

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 27 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K17933

研究課題名(和文) DNAから生まれるキラル空間の制御による革新的金属酵素の創製

研究課題名(英文) Development of DNA Metalloenzymes Using a Rational Design Approach

研究代表者

朴 昭映 (Park, Soyoung)

京都大学・理学研究科・助教

研究者番号：10628556

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：最近申請者は、DNAのリン酸骨格にピピリジン配位子を導入する方法を確立し、精密制御可能なDNA金属酵素を開発することに成功している。本研究では、多様なDNA塩基配列と金属イオンの組み合わせを基盤とするDNA金属酵素ライブラリーを構築し、 α,β -不飽和ケトンの水化反応不斉反応を行った結果、87%という高い選択性で生成物を得ることに成功した。本研究は自然界の加水酵素の機能をDNAで代替できる可能性を示唆する有意義な結果である。さらに、申請者が開発したDNA金属酵素では右巻きのらせん不斉を保ったまま、既存の超分子集合型DNAハイブリッド触媒とは逆のエナンチオマーが得られることも確認している。

研究成果の概要(英文)：DNA is one of the most plentiful and naturally occurring helical polymers on earth. Recently, this ubiquitous helical polymer has gathered attention as a chiral source for asymmetric synthesis. Our group is exploring the potential of DNA for asymmetric synthesis. To understand the structural and mechanistic features of DNA-based asymmetric catalysis, we have established a systematic strategy for the development of DNA hybrid catalyst based on the direct incorporation of an intrastrand bipyridine ligand into the DNA phosphate backbone and demonstrated its application to the asymmetric reactions. Herein, we report on the enantioselective hydration of α,β -unsaturated ketones using a modular DNA-based hybrid catalyst containing an intrastrand bipyridine ligand. The chiral β -hydroxy ketone product was obtained in up to 87% enantioselectivity.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：DNA 金属酵素 ハイブリッド触媒 不斉合成

1. 研究開始当初の背景

DNA 二重らせん構造は、今や分子生物学のみならず、DNA ナノテクノロジーを含む様々な研究分野において関心を集めている。これまでは遺伝情報の保存と伝達という観点から DNA の二重らせん構造の役割が注目されてきたが、DNA の二重らせん構造は、不斉合成における不斉源としても用いることができる。DNA を不斉源とする反応は、2005年 Feringa らが、銅を用いる Lewis 酸触媒反応を報告して以来、世界的に注目を浴びている。また、らせん構造に由来するキラリティーを不斉合成反応に用いる研究はすでに盛んに進められているが、これらは、人工的に設計・合成された高分子や超分子を使用する 경우가多く、DNA のらせん構造をそのまま触媒反応に応用する本研究は、未踏領域への挑戦となり、学術的、産業的にも、今後、大きなインパクトを与えるものである。申請者は、DNA を不斉源として触媒反応に用いる研究に大きな可能性を感じ、2010年より、この研究を開始した (*Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 3870)。

最近申請者は、DNA のリン酸骨格にビピリジン配位子 (非核酸型リンカー) を導入する方法を確立し、反応場の制御できない超分子アセンブリ型 DNA ハイブリッド触媒の欠点を克服した、精密制御可能な DNA ハイブリッド触媒を開発することに成功している。例えば、分子内 Friedel-Crafts アルキル化反応において、多環インドール誘導体を高い選択性で (up to 86% ee) 得ることに成功し、活性部位の DNA 塩基が不斉反応に与える影響を解明した (*ACS Catal.* **2014**, *4*, 4070. *Chem. Phys. Lett.* **2014**, *600*, 87)。さらに、配位子やリンカーなど人工的な官能基を導入することなく DNA と金属イオンの相互作用のみで不斉 Diels-Alder 反応が進行することを見出し、タンパク質酵素、RNA 酵素とは異なる新しいタイプの金属酵素として DNA 金属酵素を開発することにも成功している (*ACS Catal.* **2015**, *5*, 4708)。

