

超臨界二酸化炭素と酵素を利用する有用化合物の合成

松田 知子

超臨界流体とは、超臨界点を越える領域にある流体であり、どの物質も固体、液体、気体になるように超臨界流体となるが、その流体の性質は個々の物質により大きく異なる。酵素反応の溶媒や反応剤となる超臨界二酸化炭素は臨界温度（31.1°C）が低く無極性である。筆者が超臨界流体を用いる研究を始めたきっかけは、助手として採用された龍谷大学の原田研究室で超臨界アルコールを用いる無触媒有機合成反応が行われていて、通常は触媒が必要な反応が無触媒で行える不思議さに魅せられたことであるが、研究を始めてから、超臨界アルコールと超臨界二酸化炭素では利用方法がまったく異なることに気づいた。当然ながら、高温の超臨界アルコール（たとえばメタノールの臨界温度は239°C）の中では酵素反応は行えない。酵素反応が行える超臨界流体は、常温常圧では気体であるCO₂、CHF₃、C₂H₆、C₃H₈、SF₆などである。その中で、CO₂は多量に存在し無毒であるため、酵素反応の溶媒として最も頻繁に用いられてきた¹⁻¹⁰⁾。

では、なぜ酵素反応の溶媒として、水や有機溶媒ではなく、超臨界二酸化炭素を用いるか、そのメリットを以下に示す。

- 1) 反応後には常圧に戻すだけで二酸化炭素は除去できるので、生成物の分離/抽出が簡単である。
- 2) 安全な物質であるため、残存溶媒が問題とならない。
- 3) 気体のように拡散性が高いため、拡散律速の反応の速度を加速できる。
- 4) 疎水性の有機溶媒のように、疎水性の基質を溶解できる。
- 5) 高密度の二酸化炭素であるため、二酸化炭素を基質とする反応の開発には有利である。
- 6) 圧力や温度を変えると密度が大きく変化し、それに伴い溶媒の性質が変化する。そのため、反応にあわせて溶媒特性を調整できる。
- 7) 溶媒の種類を変えずに酵素反応に及ぼす溶媒効果が調べられる。さらに、連続的に溶媒特性を変化させることができるため、酵素反応の選択性などを連続的に

に変化させることができる。

これらの超臨界二酸化炭素中で酵素反応を行うメリットは、超臨界二酸化炭素を化学試薬を用いる有機合成に用いるメリットでもあり、その研究は精力的に進められてきた。たとえば、二酸化炭素の水素化によるギ酸の合成や、二酸化炭素を基質とする環状炭酸エステルの合成がなされた。しかし、酵素を用いる研究は報告例が少なく、しかも利用されてきた酵素の種類は限られており、その大半が加水分解酵素であり、酸化還元酵素やカルボキシラーゼの研究例は数例のみである。開発が待ち望まれている分野である。ここでは、それらの例を紹介する。

フロー系の超臨界二酸化炭素酵素反応装置

高圧の流体である超臨界二酸化炭素中での酵素反応には特殊な装置が必要であると思われるが、基本的には、液体クロマトグラフィー用の装置のようなものが使用できる。フロー系の装置の概要を図1に示す。ポンプにより高圧の二酸化炭素と基質を、恒温槽の中にある酵素を充填した反応管へと送液することにより反応が起こる。その後、背圧弁により圧力を常圧に戻すと、生成物と二酸化炭素を分離できる。この装置を用いると、有機溶媒をまったく使用せずに有機合成が行える。研究段階で反応条件の検討などを行う場合には、バッチ式の

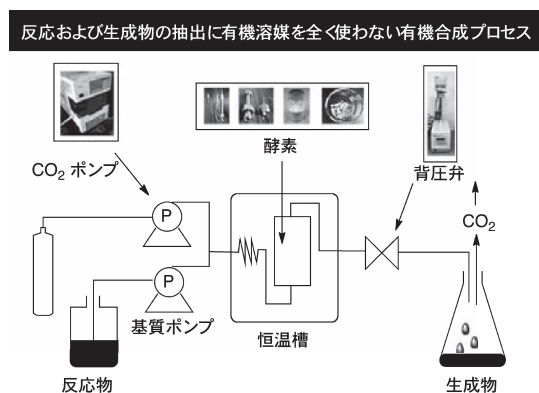


図1. 連続式（フロー系）の超臨界二酸化炭素を用いる酵素反応装置

反応装置を用いると便利であるが、最終的には、高压の流体を使用しているため反応容器の大きさを小さくする必要があり、単位スペース単位時間あたりの収量が大きいフロー系の装置を用いる必要がある。

