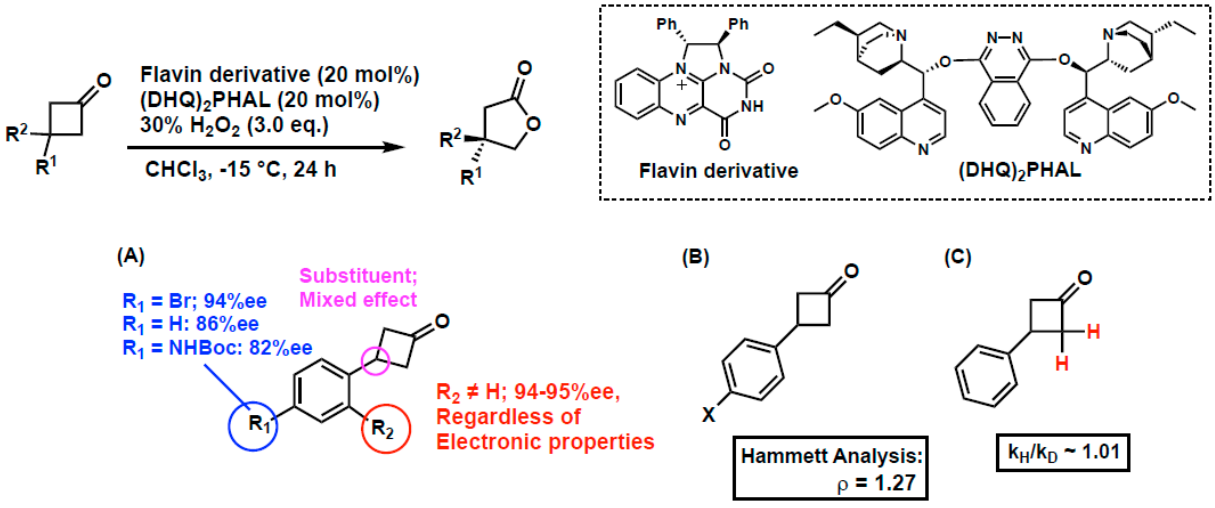
19　補酵素フラビンを基盤とする低環境負荷型触媒の開発	山本　佳奈

【目的】当研究室では低環境負荷型の生体内酸化反応を模倣した反応触媒開発に取り組んでおり、これまでに補酵素フラビン誘導体とアルカロイド 2 量体を組み合わせたイオン対触媒により、立体選択的バイヤービリガー（BV）反応を開発している。助成期間内では、この反応に関し高い立体選択性を示す基質および触媒の原理的裏付けを同定すること、より具体的には、1. 基質構造ー立体選択性相関、および 2. 反応機構の解析に向けた速度論解析を行い、これらにより反応機構の仮説をたてることを目的とした。最終的には立体選択性を決定づける反応遷移状態の仮説を立てることを目指している。

【方法および結果】1. 上記の BV 反応において高い立体選択性を示した化合物 3–フェニルシクロブタノンを基準として、そのフェニル基の置換基効果およびプロキラル中心となる 3 位について、基質特異性を調べることとした。まず基準化合物の類縁体を合成し、基準となる反応条件下での立体選択性の相違を比較検討する。基質の選定にあたっては、触媒の基質認識にフェニル基の π-スタッキング、触媒-基質間の水素結合などが関与していることが示唆されていたため、立体反発、水素結合形成の可否、そして電子効果の違いなどの比較対象が得られるように工夫した。また、4 級不斉中心炭素の有機合成上の有用性を鑑み、基準化合物の 3 位にメチル基を導入した基質についても検討した（下図 A)。まずオルト位置換の基質は、その電子効果や水素結合能によらず基準化合物よりも高い選択性を示した 。これはその効果が主に立体反発に起因することを示唆する。一方、パラ位に電子吸引基をつけた場合も同様な立体選択性の向上が見られたことから、電子効果もある程度は関与するとみられた。また、本反応では 3 位が 4 級の基質の選択性が低下したが、選択性の改善を期待してフェニル基のオルト位を臭素置換した基質を検討したところ、興味深いことに逆の選択性が得られた。2. 反応の律速段階における電子効果を同定するため、基準物質フェニル基のパラ位に様々な置換基を導入した化合物を合成し、それぞれの速度定数を求め Hammett 則に適用した（下図 B)。また、シクロブタノンの α-位を重水素交換させた基質を合成し、その同位体効果を解析した（下図 C)。これまでの結果から、Hammett 式の ρ 値が正であること、および 2 次的同位体効果がほぼ見られないことから、本反応律速が通常の BV 反応と異なり、酸化剤の付加段階であることが示唆された。これらの結果の包括的な説明は今後の計算化学を用いた反応遷移状態の解析を要する。今後は得られた情報を基に、本反応の基質汎用性および立体選択性の向上、さらに位置選択性の制御などを目指す。

