

論文題目

酸化能を有する *N5*-無置換フラビン分子触媒の開発

山野本 健

徳島大学大学院 先端技術科学教育部  
物質生命システム工学専攻 化学機能創生コース  
物質合成化学講座 A-3



# 酸化能を有する N5-無置換フラビン分子触媒の開発

## 目次

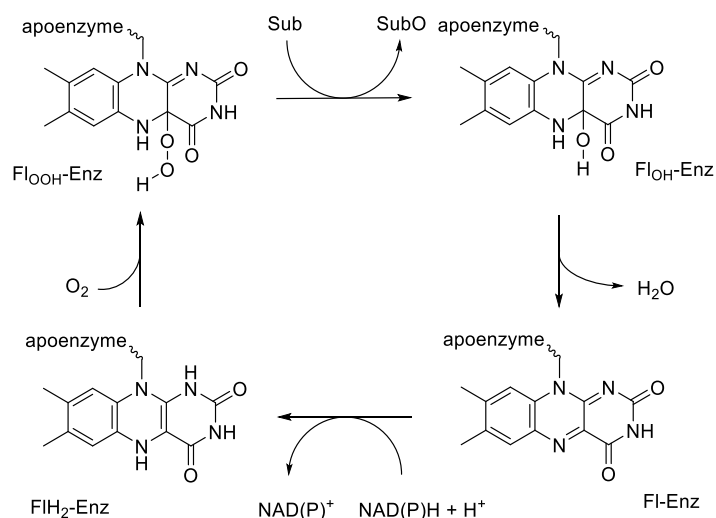
第一章	序論	1
第二章	ペプチド鎖を有するフラビン分子触媒の設計と分子状酸素を用いた求電子酸化反応への応用	8
第三章	ペプチド鎖を有するフラビン分子触媒による酸素酸化 Baeyer-Villiger 反応の開発	45
第四章	ペプチド鎖を有するフラビン分子触媒による過酸化水素酸化反応の開発	72

## 第一章 序論

合成化学の分野において酸化反応は最も基本的な反応の1つとして、古くから数多くの反応系が開発されてきた<sup>1-3</sup>。Os、Ru、W、Mn、Co、Tiなどの遷移金属は酸化反応における優れた触媒機能が知られており、反応効率や選択性の向上を求めて様々な触媒系が報告されている<sup>3</sup>。<sup>4</sup>。一方、近年では、環境負荷の軽減と元素戦略の観点から遷移金属元素を用いない触媒反応系の開発が重要な研究課題となっている。特に有機分子触媒は2000年以降、多くの科学者が注目し、急速に発展している分野であるが<sup>5</sup>、酸素酸化反応の触媒として機能する分子は少ない。

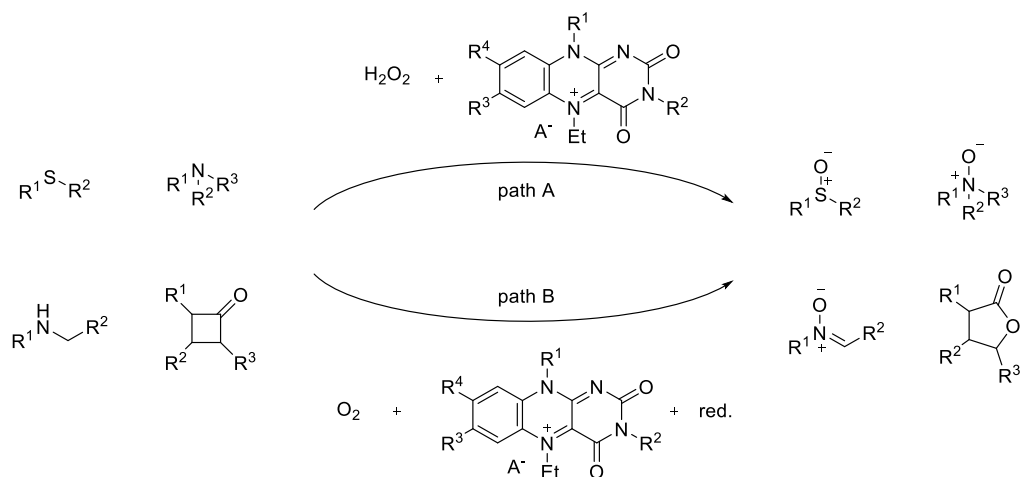
新規触媒の開発は重要な研究課題の1つとして位置づけられており、有機化学者は様々な化合物の特徴を生かした触媒を開発してきた。生体内の分子変換に着目するとその大部分が酵素の触媒作用によって温和な条件下、高い選択性で効率的に官能基変換されており、酵素反応としては一般的であっても人工の分子触媒では達成困難な分子変換は数多く存在する<sup>6</sup>。特に活性種が不安定である場合は水素結合や疎水場などの酵素特有の反応場が反応促進の鍵となる。この様に酵素は非常に優れた触媒系であると言える一方で、分子触媒と比較した場合に分子量が巨大であるために非効率的である。酵素から触媒反応に必要な最低限な要素だけを抽出して設計された人工分子触媒を開発することができれば、学術的観点及び合成化学的な観点から興味深い研究となると私は考えた<sup>7,8</sup>。

生体内にはその活性中心に金属元素を含まない酵素が存在し、それらは様々な酸化的分子変換を温和な条件下で高効率かつ高選択的に行っている。酸化還元反応を担う酵素の1つであるフラビンモノオキシゲナーゼ (FMO) はその活性中心にイソアロキサジン (中性フラビン環、Fl) と呼ばれる複素環構造を有しており、酸素分子を活性化し、ヘテロ原子やケトンを基質とする酸素添加反応を担っている<sup>9</sup>。その触媒サイクルはフラビン環の酸化体 (Fl<sub>ox</sub>-Enz) が補酵素 NAD(P)H により還元された還元体 (FlH<sub>2</sub>-Enz) を経て、酸素を取り込んで酸化活性種 4a-ヒドロペルオキシ体 (Fl<sub>OOH</sub>-Enz) が生じ、基質に酸素を添加する。Fl 自身はヒドロキシ体 (Fl<sub>OH</sub>-Enz) となり、水の脱離を伴って元の酸化体 (Fl<sub>ox</sub>-Enz) に戻り触媒サイクルが完結する (Scheme 1)。



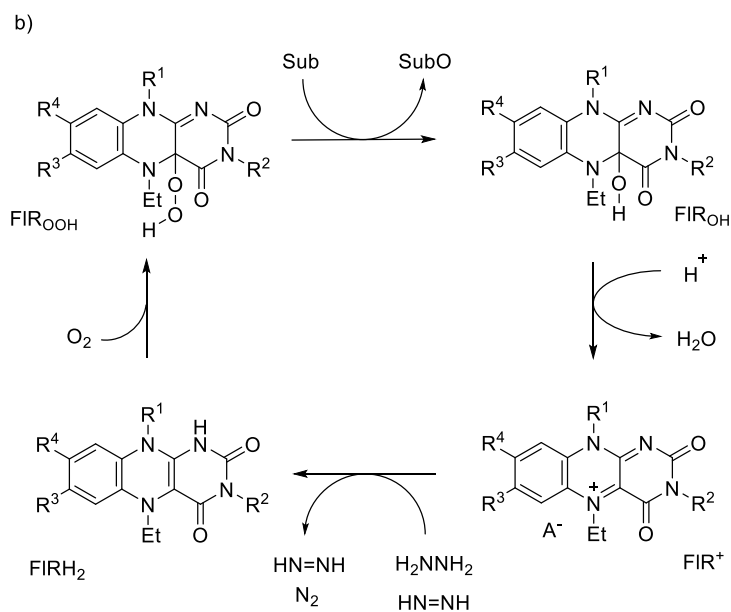
**Scheme 1.** Catalytic cycle of flavin monooxygenase.

FMO の反応シミュレーションより、1989年に村橋らは中性フラビン環の N5 位をアルキル化したカチオン性フラビン分子 (FIEt<sup>+</sup>) と過酸化水素を用いたスルフィドやアミンの触媒的酸化反応を開発した (Scheme 2, path A)<sup>10</sup>。続いて 2002 年にはケトンを経質とする Baeyer-Villiger 反応 (BV 反応) を開発しており、これら FIEt<sup>+</sup>触媒による酸化反応は温和な条件下で高い活性を示し、環境負荷の小さな優れた反応である<sup>11</sup>。その後、我々は過酸化水素の代わりに分子状



**Scheme 2.** FIEt<sup>+</sup> catalyzed Oxidations with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> or O<sub>2</sub>

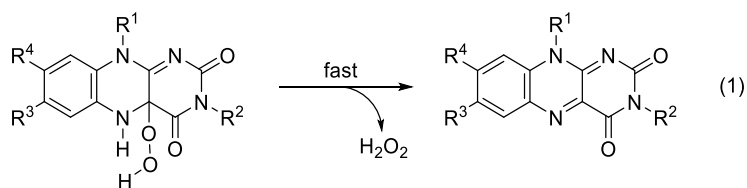
酸素を末端酸化剤として用いた FIEt<sup>+</sup>によるスルフィドやアミンの酸化反応及びケトンの BV 反応といった酸素添加反応を開発している (Scheme 2, path B)<sup>12,13</sup>。この触媒系は酸素分子を末端酸化剤として用いることができるという点において、より酵素系に近い触媒サイクルで反応が進行し、酸化由来の副生成物が水のみであるグリーンな反応である (Scheme 3)。



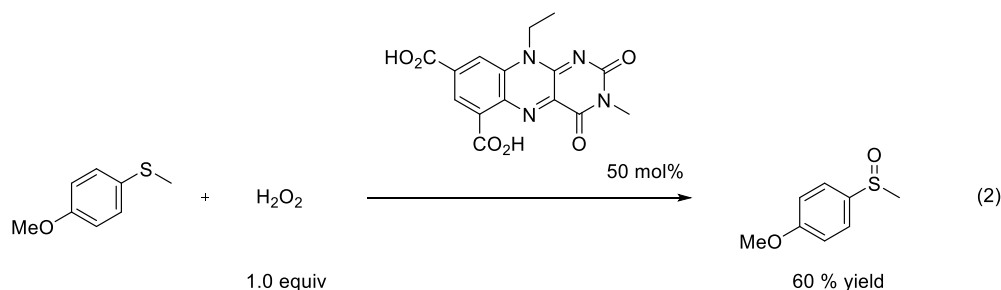
**Scheme 3.** Catalytic cycle of cationic flavin molecules.

これら酸素添加反応で用いられるフラビン分子触媒の構造に注目すると、その大部分が N5 位をアルキル化したカチオン性フラビン分子であり、FMO 本来の活性中心と等しい骨格を有する中性フラビン分子 (FI) による酵素類似の酸素添加反応は困難であった。これは非酵素系においては FI の対応する 4a-ヒドロペルオキシ活性種 ( $\text{FI}_{\text{OOH}}$ ) が極めて不安定であることが原因であり、生成した  $\text{FI}_{\text{OOH}}$  は速やかに過酸化水素の脱離を伴って  $\text{FI}_{\text{Ox}}$  に戻り失活する (式 1)。一方、酵素系において  $\text{FI}_{\text{OOH}}$  は活性中心の周辺たんぱく質との水素結合により適度に安定化され

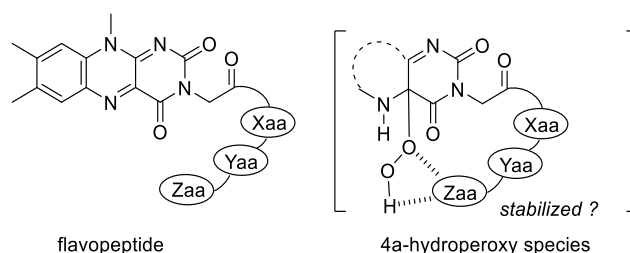
*non-enzymatic condition*



ているため効率的に基質を酸化できる<sup>14</sup>。FI による酵素類似様の酸化反応の唯一の報告例は 1992 年の米田らの報告のみであり<sup>15</sup>、6 及び 8 位にカルボキシル基を有する FI がスルフィドの過酸化水素酸化を加速すると報告しているが、詳細な反応機構の考察や活性種の同定はなされていない (式 2)。FI による酸素酸化反応はより一層困難であり、未だ達成されていない挑戦的な課題である。私は活性種を分子内水素結合により適度に安定化することでこの課題を克服できると考えた (Figure 1)。そこで私はペプチドが多様な水素結合を形成すること、及び特異な

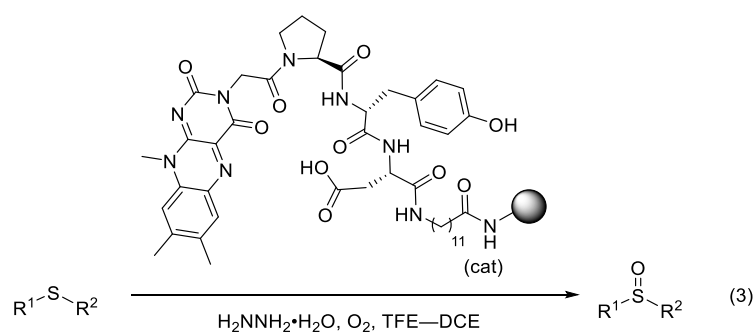


次構造をとることに着目した。活性種のヒドロペルオキシド部位がペプチドとの水素結合を形成することを期待し、ペプチド鎖を有するフラビン分子（フラボペプチド、**Fl-Pep**）を着想した。計算化学的手法を用いて設計した **Fl-Pep** を合成し、その活性を評価したところ、狙い通りにスルフィド、アミン及びケトンへの酸素添加能を有している事が分かった。この結果は酵素の活性中心に等しい **Fl** による酵素類似の酸素添加反応に成功した初めての例であり、分子内水素結合により活性種を制御する事に成功した興味深い例である。本論文では **Fl-Pep** の設計、合成及び種々の反応に対する活性の評価について記載する<sup>16</sup>。

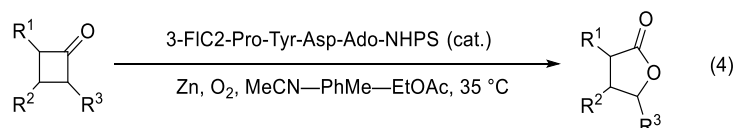


**Figure 1.** Our working hypothesis.

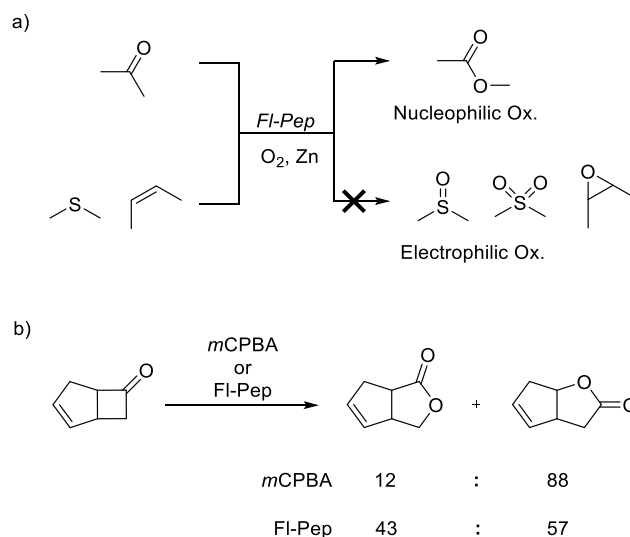
第二章では計算化学的手法を用いた **Fl-Pep** の設計、合成及びスルフィドの酸化反応における触媒活性評価について記載する。一般的に高活性なペプチド触媒の開発には最適なペプチド配列の網羅的探索が必要であり（ボトムアップ型）、触媒活性とペプチド配列の相関について予め予測して触媒の設計を行うこと（トップダウン型）は難しく、挑戦的な課題である。本研究では触媒設計時に計算化学的手法を用いて予め、トリペプチドから成る **3-FlC2-Pro-Tyr-Glu** が酸化活性を有すると予測し、実際にスルフィドの酸素酸化反応において活性を発現することを確認した。この結果を基に触媒構造の微調整性を行い、**Glu** を **Asp** に変更すると更に高い触媒活性が発現すること明かとなり、樹脂固定型フラボペプチド **3-FlC2-Pro-Tyr-Asp-Ado-NHPS (Fl-Pep 1)** とヒドラジン-水和物を酸素雰囲気下、2,2,2-trifluoro ethanol(TFE)と 1,2-dichloroethane(DCE)の混合溶媒中で用いることで効率的にスルフィドやアミンを酸化することに成功した（式3）。



第三章では FI-Pep による酸素を末端酸化剤とする Bayer-Villiger 反応 (BV 反応) に関して記載する。スルフィドの酸素酸化反応において最も活性の高かった 3-FIC2-Pro-Tyr-Asp-Ado-NHPS (FI-Pep 1) と還元剤として Zn を酸素雰囲気下、MeCN-PhMe-EtOAc (8:4:1) 混合溶媒中で用いるとケトンをラクトンに酸化することを見出



した (式 4)。FI-Pep 1 は高い官能基選択性を示すこと (Figure 2a) や *m*CPBA などの過酸とは異なるレジオ選択性を示すことも明らかとなった (Figure 2b)。これらの結果は酸化活性種が  $\text{Fl}_{\text{OOH}}$  であることを示す重要な結果である。

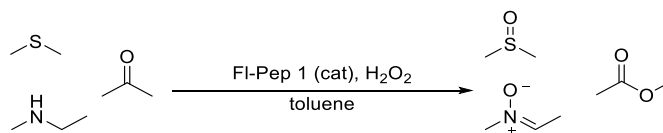


**Figure 2.** a) Chemoselective oxygenation reactions with FI-Pep. b) Regioselective BV oxidation

第 4 章では FI-Pep 1 と過酸化水素を用いた触媒的酸化反応に展開した。過酸化酸素は安価かつ取り扱いが容易なうえ、反応後の副生成物が水のみであるという優れた特徴を持つため、末端酸化剤としては古くから注目を集めてきた。前章までの結果を基に FI-Pep 1 の対応する過酸化



体 (FI<sub>OOH</sub>) は分子内水素結合により適度に安定化されていることが明らかとなったため、酸化体 (FI<sub>OX</sub>) から過酸化水素により直接的に FI<sub>OOH</sub> を生成することができると考えた。触媒量の **FI-Pep 1** と過酸化水素水をトルエン中で用いると効率的にスルフィドの酸化反応が進行し、目的のスルホキシドが効率的に得られた (Scheme 4)。本触媒系はアミン類の酸化反応や Baeyer-Villiger 反応にも適応可能であり、その詳細な結果を第 4 章に記載する。



**Scheme 4.** Oxidation reactions with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the presence of **FI-Pep 1** catalyst.

## References

- (1) Sheldon, R. A.; Kochi, J. K. *Metal-catalyzed oxidations of organic compounds : mechanistic principles and synthetic methodology including biochemical processes*; Academic Press, 1981.
- (2) Hudlicky, M. *Oxidations in organic chemistry*; ACS monograph; American Chemical Society, 1990.
- (3) *Modern oxidation methods second edition*; Bäckvall, J.-E., Ed.; Wiley-VCH: Weinheim, 2010.
- (4) Bryliakov, K. P. *Chem. Rev.* **2017**, *117*, 11406–11459.
- (5) *Asymmetric Organocatalysis, Workbench Edition*; List, B., Maruoka, K.; Thieme: Stuttgart, 2012.
- (6) (a) Wong, C.-H.; Whitesides, G. M. *Enzymes in synthetic organic chemistry*; Tetrahedron organic chemistry series; Pergamon, 1994. (b) Drauz, K.; Gröger, H.; May, O.; Waldmann, H. *Enzyme catalysis in organic synthesis*; Wiley-VCH, 2012. (c) Hollmann, F.; Arends, I. W. C. E.; Buehler, K.; Schallmeyer, A.; Bühler, B. *Green Chem.* **2011**, *13*, 226–265.
- (7) Berkessel, A.; Gröger, H. *Asymmetric organocatalysis : from biomimetic concepts to applications in asymmetric synthesis*; Wiley-VCH, 2005.
- (8) For selected recent examples of bioinspired catalyst, see: (a) He, W.-L.; Zhao, M.; Wu, C.-D. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, *58*, 168–172. (b) Wang, W.; Xu, D.; Sun, Q.; Sun, W. *Chem. Asian J.* **2018**, *13*, 2458–2464. (c) Olivo, G.; Cussó, O.; Borrell, M.; Costas, M. *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.* **2017**, *22*, 425–452. (d) Wang, V. C.-C.; Maji, S.; Chen, P. P.-Y.; Lee, H. K.; Yu, S. S.-F.; Chan, S. I. *Chem. Rev.* **2017**, *117*, 8574–8621. (e) Wu, H.; Handoko; Raj, M.; Arora, P. S. *Org. Lett.* **2017**, *19*, 5122–5125. (f) Zhang, X.; Zhang, T.; Li, Y.; Li, B.; Jiang, S.; Zhang, G.; Hai, L.; Ma, X.; Wu, W.; Wang, J. *Catal. Today* **2018**, *316*, 223–229. (g) Golime, G.; Bogonda, G.; Kim, H. Y.; Oh, K. *ACS Catal.* **2018**, *8*, 4986–4990.
- (9) (a) *Chemistry and Biochemistry of Flavoenzymes*; Müller, F., Ed.; CRC Press: Boston, 1991. (b) Poulsen, L. L.; Ziegler, D. M. *J. Biol. Chem.* **1979**, *254*, 6449–6455. (c) Kamerbeek, N. M.; Janssen, D. B.; van Berkel, W. J. H.; Fraaije, M. W. *Adv. Synth. Catal.* **2003**, *345*, 667–678. (d) Leisch, H.; Morley, K.;

- Lau, P. C. K. *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 4165–4222.
- (10) Murahashi, S. -I.; Oda, T.; Masui, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 5002–5003.
- (11) Murahashi, S.-I.; Ono, S.; Imada, Y. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2366–2368.
- (12) (a) Imada, Y.; Iida, H.; Ono, S.; Murahashi, S.-I. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 2868–2869. (b) Imada, Y.; Iida, H.; Ono, S.; Masui, Y.; Murahashi, S.-I. *Chem. Asian. J.* **2006**, *1–2*, 136 – 147.
- (13) Imada, Y.; Iida, H.; Murahashi, S. -I.; Naota, T. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 1704–1706.
- (14) stabilization of Enz-FI-OOH (a) Poulsen, L. L.; Ziegler, D. M. *J. Biol. Chem.* **1979**, *254*, 6449–6455. (b) Massey, V; Hemmerich, P. *Biochem. Soc. Trans.* **1980**, *8*, 246–257. (c) Baety, B. Narlin; Ballou, P. D. *Journal Biol. Chem.* **1980**, *255*, 3817–3819.
- (15) Akiyama, T.; Simeno, F.; Murakami, M.; Yoneda, F. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 6613–6620.
- (16) (a) Arakawa, Y.; Yamanomoto, K.; Kita, H.; Minagawa, K.; Tanaka, M.; Haraguchi, N.; Itsuno, S.; Imada, Y. *Chem. Sci.* **2017**, *8*, 5468–5475. (b) Yamanomoto, K.; Kita, H.; Arakawa, Y.; Minagawa, K.; Imada, Y. *Chimia* **2018**, *72*, 866–869.

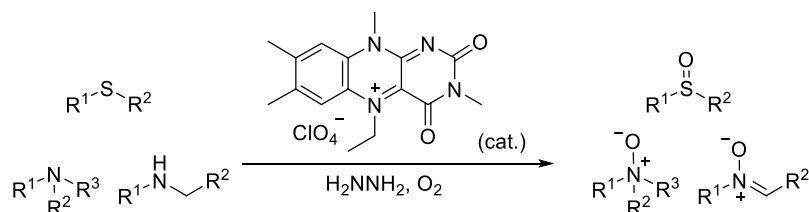
## 第二章 ペプチド鎖を有するフラビン分子触媒の設計と分子状酸素を用いた求電子酸化反応への応用

- 2.1 Introduction
- 2.2 Results and Discussion
  - 2.2.1 Rational Design of Fl-Pep
  - 2.2.2 Synthesis of Flavopeptide
  - 2.2.3 Aerobic Sulfoxidation with Flavopeptide
- 2.3 Conclusion
- 2.4 Experimental Section
- 2.5 References

### 2.1 Introduction

有機分子触媒を用いた反応開発は、2000年以降、急激な発展を遂げてきたが、その大部分が第二級アミン触媒を用いたイミン、エナミンを経由する反応や酸塩基相互作用を利用した反応、相関移動触媒を用いた反応である<sup>1</sup>。一方、酸化反応に目を向けるとその報告例は圧倒的に少ない。酸素を利用して触媒由来の過酸を生成することができれば、グリーンな触媒系の開発及び、触媒制御による選択的反応と幅広い酸素添加反応への応用が期待されるが、これらの条件を満たす有機分子触媒は限られている<sup>1,2</sup>。

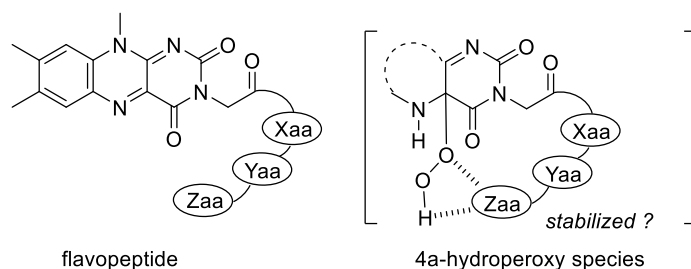
2003年に我々のグループはフラビン酵素の酸素酸化能のシミュレーションから、N5置換フラビン分子、ヒドラジン、酸素分子を用いた酸素酸化反応の開発に成功している<sup>3</sup>。これは酸素分子を末端酸化剤とした有機分子触媒による酸素添加反応を達成した初めての例であった。N5置換フラビン分子は高効率、高選択的かつグリーンな酸化反応触媒として注目を集めてきたが<sup>4</sup>、一方で酵素の活性中心に等しいN5無置換フラビン分子による酸素添加反応が困難であることは以前より知られていた。私が研究を始めた当初は酵素類似酸化能を有するFlの報告例は無く、挑戦的な課題であった。



**Figure 1.** Catalytic aerobic oxygenation reactions with *N5*-modified flavin.

Flによる酸素添加反応が困難であるのは第一章で述べたように活性種の安定性に起因し、4a-ヒドロペルオキシドフラビンを安定化する要素を付与することが中性フラビンによる酸素添加反応を達成するための鍵である。私は分子内水素結合による活性種の安定化を構想し、水素結合供与体としてペプチドに着目した (Figure 2)。ペプチドは多様な水素結合形成が可能であり、特異な三次元構造をとること及び構造多様性の観点からも有用な触媒の基本骨格として用いられてきた<sup>5-8</sup>。ペプチド触媒の開発においては、最適な触媒構造の決定のためにペプチドの網羅的なスクリーニングが必要であるから、効率的なスクリーニング方法の開発が注目を集め、精力的に研究されてきた (ボトムアップ型)<sup>9</sup>。これらの方法による最適な触媒構造の探索は限られた触媒反応系に対してしか使えないことが欠点である。これに対して予め適したペプチド配列を予測してから触媒の合成と活性評価を行うトップダウン型の触媒開発は未だ成功例は少なく、非常に挑戦的である。

分子内水素結合を利用した *N5* 無置換フラビンペルオキシドの安定化には、その最安定配座においてどのような水素結合が形成されるかが鍵となる。私は (1) 計算化学の手法を用いた触媒の最安定配座、及び反応に適したペプチド配列の予測、(2) 実際に触媒を合成しその活性を評価、(3) 触媒構造の微調整、という一連の流れに沿って研究を進めることで高い酸化活性を有する Fl-Pep の開発に取り組んだ。



**Figure 2.** Our working hypothesis.

## 2.2 Results and discussion

### 2.2.1 Rational design of FI-Pep

#### 2.2.1.1 Coupling reaction of flavin and (aminomethyl)polystyren resin

ペプチド固相合成法を用いて樹脂上にペプチド鎖を構築後、その N 末端とカルボキシル基を有するフラビン（以下フラビンカルボン酸）を縮合して目的の FI-Pep を合成することとした。フラビンカルボン酸はフラビン骨格が求核的な窒素原子を有すること、及び溶解性が低いことが原因となり固相合成法による樹脂上への固定化が困難である事が予想されたため、初めに N3 位または N10 位にカルボキシル基を有するフラビンを合成し、アミノ基含有樹脂と直接縮合を試みた (Figure 3)。

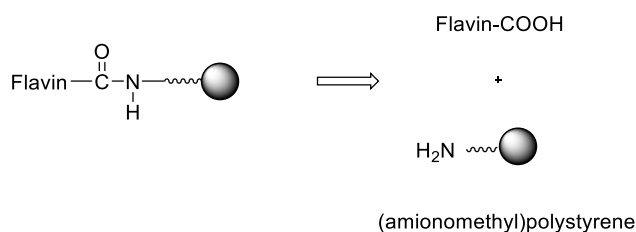
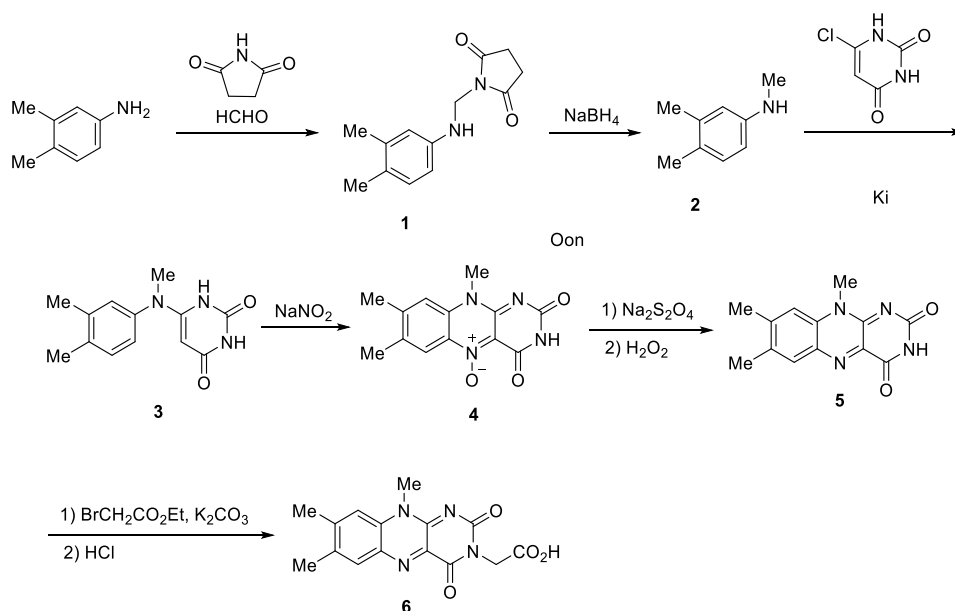


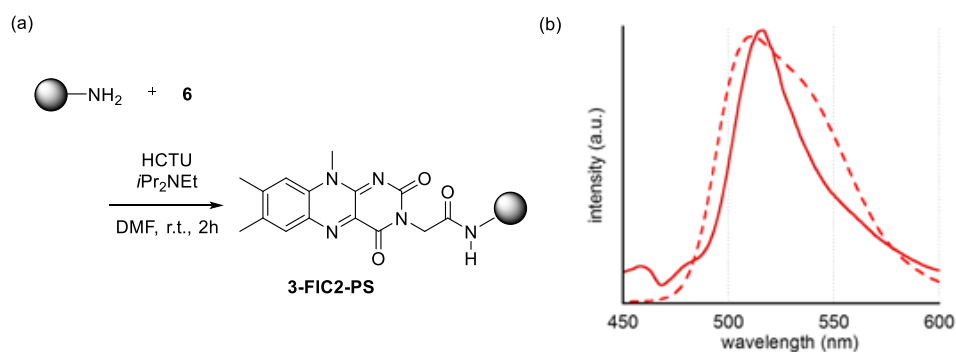
Figure 3. Direct immobilization of flavin molecule onto PS resin.



