

## 酵素と金属触媒の協同作業：

## ラセミ体アルコールを光学活性体に変換する新手法



技術解説

赤井 周 司\*

Collaboration of Enzymes and Metallic Catalysts:  
A Novel Method for the Quantitative Conversion of Racemic Alcohols  
into Optically Pure Compounds

Key Words : Lipase, Vanadium, Alcohol, Dynamic Kinetic Resolution,  
Asymmetric Synthesis

## 1. はじめに

糖の代謝経路に代表されるように、生体内では多数の酵素によって多様な変換反応が整然と進行している。このような複数の触媒による複雑な物質変換をフラスコの中でも実現できないだろうか？

著者らは十数年前から、加水分解酵素リパーゼを触媒として利用する反応開発を行ってきた<sup>1)</sup>。リパーゼは脂質のエステル結合を加水分解する消化酵素であるが、有機溶媒中で用いるとカルボン酸とアルコールからエステルを形成する触媒にもなる。その際、*d*体と*l*体の2つの鏡像異性体（エナンチオマー）の片方だけを選択的に反応させることができる（エナンチオ選択性）ために、ラセミ体を分離（速度論的光学分割）し光学活性体入手する目的に汎用されてきた。多種多様な酵素の中で、リパーゼは特に安定で補酵素が要らず、かつ、非天然の幅広い基質に対して高い触媒活性とエナンチオ選択性を示す。最近では、何十種類ものリパーゼが市販されており、セライトなどの無機物に担持され粉末状になっているものが多い。このように、リパーゼは使い勝手がよい生体触媒で、工業生産への適用例も多いが<sup>2)</sup>、その用途には改良の余地が有る。その1つは、前述した速度論的光学分割である。リパーゼはラセミ体のうちの片方の鏡像異性体だけを反応させるために、生成物の収率は最大50%になる。反応しなかった

残りの半分を再利用できれば収率100%を達成できる。それを1つのフラスコ内で行うことができれば、更に実用的な変換法になる。そのためには、冒頭で述べた複数の触媒の協同作業が必要となってくる。本稿では、著者らが最近開発したリパーゼとバナジウム触媒を併用する、ラセミ体アルコールから光学活性体に変換する新手法（動的光学分割法）について紹介する。

2. リパーゼ触媒による動的光学分割（DKR）法の背景<sup>3)</sup>

リパーゼ触媒による速度論的光学分割と並行して、反応せずに残った鏡像異性体を別の触媒によってラセミ体に戻す（ラセミ化と言う）ことができれば、最終的には、すべてのラセミ体原料を1つの光学活性体に変換することができる。この手法は動的光学分割（Dynamic Kinetic Resolution、以下DKRと略す）と呼ばれる。DKRを成功させるためには幾つかの要件が同時に満たされなければならない（詳細は総説<sup>3)</sup>参照）が、なかでも最も難題は、酵素とラセミ化触媒が1つのフラスコ内で共存し、本来の機能を発揮できることである。ラセミ化効率を高めるために触媒の活性を上げると、リパーゼとの共存性が低下する。その理由は、リパーゼは多数の反応性官能基を有するために両触媒は反応して失活するためと、リパーゼが触媒活性を維持するために表面に抱えている多数の水分子によってラセミ化触媒が失活するためである。

現在のDKRの主流は、ルテニウム錯体とリパーゼを併用する手法で、ルテニウム錯体はRuアルコキシド錯体4を経る酸化還元反応によってラセミ化を触媒する（図1）。ルテニウム錯体とリパーゼは概ね共存性に優れ、本法の適用範囲は広がっていった。しかし、アリアルアルコールの場合には収率が低



