

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 4月22日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23655157

研究課題名（和文）

C-C結合形成反応を触媒できる人工生体触媒の創製

研究課題名（英文）

Creation of Artificial Biocatalysts Capable of Catalyzing C-C Bond Formation

研究代表者

依馬 正 (Tadashi EMA)

岡山大学・大学院自然科学研究科・教授

研究者番号：20263626

研究成果の概要（和文）：

酵素（リパーゼ）に含窒素複素環式カルベン（*N*-heterocyclic carbene, NHC）有機触媒を化学修飾した人工生体触媒を創製し、それを用いてエナンチオ選択的なC-C結合形成反応を実施した。NHCは、変異導入部位（システイン）もしくは活性部位に導入した。ベンゾイン反応を試したところ、反応が進行し、低いながらもエナンチオ選択性が発現した。

研究成果の概要（英文）：

Artificial enzymes (lipases) bearing *N*-heterocyclic carbene (NHC) were created and used as a catalyst for the enantioselective C-C bond formation. NHC was linked to a mutated cysteine residue or the active site. The artificial enzymes catalyzed the benzoin reaction with low enantioselectivity.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：酵素反応・生体触媒・合成化学・不斉合成

1. 研究開始当初の背景

酵素は、温和な条件下で高い触媒活性と高いエナンチオ選択性を示す。中でもリパーゼは有機溶媒中でも水中でも反応できるため工業的に幅広く利用されている。X線結晶構造も解明されている。しかしながら、酵素は一般に基質適用範囲が狭く、限られた反応しか触媒できないといった問題があり、それが酵素の合成化学分野での利用を妨げている。

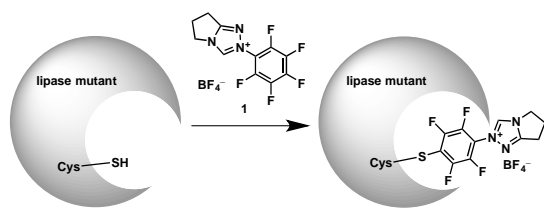
一方、近年注目されているのが有機触媒である。有機触媒は、比較的安価で環境調和性が高く、様々な反応を触媒でき、基質適用範囲が広いという利点がある。中でも含窒素複素環式カルベン（*N*-heterocyclic carbene：NHC）は様々な炭素-炭素結合形成反応を触媒できるユニークな有機触媒であり、NHC前駆体に塩基を作用させることで容易に発生させることができる。

2. 研究の目的

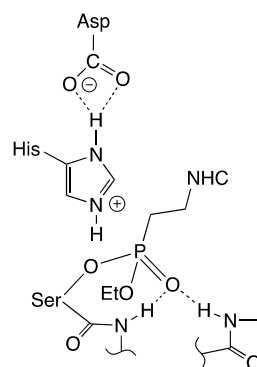
酵素を NHC 触媒で化学修飾すればタンパク質と有機触媒の良さを合わせ持つ人工生体触媒を創成できる可能性がある。タンパク質中で有機触媒反応を行うと、タンパク質反応場による反応加速効果と不斉合成が期待できる。最近、同様のコンセプトで酵素に金属イオンを導入し、タンパク質反応場で金属触媒反応を行える人工金属酵素の開発が注目を浴びている。しかしながら、酵素と有機触媒を組み合わせた人工生体触媒の報告例は未だに皆無である。本研究の目的は、酵素を NHC 触媒で化学修飾した人工生体触媒を開発することである。このような人工生体触媒を創成できれば、酵素の有用性をさらに高めることができ、生体触媒のさらなる発展が期待できる。

3. 研究の方法

(1) overlap-extention PCR 法を使ってリパーゼの活性部位近傍のアミノ酸をシステインに置換した変異体 (I287C、I290C、Q292C) を創成した。導入したシステインのチオール基を用いて NHC 触媒前駆体 (トリアゾリウム塩) のペンタフルオロフェニル基に求核置換反応させて化学修飾した。



