Dynamic light scattering : DLS) によって TNS の粒径分布測定を行った。

TNS の結晶構造解析のために、X 線回折 (XRD) 測定を行った。TNS コロイド溶液を、ガラス基板の平滑な面に 50 μ L 滴下して真空乾燥させた。乾燥後、リガク社の粉末 X 線回折 (XRD) 装置 (RINT-2200; Cu-K α radiation ($\lambda = 0.15418$ nm), 40 kV, 40 mA) によって XRD 測定を行い、TNS の結晶構造解析を行った。リパーゼ - TNS 複合体については、pH=4.0 において TNS とリパーゼを室温で 30 分間混合し作製した。その後上記の TNS 同様の手順で XRD 測定を行った。

2-5-2. リパーゼの TNS に対する結合量評価

リパーゼの TNS に対する結合量調査は、緑色蛍光色素フルオレセインイソチオシアネート (FITC, C₂₁H₁₁NO₅S) 由来の蛍光を利用して行った。リパーゼとしては、Candida 由来リパーゼ (*Candida Antarctica* Lipase B : CALB) を用いた。FITC は、チオ尿素結合によってリパーゼの-NH₂ 末端と共有結合し、(FITC)-NH-CS-NH-(リパーゼ)結合を形成する。リパーゼを 100 mM の Tris-HCl 緩衝液に溶解し ($m_{lipase} = 1.0$ mg/mL)、0.1 M FITC / 100 mM pH 8.0 Tris-HCl 緩衝液溶液と同体積で混合し、40°C で 2 h 保持することによってリパーゼを FITC で修飾した (リパーゼ - FITC)。過剰量の FITC を取り除くために、リパーゼ - FITC 溶液を限外濾過 (12000 \times g, 60 min, 25 °C) 後、純水で 3 回洗浄した。得られたリパーゼ - FITC を逆遠心 (1000 \times g, 10 min, 25 °C) で回収し、この重量より回収されたリパーゼの濃度を求めた。マイクロプレートリーダーを用いてリパーゼ濃度範囲 0 - 0.5 mg/mL、pH = 8.0 におけるリパーゼ - FITC の FITC 由来の蛍光強度を測定し、蛍光検量線を作成した (マイクロプレートリーダー測定条件 : 25 °C, 励起フィルター 485 / 20, 蛍光フィルター 530 / 25, 感度 80)。得られたリパーゼ - FITC を 20 mM pH = 4.0 酢酸緩衝液、pH = 5.0 の 20 mM クエン酸緩衝液、または pH = 8.0 および 9.0 の 20

mM Tris-HCl 緩衝液にそれぞれ溶解し($m_{\text{lipase}} = 1.0 \text{ mg/mL}$)、TNS 7.3mM と同体積で混合および室温で 30 min 攪拌し、リパーゼ - FITC の TNS 複合化を行った (リパーゼ - FITC - TNS)。その後遠心分離 ($14000 \times g$, 60 min, 25°C) により未反応のリパーゼ - FITC とリパーゼ - FITC - TNS 複合体を分離した。遠心分離後のリパーゼ - FITC-TNS の上澄み液を 100 mM pH 8.0 Tris-HCl 緩衝液で 3 倍希釈し、マイクロプレートリーダーで FITC 由来の蛍光を測定した。先ほど作成した蛍光検量線より、未反応のリパーゼ-FITC の濃度を求め、これよりリパーゼの TNS への結合率および結合量を求めた。

2-5-3. *p*NPA 加水分解反応におけるリパーゼ - TNS 複合体の触媒能評価

エステル加水分解反応におけるリパーゼ - TNS 複合体の触媒活性を、pH=4.0 の酢酸緩衝液中で評価した。TNS コロイド溶液 ($[\text{Ti}] = 7.3 \text{ mM}$, 0.75 mL, 5.5 μmol) を、ポリスチレンキュベットに入れた種々の濃度のリパーゼを溶解した 100 mM 緩衝液 ($m_{\text{lipase}} = 0.05 - 1.0 \text{ mg/mL}$, 0.75 mL) に加えた。この混合溶液を室温で 30 分間強く攪拌した。*p*NPA 5.5 mM 水溶液 0.5 mL を調製したリパーゼ - TNS 溶液に 310 K において添加し、400 nm の吸光度時間変化を測定した。*p*NPA 水溶液添加後の吸光度の初期増加より加水分解速度を求めた。各リパーゼ濃度において free リパーゼにおいても同様に加水分解速度を測定し、リパーゼ - TNS と比較した。

2-5-4. リパーゼ - TNS 複合体の熱安定性の評価

エステル加水分解反応におけるリパーゼ - TNS 複合体の触媒活性を、pH=7.0 の Tris-HCl 緩衝液中で評価した。TNS コロイド溶液 ($[\text{Ti}] = 7.3 \text{ mM}$, 0.75 mL, 5.5 μmol) を、ポリスチレンキュベットに入れたリパーゼ/100 mM pH = 7.0 Tris-HCl 溶液 (0.75 mL) に加えた。この混合溶液を室温で 30 分間強く攪拌した後、90 °C で 20 分間保持した。その後、*p*NPA 5.5 mM 水溶液 0.5 mL をリパーゼ - TNS 溶液に 310 K において添加し、400

nm の吸光度時間変化を測定した。先述の触媒能評価同様の手順で *p*NPA 水溶液添加後の吸光度の初期増加より加水分解速度を求めた。free リパーゼにおいても同様に熱処理後の加水分解速度を測定し、リパーゼ - TNS の場合と比較した。

第3章 リパーゼ- α -ZrP NS 複合体によるエステル交換反応の効率化

前章では、水系溶媒中でのエステル加水分解反応におけるリパーゼ - 無機ナノシート複合体の触媒としての有用性を明らかにした。しかしながら、一般的な有機合成反応においては有機溶媒中で反応が行われることが多いが、酵素 - 無機ナノシート複合触媒の有機溶媒中での反応への利用は未だに皆無である。そこで本章では、リパーゼ - 無機ナノシート複合体を有機溶媒中におけるエステル交換反応に適用することで、この新規固定化酵素触媒の合成化学的有用性をさらに高めることを目的とした。具体的には、光学活性化合物の合成に頻繁に利用されているラセミ体アルコールの速度論的光学分割を伴うエステル化反応において、無機ナノシート複合化によるリパーゼの触媒能を評価した。ナノシートとしては、有機溶媒中におけるリパーゼ分子の液相分散性向上を目的として、TNS より疎水性が高いことが知られている層状リン酸ジルコニウム (α -ZrP NS) を用いた。また反応基質であるアルコールとしては、合成化学的有用性が高いアリルアルコールを用いた。

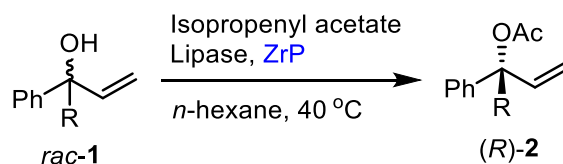
3-1. 最適条件の検討

初めに、ラセミ体アルコールのエステル交換反応における最適なリパーゼ触媒の検討を行った所、Lipase AK Amano が最も反応が進行したためこれを最適リパーゼとし、以後の検討において用いた (Supporting information 参照)。続いて、基質適用範囲を第2級アルコール **1a** および第3級アルコール **1b** について、無機ナノシートを添加せずに調査した (Table 3-1, Free lipase)。その結果、第3級アルコールについては反応が全く進行しないことが確認された。これは、第3級アルコールの嵩高さのために、リパーゼの活性中心部位に結合した酢酸イソプロペニルに攻撃し難いためであると考えられる。第2

級アルコールについては、24 時間反応後に反応が完結し目的物のキラルアセテートが 42%の収率で得られた。

続いて、この第2級アルコールを用いて最適な α -ZrP NS 添加量の検討を行った (Table 3-1, Entries 1-4)。トルエン中または THF で剥離した α -ZrP NS 溶液 (0.25M) を 30 μ L 添加した場合には、目的物の収率向上は見られず (Entries 1 and 2)、反応終了後の溶液に白色の凝集体が見られた。そこで、添加量を 10 μ L に減少させた所反応時間の短縮が見られ 16 時間で目的物が 45%の収率で得られた (Entry 3)。さらに添加量を下げた場合には反応時間の短縮は見られなかった (Entry 4)。これより、0.25 M α -ZrP NS/ THF 溶液を 10 μ L 添加する条件を最適と判断した。

Table 3-1 α -ZrP NS 溶液の最適添加量の検討 (**1a** : R = H, **1b** : R = Me)



Entry	Substrate	ZrP / μ L	Reaction time / h	Yield of 2 (% ^a)	ee ₂ (% ^b)
1 ^c	1a	30	22	16	>99
2 ^d	1a	30	21	16	>99
3 ^d	1a	10	16	45	96
4 ^d	1a	5	19	33	98
	1a	-	24	42	>99
Free lipase	1b	-	18	0	-

All reactions were performed on a 2.0 mmol reaction scale using lipase 25 mg/mmol, 2 equiv isopropenyl acetate and 0.25 M ZrP solution in *n*-hexane (5 mL) at 40 °C. ^aIsolated yield. ^bDetermined by chiral HPLC analysis. ^cUsing ZrP/toluene solution. ^dUsing ZrP/THF solution.

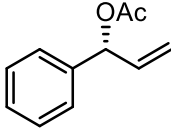
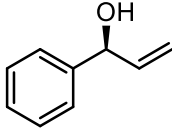
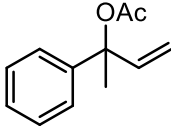
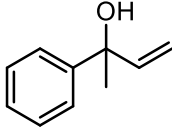
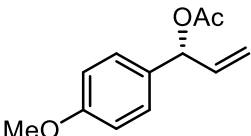
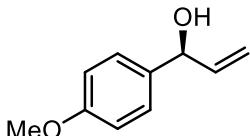
3-2. 基質適用範囲の検討

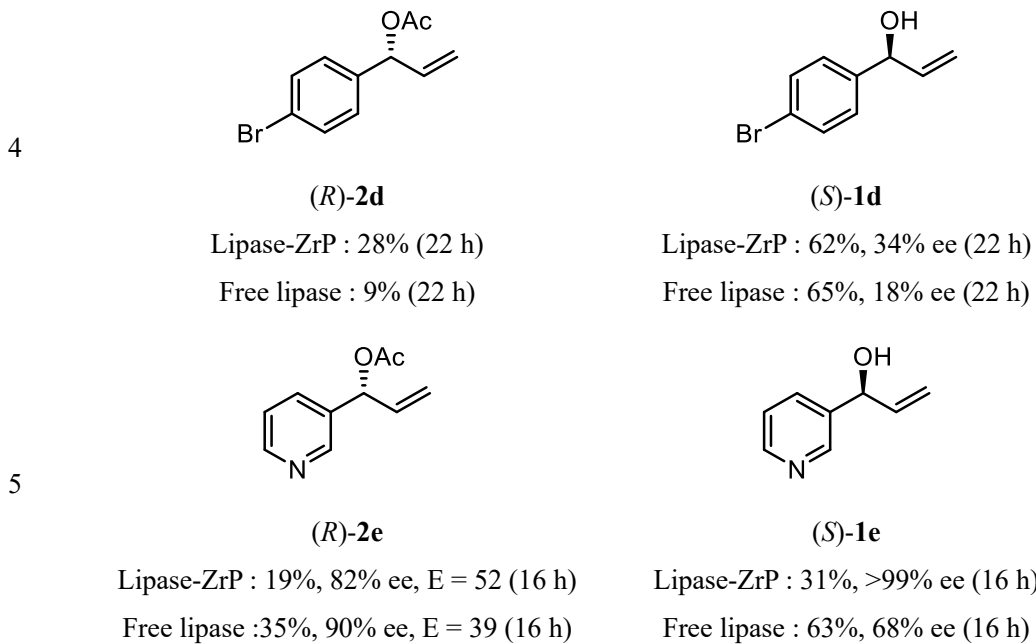
続いて、最適条件の下でアルコールの芳香環上の置換基の効果について調査した

(Table 3-2)。第 3 級アルコールを基質とした場合には、 α -ZrP NS 添加後においても反応の進行は見られなかった (Entry 2)。この結果より、 α -ZrP NS そのものにエステル交換反応を促進する効果はなく、触媒であるリパーゼの反応系中における液相分散性の向上によって反応の促進の役割を果たしていることが示唆された。芳香環上に電子供与性基をもつ基質を用いた場合には α -ZrP NS 添加による収率の向上は見られなかったが、エナンチオマーの反応速度比を表す E 値がわずかに向上した (Entry 3)。芳香環上に電子求引性基を持つ基質では、無置換のアルコール (**1a**) と比較しても大きな収率向上が見られ、遊離リパーゼと比較して約 3 倍の収率向上となった (Entry 4)。これは、電子求引性基によるアルコキシドアニオンの安定化によるものと考えられる。すなわち、アルコキシドアニオンの安定化により基質の酸性度が向上し、 α -ZrP NS 表面のオキシドアニオンによるプロトン引き抜きが促進されたことで、リパーゼ活性中心部位に結合した酢酸イソプロペニルへの攻撃が促進され、大きな収率向上が見られたと考えられる (Scheme 3-1)。最後に、重要な薬剤や電子材料としての利用が期待される化合物の部分骨格となるピリジル基をもつアルコールについても、エステル交換反応は進行し E 値の向上が見られた (Entry 5)。電子供与性基を持つ基質では、全体的に収率の大きな向上は見られなかったが、E 値の向上が見られた (Entries 3 and 5)。これは、電子供与性基のカチオン安定化効果により、 α -ZrP NS 表面の OH 基によりアルコールの O 原子がプロトン化され易くなったことで反応速度は低下したが (Scheme 3-2)、それと引き換えにエナンチオ選択性が向上したためであると考えられる。また全体的に、リパーゼの α -ZrP NS 複合化による生成物のエナンチオ選択性の大きな低下は見られなかった。本章の結果より、疎水性が高い無機ナノシートを用いることで、有機溶媒中においても酵素 - 無機ナノシート複合触媒が調製可能であり酵素の分散性向上の作用をもつことが明らかとなった。特に電子求引性置換基を含む基質において大きな収率向上が見られたこと、さらには電子供与性基を含む基質においても立体選択性向上が示唆されたことから、通

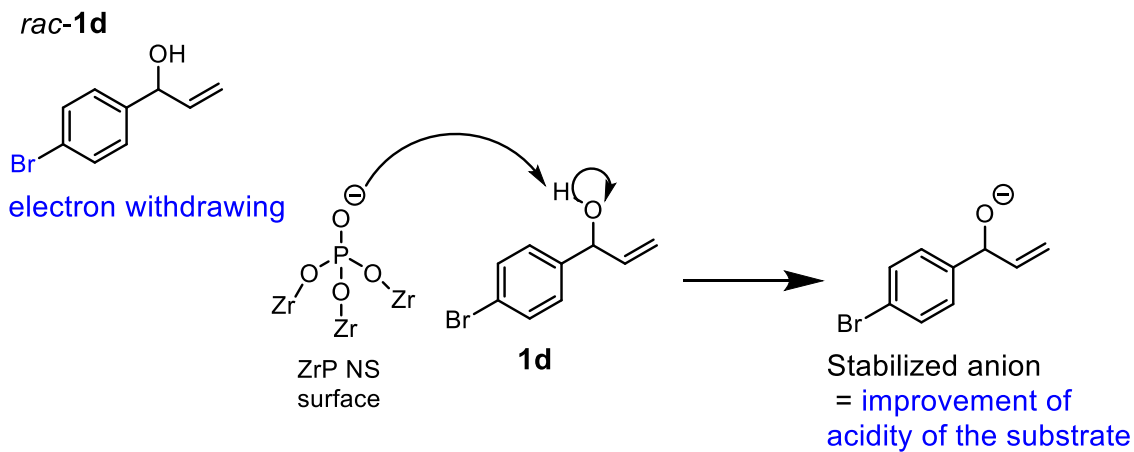
常の有機反応系における無機ナノシートの有用性が明らかとなった。今後、さらに幅広い基質適用範囲の検討を行うことで、より複合体触媒の有用性が明確になる可能性があるといえる。

Table 3-2 リパーゼ - α -ZrP NS 複合体による種々の芳香族アリルアルコールのエステル交換反応 (R = Me or H)^{a-c}

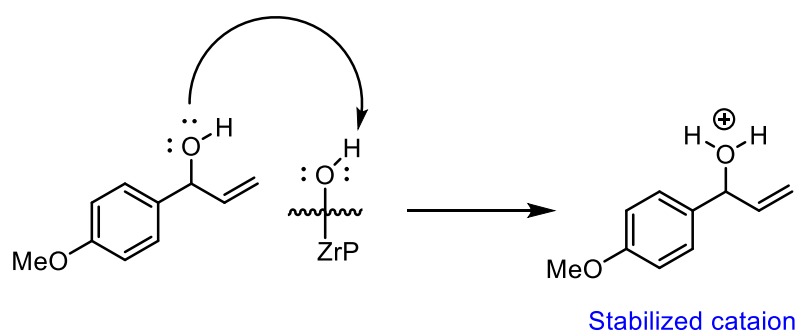
Entry	Allylic ester	Allylic alcohol
1	 <p>(R)-2a</p> <p>Lipase-ZrP : 45%, 96% ee, E = 259 (16 h) Free lipase : 42%, >99% ee, E = 1057 (24 h)</p>	 <p>(S)-1a</p> <p>Lipase-ZrP : 44%, >99% ee (16 h) Free lipase : 47%, >99% ee (24 h)</p>
2	 <p>2b</p> <p>Lipase-ZrP : 0% (10 h) Free lipase : 0% (18 h)</p>	 <p>rac-1b</p> <p>Lipase-ZrP : 91% (10 h) Free lipase : 93 % (18 h)</p>
3	 <p>(R)-2c</p> <p>Lipase-ZrP : 27%, 92% ee, E = 39 (16 h) Free lipase : 30%, 88% ee, E = 30 (16 h)</p>	 <p>(S)-1c</p> <p>Lipase-ZrP : 57%, 50% ee (16 h) Free lipase : 52%, 62% ee (16 h)</p>



^aAll reactions were performed on a 2.0 mmol reaction scale using lipase 25 mg/mmol, 2 equiv isopropenyl acetate and 0.25 M ZrP solution in n-hexane (5 mL) at 40°C. ^bIsolated yield. ^cDetermined by chiral HPLC analysis. ^dE values were calculated by ee of alcohols and acetates according to formula.^{21,22}



Scheme 3-1 電子求引性基によるアルコキシドアニオンの安定化



Scheme 3-2 α -ZrP NS 表面の水酸基による電子供与性基を含むアルコールのプロトン化

3-3. 実験項

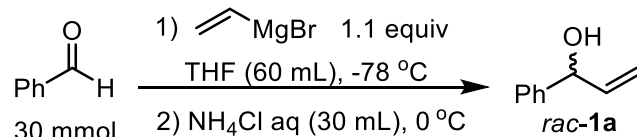
3-3-1. α -ZrP NS ($\text{Zr}(\text{HPO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$) の合成および剥離

塩化酸化ジルコニウム八水和物 (10.0 g) を純水 100 mL に溶解し、続いてリン酸水溶液 (85%, 11.83 mL) を添加した。この混合物を 90°C で 24 時間攪拌し、室温まで冷却した。得られた α -ZrP NS の白色固体は、遠心分離 (22,400×g, 10 min, 20°C) により回収し、未反応の化学種を除去するために純水で数回洗浄した。洗浄後の α -ZrP NS の固体は、70°C の真空下で数時間乾燥した。粉状の α -ZrP NS 粉末が得られた。

