

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：33919

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790031

研究課題名（和文） イオン性高分子を活用する酵素触媒反応法の開発

研究課題名（英文） Development of Novel Chemoenzymatic Reaction System for Organic Synthesis Utilizing Ionic Polymers

研究代表者

濱本 博三（HAMAMOTOHIROMI）

名城大学・農学部・准教授

研究者番号：40365896

研究成果の概要（和文）：高分子により形成される反応場を活用することに着目した酵素触媒反応システムの設計を試みた。その結果、アクリルアミド系陽イオン性高分子を活用することにより、高分子溶液中でリパーゼ触媒反応が効率良く進行し、反応の操作性も向上すること明らかにした。さらに、高分子をゲル化することにより、固相型の酵素触媒の創製にも成功し、再利用可能な触媒として利用できることを見出した。

研究成果の概要（英文）：The use of a novel reaction medium provided by functionalized polymers could often bring a new strategy in the design of reagent or catalyst recycling systems. This work focused on the use of ionic acrylamide-based polymer for the design of novel chemoenzymatic reaction system. The lipase-catalyzed esterification reactions proceeded smoothly with high stereoselectivities in ionic acrylamide-based polymer solution or polymer gel. In addition, the enzymes can be easily recovered together with this ionic polymer and was reused without significant loss of catalytic activities.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・化学系薬学

キーワード：有機化学、触媒

1. 研究開始当初の背景

現代の医薬品や農薬をはじめとするファインケミカルの製造においては、有機合成化学に基づいた様々な化学反応が多用されている。一方、自然界では医薬品の元となりうる生物活性物質の多くは微生物や酵素等により生産される。酵素や微生物は、環境にやさしい触媒であり、ときに一般の化学触媒では達成困難な高度な変換反応を可能にするため大変魅力的である。微生物や酵素を用いる有機化学研究は古くから行われており、様々な生物活性物質の合成研究に適用されその重要性が明らかにされてきた。さらに、最近の研究により酵素に金属触媒を併せて活用する複合触媒系を活用することにより

画期的な合成反応を行えることを見出され、この分野の研究が新たな局面を迎えつつある。しかしながら、微生物や酵素は繊細であり、実際の医薬品の製造に実用的に活用するには使用条件が制限されるため未だ多くの課題を抱えているのも実状である。したがって、微生物や酵素の特性を活かした有機合成研究の発展に貢献しうる有効な方法論の開発の重要性は高い。

近年、反応場に着目した酵素反応研究が注目を集め、イオン液体やフッ素系溶媒中で酵素触媒がその活性を損なうことなく利用可能になりうることが明らかにされつつある。一方、これまでに申請者は、種々の機能性高分子を用いる有機反応システムの開発を行

い、高分子の制御によりイオン性反応場を構築できることを明らかにしている。特に高分子を用いる反応系の設計では、高分子の組成や構造を工夫することにより形成する反応場の特性を大きく変化させることも可能であり、高分子機能を活かした金属触媒とのハイブリッド化等による反応系の高度化も期待できる。そこで、これまでに申請者の行ってきた高分子を用いる反応系の設計技術を活かすと、酵素や微生物を用いる有機反応の新展開を導くことができると考え、「イオン性高分子を酵素触媒反応法の開発」を着想するに至った。

2. 研究の目的

本研究では、イオン性環境中でリパーゼ等の生体触媒が安定化し、優れた触媒反応を行えることに着目し、高分子により形成されるイオン性環境を酵素触媒の反応場として活用する反応開発を目的としている。本研究の主な研究内容は、①イオン性高分子溶液中での酵素触媒反応システムの開発、②酵素触媒とイオン性高分子ゲルを用いる固相触媒反応システムの開発、③機能性分子・金属触媒を用いるシステム反応の高度化である。本研究の実施により、比較的安全性の高い酵素や生体触媒を、有機反応に活用する新たな手法を導くことが期待できる。本法では高分子体を用いているため、イオン液体を用いた場合のように生成物にイオン液体分子等が混入する恐れも無く、医薬品製造にも適した方法になりうる。

3. 研究の方法

(1) 各種イオン性高分子の設計と合成

イオン性部位を有する直鎖状アクリルアミド系高分子は、原料モノマーが安価であり、種々の組成を持つ高分子体が簡便に合成可能である。また、これらの高分子は使用する溶媒に応じて、溶解と析出を繰り返すことができる。さらに、すでにこれまでの申請者の研究により、これらの高分子の持つイオン環境が有機反応の反応場として利用できることが明らかにしている。本研究では、主に四級アンモニウム塩ユニットをもつアクリルアミドの AIBN を開始剤とする重合によりイオン性高分子を合成する。高分子物性の制御は、アンモニウム塩のカウンターアニオンの選択と高分子組成の調整により行う。

