

学位論文

研究題目

植物性食品中の糖鎖による

エポキシド不斉アミノ化触媒の開発

Development of catalysts for asymmetric amination of

epoxides by glycans in plant foods

2021 年

福井工業大学大学院 工学研究科博士後期課程

応用理工学専攻 環境生命化学コース

竹内祐希

TAKEUCHI, Yuki

目次

第1章 序論	4
1.1 研究の背景	5
1.1.1 医薬品原薬製造における安全な触媒の重要性	5
1.1.2 安全性の高い不斉触媒	9
1.2 エポキシド不斉アミノ化反応触媒の開発	10
1.2.1 β -アミノアルコール化合物とその合成	10
1.2.2 エポキシド不斉開環触媒	12
1.3 本研究の目的	15
1.4 本論文の構成	19
第2章 エポキシド不斉アミノ化反応触媒の開発	21
2.1 緒言	22
2.2 結果と考察	23
2.2.1 スクリーニング系の構築	23
2.2.2 市販酵素のスクリーニング	25
2.2.3 生成物の立体配置の確認	28
2.2.4 リパーゼ OF を用いた反応の水分効果	29
2.2.5 リパーゼ OF を用いた反応の最適化(溶媒効果)	30
2.2.6 リパーゼ活性とエポキシ開環反応活性の相関	32
2.2.7 真の活性成分の探索	35
2.2.8 ソヤファイブ S-DN の構造と活性部位	39
2.2.9 ソヤファイブ S-DN と水分量の最適化	43
2.2.10 ソヤファイブ S-DN の溶媒効果	44

2.2.11	(<i>R,R</i>)- 1a の精製	45
2.2.12	スケールアップ合成	49
2.2.13	ソヤファイブ S-DN の再利用	52
2.3	小括	54
2.4	実験材料および方法	55
2.4.1	使用機器一覧	55
2.4.2	実験材料	55
2.4.3	スクリーニング実験方法	56
2.4.4	GC 分析条件と転換率算出方法	56
2.4.5	ラセミ体 ((<i>rac</i>)- 1a) の合成	58
第 3 章 ソヤファイブ S-DN の基質適合性と反応機構の推定		59
3.1	緒言	60
3.2	結果と考察	62
3.2.1	ソヤファイブ S-DN 触媒の基質適合性(エポキシド)	62
3.2.2	ソヤファイブ S-DN 触媒の基質適合性(アミン化合物)	63
3.2.3	触媒機構の提案(反応場)	66
3.2.4	触媒機構の提案(エポキシドの適合性)	70
3.2.5	触媒機構の提案(アミンの適合性)	72
3.2.6	化合物 1c によるスケールアップ検証	76
3.2.7	化合物 1e によるスケールアップ検証	78
3.3	小括	81
3.4	実験材料および方法	83
3.4.1	実験材料	83
3.4.2	スクリーニング実験方法	83

3.4.3	GC 共通分析条件	83
3.4.4	HPLC 共通分析条件	84
3.4.5	GC 前処理法(トリメチルシリル化)	84
3.4.6	HPLC 前処理法(ベンゾイル化)	84
3.4.7	ラセミ体合成方法と物性データ、および各化合物の分析条件	85
第4章 食物粉末によるエポキシドアミノ化反応活性		97
4.1	緒言	98
4.2	結果と考察	99
4.2.1	市販多糖類による反応	99
4.2.2	食物粉末によるエポキシド不斉アミノ化反応	101
4.2.3	ニンジン触媒の基質適合性	103
4.2.4	活性中心の推定と食品成分触媒の可能性	106
4.3	小括	109
4.4	実験材料および方法	111
4.4.1	実験材料	111
4.4.2	実験および分析方法	113
第5章 総括		114
参考文献		117
外部発表		123
謝辞		127

第 1 章

序 論

1.1 研究の背景

1.1.1 医薬品原薬製造における安全な触媒の重要性

化学工業において、触媒は必要不可欠な存在である。触媒は、化学反応式には現れず、反応速度、選択性、立体規則性などを制御する物質と定義づけできる。多くの物質が触媒として機能することが知られており、単純な無機化合物や有機分子、有機金属錯体、タンパクである酵素など様々なものが研究・報告されている。産業的には、水素と窒素からのアンモニア合成やメタンと酸素によるメタノール合成などの基礎化学製品の製造から自動車の排ガス浄化、食品産業では不飽和油脂の部分水素化によるマーガリンの調製などに使用され、現代社会にとって必要不可欠なものとなっている^[1]。

医薬品産業においても、その有効成分である原薬の製造段階で多くの触媒が活用されている。目的の原薬が不斉中心を持ち一方の鏡像体のみが必要となる場合、不斉合成法が有効であり、そのための不斉触媒の開発研究は現在も重要な学術的な課題の一つである。不斉触媒反応の研究は古くよりおこなわれているが、特に 1970 年頃より実用的な合成法と言う明確な目的のもとに急速に進展した^[2]。これまでに様々な手法が開発され、医薬のみならず電子材料などの基礎化学品から、香料、農薬など多くの物質生産に利用されている。この分野の発展には、2001 年にノーベル化学賞を受賞した **W. S. Knowles**、**K. B. Sharpless**、野依良治らによる不斉触媒の開発と、その実用化によるところが大きい^[3-5]。彼らの開発したキラル配位子と遷移金属を用いる手法は、当時は技術的に困難とされていた効率性と高立体選択性を達成した。また実験室レベルから現業製造プロセスまでシームレスにスケールアップ可能な方法であったことより、レボフロキサシンなどの光学活性原薬の開発・生産などを通じて人類に大きく貢献している^[6]。

原薬には、有機合成法で生産可能な低分子化合物と生物学的手法を用いるタンパクなどの高分子化合物がある。近年の売上ランキング上位の医薬品は、タンパクである抗体などの生物学的なものが多くを占めるようになっている。抗体は従来の低分子化合物にはない薬効の強さと少ない副作用が特徴であり、例えば 2017 年医薬品売上ランキング首位の抗リュウマチ薬のアダリムマブ(ヒト型抗ヒト Tumor Necrosis Factor (TNF)- α モノクローナル抗体、商品名：ヒュミラ)や 2018 年にノーベル医学生理学賞を受賞した本庶祐らにより開発されたニボルマブ(ヒト型抗ヒト Programmed cell death 1 (PD-1)モノクローナル抗体、商品名：オブジーボ)などが代表例としてあげることができ、今後も様々な疾患に対する有効な治療薬としての開発が進むものと思われる^[7]。そして抗体の次の医薬は、核酸やペプチドなどの高～中分子(分子量 > 1000)のものが主力となっていくであろうと予想されている^[8]。

抗体や中分子などの有機合成での製造が困難な原薬が主力となっていく一方、従来の低分子薬の開発も続けられている。2016 年にアメリカ食品医薬品局 (FDA)により新たに承認された 20 の医薬品のうち、9 品は低分子薬である^[9]。また、画期的な低分子薬の開発も進んでおり、例えば 2017 年世界売上 4 位の C 型肝炎治療薬であるハーボニー配合錠(商品名)は、低分子化合物であるレジバスビルとソホスブビル(Figure 1)が有効成分となっており、既存の高分子治療薬インターフェロンよりも高い治療効果を発揮する^[10]。このように低分子薬の研究は今も続けられており、今後も画期的なものの開発され難病の治療に用いられるものと予想されている^[11]。したがって、これらの効率的合成に大きく貢献できる触媒開発についての重要性は今後も変わらないであろう。

世界各国で開発される医薬品であるが、製薬企業の地球規模の活動によりその使用が一国だけに限定されるものは少なく、その大部分は多くの国で販売され世界中の人々の健康に寄与している。また医薬品は、疾患を有する人々が使用するため、食品や化粧品などと比較してより高い安全性が求められ、特に有効成分である原薬は、確

実な効果と共に高度な品質保証が必要とされ、各国当局により様々な規制を受ける。
しかし、国により規制が異なると開発に多大なコストが必要となり、開発国が限られてしまうこととなる。

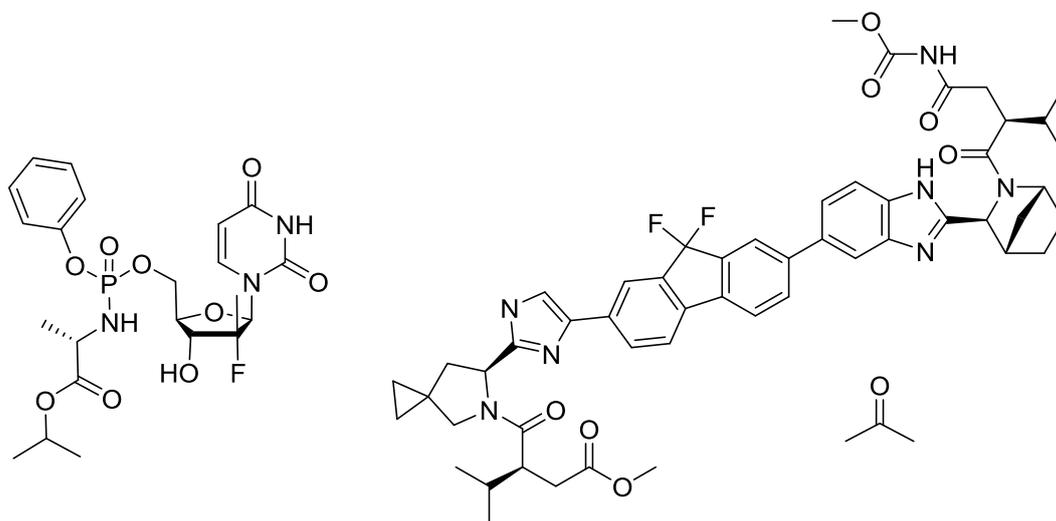


Figure 1. レジバスビルとソホスブビルの化学構造

そこで世界各国の規制を調和する目的で、日本、アメリカ合衆国、ユーロ圏の3極で医薬品規制調和国際会議：International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH) が設立されている。ここでは科学的・技術的知見に基づいた医薬品規制に関する様々なガイドラインが作成され、これに基づいて各国の医薬品を管轄する当局が規制を行っている。このガイドラインのうち品質に関するものは、Qualityの頭文字よりQが付けられている。特に医薬品の安全性に直接影響する不純物の管理については、Q3A-Dで規定されている。

Q3A：新有効成分含有医薬品のうち原薬の不純物に関するガイドライン

Q3B：新有効成分含有医薬品のうち製剤の不純物に関するガイドライン

Q3C：医薬品の残留溶媒ガイドライン

Q3D：医薬品の元素不純物ガイドライン

Q3A に規定される不純物は、原薬と構造が類似する化合物や製造の際に使用した試薬や中間体、またはそれらが変化したものが対象となる。これらに関し、細胞毒性など安全性の確認が必要となる不純物の許容濃度は、一日最大投与量 2 g を超える場合には 0.05% とされている。ただし、この基準に鏡像異性体は含まれていない。一方、サリドマイドによる薬害が発生して以来、鏡像異性体は、生体内でラセミ化する場合や両方の鏡像異性体に毒性がないことが明らかである場合を除き、不純物として取り扱うことが妥当とされ、医薬品の規格及び試験方法に関するガイドライン Q6A には、分析が可能であれば Q3A に従うと記載されている。従って光学活性な原薬は、鏡像異性体の混入量を他の不純物同様 0.05% 以下としなければならない、これは鏡像体過剰率 (ee) 換算で 99.9% と非常に高い値である。そのため、光学活性な原薬の製造には、高立体選択的な反応の開発や効率的な精製方法の確立が必要不可欠である。

原薬に含まれる不純物は有機化合物だけではなく、元素についても有害性に応じて Q3D にて規制され、残留許容濃度が設定されている。例えば、オレフィンやケトンの水素化やベンジル基の脱保護、カップリング反応の触媒として用いられる白金族元素 (Pd、Rh、Ru、Ir、Os) の許容濃度は薬の投与形態により異なるが最少は製剤中に 0.1 µg/g となっている。元素単体やその錯体が酸化や還元、増炭など様々な反応に用いられる Mo、Co、Cu、Ni、V、Cr は、それぞれ 0.1–3 µg/g。主に有機金属化合物として用いられる Li は、2.5 µg/g である。これらの元素が混入するプロセスでは、通常の反応後処理では元素を除去できないケースがあり、そのための高価なスカベンジャー樹脂などが開発・市販されている^[12]。したがって、安全性の高い原薬を安定生産するためには、有害金属を用いない原薬製造プロセスを開発することが望ましい。

このように、原薬には鏡像異性体や有害元素などの不純物が少ない高度な品質と安全性が求められるが、同時に安価な製造法の開発も重要である。近年、日本では高齢化に伴い医療費が増大しており、その抑制策の一つとして厚生労働省は安価な後発品 (ジェネリック医薬品) の使用を奨励している。後発品は、先発品の特許切れ後、ある

いは一定期間後に医薬品の公定価格である薬価が収載されるものである。これらは先発品と異なり、1品あたり1,000億円とも言われる開発コストが不要で安価に開発することが可能であるとの理由から低い薬価が設定される。厚生労働省は、後発品置換率目標(数量ベース)を2020年9月時点で80%としており、また後発品の薬価収載後10年を経過した長期収載品のうち置換率80%未満のものは、先発品の薬価を後発品価格まで引き下げる方針を示している。また、国民所得が低い発展途上国の患者を救うためにも安価な原薬を生産することは非常に重要である。

これらの背景により、今後の原薬製造プロセスに用いる触媒には、これまで求められていた選択性や反応性の高さに加え、安全性や低コストなどが求められる。

1.1.2 安全性の高い不斉触媒

不斉触媒は近年、有機分子触媒の研究も進んでいるが、その多くが有機金属錯体であり、含まれる金属や配位子が有害な場合、除去するために多くの労力とコストを要する。また金属や配位子が入手困難な場合は、医薬品の安定供給の面で課題とされることもある。そのため世界中どこでも容易に入手が可能で安価かつ毒性が低い触媒は、原薬の製造のためには非常に有益である。

また一般的に、有機金属触媒や有機分子触媒は少量の使用で効果を発現できるものが多いが、それ自体が毒性を有している場合があり、原薬製造プロセスでの使用には問題となることがある。一方、生体触媒である酵素は食品加工用などに多く用いられており、安全性は高い。しかし、工業レベルで使用可能な酵素の多くは微生物を培養することにより生産されており、比較的高価である。市販酵素には、微生物が生産するもの以外に、動物臓器や植物由来のものがある。植物由来の代表例には、それぞれパパイヤ、パイナップル、イチジクから抽出される、パパイン、ブロメライン、フィシンがある。これらは安価な上に食品素材が原料であるため安全性が高く、そのタン

パク分解作用を利用して食品産業はじめ有機合成にも利用されている^[13-15]。これら植物由来の酵素であって果実由来以外で容易に入手可能なものは、エンドウ豆由来の選択的還元酵素として市販されている SanCat がある^[16]。

しかし果物や豆類などの食品素材そのもの、あるいはそれらから製造可能な酵素以外の成分を化学反応の触媒として使用するアイディアは知られておらず、また研究自体がほとんど報告されていない。これらが触媒作用を示すのであれば、人類が長く利用してきた植物性の食品を原料とすることができるため、安全性が高く、かつ安価に大量に入手可能であり、これまでの化学的な触媒や酵素にはない大きな利点となるが、研究分野としては未知の領域であった。

そこで食品素材が触媒として機能するかについて、医薬品原薬をモデル物質とし、その製法開発を通じて研究することとした。

1.2 エポキシド不斉アミノ化反応触媒の開発

1.2.1 β -アミノアルコールとその合成

β -アミノアルコールは、アドレナリン受容体に作用する医薬として古くから用いられている (Figure 2)^[17]。また、医薬以外にも触媒やキラル補助基としても利用可能な重要な不斉源である^[18]。

その合成法は数多く開発されており、代表的な方法は次の通りである。

- ① オレフィンの直接ヒドロキシアミノ化
- ② α -アミノケトンの還元
- ③ α -ヒドロキシイミンの還元
- ④ アジリジンの加水分解
- ⑤ エポキシドのアミンによる開環

これらのうち、⑤の方法のみ理論上副生物が発生しない(Scheme 1)。更にその原料においても工業的製法では、エポキシドは基礎化学原料であるオレフィンに酸素で酸化することによって得られ、アミンもアルコールとアンモニアから得られるため、全ての工程を通じて副生成物が最小限で、原子効率が非常に高い。近年、合成化学においてこの原子効率という考え方は、環境やコストの観点から非常に重要視されている^[19]。

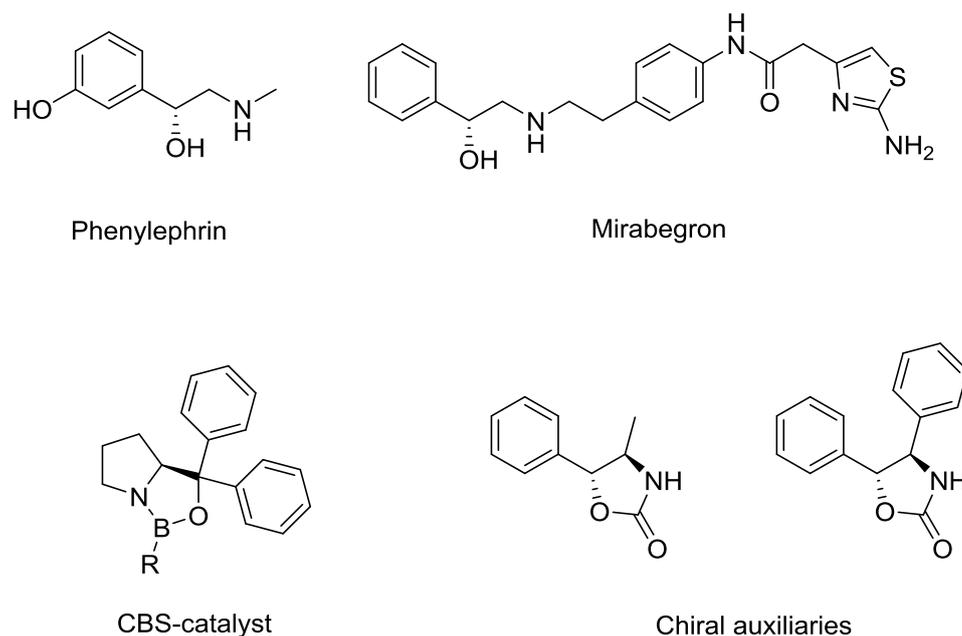


Figure 2. β-アミノアルコールの利用例



Scheme 1. エポキシドの開裂によるβ-アミノアルコール合成

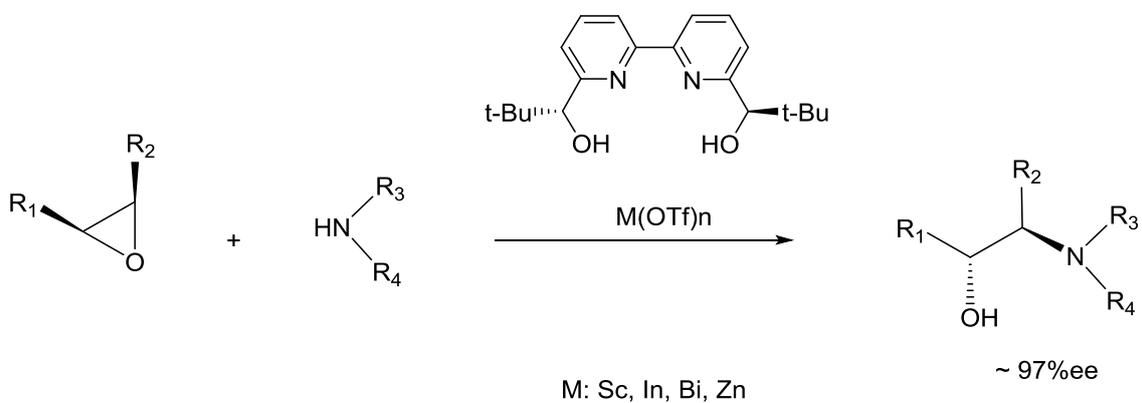
この方法の原料であるエポキシドは、三員環構造ゆえに大きく歪んでおり、反応性が高い。そのため、多くの場合では触媒が存在しなくともアミンなどの求核種との開環反応は室温であっても自発的に進行する。一方で、アミノアルコールの生産を目的とする場合は、反応速度を高めるために触媒を添加する場合が多い。触媒(反応促進剤)としては、単純な物質である酸化黒鉛や水酸化ナトリウムなど様々なものが使用できる^[20, 21]。目的物が光学活性化合物の場合には、不斉触媒を使用すると原子効率が高くなり、特にエポキシ化合物がメソ体である場合には、理論収率は100%となり理想的である。

1.2.2 エポキシド不斉開環触媒

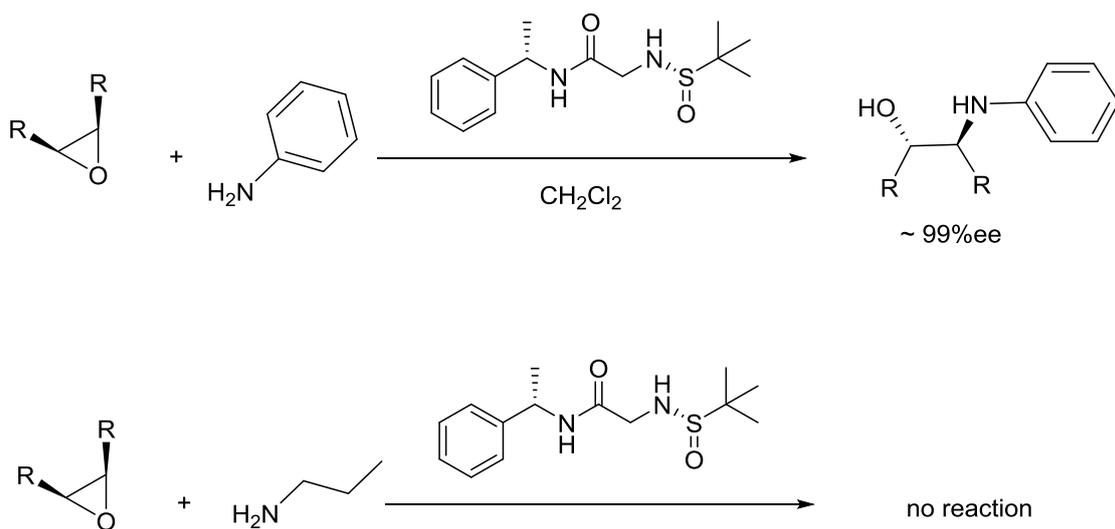
メソ体のエポキシドをアミンで開環する不斉触媒は、多くのものが開発されている。例えば、Sc、Bi、In、Znなどの遷移金属と光学活性ピペリジン配位子からなる錯体が有効である(Scheme 2)^[22]。しかし、生成物の鏡像体過剰率(ee)が90%を超えるのは、芳香族置換基を有するエポキシドまたは芳香族アミンに限定され、脂肪族アミンで高選択性を示す報告例はない。

金属錯体を用いない、スルホンアミド誘導体を有機分子触媒として使用する方法も報告されている(Scheme 3)^[23]。この場合も芳香環上に電子供与性基を有するアニリンのみが反応し、脂肪族アミンでは目的物が得られていない。

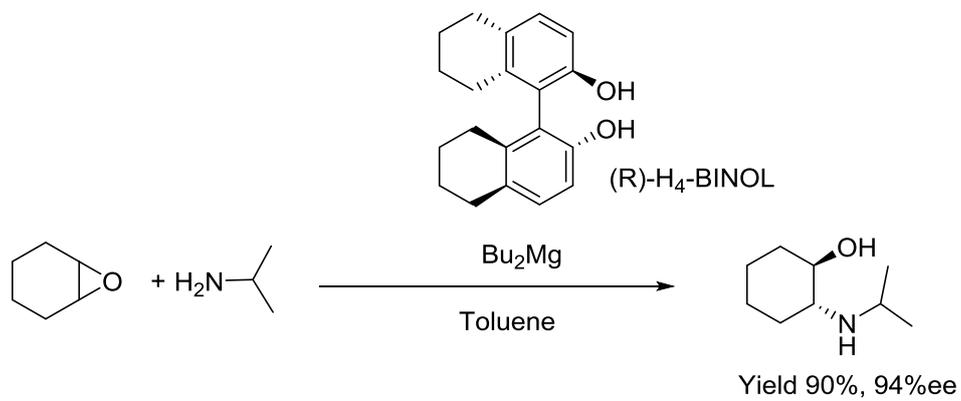
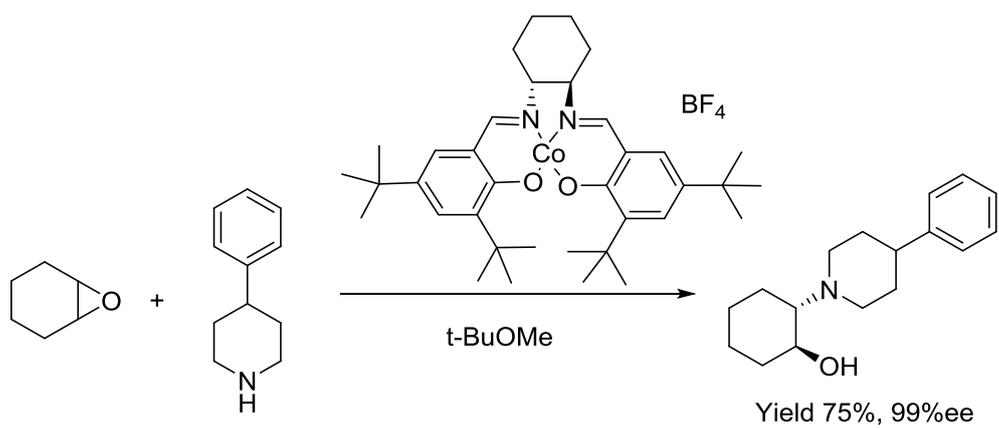
脂肪族アミンによるエポキシドの不斉アミノ化反応については報告例が少なく、Co-サレン錯体、H₄-BINOL-Mg錯体などによる方法が報告されているのみである(Scheme 4)。Co-サレン錯体を用いる方法は、脂肪族アミンではあるものの分子内にはベンゼン環を有しているアミンのみが示されており、その他のアミンについては成功例が報告されていない^[24]。H₄-BINOL-Mg錯体を用いる方法は、芳香環を有しないイソプロピルアミンでの高い選択性が報告されている唯一の例である^[25]。



Scheme 2. 遷移金属錯体を用いるエポキシドの不斉開環例



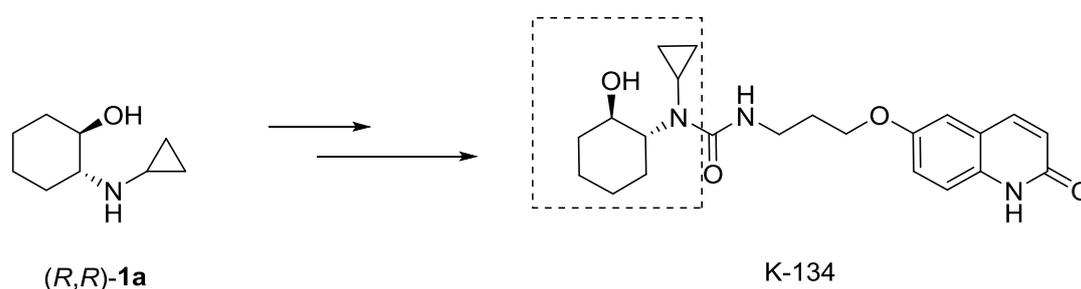
Scheme 3. 有機分子触媒を用いたエポキシドの不斉開環例



Scheme 4. 脂肪族アミンを用いたエポキシドの不斉開環例

1.3 本研究の目的

1-シクロプロピル-1-((1*R*,2*R*)-2-ヒドロキシシクロヘキシル)-3-(3-(2-オキソ-1,2-ジヒドロキノリン-6-イル)オキシ)プロピル尿素(K-134)は、細胞内のセカンドメッセンジャーである環状アデノシンモノリン酸や環状グアノシンモノリン酸を分解するホスホジエステラーゼ(PDE)のうち、血小板・心臓・血管平滑筋に存在する PDE3 を強力に阻害する作用を有する化合物で、慢性動脈閉塞症等の治療薬として期待されている化合物である^[26]。K-134 の製法は、β-アミノアルコール構造を有する(1*R*,2*R*)-2-シクロプロピルアミノ-1-シクロヘキサノール((*R,R*)-1*a*)とキノリノン誘導体を縮合するものである(Scheme 5)。そのため、(*R,R*)-1*a* を高品質かつ効率的に製造する方法は、K-134 の開発にとって非常に重要である。



