

## 酵素を用いて鏡像異性体を分ける， 創る，速度論的分割の力

古田 未有・桑田 和明・花屋 賢悟・庄司 満・須貝 威\*

### はじめに

炭素原子がもつ4本の手に、4つとも異なる置換基が結合すると、その炭素は「不斉中心」と呼ばれ、一对の鏡像関係にあるペア（鏡像異性体）が生じる。原則として原子番号がもっとも大きい置換基に1番，順次小さくなるにつれ2番，3番，4番を振り，4番が一番遠くなるように見た際，1番→2番→3番が時計回り(=R)の分子，反時計回り(=S)の分子として区別される(図1)。鏡像異性体同士の物理的性質の違いは，右回り，左回り円偏光が，物質を通り抜ける速さの差に起因する(+ )や(- )といった旋光性の違いのみで，光学異性体とも呼ばれる所以である。

しかし，鏡像異性体の分子が生体に入り，酵素や受容体などに接した際には，受け手側が多数のL-アミノ酸(ほとんどが，反時計回りの分子)で構成されているので，相互作用に差が生じることがあり，味や香りの違い，医薬としては作用の強弱，副作用の有無など，さまざまな例が知られている(図2)。医薬品の候補化合物で鏡像異性体が存在しうるケースでは研究初期の段階から両者を

分離し，それぞれの活性・毒性・薬物動態を比較する必要がある。

### 一方を優先して作ろうとする，生物的・化学的不斉合成

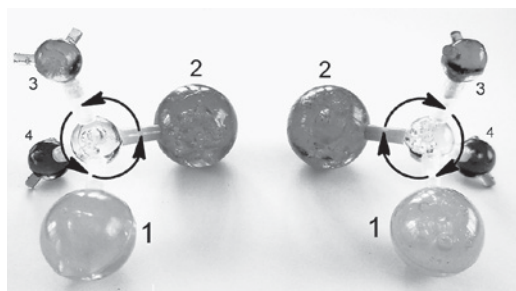
時計回り，反時計回りの分子をそれぞれ提供するには，主として5つの方法がある。まず，どちらか一方を優先的に作ろうとするアプローチとして，以下の2種類があげられる。

**発酵法，生物生産法** L-アミノ酸(反時計回り)やD-糖(時計回り)など特定物質の生産には非常に有効で，環境・資源的な視点からは圧倒的に優勢だが，生合成経路が存在しない物質に対しては難しい。

**不斉合成法** 2001年ノーベル化学賞に輝いた<sup>のより</sup>野依らの業績で著名な，鏡像異性体の一方を優先的に人工合成する方法である。触媒作用を示す金属元素に，時計回りや反時計回りの分子を設計図通りに結合させ，目的とする鏡像異性体が生成するように，触媒周辺の空間的配置を精密に制御する。最近では，金属元素を含まない，有機分子触媒も精力的に検討されている。

### 時計回り，反時計回りの分子を分けるには

上記二種の手法は有用だが，化学合成で，どうしてもラセミ体(鏡像異性体=光学異性体の等量混合物)でしか得られない，あるいは一方の鏡像異性体のみを合成し



反時計回りの分子  
 =(S)-体

時計回りの分子  
 =(R)-体

図1. 鏡像異性体(光学異性体)とは? その立体的構造の違いはどこに?

