

令和元年5月28日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2018

課題番号：25288078

研究課題名(和文) 含窒素複素環式カルベンを有する人工生体触媒の創成と有機合成への応用

研究課題名(英文) Creation of Artificial Biocatalysts with NHC and Application to Organic Synthesis

研究代表者

依馬 正 (Ema, Tadashi)

岡山大学・自然科学研究科・教授

研究者番号：20263626

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：炭素-炭素結合形成反応を触媒できる人工生体触媒を創成した。リパーゼの活性中心セリン残基と結合させるためにリン酸エステルを連結したNHC前駆体1を13段階で合成した。1をリパーゼに混ぜて両者が連結した人工生体触媒CALB-1を得た。ベンズアルデヒドのベンゾイン反応を触媒した。変異導入でリパーゼのイソロイシン287をシステインに置換したI287C変異体を化学修飾した。無溶媒でNHC触媒反応を行うと従来より少ない触媒量でも反応が進行することを発見した。触媒的な固体-液体又は固体-固体変換反応も進行した。固体-固体変換反応においては、固体混合物が部分的に融けた半固相状態を経由して反応が進行した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

C-C結合形成反応を触媒できる汎用酵素は極めて希である。生体触媒は、環境に優しく持続的発展を可能にする技術の1つであるが、C-C結合形成反応を触媒できるものが少ないため、これを打破する革新的手法が待ち望まれていた。本研究では、C-C結合形成反応を触媒できる活性種として含窒素複素環式カルベン(NHC)を選択し、NHC前駆体をタンパク質反応場であるリパーゼに導入することにより、人工生体触媒を創成し、実際にC-C結合形成反応を触媒することを確認した。C-C結合形成反応を触媒する人工生体触媒を創成できることを実証した本研究の意義は極めて大きい。

研究成果の概要(英文)：We created an artificial biocatalyst capable of catalyzing the C-C bond formation. To enable the binding to the catalytic serine residue of the active site of a lipase, NHC precursor 1 bearing a phosphate group (transition-state analog) was synthesized in 13 steps. Artificial biocatalyst CALB-1 was obtained by mixing 1 with a lipase, and it catalyzed the asymmetric benzoin reaction. We also demonstrated that enzymatic properties such as enantioselectivity could be controlled by the chemical modification of the I287C variant of a lipase. We also found that the catalyst loading of NHC can be reduced under solvent-free conditions. Even solid-to-solid or solid-to-liquid conversions took place with low catalyst loading (0.2 mol%), and even semi-solid state organocatalysis took place.

研究分野：生物有機化学

キーワード：生体触媒 有機触媒 含窒素複素環式カルベン 無溶媒

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

有機合成を「編み物」に例えると、「縦糸」に相当する C-C 結合形成反応と「横糸」に相当する C-X (ヘテロ原子) 結合形成反応からなる。有機金属化学や有機触媒化学は、縦糸も横糸も精力的に開発しているのに対して、生体触媒化学は横糸 (C-X 結合形成反応) に極端に傾倒している。アルドラーゼなどが使用されることもあるが、C-C 結合形成反応を触媒する酵素は、基質適用範囲が狭いなどの問題が多く、汎用的に使えるものは数少ない。生体触媒は、環境に優しく持続的発展を可能にする技術の 1 つであるが、縦糸 (C-C 結合形成反応) が弱いため、これを打破する革新的手法が待ち望まれている。C-C 結合形成反応を触媒できる活性種をタンパク質反応場に導入することにより、生体触媒・有機触媒・金属触媒の強みを最大限に活かした人工生体触媒を創成したい。活性種として、含窒素複素環式カルベン (NHC) に注目した。ビタミン B₁ の化学は近年、有機触媒化学の分野で大きく発展している。チアゾリウム環、イミダゾリウム環、トリアゾリウム環の塩基処理によって生じる一連のカルベン種は、種々の C-C 結合形成反応を触媒できる。ベンゾイン反応、Stetter 反応、Morita-Baylis-Hillman 反応、ホモエノラート反応など、実に多岐に渡る。NHC は金属配位子としても機能するので、金属イオンを配位させると、さらに多様な C-C 結合形成反応を触媒できる。