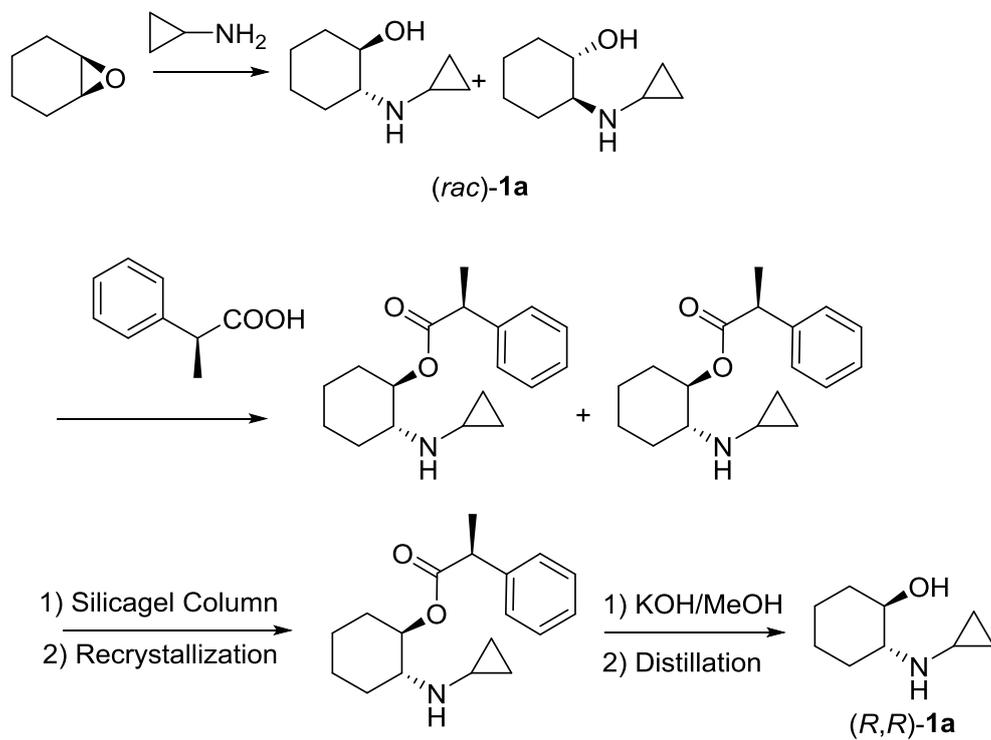
Scheme 5. PDE3 阻害剤 K-134 とその原料(*R,R*)-1*a*

K-134 の開発において、(*R,R*)-1*a* の製造法としてこれまでに報告されているものは以下の2法である。

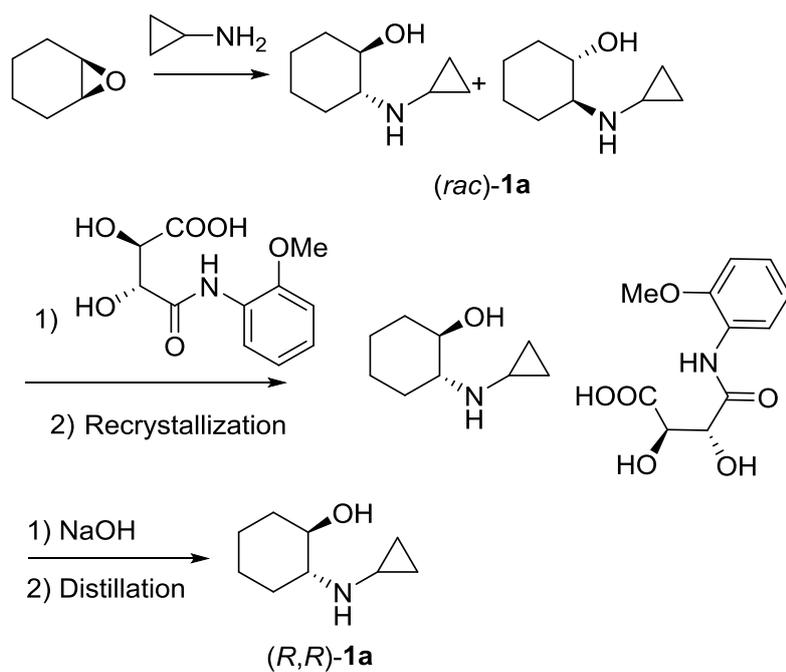
既存製法①：(*rac*)-1*a* と光学活性マンデル酸との縮合により得られるジアステレオエステルをシリカゲルクロマトグラフィーにより分離する方法(Scheme 6)^[27]。

既存製法②：(*rac*)-1*a* と光学活性酒石酸モノアミド誘導体のジアステレオマー塩を分

割する方法 (Scheme 7) [28]。



Scheme 6. (R,R)-1a の既存製法①



Scheme 7. (*R,R*)-**1a** の既存製法②

既存製法①の理論収率は最大 50%であり、かつ不要なエナンチマー(*S,S*)-**1a** は簡単にラセミ化できないため、収率を改善することは困難である。また製造に際し、(*rac*)-**1a** の合成、つづくマンデル酸との縮合、生じたジアステレオマーのシリカゲルカラムクロマトと再結晶による精製、さらに加水分解による脱マンデル酸化、最後に蒸留精製と多段階の操作を要し、特許に記載された収率は、(*rac*)-**1a** より 9%と低い。また、シリカゲルカラムクロマト精製は通常、大量の溶媒を消費するため環境面とコスト面に問題がある。

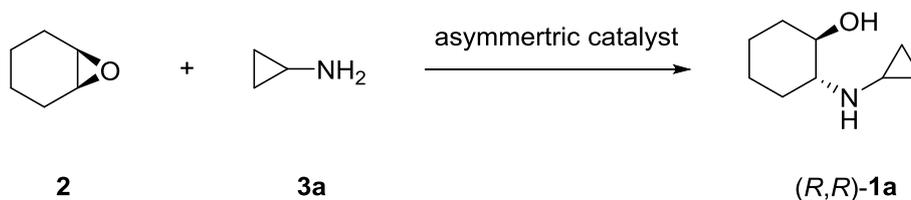
既存製法②も理論収率は①と同じであるが、製造する際の操作は少なくなり、(*rac*)-**1a** の合成、続くジアステレオマー塩形成、その再結晶による精製、フリー化による分割剤除去、最後に蒸留精製である。しかし収率は向上しておらず、こちらも同じく 9%である。いずれも、1,2-エポキシシクロヘキサン (**2**) をシクロプロピルアミン (**3a**) で非選択的にアミノ化して得られる (*R,R*)-**1a** と (*S,S*)-**1a** の混合物である (*rac*)-**1a** をジアステレオマーへ変換して分離する方法であり、これが低収率の原因となっている。

したがって、これらの問題を解決するためには、ジアステレオマー化によるラセミ体の光学分割ではなく、エポキシドの不斉アミノ化反応によって (*R,R*)-**1a** を立体選択的に得る方法を開発することが必要である。Scifinder を用いて文献調査を行ったところ、不斉触媒を用いた(*R,R*)-**1a** の立体選択的合成は報告されていなかった。さらに前節で述べたように、エポキシド不斉アミノ化反応を行う触媒はいくつか報告されているものの、原薬製造における安全性という観点から、従来の有機金属触媒や有機分子触媒を用いない新規な不斉触媒の開発が望まれる。

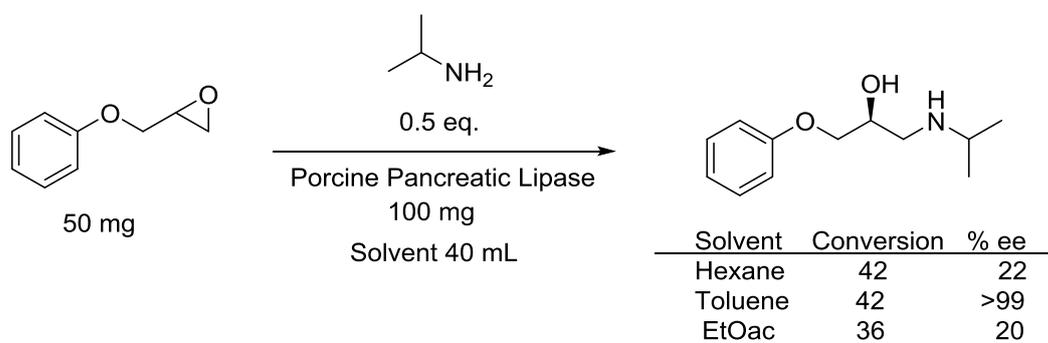
このような背景から、本研究では (*R,R*)-**1a** の立体選択的合成法の開発のため、エポキシド不斉アミノ化反応の新規な不斉触媒系を構築することを目的とする (Scheme 8)。

新規な不斉触媒に求められる要件は高い安全性が第一であるため、まずは酵素系の触媒が候補に挙がる。酵素を用いたエポキシドの不斉アミノ化反応について先行技術

を調査したところ、光学活性(*S*)-プロプラノール誘導体の製法として、リパーゼを触媒として使用する例があった(Scheme 9)^[29]。



Scheme 8. 不斉触媒を用いた (*R,R*)-**1a** の不斉合成



Scheme 9. リパーゼを利用したエポキシドのアミンによる不斉開環例

この文献ではトルエンやヘキサン、酢酸エチルなどの有機溶媒中で豚膵臓由来のリパーゼを触媒として、ラセミ体の 2-(フェノキシメチル)オキシランとイソプロピルアミンを反応することで、選択的に (*R*)-体のみが開環し、99%ee と非常に高い鏡像体過剰率でアミノアルコール誘導体が得られている。この研究例を参考に、まずはリパーゼを含む酵素を用いた不斉アミノ化反応による (*R,R*)-**1a** の検討を開始した。

市販の酵素を用いて反応を行ったところ、特定のメーカー製のリパーゼだけに活性があったため、その原因について詳細に調べた結果、リパーゼ自身に活性があるのではなく、混在していたと考えられる大豆由来成分が真の活性成分であることが示唆された。そこで市販の大豆製品スクリーニングを行ったところ、ソヤファイブ S-DN という商品に不斉アミノ化反応に対する触媒作用があることが明らかになった。

1.2 節で述べたように、食物素材そのものやその加工品に不斉触媒機能があれば、安全かつ安価な不斉合成が可能となり、原薬製造過程において大きなアドバンテージとなりうる。今回見出されたソヤファイブ S-DN にはその可能性が秘められていると考え、本研究の主眼を「エポキシドの不斉アミノ化反応における新規不斉触媒としてのソヤファイブ S-DN」に置き、その基質適合性を明らかにし、活性種や反応機構を解明することを目標とした。

1.4 本論文の構成

本論文は本章の序論を含め、全部で 5 章からなる。

第 2 章はエポキシドの不斉アミノ化反応に対する新規不斉触媒の探索過程について述べる。リパーゼを用いたスクリーニングから、メーカーに違いによる活性の差、真の活性成分が大豆由来であること、ソヤファイブ S-DN の不斉触媒機能の発見にいたる詳細を記した。

第 3 章はソヤファイブ S-DN の不斉触媒としての基質適合性ならびに反応機構の推

定について述べる。シクロプロピルアミンに対して 5 種類のエポキシドの反応を行い、エポキシドに対する適合性を調べた。また、1,2-エポキシシクロヘキサン(2)に対して 14 種類のアミンを反応させ、アミンに対する適合性を調べた。それらの結果をもとに、反応機構の推定を行った。

第 4 章は大豆以外の食物粉末について、不斉アミノ化反応に対する触媒活性について調べた結果について述べる。残念ながらソヤファイブ S-DN を超える結果は得られなかったが、食物を不斉触媒に用いるという新たな可能性の端緒となったと考えている。

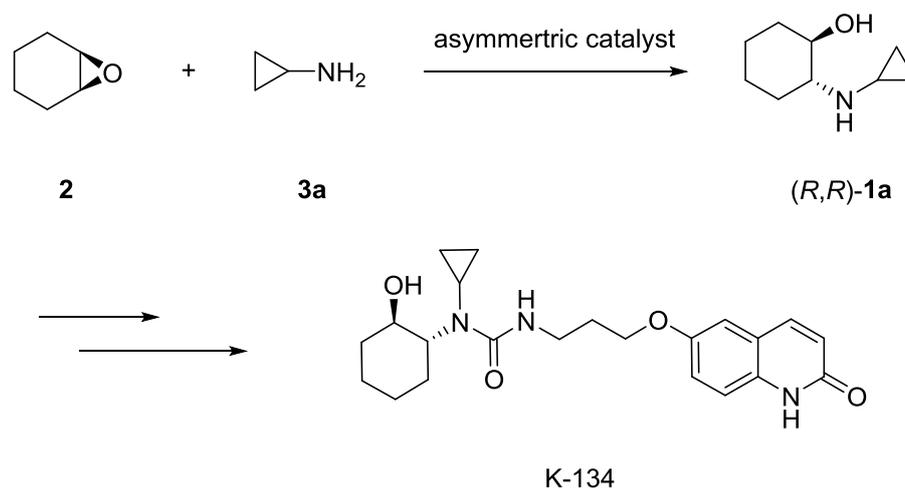
第 5 章は本研究の総括である。

第 2 章

エポキシド不斉アミノ化反応触媒の開発

2.1 緒言

近年、複雑な構造や合成が困難な構造を有する光学活性な医薬品原薬が多く承認されている。その製造過程において、不斉触媒を用いる方法はコスト面で非常に効果的なため産業界の要望は高く、学術的にも重要な課題である。加えて、医薬品製造に用いる触媒は、人体への害が少ない安全な触媒であることが望まれる。そこで、強力なPDE3阻害剤K-134のキラルビルディングブロックである、(1*R*,2*R*)-2-シクロプロピルアミノ-1-シクロヘキサノール((*R,R*)-**1a**)の製法開発を目的とし、安全な触媒の開発を念頭に研究に着手した。(*R,R*)-**1a** は、1,2-エポキシシクロヘキサノール(**2**)をシクロプロピルアミン(**3a**)にて開環的不斉アミノ化する製法が最も原子効率が高い。また、**2** と **3a** は共に基礎化学品であり、容易かつ安価に入手できるため、実生産面でも理想的な原料である。そこで、これらの反応に効果的かつ有害な元素を含まない酵素のスクリーニングより研究を開始し、安全なエポキシド不斉アミノ化触媒を探索することにした。



Scheme 10. K-134 と(*R,R*)-**1a**

2.2 結果と考察

2.2.1 スクリーニング系の構築

まず、酵素のスクリーニング系の構築を行った。一般的にエポキシドは反応性が高く、触媒を加えなくても自発的にアミンと開環反応し、アミノアルコールを与えることが知られている。したがって、酵素反応に適した室温付近の反応温度であっても基質である **2** と **3a** が自発的に反応し、ラセミ体 (*rac*)-**1a** が生じることは十分に予想される。しかし触媒を介さない自発的な反応は溶媒や温度などの条件によって、その速度が異なることが知られている。つまり、触媒が存在しない条件下で自発的な反応が十分に遅い系であれば、触媒の探索が可能となる。そこで、まずはスクリーニングを行う溶媒系について検討を行った。1.3 節にて記載したリパーゼを用いた先行研究では、ヘキサンやトルエン、酢酸エチルなどの無極性溶媒中が用いられていた。また、一般的に酵素反応で用いる有機溶媒は、アルコール類なども用いられる^[30]。そこで、産業的に用いられる事の多いメタノール、トルエン、酢酸エチルを用いて評価した。反応温度については、一般的に酵素が最も高い活性を示す 20–40 °C とした。また、通常有機溶媒中で酵素反応を行う場合は、少量の水が存在しないと活性を発現しない^[31]。そこで、水の添加効果についても調べた (Table 1)。

その結果、トルエン、酢酸エチル中では反応の進行が遅く、水 (1%) の添加の有無にかかわらず、生成物は確認されなかったため、自発的な反応はほとんど進行しないとわかった (entry 1, 2, 4)。しかしながら、トルエン中で水を 10% 添加した場合は、わずかに反応が進行し、1% の転換率で生成物を検出したが、このレベルであればスクリーニングに影響はないと判断した (entry 3)。一方、メタノールを用いた場合、水なしでも 20 °C, 22 h で転換率が 2% となった。さらに反応温度の上昇に伴って転換率は高くなり、40 °C では 10%、水を 10% 添加した場合で 12% と自発的な反応速度が十分に速

いためスクリーニング溶媒には不適とわかった (entry 5-8)。

Table 1. スクリーニング溶媒の検討^a

entry	溶媒	温度(°C)	水分(%)	反応時間(h)	転換率(%)
1	トルエン	40	—	22	0
2	トルエン	40	1	22	0
3	トルエン	40	10	21	1
4	酢酸エチル	40	1	21	0
5	メタノール	20	—	22	2
6	メタノール	30	—	22	5
7	メタノール	40	—	22	10
8	メタノール	40	10	22	12

^a反応条件：2, 0.1 mL ; 3a, 0.07 mL ; 溶媒, 10 mL

これらのことより、一般的な酵素の至適温度 35–40 °C での反応速度が十分に遅い酢酸エチルとトルエンを用い、10%程度までの水の添加であれば、触媒を介さない自発的な反応の進行が最小限に抑えられるため、スクリーニングに適したと溶媒であると判断した。しかしながら、酢酸エチルはシクロプロピルアミンと反応シアミド化合物を副生する可能性があることや、リパーゼによる加水分解反応の進行が懸念されるため、スクリーニング溶媒をトルエンに決定した。

2.2.2 市販酵素のスクリーニング

酵素のスクリーニングは、入手が容易な市販品を用いた。反応温度は、一般的な酵素の至適温度である 37 °C とし、トルエン-水混合溶媒中、振盪機で混合しながら反応を行った。なお、先述の通り酵素が触媒活性を示すためには水が必須であるため、**2** と **3a** およびトルエンの合計容量に対して 4%の水を添加した。結果を Table 2. に示す。

Table 2. 市販酵素を用いた反応^a

entry	市販酵素	起源菌	時間 (h)	転換率 (%)	ee 値 ^b (%)
1	リパーゼ QLC	<i>Alcaligenes</i> sp.	18	2	0
2	リパーゼ QLG	<i>Alcaligenes</i> sp.	18	2	0
3	リパーゼ MY	<i>Candida cylindracea</i>	18	8	65
4	リパーゼ TL	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	18	20	63
5	リパーゼ QLM	<i>Alcaligenes</i> sp.	18	28	65
6	リパーゼ OF	<i>Candida cylindracea</i>	18	21	70
7	リパーゼ A“アマノ”6	<i>Aspergillus niger</i>	65	5	-3
8	リパーゼ AH“アマノ”	<i>Pseudomonas</i> sp.	65	6	1
9	リパーゼ AK“アマノ”20	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	65	5	0
10	リパーゼ AY“アマノ”30G	<i>Candida rugosa</i>	65	13	0

Table 2 つづき

11	リパーゼ AY“アマノ”30	<i>Candida rugosa</i>	65	12	0
12	ニューラーゼ F	<i>Rhizopus niveus.</i>	65	12	36
13	リパーゼ A-5	<i>Rhizopus javanicus</i>	65	1	-7
14	リパーゼ G“アマノ”50	<i>Penicillium camemberti</i>	65	13	1
15	リパーゼ M“アマノ”10	<i>Mucor javanicus</i>	65	10	15
16	リパーゼ PS“アマノ”	<i>Burkholderia cepacia</i>	65	7	0
17	リパーゼ PS-C“アマノ”II	<i>Burkholderia cepacia</i>	65	10	0
18	リパーゼ PS-D “アマノ”I	<i>Burkholderia cepacia</i>	65	6	-1
19	リパーゼ R“アマノ”G	<i>Penicillium camembert</i>	65	8	-8
20	リパーゼ AS“アマノ”	<i>Aspergillus niger</i>	65	4	0
21	リパーゼ PS“アマノ”SD	<i>Burkholderia cepacia</i>	65	7	0
22	リパーゼ AYS“アマノ”	<i>Candida rugosa</i>	65	18	1
23	リパーゼ P“アマノ”	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	65	9	-3
24	リパーゼ A-10FG	<i>Rhizopus javanicus</i>	65	3	1
25	リパーゼ F-AP15	<i>Rhizopus oryzae</i>	65	12	7

^a反応条件：2, 50 μ L；3a, 30 μ L；トルエン, 420 μ L；水, 20 μ L リパーゼ, 100 mg

^bGC の保持時間の長い鏡像体が基準

市販のリパーゼは、名糖産業社製、天野エンザイム社製のものを中心に計 25 種類検討した。まず、名糖産業社製のリパーゼについて検討したところ、反応時間 18 h において、リパーゼ QLC、リパーゼ QLG は転換率 2% で反応がわずかしか進行しなかったが (entry 1, 2)、リパーゼ MY、リパーゼ TL、リパーゼ QLM、リパーゼ OF では反応が進行し、転換率はそれぞれ 8–28%、ee 値は 63–70% であった (entry 3–6)。

一方、天野エンザイム社製のリパーゼについては、18 h の反応時間では生成物のガスクロマトグラフィー (GC) 分析において目的物のピークが確認できなかったため、反応時間を延長し、ピークが明確に確認できた 65 h で評価した (entry 7–23)。しかしながらその転換率は全般に低く、最も高いリパーゼ AYS “アマノ” においても 18% に過ぎず (entry 22)、しかもその時の生成物の ee 値は 1% であり、ほとんど立体選択性を示さなかった。また、ee 値についてはニューラーゼ F において 36% (entry 12)、リパーゼ M “アマノ” 10 において 15% の値を示したが (entry 15)、名糖産業社製のリパーゼを用いた結果には及ばなかった。

ヤクルト社製のリパーゼ A-10FG、シグマアルドリッチ社製リパーゼ F-AP15 についても 65 h で検討したが、転換率および生成物の ee 値について良好な結果を得ることはできなかった (entry 24, 25)。

良好な成績を与えたリパーゼ MY、リパーゼ TL、リパーゼ QLM、リパーゼ OF の起源菌は、それぞれ以下の通りである。

リパーゼ MY : *Candida cylindracea*

リパーゼ TL : *Alcaligenes* sp.

リパーゼ QLM : *Pseudomonas stutzeri*

リパーゼ OF : *Candida cylindracea*

これらのことから、*Candida* 属、*Alcaligenes* 属、*Pseudomonas* 属が目的の反応を促進する酵素を生産している可能性が考えられた。しかし、同属微生物より生産された酵素であっても天野エンザイム社製である、リパーゼ AH“アマノ”、リパーゼ AK“アマノ”20、リパーゼ A“アマノ”6、リパーゼ AK“アマノ”20、リパーゼ AY“アマノ”30G、リパーゼ AY“アマノ”30、リパーゼ AS“アマノ”、リパーゼ AYS“アマノ”、リパーゼ P“アマノ”では、生成物の ee 値は、ほぼ 0%であった。また名糖産業社製のリパーゼであっても、リパーゼ QLM を珪藻土やセライトに固定化したリパーゼ QLC とリパーゼ QLG では、反応自体がほとんど進行しなかった。

これらの結果は、本反応における転換率および立体選択性の発現が、酵素の種類のみによって決まるのではなく、酵素以外のファクターが関与していることを示唆するものである。

2.2.3 生成物の立体配置の確認

名糖産業製の特定の酵素で比較的高い ee 値の生成物が得られたため、その立体構造が目的の (*R,R*) 体であるかを確認した。GC の保持時間による方法は、文献情報が無く立体を決定出来なかった。そこで Table 2, entry 3-6 の反応液を全て合併して濃縮し、得られた残渣の旋光度を測定した。文献情報によれば、光学的に純粋な (*R,R*)-**1a** の比旋光度は $[\alpha]_D^{24} = -59.3^\circ$ ($c = 1.0$, メタノール) と報告されている^[28]。そこで濃縮物をメタノールに溶解し測定した結果、比旋光度は、 $[\alpha]_D^{22} = -10.4^\circ$ ($c = 1.1$, メタノール) であった。GC にて決定した ee 値は 60% 以上であるため、 $[\alpha]_D$ は計算上 -35° 以下を示すことになるが、測定結果は一致していない。これは反応液をロータリーエバポレーターで濃縮したものを特に精製などの処理を行わずに測定したため、沸点が高い **2** などが残留したことによる影響と推定する。しかしながら、左旋性である点は一致していることより、酵素反応でより多く生じた化合物は、目的の (*R,R*) 体と考えて問題ない

と判断した。以上のことから、**2** と **3a** での不斉開環反応は、リパーゼが触媒として機能し、目的の立体構造を有するアミノアルコール体 (*R,R*)-**1a** を生成することがわかり、研究を進めることとした。

2.2.4 リパーゼ OF を用いた反応の水分効果

次に酵素反応系における水分効果を調べるため、2.2.2 節で最も高い ee 値にて (*R,R*)-**1a** 与えたリパーゼ OF を用い、反応温度 37 °C、時間を 24 h として、水添加量の影響を調査した (Table 3)。

Table 3. リパーゼ OF での水添加効果^a

entry	水添加量(μL)	転換率(%)	ee (%)
1	—	0	0
2	5	8	65
3	10	24	69
4	15	25	69
5	20	25	69

^a 反応条件 : **2**, 50 μL ; **3a**, 30 μL ; トルエン, 420 μL ; リパーゼ OF, 100 mg

水を添加しない場合は、反応が全く進行しなかった (entry 1)。水を 5 μL (溶液量に対して 1vol%、酵素に対して 5%相当) 添加すると反応が進行し、転換率は 8%、ee 値は 65%であった (entry 2)。水の量を 10 μL に増やしたところ、転換率 24%に上昇し、ee 値は 69%となった (entry 3)。しかし、水をさらに 15 μL, 20 μL と増やしてみても、

転換率、ee 値共に向上しなかった (entry 4, 5)。このことから、リパーゼ OF を触媒とした開環反応においては、水の存在が必須であるが、その量は溶媒に対して 2vol%、酵素に対して 10% 相当で充分であり、それ以上増やしても効果は見られないとわかった。

2.2.5 リパーゼ OF を用いた反応の最適化 (溶媒効果)

水分量の最適化に引き続き、溶媒効果について調査した。触媒反応の構築という観点から溶媒としてトルエンを選択したが (2.2.1 節)、トルエン以外の種々の溶媒で反応を検討し、溶媒の最適化を行った。結果を Table 4 に示す。トルエン中の結果 (entry 1) と転換率、ee 値を比較することで、溶媒の妥当性を調べた。反応温度は 37 °C、反応時間は 24 h である。

ヘキサンやヘプタン、シクロヘキサンといったパラフィン系溶媒を用いた場合、転換率はそれぞれ 38%、32%、28% となり向上したが (entry 2-4)、ee 値については 66-67% と同等の結果であった。また、非水溶性エーテル系溶媒であるシクロペンチルメチルエーテル、*tert*-ブチルエチルエーテル、*tert*-ブチルメチルエーテルについて検討したところ、*tert*-ブチルエチルエーテルにおいて若干の転換率の向上が見られたが、ee 値については 64-66% に留まった (entry 5-7)。

一方、非プロトン性極性溶媒であるジオキサン、テトラヒドロフラン、アセトニトリルを用いた場合は反応が進行しなかった (entry 8-10)。さらに、基質である化合物 2 を溶媒も兼ねて大過剰に用いたところ、転換率の算出はできなかったものの反応の進行は確認できたが、ee 値は 44% に低下した (entry 11)。

これらの結果により、転換率からは反応溶媒は低極性のものが望ましく、さらに生成物の ee 値の面からは、トルエンが最も適した溶媒といえる。そのため、これまでのスクリーニング系で問題ないと判断した。

Table 4. リパーゼ OF での溶媒効果^a

entry	溶媒	転換率 (%)	ee 値 (%)
1	トルエン	24	69
2	ヘキサン	38	67
3	ヘプタン	32	66
4	シクロヘキサン	28	67
5	シクロペンチルメチルエーテル	10	66
6	<i>tert</i> -ブチルエチルエーテル	26	68
7	<i>tert</i> -ブチルメチルエーテル	14	64
8	ジオキサン	0	–
9	テトラヒドロフラン	0	–
10	アセトニトリル	1	–
11	無溶媒 ^b	–	44

^a 反応条件 : **2**, 50 μ L ; **3a**, 30 μ L ; 溶媒, 420 μ L ; 水, 20 μ L ; リパーゼ OF, 100 mg

