

芽生え植物を用いた有用物質の変換

松尾 清子・河邊誠一郎・徳田 陽祐

江口 剛史*・山中 理央・中村 薫**

倉敷芸術科学大学生命科学部

*岡山大学大学院資源生物研究所

**京都大学化学研究所

はじめに

最近、生体触媒を用いた有機合成が盛んにおこなわれている¹⁾。生体触媒とは生物機能を利用した触媒のことで、具体的には酵素、微生物、菌体、植物細胞、動物細胞などが使われている。生体触媒の利点としては主として次の2つがあげられる。

- (1) 反応条件が温和である。生体触媒は反応温度が約37℃、pHは約7.0ではたらく。また、生体触媒は空気存在下、水溶液の中で反応するので、通常有機合成に必要な脱気や脱水の操作は不要となる。また、化学法での不斉反応は反応速度の向上のためには高温下の反応が、また選択性の向上のために極低温下の反応が必要なことが多いが、酵素は室温でも十分な選択性や活性を示すので、室温付近で反応させることが出来、低温や高温のためのエネルギーは不要である。
- (2) 立体選択性が高い。生体触媒は微生物や植物、動物の細胞そのものを指すときもあるが、実際に基質に働いているのは酵素である。酵素は反応の立体選択性が非常に高い。医薬品や農薬の合成においては高い立体選択性が要求される場合が多く、必要な立体配置をもつ化合物のみを選択的に合成する方法が必要となる。これまで生体触媒としてはリパーゼを代表とする単離酵素やパン酵母のような微生物が主として利用されており、植物の利用はほとんどみられない。通常、植物は天然生理活性物質を豊富に含んでおり、また、様々な二次代謝産物を合成するための独自の酵素を兼ね備えていることから、植物もパン酵母やリパーゼのような生体触媒と同様、有機合成に利用できる可能性を秘めていることは明らかである。通常、生体触媒として植物細胞を用いる場合は、培養細胞の形態にして用いることが多い。培養細胞を用いる利点は、細胞が均一で安定的に生産でき、また、大量増殖も可能なことである。しかしその取り扱いが一般の有機合成化学者にとっては決して容易なものではない²⁾。

今回、われわれは新しい生体触媒として芽生え植物の利用を検討した。市販されている種子から芽生え植物を得ることは、その発芽、生育条件さえ決定できれば、一年を通じて発芽させることができるものも多く、“誰でも”、“どこでも”、“簡単に”使える生体触媒として価値が高いものと考えている。われわれは芽生え植物として赤丸二十日大根コメント

(*Raphanus sativus* L) を用い、非天然物ケトン類である α, α, α -トリフルオロアセトフェノンおよびアセトフェノン誘導体を基質として還元反応³⁻⁸⁾ を検討し、その結果、高い不斉収率で相当する光学活性アルコールを得ることが出来たので報告する。

材料および方法

1) 供試植物

赤丸二十日大根コメット (*Raphanus sativus* L) 種子 (タキイ種苗) を用いた。これは二十日間で成長する品種であり、再現性等をとり易い品種である。二十日大根は園芸用品種が多い。本種の出産はヨーロッパでradish (ハツカダイコン) が原産である。

2) 実験方法

二十日大根は一般的に土の上に直播し、太陽光のもとで生育するものであるが、生体触媒として用いることを目的とするには再現性が得られること、天候、季節の影響を受けないことが必要である。そこで本実験においては、二十日大根を恒温室内で、蛍光灯の照射下で、滅菌状態で生育し、その後、基質と反応させた。(図1)

A) 種子の滅菌および発芽方法

- (1) 種子を水道水に入れてスターラーで5分間攪拌した後、最終塩素濃度約1%溶液の次亜塩素酸ナトリウム溶液中で10分間攪拌しながら滅菌をおこなった。
- (2) クリーンベンチ内で、次亜塩素酸ナトリウムを滅菌蒸留水でよく洗った後、滅菌したシャーレにろ紙4枚を敷き、滅菌蒸留水を加えて湿らせた上に、種子をのせて密封した。
- (3) 25°C、暗黒下で1~2日間置いて種子を発芽させ、その中で正常に発芽した植物体を次の生育に用いた。

B) 植物体の生育条件の検討

- (1) 一般的な生育方法とTFAの還元反応

(1-1) 生育方法

100mlの三角フラスコにLS液体培地を30mlとスクロースを入れ、A) で得られた発芽種子を1個体入れ、白色蛍光灯約4000 lux 連続照射下、120rpmで10日間振とう培養した。

