

令和 2 年 9 月 9 日現在

機関番号：84431

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07785

研究課題名(和文) 自在な立体制御を目指した有機・酵素ワンポット不斉合成反応の開発

研究課題名(英文) Absolute configuration control through chemo-enzymatic onepot process

研究代表者

佐藤 博文 (Sato, Hirofumi)

地方独立行政法人大阪産業技術研究所・森之宮センター・主任研究員

研究者番号：70443546

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：酸化マンガ/過マンガ酸カリウムを用いた酸化反応とラクトバチルスケフィア由来のアルコールデヒドロゲナーゼを組み合わせた1-フェニルエタノールの立体制御について研究を行った。この反応は単純な混合系では金属による酵素の失活により全く進行しなかったが、金属酸化剤の反応をポリジメチルシロキサン製の膜容器(PDMSティンブル)内相で行い、反応後外相にイソプロピルアルコールを添加した酵素液を添加することにより、酸化反応によって生成した1-フェニルメチルケトンを外相に拡散させて外相で酵素による不斉還元を行うことができた。反応は最大86%の転化率で進行し、得られた光学純度は>99%eeであった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来、金属を用いた酸化反応と酵素を用いた還元反応は互いに失活させるため、混合してワンポット反応を行うことはできなかった。本研究では、互換性のない反応同士でもPDMS製の膜容器を用いることで失活することを防ぎ、逐次的なワンポット反応により収率と光学純度の両方を達成できることを示した。医薬品等合成には多ステップかつ高い収率と光学純度が必要になるものも多いが、これまで組み合わせることができず、途中単離生成が必要である有機・酵素反応の組み合わせもワンポットで行える可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：One-pot reaction combined oxidation using manganese oxide/potassium permanganate with reduction using alcohol dehydrogenase from lactobacillus kefir was studied to develop stereo control of 1-phenylethanol. This combination did not work in the simple mixed conditions, however, compartmentalization by polydimethylsiloxane membrane vial (PDMS thimble) enabled the sequential reaction from the oxidation to the enzymatic reduction. 1-phenylmethylketone produced by the oxidation diffused into the exterior of PDMS thimble and the ketone was reduced into chiral 1-phenylethanol in the chemical conversion of up to 86%, in the enantioselectivity of up to 99%.

研究分野：有機化学

キーワード：ワンポット反応 酸化反応 還元反応 アルコールデヒドロゲナーゼ 脱ラセミ化 光学反転

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

多段階反応のワンポット化は中間体精製をスキップできる経済的なプロセスのため合成の実用化におけるトピックスとなっている¹。ワンポット反応を行うためには過剰に使用した試薬や副生成物が相互に反応を阻害しないことが必須条件となる。有機化学反応と生体触媒反応を組み合わせたワンポット反応はエナンチオピュアなキラル化合物を得るための有益な方法として注目を集めているが、有機化学反応と生体触媒反応はそれぞれが互いの反応を失活させるためワンポット化が難しく、これまで、限られた系でしか達成されていなかった。

我々のグループでは PDMS 膜容器を利用した有機・酵素複合反応系を構築している²。この研究では、高い化学収率と光学収率を達成することができている。本研究では、PDMS 膜容器を用いた有機・複合反応の応用として、1-フェニルエタノール類の自在な立体制御について検討を行った。

2. 研究の目的

芳香族 2 級アルコールは、医薬品のビルディングブロックとして有用であるため、この立体制御が可能なプロセス開発が求められている。芳香族 2 級アルコールの主な合成法はフェニルグリニャール試薬とアルデヒドの反応であるため、その生成物は必ずラセミ体となる。そこで本研究では、PDMS 膜を用いた chemo-enzymatic プロセスとして、酸化マンガンによる酸化反応とアルコール脱水素酵素による不斉還元反応を組み合わせ、1-フェニルエタノールの脱ラセミ化および光学反転法の開発を行うことを目的とした。また、この反応プロセスの基質適応性について検討をおこなった。

