

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月10日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590027

研究課題名（和文） オーダーメイドの固定化人工酵素の開発

研究課題名（英文） Creation of tailor-made immobilized artificial enzymes

研究代表者

日置 英彰（HIOKI HIDEAKI）

群馬大学・教育学部・教授

研究者番号：00208737

研究成果の概要（和文）：酵素のように高い反応効率と基質特異性をもち、かつ再利用可能な固定化触媒を効率よく作製する方法を検討した。ホスト分子として潜在能力の高いカリックスアレーンをプラットフォームとし、その4本のupper rimに2種類のペプチドアームを導入する方法を確立し、約10万種類からなるホストライブラリーの合成に成功した。現在合成したライブラリーから触媒活性を有する物質の探索を行っている。

研究成果の概要（英文）：Effective method for the creation of immobilized tailor-made catalysts possessing high reaction efficiency and substrate specificity like enzymes was investigated. Peptidocalixarene library, which has four arms consisting two kinds of peptides on the upper rim was synthesized. The library consists *ca* 100000 members. Exploring the highly reactive catalyst in the library is now under investigation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：有機化学

科研費の分科・細目：薬学・化学系薬学

キーワード：カリックスアレーン、触媒、コンビナトリアル化学

## 1. 研究開始当初の背景

酵素反応は基質特異的、立体選択的に進行するので、有機合成化学の分野では鏡像異性体の速度論的分割や不斉合成などに利用されている。しかしその高い特異性から適用できる基質は制限され、望み通りの反応が進行

するかどうかは、試行錯誤を繰り返すことになる。一方、一般の化学反応は酵素反応と異なり汎用性が高く、幅広い基質に適用が可能である。しかしひるがえって考えてみると、基質特異性が低いということは、分子内に複数の類似した官能基が存在する中で、望みの

官能基のみに対して選択的に反応させることや、種々雑多な化合物群が存在する中で望みの基質のみを反応させることが難しいことを意味する。この両者の欠点を解消するためには、オーダーメイドの人工酵素を容易に作製する技術を開発する必要がある。

## 2. 研究の目的

オーダーメイドの人工酵素といえば、抗体触媒が有名である。しかし生体触媒はタンパク質で構成されているので、有機溶媒や熱に対する安定性などの点において有機合成反応に利用するには限界がある。また抗体触媒の作製には特別な設備が必要であること、免疫してから触媒を見つけだすまで長い時間がかかるなどの理由から、実用例が非常に少ないのが現状である。

一方、秩序ある混合物を効率よく一気に合成するコンビナトリアルケミストリーの手法を用いて、標的分子に対して強く、選択的に結合するホスト化合物が数万種の化合物群（ライブラリー）から効率よく見いだされている。ここで構築されたライブラリーはいわば人工抗体と捉えることができるので、抗体触媒の作製と同様な方法で触媒開発ができると考えた。すなわち合成したライブラリーの中から、ねらいの反応の遷移状態アナログと選択的に結合するホスト分子を見つけることができれば、これが目的とする反応を基質特異的に触媒する分子となると期待できる。

本研究はコンビナトリアル化学の手法と用いて基質特異的にねらいの反応のみを進行させることが可能なオーダーメイドの酵素様触媒を得る一般的な手法を開発することを目的とする。

## 3. 研究の方法

ベンゼン環が環状に4個連なったカリックス[4]アレーン<sup>1</sup>は、種々の官能基の導入法が確立されており、これを上手に修飾すれば分子量200程度の低分子から分子量1万以上のタンパク質まで幅広い分子を包接することが可能である。さらに単にゲストを認識するだけでなく、酵素類似機能を有する誘導体も報告されている。そこで機能性素子として潜在能力の高いカリックスアレーンを基盤として触媒機能を有するホストライブラリーを構築すれば、その中から標的分子のみが望みの反応を行う人工酵素を容易に見つけ出すことができると考えた。

筆者はこれまでにカリックス[4]アレーンのupper rimに4本のペプチドアームをもつ化合物の合成法を確立し、さらにこのアームに10種類のアミノ酸を3個結合させた1000種類からなるペプチドカリックスアレーンライブラリーの合成にも成功している。しかし、高活性な触媒の探索を指向したライブラリーを合成するためには、4本のアームに異