上記の操作により得られた α -ZrP NS 粉末を、水酸化テトラペンチルアンモニウムを含む THF またはトルエン中で剥離した。剥離は以下の 2 段階のステップにより引き起こされる：(1) ZrP 層間の H^+ とテトラペンチルアンモニウムカチオンのイオン交換反応、(2) ZrP 層とテトラペンチルアンモニウムカチオン間の弱い静電的相互作用による層間剥離。初めに、剥離剤である水酸化テトラペンチルアンモニウム溶液を、臭化テトラペンチルアンモニウムのアニオン交換反応により調製した。臭化テトラペンチルアンモニウム (0.5 g) を THF またはトルエン (2.53 mL) とエタノール (0.5 mL) の混合溶媒に溶解した。これに、アニオン交換樹脂を目視で約半分の量まで加えた。この溶液を室温で 12 時間攪拌し、臭化物イオンの水酸化物イオンへのイオン交換を行った。その後、得ら

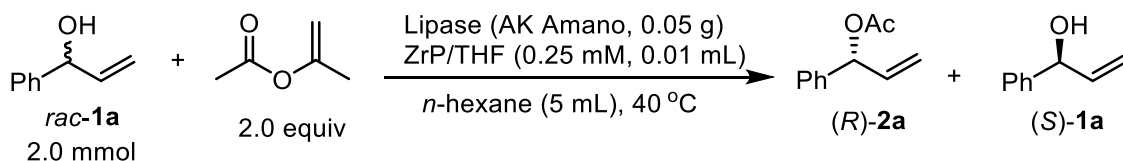
れた剥離剤溶液 (1.4 mL) を α -ZrP NS 粉末 (0.125 g) の THF またはトルエン (0.25 mL) 懸濁液に加え、室温で 24 時間攪拌することで α -ZrP NS のコロイド溶液を得た。

3-3-2. ラセミ体アリルアルコールの合成



ラセミ体アリルアルコール 1-フェニル-2-プロペン-1-オール (*rac-1a*) を、グリニャール反応により合成した。攪拌子を入れた二口フラスコにラバーセプタムおよび三方コックを取り付け、窒素置換を 3 回行った。このフラスコに THF (60 mL) およびベンズアルデヒド (3.18 g, 30 mmol) をシリンジで入れ、 -78°C (ドライアイス-アセトンバス) に冷却した。この溶液に臭化ビニルマグネシウムの 1.0 M THF 溶液 (33 mL, 33 mmol) をゆっくり滴下し、約 2 時間攪拌した。TLC により反応完結を確認後、反応溶液を氷浴につけ飽和塩化アンモニウム水溶液 (30 mL) により反応をクエンチし、反応溶液を純水 (30 mL) で希釈した。その後、エーテル抽出を 3 回行った。有機層をまとめて飽和食塩水 (50 mL) で 1 回洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。反応溶液をろ過および濃縮することで粗生成物を黄色液体として得た。カラムクロマトグラフィー(展開溶媒: *n*-hexane/EtOAc = 85:15)による精製後、目的物を 90% の単離収率で得た (収量 3.609 g, 26.9 mmol, 無色液体)。

3-3-3. リパーゼによるアリルアルコールのエステル交換反応



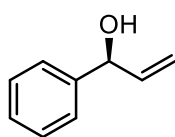
50 mL 二口フラスコにリパーゼ (Lipase AK Amano) 0.05 g を入れ、ラバーセプタムお

よび三方コックを取り付け、フラスコ内の窒素置換を3回行った。これに無水 *n*-ヘキサン (5 mL) および3-3-1節で調整した α -ZrPNS の THF コロイド溶液 (0.01 mL) を入れ、40 °C で30分間攪拌し、リパーゼと α -ZrPNS の複合化を行った。その後1-フェニル-2-プロペン-1-オール **1a** (0.27 g, 2.0 mmol)、アシルドナーとして酢酸イソプロペニル(0.4 g, 4.0 mmol)を順に加え、16時間攪拌した。TLCによる反応進行の確認後、ろ過および濃縮によりアリルアルコール **1a** とアリルアセテート **2a** を含む混合物を淡黄色液体として得た。カラムクロマトグラフィー(*n*-hexane/EtOAc = 95/5→80/20)によって(*S*)-**1a** と(*R*)-**2a** がそれぞれ44%と45%の単離収率で無色液体として得られた。なお、**1a** および **2a** の立体配置は、キラル HPLC 分析により決定した。

3-3-4. スペクトルデータ

1b のみキラル HPLC 分析結果および文献の報告より絶対立体配置を決定した¹⁵。その他の光学活性化合物の立体配置については、**1b** の絶対立体配置より類推した。

(*S*)-1-phenylprop-2-en-1-ol (**1a**)



Chiral HPLC analysis (CHIRALCEL OJ-H column), 96:4 hexane/isopropanol at 1.0 mL/min flow rate; t_R (*S*)-enantiomer (major) = 19.542 min, t_R (*R*)-enantiomer (minor) = 25.242 min.

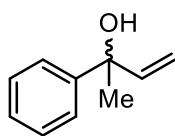
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 2.03 (d, J = 3.2 Hz, 1H), 5.20 (d, J = 9.2 Hz, 2H), 5.35 (d, J = 17.2 Hz, 1H), 6.05 (ddd, J = 17.1, 10.5, 5.6 Hz, 1H), 7.29-7.38 (m, 5H).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 75.3, 115.3, 126.1, 127.7, 128.5, 140.3, 142.8.

HRMS (EI⁺) m/z calc'd for C₉H₁₀O [M]⁺: 134.0732, found 134.0732.

rac-2-phenylbut-3-en-2-ol (**1b**)

Chiral HPLC analysis (CHIRALCEL OJ-H column), 98:2 hexane/isopropanol at 1.0 mL/min flow



rate; t_R (*S*)-enantiomer = 22.500 min, t_R (*R*)-enantiomer = 28.142 min.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 1.66 (s, 3H), 1.96 (s, 1H), 5.16 (d, J = 10.8 Hz, 1H),

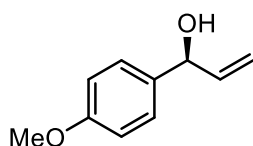
5.31 (d, J = 17.2 Hz, 1H), 6.18 (dd, J = 17.2, 10.8 Hz, 1H), 7.24-7.49 (m, 5H).

$^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ 29.3, 75.7, 112.6, 124.7, 126.5, 128.0, 144.8, 146.7.

HRMS (EI⁺) m/z calc'd for $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}$ [M]⁺: 148.0888, found 148.0887.

2.8

(*S*)-1-(4-methoxyphenyl)prop-2-en-1-ol (1c)



Chiral HPLC analysis (CHIRALCEL OJ-H column), 95:5

hexane/isopropanol at 1.0 mL/min flow rate; t_R (*S*)-enantiomer (major) =

31.367 min, t_R (*R*)-enantiomer (minor) = 36.350 min.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 2.00 (s, 1H), 3.78 (s, 3H), 5.17 (t, J = 1.4 Hz, 1H), 5.19 (t, J = 1.6 Hz,

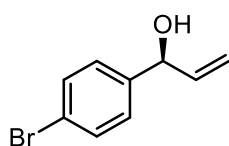
1H), 5.33 (dt, J = 17.1, 1.4 Hz, 1H), 6.04 (ddd, J = 17.2, 10.4, 6.0 Hz, 1H), 6.88 (d, J = 8.8 Hz, 2H),

7.29 (d, J = 8.4 Hz, 2H).

$^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ 55.3, 74.7, 113.9, 115.1, 127.7, 135.0, 140.5, 159.2.

HRMS (EI⁺) m/z calc'd for $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}_2$ [M]⁺: 164.0837, found 164.0837.

(*S*)-1-(4-bromophenyl)prop-2-en-1-ol (1d)



Chiral HPLC analysis (CHIRALCEL OJ-H column), 97:3 hexane/isopropanol

at 1.0 mL/min flow rate; t_R (*S*)-enantiomer = 21.158 min, t_R (*R*)-enantiomer =

23.867 min.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 2.06 (d, J = 15.6 Hz, 1H), 5.16 (d, J = 6.4 Hz, 1H), 5.21 (d, J = 10.4

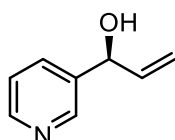
Hz, 1H), 5.33 (d, J = 17.2 Hz, 1H), 5.99 (ddd, J = 16.9, 10.5, 5.7 Hz, 1H), 7.24 (dd, J = 6.4, 5.2 Hz,

2H), 7.48 (dd, J = 6.8, 2.0 Hz, 2H).

$^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ 74.7, 115.7, 121.3, 128.1, 131.6, 139.8, 141.5.

HRMS (EI⁺) *m/z* calc'd for C₉H₉⁷⁹BrO [M]⁺: 211.9837, C₉H₉⁸¹BrO [M]⁺: 213.9816 found 211.9837, 213.9813.

(S)-1-(pyrid-3-yl)prop-2-en-1-ol (1e)



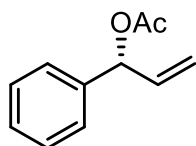
Chiral HPLC analysis (CHIRALCEL OJ-H column), 90:10 hexane/isopropanol at 1.0 mL/min flow rate; *t_R* (*S*)-enantiomer (major) = 7.818 min, *t_R* (*R*)-enantiomer (minor) = 8.923 min.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 2.07 (s, 1H), 5.21(d, *J* = 0.8 Hz, 1H), 5.23 (d, *J* = 6.0 Hz, 1H), 5.36 (d, *J* = 17.2 Hz, 1H), 6.02 (ddd, *J* = 16.8, 10.4, 5.8 Hz, 1H), 7.28 (dd, *J* = 8.0, 4.8 Hz, 1H), 7.73 (dd, *J* = 9.2, 2.0 Hz, 1H), 8.42 (dd, *J* = 4.8, 1.2 Hz, 1H), 8.51 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 72.7, 115.9, 123.5, 134.4, 138.5, 139.7, 147.8, 148.3.

HRMS (EI⁺) *m/z* calc'd for C₈H₉NO [M]⁺: 135.0684, found 135.0684.

(R)-1-phenylprop-2-en-1-yl acetate (2a)



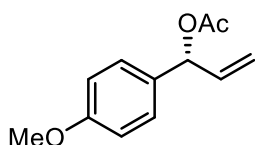
Chiral HPLC analysis (CHIRALCEL OJ-H column), 98:2 hexane/isopropanol at 1.0 mL/min flow rate; *t_R* (*S*)-enantiomer (minor) = 9.008 min, *t_R* (*R*)-enantiomer (major) = 10.300 min.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 2.11 (s, 3H), 5.23-5.32 (m, 2H), 6.01 (ddd, *J* = 17.2, 10.8, 6.0 Hz, 1H), 6.27 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 7.29-7.36 (m, 5H).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 21.3, 76.2, 117.0, 127.3, 128.1, 128.6, 136.2, 139.2, 169.7.

HRMS (EI⁺) *m/z* calc'd for C₁₁H₁₂O₂ [M]⁺: 176.0837, found 176.0836.

(R)-1-(4-methoxyphenyl)prop-2-en-1-yl acetate (2c)



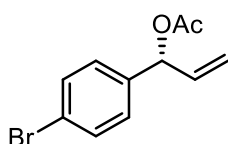
Chiral HPLC analysis (CHIRALCEL OJ-H column), 98:2 hexane/isopropanol at 1.0 mL/min flow rate; t_R (*S*)-enantiomer (minor) = 15.592 min, t_R (*R*)-enantiomer (major) = 18.542 min.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 2.09 (s, 3H), 3.80 (s, 3H), 5.21-5.29 (m, 2H), 6.01 (ddd, $J = 15.9$, 11.5, 4.5 Hz, 1H), 6.23 (d, $J = 5.6$ Hz, 1H), 6.88 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 7.26-7.34 (m, 2H).

$^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ 21.3, 55.3, 75.8, 114.0, 116.4, 128.9, 131.1, 136.3, 159.5, 170.0.

HRMS (EI^+) m/z calc'd for $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{O}_3$ [$\text{M}]^+$: 206.0943, found 206.0943.

(*R*)-1-(4-bromophenyl)prop-2-en-1-yl acetate (2d)



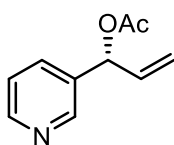
Chiral HPLC analysis (CHIRALCEL OJ-H column), 98:2 hexane/isopropanol at 1.0 mL/min flow rate; t_R (*S*)-enantiomer (major) = 7.733 min, t_R (*R*)-enantiomer (minor) = 9.775 min.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 2.11 (s, 3H), 5.25-5.31 (m, 2H), 5.97 (ddd, $J = 17.2$, 10.5, 5.5 Hz, 1H), 6.21 (d, $J = 6.0$ Hz, 1H), 7.23 (dd, $J = 6.8$, 2.0 Hz, 2H), 7.48 (dd, $J = 6.2$, 1.8 Hz, 2H).

$^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ 21.2, 75.4, 114.0, 117.3, 122.2, 128.6, 131.9, 135.8, 137.7, 169.7.

HRMS (EI^+) m/z calc'd for $\text{C}_{11}\text{H}_{11}^{79}\text{BrO}_2$ [$\text{M}]^+$: 253.9942, $\text{C}_{11}\text{H}_{11}^{81}\text{BrO}_2$ [$\text{M}]^+$: 255.9922, found 253.9942, 255.9918.

(*R*)-1-(pyrid-3-yl)prop-2-en-1-yl acetate (2e)



Chiral HPLC analysis (CHIRALPAK AD-H column), 95:5 hexane/isopropanol at 1.0 mL/min flow rate; t_R (*R*)-enantiomer (major) = 14.177 min, t_R (*S*)-enantiomer (minor) = 18.173 min.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 2.12 (s, 3H), 5.30-5.35 (m, 2H), 6.00 (ddd, $J = 17.0$, 10.8, 5.6 Hz, 1H), 6.29 (d, $J = 5.6$ Hz, 1H), 7.27-7.31 (m, 1H), 7.67 (dt, $J = 8.0$, 1.8 Hz, 1H), 8.57 (dd, $J = 4.8$, 2.0

Hz, 1H), 8.62 (d, $J = 1.6$ Hz, 1H).

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 21.0, 73.9, 117.8, 123.3, 134.4, 134.8, 135.3, 148.8, 149.4, 169.7.

HRMS (EI^+) m/z calc'd for $\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{NO}_2$ $[\text{M}]^+$: 177.0790, found 177.0789.

第4章 アリルアルコール誘導体の遷移金属触媒反応による有用化

合物への変換

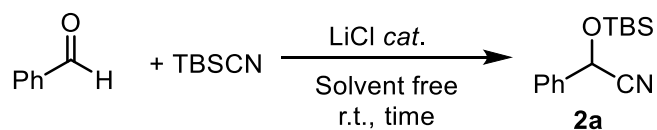
本章では、前章で得られたキラルなアリルアルコールおよびアセテートの有用化合物への変換のための遷移金属触媒変換反応を行い、これら化合物の合成化学的有用性を高めることを目的とした。P. A. Evans らにより報告された Rh 触媒を用いた TBS 保護シアノヒドリンによるアリル位置換反応について、アリル化合物の基質適用範囲の拡大を目的とした。

4-1. TBS 保護シアノヒドリンの合成

報告された文献の手順に従い、求核剤として用いる TBS 保護シアノヒドリンの合成を行った²³。文献通りの触媒量で反応を行った場合、単離収率が 19%と低かった (Table 4-1, Entry 1, 収量:0.2317 g, 無色液体)。そこで、塩化リチウム溶液の添加量を増やして再び同じ条件で反応を行ったところ、収率が向上した (Entry 2)。しかしながら、さらに塩化リチウム溶液の添加量を増やすと、収率は低下した (Entry 3)。また、この反応後の溶液に白い固体が析出している様子が観察された。これは、塩化リチウムが析出したものであると考えられるが、析出した原因については分からない。

最適触媒量 (S/C=1000) において、上記と同様の手順で 10 mmol スケールで **2a** を合成した (Entry 4)。しかしながら、単離収率が報告よりも 20%以上低かったため、反応時間を 24 h に伸ばして **2a** を合成した (Entry 5)。これにより単離収率が 87%に向上した。また、スケールをさらに 20 mmol に上げた際にも、収率の低下は見られなかった (Entry 6)。

Table 4-1 TBS 保護シアノヒドリンの合成



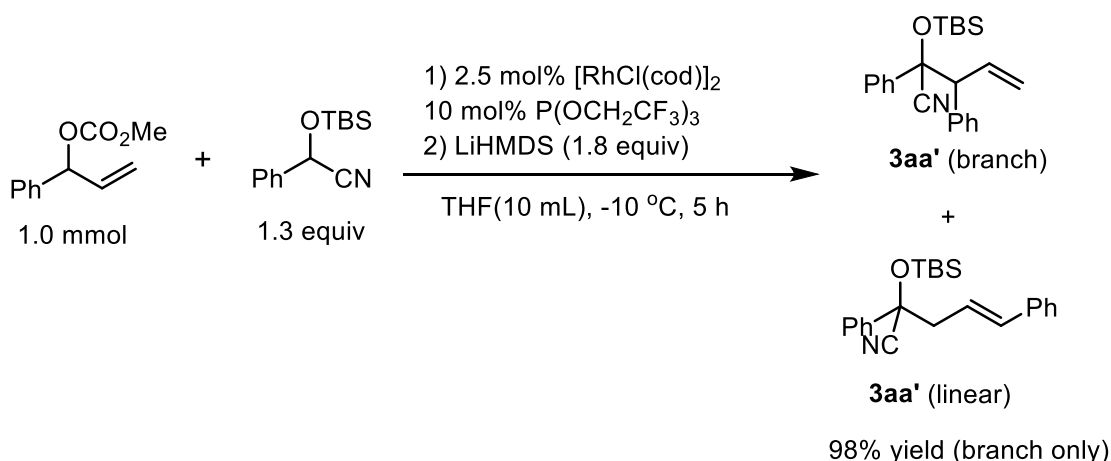
Entry	scale / mmol	time / h	S / C ^b	Isolated yield of 2a / %
1	5	5	10000	19
2	1	5	1000	75
3	1	5	200	16
4	10	5	1000	70
5	10	24	1000	87
6	20	24	1000	90

^aAll reactions were performed using 1.06 equiv of TBSCN and 60 mM LiCl / THF solution.

^bSubstrate / catalyst molar ratio.