3. 研究の方法

PDMS 膜を用いたワンポット脱ラセミ化反応の開発とその最適化

芳香族 2 級アルコールとして、1-フェニルエタノールを選んだ。1-フェニルエタノールは酸化によりアセトフェノンとなり、生成したアセトフェノンは還元により再び 1-フェニルエタノールとなる。このとき立体制御を行うことができれば、光学不活性な芳香族アルコールから光学活性なアルコールへと変換し、脱ラセミ化することができる。

1-フェニルエタノールの酸化反応は Shaabani らが報告している $\text{KMnO}_4/\text{MnO}_2$ を酸化剤とした方法を選択した。アセトフェノンの不斉還元にはラクトパチルス由来アルコールデヒドロゲナーゼ LK-ADH を用いた。それぞれの反応について最適条件を確立し、混合系での反応も行った。酵素反応が酸化マンガンにより失活する原因の究明とこれを防ぎワンポット反応を進行させるための PDMS 膜の適応について検討を行った。また、ワンポット反応として、化学収率と光学収率が最も高くなる条件検討も行った。

PDMS 膜を用いたワンポット反応の応用研究

PDMS 膜を用いたワンポット反応の基質適応性について、種々の置換基を有する 1-フェニルエタノール類を基質として反応検討を行った。

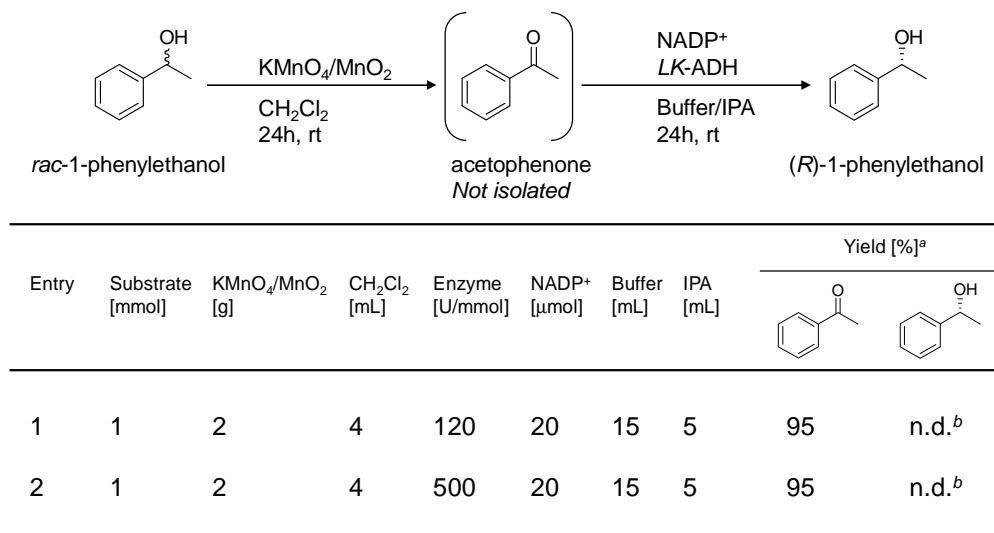
4. 研究成果

PDMS 膜を用いたワンポット脱ラセミ化反応の開発とその最適化

(1) *rac*-1-フェニルエタノールの脱ラセミ化プロセスの開発

$\text{KMnO}_4/\text{MnO}_2$ による 1-フェニルエタノールの酸化反応と LK-ADH によるアセトフェノンの不斉還元反応がそれぞれ良好に進行する反応条件を明らかとした。それぞれの反応を組み合わせ

ワンポット反応を行った $\text{KMnO}_4/\text{MnO}_2$ による *rac*-1-フェニルエタノールからアセトフェノンへの酸化反応を行った後、同じ容器に酵素を加え、不斉還元反応を行うことで *rac*-1-フェニルエタノールの脱ラセミ化を試みた (Scheme 1) と、酵素添加量によらず中間体のアセトフェノンが収率 95% で得られた。すなわち、単に酸化反応と酵素反応をワンポットで行っただけでは酵素失活のため中間体のアセトフェノンで反応が停止することが明らかとなった。



(a) Yield was calculated from NMR.