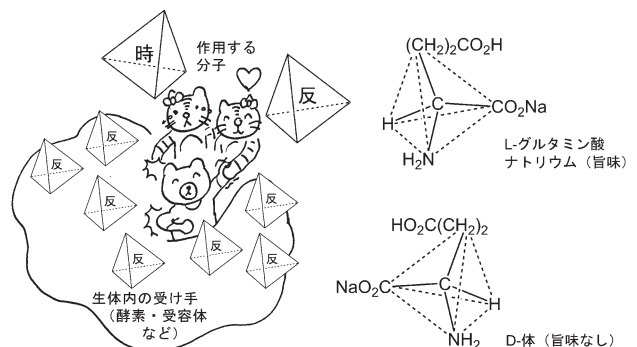


図2. 生体分子と出会った際，時計回り，反時計回り分子のふるまいの差

\* 著者紹介 慶應義塾大学薬学部(教授) E-mail: sugai-tk@pha.keio.ac.jp

ようとすると採算が合わないなどのケースが依然として存在する。このような場合、ラセミ体から目的とする鏡像異性体の一方を取り出す方法(光学分割)が重要である。

**ジアステレオマー塩の分別結晶** 分割したいラセミ体とは異なる構造の、時計回りまたは反時計回りのアミンやカルボン酸など(分割剤といい、純粋な鏡像異性体を用いる。図ではヒラメで表わしている)を用意する(図3)。それらを混ぜて塩を形成させ、沈殿の溶解度の差を利用して分離する方法である。右耳にリボンをつけた猫、左耳にリボンをつけた猫は、それぞれヒラメとペアを形成すると、ジアステレオマー(立体異性体だが、鏡像関係にない化合物)の関係になり、融点や溶解度などの物性が異なる。分離したい化合物が酸・塩基性を示す場合に有効である。

**キラル固定相を持つクロマトグラフィーによる分離** 時計回りの分子(たとえばD-グルコース)が無数に連続したセルロース誘導体などを沿道にびっしり並べて、その観客と握手をさせながら分子を走らせる(図4)。時計回りの分子が、右手で毎回握手して進むのに比べ、反時計回りの分子は左手を振って素通りするので時間差が

生じ(溶出時間が異なる)、結果的に反時計回りの分子はウサギのように早く、逆に時計回りの分子はカメのように遅くゴールする。主として鏡像異性体比の分析手法として発達してきたが、近年は大量スケールの分離に応用可能な、擬似移動床法(simulated moving bed)という手法もあみだされている。

これらに加え、医薬品候補化合物を動物試験や臨床試験にサンプルとして供給する、実製造に応用するなどの目的には、以下の方法も非常に有効である。

**酵素を用いる速度論的分割** 第二次世界大戦の前後、病気や手術などで大量に必要とされる、アミノ酸輸液に必須なL-アミノ酸製造の要望が高まっていた中、アメリカのGreensteinらは、アミノ酸のアミノ基をアシル化した化合物のラセミ体混合物を化学合成し、豚腎臓のアシラーゼI(L-アミノアシラーゼ)を作用させる研究を精力的に行った<sup>1)</sup>。酵素が触媒する反応を、図に示す鏡像異性体間の駆けっこだと考えてみよう(図5)。

