

# イオン液体を媒体とする酵素反応の開発

鳥取大学工学部物質工学科 伊藤 敏 幸

## 1. はじめに

化学反応はなんらかの反応媒体中でおこなう必要があり、反応媒体の適切な選択が化学反応の成否を決めると言って過言ではない。最近では環境に優しい有機合成の観点から、化学反応の媒体が注目されるようになり、脱有機溶媒化学を目指して、水を反応媒体とすることを売り物とする反応開発も盛んに行われている。しかし、水を反応媒体とする化学反応=環境に優しい合成法というわけではない。反応そのものは水中で進行しても、目的の有機化合物を有機溶媒で抽出すれば、今度は有機溶媒を含む排水を出すことになる。有機溶媒がとけ込んだ水溶液の無害化処理は困難であり、これでは環境に優しい合成反応とは到底言えない。たとえ有機溶媒を反応媒体としていても、きちんとした溶媒リサイクル系が構築できる場合は、単なる水を反応媒体とする反応より、環境調和という観点からはるかに好ましい有機合成反応システムといえよう。

酵素反応は重金属や貴金属を使用することなく非常に精緻な分子変換を行うことができる究極の環境調和型の合成反応である<sup>2)</sup>。ただし、ほとんどの酵素反応は水中で実現し、一般に基質濃度が低いために、目的物を反応水溶液から取り出すために多量の有機溶媒で抽出を余儀なくされることが多い。従って、酵素反応=環境に優しい有機合成というわけでもなく、反応システム全体を総合的に吟味する必要がある。従来、酵素反応の場合はもっぱら水媒体と考えられ、反応媒体に関する検討はおざなりであった。しかし、酵素の活性中心付近は疎水的な環境にあり、触媒活性が発現する場で水が不可欠というわけではない。もし、酵素反応を有機溶媒反応システム中で実現でき、溶媒リサイクル系を構築できれば、伝統的な水媒体の酵素反応よりより環境に優しい有機合成反応になると期待できる。

イオン液体は最近、超臨流体とともに注目を浴びている新しい反応媒体である<sup>3)</sup>。一般に塩としてイメージされる無機塩の多くは水溶性であり、熔融状態にするには高温を要するが、アンモニウム塩やホスホニウム塩などの有機塩の中には、常温でも結晶化せずに熔融しているものが存在する。このような塩を「イオン液体」と総称し、イオン液体のなかではイミダゾリウム塩が溶媒として最も利用されている。イミダゾリウム塩は安定であるとともに、組み合わせる対アニオンにより性質が大きく変化する。たとえば、1,3-ジメチルイミダゾリウム=ヘキサフルオロホスフェート([dmim][PF<sub>6</sub>])は室温で固体であるが、イミダゾリウム環上の置換基が非対称の1-ブチル-3-メチルイミダゾリウム塩 [bmim][PF<sub>6</sub>]は室温で液体であり、しかもその液体状を示す温度範囲は融点 -61°C、沸点 300°C以上と極めて広い。さらに、[bmim][PF<sub>6</sub>]はエーテルにも水にも溶けないという面白い溶解特性も示す。ただし、酵素の反応には最適温度や至適pHがあり、高濃度の塩の水溶液中ではタンパク質の変性を伴うことが良く知られている。従って、「塩」そのものであるイオン液体を酵素反応の溶媒として使おうというアイデアは、生物学的には常識はずれの発想と言えよう。筆者らはイオン液体を反応媒体に用いるリパーゼ触媒不斉アシル化を実現させ、イミダゾリウム塩を適切に分子設計することで酵素を効率的に再利用するシステム構築を行ってき

た<sup>3-8)</sup>. さらに、イオン液体による酵素の新しい活性化方法を検討し、PEG アルキルスルホン酸イオンのイミダゾリウム塩でリパーゼをコーティングすることで、有機溶媒中での活性を大きく向上できることを見いだした<sup>9-11)</sup>. イオン液体という新しい反応媒体を利用する酵素反応を開発し、さらにイオン液体コーティングという手法により、有機溶媒中で酵素反応を高活性で進行させる方法論について紹介する.

