

学位論文題名

生体触媒を用いるキノロン系合成抗菌薬及び  
カンプトテシン誘導体の重要不斉中間体の合成研究

学位論文内容の要旨

I. はじめに

近年、酵素あるいは微生物が有機合成手段の1つとして見直されるようになってきた。それは、酵素は条件次第で目的の基質に対して極めて選択的な反応を触媒しうるからである。著者は、酵素(微生物)が有するメリットのうち、①通常の化学反応では実現しにくいような specificity を発揮できる、② kinetic resolution を用いることにより変換生成物のみならず回収される基質も光学活性体のため両者とも有効に利用できる、という点に着目して医薬品の不斉中間体合成のキーステップに酵素反応を組み込むことを目的として研究を行ってきた。今回、キノロン系合成抗菌薬及びカンプトテシン誘導体の重要合成中間体を酵素触媒を用いて高い光学純度で合成することに成功すると同時に、カンプトテシン誘導体の不斉中間体については工業的スケールで実施できる知見が得られた。

II. キノロン系合成抗菌剤不斉中間体の合成

キノロン系合成抗菌薬の重要な不斉中間体である (1*S*, 2*S*)-2-fluorocyclopropane-carboxylic acid の合成を目的とし、ラセミ体のエステルを不斉加水分解する酵素を探索した。まず最初に、本不斉加水分解反応を触媒する酵素を市販酵素の中に求めたが、光学認識がなされていないことが明らかとなった。これはフッ素原子が生体(酵素)により識別されにくい(mimic 効果)ためであることが推測されたため、酵素源を微生物にまで広げてスクリーニングを行った。市販の微生物であるタイプカルチャー(500 菌)の検討で、いくつかの菌株において不斉認識が観測されたが、しかし *E* 値が低いことに加え目的物の光学純度(28–68%*ee*)も満足できる結果ではなかったため、集積培養法により自然界の土壌から目的物を高い光学純度で生成する菌株を探索し、目的の酵素活性を有する菌株を選出することに成功した。

本不斉加水分解反応を触媒する酵素を精製しその性質を検討したところ、この精製酵素は、モノマー酵素であり pH 4–9、50°C 以下で安定であったが水銀イオン及び DFP で強く阻害された。また本酵素は、炭素鎖 3–5 の脂肪族のエステルに広く作用

するが、芳香族のエステルには作用しないことが明らかとなった。更に、粗酵素比精製酵素での光学認識能の比較から、不斉加水分解反応においてフッ素原子を完全には認識していないことが明らかとなった。

### Ⅲ. カンプトテシン不斉中間体の合成

アセテートの酵素的な不斉加水分解反応を利用して、目的の *S* 配置を有する不斉中間体を得ることを検討した。スクリーニングの結果、パパイン等植物由来のプロテアーゼに良好な加水分解活性と不斉認識能を見出した。この反応を水-酢酸エチルの 2 層系で行うと、不斉加水分解反応は定量的に進行し、目的の *S* 配置を有する化合物を 99% *ee* という高い光学純度で単離することに成功した。この不斉中間体は、脱アセチル化後 TFA でケタールを除去することにより容易にカンプトテシンに誘導することが可能であった。

本酵素反応の基質特異性についてはかなり狭く、①アセチル基よりも炭素鎖が長いエステル、②ラクトン部分をエステルに変換した基質は加水分解反応が殆ど進行しなかった。*R* 配置を有するエステルは反応時間を長くしても全く加水分解されず、本反応の光学認識が完全に行われていることが示唆された。

更に、不斉加水分解反応で副生する *R* 配置を有する不要な異性体は、2 行程を経てラセミ体にリサイクル可能であることを見出し、酵素法と化学法を組み合わせたカンプトテシン重要中間体の工業的プロセスの確立に成功した。

### Ⅳ. まとめ

(1) 生体触媒による認識が難しいとされている、モノアルキルフルオロ化合物の不斉加水分解反応を試み、自然界の土壌中から目的の *S*-配置を有する化合物を高い光学純度で生成する菌株を見出すことに成功した。更に、この不斉加水分解反応を触媒する酵素蛋白を単離しその性質を明らかにした。

