

Isolierung einer D-stereospezifischen Aminopeptidase und ihre Anwendung als Katalysator in der Organischen Synthese

Von Yasuhisa Asano*, Akiko Nakazawa, Yasuo Kato und Kiyosi Kondo

Enzymatische Reaktionen finden in der Organischen Synthese zunehmend Verwendung^[1]. Über in-vitro-Synthesen von Peptiden, die D-Aminosäuren enthalten, wurde mehrfach berichtet^[2]. Jedoch haben diese enzymatischen Reaktionen den Nachteil, nicht spezifisch für Substrate mit D-Konfiguration zu sein. Über Aminopeptidasen, die stereospezifische Hydrolysen von Peptiden mit D-Aminosäuren^[3] katalysieren, wurde bisher nicht berichtet, obwohl solche Peptide in der Natur vorkommen^[4].

Anreicherungskulturen von einer Bodenprobe führten zur Selektion des Mikroorganismus *Achromobacter* sp. SCRC C1-38. Aus dem zellfreien Extrakt wurde das D-Alaninamid hydrolysierende Enzym mit einer Ausbeute von 17 % 2800fach gereinigt. Das Molekulargewicht beträgt etwa 122 000, die beiden gleichen Untereinheiten des Enzyms haben ein Molekulargewicht von 59 000. Abbildung 1 stellt den typischen Hydrolyseverlauf von D,L-Alaninamid zu D-Alanin dar. Die Hydrolysegeschwindigkeit von L-Alaninamid betrug weniger als 0.01 % der von D-Alaninamid. D-Alanin wurde zur Identifizierung (korrekte Elementaranalyse, $[\alpha]_D^{20} - 14.15$ (c 6.6, 1 N HCl)) isoliert. Folgende Substrate wurden unter anderem mit dem Enzym umgesetzt: D-Alaninamid (relative Geschwindigkeit: 100 %, K_m -Wert: 0.65 mM), Glycinamid (44 %, 22.3 mM), D- α -Aminobutansäureamid

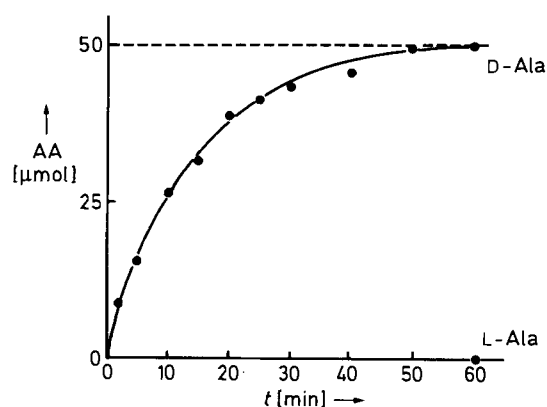


Abb. 1. Kinetische Trennung von D,L-Alaninamid mit *Achromobacter*-D-Alanin-Aminopeptidase. *Achromobacter* sp. SCRC C1-38 wurde bei 30 °C 18 h in TGY-Medium aerob kultiviert [8]. Das Enzym wurde aus Zellen (etwa 190 g Feuchtwicht) von 20 L-Kulturen durch Protaminsulfatbehandlung, fraktionierende Ammoniumsulfatfällung, Säulenchromatographien mit DEAE-Toyopearl und Butyl-Toyopearl und Gelfiltration mit Sephadex G-200 isoliert. Die Aktivität der D-Alanin-Aminopeptidase wurde anhand der Bildung von D-Alanin aus D-Alaninamid bei 30 °C festgestellt und D-Alanin mit D-Aminosäure-Oxidase bestimmt [9]. Eine Einheit der Enzymaktivität entspricht der Enzymmenge, die die Bildung von 1 µmol D-Alanin pro Minute katalysiert. Die Homogenität des Enzyms wurde durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, HPLC mit einer TSK-Gel-G-3000-SW-Säule und isoelektrische Fokussierung (pI = 4.2) geprüft; diese Proben zeigten jeweils eine Bande oder einen Peak. Die spezifische Aktivität des gereinigten Enzyms betrug 596 Einheiten mg^{-1} bei 30 °C und pH 8.0 mit D-Alaninamid als Substrat. Ein Reaktionsansatz mit 0.5 mmol Tris-Hydrochlorid, pH 8.0, 0.1 mmol D,L-Alaninamidhydrochlorid und 5 Einheiten des gereinigten Enzyms, Gesamtvolumen 5 mL, wurde bei 30 °C inkubiert. Der Anteil an L-Alanin wurde mit L-Alanin-Dehydrogenase bestimmt. AA = Stoffmenge Aminosäure.