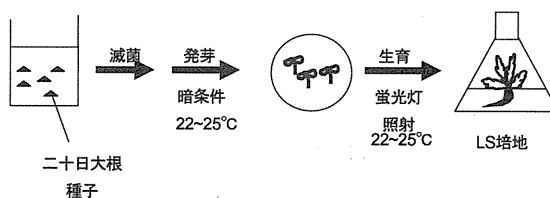


図1 二十日大根の生育方法

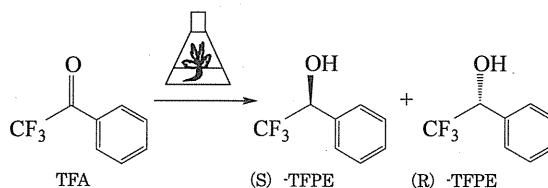


図2 二十日大根の芽生え植物を用いたTFAの還元反応

- (1-2) α, α, α -トリフルオロアセトフェノン (TFA) の還元反応 (図2)

100mlの三角フラスコに、新たに用意したLS液体培地を30ml、スクロース ((1

-1)と同量)、(1-1)で得られた植物体を1個体、TFA-DMSO溶液(10w/v%) 30 μ l加えて、約4000lux連続照射下、120rpmで振とうし、還元反応を行った。反応の後処理は、ガスクロマトグラフ用の内部標準としてナフタレン(6w/v%)を30 μ lを加えた後、エーテル5mlx2で抽出し、エーテル層をextrelutで充填したBond Eluteカラムを通して乾燥した。エーテル層をガスクロマトグラフィーで測定し、得られたアルコールの不斉収率(ee%)と収率を計算した。アルコールの絶対配置は標準物質とガスクロマトグラフの保持時間を比較して同定した⁸⁾。ガスクロマトグラフ：カラム、CP-cyclodextrin β -2,4,6-M-19 0.25 ϕ x25m；温度120 $^{\circ}$ C；保持時間 ケトン、2.94min；(S)-アルコール、15.64min；(R)-アルコール、16.36 min。

(2) 糖濃度の検討

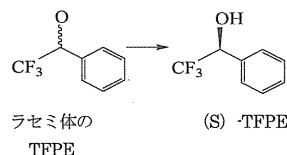
(1-1)の生育方法において、加えるスクロースの濃度を0~4%と変化させて二十日大根を10日間生育した。植物体を取り出し、新たに用意したLS液体培地30ml(生育時と同じ濃度になるようにスクロースを加えたもの)に1個体加え、TFAの還元反応(1-2)に用いた。反応日数1日間で後処理をおこない、糖濃度が還元で得られたアルコールの収率および不斉収率にどのように影響するかを調べた。

(3) 培地の量の検討

(1-1)の生育方法において、スクロースの濃度を3%に固定し、LS培地の量を5, 10, 15, 20, 30, 50mlと変化させて10日間二十日大根を生育した。植物体を取り出し、新たに用意したLS液体培地30ml(スクロース3%を加えたもの)に1個体加え、TFAの還元反応(1-2)に用いた。反応日数1日間で後処理をおこない、得られたアルコールの不斉収率にどのように影響するかを調べた²⁾。

(4) 反応日数の検討

(1-1)の生育方法において、スクロースの濃度を3%に固定して二十日大根を10日間生育した。植物体を取り出し、新たに用意したLS液体培地30ml(スクロース3%を加えたもの)に1個体加え、TFAの還元反応(1-2)に用いた。反応日数を1, 2, 3, 4, 5日間と変えて還元反応をおこない、得られたアルコールの不斉収率がどのように影響するかを調べた³⁾。



C) 二十日大根によるその他の反応

(1) ラセミ体の *a, a, a*-トリフルオロフェニルエタノール (TFPE) の不斉分解 (図3)

図3 ラセミ体のTFPEの不斉分解

B) (1-1)の生育方法において、スクロースの濃度を3%にして二十日大根を10日間生育した。得られた植物体を取り出し、新たに用意したLS液体培地30ml、3%

スクロース、ラセミ体のTFPE (10w/v% DMSO溶液) 30 μ lを加えて、約4000lux連続照射下、120rpmで振とうし、ラセミ体のTFPEの不斉分解を行った。反応の後処理はおよびガスクロの定量分析は、B) (1-2)と同様の方法で行った。

(2) o-クロロアセトフェノンの還元反応 (図4)

B) (1-1)の生育方法において、スクロースの濃度を3%にして二十日大根を10日間生育した。植物体を取り出し、新たに用意したLS液体培地30ml (スクロース3%を加えたもの)