超臨界二酸化炭素中での加水分解酵素の利用

光学活性体の大量合成 加水分解酵素は、超臨界二酸化炭素中において最も頻繁に用いられている。特に、*Candida antarctica*由来の固定化リパーゼであるNovozym 435は、超臨界二酸化炭素中において活性が高く取り扱いが容易であるため、その報告例が多い。著者らは、超臨界二酸化炭素中のNovozym 435の反応により、医薬品中間体となる光学活性化合物の合成を行った¹¹⁾。図1に示したフロー系の反応装置を用い、非常に高い立体選択性で目的とする光学活性体が得られた(図2a)。3日間の運転により1.73 gの固定化酵素を用い221 gのラセミ体(1-フェニルタノール)を光学活性体(ee 99%)へと変換できた。副反応はまったくおこらなかった。注目すべきは、この反応系では有機溶媒をまったく使用していないことである。酵素反応は通常水中で行われ、その際には生成物を水から抽出するために有機溶媒が用いられるが、この系では、常圧にすることにより二酸化炭素と生成物が

分離できた。基質特異性も広く、2-ウンデカノールのような脂肪族や1-テトラロールのような環状アルコールの速度論的分割反応にも成功した。

Novozym 435などの加水分解酵素は、超臨界二酸化炭素中で、化学触媒の存在下においても機能する。最近になり、超臨界二酸化炭素を溶媒とし、触媒としてリパーゼと化学触媒の両方を用いるフロー系の反応が報告された¹²⁾。Pd触媒を充填した反応層とリパーゼを充填した反応層を順につなげた装置が設計され、アセトフェノンのラセミ体1-フェニルエタノールへのPd触媒による還元、およびラセミ体1-フェニルエタノールのリパーゼによる立体選択的アセチル化がone-potで行われた(図2b)。

また、加水分解酵素および化学触媒の両方を用いる動的速度論的分割反応も超臨界二酸化炭素/フローシステムにより行われている。図2 a, bに示した速度論的分割においては、アルコールとエステルが混合物として得られるために最終的には分離が必要となるが、動的速度論的分割反応においてはその必要がない。分割反応の触媒としてリパーゼが用いられ、ラセミ化触媒として固体化学触媒(benzenosulfonic acid修飾シリカ)が用いられた(図2c)¹³⁾。反応溶媒としてイオン液体、送液/抽出溶媒として超臨界二酸化炭素を用いるフロー系反応が報告された。

立体選択性の制御

超臨界二酸化炭素の溶媒の性質は、圧力や温度によって制御できる。超臨界流体は、気体のように密度が低い部分と液体のように密度が高い部分が混ざっている状態であるので、たとえば少し圧力を上げると密度が高い部分が多くなり、その結果、溶媒の性質が大きく変化する。ここでは、著者らは反応溶媒として用いる二酸化炭素の圧力や温度がリパーゼの立体選択性に及ぼす影響を調べた^{14,15)}。有機溶媒の種類を変化させることにより、リパーゼの反応の溶媒効果を検討した例は多数ある。しかし、有機溶媒を用いる場合には有機溶媒の種類を変化させると分子の形が変わるため、その影響までが出てしまう。一方、超臨界二酸化炭素を用いると分子の形は変化しない。さらに、有機溶媒の性質は連続的に変化させることは不可能である。たとえばヘキサンをヘプタンにすると炭素数は6から7へと変化する。しかし、6.1や6.2の炭素数の化合物は存在しないため、その間がどのようになっているのかは調べることができない。ところが超臨界二酸化炭素を用いる場合には、

