

酵素触媒重合 - 新しい高分子合成手法

京都大学大学院工学研究科
小林四郎

生体内での化学反応による物質生産はすべて酵素の触媒作用により行われる。核酸(DNA, RNA)、タンパク質、多糖などの巨大分子も酵素触媒の産物である。これら生体内触媒反応の特徴は、通常の化学触媒(酸、塩基、有機金属、遷移金属等の触媒)にくらべて、次のような特性をもつ。穏和な条件下、通常室温付近、常圧、中性 pH 領域、水溶媒中、高い触媒活性(大きな触媒回転数)で進行する。しかもこれらの反応では多くの反応因子(基質、位置、官能基、立体化学、空間など)が精密に制御され、生成巨大分子の分子量、分子量分布、モノマーの配列、そして巨大分子の高次構造も規制される。

生物のつくった酵素を単離して触媒として用いる研究、あるいは動物そのものの代謝生成物を利用する研究は有機合成化学分野では古くから知られている。複雑な天然物の全合成のキーステップ反応に適用するような場合である。また、医薬・食品工業におけるアミノ酸の光学分割やその合成における酵素や固定化微生物の触媒作用、グルコースの異性化酵素による異性化糖の生産、あるいはアクリロニトリルからアクリルアミド製造におけるニトリルヒドラーゼの触媒作用、などすでに工業的に使われている。しかし、高分子合成に酵素が用いられるようになったのはここ十数年来のことである。

我々は、高分子合成の新手法として酵素触媒を用いる「酵素触媒重合」(Enzymatic Polymerization)を系統的に研究してきた。¹⁾ その定義は『単離された酵素を触媒として用いた非生合成経路による *in vitro* 高分子合成反応』である。従って酵素は本来の *in vivo* 触媒機構と異なる触媒機能を発現する。そのために、適切に出発モノマーを設計・合成し、目的の反応が進行するように条件設定することが鍵である。

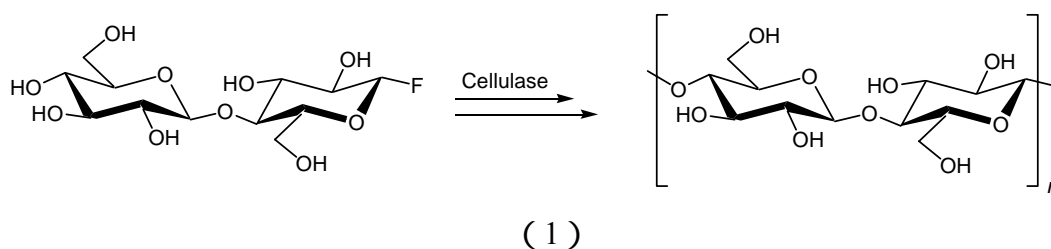
すべての酵素は表 1 に示すように 6 種類に分類される。²⁾ これらのうち 3 種類の酵素群が *in vitro* 高分子に使用され種々の高分子が合成されている。本稿では我々が展開してきた酵素触媒重合の要点を述べる。

表 1. 酵素の分類とその触媒作用による高分子合成

酵素	合成高分子の例
1. 酸化還元酵素 (Oxidoreductases)	ポリフェノール類、ポリアニリン、ビニルポリマー
2. 転移酵素 (Transferases)	多糖類、環状オリゴ糖、ポリエステル
3. 加水分解酵素 (Hydrolases)	多糖類、ポリエステル、ポリペプチド、ポリアミド、ポリカーボネート
4. 脱離酵素 (Lyases)	
5. 異性化酵素 (Isomerases)	
6. 合成酵素 (Ligases)	

