酵素触媒重合—高分子の新規合成法

新しいカテゴリーの重合触媒として酵素を用いる高分子合成について述べる。セルラーゼを用いる酵素触媒重合によりセルロースの化学合成が初めて可能になった。オリゴアミロースの合成、フェノール類やアニリン類の酸化重合およびラクトン類の開環重合においても酵素触媒の特徴が発揮された。従来困難であった高分子の合成に酵素触媒重合が大きく寄与することが期待される。

小林 四郎
Shiro Kobayashi
東北大学工学部

1. はじめに

高分子合成の歴史をみると新しい触媒、あるいは開始剤の発見が大きなブレイク・スルーをもたらしたことに気付く。1926年 Staudinger により高分子の概念が確立されて間もなくラジカル連鎖重合が提出された(ラジカル触媒, 1930年)。続いてアニオンおよびカチオン重合のイオン重合機構が確立された(アニオンおよびカチオン重合触媒, 1940年)。1953年から2年間 $\text{TiCl}_4\text{-AlR}_3$ に代表される Ziegler-Natta 触媒の発見によりエチレンをはじめ α -オレフィン類やジエン類の重合が可能になり、1950年代から1960年代にかけ世界の石油化学工業隆盛の牽引力となったことは周知のとおりである。学問分野でこの触媒系はその後の有機金属化学や遷移金属化学の発展を招来する起爆剤となった。この触媒系は最近の環状オレフィン類に対する開環メタセシス重合やアセチレン類の重合に結びついている。さらに最近ではレーア金属触媒によるビニル重合や開環重合が知られるようになった。これらはすべて遷移金属触媒重合とみなすことができる。本稿ではここ数年筆者らが展開してきた酵素を触媒として用いる高分子合成反応について述べる。この酵素触媒重合は後述のセルロース合成に挑戦する過程で生れた概念で、高分子合成分野において新しい触媒作用による重合として分類される^{1)~3)}。

2. 酵素触媒重合の背景

生体内反応はすべて酵素触媒によって進行する。それらの反応においては温和な条件における高活性、立体および位置選択性、不要な副反応の回避等が厳密に

行われる。このような酵素の特性は有機反応分野ではしばしば利用されてきた⁴⁾。多段階の反応を要する複雑な構造をもつ天然物の全合成のキーステップに酵素触媒合成反応が使われるのはその一例である。また、有機溶媒中で酵素活性が発現することが示され、より広く使われるようになった⁵⁾。

最近筆者らは酵素の特徴を良く活かした真の「酵素触媒重合」と呼べる反応を見い出した^{1), 6), 7)}。ここで酵素触媒重合とは「酵素を触媒とする非生成プロセスによる *in vitro* 重合反応」と定義する。したがって、細胞抽出成分に含まれる酵素を触媒とする生成プロセスによる細胞外 (*in vitro*) 重合反応およびポリ(ヒドロキシアルカノエート)合成にみられるような細胞内 (*in vivo*) 生成プロセス重合反応は含まない。

これまで酵素を使う重合反応がなかったわけではない。ここ10年以内に行われたもので、若干の例をあげる。ジカルボン酸とグリコールからの脱水反応⁸⁾、やオキシ酸の脱水反応^{9), 10)}でポリエステルを合成する触媒にリパーゼが用いられた。いずれの場合も重合度は低い ($n \sim 7$)。

小林四郎 東北大学工学部分子化学工学科 (980 仙台市青葉区青葉) 教授, 工博

1969年京大工学研究科博士課程修了, ケース・ウェスタン・リザーブ大博士研究員, 京大工学部助手, 講師を経て, 1986年より東北大教授。専門は高分子合成, 有機反応。