^b 溶媒を基質と兼ねて **2** を 420 μ L 使用

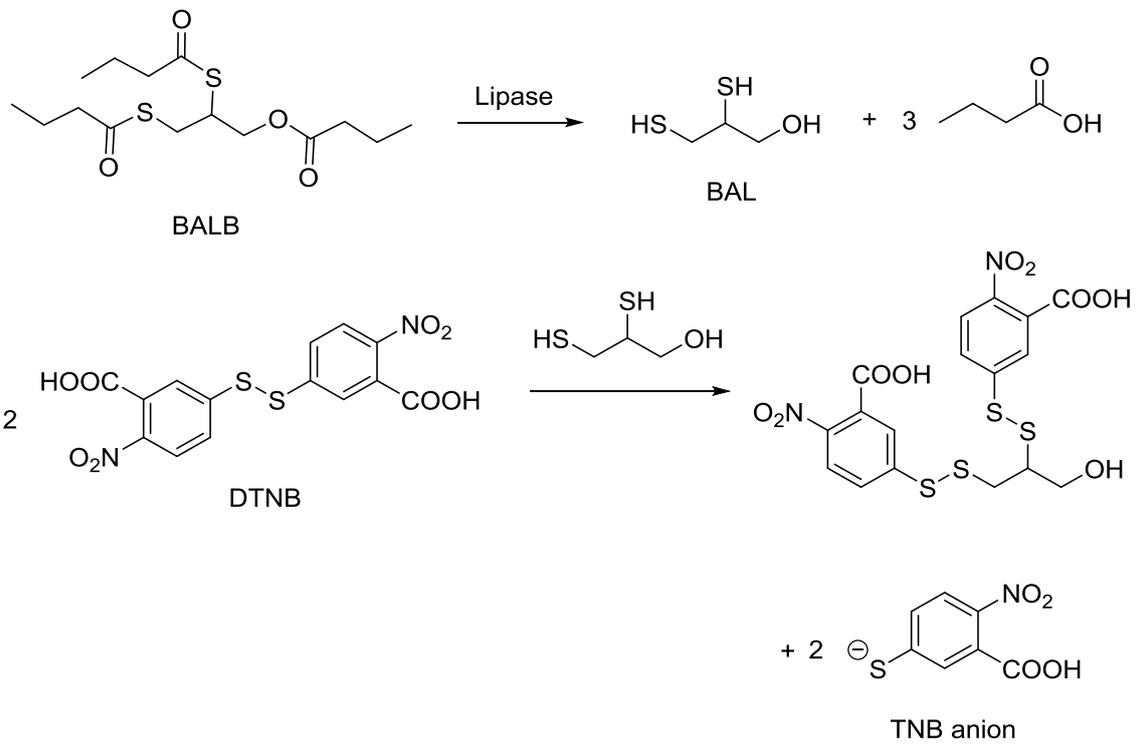
2.2.6 リパーゼ活性とエポキシ開環反応活性の相関

このように、リパーゼ OF などの市販の酵素を用いてエポキシド不斉アミノ化反応が進行することを明らかにし、反応条件の最適化も行うことができた。しかしながら、2.2.2 節で述べた、酵素の起源菌が同属であっても天野エンザイム社製の酵素には反応活性がなく、名糖産業社製のもののみに活性があるという問題点が残されている。また、名糖産業社製のものでも、酵素としては QLM と同一であるが珪藻土やセライトに固定化したリパーゼ QLC、リパーゼ QLG には反応活性がない点も解決できていない。

これらの疑問に対する答えとして、今回見出した反応活性成分は、リパーゼ本体ではなく、名糖産業社製の固定化されていない酵素のみに夾雑している微量酵素によるものではないかとの仮説を立てた。そこで、これまでの実験で反応活性を示したリパーゼ OF、リパーゼ TL、リパーゼ QLM、リパーゼ MY について、リパーゼ活性とエポキシド不斉アミノ化反応活性の相関を調査することとした。

リパーゼ活性の測定には、血液や組織などの生体試料中の活性を評価するために用いられる診断薬のリパーゼキット S (DS ファーマバイオメディカル社製) を用いた。リパーゼキット S の原理を Scheme 11 に示す。酪酸 2,3-ビス(ブチリルチオ)プロピル (BALB) がリパーゼによって加水分解を受けて 2,3-ジメルカプト-1-プロパノール (BAL) が生成し、BAL が 5,5'-ジチオビス(2-ニトロ安息香酸) (DTNB) と反応することによって 5-チオ-2-ニトロ安息香酸アニオン (TNB アニオン) が生じる。TNB アニオンは黄色発色するため、吸光光度計で 412 nm の吸光度を測定することにより、リパーゼ活性を調べることができる。

また、対照実験として、通常ほとんどの酵素が失活するオートクレーブで熱処理 (121 °C, 30 min) したリパーゼについても、リパーゼキット S による活性評価と反応評価を行った。反応温度 37 °C, 時間 24 h とでの、結果を Table 5 に示す。



Scheme 11. リパーゼキット S の活性測定原理

Table 5. リパーゼ活性とエポキシド不斉アミノ化活性の相関^a

entry	リパーゼ	吸光度 (412 nm)	転換率 (%)	ee 値 (%)
1	リパーゼ OF	2.1	16	71
2	リパーゼ TL	2.0	18	69
3	リパーゼ QLM	2.0	23	66
4	リパーゼ MY	2.2	5	55
5	リパーゼ OF 熱処理物	0	8	67
6	リパーゼ TL 熱処理物	0	24	69
7	リパーゼ QLM 熱処理物	0.1	23	68
8	リパーゼ MY 熱処理物	0	6	50

^a反応条件：2, 50 μ L；3a, 30 μ L；トルエン, 420 μ L；水, 20 μ L；リパーゼ, 100 mg

2.2.2 節で示した実験結果と同様に、リパーゼ OF、リパーゼ TL、リパーゼ QLM、リパーゼ MY においては、生成物の転換率および ee 値には差異が見られたが、リパーゼ活性を示す 412 nm における吸光度は 2.0–2.3 であり、リパーゼ間による違いは見られなかった (entry 1–4)。したがって、リパーゼ活性とエポキシドの不斉アミノ化反応の活性には相関があるとは言えない。一方、オートクレーブ処理したリパーゼを使用して対照実験を行ったところ、驚くべきことにそれらを用いても不斉アミノ化反応が進行し、転換率、ee 値共に、処理の前後でほとんど変化がないことがわかった (entry 5–8)。

この結果は、今回名糖産業社製のリパーゼで見つかったエポキシド不斉アミノ化反応の活性が、リパーゼそのものによるのではなく、非常に高い耐熱性を有する酵素、

あるいは熱処理でも変化しない酵素以外の成分に基づいていることを示唆している。

2.2.7 真の活性成分の探索

名糖産業社製のリパーゼに夾雑していた耐熱性酵素または酵素以外の成分が真の触媒である可能性が示唆されたが、起源が全く異なる酵素でも転換率、生成物の ee 値の差が小さいことより、耐熱性酵素の可能性は低いと考え、まずは酵素以外の成分を調査することとした。一般的に酵素の製造は、微生物の培養による酵素生産と微生物菌体の分離、培養液からの酵素の単離と乾燥の工程から成っており、簡略化すると次ページに示したフローとして表される (Figure 3)^[32]。

名糖産業社においても酵素がこのフローで製造されていると仮定すると、混入する可能性があるものは、菌体を除去する遠心分離の際には、同時に除去されることのないものとなる。また、菌体除去液に硫酸アンモニウムやアセトンを加えると不溶化する酵素と同時に分離される性質を有することも重要である。これらの条件を併せ持つ成分を推定するため、名糖産業社製の酵素に関する特許文献を調査したところ、実施例に記載されている培地成分は、Table 6 に示す通りである^[33]。

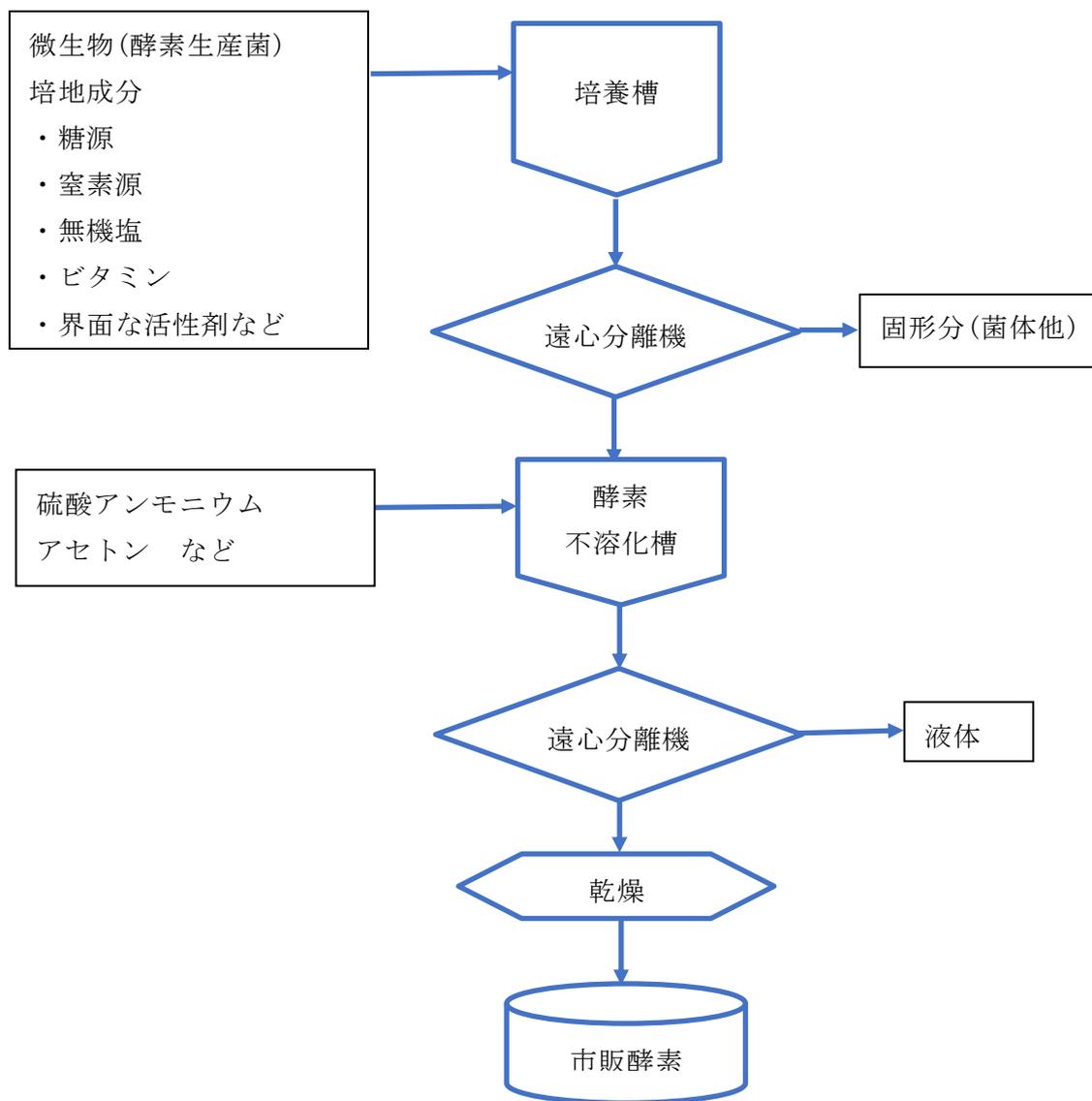


Figure 3. 酵素製造フロー

Table 6. 特許記載の名糖産業社製酵素の培地成分

培地成分	添加割合 (%)
キナコ	4.0
コーンステープリカー	1
リン酸二カリウム	0.2
大豆油	0.4
エマルゲン 320P	0.3

記載されたそれぞれの成分について考察すると、リン酸二カリウムは無機塩であること、大豆油は液状であること、エマルゲン 320P はポリオキシエチレンステアリルエーテルから成っており界面活性剤としてわずかに用いられるだけであること、よってこれらが市販酵素へ混入する可能性は低いと判断した。コーンステープリカーは、トウモロコシでんぷんを作る過程で得られる可溶性成分であり、アミノ酸量が多いことが知られているが、大部分は微生物の窒素・栄養源として消費されるため、これも混入の可能性は低いと推察した。キナコは、窒素源と栄養源として消費されると思われるが、培養中で溶解せず、かつ添加量も多いことより、完全に消化されない場合、極小の微粒子となり、菌体とは同時に除去されないが酵素とは同時に分離される可能性があると考えた。そのため、混入のする可能性が最も高い成分ではないかと推定した。キナコは大豆加熱物の粉末であるから、これを検証すべく、キナコを含め、大豆製品が触媒として機能するかどうか、スクリーニングを行った。大豆製品としては、食品として店頭より入手したキナコ、主としてアミノ酸からなる大豆タンパク水解物である A-1000、大豆のタンパク成分単離物であるフジプロ F、大豆油を絞った後の脱脂大豆粉末であるソヤフラワーF-TN、食品添加物である水溶性の食物繊維を主成分とするソヤファイブ S-DN の 5 種を調べた。反応温度は、酵素と同様 37 °C とした。結果を Table 7 に示す。

Table 7. 大豆製品のスクリーニング^a

entry	大豆製品	反応時間 (h)	転換率 (%)	ee 値 (%)
1	キナコ	64	52	62
2	A-1000	64	1	0
3	フジプロ F	18	4	19
4	ソヤフラワー FT-N	16	32	63
5	ソヤファイブ S-DN	16	67	69

^a反応条件： **2**, 50 μ L； **3a**, 30 μ L；トルエン, 420 μ L；水, 20 μ L；大豆製品, 100 mg

リパーゼの代わりにキナコを用いて反応を実施すると、反応時間 64 h で転換率 52%、ee 値は 62% で (*R,R*)-**1a** が得られた (entry 1)。推定通りキナコまたはそれが消化された成分が名糖産業社製のリパーゼに混入し、触媒として機能していたことが示唆された。

しかしながら、A-1000 を用いた場合は、反応時間 64 h で転換率がわずか 1% であった (entry 2)。また、フジプロ F を用いた場合では、反応時間 18 h で転換率 4%、ee 値は 19% とこちらも低い値であった (entry 3)。これらのことより、同じ大豆由来物であっても主としてタンパクやアミノ酸から構成される成分は、触媒機能を有しないことが判明した。

一方、ソヤフラワー F-TN は、キナコよりも活性が高く、16 h で転換率 32% となり、ee 値については 63% といずれも名糖産業社製のリパーゼとほぼ同等の値 (63–70%) であった (entry 4)。さらに、ソヤファイブ S-DN を用いると、16 h で転換率 67%、ee 値は 69% と大豆製品の中で最高の値を示し、転換率は市販酵素を含めても最も高かった (entry 5)。

これらの結果より、名糖産業社製のリパーゼに含まれていた不斉アミノ化反応の真

の触媒は、タンパク質やアミノ酸を主成分としない大豆由来の成分であることがわかった。キナコは生の大豆を加熱してから粉末化されたものであり、脱脂大豆粉はキナコより油分を除去したもの、水溶性大豆多糖類ソヤファイブ S-DN は、豆腐を作る際に副生するオカラから熱水で水溶性の成分を抽出したものである^[34]。反応が進行したこれら大豆製品に共通する成分は、植物細胞壁の構成成分である多糖類を含むものであり、これが触媒機能を有する可能性が高いことがわかる。

2.2.8 ソヤファイブ S-DN の構造と活性部位

ソヤファイブ S-DN は、不二製油社により開発・製造されている食品添加物である。主に乳製品の安定化剤として大量に使用されている。その製法は、豆腐を製造した際に副生する「オカラ」より熱水にて水溶性成分を抽出し、精製、殺菌、噴霧乾燥の工程を経ていることが開示されている。その食品添加物としての機能や組成については、中村博士らにより精力的に研究され、その構造情報についても複数の文献等にて報告されている^[34,35]。それらよるとソヤファイブ S-DN の構成成分は以下の通りであることが明らかにされている (Table 8)。

Table 8. ソヤファイブ S-DN の構成成分表

各成分(%)				繊維分の構成糖 (%)						
水分	タンパク	灰分	繊維	Rha	Fuc	Ara	Xyl	Gal	Glc	GalA
5.8	9.2	8.6	66.2	5.0	3.2	22.6	3.7	46.1	1.2	18.2

Rha : ラムノース, Fuc : フコース, Ara : A アラビノース, Xyl : キシロース

Gal : ガラクトース, Glc : グルコース, GalA : ガラクツロン酸

この構成成分表から、ソヤファイブ S-DN は主に多糖類である食物繊維により構成されており (66.2%)、その構成糖は 46.1% をガラクトースが占めていることがわかる。一方、タンパク成分はわずか 9.2% である。分子量分布は 5,000-550,000 と幅広く、その中でも分子量 550,000 のものが主成分として約 70% を占めている。オカラは、主に大豆の細胞壁成分から構成されており、そこから熱水抽出された大豆多糖類は植物由来の多糖類としてよく知られるペクチンに似た物質ではあるが、Ca や Mg などの 2 価のアルカリ土類金属と反応してゲル化するペクチンとは異なり、ゲル化しない特徴がある。また、ソヤファイブ S-DN を構成する糖鎖は下記イメージのように、糖鎖部分の末端にタンパク質が結合していると推定されている (Figure 4)^[34]。

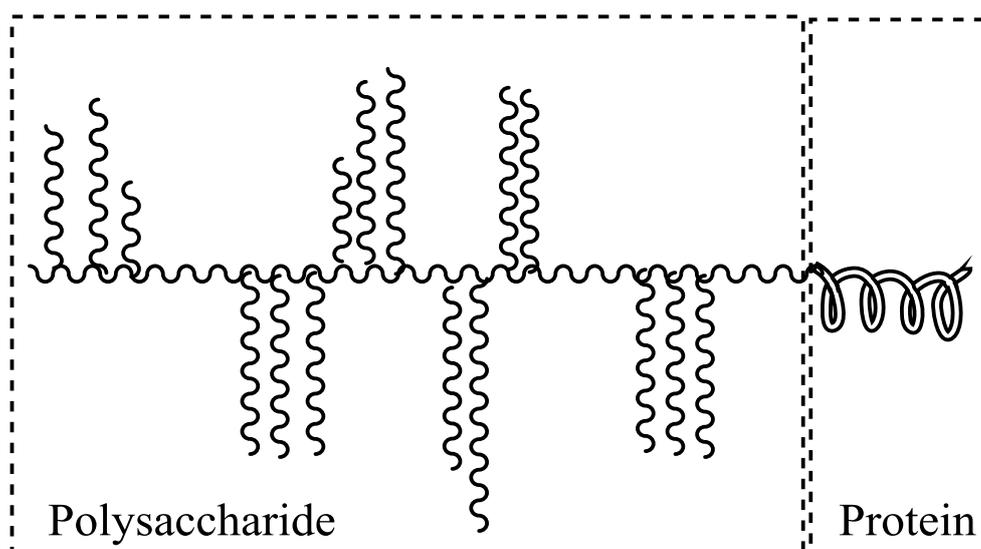


Figure 4. ソヤファイブ S-DN の推定構造イメージ

ソヤファブ S-DN は割合が少ないもののタンパク部分を有しており、これが酵素様の機能を発現しているのか、あるいは糖鎖部分なのか、もしくは全体であるのかを検証することとした。ソヤファイブ S-DN を構造解析した文献を参考にして、糖鎖とタ

ンパクのそれぞれの部分を酵素にて部分消化し、酵素を加熱して失活させてから凍結乾燥したものをを用いて反応を実施して触媒能を評価することとした^[35]。糖鎖を分解する酵素として、植物組織からアルカリで抽出される多糖類であるヘミセルロースを分解するヘミセルラーゼ、ならびに主としてポリガラクトuron酸から構成されるペクチンを分解するペクチナーゼを用いた。タンパクを分解する酵素としては、ペプチド鎖の塩基性アミノ酸(リジン、アルギニン)のカルボキシル基側のペプチド結合を分解するトリプシン、およびペプチドの疎水性アミノ酸のカルボキシル基側のペプチド結合を分解するサブチリシン A を用いた。それぞれの酵素の処理条件は Table 9 に示した。

Table 9. ソヤファイブ S-DN の酵素消化

消化酵素	酵素量	酵素消化条件 ^a
ヘミセルラーゼ	46 mg	50 mmol/L 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.5) 50 °C, 18 h
ペクチナーゼ	50 µL	50 mmol/L 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5) 40 °C, 20 h
トリプシン	50 mg	20 mmol/L 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 7) 40 °C, 24 h
サブチリシン A	10.9 mg	50 mmol/L リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.5) 37 °C, 24 h

^a ソヤファイブ S-DN 100 mg を処理

得られた酵素消化物の凍結乾燥物を 100 mg 用い、これまで同様、反応温度 37 °C、時間は 24 h として行った結果を Table 10 に示す。

Table 10. ソヤファイブ S-DN の酵素消化物による反応評価^a

Entry	ソヤファイブ S-DN	転換率(%)	ee 値(%)
1	無処理	40	64
2	ヘミセルラーゼ処理物	0	0
3	ペクチナーゼ処理物	0	0
4	トリプシン処理物	35	65
5	サブチリシン処理物	34	64

^a反応条件：2, 50 μ L；3a, 30 μ L；トルエン, 420 μ L；水, 20 μ L；

ソヤファイブ S-DN, 100 mg

その結果、糖鎖部位を分解するヘミセルラーゼ、ペクチナーゼで処理した物では、転換率が 0%と反応の進行を確認できず(entry 2, 3)、タンパク質を分解するトリプシンおよびサブチリシン A での処理物は、転換率が 34–35%、ee 値は 64–65%とソヤファイブ S-DN と同等の結果が得られた(entry 1, 4, 5)。これらの結果は、ソヤファイブ S-DN において糖鎖部位を分解すると触媒活性が失活し、残るタンパク質部位は反応に寄与していないことを示している。したがって、ソヤファイブ S-DN の触媒活性部位は分子全体にあるのではなく、糖鎖である食物繊維部分のみにあると推定できる。

糖鎖が触媒として機能する報告はほとんどなく、唯一、芹澤らによる結晶性セルロースが、エステルやアミドの加水分解を促進するもののみである^[36]。また、シクロデキストリンがスチレンオキシドの位置選択的アミノ化を促進する例も報告されているが^[37]、エポキシド不斉アミノ化反応を促進する例は報告されておらず、全く新規な発見である。また、植物細胞の構成成分である糖鎖が植物の生体内でも機能しているとするならば、タンパクである酵素と核酸であるリポザイムに次ぐ第三の生体触媒ということになる。

2.2.9 ソヤファイブ S-DN 触媒反応における水分量の最適化

これまでは、リパーゼ OF を用いて最適化した反応条件で実験を進めてきたが、ソヤファイブ S-DN は酵素ではないため、反応条件については再検討する必要がある。そこでまず、最適な水分量を調査した。ソヤファイブ S-DN 100 mg に対して、添加する水の量を 5 μ L から 100 μ L まで変化させた。結果を Table 11 に示す。全ての実験は、反応温度 37 $^{\circ}$ C、時間は 18 h として行った。なお、ソヤファイブ S-DN は市販状態で約 6%の水分が含まれている。

添加する水の量を 20 μ L (リパーゼの系での添加量)より少なくすると、転換率および ee 値が共に低下した (entry 1-3)。また、添加量を 20 μ L から 50 μ L まで変化させたところ、転換率は 70-77%、ee 値は 65-66%とほぼ安定した結果が得られた (entry 4-10)。しかしながら、水分量をそれ以上増やすと、逆に転換率、ee 値は低下した (entry 11, 12)。特に水を 100 μ L 加えた場合には ee 値が特に低下し、44%となった (entry 12)。

これらの結果から、ソヤファイブ S-DN も酵素同様、触媒として機能するにはある程度の量の水分が必要であり、その量は重量比でソヤファイブ S-DN に対して 20-50%が適当であるとわかった。水分量が多い場合に転換率、ee 値が低下するのは、ソヤファイブ S-DN が介在しない自発的な反応が共存してくるためと推察される。すなわち自発的な反応ではラセミ体が生成するため ee 値が低下し、かつ反応速度自身が触媒反応よりも遅いため転換率も低下したと考えられる。

Table 11. ソヤファイブ S-DN 触媒反応における水分量^a

Entry	水添加量 (μL)	転換率 (%)	ee 値 (%)
1	5	9	59
2	10	36	63
3	15	58	65
4	20	72	66
5	25	75	66
6	30	77	66
7	35	74	66
8	40	74	66
9	45	72	65
10	50	70	65
11	75	50	59
12	100	28	44

^a反応条件：2, 50 μL；3a, 30 μL；トルエン, 420 μL；ソヤファイブ S-DN, 100 mg

2.2.10 ソヤファイブ S-DN の溶媒効果

次にソヤファイブ S-DN を用いた反応の溶媒効果について調査した。溶媒には、これまでの検討で用いたトルエンに加えて、ヘプタンとクロロホルム、ジクロロメタンを用いた。なお、反応温度は、立体選択性の向上を狙い、これまでの検討(37 °C)よりも低い 30 °C とし、時間は 21 h とした (Table 12)。

Table 12. ソヤファイブ S-DN 触媒反応における溶媒効果

Entry	溶媒	転換率 (%)	ee 値 (%)
1	トルエン	44	71
2	クロロホルム	24	73
3	ジクロロメタン	29	66
4	ヘプタン	82	66

^a 反応条件 : **2**, 50 μL ; **3a**, 30 μL ; トルエン, 420 μL ; ソヤファイブ S-DN, 100 mg

反応温度を若干下げたことによって、同じトルエン溶媒を用いた場合、転換率は低下し (67% \rightarrow 44%)、ee 値はわずかに向上したのみであった (69% \rightarrow 71%) (entry 1)。クロロホルム、ジクロロメタンについては転換率が大きく下がり、溶媒としては適当でないことがわかった (entry 2, 3)。一方で、ヘプタンは、ee 値が 66% と若干低下したものの、反応速度は向上し転換率は 82% となった (entry 4)。これは、リパーゼ OF を触媒とした場合と同じ傾向であった (Table 5)。したがって、反応溶媒としては立体選択性の高いトルエンまたは転換率の高いヘプタンが適している。反応温度に関しては、立体選択性の向上効果よりも転換率の低下の影響が大きいため、37 $^{\circ}\text{C}$ 未満は望ましくない。

2.2.11 (*R,R*)-**1a** の精製

ソヤファイブ S-DN を触媒として用いて得られる (*R,R*)-**1a** は、最高でも 70% ee と中程度であり、このままでは K-134 の原料としては使用することは困難である。そこで、鏡像異性体を除去するため精製法について検討した。光学的に純粋な (*R,R*)-**1a** の融点は 45 $^{\circ}\text{C}$ と低く、再結晶のみによる精製は困難である。そこで、融点の高い結晶性の塩に変換して精製することとした。化合物 **1a** はアミンであるから、カルボン酸との

造塩によって結晶化させたのち、ろ過によって結晶と母液に分け、それぞれの ee 値を調べることで精製できるかどうかを検討した。カルボン酸としては、フマル酸、サリチル酸、およびナプロキセンを用いた (Figure 5)。ナプロキセンはキラル化合物であるので、光学分割が期待できる。なお、(R,R)-1a は 60% ee の粗体を用いた。結果を Table 13 に示す。

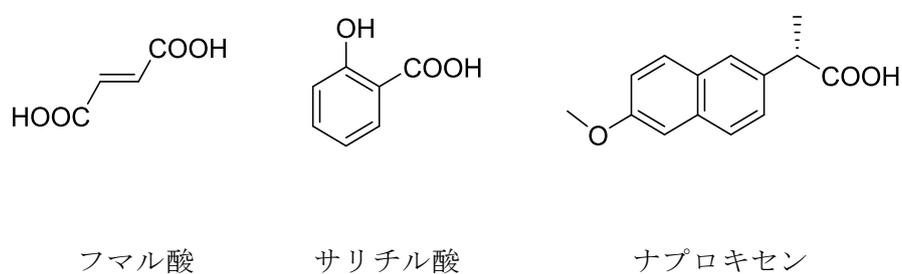


Figure 5. (R,R)-1a の造塩精製に用いたカルボン酸

Table 13. (*R,R*)-**1a** の造塩精製^a

entry	カルボン酸(当量)	溶媒(液量/mL)	ee 値(%)	
			結晶	母液
1	フマル酸(1.0)	エタノール(2.5)	11	91
2	フマル酸(0.5)	エタノール(2.0)	11	93
3	フマル酸(0.5)	2-プロパノール(2.0)	18	>99
4	サリチル酸(1.0)	エタノール(2.0)	17	78
5	ナプロキセン(0.6)	酢酸エチル(3.0)	96	16
6	ナプロキセン(0.8)	酢酸エチル(3.0)	94	2
7	ナプロキセン(1.0)	酢酸エチル(3.0)	92	-29
8	ナプロキセン(1.0)	トルエン(3.0)	95	19

