生体触媒を用いる不斉合成に関する研究 および有用物質生産への応用[†]

(1994 年度農芸化学奨励賞受賞)

須 貝 威

(慶応義塾大学理工学部)

1. はじめに

有機合成化学は、一連の反応によって、簡単な原料をより複雑で、かつ生物活性など有用な機能を持つ化合物に変換することを可能とする。ここで、鏡像異性体の混入がその活性を阻害したり、副作用を示す場合には、光学純度の高い鏡像体の合成が要求される。近年、反応場や反応種を制御する手法や理論が急速な進歩を遂げ、光学活性物質の合成、すなわち不斉合成は大きく発展した。不斉合成は、純粋な有機合成化学的手法に限られるものではなく、酵素(=生体内でさまざまな代謝反応を巧妙につかさどる触媒)もまた同じ目的に利用可能である⁽¹⁾。酵素・微生物による生体触媒反応(高い立体選択性)を化学合成の経路(幅広い応用性)と組み合わせれば、簡単な原料を付加価値の高い有用物質に変換可能であると考える、本研究を開始した。生体触媒の立体化学認識能力を利用した不斉炭素の導入法は、その源である生物が本質的に自己増殖可能であるという点に、大きな特長がある。

不斉合成の反応剤としての生体触媒を開発するにあたっては、次のような要求が科せられる。すなわち、

- 1) 反応が新規で、興味深い光学活性体が得られること。
 - 2) 反応が、実験者の技量に左右されにくく、必要に応じたスケールアップが可能なこと。
 - 3) 鏡像体としての品質(光学純度)が一定であるか、または一定にしうる簡単な補助的手段があること。
- さらに、4) 有機合成との「相性のよさ」、つまり基質、

生成物ともに合成経路にとって有益であること、などが重要な判断基準となる。著者は、これらの観点に基づき、パン酵母やリパーゼなどを、入手容易で簡便に反応を行うことが可能な酵素源として用いることを追求する一方、新規反応を触媒する酵素の探索にもスクリーニングを通じて取り組んできた。以下に、その実例を挙げる。

2. 3-ヒドロキシブタン酸関連化合物の調製

古くから、微生物を用いるカルボニル化合物の還元反応によって光学活性なアルコールが得られることが知られてきた。この還元における1つの興味は、還元のエナンチオ・ジアステレオ選択性に関する制御である。生物活性天然物には、脂肪酸、ポリケチド生合成に由来する不斉炭素を分子内に持つものが数多く存在する。光学活性な3-ヒドロキシブタン酸エステルは、これらのものの出発原料として有用である。その(S)-体が、アセト酢酸エチルのパン酵母還元によって得られるという知見が報告されていたが、光学純度、比旋光度の値が報告者によってまちまちで、信頼性に欠けていた。

そこでまず、生成物の光学純度を物理化学的方法で正確に決定する方法を確立したのち、還元条件の検討を行った。その結果、85~92%程度の光学純度(*e.e.*)を有する生成物が再現性よく得られるようになり、光学純度の変動する要因は、主として基質濃度、通気条件であることが判明した⁽²⁾。より高い光学純度を有する生成物を追及して、酵母菌株のスクリーニングを行った。その結果、高温性酵母の一種、*Saccharomyces bayanus* KI 0116株を用いたところ、98% *e.e.* の(S)-体が得られることが判明した。一方、(R)-体に関しては、バイオポリマーの分解による調製法を確立した。上に述べたいずれの反応段階も蒸留による精製のみで済み、大きなスケールで

[†] Biochemical Asymmetric Synthesis and Its Application to Chemical Synthesis of Bioactive Compounds.
Takeshi SUGAI (Department of Chemistry, Keio University, Yokohama 223)

Fig. 1. Both Enantiomers of Ethyl 3-Hydroxybutanoate

の処理も可能であることから、天然物合成の原料として広く利用されている。

α -位に置換基を有する β -ケトエステルを還元すれば、求める立体化学を有する α -置換 β -ヒドロキシエステルが得られる可能性がある。そこで、立体選択的な還元を行える微生物の検索が、精力的に進められた⁽³⁾。また、培養条件、添加物、基質の構造等が、ジアステレオ・エナンチオ選択性両方に大きく影響を与えることも明らかにされた⁽⁴⁾。これらの研究などから、菌体内には複数の酵素が存在し、それぞれ最大速度を与える基質濃度が異なり、また、添加物によって阻害を受ける程度が異なるために選択性の変化が生じると説明されている。著者らは、基質を β -ケトエステルから対応するエノールエステルに変えて還元を試みた⁽⁵⁾。酵母がエノールエステルを加水分解する酵素を有するならば、つねに系内には低濃度でケトエステルが供給されることになり、選択性の変化が期待される。実際、パン酵母を用いて反応を試みると、ケトエステルを基質とした場合に比較して *syn* 体の割合が増加した。

