「多糖・オリゴ糖」特集

酵素触媒重合によるセルロースの化学合成

小林 四郎・正田 晋一郎

1.はじめに

繊維科学の発展はセルロース研究と共にあったと言っても過言ではない。セルロースは繊維科学の黎明期からその研究対象として象徴的存在であった。繊維状高分子の中でもセルロースは、高分子量性、立体規則性、剛直性、微結晶性、水素結合に由来する特殊な物性等を兼ね備えており、自然が作り出す最も高度に制御された巨大分子の一つと言える。これが、構造、物性を中心とする基礎から工業的应用にいたるまで膨大な研究がなされてきた由縁である。自然界では年間数千億トンのセルロースが光合成されている。これに対し、人類は永い間人工の場でセルロースを作り出すことができなかった¹⁾。これは一見簡単な分子に見えるセルロースが、潜在的に多くの合成上の困難を含んでいるからに他ならない。セルロースはD-グルコースが β -1, 4グリコシド結合を介して直鎖状につながった立体規則的なポリマーであるが、その合成に際しては以下の問題点を解決しなければならない。まず第一に構成単位(モノマー)であるグルコースの反応性の似た複数の水酸基のうち、1位の水酸基と4位の水酸基とを分子間で位置選択的に縮合させること。第二に1位炭素原子の立体化学に関し、考えられる二つの異性体(α 体, β 体)のうち β 体のみを作ること。つまり、超高選択的なグリコシル化の実現である。

これまで、セルロースを化学的に合成する試みが、糖水酸基を保護したグルコース誘導体の重縮合²⁾や1, 4-無水糖のカチオン開環重合法³⁾により数多くなされてきたが、立体化学を完全に制御した例はない。開環重合による方法は、枝分かれの少ない高分子量の多糖を与えることから、極めて有用な合成法として受け入れられている。しかし、その手法をもってしても、例えば1, 4-アンヒドロ-2, 3, 6-トリ-O-ベンジル- α -グルコピラノースをルイス酸触媒で重合させると、一部望まない反応が起きてしまい、目的とする β -1, 4結合を持つきれいな多糖を得ることはできない。

最近、糖水酸基をベンジル基で保護したグルコース誘導体を出発物質とし、それを1段階ずつ結合させセロオリゴ糖(8量体)を合成したという報告があるが、生成オリゴマーからのベンジル基の除去は行われていない⁴⁾。このようにセルロース合成は近代化学において未解決のまま残されている挑戦すべき数少ない課題のひとつと言ってよいであろう。

一方、セルロースの生合成経路に沿った生産に関しては、Colvin等による酢酸菌(*Acetobacter xylinum*)を用いるセルロース生産⁵⁾を契機として、最近のBrownらによるターミナルコンプレックスの研究⁶⁾に代表される多くの報告がある。これらの手法は、自然界でのセルロ

小林 四郎

正田 晋一郎

Chemical Synthesis of Cellulose by Enzymatic Polymerization

筆者紹介 SHIRO KOBAYASHI and SHIN-ICHIRO SHODA

Department of Molecular Chemistry and Engineering, Faculty of Engineering, Tohoku University

東北大学工学部分子化学工学科

小林氏は教授、工学博士、正田氏は助教授、理学博士

筆者らは、高分子合成化学が専門で、数多くの新しい高分子合成反応を開拓し、機能高分子材料を開発されてきた。最近、酵素触媒を用いてセルロースをはじめ化学合成し、世界的にも大きな注目を集めておられる。

本稿ではその概要を述べていただく。

ース生産プロセスをそのまま抽出したものであり、ADP-, CDP-, GDP-グルコースを出発モノーとし、実際に重合反応を触媒しているのはセルロース合成酵素である⁷⁾。

我々は、セルロースの合成を従来の試みとは異なる観点から試みた。その結果、酵素の糖転移反応を利用することにより、自然界で行われる生合成とは全く別の酵素触媒重合によりセルロースを初めて人工的に合成した⁸⁾。以下、その方法の概略、特色などを簡単に述べてみたい。

2. 酵素触媒重合—基質モノー, 触媒酵素の選択

触媒として用いる酵素として、本来セルロースを分解する酵素であるセルラーゼに着目し、これを逆反応すなわち重合反応の触媒として利用することを考えた。セルロースはグルコース分子がひとつおきに裏返しにつながった形、つまりセロビオースを最小単位とする高分子である。我々は、合成に際し、セロビオース単位をつなげていくほうがグルコース単位を一個づつ延ばしていくより有利と考え、基質(モノー)としてはセロビオシル誘導体(二糖誘導体)を用いることにした。また、アノマー炭素の活性化ならびに酵素活性中心への親和性を考慮し、原子半径の小さいフッ素原子を脱離基に持つβ-D-フッ化セロビオシル $\mathbf{1}$ を基質として選択した。

