

光学活性基をもつフラビン類の合成とその 不斉水素移動反応

中尾英樹*・新海征治*・真鍋修*

Synthesis and Asymmetric Hydrogen Transfer Reactions of Optically Active Flavins

by

Hideki NAKAO*, Seiji SHINKAI,* and Osamu MANABE*

Flavins bearing an optically active substituent at N(10) (1-a and 1-b) were synthesized. As the substituent is sterically bulky, the rate constants for the oxidation of NADH model compounds which possibly proceeds via a face-to-face orientation were somewhat smaller than those of conventional flavins. We have found that the oxidation of optically active NADH model compounds by 1-b and tetra-O-acetylriboflavin occurs in an asymmetric manner. This is the first example for the in vitro asymmetric hydrogen transfer from NADH models to flavins.

1. 緒言

フラビンは、生体内に存在する酸化還元補酵素であり、中でもリボフラビンはビタミンB₂としてよく知られている。これらは、生体内反応において電子伝達が起こるほとんどの系に登場する程重要な補酵素である。その大部分は補酵素型である FMN (フラビンモノヌクレオチド) および FAD (フラビンアデニンジヌクレオチド) として存在し、主に基質の酸化により電子伝達を遂行することが多い。現在、このフラビンを含む 100以上のフラボ蛋白質が確認されているが、フラビンは基質の酸化のほかにも光還元性、酸素の活性化、化学発光性などをもち、同じく酸化還元補酵素として分類され、電子伝達系にフラビンと共にはしばしば登場する NAD⁺ (ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド) に比べて多彩な機能を有している。しかし、その反応の複雑さ故に、反応機構の詳細に関しては、いまだ不明な点が多数残されている。

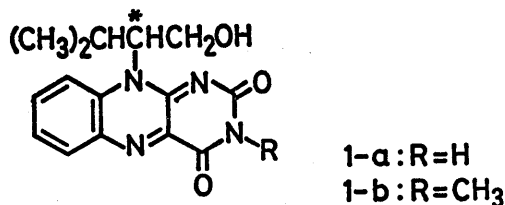
フラビンによって基質を酸化するとき、フラビンは

基質から2個の電子と2個のプロトンを受けとり、酸化型 (Fl_{ox}) から還元型 (Fl_{red}H₂) へ変換する。そして還元型フラビンは酸素により瞬時に再酸化され、酸化型フラビンにもどる。このようにフラビンは有機化学的触媒のように基質と酸素の間を何度も往復して反応を媒介する。この機構は通称、"ピンポンメカニズム" と呼ばれる。

この報告は、不斉認識能を持つフラビン誘導体に関するものである。酵素系においては、フラビンも NAD⁺ も不斉認識を含む反応を媒介することが多い。NAD⁺ 系についてはモデル反応においても、大野ら,¹⁾ 井上ら,²⁾ Kellogg ら³⁾ によって不斉還元がかなり高い光学収率で起こることが確認されている。しかし、フラビンのモデル反応においては、不斉認識を行なう酸化反応は報告例が見られない。そこで我々は、不斉を認識するサイトとして光学活性基を有するフラビン誘導体 1-a, 1-b を合成し、その反応性について検討を行なった。

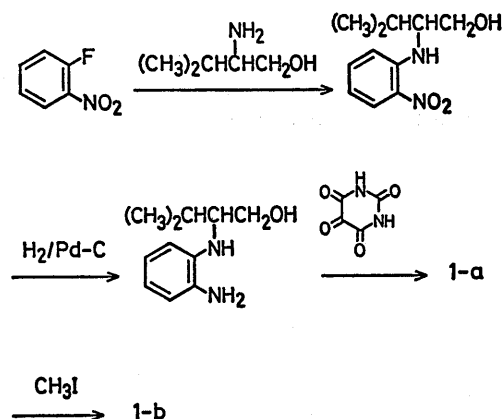
昭和60年4月30日受理

* 工業化学科 (Department of Industrial Chemistry)