次に、エノールエステルの面選択的加水分解、カルボニル基の還元という両方の反応を行うことが見出された *Pichia farinosa* IAM 4682 を用いて、反応を行ってみた。もし、面選択的に加水分解が進行し、異性化が起こるよりも速やかに還元が進行すれば、加水分解と還元の選択性の相乗効果が期待される。種々検討した結果、この酵母の対数増殖期においては加水分解酵素の発現が小さく、還元的能力が大きいことが判明した。そこで、培地に酵母の種菌を植えてから 6 時間後、対数増殖期にさしかかった段階でエノールエステルを加えたところ、菌の増殖に伴って基質が徐々に消失した。期待どおり、ケトエステルを基質とした場合と比較して生成物の光学純

Fig. 2. Preparation of 3-Hydroxyalkanoates

度が向上し、昆虫フェロモンの 1 種であるシトフィラートのエピ体 that 得られることが判明した⁽⁶⁾。

ところで現在では、BINAP-Ru 錯体を利用する、いわゆる野依法による不斉還元によって、光学活性な β -ヒドロキシエステル類は光学的に純粋な形で大量調製可能である⁽⁷⁾。今日の微生物還元 of 合成化学的意義の 1 つは、パン酵母と、基質と、糖類を混ぜて攪拌するという簡便さに見出すことが可能であろう。しかし、必ずしも光学純度が高い生成物が得られるとは限らない。生成物

Fig. 3. Synthetic Use of Tertiary α -Benzyloxy Esters

の光学純度をさらに高める方法が第二の重要な課題である。著者らは、アセト酢酸エチルをパン酵母還元して得られる 3-ヒドロキシブタン酸エチルの光学純度を、有機溶媒中リパーゼを用いる方法によってほぼ 100% とする簡便な補助的手段を確立した⁽⁸⁾。90% *e.e.* 程度の出発物質をブタン酸ビニル存在下リパーゼで処理すると、不純物として含まれる (R)-体がブタン酸エステルとして除去されるため、光学的に純粋な (S)-体を得ることが可能となった。

3. 三級アルコールを有する光学活性合成原料

光学活性三級アルコールを有する天然物は数多い。 α -位に光学活性三級アルコールを有するカルボン酸やエステルは、それらの化合物のよい出発原料となる。これまでにその調製法として、光学活性天然物からの誘導、光学分割、不斉合成法等さまざまな方法が工夫されてきた⁽⁹⁾。著者らは、 α -ヒドロキシエステルの水酸基をベンジルエーテルとして保護した化合物を基質として、微生物・酵素による加水分解をスクリーニングした。その結果、*Candida cylindracea* 由来のリパーゼが良好な立体選択性を示すことがわかった。とくに、側鎖にアシル基

を持つ化合物を用いた場合に好適であった。

この化合物から出発し、昆虫フェロモンの一種フロントリシン⁽¹⁰⁾、(R)-メバロノラクトン⁽¹¹⁾や光学活性ビタミンE中間体⁽¹²⁾の合成を行った。また、鈴木らによりビネオマイシン B₂⁽¹³⁾・フリダマイシン E⁽¹⁴⁾などの抗生物質の全合成の際、側鎖部分の鍵中間体として効果的に利用された。アシル基を側鎖に有する化合物は、側鎖、エステル部分のどちらの方向にも炭素鎖を延長可能である。このことは、光学分割の際に不可避な問題である「不要な光学異性体をいかに利用するか」という問題の解決への糸口を与えた。

4. 糖脂質合成に有用な、長鎖 α -および β -ヒドロキシ酸誘導体の光学活性体の調製

生体内両親媒性物質の活性発現には、疎水性の脂肪酸部分の絶対立体配置や鎖長が重要な役割を果たしている。構成成分である光学活性な長鎖ヒドロキシ脂肪酸の合成は、従来の多段階化学合成法、古典的な光学分割いづれによっても効率が悪く、実用合成に適しているとはいえないものであった。そこで酵素法による簡便な調製をめざして研究を開始した。

