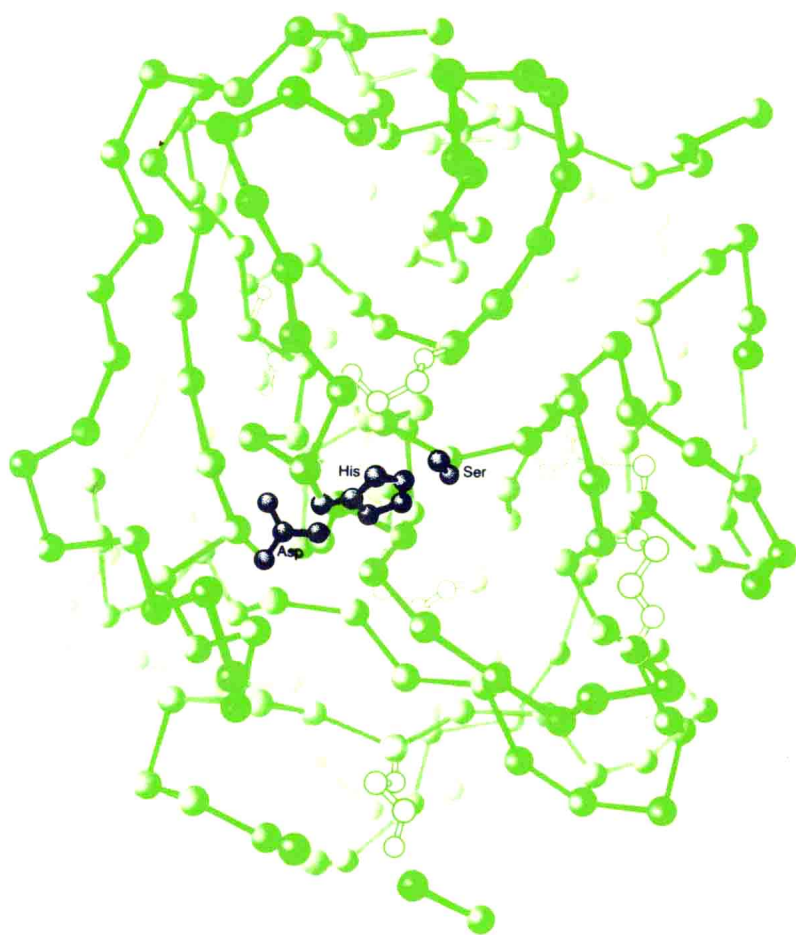


酵素機能と 精密有機合成

大野雅二 編著



シーエムシー



酵素機能と精密有機合成

——生理活性物質を創る生命科学の最先端——

江苏工业学院图书馆
藏书章

大野雅二編・著

シーエムシー

編著者紹介

大野 雅二

1930年 北海道に生る
1953年 北海道大学理学部化学科卒業
1957～60年 米国イリノイ大学・ハーバート大学留学
1961～77年 東レ(株)基礎研究所、
1977年～ 東京大学薬学部教授現在に至る

酵素機能と精密有機合成

1984年 9月10日 第1刷発行

定 価 定価 3,914 円

編著者 大野 雅二 (本体 3,800 円・税 114 円)

発行者 檜 垣 寅 雄

発行所 株式会社 シーエムシー
東京都千代田区内神田 1-5-4
(ミヤコビル) 電話03(293)2065

発売元 株式会社 ジ ス ク
東京都千代田区内神田 1-5-4
(ミヤコビル) 電話03(293)2061
大阪市北区西天満 4-7-10
(昭和ビル) 電話06(364)7571

印 刷 桂印刷株式会社

© 1984

ま え が き

生命の最も基本的な特徴は、生命を構成している物が大部分キラルな有機化合物から成り立っていることである。これらの物質は酵素によってつくられ、そしてまた代謝されてゆく。実験室であれ工場であれ、生命に関係のある物質で光学活性な生理活性物質を合成しようとする、それが触媒的であれ量論的であれ、どこかで必ず酵素のお世話になっている。