\* Shuji AKAI

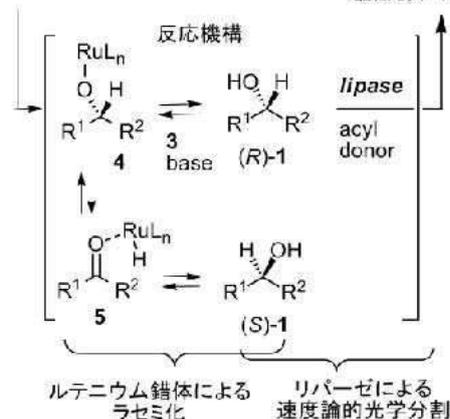
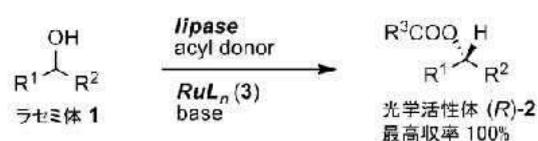
1960年1月生  
大阪大学大学院薬学研究所博士後期課程  
修了（1987年）  
現在、大阪大学 大学院 薬学研究科  
教授 薬学博士 有機合成化学、酵素触  
媒化学、医薬品化学、フッ素化学  
TEL：06-6879-8210  
FAX：06-6879-8210  
E-mail：akai@phs.osaka-u.ac.jp

下した。これは、反応中間体の Ru エノン錯体 **5** ( $R^2 = CH = CHR$ ) においてヒドリドによる 1,4-還元や錯体の解離が起こるためである<sup>4)</sup>。

### 速度論的光学分割



### 動的光学分割



### RuLn(3) の例

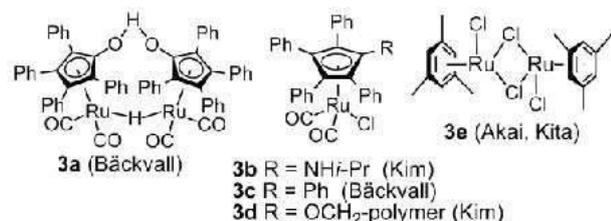


図1 速度論的光学分割並びに、ルテニウム錯体とリパーゼを併用する動的光学分割

## 3. 著者らの DKR 法

著者らはこの問題を解決すべく、前記とは異なるラセミ化機構による DKR 法の開発に着手し、オキソバナジウムに着目した。以前より知られていたオキソバナジウム化合物  $O = V(OR)_3$  によるアリルアルコールの 1,3-転位反応<sup>5)</sup>を再検討した結果、 $O = V(OSiPh_3)_3$  **8a**<sup>6)</sup> 又は樹脂に結合したホスホン酸のオキソバナジウムエステル **8b**<sup>7)</sup>を用いると、

アセトン、アセトニトリルなどの極性溶媒中、室温～50°Cで光学活性アリルアルコール (**6** 及び **7**) は 1,3-転位反応を伴いながらラセミ化することを見出した。また、ラセミ体の **6** 又は **7** に、**8a** 又は **8b** (10 mol%)、市販の固定化リパーゼ及びアシル化剤として酢酸ビニルを反応させると、DKR が進行して光学純度 90～99% ee のエステル (**R**)-**9** が収率 64～99% で得られた。これは、オキソバナジウムが、ラセミ化を伴いながら 4 種の異性体 [(**R**)-**6**, (**S**)-**6**, (**R**)-**7**, (**S**)-**7**] の間で動的平衡を生じ (発散)、リパーゼがその混合物のなかから (**R**)-**7** を高選択的に変換する (収束) という相反する性質の反応が同時進行することで初めて達成された (図2)。それぞれの触媒単独ではこの成果は得られない。また、本法では **6** と **7** は等価な原料として利用できることが合成化学上の大きな利点である (その特長を活かした応用例は後述)。しかし、これら 2 種のオキソバナジウム (**8a**, **8b**) のラセミ化能は必ずしも充分でなく、基質によってはラセミ化が遅いため生成物の収率や光学純度が低いことが問題であった。かと言って、オキソバナジウムの反応性を高めると、リパーゼとの共存性が悪化した。従って、反応性と、リパーゼとの共存性という相反する性能を同時に満足するラセミ化触媒を開発する必要があった。