2. 研究の目的

炭素-炭素 (C-C) 結合形成反応を触媒できる人工生体触媒を創成し、有機合成へ応用する。補欠分子団として含窒素複素環式カルベン (NHC) を選択し、NHC-タンパク質複合体を調製する。タンパク質としては、有機溶媒に強く耐熱性が高いリパーゼを選択する。ベンゾイン反応、Stetter 反応等の C-C 結合形成反応を触媒できる NHC-リパーゼ複合体を開発する。天然酵素が持たない触媒機能を有する人工生体触媒を創出し、酵素単独あるいは NHC 単独で反応させた場合より優れた触媒機能を狙う。

3. 研究の方法

NHC 前駆体-リパーゼ複合体を調製するために、3 つのアプローチを試す: (A) 活性中心埋め込み型 (B) 変異導入点修飾型 (C) 分子認識部位利用型。有機触媒活性種とタンパク質反応場の協同効果を引き出すために、NHC 前駆体 (チアゾリウム塩、イミダゾリウム塩、トリアゾリウム塩) とリパーゼの種類・組み合わせを変えつつ、リンカーや変異導入部位を調整していく。得られた NHC-リパーゼ複合体を用いて、ベンゾイン反応、Stetter 反応などの C-C 結合形成反応を試し、触媒活性やエナンチオ選択性を評価する。人工生体触媒と反応の適した組み合わせが明らかになったら、タンパク質側に変異を導入して進化させ、触媒性能をさらに向上させる。

4. 研究成果

(1) **リパーゼの活性中心に NHC を導入した人工生体触媒**: リパーゼの活性部位へ NHC 触媒を導入するために酵素阻害剤に着目した。リパーゼ阻害剤であるリン酸エステルは遷移状態アナログであるため、リパーゼの活性中心のセリン残基と特異的かつ不可逆的に結合する。したがって、NHC 前駆体とリン酸エステルを連結した化合物を合成できれば、その化合物とリパーゼを混ぜるだけで NHC 前駆体をリパーゼの活性中心に導入できるはずである。しかし実際には、NHC 前駆体と脱離基を有するリン酸エステルを合成するにあたりいくつかの制約がある。前駆体であるトリアゾリウム塩は塩基を用いるとカルベンが発生してしまうため、塩基性条件の反応は使えない。また、塩であるためカラム精製もできない。さらに不用意に遷移金属を用いるとカルベン-金属錯体を形成してしまう。一方、脱離基を有するリン酸エステルはプロトン性溶媒に不安定であり、脱離基が外れやすい。したがって、これらの制約を克服しながら合成を進めなければならない。実際に、この概念を実現するために膨大な数の試行錯誤を行った。ここでは、最も優れた実施例に絞って報告する。