^a (*R,R*)-**1a**, 200 mg ; 操作 : 40 °C で 30 分以上加温後、室温で生じた結晶をろ過

エタノール中、**1a** に 1 当量のフマル酸を作用させたところ結晶が析出し、ろ過後、結晶と母液の ee 値を測定したところそれぞれ 11%、91%となった(entry 1)。また、フマル酸の当量を半分に減らしてもほぼ同様の結果が得られた(entry 2)。これは(*rac*)-**1a** のフマル酸塩の方が高い結晶性を有していることを示している。さらに、溶媒を 2-プロパノールにすると母液の ee 値が>99%に向上した(entry 3)。entry 3 の結晶の ¹H NMR 測定から、2 : 1 のモル比で **1a** とフマル酸が塩を形成していることがわかった。この結晶の ee 値は 18%であったことより、この結晶の大部分は、(*R,R*)-**1a**、(*S,S*)-**1a**、およびフマル酸の 3 成分が等量含まれるラセミ体またはラセミ混合物により構成されていることがわかった。したがって、精製に必要なフマル酸量は、反応後に含まれる

(*S,S*)-**1a** の 2 モル倍量以上となる。つまり精製の際に用いるべきフマル酸の量は、粗(*R,R*)-**1a** に対し、

$$\text{モル当量} = 1 - \{ \text{粗}(\mathit{R,R})\text{-}\mathbf{1a} \text{ の ee 値}(\%) \div 100 \}$$

となる。

サリチル酸を用いた場合も、フマル酸と同様の結果を得たが、母液の ee 値はフマル酸の場合よりも低かった (entry 4)。

一方、酢酸エチル中、ナプロキセンを 0.6 当量用いた場合には、得られた結晶の ee 値は 96% となり、フマル酸の場合とは逆に(*R,R*)-**1a** との塩の方が結晶性は高かった (entry 5)。ナプロキセンの当量を増やしていくと、母液の ee 値が減少していき、1 当量用いると母液の ee 値は (*S,S*)-**1a** の過剰を示す -29% となり、光学分割効果があることがわかった (entry 6, 7)。

不斉アミノ化反応の反応溶媒であるトルエンを用いれば、反応後触媒をろ過したのちそのまま光学分割を行うことができ、実生産プロセスとして有利な方法となる。そこでトルエン中で行ったところ、結晶の ee 値は 95% であるが母液は 19% となり、光学分割効果はなかった (entry 8)。

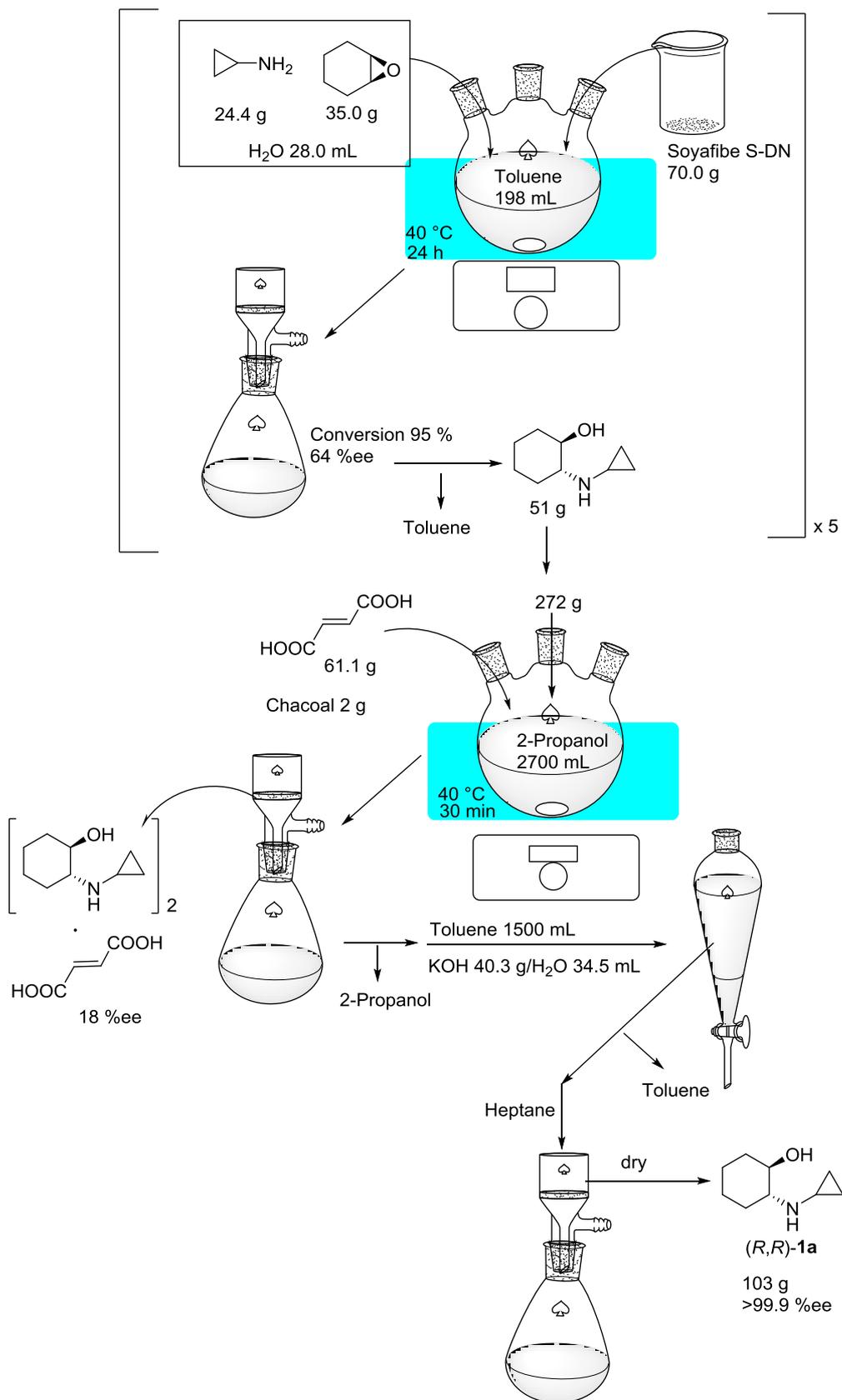
これらの結果から、**1a** の造塩精製には、カルボン酸としてフマル酸またはナプロキセンを用いることが良いとわかった。しかしながら、ナプロキセン自体が非ステロイド性抗炎症作用を有し、医薬品として使用され毒性が懸念されること、および高価であることよりフマル酸の方が望ましい。したがって、(*R,R*)-**1a** の精製は、粗生成物を 2-プロパノールを溶解させ、ee 値から算出した必要量のフマル酸を加えたのち、生じたフマル酸塩をろ別し、母液から (*R,R*)-**1a** を抽出するという方法を選択した。

2.2.12 スケールアップ合成

ここまでの結果より、ソヤファイブ S-DN でエポキシド不斉アミノ化反応が進行し、フマル酸を造塩剤として精製が可能であることがわかった。そこで、スケールアップしサンプル合成を検討した。ソヤファイブ S-DN を 70 g 用い、グラムスケールで純粋な (*R,R*)-**1a** を得ることとした。

500 mL のフラスコに 35.0 g (0.36 mol) の **2** と 24.4 g (0.42 mol) の **3a** を量り取り、トルエンを 198 mL 加えた。70.0 g のソヤファイブ S-DN と水 28.0 mL を入れ、40 °C で 26 h マグネチックスターラーで攪拌した。反応終了時に GC で分析すると、転換率は 95% で ee 値は 64% であった。ソヤファイブ S-DN をろ別し、ろ液を濃縮乾固して粗 (*R,R*)-**1a** を淡黄色油状物として 51.0 g を得た。粗収率は 87% であった。この反応を 5 回繰り返して、得られた 272 g の粗 (*R,R*)-**1a** を 2-プロパノール 2.7 L に溶解した。

この溶液に 61.1 g (0.3 当量) のフマル酸を加え、40 °C で 30 min 攪拌し、脱色のための活性炭を加え、析出した結晶と共に室温まで冷却してろ別した。ろ液を濃縮し、残渣に 40.3 g (0.41 当量) の水酸化カリウムと水を加え、フマル酸塩より遊離した (*R,R*)-**1a** をトルエンで抽出した。有機層を濃縮し、残渣にヘプタンを加えて析出した結晶をろ過し乾燥し、>99.9% ee の (*R,R*)-**1a** を 103 g 得た。**2** からの通算収率は 38% であった。一連の実験操作を Scheme 12 にまとめた。



Scheme 12. (R,R)-1a のスケールアップ合成

今回の実験ではフマル酸を 0.3 当量加えて 40 °C で攪拌し造塩している。粗体は 64%ee であるため、2.2.11 節の計算式からは、フマル酸の必要量は 0.36 当量となるが、ヘプタンでの結晶化の際にも精製効果があることを期待し、収率ロスを最小限とするため、0.3 当量とした。その結果として、期待通りヘプタンによる精製効果が確認できた。

またソヤファイブ **S-DN** は、大豆より生産されており、大豆アレルギーの原因となるタンパクをわずかに含む。これが残留した場合、**K-134** を投与された患者がアレルギー反応を起こす懸念がある。そこで、大豆アレルギーを測定するキットである、日本ハム社製の **FASKIT** スリムを用いてアレルギーの有無を調査した。このキットは、イムノクロマトの原理を応用したものである。

その結果、ソヤファイブ **S-DN** にはアレルギーが検出されたものの、得られた **(R,R)-1a** からは検出されなかった。したがって、光学純度、残留アレルギーを考慮しても、本手法で得ることのできる **(R,R)-1a** は、医薬品原薬 **K-134** の原料として十分に使用できる品質であると言える。

2.2.13 ソヤファイブ S-DN の再利用

ソヤファイブ S-DN は、食品添加物として大量に生産・使用されており、比較的安価ではあるが、触媒としては多量に使用するため、繰り返し使用することはコストだけでなく環境面からも望ましい。そこで、再利用の可能性について調査した。

実験操作としては、前節と同様にして行った。1 回目の反応を行った後、ソヤファイブ S-DN をろ別するが、その際に得られた湿体をそのまま次の反応の触媒として用いた。なお、1 回目の反応物の濃縮時に水滴を確認した。2.2.9 節で述べたが、ソヤファイブ S-DN が触媒として機能するためには、20-50%の水分量を維持する必要がある。そこで、使用後の水分をカールフィッシャー水分計でモニターしながら 2 回の繰り返し使用を行った。

加えて、ソヤファイブ S-DN は先述の通り、大豆由来のオカラより製造されている。大豆は植物であることより、産地間や収穫時期などの違いにより、含まれる糖鎖が全く同一ではない可能性がある。そこで、ソヤファイブ S-DN の製造ロット間差について調査することとし、原料の由来などの詳細な情報はないが、それぞれ別の時期に購入した Lot #120621/002 と Lot #120628/002 を用いて検証することとした (Table 14)。

Table 14. ソヤファイブ S-DN の繰り返し回数^a

Entry	繰り返し回数	水分量 (%) ^b	転換率 (%)	ee 値 (%)
1	-	40	92	64
2	1	35	92	65
3	2	30	90	64
4 ^c	-	40	87	64

^a 反応条件 : **2**, 35 g ; **3a**, 24 g ; トルエン, 198 mL ; 反応温度, 37 °C ; 反応時間, 24 h ;

ソヤファイブ S-DN Lot #120621/002

^b 反応開始時のソヤファイブ S-DN 中の水分量

^c ソヤファイブ S-DN Lot #120628/002

実験の結果、2回の繰り返し使用でも転換率、ee 値共にほぼ同等で、活性は維持されていた。反応後のソヤファイブ S-DN に含まれる水分量は、40%から漸減し、1回目の使用後で 0.35%、2回目では 30%となっていた (entry 1-3)。これは、生成物の(*R,R*)-**1a** が水溶性であるため、反応後のソヤファイブ S-DN ろ過時に、水分が反応液と共に抜けたためと考えられる。したがって、更に繰り返し使用する場合は、水分の補充が必要である。また、ロット間差に関しては転換率に若干の違いがあるものの、ee 値は全く同じ 64%であり、懸念された差はほとんどないとわかった。

2.3 小括

ホスホジエステラーゼ 3 阻害効果を有する医薬品候補化合物の 1-シクロプロピル-1-((1*R*,2*R*)-2-ヒドロキシシクロヘキシ)-3-(3-オキソ-1,2-ジヒドロキノリン-6-イル)オキシ)プロピル) 尿素(K-134)の重要原料である(1*R*,2*R*)-2-シクロプロピルアミノ-1-シクロヘキサノールの新規合成法を開発するため、1,2-エポキシシクロヘキサンとシクロプロピルアミンを用いたエポキシド不斉アミノ化する触媒の探索を行った。

市販酵素をスクリーニングした結果、トルエン溶媒中で名糖産業社製のリパーゼで反応が進行することを見出した。しかし、市販リパーゼ中の触媒活性本体を探求する過程で、酵素が触媒ではなく、混在していた大豆由来の多糖類が真の触媒であることを突き止めた。大豆の粉末であるキナコでも反応は進行し、加工品としては脱脂大豆粉とソヤファイブ S-DN に触媒活性があり、特に水溶性多糖類を主成分とする後者が高活性であった。一方、大豆タンパクを主成分とするものには活性が無かった。またソヤファイブ S-DN を酵素で部分消化し、タンパク分解酵素で処理したものは触媒活性が残存し、糖鎖分解酵素で処理したものは失活したことより、触媒活性は糖鎖に起因していることを明らかとした。その結果、容易に入手可能な市販のソヤファイブ S-DN を触媒として用いる、(1*R*,2*R*)-2-シクロプロピルアミノ-1-シクロヘキサノール製法の開発に成功した。生成物の ee 値は 70%未満であったが、フマル酸で造塩精製することで>99.9%まで精製する方法を確立した。

2.4 実験材料および方法

2.4.1 使用機器一覧

核磁気共鳴装置(NMR)：日本電子 AL-300

ガスクロマトグラフィー(GC)：島津製作所 GC-2010

液体クロマトグラフィー(HPLC):アジレント HP1100 シリーズ

高分解能質量分析装置(HRMS)：ウォーターズ Xevo G2-XSQToF

旋光計：日本分光 P-1020

可視紫外吸光光度計：アマシャムバイオサイエンス Ultraspec3300Pro

カールフィッシャー水分計：メトラートレド

融点測定装置：ヤナコ 微量融点測定装置 MP-J3

振盪培養装置：東京電年計装 SC-1000TR

2.4.2 実験材料

1,2-エポキシシクロヘキサンとシクロプロピルアミンは、東京化成工業社より購入したものをそのまま使用した。溶媒は全て、関東化学社より購入したものをそのまま使用した。リパーゼ QLC、リパーゼ QLG、リパーゼ MY、リパーゼ TL、リパーゼ QLM、リパーゼ OF は名糖産業社より購入した。リパーゼ A、“アマノ”6、リパーゼ AH“アマノ”、リパーゼ AK“アマノ”20、リパーゼ AY“アマノ”30G、リパーゼ AY“アマノ”30、ニューラーゼ F、リパーゼ G“アマノ”50、リパーゼ M“アマノ”10、リパーゼ PS、“アマノ”、リパーゼ PS-C “アマノ”II、リパーゼ PS-D“アマノ”I、リパーゼ R“アマノ”G、リパーゼ AS“アマノ”、リパーゼ PS“アマノ”SD、リパーゼ AYS“アマノ”、リパーゼ P“アマノ”、リパーゼ A-5、ヘミセルラーゼ“アマノ”90G は天野エンザイム社より購入

した。リパーゼ A-10FG は、ヤクルト社より購入した。リパーゼ F-AP15、ペクチナーゼ、トリプシン、サブチリシン A はシグマアルドリッチジャパン社より購入した。ソヤフラワーF-TN は、日清オイリオグループ社より購入した。ソヤファイブ S-DN, フジプロ F は、不二製油社より購入した。A-1000 は味の素より購入した。FASTKIT スリムは、日本ハム社より購入した。

2.4.3 スクリーニング実験方法

実験は別途記載しない限り、次の方法で行った。2 (50 μ L、0.49 mmol) と 3 (30 μ L、0.43 mmol) を 2.5 mL の GC 用ガラスバイアルに量り取り、触媒 100 mg とトルエン 0.42 mL と所定量の水を加えて密封した。これを 37 °C に設定した振盪培養装置に入れ、所定の時間振盪し反応した。反応終了後、テフロン製のメンブレンフィルターで上澄み液をろ過し、ろ液をそのまま GC にて分析した。

2.4.4 GC 分析条件と転換率算出方法

カラム： β -DEX325 (Spelco 社製) 長さ 30 m, 内径 0.25 mm, 膜厚 0.25 μ m

カラム温度：120 °C

キャリアーガス：ヘリウム 94 kPa

検出器：水素炎イオン化検出器

気化室温度：220 °C

検出器温度：300 °C

サンプル注入量：0.5 μ L

スプリット比：1 : 150

保持時間：(S,S)-1a, 26.9 min ; (R,R)-1a, 27.4 min ; 2, 4.1 min

転換率計算方法

転換率は有効炭素数 (ECN) 法を使用して以下の通り算出した^[38]。有効炭素数法は、分析対象化合物を構成する炭素原子、水素原子、窒素原子、酸素原子などがその結合形態により水素炎イオン化検出器への応答 (レスポンス) が異なることを利用した定量法である。なお、文献で報告されている各官能基の ECN 寄与率のうち、本研究に関連する部分を Table 15 に示す。

Table 15. 目的物および基質に含まれる各原子の ECN 寄与率

原子	ECN 寄与率
脂肪族炭素	1
芳香族炭素	1
オレフィン炭素	0.95
アセチレン炭素	1.3
1 級アルコール酸素	-0.5
2 級アルコール酸素	-0.75
3 級アルコール酸素	-0.25
エーテル酸素	-1
1 級アミン窒素	-0.5
2 級アミン窒素	-0.75
3 級アミン窒素	-0.25

各化合物の ECN レスポンス

・ **1a** : 脂肪族炭素 9 原子、2 級アルコール酸素 1 原子、2 級アミン窒素 1 原子

$$\text{レスポンス} = 9 \times 1 + 1 \times (-0.75) + 1 \times (-0.75) = 7.5$$

・ **2** : 脂肪族炭素 6 原子、エーテル酸素 1 原子

$$\text{レスポンス} = 6 \times 1 + 1 \times (-1) = 5$$

$$\text{転換率(\%)} = 100 \times (A_p / 7.5) / \{ (A_p / 7.5) + (A_s / 5) \}$$

A_p : (*S,S*)-**1a** と (*R,R*)-**1a** のピーク面積の和

A_s : **2** のピーク面積

2.4.5 ラセミ体((*rac*)-**1a**)の合成

保持時間確認のため、(*rac*)-**1a** を合成した。50 mL のナスフラスコに、1.2 mL (12 mmol) の **2** と 1 mL (14 mmol) の **3a** を量り取り、メタノール(10 mL)を加えて 6.5 h 攪拌加熱還流した。反応液をロータリーエバポレーターで濃縮乾固し、得られた油状の粗体をそのまま分析用サンプルとした。

$^1\text{H NMR}$ (300.40 MHz, CDCl_3) : δ 0.19–0.55 (4H, m), 0.94–1.07 (1H, m), 1.18–1.30 (3H, m), 1.71–1.76 (2H, m), 2.00–2.06 (1H, m), 2.19–2.36 (3H, m), 3.06–3.14 (1H, m)

$^{13}\text{C NMR}$ (75.45 MHz, CDCl_3) : δ 5.69 (CH_2), 7.22 (CH_2), 24.19 (CH_2), 24.85 (CH_2), 27.50 (CH), 30.71 (CH_2), 33.26 (CH_2), 63.54 (CH), 72.94 (CH)

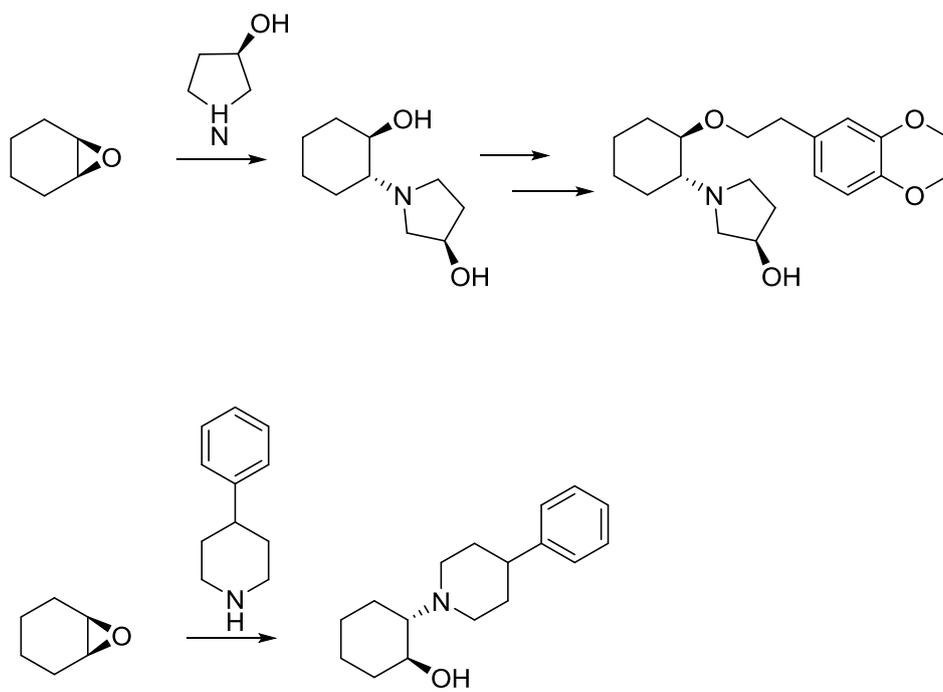
HRMS (ESI) m/z calcd for $\text{C}_9\text{H}_{18}\text{NO}^+$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$: 156.1388, found : 156.1386

第 3 章

ソヤファイブ S-DN の基質適合性と反応機構の推定

3.1 緒言

第2章では、水溶性大豆多糖類であるソヤファイブ S-DN がエポキシド不斉アミノ化反応の触媒として、1,2-エポキシシクロヘキサン (**2**) とシクロプロピルアミン (**3a**) より、67%ee の立体選択性で PDE3 阻害剤 K-134 のキラルビルディングブロックである (1*R*,2*R*)-2-(シクロプロピルアミノ)シクロヘキサノール ((*R,R*)-**1a**) を与えることを明らかとした。さらに粗生成物は、フマル酸を用いて造塩精製することで、医薬品原料として使用可能な >99%ee とできることも示した。本手法は、食品添加物として用いられるソヤファイブ S-DN を触媒とするため安全性が高く、医薬品原薬製造にとって理想的である。そこで、K-134 以外の医薬品原薬のキラルビルディングブロックへの応用の可能性を調査した。(*R,R*)-**1a** と同じ 1,2-アミノシクロヘキサノール構造を有する化合物としては、例えば Na イオンチャンネルなどを遮断することで不整脈の治療薬として既に使用されているバルナカラント、小胞アセチルコリントランスポーターに特異的な結合親和性を有するアルツハイマー病の診断剤としての研究が進むベサミコールなどが挙げられる (Scheme 13)^[39,40]。これらの化合物は (*R,R*)-**1a** と同様、エポキシド不斉アミノ化反応による製法が効果的である。そこでソヤファイブ S-DN 触媒に関し、エポキシドとアミンの基質特異性について調べ、反応機構の推定を行うことで、(*R,R*)-**1a** 以外の化合物への応用の可能性を考察した。



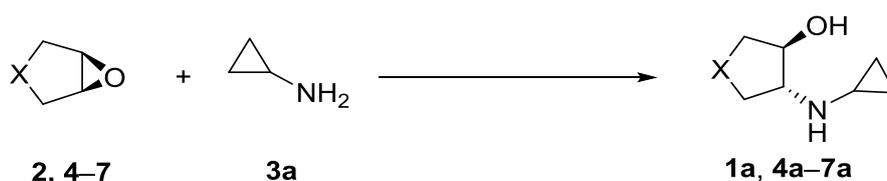
Scheme 13. バルナカラン(上)とベサミコール(下)の合成

3.2 結果と考察

3.2.1 ソヤファイブ S-DN 触媒のエポキシドの基質適合性

ソヤファイブ S-DN のエポキシドに対する基質適合性を調査するため、1,2-エポキシシクロペンタン(**4**)、1,2-エポキシシクロヘキサン(**2**)、3,4-エポキシテトラヒドロフラン(**5**)、1,2-エポキシシクロヘプタン(**6**)、*cis*-2,3-エポキシブタン(**7**)の5種のエポキシドとシクロプロピルアミンの反応を、温度 37 °C、時間 6 d、ソヤファイブ S-DN は 100 mg として行った (Table 16)。

Table 16. エポキシドのスクリーニング



Entry	エポキシド	X	転換率(%)	ee 値(%)
1	2	-C ₂ H ₄ -	98	65
2	4	-CH ₂ -	98	67
3	5	-O-	83	21
4	6	-C ₃ H ₆ -	17	35
5	7	CH ₃ , CH ₃	55	4

^a 反応条件: : エポキシド, 0.49 mmol ; **3**, 0.60 mmol ; トルエン, 420 μL ; 水, 20 μL

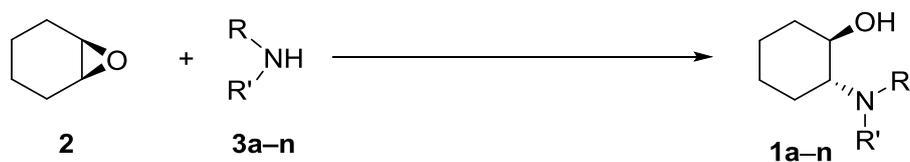
シクロペンタン環とシクロヘキサン環を有する **2** と **4** は、転換率はいずれも 98% であり、ee 値はそれぞれ 65%、67% とほぼ同等の値を示した (entry 1,2)。シクロペンタン環とシクロヘキサン環構造は、適合する構造であることが示唆された。一方、エポキシシクロペンタン同様の 5 員環構造を有する **5** は、転換率こそ 83% と高いものの、ee 値は 21% と低い値であるため、母核に酸素原子が含まれると立体認識されづらくなるものと思われる (entry 3)。シクロヘプタン環を有する **6** は **6 d** と長時間の反応でも転換率は 17% と低く、ee 値も 37% と低値であった (entry 4)。6 員環から 7 員環へと拡張することで、反応性は大きく低下するとわかった。鎖状化合物である **7** では、転換率が 55% と **6** よりも高かったが、ee 値は 4% とほぼ不斉認識されなかった (entry 5)。鎖状化合物は、基質として不適と思われる。

これらの結果から、ソヤファイブ S-DN は環状・鎖状を問わずエポキシドを活性化作用があると明らかになった。立体選択性に注目すると、適合する基質は 1,2-エポキシシクロペンタンと 1,2-エポキシシクロヘキサンのみとわかった。なお、生成物の立体構造については、**1a** のみが (*R,R*) と決定できているが、その他は文献等の情報が無く決定できなかった。

3.2.2 ソヤファイブ S-DN 触媒の基質適合性(アミン)

前節においてソヤファイブ S-DN 触媒に適合するエポキシドは、**2** と **4** であることが明らかになった。次に、アミンの適合性を調査した。エポキシド **2** と 14 種のアミンを用い、反応温度 37 °C、時間 6 d、ソヤファイブ S-DN は 100 mg とした (Table 17)。

Table 17. アミンのスクリーニング^a



Entry	アミン	R	R'	転換率 (%)	ee 値 (%)
1	3a	シクロプロピル	H	98%	65
2	3b	プロピル	H	87	39
3	3c	イソプロピル	H	97	58
4	3d	アリル	H	96	32
5	3e	プロパルギル	H	98	53
6	3f	<i>tert</i> -ブチル	H	4	32
7	3g	3-ペンチル	H	37	81
8	3h	シクロペンチル	H	99	48
9	3i	ベンジル	H	90	30
10	3k	2-フェニルエチル	H	100	59
11	3j	メチル	メチル	74	29
12	3l	-(CH ₂) ₄ -		99	29
13	3m	フェニル	H	57	18
14	3n	H	H	22	26

