酵素による有機溶媒系での有機合成†

山田 靖 宙, 仁 平 卓 也

(大阪大学工学部)

有機合成反応は、近年その発展が著しく、有機金属化合物を含む多数の優れた反応剤、不斉反応剤、触媒が開発されつつある。一方、天然の生体触媒である酵素を有機合成、とくに不斉有機合成に利用しようという機運が近年とくに高まっている。酵素を用いる場合、酵素の持つ優れた立体特異性、位置特異性を水溶液中の反応で利用しようという方向と、酵素をなんとか有機溶媒中で用いようとする方向があるものと思われる。後者の場合の歴史的な流れとしては、

- ↓
- 固定化、とくに包括法による固定化酵素を用い、
- i) 水と混和可能な溶媒中で、混合比を種々変えて反応を行う。
- ↓
- ii) 水と混和しない溶媒中で反応を行う。
- ↓
- 遊離または固定化酵素を含む水溶液相と水と混和しない溶媒相との2相系で反応を行う。
- ↓
- ドライヘキサンなどの水と混和しない溶媒中に酵素を懸濁して反応を行う。
- i) ポリエチレングリコール付加^(1,2)やパルミチル化⁽³⁾などで酵素を有機溶媒可溶にして、用いる。
- ↓
- ii) 未修飾の酵素を凍結乾燥などで粉末状にし、水と混和しない溶媒に懸濁して用いる。
- となり、現在では、市販の酵素粉末を含水量 0.1% 程度

以下に調節した、水と混和しない溶媒に懸濁し反応させる方法が主流となっている。この方法は、いわば固定化酵素の延長線上にある方法であるが、有機溶媒に裸の酵素をさらすと、酵素中の疎水結合が破壊され、不可逆的な変性による失活をまねきやすいのではとの懸念から、応用が遅れていたものと考えられる。しかし、この偏見は Klibanov らの研究⁽⁴⁾により打ち破られることになる。彼らは、豚すい臓由来のリパーゼを用いているが、100°C での加熱処理という、水溶液中の場合には、きわめて速やかな失活をもたらす条件下でも、0.015% という低含水量の有機溶媒中であればリパーゼが安定であり、エステル交換反応を行いうることを示した。加熱処理時の失活の半減期は、溶媒中の水分量に依存し約 0.3% 以下では失活はほとんど生じない。彼らは、その後も研究を進め、水と混和しない溶媒中で酵素を用いる場合、あらかじめ酵素を至適 pH の緩衝液に溶解後、凍結乾燥を行うと高い反応効率が得られること⁽⁵⁾、酵素の厳密な基質特異性が有機溶媒中では緩み、たとえばペプチド合成によく用いられる subtilisin が L 体のみでなく、D 体をも基質として効率よく利用できるようになること^(6,7)、異種の官能基を持つ化合物、たとえば 6-アミノヘキサノールのアミノ基と水酸基を区別してアシル化することができること⁽⁸⁾、一分子中に複数の同じ官能基が存在する化合物、たとえば糖類について、位置選択的なアシル化が可能であること⁽⁹⁾など、有機合成上魅力的な諸特性を明らかにしており、有機溶媒中で酵素を利用する合成研究を加速したものといえる。

酵素による有機溶媒中での反応の適用例としては、リパーゼ、エステラーゼ、プロテアーゼによる加水分解の逆反応、またはエステル交換反応を利用して、エステル、アミド結合を作る反応が大部分である。これらの反応は、本来、化学反応としては容易であるので、酵素利用の利点はもっぱら不斉合成であり、光学純度の高い合成原料の簡単な調製法に應用されている。その他に、糖

† Enzyme Catalyzed Organic Synthesis in Organic Solvents.

Yasuhiro YAMADA and Takuya NIHIRA (Department of Biotechnology, Faculty of Engineering, Osaka University, Suita 565)

図1 リパーゼPによる大環状ラクトンの生成

類における位置選択的反応, ペプチドの合成, 水中では不安定な化合物の合成などがあるが, カルボン酸, アルコール, アミンの光学分割, ペプチド合成, 糖の転移反応などについては, 本ミニレビュー中の他の総説に譲り, 本稿ではラクトンおよびポリエステルの合成, ステロイドなどの位置選択的アシル化について述べる。

1. ラクトンおよびポリエステルの合成

リパーゼが持つ直鎖状エステルの不斉加水分解能を環状エステル, すなわちラクトンに応用したのが Blanco らの研究である^(10,11)。彼らは, 不斉炭素を持つ5~7員環ラクトンを溶媒中ではなく, pH 7 程度の緩衝液中で不斉加水分解し, 光学活性なラクトンを調製している。筆者ら⁽¹²⁾は, 非水溶媒中でのエステル交換反応を分子間ではなく, 分子内で行わせれば光学活性な大環状ラクトンが得られるのではないかと考えた。実際に, ω -ヒドロキシ酸のメチルエステルからドライベンゼンまたはヘキサン中, *Pseudomonas* 由来のリパーゼ (lipase P) により大環状ラクトンが生成した (図1)。20 種類以上のリパーゼを試みたが, ラクトン形成能を持つものは限られており, 大環状ラクトン形成能は, リパーゼの一般的性質ではない。モノマーラクトンの生成は基質の鎖長が C 16 の場合が最大であり, 鎖長が短くなるにつれ二量体のラクトン (ダイオライド) の生成が増加する (表1)。さらに, 不斉炭素を含む methyl 10-hydroxyundecanoate