反時計回りの分子に相当するL-体は、加水分解の反応が速く(ウサギのように足が速い)アミノ酸になり、逆に時計回りのD-体はカメのように反応が遅く、アシ

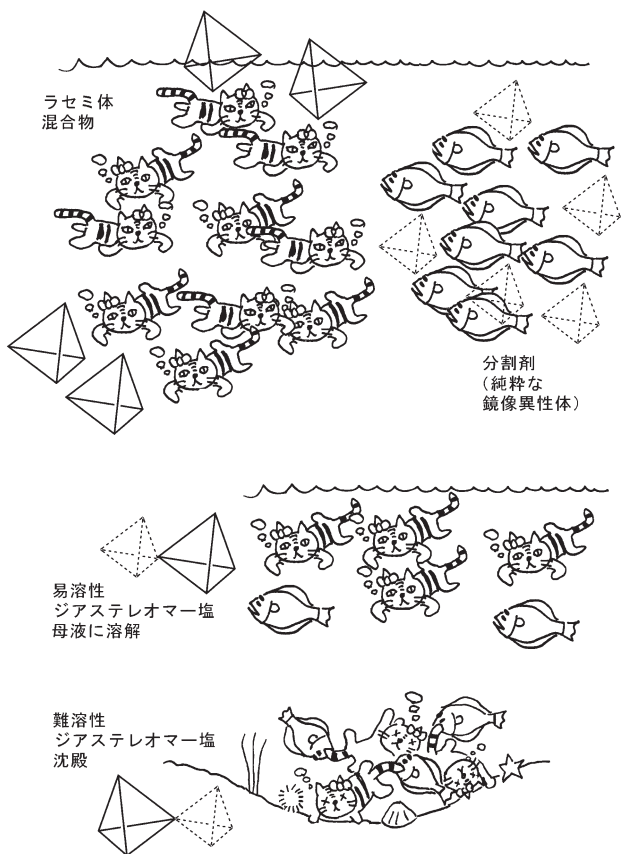


図3. ジアステレオマー塩を形成させ、溶解度の差を利用する鏡像異性体の分離

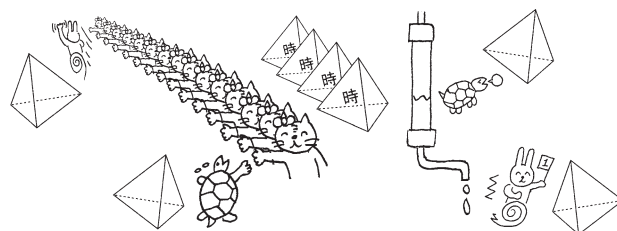


図4. クロマトグラフィーでキラル固定相を利用した、親和性の違いによる鏡像異性体の分離

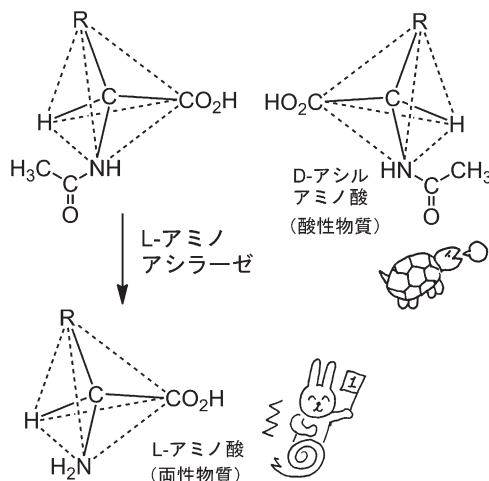


図5. アミノ酸を例とする、鏡像異性体の速度論的分割

ルアミノ酸に留まる。両者はイオン交換法などで分離できる。日本では、田辺製薬の千畑らにより、麹菌のアシラーゼが固定化され、工業合成に発展し、技術的には発酵法より先行した歴史をもつ。

このように、鏡像異性体間で反応速度が異なり、生成物の官能基の差を活用して、結果的に鏡像異性体を分離する手法を「速度論的分割 (kinetic resolution)」と呼ぶ。現代では、同じく加水分解酵素であるリパーゼを用いた、アルコール、エステルやカルボン酸類の鏡像異性体分離に大きな力を発揮している<sup>2,3)</sup>。

### 分離の「切れ味」を支配する、反応速度論パラメータ

さて、生化学や酵素学の初歩で、必ず勉強するのがミカエリス-メンテンの式である (図6)。その中に含まれる二つの重要なパラメータは、1)  $k_{cat}$  (または、 $V_{max} = k_{cat} \cdot E_0$ ): 酵素-基質複合体が、生成物と酵素に分解する段階の速度定数; 2)  $K_m$ : 酵素-基質複合体から見て出発原料に相当する、酵素と基質への解離定数、すなわち、酵素と基質の親和性の逆数、であるが、速度論的分割では、時計回りと反時計回りの基質が共存する同一容器内で酵素が働き、2種類の基質はつねに競争関係にある。その結果、速い異性体、遅い異性体それぞれに  $k_{cat}/K_m$  を計算し、異性体間におけるその値の比較が、反応の鏡像選択性に反映される<sup>4)</sup>。E 値 (enantiomeric ratio) が指標として用いられ、実用的には50以上の値を示す酵素触媒や反応条件が求められる。

岡山大学の依馬らの精力的な研究により、リパーゼなど多くの加水分解酵素では、1) 分子は時計回り、反時計回りに関わらず、酵素の中に基質として入り込み (両鏡像体間で  $K_m$  に大きな差はない)、2) 駆けっこでウサギがカメに勝つのは、ウサギの  $k_{cat}$  がカメの  $k_{cat}$  より大きいためであることがわかってきた。彼らは計算化学による論証を併せ、正四面体中間体に至る遷移状態のエネルギーの違いが大きな要因である、と結論している<sup>5)</sup>。つまり、古くから提唱されてきた「鍵と鍵穴の関係」と事

