

酵素触媒によるイオウ含有
高分子の合成に関する研究

平成 20 年度

加藤 誠

目次

第 1 章	序論	1
1.1	はじめに	1
1.2	グリーンケミストリー	2
1.3	生体プロセスを利用した高分子合成	2
1.3.1	発酵法	2
1.3.2	酵素触媒重合	3
1.4	リサイクル	4
1.5	イオウ含有高分子材料	6
1.6	本論文の研究内容	8
第 2 章	酵素触媒を利用した直接重縮合によるポリチオエステルの合成	11
2.1	緒言	11
2.1.1	はじめに	11
2.1.2	化学法によるポリチオエステルの合成	11
2.1.3	生合成によるポリチオエステルの合成	13
2.1.4	酵素触媒を利用した直接重縮合によるポリチオエステルの合成	15
2.2	試薬・機器	16
2.2.1	試薬	16
2.2.2	機器	20
2.3	実験方法	22
2.3.1	11MU の酵素触媒重合	22
2.3.2	ジカルボン酸ジエステルとジチオール ¹ の酵素触媒重合	30
2.3.3	ポリ(チオエステル)の生分解性評価	38
2.4	結果・考察	43
2.4.1	酵素触媒を用いた重縮合による poly(11MU)の合成	43
2.4.2	酵素触媒を用いた重縮合による AA - BB 型ポリチオエステルの合成とその物性	60
2.4.3	ポリチオエステルの生分解性評価	72
2.5	結論	74

第 3 章	酵素触媒を利用した開環重合による高分子量ポリチオエステルの合成と環状チオエステルの重合挙動の解析	75
3.1	緒言	75
3.1.1	はじめに	75
3.1.2	酵素触媒を利用した開環重合法	76
3.1.3	酵素触媒を利用したケミカルリサイクル	77
3.1.4	酵素触媒重合の反応機構と律速段階	78
3.2	試薬・機器	80
3.2.1	試薬	80
3.2.2	機器	82
3.3	実験方法	84
3.3.1	AA - BB 型環状チオエステルの開環重合	84
3.3.2	AB 型環状チオエステルの開環重合	93
3.3.3	環状チオエステルの開環重合挙動の解析	96
3.4	結果・考察	102
3.4.1	AA - BB 型環状チオエステルの開環重合	102
3.4.2	AB 型環状チオエステルの開環重合	121
3.4.3	開環重合挙動の解析	128
3.5	結論	138
第 4 章	酵素触媒を利用した遊離チオールをペンダントに有するポリエステルの合成	139
4.1	緒言	139
4.1.1	はじめに	139
4.1.2	化学法による遊離チオールをペンダントに有するポリマーの合成	139
4.1.3	側鎖チオールを利用したポリマーの架橋・解架橋	141
4.1.4	酵素を利用した官能基選択的重合反応	142
4.2	試薬・機器	144
4.2.1	試薬	144
4.2.2	機器	148
4.3	実験方法	150
4.3.1	側鎖チオール含有ポリエステルの合成	150
4.3.2	側鎖の立体化学による影響	156
4.3.3	架橋・解架橋反応	159
4.4	結果・考察	164

4.4.1	側鎖チオール含有ポリエステルの合成	164
4.4.2	側鎖の立体化学による影響	175
4.4.3	Poly(hexanediol - mercaptosuccinate)の架橋化	194
4.4.4	Poly(hexanediol - mercaptosuccinate)及び poly(hexanediol - mercaptosuccinate - <i>co</i> - sebacate)の生分解性評価	197
4.5	結論	199
第 5 章 総括		201
参考文献		205
本論文に関する研究発表		213
謝辞		217

略号

本論文中で用いた略号と化合物、酵素及び測定法の名称と対応を以下に示す。

Table 1: 略号と化合物、酵素及び測定法の名称と対応

略号	:	化合物、酵素及び測定法の名称
11MU	:	11-Mercaptoundecanoic acid
11HU	:	11-Hydroxyundecanoic acid
MS 4A	:	Molecular sieves 4A
Lipase CA	:	Immobilized lipase from <i>Candida antarctica</i>
Lipase PS-C	:	Immobilized lipase from <i>Burkholderia cepacia</i>
Lipase RM	:	Immobilized lipase from <i>Rhizomucor miehei</i>
Lipase AK	:	Lipase from <i>Pseudomonas fluorescens</i>
Lipase CR	:	Lipase from <i>Candida rugosa</i>
SEC	:	Size exclusion chromatography
DSC	:	Differential scanning calorimetry
FT-IR	:	Fourier transform infrared
MALDI-TOF MS	:	Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry
MOE	:	Molecular operating environment
NMR	:	Nuclear magnetic resonance
T_c	:	Crystallization temperature
T_g	:	Glass transition temperature
T_m	:	Melting temperature
ThOD	:	Theoretical oxygen demand
BOD	:	Biochemical oxygen demand

第1章

序論

1.1 はじめに

18世紀から19世紀にかけて起こった産業革命以降、人類は常に大量生産・大量消費・大量廃棄を繰り返すことにより、豊かな社会を築き上げてきた。この傾向は20世紀に入るとさらに顕著となる。20世紀は、科学技術の進歩に伴う、物質文明の急成長の世紀であった。著しい石油化学工業の発展とともに1950年頃に産声を上げた合成高分子分野においても、当然のようにこの流れが継承された。以後、高分子合成工業は現代化学工業の大きな柱へと発展し、高分子材料抜きでの日常生活はもはや想像することができないほどである。我が国におけるプラスチック生産量も年々増加し、現在では年間1500万トンを超えている¹⁾。合成高分子の爆発的な普及は現代社会の物質的な豊かさを追い求めてきた一つの象徴とみなすこともできるのかもしれない。

しかし一方で、豊かな物質社会は様々な地球規模での環境破壊・有限資源の枯渇などをもたらしたことも事実である。21世紀は大量生産・大量消費・大量廃棄をもたらす豊かさよりも、それにより顕在化した環境負荷を重視しなければならない時代に突入していると言えよう。また、それに伴い21世紀の社会は持続可能な発展が望める環境調和型への移行が求められる。持続可能な発展とは「将来の世代が彼らのニーズを満たす可能性を損なうことなく現世代のニーズを満たす発展」を意味する²⁾。これを実現するためには、あらゆる社会構造を循環型へと変革することが強く望まれる。

もちろん、高分子合成においてもこの流れは例外的なことではない。原料を化石資源から再生可能資源に代えてゆくと共に、環境低負荷型合成とリサイクルが容易な素材の開発、さらには環境への負荷をできるだけ低減する生分解性プラスチックの開発が求められる。

そのためにも「グリーン・サステイナブル ケミストリー」の概念に則った高分子合成を真剣に考える必要がある。

1.2 グリーンケミストリー

グリーンケミストリーは「環境にやさしいものづくりの化学」としばしば訳される³⁾。しかしながら、「環境にやさしい」といっても様々な側面が存在する。環境低負荷型高分子合成を実践するためには主に以下の点を考慮に入れなくてはならないと考える。

- (1) 原料 . . . バイオマスまたはその誘導体由来
- (2) 合成法 . . . 温和な反応温度、圧力での反応の進行、有機溶媒の削減、
酸クロリドの不使用
- (3) 触媒 . . . 希少、有害な金属を含む触媒の不使用、
酵素・固体酸などの利用
- (4) 廃棄 . . . 廃棄後の処理が容易または廃棄物を生まない（生分解）
- (5) リサイクル性 . . . 容易に回収・リサイクルができる

もちろん、上記以外にも人、生態系への影響などは当然考慮に入れる必要がある。いずれにせよ、グリーンケミストリーを実践する上で重要なことは全ライフサイクルを見通して総合的に評価を下すことである。また、廃棄物や危険な物質を出してから処理するのではなく、出さない・使わないといった予防に力点を置いた化学の必要性が今後も増すものと考えられる。そのためには、高分子の生物化学的合成法など、従来の化学合成プロセスとは異なった視線に立った、新たな高分子合成法も検討される必要がある。

本研究では、このようなグリーンケミストリー概念を念頭に入れ、酵素触媒重合によるイオウ含有高分子材料の開発を目的に検討を行なった。以下に、生体プロセスを利用した高分子合成、リサイクル、イオウ含有高分子材料、生分解性プラスチックについて概説する。

1.3 生体プロセスを利用した高分子合成

生体プロセスを利用した高分子合成法には、主に発酵系を利用した *in vivo* 合成と特定の酵素系で行なう *in vitro* 合成が存在する。近年、化学合成系と比べ、生体プロセスを利用した高分子合成法の顕著なエネルギー消費量の低下・二酸化炭素排出量の抑制が確認される例もあり注目を集めている⁴⁾。

1.3.1 発酵法

石油化学法では多段階ステップを要した合成法が、微生物による発酵生産によりワンポットで生産される例が知られている。ポリ(*R*-3-ヒドロキシアлкаノエート)(PHA)は糖や油脂などを炭素源として発酵生産される^{5,6)}。PHAは共重合や超高分子量化することで物性の改善が図られている。たとえば、遺伝子組み換え微生物により得られた超高分子量 P3HBは延伸・熱処理により、融点、破壊伸び、破壊強度などで大幅な改善が認められている⁷⁾。また、炭素源に芳香族環を有するモノマーやメルカプタン類を用いることで、芳香環やチオエステル構造を有するPHA類縁体も得られている^{8,9)}。このように発酵合成法によって多彩な分子構造を有するポリマーが得られることが示されている。

また、発酵法によりモノマーを生産し、これを化学的に重合させることでもバイオベースポリマーが得られる。これまでに発酵法により乳酸が得られており、これを化学的に重合させることで、ポリ乳酸(PLA)が工業的に生産されている¹⁰⁾。ポリ乳酸はステレオコンプレックス化による耐熱化と耐加水分解性が達成されており、種々の材料への応用が期待されている¹¹⁾。雑草や農産廃棄物からエタノールやプロパノールを発酵生産する技術も開発されており、そこから得られるエチレン、プロピレンを用いた石油化学に依存しない汎用ポリマーの合成が実用化されようとしている。その他にもコハク酸、アジピン酸、クエン酸、イタコン酸、リンゴ酸やプロパンジオールなど多くのものが発酵法により得られ、今後これらを用いたバイオベースポリマーの創成が期待される¹²⁾。

1.3.2 酵素触媒重合

酵素触媒重合法は酵素を通常の化学触媒の様に使用して重合を行うものである¹³⁾。主に、加水分解酵素(リパーゼ)と酸化還元酵素を用いるものが広く研究されている。

リパーゼの酵素触媒としての特徴を以下に挙げる^{14,15)}。

- (1) 化学法と比べて温度、圧力、pHなどで重合条件が温和：省エネルギー型
- (2) 生成ポリマー中に触媒由来の金属が含まれないことから、環境や生体にやさしい
- (3) 酵素自体が環境低負荷型、非毒性であり、生成物からの完全除去を必ずしも必要としない
- (4) 酵素自体再生可能触媒、かつ一般に酵素はリサイクル使用が可能
- (5) 酵素触媒重合法によるポリマーは一般に整った分子構造のものが得られ、架橋や分岐といった分子構造の多様性は少ない
- (6) エナンチオおよび位置選択性が発現
- (7) 基質として酸クロリドの不使用：酸の排出を抑制
- (8) ポリエステルの閉環解重合により、選択的に環状オリゴマー(モノマー)が生成

リパーゼは、自然界でエステル結合などの結合切断を伴う加水分解を触媒するものである。一般的には加水分解酵素として作用するリパーゼであるが、水、エタノール等の求核種の制限されている状態で用いることで反応の平衡が重合方向へと傾くことが知られている。これは、酵素反応の可逆性を有効に利用した結果である。つまり、疎水性有機溶媒中などで基質モノマー同士の結合が繰り返し起き得る条件でリパーゼを用いることで重合触媒としての作用を示す。また、位置選択性などを巧みに利用することで、従来の化学法では合成困難とされていた分子構造を有する高分子材料合成への架け橋となり得ることを示している。脂肪族ポリエステル、脂肪族ポリカーボネート、脂肪族ポリエステル-ウレタン、脂肪族ポリカーボネート-ウレタンを合成する際にリパーゼが有力な触媒となり得ることが既に報告されている¹⁶⁻¹⁹⁾。さらに、酵素触媒重合と原子移動ラジカル重合(ATRP)などを組み合わせることで、ブロック共重合体などの特異構造を有するポリマー合成が達成されている²⁰⁾。酵素触媒重合は有機溶媒中ではもちろんのこと、イオン性液体や超臨界二酸化炭素中でも良好に反応が進行することが知られている^{21, 22)}。

また、酸化還元酵素による高分子合成ではペルオキシダーゼやラッカーゼを用いたものが広く研究されている。ラッカーゼを利用したウルシオール重合による人工漆の酵素合成が達成され、化学法では困難な環境低負荷型重合を可能にしており、環境にやさしい高分子合成の実用化例となっている²³⁾。

前述のような、酵素の特異な反応性を高分子合成に有効的に利用する上で、酵素反応の科学的な知見は欠かせない。実際に、リパーゼを利用した酵素触媒重合に関するメカニズムの詳細な研究が進められている。特に、有機溶媒中でも高い触媒活性を示し、比較的高温にも耐えることができるデンマークの Novozymes 社より上市されている *Candida antarctica* 由来の固定化リパーゼ lipase CA (商品名: Novozym 435) に関しては多くの報告が寄せられている^{24, 25)}。Lipase CA は、固定化されていることから、生成物との分離も比較的容易に行なうことができる。

加水分解酵素、酸化還元酵素いずれの場合もその特徴を十分に活かすことでグリーンな重合触媒としての可能性が期待される。また、発酵法による高分子合成と比べて、酵素法では対応できるモノマーが比較的幅広く、多様な分子構造を有するポリマーを合成することができるといった利点も存在する²⁶⁾。

1. 4 リサイクル

廃棄プラスチックは地球環境汚染の元凶とも言われている。我が国におけるプラスチ

ックの年間廃棄量は 1000 万トンを超える²⁷⁾。しかし、廃プラスチックの 60%以上が埋立てや単純焼却で処理されているのが現状である¹⁾。循環型省エネルギー社会を実現する上では、まず可能な限り廃棄物を出さないといった前提に立つ必要がある。その上で、どうしても生じてしまう廃プラスチックは可能な限りリサイクルすることが求められよう。従って、21 世紀のプラスチックには易リサイクル性といった新たな価値も付与されることが望ましい。

現在、プラスチックのリサイクルはその手法により 3 つに大別することができる。

(1) マテリアルリサイクル

廃プラスチックを様々なプラスチック製品として再利用するリサイクル

(2) サーマルリサイクル

廃プラスチックから熱エネルギーを回収して有効利用するリサイクル

(3) ケミカルリサイクル

廃プラスチックを原料またはより高付加価値な化合物へ変え利用するリサイクル

循環型社会を構築するに当たってはこれら 3 つを効率的に組み合わせることが重要となる。中でも、ケミカルリサイクルはリサイクルによる品質の劣化を防ぐことができることから、比較的用途の広いリサイクル手法であると考えられる。昭和電工（株）では使用済みプラスチックをケミカルリサイクルし、アンモニアなどの化学品原料に変換するプラントが既に実用化されており、現在もフル稼働中である²⁸⁾。

ケミカルリサイクルの実用化に当たり、酵素触媒を利用した反応は非常に魅力的であると考えられる。これは、酵素の特徴の一つである外部環境の変化により平衡を傾けることができることに起因する。酵素触媒を用いることで濃厚条件下では分子間反応が優先されることから重合が起こり、希薄条件下では分子内反応が優先されることから分解が起こることが知られている。この特徴を利用することで、反応条件を変化させるだけでプラスチックのケミカルリサイクルが達成可能である(Fig. 1.1)。実際に、酵素を用いたケミカルリサイクルはポリカプロラクトン(PCL)、ポリ乳酸(PLA)、ポリブチレンアジペート(PBA)、ポリ(3-ヒドロキシブチレート)(P3HB)などにおいて報告されている²⁹⁻³²⁾。

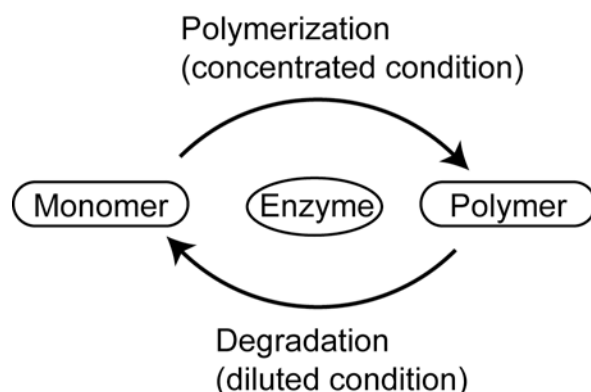
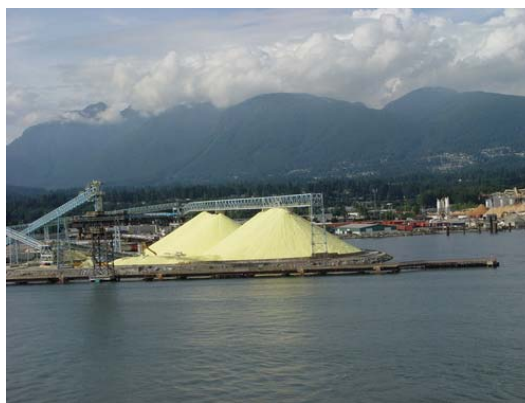


Fig. 1.1 Chemical recycling of polymers using an enzyme.

1. 5 イオウ含有高分子材料

火山国である日本では古来より、火口付近でイオウの露天掘りが行なわれてきた。現在では、国内で消費しきれないほどのイオウが石油の精製工程における副産物として、否応なしに生産されている。2005 年の統計では、イオウが単体イオウとして 240 万トン／年生産され、その約 50%に当たる 120 万トンが輸出されている。その多くは、中国に肥料原料として輸出されているのが現状である。

欧米の製油所から回収された膨大な量のイオウは、一部カナダ・アルバータ州に固体のまま野積みされている (Fig. 1.2)。現代のイオウの処分・処理問題は安全性の面からも深刻な問題として捉えられている。そのためにも、ファインケミカルとしての有機イオウ化合物の利用にとどまらず、大量のイ



オウが工業的に利活用されることが望まれる³³⁾。

Fig. 1.2 Sulfur “mountain” in Vancouver Wharves (Picture from Panoramio by Perry Tang).

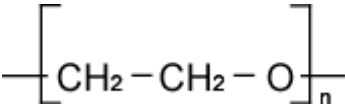
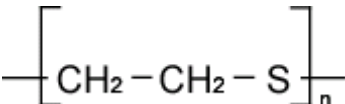
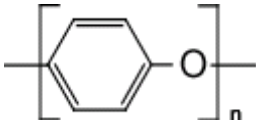
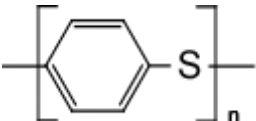
イオウが高分子に利用されたのは、1839 年グッドイヤーによる加硫の発見が初めてとされている。その後、多硫化ゴム、ポリスルフィド系シーリング剤、含イオウプラスチックへと発展を遂げた。高分子鎖中にイオウを導入することで、高分子の高屈折率化も達成され、現在では眼鏡用プラスチックレンズ、各種光学レンズ用材料として幅広く利用されている³³⁾。また、一般に、多くの主鎖中にイオウ原子を含有する高分子は、そ

れが酸素原子と置き換わった高分子と比較すると、総じて高融点になるといった報告がある³⁴⁾。ポリエーテルとポリチオエーテルの融点で顕著に差異が現れている例を Table 1.1 に示す。

含イオウプラスチックには工業的に重要なものが多数ある。中でも、ポリフェニレンスルフィド(PPS)は5大エンジニアリングプラスチック (エンプラ) (ポリアミド、ポリカーボネート、ポリアセタール、ポリブチレンテレフタレート、変性ポリフェニレンエーテル) に続く第6の汎用エンプラとしての地位の確立が期待されており、その難燃性・耐熱性の高さから自動車のエンジンまわりの部品や電気・電子分野のコネクターなど幅広く利用され、需要を伸ばしている³⁵⁾。

本研究では、酵素触媒を利用することでポリチオエステルと側鎖チオール含有ポリエステルといった異なる2種類の分子構造を有するイオウ含有プラスチックの合成を志向した。いずれも、既存の化学合成法での報告例が極めて少なく、より簡便で多様な分子構造を持った新規イオウ含有高分子材料のグリーンな合成に寄与することを目的とする。

Table 1.1 T_m of typical polyether and polythioether.

Polymer	Repeating unit	T_m (°C)
poly(ethylene oxide)		66.5 ³⁶⁾
poly(ethylene sulfide)		216 ³⁷⁾
poly(phenylene oxide)		262 ³⁸⁾
poly(phenylene sulfide)		300 ³⁹⁾

1. 6 本論文の研究内容

本研究では、酵素触媒を用いた環境低負荷型合成による新規イオウ含有高分子の創成を目的とし検討を行なった。また、チオール基が求核種として作用する際の酵素触媒重合の詳細なメカニズムに関する検討を行ない、従来の酵素触媒重合で提唱されている反応機構との比較・検討を行なった。さらに、得られた結果を基に、酵素触媒重合の特徴をフルに活かした材料合成へと研究を発展させた。

以下に、各章の概要をまとめる。

第2章 酵素触媒を利用した直接重縮合によるポリチオエステルの合成

新規イオウ含有高分子材料としてポリチオエステルに着目した。直鎖ポリチオエステルは相当するポリエステルと比べて高耐熱性、耐有機溶媒性といった特異な物性を示すことが明らかとなり、新規高分子材料としての期待がもたれる。しかしながら、従来の合成プロセスは煩雑であることから工業的な生産はなされていない。そこで、酵素触媒を利用した直接重縮合による種々の分子構造を有するポリチオエステルの合成を行なった。また、熱特性について相当するポリエステルとの比較を行なった。

第3章 酵素触媒を利用した開環重合による高分子量ポリチオエステルの合成と環状チオエステルの開環重合挙動に関する評価

第2章に続き、酵素触媒を利用したポリチオエステルの合成について検討した。但し本章では、分子量の向上を目的とし、環状チオエステルの開環重合による合成を中心に行なった。また、相当する環状エステルの開環重合と重合挙動を比較することで、チオール基が求核種として作用する際の酵素反応に関する特異なメカニズムを明らかにした。さらに、酵素を利用したポリチオエステルのケミカルリサイクル性について検討した。

第4章 酵素触媒を利用した遊離チオールをペンダントに有するポリエステルの合成

前章で得られた酵素反応に関する知見を応用し、酵素触媒を利用した側鎖チオール含有ポリエステルの合成を行なった。既存の化学触媒では合成困難、あるいは多段階ステップを要する反応であるが、酵素触媒を利用することでワンポットでの合成を達成した。また、側鎖チオールを含有するモノマーである2-メルカプトコハク酸ジメチルの立体化学が酵素重合性に及ぼす影響について評価した。相当するヒドロキシモノマーである

リンゴ酸ジメチルをモノマーとした時との酵素重合性の差異について MOE (Molecular Operating Environment)などを用いて比較・検討した。

第5章 総括

本研究で得られた結果について総括し、今後の展望について記した。

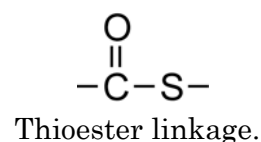
第2章

酵素触媒を利用した直接重縮合による ポリチオエステルの合成

2.1 緒言

2.1.1 はじめに

ポリチオエステルとはチオエステル結合を含有するポリマーの総称である。イオウ原子が主鎖中に組み込まれている点



が、その構造的な特徴である。既存の合成法が比較的煩雑なことが影響してか、現在までに、工業的な生産がなされてきたポリチオエステルはない。しかしながら、ポリフェニレンスルフィド (PPS)、ポリエチレンスルフィド (PES) など多くのイオウ含有ポリマー同様に高融点・耐有機溶媒性といった特性が付与されることが十分に期待されることから、新規高分子材料として期待がもたれる。ポリチオエステルは、近年、炭素源と培養条件を工夫することで、生合成により得られることが明らかとなったことや、生分解性に関する報告がなされたことから注目を集めている^{40, 41)}。

本章では、酵素触媒を用いることで、比較的温和な条件下、直接重縮合によるポリチオエステルの合成について検討を行なった。以下に、化学法、生合成法、酵素触媒重合法によるポリチオエステルの合成について記した。

2.1.2 化学法によるポリチオエステルの合成

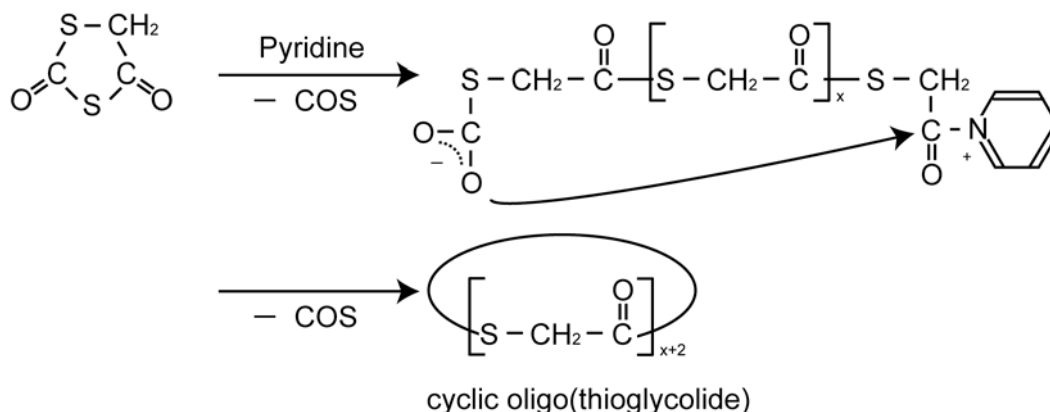
ポリチオエステルの歴史は 1944 年に Schöberl らがチオ酢酸の重縮合を報告したことにより始まる⁴²⁾。その後も Schöberl らによる種々の検討が続けられたが、当時は、副反応を抑えつつある程度の重合度を有するポリチオエステルの合成は達成されなかった⁴³⁾。その後、1951 年に Kotch らによりピリジンを触媒としたヘキサン - 1,6 - ジチオールと種々のジカルボン酸ジクロリドとの重縮合による一連のポリチオエステル

の合成が達成されたものの、いずれもポリマー収率が 10%以下と非常に低く、また望む物性を発現するような高分子量体は得られなかった⁴⁴⁾。

(a) Poly(thioglycolide) synthesized from 2,5-dioxo-1,3-oxathiolane



(b) Poly(thioglycolide) synthesized from 1,3-dithiolane-2,4-dione



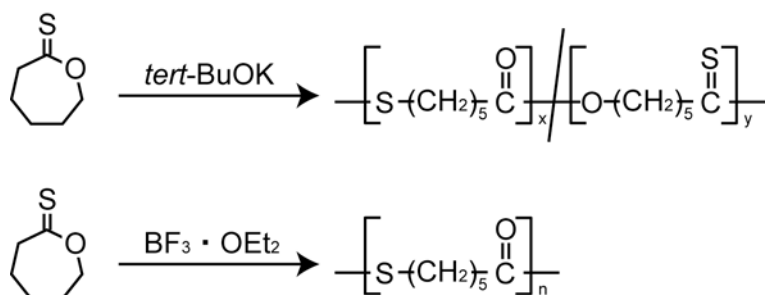
Scheme 2.1 Chemical synthesis of poly(thioglycolide) by the ring-opening polymerization.

そこで、新たなアプローチとして Schöberl らは開環重合によるポリチオエステルの合成を提唱した。種々の開始種を利用した 2,5 - ジオキソ - 1,3 - オキサチオランの開環重合が報告されたが、いずれも数量体程度のものしか得られなかった(Scheme 2.1 (a))^{45, 46)}。次に、Kricheldorf らによる 1,3 - ジチオラン - 2,4 - ジオン(DTD)の開環重合によるポリチオエステルの合成が報告された(Scheme 2.1 (b))⁴⁷⁻⁴⁹⁾。四級アミン類やナトリウムメトキシド、塩化リチウムなどの強塩基が有力な重合触媒としての可能性を示したものの、ポリマーの分子内環化反応に伴う環状体への分解も同時に起きるため、重合条件の制御が非常に難しいことが明らかとなった。

環状チオラクトン類の開環重合によるポリチオエステルの合成も報告されている。Overbergerらにより 6 員環及び 7 員環チオラクトンのアニオン重合が報告された^{50, 51)}。本法では、比較的高分子量体を得られるものの、原料モノマーを高収率で得ることが困難な上、煩雑な合成経路を要する。

新たな合成法として、近年、Sanda らによる ϵ - チオノカプロラクトンの開環重合が報告された。カリウム *tert* - ブトキシドなどのアニオン系開始種を用いることでチオノエステルとチオエステルを有するランダム共重合体を得られ、三フッ化ホウ素・ジエチルエーテルなどのカチオン系開始種を用いることで、ポリチオエステルが選択的に得ら

れることが見出された(Scheme 2.2)^{52, 53}。ε - チオノカプロラク톤のカチオン開環重合により得られたポリチオエステルは収率 88%と良好で、分子量も $M_n = 57,000$ と比較的高い。原料であるチオノラクトン類の効率的合成が達成されれば、カチオン開環重合はポリチオエステル合成における有力な方法になり得ることを示唆している。また、γ - チオノブチロラク톤のカチオン重合も達成されている⁵⁴。



Scheme 2.2 Anionic and cationic ring-opening polymerization of ε-thiocaprolactone.

2.1.3 生合成によるポリチオエステルの合成

種々の微生物内でポリ(*R*-3-ヒドロキシアлкаノエート)(PHA)が生合成され、微生物のエネルギー源として蓄えられていることが知られている^{5, 6}。微生物が産生するPHAホモポリマーは結晶性が高く優れた強度を有する反面、大変脆いという欠点を有する。そのために、工業用的高分子材料としての利用はされてこなかった。ところが、微生物に与える栄養を選択することにより、共重合ポリエステル類が合成されることが見出され、硬い材料から柔らかい材料まで様々な特徴をもつ生分解性ポリエステルが合成されることが明らかになった⁵⁵。

2001年にSteinbüchelらにより、チオエステル結合を一部含有したポリエステルの生合成が発表された⁵⁶。これは、主鎖中にイオウを含有するバイオポリマーとして初の報告例であり大きな注目を集めた。その後も、種々培養条件を変化させることなどにより、共重合成分として3-メルカプトプロピオン酸(3MP)、3-メルカプトブタン酸(3MB)、3-メルカプトバレリアン酸(3MV)などを含む微生物産ポリチオエステルが相次いで報告された(Fig. 2.1)⁵⁷⁻⁵⁹。

さらに、遺伝子組換えにより生産性を向上さ

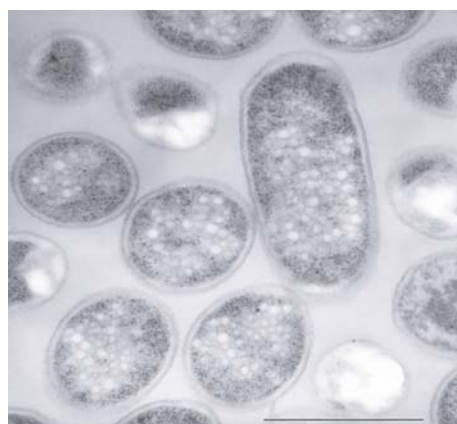
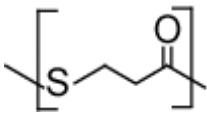
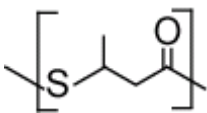
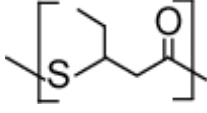


Fig. 2.1 TEM image of *E. coli* accumulating poly(3MV)³⁴.

せた大腸菌を用いることで、それぞれのホモポリマーも生合成されることが明らかとなった³⁴⁾。Poly(3MB), poly(3MV)の重量平均分子量はそれぞれ 176,000 と 165,000 であった。また、poly(3MP)は 170°Cの融点を示し、対応する PHA のポリ(3-ヒドロキシプロピオネート) (poly(3HP))の 77°Cと比較して、約 100°C高いことが明らかになった。また、5%熱分解温度も、poly(3MP)が 277°Cで、poly(3HP)の 233°Cより 40°C以上高いことが見出された(Table 2.1)。

Table 2.1 T_m and T_g of biosynthesized polythioesters.

Polymer	Repeating unit	T_g (°C)	T_m (°C)
poly(3MP)		—	170
poly(3MB)		8	100
poly(3MV)		-1	84

微生物産ポリチオエステルの生分解性については現在研究が進められている段階で、いくつかの報告が出されている。中でも、poly(3MP)については詳細に検討がなされており、微生物が産生するポリチオエステルであるにも関わらず、生分解性を示さない特異な性質が報告されている^{60, 61)}。しかしながら、一部のチオエステル結合含有共重合体では、生分解性が認められており、分解酵素によるチオエステル結合の切断も確認されている^{41, 62-63)}。このことは、ポリマー鎖中へのチオエステル結合の導入により、耐熱性を向上させつつ生分解度をコントロールできることを示唆している。微生物産ポリチオエステルの発見は、学術的に重要な知見であることはもちろんのこと、ポリチオエステルの高分子材料としての可能性をも明らかにした。

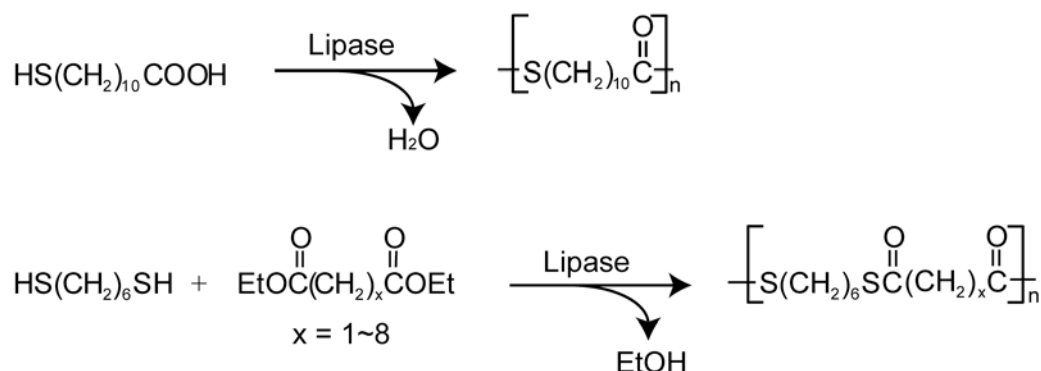
2.1.4 酵素触媒を利用した直接重縮合によるポリチオエステルの合成

酵素触媒を利用した高分子合成は、これまで主にポリエステル類について数多くの研究がなされてきた。一方、酵素触媒重合によるポリチオエステルの合成についての報告例は極めて少ない。Caussette や Weber らにより、酵素触媒を利用したモノカルボン酸とモノチオールあるいはジチオールとのチオエステル化に関する報告が出されているのみで⁶⁴⁻⁶⁸⁾、ポリチオエステルの酵素合成に関する論文は当研究室の Iwata らが発表した 11-メルカプトウンデカン酸(11MU)あるいは 3MP と ϵ -カプロラクトンとの共重合体の合成が初めてである⁶⁹⁾。しかし、得られた共重合体中のチオエステル成分の割合は最大でも 10 mol%程度に留まり、また、その重量平均分子量は 1 万程度であった。

2006 年以降、Fehling らにより *Rhizomucor miehei* 由来の固定化酵素 Lipozyme RM IM を利用した酵素触媒重合によるポリチオエステル合成に関する報告がなされたが、いずれも平均分子量 2000 程度のものに限定され、反応の進行に伴い、原料チオールの副反応による副生物の生成も確認されており、実用的重合法とは言えない^{70, 71)}。

そこで本研究では、化学法、生合成に次ぐポリチオエステルの合成法として酵素触媒を利用した環境低負荷型重合法を確立することを目的とした。本章では、直接重縮合によるホモポリチオエステルの合成について報告する。具体的には、Scheme 2.3 に示すように、初めに基質として 11MU を用いリパーゼ触媒下で反応させることでポリチオエステルの合成を試みた。ついで、様々な分子構造を有するポリチオエステルを合成するために、容易に入手可能なヘキササン-1,6-ジチオールならびにジカルボン酸ジエステルの重縮合による種々の AA-BB 型ポリチオエステルの合成を試みた。

また、新規に合成したポリチオエステルの生分解性を評価した。ポリチオエステルを唯一の炭素源として活性汚泥とともに培養することで資化菌株の単離を試みた。



Scheme 2.3 Direct enzymatic synthesis of polythioester.

2. 2 試薬・機器

2. 2. 1 試薬

本章で用いた酵素を以下に示す。酵素は、いずれも五酸化ニリン存在下、常温で2時間減圧乾燥(3 mmHg)させてから用いた。

Table 2.2 List of enzymes.

Enzyme origin	Abbreviation	Manufactures
Immobilized lipase from <i>Candida antarctica</i> (Novozym 435) Activity = 10,000 PLU/g ^(a)	CA	Novozymes Japan
Immobilized lipase from <i>Burkholderia cepacia</i> (Lipase PS - C Amano I immobilized on ceramic) Activity = 1,000 PLU/g ^(b)	PS - C	Amano Enzyme Inc.
Immobilized lipase from <i>Rhizomucor miehei</i> (Lipozyme RM IM) Activity = 5 - 6 BAUN/g ^(c)	RM	Novozymes Japan
Lipase from <i>Pseudomonas fluorescens</i> Activity = 25,000 U/g protein) ^(d)	AK	Amano Enzyme Inc.
Lipase from <i>Candida rugosa</i> Activity = 500 U/mg ^(e)	CR	Sigma Chemical Co., Inc.

^(a) Lipase (B lipase) from *Candida antarctica* produced by submerged fermentation of genetically modified *Aspergillus oryzae* microorganism and adsorbed on a macroporous acrylic resin, having 10,000 PLU/g (propyl laurate units : lipase

activity based on ester synthesis). The product has a water content of 1 - 2 wt%.

(b) One unit will produce 1.0 micromole of 1-phenethyl alcohol to 1-phenethyl acetate per min at 25°C in the presence of vinyl acetate.

(c) The interesterification activity of Lipozyme RM IM is expressed in batch acidolysis units Novo (BUN/g). Lipozyme RM IM is immobilized on a macroporous anion - exchange resin.

(d) One unit of enzyme activity is defined as the enzyme quality which liberates 1 μ mol of fatty acid per one minute.

(e) One unit will hydrolyze 1.0 microequivalent of fatty acid from a triglyceride in 1 hr at pH 7.2 at 37 °C using olive oil (30 min incubation).

熱失活リパーゼ CA (thermally deactivated lipase CA)は、50 mL ナスフラスコにリパーゼ CA 100 mg をはかり取り、これをオートクレーブ中で 120 °C、15 分間蒸気により加熱及び加圧し、次いで凍結乾燥することにより調製した。凍結乾燥後の熱失活リパーゼ CA の水分量は 0.5 wt%程度であった。

本章で用いた試薬を以下に示す。

Table 2.3 List of reagents for experiments.

試薬名	製造会社	等級
11 - メルカプトウンデカン酸 (11MU)	Aldrich Chem. Co., Inc.	
11 - ヒドロキシウンデカン酸 (11HU)	Aldrich Chem. Co., Inc.	
ヘキサン - 1,6 - ジチオール	Aldrich Chem. Co., Inc.	
ヘキサン - 1,6 - ジオール	関東化学 (株)	鹿特級
6 - メルカプト - 1 - ヘキサノール	Aldrich Chem. Co., Inc.	
マロン酸ジエチル	東京化成工業 (株)	一級
コハク酸ジエチル	東京化成工業 (株)	一級
グルタル酸ジエチル	東京化成工業 (株)	一級
アジピン酸ジエチル	東京化成工業 (株)	
ピメリン酸ジエチル	東京化成工業 (株)	一級
スベリン酸ジエチル	東京化成工業 (株)	一級
アゼライン酸ジエチル	Aldrich Chem. Co., Inc.	
セバシン酸ジエチル	東京化成工業 (株)	一級
リン酸水素二カリウム	純正化学 (株)	純正一級
リン酸二水素カリウム	純正化学 (株)	純正一級
リン酸水素二ナトリウム・十二水和物	純正化学 (株)	純正一級
塩化アンモニウム	純正化学 (株)	純正一級
硫酸マグネシウム・七水和物	和光純薬工業 (株)	試薬特級
塩化カルシウム	関東化学 (株)	特級
硫酸鉄 (Ⅲ)・六水和物	和光純薬工業 (株)	試薬特級
アニリン	和光純薬工業 (株)	試薬特級
塩化カルシウム・二水和物	和光純薬工業 (株)	試薬特級
硫酸鉄 (Ⅱ)・七水和物	小宗化学薬品 (株)	試薬特級
硫酸マンガン・四水和物	小宗化学薬品 (株)	試薬特級
硫酸亜鉛・七水和物	和光純薬工業 (株)	試薬特級
硫酸銅・五水和物	純正化学 (株)	純正一級
塩酸チアミン(VB ₁ ・HCl)	和光純薬工業 (株)	試薬特級
寒天 (粉末)	純正化学 (株)	純正一級
普通寒天培地 (肉エキス入り)	極東製薬工業 (株)	
クロロホルム	信越化学工業 (株)	業務用
クロロホルム(stabilized with amylene)	関東化学 (株)	HPLC 用
メタノール	純正化学 (株)	HPLC 用
プロパノール	関東化学 (株)	試薬特級

本章で用いた分析用試薬・その他実験用品を以下に示す。

Table 2.4 List of reagents for experimental analysis and others.

試薬名	製造会社	等級
酸化リン (V)	関東化学 (株)	特級
シリカゲル 60N (球状、中性)	関東化学 (株)	カラム用
海砂 (15-20 メッシュ)	純正化学 (株)	化学用
TLC 板	Merck	
モレキュラーシーブス 4A (ビーズ)	純正化学 (株)	化学用
2,5 - ジヒドロキシ安息香酸	Sigma Inc.	
臭化ナトリウム	関東化学 (株)	特級
Peptide calibration standard (1000-4000 Da)	Bruker Daltonics Inc.	
重クロロホルム	ISOTEC Inc.	

2. 2. 2 機器

サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) 高分子量用

ポンプ	PU - 980	日本分光 (株)
カラムオーブン	CO - 1565	日本分光 (株)
カラム	K - G, K - 804L (8 mm ϕ $\times$ 300 mm)	日本分光 (株)
検出器	RI - 930	日本分光 (株)
レコーダー	807 - IT	日本分光 (株)
デガッサー	DG - 980 - 50	日本分光 (株)
溶離液	1%エタノール含有クロロホルム	
測定条件	流速	1.0 mL/min
	測定温度	35 °C
	試料注入量	100 μ L (1 mg/mL)
検量線用標準試料	ポリスチレンスタンダード (M_w = 233,000、110,000、50,000、 17,500、9,000、2,200、906)	ケムコ化学 (株)

サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) 低分子量用

ポンプ	PU - 980	日本分光 (株)
カラムオーブン	CO - 1565	日本分光 (株)
カラム	K - G, K - 801 (8mm ϕ $\times$ 300 mm)	日本分光 (株)
検出器	RI - 1530	日本分光 (株)
レコーダー	807 - IT	日本分光 (株)
デガッサー	DG - 980 - 50	日本分光 (株)
溶離液	1%エタノール含有クロロホルム	
測定条件	流速	1.0 mL/min
	測定温度	室温
	試料注入量	20 μ L (3 mg/mL)

その他の機器

FT - NMR

JEOL JNM - LA300

日本電子 (株)

VARIAN NMR300

VARIAN. Inc.

MALDI - TOF MS

Bruker Ultraflex mass spectrometer

Bruker Daltonics Inc.

示差走査熱量計

DSC - 60

(株) 島津製作所

BOD Tester

アクタック (株)

分光光度計

UV - 160

(株) 島津製作所

ガラス電極式水素イオン濃度計

HM - 20E

東亜電波工業 (株)

油浴

OMS - 1

石井商店 (株)

マグネットスターラー

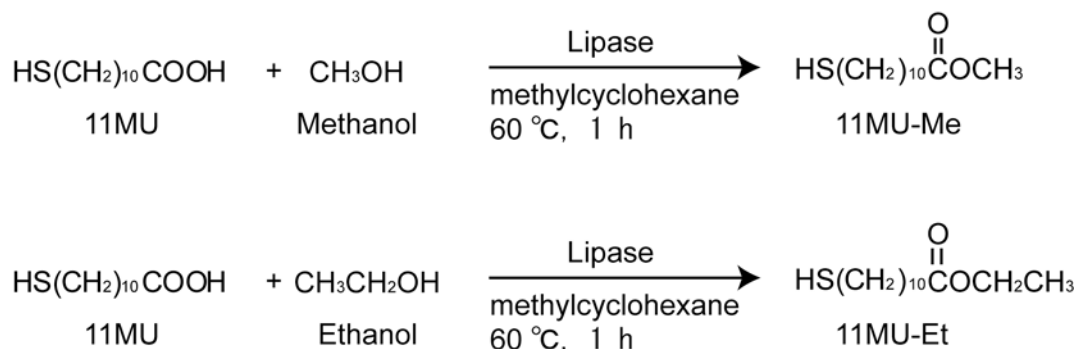
EG

石井商店 (株)

2.3 実験方法

2.3.1 11MU の酵素触媒重合

2.3.1.1 11 - メルカプトウンデカン酸メチル(11MU-Me), 11 - メルカプトウンデカン酸エチル(11MU-Et)の調製



Scheme 2.4 Esterification of 11MU.

Scheme 2.4 に示すように 2 種のエステルを合成した。それぞれの合成法及び ^1H NMR スペクトルを以下に示した。

・ 11MU-Me

磁気回転子を付した 30 mL ナスフラスコに 11MU 1.0 g (4.58 mmol) 及びリパーゼ CA 100 mg (10 wt%) はかり取り、2 時間常温で減圧乾燥させた。これにメチルシクロヘキサン 10 mL とメタノール 220 mg (6.87 mmol = 1.5 eq.) を添加後、試験管内をアルゴンで置換し密栓後オイルバスにて 60 $^\circ\text{C}$ で 1 時間攪拌した。反応混合物にクロロホルム 10 mL を加えリパーゼ CA をろ別し、ついで、ろ液をロータリーエバポレーターを用いて濃縮することで、粗 11MU-Me を転化率 95% で得た。転化率は ^1H NMR における 3.66 ppm の 11MU-Me 由来メチルエステルのピーク (-COO-CH₃) と、2.20 ~ 2.40 ppm の 11MU 及び 11MU-Me 由来カルボニル隣接メチレンピーク (-CH₂-COO-) の積分値から算出した。展開溶媒としてクロロホルムを用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィー(シリカゲル 60N 50 g) で $R_f = 0.61$ のフラクションを分取することで、11MU-Me を 0.97 g (収率 91 %) 得た。11MU-Me の ^1H NMR スペクトルを Fig. 2.2 に示した。また、元素分析の結果も併せて示した。

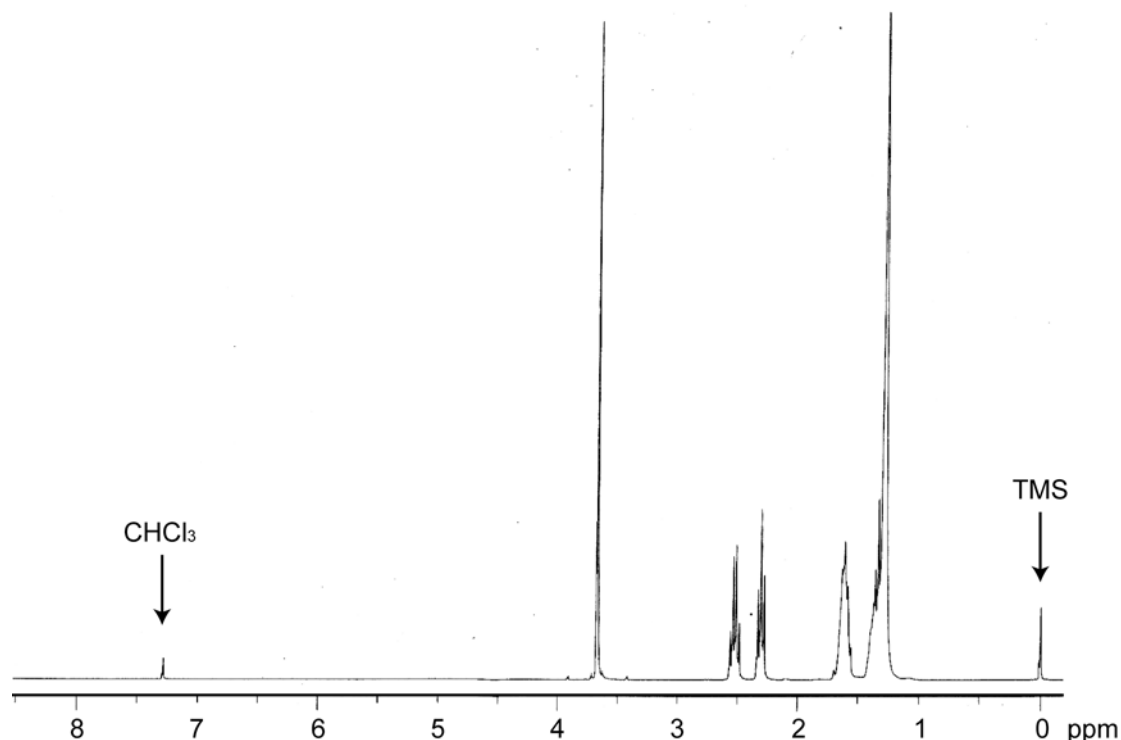


Fig. 2.2 300 MHz ^1H NMR spectrum of methyl 11-mercaptoundecanoate in CDCl_3 .

Methyl 11-mercaptoundecanoate (11MU-Me) : ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3); δ (ppm) = 1.28 (m, 13H, $\text{HS} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - (\text{CH}_2)_6 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{COO} - \text{CH}_3$), 1.60 (m, 4H, $\text{HS} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - (\text{CH}_2)_6 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{COO} - \text{CH}_3$), 2.30 (t, 2H, $\text{HS} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - (\text{CH}_2)_6 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{COO} - \text{CH}_3$, $J = 7.0$ Hz), 2.52 (dt, 2H, $\text{HS} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - (\text{CH}_2)_6 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{COO} - \text{CH}_3$, $J_1 = 7.2$ Hz, 7.2 Hz), 3.66 (s, 3H, $\text{HS} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - (\text{CH}_2)_6 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{COO} - \text{CH}_3$).

$\text{C}_{12}\text{H}_{24}\text{O}_2\text{S}$ (232.15): Calcd. C 62.02, H 10.41, S 13.80; Found C 61.85, H 10.31, S 13.99.

• 11MU-Et

磁気回転子を付した 30 mL ナスフラスコに 11MU 1.0 g (4.58 mmol) 及びリパーゼ CA 100 mg (10 wt%) はかり取り、2 時間常温で減圧乾燥させた。これにメチルシクロヘキサン 10 mL とエタノール 317 mg (6.87 mmol = 1.5 eq.) を添加後、試験管内をアルゴンで置換し密栓後オイルバスにて 60 $^{\circ}\text{C}$ で 1 時間攪拌した。反応混合物にクロロホルム 10 mL を加えリパーゼ CA をろ別し、ついで、ろ液をロータリーエバポレーターを用いて濃縮することで、粗 11MU-Et を転化率 96 % で得た。転化率は ^1H NMR における 4.12 ppm の 11MU-Et 由来エチルエステルピーク ($-\text{COO} - \text{CH}_2 - \text{CH}_3$) と、2.20 ~

2.40 ppm の 11MU 及び 11MU-Et 由来カルボニル隣接メチレンピーク ($-\underline{\text{CH}}_2-\text{COO}-$) の積分値から算出した。展開溶媒としてクロロホルムを用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィー(シリカゲル 60N 50g)で $R_f = 0.59$ のフラクションを分取することで、11MU-Et を 1.04 g (収率 92 %) 得た。11MU-Et の ^1H -NMR スペクトルを Fig. 2.3 に示した。また、元素分析の結果も併せて示した。

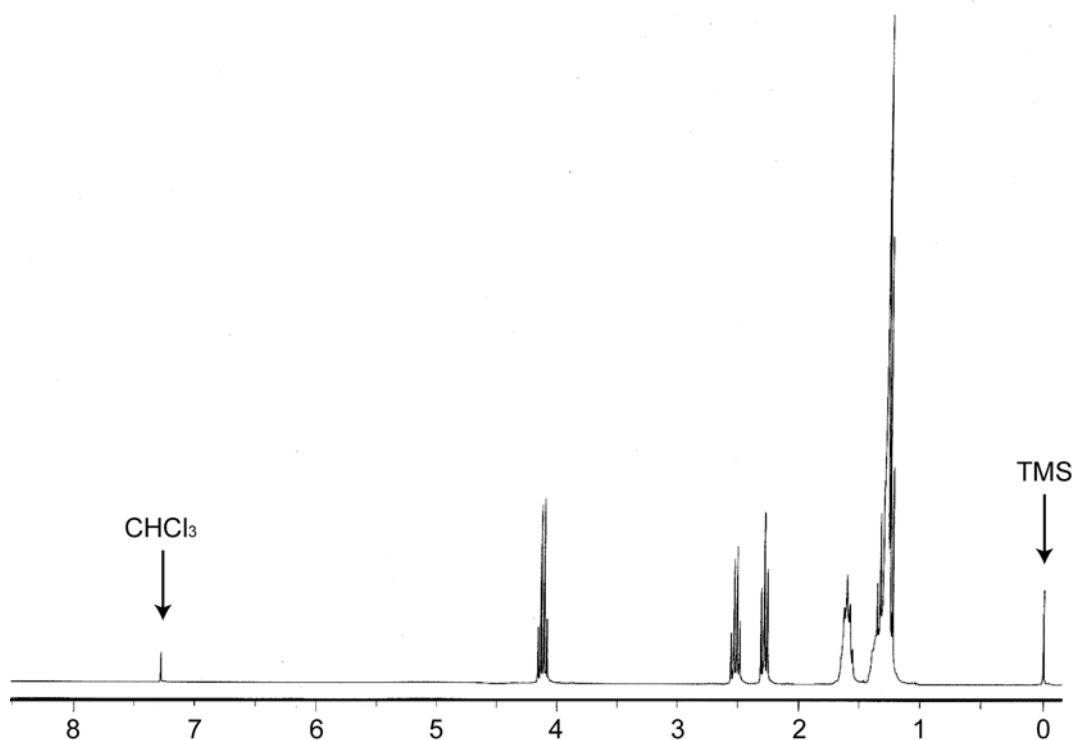
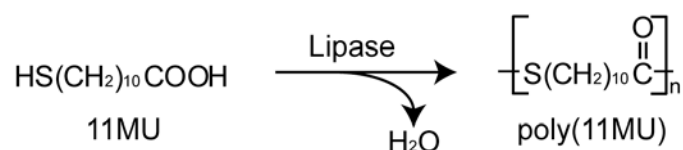


Fig. 2.3 300 MHz ^1H NMR spectrum of ethyl 11-mercaptoundecanoate in CDCl_3 .

Ethyl 11-mercaptoundecanoate (11MU-Et): ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3); δ (ppm) = 1.23 (t, 3H, $\text{HS}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-(\text{CH}_2)_6-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COO}-\text{CH}_2-\underline{\text{CH}}_3$, $J = 7.0$ Hz), 1.28 (m, 13H, $\underline{\text{H}}\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-(\underline{\text{CH}}_2)_6-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COO}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$), 1.59 (m, 4H, $\text{HS}-\text{CH}_2-\underline{\text{CH}}_2-(\text{CH}_2)_6-\underline{\text{CH}}_2-\text{CH}_2-\text{COO}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$), 2.28 (t, 2H, $\text{HS}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-(\text{CH}_2)_6-\text{CH}_2-\underline{\text{CH}}_2-\text{COO}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$, $J = 7.0$ Hz), 2.52 (dt, 2H, $\text{HS}-\underline{\text{CH}}_2-\text{CH}_2-(\text{CH}_2)_6-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COO}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$, $J_1 = 7.2$ Hz, $J_2 = 7.2$ Hz), 4.12 (q, 2H, $\text{HS}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-(\text{CH}_2)_6-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COO}-\underline{\text{CH}}_2-\text{CH}_3$, $J = 7.0$ Hz).

$\text{C}_{12}\text{H}_{24}\text{O}_2\text{S}$ (246.17): Calcd. C 63.37, H 10.64, S 13.01; Found C 63.20, H 10.62, S 13.19.

2.3.1.2 直接重縮合による poly(11MU)の合成



Scheme 2.5 Enzymatic polycondensation of 11MU.

11MU は展開溶媒としてメタノール/クロロホルム = 1/20 (v/v)を用いたシリカゲルクロマトグラフィー (1 g の基質に対してシリカゲル 60 N 50 g) で $R_f = 0.32$ のフラクションを分取することで、精製してから用いた。11MU, 11MU-Me, 11MU-Et を基質として用いることで、poly(11MU)の合成を行なった。一例として、Scheme 2.5 に示す通り、11MU からの酵素触媒を用いた重縮合例を以下に記す。

モレキュラーシーブス 4A をアルミホイルで作成した簡易容器に満たし、使用前に 150℃で 2 時間加熱することで、十分に乾燥させた。さらに、ネジキャップ付き試験管 (13×100 mm)に 11MU を 60 mg 及びリパーゼ CA を 36 mg はかり取り、2 時間減圧乾燥させた。試験管内をアルゴンで置換し、モレキュラーシーブス簡易容器を付し、密栓後オイルバスにて 110 °C で 48 時間反応させた。Fig. 2.4 に反応系の模式図を示した。

反応終了後、反応物にクロロホルム (安定化剤としてアミレンを含む) 20 mL を加え、50 °C のウォーターバスで数分加熱し、ついでリパーゼ CA を熱時ろ過した。ろ液を減圧濃縮し、粗生成物を得た。粗生成物は再沈殿 (良溶媒：クロロホルム 400 μL、貧溶媒：プロパノール 20 mL) を 2 回繰り返すことで精製し、白色フィルム状に poly(11MU) [$M_w = 34,000$ 、 $M_w/M_n = 2.3$]を収率 86 % で得た。

精製ポリマーの ^1H NMR を Fig. 2.5 に示した。

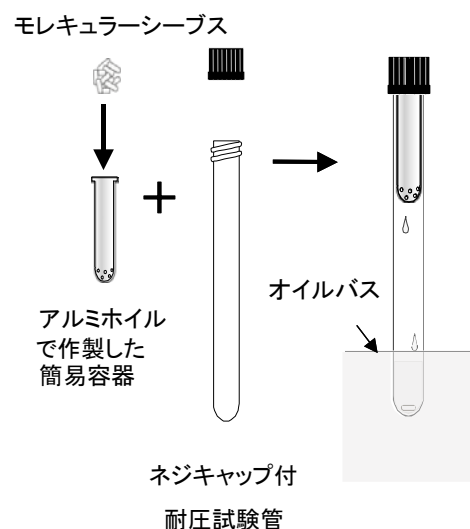


Fig. 2.4 The reaction vessel of the enzymatic polycondensation.

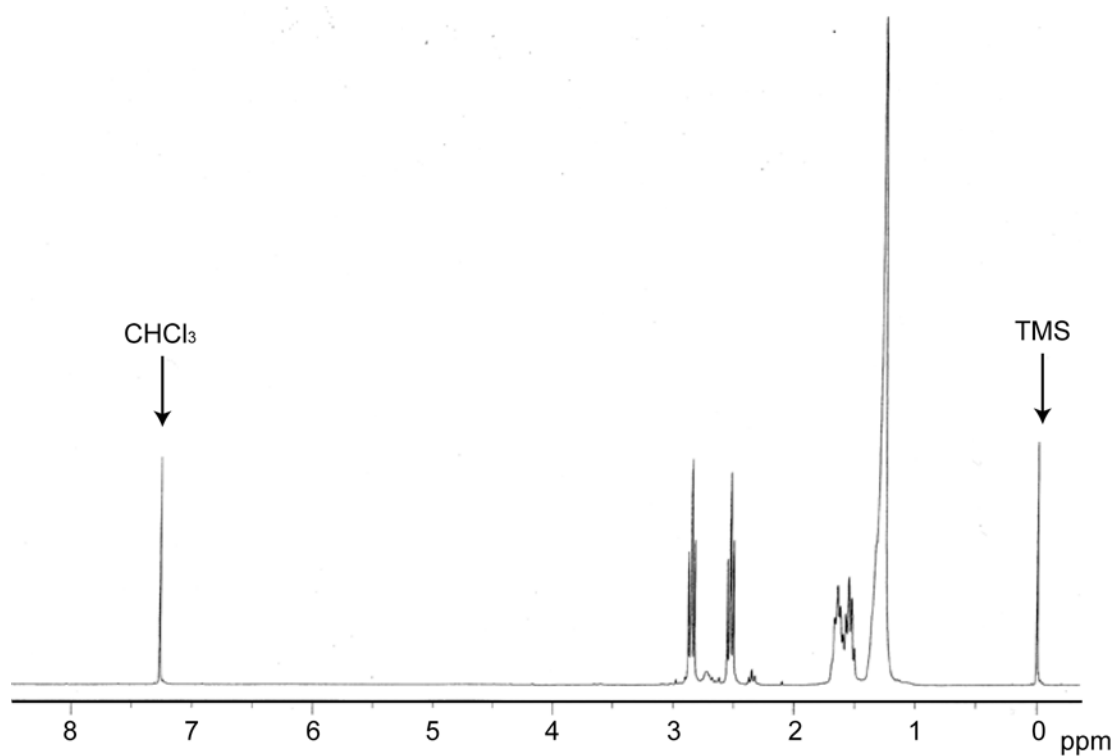


Fig. 2.5 300 MHz ^1H NMR of poly(11MU) in CDCl_3 .

Poly(11MU): ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3); δ (ppm) = 1.28 (m, 12H, - S - CH_2 - CH_2 - $(\text{CH}_2)_6$ - CH_2 - CH_2 - CO -), 1.59 (m, 4H, - S - CH_2 - CH_2 - $(\text{CH}_2)_6$ - CH_2 - CH_2 - CO -), 2.53 (t, 2H, - S - CH_2 - CH_2 - $(\text{CH}_2)_6$ - CH_2 - CH_2 - CO - , $J = 7.8$ Hz), 2.85 (t, 2H, - S - CH_2 - CH_2 - $(\text{CH}_2)_6$ - CH_2 - CH_2 - CO - , $J = 7.6$ Hz).

2.3.1.3 Poly(11HU)の合成

Poly(11MU)に相当するポリエステルであるポリ(11 - ヒドロキシウンデカン酸) [poly(11HU)]の合成を行なった。一例として $M_w = 29,000$ の poly(11HU)の調製と ^1H NMR による分析結果を以下に示す。

モレキュラーシーブス 4A をアルミホイルで作成した簡易容器に満たし、使用前に $150\text{ }^\circ\text{C}$ で 2 時間加熱することで、十分に乾燥させた。さらに、ネジキャップ付き試験管(13×100 mm)に 11HU を 60 mg 及びリパーゼ CA を 36 mg はかり取り、2 時間減圧乾燥させた。試験管内をアルゴンで置換し、モレキュラーシーブス簡易容器を付し、密栓後オイルバスにて $110\text{ }^\circ\text{C}$ で 48 時間反応させた。反応終了後、反応物にクロロホルム (安定化剤としてアミレンを含む) 20 mL を加え、 $50\text{ }^\circ\text{C}$ のウォーターバスで数分加熱し、ついでリパーゼ CA を熱時ろ過した。ろ液を減圧濃縮することで粗生成物を得た。粗生成物は再沈殿 (良溶媒: クロロホルム 400 μL 、貧溶媒: プロパノール 20 mL) を 2 回繰り返すことで精製し、白色フィルム状に poly(11HU) [$M_w = 29,000$ 、 $M_w/M_n = 2.8$] を収率 90 % で得た。

精製ポリマーの ^1H NMR を Fig. 2.6 に示した。

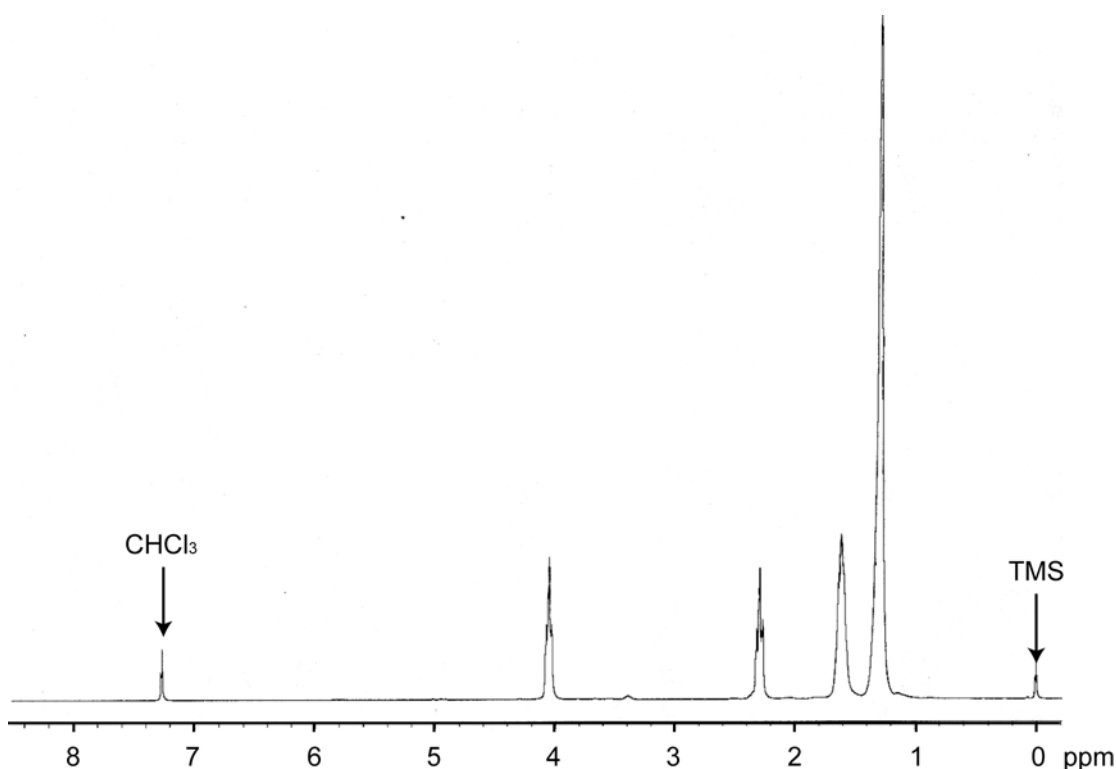


Fig. 2.6 300 MHz ^1H NMR of poly(11HU) in CDCl_3 .

Poly(11HU): ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3); δ (ppm) = 1.30 (m, 12H, - O - CH_2 - CH_2 - (CH_2)₆ - CH_2 - CH_2 - CO -), 1.59 (m, 4H, - O - CH_2 - CH_2 - (CH_2)₆ - CH_2 -

CH₂ - CO -), 2.29 (t, 2H, - O - CH₂ - CH₂ - (CH₂)₆ - CH₂ - CH₂ - CO - , $J = 7.8$ Hz), 4.05 (t, 2H, - O - CH₂ - CH₂ - (CH₂)₆ - CH₂ - CH₂ - CO - , $J = 6.3$ Hz).

2.3.1.4 MALDI - TOF MS 測定用試料溶液の調製

ポリマー試料溶液

ポリマー溶液 10 μ L、マトリックス溶液 90 μ L 及びイオン化助剤溶液 10 μ L を 0.5 mL マイクロテストチューブにはかり取り、テストチューブミキサーを用いて攪拌した。この試料溶液 1 μ L を MALDI - TOF MS 測定用ターゲットに塗布して測定に供した。ポリマー溶液、マトリックス溶液及びイオン化助剤溶液の調製法を以下に記した。

ポリマー溶液

ポリマー 1 mg を 1.5 mL マイクロテストチューブにはかり取り、クロロホルム 200 μ L を加え溶解することでポリマー溶液を調製した。

マトリックス溶液

2,5 - ジヒドロキシ安息香酸 10 mg を 1.5 mL マイクロテストチューブにはかり取り、クロロホルム/メタノール = 9/1 (v/v) 混合溶媒 1 mL を加えて溶解し、マトリックス溶液 (10 mg/mL) を調製した。

イオン化助剤溶液

臭化ナトリウム 1 mg を 1.5 mL マイクロテストチューブにはかり取り、メタノール 200 μ L を加えて溶解後、クロロホルム 800 μ L を加えてイオン化助剤溶液 (1 mg/mL) を調製した。

検量線用溶液

検量線用標準試料には Peptide calibration standard (1000 - 4000 Da) (Bruker Daltonics Inc.) を用いた。ペプチド溶液 2 μ L 及びマトリックス溶液 6 μ L を 0.5 mL マイクロテストチューブにはかり取り、テストチューブミキサーを用いて攪拌してペプチド試料溶液を調製し、この 1 μ L を MALDI - TOF MS 測定用ターゲットに塗布して測定した。Peptide Calibration Standard に含まれるペプチドを Table 2.5 に示す。また、ペプチド溶液及びマトリックス溶液の調製法を以下に記した。

Table 2.5 Peptide calibration standard (1000 - 4000 Da).

Substance	Mono isotopic [M + H] ⁺	Average [M + H] ⁺
Angiotensin II	1046.54	1047.19
Angiotensin I	1296.68	1297.49
Substance P	1347.74	1348.64
Bombesin	1619.82	1620.86
ACTH clip 1-17	2093.09	2094.43
ACTH clip 18-39	2465.20	2466.68
Somatostatin 28	3147.47	3149.57

ペプチド溶液

Table 2.5 に示した各ペプチドが 500 pmol の入った容器に 0.1 %トリフルオロ酢酸水溶液 125 μ L を加えて溶解し、各ペプチドの濃度が 4 pmol/ μ L になるようにペプチド溶液を調製した。

マトリックス溶液

α -cyano-4-hydroxycinnamic acid 5 mg を 1.5 mL マイクロテストチューブにはかり取り、アセトニトリル/0.1 %トリフルオロ酢酸水溶液 = 1/2 (v/v) 混合溶媒 1 mL を加え、テストチューブミキサーを用い攪拌後、超音波をあてて α -cyano-4-hydroxycinnamic acid を懸濁させた。その後、小型微量遠心機を用いて懸濁物を沈殿させ、飽和溶液を得、マトリックス溶液として調製した。

2.3.1.5 熱分析

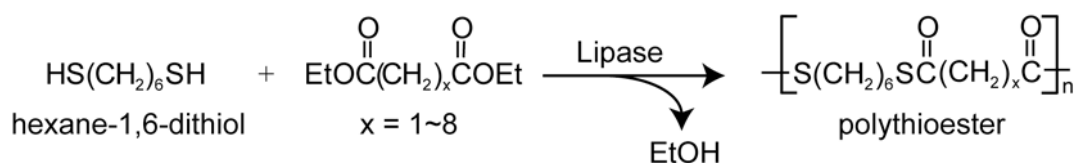
ポリマーの熱特性の解析を DSC を用いて行なった。Poly(11MU)及び poly(11HU) 3 - 5 mg をシールセルにはかり取り、シーラーを用いてセルを密閉した。基準物質用のセルは空のまま密閉した。測定は Table 2.6 に示すタイムプログラムで行なった。

Table 2.6 Time program of DSC measurements of poly(11MU) and poly(11HU).

Heating / Cooling	Temperature range (°C)	Heating / Cooling rate (°C/min)
First heating	26 ~ 130	20
Cooling	130 ~ -110	-50
Second heating	-110 ~ 130	20

2.3.2 ジカルボン酸ジエステルとジチオール酵素触媒重合

2.3.2.1 種々の AA - BB 型ポリチオエステルの合成



Scheme 2.6 Enzymatic polycondensation of hexane-1,6-dithiol and diethyl ester with various methylene length.

Scheme 2.6 に示す 8 種類の AA - BB 型ポリチオエステルは、ヘキサン - 1,6 - ジチオールとマロン酸ジエチル($x = 1$)、コハク酸ジエチル($x = 2$)、グルタル酸ジエチル($x = 3$)、アジピン酸ジエチル($x = 4$)、ピメリン酸ジエチル($x = 5$)、スベリン酸ジエチル($x = 6$)、アゼライン酸ジエチル($x = 7$)、アジピン酸ジエチル($x = 8$)などのジエステルをモノマー仕込み比が 1:1 (mol/mol)となるようにはかり取り、リパーゼ CA とそれぞれ 120 °C、2 日間反応させることにより得た。

一例として、酵素触媒を用いた重縮合による poly(hexanedithiol - sebacate)の重合例を以下に示す。

モレキュラーシーブス 4A をアルミホイルで作成した簡易容器に満たし、使用前に 150 °C で 2 時間加熱することで、十分に乾燥させた。さらに、ネジキャップ付き試験管(13×100 mm)にリパーゼ CA 36.2 mg をはかり取り、2 時間減圧乾燥させた。ついで、ヘキサン - 1,6 - ジチオールを 30.1 mg (0.20 mmol)及びセバシン酸ジエチル 51.7 mg (0.20 mmol)を試験管内にはかり取った。アルゴンで試験管内を置換し、モレキュラーシーブス簡易容器を付し、密栓後オイルバスにて 120 °C で 48 時間反応させた。反応終了後、粗生成物にクロロホルム (安定化剤としてアミレンを含む) 20 mL を加え、50 °C のウォーターバスで数分加熱し、ついでリパーゼ CA を熱時ろ過した。ろ液を減圧濃縮することで粗生成物を得た。粗生成物は再沈殿 (良溶媒: クロロホルム 400 μ L、貧溶媒: メタノール 20 mL) を 2 回繰り返すことで精製し、白色粉末状に poly(hexanedithiol - sebacate) [$M_w = 10,200$ 、 $M_w/M_n = 1.7$]を収率 90 %で得た。

精製ポリマーの ^1H NMR を Fig. 2.7 に示す。

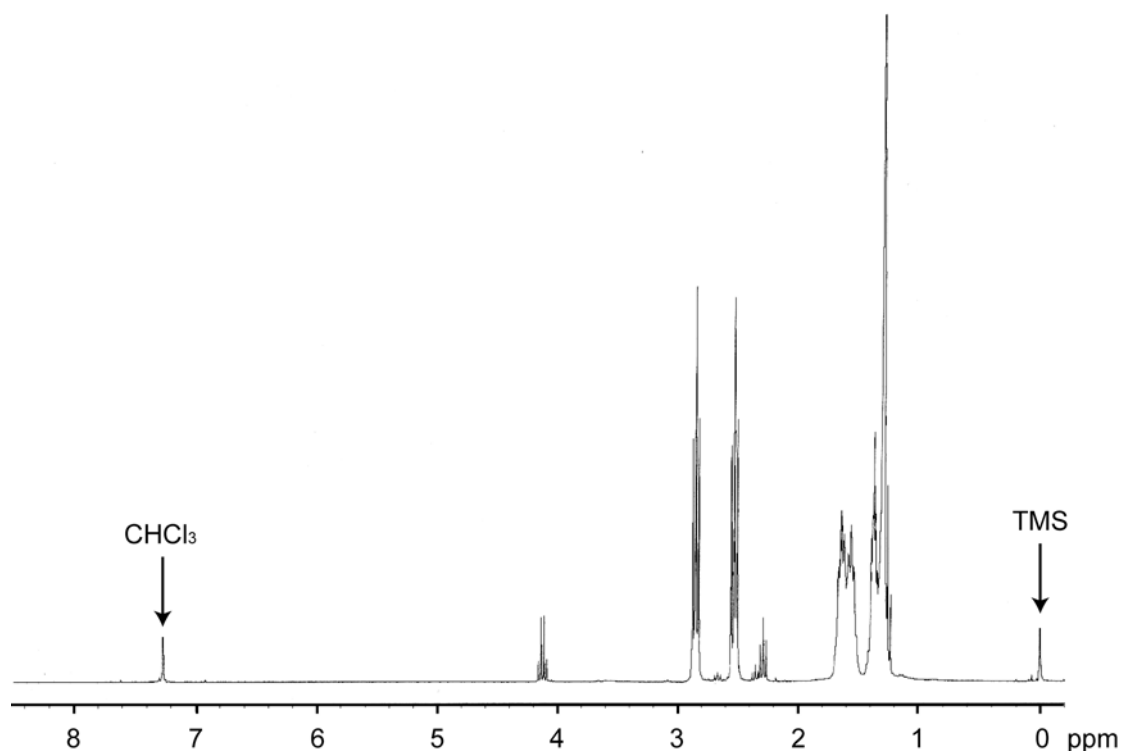


Fig. 2.7 300 MHz ^1H NMR of poly(hexanedithiol - sebacate) in CDCl_3 .

