

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580152

研究課題名(和文) 酵素法 - 化学合成を組み合わせた生産系の効率向上をめざす基質分子の設計と合成

研究課題名(英文) Design and synthesis of highly efficient substrate compatible to chemo-enzymatic 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：60171120

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：酵素触媒と有機合成をあわせて活用する物質生産プロセスの効率向上を目指し、反応速度論上のパラメーターが好適で、かつ反応媒体にもよい親和性を示す基質を分子設計、合成した。具体的には、まず、微生物全菌体還元を基質として機能する  $\alpha$ -ハロケトン構造最適化を行った。そのものを基質とし、新規に探索した酵素を用いた還元を鍵段階として、テルブタリンの合成を達成した。一方、位置選択性および官能基多様性を最大限に発揮できる、アラビノースやグリカル誘導体を基質設計し、大量合成法を確立した。後者では酵素反応生成物に対する立体選択的 Ferrier 反応を可能とし、L-フコースやL-グルコースの合成前駆体へと導いた。

研究成果の概要(英文)：Under these circumstances that biocatalytic transformation is widely used, two approaches, the elaboration of "substrate molecular technology" and "quest of biocatalysts" should be emphasized. The aim of this approach is to find the optimized structure and synthetic routes of substrates, which would be maximally advantageous for both selectivity of enzyme-catalyzed reaction, and the total efficiency to target molecules. As the results through the research, three topics were achieved: 1) the exploration of the structure of  $\alpha$ -haloketones which would be highly and efficiently reduced by stereoselective whole-cell microorganisms; 2) development of the structure of sugar oxazolines and glycol derivatives which serves free functional groups requisite for regio- and stereoselective transformation such as Ferrier reaction, were established. Based on them, new routes for (R)-terbutaline hydrochloride and rare sugars became available.

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 酵素合成 糖質化学 応用微生物学

様式 C-19、F-19、Z-19 (共通)

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、長期的視点から我々に課せられた命題である。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、この問題解決のカギになると期待され、特にエネルギーの節約という観点から重要である。また天然資源由来の糖質やアミノ酸類などは、多官能性ゆえ、そのままでは化学合成の基質として用いることができないものが多く、官能基変換には微生物・酵素が大きな力を発揮する。しかし高選択性、反応性とはうらはらに、「基質特異性」の制約に起因して応用範囲は必ずしも広くない、という状況がその当時の問題点であった。

2. 研究の目的

酵素触媒と有機合成をあわせて活用する物質生産プロセスの効率向上を目指し、反応速度論上のパラメーターが好適で、かつ反応媒体にもよい親和性を示す基質を分子設計、合成する。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検討する。さらに反応の結果もたらされる効率・阻害などの情報を活用し、新規酵素機能のスクリーニングを並行して行うこととした。

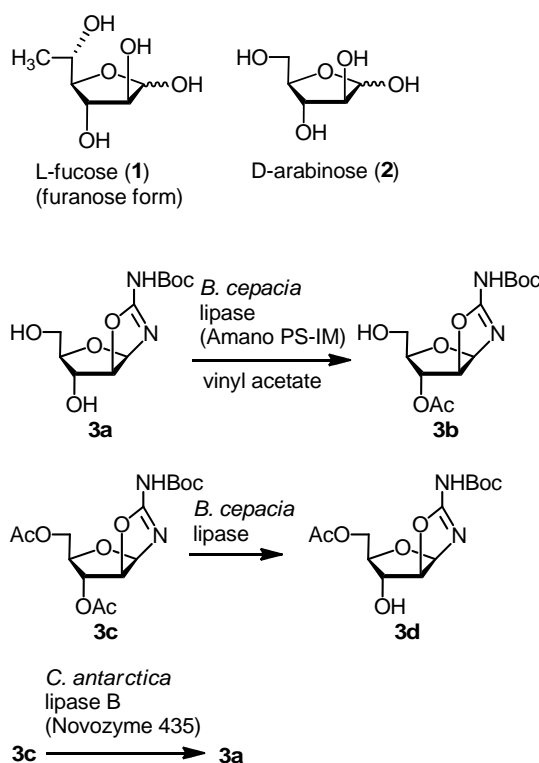
3. 研究の方法

研究期間を通じ一貫して、各種加水分解や酸化還元酵素に対し活性が高く、かつ、特徴ある骨格や官能基を有する基質を分子デザインし、化学合成した。酵素による物質変換、生成物をさらに立体・位置選択的に変換しうる化学的手法の新規開拓につとめた。テルブタリンや希少糖前駆体合成法確立などの成果に反映されている。