## 2. イオン液体を反応媒体とするリパーゼ触媒不斉アシル化反応

加水分解酵素であるリパーゼはエステルを加溶媒分解してアルコールに変換し、有機溶媒中ではアシル化剤となるエステル存在下、アルコールのアシル化反応を触媒する機能を持つ. このとき、エナンチオマーを見分けて反応するため、エナンチオマー間でアシル化速度が異なる. 従って、ラセミ体のアルコールをアシル化すると、酵素と適合したエナンチオマーが優先的にエステル化され、適合しないエナンチオマーは未反応でアルコールのまま残る. 反応後にエステルとアルコールを分離すれば、エナンチオマーを分離できたことになる (速度論的光学分割). 適した酵素さえ見つければ実験室でも一度に数十グラムの光学活性体化合物を簡単に得ることができる<sup>2)</sup>. 筆者らは、イオン液体を反応媒体としてリパーゼによる第2級アルコールの不斉アシル化反応を検討し、ラセミ体

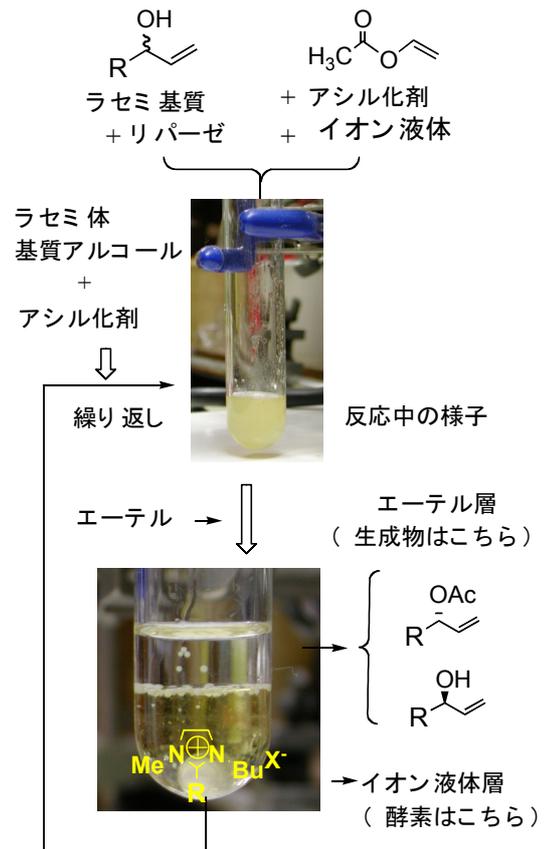


図1. イオン液体溶媒によるリパーゼ繰り返し利用システム

5-フェニル-1-ペンテン-3-オールをモデル

基質に用いて、イミダゾリウム塩イオン液体を反応媒体としたリパーゼによる不斉アシル化反応を検討し、イオン液体 [bmim][BF<sub>4</sub>], [bmim][PF<sub>6</sub>]が良い溶媒になり、Novozym435 (*Candida antarctica*) や *Burkholderia cepacia*<sup>12)</sup>リパーゼで不斉アシル化反応が実現することを明らかにした<sup>3)</sup>. E 値<sup>13)</sup> 200 以上と完璧なエナンチオ選択性で反応が進行し、反応終了後エーテルを加えると、エーテル層とイオン液体層に綺麗に分離する. 未反応アルコールと生じたエステルはエーテル層に移り、イオン液体には酵素が残るため、エーテルを除いたのち、基質のアルコールとアシル化剤を加えると再度アシル化反応が進行し、酵素を再利用することができる (図1).