4-2. 第2級アリルカーボネートを基質としたRh触媒による変換反応

前章で得られたアリルアルコールから誘導化可能な第2級アリルカーボネートについて、Evansらにより報告されたTBS保護シアノヒドリンを求核剤としたRh触媒アリル位置換反応を行った。文献の手順を参考に反応を行った所、目的物であるβ,γ-不飽和ケトンの前駆体であるbranch体のシアノヒドリン付加体**3aa'**が、約1:1のジアステレオマー混合物として98%の単離収率で得られた(収量:0.3543 g, 0.975 mmol, 半透明の無色液体)。また、linear体の生成は見られなかった。この結果から、アリルカーボネートを基質とした場合には、置換基の種類に関係なくこの反応は位置選択的に進行し、高い収率で目的物を与えることが確認できた。



Scheme 4-1 第2級アリルカーボネートの TBS 保護シアノヒドリンを求核剤とした Rh 触媒アリル位置換反応

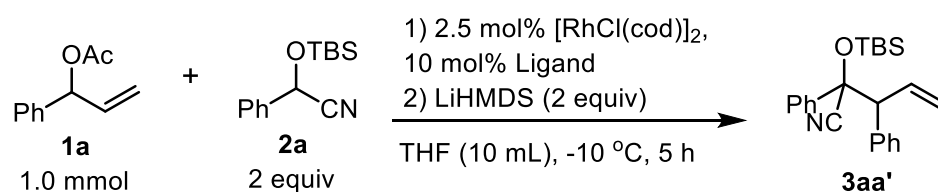
4-3. Rh 触媒を用いた第2級アリルアセテートのアリル位置換反応

4-3-1. 配位子の検討

さらなる基質一般性の拡大を目的として、前章で得られた第2級アリルアセテートを基質としてこの反応の条件検討を行った。最初に、多様なホスファイトおよびホスフィン配位子を用いて、最適配位子の検討を行った。Evans の報告および先ほどの第2級アリルカーボネートを基質とした反応において高い収率で目的物を与えたトリス (2,2,2-トリフルオロエチル) ホスファイトを用いた場合には、複雑混合物が得られ、目的物の生成は確認できなかった (Table 4-2, Entry 1)。トリフェニルホスファイトおよびトリメチルホスファイトを用いた場合には、複雑混合物が得られたが微量の目的物の生成が確認できた (Entries 2 and 3)。嵩高いホスファイトを用いた場合には、52%の収率で目的物が位置異性体の生成なしに得られた (Entry 4, ジアステレオマー比= 約 1:1)。トリフェニルホスフィンを用いた場合には、17%の収率で上記同様に目的物が得られ (Entry 5)、アリルアセテートを基質とした場合には、ホスファイト配位子の有効性が示唆された。電子供与性基をもつホスフィン配位子においては、それぞれ 41%、13%の収率で目的物

が得られた (Entries 6 and 7)。しかしながら、トリ (*p*-メトキシフェニル) ホスフィンを用いた場合には、位置異性体の生成が見られ、反応系が汚く収率が低下した (Entry 7)。トリ *n*-ブチルホスフィンを用いた場合において、若干の不純物を含むものの、高い収率で目的物が得られた (Entry 8)。なお、目的物は全て 1:1 のジアステレオマー混合物として得られた。

Table 4-2 配位子の検討



Entry	Ligand	Yield of 3aa' / %
1	P(OCH ₂ CF ₃) ₃	0 (complex mixture)
2	P(OPh) ₃	trace (complex mixture)
3	P(OMe) ₃	trace (complex mixture)
4	P(O-2,4-di ^t BuC ₆ H ₃) ₃	52
5	PPh ₃	17
6	P(<i>o</i> -tol) ₃	41
7	P(<i>p</i> -MeOC ₆ H ₄) ₃	13 ^{a)}
8	P(<i>n</i>-butyl)₃	99^{b)}

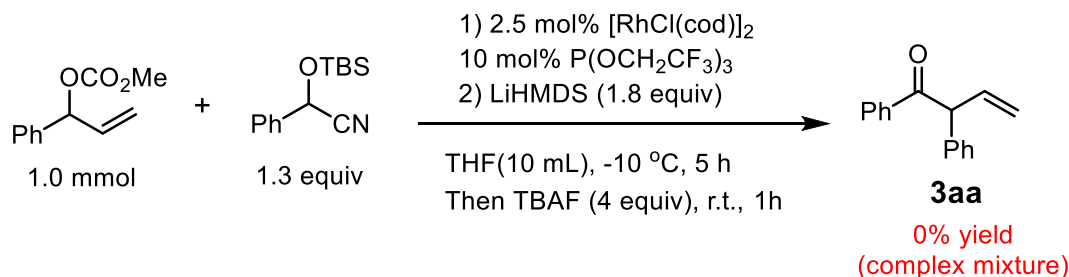
a) b:l = 87:13 で、位置異性体が生成

b) 10%程度の不純物を含む

4-3-2. TBS 基の脱保護条件の検討

4-2 項におけるアリルカーボネートの変換反応において、最終的な目的物である不飽

和ケトンを得るために TBAF による TBS 基の脱保護を試みた。しかしながら、TBAF 添加後室温で 1 時間攪拌したところ、精製後に複雑混合物が得られ、目的物の単離はできなかった (Scheme 4-2)。

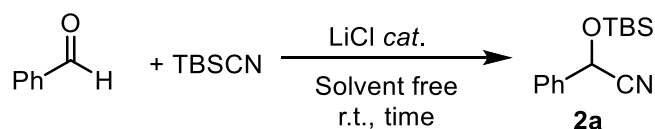


Scheme 4-2 アリルカーボネートの Rh 触媒アリル位置換反応および TBAF による TBS 基の脱保護による不飽和ケトンの合成

この結果より、第 2 級アリルカーボネートおよびアセテートを基質とした場合には更なる脱保護条件の検討 (TBAF 添加量、反応温度等) が必要であると考えられる。

4-4. 実験項

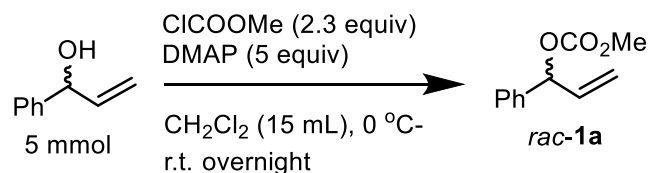
4-4-1. TBS 保護シアノヒドリンの合成



報告された文献の手順に従って、TBS 保護シアノヒドリン **2a** の合成を行った¹⁸。最初に、触媒として用いる 60 mM の塩化リチウムの THF 溶液を、塩化リチウムと THF を混合後、塩化リチウムを溶解させるために 10 分間超音波処理することで調製した。*tert*-ブチルジメチルシリルシアニドおよび攪拌子を入れた 50 mL ニロフラスコに、ラバーセプタムおよび三方コックを取り付け、3 回窒素置換を行った。その後、このフラスコにベンズアルデヒドを添加・攪拌し、最初に調製した塩化リチウム溶液を滴下した。反応は発熱的に進行した。反応後、減圧蒸留 (1-2 Torr, $95\text{ }^\circ\text{C}$) により目的物を単離精製し

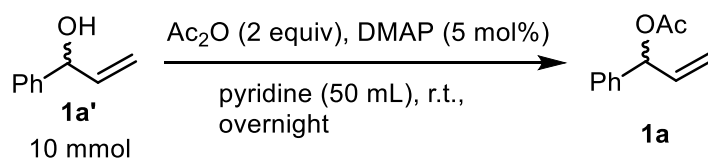
た。

4-4-2. 第2級アリルアルコールのカーボネートへの変換



50 mL の二口フラスコに DMAP (25 mmol, 3.05 g) を入れ、このフラスコにラバーセプタムと三方コックを取り付け、3 回窒素置換を行った。このフラスコに CH₂Cl₂ (15 mL) および 1-フェニル-2-プロペン-1-オール (5 mmol, 0.671 g) を入れ、氷浴につけ攪拌した。これにクロロギ酸メチル (11.5 mmol, 0.89 g) を添加した。反応溶液を室温に戻し、一晩攪拌した。塩化アンモニウム水溶液 (10 mL) により反応を停止し、水層を CH₂Cl₂ で 3 回抽出した。有機層をまとめて硫酸マグネシウムで乾燥させ、ろ過および濃縮を行った。カラムクロマトグラフィー (展開溶媒: *n*-hexane/EtOAc = 97:3) による精製後、第2級アリルカーボネートを 90% の単離収率で得た (収量: 0.8608 g, 4.48 mmol, 淡黄色液体)。

4-4-3. 第2級アリルアセテートの合成



反応条件検討においては、ラセミ体のアリルエステル (*rac*-**1a**) を用いて調査を行おうと考え、これをアセチル化反応により合成した。DMAP (5 mol%, 61 mg) および攪拌子を二口フラスコに入れ、これにラバーセプタムおよび三方コックを取り付け、窒素置換を 3 回行った。その後、このフラスコにピリジン (50 mL)、**1a'** (10 mmol, 1.342 g) および無水酢酸 (20 mmol, 2.04 g) を入れ、室温で一晩攪拌した。反応完結を TLC により確認後、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液による洗浄およびエーテル抽出を行った。さら

に、有機層をまとめて飽和硫酸銅水溶液と純水で1回ずつ洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。カラムクロマトグラフィー (展開溶媒: *n*-hexane/EtOAc = 95:5) による精製後、単離収率 90 %で目的物 **1a** を得た(収量 1.5783 g, 8.96 mmol, 無色液体)。

4-4-4. 第2級アリルアセテートの TBS 保護シアノヒドリンを求核剤とした Rh 触媒アリル位置換反応

[RhCl(cod)]₂ (0.025 mmol, 12.4 mg) を入れた 50 mL の二口フラスコにラバーセプタムと三方コックを取り付け、フラスコ内を3回窒素置換した。これに THF 4.0 mL および配位子 (0.1 mmol) を加え、室温で約 5 分間攪拌した。(=Rh 触媒溶液)。

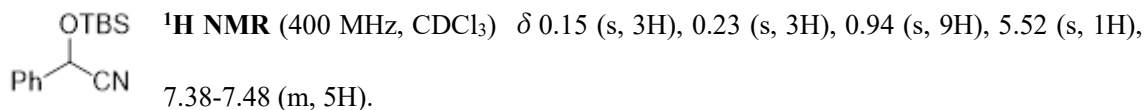
別の 50 ml 二口フラスコに同様にラバーセプタムおよび三方コックを取り付け、窒素置換を行った。このフラスコに THF 6 mL、**2a** (2.0 mmol, 0.494 g) を入れ、フラスコを-10°Cに冷却した。さらにこれに LiHMDS 溶液 (1.3 M THF 溶液、2.0 mmol, 1.54 mL) をゆっくり添加し、約 30 分間攪拌した (=求核剤溶液)。

その後、Rh 触媒溶液のフラスコを-10 °C に冷却し、**1a** (1.0 mmol, 0.176 g)、先ほど調製した求核剤溶液全量を順に添加し、5 時間攪拌した。反応は TLC によりモニターし、反応終了後に純水およびジエチルエーテルを加え、抽出を行った。有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥し、ろ過および濃縮後に粗生成物をカラムクロマトグラフィー(展開溶媒: *n*-hexane/Et₂O = 97:3) により精製した。

4-4-5. スペクトルデータ

1-フェニル-2-プロペン-1-オール **1a'** およびそれに対応するアセテート **1a** についてのスペクトルデータは前章と同様であるためここでは省略する。

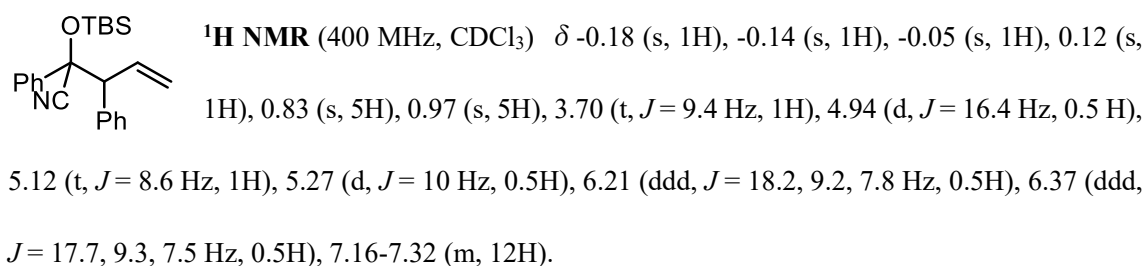
2-*tert*-butyldimethylsilyloxy-2-phenylacetone (2a)



¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ -5.3, -5.2, 18.1, 25.5, 63.9, 119.2, 126.0, 128.8, 129.1, 136.4.

HRMS (EI⁺) *m/z* calc'd for C₁₀H₁₁NO₂ [M]⁺: 247.1392, found 247.1393.

2-tert-butyl dimethylsilyloxy-2,3-diphenyl-4-pentenitrile (3aa')



¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ -4.5, -4.2, -3.9, -3.7, 18.5, 26.0, 63.4, 78.8, 78.9, 119.6, 119.7, 119.9, 120.0, 126.0, 126.1, 127.3, 127.4, 127.86, 127.88, 127.95, 129.5, 129.9, 134.5, 135.0, 137.4, 137.8, 139.1, 139.5.

※ジアステレオマー比 = 1:1

HRMS (EI⁺) *m/z* calc'd for C₂₃H₂₉NOSi [M]⁺: 363.2018, found 363.2022.

第5章 結論・総括

第1章では、研究背景および研究目的について述べた。消化酵素の一種であるリパーゼによるエステル加水分解およびエステル交換反応は合成化学的有用性が高く期待が高まっている。しかしながら、酵素は生体高分子であるために一般的に有機溶媒中などの非生理的条件下においては化学的安定性が低い。この問題点を解決するために、酵素を触媒とした合成反応では酵素の安定性向上のためにこれを無機物等の表面に結合させた固定化酵素がよく用いられるが、これにより酵素の運動が制限され、見かけの酵素活性の低下を招くという新たな問題が生じている。これらの問題点のために、現在では酵素を触媒とした有機合成反応はまだ本格的な実用化は達成されていない。そこで本研究では、酵素および固定化酵素の欠点を改善することによる酵素を触媒とした有機合成反応の利用範囲の拡大を目的とした。具体的には、リパーゼ分子と物理化学的に安定かつ液相中で高い分散性を示す無機ナノシート（チタン酸ナノシート: TNS または層状リン酸ジルコニウム: α -ZrPNS）を静電的相互作用によって結合し、新規無機—バイオ複合触媒を開発することを目的とした。酵素を無機ナノシートと結合させることで、酵素分子の液相分散性の向上による活性増加、そして安定性向上が期待できると考え、それによる酵素を触媒とした有機合成反応の効率化が期待できると考えた。

第2章では、水系溶媒中におけるエステル加水分解反応について、リパーゼ - 無機ナノシート複合体触媒の活性について検討を行った。無機ナノシートとしてチタン酸ナノシート (TNS) を用い、*p*-ニトロフェニルアセテート (*p*NPA) の加水分解反応により酵素活性を評価した。TNS は、チタンテトライソプロポキシド (TTIP) の加水分解反応により合成し、動的光散乱法 (DLS) による粒子径評価および X 線回折による結晶構造解析により、分散安定性が高いチタン酸ナノシートコロイド溶液が作製できたことが確認できた。その後、リパーゼと TNS の複合化における最適 pH を決定するため、pH=4.0-

9.0においてリパーゼの TNS に対する結合量評価を行った。pH = 4.0 において結合量が大きく増加したことから、これを最適 pH とした。pH = 4.0 においてリパーゼと TNS を結合し加水分解反応の触媒として用いることで、遊離リパーゼ (Free lipase) と比較して最大 8 倍以上の著しい触媒活性向上が確認された。さらに、TNS 複合化におけるリパーゼの安定性向上の評価のために耐熱性評価も行った所、90°C で 20 分間熱処理を行った後の活性評価において、Free lipase と比較して酵素活性失活が約半分に抑えられた。これらの結果より、高い活性と優れた安定性を両立した高機能固定化酵素触媒の開発が示唆され、酵素触媒有機合成反応における酵素担体としての無機ナノシートの有用性が明らかとなった。

第 3 章では、リパーゼ-無機ナノシート複合体を一般的な有機合成反応系に応用することを目的とし、アルコールのエステル交換反応による光学分割を行った。キラルアリルアルコールおよびその誘導体は、立体特異的アリル位置換反応の出発物として有用であるため、本研究ではラセミ体アリルアルコールを基質として用いることで、効率的なキラルなアリルアルコール誘導体の合成を目的とした。ここでは、無機ナノシートとしてチタン酸ナノシートより疎水性が高い層状リン酸ジルコニウム (α -ZrP NS) を用い、リパーゼ - 無機ナノシート複合体触媒を作製した。なお、本章では、有機溶媒中で反応を行うため、リパーゼと α -ZrP NS の複合化を *n*-ヘキサン中で行った。最適条件において、反応完結までの時間が遊離リパーゼでは 24 時間であったのに対し、リパーゼ-ZrP 系では 16 時間と反応時間の短縮が見られた。これより、有機溶媒中においても酵素 - 無機ナノシート複合体が調製可能であることが明らかとなり、疎水性無機ナノシートが酵素の活性向上に寄与することが明らかとなった。さらに数種類のアリルアルコールを用いて反応を行ったところ、特に芳香環上に電子求引性置換基であるブロモ基を持つ基質において、遊離リパーゼと比較して目的物であるアリルアセテートの大きな収率向上が観察された。また、電子供与性基であるメトキシ基およびピリジル基を含む基質につ

いては、反応の立体選択性の向上が示唆された。この研究結果より、無機ナノシートが有機溶媒中での一般的な有機合成反応系においても酵素固定化担体として有用であることが証明された。

さらに第4章では、前章で得られたキラルアシルアルコールおよびアセテートの合成化学的有用性を高めるために、これら化合物を出発物とした遷移金属触媒による有用化合物への変換を試みた。アシルアルコールを対応するアシルカーボネートに変換後、TBS保護シアノヒドリンを求核剤としたRh触媒アシル位置換反応を行った所、高い収率および位置選択性で目的物を得た。また、アシルアセテートを出発物として同様の反応を試みた場合にも、最適な配位子を用いた場合に目的物が高い収率および位置選択性で得られた。本研究で用いたアシルカーボネートおよびアシルアセテートのこのRh触媒アシル位置換反応への適用例はなく、この触媒反応における基質一般性の拡大が示唆された。

以上、本研究では、新規なリパーゼ - 無機ナノシート固定化酵素の合成化学的有用性が明らかにされた。これより無機ナノシートは酵素を触媒とした合成反応の一般性拡大に大きく貢献する可能性があるといえる。また、本研究で得られたキラルなアシル化合物は、今後立体特異的アシル位置換反応により様々な有用化合物の出発原料となりうることを期待される。しかしながら、酵素 - 無機ナノシート複合触媒による反応およびアシルアセテートを基質としたRh触媒アシル位置換反応におけるさらなる基質適用範囲の調査、アシル位置換反応におけるTBS基脱保護の条件の検討および光学活性な基質の適用等、まだ課題は残されている。今後、これらについてさらに詳細に調査を行うことで、本研究で開発された新規固定化酵素の有用性、そして得られた光学活性化合物の利用価値が高まることを期待している。

参考文献

- 1) K. M. Koeller and C. H. Wong, *Nature*, 2001, **409**, 232.
- 2) A. Ghanem and H. Y. Aboul-Enein, *Chirality*, 2005, **17**, 1.
- 3) E. Sataniello, P. Ferraboschi and P. Grisenti, *Enzyme Microb. Technol.*, 1993, **15**, 367.
- 4) M. Ahmed, T. Kelly and A. Ghanem, *Tetrahedron*, 2012, **68**, 6781.
- 5) F. V. Rantwijk, M. A.P. J. Hacking and R. A. Sheldon, *Monatshefte für Chemie*, 2000, **131**, 549.
- 6) R. D. Schmid and R. Verger, *Angew. Chem. Int. Ed.* 1998, **37**, 1608.
- 7) B.P. Dwivedee, S. Soni, M. Sharma, J. Bhaumik, J. K. Laha and U. C. Banerjee, *Chemistry select*, 2018, **3**(9), 2441.
- 8) 清田洋正 「生物有機化学がわかる講義」、講談社
- 9) Shi, L.; Gao, Q.; Wu, Y.; Chen, Z.; Liu, A. *Biosensors and Bioelectronics*. 2009, **25**, 948.
- 10) K. Kamada, A. Yamada and N. Soh, *RCS, Adv.* 2015, **5**, 85511.
- 11) K. Kamada, A. Yamada, M. Kamiuchi, M. Tokunaga, D. Ito, *Methods in Enzymology*, 2016, **571**, 113.
- 12) B. M. Trost, H. Yang, O. R. Thiel, A. J. Frontier and C. S. Brindle, *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, **129**, 2206.
- 13) N. Trongsirawat, M. Li, A. P. Escudero, B. Yucel and P. J. Walsh, *Adv. Synth. Catal.*, 2019, **361**, 502.
- 14) P. A. Evans, S. Oliver and J. Chae, *J. Am. Chem. Soc.* 2012, **134**, 19314.
- 15) P. A. Evans and S. Oliver, *Org. Lett.* 2013, **15** (22), 5626.
- 16) B. W. H. Turnbull, S. Oliver and P. A. Evans, *J. Am. Chem. Soc.* 2015, **137**, 15374.
- 17) B.W. H. Turnbull, J. Chae, S. Oliver and P. A. Evans, *Chem. Sci.*, 2017, **8**, 4001.
- 18) J. C. Hethcox, S. E. Shockley and B. M. Stoltz, *Org. Lett.* 2017, **19**, 1527.
- 19) S. E. Shockley, J. C. Hethcox and B. M. Stoltz, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2017, **56**, 11545.