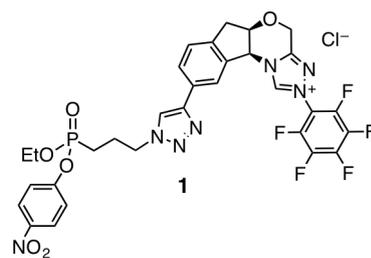
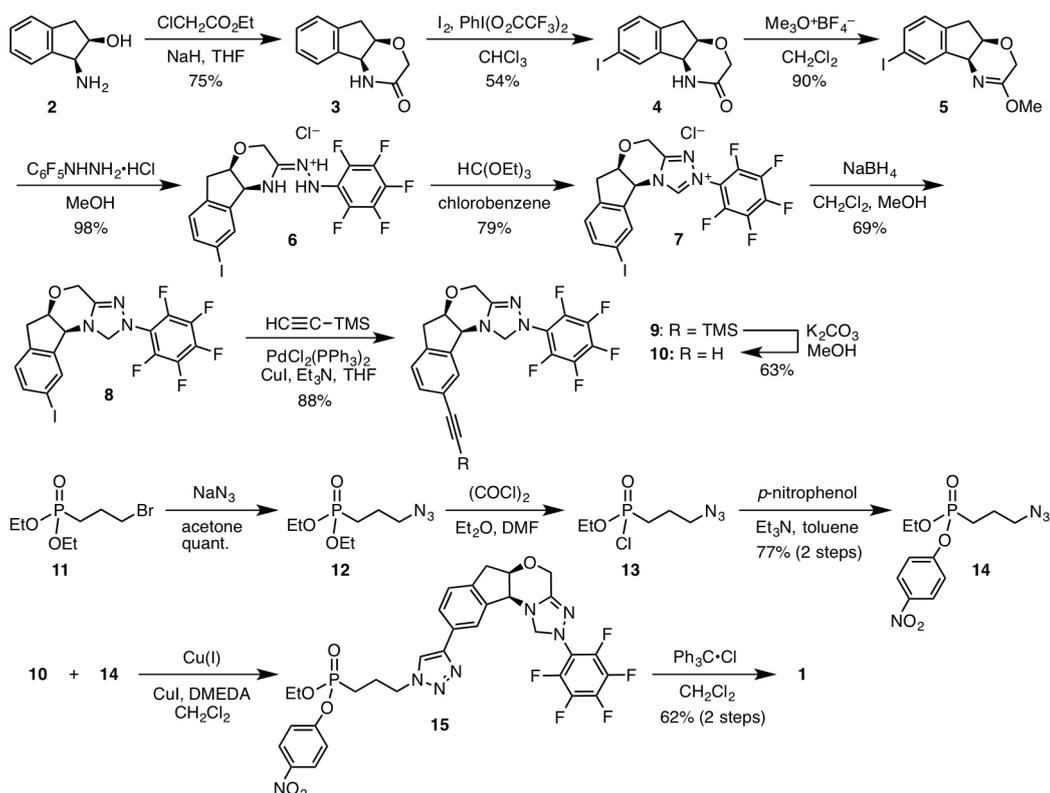


図 1. NHC 前駆体 1.

NHC 前駆体と脱離基を有するリン酸エステルとして目的物 **1** を設計した (図 1)。NHC 前駆体には、アミノアルコールから 4 ステップで合成でき、多くの NHC 触媒反応に有効な Rovis 触媒の骨格を採用した。**1** の合成戦略は、まずクロスカップリングできるようにヨウ素を導入したトリアゾリウム塩を合成し、一旦還元してトリアゾリンとする。菌頭カップリングによってエチニル基を導入してトリアゾリン **10** を得た後、脱離基を有するリン酸エステル **14** との Huisgen 反応によりリン酸エステル部位を導入し、最後にトリアゾリンを酸化して再びトリアゾリウム塩に戻すという戦略である。トリアゾリン **10** はカラム精製が可能であり、その後の Huisgen 反応も酸化反応も穏やかであるため目的物の分解は考えにくい。したがって、この合成経路では前述の制約を満たすことが期待された。

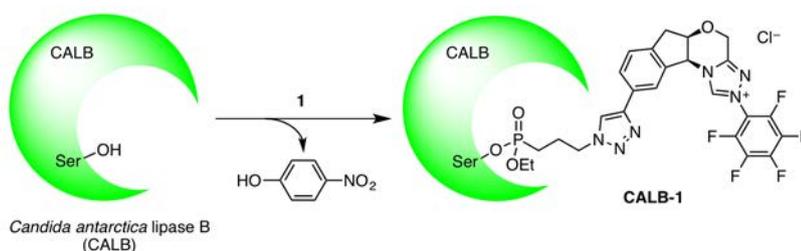
目的物 **1** の合成経路をスキーム 1 に示す。出発原料 **2** をクロロ酢酸エチルで環化しラクタム **3** を得た。その後、超原子価ヨウ素試薬 [bis(trifluoroacetoxy)iodo]benzene (PIFA) とヨウ素を用いてヨウ素化し、ラクタム **4** を得た。このとき目的物である **4** を原料や副生成物から分離しにくかったため、収率は 54%にとどまった。ヨウ素化試薬として *N*-iodosuccinimide (NIS) や一塩

化ヨウ素 (ICl) などとも試したが、PIFA とヨウ素の組み合わせが最も良かった。その後、Meerwein 試薬で *o*-メチル化し **5** を得てペンタフルオロフェニルヒドラジン塩酸塩と反応させて **6** を合成



スキーム 1. NHC 前駆体 **1** の合成経路.