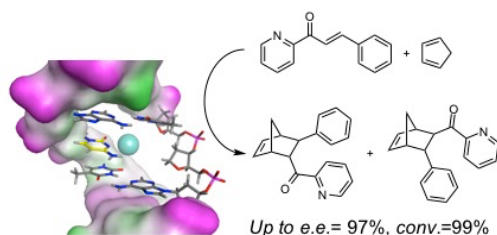


図1 DNA からなる空間 (space) が触媒機能 (catalysis) を生み出す ; DNA-based asymmetric Diels-Alder reaction

2. 研究の目的

本研究では、DNA のユニークならせん構造に由来する特徴的なキラル空間に着目し、この空間を高度に制御することで、新しい概念の DNA 金属酵素を開発し、機能性生体分子としての DNA を応用した持続可能な合成戦略を確立することを目標とする。本研究により、生命化学と触媒化学、DNA ナノテクノロジーという多様な研究分野を融合した学際的な研究領域を開拓し、未来を先導する革新的技術として確立することを目的に掲げる。

3. 研究の方法

DNA を活用した持続可能な合成戦略を確立するため、DNA の天然塩基 (A, T, G, C) あるいは配位子を導入した DNA 金属酵素を設計し、高度に設計・制御されたナノサイズのキラル空間を反応場として触媒的不斉合成を行った。すなわち、DNA 特有の相補性と優れた自己組織化能力を利用した bottom-up 手法を生かして多様な DNA 塩基配列と金属イオンの組み合わせを基盤とする DNA 金属酵素ライブラリーを構築し、さらなる酵素的能・ユーティリティーの向上を目指したスクリーニングを行った。

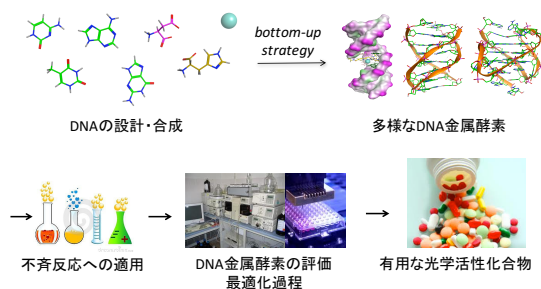


図2 DNA 金属酵素の開発

(1) ビピリジン配位子を含むモノマーの設計と合成 : 市販されている 2,2'-ビピリジン-5,5'-ジカルボン酸を基質としてアルキルリンカーを導入したモノマー合成を行った。

(2) DNA 金属酵素の設計と合成 : モノマーをホスホロアミダイト化した後、自動合成機に導入することで、設計した場所に配位子を有するオリゴヌクレオチドを合成した。

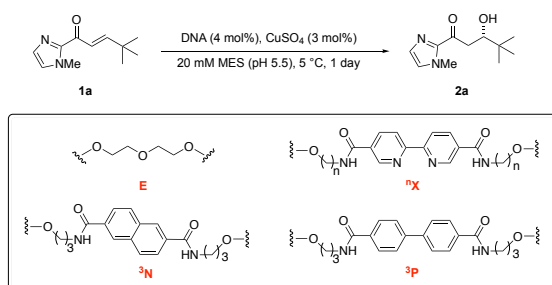
(3) DNA 金属酵素を用いた α,β -不飽和ケトン化合物の選択的不斉水和反応

(4) DNA を反応場とする触媒的不斉合成の反応機構の解明 : DNA の立体構造から生じる不斉環境の詳細については、実験での検討とともに分子モデリング研究を並行して行った。

4. 研究成果

DNA 鎖の中心にビピリジン配位子を導入した ODN1 または ODN2 (13 塩基) とその相補鎖になる ODN3-ODN10 (13 塩基) を設計・合成した後、Cu(II)イオンと組み合わせることで DNA 金属酵素を構築した。また、ODN8 の中心にはエチレングリコールリンカーを ODN9-10 の中心にはナフタレンやビフェニル基のような嵩高い骨格を有するリンカーを導入し、活性部位の立体環境を制御した。