[*] Dr. Y. Asano, A. Nakazawa, Y. Kato, Dr. K. Kondo
Sagami Chemical Research Center
Nishi-Ohnuma 4-4-1
Sagamihara, Kanagawa 229 (Japan)

(30 %, 18.3 mM), D-Serinamid (29 %, 27.0 mM), D-Alanin-3-aminopentanamid (32 %, 2.27 mM), D-Alanin-*p*-nitroanilid (96 %, 0.51 mM), D-Alaninmethylester (75 %), das Dimer (21 %, 10.2 mM), Trimer (92 %, 0.57 mM) und Tetramer (89 %, 0.32 mM) von D-Alanin, D-Alanyl-glycin (95 %, 0.98 mM), D-Alanyl-glycyl-glycin (45 %, 0.37 mM) und D-Alanyl-L-alanyl-L-alanin (100 %, 0.65 mM). Diese Ergebnisse zeigen die höhere Substrataffinität des Enzyms zu Peptiden gegenüber Aminosäureamiden. Das Enzym hatte weder Endopeptidase- noch Carboxypeptidase-Aktivität. Der zeitliche Verlauf der Hydrolyse von D-Alanyl-glycyl-glycin durch das Enzym war typisch für Aminopeptidasen (EC 3.4.11)^[5]. Weiterhin beeinflussten verschiedene Verbindungen und Metall-Ionen die Enzymaktivität wie bei einer Thiolpeptidase, deshalb der Namensvorschlag „D-Alanin-Aminopeptidase“.

Für eine D-stereospezifische enzymatische Aminolyse von Aminosäureestern wurde das Enzym mit Urethanpräpolymer PU-6 immobilisiert^[6] und mit wassergesättigten organischen Lösungsmitteln (Benzol, *n*-Butylacetat, 1,1,1-Trichlorethan) inkubiert (Tabelle 1). Aus D-Alaninmethylester und

Tabelle 1. Aminolyse von Alaninmethylester mit 3-Aminopentan, katalysiert durch *Achromobacter*-D-Alanin-Aminopeptidase [a].

Acyl-donor	Lösungsmittel	Ausb. [%][b]
D-Alaninmethylester · HCl	Butylacetat	98
D,L-Alaninmethylester · HCl	Butylacetat	48
L-Alaninmethylester · HCl	Butylacetat	0
D-Alaninmethylester · HCl	Benzol	98
D-Alaninmethylester · HCl	Trichlorethan	91
D-Alaninmethylester · HCl	Toluol	67

[a] Ein Reaktionsansatz mit PU-6-immobilisierter D-Alanin-Aminopeptidase (7.5 Einheiten des teilweise gereinigten Enzyms mit 210 Einheiten mg^{-1}), 0.1 mmol Alaninmethylesterhydrochlorid und 0.5 mmol 3-Aminopentan in wassergesättigtem organischem Lösungsmittel (1 mL) wurde bei 30 °C 1 h inkubiert. [b] Die Ausbeute wurde über die Ninhydrinreaktion mit authentischen, chemisch synthetisierten Produkten als Referenz bestimmt.

3-Aminopentan entsteht innerhalb einer Stunde quantitativ D-Alanin-3-aminopentanamid. Die katalytische Aktivität ergab sich zu 7700 min^{-1} (k_{kat}); sie ist also einige hundert- bis zehntausendmal größer als bei α -Chymotrypsin^[2 a)] oder Subtilisin-katalysierten^[2 b)] Peptidsynthesen. Aus D,L-Alaninmethylester wurde D-Alanin-3-aminopentanamid mit 46 % Ausbeute synthetisiert; es entstand kein Produkt aus L-Alaninmethylester. Die Aminolyse gelingt auch mit D-Alaninamid. Die Substratspezifität bezüglich der Acylgruppe zeigt sich bei den hydrolytischen Reaktionen. Bezüglich des Nucleophils ist die Substratspezifität nicht so ausgeprägt: Wird nur D-Alaninmethylester mit dem immobilisierten Enzym inkubiert, bildet sich kein D-Alaninpolymer. Jedoch konnten D-Alanin-*N*-alkylamide von *n*-Butylamin, Benzylamin und Neopentylamin mit hohen Ausbeuten synthetisiert werden.

