

機関番号：3 2 6 1 2

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：2 0 5 8 0 1 1 4

研究課題名（和文） 微生物酵素触媒と有機合成を相補的に活用する有用物質生産

研究課題名（英文） Fine chemical production by complementary use of microbial catalysts and organic synthesis

研究代表者

須貝 威（SUGAI TAKESHI）

慶應義塾大学・薬学部・教授

研究者番号：6 0 1 7 1 1 2 0

研究成果の概要（和文）：基質の分子設計、スクリーニング両面を重視し、新機能、特色を持つ酵素反応を探索した。中間体の大量供給を可能とする実用的合成経路についても検討した。具体的成果として、グリカール誘導体の位置選択的脱保護を可能にする加水分解酵素、エポキシドヒドロラーゼの新規機能開拓や評価、遠隔位不斉中心を識別するリパーゼ触媒のプロープについて検討し、シアリダーゼ阻害剤や微量分析試薬の新合成法開拓に貢献した。

研究成果の概要（英文）：On the screening of biocatalysts for the key steps in the total synthetic schemes, molecular design of substrates for enzyme-catalyzed reactions was thoroughly elaborated. Practical synthetic schemes themselves approaching key intermediates were also studied. As the results, three major methods for preparation were achieved: 1) the exploration of hydrolyzing enzymes which regioselectively treat the hydroxy and acyloxy groups in glycal derivatives; 2) development of new functions of an epoxide hydrolase through the substrate specificity study; 3) synthesis of the unique fluorine-containing aromatic substances which probe the recognition of remote chirality in the catalytic site of lipases. Based on them, novel and expeditious synthetic routes for sialidase inhibitors and a chiral analyzing agent for trace amount of biomolecules were established.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・生物生産化学・生物有機化学

キーワード：有機化学、バイオリクター、酵素、応用微生物

1. 研究開始当初の背景

希少な触媒資源を散逸的に消費し、また石油などの化石燃料を基盤とするような化学合成は、生命活動そのものに伴う触媒作用や生産物によって代替してゆくことが、長期的視点に立てば人類に課せられた大きな命題である。

2. 研究の目的

酵素反応は、常温常圧において高い触媒活性および選択性を示すため、有用物質の合成においてエネルギーの節約という観点から重要である。しかし、出発物質となる物質のうち、天然資源由来の糖質やアミノ酸類などは、

多官能性ゆえ、そのままでは有機溶媒中での合成化学の基質として用いることができないものが多い。高選択性、反応性とはうらはらに、「基質特異性」の制約に由来する応用範囲の狭さが当然付随する。本研究課題では、微生物酵素触媒と有機合成を相補的に活用する有用物質生産プロセスの開発を目指した。

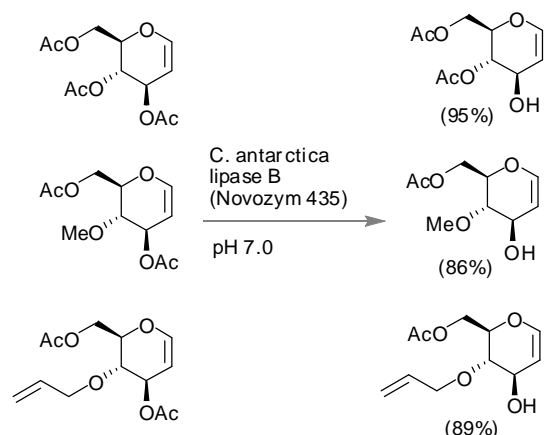
3. 研究の方法

本課題期間では、生体内で重要な情報伝達を担う生物活性天然有機化合物、複合糖質関連化合物を主たる標的物質とし、天然界から動植物の生物生産によって容易かつ大量に得られる原料や発酵生産産物などに出発原料を求め、資源効率のよい合成を試みた。合成の鍵段階は、新しい機能、特色を持つ酵素(生物資源触媒)反応であり、これを探索開拓した。酵素触媒の基質の分子設計、および新規酵素のスクリーニングという両方の側面が重要である。さらに、標的化合物そのものや、合成中間体の大量供給を可能とする実用的な生産方法、合成経路についても徹底的に検討した。