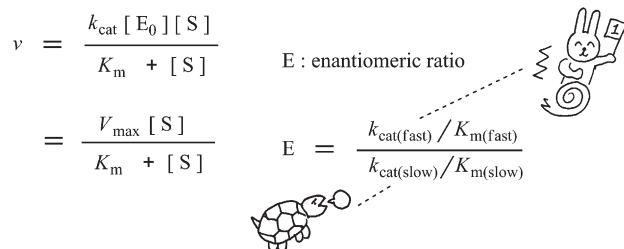


図6. 鏡像異性体同士の反応性の差に関わる、速度論パラメータ

実は若干異なる。

速度論的分割の「切れ味」を良くするにはウサギ異性体の  $k_{cat}$  が大きく、カメのそれが小さく、一方、ウサギの  $K_m$  が小さくなるよう、基質分子の構造を設計・合成する必要がある<sup>6)</sup>。さらに、良い酵素との組合せを見つけ出し、遺伝子レベルから酵素のタンパク構造を変えた変異体を創るアプローチが好ましく、世界中の数多くの企業や大学・研究機関などで日々検討されている。

### 鏡像異性体混合物を、時計回り・反時計回りどちらか一方に収束させるには？

さて、速度論的分割において、反応速度の小さいカメ異性体は、酵素の中に入って居座れば (反応しにくいので、いずれはそのままで退去するが)、いわばウサギ異性体を邪魔している状況にある。速度論的分割が進んで、ウサギが少なくなり反応速度が小さくなってきた時は、カメばかりになっているので、その被害は甚大である (図7)。残存するカメは少なければ少ない方が、選択性はよくなる。反応系に特殊な化学触媒などを加え、基質のうちカメを常時ラセミ化させウサギに変換しつつ、速度論的に分割する「動的速度論的分割 (dynamic kinetic resolution)」は、この視点からきわめて有効である<sup>7,8)</sup>。

