

## ハイスループット核磁気共鳴装置の使用で得られた研究成果

倉持 甚也\*<sup>1</sup>, 高石 和人\*<sup>2</sup>, 横山 明弘\*<sup>3</sup>, 坪村 太郎\*<sup>3</sup>, 戸谷 希一郎\*<sup>4</sup>

### Research Results Obtained by the Use of High-Throughput Nuclear Magnetic Resonance System

Jinya KURAMOCHI\*<sup>1</sup>, Kazuto TAKAISHI\*<sup>2</sup>, Akihiro YOKOYAMA\*<sup>3</sup>,  
Taro TSUBOMURA\*<sup>3</sup>, Kiichiro TOTANI\*<sup>4</sup>

**ABSTRACT** : The nuclear magnetic resonance (NMR) system was an indispensable measurement equipment and used in a variety of chemical research areas. The ladder-ratio of synthesized polyamide was estimated by the integral values of <sup>1</sup>H NMR spectra. The structure of metal complexes was determined by <sup>1</sup>H, <sup>19</sup>F and <sup>31</sup>P NMR spectra. The <sup>1</sup>H NMR was also used to elucidate the structure of synthesized oligosaccharide.

**Keywords** : nuclear magnetic resonance, ladder polymer, metal complex, oligosaccharide

(Received September 20, 2013)

### 1. はじめに

化学は原子や分子、物質の変化を扱う研究分野であるが、原子や分子を直接見ることはほとんど出来ない。そのため、各種の分光学的な手法を用い、原子や分子の状態を調べる必要がある。核磁気共鳴装置(以下、NMR と略す)は、サンプルを強磁場中に置くことにより原子核のスピンの状態を変化させ、そこに電磁波を照射してシグナルを得る装置である。得られたシグナルの解析により、分子を構成している水素や炭素、リンなどの原子核の状態を知ることができるため、無機・有機・高分子化合物の構造を決定する上で最も強力な装置であり、現在の化学分野の研究において NMR は必須の汎用機器となっている。この半世紀の合成化学や天然物化学の目覚ましい発展が、NMR 技術の進歩によって支えられてきたことも自明である。

これまでに本学では、1996 年度に導入された NMR 装置の老朽化が進み、維持や安全管理の面で装置の更新

を強く希望していた。また近年、NMR に使用される超伝導磁石の高性能化やデータ処理の高速化が進み、それに伴い新たな測定手段が次々と開発され、NMR 装置は単なる低分子化合物の構造決定のための機器ではなくなり、生命科学分野へ応用範囲を急速に広げている。このような観点に基づき、迅速に多くの情報が得られる最新の高性能 NMR 装置を整備して積極的な研究の展開を図るため、2009 年度に日本電子株式会社製の核磁気共鳴装置 JNMECA-500 を購入した。

本装置は理工学部物質生命理工学科の様々な研究室で使用されており、それぞれの分野における研究の進展に大きく貢献している。本論文では有機化学研究室と応用錯体化学研究室および生体分子化学研究室で行われた研究のうち、本装置の使用によって得られた成果について報告する。

### 2. ラダーポリアミドの構造解析

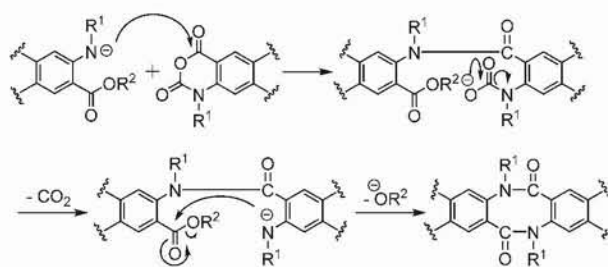
多段階反応により合成されるラダーポリマーは構造欠損を含むことが多い。そこで有機化学研究室では、モノマー間に二つのアミド結合を連続的に構築すれば構造欠損のないラダーポリアミドが得られると考え、スキーム 1 に示した反応を開発した<sup>1)</sup>。

\*1 : 理工学研究科理工学専攻博士前期課程

\*2 : 理工学部物質生命理工学科助教

\*3 : 理工学部物質生命理工学科教授 (ayokoyama@st.seikei.ac.jp)

\*3 : 理工学部物質生命理工学科准教授



Scheme 1 Reaction mechanism.

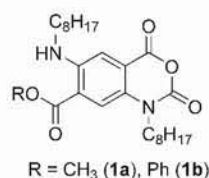


Figure 1 Structure of monomers.