<趣味>囲碁, 音楽鑑賞

Enzymatic Polymerization: A Novel Method of Polymer Synthesis

また、主鎖にベンゼン環をもつ光学活性ポリエステルやポリアミドが改良セルラーゼ触媒による脱水反応より合成された¹¹⁾。この場合、触媒を大量に用いる必要がある。

しかし、これらの反応はすべて脱水反応で、本質的には酵素の代りに他の脱水剤で置換され得る反応である。最近、酵素のより高次機能である不斉識別能を利用した重合として、ラセミ混合物のエポキシ置換ジエステルとブタンジオール (2:1) からリパーゼ触媒により光学活性ポリエステル (分子量=5300) を得た反応がある¹²⁾。この反応で未反応モノマージエステルは 88% 回収され、その光学純度 95%ee であった。つまり対掌体選択重合が起こっている。しかしながら、このようなポリエステルやポリアミドの合成においては必ずしも触媒の特徴が十分に活用されているわけではない。

3. 酵素触媒重合

3-1. セルロースの化学合成

なぜセルロースか？セルロースのような多糖類は自然界に存在する核酸、タンパク質と並んで三大重要生体高分子群を構成する。セルロースは高等植物では細胞壁をつくる構造材料で、地球上に最も多量に存在する有機化合物である。毎年地球上で約数千億トン光合成される。現在も繊維、紙、パルプ、木材等として広く使用されている再生可能な生分解性の重要な出発工業原料である。地球環境を考え、石油や石炭の化石資源依存率の減少を考えなくてはならぬ時、セルロースに代表される天然高分子を見直し、より有意義な活用を図るべきであろう。

さらに高分子科学にとって大事なことはその黎明期に Staudinger, Mark らはセルロースを対象として研究を展開したことに示されるように、セルロースはシンボリック物質である。そして、多くの生化学の教科書にも記してあるように、セルロースの化学合成はこれまで成功していない¹³⁾。

これらのことが動機となって筆者らがセルロース合成の挑戦を開始したのは 1988 年のことである¹⁴⁾。タンパク質や核酸に関しては現在コンピューター制御の自動合成装置が市販されるに至っているが、糖類の合成は立体化学および位置選択性を制御する必要性のため桁違いに困難である。

セルロースの改質反応は工業的に大変重要で、前世紀からぼう大な研究が行われてきたが、セルロースそのものの合成は 1941 年グルコースの単純脱水反応により初めて試みられた¹⁵⁾。以来さまざまな試みがなされたが成功しなかった。二、三の例をあげる。2, 3, 6 位の水酸基を保護したグルコースの脱水反応においても C1 位の立体化学の制御ができず、セルロース誘導は生成しない¹⁶⁾。

重合化学分野では無水糖のカチオン開環重合による試みがあるが、結合開裂箇所の制御が困難で、目的とする β -1,4 結合した 6 員環ピラノースユニットからなるセルロース誘導体は得られず、5 員環フランユニットとの混合物となってしまう¹⁷⁾。

糖類の合成ではグリコシル結合生成が鍵であり、有機化学的にグルコース単位を 1 つずつ延長させていくとセロオリゴ糖が得られる。このグリコシル化反応は

古くから糖質化学の中心課題で、C1 炭素の立体制御に関して現在もお活発な研究が続いている。式中のドナー分子の C1 炭素の活性化法が最も重要で、反応前後で立体化学は α から β に反転するが、その選択性が問題である。これまでよく知られている方法を年代順にあげる。

- a) Koenigs-Knorr 法 (1901)
- b) Helferich 法 (1933) ; 小川 (1981)
- c) オルトエステル法 (Kochetkov, 1971)
- d) オキサゾリン法 (Khorlin, 1975)
- e) イミデート法 (Snař, 1978)
- f) 改良イミデート法 (Schmidt, 1980)

今までのところ改良イミデート法が最良と考えられているので、この反応を用い 4 つの保護基を使いわけ

て単糖をつないでいきセロオクタマー誘導体が合成された¹⁸⁾。オクタマー誘導体からの脱保護も易しくはない。結局まだ構造明確なセロオクタマーは合成されていない。これまで化学合成された最長のものは4量体のセロテトラマーである。

