酵素触媒重合

—天然高分子で人工高分子をつくる—

Enzymatic Polymerization—Synthesis of Artificial Polymers Catalyzed by Natural Polymers—

小林四郎 京都大学大学院工学研究科
Shiro KOBAYASHI

研究対象とする高分子構造がより複雑になり、要求される反応選択性が厳しくなるに伴い、酵素触媒の高分子合成における有用性がますます強く認識されるようになってきた。この分野の最近数年の進展は目覚ましい。本稿では多糖類、ポリエステルおよびポリフェノール類の合成を中心にその近況と課題を概説する。

1. はじめに

生体内で重要な巨大分子として、核酸 (DNA, RNA)、タンパク質、多糖の3群が挙げられる。これら生体高分子はすべて酵素 (タンパク質) の触媒作用によりつくられる。自然界ではあらゆる生物が自身の生存のために酵素を産生している。これら生物のつくった酵素を分離し、それを化学反応触媒として複雑なターゲット分子全合成の鍵反応に用いるような研究は有機成分分野では古くから知られている¹⁾。しかし、高分子合成の触媒としての研究はここ数十年のことである。初期にはリパーゼ触媒によるポリエステル合成が報告されたが、オリゴマー程度の分子量にしかならなかった²⁾。筆者らは、酵素反応は複雑で依然として不明な点が多いが、酵素も分子量は巨大ではあるが分子であるので分子触媒の一つとして捉え、酵素 (天然高分子) を積極的に重合触媒として用い人工高分子をつくる研究を酵素触媒重合 (enzymatic polymerization) として系統的に進めてきた³⁾。最近この分野の研究が急速に増加している。本稿では数年前の短い総説⁴⁾を受けて、その後の進展をおもに述べる。ここで酵素触媒重合は“酵素触媒を用いる非生成経路による *in vitro* 重合反応”をいう。

2. 酵素触媒の種類と特徴

すべての酵素は6種類に分類される。これまで3種類の酵素群による重合触媒作用が報告されており、各々の酵素群により得られた高分子の例を挙げる (表1)^{3a)}。

生体内における酵素反応の特徴は酵素の種類により大きく異なるが一般的にいえることは、穏和な条件下、水溶液中、基質特異的、反応特異的に高い触媒活性で進行することである。これらの特徴が *in vitro* 酵素触媒重合に活かされると、これまで不可能であった複雑な構造をも

表1. 酵素の分類とその触媒作用による高分子の生成

酵 素	生成高分子の例
1. 酸化還元酵素	ポリフェノール類, ポリアニリン, ポリアクリルアミド
2. 転移酵素	多糖類, 環状オリゴ糖
3. 加水分解酵素	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. 除去付加酵素	
5. 異性化酵素	
6. 合成酵素	

つ高分子の合成が実現し、立体化学、位置選択性、官能基選択性等の構造制御された新しい高分子の合成が可能となる。この合成法は新しい機能や性能をもつ高分子材料の創製につながる手法として認められるようになった。

3. 酵素触媒重合—最近の進展

3-1. 加水分解酵素触媒

これまで酵素重合の触媒として加水分解酵素 (ヒドラーゼ) が圧倒的に多く用いられている。自然界に多種多様な存在し、入手しやすい。生細胞中エステル結合、ペプチド (アミド) 結合、グリコシル結合などの結合切断を伴う加水分解を触媒する酵素が重合触媒として機能するためには、基質モノマーどうしの結合形成を繰り返し引き起こさねばならない。つまり酵素本来の触媒作用とは逆反応の触媒として働く必要がある。すべての化学反応は原理的には平衡反応であるから、重合反応を進行させるには酵素作用機作を考慮した基質モノマーの設計が鍵となる。