- 20) A. Yamada, K. Kamada, T. Ueda, T. Hyodo, Y. Shimizu and N. Soh, *RSC Adv.* 2018, **8**, 20347.
- 21) R. Lihammar, R. Millet and J. E. Bäckvall, *J. Org. Chem.*, 2013, **78**, 12114.
- 22) C. S. Chen, Y. Fujimoto, G. Girdaukas and C. J. Sih, *J. Am. Chem. Soc.*, 1982, **104**, 7294.
- 23) N. Kuroono, M. Yamaguchi, K. Suzuki and T. Ohkuma, *J. Org. Chem.*, 2005, **70**, 6530.

Supporting Information

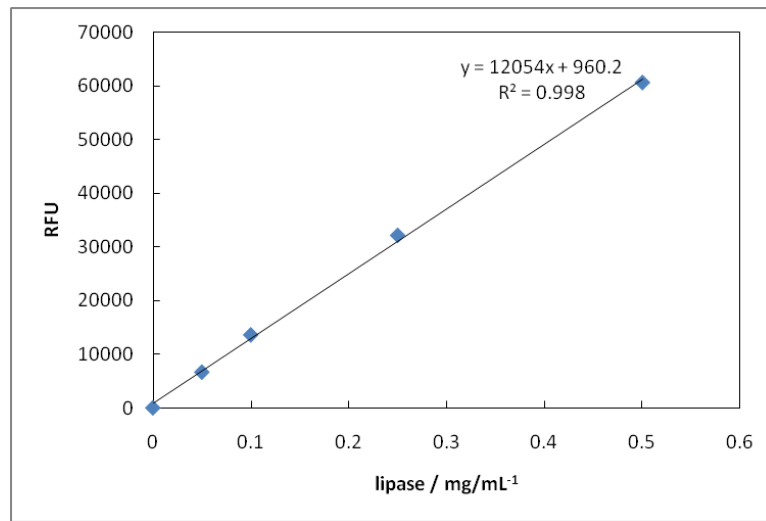


Fig. S-1 リパーゼ - FITC の蛍光検量線

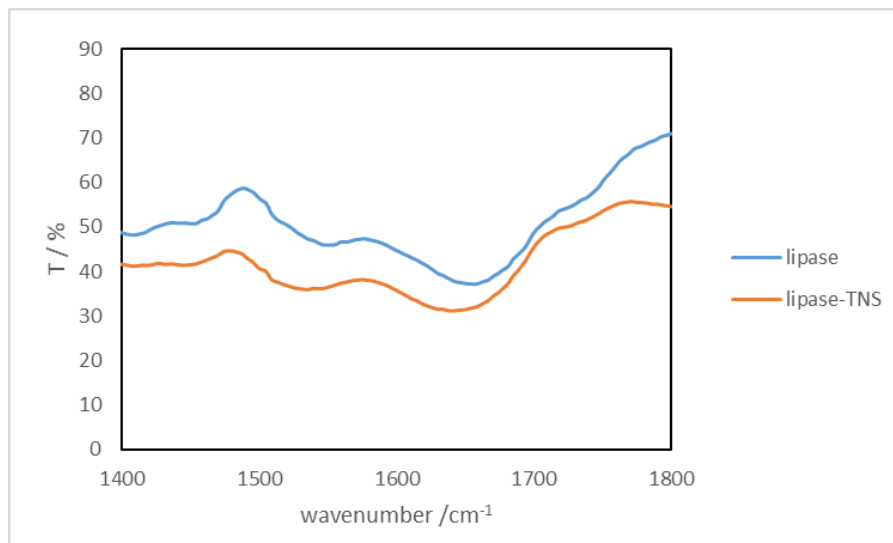


Fig. S-2 リパーゼの TNS 複合化前後の IR 測定結果 (アミド結合部位)

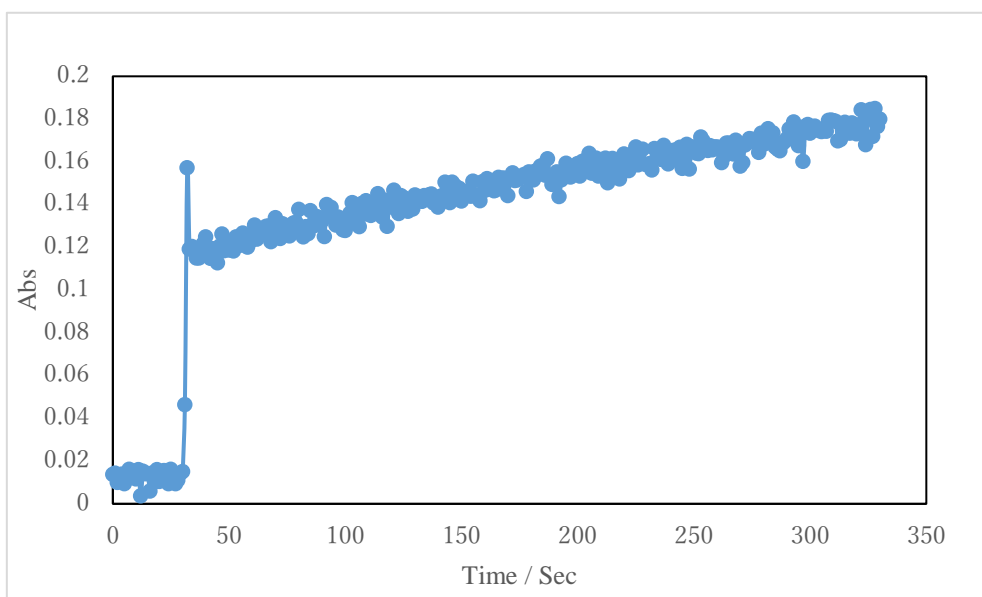


Fig. S-3 *p*NPA 加水分解反応におけるリパーゼ - TNS の吸光度時間変化 (400 nm, pH = 4.0, lipase 0.05 mg/mL)

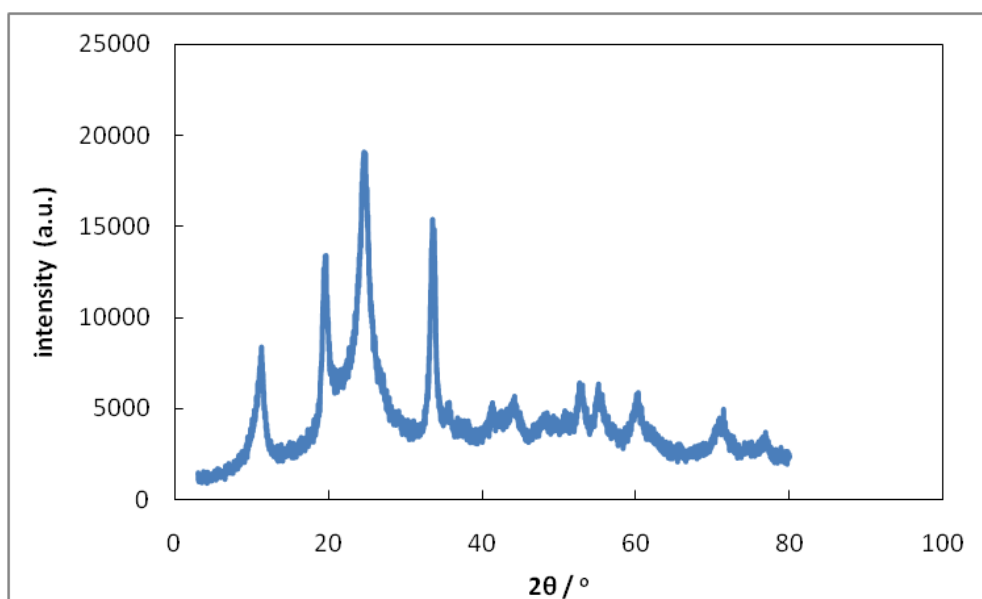
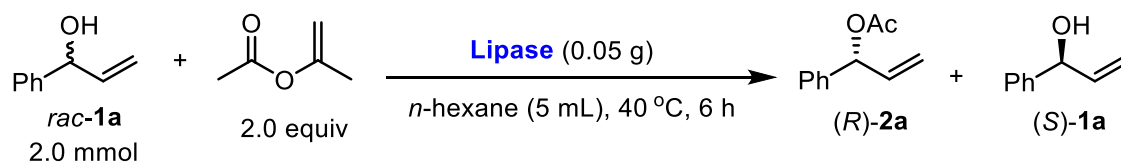


Fig. S-4 α -ZrP NS の XRD パターン

アリルアルコールのエステル交換反応における最適リパーゼの検討



Entry	Lipase
1	ブタ膵臓由来
2	Lipase AK Amano
3	Lipase AS Amano
4	Lipase AYS Amano
5	Lipase G Amano 50
6	Lipase PS Amano SD

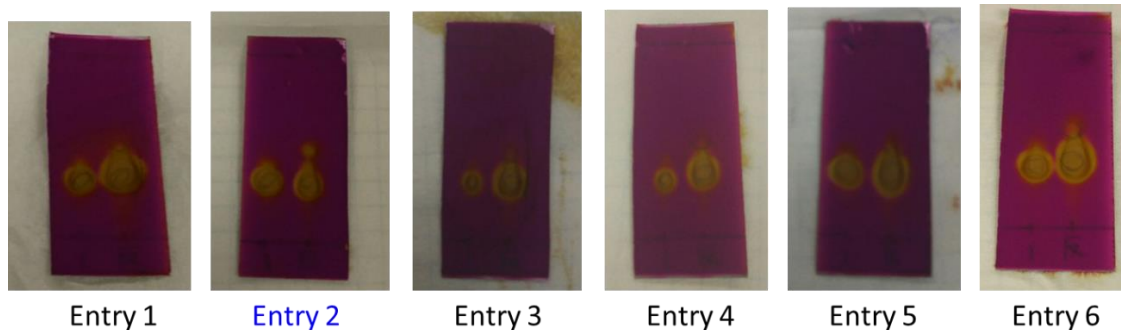
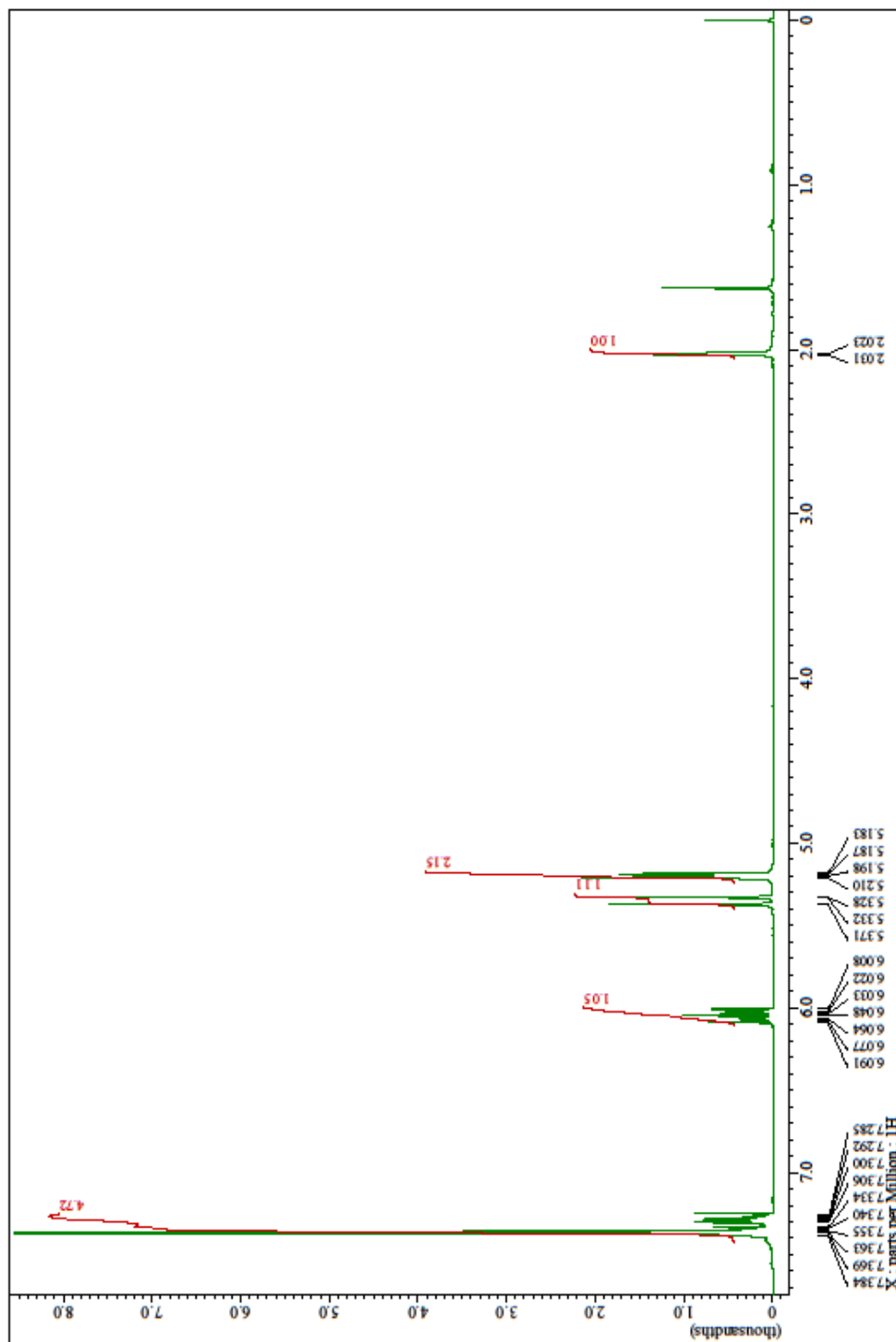


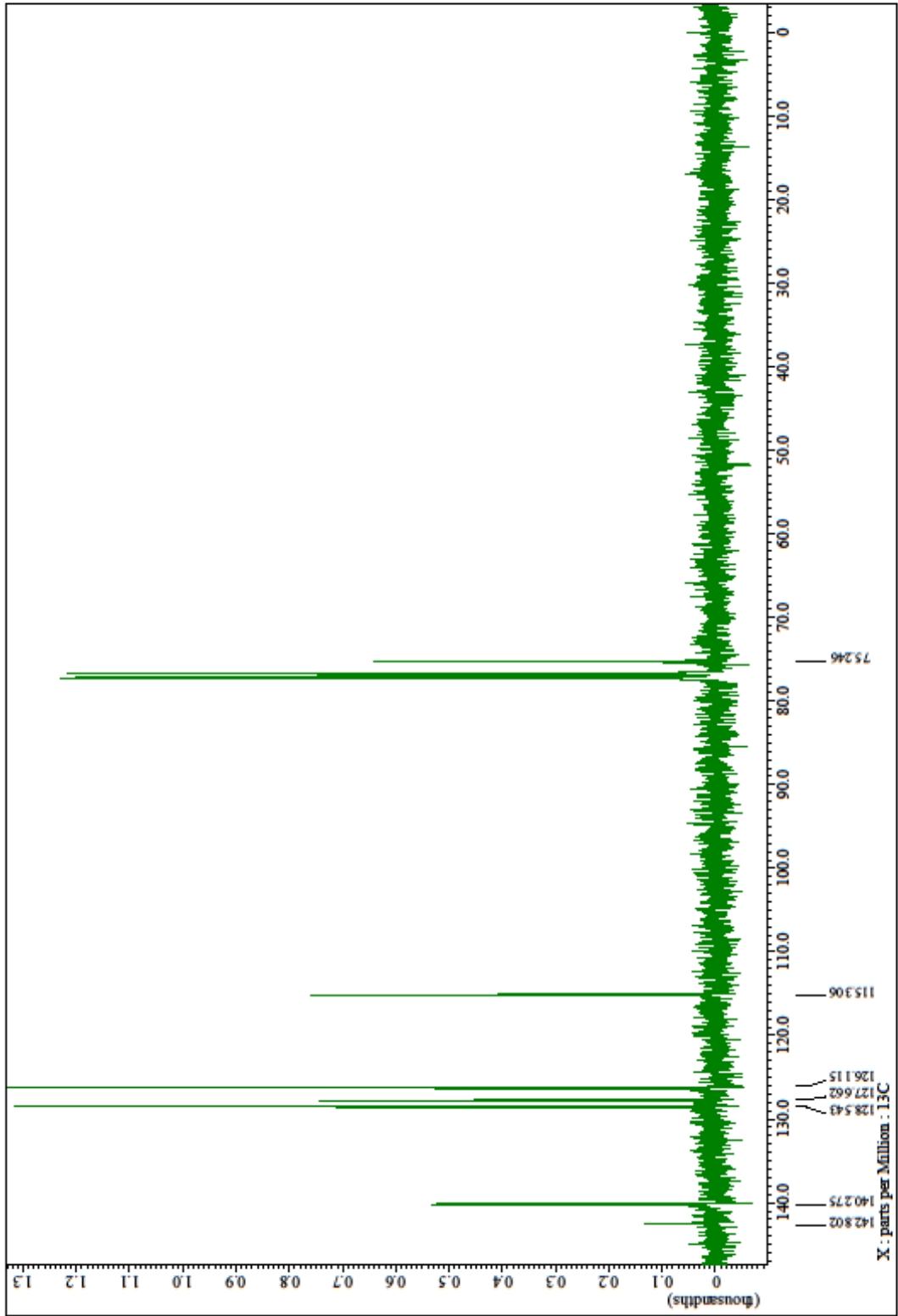
Fig. S-5 反応から 6 h 後の TLC 分析結果

(展開溶媒 : *n*-hexane/EtOAc = 80:20、検出 : 254 nm の UV 吸収および KMnO_4 -アルカリ
 検出薬、**1a**: $R_f = 0.3$, **2a**: $R_f = 0.5$)