(b) n.d.: not detected.

Scheme 1 酸化マンガンを酵素と組み合わせた *rac*-1-フェニルエタノールの脱ラセミ化

(2) 酸化マンガンの酵素失活への影響

酸化マンガンを酵素に及ぼす影響を調べるために酵素液に酸化マンガンを加え振とうした後、その酵素液の活性測定を行った。酸化マンガンを添加する前の酵素活性を 1.0 として規格化すると、添加直後には比活性は 0.53 となり、活性が添加前の約半分まで低下することがわかった。さらに添加 10 分後には比活性は 0.10、添加 60 分後には 0.012 となり、酸化マンガンを添加した 60 分後にはほぼ失活してしまうことがわかった。

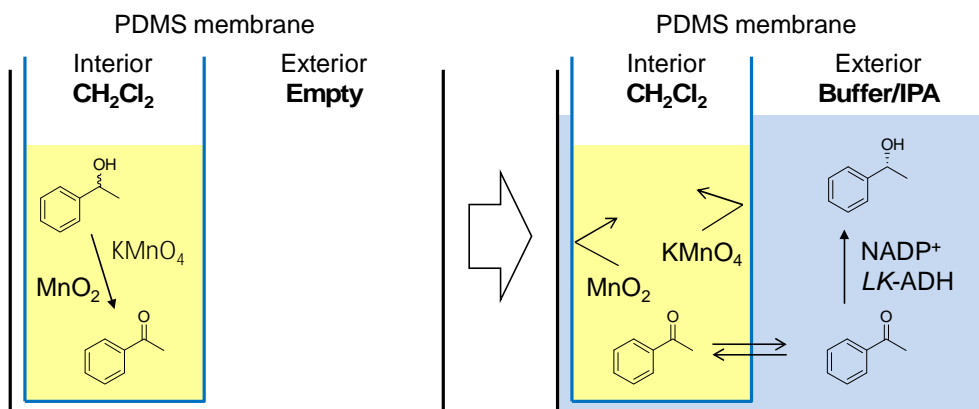
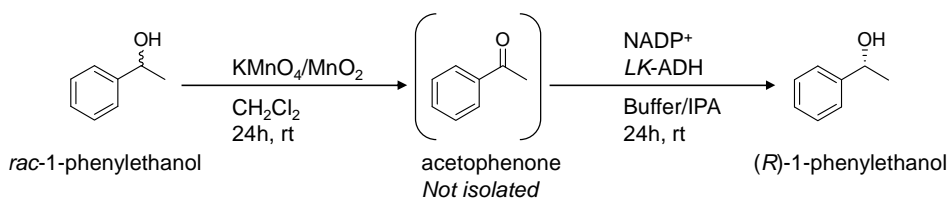
そこで、ポリジメチルシロキサン (PDMS) で作成した膜容器を用いて酸化反応と還元反応にしきりをして逐次反応を行った。PDMS は疎水性の高分子で、親水性の物質は通さず疎水性の物質のみを透過させる特徴がある。この性質を利用して酸化剤と酵素の接触を妨げ、酸化剤による酵素の失活を防ぐことを考えた。

PDMS 膜を用いた *rac*-1-フェニルエタノールの脱ラセミ化プロセスを Scheme 2 に示す。種々検討を行った結果、(*R*)-1-フェニルエタノール収率を 92%、光学収率 99% ee まで向上させることができた (Table 1, Entry 2)。

