

ナノ空間制御シリカへのペプチド固定化による高性能不斉触媒の開発

吉田 暁弘*

Development of heterogeneous peptide catalysts by immobilization of peptide molecules on nano-structured silica supports

Akihiro YOSHIDA*

1. 緒言

本研究は、神奈川大学工学研究所の共同研究として、2015、2016年度の二年間にわたりご支援を頂いたものである。本来、本稿には2016年度の成果を掲載すべきであったが、2016年の末に発刊の工学研究所報告にほぼ二年間分に渡る全成果を掲載してしまったため、本稿ではその二年間の成果を集約した上で、新たな考察を加えて紹介する。

本研究における筆者らの取り組みの要点は、ペプチド触媒を自由空間ではなく2~10nm程度のナノ細孔を有するメソポーラスシリカの細孔内に導入することで、ペプチド触媒分子やそこに基質が吸着した反応中間状態の分子に対して立体的なストレスを与えることで、ペプチド分子の触媒特性をチューニングし、いわば酵素が行っていることを人工的に実現しようとするものである。検討を行うに当たっては、触媒活性なペプチドとしてアルドール反応に高活性を示すことが知られる Pro-Pro-Asp (プロリン-プロリン-アスパラギン酸) トリペプチドを⁽¹⁾、各種メソポーラスシリカ及び本学の金教授らによって開発されたキラルシリカ⁽²⁾上に固定化したものを合成し、不斉アルドール反応を行って触媒特性を比較検討した。使用したペプチド種やシリカ種の選定、シリカ上へのペプチドの固定化法、触媒反応の条件、各種反応結果やスペクトルについては重複を避けるため本稿には記載しないが、既報に詳細に記載したので参照されたい⁽³⁾。

2. 各種メソポーラスシリカ担体に固定化した Pro-Pro-Asp の不斉アルドール反応特性

まず、固定化ペプチドの触媒能に対する固定化担体側のナノ空間サイズの影響を検討するために、異なる細孔サイズ、形状を持つ種々のシリカ担体にペプチドを固定化した触媒を調製し、触媒反応に適用し比較検討を行った。

いずれのシリカを固定化担体を使用した場合も4-ニトロベンズアルデヒドとアセトンの不斉アルドール触媒に対する活性が発現したが、その活性序列は使用するシリカ種によって大きく異なった。具体的には、各担体使用時の活性序列は、MCM-41 (68%, 833m²/g)

>SBA-15 (35%, 580m²/g)>KIT-6 (26%, 642m²/g)>非メソポーラス SiO₂ (17%, 276m²/g) (カッコ内は同一条件下における生成物の収率と担体の BET 表面積) となり、メソポーラス担体の使用が活性向上に有効であることが明らかになった。この活性序列は概ね触媒の表面積の序列と対応しているが、MCM-41を使用した際の同一反応時間での収率は SBA-15や KIT-6を使用した場合に比べて二倍程度の値となっており、MCM-41を使用した際の活性が表面積との比較では説明ができないほど高いことがわかる。現在のところ詳しい解析はできていないが、この結果から、i) MCM-41の狭隘なナノ細孔内でペプチド分子のコンフォメーションが規制され、活性点である末端の Pro 残基のイミノ基部分とアスパラギン酸残基のカルボキシル基が反応に適した配置となった、あるいはii) 他の担体よりも広い MCM-41の細孔表面でペプチド分子が高分散で存在しており、活性の低下を招く隣接した固定化ペプチド間での相互作用が減少した、等の理由により活性が向上したのではないかと推測される。また、同様の表面積と活性の比較から、SBA-15を使用した場合に KIT-6よりも表面積が低いにも関わらず、高い活性が発現していることがわかる。これは、KIT-6の方が SBA-15に比べて半分以下の細孔体積しか持たないことと、SBA-15が直線状の細孔を持つものに対し、KIT-6は三次元網目状の細孔であることから、基質の細孔内への拡散性が SBA-15の方が高かったことに由来するのではないかと推測される。