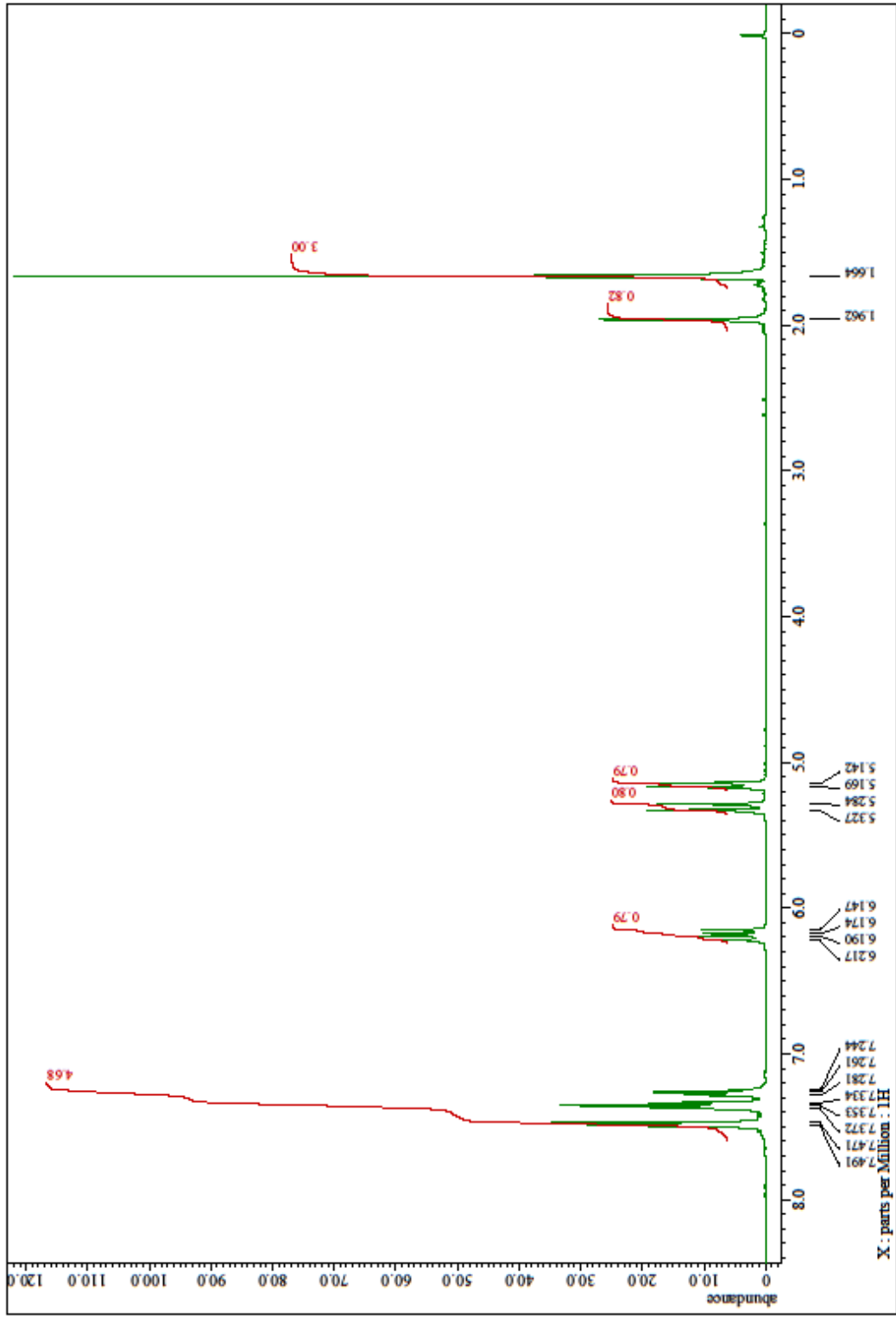
NMR スペクトル (第3章)