なるアミノ酸を導入する一般的な合成法を確立する必要があるため、最初にそのライブラリーの合成法を検討した。また、ビルディングブロックを精査し、かつライブラリーサイズも大きくすることで高活性な触媒が得られるよう工夫した。触媒活性については、手始めに遷移状態がよく研究されているエステルの加水分解について検討することとし、実験に着手した。

## 4. 研究成果

合成を計画したカリックスアレーンライブラリーを**1**に示す。4本のアームにすべて異なるアミノ酸を導入するのはむずかしいと判断し、アームを二つのグループに分け、隣同士のアームにはそれぞれに異なったビルディングブロックを導入することにした。ビルディングブロックの数を多くするとコア化合物を大量に準備する必要があるため、7種類に限定し、約10万種類からなるライブラリーを合成することにした。

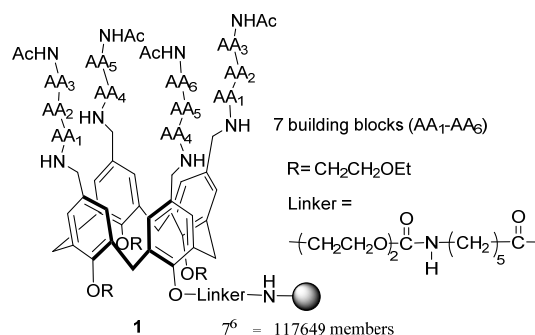
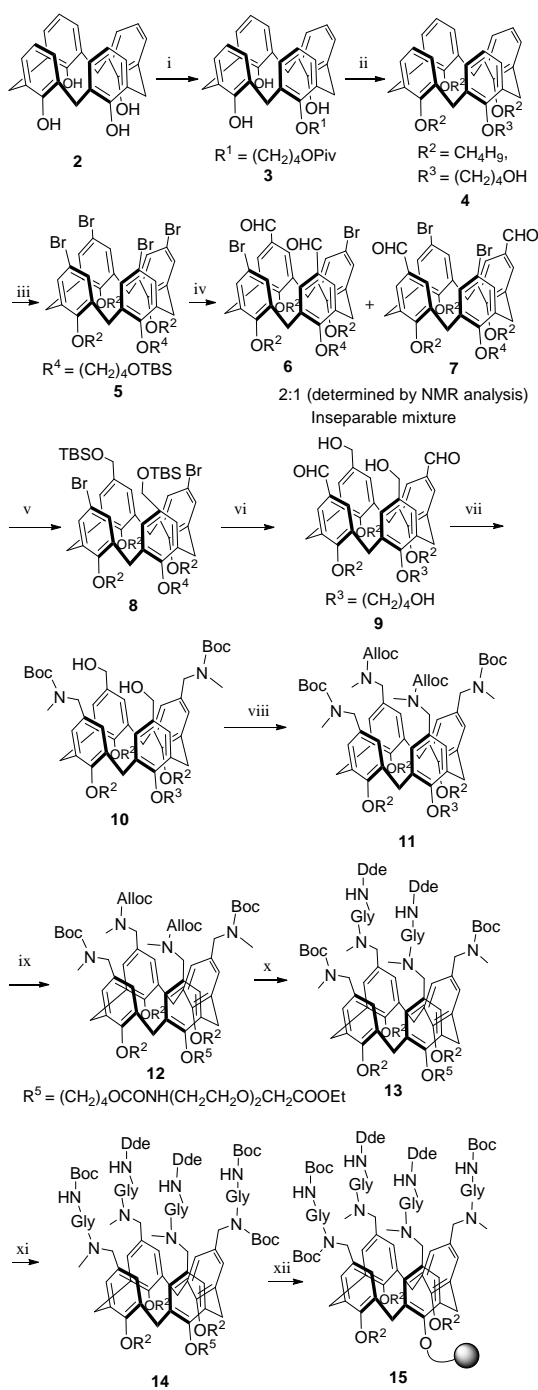


図1. 二つの異なるアームを有するペプチドカリックスアレーン

二つの異なるアームを導入するためには、ビルディングブロックを導入する前のコア化合物の4個のアミノ基を2種類の異なる保護基保護する必要がある。そのために等価な4個のベンゼン環を如何に区別して官能基変換するかが鍵になる。

