

### 3. リパーゼ加水分解反応のエナンチオ選択性を制御するホスト機能性分子

伊藤 敏幸<sup>1</sup>・高木由美子<sup>2</sup>・築部 浩<sup>3</sup> (岡山大学教育学部理科講座<sup>1</sup>,  
兵庫教育大学学校教育学部自然系教育講座<sup>2</sup>, 岡山大学理学部化学教室<sup>3</sup>)

#### 1. はじめに

リパーゼによるエステル類の不斉加水分解反応は、非天然分子の不斉合成にも有用であることが知られるようになり、有機合成のさまざまな場面で利用されるようになってきた。リパーゼは基質をさほどより好みしない酵素であるが、加水分解反応のエナンチオ選択性が高くないケースもしばしば認められる。たとえば、2-シアノ-1-メチルエチル=アセタートの(1)は官能基変換の容易なシアノ基とアセチル化された水酸基を持つ重要な合成中間体であり、光学活性体がリパーゼ加水分解によって得られればその有機合成上の意義は大きい。ところがラセミ体1をリン酸緩衝液中(pH 7.2)でリパーゼ加水分解したところ、市販酵素中でもっとも好結果を与えたリパーゼPSでさえも、45%の加水分解率で得られたアルコールの光学純度は61%eeであり、実用的な光学分割法とは言えない。このような場合、高い不斉選択性を有する新しい酵素を探ることが伝統的な解決方法であるが、何らかの手法でこの酵素の反応選択性を向上できれば、入手容易な酵素の特性をさらに活用できるであろう。通常の有機合成反応であれば、この程度まで選択性が確認できれば、さらなる反応条件の最適化を図ろうと考えるはずであり、酵素反応にもこのようなアプローチが可能ではと我々は考えた。すなわち、リパーゼPSをそのまま用いて新たなファクターを導入してエナンチオ選択性の向上を計ろうというわけである。溶媒効果などによりリパーゼ反応の選択性が制御できることが知られているが、<sup>2)</sup>我々は二つの観点からリパーゼ反応の制御を試みてきた。<sup>3,4)</sup>第一は、加水分解を受ける反応基質の分子設計指針を探ることである。すでに *Pseudomonas cepacia* リパーゼ(リパーゼPS)によるβ-アシロキンプチロニトリルの加水分解において、アシロ部位を硫黄などのヘテロ原子で修飾すると、リパーゼのエナンチオ選択性が制御できることを見いだした。<sup>3)</sup>第二はリパーゼの活性を左右する添加剤を開発することであり、L-メチオニールを基質に対して触媒量添加するだけで、加水分解反応のエナンチオ選択

性が向上することを明らかにし、<sup>4)</sup>さらに最近クラウンエーテルに代表されるホスト機能性分子も有効な添加剤となることを発見した。<sup>5)</sup>また、クラウン環骨格を持つエステル基質の加水分解反応ではクラウン環部位と錯形成しうる金属塩を添加すると著しくエナンチオ選択性が向上することも見いだした。<sup>6)</sup>本報ではクラウンエーテルなどホスト機能分子を添加剤とする2-シアノ-1-メチルエチル=アセタートの *P. cepacia* リパーゼによる加水分解反応を詳細に検討した。クラウンエーテルは酵素タンパクと錯形成できることが報告されているが、<sup>7)</sup>酵素機能のエナンチオ選択性に対する影響を調べた例は過去にない。我々はチアクラウンエーテルがエナンチオ選択性を大きく向上させることを見だし、その作用機構についても考察を行ったので報告したい。<sup>8)</sup>

#### 2. 実験結果と考察

現在、もっとも幅広く有機合成に活用されている酵素の一つであるリパーゼPSによるアセタート1の加水分解をモデル反応として選び、クラウンエーテル型添加剤によるエナンチオ選択性への効果を調べた(式1)。リパーゼPSはほぼ単一の酵素タンパク(分子量32,000)からなり、安定化のためのセライト系の無機物に吸着されて市販されている。<sup>9)</sup>なお、用いたクラウンエーテル型添加剤は緩衝溶液中のカオチン種と錯形成する可能性もあるため、加水分解反応は純水と補助溶媒であるアセトン(10:1)混合溶媒中で以下のように行った。リパーゼPSを純水に懸濁させ攪拌後3,000 rpmで5分間遠心分離を行い、上澄みを酵素液としてアセタート1と35°Cで一定時間反応させた後、生成したアルコール2と未反応のアセタート3をシリカゲル薄層クロマトグラフィーで分離し、それぞれの光学純度(%ee)をキラルキャピラリーガスクロマトグラフィー(Chiraldex G-Ta)で求めた(Fig. 1)。酵素のエナンチオ選択性の評価にあたってはSihらが提唱しているE値<sup>9)</sup>を利用した。