PDMS 膜を用いたワンポット反応の応用研究



(1) 種々の *rac*-1-フェニルエタノール類の脱ラセミ化

PDMS 膜を用いた脱ラセミ化プロセスにより 6 種類の *rac*-1-フェニルエタノール類 (*rac*-1-(2-クロロフェニル)エタノール、*rac*-1-(3-クロロフェニル)エタノール、*rac*-1-(4-クロロフェニル)エタノール、*rac*-1-(2-メチルフェニル)エタノール、*rac*-1-(3-メチルフェニル)エタノール、*rac*-1-(4-メチルフェニル)エタノール) の脱ラセミ化を行った (Scheme 7)。その結果、(*R*)-1-(2-クロロフェニル)エタノールを 32%、91% ee、(*R*)-1-(3-クロロフェニル)エタノール



Scheme 2. PDMS 膜を用いた *rac*-1-フェニルエタノールの脱ラセミ化

Table 1. 酸化マンガン添加量の検討と収率

Entry	Substrate [mmol]	$\text{KMnO}_4/\text{MnO}_2$ [g]	CH_2Cl_2 [mL]	Enzyme [U/mmol]	NADP^+ [μmol]	Buffer [mL]	IPA [mL]	Yield [%] ^a	
									
1	Interior	1	0.5	4	—	—	—	n.d. ^b	n.d. ^b
	Exterior	—	—	—	500	20	15	15	3
2	Interior	1	1	4	—	—	—	n.d. ^b	n.d. ^b
	Exterior	—	—	—	500	20	15	15	4
3	Interior	1	1.5	4	—	—	—	n.d. ^b	n.d. ^b
	Exterior	—	—	—	500	20	15	15	6
4	Interior	1	2	4	—	—	—	n.d. ^b	n.d. ^b
	Exterior	—	—	—	500	20	15	15	13
5	Interior	1	3	4	—	—	—	n.d. ^b	n.d. ^b
	Exterior	—	—	—	500	20	15	15	14

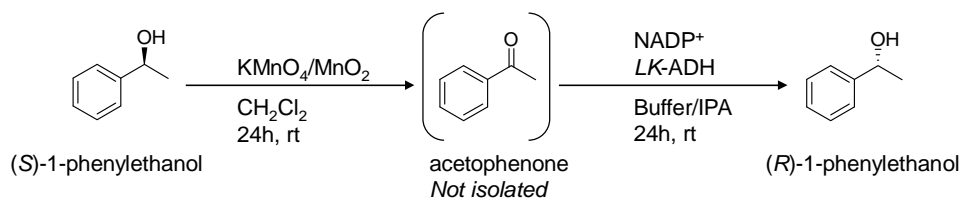
(a) Yield was calculated from NMR. (b) n.d.: not detected.



(c) Enantiomeric excess of (*R*)-1-phenylethanol was determined by chiral HPLC.

83%、99%ee、(*R*)-1-(4-クロロフェニル)エタノール 93%、99%ee、(*R*)-1-(2-メチルフェニル)エタノール 5%、83%ee、(*R*)-1-(3-メチルフェニル)エタノール 65%、99%ee、(*R*)-1-(4-メチルフェニル)エタノール 82%、99%ee で得ることができ、開発したプロセスが広い基質応用性を有していることが明らかとなった。

(2) (S)-1-フェニルエタノールの光学反転

PDMS 膜を用いた *rac*-1-フェニルエタノールの脱ラセミ化プロセスを応用し、(S)-1-フェニルエタノールの光学反転を行った。(S)-1-フェニルエタノール (99%ee) を出発原料として反応を行い、(R)-1-フェニルエタノールを 92%、99%ee で得ることができ、開発したプロセスで 1-フェニルエタノールの自在な立体制御が可能であることが明らかとなった。(Scheme 3、Entry 1)



Entry	Substrate [mmol]	KMnO ₄ /MnO ₂ [g]	CH ₂ Cl ₂ [mL]	Enzyme [U/mmol]	NADP ⁺ [μmol]	Buffer [mL]	IPA [mL]	Yield [%] ^a	
									
ref.	Interior	1 ^d	4	—	—	—	—	n.d. ^b	n.d. ^b
	Exterior	—	—	500	20	15	15	4	92 (99%ee ^c)
1	Interior	1 ^e	4	—	—	—	—	n.d. ^b	n.d. ^b
	Exterior	—	—	500	20	15	15	4	92 (99%ee ^c)

(a) Yield was calculated from NMR. (b) n.d.: not detected.

