

リパーゼ反応の合理性の追究と120°Cから-40°Cまでの 極限温度下における酵素反応

依馬 正

酵素は一般に、①高い触媒活性、②高い立体選択性、③厳格な基質特異性を同時に示す。Fischerの「鍵と鍵穴説」は、この現象を非常にうまく説明できるため、100年以上に渡って生化学の定説となっている。しかし近年、酵素を有機合成へ応用する研究が活性化し、種々の非天然基質が試されるようになると、酵素反応には鍵と鍵穴のパラダイムではとらえきれない一面もあることが分かってきた。その最も顕著な例がリパーゼである。田辺製薬のジルチアゼムや住友化学のピレスロイド殺虫剤をはじめ、いくつかの製造プロセスでリパーゼが使われているのでご存じの方も多いと思う。リパーゼは本来脂質(トリアシルグリセロール)を加水分解する酵素であり立体選択性とは無縁のはずだが、種々のキラル非天然基質(2級および1級アルコールやカルボン酸)に対して高いエナンチオ選択性を示す。たった1種類のリパーゼが、数百種類の2級アルコールに対して高いエナンチオ選択性を示すことも分かってきた。このような有機合成に打ってつけの現象のメカニズムを考える時、鍵と鍵穴に例えられる相補的な分子間相互作用を酵素と基質(群)の間に仮定すると矛盾をきたす。

筆者らはリパーゼやスブチリシンなどの加水分解酵素がなぜ、高いエナンチオ選択性と幅広い基質特異性を両立できるのかという疑問に答えるために、鍵と鍵穴の概念を使わないメカニズムを提案した(図1)。²⁻⁴⁾ キーワードは、①遷移状態、②コンフォメーション、③立体反発である。酵素のポケットと基質の置換基との間の分子認識(鍵と鍵穴的な因子)は二次的なものであり、酵素がR-選択性を示すかS-選択性を示すかには影響しない。この意味で、図1の概念を「non-lock-and-key concept」と呼んでいる。⁴⁾ 図1aに示すように、リパーゼとスブチリシンは2級アルコールに対して逆の立体選択性を示すという経験則が知られているが、図1bとcの遷移状態モデルはそれを簡単に説明できる。図1へ至った経緯や検証実験に関しては他の解説⁵⁻⁷⁾や論文²⁻⁴⁾に譲ることにして、ここではその後の展開を紹介させて頂く。リパーゼ反応を利用した2級アルコールの絶対配置決定法⁸⁾について簡単に述べた後、120°Cまでの高温生体触媒反応⁹⁾を中心に述べる。

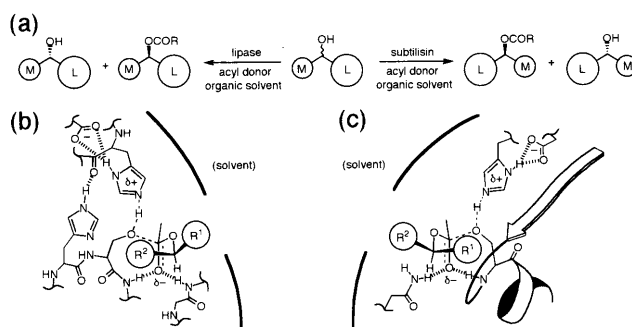


図1. (a) リパーゼおよびスブチリシンを用いた2級アルコールの速度論的光学分割における経験則。Lは立体的に大きい方の置換基、Mは小さい方の置換基を示す。(b) リパーゼの2級アルコールに対するエナンチオ選択性を説明できる遷移状態モデル。基質のC-O結合と切断されつつあるC-O結合は、立体電子効果により図のようなgauche配座をとる。不斉炭素に付いた水素原子はカルボニル基の酸素原子に対してsyn-配向をとる。このように局所的に安定な配座をとった時、速く反応するエナンチオマー(通常、(R)-体)は大きい方の置換基(R¹)を無理なく溶媒方向へ向けられる。一方、遅く反応するエナンチオマー(通常、(S)-体)の場合は、大きい方の置換基(R²)がタンパク側へ向くために立体障害が生じる。(c) スブチリシンの遷移状態モデル。

リパーゼ反応を利用した絶対配置決定法

有機化学の分野では約30年前に、有機分子の絶対配置(立体化学)をメカニズムに基づいて決定する方法が開発された(図2)。¹⁰⁾ 今でも、2級アルコールの絶対配置を決定するためにこのMTPA法はよく使われる。30年遅れたが、リパーゼ反応と図1bを利用してそれと似たようなことができるようになった。リパーゼ反応を実施した時に得られるエステル体とアルコール体の絶対配置を図1bから推定・決定するというものである。なお、図1の

