

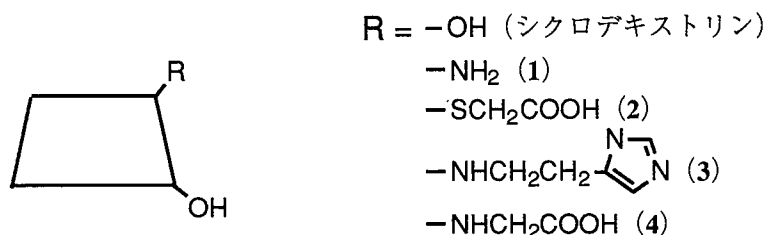
| | |
|-----------|---|
| 氏名 | 飯島 政雄 |
| 授与学位 | 博士(工学) |
| 学位授与年月日 | 平成11年3月25日 |
| 学位授与の根拠法規 | 学位規則第4条第1項 |
| 研究科、専攻の名称 | 東北大学大学院工学研究科(博士課程) 生物工学専攻 |
| 学位論文題目 | 修飾シクロデキストリンの合成とその酵素型反応への応用 |
| 指導教官 | 東北大学教授 加藤 紀元 |
| 論文審査委員 | 主査 東北大学教授 加藤 紀元 東北大学教授 宮野 壮太郎 東北大学教授 西野 徳三 |

論文内容要旨

本論文は全7章から構成され、第1章では序論として本研究の背景や意義および目的、そしてシクロデキストリンの性質について記述している。

酵素は中性、常温、常圧下において反応加速性、基質特異性、反応選択性、位置特異性、そして立体特異性などの優れた特性を持つ生体内にある触媒である。その高い触媒活性は、活性中心における特定のアミノ酸残基の基質反応点への近接と反応の遷移状態の安定化によって達成されていると考えられている。このような特性から酵素は醗酵工業や食品工業で、また現在では有機合成や臨床分析用の試薬としても使用されている。しかしながら酵素は高価であり、さらにタンパク質であるためにその活性は温度や pH による影響を受けやすいという欠点を持っている。近年、複雑な酵素反応も効率の良い単純な化学反応の組み合わせと遷移状態の安定化から成り立っていることが解明されてきた。このことは、有機小分子から生体類似機能を持つ物質を化学的に再構築できることを意味している。こうした酵素類似あるいは酵素にはない新しい機能を持った人工酵素(酵素モデル)を溶液内の反応によって創り、これを用いて酵素型の反応に応用することは、反応の効率化、省資源、省エネルギー、環境の浄化という観点から重要な意義を持っている。

本研究では、加水分解酵素型の反応を構築するために基質結合部位となるシクロデキストリンに触媒官能基を結合させた酵素モデル物質を設計した。シクロデキストリンはグルコースの環状オリゴマーであり、いろいろな物質と包接複合体を形成することが知られている。その一級水酸基の一つに官能基を導入した次のような修飾シクロデキストリンを合成し、これらを用いて酵素型反応を行い、その包接挙動や触媒反応挙動を検討した。



第2章では、触媒官能基だけの反応機構的モデルであるエステル加水分解におけるイミダゾールの一般塩基および酸触媒作用について記述している。

セリン酵素類の活性中心にある His のイミダゾール基は、一般酸-塩基触媒として作用していることが知られている。酵素活性中心におけるイミダゾール基は電子的、親水的、疎水のおよび立体的な効果などが同時に作用している特殊な環境下にあると考えられ、イミダゾールの触媒作用に及ぼすこれらの効果を明らかにしようとした。いくつかの 2-アルキルおよび 2-ヒドロキシアリキル置換イミダゾールを触媒を兼ねた緩衝液とし、一般塩基触媒作用ではジクロロ酢酸エチルを、一般酸触媒作用ではジエチルフェニルオルトホルマー

トを基質として、エステルの加水分解速度を測定した。各置換イミダゾールについて得られた速度定数を置換基の立体パラメーターを用いて解析した結果、これらの置換基がイミダゾールの一般酸-塩基触媒作用に及ぼす立体的影響は少ないことがわかった。さらに、一般塩基触媒作用ではイミダゾール基近傍の極性置換基は反応を 1.7 倍加速し、その加速性は“微視的溶媒効果”によるものと考えられた。また、一般酸触媒作用におけるイミダゾリウムイオンから基質エステルへのプロトン移動は、これらの間に水分子を介するものであることが示唆された。

