酵素触媒重合

宇山 浩・小林 四郎

環境に優しい高分子合成法としての酵素触媒重合の近況を概説する。酵素の特異的触媒機能を活かすことにより、従来法では得られない新素材が創出されている。穏和な条件下での天然資源からの高性能塗膜材料や高分子量生分解性ポリマーの酵素合成が報告された。さらに酵素触媒を用いた高分子のケミカルリサイクルシステムが開発されている。

1. はじめに

高分子材料は化学工業の主要分野を担うとともに、日常生活に欠かさないものである。日本では年間約1,400万トンの高分子材料が製造されている。しかし、廃プラスチックに基づく環境汚染は、炭酸ガス濃度の上昇による温暖化やフロンガスによるオゾン層の破壊とともに環境破壊に対する大きな原因のひとつとして大きく社会問題化している。また、地球環境保護の立場から、毒性の危惧されるモノマーおよび触媒の使用、高エネルギーを必要とする高温、高圧下での製造方法は早急な改善を求められており、同時に有限資源である石油の代わりとなる高分子の出発物質に関する研究もきわめて重要である。最近、世界的に天然資源からの汎用高分子材料の開発が急速に進んでいるが、省資源の観点のみならず得られる高分子材料の多くが生分解性であることもその要因であろう。

有機合成分野では、酵素を立体あるいは位置選択的反応の触媒として用いる試みが活発に行われてきた¹⁾。有機合成反応における酵素触媒作用は、化学触媒と比較して多くの場合に高い触媒活性、穏和な反応条件、高い立体、位置および官能基選択性、副反応の抑制といった多くの利点を有している。このような特徴から、生体触媒を用いる物質生産に対する関心が高まってきた。筆者らは酵素を積極的に重合触媒として用いる高分子合成に関する研究（「酵素触媒重合」）を世界に先駆けて系統的に進めてきた。近年、機能性高分子材料開発における精密構造制御の必要性が高

まっており、それらに対応できる高分子合成の新手法としても酵素触媒重合が注目されている²⁾。

また、酵素触媒重合は穏和な条件下での高活性触媒作用（省エネ）、有効利用の望まれている天然資源の出発物質としての活用（省資源）、酵素反応系の無毒性（毒性の高い金属触媒やモノマーの非使用）、生成ポリマーの高い生分解性といった点で、環境低負荷型の高分子材料創製プロセスである。酵素触媒重合は自然界の物質循環に取り込まれるものであり、その研究開発が「グリーンポリマーケミストリー」の推進につながるものと期待される²⁾。

本稿では環境調和型高分子材料の合成法の視点から、酵素触媒重合の近況を概説する。具体的には酵素関連触媒を用いるフェノール類の重合、人工漆の開発、酵素触媒を用いる生分解性ポリエステルとポリアミノ酸の合成とケミカルリサイクルの最近の成果を紹介する。

2. 酵素関連触媒を用いるフェノール類の重合

ペルオキシダーゼ触媒を用いるフェノール類の酸化重合は、毒性の高いホルマリンを用いるフェノール樹脂（ノボラック樹脂、レゾール樹脂）に代わるポリフェノール合成法として注目されている。この酵素法ポリフェノールはホルマリンを含まない真のフェノール樹脂として特記されるものである。フェノール類の酵素触媒重合は含水有機溶媒で行われることが多い。重合前は均一系であるが、過酸化水素（酸化剤）を加えることによりポリマーが析出する。

UYAMA, Hiroshi (左)

京都大学大学院工学研究科 (606-8501 京都市左京区吉田本町)・助教授、工学博士。1987年京都大学大学院工学研究科修士課程修了。1988年東北大学工学部助手、2000年より現職。専門は高分子合成、グリーンポリマーケミストリー。

KOBAYASHI, Shiro (右)