2. 合成

1-a および 1-b の合成は次のスキームに従って行なった。



2.1. (S)-N-(1-ヒドロキシ-3-メチルブト-2-イル)-O-ニトロアニリン (2) の合成

(S)-2-アミノ-3-メチル-1-ブタノール 1.01g (9.79×10^{-3} mol) を DMF (*N,N*-ジメチルホルムアミド) 20ml に溶解し、これに K_2CO_3 10g (7.23×10^{-2} mol) を懸濁した。この溶液に *O*-フルオロニトロベンゼン 1.41g (8.08×10^{-3} mol) を 20ml の DMF に溶かした溶液を加え、 55°C に加熱攪拌しながら反応を行なった。24時間後、反応は終了した。 K_2CO_3 をろ別した後、DMF を減圧下、加熱して留去した。残渣をクロロホルムに溶かし、大型薄層クロマトグラフで単離した(展開溶媒: ベンゼン)。メタノールで抽出した後、メタノールを減圧留去し、目的物を得た。収量 1.00g (収率 59.4%)。NMR (CDCl_3): δ 6.57~8.10, 3.60, 2.10, 0.97ppm。

2.2. (S)-N-(1-ヒドロキシ-3-メチルブト-2-イル)-O-フェニレンジアミン (3) の合成

1.00g (4.46×10^{-3} mol) の 2 をメタノール 40ml に溶解し、少量の水で湿らせてからメタノールに懸濁したパラジウムカーボン 0.5g を加えた。攪拌しながら水素を通じ、水素還元を行なった。1時間半で水素

の吸収が止まり、反応が終了した。窒素雰囲気下でパラジウムカーボンをろ過して除き、減圧下でメタノールを留去すると白色結晶が得られた。収量 0.80g (収率 92.3%)。IR (KBr): 3360, 3000~2800, 1600, 1270 cm^{-1} 。

2.3. (S)-10-(1'-ヒドロキシ-3'-メチルブト-2'-イル)イソアロキサジン (1-a) の合成

ほう酸 0.46g (7.44×10^{-3} mol) および アロキサジン 0.95g (5.93×10^{-3} mol) を窒素置換した酢酸 70ml に溶解し、これに 1.06g (5.47×10^{-3} mol) の 3 を加えた。窒素気流下で 60°C に加熱し攪拌しながら反応を行なった。反応終了後、減圧下で酢酸を留去し、残渣を少量のメタノールに加熱溶解し、これに水を加えた後、活性炭処理した。冷所へ静置しておくで結晶が析出した。この結晶を濾過して集め、再度メタノール-水によって再結晶を行なった。収量 0.82g (収率 49.9%)、mp $218.0 \sim 219.5^\circ\text{C}$ 。IR (KBr): 3440, 3180, 3000~2800, 1710, 1660, 1540, 1270 cm^{-1} 。理論値 ($\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}_8 \cdot 0.75\text{H}_2\text{O}$): C, 57.41; H, 5.62; N, 17.90%。測定値: C, 57.35; H, 5.40; N, 17.84%。UV スペクトル(メタノール中): $\lambda_1 = 434\text{nm}$ ($\epsilon = 8400$), $\lambda_2 = 347\text{nm}$ ($\epsilon = 7300$)