Scheme 1. Synthesis of lumiflavin-3-acetic acid (6)

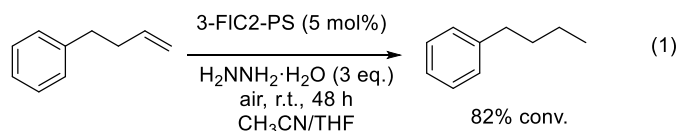
lumiflavin-3-acetic acid (6) は既知の合成法を参考に合成した (Scheme 1)<sup>3b, 10</sup>。樹脂上のアミノ基に対して 2.5 等量の 6 及び HCTU と 7.5 等量の *N,N*-diisopropylethylamine を用いて、2 時

間振とうさせると黄色の樹脂を得た (Fig. 4a)。反応の進行は Kaiser Test により確認し、得た樹脂の固体蛍光を測定するとフラビン **6** の溶液の蛍光と同様のピークが見られた (Fig. 4b)。元素分析より担持量を 0.998 mmol/g だと算出し、この値は元々の樹脂のアミノ基含有量 (1.48 mmol/g) から計算した理論値 (1.02 mmol/g) とほぼ一致した。



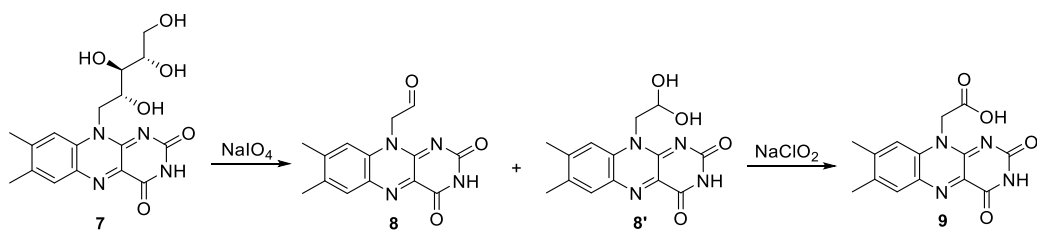
**Figure 4.** (a) Synthesis of **3-FIC2-NHPS**. (b) Emission spectra of **3-FIC2-NHPS** (a solid line) and 0.1 nM of flavin **6** in MeOH (a dashed line). (at room temperature,  $\lambda_{\text{ex}}=420$  nm)

**3-FIC2-NHPS** を用いてヒドラジンを水素源とするオレフィンの水素添加反応を行い、樹脂上に固定化したフラビンの触媒活性を評価した。反応容器に **3-FIC2-NHPS** (5 mol%, 0.025 mmol)、4-phenyl-1-butene (33 mg, 0.25 mmol)、混合溶媒 (THF/CH<sub>3</sub>CN=3:1) 溶媒 (1 mL)、hydrazine monohydrate (50 mg, 1.0 mmol)、溶媒 (1 mL) を記載の順番通り加えて振とうを開始した。転化率はガスクロマトグラフィーにより求めた (式 1)。



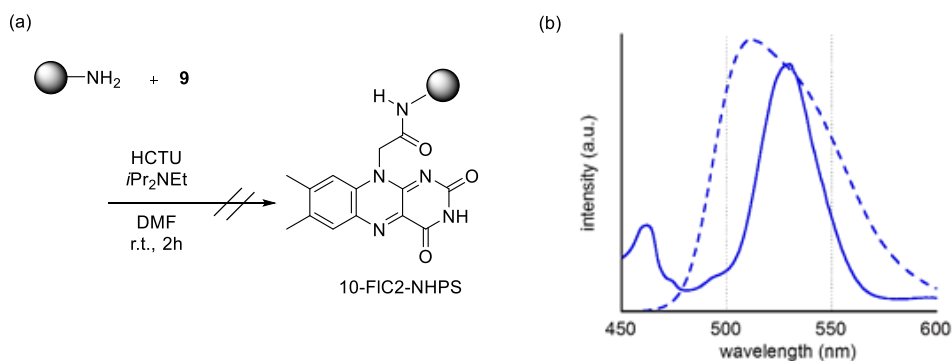
5 mol% の **3-FIC2-PS** を用いた場合は 48 時間で 82% の転化率となり、触媒無しの場合は 48 時間後に基質の転化率は 35% であった。この結果よりフラビン分子触媒は樹脂へ固定化しても触媒活性を有する事が確認された。

N10 位にカルボキシル基を有するフラビン **9** は既知の合成法<sup>11</sup> を基にリボフラビンから合成し (Scheme 2)、**6** と同様に樹脂上への固定化を試みた。



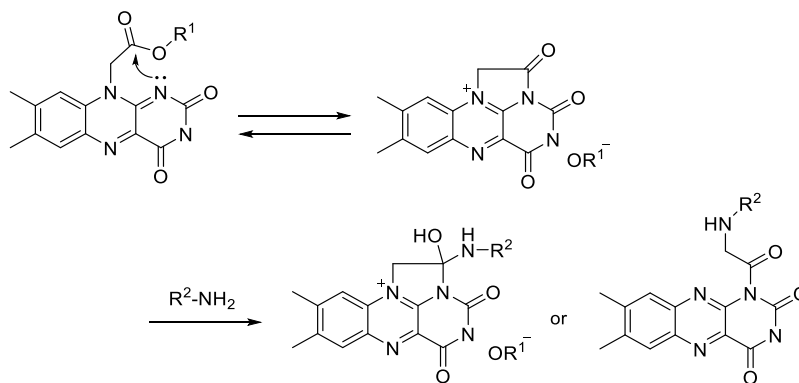
**Scheme 2.** Synthesis of flavins containing carboxylic group

同様の反応条件で縮合を行ったが、フラビン **9** は DMF への溶解性が低く溶け切らなかったために懸濁状態の反応溶液を樹脂へ加えた。得られた樹脂はフラビン特有の黄色ではなく黒色で、得られた樹脂の固体蛍光を測定すると Figure 5b に示すように **9** の溶液とは異なるピークが観察され、狙った様な縮合反応は起こっていないと判断した。



**Figure 5.** (a) Synthesis of **10-FIC2-NHPS**. (b) Emission spectra of **10-FIC2-NHPS** (a solid line) and 0.1 nM of flavin **9** in MeOH (a dashed line). (at room temperature,  $\lambda_{\text{ex}}=420$  nm)

この原因として活性エステルが生じてから N1 位の窒素がカルボニル炭素に求核攻撃し続いてアミンの求核攻撃が進行するなどの副反応が考えられ<sup>11)</sup>、目的の反応が進行しなかったと考えられる (Scheme 3)。



**Scheme 3.** Supposed reaction mechanism in side reaction.

### 2.2.1.2 Design of FI-Pep using DFT calculation

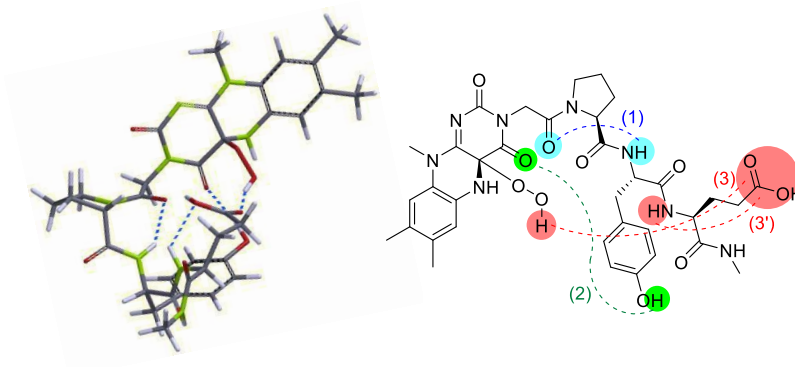
以下、5つの条件を満たす FI-Pep について対応する Fl<sub>OOH</sub> の安定配座を DFT 計算により求め、活性種とペプチド側鎖が水素結合を形成する FI-Pep を探した。1) 先の実験結果を基に lumiflavin-3-acetic acid (6) をペプチドの N 末端へ縮合する。2) 使用するアミノ酸は入手が容易な L-アミノ酸とする。3) ペプチドはジペプチド及びトリペプチドとする。4) フラビンに隣接するアミノ酸残基はターン構造を期待して Pro とする。5) 2、3 残基目 (Yaa, Zaa) にはヒドロペルオキシド部位との水素結合を期待して酸性側鎖を有するアミノ酸残基を中心に配置する。以上 5 つの条件をみたす 3-FIC2-Xaa-Yaa-NHMe と 3-FIC2-Xaa-Yaa-Zaa-NHMe について各 Fl<sub>OOH</sub> 体の安定配座 DFT 計算 (B3LYP/6-31G\*) により求めた (Figure 6a)。計算の結果、3-FIC2-Xaa-Yaa-NHMe の最安定配座ではペプチドが短いために狙った様な水素結合は確認されなかった。トリペプチド 3-FIC2-Pro-Tyr-Glu-NHMe の場合は狙った様なヒドロペルオキシド部位と Glu の側鎖カルボン酸との水素結合が見られた (Figure 6b red (3))。他にもプロリンを挟んでフラビンカルボン酸由来のカルボニル酸素と Tyr の N 末端アミドとの水素結合により  $\gamma$  turn が形成され (Figure 6b blue (1))、Tyr の OH 基とフラビンの 4 位炭素のカルボニル酸素との水素結合 (Figure 6b green (2)) によりターン構造が固定される様子が見受けられ、これらによりヒドロペルオキシド部位と Glu の側鎖カルボン酸の水素結合形成がより強固になっている。



a)

entry	Xaa	AA2	AA3
1	Pro	Tyr	---
2	Pro	Glu	---
3	Pro	Gly	---
4	Pro	Tyr	Glu
5	Pro	Tyr	Gln
6	Pro	Phe	Glu
7	Pro	Asp	Glu
8	$\beta$ Ala	Tyr	Glu

b)



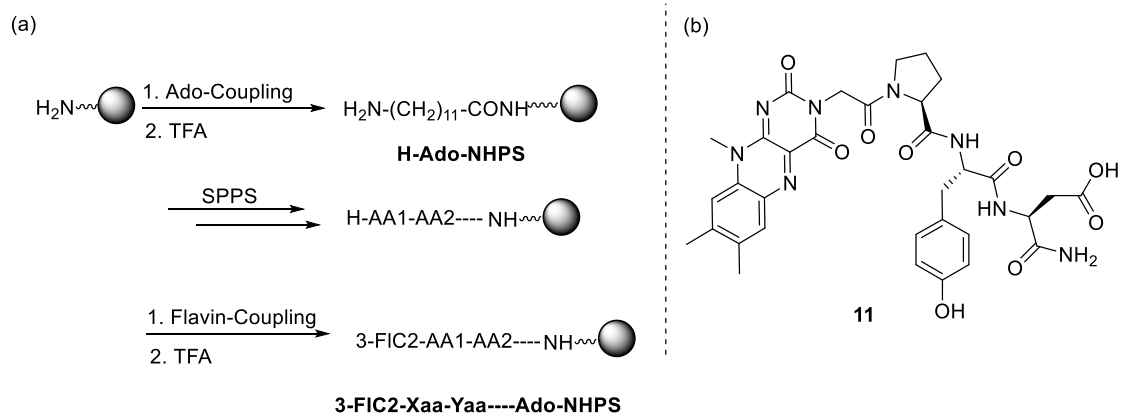
**Figure 6.** a) Calculated 3-FIC2-Xaa-Yaa-NHMe and 3-FIC2-Xaa-Yaa-Zaa-NHMe. b) Lowest energy structure of 3-FIC2<sub>4a(R)</sub>OOH-Pro-Tyr-Glu-NHMe estimated by DFT calculation and graphical representation of remarkable hydrogen bond.

### 2.2.2.1 Synthesis of Flavins Including Peptide

DFT 計算の結果より Pro-Tyr-Glu から成る Fl-Pep が対応する活性種を安定化し、酸化活性を有することが予想されたので Fl-Pep を合成した。同様に類似の構造を有する Fl-Pep も合成し、各アミノ酸の影響を比較することとした。

アミノ基含有ポリスチレン(aminomethyl)polystyrene (1% ジビニルベンゼン架橋) を用いて Boc-Ado-OH を縮合し、TFA により Boc 基の脱保護を行った。その後は一般的な Fmoc 固相合成法にのっとり樹脂上にペプチドを構築し、その N 末端にフラビンカルボン酸 **6** を縮合した (Figure 7a)。得られた樹脂を TFA で処理することでアミノ酸側鎖の保護基である t-Bu 基または

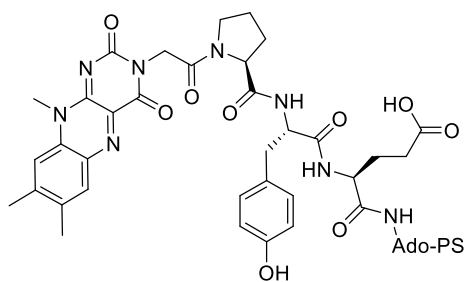
Trt 基を脱保護して樹脂担持型 Fl-Pep を合成し（詳細な合成方法は experimental section 参照）、樹脂に担持したままその酸化活性を評価することとした。尚、別途ペプチド切り出し用リンカーをもつ Rink Amide Resin を用いて上記の(aminomethyl)polystyrene と同様の手順で樹脂上に Fl-Pep: 3-FIC2-Pro-Tyr-Asp-NH<sub>2</sub> を合成した後、酸処理によって樹脂上から切り出して構造解析を行うことで上記の手法で目的の Fl-Pep が合成できる事は確認した(Fig. 7b)。合成した 3-FIC2-Xaa-Yaa-Zaa-linker-resin の一覧は Table 1 と Chart 1 に記す。



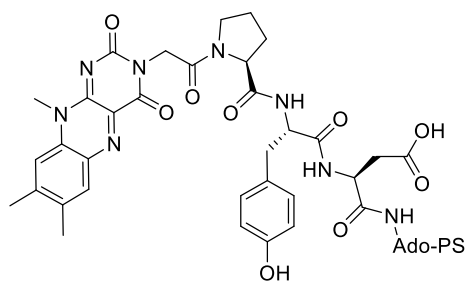
**Figure 7.** (a) General procedure for synthesis of Fl-Pep. (b) Structure of 3-FIC2-Pro-Tyr-Asp-NH<sub>2</sub>

**Table 1.** Tripeptidic flavins supported on PS resin

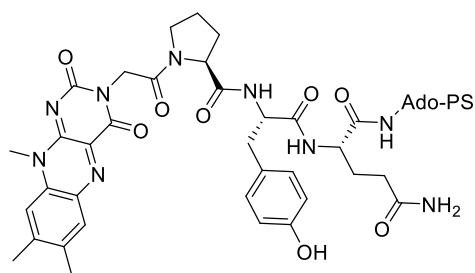
entry	AA 1	AA 2	AA 3	label	loading (mmol/g)
1	Pro	Tyr	Glu	<b>Fl-Pep 1a</b>	0.44
2	Pro	Tyr	Asp	<b>Fl-Pep 2a</b>	0.55
3	Pro	Tyr	Gln	<b>Fl-Pep 3a</b>	0.53
4	Pro	Phe	Glu	<b>Fl-Pep 4a</b>	0.55
5	Pro	Asp	Glu	<b>Fl-Pep 5a</b>	0.53
6	bAla	Tyr	Glu	<b>Fl-Pep 6a</b>	0.42



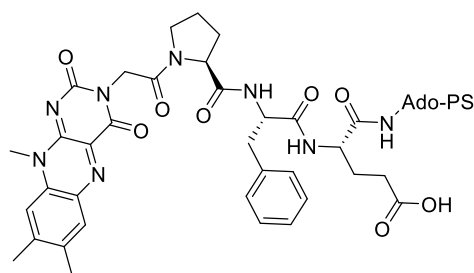
**FI-Pep 1a**  
3-FIC<sub>2</sub>-Pro-Tyr-Glu-Ado-PS



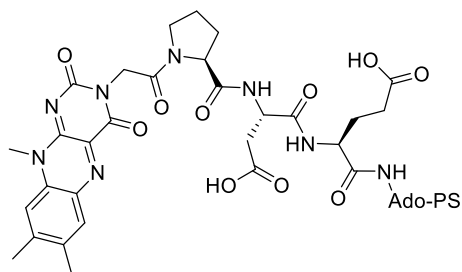
**FI-Pep 2a**  
3-FIC<sub>2</sub>-Pro-Tyr-Asp-Ado-PS



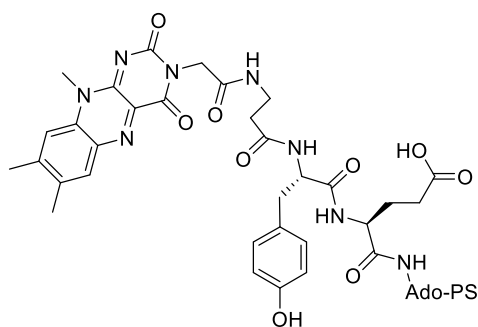
**FI-Pep 3a**  
3-FIC<sub>2</sub>-Pro-Tyr-Gln-Ado-PS



**FI-Pep 4a**  
3-FIC<sub>2</sub>-Pro-Phe-Glu-Ado-PS



**FI-Pep 5a**  
3-FIC<sub>2</sub>-Pro-Asp-Glu-Ado-PS

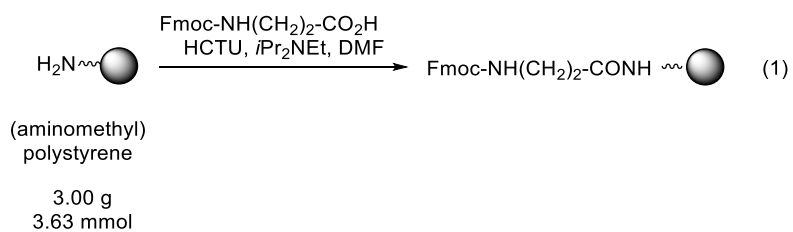


**FI-Pep 6a**  
3-FIC<sub>2</sub>-Pro-Tyr-Glu-Ado-PS

**Chart 1.** Structure of 3-FIC<sub>2</sub>-X<sub>1</sub>-X<sub>2</sub>-X<sub>3</sub>-Ado-PS

これまでマニュアル固相合成により FI-Pep の合成を行っていたが、触媒合成の再現性を確認するため固相合成の一部を自動合成装置を用いて行い触媒活性をマニュアル合成の結果と比較した。

マニュアル合成により Fmoc-βAla-NH-PS を 1 バッチで大量合成した (eq. 13)。



式1で合成した Fmoc-βAla-NH-PS を用い、以下 Fmoc-Xaa-Yaa-Xaa-βAla-NH-PS まで自動合成装置を用いて合成した (Table 2)。

**Table 2.** Peptides immobilized on to resin.

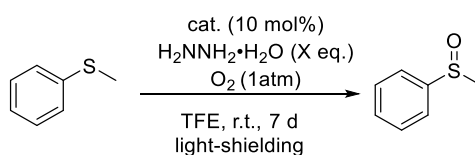
entry	Xaa	Yaa	Zaa	label	loading (mmol/g)
1	Pro	Tyr	Glu	<b>F1-Pep 1b</b>	0.48
2	Pro	Tyr	Asp	<b>F1-Pep 2b</b>	0.48
3	Pro	Tyr	Gln	<b>F1-Pep 3b</b>	0.53
4	Pro	Phe	Glu	<b>F1-Pep 4b</b>	0.47
5	Pro	Asp	Glu	<b>F1-Pep 5b</b>	0.40
6	βAla	Tyr	Glu	<b>F1-Pep 6b</b>	0.42

## 2.2.3 Aerobic sulfoxidation with FI-Pep

### 2.2.3.1 Initial trial of FI-Pep-catalyzed oxidation of thioanisole

N5 置換フラビン触媒による酸素酸化反応においてヒドラジンと TFE を用いると効率的にスルフィドの酸化が進行することが報告されている。この知見を基にチオアニソール (12.4 mg, 0.10 mmol) を基質としてヒドラジン存在下、酸素雰囲気下、TFE (2 mL) 中で 10 mol% の樹脂担持型フラボペプチドを用いて酸化活性の有無を調べた。

**Table 3.** Oxidation of thioanisole with 1 equivalent of hydrazine. \*<sup>1</sup>



entry	cat.	hydrazine (equiv)	yield (%)
1	3-FIC2-Pro-Tyr-Glu-Ado-PS ( <b>FI-Pep 1a</b> )	1	40
2	3-FIC2-Pro-Asp-Glu-Ado-PS ( <b>FI-Pep 2a</b> )	1	12
3	FI-Pep 2a	2	17
4	3-FIC2-PS	1	trace
5	H-Pro-Asp-Glu-Ado-PS	1	0

\*<sup>1</sup> Reactions were carried out using thioanisole (0.1 mmol) in TFE (1.0 mL).

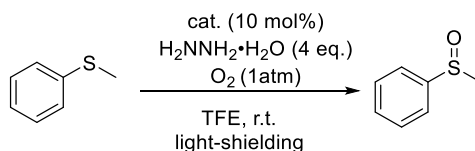
\*<sup>2</sup> The yield was determined by GC.

DFT の計算より 3-FIC2-Pro-Tyr-Glu-NHMe が酸化活性種を安定化し得ることが分かったので、同様の配列をもつフラボペプチドを合成し酸化活性の評価を行った。まずアミノメチルポリスチレンレジンをヘスペーサーとして 12-aminododecanoic acid を縮合し、N 末端伸長法で目的のペプチドを構築し、最後にフラビンカルボン酸 **6** を縮合した。DFT 計算の結果を基に合成した 3-FIC2-Pro-Tyr-Glu-Ado-PS (**FI-Pep 1a**) が酸化能を有する事がわかった(entry 1)。ペプチドとフラビンの相互作用で反応が進行している事を確認するためにフラビンを直接 PS へ固定化した触媒 3-FI-PS を用いて同様の反応を行ったが反応の進行は殆ど確認されなかった(entry 4)。ペプチド鎖のみで反応が進行する可能性もあったのでペプチド鎖のみで反応を行ったが反応の進行は全く確認されなかった(entry 5)。X2 を Asp に変更したが反応はあまり進行せず、ヒドラジン量を 2 当量にすると収率の向上が見られた(entries 2,3)。

### 2.2.3.2 The effect of amino acid residue for the oxidation

ペプチド配列の酸化活性への影響を調べた。チオアニソール (12.4 mg, 0.1 mmol) に対してヒドラジン (50.0 mg, 0.40 mmol) 存在下、酸素雰囲気下、TFE 中で 10 mol% の樹脂担持型フラボペプチドを用いて反応を行った (Table 4)。

**Table 4.** Flavopeptide-catalysed aerobic oxidation of thioanisole with 4 equivalent of hydrazine. \*<sup>1</sup>



entry	cat.	conc. (M)	conv. (%) <sup>*2</sup>	
			48 h	70 h
1	3-FIC2-Pro-Tyr-Glu-Ado-PS ( <b>Fl-Pep 1a</b> )	0.1	28	50
2	<b>Fl-Pep 1a</b>	0.2	59	95
3	3-FIC2-Pro-Tyr-Asp-Ado-PS ( <b>Fl-Pep 2a</b> )	0.2	79	>99 (60 h)
4	3-FIC2-Pro-Asp-Glu-Ado-PS ( <b>Fl-Pep 5a</b> )	0.2	38	59
5	3-FIC2-Pro-Phe-Glu-Ado-PS ( <b>Fl-Pep 4a</b> )	0.2	32	68
6	3-FIC2-Pro-Tyr-Gln-Ado-PS ( <b>Fl-Pep 3a</b> )	0.2	7	19
7	3-FIC2-βAla-Tyr-Glu-Ado-PS ( <b>Fl-Pep 6a</b> )			
8 <sup>*3</sup>	<b>Fl-Pep 1a</b>	0.2	6	20

\*<sup>1</sup> Reactions were carried out using thioanisole (0.1 mmol) in TFE (0.5 mL) \*<sup>2</sup> The yield was determined by GC. \*<sup>3</sup> The reaction was carried out under air.

Table 3 の実験よりヒドラジン量と反応濃度が反応に大きく影響する事がわかったので反応における濃度の影響をみたところ、濃度を濃くすると収率が大幅に上がり、基質濃度 0.2 M を最適条件とした (entries 1, 2)。

3FIC2-Pro-Tyr-Glu-Ado-PS (**Fl-Pep 1a**)のどのアミノ酸残基が反応に関与しているのかを調べるために X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub> を変更した (entries 3-7)。この結果より Pro による配座の固定、Tyr の嵩高さと酸性度、Glu の酸性度が反応に重要だと分かった。entry 8 より空気条件下では反応が遅くなる事が分かった。本反応は酸素と触媒との気体-固体間の反応により活性種が生じるので系内の酸素濃度が重要だと分かる。

### 2.2.3.3 Solvent effect in the catalytic aerobic oxigenation of thioanisole.

担体であるポリスチレンの膨潤度を考慮して 1,2-dichloroethane (DCE) と TFE の比率を変化させ、その時の活性を比較した。チオアニソール (12.4 mg, 0.1 mmol) に対してヒドラジン (50.0 mg, 0.40 mmol) 存在下、酸素雰囲気下、TFE/DCE 混合溶媒中で 10 mol% の **Fl-Pep 2a** を用いて反応を行い TFE/DCE の比率と酸化活性の関係を調べた (Table 5)。

Table 5. Solvent effect in the catalytic aerobic oxidation of sulfide. \*1

0.2 M

entry	ratio of TFE/DCE	yield (%) *2
1	100/0	26
2	75/25	40
3	50/50	62
4	25/75	4

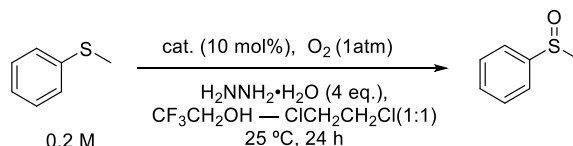
\*1 Reactions were carried out using thianisole (0.1 mmol) in TFE (0.5 mL)

\*2 The yield was determined by GC.

結果は TFE100% から DCE の比率を上げていくと収率が良くなり、TFE : DCE = 50:50 の時、最も高い収率となり、DCE の比率を上げすぎると収率が大幅に減少した。カチオン性フラビン分子の酸素酸化反応の場合、TFE 中では 4a-ヒドロペルオキシフラビンの酸化力 (求電子性) が上昇し、対してヒドラジンの還元力 (求核性) が低下することにより触媒サイクルが回っている。カチオン性フラビン分子と同様の触媒サイクルで本触媒系も回っているとすると溶媒の TFE の比率が低下しすぎると反応の進行が遅くなったという実験結果は妥当である。今後は TFE : DCE = 50:50 を標準条件とする。

### 2.2.3.4 The effect of amino acid residue of Fl-Pep in the oxidation of thioanisole using a mixed solvent.

混合溶媒系が高い触媒活性を示す事が分かったのでもう一度ペプチド配列の酸化活性への影響を調べた (Table 6)。チオアニソール (12.4 mg, 0.1 mmol) に対してヒドラジン (50.0 mg, 0.40 mmol) 存在下、酸素雰囲気下、TFE/DCE = (1:1) 混合溶媒中で 10 mol% の樹脂担持型フラボペプチドを用いて反応を行った。

**Table 6.** Oxidation of thioanisole in a TFE-DCE mixed solvent. \*<sup>1</sup>

entry	cat. and additive	GC yield	NMR yield	note
1	3-MeLumiflavin	3	4	
2	3-FIC2-NHPS	2	2	
3	3-FIC2-Glu-Ado-NHPS	10	8	
4	3-FIC2-Pro-Tyr-Asp-Ado-NHPS ( <b>FI-Pep 2a</b> )	60 >99 (36 h)	62 >99 (36 h)	
5	3-FIC2-Pro-Tyr-Asp-Ado-NHPS	41	43	under air
6* <sup>2</sup>	3-FIC2-Pro-Tyr-Asp-Ado-NHPS	79	no deta	
7	3-FIC2-Pro-Tyr-Glu-Ado-NHPS ( <b>FI-Pep 1a</b> )	44	46	
8	3-FIC2-Pro-Tyr-Glu-Ado-NHPS	no deta	21	under air
9	3-FIC2-Pro-Phe-Glu-Ado-NHPS ( <b>FI-Pep 4a</b> )	18	24	
10	<b>FI-Pep 4a</b> + 10 mol% PhOH	16	15	
11	3-FIC2-Pro-Tyr-Gln-Ado-NHPS ( <b>FI-Pep 3a</b> )	12	15	
12	<b>FI-Pep 3a</b> + 10 mol% AcOH	no deta	10	
13	3-FIC2-βAla-Tyr-Glu-Ado-NHPS( <b>FI-Pep 6a</b> )	no deta	18	
14	3-FIC2- Glu-Ado-PS	14	13	

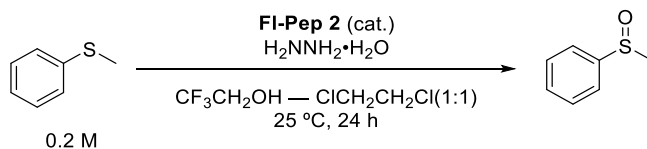
\*<sup>1</sup> Reactions were carried out using thioanisole (0.1 mmol) in TFE:DCE=1:1 (0.5 mL).

\*<sup>2</sup> Conc.= 0.2 M at 35 °C.

触媒活性の傾向は TFE100%溶媒の系と変化は無く、**FI-Pep 2a** が一番高い触媒活性を示し、36 時間でほぼ定量的に反応は進行した。反応濃度を 0.2 M、温度を 35 °C にすると反応の加速がみられた (entry 6)。温度が高いとフラボペプチドが取り得るコンフォメーション数が増加し、活性種の安定化が阻害される可能性もあったが問題なく反応が進行した。**FI-Pep 1a** の Pro 部位をβAla に変えペプチド配座の自由度を上げると活性が大きく下がった。Pro、Tyr、Glu の影響をみた結果 (entries 8, 10 and 12) より Pro-Tyr-Glu の配列全てが重要であるとわかった。またアミノ酸由来のカルボキシル基やフェノール性水酸基の代わりに外部から酢酸やフェノールを加えても反応の加速が見られなかった事からペプチド鎖内に酸性官能基を有している事が重要であることもわかった (entries 9, 11)。



**Table 7.** Oxidation of thioanisole under different conditions. \*1



entry	atmosphere	<b>22</b> (mol%)	H <sub>2</sub> NNH <sub>2</sub> ·H <sub>2</sub> O (equiv)	yield (%) <sup>*2</sup>
1	O <sub>2</sub>	10	4	62
2	air	10	4	15
3	O <sub>2</sub>	5	4	50
4	N <sub>2</sub>	10	4	0
5	O <sub>2</sub>	10	0	0

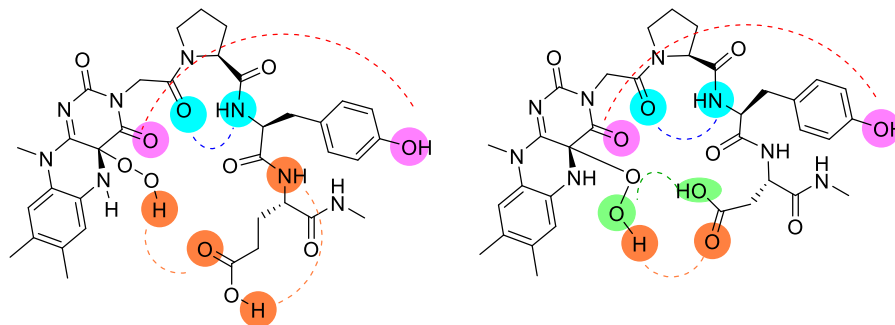
\*1 Reactions were carried out using thioanisole (0.1 mmol) in TFE:DCE=1:1 (0.5 mL) \*2 The yield was determined by GC.

