

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：32685

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05870

研究課題名(和文) 生体触媒による官能基変換をトリガーとするドミノ型不斉合成プロセスの開発

研究課題名(英文) Development of a domino-type asymmetric synthesis process triggered by biocatalytic functional group transformations

研究代表者

富宿 賢一 (Fuhshuku, Ken-ichi)

明星大学・理工学部・教授

研究者番号：70392090

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：生体触媒により生じた高反応性中間体が酵素のアミノ酸残基の形成する不斉反応場中で光学活性物質に変換されるという連続的な反応を、優れた収率や不斉収率で達成することを目的として研究に取り組んだ。具体的には、生体触媒での加水分解をトリガーとする遠隔不斉誘導と生体触媒をトリガーとするドミノ型酸化・不斉環化の2つの課題に取り組んだ。特に興味深い結果として、ブテノライドを対象とする検討の中で、生体触媒により高反応性なジエノラートが生じ、引き続く二重結合の移動を伴うプロトン化が、 α -位でエナンチオ面選択的に進行することを見出したことが挙げられる。この反応を利用し、各種の光学活性なブテノライドの合成を達成した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

既存のタンパク質やゲノムのデータベースに捉われず、独自の分子設計に基づく低分子化合物を基質として用いることにより、全く新しい活性を示す酵素を見つけ出すことができる。性質や機能、構造に基づき新しい酵素を体系化することにより、生体触媒としての利用のみならず、生合成系の人為的なデザインに利用でき、天然物を凌ぐ生物活性を示す有用物質の供給につながると期待できる。基質の適切な分子設計により生物活性天然物の合成に直結する斬新な生体触媒プロセスを開発してその有用性を示せば、多くの有機合成化学者による生体触媒の利用につながり、この分野の発展に大きく寄与することができる。

研究成果の概要(英文)：The domino-type reactions in which highly reactive intermediates generated by biocatalysts are converted to optically active products with excellent yields and asymmetric yields in an asymmetric reaction field formed by amino acid residues of enzymes, were studied. Specifically, we addressed two issues: remote asymmetric induction triggered by biocatalytic hydrolysis and domino-type oxidation-asymmetric cyclization triggered by biocatalysts. One particularly interesting result was the discovery, in the investigation of synthetic studies on butenolides, that the biocatalytic generation of a highly reactive dienolate of them and subsequent isomerization with proton transfer proceeded enantioface-selectively at the α -position. Using this reaction, the synthesis of various optically active butenolides was achieved.

研究分野：有機化学、酵素化学、応用微生物学

キーワード：生体触媒 不斉異性化 プロトン移動 エナンチオ面選択性 酸化 環化 ドミノ反応

1. 研究開始当初の背景

酵素が触媒する物質変換は、温和な条件下で利用でき、高い環境調和性を示す。近年では、酵素はその高い物質変換能と優れた立体選択性という大きな特徴を活かし、生体触媒として有機合成の一研究分野として確固とした地位を占めるに至っている。

有機合成に有用な生体触媒ではあるものの、その利用の多くはリパーゼによる加水分解やパン酵母による還元など比較的単純な官能基変換と、その立体選択性を利用した光学活性物質の調製であり、炭素-炭素結合の形成や不斉炭素骨格の構築での利用は限られているのが現状である。近年ではゲノムマイニングにより様々な天然物の生合成遺伝子を取得し、その生合成系を再構築する不斉炭素骨格の構築や天然物の生産が可能となりつつある。しかし、骨格構築に関与する酵素群の基質特異性は概して厳しく汎用性に乏しいため、通常の有機合成に生体触媒として幅広く利用するのは未だ困難である。このため、不斉炭素骨格の構築は、金属触媒や分子触媒など汎用性の高い化学触媒の利用を中心に行われているのが現状である。