2.4. (S)-3-メチル-10-(1'-ヒドロキシ-3'-メチルブト-2'-イル)イソアロキサジン (1-b) の合成

1-a 0.100g (3.33×10^{-4} mol) を DMF 5ml に溶解し、これに K_2CO_3 0.460g (3.33×10^{-3} mol) を加えた。ヨウ化メチル 0.95g (6.69×10^{-3} mol) を加え 12 時間、 60°C に加熱し攪拌しながら反応を行なった。反応液を室温まで冷却し、 K_2CO_3 をろ過して除いた後、DMF を減圧下、加熱し留去した。残渣をクロロホルムに溶解し、水で洗浄した。クロロホルムを濃縮し、薄層クロマトグラフで単離した(展開溶媒: メタノール/ジエチルエーテル=1/10)。クロロホルムで抽出し、減圧下でクロロホルムを除去した後、メタノール-エーテルで再結晶した。収量 0.052g (収率 49.7%)、mp $228.0 \sim 230.0^\circ\text{C}$ 。IR (KBr): 3440, 3000~2800, 1700, 1650, 1540 cm^{-1} 。理論値 ($\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_8$): C, 61.14; H, 5.77; N, 17.82%。測定値: C, 60.90; H, 5.82; N, 17.76%。UV スペクトル(メタノール中): $\lambda_1 = 438\text{nm}$ ($\epsilon = 7980$), $\lambda_2 = 336\text{nm}$ ($\epsilon = 6960$)。旋光度(メタノール中, 0.2g/10ml): $[\alpha]_D^{25} = -35.0^\circ$ 。

3. 光学活性フラビン誘導体 1-a の反応性

チオール類, NADH モデル化合物および Na_2SO_3 はフラビン類と室温付近で速やかに反応する。これらの化合物と 1-a の反応について検討した。1-a との反応に使用した基質は、1,4-ブタンジチオール (HS-

(CH₂)₄SH), 2-メルカプトエタノール (HO(CH₂)₂-SH) および 1-ベンジル-1, 4-ジヒドロニコチンアミド (BNAH), 1-ベンジル-3-カーボモイル-1,4-ジヒドロキノリン (BCQH), そして Na₂SO₃ である。これらの 1-a との反応速度を 10-エチルイソアロキサジン (IA) との反応速度と比較した。

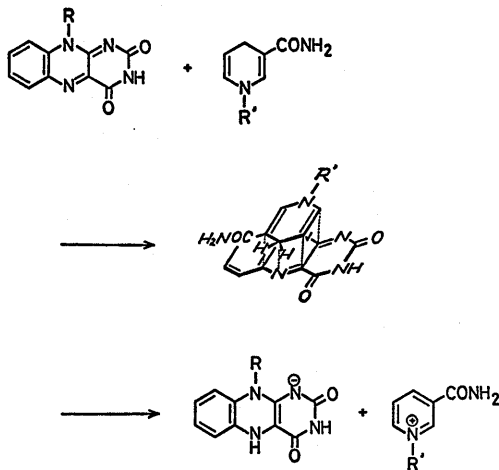
BNAH, BCQH との反応速度定数は、それぞれの UV スペクトルの極大波長 (BNAH: 359nm, BCQH: 347nm) における吸光度の減少により、また 1,4-ブタンジチオール, 2-メルカプトエタノールおよび Na₂SO₃ との反応ではフラビンモデルの UV スペクトルの極大波長 (1-a: 437nm, IA: 431nm) における吸光度の減少速度よの求めた。反応は 30°C, pH=8.66 の緩衝溶液 (0.1M-KH₂PO₄+0.05M-Na₂B₄O₇=3.4+6.6) 中で、NADH モデルとの反応は酸素下で、その他の基質とは窒素下で行なった。結果を表 1 に示す。

NADH モデル化合物である BNAH および BCQH との反応では IA に比べ 1-a の反応速度は著しく小

表 1. 1-a, IA による酸化反応に対する擬 1 次速度定数 (k_1')^{a)}

基質 (mM)	10 ⁴ •k ₁ ' (s ⁻¹)		k ₁ '(1-a)
	1-a	IA	k ₁ '(IA)
BNAH (0.0956)	1.35	9.40	0.143
BCQH (0.0995)	0.0930	0.442	0.210
Na ₂ SO ₃ (492)	94.8	116	0.817
HS(CH ₂) ₄ SH(1.07)	4.38	1.32	3.32
HO(CH ₂) ₂ SH(10.0)	0.0391	0.0172	2.27