Poly(hexanedithiol - sebacate): ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3); δ (ppm) = 1.29 (m, 8H, - $\underline{\text{CH}_2}$ - $\underline{\text{CH}_2}$ - CH_2 - CH_2 - COS -), 1.37 (m, 4H, - S - CH_2 - CH_2 - $\underline{\text{CH}_2}$ -), 1.56 (m, 4H, - CH_2 - CH_2 - $\underline{\text{CH}_2}$ - CH_2 - COS -), 1.64 (tt, 4H, - S - CH_2 - $\underline{\text{CH}_2}$ - CH_2 - , J = 7.3 Hz, 7.3 Hz), 2.53 (t, 4H, - CH_2 - CH_2 - CH_2 - $\underline{\text{CH}_2}$ - COS - , J = 7.5 Hz), 2.85 (t, 4H, - S - $\underline{\text{CH}_2}$ - CH_2 - CH_2 - , J = 7.3 Hz).

一連の AA - BB 型ポリ(チオエステル)の ^1H NMR の結果を以下に示す。

ポリ(チオエステル)

Poly(hexanedithiol - malonate) ; δ (ppm) = 1.37 (m, 4H, - S - CH_2 - CH_2 - $\underline{\text{CH}_2}$ -), 1.59 (m, 4H, - S - CH_2 - $\underline{\text{CH}_2}$ - CH_2 -), 2.91 (t, 4H, - S - $\underline{\text{CH}_2}$ - CH_2 - CH_2 - , J = 7.4 Hz), 3.77 (s, 2H, - $\underline{\text{CH}_2}$ COS -).

Poly(hexanedithiol - succinate) ; δ (ppm) = 1.37 (m, 4H, - S - CH_2 - CH_2 - $\underline{\text{CH}_2}$ -), 1.59 (m, 4H, - S - CH_2 - $\underline{\text{CH}_2}$ - CH_2 -), 2.85 (t, 4H, - S - $\underline{\text{CH}_2}$ - CH_2 - CH_2 - , J = 7.4 Hz), 2.88 (s, 4H, - $\underline{\text{CH}_2}$ - COS -).

Poly(hexanedithiol - glutarate) ; δ (ppm) = 1.37 (m, 4H, - S - CH_2 - CH_2 - $\underline{\text{CH}_2}$ -)

-), 1.56 (m, 4H, - S - CH₂ - CH₂ - CH₂ -), 2.01 (t, 2H, - CH₂ - CH₂ - COS-, $J=7.2$ Hz), 2.60 (t, 4H, - CH₂ - CH₂ - COS-, $J=7.2$ Hz), 2.86 (t, 4H, - S - CH₂ - CH₂ - CH₂ -, $J=7.2$ Hz).

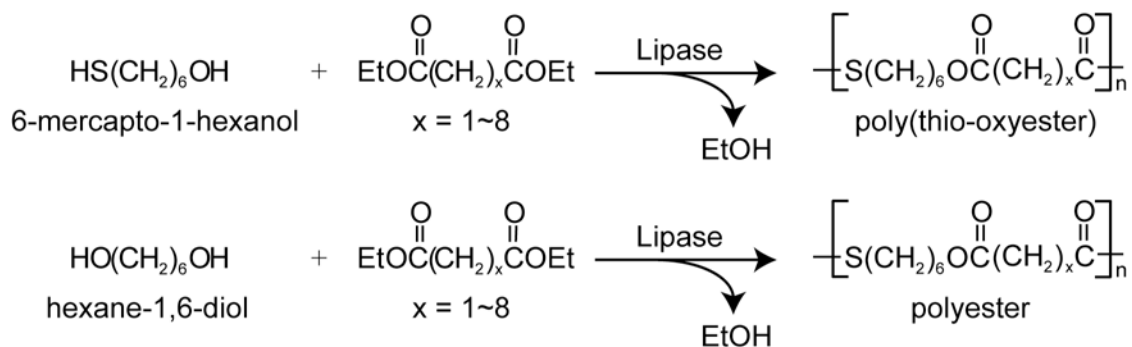
Poly(hexanedithiol - adipate) ; δ (ppm) = 1.36 (m, 4H, - S - CH₂ - CH₂ - CH₂ -), 1.56 (m, 4H, - CH₂ - CH₂ - COS -), 1.69 (tt, 4H, - S - CH₂ - CH₂ - CH₂ -, $J=6.9$ Hz, 6.9 Hz), 2.56 (t, 4H, - CH₂ - CH₂ - COS-, $J=6.6$ Hz), 2.85 (t, 4H, - S - CH₂ - CH₂ - CH₂ -, $J=6.9$ Hz).

Poly(hexanedithiol - pimelate) ; δ (ppm) = 1.37 (m, 4H, - S - CH₂ - CH₂ - CH₂ -), 1.56 (m, 6H, - CH₂ - CH₂ - CH₂ - COS -), 1.67 (tt, 4H, - S - CH₂ - CH₂ - CH₂ -, $J=7.6$ Hz, 7.6 Hz), 2.53 (t, 4H, - CH₂ - CH₂ - CH₂ - COS-, $J=7.4$ Hz), 2.85 (t, 4H, - S - CH₂ - CH₂ - CH₂ -, $J=7.4$ Hz).

Poly(hexanedithiol - suberate) ; δ (ppm) = 1.36 (m, 8H, - S - CH₂ - CH₂ - CH₂ -, - CH₂ - CH₂ - CH₂ - COS -), 1.56 (m, 4H, - CH₂ - CH₂ - CH₂ - COS -), 1.65 (tt, 4H, - S - CH₂ - CH₂ - CH₂ -, $J=7.4$ Hz, 7.4 Hz), 2.53 (t, 4H, - CH₂ - CH₂ - CH₂ - COS -, $J=7.5$ Hz), 2.85 (t, 4H, - S - CH₂ - CH₂ - CH₂ -, $J=7.4$ Hz).

Poly(hexanedithiol - azelate) ; δ (ppm) = 1.36 (m, 10H, - S - CH₂ - CH₂ - CH₂ -, - CH₂ - CH₂ - CH₂ - CH₂ - COS -), 1.56 (m, 4H, - CH₂ - CH₂ - CH₂ - CH₂ - COS -), 1.64 (tt, 4H, - S - CH₂ - CH₂ - CH₂ -, $J=7.4$ Hz, 7.4 Hz), 2.53 (t, 4H, - CH₂ - CH₂ - CH₂ - CH₂ - COS -, $J=7.4$ Hz), 2.85 (t, 4H, - S - CH₂ - CH₂ - CH₂ -, $J=7.4$ Hz).

さらに、熱特性比較のために相当するポリ(チオ - オキシエステル)、ポリ(エステル)も同様に合成した。すなわち、Scheme 2. 7に示すように、ヘキサン - 1,6 - ジチオールを等モルの6 - メルカプト - 1 - ヘキサノールまたはヘキサン - 1,6 - ジオールと置き換え、AA - BB 型ポリチオエステル合成と同様の実験操作を行なうことで、相当するポリ(チオ - オキシエステル)及びポリ(エステル)を得た。



Scheme 2.7 Enzymatic synthesis of poly(thio - oxyester) and polyester.

Poly(mercaptohexanol - sebacate) [$M_w = 16,900$ 、 $M_w/M_n = 1.9$]は収率 82 %で得られ、poly(hexanediol - sebacate) [$M_w = 75,000$ 、 $M_w/M_n = 1.8$]は収率 92 %で得られた。それぞれの ^1H NMR を Fig. 2.8, 2.9 に示した。

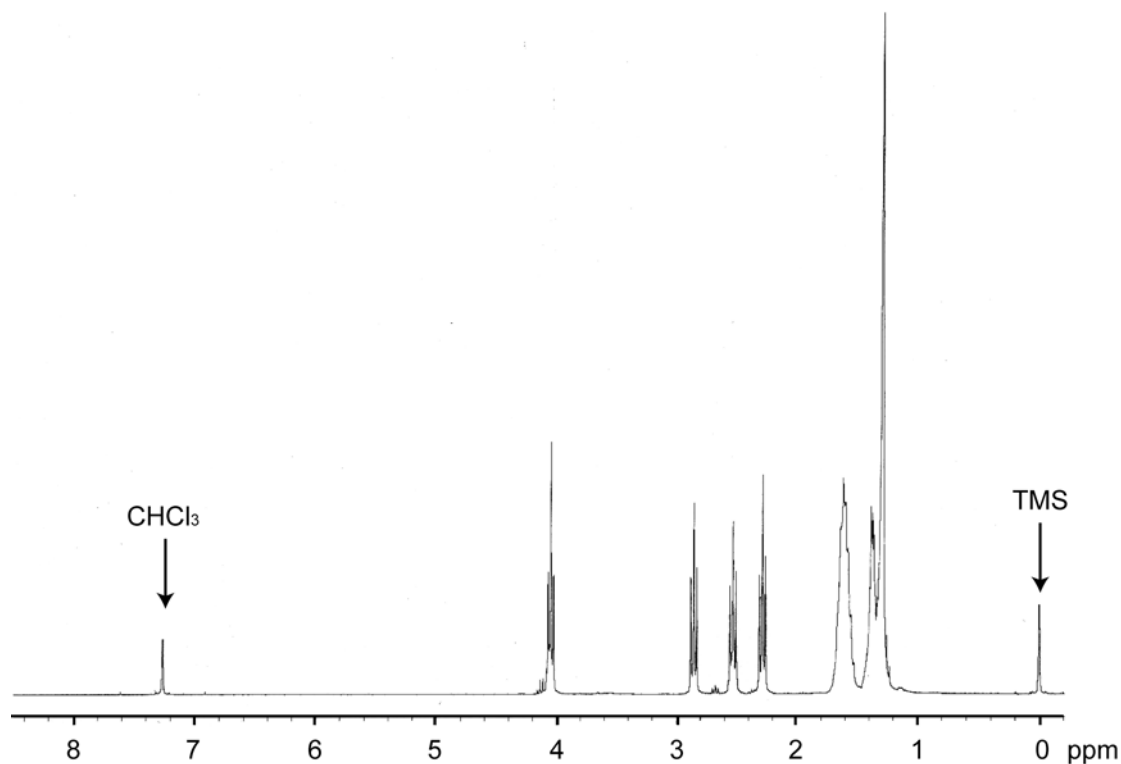


Fig. 2.8 300 MHz ^1H NMR of poly(mercaptohexanol - sebacate) in CDCl_3 .

Poly(mercaptohexanol - sebacate): ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3); δ (ppm) = 1.30 (m, 8H, -SOC-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-COO-), 1.38 (m, 4H, -S-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-O-), 1.61 (m, 8H, -S-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-O-, -SOC-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-COO-), 2.28 (t, 2H, -SOC-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-COO-, $J = 7.4$ Hz), 2.53 (t, 2H, -SOC-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-COO-, $J = 7.7$ Hz), 2.86 (t, 2H, -S-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-O-, $J = 7.4$ Hz), 4.05 (t, 2H, -S-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-O-, $J = 6.8$ Hz).

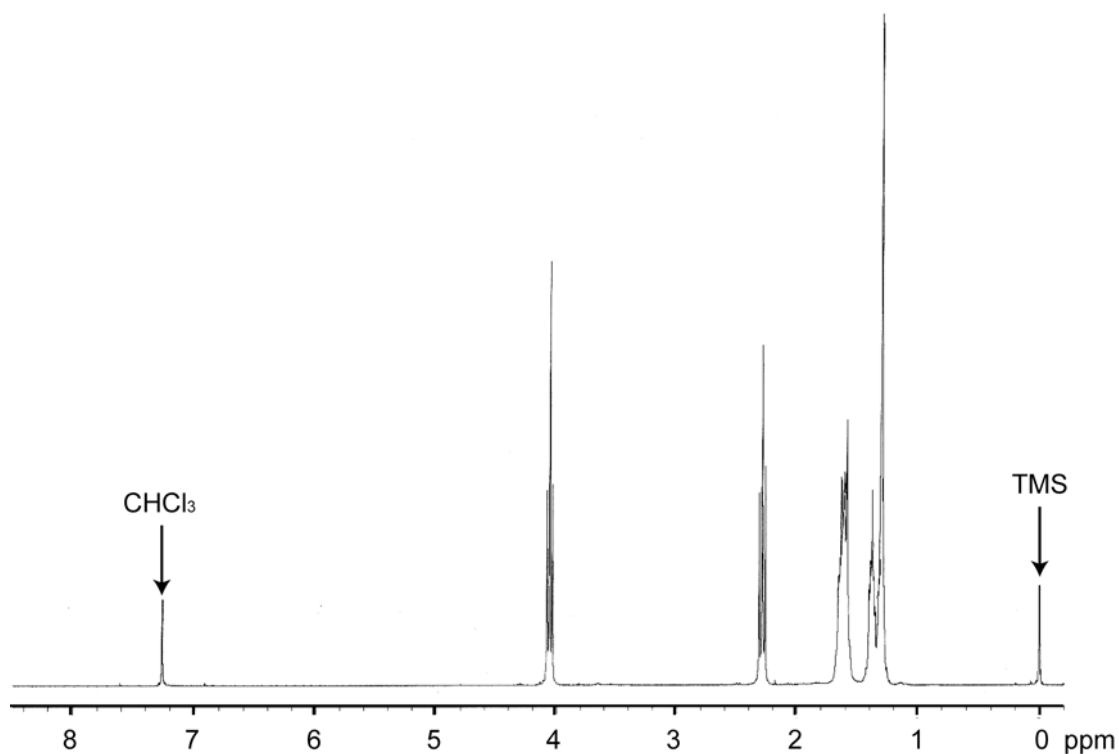


Fig. 2.9 300 MHz ^1H NMR of poly(hexanediol - sebacate) in CDCl_3 .

Poly(hexanediol - sebacate): ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3); δ (ppm) = 1.30 (m, 8H, -OOC-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-), 1.38 (t, 4H, -O-CH₂-CH₂-CH₂-, $J = 7.6$ Hz), 1.62 (m, 8H, -OOC-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-, -O-CH₂-CH₂-CH₂-), 2.29 (t, 4H, -OOC-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-, $J = 7.5$ Hz), 4.06 (t, 4H, -O-CH₂-CH₂-CH₂-, $J = 6.6$ Hz).

また、一連の AA - BB 型ポリ(チオ - オキシエステル)及びポリエステル¹の ^1H NMR

の結果を以下に示す。

ポリ(チオオキシエステル)

Poly(mercaptohexanol - malonate) ; δ (ppm) = 1.38 (m, 4H, - S - CH₂ - CH₂ - CH₂ - CH₂ - CH₂ - CH₂ - O -), 1.64 (m, 4H, - S - CH₂ - CH₂ - CH₂ - CH₂ - CH₂ - CH₂ - O -), 2.93 (t, 2H, - S - CH₂ - CH₂ - CH₂ - CH₂ - CH₂ - CH₂ - O - , $J = 7.2$ Hz), 3.58 (s, 2H, - SOC - CH₂ - COO -), 4.14 (m, 2H, - S - CH₂ - CH₂ - CH₂ - CH₂ - CH₂ - CH₂ - O -).

Poly(mercaptohexanol - succinate) ; δ (ppm) = 1.37 (m, 4H, - S - CH₂ - CH₂ - CH₂ - CH₂ - CH₂ - CH₂ - O -), 1.60 (m, 4H, - S - CH₂ - CH₂ - CH₂ - CH₂ - CH₂ - CH₂ - O -), 2.65 (t, 2H, - SOC - CH₂ - CH₂ - COO - , $J = 6.9$ Hz), 2.88 (t, 2H, - SOC - CH₂ - CH₂ - COO - , $J = 6.9$ Hz), 4.07 (t, 2H, - S - CH₂ - CH₂ - CH₂ - CH₂ - CH₂ - CH₂ - O - , $J = 6.6$ Hz).

Poly(mercaptohexanol - glutarate) ; δ (ppm) = 1.37 (m, 4H, - S - CH₂ - CH₂ - CH₂ - CH₂ - CH₂ - CH₂ - O -), 1.60 (m, 4H, - S - CH₂ - CH₂ - CH₂ - CH₂ - CH₂ - CH₂ - O -), 1.98 (tt, 2H, - SOC - CH₂ - CH₂ - CH₂ - COO - , $J = 7.4$ Hz, 7.4 Hz), 2.37 (t, 2H, - SOC - CH₂ - CH₂ - CH₂ - COO - , $J = 7.4$ Hz), 2.61 (t, 2H, - SOC - CH₂ - CH₂ - CH₂ - COO - , $J = 7.4$ Hz), 2.87 (t, 2H, - S - CH₂ - CH₂ - CH₂ - CH₂ - CH₂ - CH₂ - O - , $J = 7.4$ Hz), 4.06 (t, 2H, - S - CH₂ - CH₂ - CH₂ - CH₂ - CH₂ - CH₂ - O - , $J = 6.6$ Hz).

Poly(mercaptohexanol - adipate) ; δ (ppm) = 1.37 (m, 4H, - S - CH₂ - CH₂ - CH₂ - CH₂ - CH₂ - CH₂ - O -), 1.67 (m, 8H, - S - CH₂ - CH₂ - CH₂ - CH₂ - CH₂ - CH₂ - O - , - SOC - CH₂ - CH₂ - CH₂ - CH₂ - COO -), 2.32 (t, 2H, - SOC - CH₂ - CH₂ - CH₂ - CH₂ - COO - , $J = 6.9$ Hz), 2.57 (t, 2H, - SOC - CH₂ - CH₂ - CH₂ - CH₂ - COO - , $J = 7.4$ Hz), 2.86 (t, 2H, - S - CH₂ - CH₂ - CH₂ - CH₂ - CH₂ - CH₂ - O - , $J = 7.4$ Hz), 4.05 (t, 2H, - S - CH₂ - CH₂ - CH₂ - CH₂ - CH₂ - CH₂ - O - , $J = 6.6$ Hz).

Poly(mercaptohexanol - pimelate) ; δ (ppm) = 1.37 (m, 6H, - S - CH₂ - CH₂ - CH₂ - CH₂ - CH₂ - CH₂ - O - , - SOC - CH₂ - CH₂ - CH₂ - CH₂ - CH₂ - COO -), 1.62 (m, 8H, - S - CH₂ - CH₂ - CH₂ - CH₂ - CH₂ - CH₂ - O - , - SOC - CH₂ - CH₂ - CH₂ - CH₂ - CH₂ - COO -), 2.30 (t, 2H, - SOC - CH₂ - CH₂ - CH₂ - CH₂ - CH₂ - COO - , $J = 7.5$ Hz), 2.55 (t, 2H, - SOC - CH₂ - CH₂ - CH₂ - CH₂ - CH₂ - COO - , $J = 7.4$ Hz), 2.86 (t, 2H, - S - CH₂ - CH₂ - CH₂ - CH₂ - CH₂ - CH₂ - O - , $J = 7.4$ Hz), 4.05 (t, 2H, - S - CH₂ - CH₂ - CH₂ - CH₂ - CH₂ - CH₂ - O - , $J = 6.6$ Hz).

Poly(mercaptohexanol - suberate) ; δ (ppm) = 1.35 (m, 8H, - S - CH₂ - CH₂ - CH₂ - CH₂ - CH₂ - CH₂ - O -, - SOC - CH₂ - CH₂ - CH₂ - CH₂ - CH₂ - CH₂ - COO -), 1.48-1.76 (m, 8H, - S - CH₂ - CH₂ - CH₂ - CH₂ - CH₂ - CH₂ - O -, - SOC - CH₂ - CH₂ - CH₂ - CH₂ - CH₂ - CH₂ - COO -), 2.29 (t, 2H, - SOC - CH₂ - CH₂ - CH₂ - CH₂ - CH₂ - CH₂ - COO -, $J = 7.5$ Hz), 2.53 (t, 2H, - SOC - CH₂ - CH₂ - CH₂ - CH₂ - CH₂ - CH₂ - COO -, $J = 7.4$ Hz), 2.86 (t, 2H, - S - CH₂ - CH₂ - CH₂ - CH₂ - CH₂ - CH₂ - O -, $J = 7.4$ Hz), 4.05 (t, 2H, - S - CH₂ - CH₂ - CH₂ - CH₂ - CH₂ - CH₂ - O -, $J = 6.8$ Hz).

Poly(mercaptohexanol - azelate) ; δ (ppm) = 1.31 (m, 10H, - S - CH₂ - CH₂ - CH₂ - CH₂ - CH₂ - CH₂ - O -, - SOC - CH₂ - CH₂ - CH₂ - CH₂ - CH₂ - CH₂ - COO -), 1.48-1.76 (m, 8H, - S - CH₂ - CH₂ - CH₂ - CH₂ - CH₂ - CH₂ - O -, - SOC - CH₂ - CH₂ - CH₂ - CH₂ - CH₂ - CH₂ - COO -), 2.28 (t, 2H, - SOC - CH₂ - CH₂ - CH₂ - CH₂ - CH₂ - CH₂ - COO -, $J = 7.4$ Hz), 2.53 (t, 2H, - SOC - CH₂ - CH₂ - CH₂ - CH₂ - CH₂ - CH₂ - COO -, $J = 7.5$ Hz), 2.86 (t, 2H, - S - CH₂ - CH₂ - CH₂ - CH₂ - CH₂ - CH₂ - O -, $J = 7.2$ Hz), 4.05 (t, 2H, - S - CH₂ - CH₂ - CH₂ - CH₂ - CH₂ - CH₂ - O -, $J = 6.5$ Hz).

ポリ(エステル)

Poly(hexanediol - malonate) ; δ (ppm) = 1.39 (m, 4H, - O - CH₂ - CH₂ - CH₂ -), 1.66 (m, 4H, - O - CH₂ - CH₂ - CH₂ -), 3.38 (s, 2H, - CH₂ - COO -), 4.14 (t, 4H, - O - CH₂ - CH₂ - CH₂ -, $J = 6.6$ Hz).

Poly(hexanediol - succinate) ; δ (ppm) = 1.38 (m, 4H, - O - CH₂ - CH₂ - CH₂ -), 1.64 (m, 4H, - O - CH₂ - CH₂ - CH₂ -), 2.62 (s, 4H, - CH₂ - COO -), 4.08 (t, 4H, - O - CH₂ - CH₂ - CH₂ -, $J = 6.8$ Hz).

Poly(hexanediol - glutarate) ; δ (ppm) = 1.37 (m, 4H, - O - CH₂ - CH₂ - CH₂ -), 1.63 (m, 4H, - O - CH₂ - CH₂ - CH₂ -), 1.94 (m, 2H, - CH₂ - CH₂ - COO -), 2.37 (t, 4H, - CH₂ - CH₂ - COO -, $J = 7.2$ Hz), 4.06 (t, 4H, - O - CH₂ - CH₂ - CH₂ -, $J = 6.6$ Hz).

Poly(hexanediol - adipate) ; δ (ppm) = 1.37 (m, 4H, - O - CH₂ - CH₂ - CH₂ -), 1.63 (m, 8H, - O - CH₂ - CH₂ - CH₂ -, - CH₂ - CH₂ - COO -), 2.33 (t, 4H, - CH₂ - CH₂ - COO -, $J = 7.2$ Hz), 4.06 (t, 4H, - O - CH₂ - CH₂ - CH₂ -, $J = 6.6$ Hz).

- CH_2 - COO - , $J = 7.2$ Hz), 4.06 (t, 4H, - O - CH_2 - CH_2 - CH_2 - , $J = 6.8$ Hz).

Poly(hexanediol - pimelate) ; δ (ppm) = 1.38 (m, 6H, - O - CH_2 - CH_2 - CH_2 - ,
- CH_2 - CH_2 - CH_2 - COO -), 1.64 (m, 8H, - O - CH_2 - CH_2 - CH_2 - , - CH_2 - CH_2 - CH_2 - COO -), 2.30 (t, 4H, - CH_2 - CH_2 - CH_2 - COO - , $J = 7.5$ Hz), 4.06 (t, 4H, - O - CH_2 - CH_2 - CH_2 - , $J = 6.6$ Hz).

Poly(hexanediol - suberate) ; δ (ppm) = 1.36 (m, 8H, - O - CH_2 - CH_2 - CH_2 - ,
- CH_2 - CH_2 - CH_2 - COO -), 1.62 (m, 8H, - O - CH_2 - CH_2 - CH_2 - , - CH_2 - CH_2 - CH_2 - COO -), 2.29 (t, 4H, - CH_2 - CH_2 - CH_2 - COO - , $J = 7.5$ Hz), 4.06 (t, 4H, - O - CH_2 - CH_2 - CH_2 - , $J = 6.6$ Hz).

Poly(hexanediol - azelate) ; δ (ppm) = 1.37 (m, 10H, - O - CH_2 - CH_2 - CH_2 - ,
- CH_2 - CH_2 - CH_2 - CH_2 - COO -), 1.62 (m, 8H, - O - CH_2 - CH_2 - CH_2 - , - CH_2 - CH_2 - CH_2 - COO -), 2.30 (t, 4H, - CH_2 - CH_2 - CH_2 - COO - , $J = 7.5$ Hz), 4.06 (t, 4H, - O - CH_2 - CH_2 - CH_2 - , $J = 6.6$ Hz).

尚、各試料の MALDI - TOF MS 測定、熱特性の解析は poly(11MU)測定と同様に行なった。

2.3.3 ポリ(チオエステル)の生分解性評価

2.3.3.1 BOD 法

(1) 評価法

合成した poly(hexanedithiol - glutarate)の生分解性を生物化学的酸素要求量(BOD)を測定することで評価した。BOD の測定は基本的には JIS K 6950 に従い行なった。生分解率は(2.1)式から算出した。

$$\text{生分解率(\%)} = [\text{BOD}(\text{mgO}_2) / \text{ThOD}(\text{mgO}_2)] \times 100 \quad (2.1)$$

ここで、BOD 及び ThOD の定義を記す。

・生物化学的酸素要求量 BOD (biochemical oxygen demand)

有機物が微生物によって好氣的条件下で分解、資化される間に消費される酸素の量。試験物質 1.0 mg または 1.0 g 当たりの mg - 酸素量として表される。

・理論的酸素要求量 ThOD (theoretical oxygen demand)

化学物質が、完全に酸化されるために必要とされる分子式から計算される理論酸素要求量。試験物質 1 mg または 1 g 当たりの必要とされる mg - 酸素量として表される。

Fig. 2.10 に用いた BOD センサーシステムの模式図を示す。

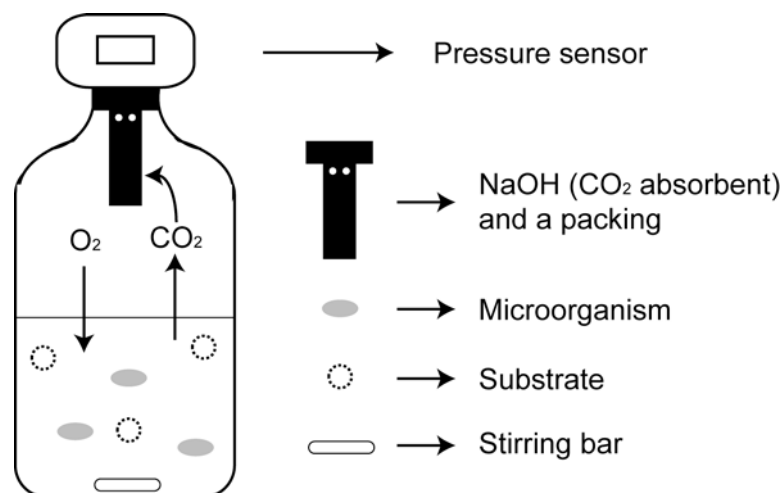


Fig. 2.10 BOD sensor system.

培養液中の有機物が微生物によって好氣的生物酸化される際には酸素が消費され、それに伴って放出される二酸化炭素は培養容器上部に取り付けたキャップ内に仕込んだ水酸化ナトリウムによって吸収される。従って、消費された酸素量に相当する分の内圧

が低下する。本研究で用いた圧力センサーは培養開始直後の内圧と一定時間後の内圧との差を測定し、この圧力差から培養液 1 L 当たり消費された酸素量 (mgO_2/L) を算出して表示する。BOD センサーが表示する値(BOD'値)は BOD 値と培養液 1 L に含まれる試料量との積に等しい。従って、培養液 1 L に含まれる試料量を $A \text{ mg}$ としたとき、(2.1) 式の分母には ThOD 値を A 倍にした値 (ThOD'値)、分子には BOD'値を代入することで生分解率を算出することができる。ただし、培養で消費される酸素量は菌体が試料を酸化するのに要した酸素量と基礎呼吸に要した酸素量との和であるので、生分解率の算出では試料溶液の BOD'値からブランク試験の BOD'値を差し引いた値を用いる必要がある。

(2) 測定条件

試験物質の濃度	74.8 ppm
試験物質の ThOD ($\text{mgO}_2/\text{1g sample}$)	2141.9 mg
基準物質(アニリン)の濃度	51.6 ppm
基準物質の ThOD ($\text{mgO}_2/\text{1g sample}$)	3178.4 mg
活性汚泥の添加濃度	30 mg / L

25 °C のイオン交換水を満たした恒温槽中、炭酸ガス吸収剤として水酸化ナトリウム共存下、攪拌子を付した密閉された測定器中で 28 日間行なった。

(3) 溶液調製

(a) 植種源

横浜市港北区下水処理場から活性汚泥を採取し、植種源として用いた。エアーポンプを用いて 3 時間ばっ気をすることで、活性汚泥中の有機物を分解させた。

(b) 懸濁固形物質濃度の測定

JIS K 6950 記載の方法に従った。

(c) 標準試験培養液の調製

JIS K 6950 記載の方法に従った。

・水

イオン交換膜を通した後蒸留した水を、エアーポンプを用い、3 時間以上ばっ気したものをを用いた。

・溶液 A

無水リン酸二水素カリウム (KH_2PO_4)	8.50 g
無水リン酸水素二カリウム (K_2HPO_4)	21.75 g
リン酸水素二ナトリウム・十二水和物 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	44.60 g
塩化アンモニウム (NH_4Cl)	1.70 g
以上を水に溶解させ 1000 mL にした。	

・溶液 B

硫酸マグネシウム七水和物 ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	22.50 g
を水に溶解させ 1000 mL にした。	

・溶液 C

塩化カルシウム (CaCl_2)	27.50 g
を水に溶解させ 1000 mL にした。	

・溶液 D

塩化鉄(III)六水和物 ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0.25 g
を水に溶解させ 1000 mL にした。	

・標準試験培養液

試験培養液 1000 mL を調製するため、溶液 A を 10 mL, 溶液 B~D を各 1 mL, それぞれ 500 mL の水に加えた。これにさらに水を加え 1 L とした。

調製後、1 N の塩酸を用いて pH を 7.0 に設定した。

(d) 測定方法

あらかじめはかり取った poly(hexanedithiol - glutarate) 18.7 mg を磁気攪拌子を付した培養容器に取り、そこへ植種液 7.5 mL 及び無機塩培地 242.5 mL を添加した。圧力センサーをきつく閉め、培養容器を密閉して測定を開始した。生分解試験の標準物質としてアニリンを用いた。アニリンはマイクロシリンジを用いて 12.5 μL を秤量することでアニリンの ThOD' 値を 160.0 mgO_2/L と設定した。

2.3.3.2 資化菌の単離

培養液を植種源とし、poly(hexanedithiol - glutarate)を唯一の炭素源として集積培養を行なうことによって資化菌の単離を行なった。

集積培養に用いた植種液、液体培地及び固形培地の調製は以下のようにして行なった。

植種液

横浜市港北区下水処理場から活性汚泥を採取し、植種源として用いた。

液体培地

蒸留水 1 L 当たりの炭素源及び無機塩の組成を以下に示す。この無機塩培地 100 mL に唯一の炭素源として poly(hexanedithiol - glutarate) 200 mg (0.2 wt%)を加え、pH 7.0 に調整し 0.2 wt% poly(hexanedithiol - glutarate)を含む液体培地を調製した。

炭素源:	poly(hexanedithiol - glutarate)	2000 mg
無機塩:	塩化アンモニウム (NH_4Cl)	2000 mg
	リン酸水素二カリウム (K_2HPO_4)	200 mg
	硫酸マグネシウム・七水和物 ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	200 mg
	塩化カルシウム・二水和物 ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	2 mg
	硫酸鉄・七水和物 ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	1 mg
	硫酸マンガン・四水和物 ($\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	2 mg
	硫酸亜鉛・七水和物 ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	7 mg
	硫酸銅・五水和物 ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	0.05 mg
	塩酸チアミン ($\text{VB}_1 \cdot \text{HCl}$)	0.05 mg

固体平面培地

上記 0.2 wt% poly(hexanedithiol - glutarate)を含む液体培地 200 mL に寒天粉末 4 g (2 wt%)を添加し、オートクレーブで滅菌した後、滅菌シャーレに約 25 mL 流し入れ、固まるまで室温で静置することで平面培地を調製した。また、保存用スラントの作成では、滅菌後の培地約 5 mL を試験管に流し入れた後、シリコン栓をして再びオートクレーブで滅菌を行なった。

同様に、肉エキス入り寒天培地を用いることでスラントを作成した。液体培地 200 mL に 3.0 g の肉エキス入り寒天粉末と 1.0 g の寒天粉末を添加し、オートクレーブで滅菌した後、培地約 5 mL を試験管に流し入れ、シリコン栓をして再びオートクレーブで滅菌を行なった。

用いた肉エキス入り寒天粉末の組成を以下に記す。

組成 (35.0 g/L)

肉エキス	5.0 g
ペプトン	10.0 g
塩化ナトリウム	5.0 g
寒天粉末	15.0 g

集積培養は Fig. 2.11 に示すように液体培地及び平面培地で行なった。

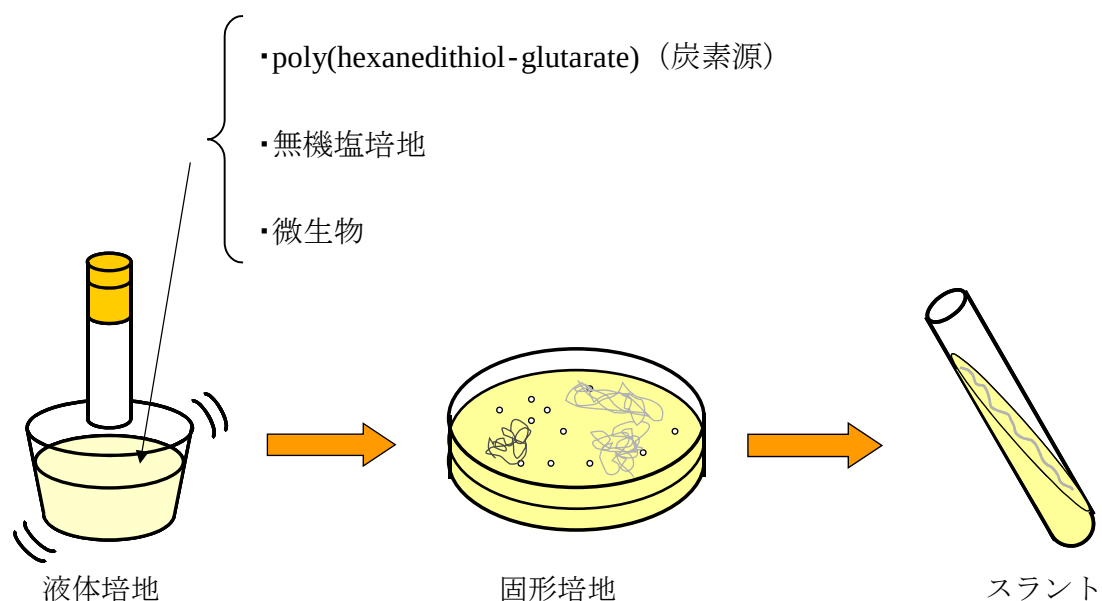


Fig. 2.11 Isolation of a poly(hexanedithiol - glutarate) assimilating microbes.

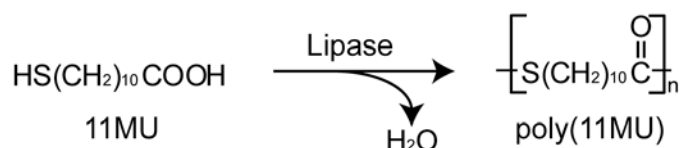
液体培地 100 mL を 500 mL 坂口フラスコに取り、これに植種液（活性汚泥）0.2 mL を添加して培養液を調製し、ウレタン栓をして 30 °C で好氣的に振とう培養を行なった。

液体培地の濁度から菌体の増殖を確認するため OD₆₆₀ 値の測定を行なった。3 週間後、OD₆₆₀ 値が 0.20 まで増えたことを確認し、培養液を滅菌した生理食塩水で 10⁶ 倍希釈し、これを 0.1 mL 固形培地に塗布し、30 °C で培養した。2 週間後、菌体の生成を確認した。それぞれ 0.2 wt% poly(hexanedithiol - glutarate) を含むスラント及び肉エキス入り寒天培地を用いたスラントに一白金耳植菌した。これらのスラントを 30 °C で培養し菌体の生育を確認し、4 °C にて保存した。

2.4 結果・考察

2.4.1 酵素触媒を用いた重縮合による poly(11MU)の合成

本節では、Scheme 2.8 に 11MU の酵素触媒重合について検討した。



Scheme 2.8 Synthesis of poly(11MU) by enzymatic polycondensation.

(1) 酵素スクリーニング

11MU の重合について起源の異なる 5 種類のリパーゼを用いて検討を行なった。モノマー転化率は低分子用 SEC (K - 801 カラム)用い、モノマー濃度に対するピーク面積をプロットし、検量線を作成することで算出した。11MU は測定開始から 6.9 min で検出された。各モノマー濃度の SEC チャートを Fig. 2.12 に、得られた検量線を Fig. 2.13 に示す。

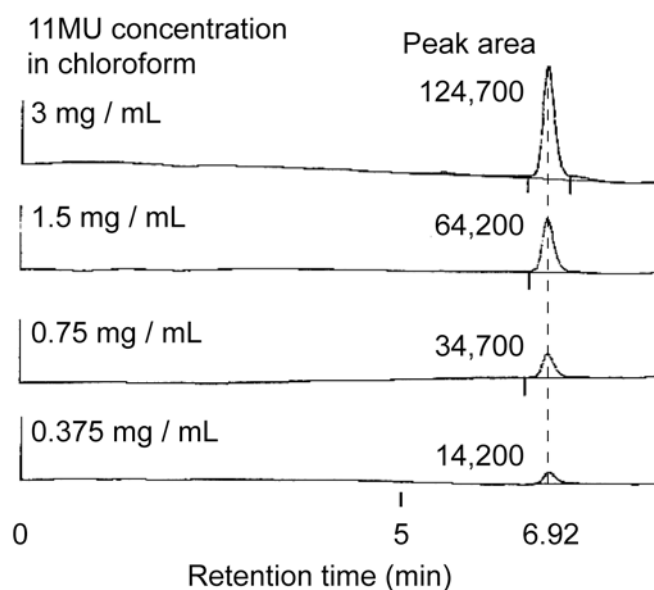


Fig. 2.12 SEC chart for calibration curve of 11MU.

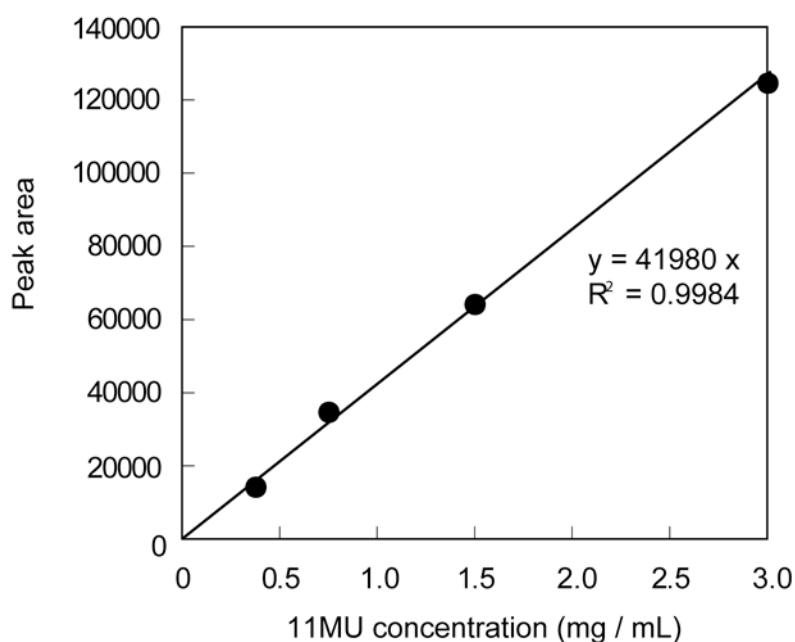


Fig. 2.13 Calibration curve of 11MU.

Fig. 2.13 の検量線を用い、各種リパーゼを Scheme 2.8 に示す重縮合に用いた際のモノマー転化率を求めた。結果を Table 2.7 に示す。

Table 2.7 Polymerization of 11MU using lipases from various origins at 70 °C.

Entry	Lipase	Conv. (%)	M_w	M_w/M_n
1	<i>Candida antarctica</i> (lipase CA)	84	2,100	1.9
2	<i>Burkholderia cepacia</i> (PS - C)	47	700	1.6
3	<i>Rhizomucor miehei</i> (lipase RM)	< 5	< 400	1.4
4	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (AK)	< 5	< 400	1.5
5	<i>Candida rugosa</i> (CR)	< 5	< 400	2.0
6	Thermally deactivated lipase CA	< 5	< 400	1.7
7	Blank	< 5	< 400	2.0

Reaction conditions : A mixture of 11MU (60 mg) and 60 wt% enzyme (relative value to 11MU) was reacted at 70 °C for 1 day with molecular sieves 4A placed at the top of the vial.

Table 2.7 より、11MU はリパーゼ CA 及び PS - C を用いたときに、モノマーの転化が認められた。さらに、リパーゼ CA を用いたとき、重合の進行が認められた。酵素起源によって、全く反応しないものも認められた。Entry 6 より、熱失活させたリパーゼ CA では全く反応の進行がみられなかった。以上のことから、本反応が酵素の触媒作用

によることが確認された。

本条件で、リパーゼ CA を用いたときに最も顕著に反応が進行した要因の 1 つとして、リパーゼ CA が固定化されていることが挙げられる。固定化酵素は比較的、熱や有機溶媒に対して強い耐性をもつことが知られている⁷²⁾。得られた反応物の ^1H NMR の測定結果から、わずかでもチオエステル結合の形成 [$\delta(\text{ppm}) = 2.85$ (t, 2H, $-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-(\text{CH}_2)_6-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CO}-$, $J = 7.6$ Hz)] が認められたものは Entry 1 ~ 3 であり、それらの実験で用いたリパーゼはいずれも固定化されていた。

リパーゼ CA の立体構造は PROTEIN DATA BANK に保管されており、Fig. 2.14 に示す通りである。

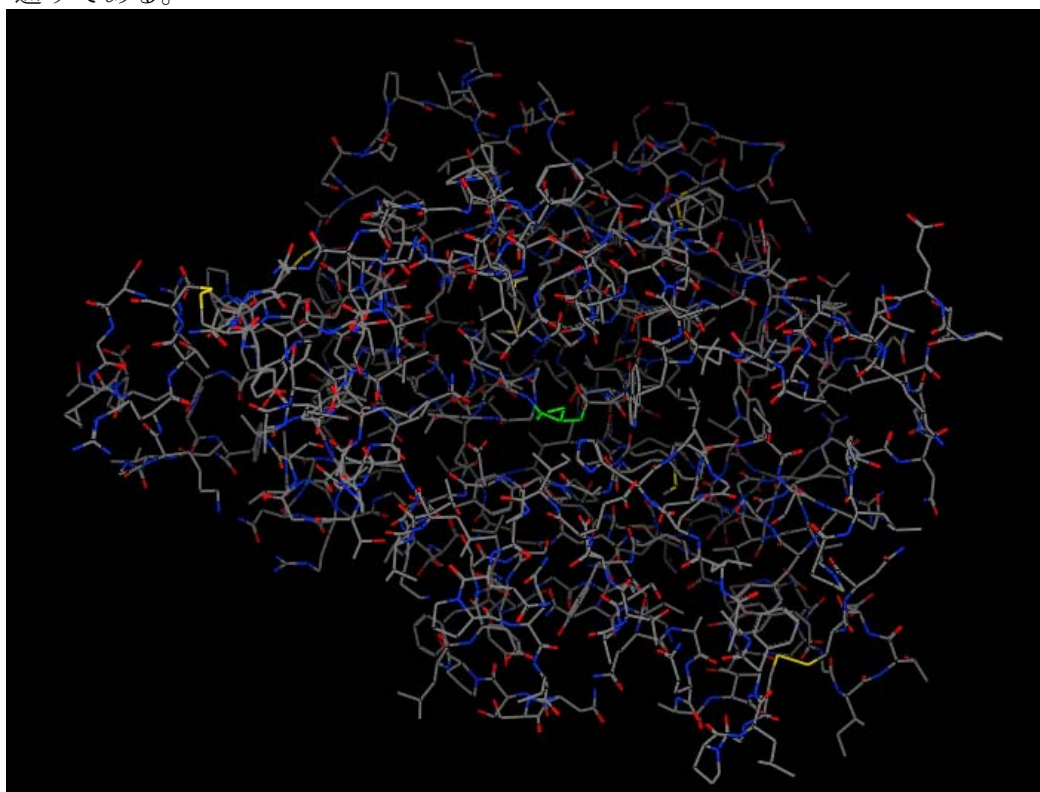


Fig. 2.14 Structure of lipase CA (Ser - 105 shown in green).

リパーゼ CA は N 末端から 105 番目のセリン残基(Ser^{105})を活性中心とする酵素であることが明らかにされている⁷³⁾。また、活性中心近傍の His^{224} , Asp^{187} が協奏的に作用することで、 Ser^{105} の活性化を促すことが知られている。本重合反応の反応機構に関する詳細は後述する。

Fig. 2.14 より、リパーゼ CA の活性中心近傍のポケットには基質である 11MU が入り込むための空間的な余裕が十分に確認される。活性ポケットの最も狭い部分でさえ、アミノ酸残基間に $8\text{\AA}$ 程度の距離があり、基質である 11MU は容易に取り込まれ得る。リパーゼ CA は 12 - ヒドロキシステアリン酸など側鎖を有する化合物に対しても有効な重合触媒になることが報告されており、幅広い基質認識性を有することを示している。

74, 75)。

(2) モレキュラーシーブス 4A (MS 4A) の効果

リパーゼ本来の作用はトリグリセリドを加水分解し、脂肪酸を遊離することである。一方で、酵素の触媒作用は一般的に可逆性を示すことが知られている。本研究では、その可逆性に着目し、重合触媒として酵素を用いた。従って、目的とする重合反応を効率的に進行させるためには、反応の進行に伴い発生する縮合物を効率的に除去することで反応の平衡を傾ける必要があると考えられる。そこで、Fig. 2.4 に示す反応系を構築し、モレキュラーシーブスを気相中で用いることで、縮合物の効率的除去を試みた。MS 4A の主な特徴は以下の通りである⁷⁶⁾。

- ・ 分子径 4Å以下の分子(水、メタノール、エタノール、二酸化炭素等)のみを選択的に吸着する。
- ・ 気化した試料中からの水分吸着や選択吸着が行なえる。
- ・ 加熱、減圧等により吸着物を脱着・回収することができ、また再生を行なうことができる。
- ・ 理論的には自重の約 20 ~ 25 %程度の乾燥能力を有する。

以上の特徴を有することから、MS 4A を使用することで、本反応の進行に伴い、縮合物として生成する水を効果的に補足し、重合反応が促進されるのではないかと期待される。また、縮合物を減圧環境で除去するよりも、酵素触媒に対する負荷や消費エネルギーの観点からも優位性を有する手法であると考えられる。Fig. 2.15 にモレキュラーシーブスを用いた際の重合結果を示す。

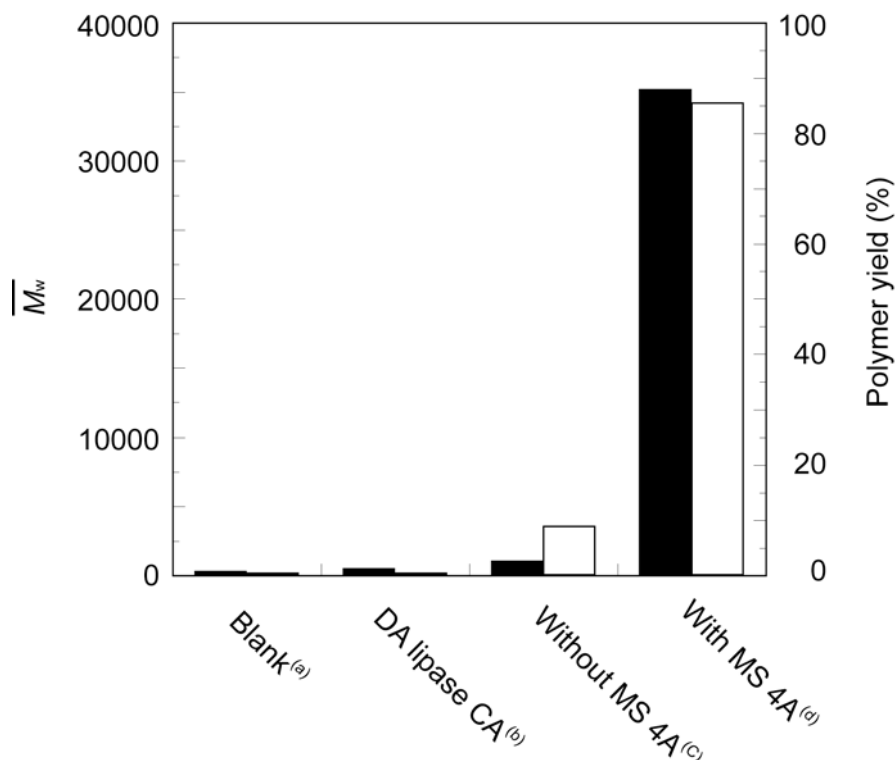


Fig. 2.15 Effects of molecular sieves 4A on polymerization of 11MU.

■ : M_w , □ : polymer yield

Reaction conditions : 11MU (60 mg) was polymerized in bulk at 110 °C for 2 days without lipase CA and with molecular sieves 4A (MS 4A) (a), with deactivated lipase CA (60 wt %) and MS 4A (b), with lipase CA (60 wt%) and without MS 4A (c), with lipase CA (60 wt%) and with MS 4A (d).

Fig. 2.15 より、以下のことが明らかとなった。

- ① (c)と(d)を比較することで MS 4A を用いることで重合反応が顕著に促進されたことが理解できる。
- ② (a), (b)と(d)を比較することで 110 °Cにおいても酵素の触媒作用により重合が進行していることが理解できる。

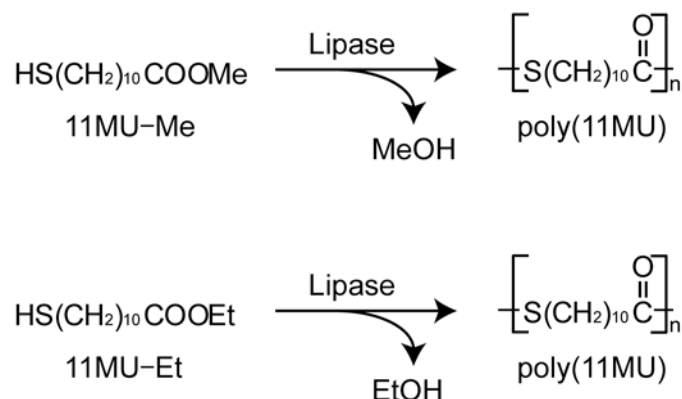
実際に、(c)の MS 4A を用いない条件では $M_w = 900$ のオリゴマーしか生成しないのに対して、(d)の MS 4A を用いる条件では $M_w = 34,000$ のポリマーが生成した。また、ポリマー収率も 8 %から 86 %へと変化し、大幅な向上も確認された。

Fig. 2.4 に示したアルミホイルで作製したモレキュラーシーブス用簡易容器には、MS 4A を約 1 g 充填することが可能である。反応に用いた 11MU 60 mg (0.27 mmol) からは、最大 4.86 mg (0.27 mmol)の水が縮合に伴い発生する。前述の通り、MS 4A は

理論的に自重の 20～25 % 程度の乾燥能力を有することから、反応の進行に伴い発生する縮合水を吸収するには十分量の MS 4A が系内に存在することも併せて確認した。

MS 4A を用いることで、重縮合反応の顕著な促進が確認されたことから、以後の検討は全て同様の反応系を用いることとした。

(3) 基質のカルボキシル末端の影響



Scheme 2.9 Synthesis of poly(11MU) by enzymatic polycondensation.

(2) の検討から、分子量増大のためには縮合物の効率的除去が非常に重要であることが明らかとなった。そこで Scheme 2.9 に示す通り、11MU-Me 及び 11MU-Et を用いて、同様に実験を行なった。基質として 11MU ではなく、11MU-Me あるいは 11MU-Et を用いることで、反応に伴い発生する縮合物が水からメタノールあるいはエタノールとなる。縮合物の沸点はそれぞれ、水 … 100 °C、メタノール … 64.7 °C、エタノール … 78.3 °C であり、縮合物の沸点が低下することで、より効果的な MS 4A への吸着が起こり得ると考えた。結果を Table 2.8 に示す。

Table 2.8 Effect of end group on enzymatic synthesis of poly(11MU).

Monomer	M_w	M_w/M_n	Polymer yield (%)
11MU	22,600	3.8	81
11MU-Me	4,500	3.5	53
11MU-Et	3,200	3.1	47

Reaction conditions : Each monomer (60 mg) was polymerized in bulk at 110 °C for 1 day with lipase CA (60 wt%) with MS 4A placed at the top of the vial.

11MU-Me と 11MU-Et では縮合物の沸点が低い 11MU-Me を用いたときにより重合の進行がみられた。これは、縮合物の除去効率に起因するものと考えられる。しかしながら、縮合物の沸点が一番高く、一見、重合は進行しづらいと考えられた 11MU を基質として用いたときに、最も重合の進行が確認された。この点について考察する。

本反応はいずれもバルク条件下で行なっている。従って、基質の熔融状態においては基質自身があたかも溶媒であるかの如き役割も担うことが想定される。いずれの基質もメチレン鎖が比較的長いことから、基質自身の疎水性は相当高いことが容易に想像される。従って、縮合で発生する水はメタノールやエタノールと比べて基質自身と混和せずに速やかに気相中の MS 4A へ除去されたことが考えられる。一方、11MU-Me や 11MU-Et を用いた場合は、縮合物の沸点は低いものの、熔融状態の基質と混和し易く、反応系上部の MS 4A に吸着される前に逆反応が進行してしまった可能性が考えられる。すなわち、縮合物の沸点よりも、縮合物自身の溶媒、基質との溶解性が得られるポリマーの分子量に顕著な影響を与えたものと考えられる。また、トルエン、*o*-キシレン、シクロヘキサン等の有機溶媒中でも同様に本重合反応を検討したが、いずれもバルク中で行った反応よりも分子量の増加は確認されなかった。これは、モノマーの基質濃度が減少し反応の平衡が重合側へと十分に傾かなかったためと思われる。

Yanagishita らは 70 °C、アニソール中でリパーゼ CA を用いた重縮合によるポリエステルウレタンの合成を行ない、末端カルボン酸型モノマーからは $M_w = 126,000$ 、末端メチルエステル型モノマーからは $M_w = 40,000$ のポリマーがそれぞれ得られたと報告している⁷⁷⁾。反応条件が異なるため、単純に比較することは困難であるが、これらの結果からも末端カルボン酸型モノマーを用いた方が、結果的に逆反応が抑制され酵素触媒重合は進行し易いことが示唆される。

(4) MALDI - TOF MS によるオリゴマー分子の構造解析

重縮合による生成物の詳細な構造解析を MALDI - TOF MS を用いて行なった。MALDI - TOF MS は試料とマトリックスが混合した結晶にパルスレーザーを照射して試料分子をイオン化する方法であり、タンパク質、難揮発性、熱不安定物質のイオン化によく用いられる⁷⁸⁾。ポリマー分子は非常にイオン化されづらかったために測定することが困難であった。従って、重合時間を 6 時間に限定し反応初期の分子量 3,000 未満の低分子領域について解析を行なった。Fig. 2.16 に MALDI - TOF MS スペクトルを示す。

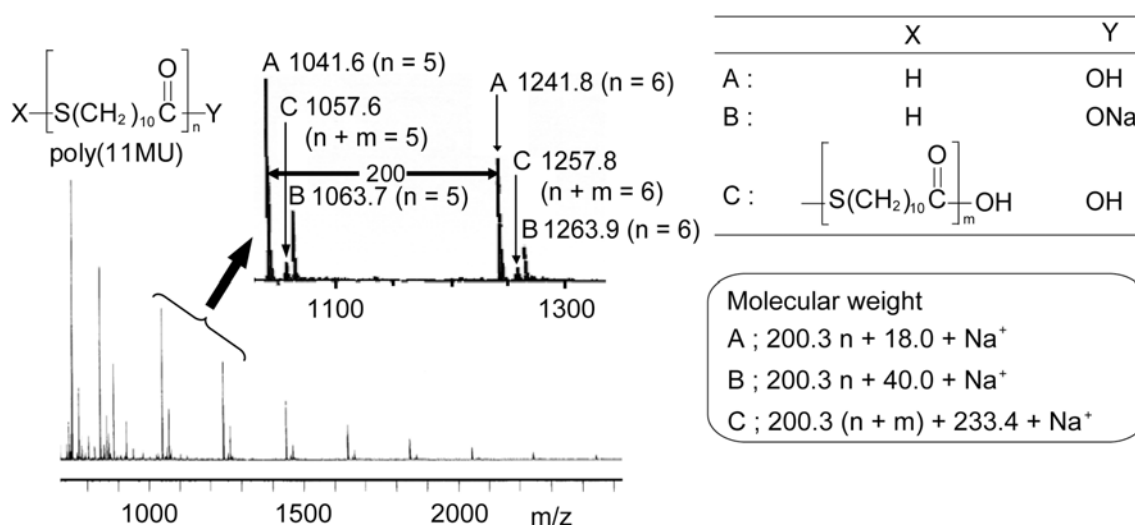


Fig. 2.16 MALDI - TOF MS spectrum of poly(11MU).

Reaction conditions : A mixture of 11MU and lipase CA (60 wt %) was reacted in bulk at 110 °C for 6 h with MS 4A placed at the top of the vial.

3種類の周期的なピークがそれぞれ 200 m/z 間隔で確認された。200 m/z はちょうど poly(11MU)の1ユニットに相当する。両末端にチオールとカルボン酸を有する分子構造をもった poly(11MU) (ピーク A) と共に末端のカルボキシル基がナトリウム塩となったもの (ピーク B) 及び分子内にジスルフィド結合を1ヶ所もつもの (ピーク C) と同じ分子量を示すピークが周期的に確認された。ナトリウム塩は検出時にイオン化助剤として用いた NaBr が付加したものである。化合物によって、MALDI - TOF MS 検出時にカルボキシル末端が塩となって検出される現象は、一般的にしばしば確認される⁷⁹⁾。また、チオールは非常に酸化され易く、空気酸化などにより容易にジスルフィド結合を形成する⁸⁰⁾。実際に、得られた poly(11MU)の¹H NMR においてもジスルフィド結合に隣接するメチレン(-CH₂-S-S-CH₂-)に帰属されるピークが $\delta = 2.70$ ppm に確認される。

重縮合は想定した反応機構で進行し、一部の末端チオールが酸化されジスルフィド結合になっていることが確認された。ジスルフィド結合の生成を抑制するためには、反応系内の酸素を可能な限り除く必要があると思われる。これにはアルゴン、窒素などの不活性気体フロー中で反応を行うといった対策が考えられる。

(5) 反応温度

反応温度は、ポリマーの溶解性や縮合物の効率的除去に大きな影響を及ぼすものと考

えられる。そのために、分子量及びポリマー収率を決定する大きな因子になり得る。そこで、本反応の至適温度を決定するべく、70 °C ~ 130 °Cの範囲で1日間反応を行った。その結果を Fig. 2.17 に示す。

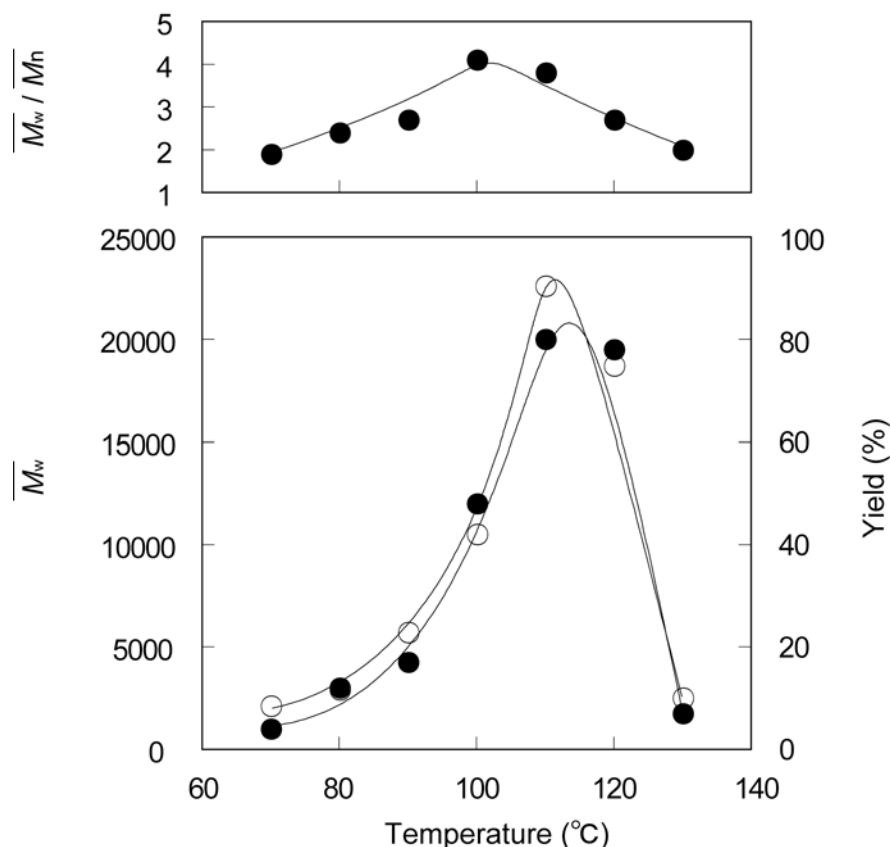


Fig. 2.17 Effect of reaction temperature on polymerization of 11MU.

● : M_w and M_w/M_n , ○ : yield

Reaction conditions : A mixture of 11MU (60 mg) and lipase CA (60 wt%) was reacted in bulk for 1 day with MS 4A placed at the top of the vial.

分子量、ポリマー収率ともに 110 °C で最大となった。110 °C は一般的な酵素反応と比較するとかなり高温である。Novozymes 社の製品安全データシートによると、リパーゼ CA によるラウリン酸のプロピルエステル化は 70 ~ 80 °C 程度で最も良好に進行すると記されている。また、リン酸緩衝液中でのリパーゼ CA を用いた酢酸エステルの加水分解は 40 °C で至適温度となることが報告されている⁸¹⁾。

酵素活性と反応温度の関係は比較的外部環境に依存性が高いことが知られている。リパーゼ CA の至適温度は親水性溶媒中よりも疎水性溶媒中でより高くなるとされている⁸²⁾。これには、酵素の熱失活のメカニズムが大きく関係していると思われる。酵素の熱失活の要因は様々であるが、主に熱によりタンパク質中の自由水が奪われる過程で、タンパク質の高次構造が崩れることで起こるとされている⁸³⁾。疎水性有機溶媒中など

酵素が比較的乾燥した状態で使用する条件ではリパーゼ、プロテアーゼ、エステラーゼなど種々の酵素が 90 - 120 °C 程度の高温でも十分に活性を有することが報告されている⁸⁴⁻⁸⁶⁾。Turner らは、リパーゼ CA によるパルミチン酸エステルの加水分解が *t*-ブチルベンゼン中、130 °C でも進行することを示している⁸⁷⁾。また、酵素の結合水を除去するには 200 °C 以上の高温が必要であるとする報告も存在する⁸⁷⁾。

本反応条件では、120 °C までは重合が確認された。しかし、130 °C からは顕著な重合性の低下が確認された。これは、先に記した酵素の熱失活が原因であると考えられる。また、本重合系にて 110 °C でも酵素の触媒作用により重合が進行していることは、前述の(2)の考察で示した。さらに、110 °C で重合が最も進行した主要因として、主に 2 つのことが挙げられる。

1 つ目は、縮合水の除去効率である。水の沸点が 100 °C であることから、100 °C 以上では容易に縮合水が気体となり気相中のモレキュラーシーブス 4A に吸着されることが期待される。そのために、逆反応が抑制されより高分子量体が得られると考えられる。実際に、90 °C → 100 °C → 110 °C と反応温度が上がるにつれて重量平均分子量も 5,700 → 10,500 → 22,600 と増加する。

2 つ目は、ポリマーの溶解性である。反応系が固化してしまうと、固定化酵素中の活性部位に基質が取り込まれることは困難となる。バルク条件で反応を行っているため、十分な分子量を得るためには、生成ポリマーの融点以上の反応温度が必要であると考えられる。後述するが、poly(11MU)の T_m は 105.4 °C を示した。そのために、ポリマーの融点以上である、110 °C でエステル交換反応がより顕著に進行し分子量の向上につながったものと思われる。

以上の実験結果から、酵素触媒によるポリチオエステルの合成はある程度的高温で達成されることが認められた。リパーゼ CA を用いたチオエステル結合の加水分解反応においては、40 °C ではチオールによる求核攻撃が全く起こらないため逆反応が抑制されるといった報告も存在する⁸⁸⁾。このことから、チオールによる基質 - 酵素複合体への求核攻撃はアルコールによる求核攻撃よりも一般的に進行しづらいことが予測される。

(6) 酵素量

11MU に対する酵素濃度を 30 ~ 70 wt % の範囲で変化させ、酵素濃度が重縮合に及ぼす影響について検討した。その結果を Fig. 2.18 に示す。

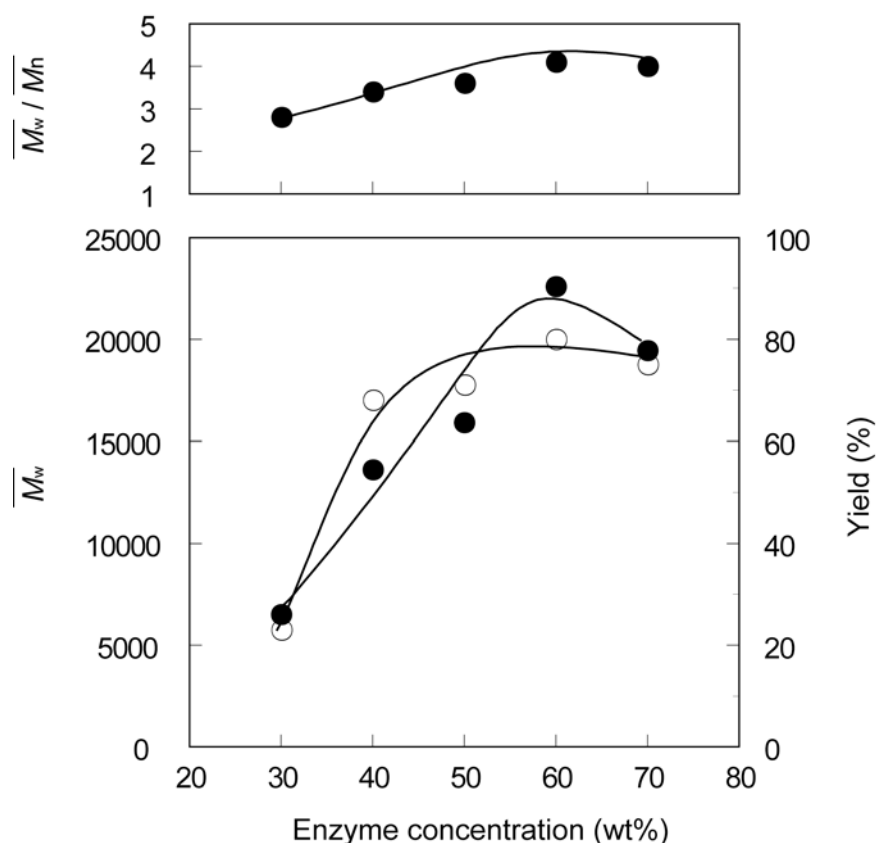


Fig. 2.18 Effect of enzyme concentration on polymerization of 11MU.

● : M_w and M_w/M_n , ○ : yield

Reaction conditions : A mixture of 11MU (60 mg) and lipase CA was reacted in bulk at 110 °C for 1 day with MS 4A placed at the top of the vial.

60 wt%のリパーゼ CA を用いたときに、最も分子量及びポリマー収率の増加がみられた。110 °Cでは徐々に酵素の失活も起こりうるため、ある程度の酵素量が必要となる。リパーゼ CA はアクリル樹脂に固定化されている状態で存在する。実際に含まれる酵素量は自重の 1 wt%程度で、その他は固定化剤に相当する⁸⁹⁾。一見、重合反応の触媒濃度が基質に対して 60 wt%というと多く感じるが、酵素換算でいうと、0.6 wt%程度となる。また、70 wt%以上では僅かに分子量の低下がみられるが、一部、酵素に付着している自由水の増加に伴う加水分解の進行も考えられる。

(7) 経時変化

これまでに検討した至適条件で反応を行ない、その経時変化を測定した。その結果を Fig. 2.19 に示す。

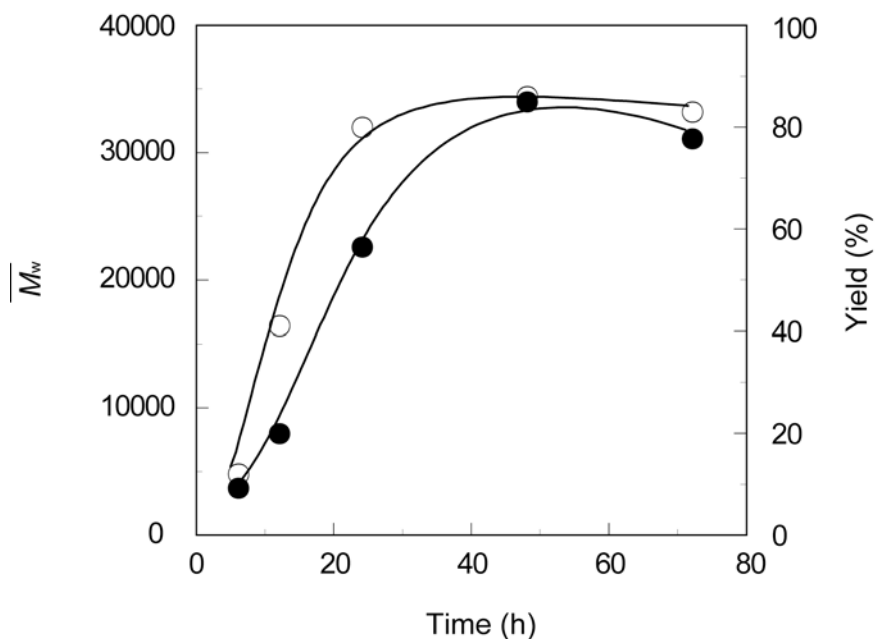


Fig. 2.19 Effect of reaction time on polymerization of 11MU.

● : M_w , ○ : yield

Reaction conditions : A mixture of 11MU (60 mg) and lipase CA (60 wt%) was reacted in bulk at 110 °C with MS 4A placed at the top of the vial.

時間とともに分子量は顕著に増大し、48 時間で最大となった。再沈殿後、 $M_w = 34,000$ 、 $M_w/M_n = 2.3$ の poly(11MU) が収率 86 % で得られた。また、Fig. 2.20 に 24 時間反応後の低分子用 SEC のチャートを示す。

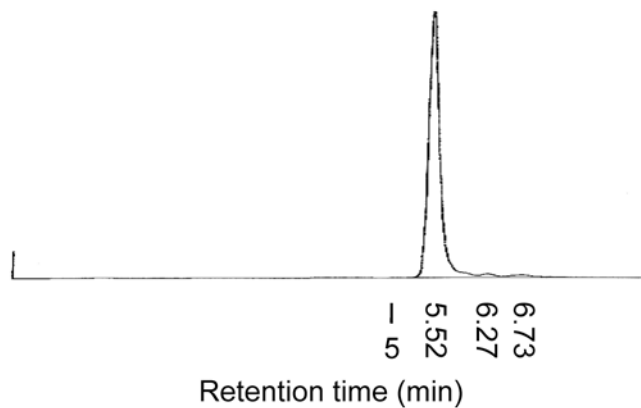


Fig. 2.20 SEC chart after 24-h reaction at 110 °C.

24 時間経過後は、低分子用 SEC チャートで保持時間 6.92 min に現れる 11MU モノマーに相当するピークは確認されなかった。一方で、ポリマーに相当するピークが確認された。従って、この時点で既に原料はほぼ全て消費されているといえる。しかしながら、重合反応は 24 時間経過後も伸長している。このことから、リパーゼ CA により、ポリマー鎖中あるいはポリマー末端のカルボニルも認識され、ポリマー分子間のエステル交換による分子量の増加がみられることが確認された。

(8) 反応条件のまとめ

重縮合による poly(11MU)の合成について各反応条件の検討結果を Table 2.9 にまとめた。

Table 2.9 Optimum reaction conditions for enzymatic synthesis of poly(11MU).

