

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450143

研究課題名(和文) 微生物酵素触媒を活用する効率的有機合成

研究課題名(英文) Efficient organic synthesis utilizing microbial enzyme catalysts

研究代表者

須貝 威 (SUGAI, Takeshi)

慶應義塾大学・薬学部(芝共立)・教授

研究者番号：60171120

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：温和な条件下優れた活性を示し、高い立体・位置・官能基選択性で反応が進行、かつ、化学触媒に比べ製造速度が格段に速い酵素を一層活用することを目標に、化学-酵素複合合成を検討した。具体的成果として、位置選択性を活用し、フェノール性生物活性物質アルテピリンC、セリノン、アストリンギンを合成した。反応媒体として水を使わず、酸・塩基の影響を受けにくいエステル交換は光学分割にも有用であり、(R)-3-ヒドロキシ-N-メチルピペリジンを、ラセミ体の速度論的光学分割により調製した。さらに、遠隔不斉認識能を明らかにし、キラル誘導分析試薬であるMNBカルボン酸メチルエステルの両鏡像体も合成した。

研究成果の概要(英文)：Complementary and synergistic utilization of enzyme-catalyzed reactions and chemical transformation was studied, toward the efficient synthesis of complex target molecules involving valuable natural and unnatural products. The achievements are shown below. Lipase-catalyzed transesterification proceeded with specific site-selectivity contrasting to chemical transformations, and the syntheses of selinone and astringin, artepillin C became successful. It was revealed that the transesterification under non-aqueous conditions was advantageous for the substrates which are labile to water and/or prone to protonation under aqueous conditions. The preparation of highly enantiomerically pure (R)-3-hydroxy-N-methylpiperidine by the lipase-catalyzed kinetic resolution of corresponding racemate was established. The synthesis of enantiomers of NMB carboxylic acid was also successful, by discriminating the stereochemistry of remote chiral center in a primary acetate, as the key step.

研究分野：有機合成化学、生物有機化学

キーワード：立体選択的反応 位置選択的反応 リパーゼ触媒 ポリフェノール 複素環化合物

1. 研究開始当初の背景

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、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状況にあった。

2. 研究の目的

本課題期間では、1)水中、体温程度の温度で優れた活性を示し、2)高い立体・位置・官能基選択性で反応が進行、3)あらゆる化学触媒に比べ、微生物を活用できるため製造速度が格段に速い、という特長を持つ酵素を一層活用することを目指し、複雑な標的化合物を対象として、化学・酵素法を相補的、相乗的に活用する複合成成を検討する。

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、化学合成する。本研究には、 K_m が小さく、 k_{cat} が大きいなど、速度論上のパラメーターが反応実施に好適で、かつ反応媒体に高い溶解性を示すなど親和性のよい基質の分子設計が重要である。生体内で重要な情報伝達を担う生物活性天然有機化合物、新しいバルク材料など、多様な化合物を最終的標的物質とし、効率のよい合成を試みる。特に合成中間体の大量供給を可能とする生産方法、合成経路について検討する。

4. 研究成果

平成26年度

2-Methyl-2-(2'-naphthyl)-1,3-benzodioxole-4-carboxylic acid (MNBカルボン酸)は、アミノ酸のように不斉中心を有する生体物質の鏡像異性体比を分析する目的で、大類、西田らにより開発されたキラル誘導分析試薬である。[2-methyl-2-(2'-naphthyl)-1,3-benzodioxol-4-yl]methyl acetateを基質とし、リパーゼを用いた速度論的分割を活用したMNBカルボン酸の両鏡像体の効率的調製法の確立を図った。THFを溶媒とし、求核剤として作用する2-プロパノール存在下、ラセミ体の基質に*B. cepacia*リパーゼを作用させると、一方の鏡像体が優先的に反応し、鏡像選択比を示すE値は72であった。得られた両鏡像体の鏡像体過剰率をさらに向上させようと、一度分割した両鏡像体を基質として再度リパーゼによるエステル交換で速度論的分割を試みた。まず、fast isomerである(R)-アセタートは、エステル交換で得られた2-methyl-2-(2'-naphthyl)-1,3-benzodioxol-4-yl]methanol (90.8% ee)を再度アセチル化、エステル交換に付した。転