種々検討の結果、最も効果的な解決策は両触媒を物理的に隔離することである、という結論に達した。リパーゼとラセミ化触媒を別々の容器に入れて隔離して使用方法はすでに報告されていたが<sup>8)</sup>、それでは装置が大掛かりになる。1つのフラスコ内で、簡単に隔離できないかと模索した結果、メソポーラスシリカ (MPS) の細孔を利用することを思いついた。MPS は二酸化ケイ素 (シリカ) を材質として、均一で規則的な細孔をもつ多孔質無機化合物で、表面積が約 1000 m<sup>2</sup>/g もある (図2)。ゼオライト、モンモリロナイト、ハイドロタルサイトなどの多孔質又は層状の無機化合物も候補に挙がったが、これらは酸性もしくは塩基性を示すためにリパーゼに悪影響を及ぼす可能性があり採用しなかった。また、細孔径サイズが異なる種々の MPS (内径 2～50 nm) を入手することができるが、本 DKR には細孔径約 3 nm の MPS を利用した。MPS と **8a** をベンゼン中 8 時間で加熱還流することで、細孔内部表面のシランールにバナジウムが共有結合した **V-MPS** (バナ

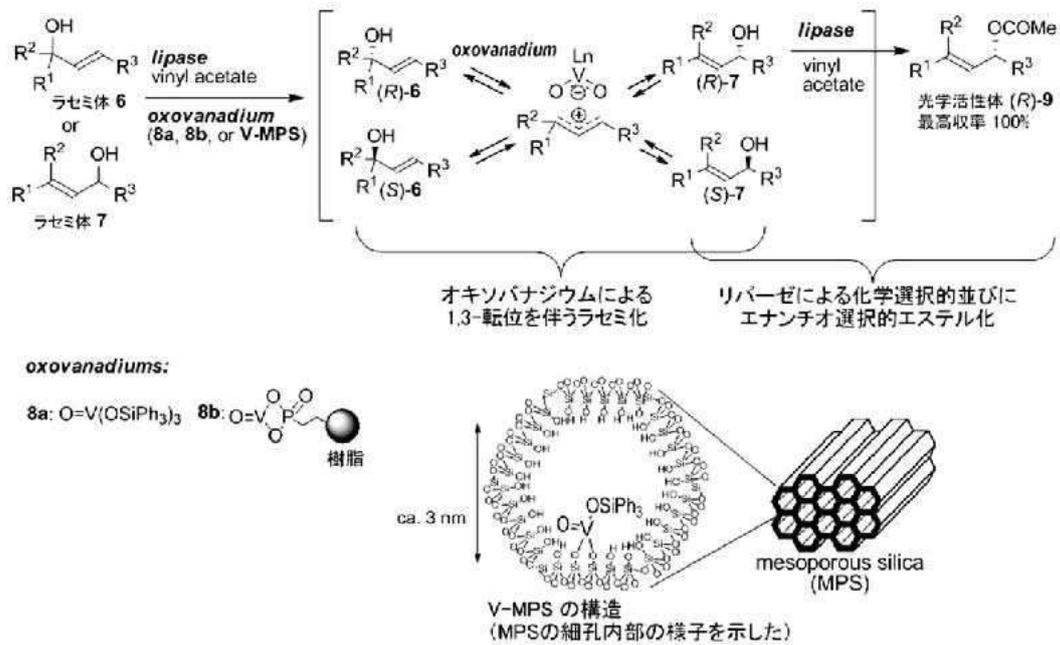


図2 オキソバナジウムとリパーゼを併用する動的光学分割

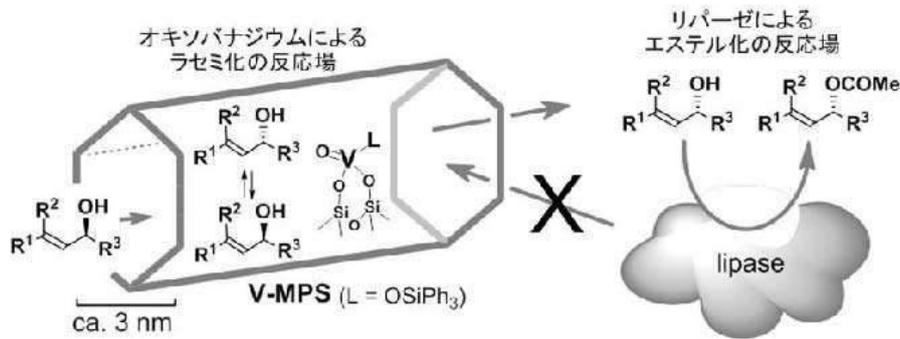


図3 MPSの細孔を利用する反応場の分離

ジウム含量 0.20 ~ 0.22 mmol/g) を調製することができた。また、その構造は ICP-AMS、元素分析、BET 法などによって図2のように推定している。分子量数百以下の汎用的な小分子有機化合物は、V-MPSの細孔に簡単に入ることができる。一方、分子量数万ダルトン以上の巨大なリパーゼは細孔に入っていくれない(図3)(実際には、ポリマーや無機素材に担持されたリパーゼを利用することが多いので、細孔内に入る可能性は限りなくゼロに近い)。こうして、バナジウムによるラセミ化の反応場と、リパーゼによるエステル化の反応場がMPSの細孔によって完全に分離できるわけである。

