

## 酵素をおおざっぱにまねる： ペプチド有機触媒

化学生命工学専攻公開講座

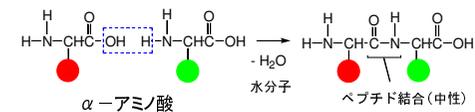
化学生命工学 - 未来への挑戦 -

13/11/20

工藤 一秋 (東大生産研)

## ペプチドとは

$\alpha$ -アミノ酸 (天然には20種類存在) 2分子から1つ水分子がとれて化学結合 (ペプチド結合) ができる。この結合を介してアミノ酸がいくつか連なったものが**ペプチド**。アミノ酸の数が多いものは**ポリペプチド**とよばれ、タンパク質はポリペプチドのひとつ。

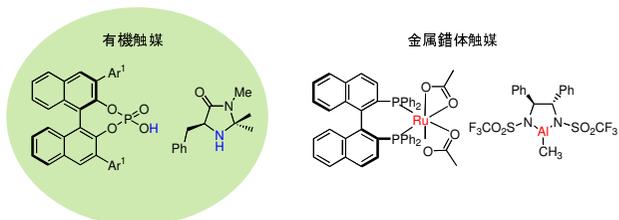


アミノ酸の数	可能なペプチドの数
2	$20^2 = 400$
3	8000
4	160000
5	3200000
10	$1.02 \times 10^{13}$

## 有機触媒 (有機分子触媒) とは

金属種を含まない触媒のこと。2000年ごろから爆発的に研究が進展。

- ・低環境負荷
- ・反応生成物中への金属の残留がない



## 有機化学の醍醐味とは？

分子レベルでものがつくれること

どんなもの？

医薬・機能材料など、価値のあるもの

何から？どうやって？

入手可能な有機化合物から  
化学反応によって合成する

よい合成とは？

- ・ほしい物だけが得られる合成
- ・加熱や冷却などエネルギーをつぎ込まなくてもできる合成
- ・有機溶媒を使わず水の中でもできる合成

お手本は？

酵素！

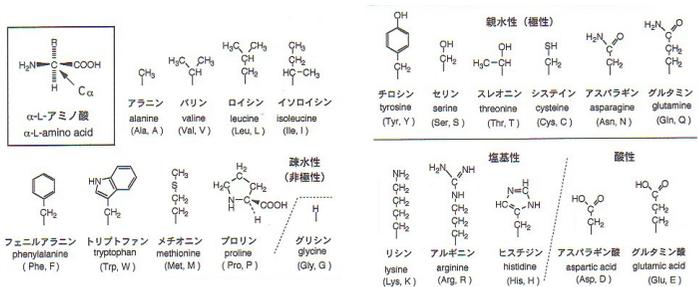


・水中・体温程度の温度で必要な物だけを選択的につくる触媒

・本体はタンパク質、つまり $\alpha$ -アミノ酸がペプチド結合でつながってできた生体高分子(ポリペプチド)