4. 研究成果

平成20年度：

グリカル誘導体の位置選択的脱保護を可能にする、加水分解酵素の探索について、以下に示す検討を行った。トリアセチル-D-グルカールは、グルコースより2段階で合成可能、しかも1,2位を修飾することができる化合物であり、さまざまな2-アミノ糖類への変換が期待できる。しかし、それには3箇所のアセチル基を位置選択的に脱保護し、反応性の官能基を導入する必要がある、従来報告されている事例は、非常に多くの工程を要するものばかりである。

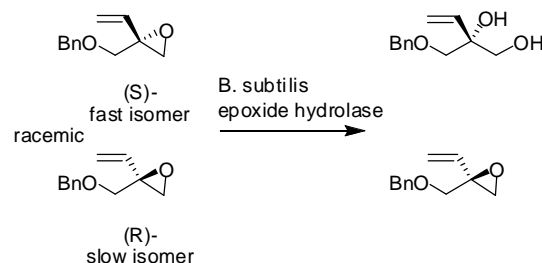


そこで、N-アセチル-D-マンノサミン、N-アセチル-D-ガラクトサミン糖などを究極の標的物質とし、出発段階としてトリアセチル-D-

グルカールの3位及び4位のアセチル基を選択的に加水分解できる酵素を探索した。

平成21年度：

枯草菌エポキシドヒドロラーゼは、ラセミ体1-ベンジルオキシメチル-1-メチルオキシランを基質として、鏡像選択的に加水分解する酵素である。有用物質合成への応用を指向し、広汎な基質を設計して、反応性および鏡像選択性を検討した。具体的には、上記化合物の1-位メチル基を異なる位置に移動したもの、削除したもの、メチル基をヒドロキシメチル基、メトキシカルボニル基、ホルミル基などに変換した物質を合成、基質とした上で、酵素反応を検討した。まず、fast isomer (反応がより速い鏡像異性体)では、付け根のメチル基を欠き立体障害を減らすと、より酵素に対する親和性が上がると推定したにもかかわらず、かえって反応性が低くなった。この反応は酵素内で、アスパラギン酸由来のカルボキシラートイオンがエポキシド末端に求核攻撃するところから反応が始まると考えられている。第三級エポキシドのメチル基の立体障害が消失した基質では、活性中心内で回転の自由度が大きく、この回転によりfast isomerである(S)-体が、反応点が遠ざかるため反応性が低下、一方slow isomerである(R)-体への求核攻撃は容易になり、上記2つの要因があわさって結果的に選択性が低下したと結論した。第三級エポキシドの構造を残したままで、メチル基を冒頭に述べたような極性官能基に変換した基質でも、やはり反応速度の低下がみられた。しかし、ビニル基やアルキニル基では良好な選択性をもって反応が進行、得られた化合物は再結晶により純粋な鏡像体を得ることができた。トリス(ヒドロキシメチル)メタノールを非対称に保護したキラルシントンの前駆体として有用である。

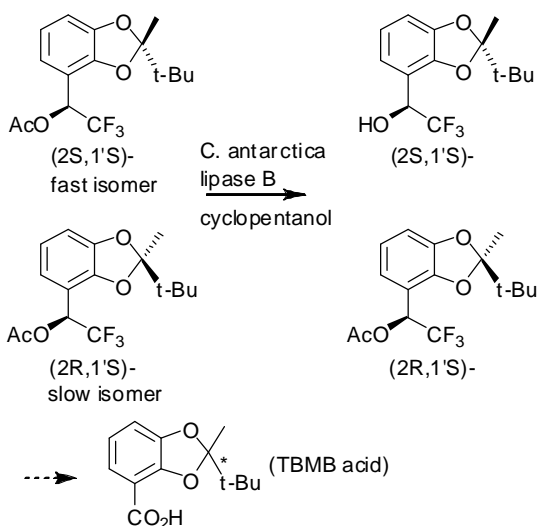


平成22年度：

生体内で脂肪の消化酵素として働き、油脂交換やバイオディーゼル製造などで産業上も広く使われているリパーゼは、本来トリグリセリドを基質として作用する。幅広い基質特異

性と高い位置・立体選択性、という両立しにくい性質を併せ持つという特徴を有することから、基質と酵素の活性中心は単純な「鍵と鍵穴」の関係とは言い難い。アシロキシ置換基が手前側に向けたタイプの立体配置を持つ分子は、その鏡像異性体に比べ加水分解に対する反応性が高い。Lの立体的にかさ高い置換基は、長鎖アルキル基に留まらず、ステロイド骨格や多環性芳香族など、幅広い種類でしかもサイズの大きいものがリパーゼの活性中心近傍に収容される。

