



Title	Performance improvements of chemoenzymatic dynamic kinetic resolution of racemic alcohols using an oxovanadium-type racemization catalyst
Author(s)	堀野, 聡志
Citation	大阪大学, 2025, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/101945">https://hdl.handle.net/11094/101945</a>
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

## 論文内容の要旨

氏 名 ( 堀野 聡志 )	
論文題名	Performance improvements of chemoenzymatic dynamic kinetic resolution of racemic alcohols using an oxovanadium-type racemization catalyst (オキソバナジウム系ラセミ化触媒を用いたラセミ体アルコールの化学酵素的動的速度論的光学分割法の高機能化)
<p>論文内容の要旨</p> <p>天然のリパーゼはアルコールのヒドロキシ基近傍の置換基の大小を識別し、アルコールをエナンチオ選択的にエステル化する。この特性を活用した速度論的光学分割 (KR) の例が報告されているが、理論的にはR体生成物を最大50%収率でしか得られないという課題があった。この問題を克服する手法が、動的速度論的光学分割 (DKR) である。DKRは、KRの際に未反応のアルコールをラセミ化触媒でラセミ化させることにより、ほぼ定量的に光学活性体を得る手法である。医薬品合成や創薬研究においてプロパルギルアルコールや第3級アルコール等は有用な合成中間体として汎用されており、それらの光学活性体を化学合成的する方法は数多く報告されている。しかし、加水分解酵素リパーゼを活用した合成法の報告は限られている。著者は、大腸菌内で過剰発現させることで大量に調製可能、かつ、室温付近の温和な条件下で反応が進行し、高いエナンチオ選択性で生成物を与えるというリパーゼの長所に着目し、上記の化合物の光学活性体をリパーゼ触媒DKR法で合成する手法の開発に着手した。その結果、以下に示す2つの成果を得た。</p> <p>1) 天然リパーゼ触媒的DKRによるS,R体プロパルギルアルコールの作り分け</p> <p>赤井らは、独自に開発したオキソバナジウム種をメソポーラスシリカ(MPS) 細孔内に固定化したV-MPS4をラセミ化触媒として利用し、天然リパーゼと併用することでラセミ体第二級アルコールを光学活性なエステルへほぼ定量的に変換するDKR法を開発した。一般的に第二級アルコールの天然リパーゼ触媒DKRで得られるエステルはR体である。一方で、S体選択的な加水分解酵素は、その触媒活性と安定性の低さゆえにDKRへの利用例が乏しい。そこで著者は、第2級プロパルギルアルコールの小さい方の置換基 (エチニル基) に着脱容易なトリアルキルシリル基を導入することで、リパーゼが識別する水酸基近傍の大小関係を一時的に逆転すれば、天然リパーゼを用いたDKRによりS体アルコールを高収率かつ高光学純度で調製できると考えた。エチニル基末端にトリアルキルシリル基を有する第二級プロパルギルアルコール1でリパーゼのスクリーニングとラセミ化条件を検討した結果、<i>Pseudomonas fluorescence</i> リパーゼ (リパーゼAK) とV-MPS4共存下、酢酸ビニルを溶媒とするDKR条件が最適であった。リパーゼAKとV-MPS4が互いに相互作用し、反応中にV-MPS4が失活する問題に直面した。著者は、両触媒の相互作用を避けるためにリパーゼAKの固定化を試みた結果、セライトにリパーゼAKを担持した固定化品 (self-immobilized lipase AK) でDKRが首尾よく進行し、DKR生成物を高収率かつ高光学純度で取得することに成功した。Self-immobilized lipase AKを用いたDKRは7例の基質に適用でき、脱シリル化と加水分解の後にS体アルコールを50-90%収率、56-99% eeで得た。著者の所属研究室で開発されたR体選択的DKR法を参考にして、著者は天然リパーゼを用いるDKRにより、1からプロパルギルアルコールのS体とR体を良好な収率とエナンチオ選択性で作り分ける手法の開発に成功した。</p> <p>2) 第三級アルコールのリパーゼ触媒DKR法の高機能化</p> <p>リパーゼ触媒による第三級アルコールのDKRは、赤井及びGröger (ドイツ、Bielefeld大学) らが共同研究した<i>Candida antarctica</i> lipase A (CAL-A) とV-MPS4を組み合わせた方法で唯一達成されている。生成物のエナンチオ選択性は99% eeと極めて良好であった一方、77%収率に到達するまでに13日の反応時間を要し、その間CAL-AやV-MPS4を数日おきに交換する必要があった。また、成功例は1例しかなかった。そこでK. Wagnerと著者は第三級アルコールのリパーゼ触媒DKR法における上記の課題の解決と適用範囲の拡大を目的として共同研究に着手した。著者は、第三級アルコール2を用いてDKRの反応時間を短縮するために、まず、KR条件の改良を検討し、Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>を添加することで反応が促進されることを見出した。この条件下、新たに6例の第三級アルコールでDKRが進行することを見出した。</p> <p>次に、前述したKRとラセミ化を同時進行させてDKRを実施するための改善案を探索した。著者は、KRに用いるCAL-A及びNa<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>とラセミ化触媒V-MPS4との共存性を改善するために、シリコンチューブ (PDMS thimble) で両者の反応場を分離することがV-MPS4の活性維持に重要であった。</p> <p>PDMS thimbleを用いたDKR条件を検討した結果、CAL-A由来の水分を過剰量のNa<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>で吸着することが生成物の収</p>	

率向上に効果的であった。このDKR条件を基本として基質ごとにV-MPS4の使用量を変更することで、7例の第三級アルコール**2**から所望の光学活性なエステルを52-62%収率、75-99% eeで取得することに成功した。