これらの状況を熟慮し、既知反応を利用したセルロース合成は無理と判断した。そこで酵素を触媒として使うことを着想した。基質モノマーとしてフッ化 β -D-セロビオシル (β -CF) を選び、酵素としてセルロースの加水分解酵素セルラーゼを用いたところ、30°C で重合が起こり水不溶性の生成物「合成セルロース」(後述)を得ることに成功した(表1)¹⁾。この重合には有機溶媒と緩衝液の混合溶媒を使う必要があり、調べた範囲ではアセトニトリルが適当であった。アセトニトリル量を変えることによりセルロース(重合度 $\text{DP} \geq 10$) とセロオリゴマー ($9 \geq \text{DP} > \sim 5$) を選択的につくることができる。DMF や DMSO は酵素を失

活させる。なお、この反応は HF 分子を脱離する重縮合であるが、塩基触媒等では全然うまく進行しない。

β -CF を基質モノマーとして選んだ理由は三つある。セルラーゼ酵素に認識される最小分子は二糖であろうこと、フッ素アニオンが脱離基として優れていること、およびフッ素原子の大きさが水酸基のそれに近いので認識に際して有利であろうことである。

酵素活性はその由来に依存することが知られているので、由来の異なるセルラーゼを用いて同様の反応条件で重合を行った。合成セルロースの収率は次のようである。*Trichoderma viride* (54%), *Aspergillus niger* (8%), *Polyporus tulipiferae* (ウスバタケ) (25%), β -グリコシダーゼ (アーモンド) (0%)。一般にセルラーゼは種々の加水分解酵素タンパク質の集合体で存在すると言われている。それらはセルロース鎖のグリコシド結合をランダムに切断するエンドグルカナーゼ、非還元末端から順次セロビオースを生成するエキソグルカナーゼ、非還元末端から順次グルコースを生成する β -グリコシダーゼの三種に大別される。したがって重合活性は前二者のいずれかによるのであるが、現時点ではエンドグルカナーゼと考えている。

水不溶部の白色粉末試料の構造決定のため測定した固体 CP/MAS ^{13}C -NMR スペクトルは、天然セルロースのそれとほぼ同様のスペクトルを示す(図1)。すなわち、この試料は β (1 $\rightarrow$ 4) グルカン構造をもつことがわかる。IR スペクトルも天然セルロースとほとんど同じパターンを示す。X 線回折結果は水不溶部が典型的なセルロース II 型で高結晶性を示した。つまり再生セルロースやマーセル化セルロースと同じ II 型で、天然セルロースのみの示す I 型とは異なる。

水不溶部をアセチル化することにより可溶性とし、GPC 測定より $\text{DP} \sim 22$ と決められた。糖質化学では $\text{DP} \geq 10$ を多糖類、 $\text{DP} \leq 9$ をオリゴ糖と区分されるので、水不溶部は多糖の「合成セルロース」ということができる。この合成セルロースは天然セルロースと全

表 1 各種有機溶媒中における基質モノマー (β -CF) の酵素触媒重合^{a)}

溶 媒	収 率 (%)	
	水不溶部 (合成セルロース)	水可溶部 ^{c)} (セロオリゴマー)
アセトニトリル/buffer ^{b)} (5:1)	54	10
アセトニトリル/buffer (7.5:1)	31	43
アセトニトリル/buffer (15:1)	5	45
プロピオニトリル/buffer (5:1)	7	6
アセトン/buffer (5:1)	7	6
メタノール/buffer (5:1)	6	11
エタノール/buffer (5:1)	7	13
1,4-ジオキサン/buffer (5:1)	0	4
ニトロメタン/buffer (5:1)	1	14
DMF/buffer (5:1)	0	0
DMSO/buffer (5:1)	0	0

a) [モノマー] = 2.5×10^{-2} mol/l, セルラーゼ = 5 wt%, 30°C, 12 時間

b) 酢酸緩衝液 c) メタノール/水 (5:1) 不溶部

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

く同様に 260°C 付近で熱分解し、セルラーゼ酵素で加水分解される。

本酵素触媒重合の特徴はC1炭素の立体化学が保持されていること、およびモノマー中7個存在する水酸基のうち4'位の水酸基のみが反応していること（位置選択性）である。重合化学の立場から重合機構に対し二つの可能性、活性化モノマー機構（式1, 2）と活性化生長末端機構（式1', 2'）が考えられる。両者の区別は今のところ困難であるが、C1炭素が立体保持で進行しているので2回の反転を伴っている。図2は前者の機構で進行し、すでにフッ素アニオンが脱離して一度反転した α 構造中間体モデルを示す。この