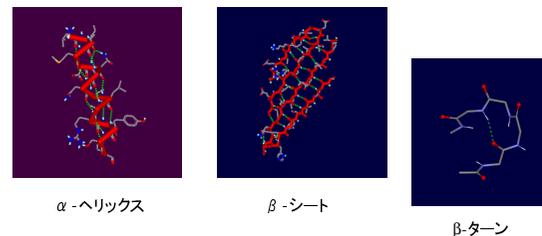
・アミノ酸側鎖間の相互作用などに起因した特定の三次元構造

## 天然の $\alpha$ -アミノ酸

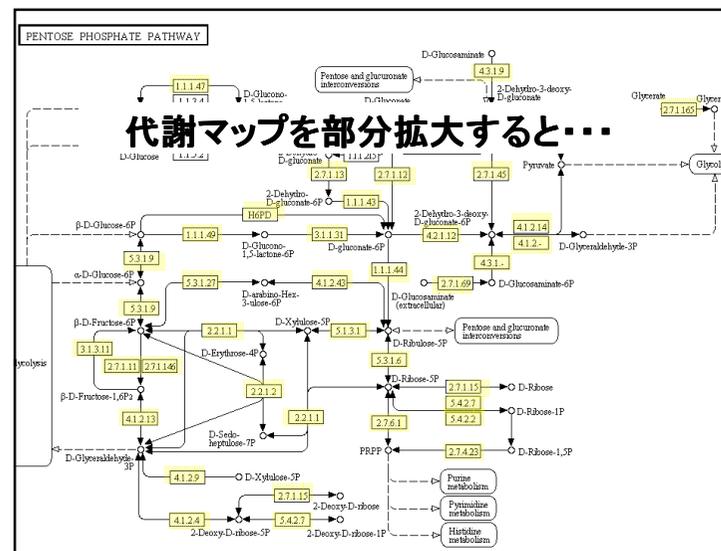
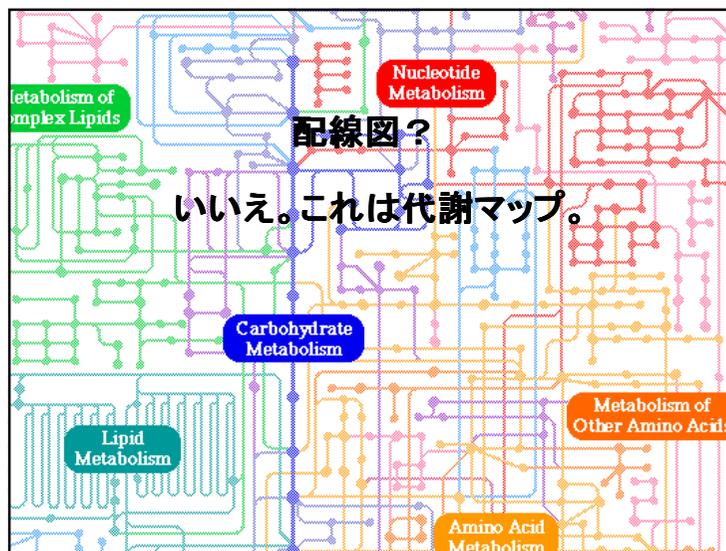


20種。酵素分子はこれらを組み合わせて作られている。

## 酵素の部分構造(二次構造)



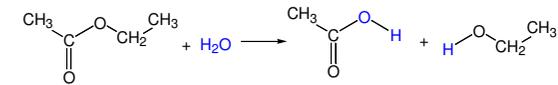
構造はアミノ酸の配列によって決まる



・生命活動を維持するために、生体内ではおびただしい数の有機化学反応が同時並行で進行

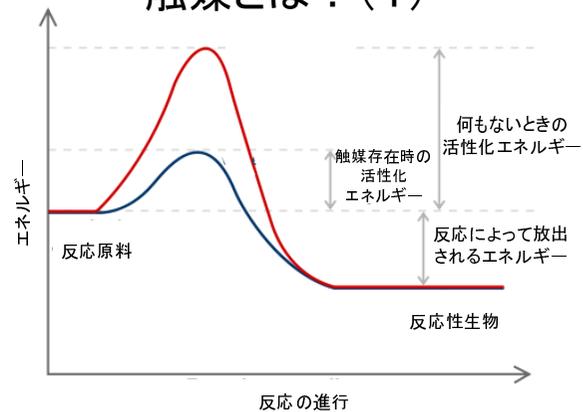
・5000種以上の酵素が、**触媒**となってそれらの反応を進めている

### 触媒の例: エステルの加水分解反応



活性化剤(触媒)	反応の速さ
なし	34日後も生成物確認できず
0.025 mol/L 塩酸(酸)	半減期4.5時間
0.01 mol/L NaOH水溶液(アルカリ)	半減期20秒

### 触媒とは？(1)



触媒は反応の進行に必要な活性化エネルギーを下げる

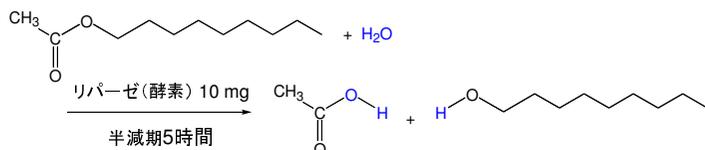
### 触媒とは？(2)

化学反応に関わるが、反応終了後は元の姿に戻る。

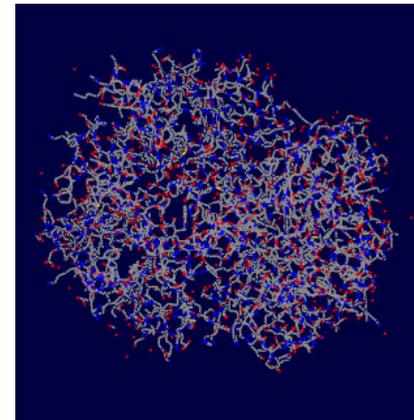
何度もはたらくことができるので、反応物に対して少量あればよい。

**分子レベルのものづくりのツール**

## 酵素: 生体内にある触媒



## 酵素の本体はポリペプチドである



基質(反応する分子)はこの程度の大きさ



## 酵素は特定の分子だけを反応させる(基質特異性)

例: 糖の加水分解

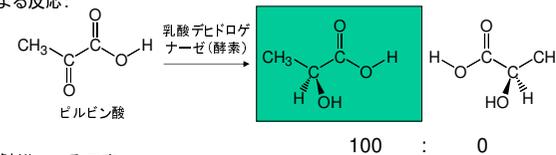
マルターゼ(酵素)による反応:

酸触媒による反応:

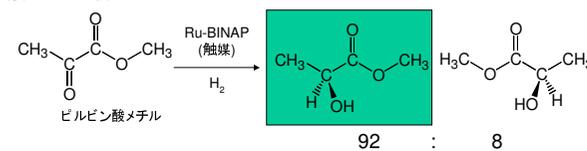
○	<b>麦芽糖</b> 	○
×	<b>ショ糖(砂糖)</b> 	○
×	<b>乳糖</b> 	○

## 酵素は特定のものだけをつくりだす(選択性)

酵素による反応:



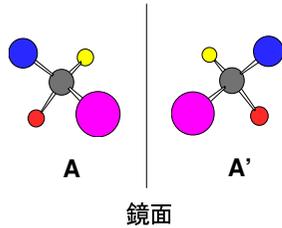
人工の触媒による反応:



この点では、人工触媒も高い水準までできている。  
(2001年ノーベル化学賞)

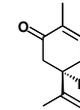
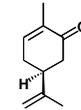
## 鏡像異性体(エナンチオマー)

- 炭素は正四面体の重心から各頂点に向かって4本の結合
- 炭素に結合する4つが全て異なるとき、丁度右手と左手の関係にある2通りの化合物が存在する。そのような分子を**キラル**な分子という。

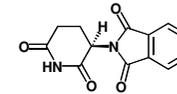
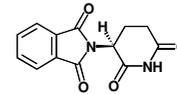


AとA'は別の化合物であり互いに**鏡像異性体**(=光学異性体、鏡像体、エナンチオマー)である。物質Aと物質A'は、融点、沸点、溶解度、屈折率などほとんどの物性は同じ。

## 一方の鏡像異性体のみを入手することの有用性



カルボン  
左手型 ヒメウイキョウ臭  
右手型 スペアミント臭

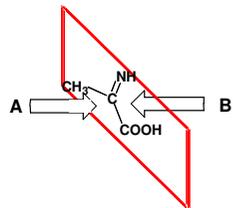
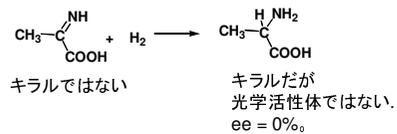


サリドマイド  
左手型 催奇性あり  
右手型 催奇性なし  
鎮痛剤、睡眠薬

鏡像異性体間では生体の応答が異なる。このため、薬などには鏡像異性体のうちの一方のみを用いる必要がある。

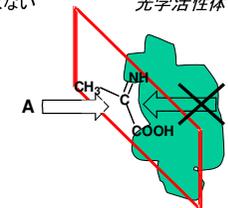
$$ee \text{ (鏡像異性体過剰率)} = \frac{|\text{左手型} - \text{右手型}|}{\text{左手型} + \text{右手型}} \times 100 (\%) \quad ee \text{ 100\%が理想。}$$

## 鏡像異性体的一方だけを得ることは難しい



H<sub>2</sub>がA側から近づいたときと、B側からのときとで違うものができる。AとBのどちらから近づくかは全く同確率。結果として、鏡像異性体の1:1の混合物ができる。

## 不斉触媒のしくみ

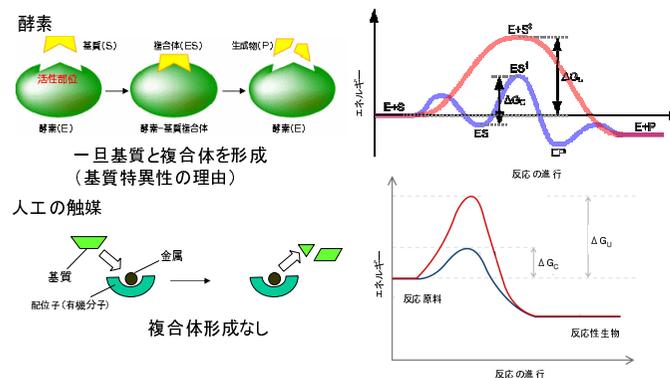


酵素や人工触媒は基質の一方の面を覆って、そちら側から反応がいかないようにしている。そのような作用をする触媒を**不斉触媒**という。

## 触媒の比較

	酵素	人工触媒	工業的重要度
水中・温和な条件	◎	△	今後重要に (グリーンケミストリー)
基質特異性	◎	×	?
選択性	◎	○	重要
触媒設計	△	◎	重要
量産可能性	△	○	重要
入手方法	生物	化学合成	

## 酵素と人工の触媒の比較(2)



酵素と人工触媒の長所を兼ね備えた  
触媒はないか？

⇒ ペプチド触媒!