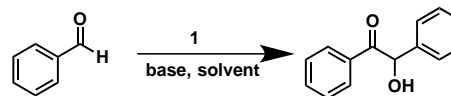
(2) リパーゼ酵素阻害剤であるリン酸エステルは、活性部位 (触媒セリン残基) に不可逆的に共有結合することが知られている。NHC 触媒を有するリン酸エステルをいくつか合成し、リパーゼと混ぜることにより NHC を導入した。



4. 研究成果

(1) I287C 変異体とトリアゾリウム塩 **1** を DMF 中、Ar 雰囲気下で 24 時間攪拌し化学修飾した。このリパーゼを用いて反応を行う際の問題点は、触媒量をかなり少なくせざるを得ないことと基質濃度もかなり低い条件で反応しないといけないことであった。そこで、少ない触媒量、低い基質濃度でもトリアゾリウム塩 **1** によるベンゾイン反応が進行するか検討した。

Table 1. Benzoin reaction under different conditions^a.

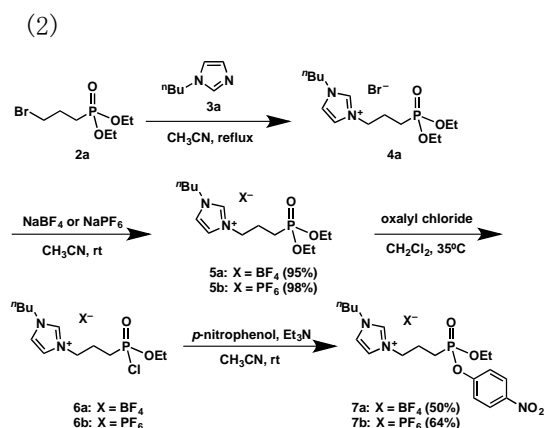


entry	catalyst	solvent	base	time (h)	yield (%) ^b
1 ^c	1	CH ₂ Cl ₂	Et ₃ N	51	0
2	1	CH ₂ Cl ₂	Et ₃ N	96	0
3	1	CH ₂ Cl ₂	Cs ₂ CO ₃	38	0
4	1	THF	Cs ₂ CO ₃	24	20
5	1	THF	Et ₃ N	24	55
6 ^d	I287C- 1	THF	Et ₃ N	24	55 (4% ee)

^a Conditions : catalyst (0.6 mol%), solvent (0.15 M). ^b Determined by ¹H NMR. ^c Solvent (0.06 M). ^d catalyst (< 0.6 mol%), ee was determined by HPLC.

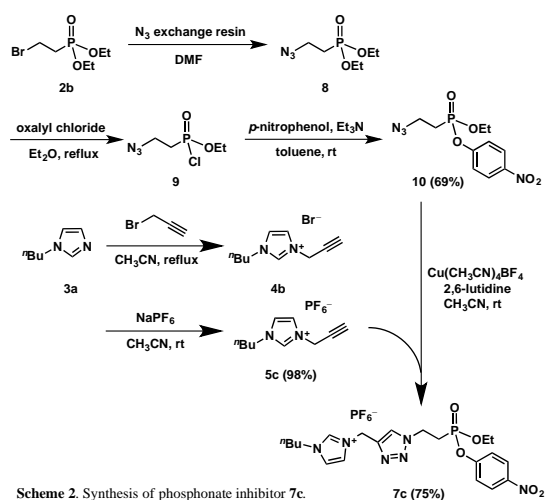
まず塩化メチレン中、基質濃度 0.06 M、トリエチルアミンを用いて反応を行うと反応は全く進行しなかった (entry 1)。基質濃度を 0.15 M に上げて反応は進行しなかった (entry 2)。塩基を炭酸セシウムに変えても反応は進行しなかった (entry 3)。しかしながら、溶媒を THF に変えると、反応時間 24 時間で収率 20%で目的物を得ることができた (entry 4)。さらに塩基をトリエチルアミンにすると収率 55%まで上げることができた (entry 5)。そこで、この条件で NHC を化学修飾したリパーゼ I287C-**1** を用いてベンゾイ

ン反応を行ったところ 24 時間で変換率 55%、4% ee で生成物を得た (entry 6)。



Scheme 1. Synthesis of phosphonate inhibitor 7a and 7b.