図2 活性化モノマー機構による基質モノマー β -CFの酵素触媒重合反応中間体のモデル

後4'位の水酸基が β 位から攻撃しもう一度反転して β (1 $\rightarrow$ 4) 結合が達成される。

ここで反応の選択性について試算する。 β -CF 同士が反応する場合、C1炭素に α と β の2つの異性体があり、もし7個の水酸基の反応性が等しいと仮定すると $2 \times 7 = 14$ 個の異性体が生成する。DP=22 ($n=10$) および活性化生長末端機構の場合 $14^{10} \approx 2.9 \times 10^{11}$ 個となる。活性モノマー機構の場合は $(2 \times 7) [2 \times (7+6 \times 1)] [2 \times (7+6 \times 2)] \cdots \times [2 \times (7+6 \times 9)] \approx 3.6 \times 10^{17}$ 個となり、合成セルロース生成はこれら可能な異性体のうち一つが選択的に生成したことを意味する。

なお、本重合反応とは対照的に生体内のセルロース合成の最終段階では、基質モノマー UDP- α -D-グルコースがセルロース合成酵素の触媒作用で重合していく際C1炭素は1回反転するのみであり、根本的に両者の反応様式は異なっている。

3-2. オリゴアミロースの化学合成

セルロース合成の展開としてフッ化 α -D-マルトシルを基質モノマーとして α -アミラーゼを触媒とする重合反応を行った⁶⁾。反応はフッ化水素を脱離して室温で起こり、調べた溶媒の中ではメタノール/リン酸緩衝液が良い結果を与えた。重合度7までのオリゴアミロースが得られた。この酵素触媒重合においても、基質モノマーのC1炭素は2回反転して α 体となる制御と4'位水酸基が反応する位置制御は完全に達成

されている。

3-3. 酵素触媒酸化重合

フェノール類がパーオキシダーゼ酵素触媒で過酸化水素水中で酸化重合することが知られている。例えば *p*-フェニルフェノールの酸化重合はオルト位とパラ位に反応が起こり、芳香族環のつながった複雑な構造のポリマーとなるが、共役 π 結合をもつので導電性ポリマーとして有用であろう¹⁹⁾。

アニリンの酸化重合が銅を含む酵素、ビリルビンオキシダーゼを触媒として調べられ、ガラス表面上にポリアニリン生成が認められた。1,4-および1,2-置換構造が考えられており導電性を示す²⁰⁾。 *o*-フェニレンジアミンは西洋ワサビパーオキシダーゼ (HRP) 触媒により過酸化水素中で重合してオリゴマーと可溶性のポリアニリン誘導体 (分子量 $\sim$ 2万) が生成した⁷⁾。通常の触媒重合や電気化学重合では可溶性ポリマーは得られないので酵素触媒の特徴があらわれている。

3-4. 酵素触媒開環重合

ラクトン類がリパーゼ触媒で重合する²¹⁾。 ϵ -カプロラクトンの 60°C におけるバルク重合で分子量数千、末端に水酸基とカルボキシル基をもつポリエステルを得た。系中に微量存在する水が関与すると考えているが、酵素が開環段階でどのように効いているか現在検討中である。いずれにしても、新しい酵素触媒作用である。