(c) Enantiomeric excess of 1-phenylethanol was determined by chiral HPLC.

(d) *rac*-1-phenylethanol (0%ee). (e) (S)-1-phenylethanol (99%ee).

Scheme 3. (S)-1-フェニルエタノールの光学反転

まとめ

酸化マンガンによるアルコールの酸化反応と酵素による不斉還元反応をワンポットで組み合わせた 1-フェニルエタノールの脱ラセミ化プロセスの開発を行った。PDMS 膜を用いることなく酸化マンガンと酵素を組み合わせて反応を行った場合、酸化マンガンにより酵素が失活したため、還元反応は進行せず、中間体であるアセトフェンのみが生成した。酸化マンガンと酵素の接触を防ぐために、PDMS 膜を用いて各反応系にしきりをして逐次反応を行うと、酸化反応と不斉還元反応がともに進行し、(R)-1-フェニルエタノールを収率 92%、光学収率 99%ee で得ることができた。また、PDMS 膜を用いた脱ラセミ化プロセスを応用することで、(S)-1-フェニルエタノールから (R)-1-フェニルエタノールへの光学反転を行うことに成功した。また、種々の *rac*-1-フェニルエタノール類の脱ラセミ化を行うことに成功した。さらに、エチルベンゼンを基質とした (R)-1-フェニルエタノールのワンポット合成に成功した。

参考文献

1. C. A. Denard, J. F. Hartwig, H. Zhao. *ACS Catal.* **2013**, *3*, 2856-2864.
2. (a) H. Sato, W. Hummel, H. Gröger. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 1-6. (b) F. Uthoff, H. Sato, H. Gröger, *ChemCatChem.* **2017**, *9*, 1-5.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 佐藤博文	4. 巻 93
2. 論文標題 食品中リスク懸念物質である3-モノクロロプロパン-1,2-ジオール (3-MCPD) とその類縁体に関する研究	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 科学と工業	6. 最初と最後の頁 255-263
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 静間基博、三原正稔、中井猛夫、岩井利之、松元深、佐藤博文	4. 巻 93
2. 論文標題 質量分析の基礎 (第5回/全5回) 分析・測定例	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 科学と工業	6. 最初と最後の頁 50-61
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Florian Uthoff, Hirofumi Sato, Harald Groeger	4. 巻 9
2. 論文標題 Formal Enantioselective Hydroamination of Non Activated Alkenes: Transformation of Styrenes into Enantiomerically Pure 1 Phenylethylamines in Chemoenzymatic One Pot Synthesis	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 ChemCatChem	6. 最初と最後の頁 555-558
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cctc.201601463	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計16件（うち招待講演 0件/うち国際学会 7件）