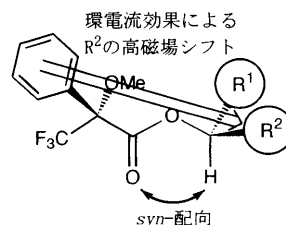


図2. NMRで絶対配置を決定するMTPA法。MTPAエステルに対して提案されたコンフォメーション。

遷移状態モデルと図2の MTPA エステルに対して提案されたコンフォメーションには共通点がある。2級アルコール部分の不斉炭素に付いた水素原子はカルボニル酸素原子と同じ方向を向いている。このコンフォメーションは基底状態でも遷移状態でも維持されており、両決定法において重要な因子となっている。ここでは詳細な説明は避けるが、とにかくリパーゼ反応を利用していくつかの2級アルコールの絶対配置を決定した。⁸⁾

高温生体触媒反応

ところが例外にも遭遇した。図3-1がまったく反応しなかったのである(図3)。図1bの遷移状態モデルからは、1が反応しても良さそうであり、反応すればエナンチオ選択性は高いと予測できる。X-線結晶構造を調べてみると、遷移状態モデルに示されていない3つのアミノ酸残基が(R)-体(速く反応するエナンチオマー)に対してさえ立体反発を及ぼしていることが示唆された。この立体反発を克服する最も簡単な方法は、反応温度を上げることである。酵素の耐熱性が気になったが、これは多孔質セラミックスに固定化されたものを使えば何とかなると楽観的に考えた。それ以前に使用していたリパーゼは lipase PS (天野エンザイム) というもので、固定化担体はセライトである。セライトに表面吸着しているよりも、多孔質セラミックスの細孔(約60 nm)の中に吸着しているリパーゼ(lipase PS-C II, 天野エンザイム)の方が周りから押さえ込まれた形で分子間相互作用しているために変性しにくいと考えた。溶媒は沸点が十分に高い*n*-デカン(bp 174°C)を用い、アシル化剤である酢酸ビニル(bp 72°C)が蒸発しないように、オートクレーブ(ステンレス製耐圧反応容器)中で反応を行った。マグネチックスターラーで攪拌しながら3時間反応させて停止した。結果を表1に示す。表1には、アシル化剤としてカプロン酸ビニル(bp 166°C)を用いた時の結果も示した。この場合は沸点が十分に高いので、反応容器としてガラス試験管を使用した。オイルバスで反応溶液を120°Cに加熱してからシリンジでカプロン酸ビニルを加えて反応を開始した。⁹⁾

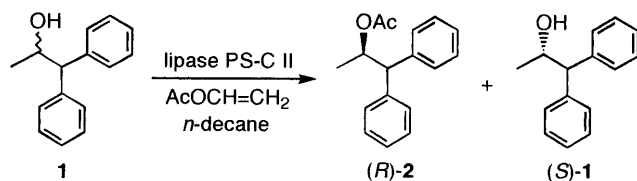


図3. 高温下におけるリパーゼ触媒反応。

表1. 高温下でのエナンチオ選択的リパーゼ反応

温度 (°C)	変換率 (%)	% 収率 (% ee)	
		(R) -2	(S) -1
30	3	— (—)	— (—)
40	16	13 (>98)	74 (16)
50	23	17 (>98)	70 (27)
60	27	20 (>98)	60 (39)
70	32	27 (>98)	58 (46)
80	39	31 (>98)	52 (58)
90	39	33 (>98)	52 (59)
100	30	29 (>98)	61 (42)
100 ^a	0	— (—)	— (—)
110	21	25 (>98)	62 (28)
120	12	13 (>98)	71 (14)
120 ^b	7	8 (>98)	78 (10)

^a lipase PS (セライト固定) を使用

^b カプロン酸ビニルを使用し、試験管中で反応

温度を上げることにより反応が進行しやすくなり、30°Cで変換率3%だったものが80°Cおよび90°Cでは変換率39%に達した。それ以上温度を上げると変換率は徐々に低下したが、120°Cにおいても反応が進行した。30°C以外のすべての反応温度において、得られたエステル生成物は光学的に純粋(>98% ee)であった。120°Cでカプロン酸ビニルを用いた場合も酢酸ビニルと似た結果になった。元来 *Burkholderia cepacia* 由来のリパーゼの至適反応温度(水中)は50°C付近であるので、①通常の滅菌温度である120°Cでも酵素反応が進行したこと、②120°Cまでの高温下でも光学的に純粋(>98% ee)なエステル生成物を与えたことは特筆に値する。また表1に示すように、lipase PS (セライト固定)を用いて100°Cで反応させた場合は、反応が全く進行しなかった。酵素は同じなので、固定化担体の違いによりこれだけ耐熱性に違いが生じたものと考えられる。

セラミックスに固定化されたリパーゼの熱安定性を調査するために、各温度で3時間熱処理した後の残存活性を測定してみた。熱処理は、実際の反応系に近づけるために、オートクレーブに*n*-デカンを入れリパーゼを懸濁させて行った。残存活性は、標準的な方法を使って30°Cで測定した。表2に結果を示す。熱処理温度が高くなるにつれて残存活性も次第に低下していき、140°Cで3時間熱処理すると事実上完全に失活した。それでも100°C、120°Cで3時間熱処理したリパーゼは、それぞれ63%、31%の活性を残していることから、通常より耐熱性が向