4. おわりに

重合触媒としては全く新しいカテゴリーに属する酵素を触媒とする高分子合成反応について述べた。セルロースの加水分解酵素であるセルラーゼを用いる酵素触媒重合によりセルロースの化学合成に初めて成功した。この反応は従来の例とは異なり、酵素機能の特徴が十分に活かされ立体化学と位置選択性の制御が完全であり、他の触媒で進行するような反応ではないので真の酵素触媒重合と考えている。この新概念に基づいてアミラーゼ触媒重合によりオリゴアミロースやリパーゼ触媒開環重合によりポリエステルの合成を達成した。つまり、加水分解酵素がその逆反応の重合触媒となるという一般原理を提案し確立すべく、また、酵素触媒酸化重合の例にみられるように、さらに酵素触媒重合のスコープを広げるべく研究を続けている。

これまで酵素というと化学者は摩訶不思議な特別な存在と考え勝ちであったが、われわれは例えば α -オレフィンの重合に Ziegler-Natta 触媒を使うのと同じ感覚で酵素を重合触媒として使っている。酵素のもつ最高次機能の一つである触媒機能を新たに発掘し、酵素工学の発展に寄与したい。今後あらゆる化学反応で地球環境問題を抜きに考えられない状況にあって、酵素触媒重合は時宜にかなった方向であろう。

合成セルロースに関連して言えば、電子顕微鏡で *in vitro* 生成を観測できた²²⁾。現在セルラーゼを分画して触媒作用を調べているが、これまでより高重合度、しかも筆者の夢である生物のみが生産することが出来るセルロース I 型の合成の可能性がある。もし可能になれば I 型の生成機構の情報はセルロースの生合成機構解明に役立つであろう。本法で得られる低重合度のセルロースは、これまで重合度が 5 から 50 位の範囲のものをを使った研究が皆無と言ってよだけに今後有用であろう。さらに酵素機能の特性を活かし、酵素を使いわけることにより非天然のオリゴ糖が合成できる²³⁾。これらの結果を糖鎖工学への展開につなげたい。酵素触媒重合はまだ始まったばかりであるが、今後高分子合成の新しい一般手法として発展が期待されるとともに従来法では合成困難であった巨大分子の創製に寄与することが望まれる。

最後にここにあげたわれわれの研究は正田晋一郎博士、宇山浩博士はじめ研究室メンバーの協力によるものである。ここに付記し謝意を表わしたい。

文 献

- 1) S. Kobayashi, K. Kashiwa, T. Kawasaki, S. Shoda : *J. Am. Chem. Soc.*, **113**, 3079 (1991)
- 2) 小林四郎, 正田晋一郎, 宇山 浩 : 化学, **47**, 214 (1992)
- 3) S. Kobayashi, S. Shoda, H. Uyama : *Adv. Polym. Sci.*, in press
- 4) J.B. Jones : *Tetrahedron*, **42**, 3351 (1986)
- 5) A.M. Klivanov : *Acc. Chem. Res.*, **23**, 114 (1990)
- 6) S. Kobayashi, J. Shimada, K. Kashiwa, S. Shoda : *Macromolecules*, **25**, 3237 (1992)
- 7) S. Kobayashi, I. Kaneko, H. Uyama : *Chem. Lett.*, 393 (1992)
- 8) S. Okumura *et al.* : *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 2805 (1984)
- 9) S. Matsumura, J. Takahashi : *Makromol. Chem. Rapid Commun.*, **7**, 369 (1986)
- 10) A.L. Gutman *et al.* : *Tetrahedron Lett.*, **28**, 5367 (1987)
- 11) T. Kitazume *et al.* : *Chem. Express*, **3**, 135 (1988)
- 12) J.S. Wallace, C.J. Morrow : *J. Polym. Sci. Part A : Polym. Chem.*, **27**, 2553 (1989)
- 13) 例えば L. Stryer : *Biochemistry*, 3rd ed.; W.H. Freeman, New York, (1988) p.342
- 14) 小林四郎, 正田晋一郎, 柏 啓太 : 日化第 58 春季年会
予稿集, 1089 (1989) ; 日化第 59 春季年会予稿集, 2059 (1990) ; 高分子学会予稿集, **38**, 3005 (1989) ; 小林四郎, 正田晋一郎 : *ファインケミカルズ*, **20**, 13 (1991) ; 小林四郎 : 化学と生物, **29**, 215 (1991) ; 小林四郎 : 化学と工業, **44**, 1914 (1991) ; 小林四郎, 正田晋一郎 : 高分子加工, **40**, 237 (1991) ; 小林四郎, 正田晋一郎 : 繊維と工業, **48**, 148 (1992)
- 15) H.H. Schlubach, L. Lührs : *Ann.*, **547**, 73 (1941)
- 16) E. Husemann, G.J. Müller : *Makromol. Chem.*, **91**, 212 (1966)
- 17) T. Uryu *et al.* : *Macromolecules*, **18**, 599 (1985)
- 18) F. Nakatsubo *et al.* : CELLULOSE, Structural and Functional Aspects, ed by J.F. Kennedy, G.O. Phillips, P.A. Williams, Ellis Horwood Ltd., (1989) p.201
- 19) J.A. Akkara, K.I. Senecal, D.J. Kaplan : *J. Polym. Sci., Polym. Chem. Ed.*, **29**, 1561 (1991)
- 20) M. Aizawa, L. Wang, H. Shinohara, Y. Ikariyama : *J. Biotechnol.*, **14**, 301 (1990)
- 21) 小林四郎, 宇山 浩 : 日化第 65 春季年会, 東京 (1993 年 3 月)
- 22) 正田晋一郎, 小林四郎, J. Lee, K. Okuda, R.M. Brown, Jr. : 日化第 63 春季年会予稿集, 1381 (1992)
- 23) 小幡 慶, 川崎達也, 正田晋一郎, 小林四郎 : 高分子学会予稿集, **41**, 2415 (1992)