第 3 章では、シクロデキストリンの包接能に及ぼす静電的効果を検討したイオン性シクロデキストリンの包接挙動について記述している。

シクロデキストリンがその疎水性空洞にゲスト分子を包接するときの結合の駆動力には、非共有結合的な多くの相互作用が働いていることが知られている。これらのうちで静電的（極性）相互作用の寄与は小さいと言われているが、この静電的相互作用を十分に活用することはシクロデキストリンの分子認識能を高めたり、制御したりするひとつの手段として重要であると考えられる。複合体形成における静電的相互作用を観察するためにカチオン性のアミノ基修飾シクロデキストリン(1)とアニオン性のチオグリコール酸修飾シクロデキストリン(2)を宿主分子として用い、これらとアニオン性ゲスト分子である *p*-ニトロフェノールおよびケイ皮酸との複合体形成をいろいろな pH で調べた。ホスト-ゲスト複合体生成は UV スペクトル法によって観察し、複合体生成の結合定数を算出した。1 および 2 の各ゲストについて得られた結合定数の値は pH を変えても極端には変化しなかった。ホストとゲスト間の同種の電荷同士による不利な結合や異種電荷同士の有利な結合は見られたものの、それらの結合の変化は結合定数でせいぜい数倍程度であった。したがって、シクロデキストリンの包接作用に及ぼす極性の効果は小さいことが確かめられた。

第 4 章では、シクロデキストリンとイミダゾールが共存する系でのシクロデキストリンに包接された基質の加水分解について記述している。

シクロデキストリンは基質取り込み部位としての疎水性空洞の他に多くのアルコール性水酸基を持つため、単独でもセリン酵素のモデルとなることが知られている。これをさらに反応性の高い酵素モデルとするために、酢酸 *m*-ニトロフェニルを基質としてシクロデキストリン存在下、第 2 章で用いた各種置換イミダゾール緩衝溶液中で基質の加水分解を行い、シクロデキストリンに取り込まれた基質の分解がその周囲に存在するイミダゾール基によってどの程度加速されるのかを明らかにし、そしてそれはどのような機構によるのかを速度論的に考察した。この反応系は用いた置換イミダゾールが触媒であると同時に、シクロデキストリンと複合体を形成し阻害剤としても作用する珍しい系だった。シクロデキストリンの濃度とイミダゾール濃度による速度定数の関係式から得られた各種の速度パラメーターの解析から、シクロデキストリンに取り込まれた基質の分解は酵素中に見られるような周囲に存在するイミダゾール基の一般塩基触媒作用によって優先的に起こることが示唆された。こうして、触媒官能基が基質結合部位としてのシクロデキストリンと共有結合せずに共存した系によっても酵素型の反応を行うことができた。しかしながら、その反応加速性は低いものだった。

第 5 章では、より高度な加水分解酵素型の反応系として、触媒官能基をシクロデキストリンに共有結合させた酵素型反応について記述している。

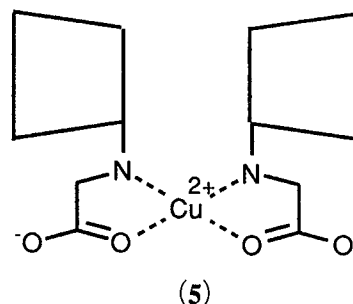
前章で観察されたイミダゾール基の反応性をさらに高めるために設計したヒスタミン修飾シクロデキストリン(3)は、基質とした酢酸 *p*-ニトロフェニルの加水分解反応においてターンオーバー性を持つことが見出された。さらに、反応の pH を変えて測定した結果からは中性付近での最大加速性が観察され、反応活性種は 5 のヒスタミン残基中のイミダゾール基であることが推察された。このように、共有結合によって触媒官能基を修飾したシクロデキストリンは取り込んだ基質の分解を効率的に促進することができ、3 を用いて加水分解酵素 α -キモトリプシンの良い酵素型反応を構築することに成功した。

触媒官能基としてのカルボキシル基を持つグリシン修飾シクロデキストリン(4)は、加水分解酵素リゾチームのモデルとなることが期待された。ジエチルフェニルオルトホルメートおよび 2-(*p*-ニトロフェノキシ)テトラヒドロピランを基質として、酸性条件下、これらの加水分解における 4 の酸触媒能を調べたところ、4 は触媒活性を示さず、むしろ反応を遅延させた。未修飾のシクロデキストリンでも同様な遅延効果が観察さ

れ、シクロデキストリンに共有結合したグリシン残基による特別の効果は見られなかった。この反応系では、溶液中のヒドロニウムイオンから基質へのプロトン移動がシクロデキストリン疎水性空洞への基質の取り込みによって妨げられていることが考えられた。基質結合部位としてのシクロデキストリンに触媒官能基を単に共有結合させただけでは触媒作用が発現しないこともあり、シクロデキストリン環内での基質の配向性や空間配置、遷移状態構造などを考慮した酵素型反応の設計が必要であるとした。