^{a)} [1-a]=4.83×10⁻⁵M, [IA]=5.06×10⁻⁵M



さい。フラビンと NADH の反応は面と面が向かい合った電荷移動錯体に近い中間体を経て反応が進行しているといわれているが、1-a は 10 位の不斉の置換基が嵩高いため、この “face-to-face” の中間体をとりにくく、立体的に反応の進行を妨げているものと考えられる。

チオール類との反応では、逆に 1-a の方が反応性が高くなっている。これは 10 位の置換基の OH 基が 1 位の N と水素結合を行なっているのではないかと考えられる。このために、5-4a-10a 位のラインの電子が 1 位の N へ流れ、チオールとの反応点である 4a 位の電子欠損度がさらに大きくなり、置換基の張り出しの影響を受けずに反応できるチオールとの反応では、反応速度が大きくなったものと思われる。しかし、この問題は更に詳細に検討する必要がある。

4. 光学活性基質との反応

4. 1. 光学活性 NADH モデル化合物との反応

フラビンと NADH の水素移動反応はモデル系でも容易に進行し、研究対象として頻繁に取り上げられてきた。ここで合成した光学活性フラビン誘導体も NADH モデル化合物と速やかに反応することがわかった。NADH モデルについては、種々の基質の還元において高い光学収率が得られた系が報告されていることは前述したが、この場合は Mg²⁺ が重要な役割を演じていた。Mg²⁺ は NADH と相互作用し錯体を形成するが、この Mg²⁺ の存在下でのみ不斉還元が認められている⁴⁾。

フラビンについても、種々の金属と相互作用することが知られているが、Mg²⁺ もその 1 つである。ここでは、光学活性フラビン誘導体と光学活性 NADH モデル化合物との水素移動反応について検討するが、この場合も不斉認識を実現するためには Mg²⁺ の存在が重要となるのではないかと考えられる。

4. 1. Mg²⁺ との会合定数

フラビン誘導体のアセトニトリル溶液に Mg(ClO₄)₂ を加えると、UV スペクトルの変化が観測された。このことにより、Mg(ClO₄)₂ の濃度変化によるフラビンのスペクトル変化から会合定数を決定した。光学活性ラビン誘導体 1-b, 天然に存在し不斉を有するリポフラビンからの誘導体テトラ-O-アセチルリポフラビン (Ac₄RFI) 及び 10-エチルイソアロキサジン (IA) の 30°C におけるアセトニトリル (含水量 [H₂O]= (1~2)×10⁻²M) 中での会合定数は次の通りであった: 1-b, 60.9M⁻¹; Ac₄RFI, 124M⁻¹; IA, 40.8M⁻¹。

4. 2. 水中での水素移動反応

まず水中での 1-b 及び Ac₄RFI と光学活性

NADH モデル化合物 *N*- α -メチルベンジル-1-プロピル-1,4-ジヒドロニコチンアミド (Pr, MeBzl*NAH) 及び 1- α -メチルベンジル-1,4-ジヒドロニコチンアミド (MeBzl*NAH) との反応における不斉認識について検討を行なった。

酸素下, 30°C における pH=8.66 の緩衝溶液中で反応を行ない, それぞれの濃度は [1-b]= 5.13×10^{-5} M, [Ac₄RfI]= 5.09×10^{-5} M, [Pr, MeBzl*NAH]= 1.00×10^{-4} M, [MeBzl*NAH]= 1.03×10^{-4} M であった。NADH モデル化合物の吸収極大波長 (Pr, MeBzl*NAH: 360nm, MeBzl*NAH: 358nm) における吸光度の減少速度より速度定数を求めた。フラビンは酸素により瞬時に再酸化されるので, リサイクルして使用され, 濃度変化はないものとした。結果を表2に示す。NADH モデル化合物の (R) 体と (S) 体に対するそれぞれの光学活性フラビン誘導体の反応速度はほとんど同じで不斉の認識は見られなかった。