一方、有機合成の研究は、過去のどの時代よりも不斉炭素が含まれている生理活性物質を指向している。しかも物を創る技術は単に有機化学ばかりでなく、遺伝子工学、組織培養、醗酵、酵素法なども日進月歩の展開をしている。これらの手法は、水溶性物質および多くの不斉炭素を含む高分子物質の合成に秀でている。しかし有機合成は最も微妙な必須構造を分子に賦与できる立場から近代生命科学に大きく貢献している。遺伝情報の化学が詳しく解明されているのに対して、アミノ酸に基づく化学の拡がり、なんと奥が深く今なお神秘的なベールに包まれていることか。20個のアミノ酸からなるのに、モノマーからオリゴマーさらに分子量1～100万単位のものにわたってそれぞれの生理活性を示す驚くべき物質群である。化学結合としては単純なペプチド結合であるのに、構成されてくるオリゴペプチドからポリペプチドにいたる物質、特に蛋白質と総称されるものの立体化学、機能のなんと多様性に満ちていることだろう。量が質に変換してゆくからくり、この酵素の機能が解明され新しいインパクトが世に出るためには有機化学者の参加がぜひ必要である。この重要性は1984年になって相ついで開催されている国際化学会議の主題の一つに選ばれていることから窺える。しかし酵素は一次構造がわかったとしても、なおかつ高分子量であるために活性部位（触媒部位＋結合部位）における基質との相互作用をうきぼりにすることは容易ではない。つまり酵素反応機構は有機反応機構と比較したとき、かなり未開発の状態にある。酵素の三大特異性（基質・立体・位置）とは何か。またそれは長所であると同時に汎用性がないという点で短所であり、生成物の立体化学予測が論理的でなく多

分に経験的であるなど今後の展開が待たれるところである。理想的には酵素に学んだより合理的な触媒（分子量を 100 万分の 1 位にして）の設計，有機合成のルートを酵素に再び求める酵素反応機構への挑戦などが関心の的である。1976 年に出版された Jones, Sih, Perlman らによる “Application of Biochemical Systems in Organic Chemistry” は，この分野の総合的参考書であるが，内容を一新する時機にきている。こうした状況の中で本企画は，わが国のこの境界領域分野で最先端の研究を推進されている専門家の考え方，成果，夢などを記述していただいたものである。

さらに本書の内容を敷衍すれば，まず酵素機能あるいは生物機能を用いてどんなことができるのか，どんな有用物質につながるかを記述していただいた（山田・長沢，森・須貝，大石・秋田，黒住，小倉，大野）。これらは境界領域である故に研究者にとって不慣れなことが多く，この不慣れに由来する障害を除くために，本書ではできるだけ各章に実験例をのせていただいた。また，酵素機能発現の基質認識と活性部位を中心とする機構に現状ではどの程度アプローチできるかを示していただいた（金岡，徳重）。酵素自体を有機合成（非酵素的に）で合成することの現状を示していただき，高分子ペプチドもフラスコの中で作れることを示した（矢島）。これらの内容は，勉強される立場，立場で異なった角度から受け取られると思うが，ようやく世界的に活発になってきた本研究分野を新しい観点から編集した本書が，学部 3，4 年生，大学院生，および現代第一線で活躍されている有機化学者，生化学者，微生物学者にとっていささかでもお役にたつことができれば，本企画者として望外のよろこびである。

1984 年 7 月

大野雅二

執筆者一覽 (執筆順)

京都大学農学部農芸化学科教授	山田秀明
京都大学農学部農芸化学科助手	長沢透
東京大学農学部農芸化学科助手	須貝威
東京大学農学部農芸化学科教授	森謙治
帝人㈱生物医学研究所主席研究員	黒住精二
理化学研究所有機合成化学研究室主任研究員	大石武
理化学研究所有機合成化学研究室研究員	秋田弘幸
東北大学非水溶液化学研究所教授	小倉協三
京都大学薬学部製薬化学科教授	矢島治明
北海道大学薬学部製薬化学科教授	金岡祐一
京都大学理学部化学科助教授	徳重正信
東京大学薬学部製薬化学科教授	大野雅二