立体選択的 BV 反応（A）基質–立体選択性相関（B）速度論解析結果（C）同位体効果



19. 補酵素フラビンを基盤とする低環境負荷型触媒の開発

山本　佳奈

早稲田大学 理工学術院 国際理工学センター

Key words：低環境負荷型触媒，バイオミメティック，補酵素フラビン，自己集合型触媒，イオン対触媒

緒　言

研究の背景：有機合成化学の方向性はかつては効率性や新反応のみに特化していたが、今世紀に入り環境負荷の少ない合成法が求められたことから、毒性の少ない金属触媒や有機触媒の開発へと一転した。しかし、酸化反応については企業プロセスに耐えうるクリーンな反応、特に安価な分子状酸素や過酸化水素を酸化剤とする反応は開発　が著しく遅れており「持続可能な開発目標（SDGs）」の目標を実現させる上で急務となっている。一方、酸化還元酵素による生体内酸化反応は環境負荷がゼロであり、その触媒機構を模倣した触媒設計は、求められている酸化還元触媒開発への手がかりとなる。

研究を始めた動機：我々は、環境負荷の少ない化学合成法、特に酸化触媒の開発に興味を持ち、特に酸化還元酵素に用いられる補酵素フラビンの誘導体に関する研究を続けてきた。低環境負荷反応を考える上で生体内反応を手がかりとするのはよく用いられる手法であるが、生体外で小分子である補酵素のみを用いて触媒を再構築する場合、触媒活性は得られてもタンパク質（酵素）という大きな反応場がないため、高い位置・立体選択性は失われてしまう。特に平坦なフラビン分子はその構造ゆえに不斉因子を組み込みにくいという問題があった。

この問題解決のため「分子集合触媒」の概念から発想を得て、酸性プロトンを持つフラビン誘導体と塩基性のアルカロイド 2 量体とで形成されるイオン対を触媒に用いることで、3 位の置換したシクロブタノンのバイヤービリガー（BV）反応を高立体選択的（96%ee）に進行させることに成功した［1］。分子を反応溶液中で弱い非共有結合により自発的に集合させることにより、フラビンと基質の相対的位置関係を含めた反応遷移状態を制御し得る、いわば酵素のような大きな反応場を構築できたためと考えている。

フラビン誘導体は BV 反応以外にも多彩な反応を促進すること、それらは全て環境負荷が少なくマイルドな条件で進行することなどから、その反応機構解析はこれらの反応の今後の触媒開発展開を導くことが期待できた。また、BV 反応は有機合成的にも有用であるため、現在の系を基に基質汎用性の拡張、立体選択性のほか位置選択性の制御を指向して本研究を立案した。

研究目的：研究の最終目標は環境負荷の少ない次世代の触媒を開発することにあるが、研究期間内では、先ずは既に高い選択性の認められた BV 反応の立体選択性に関する理論的背景を確立することを目的とした。具体的には、1. 反応機構の解析に向けた速度論解析、および 2. 基質構造–立体選択性相関の二つに焦点を置く。これらの情報は立体選択性を決定づける遷移状態の立体配置の予測、引いては触媒のデザインを可能にする。

方法および結果

上述したフラビン触媒によるBV反応の立体選択性は、アルカロイド2量体の間にフラビン誘導体および基質が入り込み、水素結合やπ-スタッキング等、多数の弱い結合によってキラルな環境を形作っていることに由来するという仮説をたてている（図1）が、その仮説の立証に当たり、先ず反応機構の律速段階を決定する。

BV反応の律速は基質や条件に依ることが知られているが、一般に基質の付加あるいは結合遷移段階（図1A）である。しかし、そのいずれの段階が律速かは判別できないため、Hammett則による置換基効果および重水素置換した基質を用いた同位体効果のふたつの速度論解析を用いて判定することとした。得られた律速段階の情報に基づき、フラビン

触媒、アルカロイド2量体、反応剤、および基質の相対的立体配置と予測される相互作用についてさらに仮説を立てる。こうして得られた結果から、触媒と基質のそれぞれについて置換基の立体化学が与える影響が予測できる。その情報と基質構造–立体選択性相関関係の試験結果と照らし合わせ、反応機構の仮説を立証する。