Table 1. ビピリジン配位子を含む DNA 金属酵素を用いた不斉水和反応



entry	DNA sequences	ee (%)
1	5'-GCATGG ³ XCACGGT-3' (ODN1) 3'-CGTACC ³ CGTGCCA-5' (ODN3)	64
2	5'-GCATGG ³ XCACGGT-3' (ODN1) 3'-CGTACC ³ AGTGCCA-5' (ODN4)	57
3	5'-GCATGG ³ XCACGGT-3' (ODN1) 3'-CGTACC ³ TGTGCCA-5' (ODN5)	54
4	5'-GCATGG ³ XCACGGT-3' (ODN1) 3'-CGTACC ³ GGTGCCA-5' (ODN6)	53
5	5'-GCATGG ³ XCACGGT-3' (ODN1) 3'-CGTACC ³ dSGTGCCA-5' (ODN7)	45
6	5'-GCATGG ³ XCACGGT-3' (ODN1) 3'-CGTACC ³ EGTGCCA-5' (ODN8)	51
7	5'-GCATGG ³ XCACGGT-3' (ODN1) 3'-CGTACC ³ NGTGCCA-5' (ODN9)	65
8	5'-GCATGG ³ XCACGGT-3' (ODN1) 3'-CGTACC ³ PGTGCCA-5' (ODN10)	65
9 ^a	5'-GCATGG ⁶ XCACGGT-3' (ODN2) 3'-CGTACC ³ PGTGCCA-5' (ODN10)	87

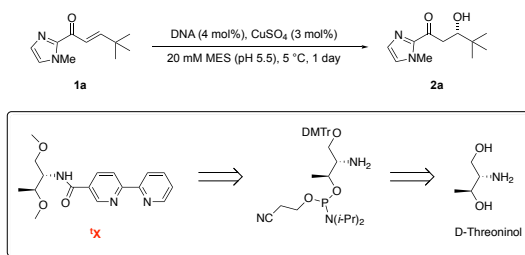
^a 15 mol% DNA was used.

モデル化合物として α,β -不飽和 2-アシルイミダゾール (**1a**) を用いて Table 1 のような反応条件下で (MES = 2-morpholinoethanesulfonic acid) 水の付加反応を行ったところ、良好なエナンチオ選択性で β -ヒドロキシケトン化合物 (**2a**) が得られた。生成物のエナンチオ選択性はビピリジン配位子 ("X") のリンカーの長さや相補鎖 (ODN8~ODN10) の中心に導入したリンカーの骨格に大きく依存することがわかった。

Entry 9 で示したように、ヘキシルリンカーでビピリジン配位子を導入した ODN2 とビフェニルリンカーを含む ODN10 の組み合わせによる DNA 金属酵素を用いた場合、87% という最も高いエナンチオ選択性で目的物 **2a** が得られた。

また、D-Threoninol (Asanuma, H. et. al. *Chem. Eur. J.*, **2013**, *19*, 14151) をリンカーとしてアミド結合によりビピリジン配位子を導入した DNA 金属酵素を開発した (Table 2)。 α,β -不飽和 2-アシルイミダゾール (**1a**) を用いて水の付加反応を行った結果、いずれの場合でも反応が進行し、中程度のエナンチオ選択性で β -ヒドロキシケトン化合物 (**2a**) が得られた。最適条件としては、Table 1 と同様にビフェニルリンカーを含む ODN10 との組み合わせによる DNA 金属酵素 (ODN11/ODN10) が最も高いエナンチオ選択性を与え、87% ee で目的物 **2a** が得られた。

Table 2. D-Threoninol-ビピリジン配位子を含む DNA 金属酵素の開発と不斉水和反応



entry	DNA sequences	ee (%)
1	5'-GCATGG ⁶ XCACGGT-3' (ODN11) 3'-CGTACC ³ CGTGCCA-5' (ODN3)	64
2	5'-GCATGG ⁶ XCACGGT-3' (ODN11) 3'-CGTACC ³ AGTGCCA-5' (ODN4)	54
3	5'-GCATGG ⁶ XCACGGT-3' (ODN11) 3'-CGTACC ³ TGTGCCA-5' (ODN5)	64
4	5'-GCATGG ⁶ XCACGGT-3' (ODN11) 3'-CGTACC ³ GGTGCCA-5' (ODN6)	64
5	5'-GCATGG ⁶ XCACGGT-3' (ODN11) 3'-CGTACC ³ dSGTGCCA-5' (ODN7)	54
6	5'-GCATGG ⁶ XCACGGT-3' (ODN11) 3'-CGTACC ³ EGTGCCA-5' (ODN8)	64
7	5'-GCATGG ⁶ XCACGGT-3' (ODN11) 3'-CGTACC ³ NGTGCCA-5' (ODN9)	66
8 ^a	5'-GCATGG ⁶ XCACGGT-3' (ODN11) 3'-CGTACC ³ PGTGCCA-5' (ODN10)	87