35種のホスト機能性分子の添加効果を調べたうち主な結果をTable 1に示す。添加剤を加えない場合、加

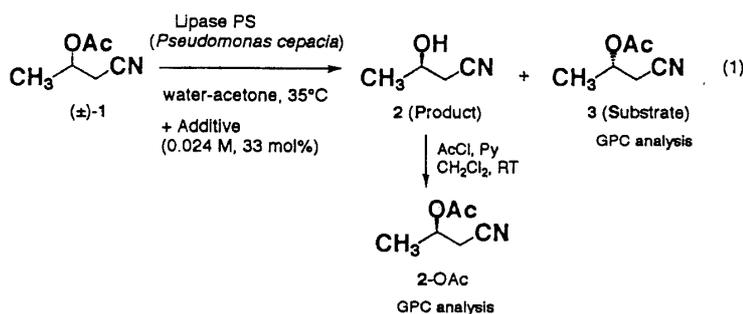


Fig. 1. Reaction scheme of the lipase catalyzed-hydrolysis.

水分解反応のエナンチオ選択性は反応の進行に伴って大きく変動し、40%程度の加水分解率(%conv.)で最大のE値を示した(Entry 2)。しかし、これ以上反応を続けると反応速度は極度に落ち込み、逆反応によってE値も低下した(Entry 3)。また、緩衝液中でも30%以上の加水分解率にならないとE値は一定とならず(Entries 5, 6)、このままでは光学分割法として実用に供するには難しいレベルにある。一般にE値は

加水分解率によって変動しないと考えられているが、反応系によっては取り扱いに注意を要する。反応系中にクラウンエーテル型添加剤を加えると、多くの場合加水分解速度は増加し、加水分解率にかかわらず高いエナンチオ選択性を与えることがわかった。エナンチオ選択性を大きく向上させたクラウンエーテル型添加剤の分子構造をFig. 2にまとめた。特にチアクラウンエーテル(Entries 15~21)、アームドクラウンエーテル

Table 1. Effect of crown compounds in the lipase-catalyzed hydrolysis.

Entry	Additive	Time (h)	c (%conv.)	Relative rate (c/h)	%ee of 2 (%yield)	%ee of 3 (%yield)	E
1	none	14	18	1.3	77 (18)	17 (48)	9
2	none	60	38	0.6	80 (35)	16 (40)	16
3	none	96	41	0.4	68 (41)	8 (51)	8
4	none <sup>a</sup>	3	8	2.7	75 (18)	6 (62)	8
5	none <sup>a</sup>	22	37	1.7	81 (20)	48 (43)	17
6	none <sup>a</sup>	33	52	1.6	75 (21)	80 (39)	16
7	#7	13	52	3.7	80 (48)	89 (32)	28
8	#18 (RS)	14	54	3.9	77 (54)	91 (44)	24
9	#19 (RS)	14	44	3.1	87 (40)	68 (39)	28
10	#19 (R)	19	46	2.4	81 (40)	68 (26)	20
11	#19 (S)	11	42	3.8	83 (42)	60 (30)	20
12	#19 (RS) <sup>a</sup>	6.5	35	5.4	83 (32)	46 (43)	18
13	#20 (RS)	14	46	3.3	87 (34)	72 (42)	30
14	#21	14	50	3.6	74 (40)	75 (32)	15
15	#22	13	41	3.2	84 (24)	59 (32)	22
16	#23	14	59	4.2	71 (39)	99 (40)	37
17	#24	14	57	4.1	74 (40)	99 (21)	34
18	#25	13	37	2.8	84 (24)	50 (38)	20
19	#26	14	57	3.1	79 (26)	99 (21)	34
20	#27	14	60	4.3	65 (39)	99 (33)	27
21	#28	13	42	3.2	84 ( 7)	61 (55)	21
22	#29 (RS)	15	32	2.1	85 (18)	41 (47)	18
23	#29 (S)	24	46	1.9	80 (45)	67 (44)	18

<sup>a</sup> Reaction was carried out at pH 7.2 in 0.1 M phosphate buffer.