^a 反応条件: : **2**, 0.49 mmol ; **3**, 0.60 mmol ; トルエン, 420 μ L ; 水, 20 μ L

シクロプロピルアミンと同じ炭素数が 3 の骨格より構成される、プロピルアミン (**3b**)、イソプロピルアミン (**3c**)、アリルアミン (**3d**)、プロパルギルアミン (**3e**) では、転換率が 87–98% と、いずれも同等の反応性であることがわかった。しかしながら、立体選択性は異なり、**3a** を用いた場合の 65% ee が、**3c**、**3e** ではそれぞれ 58% ee、53% ee と低下し、**3b**、**3d** では 39% ee と 32% ee となった (entry 1–5)。よって、炭素数 3 のアミンの反応性は同等であるが、構造によって ee 値が異なったことより、この触媒系では反応性と立体選択性の発現機構が同じではないとわかった。

また本検討で用いたアミンで最もかさ高い *tert*-ブチルアミン (**3f**) は、反応が遅く生成物の転換率はわずか 4% で立体選択性も 32% ee と低い値であった (entry 6)。これは、*tert*-ブチル基の様なかさ高すぎる構造は、ソヤファイブ S-DN に適さないと思われる。3-ペンチルアミン (**3g**) を用いた場合は、転換率は 37% と低かったものの立体選択性は今回の実験で最高の 81% ee であった (entry 7)。さらに環状アルキル基を有するシクロペンチルアミン (**3h**) でも、転換率 99%、ee 値 4 は 8% と比較的良好な値であった (entry 8)。これらの結果より、置換基としては比較的大きい、3-ペンチル基やシクロペンチル基であっても窒素原子に結合する炭素が 3 級であれば反応は進行し、特に前者の置換基はソヤファイブ S-DN の立体制御部位に最も適合する構造と思われる。

さらに、ベンゼン環を置換基として有する、ベンジルアミン (**3i**)、2-フェニルエチルアミン (**3j**) ではそれぞれ、90%、100% と同等の高い転換率で反応は進行したが、立体選択性は大きく異なり、**3j** では 59% ee と高かったが、**3i** では 30% ee と半減した (entry 9, 10)。このことより、ベンゼン環を有しているアミンでも反応は進行するが、その置換位置が選択性に重要であると考えられる。

2 級アミンであるジメチルアミン (**3k**)、ピロリジン (**3l**) でも反応は進行し、74% と 99% と高い転換率で生成物を与えたが、ee 値はいずれも同じ 29% と低かった (entry 11, 12)。一方で、求核性が低いアニリン (**3m**) は、反応が遅い上に立体選択性も 18% ee と低い (entry 13)。アンモニア水 (**3n**) でも反応は進行しするが、**3m** 同様反応が遅く、ee

値も 26%と低い(entry 14)。これらの結果より、塩基性が高くても低すぎても基質として適合しないと思われる。

本検討の結果をまとめると、ソヤファイブ S-DN に、アンモニアを含む種々のアミンと 1,2-エポキシシクロヘキサンのエポキシド不斉アミノ化反応触媒としての作用があるとわかった。立体選択性についてはアミンの構造により異なり、生成物の ee 値が高くなるアミンの置換基は、シクロプロピル基、イソプロピル基、プロパルギル基、3-ペンチル基、シクロペンチル基である。プロパルギル基と 2-フェニルエチル基を除くと、窒素原子に結合する炭素は 3 級の Y 字構造が良いことが明らかとなった (Figure 6)。

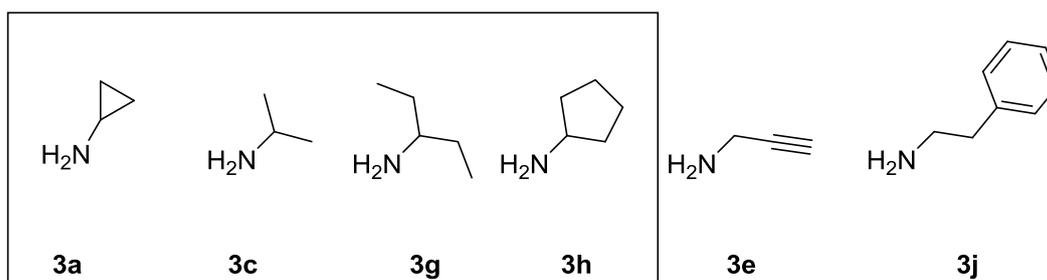


Figure 6. 立体選択性が高くなるアミンの構造

3.2.3 触媒機構の提案(反応場)

これまでのデータに基づき、ソヤファイブ S-DN の触媒機構について推定し提案を試みる。一般的にエポキシ基の開環反応では酸性化合物が触媒として機能することが知られている。高い立体選択性で目的物を与えることが報告されている不斉触媒の多くは、光学活性ルイス酸として機能している。反応機構は、エポキシ基の酸素原子上

の孤立電子対が金属に配位することで C-O 結合が活性化され、さらに配位子の立体効果によりアミン窒素原子上の孤立電子対が求核攻撃する面を制御することが提唱されている (Figure 7)^[41]。

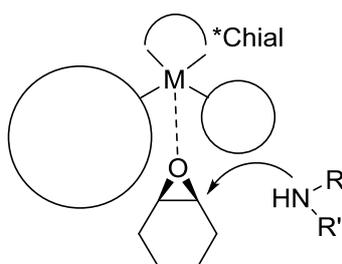


Figure 7. ルイス酸触媒でのエポキシ開環

また、エポキシ基は塩基によっても活性化される。水溶液中に 1,4-ジアザビシクロ [2.2.2]オクタンやトリエチルアミンなどの有機塩基や水酸化ナトリウム水溶液 (pH >8) を添加すると反応が促進されることも報告されている^[21, 42]。

今回見出した触媒であるソヤファイブ S-DN は、糖鎖が繊維状に複雑に絡み合った状態で固体になっているものと思われ、水には溶解するが有機溶媒には不溶である。反応の際にはトルエンに水を少量添加していることにより、一部のみが水溶液となり、残りの大部分を占める固体粒子の内部や周囲に付着しているものと思われる。実験中においても、反応容器の底部にスラリー状のソヤファイブ S-DN が流動していることを観察しており、次イメージとして図示することが出来る (Figure 8)。

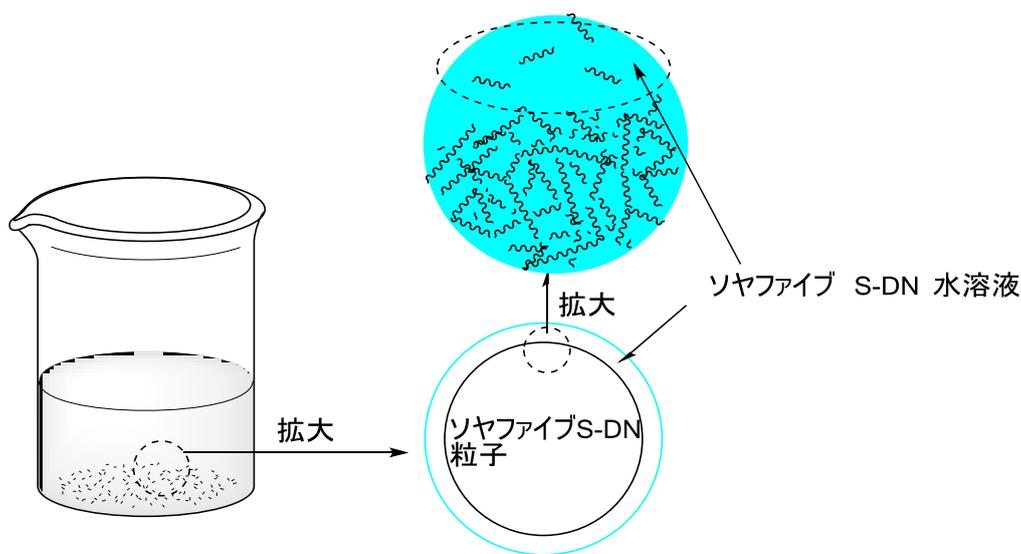


Figure 8. 反応中のソヤファイブ S-DN のイメージ図

ソヤファイブ S-DN は食品分野にて乳化剤として使用されていることより^[43]、相間移動作用が期待できる。したがって水溶液には、トルエン中のエポキシドとアミンを取り込み、ソヤファイブ S-DN の反応場に運び込む機能を有するものと思われる。水を添加しない場合は、ソヤファイブ S-DN に触媒能がないことより、水溶液部分、あるいは水を含む固体部分、またはそれら両方が反応場となりうる。ソヤファイブ S-DN 水溶液は、pH 5.4 (22 °C) と弱酸性であったが、シクロプロピルアミンの添加後は同 11.5 と強い塩基性を示した。水酸化ナトリウム水溶液中のエポキシドの反応は、pH >8 で促進され、これに類似した反応機構であるとする、ソヤファイブ S-DN の相関移動効果により取り込まれたエポキシドとアミンが水溶液中で主に反応するため、水の添加量と共に転換率が向上するはずである。ところが、実験結果は、水の添加量がソヤファイブ S-DN 質量の 50% を超えると、逆に転換率が低下している (Table 12)。したがって、反応場においては、水溶液部分が主ではないと思われる。

主反応場が水溶液中ではないとすると、残りは水を含んだソヤファイブ S-DN の固体部分となる。この場合、環状化合物のβ-シクロデキストリンを触媒とするスチレン

オキシドの位置選択的な開環反応の例が参考となる。反応機構は、疎水性を有するシクロデキストリン内部にベンゼン環が包接され、エポキシ基が外側に出る状態となり、その近傍のヒドロキシ基とアミノ基が水素結合することで近づき、反応すると提唱されている^[37]。ソヤファイブ S-DN は枝分かれの多い複雑な糖鎖であり、これが水を含むと、エポキシドを固定するシクロデキストリンの包接に近い部分が登場するものと思われる。ここへ、エポキシドが入り込み、アミンがその近傍のヒドロキシ基を水素結合することで近づくものと推察する。さらに、ソヤファイブ S-DN は主にアラビノース、ガラクトース、ガラクトツロン酸から構成される糖鎖であることより、分子内に多くのヒドロキシ基やカルボキシル基を有していることに起因しルイス酸として機能し、内部に取り込んだ化合物のエポキシ基を強く活性化するものと考えられる。なお、水溶液中では反応性と立体選択性が共に低い理由として、水溶液中ではエポキシドを固定するコンフォメーションが形成されないことによるものと思われる (Figure 9)。

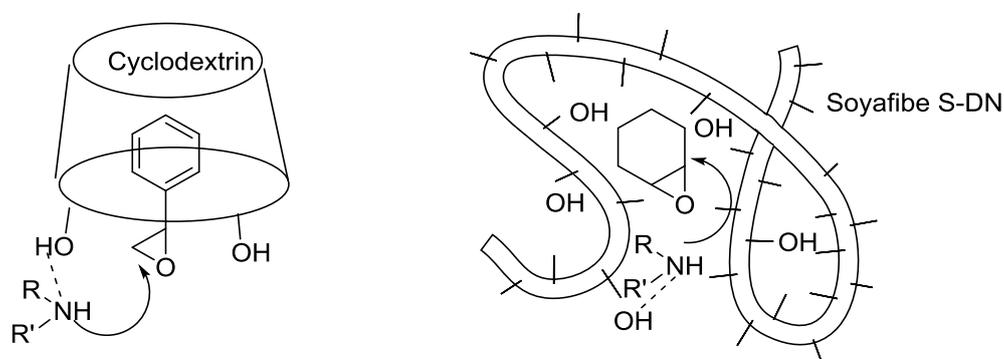


Figure 9. シクロデキストリンとソヤファイブ S-DN によるエポキシド開環反応

3.2.4 触媒機構の提案(エポキシドの適合性)

エポキシドの基質特異性は、エポキシドを固定する固体部分のソヤファイブ S-DN の構造に起因するものと思われる。エポキシドの母核が 5 と 6 員環の場合、固体状ソヤファイブ S-DN に入り固定されることで転換率が高くなる。一方、7 員環は内部に入りにくく、転換率が大きく低下する。鎖状のものは、内部に入りやすいが固定化されにくいため、転換率は中程度となったものとする (Figure 10)。エポキシテトラヒドロフランで、立体選択性が低い理由は、母核中の酸素原子が糖鎖のヒドロキシ基と水素結合などの相互作用を示すためと思われる。

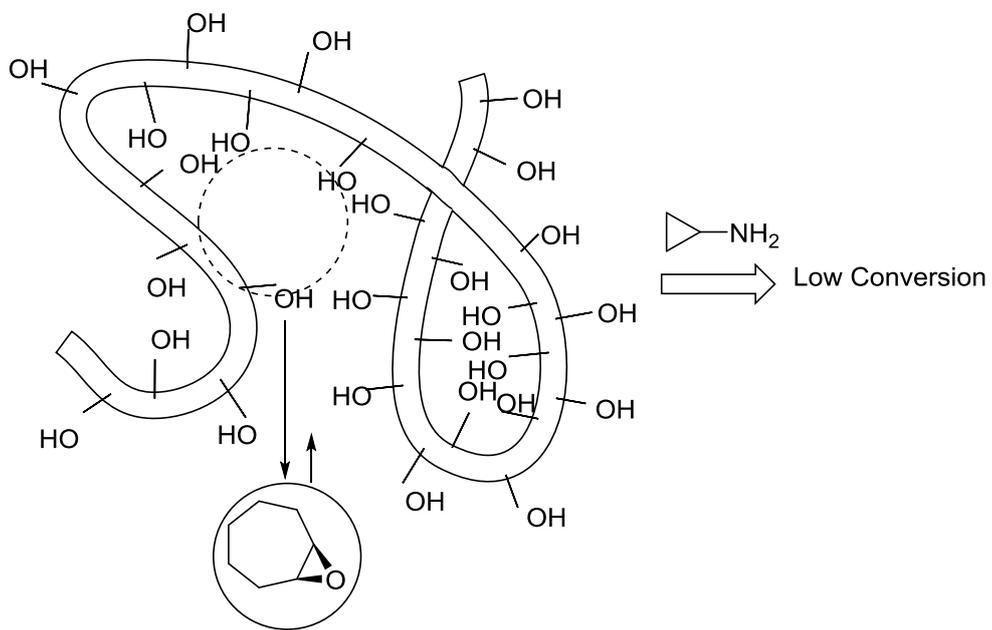
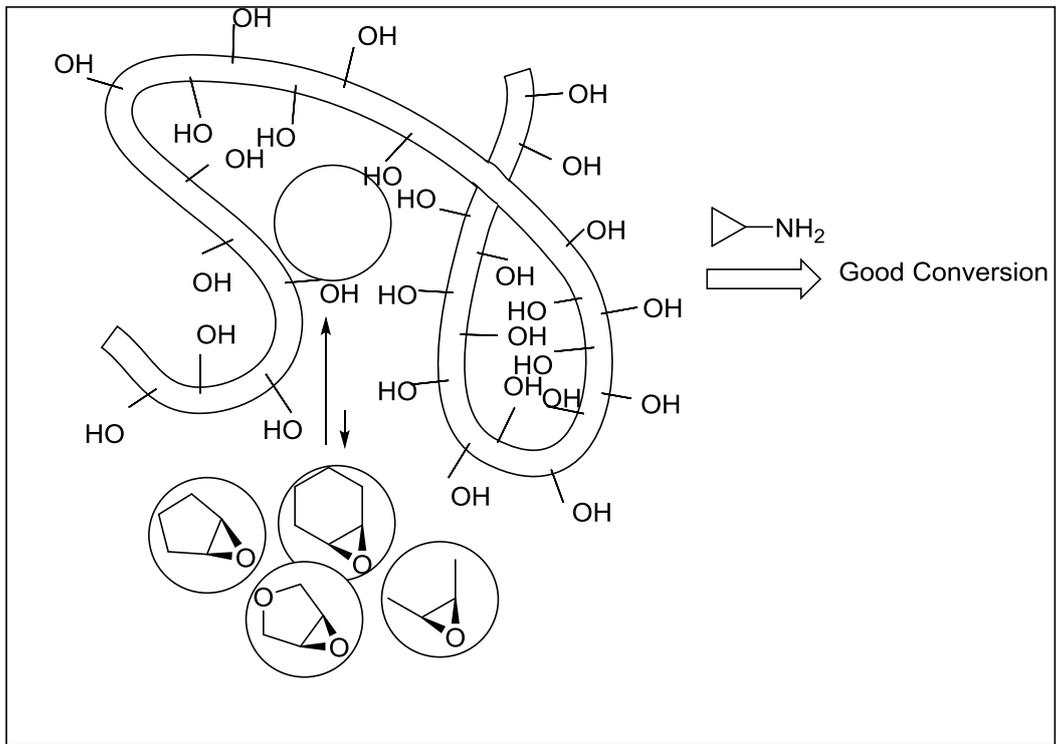


Figure 10. ソヤファイブ S-DN へのエポキシ化合物の固定化イメージ

3.2.5 触媒機構の提案(アミンの適合性)

アミンの基質適合性に関しても同様に説明できると考える。糖鎖に固定され活性化されたエポキシドの近傍で、ヒドロキシ基に水素結合したアミノ基が反応するが、アミンの求核性と置換基の大きさが転換率と選択性に関与するものと推察する。程よい大きさの置換基を有し、固体のソヤファイブ S-DN 中の糖鎖に固定されたエポキシドへの攻撃面が制限されるアミンは立体選択性が高くなる。これに適した構造が、シクロプロピル基やイソプロピル基などであると思われる。また、これらの置換基を有するアミンは、水溶液中ではそれほど反応しない程度の求核性であるため、固体中の反応が主となり選択性が高くなったものとする (Figure 11)。

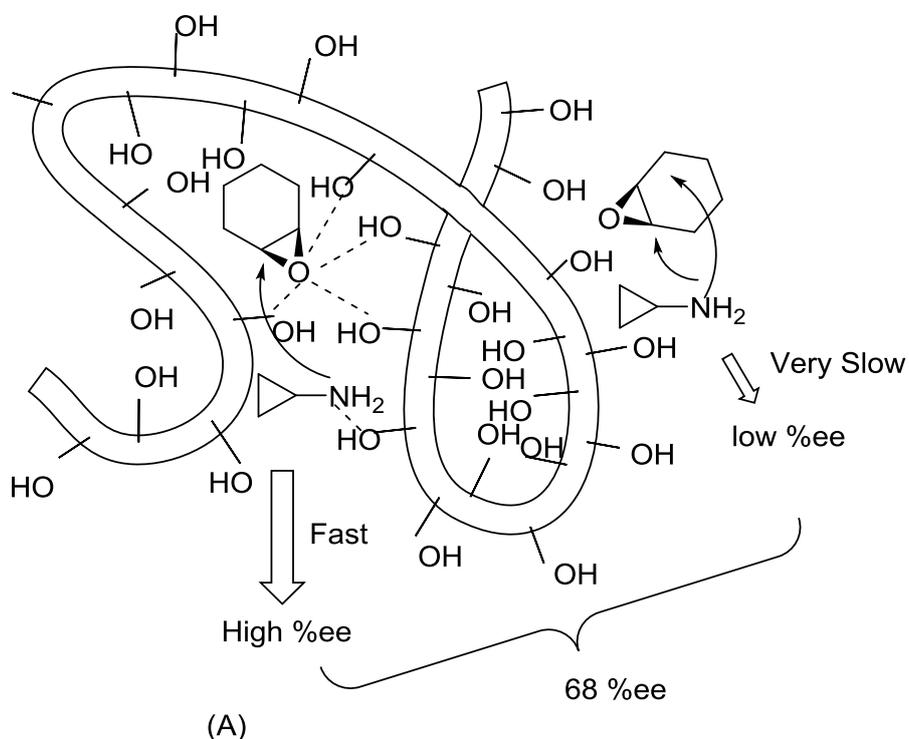


Figure 11. 転換率・立体選択性が共に高となるアミンの反応場イメージ

転換率が低いアミンについては、ソヤファイブ S-DN の固体と水溶液に存在するい
 ずれのエポキシドにも近づきにくい立体障害の大きい置換基を有するものが該当する
 と思われる。その場合でも、反応は主に固体中で進行し、立体選択性は発現する (Figure
 12)。かさ高すぎる **3f** では 32 %ee だが、やや立体障害が小さくなる **3g** では選択性が
 非常に高くなっているが、これはほとんどの反応がソヤファイブ S-DN 固体で進行し
 たためと考える。

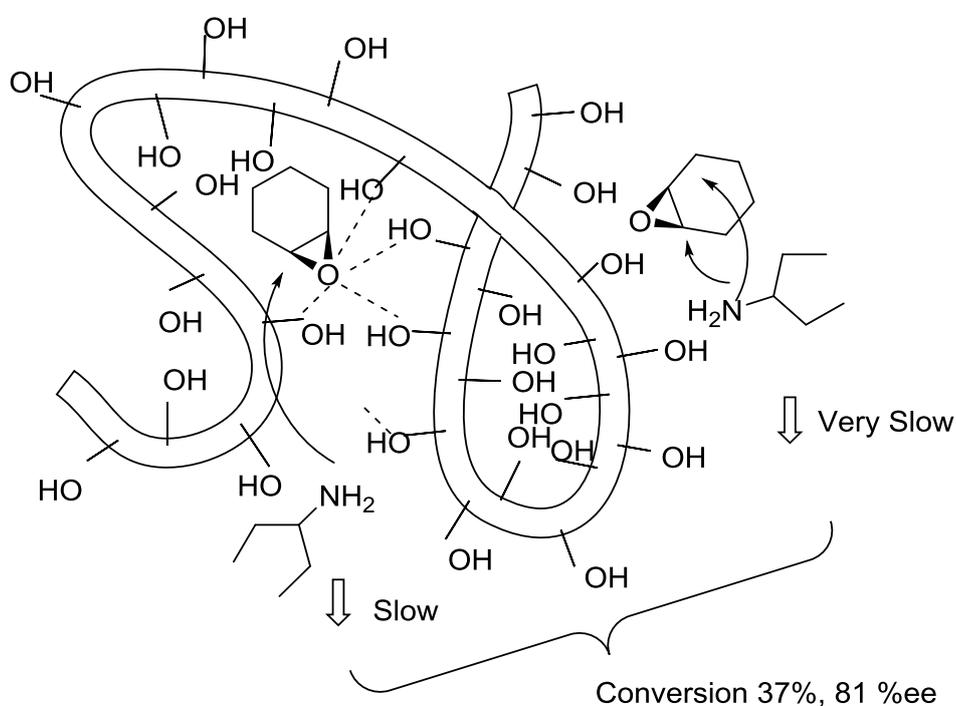


Figure 12. 転換率低・立体選択性高となるアミンの反応場イメージ

転換率が高く選択性が低くなるアミンには2種類のタイプがあると考えられる。まずは**3j**や**3l**で2級アミンのケースである。これらは、塩基性と求核性が高く水溶液中での反応は速いが立体選択性は殆どないものと思われる。固体中での反応であれば、中程度の立体選択性を示す可能性があるが、水溶液中の反応が速いため、結果として生成物のee値が低くなるものと推察する (Figure 13)。

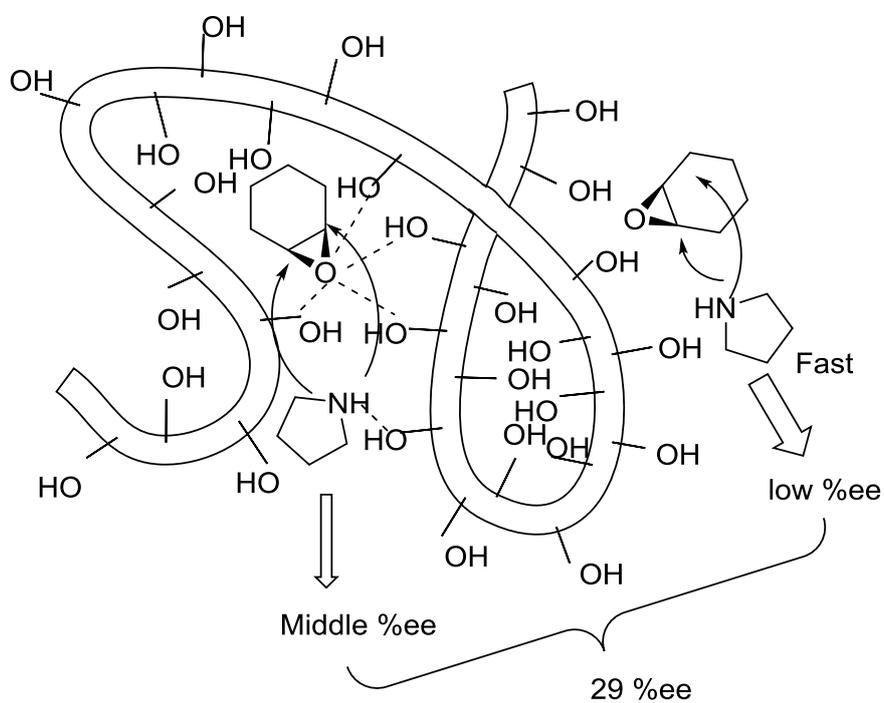


Figure 13. 転換率高・選択性低となるアミン反応場イメージ①

もう一方は、**3b** や **3d** である。これらは 1 級アミンであり、その塩基性より **3a** と同様水溶液中での反応はそれほど進行しないものと思われる。その一方で、固体中では反応は早く進行するものの、置換基が小さいため、攻撃面が制御されず生成物の ee 値が低くなったものとする (Figure 14)。

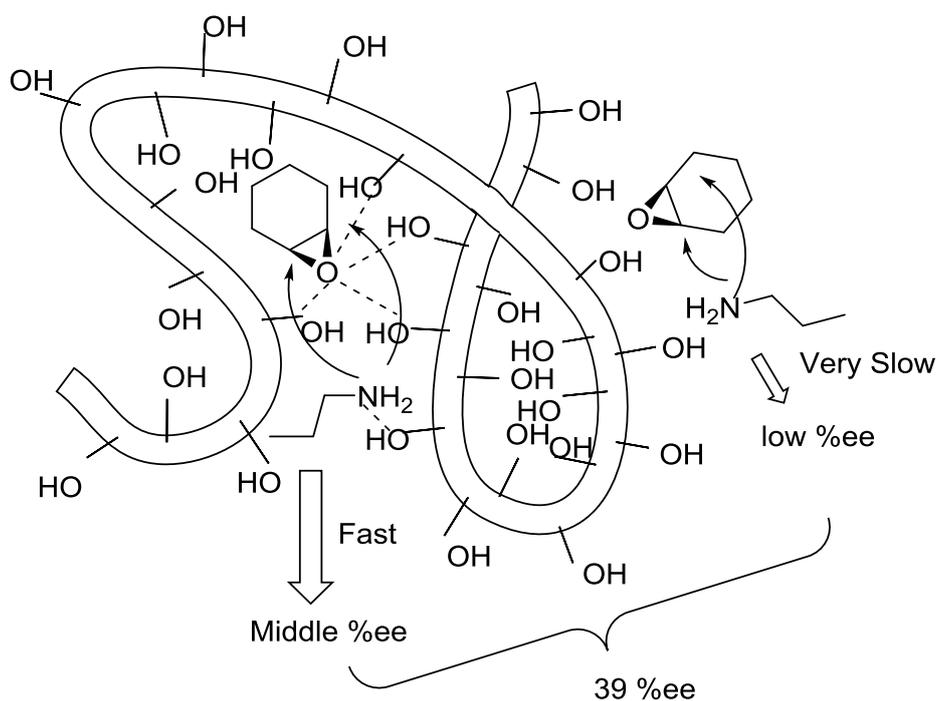


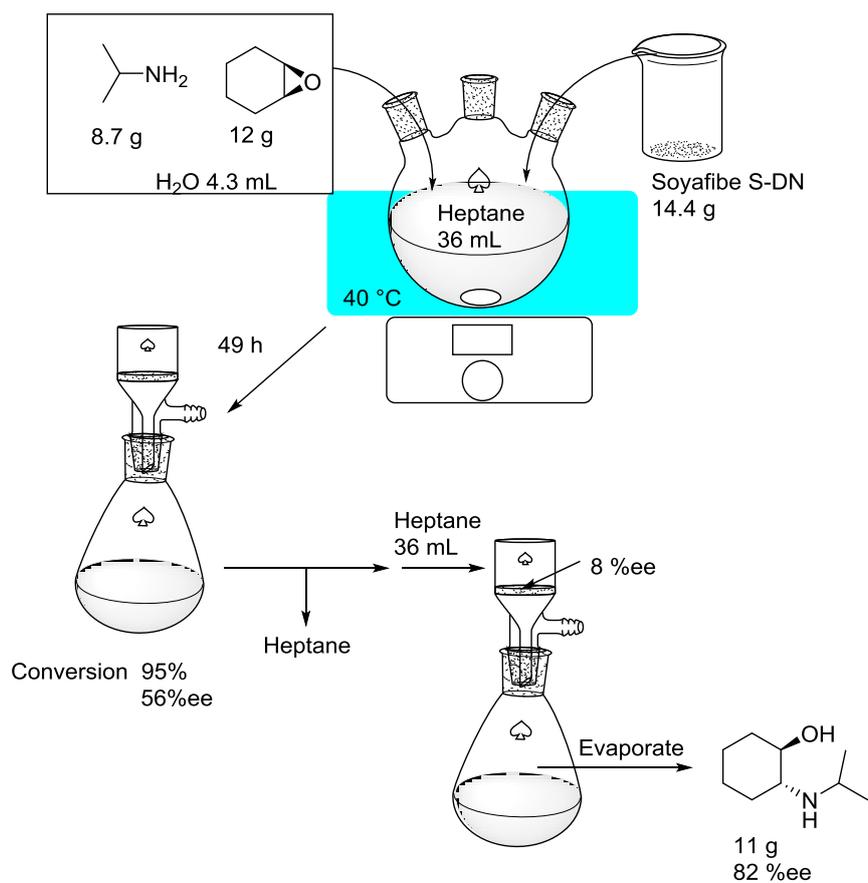
Figure 14. 転換率高・選択性低となるアミン反応場イメージ②

3.2.6 化合物 **1c** によるスケールアップ検証

これまでは基質適合性を調査するため小スケールで転換率や生成物の ee 値を確認する実験であった。そこで、スケールアップして化合物を単離することで、ソヤファイブ S-DN 触媒が(*R,R*)-**1a** 以外の化合物についても実用的な製法であるかを検証することとした。**1c** は、窒素原子上にイソプロピル基が置換しており、その立体効果からベンズアルデヒドへのジエチルアエンの不斉付加反応の触媒として使用されている^[44]。