1. 反応機構の解析に向けた速度論解析

反応機構解析のよく用いられる手法の一つに Hammett 則を用いる速度論解析がある。これは任意の反応について、様々な置換基（x）を持つ芳香族系の基質の速度定数の比（k_x/k_H）が、置換基効果と比例関係にあるという法則である（$\log(k_x/k_H) = \sigma \times \rho$、$\sigma$：置換定数、$\rho$：反応定数）。これは置換基による電子的効果が自由エネルギーに比例することによるもので、立体障害などの他の要因がない場合に適用できる。BV 反応の場合、付加段階が律速の場合は電子吸引基、転移段階の場合は電子供与基により反応が促進されることから律速が判別できる（反応定数がそれぞれ正、負の値となる）。本研究ではパラ置換 3-フェニルシクロブタノン（図 1B）を用い、最適化した反応条件下それぞれの転換率を GC により測定した。このように求めた反応曲線は一次反応曲線と最も良い近似をとったため、一次反応と仮定して速度定数割り出した（図 2A）。

Hammett 解析の結果、電子吸引基を持つ基質に関しては明らかに反応速度の上昇が見られ、反応定数 $\rho = 1.27$ と値は小さいが正となった。反応定数の絶対値が小さいことは置換基が反応点からかなり離れていることに起因すると考えている。

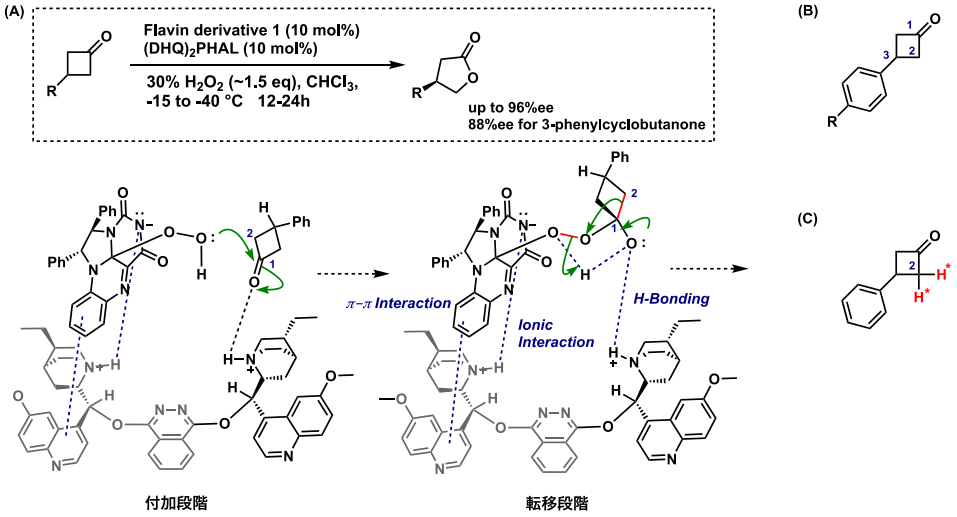


図 1. （A）立体選択的 BV 反応とその遷移状態および律速段階（仮説）（B）速度論解析に用いる基準基質（C）同位体効果の解析に用いる基準基質

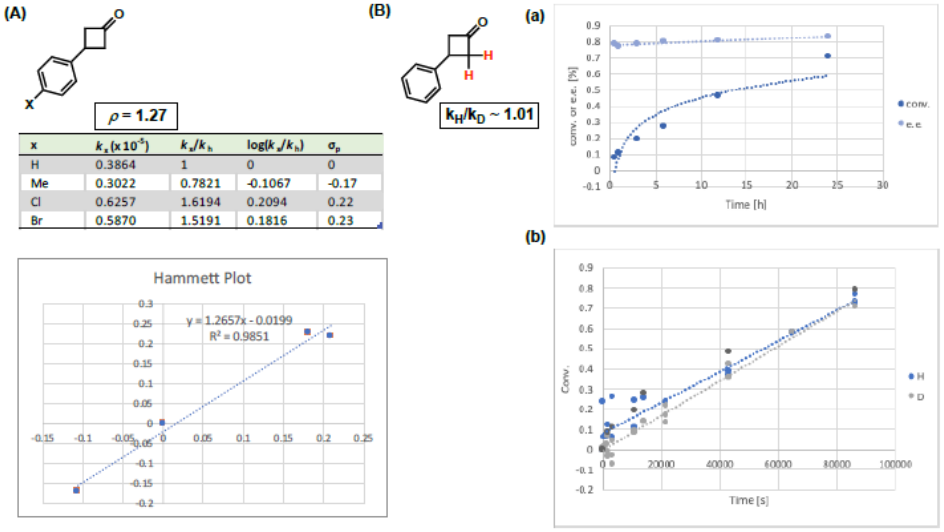
（A） 枠内：立体選択的BV反応の基準となる反応。枠外：同反応の律速と考えられる反応段階。キラルなフラビン誘導体と天然物質アルカロイド2量体とのイオン対による大きな反応場で立体制御が可能となる。得られた立体選択性から推測される反応律速（付加あるいは転移段階）における遷移状態の相対的立体配置の仮説。