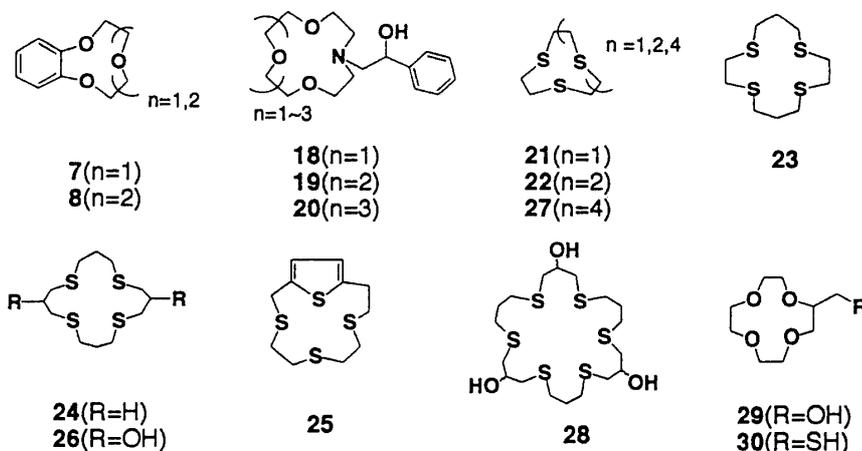


Fig. 2. Molecular aspects of the crown compounds.

(Entries 8~13)などの添加剤がE値と反応速度とを共に大きく向上させた。また、クラウンエーテルの添加量を増加させると加水分解速度は増加するが、エナンチオ選択性についてはチアクラウンエーテル23で5 mol%, ヒドロキシメチルクラウンエーテル29では33 mol%の添加量でそれぞれ閾値が存在することもわかった。Table 1に示したようにチアクラウンエーテル23を用いるとE値は最大37まで上昇し、無添加時(Entry 1)と比較して $1.4 \times 10^{12}$ 倍ものエナンチオ選択性の向上が確認された。我々が先に見いだしたヒドロキシメチル12-クラウン-4 (29)<sup>5)</sup>よりも、はるかにすぐれた添加剤がいくつも見つかったわけである。

塩基性のアザクラウンエーテルは加水分解によって生じた酢酸を捕捉できるとも考えられるが、塩基性もないチアクラウンエーテルが触媒量で反応速度とエナンチオ選択性を大きく向上させる現象は大変興味深い。そこでまず、基質アセタート1、ならびに生成物アルコール2とクラウンエーテルとの相互作用を<sup>13</sup>C NMRを用いて検討した。その結果、チアクラウンエーテルと基質エステルとの相互作用は認められなかったが、生成物アルコール2との間には顕著なスペクトル変化が観測され、アルコールがチアクラウンエーテルとの錯体形成によってトラップされ逆反応が抑制されている可能性が示唆された。

リパーゼによる加水分解反応は本質的に不均一系の反応であり、わずかなエネルギー差が反映されるエナンチオ選択性の要因を特定することは容易ではない。我々が見いだしたクラウンエーテル型添加剤の作用機構についても現在のところ不明な点が多いが、クラウンエーテルが酵素タンパクの表面を被い新しい環境場

を作り上げ、酵素活性を高めているのではないかと推測している。すなわち、酵素表面をある種コーティングしたクラウンエーテルが生成物を一時的に捕捉し、活性部位からバルク水相への拡散を早めた結果、逆反応が押さえられ基質アセタートの酵素への取り込みも促進され、反応速度とエナンチオ選択性がともに向上するのではと思われる。この際にクラウンエーテルは酵素タンパクの極性表面部位と相互作用し、加水分解酵素の機能変化をもたらしたと考えることができる。

リパーゼPSのX線結晶解析が完了していない現状では、早計に反応機構への立ち入った考察は避けるべきであるが、本研究では*P. cepacia* リパーゼのエナンチオ選択性を添加剤の活用によって制御するというアイデア実現のため、手ごたえあるリード化合物を見いだすことができた。しかし、これらの添加剤は、酵素本来のエナンチオ選択性を変化させてしまう魔法の試薬ではない。最近、アリルアルコールなどの基質についてクラウン化合物の添加効果を検討したところ、ほとんどの基質について反応速度の向上が確認されたが、エナンチオ選択性に関しては、リパーゼ自身がある程度エナンチオ選択性を示す基質に対してのみ顕著な効果が見いだされた。すなわち、添加剤はリパーゼの潜在的な能力を実用的なレベルにまで引き上げている。このようにリパーゼの不斉反応特性を有機化学の立場から制御することが可能となり、今後、より多彩な添加剤をより広範な酵素反応に適用し、一般的な方法論として確立したいと考えている。

## 文 献

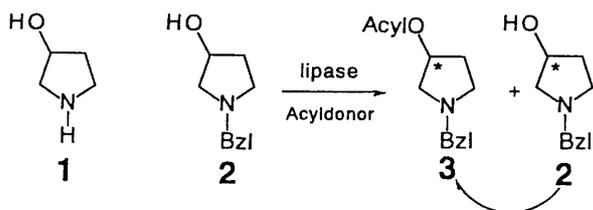
- 1) (a) Santaniello, E., Ferraboschi, P., Gsentì, P. and