目 次

第 1 章 酵素を用いる有用物質の合成 ……………〔山田秀明，長沢透〕…	1
1. はじめに……………	1
2. 酵素の触媒機能の性質……………	3
3. 微生物・酵素の有機合成プロセスへの応用……………	5
3.1 アミノ酸の合成に関与する酵素反応……………	5
3.1.1 加水分解酵素を用いる方法……………	5
3.1.2 ピリドキサル酵素を用いる各種有核，含硫， 水酸化アミノ酸類の合成……………	13
3.1.3 その他の酵素を用いたアミノ酸の合成……………	24
3.2 有機酸および関連化合物の合成に関与する酵素反応……………	26
3.2.1 シスエトキシコハク酸ヒドロラーゼを 用いる L-酒石酸の合成……………	26
3.2.2 ビタミン，補酵素・核酸関連化合物の合成に 関与する酵素反応……………	26
3.3 化学工業用原料の合成に関与する酵素反応……………	34
3.3.1 没食子酸脱炭酸酵素を用いるピロガロールの合成……………	34
3.3.2 ニトリルヒドラターゼを用いるニトリルの水和- アミドの生産……………	35
4. おわりに……………	37
第 2 章 生化学反応を利用した天然物合成 ……………〔須貝威，森謙治〕…	44
1. はじめに……………	44
2. 加水分解反応の利用……………	44
2.1 アミノアシラーゼによる不斉加水分解……………	44
2.2 枯草菌による不斉加水分解……………	47
2.3 豚肝臓エステラーゼによる不斉加水分解……………	50
3. 還元反応の利用……………	53

3.1	3-ヒドロキシブタン酸エステルの利用	53
3.2	他のケトンの還元生成物の利用	60
3.3	還元縮合生成物の利用	62
4.	酸化反応の利用	67
4.1	β -酸化の利用	67
4.2	その他の酸化の利用	69
5.	おわりに	70

第3章 微生物および酵素機能を用いた簡単な系の官能基変換反応

〔黒住精二〕 … 75

1.	はじめに	75
2.	還元反応	76
2.1	非環状ケトンの還元による光学活性アルコールの合成	76
2.2	環状ケトンの還元による光学活性アルコールの合成	78
2.3	α , β -不飽和カルボニル化合物の還元による光学活性 ケトンの合成	85
3.	酸化反応	87
3.1	水酸化反応によるアルコールの合成	87
3.2	第一級アルコールの酸化によるカルボン酸の合成	91
3.3	第二級アルコールの酸化によるケトンの合成	93
3.4	ジオール類の選択的酸化による光学活性ラクトンの合成	93
3.5	キラルなエポキシド, スルホキシドの合成	96
4.	加水分解反応	98
4.1	エステルの加水分解によるカルボン酸の合成	98
4.2	アセテートの不斉加水分解による光学活性アルコールの合成	100
4.3	対称エステルの不斉加水分解によるキラル Synthons の合成	103
5.	おわりに	106

第4章 微生物の還元機能を利用する天然物合成

〔大石武, 秋田弘幸〕 … 112

1.	はじめに	112
2.	単純ケトンの還元	113

3. α , β -不飽和ケトンの還元	116
4. β -ジケトンの還元	117
5. γ -ジケトンの還元	122
6. β -ケトエステルの還元	122
6.1 アセト酢酸エステルの還元	122
6.2 α -置換アセト酢酸エステルの還元	128
6.3 γ -置換アセト酢酸エステルの還元	131
6.4 α , γ -ジ置換 β -ケトエステルの還元	135
6.4.1 鎖状 α , γ -ジ置換 β -ケトエステルの還元	135
6.4.2 環状 α , γ -ジ置換 β -ケトエステルの還元	142
7. α -ケトエステルの還元	144
8. α -ハイドロキシケトンおよび α 位にヘテロ原子を有する ケトンの還元	147
9. 二重結合の還元	151
10. おわりに	153

第5章 炭素・炭素結合形成の酵素反応とその応用 …〔小倉協三〕… 160

1. 炭素・炭素結合形成の酵素反応	160
1.1 カルボキシル化反応	160
1.2 メチル化	161
1.3 シクロプロパン環形成	161
1.4 アシル基転移	162
1.5 プレニル基転移	163
1.6 芳香環のカルボキシアミノエチル化	164
1.7 シアノヒドリン生成	164
1.8 分子内反応	164
2. プレニルトランスフェラーゼ	165
3. ファルネシルピロリン酸シンテターゼ	166
3.1 立体化学	166
3.2 基質特異性	167
3.2.1 プライマーの構造条件	167
3.2.2 IPP 側の特異性	171