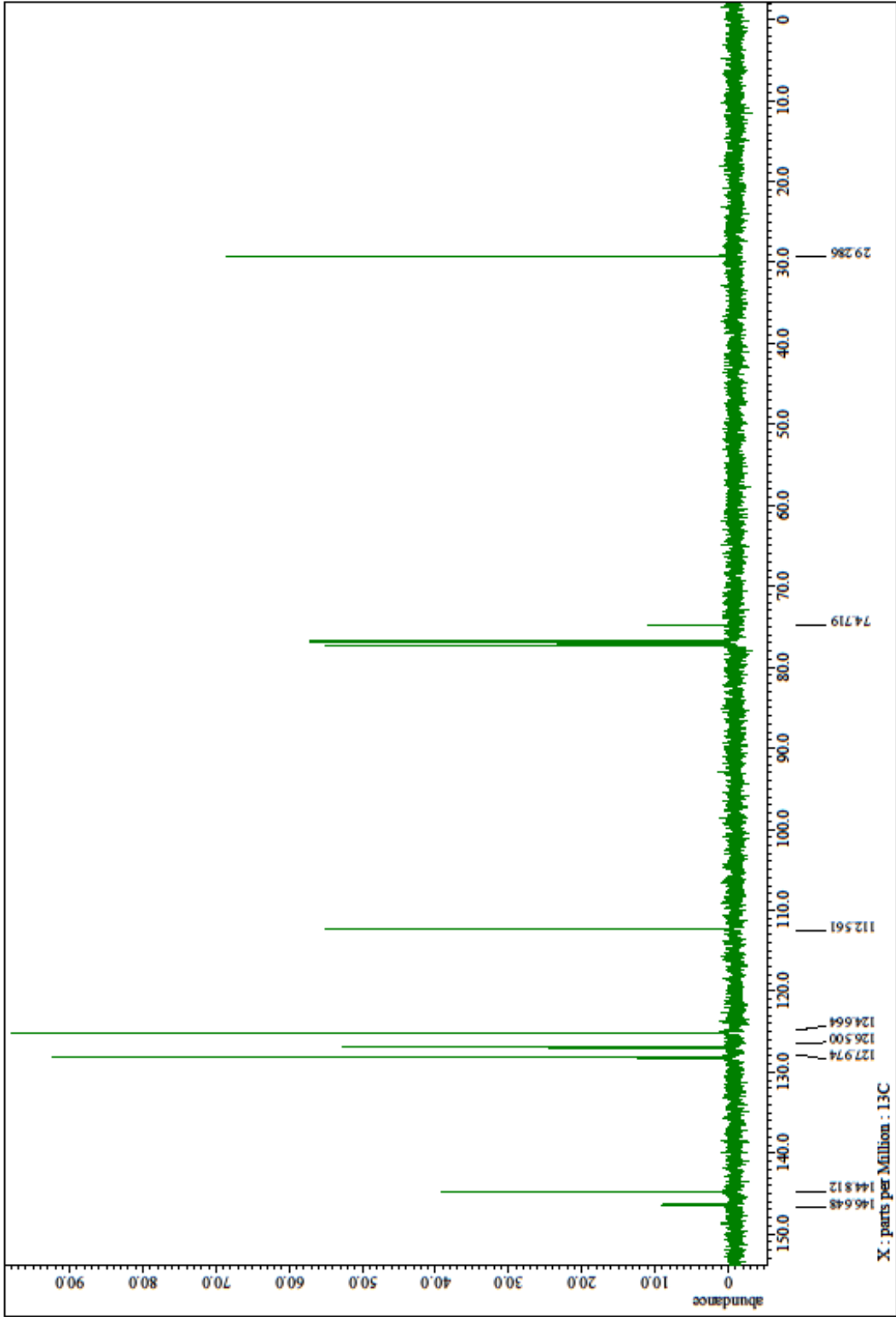
1a



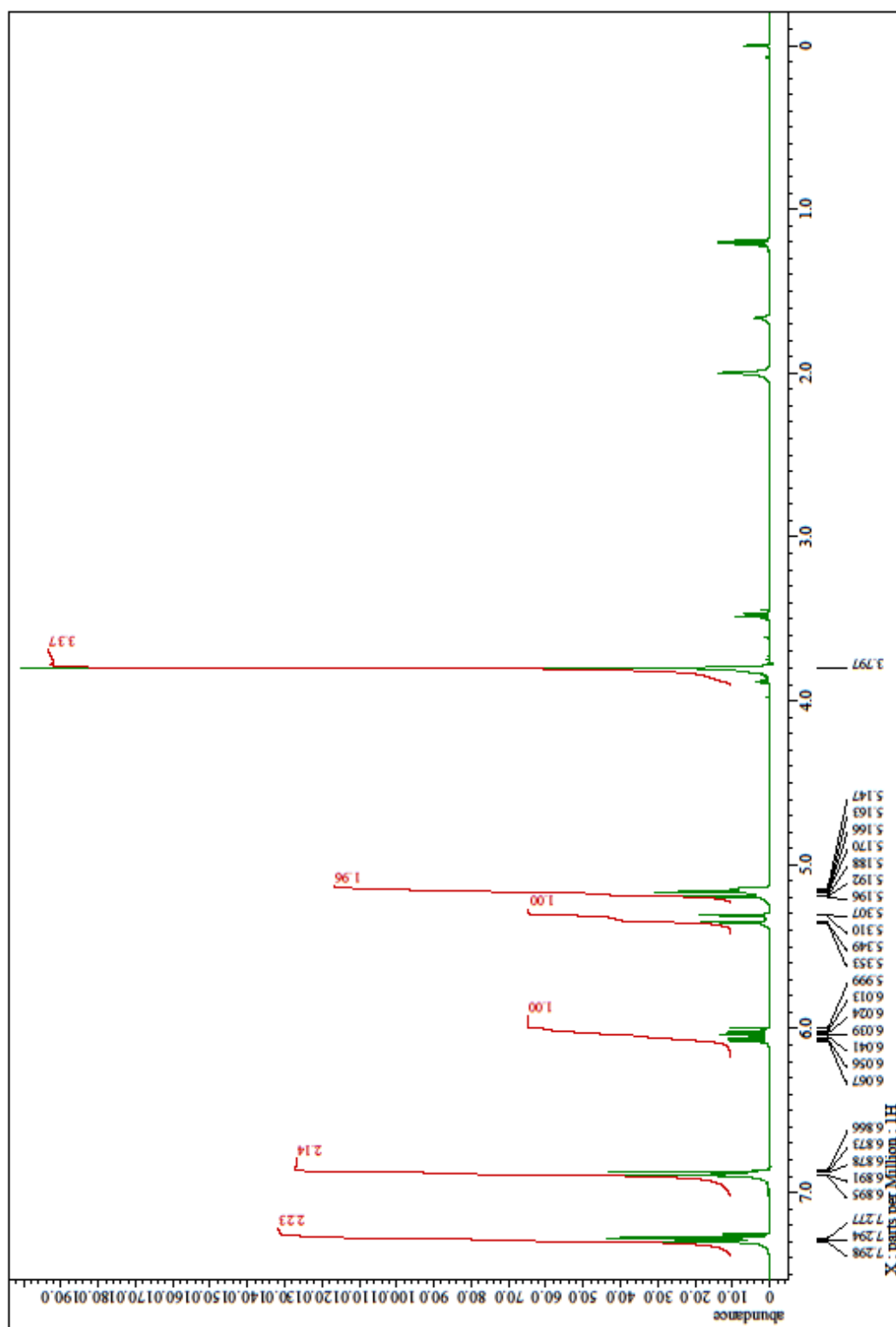


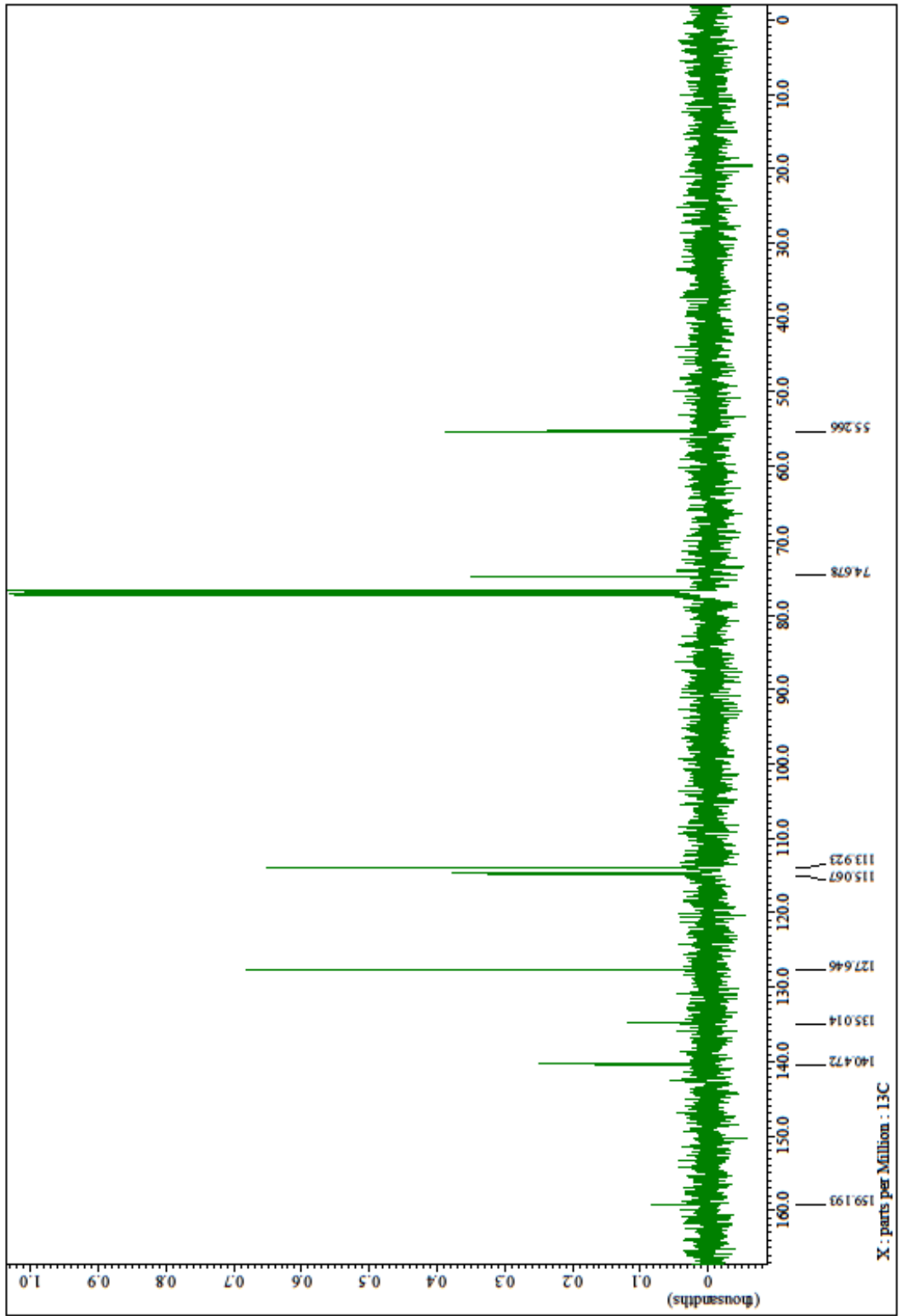
1b



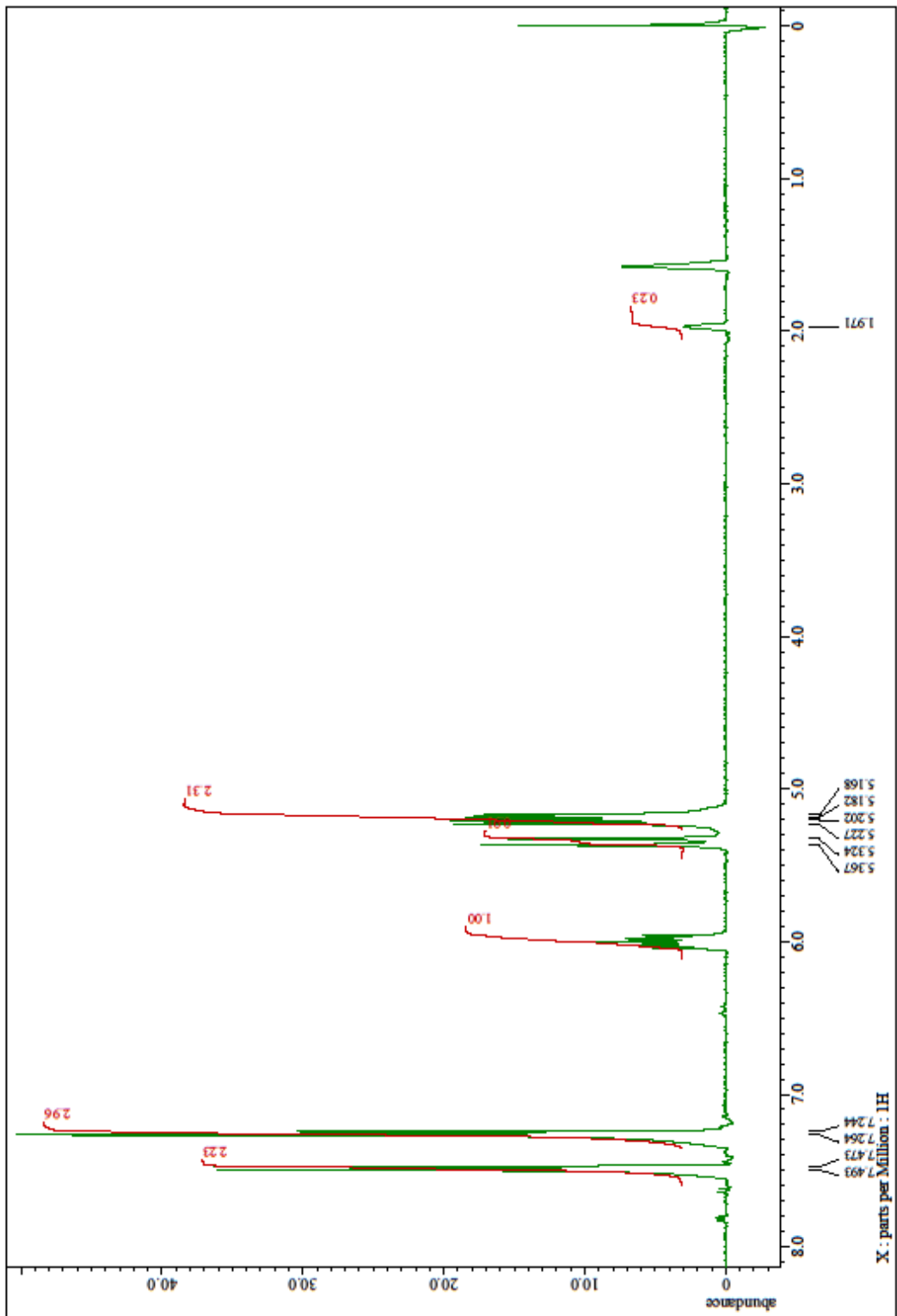


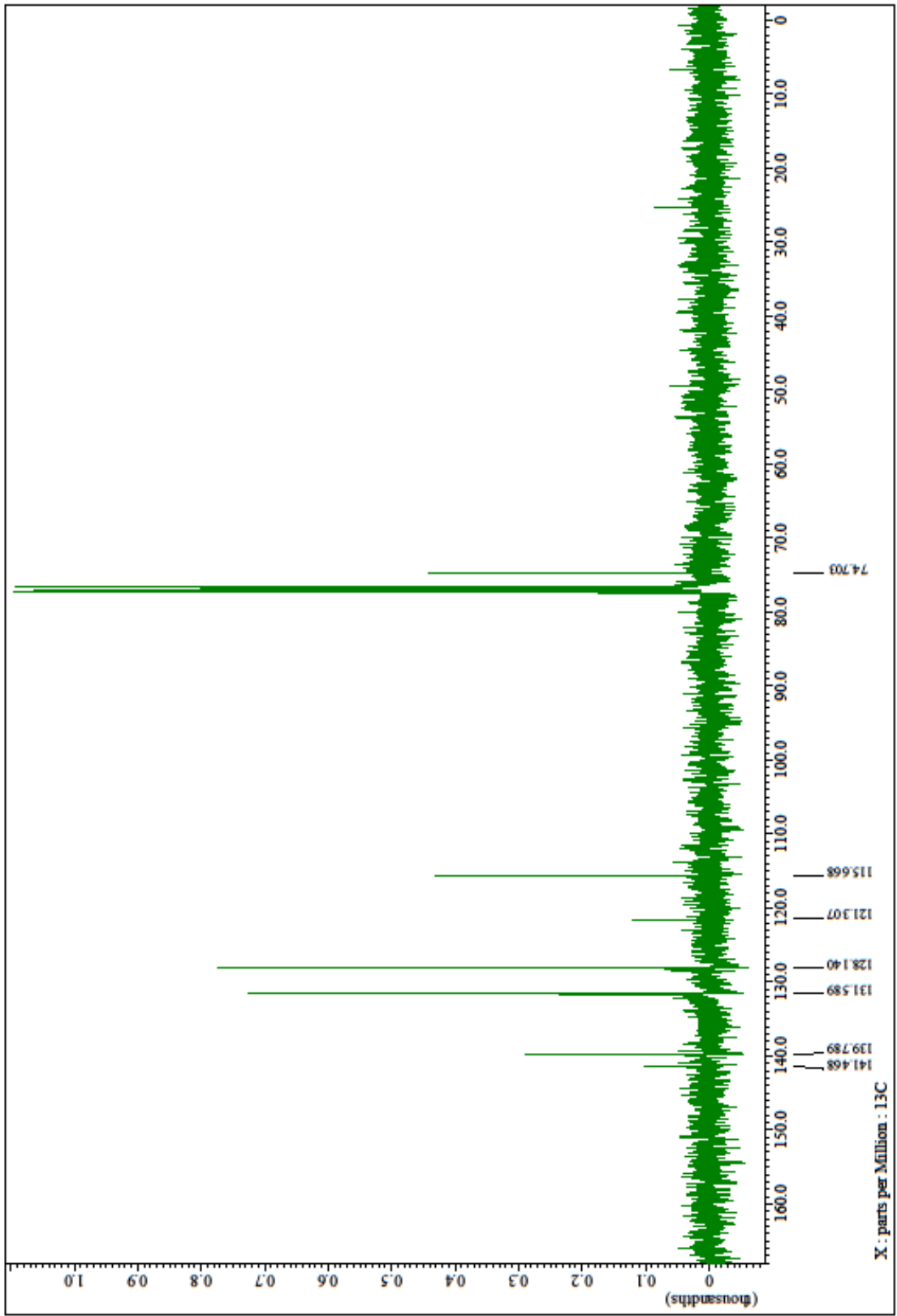
1c



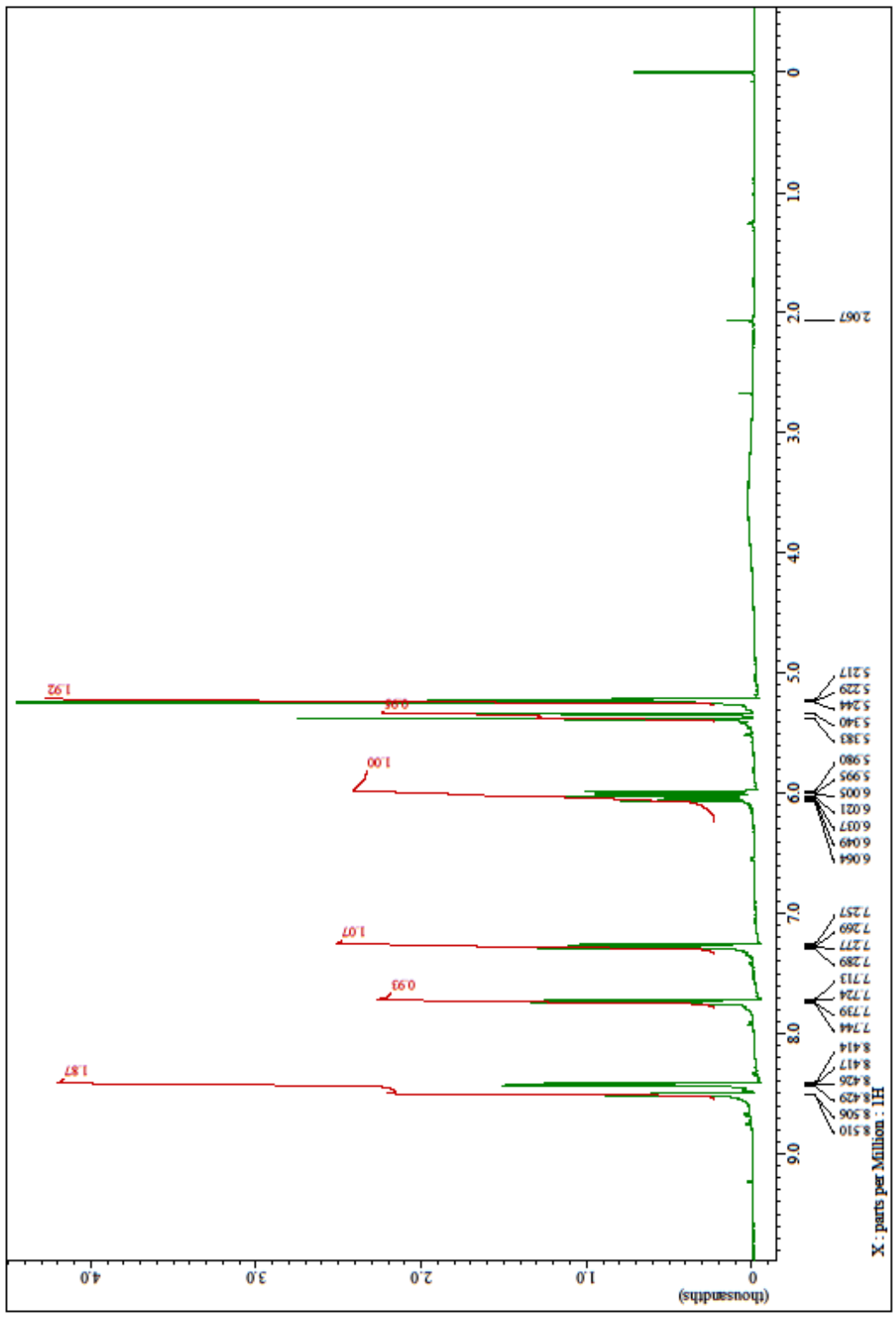


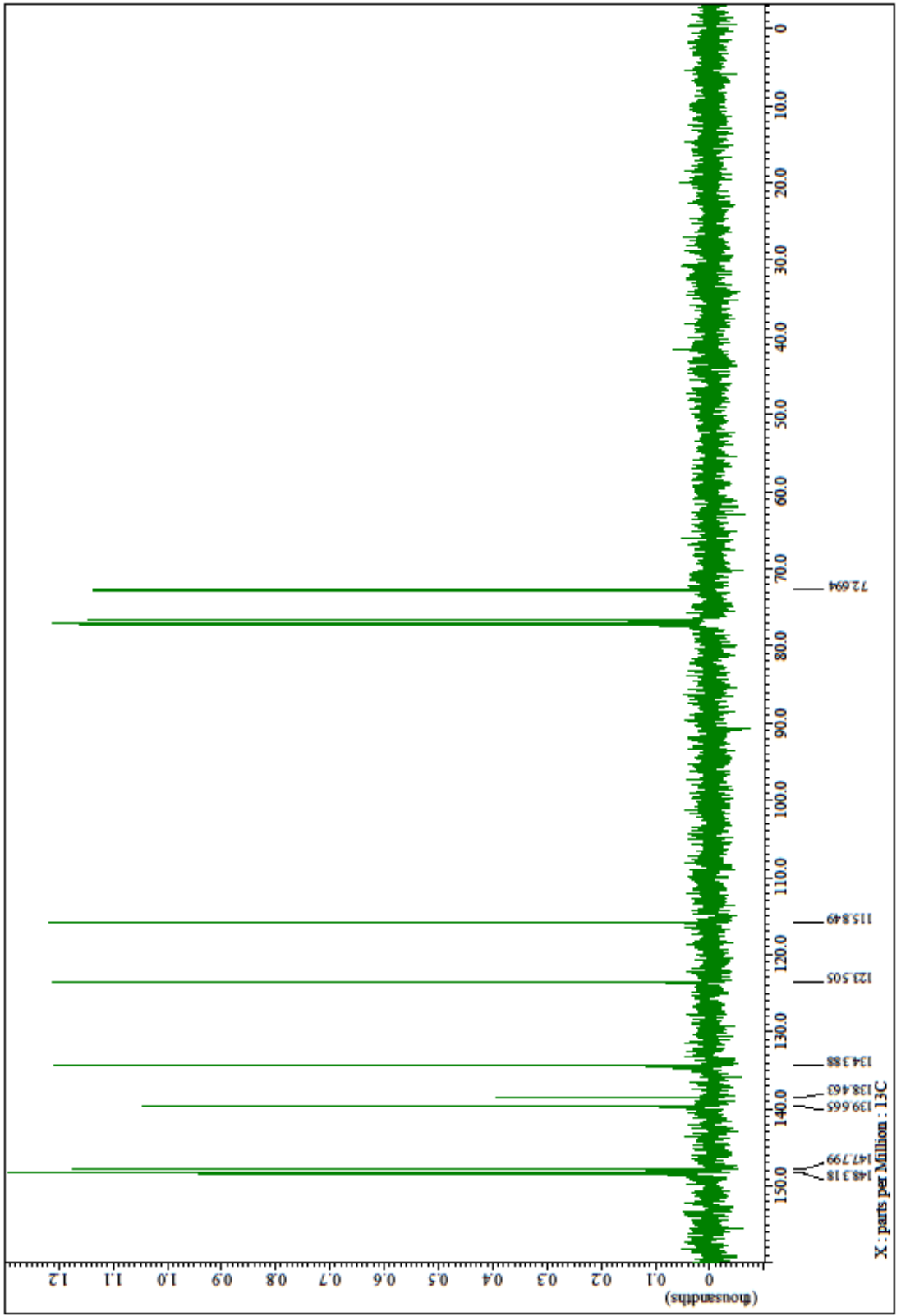
1d



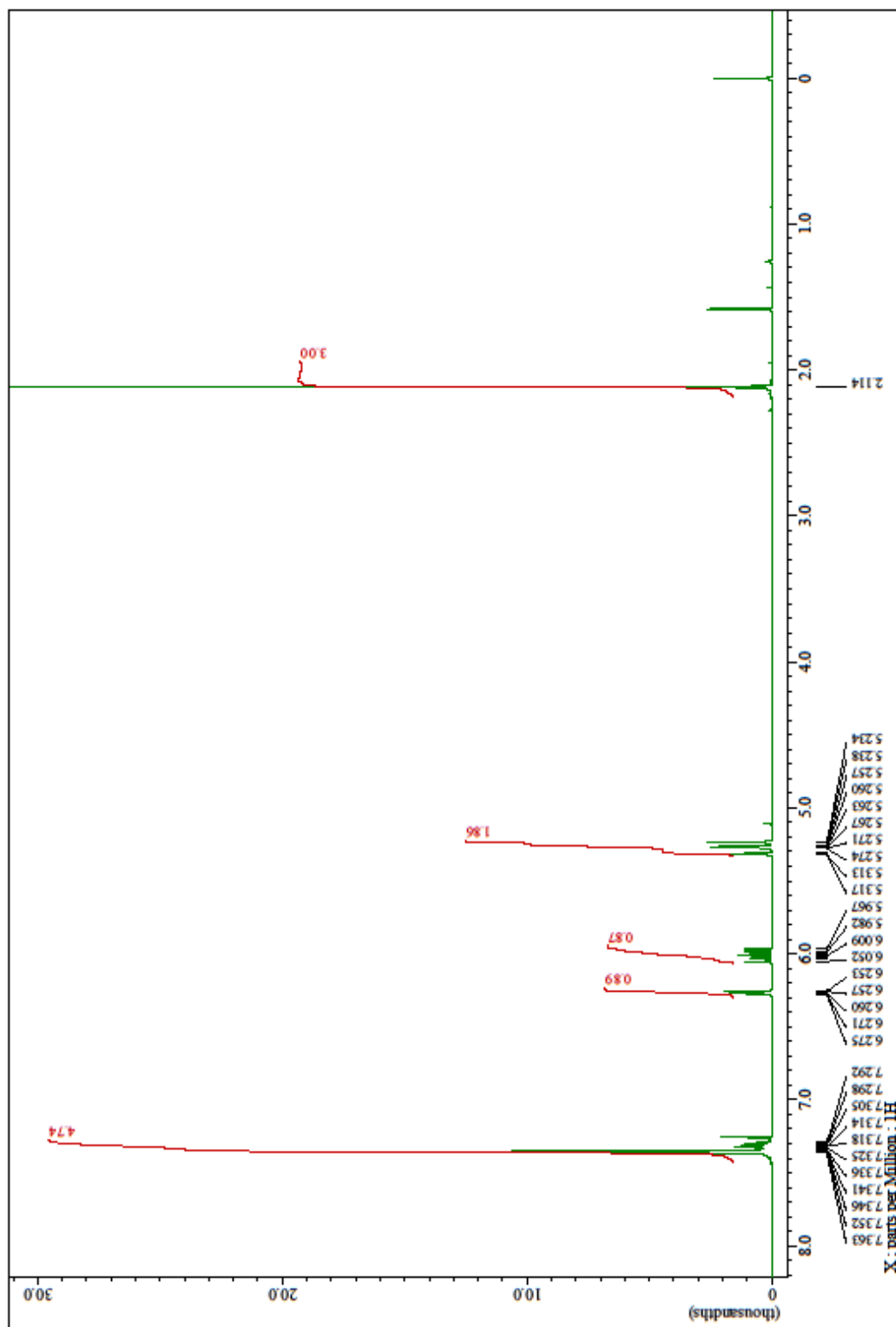


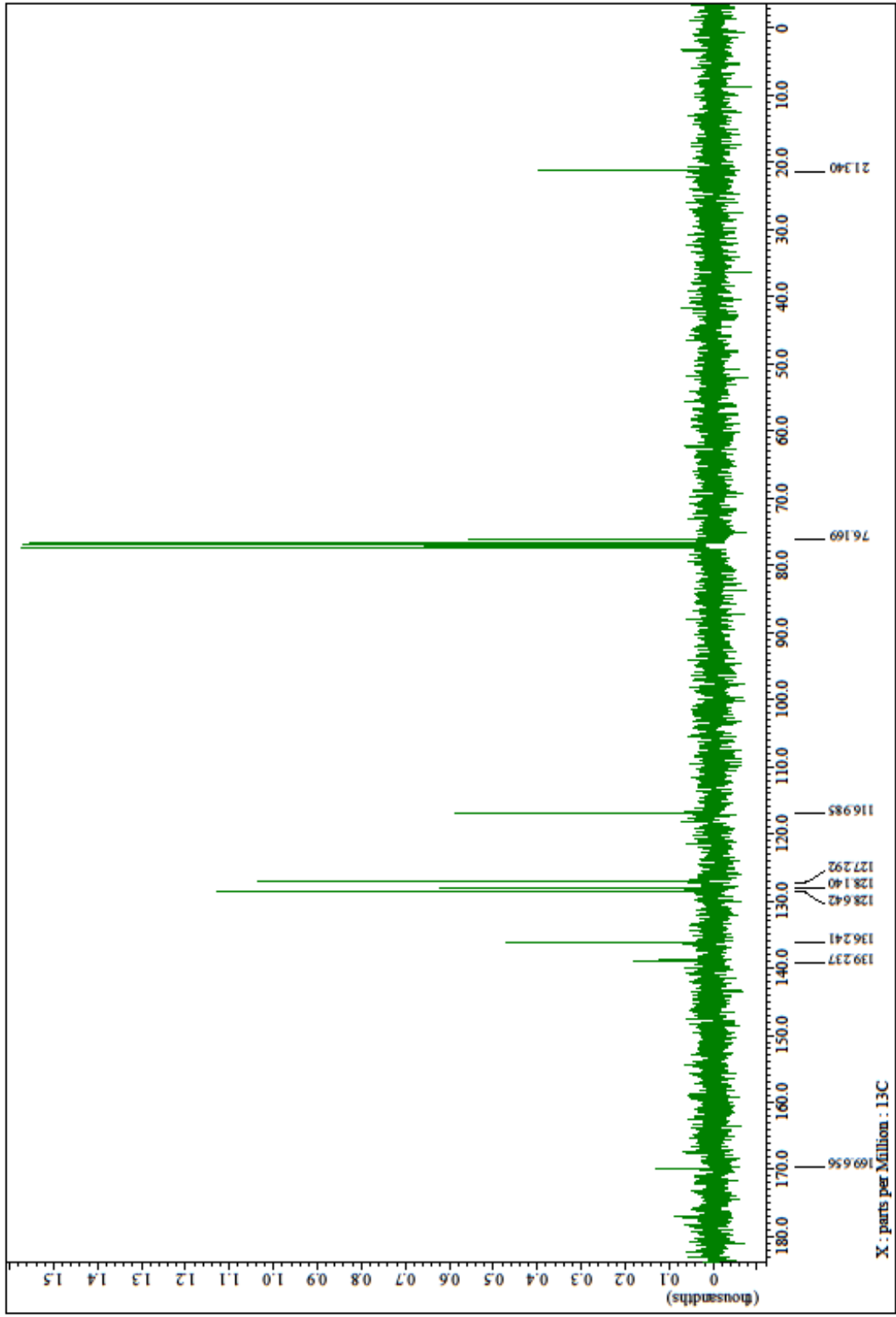
1e



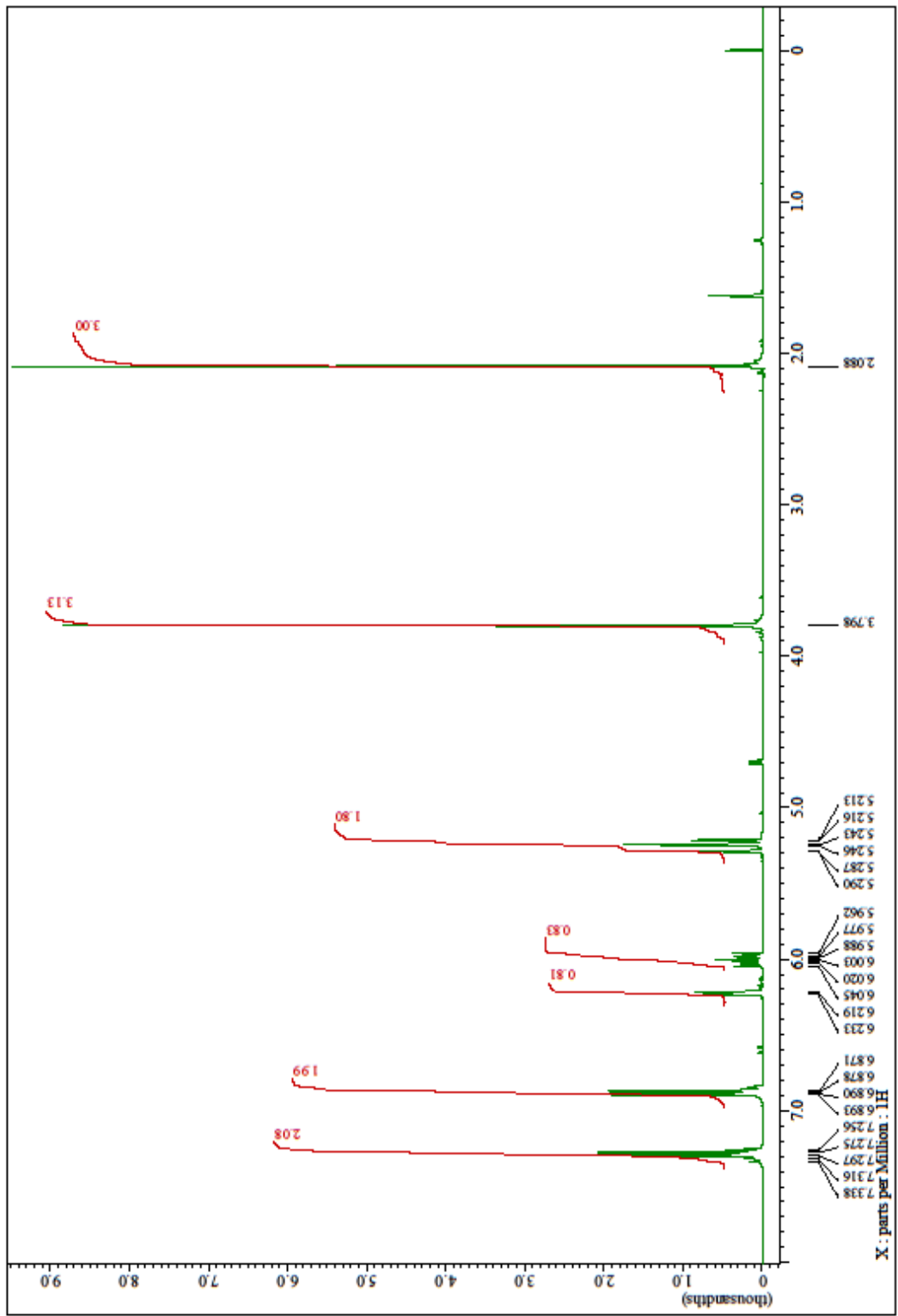