し、オルトギ酸トリエチルを用いた閉環反応によってトリアゾリウム塩 **7** を得た。水素化ホウ素ナトリウムによって還元しトリアゾリン **8** へ変換した。その後、TMS アセチレンとの菌頭カップリングによって **9** を得た後、微量の炭酸カリウム存在下メタノールで脱保護してエチニル基が導入されたトリアゾリン **10** を得た。一方、アジド基と脱離基を有するリン酸エステルを合成した。まず原料である diethyl (3-bromopropyl)phosphonate (**11**) をアジ化ナトリウムでアジド化した。その後、塩化オキサリルで塩素化して **13** を合成した。**13** は空気や水に不安定であるため、単離操作を行わずにすぐに *p*-ニトロフェノールとトリエチルアミンを作用させて **14** へ変換し、カラム精製によって単離した。**14** もまた不安定な化合物であるため、その後の反応にはカラム精製直後のものを用いた。合成したトリアゾリン **10** とリン酸エステル **14** を Huisgen 反応によって連結した。銅触媒を活性化する配位子として一般的に用いられる tris[(1-benzyl-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methyl]amine (TBTA) や、tris(2-benzimidazolylmethyl)amine ((BimH)₃) では反応がほとんど進行しなかった。これは配位子と嵩高い **10** との立体障害が原因ではないかと推測された。配位子が無い条件でも試したが、反応はほとんど進行しなかった。そこで、TBTA や (BimH)₃ ほど嵩高くなく、銅とキレート錯体を形成する dimethylethylenediamine (DMEDA) を用いて反応を行ったところ、室温 30 分で反応が完結した。分液操作によって銅触媒を除いた後、トリチルクロリドによって酸化することで目的物 **1** を合成することに成功した。NMR と ESI-MS により **1** の生成を確認した。**1** と過剰量のトリチルクロリドとの分離はジエチルエーテルに対する溶解性の違いによって達成した。



スキーム 2. 人工生体触媒 CALB-1 の合成.

合成した **1** を *Candida antarctica* lipase B (CALB) とリン酸緩衝液 (pH 7.0) 中、室温で 1 時間攪拌すると、リパーゼに NHC 前駆体が連結した人工生体触媒 CALB-1 が得られた (スキーム 2)。CALB は優れた生体触媒であり耐熱性・有機溶媒耐性においても優れているため本研究に用いた。その後、透析とスピンカラムによって精製した。ESI-MS スペクトルから人工生体触媒 CALB-1 の生成が確認された (図 2)。

合成した **1** を *Candida antarctica* lipase B (CALB) とリン酸緩衝液 (pH 7.0) 中、室温で 1 時間攪拌すると、リパーゼに NHC 前駆体が連結した人工生体触媒 CALB-1 が得られた (スキーム 2)。CALB は優れた生体触媒であり耐熱性・有機溶媒耐性においても優れているため本研究に用いた。その後、透析とスピンカラムによって精製した。ESI-MS スペクトルから人工生体触媒 CALB-1 の生成が確認された (図 2)。