3.3 生理活性天然物の合成への応用	176
3.3.1 ファラナールの不斉合成と絶対構造	176
3.3.2 4 <i>R</i> -ファラナール類似体の合成と構造-活性相関 研究への応用	178
3.3.3 昆虫幼若ホルモン(JH)類の合成と絶対構造	179
4. ゲラニルゲラニルピロリン酸シンターゼ	182
5. ポリプレノールの酵素的合成	182
5.1 <i>Z</i> 型縮合を触媒する酵素	182
5.2 all- <i>E</i> -ポリプレノールの酵素的合成	184
6. スクワレンシンターゼ	186
7. 2,3-オキシドスクワレンの環化酵素	188
7.1 ラノステロールへの環化	188
7.2 Cycloartenol への環化酵素	191
8. スクワレンの環化酵素	192
9. 実験例	193
 第6章 生理活性ペプチド、タンパク質の合成	 200
1. はじめに	200
2. ペプチド合成における脱保護法の発展	201
3. 酸脱保護法	202
3.1 希塩酸法によるLys(For)(<i>N</i> ^ε -formyllysine)の脱保護	202
3.2 TFA 法によるLys(Boc)(<i>N</i> ^ε - <i>tert</i> -butoxycarbonyllysine) の脱保護	204
3.3 HF によるLys(Z)の脱保護	206
3.4 メタンスルホン酸(MSA),あるいはトリフルオロメタン スルホン酸(TFMSA)法によるLys(Z)の脱保護	207
4. ペプチド合成への応用	209
4.1 Lys 含有ペプチドの合成	209
4.2 Met 含有ペプチドの合成	210
4.2.1 “Hard-Soft” Concept に基づくエーテルの開裂	211
4.2.2 “Push-Pull” 機構によるZ基の切断除去	211
4.2.3 メトキシカルボニル基の開裂	212

4.2.4 S-保護なしのMet 含有ペプチドの合成	212
4.2.5 S-保護のMet 含有ペプチドの合成	213
4.3 Arg 含有ペプチドの合成	213
4.4 Tyr 含有ペプチドの合成	216
4.5 Ser, Thr 含有ペプチドの合成	216
4.6 Trp 含有ペプチドの合成	218
4.7 Asp 含有ペプチドの合成	219
4.8 Cys 含有ペプチドの合成	221
4.9 ジスルフィドの形成反応	222
5. タンパク質R Nase A の合成に際する脱保護反応	222
5.1 保護 R Nase A の合成	222
5.2 TFMSA-チオアニソール / TFA による脱保護	223
6. おわりに	228

第7章 酵素の基質認識と有機合成 [金岡祐一] ... 233

1. 酵素と有機合成	233
1.1 はじめに	233
1.2 酵素はブラックボックス	233
1.3 酵素を利用する有機合成	235
1.3.1 反応の種類	235
1.3.2 酵素により触媒される合成反応の特徴	236
2. 酵素の基質認識—特異性と選択性	237
2.1 酵素の特異性	237
2.2 酵素の基質認識	238
2.3 基質としての条件	239
3. 酵素作用機構研究への有機化学的アプローチ	241
3.1 酵素の合成阻害剤, 合成基質	241
3.2 プロテアーゼ活性部位のサブサイト	242
4. プロテアーゼとタンパク性インヒビターの相互作用	244
4.1 サブチリシンとオリゴペプチド	244
4.2 サブチリシンとSSI	245
5. トリプシンの逆性基質—新しい型の基質と開発	246

5.1	トリプシンと BPTI	246
5.2	トリプシンの逆性基質の発見とその性質	250
5.3	逆性基質法の応用	252
6.	おわりに	254
第 8 章	酵素機能の変換	〔徳重正信〕 257
1.	はじめに	257
1.1	酵素の特徴	257
1.2	酵素機能発現のしくみ	259
2.	ペプチドの限定分解による機能変換	260
2.1	不活性前駆体の活性化	261
2.2	限定分解による機能変換	261
3.	側鎖の化学修飾による機能変換	264
4.	反応機構の操作による機能変換	268
4.1	素過程の操作	269
4.2	反応中間体アナログによる操作	271
4.3	擬似反応の利用	273
5.	酵素の修復	274
5.1	相補操作	274
5.2	可逆的変性操作	275
5.3	タンパク質の老化をめぐる	278
6.	反応機構を利用した医療	279
6.1	痛風の治療薬剤	279
6.2	けいれん誘発のしくみ	280
7.	おわりに	280
第 9 章	酵素機能を利用するキラルシントンの創製とその応用： 立体選択的抗生物質の全合成	〔大野雅二〕 283
1.	はじめに	283
2.	酵素による不斉合成の意義	287
3.	Mesotric K と酵素反応の組み合わせ	289
4.	酵素によるキラルシントンの創製とその抗生物質全合成への応用	292