これまでに図 1 に示したメチルエステルモノマー **1a** を用いた重合を検討したところ、脱離成分として放出されたメトキシドアニオンがモノマーや重合生長末端を攻撃し、重合を阻害することがわかった。そこで本研究では、副反応を抑制して高分子量体を得るために、フェニルエステルモノマー **1b** を用いた重合を検討した。

出発原料のコハク酸ジメチルから 7 工程で **1b** を合成し、その重合を検討した。THF 中、**1b** に対して塩基としてリチウムヘキサメチルジシラジド (LiHMDS) を作用させて 0-50 °C で重合させたところ、反応温度を高くすると高分子量の生成物が得られ、50 °C の重合で  $M_n = 4300$  の生成物が得られた (Table 1, Entry 1-3)。<sup>1</sup>H NMR による解析から、得られた生成物にはラダー化していない部分が多くあることがわかった。重合中の環化反応を促進するために、添加剤として *N,N,N',N'*-テトラメチルエチレンジアミン (TMEDA) を加えて 0-50 °C で重合を行ったところ、50 °C のときに生成物の分子量が最も大きくなった (Table 1, Entry 4-6)。

本重合で得られたポリアミドには、先に Scheme 1 で

Table 1. Polymerization of **1b** with LiHMDS in THF<sup>1</sup>

Entry	Additive	Temp (°C)	Time (h)	$M_n$	$M_w/M_n$
1	—	0	48	3020	1.32
2	—	rt	53	3580	1.45
3	—	50	48	4300	2.33
4	TMEDA	0	48	2480	1.30
5	TMEDA	rt	48	3060	1.42
6	TMEDA	50	48	3370	1.60

<sup>1</sup>Polymerization of **1b** was carried out in the presence of LiHMDS (1.0 eq) with/without TMEDA (5.0 eq) in THF

示した反応機構によってラダー型の骨格になっている部分と、スキーム 1 の途中の段階で反応が止まり、モノマーユニットが 1 本のアミド結合だけでつながった部分があると考えられる。そこで、その比率を求めるために、1 本のアミド結合をもつモデル化合物 **2** と 2 本のアミド結合をもつモデル化合物 **3**、および重合で得られたポリマーの <sup>1</sup>H NMR を比較した (Fig. 2)。**2** の <sup>1</sup>H NMR より、アミド結合が 1 本だけ生成した部分では、アミノ基の隣にあるメチレンプロトンのシグナルが 3.1 ppm 付近に 2H のシグナルを与え、アミド基の隣にあるメチレンプロトンのシグナルが 3.5-4.2 ppm 付近に 2H のシグナルを与えることが分かる。一方、**3** の <sup>1</sup>H NMR より、環状構造になった場合にはアミド基の隣にあるメチレンプロトンのシグナルが 3.4 ppm 付近と 4.3 ppm 付近にそれぞれ 2H のシグナルを与えることが分かる。それらの知見をもとにポリマーの <sup>1</sup>H NMR を解析すると、2.7-3.9 ppm 付近に 5.08 H のシグナルがあり、3.9-4.8 ppm 付近に 2.00 H のシグナルがあることから、このポリマーにはラダー化した部分が 57%、1 本のアミド結合でつながれた部分が 43% の比率で構成されていることが分かった。

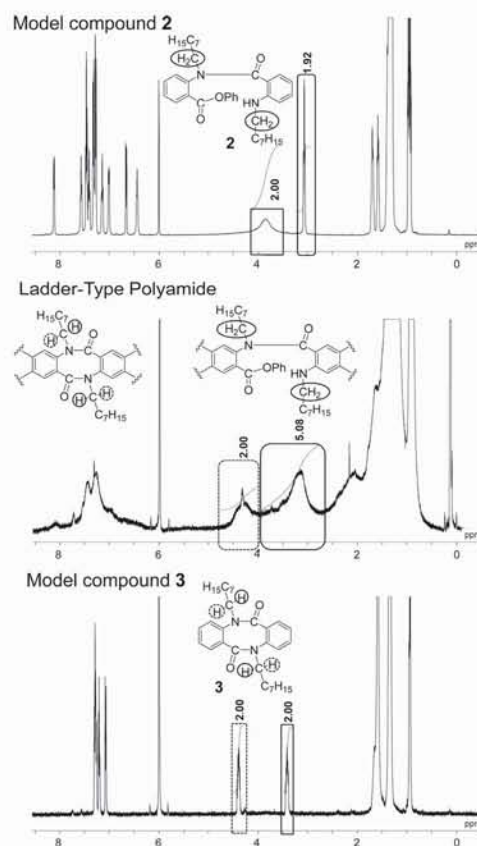
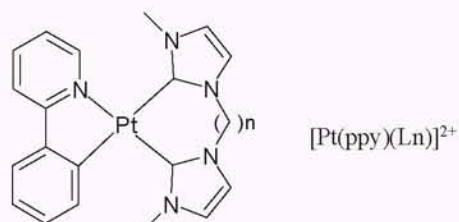


Figure 2 <sup>1</sup>H NMR spectra of polyamide and model compounds **2** and **3** in 1,1,2,2,-tetrachloroethane-*d*<sub>2</sub> at 100 °C.