表2. 3時間の熱処理後のリパーゼ残存活性

熱処理温度 (°C)	残存活性 (%)
80	66
100	63
120	31
130	6
140	2

上していることは明らかである。

他の基質についても温度による反応加速効果を調査した。以前に、図 1b の遷移状態モデルを検証するために、置換基としてテトラフェニルポルフィリンを有する巨大 2 級アルコール 3 を設計し、リパーゼ反応を行ったことがある (図 4)。³⁾ 予測どおりエナンチオ選択性は非常に高かったが、反応性が低いために多量のリパーゼが必要であった。そこで、lipase PS-C II を用いて温度効果を調査したところ、60°C で変換率が最大になることが分かった。その条件でかなりの量の 3 が光学分割できるようになったので、光学活性な 3 を修飾して機能性分子として使う道が開かれた。

低温生体触媒反応

数年前に酒井らは、-40 ~ -60°C という前例のない極低温下でのリパーゼ反応を報告している。¹¹⁾ その時に使用されたリパーゼは lipase PS (セライト固定) であったので、lipase PS-C II (セラミックス固定) がどの程度の低温下まで酵素活性を示すかについても調査した。その結果、図 5 に示すように 1 級アルコール 5 に対してこの酵素は -40°C でも活性を示し、エナンチオ選択性も 30°C の場合より向上していた。このように、1 つの酵素が -40°C から 120°C までの非常に幅広い温度範囲で触媒活性を示すことが実証された。なお、エナンチオ選択性の向上のための低温法に関しては、酒井らによって詳細に検討され、いろいろな 1 級アルコールの速度論的光学分割に威力を発揮することが実証されている。¹²⁾

リパーゼは、水溶液だけでなく、有機溶媒、超臨界流体、^{13,14)} イオン性液体¹⁵⁾ といった非水媒体中でも触媒活性を示し、幅広い基質特異性と高いエナンチオ選択性を同時に示すため、有機合成に打ってつけの性質を持ち合わせている。有機合成で最も頻繁に使用される酵素くらいはメカニズムをはっきりさせておくべきだという思いから理論的な研究を行ってきた。今回、メカニズムの研

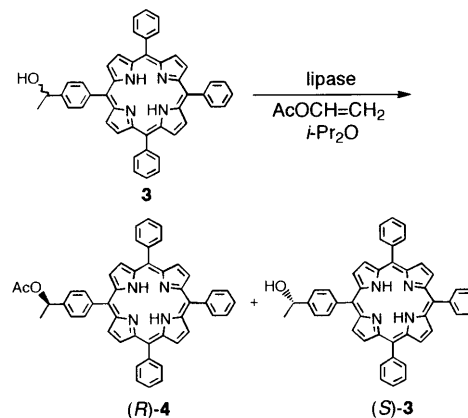


図 4. リパーゼを用いた光学活性ポルフィリンの合成。

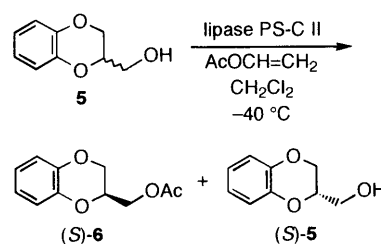


図 5. 低温下におけるリパーゼ触媒反応。

究が転じて、常温菌由来の酵素が -40°C から 120°C というギネス級に幅広い温度範囲で活性を示すことや、120°C でさえエナンチオ特異的な酵素反応が非天然基質に対して進行するという結果に至った経緯を紹介させて頂いた。今後も酵素の潜在能力がいろいろな形で引き出されると期待される。

文 献

- 1) Drauz, K. and Waldmann, H. (Ed): *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*, 2nd Ed, Wiley-VCH (2002).
- 2) Ema, T. et al.: *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **71**, 443 (1998).
- 3) Ema, T. et al.: *J. Org. Chem.*, **67**, 2144 (2002).
- 4) Ema, T. et al.: *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, **22**, 181 (2003).
- 5) 依馬 正: 化学と工業, **52**, 163 (1999).
- 6) 依馬 正, 酒井貴志: 有機合成化学協会誌, **58**, 691 (2000).
- 7) 依馬 正: バイオサイエンスとインダストリー, **58**, 493 (2000).
- 8) Ema, T. et al.: *Tetrahedron: Asymmetry*, **13**, 1223 (2002).
- 9) Ema, T. et al.: *Tetrahedron: Asymmetry*, **14**, 3943 (2003).
- 10) Dale, J. A. and Mosher, H. S.: *J. Am. Chem. Soc.*, **95**, 512 (1973).
- 11) Sakai, T. et al.: *J. Org. Chem.*, **62**, 4906 (1997).
- 12) Sakai, T. et al.: *Tetrahedron Lett.*, **39**, 7881 (1998).
- 13) Mori, T. et al.: *Chem. Lett.*, 921 (1998).
- 14) Matsuda, T. et al.: *Tetrahedron: Asymmetry*, **14**, 2087 (2003).
- 15) Itoh, T. et al.: *Chem. Lett.*, 262 (2001).