4.1	Carbapenem 系抗生物質の全合成	292
4.2	Negamycin の立体選択的合成	301
4.3	各種ヌクレオシドのエナンチオマー選択的合成	305
4.4	Polyoxin N の立体選択的合成	311
4.5	キラルシクロヘキサン誘導体の創製	313
5.	Pig Liver Esterase の基質認識	315
6.	おわりに	319

第1章 酵素を用いる有用物質の合成

1. はじめに

最近約30年間におけるわが国の応用微生物学の進歩は、まことにめざましいものがあり、抗生物質、糖、有機酸、アミノ酸、核酸、その他種々の有用物質が、微生物反応を巧みに利用して生産されている。微生物反応を利用して物質を生産する手法は、発酵法と酵素法に大別される。発酵法は、従来のアルコール発酵、有機酸発酵などに見られるように、微生物の営む生命現象、すなわち複雑な物質代謝を利用して、安価な炭素源、窒素源から物質を生産する手法である。一方、酵素法は、微生物をより機能的にとらえ、特定の反応を触媒する酵素とみなしており、微生物が生物であることを必ずしも必要としないことを意味しており、きわめて有機合成的な発想に基づく新しい微生物の利用法といえよう。

微生物が有する多様な機能のうち、単に生体触媒としての機能のみに着目して、微生物を直接触媒として利用するこのような手法が広く認められるようになったのは、微生物によるステロイドの変換の試みが大きな成功を収めたからであろう。かび、細菌、あるいは酵母はステロイドに作用して水酸化、脱水素、側鎖の切断など多彩な反応を触媒し、これらのうちいくつかは工業的な意味で利用されている。以来この手法はとくに化学的方法では困難な有機化合物の合成、変換に有力な手段として利用されている。

表1・1には、最近報告されている酵素法による有用物質生産研究の中で、とくに興味あるものを列記した。これらの研究は主として日本において行われたものであり、わが国の応用微生物学の水準の高さを示すものである。

筆者らは、この酵素的手法による新しい微生物生産法の開発に取り組んできた。本稿では、酵素の触媒的機能の特質を述べるとともに、酵素反応を利用する有機合成が物質生産の立場からどのような場合にその独自性、有利性を発揮できるかを

表1・1 微生物酵素による有用物質の合成・変換

1. ステロイド類の変換
 - 水酸化反応（酸素添加酵素）
 - 還元反応（脱水素酵素）
 - 側鎖切断反応（酸素添加酵素）
2. アルカロイド類の変換
3. 抗生物質の合成
 - 人工ペニシリンの合成（アミダーゼ）
 - 人工セファロスポリンの合成（アミダーゼ）
4. 有機酸の合成
 - フマル酸の水和反応（フマラーゼ）
 - アルケンの両端酸化反応（酸素添加酵素）
 - エポキシコハク酸の加水反応（水解酵素）
5. 糖の変換
 - 異性化糖（グルコースイソメラーゼ）
6. タンパク質の合成
 - プラステインの合成（プロテアーゼ）
 - ヒトインシュリンの合成（プロテアーゼ）
7. 核酸関連化合物の合成
 - N*-リボシル化反応（ホスホリラーゼ）
 - N*-アラビノシル化反応（ホスホリラーゼ）
 - ヌクレオシドのリン酸化反応（リン酸転位反応）
 - ヌクレオチドのピロリン酸化反応（ピロリン酸転位酵素）
 - 糖ヌクレオチドの合成（ピロホスホリラーゼ）
 - 補酵素類の合成
8. アミノ酸の合成
 - 立体選択的加水分解反応（水解酵素）
 - アミノカプロラクタム
 - アミノチアゾリンカルボン酸
 - ヒダントイン
 - フマル酸のアミノ化反応（アスパルターゼ）
 - チロシン関連アミノ酸の合成（ β -チロシナーゼ）
 - トリプトファン関連アミノ酸の合成（トリプトファナーゼ）
 - システイン関連アミノ酸の合成（システインデスルフヒドラーゼ）
 - セリンの合成（セリントランスヒドロキシメチラーゼ）
 - アラニンの合成（アスパラギン酸- β -脱炭酸酵素）
9. アミンの合成（脱炭酸酵素）
10. 化学工業原料
 - オキサイド類の合成（酸素添加酵素）
 - ケトン類（二級アルコール脱水素酵素）
 - ピロガロールの合成（没食子酸脱炭酸酵素）
 - アミド類の合成（ニトリルヒドラーゼ）