著者は本DKR法のさらなる適用性拡大を目指して、K. Wagnerが最近開発したCAL-A変異体（DM-CAL-A）を著者自らがBielefeld大学にて発現・固定化させ、市販のCAL-Aでは適用が困難な基質に適用した。DM-CAL-Aは野生型CAL-Aがエステル化できなかった第三級アルコール4種に対して良好にKRが進行し、30-47%収率、81-99% eeで対応するエステルを得た。今後は、このDM-CAL-Aを上記のDKR条件に適用することで更なる適用範囲の拡張が見込まれる。

## 論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 ( 堀 野 聡 志 )			
	(職)	氏 名	
論文審査担当者	主 査	教授	赤井 周司
	副 査	教授	有澤 光弘
	副 査	教授	Harald Gröger
	副 査	准教授	Stephan Hammer

## 論文審査の結果の要旨

加水分解酵素のリパーゼは、多様な酵素群の中でも最も安定で取り扱いやすい酵素の 1 つである。リパーゼを有機溶媒中で利用すると、ラセミアルコールの 2 つの鏡像異性体を厳密に区別し、エナンチオ選択的エステル化を触媒する。この特性を利用して、速度論的分割 (KR) により、ラセミアルコールを最大 50% の収率でそれぞれの鏡像異性体に分離できる例が多数報告されている。一方、KR の拡張である動的速度論的分割 (DKR) では、ラセミ体を収率100%で1つの鏡像異性体に変換することができる。ラセミ体アルコールのDKR は、KRで残る片方の鏡像異性体のラセミ化とKRを同時進行させることで実現されるが、ラセミ化触媒とリパーゼが1つの反応容器内で共存することが不可欠である。両者の共存性を向上させるため、赤井らはメソポーラスシリカ (MPS) の細孔表面にオキシバナジウム種を固定化した独自のラセミ化触媒V-MPS4を調製した。V-MPS4を天然リパーゼと組み合わせて、ラセミの第二級アルコールを光学的に純粋なエステルに定量的に変換するDKR法を開発した。しかし、未解決の課題がいくつかある。

堀野聡氏は、大阪大学大学院薬学研究科とビーレフェルト大学とのダブルディグリープログラムに在籍しており、赤井教授とGröger教授（ビーレフェルト大学）の指導の下、リパーゼ触媒DKRの未解決課題のうち以下に示す2つの研究テーマに取り組んだ。その研究成果を2つの章に纏めて論述した。

第一章では、リパーゼ触媒DKRによる第二級プロパルギルアルコールの両鏡像異性体の合成法の開発が述べられている。天然リパーゼはホモキラリティーのため片方の異性体とのみ反応する。例えば、第二級アルコールからは(R)-エステルが生じるため、DKRで(S)-エステルを得ることができない。著者は、末端エチニル基に容易に除去できるトリアルキルシリル基を持つプロパルギルアルコールを用いることで、S-選択的DKRを検討した。この研究で用いた市販の*Pseudomonas fluorescens*由来リパーゼ (Lipase AK) がV-MPS4を不活性化する問題に直面したが、市販リパーゼをセライトに固定化することで解決した。固定化リパーゼAKを用いるDKR法を7種のラセミのシリル化アルコールに適用し、その後、脱シリル化とエステル加水分解を経て(S)-プロパルギルアルコールを得た。さらに著者は、赤井研究室のR選択的DKR法を参考に、上記7種に対応するシリル基を持たないプロパルギルアルコールから(R)-アルコールを合成した。このように著者は、2通りのDKR法を選択することにより、第二級プロパルギルアルコールの両鏡像異性体の作り分けを達成した。

第二章では、第三級アルコールのDKR法の改良研究の成果が述べられている。Grögerと赤井の両グループは、*Candida antarctica*由来リパーゼA (CAL-A) とV-MPS4を用い、第三級アルコールのDKRを初めて報告したが、反応に13日間を要し、実施例は1例であった。著者はGröger 研究室の院生Wagner氏と共同で、リパーゼ触媒による第三級アルコールのDKRの改良研究を開始し、著者は主に反応時間の短縮と基質範囲の拡大研究を担当した。まず、市販の固定化CAL-Aに混入しているポリエチレングリコールがV-MPS4の不活性化の原因の1つであることを突き止め、有機溶媒でCAL-Aを洗浄することでこの問題を解決した。また、KR条件にNa<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>を添加するとリパーゼ触媒エステル化反応が大幅に促進されること、ヘキサン酸ビニルを使用することで生じるエステルはクロマトグラフィーで単離精製が可能になることを見出した。この新しいKR条件下で、著者は6つの新しい第三級アルコールを含む7つの第三級アルコールのKRを実施した。これらの反応はすべて25℃、24時間で行われたことは注目に値する。

次に著者は、改良型KR条件をDKRに適用した。その際、疎水性ポリジメチルシロキサン (PDMS) シンプルを使用してKRとラセミ化の反応場を1つのフラスコ内で分離することで、V-MPS4の失活が抑えられることを見出した。

そこで、PDMS シンブルを用いた新しい DKR 法を前述の 7 種類の第三級アルコールに適用し、わずか 48 時間で (R)-エステル (単離収率 52~62%) を得ることに成功した。続いて、最近 Wagner が開発した CAL-A 二重変異体を DKRに適用するため、著者はビーレフェルト大学で変異体 DM-CAL-A を調製した。次に、CAL-A二重変異体を用いると、より嵩高い第三級アルコールが25℃でエステル化を触媒することを見出した。これらは、DKR法の更なる適用拡張につながる意義深い成果である。

以上、本研究は、キラルな医薬品の開発研究や光学的に純粋な医薬品の製造工程の効率化に寄与するところが大きく、博士（薬科学）の学位論文に値するものと認める。