以上のように、三種のメソポーラスシリカを固定化担体を使用することで、各シリカの細孔特性の違いに基づくと考えられる触媒活性の差異が発現することが明らかとなった。しかし、生成物の立体選択性については、各メソポーラスシリカ担体間での差異はほとんど見られず、さらにはメソ細孔を持たないシリカを担体とした場合ともほとんど違いが見られなかった。つまり、ペプチド触媒の立体選択性は、シリカ担体のナノ構造にほとんど影響を受けないことが分かった。しかしながら、重要な知見として、いずれのシリカ担体を使用しても優先的に生成する生成物が R 体であったことが挙げられる。これは、同一基質を用いた液相均一系において H-Pro-Pro-Asp-NH₂トリペプチドが S 体を優先的に生成することが報告されていること⁽¹⁾、ならびに本研究で対照試料として使用した同一ペプチドを有機レジンに固定化した場合にやはり S 体の生成が優先した結果とは異なっている。つまり、当初の期待のように、シリカ上のナノ構造により活性のみならず立体選択性も変化させることには実現できなかったものの、シリカという固定化担体を使用そのもの

*助教 物質生命化学科 (～2017.2)

Assistant Professor, Dept. of Material and Life and Chemistry
(現准教授 弘前大学北日本新エネルギー研究所)

Associate Professor, North Japan Research Institute for Sustainable Energy, Hirosaki University)

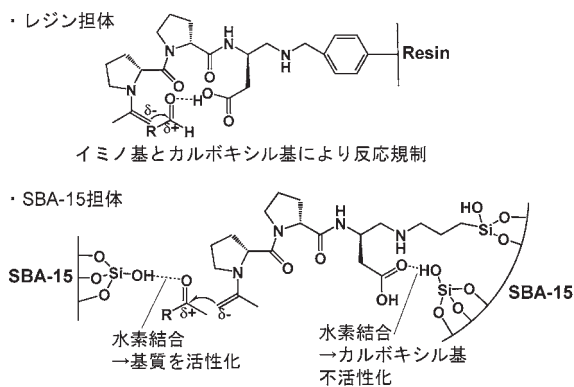


図1. 想定されるシリカの担体効果（神奈川県工学研究所所報第39号 p113から転載）

が、ペプチド触媒の立体選択性に大きな影響を及ぼすことが明らかとなった。更なる検討の結果、SBA-15を始めとするシリカ担体上でPro-Pro-Aspのカルボキシル基が立体選択性の発現に寄与しないのは、シリカ表面上に存在するシラノール基とカルボキシル基間の水素結合が原因ではないかと推測された（図1）。

3. キラルシリカ担体に固定化したPro-Pro-Aspの不斉アルドール反応特性

前項までに記したように、シリカ担体上へのペプチドの固定化により、ペプチドとシラノール間に基づいてペプチド触媒の立体選択性や活性が変化することが明らかとなった。そこで、キラリティを持ったシリカ上にペプチドを固定化することで、ペプチド触媒の立体選択性の制御を試みた。緒言にも記したように、キラルシリカとしては本学の金教授らの開発したものを使用した⁽²⁾。

L-酒石酸、D-酒石酸を原料に合成したキラルシリカ（以下L-tart-CS、D-tart-CS）に対し、前項と同様の方法でPro-Pro-Aspトリペプチドを導入した（以下PPA-tart-CS）。合成の過程で、ペプチド末端に紫外域に吸収を持つフルオレニル基が保護基として結合したFmoc-Pro-Pro-Asp-tart-CSが得られるが、この物質のCD測定において、Fmoc基の吸収領域にコットン効果が観測されたことから、ペプチド上にもキラルシリカ由来のキラリティが伝達されるものと推測された。

この結果から、大いなる期待をもってPPA-tart-CSを触媒とした不斉アルドール反応を実施したが、実際にはtart-CSを固定化担体に用いても立体選択性にほとんど変化は見られなかった。またL体、D体どちらのtart-CSを使用しても立体選択性が変化しないことから、tart-CSのキラリティが本条件下ではほとんど立体選択性に影響を及ぼさない結果となった。この原因を探るべく、反応溶媒であるアセトンの湿潤下で紫外光応答性の官能基を持つペプチドで修飾したキラルシリカの固体CDスペクトルを測定したところ、乾燥状態では明確なコットン効果が観測されたのに対し、湿潤下ではほとんどコットン効果が観測されなかった。つまり、溶媒和された条件下では、シリカ由来のキラリティが表面上の修飾分子にうまく伝達されていないということが推測された。また、シリカ表面のキラリティについて、外部に露出した面のうちどの程度の割合がキラリティを持っているか、どの程度の密度でキラリティが発現している