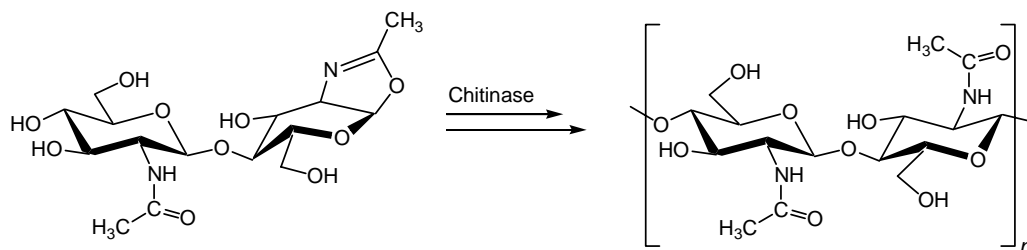
(1) 多糖類の人工合成

多糖類の代表的存在であるセルロースは地球上で桁違いに多量（毎年 2~3 千億トンが光合成）生産される有機物質である。セルロースは D-グルコースが $\beta(1 \rightarrow 4)$ グリコシド結合によって直鎖状につながった立体規則性高分子である。したがって、重合反応によりセルロースの分子骨格（一次構造）を構築するためには、厳密な位置選択性（1-4 結合）と立体選択性（ β -グリコシド結合）の制御が必須となる。この困難さのため、最初の試みから半世紀にわたりその化学合成による成功例は報告されていなかった。我々は、従来の化学合成とは異なった観点からセルラーゼ酵素触媒を用いる重合反応を開発し、自然界が作るのとは全く異なった合成経路による *in vitro* セルロース合成に初めて成功した(1式)³⁾



一段反応でセルロースが生成する利点を活かし、電子顕微鏡を用いた反応系の直接観測により高次構造セルロース I 型が *in vitro* で初めて形成された。⁴⁾ 通常熱力学的に安定な逆平行鎖構造のセルロース II 型を形成するが、生体のみがつくる準安定な I 型の形成機構はセルロース生合成機構の理解に大きく貢献した。

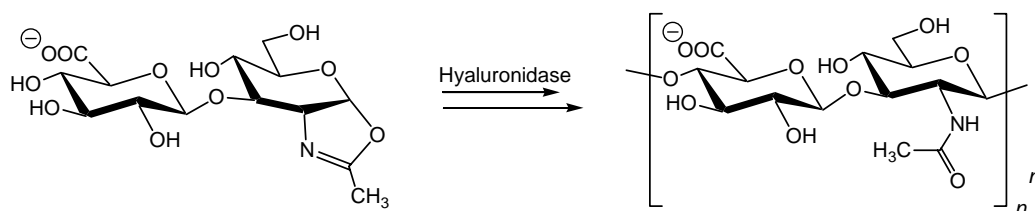
動物界で最も多量存在する有機物質キチンの合成を、オキサゾリン誘導体モノマーを設計・合成しキチンの加水分解酵素キチナーゼを用いて初めて達成した(式 2)。⁵⁾



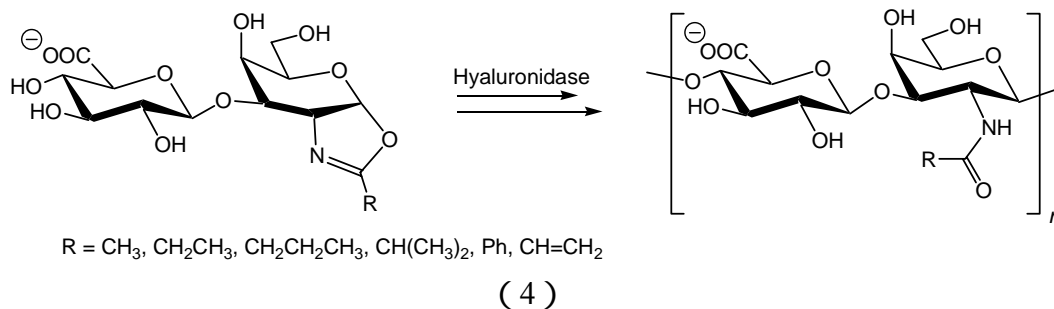
(2)