同上・教授、工学博士。1969年京都大学大学院工学研究科博士課程修了。1986年東北大学工学部教授、1997年より現職。専門は高分子合成、有機反応。

Enzymatic Polymerization: An Environmentally Benign Method of Polymer Synthesis

重合後、濾過などによりポリマーを簡単に回収できる。また、反応は室温で進行するため、フェノール類の酵素触媒重合は穏和な条件下での簡便なポリマー合成法である。

もっとも単純かつ重要なフェノール類化合物である無置換フェノールは酸化カップリングにおける反応点が4カ所あるために、構造の制御された可溶性ポリマーを得ることは困難であった。酸化重合の代表的な触媒である銅/アミン触媒を用いた場合には不溶性のポリマーしか得られない。一方、西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) 触媒による重合では、メタノールと緩衝液の混合溶媒を用いることでDMFに可溶なポリフェノールが高収率で合成された (式 (1))³⁾。

メタ体のアルキルフェノールからも可溶性のポリマーが合成されている⁴⁾。モノマーに *m*-クレゾール、触媒に HRP、溶媒に含水メタノールを用いたところ、ほぼ定量的にポリマーが得られた。生成ポリマーは極性溶媒に易溶であり、ガラス転移温度は 200℃ 以上であった。なお、このポリマーは土壌中で生分解される⁵⁾。また、*m*-置換フェノールの重合挙動は酵素種に大きく影響を受けた。アルキル置換基の場合、HRP 触媒では置換基が小さいほど、大豆ペルオキシダーゼ触媒では置換基がかさ高いほど収率が向上した。また、種々のビスフェノール類からも可溶性ポリマーが合成されている⁶⁾。

ペルオキシダーゼ触媒によるフェノール類の重合はフリーラジカル機構で進行するために、構造制御は容易ではない。フェノール類の酸化重合により得られるポリマーはフェニレンユニットとオキシフェニレンユニットの混合体である。フェノールの重合ではメタノールと緩衝液の混合溶媒が用いられるが、その溶媒組成 (混合比) を変えることによりポリマーの組成比が制御された (フェニレンユニット 40~70%)³⁾。本結果は溶媒組成によるポリフェノールの構造制御のはじめての例となった。また、パラ置換フェノールの重合を種々の含水有機溶媒で行ったところ、有機溶媒の疎水性パラメーター ($\log P$) およびモノマー置換基の疎水性置換基数 (π) にポリマー構造との良好な一次相関関係が見られた⁷⁾。さらにこれらのパラメーターを変えることにより、フェニレン/オキシフェニレンユニット比が 94/6~4/96 の範囲まで制御可能となった。また、分子量制御は重合能の低い二置換フェノールとの共重合により達成されている⁸⁾。

上述のようにフェノール類の酵素触媒重合は含水有機溶媒で行われることが多いが、水溶性オリゴマーの添加により水中での重合が可能となった。ジメチル- α -シクロデキストリンを少量加えることにより、可溶性ポリフェノールが生成した⁹⁾。また、メタ置換フェノールの場合にはジメチル- β -シクロデキストリンの添加により水中での重合が確認されている¹⁰⁾。フェノールの重合にはポリエチレングリコール (PEG) の添加も有効であり、ポリフェノールと

PEG の複合体が得られる¹¹⁾。さらに位置選択性が大幅に向上し、フェニレンユニットを約 90% 含むポリマーが生成した。

ペルオキシダーゼの触媒機能を利用してアセチレン基を有するポリフェノールが合成された¹²⁾。HRP を触媒に用い、含水メタノール中で *m*-エチニルフェノールの重合を行うと、側鎖にエチニル基を有する可溶性ポリフェノールが得られた。本ポリマーは側鎖アセチレン基を利用した反応性高分子として、また焼成における残存率が高いために機能性炭素材料の前駆体として有望である。

ペルオキシダーゼのモデル錯体を触媒に用いた酸化重合が検討された。錯体としては有機溶媒に可溶なヘマチン¹³⁾や鉄サレン¹⁴⁾が用いられ、後者は優れた触媒活性を示す。2,6-ジフルオロフェノールの重合では融点 250℃ 以上の結晶性ポリフェニレンオキシド (PPO) が得られた¹⁵⁾。また、チロシナーゼのモデル錯体を触媒とする位置選択的重合により 4-フェノキシフェノールから結晶性無置換 PPO が、2,5-ジメチルフェノールから融点 300℃ 以上の結晶性 PPO 誘導体が生成した (式 (2))¹⁶⁾。