Fig. 4. Preparation of Longer Chain α - and β -Hydroxyalkanoates

これらのうち α -ヒドロキシ酸は、アミノアシラーゼを利用して光学分割された α -アミノ酸を van Slyke 反応に付すことによって合成可能である⁽¹⁶⁾。しかし、ヒドロキシ脂肪酸の鎖長が大きくなるにつれ、その誘導体は水、有機溶媒いずれにも溶解度が小さくなり、エマルジョンを形成しやすいという難点があった。著者らは、有機溶媒中、リパーゼを利用するエステル交換反応⁽¹⁶⁾に、解決法を見出した。高温の極性溶媒中、リパーゼの存在下酢酸ビニルを作用させることによって、ラセミ体 α -および β -ヒドロキシ酸が鏡像体選択的にアシル化される。生成物は分別再結晶で精製可能である⁽¹⁷⁾。この方法によって、たとえば 2-アセトキシテトラコサン酸の両鏡像体が容易に調製可能となり、このものは秋元ら⁽¹⁸⁾により海産セレブロシドの 1 種であるアゲラスフィン-9b の合成に利用されている。また、リポド A の構成成分である (R)-3-ヒドロキシテトラデカン酸の調製も達成した⁽¹⁹⁾。

5. 含窒素官能基の微生物加水分解における立体選択性

シアノ化合物、すなわちニトリルは、加水分解によってアミドやカルボン酸を与える、有機合成化学上重要な化合物である。しかし、加水分解反応の進行はエステルなどに比較すると遅く、一般に酸・アルカリの存在下加熱するという条件が必要である。この問題を解決するために、これまでに穏和な加水分解が可能である酵素法が開発され、工業化された例も数多い⁽²⁰⁾。著者らは、このような含窒素官能基を加水分解する酵素反応の立体化学に興味を持ち、ニトリル加水分解菌のスクリーニングを行った。ベンゾニトリルの加水分解能力を指標として見出した *Rhodococcus rhodochrous* (IFO に供託し、現在 15564 株) が、ラセミ体のニトリルに対し鏡像体選択的加水分解を行うことが判明した⁽²¹⁾。

次に、さまざまなプロキラル・メソ型ジニトリルの基質を合成し、反応を試みた。その結果、ジ置換マロノニ

Fig. 5. Enzymatic Hydrolysis of Nitriles

トリルに対し IFO 15564 株はエナンチオ場選択的加水分解を行うことが判明し、強誘電性液晶等の原料として有用な、光学活性アミドカルボン酸類が効率よく得られるようになった⁽²²⁾。この化合物の場合、ニトリルヒドラーゼの作用で生じる中間体のジアミドにアミダーゼが立体選択的に働くため、生成物が光学活性体となることがわかった。この酵素はともに疎水性置換基であるメチル基とブチル基の、立体障害の差をはっきりと識別する。このブチル基を各種芳香族置換基に換えた化合物でも、同様の立体選択的加水分解反応は進行した。また、3位に置換基を有するグルタニトリル型基質からは、光学活性シアノカルボン酸類が得られた⁽²³⁾。

6. 新しい糖質合成関連酵素の開発—糖鎖工学への応用

近年、化学的手法による複雑な糖鎖化合物の合成の発

展はめざましい⁽²⁴⁾。化学合成においては、単糖類の合成や、グリコシド結合形成の際に高い収率や位置・立体選択性を確保するため複雑な保護・脱保護の工程を必要とし、いわば「水溶性の化学」を、「脂溶性の化学」に置き換えているといえる。これに対し、酵素反応を用いれば無保護・高効率の直接的な合成が可能となり、糖を本来あるべき姿で取り扱える。その最も基礎としての、合成ブロックとなる単糖誘導体の酵素合成に取り組んだ。

シアル酸、KDN、KDO などの糖酸はガングリオシドやリポ多糖等の重要な生物機能を有するオリゴ糖の重要な構成部分である⁽²⁴⁾。これらの糖酸を中性糖とピルビン酸に生体内で分解（逆アルドール開裂）する糖酸アルドラーゼ類は、触媒する反応が可逆であるため、高濃度の基質存在下では糖酸の合成反応に利用可能である。実際に、シアル酸の合成法としてシアル酸アルドラーゼを用いる方法が知られている⁽²⁵⁾。この反応では、カルボニル