アミンの基質適合性調査の過程で分析用の(*rac*)-**1c** を合成した際に、この化合物はヘプタン中で結晶化することがわかった。そこで、精製法として反応物にヘプタンを加えてラセミ体を結晶として析出させて除去することを試みた。しかし、トルエンで反応すると、濃縮後に残留するトルエンの影響で、ヘプタンを加えても結晶が析出なかった。トルエンはヘプタンよりも高沸点であるため、溶媒置換濃縮で除去することは困難であるため、反応溶媒をヘプタンへと変更した。実験操作は以下の通りである。

100 mL のフラスコに 12 g (12 mmol) の **2** と 8.7 g (15 mmol) の **3c** を量り取り、ヘプタン 36 mL を加えた。ソヤファイブ S-DN 14.4 g と水 4.3 mL を入れ、40 °C で 49 h マグネチックスターラーで攪拌した。反応終了時の転換率は 95% で ee 値は 56% とトルエン溶媒で行った小スケールの結果とほぼ同等であった (Table 17)。ソヤファイブ S-DN をろ別し、エバポレーターで濃縮乾固後、ヘプタン 36 mL を加えて生じた結晶をろ過した。なお結晶の ee 値は 8% であり、想定通り主としてラセミ体が結晶化していた。母液を濃縮し、濃縮残渣に再びヘプタンを加えて析出した結晶をろ過し、82% ee で光学活性 **1c** を 11 g 取得した。**2** からの通算収率は 58% であった。結果は Scheme 14 にまとめた。

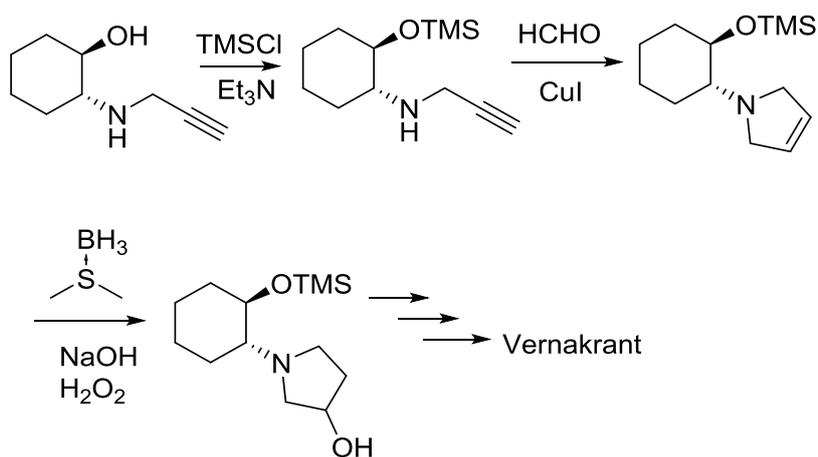


Scheme 14. 化合物 **1c** のスケールアップ合成

得られた **1c** はさらにラセミ体除去の再結晶を繰り返すか、**(R,R)-1a** と同様に造塩による精製を併用すれば、ee 値を向上できると思われる。したがって、ソヤファイブ S-DN は、**(R,R)-1a** 以外に、光学活性体化合物 **1c** の合成にも応用可能であるとわかった。得られた生成物の立体構造は、キラル GC の検出順などから**(R,R)**体である可能性は高いと思われるものの、文献などの情報はなく、その立体構造を確定できなかった。

3.2.7 化合物 **1e** によるスケールアップ検証

プロパルギル基は、アセチレン部分を変換することができるため、有用な化合物である。例えば、既存の環化とヒドロキシ化の組み合わせでベルナカラントへ誘導できると思われる。具体的には、Scheme 15 に示す、プロパルギル基のアルキンをホルマリンと銅で処理して不飽和ピロリジン環を形成^[45]、つづくヒドロボレーションによるヒドロキシ化^[46]を組み合わせた方法が考えられる (Scheme 15)。

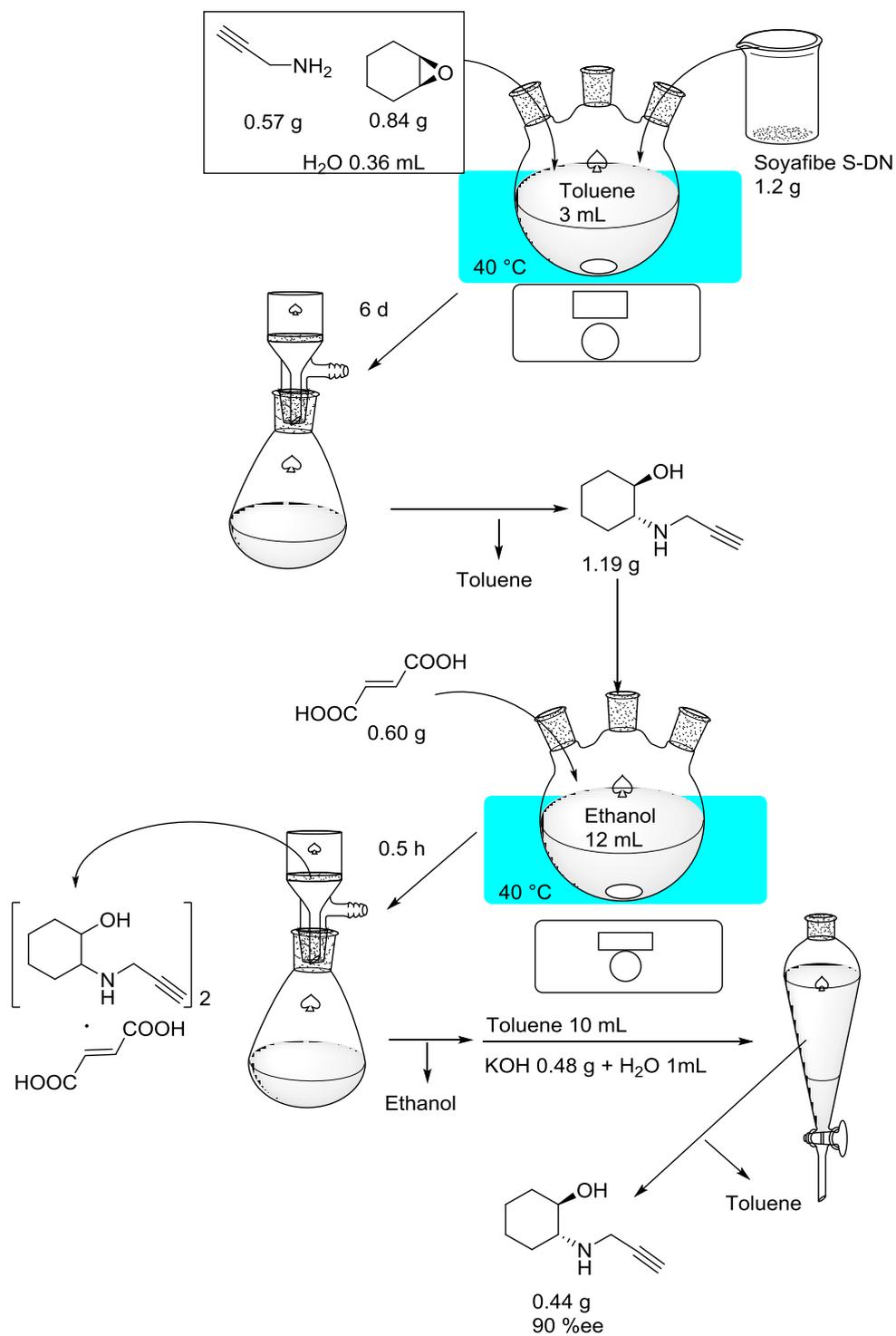


Scheme 15. 化合物 **1e** からベルナカラントへの誘導化

そこで、イソプロピルアミンでの検証実験に引き続き、プロパルギルアミンでのスケールアップ実験を行った。**1e** はスケールアップしても、転換率、ee 値共に 3.2.2 節の結果を再現した。反応終了後の粗体は、(*R,R*)-**1a** と同様、フマル酸塩で低光学純度の結晶を除去することにより、ee 値を高めることが出来た。

50 mL のフラスコに 0.84 g (8.6 mmol) の **2** と 0.57 g (10 mmol) の **3e** を量り取り、トルエン 3 mL を加えた。ソヤファイブ S-DN 1.2 g と水 0.36 mL を入れ、40 °C で 6 d、

マグネチックスターラーで攪拌した。反応終了時後、ソヤファイ S-DN をろ別し、エバポレーターで濃縮乾固して粗体を淡黄色油状物として 1.19 g 得た。粗収率は 91% で、ee 値は 45% であった。これにエタノール 12 mL を加え、40 °C に加温してからフマル酸 0.60 g (粗体に対し 0.66 当量) を加え、30 min 攪拌し、室温でさらに 60 min 攪拌して析出した結晶をろ別した。ろ液をエバポレーターで濃縮し、残渣に水酸化カリウム 0.48 g (粗体に対し 1.1 当量) と水を加え、フリー化しトルエンで抽出した。有機層をロータリーエバポレーターで濃縮し、無色油状物の光学活性 **1e** を 0.44 g、90% ee で得た。**2** からの通算収率は 33% であった。この化合物についても得られた生成物の立体構造は、キラル GC の検出順より (*R,R*) 体であり可能性は高いと思われるものの、他の方法では構造決定できなかった。結果は Scheme 16 にまとめた。



Scheme 16. 化合物 **1e** のスケールアップ合成

3.3 小括

ソヤファイブ S-DN は、1,2-エポキシシクロヘキサンのみならず、1,2-エポキシシクロペンタン、3,4-エポキシテトラヒドロフラン、1,2-エポキシシクロヘプタン、*cis*-2,3-エポキシブタンとシクロプロピルアミンによる開環反応の触媒として機能することを明らかとした。立体選択性は、1,2-エポキシシクロヘキサンと 1,2-エポキシシクロペンタンより生成するもので 65–67%と高かったことより、これらの 2 種のエポキシドがソヤファイブ S-DN が適合する構造であることを示した。

1,2-エポキシシクロヘキサンとアンモニアを含む 14 種のアミンの組み合わせで、アミンに関するソヤファイブ S-DN 触媒の基質特異性を調査した。全ての組み合わせで開環反応が進行し、それぞれのアミンに対応する 1,2-アミノシクロヘキサノールが生成した。3-アミノペンタンを用いた場合、生成物 ee 値は最も高い 81%であった。シクロプロピルアミン、イソプロピルアミン、3-アミノペンタン、シクロペンチルアミンなど、窒素原子に結合する炭素が 3 級であるものは、ee 値が高い傾向にあった。アリルアミンや 2-フェニルエチルアミンでも ee 値が高かったが、他のアミンでは低かった。これらのことより、Y 字構造を有する置換基とプロパルギル基、2-フェニルエチル基がソヤファイブ S-DN に適合することを明らかとした。

これらの結果に基づき、ソヤファイブ S-DN の触媒機構について考察した。まず、この触媒系の主な反応場は、水を含んだソヤファイブ S-DN の固体部分であると推察した。触媒機構は、ソヤファイブ S-DN の糖鎖が、シクロデキストリンの様にエポキシドを固定し、アミンが近傍のヒドロキシ基に水素結合することで、反応が促進されるモデルを提案した。立体選択性については、水溶液中での反応性が高いアミンでは低くなり、低いアミンでは高くなると推察した。ソヤファイブ S-DN 固体中の立体選択性は、糖鎖の立体構造に起因し、影響を受けにくい小さな置換基を有するアミンでは低くなり、影響を受ける中程度の大きさの置換基を有するものは高くなるが、大き

な置換を有するものは反応性と共に低下すると推論した。

ソヤファイブ S-DN が触媒として適合し、かつ生成物に用途が認められる *trans*-2-(イソプロピルアミノ)シクロペンタン-1-オールと *trans*-2-(プロパルギルアミノ)シクロペンタン-1-オールの合成についてスケールアップ実験を行い、本触媒の実用性を検証した。これらを通じて、ソヤファイブ S-DN は、エポキシドやアミンが適合する構造を有していれば、光学活性 2-アミノシクロアルカノールの製造にとって、有用な触媒であることを明らかとした。

3.4 実験材料および方法

3.4.1 実験材料

2.4.2 節に示したものの以外は全て東京化成工業社より購入したものをそのまま用いた。

3.4.2 スクリーニング実験方法

実験は別途記載しない限り、下記の方法で行った。

エポキシド (0.49 mmol) とアミン (0.60 mmol) を 2.5 mL の GC 用ガラス製サンプルバイアルに量り取り、ソヤファイブ S-DN (100 mg) とトルエン (0.42 mL) と水 (0.02 mL) を加えて密封した。これを 40 °C に設定した振盪培養装置に入れ、所定の時間振盪した。反応終了後、メンブレンフィルターで上澄み液をろ過し、ろ液を分析した。保持時間の確認は、別途ラセミ体を合成して確認した。各化合物の分析方法と保持時間、¹H NMR、¹³C NMR、HRMS データは 3.4.7 節に記載した。

3.4.3 GC 共通分析条件

カラム：β-DEX120 (Spelco 社製) 長さ 30 m, 内径 0.25 mm, 膜厚 0.25 μm

キャリアーガス：ヘリウム 94 kPa

検出器：水素炎イオン化検出器

気化室温度：220 °C

検出器温度：300 °C

サンプル注入量：0.5 μL

スプリット比：1：150

転換率は、2.2.4 節で述べた有効炭素数法 (ECN) を使用して算出した。

各化合物のカラム温度、保持時間、ECN レスポンスは 3.4.7 節に記載する。

3.4.4 HPLC 共通分析条件

検出器：紫外吸収検出器

検出波長：254 nm

サンプル注入量：1 μ L

各化合物の移動相、保持時間は 3.4.7 に記載する。

3.4.5 GC 前処理法(トリメチルシリル化)

反応液をろ過し、エバポレーターで濃縮した。残渣をジクロロメタンに再溶解し、クロロトリメチルシランとトリエチルアミンを加え 30 min 攪拌した。生じた塩をろ別した液を GC で分析した。

3.4.6 HPLC 前処理法(ベンゾイル化)

反応液をろ過し、エバポレーターで濃縮した。残渣をアセトニトリルに再溶解し、塩化ベンゾイルとトリエチルアミンを加え 30 min 攪拌した。生じた塩をろ別した液を HPLC で分析した。

3.4.7 ラセミ体合成方法と物性データ、および各化合物の分析条件

各エポキシ化合物 15 mmol とアミン 15 mmol と塩化リチウム 3.1 mmol をメタノール 8 mL に溶解し、50 °C で 48 h で攪拌した。反応液をエバポレーターで濃縮し粗体を得た。得られた粗体は必要に応じて、クーゲルロー蒸留で精製した。

• *trans*-2-(シクロプロピルアミノ)シクロヘキサン-1-オール (*rac*-**1a**)

¹H NMR, ¹³C NMR、HRMS の各データ、ECN レスポンスは、2.4.4 節に記載。

GC 条件(転換率, ee 値)

カラム温度 : 120 °C

保持時間 : (*S,S*)-**1a**, 26.9 min ; (*R,R*)-**1a**, 27.4 min ; **2**, 4.2 min

• *trans*-2-(シクロプロピルアミノ)シクロペンタン-1-オール (**4a**)

bp: 105–110 °C (外浴温度) / 0.1 mmHg

GC 条件(転換率)

カラム温度 : 130 °C

保持時間 : **1b**, 20.1 min, 20.3 min ; **4**, 3.2 min

ECN レスポンス : **4a**, 9.5 ; **4**, 4

GC 条件(ee 値) : TMS 化後測定

カラム温度 : 90 °C, (5 min) → 130 °C, 20 °C/min

保持時間 : **4a**-TMS, 15.5 min (major), 15.7 min (minor)

¹H NMR (300.40 MHz, CDCl₃) : δ 0.31–0.52 (4H, m), 1.27–1.40 (1H, m), 1.48–1.79

(3H, m), 1.88–1.99 (1H, m), 2.03–2.29 (2H, m), 2.90–2.97 (1H, m), 3.85 (1H, q, $J = 6.31$)

^{13}C NMR (75.45 MHz, CDCl_3) : δ 5.89 (CH_2), 6.46 (CH_2), 20.08 (CH_2), 29.30 (CH), 30.13 (CH_2), 32.12 (CH_2), 66.95 (CH), 72.21 (CH)

HRMS (ESI, m/z) calcd for $\text{C}_8\text{H}_{16}\text{NO}^+$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$: 142.1232, found : 142.1225

• *trans*-4-(シクロプロピルアミノ)テトラヒドロフラン-3-オール (**5a**)

GC 条件 (転換率)

カラム温度 : 155 °C

保持時間 : **5a**, 20.1 min ; **5**, 2.6 min

ECN レスポンス : **5a**, 4.5 ; **5**, 2

HPLC 条件 (ee 値) Bz 化後測定

カラム : CHIRALPAK AS-RH (ダイセル社製), 長さ 150 mm, 内径 4.6 mm

移動相 A : 水

移動相 B : アセトニトリル

グラジエント条件 : 15% B (15 min) \rightarrow 80% B (20 min)

流量 : 1.0 mL/min

カラム温度 : 30 °C

保持時間 : **5a**-Bz, 26.2 min (major), 28.2 min (minor)

^1H NMR (300.40 MHz, CDCl_3) : δ 0.41–0.53 (4H, m), 2.12–2.19 (1H, m), 3.27–3.31 (1H, m), 3.61–3.68 (2H, m), 3.97 (1H, dd, $J_1 = 9.61$, $J_2 = 5.41$), 4.06 (1H, dd, $J_1 = 9.01$, $J_2 = 5.41$), 4.21 (1H, q, $J = 2.40$)

^{13}C NMR (75.45 MHz, CDCl_3) : δ 6.18 (CH_2), 6.35 (CH_2), 28.93 (CH), 66.57 (CH), 71.90 (CH_2), 73.62 (CH_2), 75.59 (CH)

HRMS (ESI) m/z calcd for $C_7H_{14}NO_2^+$ $[M+H]^+$: 144.1025, found : 144.1016

• *trans*-2-(シクロプロピルアミノ)シクロヘプタン-1-オール (**6a**)

GC 条件(転換率)

カラム温度 : 145 °C

保持時間 : **6a**, 27.2 min ; **6**, 4.8 min

ECN レスポンス : **6a**, 8.5 ; **6**, 6

HPLC 条件(ee 値)Bz 化後測定

カラム : CHIRALPAK AS-RH(ダイセル社製), 長さ 150 mm, 内径 4.6 mm

移動相 A : 水

移動相 B : アセトニトリル

グラジエント条件 : 15% B (15 min) → 80% B (20 min)

流量 : 1.0 mL/min

カラム温度 : 30 °C

保持時間 : **6a**-Bz, 25.3 min (major), 28.5 min (minor)

1H NMR (300.40 MHz, $CDCl_3$) : δ 0.22–0.56 (4H, m), 1.21–1.32 (1H, m), 1.39–1.71 (7H, m), 1.89–1.99 (1H, m), 2.07–2.14 (1H, m), 2.21–2.28 (1H, m), 2.33–2.41 (1H, m), 3.06–3.16 (1H, m)

^{13}C NMR (75.45 MHz, $CDCl_3$) : δ 6.20 (CH_2), 7.13 (CH_2), 22.08 (CH_2), 23.71 (CH_2), 26.55 (CH_2), 27.62 (CH), 29.90 (CH_2), 32.75 (CH_2), 65.76 (CH), 74.90 (CH)

HRMS (ESI) m/z calcd for $C_{10}H_{20}NO^+$ $[M+H]^+$: 170.1545, found : 170.1536

• *trans*-3-(シクロプロピルアミノ)ブタン-2-オール (**7a**)

bp. 135–140 °C (外浴温度) / 0.1 mmHg

GC 条件 (転換率, ee 値)

カラム温度 : 110 °C

保持時間 : **7a**, 11.1 min (minor), 11.4 min (major) ; **7**, 2.6 min

ECN レスポンス : **7a**, 5.5 ; **7**, 3

¹H NMR (300.40 MHz, CDCl₃) : δ 0.22–0.31 (1H, m), 0.36–0.55 (3H, m), 1.12 (3H, d, *J* = 6.31 Hz), 1.31 (3H, d, *J* = 11.7 Hz), 2.19–2.26 (1H, m), 2.40–2.50 (1H, m), 3.21–3.30 (1H, m)

¹³C NMR (75.45 MHz, CDCl₃) : δ 6.18 (CH₂), 7.08 (CH₂), 16.46 (CH₃), 19.25 (CH₃), 27.81 (CH), 60.21 (CH), 70.21 (CH)

HRMS (ESI) *m/z* calcd for C₇H₁₇NO⁺ [M+H]⁺ : 130.1232, found : 130.1225

• *trans*-2-(プロピルアミノ)シクヘキサン-1-オール (**1b**)

bp. 115–120 °C (外浴温度) / 0.2 mmHg

GC 条件 (転換率, ee 値)

カラム温度 : 130 °C

保持時間 : **1b**, 20.0 min (minor), 20.3 min (major) ; **2**, 4.2 min

ECN レスポンス : **1b**, 7.5 ; **2**, 5

¹H NMR (300.40 MHz, CDCl₃) : δ 0.90–0.99 (4H, m), 1.21–1.29 (3H, m), 1.42–1.55 (2H, m), 1.71–1.73 (2H, m), 2.02–2.22 (3H, m), 2.39–2.47 (1H, m), 2.70–2.79 (1H, m), 3.10–3.18 (1H, m)

¹³C NMR (75.45 MHz, CDCl₃) : δ 11.69 (CH₃), 23.60 (CH₂), 24.39 (CH₂), 25.03 (CH₂), 30.43 (CH₂), 33.52 (CH₂), 45.54 (CH₂), 63.47 (CH), 73.46 (CH)

HRMS (ESI) *m/z* calcd for C₉H₂₀NO⁺ [M+H]⁺ : 158.1545, found : 158.1539

• *trans*-2-(イソプロピルアミノ)シクヘキサン-1-オール (**1c**)

bp. 135-140 °C (外浴温度) / 0.1 mmHg

GC 条件 (転換率, ee 値)

カラム温度 : 120 °C

保持時間 : **1c**, 12.9 min (minor), 13.2 min (major) ; **2**, 4.2 min

ECN レスポンス : **1c**, 7.5 ; **2**, 5

¹H NMR (300.40 MHz, CDCl₃) : δ 0.82–0.94 (1H, m), 1.00 (3H, d, *J* = 6.31), 1.06 (3H, d, *J* = 6.31), 1.20–1.31 (3H, m), 1.69–1.73 (2H, m), 2.06–2.10 (2H, m), 2.18–2.26 (1H, m), 2.69 (1H, sept, *J* = 6.31), 3.09 (1H, m)

¹³C NMR (75.45 MHz, CDCl₃) : δ 22.79 (CH₃), 24.28 (CH₂), 24.73 (CH₃), 25.36 (CH₂), 31.29 (CH₂), 32.98 (CH₂), 45.05 (CH), 60.64 (CH), 73.87 (CH)

HRMS (ESI) *m/z* calcd for C₉H₂₀NO⁺ [M+H]⁺ : 158.1545, found : 158.1535

• *trans*-2-(アリルアミノ)シクヘキサン-1-オール (**1d**)

GC 条件 (転換率, ee 値)

カラム温度 : 120 °C

保持時間 : **1d**, 34.8 min (minor), 35.2 min (major) ; **2**, 4.2 min

ECN レスポンス : **1d**, 7.5 ; **2**, 5

¹H NMR (300.40 MHz, CDCl₃) : δ 0.92–1.04 (1H, m), 1.19–1.31 (3H, m), 1.70–1.72 (2H, m), 1.97–2.07 (2H, m), 2.24–2.32 (1H, m), 3.11–3.26 (2H, m), 3.26–3.42 (1H, m), 5.06–5.22 (1H, m), 5.84–5.97 (1H, m)

¹³C NMR (75.45 MHz, CDCl₃) : δ 24.28 (CH₂), 24.71 (CH₂), 30.07 (CH₂), 33.62 (CH₂), 49.17 (CH₂), 62.65 (CH), 73.27 (CH), 115.61 (CH₂), 126.85 (CH)

HRMS (ESI) m/z calcd for $C_9H_{18}NO^+$ $[M+H]^+$: 156.1388, found : 156.1378

• *trans*-2-(プロパルギルアミノ)シクヘキサン-1-オール (**1e**)

GC 条件 (転換率, ee 値)

カラム温度 : 125 °C

保持時間 : **1e**, 47.1 min (minor), 47.6 min (major) ; **2**, 4.2 min

ECN レスポンス : **1e**, 8.1 ; **2**, 5

1H NMR (300.40 MHz, $CDCl_3$) : δ 0.92–1.05 (1H, m), 1.21–1.38 (3H, m), 1.68–1.73 (2H, m), 1.96–2.08 (2H, m), 2.24 (1H, t, $J = 2.40$), 2.40–2.48 (1H, m), 3.21–3.29 (1H, m), 3.47 (2H, dq, $J_1 = 16.82$, $J_2 = 2.40$)

^{13}C NMR (75.45 MHz, $CDCl_3$) : δ 24.31 (CH_2), 24.56 (CH_2), 29.79 (CH_2), 33.80 (CH_2), 35.35 (CH_2), 62.01 (CH), 71.30 (C), 73.61 (CH), 82.22 (CH)

HRMS (ESI) m/z calcd for $C_9H_{16}NO^+$ $[M+H]^+$: 154.1232, found : 154.1222

• *trans*-2-(*tert*-ブチルアミノ)シクヘキサン-1-オール (**1f**)

bp. 100–105 °C (外浴温度) / 0.1 mmHg

GC 条件 (転換率, ee 値)

カラム温度 : 130 °C

保持時間 : **1f**, 15.6 min (minor), 15.8 min (major) ; **2**, 4.2 min

ECN レスポンス : **1f**, 8.5 ; **2**, 5

1H NMR (300.40 MHz, $CDCl_3$) : δ 0.90–1.19 (1H, m), 1.13 (9H, s), 1.24–1.32 (3H, m), 1.67–1.71 (2H, m), 1.98–2.07 (2H, m), 2.19–2.27 (1H, m), 2.89–2.97 (1H, m)

^{13}C NMR (75.45 MHz, $CDCl_3$) : δ 24.47 (CH_2), 25.88 (CH_2), 30.63 (CH_3), 32.64

(CH₂), 34.88 (CH₂), 50.68 (C), 58.13 (CH), 74.31 (CH)

HRMS (ESI) m/z calcd for C₁₀H₂₂NO⁺ [M+H]⁺ : 172.1701, found : 172.1691

• *trans*-2-(3-ペンチルアミノ)シクヘキサン-1-オール (**1g**)

bp. 150–155 °C (外浴温度) / 0.1 mmHg

GC 条件 (転換率, ee 値)

カラム温度 : 130 °C

保持時間 : **1g**, 30.3 min (minor), 31.3 min (major) ; **2**, 4.2 min

ECN レスポンス : **1g**, 9.5 ; **2**, 5

¹H NMR (300.40 MHz, CDCl₃) : δ 0.83–0.94 (7H, m), 1.20–1.56 (7H, m), 1.69–1.73 (2H, m), 2.05–2.09 (2H, m), 2.14–2.22 (1H, m), 2.44–2.52 (1H, m), 3.02–3.10 (1H, m)

¹³C NMR (75.45 MHz, CDCl₃) : δ 8.99 (CH₃), 10.26 (CH₂), 24.28 (CH₃), 25.40 (CH₂), 26.19 (CH₂), 26.89 (CH₂), 31.14 (CH₂), 32.89 (CH₂), 56.76 (CH), 61.14 (CH), 74.12 (CH)

HRMS (ESI) m/z calcd for C₁₁H₂₄NO⁺ [M+H]⁺ : 186.1858, found : 186.1849

• *trans*-2-(シクロペンチルアミノ)シクヘキサン-1-オール (**1h**)

bp. 150–155 °C (外浴温度) / 0.1 mmHg

GC 条件 (転換率, ee 値)

カラム温度 : 155 °C

保持時間 : **1h**, 24.7 min (minor), 25.2 min (major) ; **2**, 3.4 min

ECN レスポンス : **1h**, 9.5 ; **2**, 5

^1H NMR (300.40 MHz, CDCl_3) : δ 0.83–0.95 (1H, m), 1.20–1.38 (5H, m), 1.50–1.87 (8H, m), 2.01–2.22 (3H, m), 3.01–3.09 (1H, m), 3.19–3.27 (1H, m)

^{13}C NMR (75.45 MHz, CDCl_3) : δ 23.59 (CH_2), 23.79 (CH_2), 24.31 (CH_2), 25.27 (CH_2), 30.91 (CH_2), 33.08 (CH_2), 32.12 (CH_2), 34.59 (CH_2), 56.14 (CH), 61.86 (CH), 73.75 (CH)

HRMS (ESI) m/z calcd for $\text{C}_{11}\text{H}_{22}\text{NO}^+$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 184.1701, found : 186.1693.