（B） 電子的に異なる置換基を立体効果に左右されないフェニル基のパラ位に導入した基質について速度定数を求めることで反応律速が得られる。

（C） 基準物質の2位を同位体ラベルすることで、同位体効果の有無により反応律速はそれぞれ付加段階、結合遷移段階と判別できる。

一方、同位体効果も反応機構解析には頻繁に用いられる手法である。一般的に、基質を構成する原子の一つを原子量の大きい同位体で置換した場合、置換した原子を含む結合は量子力学的効果により反応生が低くなる。従って、その結合の切断や生成を含む段階が反応律速である場合、同位体を含む基質の反応速度は著しく低下する（1次同位体効果）。また、同位体原子と結合が2つ以上離れている結合の関与する段階が律速である場合でも、反応速度が一次効果ほどではないが影響を受ける（2次同位体効果）。

そこで、高い立体選択性（88%ee）の得られた3–フェニルシクロブタノンを基準物質として2位の水素を同位体ラベルし、同位体効果の有無を解析した。同位体ラベルされた基質は既知の方法で合成し、最適化した条件下での転換率をNMRにより解析した。その際に立体選択性が転換率により変化しないことも確認した（図2B(a)）。反応曲線より同様に速度定数を同位体ラベル基質（k_D）と基準基質（k_H）について求めた結果、其々1.392×10^{-5}および1.409×10^{-5}、$k_H/k_D=1.01$となった（図2B(b)）。この値は非常に低い２次同位体効果とも同位体効果なしとも解析できるが、現在の時点では、後者と考えている。



x	k_x (x 10^{-4})	k_x/k_h	$\log(k_x/k_h)$	σ_p
H	0.3864	1	0	0
Me	0.3022	0.7821	-0.1067	-0.17
Cl	0.6257	1.6194	0.2094	0.22
Br	0.5870	1.5191	0.1816	0.23

図 2.　速度論解析の結果

(A)　立体選択的BV反応のパラ置換3−フェニルシクロブタノンのHammett解析結果。

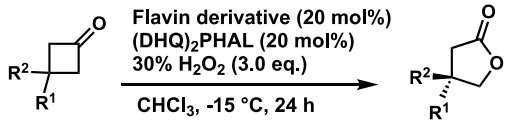
(B)　3−フェニルシクロブタノン2位の同位体効果。

2.　基質構造−立体選択性相関

基質構造−立体選択性の相関関係の解析に先立ち、まず触媒系についての構造情報を得るために、反応の最適条件に用いられるフラビン誘導体とアルカロイド 2 量体の Job Plot 解析を行った。これは系内に二つ以上の種が存在する場合、それらの会合の有無と比率を求めるのに有効な手段である。そこで、様々なモル比率のフラビン誘導体と 2 量体の混合物の紫外吸収を計測し、得られた吸光度を会合がない場合の両化合物の吸光度で補正して、モル比率に対してプロットした（図 3B）。その結果、ほぼ 1 : 2 の比率の時点で最大吸光が見られ、会合していることが明らかとなった。アルカロイドが 2 量体であることから比率 1 : 2 では 2 量体 1 分子に対しフラビン誘導体 2 分子が会合しているためと考えられる。しかし最適反応条件は 1 : 1 または 2 : 1 の混合物を用いるため、それぞれが 1 : 1 で会合するという反応遷移状態の仮説は有効と考えられる［1］。