反応条件項目	: 結果の要約
酵素起源	: <i>Candida antarctica</i> 由来固定化リパーゼ、リパーゼ CA を用いたときに重合の進行が確認された。
基質	: 遊離のカルボン酸を有する 11MU がそのメチルあるいはエチルエステル体である 11MU·Me, 11MU·Et よりも優れた重合性を示した。
モレキュラーシーブス 4A	: 気相中に縮合に伴い発生する水の吸収剤としてモレキュラーシーブス 4A を用いることで大幅な分子量の増大が確認された。
反応温度	: ポリマーの分子量、収率は温度の上昇に伴い増加し 110 °C でピークに達した。また、130 °C では熱失活による分子量の減少が確認された。
酵素量	: 11MU に対して 60 wt%の酵素を用いたときに最適となった。
反応時間	: 反応開始 2 日後まではポリマー分子量の増加が確認された。反応はポリマー鎖間でのエステル交換反応によっても進行した。
至適条件で得られる poly(11MU)	: $M_w = 34,000$ 、 $M_w/M_n = 2.3$ の poly(11MU)が収率 86 % で得られた。

(9) 推定反応機構

リパーゼ CA は通常のセリン残基を活性中心とするセリン酵素同様の反応機構を示すことが知られている^{73), 90)}。これまでの検討から、リパーゼ CA はエステル結合のみならず、チオエステル結合形成にも触媒作用を示すことが明らかとなった。そこで、重合反応の推定反応機構について考察する。はじめに、Fig. 2. 14 に示したリパーゼ CA のタンパク構造に関して、活性部位である Ser¹⁰⁵ 周辺の拡大図を Fig. 2.21 に示す。

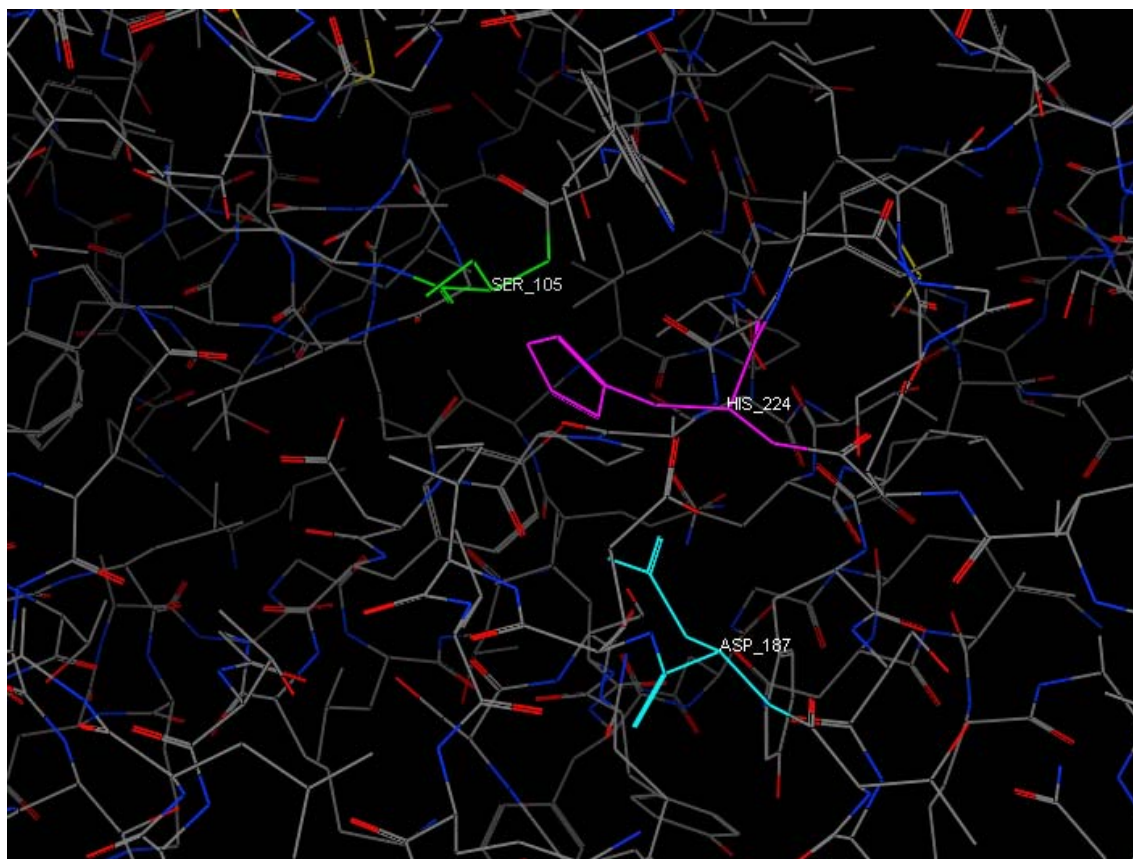
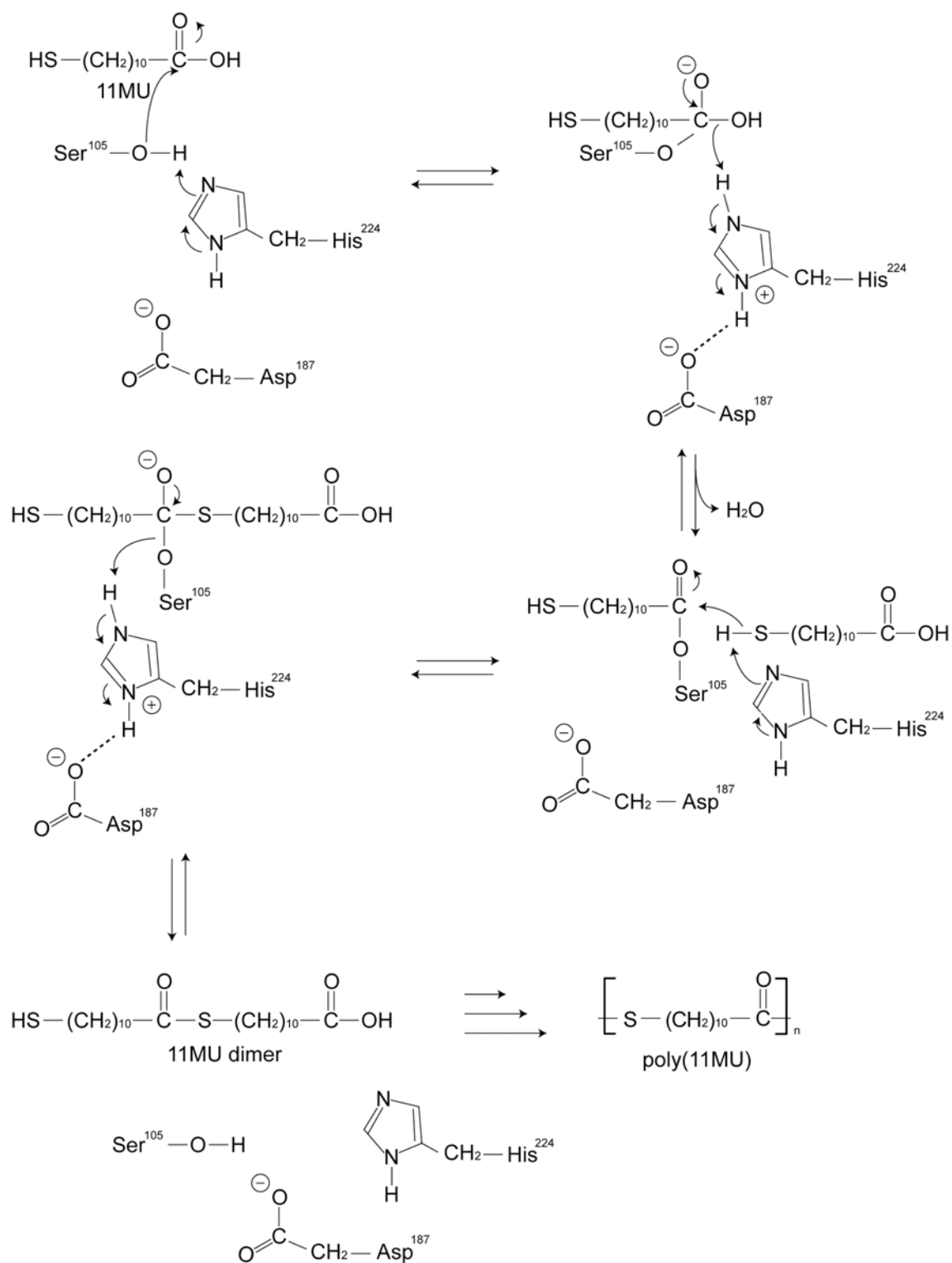


Fig. 2.21 Active site of lipase CA.

(green : Ser¹⁰⁵, pink : His²²⁴, light blue : Asp¹⁸⁷).

活性部位のセリン残基は、アミノ酸配列上は隣接していないものの、空間的に隣接している1個のヒスチジン残基と1個のアスパラギン残基とが協奏的に作用することで触媒作用を示すことが知られている（触媒性トライアッド：catalytic triad）。リパーゼ CA は 317 個のアミノ酸からなるリパーゼである。リパーゼ CA の活性部位は Ser¹⁰⁵ であり、His²²⁴、Asp¹⁸⁷ と触媒トライアッドを組むことで活性を発現する。11MU の重合を例に、その推定反応機構について Scheme 2.10 に示す。



Scheme 2.10 Proposed mechanisms of lipase - catalyzed polymerization of 11MU.

His²²⁴ が Asp¹⁸⁷ のカルボキシラートにより安定化されてイミダゾリウムカチオンとなり、この His²²⁴ の塩基触媒反応により、Ser¹⁰⁵ による 11MU への攻撃が可能となる。活性部位の Ser¹⁰⁵ は 11MU のカルボニルを攻撃し、四面体のオキシアニオン中間体を形成する。その後、水が脱離し基質 - 酵素複合体が形成される。基質 - 酵素複合体に 11MU のチオール基が求核攻撃することで、11MU ダイマーが生成される。この反応が順次進行することで、poly(11MU)が合成されることが考えられる。

従来のリパーゼ CA による酵素触媒重合と本反応では基質 - 酵素複合体への求核種が異なる。すなわち、前者の求核種がヒドロキシ基であるのに対して、後者のそれはチオールである。この求核種の違いが重合性に及ぼす影響については第 3 章で詳細に議論する。この様に基質 - 酵素複合体にチオールが求核攻撃をすることでホモポリチオエステルも合成されることが見出された。

(10) 熱特性の比較

ポリチオエステルの一般的な物性の特徴として融点が相当するポリエステルよりも高いことが挙げられる⁹¹⁾。ここでは、合成したポリチオエステルである poly(11MU) が実際に相当するポリエステルである poly(11HU)と比較してその様な物性を示すかについて、DSC を測定することで確認した。DSC チャートを Fig 2. 22 に示す。

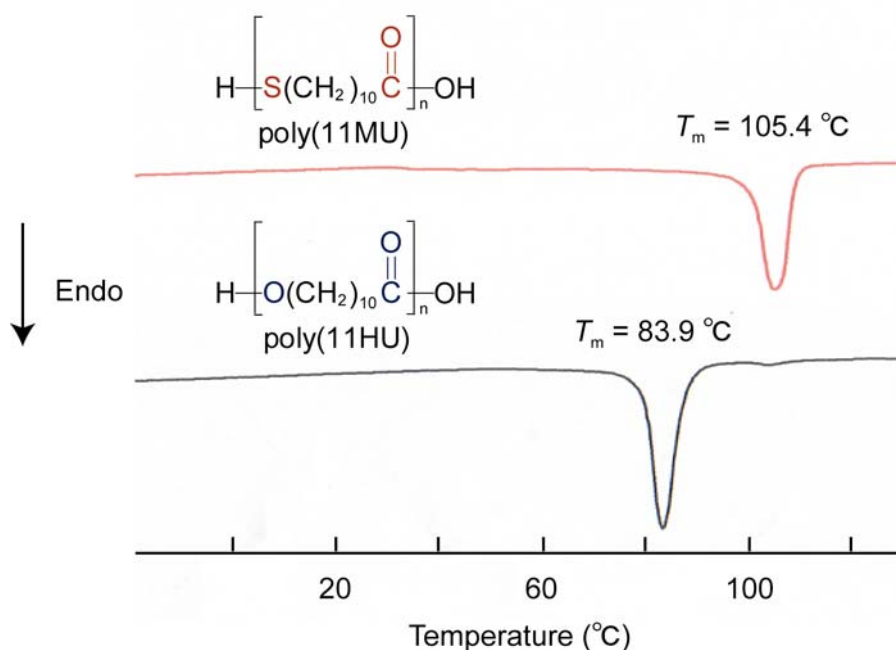


Fig. 2.22 DSC curves of poly(11MU) and poly(11HU) [second scan].

測定結果を Table 2.10 にまとめる。

Table 2.10 Thermal properties of poly(11MU) and poly(11HU).

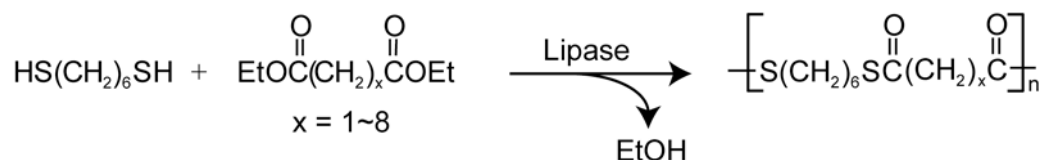
Polymer	M_w	M_w/M_n	T_g (°C)	T_c (°C)	T_m (°C)
Poly(11MU)	31,000	2.5	-	83.4	105.4
Poly(11HU)	29,000	2.8	-	63.6	83.9

結晶化度が非常に高いためか、どちらのポリマーも溶解後、急冷し、再度昇温する過程では結晶化ピークは確認されなかった。結晶化ピークは急冷過程で検出され、ガラス転移温度は検出されなかった。DSC で高い結晶性を有するポリマーの熱測定を行なう際にこのような現象が見られることがある。生合成により生成されるポリチオエステルであるポリ（メルカプトプロピオネート）も同様の結果が報告されている⁹¹⁾。

本研究で合成したポリチオエステルである poly(11MU)は相当するポリエステルである poly(11HU)よりも融点、結晶化温度共に約 20 °C 高いことが確認された。つまり、チオエステル結合を導入することで融点の上昇が見込まれる。しかしながら、現時点で基質として比較的安価で容易に入手可能なメルカプトカルボン酸は 11MU の他には 3 -メルカプトプロピオン酸などに限られる。そこで、次項より種々のポリチオエステルを合成するべく、ジチオールとジエステルの重縮合による種々 AA - BB 型ポリチオエステルの合成について検討を行なった。

2.4.2 酵素触媒を用いた重縮合による AA - BB 型ポリチオエステルの合成とその物性

本節では、Scheme 2.11 で示すように、酵素触媒を利用したヘキサン - 1,6 - ジチオールとメチレン鎖長の異なる 8 種のジカルボン酸ジエステルの重縮合について検討した。



Scheme 2.11 Synthesis of AA - BB type polythioester.

前節ではエステル体を用いるよりも、カルボン酸を用いることで、より高分子量体のポリチオエステルの合成が達成された。本節でも、まずメチレン鎖長の異なる種々のジカルボン酸を用いて検討したが、これら基質はいずれも非常に融点が高く、また疎水性有機溶媒に対する溶解性も乏しかったため、反応系が固化したままで、重合反応の進行がみられなかった。一般に、酵素触媒を利用した AA - BB 型の重縮合では、疎水性有機溶媒あるいはバルク条件におけるジカルボン酸の溶解性が低いことから重合反応が進行し難いことが報告されている⁹²⁾。そこで、いずれの基質も常温で液体であるジチオールとジエステルからの重合を試みた。また、 $x = 1 \sim 8$ メチレン鎖長を有する一連のジエステル体が入手可能なジエチルエステル体を用いることで各種 AA - BB 型ポリチオエステルの合成を行なった。さらに、前節で最も良好な結果が得られたことから、酵素はリパーゼ CA、反応系はモレキュラーシーブスをついた Fig. 2.4 に示した系を用い、その他の反応条件について最適化を行なった。ヘキサン - 1,6 - ジチオールとセバシン酸ジエチル($x = 8$)の重合についての結果を以下に示す。

(1) 反応温度

前述の通り、ヘキサシ - 1,6 - ジチオールとセバシン酸ジエチルの AA - BB 型ポリチオエステルの合成について温度検討を行なった。結果を Fig. 2.23 に示す。

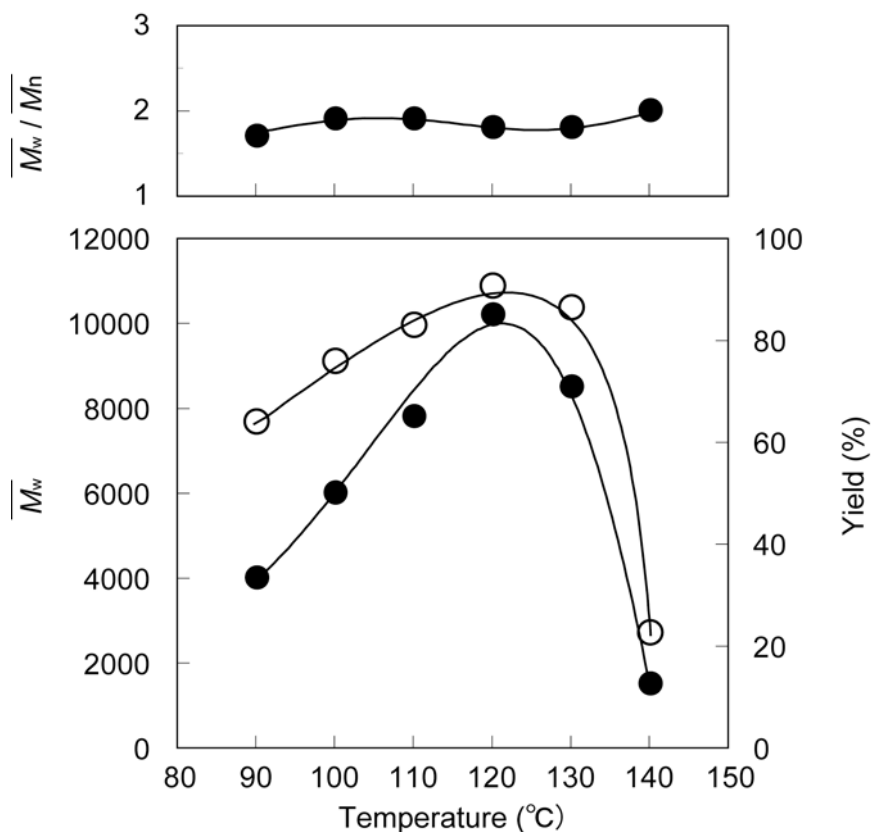


Fig. 2.23 Effect of reaction temperature on polymerization of hexane-1,6-dithiol and diethyl sebacate.

● : M_w and M_w/M_n , ○ : yield

Reaction conditions : A mixture of hexane-1,6-dithiol (31.3 mg) and diethyl sebacate (51.7 mg) was reacted with lipase CA (70 wt%) in bulk with MS 4A placed at the top of the vial for 2 days.

分子量、ポリマー収率ともに 120 °C で最大となった。本反応では、140 °C で顕著な重合性の低下が確認された。至適温度、顕著な重合性の低下がみられる温度ともに 11MU 重合時と比べて 10 °C 高い。重合は、酵素が熱失活しない程度の高温度で最も進行することが考えられるが、バルク中でのその温度は、用いる基質により多少異なることが推測される。すなわち溶媒同様に、疎水性の高い基質を用いた際には酵素がある程度の活性を保てる温度が上昇するものと考えられる。

(2) 酵素量

酵素量がヘキサン - 1,6 - ジチオールとセバシン酸ジエチルの重合に与える影響について検討を行なった。Fig. 2.24 にその結果を示す。

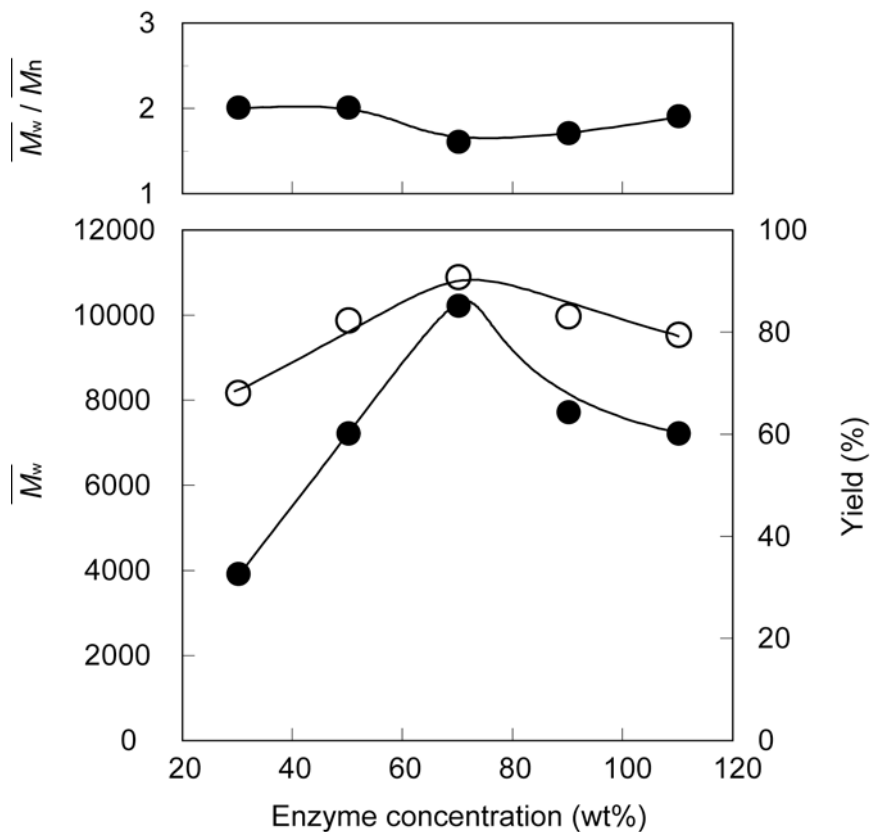


Fig. 2.24 Effect of enzyme concentration on polymerization of hexane-1,6-dithiol and diethyl sebacate.

● : M_w and M_w/M_n , ○ : yield

Reaction conditions : A mixture of hexane-1,6-dithiol (31.3 mg) and diethyl sebacate (51.7 mg) was reacted with lipase CA in bulk at 120 °C with MS 4A placed at the top of the vial for 2 days.

重合反応の際に、酵素と複合体を形成するセバシン酸ジエチルに対して 70 wt%の酵素量を用いたときに最大の分子量とポリマー収率が得られた。また、11MU 重合時同様に酵素量が多すぎると分子量の低下が起ることが確認された。

(3) 経時変化

反応時間がヘキササン - 1,6 - ジチオールとセバシン酸ジエチルの重合に与える影響について検討を行なった。Fig. 2.25 にその結果を示す。

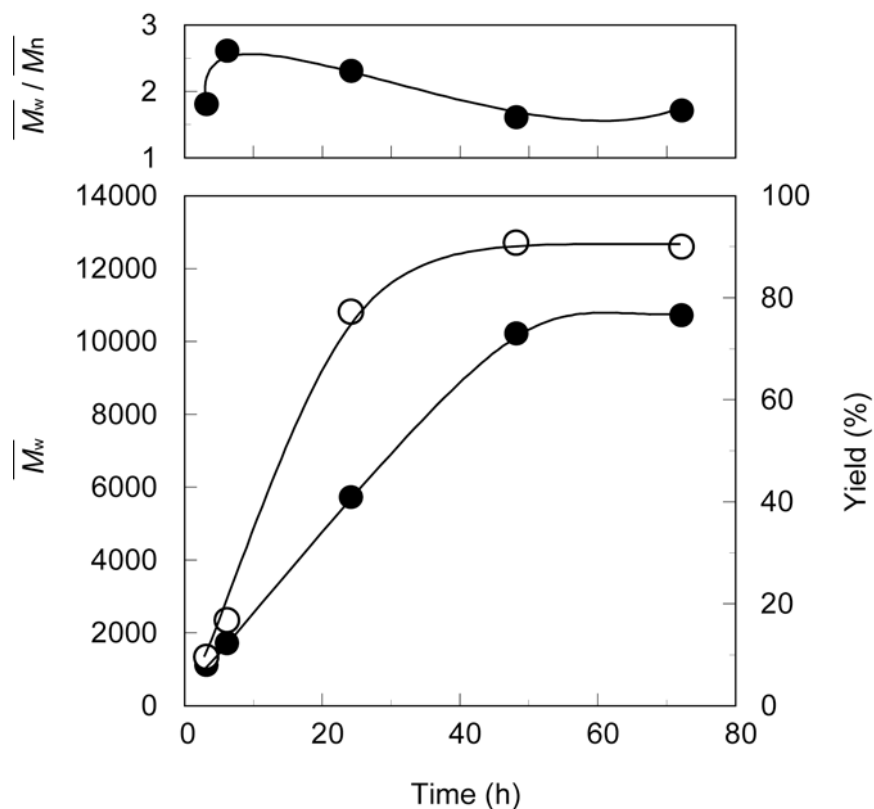


Fig. 2.25 Effect of reaction time on polymerization of hexane-1,6-dithiol and diethyl sebacate.

● : M_w and M_w/M_n , ○ : yield

Reaction conditions : A mixture of hexane-1,6-dithiol (31.3 mg) and diethyl sebacate (51.7 mg) was reacted with lipase CA (70 wt%) in bulk at 120 °C with MS 4A placed at the top of the vial.

AA - BB 型の重縮合においても、48 時間で分子量とポリマー収率は最大となった。再沈殿後、 $M_w = 10,800$ 、 $M_w/M_n = 1.7$ の poly(hexanedithiol - sebacate) が収率 90 % で得られた。

(4) MALDI - TOF MS によるオリゴマー分子の構造解析

重合物の構造解析は MALDI - TOF MS 及び ^1H NMR を用いて行なった。Poly(11MU)と同様に、高分子領域の MALDI - TOF MS は測定が困難であったため、比較的 low 分子領域について構造解析を行なった。Fig. 2.26 に MALDI - TOF MS スペクトルを示す。

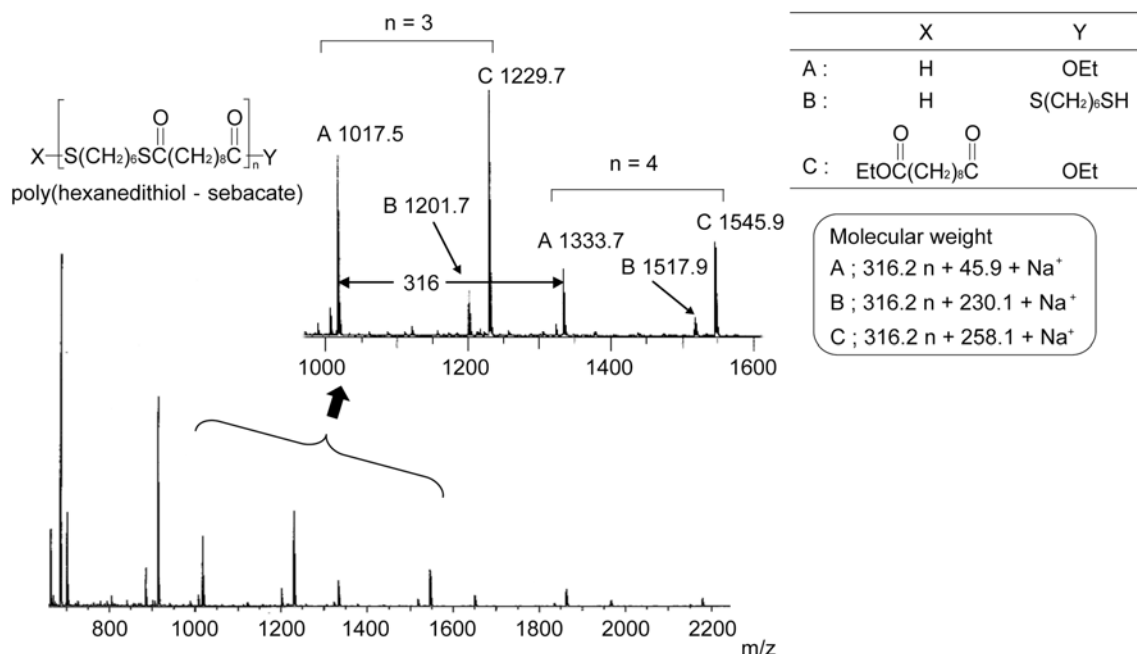


Fig. 2.26 MALDI - TOF MS spectrum of poly(hexanedithiol - sebacate).

Reaction conditions : A mixture of hexane-1,6-dithiol (31.3 mg) and diethyl sebacate (51.7 mg) was reacted with lipase CA (70 wt%) in bulk at 120 °C with MS 4A placed at the top of the vial for 6 h.

3 種の周期的なピークがそれぞれ 316 m/z 間隔で確認された。これは、poly(hexanedithiol - sebacate)のくりかえし単位の分子量に相当する。また、これらの周期的なピークは、Fig. 2.26 に示す通り、それぞれ末端構造の異なるものに相当する。

AA - BB 型の重縮合において、高分子量体を得るためには、官能基のモル比が正確に 1:1 に保たれる必要がある。副反応としてチオールの酸化に伴いジスルフィド結合が形成されれば、系内で相対的にエステル末端が過剰になることが想定される。MALDI - TOF MS から、両末端チオール（ピーク B）と両末端エステル（ピーク C）を比較すると、後者のピークがより強く検出されていることがわかる。このピークの強度と実際のモル比が比例関係にあるならば、ヘキサン - 1,6 - ジチオールとセバシン酸ジエチルの仕込みモル比を変化させることで、さらなる分子量の増加が望める。そこで、ポリマ

一中のチオール末端とエステル末端を ^1H NMR を用いて定量的に評価した。Fig. 2.27 に ^1H NMR スペクトルを示す。

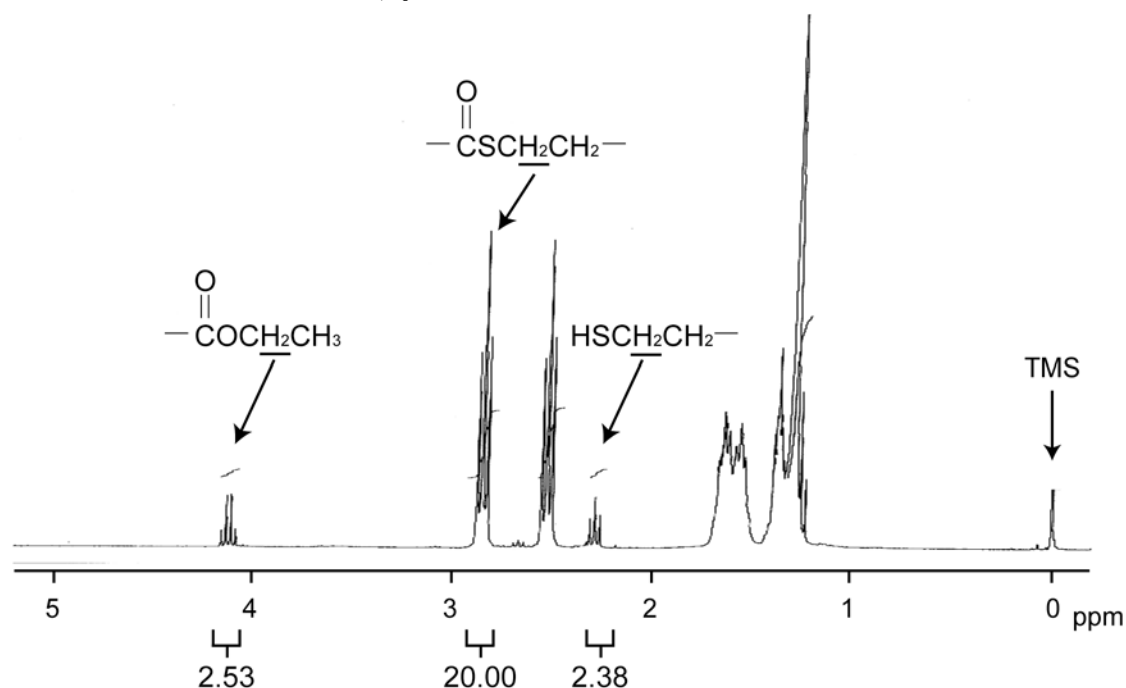


Fig. 2.27 ^1H NMR spectrum of poly(hexanedithiol - sebacate).

Reaction conditions : A mixture of hexane-1,6-dithiol (31.3 mg) and diethyl sebacate (51.7 mg) was reacted with lipase CA (70 wt%) in bulk at 120 °C with MS 4A placed at the top of the vial for 48 h. ^1H NMR was detected after purification by reprecipitation in chloroform (good solvent) – methanol (poor solvent).

2.85 ppm のポリマー主鎖中のチオエステル由来ピーク ($-\text{COSCH}_2\text{CH}_3-$) のピーク強度を 20 とすると、4.12 ppm のエチルエステル末端由来ピーク ($-\text{COOCH}_2\text{CH}_3$) と 2.28 ppm のチオール末端由来ピーク ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SH}$) のピーク強度は、前者が 2.53、後者が 2.38 で現れた。両者のポリマー末端比は 1.06 であり、わずかにエステル末端過剰ではあるが、MALDI - TOF MS で検出されたほどの差異は確認されなかった。すなわち、ほぼ仕込み比通りのポリマー末端組成が認められた。このことから、Fig. 2.26 でピーク B に相当する両末端にチオールを保持したオリゴマーは MALDI - TOF MS における検出強度が相対的に弱いことが明らかとなった。また、MALDI - TOF MS では、ジスルフィド結合を有する生成物のピークは確認されなかったものの、 ^1H NMR では 2.70 ppm にジスルフィド結合に隣接するメチレンに帰属されるピークが僅かに確認された。

(5) 反応条件のまとめ

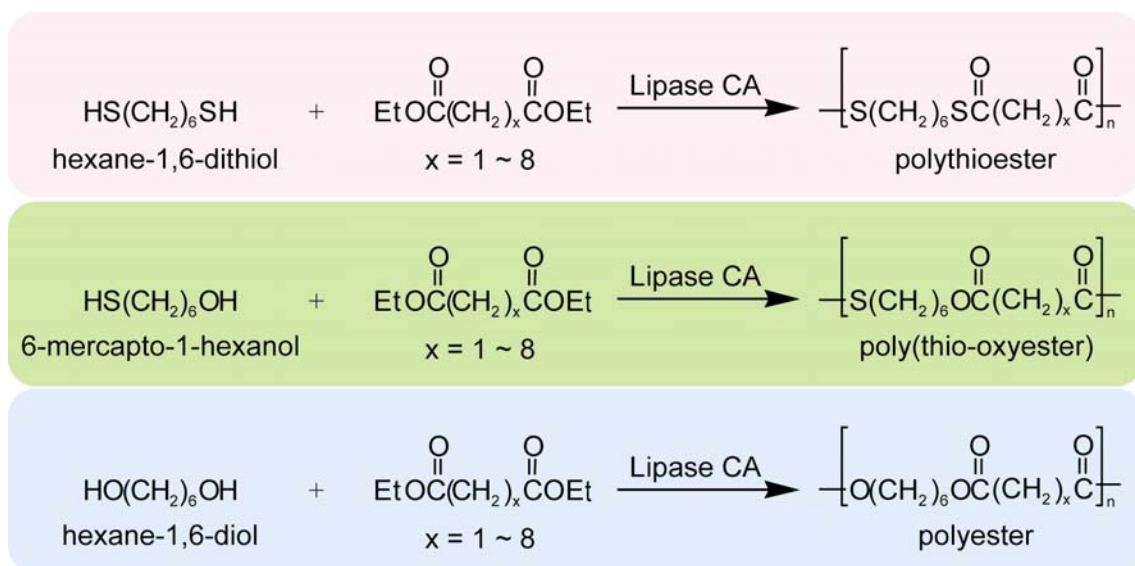
重縮合による poly(hexanedithiol - sebacate)の合成について各反応条件の検討結果を Table 2.11 にまとめた。

Table 2.11 Optimum reaction conditions for enzymatic synthesis of poly(hexanedithiol - sebacate).

反応条件項目	: 結果の要約
反応温度	: ポリマーの分子量、収率は 120 °C でピークに達した。
酵素量	: セバシン酸ジエチルに対して 70 wt% のリパーゼ CA を用いたときに最適となった。
反応時間	: 反応開始 2 日後まではポリマー分子量の増加が確認された。
至適条件で得られる poly(hexanedithiol - sebacate)	: $M_w = 10,800$ 、 $M_w/M_n = 1.7$ の poly(hexanedithiol - sebacate) が収率 90 % で得られた。

(6) 各種ポリ(チオ - オキシエステル)、ポリエステルの合成

メチレン鎖長の異なる種々のジカルボン酸ジエチルエステルを用い、種々のポリチオエステルを合成した。また、熱特性比較のために相当するポリ(チオ - オキシエステル)とポリエステルも同様に Scheme 2.12 で示すように合成した。結果を Table 2.12 に示す。



Scheme 2.12 Synthesis of polythioester, poly(thio - oxyester) and polyester.

Table 2.12 Synthesis of polymers with various methylene length.

Entry	Diethylester	(x)	hexane-1,6-dithiol			6-mercapto-1-hexanol			hexane-1,6-diol		
			$\overline{M}_w$	$\overline{M}_w / \overline{M}_n$	Polymer yield (%)	$\overline{M}_w$	$\overline{M}_w / \overline{M}_n$	Polymer yield (%)	$\overline{M}_w$	$\overline{M}_w / \overline{M}_n$	Polymer yield (%)
1	Malonate	(1)	9,000	1.8	80	3,600	2.7	—	22,000	5.0	—
2	Succinate	(2)	8,100	2.0	88	8,500	1.5	58	37,000	1.6	74
3	Glutarate	(3)	9,800	1.8	86	14,300	1.5	67	86,000	1.7	77
4	Adipate	(4)	8,600	1.8	84	14,600	1.8	76	44,000	1.7	73
5	Pimelate	(5)	7,000	1.9	83	18,400	1.9	78	88,000	2.3	88
6	Suberate	(6)	7,000	1.9	75	18,200	2.0	82	72,000	1.8	89
7	Azelate	(7)	8,600	1.8	88	17,600	2.0	84	70,000	2.0	93
8	Sebacate	(8)	10,800	1.7	90	16,900	1.9	82	75,000	1.8	92

Reaction conditions : A mixture of hexane-1,6-dithiol (0.20 mmol) or 6-mercapto-1-hexanol (0.20 mmol) or hexane-1,6-diol (0.20 mmol) and various diethyl esters (0.20 mmol) was reacted with lipase CA (70 wt%) in bulk at 120 °C with MS 4A placed at the top of the vial for 48 h.

Poly(mercaptohexanol - malonate)及び poly(hexanediol - malonate)は生成物が液状であり、再沈殿が困難であったためポリマー収率は算出されなかった。

ヘキサン - 1,6 - ジチオールと種々のメチレン鎖長を有するジエチルエステルをリパーゼ CA と反応させることで分子量 7000 ~ 10,000 程度のポリチオエステルが高収率で得られた。また、同様にヘキサン - 1,6 - ジチオールを等モルの 6 - メルカプト - 1 - ヘキサノールあるいはヘキサン - 1,6 - ジオールと置き換えることで、ポリ(チオ - オキシエステル)及びポリエステルを得た。

得られたポリチオエステルの分子量はポリエステルと比較して、大幅に減少した。この点について考えられる要因は 2 つある。1 つはチオールの基質 - 酵素複合体に対する反応性がアルコールに比べて劣ることである。そのために、相対的に重合速度が非常に遅いことが考えられる。

もう 1 つの可能性としては、チオエステル結合が縮合に伴い発生するアルコールによる求核攻撃を受け易いことである。すなわち、反応系内に付したモレキュラーシープスによるアルコールの吸着が起こる前に、チオエステル結合の分解が起こることが想定される。後者の要因を解決するためには、発生する縮合物を効率的に除去し可能な限り逆反応を抑制する必要がある。理論的には、縮合物が発生しない開環重合を行なうことで高分子量ポリチオエステルの合成が達成されるものと考えられる。開環重合によるポリチオエステルの合成については、次章で詳細に検討を行なう。

(7) 熱特性の比較

合成した種々のメチレン鎖長を有するポリチオエステル、ポリ(チオ - オキシエステル) 及びポリエステルを DSC を測定することで確認した。測定結果を Fig. 2.28, Fig. 2.29 に示す。

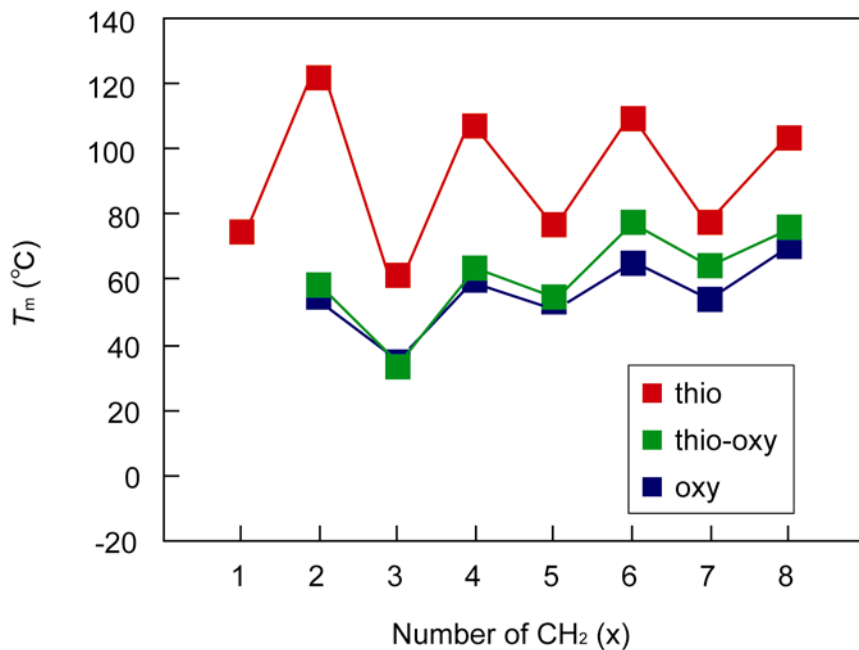


Fig. 2.28 T_m of various polythioesters, poly(thio - oxyester)s, and polyesters.

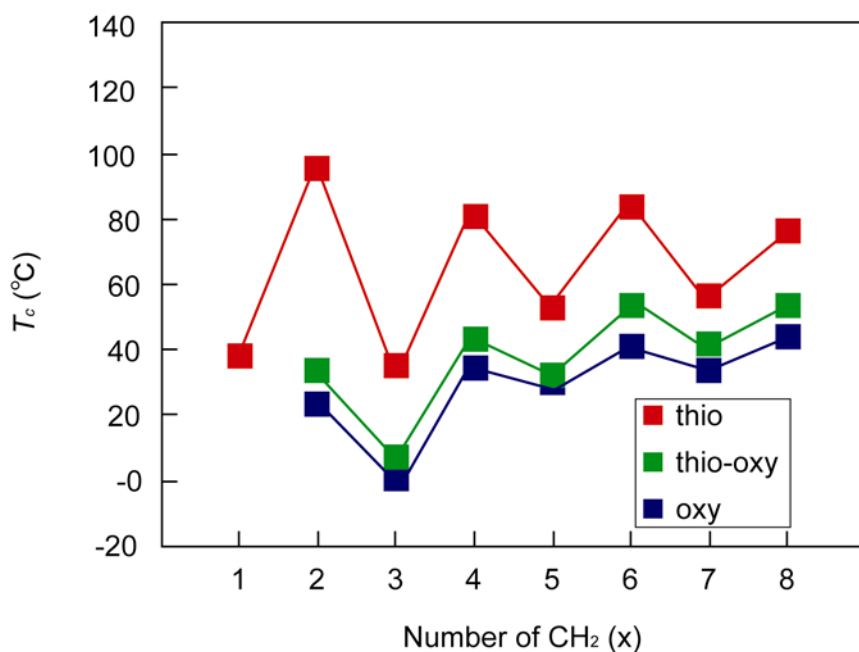


Fig. 2.29 T_c of various polythioesters, poly(thio - oxyester)s, and polyesters.

Fig. 2.28, 2.29 より、合成した全てのポリチオエステルについて、ポリエステルと比べ、 T_m 、 T_c の上昇が確認された。また、チオエステル結合とエステル結合からなる poly(thio - oxyster) に関しては、 $x = 3$ を除き、 T_m は両者の間の値が確認された。また、いずれのポリマーもメチレン鎖数が偶数系列のものは奇数系列のものよりも高い T_m , T_c を示した。

(8) 熱特性の規則性① 高融点

Fig. 2.28 から合成したポリチオエステルが相当するポリエステルと比較していずれも高融点を示すことが明らかとなった。この要因について考察する。

融点とは、ある指定した圧力の下で、液相と固相が平衡で共存する温度をいう。すなわち、液相・固相間の自由エネルギーが等しくなる温度である。液相での自由エネルギーを G_l 、固相での自由エネルギーを G_s 、融解のエンタルピー変化を ΔH_m 、融解のエントロピー変化を ΔS_m 、融点を T_m で表すと以下の式が成立する。

$$\Delta G = G_l - G_s = \Delta H_m - T_m \Delta S_m = 0 \quad (1)$$

$$T_m = \Delta H_m / \Delta S_m \quad (2)$$

(2)式から、高融点を示すポリマーは ΔH_m が大きいのか ΔS_m が小さいかである。 ΔH_m を大きくする因子として分子間力と分子の充填密度が挙げられる。水素結合をつくるような極性基を含むポリマーは ΔH_m が大きくなることが知られている⁹³⁾。

また、 ΔS_m に影響を与える因子としては、主に分子鎖の剛直性や屈曲性、あるいは回転の自由度の抑制が挙げられる。主鎖にカルボニル基、アミド基、芳香族など分子内回転を妨げるようなものが入っていると ΔS_m は小さくなり逆にエーテルのような屈曲性基が入ってくると ΔS_m は大きくなる。

このように分子構造によって T_m に違いが生じることが理解できる。では、合成されたポリチオエステルは ΔH_m , ΔS_m どちらの影響をより強く受けて高融点を示しているのだろうか。Poly(hexanedithiol - sebacate) および poly(hexanediol - sebacate) の各値を比較することで検討した。DSC により求められた値を Table 2.13 に示す。

Table 2.13 Thermodynamic parameters.

Polymer	M_w	M_w/M_n	T_m (°C)	ΔH_u (kJ / mol)	ΔS_u (J / mol / K)
poly(hexanedithiol - sebacate)	100,000	2.1	108.8	14.5	38.0
poly(hexanediol - sebacate)	100,000	2.0	74.8	17.3	49.9

ここで、 ΔH_m 、 ΔS_m はそれぞれ繰り返し単位当たりの融解エンタルピーまたは融解エントロピーを指す。測定したポリチオエステルの T_m の上昇は、 ΔS_m の減少に大きく起因することが確認された。すなわち、チオエステル結合がエステル結合よりも剛直性が強くそのために T_m が上昇したことが示唆される。エステル結合はエーテル結合とともに代表的な屈曲性基とされている。相対的にチオエステル結合は剛直性がより強いものと考えられる。

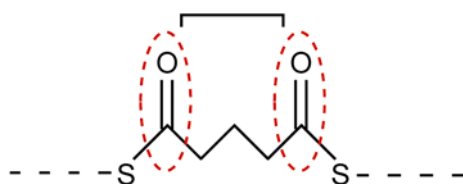
また、ポリチオエステルはメチレン鎖が伸びるにつれて T_m の降下が徐々に確認されるのに対して、ポリエステルはメチレン鎖が伸びるにつれて T_m が徐々に上昇する傾向が確認された。前者に関しては、メチレン鎖が伸びるにつれて剛直性基であるチオエステル結合の分子鎖中の割合が減少するためと考えられる。逆に、後者では屈曲性基であるエステル結合の分子鎖中の割合が減少したことが要因と考えられる。

(9) 熱特性の規則性② 偶奇性

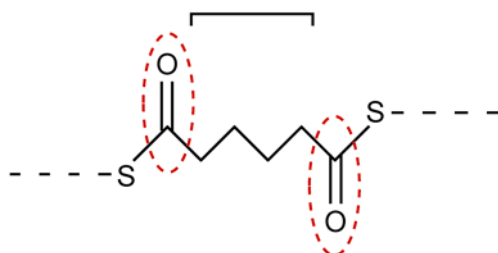
Fig. 2.28 及び 2.29 から合成したポリマーは全て、メチレン鎖数 x が偶数系列のものが奇数系列のものより高い T_m , T_g を示すことが認められた。この傾向は特にポリチオエステルで強く現れ、 $n = 2$ の poly(hexanedithiol - succinate) と $n = 3$ の poly(hexanedithiol - glutarate) を比較すると、 T_m で 60 °C の上昇が確認される。この要因について考察する。

カルボニル基に注目して、偶数系列のポリマー($x = 4$)と奇数系列のポリマー($x = 3$)について模式的に Scheme 2.13 に示す。

Number of CH₂ units $x = 3$ (odd)



Number of CH₂ units $x = 4$ (even)



Scheme 2.13 Odd - Even effect.

メチレン鎖がジグザグ構造を取ると仮定すれば、奇数系列のポリマーにおいてはカルボニル基が同方向に向く。逆に偶数系列のポリマーにおいてはカルボニル基が逆方向に向く。分子鎖はカルボニル基が逆方向を向いている方が配向し易いことが知られている⁹⁴⁾。そのため、偶数系列のポリマーはより安定な結晶構造を形成する。この現象はポリエステルやポリアミドについてよく知られている^{95, 96)}。ポリチオエステルについても同様な要因で偶数系列において高い熱特性が確認されたものと思われる。

2.4.3 ポリチオエステルの生分解性評価

(1) BOD 法による生分解性の評価

Poly(hexanedithiol - glutarate) [$M_w = 9,800$ $M_w/M_n = 1.8$]、poly(hexanediol - glutarate) [$M_w = 81,000$ $M_w/M_n = 1.8$]の生分解性について下水処理場から採取した活性汚泥を用いて BOD 法により評価を行なった。生分解率の経時変化を Fig. 2.30 に示す。

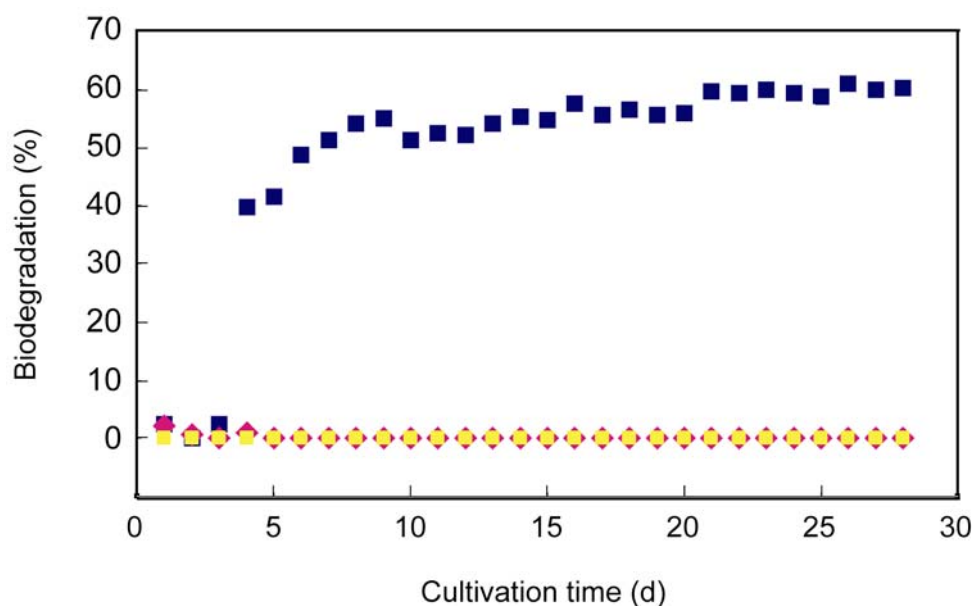


Fig. 2.30 Biochemical oxygen demand (BOD) biodegradation of poly(hexanedithiol - glutarate), poly(hexanediol - glutarate) and aniline using activated sludge at 25 °C. ■ : aniline, ◆ : poly(hexanedithiol - glutarate), ■ : poly(hexanediol - glutarate).

標準物質のアニリンの生分解率は分解開始 7 日後に 40 %を超え、28 日後には生分解性の目安である 60 %に達したことから、生分解試験は有効であると判断された。BOD 法ではポリチオエステル、ポリエステルともに生分解性が確認されなかった。いずれのポリマーも結晶化度の高い個体であることから、土壌埋設法など水溶液中での生分解性試験以外の評価法で再度検証することで異なった結果が得られるものと考えられる。

(2) 活性汚泥を用いた資化菌の単離

前述の理由で、BOD 法ではポリチオエステルの生分解性が確認されなかったことが考えられる。しかし、ポリチオエステルの資化菌が単離できれば間接的に生分解性を示

すことが可能である。そこで、活性汚泥を植種源とし、poly(hexanedithiol - glutarate)を唯一の炭素源として pH 7.0, 30 °C で集積培養を行なうことで資化菌の単離を試みた。OD₆₆₀ 値を測定することで求めた液体培地の濁度の経時変化を Fig. 2.31 に示す。

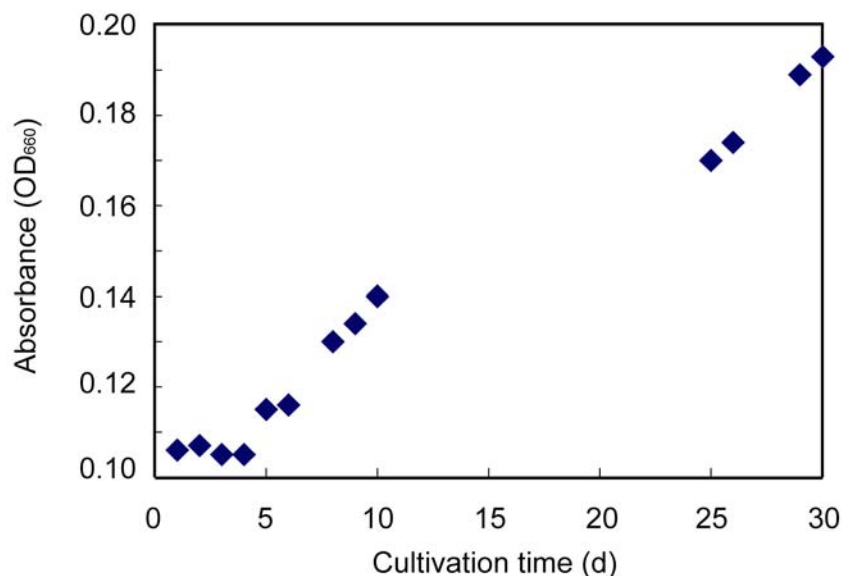


Fig. 2.31 Cultivation of microorganisms with poly(hexanedithiol - glutarate) as a sole carbon source at 30 °C.

徐々にではあるが、OD₆₆₀ 値の増加から菌の増殖が確認された。Poly(hexanedithiol - glutarate)を唯一の炭素源としてスラントに保存した単離菌の様子を Fig. 2.32 に示す。白色のバクテリアと思われる菌体が単離された。微生物産ホモポリチオエステルは生分解性を示さないことが報告されているが⁶¹⁾、本ポリチオエステルは分解菌が単離されたことから、生分解性を有することが予想される。

酵素法により合成されるポリチオエステルは、生合成と比べると比較的分子設計が容易である。任意のメチレン鎖長や共重合組成を有するポリチオエステルを合成することなどで、生分解速度の制御などへ応用が期待される。



Fig. 2.32 Isolated microorganism.

2.5 結論

環境低負荷型触媒である酵素を利用し、重縮合によるポリチオエステルの合成を行なった。具体的には、メルカプトカルボン酸である 11MU の重縮合及びヘキサン - 1,6 - ジチオールと種々ジカルボン酸ジエステルの重縮合によるポリチオエステルの合成を行なった。

11MU の重縮合は、リパーゼ CA 存在下、縮合により生成する水をモレキュラーシーブス 4A を用いて吸着させて、バルク中、110 °C で反応を行なうことで最も効率的に進行了。48 時間反応後、 $M_w = 34,000$ 、 $M_w/M_n = 2.3$ の poly(11MU) が収率 86 % で得られた。また、11MU - Me, 11MU - Et よりも 11MU を用いたときにより高分子量体が得られた。Poly(11MU) は相当するポリエステルである poly(11HU) と比較して T_m , T_c とともに約 20 °C 高いことが確認された。

AA - BB 型ポリチオエステルも同様に触媒としてリパーゼ CA を用いることで得られた。一例として、ヘキサン - 1,6 - ジチオールとセバシン酸ジエチルの重縮合例を示す。ヘキサン - 1,6 - ジチオールとセバシン酸ジエチルを等モル、リパーゼ CA 存在下、縮合により生成するエタノールをモレキュラーシーブス 4A を用いて吸着させて、バルク中、120 °C、2 日間反応を行なうことで $M_w = 10,800$ 、 $M_w/M_n = 1.8$ の poly(hexanedithiol - sebacate) が収率 90 % で得られた。また、ヘキサン - 1,6 - ジチオールと異なるメチレン鎖長を有するジカルボン酸ジエステルの重縮合反応により、 $M_w = 7,000 \sim 10,000$ 程度の一連のポリチオエステルが高収率で得られた。いずれのポリチオエステルも相当するポリエステルと比べて高い T_m , T_c が確認された。また、メチレン鎖数により顕著な偶奇性を示した。さらに、酵素法により得られた poly(hexanedithiol - glutarate) を唯一の炭素源として集積培養を行なうことで、分解菌が単離され生分解性が示唆された。

以上のことから、ポリチオエステルの新規合成法として環境低負荷型触媒である酵素を利用した手法が提唱された。イオウが主鎖中に含まれるホモポリマーの酵素合成は本例が初である。実用化に向けては、更なる分子量の向上が課題として挙げられる。そのためにも、次章以降で開環重合法によるポリチオエステルの合成とその詳細な反応機構について評価をする。

第 3 章

酵素触媒を利用した開環重合による高分子量ポリチオエステルの合成と環状チオエステルの重合挙動の解析

3.1 緒言

3.1.1 はじめに

本章では、前章に引き続き、酵素触媒を利用したポリチオエステルの合成について報告する。前章で検討した、「酵素触媒を利用した直接重縮合によるポリチオエステルの合成」では課題として、分子量の向上が挙げられた。ポリマーの分子量は特に力学特性に大きな影響を与える。分子量の異なる直鎖状低密度ポリエチレン (LLDPE) について引張り試験を行なうと、分子量 2 万以下のときは非常にもろく、引張り試験に耐えられないことが知られている。一方、10 万程度の分子量を有する LLDPE は、引張り強度、破断伸びともに大幅な向上が確認される。例えば、分子量 3 万の LLDPE の破断応力が約 100 kg/cm²なのに対して分子量 10 万の LLDPE は約 300kg/cm²にまで達する⁹⁷⁾。このように、LLDPE の引張り強度はある程度までは分子量の増加とともに増大することが知られている。また、ポリ乳酸も同様の傾向を示す⁹⁸⁾。

これらの指標からも、実用的高分子材料を指向するに当たっては、一つの目安として 10 万程度の分子量を有するポリチオエステルが必要となる。しかしながら、前章で示した通り種々条件を検討した結果、直接重縮合で得られる AA - BB 型ポリチオエステルの分子量は 1 万程度に限られた。そこで、新たなアプローチとして「酵素触媒を利用した開環重合によるポリチオエステルの合成」を検討することとした。

以下に、酵素触媒を利用した開環重合法、酵素触媒を利用したケミカルリサイクル、酵素触媒重合の反応機構と律速段階について記した。

3.1.2 酵素触媒を利用した開環重合法

前章でも紹介したが、酵素触媒を利用した高分子合成は主にポリエステル類の合成に関して報告がなされてきた。直接重縮合だけでなく、酵素触媒を利用した開環重合によるポリエステルの合成についても同様に多く報告され総説が出されている⁹⁹⁾。

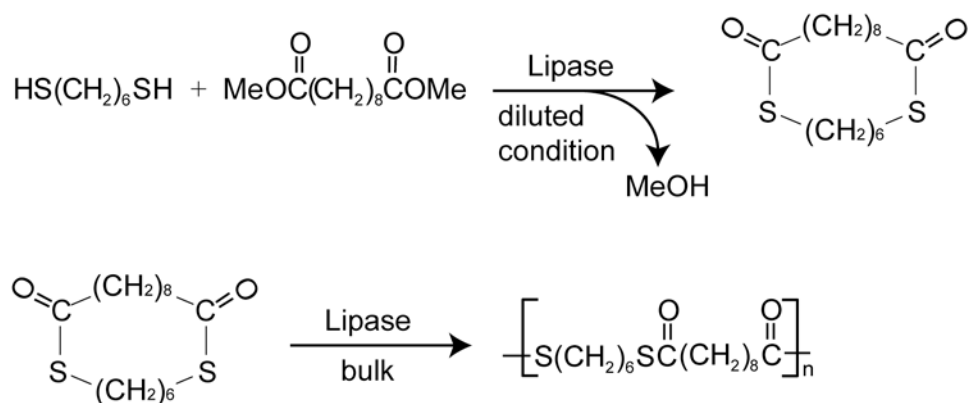
酵素触媒を利用した開環重合は、Kobayashi らと Knani らの 2 グループによりほぼ同時期に初めて報告された^{100, 101)}。その後、種々の起源より得られるリパーゼを利用して 4~17 員環を有するラクトンや環状ジエステルの重合が研究された¹⁰²⁻¹⁰⁴⁾。また、ある種のリパーゼは環状カーボネートの開環重合によるポリカーボネートの合成も触媒することが知られている¹⁰⁵⁾。

開環重合の最大の利点は、重合反応中に縮合物が発生しないことである。酵素は可逆性を有する触媒であるために、重縮合反応の触媒として用いる際には、縮合物を系外へ除去しなくては分子量の向上が見込めなかった。開環重合においては、理論的にはその必要性がないため、より効率的に高分子量体が得られることが期待される。Sugihara らは酵素触媒を利用したポリブチレンサクシネート (PBS) の合成において、環状体を用いる顕著な優位性を見出した。コハク酸ジメチルとブタン - 1,4 - ジオールの直接重縮合で得られる PBS の分子量が $M_w = 43,000$ であるのに対して、相当する環状オリゴマーの開環重合では分子量が $M_w = 130,000$ へ増加する¹⁰⁶⁾。また、Soeda らは種々のポリ (エステルウレタン)、ポリ (カーボネートウレタン) の酵素合成において、開環重合法による顕著な分子量の増大を報告している^{18, 19)}。

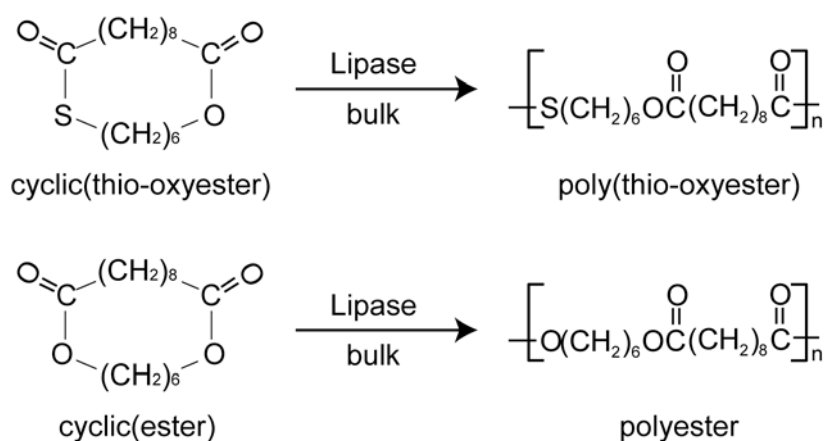
これらの例からわかる通り、酵素触媒を利用したポリチオエステルの合成においても開環重合法により、顕著な分子量の増大が見込まれる。しかしながら、既存の化学法による環状チオエステル化合物の合成に関する報告例は少ない。合成反応に 210 °C 以上の高温を使用する例や、収率が 10 % 程度に限られる例に限定される¹⁰⁷⁻¹⁰⁸⁾。

酵素触媒反応は比較的温和な条件下でも活性を示す。また、酵素を希薄条件下で作用させることで環状ラクトン類の合成に優れた触媒作用を示すことが知られている²⁶⁾。これは、希薄条件で酵素が作用することで、分子間反応である重合よりも分子内反応である環化が優先されるためと思われる。

そこで本章では、まず酵素触媒を利用した環状チオエステルの合成を検討した。その後、得られた環状チオエステルをバルク中で再度酵素と反応させることで開環重合を行なった。具体的には Scheme 3.1 に示すように、基質としてヘキサン - 1,6 - ジチオールならびにセバシン酸ジメチルを用い、酵素触媒を利用した環状チオエステルの合成とその開環重合について具体的に検討した。また、酵素反応性の比較を行なうため、ヘキサン - 1,6 - ジチオールの代わりに 6 - メルカプト - 1 - ヘキサノールやヘキサン - 1,6 - ジオールを用い、相当する環状 (チオ - オキシエステル)、環状エステルを合成し、Scheme 3.2 に示すように開環重合反応を行なった。



Scheme 3.1 Synthesis of cyclic(thioester) and ring-opening polymerization using a lipase.



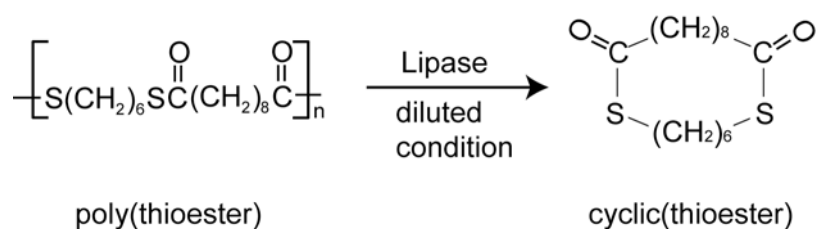
Scheme 3.2 Enzymatic ring-opening polymerization of cyclic(thio-oxyester) and cyclic(ester).

3.1.3 酵素触媒を利用したケミカルリサイクル

前述の通り、環状化合物は希薄条件下で鎖状モノマーを作用させることで得られる。これを応用することで、酵素触媒を利用したケミカルリサイクルが達成される。ポリマーに酵素を有機溶媒中、希薄条件下で作用させることで分子内環化反応が進行し、選択的に環状体が得られる。有機溶媒に求核種を添加すれば、環状体ではなく鎖状モノマーへと分解する。このように、同じ酵素を用いても、基質濃度に変化をつけるだけで重合または分解が進行し得る。

酵素反応を利用したケミカルリサイクルは種々の脂肪族ポリエステルで達成されている²⁶⁾。また、ポリブチレンアジペート (PBA) やポリ 3-ヒドロキシブタノエート

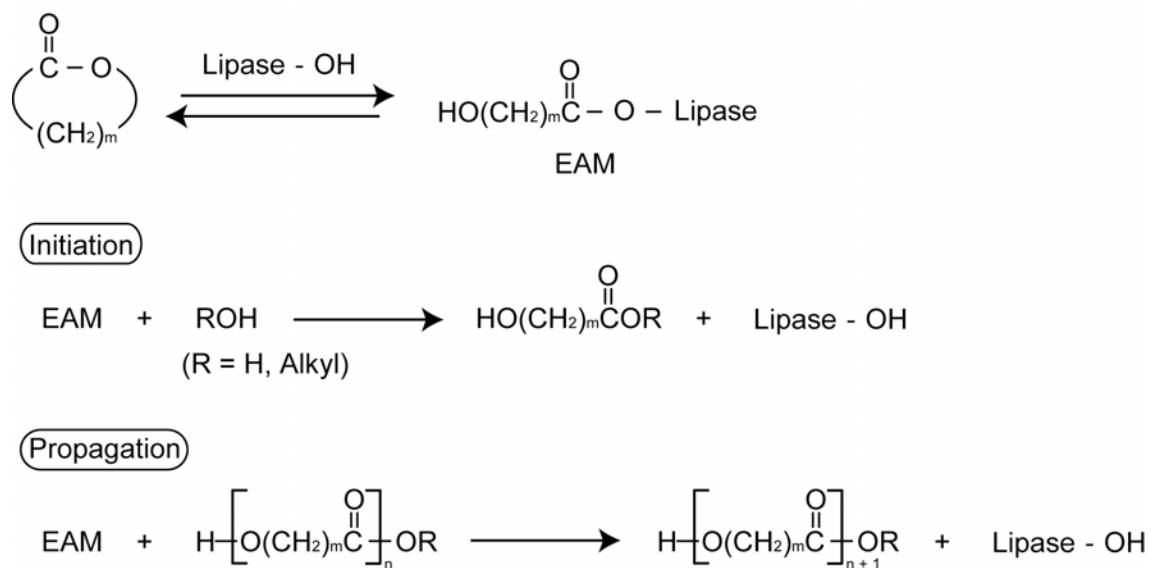
(PHB) は酵素充填カラムを用いた連続分解による環状オリゴマーの選択的合成が高収率で達成された¹⁰⁹⁻¹¹⁰⁾。本研究でも酵素触媒を用いたポリチオエステルのケミカルリサイクル性について評価した。Scheme 3.3 に示すように、モノマーから合成したときと同様に、ポリチオエステルに酵素を希薄条件下で作用させることでも、優れた重合性を有すると考えられる環状チオエステルへの分解が進行すれば、酵素を用いたポリチオエステルの一連のケミカルリサイクルが達成されることが考えられる。本章では、このケミカルリサイクル性についても評価した。



Scheme 3.3 Enzymatic degradation of polythioester into cyclic(thioester).

3.1.4 酵素触媒重合の反応機構と律速段階

酵素触媒を利用した開環重合反応は酵素によって活性化されたモノマー (Enzyme activated monomer: EAM) を経由することで進行することが Uyama, Kobayashi らにより提唱された¹¹¹⁾。提唱されたラクトン環の開環重合機構を Scheme 3.4 に示す。



Scheme 3.4 Proposed mechanism for enzymatic ring-opening polymerization of lactones.

セリン型リパーゼの活性部位にあるセリン残基がラクトン環のカルボニル炭素を求核攻撃することでラクトン環が開環し、EAM を形成する。EAM に対して水が求核攻撃することで重合反応の開始種が生成する。この水は、酵素に含まれている微量の自由水が用いられると考えられる。開始種末端の水酸基が順次、EAM を攻撃することでポリマー鎖が成長する。この反応の律速段階は EAM の形成時であることが種々の研究結果から明らかとなっている。

酵素開環重合の反応機構と律速段階に関する既存の研究は全て、環状ラクトンに関するものである¹¹²⁾。一方、酵素触媒による環状チオエステルの開環重合は報告例が無い¹¹²⁾ため、その反応機構や律速段階に関して知られていない。特に、環状チオエステルの開環重合は成長種末端がチオールであることから、律速段階や反応挙動が既存の報告例と大きく異なることが予想される。

そこで、本章では新規酵素重合反応である環状チオエステルの開環重合について重合挙動を精査し、重合の律速段階を明らかとすることを目的とした。

3. 2 試薬・機器

3. 2. 1 試薬

本章では、前章で最も高い活性を示したリパーゼ CA を用い、実験を行なった。リパーゼ CA は五酸化二リン存在下、常温で 2 時間減圧乾燥(3 mmHg)させてから用いた。

Table 3.1 Lipase CA.

Enzyme origin	Abbreviation	Manufacture
Immobilized lipase from <i>Candida antarctica</i> (Novozym 435) Activity = 10,000 PLU/g ^(a)	CA	Novozymes Japan

^(a) Lipase (B lipase) from *Candida antarctica* produced by submerged fermentation of genetically modified *Aspergillus oryzae* microorganism and adsorbed on a macroporous acrylic resin, having 10,000 PLU/g (propyl laurate units : lipase activity based on ester synthesis). The product has a water content of 1 - 2 wt%.

熱失活リパーゼ CA (Thermally deactivated lipase CA)は、50 mL ナスフラスコにリパーゼ CA 100 mg をはかり取り、これをオートクレーブ中で 120 °C、15 分間蒸気により加熱及び加圧し、次いで凍結乾燥することにより調製した。凍結乾燥後の熱失活リパーゼ CA の水分量は 0.5 wt%程度であった。

本章で用いた試薬を以下に示す。

Table 3.2 List of reagents for experiments.

試薬名	製造会社	等級
11 - メルカプトウンデカン酸 (11MU)	Aldrich Chem. Co., Inc.	
ヘキサン - 1,6 - ジチオール	Aldrich Chem. Co., Inc.	
ヘキサン - 1,6 - ジオール	関東化学 (株)	鹿特級
6 - メルカプト - 1 - ヘキサノール	Aldrich Chem. Co., Inc.	
セバシン酸ジメチル	関東化学 (株)	鹿一級
<i>n</i> - ノナン	東京化成 (株)	特級
トルエン (脱水)	関東化学 (株)	鹿特級
クロロホルム	信越化学工業 (株)	業務用
クロロホルム(stabilized with amylene)	関東化学 (株)	HPLC 用
メタノール	純正化学 (株)	HPLC 用
1 - プロパノール (脱水)	Aldrich Chem. Co., Inc.	

本章で用いた分析用試薬・その他実験用品を以下に示す。

Table 3.3 List of reagents for experimental analysis and others.

試薬名	製造会社	等級
酸化リン (V)	関東化学 (株)	特級
シリカゲル 60N (球状、中性)	関東化学 (株)	カラム用
海砂 (15-20 メッシュ)	純正化学 (株)	化学用
TLC 板	Merck	
モレキュラーシーブス 4A (ビーズ)	純正化学 (株)	化学用
HYDRANAL - Coulomat AG	Aldrich Chem. Co., Inc.	
重クロロホルム	ISOTEC Inc.	

3. 2. 2 機器

サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) 高分子量用

ポンプ	PU - 980	日本分光 (株)
カラムオーブン	CO - 1565	日本分光 (株)
カラム	K - G, K - 804L (8 mm ϕ $\times$ 300 mm)	日本分光 (株)
検出器	RI - 930	日本分光 (株)
レコーダー	807 - IT	日本分光 (株)
デガッサー	DG - 980 - 50	日本分光 (株)
溶離液	1%エタノール含有クロロホルム	
測定条件	流速	1.0 mL/min
	測定温度	35 °C
	試料注入量	100 μ L (1 mg/mL)
検量線用標準試料	ポリスチレンスタンダード (M_w = 233,000、110,000、50,000、 17,500、9,000、2,200、906)	ケムコ化学 (株)

サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) 低分子量用

ポンプ	PU - 980	日本分光 (株)
カラムオーブン	CO - 1565	日本分光 (株)
カラム	K - G, K - 801 (8mm ϕ $\times$ 300 mm)	日本分光 (株)
検出器	RI - 1530	日本分光 (株)
レコーダー	807 - IT	日本分光 (株)
デガッサー	DG - 980 - 50	日本分光 (株)
溶離液	1%エタノール含有クロロホルム	
測定条件	流速	1.0 mL/min
	測定温度	室温
	試料注入量	20 μ L (3 mg/mL)

その他の機器

FT - NMR

JEOL JNM - LA300

日本電子 (株)

VARIAN NMR300

VARIAN. Inc.

APCI MS

LCQ - mass spectrometer system

Finnigan Mat Inc.

高感度示差屈折計

DRM - 3000

大塚電子（株）

動的光散乱測定装置

DAWN EOS

Wyatt Technology Corp.

カールフィッシャー微量水分測定装置

831 KF coulometer

メトローム・シバタ（株）

油浴

OMS - 1

石井商店（株）

マグネットスターラー

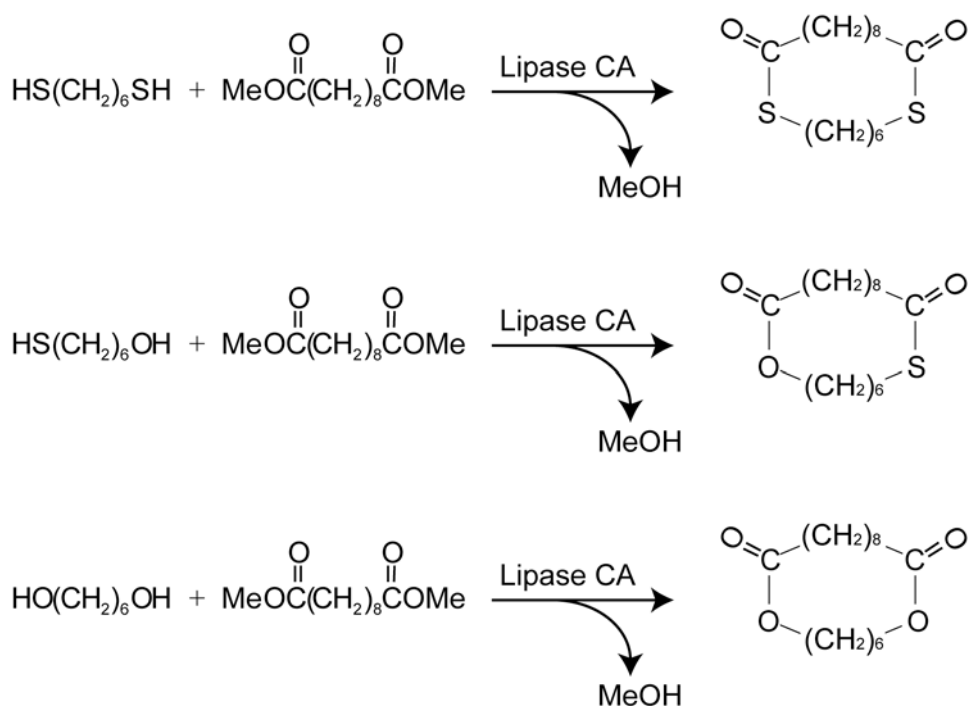
EG

石井商店（株）

3.3 実験方法

3.3.1 AA - BB 型環状チオエステルの開環重合

3.3.1.1 Cyclic(hexanedithiol - sebacate), cyclic(mercaptohexanol - sebacate)及び cyclic(hexanediol - sebacate)の調製



Scheme 3.5 Enzymatic preparation of AA-BB type cyclic(thioester), cyclic(thio-oxyester) and cyclic(ester).