実際の合成経路をスキーム1に示した。まずカリックス[4]アレーン(2)のlower rimから固相担体に結合させるため、一つのフェノール水酸基を選択的にアルキル化した。このアルキル化の選択性は低く、少量のアルキル化剤を加え、原料を回収しながら何度か行うことで49%の収率で3を得た。次にupper rimの選択的官能基を行った。多くの条件検討の結果、Reinhoudtの方法を採用することとした。テトラプロモカリックスアレーン5へ導いた後、2等量の*n*-ブチルリチウムでチリオ化後、DMFによって向かい合ったベンゼン環を選択的にホルミル化した。このとき、lower rimの修飾に起因する、二つの異性体がNMRで確認されたが、分離が困難であること、両異性体を分離しなくともライブラリー合成後の触媒活性に差が生じる可能性が少ないことから混合物のまま先に進むことにした。以



スキーム 1. 二つの異なるアームを有するペプチドカリックスアレーン

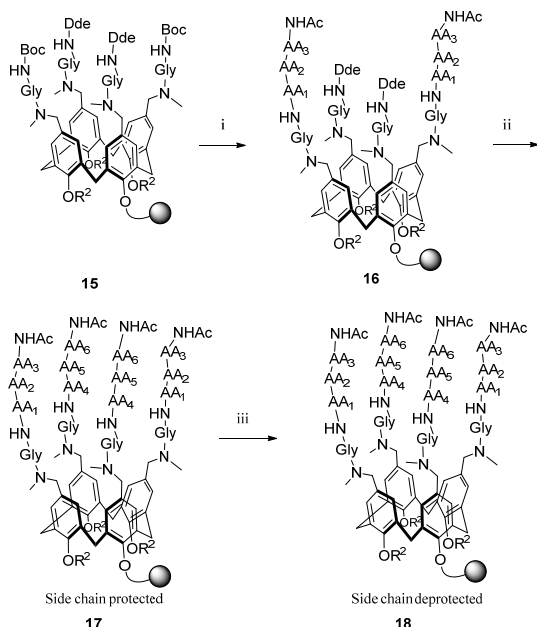
反応条件 (i)  $\text{TsO}(\text{CH}_2)_4\text{OPiv}$ ,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{CH}_3\text{CN}$ , 49% (BRSM) (ii) (a)  $n\text{-BuBr}$ ,  $\text{NaH}$ , (b)  $\text{DIBAL-H}$ ,  $\text{DCM}$ , 92% (iii) (a)  $\text{PyHBr}_3$ ,  $\text{DCM}$ ,  $\text{MeOH}$ , (b)  $\text{TBSCl}$ ,  $\text{Et}_3\text{N}$ ,  $\text{DMAP}$ ,  $\text{DCM}$ , 60% (iv) (a)  $n\text{-BuLi}$ ,  $\text{DMF}$ ,  $\text{THF}$ , 100% (v) (a)  $\text{NaBH}_4$ ,  $\text{EtOH}$ ,  $\text{THF}$ , (b)  $\text{TBSCl}$ ,  $\text{imidazole}$ ,  $\text{DMF}$  78%, (vi) (a)  $n\text{-BuLi}$ ,  $\text{DMF}$ ,  $\text{THF}$ , (b) 1 M  $\text{HCl}$ ,  $\text{MeOH}$ ,  $\text{THF}$ , 75%, (vii) (a)  $\text{MeNH}_2$ ,  $\text{H}_2$ ,  $\text{Pd}(\text{OH})_2$ ,  $\text{EtOH}$ , (b)  $\text{Boc}_2\text{O}$ ,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , 1,4-Dioxane,  $\text{H}_2\text{O}$ , 98%, (viii) (a)  $\text{MnO}_2$ ,  $\text{DCM}$  (b)  $\text{MeNH}_2$ ,  $\text{H}_2$ ,  $\text{Pd}(\text{OH})_2$ ,  $\text{EtOH}$ , (c)  $\text{AllocCl}$ ,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , 1,4-Dioxane,  $\text{H}_2\text{O}$ , 91%, (ix) (a)  $\text{Triphosgene}$ ,  $\text{PhNMe}_2$ ,  $\text{DCM}$ , (b)  $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_2\text{CH}_2\text{COOEt}$ ,  $\text{DIEA}$ ,  $\text{DCM}$ , 85%, (x) (a)  $\text{Pd}_2(\text{dba})_2$ ,  $\text{dppb}$ ,  $\text{thiosalicylic acid}$ ,  $\text{THF}$ , (b)  $\text{Dde-GlyOH}$ ,  $\text{FDPP}$ ,  $\text{DIEA}$ ,  $\text{DCM}$ , 56%, (xi)  $\text{TFA}$ ,  $\text{DCM}$ , (b)  $\text{Boc-GlyOH}$ ,  $\text{FDPP}$ ,  $\text{DIEA}$ ,  $\text{DCM}$ , 66%, (xii) 1 M  $\text{NaOH}$ ,  $\text{EtOH}$ , (b) 2-acetyl dimedone,  $\text{DIEA}$ ,  $\text{EtOH}$  83%, (c)  $\text{NovaSynTG amio resin}$ ,  $\text{HOBT}$ ,  $\text{DIC}$ ,  $\text{DMAP}$