イオン液体という溶媒に「酵素を固定化」して再利用できることがわかったが、リサイクルを繰り返すと反応速度が低下するという問題が生じた<sup>3)</sup>. この反応ではアシル化剤に酢酸ビニルを用いている. 酢酸ビニルをアシル化に用いるとビニルアルコールが生じる. ビニルアルコールは直

ちに互変異性しアセトアルデヒドとなるため逆反応が起こらない。このため、酢酸ビニルがリパーゼ触媒によるアシル化反応のアシル化剤として広く利用されている。アセトアルデヒドは酵素タンパク中のアミノ酸とシッフ塩基を形成するため酵素阻害作用があるが、実際には揮発して反応系から速やかにでていくために問題にならなかったのである。ところが、再使用を繰り返したイオン液体を調べてみると、アセトアルデヒドオリゴマー（主に 3 量体）が蓄積しており、これがリパーゼを阻害することがわかった（表 1, Entry 1-3）<sup>4,5)</sup>。

アシル化剤としてビニルエステルの代わりにメチルエステルを使用し、減圧条件下で酵素反応を行い、生じたメタノールを直ちに反応系から追い出してしまえば、逆反応も起きず、アセトアルデヒドがでることもない。ただし、減圧条件下で反応させようとすると、メチルエステルを溶媒兼用で大過剰使用する必要があった。一方、イオン液体は減圧しても揮発しない溶媒である。従って、イオン液体溶媒系ではメチルエステルを必要量だけ用いればよいはずである。高いエナンチオ選択性を実現するためにはメチルエステルを適切に選択する必要があったが、フェニルチオ酢酸メチルをアシル化剤に用いて減圧条件下でアシル化反応を行ったところ、極めて効率的な不斉アシル化が実現し、5 回反応を繰り返しても反応速度、エナンチオ選択性共に低下しないことがわかった。しかも、理論量のアシル化剤しか使用しないという理想的な不斉アシル化反応が実現した<sup>4,5)</sup>。

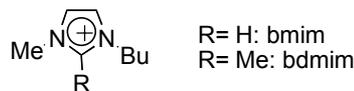
ただし、当然の事ながら、低沸点の基質には減圧反応システムが使えない。イオン液体溶媒中で酢酸ビニルをアシル化剤に使うとアセトアルデヒドが蓄積する理由は、イミダゾリウム塩の 2 位のプロトンの酸性度が高く、このプロトンが酸触媒として作用してアセトアルデヒドのオリゴマー化が促進されていると予想された。そこで、2 位をメチル化してプロトンをなくした 1-ブチル-2,3-ジメチルイミダゾリウム=テトラフルオロボレート ([bdmim][BF<sub>4</sub>]) を合成して反応溶媒に用

いたところ、期待通りアセトアルデヒドオリゴマーの蓄積が認められなくなり、10 回反応を繰り返してもほとんど反応速度が低下せず、完璧なエナンチオ選択性を保ったまま酵素の再利用が実現した（表 1, Entry 4-6）<sup>6)</sup>。いまでは、数ヶ月以上にわたり全く活性を損なわず 20 回以上酵素の再使用ができることがわかっている。

イミダゾリウム塩の対アニオンとして BF<sub>4</sub> や PF<sub>6</sub>, N(Tf)<sub>2</sub>, OTf などが対アニオンとして広く使われてきた。もし、スルホン酸イオンを対アニオンにできれば、対アニオンの種類を飛躍的に増やすことができる。そこでアルキルスルホン酸を対アニオンとするイオン性液体を各種合成し、リパーゼ触媒反応を検討した。その結果、メトキシエトキシスルホン酸イオンやフェノキシエトキシスルホン酸イオンを持つイミダゾリウム塩が良い溶媒になることがわかった（表 1）<sup>7)</sup>。なお、リパーゼをイオン性液体中で繰り返し使用する場合には酵素を固定化したほうがよい。抽出操作