最も活性の高かった **FI-Pep 2a** を用いて様々な条件下で反応を行った (Table 7)。空気下で反応を行うと活性の低下がみられたが、触媒量を 5 mol% に減らしても収率の大きな低下はみられなかった (entries 2 and 3)。酸素源である酸素分子や還元剤であるヒドラジンがない条件下では反応は全く進行しなかった (entries 4 and 5)。

以上より 3-FIC2-Pro-Tyr-Asp-Ado-PS がチオアニソールの空気酸化反応において高い触媒活性を示すことが分かった。Pro-Tyr-Asp のアミノ酸配列が重要であり、Asp 由来のカルボン酸が酸化活性種であるヒドロペルオキシ体の安定化に大きく寄与していると考えられる。

3-FIC2-Pro-Tyr-Asp-Ado-PS の触媒構造は当初の DFT 計算の一覧には含まれていなかったため、最適化した同様の方法に則り 3-FIC2<sub>4a(R)</sub>OOH-Pro-Tyr-Asp-NHMe の最安定配座を求めた。

(Figure 8)



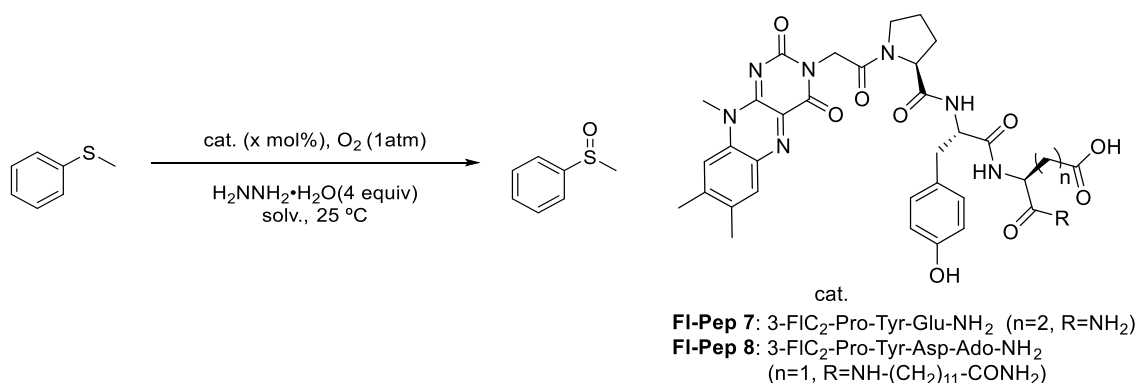
**Figure 8.** The most stable conformations of 3-FIC2<sub>4a(R)</sub>OOH-Pro-Tyr-Glu-NHMe (left) and 3-FIC2<sub>4a(R)</sub>OOH-

Pro-Tyr-Asp-NHMe (right) calculated in DFT at B3LYP/61-G\* level. Dod lines: hydrogen bonds.

3-FIC2<sub>4a(R)</sub>OOH-Pro-Tyr-Glu-NHMe はヒドロペルオキシド部位と Glu のカルボニル基間に 1 つの水素結合が形成されていたのに対し、3-FIC2<sub>4a(R)</sub>OOH-Pro-Tyr-Asp-NHMe は 2 つの水素結合が形成されていた。この 2 つの水素結合が酸化反応の促進に重要であり、計算化学による触媒設計の妥当性が確認された。

### 2.2.3.5 Aerobic Oxygenation of sulfide with homogenous FI-Pep

**Figure 9.** homogeneous system reaction: 3-FIC2-Pro-Tyr-Glu/Asp-NH<sub>2</sub> catalyzed aerobic oxidation of thioanisole.



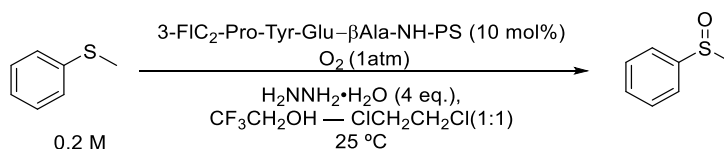
entry	cat (mol%)	solv.	conv. (%)
1	<b>FI-Pep 7</b> (5)	TFE	0%(24 h)
2	<b>FI-Pep 7</b> (5)	TFE-AcOH(1:1)	0%(48 h)
3	<b>FI-Pep 7</b> (5)	CH <sub>3</sub> CN-AcOH(1:0.2)	trace(48 h)
4	<b>FI-Pep 7</b> (2.5)	TFE-AcOH(1:0.2)	7%(24 h), 19 %(65 h)
5	<b>FI-Pep 7</b> (2.5)	EtOH-AcOH(1:0.2)	10%(24 h), 15%(65 h)
6	<b>FI-Pep 8</b> (10)	TFE-DCE (1:1)	7% (24 h)
7*	<b>FI-Pep 8</b> (10)	TFE-DCE (1:1)	40% (24 h), 68%(36 h)

\*8 equivalent of hydrazine monohydrate was used.

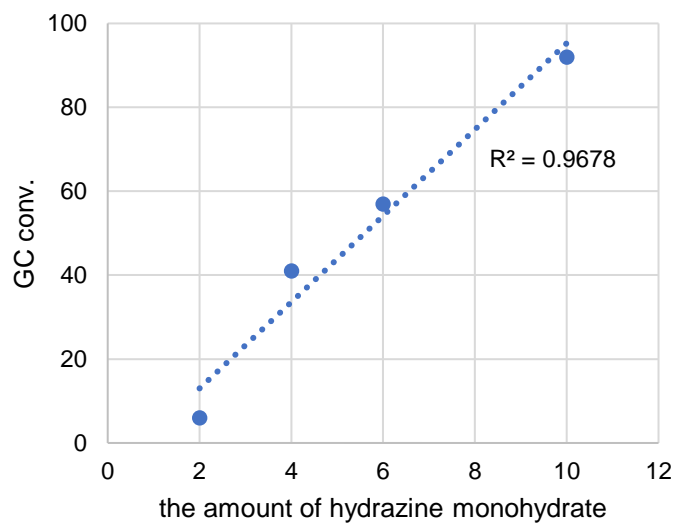
樹脂から FI-Pep を切り出して均一系触媒として用いた場合の酸化活性を調べた (Figure 9)。**FI-Pep 7** を用いて反応を行ったところ、反応は全く進行しなかった (entry 1)。酸の添加及びヒドラジンを過剰に使用すると反応は進行したが、樹脂担持型ほどの高活性は示さなかった (entries 2-7)。**FI-Pep 7** と同じペプチド配列の 3-FIC2-Pro-Tyr-Glu-Ado-PS (10 mol%) を用いて TFE 中で Table 8 の entry 1 と同じ条件下で反応を行うと 26%(24 h) という結果であったが、均一系触媒は樹脂担持型触媒と同条件では活性を示さなかった。樹脂担持型触媒の場合、フラボペプチドの周辺環境がポリスチレン樹脂により疎水的になっており、その疎水場が水素結合をより強固にし、触媒の配座を反応に有利になるように制御していると推察される。均一系触媒では

そのような疎水場がなく、高極性溶媒である TFE の影響で分子内水素結合が阻害され、狙った配座をないことが原因で活性が低いと考えている。

### 2.2.3.6 Mechanistic investigation of Fl-Pep-catalyzed aerobic oxygenation.

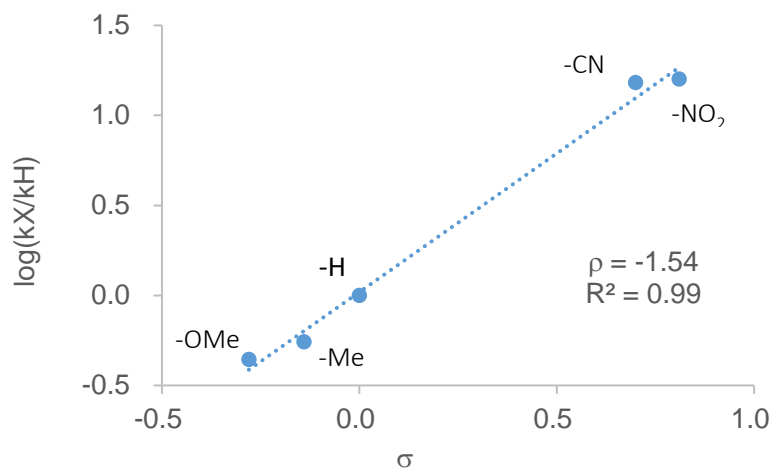


entry	hydrazine (equiv)	GC conv. (%)		
		16 h	24 h	36 h
1	2		6	12
2	4		41	76
3	6		57	97
4	10	72	92	99
5	60	trace	trace	



**Figure 10.** The effect of amount of hydrazine in flavopeptide-catalyzed oxygenation reaction

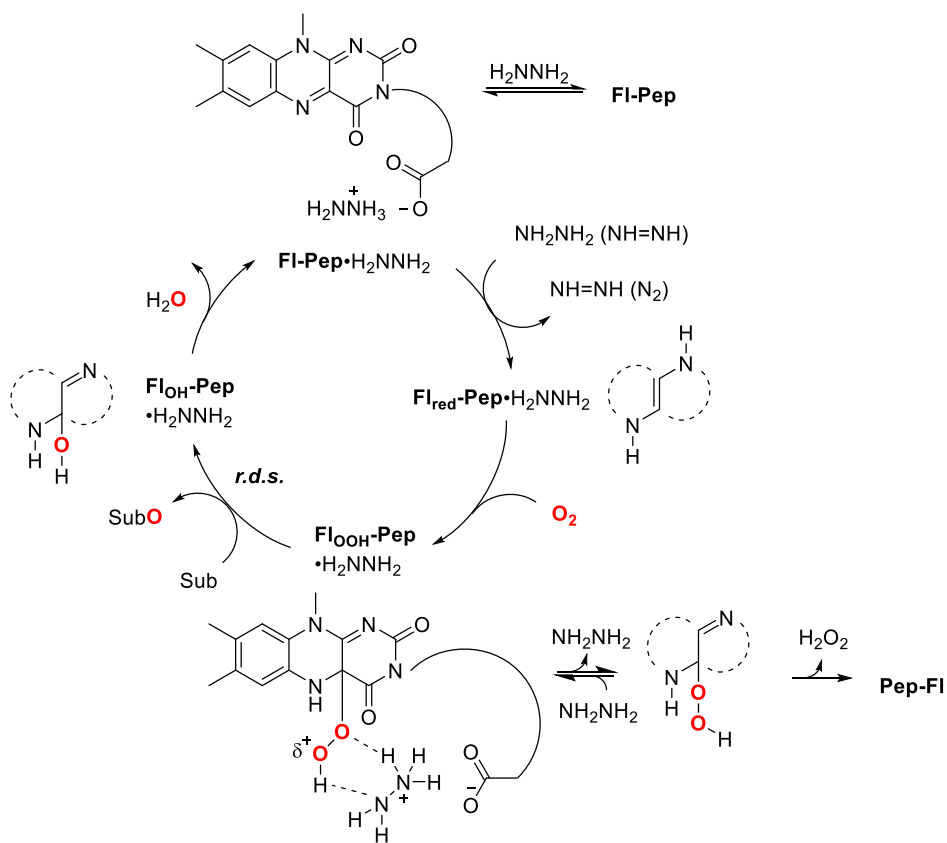
ヒドラジンの当量と反応性の相関を調べた (Figure 10)。ヒドラジン量を 2 当量から増やしていくと 10 当量まではヒドラジン量に比例して反応速度の増加がみられた。しかし 60 当量のヒドラジンを用いた場合は加える途中から触媒の樹脂が黄色から黒ずみ、触媒活性はほとんどみられなかった。これは触媒が失活したためだと考えられる。



**Figure 11.** Hammett plot for flavopeptide-catalyzed oxidation of substituted methyl phenyl sulfides using O<sub>2</sub> as an oxidant.

ハメットプロットを作成すると $\rho = -1.54$ となり、本反応が求電子反応であることが確認された (Figure 11)。N5 置換フラビン由来の 4a-ヒドロペルオキシドを用いた量論的なスルフィドの酸化反応の場合は $\rho = -1.47$ <sup>12</sup>、また N5 置換フラビンによる触媒的な酸素酸化反応の場合は $\rho = -1.60$ <sup>3b</sup>であるから本反応の $\rho$ 値と近い。これらの結果よりフラボペプチドによる酸化反応系でも活性種は 4a-ヒドロペルオキシフラビンだと推察される。

以上の結果より、想定される触媒サイクルは以下の通り。系内に過剰に存在するヒドラジンは塩基性であるために **FI-Pep 2a** のカルボン酸と塩を形成し、ヒドラジニウム塩 (**FI-Pep•H<sub>2</sub>NNH<sub>2</sub>**) が生成する。**FI<sub>red</sub>-Pep•H<sub>2</sub>NNH<sub>2</sub>** は還元体を経て、酸素を取り込んだ後、酸化活性種 **FI<sub>OOH</sub>-Pep•H<sub>2</sub>NNH<sub>2</sub>** となる。これが基質を酸化後、ヒドロキシ体 **FI<sub>OH</sub>-Pep•H<sub>2</sub>NNH<sub>2</sub>** の生成、及び脱水の過程を経て **FI-Pep•H<sub>2</sub>NNH<sub>2</sub>** が再生される。反応の律速段階はハメットプロットよりカチオン性フラビンによる酸素酸化反応と同じく基質を酸化する段階であることが示されている。脱水の過程はカチオン性フラビンの場合は平衡過程であるが、中性フラビンの場合は対応する OH 体の検出例は無く、速やかに進行すると思われる。またフラビンペルオキシドのヒドラジニウム塩は一見、分子内の酸化還元反応により失活するようにも思われるが、完全にプロトン化されたヒドラジンは還元能が失活することや低下することが知られている<sup>13</sup>。活性種の失活により遊離した過酸化水素はヒドラジンとの反応して速やかに失活すると考えられる。



**Figure 12.** Proposed catalytic cycle of FI-Pep-catalyzed aerobic oxygenation with hydrazine monohydrate

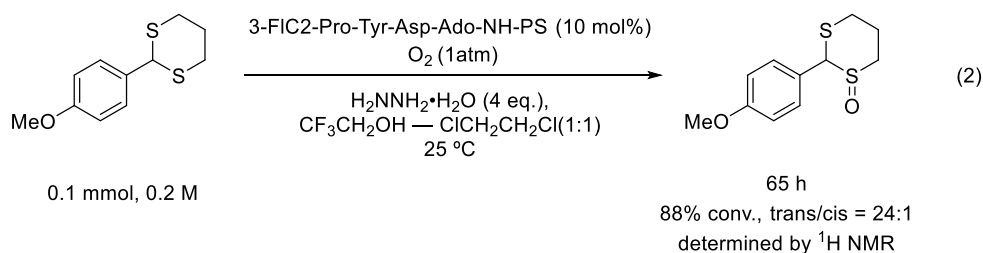
**Table 9.** The effect of reaction concentration on flavopeptide-catalyzed oxidation reaction.

entry	conc. (M)	GC conv.		
		16 h	24 h	36 h
1	0.2		51	78
2	0.25	61	93	99
3	1	60	65	

これまでの触媒反応で時間経過と共に反応が加速する傾向がみられた。これは反応時間が長いために溶媒が揮発して反応濃度が大きくなったためではないかと考えた。標準条件は基質 0.1 mmol に対して 0.5 mL の溶媒を用いていた (Table 9, entry 1)。溶媒量を 0.4 mL と僅かに減らし、濃度を 0.25 M とすると反応が大きく加速した。この結果より触媒反応の経過と共に反応が加速するのは溶媒が揮発したことが大きく影響していることが示唆された。

### 2.2.3.7 Stereoselective sulfoxidation with Fl-Pep

2 位置換 1,3-ジチアンは 2 カ所のスルフィドの部位を有し、対応するスルホキシドのキラリティーやスルホンへの過剰酸化を考慮すると酸化生成物が複雑になる。理論的には 15 種類の酸化生成物が存在するので高い選択性のある反応系の開発は困難である。私はフラボペプチドの選択性とキラリティーにより化学選択的及び立体選択的に反応が進行すると考えた。



フラボペプチド (3-FIC2-Pro-Tyr-Asp-Ado-NH-PS) を用いて 2 位置換ジチアンの酸化反応を行った (式 2)。反応条件は上式の通りで、モノ酸化体生成物のみを 88% の転化率、trans/cis=(24:1) のジアステレオ選択性で得た。反応後、ジクロロメタン、飽和 Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> を加え抽出操作を行い生成物を回収した。得た生成物の不斉収率を求めるために HPLC 測定を行った。条件：CHIRAL column OD-H, hexane:IPA=7:3, 0.5 ml/min

結果 : trans, S 体、2.8%ee、 $Rt(\text{trans, S}) = 25 \text{ min}$ ,  $Rt(\text{cis}) = 35 \text{ min}$ ,  $Rt(\text{trans, R}) = 46 \text{ min}$ 。

過酸によるジチアンの酸化 (溶媒、濃度、温度は式 2 と同じ)

1.5 等量の過酸化水素を用いた場合は、反応時間 1 時間でモノ酸化体を 100%の転化率、 $\text{trans/cis}=(15:1)$ のジアステレオ選択性で得た。

1.2 等量の mCPBA を用いた場合は、モノ酸化体は得られず過剰酸化されたと思われる生成物のピークが 3 種類確認された。文献値が無かったために生成物の同定は行っていない。

## 2.3 Conclusion

酵素環境下ではフラビン骨格は酵素のポケット内部に存在するため、対応する 4a-ヒドロキシ活性種がアポ酵素と水素結合を形成することで適度に安定化されている。この仕組みが鍵となり、活性種の失活を抑制し、基質を酸化することができる。一方、非酵素環境下、即ちアポ酵素が欠落した環境下では、活性種が不安定となり、FMO 類似機構を経る FI による酸素酸化は困難であるとされてきた。FI 及び FIET<sup>+</sup>が酸化還元反応に対して優れた有機分子触媒として注目を集めているにも関わらず、FI と酸素による触媒的な酸素添加反応は今まで達成されていなかった。本研究では分子内水素結合による活性種の安定化を構想し、短鎖ペプチドを有する N5 置換フラビン触媒を設計し、その酸化能を評価した。一般的な触媒設計は様々な構造の触媒を合成し、その中から最適なものを探し出す網羅的な手法がとられる。一方、私は活性種の最安定配座において活性部位であるヒドロペルオキシド部位とペプチド側鎖が水素結合を形成すれば、安定化するという仮説の下、異なるペプチド配列の FI-Pep 触媒に対して対応する活性種の最安定配座を計算化学的手法を用いて算出した後、その中から仮説の条件と合致し、活性種を安定化し得る触媒を探し出した。計算結果の中から 3-FIC2<sub>4a(R)</sub>OOH-Pro-Tyr-Glu-NHMe の最安定配座のみに (1) Glu の側鎖カルボン酸とヒドロペルオキシド部位の水素結合、(2) プロリンを挟んでフラビンカルボン酸由来のカルボニル酸素と Tyr の N 末端アミドとの水素結合による  $\gamma$  turn の形成 (3) Tyr の OH 基とフラビンの 4 位炭素のカルボニル酸素との水素結合によりターン構造が固定される様子が見受けられ、仮説の条件を満たした。この計算結果をもとに、固相合成により樹脂上にペプチドを構築後、その N 末端に lumiflavin-3-acetic acid を縮合して 3-FIC2-Pro-Tyr-Glu-Ado-NHPS (FI-Pep 1a) を合成した。FI-Pep 1a は樹脂担持型触媒としてスルフィドの酸素酸化反応に用いることでその活性を評価すると、酸化活性を有することが明らかとなった。各種対照実験より、フラビン、Pro-Tyr-Glu のペプチド配列とスペーサーの両方が高い酸化活性の発現には必須であることも確認された。FI-Pep 1a をもとに Glu を Asp に変更した 3-FIC2-Pro-Tyr-Asp-Ado-NHPS (FI-Pep 2a) は更に高い活性を示し、本触媒系は固体触媒と気体である酸素を用いる固一気反応であるにも関わらず効率的にスルフィドの酸化反応を進行させた。興味深いことに FI-Pep 2a と同じ配列を有する樹脂から切り出した触媒 3-FIC2-Pro-Tyr-Asp-Ado-NH<sub>2</sub> を用いた場合は反応の進行は遅く、ポリスチレン樹脂の疎水場も酸化活性には重要な要素であった。これは疎水場により分子内水素結合がより強固に働き、活性種からの過酸化水素脱離を抑制しているためだと考えられる。ハメットプロットより  $\rho$  値が FIET<sup>+</sup><sub>OOH</sub> の値と近かったため、本触媒系の活性種もフラビンペルオキシドであることが支持され、触媒サイクルにおける律速段階が基質への酸素添加の過程だと示された。

本研究は不安定な活性種を水素結合により安定化し、触媒反応へと応用することに成功した例であると言える。固相合成法により FI-Pep 触媒を合成できたことはペプチド配列を容易に変更し、触媒反応に必要な要素を付与できる。この利点を生かして FI-Pep 2a を基に更に有用な触媒の開発が期待される。また酵素類似の酸化活性を有する FI は酵素のモデル化合物としての応



用も期待されたため<sup>14</sup>、現在の触媒系のより詳細な反応機構の解明が望まれる。

## 2.4. Experimental Section

- 2.4.1 General information
- 2.4.2 Preparation of flavin
- 2.4.3 Preparation of 3-FIC2-NH-PS
- 2.4.4 DFT conformational studies of flavopeptide (Fl-Pep)
- 2.4.5 Preparation of Fl-Peps
- 2.4.6 Preparation of 3-FIC2-Pro-Tyr-Asp-Ado-NH<sub>2</sub>
- 2.4.7 Aerobic oxidations of sulfide with flavin catalyst
- 2.4.8 Competitive reaction of *p*-substituted methyl phenyl sulfide
- 2.4.9 Stereoselective oxygenation of dithiane

### 2.4.1 General information

NMR spectra were recorded using JOEL JNK-ECX-400 spectrometer (<sup>1</sup>H, 400 MHz), JNM-ECA-400 spectrometer (<sup>1</sup>H, 400 MHz), and JNM-ECA-500W (<sup>1</sup>H, 500 MHz). Chemical shifts were reported in ppm using TMS or the residual solvent peak as a reference; CF<sub>3</sub>COOH (11.5 ppm for <sup>1</sup>H NMR) or ((CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO) (2.50 ppm for <sup>1</sup>H NMR). UV spectra were recorded on a JASCO V-550 spectrometer. Emission spectra were obtained using a Hitachi F-7000 spectrometer. Elemental analysis was carried out on a J-Science Lab JM10 micro corder. Gas chromatography analysis were carried out on Shimadzu GC-2010 by using a DB-1 glass capillary column (0.25 mm×30 m). High-resolution mass spectra were obtained on a Waters LCT Premier mass spectra.

### Materials

3-Methyllumiflavin, <sup>3b</sup> lumiflavin-3-acetic acid (**6**), <sup>3b, 15</sup> lumiflavin-10-aceto aldehyde (**8**), Fmoc-Ado-OH <sup>16</sup> and Boc-Ado-OH<sup>17</sup> were prepared according to the literature procedures. Lumiflavin-10-acetic acid (**9**), and 2-substituted dithiane were synthesized according to the procedures described below. Solid phase peptide syntheses were performed either on Intavis MultiPep CF automatically or under manual operation using (aminomethyl)polystyrene (70–90 mesh, 1% cross-linked, the N loadings were determined by elemental analysis in every lot: 1.21 mmol g<sup>-1</sup> for the synthesis of **Fl-Pep1-a**, **Fl-Pep2-a**, **Fl-Pep3-a**, **Fl-Pep4-a**, and **Fl-Pep5-a**, 1.38 mmol g<sup>-1</sup> for the synthesis of **Fl-Pep1-b**, **Fl-Pep2-b**, **Fl-Pep3-b**, **Fl-Pep4-b**, and **Fl-Pep5-b**, 1.48 mmol g<sup>-1</sup> for the synthesis of **3-FIC2-NH-PS**) purchased from Sigma-Aldrich or Rink amide Resin purchased from Watanabe Chemical Industries, LTD. All other reagents were purchased from commercial supplies and used without purification.

### 2.4.2 Preparation of flavin

#### Preparation of lumiflavin-10-acetic acid (**9**)

To a light-shielding stirred solution of crude aldehyde **8** (65 mg, 0.21 mmol), 2-methyl-2-butene (159 mg, 2.3 mol), and NaHPO<sub>4</sub> (158 mg, 1.0 mmol) in *t*-BuOH (4 mL) and H<sub>2</sub>O (3.5 mL) was added dropwise NaClO<sub>2</sub> (56 mg, 0.62 mmol) in H<sub>2</sub>O (0.5 mL). The reaction mixture was stirred for 20 min, and then the pH was adjusted to 1-2 with 2N HCl. The precipitated was collected by filtration which was washed with cold-water, cool ethanol, and diethyl ether and dried in vacuo to give crude flavin **9**. Crystallization of the crude flavin from conc. HCl-water gave **9** (51 mg, 75%): <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, TFA-*d*) δ 2.68 (s, 3 H, C<sup>7'or8'</sup>H<sub>3</sub>), 2.80 (s, 3 H, C<sup>7'or8'</sup>H<sub>3</sub>), 5.99 (s, 2 H, C<sup>2</sup>H<sub>2</sub>), 8.02 (s, 1 H, C<sup>6'or9'</sup>H), 8.35 ppm (s, 1 H, C<sup>6'or9'</sup>H).

### 2.4.3 Preparation of 3-FIC2-NH-PS

To (aminomethyl)polystyrene resin pre-swollen in DMF was added a solution of lumiflavin-3-acetic acid (2.5 equiv), HCTU (2.5 equiv), and *i*Pr<sub>2</sub>NEt (7.5 equiv), and the mixture was agitated for 2 h at room temperature. The coupling reaction was monitored by quantitative Kaiser Test. The suspension was washed with DMF repeatedly until the solution layer becomes colorless and then with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3x), and the resulting resin was dried in vacuo at room temperature to give 3-FIC2-NH-PS. The catalyst loading of 3-FIC2-NH-PS was determined to be 1.00 mmol g<sup>-1</sup> by elemental analysis. Found: N 6.99%, H 6.82%, C 77.47%.

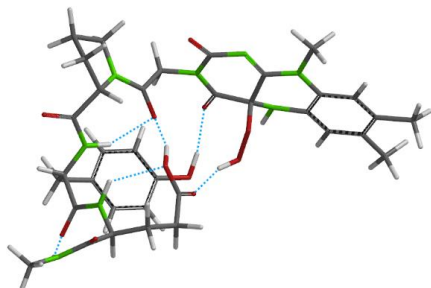
### 2.4.4 DFT conformational studies of flavopeptide (Fl-Pep)

Spartan '14 (Wavefunction, Inc.; Irvine, California, USA) was used to estimate stable conformations of 3-FIC2<sub>4a(R)</sub>-OOH-Pro-Tyr-NHMe, 3-FIC2<sub>4a(R)</sub>-OOH-Pro-Tyr-Gly, 3-FIC2<sub>4a(R)</sub>-OOH-Pro-Glu-NHMe, 3-FIC2<sub>4a(R)</sub>-OOH-Pro-Tyr-Glu-NHMe, 3-FIC2<sub>4a(S)</sub>-OOH-Pro-Tyr-Glu-NHMe, 3-FIC2<sub>4a(R)</sub>-OOH-Pro-Asp-Glu-NHMe, 3-FIC2<sub>4a(R)</sub>-OOH-Pro-Tyr-Gln-NHMe, 3-FIC2<sub>4a(R)</sub>-OOH-Pro-Phe-Glu-NHMe, 3-FIC2<sub>4a(R)</sub>-OOH-βAla-Tyr-Glu-NHMe, 3-FIC2<sub>4a(R)</sub>-OOH-Pro-Tyr-Asp-NHMe. Monte Carlo conformational searches for these Fl<sub>OOH</sub>-Peps in MMFF were initially conducted. Among the resulting conformers, those with relative energy less than 15 kJ mol<sup>-1</sup> and over over Boltzmann distribution value of 002 were recalculated in DFT at B3LYP/6-31G\* level. We analyzed the resulting We analyzes the resulting structures to find promising hydrogen bonds (see the main manuscript) only in 3-FIC2<sub>4a(R)</sub>-OOH-Pro-Tyr-Glu-NHMe and 3-FIC2<sub>4a(R)</sub>-OOH-Pro-Tyr-Asp-NHMe.

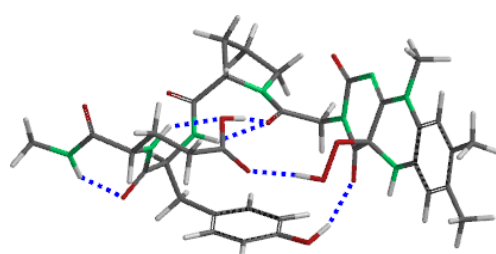
Conformers within 10 kJ mol<sup>-1</sup> are shown below, where their relative potential energy value in kJ mol<sup>-1</sup> are given in parentheses and hydrogen bonds are given in blue dotted line.