のに1個体加え、B) (1-2)の方法においてTFAの代わりにo-クロロアセトフェノンを基質とし、反応日数を4日間として還元反応をおこなった。B) (1-2)と同様の方法で反応の後処理およびガスクロの定量分析を行った。ガスクロマトグラフ：カラム、CP-cyclodextrin β -2,4,6-M-190.25 ϕ x 25m；温度140 $^{\circ}$ C；保持時間ケトン、6.95min；(R)-アルコール、11.68min；(S)-アルコール、13.05 min。⁶⁾

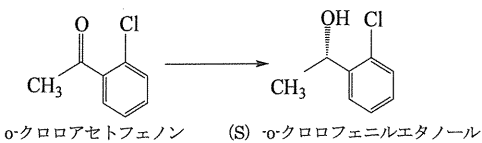


図4 o-クロロアセトフェノンの還元反応

結果および考察

1) 糖濃度の検討

二十日大根の種子を滅菌し、発芽させた。100mlの三角フラスコにスクロース (0, 1, 2, 3, 4%) を含むLS液体培地30mlをいれ、発芽した二十日大根をクリーンベンチの中で、無菌的に加えて10日間生育した。二十日大根を取り出し、TFAの還元反応をおこない、得られたTFPEの不斉収率を図5に表した。

二十日大根の生育時にスクロースを加えない場合、得られた二十日大根を用いてTFAを還元すると、R体のTFPEが約20%の不斉収率で得られるが、その収率はあまり高くない。このときの二十日大根の新鮮重量は約0.5gとあまり大きくならないので二十日大根の生育には糖が必要と考えられる。そこで、生育時にスクロースを1%、2%、3%、4%加えた場合のTFPEの立体選択性を比べてみると、いずれもS体のTFPEが得

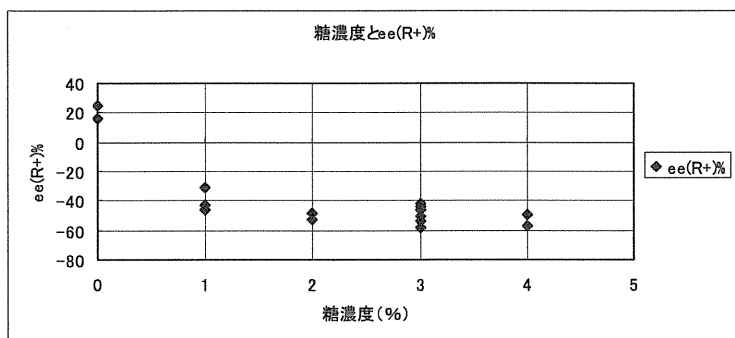


図5 二十日大根の生育における糖濃度の影響

られ、その不斉収率は30~58%であった。TFAの還元反応を行うには、ある程度二十日大根がよく生育している必要があると考えられる。生育時に5%以上の糖を加えたとすると浸透圧の関係から細胞がダメージを受けるため、実際には2~3%の糖があれば良いと思われる。微生物を使った不斉還元における糖の影響はパン酵母の例が知られている^{9,10)}。

2) 培地の量の検討

次にLS液体培地の量を変え(5, 10, 15, 20, 30, 50ml)、スクロース3%加えて二十日大根を10日間生育した。二十日大根を取り出し、スクロース3%を加えたLS培地30mlに入れて、TFAの還元反応をおこなった。得られたTFPEの不斉収率を図6に表した。

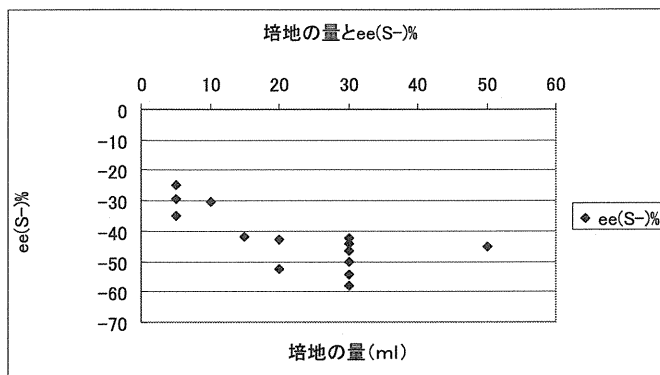


図6 二十日大根の生育における培地の量の影響

図6に示したように、培地の量が5ml-10ml

と少ない時は、TFPEの不斉収率はあまり高くない。それに対して培地の量が20~50mlのときはTFPEの不斉収率は高くなった。これは培地の量が少ないと二十日大根の生育に必要な栄養分を十分に供給することが出来ないため、二十日大根の生育が悪く、このことがTFPEの収率および不斉収率と関係しているものと思われる。