多糖類の加水分解酵素であるグリコシダーゼが多糖類の合成触媒に用いられた。セルラーゼ、キシラナーゼお

およびキチナーゼが各々セルロース⁵⁾、キシラン⁶⁾ およびキチン⁷⁾ の合成に高活性であった。これら天然多糖の合成は達成されていなかったが、本手法によりはじめて可能になったものである。下式キシランの合成にみられるように、多糖合成の難しさはアノマー炭素 C1 の立体化学 (α あるいは β) とグリコシル結合 (反応する OH 基) の位置選択性の制御にある。この重合は反応中 HF 分子が脱離するので重縮合である。これらの重合では系中で多糖そのものが生成するので、セルロースの高次構造形成が直接観測される。その結果、生物のみがつくると信じられていた高次構造セルロース I 形成が *in vitro* で可能となった (空間選択的重合, choroselective polymerization)⁸⁾。

一方、キチンの合成は二糖オキサゾリンモノマーの開環重付加反応により成功した⁷⁾。この反応は緩衝液中、有機溶媒なしでスムーズに進行し、モノマー組成そのままキチンに変化する (開環付加重合)。

酵素触媒重合が起こるためにはモノマーが基質として触媒に認識されねばならない。1894 年 Fischer により鍵と鍵穴の説が提唱され、今もそれは正しい。しかし、酵素と基質の関係は実際厳密に対応するものではなく、ある程度の許容範囲がある。この範囲内でモノマーを設計すれば基質として認識され活性化されて反応が起こる。上述の天然多糖合成反応のモノマーはすべてこれらの条件を満たしている。すなわち、フッ化物モノマーの場合、フッ素は脱離基として優れているだけでなく、原子の大きさが酸素のそれに似ているので認識され基質となるのである。キチナーゼによるキチンの加水分解の遷移状態としてオキサゾリン構造が考えられており、オキサゾリンモノマー構造はちょうど遷移状態アナログとなっているため、非常に認識されやすく、したがって重合速度が大きいと考えられる⁹⁾。この許容範囲をうまく利用すればまったく新しい重合反応が開発される。人工多糖の交互メチル化セルロース¹⁰⁾、セルロース/キシランハイブリッド¹¹⁾ が得られた。

リパーゼは本来、高級脂肪酸エステルの加水分解酵素

である。有機溶媒中では 100℃ でもリパーゼは活性を失わずエステル化反応やエステル交換反応が報告され¹²⁾、有機合成におけるリパーゼの有用性が広がった。高分子合成ではじめて酵素が用いられたのはリパーゼ触媒によるポリエステル合成である。脱水反応によりオリゴマーの生成が認められる程度であったのが²⁾、最近では分子量 2~3 万のものが得られている。ここ数年この周辺の研究に活発でめざましい進展がみられる。

オキシ酸エステルのエステル化反応¹³⁾、モレキュラーシーブ存在下オキシ酸類の脱水反応¹⁴⁾ によるポリエステル合成がある。後者の場合高分子量体を得るには大量のリパーゼ (モノマーの 10 倍量) が必要である。通常脱水反応は有機溶媒中でのみ起こるが、リパーゼ触媒によるジカルボン酸とグリコールの脱水反応でポリエステル合成が水中で起こることが指摘された¹⁵⁾。リパーゼ、ジカルボン酸およびグリコールに対し挙動に特異性があるが、詳しい理由は今後の課題である。

ジカルボン酸活性化エステルとグリコールからポリエステルの合成には、活性化エステルとしてトリクロロエチルエステル等が用いられる¹⁶⁾。リパーゼの不斉認識能を利用したエポキシ基を含む光学活性ポリエステル (光学純度 >96%, 分子量 5300) が得られ、未反応モノマーからもう一方の対掌体が 95% の光学純度で回収された¹⁷⁾。活性化基としてビニルエステルを用いると、反応性が高く脱離したビニルアルコールがアセトアルデヒドに異性化し、反応が不可逆となるため温和な条件下、高収率でポリエステルを得ることができる¹⁸⁾。

リパーゼ触媒によるラクトン類の開環重合が見いだされた。ε-カプロラクトン (7 員環)¹³⁾、¹⁹⁾ の研究から始まり、小員環 (4 員環)²⁰⁾、中員環 (6, 7, 9)²¹⁾ および大環状ラクトン (12, 13, 16, 17)²²⁾ が重合する。4 員環ラクトンからは低分子量ポリエステルが得られるのに対し、大環状ラクトンからは分子量 2 万以上のポリエステルが容易に得られる。触媒活性が極めて高い固定化リパーゼ²³⁾、重合中大環状オリゴマーの生成²⁴⁾ についての研究がある。