3. 人工漆の開発

酵素触媒を用いる酸化重合が硬化反応に拡張された。世界最古の塗料である漆の主成分はウルシオールと呼ばれる 3-アルケニルカテコール誘導体であり、漆塗膜を形成する主要素となる。化学合成の難しいウルシオールの類似体から空气中、ラッカーゼ酵素を用いる硬化により高分子塗膜 (人工漆) が開発された (式 (3))¹⁷⁾。本ウルシオール類似体は天然ウルシオールと同様に酵素作用により硬化し、天然漆に近い物性を有する塗膜を与えた。本硬化系は大気下、

酵素触媒により有機溶媒を用いることなく穏和な条件で進行し、優れた光沢性および膜物性を有する塗膜を与えることから、環境調和型の硬化システムとして期待される。

カシューナッツ殻液に含まれる主成分（アナカルド酸）の加熱処理により得られるカルダノールはメタ位に0～3の不飽和基を有するフェノール脂質である。カルダノールは食用カシューナッツを得る工程で多量に生成する副産物であり、その有効利用が望まれていた。鉄サレン錯体をカルダノールの重合触媒に用いたところ、有機溶媒中で反応を行うことにより可溶性ポリマーが高収率で得られた¹⁸⁾。不飽和基が重合に関与せず、側鎖に不飽和基を有するポリフェノールが生成する。生成ポリマーは熱処理あるいはナフテン酸コバルト触媒により容易に硬化し、光沢性の優れた硬化膜が生成した。本塗膜の物性は天然漆に匹敵し、広義に人工漆とみなされる。

4. 生分解性ポリマーの酵素合成

酵素触媒重合の触媒として加水分解酵素が圧倒的に多く用いられている。自然界に多種多様存在し、工業的にも安価なものが多く、入手しやすいためであろう。自然界でグリコシル結合、エステル結合、ペプチド（アミド）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が繰り返し起こり、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。

生分解性プラスチックは環境低負荷型の次世代高分子材料としてきわめて有望である。主たる生分解性プラスチックとして脂肪族ポリエステルがあげられ、発酵合成法と化学合成法により製造されている。最近、リパーゼ触媒を用いる脂肪族ポリエステル合成が生分解性高分子材料の新しい合成手法として確立されつつある¹⁹⁾。リパーゼは本来、油脂（グリセリン高級脂肪酸トリエステル）の加水分解酵素であるが、有機溶媒中ではエステル化反応やエステル交換反応の触媒として作用することが報告され、有機合成におけるリパーゼの有用性が広がった。このようなリパーゼの触媒能を利用することによりポリエステルが合成されてきた。おもにラクトン、ジカルボン酸誘導体/グリコール、オキシ酸誘導体がモノマーとして用いられ、いずれも穏和な条件下で重合が進行する。

多孔性アクリル樹脂に固定化した *Candida antarctica* リパーゼがポリエステル合成に高い活性を有しており²⁰⁾、ラクトン類から分子量数万のポリエステルを効率よく与える²¹⁾。また、繰り返し使用も可能である。また、環境調和型溶媒である超臨界二酸化炭素やイオン性液体中でもラクトンの重合が進行した²²⁾。

このリパーゼは立体選択的重合の触媒としても作用する。 β -ブチロラクトン (β -BL) と無置換 13 員環ラクトン

(DDL) の共重合では S 体の β -BL が立体選択的に重合し、光学純度約 85% の S 体光学活性ポリエステルが生成した (式 (4))²³⁾。 γ -アルキル- ϵ -カプロラクトンの立体選択的重合が報告されており、高い光学純度のポリエステルが得られている²⁴⁾。不飽和基を有するラクトン類の酵素触媒重合では官能基選択的に開環重合が進行し、不飽和基含有ポリエステルが合成された (式 (5))²⁵⁾。このポリマーはラジカル開始剤により容易に硬化する。

リパーゼ触媒を用いる重縮合も活発に研究されてきた。安価なジカルボン酸とグリコールの重合が無溶媒で進行する²⁶⁾。200 キロスケールの工業的製造研究も行われた。リパーゼの高い位置選択的触媒能を利用した反応性ポリエステル合成が検討された。セバシン酸ジビニルとグリセリンの重合では、グリセリンの 1 位と 3 位が位置選択的にアシル化された線状ポリエステルが得られた²⁷⁾。また、ソルビトールとの重合では、位置選択的にアシル化された糖含有ポリエステルが合成された²⁸⁾。