(2) 酵素担持固相触媒の調製

イオン性高分子に対する酵素の担持方法としては、高分子に対して吸着させる方法と高分子合成の際に導入する方法を用いる。一般に、高分子合成の際に導入する場合、酵素自身も失活する可能性があるため、温和な条件における重合反応が必要になる。本研究においては、なお、室温付近で重合可能な低温

重合開始剤を用いる方法を採用する。

(3) 酵素触媒反応系の構築

イオン性高分子が酵素反応に与える影響を評価するためには、高分子溶液における酵素触媒の活性を確認する方法が有効と考えられる。そこで、一般的に有機合成でも多用されている酵素触媒である Lipase PS を用いるアルコールのアシル化反応をモデルとし、その反応性と選択性を指標として高分子溶液中の活性評価と高分子特性を活かした反応系の構築を行う。さらに、高分子溶液中における研究結果に基づいて高分子ゲルを反応場とする酵素触媒反応の検討も行い、酵素担持固相触媒を用いる反応システムの設計への展開を行う。また、同時に、イオン性高分子と金属酸化物試薬を用いる酵素モデル型触媒の設計および、システム反応の高度化を指向したフルオラスケミストリーとの融合による新たな反応法開発に対する検討も加える。

(4) 高分子および固相触媒の評価

高分子物性や高分子溶液の分析には、核磁気共鳴分光法(NMR)と固体 NMR、赤外分光法、熱分析法、電子顕微鏡(SEM, TEM)測定、粘度測定、ゲル浸透クロマトグラフ(GPC)による分子量分析等を用いる。また、高分子ゲルや固相触媒の分析には、蛍光プローブ分子導入した高分子を用い、蛍光分析や蛍光顕微鏡測定により解析を行う。

4. 研究成果

①イオン性高分子溶液中での酵素触媒反応システムの開発

アクリルアミド系高分子である Poly-*N*-isopropylacrylamide (PNIPAAm) は、原料入手が容易で耐久性に優れており、さらに、外部の温度変化に応じてその親・疎水性が変化する温度応答性質を持つことから、材料科学分野で広く応用研究が行われている。本研究では、*N*-isopropylacrylamide とイオン性ユニットとして四級アンモニウム塩部位を持つアクリルアミドモノマーを用い、AIBN (2,2'-Azodiisobutyronitrile) を開始剤として用いる重合反応により直鎖状イオン性高分子 (1A) を得た。このイオン性高分子のアセトニトリル溶液で Lipase PS を用いる 1-オクタノールのアシル化反応を行ったところ、60°C に加温しても酵素活性は失活することなく、効率良く反応生成物を与えることを見出した。さらに、反応終了後、高分子溶液をジエチルエーテル中に投入すると、高分子と共に Lipase PS を回収できることを見出した。回収した高分子-Lipase PS 混合体は繰り返し反応に利用することができ、5 回以上の再利用を行っても酵素触媒活性の低下は見受けられなかった。また、本反応システムは、他のリパーゼを用いる各種アルコー