● 3-FIC2<sub>4a(R)</sub>OOH-Pro-Tyr-Glu-NHMe

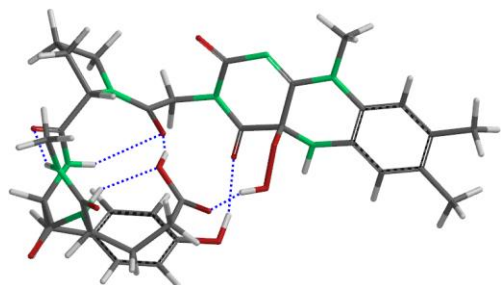
M0004(0.00)



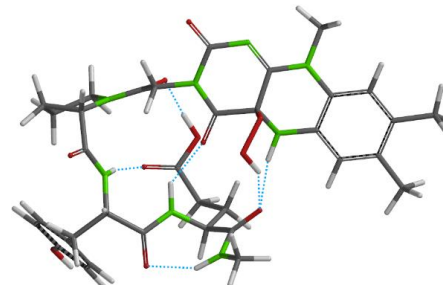
M0004 (side)



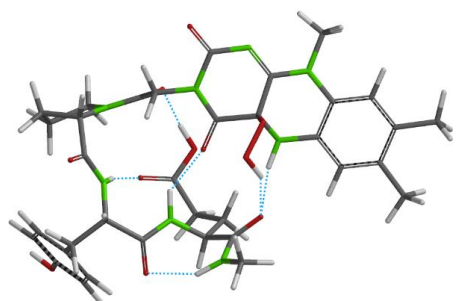
M0008 (1.09)



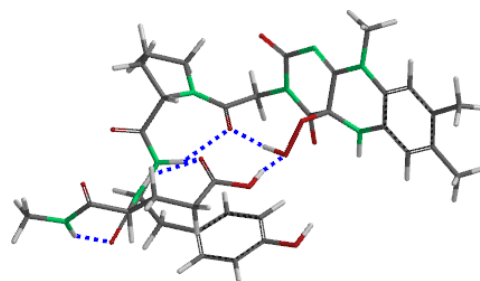
M0001 (1.16)



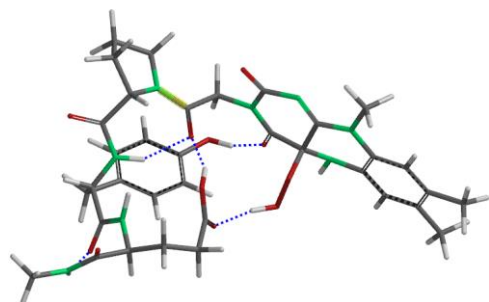
M0003 (1.40)



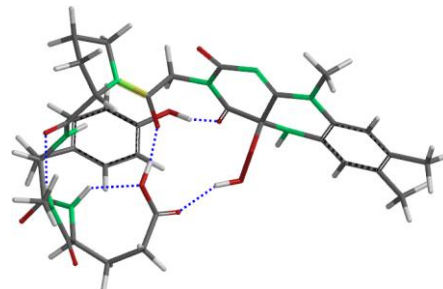
M0011 (2.08)



M0002 (2.97)

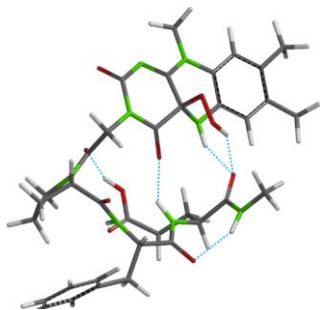


M0005 (4.62)

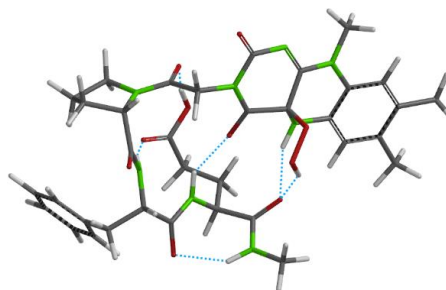


● 3-FIC2<sub>4a</sub>(R)<sub>OOH</sub>-Pro-Phe-Glu-NHMe

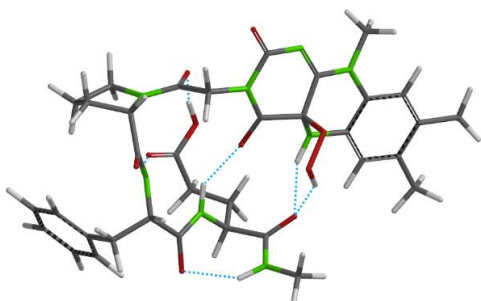
M0004 (0.00)



M0001 (0.59)

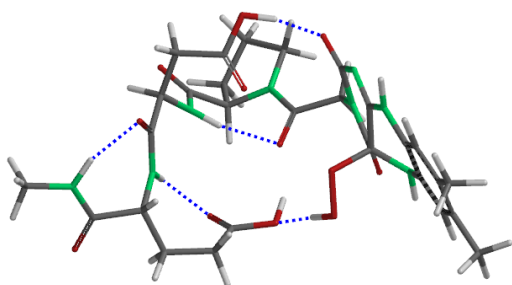


M0002 (0.59)

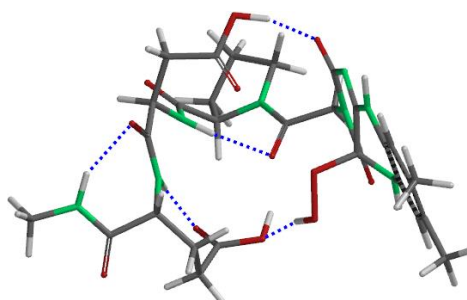


● 3-FIC2<sub>4a</sub>(R)<sub>OOH</sub>-Pro-Asp-Glu-NHMe

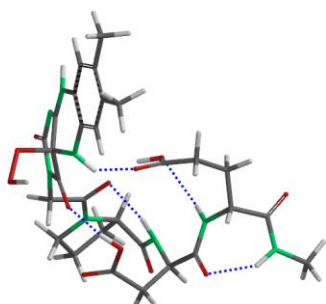
M0002 (0.00)



M0004 (3.55)

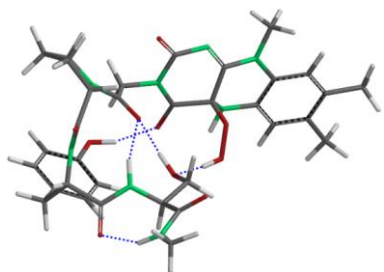


M0001 (19.74)

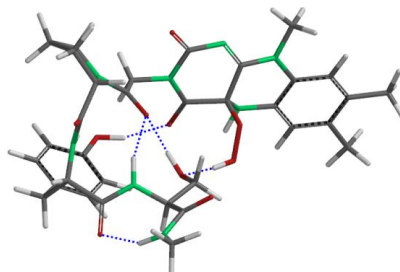


● 3-FIC<sub>24a(R)</sub>OOH-Pro-Tyr-Ser-NHMe

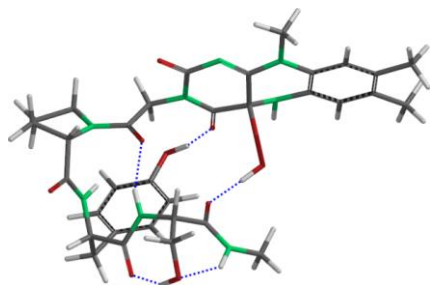
M0001 (0.00)



M0002 (0.22)

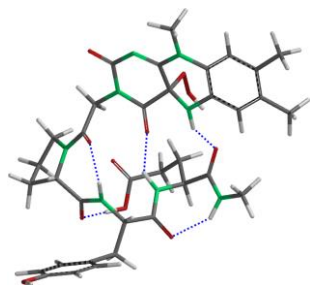


M0008 (5.83)

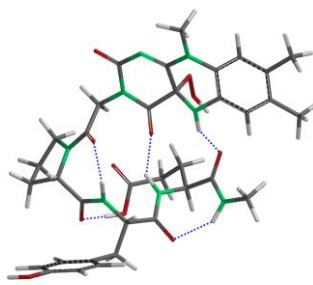


● 3-FIC<sub>24a(S)</sub>OOH-Pro-Tyr-Glu-NHMe

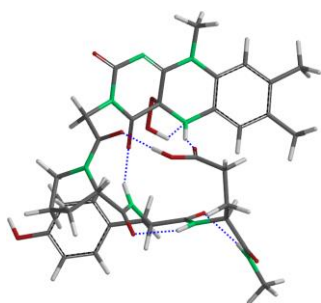
M0002 (0.00)



M0003 (0.30)

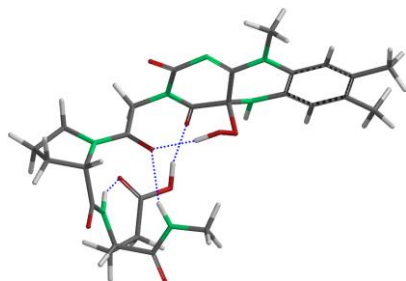


M0001 (18.79)

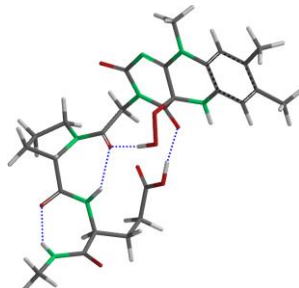


● 3-FIC2<sub>4a</sub>(R)<sub>OOH</sub>-Pro-Glu-NHMe

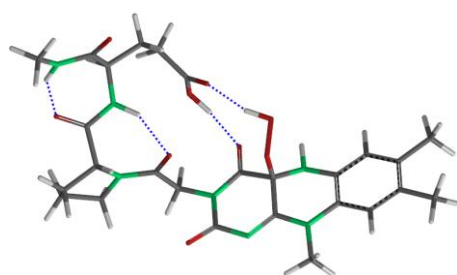
M0010 (0.00)



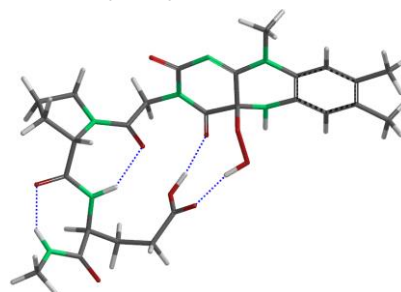
M0006 (3.08)



M0005 (4.53)

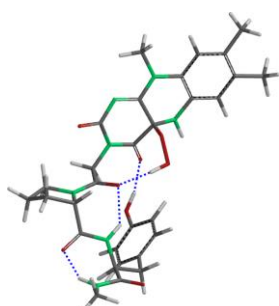


M0009 (8.78)

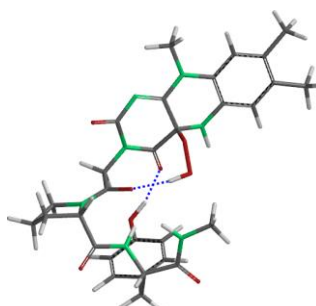


● 3-FIC2<sub>4a</sub>(R)<sub>OOH</sub>-Pro-Tyr-NHMe

M0006 (0.00)

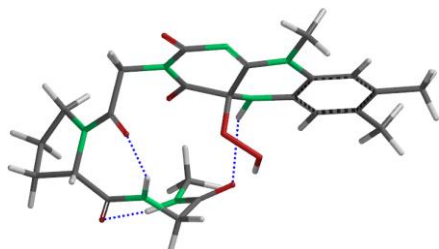


M0002 (11.44)

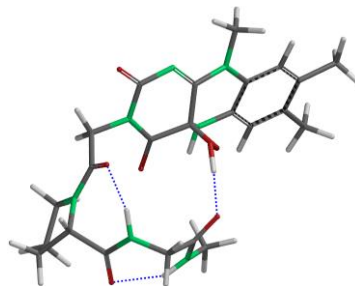


● 3-FIC<sub>24a(R)</sub>OOH-Pro-Gly-NHMe

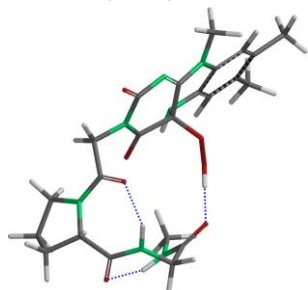
M0004 (0.00)



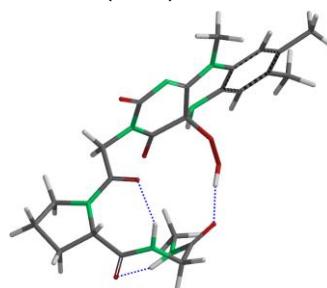
M0003 (3.56)



M0001 (3.57)

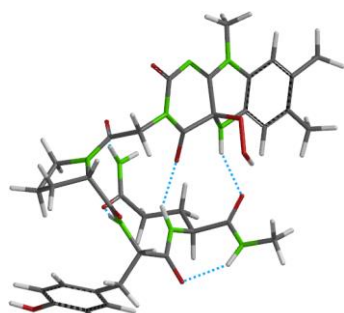


M0002 (5.79)

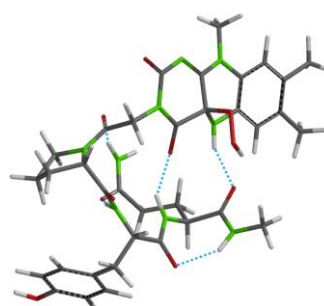


● 3-FIC<sub>24a(R)</sub>OOH-Pro-Tyr-Gln-NHMe

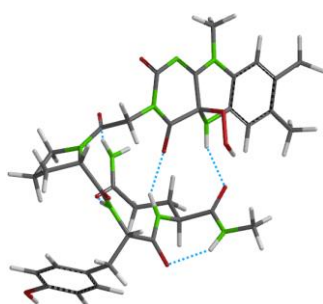
M0003 (0.00)



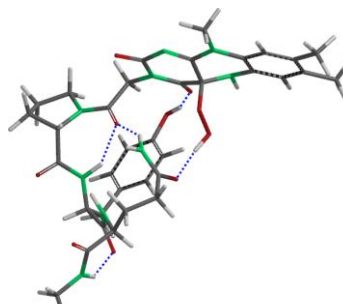
M0002 (0.09)



M0001 (0.19)



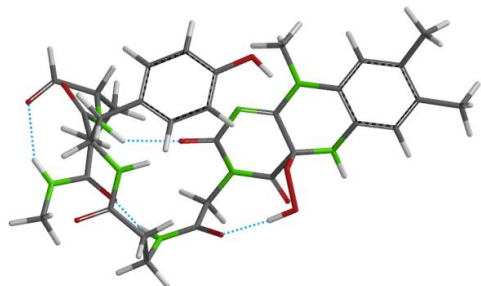
M0007 (4.92)



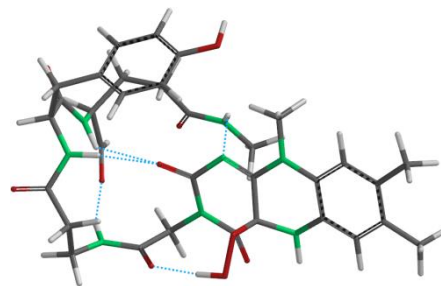


● 3-FIC2<sub>4a(R)</sub>OOH-βAla-Tyr-Glu-NHMe

M0002 (0.00)

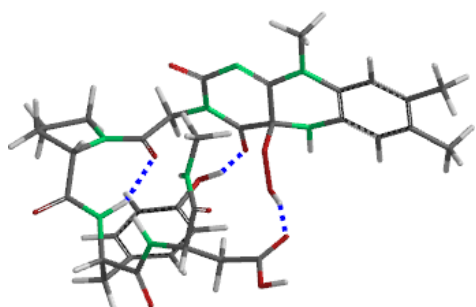


M0001 (17.67)

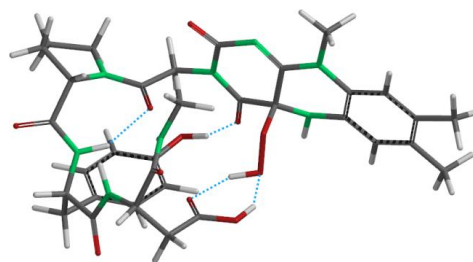


● 3-FIC2<sub>4a(R)</sub>OOH-Pro-Tyr-Asp-NHMe

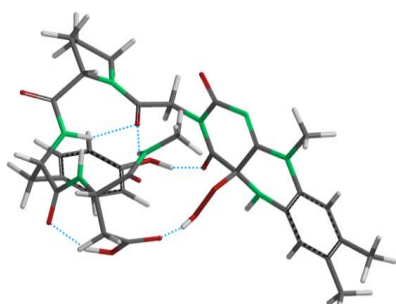
M0014 (0.00)



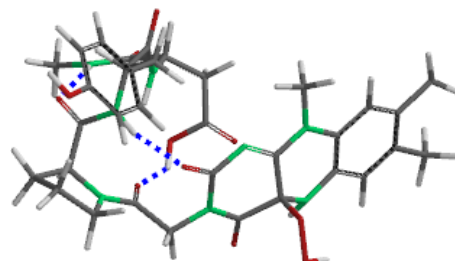
M0012 (0.10)



M0002 (5.83)



M0009 (6.79)



## 2.4.5 Preparation of Fl-Peps

### 2.4.5a Preparation of H-Ado-NHPS

To the amino functionalized resin pre-swollen in DMF was added a solution of the Boc-Ado-OH (2.5 equiv), HCTU (2.5 equiv), and *N*-ethyl-diisopropylamine (7.5 equiv), and the mixture was agitated for 1.5 h. The suspension was washed with DMF (5×), DMF/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (4:1) (5×), and CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3×). The coupling reaction was monitored by qualitative Kaiser<sup>18</sup> and chloranil tests<sup>19</sup> (secondary amine). After coupling of Boc-Ado-OH, a mixture of TFA/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2:1) was added to the resulting resin pre-swollen in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, and the reaction mixture was agitated for 1 h. The solution phase was drained and the resin was again treated with a mixture of TFA/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2:1) for 20 min. Finally, the resin was washed with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (4×), 5% iPr<sub>2</sub>NEt in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (w/w, 6×) and CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (6×), and dried in *vacuo* to afford **H-Ado-NHPS**.

### 2.4.5b Fl-Pep 1–6 a

These flavopeptide were prepared through the manual solid-phase peptide synthesis from H-Ado-NHPS following the general procedures for peptide coupling, Fmoc-deprotection, the coupling lumiflavin-3-acetic acid, and *t*-Bu or Trt-deprotection described below. Catalyst loading was determined by quantitative Fmoc test of Fmoc-Xaa-Yaa-Zaa-Ado-NHPS.

#### General procedure for peptide coupling

To the amino functionalized resin pre-swollen in DMF was added a solution of the Fmoc-amino acid (2.5 equiv), HCTU (2.5 equiv), and *N*-ethyl-diisopropylamine (7.5 equiv), and the mixture was agitated for 1.5 h. The suspension was washed with DMF (5×), DMF/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (4:1) (5×), and CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3×). The coupling reaction was monitored by qualitative Kaiser<sup>16</sup> and chloranil tests<sup>5</sup> (secondary amine). Even though the Kaiser test or Chloranil test was negative, undetected amount of amino group might remain. To inactivate such residueals, acetyl capping was carried out using acetic anhydride (10 equiv) and triethylamine (10 equiv).

#### General procedure for Fmoc-deprotection

A 20% v/v solution of piperidine in DMF was added to the Fmoc-protected resin pre-swollen in DMF and the reaction mixture was agitated for 10 min. The solution phase was drained and the resin was again treated with 20% v/v solution of piperidine for another 15 min. The resin then washed with DMF (3×), DMF/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (4:1) (5×), and CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3×).

#### General procedure for the coupling of lumiflavin-3-acetic acid

To the resin modified by *N*-terminus unprotected peptide pre-swollen in DMF was added a solution of lumiflavin-3-acetic acid (2.5 equiv), HCTU (2.5 equiv), and *N*-ethyl-diisopropylamine (7.5 equiv), and the mixture was agitated for 2 h. The suspension was washed with DMF repeatedly until the

solution layer becomes colorless, then with DMF/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (4:1) (5×), and with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3×). The coupling reaction was monitored by either qualitative Kaiser test or chloranil test<sup>17</sup>.

#### **General procedure for t-Bu or Trt-deprotection**

After the coupling of lumiflavin-3-acetic acid, a mixture of TFA/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2:1) was added to the resulting resin pre-swollen in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, and the reaction mixture was agitated for 1 h. The solution phase was drained and the resin was again treated with a mixture of TFA/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2:1) for 20 min. Finally, the resin was washed with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (6×) and dried in *vacuo* to afford **Fl-Pep**.

#### **2.4.5c Fmoc-βAla-NHPS**

Fmoc-bAla-NHPS was prepared by manual solid-phase-peptide synthesis from (aminomethyl)polystyrene resin (**H<sub>2</sub>NPS**) following the above general procedure for peptide coupling.

#### **2.4.5d Fl-Pep1–6 b**

These flavopeptides were prepared through the automated synthesis of Fmoc-AA1-AA2-AA3-βAla-NH-PS (where AA1=Pro or βAla, AA2=Tyr(*t*-Bu) or Phe, AA3=Glu(*Ot*-Bu), Asp(*Ot*-Bu), or Gln(*Trt*)) from Fmoc-βAla-NH-PS followed by the manual coupling of lumiflavin-3-acetic acid after Fmoc-deprotection, and finally *t*-Bu or *Trt*-deprotection. The automated processes were carried out by using Fmoc-bAla-NH-PS (215 mg, 245 μmol), Fmoc-amino acids (0.5 M in DMF, 5.25 equiv), HBTU (0.5 M in DMF, 5.25 equiv) as acoupling reagents, *N*-methylmorpholine (3.9 M in DMF, 9.60 equiv) as a base, Ac<sub>2</sub>O (0.54 M in DMF, 13.2 equiv) as a capping agent, and DMF or NMP (when Fmoc-Pro-OH was used) as a solvents under conditions recommended by Intavis. Fmoc-deprotection, the coupling lumiflavin-3-acetic acid, and *t*Bu or *Trt* deprotection under manual operation were carried out following the general procedures described below. Catalyst loading was determined by quantitative Fmoc test of Fmoc-Xaa-Yaa-Zaa-βAla-NHPS.

#### **2.4.6 Preparation of 3-FIC2-Pro-Tyr-Asp-Ado-NH<sub>2</sub>**

3-FIC2-Pro-Tyr-Asp-Ado-NH<sub>2</sub> was prepared on Rink-amide Resin following the general protocol for Fmoc solid phase protocol. After the flavopeptide sequence was sturctured on resin, a mixture of TFA/ CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2:1) was added to modified resin and reaction mixture was aditated for 1 h for *t*-Bu deprotection and cleavage of flavopeptide from resin. The solution phase was pooled and the resin was again treated with TFA/ CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2:1) for 20 min. All volatiles were removed from the combined filtrates under reduced pressure. Et<sub>2</sub>O was added to the residue, and the resulting precipitate was washed with Et<sub>2</sub>O and recrystalization from a mixture of MeOH and EtOH to afford the flavopeptide as yellow solid, which was characterazied by NMR (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, COSY, HMBC, HMQC, ROESY) and mass spectroscopy (MALDY-TOF).

MS (MALDI-TOF):  $m/z$  calculated for C<sub>45</sub>H<sub>59</sub>N<sub>9</sub>O<sub>10</sub> [M + Na]<sup>+</sup> 908.4283, found 908.4333. **2.4.7**

#### **Aerobic oxygenation of thioanisole with Fl-Pep catalysis**

##### **General Procedure for Flavopeptide-catalyzed Aerobic Oxidation of Thioanisole using hydrazine**

To a reaction mixture of thioanisole (12.4 mg, 0.10 mmol), **Fl-Pep** (0.010 mmol, 10 mol%) in solvent (0.5 mL) was added NH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O (20 mg, 0.40 mmol), and continued to stir at 25 °C for 24–48 h under an atmosphere of oxygen. The formation of methylphenylsulfoxide was monitored periodically by means of GC analysis.

##### **Oxygenation of Thioanisole by Flavopeptide/Zinc System**

Activated zinc (26 mg, 0.40 mmol) was added to a stirred mixture of thioanisole (12.4 mg, 0.10 mmol), **Fl-Pep** (0.010 mmol, 10 mol%) in a 1:1 mixture of TFE and 1,2-DCE (0.5 mL). The yield of methylsulfinylbenzene was determined by means of GC analysis.

##### **Oxygenation of Thioanisole by Flavopeptide/Formic acid System**

Formic acid (57.5 mg, 1.25 mmol) and NEt<sub>3</sub> (15.8 mg, 0.156 mmol) were added to a stirred mixture of thioanisole (12.4 mg, 0.10 mmol), 3-FIC2-Pro-Tyr-Glu-Ado-PS (19.1 mg, 0.010 mmol, 10 mol%) in a 1:1 mixture of TFE and 1,2-DCE (0.5 mL). The yield of methyl sulfinyl benzene was determined by means of GC analysis.

#### **Product isolation**

To a stirred mixture of thioanisole (124 mg, 1.0 mmol) and **Fl-Pep-2a** (5 μmol, 5 mol%) in a TFE–DCE mixed solvent (1:1, 5 mL) was added NH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O (200 mg, 4.0 mmol), and the resulting mixture was further stirred at 25 °C under an atmosphere of oxygen. After 14 h, NH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O (200 mg, 4.0 mmol) was added, and the reaction was continued for another 34 h to give methyl phenyl sulfoxide in 97% GC yield. The catalyst was filtrated off and washed with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1 mL x 5), and combined filtrate was washed with saturated aqueous Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>. The collected organic layer was dried over MgSO<sub>4</sub>, which was filtrated and concentrated under reduced pressure. The resulting crude product was purified by column chromatography on silica gel (hexane:EtOAc=8:1 to 2:3) to afford 119 mg of methyl phenyl sulfoxide as colorless oil (85%). Analytical data were in agreement with the published data<sup>15</sup>.

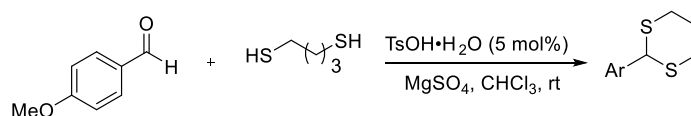
#### **2.4.8 Competitive reaction of *p*-substituted methyl phenyls sulfides (X-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>SCH<sub>3</sub>, X = *p*-MeO, *p*-Me, *p*-H, *p*-CN, *p*-NO<sub>2</sub>) for flavopeptide-catalyzed aerobic oxygenation.**

To a stirred mixture of thioanisole (10 mg, 0.08 mmol) and *p*-substituted methyl phenyl sulfide (0.08 mmol) and 3-FIC2-Pro-Tyr-Glu-βAla-NH-PS (34 mg, 0.010 mmol, 10 mol%) in a TFE—DCE mixed solvent (1:1, 0.8 mL) was added NH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O (32 mg, 0.64 mmol), and the resulting mixture was continued to stir at 25 °C for 4 h under an atmosphere of oxygen. Saturated Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> was added

to quench the reaction, and the reaction mixture was extracted with diethyl ether. The combined extracts were dried over  $\text{MgSO}_4$  and evaporated under reduced pressure. The product ratios were determined on basis of the integration of the methyl protons ( $\text{X-C}_6\text{H}_4\text{-SO-CH}_3$ ). The singlets for methyl protons of  $\text{X-C}_6\text{H}_4\text{SCH}_3$  are observed at  $\delta = 2.71$  (*p*-MeO), 2.71 (*p*-Me), 2.73 (*p*-H), 2.75 (*p*-CN) and 2.78 ppm (*p*- $\text{NO}_2$ ).

## 2.4.9 Stereoselective oxygenation of dithiane

### Preparation of dithianes



A mixture of substituted Benzaldehyde (9.8 mmol), dithiol (9.8 mmol),  $\text{TsOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$  (84 mg, 0.49 mmol, 5 mol%) and  $\text{MgSO}_4$  (100 mg) in  $\text{CHCl}_3$  (50 mL) was stirred at room temperature for 3 h–4 h. The reaction was monitored by TLC. After aldehyde was consumed, 2 N NaOH aq. (20 mL) was added to the reaction mixture and extracted with  $\text{CHCl}_3$  (20 mL x2). The collected organic layer was washed with brine and dried over  $\text{MgSO}_4$  and filtered. Evaporation of the solvent in vacuo gave the crude product. Purification by column chromatography (hexan:EtOAc) gave corresponding dithianes.

### Oxygenation of 2-Methoxyphenyl-1,3-Dithiane by Flavopeptide

$\text{NH}_2\text{NH}_2\cdot\text{H}_2\text{O}$  (20 mg, 0.4 mmol) was added to a stirred mixture of thioanisole (12.4 mg, 0.10 mmol), 3-FIC2-Pro-Tyr-Asp-Ado-NH-PS (0.010 mmol, 10 mol%) in solvent (0.5 mL). The conversion of dithiane and the diastereoselectivity were determined on basis of singlet integration of methine protons. The methine protons of dithiane and monooxide are observed at  $\delta = 4.51$  (monooxide, trans), 4.74 (monooxide, cis), 5.13 ppm (dithiane). Sulfone and dioxide were not observed. The enantiomeric excess was determined by HPLC analysis using Daicel Chiralpak OD-H. HPLC: hexane:*i*PrOH = 7:3, 0.5 mL/min, 203 nm,  $\text{Rt}(\text{trans}, S) = 25$  min,  $\text{Rt}(\text{cis}) = 35$  min,  $\text{Rt}(\text{trans}, R) = 46$  min.

## 2.5 References

- (1) *Asymmetric Organocatalysis, Workbench Edition*; List, B., Maruoka, K.; Thieme: Stuttgart, 2012.
- (2) *Modern oxidation methods second edition*; Bäckvall, J.-E., Ed.; Wiley-VCH: Weinheim, 2010.
- (3) (a) Imada, Y.; Iida, H.; Ono, S.; Murahashi, S.-I. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 2868–2869. (b) Imada, Y.; Iida, H.; Ono, S.; Masui, Y.; Murahashi, S.-I. *Chem. Asian. J.* **2006**, *1–2*, 136–147.
- (4) For review on flavin catalyst, see: (a) Imada, Y.; Naota, T. *Chem. Rec.* **2007**, *7*, 354–361. (b) Iida, H.; Imada, Y.; Murahashi, S.-I. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 7599–7613. (c) Cibulka, R. *Eur. J. Org. Chem.* **2015**, *2015*, 915–932.
- (5) For review, see: (a) Davie, E. A. C.; Mennen, S. M.; Xu, Y.; Miller, S. J. *Chem. Rev.* **2007**, *10*, 5759–5812. (b) Wennemers, H. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 12036. (c) Duschmale, J.; Arakawa, Y.; Wennemers, H. in *Science of Synthesis, Asymmetric Organocatalysis*; List, B.; Maruoka, K., Eds.; Georg Thieme Verlag: Stuttgart, 2012. (d) Lewandowski, B.; Wennemers, H. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2014**, *22*, 40–46. (e) Fingerhut, A.; Grau, D.; Tsogoeva, S. B. In *Sustainable Catalysis: Without Metals or Other Endangered Elements, Part 1*; North, M., Ed.; Royal Society of Chemistry: Cambridge, 2016; pp 309–353. (f) Shugrue, C. R.; Miller, S. J. *Chem. Rev.* **2017**, *117*, 11894–11951.
- (6) For recent reports of peptide catalyst, see: (a) Schnitzer, T.; Wennemers, H. *Synthesis* **2018**, *50*, 4377–4382. (b) Akagawa, K.; Higuchi, J.; Yoshikawa, I.; Kudo, K. *Eur. J. Org. Chem.* **2018**, *2018*, 5278–5281. (c) Akagawa, K.; Kudo, K. *J. Org. Chem.* **2018**, *83*, 4279–4285. (d) Ryss, J. M.; Turek, A. K.; Miller, S. J. *Org. Lett.* **2018**, *20*, 1621–1625. (e) Wadzinski, T. J.; Steinauer, A.; Hie, L.; Pelletier, G.; Schepartz, A.; Miller, S. J. *Nat. Chem.* **2018**. (f) Kwon, Y.; Chinn, A. J.; Kim, B.; Miller, S. J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 6251–6255.
- (7) For selected examples of conformational study for peptide catalyst, see: (a) Schnitzer, T.; Wennemers, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 15356–15362. (b) Rigling, C.; Kisunzu, J. K.; Duschmalé, J.; Häussinger, D.; Wiesner, M.; Ebert, M. O.; Wennemers, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 10829–10838. (c) Metrano, A. J.; Abascal, N. C.; Mercado, B. Q.; Paulson, E. K.; Miller, S. J. *Chem. Commun* **2016**, *4816*, 4816–4819. (d) Metrano, A. J.; Abascal, N. C.; Mercado, B. Q.; Paulson, E. K.; Hurtley, A. E.; Miller, S. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 492–516.
- (8) For selected examples of peptide catalyst for oxidation reactions, see: (a) Romney, D. K.; Colvin, S. M.; Miller, S. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 14019–14022. (b) Peris, G.; Jakobsche, C. E.; Miller, S. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 8710–8711. (c) Alford, J. S.; Abascal, N. C.; Shugrue, C. R.; Colvin, S. M.; Romney, D. K.; Miller, S. J. *ACS Cent. Sci.* **2016**, *2*, 733–739. (d) Kolundzic, F.; Noshi, M. N.; Tjandra, M.; Movassaghi, M.; Miller, S. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 9104–9111. (e) Featherston, A. L.; Shugrue, C. R.; Mercado, B. Q.; Miller, S. J. *ACS Catal.* **2019**, *9*, 242–252.
- (9) (a) Jarvo, E. R.; Evans, C. A.; Copeland, G. T.; Miller, S. J. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 5522–5527. (b) Krattiger, P.; McCarthy, C.; Pfaltz, A.; Wennemers, H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 1722–1724. (b)

- Akagawa, K.; Sakai, N.; Kudo, K. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 1822–1826.
- (10) Takeda, J.; Ota, S.; Hirobe, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 7677–7688.
- (11) Kino, K.; Kobayashi, T.; Arima, E.; Komori, R.; Kobayashi, T. Miyazawa, H. *Bioorg, Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 2070–2074
- (12) Oae, S.; Asada, K.; Yoshimura, T. *Tetrahedron Lett.* **1983**, *24*, 1265–1268.
- (13) Arakawa, Y.; Kohda, T.; Minagawa, K.; Imada, Y. *SynOpen* **2017**, *1*, 11–14.
- (14) Lee, J.; Müller, F.; Visser, A. J. W. G. *Photochem. Photobiol.* **2018**. DOI: 10.1111/php.13063
- (15) Ikeda, H.; Yoshida, K.; Ozeki, M.; Saito, I. *Tetrahedron Lett.* **2001** *42*, 252–2531.
- (16) Perlin, L.; MacNeil, S.; Rimmer, S. *Chem. Commun.* **2008**, *0*, 5951.
- (17) Teunissen, J. P. A.; Paffen, F. E. T.; Ercolani, G.; de Greef, T. F. A.; Meijer, E. W. *J. Am. Chem Soc.* **2016**, *138*, 6852–6860.
- (18) Kaiser, E.; Colescott, R. L.; Bossinger, C. D.; Cook, P. I. *Anal. Biochem.* **1970**, *34*, 595.
- (19) Vojkovsky, T. *Pept. Res.* **1995**, *8*, 236.