### 3. 金属錯体の合成と構造

応用錯体化学研究室において行っている新規の化合物合成の研究においては、得られた物質の構造を同定することは必須の条件であり、このためには NMR から得られる情報は極めて有用である。ここでは最近の研究においてどのように NMR を用いたかを紹介したい。



Uesugi らはフェニルピリジン配位子とキレートカルベン配位子を含む一連の白金錯体を合成し、これらが紫外線励起下において白金錯体としては極めて高い量子効率をもつて (>50%)、溶液中で発光を示すことを見いだした<sup>2)</sup>。この錯体の構造は X 線構造解析によって決定したが、例えば  $[\text{Pt}(\text{ppy})(\text{L1})]^{2+}$  の場合、カルベン間のメチレン基の 2 つのプロトンが 6.2 ppm に四重線で観測され、溶液中でもカルベンキレートの構造が固定されていることが判明した (Fig. 3)。

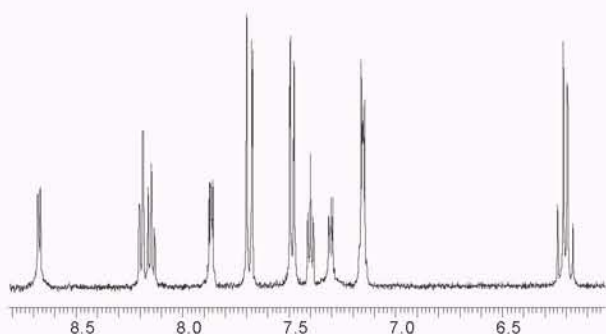
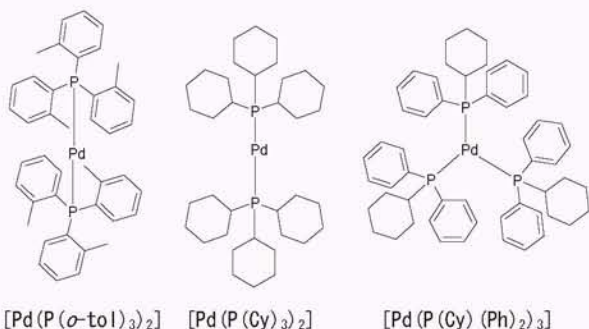


Figure 3  $^1\text{H}$  NMR spectrum of  $[\text{Pt}(\text{ppy})(\text{L1})]^{2+}$  measured in  $\text{DMSO}-d_6$ .

Ohkubo らは、各種の単座ホスフィンを含むパラジウム(0) 錯体が強い発光を示すことを見いだした。興味深いことに、ホスフィンの種類によって発光色が青からオ



レンジまで変化する。これらの錯体の構造も X 線構造解析によって決定したが、 $^{31}\text{P}$  核の NMR の測定の結果、これらの錯体のシグナルは -7.0~27.7 ppm の範囲に一本ずつ観測され、溶液中でも一種類の化学種として存在していることを明らかにした<sup>3)</sup>。また、対応する白金(0) 錯体の研究も行っており、例えば  $[\text{Pt}(\text{P}(m\text{-tol}))_3]$  錯体の場合は Fig. 4 に示すとおり、溶液中で三本に分裂したシグナルを与えるが、これはリン原子が白金核に結合している証拠となっている。

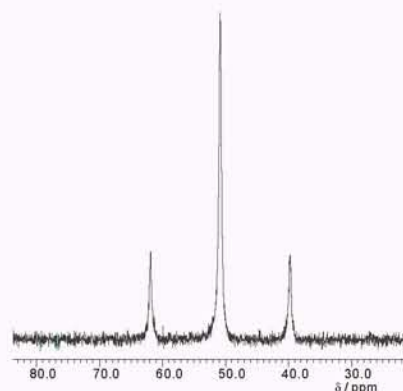


Figure 4  $^{31}\text{P}$  NMR spectrum of  $[\text{Pt}(\text{P}(m\text{-tol}))_3]$  in  $\text{toluene}-d_8$  solution.