ルのアシル化反応にも適用できることも明らかにした。

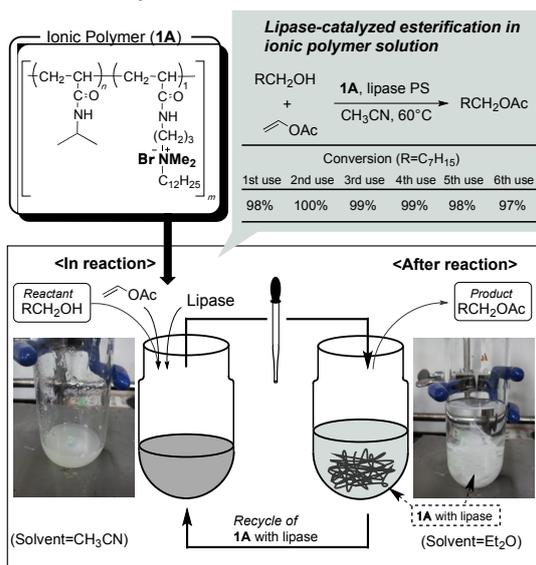


図1 イオン性高分子溶液中での酵素触媒反応システム

② 酵素触媒とイオン性高分子ゲルを用いる固相触媒反応システムの開発

架橋鎖を持つアクリルアミド系高分子は、用いる溶媒に応じて高分子ゲル形成することが可能になる。特に、イオン性高分子ゲル内では、分子が自由に動くことのできるイオン液体中とは異なり、イオン部位が固定された集合体であるため、特殊なイオン性環境を与えうる。そこで、架橋剤とイオン性アクリルアミドモノマーを用いる重合反応により架橋型イオン性高分子を合成し、そこに lipase PS の導入を試みた。その結果、各種架橋型高分子の合成に成功し、これらが種々の溶媒中で高分子ゲルの形成できることを見出したが、効率良く lipase PS を導入することはできなかった。そこで、高分子合成時に一挙に酵素触媒を導入する方法を試みるために、低温重合用開始剤を用いる調製法を検討した。その結果、重合開始剤として V-70 (2,2'-Azobis[4-methoxy-2,4-dimethylvaleronitrile]:10 時間半減期温度=35°C) を用いた場合に lipase PS を良好に組み込んだ架橋型イオン性高分子が得られることを見出した。さらに、高分子構造の最適化を行ったところ、ビス(トリフルオロメタンスルホン)イミド塩 (NTf₂⁻) をカウンターアニオンとする高分子 (1B) が lipase PS の導入に最も適しており、1-フェニルエタノールの反応速度論的光学分割が良好に進行し、高い選択性 (E 値 > 100) を示すことを明らかにした。また、1B は反応後に濾過により反応液から簡便に回収することができ、再利用してもその活性を落とすことなく利用できることも見出した。なお、他のリパーゼも本法によりイオン性高分子内に導入することが可能であり、各種アルコールのアシル化反応に適用可

能になることも明らかにした。

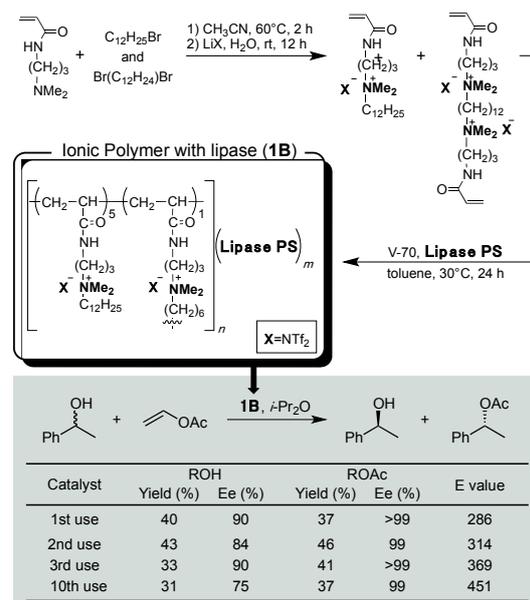


図2 酵素導入型イオン性高分子ゲルの調製とその利用

③ 金属触媒・機能性分子を用いるシステム反応の高度化

フルオラス分子は有用な機能性分子であり、多岐の分野において応用研究が行われている。高分子 1A と 1B のフッ素系アルコール等のフルオラス分子に対する挙動を調べたところ、それぞれ非常に高い親和性を示した。そこで、このフルオラス分子に対する高分子特性に着目した反応システムの高度化を指向し、酵素反応が重要な役割を担うペプチド合成で利用可能なフルオラス試薬の開発とフルオラス分子を本反応システムで活用するための評価研究を行った。その結果、フルオラスタグを有する Fmoc 試薬の合成と開発に成功し、これがペプチド類縁体のミクスチャー合成等に適用できることを見出した。また、含フッ素アルコールを用いる 1H、1H, 2H, 2H-Perfluoro Octylgallate の酵素合成を検討し、フルオラス環境で lipase が効率良く利用できることも見出した。これらの知見より、今後イオン性高分子に対してペプチド合成酵素を効率良く導入することが可能になれば、本研究成果のバイオテクノロジー分野への応用研究の展開が可能になると期待できる。

一方、酵素触媒と金属触媒を組み合わせると動的速度論的分割等の高度な有機反応への適用が可能になる。したがって、1B に金属触媒を導入することが可能になれば、酵素触媒と金属触媒を一挙に固相に組み込んだハイブリッド型触媒の開発が期待できる。研究②により既に酵素をその活性を起こすことなく高分子内に導入できることを明らかにしているため、(lipase を導入していない) 高分子に対する金属触媒の導入につい