リパーゼ触媒によるラクトン類の開環重合機構は次のように考えられている^{22a)}。アシル-酵素中間体 (EM) のアシル炭素が開始反応で ROH により求核攻撃を受けてアルコールを生成し、生長反応でも同じく EM が分子鎖末端のアルコールによる求核攻撃を受けて生長する、いわゆる活性化モノマー機構である (図 1)。

ROH として糖類を用いると第一級と第二級ヒドロキ

図1 リパーゼ触媒によるラクトン類の開環重合機構

シル基のうち第一級だけが位置選択的に反応してラクトンの重合を開始した^{21b), 25)}。

重合反応性の環員数依存を調べるため Michaelis-Menten 動力学解析を行い、定量的に評価した。通常のアニオン重合では大環状ラクトンの方が環ひずみが小さいため、環ひずみのより大きい6,7員環ラクトンより重合反応性は小さい²⁶⁾。しかしリパーゼ触媒による重合ではまったく逆の傾向を示すという注目すべき結果となった²⁷⁾。EM 生成が律速で、大環状ラクトンの方が酵素に認識されやすく、開環反応が速く起こって EM を生成するからである。

リパーゼはまた環状カーボネートの開環重合触媒となりポリカーボネート²⁸⁾を、ラクチドの開環重合によりポリラクチド²⁹⁾を与える。

3-2. 酸化還元酵素触媒

酸化還元酵素として西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP)、ダイズ由来ペルオキシダーゼ (SBP) (これらは活性中心に鉄プロトポリフィリンをもつヘムタンパク)、およびラッカーゼ (活性中心は銅タンパク) 等が知られている。

p-フェニルフェノールが H_2O_2 を酸化剤とする HRP 触媒により重合することが 1987 年に報告され、新しいポリアロマチック高分子材料の可能性が示されたが、キャラクタリゼーションは不十分であった³⁰⁾。そこで無置換フェノールの HRP 触媒による酸化重合が詳しく調べられた³¹⁾。構造はフェニレンユニットとオキシフェニレンユニットが約 1:1 の割合で含まれ、DMF, DMSO に部分的に可溶で、可溶部の分子量 35,000 であった。用いる溶媒組成により両ユニット比と分子量は大きく影響され、分子量数千以下の可溶性ポリフェノールが合成されるようになった³²⁾。フェノールの酸化重合をポリ

(ビニルメチルエーテル) 等の分散剤存在下で行うとサブミクロンサイズのポリマー粒子が得られた³³⁾。アルキルフェノール類も HRP, SBP で酸化重合して可溶性ポ

リマーを与える³⁴⁾。SBP 触媒によるビスフェノール-A からのポリマー (分子量 4000) は有機溶剤に易溶で熱硬化性、エポキシ架橋により耐熱性ポリマーを与えた³⁵⁾。既存のフェノール樹脂はホルムアルデヒドを使っているのでその毒性が問題となっている。ポリフェノールは既存樹脂より耐熱性にすぐれ、ホルムアルデヒドを含まないため材料として

新たな用途の可能性がある。

3,5-ジメトキシ-4-ヒドロキシ安息香酸は HRP (SBP) と H_2O_2 またはラッカーゼと O_2 による酸化重合で脱炭酸を伴い分子量 1 万以上のポリ (フェニレンオキシド) を与えた³⁶⁾。

メタクリル基含有フェノールは官能基選択的にフェノール部分でのみ酸化重合し可溶性ポリマーが生成した³⁷⁾。それは 100℃ での加熱および光照射で硬化するのでレジスト材料として有力である (式 (6))。

チロシナーゼモデル錯体を触媒とし、4-フェノキシフェノールから酸素酸化により直接無置換結晶性ポリ (フェニレンオキシド) が得られた。反応制御されたラジカル種を含むため、このような高選択性反応が起こったと説明されている³⁸⁾。