リパーゼ触媒を用いて新しい架橋性ポリエステルが開発された。植物油由来の不飽和カルボン酸存在下にセバシン酸ジビニルとグリセリンの重合を行ったところ、側鎖に不飽和基をもつポリエステルが一段階で合成された²⁹⁾。リノール酸あるいはリノレン酸を用いて得られたポリマーはナフテン酸コバルト触媒あるいは加熱処理により容易に硬化し、透明な架橋塗膜が得られた。さらに本硬化膜は良好な生分解性を示した。

プロテアーゼによるアミノ酸エステルの重合が報告されている。パパイン触媒による重合では立体選択的に重合が進行する。グルタミン酸ジエチルエステルの重合では α 位で位置選択的に反応が進行した³⁰⁾。また、チロシンエステルの重合では反応中に数十ミクロンの球状の結晶生成が観察された (図 1)³¹⁾。

図1 ポリチロシンの球状結晶

5. 酵素触媒を用いる生分解性ポリマーのケミカルリサイクル

脂肪族ポリエステルは水中でのリパーゼ触媒作用による分解あるいは土壌中での生分解を受ける。一方、有機溶媒中では多くの場合にポリエステル合成が進行するが、反応条件により分解を起こさせることも可能である。そのような条件下では高分子量ポリ(ϵ -カプロラクトン)はリパーゼ触媒により分解し、分子量数百のオリゴマーに変換された³²⁾。また、同じ酵素触媒存在下にこのオリゴマーを無溶媒で加熱するとポリエステルになる。この結果から、酵素触媒を用いる高分子材料の新規ケミカルリサイクル手法が提案された。これは溶媒の有無といったきわめて簡単な条件設定により重合・分解を制御できるという新概念に基づくものである。同様のポリエステルの分解や再合成は超臨界二酸化炭素中でも進行する³³⁾。

また、分解における基質濃度を低くすると、選択的に環状2量体が生成した³⁴⁾。さらにこのリサイクル手法は種々のポリエステルやポリカーボネートに拡張された³⁵⁾。

6. おわりに

本稿では、環境に優しい高分子合成法の観点から酵素触媒重合の新展開を概説した。紙面の都合で紹介できなかった研究は最近の総説を参照されたい^{2), 19)}。今後、本分野の研究がいっそう活発になり、生体触媒作用を利用した地球環境保護の観点からの新材料、新プロセスの開発が期待される。

文 献

- 1) C.-H. Wong, G. M. Whitesides: "Enzymes in Synthetic Organic Chemistry," Pergamon, Oxford, 1994
- 2) a) 小林四郎: 高分子, **42**, 308 (1993). b) 小林四郎: 高分子, **48**, 124 (1999). c) S. Kobayashi: *J. Polym. Sci., Polym. Chem. Ed.*, **37**, 3041 (1999). d) S. Kobayashi, et al.: *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **74**, 613 (2001). e) S. Kobayashi, et al.: *Chem. Rev.*, **101**, 3793 (2001). f) R. A. Gross, et al.: *Chem.*