新規に調製した V-MPS は、従来使用していたラセミ化触媒 (8a, 8b) よりも格段にラセミ化活性が高いことがわかった(図4)。すなわち、8a, 8b は 10 mol% 使用していたが、V-MPS は 1 mol% で十分に高い活性を示した。さらに、100 nm や 400 nm の大きな細孔径を有するマクロポーラスシリカ (MacroPS) に結合したオキソバナジウム [V-MacroPS(100 nm), V-MacroPS(400 nm)] はラセミ化活性が低いことから(図4)、V-MPS のナノサイズの小さな細孔がラセミ化の促進に極めて重要な役割を果たしていることが明らかになった。これは著者らの予想を超える好結果であった。

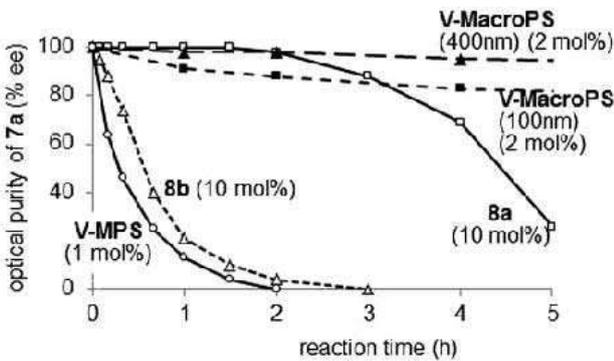
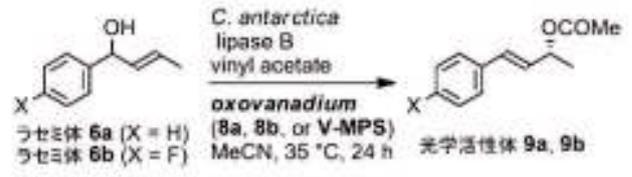
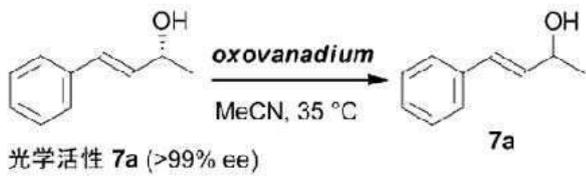


図4 各種オキシバナジウムのラセミ化活性の比較 (括弧内の数字は、反応に用いたバナジウムの当量数)

oxovanadium	9a: X = H	9b: X = F
V-MPS (1 mol %)	99%, 99% ee	100%, 99% ee
O=V(OSiPh <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> (8a) <sup>2</sup> (10 mol %)	71%, 94% ee	64%, 93% ee
O=V(OSiPh <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (O <sup>-</sup> )(8b) (10 mol %)	79%, 98% ee	64%, 80% ee

a) Conducted in acetone at 50 °C for 72 h.

表1 DKRに於ける3種類のオキシバナジウムの性能比較

V-MPSをラセミ体(6a, 6b)のDKRに使用すると、光学活性体(9a, 9b)をいずれも $\geq 99\%$ 収率、99% eeで与えた。従来のラセミ化触媒(8a, 8b)を用いたDKRの結果と比較すると、V-MPSの性能の高さは一目瞭然である(表1)。

V-MPSとリパーゼの共存性の良さは、これらの触媒を数回、回収再利用できることから支持された。この実験は以下のとおりである。V-MPSと市

販の *C. antarctica* リパーゼ B は何れも粉末状である。これらを使ってラセミ体 6a の DKR を行った後、溶液と沈殿物を分離した。溶液を減圧濃縮すると、高純度の 9a が 99% 収率、99% ee で得られた。また、溶液部分に漏洩したバナジウム量は 0.0003% 未満であった。さらに、沈殿物 (V-MPS とリパーゼの混合物) を減圧乾燥後、同じ条件下、再度 DKR に使用すると全く同じ結果が得られた。この、混合触媒は 6 回目まで全く失活することなく再利用できた (図 5) <sup>9)</sup>。