換率90%で反応を停止したところ、得られた(R)-アルコールの鏡像体過剰率は99.4%まで向上した。一方、反応の遅い(S)-アセタートは、一般的な速度論的分割の原理に従えば、反応の進行に伴って、その鏡像体過剰率は100%に近づくはずである。しかし、本反応では反応が進行するにつれ、立体障害が小さく反応性の高い第一級アルコールが生じる。このものがアシル酵素中間体に再び求核攻撃して元のエステルに戻る逆反応が進行し、結果として転換率を上げて鏡像体過剰率が上昇しなくなる可能性が高い。このような逆反応を避けようと、初回のエステル交換を転換率48%で一旦停止、fast isomerから生じたアルコールを除いた後、反応で残った(S)-アセタート(87.2% ee)を再度エステル交換に付したところ99.8% eeで(S)-アセタートを得た。このようにして得られたアルコールの両鏡像体は、温和な条件で、MNBカルボン酸のメチルエステルへと変換した。

平成27年度

リパーゼの位置選択的脱アセチル化能力を活用する、プロポリス由来のプレニル化フェノール、アルテピリンCの効率的合成を達成した。プロポリスは、ヨーロッパを中心に古くから抗菌、抗炎症作用を有する民間薬として用いられ、日本では、健康補助食品として病気の予防、治療目的で服用されている。本研究では、4-メトキシフェノールから出発し、2,6-ジアリル-4-メトキシフェノールを経由する合成を試みた。2-メチル-2-ブテンとのクロスメタセシスで、ジプレニル体に導き、酸化的脱メチル化でジオールとし、位置選択的反応を経て溝呂木・ヘック反応の基質に誘導した。最後に、アクリル酸メチルとのカップリングを経てアルテピリンCを合成した。宮沢らは、ヒドロキノンジアシラートに対し、*C. antarctica*由来のリパーゼを触媒とし、第二級アルコールを求核剤として作用させると、かさ高い*t*-Bu基が隣接していない一方のアシル基のみが選択的に除去されると報告している。この先行例を参考に、本研究において鍵段階として、リパーゼを触媒とする、位置選択的脱アセチル化を検討した。上述のジオールをジアセタートとし、*C. antarctica*由来のリパーゼを触媒とし、求核剤兼溶媒として2-プロパノールを作用させたところ、目的とするモノアセタートを得、反応温度を50 にまで上げたところ、収率は定量的にまで上昇した。生じたモノアセタートの遊離ヒドロキシ基をトリフリル化し、高い収率で鍵中間体を調製することに成功した。

平成28年度

有用ポリフェノール類で、抗カビ作用を示すセリノンをナリングニンから、抗酸化性スチルベノイドであるアストリンギンをピセイドから合成、また、M3受容体に対する結合活性

が高く、動物実験においても強い気管支拡張効果を有する(R)-メペンゾラートの重要な出発原料である(R)-3-ヒドロキシ-N-メチルピペリジンを、ラセミ体の光学分割により調製する研究に取り組んだ。合成に際し要求される「位置・立体選択的変換」が最大の課題であり、以下にその成果を示す。セリノンの合成には、ナリンゲニンの7位と4'位のヒドロキシ基をアセチル化し、化学的に反応性が低い4'位を選択的に脱アセチル化しなければならない。その位置に選択的に反応させる酵素法として、テトラヒドロフラン中、2-プロパノールを求核剤として*C. antarctica* リパーゼBを作用させるエステル交換反応を見出した。配糖体の全アセチル体を基質として、この反応をアストリンギンの合成にも応用した。反応媒体として水を使わず、酸・塩基の影響を受けにくいエステル交換は光学分割にも有用であった。

アセチル基は安価で、温和な条件下で容易に導入可能である。しかし、酸・塩基性条件下における化学的な脆弱性により、これまでアルコールやフェノール性ヒドロキシ基の保護基として多段階合成に用いられた例は少ない。代表者は新しい選択的変換に加え、最終段階で不要になったアセチル基を脱保護する温和な条件をも見出したことにより、アセチル基を活用する有機合成化学の新しい可能性を拓いた。

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 5件)

Y. Yamashita, A. Biard, K. Hanaya, M. Shoji, T. Sugai. Short-step syntheses of naturally occurring polyoxygenated aromatics based on site-selective transformation; *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, **81**, (2017) 査読有.