表 1. イオン液体溶媒中でのリパーゼ繰り返し反応結果

Entry	溶媒	時間当転換率 (% conv./h)	E 値	
1	[bmim][BF <sub>4</sub> ]	1回目	14	>200
2		3回目	9	>200
3		5回目	0.8	>200
4	[bdmim][BF <sub>4</sub> ]	1回目	16	>200
5		5回目	10	>200
6		10回目	12	>200
	[bmim][PhOCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ]	1回目	1.2	>200
	[bdmim][PhOCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ]	1回目	19	>200



を容易にするための酵素固定化担体を検討し、セラミックスの一種やメソポーラスシリカ<sup>5)</sup>、タングステンオキシドでコートした金属塩が、優れた酵素固定化担体になることを見いだしている<sup>8)</sup>。

### 3. PEG アルキルスルホン酸イミダゾリウム塩イオン液体によるリパーゼの活性化

リパーゼによるアシル化は、基質によっては溶媒選択でエナンチオ選択性が大きく変化することが知られている。また、リパーゼのタンパクと相互作用を考えると考えられる様々な化合物でエナンチオ選択性が変化することが知られ、筆者らはチオクラウンエーテルを微量添加することでエナンチオ選択性や加水分解反応の反応加速が起こることを明らかにしている<sup>14)</sup>。さらに、最近、後藤らはPEGでコーティングした酵素がイオン液体中で高い活性を示すことを明らかにしている<sup>15)</sup>。そこで、イオン液体と酵素との高い親和性を期待し、硫酸エステル系イオン液体としてポリオキシエチレンアルキルスルホン酸=1-ブチル-2,3-ジメチルイミダゾリウムを合成し、これらでコーティングしたリパーゼを調製しジイソプロピルエーテル溶媒中でアシル化反応を行った(式1)。

アルコール(±)-**1** について、ジイソプロピルエーテル(*i*-Pr<sub>2</sub>O) 溶媒中で酢酸ビニルをアシルドナーに用いて不斉アシル化反応を行い、市販リパーゼ PS と活性を比較を行ったところ、イオン液体でコーティングした酵素は、エナンチオ選択性を保持したまま、市販リパーゼ PS-C に較べて数十倍の反応加速が観察された<sup>9)</sup>。反応加速効果はアニオン部に依存し、界面活性剤 Brij-56 から誘導したポリオキシエチレン(10)セチル硫酸イオンを対アニオンとするイオン液体 **IL1** が最も優れていた。酵素タンパクコーティングに要する **IL1** の最適量を調べたところ、リパーゼ PS の酵素タンパク当たりモル比で約 100 倍程度加えて調製した場合に最大の反応加速効果が得られ、これ以上加えると反応速度が徐々に低下した。また、単にイオン液体と混合するだけでは活性化効果はあまり認められず、リパーゼの水溶液中でイオン液体と混合したのちに凍結乾燥処理することが活性化に必須であった<sup>11)</sup>。

さらに、酵素のコーティングに用いたイオン液体を構成しているイミダゾリウムカチオンの構造でエナンチオ選択性が変化することがわかった。1-ブチル-3-メチルイミダゾリウム塩では反応加速は起こるもののエナンチオ選択性が低下し、1-ブチル-2,3-ジメチルイミダゾリウム塩ではエナンチオ選択性の低下が認められず、イミダゾリウム環の 2 位のプロトンの有無がリパーゼのエナンチオ選択性を左右していた。このことは、イミダゾリウム塩が酵素のタンパク質に積極的に相互作用していることを示唆していると考えられる。そこで、**IL1** でコーティングしたリパーゼ PS (**IL1-coated Lipase PS**)を用いて各種の 2 級アルコール **3** について、酢酸ビニルをアシル化剤に使用し、ジイソプロピルエーテル溶媒中の不斉アシル化反応を調べた。その結果、反応加速効果、エナンチオ選択性共に、基質アルコールの構造に大きく依存することがわかった(図 2)。ナフチル誘導体 **1a**, **1b** の場合、市販リパーゼ PS では反応が遅いが、**IL1**-コーティングしたリパーゼ PS を用いることで顕著な反応加速が認められ、実用的に利用できる反応になった。また、3-ヒドロキシペンタンニトリル **1c** の場合は、加速倍率は 98 倍であるが、市販リパーゼ PS で 2 時間程度かかる反応が 10 分で終了し、しかもエナンチオ選択性が変化しないという優れた結果が得られた。実用的な観点から極めて意義が大きい<sup>11)</sup>。