## ペプチド触媒開発の2つのアプローチ:

(その1)

酵素機能はタンパク質分子が特定の三次元構造をとっていることに基づいていることは明らか。それに倣って、分子の三次元構造を精緻に設計して、ES複合体を経由する優れた触媒を目指す。  
(バイオミメティック・理学的)

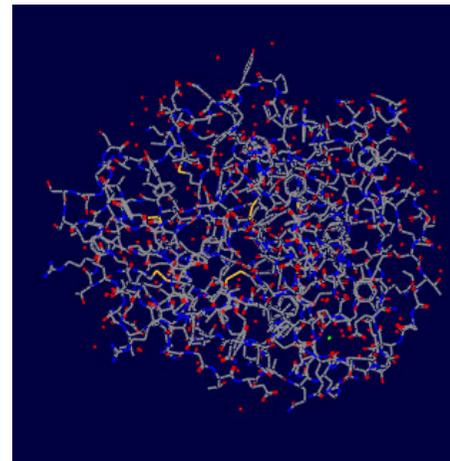
(その2)

酵素の機能は優れた触媒能にある。微細な構造をまねする必要はなく、酵素の構造の特徴を大雑把にとらえて、機能の実現を目指す。ES複合体は経由してもしなくてもよい。  
(バイオインスパイアード・工学的)

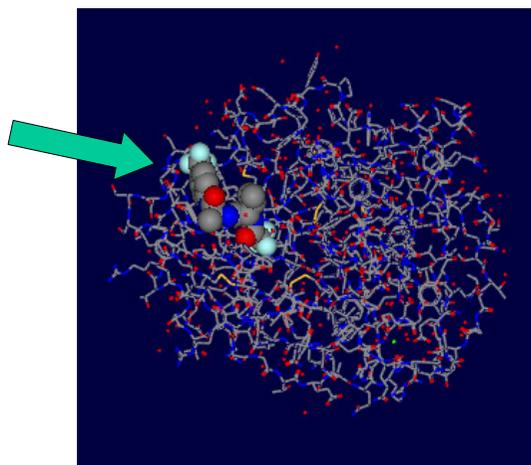
## アプローチその1

まずは酵素分子の構造を知るところから。

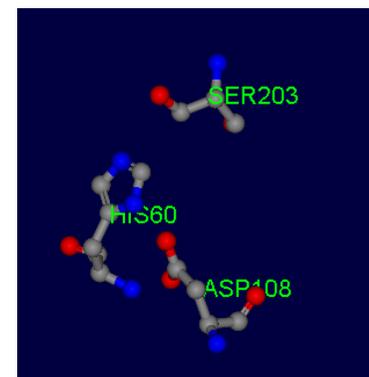
例：ブタ脾臓にある加水分解酵素（セリンプロテアーゼ）



例：ブタ脾臓にある加水分解酵素（セリンプロテアーゼ）



例：ブタ脾臓にある加水分解酵素

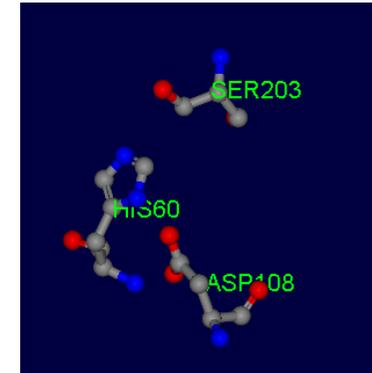


空間的に適切な位置関係にあるSer/His/Aspの3つのアミノ酸の側鎖が関与

セリンプロテアーゼの触媒反応機構は  
著作権の関係で削除しました。  
以下のアドレスで見ることができます。

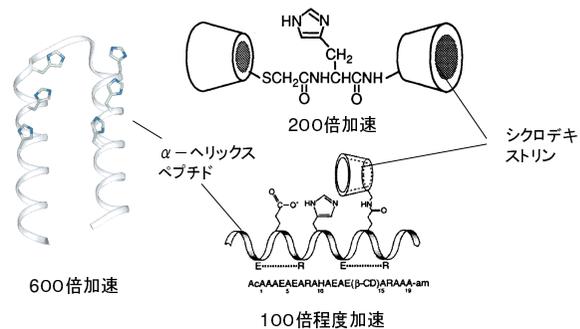
<http://www.bmb.uga.edu/bcmb8010/moremen/weblinks/WebSerineProteases/SerProt.html>