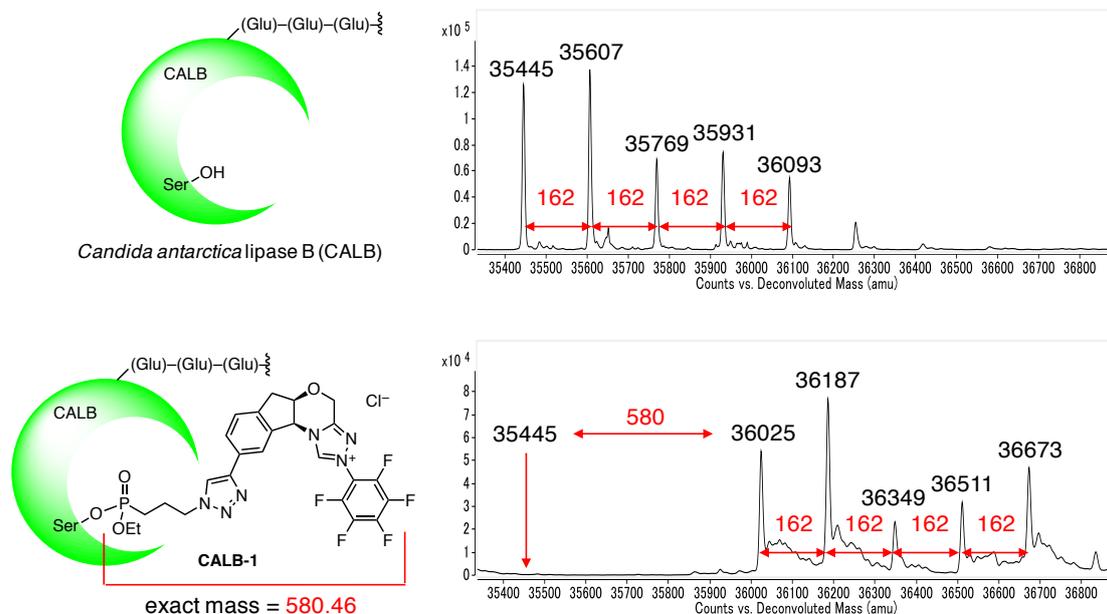


図 2. CALB と CALB-1 の ESI スペクトル.

連続するピークの間隔はいずれも 162 であり、これはリパーゼに結合しているグルコース鎖のフラグメンテーションによるものである。人工生体触媒 CALB-1 の ESI-MS スペクトルを見ると、CALB 単体のピークが出ている 35445 から 36000 の周辺にピークが見られず、35445 に 580 を足した 36025 からピークが出ているため NHC 前駆体 **1** が完全に CALB に導入されている。

表 1. NHC 触媒ベンゾイン反応.

Ar-CHO + NHC precat. 1 or A or B (0.5 mol%) ->[Cs2CO3, no solvent] Ar-CH(OH)-Ar

entry ^a	Ar	NHC precat.	yield (%) ^b	ee (%) ^c	R/S
1	Ph	1	99	93	S
2	Ph	A	95	87	R
3	Ph	B	99	77	S
4	2-furyl	1	99	63	S
5	2-furyl	A	97	43	R
6	2-furyl	B	99	44	S

^a 反応条件: NHC 前駆体 (0.5 mol%), Cs₂CO₃ (0.5 mol%), Ar, 30°C, 1 時間. ^b 単離収率.

^c HPLC で決定.

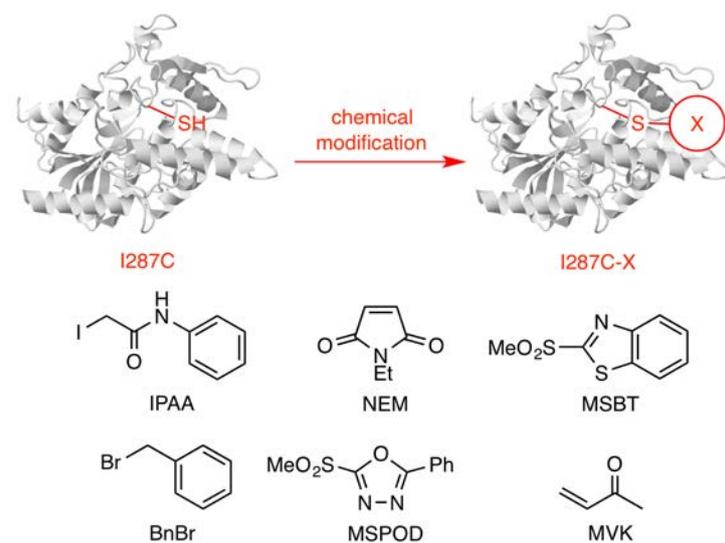
合成した NHC 前駆体 **1**、市販の Rovis 触媒である **A**、その逆のエナンチオマー **B** の触媒活性をベンゾイン反応によって比較した (表 1)。基質はベンズアルデヒドと反応性の高いフルフラールを用い、触媒量 0.5 mol%、無溶媒で反応を行った。後述するように、無溶媒条件では触媒量を大幅に減らすことができる。合成した **1** はどちらの基質においても Rovis 触媒よりも高い立体選択性を示した。置換基導入による効果と考えられる。