表1 基質の鎖長と大環状ラクトンの収率

基質 $\text{HO}(\text{CH}_2)_n\text{COOCH}_3$	モノマーラクトン 単離収率(%)	ダイオライド 単離収率(%)
$n=10^a$	0	83
11 ^a	ND	66
12 ^b	38	25
13 ^c	64	9
14 ^d	78	ND
15 ^e	80	3

a) lipase P (ナガセ) 10 mg/ml; 基質 1 mM; ドライ *n*-ヘキサン 300 ml; 40°C, 60 h.

b) 10 mg/ml; 0.82 mM; ドライベンゼン 300 ml; 37°C, 61 h.

c) 10 mg/ml; 1 mM; ドライベンゼン 300 ml; 40°C, 45 h.

d) 10 mg/ml; 0.74 mM; ドライベンゼン 300 ml; 40°C, 6 days.

e) 10 mg/ml; 1 mM; ドライベンゼン 300 ml; 40°C, 58 h.

を基質とした場合, 低収率ではあるが 97% ee と光学純度の高い (−)-*R*-ダイオライドが生成しており, この lipase P によるラクトン化は, 期待どおり立体選択的でもある。しかし, 基質濃度が高いとダイオライド形成が優勢になるため, モノマーラクトン合成には 1 mM という高度希釈条件が必要な点とリングサイズを自由に選べないという問題点が残っている。太田ら⁽¹³⁾は, lipase P によりイソオクタン中図2に示すエステル交換反応を行った。R1=H, CH₃ の場合には, モノマーラクトンの収率は非常に低いが, R1=C₆H₁₃ のとき, 14~20% の収率で非常に高い ee のモノマーラクトンを得ている。興味深いのは, 生成するモノマーラクトンは, いずれも 13 員環になるが, その収率は基質の全体の鎖長に強く支配されるという点である。

その後, Sih らも筆者らの方法にならい, ジカルボン

R ¹	R ²	変換率 (%)	収率 (%)	ee %	[α] _D	絶対構造
H	CH ₂ CH ₂	100	0	—	—	—
CH ₃	CH ₂ CH ₂	57	6	—	—	—
C ₆ H ₁₃	CH ₂ CH ₂	91	14	>99	−5.5	R
C ₆ H ₁₃	CH=CH (<i>E</i>)	87	18	>99	+41.4	R
C ₆ H ₁₃	CH=CH (<i>Z</i>)	70	20	98	+32.2	R

図2 Lipase P によるヒドロキシエステルのラクトン化

図3 4-ヒドロキシピメリン酸ジエステルの不斉ラクトン化

酸とジオールから環状ポリマーを⁽¹⁴⁾, また ω および(ω -1) ヒドロキシカルボン酸からモノマー, ダイマー, トリマーラクトンを合成している⁽¹⁵⁾.

5.6 員環ラクトンの不斉合成に関しては, 筆者らと同様の方法で行った Gutman らの報告がある^(16,17). 彼らは, 豚すい臓リパーゼを用いたエーテル, またはヘキサン中, 不斉炭素を持つ methyl 4-hydroxypentanoate と methyl 5-hydroxyhexanoate をラクトン化させ, それぞれ光学活性な γ -ラクトンおよび δ -ラクトンの合成に成功している. また, プロキラルな 4-hydroxypimelic acid diester をヘキサン中リパーゼで不斉ラクトン化し, 定量的に 98% ee の R 体ラクトンを得ている (図3)⁽¹⁸⁾.

ラクトン化が分子内エステル交換反応であるのに対し, 分子間で反応が起こるとポリエステルが生成する. これには, 基質として ω -ヒドロキシ酸⁽¹⁹⁾, ジカルボン酸とジオール⁽²⁰⁾, およびジカルボン酸ジエステルとジオール⁽²¹⁾を用いた例がある.

2. 糖以外の化合物の位置選択的アシル化

化学的性質の全く等しい水酸基を2つ持つ直鎖状ジオール $\text{HO}(\text{CH}_2)_n\text{OH}$ のモノエステル化は, 化学反応では困難であるが, パパインにより磷酸緩衝液-ジクロロメタンの2相系で $n=2\sim10$ のジオールに対し *N*-*t*-butoxycarbonyl-Alanine (Boc-Ala-OH) をアシル化剤として 66~96% の収率で Boc-Ala モノエステルが得られている⁽²²⁾. Klibanov らは, 5 α -androstene-3 β , 17 β -diol について, 無水アセトン中, trifluoroethyl butyrate との間でエステル交換反応を行い, subtilisin によっては 17 位の, また *Chromobacterium viscosum* のリパーゼによ

っては, 3 位のモノアシル体得られることを報告している⁽²³⁾. Margolin ら⁽²⁴⁾は, 植物アルカロイドの castanospermine について, ピリジン中 subtilisin によるエステル交換を行い, 高収率で 1 位モノアシル体を得た (図4). また, 1 位モノアシル体を基質にすると, subtilisin では 6 位が, *Chromobacterium viscosum* リパーゼ (lipase CV) によっては 7 位が優先的にアシル化されることを見出している.