反応加速の理由を探るため、イオン液体コーティングしたリパーゼ PS(**IL1-coated Lipase PS**)の粉

未と未処理酵素粉末(Celite free Lipase PS)の SEM を測定した。その結果、イオン液体コーティングでは多孔質な酵素タンパク集合体が形成されることがわかり、イオン液体コーティング処理でタンパクの表面積が増大していることがわかった。このため基質分子の取り込み速度が向上したと考えると反応加速効果が説明できる。一方、エナンチオ選択性の変化はこのような要因では考えにくい。イミダゾリウムカチオンの構造でエナンチオ選択性が変化するため、イミダゾリウムカチオンが酵素タンパクに対して何らかの作用をしているのは確実である。イオン液体コーティングを行うと、基質分子で選択性が変化することから考えると、イオン液体を構成するイミダゾリウムカチオンと酵素タンパク間の相互作用によるコンフォーメーション変化がエナンチオ選択性を変化させる大きな要因と推察される<sup>11)</sup>。

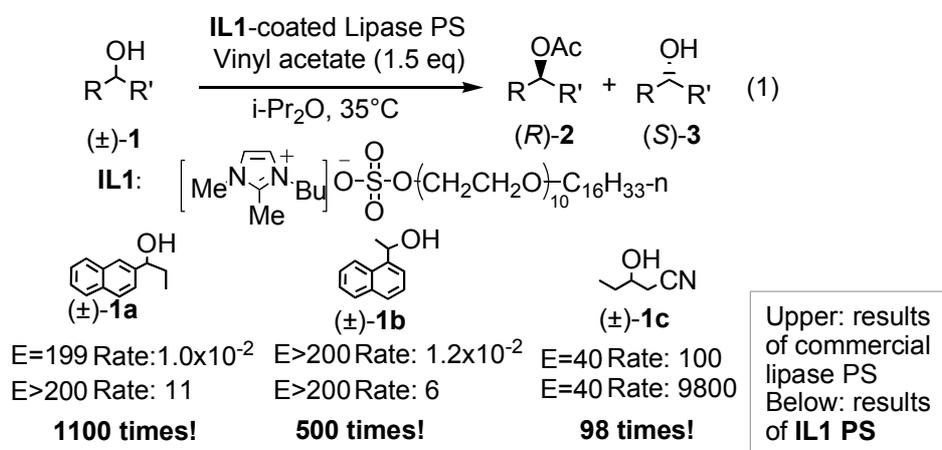


図2. IL-1コーティングしたリパーゼPSの活性化効果

#### 4. 今後の展望

筆者の研究室では、イオン液体は再生処理して常に再利用している。実験操作のために少しずつ目減りするため必要に応じて追加しているが、現在使っている[bmim][PF<sub>6</sub>], [bmim][BF<sub>4</sub>], [bmim][TFSI]などは6年物のイオン液体である。酵素の安定性に関しては、エステル交換反応に通常使用されてきたトルエンやヘキサン、ジイソプロピルエーテル等の有機溶媒よりイオン液体が優れていることも間違いがない。コスト問題がクリアできればイオン液体溶媒による酵素触媒反応は広く普及すると思われる。