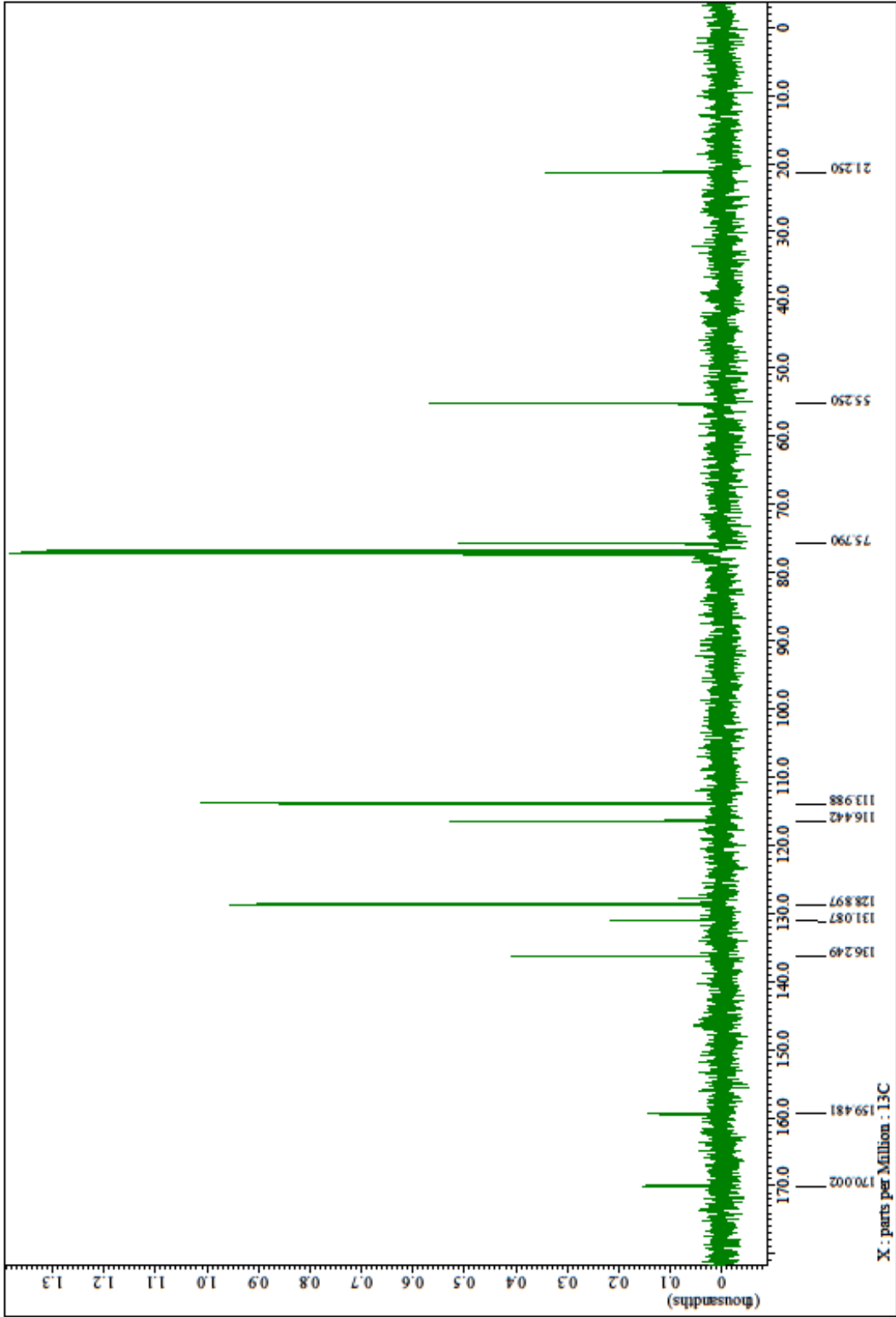
2a



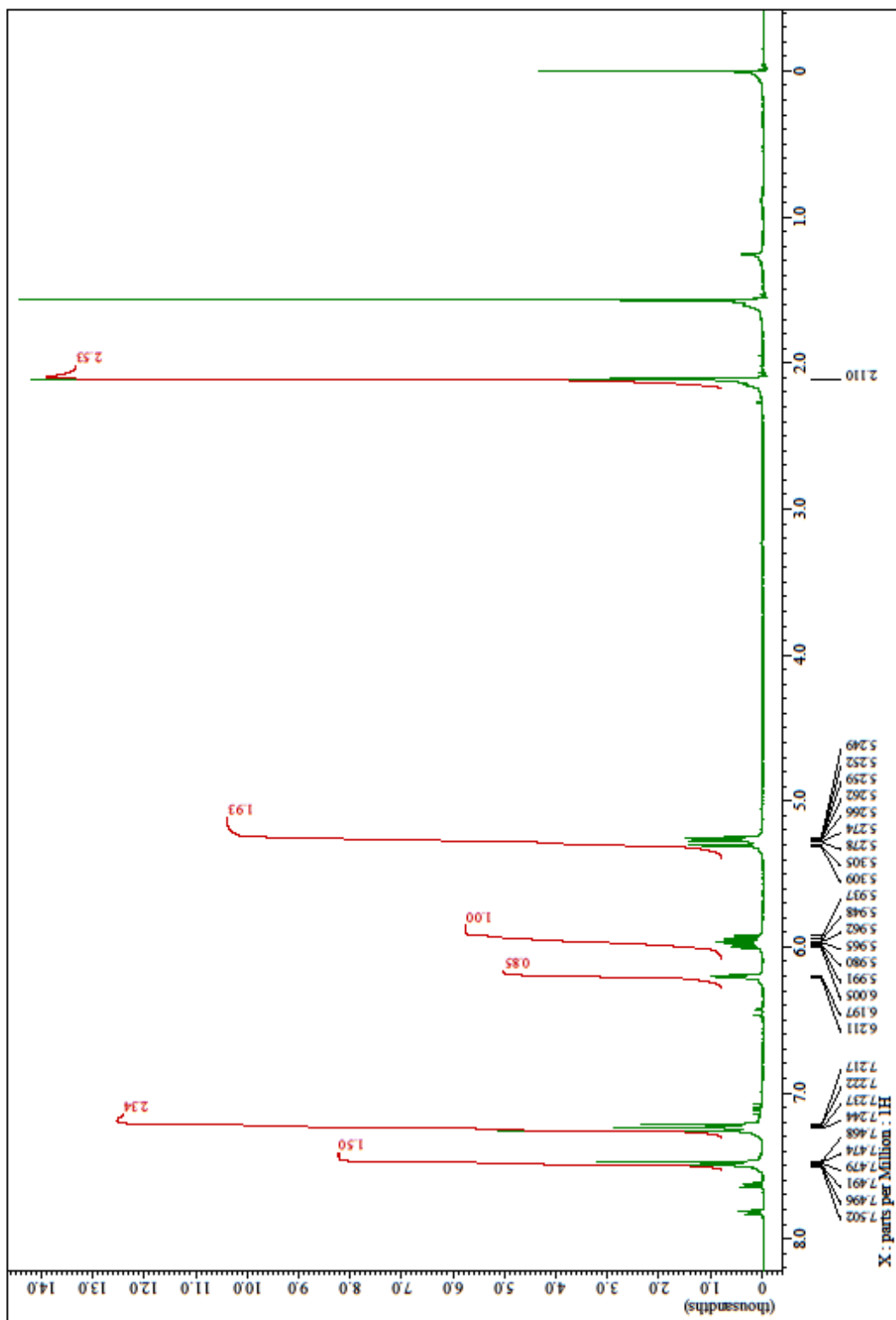


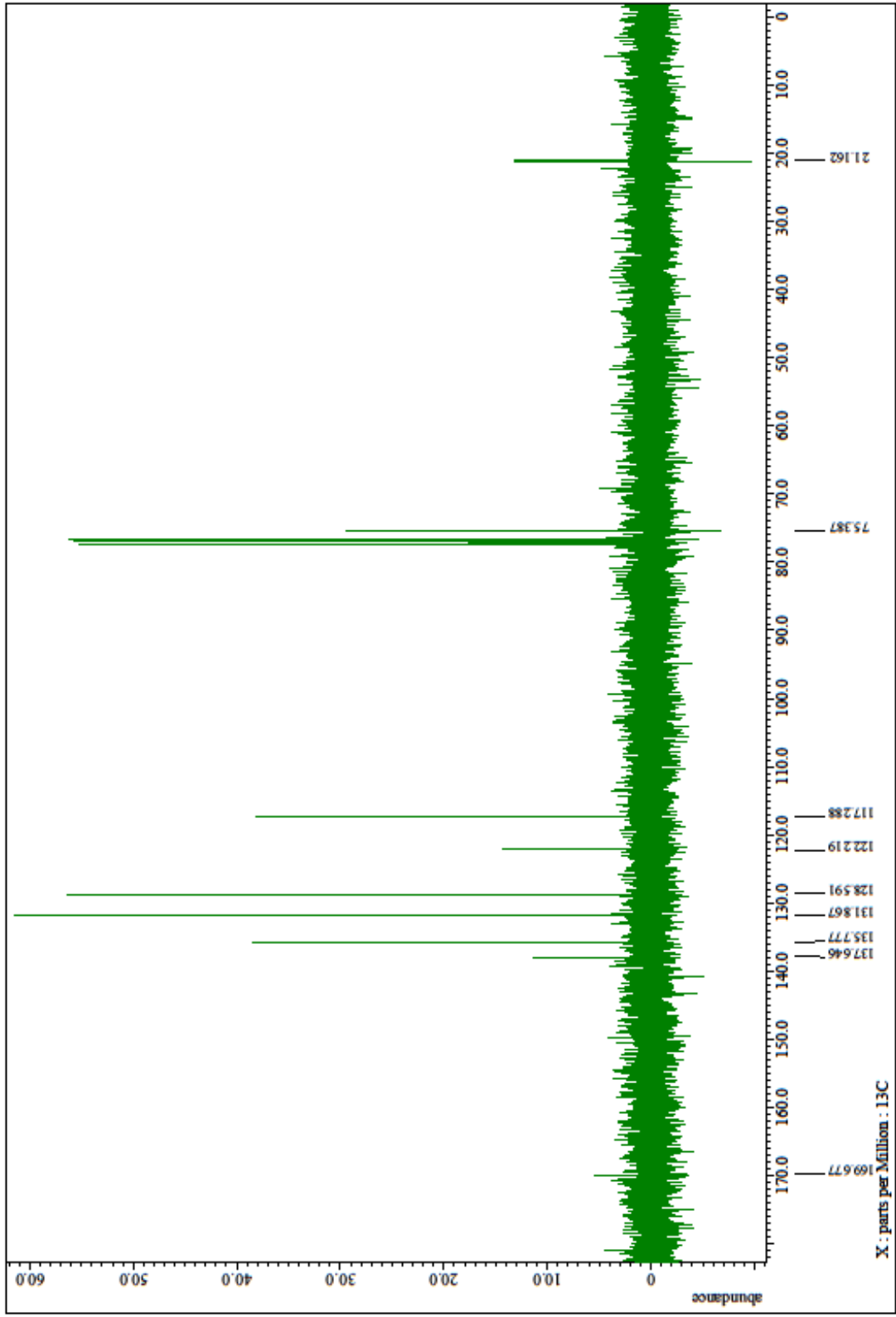
2c



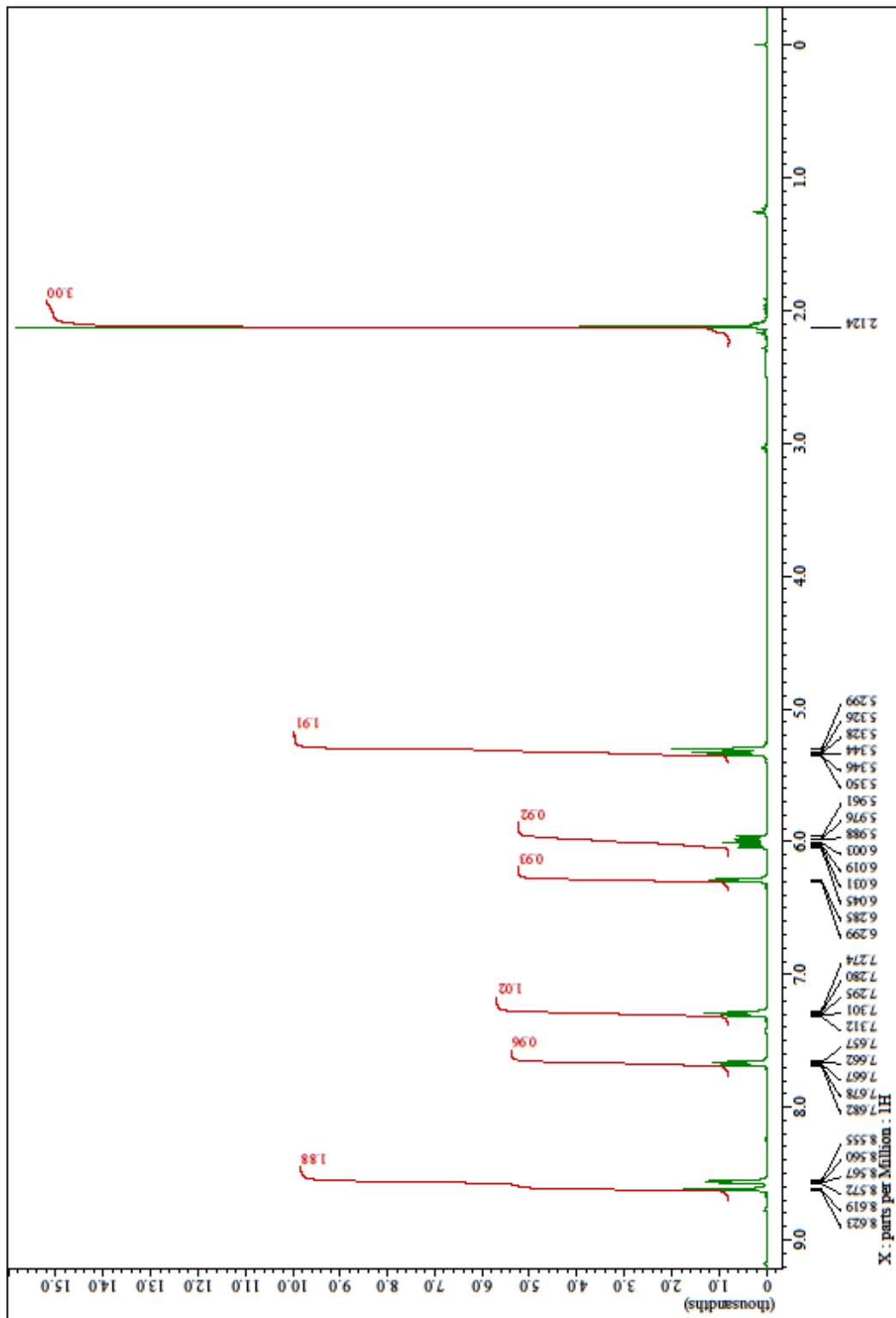


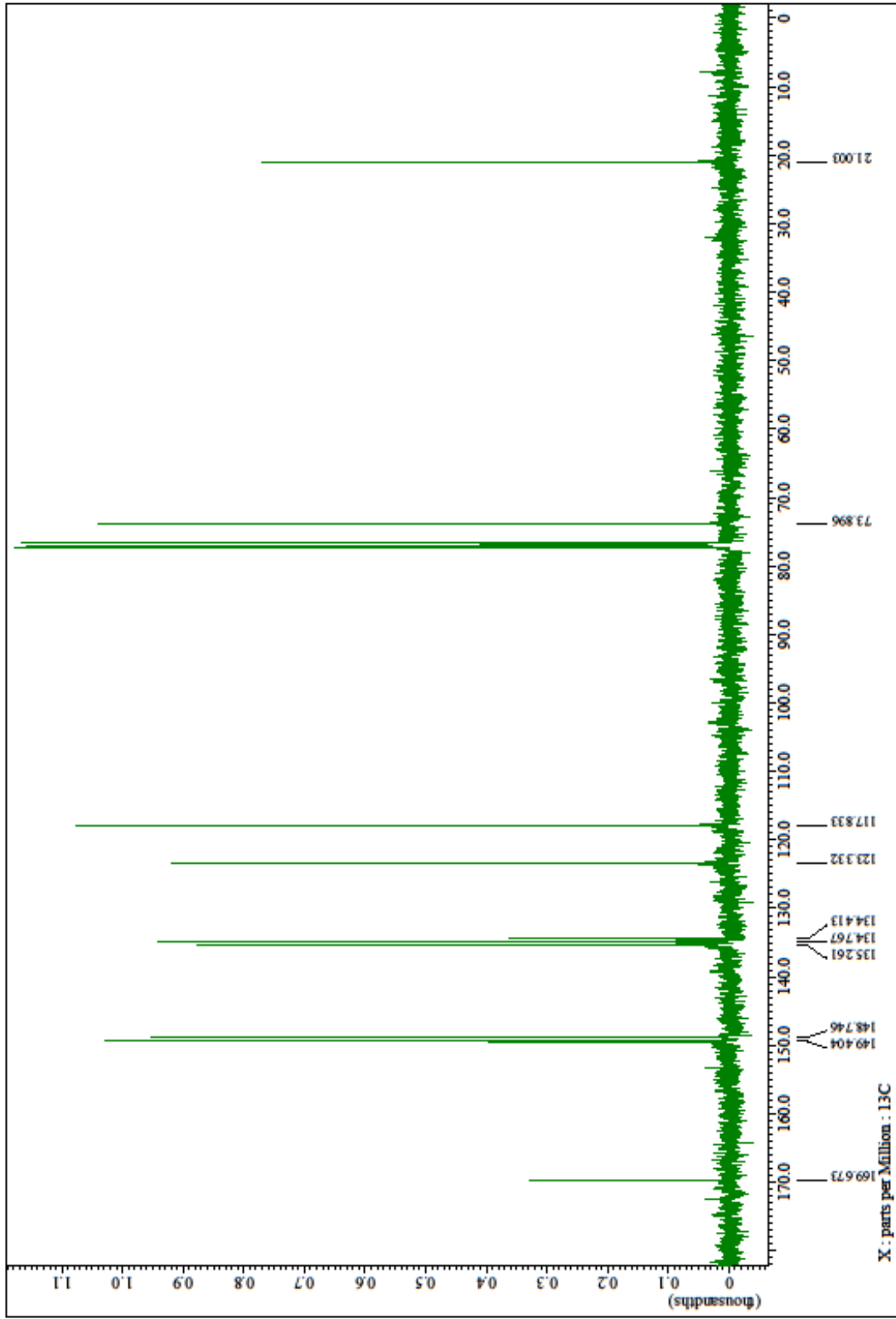
2d





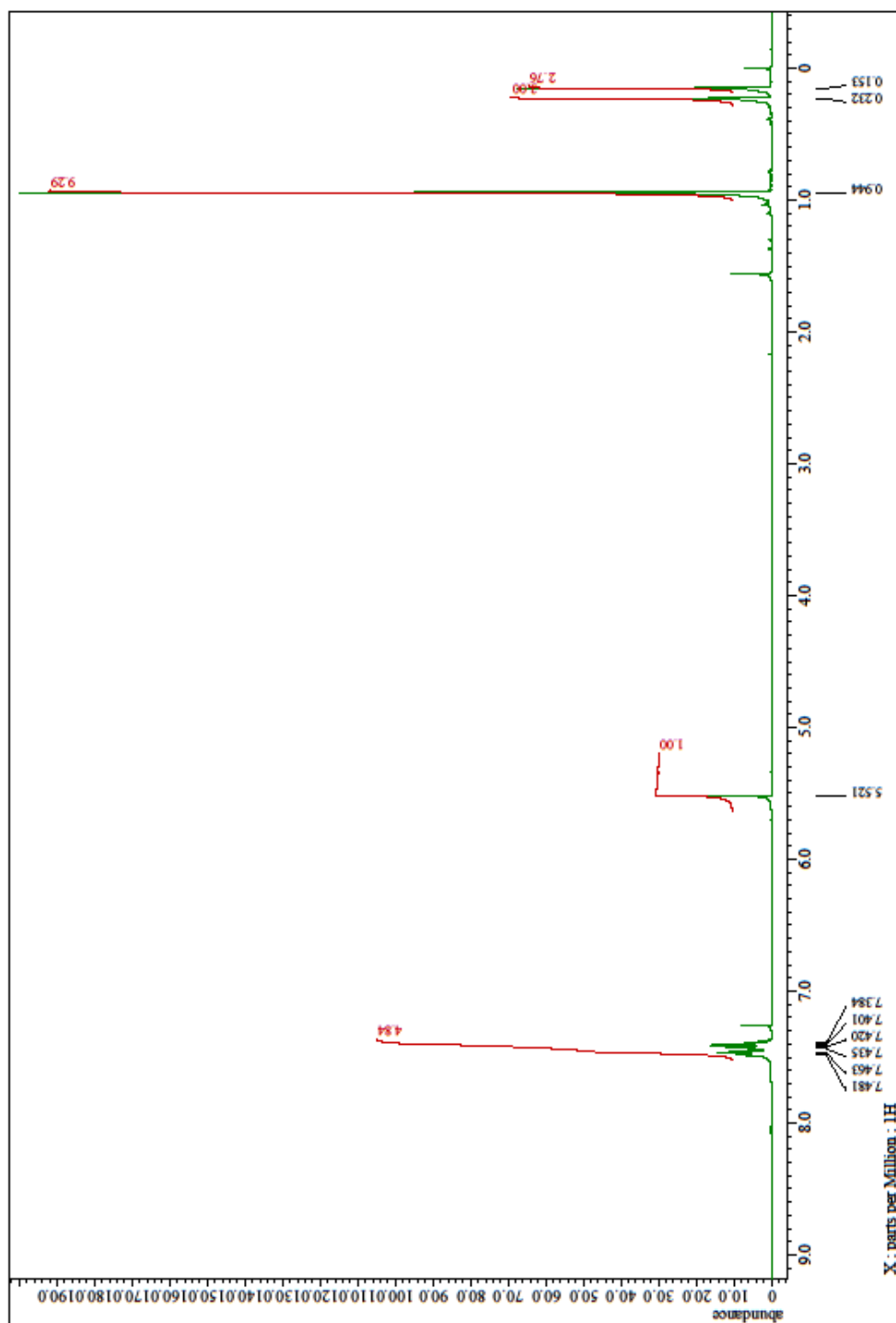
2e

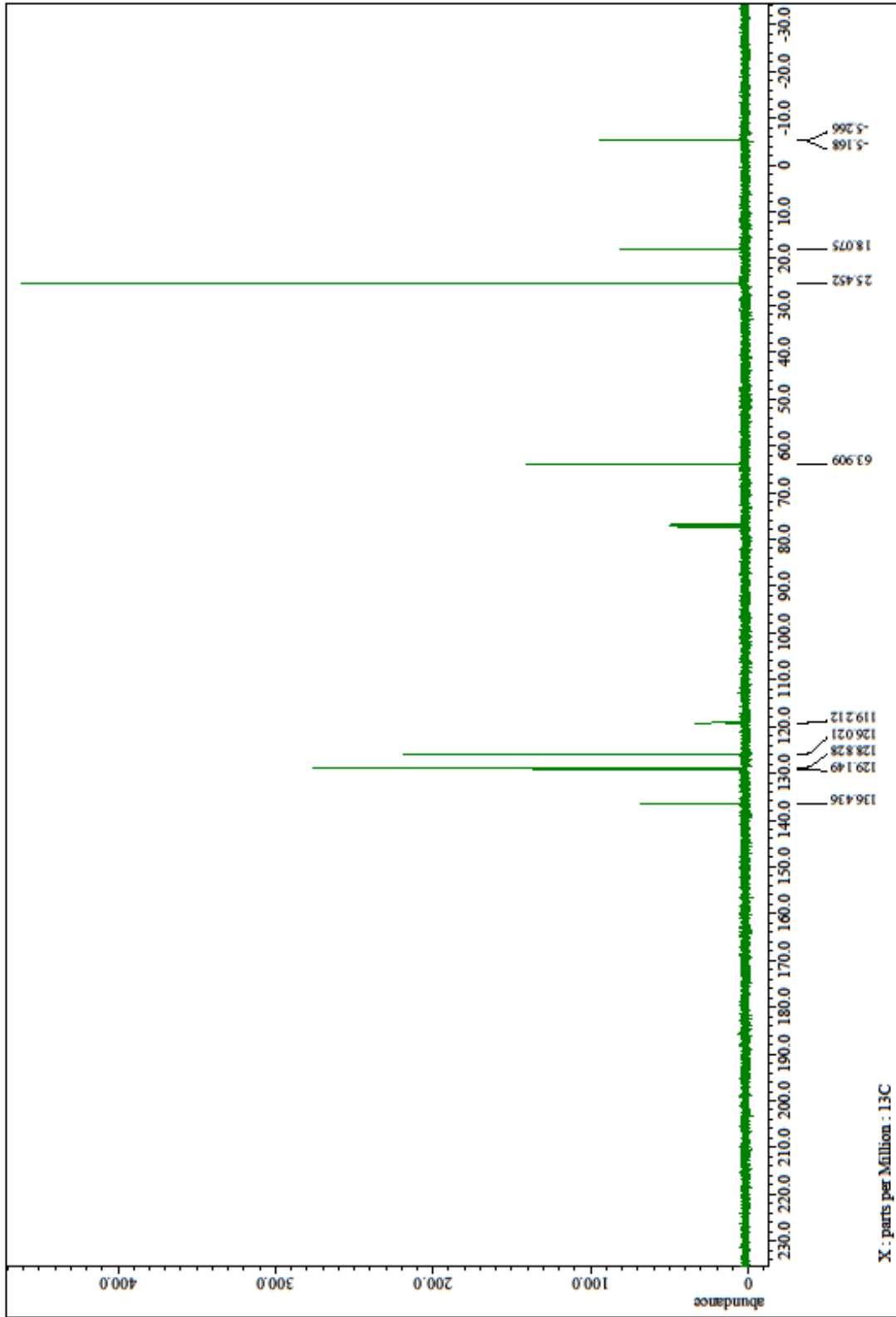


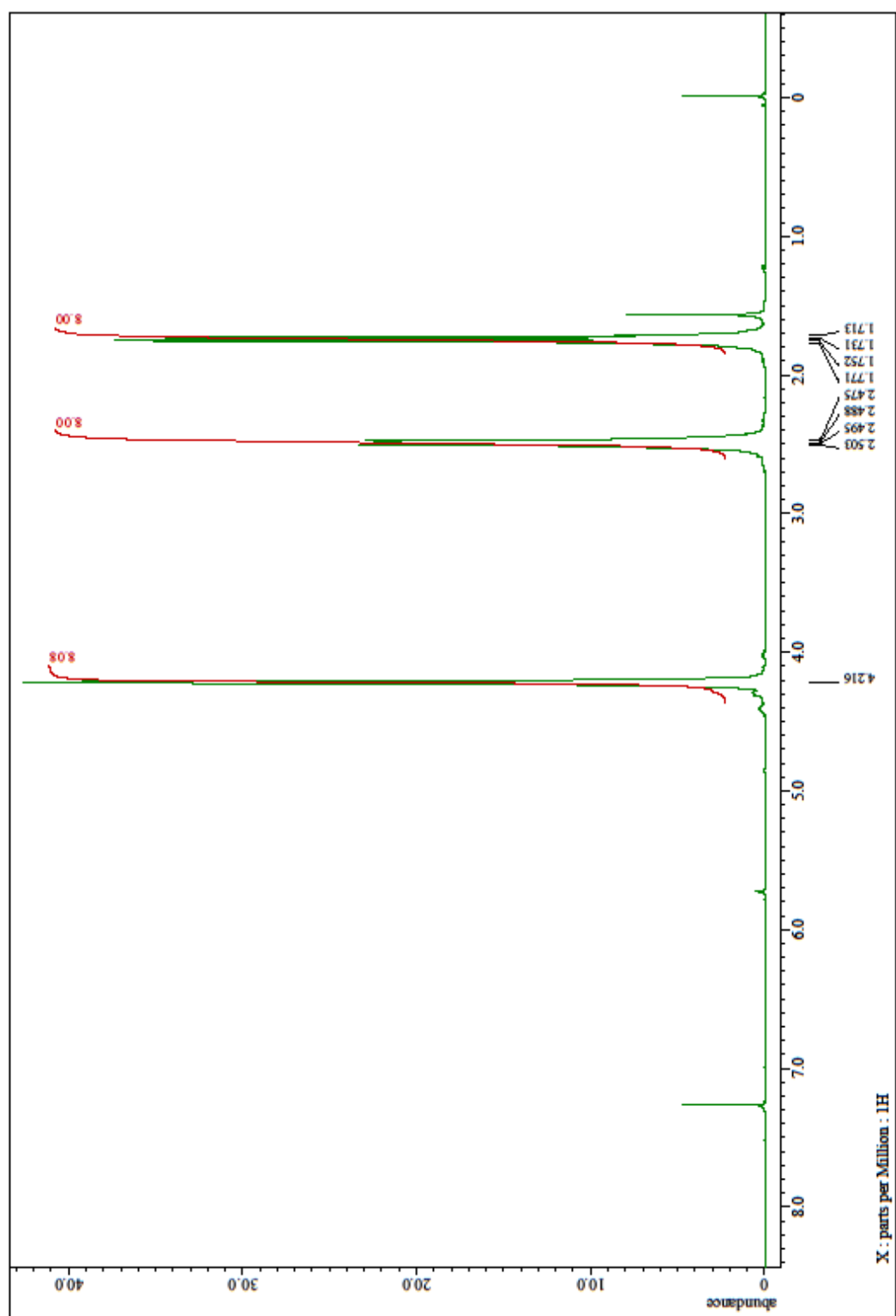
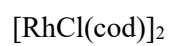


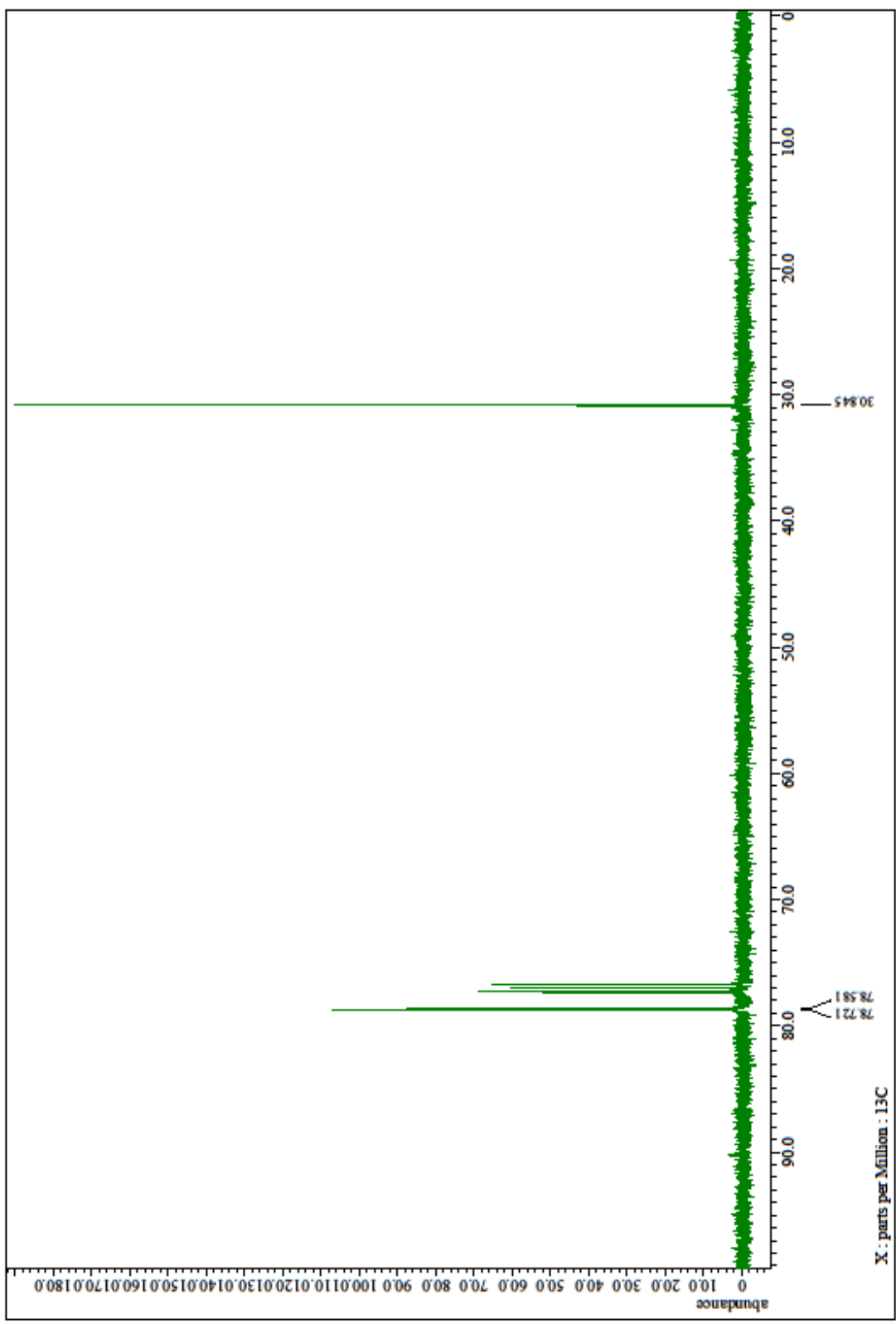
NMR スペクトル (第 4 章)

2a