Scheme 3.5 に示すように 3 種の環状体を合成した。それぞれの合成法及び ¹H NMR スペクトルを以下に示した。

・ Cyclic(hexanedithiol - sebacate)

磁気回転子を付したネジキャップ付き試験管(23×150 mm)にセバシン酸ジメチル 92.2 mg (0.40 mmol)及びヘキサン - 1,6 - ジチオール 60.7 mg (0.40 mmol)をはかり取り、これに、リパーゼ CA 184.4 mg (セバシン酸ジメチルに対して 200 wt%)と *n* - ノナン 20 mLを加えた。試験管内をアルゴンで置換し、モレキュラーシーブス簡易容器を付し、密栓後オイルバスにて 120 °Cで 48 時間反応させた。反応終了後、反応物にクロロホルム (安定化剤としてアミレンを含む) 10 mLを加え、リパーゼ CA をろ別し、ろ液を回収した。ろ別したリパーゼ CA を 40 mL のクロロホルムで更に洗浄し、さきの

ろ液と併せてロータリーエバポレーターで減圧濃縮した。ついで、昇温デシケーター中 50 °C、3 mmHg で粗生成物を十分に乾燥させた。

ついで、粗生成物を展開溶媒として酢酸エチル/ヘキサン = 1/12 (v/v)を用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィー(1 gの基質に対してシリカゲル 60 N 100 g)で $R_f = 0.28$ のフラクションを分取することで精製し、cyclic(hexanedithiol - sebacate)を収率 16.7 %で得た。Cyclic(hexanedithiol - sebacate)の ^1H NMR を Fig. 3.1 に示した。また、元素分析の結果も併せて示した。

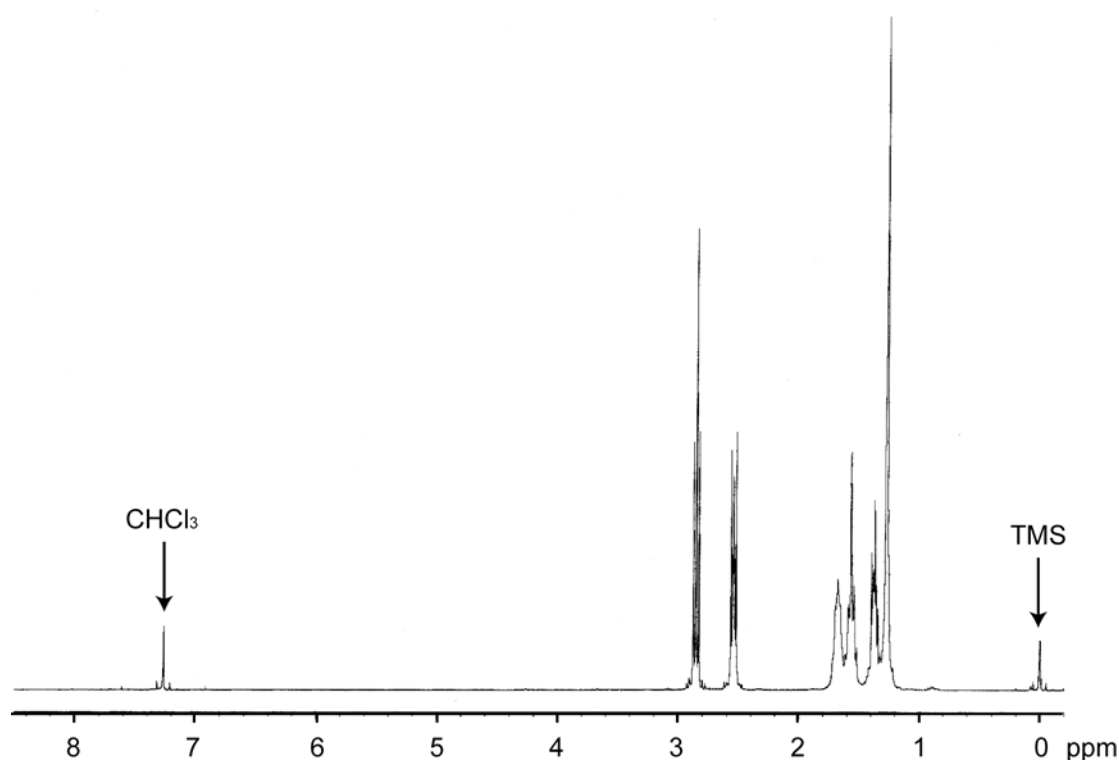


Fig. 3.1 300 MHz ^1H NMR spectrum of cyclic(hexanedithiol - sebacate) in CDCl_3 .

Cyclic(hexanedithiol - sebacate): ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3); δ (ppm) = 1.29 (m, 8H, - $\underline{\text{CH}_2}$ - $\underline{\text{CH}_2}$ - CH_2 - CH_2 - COS -), 1.37 (m, 4H, - S - CH_2 - CH_2 - $\underline{\text{CH}_2}$ -), 1.56 (m, 4H, - CH_2 - CH_2 - $\underline{\text{CH}_2}$ - CH_2 - COS -), 1.67 (m, 4H, - S - CH_2 - $\underline{\text{CH}_2}$ - CH_2 -), 2.54 (t, 4H, - CH_2 - CH_2 - CH_2 - $\underline{\text{CH}_2}$ - COS - , $J = 6.2$ Hz), 2.85 (t, 4H, - S - $\underline{\text{CH}_2}$ - CH_2 - CH_2 - , $J = 6.6$ Hz).

$\text{C}_{16}\text{H}_{28}\text{O}_2\text{S}_2$ (316.52): Calcd. C 60.71, H 8.92, S 20.26; Found C 60.83, H 9.01, S 20.10.

• Cyclic(mercaptohexanol - sebacate)

前述の cyclic(hexanedithiol - sebacate)合成の際のヘキサン - 1,6 - ジチオール 60.7 mg (0.40 mmol)を 6 - メルカプト - 1 - ヘキサノール 53.6 mg (0.40 mmol)と置き換え、

・ Cyclic(hexanediol - sebacate)

前述の cyclic(hexanedithiol - sebacate)合成の際のヘキサン - 1,6 - ジチオール 60.7 mg (0.40 mmol)をヘキサン - 1,6 - ジオール 47.3 mg (0.40 mmol)と置き換え、同様の実験操作を行なうことで粗生成物を得た。

ついで、粗生成物を展開溶媒として酢酸エチル/ヘキサン = 1/6 (v/v)を用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィー(1 gの基質に対してシリカゲル 60 N 100 g)で $R_f = 0.38$ のフラクションを分取することで精製し、cyclic(hexanediol - sebacate)を収率 77.5 % で得た。Cyclic(hexanediol - sebacate)の ^1H NMR を Fig. 3.3 に示した。また、元素分析の結果も併せて示した。

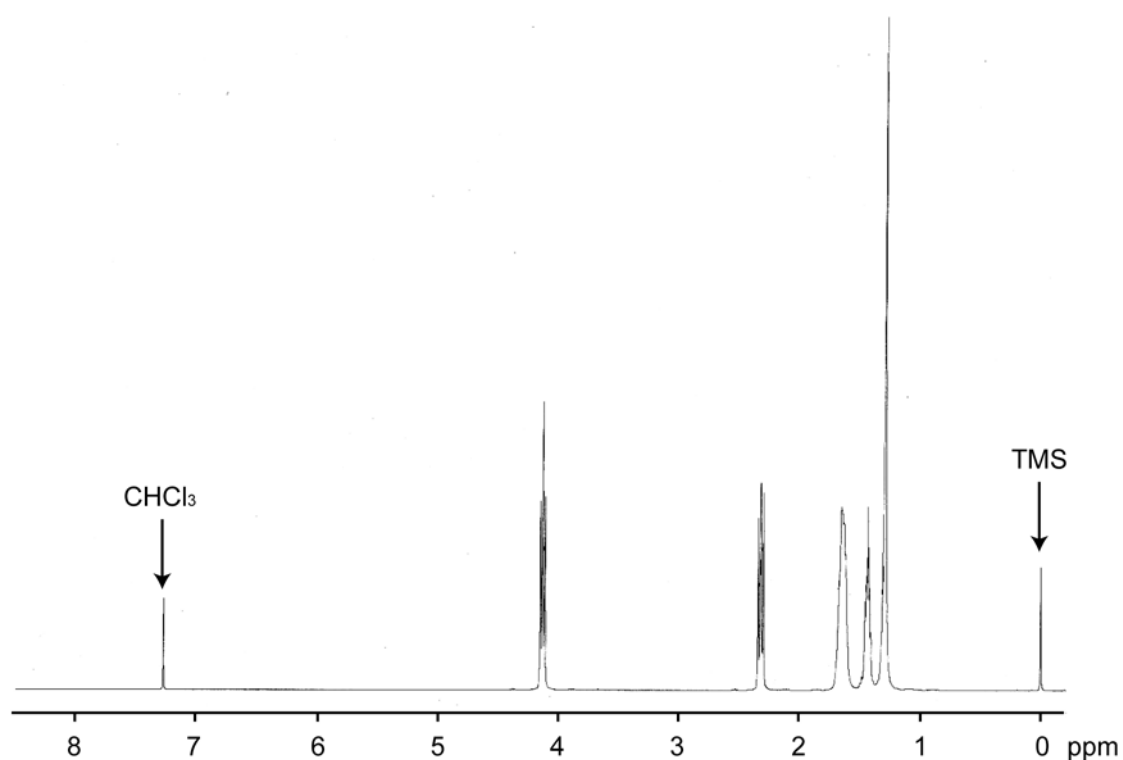


Fig. 3.3 300 MHz ^1H NMR spectrum of cyclic(hexanediol - sebacate) in CDCl_3 .

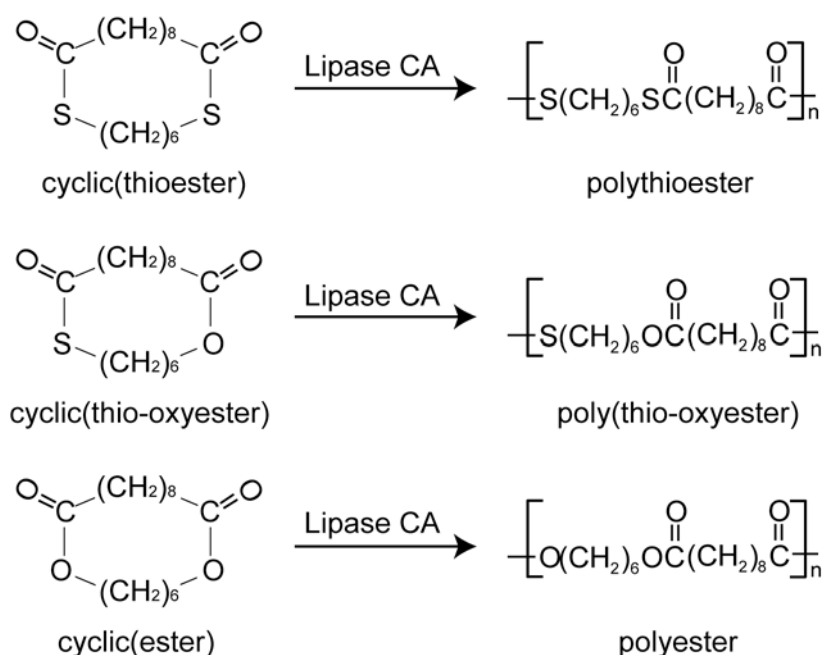
Cyclic(hexanediol - sebacate): ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3); δ (ppm) = 1.30 (m, 8H, - $\text{OOC} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \underline{\text{CH}_2} - \underline{\text{CH}_2} -$), 1.44 (tt, 4H, - $\text{O} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \underline{\text{CH}_2} -$, $J = 3.6, 3.6$ Hz), 1.64 (m, 8H, - $\text{OOC} - \text{CH}_2 - \underline{\text{CH}_2} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 -$, - $\text{O} - \text{CH}_2 - \underline{\text{CH}_2} - \text{CH}_2 -$), 2.32 (t, 4H, - $\text{OOC} - \underline{\text{CH}_2} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 -$, $J = 6.5$ Hz), 4.13 (t, 4H, - $\text{O} - \underline{\text{CH}_2} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 -$, $J = 5.7$ Hz).

$\text{C}_{16}\text{H}_{28}\text{O}_4$ (284.39): Calcd. C 67.57, H 9.92; Found C 67.73, H 9.84.

3.3.1.2 APCI MS 測定用試料溶液の調製

環状体 0.1 mg を 1.5 mL マイクロテストチューブにはかり取り、クロロホルムを 1 mL 加え溶解することで試料溶液を調製した。測定には、アセトニトリル/水 = 95/5 (v/v) の溶離液を用いた。

3.3.1.3 Cyclic(hexanedithiol - sebacate), cyclic(mercaptohexanol - sebacate)及び cyclic(hexanediol - sebacate)の開環重合



Scheme 3.6 Enzymatic ring-opening polymerization of AA-BB type cyclic(thioester), cyclic(thio-oxyester) and cyclic(ester).

Scheme 3.6 に示すように 3 種の環状体から、それぞれ相当するポリマーを開環重合により合成した。それぞれの合成法及び ¹H NMR スペクトルを以下に示した。

・ Poly(hexanedithiol - sebacate)

モレキュラーシーブス 4A をアルミホイルで作成した簡易容器に満たし、使用前に 150 °C で 2 時間加熱することで、十分に乾燥させた。ネジキャップ付き試験管(13×100 mm)に cyclic(hexanedithiol - sebacate) 20 mg、別の小試験管にリパーゼ CA 14 mg をそれぞれはかり取り、2 時間減圧乾燥させた。ついで、小試験管内のリパーゼ CA を cyclic(hexanedithiol - sebacate)を含むネジキャップ付き試験管に移し入れた。試験管内をアルゴンで置換し、モレキュラーシーブス簡易容器を付し、密栓後オイルバスにて

120 °Cで48時間反応させた。

反応終了後、反応物にクロロホルム（安定化剤としてアミレンを含む）15 mL を加え、50 °Cのウォーターバスで数分加熱し、ついでリパーゼ CA を熱時ろ過した。ろ液を減圧濃縮し、粗生成物を得た。粗生成物は再沈殿（良溶媒：クロロホルム 400 μ L、貧溶媒：メタノール 20 mL）を2回繰り返すことで精製し、白色フィルム状に poly(hexanedithiol - sebacate) [$M_w = 115,000$ 、 $M_w/M_n = 2.3$] を収率 90 % で得た。

精製ポリマーの ^1H NMR を Fig. 3.4 に示した。

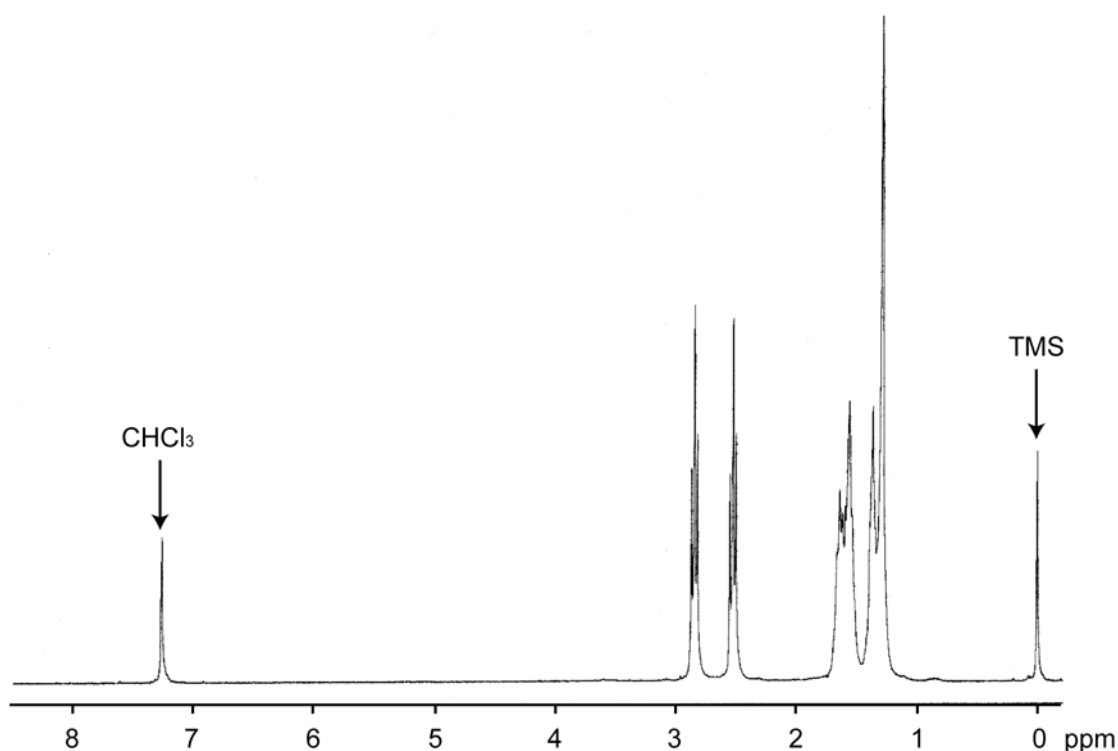


Fig. 3.4 300 MHz ^1H NMR spectrum of poly(hexanedithiol - sebacate) in CDCl_3 obtained by ring-opening polymerization.

Poly(hexanedithiol - sebacate): ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3); δ (ppm) = 1.29 (m, 8H, - $\underline{\text{CH}_2}$ - $\underline{\text{CH}_2}$ - CH_2 - CH_2 - COS -), 1.37 (m, 4H, - S - CH_2 - CH_2 - $\underline{\text{CH}_2}$ -), 1.56 (m, 4H, - CH_2 - CH_2 - $\underline{\text{CH}_2}$ - CH_2 - COS -), 1.64 (tt, 4H, - S - CH_2 - $\underline{\text{CH}_2}$ - CH_2 - , $J = 7.3$ Hz, 7.3 Hz), 2.53 (t, 4H, - CH_2 - CH_2 - CH_2 - $\underline{\text{CH}_2}$ - COS - , $J = 7.5$ Hz), 2.85 (t, 4H, - S - $\underline{\text{CH}_2}$ - CH_2 - CH_2 - , $J = 7.3$ Hz).

・ Poly(mercaptohexanol - sebacate)

前述の開環重合による poly(hexanedithiol - sebacate) 合成の際の cyclic(hexanedithiol - sebacate) 20 mg を cyclic(mercaptohexanol - sebacate) 20 mg と置き換え、同様の実験操作を行なうことで粗生成物を得た。

粗生成物は再沈殿（良溶媒：クロロホルム 400 μ L、貧溶媒：メタノール 20 mL）を 2 回繰り返すことで精製し、白色フィルム状に poly(mercaptohexanol - sebacate) [M_w = 117,000、 M_w/M_n = 1.9] を収率 92 % で得た。

精製ポリマーの ^1H NMR を Fig. 3.5 に示した。

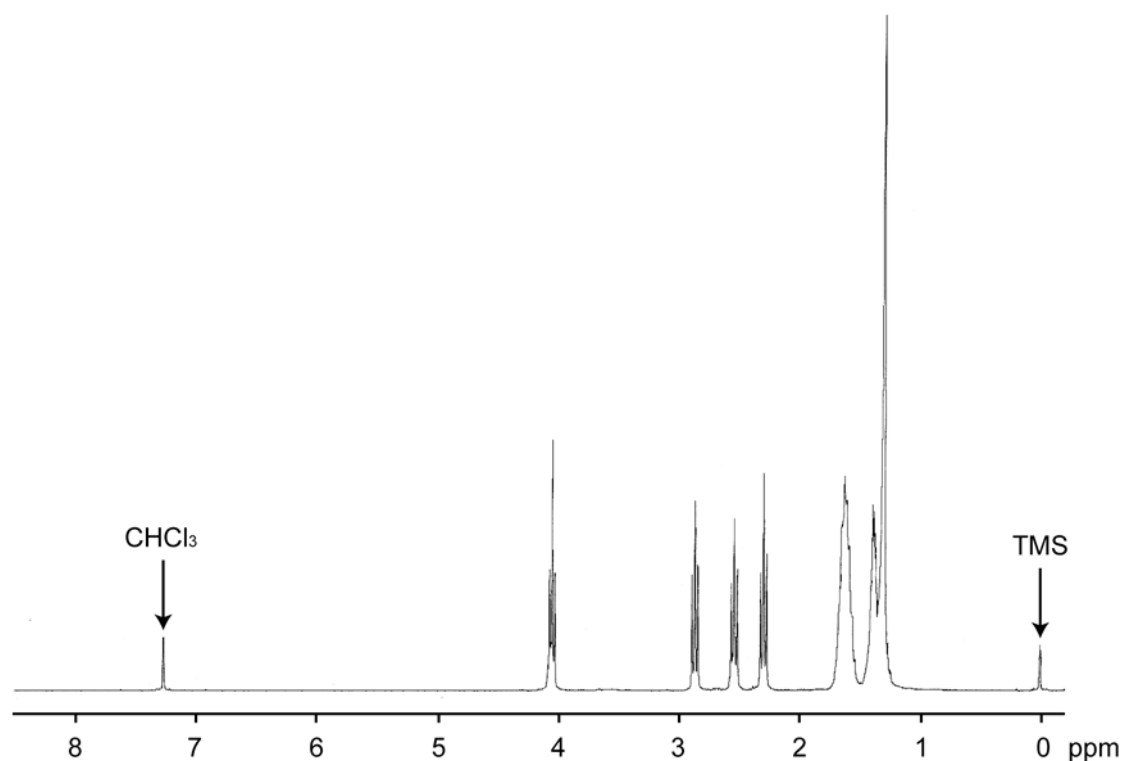


Fig. 3.5 300 MHz ^1H NMR spectrum of poly(mercaptohexanol - sebacate) in CDCl_3 obtained by ring-opening polymerization.

Poly(mercaptohexanol - sebacate): ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3); δ (ppm) = 1.30 (m, 8H, - SOC - CH_2 - CH_2 - CH_2 - CH_2 - CH_2 - CH_2 - CH_2 - CH_2 - CH_2 - COO -), 1.38 (m, 4H, - S - CH_2 - CH_2 - CH_2 - CH_2 - CH_2 - CH_2 - O -), 1.61 (m, 8H, - S - CH_2 - CH_2 - CH_2 - CH_2 - CH_2 - CH_2 - O - , - SOC - CH_2 - CH_2 - CH_2 - CH_2 - CH_2 - CH_2 - CH_2 - CH_2 - COO -), 2.28 (t, 2H, - SOC - CH_2 - CH_2 - CH_2 - CH_2 - CH_2 - CH_2 - CH_2 - CH_2 - COO - , J = 7.4 Hz), 2.53 (t, 2H, - SOC - CH_2 - CH_2 - CH_2 - CH_2 - CH_2 - CH_2 - CH_2 - CH_2 - COO - , J = 7.7 Hz), 2.86 (t, 2H, - S - CH_2 - CH_2 - CH_2 - CH_2 - CH_2 - CH_2 - O - , J = 7.4 Hz), 4.05 (t, 2H, - S - CH_2 - CH_2 - CH_2 - CH_2 - CH_2 -

$\text{CH}_2 - \text{O} -$, $J = 6.8 \text{ Hz}$).

• Poly(hexanediol - sebacate)

前述の開環重合による poly(hexanedithiol - sebacate) 合成の際の cyclic(hexanedithiol - sebacate) 20 mg を cyclic(hexanediol - sebacate) 20 mg と置き換え、同様の実験操作を行なうことで粗生成物を得た。

粗生成物は再沈殿（良溶媒：クロロホルム 400 μL 、貧溶媒：メタノール 20 mL）を 2 回繰り返すことで精製し、白色フィルム状に poly(hexanediol - sebacate) [$M_w = 218,000$, $M_w/M_n = 1.6$] を収率 94 % で得た。

精製ポリマーの ^1H NMR を Fig. 3.6 に示した。

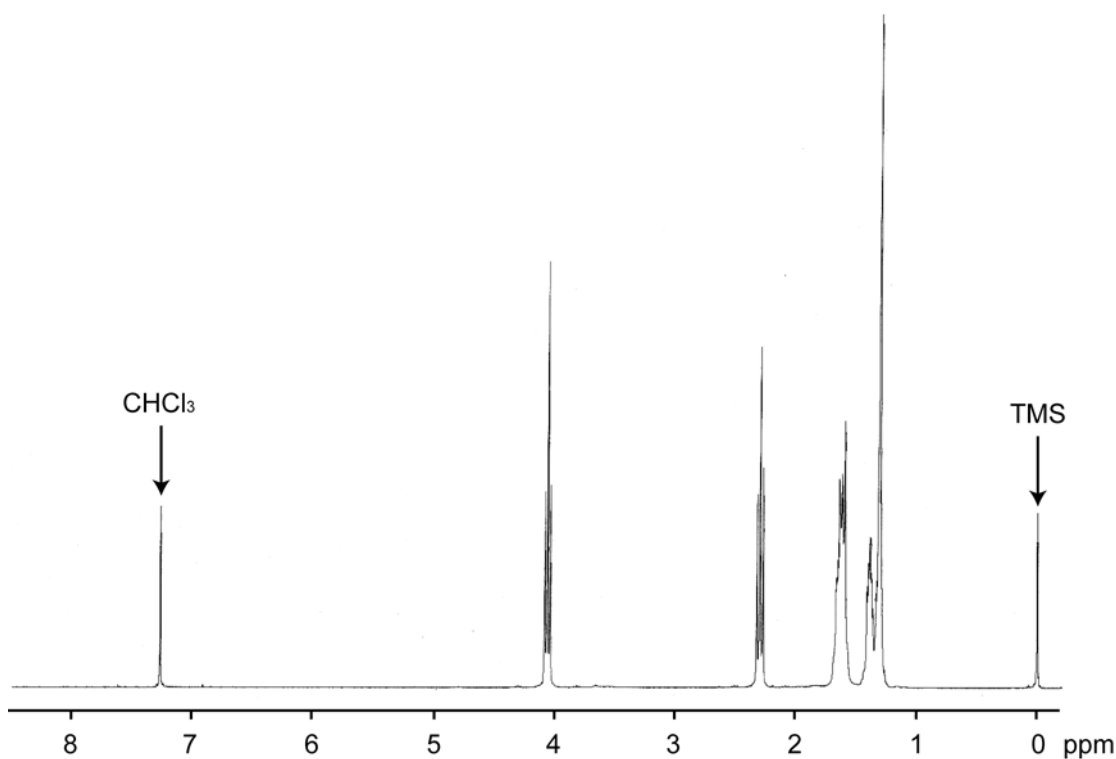
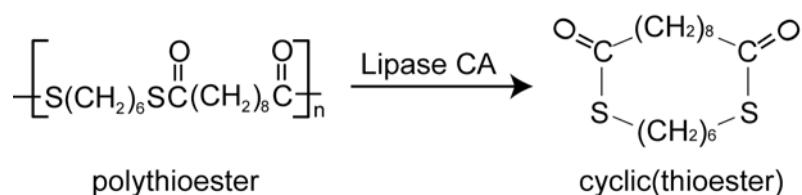


Fig. 3.6 300 MHz ^1H NMR spectrum of poly(hexanediol - sebacate) in CDCl_3 obtained by ring-opening polymerization.

Poly(hexanediol - sebacate): ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3); δ (ppm) = 1.30 (m, 8H, - $\text{OOC} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \underline{\text{CH}_2} - \underline{\text{CH}_2} -$), 1.38 (t, 4H, - $\text{O} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \underline{\text{CH}_2} -$, $J = 7.6 \text{ Hz}$), 1.62 (m, 8H, - $\text{OOC} - \text{CH}_2 - \underline{\text{CH}_2} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 -$, - $\text{O} - \text{CH}_2 - \underline{\text{CH}_2} - \text{CH}_2 -$), 2.29 (t, 4H, - $\text{OOC} - \underline{\text{CH}_2} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 -$, $J = 7.5 \text{ Hz}$), 4.06 (t, 4H, - $\text{O} - \underline{\text{CH}_2} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 -$, $J = 6.6 \text{ Hz}$).

3.3.1.4 Poly(hexanedithiol - sebacate) の cyclic(hexanedithiol - sebacate)への分解



Scheme 3.7 Enzymatic degradation of polythioester into the cyclic(thioester).

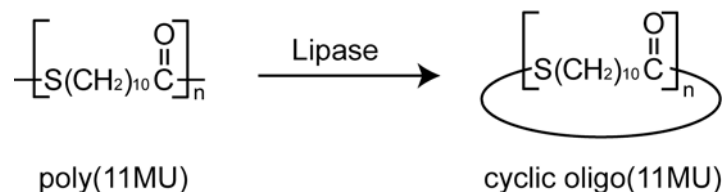
酵素触媒を用いたポリチオエステルの分解反応の一例を以下に示す。

磁気回転子を付した 200 mL ナス型フラスコに poly(hexanedithiol - sebacate) [$M_w = 115,000$, $M_w/M_n = 2.3$] 50.0 mg 及びリパーゼ CA 200 mg (ポリマーに対して 400 wt%) をはかり取り、常温で 2 時間減圧乾燥させた。これに *n*-ノナン 50 mL を加え、ナス型フラスコ内をアルゴンで置換した後、モレキュラーシーブス簡易容器を付し、密栓した。これをオイルバスにて 120 °C で 48 時間反応させた。反応終了後、反応混合物にクロロホルム (安定化剤としてアミレンを含む) 100 mL を加え、リパーゼ CA をろ別し、ろ液をロータリーエバポレーターを用いて減圧濃縮した。濃縮後、昇温デシケーター中 50 °C、3 mmHg で粗生成物を十分に乾燥させた。

ついで、粗生成物を展開溶媒として酢酸エチル/ヘキサン = 1/12 (v/v)を用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィー (1 g の基質に対してシリカゲル 60 N 100 g) で $R_f = 0.28$ のフラクションを分取することで精製し、cyclic(hexanedithiol - sebacate)を 34.7 mg (収率 69.3 %) で得た。Cyclic(hexanedithiol - sebacate)の ^1H NMR は Fig. 3.1 と完全に一致したので、ここでは省略する。

3.3.2 AB 型環状チオエステルの開環重合

3.3.2.1 Cyclic oligo(11MU)の調製



Scheme 3.8 Enzymatic preparation of cyclic oligo(11MU) by the degradation of poly(11MU).

Scheme 3.8 に示す通り、poly(11MU)を酵素を用い希薄条件下で分解することで、cyclic oligo(11MU)を得た。実験操作法及び ^1H NMR スペクトルを以下に示した。

磁気回転子を付した 200 mL ナス型フラスコに poly(11MU) [$M_w = 34,000$ 、 $M_w/M_n = 2.3$] 100 mg 及びリパーゼ CA を 200 mg はかり取り、2 時間減圧乾燥させた。試験管内をアルゴンで置換し、 n -ノナン 50 mL を加え、モレキュラーシーブス簡易容器を付し、密栓した。これを、オイルバスにて 110 °C で 24 時間反応させた。反応終了後、反応物にクロロホルム(安定化剤としてアミレンを含む) 100 mL を加え、50 °C のウォーターバスで数分加熱し、ついで、リパーゼ CA をセライト熱時ろ過した。ついで、ろ液を減圧濃縮することで粗生成物を得た。

得られた粗生成物の精製を展開溶媒として酢酸エチル/ヘキサン = 1/15 (v/v)を用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィー(1 g の基質に対してシリカゲル 60 N 100g)で $R_f = 0.28$, 0.19, 0.09 のフラクションを分取することで精製し、cyclic oligo(11MU)を収率 32.6 % で得た。Cyclic(11MU) dimer ($R_f = 0.28$) の ^1H NMR を Fig. 3.7 に示した。また、元素分析の結果も併せて示した。

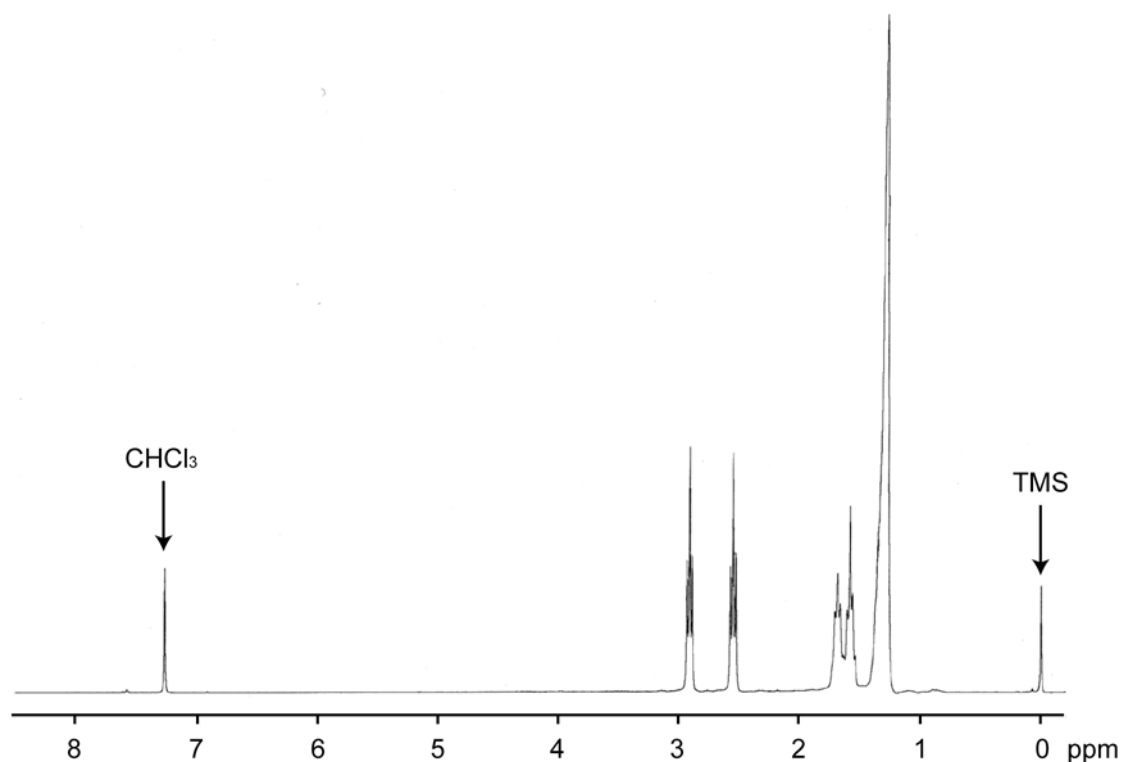
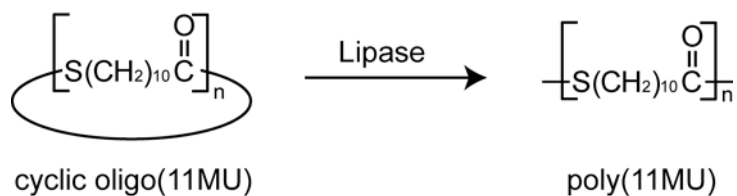


Fig. 3.7 300 MHz ^1H NMR spectrum of cyclic(11MU) dimer in CDCl_3 .

Cyclic(11MU) dimer: ^1H NMR (300MHz, CDCl_3); δ (ppm) = 1.28 (m, 12H, - S - CH_2 - CH_2 - $(\text{CH}_2)_6$ - CH_2 - CH_2 - CO -), 1.59 (m, 4H, - S - CH_2 - CH_2 - $(\text{CH}_2)_6$ - CH_2 - CH_2 - CO -), 2.55 (t, 2H, - S - CH_2 - CH_2 - $(\text{CH}_2)_6$ - CH_2 - CH_2 - CO - , $J = 6.9$ Hz), 2.91 (t, 2H, - S - CH_2 - CH_2 - $(\text{CH}_2)_6$ - CH_2 - CH_2 - CO - , $J = 6.6$ Hz). $(\text{C}_{11}\text{H}_{20}\text{OS})_n$ (200.34) $_n$; Calcd. C 65.95, H 10.06, S 16.01; Found C 66.16, H 10.27, S 15.92.

3.3.2.2 Cyclic oligo(11MU)の開環重合



Scheme 3.9 Enzymatic ring-opening polymerization of cyclic oligo(11MU).

Scheme 3.9 に示すように cyclic oligo(11MU)から、開環重合により poly(11MU)を得た。実験操作法を以下に示した。

モレキュラーシーブス 4A をアルミホイルで作成した簡易容器に満たし、使用前に 150 °C で 2 時間加熱することで、十分に乾燥させた。ネジキャップ付き試験管(13×100 mm)に cyclic oligo(11MU) 60 mg、別の小試験管にリパーゼ CA 36 mg をそれぞれはかり取り、2 時間減圧乾燥させた。ついで、小試験管内のリパーゼ CA を cyclic oligo(11MU) を含むネジキャップ付き試験管に移し入れた。試験管内をアルゴンで置換し、モレキュラーシーブス簡易容器を付し、密栓後オイルバスにて 110 °C で 48 時間反応させた。

反応終了後、反応物にクロロホルム（安定化剤としてアミレンを含む）15 mL を加え、50 °C のウォーターバスで数分加熱し、ついでリパーゼ CA を熱時ろ過した。ろ液を減圧濃縮し、粗生成物を得た。粗生成物は再沈殿（良溶媒：クロロホルム 400 μ L、貧溶媒：メタノール 20 mL）を 2 回繰り返すことで精製し、白色フィルム状に poly(11MU) [$M_w = 38,000$ 、 $M_w/M_n = 2.1$] を収率 80 % で得た。

精製ポリマーの ^1H NMR は Fig. 2.5 と一致したので、ここでは省略する。

3.3.3 環状チオエステルの開環重合挙動の解析

3.3.3.1 環状モノマーの転化率の推移

環状チオエステルのリパーゼ CA による開環重合挙動について検討した。モノマー転化率は低分子用 SEC を用い、モノマー濃度に対するピーク面積をプロットし、検量線を作成することで算出した。Cyclic(hexanedithiol - sebacate)は測定開始から 7.1 min に単一ピークとして検出された。クロロホルム中、cyclic(hexanedithiol - sebacate) 3 mg/mL の濃度で検出されたピークを Fig. 3.8 に示す。

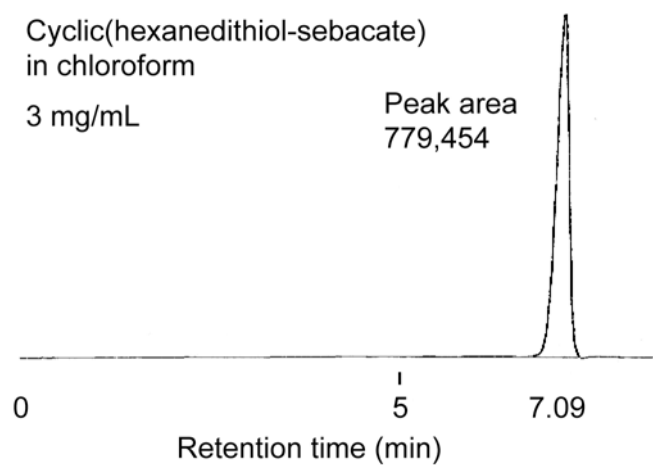


Fig. 3.8 SEC chart of cyclic(hexanedithiol - sebacate).

同様に、1.5 mg/mL, 0.75 mg/mL, 0.375 mg/mL の各モノマー濃度で検出された cyclic(hexanedithiol - sebacate)のピーク面積から検量線を作成した。得られた検量線を Fig. 3.9 に示す。

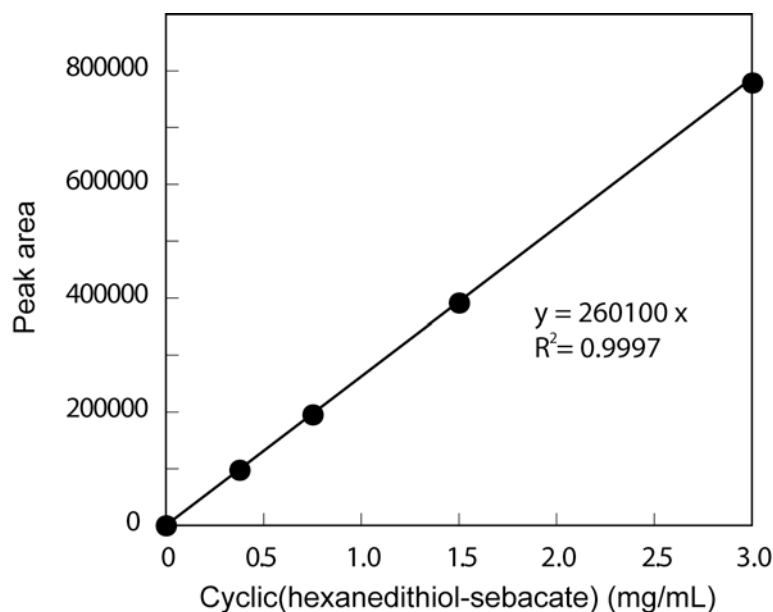


Fig. 3.9 Calibration curve of cyclic(hexanedithiol - sebacate).

Fig. 3.9 の検量線を用い、反応時間に対する開環重合反応のモノマー転化率の推移を求めた。また、同様に cyclic(mercaptohexanol - sebacate)及び cyclic(hexanediol - sebacate)の検量線を作成し、それぞれの反応時間に対する開環重合反応のモノマー転化率の推移も求めた。

3.3.3.2 求核種の添加による影響

反応系に求核種として 1 - プロパノールを添加することが、モノマー転化率に及ぼす影響を cyclic(hexanedithiol - sebacate)及び cyclic(hexanediol - sebacate) について調べた。反応の一例を以下に示す。

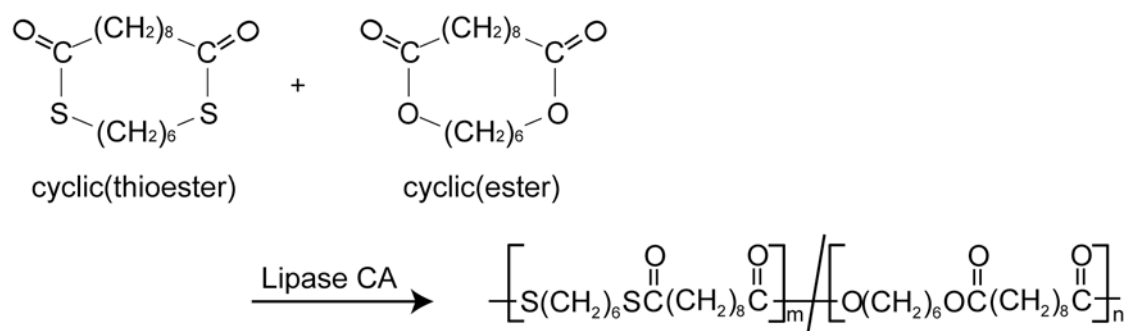
ネジキャップ付き試験管(13×100 mm)に cyclic(hexanedithiol - sebacate) 20 mg (0.063 mmol)、別の小試験管にリパーゼ CA 14 mg をそれぞれはかり取り、2 時間減圧乾燥させた。cyclic(hexanedithiol - sebacate)を含むネジキャップ付き試験管に無水トルエン 63.2 μ L と 1 - プロパノール 3.8 mg (0.063 mmol)を加えた。試験管内をアルゴンで置換し、密栓後オイルバスにて 50 $^{\circ}$ C になるように数分間加熱した。ついで、小試験管内のリパーゼ CA を cyclic(hexanedithiol - sebacate)、無水トルエン及び 1 - プロパノールを含むネジキャップ付き試験管に素早く移し入れ、密栓し 50 $^{\circ}$ C で 1 ～ 5 分間攪拌した。

反応終了後、反応物にクロロホルム (安定化剤としてアミレンを含む) 5 mL を加え、

リパーゼ CA をろ別した。ろ液を減圧濃縮し、乾燥させることで反応物を得た。反応物が 3 mg/mL になるようにクロロホルムに溶解し、低分子用 SEC を測定した。Fig. 3.9 に示した低分子用 SEC の検量線を用いモノマー転化率を求めた。

求核種の影響を確認するために、同様の実験を 1 - プロパノールを加えない反応系でも行なった。また、cyclic(hexanedithiol - sebacate)の代わりに、cyclic(hexanediol - sebacate)を用い、実験を行なった。

3.3.3.3 酵素認識性の比較



Scheme 3.10 Reaction between cyclic(thioester) and cyclic(ester).

酵素によるチオエステル結合とエステル結合の認識性を比較するために、Scheme 3.10 に示す通り、cyclic(hexanedithiol - sebacate)と cyclic(hexanediol - sebacate)のモル仕込み比率を 1:9 から 9:1 まで変化させ、酵素重合初期（ポリマー収率 30 %未満）のポリマー中に含まれるそれぞれの割合を ^1H NMR より算出した。

反応時間は、モノマー仕込み比によって 0.5 h ~ 6 h と変化させた。Cyclic(hexanedithiol - sebacate) : cyclic(hexanediol - sebacate) = 1 : 1 (mol/mol)で反応させた例を以下に示す。

モレキュラーシーブス 4A をアルミホイルで作成した簡易容器に満たし、使用前に 150 °C で 2 時間加熱することで、十分に乾燥させた。ネジキャップ付き試験管(13×100 mm)に cyclic(hexanedithiol - sebacate) 10 mg (0.032 mmol)と cyclic(hexanediol - sebacate) 9 mg (0.032 mmol)を、別の小試験管にリパーゼ CA 13.3 mg をそれぞれはかり取り、2 時間減圧乾燥させた。試験管内をアルゴンで置換し、密栓後オイルバスにて 120 °C で数分間加熱し、基質の溶解を確認した。ついで、小試験管内のリパーゼ CA をネジキャップ付き試験管に素早く移し入れ、モレキュラーシーブス簡易容器を付し、4 時間反応させた。

反応終了後、反応物にクロロホルム（安定化剤としてアミレンを含む）15 mL を加え、50 °C のウォーターバスで数分加熱し、ついでリパーゼ CA を熱時ろ過した。ろ液を減圧濃縮し、粗生成物を得た。粗生成物は再沈殿（良溶媒：クロロホルム 200 μL 、貧溶媒：メタノール 8 mL）を 2 回繰り返すことで精製し、貧溶媒に析出した高分子量体 [$M_w = 23,000$ 、 $M_w/M_n = 2.5$]が 5.0 mg 得られた。

高分子量体の ^1H NMR を Fig. 3.10 に示した。

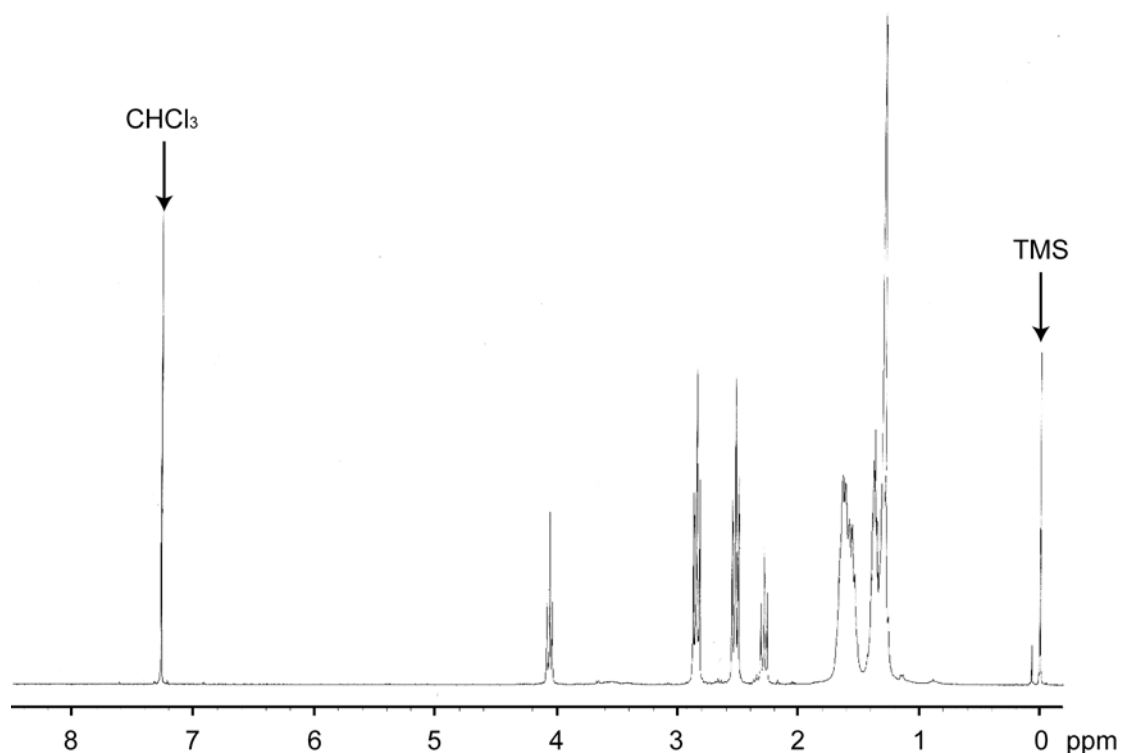


Fig. 3.10 300 MHz ^1H NMR spectrum of high molecular weight component in CDCl_3 obtained by ring-opening polymerization of cyclic(hexanedithiol - sebacate) and cyclic(hexanediol - sebacate).

High molecular weight component [Poly{(hexanedithiol - sebacate) - *co* - (hexanediol - sebacate)}]: ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3); δ (ppm) = 1.30 (m, 16H, - $\underline{\text{CH}_2}$ - $\underline{\text{CH}_2}$ - CH_2 - CH_2 - COS -, - $\underline{\text{CH}_2}$ - $\underline{\text{CH}_2}$ - CH_2 - CH_2 - COO -), 1.37 (m, 8H, - S - CH_2 - CH_2 - $\underline{\text{CH}_2}$ -, - O - CH_2 - CH_2 - $\underline{\text{CH}_2}$ -), 1.56 (m, 4H, - CH_2 - CH_2 - $\underline{\text{CH}_2}$ - CH_2 - COS -), 1.62 (m, 12H, - S - CH_2 - $\underline{\text{CH}_2}$ - CH_2 -, - CH_2 - CH_2 - $\underline{\text{CH}_2}$ - CH_2 - COO -, - O - CH_2 - $\underline{\text{CH}_2}$ - CH_2 -), 2.28 (t, 4H, - CH_2 - CH_2 - CH_2 - $\underline{\text{CH}_2}$ - COO -, $J=7.5$ Hz), 2.53 (t, 4H, - CH_2 - CH_2 - CH_2 - $\underline{\text{CH}_2}$ - COS -, $J=7.5$ Hz), 2.85 (t, 4H, - S - $\underline{\text{CH}_2}$ - CH_2 - CH_2 -, $J=7.3$ Hz), 4.06 (t, 4H, - O - $\underline{\text{CH}_2}$ - CH_2 - CH_2 -, $J=6.6$ Hz).

また、貧溶媒に溶解した、未反応物あるいは低分子量体が 13.4 mg 得られた。
低分子量体の ^1H - NMR を Fig. 3.11 に示した。

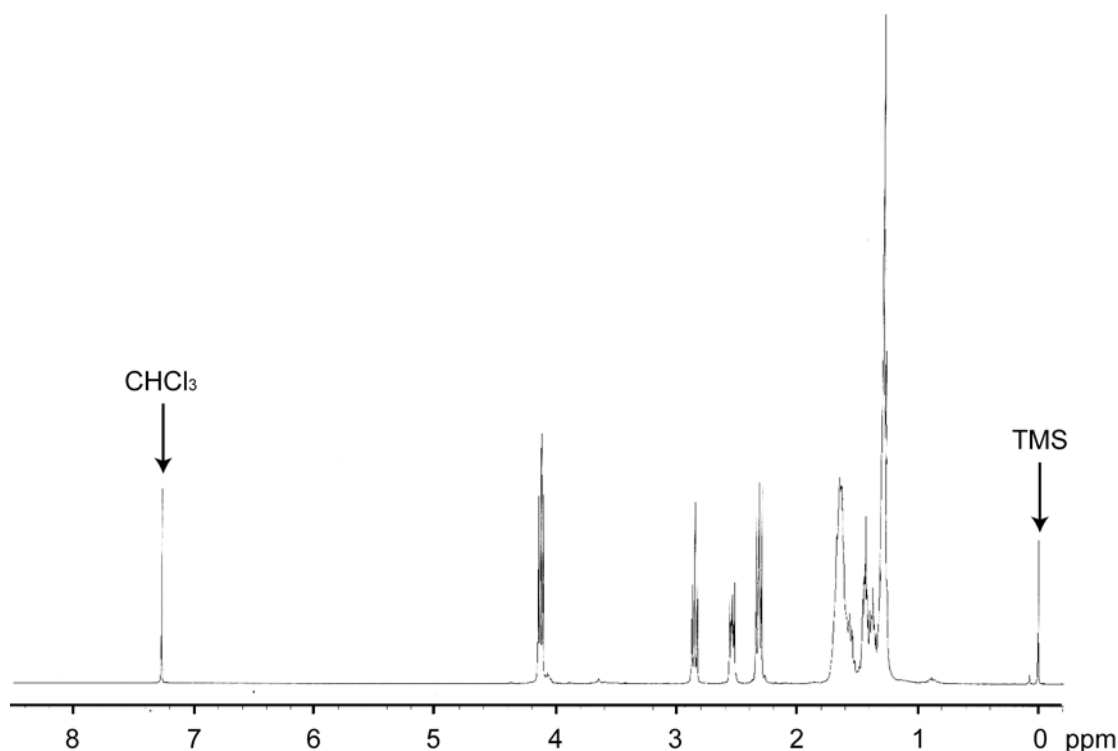


Fig. 3.11 300 MHz ^1H NMR spectrum of low molecular weight component in CDCl_3 obtained by ring-opening polymerization of cyclic(hexanedithiol - sebacate) and cyclic(hexanediol - sebacate).

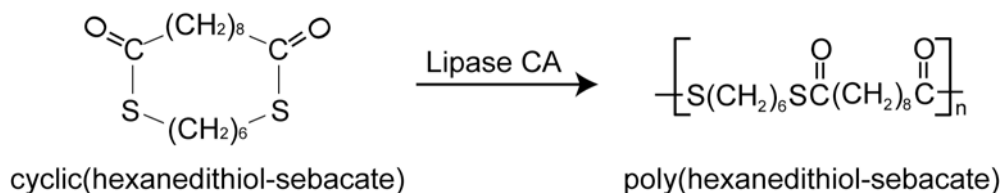
Low molecular weight component [Mainly a mixture of cyclic(hexanedithiol - sebacate) and cyclic(hexanediol - sebacate)]: ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3); δ (ppm) = 1.27 (m, 8H, - CH_2 - CH_2 - CH_2 - CH_2 - COS -), 1.30 (m, 8H, - CH_2 - CH_2 - CH_2 - CH_2 - COO -), 1.37 (m, 4H, - S - CH_2 - CH_2 - CH_2 -), 1.44(m, 4H, - O - CH_2 - CH_2 - CH_2 -), 1.56 (m, 4H, - CH_2 - CH_2 - CH_2 - CH_2 - COS -), 1.65 (m, 12H, - S - CH_2 - CH_2 - CH_2 - , - CH_2 - CH_2 - CH_2 - CH_2 - COO - , - O - CH_2 - CH_2 - CH_2 -), 2.32 (t, 4H, - CH_2 - CH_2 - CH_2 - CH_2 - COO - , J = 6.5 Hz), 2.54 (t, 4H, - CH_2 - CH_2 - CH_2 - COS - , J = 6.2 Hz), 2.86 (t, 4H, - S - CH_2 - CH_2 - CH_2 - , J = 6.6 Hz), 4.13 (t, 4H, - O - CH_2 - CH_2 - CH_2 - , J = 5.7 Hz).

ポリマー中のモル比率の算出方法等、詳細は次節の結果・考察項に記す。

3.4 結果・考察

3.4.1 AA - BB 型環状チオエステルの開環重合

本節では、Scheme 3.11 に示す cyclic(hexanedithiol - sebacate)の開環重合について検討した。



Scheme 3.11 Ring-opening polymerization of cyclic(hexanedithiol - sebacate).

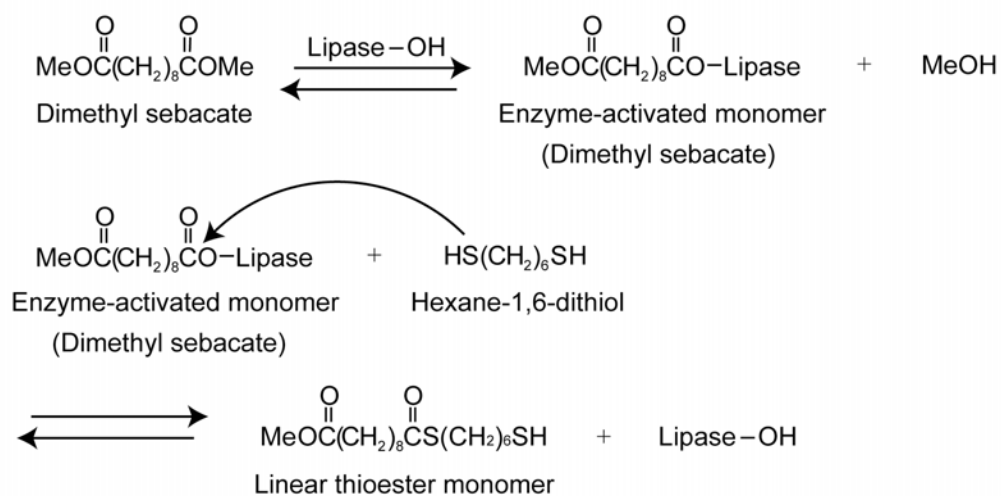
3.4.1.1 環状モノマーの調製

(1) 環状(チオエステル)モノマーの調製

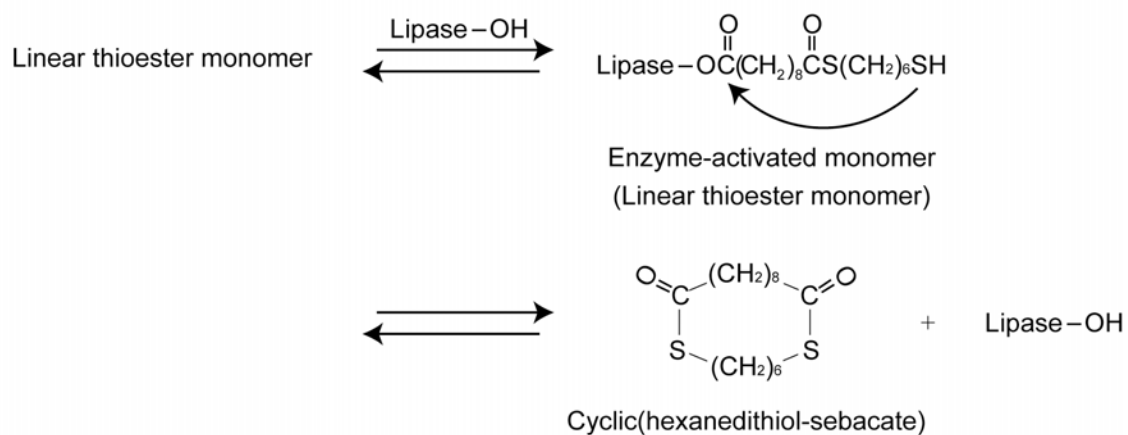
第 2.4.2 節で、ジチオールと種々のジエステルの重縮合による異なるメチレン鎖長を有する AA - BB 型ポリチオエステルが高収率で得られることが見出された。しかしながら、Table 2.12 に示した通り、いずれも分子量が 1 万程度に限定されてしまうため、フィルム形成が困難であった。そこで、酵素重合で一般的に高分子量体が得られることが報告されている開環重合に着目した¹⁰⁶⁾。始めに、ヘキサン - 1,6 - ジチオールとセバシン酸ジメチルにリパーゼ CA を希薄条件で作用させることで環状チオエステルの合成を行なった。Scheme 3.12 に示す通り、十分に希薄な条件下でリパーゼ CA を作用させることで、環状体が得られることが予想される。すなわち、まずヘキサン - 1,6 - ジチオールとセバシン酸ジメチルの分子間反応により鎖状チオエステルモノマーが得られ(I. Intermolecular transesterification)、ついで分子内環化反応の進行に伴い、環状チオエステルが得られる(II. Intramolecular transesterification)。

従って、同種類のリパーゼを用いても、基質濃度を変化させることにより重合と分解(環化)の平衡が存在すると考えられる。*n* - ノナン中、120 °C、セバシン酸ジメチルに対して 4.6 mg/mL でリパーゼ CA を作用させ、シリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製した後に、高分子用 SEC を用い測定した SEC チャートを Fig. 3.12 に示す。

I . Intermolecular transesterification



II . Intramolecular transesterification



Scheme 3.12 Reaction mechanism for enzymatic synthesis of cyclic(thioester).

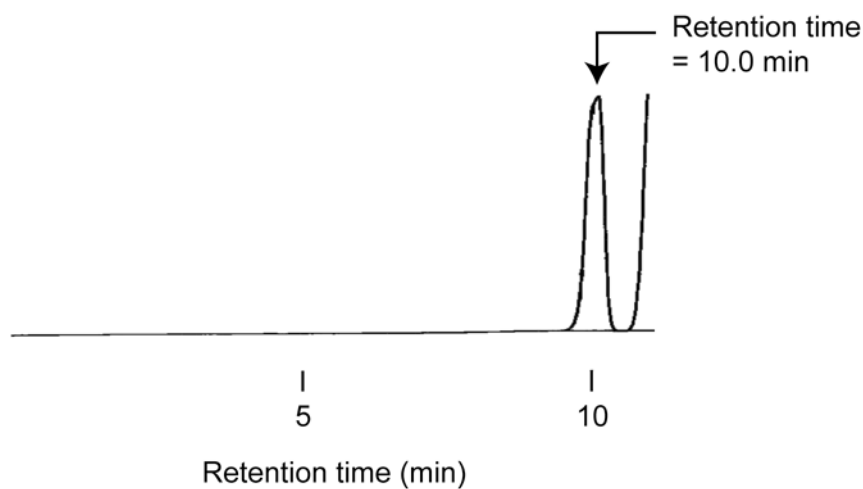


Fig. 3.12 SEC profiles of reaction product after purification by silica gel column chromatography.

シリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製後、単一ピークの SEC チャートが確認された。単離精製後の ^1H NMR は Fig. 3.1 で示した通りである。また、この単離精製物の APCI MS スペクトルを Fig. 3.13 に示す。APCI MS は MALDI TOF MS とイオン化の方法が異なり、比較的低分子量の化合物を検出する際に有効である ⁷⁸⁾。

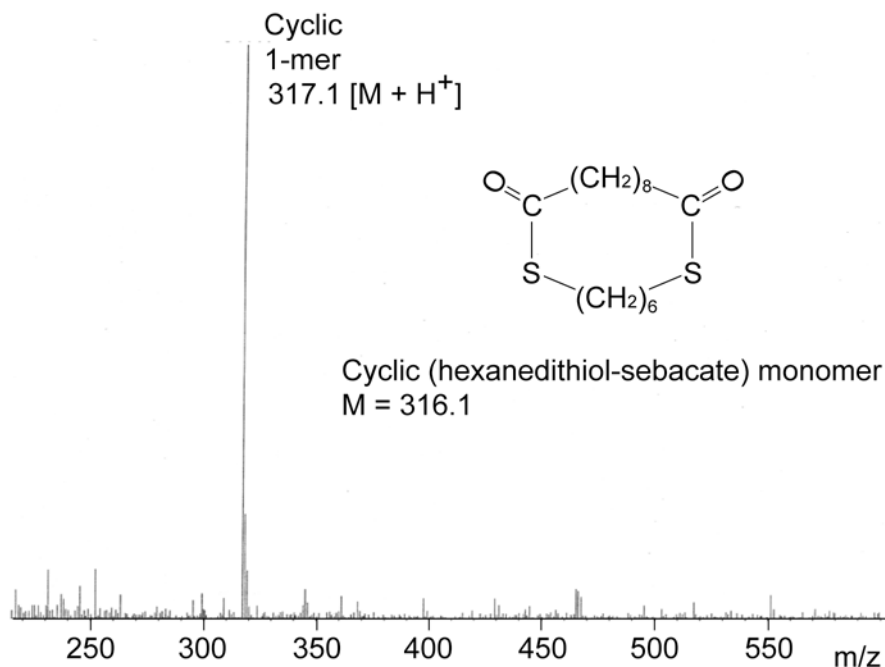


Fig. 3.13 APCI MS spectrum of cyclic(hexanedithiol - sebacate) after purification by silica gel column chromatography.

APCI MS スペクトルを解析した結果、環状一量体に相当するピークが検出された。 ^1H NMR スペクトル、元素分析、SEC チャート、APCI MS スペクトルの結果から、ヘキサンジチオール及びセバシン酸ジメチルに *n*-ノナン中、希薄条件下でリパーゼ CA を作用させることで cyclic(hexanedithiol - sebacate) が得られることが明らかとなった。Cyclic(hexanedithiol - sebacate) の単離収率は 16.7 % であったが、その他の残りの部分は未反応物あるいは鎖状オリゴマーであった。従って、基質濃度、酵素量等の反応条件をさらに精査することで収率の向上は見込まれると考えられる。この単離された環状モノマーを開環重合の原料に用いることとした。

(2) 環状(チオオキシエステル)モノマー及び環状(エステル)モノマーの調製

同様にして得られた cyclic(mercaptohexanol - sebacate) 及び cyclic(hexanediol - sebacate) の APCI MS スペクトルを Fig. 3.14 及び Fig. 3.15 に示す。

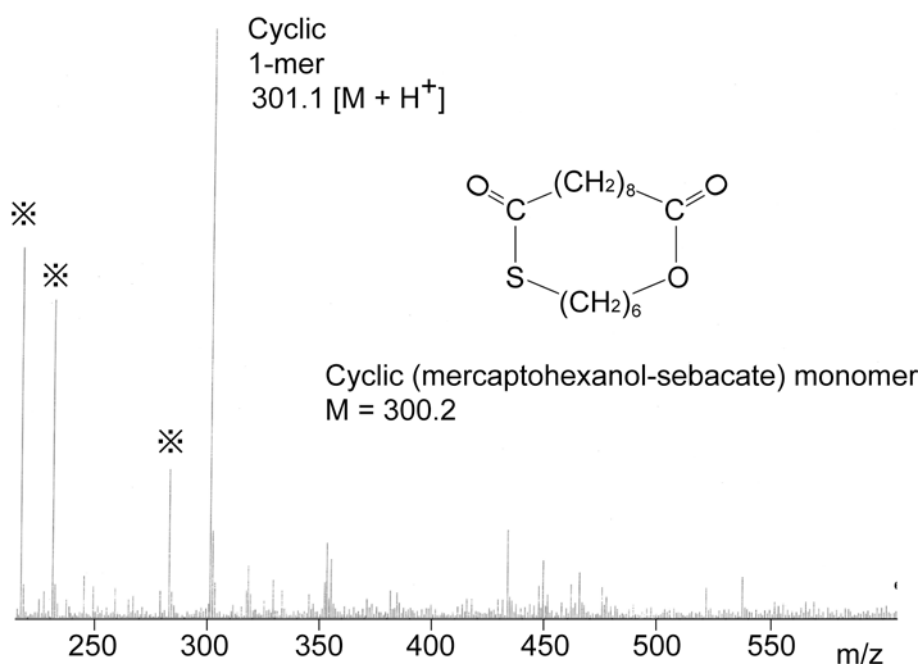


Fig. 3.14 APCI MS spectrum of the cyclic(mecaptohexanol - sebacate) after purification by silica gel column chromatography. Peaks with asterisk indicate the plasticizer-derived peaks for APCI MS measurements which contains in the solvent.

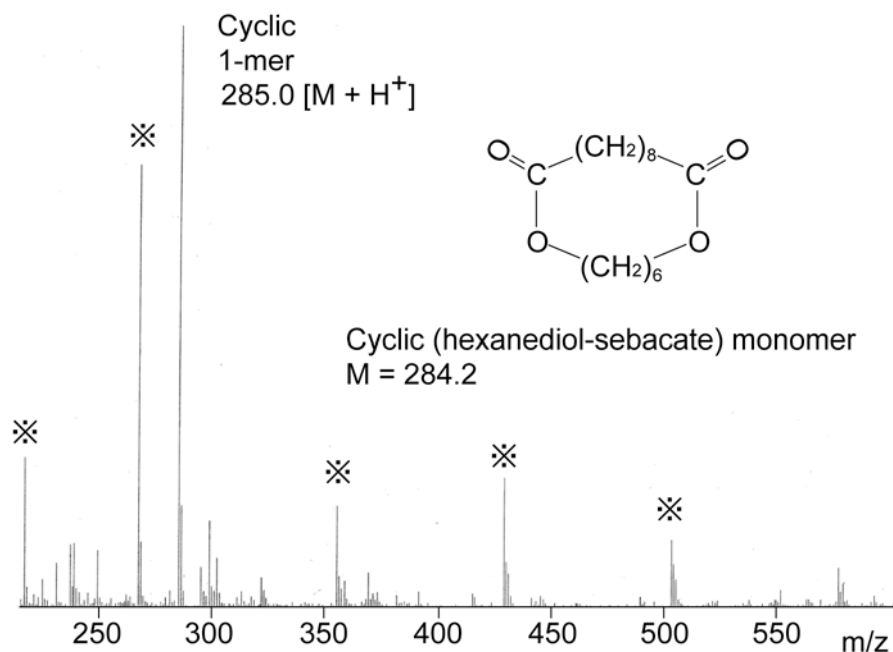
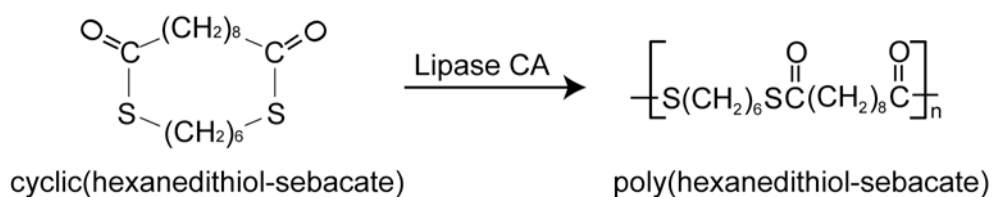


Fig. 3.15 APCI MS spectrum of cyclic(hexanediol - sebacate) after purification by silica gel column chromatography. Peaks with asterisk indicate the plasticizer-derived peaks for APCI MS measurements which contains in the solvent.

Cyclic(mercaptohexanol - sebacate), cyclic(hexanediol - sebacate)ともに、環状一量体に相当するピークが APCI MS スペクトルから検出された。Cyclic(hexanedithiol - sebacate)の分子構造を解析したときと同様に、¹H NMR スペクトル、元素分析、SEC チャート、APCI MS スペクトルの結果から、cyclic(mercaptohexanol - sebacate)は 23.3 %、cyclic(hexanediol - sebacate)は 77.5 %で単離されたことを確認した。これら環状モノマーも以降の開環重合の原料として用いた。

3.4.1.2 Cyclic(hexanedithiol - sebacate)の開環重合



Scheme 3.13 Ring-opening polymerization of cyclic(hexanedithiol - sebacate).

(1) 反応温度

リパーゼ CA を用いた cyclic(hexanedithiol - sebacate)の開環重合における反応温度は、前章で検討した重縮合反応と同様に、得られるポリマーの分子量、収率に大きく影響を与えることが考えられる。そこで、本反応の至適温度を検討するために、90 ~ 130 °Cの範囲で 2 日間反応を行い、生成ポリマーの分子量及び収率を測定した。その結果を Fig. 3.16 に示す。

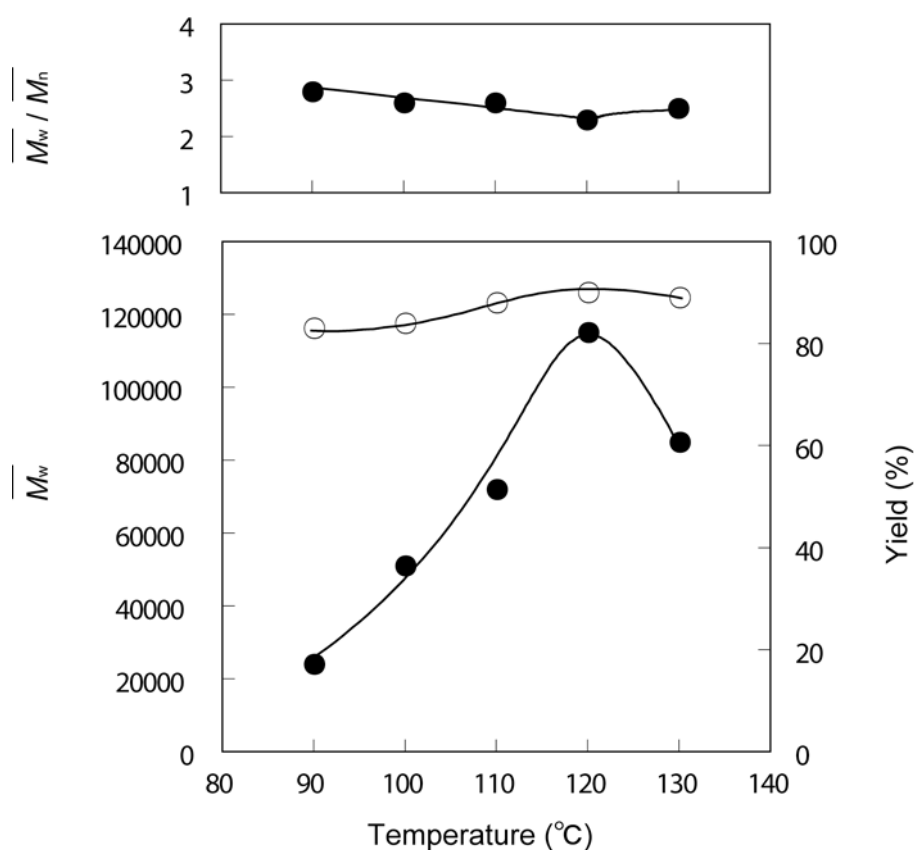


Fig. 3.16 Effect of reaction temperature on ring-opening polymerization of cyclic(hexanedithiol - sebacate).

● : M_w and M_w/M_n , ○ : yield

Reaction conditions : A mixture of cyclic(hexanedithiol - sebacate) (20 mg) and lipase CA (70 wt%) was reacted in bulk for 2 days with MS 4A placed at the top of the vial.