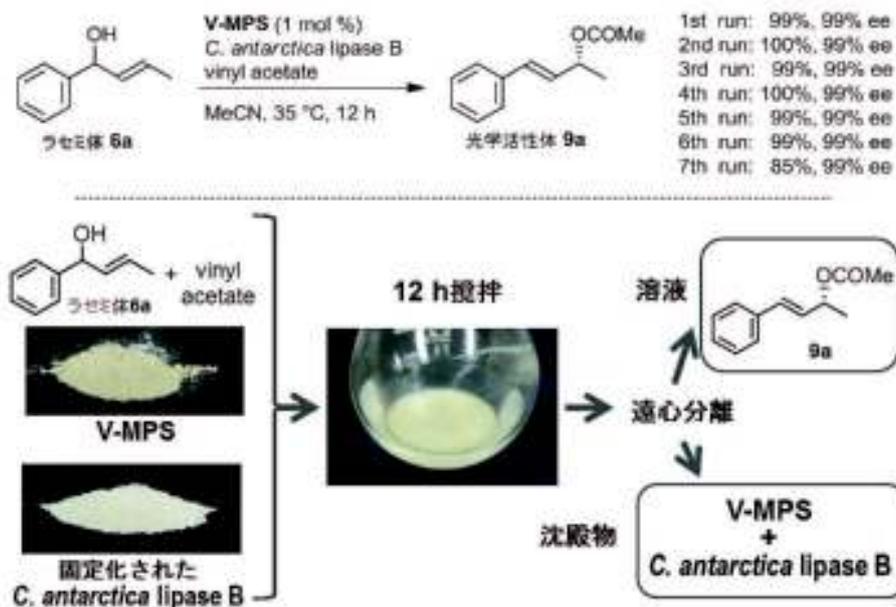


図5 V-MPSと市販の *C. antarctica* リパーゼ B を用いた DKR と、これら触媒の回収再利用

本DKR法は、下記のような活性官能基を有するアルコール (**10a**, **10b**) にも適用できた (図6)。

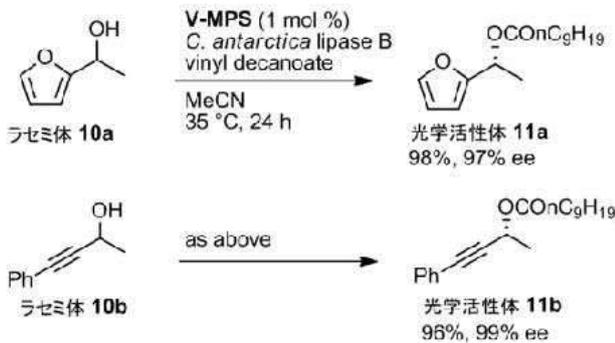


図6 他のアルコール類へのDKR法の適用

本DKR法の実用性を示す例を1つ挙げる。以前、北、藤岡らは、独自に開発した超原子価ヨウ素反応剤を用いて、抗菌剤 (+)-タニコライドの不斉全合成を達成した<sup>10)</sup>。その際、鍵中間体となる光学活性アリルアルコール (*R*)-**15** をエノンの Corey-Bakshi-Shibata 不斉還元法によって合成した。カルボニル基の隣接位に置換基がない環状エノンの不斉還元ではエナンチオ選択性が芳しくないため、 $\alpha$  位にかさ高いヨード基を導入して選択性を上げるのが常法である。かくして、 $\beta$ -エトキシシクロヘキセノン **16** から誘導したエノン **18** の CBS 不斉還元を経て、5工程、通算収率31%で (*R*)-**15** を得た。一方、著者