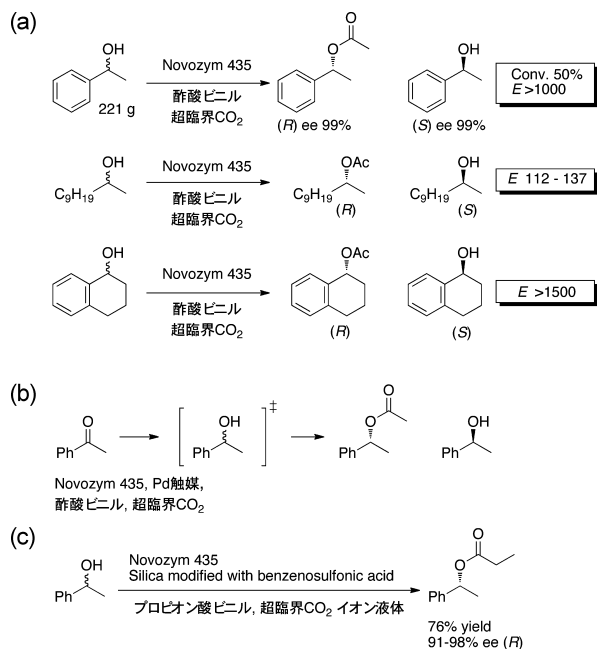


図2. 超臨界二酸化炭素中でのリパーゼによる光学活性化合物の合成。(a) フロー系の速度論的分割反応、(b) フロー系のone-potの還元および速度論的分割反応、(c) フロー系の動的速度論的分割反応。

圧力や温度は連続的に次第に変化させることができるので、立体選択性も連続的に変化させることができる。

実際に、図3aに示すリパーゼの反応の立体選択性は、圧力や温度を変化させることにより連続的に変化した(図3b, c)。また、その変化は密度の変化とも関係深いことがわかった。ではなぜ温度や圧力により超臨界二酸化炭素の密度が変化すると、反応の立体選択性が変化する

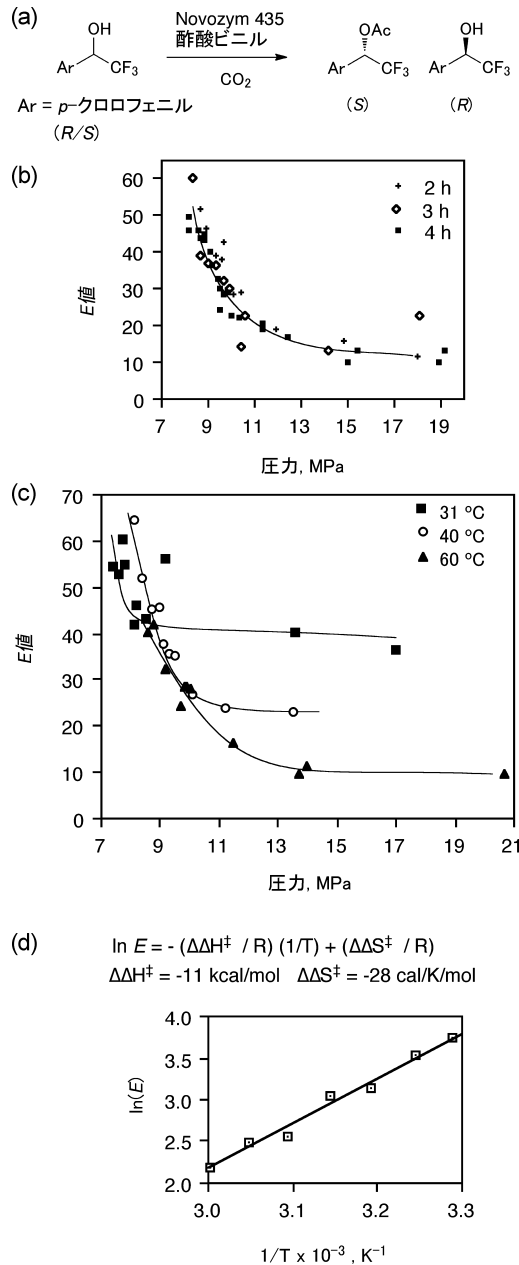


図3. 超臨界二酸化炭素中でのリパーゼによるフルオロアルコールの速度論的分割反応の立体選択性に及ぼす圧力および温度の影響。(a) 反応スキーム, (b) 55°Cでの立体選択性に及ぼす圧力の影響, (c) さまざまな温度での立体選択性に及ぼす圧力の影響, (d) 二酸化炭素の密度一定条件下 (0.75 g/ml) での立体選択性に及ぼす温度の影響。