### 第三章 ペプチド鎖を有するフラビン分子触媒による酸素酸化 Baeyer-Villiger 反応の開発

- 3.1 Introduction
- 3.2 Results and Discussion
  - 3.2.1 Baeyer-Villiger Oxidation with Molecular Oxygen
  - 3.2.2 Effect of Resin and Peptide
  - 3.2.3 Regio- and Chemoselective Baeyer-Villiger Oxidation
- 3.3 Conclusion
- 3.4 Experimental Section
- 3.5 References

#### 3.1 Introduction

Baeyer-Villiger (BV) 反応はケトンをラクトンに変換する優れた酸化反応であり、一般的には *m*CPBA などに代表される過酸が酸化剤として用いられる。反応の効率化や選択性の発現のために金属や有機分子を触媒とする反応が多数報告されてきたが、それらの大部分の触媒系においても過酸が末端酸化剤として用いられている<sup>1</sup>。反応をより安全かつグリーンにするためにも酸素分子を酸化剤とする反応が求められるが、そのような系は少ない。向山ら<sup>2</sup>と村橋ら<sup>3</sup>は金属触媒と還元剤としてアルデヒドを用いた触媒反応系を報告しており(式 1)、その後 Bolm ら<sup>4</sup>は触媒をキラルな金属錯体とすることで不斉 BV 反応を達成している。近年では金属の代わりに触媒として炭素材料<sup>5</sup>や *N*-ヒドキシフタルイミド<sup>6</sup>を用いた金属フリーな触媒系の開発が精力的に行われている。これらの触媒系はアルデヒドと酸素より過カルボン酸を系内で発生させることが反応の鍵である。

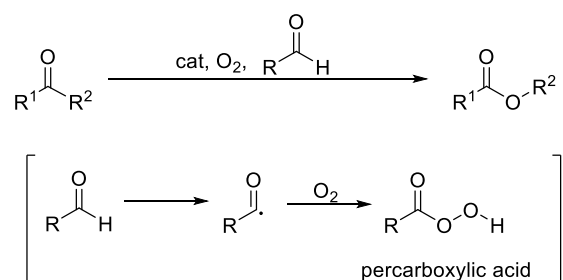


Figure 1. Catalytic aerobic BV reaction using aldehyde to generate percarboxylic acid.

触媒と酸素から触媒構造由来の酸化活性種を生成することができれば反応制御が触媒構造によって可能となるため、高い官能基選択性や立体選択性の発現が見込まれる。生体内の触媒反応に着目すると、フラビン酵素の1つである Baeyer-Villiger monooxygenase (BVMO)<sup>7</sup>は興味



深い機構で酸化反応を行っている。BVMO は酸素を末端酸化剤として酸化活性種 4a-  
 peroxyflavin (**Flo<sub>o</sub><sup>-</sup>**) を発生させ、基質を酸化することが知られており、この活性種は様々な基  
 質に対して酸素を添加することができる高い酸化能を有している (Figure 2a)。我々はこの反応  
 機構のシミュレーションより 2005 年に N5 置換カチオン性フラビニウム塩 (**FIR<sup>+</sup>**) による BV  
 反応を報告しており (Figure 2b) <sup>8</sup>、これは有機分子触媒による酸素酸化 BV 反応の初めての例  
 として注目を集めた。

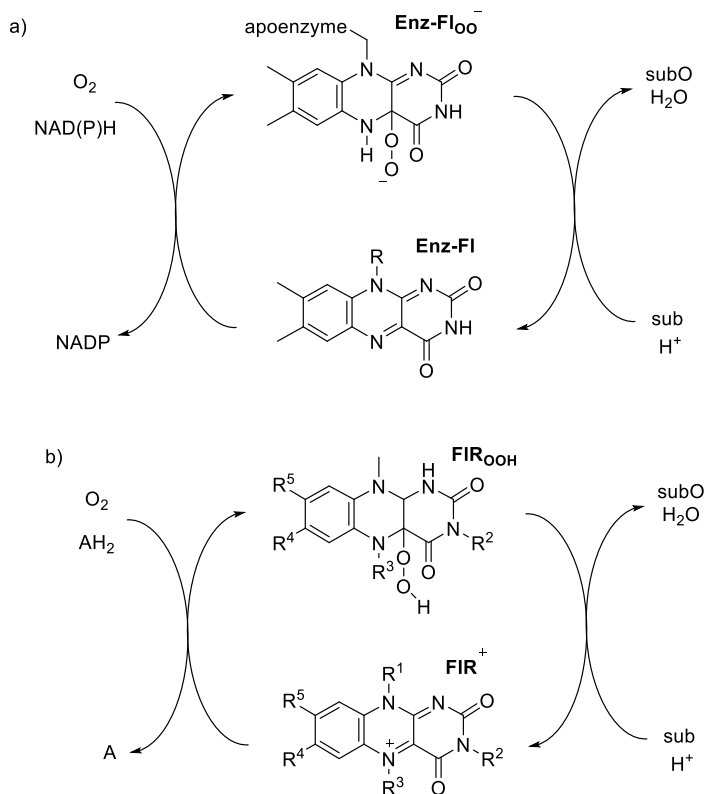
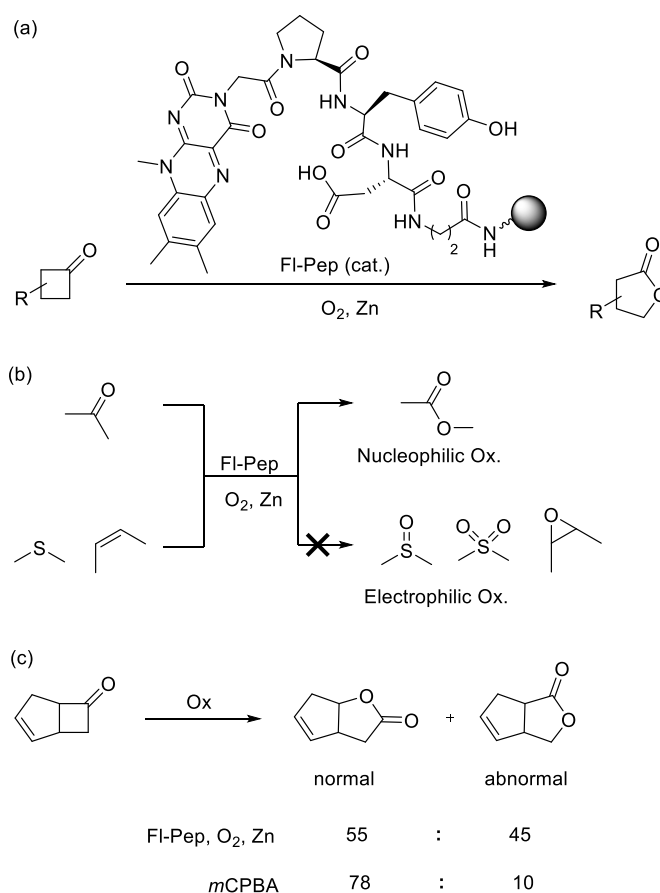


Figure 2. Catalytic cycle of flavins (a) flavoenzyme and (b) **FIR<sup>+</sup>**.

**Flo<sub>o</sub><sup>-</sup>**は酸化活性種として非常に興味深い、分子触媒系における同様の活性種を用いた酸化  
 反応例は、限られており、更なる研究が必要である <sup>10,11</sup>。前章で私はフラビン酵素の活性中心  
 と等しい骨格 (N5 無置換フラビン、**FI**) を有するフラボペプチド (**FI-Pep**) による酵素類似求  
 電子酸化反応を達成している。第 3 章では求核的酸化反応である BV 反応における **FI-Pep** の触  
 媒活性を評価した。

**FI-Pep** の BV 反応における触媒活性を評価したところ、樹脂担持型 **FI-Pep** 触媒と亜鉛粉末を  
 用い、酸素雰囲気下で四員環ケトンを経率的にラクトンへと酸化できることが明らかとなった  
 (Figure 3a)。更に **FI-Pep** はスルフィドやオレフィン存在下でも高い官能基選択性でケトンのみ  
 を酸化できる高い官能基選択性を示した (Figure 3b)。これはフラビンペルオキシドの温和な酸  
 化能を活かした優れた特徴である <sup>8,9</sup>。触媒制御による立体選択的 BV 反応、特にエナンチオ選  
 択的な反応系はいくつか報告があるが <sup>11,12</sup>、レジオ選択的反応に関しては 2 報しかない。1 つ

は我々の *N5* 置換カチオン性フラビニウム塩による酸素酸化 BV 反応<sup>9</sup>であり、もう一方は Miller ら<sup>12c,e</sup>のアスパラギン酸含有ペプチド触媒の例のみである。一般的には基質のケトンの級数の高い炭素側に酸素が挿入したラクトンを与えることが知られている。FI-Pep を用いた場合にはフラビニウム塩を用いた場合と同様に *m*CPBA による酸化とは異なる選択性でラクトンを与え、特異な位置選択性を示す BV 反応が進行した (Figure 3c)。これらの官能基及びレジオ選択性は FI-Pep による酸素酸化反応における酸化活性種がヒドロペルオキシ体であることを強く示す結果である。第三章で記すこれらの結果は酵素の活性中心に等しい *N5* 位無置換中性フラビン分子による初めての酸素酸化 BV 反応に成功した例である。



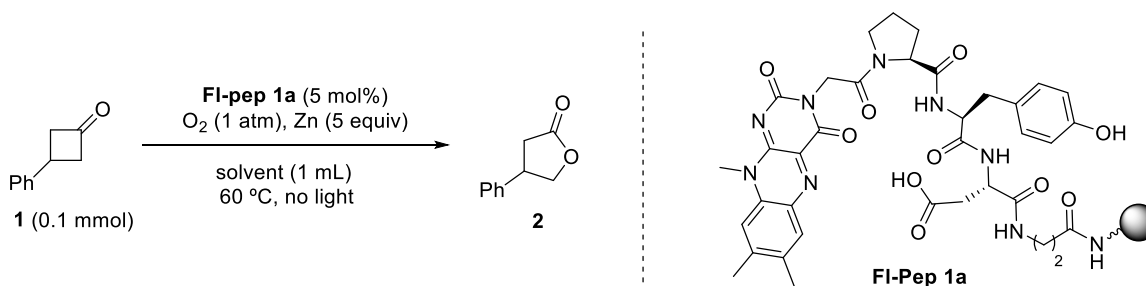
**Figure 3.** a) FI-Pep-catalyzed aerobic Baeyer-Villiger oxidation reaction. b) Chemoselective oxidation with FI-Pep. c) Regioselective BV reaction of fused ketone with FI-Pep.

## 3.2 Result and Discussion

### 3.2.1 Baeyer-Villiger Oxidation with molecular Oxygen

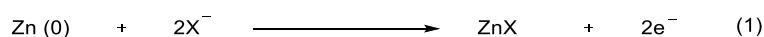
スルフィドの酸素酸化反応において優れた触媒能を発揮した **FI-Pep 1a** を用いて 3-Phenylcyclobutanone の酸素酸化 BV 反応を行った (Table 1)。還元剤は過去の報告を参考に<sup>9</sup> 亜鉛粉末を用い、トルエン、エタノール、トルエン-エタノール混合溶媒の三種類の溶媒を用いて反応を行った。反応の進行は <sup>1</sup>H NMR により確認し、基質と生成物の比を求めた。反応はトルエン-エタノール混合溶媒中で効率的に進行し、反応開始より 6 時間後に Pro/Sub = 1.71 となり、ラクトンの生成が確認された。一方、溶媒がトルエンもしくはエタノールのみではほとんど反応は進行しなかった。0 価の亜鉛が還元剤として働くと、電子 2 個と ZnX<sub>2</sub> (X=OH, OR) を生成するため (式 1)、トルエン中では亜鉛による **FI** の還元過程が遅くなると考えられ、他方、エタノール中では触媒担体である樹脂が膨潤しないため反応の進行が非常に遅いと考えられる。混合溶媒中では生成する ZnX<sub>2</sub> のカウンターアニオン源としてエトキサイドアニオンが機能するため、**FI** の還元過程が加速され、かつ樹脂も十分に膨潤するために効率的に反応が進行した<sup>8</sup>。

Table 1. FI-Pep-catalyzed aerobic BV reaction<sup>a</sup>



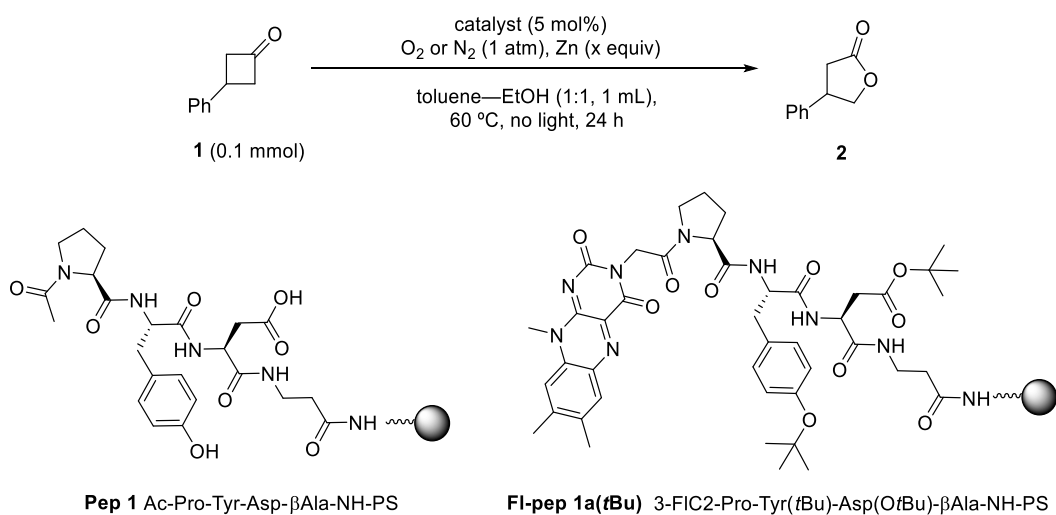
entry	solvent	time (h)	Pro/Sub
1	toluene/EtOH (1:1)	6	1.71
2	toluene	24	0.01
3	EtOH	24	0.07

<sup>a</sup>Determined by <sup>1</sup>H NMR analysis.



各種対照実験をトルエン-エタノール溶媒下で行ったところ、ペプチドのみ (**Pep 1**) や **Fl-Pep 1a** のペプチドの酸性側鎖を保護した触媒 (**Fl-pep 1a(tBu)**) を用いた場合や触媒、亜鉛、酸素のいずれかが欠けた条件下では反応が進行しなかった (Table 2)。これらの結果より **Fl-Pep 1a** による BV 反応がフラビンとペプチドの協奏的働きによって進行していることが確認された。

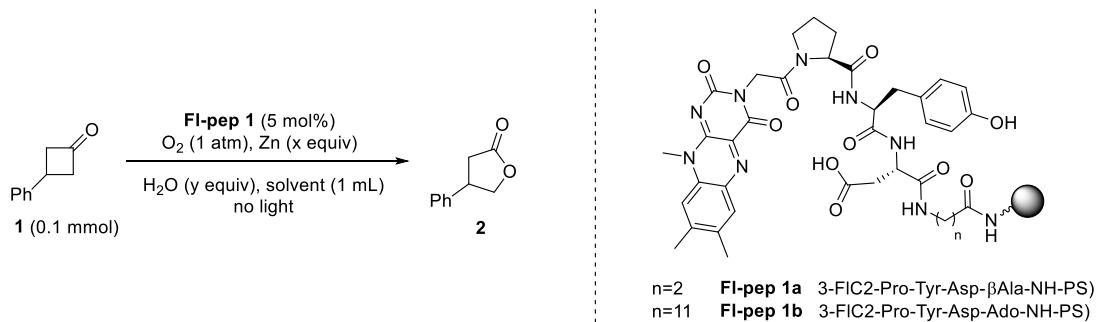
**Table 2.** Control experiment on Baeyer-Villiger reaction of 3-phenylcyclobutanone. <sup>a</sup>



entry	catalyst	zinc (equiv)	atmosphere	conv. (%)	yield (%)
1	<b>Pep 1a</b>	5	O <sub>2</sub>	19	14
2	<b>Fl-pep 1a(tBu)</b>	5	O <sub>2</sub>	<1	n.d. <sup>b</sup>
3	none	5	O <sub>2</sub>	8	<1
4	<b>Fl-pep 1a</b>	none	O <sub>2</sub>	31	n.d.
5	<b>Fl-pep 1a</b>	5	N <sub>2</sub>	4	<1

<sup>a</sup> Determined by <sup>1</sup>H NMR analysis using dodecane as an internal standard. <sup>b</sup> n.d. is not detected.

**Table 3.** Comparison under different conditions on Baeyer-Villiger reaction of 3-phenyl-cyclobutanone. <sup>a</sup>



entry	solv.	Zn (equiv)	H <sub>2</sub> O (equiv)	temp. (°C)	time (h)	yield (%)
1	CH <sub>3</sub> CN/toluene 1:1	5	10	60	6	35
2	CH <sub>3</sub> CN/toluene 1:1	5	50	60	6	11
3	CH <sub>3</sub> CN/toluene 1:1	5	100	60	6	3
4	CH <sub>3</sub> CN/toluene 2:1	5	5	60	6	5
5	CH <sub>3</sub> CN/toluene 2:1	5	30	60	6	56
6	CH <sub>3</sub> CN/toluene 2:1	5	50	60	12	61
7	CH <sub>3</sub> CN/toluene 2:1	5	10	35	40	70
8	CH <sub>3</sub> CN/toluene 2:1	5	10	25	40	42
9	CH <sub>3</sub> CN/toluene 2:1	5	30	35	24	65
10	CH <sub>3</sub> CN/toluene 2:1	3.5	20	35	24	60
11 <sup>b</sup>	CH <sub>3</sub> CN/toluene/EtOAc 8:4:1	3.5	20	35	4	58
					7	72
12 <sup>b,c</sup>	CH <sub>3</sub> CN/toluene/EtOAc 8:4:1	3.5	20	35	15	66
13 <sup>b</sup>	CH <sub>3</sub> CN/toluene/EtOAc 8:4:1	2	20	35	7	19
14 <sup>b</sup>	CH <sub>3</sub> CN/toluene/EtOAc 8:4:1	3.5	0	35	7	18
15 <sup>b</sup>	CH <sub>3</sub> CN/toluene/EtOAc 4:2:1	3.5	20	35	4	47
16 <sup>b</sup>	CH <sub>3</sub> CN/toluene/EtOAc 2:1:1	3.5	20	35	4	31
17 <sup>b</sup>	CH <sub>3</sub> CN/toluene/EtOAc 8:2:1	3.5	20	35	4	57

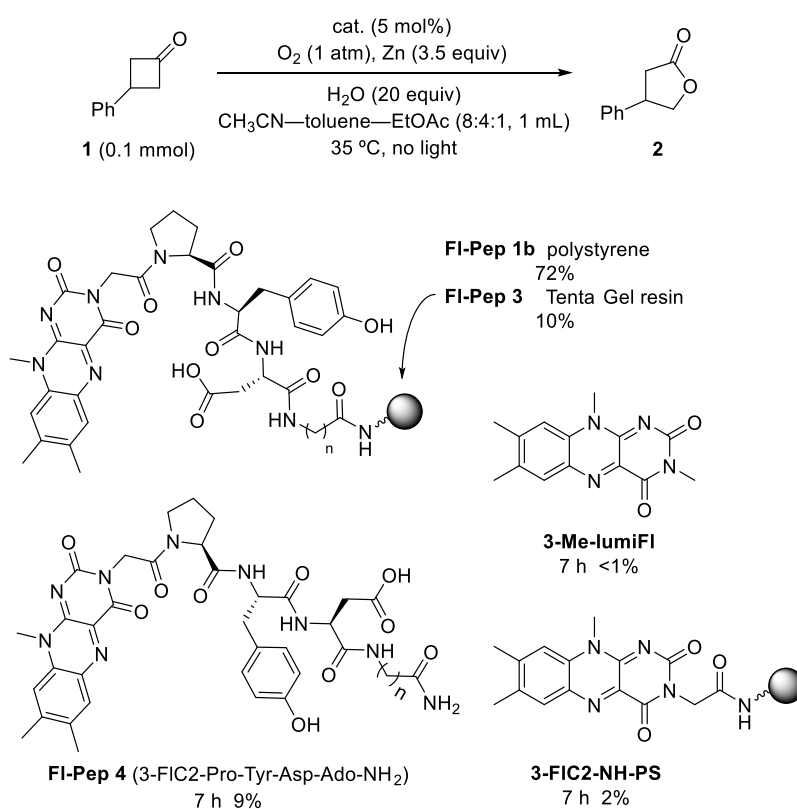
<sup>a</sup> Determined by <sup>1</sup>H NMR analysis using hexadecane or dodecane as an internal standard. <sup>b</sup> **FI-pep 1b** was used instead of **FI-pep 1a**. <sup>c</sup> Substrate 0.80 mmol scale and isolated yield.

**FI-Pep 1a** の酸化活性が認められたので、様々な条件下で反応を行い最適条件を探した (Table 3)。当初はエタノールを用いていたがラクトンの加溶媒分解が見られたため、代わりに水を添加した。反応温度は 60 °C 下から 35 °C まで下げても効率的に反応は進行した。過去に報告されて

いる **FIR**<sup>+</sup>による BV 反応の溶媒を参考に最終的にアセトニトリル—トルエン—酢酸エチル混合溶媒を使用し、35 °Cで 5 mol%の **FI-Pep 1b**、3.5 等量の亜鉛、20 等量の水を用いて 7 時間攪拌することで 72%収率を達成した。

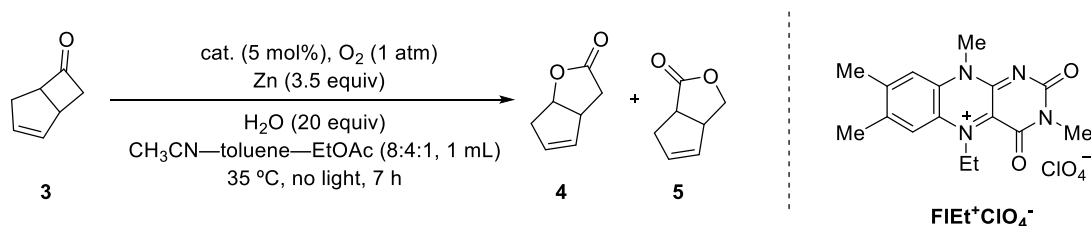
### 3.2.2 Effect of Peptide, Resin and Reductant

最適条件下で両親媒性の Tenta Gel 樹脂<sup>13</sup>を用いた **FI-Pep 3** や樹脂から切り出した **FI-Pep 4**、もしくはペプチド構造の無い、3-methyllumiflavin、**3-FIC2-NH-PS** を用いて反応を行ったが、**FI-Pep 1b** 程の高い活性は見られなかった (Figure 4)。このことより、スルフィドの酸化反応の場合と同様にペプチド部位の分子内水素結合が鍵となり酸化反応が進行しており、ポリスチレン樹脂の疎水場は分子内水素結合をより強固にし、狙った様な活性種の安定化がより有利になっていると推察される。類似の疎水的な反応場の特徴を生かした FI の酸素酸化 BV 反応の例として Avenir<sup>10d</sup> らはポリエチレンイミンに FI 誘導体を内包させると NADH を還元剤とする BV 反応が進行することを報告している。



**Figure 4.** Control experiment on BV reaction.

**Table 4.** Catalytic activity of FI-Pep 2b and FIEt<sup>+</sup>ClO<sub>4</sub><sup>-</sup>.<sup>a</sup>



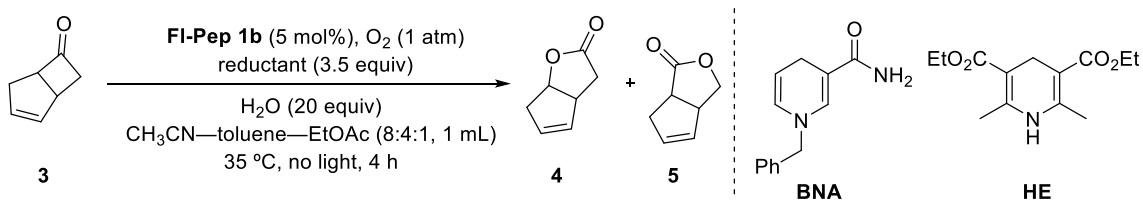
entry	catalyst	conv. (%) <sup>b</sup>	yield (%) <sup>b</sup>	product ratio <sup>b</sup>	
				4	5
1	<b>FI-Pep 1b</b>	76	64	54	46
2	<b>FIEt<sup>+</sup>ClO<sub>4</sub><sup>-</sup></b>	66	63	57	43
3	none	0	0	—	—
4	<b>3-FIC2-NHPS</b>	0	0	—	—
5	<b>3-Me-lumiFI</b>	0	0	—	—

<sup>a</sup> Reactions were performed using 0.1 mmol of 3, 3.5 equiv. of Zn, and 20 equiv of H<sub>2</sub>O in a mixed solvent (CH<sub>3</sub>CN—toluene—EtOAc) in the presence of 5 mol% of catalyst under 1 atm of O<sub>2</sub> at 35 °C. <sup>b</sup> Determined by <sup>1</sup>H NMR analysis using dodecane as an internal standard.

ケトン **3** の BV 反応における **FI-Pep 2b** と **FIEt<sup>+</sup>ClO<sub>4</sub><sup>-</sup>** の触媒活性を比較したところ (Table 4)、**FIEt<sup>+</sup>ClO<sub>4</sub><sup>-</sup>** は不均一系触媒にも関わらず、**FIEt<sup>+</sup>ClO<sub>4</sub><sup>-</sup>** と遜色ない高い触媒活性を示した (entries 1,2)。一般的に過酸による BV 反応における生成物ラクトンの酸素が挿入される位置は級数の多い炭素側であるが、フラビン酵素やフラビン分子触媒を用いた場合には特徴的な選択性がみられる<sup>7,14</sup>。興味深いことに **FI-Pep 1b** もその特徴を有することが明らかになった。触媒を加えない場合や単純なフラビン触媒を用いた場合は目的の BV 反応は進行しないも確認しており (entries 3–5)、これらの結果は **FI-Pep 1b** による BV 反応が活性種 4a-peroxyflavin を経由していることを支持するものである。ケトン **3** の位置選択性に関しては次項で詳細に記す。

これまで FI の還元過程における還元剤及び水素源として Zn 粉末と水を用いてきた。生体内では NAD(P)H がその役割を果たすことが知られており、非金属水素源を用いた BV 反応を試みた。水素源としては NAD(P)H のモデル化合物として知られる BNA とハンチュエステルを検討しが (Table 5)<sup>15</sup>、反応の進行は確認されなかった。

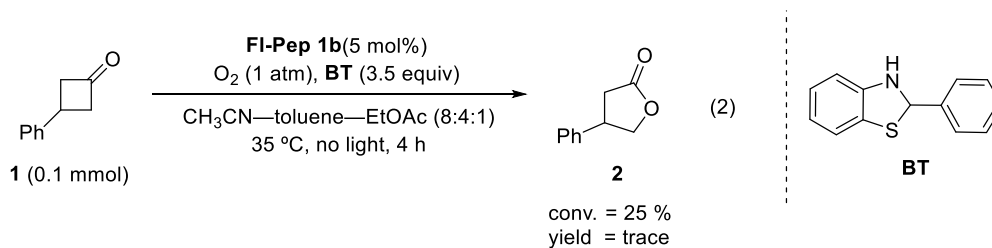
**Table 5.** Aerobic BV reaction using organic hydrogen source.<sup>a</sup>



entry	reductant	additive	conv. (%)	yield (%)
1 <sup>c</sup>	Zn	H <sub>2</sub> O (20)	88	73
2	<b>BNA</b>	H <sub>2</sub> O (20)	0	0
3 <sup>d</sup>	<b>HE</b>	none	0	0

<sup>a</sup> Reactions were performed using 0.1 mmol of **3** and 3.5 equiv. of reductant in a mixed solvent (CH<sub>3</sub>CN—toluene—EtOAc) in the presence of 5 mol% of **FI-Pep 1b** under 1 atm of O<sub>2</sub> at 35 °C. <sup>b</sup> Determined by <sup>1</sup>H NMR analysis using dodecane as an internal standard. <sup>c</sup> In 4.5 h. <sup>d</sup> In 6 h.