イミダゾリウム塩を化学修飾したリン酸エステルに対していくつかの合成経路を計画した。一つ目の経路を Scheme 1 に示す。リン酸エステル **2a** にイミダゾール **3a** を作用させイミダゾリウム塩 **4a** に誘導した後、アニオン交換し **5a** を得た。その後、塩化オキサリルを用いて塩素化し、最後に *p*-nitrophenoxy 基を導入してイミダゾリウム塩を有するリン酸エステル **7a** を合成した。同様の方法で PF₆ 塩 **7b** も合成した。リン酸エステル **2a** を用いた場合は比較的きれいに **4a** が得られたが、**2a** の代わりに炭素鎖の一つ短いリン酸エステルを用いると末端がアルケンになった脱離生成物が副生した。これら二つの物質は分離することが困難で、様々な有機溶媒で洗浄しても目的物を単離することができなかった。また *p*-nitrophenoxy 基を導入した後イミダゾリウム塩を得る順序だとイミダゾリウム塩に誘導する段階で、*p*-nitrophenoxy 基部分が加水分解してしまった。このことから *p*-nitrophenoxy 基の部分は非常に加水分解されやすいため最後に導入するのが適切だと分かった。



2 つ目の経路はクリックケミストリーを用いた方法である。クリックケミストリーは実験操作が簡便で副生成物を生成せずに反応できる非常にクリーンな反応として知られている。Huisgen 反応はクリックケミストリーの中で最もよく知られている反応であり、アジドとアルキンの [3+2] 型付加環化反応である。Huisgen 反応は選択性が高いため酵素の化学修飾の分野でもよく用いられている。この反応を利用して Scheme 2 の反応経路で酵素阻害剤を合成した。まずリン酸エステル **2b** をアジド交換樹脂でアジド化した後、塩化オキサリルを用いて塩素化した。その後 *p*-nitrophenoxy 基を導入しリン酸エステル **10** を合成した。また、イミダゾール **3a** から末端アルキンを持ったイミダゾリウム塩 **4b** を合成し、アニオン交換を経て **5c** を得た。最後にリン酸エステル **10** とイミダゾリウム塩 **5c** を用いて Huisgen 反応することにより目的物 **7c** を得た。Huisgen 反応は様々な触媒、溶媒を試したがこの組み合わせの時のみ目的物 **7c** を得ることができた。他の場合では *p*-nitrophenoxy 基部分が抜けてしまった。

以上の合成法で3種類のイミダゾリウム塩で修飾された酵素阻害剤 (**7a**、**7b**、**7c**) を合成した。

まず酵素阻害剤 **7a** を用いてリパーゼへの導入の条件を検討した。リパーゼへ酵素阻害剤が導入できているか否かは、1-phenylethanol の速度論的光学分割 (KR) の変換率を比較することで判断した。リン酸エステルがリパーゼの活性中心に導入できれば、1-phenylethanol の速度論的光学分割の変換率は通常のリパーゼを用いた場合と比べて下がると予想される。様々な条件でリパーゼと **7a** を溶媒中で攪拌したものと、リパーゼのみを攪拌したものとで変換率に違いがあるかを検討し最適な酵素阻害剤導入条件を探索した。結果を Table 2 に示す。

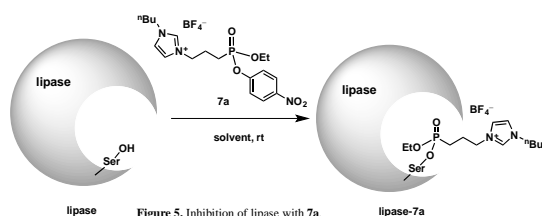


Table 2. Inhibition of lipase with **7a** and KR of 1-phenylethanol with inhibited lipase.