て検討した。その結果、金属酸化物塩（オスミウム酸塩、過ルテニウム酸塩、ヘテロポリ酸塩等）を用いると架橋型イオン性高分子に効率良く導入できることを見出し、さらにその触媒活性を低下させることなく利用できることも明らかになった。特に、金属酸化物塩導入型の高分子ゲルは、アルコール類の触媒的酸化反応を水中で効率良く行うことが可能であった。続いて、(lipaseを導入している) 1B に対する金属触媒の導入について検討したところ、同様に金属酸化物塩は導入できたものの酵素触媒活性は低下した。以上より、今回行った方法による酵素触媒と金属触媒を高分子に組み込んだハイブリッド型触媒の創製は困難であることが判明し、有機分子触媒や有機反応剤（超原子価ヨウ素試薬等）を用いる別のアプローチを検討する必要性が生じた。しかしながら、金属酸化物塩導入型の高分子ゲルが酵素触媒等と同様に水中で効率良く機能することを明らかにした本知見は興味深く、生合成型の酸化反応において酵素モデル型触媒としての応用が可能になることを示唆している。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

(1) Yuya Sugiyama, Kazuki Ishihara, Yuka Masuda, Yuki Kobayashi, Hiromi Hamamoto, Masato Matsugi, Fluorous mixture synthesis of fluoros-fmoc reagents using a one-pot double tagging strategy, *Tetrahedron Letters*, 査読有、54、2013、pp2060-2062

DOI: 10.1016/j.tetlet.2013.02.008

(2) Hiromi Hamamoto, Novel Use of Oxometalate Catalysts in the design of New Oxidation Methods, *Sci. Rep. Fac. Agr. Meijo Univ.*, 査読有、49、2013、pp33-41
DOI: なし

(3) Hiromi Hamamoto, Development and Application of New Oxidation Systems Utilizing Oxometalate Catalysts. *Chem. Pharm. Bull.*, 査読有、60、2012、pp799-817
DOI: 10.1248/cpb.c112001

(4) Yuya Sugiyama, Yuki Kurata, Yoko Kunda, Atsushi Miyazaki, Junko Matsui, Shuichi Nakamura, Hiromi Hamamoto, Takayuki Shioiri, Masato Matsugi, A fluoros Fukuyama coupling reagent for a concise condensation reaction: Utility of medium-fluorous strategy, *Tetrahedron*, 査読

有、68、2012、pp3885-3892
DOI: 10.1016/j.tet.2012.03.034

(5) Yasuyoshi Miki, Hideaki Umemoto, Masashi Dohshita, Hiromi Hamamoto, Synthesis of pyrrolophenanthridone alkaloid kalbretorine from indolecarboxylic acids via hypervalent iodine(III) mediated halodecarboxylation and reduction, *Tetrahedron Letters*, 査読有、53、2012、pp1924-1927
DOI: 10.1016/j.tetlet.2012.01.132

(6) Hideaki Umemoto, Masashi Dohshita, Hiromi Hamamoto, Yasuyoshi Miki, Simple Synthesis of Pratosine and Hippadine by Intramolecular Palladium-Catalyzed Cyclization and Decarboxylation, *Heterocycles*, 査読有、83、2011、pp1111-1119
DOI: 10.3987/COM-11-12167

[学会発表] (計 20 件)

- ① 三木康義、大石峻平、瀬木良俊、濱本博三、アセトフェノンオキシムの Beckmann 転位について、日本薬学会第 133 年会、2013 年 3 月 30 日 (横浜)
- ② 小林佑基、濱本博三、塩入孝之、松儀真人、テフロンを用いた固相-液相間移動型新規フルオラス触媒反応システムの構築、日本薬学会第 133 年会、2013 年 3 月 30 日 (横浜)
- ③ 廣瀬正樹、松井純子、塩入孝之、濱本博三、松儀真人、フルオラス Fmoc 試薬を用いる ACE 阻害活性ペプチド類縁体のミクスチャー合成、日本農芸化学会 2013 年度大会、2013 年 3 月 25 日 (仙台)
- ④ 三木康義、梅本英彰、堂下正嗣、太田千晶、濱本博三、ピロロフェナンスリトールアルカロイド kalbretorine の合成研究、第 38 回反応と合成の進歩シンポジウム、2012 年 11 月 5 日 (東京)
- ⑤ 王磊、石原一輝、江口文崇、杉山祐也、塩入孝之、濱本博三、松儀真人、大量合成を指向した fluoros-Fmoc 試薬の合成ルートの確立、第 38 回反応と合成の進歩シンポジウム、2012 年 11 月 5 日 (東京)
- ⑥ 濱本博三、藤村一真、畑井一志、服部 翔、三木康義、超原子価ヨウ素試薬を用いるアミノ安息香酸誘導体の脱炭酸的ハロケン化反応、第 62 回 日本薬学会近畿支部総会・大会、2012 年 10 月 20 日 (神戸)
- ⑦ 三木康義、梅本英彰、堂下正嗣、太田千晶、森山希美、濱本博三、Kalbretorine の合成研究、第 62 回 日本薬学会近畿支部総会・大会、2012 年 10 月 20 日 (神戸)
- ⑧ 石原一輝、杉村昌浩、塩入孝之、濱本博