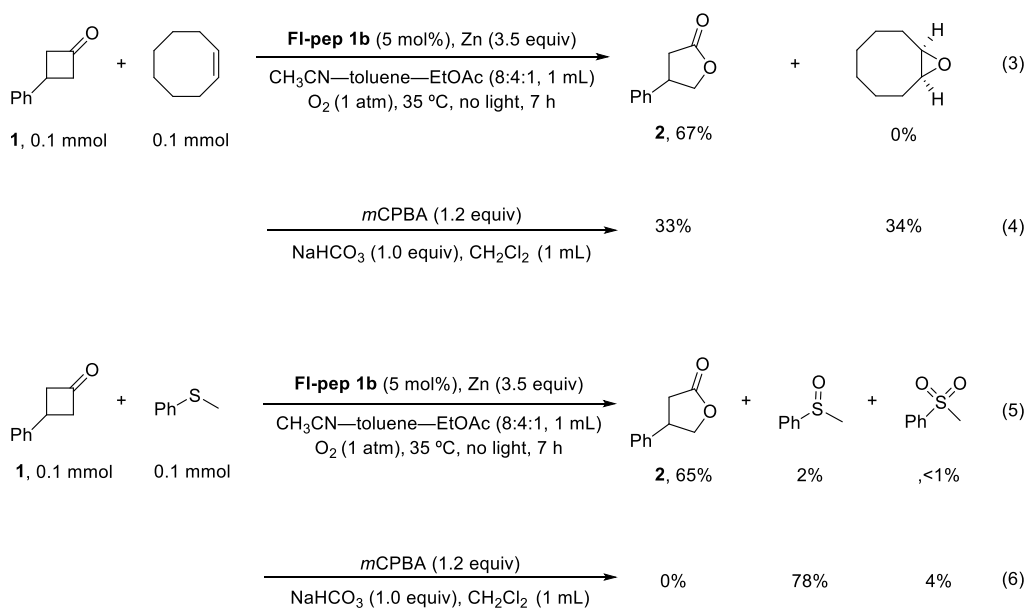
次いで、イミンの水素添加反応における水素源として用いられていたベンゾチアゾリン<sup>16</sup> (**BT**) を用いたが、こちらもラクTONの生成はほとんど確認されなかった (式2)。これは **BT** と基質のケTONのチオアミナル交換反応が進行したためだと考えられる。以上の結果より Zn が最も適した還元剤として働いたので、以降は Zn を用いて BV 反応を行った。





### 3.2.3 Regio- and Chemoselective Baeyer-Villiger Oxidation

高度に官能基された化合物の分子変換反応は困難であるが、近年、官能基選択的な触媒系が開発され、Late-stage functionalization に適応されている<sup>17</sup>。酸化反応においても官能基選択的反応の開発は求められており、オレフィンやスルフィド存在下にケトンのみをラクトンへ酸化できればその有用性は高い。触媒量の **Fl-Pep 1b** と還元剤として亜鉛を用いて、酸素雰囲気下で同量のケトンとオレフィン存在下、酸化反応を行うとラクトンのみが高い選択性で得られた (式 3)。これに対し *m*CPBA を用いるとラクトンとエポキシドの両方が生成し (式 4)、**Fl-Pep 1b** の高い官能基選択性が明らかとなった。オレフィンの代わりに更に酸化されやすいスルフィド存在下でも **Fl-Pep 1b** は *m*CPBA とは大きく異なる化学選択性を示した (式 5, 6)。過去に我々はカチオン性フラビン分子触媒の BV 反応がオレフィンやスルフィドの存在下でも高い官能基選択性で酸化反応が進行することを報告している<sup>9</sup>。この選択性は酸化活性種である 4a-hydroperoxyflavin の酸化力が温和であることに起因するものであり、**Fl-Pep** も同様の選択性が期待されたので確認したところ高い選択性がみられた (Scheme 1)。



**Scheme 1.** Chemoselective oxidation with Fl-Pep

次いで FI-Pep による BV 酸化反応における位置選択性を調べた (Figure 5)。FI-Pep 1b によるケトン 3 の BV 反応は異なる位置異性体 4a と 4b を 51:49 の比で与え、オレフィン部位は全く酸化されなかった (式 7)。一方、mCPBA を用いた場合は 4a が主生成物として得られ、エポキシドの生成も確認され、FI-Pep 触媒系が過酸による酸化とは大きく異なる選択性を示すことが明らかとなった (式 8)。Baeyer-Villiger monooxygenase (BVMO) によるケトン 3 の酸化反応は位置異性体 4a と 4b を 51:49 で与えることが知られており<sup>7,8</sup> (式 9)、FI-Pep 触媒系は BVMO と類似の選択性を有する。官能基選択的な BV 反応との結果と合わせてこれらは FI-Pep 触媒系の酸化活性種が 4a-peroxyflavin (Fl<sub>OO</sub><sup>-</sup>) であることを強く支持するものである。

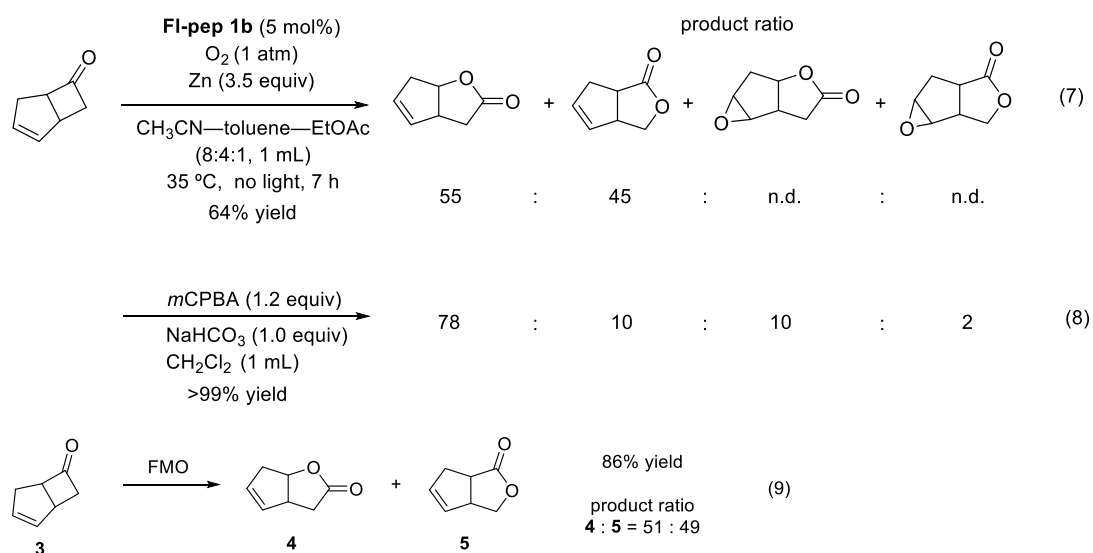


Figure 5. Regioselectivity on the aerobic BV reaction of (±)-cis-bicyclo[3.2.0]hept-2-ene-6-one.

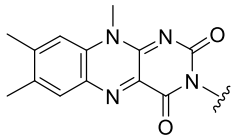
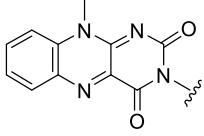
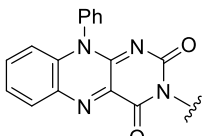
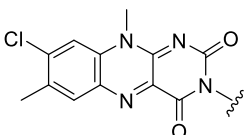
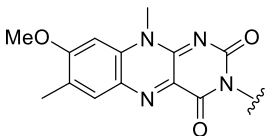
### 3.2.4 Mechanistic Aspects of aerobic BV reaction with FI-Pep

異なるフラビン骨格から成る FI-Pro-Tyr-Asp-Ado-NHPS を合成し、それぞれの触媒活性を調べた (Table 6)。フラビン酵素の活性中心に等しい構造のルミフラビン誘導體及び、ルミフラビンの 7, 8 位が水素のフラビンは活性が高く (entries 1, 2)、それ以外のフラビンは活性が低い結果となった (entries 3-5)。単純なフラビン環の電子状態と触媒活性の相関は見られず、フラビン環の電子状態が活性種の安定化、基質への求核付加段階、Criegee 中間体からの転移段階など触媒サイクルの複数の段階に影響している。

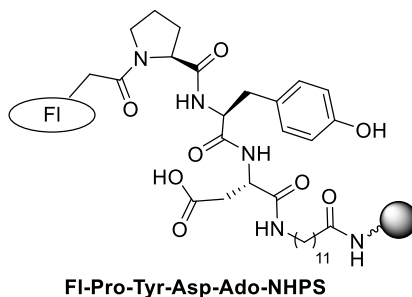
これまでの結果をより、FI-Pep による酸素酸化 BV 反応の活性種は 4a-peroxyflavin (Fl-OO<sup>-</sup>) であると考えられる。その触媒サイクルは FI-Pep が亜鉛に 2 電子還元されて、FIred-Pep となった後、酸素と反応して活性種 4a-peroxyflavin (Fl<sub>OO</sub><sup>-</sup>-Pep) が生じる。この活性種はヒドラジンを還元剤としたスルフィドの酸素酸化反応の時とは異なり、亜鉛を用いた条件下では求

核的な活性種であることが明らかとなっている (Scheme 1)。これがケトンへ求核的に付加して、Criegee 中間体を経て、ラクトンが生成する。

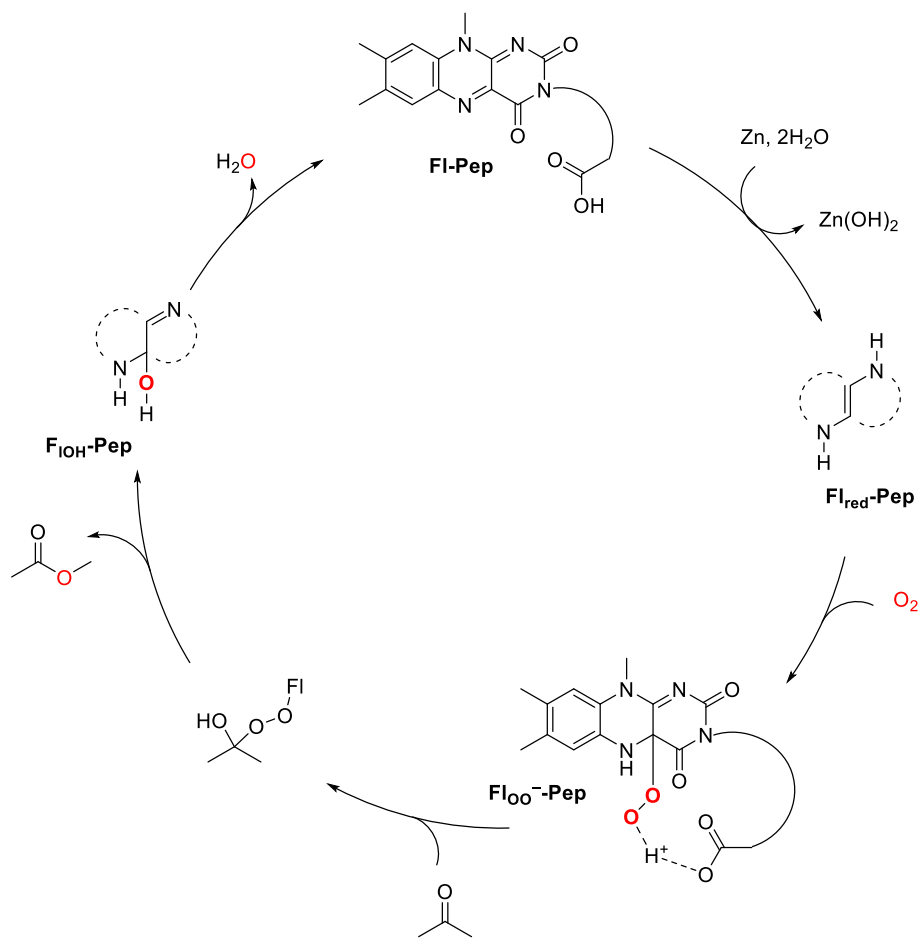
**Table 6. Catalytic activity and electron density of flavin. <sup>a</sup>**

entry	FI	conv. (%) <sup>b</sup>	yield (%) <sup>b</sup>
1		78	63
2		83	69
3		33	33
4		6	5
5		8	13

<sup>a</sup> Reactions were performed using 0.1 mmol of **1**, 3.5 equiv. of Zn, and 20 equiv of H<sub>2</sub>O in a mixed solvent (CH<sub>3</sub>CN—toluene—EtOAc) in the presence of 5 mol% of FI-Pro-Tyr-Asp-Ado-NHPS under 1 atm of O<sub>2</sub> at 35 °C. <sup>b</sup> Determined by <sup>1</sup>H NMR analysis using dodecane as an internal standard.



**Figure 6.** Catalytic cycle of FI-Pep-catalyzed aerobic BV reaction



### 3.3 Conclusion

第三章ではペプチド鎖を有するフラボペプチド 3-FIC2-Pro-Tyr-Asp-Ado-NHPS (**Fl-Pep 1b**) が還元剤として亜鉛を用いた酸素酸化 BV 反応の触媒として効率的に機能することが明らかとした。有機分子触媒による酸素酸化 BV 反応はカチオン性フラビン触媒系のみであったため、フラボペプチドによる触媒系は有機分子触媒による種々の求核的酸素酸化反応への応用が期待される。**Fl-Pep 1b** は高い官能基選択性を有し、スルフィドやオレフィンなどの酸化されやすい官能基存在下でもケトンからラク톤を得られる優れた特徴がある。またレジオ選択性においても**Fl-Pep** 触媒は過酸とは異なる選択性を示し、その選択性はBVOの特徴と類似するものであった。官能基選択性とレジオ選択性の特徴は、**Fl-Pep** 触媒系の酸化活性種が対応するヒドロペルオキシ体であることを強く示す結果であり、これは N5 無置換中性フラビン分子による酵素類似 BV 酸化を達成した初めての例である。本研究では立体選択的な BV 反応は達成できなかったが、今後の更なる応用が期待される。

### 3.4 Experimental Section

#### 2.4.1 General information and materials

#### 2.4.2 Baeyer-Villiger oxidation of 3-phenylcyclobutan-1-one with flavin catalyst

#### 2.4.3 Competitive reaction

#### 2.4.4 Preparation of flavin

#### 2.4.1 General information and materials

NMR spectra were recorded using JOEL JNK-ECX-400 spectrometer ( $^1\text{H}$ , 400 MHz), JNM-ECA-400 spectrometer ( $^1\text{H}$ , 400 MHz), and JNM-ECA-500W ( $^1\text{H}$ , 500 MHz). The chemical shifts of  $^1\text{H}$  NMR signals is quoted relative to tetramethylsilane. Gas chromatography analysis were carried out on Shimadzu GC-2010 by using a DB-1 glass capillary column (0.25 mm $\times$ 30 m).

**Fl-Peps** were prepared according to the experimental section in chapter 2. 3-Phenylcyclobutanone<sup>18</sup>, **BNAH**<sup>15b</sup> and **BT**<sup>19</sup> were prepared according to the reported procedure. All other reagents were purchased commercial supplies and used without further purification.

#### 3.4.2 Baeyer-Villiger oxidation of 3-phenylcyclobutan-1-one with flavin catalyst

##### Typical procedure

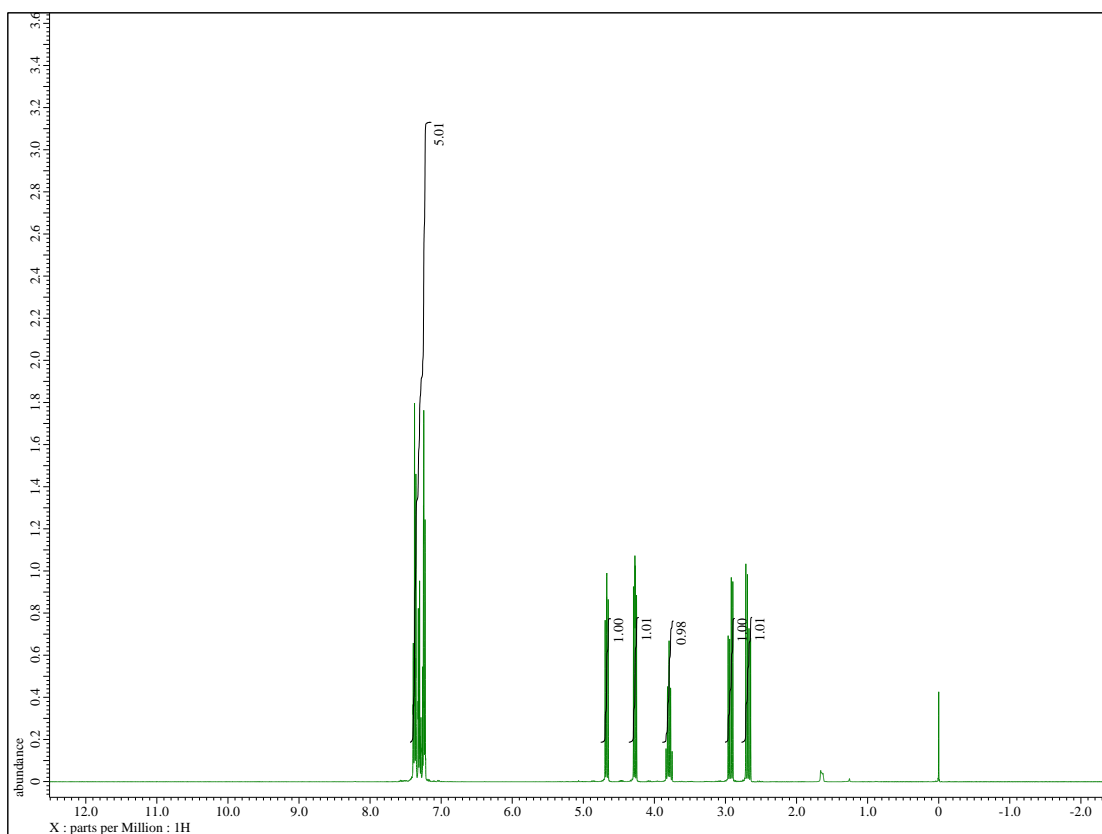
A mixture of 3-phenylcyclobutan-1-one (14.6 mg, 100  $\mu\text{mol}$ ), flavin catalyst (5  $\mu\text{mol}$ , 5 mol%), zinc (22.8 mg, 350  $\mu\text{mol}$ ),  $\text{H}_2\text{O}$  (36  $\mu\text{l}$ , 2.0 mmol), and dodecane (1  $\mu\text{mol}$ , internal standard) in an acetonitrile—toluene—ethyl acetate mixed solvent (8:4:1, 1.0 mL) was stirred at a defined temperature (25–60  $^\circ\text{C}$ ) for 6–40 h under an atmosphere of oxygen. The yield of  $\beta$ -phenyl- $\gamma$ -butyrolactone was determined by  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy of the crude mixture

##### Product isolation

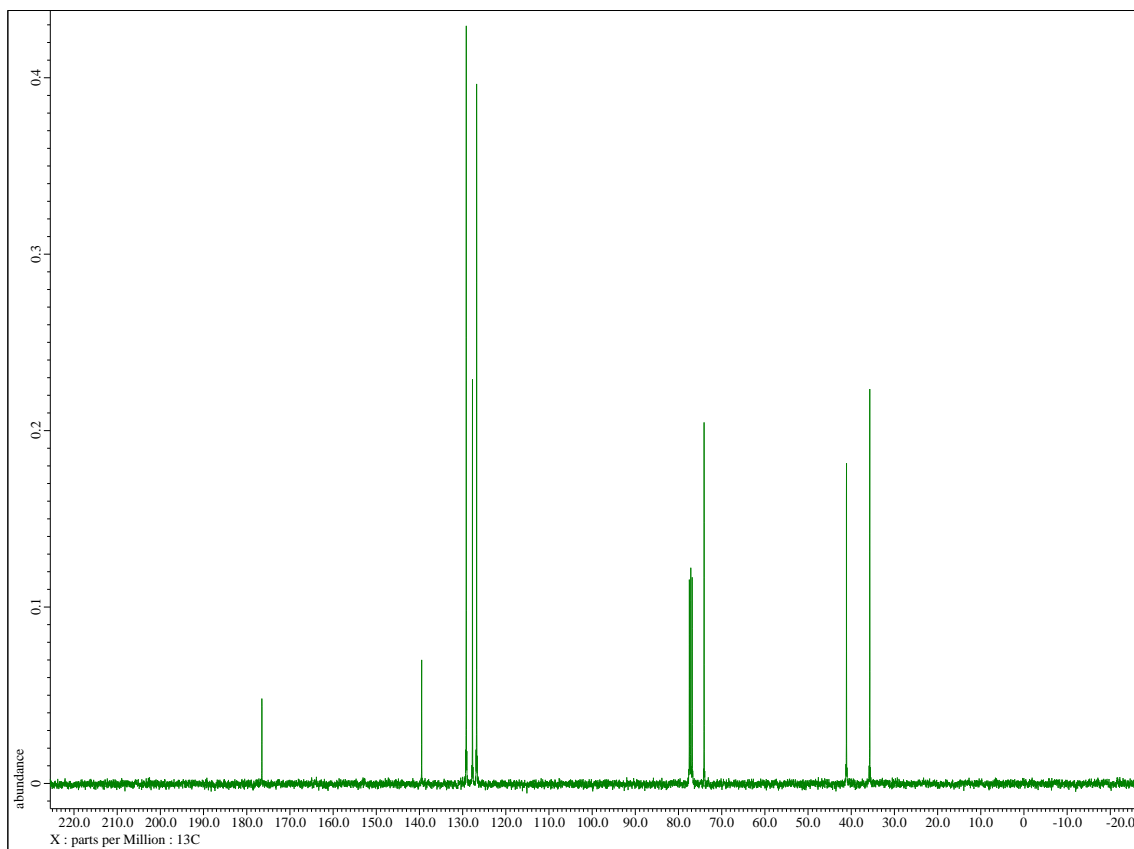
A mixture of 3-phenylcyclobutanone (117 mg, 0.80 mmol), **Fl-Pep 1b** (0.040 mmol, 5 mol%),  $\text{H}_2\text{O}$  (290  $\mu\text{L}$ , 16 mmol) and zinc (183 mg, 2.80 mmol) in an acetonitrile—toluene—ethyl acetate mixed solvent (8:4:1, 8.0 mL) was stirred at 35  $^\circ\text{C}$  under an atmosphere of oxygen for 15 h. The catalyst was filtered out and washed with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (5  $\times$  1 mL), and the combined filtrate was washed with saturated aqueous  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  (5 mL). The aqueous layer was extracted with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (4  $\times$  7 mL), and the combined organic layers were dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , which was filtered and concentrated under reduced pressure. The resulting crude product was purified by flash column chromatography on silica gel using a mixture of hexane and ethyl acetate 7:3 as eluent to afford 83 mg of  $\beta$ -phenyl- $\gamma$ -butyrolactone as colorless oil (66%).

Analytical data were in agreement with the published data<sup>8</sup>. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ : 2.68 (dd, *J* = 9.1, 17.4 Hz, 1 H, -C(O)CHH-), 2.93 (dd, *J* = 8.7, 17.4 Hz, 1 H, -C(O)CHH-), 3.76-3.83 (m, 1 H, ArCH), 4.27 (dd, *J* = 8.0, 9.2 Hz, 1 H, OCHH-), 4.67 (dd, *J* = 7.9, 9.1 Hz, 1 H, -OCHH-), 7.23-7.25 (m, 2 H, ArH), 7.29-7.32 (m, 1 H, ArH), 7.36-7.39 (m, 2 H, ArH); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz, δ) : 35.7, 41.1, 74.1, 126.7, 129.2, 139.5, 176.4; elemental anal. calcd. for C<sub>10</sub>H<sub>10</sub>O<sub>2</sub>: C 74.06, H 6.22; found for C 73.97, H 6.30.

### <sup>1</sup>H NMR



### <sup>13</sup>C NMR



#### 3.4.3 Competitive reaction

Competitive experiments (section 3.2.3 in main text) were carried out and analyzed according to the following procedures.

##### 3-Phenylcyclobutan-1-one vs cyclooctene under FI-Pep condition (equation ).

A mixture of 3-phenylcyclobutan-1-one (14.6 mg, 0.10 mmol), cyclooctene (11.0 mg, 0.10 mmol), **FI-Pep 1b** (5.0 mmol, 5 mol%), dodecane (0.010 mmol, internal standard), H<sub>2</sub>O (36 μL, 2.0 mmol) and zinc (22.9 mg, 0.35 mmol) in a toluene—acetonitrile—ethyl acetate mixed solvent (4:8:1, 1.0 mL) was stirred at 35 °C for 7 h under an atmosphere of oxygen. The yield of products were determined by <sup>1</sup>H NMR spectroscopy of the crude mixture, which was described below.

##### 3-Phenylcyclobutan-1-one vs cyclooctene under FI-Pep condition.



A mixture of 3-phenyl cyclobutanone (14.6 mg, 0.10 mmol), cyclooctene (11.0 mg, 0.10 mmol), *m*CPBA (20.9 mg, 0.12 mmol), NaHCO<sub>3</sub> (8.4 mg, 0.10 mmol) and hexadecane (0.010 mmol, internal standard) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (0.5 mL) was stirred at room temperature for 5 h. The yield of products were calculated by <sup>1</sup>H NMR spectroscopy of the reaction mixture, which was described below.

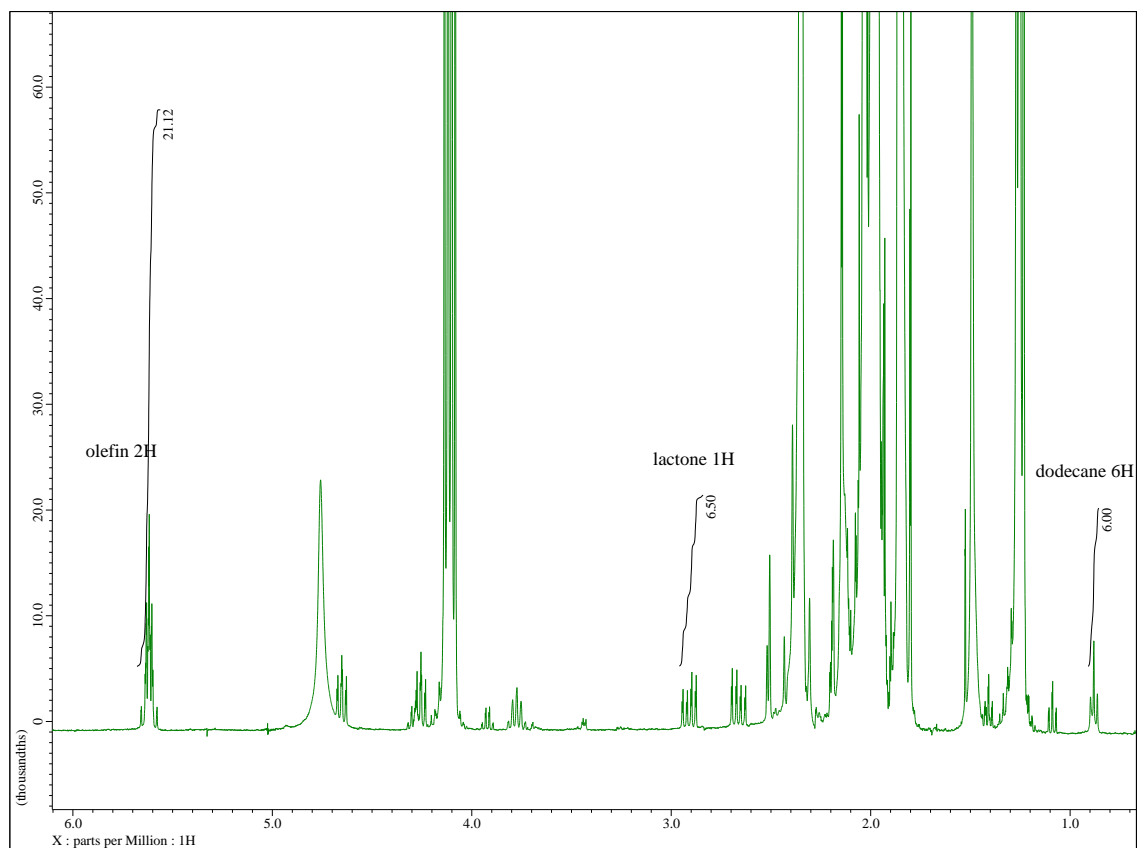
### **3-Phenylcyclobutan-1-one vs thioanisole under FI-Pep conditions.**

A mixture of 3-phenylcyclobutan-1-one (14.6 mg, 0.10 mmol), methyl phenyl sulfide (12.4 mg, 0.10 mmol), **FI-Pep 2** (5.0 μmol, 5 mol%), dodecane (0.010 mmol, internal standard), H<sub>2</sub>O (36 μL, 2.0 mmol) and zinc (22.9 mg, 0.35 mmol) in a toluene—acetonitrile—ethyl acetate mixed solvent (4:8:1, 1.0 mL) was stirred at 35 °C for 7 h under an atmosphere of oxygen. The yield of products were determined by <sup>1</sup>H NMR spectroscopy of the crude mixture, which was described below.

### **3-Phenylcyclobutan-1-one vs thioanisole under *m*CPBA conditions.**

A mixture of 3-phenyl cyclobutanone (14.6 mg, 0.10 mmol), methyl phenyl sulfide (12.4 mg, 0.10 mmol), *m*CPBA (20.9 mg, 0.12 mmol), NaHCO<sub>3</sub> (8.4 mg, 0.10 mmol) and dodecane (0.010 mmol, internal standard) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (0.5 mL) was stirred at room temperature for 24 h. The yield of products were calculated by <sup>1</sup>H NMR spectroscopy of the reaction mixture, which was described below.