HRP 触媒により 2,5-ジアミノベンゼンスルホン酸の酸化重合で水可溶のポリアニリンが得られ、電気化学挙動が調べられた³⁹⁾。

ビニルモノマーのラジカル重合が報告された。HRP はアクリルアミド⁴⁰⁾やアクリレート³⁷⁾の重合を開始する。アセチルアセトンを共存させておくと系中で炭素ラジカルが発生し HRP が良好なメディエーターとな

る⁴⁰⁾。ラッカーゼは単独でアクリルアミドの重合をひき起こし、高分子量体を与える⁴¹⁾。

3-3. 転移酵素触媒

この酵素を用いた例は少ない。ホスホリラーゼ触媒によりオリゴアミロースの非還元末端にグルコース 1-リン酸からグルコース転移させる方法でアミロースをもつスチレン型マクロモノマーをつくり、そのラジカル重合でグラフト重合体を得た。重合体とヨウ素の錯形成などが調べられている⁴²⁾。

4. おわりに

ごく最近の結果を中心に紹介したが、紙面の都合で多くの研究を割愛した。酵素機能の特徴を十分に活かした新構造高分子の創製や高分子合成の新手法の開発が今後とも重要である。酵素触媒重合は多くの場合自然界の物質循環に組み込まれるので環境負荷の小さいプロセス (green polymer chemistry) として期待される。

文 献

- 1) J. B. Jones: *Tetrahedron*, **42**, 3351 (1986)
- 2) a) S. Okumura, *et al.*: *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 2805 (1984). b) S. Matsumura, *et al.*: *Macromol. Chem., Rapid Commun.*, **7**, 369 (1986)
- 3) a) S. Kobayashi, S. Shoda, H. Uyama: "Catalysis in Precision Polymerization", S. Kobayashi, Ed., John Wiley & Sons (1997) Chapter 8. b) "Enzymes in Polymer Synthesis", R. A. Gross, *et al.*, Ed., ACS Symp. Ser. 684 (1998). c) G. Ritter, *Trends Polym. Sci.*, **1**, 171 (1993)
- 4) 小林四郎: 高分子, **42**, 308 (1993)
- 5) S. Kobayashi, *et al.*: *J. Am. Chem. Soc.*, **113**, 3079 (1991)
- 6) S. Kobayashi, *et al.*: *Macromolecules*, **29**, 2698 (1996)
- 7) S. Kobayashi, *et al.*: *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 13113 (1996)
- 8) J. H. Lee, *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **91**, 7425 (1994)
- 9) A. C. T. van Scheltinga, *et al.*: *Biochemistry*, **34**, 15619 (1995)
- 10) E. Okamoto, *et al.*: *Cellulose*, **4**, 161 (1997)
- 11) M. Fujita, *et al.*: *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 6411 (1998)
- 12) A. M. Klibanov: *Acc. Chem. Res.*, **23**, 114 (1990)
- 13) D. Knani, *et al.*: *J. Polym. Sci., Polym. Chem. Ed.*, **31**, 1221 (1993)
- 14) a) D. O'Hagen, N. A. Zaidi: *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 2389 (1993). b) *Idem*: *Polymer*, **35**, 3576 (1994)
- 15) S. Kobayashi, H. Uyama, S. Suda, S. Namekawa: *Chem. Lett.*, **105** (1997)
- 16) a) E. M. Brazwell, *et al.*: *J. Polym. Sci., Polym. Chem. Ed.*, **33**, 89 (1995). b) Y. Y. Linko, *et al.*: *Enzyme Microb.*

Technol., **17**, 506 (1995)

