

NRPS 構成モジュールを利用した 汎用的なアミノ酸アミド合成法の開発

佐藤 大¹・原 良太郎²・木野 邦器^{1,2}

1:早稲田大学理工学術院 先進理工学部 応用化学科

2:早稲田大学先端科学・健康医療融合研究機構

〒169-8555 東京都新宿区大久保 3-4-1

E-mail: kkino@waseda.jp

Home Page: <http://www.f.waseda.jp/kkino/index.html>

触媒的なアミド結合の形成反応は、近年、あらためて注目されているが、化学合成反応でも技術的に確立されている例は少ない。我々は無保護アミノ酸からペプチドを直接合成可能な酵素による効率的なペプチド合成法を検討しているが、この技術を応用することで、ペプチドに限定されないアミド化合物の触媒的合成法が確立できるものと考えた。ペプチド合成酵素の中でも non-ribosomal peptide synthetase の 1 つである TycA を利用した反応では、求核剤としてアミノ酸に限定することなく多くの 1 級、2 級アミンが利用可能であり、求核剤の分子サイズにも影響されにくいことを明らかにした。本反応は、酵素を利用した触媒的なアミド合成の一例であるが、無保護アミノ酸と求核剤から温和な条件かつ副生物の少ないアミド結合の形成が可能であり、今後、酵素の拡充や ATP 再生系の導入によってエネルギー的にも経済的にも優れた汎用的なアミド合成法として工業的な利用が期待される。

1. はじめに

タンパク質に代表されるように、生物にはアミド結合によって構成される様々な化合物が存在している。また、ナイロンのようなアミド結合によって構成されるポリマー化合物も広く利用されており、アミド結合の形成反応は産業上あるいは学術的にも重要である。

タンパク質はリボソームを介した極めて効率的かつ精密な機構によって合成されているが、その反応はアミノ酸同士の結合に限定される。また、コモディティケミカルの工業的生産量からするとスケールの大きな乖離がある。有機合成反応でカルボン酸とアミンを連結してアミド結合を形成する際には、不活性なカルボキシル基を活性化するために縮合剤を用いるのが一般的である。しかしこれらの反応には、生成物と等モル量の縮合剤が必要であるという課題がある。

近年になり触媒的なアミド結合形成が注目され Ru-complex や N-heterocyclic carbene を触媒としたアルコールやアルデヒドとアミンからのアミド化合物合成が報告されているが、カルボン酸とアミンからの直接的なアミド化合物合成に関しては Boronic acid 誘導体を触媒とした報告に限られている[1]。

一方、我々はペプチド合成研究として、酵素を利用した触媒的なアミド合成法を検討している[2]。これらの酵素反応では中間体としてアミノ酸の活性エステルを生成しており、基質特異性の揺らぎの大きい酵素であれば、この活性エステルにアミンを求核的に反応させることでアミド化合物が合成できると考えられる。本研究では、ペプチド合成酵素を利用した新たな触媒的なアミド結合形成反応による各種アミド化合物の汎用的合成法の構築を目的として検討を行った。

2. ペプチド合成酵素の反応機構

これまでに知られているペプチド合成酵素はいずれも ATP のエネルギーを利用して反応を進行させるが、反応中間体の活性エステルの種類から 2 種類に分類される。1 つは細菌のペプチドグリカン生合成に関わる D-alanine-D-alanine ligase など基質アミノ酸をリン酸エステルとして活性化する一群の酵素である。2 つ目は微生物の二次代謝産物合成に関わる non-ribosomal peptide synthetase (NRPS) であり、これらの酵素は基質アミノ酸をアデニル化により活性化し酵素分子内のチオール基とチオエステルを形成させている。NRPS の 1 つであ

る Tyrocidine synthetase A (TycA)には、単独ドメインでジペプチドを合成した報告があり[3]、活性エステルにアミノ酸が求核的な反応を起こしていることが推察される。また、TycA は単独のモジュールからなる酵素で Tyrocidine 生合成では L-phenylalanine (L-Phe)を基質とするが、芳香族や一部の脂肪族アミノ酸に対しても活性を有することが知られている[4]。我々の TycA と後続のモジュール TycB1 を用いた検討でも、tryptophan (Trp) を基質とした場合でも著量のジペプチドが生成することを見いだしている。そこで Trp を基質として TycA を利用したアミド合成の反応特性を検討した (図 1)。