^a 15 mol% DNA was used.

そこで、entry 9 (Table 1) の配列を最適条件として、気質適用範囲について検討した (図 3)。 α,β -不飽和 2-アシルイミダゾールのベータ位がシクロヘキシル基やイソプロピル基の場合、良好なエナンチオ選択性で目的物が

得られた (**2b**:77% ee, **2c**:68% ee)。しかし、 α,β -不飽和 2-アシルイミダゾールのベータ位が *n*-ペンチル基の場合、エナンチオ選択性は大きく低下した (**2e**:31% ee)。エノン化合物のイミダーズル基をピリジル基に変えても反応は進行し、有効なエナンチオ選択性で目的物が得られた (**2d**:63% ee)。

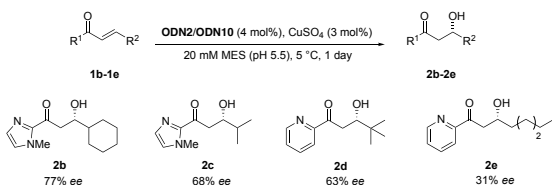
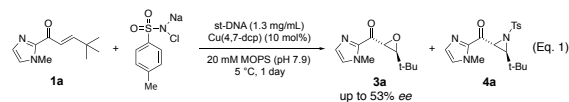


図 3. DNA 金属酵素を用いた不斉水和反応の基質適用範囲

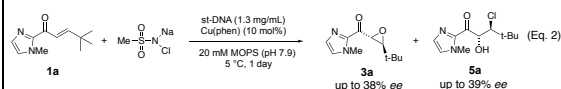
一方、今回開発した DNA 金属酵素は既存の超分子アセンブリ型 DNA ハイブリッド触媒 (Roelfes, G. et. al. *Nature Chem.* **2010**, *2*, 991) とは逆の絶対立体配置をもつ生成物を与えることがわかった。これは DNA のらせん不斉を反転することなく活性部位のみを制御するだけでエナンチオマーの選択性を逆転させることを見出した興味深い結果である。自然界の加水酵素 (hydratase) のように温和な条件下で水の付加反応を行う有機金属触媒の開発は非常に難しい挑戦的なテーマである。今回我々は、DNA 金属酵素を用いて α,β -不飽和ケトンの水和反応を行い、87%という高い選択性で生成物を得られることに成功した。これは既知の酵素の機能を、DNA で代替できる可能性を示唆する重要な結果である。

クロラミン T (*N*-クロロ-*N*-ソジオ-*p*-トルエンスルホンアミド) は安価で取り扱い容易な試薬としてアジリジンの合成などによく用いられている。 α,β -不飽和 2-アシルイミダゾール (**1a**) を用い、クロラミン T、DNA ハイブリッド触媒存在条件下で (MOPS = 3-(*N*-morpholino)propanesulfonic acid) 反応を行ったところ、アジリジン **4a** だけでなくエポキシド **3a** も同時に得られ、さらにエポキシドのみがエナンチオ選択的に得られることを見出した (式 1)。これは、DNA ハイブリッド触媒を用いた不斉エポキシ化反応として初めての例になる。



また、クロラミン T のトシル基部位をメシル基に置換した、クロラミン M (*N*-クロロ-*N*-

ソジオ-メチルスルホンアミド) を用いて同様の反応を行った結果、アジリジン **4a** は得られず、エポキシド **3a** とクロロヒドリン **5a** がエナンチオ選択的に得られた (式 2)。