多くの遷移金属イオンは、水溶液中では水が 6 個配位した  $[\text{M}(\text{H}_2\text{O})_6]^{n+}$  型の錯イオンとなっていることが知られている。例えばニッケル(II) イオンを含む水溶液中の色が緑色であり、また銅(II) イオンの場合はピンク色となるのは、イオンそのものの色を見ているのではなく、上記のような錯イオンの色を見ていることになるということによく知られている。Takao らは、陽イオンと陰イオンからなる塩であるにもかかわらず室温付近でも液体となっているイオン液体中に  $[\text{M}(\text{H}_2\text{O})_6]^{n+}$  を含む塩を溶かすと自然に脱水和が生じ、水溶液中の色と異なることを発見した<sup>4)</sup>。例えば  $[\text{Co}(\text{H}_2\text{O})_6]\text{BF}_4$  を水に溶解するとピンク色となるが、イオン液体であるテトラフルオロホウ酸エチル-3-メチルイミダゾリウムに溶解すると青色溶液となる。EXAFS および  $^1\text{H}$  核、 $^{19}\text{F}$  核の NMR スペクトルの測定結果から溶液中の構造を研究し、金属種には水分子が 4 つ結合し、イオン液体を構成する分子は金属の近傍には存在しないことを示した。

以上のように有機化学のみならず無機イオンを含む錯体化学においても様々な核種や手法の NMR を駆使して研究を行っている。

#### 4. オリゴ糖合成における構造解析

糖鎖は核酸、タンパク質と並ぶ第三の生体高分子であり、主にタンパク質や脂質に付加して、糖タンパク質や糖脂質として細胞機能の調節に寄与している。生体分子化学研究室では糖鎖機能解析を志向したオリゴ糖合成の過程で、NMR をそれらの構造解析に活用しているのを報告する。

糖鎖合成は高度にデザインされた糖供与体と糖受容体を用いて、望みの位置および立体でグリコシル化を繰り返すことで達成される。その際、位置選択性は保護基の適切な導入によって確実に制御できるが、グリコシド結合形成に伴う  $\alpha$ - $\beta$ -選択性の制御は、糖鎖合成における最も挑戦的な課題のひとつである。とくに望みのグリコシド結合と隣接する 2 位水酸基が不安定な 1,2-*cis* 配置の場合、立体選択的なグリコシル化には工夫を要する。

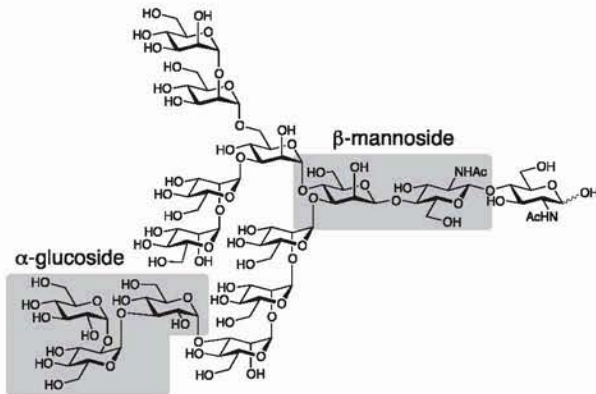


Figure 5 Structure of  $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$

生体分子化学研究室では小胞体型糖タンパク質糖鎖の合成と利用に取り組んでおり<sup>56)</sup>、 $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$  型 14 糖の合成研究においては、いくつかの興味深いアプローチでこの問題の解決に取り組んでいる。例えば Fig. 5 中に示した  $\alpha$ -グルコシド結合の構築には、アノマー位における双極子モーメントの安定性を利用して  $\alpha$ -結合を構築する手法（アノマー効果）を用いた。一般的にこの手法は  $\alpha$ -グルコシドを優先的に与えるが、立体選択性を完全に制御できるほど強力ではない。そこで我々は、糖供与体の 2 位水酸基の保護基として電子供与性の *t*-butyldimethylsilyl (TBS) 基を用いることで、アノマー効果の増強を図った。その結果、反応は完全に  $\alpha$ -選択的に進行し、望みの 3 糖を高収率かつ高立体選択的に与えることが分かった (Fig.6)。一方、保護基として TBS 基の代わりにベンジル基を用いると、グリコシル化の立体選択性は 5:1 程度に低下した。生成物の立体配置は、<sup>1</sup>H NMR によってグリコシド結合にまつわるアノマープロトンの