第6章では、**4**が銅イオンと2:1の錯体を形成してできるグリシン修飾シクロデキストリン-金属錯体(**5**)の反応挙動について記述している。

配位結合によって生成した**4**の2量体である**5**は、2個のシクロデキストリン環の特別な空間的配置によって新たな基質選択性や反応加速性を引き起こすと予想された。安息香酸部分とニトロフェニル部分の2つの疎水性部を持つ安息香酸の*m*-および*p*-ニトロフェニルエステルを基質として、この“長い”基質の加水分解の**5**による加速性と*m*体と*p*体についての基質選択性を明らかにした。**5**はこれらの基質に対して大きな反応加速性を示し、そのゆがんだ構造のために曲った構造の*m*体に強く基質結合し、さらにその遷移状態とも強く結合することがわかった。一方、直線的な構造の*p*体に対しては**5**の基質結合は弱い



が、2つのシクロデキストリン環による協同作用によって遷移状態構造が安定化され、その後の分解反応は加速されることが示唆された。このような遷移状態の安定化は、酵素の大きな反応加速性の要因のひとつであると考えられ、配位結合によって生じた特異な構造を持つ**5**を用いることによって、反応加速性は不十分であるが、より洗練された酵素型反応を行うことができた。

また、いくつかの光学活性な N-Boc 保護アミノ酸の *p*-ニトロフェニルエステルの加水分解における**5**の基質選択性や立体選択性についても検討したが、その目立った効果は観察されなかった。

さらに、アシル部分の炭素数(メチレン炭素数 $n = 0$ から 8)の異なる長鎖アルキルカルボン酸の *p*-ニトロフェニルエステルを基質として、**5**の触媒作用に及ぼす基質疎水部分の長さの影響を調べた。 $n = 8$ の長鎖カルボン酸ニトロフェニルエステルの加水分解では**5**が200倍もの反応加速性を示した。これは、**5**の2個のシクロデキストリン環によって遷移状態構造が安定化されたためと考えられ、基質の長さによって反応性に大きな違いが現われてくることを見出した。

第7章は結論として本研究の成果を総括し、基質結合部位としてのシクロデキストリンに種々の官能基を導入することでこれまでにない特徴的な酵素型反応を構築することに成功したことを述べている。

審査結果の要旨

天然酵素の高い反応加速性と基質選択性を実験的に溶液内で再現する試みは、酵素の生体内における反応性を理解することのみならず、生物化学を始め、高効率的で高選択的な有機反応の開発、および天然酵素を越える種々の活性を持つ人工酵素の構築にもつながる。本研究では加水分解酵素型の反応を機軸として、シクロデキストリンに種々の官能基を導入した修飾シクロデキストリンの設計と合成を行い、これを用いて酵素類似機能の発現を検討した。本論文はこれらの研究成果をまとめたもので、全文7章から構成される。

第1章は序論であり、本研究の背景と目的を述べている。

第2章では、タンパク質加水分解酵素のモデル化として、エステル加水分解における置換イミダゾールの一般酸-塩基触媒作用を検討し、この作用には立体因子はほとんど影響しないこと、および水分子が介在する一般酸触媒反応機構を提唱した。

第3章では、アミノ酸およびチオグリコール酸修飾シクロデキストリンのイオン性ゲストに対する結合性を検討し、ホスト-ゲスト間の静電的相互作用がシクロデキストリンの包接能におよぼす影響は、結合定数では数倍の差しかないことを明かにした。

第4章では、置換イミダゾール緩衝溶液における未修飾シクロデキストリンの酵素型加水分解反応は、イミダゾールが触媒と阻害の両作用を示すことを明かにするとともに、包接された基質の分解はイミダゾール基の一般塩基触媒作用により促進されることを論じている。

第5章では、ヒスタミン修飾シクロデキストリンによる酵素型加水分解反応において、天然酵素と類似のターンオーバーと中性付近での触媒活性発現に成功したこと、またグリシン修飾シクロデキストリンのオルトエステル加水分解で見いだされた反応遅延効果を考察し、今後の酵素型反応の設計における因子について論ずるなど、有用な知見を得た。

第6章では、グリシン修飾シクロデキストリンの銅錯体からなる2量体の包接能を検討した。芳香環を2個持つエステル、および長鎖アルキルエステルの加水分解では高い反応加速性が見られ、また基質の立体化学が及ぼす効果と合わせて、2個のシクロデキストリン環の協同作用による遷位状態を考察し、シクロデキストリン複合体に対する有用な知見を得た。

第7章は結論である。

以上要するに本論文では、加水分解酵素型反応を機軸として、基質結合部位として修飾シクロデキストリンの高機能化を指向した設計を行い、これを用いて新規な酵素類似反応を考案するとともに、その発現に成功している。この成果は生物有機化学のみならず有機化学、薬学の発展に寄与するところが少なくない。

よって本論文は博士（工学）の学位論文として合格と認める。