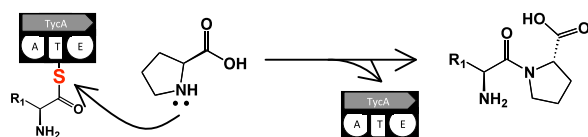


図 1. 酵素を利用した触媒的アミド結合形成反応

3. 結果と考察

(1) D,L-Trp に対する各種アミノ酸の反応性

L-Trp を TycA の基質として、求核剤となる L-proline (L-Pro)および補酵素 ATP と MgSO₄ を混合した反応液に TycA を作用させたところ、単独のモジュールのみで L-Trp-L-Pro が合成可能であることを確認した。そこで、Trp と Pro および 4-hydroxy-Pro の光学異性体の組み合わせを用いて反応の特性を詳細に検討した。

図 2 に示したように、Trp の光学異性体を基質とした場合には生成量に変化が生じたが、Pro や 4-hydroxy-Pro のような求核剤の光学異性を変化させても生成量には影響がなかった。すなわち、生成するジペプチドの N 末端基質にのみ TycA の異性体認識が働いていることが示唆された。

一方、Pro と 4-hydroxy-Pro では、いずれの組み合わせにおいても 4-hydroxy-Pro を基質とした場合の方が多くのジペプチドを生成していた。Pro と 4-hydroxy-Pro の pKa はそれぞれ 10.6 と 9.7 であり、弱アルカリ性溶液中では 4-hydroxy-Pro の方が求核性の強いことが予想され、生成量は求核性に起因すると考えられる。

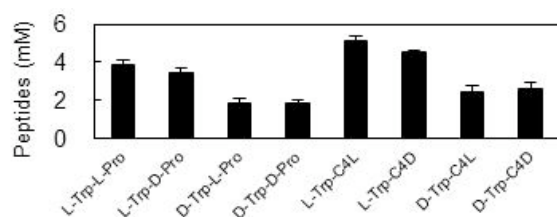


図 2. 光学異性体と求核剤に対するジペプチド生成量
C4L: cis-4-hydroxy-L-proline, C4D: cis-4-hydroxy-D-proline

(2) 各種低分子アミンの反応性

一般的なアミンの求核性は 1 級アミンよりも 2 級アミンの方が強い。そこで、methyllamine と dimethylamine を求核剤として TycA で活性化した L-Trp に反応させたところ、予想通り dimethylamine を用いた方がより多くのアミドを生成した。さらに、Pro のアナログとしてイミノ環を有し炭素数の異なる L-azetizine-2-carboxylic acid (4 員環) と L-pipecolic acid (6 員環) を求核剤として反応させた場合でも Trp とジペプチドを生成することから、本反応は求核剤の分子サイズの影響を受けにくいことも示唆された。Pro のイミノ環骨格である pyrrolidine や、市販されている炭素数の異なる類縁化合物を基質とした場合、4 員環の azetidine から 8 員環の azocane まで、検討した全ての基質からアミドの生成が LC-ESI-MS 分析で確認することができた。

これらの結果から、本反応における求核剤は一般的な有機化学の特性に基づいて反応していると考えられ、本反応が酵素の基質特異性に限定されない柔軟なアミド合成に応用可能であることが期待される。

本反応をペプチド合成に応用すると、これまで酵素合成が困難であった Pro を C 末端に配置するペプチドやβ-アミノ酸を含有する新たなペプチド合成にも展開できると考えられる。

4. 今後の展望

本研究によって酵素的にカルボン酸を活性化することで任意のアミンとのアミド化合物合成の可能性が見いだされた。アデニル化やチオエステル形成によってカルボン酸を活性化する酵素は、NRPS だけでなく Acyl-CoA ligase や Firefly Luciferase など多岐にわたる。今後、本手法をアミド化合物の汎用的な合成法とするには、これら酵素群を検討して、アミド合成に利用できるカルボン酸の種類を拡充することが重要である。また本反応は生成物と当モル量の ATP が必要であるが、ATP 再生系を組み込んだ効率的なプロセスの構築も可能である。アミド化合物の汎用的な工業的合成手法を提供するだけでなく、多機能性を有する新規 アミド化合物の創出にも大きく貢献するものと期待される。

参考文献

- [1] Pattabiraman V, *et al.*: Nature, 480, 471-479 (2011)
- [2] Kino K, *et al.*: B.B.B., 74, 129-134 (2010)
- [3] Dieckmann R, *et al.*: FEBS Lett., 498, 42-45 (2001)
- [4] Villiers B, *et al.*: Chem. Biochem., 10, 671-682 (2009)