4. 研究成果

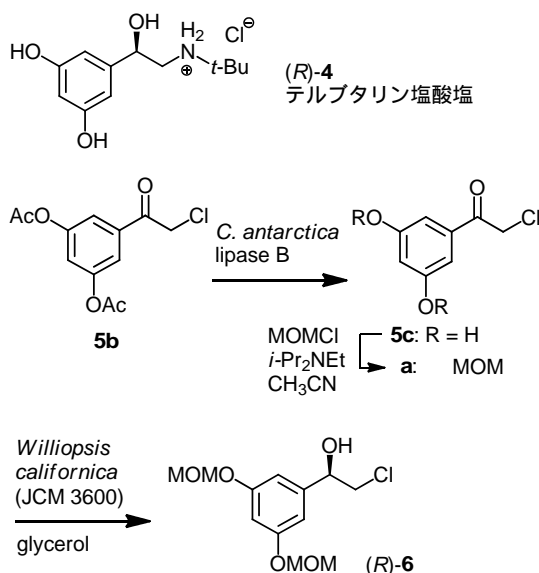
平成23年度：

L-フコース (1) は、白血球やがん細胞が血管内皮細胞と接着する際に関与する sialyl LeX や、血液型決定因子を構成する重要な糖である。フラノース型で投影すると、アラビノースの非還元末端から一炭素増炭した関係にあることに着目し、D-アラビノース (2) から合成するルートを検討することとした。一段階で得られるアミノオキサゾリン(3a)やアセチル体(3c)として、各種リパーゼによる処理を試み、酵素の種類による相補的な選択性を見出すことができた。



平成 24 年度：

抗喘息薬(R)-テルブタリン塩酸塩(4)の合成に向け、前駆体となる  $\alpha$ -クロロアセトフェノン(5a)の酵母不斉還元を試みた。ジアセタート(5b)の脱アセチル化には、*Candida antarctica* 由来のリパーゼ B を用いた加水分解が、基質の分解を伴うアルカリ加水分解に比べ圧倒的に有効であることを見出した。

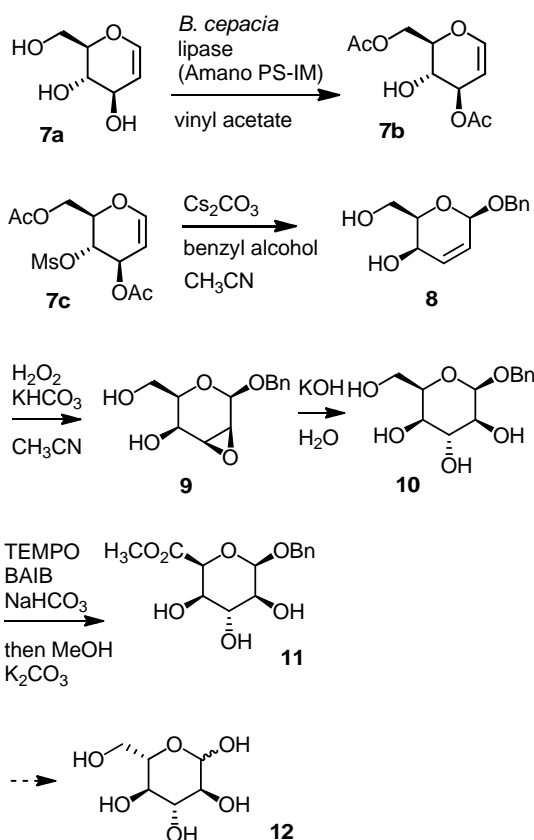


ケトン(5a)を基質とし、*Williopsis californica* を収率・立体選択性の観点から選抜した。しかし生成物(R)-6 の鏡像体過剰率はばらつきが見られ(63-99%)、再現性向上を指標に培養・反応条件を検討した。この問題解決には前培養・反応時にグリセロールを添加するこ

とが有効で、再現性良く 98.4% ee、収率 80% で(R)-6 が得られるようになった。この結果から、還元にはグリセロール脱水素酵素の関与が強く示唆された。

平成 25 年度：

リパーゼによる位置選択的アセチル化(7a)→(7b)を経て得られる、D-グルカール誘導体(7c)に対する Ferrier 反応を検討、セシウムアルコキッドを作用させると、アノマー位がβ配向の生成物(8)が得られることが判明した。