3) 反応日数の検討

3%スクロースを加えた30mlのLS液体培地を用いて10日間二十日大根を生育させた。二十日大根を取り出して、新たに用意したLS液体培地30ml(スクロース3%を加えたもの)に入れ、TFAの還元反応をおこなった。このときの反応日数を1, 2, 3, 4, 5日間と変えて、得られたTFPEの不斉収率に与える影響を調べた。(図7)

図7より、反応日数が長いほど、得られる(S)-TFPEの不斉収率は高くなり、収率は低くなることから、反応時間を延ばすと(R)-

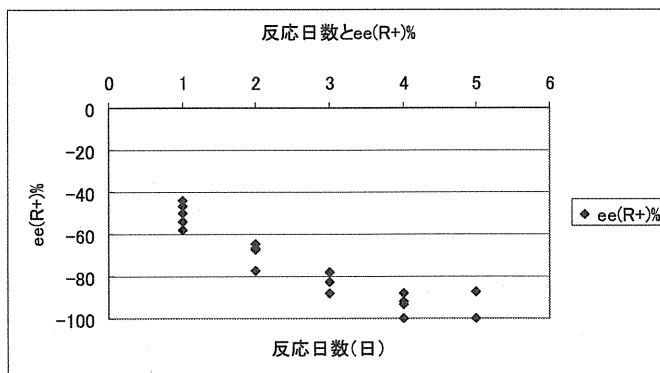


図7 TFAの還元反応における反応日数とee%の関係

TFPEが選択的に分解されているものと考えられる。微生物を利用した還元反応に伴うラセミ体のTFPEの不斉分解に関しては、パン酵母を使った α -ヒドロキシエステルの例が報告されている⁹⁾。

4) ラセミ体のTFPEの不斉分解

3)において述べたように、TFAの還元反応において反応日数が長いほど得られる(S)-TFPEの不斉収率は高く、収率は低くなることから、(R)-TFPEが選択的に分解されていると考えられる。それを検証するため、ラセミ体のTFPEの不斉分解について調べた。

100mlの三角フラスコに3%スクロースを含むLS液体培地30mlを入れ、二十日大根を10日間生育した。得られた植物を取り出して、新たに用意したLS液体培地(スクロース3%加えたもの)に加え、ラセミ体のTFPEの不斉分解をおこなった。反応日数は1, 2, 3, 4日間とした。(図8)

図8より、反応日数が長くなるほど(S)-TFPEの不斉収率が高くなり、収率は減少していくことがわかった。このことは(R)-TFPEが選択的に分解されていることを示している。すなわち二十

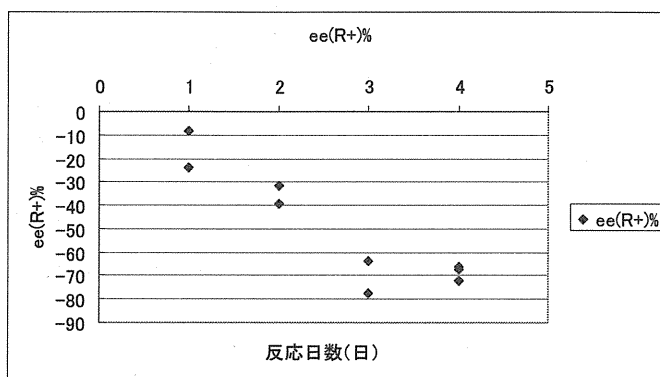


図8 ラセミ体のTFPEの不斉分解

日大根はTFAの還元反応と同時に(R)-TFPEの分解反応も触媒している。

5) o-クロロアセトフェノンの還元反応

100mlの三角フラスコにLS液体培地30ml、3%スクロースを加え、二十日大根を10日間生育した。得られた植物体を取り出し、新たに用意したLS液体培地(スクロース3%加えたもの)に加え、o-クロロアセトフェノンの還元反応を行った。反応日数は1日間とした。得られたアルコールはS体で不斉収率は $ee > 99\%$ 、収率は30.1%であった。

二十日大根を用いた不斉還元反応では基質としてTFAとo-クロロアセトフェノンを用いた。得られる光学活性アルコールの絶対配置はいずれもS体であるが、これは立体表示法でフッ素のほうが炭素より優先されるためであり、図9に示したようにその絶対配置は異なっている。