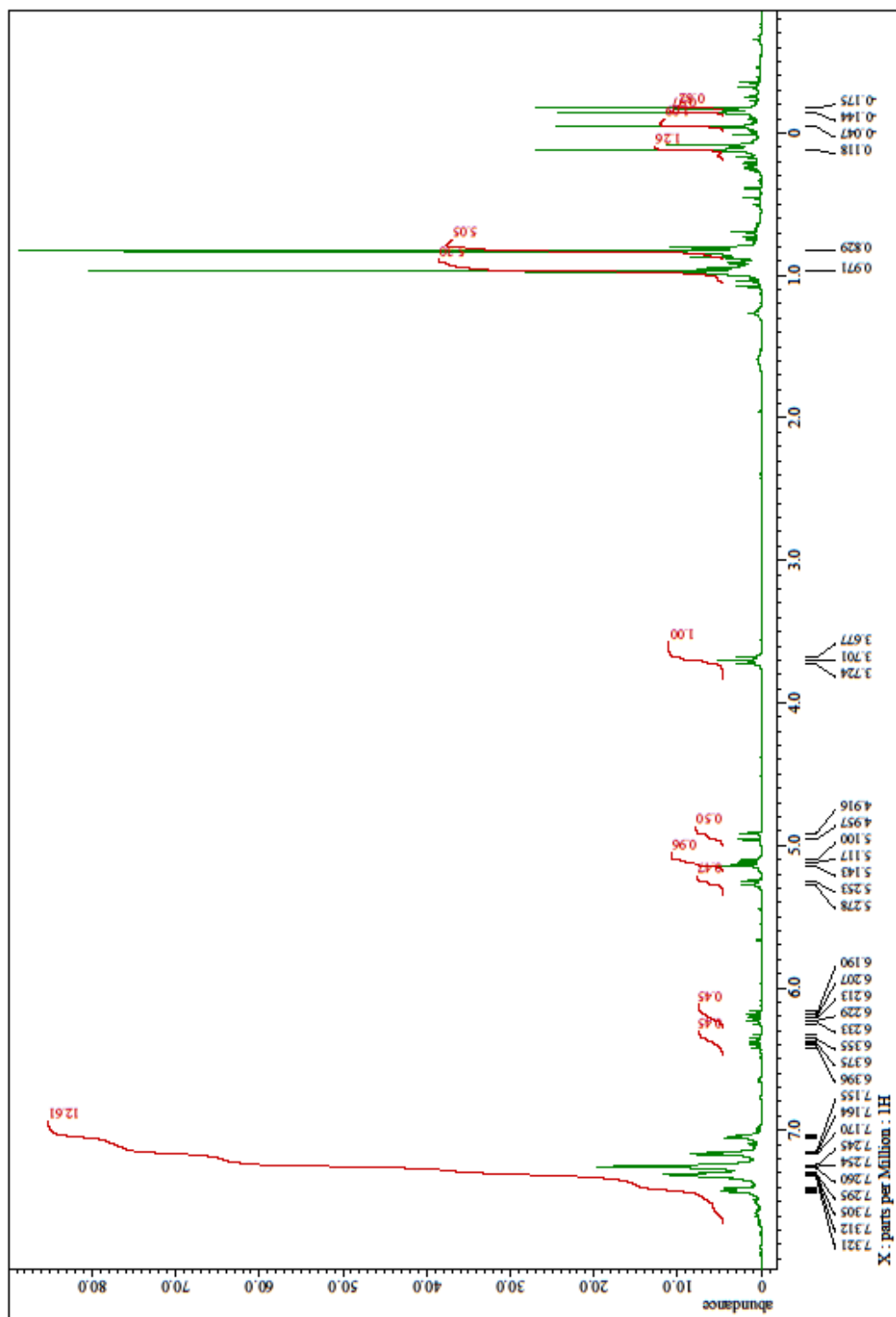








3aa'



謝辞

本研究を遂行するにあたり、厳しくも優しいご指導を頂いた指導教員の機能材料化学研究室准教授の鎌田海先生、副指導教員の有機生命化学研究室教授の木村正成先生および准教授の小野寺玄先生に深く感謝いたします。

また、本論文の作成にあたり、検討会などにおいて数々のご教示を頂いた機能材料化学研究室教授の清水康博先生、准教授の兵頭健生先生、助教の上田太郎先生、そして有機生命化学研究室助教の福田勉先生に深く感謝いたします。

そして、日々の研究や様々な面でご協力いただいた機能材料化学研究室事務補佐員の前田夏希様、森田華津恵様、有機生命化学研究室事務補佐員の仁科清美様、有機生命化学研究室技術職員の大濱祐七郎様に感謝いたします。

最後になりますが、共に研究に取り組んだ機能材料化学研究室および有機生命化学研究室の学生みなさんに深く感謝いたします。

2020年3月

有機生命化学研究室

山田あかね