上の二例はいずれもセルロース及びキチンの加水分解酵素、すなわち本来結合切断反応を触媒するセルラーゼ及びキチナーゼが、各々の *in vitro* 重合反応においては結合生成反応を触媒する機能を発揮している。出発基質モノマーの設計に遷移状態アナログ基質モノマー (transition-state analogue substrate monomer) という新概念が提出された。⁵⁾ さらに、天然ホモ多糖類の合成例としてアミロース⁶⁾、キシラン⁷⁾がある。

天然ヘテロ多糖として、グリコサミノグリカンに分類されるヒアルロン酸 (HA) 及びコンドロイチン (Ch) が挙げられる。これら HA 及び Ch は細胞外マトリクスをはじめとする生体内のあらゆる組織中に存在し、細胞の増殖や分化、組織の形態形成に直接関与している重要な生体高分子である。HA 及び Ch の構造は、それぞれ D-グルクロニル- $\beta(1-3)$ -N-アセチル-D-グルコサミン (GlcA $\beta(1-3)$ GlcNAc) 及び D-グルクロニル- $\beta(1-3)$ -N-アセチル-D-ガラクトサミン (GlcA $\beta(1-3)$ GalNAc) を繰り返し二糖構造とし、さらにそれらが $\beta(1-4)$ グリコシド結合で繋がったきわめて複雑な構造を有する。このような構造を持つ HA 及び Ch の効率的な合成法は有機化学的、あるいは生化学的にも報告例がない。我々は、上記新概念に従ってモノマーを設計・合成し酵素触媒重合によるヘテロ多糖 HA (式3)⁸⁾ 及び Ch (式4)⁹⁾ の合成に初めて成功した。



(3)



ここで用いられたヒアルロニダーゼはヒアルロン酸及びコンドロイチンの $\beta(1 \rightarrow 4)$ 結合で加水分解する酵素である。従ってセルロース、キチンの場合と同様本来の結合切断を触媒する酵素が *in vitro* 重合反応では結合形成する触媒機能を持っている。表 2 にヒアルロン酸の合成結果を示す。

表 2 . ヒアルロン酸合成結果

Enzyme	Yield / % ^a	M_n^b	M_w^b
BTH	39	1.74×10^4	6.69×10^4
OTH	52	1.35×10^4	4.12×10^4

OTH: ovine testicular hyaluronidase (560 units/mg), BTH: bovine testicular hyaluronidase (330 units/mg).

^a Isolated yield

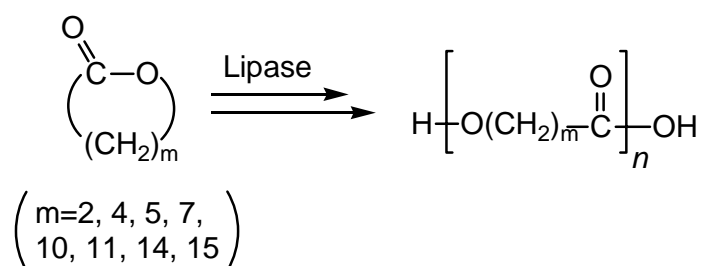
^b Determined by SEC measurements calibrated by HA standards.

上の概念は天然多糖だけでなく、いくつかの非天然多糖の合成にも有効である。式 (4) の $R=CH_3$ (コンドロイチン) 以外の R は非天然多糖であり、R 基を工夫することにより機能化多糖合成の良好な方法を提供する。

(2) ポリエステルの合成

・ラクトン類の酵素触媒開環重合

リパーゼは本来エステル類の加水分解触媒であるが、反応条件を選ぶことによりエステル化反応、エステル交換反応の触媒として作用する。バルクあるいは有機溶媒中でラクトン類にリパーゼを作用させることにより、ラクトン類が開環重合し脂肪族ポリエステルを与える。¹⁰⁾ 小員環 (4 員環)、中員環 (6, 7, 9 員環)、大環状 (12, 13, 16, 17 員環) ラクTONの重合により末端にアルコールとカルボン酸を有するポリエステルが得られる (式 5)。大環状ラクTONからは分子量数万以上になる。