• *trans*-2-(ベンジルアミノ)シクヘキサン-1-オール (**1i**)

bp. 175–180 °C (外浴温度) / 0.1 mmHg

GC 条件 (転換率)

カラム温度 : 185 °C, (35 min) \rightarrow 210 °C, (10 °C/min) \rightarrow 210 °C, (12 min)

保持時間 : **1i**, 43.9 min ; **2**, 3.2 min

ECN レスポンス : **1i**, 11.5 ; **2**, 5

HPLC 条件 (ee 値)

カラム : CHIRALCEL OB-H (ダイセル社製) , 長さ 250 mm, 内径 4.6 mm

移動相 : ヘキサン/2-プロパノール/ジエチルアミン混液 (980 : 20 : 1)

流量 : 0.5 mL/min

カラム温度 : 40 °C

保持時間 : **1i**, 21.0 min (minor), 28.6 min (major)

^1H NMR (300.40 MHz, CDCl_3) : δ 0.91–1.05 (1H, m), 1.16–1.25 (3H, m), 1.71–1.74 (2H, m), 2.01–2.07 (1H, m), 2.15–2.21 (1H, m), 2.25–2.33 (1H, m), 3.16–3.24 (3H, m), 3.69 (1H, d, $J = 12.92$), 3.96 (1H, d, $J = 12.92$), 7.22–7.36 (5H, m)

^{13}C NMR (75.45 MHz, CDCl_3) : δ 24.25 (CH_2), 24.85 (CH_2), 30.20 (CH_2), 33.40 (CH_2), 50.68 (CH_2), 62.89 (CH), 73.41 (CH), 126.81 (CH), 127.96 (CH), 128.25

(CH), 140.32 (C)

HRMS (ESI) m/z calcd for $C_{13}H_{20}NO^+$ (M+H)⁺ : 206.1545, found : 206.1537

• *trans*-2-(2-フェニルエチルアミノ)シクヘキサン-1-オール (**1j**)

GC 条件 (転換率)

カラム温度 : 185 °C, (35 min) → 210 °C, (10 °C/min) → 210 °C, (12 min)

保持時間 : **1j**, 47.4 min ; **2**, 3.2 min

ECN レスポンス : **1j**, 12.5 ; **2**, 5

HPLC 条件 (ee 値)

カラム : CHIRALCEL OB-H (ダイセル社製) , 長さ 250 mm, 内径 4.6 mm

移動相 : ヘキサン/2-プロパノール/ジエチルアミン混液 (980 : 20 : 1)

流量 : 0.5 mL/min

カラム温度 : 40 °C

保持時間 : **1j**, 24.2 min (minor), 32.2 min (major)

¹H NMR (300.40 MHz, CDCl₃) : δ 0.84–0.96 (1H, m), 1.18–1.32 (3H, m), 1.67–1.71 (2H, m), 1.99–2.07 (2H, m), 2.16–2.25 (1H, m), 2.70–2.86 (3H, m), 3.00–3.15 (2H, m), 7.18–7.32 (5H, m)

¹³C NMR (75.45 MHz, CDCl₃) : δ 24.29 (CH₂), 25.15 (CH₂), 30.55 (CH₂), 33.25 (CH₂), 37.01 (CH₂), 47.89 (CH₂), 63.55 (CH), 73.62 (CH), 126.06 (CH), 128.36 (CH), 128.63 (CH), 140.06 (C)

HRMS (ESI) m/z calcd for $C_{14}H_{22}NO^+$ [M+H]⁺ : 220.1701, found : 220.1694

• *trans*-2-(ジメチルアミノ)シクヘキサン-1-オール (**1k**)

GC 条件 (転換率、ee 値)

カラム温度 : 95 °C

保持時間 : **1k**, 46.5 min (minor), 47.1 min (major) ; **2**, 8.4 min

ECN レスポンス : **1k**, 7 ; **2**, 5

¹H NMR (300.40 MHz, CDCl₃) : δ 1.03–1.31 (4H, m), 1.69–1.78 (3H, m), 2.07–2.33 (8H, m), 3.27–3.35 (1H, m)

¹³C NMR (75.45 MHz, CDCl₃) : δ 20.16 (CH₂), 23.97 (CH₂), 25.14 (CH₂), 33.05 (CH₂), 39.98 (CH₃), 69.11 (CH), 69.36 (CH)

HRMS (ESI) *m/z* calcd for C₈H₈NO⁺ [M+H]⁺ : 144.1388, found : 144.1382

• *trans*-(2-ヒドロキシシクロヘキシル)ピロリジン (**1l**)

bp. 100–105 °C (外浴温度)/0.1 mmHg

GC 条件 (転換率)

カラム温度 : 130 °C

保持時間 : **1l**, 35.4 min ; **2**, 3.4 min

ECN レスポンス : **1l**, 12.45 ; **2**, 5

GC 条件 (ee 値)

カラム温度 : 130 °C, (30 min) → 170 °C, (4 °C/min)

保持時間 : **1l**-TMS, 23.0 min (major), 23.2 min (minor)

¹H NMR (300.40 MHz, CDCl₃) : δ 1.17–1.27 (4H, m), 1.69–1.78 (7H, m), 2.05–2.15 (1H, m), 2.42–2.59 (3H, m), 2.64–2.71 (2H, m), 3.29–3.37 (1H, m)

¹³C NMR (75.45 MHz, CDCl₃) : δ 20.99 (CH₂), 23.43 (CH₂), 24.03 (CH₂), 25.16

(CH₂), 33.13 (CH₂), 47.03 (CH₂), 64.78 (CH₂), 70.51 (CH)

HRMS (ESI) m/z calcd for C₁₀H₂₀NO⁺ [M+H]⁺ : 170.1545, found : 170.1537.

• *trans*-2-(フェニルアミノ)シクヘキサン-1-オール (**1m**)

GC 条件 (転換率)

カラム温度 : 185 °C, (35min) → 210 °C, (10 °C/min) → 210 °C, (12 min)

保持時間 : **1m**, 44.2 min ; **2**, 3.2 min

ECN レスポンス : **1m**, 10.5 ; **2**, 5

HPLC 条件 (ee 値)

カラム : CHIRALCEL OB-H (ダイセル社製) , 長さ 250 mm, 内径 4.6 mm

移動相 : ヘキサン/2-プロパノール/ジエチルアミン混液 (980 : 20 : 1)

流量 : 0.5 mL/min

カラム温度 : 40 °C

保持時間 : **1m**, 27.0 min (minor), 28.2 min (major)

¹H NMR (300.40 MHz, CDCl₃) : δ 0.98–1.11 (1H, m), 1.24–1.47 (3H, m), 1.70–1.79 (2H, m), 2.10–2.14 (2H, m), 3.10–3.18 (1H, m), 3.31–3.39 (1H, m), 6.70–6.77 (3H, m), 7.15–7.25 (2H, m)

¹³C NMR (75.45 MHz, CDCl₃) : δ 24.15 (CH₂), 24.82 (CH₂), 31.42 (CH₂), 33.09 (CH₂), 59.89 (CH), 74.25 (CH), 114.17 (CH), 118.07 (CH), 129.18 (CH), 147.73 (C)

HRMS (ESI) m/z calcd for C₁₂H₁₈NO⁺ [M+H]⁺ : 192.1388, found : 192.1380.

• *trans*-2-アミノシクロヘキサン-1-オール (**1n**)

市販品をそのまま分析に用いた。

GC 条件 (転換率、ee 値)

カラム温度 : 120 °C

保持時間 : **1n**, 18.4 min (major), 18.8 min (minor) ; **2**, 4.2 min

ECN レスポンス : **1n**, 4.74 ; **2**, 5

第 4 章

食物粉末によるエポキシドアミノ化反応活性

4.1 緒言

これまでの各章において、水溶性大豆多糖類であるソヤファイブ S-DN が、1,2-エポキシシクロヘキサン (**2**) とシクロプロピルアミン (**3a**) のエポキシド不斉アミノ化反応の触媒活性を有しており、ホスホジエステラーゼ 3 阻害剤 K-134 のキラルビルディングブロックである (1*R*,2*R*)-2-シクロプロピルアミノ-1-シクロヘキサノール ((*R,R*)-**1a**) の製造に使用可能であることを明らかとした。さらに、不斉触媒として使用される光学活性 *trans*-2-イソプロピルアミノ-1-シクロヘキサノール (**1c**) や、不整脈治療剤ベルナカラントへ誘導可能なキラルビルディングブロックである光学活性 *trans*-2-プロパルギルアミノ-1-シクロヘキサノール (**1e**) の合成にも応用可能であることを示した。

ソヤファイブ S-DN の触媒活性部位は、構成成分である糖鎖とタンパクのうち、前者の部分であることを明らかとした。この糖鎖触媒の先例は、芹澤らによる見出された、結晶性セルロース触媒によるエステルやアミドの加水分解促進のみであり^[36]、エポキシド不斉アミノ化反応は報告がなかった。

また、ソヤファイブ S-DN は食品添加物として多くの加工食品に使用されており、人体への安全性は高い^[47]。さらに大量生産されていることより、入手が容易であり工業用途での利用も十分に可能である。これら安全かつ安価という付加価値は、第 1 章でも述べたように、医薬品原薬の製造に有効である。一方で、第 2 章、第 3 章で示したようにソヤファイブ S-DN を用いて得られる生成物の立体選択性は最高でも 81% と決して高いものではなく、エポキシドやアミンの基質適合性についても限界があった。そこで、立体選択性の向上や基質適合性の拡張の可能性を論じるため、市販の糖鎖および大豆以外の食物粉末を用いて反応を行った。

4.2 結果と考察

4.2.1 市販多糖類による反応

水溶性大豆多糖類ソヤファイブ S-DN はペクチン様物質であることが知られている。ペクチンは、ソヤファイブ S-DN 同様、主にポリガラクトロン酸、ガラクトロナン、ラムノガラクトロナンから形成され、エポキシド不斉アミノ化反応の活性が期待できる。そこで、ペクチンを含む、試薬として入手可能な多糖類を用いて **2** と **3a** の反応を行った。使用した多糖類は 9 種。柑橘類由来のペクチン、およびそのウロン酸メチルエステルを加水分解したペクチン酸。乳酸菌により産出される、主としてグルコースからなるデキストラン。甲殻類から得られるキチンをアルカリ処理した、グルコサミンとその酢酸エステルからなるキトサン。海藻から得られる、硫酸化されたガラクトースからなるカラギーナン。細菌が生産する、主に 1,3-グルカンからなるカードラン、およびグルコース、マンノース、グルクロン酸から成るキサントガム。アラビアゴムの樹液より得られ、主として(+)-アラビノガラクトタンからなるアラビアゴム。カラマツ由来の(+)-アラビノガラクトタンである。反応はこれまで同様トルエンを溶媒とし、水を添加して温度 40 °C、時間は 16 h として行った。

その結果、デキストラン、グルコサミン、キトサン、カラギーナン、カードラン、(+)-アラビノガラクトタン、キサントガム、アラビアゴムでは、転換率が 5% 未満であり、ee 値はほぼ 0 であった (entry 2-8)。よってこれらは、触媒として機能しないとわかった。ペクチンおよびペクチン酸を用いた場合、**3a** の使用量が 30 μL では、GC チャートにて目的物が検出されなかった。さらに、ペクチン類以外の反応液には確認できた **3a** のピークについても認められなかった。これは、ペクチンやペクチン酸は、その構造中にカルボキシル基を多く有するため、これらが **3a** と塩を形成し、反応しなかったものと推察した。そこで、**3a** を 2 倍の 60 μL として再度実験を行った。その結果、

ペクチンおよびペクチン酸を触媒として使用したいずれの反応液にも **3a** を確認できた。生成物(*R,R*)-**1a** は、ペクチンを用いた場合は確認できたが、ペクチン酸では認められなかった (entry 1,9)。ペクチンは、転換率 9%、ee 値 42%とソヤファイブ S-DN よりも活性および立体選択性が劣るものの、(*R,R*)選択的なエポキシド不斉アミノ化反応の触媒として機能することがわかった。このことより、ペクチン同様、ソヤファイブ S-DN と共通する多糖より構成される成分を含む食物粉末であれば、エポキシド不斉アミノ化触媒として機能することが示唆された。

Table 18. 市販多糖を用いたエポキシド開環反応 ^a

Entry	多糖	転換率 (%)	(<i>R,R</i>)- 1a ee 値 (%)
1 ^b	ペクチン (柑橘由来)	9	42
2	デキストラン	1	0
3	キトサン	2	0
4	カラギーナン	4	0
5	カードラン	4	-1
6	(+)-アラビノガラクトン (カラマツ由来)	0	-
7	アラビアゴム	1	0
8	キサントタンガム	0	-
9 ^b	ペクチン酸	0	-

^a 反応条件 : **2**, 50 μ ; **3a**, 30 μ L ; トルエン, 420 μ L ; 水, 20 μ L ; 多糖類, 100 mg

^b **3a**, 60 μ L

4.2.2 食物粉末によるエポキシド不斉アミノ化反応

ペクチンは広く多くの植物中に含まれることが知られている^[48]。植物の一部は、我々人類が食物として毎日摂取しており、安全性が高い。これを触媒として利用できることは、第1章で述べたように、医薬品製造用途として望ましい。そこで食品として入手した35種の果物と野菜の粉末について、**2**と**3a**のエポキシド不斉アミノ化触媒能の有無を調査した(Table 19)。反応温度は40 °C、時間16 hでとして行った。

Table 19. 植物粉末を用いたエポキシド不斉アミノ化反応^a

転換率	植物名
3%以上	キウイ、ニンジン、文旦(種)、かぼちゃ、ピスタチオ、ジャガイモ、柚子(果皮)、蓮根、リンゴ(種)、茶、インゲン豆、えんどう豆、ウコン 計13種
3%未満	トマト、コーヒー、ニンニク、ナツメグ、バジル、生姜、米ぬか、小麦胚芽、ピーナッツ、アーモンド、花柚子(種)、バナナ、オリーブ、銀杏、胡椒、ヒマワリ(種)、昆布、海苔、ヒジキ、小豆、ヒヨコマメ、エゴマ(種)、大根 計22種

^a 反応条件: **2**, 50 μ L ; **3a**, 30 μ L ; トルエン, 420 μ L ; 水, 20 μ L ; 食物粉末, 100 mg

実験の結果、転換率が3%を超えたものはTable 19上段に示す13種であった。これらのものは、一般的にペクチン類を多く含むものと思われる。一方、海藻類にはペクチン質は含まれていないため、反応はほとんど進行しなかった。このことより触媒能は、食物粉末に含まれていたペクチン類に起因するものと思われる。転換率が3%以上を示した食物粉末を用いた場合の転換率及び生成物のee値をTable 20に示す。

Table 20. 転換率が 3%を超える食物粉末^a

Entry	植物	転換率 (%)	ee 値 (%)
1	キウイ (果皮)	9	71
2	ニンジン	12	62
3	文旦 (種)	9	54
4	カボチャ	8	54
5	ピスタチオ	7	47
6	ジャガイモ	7	33
7	柚子 (果皮)	4	32
8	蓮根	4	31
9	リンゴ (種)	3	26
10	茶	29	28
11	えんどう豆	5	27
12	グリーンピース	4	14
13	ウコン	11	-14

^a 反応条件: **2**, 50 μ L; **3a**, 30 μ L; トルエン, 420 μ L; 水, 20 μ L; 食物粉末, 100 mg

キウイの果皮を用いた場合、転換率は 9%と市販のペクチンと同等であったが、ee 値は 71%と高かった (entry 1)。キウイには、立体選択性が高くなるような糖鎖構造が含まれているものと思われる。その他の食物粉末で転換率が 10%を超えたものはニンジン、茶、ウコンであった (entry 2, 10, 13)。キウイを含めこれらは触媒活性を有する糖鎖の含有量が多いと推察される。特に、茶では 29%と乾燥以外の加熱加工が施されていない粉末としては非常に高い値を示したが、ee 値は 28%と低いことより、反応活性と立体選択性は同一ではないことが示唆された。立体選択性の面は、ニンジンで 62%ee と高く、キナコに近い値となった (entry 2)。ニンジン以外では、文旦の種、カ

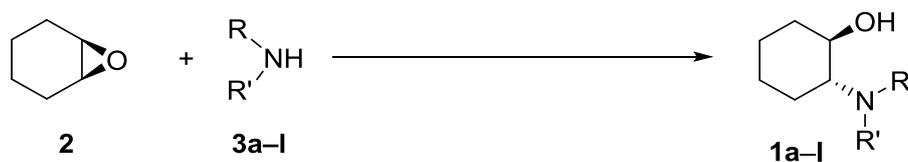
ボチャ、ピスタチオで 47–54%ee と比較的良好であった (entry 3–5)。文旦の種は、54%ee とキウイに次いで立体選択性高いが、同じく柑橘類由来物であるペクチン(原料詳細は不明)は 42%ee、柚子の果皮は 32%ee であったことより、植物の種類によって立体選択性は異なるとわかった (entry 3, 7)。また、ジャガイモや蓮根の粉末の立体選択性は、柚子の果皮と同等の 30% 台であったが、リンゴの種、茶、えんどう豆、グリーンピースの粉末では 30% 未満であった (entry 6, 8, 9–12)。これらの結果より、植物の属種や部位と反応活性や立体選択性には、関連はないとわかった。全ての結果を通じ、特筆すべきはウコンで、今回実験した食物の中で唯一 (*S,S*) 体の立体選択性を示し、生成物の ee 値は 14% であった。ウコンには、他の植物とは異なる立体構造をもつ何らかの糖鎖が含まれているものと思われる (entry 13)。

これら結果より、植物の種類や使用する部分により立体選択性および反応活性が大きく変わることがわかった。したがって、目的物に合わせたエポキシドやアミンを用いて多くの植物をスクリーニングすることで、適合する糖鎖を含有する食物が見つかる可能性があるものと推察する。

4.2.3 ニンジン触媒の基質適合性

前節にて、植物種により反応活性や立体選択性が異なることを明らかとした。その際に使用したニンジンは、こだま食品株式会社より加工食品製造用途として市販されている、キャロットパウダーである。これはソヤファイブ S-DN 同様、大量に入手可能であり、工業用途としても使用できる。そこで、このキャロットパウダーを触媒とし、**2** のエポキシド不斉アミノ化反応において 12 種のアミン (**3a-1**) の基質適合性を調査し、ソヤファイブ S-DN の結果と比較した。反応温度は 40 °C、時間 6 d として行った (Table 21)。

Table 21. キャロットパウダーのアミン適合性^a



Entry	アミン	R	R'	キャロット		ソヤファイブ	
				パウダー (%)		S-DN (%)	
				転換率	ee 値*	転換率	ee 値*
1	3a	シクロプロピル	H	47	59	98	65
2	3b	プロピル	H	21	13	87	39
3	3c	イソプロピル	H	23	51	97	58
4	3d	アリル	H	19	8	96	32
5	3e	プロパルギル	H	27	2	98	53
6	3f	<i>tert</i> -ブチル	H	2	5	4	32
7	3g	3-ペンチル	H	2	31	37	81
8	3h	シクロペンチル	H	25	37	99	48
9	3i	ベンジル	H	18	3	90	30
10	3j	2-フェニルエチル	H	48	50	100	59
11	3k	-(CH ₂) ₄ -		55	-14	74	-29
12	3l	メチル	メチル	34	15	99	29

^a 反応条件: : **2**, 0.49 mmol ; **3**, 0.60 mmol ; トルエン, 420 μL ; 水, 20 μL ; 触媒, 100 mg

キャロットパウダーは、ソヤファイブ S-DN と比較して、全てのアミンで転換率が低かった。6 d もの長時間の反応にもかかわらず、転換率が 45%を超えたのはシクロプロピルアミン、2-フェニルエチルアミン、ジメチルアミンの 3 種であった (entry 1, 10, 11)。これらのうち、最も高い転換率を示したものはジメチルアミンで 55%であったが、ソヤファイブ S-DN を用いた場合の 74%と比べて約 20 ポイント低下した。シクロプロピルアミン、2-フェニルエチルアミンでの転換率は、ソヤファイブ S-DN の場合の約半分であった。これらの結果は、それぞれの粉末の製造方法に起因しているものと考えられる。ソヤファイブ S-DN は、前述したようにオカラより水溶性の多糖類を熱水で抽出したものであり、食物繊維の割合は 66%である。一方、キャロットパウダーはニンジンの根茎を乾燥し、粉碎しただけであり、日本食品標準成分表によれば、その食物繊維量は乾燥物換算で 25%に過ぎない^[49]。この単位質量当たりの糖鎖の含有量の違いが、活性の差になっているものと思われる。ただし、アミンの違いによっても転換率が異なったことより、活性の差は糖鎖の含有率以外の要素があることも示唆された。すなわち、ソヤファイブ S-DN とキャロットパウダーに含まれる糖鎖の含有量と、その構成単糖または立体構造の違いが反応性の差に起因しているものと思われる。

生成物の立体選択性に関しても、キャロットパウダーがソヤファイブ S-DN よりも低かった。その差が 10 ポイント未満であったのは、シクロプロピルアミン、イソプロピルアミン、2-フェニルエチルアミンであった (entry 1, 3, 10)。キャロットパウダーで最も高い ee 値を示したのは、シクロプロピルアミンの 59%、次いでイソプロピルアミンの 51%ee、2-フェニルエチルアミンの 50%ee であった。これらは、ソヤファイブ S-DN を用いた場合に近い値であった。一方、プロパルギルアミンでは 2%ee、3-ペンチルアミンでも 31%ee とソヤファイブ S-DN の場合より約 50 ポイントの大幅な低下が見られた。これらのことより、キャロットパウダーとソヤファイブ S-DN に含まれる糖鎖の構造の違いが、各アミンでの立体選択性の差となっているものと考えられる。

4.2.4 触媒活性中心の推定と食物成分触媒の可能性

これまでの検討より、エポキシド不斉アミノ化反応の進行を確認できたソヤファイブ S-DN、ペクチン、キャロットパウダーに含まれる共通の糖鎖がないかを調査し、触媒活性を発現する構造の推定を試みる。まず、ソヤファイブ S-DN^[35]、ペクチン^[50]、およびニンジン^[51]とカラマツ由来のアラビノガラクトタン^[52]とアラビアゴム^[53]の構成糖を文献情報に基づきまとめた (Table 22)。

Table 22. 市販糖鎖およびニンジンペクチンの糖組成

成分	繊維分の構成糖 (%)							
	Rha	Fuc	Ara	Xyl	Gal	Glc	GalA	その他
ソヤファイブ S-DN	5.0	3.2	22.6	3.7	46.1	1.2	18.2	
ペクチン (柑橘類)	1.7– 4.5	1.2	3.3– 9.0	2.3	7.0– 12.0	2.9– 11.1	63.3– 80.1	Man 1.6-2.8
ニンジン	2.2	0.1	5.7	2.2	8.6	34.9	43.7	Man 2.4
(+)アラビノガラクトタン (カラマツ由来)	0.2	0.2	12.5	1.2	85.9	-	-	
アラビアゴム	13	-	27	-	44	-	-	GlcA 14.5

Rha : ラムノース, Fuc : フコース, Ara : アラビノース, Xyl : キシロース

Gal : ガラクトース, Glc : グルコース, GalA : ガラクツロン酸, Man : マンノース

GlcA : グルクロン酸

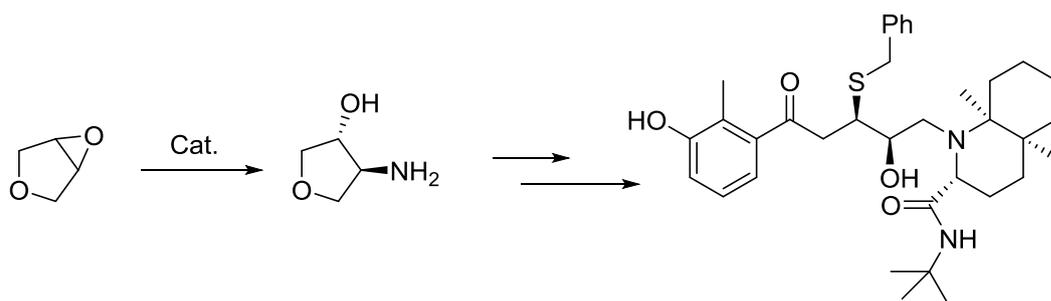
触媒活性を有するものに共通するのは、ガラクトツロン酸の存在である。ペクチンおよびペクチン様物質の主鎖はポリガラクトツロン酸であるため、これらを含むものはガラクトツロン酸の比率が高くなっているものと思われる。一方で、ソヤファイブ S-DN、ペクチン、およびニンジンと比較すると、ガラクトツロン酸含有量と触媒活性の間には逆相関があるため、反応場としてはポリガラクトツロン酸部位以外の糖鎖も影響しているものと推察される。また、これらの3種に含まれる構成単糖で、ソヤファイブ S-DNに最も多く含まれるものはガラクトースであり、これが構成する糖鎖が触媒活性の発現に寄与している可能性がある。しかし、同様にガラクトースが多い(+)-アラビノガラクトンやアラビアゴムは触媒活性がない。そのため、ガラクトースの結合形態が重要であると思われる。そこで、ソヤファイブ S-DN、ペクチン、(+)-アラビノガラクトン、アラビアゴムを構成するガラクトンについて、その結合状態を文献情報に基づきまとめた (Table 23)。

Table 23. 各糖鎖に含まれるガラクトースの形態

多糖類	ガラクトースの形態
ソヤファイブ S-DN	β -1,4-ガラクトン
(+)-アラビノガラクトン(カラマツ由来)	β -1,3-ガラクトン
	β -1,6-ガラクトン
アラビアゴム	β -1,3-ガラクトン
	β -1,6-ガラクトン
ペクチン (柑橘由来)	β -1,3-ガラクトン
	β -1,4-ガラクトン

ソヤファイブ S-DN のガラクトンは、 β -1,4 結合で構成されるのに対し、ペクチンで

は、 β -1,3 結合のものも含まれる^[54]。(+) -アラビノガラクトタンやアラビアゴムでは主に、 β -1,3 結合および β -1,6 結合のもで構成される^[52, 53]。反応活性を有するのはソヤファイブ S-DN とペクチンのみであったことより、エポキシドを固定化し活性化する部位は、 β -1,4 ガラクトタン構造とポリガラクトツロン酸であると思われる。また、植物種間での立体選択性の差は、ガラクトタンに結合するラムノースやアラビノース、キシロースなどの単糖や他のオリゴ糖、ポリガラクトツロン酸主鎖などの立体構造が、それぞれの植物で異なるためではないかと考える。この立体構造とエポキシドおよびアミンとの相関を明らかにできれば、高い選択性や基質適合性を有する糖鎖を推定できる可能性がある。そして、推定した構造を有する植物をスクリーニングで見出すことができれば、ソヤファイブ S-DN では適合しない化合物の生産に使用可能な触媒を開発できるものとする。例えば、立体構造としては (S,S) 体となるエイズ治療薬ネルフィナビルの重要中間体の合成に関しても^[55]、ソヤファイブ S-DN と反対の立体選択性を示すウコンの糖鎖構造を解析し、これに適合する植物種を探し出すことで対応可能になるものとする期待できる。



Scheme 17. 糖鎖触媒のネルフィナビル中間体合成への応用

さらにエポキシド不斉アミノ化反応と同様な機構で進行する反応であれば、今回見出した食物粉末を触媒とすることができ、これまでに示した光学活性アミノシクロア

ルカノール以外の化合物の合成にも応用展開できる可能性がある。

4.3 小括

多糖類によるエポキシド不斉アミノ化反応の立体選択性の向上や基質適合性の拡張の可能性を論じるため、市販の糖鎖および大豆以外の食物粉末を用いて反応を行った。市販の糖鎖である、ペクチン、ペクチン酸、デキストラン、キトサン、カラギーナン、カルダン、(+)-アラビノガラクトサン、キサンタンガム、アラビアゴムを用いて、1,2-エポキシシクロヘキササンとシクロプロピルアミンの反応で評価した。その結果、ペクチンのみが触媒作用を示し、(1*R*,2*R*)-2-シクロプロピルアミノ-1-シクロヘキサノールを与えたが、ソヤファイブ **S-DN** と比較して転換率、*ee* 値共に低かった。ペクチンは、多くの植物細胞壁に存在することが知られており、大豆以外の植物成分がエポキシド不斉アミノ化触媒として機能する可能性があることが示唆された。そこで、食品として流通する多くの食物粉末をスクリーニングした結果、キウイ、ニンジン、文旦、かぼちゃ、ピスタチオ、ジャガイモ、柚子(果皮)、蓮根、リンゴ(種)、茶、インゲン豆、えんどう豆を用いると転換率 3%以上で、目的物が得られた。特にニンジンより製造されるキャロットパウダーを用いた場合、転換率、*ee* 値共に良好であった。

植物種により基質適合性が異なるかを調べるため、ソヤファイブ **S-DN** とキャロットパウダーを用い、1,2-エポキシシクロヘキササンと 12 種のアミンで反応し、立体選択性を比較した。全ての実験で、ソヤファイブ **S-DN** の方が高選択性であり、立体選択性の向上や基質適合性の拡張性は確認できなかった。一方で、ソヤファイブ **S-DN** とキャロットパウダーと立体選択性の差はアミンにより異なった。シクロプロピルアミン、イソプロピルアミン、2-フェニルエチルアミンでの *ee* 値の差は、キャロットパウダーとソヤファイブ **S-DN** で 10 ポイント以内であったが、他のアミンでは大きく低下した。これらの結果は、植物成分に含まれる糖鎖構造の違いにより、基質特異性が異なることを示している。

これらの結果より、エポキシドとアミンと植物種の組み合わせを最適化できれば、

目的のアミノアルコール化合物が、高い立体選択性で得られる可能性があると思われる。

また、細胞壁を構成する多糖類は、植物の種類によって構造や構成単糖の割合が異なっていることが知られている。このことは、ソヤファイブ **S-DN** に含まれる糖鎖による触媒活性の発現機構が明らかとなれば、基質に合わせた糖鎖が含まれる食物を探すことで、新たな触媒が見つかる可能性を示すものと考えている。

4.4 実験材料および方法

実験装置全て、2.4.1 節と同じものを用いた。

4.4.1 実験材料

2.4.2 節に示したものの以外の、ペクチン、ペクチン酸、デキストラン、キトサン、カラギーナン、カードラン、(+)-アラビノガラクトサン、キサントランガムは、東京化成工業社より購入したものをそのまま使用した。アラビアゴムはナカライテスク社より購入したものをそのまま使用した。植物粉末は、一般市場で入手したものの他、加工食品や健康食品の原料として粉末で大量生産されているものを使用した。これらの入手先、および粉末の調製法を Table 24 に示した。

- ・植物粉末調製法 A：市販の植物乾燥片をそのまま粉砕機で粉砕し、得られた粉末をヘキサンでスラリー洗浄し、油分を除去した。その後、減圧デシケーターで乾燥し使用した。
- ・植物粉末調製法 B：店頭で入手した果実の果皮または種子を 80 °C で減圧乾燥した。乾燥物を粉砕し、得られた粉末をヘキサンでスラリー洗浄し、油分を除去した。その後、減圧デシケーターで再度乾燥し使用した。

Table 24. 植物粉末の入手先と調製法

商品名	入手先	状態	調製法
パンプキンパウダー	こだま食品	乾燥末	—
マッシュポテト	三木食品	乾燥末	—
キャロットパウダー	こだま食品	乾燥末	—
レンコンパウダー	こだま食品	乾燥末	—
トマトパウダー	こだま食品	乾燥末	—
乾燥大根おろし	こだま食品	乾燥末	—
ウコン粉末	日本粉末薬品	乾燥末	—
ガーリックパウダー	一般市場品	乾燥末	—
ナツメグ	一般市場品	乾燥末	—
乾燥ネギ	一般市場品	乾燥物	粉碎のみ
緑茶	一般市場品	乾燥物	粉碎のみ
コーヒー	一般市場品	乾燥物	粉碎のみ
バジル	一般市場品	乾燥物	粉碎のみ
生姜	一般市場品	乾燥物	粉碎のみ
米ぬか	一般市場品	乾燥物	粉碎のみ
小麦胚芽	一般市場品	乾燥物	粉碎のみ
海苔	一般市場品	乾燥物	粉碎のみ
ヒジキ	一般市場品	乾燥物	粉碎のみ
昆布	一般市場品	乾燥物	粉碎のみ
アーモンド	一般市場品	種子	A
ピスタチオ	一般市場品	種子	A
インゲン豆	一般市場品	種子	A

Table 25 つづき

えんどう豆	一般市場品	種子	A
ヒヨコマメ	一般市場品	種子	A
銀杏	一般市場品	種子	A
エゴマ	一般市場品	種子	A
オリーブ	一般市場品	果実	B
夏みかん(果皮)	一般市場品	果実	B
キウイ(果皮)	一般市場品	果実	B
文旦(種子)	一般市場品	果実	B
リンゴ(果皮)	一般市場品	果実	B
花柚子(種子)	一般市場品	果実	B
バナナ(果皮)	一般市場品	果実	B

4.4.2 実験および分析方法

実験および分析方法は、3.4 節と同様に行った。

第 5 章

総 括

医薬品の原料として重要な化合物である、光学活性 β -アミノアルコールの製法として、エポキシドとアミンによるエポキシド不斉アミノ化反応触媒の開発を行った。ホスホジエステラーゼ 3 阻害剤効果を有する K-134 の原料である (1*R*,2*R*)-2-シクロプロピルアミノ-1-シクロヘキサノールを研究対象化合物として検討した。市販酵素をスクリーニングした結果、名糖産業社製のいくつかのリパーゼで 1,2-エポキシシクロヘキサンとシクロプロピルアミンによるエポキシド不斉アミノ化反応が進行することを見出した。市販リパーゼ中の触媒活性本体を探求する過程で、酵素そのものではなく、混在していた大豆由来の多糖類が真の触媒であることを突き止めた。大豆の食用粉末であるキナコでも反応は進行し、加工品としては脱脂大豆粉とソヤファイブ S-DN に高い触媒活性を認めた。一方、大豆タンパクを主成分とするものには活性が無かった。さらに、ソヤファイブ S-DN を酵素で部分消化して反応活性を評価したところ、タンパク分解酵素で処理したものは触媒活性が残存し、糖鎖分解酵素で処理したものは失活したことより、エポキシド不斉アミノ化の触媒活性は糖鎖に起因していることが示唆された。次に、ソヤファイブ S-DN 触媒での反応条件を最適化し、(1*R*,2*R*)-2-シクロプロピルアミノ-1-シクロヘキサノールのスケールアップ合成を行い、本触媒を用いる方法が実用的であることを示した。

つづいてソヤファイブ S-DN は、1,2-エポキシシクロヘキサンとシクロプロピルアミン以外のエポキシドとアミンの組み合わせにおいても触媒作用を示すのかを調査した。結果、1,2-エポキシシクロペンタン、3,4-エポキシテトラヒドロフラン、1,2-エポキシシクロヘプタン、*cis*-2,3-ジメチルブタンの 5 種のエポキシドとシクロプロピルアミンの組み合わせ全てで反応の進行を確認できた。生成物の ee 値は、1,2-エポキシシクロペンタン、1,2-エポキシシクロヘキサンを用いた場合で高く、これらのエポキシドが基質として適合していることがわかった。1,2-エポキシシクロヘキサンと種々のアミンの組み合わせでは、シクロプロピルアミン、イソプロピルアミン、アリルアミン、3-ペンチルアミン、シクロペンチルアミン、2-フェニルエチルアミンで生成物の ee 値

が高く、これらのアミンが基質として望ましいことを明らかとした。また、光学活性な *trans*-2-イソプロピルアミノ-1-シクロヘキサノールと *trans*-2-プロパルギルアミノ-1-シクロヘキサノールをスケールアップ合成することで、(1*R*,2*R*)-2-シクロプロピルアミノ-1-シクロヘキサノール以外の化合物についても、ソヤファイブ S-DN が実用的な触媒として使用可能であると示した。これら実験結果に基づいて反応機構を考察し、糖鎖がエポキシ基を活性化し、不斉誘起を発現するモデルを提案した。

さらに、水溶性大豆多糖類であるソヤファイブ S-DN 以外で市販されている多糖に同様の反応活性があるかを調査した。1,2-エポキシシクロヘキサノールとシクロプロピルアミンの反応でスクリーニングした結果、ペクチンが同様な触媒活性を有することを見出した。ペクチンは多くの植物に含まれていることより、大豆以外の植物性食品として入手可能なものを用いて反応を実施した。その結果、多くの植物粉末で反応が進行することを確認した。市販の食物粉末では、ニンジン由来のキャロットパウダーが大豆由来のソヤファイブ S-DN に次ぐ活性を有することがわかった。キャロットパウダーとソヤファイブ S-DN でアミンの基質適合性を比較すると、置換基構造の違いにより生成物の ee 値が異なることがわかった。エポキシドとアミンと植物種の組み合わせの最適化により、高い立体選択性で目的の光学活性アミノアルコールが得られる可能性があること示唆された。

これらの研究結果より、植物性の食物粉末がエポキシド不斉アミノ化反応触媒となることを明らかとした。この知見はこれまでに一切の報告はなく、世界初の発見である。本研究は、植物性の食物粉末、あるいはそれらから抽出できる糖鎖を主成分とした食物を不斉触媒として用いるという新たな可能性の端緒となったと考えている。食物成分を触媒として用いる物質生産方法は、安全性が高く医薬品原薬や食品添加物の製造での応用が期待できる。

参考文献

1. 一般社団法人触媒学会ホームページ. “触媒学会からのメッセージ”. 日本触媒学会. **2008**.
<https://www.shokubai.org/general/toha/index.html>
2. 向山光昭. “III 不斉合成 1 展望”. 高選択的反応—新しい有機合成—. 野崎一, 向山光昭, 野依良治 共編. 化学同人, **1981**, P145-149.
3. William S. Knowles. Asymmetric Hydrogenations (Nobel Lecture). *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 1998-2007.
4. Ryoji Noyori. Asymmetric Catalysis: Science and Opportunities (Nobel Lecture). *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2008-2022.
5. K. Barry Sharpless. Searching for New Reactivity (Nobel Lecture). *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2024-2032
6. 雲林秀徳, 佐用昇, 芥川進, 坂口登志昭, 鶴田治樹. 金属—BINAP 触媒を用いた不斉合成技術の開発. 日本化学会誌 **1997**, *12*, 835-846.
7. 前田雄樹. “2018 年に世界で最も売れた薬は「ヒュミラ」…「オプジーボ」「キイトルーダ」もトップ 10 入り”. Ansewrs News. 2019/06/24.
<https://answers.ten-navi.com/pharmanews/16470/>
8. 藤井郁雄. ポスト抗体医薬 抗体様分子標的ペプチド「マイクロ抗体」の創出. 化学と生物 **2017**, *55*, 224-226.
9. 経済産業省生物化学産業課. “バイオベンチャー現状と課題”. 経済産業省. 2017/11/15.
https://www.meti.go.jp/committee/kenkyukai/bio_venture/pdf/001_07_00.pdf
10. 佐々木裕. ウイルス性肝炎治療の最近の進歩. 日本内科学会雑誌 **2018**, *107*, 431-437.
11. 矢守 隆夫. 元素の潜在能力を生かした低分子モダリティ創出への期待. ファルマシア **2020**, *56*, 381.
12. Laura C. Forfar, Paul M. Murray. “Meeting Metal Limits in Pharmaceutical Processes”. *Topics in Organometallic Chemistry* **65**, Thomas J. Colacot, Vilvanathan Sivakumar,

Springer **2019**, *65*, 217-252

13. Charles A. Dekker, Sterling P. Taylor, Jr., Joseph. S. Fruton. Synthesis of peptides of methionine and their cleavage by proteolytic enzymes. *J. Biol. Chem.* **1949**, *180*, 155-173
14. Dar-Fu Tai, Shu-Lin Fu. Bromelain catalyzed synthesis of peptides in organic solvent. *J. Chinese Chem. Soci.* **2003**, *50*, 179-183
15. S. K. Srinivasan, S. Kapila, F. Daniel, P. Nam. Papain catalyzed oligomerization in monophasic aqueous organic media - synthesis and characterization of neutral polar amino acid oligomer. *Enz. Eng.* **2017**, *6*, 1000161.
16. Hiroyuki Nagaoka. Heterogeneous asymmetric oxidation catalysis using hemophore HasApf. Application in the chemoenzymatic deracemization of *sec*-alcohols with sodium borohydride. *Catalysts* **2016**, *6*, 38-49.
17. Franz Dietrich Klingler. Asymmetric hydrogenation of Prochiral Amino Ketones to Amino Alcohols for Pharmaceutical Use. *Acc. Chem. Res.* **2007**, *40*, 1367-1376.
18. David J. Ager, Indra Prakash, David R. Schaad. 1,2-Amino alcohols and their heterocyclic derivatives as chiral auxiliaries in asymmetric synthesis. *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 835-875.
19. Barry. M. Torst. Atom economy- a challenge for organic synthesis: homogeneous catalysis leads the way-. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 259-281.
20. Maryam Mirza-Aghayan, Frazaneh Albandi, Mahdiah Molae Tavana, Rabah Boukerroub,. Graphite oxide catalyzed synthesis of β -amino alcohols by ring-opening of epoxides. *Turk. J. Chem.* **2017**, *41*, 70-79.
21. Simana Bonollo, Francesco Fringuelli, Ferdinando Pizzao, Luigi Vaccaro. A green route to β -amino alcohols *via* the uncatalyzed aminolysis of 1,2-epoxides by alkyl- and arylamines. *Green Chem.* **2006**, *8*, 960-964.
22. 小川知香子, 小久保雅也, 小林修. 光学活性ビピリジン錯体を用いるメソエポキシ

- シドの不斉開環反応. 有機合成化学協会誌 **2010**, *68*, 718-728.
23. Manish Kumar, Rukhsana I. Kureshy, S. Saravanan, Shailesh Verma, Ajay Jakhar, Noor-ul H. Khan, Sayed H. R. Abdi, Hari C. Bajaj. Unravelling a new class of chiral organocatalyst for asymmetric ring-opening reaction of *meso* epoxides with anilines. *Organic Lett.* **2014**, *16*, 2798-2801.
24. Arun Sharma, Jyoti Agarwal, Rama Krishna Peddinti. Direct access to the optically active VAcHT inhibitor vesamicol and its analogues *via* the asymmetric aminolysis of *meso*-epoxides with secondary aliphatic amines. *Org. Biomol. Chem.* **2017**, *15*, 1913-1920.
25. Hongli Bao, Jiang Wu, Hongji Li, Zheng Wang, Tianpa You, Kuiling Ding. Enantioselective ring opening reaction of *meso*-epoxides with aromatic and aliphatic amines catalyzed by magnesium complexes of BINOL derivatives. *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, 6722-6276.
26. Yasuo Koga, Yoshito Kihara, Minoru Okada, Yoshihiro Inoue, Shirou Tochizawa, Kazuyuki Toga, Kazue Tachibana, Yukio Kimura, Takao Nishi, Hiroyuki Hidaka. 2(1*H*)-Quinolinone derivatives as novel anti-arteriostenotic agents showing anti-thrombotic and anti-hyperplastic activities. *Bio. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 1471-1476.
27. Otsuka Pharmaceutical company, Limited. Yasuo Koga, Yoshito Kihara, Minoru Okada, Takao Nishi, Yoshihiro Inoue, Yukio Kimura, Hiroyuki Hidaka, Norio Fukuda. Carbostyryl derivatives as antithrombotic agents. PCT Int. Appl. WO9712869. 1997/4/10.
28. 株式会社デ・ウエスタンセラピテクス研究所. 竹崎宏, 佐藤治代. 光学活性 2-アミノシクロヘキサノール誘導体の製造方法. 特許第 4406483 号, 2009/11/13.
29. Ahmed Kamal, Yalamati Damayanthi, Maddamsetty V. Rao. Stereoselective synthesis of (S)-propanol amines: Lipase catalyzed opening of epoxides with 2-propylamine.

Tetrahedron Asymmetry **1992**, *3*, 1361-1364

30. 山田靖宙. 非水溶媒中の酵素反応—有機合成への利用. *化学と生物* **1988**, *26*, 706-711.
31. 北口博司. 有機溶媒中の酵素反応. *有機合成化学協会誌* **1995**, *53*, 381-391.
32. 坂口博脩, ステン L クヌーセン. 工業用酵素の開発動向について. *有機合成化学協会誌* **1983**, *41*, 872-878.
33. 名糖産業株式会社. 角田昭, 加藤重昭, 大島章夫. 新規リパーゼ生産能をもつ細菌、リパーゼ、その製造方法、およびその使用. 特開平 11-253157, 1999/9/21.
34. 中村彰宏. オカラ由来の大豆多糖類の開発と食品機能剤としての利用. *日本食品科学工学会誌* **2011**, *58*, 559-565.
35. Akihiro Nakamura, Hitoshi Furuta, Hirokazu Maeda, Yasunori Ngamatsu, A. Yoshimoto. Analysis of structural components and molecular construction of soybean soluble polysaccharides by stepwise enzymatic degradation. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2001**, *65*, 2249-2258.
36. Takeshi Serizawa, Toshiki Sawada, Hiromichi Okura, Masahisa Wada. Hydrolytic activities of crystalline cellulose nanofibers. *Biomacromolecules* **2013**, *14*, 613-617.
37. K. Surendra, N. Srilakshmi Krishnaveni, K. Rama Rao. The selective C-3 opening of aromatic 2,3-epoxy alcohols/epoxides with aromatic amines catalysed by β -cyclodextrin in water. *Synlett.* **2005**, *3*, 506-510.
38. James T. Scanlon, Donald E. Willis. Calculation of flame ionization detector relative response factors using the effective carbon number concept. *J. Chromatographic Sci.* **1985**, *23*, 333-340.
39. CAR-DIOME PHARMA CORP. Gregory N. Beatch, Lewis Siu Leung Choi, Grace Jung, Yuzhong Liu, Bertrand Plouvier, Richard Wall, Jeff Zhu, Alexandre Zolotoy, Anthony G. M. Barrett. Aminocyclohexyl ether compounds and uses thereof. PCT Int. Appl.

WO099137, 2004/11/18.

40. Izumi Uno, Takashi Kozaka, Daisuke Miwa, Yoji Kitamura, Mohammad Arrwar-ul Azim, Kazuma Ogawa, Junichi Taki, Seigo Kinuya, Kazuhiro Shiba. *In Vivo* Differences between Two Optical Isomers of Radioiodinated *o*-iodo-*trans*-decalinvesamicol for Use as a Radioligand for the Vesicular Acetylcholine Transporter. *PLoS ONE* **2016**, *11*, 1-14.
41. Arun Sharma, Jyoti Agarwal, Rama Krishna Peddinti. Direct access to the optically active VAcHT inhibitor vesamicol and its analogues via the asymmetric aminolysis of *meso*-epoxides with secondary aliphatic amines. *Org. Biomol. Chem.* **2017**, *15* 1913-1920.
42. Jie Wu, Hong-Guang Xia. Tertiary amines as highly efficient catalyst in the ring-opening reactions of epoxides with amines or thiols in H₂O: expeditious approach to β -amino alcohols and β -aminothioethers. *Green Chem.* **2005**, *7*, 708-710.
43. Akihiro Nakamura, Ryuji Yoshida, Hirokazu Meda, Hitoshi Furuta, Milena Corredig. Study of the role of the carbohydrate and protein moieties of soy soluble polysaccharides in their emulsifying properties. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 5506-5512.
44. González-Sabín Javier, Gotor Vicente, Rebelledo Francisca. Chemoenzymatic preparation of optically active β -amino-cyclohexanols and their application in the enantioselective addition of diethylzinc to benzaldehyde. *Tetrahedron Asymmetry* **2004**, *15*, 1335-1341.
45. Karamil Jayaprakash, Chittoor S. Venkatachalam, Kalpattu K. Balasubramanian. A convenient one-pot synthesis of *N*-aryl-3-pyrrolines. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 6493-6496.
46. Herbert C. Brown, J. V. N. Vara Prasad, Ashok K. Gupta. Hydroboration. 78. Reinvestigation of the hydroboration of *N*-substituted 3-pyrrolines. Preparation of *N*-benzyl-3-pyrrolidinol and (*N*-benzyl-3-pyrrolidinyl)boronate of very high

- enantiomeric purity. *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 4296–4298.
47. T. Takahashi, A. Nakamura, M. Kato, H. Maeda, R.C. Mandella, A. Broadmeadow, S.A. Ruckman. Soluble soybean fiber: a 3-month dietary toxicity study in rats. *Food Chem. Toxicol.* **2003**, *41*, 1111-1121.
48. Robert A. Baker. Reassessment of some fruit and vegetable pectin levels. *J. Food Sci.*, **1997**, *62*, 225-229.
49. 文部科学省 日本食品標準成分表 2020 年版(八訂).
https://www.mext.go.jp/a_menu/syokuhinseibun/mext_01110.html
50. Aline Francielle Fracasso, Camila Augusto Perussello, Danielle Carpiné, Carmen Lúcida de Oliveira Petkowicz, Charles Windson Isidoro Haminiuk. Chemical modification of citrus pectin: Structural, physical and rheological implications. *Int. J. Biol. Macromol* **2018**, *109*, 784-792.
51. Patrice Massiot, Xavier Rouau, Jean-Francois Thibault. Characterisation of the extractable pectins and hemicelluloses of the cell wall of carrot. *Carbohydrate Research* **1988**, *172*, 229-242.
52. 小崎誠. アラビノガラクトサンの構造とその生理機能—機能性アラビノガラクトサンの農産物由来アラビノガラクトサンの構造比較—. *応用糖質科学* **2011**, *1*, 238-243.
53. 井戸隆雄, 片山豪. アラビアガムの特性とその利用. *応用糖質科学* **2011**, *1*, 244-246.
54. Naomi Geshi, Markus Pauly, Peter Ulvskov. Solubilization of galactosyltransferase that synthesizes 1,4- β -galactan side chain in pectic rhamnogalacturonan I. *Physiologia Plantarum* **2002**, *114*, 540-548.
55. アグロン・ファーマシューティカルズ・インコーポレーテッド. ブッセ ジュリエット・クハース, ズーク スコット・エドワード, ボレー ベネット・チャップリン. テトラヒドロフランからのオキサゾリジノンの製造方法. 特開 2008-7522,

2008/1/17.

外部発表

論文発表

1. Asymmetric amination of *meso*-epoxide with vegetable powder as a low-toxicity catalyst.

Yuki Takeuchi, Tatsuhiro Asano, Kazuya Tsuzaki, Koichi Wada, and Hiroyuki Kurata

Molecules **2020**, *25*, 3197-3209.

2. Catalytic Asymmetric Amination of *meso*-Epoxide Using Soy Polysaccharide (Soyafibe S-DN)

Yuki Takeuchi, Tatsuhiro Asano, Kazuya Tsuzaki, and Koichi Wada

Bull. Chem. Soc. Jpn. **2018**, *91*, 678-683.

参考論文

1. フタロイルビス（ピラゾリンーオン）セリウム錯体の合成と触媒活性

吉國忠亜, 竹内祐希

群馬大学教育学部紀要 自然科学編 **2002**, *50*, 139-144.

2. セリウム酸素酸化によるヒドロキシナフトカルバルデヒドの合成とカップリング反応

吉國忠亜、竹内祐希

電気化学会技術・教育研究論文誌 **2000**, *9*, 39-42.

3. セリウム触媒による酸素酸化カップリング

吉國忠重、竹内祐希

電気化学会技術・教育研究論文誌 **1997**, *6*, 173-180.

4. セリウム触媒によるポリメチルクレゾールの酸素酸化反応

吉國忠重、橋本茂、竹内祐希

電気化学会技術・教育研究論文誌 **1997**, *6*, 167-172.

5. Oxidative coupling by cerium compounds

Tadatsugu Yoshikuni, Yuhki Takeuchi

J. Inorg. Biochem. **1997**, *67*, 442.

6. セリウム触媒による酸化的カップリング反応

吉國忠重、竹内祐希

長岡技術科学大学研究報告 **1995**, *17*, 37-41.

7. クロマトスキャナーによる測定;セリウム塩触媒による酸化的カップリング反応生成物の分析

吉國忠重、宮島豊、竹内祐希

長岡技術科学大学研究報告 **1995**, *17*, 31-35.

8. ヒドロキシナフトエ酸エステルの HPLC 分析とカップリング反応

吉國忠重、大橋和磨、園田浩、竹内祐希、橋本茂

長岡技術科学大学研究報告 **1994**, *16*, 5-9.

学会発表（下線：発表者）

1. 大豆多糖類触媒でのメソエポキシド不斉アミノ化反応
竹内祐希、浅野健裕、津崎和也、和田浩一、蔵田浩之
2018, 平成 30 年度有機合成化学北陸セミナー
2. 植物成分の新機能発見—エポキシド不斉開環反応—
竹内祐希, 浅野健裕, 津崎和也, 和田浩一
2017, 日本化学会第 97 春季年会 (2017)

参考発表（下線：発表者）

1. Oxidative Coupling Reactions of 2-Hydroxy-3-Naphthoic acid Derivatives with Cerium(III) Compounds.
Tadatsugu Yoshikuni, Yuhki Takeuchi
1995, 1995 International Chemical Congress of Pacific Basin Society.
2. セリウム (III) を用いた 2-ヒドロキシ-3-ナフトエ酸エステルの酸化的カップリング反応
Tadatsugu Yoshikuni, Yuhki Takeuchi
1995, 希土類討論会 (1995)

参考特許

1. ルビプロストンの製造方法
浅野健裕、杉本一彦、竹内祐希
公開特許番号 特開 2019-131510

2. 光学活性体の製造方法

竹内祐希、浅野健裕、和田浩一、津崎和也

特許第 6630667 号

3. 新規なキラルビスホスフィン配位子

渡辺道正、竹内祐希、磯部貴弘、竹内禎

特許第 5269452 号 (EP1975170, US7569730)

4. 不斉還元方法

松本義則、竹内祐希、山本浩之

特許第 4918257 号 (CN 101346352, KR101437078, US7847107)

5. β -アラニン誘導体およびその製造製法

竹内祐希

特許第 4427266 号

6. 光学活性フェニルアラニンの製造方法

竹内祐希、松本義則

特許第 4270484 号

謝辞

本研究の遂行にあたり、丁寧でご親切なるご指導とご鞭撻を賜り、論文の校閲の労をお取りいただきました、福井工業大学基盤教育機構 蔵田 浩之 教授に対し、心より感謝の意を表します。また、研究への多大なご指導・ご支援を頂きました福井工業大学の皆様に厚く御礼申し上げます。

また本研究の共同研究者として多くの実験に協力頂いた、協和ファーマケミカル株式会社 和田 浩一 博士、津崎 和也さん、浅野 健裕さんに深く感謝申し上げます。

さらに、研究へのご助言とご協力ならびに社会人学生として学ぶ機会を与えて下さいました、協和ファーマケミカル株式会社常務取締役執行役員 衣川 雅彦 博士に厚く御礼申し上げます。