- Rev.*, **101**, 2097 (2001). g) 小林四郎: "グリーンケミストリー", 御園生誠, 村橋俊一編, 講談社(2001)第11章
- 3) a) T. Oguchi, et al.: *Macromol. Rapid Commun.*, **20**, 401 (1999). b) T. Oguchi, et al.: *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **73**, 1389 (2000)
- 4) H. Tonami, et al.: *Macromol. Chem. Phys.*, **200**, 2365 (1999)
- 5) R. Farrell, et al.: *J. Environ. Polym. Degrad.*, **6**, 115 (1998)
- 6) a) S. Kobayashi, et al.: *Macromol. Chem. Phys.*, **199**, 777 (1998). b) H. Uyama, et al.: *Biomacromolecules*, **3**, 187 (2002)
- 7) N. Mita, et al.: *Chem. Lett.*, **402** (2002)
- 8) N. Mita, et al.: *Polym. J.*, **33**, 374 (2001)
- 9) N. Mita, et al.: *Macromol. Biosci.*, **2**, 215 (2002)
- 10) H. Tonami, et al.: *e-Polymers*, no. 3, 1 (2002)
- 11) 金 榮鎮ら, 高分子学会予稿集, **51**, 1325 (2002)
- 12) H. Tonami, et al.: *Biomacromolecules*, **1**, 149 (2000)
- 13) J. A. Akkara, et al.: *Macromolecules*, **33**, 2377 (2000)
- 14) a) H. Tonami, et al.: *Polym. Bull.*, **42**, 125 (1999). b) H. Tonami, et al.: *J. Macromol. Sci.-Pure Appl. Chem.*, **A36**, 719 (1999)
- 15) R. Ikeda, et al.: *Macromolecules*, **33**, 6648 (2000)
- 16) a) H. Higashimura, et al.: *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 8529 (1998). b) H. Higashimura, et al.: *Macromol. Rapid Commun.*, **21**, 1121 (2000)
- 17) a) S. Kobayashi, et al.: *Chem. Lett.*, **1214** (2000). b) R. Ikeda, et al.: *Proc. Jpn. Acad.*, **76B**, 155 (2000). c) R. Ikeda, et al.: *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **74**, 1067 (2001). d) S. Kobayashi, et al.: *Chem. Eur. J.*, **7**, 4754 (2001)
- 18) a) R. Ikeda, et al.: *Macromol. Rapid Commun.*, **21**, 496 (2000). b) R. Ikeda, et al.: *Polymer*, **43**, 3475 (2002)
- 19) a) S. Matsumura, *Macromol. Biosci.*, **2**, 105 (2002). b) S. Kobayashi, H. Uyama, *Curr. Org. Chem.*, **6**, 209 (2002)
- 20) H. Uyama, et al.: *Chem. Lett.*, 1109 (1997)
- 21) a) A. Kumar, R. A. Gross: *Biomacromolecules*, **1**, 133 (2000). b) A. Kumar, et al.: *Macromolecules*, **33**, 6303 (2000)
- 22) a) T. Takamoto, et al.: *e-Polymers*, no. 4, 1 (2001). b) H. Uyama, et al.: *Polym. J.*, **34**, 94-96 (2002)
- 23) H. Kikuchi, et al.: *Macromolecules*, **33**, 8971 (2000)
- 24) T. F. Al-Azemi, et al.: *Macromolecules*, **35**, 3380 (2002)
- 25) H. Uyama, et al.: *Macromolecules*, **34**, 6554 (2001)
- 26) a) H. Uyama, et al.: *Chem. Lett.*, 1285 (1998). b) F. Binns, et al.: *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 2671 (1999). c) H. Uyama, et al.: *Polym. J.*, **32**, 440 (2000)
- 27) a) H. Uyama, et al.: *Macromol. Rapid Commun.*, **20**, 171 (1999). b) H. Uyama, et al.: *Macromol. Biosci.*, **1**, 40 (2001)
- 28) H. Uyama, et al.: *Chem. Lett.*, 800 (2000)
- 29) a) T. Tsujimoto, et al.: *Biomacromolecules*, **2**, 29 (2001). b) T. Tsujimoto, et al.: *Macromol. Biosci.*, **2**, 329 (2002)
- 30) H. Uyama, et al.: *Biomacromolecules*, **3**, 318 (2002)
- 31) T. Fukuoka, et al.: *Biomacromolecules*, **3**, 768 (2002)
- 32) a) S. Kobayashi, et al.: *Biomacromolecules*, **1**, 3 (2000). b) S. Matsumura, et al.: *Macromol. Rapid Commun.*, **21**, 860 (2000)
- 33) a) T. Takamoto, et al.: *Macromol. Biosci.*, **1**, 215 (2001). b) S. Matsumura, et al.: *Macromol. Rapid Commun.*, **22**, 1325 (2001). c) R. Kondo, et al.: *Macromol. Biosci.*, **2**, 267 (2002)
- 34) H. Ebata, et al.: *Biomacromolecules*, **1**, 511 (2000)
- 35) a) Y. Osanai, et al.: *Macromol. Rapid Commun.*, **21**, 860 (2000). b) S. Matsumura, et al.: *Macromol. Rapid Commun.*, **22**, 215 (2001)