のかを考察した。二酸化炭素の酵素への吸着などによる酵素の構造の微妙な変化が立体選択性に影響を与えていると考えられる。温度による立体選択性の制御に関しては、有機溶媒中のリパーゼの反応においても報告^{16,17)}されており、そこでの説明に用いられている絶対反応速度式を、超臨界二酸化炭素中での反応を説明するためにも用いることができた(図3d)。

超臨界二酸化炭素中での酸化還元酵素の利用

加水分解酵素以外の酵素も、数例ではあるが、超臨界二酸化炭素中で用いる研究が行われている。還元反応には *Geotrichum candidum*¹⁸⁻²⁰⁾ およびウマ肝臓アルコール脱水素酵素²¹⁾ が用いられている。 *G. candidum* 由来のアルコール脱水素酵素は不斉還元における立体選択性が高く、基質特異性が広いので、今後の展開が期待される。さらに固定化にも成功しており、フロー系での利用も試みられている(図4a)¹⁸⁻²⁰⁾。また、ウマ肝臓アルコール脱水素酵素による反応では、補酵素として必要である

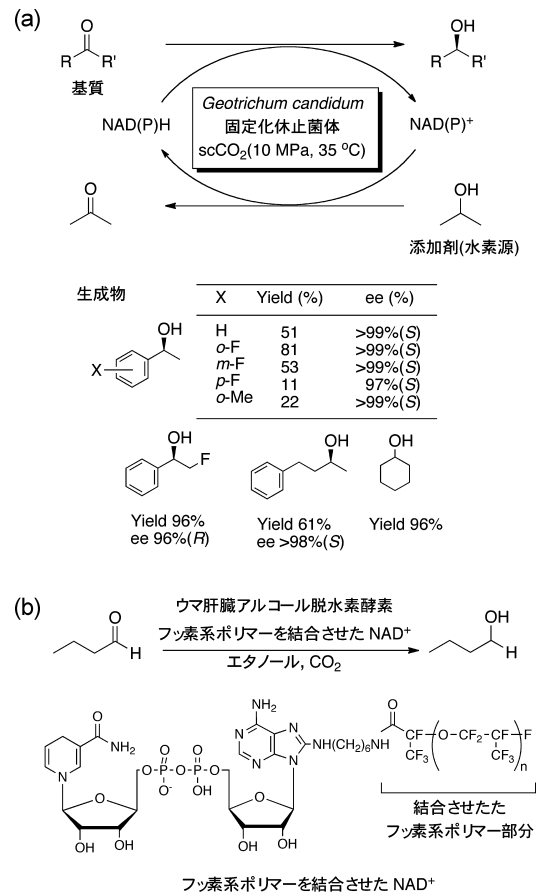


図4. 超臨界二酸化炭素中でのアルコール脱水素酵素による還元反応

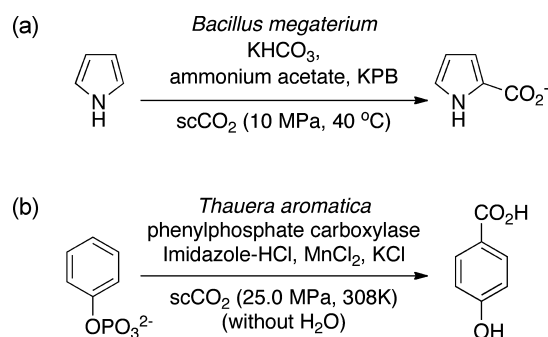


図5. 超臨界二酸化炭素中での位置選択的カルボキシル化反応

NADHにフッ素鎖を結合させて、二酸化炭素に可溶化させることにより、反応の進行を可能としている²¹⁾。

超臨界二酸化炭素中での 脱炭酸酵素/カルボキシラーゼの利用

超臨界二酸化炭素中でのデカルボキシラーゼの逆反応によるカルボキシル化反応は、二酸化炭素を原料とする反応の開発は重要であるので注目を浴びている。1970年代には、水の密度が低い非水系溶媒中では、加水分解酵素はその逆反応であるエステル化反応を触媒することが見いだされた。同様に、二酸化炭素の密度が高い超臨界二酸化炭素中では、脱炭酸酵素はカルボキシル化反応を効率的に進行させると考えられる。