10.1080/09168451.2017.1303362

Y. Yamashita, K. Hanaya, M. Shoji, T. Sugai. Preparation of (R)-3-hydroxy-N-methylpiperidine, a synthetic key intermediate of (R)-mepenzolate, based on the lipase-catalyzed resolution of the racemic form; *Heterocycles*, **95**, 370-379 (2017) 査読有. 10.3987/COM-16-S(S)28

Y. Yamashita, K. Hanaya, M. Shoji, T. Sugai. Simple synthesis of sakuranetin and selinone via common intermediate, utilizing complementary regioselectivity in the deacetylation of naringenin triacetate; *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, **64**, 961-965 (2016) 査読有.

org/10.1248/cpb.c16-00190

K. Yashiro, K. Hanaya, M. Shoji, T. Sugai. New synthesis of artepillin C, a prenylated phenol, utilizing lipase-catalyzed regioselective deacetylation as the key step; *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, **79**, 1926-1930 (2015) 査読有. 10.1080/09168451.2015.1058704

N. Natori, K. Nakagawara, M. Shoji, T. Sugai, K. Hanaya. Recognition of the remote chiral center in lipase-catalyzed kinetic resolution of [2-methyl-2-(2'-naphthyl)-1,3-benzodioxol-4-yl]methyl acetate, the precursor of 2-methyl-2-(2'-naphthyl)-1,3-benzodioxole-4-carboxylic acid (MNB carboxylic acid; *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **109**, 130-135 (2014) 査読有. 10.1016/j.molcatb.2014.08.010

[学会発表](計 5件)

坂倉彩香、山下泰信、恒川龍二、野城和貴、花村 駿、花屋賢悟、庄司 満、須貝 威、酵素触媒の位置選択性を活用したポリフェノール類の合成研究；生体触媒化学シンポジウム、2016年12月21日～2016年12月22日、明星大学(東京都日野市)

Y. Yamashita, K. Hanaya, M. Shoji, T. Sugai. Advantage of enzyme-catalyzed acetylation and deacetylation in the synthesis of useful products; The Fifth International Conference on Cofactors (ICC-05) and Active Enzyme Molecule 2016 (AEM 2016)(国際学会) 2016年09月04日～2016年09月08日 Kurobe Unazuki International Hall Selene (富山県黒部市)

須貝 威、花村 駿、花屋賢悟、庄司 満、木内文之、配糖体と酵素触媒を活用する、有用ポリフェノール類の合成研究；日本農芸化学会関東支部2015年度支部大会、2015年09月26日、お茶の水女子大学(東京都文京区)

K. Yashiro, K. Hanaya, M. Shoji, T. Sugai. Synthesis of artepillin C, based on lipase-catalyzed regioselective deacetylation; Biotrans 2015(国際学会) 2015年07月26日～2015年07月30日 Reed Messe Wien GmbH Congress Center (Wien, Austria)

名取直輝、花屋賢悟、庄司 満、須貝 威、リパーゼによる遠隔位不斉認識を利用したMNBカルボン酸の合成；有機合成化学協会関東支部シンポジウム、2014年5月17日、慶應義塾大学理工学部(神奈川県横浜市)

[図書](計 2件)

R. Tsunekawa, K. Hanaya, M. Shoji, T.

Sugai, Elsevier B. V., “Site-selective lipase-catalyzed acylation and deacylation in the synthesis of valuable carbohydrates and flavonoids from naturally abundant starting materials” in “Future Directions in Biocatalysis (Second Edition)” (2017)、総ページ数17
須貝 威、古田未有、丸善 「加水分解酵素を用いるエナンチオマー（鏡像異性体）の速度論的分割」; 有機合成実験法ハンドブック第2版 (2015)、pp. 779-781 (総ページ数3)

〔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

<https://www.youtube.com/watch?v=dB-D0JKHpes>

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