BOOKS 新刊・新着図書

Advanced Thermoplastic Composites : Characterization and Processing H.-H. Kausch 編, 370 頁, DM148 (1992) Carl Hanser Verlag, Germany

Advances in Polymer Science Vol.105 : Recent Trends in Radiation Polymer Chemistry S. Okamura 編, 165 頁, 18,500 円 (1993) Springer, Germany

Advances in Urethane Science and Technology Vol.11 K.C. Frisch 他編, 255 頁, SFr.165 (1992) Technomic Publishing, Switzerland

A Glossary of Plastics Terminology in 5 Languages (2nd ed.) W. Glenz 編, 231 頁, DM34 (1992) Carl Hanser Verlag, Germany

Azo Functional Polymers : Functional Group Approach in Macromolecular Design G.S. Kumar 著, 164 頁, SFr.150 (1992) Technomic Publishing, Switzerland

Catalysis in Polymer Synthesis (ACS Symposium Ser., No.496) E.J. Vandenberg and J.C. Salamone 編, 291 頁, 15,740 円 (1992) ACS, USA

Comprehensive Polymer Science G. Allen 他編, 690

頁, 54,000 円 (1992) Pergamon Press, UK

Conjugated Polymers and Related Materials : The interconnection of chemical and electronic structure W.R. Salaneck 他編, 400 頁, 18,700 円 (1993) Oxford U.P. UK

Einführung in die Kunststoffverarbeitung

W. Michaeli 著, 214 頁, DM48 (1992) Carl Hanser Verlag, Germany

RecyclingPlas Conference Proceedings

(Proceedings of the 7th Annual RecyclingPlas Conference, May 1992) D.E. Polk Jr. 他編, \$75 (1992) Plastics Institute of America, USA

Resists in Microlithography and Printing

(Materials Science Monographs, Vol.76) B. Bednár 他著, 380 頁, 30,800 円 (1993) Elsevier, the Netherlands

Rotational Moulding of Plastics (Polymer Engineering Ser., No.1) R.J. Crawford 著, 300 頁, 19,630 円 (1992) Research Studies Pr., UK

有機工業化学 第 2 版 園田 昇, 亀岡 弘編, 424 頁, 4,326 円 (1993) 化学同人

例文でみる英文化技法 科学技術英語 アグネ叢書 7
原田豊太郎著, 310 頁, 3090 円 (1993) アグネ

本欄は国内で刊行された高分子関係図書のほか, 海外で発行されたもので国内で入手できる新着図書を紹介します。