下のスキームには便宜上一つの異性体のみを記してある。

続いてホルミル基をアルコールに還元後、シリルエーテル **8** とし、残り二つの臭素原子を同様な方法でホルミル化した。生成したホルミル基はメチルアミンとの還元的アミノ化に付し、生成したアミノ基は Boc 基で保護して **10** へ導いた。さらに二つのベンジルアルコールを選択的に二酸化マンガンで酸化後、同様に還元的アミノ化、Alloc 基による保護を経てアームの区別に成功した。最後に lower rim のヒドロキシブチル基をカルバメート化しながら適当な長さのリンカーを導入してエステル **12** へ導いた。

ここで **12** のエステル部を加水分解してアミノメチル化された固相担体に担持すればコア化合物の合成を完了することになるが、ひとまず液相でアミノ酸の導入を検討した。驚いたことに upper rim の反応性が極端に落ちており、グリシンのような立体的に小さなアミノ酸しか収率よく導入できないことがわかった。窒素上にメチル基が存在すること、そして隣の二つのアームには立体的に大きな保護基がついていることが原因と思われる。そこで、**6** と **9** の段階でホルミル基を一級アミンへ変換するなど、コア化合物の合成法を種々検討したが、どれも収率よく変換することができなかった。そこでやむなくアミノ基にグリシンを導入し、そこからペプチド合成を行うこととした。まず、**12** の Alloc 基を除去した後、Dde-グリシンを導入し **13** とし、その後 Boc 基をはずして Boc-グリシンを導入して **14** とした。最後にエステル部を加水分解し、固相に担持して **15** へ導いた。このとき、一部 Dde 基の脱落が認められたので、再度 Dde 基を導入した。**14** ではアミノ酸が容易に導入できることが確認できたので、この経路でコア化合物の合成を行うことを決め、**15** の大量合成を行った。

キモトリプシンなど多くの加水分解酵素では、ヒスチジン、アスパラギン酸、セリンなどがプロトンの伝達に関与しており、これが反応の促進に大きく寄与している。そこで極性の高いアミノ酸残基をビルディングブロックに用いることにした。用いたアミノ酸は、アルギニン、ヒスチジン、リジン、グルタミン酸、アスパラギン、チロシン、セリンの 7 種類である。Fmoc 法によりこれらアミノ酸残基を各アームに順次導入した。まず、**15** の Boc 基をはずして、スプリット合成により 3 個アミノ酸を縮合させ、N 末端をアセチル基でキャップし **16** とした。次にヒドラジンで Dde を除き、同様な操作を行って、 $7^6 = 117949$  種類のペプチドカリックスアレーン **17** とし、最後にアミノ酸の側鎖の保護基をトリフルオロ酢酸で除去して合成を完了した。(スキーム 2)



スキーム2. ペプチドカリクスアレーンライブラリーの合成

反応条件 (i) 50% TFA, PhSH, DCM (b) encoded split Fmoc peptide synthesis, 3times (c) Ac<sub>2</sub>O, Et<sub>3</sub>N, DCM (ii) (a) 2% hydrazine, DMF (b) encoded split Fmoc peptide synthesis, 3times (c) Ac<sub>2</sub>O, Et<sub>3</sub>N, DCM, (iii) TFA, TIPS, H<sub>2</sub>O