次に 3–フェニルシクロブタノンを基準として、そのフェニル基の置換基効果およびプロキラル中心となる 3 位について、基質特異性を調べることとした。基質の選定にあたっては、触媒の基質認識にフェニル基のπ-スタッキング、触媒-基質間の水素結合などが関与していることが示唆されていることから、立体反発、水素結合形成の可否、そして電子効果の違いなどで比較対象が得られるように工夫した。また、4 級不斉中心炭素の有機合成上の有用性を鑑み、基準基質の 3 位にメチル基を導入した基質も検討した（図 3）。まずオルト位置換の基質は、その電子効果や水素結合能によらず基準化合物よりも高い選択性を示した（Entries 1〜4）。これはその効果が主に立体反発に起因することを示唆する。一方、パラ位に電子吸引基をつけた場合も同様な選択性の向上が見られたことから（Entry 6）、電子効果も関与しないと言い切れない。また 3 位が 4 級の基質の選択性が低下することがわかったため（Entry 10）、選択性が向上することを期待してフェニルのオルト位を臭素置換した基質を検討したところ、興味深いことに逆の選択性が得られた（Entry 11）。この効果については転移の選択性が逆になった可能性と付加段階の選択性が低下した可能性があり、今の段階では判別がつかない。

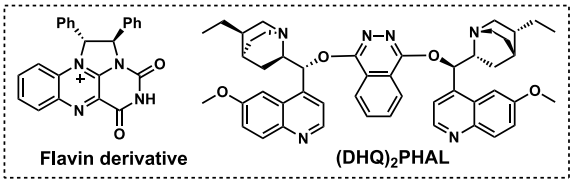
(A)



Entry	R^1, R^2	Conv. / %[a]	e.e. / %[b]
1	Ph, H	96.2	85.2
2	*o*-Br-Ph, H	96.7	94.6
3	*o*-NHBoc-Ph, H	97.8	95.3
4	*o*-Vinyl-Ph, H	99.6	95.2
5	*o*-NHAc-Ph, H	-	-
6	*p*-Br-Ph, H	99.8	93.7
7	*p*-NHBoc-Ph, H	79.6	81.7[c]
8	*p*-NHAc-Ph, H	-	-
9	*p*-Me-Ph, H	-	-
10	Ph, Me	30.2	56.6
11	*o*-Br-Ph, Me	34.0	-43.4

a) determined by GC analysis with using styrene as an internal standard.
b) determined by HPLC analysis.
c) determined after lactone solvolysis.

(B)



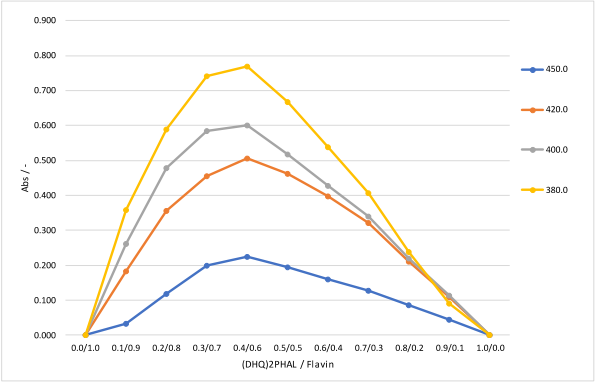


図 3. 立体選択的 BV 反応のフラビン誘導体と補助剤、およびそれらと基質との相互作用
(A) 基質－立体選択性相関関係の結果。
(B) 最適条件に用いたフラビン誘導体および補助剤との紫外吸収スペクトル。

考 察

BV反応の反応機構に関しては多くの研究がされており、一般的な過酸を反応剤として用いる条件では遷移段階が律速と考えられているが、フラビン誘導体を用いる系や生体内反応については知見がない。しかし本研究により、フラビン誘導体を触媒とするBV反応は付加段階が律速であることが示唆された。また、基質汎用性を検討する過程で、基質を有効に修飾することでより高い立体選択性が得られた。これにより補助剤となる置換基を配置することで、より基質汎用性を拡張できる可能性が広がった。

これらの結果の包括的な説明は今後の計算化学を用いた反応遷移状態の解析による検討を要するが、今後は得られた情報を基に、本反応の基質汎用性および立体選択性の向上、さらに位置選択性の制御などを目指す。計算化学と速度論解析の結果とを合わせて律速段階での遷移状態予測から反応最適化に向けて触媒構造を再デザインし、仮説－検証を繰り返すことで次世代の触媒開発につなげたい。

謝 辞

研究室の立ち上げにあたり、早稲田大学特定課題研究助成費「新任教員」および「研究基盤形成」の助成金を頂きました。深くお礼申し上げます。

文 献

1) Poudel P, Arimitsu K, Yamamoto K. Self-assembled ion-pair organocaltalysis – asymmetric Baeyer-Villiger oxidation mediated by flavinium-cinchona alkaloid dimer. Chem. Commun. 2016 52, 4163-66. PMID: 2692149. DOI: 10.1039/c6cc00663a.