entry	lipase-inhibitor	inhibition		KR of 1-phenylethanol ^a	
		solvent	time (h)	conv. ^b (%)	
1	lipase- 7a	CH ₂ Cl ₂	24	47	
2	lipase	CH ₂ Cl ₂	24	48	
3	lipase- 7a	<i>i</i> -Pr ₂ O / DMF (1:1)	24	0	
4	lipase	<i>i</i> -Pr ₂ O / DMF (1:1)	24	12	
5	lipase- 7a	THF	6	42	
6	lipase	THF	6	49	
7	lipase- 7a	THF	72	21	
8	lipase	THF	72	38	

^a Conditions : lipase (30 mg), **11** (0.50 mmol), vinyl acetate (1.0 mmol), molecular sieves 3A (three pieces), dry *i*-Pr₂O (5 mL), 30 °C, 1.5 h. ^b Determined by ¹H NMR.

酵素阻害剤 **7a** が塩化メチレンに溶解したのでリパーゼと **7a** を塩化メチレン中で 24 時間攪拌した。吸引ろ過し真空乾燥して得られたリパーゼを用いて 1-phenylethanol の KR を行うと変換率は 47%であった (entry 1)。コントロールとしてリパーゼのみを塩化メチレン中で 24 時間攪拌し吸引ろ過、真空乾燥して得られたリパーゼを用いて同様に KR を行うと変換率は 48%であった (entry 2)。変換率にあまり差がないことから、酵素阻害剤 **7a** は entry 1 の条件ではリパーゼの活性部位に導入できていないことが分かった。おそら

く塩化メチレン中ではリパーゼが閉じたコンフォメーションを取るため **7a** が活性部位に入らなかったと思われる。次にイソプロピルエーテル / DMF (1 : 1) の混合溶媒に **7a** が溶解することが分かったのでその混合溶媒を用いて同様に実験を行った (entry 3, 4)。その結果、リパーゼのみで攪拌した場合の変換率がかなり低いことが分かった。これはこの混合溶媒の極性が高すぎるためリパーゼが変性してしまったと考えられる。さらに溶媒の検討を行い、**7a** が THF に溶解することが分かった。THF 中で攪拌時間 6 時間で行うとあまり変換率に差がなかったが (entry 5, 6)。攪拌時間を 72 時間にするとリパーゼのみ攪拌したものの変換率は 38%で **7a** とリパーゼを攪拌したものは 21%であった (entry 7, 8)。この条件だと 72 時間という長時間の攪拌のためリパーゼの活性が若干減少しているが、**7a** が少し活性部位に導入できていることが分かった。

次に、この条件を用いて 3 種類の酵素阻害剤を活性部位へ導入した。結果を Table 3 に示す。

Table 3. Inhibition of lipase with **7a**, **7b** and **7c** and KR of 1-phenylethanol with inhibited lipase.

entry	lipase-inhibitor	inhibition condition		KR of 1-phenylethanol ^a	
		solvent	time (h)	conv. ^b (%)	
1	lipase	THF	72	38	
2	lipase- 7a	THF	72	21	
3	lipase- 7b	THF	72	38	
4	lipase- 7c	THF	72	8	

^a Conditions : lipase 30 mg, **11** (0.50 mmol), vinyl acetate (1.0 mmol), molecular sieves 3A (three pieces), dry *i*-Pr₂O (5 mL), 30 °C, 1.5 h. ^b Determined by ¹H NMR.

PF₆ 塩にした場合の **7b** では全く活性部位へ導入できていないことが分かった。このことからアニオンの大きさや親水性が活性部位への導入に影響していることが分かった。別の経路で合成した **7c** では PF₆ 塩であるにもかかわらず、かなり活性部位へ導入できていることが分かった。 **7b** と **7c** の比較からリン酸

エステル部位とイミダゾリウム塩部分とを結ぶリンカー部位の長さも活性部位への入りやすさに影響していると言える。

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)

該当なし

6. 研究組織

研究者番号：

(1) 研究代表者

依馬 正 (Tadashi EMA)

岡山大学・大学院自然科学研究科・教授

研究者番号：20263626