不斉炭素骨格を構築するために有機合成で注目されているものに、一つの反応容器中で複数の反応が連続的に進行するドミノ型と呼ばれるプロセスがある。多段階合成を単なる工程数だけでなく、精製過程や廃棄物、所要時間などの点からも大幅に効率化できるポテンシャルを持つ。このドミノ型プロセスの開発に向け、複数の生体触媒、あるいは生体触媒と化学触媒を組み合わせる研究が行われている。しかし従来型の生体触媒ドミノ型プロセスでは、単純な炭素鎖の結合形成はともかく不斉炭素骨格の構築は困難であり、収率や不斉収率が低いという本質的な課題を抱えている。すなわち、1段階目の反応の後、不安定で反応性の高い中間体が遊離して系中に存在することになり、2段階目の反応は非酵素的な反応やその他の副反応と競合してしまう。このことが収率や不斉収率の低下を招く要因である。

2. 研究の目的

生体触媒を用いる有機合成のより一層の発展には、環境調和性と汎用性を併せ持ち、複雑な炭素骨格を立体選択的に構築できる優れたドミノ型不斉合成プロセスの開発が望まれる。そのためには、比較的汎用性の高い加水分解酵素や酸化還元酵素の利用が望ましい。

本研究では、生体触媒である酵素の示す柔軟な分子認識能と高い物質変換能、優れた立体選択性という3つの特徴を活かし、比較的汎用性の高い加水分解酵素や酸化還元酵素による官能基変換をトリガーとしたプロセスを開発する(図1)。すなわち、官能基変換により生じた反応性の高い中間体が、酵素のアミノ酸残基の形成する不斉反応場を利用した結合形成や骨格構築へと導かれ、光学活性な有用物質へと変換されるドミノ型反応である。この一連の反応を、不安定で反応性の高い中間体を系中に遊離しない同一酵素タンパク質内で実現し、優れた収率や不斉収率を達成する。

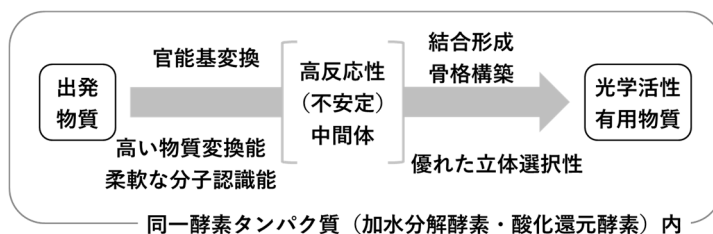


図1. 生体触媒を利用するドミノ型合成プロセス

3. 研究の方法

本研究の目的の遂行に向け、2つの生体触媒プロセスの開発に取り組んだ。

(1) 生体触媒での加水分解をトリガーとする遠隔不斉誘導

エナンチオ面選択的な不斉プロトン化反応は、光学活性物質を生成する優れた反応である。特に、カルボニル基のケト-エノール互変異性を利用したエノール型基質の α -位不斉プロトン化反応の研究が盛んに行われ、微生物や酵素などの生体触媒を用いた例も知られている。

カルボニル基の α -位から β -位に面選択的なプロトン化の反応点を移すことを志向し、ブテノリドに着目した。ブテノリドをアシル化してジエノールエステルに変換後、求電子剤との共存下で加水分解酵素を作用させると、ジエノールエステルの加水分解に伴い高反応性(不安定)中間体であるジエノラートが生成する。このジエノラートの生成をトリガーとして酵素の不斉反応場を利用したビニロガス反応が進行し、酵素の反応点であるアシル基からは遠隔位にあたるブテノリドの β -位に立体選択的に求電子剤が導入(遠隔不斉誘導)される。反応点から遠隔位に不斉を誘起する方法は研究の盛んな分野であり、水中の温和な条件下で加水分解酵素により実現できれば、きわめて実用性が高い