今後は、生成物の収率・エナンチオ選択性の向上のため、触媒の金属・配位子の検討を行う予定である。

また、申請者は珪素化合物と第四級アンモニウムカチオンを利用した DNA ミネラル化法を応用することによって銅-ピリジン複合体を含む DNA を固体化し、新しいコンセプトの触媒を開発した (図 4)。

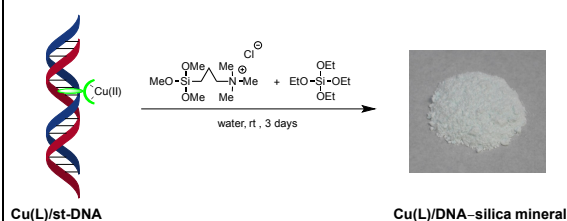


図 4. Cu-(L)/DNA-シリカミネラルの合成

Cu-dmbpy/DNA-シリカミネラルを触媒として用いて Diels-Alder 反応を行った結果、高いエナンチオ選択性で生成物を得ることを確認し (up to 99% ee)、10 回繰り返して使用できることに成功した (Table 3, *Chem. Lett.* **2017**, *46*, 1165)。固体触媒反応は、均一系の液相有機合成反応に比べて生成物の単離が容易であり、また、触媒の回収や再利用に適した方法であることから、グリーンケミストリーの実現に大きく寄与できる。

Table 3. 再利用可能な Cu-dmbpy/DNA-シリカミネラルを用いた asymmetric Diels-Alder reaction

	cycles	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
ee (%) ^a		99	98	99	99	99	99	99	98	97	98
conversion (%) ^a		97	85	89	79	92	91	82	80	80	77

^a conversion and ee were determined by HPLC analysis.

今後は、DNA の相補性と自己組織化能力を利用した bottom-up 手法で構築する DNA 金属酵素ライブラリーを基盤として特定の反応に対応するオーダーメイド型金属酵素を開発

し、実用的・環境調和的な合成プロセスを確立したい。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

1. Okamura, I.; Park, S.; Han, J. H.; Notsu, S.; Sugiyama, H. **A Combination of Visible-Light Photoredox and Metal Catalysis for the Mannich-Type Reaction of N-Aryl Glycine Esters.** *Chem. Lett.* **2017**, *46*, 1597–1600.

2. Sakashita, S.; Park, S.; Sugiyama, H. **Copper-containing DNA–Silica Mineral Complexes for the Asymmetric Diels–Alder Reaction.** *Chem. Lett.* **2017**, *46*, 1165–1168.

3. Han, J. H.; Yamamoto, S.; Park, S.; Sugiyama, H. **Development of a Vivid FRET System Based on a Highly Emissive dG–dC Analogue Pair.** *Chem. Eur. J.* **2017**, *23*, 7606–7613.

4. Okamura, I.; Park, S.; Hiraga, R.; Yamamoto, S.; Sugiyama, H. **Synthesis, Photophysical Properties, and Enzymatic Incorporation of an Emissive Thymidine Analogue.** *Chem. Lett.* **2017**, *46*, 245–248.

[学会発表] (計 4 件)

1. Park, S.; Yum, J.; Sugiyama, H. **Design and Application of DNA Hybrid Catalyst for Asymmetric Catalysis.** 日本化学会 第98春季年会、2018年3月20日、日本大学 (日本)

2. Park, S. **Development of DNA Hybrid Catalyst for Asymmetric Synthesis.** OMCOS19 (The 19th IUPAC International symposium on Organometallic Chemistry Directed Towards Organic Synthesis)、2017年6月26日、Jeju (韓国)

3. Park, S. **Development of DNA Hybrid Catalyst for Asymmetric Synthesis.** 招待講演、2017年6月7日、Yeungnam University (韓国)

4. Park, S. **Development of DNA Metalloenzymes Using a Rational Design Approach for Asymmetric Synthesis.** 招待講演、2016年6月5日、Pohang University of Science and Technology (韓国)

[その他]

ホームページ

<http://kuchem.kyoto-u.ac.jp/chembio/dna.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

朴 昭映 (Park Soyoung)

京都大学大学院 理学研究科 助教

研究者番号：10628556