最後にエステル **19** の加水分解を促進する触媒の開発をめざして、その遷移状態アナログとなるリン酸エステル **20** と結合実験を行った。バインディングアッセイは筆者が以前に開発したポストラベル化法によるオンビーズカラーアッセイを用いた。残念ながら、多くのライブラリーメンバーと **20** が結合してしまい、選択性は非常に低いものとどまった。水中でのアッセイであったため、カリクスアレーンの lower rim の疎水性部分と非特異的な相互作用を起こしてしまったと考えている。

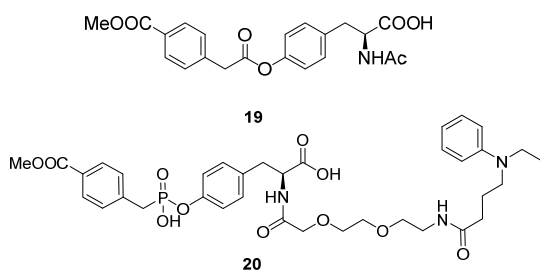


図2. 加水分解反応の基質**19**とその遷移状態アナログ**20**

今後は疎水性相互作用をおさえることができる有機溶媒中での反応（アルドール反応など）をデザインすることとし、抗体触媒のハプテンを手本に遷移状態アナログの合成を行って再度検討する予定である。

## 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)

[雑誌論文] (計3件)

- ① Hideaki Hioki, Kimihito Matsushita, Takeshi Noda, Kota Yamaguchi, Miwa Kubo, Kenichi Harada, Yoshiyasu Fukuyama, Solid-phase synthesis of benzothiazoles using an alkoxyamine linker., *Tetrahedron Lett.*, 査読有, vol. 53, No. 33, 2012, pp. 4337-4342.
- ② Kenichi Harada, Akiko Imai, Kazuharu Uto, Rich G. Carter, Miwa Kubo, Hideaki Hioki, Yoshiyasu Fukuyama, Synthesis of the ABC ring system of Jiadifenin via Pd-catalyzed cyclizations., *Org. Lett.*, 査読有, vol. 13, No. 5, 2011, pp. 988-991.
- ③ Kimihito Matsushita, Chieko Okamoto, Mayumi Yoshimoto, Kenichi Harada, Miwa Kubo, Yoshiyasu Fukuyama, Hideaki Hioki, Novel alkoxyamine linker to load ketones for solid-phase synthesis: Application of the synthesis of 1,4-benzodiazepine-2-ones., *J. Comb. Chem.*, 査読有, vol. 12, No. 3, 2010, pp. 311-314.

[学会発表] (計4件)

- ① 山口滉太, 樋口優介, 日置英彰, アルコキシアミンリンカーを用いたベンズアゾール類の固相合成法の開発, 日本薬学会第133年会, 2013.3.30, パシフィコ横浜(神奈川県)
- ② 山口滉太, 樋口優介, 松下公人, 原田研一, 久保美和, 福山愛保, 日置英彰, 基質をオキシムとして担持するアルコキシアミンリンカーを用いたベンズアゾール類の固相合成法の開発, 日本化学会関東支部群馬地区地域懇談会, 2011.12.10, 群馬大学工学部 (群馬県)
- ③ 新井逸実, 樋口優介, 松下公人, 原田研一, 久保美和, 福山愛保, 日置英彰, アルコキシアミンリンカーを用いたベンゾジアゼピン類の固相コンビナトリアル合成, 日本化学会関東支部群馬地区地域懇談会, 2011.12.10, 群馬大学工学部 (群馬県)
- ④ 松下公人, 原田研一, 久保美和, 福山愛保, 日置英彰, アルコキシアミンリンカーを用いたベンゾジアゼピン類の固相コンビナトリアル合成とその抗マラリア活性, 第60回有機合成化学協会関東支部シンポジウム, 2010.12.4, 新潟薬科大学 (新潟県)

[図書] (計0件)

なし

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

なし

○取得状況 (計0件)

なし

〔その他〕  
ホームページ等  
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

日置 英彰 (HIOKI HIDEAKI)  
群馬大学・教育学部・教授

研究者番号：00208737

(2) 研究分担者  
なし

(3) 連携研究者  
なし