例: フタ脾臓にある加水分解酵素



空間的に適切な位置関係にあるSer/His/Aspの3つのアミノ酸側鎖の芸術的といえるほど精妙な共同作用による触媒機能

「空間的に適切な位置関係にあるSer/His/Asp」に似たものを作る。  
⇒これまでに多数の例。



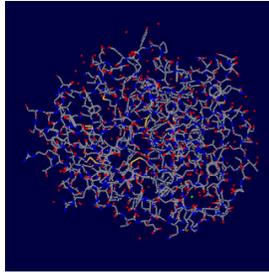
•それぞれの構造は美しいが、これらの分子を作るのはとても大変。  
•「本家」の酵素が最高で約100万倍反応を加速することと比べると見劣りする

## アプローチその2

別の視点で酵素分子の構造を見る

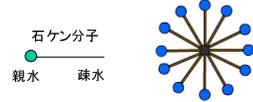
## 酵素の構造と機能の関係

酵素の構造をおおざっぱに見てみると...

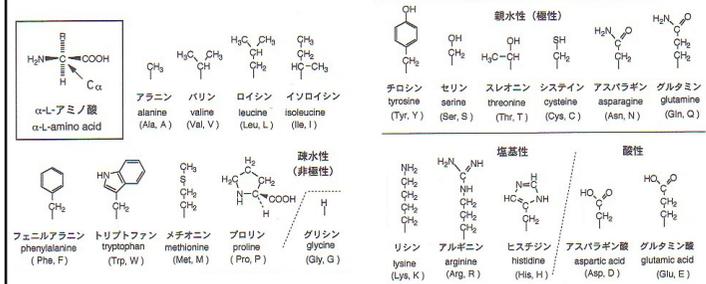


- ・球状タンパク質である
- ・球の内部には疎水性のアミノ酸が多く、外部には親水性のものが多い。(両親媒性)
- ・反応中心(触媒作用を起こす部分)は疎水部分に隣接して存在。  
⇒水中で反応ができるのはこのため

(参考)石ケン分子のつくるミセル



## 天然の $\alpha$ -アミノ酸



## 酵素をおおざっぱにまねる

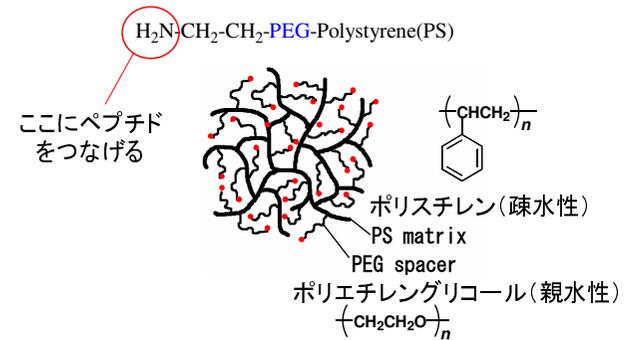
水中で反応をすすめるには疎水的な部分が必要。しかし、疎水的なアミノ酸でペプチドを作ると凝集して沈殿するため使えない。

ペプチドではない両親媒性の何かにペプチドを結合させて触媒とする



ペプチド合成, 触媒反応後の分離, 再利用が容易

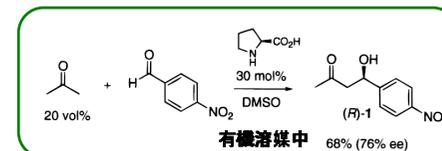
## 今回用いた樹脂



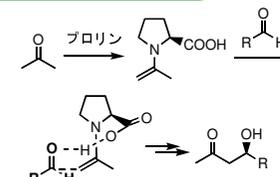
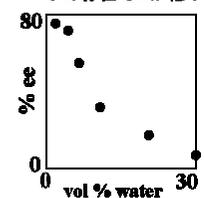
樹脂上へのペプチド合成は1960年代に確立されている

## 不斉アルドール反応と連続反応への展開

プロリン(アミノ酸)が不斉触媒となって進むアルドール反応 (Listらが2000年に発表)



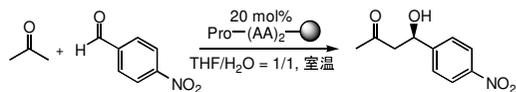
水の存在でeeが低下



プロリンとケトンからできたエナミンがアルデヒドと反応し、生成物が加水分解を受けてプロリンが再生。(アミンの触媒作用その1)