Fig. 6. Stereoselectivity of Aldolases

基に対するピルビン酸の付加が面選択的 (*si-face attack*) に進行し、その立体選択性はきわめて高い。

もし、*re-face attack* で反応が進行する相補的な面選択性を示す酵素も存在すれば、逆の立体化学を有する生成物が合成しうる。その候補として、KDO アルドラーゼが浮かび上がった。著者らは Wong および Shen によって見出された、*Aureobacterium barkeri* ATCC 49977 が産生する KDO アルドラーゼが示す立体選択性を、天然・合成基質を用いて検討した。その結果、これまで知られたシアル酸アルドラーゼとは相補的な立体要求性、面選択性を示す新規な酵素であることが判明した⁽²⁶⁾。KDN の両鏡像体合成において、そのことが明示されている。

ところで、これらのアルドール反応の後処理における最大の問題点は、大過剰 (7~10 当量) に用いたピルビン酸をいかに効率よく除去するかであった。著者らは、酵素が触媒する脱炭酸反応により過剰分のピルビン酸をアセトアルデヒドおよび二酸化炭素に分解する方法について検討した。その結果、脱炭酸反応に必要な補因子である Mg^{2+} およびチアミンピロリン酸の添加量の制御、

通気・攪拌装置の改良等によって、パン酵母中に含まれる脱炭酸酵素の活性を向上させ、実用に耐える反応系を構築することができた。

このピルビン酸除去法をアルドール反応と組み合わせで調製した D-KDN (59%) からオリゴ糖合成に有用な既知中間体を合成した⁽²⁷⁾。アルドール反応が高立体選択的に進行するので、従来法⁽²⁸⁾では不可避であった 4 位に関するジアステレオマーの分離の必要がない点が特長である。また、D-マンノースからの通算収率は 45% であり、これも従来法を凌いでいる。

本研究に対し、ご指導・ご鞭撻を賜りました東京大学農学部森 謙治教授、慶応義塾大学理工学部太田博道教授、Scripps 研究所 C.-H. Wong 教授に心より感謝申し上げます。多くのご助言とご激励をいただきました、北原 武教授、鈴木啓介教授、G.-J. Shen 博士、市川幸孝博士をはじめとする、農芸化学科有機化学研究室、化学科反応有機・酵素有機化学研究室、Wong group の皆様、さらに研究を支えてくださった内外の方々に厚く御礼申し上げます。

Fig. 7. Aldolase-Catalyzed Synthesis of D-KDN

- (1) 「ハイブリッドプロセスによる有用物質生産—生化学反応と有機合成反応の組合せ」, 化学増刊, Vol. 119, 山田秀明, 土佐哲也, 上野民夫共編, 化学同人, 京都, 1991; 「実験化学講座—有機合成 VIII」, 日本化学会編, 丸善, 東京, 1992; 太田博道: ファルマシア, 28, 1111—1115 (1992); 森 謙治, 須貝 威: 「酵素実験法 II」, 大野素徳, 崎山文夫, 高橋健治編, 廣川書店, 東京, 1993; 松村秀一, 戸嶋一敦: *Bio Industry*, 10, 265—274 (1993); 森 謙治: 化学と生物, 32, 126—130 (1994); 伊藤敏幸, 高木由美子: 有合化, 52, 59—71 (1994); C.-H. Wong and G. M. Whitesides: in “Enzymes in Synthetic Organic Chemistry,” Elsevier, New York, 1994.
- (2) 須貝 威, 藤田 満, 森 謙治: 日化, 1983, 1315—1320 (1983).
- (3) 秋田弘幸: 薬誌, 110, 789—794 (1990).
- (4) D. Buisson, R. Azerad, S. Sanner, and M. Larcheveque: *Biocatalysis*, 3, 85—93 (1990); 中村 薫, 大野惇吉: 有合化, 49, 110—117 (1991).
- (5) H. Ohta, N. Kobayashi, and T. Sugai: *Agric. Biol. Chem.*, 54, 489—493 (1990).
- (6) T. Sugai, D. Sakuma, N. Kobayashi, and H. Ohta: *Tetrahedron*, 47, 7237—7244 (1991).
- (7) R. Noyori: in “Asymmetric Catalysis in Organic Synthesis,” John Wiley & Sons, New York, 1994.
- (8) T. Sugai and H. Ohta: *Agric. Biol. Chem.*, 53, 2009—2010 (1989).
- (9) J. K. Whitesell, K. Nabona, and D. Deyo: *J. Org. Chem.*, 54, 2258—2261 (1989); 小林修: 「金属反応剤を用いる不斉化学合成」, 日本化学会編, 季刊化学総説 19, 学会出版センター, 東京, 1992, pp. 39—49.
- (10) T. Sugai, H. Kakeya, and H. Ohta: *J. Org. Chem.*, 55, 4643—4647 (1990).
- (11) T. Sugai, H. Kakeya, and H. Ohta: *Tetrahedron*, 46, 3463—3468 (1990).
- (12) T. Sugai, N. Watanabe, and H. Ohta: *Tetrahedron: Asymmetry*, 2, 371—376 (1991).
- (13) T. Matsumoto, M. Katsuki, H. Jona, and