カップリング定数に基づいて決定した。Karplus 曲線によれば、 $\alpha$ -グルコシドのカップリング定数は 3-4 Hz であるが、 $\beta$ -グルコシドは 8-9 Hz を与え、両者を容易に区別できる。

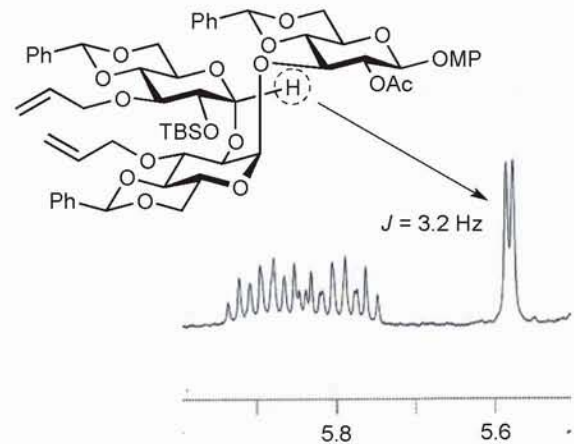


Figure 6  $\alpha$ -Selective glucosylation using TBS group.

また Fig. 5 中の  $\beta$ -マンノシドは最も構築の難しい 1,2-*cis* 型グリコシドである。我々はこの結合の構築を、容易に立体制御可能な  $\beta$ -グルコシド (1,2-*trans*) として形成後、導入したグルコース残基の 2 位水酸基を立体反転させる方法で達成した (Fig. 7)。グルコース残基の 2 位水酸基を酸化して、いったんケト基とした後、水素化ホウ素ナトリウムによって還元すると、ヒドリドの攻撃がグリコシド結合や 3 位水酸基の結合方向に対して *trans* の方向から優先的に起こり、アキシアル水酸基を有するマンノース型骨格を生成した。これにより、あらかじめ構築しておいたグリコシド結合は、結果として望みの  $\beta$ -マンノシドに変換することができた。生成物の  $\beta$ -マンノシドへの変換は、基質と生成物の <sup>1</sup>H NMR スペクトルを比較し、アノマープロトンのカップリング定数が前述の原理に基づいて大きく変化することを指標に同

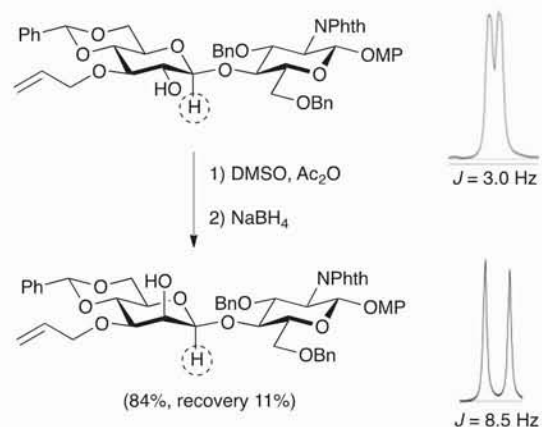


Figure 7 Stereo-inversion of  $\beta$ -glucoside.



定した。

このように NMR は生体高分子の化学合成においても、研究を支える強力な分析機器として駆使されている。

## 5. むすび

ここに紹介した研究内容は、本装置でこれまでに得られた成果の一部である。各研究室ではこれまでに、様々な核種の一次元測定や、原子の結合や距離の相関を調べるための二次元測定を行い、化合物の構造決定だけでなく、溶液中における分子の解離や結合、あるいはコンフォメーション変化などの動的解析を行ってきた。今後も本装置を用いることによって、多くの素晴らしい研究成果が得られるものと期待される。

## 参考文献

- 1) Yokoyama, A.; Karasawa, M.; Taniguchi, M.; Yokozawa, T. *Chem. Lett.* **2013**, *42*, 641–642.
- 2) Uesugi, H.; Tsukuda, T.; Takao, K.; Tsubomura, T. *Dalton Trans.* **2013**, *42*, 7396–7403.
- 3) Ohkubo, T.; Takao, K.; Tsubomura, T. *Inorg. Chem. Commun.* **2012**, *20*, 27–29.
- 4) Takao, K.; Tone, C.; Hennig, S.; Inoue, T.; Tsubomura, T. *Inorg. Chem.* **2012**, *51*, 4850–4854.
- 5) Iwamoto, S.; Isoyama, M.; Hirano, M.; Yamaya, K.; Ito, Y.; Totani, K. *Glycobiology* **2013**, *23*, 121–131.
- 6) Matsushima, H.; Hirano, M.; Ito, Y.; Totani, K. *ChemBioChem* **2013**, *14*, 753–758.