前章の Fig. 2.23 で示した重縮合における結果と同様に、cyclic(hexanedithiol - sebacate)の開環重合も 120 °Cで分子量は最大となった。また、130 °Cでは分子量の低下が確認された。これは 2.4.2 節で示された結果と同様であり、熱による酵素の活性の低下が考えられる。

ポリマー収率は分子量にほとんど依存せず、検討した温度領域では 80 ~ 90 %で大きく変化しなかった。開環重合がエステル交換反応を伴わずにリビング的に進行するのであれば、モノマー転化率と分子量の間には相関関係が存在するものと思われる。このとき、モノマー転化率とポリマー収率はほぼ同様の挙動を示すと考えられる。本反応では、ポリマー収率は大きく変化しないにも関わらず、分子量は 90 °Cでは 24,000、120 °Cでは 115,000 と大きく異なった。従って、開環重合の進行と同時に生成したポリマー間でのエステル交換反応も進行していることが示唆される。本反応の一連の重合挙動についての詳細は後述する。

(2) 酵素量

酵素量が開環重合に及ぼす影響について検討するために、バルク中、10 ～ 80 wt% の酵素量で 120 °C、2 日間反応を行い、生成ポリマーの分子量を SEC を用いて測定した。結果を Fig. 3.17 に示す。

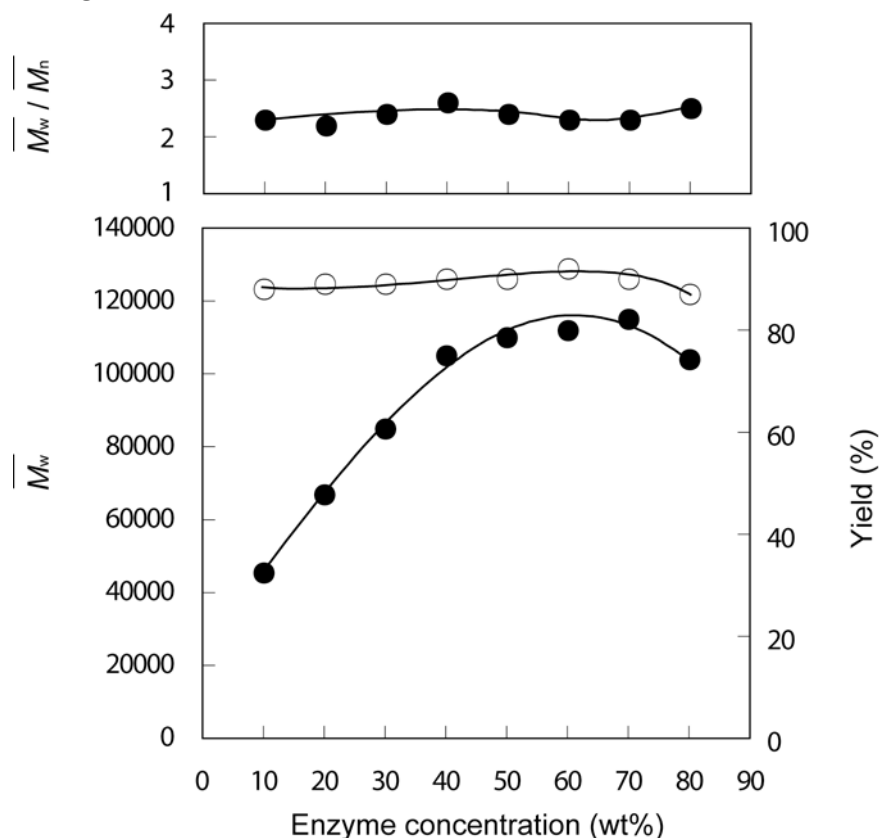


Fig. 3.17 Effect of enzyme concentration on ring-opening polymerization of cyclic(hexanedithiol - sebacate).

● : M_w and M_w/M_n , ○ : yield

Reaction conditions : A mixture of cyclic(hexanedithiol - sebacate) (20 mg) and lipase CA was reacted in bulk for 2 days with MS 4A placed at the top of the vial.

酵素量が cyclic(hexanedithiol - sebacate)に対して 70 wt%のときに、最大の分子量が得られた。また、10 wt%から 40 wt%にかけては酵素量の増加に伴い、分子量の大幅な増加が確認された。ここで、リパーゼ CA を 10 wt%または 70 wt%を用い、バルク中、120 °Cで 2 日間反応させ、生成物の再沈殿を行なう前に測定した SEC チャートを Fig. 3.18 に示す。

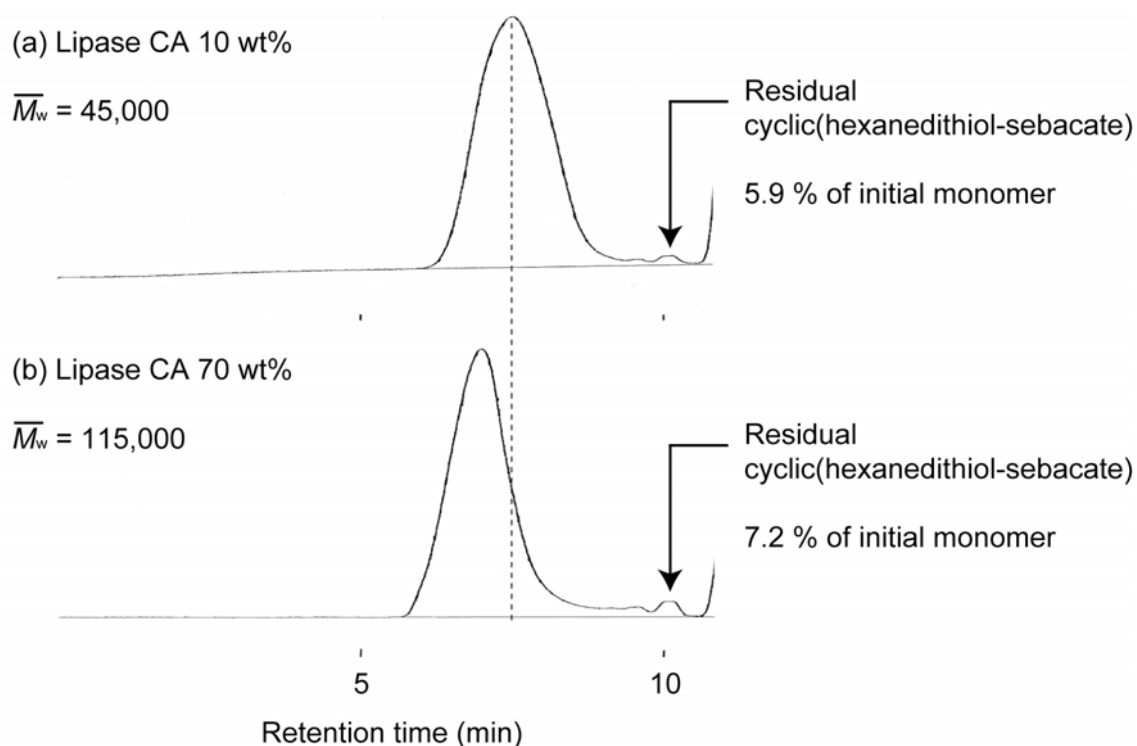


Fig. 3.18 SEC profiles of ring-opening polymerization products of cyclic(hexanedithiol - sebacate).

Reaction conditions : A mixture of cyclic(hexanedithiol - sebacate) (20 mg) and lipase CA [(a) : 10 wt%, (b) : 70 wt%] was reacted in bulk for 2 days with MS 4A placed at the top of the vial.

リパーゼ CA 10 wt%、70 wt%どちらの場合も 120 °C、48 時間反応後に大部分の環状モノマーの消費が確認された。すなわち、高分子量体を得るためには、環状モノマーがある程度消費されてから、ポリマー鎖間で起こるエステル交換反応をいかに効率的に行なうかが重要になる。酵素量が少ない方が系内で反応開始種として作用する酵素中の自由水も減少する。従って、モノマー転化率が同程度であれば、酵素量が少ない方が分子量の増加が期待されるはずである¹¹³⁾。その様な結果が得られなかった要因として、10 wt%程度の酵素量では、環状体はほぼ定量的に消費されるものの、その後のエステル交換反応の進行が効率的に進行しないことが挙げられる。

エステル交換反応を効率的に進行させるために、ある程度の酵素量が必要なことは、第 2.4.2 節で示した重縮合によるポリチオエステルの合成結果においても明らかである。

(3) 経時変化と直接重縮合反応との比較

これまでに検討した至適条件で反応を行ない、生成ポリマーの分子量の経時変化を測定した。

ヘキササン - 1,6 - ジチオールとセバシン酸ジメチルの重縮合の経時変化の結果と併せて Fig. 3.19 に示す。

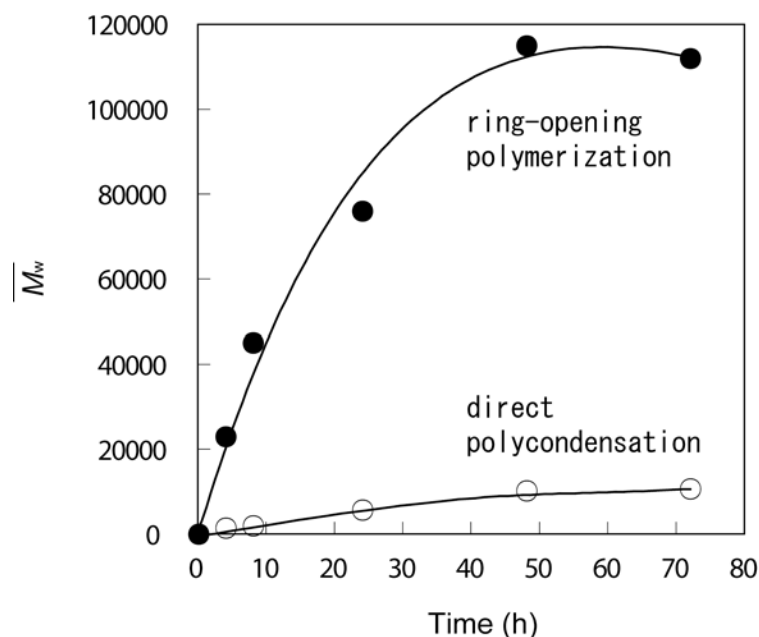


Fig. 3.19 Effect of reaction time on synthesis of poly(hexanedithiol - sebacate).

● : ring-opening polymerization

○ : direct polycondensation

Reaction conditions :

Ring-opening polymerization : A mixture of cyclic(hexanedithiol - sebacate) (20 mg) and lipase CA (70 wt%) was reacted in bulk at 120 °C with MS 4A placed at the top of the vial.

Direct polycondensation : A mixture of hexane-1,6-dithiol (31.3 mg) and diethyl sebacate (51.7 mg) and lipase CA (70 wt%) was reacted in bulk at 120 °C with MS 4A placed at the top of the vial.

開環重合反応は反応開始後 24 時間以降も緩やかに分子量の増加が確認され、分子量は 48 時間で最大となった。また、Fig. 3.20 に開環重合における SEC チャートの経時変化を示す。

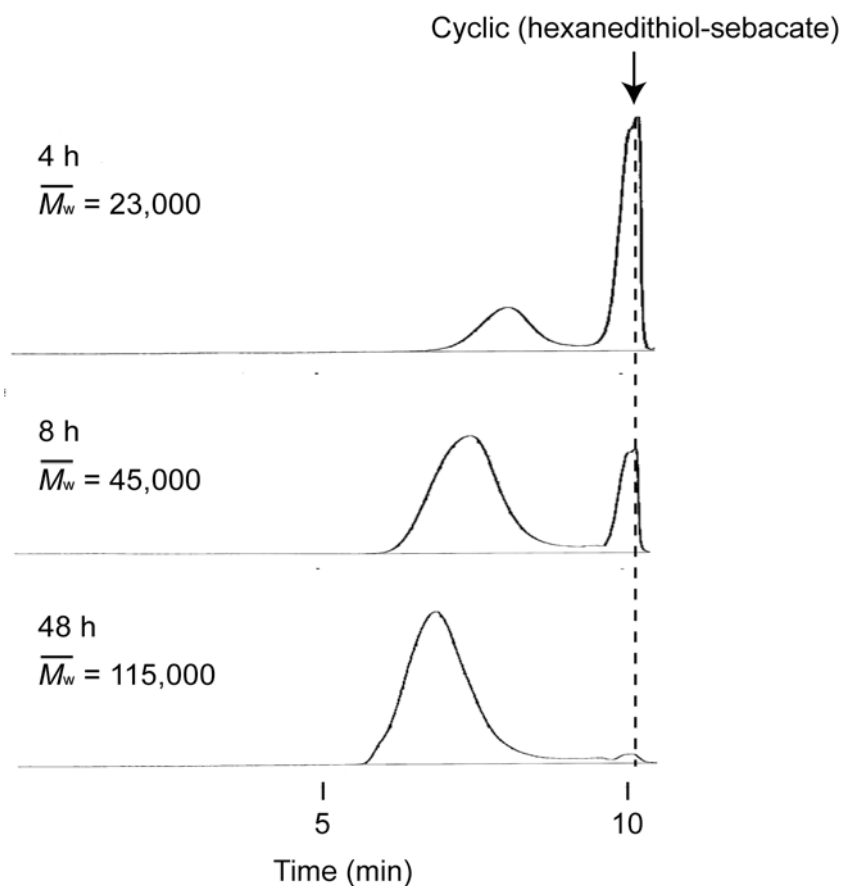


Fig. 3.20 Time course for SEC profile changes during ring-opening polymerization of poly(hexanedithiol - sebacate).

Reaction conditions : A mixture of cyclic(hexanedithiol - sebacate) (20 mg) and lipase CA (70 wt%) was reacted in bulk at 120 °C for 4, 8 and 48 hours with MS 4A placed at the top of the vial.

Cyclic(hexanedithiol - sebacate)の消費とともに分子量の増大が確認された。再沈殿後、 $\overline{M}_w = 115,000$ 、 $\overline{M}_w/\overline{M}_n = 2.3$ の poly(hexanedithiol - sebacate)が収率 90 %で得られた。ただし前述の通り、特に反応後期にかけてはポリマー鎖間のエステル交換反応の進行による分子量の増大も示唆される。

ここで、開環重合と直接重縮合それぞれの最適条件で合成した poly(hexanedithiol - sebacate)の SEC チャートを Fig. 3.21 に示す。

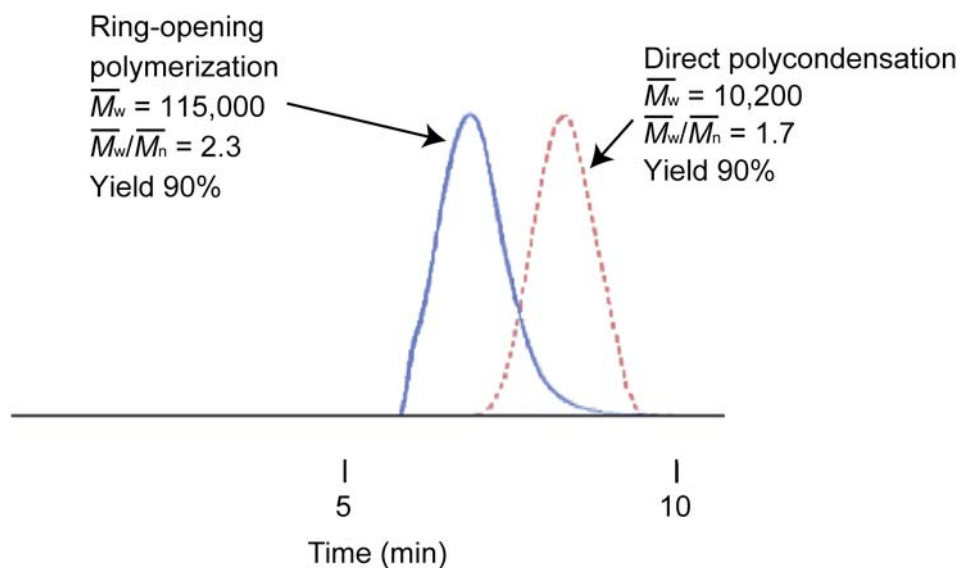


Fig. 3.21 SEC profiles of poly(hexanedithiol - sebacate) synthesized by ring-opening polymerization and direct polycondensation.

直接重縮合と比べ、開環重合により顕著な分子量の増大が確認され、実用的高分子材料の一つの目安と考えられる、分子量 10 万以上のポリチオエステルが合成された。また、分子量の増大に伴い、ソルベントキャスト法によるポリマーフィルムの形成が達成された。Poly(hexanedithiol - sebacate) [$\overline{M}_w = 115,000$ 、 $\overline{M}_w/\overline{M}_n = 2.3$] 200 mg をクロロホルム 10 mL に溶解させ、パスツールピペットを用いてテフロンシャーレ (60 mm ϕ) に流し入れ、その後室温で 24 時間静置することで、白色フィルム状の poly(hexanedithiol - sebacate)を得た。得られたフィルムを Fig. 3.22 に示す。



Fig. 3.22 Poly(hexanedithiol - sebacate) film synthesized by solvent - cast method.

直接重縮合と比べ開環重合法により高分子量体を得られた要因としては、主に 2 つ考えられる。

1 つ目は、縮合物の影響である。酵素触媒反応は可逆的に進行するため、直接重縮合では発生する縮合物を効果的に除去する必要がある。前章では、モレキュラーシーブス 4A を用い、縮合物を吸着することで顕著な分子量の増加がみられた。一方、開環重合法では、理論的には縮合物の発生を伴わずに重合が進行する。そのため、反応の平衡が重合側に傾くことが容易に推測される。結果的に、より高分子量体が得られると考えられる。

2 つ目として、ヘキサン - 1,6 - ジチオールとセバシン酸ジメチルのモル比の影響が考えられる。ジオールとジカルボン酸の重縮合における AA - BB 型ポリエステルの合成において、高分子量体を得るためにはヒドロキシ末端とカルボキシル末端の比が重要であることが知られている¹¹⁴⁾。そのため、PET など多く AA - BB 型ポリエステル合成は、初めにジオール成分を敢えて過剰に加えオリゴマー化を行い、高温減圧下でさらにエステル交換反応させ、過剰のジオールを除去する。こうすることで、末端比がそろい、高分子量体が得られている¹¹⁵⁾。環状モノマーを用いることで系内のチオール末端とカルボキシル末端の比は厳密に 1:1 に保たれる。そのために、高分子量体が得られた可能性も示唆される。

次に、縮合物とモル比の影響のどちらがより強く分子量の増大に寄与しているかを確認することとした。

(4) 開環重合におけるモレキュラーシーブス 4A の効果

前述の開環重合に関する条件検討は、全て Fig. 2.4 に示したモレキュラーシーブス 4A を付した反応系を用いて行なった。ここで、縮合物の影響を確認するために、開環重合におけるモレキュラーシーブス 4A の有無が生成ポリマーの分子量に及ぼす影響を評価した。それぞれの SEC チャートを Fig. 3.23 に示す。

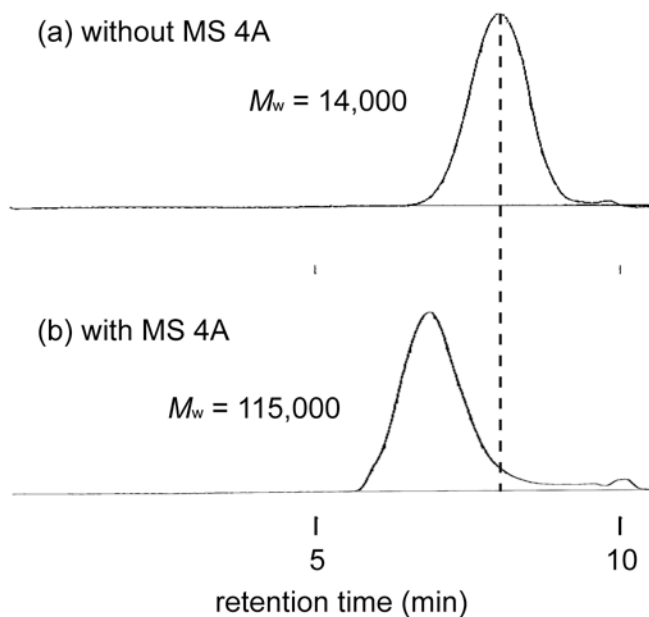


Fig. 3.23 SEC profiles of poly(hexanedithiol - sebacate) synthesized by ring-opening polymerization of cyclic(hexanedithiol - sebacate).

Reaction conditions : A mixture of cyclic(hexanedithiol - sebacate) (20 mg) and lipase CA (70 wt%) was reacted in bulk at 120 °C for 2 days without MS 4A (a) and with MS 4A (b) placed at the top of the vial.

直接重縮合同様に、開環重合もモレキュラーシーブス 4A の有無により、生成ポリマーの分子量に大きな差が生じた。開環重合が重縮合反応を伴わずに進行するのであればモレキュラーシーブス 4A の効果は限定的であると考えられる。しかし、そのような結果とはならなかった。すなわち、チオール末端とカルボキシル末端の比が厳密に 1:1 に保たれることが、開環重合法による顕著な分子量の増加に、より大きな影響を及ぼしていると考えられる。この考察が正しければ、AB 型の開環重合と重縮合では生成ポリマーの分子量は大きく変わらないことになる。これは、AA - BB 型と異なり、AB 型は初めから同一分子内にチオール末端とカルボキシル末端を 1 つずつ有するためである。AB 型の開環重合に関する結果は後述する。

(5) 反応条件のまとめ

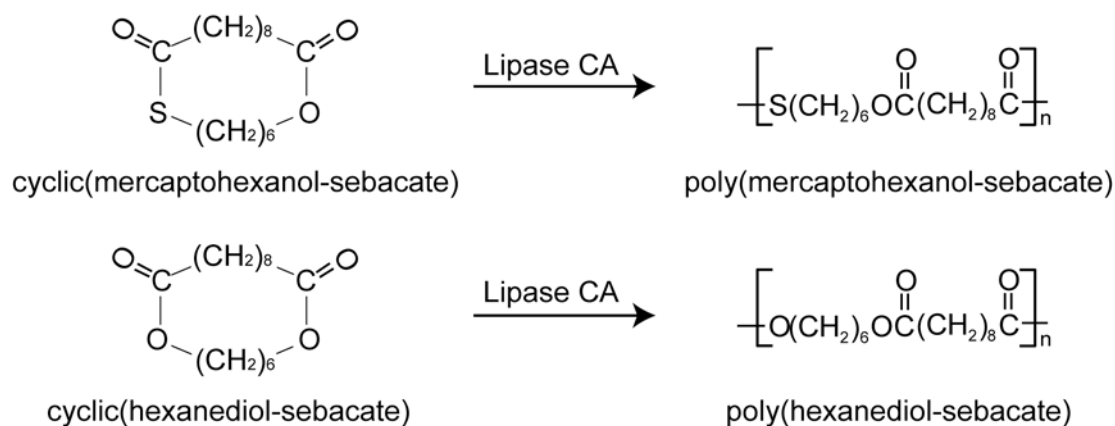
開環重合による poly(hexanedithiol - sebacate)の合成について各反応条件の検討結果を Table 3.4 にまとめた。

Table 3.4 Enzymatic ring-opening polymerization of cyclic(hexanedithiol - sebacate).

反応条件項目	: 結果の要約
反応温度	: ポリマーの分子量、収率は 120 °C でピークに達した。130 °C 以上では酵素の失活のために分子量が減少したと考えられる。
酵素量	: Cyclic(hexanedithiol - sebacate)に対して 70 wt% のリパーゼ CA を用いたときに最大分子量となった。酵素量が少ないと反応後期のポリマー鎖間でのエステル交換反応が起こり難いため、分子量が増加しないと考えられる。
反応時間	: 反応開始 2 日後まではポリマー分子量の増加が確認された。2 日目以降は同程度の分子量で止まった。
至適条件で得られる poly(hexanedithiol - sebacate)	: $M_w = 115,000$ 、 $M_w/M_n = 2.3$ の poly(hexanedithiol - sebacate)が収率 90 % で得られた。

3.4.1.3 Cyclic(mercaptohexanol - sebacate)及び cyclic(hexanediol - sebacate)の開環重合

Scheme 3.14 に示すように、poly(mercaptohexanol - sebacate)及び poly(hexanediol - sebacate)を相当する環状一量体の開環重合にて合成した。



Scheme 3.14 Ring-opening polymerization of cyclic(mercaptohexanol - sebacate) and cyclic(hexanediol - sebacate).

Table 3.5 にリパーゼ CA 70 wt%, 120 °C, モレキュラーシーブス 4A 存在下で 48 時間反応させたときの分子量、分散及びポリマー収率を示す。また比較のために、重縮合により得られた結果も示す。

Table 3.5 Synthesis of poly(mercaptohexanol - sebacate) and poly(hexanediol - sebacate).

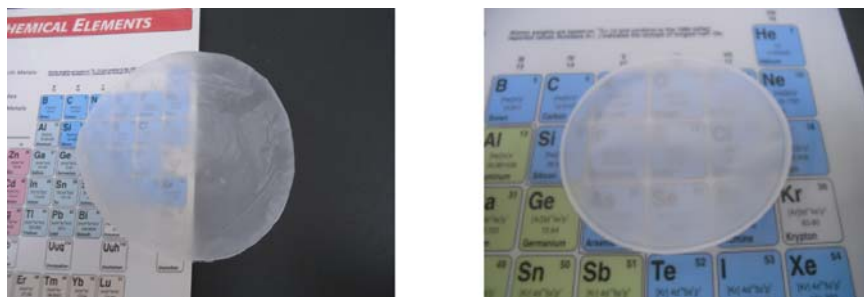
	Ring-opening polymerization ^{a)}			Polycondensation ^{b)}		
	M_w	M_w/M_n	Yield/ %	M_w	M_w/M_n	Yield/ %
Poly(mercaptohexanol - sebacate)	117,000	1.9	92	16,900	1.9	82
Poly(hexanediol - sebacate)	219,000	2.1	94	75,000	1.8	92

Reaction conditions : ^{a)} A mixture of cyclic monomer (20 mg) and lipase CA (70 wt%) was reacted in bulk at 120 °C with MS 4A placed at the top of the vial for 48 h.

^{b)} A mixture of 6-mercapto-1-hexanol (26.8 mg = 0.20 mmol) or hexane-1,6-diol (23.7 mg = 0.20 mmol) and dimethyl sebacate (46.1 mg = 0.20 mmol) was reacted with

lipase CA (70 wt%) in bulk at 120 °C with MS 4A placed at the top of the vial for 48 h.

いずれの場合も、開環重合法は直接重縮合に比べ分子量の顕著な増大が確認された。Fig. 3.24 に示す通り、poly(hexanedithiol - sebacate) と同様、開環重合により得られたポリマーは、溶剤キャスト法によるポリマーフィルムの形成が達成された。



Poly(mercaptohexanol - sebacate)

Poly(hexanediol - sebacate)

Fig. 3.24 Poly(mercaptohexanol - sebacate) and poly(hexanediol - sebacate) film synthesized by solvent - cast method.

また、ポリマーの繰り返し単位中にチオエステル結合を有する poly(mercaptohexanol - sebacate) の分子量は開環重合、重縮合ともに poly(hexanediol - sebacate) と比べて小さかった。これは、EAM に対するチオール反応性がヒドロキシ基に比べ劣るために、エステル交換反応が十分に進行しなかったことが要因として考えられる。重縮合反応における顕著な分子量の差異もこの要因によることが示唆される。EAM に対するチオールまたはヒドロキシ基の反応性については、後述する。

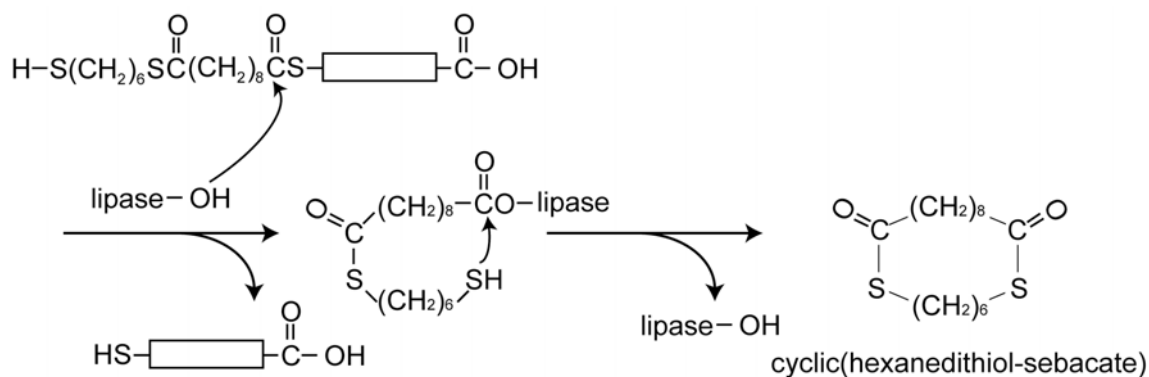
3.4.1.4 Poly(hexanedithiol - sebacate) の cyclic(hexanedithiol - sebacate)への分解



Scheme 3.15 Enzymatic degradation of poly(hexanedithiol - sebacate) into cyclic(hexanedithiol - sebacate).

第3.4.1節で得られた poly(hexanedithiol - sebacate)をリパーゼ CA を触媒に用いて分解し、ポリマー原料である環状モノマーへの変換を行なった。分解反応は分子内エステル交換反応を優先させるために低ポリマー濃度で行なった。分解前後と得られた環状モノマーを用いた再重合の SEC チャートを Fig. 3.25 に示す。

n - ノナン中、1 mg/mL という希薄条件下でリパーゼ CA と 48 時間反応させることで大部分が環状 1 量体である cyclic(hexanedithiol - sebacate)へと分解された。Poly(hexanedithiol - sebacate)の分解により得られた cyclic(hexanedithiol - sebacate)の収率(69.3 %)は、ヘキサン - 1,6 - ジチオールとセバシン酸ジメチルから直接環化させたときの収率(16.7 %)よりも高かった。Scheme 3.16 に示す通り、ポリマーの分解では既にチオエステル結合が形成されている状態から反応が開始するため、分子内環化反応のみで環状体が得られる。一方、直接環化反応では、まず分子間でチオエステル結合を形成した後に分子内で環化反応が進行する必要がある。十分な希薄条件下では、ジチオールとセバシン酸ジメチル間での分子間反応の進行はより起こり難いことが推測される。この要因が、直接環化反応とポリマーの分解反応による cyclic(hexanedithiol - sebacate)の収率の差に影響を及ぼした可能性が示唆される。



Scheme 3.16 Reaction mechanism of enzymatic degradation of poly(hexanedithiol - sebacate).

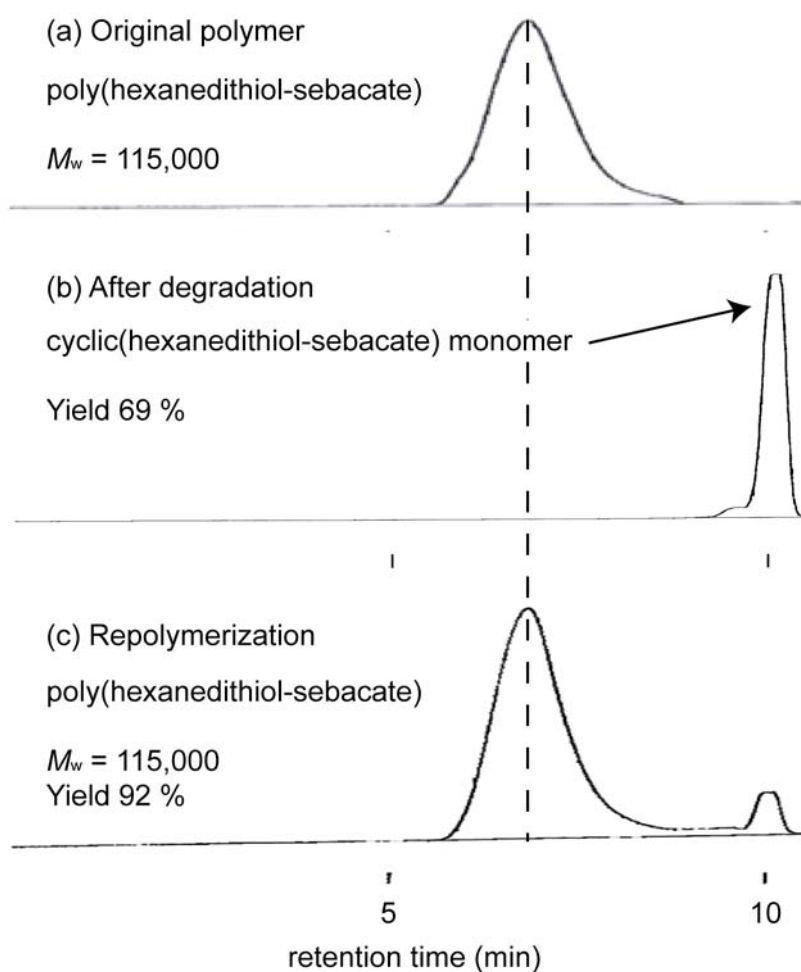


Fig. 3.25 SEC profiles of original poly(hexanedithiol - sebacate) (a), after degradation (b) and repolymerization product (c).

Reaction conditions :

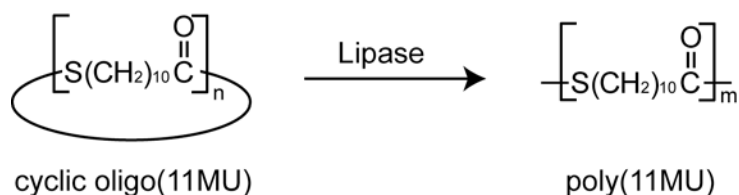
Degradation : A mixture of poly(hexanedithiol - sebacate) (50 mg) and lipase CA (400 wt%) was reacted in *n*-nonane (50 mL) at 120 °C for 2 days with MS 4A placed at the top of the vial.

Repolymerization : A mixture of cyclic(hexanedithiol - sebacate) (20 mg) and lipase CA (70 wt%) was reacted in bulk at 120 °C for 2 days with MS 4A placed at the top of the vial.

元のポリマーと同等の分子量を有する poly(hexanedithiol - sebacate)が、分解物である cyclic(hexanedithiol - sebacate)からの再重合により得られた。脂肪族ポリエステル、脂肪族ポリカーボネート同様に、リパーゼを利用したポリチオエステルのケミカルリサイクルが達成可能であることが示された。

3.4.2 AB型環状チオエステルの開環重合

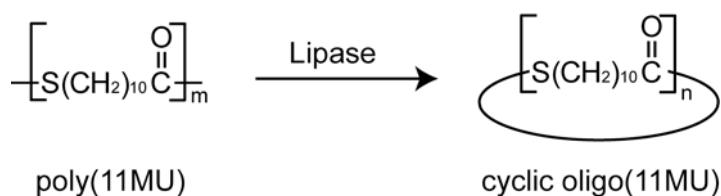
本節では、Scheme 3.17 に示す cyclic oligo(11MU)の開環重合について検討した。



Scheme 3.17 Ring-opening polymerization of cyclic oligo(11MU).

3.4.2.1 環状 11MU オリゴマーの調製

前節では、ポリマーに希薄条件下でリパーゼ CA を反応させることで、比較的高収率で相当する環状体が得られた。そこで、Scheme 3.18 に示す通り、直接重縮合により得られた poly(11MU)を分解することで環状オリゴマーの調製を行なった。



Scheme 3.18 Degradation of poly(11MU) into cyclic oligo(11MU).

(1) 反応温度の影響

ポリマーの分解で反応温度を変化させた際の SEC チャートの変化を Fig. 3.26 に示す。

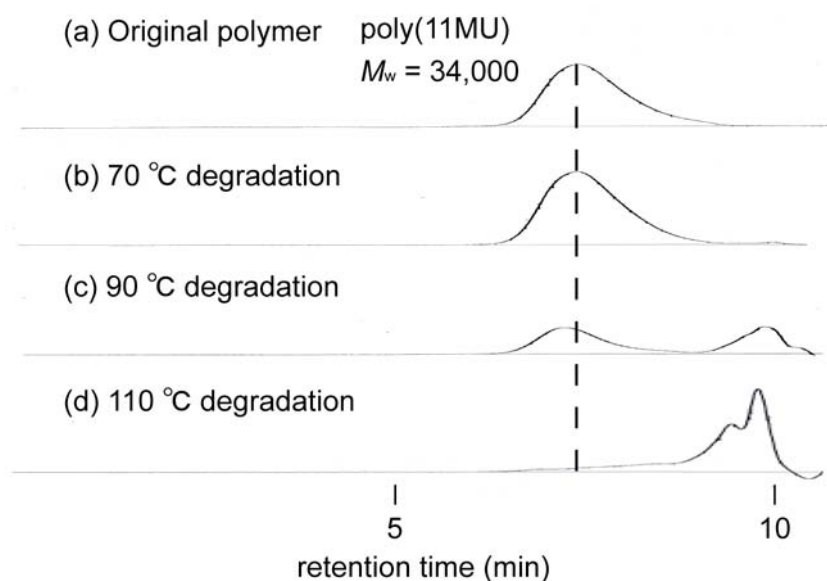


Fig. 3.26 Effect of temperature on degradation of poly(11MU).

Reaction conditions: A mixture of poly(11MU) (100 mg) and lipase CA (200 mg) was reacted in *n*-nonane (10 mL) at 70 °C (b), 90 °C (c) and 110 °C (d) for 1 day with MS 4A placed at the top of the vial.

高温になるほど顕著に SEC ピークが低分子側にシフトする様子が確認された。70 °C ではほぼ元のポリマーピークに変化が見られないのに対して、90 °C では部分的に、また 110 °C では大部分が分解した。

これは、主としてポリマーの溶解性に関係しているものと思われる。70 °C では、poly(11MU)は分解反応に用いた *n*-ノナンに対して溶解が確認されなかった。また、90 °C では、一部の比較的低分子側のポリマーが溶解したものと考えられ、白濁溶液を形成した状態で反応が進行した。一方、110 °C で poly(11MU)は *n*-ノナン中に溶解し均一系で反応が進行した。さらなる高温ではリパーゼ CA の熱失活が起こる可能性が高いことから検討を行わず、110 °C での分解物の構造解析を行なった。

(2) 分解物の構造解析

構造決定のため、シリカゲルカラムクロマトグラフィーを用いて分解物の精製を行った。精製前後の SEC チャートを Fig. 3.27 に示す。

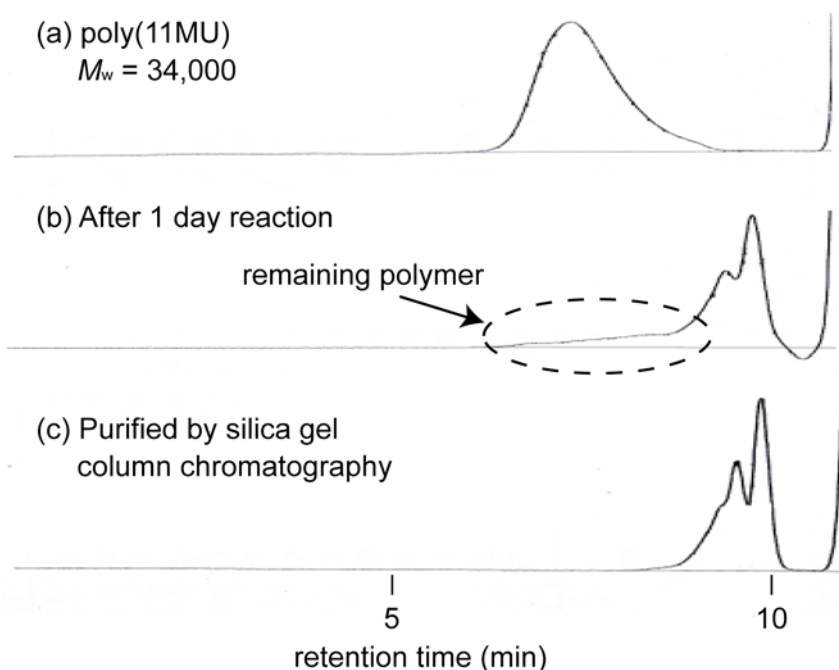


Fig. 3.27 SEC profiles of degradation products of poly(11MU).

Reaction conditions: A mixture of poly(11MU) (100 mg) and lipase CA (200 mg) was

reacted in *n*-nonane (10 mL) at 110 °C for 1 day with MS 4A placed at the top of the vial.

分解反応後の SEC チャートでは、一部ポリマーの残存が確認された。この残存ポリマーは反応時間、酵素量、ポリマー濃度など種々条件を検討しても消失することはなかった。これは、分解前のポリマー中に確認されたわずかなジスルフィド結合が起因しているものと考えられる。詳細は後述する。

精製後の分解物の構造解析は APCI MS 及び ^1H NMR を用いて行なった。APCI MS スペクトルを Fig. 3.28 に示す。

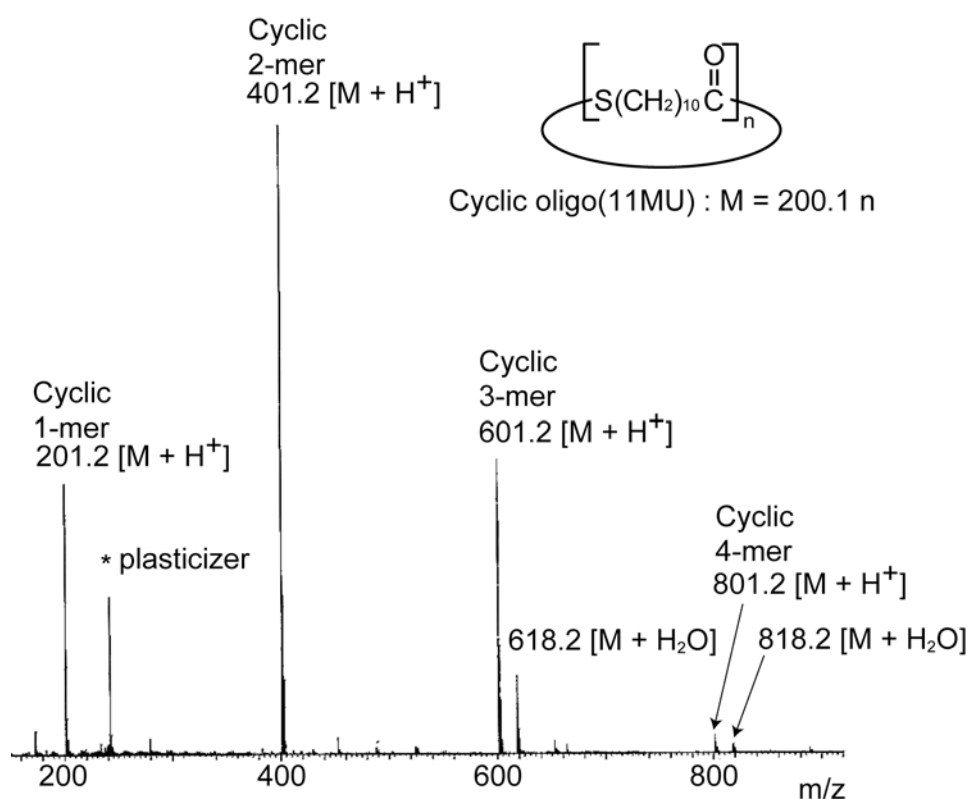


Fig. 3.28 APCI MS spectrum of cyclic oligo(11MU).

Cyclic oligo(11MU)の分子単位である 200 m/z 間隔で周期的なピークが確認された。これらのピークは環状 1 ~ 4 量体に H^+ または H_2O が付加したものに相当する。なお、 H_2O が付加したピークは鎖状オリゴマーと重なるが、Fig. 3.7 の ^1H NMR より末端ピークが見られなかったことから、精製された分解物は環状オリゴマーであると断定できる。

カラム精製に用いた酢酸エチル/ヘキサン = 1/15 (v/v)の展開溶媒系では目的とする環状分解物は 3 つの異なるスポットとして TLC 上に現れた。それぞれ分取した SEC チャート及び APCI MS スペクトルを Fig. 3.29 に示す。

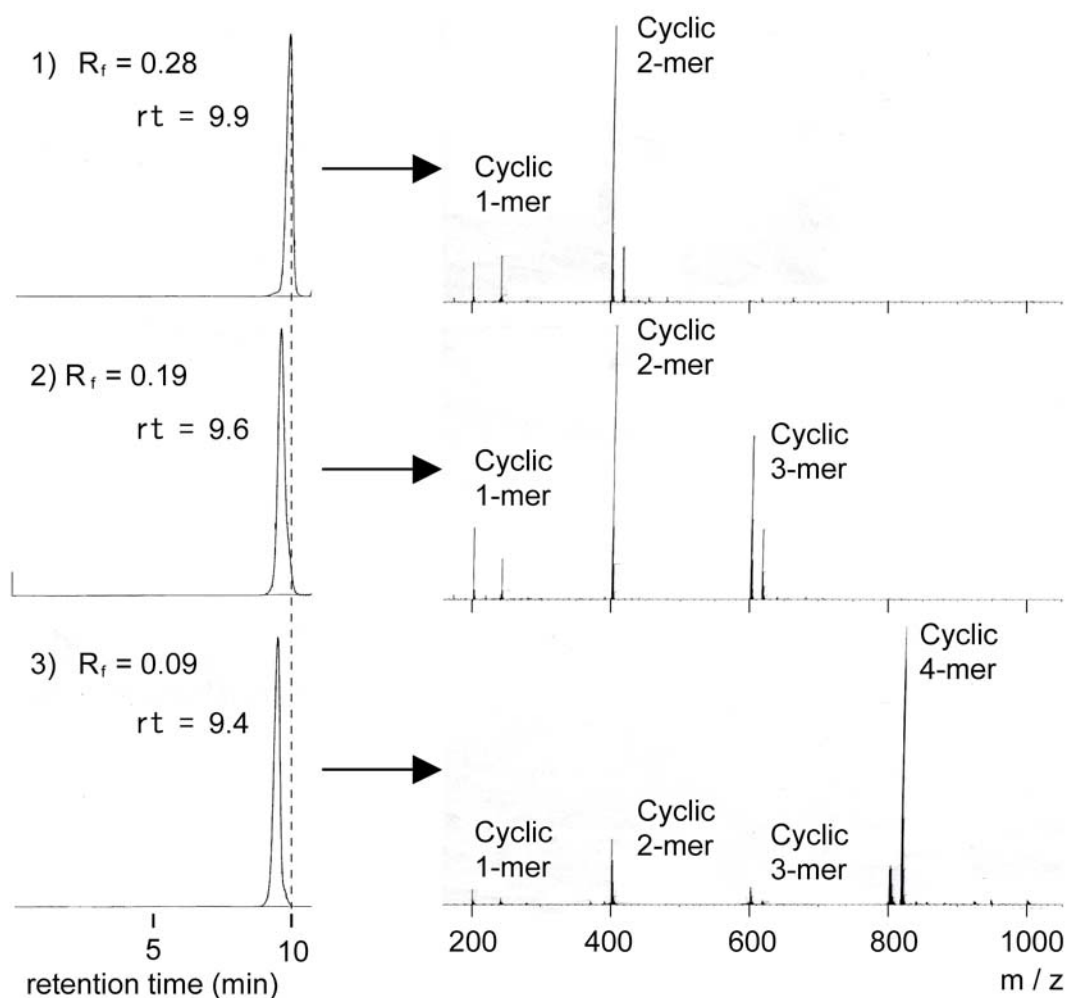


Fig. 3.29 SEC profiles and APCI MS spectrum of degradation products.

シリカゲルカラムクロマトグラフィーでそれぞれの量体数が分取されていても、APCI MS 検出時にフラグメント化する可能性が示された。チオエステル結合の部分でフラグメント化するために、仮に 4 量体を単離して測定を行なっても、4 量体以外に 3~1 量体も検出された。Fig. 3.29 より、環状分解物は 2~4 量体からなり、1 量体に相当するピークはフラグメント化により検出されたものであると考えられる。

得られた 2~4 量体の環状オリゴマーの比率は以下の通りである。

Cyclic 2-mer : 48 %

Cyclic 3-mer : 40 %

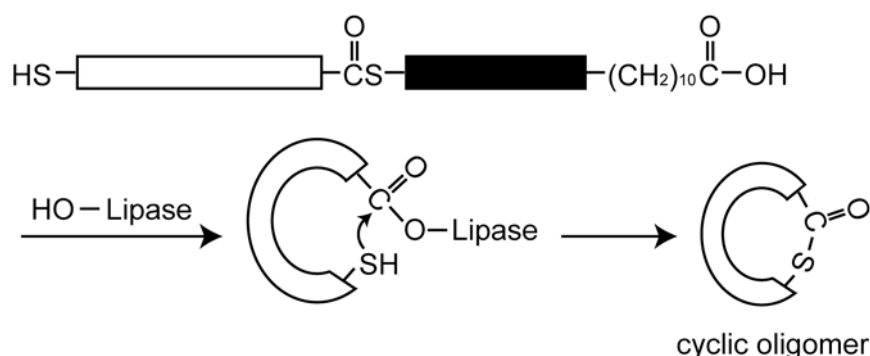
Cyclic 4-mer : 12 %

また、poly(11MU)の分解により環状オリゴマーが収率 32.6 %で得られた。これは、3.4.1.4 節で示した poly(hexanedithiol - sebacate)の分解により得られた環状体の収率である 69.3 %よりも低収率であった。これは、前述した通り、分解されなかった残存ポリマーが影響しているものと考えられる。

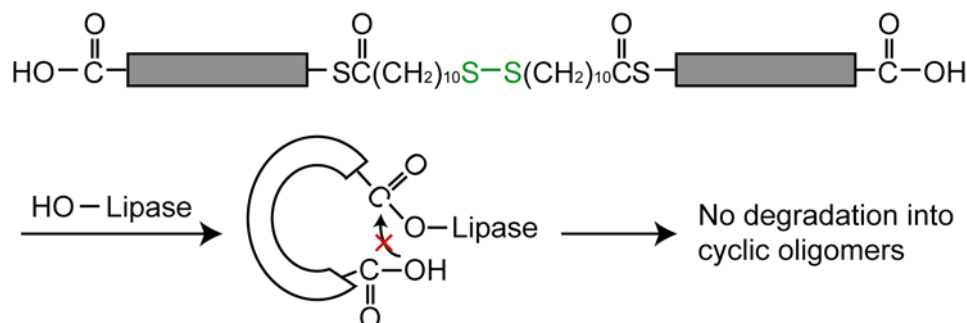
(3) ジスルフィド結合が分解反応に及ぼす影響

Poly(11MU)の環状オリゴマーへの分解は Scheme 3.12 で示した poly(hexanedithiol - sebacate)の cyclic(hexanedithiol - sebacate)への分解と同様の反応機構で進行すると考えられる。Fig. 2.5 の ^1H NMR 及び Fig. 2.16 の MALDI TOF MS の結果から、重縮合により得られた poly(11MU)中には、一部ジスルフィド結合を含むものが存在することを示した。ここで、ジスルフィド結合の有無が分解反応に及ぼす影響を Scheme 3.19 に示す。

(a) Poly(11MU) without disulfide linkage



(b) Poly(11MU) with disulfide linkage



Scheme 3.19 Difference in enzymatic degradation of poly(11MU) without (a) or with (b) disulfide linkage.

Scheme 3.19 で、ジスルフィド結合がポリマー中に存在しない(a)の状態について考える。このとき、希薄条件下では末端チオールによる EAM への求核攻撃が進行し、相当する環状オリゴマーが形成され得る。一方、ジスルフィド結合を分子内に有する(b)の状態では、ポリマーの両末端はともにカルボン酸となる。この場合、カルボン酸は求核種にはなり得ないことから、この分子は仮に基質 - 酵素複合体を形成しても、その後の分子内環化反応は起こらない。分子間でのエステル交換反応は起こり得るが環状体は生成しない。従って、ジスルフィド結合を含んだ poly(11MU)分子は希薄条件下でリパ

一ゼ CA を作用させても、環状体が生成することは無いと言える。そのために、前述した分解過程でポリマーの一部が残存する現象も、このジスルフィド結合を含んだ poly(11MU) が影響しているものと考えられる。また、poly(11MU) の分解によって得られる環状体の収率がそれほど高くないことの原因の一つであると思われる。重合時にジスルフィド結合が生成しないように反応を制御できれば、環状体の収率向上につながる可能性は残されている。

(4) 環状オリゴマーを用いた開環重合

環状オリゴマーを原料に、開環重合による poly(11MU) の合成について検討した。重合前後の SEC チャートを Fig. 3.30 に示す。

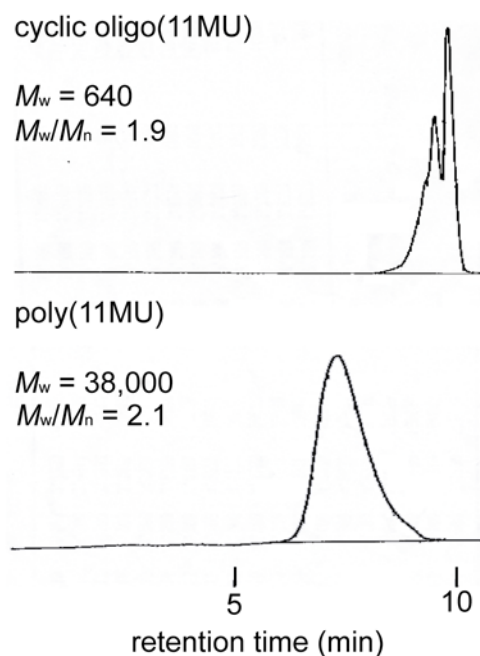


Fig. 3.30 SEC profiles of cyclic oligo(11MU) and poly(11MU) synthesized by ring-opening polymerization.

Reaction conditions: A mixture of cyclic oligo(11MU) (60 mg) and lipase CA (36 mg) was reacted in bulk at 110 °C for 2 days with MS 4A placed at the top of the vial.

Cyclic oligo(11MU) の開環重合によって 80 % の収率で poly(11MU) が得られた。2.4.1 節で検討したが、11MU の直接重縮合では $M_w = 34,000$ 、 $M_w/M_n = 2.4$ の poly(11MU) が収率 86% で得られた。AB 型である 11MU では開環重合でもほぼ同程度の分子量しか得られなかった。一方、3.4.1.2 節で示した AA - BB 型では、直接重縮合と開環重合

で、得られるポリマーの分子量は後者が顕著に大きかった。これらの結果から、AA - BB 型の開環重合で高分子量体が得られた最大の要因は縮合物が発生しないことではなく、チオール末端とカルボキシル末端のモル比が正確に 1 : 1 に等しくなったことであると考えられる。縮合物が発生しないことによる効果が分子量増大の主因子であるならば、AB 型においても同様に、開環重合による大幅な分子量の増大が見込まれなくてはならない。しかし、この影響がそこまで大きくないため、モノマー仕込み時の末端比が 1 : 1 に保たれている AB 型では、開環重合による分子量の増大が限定的であったものと考えられる。AB 型でも重合反応中のジスルフィド結合生成による、末端モル比の微妙なズレの影響も考えられるが、この点は AA - BB 型でも同様に考えられるためその影響よりも初期仕込み比の影響が大きいと考えられる。

3.4.3 開環重合挙動の解析

本節では、新規酵素重合反応である環状チオエステルの開環重合について重合挙動を精査し、反応の律速段階について検討した。

3.4.3.1 環状モノマーの転化率の経時変化

Cyclic(hexanedithiol - sebacate)及び cyclic(hexanediol - sebacate)の開環重合における数平均分子量及びモノマー転化率の経時変化を Fig. 3.31 と Fig. 3.32 に示す。

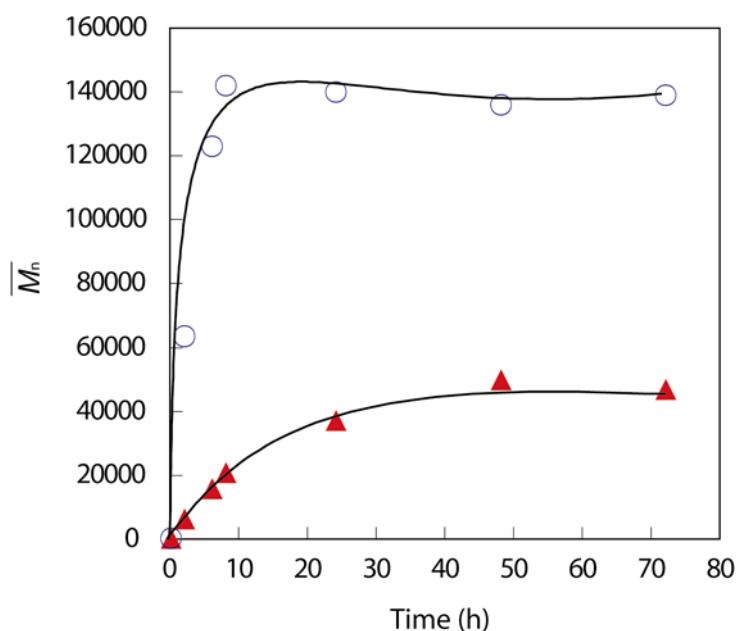


Fig. 3.31 Effect of reaction time on M_n .

▲: Poly(hexanedithiol - sebacate) ○: Poly(hexanediol - sebacate)

Reaction conditions : A mixture of cyclic(hexanedithiol - sebacate) or cyclic(hexanediol - sebacate) (20 mg) and lipase CA (70 wt%) was reacted in bulk at 120 °C with MS 4A placed at the top of the vial.

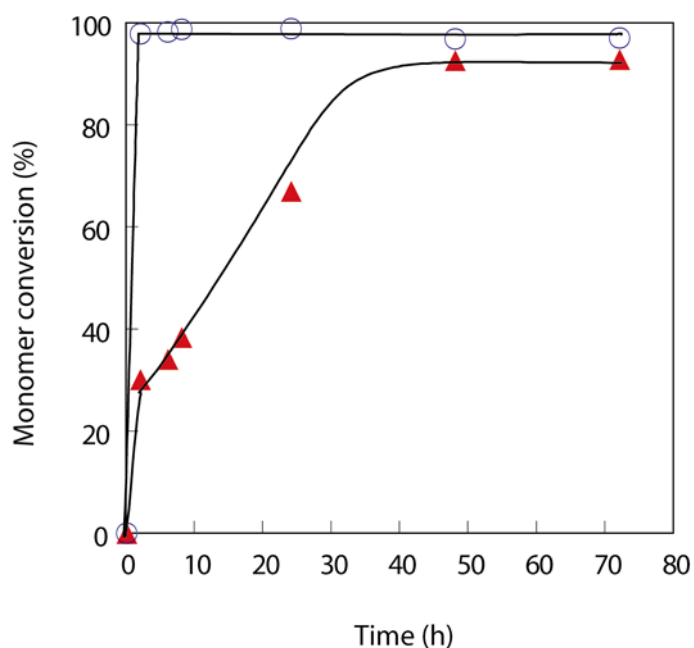


Fig. 3.32 Effect of reaction time on monomer conversion.

▲: Poly(hexanedithiol - sebacate) ○: Poly(hexanediol - sebacate)

Reaction conditions : A mixture of cyclic(hexanedithiol - sebacate) or cyclic(hexanediol - sebacate) (20 mg) and lipase CA (70 wt%) was reacted in bulk at 120 °C with MS 4A placed at the top of the vial.

Fig. 3.31 及び Fig. 3.32 より、環状チオエステルと環状エステルでは重合速度が大きく異なることがわかる。特に、モノマー転化率は前者が後者と比べ、明らかに遅いことが見出された。ここで、反応初期のそれぞれのモノマー転化速度を求めるために、時間とモノマー転化速度が一次の直線関係になる部分について評価した。環状チオエステルについては反応開始から 8 時間後、環状エステルについては反応開始から 1 分後までの転化率の変化を求めた。Fig. 3.33 に結果を示す。

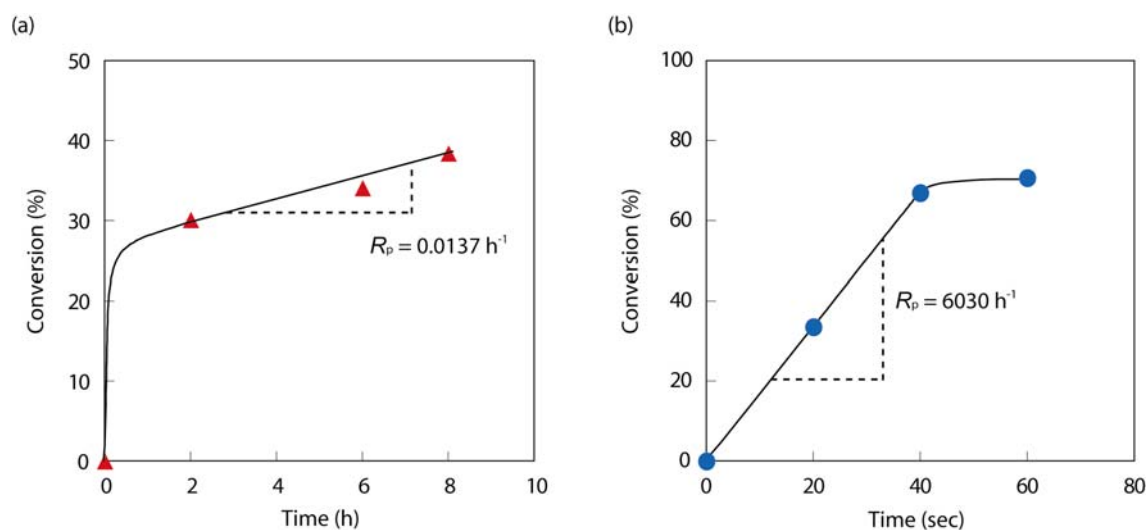


Fig. 3.33 Monomer conversion of cyclic(hexanedithiol - sebacate) and cyclic(hexanediol - sebacate) during the initial stage of the reaction.

▲: Poly(hexanedithiol - sebacate) ●: Poly(hexanediol - sebacate)

Reaction conditions : A mixture of cyclic(hexanedithiol - sebacate) (a) or cyclic(hexanediol - sebacate) (b) (20 mg) and lipase CA (70 wt%) was reacted in bulk at 120 °C with MS 4A placed at the top of the vial.

転化率の経時変化における傾きから求めたモノマー転化速度(propagation rate of cyclic monomer : R_p)はそれぞれ、cyclic(hexanedithiol - sebacate) : 0.0137 h^{-1} 及び cyclic(hexanediol - sebacate) : 6030 h^{-1} であった。検討した環状チオエステルと環状エステルの開環重合を比較すると、前者の進行が 4.4×10^5 倍遅いことが見出された。また、Fig. 3.33 (a)より、 R_p を算出した直線が原点を通らないため、cyclic(hexanedithiol - sebacate)の開環重合は反応開始後 2 時間未満とそれ以後で大きく転化速度が異なることが示唆される。一方、Fig. 3.33 (b)より、cyclic(hexanediol - sebacate)の場合はこの直線は原点を通過している。そこで、cyclic(hexanedithiol - sebacate)についてより短時間である反応開始 1 分後までの転化率の経時変化をさらに検討した。Fig. 3.34 に結果を示す。

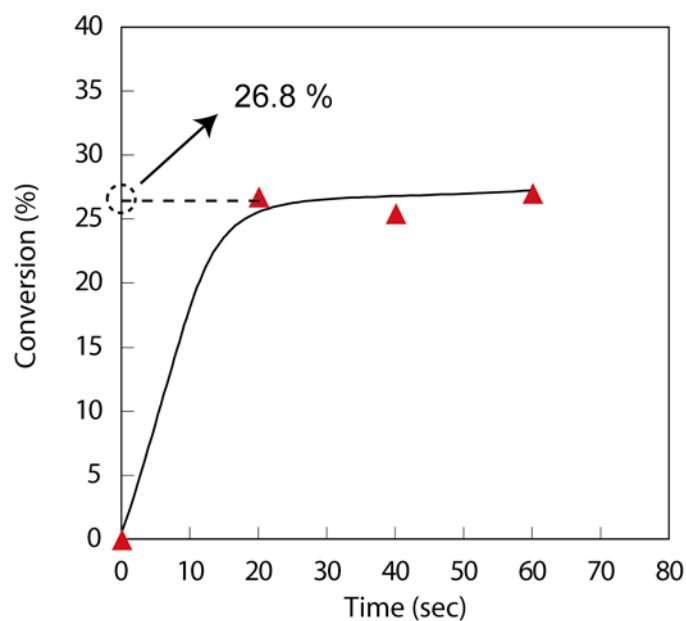
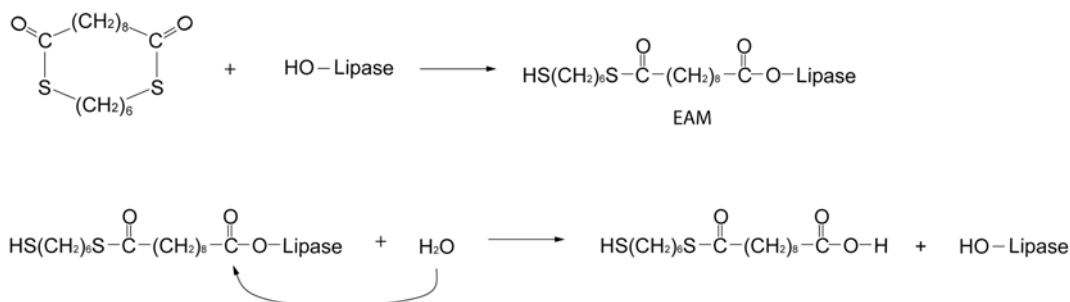


Fig. 3.34 Monomer conversion of cyclic(hexanedithiol - sebacate) at 20, 40 and 60 second reaction.

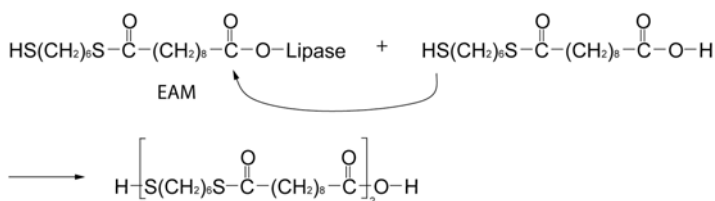
Reaction conditions : A mixture of cyclic(hexanedithiol - sebacate) (20 mg) and lipase CA (70 wt%) was reacted in bulk at 120 °C with MS 4A placed at the top of the vial.

反応開始 20 秒の時点で、既に 27% 程度の環状モノマーの消費が認められる。その後、40 秒後、60 秒後の転化率はほぼ変化が見られなかった。このことから、開始反応は反応開始 20 秒未満の極初期に進行することが示唆された。また、それと比較して重合反応は非常に遅いことが示唆される。以上の結果から、推定される環状チオエステルの開環重合機構を Scheme 3.20 に示す。

i) Initiation (Rapid)

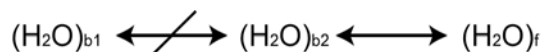


ii) Propagation (Slow)



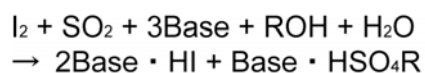
Scheme 3.20 Proposed mechanism of enzymatic ring-opening polymerization of cyclic(hexanedithiol - sebacate).

極初期における反応は、基質 - 酵素複合体(Enzyme activated monomer : EAM)を形成後、酵素に含まれる微量の水による鎖状モノマーの生成であると考えられる。Clark らは有機溶媒中での酵素結合水の状態を以下のように定義している¹¹⁶⁾。



b1 は固く結合し、通常離れることのない結合水(tightly bound water)、f は自由水(free water)、b2 は両者の中間状態の付着水(moderately bound water)を示している。b1 状態の水分子の役割は酵素活性を有する三次元構造を維持することである。b2 及び f 状態の水分子の役割は酵素の柔軟性と、活性部位の極性を増すことであると考えられている。

この説に基づくと、本反応の開始反応に使用される水分子は b2 及び f 状態の水分子が関与していると思われる。さらには、基質に付着している完全に除去しきれなかった水分子の存在も否定できない。それらの水分子が反応初期の 26.8 % の環状モノマーの初期転化に結びついたのではないか。そこで、カールフィッシャー法による酵素及び基質に含まれる微量水分の測定を行なった。カールフィッシャー法は以下の反応に基づき微量水分を検出する。



滴定の終点に達するまでに要した I_2 を発生させるための電流の量から、試料に含まれている水分量が算出される。カールフィッシャー法により算出された、五酸化二リン存在下、室温、3 mmHg で 2 時間減圧乾燥した後のリパーゼ CA および cyclic(hexanedithiol - sebacate)に含まれる水分量を Table 3.6 に示す。

Table 3.6 Determination of water contained in lipase
CA and cyclic(hexanedithiol-sebacate).

	water content (wt%)
lipase CA	0.40
cyclic(hexanedithiol - sebacate)	0.51

Fig. 3.34 で示した実験を行った反応系では、リパーゼ CA を 14 mg、cyclic(hexanedithiol - sebacate)を 20 mg 用いた。これらの酵素及び基質に含まれる水分量を計算した。

$$14 \text{ (mg)} \times 0.40 \div 100 \text{ [酵素に含まれる水分量]} + 20 \text{ (mg)} \times 0.51 \div 100 \text{ [基質に含まれる水分量]} = 0.158 \text{ (mg)}$$

$$0.158 \text{ (mg)} \div 18 \text{ (g / mol)} \text{ [水の分子量]} = 8.8 \text{ (}\mu\text{ mol)}$$

反応系内には cyclic(hexanedithiol - sebacate)が 63.0 $\mu\text{ mol}$ 含まれているため、基質に対する水分量の割合は、

$$8.8 \text{ (}\mu\text{ mol)} \div 63.0 \text{ (}\mu\text{ mol)} = 14.0 \text{ (mol\%)}$$

と算出された。

推定反応機構から予想された基質に対する水分子の割合は約 27 mol%であったため計算値はこれよりも少ないが、実際にはカールフィッシャー法では酵素中に含まれる b2 状態の水が全て検出されない点や反応系内の微量水分子を測定していない点を考慮に入れなくてはならない。

3.4.3.2 求核種の添加による影響

MeiらはリパーゼCAによる ϵ -カプロラク톤の開環重合で酵素に含まれる水分量を変化させてもモノマー転化速度に影響を与えないことを示した¹¹²⁾。また、Uyamaらは1-オクタノールを添加し系内の求核種濃度を変化させて、酵素による12-ドデカノラク톤の開環重合反応を行なっても環状モノマーの転化速度に影響がないことを示した¹¹⁷⁾。以上のことから、酵素触媒重合反応によるポリエステル合成の律速段階は成長反応種の末端基による求核攻撃段階ではなく、EAM形成段階であるとされてきた¹¹⁸⁾。

一方、環状チオエステルの開環重合における律速段階はEAMに対して末端チオールが求核攻撃する段階であると推測される。これを明らかにするために、求核種の添加が酵素反応に及ぼす影響をcyclic(hexanedithiol - sebacate)及びcyclic(hexanediol - sebacate)で評価した。

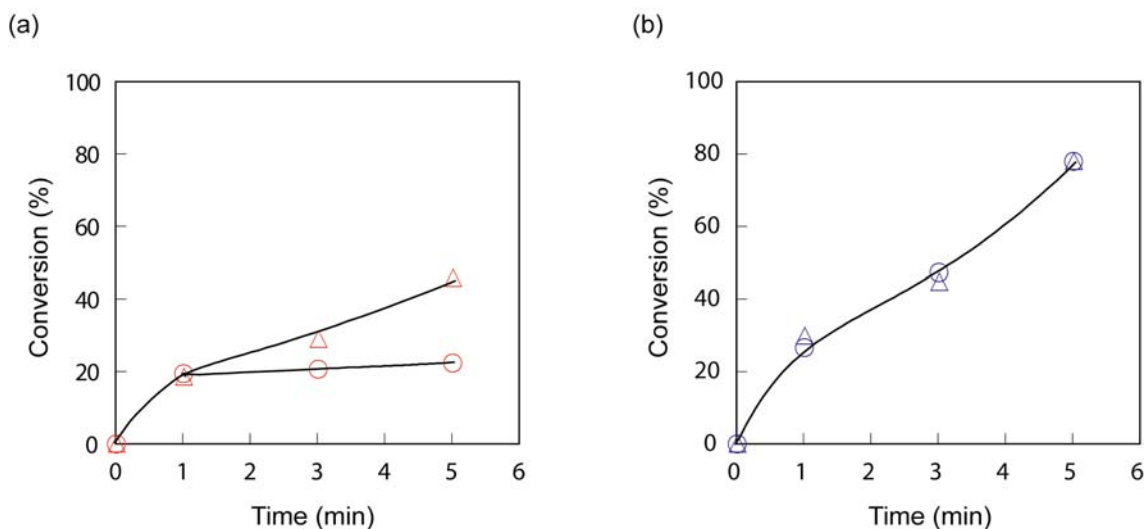


Fig. 3.35 Conversion time course for enzymatic ring-opening reaction of cyclic(hexanedithiol - sebacate) (a) and cyclic(hexanediol - sebacate) (b) with and without 1-propanol as a nucleophile: without 1-propanol ○; with 1-propanol △.

Reaction conditions : Cyclic(hexanedithiol - sebacate) (0.063 mmol) or cyclic(hexanediol - sebacate) (0.063 mmol) was reacted with lipase CA at 50 °C in toluene (63.2 μ L) with and without 1-propanol (0.063 mmol) as a nucleophile.

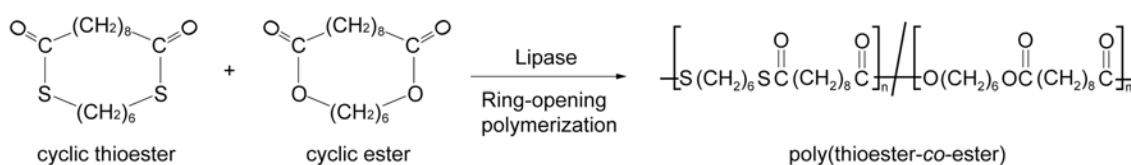
Fig. 3.35 (a)より、cyclic(hexanedithiol - sebacate)は1-プロパノールを求核種として添加することで転化率がさらに伸びた。一方、Fig. 3.35 (b)より、cyclic(hexanediol

- sebacate)は求核種の有無に関わらず転化率の経時変化は一定であった。これらの結果は、環状チオエステルの酵素重合反応ではチオールによる求核反応が律速段階であるのに対し、環状エステルの酵素重合反応では EAM 形成段階が律速段階であるという考察を支持している。

チオールの求核力は一般的に、アルコールよりも強いことが知られている。従って、EAM に対するチオールの求核反応が遅いという実験結果は一見矛盾するように思われる。イオウ原子は酸素原子に比べ約 1.7 倍原子半径が大きい。酵素反応が活性部位という限定された空間で進行することを考えると立体障害的な要因が大きく寄与したことが、チオールの EAM に対する求核性の低さの要因の一つとして考えられる。

3.4.3.3 酵素認識性の比較

チオエステル結合とエステル結合、それぞれの酵素認識性を比較するために、Scheme 3.20 に示す反応を行なった。



Scheme 3.19 Ring-opening copolymerization of cyclic thioester and cyclic ester using lipase CA.

Scheme 3.19 に示した通り、酵素重合反応は基質が酵素により認識され、鎖状末端による求核攻撃を受けることで伸長する。従って、酵素重合初期におけるポリマー中の共重合組成は酵素の基質認識性と相関関係があると考えられる。それぞれの組成は ^1H NMR で 2.85 ppm に現れるチオエステル隣接メチレン(A)と 4.06 ppm に現れるエステル隣接メチレン(B)のピーク強度の比から算出した。すなわち、ポリマー中に組み込まれたチオエステル組成比は以下の式より求めた。

$$\text{Content of thioester unit in the copolymer (mol \%)} = (A) \times 100 / [(A) + (B)]$$

一例として、cyclic(hexanedithiol - sebacate)と cyclic(hexanediol - sebacate)を 1 : 1 で仕込み 4 時間開環重合を行なった後の ^1H NMR を拡大して Fig. 3.36 に示す。

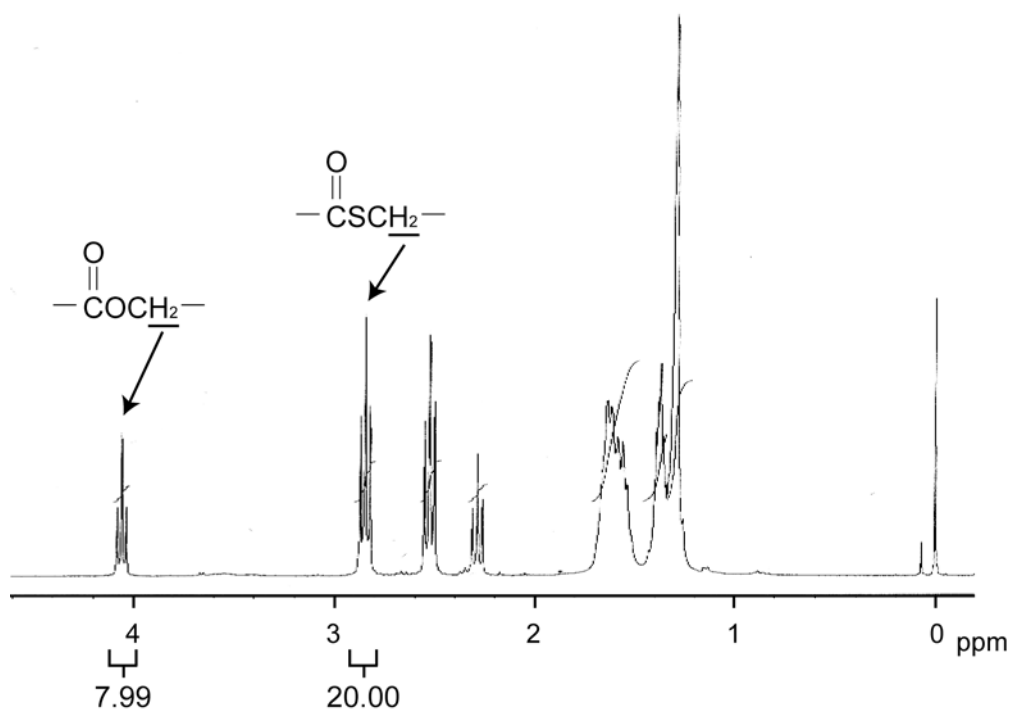


Fig. 3.36 ^1H NMR of poly[(hexanedithiol - sebacate) - *co* - (hexanediol-sebacate)].