(2) カンプトテシン誘導体合成で、汎用性の高い不斉中間体の合成において、市販酵素パパインが良好な不斉認識能を有することを見出した。水-酢酸エチル二層系で酵素反応を行なうと、目的の *S* 配置を有する化合物が定量的かつ 99% *ee* 以上という高い光学純度で得られた。現在、このパパインを用いる酵素法は、200L スケールのパイロットプラントでの製造に成功している。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 大 塚 栄 子  
副 査 教 授 松 田 彰  
副 査 助 教 授 井 上 英 夫  
副 査 講 師 南 川 典 昭

## 学位論文題名

### 生体触媒を用いるキノロン系合成抗菌薬及び カンプトテシン誘導体の重要不斉中間体の合成研究

申請者は生体触媒を用いる重要不斉中間体の合成研究を行ってきたが、酵素（微生物）が有するメリットのうち、①通常の化学反応では現実しにくいようなspecificityを発揮できる、②kinetic resolutionを用いることにより変換生成物のみならず回収される基質も光学活性体のため両者とも有効に利用できる、という点に着目した。今回、キノロン系合成抗菌薬及びカンプトテシン誘導体の重要合成中間体を酵素触媒を用いて高い光学純度で合成することに成功すると同時に、カンプトテシン誘導体の不斉中間体については工業的スケールで実施できる知見を得た。

#### キノロン系合成抗菌剤不斉中間体の合成

キノロン系合成抗菌薬の重要な不斉中間体である(1*S*, 2*S*)-2-fluorocyclopropane carboxylic acidの合成を目的とし、ラセミ体のエステルを不斉加水分解する酵素を探索した。まず最初に、本不斉加水体反応を触媒する酵素を市販酵素の中に求めたが、光学認識がなされていないことが明らかとなった。これはフッ素原子が生体（酵素）により識別されにくい（mimic効果）ためであることが推測されたため、酵素源を微生物にまで広げてスクリーニングを行った。市販の微生物であるタイプカルチャー（500菌）の検討で、いくつかの菌株において不斉認識が観測されたが、しかし*E*値が低いことに加え目的物の光学純度（28-68%*ee*）も満足できる結果ではなかったため、集積培養法により自然界の土壌から目的物を高い光学純度で生成する菌株を探索し、目的の酵素活性を有する菌株を選出することに成功した。

本不斉加水体分解反応を触媒する酵素を精製その性質を検討したところ、この

精製酵素は、モノマー酵素でありpH4-9, 50℃以下で安定であったが水銀イオン及びDFPで強く阻害された。また本酵素は、炭素鎖3~5の脂肪族のエステルに作用するが、芳香族のエステルには作用しないことが明らかとなった。更に、粗酵素及び精製酵素での光学認識能の比較から、不斉加水分解反応においてフッ素原子を完全には認識していないことが明らかとなった。

#### カンプトテシン不斉中間体の合成

アセテートの酵素的な不斉加水分解反応を利用して、目的の*S* 配置を有する不斉中間体を得ることを検討し、パパイン等植物由来のプロテアーゼに良好な加水分解活性と不斉認識を見出した。この反応を水-酢酸エチルの2層系で行うと不斉加水分解反応は定量的に進行し、目的の *S* 配置を有する化合物を99% *ee* という高い光学純度で単離することに成功した。この不斉中間体は、脱アセチル化後 TFA でケタールを除去することにより容易にカンプトテシンに誘導することが可能であった。

本酵素反応の基質特異性についてはかなり狭く、①アセチル基よりも炭素鎖が長いエステル、②ラクトン部分をエステルに変換した基質は加水分解反応が殆ど進行しなかった。*R* 配置を有するエステルは反応時間を長くしても全く加水分解されず、本反応の光学認識が完全に行われていることが示唆された。

更に、不斉加水分解反応で副生する *R* 置換を有する不要な異性体は、2行程を経てラセミ体にリサイクル可能であることを見出し、酵素法と化学法を組み合わせたカンプトテシン重要中間体の工業的プロセス確立に成功した。

以上の業績は、博士（薬学）を授与するのに値するものと判断した。