⇒ プロリンの入ったペプチドを触媒に

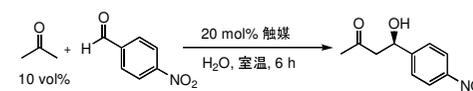
## どんなペプチドがよいかー trial and error



entry	AA	time (h)	yield (%)	ee (%) <sup>a</sup>
1	—	6	85	12
2	Leu	2	95	39
3	Phe	2	89	44
4	Val	4	100	36
5	Thr( <i>t</i> -Bu)	6	89	29
6	Tyr( <i>t</i> -Bu)	6	100	32
7	Trp	6	88	29
8	Glu(O <i>t</i> -Bu)	4	100	29
9	Lys(Boc)	4	100	28

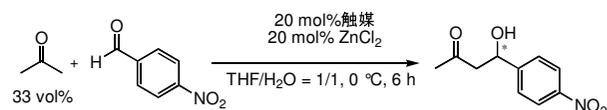
THF : テトラヒドロフラン (有機溶媒) 収率

## どんなペプチドがよいか(その2)



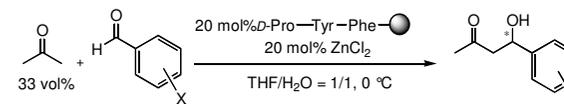
entry	catalyst	yield (%)	ee (%)
1	Pro-	85	12
2	Pro-Phe-	67	27
3	Pro-(Phe) <sub>2</sub> -	100	34
4	Pro-(Phe) <sub>3</sub> -	88	28
5	Pro-(Phe) <sub>4</sub> -	93	31
6	Pro-(Phe) <sub>5</sub> -	94	22
7	Pro-(Phe) <sub>10</sub> -	51	25

### どんなペプチドがよいか(その3)



entry	触媒	yield (%)	ee (%)
1	Pro-Glu-(Et <sub>3</sub> N)-Phe	35	38
2	Pro-(HCl)-Glu-Phe	31	37
3	Pro-Lys-Phe	83	42
4	Pro-His-Phe	72	38
5	Pro-Tyr-Phe	100	23
6	D-Pro-(Phe) <sub>2</sub>	81	26
7	D-Pro-His-Phe	83	69
8	D-Pro-Tyr-Phe	66	73

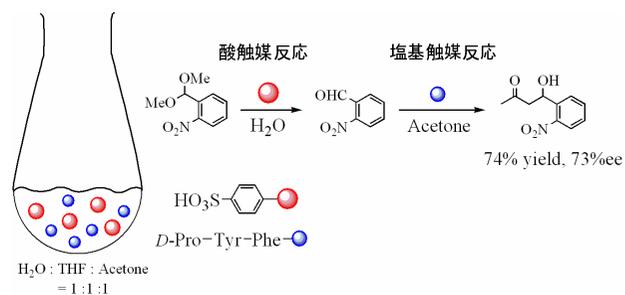
### 汎用性のチェック(酵素との違い)



entry	X	time (h)	yield (%)	ee (%)
1	4-NO <sub>2</sub>	20	100	71
2	2-NO <sub>2</sub>	18	89	84
3	3-NO <sub>2</sub>	24	83	76
4	2-Cl	30	93	74
5	4-Cl	30	50	75
6	4-MeO	24	0	-

- 反応後の触媒はろ過によって容易に回収可能
- 触媒は5回以上再利用可能

### 単一反応容器中での二段階連続反応への応用

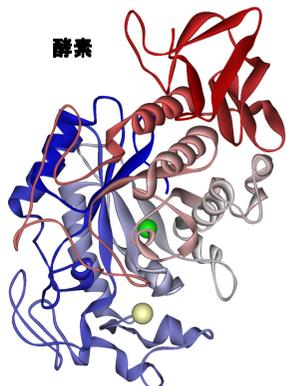


- 通常、酸触媒と塩基触媒を混ぜると中和してしまっどどちらも役に立たなくなる。不溶性の樹脂を用いることでそれを回避。
- 触媒は混合物のまま回収して5回以上再利用可能

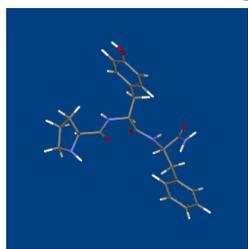
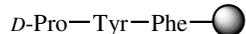
### ポリロイシン結合型ペプチド触媒