このことから鍵穴（基底状態）には両鏡像体の分子ともに入るが、鍵を回してE-S complexの遷移状態を超えようとする際、両鏡像体間でエネルギーの高さに差が生じるという機構が依馬らによって提唱され、実際に、 K_m , V_{max} (kcat)の値の差に反映されている。本研究費受領者はリパーゼの示す鏡像体間の速度差を利用し、大類・西田によりキラル誘導分析試薬として開発された、TBMBカルボン酸の鏡像異性体を分離することに成功した。本研究では、ラセミ体の合成基質が典型的な第二級アセタートとして、ヘテロ芳香環がL、トリフルオロメチル基がS置換基として認識された。ところが、反応が本来早いはずの1S'立体異性体であっても、*Candida antarctica* リパーゼを用いたエステル交換反応の速度は、遠隔位である第四級アセタール内の2位の立体化学の影響を受けるというユニークな現象を見出し、速度論解析とドッキングスタディによりその原因を探索した。



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)

J. Calveras, Y. Nagai, I. Sultana, Y. Ueda, T.

Higashi, M. Shoji, T. Sugai: New chemo-enzymatic route toward N-acetylneuraminic acid derivatives with alkyl groups at C-7 hydroxyl group; *Tetrahedron*, 査読有, **66**, 2010, 4284-4291
 K. Shimizu, M. Sakamoto, M. Hamada, T. Higashi, T. Sugai, M. Shoji: The scope and limitation on the regio- and enantioselective hydrolysis of aliphatic epoxides by *Bacillus subtilis* epoxide hydrolase, and exploration towards chirally differentiated tris(hydroxymethyl)methanol; *Tetrahedron: Asymmetry*, 査読有, **21**, 2010, 2043-2049
 T. Higashi, C. Abe, K. Ninomiya, T. Machida, N. Chishima, S. Taketomi, M. Furuta, Y. Komaki, Y. Senba, T. Tokuda, M. Shoji and T. Sugai: Chemo-enzymatic Synthesis of Both Enantiomers of 2-tert-Butyl-2-methyl-1,3-benzodioxole-4-carboxylic (TBMB) Acid; *Adv. Synth. Catal.*, 査読有, **352**, 2010, 2549-2558
 K. Kitsuda, J. Calveras, Y. Nagai, T. Higashi, T. Sugai: A Short-step Chemo-enzymatic Synthesis of a Precursor for L-Nucleosides from D-Lyxose; *J. Mol. Catal. B: Enz.*, 査読有, **59**, 2009, 197-200

[学会発表](計2件)

M. Hamada, Y. Ueda, N. Chishima, J. Calveras, T. Higashi, M. Shoji, T. Sugai: Regio- and stereoselective lipase-catalyzed reactions on sugars and carbasugars (Invited Lecture), The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, Honolulu, Hawaii, 2010/12/19

T. Sugai: Recognition of Remote Chiral Centers in the Course of Lipase-Catalyzed Resolution and Its Application to Both Enantiomers of TBMB Acid (Invited Lecture), BIT's Inaugural Symposium on Enzymes & Biocatalysis, Shanghai, 2010/04/24

[図書](計2件)

橘田和憲、濱田 学、梅澤一夫、東 利則、須貝 威: 位置・立体選択的反應を鍵段階とする酵素 - 化学複合合成法の開発; 正田晋一郎、稲津敏行編、「複合糖質の化学と最新応用技術」、pp.73-82、シーエムシー(2009).

T. Sugai, A. Fujino, H. Yamaguchi, M. Ikunaka, "Epoxide Hydrolase Catalyzed Synthesis of (R)-3-benzyloxy-2-methylpropane-1,2-diol" in "Practical Methods for Biocatalysis and Biotransformations", J. Whittall, P. W. Sutton, eds., pp. 190-198, Wiley (2009).

6 . 研究組織

(1)研究代表者

須貝 威 (SUGAI TAKESHI)
慶應義塾大学・薬学部・教授
研究者番号：60171120

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし