

氏 名	はやし 林 素 子
学位(専攻分野)	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	理 博 第 2490 号
学位授与の日付	平 成 14 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	理 学 研 究 科 化 学 専 攻
学 位 論 文 題 目	Studies on Asymmetric Reduction of a Carbon-Carbon Double Bond with Biocatalyst (生体触媒を用いた炭素—炭素二重結合の不斉還元に関する研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 時 任 宣 博 教 授 林 民 生 助 教 授 中 村 薫

論 文 内 容 の 要 旨

生体触媒を用いた不斉合成反応は光学活性化合物を得るための重要な方法として広く認知され、盛んに研究が進められている分野である。しかし、これまでの報告の大部分は、パン酵母に含まれている酸化還元酵素を利用したカルボニル基の還元と、リパーゼに代表される加水分解酵素を利用したアルコール及びエステル類の光学分割であり、それらの生成物は光学活性アルコールまたはその誘導体に限られていた。また、これまでの生体触媒反応の研究においては反応機構の解明よりも物質変換に主眼が置かれ、基質と酵素間の相互作用が酵素反応の反応性、選択性に及ぼす影響については殆ど報告がない。

申請者は、これまでに報告例が少なく、水酸基以外の様々な官能基を有する光学活性化合物の合成が可能となる生体触媒による炭素—炭素二重結合の還元反応を取り上げ、基質と酵素間の相互作用と酵素反応の選択性・反応性との関係を明らかにすることを目的として研究を行った。

申請者は、様々な電子求引性基を有するアルケンを合成し、生体触媒としては最も一般的なパン酵母を用いて炭素—炭素二重結合の還元を試みた。その結果、パン酵母によって炭素—炭素二重結合が還元されうる基質は、比較的高い電子求引性能の置換基で活性化された炭素—炭素二重結合を有する平面分子であることが示された。また、カルボニル基の β 位にピリジン環またはその誘導体を有する α , β -不飽和ケトン(エノン)を用いてパン酵母による炭素—炭素二重結合の不斉還元反応について検討し、基質と酵素間の水素結合などの特異的相互作用が還元反応の立体選択性に影響していることを明らかにした。これらの知見から、光学活性ケトンを高い不斉収率で合成する方法を確立した。また、生成物である光学活性ケトンの絶対立体配置を決定するために、独自に設計・合成した6-クロロ-2, 4-ジニトロフェニルヒドラジンを用いて光学活性ケトンをヒドラゾンに誘導し、その単結晶に対して重原子異常分散効果を用いたX線結晶構造解析を行って決定するという新しい方法を開発した。

次に、パン酵母中からエノンの炭素—炭素二重結合の還元を触媒する酵素を単離・精製することにより、2種類の新規な炭素—炭素二重結合還元酵素が存在することを示し、それらの諸性質を明らかにした。酵素による反応とパン酵母による反応の比較から、パン酵母を用いた反応でも一方の酵素が主に働いていることが示唆された。本酵素の立体選択性は、カルボニル基の β 位の芳香環上のヘテロ原子または置換基の位置、及び α 位の置換基の大きさにより厳密に規定されていることから、基質の立体的要因、特異的相互作用が反応の立体選択性を支配していることを明らかにした。また、単位時間あたりの基質の変換率に対してHammettプロットをとると、反応の立体選択性に関わらず良い相関で直線関係を与えるという結果を得た。これは、基質特異性が非常に高いと言われている酵素反応の反応速度と基質が本来有している反応性との間に相関が見られたということであり、基質の電子的要因が酵素反応における反応性を支配していることを示した。更に、重水素化された基質を酵素で還元した結果とパラジウム炭素で水素化した結果の比較から、酵素による還元反応は水からのプロトンがカルボニル基の α 位に、補酵素からのヒドリドが β 位に導入され、形式的には水素の完全なトランス付加で進行していることを明らかにした。

以上の結果から、炭素—炭素二重結合還元酵素の反応部位のモデルを提案した。また、本酵素を用いた反応において基質の立体的要因、特異的相互作用が反応の立体選択性に、電子的要因が反応性に大きく影響していることを明らかにした。これらの事実は酵素反応機構を明らかにする上でも、酵素反応を用いたより効率的な不斉合成反応系を構築するためにも有用な知見である。

論文審査の結果の要旨

生体触媒を用いた不斉合成反応はキラル化合物を得るための有用な方法として広く認知され、盛んに研究が進められている分野である。しかし、その多くはパン酵母中の酸化還元酵素を利用したカルボニル基の不斉還元と、リパーゼに代表される加水分解酵素を用いたアルコールまたはエステルの速度論的光学分割であり、得られる生成物は光学活性アルコールまたはその誘導体に限られていた。また、これまでの生体触媒反応の研究においては反応機構の解明よりも物質変換に主眼が置かれ、基質と酵素間の相互作用が酵素反応の反応性、選択性に及ぼす影響については殆ど報告がない。

申請者は生体触媒を用いた新しい反応として生体触媒による炭素—炭素二重結合の不斉還元反応について研究を行った。様々な電子求引性基を有するアルケンを合成し、最も一般的な生体触媒であるパン酵母によって炭素—炭素二重結合の還元を試みた結果、パン酵母によって炭素—炭素二重結合が還元されうる基質は比較的強い電子求引性基を有する平面分子であることを明らかにした。

また、パン酵母中から α 、 β 不飽和ケトン（エノン）の炭素—炭素二重結合の還元反応を触媒する酵素を単離、精製した結果、2種類の新規酵素が存在することを見出し、その諸性質について検討した。パン酵母による還元反応の結果と酵素反応の結果の比較から、パン酵母による還元反応では片方の酵素のみが主に働いていることが強く示唆されることを明らかにした。また、基質であるエノンの構造について検討し、カルボニル基の β 位に芳香環を有し、かつそのメタ位に置換基またはヘテロ原子を有するか、 α 位の置換基をエチル基に伸長した場合に炭素—炭素二重結合のみが立体特異的に反応することを見出し、還元反応の立体選択性は基質の構造と基質と酵素間の特異的相互作用に依存していることを明らかにした。これらの知見により、光学活性ケトンを高不斉収率で合成する方法を確立した。更に、生成物である光学活性ケトンの絶対立体配置を、独自に設計・合成した6-クロロ-2,4-ジニトロフェニルヒドラジンによってヒドラゾンに誘導し、その単結晶のX線結晶構造解析を行い、分子中に含まれる塩素原子の重原子異常分散効果を用いて決定するという新しい手法を開発した。また、カルボニル基の α 位に水からのプロトンが、 β 位に補酵素からのヒドリドが導入され、その水素付加は形式的には完全なトランス付加であることを明らかにした。また、酵素反応の反応速度は基質の反応性と直線自由エネルギー関係にあることが示され、基質の電子的要因が酵素反応の反応性に寄与していることを明らかにした。

以上のように、申請者は光学活性ケトンを高不斉収率で合成する方法を確立すると共に、その絶対立体配置を直接決定する方法を開発した。また、パン酵母またはパン酵母に由来する炭素—炭素二重結合還元酵素を用いた反応において、基質の立体的要因、特異的相互作用が反応の立体選択性に、電子的要因が反応性に大きく影響していることを明らかにした。これらの結果は、酵素反応機構を明らかにする上でも、酵素反応を用いたより効率的な不斉合成反応系を構築するためにも非常に有用な知見であり、その業績は高く評価される。

よって、申請者の研究は博士（理学）の称号に値するものであることを認める。

なお、本申請論文に報告されている研究業績を中心とし、これに関連した分野について口頭試問を行った結果、合格と認めた。