フッ化β-D-セロビオシルはD-セロビオースから4段階で容易に合成することができ、取扱い易く、冷蔵庫内で長期保存することができる⁹⁾。

セルラーゼのような加水分解酵素の転移反応をその分解に優先して促進させるためには、反応系へ有機溶媒を添加するのがよい。その際、酵素が失活しないよう適切

表1 各種有機溶媒存在下でのフッ化β-D-セロビオシル $\mathbf{1}$ の酵素触媒重合^{a)}

溶 媒	収率 (%) ^{c)}
アセトニトリル/buffer ^{b)} (5 : 1)	64 (54)
プロピオニトリル/buffer (5 : 1)	10 (3)
アセトン/buffer (5 : 1)	13 (7)
メタノール/buffer (5 : 1)	17 (6)
エタノール/buffer (5 : 1)	20 (7)
1,4-ジオキサン/buffer (5 : 1)	4 (~0)
ニトロメタン/buffer (5 : 1)	15 (1)
DMF/buffer (5 : 1)	~0 (0)
DMSO/buffer (5 : 1)	~0 (0)

^{a)} 30℃ for 12h, $[\mathbf{1}] = 2.5 \times 10^{-2}$ mol/L, セルラーゼ; 5 wt% for $\mathbf{1}$, ^{b)} 酢酸緩衝液 (0.05M, pH 5), ^{c)} メタノール : 水 (5 : 1) 不溶部, カッコ内は水不溶部の収率

な有機溶媒を選定する必要がある。実際、本重合反応における溶媒効果について検討してみると、生成物の収率は添加する有機溶媒の種類により大きく影響を受けることが分かった(表1)。

収率はアセトニトリルを用いた場合最も良好であり、以下エタノール、メタノール、ニトロメタン、アセトン、プロピオニトリル、1, 4-ジオキサンの順であった。これに対し、DMF、DMSOのような極性溶媒の存在下では、重合は全く進行しなかった。これは溶媒添加によりセルラーゼが失活し、セロビオシル転移反応が発現しなかったためであろう。

重合はアセトニトリル/酢酸緩衝液(5 : 1)中に触媒量のセルラーゼを加えて開始させる。重合の進行と共に白色沈澱が析出してくるのが観察される。反応液を100℃で10分間加熱しセルラーゼを失活させ、過剰のメタノール-水(5 : 1)へ投入し、メタノール-水(5 : 1)不溶部と可溶部とに分別する。さらにこの部分は水不溶部(合成セルロース)と水可溶部(オリゴマー)に分別される。

アセトニトリルと緩衝液の比率も重合結果に影響する。両者の混合比が5 : 1の場合、最も良い収率で水不溶部(合成セルロース)が得られ、15 : 1の系では水可溶性オリゴマーが優先的に得られた(表2)。これはアセトニトリルの割合が多くなると、分子鎖がオリゴマー領域まで延びた時点で活性生長種が析出するためであろう。

一般にセルラーゼは生産菌の由来によりその触媒活性が著しく異なる。そこで起源の異なる数種類のセルラー

表2 アセトニトリル濃度の影響^{a)}

溶 媒	収率 (%) ^{c)}
buffer ^{b)}	0 (0)
アセトニトリル/buffer (2 : 1)	16 (3)
アセトニトリル/buffer (5 : 1)	64 (54)
アセトニトリル/buffer (7.5 : 1)	77 (31)
アセトニトリル/buffer (10 : 1)	67 (14)
アセトニトリル/buffer (15 : 1)	50 (5)

^{a)} 30°C for 12h, $[1] = 2.5 \times 10^{-2}$ mol/L, セルラーゼ; 5 wt% for 1. ^{b)} 酢酸緩衝液 (0.05M, pH 5), ^{c)} メタノール: 水 (5 : 1) 不溶部, カッコ内は水不溶部の収率

図1 セルロースのCP/MAS ^{13}C NMRスペクトル(a)合成セルロース, (b)天然セルロース (パルプ)

ゼを用いて検討した結果, 本重合では *Trichoderma viride* 菌由来のセルラーゼが水不溶部の収率に関して最も良い結果を与えることが分かった。 β -グルコシドの糖転移反応を触媒する β -グルコシダーゼ (アーモンド由来) では重合は全く進行しない。