らはシクロヘキセノン **12** から導いたラセミ体の第3級アルコール **13** に上記DKR法を適応し、収率85%で (*R*)-**15** を得た (図7)。不斉還元による光学活性体の合成法は、酸化段階が1つ高い原料を用いる必要があるが、著者らのDKR法では、酸化段階が変化しない。さらに、反応系中で水酸基の1,3-転位を伴うことの利点を生かし、酸化段階が低く、より安価なエノン **12** を原料として利用できた。総合的に考えれば、全工程の短縮、全収率の向上 (収率が2倍強に向上)、廃棄物の削減などが特筆される。**13** から (*R*)-**14** への変換において、多段階の反応を1つのフラスコ中で一挙に行う本法の特長が表れている<sup>9)</sup>。

上記の応用例では、DKRによって導入されたアシル基は加水分解によって除去されたが、著者らは、このアシル基を有効利用する研究も並行して行っている<sup>11)</sup>。すなわち、活性官能基FGを組み込んだアシル化剤 **20** を使い、オレフィン、アセチレン、フランなどの多重結合官能基を有するラセミ体アルコール **21** のDKR反応を行う。この時、生成する光学活性エステル **22** は続いて分子内環化付加反応を起こし、多数の不斉炭素を有する環状化合物 **23** を一挙に不斉構築できる。この反応系中では、複数の触媒によって1,3-転位を伴うラセミ化反応、エステル化反応、分子内環化付加反応という3種の反応が進行する。本法によれば、入手容易な簡単な構造の