4.3. 有機溶媒 (アセトニトリル) 中での反応

アセトニトリル (含水量 [H₂O]=(1~2) $\times 10^{-2}$ M) 中で, 水中での反応で用いたフラビン誘導体及び NADH モデル化合物を用いて反応を行なった。温度,

化合物の濃度などの測定条件は水中での反応の場合と同様であるが, Mg(ClO₄)₂, KClO₄, Bu₄NBr などの塩を加えて反応を行なった。結果を表3に示す。表3に示したほかに, KClO₄ を添加した系についても反応を試みたが, 反応が遅すぎて速度定数を求めることができなかった。

表3のように, 光学活性フラビン誘導体-NADH モデル化合物間のアセトニトリル中での水素移動反応については, Mg(ClO₄)₂ が 0.1M と大過剰に存在するときのみ NADH モデル化合物の (R) 体と (S) 体に対する反応性が異なっている。特に Ac₄RfI と Pr,

表2. 水中における酸化反応に対する2次反応速度定数 (k_2 , M⁻¹s⁻¹)

フラビン	Pr•MeBzl*NAH		k_R	MeBzl*NAH		k_R
	R	S		R	S	
1-b	23.2	25.1	0.92	3.06	3.12	0.98
Ac ₄ RfI	396	409	0.97	12.6	12.9	0.98

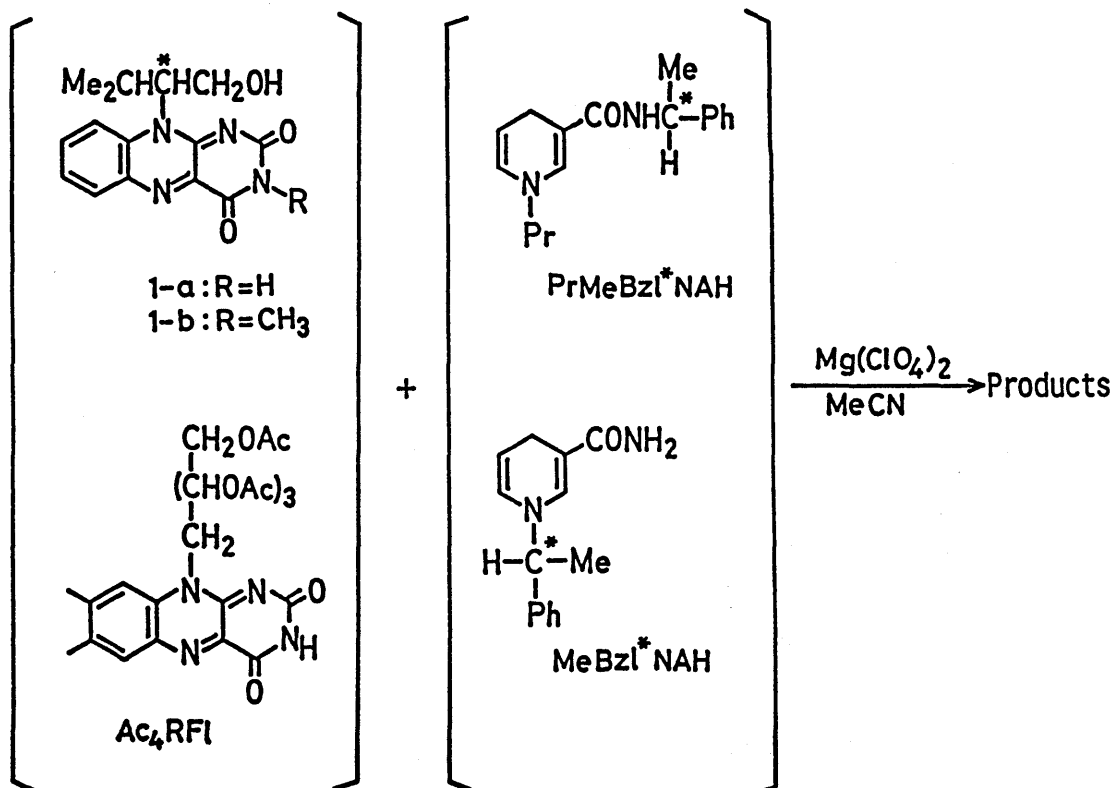


表3. アセトニトリル中における酸化反応に対する2次反応速度定数 (k_2 , $M^{-1}s^{-1}$)