同様の結果はチチカビを用いた不斉還元でも観察されており、この場合は還元に関与している酵素が異なっていることが報告されている^{7,8)}。

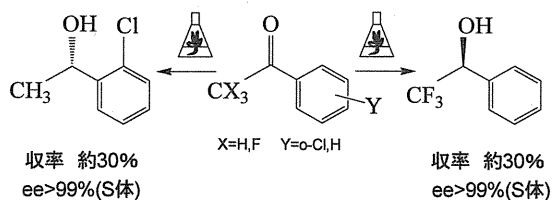


図9 二十日大根を用いたアセトフェノン誘導体の還元反応

結論

二十日大根コマットを発芽させ、LS液体培地中、スクロースを加え、蛍光灯の照射下で10日間生育させ、*a, a, a*-トリフルオロアセトフェノン (TFA) および α -クロロアセトフェノンを基質として、還元反応を検討した。その結果、100ml三角フラスコにLS液体培地30ml、3%スクロースを加えて10日間生育したものをを用いた場合が、還元反応において対応する光学活性アルコールの不斉収率が高いことがわかった。また、TFAの還元と α -クロロアセトフェノンの還元では得られる光学活性アルコールの絶対配置が異なるという結果が得られた。また、二十日大根はラセミ体の*a, a, a*-トリフルオロフェニルエタノールの不斉分解にも利用できることがわかった。今回の方法では生育管理の難しい培養細胞と異なり、実験の都度、適宜発芽させることにより、植物を生体触媒として利用できることがわかった。今回の発見により、有機合成化学者が植物を利用して生体触媒反応をすることが容易になった。尚、この研究の一部を生体触媒化学シンポジウムで報告した¹¹⁾。

参考文献

- 1) "Enzyme Catalysis in Organic Synthesis" Ed. by Drauz, K.; Waldmann, H.; 2nd ed., Wiley-VCH, Verlag GmbH, Weinheim, 2002
- 2) Suga, T.; Hirata, T. *Phytochemistry*, 1990, 29, 2393-2406.
- 3) Nakamura, K.; Matsuda, T.; "Enzyme-Catalyzed Reduction Reactions" in "Enzyme Catalysis in Organic Synthesis" Ed. by Drauz, K.; Waldmann, H.; 2nd ed. Vol. III, Wiley-VCH, Verlag GmbH, Weinheim, 2002, pp.991-1047.
- 4) Nakamura, K.; Matsuda, T.; Harada T. *Chirality*, 2002, 14, 703-708.
- 5) Nakamura, K.; Yamanaka, R.; Matsuda, T. Harada, T. *Tetrahedron: Asymm.* 2003, 14, 2659-2681.
- 6) Nakamura, K.; Matsuda, T. *J. Org. Chem.* 1998, 63, 8957-8964.
- 7) Nakamura, K.; Matsuda, T.; Itoh, T.; Ohno, A. *Tetrahedron Lett.* 1996, 37, 5727-5730.
- 8) Matsuda, T.; Harada, T.; Nakajima, N.; Itoh, T.; Nakamura, K. *J. Org. Chem.* 2000, 65, 157-163.
- 9) Nakamura, K.; Inoue, K.; Ushio, K.; Oka, S.; Ohno, A. *J. Org. Chem.*, 1988, 53, 2589-2593.
- 10) Nakamura, K.; Inoue, K.; Ushio, K.; Oka, S.; Ohno, A. *Chemistry Lett.*, 1987, 679-682.
- 11) 松尾清子, 河邊誠一郎, 江口剛史, 山中理央, 中村 薫; 第8回生体触媒化学シンポジウム 2004年11月

Transformation of Efficient Products by Germinated Plant

Kiyoko MATSUO, Yousuke TOKUDA, Tuyoshi EGUCHI, Seiichirou KAWABE

*College of Life Science,
Kurashiki University of Science and the Arts,
2640 Nishinoura, Tsurajima-cho, Kurashiki-shi, Okayama 712-8505, Japan*

Riyo YAMANAKA, Kaoru NAKAMURA

*Institute for Chemical Research,
Kyoto University*

(Received September 30, 2005)

We describe the novel method for asymmetric biotransformations : germinated plants are used as powerful biocatalysts. Germinated plants are available easily anywhere, anytime, and by anyone, once the conditions to grow plants are optimized. Radish was grown from the seeds in LS liquid medium in the presence of sucrose at room temperature under continuous fluorescent light (4000 lux) for 10 days under sterilized conditions. The reduction of trifluoroacetophenone (TFA) and o-chloroacetophenone (OCA) by the germinated radish as the biocatalyst was investigated. Both TFA and OCA gave the corresponding (S) -alcohols (TFPE and OCPE respectively) with excellent ee (>99%) , although the products alcohols have different configurations, by definition. We also have found that germinated radish could catalyze the asymmetric degradation of racemic TFPE.