### 第一世代固定化ペプチド触媒の問題点

酵素



固定化ペプチド

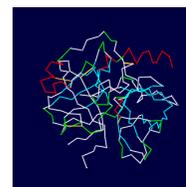


安定な高次構造により形成された反応場

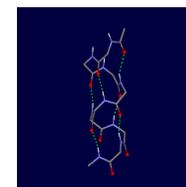
特定の立体配座をとりにくい

⇒ 二次構造の積極的利用

### 酵素の分子構造



主鎖全体



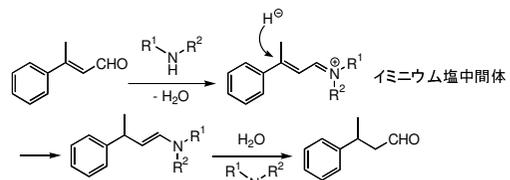
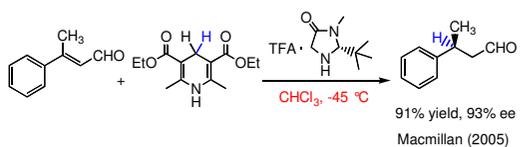
部分構造(α-ヘリックス)



部分構造(β-ターン)

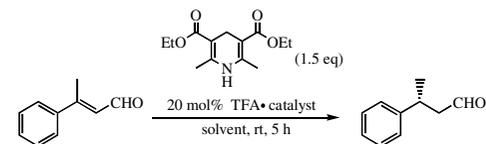
分子構造 ⇔ 機能

### 背景: 有機触媒による二重結合の水素化反応



(アミンの触媒作用その2)

### 含水溶液中でのイミニウム塩型活性化機構による反応へ

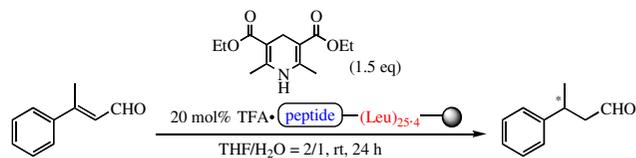


entry	catalyst	solvent	conversion (%)	ee (%)
1	Proline	THF/H <sub>2</sub> O = 2/1	3	n.d.
2	Pro-●	THF/H <sub>2</sub> O = 2/1	3	n.d.
3	Pro-(Leu) <sub>2</sub>	THF/H <sub>2</sub> O = 2/1	3	n.d.
4	Pro-(Leu) <sub>2,5-4</sub>	THF/H <sub>2</sub> O = 2/1	21	27
5	Pro-(Leu) <sub>2,5-4</sub>	THF/H <sub>2</sub> O = 1/2	63	24
6	Pro-(Phe) <sub>10</sub>	THF/H <sub>2</sub> O = 2/1	1	n.d.

転化率  
n.d.: 測定せず

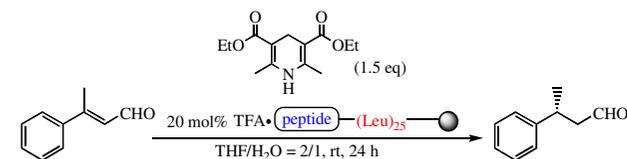
疎水性のポリロイシン鎖が含水溶液中で有効な反応場を提供

### ペプチド配列の検討



entry	peptide	conversion (%)	ee (%)
1	Pro-Phe	68	33 (R)
2	Pro-Tyr	22	45 (R)
3	Pro-Trp	53	45 (R)
4	D-Pro-Trp	35	60 (S)
5	Pro-D-Trp	20	47 (R)

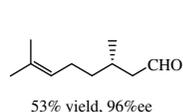
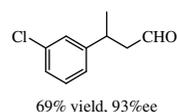
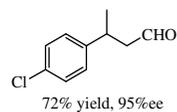
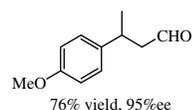
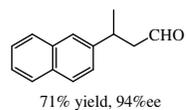
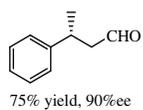
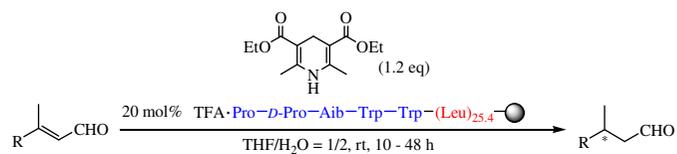
### ペプチド配列の検討(2)



entry	peptide	conversion (%)	ee (%)
1	Pro-D-Pro-Aib	4	77
2	Pro-D-Pro-Aib-Trp	7	87
3	Pro-D-Pro-Aib-Trp-Trp	13	91
4	Pro-D-Pro-Aib-Trp-Trp-Trp	12	89