か、あるいは、シリカ上のキラリティによってペプチド分子の配座がどの程度変化したか、といった要素が触媒反応における立体選択性に影響を与えるためには不十分であった可能性も推測される。すなわち、触媒反応において立体選択性に影響を与えるためには、例えばシリカ表面上のペプチドのうち1割が影響を受けている程度では立体選択性の変化は判別不可能なほど微小なものになるため、ペプチド種の大半がシリカ上のキラリティの影響を受けてその配座を変化させる必要があると考えられる。また、仮に大半のペプチド分子の立体的配座がシリカ上のキラリティに呼応して変化したとしても、それが触媒反応時の選択性に及ぼす形状に変化しなければ、結果的には立体選択性の変化として観測することはできない。現状、シリカ表面上でのキラリティの有無を判定可能な方法は固体CDスペクトルのみであるが、本測定法ではキラリティの有無は判定可能であっても、シリカ表面上のキラリティの量的、密度的な情報や、ペプチド分子にどれだけの影響が及んでいるかといった質的な情報を得ることはできない。今後、キラルシリカの表面構造の解明、固体表面上のキラリティについて新たな知見を与える新規な分光法の開発、これらの分野に関する計算化学的取り組み等、いくつかのブレイクスルーがあれば、これらの問題に取り組むことができるようになるものと考えられる。

4. 結言

ペプチド触媒の機能性向上を期待して、Pro-Pro-Aspトリペプチドをシリカ系担体に固定化したところ、ペプチド固定化担体として一般的なレジン担体にPro-Pro-Aspトリペプチドを固定化した場合に比べて、高表面積と細孔を持つメソポーラスシリカを担体とした場合に著しい活性向上が観測された。さらに興味深いことに、レジン担体とシリカ系担体では立体選択性が反転することを見出した。各種検討の結果、シリカ担体上ではシラノール基との水素結合によりペプチド上のカルボキシル基が反応に関与しなくなったことが立体選択性の変化をもたらしたものと推測された。さらなる立体選択性の制御を期待して、キラルシリカ上にPro-Pro-Aspトリペプチドを固定化して反応を行ったところ、期待に反して立体選択性はキラリティを持たないシリカ担体を使用した時と同様であった。乾燥条件下では、CD測定によりアミノ基やペプチド近傍に存在する紫外域に吸収を持つ保護基にキラリティが誘起されることを確認したが、反応溶媒の存在下ではCDスペクトルが消失することから、溶媒和によってキラルシリカとペプチド間の相互作用が弱くなり、キラリティの伝達が溶媒非存在下に比べてほとんど起こらなかったことが立体選択性の制御に至らなかった一因と推測された。

上述した成果は、平成27～28年度の工学研究所共同研究Aの採択課題としての実施により得られたものである。本研究の遂行に当たって、活発なご議論とご指導を賜った本学の内藤周弼名誉教授、上田渉教授、引地史郎教授、ならびにキラルシリカの合成に関してもご指導を賜った金仁華教授に御礼を申し上げます。

参考文献

- (1) P. Krattiger, R. Kovasy, J. D. Revell, S. Ivan, H. Wennemers, “Increased Structural Complexity Leads to Higher Activity: Peptides as Efficient and Versatile Catalysts for Asymmetric Aldol Reactions”, *Org.*

Lett., 7, 1101 (2005).

- (2) H. Matsukizono, R.-H. Jin, “High-Temperature-Resistant Chiral Silica Generated on Chiral Crystalline Templates at Neutral pH and Ambient Conditions”, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 124, 5964 (2012).
- (3) 吉田曉弘, ペプチド固定化シリカ触媒の不斉アルドール反応特性, 神奈川大学工学研究所所報, 39, 110 (2016).