むすびに

以上, リパーゼの新しい応用例であるラクトンの合成を主として述べた. 有機溶媒中での酵素反応としては,他に環状無水物のリパーゼによる不斉開環反応^(25,26), ポリフェノールオキシダーゼによるフェノールの酸化⁽²⁷⁾, パーオキシダーゼによるリグニンの酸化⁽³⁾などが, 興味深いものであるが, 紙面の都合で省略した. 部位特異的の変異により, 野生体より 50 倍も無水ジメチルホルムアミド中で安定な subtilisin が作り出されている⁽²⁸⁾のがよい例であるが, 今後, 合成反応用触媒としてのニーズにより合う酵素が, タンパク質工学的手法や地道なスクリーニングにより生みだされることが期待される.

- (1) K. Takahashi, H. Nishimura, T. Yoshimoto, Y. Saito and Y. Inada: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **121**, 261 (1984).
- (2) Y. Inada, H. Nishimura, K. Takahashi, T. Yoshimoto, A. R. Saha and Y. Saito: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **122**, 845 (1984).
- (3) J. S. Dordick, M. A. Marletta and A. M. Klibanov: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **83**, 6255 (1986).
- (4) A. Zaks and A. M. Klibanov: *Science*, **224**, 1249 (1984).
- (5) A. Zaks and A. M. Klibanov: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **82**, 3192 (1985).
- (6) A. L. Margolin, D.-F. Tai and A. M. Klibanov:

図4 Castanospermine の位置選択的アシル化

- nov : *J. Am. Chem. Soc.*, **109**, 7885 (1987).
- (7) T. Sakurai, A. L. Margolin, A. J. Russell and A. M. Klibanov : *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 7236 (1988).
- (8) N. Chinsky, A. L. Maergolin and A. M. Klibanov : *J. Am. Chem. Soc.*, **111**, 386 (1989).
- (9) M. Therisod and A. M. Klibanov : *J. Am. Chem. Soc.*, **109**, 3977 (1987).
- (10) L. Blanco, E. Guibé-Jampel and G. Rousseau : *Tetrahedron Lett.*, **29**, 1915 (1988).
- (11) E. Guibé-Jampel, G. Rousseau and L. Blanco : *Tetrahedron Lett.*, **30**, 67 (1989).
- (12) A. Makita, T. Nihira and Y. Yamada : *Tetrahedron Lett.*, **28**, 805 (1987).
- (13) H. Yamada, S. Ohsawa, T. Sugai, and H. Ohta : *Chem. Lett.*, **1775**, 1989.
- (14) Z.-W. Guo and C. J. Sih : *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 1999 (1988).
- (15) Z.-W. Guo, T. K. Ngooi, A. Scilimati, G. Fülling and C. J. Sih : *Tetrahedron Lett.*, **29**, 5583 (1988).
- (16) A. L. Gutman, K. Zuobi and A. Boltansky : *Tetrahedron Lett.*, **28**, 3861 (1987).
- (17) A. L. Gutman, D. Oren, A. Boltansky and T. Bravdo : *Tetrahedron Lett.*, **28**, 5367 (1987).
- (18) A. L. Gutman and T. J. Bravdo : *Org. Chem.*, **55**, 3546 (1990).
- (19) A. Ajima, T. Yoshimoto, K. Takahashi, Y. Tamura, Y. Saito and Y. Inada : *Biotechnol. Lett.*, **7**, 303 (1985).
- (20) S. Okumura, M. Iwai and Y. Tominaga : *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 2805 (1984).
- (21) A. L. Margolin, J.-Y. Crenne and A. M. Klibanov : *Tetrahedron Lett.*, **28**, 1607 (1987).
- (22) D. Cantacuzène and G. Guerreiro : *Tetrahedron Lett.*, **28**, 5153 (1987).
- (23) S. Riva and A. M. Klibanov : *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 3291 (1988).
- (24) A. L. Margolin, D. L. Delinck and M. R. Whalon : *J. Am. Chem. Soc.*, **112**, 2849 (1990).
- (25) K. Yamamoto, T. Nishioka and J. Oda : *Tetrahedron Lett.*, **29**, 1717 (1988).
- (26) J. Hiratake, K. Yamamoto, Y. Yamamoto and J. Oda : *Tetrahedron Lett.*, **30**, 1555 (1989).
- (27) R. Z. Kazandjian and A. M. Klibanov : *J. Am. Chem. Soc.*, **107**, 5448 (1985).
- (28) C.-H. Wong, S.-T. Chen, W. J. Hennen, J. A. Bibbs, Y.-F. Wang, J. L.-C. Liu, M. W. Pantoliano, M. Whitlow and P. N. Bryan : *J. Am. Chem. Soc.*, **112**, 945 (1990).