Mit der Isolierung und Charakterisierung dieser neuen D-Alanin-Aminopeptidase wurde ein neuer Weg zur kinetischen Racematspaltung von Aminosäureamiden eröffnet; ferner lassen sich D-Aminosäure-*N*-alkylamide^[7] stereospezifisch aus racemischen Aminosäureestern synthetisieren.

Eingegangen am 31. Oktober 1988 [Z 3031]

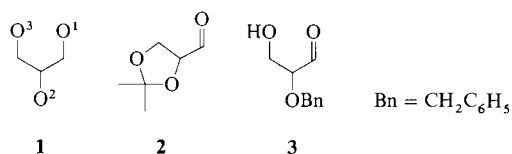
[1] G. M. Whitesides, C.-H. Wong, *Angew. Chem.* 97 (1985) 617; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 24 (1985) 617; C. Laane, J. Tramper, M. D. Lilly (Hrsg.): *Biocatalysts in Organic Media*, Elsevier, Amsterdam 1987; H. Yamada, S. Shimizu, *Angew. Chem.* 100 (1988) 640; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 27 (1988) 622.

- [2] a) J. B. West, C.-H. Wong, *J. Org. Chem.* 51 (1986) 2728; b) A. L. Margolin, D.-F. Tai, A. M. Klivanov, *J. Am. Chem. Soc.* 109 (1987) 7885; c) K. Kato, K. Kawahara, T. Takahashi, S. Igarashi, *Agric. Biol. Chem.* 44 (1980) 821; I. B. Stoineva, D. D. Petkov, *FEBS Lett.* 183 (1985) 103; H. Nakajima, S. Kitabatake, R. Tsurutani, K. Yamamoto, I. Tomioka, K. Imahori, *Int. J. Pept. Protein Res.* 28 (1986) 179; A. L. Margolin, A. M. Klivanov, *J. Am. Chem. Soc.* 109 (1987) 3802; C. F. Barbas III, C.-H. Wong, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1987, 533.
- [3] M. Sugie, H. Suzuki, *Agric. Biol. Chem.* 50 (1986) 1397; Y.-C. Tsai, C.-P. Tseng, K.-M. Hsiao, L.-Y. Chen, *Appl. Environ. Microbiol.* 54 (1988) 984.
- [4] K. H. Schleifer, O. Kandler, *Bacteriol. Rev.* 36 (1972) 407; H. Manabe, *Phytochemistry* 25 (1986) 2233; H. Kleinkauf, H. von Döhren, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 91 (1981) 129; K. Richter, R. Egger, G. Krell, *Science (Washington)* 238 (1987) 200.
- [5] Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry: *Enzyme Nomenclature*, Academic Press, New York 1984, S. 332.
- [6] S. Fukui, A. Tanaka, *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 29 (1984) 1.
- [7] Die Firma Pfizer synthetisierte mehrere Süßstoffe mit D-Alanin-N-alkylamid-Einheiten: US-Pat. 4411925 (1983).
- [8] Y. Asano, T. Sekigawa, H. Inukai, A. Nakazawa, *J. Bacteriol.* 170 (1988) 3189.
- [9] C. C. Allain, L. S. Poon, C. S. G. Chan, W. Richmond, P. C. Fu, *Clin. Chem.* 20 (1974) 470.

2-O-Benzylglycerinaldehyd: Ein in beiden enantiomeren Formen erhältlich, rasch oligomerisierender und deshalb konfigurationsstabiler Baustein für die Organische Synthese**