3. 合成セルロースの構造と結晶性

水不溶部のCP/MAS 固体 ^{13}C NMR スペクトルを図1(a)に示した。また, 参考のため天然の微結晶セルロースのスペクトル(b)を示す。両スペクトルはよく一致しており各ピークはそれぞれ β 1, 4 グルカン構造のC1~C6炭素に帰属することができた¹⁰⁾。106ppm付近には1位の炭素に由来するピークのみが観測され, 他のピーク (例えば β -1, 6 結合に由来するもの) は全く観測されなかった。また, この水不溶部を酢酸緩衝液 (pH 5) 中に懸濁し, 触媒量のセルラーゼで処理したところ, 加水分解が進行し, D-グルコース, あるいはD-セロビオースを定量的に与える。以上のことから水不溶部のグリコシド結合は完全に β -1, 4 結合に制御されていることが分かる。

次に, 過塩素酸触媒の存在下無水酢酸で処理し, 対応するアセチル化物へ変換した。生成物の分子量はGPC測定により, 6.3×10^3 (DP=22) 程度であることが分かった。一般に, 糖質化学では重合度10以上を多糖と定

図2 X線回折図

- (a) 合成セルロース (II型)
- (b) マーセル化セルロース (II型)
- (c) 天然セルロース (I型)

義しているで、本重合で得られる水不溶部は β -1, 4 グルカン構造からなる多糖すなわち合成セルロースと呼ぶことができる。

セルロースにはそのコンホメーションの違いにより、いくつかの結晶状態が存在し、X線回折、NMRにより定量的な研究が活発に行われている。これら結晶状態を大きく分けるとⅠ型とⅡ型の二つに分類できる。図2に合成セルロース(a)、天然セルロース(c)、およびこれをマーセル化後、水処理したセルロース(b)のX線回折図を示す。合成セルロースは天然セルロース(Ⅰ型)¹¹⁾とは結晶構造の異なるセルロース(Ⅱ型)であった。また、一般にマーセル化して得られる再生セルロース(Ⅱ型)の結晶性はかなり低くなるが、ここで得られた合成セルロースはX線回折図のピークが鋭く、高い結晶性を有していることが分かる。

4. 反応機構

本重合の生長反応は以下に述べる二つの機構のうちいずれかで進むと考えられる。一つはフッ化 β -D-セロビオシル(GG-F)がセルラーゼ(Enz-)に取り込まれ、基質-酵素複合体(GG-Enz)が生成し、引き続き生成ポリマー[(GG)_n-F]の4'位水酸基がこれを攻撃してポリマー鎖が延びていく活性化モノマー機構である[(1)および(2)]。もうひとつは生長種[(GG)_n-F]末端がセルラーゼ(Enz-)により活性化され、活性化生長種[(GG)_n-Enz]が生成し、そこへモノマーのフッ化 β -D-セロビオシル(GG-F)の4'位水酸基が攻撃する活性化生長種機構である[(3)および(4)]。今のところ、どちらの機構で重合が進行しているかは明かではなく、機構解明は今後の大きな課題である。

位置および立体選択的に β -1, 4 グリコシド結合が生成するのは以下のように説明することができる(図3)。

すなわち、フッ化 β -D-セロビオシルの1位フッ素原子がセルラーゼ構成アミノ酸であるグルタミン酸あるいはアルパラギン酸残基のカルボキシル基により置換さ

(a) Glycosyl enzyme intermediate

(b) Glycosyl oxocarbenium ion intermediate

図3 酵素-基質複合体と4'位水酸基の反応による β -1, 4 グリコシド結合の生成

図4 (a) 触媒セルラーゼ(基質1を含まない)の電子顕微鏡写真
(b) 重合開始から30秒後の電子顕微鏡写真

れ、 α 配置をもつ活性アシル糖誘導体(a)あるいは糖オキシカルベニウムイオン(b)が生成する¹²⁾。これらの中間を他のモノマーの4'位水酸基が β 側から攻撃し、見かけ上立体配置を保持しながら β -1, 4 グリコシド結合ができる。この機構の妥当性は、1位がフッ素原子で置換されていないD-セロビオースや1位の立体配置が逆のフッ化 α -D-セロビオシルを基質に用いると、目的とする重合反応が進行しないことから明かである。

5. 合成セルロースフィブリルの観察

本酵素触媒重合の初期過程におけるフィブリル形成の様子を高分解能電子顕微鏡を用いて観察した。基質1とそれに対して5重量%のセルラーゼ(*Trichoderma viride*由来)のアセトニトリル/酢酸緩衝液(5:1)中に、銅グリット(Formvar/炭素)を浸し、反応系内に析出