- K. Suzuki : *J. Am. Chem. Soc.*, **113**, 6982—6992 (1991).
- (14) T. Matsumoto, H. Jona, M. Katsuki, and K. Suzuki : *Tetrahedron Lett.*, **32**, 5103—5106 (1991).
- (15) Y. Masaoka, M. Sakakibara, and K. Mori : *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 2319—2324 (1982) ; K. Mori and Y. Funaki : *Tetrahedron*, **41**, 2379—2386 (1985).
- (16) 須貝 威, 太田博道 : 有合化, **48**, 1070—1071 (1990) ; K. Faber and S. Riva : *Synthesis*, **1992**, 895—910 ; J.-M. Fang and C.-H. Wong : *Synlett*, **1994**, 393—402 (1994).
- (17) T. Sugai and H. Ohta : *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 3337—3338 (1990) ; T. Sugai and H. Ohta : *Tetrahedron Lett.*, **32**, 7063—7064 (1991) ; T. Sugai and H. Ohta : *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 293—294 (1991).
- (18) T. Natori, M. Morita, K. Akimoto, and Y. Koezuka : *Tetrahedron*, **50**, 2771—2784 (1994).
- (19) T. Sugai, H. Ritzén, and C.-H. Wong : *Tetrahedron : Asymmetry*, **4**, 1051—1054 (1993).
- (20) 長沢 透, 山田秀明 : 有合化, **48**, 1072—1073 (1990) ; K. Yamamoto, K. Oishi, I. Fujimatsu, and K. Komatsu : *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**, 3028—3032 (1991) ; Y. Ashina and M. Suto : *Bioprocess Technol.*, **16**, 91—107 (1993).
- (21) H. Kakeya, N. Sakai, T. Sugai, and H. Ohta : *Tetrahedron Lett.*, **32**, 1343—1346 (1991).
- (22) M. Yokoyama, T. Sugai, and H. Ohta : *Tetrahedron : Asymmetry*, **4**, 1080—1084 (1993).
- (23) H. Kakeya, N. Sakai, A. Sano, M. Yokoyama, T. Sugai, and H. Ohta : *Chem. Lett.*, **1991**, 1823—1824.
- (24) 「糖—その多様性を探る」 小川智也, 楠本正一編, 化学増刊 122, 化学同人, 京都, 1992.
- (25) C.-H. Lin, T. Sugai, R. L. Halcomb, Y. Ichikawa, and C.-H. Wong : *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 10138—10145 (1992) ; 梶本哲也, 須貝威, C.-H. Wong : *Trends Glycosci. Glycotech.*, **5**, 193—207 (1993) ; 太田泰弘, 塚田陽二 : バイオサイエンスとインダストリー, **51**, 909—910 (1993).
- (26) T. Sugai, G.-J. Shen, Y. Ichikawa, and C.-H. Wong : *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 413—421 (1993).
- (27) 須貝 威, 平松茂樹, 窪木厚人, 太田博道 : 農化, **68**, 518 (1994) (講演要旨集 ; 3 GP 09).
- (28) M. Nakamura, K. Furuhashi, T. Yamasaki, and H. Ogura : *Chem. Pharm. Bull.*, **39**, 3140—3144 (1991).