Reaction conditions : A mixture of cyclic(hexanedithiol - sebacate) (0.032 mmol) and cyclic(hexanediol - sebacate) (0.032 mmol) was reacted with lipase CA (13.3 mg) in bulk at 120 °C with MS 4A placed at the top of the vial for 4 h. ^1H NMR was detected after purification by reprecipitation in chloroform (good solvent) – methanol (poor solvent).

ここでのポリマー中のチオエステル組成は、 $20 \times 100 / (20 + 7.99) = 71.5$ (mol%)と算出された。同様に実験を行い、仕込み比を変化させたときの反応初期におけるチオエステル成分の組成比を Fig. 3.37 にまとめた。

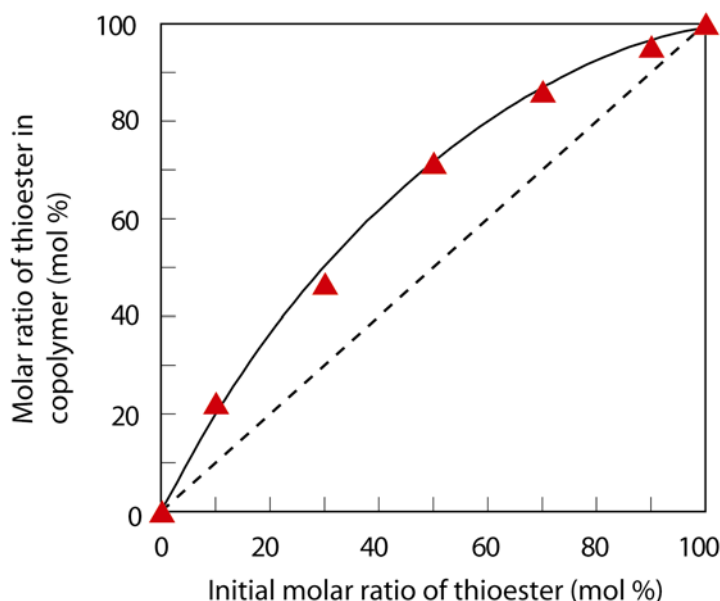


Fig. 3.37 Thioester composition of the copolymer.

Reaction conditions : A mixture of cyclic(hexanedithiol - sebacate) and cyclic(hexanediol - sebacate) was reacted with lipase CA (70 wt%) in bulk at 120 °C with MS 4A placed at the top of the vial for 4 h. ^1H NMR was detected after purification by reprecipitation in chloroform (good solvent) – methanol (poor solvent).

いずれの仕込み組成比においても、常にポリマー中に組み込まれる割合は環状チオエステルが優先された。それぞれの環状体を単独で重合させたときは、環状エステルの重合速度が顕著に速くポリマーを生成することは前述の通りであるが、共重合においては重合速度が遅い環状チオエステルがよりポリマー中に組み込まれる結果となった。これは、酵素により環状エステルよりも環状チオエステルが優先的に認識されたためと考えられる。リパーゼ CA による基質認識は環状エステルよりも環状チオエステルが優先されるにも関わらず、それぞれの単独の重合における反応速度を比較すると前者が 10^5 倍以上速いことから、環状チオエステルの開環重合反応における律速段階がチオールによる求核段階であることが支持された。

3.5 結論

酵素触媒を利用した環状チオエステルの開環重合によるポリチオエステルの合成を行った。具体的には、ヘキサン - 1,6 - ジチオールならびにセバシン酸ジメチルをリパーゼ CA と希薄条件下で反応させ、cyclic(hexanedithiol - sebacate)を合成し、ついで開環重合を行った。

リパーゼ CA を用いた cyclic(hexanedithiol - sebacate)の開環重合により $M_w = 115,000$ 、 $M_w/M_n = 2.3$ の poly(hexanedithiol - sebacate)が収率 90 %で得られた。前章で検討した重縮合と比べ、開環重合法では 10 倍以上の分子量の増大が確認された。また、開環重合により得られたポリマーは分子量の増大に伴い、ソルベントキャスト法によるポリマーフィルム形成が達成された。

Poly(hexanedithiol - sebacate)を再び希薄条件下でリパーゼ CA と反応させることで分子内環化反応が進行し、cyclic(hexanedithiol - sebacate)が収率 69.3 %で得られた。リパーゼを利用した脂肪族ポリチオエステルのケミカルリサイクルが達成可能であることが示された。

AB型である 11MU も同様に環状体を合成し、開環重合を行ったところ $M_w = 38,000$ 、 $M_w/M_n = 2.1$ の poly(11MU)が得られた。AA - BB 型とは異なり、AB 型では直接重縮合により得られたものとほぼ同程度の分子量のポリチオエステルが得られた。これらの結果から、AA - BB 型における開環重合による分子量の増大は縮合物が発生しないことではなく、チオール末端とカルボキシル末端のモル比が正確に 1:1 に保たれることが示唆された。

環状チオエステルである cyclic(hexanedithiol - sebacate)の開環重合挙動を解析したところ、相当する環状エステルである cyclic(hexanediol - sebacate)とは大きく異なることが明らかとなった。環状チオエステルは相当する環状エステルと比べ重合速度が 10^5 倍以上遅いことが見出された。前者と後者では重合反応の律速段階が異なると考えられる。前者の律速段階が末端チオールによる EAM への求核攻撃段階であるのに対し、後者は EAM 形成段階が律速という結果が得られた。また、酵素による基質認識性は前者が優位であることが示された。

以上のことから、酵素触媒を利用した高分子量体を有する AA - BB 型ポリチオエステルの新規合成法として開環重合法が提唱された。また、開環重合挙動を解析した結果、得られた理学的知見を応用することで、酵素を利用した特異な構造を有するポリマー合成への発展が期待される。次章で応用例を記述する。

第4章

酵素触媒を利用した遊離チオールをペンダントに有するポリエステルの合成

4.1 緒言

4.1.1 はじめに

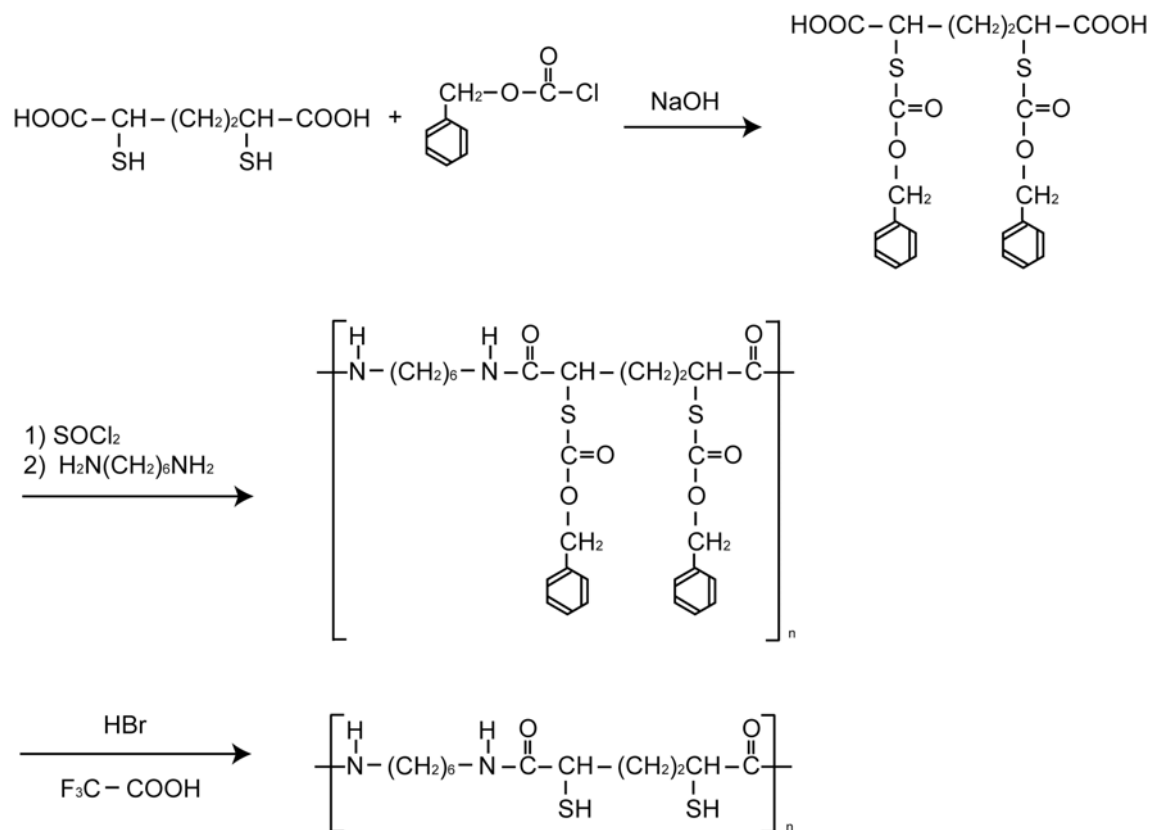
チオールはイソシアナート、酸クロリド、ジアゾニウム塩などと並び高反応性基とみなされおり、生体反応でも重要な役割を示すことが多い¹¹⁹⁻¹²⁰⁾。また、亜鉛イオンやカドミウムイオンなどの重金属イオンを捕捉しキレート作用を示すことが知られている¹²¹⁾。さらに、メルカプト基は、比較的温和な条件で容易に酸化しジスルフィド結合を形成することはよく知られている。アルケンとの反応でチオエーテル結合を容易に形成することも可能である¹²²⁾。このように、多くの特徴を有するチオールをポリマー側鎖に導入することで種々の特異な機能を発現することが期待される。

4.1.2 化学法による遊離チオールをペンダントに有するポリマーの合成

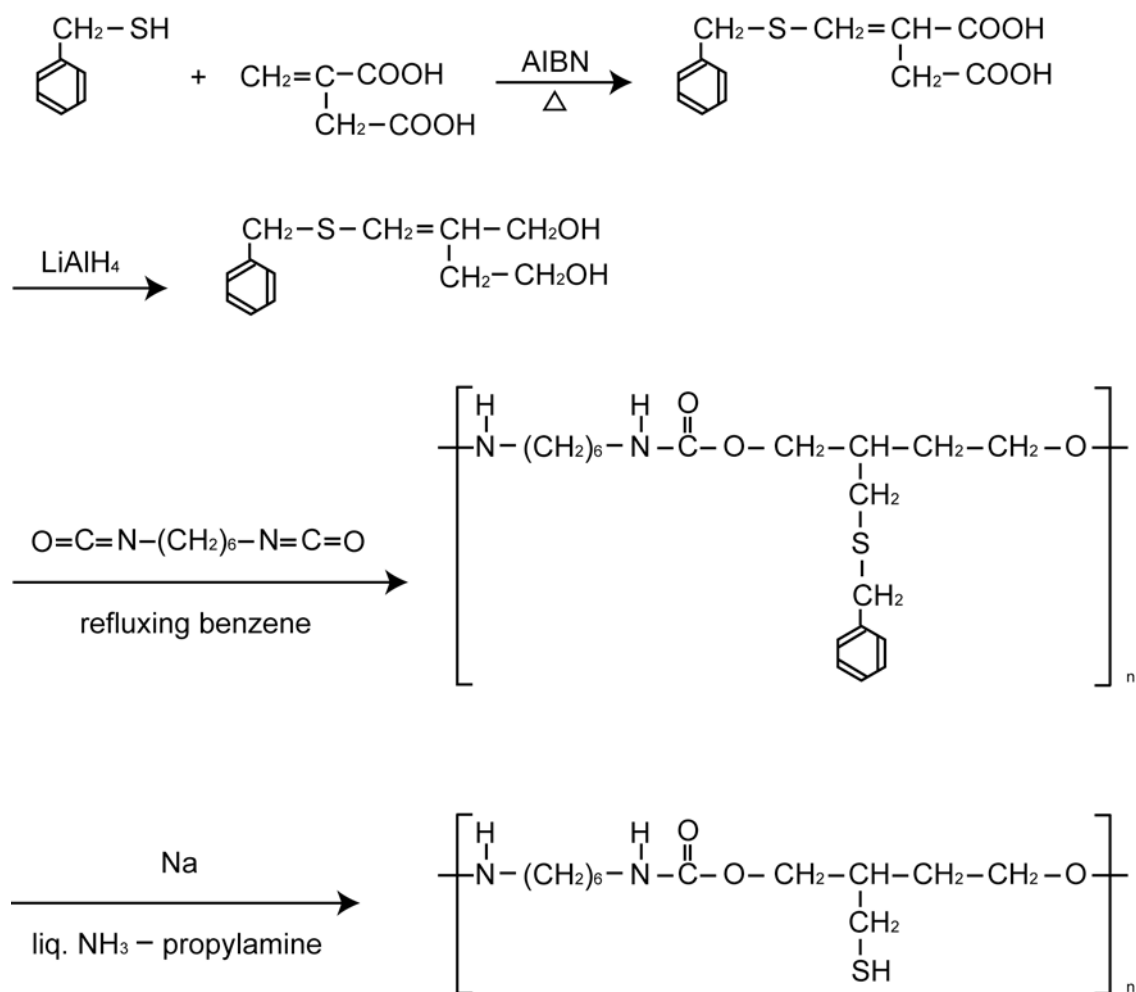
側鎖にチオールを有するポリマーの合成例を紹介する。Miyazaki らは側鎖にエポキシドを有するポリマーに塩酸を作用させ、ついで水硫化ナトリウムと反応させることで相当するポリマーの合成を達成した¹²³⁾。また、Overberger らは Scheme 4.1, 4.2 に示した方法で側鎖にチオールを含有するポリアミドおよびポリウレタンを合成した^{124, 125)}。いずれのポリマーの合成も、ベンジル基によるチオールの保護、重縮合、ベンジル基の脱保護といった一連の操作を必要とする。また、同様の方法で側鎖にチオールを含有するポリエステルの合成を試みたところ、チオールの脱保護時にポリマー主鎖中のエステル結合の分解が確認された¹²⁴⁾。従って、側鎖にチオールを有するポリエステルの合成は、保護、脱保護といった多段階ステップを要せずに進行することが望まれる。また、グリーンケミストリーを実践する上でもワンポットによる合成が望ましい。

近年、120 °Cで濃塩酸を触媒とした重縮合による、側鎖チオール含有ポリエステル

のワンポット合成が報告されたが、ポリマー構造等の詳細は示されていない¹²⁶⁾。また、より温和な条件で官能基選択的に重合反応が進行することが望まれる。



Scheme 4.1 Chemical synthesis of polyamide containing pendant thiols.



Scheme 4.2 Chemical synthesis of polyurethane containing pendant thiols.

4.1.3 側鎖チオールを利用したポリマーの架橋・解架橋

Takada らはチオール - ジスルフィド間の平衡反応を利用し、リサイクル可能な架橋ポリマーについて報告している。ポリクラウンエーテルにダンベル状ジスルフィド型アンモニウム塩と触媒のチオールとを反応させることで、2つのクラウンエーテル環がジスルフィド結合を介して機械的に結合された架橋ポリマーが得られ、透明で弾力のあるゲルが得られた。また、このジスルフィド結合は可逆的開裂を起こし、架橋ポリマーの定量的なリサイクルが可能であった¹²⁷⁾。

ジスルフィド結合で架橋したエポキシ樹脂も同様にチオール - ジスルフィド間の平衡反応を利用することで解架橋ならびに再架橋化が進行する^{128, 129)}。また、Aoki らはセルロースアセートにメルカプト酢酸を作用させ、一部の主鎖に遊離チオールをペン

ダントに有する誘導体を合成した。このポリマーも前述したような特徴を示し、架橋および解架橋が何度でも容易に進行した。また、架橋したポリマーは形状記憶特性を示した¹³⁰⁾。

このように、側鎖にチオールを有するポリマーは、易リサイクル性架橋型高分子材料としての利用が期待される。このような特性を有するポリマーとしては他に、ディールス・アルダー反応を利用したものも最近注目されている¹³¹⁾。

4.1.4 酵素を利用した官能基選択的重合反応

酵素反応は温和な条件で進行するだけでなく、高官能基選択的に重合が進行することも多く報告されている。リパーゼ CA を利用した反応は、第一級ヒドロキシ基と第二級ヒドロキシ基で反応性が顕著に異なる例も存在する。還元糖であるソルビトールと種々のジカルボン酸のリパーゼ CA による重縮合は、第一級ヒドロキシ基とカルボニルの間で選択的にエステル化が進行するため、ワンポットで側鎖にヒドロキシ基を有する鎖状ポリエステルが合成されることが報告されている¹³²⁻¹³⁵⁾。このような側鎖にヒドロキシ基を有するポリエステルは、高い生体適合性を示すことが確認され、生体材料への応用などが研究されている¹³⁶⁾。

リパーゼ CA を利用した L - リンゴ酸と種々ジオールの重縮合に関する報告例も存在する。Li らは、リパーゼ CA を利用した L - リンゴ酸、コハク酸およびオクタン - 1,8 - ジオールの共重合により、 $M_w = 17,800$ の poly(octanediol - 60 mol% succinate - co - 40 mol% malate) を合成した。本反応では、L - リンゴ酸の二級ヒドロキシ基は未反応のままポリマー中に側鎖として組み込まれる^{137, 138)}。

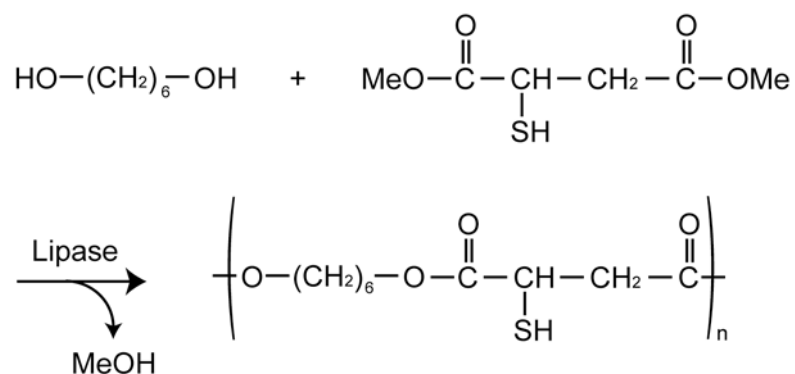
このように、リパーゼ CA を利用した反応は第一級ヒドロキシ基と第二級ヒドロキシ基で選択性が発現する例が報告されている。これらの知見と前章で示したチオールとヒドロキシ基の EAM に対する反応性の差を利用することで、側鎖にチオールを含有するポリエステルのワンポット合成が期待される。

そこで、本研究では、Scheme 4.3 に示した通り、リパーゼ CA を触媒としてヘキサン - 1,6 - ジオールと 2 - メルカプトコハク酸ジメチルを反応させることで、側鎖にチオールを有するポリエステルの選択的ワンポット合成を行った。

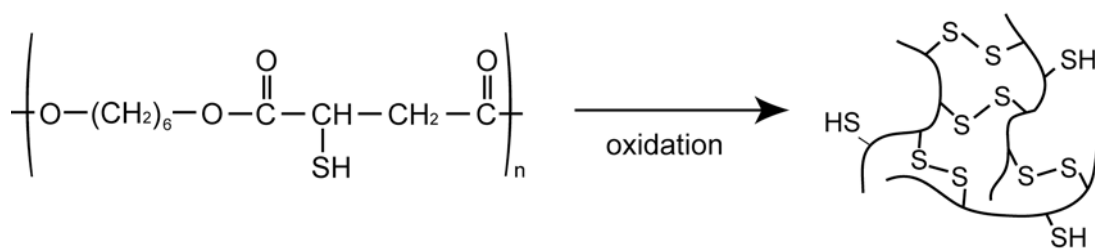
また、Scheme 4.4 に示した通り、側鎖チオールの酸化によるジスルフィド結合の形成に伴うポリマーの架橋化を行った。このような構造を有するポリマーは、前述の通りリサイクル性を有することが十分に期待される。

さらに、側鎖チオール含有モノマーである 2 - メルカプトコハク酸ジメチルの立体化学が酵素重合性に及ぼす影響について評価した。対照実験としてヘキサン - 1,6 - ジオールと側鎖ヒドロキシモノマーであるリンゴ酸ジメチルの重縮合も行い、それぞれにつ

いて結果を比較した。



Scheme 4.3 Enzymatic synthesis of polyester with free pendant thiols.



Scheme 4.4 Cross-linking reaction by oxidation of thiol to disulfide.

4. 2 試薬・機器

4. 2. 1 試薬

本章で用いた酵素を以下に示す。酵素は、いずれも五酸化ニリン存在下、常温で2時間減圧乾燥(3 mmHg)させてから用いた。

Table 4.1 List of enzymes.

Enzyme origin	Abbreviation	Manufactures
Immobilized lipase from <i>Candida antarctica</i> (Novozym 435) Activity = 10,000 PLU/g ^(a)	CA	Novozymes Japan
Immobilized lipase from <i>Burkholderia cepacia</i> (Lipase PS - C Amano I immobilized on ceramic) Activity = 1,000 PLU/g ^(b)	PS - C	Amano Enzyme Inc.
Immobilized lipase from <i>Rhizomucor miehei</i> (Lipozyme RM IM) Activity = 5 - 6 BAUN/g ^(c)	RM	Novozymes Japan
Lipase from <i>Candida rugosa</i> Activity = 500 U/mg ^(d)	CR	Sigma Chemical Co., Inc.

^(a) Lipase (B lipase) from *Candida antarctica* produced by submerged fermentation of genetically modified *Aspergillus oryzae* microorganism and adsorbed on a macroporous acrylic resin, having 10,000 PLU/g (propyl laurate units : lipase activity based on ester synthesis). The product has a water content of 1 - 2 wt%.
Lot Number of Novozym 435 : LC200207

^(b) One unit will produce 1.0 micromole of 1-phenethyl alcohol to 1-phenethyl acetate

per min at 25 °C in the presence of vinyl acetate.

(c) The interesterification activity of Lipozyme RM IM is expressed in batch acidolysis units Novo (BUN/g). Lipozyme RM IM is immobilized on a macroporous anion - exchange resin.

(d) One unit will hydrolyze 1.0 microequivalent of fatty acid from a triglyceride in 1 hr at pH 7.2 at 37 °C using olive oil (30 min incubation).

熱失活リパーゼ CA (thermally deactivated lipase CA)は、50 mL ナスフラスコにリパーゼ CA 100 mg をはかり取り、これをオートクレーブ中で 120 °C、15 分間蒸気により加熱及び加圧し、次いで凍結乾燥することにより調製した。凍結乾燥後の熱失活リパーゼ CA の水分量は 0.5 wt%程度であった。

本章で用いた試薬を以下に示す。

Table 4.2 List of reagents for experiments.

試薬名	製造会社	等級
DL-2-メルカプトコハク酸	Aldrich Chem. Co., Inc.	
ヘキサン - 1,6 - ジオール	関東化学 (株)	鹿特級
セバシン酸ジメチル	関東化学 (株)	鹿特級
ジメチルスルホキシド	関東化学 (株)	鹿特級
DL - リンゴ酸ジメチル	東京化成工業 (株)	一級
D - リンゴ酸ジメチル	東京化成工業 (株)	
L - リンゴ酸ジメチル	東京化成工業 (株)	一級
1 - デカノール	東京化成工業 (株)	一級
(1 <i>R</i> ,2 <i>R</i>)-(–)-2-amino-1-phenyl-1,3-propanediol	和光純薬工業 (株)	
(1 <i>S</i> ,2 <i>S</i>)-(+) -2-amino-1-phenyl-1,3-propanediol	和光純薬工業 (株)	
リン酸水素二カリウム	純正化学 (株)	純正一級
リン酸二水素カリウム	純正化学 (株)	純正一級
リン酸水素二ナトリウム・十二水和物	純正化学 (株)	純正一級
塩化アンモニウム	純正化学 (株)	純正一級
硫酸マグネシウム・七水和物	和光純薬工業 (株)	試薬特級
塩化カルシウム	関東化学 (株)	特級
硫酸鉄 (Ⅲ)・六水和物	和光純薬工業 (株)	試薬特級
アニリン	和光純薬工業 (株)	試薬特級
塩化カルシウム・二水和物	和光純薬工業 (株)	試薬特級
硫酸鉄 (Ⅱ)・七水和物	小宗化学薬品 (株)	試薬特級
硫酸マンガン・四水和物	小宗化学薬品 (株)	試薬特級
硫酸亜鉛・七水和物	和光純薬工業 (株)	試薬特級
硫酸銅・五水和物	純正化学 (株)	純正一級
塩酸チアミン(VB ₁ ・HCl)	和光純薬工業 (株)	試薬特級
Amberlite IR –120 PLUS (H)	和光純薬工業 (株)	
Amberlyst 15	和光純薬工業 (株)	
メタノール	関東化学 (株)	鹿特級
エタノール	関東化学 (株)	鹿特級
クロロホルム	信越化学工業 (株)	業務用
クロロホルム(stabilized with amylene)	関東化学 (株)	HPLC 用

本章で用いた分析用試薬・その他実験用品を以下に示す。

Table 4.3 List of reagents for experimental analysis and others.

試薬名	製造会社	等級
酸化リン (V)	関東化学 (株)	特級
シリカゲル 60N (球状、中性)	関東化学 (株)	カラム用
海砂 (15–20 メッシュ)	純正化学 (株)	化学用
TLC 板	Merck	
モレキュラーシーブス 4A (ビーズ)	純正化学 (株)	化学用
重クロロホルム	ISOTEC Inc.	

4.2.2 機器

サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) 高分子量用

ポンプ	PU - 980	日本分光 (株)
カラムオーブン	CO - 1565	日本分光 (株)
カラム	K - G, K - 804L (8 mm ϕ $\times$ 300 mm)	日本分光 (株)
検出器	RI - 930	日本分光 (株)
レコーダー	807 - IT	日本分光 (株)
デガッサー	DG - 980 - 50	日本分光 (株)
溶離液	1%エタノール含有クロロホルム	
測定条件	流速	1.0 mL/min
	測定温度	35 °C
	試料注入量	100 μ L (1 mg/mL)
	検量線用標準試料	ポリスチレンスタンダード (M_w = 233,000、110,000、50,000、 17,500、9,000、2,200、906)
		ケムコ化学 (株)

その他の機器

FT - NMR

JEOL JNM - LA300

日本電子 (株)

VARIAN NMR300

VARIAN. Inc.

フーリエ変換赤外分光光度計

FT/IR - 4100

日本分光 (株)

旋光度計

P - 1010 digital polarimeter

日本分光 (株) .

示差走査熱量計

DSC - 60

(株) 島津製作所

BOD Tester

アクタック (株)

ガラス電極式水素イオン濃度計

HM - 20E

東亜電波工業 (株)

油浴

OMS - 1

石井商店（株）

マグネットスターラー

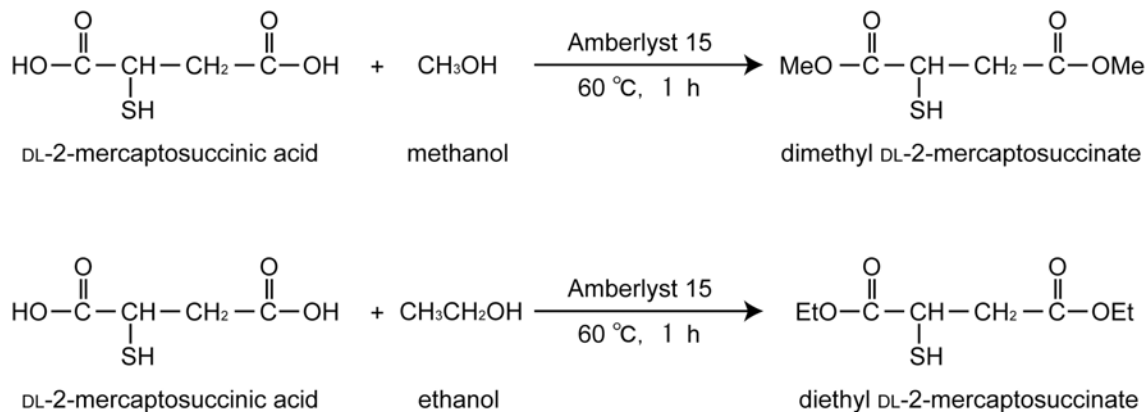
EG

石井商店（株）

4.3 実験方法

4.3.1 側鎖チオール含有ポリエステルの合成

4.3.1.1 DL-2-メルカプトコハク酸ジメチル及び DL-2-メルカプトコハク酸ジエチルの調製



Scheme 4.5 Esterification of DL-2-mercaptosuccinic acid.

Scheme 4.5 に示すように 2 種のエステルを調製した。それぞれの合成法および ^1H NMR スペクトルを以下に示した。

・ DL-2-メルカプトコハク酸ジメチル

磁気回転子を付した 300 mL ナスフラスコに DL-2-メルカプトコハク酸 4.0 g (26.6 mmol) 及び Amberlyst 15 2.0 g をはかり取り、メタノール 160 mL を添加後、フラスコ内をアルゴンで置換し 60 °C で 24 時間攪拌した。反応混合物から Amberlyst 15 をセライトろ過によりろ別し、ついで、ろ液をロータリーエバポレーターを用いて濃縮することで、粗 DL-2-メルカプトコハク酸ジメチルを得た。展開溶媒として酢酸エチル/ヘキサン = 1/2 (v/v) を用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィー (1 g の基質に対してシリカゲル 60 N 50 g) で $R_f = 0.47$ のフラクションを分取した。これをロータリーエバポレーターを用いて濃縮した。濃縮物から酢酸エチルを完全に除去するために、濃縮物にメタノール 10 mL を加え、再度ロータリーエバポレーターで共沸的に濃縮した。この共沸操作を数回繰り返した後、室温、3 mmHg で十分に乾燥させることで DL-2-メルカプトコハク酸ジメチルを収率 91.6 % で得た。DL-2-メルカプトコハク酸ジメチルの ^1H NMR を Fig. 4.1 に示した。また、元素分析の結果も併せて示した。

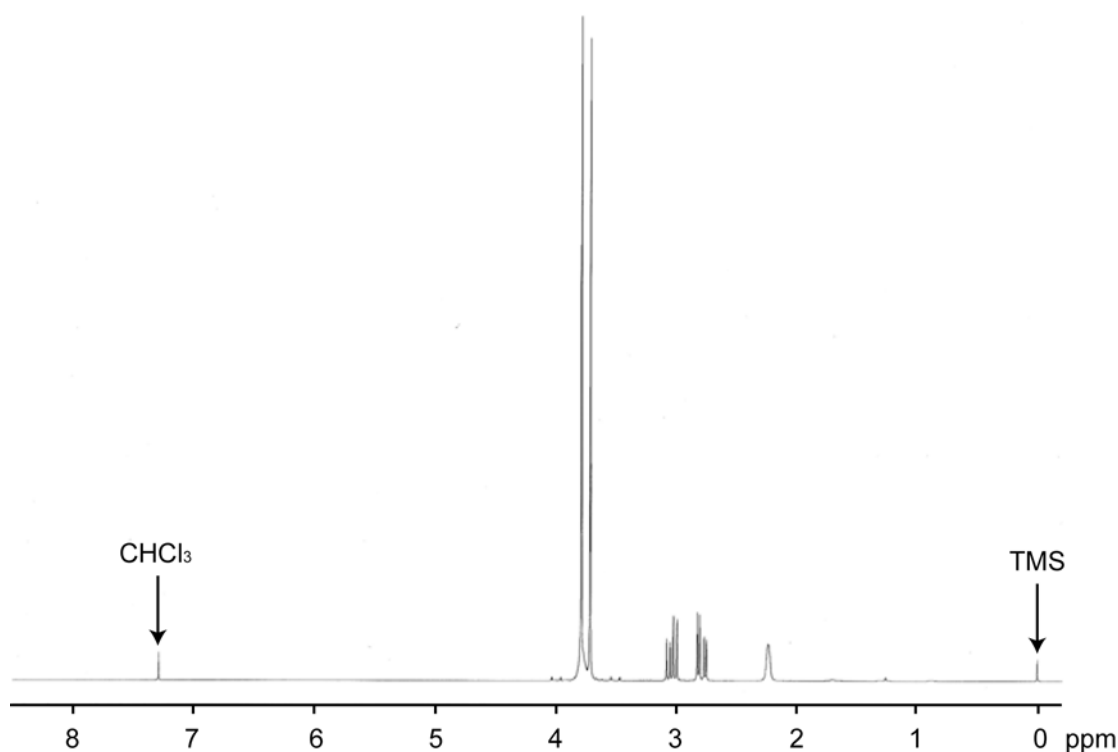


Fig. 4.1 300 MHz ^1H NMR spectrum of dimethyl DL-2-mercaptop succinate in CDCl_3 .

Dimethyl DL-2-mercaptop succinate : ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3); δ (ppm) = 2.23 (d, 1H, - SH , $J = 9.6$ Hz), 2.78 (dd, 1H, - $\text{OOC} - \text{CH}(\text{SH}) - \text{CH}_\text{A}\text{H}_\text{B} - \text{COO}^-$, $J_1 = 17.0$ Hz, $J_2 = 6.0$ Hz), 3.03 (dd, 1H, - $\text{OOC} - \text{CH}(\text{SH}) - \text{CH}_\text{A}\text{H}_\text{B} - \text{COO}^-$, $J_1 = 17.0$ Hz, $J_2 = 8.7$ Hz), 3.71 (s, 3H, $\text{H}_3\text{C} - \text{OOC} - \text{CH}(\text{SH}) - \text{CH}_\text{A}\text{H}_\text{B} - \text{COO} - \text{CH}_3$), 3.78 (s, 3H, $\text{H}_3\text{C} - \text{OOC} - \text{CH}(\text{SH}) - \text{CH}_\text{A}\text{H}_\text{B} - \text{COO} - \text{CH}_3$), 3.82 (m, 1H, $\text{H}_3\text{C} - \text{OOC} - \text{CH}(\text{SH}) - \text{CH}_\text{A}\text{H}_\text{B} - \text{COO} - \text{CH}_3$).

$\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_4\text{S}$ 178.21: Calcd. C 40.44, H 5.66, S 17.99; Found C 40.38, H 5.73, S 18.15.

• DL - 2 - メルカプトコハク酸ジエチル

磁気回転子を付した 300 mL ナスフラスコに DL - 2 - メルカプトコハク酸 4.0 g (26.6 mmol)及び Amberlyst 15 2.0 g をはかり取り、エタノール 160 mL を添加後、フラスコ内をアルゴンで置換し 60 $^{\circ}\text{C}$ で 24 時間攪拌した。反応混合物から Amberlyst 15 をセライトろ過することでろ別し、ついで、ろ液をロータリーエバポレーターを用いて濃縮することで、粗 DL - 2 - メルカプトコハク酸ジエチルを得た。展開溶媒として酢酸エチル/ヘキサン = 1/2 (v/v)を用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィー (1 g の基質に対してシリカゲル 60 N 50 g) で $R_f = 0.36$ のフラクションを分取した。これをロー

タリーエバポレーターを用いて濃縮した。濃縮物から酢酸エチルを完全に除去するために、濃縮物にメタノール 10 mL を加え、再度ロータリーエバポレーターで共沸的に濃縮した。この共沸操作を数回繰り返した後、室温、3 mmHg で十分に乾燥させることで DL - 2 - メルカプトコハク酸ジエチルを収率 88.1 % で得た。DL - 2 - メルカプトコハク酸ジエチルの ^1H NMR を Fig. 4.2 に示した。また、元素分析の結果も併せて示した。

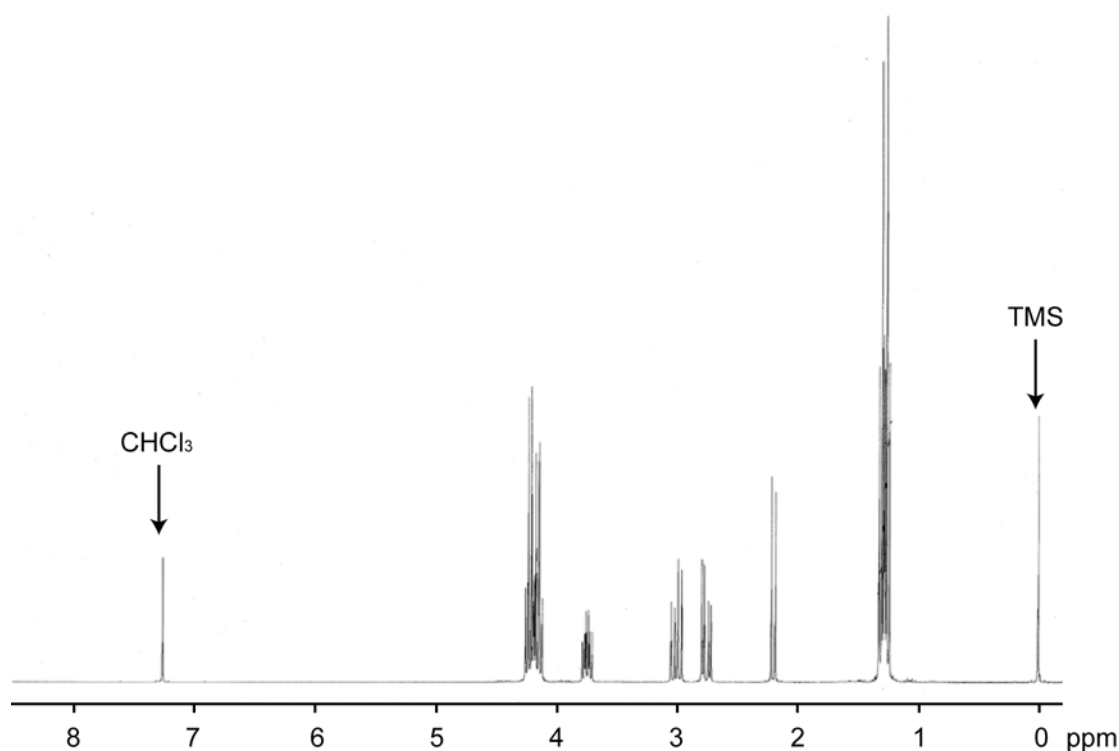
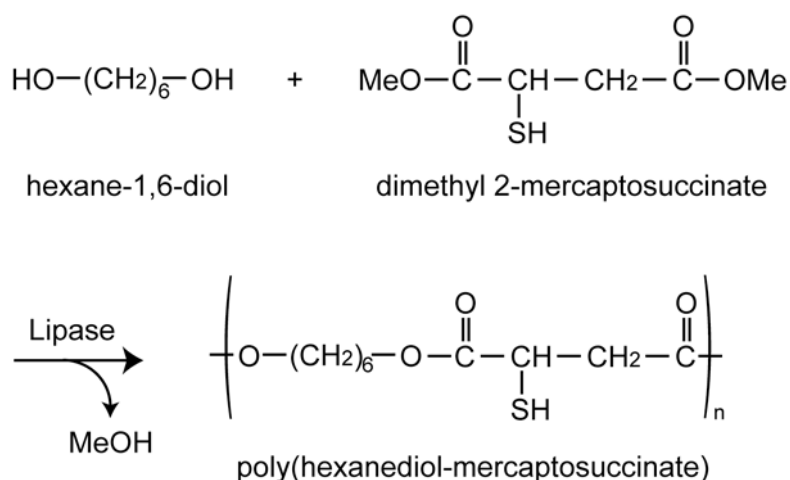


Fig. 4.2 300 MHz ^1H NMR spectrum of diethyl DL-2-mercaptosuccinate in CDCl_3 .

Diethyl DL-2-mercaptosuccinate : ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3); δ (ppm) = 1.26 (t, 3H, $\text{H}_3\text{C} - \text{H}_2\text{C} - \text{OOC} - \text{CH}(\text{SH}) - \text{CH}_\text{A}\text{H}_\text{B} - \text{COO} - \text{CH}_2 - \text{CH}_3$, $J = 7.2$ Hz), 1.30 (t, 3H, $\text{H}_3\text{C} - \text{H}_2\text{C} - \text{OOC} - \text{CH}(\text{SH}) - \text{CH}_\text{A}\text{H}_\text{B} - \text{COO} - \text{CH}_2 - \text{CH}_3$, $J = 7.2$ Hz), 2.20 (d, 1H, $-\text{SH}$, $J = 9.3$ Hz), 2.73 (dd, 1H, $-\text{OOC} - \text{CH}(\text{SH}) - \text{CH}_\text{A}\text{H}_\text{B} - \text{COO} -$, $J_1 = 16.8$ Hz, $J_2 = 6.0$ Hz), 3.01 (dd, 1H, $-\text{OOC} - \text{CH}(\text{SH}) - \text{CH}_\text{A}\text{H}_\text{B} - \text{COO} -$, $J_1 = 16.8$ Hz, $J_2 = 9.3$ Hz), 3.75 (ddd, 1H, $-\text{OOC} - \text{CH}(\text{SH}) - \text{CH}_\text{A}\text{H}_\text{B} - \text{COO} -$, $J_1 = J_2 = 9.3$ Hz, $J_3 = 6.0$ Hz), 4.16 (q, 2H, $\text{H}_3\text{C} - \text{H}_2\text{C} - \text{OOC} - \text{CH}(\text{SH}) - \text{CH}_\text{A}\text{H}_\text{B} - \text{COO} - \text{CH}_2 - \text{CH}_3$, $J = 7.2$ Hz), 4.22 (q, 2H, $\text{H}_3\text{C} - \text{H}_2\text{C} - \text{OOC} - \text{CH}(\text{SH}) - \text{CH}_\text{A}\text{H}_\text{B} - \text{COO} - \text{CH}_2 - \text{CH}_3$, $J = 7.2$ Hz).

$\text{C}_8\text{H}_{14}\text{O}_4\text{S}$ 206.26: Calcd. C 46.58, H 6.84, S 15.55; Found C 46.44, H 6.73, S 15.63.

4.3.1.2 直接重縮合による poly(hexanediol - mercaptosuccinate)の合成



Scheme 4.6 Enzymatic synthesis of poly(hexanediol - mercaptosuccinate).

Poly(hexanediol - mercaptosuccinate)は、ヘキサン - 1,6 - ジオールと DL - 2 - メルカプトコハク酸、DL - 2 - メルカプトコハク酸ジメチル、DL - 2 - メルカプトコハク酸ジエチルなどの側鎖チオール含有ジカルボキシルモノマーをモノマー仕込み比が 1:1 (mol/mol)となるようにはかり取り、リパーゼ CA とそれぞれ 70 °C、2 日間反応させることにより得た。ヘキサン - 1,6 - ジオールと DL - 2 - メルカプトコハク酸ジメチルからの重合例を以下に記す。

モレキュラーシーブス 4A をアルミホイルで作成した簡易容器に満たし、使用前に 150 °C で 2 時間加熱することで、十分に乾燥させた。さらに、ネジキャップ付き試験管(13×100 mm)にヘキサン - 1,6 - ジオール 47.3 mg (0.40 mmol)及び DL - 2 - メルカプトコハク酸ジメチル 71.2 mg (0.40 mmol)、別の小試験管にリパーゼ CA 21.4 mg をはかり取った。小試験管内のリパーゼ CA は 2 時間減圧乾燥させ、ついで、基質を含むネジキャップ付き試験管に移しいれた。試験管内をアルゴンで置換し、モレキュラーシーブス簡易容器を付し、密栓後オイルバスにて 70 °C で 48 時間反応させた。

反応終了後、反応物にクロロホルム (安定化剤としてアミレンを含む) 15 mL を加え、リパーゼ CA をろ別した。ろ液を減圧濃縮し、粗生成物を得た。粗生成物はまず、良溶媒：クロロホルム 400 μL、貧溶媒：1 - ヘキサノール 40 mL で一度再沈殿を行った。ついで、良溶媒：クロロホルム 400 μL、貧溶媒：ヘキサン 40 mL で再び再沈殿を行った。2 度再沈殿を行うことで、ポリマー中の溶媒を完全に除去した。上記操作により精製し、無色透明の粘性液状で poly(hexanediol - mercaptosuccinate) [$M_w = 14,000$ 、 $M_w/M_n = 2.3$]を収率 92.2 %で得た。

精製ポリマーの ^1H NMR を Fig. 4.3 に示した。

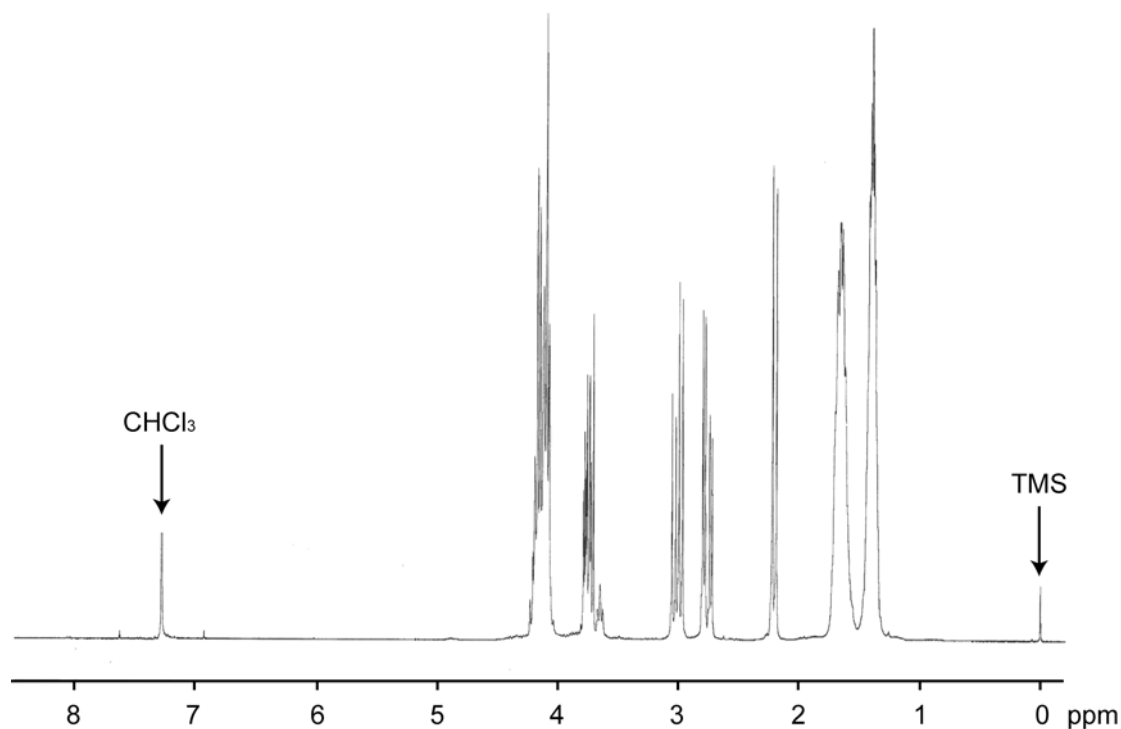


Fig. 4.3 300 MHz ^1H NMR spectrum of poly(hexanediol - mercaptosuccinate) in CDCl_3 .

Poly(hexanediol - mercaptosuccinate) : ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3); $\delta(\text{ppm}) = 1.30 \sim 1.51$ (m, 4H, $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\underline{\text{CH}_2}-\underline{\text{CH}_2}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$), $1.52 \sim 1.78$ (m, 4H, $-\text{O}-\text{CH}_2-\underline{\text{CH}_2}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\underline{\text{CH}_2}-\text{CH}_2-\text{O}-$), 2.20 (d, 1H, $-\text{SH}$, $J = 9.6$ Hz), 2.76 (dd, 1H, $-\text{OOC}-\text{CH}(\text{SH})-\underline{\text{CH}}_{\text{A}}\text{H}_{\text{B}}-\text{COO}-$, $J_1 = 17.0$ Hz, $J_2 = 6.0$ Hz), 3.01 (dd, 1H, $-\text{OOC}-\text{CH}(\text{SH})-\text{CH}_{\text{A}}\text{H}_{\text{B}}-\text{COO}-$, $J_1 = 17.0$ Hz, $J_2 = 9.6$ Hz), $3.72 \sim 3.80$ (m, 1H, $-\text{OOC}-\underline{\text{CH}}(\text{SH})-\text{CH}_{\text{A}}\text{H}_{\text{B}}-\text{COO}-$), 4.09 (t, 2H, $-\text{CH}_2-\text{OOC}-\text{CH}(\text{SH})-\text{CH}_{\text{A}}\text{H}_{\text{B}}-\text{COO}-\underline{\text{CH}_2}-$, $J = 6.6$ Hz), $4.10 \sim 4.20$ (m, 2H, $-\underline{\text{CH}_2}-\text{OOC}-\text{CH}(\text{SH})-\text{CH}_{\text{A}}\text{H}_{\text{B}}-\text{COO}-\text{CH}_2-$).

また、前述の重縮合による poly(hexanediol - mercaptosuccinate)合成の際の DL - 2 - メルカプトコハク酸ジメチル 71.2 mg (0.40 mmol)を L - リンゴ酸ジメチル 64.8 mg (0.40 mmol)と置き換え、同様の実験操作を行うことで、側鎖ヒドロキシ基含有ポリエステルである poly(hexanediol - malate) [$M_w = 16,000$ 、 $M_w / M_n = 2.5$]を収率 86.2 % で得た。

精製ポリマーの ^1H NMR を Fig. 4.4 に示した。

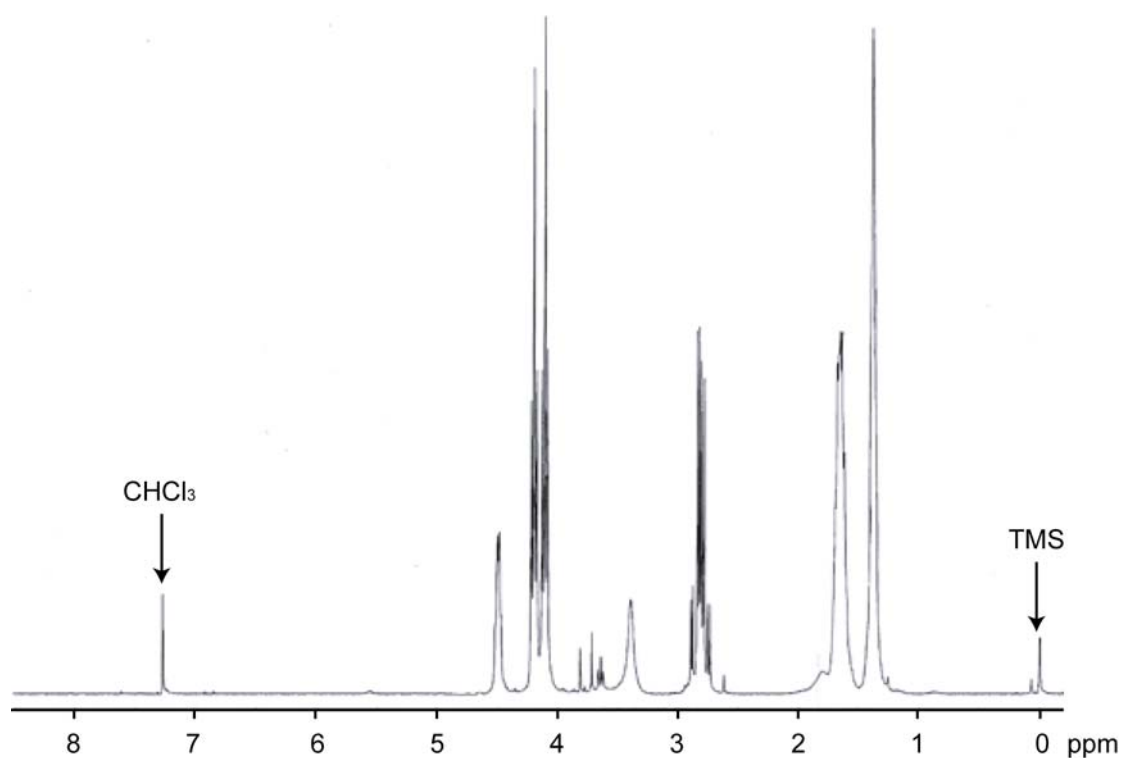


Fig. 4.4 300 MHz ^1H NMR spectrum of poly(hexanediol - malate) in CDCl_3 .

Poly(hexanediol - malate): ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3); $\delta(\text{ppm}) = 1.22 \sim 1.38$ (m, 4H, - O - CH_2 - CH_2 - $\underline{\text{CH}_2}$ - $\underline{\text{CH}_2}$ - CH_2 - CH_2 - O -), 1.52 $\sim$ 1.76 (m, 4H, - O - CH_2 - $\underline{\text{CH}_2}$ - CH_2 - CH_2 - $\underline{\text{CH}_2}$ - CH_2 - O -), 2.78 (dd, 1H, - OOC - CH (OH) - $\underline{\text{CH}_A\text{H}_B}$ - COO - , $J_1 = 16.2$ Hz, $J_2 = 6.0$ Hz), 2.86 (dd, 1H, - OOC - CH (OH) - $\text{CH}_A\underline{\text{H}_B}$ - COO - , $J_1 = 16.2$ Hz, $J_2 = 4.2$ Hz), 3.36 (br, 1H, - $\underline{\text{OH}}$), 4.11 (t, 2H, - CH_2 - OOC - CH (OH) - CH_AH_B - COO - $\underline{\text{CH}_2}$ - , $J = 6.6$ Hz), 4.21 (t, 2H, - $\underline{\text{CH}_2}$ - OOC - CH (OH) - CH_AH_B - COO - CH_2 - , $J = 6.6$ Hz), 4.49 (m, 1H, - OOC - $\underline{\text{CH}}$ (OH) - CH_AH_B - COO -).

4.3.2 側鎖の立体化学による影響

4.3.2.1 DL-2-メルカプトコハク酸の光学分割による D-2-メルカプトコハク酸及び L-2-メルカプトコハク酸の調製

Shiraiwa らの方法に従い、D-2-メルカプトコハク酸及び L-2-メルカプトコハク酸を調製した¹³⁹⁾。実験操作を以下に記す。

300 mL ナスフラスコに DL-2-メルカプトコハク酸 2.70 g (18 mmol) と (1*S*, 2*S*)-2-amino-1-phenyl-1,3-propanediol [(*S*)-APP] 6.02 g (36.0 mmol)をはかり取り、25 mL のメタノールを添加し溶解させた。室温で 2 時間攪拌し、ついで析出した結晶をろ別し、乾燥させることで、粗 D-2-メルカプトコハク酸-(*S*)-APP 塩を 4.42 g 得た。この塩を回収し、300 mL ナスフラスコ中で 80 mL の水と Amberlite IR - 120 Plus (H) 22.1 g とともに室温で 24 時間攪拌した。ついで、Amberlite IR - 120 Plus (H)をろ別し、ろ液を減圧濃縮することで粗 D-2-メルカプトコハク酸を 1.25 g 得た。この粗生成物を 3 mL の水中で 2 回再結晶を繰り返すことで、D-2-メルカプトコハク酸を 1.07 g (7.13 mmol)収率 79.2 %で得た。

また、上記の(1*S*, 2*S*)-2-amino-1-phenyl-1,3-propanediol [(*S*)-APP] 6.02 g (36.0 mmol)を(1*R*, 2*R*)-2-amino-1-phenyl-1,3-propanediol [(*R*)-APP] 6.02 g (36.0 mmol)と置き換え同様の実験操作を行うことで、L-2-メルカプトコハク酸を 1.08 g (7.20 mmol)収率 80.0 %で得た。

それぞれの比旋光度及び光学純度は以下の通りである。

D-2-メルカプトコハク酸: $[\alpha] +64.4^\circ$ ($c = 1.0$ in ethanol; lit., $[\alpha] +64.4^\circ$ ¹⁴⁰⁾、光学純度 100 %

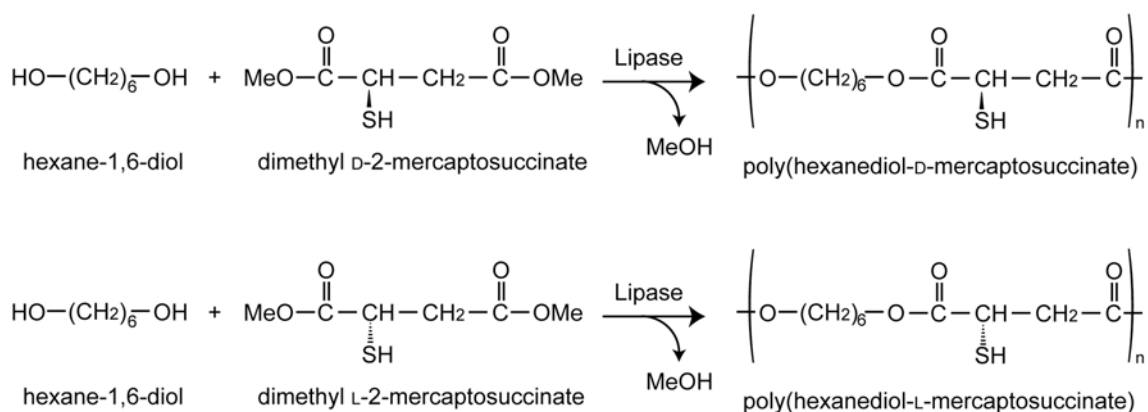
L-2-メルカプトコハク酸: $[\alpha] -63.8^\circ$ ($c = 1.0$ in ethanol; lit., $[\alpha] -64.8^\circ$ ¹⁴⁰⁾、光学純度 98.5 %

いずれの光学活性体も 4.3.1.1 節で示した方法に従い、相当するメチルエステルへと変換した。D-2-メルカプトコハク酸より D-2-メルカプトコハク酸ジメチルを収率 87.3 %で得た。また、L-2-メルカプトコハク酸より L-2-メルカプトコハク酸ジメチルを収率 78.8 %で得た。それぞれの比旋光度は以下の通りである。

D-2-メルカプトコハク酸ジメチル: $[\alpha] +49.7^\circ$ ($c = 1.0$ in ethanol)

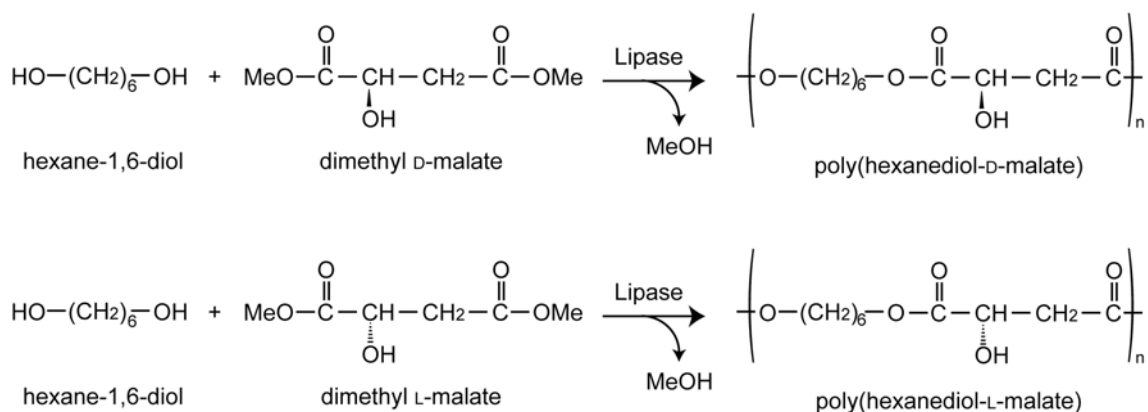
L-2-メルカプトコハク酸ジメチル: $[\alpha] -50.4^\circ$ ($c = 1.0$ in ethanol)

4.3.2.2 光学活性体を用いた重合



Scheme 4.7 Enzymatic polymerization using optically active dimethyl 2-mercaptosuccinates.

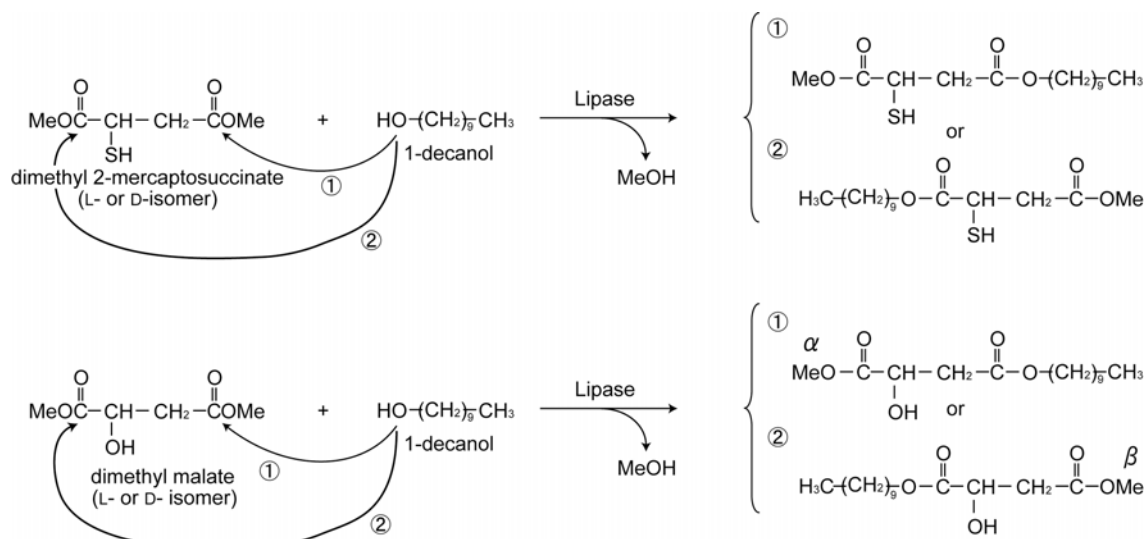
4.3.1.2 節で示した重合反応を Scheme 4.7 で示す様に光学活性体を用いて行った。前述の poly(hexanediol - mercaptosuccinate) 合成の際の DL - 2 - メルカプトコハク酸ジメチルを等モルの D - または L - 2 - メルカプトコハク酸ジメチルと置き換え、同様の実験操作を行うことで立体化学が重合に及ぼす影響を評価した。



Scheme 4.8 Enzymatic polymerization using optically active dimethyl malates.

また、Scheme 4.8 に示す様に同様の実験を D - または L - リンゴ酸ジメチルを用いて行った。それぞれの結果に関する詳細は後述する。

4.3.2.3 光学活性体のエステル化



Scheme 4.9 Enzymatic esterification of optically active dimethyl 2-mercaptosuccinate and dimethyl malate.

4.3.2.2 節の光学活性体を用いた重合に関する結果を受け、リパーゼ CA によるそれぞれの光学活性体のデシルエステル化を行った。これにより、側鎖の立体化学と各カルボニルの酵素認識性の関係を比較することが可能となる。実験操作を以下に記す。

モレキュラーシーブス 4A をアルミホイルで作成した簡易容器に満たし、使用前に 150 °C で 2 時間加熱することで、十分に乾燥させた。さらに、ネジキャップ付き試験管(13×100 mm)に D - 2 - メルカプトコハク酸ジメチルまたは L - 2 - メルカプトコハク酸ジメチル 71.2 mg (0.40 mmol) と 1 - デカノール 63.4 mg (0.40 mmol)、別の小試験管にリパーゼ CA 21.4 mg をはかり取った。小試験管内のリパーゼ CA は 2 時間減圧乾燥させ、ついで、基質を含むネジキャップ付き試験管に移し取った。試験管内をアルゴンで置換し、モレキュラーシーブス簡易容器を付し、密栓後オイルバスにて 70 °C で 24 時間反応させた。

反応終了後、反応物にクロロホルム (安定化剤としてアミレンを含む) 15 mL を加え、リパーゼ CA をろ別した。ろ液を減圧濃縮し、乾燥させることで生成物を得た。

D - または L - 2 - メルカプトコハク酸ジメチル 71.2 mg (0.40 mmol) を D - または L - リンゴ酸ジメチルと置き換えることで側鎖ヒドロキシ基の立体化学が及ぼす影響についても評価した。

酵素によるカルボニルの認識性に関する評価には、 ^1H NMR を用いた。評価に用いたピーク等の詳細は結果、考察項に記す。

4.3.3 架橋・解架橋反応

4.3.3.1 Poly(hexanediol - mercaptosuccinate)の架橋化

側鎖チオールをジスルフィドへ酸化することにより架橋反応を進行させた。反応例を以下に記す。

500 mg の poly(hexanediol - mercaptosuccinate) [$M_w = 14,000$ 、 $M_w/M_n = 2.3$]を 5 mL のジメチルスルホキシドに溶解させ、70 °Cに加熱した。3 時間後に不溶物が確認された。その後、さらに 21 時間加熱を続け合計 1 日反応させた。不溶物を回収し 200 mL のメタノール中に 2 時間浸し、ついで減圧乾燥することで、cross-linked poly(hexanediol - mercaptosuccinate)を得た。

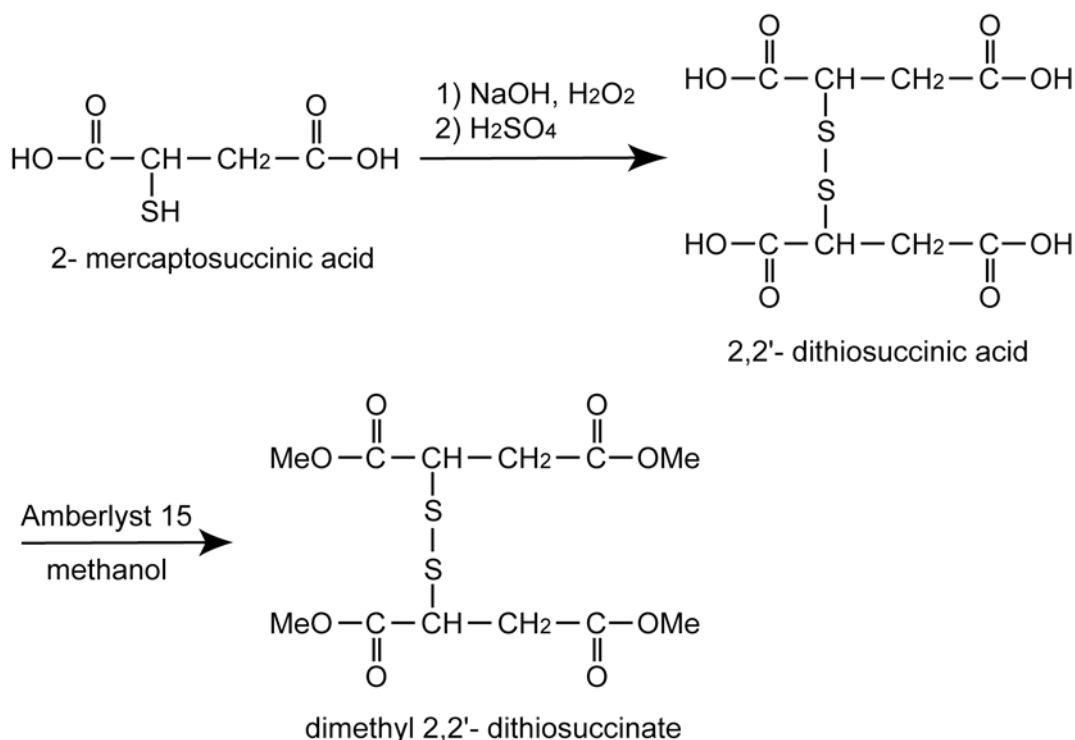
ゲル分率はこの架橋サンプルのクロロホルム不溶分と架橋前の poly(hexanediol - mercaptosuccinate)の重量の比から算出した。すなわち、以下の公式を用いた。

$$\text{Gel fraction (\%)} = (W_g / W_0) \times 100$$

ここで、 W_g は架橋反応後クロロホルム不溶分、 W_0 は架橋前の poly(hexanediol - mercaptosuccinate)を示す。

得られた cross-linked poly(hexanediol - mercaptosuccinate)のゲル分率は 76 %であった。また、架橋後の化学構造については、結果、考察項に記す。

4.3.3.2 ジスルフィドモデル化合物の合成



Scheme 4.10 Synthesis of dimethyl 2,2'-dithiosuccinate.

モデル化合物として、2,2'-ジチオコハク酸ジメチルをHarusawaらの方法を応用し、調製した¹⁴¹⁾。合成法及び¹H NMRスペクトルを以下に示した。

磁気回転子を付した5 mL ナスフラスコに1.8 mLの8 N NaOHを加え、0 °Cに保った。これに、DL-2-メルカプトコハク酸1.0 g (6.65 mmol)を徐々に加えた。ついで、室温で30 % 過酸化水素水を520 μL ゆっくりと加え、2時間攪拌した。その後、20 % 硫酸水溶液を1.9 mL 加え、pH = 1 としてからジエチルエーテルで抽出し、ジエチルエーテル層を回収した。ジエチルエーテル層を再度飽和食塩水で分液し、ついで硫酸ナトリウムを用い脱水した。これをロータリーエバポレーターを用いて濃縮することで、粗2,2'-ジチオコハク酸がほぼ定量的に得られた。

粗2,2'-ジチオコハク酸を4.3.1.1節で示した方法と同様にAmberlyst 15を用いてメチルエステル化し酢酸エチル/ヘキサン = 2/3 (v/v)を用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィーで $R_f = 0.47$ のフラクションを分取することで精製し、2,2'-ジチオコハク酸ジメチルを74.4 %の収率で得た。2,2'-ジチオコハク酸ジメチルの¹H NMRをFig. 4.5に示した。

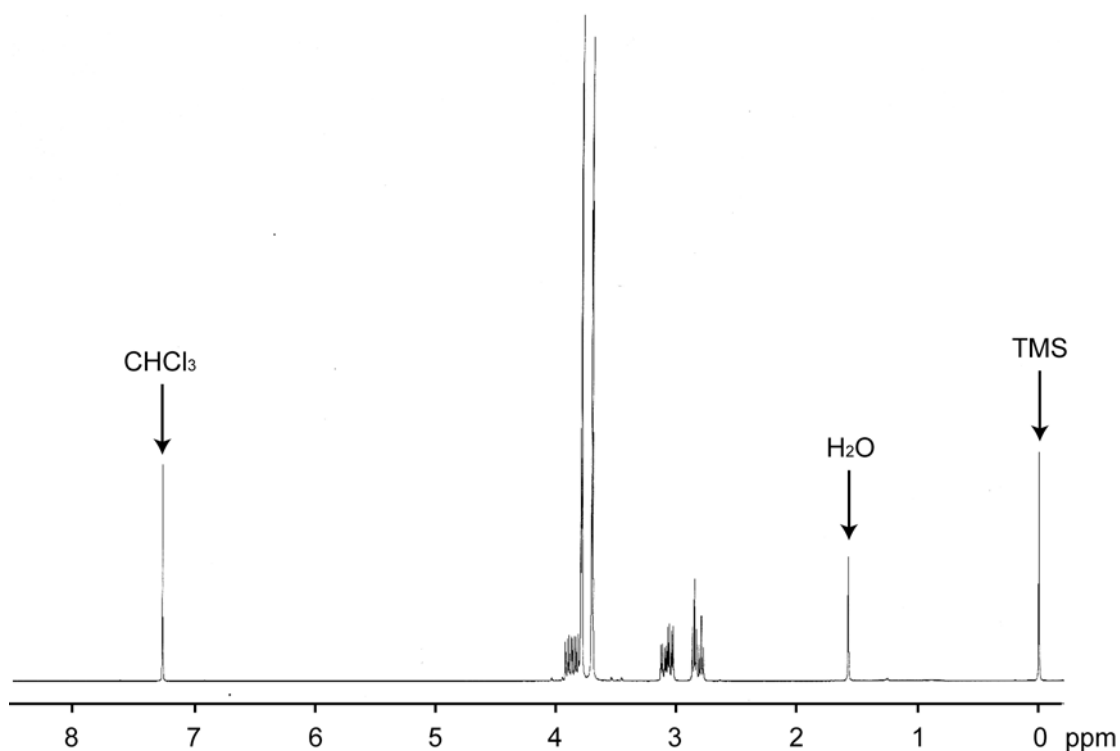
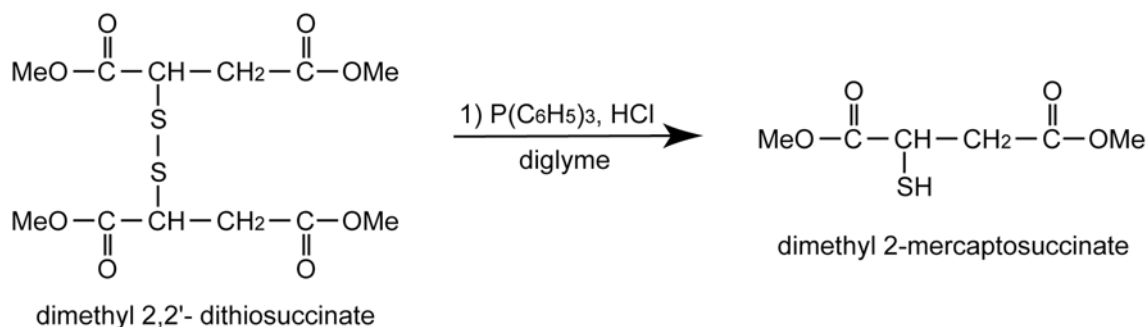


Fig. 4.5 300 MHz ^1H NMR spectrum of dimethyl 2,2'-dithiosuccinate CDCl_3 .

Dimethyl 2,2'-dithiosuccinate (mixture of diastereomers) : ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3); δ (ppm) = 2.80 (dd, 1H, - OOC - CH (S -) $\underline{\text{CH}}_{\text{A}}\text{H}_{\text{B}}$ - COO - , $J_1 = J_2 = 5.7$ Hz), 2.86 (dd, 1H, - OOC - CH (S -) - $\underline{\text{CH}}_{\text{A}}\text{H}_{\text{B}}$ - COO - , $J_1 = J_2 = 5.4$ Hz), 3.07 (dd, 1H, - OOC - CH (S -) $\text{CH}_{\text{A}}\underline{\text{H}}_{\text{B}}$ - COO - , $J_1 = 17.1$ Hz, $J_2 = 3.6$ Hz), 3.10 (dd, 1H, - OOC - CH (S -) - $\text{CH}_{\text{A}}\underline{\text{H}}_{\text{B}}$ - COO - , $J_1 = 17.1$ Hz, $J_2 = 3.9$ Hz), 3.71 (s, 3H, H_3C - OOC - CH (S -) - $\text{CH}_{\text{A}}\text{H}_{\text{B}}$ - COO - $\underline{\text{CH}}_3$), 3.84 (dd, 1H, H_3C - OOC - $\underline{\text{CH}}$ (S -) - $\text{CH}_{\text{A}}\text{H}_{\text{B}}$ - COO - CH_3 , $J_1 = 5.7$ Hz, $J_2 = 17.1$ Hz), 3.90 (dd, 1H, H_3C - OOC - $\underline{\text{CH}}$ (S -) - $\text{CH}_{\text{A}}\text{H}_{\text{B}}$ - COO - CH_3 , $J_1 = 5.4$ Hz, $J_2 = 17.1$ Hz)

4.3.3.3 ジスルフィドモデル化合物の還元



Scheme 4.11 Reduction of dimethyl 2,2'-dithiosuccinate to dimethyl 2-mercaptosuccinate.