(5)

・ジカルボン酸とグリコールの脱水重縮合

脱水反応は通常非水系で行われる。水中では質量作用の法則により平衡が出發物質側に傾き、反応が進行しない。しかし、リパーゼ触媒より脱水重縮合が起る。¹¹⁾ これは見かけ上、質量作用の法則に反する現象であり、「水中での脱水縮合」が達成された。この反応は基質の性質に大きく依存する。

・活性化エステルを用いる重縮合

エステル基としてアルキル基、アリール基、ハロゲン化アルキル基等がよく用いられるが、最も反応性の高いのはビニル基である。¹²⁾ アルコール成分としてグリコール、トリオール、ポリオールが用いられるが、リパーゼ触媒により位置選択的ポリエステル合成が可能である。糖アルコールの第一級水酸基が選択的に反応する。このような反応制御は通常の化学触媒では不可能である。

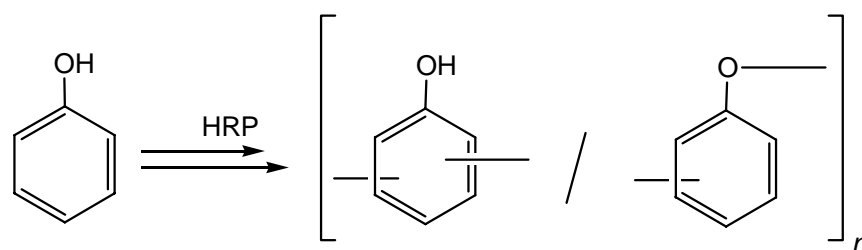
(3) ポリフェノール類の合成

・機能性ポリフェノールの合成

ペルオキシダーゼは、過酸化水素を水素受容体として種々の物質の酸化反応を触媒する。この酵素は動植物界に広く存在しており、生体内で生じる活性酸素種に対する防御機能に関与していると考えられている。ポリフェノール合成には、西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) が主に用いられてきた。HRP は分子量約4万で、活性中心に鉄プロトポルフィリンを有するヘムタンパクである。ペルオキシダーゼは種々のフェノールやアニリン類を酸化することが知られており、水中での酸化反応ではポリマーと思われる不溶物の生成が確認されている。

無置換フェノールを HRP 触媒により重合した。構造、分子量の制御には反応溶媒が重要であり、含水メタノール中で重合を行うことにより、可溶性ポリフェノールの合成に成功した (分子量 2000-4000) (式 6)¹³⁾。ポリマーの熱安定性を TG を用いて評価したところ、窒素下での 10% 重量損失温度は 387 °C であり、本ポリマーが優れた耐熱性を有していることがわかった。また、窒素下、1000

で焼成を行ったところ、炭化ポリマーが収率 43% で得られた。

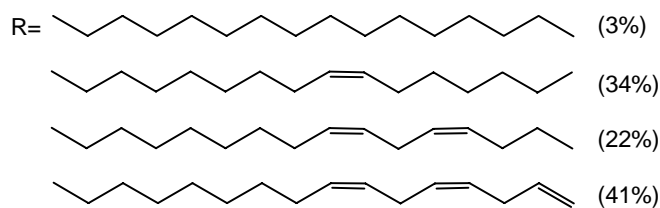
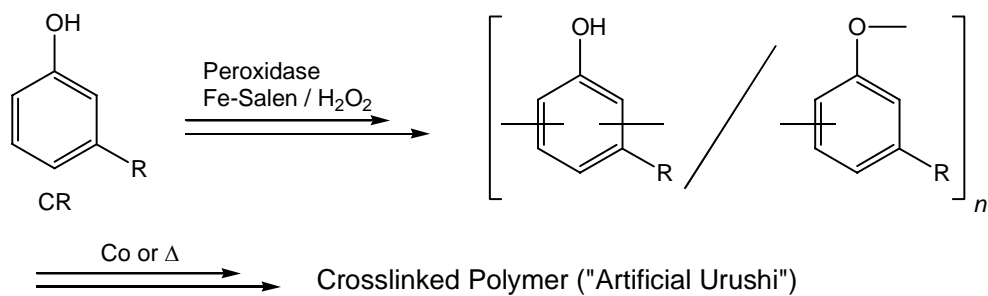