フラビン	添加塩 (mM)	Pr•MeBzl* NAH		k_R	MeBzl* NAH		k_R
		R	S	k_S	R	S	k_S
1-b	Mg(ClO ₄) ₂ (0.20)	0.33	0.32	1.03	0.22	0.24	0.92
1-b	Mg(ClO ₄) ₂ (2.0)	0.54	0.56	0.96	0.18	0.19	0.95
1-b	Mg(ClO ₄) ₂ (100)	1.14	1.05	1.09	0.77	0.98	0.79
Ac ₄ RF1	Mg(ClO ₄) ₂ (0.20)	0.89	0.86	1.03	0.42	0.43	0.98
Ac ₄ RF1	Mg(ClO ₄) ₂ (2.0)	1.71	1.76	0.97	0.39	0.41	0.95
Ac ₄ RF1	Mg(ClO ₄) ₂ (100)	3.80	1.99	1.91	0.24	0.18	1.33
Ac ₄ RF1	Bu ₄ NBr (100)	0.23	0.24	0.96	—	—	—

MeBzl*NAH の反応については、1.91倍という大きな違いがみられた。したがって、フラビン誘導体と NADH モデル化合物との水素移動反応においても Mg^{2+} が重要な役割を果たしていると考えられる。

NADH モデル化合物によるカルボニル化合物の還元では、 Mg^{2+} は両化合物の中間に位置し、遷移状態における橋架け剤として作用すると考えられている。 Mg^{2+} はフラビン誘導体および NADH モデル化合物のどちらとも相互作用できるので、この水素移動反応においても両者の間に存在し、橋架け的作用を行なっていると思われる。

フラビンおよび NADH モデル化合物のどちらとも、相互作用を行なわない Bu₄NBr, KClO₄ 存在下で不斉認識が認められなかったことと考え合わせて、 Mg^{2+} のようにフラビンおよび NADH モデル化合物のどちらとも相互作用し得る媒体の存在下でのみ不斉認識が起こるという事実は、水素移動反応の遷移状態における自由度を減少させることの重要性を示唆している。

5. 結 言

今回、合成した光学活性フラビン誘導体 1-a, 1-b は通常のフラビンモデル化合物とは異なった性質を有している。10位の置換基が立体的に込み合っているために、この部分の結合が不安定であり、また2級炭

素として比較的安定な脱離基となり得るために光によって分解しやすくなっている。これを克服すれば、もっと広い領域で検討できるであろう。

NADH モデル化合物との不斉水素移動反応で得られた結果は、この種の研究が始められたばかりの現在の段階では、ある程度良い結果が得られたものと思われる。NADH モデルによる不斉還元、フラビン誘導体-NADH モデル化合物間の不斉水素移動の系を見ると、攻撃試薬と基質の両者と相互作用を規制することの重要性が示唆される。これは今後の分子設計において重要なヒントとなるものと考えられる。将来、フラビン誘導体の分子設計および反応系の設定などについて検討していくとフラビン誘導体による不斉酸化触媒反応により良い成果が得られることが期待される。

参 考 文 献

- 1) A. Ohno, M. Ikeguchi, T. Kimura, S. Oka, *J. Am. Chem. Soc.*, 101, 7036 (1979).
- 2) T. Makino, T. Nunozuka, N. Baba, J. Oda, Y. Inoue, *J. Chem. Soc., Perkin I*, 1980, 7.
- 3) J. G. de Vries, R. M. Kellogg, *J. Am. Chem. Soc.*, 101, 2759 (1979).
- 4) Y. Ohnishi, T. Numakunai, A. Ohno, *Tetrahedron Lett.*, 1976, 2699.