モデル化合物である、2,2'-ジチオコハク酸ジメチルのジスルフィドを還元することで、2-メルカプトコハク酸ジメチルを調製した。実験方法及び ^1H NMR スペクトルを以下に示した。

磁気回転子を付した 20 mL ナスフラスコに 2,2'-ジチオコハク酸ジメチル 50 mg、ジエチレングリコールジメチルエーテル（ジグリム）2 mL、トリフェニルホスフィン 0.425 g 及び 0.01 M 塩酸を 20 μL 加え 80 $^\circ\text{C}$ で 24 時間攪拌した。ついで、ジエチルエーテル/飽和食塩水で分液しジエチルエーテル層を回収した。これをロータリーエバポレーターを用いて濃縮し、酢酸エチル/ヘキサン = 1/2 (v/v) を用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィーで $R_f = 0.47$ のフラクションを分取することで精製したところ、2-メルカプトコハク酸ジメチルが 85.1 % で得られた。還元反応後に得られた 2-メルカプトコハク酸ジメチルの ^1H NMR を Fig. 4.6 に示した。

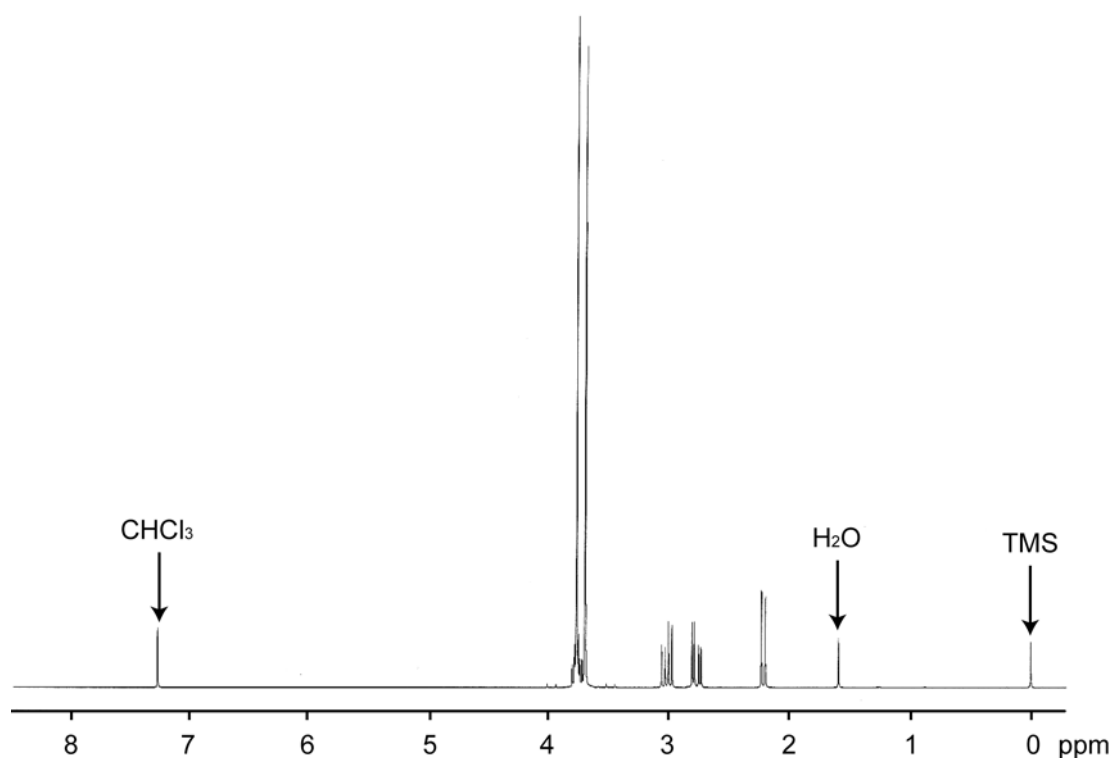


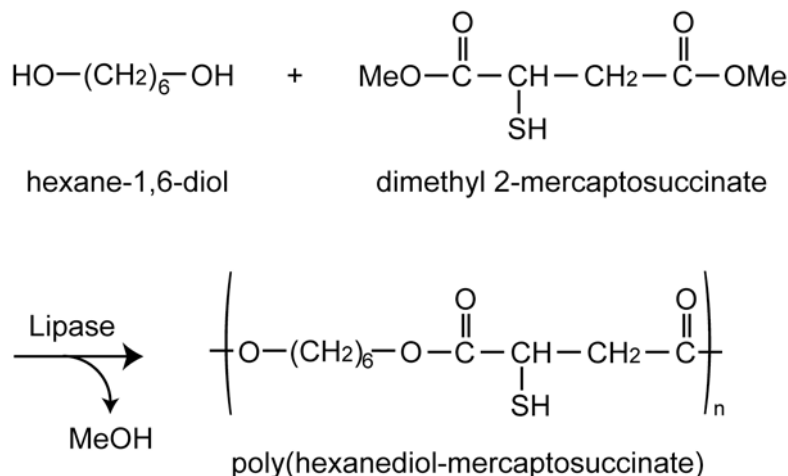
Fig. 4.6 300 MHz ^1H NMR spectrum of reduced product of dimethyl 2,2'-dithiosuccinate in CDCl_3 (dimethyl 2-mercaptosuccinate).

Dimethyl 2-mercaptosuccinate : ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3); δ (ppm) = 2.23 (d, 1H, - SH , $J = 9.6$ Hz), 2.78 (dd, 1H, - $\text{OOC} - \text{CH}(\text{SH}) - \text{CH}_\text{A}\text{H}_\text{B} - \text{COO} -$, $J_1 = 17.0$ Hz, $J_2 = 6.0$ Hz), 3.03 (dd, 1H, - $\text{OOC} - \text{CH}(\text{SH}) - \text{CH}_\text{A}\text{H}_\text{B} - \text{COO} -$, $J_1 = 17.0$ Hz, $J_2 = 8.7$ Hz), 3.71 (s, 3H, $\text{H}_3\text{C} - \text{OOC} - \text{CH}(\text{SH}) - \text{CH}_\text{A}\text{H}_\text{B} - \text{COO} - \text{CH}_3$), 3.78 (s, 3H, $\text{H}_3\text{C} - \text{OOC} - \text{CH}(\text{SH}) - \text{CH}_\text{A}\text{H}_\text{B} - \text{COO} - \text{CH}_3$), 3.82 (m, 1H, $\text{H}_3\text{C} - \text{OOC} - \text{CH}(\text{SH}) - \text{CH}_\text{A}\text{H}_\text{B} - \text{COO} - \text{CH}_3$).

4.4 結果・考察

4.4.1 側鎖チオール含有ポリエステルの合成

本節では、Scheme 4.12 に示す酵素触媒重合による poly(hexanediol - mercaptosuccinate)の合成について検討した。



Scheme 4.12 Synthesis of poly(hexanediol - mercaptosuccinate) by enzymatic polycondensation.

(1) 酵素スクリーニング

Scheme 4.12 に示した重合反応について起源の異なる 4 種のリパーゼを用いて検討を行なった。重合性は、得られたポリマーの収率及び分子量により評価した。結果を Table 4.4 に示す。

Table 4.4 Polymerization using lipases from various origins at 70 °C.

Entry	Lipase	Polymer yield (%) ^a	M_w	M_w/M_n
1	<i>Candida antarctica</i> (lipase CA)	92	14,000	2.3
2	<i>Pseudomonas</i> sp. (PS - C)	12	2,400	2.0
3	<i>Rhizomucor miehei</i> (lipase RM)	—	< 400	—
4	<i>Candida rugosa</i> (CR)	—	< 400	—
5	Thermally deactivated lipase CA	—	< 400	—
6	Blank	—	< 400	—

^a determined after reprecipitation using chloroform (good solvent) - 1-hexanol (poor solvent)

Reaction conditions : A mixture of hexane-1,6-diol (47.3 mg) and dimethyl DL-2-mercaptosuccinate (71.2 mg) was reacted with 30 wt% enzyme (relative value to dimethyl DL-2-mercaptosuccinate) at 70 °C for 2 days with MS 4A placed at the top of the vial.

Table 4.4 より、重合はリパーゼ CA 及び PS - C を用いたときに進行することが認められた。その中でも、リパーゼ CA を用いたときに最も良好に重合の進行が確認された。第2章でも触れたが、リパーゼ CA の活性中心近傍は比較的幅広いことが知られている。そのため、DL - 2 - メルカプトコハク酸ジメチルのように側鎖チオールを有する化合物も基質として認識することができたことが示唆される。また、Entry 5 及び 6 より、熱失活させたリパーゼ CA または酵素を用いないブランク反応では重合の進行が一切みられなかった。以上のことから、本反応がリパーゼ CA の触媒作用によることが確認された。

本反応で酵素を用いることで、ヘキサン - 1,6 - ジオールのヒドロキシ基と DL - 2 - メルカプトコハク酸ジメチルのメチルエステル間で選択的に縮合反応が進行し側鎖に遊離チオールを有するポリエステルがワンポットで合成されることが期待される。そのため、重合が進行することはもちろんのこと、得られたポリマーが実際に目的とする化学構造を有しているかが重要となる。そこで、Entry 1 の反応により得られたポリマーの化学構造を ¹H NMR により検証した。

(2) ^1H NMR による分子構造の決定

前述の反応で得られたポリマーの ^1H NMR チャートは 4.3.1.2 節、Fig. 4.3 に示した通りである。ここで、Fig. 4.3 をさらに拡大した ^1H NMR チャートを Fig. 4.7 に示す。

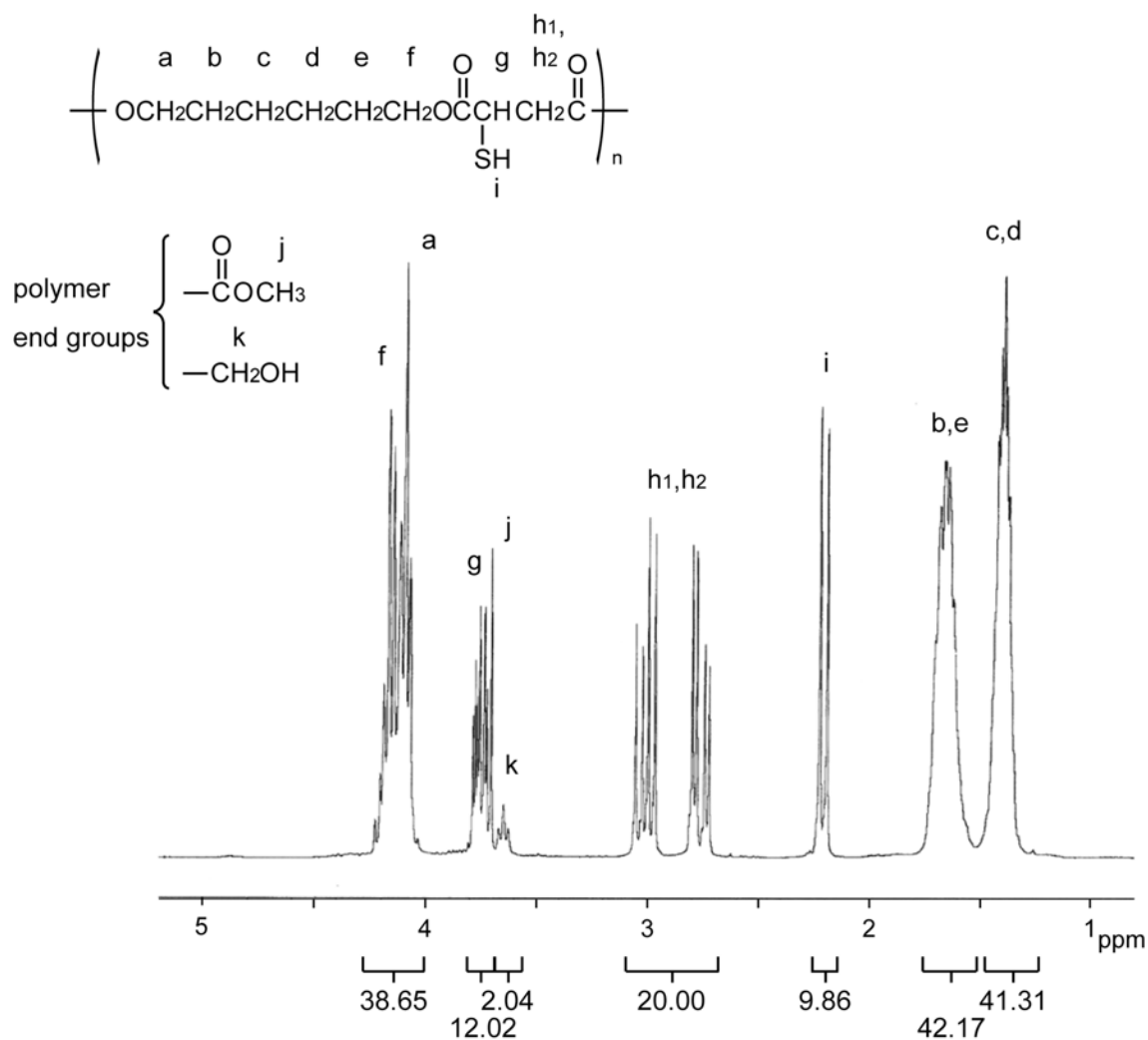


Fig. 4.7 300 MHz ^1H NMR spectrum of poly(hexanediol - mercaptosuccinate) in CDCl_3 .

Reaction conditions : A mixture of hexane-1,6-diol (47.3 mg) and dimethyl DL-2-mercaptosuccinate (71.2 mg) was reacted with 30 wt% lipase CA (relative value to dimethyl DL-2-mercaptosuccinate) at 70 °C for 2 days with MS 4A placed at the top of the vial. ^1H NMR was detected after purification by reprecipitation in chloroform (good solvent) – 1-hexanol (poor solvent).

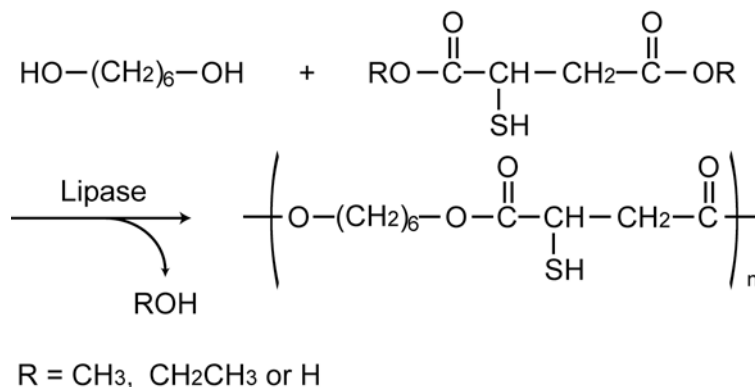
4.00 ~ 4.22 ppm に新たに主鎖中のエステル由来ピーク ($-\text{COO}-\underline{\text{CH}_2}-$) a 及び f が現れたことと、2.70 ~ 3.10 ppm に現れるポリマー主鎖中のピーク ($-\text{OOC}-\text{CH}(\text{SH})-\underline{\text{CH}_A\text{H}_B}-\text{COO}-$) h_1, h_2 のピーク強度を 20 としたとき、側鎖チオール由来 ($-\underline{\text{SH}}$) i のピーク強度が 9.86 で現れたことから、ほぼ定量的に側鎖チオールが保持された状態で重合が進行したことが伺える。すなわち、重縮合反応はヘキサン - 1,6 - ジオールのヒドロキシ基と DL - 2 - メルカプトコハク酸ジメチルのメチルエステル間で進行した。また、側鎖チオールが反応した際に 3.2 ppm 付近に確認されるチオエステル由来ピーク ($-\underline{\text{CH}_2}-\text{COS}-$) または、3.8 ppm 付近に確認されるジスルフィド由来ピーク ($-\underline{\text{HCS}}-\underline{\text{SCH}}-$) が確認されなかったことから、官能基選択的に重合が進行したと言える。

これは、第 3 章で考察したように、EAM に対するチオールの求核反応速度がヒドロキシ基に比べ著しく劣ることが要因と考えられる。Yao らは、リパーゼ CA を利用した poly(octanediol - adipate - co - malate) の合成に関して報告している^{137, 138)}。この報告では、L - リンゴ酸の第二級ヒドロキシ基は重合には関与せず、側鎖にヒドロキシ基を有する線状コポリマーが合成された。また、ソルビトールのように複数の第二級ヒドロキシ基を有する化合物をモノマーとして用いた際も、第一級ヒドロキシ基で高選択的に重合が進行することが知られている¹³²⁻¹³⁶⁾。これは、第二級ヒドロキシ基が第一級ヒドロキシ基に比べかさ高いことと求核力が劣ることが要因と考えられる。

今回行った実験の対照実験を、DL - 2 - メルカプトコハク酸ジメチルを L - リンゴ酸ジメチルと置き換えることで行ったところ、前述の事例同様に、側鎖にヒドロキシ基を有する線状ポリエステルが合成された (Fig. 4.4 参照)。側鎖がチオールの場合、このときよりもさらに EAM に対する求核攻撃が起こりにくいため、目的とする分子構造を有するポリマーが合成されたものと考えられる。また、DL - 2 - メルカプトコハク酸ジメチルの第二級チオールはヘキサン - 1,6 - ジオールの第一級ヒドロキシ基に比べさらにかさ高いため、より立体障害の影響を受け易いことも推測される。

MALDI TOF MS により、得られたポリマーの構造解析を行ったが、ポリマーのイオン化が起こりにくかったためか、目的とする繰り返し単位を有するピークは検出されずマトリックス由来のピークのみが検出された。

(3) 基質のカルボキシル末端の影響



Scheme 4.13 Synthesis of poly(hexanediol - mercaptosuccinate) by enzymatic polycondensation from monomers with various end groups.

第2章でも示した通り、酵素触媒を利用した重縮合反応において縮合物の効率的な除去は高分子量体を得る上で非常に重要である。そこで、Scheme 4.13 に示すように、ヘキサン - 1,6 - ジオールと末端構造が異なる3種のジカルボキシルモノマー（ジメチル、ジエチルまたはジカルボン酸）を用い、得られたポリマーの分子量をそれぞれ比較した。結果を Fig. 4.8 に示す。

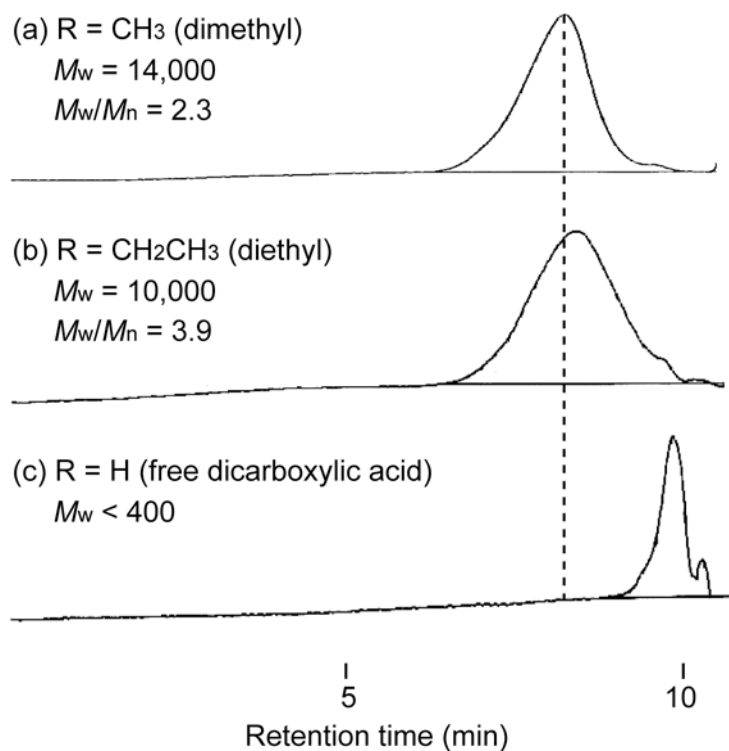


Fig. 4.8 SEC profiles of poly(hexanediol - mercaptosuccinate) synthesized from monomers with various end groups.

Reaction conditions: A mixture of dimethyl DL-2-mercaptop succinate (a), diethyl DL-2-mercaptop succinate (b) or DL-2-mercaptop succinic acid (c) with hexane-1,6-diol was polymerized by lipase CA (30 wt%) in bulk at 70 °C with MS 4A placed at the top of the vial 2 days.

Fig. 4.8 より、(c)のジカルボン酸を用いた重合ではほとんど反応の進行がみられなかった。これは、DL - 2 - メルカプトコハク酸が実験を行ったバルク中 70 °Cという条件で融解していなかったためと考えられる。そのため、分子が酵素の触媒部位に到達することができず反応が進行しなかったと考えられる。

一方、DL - 2 - メルカプトコハク酸ジメチルまたは DL - 2 - メルカプトコハク酸ジエチルを用いた際はいずれも重合の進行がみられた。なかでも、DL - 2 - メルカプトコハク酸ジメチルを用いた方が DL - 2 - メルカプトコハク酸ジエチルに比べより高い分子量を有するポリマーを生成した。これは、メチルエステルを用いたときにより効率的に縮合物が除去されたためと考えられる。縮合物の除去は系内の気相中に存在するモレキュラーシーブス 4A により行っている。反応温度である 70 °Cはメタノールの沸点である 64.7 °Cよりは高いが、エタノールの沸点である 78.3 °Cよりは低い。このため、メタノールが縮合物として発生するメチルエステルを用いたときにより効率的にモレキュラーシーブス 4A に縮合物がトラップされたものと考えられる。結果的に、逆反応が抑制されることにより高分子量体を得られたのではないだろうか。

縮合物の除去効率は反応温度をより高くすることで上昇すると考えられ、カルボキシル末端による影響もより限定的になるものと考えられる。そこで、次に反応温度が重合性に及ぼす影響について評価した。

(4) 反応温度

本重縮合反応は、反応温度により大きく影響を受けた。反応温度を 70 °C、90 °C 及び 110 °C でヘキサン - 1,6 - ジオールと DL - 2 - メルカプトコハク酸ジメチルをリパーゼ CA により重合させた際の SEC チャートとそれぞれの温度での反応後の回収率を Fig. 4.9 に示す。いずれの SEC チャートもクロロホルム可溶分が反映されている。

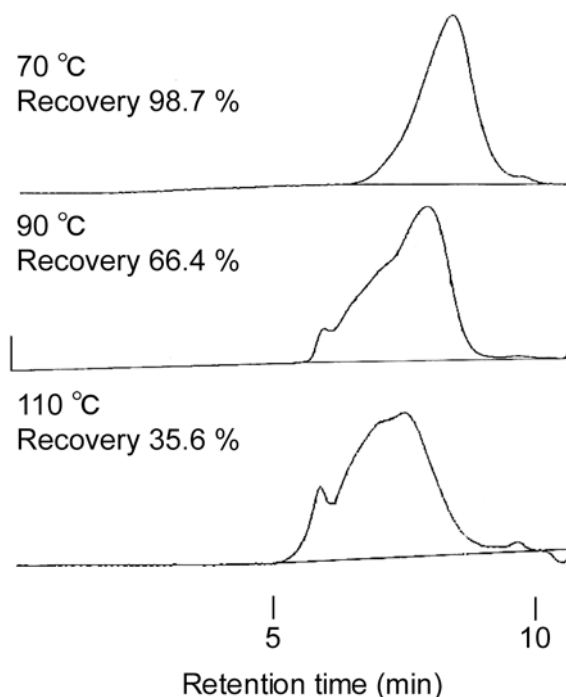


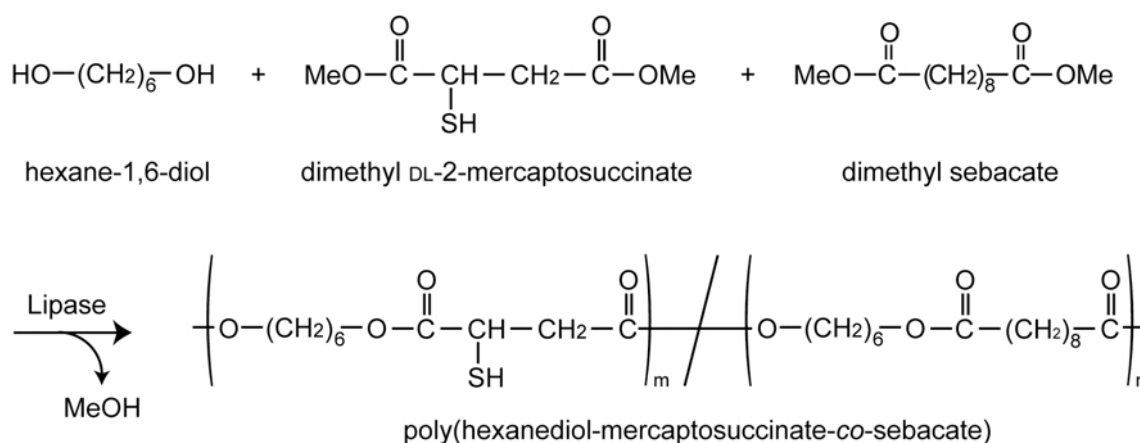
Fig. 4.9 SEC profiles of polymerization products at various reaction temperatures.

Reaction conditions: A mixture of hexane-1,6-diol and dimethyl DL-2-mercaptosuccinate was polymerized by lipase CA (30 wt%) in bulk with MS 4A placed at the top of the vial for 2 days.

70 °Cでは、ほぼ定量的にポリマーが回収され、SEC チャートも単峰性を示した。一方、反応温度の上昇に伴い、徐々に SEC スペクトルの対称性が高分子側に崩れる傾向が確認された。また、回収率も反応温度の上昇に伴い大幅に低下した。70 °Cよりも高温の反応では、反応終了時にクロロホルムを加えた際にクロロホルム不溶成分が存在した。これが、酵素をろ別した際にろ紙を通過しなかったため、回収率の低下につながった。これは、90 °C、110 °Cでは一部側鎖チオールが反応しジスルフィド結合あるいはチオエステル結合が形成したためと考えられる。その結果、架橋あるいは分岐反応が進行し、SEC スペクトルの対称性の崩れ及び回収率が低下したのではないだろうか。

2.4.1節及び2.4.2節で示したリパーゼCAを用いた重縮合によるポリチオエステルの合成反応の至適温度はいずれも 110 ~ 120 °C であった^{142,143)}。第一級チオールが求核種として作用するこれらの反応を 70 °C で行った際には低分子量オリゴマーがわずかに得られるのみであった。すなわち 70 °C では、大部分の第一級チオールの反応は確認されなかった。第二級チオールは第一級チオールに比べ求核性、立体障害の観点から反応性が劣る。比較的低温で重合反応を進行させることでヘキサン - 1,6 - ジオールのヒドロキシ基と DL - 2 - メルカプトコハク酸ジメチルのメチルエステル間で選択的な重合が進行したものと考えられる。また、本反応では副反応を抑制するため反応温度を高くすることが困難であることから、用いる基質はジメチルエステルが望ましい。

(5) 共重合によるポリマー中の側鎖チオールの割合の制御



Scheme 4.14 Synthesis of copolymer with free pendant thiol.

任意にポリマー中の側鎖チオールの割合を制御することを目的に、Scheme 4.14 に示す共重合反応を行った。ヘキサン - 1,6 - ジオールを 0.40 mmol で固定し DL - 2 - メルカプトコハク酸ジメチルとセバシン酸ジメチルの総モル数は 0.40 mmol のままモル比を 1:9、3:7、1:1、7:3、9:1 の 5 つの共重合反応を行った。さらに、それぞれのホモポリマーも合成した。一例として、DL - 2 - メルカプトコハク酸ジメチルとセバシン酸ジメチルを 1:9 で仕込んだ際のポリマーの ¹H NMR を Fig. 4.10 に示す。また、得られたコポリマーの組成、分子量及び分散を Table 4.5 に示す。さらに、DL - 2 - メルカプトコハク酸ジメチルの仕込み比に対するポリマー中に組み込まれた割合を Fig. 4.11 に示す。

再沈殿後、ポリマー中に組み込まれた 2 - メルカプトコハク酸ユニットの割合は ¹H NMR 中の 2 - メルカプトコハク酸ユニットのメチレンプロトン(A) [(300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 2.76 (dd, 1H, -OOCCH(SH)CH_AH_BCOO-, *J*₁ = 17.0 Hz, *J*₂ = 6.0 Hz), 3.01

(dd, 1H, $-OOC-CH(SH)-CH_AH_B-COO^-$, $J_1 = 17.0$ Hz, $J_2 = 9.6$ Hz)]及びセバシン酸ユニットのメチレンプロトン(B)[(300 MHz, $CDCl_3$) $\delta = 2.29$ (t, 4H, $-OOC-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-COO-$, $J = 7.5$ Hz)]のピーク強度から以下の式より算出した。

コポリマー中の 2-メルカプトコハク酸ユニットの割合 (mol %)

$$= [(A) / 2] \times 100 / [(A) / 2 + (B) / 4]$$

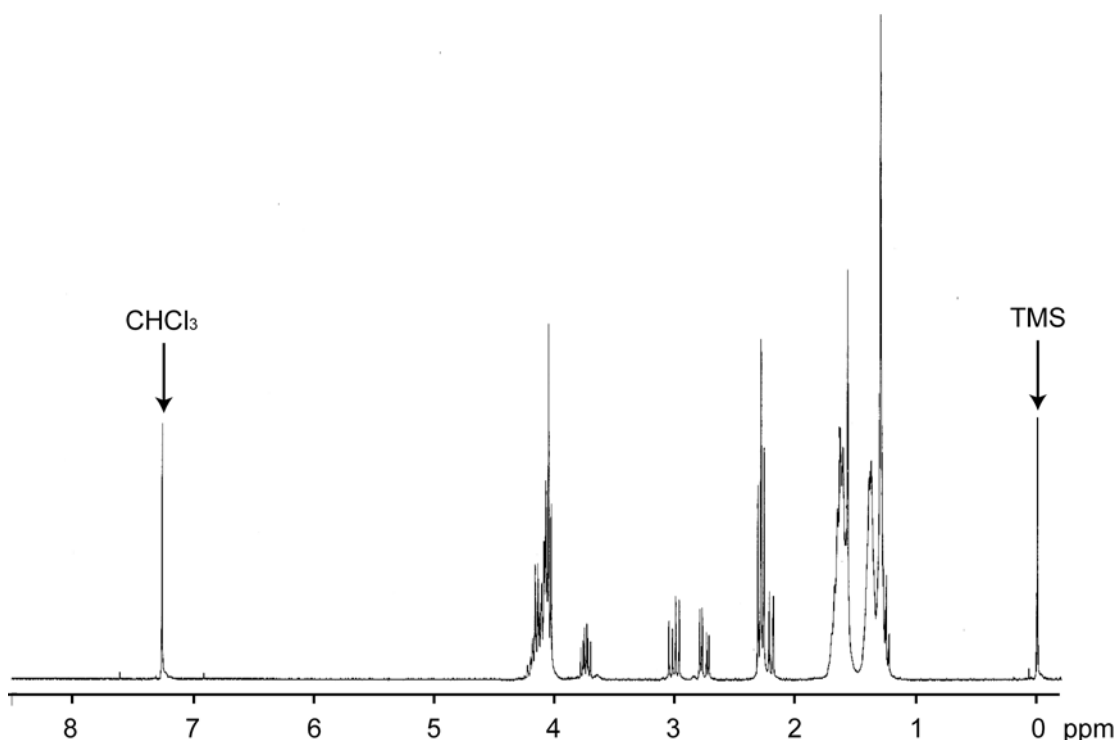


Fig. 4.10 1H NMR of poly(hexanediol - 50 mol% mercaptosuccinate - *co* - 50 mol% sebacate).

Poly(hexanediol - 50 mol% mercaptosuccinate - *co* - 50 mol% sebacate) : 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$); δ (ppm) = 1.30 (m, 8H, $-OOC-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-$), 1.38 (m, 4H, $-O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-O-$), 1.52 ~ 1.78 (m, 4H, $-O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-O-$), 2.20 (d, 1H, $-SH$, $J = 9.6$ Hz), 2.29 (t, 4H, $-OOC-CH_2-CH_2-CH_2-$, $J = 7.5$ Hz), 2.76 (dd, 1H, $-OOC-CH(SH)-CH_AH_B-COO-$, $J_1 = 17.0$ Hz, $J_2 = 6.0$ Hz), 3.01 (dd, 1H, $-OOC-CH(SH)-CH_AH_B-COO-$, $J_1 = 17.0$ Hz, $J_2 = 9.6$ Hz), 3.72 ~ 3.80 (m, 1H, $-OOC-CH(SH)-CH_AH_B-COO-$), 4.06 (t, 4H, $-O-CH_2-CH_2-CH_2-$, $J = 6.6$ Hz), 4.09 (t, 2H, $-CH_2-OOC-CH(SH)-CH_AH_B-COO-CH_2-$, $J = 6.6$ Hz), 4.10 ~ 4.20 (m, 2H, $-CH_2-OOC-CH(SH)-CH_AH_B-COO-CH_2-$).

Table 4.5 Copolymerization using lipase CA.

Entry	Initial molar ratio of mercaptosuccinate (mol %)	Molar ratio of mercaptosuccinate in copolymer (mol%)	M_w	M_w/M_n
1	0	0	25,000	2.2
2	10	12.3	19,000	2.0
3	30	32.0	20,000	1.9
4	50	51.9	28,000	2.6
5	70	74.2	16,000	2.6
6	90	91.1	19,000	2.5
7	100	100	14,000	2.3

Reaction conditions: A mixture of hexane-1,6-diol, dimethyl DL-2-mercaptosuccinate and dimethyl sebacate was reacted with lipase CA (30 wt%) in bulk with MS 4A placed at the top of the vial for 2 days.

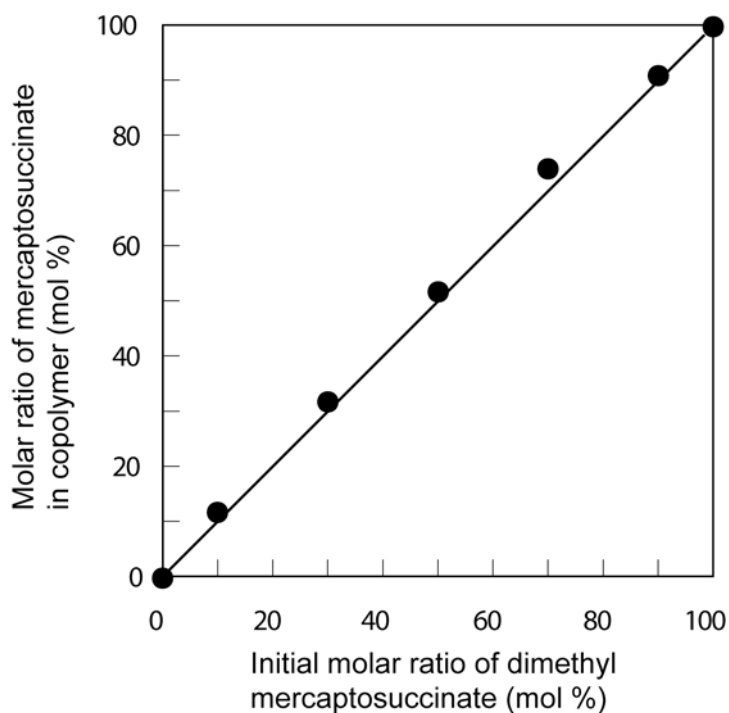


Fig. 4.11 Composition of the copolymer vs feed monomer ratio.

Reaction conditions: A mixture of hexane-1,6-diol, dimethyl DL-2-mercaptosuccinate and dimethyl sebacate was reacted with lipase CA (30 wt%) in bulk at 70 °C with MS 4A placed at the top of the vial for 2 days.

初期の仕込み比に応じ、ポリマー中の 2 -メルカプトコハク酸ユニットの割合を任意に変化させ、重量平均分子量 2 万程度のコポリマーが得られた。得られたコポリマーの T_m ピークを示す DSC チャートを Fig. 4.12 に示す。

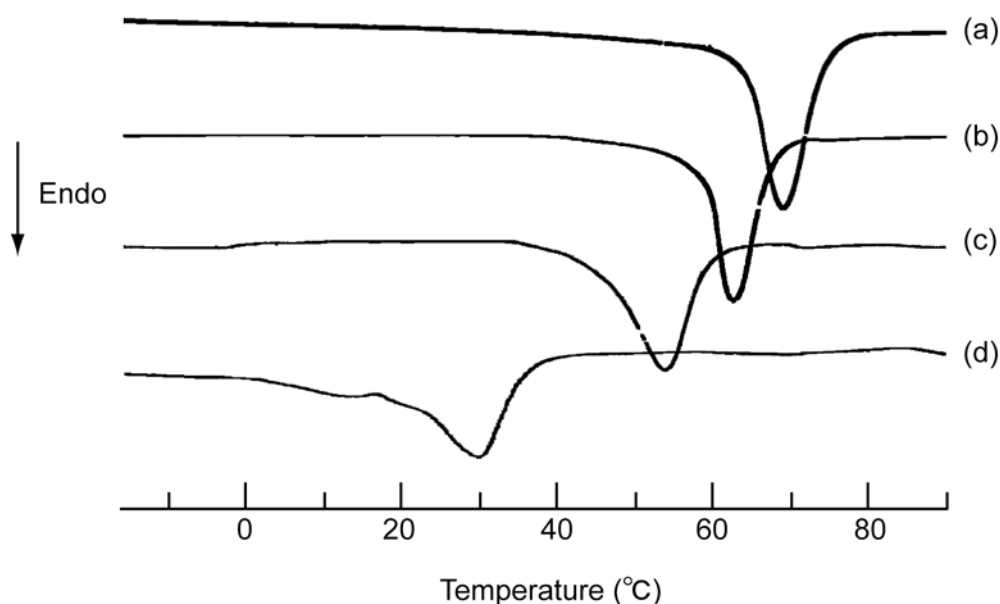


Fig. 4.12 DSC melting endotherms of copolymers: poly(hexanediol - sebacate) (a), poly(hexanediol - 10 mol% mercaptosuccinate - *co* - 90 mol% sebacate) (b), poly(hexanediol - 30 mol% mercaptosuccinate - *co* - 70 mol% sebacate) (c) and poly(hexanediol - 50 mol% mercaptosuccinate - *co* - 50 mol% sebacate) (d). T_m was not observed for copolymers with greater than 70 mol% mercaptosuccinate.

ポリマー中のメルカプトコハク酸ユニットの増加に伴い、 T_m の低下が認められた。また、メルカプトコハク酸ユニットが 70 mol% 以上のコポリマーに関しては DSC にて T_m を示すピークが検出されなかった。

4.4.2 側鎖の立体化学による影響

(1) 光学活性体の重合

多くの酵素反応が高い立体特異性や官能基選択性を示すことが知られている。例えば、リパーゼ CA による側鎖にメチル基を有するラクトン環の開環重合性は側鎖の立体化学に大きく影響を受けることが報告されている¹⁴⁴⁻¹⁴⁶⁾。これは、古くから表されてきたとおり、基質と酵素が「鍵と鍵穴」の関係性を有するためと言えよう¹⁴⁶⁾。本章でこれまで検討してきた重合反応は、全て DL 体を用いた。そこで、側鎖チオールは立体化学が酵素重合性に及ぼす影響を評価するため、L-2-メルカプトコハク酸ジメチル及び D-2-メルカプトコハク酸ジメチルを調製し、それぞれをヘキサセン-1,6-ジオールとリパーゼ CA を用いバルク中 1 日間、重合させた。それぞれの重合後の SEC チャートを Fig. 4.13 に示す。

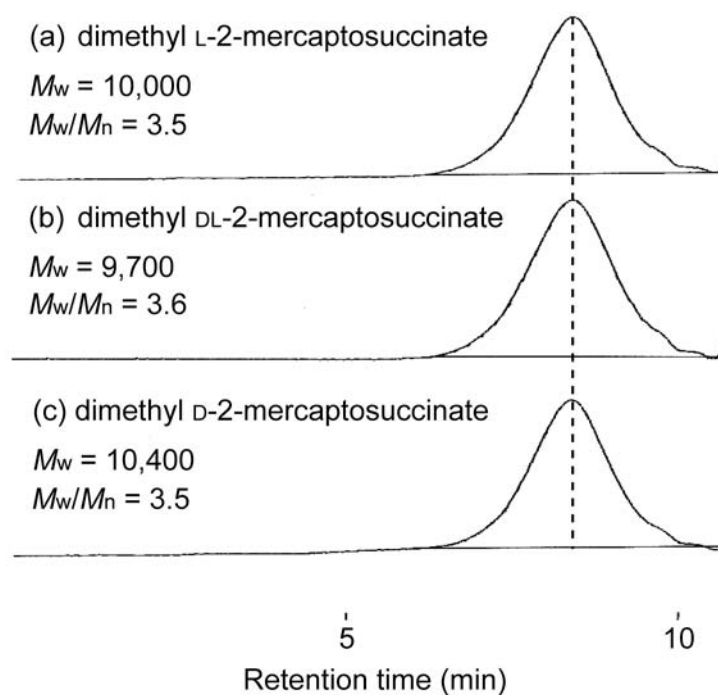
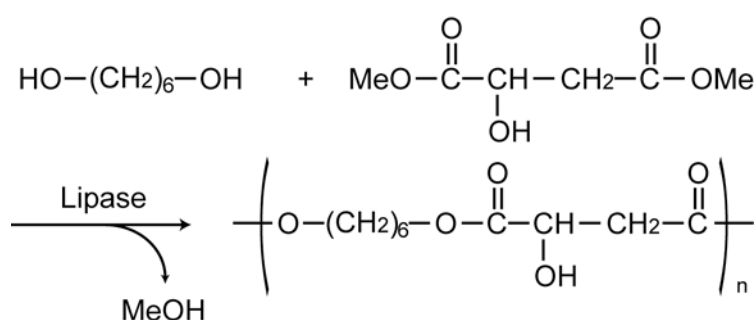


Fig. 4.13 SEC profiles of poly(hexanediol - mercaptoposuccinate) synthesized from hexane-1,6-diol and dimethyl L-2-mercaptoposuccinate (a), dimethyl DL-2-mercaptoposuccinate (b) or dimethyl D-2-mercaptoposuccinate (c).

Reaction conditions; A mixture of hexane-1,6-diol and dimethyl 2-mercaptoposuccinate was reacted with lipase CA (30 wt%) in bulk at 70 °C with MS 4A placed at the top of the vial for 1 day.

リパーゼ CA を用いた重縮合反応は、側鎖チオール立体化学に関係なく進行した。L 体、DL 体、D 体いずれからでもほぼ同程度の分子量を有する poly(hexanediol - mercaptosuccinate) が得られた。従って本反応において、側鎖チオール立体化学の影響は重合にほとんど影響を与えないことが示唆される。

次に、Scheme 4.15 に示す通り、同様の実験を相当する側鎖ヒドロキシモノマーであるリンゴ酸ジメチルを用いて行った。すなわち、側鎖ヒドロキシ基の立体化学が酵素重合性に及ぼす影響を評価するため、L - リンゴ酸ジメチル、DL - リンゴ酸ジメチルまたは D - リンゴ酸ジメチルをヘキサン - 1,6 - ジオールとリパーゼ CA を用いバルク中 1 日間、重合させた。それぞれの重合後の SEC チャートを Fig. 4.14 に示す。



Scheme 4.15 Synthesis of poly(hexanediol - malate) by enzymatic polycondensation.

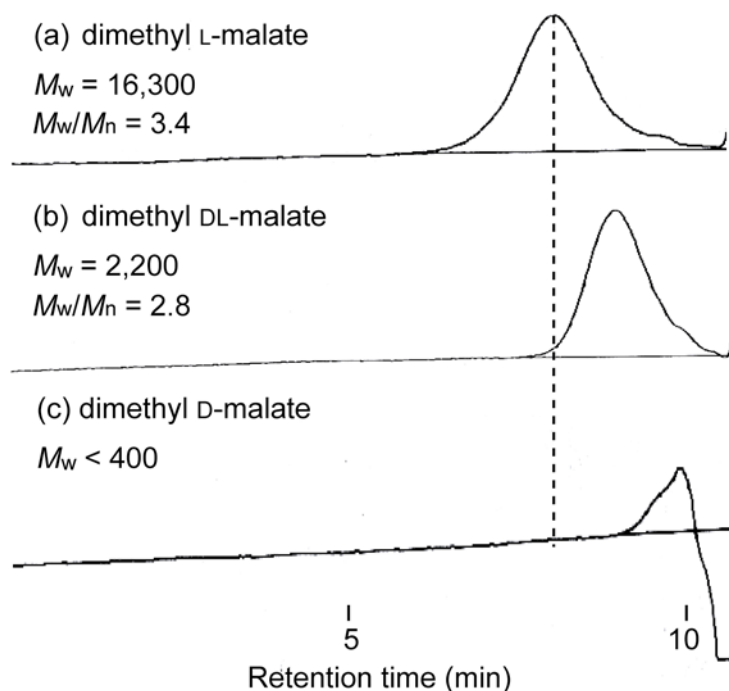


Fig. 4.14 SEC profiles of poly(hexanediol - malate) synthesized from hexane-1,6-diol and dimethyl L-malate (a), dimethyl DL-malate (b) or dimethyl D-malate (c).

Reaction conditions: A mixture of hexane-1,6-diol and dimethyl malate was reacted with lipase CA (30 wt%) in bulk at 70 °C with MS 4A placed at the top of the vial for 1 day.

側鎖チオールの場合とは異なり、リンゴ酸ジメチルの側鎖ヒドロキシ基の立体化学により、得られる poly(hexanediol - malate)の分子量は大きく変化した。1日反応後、L - リンゴ酸ジメチルとヘキサセン - 1,6 - ジオールからは $M_w = 16,300$ のポリマーが得られたが、DL - リンゴ酸ジメチルからは $M_w = 2,200$ の比較的低分子量体が、さらに D - リンゴ酸ジメチルからはほとんど重合が進行しなかった。以上の結果から、D体はL体に比べ、酵素重合性に劣ることが示唆される。次に、この要因についてさらに検討する。

(2) 光学活性体のエステル化

リパーゼ CA によるヘキサセン - 1,6 - ジオールとリンゴ酸ジメチルの重合はリンゴ酸ジメチルの側鎖アルコールの立体化学に大きく影響を受けた。一方、2 - メルカプトコハク酸ジメチルを用いた同様の重合は立体化学の影響が確認されなかった。この違いを精査するため、以下に示すモデル反応による L - 及び D - 体の酵素認識性を評価した。2 - メルカプトコハク酸ジメチルまたはリンゴ酸ジメチルの光学活性体と等モルの 1 - デカノールとリパーゼ CA とバルク中、70 °Cで1日間反応させ、デシル化を行った。これにより、同一分子内の2つのカルボキシレートの酵素認識性を評価することが可能となる。

初めに、立体化学が重合に影響を及ぼさなかった 2 - メルカプトコハク酸ジメチルについてデシル化反応を行った。Fig. 4.15 に反応物の ^1H NMR を示す。

2 - メルカプトコハク酸ジメチルの立体化学によらず、いずれの光学活性体もデシル化が進行したことを 4.2 ppm 付近に現れた新たなエステル由来ピークより確認した。また、立体化学によらず同一分子内の2つのカルボキシレート間でデシル化はほぼ等量的に進行した。これは、 $\delta = 3.71$ (s, 3H, -OOC-CH(SH)-CH_AH_B-COO-CH₃)の β 位カルボキシル隣接メチルと $\delta = 3.78$ (s, 3H, H₃C-OOC-CH(SH)-CH_AH_B-COO-)の α 位カルボキシル隣接メチルのピーク強度を比較することで明らかとなる。デシル化反応後、L - 、D - 2 - メルカプトコハク酸ジメチルともに、これらのピークのピーク強度比はほぼ同程度であった (L - ; $\alpha / \beta = 1.02 : 1$, D - ; $\alpha / \beta = 1.04 : 1$)。これは、それぞれのメチルエステルがほぼ同程度消費され、デシルエステルへと変化したことを意味する。L - 、D - 体によらず、同一分子内の2つのエステルの酵素認識性がほぼ同程度であるため、いずれを用いた際も重合が進行したことが示唆される。

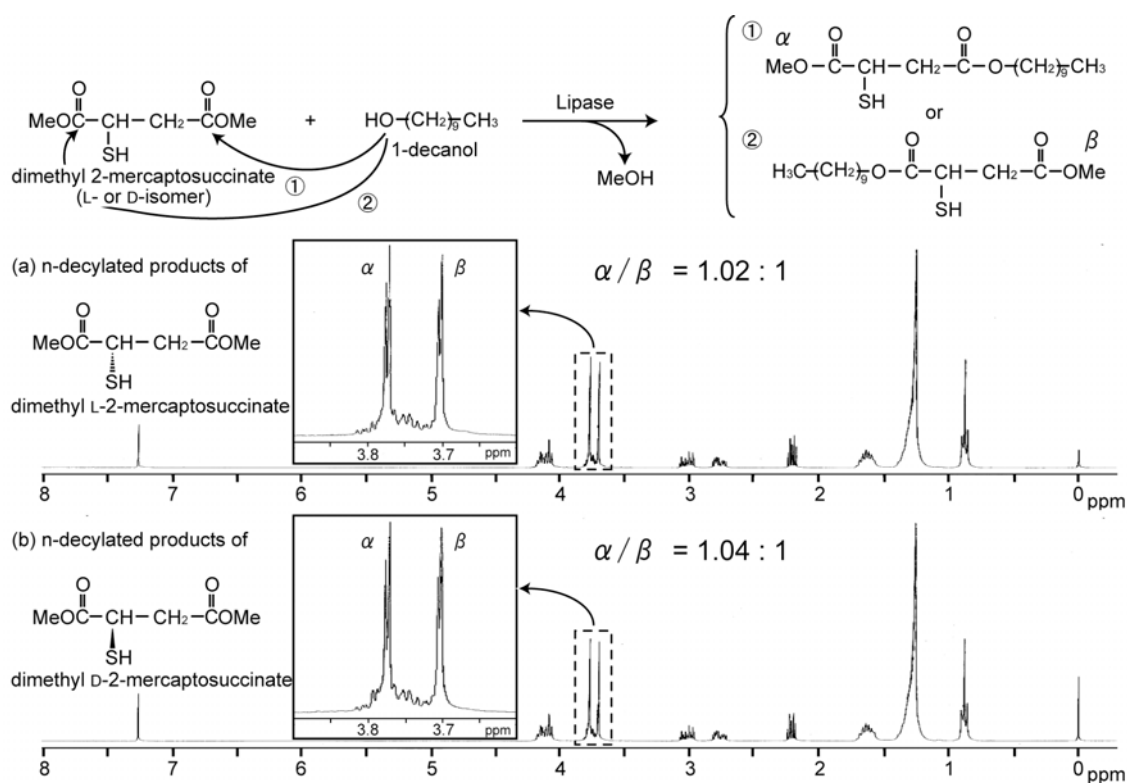


Fig. 4.15 ¹H NMR spectrum of the reaction mixture after the n-decylation of dimethyl L- or D-2-mercaptosuccinate.

Peaks derived from methyl protons are shown enlarged. Reaction conditions: A mixture of the dimethyl L- or D-2-mercaptosuccinate (0.40 mmol) and 1-decanol (0.40 mmol) was reacted with lipase CA (30 wt%) in bulk at 70 °C with molecular sieves 4A placed at the top of the vial for 1 day.

次に、立体化学が重合に大きく影響を及ぼしたリンゴ酸ジメチルについてデシル化反応を行った。Fig. 4.16 に反応物の ¹H NMR を示す。

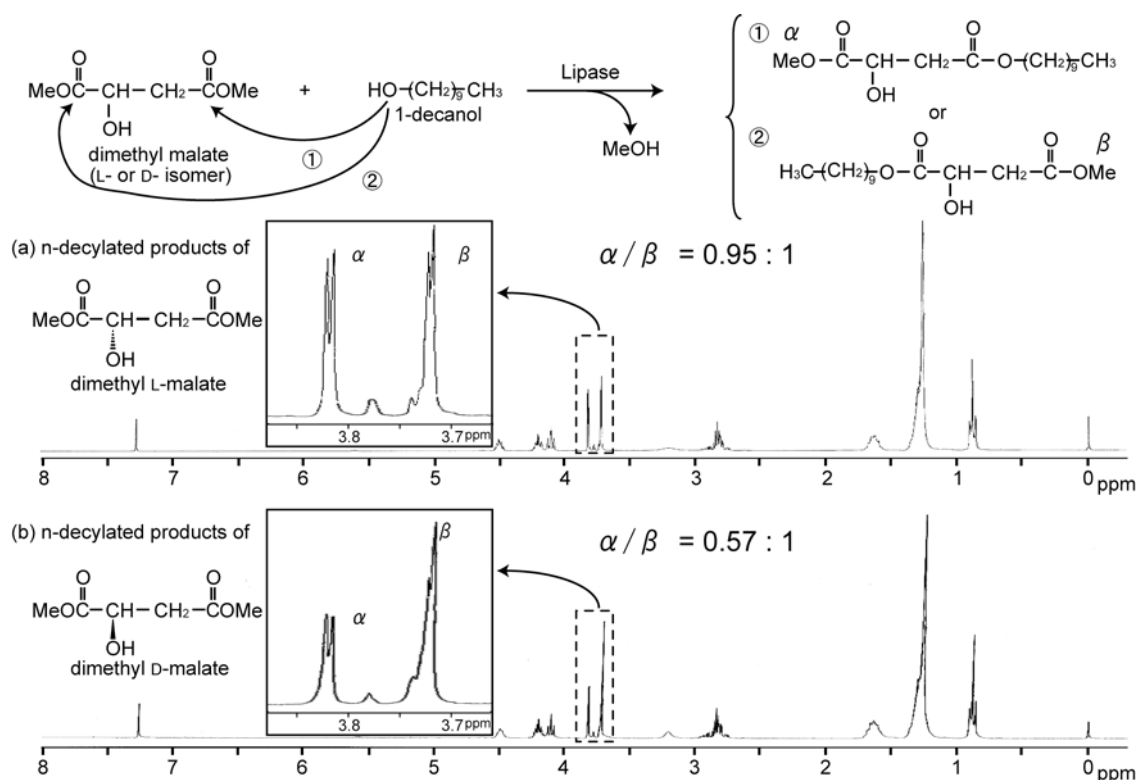


Figure 4.16 ^1H NMR spectrum of the reaction mixture after the n-decylation of dimethyl L- or D-malate.

Peaks derived from methyl protons are shown enlarged. Reaction conditions: A mixture of the dimethyl L- or D-malate (0.40 mmol) and 1-decanol (0.40 mmol) was reacted with lipase CA (30 wt%) in bulk at 70 °C with molecular sieves 4A placed at the top of the vial for 1 day.

4.2 ppm 付近に現れた新たなエステル由来ピークより、リンゴ酸ジメチルの立体化学によらず、いずれの光学活性体もデシル化は進行した。しかし、L- または D- リンゴ酸ジメチルにより同一分子内の 2 つのカルボキシレート間でデシル化が進行した割合は大きく異なった。前述の 2-メルカプトコハク酸ジメチル同様に、 $\delta = 3.72$ (s, 3H, $-\text{OOCCH}(\text{OH})\text{CH}_\text{A}\text{H}_\text{B}\text{COOCH}_3$) の β 位カルボキシル隣接メチルと $\delta = 3.82$ (s, 3H, $\text{H}_3\text{CCOOCCH}(\text{OH})\text{CH}_\text{A}\text{H}_\text{B}\text{COO}-$) の α 位カルボキシル隣接メチルのピーク強度を比較した。デシル化反応後、L- リンゴ酸ジメチルは、これらのピークのピーク強度比がほぼ同程度であった (L- ; $\alpha/\beta = 0.95 : 1$)。一方、D- リンゴ酸ジメチルは、これらのピークのピーク強度比が大きく異なった (D- ; $\alpha/\beta = 0.57 : 1$)。すなわち、D- リンゴ酸ジメチルは分子内の 2 つのカルボキシレートの酵素認識性が異なり α 位側のメチルエステルがより消費された。従って、D- リンゴ酸ジメチルを用いた重合反応はエステル交換反応が効率的に進行しないために、分子量の増大が確認されなかったものと思われる。リ

パーゼ CA を利用したリンゴ酸の選択的モノエステル化に関する報告が存在するが、ここでもやはり α 位のカルボニルが高選択的にエステル化されている¹⁴⁷⁾。

(3) MOE(Molecular Operating Environment)を利用した基質認識性の評価

MOEはChemical Computing Group Inc.が開発した分子設計支援ソフトウェアであり、タンパク質と選択的に相互作用を示す分子を分子設計する用途で広く用いられている¹⁴⁸⁾。多種のタンパク質と基質の相互作用を評価することができるため、新規医薬品を開発する上で、非常に有力なシミュレーションソフトウェアであることが報告されている¹⁴⁹⁻¹⁵¹⁾。

MOEにはリパーゼ CA のタンパク構造に関するデータも含まれているため、前述の2-メルカプトコハク酸ジメチルとリンゴ酸ジメチルの光学活性体で確認された酵素重合性の差異について、それを用いて評価することが可能である。MOEを基質の重合性を説明するために利用する例は、おそらく本例が初であり、非常に面白い試みであると考えられる。

評価を行う前に、分子力場、リパーゼ CA 結合部位の検出及び構造最適化計算に用いた各種パラメータを Fig. 4.17 – 4.19 に示す。

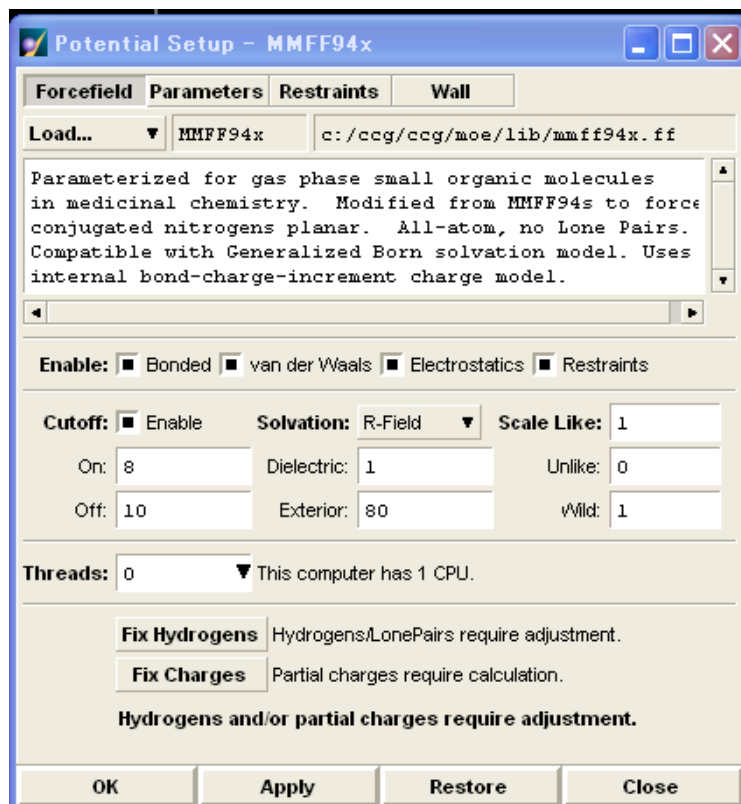


Fig. 4.17 Parameters for potential setup.

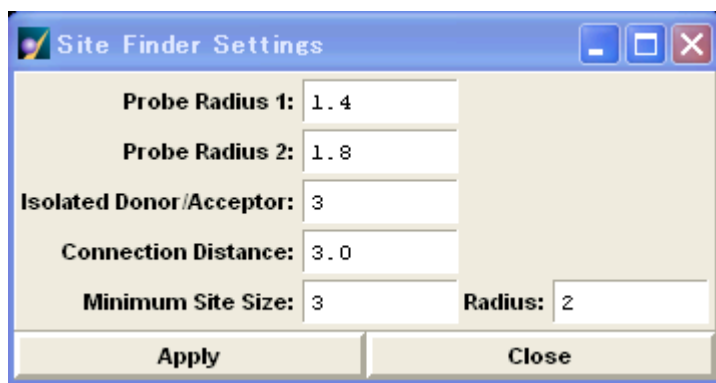


Fig. 4.18 Parameters for site finding of lipase CA.

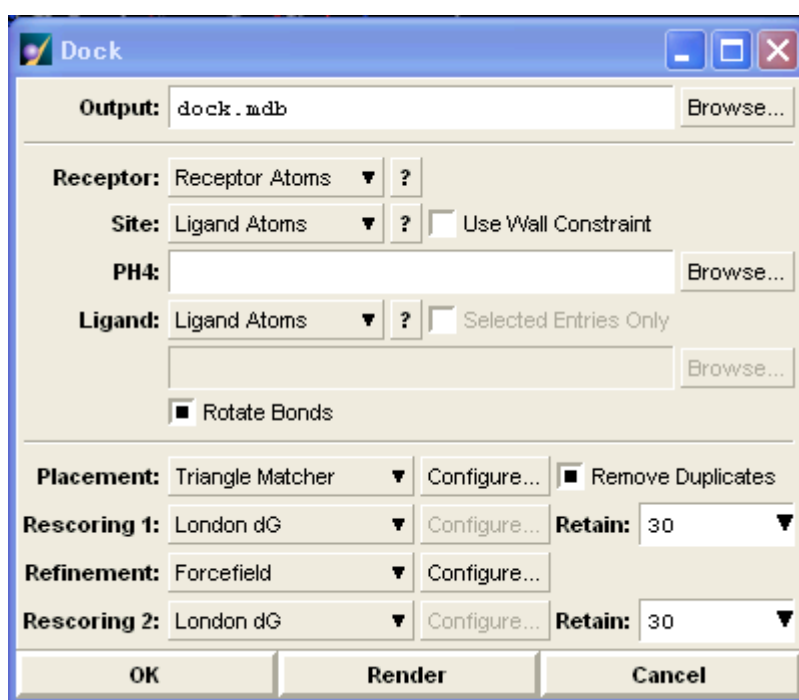


Fig. 4.19 Parameters for site finding of lipase CA.

各種パラメーターは、MOE を用いてタンパク質と化合物のドッキングシミュレーションを行う際に、一般的なものを用いた。それぞれのパラメーターの詳細に関しては、日本における MOE の販売元である株式会社菱化システムより報告されている¹⁵²⁾。

上記のパラメーターを用い、2 -メルカプトコハク酸ジメチル及びリンゴ酸ジメチルの光学活性体について、リパーゼ CA の活性中心である Ser₁₀₅ が分子内の 2 つのカルボキシレートそれぞれ認識した際の相互作用の様子と相互作用エネルギーを示す。

初めに、リパーゼ CA が L-2-メルカプトコハク酸ジメチルの α 位あるいは β 位カルボキシルと最安定構造を形成した際の、ドッキングシミュレーションの結果を Fig. 4.20 - 4.21 に示す。Figure 中、基質は Ball and Stick、酵素は Line で表示した。また、基質と酵素間の水素結合は破線で示している。また、紫の破線の横に示されている数値が大きいほど、PROTEIN DATA BANK データによく存在している理想的水素結合であることを意味している。従って、この値は水素結合の存在する可能性を表している。

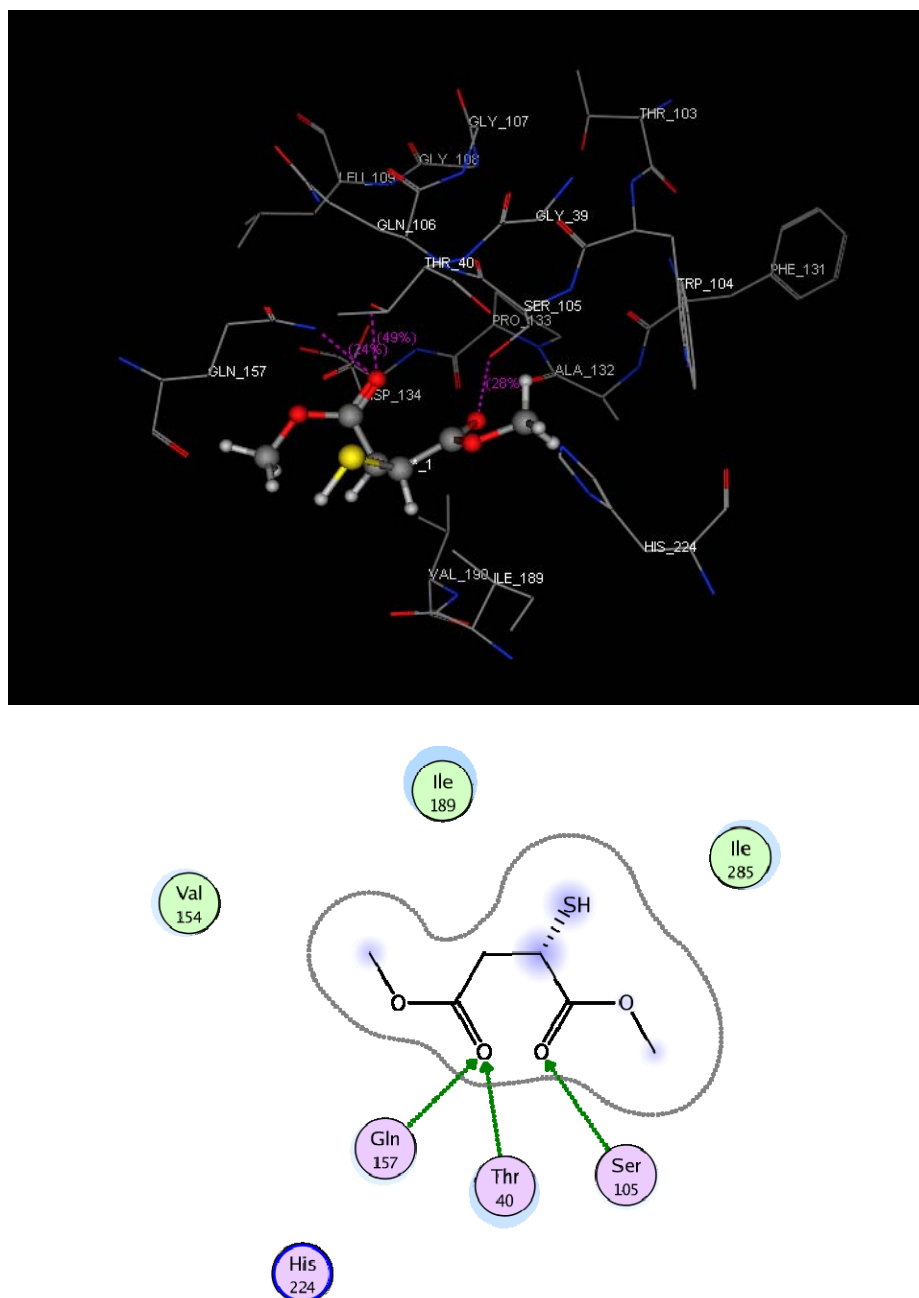


Fig. 4.20 Interaction between active site of lipase CA and α -carboxyl group of dimethyl L-2-mercaptopropionate.

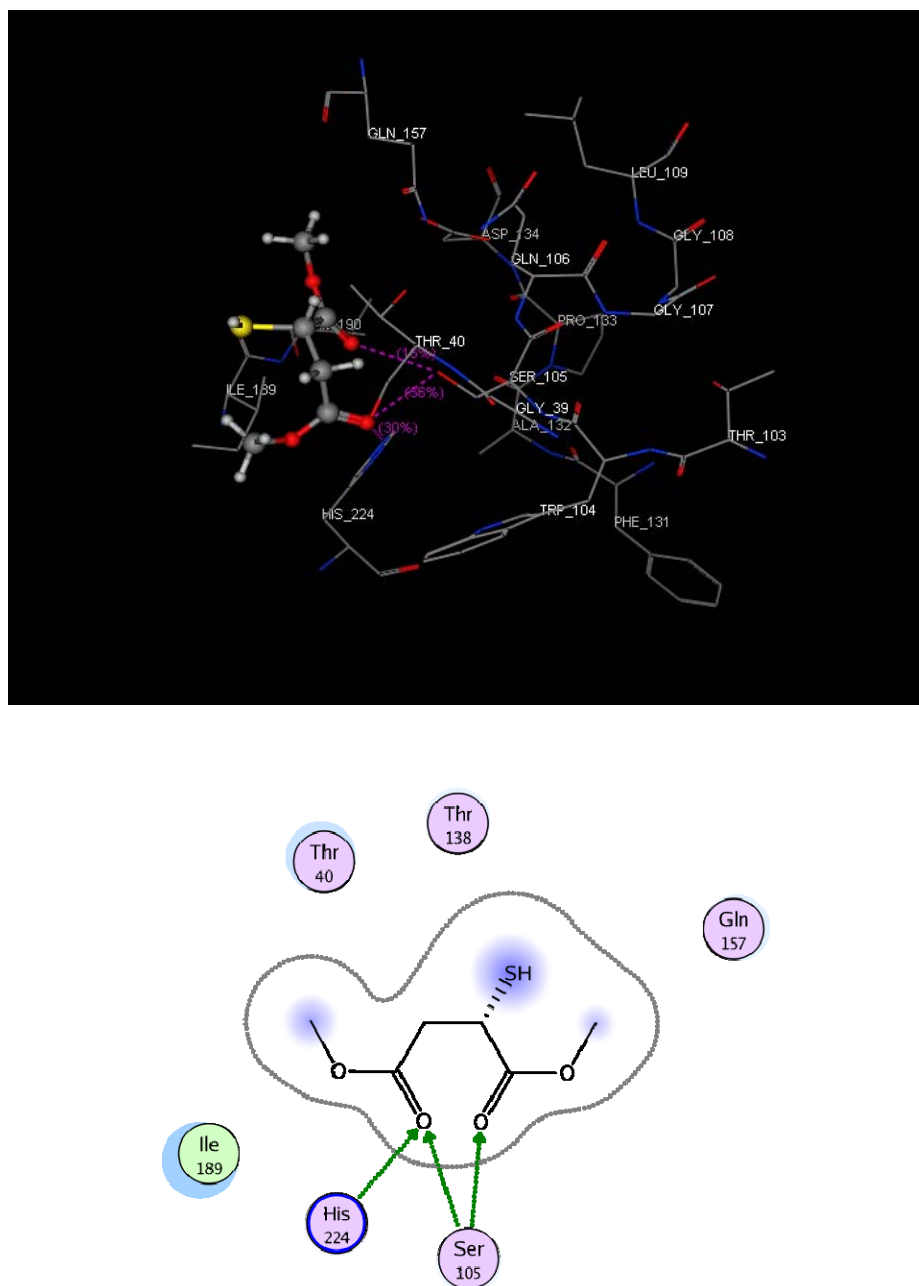


Fig. 4.21 Interaction between active site of lipase CA and β -carboxyl group of dimethyl L-2-mercaptosuccinate.

Fig. 4.21 の Ser₁₀₅ は α 位及び β 位両方のカルボキシル基と相互作用を示しているが、より高い相互作用確率が確認された β 位を認識していると判断した（相互作用の確率： $\alpha/\beta = 16:56$ ）。Fig. 4.20 及び 4.21 のように認識された際、シミュレーションにより算出された相互作用エネルギー値を Table 4.6 に示す。ここで示す、相互作用エネルギー値（MOE 上では S 値で表示されるが、エントロピーと混同を避けるため以後は E 値

で表記する) は、値が小さければ小さいほど基質が酵素によって認識されやすい、すなわち EAM を形成しやすいことを示している。得られたそれぞれの E 値に関する考察は後述する。

Table 4.6 Interaction energy between lipase CA and dimethyl L-2-mercaptosuccinate.

Entry	Interacting carboxyl group	E(Interaction energy) (kcal/mol)
1	α	-8.3650
2	β	-8.1742

次に、リパーゼ CA が D - 2 - メルカプトコハク酸ジメチルの α 位あるいは β 位カルボキシルと最安定構造を形成した際の、ドッキングシミュレーションの結果を Fig. 4.22 - 4.23 に示す。また、Fig. 4.22 及び 4.23 のように認識された際、シミュレーションにより算出された E 値を Table 4.7 に示す。

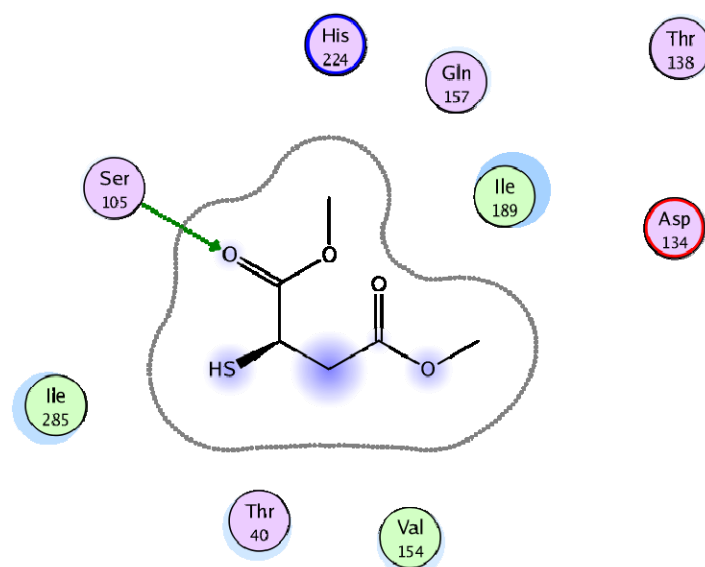
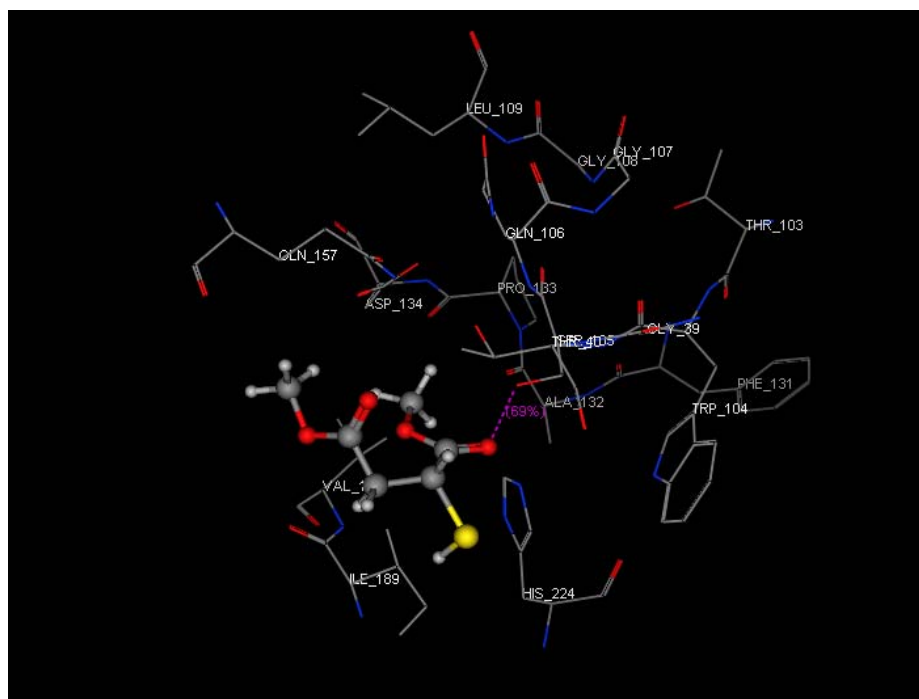


Fig. 4.22 Interaction between active site of lipase CA and α -carboxyl group of dimethyl D-2-mercaptosuccinate.