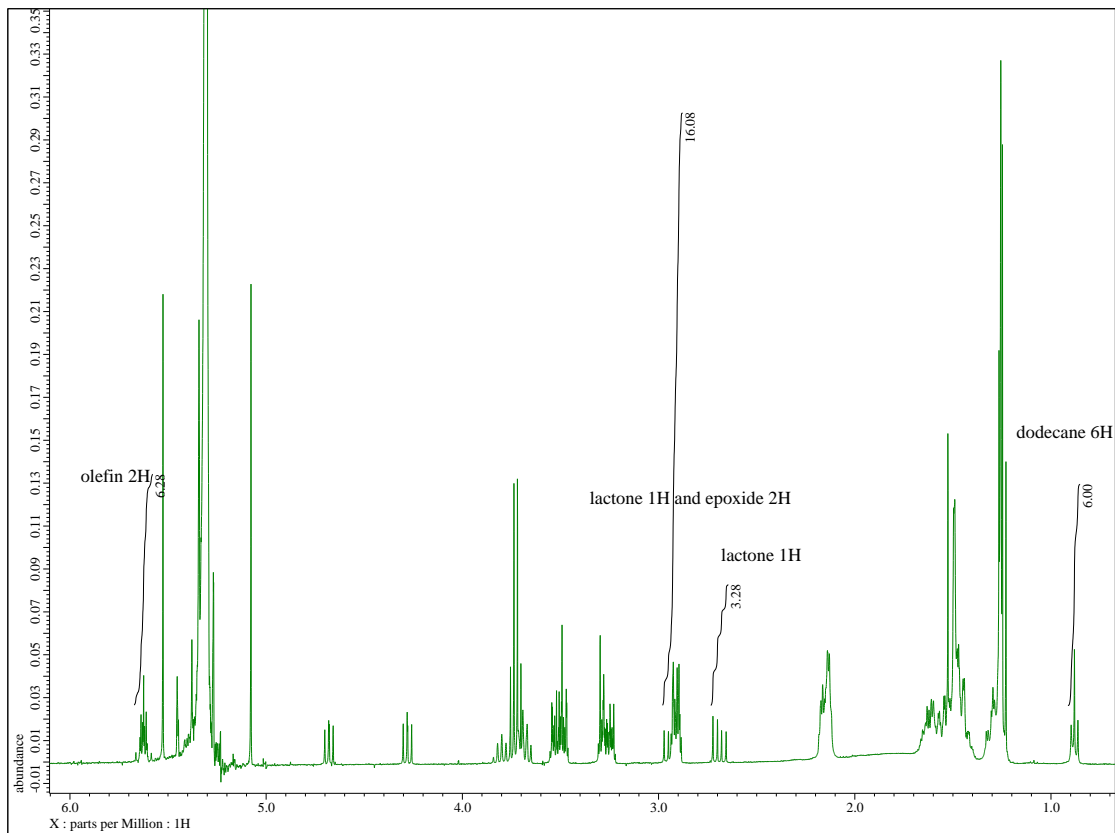
ketone vs olefine with Fl-Pep



	chemical shift (ppm)	peak integral	yield (%)
dodecane (6H)	0.88	6.00	
lactone (1H)	2.90 - 2.97	6.50	67
olefin (2H)	5.58 - 5.64	21.12	99

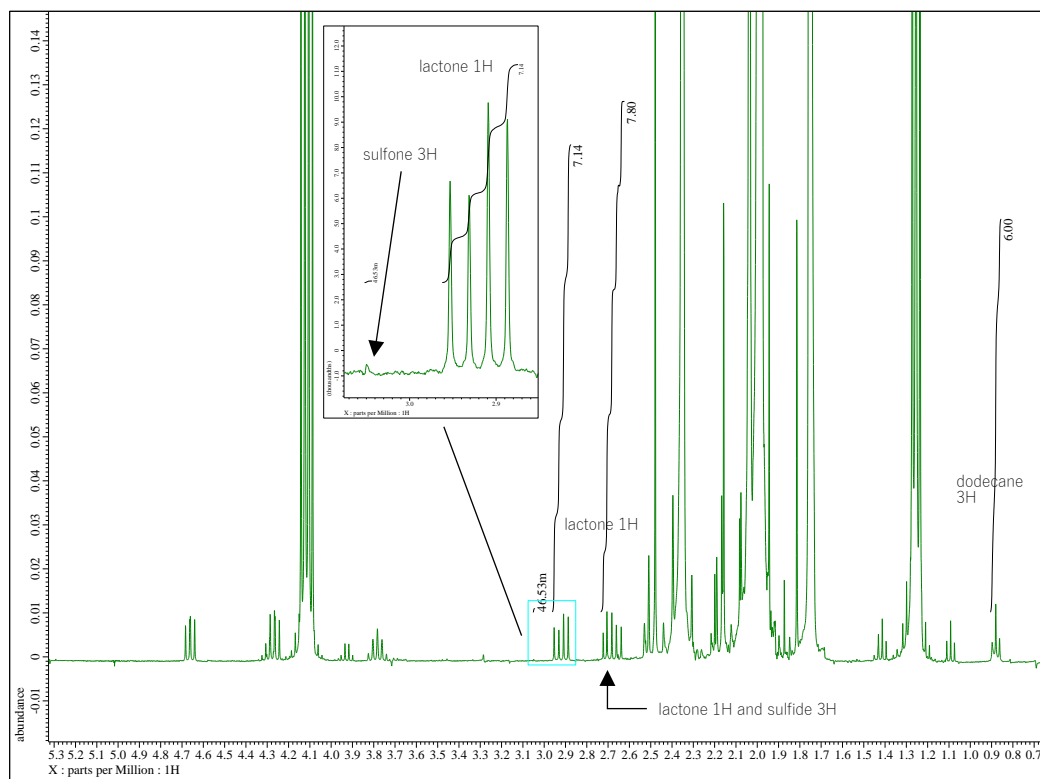
Epoxide (2.90 ppm) was not detected.

ketone vs olefin with *m*CPBA



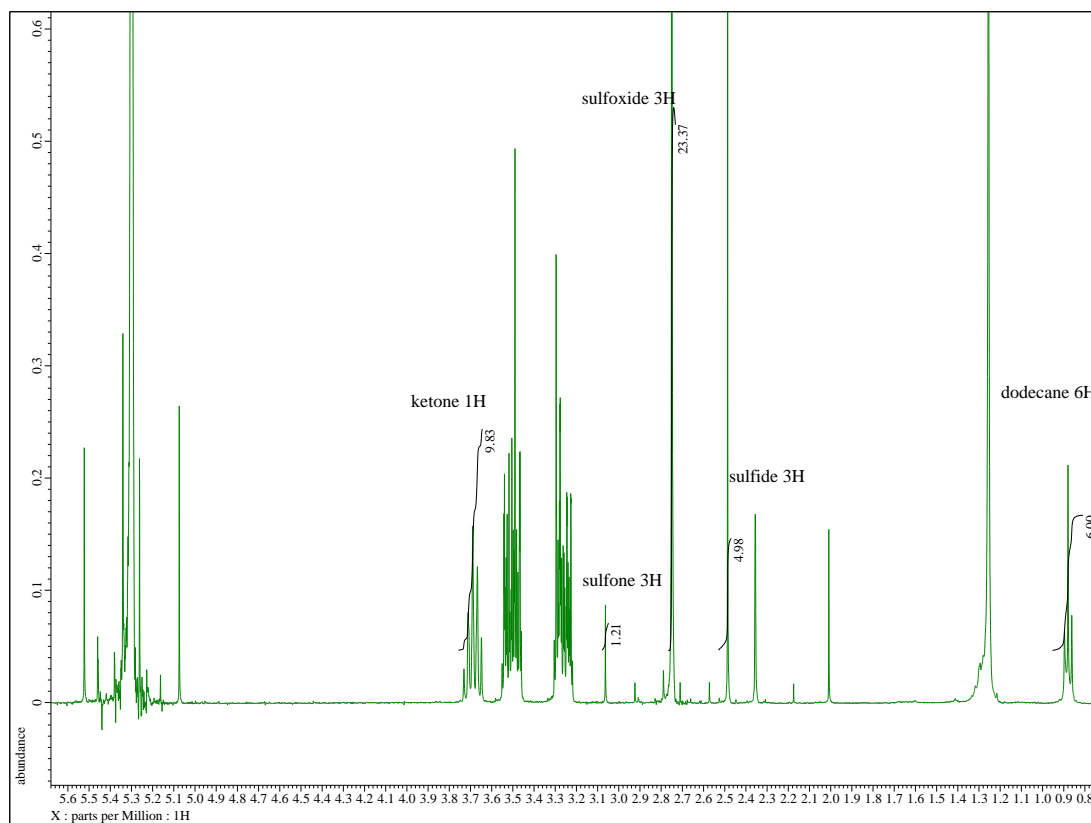
	chemical shift (ppm)	peak integral	yield (%)
hexadecane (6H)	0.88	6.00	
lactone (1H)	2.65 - 2.71	3.28	33
lactone + epoxide	2.88 - 2.97	16.08	
epoxide (2H)	2.88 - 2.94	16.08 - 3.28 = 12.8	64
ketone (2H)	3.21-3.32	14.04	70
olefin (2H)	5.58 - 5.64	6.28	31

ketone vs sulfide with F1 Pep



	chemical shift (ppm)	peak integral	yield (%)
dodecane (6H)	0.88	6.00	
lactone and sulfoxide	2.65 - 2.73	7.80	
lactone	2.90 - 2.97	7.14	65
sulfoxide (3H)	2.73	$7.80 - 7.14 = 0.66$	2
sulfone (3H)	3.05	0.046	<1

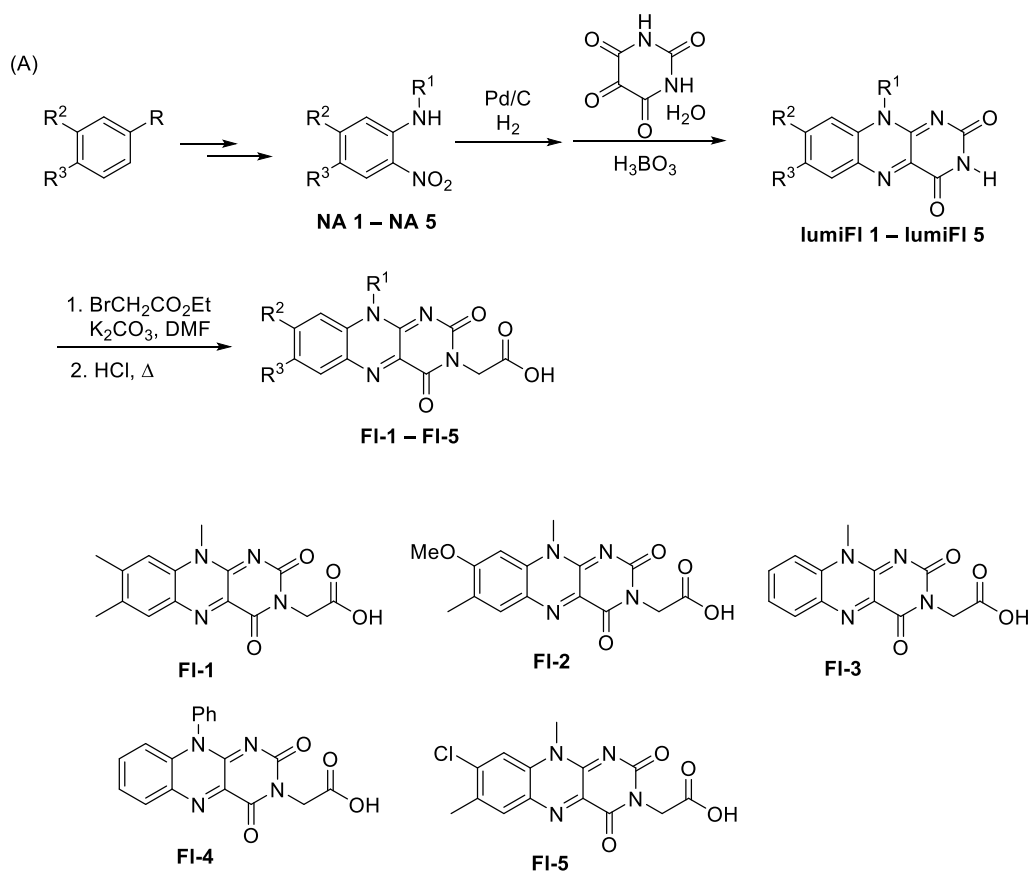
### ketone vs sulfide with *m*CPBA



	chemical shift (ppm)	peak integral	yield (%)
dodecane (6H)	0.88	6.00	
sulfide (3H)	2.49	4.98	17
sulfoxide (3H)	2.75	23.37	78
sulfone (3H)	3.05	1.21	4
ketone (1H)	3.63 - 3.74	9.83	99

Lactone (2.65 – 2.73 ppm) was not detected.

### 2.4.4 Preparation of flavins



**FI-1**<sup>chapter 2</sup> and **FI-3**<sup>21</sup> were prepared according to the literature procedure. **FI-2**, **FI-4**, and **FI-5** were prepared according to the procedure below.

## FI-2

### Preparation of *N*,4-dimethyl-5-methoxy-2-nitroaniline. (NA 2)

5-chloro-*N*,4-dimethyl-2-nitroaniline (1.00 g, 5.0 mmol) was dissolved in MeOH (10 mL). To this solution was added to 28% sodium methoxide methanol solution (4 mL, 16.4 mmol), and the mixture stirred at 90 °C for 18 h. The reaction mixture was cooled, poured into water and extracted with EtOAc. The combined organic phases were washed by brine, dried over anhydrous magnesium sulfate, and the EtOAc was removed in vacuo to give a title compound without purification (809 mg, 82%). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 2.10 (s, 3 H, 4-CH<sub>3</sub>), 3.03 (d, 4.98 Hz, 3 H, NCH<sub>3</sub>), 3.92 (s, 3 H, OCH<sub>3</sub>), 6.05 (s, 1 H, 6-ArH), 7.97 (s, 1 H, 3-ArH), 8.38 (brs, 1 H, NHCH<sub>3</sub>).

### Preparation of 8-methoxy-7,10-dimethylisoalloxazine (lumiFI 2)

A mixture of 5-methoxy-*N*,4-dimethyl-2-nitroaniline (1.00 g, 5.2 mmol), Pd/C (5%, 115 mg, 52 μmol) and acetic acid (35 mL) was stirred at 40 °C for 22 h under H<sub>2</sub>. The mixture was filtrated through a pad of celite under an N<sub>2</sub> atmosphere into a mixture of alloxane monohydrate (1.05 g, 7.3 mmol) and boric

acid (450 mg, 7.3 mmol). The mixture was stirred at r.t. for 1.5 h. The product was corrected by filtration, washed by water and EtOH, dried in vacuo to give crude product containing the title compound (916 mg, crude yield 65%).

#### **Preparation of ethyl 8-methoxy-7,10-dimethylisoalloxazine-3-acetate.**

The crude product containing 8-methoxy-7,10-dimethylisoalloxazine (853 mg, 3.12 mmol) and anhydrous potassium carbonate (1.64 g, 11.9 mmol) were suspended in dry DMF (130 mL). To this suspension was added ethyl bromoacetate (2.94 g, 17.4 mmol), and the mixture stirred at 60 °C for 16 h under N<sub>2</sub>. The reaction mixture was filtered, and DMF was removed by rotary evaporation. Water was added to the resulting solid and the mixture was extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. The combined organic phases were dried over anhydrous magnesium sulfate, and CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> was removed in vacuo. The crude product was purified by silica gel column chromatography (CHCl<sub>3</sub>/MeOH = 25 : 1, R<sub>f</sub>=0.30) to give a title compound (288 mg, 13% for *N*,4-dimethyl-5-methoxy-2-nitroaniline). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 1.29 (t, *J* = 7.2 Hz, 3 H, CO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2.37 (s, 3 H, 7-CH<sub>3</sub>), 4.10 (s, 3 H, 10-NCH<sub>3</sub>), 4.15 (s, 3 H, 8-OCH<sub>3</sub>), 4.24 (q, *J* = 7.1 Hz, 2 H, CO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 4.87 (s, 2 H, NCH<sub>2</sub>CO), 6.83 (s, 1 H, 9-ArH), 8.05 (s, 1 H, 6-ArH).

#### **Preparation of 8-methoxy-7,10-dimethylisoalloxazine-3-acetic acid. (Fl 2)**

Ethyl 8-methoxy-7,10-dimethylisoalloxazine-3-acetate (200 mg, 0.56 mmol) was dissolved in concentrated hydrochloric acid (3.0 mL), and the mixture was stirred at 80 °C for 1.5 h. After the reaction mixture was cooled, and water was added to the solution. The orange crystals were precipitated. The crystals were collected by filtration, washed with water and EtOH, and dried in vacuo to give the title compound (168 mg, 91%). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 2.32 (s, 3 H, 7-CH<sub>3</sub>), 4.07 (s, 3 H, NCH<sub>3</sub>), 4.12 (s, 3 H, 8-OCH<sub>3</sub>), 4.56 (s, 2 H, NCH<sub>2</sub>CO), 7.27 (s, 1 H, ArH), 8.01 (s, 1 H, ArH).

#### **Fl-4**

##### **Preparation of Ethyl 10-phenylisoalloxazine-3-acetate**

10-Phenylisoalloxazine (764 mg, 2.63 mmol) and anhydrous potassium carbonate (3.65 g, 26.3 mmol) were suspended in dry DMF (20 mL). To this suspension was added ethyl bromoacetate (4.63 g, 26.3 mmol), and the mixture stirred at 60 °C for 4 h under N<sub>2</sub>. The reaction mixture was filtered, and DMF was removed by rotary evaporation. Water was added to the resulting solid and the mixture was extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. The combined organic phases were dried over anhydrous magnesium sulfate, and the CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> was removed in vacuo. The crystals were recrystallized from EtOH/Et<sub>2</sub>O (= 1 : 2) to give the title compound as a green powder (337 mg, 34%). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 1.29 (t, *J* = 7.0, 7.3 Hz, 3 H, CO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 4.23 (q, 2 H, CO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 4.84 (s, 2 H, NCH<sub>2</sub>CO), 6.91 (dd, *J* = 0.9, 8.6 Hz, 1 H, ArH), 7.29-7.34 (m, 2 H, ArH), 7.57-7.71 (m, 5 H, NPh), 8.53 (dd, *J* = 1.1, 1.3, 8.0 Hz, 1 H, ArH).

#### Preparation of Ethyl 10-phenylisoalloxazine-3-acetic acid. (FI 4)

Ethyl 10-phenylisoalloxazine-3-acetate (300 mg, 0.80 mmol) was dissolved in concentrated hydrochloric acid (8.0 mL), and the mixture was stirred at 110 °C for 2 h. After the reaction mixture was cooled, and water was added to the solution. The yellow crystals were precipitated. The crystals were collected by filtration, washed with water, and dried in vacuo to give the title compound (206 mg, 74%). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 4.55 (s, 2 H, NCH<sub>2</sub>CO), 6.81 (d, *J* = 9.29 Hz, 1 H, ArH), 7.47-7.51 (m, 2 H, ArH), 7.63-7.83 (m, 5 H, NPh), 8.27 (dd, *J* = 1.1, 8.15 Hz, 1 H, ArH).

#### FI-5

##### Preparation of Ethyl 8-chloro-7,10-dimethylisoalloxazine-3-acetate

The crude product containing 8-chloro-7,10-dimethylisoalloxazine<sup>22,23</sup> (806 mg, 2.91 mmol) and anhydrous potassium carbonate (2.24 g, 16.2 mmol) were suspended in dry DMF (100 mL). To this suspension was added ethyl bromoacetate (2.00 g, 12.0 mmol), and the mixture stirred at 40-50 °C for 5 h under N<sub>2</sub>. The reaction mixture was filtered, and DMF was removed by rotary evaporation. Water was added to the resulting solid and the mixture was extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. The combined organic phases were dried over anhydrous magnesium sulfate, and the CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> was removed in vacuo. The crude product was purified by silica gel column chromatography (CHCl<sub>3</sub>/MeOH = 10 : 1, R<sub>f</sub>=0.56) to give a title compound (404 mg, 43% for 5-chloro-*N*,4-dimethyl-2-nitroaniline). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 1.30 (t, *J* = 6.9, 7.2 Hz, 3 H, CO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2.56 (s, 3 H, 7-CH<sub>3</sub>), 4.10 (s, 3 H, 10-NCH<sub>3</sub>), 4.24 (q, *J* = 7.1 Hz, 2 H, CO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 4.86 (s, 2 H, NCH<sub>2</sub>CO), 7.67 (s, 1 H, ArH), 8.18 (s, 1 H, ArH).

##### Preparation of 8-chloro-7,10-dimethylisoalloxazine-3-acetic acid (FI 5)

Ethyl 8-chloro-7,10-dimethylisoalloxazine-3-acetate (250 mg, 0.69 mmol) was dissolved in concentrated hydrochloric acid (2.0 mL), and the mixture was stirred at 50-80 °C for 5.5 h. After the reaction mixture was cooled, and water was added to the solution. The yellow crystals were precipitated. The crystals were collected by filtration, washed with water, and dried in vacuo to give the title compound (205 mg, 89%). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 2.51 (s, 3 H, 7-CH<sub>3</sub>), 3.99 (s, 3 H, NCH<sub>3</sub>), 4.57 (s, 2 H, NCH<sub>2</sub>CO), 8.13 (s, 1 H, ArH), 8.20 (s, 1 H, ArH).



### 3.5 References

- (1) For review about catalytic BV reaction, see: (a) Brink, G.; Arends, I. W. C. E.; Sheldon, R. a; Corma, A.; Garcia, H. *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 4105. (b) Liang, Y.; Wei, J.; Qiu, X.; Jiao, N. *Chem. Rev.* **2018**, *118*, 4912–4945. (c) Uyanik, M.; Ishihara, K. *ACS Catal.* **2013**, *3*, 513–520.
- (2) Yamada, T.; Takahashi, K.; Kato, K.; Takai, T.; Inoki, S.; Mukaiyama, T. *Chem. Lett.* **1991**, *20*, 641–644.
- (3) Murahashi, S. I.; Oda, Y.; Naota, T. *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 7557–7560.
- (4) Bolm, C.; Schlingloff, G.; Weickhardt, K. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1994**, *33*, 1848–1849.
- (5) For selected examole of catalysis of carbone material, see: (a) Nabae, Y.; Rokubuichi, H.; Mikuni, M.; Kuang, Y.; Hayakawa, T.; Kakimoto, M. *ACS Catal.* **2013**, *3*, 230–236.
- (6) Wang, L.; Wang, Y.; Du, R.; Dao, R.; Yuan, H.; Liang, C.; Yao, J.; Li, H. *ChemCatChem* **2018**, *10* (21), 4947–4952
- (7) For reports of BVMO-catalyzed BV reaction, see: (a) De Gonzalo, G.; Mihovilovic, M. D.; Fraaije, M. W. *ChemBioChem* **2010**, *11*, 2208–2231. (b) Leisch, H.; Morley, K.; Lau, P. C. K. *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 4165–4222.
- (8) Imada, Y.; Iida, H.; Murahashi, S. I.; Naota, T. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 1704–1706.
- (9) For review of flavin-catalyzed oxidation reactions, see: (a) Imada, Y.; Naota, T. *Chem. Rec.* **2007**, *7*, 354–361. (b) Iida, H.; Imada, Y.; Murahashi, S.-I. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 7599–7613. (c) Cibulka, R. *Eur. J. Org. Chem.* **2015**, *2015* 915–932.
- (10) For recent reports of aerobic oxidation reactions using 4a-hydroperoxyflavin derivertives, see: (a) Imada, Y.; Osaki, M.; Noguchi, M.; Maeda, T.; Fujiki, M.; Kawamorita, S.; Komiya, N.; Naota, T. *ChemCatChem* **2015**, *7*, 99–106. (b) Arakawa, Y.; Oonishi, T.; Kohda, T.; Minagawa, K.; Imada, Y. *ChemSusChem* **2016**, *9*, 2769–2773 (c) Sakai, T.; Kumoi, T.; Ishikawa, T.; Nitta, T.; Iida, H. *Org. Biomol. Chem.* **2018**, *16*, 3999–4007. (d) Chevalier, Y.; Ki, Y. L. T.; Nouen, D. le; Mahy, J.-P.; Goddard, J.-P.; Avenier, F. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018** *57* (50), 16412–16415.
- (11) For selective examples of enantioselective BV reactions with flavin catalyst using H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, see: (a) Murahashi, S.-I.; Ono, S.; Imada, Y. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2366–2368. (b) Poudel, P. P.; Arimitsu, K.; Yamamoto, K. *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 4163–4166.
- (12) With other organocatalyst and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, see: (a) Xu, S.; Wang, Z.; Zhang, X.; Zhang, X.; Ding, K. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 2840–2843. (b) Xu, S.; Wang, Z.; Li, Y.; Zhang, X.; Wang, H.; Ding, K. *Chem. A Eur. J.* **2010**, *16*, 3021–3035. (c) Romney, D. K.; Colvin, S. M.; Miller, S. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 14019–14022. (e) Alford, J. S.; Abascal, N. C.; Shugrue, C. R.; Colvin, S. M.; Romney, D. K.; Miller, S. J. *ACS Cent. Sci.* **2016**, *2* (10), 733–739. (d) Featherston, A. L.; Shugrue, C. R.; Mercado, B. Q.; Miller, S. J. *ACS Catal.* **2018** *ACS Catal.* **2019**, *9*, 242–252.
- (13) (a) Akagawa, K.; Fujiwara, T.; Sakamoto, S.; Kudo, K. *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 8040. (b)

- Arakawa, Y.; Wiesner, M.; Wennemers, H. *Adv. Synth. Catal.* **2011**, *353*, 1201–1206. (c) Nakai, Y.; Uozumi, Y. *Org. Lett.* **2005**, *7*, 291–293., and references therein.
- (14) For reports of BVMO-catalyzed regiodivergent BV reaction, see: (a) Petit, F.; Furstoss, R. *Tetrahedron: Asymmetry* **1993**, *4*, 1341–1352. (b) Alphand, V.; Furstoss, R. *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 1306–1309. (c) Martinoli, C.; Dudek, H. M.; Orru, R.; Edmondson, D. E.; Fraaije, M. W.; Mattevi, A. *ACS Catal.* **2013**, *3*, 3058–3062.
- (15) (a) Eisner, U.; Kuthan, J. *Chem. Rev.* 1972, *72*, 1–42. (b) Iida, H. Doctor thesis, Osaka Univ., 2005.
- (16) Saito, K.; Horiguchi, K.; Shibata, Y.; Yamanaka, M.; Akiyama, T. *Chem A Eur. J.* **2014**, *20*, 7616–7620.
- (17) White, M. C.; Zhao, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 13988–14009.
- (18) (a) Krepski, L. R.; Hassner, A. *J. Org. Chem.* **1978**, *43*, 2879–2882. (b) Zhou, L.; Liu, X.; Ji, J.; Zhang, Y.; Hu, X.; Lin, L.; Feng, X. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 17023–17026.
- (19) Bräuer, T. M.; Zhang, Q.; Tiefenbacher, K. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 17500–17507.
- (20) Kirsch, P.; Schönleben-Janias, A.; Schirmer, R. H. *Liebigs Ann.* **1995**, *1995*, 1275–1281.
- (21) Takeda, J.; Ota, S.; Hirobe, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 7677–7688.
- (22) patent: WO 2011126567 A1, 2011, page 210.
- (23) patent: WO 03/080125 A2, 2003, page 48.

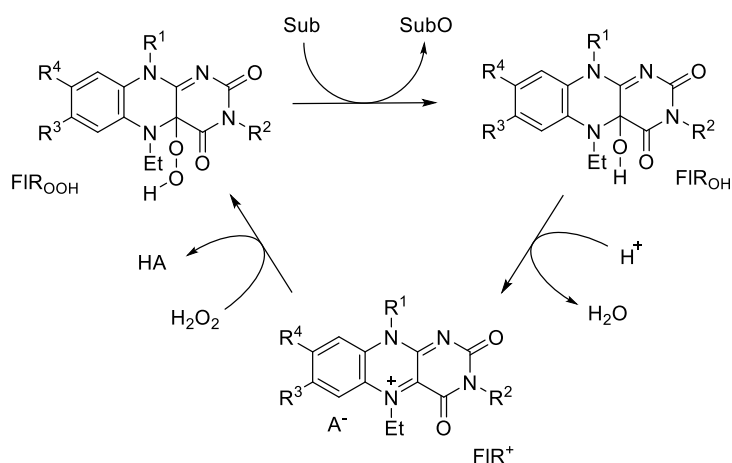
## 第四章 ペプチド鎖を有するフラビン分子触媒による過酸化水素酸化反応の開発

- 4.1 Introduction
- 4.2 Results and Discussion
  - 4.2.1 Flavopeptide-catalyzed sulfoxidation with hydrogen Peroxide
  - 4.2.2 Flavopeptide-catalyzed oxidation of secondary amine with hydrogen Peroxide
  - 4.2.3 Bayer-Villiger oxidation with flavopeptide
- 4.3 Conclusion
- 4.4 References

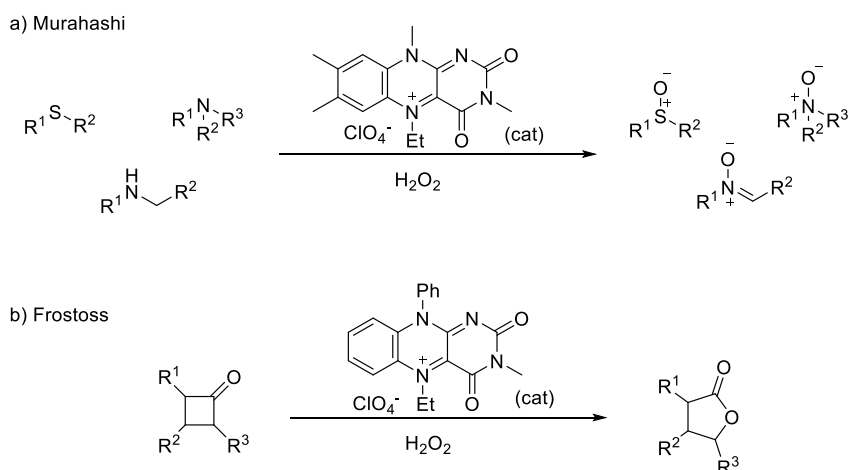
### 4.1 Introduction

酸化反応は合成化学において最も基本的な反応であり古くから様々な酸化剤や触媒が研究されてきたが、近年は特に元素戦略と環境負荷の低減の2点を考慮した反応の開発が求められている。この要求を満たす方法として過酸化水素と有機分子触媒を用いた酸化反応が注目を集めている<sup>1,2</sup>。過酸化酸素は安価かつ取り扱いが容易なうえ、反応後の副生成物が水のみであるという優れた特徴を持つため、理想的な末端酸化剤である。有機分子触媒は金属フリーの反応開発を目指して広く研究されており、様々な触媒の開発と合成反応への応用が数多く報告されている。

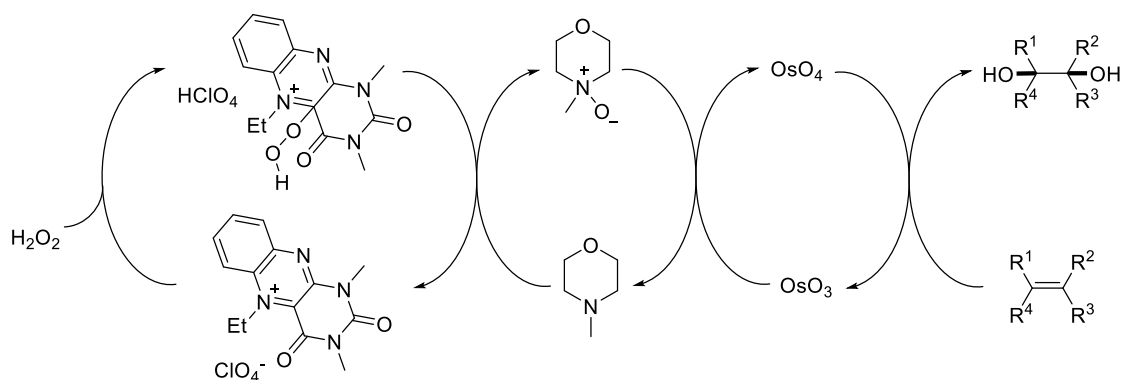
N5位無置換フラビン (**FI**) はフラビン酵素の活性中心に存在する複素環構造を有する分子である<sup>3</sup>。フラビン酵素の活性中心のモデル化合物として、**FI**の誘導体である **FIEt<sup>+</sup>**は古くより用いられてきた<sup>3a,4</sup>。1989年に村橋らはフラビン酵素のシミュレーションより N5位置換型フラビン (**FIEt<sup>+</sup>**) と過酸化水素による触媒的なスルフィドやアミンの酸化を報告している<sup>5</sup>。過酸化水素は **FIEt<sup>+</sup>**へ付加して対応する活性種 4a-ヒドロペルオキシフラビン (**FIEt<sup>+</sup>oon**) が生成される。これが基質を酸化すると 4a-ヒドロキシフラビン (**FIEt<sup>+</sup>oh**) が生じ、脱水過程を経て **FIEt<sup>+</sup>** が再生することで触媒サイクルが完結する (Figure 1)。Furstoss らは 1996年に **FIEt<sup>+</sup>**による BV 反応を報告したり、Bäckvall らは **FIEt<sup>+</sup>**の第三級アミンの酸化能と Os 触媒を組み合わせることでオレフィンのジヒドロキシル化反応を達成している (Figure 2, 3)<sup>5</sup>。これらの報告以降、**FIEt<sup>+</sup>**を用いた様々な過酸化水素酸化が報告されており、これらはグリーンな触媒系として注目を集めてきた<sup>6</sup>。



**Figure 7.** Catalytic cycle of FIET<sup>+</sup>-catalyzed oxygenation reactions with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.