上の方法のもう一つの利点は、化学合成で生じるラセ

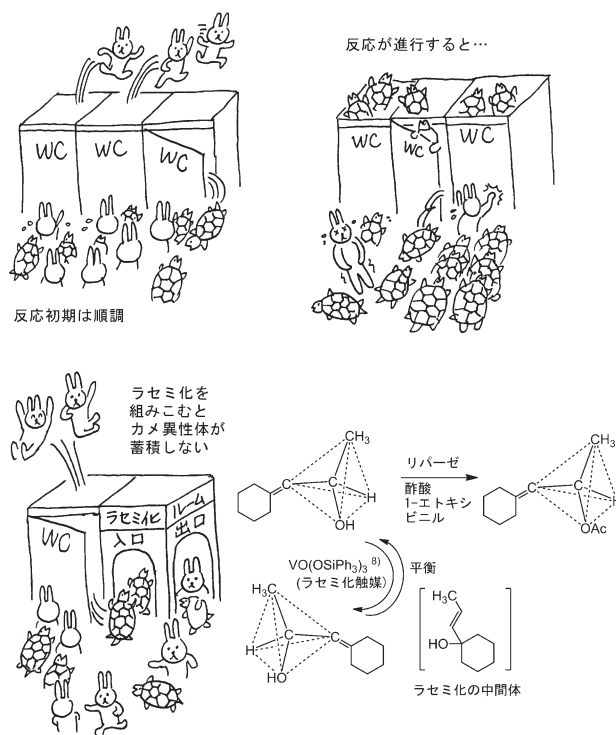


図7. 動的速度論的分割のしくみと実例

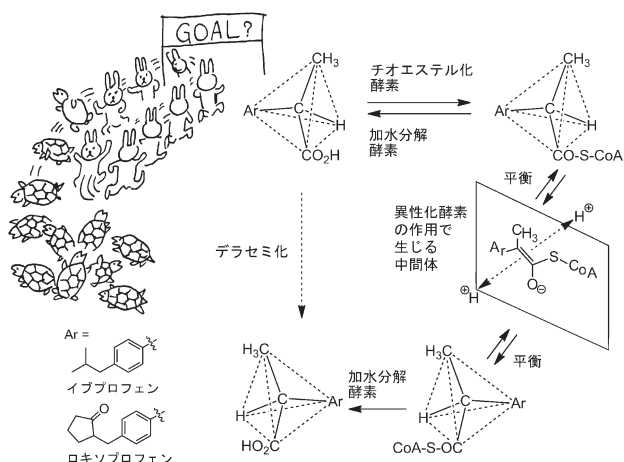


ミ体のうち不要な鏡像異性体を捨てることなく活用できることである。その点から、産業・環境上も非常に好ましい。しかしこのように紙上では理想的な方法だが、1) 生成物がラセミ化しない、2) 添加物や反応条件が酵素触媒自体を阻害しないことが絶対の前提であり、徹底的な条件検討が不可欠である。

もう一つ、両鏡像体を余さず活用する方法として「デラセミ化 (deracemization)」があげられる。足の速いウサギが先にゴールし、と思いきや、そこは折り返し点であり、別のコースを戻ってスタート地点に帰る時、少なくとも半分がカメに化ける (図8)。反応の繰り返しにより、ウサギを消してスタート地点に残るカメにすべてを収束させる手法である<sup>9)</sup>。複数の酵素を働かせたり、化学的にラセミ体に戻す試薬を加えたりしてこの目的を達成する。

実は風邪薬などに含まれ、消炎鎮痛作用を示す有効成分であるプロピオン酸系化合物 (イブプロフェンやロキソプロフェンなど) は、ほとんどの場合ラセミ体で添加されているが、これが生体内に入ると、三種類の酵素によるデラセミ化反応が進行し、消炎鎮痛作用のある、反時計回りの分子 [(S)-体] へと変換・収束される。このことによって、高価な反時計回りの分子を単独で、わざわざ添加しなくても、安価なラセミ体で同等の薬理活性を発現させることができるのである。

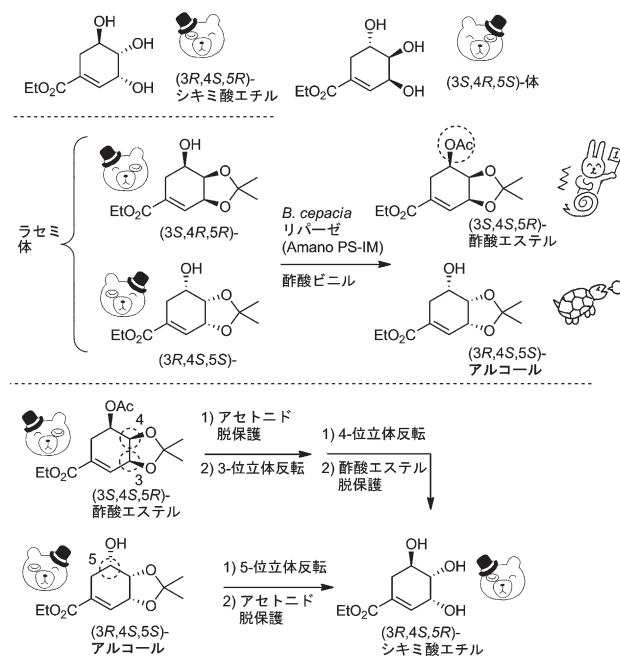
最後に、お正月の福笑いのような例を紹介する。「シキミ酸エチル」は、オセルタミビルリン酸塩 (抗インフルエンザ薬) の重要な製造原料である。フランとアクリル酸のDiels-Alder反応を鍵段階として、炭素骨格と酸素原子は、容易かつ適切に導入できるが、生じるのは残念ながらラセミ体である。この化合物にはヒドロキシ基



が3,4,5-位の3か所についているので、3か所の不斉中心 (クマの帽子, 右目, 左目で表わす) を持つ。ラセミ体から出発して、速度論的分割した場合、全体の半分しか回収できない。動的速度論的分割, デラセミ化も3か所すべての立体反転は困難なので適用は難しい。こういうものを分割で、しかも効率よく作るには、どうしたらよいだろうか。