- 三、松儀真人、ライトフルオラスタグを有する Fmoc 試薬の大量合成、日本プロセス化学会 2012 サマーシンポジウム、2012 年 7 月 18 日 (京都)
- ⑨ 江口文崇、宮崎惇、塩入孝之、濱本博三、松儀真人、Tenucyclamide B 全立体異性体のフルオラスミクスチャー合成：Tenucyclamide B 天然型異性体の効率的合成ルートの確立、日本プロセス化学会 2012 サマーシンポジウム、2012 年 7 月 18 日 (京都)
- ⑩ 濱本博三、藤村一真、服部翔、三木康義、脱炭酸的ハロゲン化反応を鍵とする芳香族ハロゲン化合物類の合成、日本薬学会第 132 年会、2012 年 3 月 30 日 (札幌)
- ⑪ 三木康義、堂下正嗣、梅本英彰、濱本博三、脱炭酸的ハロゲン化を利用するピロロフェナンスリドンアルカロイドの合成について、日本薬学会第 132 年会、2012 年 3 月 30 日 (札幌)
- ⑫ 濱本博三、金属酸化物を活用する新規酸化反応システムの開発と応用、日本薬学会第 132 年会、2012 年 3 月 29 日 (札幌)
- ⑬ 宇野喜晴、濱本博三、倉田淳志、岸本憲明、リパーゼを用いた 1H、1H、2H、2H-Perfluoro Octylgallate の酵素合成、日本農芸化学会 2012 年度大会、2012 年 3 月 23 日 (京都)
- ⑭ 宇野喜晴、濱本博三、倉田淳志、岸本憲明、2 段階の酵素反応を用いた Ethyl gallate から Octylgallate 4-O- α -glucopyranoside、第 15 回 生体触媒化学シンポジウム、2011 年 12 月 22 日 (東京)
- ⑮ 原田真理嘉、宇野喜晴、濱本博三、倉田淳志、岸本憲明、リパーゼを用いた 1H、1H、2H、2H-Perfluoro Octylgallate の酵素合成、第 15 回 生体触媒化学シンポジウム、2011 年 12 月 22 日 (東京)
- ⑯ 濱本博三、梅本英彰、堂下正嗣、桑島知代、岡本正道、昼馬美寿々、三木康義、超原子価ヨウ素試薬を用いる安息香酸類の脱炭酸的ハロゲン化とその応用、第 37 回 反応と合成の進歩シンポジウム、2011 年 11 月 8 日 (徳島)
- ⑰ 濱本博三、中嶋梨乃、昼馬美寿々、畑小百合、三木 康義、イオン性高分子を用いる水中固相酸化反応システムの設計、第 61 回日本薬学会 近畿支部総会・大会、2011 年 10 月 22 日 (神戸)
- ⑱ 濱本博三、稲森 真由美、竹丸 香織、鍛治 宗彦、三木 康義、イオン性高分子を用いるリパーゼ触媒の有効活用法の開発、第 61 回日本薬学会 近畿支部総会・大会、2011 年 10 月 22 日 (神戸)
- ⑲ 濱本博三、太田 千晶、藤田 絵美、三木 康義、超原子価ヨウ素試薬による脱炭酸的

ハロゲン化反応を用いるハロインドール類の合成、第 61 回日本薬学会 近畿支部総会・大会、2011 年 10 月 22 日 (神戸)

- ⑳ Hiromi Hamamoto、Shou Hattori、Kaori Takemaru、Munehiko Kaji、Yasuyoshi Miki、Development of A Novel Oxidation System for Halodecarboxylation of Arenecarboxylic Acids、The 2nd International Symposium on Process Chemistry、2011 年 8 月 11 日 (京都)

[図書] (計 1 件)

- (1) 濱本博三、松儀真人、S&T 出版社、新しい溶媒を用いた有機合成、第 5 章 4 節フッ素系アルコールを溶媒に用いた有機合成、2013、339-350

[その他]

ホームページ等

<http://www-agr.meijo-u.ac.jp/cgi-bin/lab013/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

濱本 博三 (HAMAMOTO HIROMI)

名城大学・農学部・准教授

研究者番号：40365896