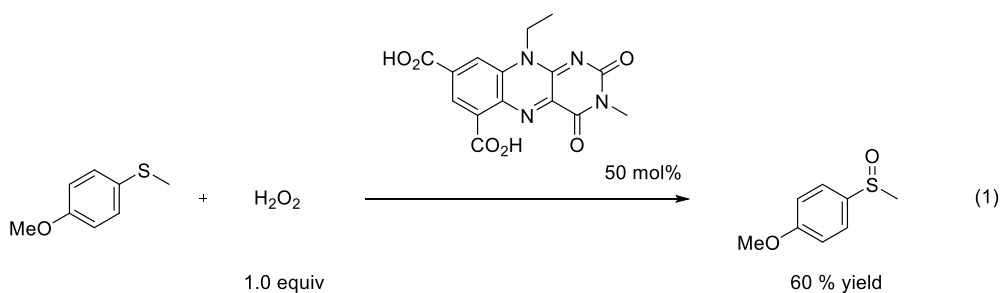
**Figure 8.** FIET<sup>+</sup>-catalyzed oxygenation reactions with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.



**Figure 9.** Dihydroxylation of alkene using OsO<sub>4</sub>-NMM-flavin-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

一方、酵素の活性中心と等しい構造である **FI** と過酸化水素酸化による酸素添加反応は対応す

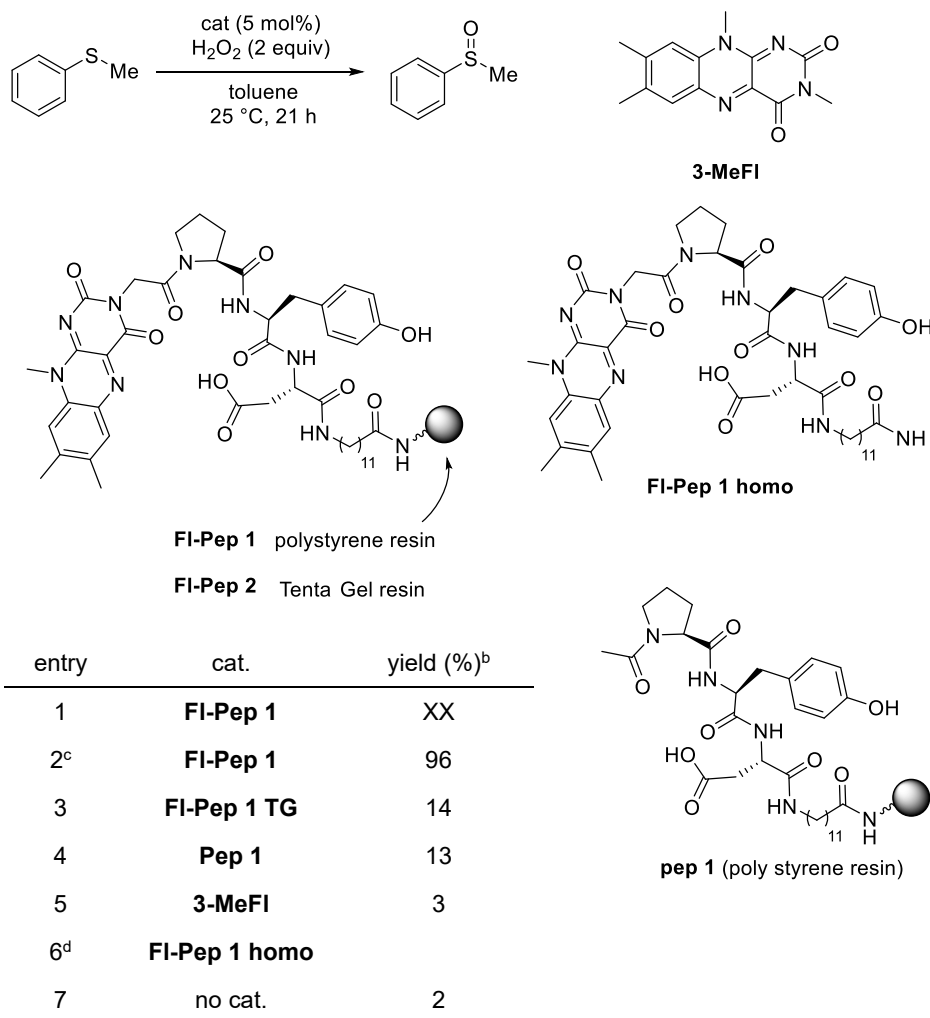
る **Floox** が不安定であるために困難であることは以前より知られていた。中性フラビン分子の触媒的過酸化水素酸化への応用は 1992 年の米田ら報告のみである<sup>7</sup>。彼らは 6、8 位にカルボキシル基を導入した **F1** をスルフィドに対して 50 mol% 用いると、60% 収率で目的のスルホキシドが得られたことを報告している。この触媒系は効率の点で改善の余地が残されており、反応活性種についての詳細な検討もなされていなかった。私は独自に設計したフラボペプチドが酸素酸化反応において高い活性を示したことをもとに **F1** と過酸化水素から直接的に活性種 **Floox** を生成させることができれば、生成した活性種は水素結合による安定化を受けて基質を酸化することが可能ではないかと仮説を立てた。第 4 章ではスルフィドの酸化反応、第二級アミンのニトロンへの酸化反応、ケトンの BV 反応における **F1-Pep** の触媒活性を評価した。



## 4.2 Results and Discussion

### 4.2.1 Flavopeptide-Catalyzed Sulfoxidation with Hydrogen Peroxide

**Table 7.** FI-Pep-catalyzed oxidation with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and the effect of resin and peptide in oxidation.<sup>a</sup>

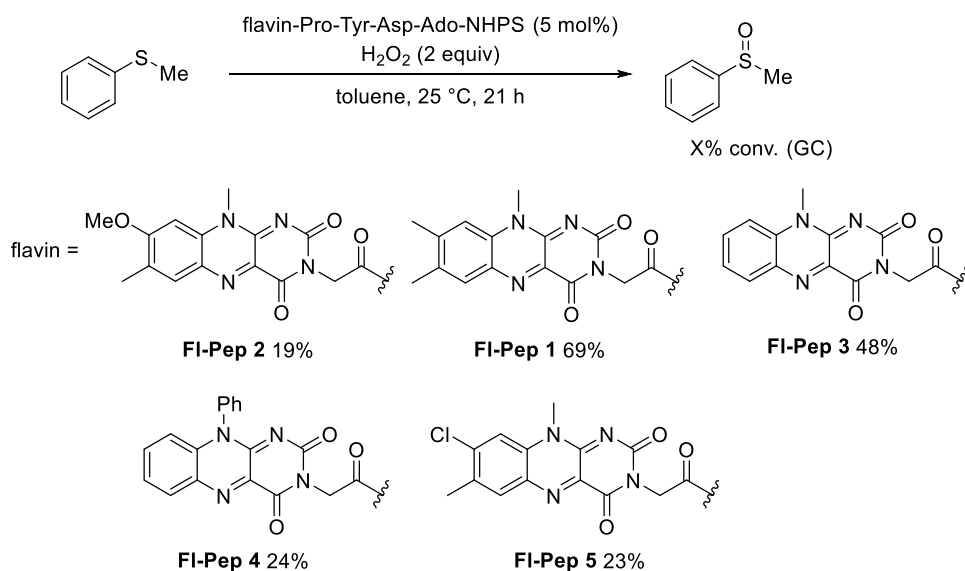


<sup>a</sup> The reactions were performed using 0.1 mmol of sulfide and 0.2 mmol of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in 0.5 mL of toluene at 25 °C. <sup>b</sup> in 48 h. <sup>c</sup> In 60 h. <sup>d</sup> A toluene—MeOH (9:1, 0.1 M) mixed solvent was used.

まずスルフィドの過酸化水素酸化において FI-Pep の活性を評価した (Table 1)。触媒は酸素酸化反応において最も活性の高かった Pro-Ty-Asp から成る 3-FIC2-Pro-Tyr-Asp-Ado-NHPS (**FI-Pep 1**) を 5 mol% と 35%過酸化水素水を 2 等量用い、トルエン中、25°C下で攪拌した。21 時間後に GC 測定を行ったところ、基質の転化率は 69%であった。この結果と触媒を加えなかった場合や単純な 3-methylflavin (**3-MeFI**) もしくはペプチドのみ (**Pep 1**) を用いた場合と比

較すると明らかに **FI-Pep 1** が高い活性を有することがわかった。興味深いことに樹脂を両親媒性の Tenta Gel resin<sup>8</sup> に変更した **FI-Pep 2** や均一系触媒 **FI-Pep 3** は **FI-Pep 1** ほどの酸化活性を示さず、**FI-Pep 1** の疎水的なポリスチレン樹脂が効率的に反応を促進するために必須であることが明らかとなった。

**FI-Pep** のフラビンの電子状態が酸化反応に与える影響を調べるために異なるフラビン骨格から成る **FI-Pep** を合成し、チオアニソールの酸化反応に用いた (Figure 5)。反応効率は酵素と同じ骨格のフラビン環を有する **FI-Pep** が最も高くなり、電子不足になるにつれて、効率が下がった。電子豊富な **FI-Pep 2** も活性が低く、これは過酸化水素のフラビンへの付加が遅いためだと考えられる。



**Figure 10.** Catalytic activity and electron density of flavin.

#### 4.2.2 Catalytic Oxidation of Secondary Amine to Nitrone with FI-Pep catalyst using H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

**Table 8.** Effect of base in FI-Pep-catalyzed oxidation of dibenzylamine using H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.<sup>a</sup>

c1ccc(cc1)CN(c2ccccc2)c3ccccc13
 $\xrightarrow[\text{PhMe (0.2 M), 60 }^\circ\text{C}]{\text{FI-Pep 1 (10 mol\%), base (10 mol\%), H}_2\text{O}_2 \text{ (4 equiv)}}$ 
c1ccc(cc1)N(=O)C=C(c2ccccc2)c3ccccc13

procedure

FI-Pep  
 base  
 PhMe

sub, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>  
 rt, 1 h      60 °C

NMM      G1

entry	conditions	time	amine : nitrone <sup>b</sup>
1	<b>FI-Pep 1</b>	40 h	42:58
2	no cat	40 h	>99:1
3	<b>FI-Pep 1</b> (at 40 °C)	24 h	>99:1
4	<b>FI-Pep 1</b> + NMM	40 h	full conv.
5	<b>FI-Pep 1</b> + NMM	24 h	27:73
6	NMM	24 h	>99:1
7	<b>FI-Pep 1</b> + NMM (at 40 °C)	24 h	62:38
8	<b>FI-Pep 1</b> + pyridine	24 h	19:81
9	pyridine	24 h	79:21
10	<b>FI-Pep 1</b> + Et <sub>3</sub> N	40 h	48:52
11	<b>FI-Pep 1</b> + <i>i</i> Pr <sub>2</sub> NEt	40 h	27:73
12	<b>FI-Pep 1</b> + G 1	40 h	29:71
13	<b>FI-Pep 1</b> + K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> aq	40 h	>99:1
14	<b>FI-Pep 1</b> + NH <sub>3</sub> aq	40 h	45:55

<sup>a</sup> The reactions were performed using 0.1 mmol of dibenzylamine and 0.4 mmol of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> with FI-Pep catalyst in 0.5 mL of toluene. <sup>b</sup> The ratio of amine and nitrone were determined by <sup>1</sup>H NMR.

アミン含有化合物の合成のためにニトロンは有用な合成中間体として幅広く使用されている<sup>9,10</sup>。私は反応適応範囲の拡大を狙い、FI-Pepによる第二級アミンのニトロンへの過酸化水素酸化を行った。FI-Pepのみを用いた場合、40 °Cではほとんど反応は進行せず、60 °C下で反応を



行くと目的のニトロンの生成が確認された (Table 2)。Fl-Pep 1 はカルボキシル基を有するため、系内ではそのアミン塩が活性種だと考えた。酸素酸化反応においてもヒドラジニウム塩が酸化活性種だと考えているので、塩基の構造が活性に大きく影響すると考え、塩基の検討を行った。実験手順は上図の通り。NMM を用いた場合は効率的に反応が進行し、40 時間で定量的に反応が進行し (entry 1 vs 4)、NMM のみでは活性がなかったことより Fl-Pep 1 の NMM 塩が高活性であることが分かった。この時 NMM の酸化体は確認されず、ヒドロキシルアミンやニトロンの加水分解生成物は 1% 以下であった。ピリジンを加えた場合は反応速度が最も早かったが、ピリジンのみでも反応の進行が確認された (entries 8, 9)。他の有機及び無機塩基を加えた場合には NMM 程の加速効果は見られなかった。

NMM を添加した場合にもヒドラジン存在下の酸化反応と同様に Fl-Pep 1 の Asp 残基の側鎖カルボン酸の共役酸が鍵となって反応が進行している。Figure XX に想定される相互作用を記す。

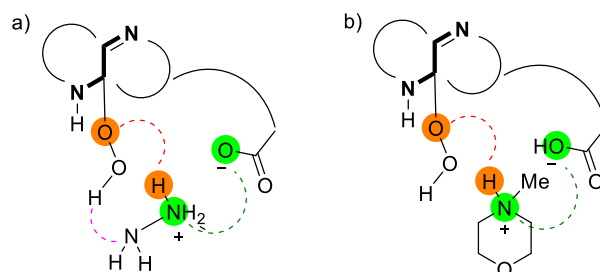


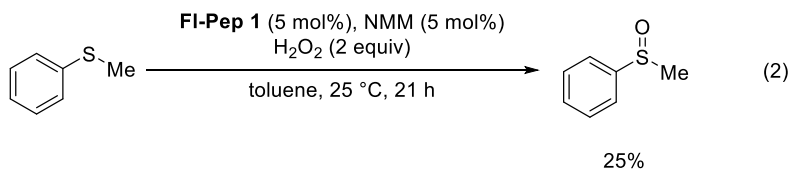
Figure 11. Proposed interlaction of FlOOH-hydrazine or NMM salt for the oxidation.

これらの結果を基にいくつかの第二級アミンに対して、少し条件を変更して FI-Pep-NMM 触媒による酸化を行った。ジベンジルアミンは対応するニトロンを良好な単離収率で与え (Table 2, entry 1)、ジブチルアミンと 1,1,2,2,-ヒドロイソキノリンについても中程度の収率で目的物を与えた (Table 2, entries 2, 3)。一般的な酸化剤を用いた場合には 1,1,2,2,-ヒドロイソキノリンはジアルキルアミンよりも酸化されやすく、**FI-Pep** を用いた場合も同様の傾向がみられ、25°C でも反応は進行した。

**Table 9.** FI-Pep 1-catalyzed oxygenation of secondary amine with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.<sup>a</sup>

entry	product	temp (°C)	time (h)	yield (%) <sup>b</sup>
1		60	48	83 <sup>c</sup>
2		60	48	74
3 <sup>d</sup>		25	28	70

<sup>a</sup> Reactions were performed using 1.0 mmol of amine and 4.0 mmol of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> with FI-Pep in 5 mL of toluene. <sup>b</sup> Determined by <sup>1</sup>H NMR analysis. <sup>c</sup> Isolated yield. <sup>d</sup> 0.1 mmol scale.

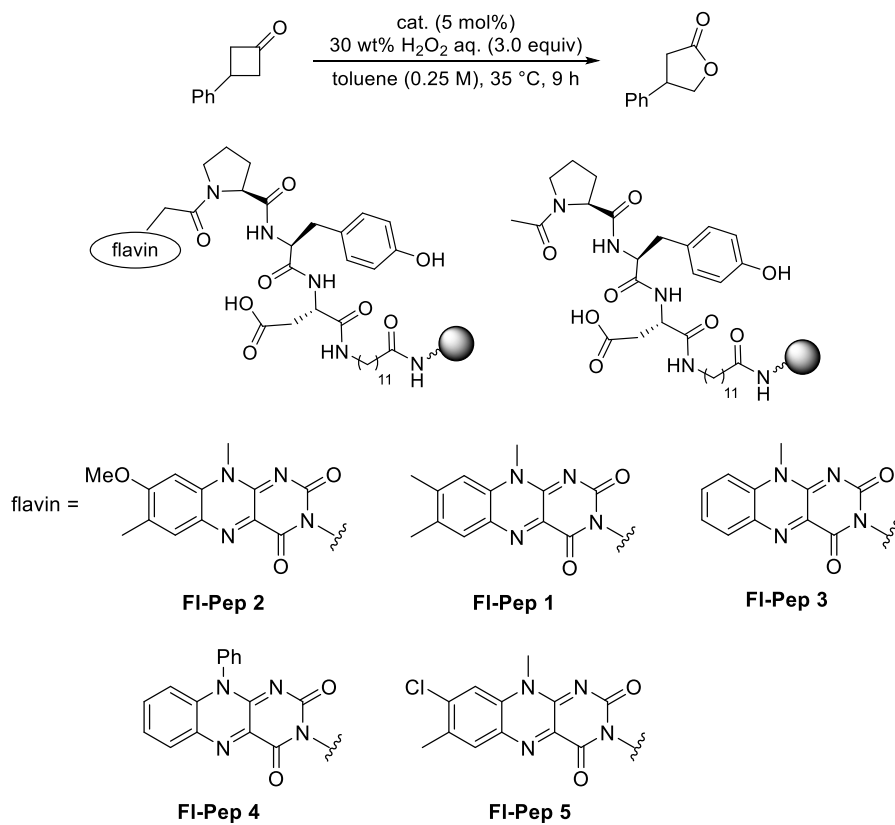


スルフィドの酸化においても NMM の添加を試みたが、反応の進行は遅くなった (式 2)。

#### 4.2.3 Baeyer-Villiger Oxidation with Flavopeptide using H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

求核的酸化である Baeyer-Villiger (BV) 反応において異なるフラビン骨格を有する触媒を合成し、それぞれの活性を評価した (Table 4)。FI-Pep を 5 mol% と 3 等量の過酸化水素水を用いて 3-phenylcyclobutanone の酸化をトルエン中、室温で行ったところ、フラビン酵素本来の活性中心と等しい構造を有する FI-Pep 1 よりも電子不足な FI-Pep 3 が最も高い活性を示し 70% 収率で目的のラクトンを与えた (entry 4)。FI-Pep 3 よりも更に電子不足な触媒 (FI-Pep 4, 5, entries 5, 6) や電子豊富な触媒 (FI-Pep 2, entry 1) では効率的な酸化は進行しなかった。また NMM の添加効果も見たが、僅かに反応が早くなったのみであった (entry 2 vs 3)。反応系はトルエンと過酸化水素水の二層系かつ FI-Pep 1 は固体であるにも関わらず効率的に働いたのはトルエンにより樹脂が膨潤していることが大きな要因であると考えられる。ペプチド (Pep 1) のみを触媒として用いた場合や触媒を加えなかった場合もラクトンの生成がみられた (entries 8, 9)。酸性条件下ではケトンと過酸化水素よりラクトンが得られることが報告されており<sup>11</sup>、Pep 1 の場合も Asp 残基のカルボン酸部位や Tyr の水酸基がブレンステッド酸として機能し反応が進行している。

**Table 10. FI-Pep-catalyzed BV reaction with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.<sup>a</sup>**



entry	cat.	conv. (%) <sup>b</sup>	yield (%) <sup>b</sup>
1	<b>FI-Pep 2</b>	52	32
2	<b>FI-Pep 1</b>	42	23
3 <sup>c</sup>	<b>FI-Pep 1</b>	45	29
4	<b>FI-Pep 3</b>	90	70
5	<b>FI-Pep 4</b>	51	27
6	<b>FI-Pep 5</b>	50	36
7 <sup>d</sup>	<b>FI-Pep 1</b>	32	18
8	<b>pep 1</b>	55	27
9	no cat.	36	13

<sup>a</sup> Reactions were performed using 0.1 mmol of ketone and 0.3 mmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> with 5 mol% of catalyst in 0.4 mL of toluene. <sup>b</sup> Determined by NMR analysis using dodecane as an internal standard. <sup>c</sup> NMM was added. <sup>d</sup> The reaction was carried out at room temperature for 12 h with 0.1 M of concentration.

### 4.3 Conclusion

単純な **3-MeFl** と過酸化水素を混合して生じる **4a**-ヒドロペルオキシ活性種は不安定であるために速やかに過酸化水素の脱離が進行し、酸化反応への応用が困難であった。一方、**Fl-Pep** は水素結合による活性種の制御を鍵とした酸素酸化反応を達成している。これを基に私は過酸化水素の **Fl-Pep** への付加から生じた **4a**-ヒドロペルオキシ活性種も前例と同様に制御可能であり、酸化反応への応用が可能だと考え、**Fl-Pep** をスルフィド、第二級アミン、ケトンの触媒的過酸化水素酸化反応へと応用した。温和な条件下で **Fl-Pep** はスルフィドを目的のスルホキシドへと酸化することが可能であり、狙い通りの結果が得られた。**Fl-Pep** は同様の求電子酸化である第二級アミンのニトロンへの酸化に対しても触媒的酸化能を示し、特に **NMM** を添加した場合には効率的に反応が促進された。これは **Fl-Pep 1** のカルボン酸部位のアミン塩が重要な働きをすることが示された。酸化反応を利用したアミン含有化合物の合成及び官能基変換は重要な研究分野であるにも関わらず<sup>9</sup>、有機分子触媒と過酸化水素による第二級アミンのニトロンへの酸化は **N5** 位置換カチオン性フラビンのみしか報告例がない。より効率的な **Fl-Pep** 触媒によるアミン類の酸化反応の開発が望まれる。求核的酸化反応である **BV** 反応においても **Fl-Pep** は酸化能を示し、特に酵素オリジナルのフラビン骨格よりも電子不足なフラビンが効率的に反応を促進させた。これらの結果より、**Fl-Pep** と過酸化水素を用いた反応は求核的及び求電子的な酸化反応において触媒活性があることが明らかとなった。

現段階では **Fl-Pep 1** の対応するヒドロペルオキシ体は分子内水素結合により適度に安定化されることにより活性種の失活を防ぎ、効率的に酸化反応を促進することができたためであると考えられる。活性種の安定化にはポリスチレン樹脂の疎水場も重要であることが両親媒性樹脂 (**Tenta Gel PS**) を用いた対照実験からも明らかとなり、フラビン、ペプチド、樹脂の全てが効率的な反応の促進に必要であった。

本触媒系は副生成物が水のみであるため環境負荷の低い優れた反応である点や担持触媒であるため回収再利用への応用が容易である点から、実用的な酸化触媒系としての今後の応用が期待される。

## 4.4 Experimental Section

### General

NMR spectra were recorded using JOEL JNK-ECX-400 spectrometer ( $^1\text{H}$ , 400 MHz), JNM-ECA-400 spectrometer ( $^1\text{H}$ , 400 MHz), and JNM-ECA-500W ( $^1\text{H}$ , 500 MHz). Chemical shifts were reported in ppm using TMS or the residual solvent peak as a reference;  $\text{CF}_3\text{COOH}$  (11.5 ppm for  $^1\text{H}$  NMR) or  $((\text{CH}_3)_2\text{SO})$  (2.50 ppm for  $^1\text{H}$  NMR). Gas chromatography analysis were carried out on Shimadzu GC-2010 by using a DB-1 glass capillary column (0.25 mm $\times$ 30 m).

### Materials

Flavins and Fl-Peps were prepared according to the procedure in chapter 2 and 3. Other reagents were used without further purification.

### General procedure for oxidation of thioanisole with Fl-Pep using $\text{H}_2\text{O}_2$ .

To a reaction mixture of **Fl-Pep 1** (5 mol%) and thioanisole (12.4 mg, 0.10 mmol) in toluene (0.5 mL) was added 30 %  $\text{H}_2\text{O}_2$  aq. (10  $\mu\text{L}$ , 0.20 mmol, 2.0 equiv) at 25  $^\circ\text{C}$  and stirred for 21–48 h. A resulting mixture was distilled with dichloromethane (0.5 mL), and the yield was determined by GC analysis.

### Effect of the base in the oxidation of secondary amine to nitron (table 2)

To 1 M of a solution of NMM in toluene (100  $\mu\text{L}$ , 10  $\mu\text{mol}$ , 10 mol%) were added Fl-Pep (10  $\mu\text{mol}$ , 10 mol%), dibenzylamine (19.7 mg, 100  $\mu\text{mol}$ ) and toluene (0.40 mL), and stirred for 1 h at room temperature. After an addition of  $\text{H}_2\text{O}_2$  aq. (20  $\mu\text{L}$ , 400  $\mu\text{mol}$ ), a reaction mixture was stirred at 60  $^\circ\text{C}$  for 24–48 h. A reaction mixture was distilled with acetonitrile (0.5 mL), and a ratio of amine and nitron was determined by  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy of the crude mixture.

### General procedure for oxidation of secondary amine to nitron

A mixture of secondary amine (1 mmol), Fl-Pep (0.08 mmol, 8 mol%) and NMM (0.08 mmol, 8 mol%) in toluene (0.5 mL) was stirred for 20 min at room temperature. After an addition of  $\text{H}_2\text{O}_2$  aq. (200  $\mu\text{L}$ , 4 mmol) a reaction mixture was stirred for 28–48 h at 60  $^\circ\text{C}$ .

### General procedure for Baeyer-Villiger reaction with $\text{H}_2\text{O}_2$

To a mixture of 3-phenylcyclobutanone (14.6 mg, 0.10 mmol), Fl-Pep (5  $\mu\text{mol}$ ) and dodecane (1  $\mu\text{mol}$ ) as an internal standard in toluene (0.4 mL) was added 30 wt%  $\text{H}_2\text{O}_2$  aq. (15  $\mu\text{L}$ , 0.30 mmol) at room temperature, and stirred at 35  $^\circ\text{C}$  for 9 h. The conversion of substrate and yield of product were determined by  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy of crude mixture.

## 4.5 References

- (1) For review on the oxidations with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, see: (a) Bryliakov, K. P. *Chem. Rev.* **2017**, *117*, 11406–11459. (b) Russo, A.; DeFusco, C.; Lattanzi, A. *ChemCatChem* **2012**, *4*, 901–916.
- (2) For selected examples of organocatalytic oxidation with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> other than flavin, see: oxidation of sulfide: (a) Liu, Z. M.; Zhao, H.; Li, M. Q.; Lan, Y. B.; Yao, Q. B.; Tao, J. C.; Wang, X. W. *Adv. Synth. Catal.* **2012**, *354*, 1012–1022. (b) Liao, S.; Čorić, I.; Wang, Q.; List, B. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 10765–10768., Baeyer-Villiger reaction: Xu, S.; Wang, Z.; Zhang, X.; Zhang, X.; Ding, K. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 2840–2843.
- (a) Peris, G.; Miller, S. J. *Org. Lett.* **2008**, *10*, 3049–3052.
- (b) Romney, D. K.; Colvin, S. M.; Miller, S. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 14019–14022. (c) Featherston, A. L.; Shugrue, C. R.; Mercado, B. Q.; Miller, S. J. *ACS Catal.* **2019**, *9*, 242–252.
- (3) (a) Ballou D. P. In *Flavins and Flavoproteins*; Massey, V., and Williams, C. H. Eds.; Elsevier: New York, 1082. (b) *Chemistry and Biochemistry of Flavoenzymes*; Müller, F., Ed.; CRC Press: Boston, 1991. (c) Poulsen, L. L.; Ziegler, D. M. *J. Biol. Chem.* **1979**, *254*, 6449–6455. (d) Kamerbeek, N. M.; Janssen, D. B.; van Berkel, W. J. H.; Fraaije, M. W. *Adv. Synth. Catal.* **2003**, *345*, 667–678. (e) Leisch, H.; Morley, K.; Lau, P. C. K. *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 4165–4222.
- (4) (a) Bruice, T. C.; Noar, J. B.; Ball, S. S.; Venkataram, U. V. *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 2452–2463. (b) Oae, S.; Asada, K.; Yoshimura, T. *Tetrahedron Lett.* **1983**, *24*, 1265–1268. (c) Merényi, G.; Lind, J. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 3146–3153.
- (5) For selected examples of flavin-catalyzed H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oxidation, see: (a) Murahashi, S. I.; Oda, T.; Masui, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 5002–5003. (b) Mazzini, C.; Lebreton, J.; Furstoss, R. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 8–9. (c) Jonsson, S. Y.; Färnegårdh, K.; Bäckvall, J. E. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 1365–1371. (d) Murahashi, S.-I.; Ono, S.; Imada, Y. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2366–2368.
- (6) Iida, H.; Imada, Y.; Murahashi, S.-I. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 7599–7613. (b) Imada, Y.; Naota, T. *Chem. Rec.* **2007**, *7*, 354–361. (c) Cibulka, R. *Eur. J. Org. Chem.* **2015**, *2015*, 915–932.
- (7) Akiyama, T.; Simeno, F.; Murakami, M.; Yoneda, F. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 6613–6620.
- (8) (a) Akagawa, K.; Fujiwara, T.; Sakamoto, S.; Kudo, K. *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 8040. (b) Arakawa, Y.; Wiesner, M.; Wennemers, H. *Adv. Synth. Catal.* **2011**, *353*, 1201–1206. (c) Nakai, Y.; Uozumi, Y. *Org. Lett.* **2005**, *7*, 291–293., and references therein.
- (9) For recent example of transformation of nitron, see: (a) Lisnyak, V. G.; Lynch-Colameta, T.; Snyder, S. A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 15162–15166. (b) Ye, C. X.; Melcamu, Y. Y.; Li, H. H.; Cheng, J. T.; Zhang, T. T.; Ruan, Y. P.; Zheng, X.; Lu, X.; Huang, P. Q. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 1–9.
- (10) For review on transformation of nitron, see: (a) Hashimoto, T.; Maruoka, K. *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 5366–5412. (b) Merino, P.; Tejero, T. *Synlett* **2011**, *14*, 1965–1977.
- (11) Ma, Q.; Zhao, J.; Xing, W.; Peng, X. *J. Adv. Oxid. Technol.* **2014**, *17*, 212–216.





## 謝辞

本研究は2013年4月から2019年3月まで徳島大学大学院理工学研究部 理工学部門 応用化学科の物質合成化学 A3 講座において、今田泰嗣教授と荒川幸弘助教の下で行ったものである。6年間もの長きにわたって、実験計画の立て方から論文の書き方までの研究活動の基礎を常に丁寧かつ親身にご指導いただきましたことに深く感謝を申し上げます。先生方の科学に対する熱意と多くのご助言のおかげで本研究をまとめることができました。

南川教授には NMR 測定の依頼の仲介役をして頂きましたこと、感謝申し上げます。また、日々の研究を共に行ってきた A3 講座の卒業生と在学生には多くのサポートと刺激を与えて頂きましたこと感謝申し上げます。特に大西崇裕さんと田上拓磨さんには私の学部時代からのお付き合いとなり、様々な場面でご支援を頂きましたこと、深く感謝申し上げます。同様に多くのご助言とご支援を頂きました徳島大学大学院理工学研究部 理工学部門 応用化学科の教員及び技術職員の方々にも深く御礼申し上げます。

本研究を行うにあたり豊橋技術科学大学の伊津野先生、原口先生にはご多忙の中、ペプチド自動合成装置を貸して頂きましたこと、徳島文理大学の田中教授には NMR 測定を行って頂きましたことも感謝申し上げます。

最後に、研究成果が見込めるか不確かにも関わらず、私のフラボペプチドの研究を2016年の4月よりを共に行ってくれました喜多葉月さんにも深く感謝を申し上げます。彼女の熱意と真摯さには非常に助けられました。

2019年3月

徳島大学大学院 先端技術科学教育部  
物質合成化学専攻 化学機能創生コース  
山野本 健