Aib: 2-アミノイソ酪酸  
(非天然アミノ酸)

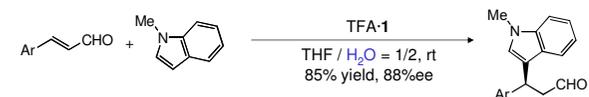
### 反応基質の一般性の検討



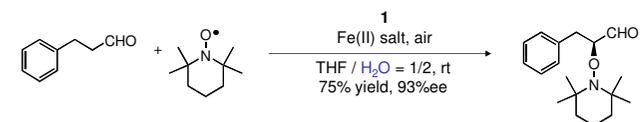
### 同じ触媒が別の反応にも適用可能

Pro-D-Pro-Aib-Trp-Trp-(Leu)25,4 (1)

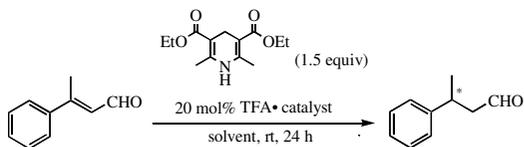
#### 炭素骨格形成



#### 酸化

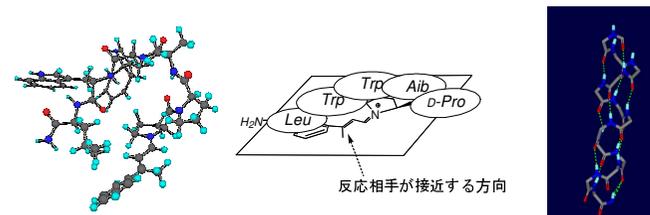


### ポリロイシン鎖の役割は？



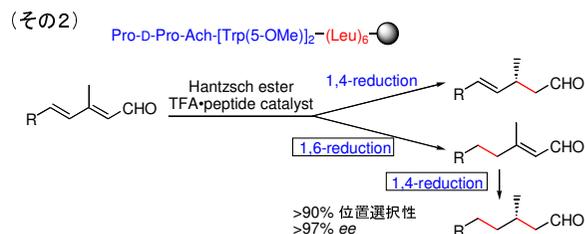
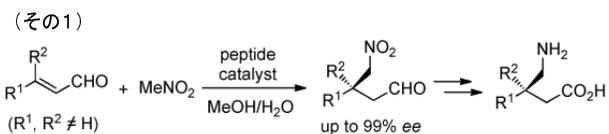
	触媒	溶媒	収率 (%)	ee (%)
1	Pro-D-Pro-Aib-(Trp) <sub>2</sub> -(Leu) <sub>25-4</sub>	THF	89	88 (R)
2	Pro-D-Pro-Aib-(Trp) <sub>2</sub>	THF	51	86 (R)
3	Pro-D-Pro-Aib-(Trp) <sub>2</sub> -(Leu) <sub>25-4</sub>	THF/H <sub>2</sub> O = 1/2	75	91 (R)
4	Pro-D-Pro-Aib-(Trp) <sub>2</sub>	THF/H <sub>2</sub> O = 1/2	17	64 (R)

### 立体選択性が見られる理由の推定



α-ヘリックス構造をもつポリロイシンが水中でペプチドの3次元分子構造を安定化

### 最近の進展



### 樹脂固定化ペプチド触媒

#### メリット

- キラルなアミノ酸で構成されているので不斉触媒となりうる
- 立体選択性のみでなく、位置選択性、化学選択性も期待できる
- 触媒の構造最適化が比較的容易
- 容易に回収でき再利用も可能
- one-pot多段階合成へ適用可能
- 副反応の回避
- ペプチドは環境へのインパクトが小さい
- 有機溶媒の使用量を減らすことが可能

#### 課題

- 有機溶媒0というのはまだ難しい
- 触媒としての使用量が比較的多い
- 反応時間が長め
- 選択性に改良の余地

## ペプチド触媒の位置付け

	酵素	ペプチド触媒	低分子触媒	工業的重要度
水中・温和な条件	◎	○	△	今後重要に (グリーンケミストリー)
基質特異性	◎	○?	×	重要でない
選択性	◎	○	○	重要
触媒設計	△	○	◎	重要
量産可能性	△	△	○	重要
入手方法	生物由来	化学合成	化学合成	
扱い易さ	△	○	○	重要

## 未来への挑戦

- ・位置選択的触媒のさらなる開発
- ・ペプチド鎖が制御する触媒反応の拡張
- ・1つの反応容器中で複数のペプチド触媒による多段階反応を実現