した合成セルロースを吸着させ、引き続き2%酢酸ウランでネガティブ染色した試料をフィリップ社製420 TEM (100KV) で観察した。触媒酵素のみを吸着させた試料では、直径約30nm程度のセルラーゼ会合体が観察された(図4-a)。そこへ基質1を添加し、重合を開始させたところ、開始からわずか30秒後に合成セルロースフィブリルが観察された。フィブリルの直径は約13nmであった。同時に、直径100nm程度のさらに大きなセルラーゼ会合体が出現し、上記の合成セルロースフィブリルに沿って、錯体を形成している様子がわかる(図4-b, 矢印)。本観察は、明確な化学反応によって、溶液中に析出したセルロースフィブリルを観察した初めての例であり、重合反応とフィブリル形成との関連を考える上で興味深い¹³⁾。

6. おわりに

本重合反応は以下に述べる特徴を有している。1) セルロースの加水分解酵素であるセルラーゼの糖転移反応を利用している。2) フッ化 β -D-セロビオシルを用い、セルロースの生合成とは全く異なる反応形式で進行する。3) 重合を促進させるため有機溶媒/緩衝液混合系で行う。4) 反応条件が穏和である。5) 糖と糖を結合しているグリコシド結合について目的とする β 構造のみが生成する(立体化学の制御)。6) グリコシド結合の位置選択性が100%(4'位の水酸基)である。7) 通常の化学合成のように複雑な保護基の導入、脱離を必要としない。8) 反応条件をコントロールすることにより分子量の制御が可能である。9) 得られた合成セルロースは高結晶性でII型である。

セルロースは生成、分解ともに自然のサイクルに取り込まれているので地球環境保全の立場からも望ましい物質で、近年様々な機能性材料として注目を集めている。本重合反応により得られる合成セルロースの機能性ポリマーとしての応用が期待される。一方、繊維状高分子のフィブリル形成に関する基礎知識を得るためには、高分子の形態を重合反応との関連でとらえ、理解することが必要である。本重合反応はセルロースマイクロフィブリルを非生合成的に *in vitro* で発生させた初めての例である。今後、この研究を足がかりにフィブリル化、結晶化

に関するさらに新しい繊維科学的知見を提供することができれば幸いである。

文 献

- 1) H. Mark, *Cellulose Chem. Technol.*, **14**, 569 (1980)
- 2) E. Husemann, G. J. M. Müller, *Makromol. Chem.*, **91**, 212 (1966).
- 3) (a) F. Micheel, O-E. Brodde, K. Reinking, *Liebigs Ann. Chem.*, **1974**, 124. (b) T. Uryu, C. Yamaguchi, K. Morikawa, K. Terui, T. Kanai, K. Matsuzaki, *Macromolecules*, **18**, 599 (1985).
- 4) F. Nakatsubo, T. Takano, T. Kawada, K. Murakami "CELLULOSE, Structure and Functional Aspects", J. F. Kennedy, G. O. Phillips, P. A. Silliams Eds., Ellis Horwood, p. 201 (1989).
- 5) J. R. Colvin, *Nature*, **183**, 1135 (1959).
- 6) 例えば R. M. Brown, Jr., D. Montezinos, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**, 143 (1976).
- 7) D. Y. Delmer, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, **41**, 105 (1983).
- 8) (a) 小林四郎, 第22回繊維学会夏季セミナーテキスト, p. 197 (1990).
(b) S. Kobayashi, K. Kashiwa, T. Kawasaki, S. Shoda *J. Am. Chem. Soc.*, **113**, 3079 (1991).
- 9) (a) D. H. Brauns, *J. Am. Chem. Soc.*, **51**, 1820 (1929).
(b) D. S. Genghof, C. F. Brewer, E. J. Hehre, *Carbohydr. Res.*, **61**, 291 (1978).
- 10) R. H. Atalla, J. C. Gast, D. W. Sindorf, V. J. Bartuska, G. E. Maciel, *J. Am. Chem. Soc.*, **102**, 3249 (1980).
- 11) J. Hayashi, T. Yamada, K. Kimura, *Appl. Polym. Symp.*, **28**, 713 (1976).
- 12) K. Nishizawa, Y. Hashimoto, "The Carbohydrates Chemistry and Biochemistry", W. Pigman, D. Horton, Eds., Academic Press, NY and London Vol. 2A, p. 241 (1980).
- 13) 正田晋一郎, 小林四郎, J. Lee, K. Okuda, R. M. Brown, Jr., 日本化学会第63春季年会講演番号2B5 41 (1992) .

(平成4年2月6日受理)