化学的な合成法との比較もまじえながら論じたい。なお研究例としては、筆者らの研究室での研究成果を中心に、関連する分野で報告された比較的新しい研究をとりあげて述べる。

2. 酵素の触媒機能の特質

酵素の触媒する反応は、反応の型によって次の6つの基本型に分類されている。

- ① 酸化還元酵素 (oxidoreductase)
- ② 転移酵素 (transferase)
- ③ 加水分解酵素 (hydrolase)
- ④ 脱水素酵素・リアーゼ (lyase)
- ⑤ 異性化酵素 (isomerase)
- ⑥ 合成酵素・リガーゼ (ligase)

これらが触媒する反応機構に関しては、不明な点も多いが、一応以下のような説明が与えられている。すなわち、タンパク質を構成するアミノ酸残基が、それぞれの有する官能基を含めて複雑な立体構造を形成し、そのうちのある部分（複数の場合もある）が、反応の場を提供したり、反応の進行に関与することになる。反応に直接関与する部分、すなわち活性中心には、通常 $-SH$ 、 $-OH$ 、 $>C=O$ 、 $-COOH$ 、やイミダゾリル基などの官能基が存在している。酵素の触媒作用は、これらの官能基自身あるいは補酵素の作用を介して発現する。通常、反応の場となる部位は、ポケットと呼ばれるタンパク質の高次構造の中につくられた穴ともいふべきところにあり、反応に関与する官能基や補酵素が適切に配列されている。この場では、基質濃度が反応系全体を平均化した濃度よりも高く保たれるように、また、基質分子間あるいは基質と活性中心との相互作用が高い確率で起こるような配向性が成立するように、酵素—基質間の空間配置がとられる。次いで、活性中心の官能基と基質との反応が起こる。反応の場では数種の官能基や補酵素が協同的に作用し、反応効率を高める。図1・1にカルボキシル基のプロトンが基質に移動する例を示したが、イミダゾリル基が協同的に作用し反応効率を高めていることがわかる。上述の基質や官能基間の相互作用の結果、生じる酵素自体の立体構造の変化を通じて、基質に歪力またはひずみをひき起こし、基質分子の変化が

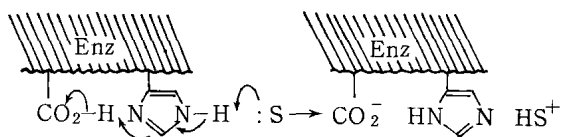


図1・1 酵素反応における官能基の役割の一例

もたらされる。

このように酵素はその反応機構が通常の触媒とやや趣を異にしている。表1・2に酵素反応と通常の化学反応の一般的特徴を示した。生体内

で様々な反応を触媒する酵素の触媒機能の特徴は、温和な反応条件で、その機能が効率よく発揮されること、反応の選択性が著しく高く、特定の構造上の特定の位置に立体選択的に反応が起こるので、副生物が少なく収率の向上が可能であること、基質特異性が厳密なため種々の化合物の混在下でも特定の化合物のみを選択的に変化させうる等の利点を有している。しかし酵素はタンパク質からなる触媒であるため、通常の化学触媒と著しく異なった物性を示す。つまり、酵素は最も弱い結合力である van der Waals 力や水素結合力が主体となって、その三次構造が保たれているため、それらの弱い結合力が維持できる条件下でのみ、酵素は作用しうる。したがって、酵素は一般的に熱や有機溶媒、酸性やアルカリ性溶液に不安定であり、これ

らは酵素の触媒としての大きな欠点の原因となっている。

表1・1からも理解できるように、酵素法による物質生産の最大の特徴は、生産物としては比較的付加価値の高いファインケミカルズや光学的に活性な化合物の合成にその成果が集中していることであ

表1・2 酵素反応と化学反応の比較 ¹⁾

	酵素反応		化学反応	
反 応 条 件	常温，常圧		高温，高压	
反 応 エ ネ ル ギ ー	酵素分子の配座の 変化エネルギー (van der Waals) 水素結合 疎水結合 など		熱エネルギー	
溶 媒	水		水，有機溶媒	
反 応 特 異 性 (位置特異性を含む)	高 い		副反応あり	
基 質 特 異 性				
構 造 特 異 性	高 い		低 い	
立 体 特 異 性	高 い		低 い	
反 応 物 濃 度	低 い		高 い	