(2) 生体触媒をトリガーとするドミノ型酸化-不斉環化

生体触媒によるアルコールの酸化をトリガーとして、生じたアルデヒドが酵素内に留まったまま、活性部位近傍の不斉反応場により立体選択的な環化(Diels-Alder反応)が進行するドミノ型酸化-不斉環化を開発する。この反応により、生物活性天然有機化合物の合成に有用なピシクロ[4.3.0]ノナン骨格やピシクロ[4.4.0]デカン骨格を構築する。

4. 研究成果

(1) 生体触媒による光学活性なブテノライドの合成

市販の β -アングリカラクトンを塩基性条件下でアシル化し、ジエノールエステルとして生体

触媒のスクリーニングに用いた。生体触媒による加水分解に伴い、生体触媒の反応点であるアシル基から遠隔位に相当するカルボニル基の α -位でのプロトン化がエナンチオ面選択的に進行すれば、光学活性な α -アンゲリカラクトンを生成するはずである。

各種の加水分解酵素や微生物からのスクリーニングの結果、高い立体選択性を示し光学活性な α -アンゲリカラクトンを生成する数種類の微生物を見出すことができた。その後、反応条件や基質特異性の精査に取り組んだものの、この反応では満足できる結果を得ることができなかった。しかしこの過程で、ある種の微生物においては、 α -アンゲリカラクトンを異性化し、光学活性な α -アンゲリカラクトンへと変換することを見出した。 α -位の脱プロトン化によりジエノラートが生じ、引き続き二重結合の移動を伴うプロトン化が、 β -位でエナンチオ面選択的に進行すると考えられる。この活性を示す微生物の中から最適なものを選抜するために、各種の微生物をスクリーニングした。微生物を液体培養後、集菌と洗浄、破碎により無細胞抽出液を調製した。次いで、この無細胞抽出液を用いて α -アンゲリカラクトンから β -アンゲリカラクトンへの酵素反応を行い、生じた光学活性な β -アンゲリカラクトンの収率と鏡像体過剰率を HPLC 分析により求め、反応性と選択性の両面から酵素活性を評価した。スクリーニングの結果、特に酵母の一種 *Ogataea polymorpha* NBRC 1476 が高い酵素活性を示し、高いエナンチオ面選択性にて光学活性な(S)-体の β -アンゲリカラクトンへと変換した。そこで、この菌株を選抜し、微生物菌体反応と酵素反応の両面から、微生物菌体量や酵素量、基質濃度、後処理方法などを精査し、酵素反応としての反応条件を確立した(図2)。並行して、基質特異性を精査するために必要な、酵素反応の基質となる、 α -不飽和ブテノライドと生成物標品となるラセミ体の β -不飽和ブテノライドを、2通りの方法により各種合成した。4-オキソカルボン酸誘導体を環化する方法と、酸塩化物からアレン酸エステルを合成し、加水分解後に生じるカルボン酸を環化する方法である。合成した各種の α -不飽和ブテノライドを用いて、*Ogataea polymorpha* NBRC 1476 を用いる生体触媒不斉異性化の基質特異性を精査した。その結果、この反応は各種の光学活性な β -不飽和ブテノライドの合成に有効であることが明らかになった。