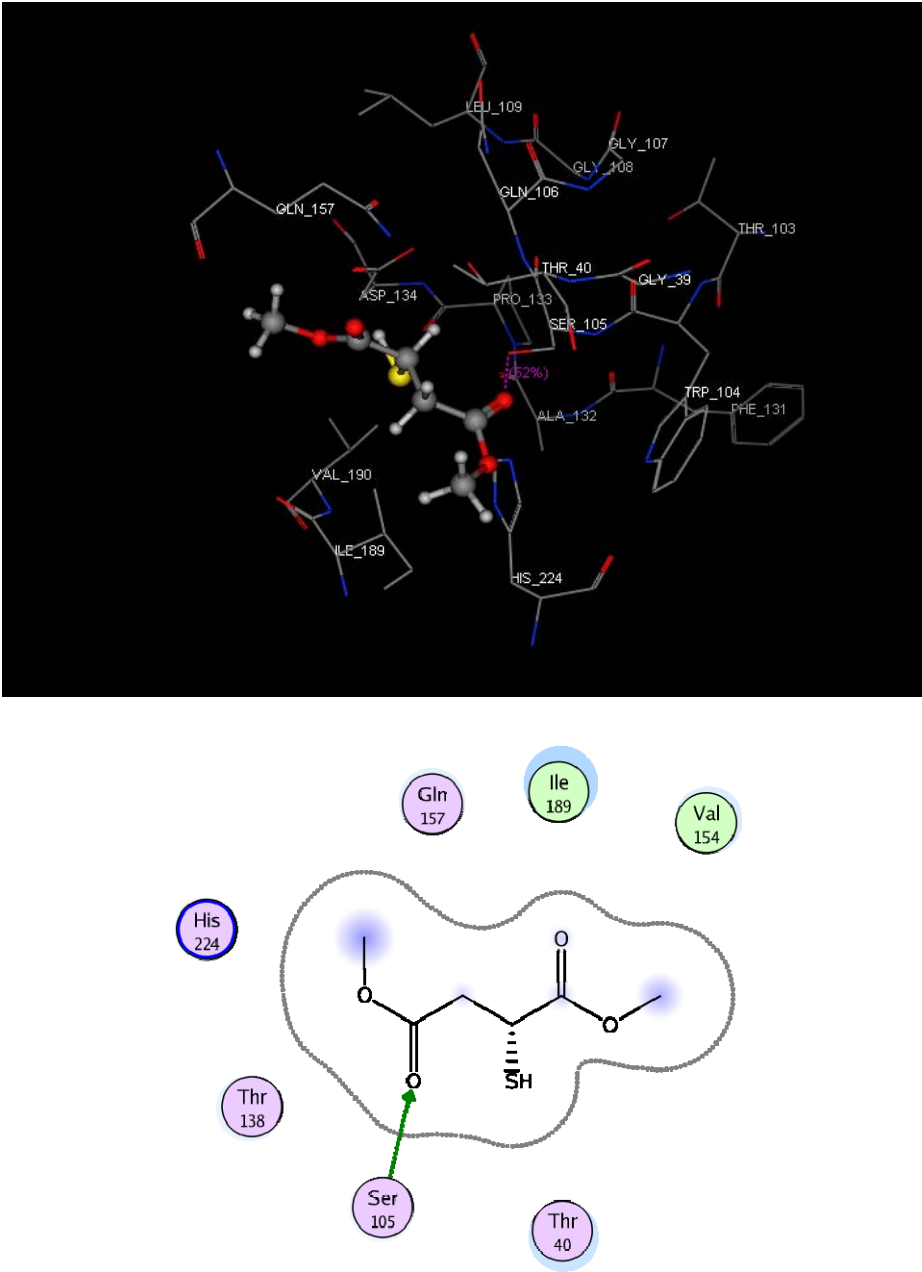


Fig. 4.23 Interaction between active site of lipase CA and β -carboxyl group of dimethyl D-2-mercaptosuccinate.

Table 4.7 Interaction energy between lipase CA and dimethyl D-2-mercaptosuccinate.

Entry	Interacting carboxyl group	E(Interaction energy) (kcal/mol)
1	α	-7.8445
2	β	-7.7800

次に、リパーゼ CA が L - リンゴ酸ジメチルの α 位あるいは β 位カルボキシルと最安定構造を形成した際の、ドッキングシミュレーションの結果を Fig. 4.24 - 4.25 に示す。また、Fig. 4.24 及び 4.25 のように認識された際、シミュレーションにより算出された E 値を Table 4.8 に示す。

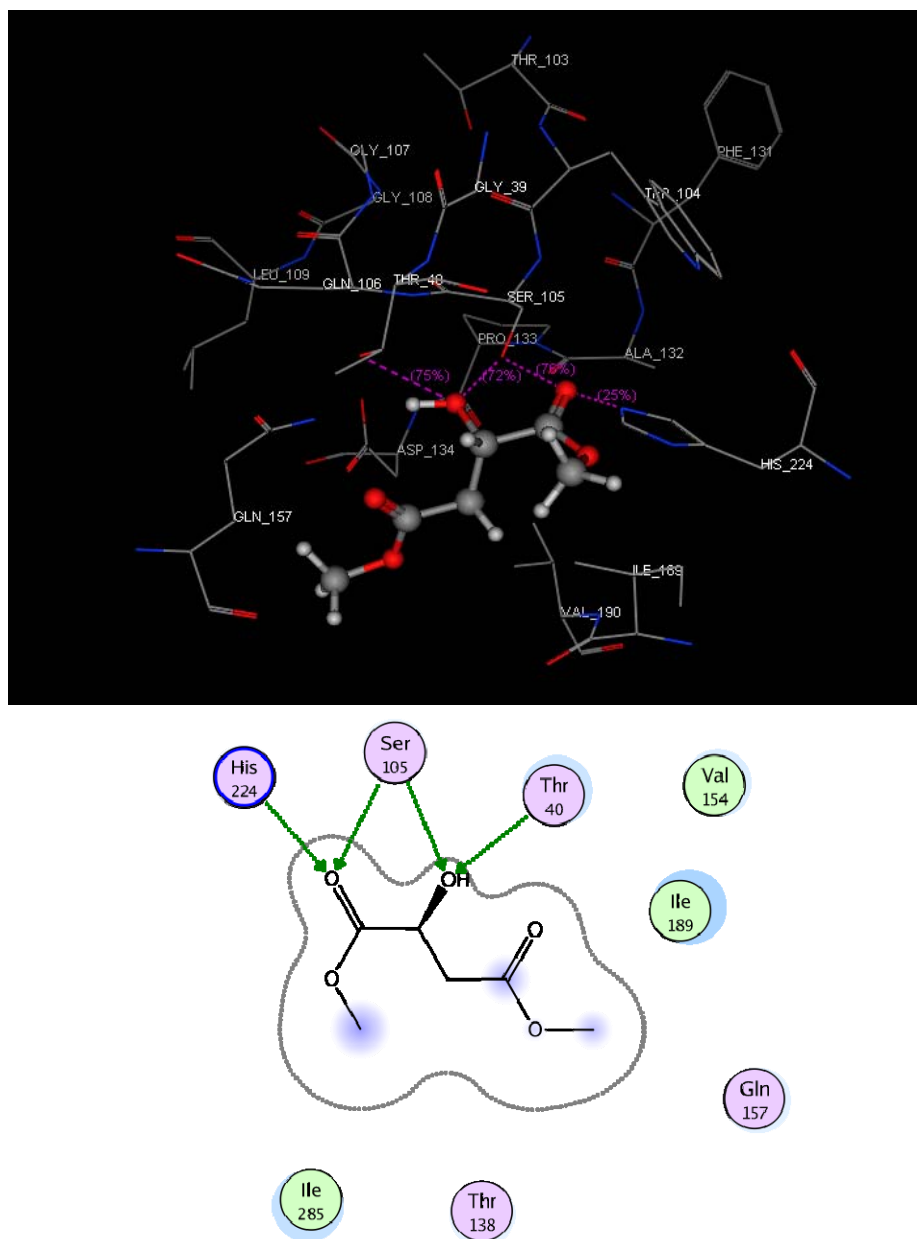


Fig. 4.24 Interaction between active site of lipase CA and α -carboxyl group of dimethyl L-malate.

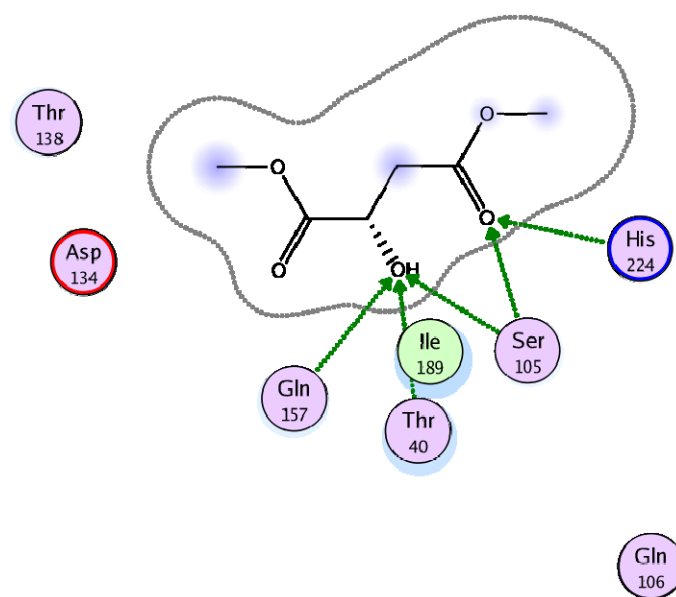
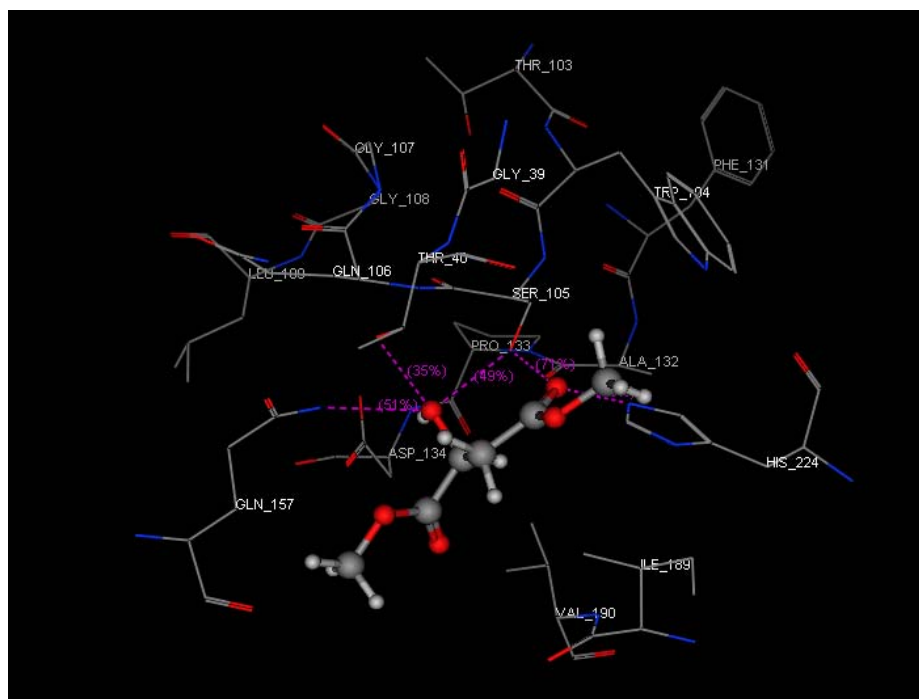


Fig. 4.25 Interaction between active site of lipase CA and β -carboxyl group of dimethyl L-malate.

Table 4.8 Interaction energy between lipase CA and dimethyl L-malate.

Entry	Interacting carboxyl group	E (Interaction energy) (kcal/mol)
1	α	-9.6268
2	β	-9.9033

最後に、リパーゼ CA が D - リンゴ酸ジメチルの α 位あるいは β 位カルボキシルと最安定構造を形成した際の、ドッキングシミュレーションの結果を Fig. 4.26 - 4.27 に示す。また、Fig. 4.26 及び 4.27 のように認識された際、シミュレーションにより算出された E 値を Table 4.9 に示す。

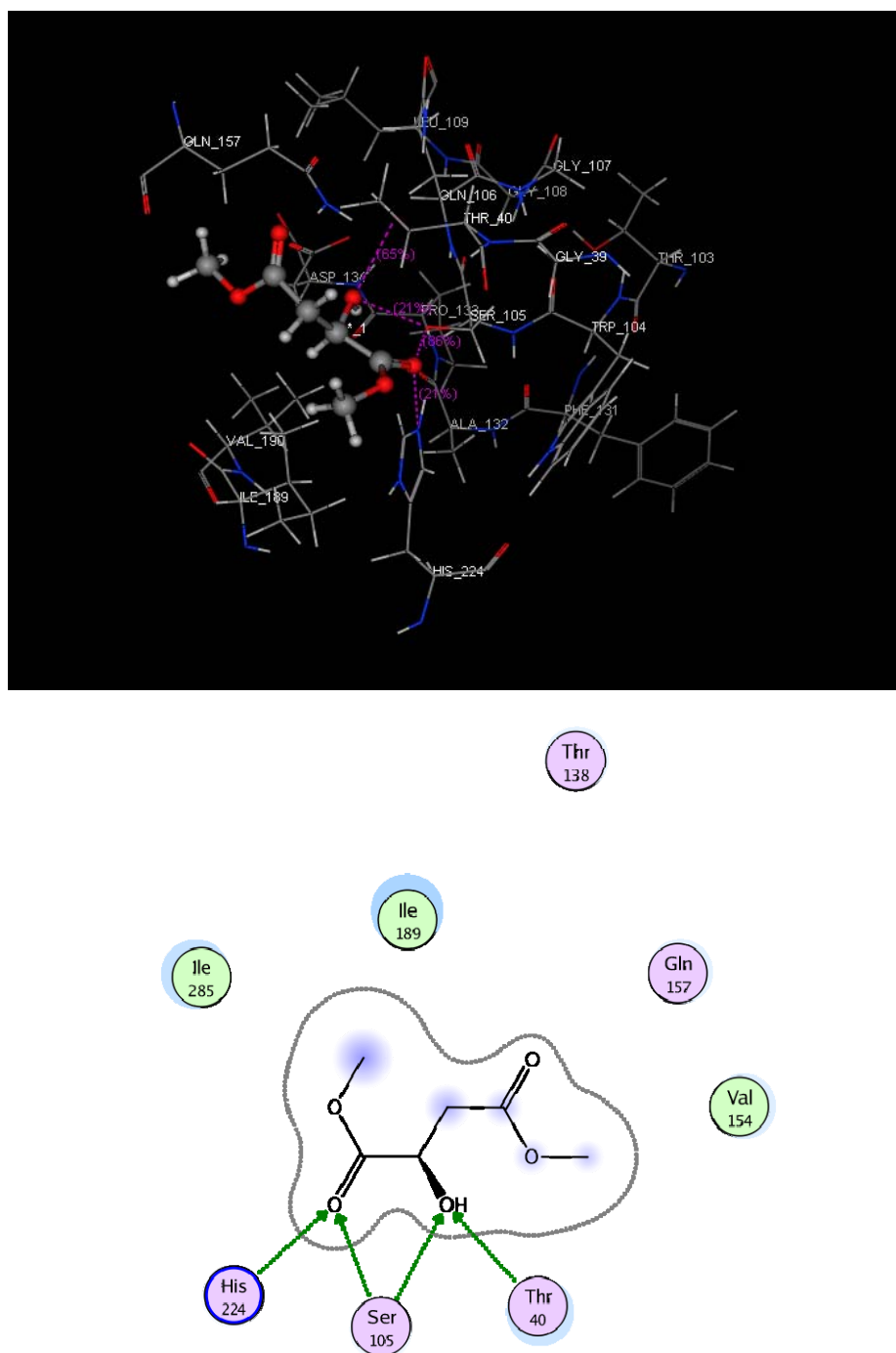


Fig. 4.26 Interaction between active site of lipase CA and α -carboxyl group of dimethyl D-malate.

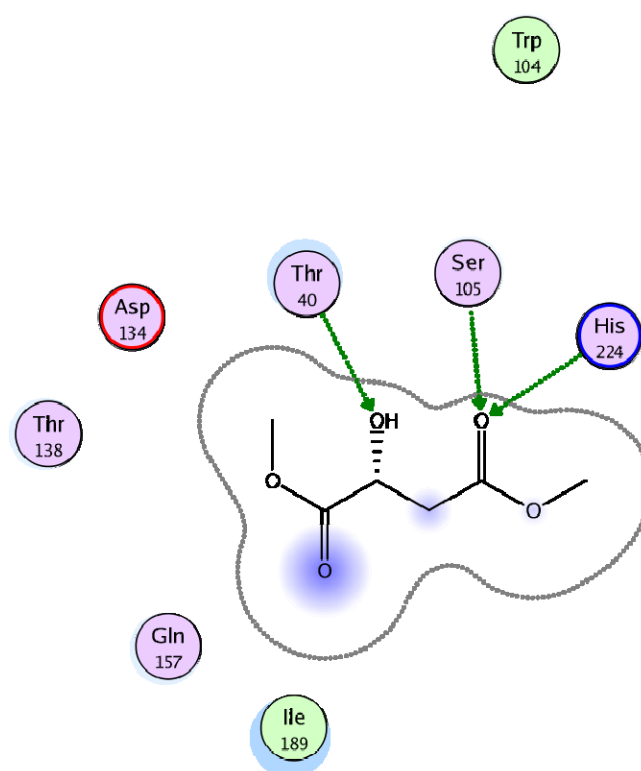
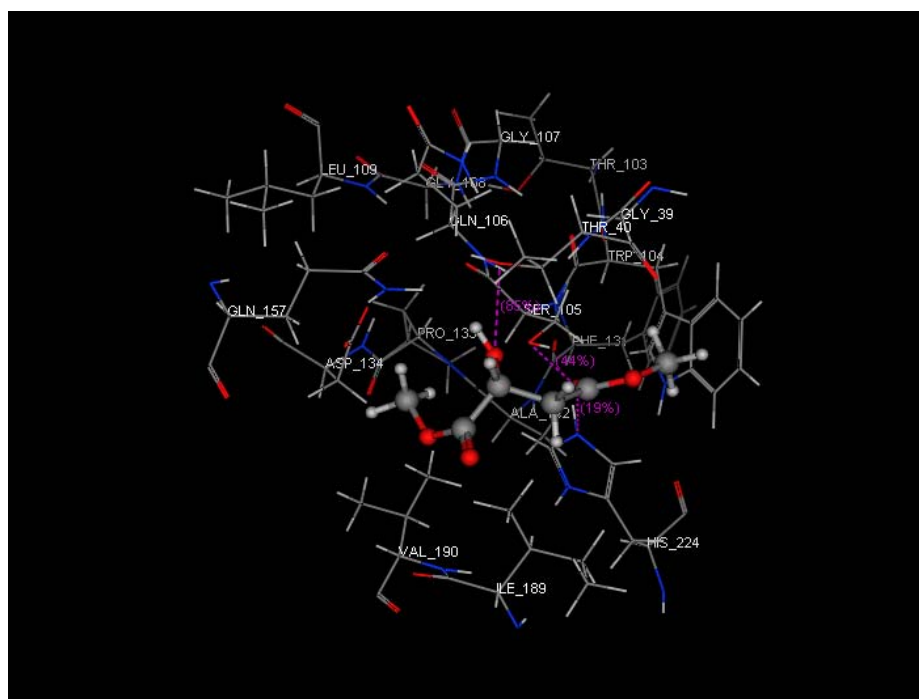


Fig. 4.27 Interaction between active site of lipase CA and β -carboxyl group of dimethyl D-malate.

Table 4.9 Interaction energy between lipase CA and dimethyl D-malate.

Entry	Interacting carboxyl group	E (Interaction energy) (kcal/mol)
1	α	-9.6804
2	β	-8.4971

Table 4.6 - 4.9 をまとめ、MOE により算出されたリパーゼ CA による 2 - メルカプトコハク酸ジメチルまたはリンゴ酸ジメチルの α - 、 β - カルボニル認識性の差をそれぞれの E 値の差で算出した。結果を Table 4.10 に示す。

Table 4.10 ΔE of α - and β - carbonyl for dimethyl 2-mercaptosuccinate and dimethyl malate.

Entry	Substrate	ΔE (kcal/mol)
1	dimethyl L-2-mercaptosuccinate	0.1908
2	dimethyl D-2-mercaptosuccinate	0.0645
3	dimethyl L-malate	0.2765
4	dimethyl D-malate	1.1833

MOE によるシミュレーションは、実験結果と符合し、Entry 4 で示した D - リンゴ酸ジメチルを用いたときに、Entry 1 ~ 3 と比べ、 α - 位と β - 位のカルボニルの認識性に顕著な差が現れるという計算結果を得た。

Fig. 4.26 より、D - リンゴ酸ジメチルが Ser₁₀₅ と α - カルボニルで相互作用した際には、同時に Ser₁₀₅ が第二級ヒドロキシ基とも水素結合を示すというシミュレーション結果を得た。一方、Fig. 4.27 より、 β - カルボニルで相互作用した際には、この水素結合が確認されない。従って、それぞれの E 値も前者が -9.6804、後者が -8.4971 と他のシミュレーション結果と比べ大きく異なった。Entry 3 で示した L - リンゴ酸ジメチルでは、Ser₁₀₅ はいずれの場合も第二級ヒドロキシ基と水素結合を示している。また、Entry 1 及び 2 で示した 2 - メルカプトコハク酸ジメチルの光学活性体では、Fig. 4.20 - 4.23 から、いずれも第二級チオールとは水素結合を示していない。従って、D - リンゴ酸ジメチルのみ、Ser₁₀₅ が基質の安定化に寄与する割合が大きく異なることが示唆される。立体障害的な要因など、他の要素も無視することはできないだろうが、水素結合の存在が反応性の差に大きく寄与したものと考えられる。

上記の結果から、MOEを用いることで、不斉を有するモノマーを酵素重合する際に、いずれの光学活性モノマーが良好に重合するかを予測できることが示唆された。特に、AA - BB型の重縮合では両カルボニル間の ΔE 値が小さくなければ、エステル交換反応が効率的に進行しないことが予想される。E値の絶対的な数値としての意味などまだまだ検証が必要な部分もあるだろうが、酵素触媒重合をより理解するために、MOEは強力なツールになり得ることが示された。

4.4.3 Poly(hexanediol - mercaptosuccinate)の架橋化

(1) 架橋反応

チオール基は高い反応性を有し、比較的温和な条件でジスルフィド結合を形成することが知られている。そこで、poly(hexanediol - mercaptosuccinate)の側鎖チオールを酸化し、ジスルフィド結合へと変換することで架橋反応を試みた。Poly(hexanediol - mercaptosuccinate)をジメチルスルホキシドに溶解させ、70 °Cで1日反応させた際の反応前後のポリマーの様子を Fig. 4.28 に示す。また、反応前後の FT - IR の変化を Fig. 4.29 に示す。

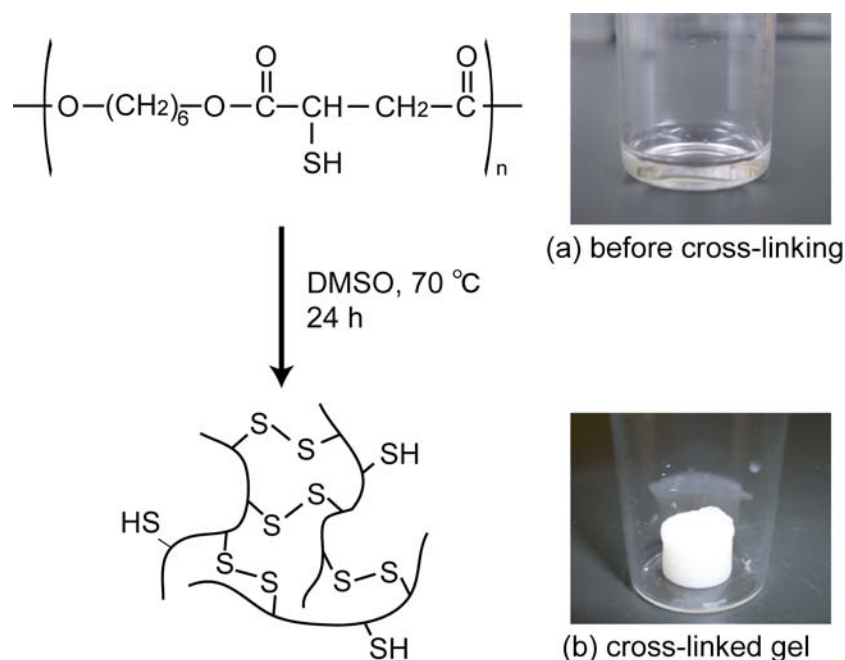


Fig. 4.28 Poly(hexanediol - mercaptosuccinate) before (a) and after (b) cross-linking.

24 時間反応後、液状ポリマーが白色の固体へと変化した。FT - IR を比較すると、反応前に 2560 cm^{-1} 付近に確認されていたチオール由来ピークが反応後にはほぼ消失していることが明らかとなった。また、反応後に 470 cm^{-1} 付近にわずかではあるが、ジスルフィド由来と思われるピークも確認された。FT - IR でジスルフィド由来ピークは定量性がないことが知られているが¹⁵³⁾、チオールがジスルフィド結合へと変換し架橋したことが推測される。ジスルフィド結合は種々の還元剤により再びチオールに戻ることが知られており、この反応を応用することで架橋ポリマーのケミカルリサイクルが達成

される可能性が示唆される¹⁵⁴⁾。

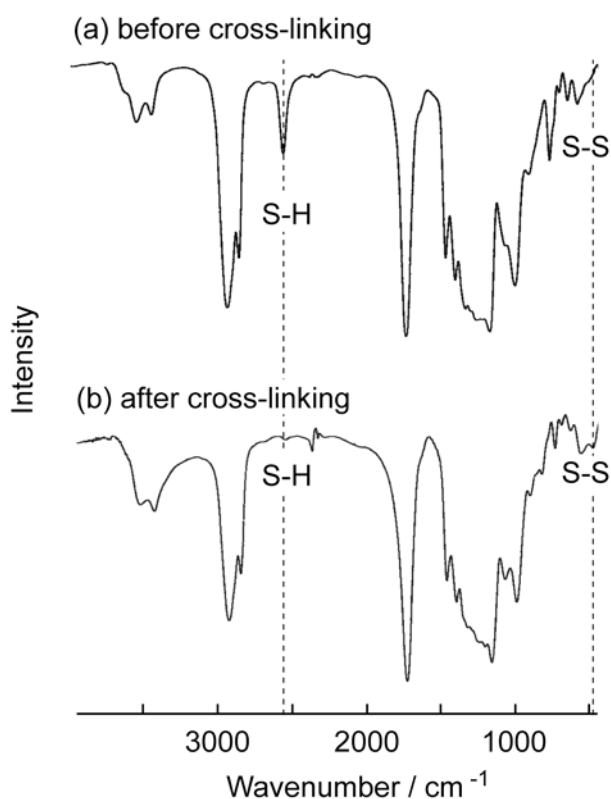


Fig. 4.29 FT - IR spectra of poly(hexanediol - mercaptosuccinate) before (a) and after (b) cross-linking.

(2) ジスルフィド結合の還元

モデル化合物である 2,2' - ジチオコハク酸ジメチルのジスルフィドのチオールへの還元反応を行った。反応前後の ^1H NMR を拡大し Fig. 4.30 に示した。

還元反応前に 3.8 ppm 付近に現れたジスルフィド由来ピーク ($-\text{CH}-\text{S}-\text{S}-\text{CH}-$) が消失し、代わりに 2.2 ppm 付近にチオール由来ピーク ($-\text{SH}$) が現れた。すなわち、モデル化合物のジスルフィド結合はチオールへと還元され、収率 85.1 % でメルカプトコハク酸ジメチルが得られた。以上のことから、架橋ポリマー中のジスルフィド結合でも還元の進行が期待された。

しかし、同様の反応条件で架橋した poly(hexanediol - mercaptosuccinate) の還元を行ったところ、解架橋反応の進行は確認されなかった。この要因としては、架橋密度が高すぎたことが挙げられる。Tesoro, Sastri らは高度にジスルフィド結合で架橋したポリマーに対しては還元剤が架橋ポリマー中に浸透しないので、反応が完全には進行しな

いことを報告している^{128, 129}。一部側鎖チオールをグラフト化するなどにより架橋密度を下げることで、架橋ポリマーでも還元反応の進行が期待されるのではないかと。

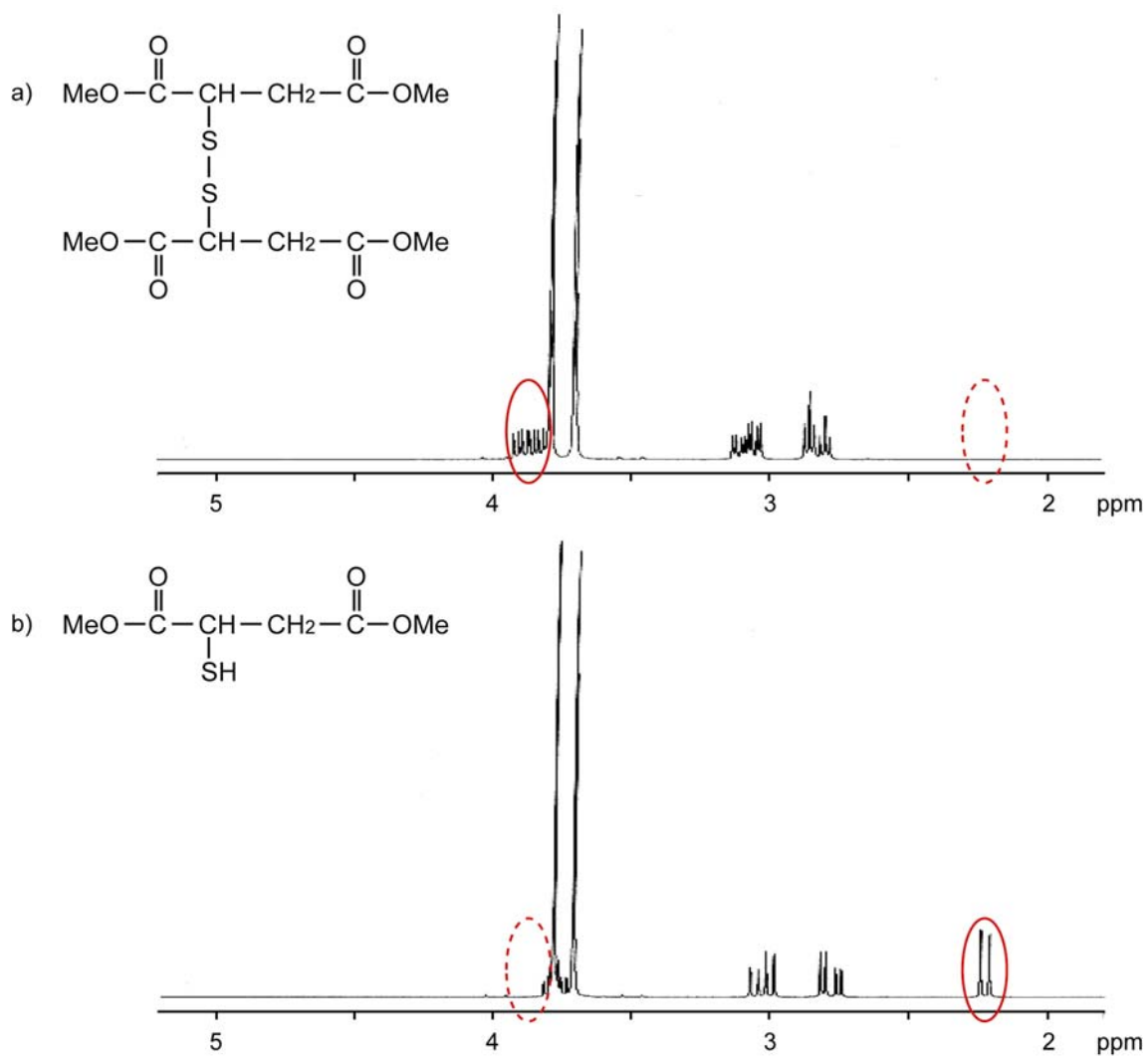


Fig. 4.30 300 MHz ^1H NMR spectrum before (a) and after (b) reduction of disulfide.

4.4.4 Poly(hexanediol - mercaptosuccinate) 及び poly(hexanediol - mercaptosuccinate - co - sebacate)の生分解性評価

Poly(hexanediol - mercaptosuccinate) [$M_w = 14,000$ 、 $M_w/M_n = 2.3$]、poly(hexanediol - 50 mol% mercaptosuccinate - co - 50 mol% sebacate) [$M_w = 28,000$ $M_w/M_n = 2.6$]、poly(hexanediol - 30 mol% mercaptosuccinate - co - 70 mol% sebacate) [$M_w = 19,000$ $M_w/M_n = 2.5$]の生分解性について下水処理場から採取した活性汚泥を用いて BOD 法により評価を行なった。生分解率の経時変化を Fig. 4.31 に示す。

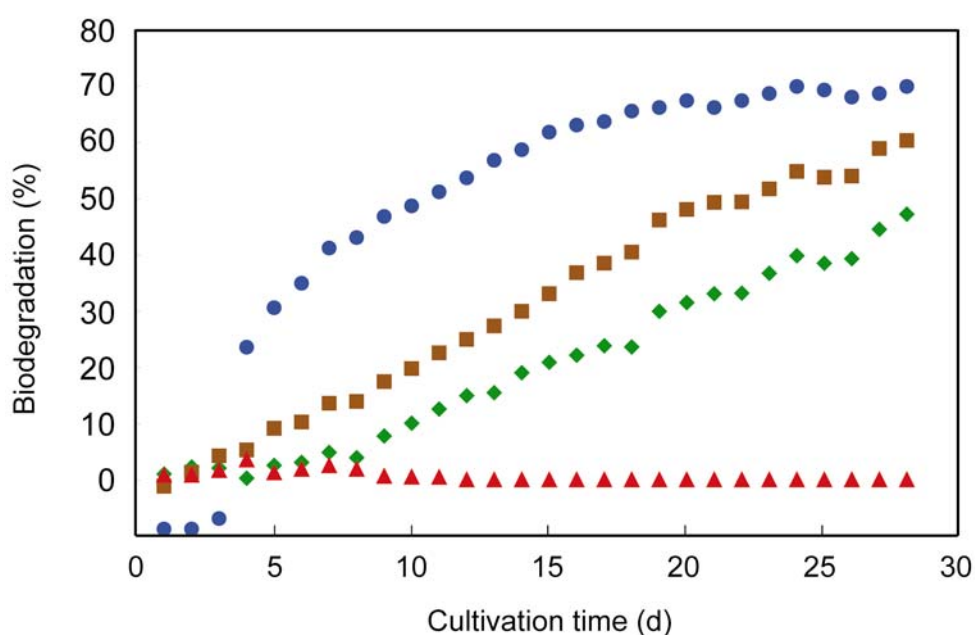


Fig. 4.31 Biochemical oxygen demand (BOD) biodegradation of poly(hexanediol - mercaptosuccinate), poly(hexanediol - 30 mol% mercaptosuccinate - co - 70 mol% sebacate), poly(hexanediol - 50 mol% mercaptosuccinate - co - 50 mol% sebacate) and aniline using activated sludge at 25 °C.

- : aniline
- : poly(hexanediol - 50 mol% mercaptosuccinate - co - 50 mol% sebacate)
- ◆ : poly(hexanediol - 30 mol% mercaptosuccinate - co - 70 mol% sebacate)
- ▲ : poly(hexanediol - mercaptosuccinate)

標準物質のアニリンの生分解率は分解開始 7 日後に 40 %を超え、28 日後には生分解性の目安である 60 %に達したことから、生分解試験は有効であると判断された。2

-メルカプトコハク酸ユニットを含む共重合体はいずれも生分解性を有した。特に、poly(hexanediol - 50 mol% mercaptosuccinate - *co* - 50 mol% sebacate)は易分解性を示した。逆に、ホモポリマーである poly(hexanediol - mercaptosuccinate)は分解性が確認されなかった。

4.5 結論

酵素触媒を利用した重縮合により、側鎖にチオールを有するポリエステルの合成を行った。具体的には、ヘキサン - 1,6 - ジオールならびに 2 - メルカプトコハク酸ジメチルの重縮合による poly(hexanediol - mercaptosuccinate)の合成を行った。

リパーゼ CA を用いた上記の重縮合反応は、ヘキサン - 1,6 - ジオールのヒドロキシ基と 2 - メルカプトコハク酸ジメチルのメチルエステル間で進行し、側鎖に遊離チオールを有するポリエステルがワンポットで合成された。モレキュラーシーブス 4A 存在下、バルク中、70 °C で反応を行うことで重合は最も効率的に進行し、48 時間反応後、 $M_w = 14,000$ 、 $M_w/M_n = 2.3$ の poly(hexanediol - mercaptosuccinate)が収率 92.2 % で得られた。本反応は、反応温度の上昇に伴い、側鎖チオールの副反応による架橋、分岐反応の進行が認められた。また、ポリマー中の側鎖チオールの割合は共重合化することで任意に制御することが可能であった。

2 - メルカプトコハク酸ジメチルの側鎖チオールの立体化学によらず、前述の重合反応は良好に進行した。すなわち、D - メルカプトコハク酸ジメチル、L - メルカプトコハク酸ジメチルまたは DL - メルカプトコハク酸ジメチルいずれを用いた場合もほぼ同程度の分子量を有するポリマーが得られた。一方、対照実験として行った側鎖ヒドロキシ型モノマーであるリンゴ酸ジメチルを用いた重縮合反応は、側鎖ヒドロキシ基の立体化学による影響を顕著に受けた。L - リンゴ酸ジメチルを用いたときにのみ良好に重合は進行し $M_w = 16,300$ 、 $M_w/M_n = 2.5$ の poly(hexanediol - malate)が収率 86.2 % で得られた。2 - メルカプトコハク酸ジメチルはいずれの光学活性体も分子内の 2 つのカルボキシレートが酵素によりほぼ同程度の認識性を示したのに対して、リンゴ酸ジメチルは D - リンゴ酸ジメチルの α 位カルボキシル隣接メチルエステルの酵素認識性が高いことが明らかとなった。従って、D - リンゴ酸ジメチルを用いた重合反応はエステル交換反応が効率的に進行しないために、分子量の増大が確認されなかったことが示唆された。これは、MOE によるシミュレーション結果からも支持された。

Poly(hexanediol - mercaptosuccinate)は DMSO 中、70 °C で側鎖チオールのジスルフィドへの酸化に伴う架橋反応が容易に進行した。架橋反応後、クロロホルム不溶の白色固体が 76 % で得られた。モデル化合物ではジスルフィド結合はチオールへの還元が起こったが、架橋した poly(hexanediol - mercaptosuccinate)では解架橋反応の進行は困難であり架橋密度を下げるなど更なる検討が必要であることが明らかとなった。

以上のことから、酵素触媒を利用した重縮合による側鎖チオール含有ポリエステルの新規合成法が提唱された。酵素の特徴である官能基選択性を利用することで、特徴的な構造を有するポリマーがワンポットかつ環境低負荷な反応条件で合成された。得られたポリマーは、リサイクル性を有する架橋高分子材料へと発展することが期待される。

第5章

総括

21 世紀の材料開発においては、高機能はもちろんのこと、環境受容性が強く望まれる。また、目的とする材料が環境に優しいこと以外にも、その合成過程から廃棄まで総合的に評価した結果、環境低負荷であることが求められる。環境低負荷型高分子合成を実践するためには、従来の化学合成プロセスとは異なった視点に立った、新たな高分子合成法が検討される必要がある。酵素などの環境低負荷型触媒を利用した高分子合成法も、新たな候補になり得ると考えられる。

本研究では、環境低負荷型触媒である酵素による、新規イオウ含有高分子の創成を目的とし研究を進めた。具体的には、主鎖中にイオウを含むポリチオエステルの合成及びペンダントに遊離チオールとしてイオウを含むポリエステルの合成について検討を行った。

本研究で得られた結果を以下にまとめた。

第2章 酵素触媒を利用した直接重縮合によるポリチオエステルの合成

環境低負荷型触媒である酵素を利用し、重縮合によるポリチオエステルの合成を行った。メルカプトカルボン酸である 11MU の重縮合及びヘキサン - 1,6 - ジチオールと種々ジカルボン酸ジエステルの重縮合によるポリチオエステルの合成について検討した。

11MU の重縮合は、リパーゼ CA 存在下、縮合により生成する水をモレキュラーシーブス 4A を用いて吸着させて、バルク中、110 °C で反応を行なうことで最も効率的に進行した。48 時間反応後、 $M_w = 34,000$ 、 $M_w/M_n = 2.3$ の poly(11MU) が収率 86 % で得られた。Poly(11MU) は相当するポリエステルである poly(11HU) と比較して T_m 、 T_g ともに約 20 °C 高いことが確認された。

AA - BB 型ポリチオエステルも同様に触媒としてリパーゼ CA を用いることで得られた。ヘキサン - 1,6 - ジチオールとセバシン酸ジエチルを等モル、リパーゼ CA 存在下、縮合により生成するエタノールをモレキュラーシーブス 4A を用いて吸着させて、バルク中、120 °C、2 日間反応を行なうことで $M_w = 10,800$ 、 $M_w/M_n = 1.8$ の poly(hexanedithiol - sebacate) が収率 90 % で得られた。また、ヘキサン - 1,6 - ジチオールと異なるメチレン鎖長を有するジカルボン酸ジエステルの重縮合反応により、 $M_w = 7,000 \sim 10,000$ 程度の一連のポリチオエステルが高収率で得られた。いずれのポリチオエステルも相当するポリエステルと比べて高い T_m 、 T_g が確認された。また、メチレン

鎖数により顕著な偶奇性を示した。さらに、酵素法により得られた poly(hexanedithiol - glutarate) を唯一の炭素源として集積培養を行なうことで、分解菌が単離され生分解性が示唆された。

以上のことから、ポリチオエステルの新規合成法として環境低負荷型触媒である酵素を利用した手法が提唱された。本例は、イオウが主鎖中に含まれるホモポリマーの酵素合成として初の例である。しかしながら、実用化に向けては、更なる分子量の向上が課題として挙げられた。

第 3 章 酵素触媒を利用した開環重合による高分子量ポリチオエステルの合成と環状チオエステルの重合挙動の解析

酵素触媒を利用した環状チオエステルの開環重合によるポリチオエステルの合成を行った。初めに、ヘキサン - 1,6 - ジチオールならびにセバシン酸ジメチルをリパーゼ CA と希薄条件下で反応させ、cyclic(hexanedithiol - sebacate) を合成し、ついで開環重合を行った。

リパーゼ CA を用いた cyclic(hexanedithiol - sebacate) の開環重合により $M_w = 115,000$ 、 $M_w/M_n = 2.3$ の poly(hexanedithiol - sebacate) が収率 90 % で得られた。重縮合法と比べ、開環重合法では 10 倍以上の分子量の増大が確認された。また、開環重合により得られたポリマーは分子量の増大に伴い、ソルベントキャスト法によるポリマーフィルム形成が達成された。

Poly(hexanedithiol - sebacate) を再び希薄条件下でリパーゼ CA と反応させることで分子内環化反応が進行し、cyclic(hexanedithiol - sebacate) が収率 69 % で得られた。リパーゼを利用した脂肪族ポリチオエステルのケミカルリサイクルが達成可能であることが示された。

AB 型である 11MU も同様に環状体を合成し、開環重合を行ったところ $M_w = 38,000$ 、 $M_w/M_n = 2.1$ の poly(11MU) が得られた。AA - BB 型とは異なり、AB 型では直接重縮合により得られたものとはほぼ同程度の分子量のポリチオエステルが得られた。これらの結果から、AA - BB 型における開環重合による分子量の増大は縮合物が発生しないことではなく、チオール末端とカルボキシル末端のモル比が正確に 1:1 に保たれることが示唆された。

環状チオエステルである cyclic(hexanedithiol - sebacate) の開環重合挙動を解析したところ、相当する環状エステルである cyclic(hexanediol - sebacate) とは大きく異なることが明らかとなった。環状チオエステルは相当する環状エステルと比べ重合速度が 10^5 倍以上遅いことが見出された。前者の律速段階が末端チオールによる EAM への求核攻撃段階であるのに対し、後者は EAM 形成段階が律速という結果が得られた。また、酵素による基質認識性は前者が優位であることが示された。

以上のことから、酵素触媒を利用した高分子量体を有する AA - BB 型ポリチオエス

テルの新規合成法として開環重合法が提唱された。また、開環重合挙動を解析した結果、得られた理学的知見を応用することで、酵素を利用した特異な構造を有するポリマー合成への発展が期待される。

第4章 酵素触媒を利用した遊離チオールをペンダントに有するポリエステルの合成

酵素触媒を利用した重縮合により、側鎖にチオールを有するポリエステルの合成を行った。ヘキサン - 1,6 - ジオールならびに 2 - メルカプトコハク酸ジメチルの重縮合による poly(hexanediol - mercaptosuccinate)の合成について検討した。

リパーゼ CA を用いた上記の重縮合反応は、ヘキサン - 1,6 - ジオールのヒドロキシ基と 2 - メルカプトコハク酸ジメチルのメチルエステル間で進行し、側鎖に遊離チオールを有するポリエステルがワンポットで合成された。モレキュラーシーブス 4A 存在下、バルク中、70 °C で反応を行うことで重合は最も効率的に進行し、48 時間反応後、 $M_w = 14,000$ 、 $M_w/M_n = 2.3$ の poly(hexanediol - mercaptosuccinate)が収率 92 % で得られた。本反応は、反応温度の上昇に伴い、側鎖チオールの副反応による架橋、分岐反応の進行が認められた。また、ポリマー中の側鎖チオールの割合は共重合化することで任意に制御することが可能であった。

2 - メルカプトコハク酸ジメチルの側鎖チオールの立体化学によらず、前述の重合反応は良好に進行した。一方、対照実験として行った側鎖ヒドロキシ型モノマーであるリンゴ酸ジメチルを用いた重縮合反応は、側鎖ヒドロキシ基の立体化学による影響を顕著に受けた。L - リンゴ酸ジメチルを用いたときにのみ良好に重合は進行し $M_w = 16,300$ 、 $M_w/M_n = 2.5$ の poly(hexanediol - malate)が収率 86 % で得られた。2 - メルカプトコハク酸ジメチルはいずれの光学活性体も分子内の 2 つのカルボキシレートが酵素によりほぼ同程度の認識性を示したのに対して、リンゴ酸ジメチルは D - リンゴ酸ジメチルの α 位カルボキシル隣接メチルエステルの酵素認識性が高いことが明らかとなった。従って、D - リンゴ酸ジメチルを用いた重合反応はエステル交換反応が効率的に進行しないために、分子量の増大が確認されなかったことが示唆された。これは、MOE によるシミュレーション結果からも支持された。

Poly(hexanediol - mercaptosuccinate)は DMSO 中、70 °C で側鎖チオールのジスルフィドへの酸化に伴う架橋反応が容易に進行した。架橋反応後、クロロホルム不溶の白色固体が 76 % で得られた。モデル化合物ではジスルフィド結合はチオールへの還元が起こったが、架橋した poly(hexanediol - mercaptosuccinate)では解架橋反応の進行は困難であり架橋密度を下げるなど更なる検討が必要であることが明らかとなった。

以上のことから、酵素触媒を利用した重縮合による側鎖チオール含有ポリエステルの新規合成法が提唱された。酵素の特徴である官能基選択性を利用することで、特徴的な構造を有するポリマーがワンポットかつ環境低負荷な反応条件で合成された。得られたポリマーは、リサイクル性を有する架橋高分子材料へと発展することが期待される。

本研究では、酵素触媒を利用したポリチオエステル及びペンダントに遊離チオールを有するポリエステルの合成を達成した。AA - BB 型ポリチオエステルは開環重合を行うことで高分子量体が得られることが見出された。重合挙動を解析することで、チオールと基質 - 酵素複合体の反応に関する新たな理学的知見が得られ、従来の酵素触媒重合とは異なる律速段階の存在を提唱した。また、温和な条件で反応を進行させることで、保護、脱保護の必要なく、ワンポット反応でペンダントに遊離チオールを有するポリエステルが合成された。

日本にも豊富に存在するイオウに着目し、酵素触媒重合によるイオウ含有高分子材料の創成について検討したが、本研究で新たに得られた知見や新たに提唱した MOE の利用法などが酵素触媒重合一般にも広く用いられることがあれば幸いである。

参考文献

- [1] 御園生誠（監修）．環境にやさしい化学技術の開発，シーエムシー出版，2000.
- [2] 宮元純之（監訳）．グリーンケミストリー，化学フロンティア，第4巻．化学同人，2001.
- [3] 御園生誠，村橋俊一（編）．グリーンケミストリー．講談社サイエンティフィク，2001.
- [4] M. Akiyama, T. Tsuge and Y. Doi. *Polym. Degrad. Stab.*, 80, p. 183, 2003.
- [5] 土肥義治（監修）．分解性プラスチックの開発．シーエムシー出版，2000.
- [6] S. Kusaka, H. Abe, S. Y. Lee and Y. Doi. *Appl. Microbiol. Biotech.*, 47, p. 140, 1997.
- [7] S. Kusaka, T. Iwata and Y. Doi. *Int. J. Biol. Macromol.*, 25, p. 87, 1999.
- [8] T. Lütke-Eversloh and A. Steinbüchel. *Macromol. Biosci.*, 4, p. 165, 2004.
- [9] S. Tanaka, L. Feng and Y. Inoue. *Polym. J.*, 36, p. 570, 2004.
- [10] 生分解性プラスチック研究会（編）．生分解性プラスチックハンドブック．エヌ・ティー・エス，2004.
- [11] H. Tsuji. *Macromol. Biosci.*, 5, p. 569, 2005.
- [12] S. Y. Lee, S. H. Hong, S. H. Lee and S. J. Park. *Macromol. Biosci.*, 4, p. 157, 2004.
- [13] 小林四郎．*高分子*, 42, p. 308, 1993.
- [14] S. Kobayashi, H. Litter and D. Kaplan, Eds. *Enzyme-catalyzed synthesis of polymers, Advances in Polymer Science*, 194, Springer, 2006.
- [15] I. K. Varma, A.-C. Albertsson, R. Rajkhowa and R. K. Srivastava. *Prog. Polym. Sci.*, 30, p. 949, 2005.
- [16] H. Uyama, S. Kobayashi, S. Suda and H. Kikuchi. *Chem. Lett.*, 11, p. 1109, 1997.
- [17] S. Kobayashi, H. Kikuchi and H. Uyama. *Macromol. Rapid Commun.*, 7, p. 575, 1997.
- [18] Y. Soeda, K. Toshima and S. Matsumura. *Macromol. Biosci.*, 4, p. 721, 2004.
- [19] Y. Soeda, K. Toshima and S. Matsumura. *Macromol. Biosci.*, 5, p. 277, 2005.
- [20] J. Zhou, S. Villarroya, W. Wang, M. F. Wyatt, C. J. Duxbury, K. J. Thurecht and S. M. Howdle. *Macromolecules*, 39, p. 5352, 2006.
- [21] R. Marcilla, M. Geus, D. Mecerreyes, C. J. Duxbury, C. E. Koning and A.

- Heise. *Eur. Polym. J.*, 42, p. 1215, 2006.
- [22] F. C. Loeker, C. J. Duxbury, R. Kumar, W. Gao, R. A. Gross and S. M. Howdle. *Macromolecules*, 37, p. 2450, 2004.
- [23] S. Kobayashi, H. Uyama and R. Ikeda. *Chem. Eur. J.*, 7, p. 4754, 2001.
- [24] A. O. Magnusson, J. C. Rotticci-Mulder, A. Santagostino and K. Hult. *ChemBioChem*, 6, p. 1051, 2005.
- [25] J. W. Chen and W. T. Wu. *J. Biosci. Bioeng*, 95, p. 466, 2003.
- [26] S. Matsumura. *Macromol. Biosci.*, 2, p. 105, 2002.
- [27] (社)プラスチック処理促進協会, プラスチックリサイクルの基礎知識, 2008.
- [28] Y. Toyomasu. *水素エネルギーシステム*, 33, p. 22, 2008.
- [29] S. Matsumura, H. Ebata and K. Toshima. *Macromol. Rapid Commun.*, 12, p. 860, 2000.
- [30] Y. Takahashi, S. Okajima, K. Toshima and S. Matsumura. *Macromol. Biosci.*, 4, p. 346, 2004.
- [31] S. Okajima, R. Kondo, K. Toshima and S. Matsumura. *Biomacromolecules*, 4, p. 1514, 2003.
- [32] Y. Osanai, K. Toshima and S. Matsumura. *Green Chem.*, 5, p. 567, 2003.
- [33] 中山重蔵 (監修) . サルファーケミカルズのフロンティア, シーエムシー出版, 2007.
- [34] T. Lütke-Eversloh, A. Fischer, U. Remminghorst, J. Kawada, R. H. Marchessault, A. Bögershausen, M. Kalwei, H. Eckert, R. Reichelt, S.-J. Liu and A. Steinbüchel. *Nat. Mater.*, 1, p. 236, 2002.
- [35] 竹本喜一、飯田襄 (著) . 機能性プラスチックが身近になる本, シーエムシー出版, 2004.
- [36] Y. Takanashi, I. Sumita and H. Takadokoro. *J. Polym. Sci., Polym. Phys. Ed.*, 11, p. 2113, 1973.
- [37] K. Tai and H. Takadokoro. *Macromolecules*, 7, p. 507, 1974.
- [38] J. Boon and E. P. Magré, *Macromol. Chem.*, 126, p. 130, 1969.
- [39] B. J. Tabor, E. P. Magré and J. Boon. *Eur. Polym. J.*, 7, p. 1127, 1971.
- [40] T. Lütke-Eversloh, K. Bergander, H. Luftmann, and A. Steinbüchel. *Biomacromolecules*, 2, p. 1061, 2001
- [41] Y. Kamei, A. Nagai, H. Nishida, H. Kimura and T. Endo. *Macromol. Biosci.*, 7, p. 364, 2007.
- [42] A. Schöberl and F. Krumei. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, 77, p. 371, 1944.
- [43] A. Schöberl. *Angew. Chem.*, 60, p. 7, 1948.
- [44] C. S. Marvel and A. Kotch. *J. Am. Chem. Soc.*, 73, p. 1100, 1951.

- [45] A. Schöberl and G. Wiehler. *Angew. Chem.*, 66, p. 273.
- [46] A. Schöberl and G. Wiehler. *Liebigs Ann. Chem.*, 595, p. 101.
- [47] H. R. Kricheldorf and K. Bösing. *Makromol. Chem.*, 173, p. 67, 1973.
- [48] H. R. Kricheldorf. *Angew. Chem.*, 83, p. 793, 1971.
- [49] H. R. Kricheldorf, K. Bösing and G. Schwarz. *Makromol. Chem.*, 173, p. 43, 1973.
- [50] C. G. Overberger and J. K. Weiss. *Polym. L. H.*, 2, p. 329, 1964.
- [51] C. G. Overberger and J. K. Weiss. *J. Am. Chem. Soc.*, 90, p. 3525, 1968.
- [52] F. Sanda, D. Jirakanjana, M. Hitomi and T. Endo. *Macromolecules*, 32, p. 8010, 1999.
- [53] F. Sanda, D. Jirakanjana, M. Hitomi and T. Endo. *J. Polym. Sci., Part A : Polym. Chem.*, 38, p. 4057, 2000.
- [54] H. Kikuchi, N. Tsubokawa and T. Endo. *Chem. Lett.*, 34, p. 376, 2005.
- [55] R. W. Lenz and R. H. Marchessault. *Biomacromolecules*, 6, p.1, 2005.
- [56] T. Lütke-Eversloh, K. Bergander, H. Luftmann and A. Steinbüchel. *Biomacromolecules.*, 2, p. 1061, 2001.
- [57] T. Lütke-Eversloh, K. Bergander, H. Luftmann and A. Steinbüchel. *Microbiology.*, 147, p. 11, 2001.
- [58] T. Lütke-Eversloh, A. Steinbüchel, in: *Biopolymers*, Vol.9, S. Matsumura, A. Steinbüchel, Eds., Wiley-VCH: Weinheim, Germany, 63, 2003.
- [59] T. Lütke-Eversloh, J. Kawada, R. H. Marchessault and A. Steinbüchel. *Biomacromolecules*, 3, p. 159, 2002.
- [60] K. Elbanna, T. Lütke-Eversloh, D. Jendrosseck, H. Luftmann and A. Steinbüchel. *Arch. Microbiol.*, 182, p. 212, 2004.
- [61] D. Y. Kim, T. Lütke-Eversloh, K. Elbanna, N. Khakor and A. Steinbüchel. *Biomacromolecules*, 6, p. 897, 2005.
- [62] B. Zhu, S. Tanaka, L. Feng, N. Ishii, K. Kasuya, Y. Doi and Y. Inoue. *Polym. J.*, 37, p. 711, 2005.
- [63] H. Kimura, K. Mouri and Y. Kamei. *Polym. J.*, 38, p. 737, 2006.
- [64] M. Caussette, A. Marty and D. Combes. *J. Chem. Biotechnol.*, 68, p. 257, 1997.
- [65] N. Weber, E. Klein and K. D. Mukherjee. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 76, p. 1297, 1999.
- [66] N. Weber, E. Klein, K. Vosmann and K. D. Mukherjee. *Biotechnol. Lett.*, 20, p. 687, 1998.
- [67] N. Weber, E. Klein and K. D. Mukherjee. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 51, p.

- 401, 1999.
- [68] N. Weber, E. Klein, K. Vosmann and K. D. Mukherjee. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 64, p. 800, 2004.
 - [69] S. Iwata, K. Toshima and S. Matsumura. *Macromol. Rapid Commun.* 24, p. 467, 2003.
 - [70] N. Weber, K. Bergander, E. Fehling, E. Klein, K. Vosmann and K. D. Mukherjee. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 70, p. 290, 2006.
 - [71] E. Fehling, E. Klein, N. Weber, C. Demes and K. Vosmann. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 74, p. 357, 2007.
 - [72] B. L. Zamost, H. K. Nielsen and R. L. Starnes. *J. Ind. Microbiol.*, 8, p. 71, 1991.
 - [73] R. W. McCabe and A. Taylor. *Enzyme Microb. Technol.*, 35, p. 393, 2004.
 - [74] H. Ebata, K. Toshima and S. Matsumura. *Macromol. Biosci.*, 7, p. 798, 2007.
 - [75] H. Ebata, K. Toshima and S. Matsumura. *Macromol. Biosci.*, 8, p. 38, 2008.
 - [76] 嵯峨是人, 土屋忠一. 別冊化学工業, 28, p.232, 1984.
 - [77] 柳下芳雄. 修士論文. 慶應義塾大学大学院理工学研究科基礎理工学専攻, 2007.
 - [78] 丹羽利充 (編著). 最新マススペクトロメトリー, 化学同人, 1995.
 - [79] J. Saarinen, H. G. Welgus, C. A. Flizar, N. Kalkkinen and J. Helin. *Eur. J. Biochem.*, 259, p. 829, 1999.
 - [80] 石黒正恒 (著). SH 基の化学修飾, 学会出版センター, 1978.
 - [81] A. Ghanem and V. Schrig. *Tetrahedron : Asym.*, 14, p. 57, 2003.
 - [82] A. Kumar and R. A. Gross. *Biomacromolecules*, 1, p. 133, 2000.
 - [83] M. N. Gupta and I. Roy. *Eur. J. Biochem.*, 271, p. 1, 2004.
 - [84] D. B. Volkin, A. Staubli, R. Langer and A. M. Klibanov. *Biotechnol. Bioeng.*, 37, p. 843, 1991.
 - [85] F. Parvaresh, H. Roberts, D. Thomas and M. D. Legoy. *Biotechnol. Bioeng.*, 39, p. 467, 1992.
 - [86] N. A. Turner, D. B. Duchateau and E. N. Vulfson, *Biotechnol. Lett.*, 17, p. 371, 1995.
 - [87] N. A. Turner and E. N. Vulfson. *Enzyme Microb. Technol.*, 27, p. 108, 2000.
 - [88] H. Frykman, N. Öhrner, T. Norin and K. Hult, *Tetrahedron Lett.*, 8, p. 1367, 1993.
 - [89] Novozym435 Product Sheet, Novozymes, 2002
 - [90] J. Uppenberg, M.T. Hansen, S. Patkar and T. A. Jones. *Structure*, 2, p. 293, 1994.
 - [91] J. Kawada, T. Lütke-Eversloh, A. Steinbüchel and R. H. Marchessault.

- Biomacromolecules*, 4, p. 1698, 2003.
- [92] H. Uyama, K. Inada and S. Kobayashi. *Polym. J.*, 32, p. 440, 2000.
 - [93] 妹尾学, 栗田公夫, 矢野彰一郎, 澤口孝志 (著). 基礎高分子科学, 共立出版株式会社, 2000.
 - [94] P. J. M. Serrano, E. Thüss and R. J. Gaymans. *Polymer*, 15, p. 3893, 1997.
 - [95] C. S. Fuller and C. L. Erickson. *J. Am. Chem. Soc.*, 59, p. 344, 1937.
 - [96] W. O. Baker and C. S. Fuller. *J. Am. Chem. Soc.*, 64, p. 2399, 1942.
 - [97] S. Hosoda and A. Uemura. *Polym. J.*, 24, p. 939, 1992.
 - [98] G. Perego, G. D. Cella and C. Bastioli. *J. Appl. Polym. Sci.*, 59, p. 37, 1996.
 - [99] A.-C. Albertsson and R. K. Srivastava. *Adv. Drug Delivery Rev.*, 60, p. 1077, 2008.
 - [100] H. Uyama and S. Kobayashi. *Chem. Lett.*, 22, p. 1149, 1993.
 - [101] D. Knani, A. L. Gutman and D. H. Kohn. *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.*, 31, p. 1221, 1993.
 - [102] S. Namekawa, H. Uyama and S. Kobayashi. *Polym. J.*, 28, p. 730, 1996.
 - [103] H. Uyama, H. Kikuchi, K. Takeya and S. Kobayashi. *Acta Polym.*, 47, p. 357, 1996.
 - [104] K. J. Thurecht, A. Heise, M. de Geus, S. Villarroya, J. Zhou, M. F. Wyatt and S. M. Howdle. *Macromolecules*, 39, p. 7967, 2006.
 - [105] S. Matsumura, K. Tsukada and K. Toshima. *Macromolecules*, 30, p. 3122, 1997.
 - [106] S. Sugihara, K. Toshima and S. Matsumura. *Macromol. Rapid Commun.*, 27, p. 203, 2006.
 - [107] P. E. Fritze. Patent No. 3,786,066 (United States Patent), 1974.
 - [108] D. Bhar and S. Chandrasekaran. *Tetrahedron*, 53, p. 11835, 1997.
 - [109] Y. Osanai, K. Toshima and S. Matsumura. *Macromol. Biosci.*, 4, p. 936, 2004.
 - [110] Y. Osanai, K. Toshima, S. Matsumura. *Green Chem.*, 5, p. 567, 2003.
 - [111] S. Numekawa, S. Suda, H. Uyama and S. Kobayashi. *Int. J. Biol. Macromol.*, 25, p. 145, 1999.
 - [112] Y. Mei, A. Kumar and R. Gross. *Macromolecules*, 36, p. 5530, 2003.
 - [113] Y. Mei, A. Kumar and R. Gross. *Macromolecules*, 35, p. 5444, 2002.
 - [114] 井上祥平. 高分子合成化学, 裳華房, 1996.
 - [115] K. Pang, R. Kotek and A. Tonelli. *Prog. Polym. Sci.*, 31, p. 1009, 2006.
 - [116] C. S. Lee, M. T. Ru, M. Haake, J. S. Dordick, J. A. Reimer and D. S. Clark. *Biotechnol. Bioeng.*, 57, p. 686, 1998.
 - [117] H. Uyama, S. Namekawa and S. Kobayashi. *Polym. J.*, 29, p. 299, 1997.

- [118] H. Uyama, K. Takeya and S. Kobayashi. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 68, p. 56, 1995.
- [119] 戸嶋直樹, 遠藤剛, 山本隆一 (著). 機能高分子材料の化学, 朝倉書店, 1998.
- [120] D. E. Fomenko, S. M. Mariano and V. N. Gladyshev. *Mol. Cells*, 26, p. 228, 2008.
- [121] G. Crisponi, A. Diaz, V. M. Nurchi, T. Pivetta and M. J. T. Estévez. *Polyhedron*, 21, p. 1319, 2002.
- [122] R. F. Mayo and C. Walling. *Chem. Rev.*, 27, p. 351, 1940.
- [123] K. Miyazaki, K. Hisada and T. Hori. *SEN'I GAKKAISHI*, 56, p. 227, 2000.
- [124] C. G. Overberger and H. Aschkenasy. *J. Am. Chem. Soc.*, 82, p. 4357, 1960.
- [125] C. G. Overberger and H. Aschkenasy. *J. Org. Chem. Soc.*, 25, p. 1648, 1960.
- [126] A. B. Seabra, R. Silva and M. G. Oliveira. *Biomacromolecules*, 6, p. 2512, 2005.
- [127] 高田十志和, 奥智也. 第 16 回エラストマー討論会予稿集, p. 2, 2003.
- [128] G. C. Tesoro and V. Sastri. *J. Appl. Polym. Sci.*, 39, p. 1425, 1990.
- [129] V. R. Sastry and G. C. Tesoro. *J. Appl. Polym. Sci.*, 39, p. 1439, 1990.
- [130] D. Aoki, Y. Teramoto and Y. Nishio. *Biomacromolecules*, 8, p. 3749, 2007.
- [131] K. Ishida and N. Yoshie. *Macromol. Biosci.*, 8, p. 916, 2008.
- [132] H. Uyama, E. Klegraf, S. Wada and S. Kobayashi. *Chem. Lett.*, 29, p. 800, 2000.
- [133] H. Fu, A. S. Kulshrestha, W. Gao and R. A. Gross. *Macromolecules*, 36, p. 9804, 2003.
- [134] A. Kumar, A. S. Kulshrestha, W. Gao and R. A. Gross. *Macromolecules*, 36, p. 8219, 2003.
- [135] J. Hu, W. Gao, A. Kulshrestha and R. A. Gross. *Macromolecules*, 39, p. 6789, 2006.
- [136] Y. Mei, A. Kumar, W. Gao, R. Gross, S. B. Kennedy, N. R. Washburn, E. J. Amis and J. T. Elliott. *Biomaterials*, 25, p. 4195, 2004.
- [137] D. Yao, G. Li and M. Zong. *Chem. Lett.*, 36, p. 574, 2007.
- [138] G. Li, D. Yao and M. Zong. *Eur. Polym. J.*, 44, p. 1123, 2008.
- [139] T. Shiraiwa, M. Ohkubo, M. Kubo, H. Miyazaki, M. Takehata, H. Izawa, K. Nakagawa and H. Kurokawa. *Chem. Pharm. Bull.*, 46, p. 1364, 1998.
- [140] J. Buckingham and F. Macdonald., Eds. *Dictionary of Organic Compounds*, Chapman and Hall: London, 4, p. 4150, 1996.
- [141] S. Harusawa, K. Yoshida, C. Kojima, L. Araki and T. Kurihara. *Tetrahedron*, 60, p. 11911, 2004.

- [142] M. Kato, K. Toshima and S. Matsumura. *Biomacromolecules*, 6, p. 2275, 2005.
- [143] M. Kato, K. Toshima and S. Matsumura. *Macromol. Rapid Commun.*, 27, p. 605, 2006.
- [144] J. W. Peeters, O. van Leeuwen, A. R. A. Palmans and E. W. Meijer. *Macromolecules*, 38, p. 5587, 2005.
- [145] J. van Buijtenen, B. A. C. van As, M. Verbruggen, L. Roumen, J. A. J. M. Vekemans, K. Pieterse, P. A. J. Hilbers, L. A. Hulshof, A. R. A. Palmans and E. W. Meijer. *J. Am. Chem. Soc.*, 129, p. 7393, 2007.
- [146] E. Fischer, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, 27, p. 2985, 1894.
- [147] C. Torres, M. Bernabé and C. Otero. *Enzyme Microb. Technol.*, 25, p. 753, 1999.
- [148] 片岡良一, 後藤純一. *Mol. Sci.*, 2, NP008, 2008.
- [149] U. Roy and L. A. Luck. *Biochem. Mol. Biol. Educ.*, 35, p. 238, 2007.
- [150] S. Salmaso, A. Semenzato, S. Bersani, F. Mastrotto, A. Scomparin and P. Caliceti. *Eur. Polym. J.*, 44, p. 1378, 2008.
- [151] T. Iwaki, K. Shiota, K. A. Taweel, D. Kobayashi, A. Kobayashi, K. Suzuki, T. Yui and A. Wadano. *J. Biosci. Bioeng.*, 105, p. 26, 2008.
- [152] 株式会社 菱化システム Web Site, <http://www.rsi.co.jp/>
- [153] 中西香爾, 梶原正宏, 堤憲太郎 (訳). 有機化合物スペクトルデータ集, 講談社サイエンティフィック, 1982.
- [154] J.Niu, F. Shi, Z. Liu, Z. Wang and X. Zhang. *Langmuir*, 23, p. 6377, 2007.

本論文に関する研究発表

主論文に関する原著論文

1. “Preparation of Aliphatic Poly(thioester) by the Lipase-Catalyzed Direct Polycondensation of 11-Mercaptoundecanoic Acid”
Makoto Kato, Kazunobu Toshima, Shuichi Matsumura, *Biomacromolecules*, **2005**, 6, 2275-2280.
2. “Enzyme-Catalyzed Preparation of Aliphatic Polythioester by Direct Polycondensation of Diacid Diester and Dithiol”
Makoto Kato, Kazunobu Toshima, Shuichi Matsumura, *Macromolecular Rapid Communications*, **2006**, 27, 605-610.
3. “Enzymatic Synthesis of Polythioester by the Ring-Opening Polymerization of Cyclic Thioester”
Makoto Kato, Kazunobu Toshima, Shuichi Matsumura, *Biomacromolecules*, **2007**, 8, 3590-3596.
4. “Direct Enzymatic Synthesis of a Polyester with Free Pendant Mercapto Groups”
Makoto Kato, Kazunobu Toshima, Shuichi Matsumura, *Biomacromolecules*, in press.

その他の論文

1. “Enzyme-catalyzed Synthesis and Degradation of Polyester and Polythioester”
Shuichi Matsumura, Makoto Kato, Satoko Sugihara, Kazunobu Toshima, *Polymer Preprints*, **2006**, 47, 239-240.
2. “Chemoenzymatic Synthesis and Chemical Recycling of Sustainable Polyurethanes”
Yoshio Yanagishita, Makoto Kato, Kazunobu Toshima, Shuichi Matsumura, *ChemSusChem*, **2008**, 1, 133-142.
3. 「環境にやさしい高分子合成法」、加藤誠、松村秀一、*高分子*、**2008**, 第 57 巻、6 月号、438-441.

国際会議発表

1. “Enzyme-Catalyzed Preparation of Aliphatic Polythioesters and its Copolymers”
Makoto Kato, Kazunobu Toshima, Shuichi Matsumura, 1st International Conference on Bio-based Polymers, Riken Institute, Japan, November 12-14, 2003.
2. “Enzyme-catalyzed preparation of aliphatic polythioester and its transformation into cyclic oligomers”
Makoto Kato, Kazunobu Toshima, Shuichi Matsumura, International Symposium on Biological Polyesters, Beijing, China, August 22-27, 2004.
3. “Novel enzyme-catalyzed synthesis of polythioester and cyclic oligomers”
Makoto Kato, Kazunobu Toshima, Shuichi Matsumura、第8回生体触媒化学シンポジウム、慶應義塾大学、December 16-17, 2004.
4. “Novel Enzymatic Synthesis and Properties of Aliphatic Polythioester”
Makoto Kato, Kazunobu Toshima, Shuichi Matsumura, 10th Annual Green Chemistry and Engineering Conference, Washington D.C., U.S.A., June 26-30, 2006.
5. “Synthesis and Chemical Recycling of Polythioester Using an Enzyme”
Makoto Kato, Kazunobu Toshima, Shuichi Matsumura, GSC-AON 2007, Hitotsubashi Memorial Auditorium, Japan, March 6-9, 2007.
6. “Synthesis and Chemical Recycling of Polythioester Using an Enzyme”
Makoto Kato, Kazunobu Toshima, Shuichi Matsumura, 3rd International Conference on Green and Sustainable Chemistry, Delft, The Netherlands, July 1-5, 2007.
7. “Enzymatic Synthesis of Sulfur Containing Polymers”
Makoto Kato, Kazunobu Toshima, Shuichi Matsumura, International Symposium on Biological Polyesters ISBP 2008, Auckland, New Zealand, November 23-26, 2008.

国内学会発表

1. 「酵素触媒重合による新規ポリチオエステルの合成」
加藤誠、戸嶋一敦、松村秀一、第54回高分子学会年次会、横浜、2005年5月25-27日
2. 「酵素触媒によるジチオール - ジカルボン酸型ポリチオエステルの直接合成ならびに物性評価」
加藤誠、戸嶋一敦、松村秀一、第54回高分子討論会、山形、2005年9月20-22日

日

3. 「酵素触媒を用いた新規ポリチオエステルの合成」
加藤誠、戸嶋一敦、松村秀一、第 6 回 GSC シンポジウム、一ツ橋、2006 年 3 月 7-8 日
4. 「酵素触媒重合による高分子量ポリチオエステルの合成」
加藤誠、戸嶋一敦、松村秀一、第 55 回高分子学会年次会、名古屋、2006 年 5 月 24-26 日
5. 「ポリエステルのワンポット反応によるポリチオエステルの合成と性質」
橋本啓子、加藤誠、戸嶋一敦、松村秀一、第 55 回高分子学会年次会、名古屋、2006 年 5 月 24-26 日
6. 「酵素触媒重合による高分子量ポリチオエステルの合成と物性」
加藤誠、戸嶋一敦、松村秀一、第 55 回高分子討論会、富山、2006 年 9 月 20-22 日
7. 「酵素触媒重合によるポリ（チオ - オキシエステル）の合成」
加藤誠、戸嶋一敦、松村秀一、第 56 回高分子学会年次会、京都、2007 年 5 月 29-31 日
8. 「酵素触媒による環状チオエステルの開環重合挙動」
加藤誠、戸嶋一敦、松村秀一、第 56 回高分子討論会、名古屋、2007 年 9 月 19-21 日
9. 「側鎖チオール含有ポリエステルの酵素合成」
加藤誠、戸嶋一敦、松村秀一、第 57 回高分子学会年次会、横浜、2008 年 5 月 28-30 日
10. 「酵素触媒重合による側鎖チオール含有ポリエステルの合成と架橋化」
加藤誠、戸嶋一敦、松村秀一、第 57 回高分子討論会、大阪、2008 年 9 月 24-26 日
11. 「酵素触媒による環状チオエステルオリゴマーの合成と開環重合」
下川敬輔、加藤誠、戸嶋一敦、松村秀一、第 57 回高分子討論会、大阪、2008 年 9 月 24-26 日

謝辞

本研究を遂行するにあたり、多大なご教授、ご鞭撻、ご指導を賜り、さらには多くの国際学会で発表をさせて戴く機会を与えて下さった慶應義塾大学理工学部の松村秀一教授に心より感謝し、深く御礼申し上げます。ご指導頂いた6年間で研究の真の面白さを知ることができました。

本研究を遂行するにあたり、中間報告会等で数々の貴重なご意見を賜りました慶應義塾大学理工学部の戸嶋一敦教授に深く感謝致します。

本論文の作成にあたり、数々の有益なご意見、ご指導を賜りました慶應義塾大学理工学部の川口春馬教授、慶應義塾大学薬学部の須貝威教授に深く感謝致します。

MOEの利用法などについて適切な助言を下さいました慶應義塾大学理工学部の高橋大介助教に感謝申し上げます。

博士課程で研究を行うにあたり、文部科学省21世紀COEプログラム「慶應義塾大学・機能創造ライフコンジュゲートケミストリー(LCC)」にご支援頂きましたことに感謝の意を表します。

特別研究員として採用頂き、研究費等ご支援頂きました日本学術振興会に感謝の意を表します。

研究を一から指導して戴き、適切な助言をして下さった松村研究室OBの鈴木陽一博士、小山内靖博士、添田泰之博士、江端洋樹博士に心より感謝申し上げます。有意義な研究生生活を送る上で欠かせなかった松村研究室、戸嶋研究室の先輩方、同輩、後輩の皆様に感謝致します。また、イオウ化合物独特の臭いを嫌な顔せずを受け入れて下さった同じ西部屋で研究を進めてきた仲間たちに深く感謝致します。

最後になりましたが、長期にわたる学生生活を支えて下さいました両親に対して厚く御礼を申し上げます。

2009年2月

慶應義塾大学大学院理工学研究科
基礎理工学専攻 生物化学専修
生体機能分子化学研究室