筆者らは、まず、天然型シキミ酸とはジアステレオマーの関係にあるラセミ体混合物を合成した (図9上段)。(3S,4R,5R)-クマはシキミ酸エチルと、帽子は同じだが右目と左目の関係だけが違い、一方(3R,4S,5S)-クマは目の関係は同じだが、帽子の位置だけが異なり、それら同士は鏡像関係にある。その混合物に対し、リパーゼを用いたアセチル化によって両鏡像体を分離した。両鏡像体の反応速度比は、500:1を超えている<sup>10)</sup>。

速度論的分割は、ラセミ体の直接的な分離とは本質的に異なり、反応が速い異性体は、分割と同時に別の化合物に変化する。この場合は、ヒドロキシ基がアセチル化されている (図9下段)。遊離ヒドロキシ基のままの、反応が遅い分子との極性の差によって、クロマトグラフィー分離の手掛かりになるだけでなく、ヒドロキシ基の保護基として機能する。酢酸エステルの方はアセトニド (3,4-位に隣り合うヒドロキシ基にかかった、5角形の保護基) を化学的に除去し、二重結合の隣で反応性の高い3-位を先に、ついで残る4-位の2か所を連続的に



立体反転して(右目と左目を、それぞれ変える)、天然型シキミ酸エチルへと導いた。一方アルコールは、目はそのままに、帽子を左耳から右耳に移すように、5-位ヒドロキシ基の付け根のみを化学的に立体反転して、天然型シキミ酸エチルとした。

### おわりに

速度論的分割には、上記のような酵素の性質 ( $k_{cat}$  の差)、化合物の分子設計に加え、酵素の耐久性が大切である。選択性が良くても、転換率がたかだか20%くらいで酵素がへたばってしまったら、カメ異性体とともにウサギ異性体が沢山残ったままで、折角の酵素の切れ味を活かせない。酵素触媒・工学の分野の研究者や企業には、高温や有機溶媒添加など、過酷な条件でも失活せず、高い能力が持続する酵素の開発を望みたい。さらに、よいマッチングを達成するには、優れた酵素の開発にばかり期待・依存してはダメである。脂溶性または水溶性が高く、「水や有機溶媒などの反応媒体に溶け(融点降下によって融け)やすい」基質を、そして、反応中非酵素的に自己分解して、至適pHから外れることのないように分子設計することが要求され、ここは有機化学者が、経験と知恵を発揮すべき出番である。

最後に、酵素を使って、純粋な鏡像異性体をつくる分野には、まだまだやるべきことがたくさん残っている。読者の皆さんが、普段何気なしに利用している酵素にも、物質生産に適した素晴らしい能力が眠っているかもしれない。生物学的な立場からだけでなく、時には有機化学的な視点から酵素反応利用の可能性を考えていただきたい。きっと新しい展開が見えてくるだろう。

### 文 献

- 1) Fodor, P. J. *et al.*: *J. Biol. Chem.*, **178**, 503 (1949).
- 2) 須貝 威, 浅野正義: 化学と教育, **53**, 436 (2005).
- 3) Patel, R. N.: *ACS Catal.*, **1**, 1056 (2011).
- 4) 21世紀COEプログラム慶應義塾大学ライフコンジュゲートケミストリーPJ編, ライフコンジュゲートケミストリー: 暮らしと未来を支える化学, p. 25, 三共出版 (2006).
- 5) 依馬 正, バイオサイエンスとインダストリー, **58**, 493 (2000).
- 6) 古田未有ら: 有機合成化学協会誌, **71**, 237 (2013).
- 7) Kourist, R. *et al.*: *Green Chem.*, **13**, 2607 (2011).
- 8) Akai, S. *et al.*: *Angew. Chem. Int. Ed.*, **45**, 2592 (2006).
- 9) 小宮山眞監修: 酵素利用技術体系～基礎・解析から改変・高機能化・産業利用まで～, p. 434, エヌ・ティー・エス出版 (2010).
- 10) Yamashita, Y. *et al.*: *Tetrahedron*, **69**, 6527 (2013).