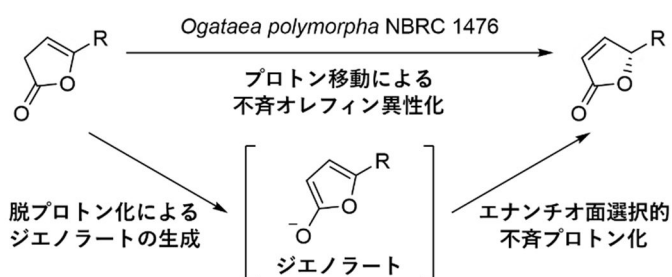


図2. *Ogataea polymorpha* NBRC 1476が触媒するプロトン移動による不斉オレフィン異性化

この酵母の示す酵素活性について、酵素の精製によりその構造や機能を解明することを目指した。まず、HPLC 分析で酵素活性を評価する方法を確立し、この方法を用いて酵素活性を評価しながら酵素の精製を検討した。培養した酵母を緩衝液と懸濁後に破碎して遠心分離し、上清を無細胞抽出液として得た。熱処理と硫酸分画により精製度を高め、次いで、疎水クロマトグラフィー、陰イオン交換クロマトグラフィー、陽イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィーと順次精製を進めた。各精製段階の酵素液について、比活性と SDS-PAGE をもとに評価し、20.0 kDa 付近のタンパク質が目的の酵素であると推定した。N 末端アミノ酸解析の結果、機能未知タンパク質と高い相同性を示し、SDS-PAGE から推定される分子量とも良い一致を示した。

(2) 生体触媒による光学活性なビシクロ[4.3.0]ノナン骨格やビシクロ[4.4.0]デカン骨格の合成
 生体触媒による第一級アルコールの酸化と、続く酵素内での立体選択的な環化が連続的に進行するドミノ型酸化 - 不斉環化反応による光学活性なビシクロ[4.3.0]ノナン骨格やビシクロ[4.4.0]デカン骨格の合成に取り組んだ。基質の第一級アルコールは、既知の合成法を組み合わせで合成した。ビシクロ[4.3.0]ノナン骨格の構築に向け、(トリフェニルホスホラニリデン)酢酸エチルとグルタルアルデヒドを出発原料として用い、Wittig 反応による炭素鎖の伸長とヒドリド還元により、基質の第一級アルコールを合成した。ビシクロ[4.4.0]デカン骨格の構築には、1,6-ヘキサジオールを出発原料として用いた。この場合も、Wittig 反応による炭素鎖の伸長とヒドリド還元により、基質の第一級アルコールを合成した。これらを用い環化生成物の標品を合成に取り組むとともに、合成した第一級アルコールを基質として酸化する微生物をスクリーニングした。これまでの検討では、目的の反応を立体選択的に進行するような生体触媒の発見には至っていない。

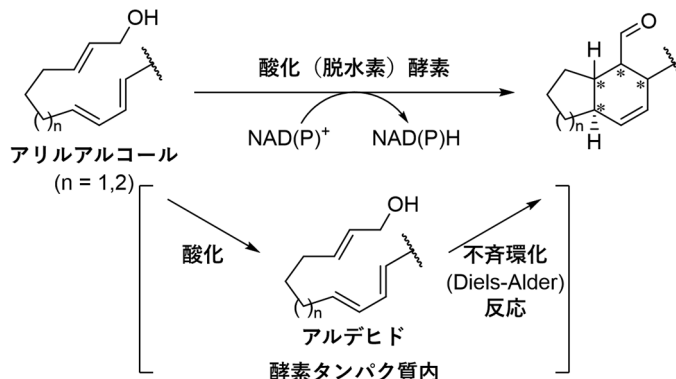


図3. 生体触媒をトリガーとするドミノ型酸化 - 不斉環化

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Monna Takashi、Fuhshuku Ken-ichi	4. 巻 497
2. 論文標題 Biocatalytic reductive desymmetrization of prochiral 1,3-diketone and its application to microbial hormone synthesis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Catalysis	6. 最初と最後の頁 111217
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.mcat.2020.111217	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小西 恭平、富宿 賢一
2. 発表標題 立体化学の解明のためのmycenolide Aの合成研究
3. 学会等名 日本化学会第103春季年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 杉本 圭伍、門奈 嵩土、角丸 啓悟、鈴木 悠介、富宿 賢一
2. 発表標題 生体触媒反応を鍵反応とする微生物ホルモンの合成研究
3. 学会等名 日本化学会第103春季年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 角丸 啓悟、櫻井 篤、富宿 賢一
2. 発表標題 光学活性なブテノライドの合成を志向する生体触媒不斉異性化反応の開発
3. 学会等名 日本化学会第103春季年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 櫻井 篤、石井 修介、川島 丈、吉富 翔悟、富宿 賢一
2. 発表標題 生体触媒による光学活性ブテノライドの合成
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関