次に、合成した人工生体触媒 CALB-1 を Toyonite-200M に固定化し、その触媒活性をベンズアルデヒドのベンゾイン反応により調査した。トリエチルアミンを塩基として用いた時に反応が進行したため、HPLC によって生成物の光学純度を確認したところ、79% ee であった。これは **1** (表 1, エントリー 1) と比較して選択性が下がる結果となった。このことから CALB に導入された NHC は S 体の生成を選択的に触媒する一方で、CALB タンパク質は S 体の生成を阻害するように働いているという mismatched pair の関係であることが示唆された。

(2) システイン変異体の化学修飾: 変異導入によりリパーゼのイソロイシン 287 をシステインに置換しておき、この I287C 変異体を NHC で化学修飾するための方法論を検討した。NHC で化学修飾する前に、より単純な化学修飾試薬 (2-ヨード-N-フェニルアセトアミド (IPAA)、N-エチルマレイミド (NEM)、メチルスルホニルベンゾチアゾール (MSBT)、臭化ベンジル (BnBr)、2-メチルスルホニル-5-フェニル-1, 3, 4-オキサジアゾール (MSPOD)、メチルビニルケトン (MVK)) で化学修飾

した (スキーム 3)。ESI マススペクトルで分子イオンピークを観測することにより化学修飾を確認した。2 級アルコールの速度論的光学分割を行うと、どの化学修飾体もエナンチオ選択性や触媒活性が変化したことより、目的の位置に化学修飾できていると判断した。I287C 変異体に NHC 誘導体を化学修飾するには至っていない。

(3) 無溶媒 NHC 触媒反応: 本研究の過程で思わぬ発見をした。無溶媒で NHC 触媒反応を行うと、従来よりかなり少ない触媒量でも反応が進行することを見出した。NHC 触媒による芳香族アルデヒドの分子間ベンゾイン反応では、通常 5~20 mol% 程度の触媒が必要とされるが、無溶媒で反応を行うと触媒量 0.2 mol% でも良好な収率で生成物が得られた。また、反応時間を 1 時間まで短縮することもできた。分子内ベンゾイン反応においても、通常 20 mol% 程度の NHC 触媒が必要とされるが、無溶媒で反応を行うと触媒量 0.5 mol% でも反応が進行した。このとき、高濃度にも関わらず、分子間反応は進行せず、高選択的に分子内ベンゾイン反応が進行した。また、無溶媒分子内 Stetter 反応においても、触媒量を 0.2 mol% まで下げることができた。溶媒を用いる分子内 Stetter 反応では通常 20 mol% 程度の触媒が必要とされている。この場合も、分子間反応 (分子間ベンゾイン反応や分子間 Stetter 反応) は進行しなかった。さらに、触媒的な固体-液体もしくは固体-固体変換反応が進行することも見出した。基質と触媒前駆体と無機塩基の混合物が粉末状固体であっても、それぞれの化合物の融点より低い温度で反応が進行した。固体-固体変換反応においては、たいていの場合、固体混合物が一旦部分的に融けたり懸濁した半固相状態 (semi-solid state) を経由して反応が進行した (表 2)。融点降下との関連性が考えられる。



スキーム 3. リパーゼ変異体の化学修飾。

表 2. 無溶媒固体-固体変換ベンゾイン反応.^a

(a)

(b)

(c)

entry	Ar	T (°C)	yield (%) ^b	ee (%) ^c
1	4-Cl-C ₆ H ₄	30	98	78
2 ^d	4-Br-C ₆ H ₄	30	99	79
3 ^d	2-naphthyl	50	87	73

^a 反応条件: アルデヒド (5.0 mmol), NHC 前駆体 **A** (0.5 mol%), Cs₂CO₃ (0.5 mol%), Ar, 12 時間. ^b 単離収率. ^c HPLC で決定. ^d NHC 前駆体 **A** (1.0 mol%), Cs₂CO₃ (1.0 mol%).