4-位ヒドロキシ基の配向を利用し、ペイン酸化の条件で立体選択的にエポキシ化、良好な収率でエポキシド(9)を得た。このものに対し、水酸化物イオンを求核剤として用い、エポキシドを位置選択的に開環、高い収率でD-グルコースの2,3,4-位を全て反転させた物質に相当するイドシド(10)へ変換した。ここから第一級アルコールを位置選択的に酸化、ラクトンの開環で、メチルエステル(11)を調製した。5位のエピメリ化によってL-グルコース(12)への変換を試みている。

一連の研究を通じ、「保護基工学」的手法についても知見を得た。容易に入手可能な原料から、分子標的薬を合成するにあたって、保護基は可能な限り避けるべきアイテムである。しかし、「必要悪」を逆手にとって1) コストが安く、良いタイミングで、安価で穏和な条件で脱保護できる、しかも廃棄物も環境によい；2) 化合物の物性を変え、さらに脱保

護の中間体の物性を改善するなど、逆に効果的に活用する新しい手法を開拓した。

## 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 7件)

古田未有、花屋賢悟、庄司 満、須貝 威：微生物酵素触媒を高度に活用する - 合成経路デザインにおける、基質分子工学と触媒探索の重要性 - ；有機合成化学協会誌、**71**, 237-246 (2013) 査読有。

<http://dx.doi.org/10.5059/yukigoseikyokaishi.71.237>

R. Kobayashi, T. Itou, K. Hanaya, M. Shoji, N. Hada, T. Sugai, Chemo-enzymatic transformation of naturally abundant naringin to luteolin, a flavonoid with various biological effects; *J. Mol. Catal. B: Enz.*, **92**, 14-18 (2013). 査読有. DOI:

10.1016/j.molcatb.2013.03.002

S. Ohba, H. Okazaki, Y. Ueda, K. Hanaya, T. Sugai, (-)-Benzyl 2,3-dideoxy-β-D-erythro-hex-2-enopyranoside; *Acta Cryst.* **E69**, o1811 (2013) 査読有.

doi:10.1107/S1600536813031140

K. Asami, T. Machida, S. Jung, K. Hanaya, M. Shoji, T. Sugai, Synthesis of (R)-bambuterol based on asymmetric reduction of

1-[3,5-bis(dimethylcarbamoyloxy)phenyl]-2-chloroethanone with incubated whole cells of *Williopsis californica* JCM 3600; *J. Mol. Catal. B: Enz.*, **97**, 106-109 (2013) 査読有. DOI: 10.1016/j.molcatb.2013.08.003

D. Tokoshima, K. Hanaya, M. Shoji, T. Sugai, Whole-cell yeast-mediated preparation of (R)-2-chloro-1-(3-nitrophenyl)ethanol as a synthetic precursor for

(R)-phenylephrine; *J. Mol. Catal. B: Enz.*, **97**, 95-99 (2013) 査読有. DOI:

10.1016/j.molcatb.2013.07.021

R. Kobayashi, K. Hanaya, M. Shoji, K. Umezawa, T. Sugai, A Chemo-enzymatic Expedient Route to Racemic Dihexanoyl (2*R*\*,3*R*\*,4*R*\*)-DHMEQ (Dehydroxymethyl epoxyquinomycin), the Precursor for Lipase-catalyzed Synthesis of (2*S*,3*S*,4*S*)-DHMEQ, a Potent NF-κB Inhibitor; *Chem. Pharm. Bull.*, **60**, 1220-1223 (2012). 査読有.

<http://dx.doi.org/10.1248/cpb.c12-00417>

S. Taketomi, M. Asano, T. Higashi, M. Shoji, T. Sugai, Chemo-enzymatic routes for (R)-terbutaline hydrochloride based on microbial asymmetric reduction of α-haloacetophenones; *J. Mol. Catal. B: Enz.*, **84**, 83-88 (2012) 査読有.

DOI:10.1016/j.molcatb.2012.01.020

〔学会発表〕(計 4件)

岡崎隼人、植田裕二、大場茂、羽田紀康、  
花屋賢悟、庄司満、須貝 威、β-選択的  
Ferrier 反応を鍵段階とする、L-グルコー  
スの合成研究、日本化学会大 94 春季年会、  
名古屋大学、2014/03/28

須貝 威、つねに再生・進化する酵素・バ  
イオ触媒～ファインケミカル合成におけ  
る活用、第二回 CSJ 化学フェスタ 2012、  
東京工業大学、2012/10/16

T. Sugai, Y. Yamashita, Y. Niitsu, M. Hamada,  
C. Hiraoka, T. Higashi, M. Shoji, The  
complementary and integrated  
chemo-enzymatic processes for fine  
chemical syntheses, APCChE2012 (invited  
lecture), Singapore, 2012/2/23

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0件)

○取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

なし

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