実際に図5aに示すように、長澤らにより見いだされた *Bacillus megaterium* を超臨界二酸化炭素中で用いピロールの2位への位置特異的カルボキシル化反応が報告された^{22,23)}。また、*B. megaterium* を固定化し、フロー系でも使用できることが報告された^{22,23)}。しかし、この反応においては共溶媒として緩衝溶液が必要である。2006年には、*Thauera aromatica* 由来の Mn^{2+} 依存性の酵素である phenylphosphate カルボキシラーゼによる反応が超臨界二酸化炭素中 (25.0 MPa, 308 K) で水をまったく使用

せずに進行することが報告された²⁴⁾。

まとめ

超臨界二酸化炭素中での酵素反応による有機合成の最近の研究を紹介した。ここで紹介した反応が、持続的社会を構築するための二酸化炭素を材料や溶媒とする未来の物質変換法の開発につながることを期待する。

本研究は、龍谷大学の原田忠夫教授および京都大学中村薫准教授の指導、および研究室の学生との共同研究により成功したものであり深く感謝する。

文 献

- 1) Randolph, P. T. W. *et al.*: *Biotechnol. Lett.*, **7**, 325 (1985).
- 2) Hammond, D. A. *et al.*: *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **11**, 393 (1985).
- 3) Nakamura, K. *et al.*: *Chem. Eng. Commun.*, **45**, 207 (1986).
- 4) Hobbs, H. R. and Thomas, N. R.: *Chem. Rev.*, **107**, 2786 (2007).
- 5) Matsuda, T. *et al.*: *Tetrahedron: Asymmetry*, **16**, 909 (2005).
- 6) Matsuda, T. *et al.*: *Green Chem.*, **6**, 440 (2004).
- 7) 松田知子: 超臨界CO₂と酵素による有用物質の合成, p.172, エヌ・ティー・エス (2007).
- 8) 松田知子: 化学, **63**, 40 (2008).
- 9) Mori, T. *et al.*: *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 1188 (2002).
- 10) Mori, T. *et al.*: *Chem. Commun.*, p.1832 (2001).
- 11) Matsuda, T. *et al.*: *Chem. Commun.*, p.2286 (2004).
- 12) Hobbs, H. R. *et al.*: *Green Chem.*, **9**, 816 (2006).
- 13) Lozano, P. *et al.*: *Biotechnol. Lett.*, **28**, 1559 (2006).
- 14) Matsuda, T. *et al.*: *Tetrahedron: Asymmetry*, **14**, 2087 (2003).
- 15) Matsuda, T. *et al.*: *Tetrahedron Lett.*, **42**, 8319 (2001).
- 16) Sakai, T. *et al.*: *J. Org. Chem.*, **62**, 4906 (1997).
- 17) Sakai, T. *et al.*: *Tetrahedron Lett.*, **39**, 7881 (1998).
- 18) Matsuda, T. *et al.*: *Chem. Commun.*, p.1367 (2000).
- 19) Matsuda, T. *et al.*: *Chem. Commun.*, p.1198 (2003).
- 20) Matsuda, T. *et al.*: *Tetrahedron: Asymmetry*, **19**, 2272 (2008).
- 21) Panza, J. L. *et al.*: *Tetrahedron*, **58**, 4091 (2002).
- 22) Matsuda, T. *et al.*: *Chem. Commun.*, p.2194 (2001).
- 23) Matsuda, T. *et al.*: *Tetrahedron Lett.*, **49**, 6019 (2008).
- 24) Hernandez, F. J. *et al.*: *Appl. Catal. B: Environmental*, **67**, 121 (2006).