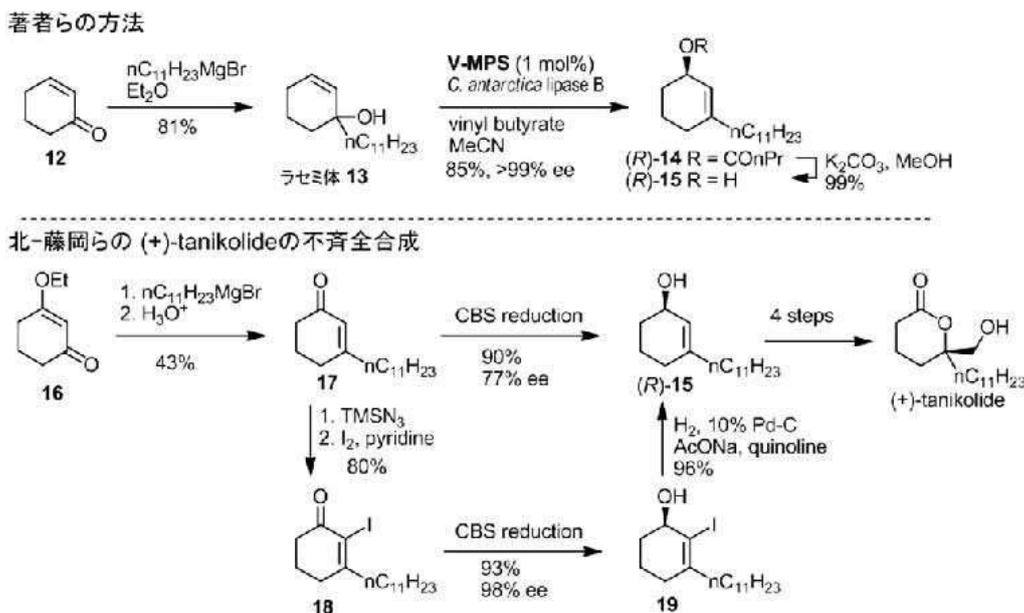


図7 抗菌活性天然物 (+)-タニコライドの不斉全合成における鍵中間体 (*R*)-**15** の合成法の比較

化合物 (20, 21) を原料に用いて、廃棄物を殆ど出さずに複雑な環状分子 23 を合成することができる (図 8)。

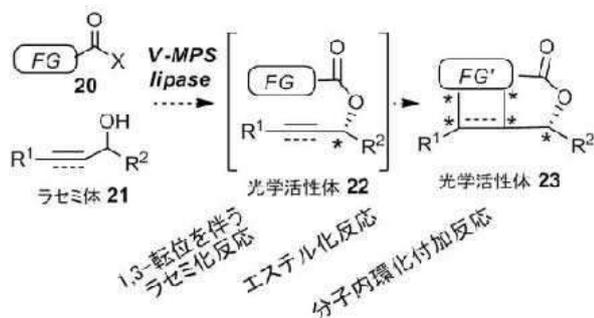


図8 DKR法と分子内環化付加反応が連続進行する不斉合成法

#### 4. まとめ

リパーゼ (生体触媒) とオキソバナジウム化合物 (金属触媒) という異質な触媒を1つのフラスコ内で同時に用いることにより、入手容易なラセミ体アルコールを1つの光学活性体に変換するDKR反応を開発した。これは、オキソバナジウムが、ラセミ化を伴いながら複数の構造異性体間の動的平衡を生じ (発散)、リパーゼがその混合物のなかから1つの鏡像異性体を高選択的に変換する (収束) という相反する性質の反応が同時進行することで初めて達成された。また、高活性な触媒が互いに悪影響を及ぼすことなく共存し、本来の機能を最大限に発揮するためには、メソポーラスシリカのナノスケールの細孔を利用することが極めて効果的であることもわかった。著者らは、このナノスケールの反応場の更なる活用研究を進めている。

一方で、サリドマイドの例にあるように、2つの鏡像異性体が我々の体の中で異なる作用を示すことはよく知られている。場合によっては、片方の鏡像異性体が副作用を引き起こすこともある。従って、安全な医薬品開発には、望む構造のものを光学的に純粋に、効率的に合成する技術は不可欠である。著者らは、今回紹介したDKR法を、その要求に応える合成法にすべく研究を継続している。

#### 謝辞

本研究は、共同研究者の熱心な実験と討論の賜物であり、深く感謝致します。リパーゼは天野エンザイム株式会社、ロシュ・ダイアグノスティックス株

式会社から、メソポーラスシリカは太陽化学株式会社から、マクロポーラスシリカは富士シリシア株式会社からご恵与賜りました。V-MPSの分析にご助言やご指導いただいた佐治木弘尚教授 (岐阜薬科大学)、坂田昌弘教授 (静岡県立大学)、光延 聖博士 (同)、ICP分析を行っていただきましたエヌ・イーケムキャット株式会社に感謝致します。また、本研究は、文部科学省科学研究助成金 (基盤研究 (B)) 並びに新学術領域「集積反応化学」、旭硝子財団研究奨励金によって行うことができました。

#### 参考文献

- 1) 総説: 赤井周司, 北 泰行, *有合化誌* **2007**, 65, 772.
- 2) 総説: 廣瀬芳彦, *有合化誌* **2011**, 69, 506.
- 3) 総説: M. Ahmed, T. Kelly, A. Ghanem, *Tetrahedron* **2012**, 68, 6781. P. Hoyos, V. Pace, A. R. Alcátera, *Adv. Synth. Catal.* **2012**, 354, 2585. C. A. Denard, J. F. Hartwig, H. Zhao *ACS Catal.* **2013**, 3, 2856.
- 4) R. Lihamar, R. Millet, J.-E. Bäckvall, *J. Org. Chem.* **2013**, 78, 12114.
- 5) P. Chabardes, E. Kuntz, J. Varagnat, *Tetrahedron* **1977**, 33, 1775.
- 6) S. Akai, K. Tanimoto, Y. Kanao, M. Egi, T. Yamamoto, Y. Kita, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 2592
- 7) S. Akai, R. Hanada, N. Fujiwara, Y. Kita, M. Egi, *Org. Lett.* **2010**, 12, 4900.
- 8) P. Ödman, L. A. Wessjohann, U. T. Bornscheuer, *J. Org. Chem.* **2005**, 70, 9551. S. Wuyts, J. Wahlen, P. A. Jacobs, D. E. De Vos, *Green Chem.* **2007**, 9, 1104.
- 9) M. Egi, K. Sugiyama, M. Saneto, R. Hanada, K. Kato, S. Akai, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, 52, 3654.
- 10) H. Fujioka, S. Matsuda, M. Horai, E. Fujii, M. Morishita, N. Nishiguchi, K. Hata, Y. Kita, *Chem. Eur. J.* **2007**, 13, 5238.
- 11) S. Akai, K. Tanimoto, Y. Kita, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 1407. H. Nemoto, K. Tanimoto, Y. Kanao, S. Omura, Y. Kita, S. Akai *Tetrahedron* **2012**, 68, 7295.