- Manzo, A.: *Chem. Rev.*, **92**, 1071 (1992).  
 (b) 伊藤敏幸, 高木由美子: 有合化, **52**, 59 (1994).  
 2) Zaks, A. and Klivanov, A. M.: *J. Biol. Chem.*, **263**, 8017 (1988).  
 3) Itoh, T., Takagi, Y. and Nishiyama, S.: *J. Org. Chem.*, **56**, 1521 (1991).  
 4) Itoh, T., Ohira, E., Nishiyama, S. and Nakamura, K.: *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **64**, 624 (1991).  
 5) Preliminary account see.: Itoh, T., Hiyama, Y., Betchaku, A. and Tsukube, H.: *Tetrahedron Lett.*, **34**, 2617 (1993).  
 伊藤敏幸, 築部 浩: シンポジウム「モレキュラーキラリティー」講演要旨集, p. 95 (1993).  
 6) Tsukube, H., Betchaku, A., Hiyama, Y. and Itoh, T.: *J. Org. Chem.*, **59**, 7014 (1994).  
 7) Odell, B. and Eatlam, G.: *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, p. 359 (1985).  
 8) Itoh, T., Takagi, Y., Murakami, T., Hiyama, Y. and Tsukube, H.: *J. Am. Chem. Soc.*, 投稿中.  
 9) Chen, C. S., Fujimoto, Y., Girdaukas, G. and Sih, C. J.: *J. Am. Chem. Soc.*, **104**, 7294 (1982).

#### 4. リパーゼを用いた医薬中間体の光学分割

持田 顕一<sup>1</sup>・江口 有<sup>1</sup>・堀口 晃<sup>2</sup> (協和発酵工業東京研究所<sup>1</sup>・医薬研究所<sup>2</sup>)

##### 1. (R)-3-ピロリジノール



(R)-3-ピロリジノール 1 は抗生物質などの医薬中間体<sup>1)</sup>として有用な化合物であり, 多くの合成法が報告されている。<sup>2)</sup>我々はこの製造法として, 安価に合成できる *N*-ベンジル体 2 を基質としたリパーゼによる分割について検討を行った。市販リパーゼ 18 種の不斉アシル化活性を調べたところ, アmano P (天野製薬) に高い活性と非常に良い立体選択性が認められた。そこでこの酵素について反応条件を検討した。用いる溶媒の種類が選択性に影響し, イソプロピルエーテル中では反応は早いものの長時間反応させると 50% 以上進行したが, トルエンでは 50% の転換率で反応は停止した。最適条件としてはトルエン中 70 mg/ml の基質とアmano P 10 mg/ml, アシルドナーとして酢酸ビニル 3.5 当量加え 3 時間反応させると, 転換率 51% で 98% ee のアセテートが生成し, 残存基質の光学純度は, ほぼ 100% ee であった。立体配置については, 比旋光度より生成するアセテートが (R) 体で, 残存基質が (S) 体と決定した。<sup>3)</sup>

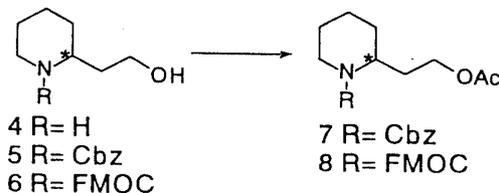
次に酵素をセライトと共にカラムに充填し, 基質と酢酸ビニルを流す連続反応の検討を行った。この場合も 50 mg/ml の基質と 3 当量の酢酸ビニルのトルエン溶液を流すと, 変換率 50% でほぼ 100% ee のアセテ-

トおよび未反応基質を得ることができた。このときのカラム効率は, 625 mg/g Enz/h と比較的高いものであった。

この分割では, 収率が 50% であること, また生成物の分離が必要なことより, 未反応基質の反転について検討した。すなわち, 酵素分割反応液を MsCl-ピリジンで未反応基質をメシル化し, アセテートを加水分解すると同時にメシル体を反転させすべてを (R)-アルコールへ導こうとした。しかし直接の加水分解ではメシル基の置換は起こらず, いったん酢酸ナトリウムと置換させることにより, すべて (R)-アセテートとすることができた。通算収率は 86% で光学純度は 93% ee であり, 最適化を行っていないため若干反転時にラセミ化が生じている。

このように酵素を用いる不斉アシル化と化学的な反転を組み合わせることにより, 高収率で (R)-ピロリジノールを得るルートがほぼ確立できた。

##### 2. 2-ヒドロキシエチルピペリジン



2-ヒドロキシエチルピペリジン 4 も含窒素化合物で, いろいろな医薬品の原料として注目されている。<sup>4)</sup>我々は, この両鏡像体を取得するためリパーゼによる分割を検討した。N に紫外部に吸収を持つ置