さらに、ポリフェノール粒子が HRP 触媒によって初めて得られている。¹⁴⁾

・人工漆の創製

漆は世界最古の天然塗料であり、日本文化の象徴的存在である。最近北海道の遺跡から漆片が発見され、その年代測定から縄文時代前期の 9000 年前にさかのぼることが分った。漆塗膜の美しさ、深さ、柔かさ、光沢を備えたその質感と堅牢性は人工系塗料の追随を許さない。温和な条件下、水系、高固形分で硬化する環境調和型塗料である。漆は自然界で酵素を硬化触媒としている唯一の例でもある。しかし、優れた硬化膜を与える日本産の漆樹液の生産量は近年極めて少なくなり、大変高価なため特殊な用途のみに使われているのが現状である。一方、漆の出発物質である天然ウルシオールを合成するのは大変煩雑なプロセスを必要とするので実際的ではない。また、ウルシオールはかぶれを引き起こすという問題がある。そこで、天然漆システムから学び、より安価で、天然漆に似た性質をもつ人工漆を開発した。¹⁵⁾

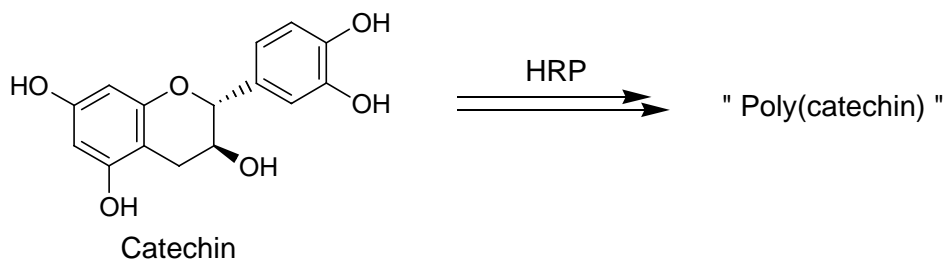
人工漆開発のため、様々なウルシオール類似体を合成し、硬化反応を検討した。また、再生可能資源を用いることを検討した。フェノール誘導体のカルダノール (CR) を主成分として含むカシューナッツ殻液 (CNSL) がウルシオール類似体として挙動し人工漆を与えた。CR はフェノール環に直接不飽和基が結合しており、ウルシオールに極めて近い構造を有するがかぶれを起さない (式 7)。CNSL をペルオキシダーゼ又は鉄 - サレン系で酸化重合すると分子量 2000 ~ 4000 のプレポリマーを得る。粘稠液をアプリケーションナーを用いてガラス上でフィルムを形成させ、ナフテン酸コバルト (3 wt%) を触媒とする架橋反応又は熱硬化 (150 °C、30 分) により十分に硬いフィルム、つまり人工漆が得られた。この人工漆は外観上も天然漆に大変近く、粘弾性測定からもそのことが言える。



(7)

・ポリフェノール（フラボノイド）のポリマー

フェノール類の重合をポリフェノール化合物（フラボノイド）の重合に展開した。緑茶やワインに含まれるカテキンのようなポリフェノールは高い抗酸化性を示し、抗ガン性を示すとして非常に注目されている。我々は酵素触媒を用いてフラボノイドのポリマーを合成し、高分子化によりフラボノイドの抗酸化性が大きく増幅されることを見出した（式8）。¹⁶⁾



(8)

References

- 1) For reviews: (a) S. Kobayashi, S. Shoda, H. Uyama, *Adv. Polym. Sci.*, **121**, 1 (1995). (b) S. Kobayashi 編著 “Catalysis in Precision Polymerization”, John Wiley & Sons (1997). (c) S. Kobayashi, *J. Polym. Sci., Polym. Chem. Ed.*, **37**, 3041 (1999). (d) S. Kobayashi, H. Uyama, M. Ohmae, *Bull. Chem. Soc. Japan*, **74**, 613 (2001). (e) S.