イオン液体コーティングによる活性化効果は、リパーゼのみならずアルカリプロテアーゼでも確認している。現在、さらに酸化還元酵素などの他の酵素反応におけるイオン液体コーティング効果を調べているが、このような簡単な処理で、従来は水系でしか作用しなかった酵素反応が有機溶媒中で実現できれば、反応媒体で酵素反応を制御することも可能となるであろう。また、低温でしか保存できなかった酵素を、室温で保存できるように安定化できれば酵素反応のブレークスルーにもつながるものと期待している。さらに、本研究で開発できたPEG-アルキル硫酸イミダゾリウム塩イオン液体は、タンパクを保護するという側面がある。分子設計次第ではペプチド系医薬の被覆剤や、組み合わせる4級アンモニウム塩次第では抗菌性を持たせることも可能と考え

られ、さらなる発展が期待される。

## 文献

- 1) Review の例 : (a) “Ionic Liquids in Synthesis”, Eds, P. Wasserscheid and T. Welton, Wiley-VCH (2003).  
(b) 北爪智哉, 淵上寿雄, 沢田英夫, 伊藤敏幸, - イオン液体-常識を覆す不思議な塩-, コロナ社, 東京 (2005). (c)イオン液体 II-驚異的な進歩と多彩な近未来-, 大野弘幸編, CMC 出版, 東京 (2006).
- 2) 太田博道 “生体触媒を使う有機合成”, 講談社サイエンティフィク, (2003) .
- 3) Itoh, T.; Akasaki, E.; Kudo, K.; Shirakami, S. *Chem. Lett.* **2001**, 262.
- 4) Itoh, T.; Akasaki, E.; Nishimura, Y. *Chem. Lett.* **2002**, 154.
- 5) Itoh, T.; Nishimura, Y.; Kashiwagi, M.; Onaka, M., Ionic Liquids as Green Solvents: Progress and Prospects, ACS Symposium Series 856, Eds, R. D. Rogers and K. R. Seddon, American Chemical Society: Washington DC, Chapter 21, pp. 251-261 (2003) .
- 6) Itoh, T.; Nishimura, Y.; Ouchi, N.; Hayase, S. *J. Mol. Catalysis B: Enzymatic*, **2003**, 26, 41.
- 7) Itoh, T.; Ouchi, N.; Hayase, S.; Nishimura, Y. *Chem. Lett.* **2003**, 32, 654.
- 8) Itoh, T.; Ouchi, N.; Nishimura, Y.; Han, S-H.; Katada, N.; Niwa, M.; Onaka, M. *Green Chem.* **2003**, 5, 494.
- 9) Itoh, T.; Han, S.; Matsushita, Y.; Hayase, S. *Green Chem.* **2004**, 6, 437.
- 10) Tsukada, Y.; Iwamoto, K.; Furutani, H.; Matsushita, Y.; Abe, Y.; Matsumoto, K.; Monda, K.; Hayase, S.; Kawatsura, M.; Itoh, T. *Tetrahedron Lett.* **2006**, 48, 1801.
- 11) Itoh, T.; Matsushita, Y.; Abe, Y.; Han, S-H.; Wada, S.; Hayase, S.; Kawatsura, M.; Takai, S.; Morimoto, M.; Hirose, Y. *Chemistry-A European J.* **2006**, in press.
- 12) 以前は *Pseudomonas cepacia* と呼ばれていたが、最近、名称が変更された。
- 13) Chen, C. -S.; Fujimoto, Y.; Girdauskas, G.; Sih, C. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, 102, 7294
- 14) Itoh, T.; Mitsukura, K.; Kanphai, W.; Takagi, Y.; Kihara, H.; Tsukube, H. *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 9165.
- 15) (a) Maruyama, T.; Nagasawa, S.; Goto, M. *Biotechnology Lett.* **2002**, 24, 1341. (b) Maruyama, T.; Yamamura, H.; Kotani, T.; Kamiya, N.; Goto, M. *Organic & Biomolecular Chem.* **2004**, 2, 1239.