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

- Solvent-Free Benzoin and Stetter Reactions with a Small Amount of NHC Catalyst in the Liquid or Semisolid State.
Ena, T.; Nanjo, Y.; Shiratori, S.; Terao, Y.; Kimura, R. *Organic Letters* **2016**, *18*, 5764-5767. [査読有]
- Chemical Modification of Lipase for Rational Enhancement of Enantioselectivity.
Ena, T.; Inoue, H. *Chemistry Letters* **2015**, *44*, 1374-1376. <Editor's Choice>[査読有]

〔学会発表〕（計 12 件）

- ① 岩井健太, 小野真一, 南條喜子, 前田千尋, 高石和人, 依馬 正「効率的利用を目指した NHC 触媒反応の条件検討」2018 年日本化学会中国四国支部大会, 講演番号 1P-025, 2018. 11. 17 (松山)
- ② 小野真一, 南條喜子, 前田千尋, 高石和人, 依馬 正「ペンタフルオロフェニル基を有する NHC 有機触媒を用いた無溶媒 benzoin 反応と Stetter 反応」第 44 回有機典型元素化学討論会, 講演番号 P-7, 2017. 12. 8 (東京)
- ③ 小野真一, 南條喜子, 前田千尋, 高石和人, 依馬 正「無溶媒で液体または固体の基質を用いる NHC 有機触媒反応」日本化学会中国四国支部大会, 講演番号 OR60P, 2017. 11. 11 (鳥取)
- ④ 小野真一, 南條喜子, 前田千尋, 高石和人, 依馬 正「微量の NHC 触媒を用いる無溶媒 benzoin 反応と Stetter 反応」第 28 回基礎有機化学討論会, 講演番号 2P104, 2017. 9. 8 (福岡)
- ⑤ 白鳥 翔, 南條喜子, 前田千尋, 高石和人, 依馬 正「微量の NHC 有機触媒を用いる無溶媒ベンゾイン反応と Stetter 反応」日本化学会第 97 春季年会, 講演番号 3F2-04, 2017. 3. 18 (横浜)
- ⑥ 南條喜子, 寺尾雄太, 木村 涼, 前田千尋, 高石和人, 依馬 正「微量の NHC を用いる無溶媒有機触媒反応」第 110 回有機合成シンポジウム, 講演番号 P-4, 2016. 11. 11 (東京)
- ⑦ 南條喜子, 寺尾雄太, 木村 涼, 前田千尋, 高石和人, 依馬 正「NHC 有機触媒を用いた無溶媒条件下での反応」2016 年日本化学会中国四国支部大会, 講演番号 1P58, 2016. 11. 5 (高松)
- ⑧ 南條喜子, 寺尾雄太, 木村 涼, 前田千尋, 高石和人, 依馬 正「無溶媒条件下における高効率な NHC 有機触媒反応」第 27 回基礎有機化学討論会, 講演番号 2P155, 2016. 9. 2 (広島)
- ⑨ 南條喜子, 寺尾雄太, 木村 涼, 前田千尋, 高石和人, 依馬 正「NHC 有機触媒を用いた無溶媒ベンゾイン反応」日本化学会第 96 春季年会, 講演番号 2F6-51, 2016. 3. 25 (京田辺)
- ⑩ Hiroki Inoue, Chihiro Maeda, Tadashi Ema「Creation of Chemically Modified Lipases and Application to Organic Synthesis」Active Enzyme Molecule 2014, P-04, 2014. 12. 18 (富山)
- ⑪ 井上浩希, 前田千尋, 依馬 正「有機合成への応用を目的とした化学修飾リパーゼの創成」第 8 回バイオ関連化学シンポジウム, 講演番号 1P-027, 2014. 9. 11 (岡山)
- ⑫ 井上浩希, 前田千尋, 依馬 正「化学修飾リパーゼの創成と有機合成への応用」モレキュラー・キラリティー2014, 講演番号 PP-42, 2014. 6. 7 (仙台)