- Kobayashi, H. Uyama, S. Kimura, *Chem. Rev.*, **101**, 3793 (2001). (f) S. Kobayashi, J. Sakamoto, S. Kimura, *Prog. Polym. Sci.*, **26**, 1525 (2001). (g) S. Kobayashi, H. Higashimura, *Prog. Polym. Sci.*, **28**, 1015 (2003). (h) S. Kobayashi, H. Uyama, "Enzymatic Polymerization" in *Encyclopedia of Polymer Science and Technology*, John Wiley & Sons, Inc. Website (2003).
- 2) 小林四郎 , 高分子 , **42**, 308 (1993); **48**, 124 (1999).
 - 3) S. Kobayashi, K. Kashiwa, T. Kawasaki, S. Shoda, *J. Am. Chem. Soc.*, **113**, 3079 (1991).
 - 4) J. H. Lee, R. M. Brown, Jr., S. Kuga, S. Shoda, S. Kobayashi, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **91**, 7425 (1994).
 - 5) S. Kobayashi, S. Kiyosada, S. Shoda, *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 13113 (1996).
 - 6) S. Kobayashi, J. Shimada, K. Kashiwa, S. Shoda, *Macromolecules*, **25**, 3237 (1992).
 - 7) S. Kobayashi, X. Wen, S. Shoda, *Macromolecules*, **29**, 2698 (1996).
 - 8) S. Kobayashi, H. Morii, R. Itoh, S. Kimura, M. Ohmae, *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 11825 (2001).
 - 9) S. Kobayashi, S. Fujikawa, M. Ohmae, *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 14325 (2003).
 - 10) S. Kobayashi, H. Uyama, *Curr. Org. Chem.*, **6**, 209 (2002).
 - 11) (a) S. Kobayashi, H. Uyama, S. Suda, S. Namekawa, *Chem. Lett.*, 105 (1997). (b) S. Suda, H. Uyama, S. Kobayashi, *Proc. Jpn. Acad.*, **75B**, 201 (1999).
 - 12) H. Uyama, E. Klegraf, S. Kobayashi, *Chem. Lett.*, 800 (2000).
 - 13) (a) T. Oguchi, S. Tawaki, H. Uyama, S. Kobayashi, *Macromol. Rapid Commun.*, **20**, 401 (1999). (b) T. Oguchi, S. Tawaki, H. Uyama, S. Kobayashi, *Bull. Chem. Soc. Japan*, **73**, 1389 (2000).
 - 14) H. Uyama, H. Kurioka, S. Kobayashi, *Chem. Lett.*, 795 (1995).
 - 15) (a) S. Kobayashi, H. Uyama, R. Ikeda, *Chem. Eur. J.*, **7**, 4754 (2001). (b) R. Ikeda, H. Tanaka, H. Uyama, S. Kobayashi, *Polymer*, **43**, 3475 (2002).
 - 16) (a) M. Kurisawa, J. E. Chung, H. Uyama, S. Kobayashi, *Macromol. Biosci.*, **3**, 758 (2003). (b) M. Kurisawa, J. E. Chung, Y. J. Kim, H. Uyama, S. Kobayashi, *Biomacromolecules*, **4**, 469 (2003). (c) M. Kurisawa, J. E. Chung, Y. J. Kim, H. Uyama, S. Kobayashi, *Chem. Commun.*, 294 (2004).