- 17) J. S. Wallace, C. J. Morrow: *J. Polym. Sci., Polym. Chem. Ed.*, **27**, 2553 (1989)
- 18) a) H. Uyama, S. Kobayashi: *Chem. Lett.*, 1687 (1994). b) A. K. Chaudhary, *et al.*: *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 3728 (1995)
- 19) a) H. Uyama, S. Kobayashi: *Chem. Lett.*, **1149** (1993). b) S. Kobayashi, *et al.*: *Macromol. Chem. Phys.*, **199**, 1729 (1998). c) R. T. MacDonald, *et al.*: *Macromolecules*, **28**, 73 (1995)
- 20) a) G. A. R. Nobes, *et al.*: *Macromolecules*, **29**, 4829 (1996). b) Y. Y. Svirkin, *et al.*: *Macromolecules*, **29**, 4591 (1996). c) S. Namekawa, *et al.*: *Polym. J.*, **28**, 730 (1996). d) S. Matsumura, *et al.*: *Chem. Lett.*, 795 (1996)
- 21) a) K. Küllmer, *et al.*: *Macromol. Rapid Commun.*, **19**, 127 (1998). b) K. S. Bisht, *et al.*: *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 1363 (1998). c) S. Kobayashi, *et al.*: *Macromolecules*, **31**, 5655 (1998)
- 22) a) H. Uyama, *et al.*: *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **68**, 56 (1995). b) H. Uyama, *et al.*: *Macromolecules*, **28**, 7046 (1995). c) H. Uyama, *et al.*: *Acta Polym.*, **47**, 357 (1996). d) H. Uyama, *et al.*: *Chem. Lett.*, **107** (1996). e) K. S. Bisht, *et al.*: *Macromolecules*, **30**, 2705 (1997)
- 23) H. Uyama, *et al.*: *Chem. Lett.*, 1109 (1997)
- 24) a) C. Berkane, *et al.*: *Macromolecules*, **30**, 7729 (1997). b) A. Cordova, *et al.*: *Polymer*, **39**, 6519 (1998)
- 25) A. Cordova, *et al.*: *Macromolecules*, **31**, 1040 (1998)
- 26) R. Nomura, *et al.*: *Macromolecules*, **27**, 620 (1994)
- 27) S. Namekawa, *et al.*: *Proc. Jpn. Acad.*, **74B**, 64 (1998)
- 28) a) S. Matsumura, *et al.*: *Macromolecules*, **30**, 3122 (1997). b) S. Kobayashi, *et al.*: *Macromol. Rapid Commun.*, **18**, 575 (1997)
- 29) a) H. Uyama, *et al.*: *Proc. Jpn. Acad.*, **69B**, 203 (1993). b) S. Matsumura, *et al.*: *Macromol. Chem., Rapid Commun.*, **18**, 477 (1997)
- 30) J. S. Dordick, *et al.*: *Biotechnol. Bioeng.*, **30**, 31 (1987)
- 31) H. Uyama, *et al.*: *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **69**, 189 (1996)
- 32) 小口貴久ら, 高分子学会予稿集, **47**, 249 (1998)
- 33) H. Uyama, *et al.*: *Chem. Lett.*, **795** (1995)
- 34) H. Kurioka, *et al.*: *Macromol. Rapid Commun.*, **15**, 507 (1994)
- 35) S. Kobayashi, *et al.*: *Macromol. Chem. Phys.*, **199**, 777 (1998)
- 36) R. Ikeda, *et al.*: *Macromolecules*, **29**, 3053 (1996)
- 37) H. Uyama, *et al.*: *Macromolecules*, **31**, 554 (1998)
- 38) H. Higashimura, *et al.*: *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 8529 (1998)
- 39) K. S. Alva, *et al.*: *Macromolecules*, **30**, 4024 (1997)
- 40) O. Emery, *et al.*: *J. Polym. Sci., Polym. Chem.*, **35**, 3331 (1997)
- 41) R. Ikeda, *et al.*: *Macromol. Rapid Commun.*, **19**, 423 (1998)
- 42) a) G. Ziegast, B. Pfannemüller: *Carbohydr. Res.*, **160**, 185 (1987). b) K. Kobayashi, *et al.*: *Macromolecules*, **29**, 8670 (1996)

小林四郎 京都大学大学院工学研究科材料化学専攻 (606-8501 京都市左京区吉田本町) 教授、工博
1964年京都大学工学部合成化学科卒、1969年同大学院工学研究科博士課程修了、京都大学工学部助手、講師を経て、1986年東北大学工学部教授。1997年より現職。1969～71年ケース・ウェスタン・リザーブ大学博士研究員。専門は高分子合成、有機反応。〈趣味〉囲碁、音学鑑賞