1. 発表者名 長船有里、渡辺嘉、佐藤博文、小林正治、益山新樹
2. 発表標題 "Hep G2細胞に対するクロロプロパノール類の毒性評価
3. 学会等名 第57回日本油化学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 長船有里, 渡辺嘉, 佐藤博文, 小林正治, 益山新樹
2. 発表標題 2-モノクロプロパンジオールのHep G2細胞に対する毒性評価
3. 学会等名 日本油化学会オレオマテリアル部会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yomi Watanabe, Naoki Kaze, Kaeko Murota, Hirofumi Sato, Yuri Osafune, Araki Masuyama
2. 発表標題 Toxicity evaluation of 2-MCPD and estimation of intestinal absorption of the monoesters
3. 学会等名 アメリカ油化学会 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yomi Watanabe, Yuri Osafune, Hirofumi Sato, Taro Kiso, Araki Masuyama
2. 発表標題 Cytotoxicity evaluation of 2-monochloropropanediol
3. 学会等名 International Symposium on Biocatalysis and Agricultural (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 静間基博, 佐藤博文, 川野真太郎, 松崎剛, 朝野芳織, 鈴木健之, 小野大助
2. 発表標題 高速原子衝撃質量分析による化学修飾フルクトオリゴ糖類のキラルアミノ酸エステルアンモニウムイオンに対するキラル識別能評価
3. 学会等名 第57回日本油化学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Makoto Okumura, Daisuke Ono, Shintaro Kawano, Hirofumi Sato, Motohiro Shizuma, Araki Masuyama
2. 発表標題 Amide Types of Chemocleavable Surfactants Bearing a 1,3-Dioxolane Ring Derived from Diethyl Tartrate
3. 学会等名 AOCS (アメリカ油化学会) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 静間基博、安達吉宏、川野真太郎、佐藤博文、川崎英也、荒川隆一、小野大助
2. 発表標題 包接能有する大環状分子をマトリクスとして用いたレーザー脱離イオン化質量分析
3. 学会等名 日本質量分析学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yomi Watanabe, Naoki Kaze, Kaeko Murota, Hirofumi Sato, Yuri Osafune, Araki Masuyama
2. 発表標題 Toxicological evaluation of 2-MCPD and estimation of intestinal absorption of its fatty acyl esters
3. 学会等名 第15回日中韓酵素工学会議 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐藤博文
2. 発表標題 順相LC-MS/MSによるMCPDモノエステル定量分析
3. 学会等名 第57回日本油化学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 三輪真之、渡辺嘉、田中重光、静間基博、川崎英也、佐藤博文
2. 発表標題 蛍光プローブによるバクテリア生産リパーゼの直接検出
3. 学会等名 第57回日本油化学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hirofumi Sato, Rei Yamada, Takaaki Kiryu, Ryuichi Arakawa, Hideya Kawasaki
2. 発表標題 Deracemization of 1-phenylethanol by chemo-enzymatic combination Mn O ₂ -oxidation and ADH-reduction through compartmentalization
3. 学会等名 The Asian Conference on Oleo Science 2017 and The 56th Annual Meeting of the Japan Oil Chemists' Society (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Masayuki Miwa, Yomi Watanabe, Motohiro Shizuma, Hideya Kawasaki, Hirofumi Sato
2. 発表標題 Design and Synthesis of Fluorescent Probe for Efficient Lipase Detection Based on TokyoGreen Platform
3. 学会等名 The Asian Conference on Oleo Science 2017 and The 56th Annual Meeting of the Japan Oil Chemists' Society (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 田中重光、佐藤博文、永尾寿浩
2. 発表標題 蛍光基質を用いたエーテル化合物分解菌分離法の検討
3. 学会等名 環境微生物系学会合同大会2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 三輪真之、渡辺嘉、静間基博、川崎英也、佐藤博文
2. 発表標題 リパーゼ応答性蛍光プローブを用いたリパーゼ活性の定量分析
3. 学会等名 日本化学会第98春季年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 安達吉宏、川野真太郎、佐藤博文、小野大助、川崎英也、荒川隆一、静間基博
2. 発表標題 アリアルアゾカリックス[n]アレーン (n = 34, 6, 8) の錯形成挙動とレーザー脱離イオン化マトリックス効果
3. 学会等名 有機典型元素化学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Daisuke Ono, Makoto Okumura, Shintaro Kawano, Hirofumi Sato, Motohiro Shizuma, Araki Masuyama
2. 発表標題 Chemocleavable Nonionic Surfactants Bearing Mono-dispersed Polyethylene Glycol Derived from Diethyl Tartrate
3. 学会等名 American Oil Chemists' Society (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	渡辺 嘉 (Watanabe Yomi) (60416310)	地方独立行政法人大阪産業技術研究所・森之宮センター・主任研究員 (84431)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	川崎 英也 (Kawasaki Hideya) (50322285)	関西大学・化学生命工学部・教授 (34416)	