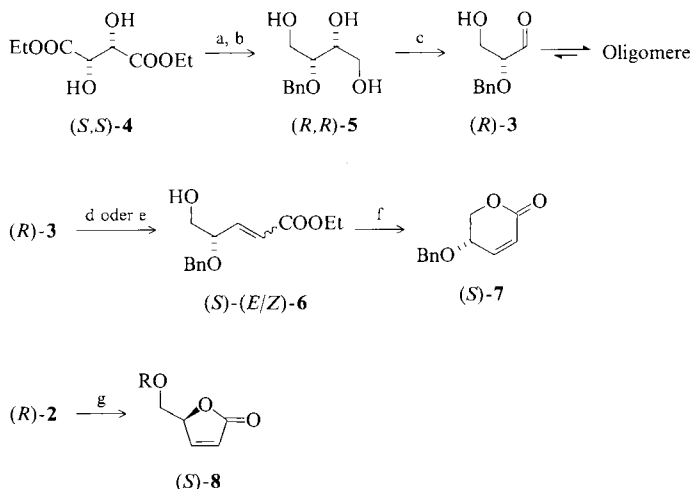
Von Volker Jäger* und Volkmar Wehner

Optisch aktive C₃-Bausteine des Typs **1** sind in der Organischen Synthese von großer Bedeutung^[1]. Die Hauptrolle spielt bisher 2,3-O-Isopropylidenglycerinaldehyd **2**, dessen beide Enantiomere gut zugänglich sind^[1, 2] und der durch die freie Aldehyd- und geschützte Diol-Funktion sehr variabel nutzbar ist. Allerdings ist **2** nicht monomer und racemisierungsfrei haltbar^[3].



Glycerinaldehyd-Derivate mit einer geschützten und einer freien Hydroxy-Gruppe könnten im Prinzip neue Einsatzmöglichkeiten eröffnen, da O²/O³ stärker differenziert sind und die freie Hydroxygruppe bei den ersten oder späteren Umsetzungen andere Regio- und Stereoselektivitäten erwarten läßt. Wir beschreiben im folgenden eine neue, einfache Synthese beider Enantiomere eines solchen Vertreters **3** mit Folgereaktionen, die dies belegen und zudem **3** als bei Raumtemperatur konfigurationsstabiles Glycerinaldehyd-Derivat ausweisen.

(R)-2-O-Benzylglycerinaldehyd (R)-**3** wurde früher aus D-Mannit (vier Stufen, ca. 5% Gesamtausbeute) oder aus D-Glucose (sechs Stufen, ca. 50%) erhalten und ohne nähere Prüfung umgesetzt^[4]. Beide Enantiomere, (R)-**3** und (S)-**3**,



Schema 1. Herstellung und Horner/Wittig-Produkte von **3**. Die Formeln geben Edukte und Produkte bezüglich (R)-**3** wieder; alle Reaktionen wurden in beiden enantiomeren Reihen durchgeführt. Die Strukturen von **6** und **7** sind spektroskopisch (IR, ¹H-, ¹³C-NMR) und durch passende Elementaranalysen gesichert. a, b) Nach Seebach et al. [5]: PhCHO, TosOH · H₂O (Kat.), C₆H₆, Rückfluß; Fp = 45 °C; dann LiAlH₄, AlCl₃, CH₂Cl₂, -40 °C bis Rückflußtemperatur; Gesamtausbeute ca. 75% **5**. c) NaOAc, H₂O, 20 °C; 90–96% **3**; Kp ca. 140 °C/0.005 Torr (Kurzwegdestillation); Maßstab 5–50 mmol. d) (EtO)₂P(O)CH₂COOEt, NaH, THF, 0 °C; Zugabe von **3** bei -78 °C, dann bis Raumtemperatur; 76–78% **6** (farbloses Öl) mit E:Z = > 97:3, Enantiomerenverhältnis > 97:3 nach NMR-Analyse mit 5.8% (+)-Eu(hfc)₃ und Vergleich mit (S):(R)-Gemischen (86:14 und 33:67); Siedebereich 150–180 °C (Badtemperatur, Kugelrohr)/0.08 Torr; (S)-(E)-**6**: [α]_D²⁵ + 73.8 (c = 0.90, CHCl₃), (R)-(E)-**6**: [α]_D²⁵ - 74.4 (c = 0.90, CHCl₃). e) Ph₃P=CH-COOEt, MeOH, 0 °C, 94% (S)-**6** oder (R)-**6** mit Z:E = 76:24 (nach ¹H-, ¹³C-NMR) und geringem Anteil **7** (3–5%), der beim Stehenlassen der Probe auf Kosten von (Z)-**6** zunimmt. f) TosOH · H₂O (0.1 Äquiv.), Toluol, 20 °C; MPLC (LiChroprep Si-60, Petroether/Essigester 2:1, Detektion bei 254 nm); farblose Kristalle, Fp = 71–71.5 °C, 53–55% Ausbeute; (S)-**7**: [α]_D²⁵ + 121.6 (c = 0.852, CHCl₃); (R)-**7**: [α]_D²⁵ - 120.9 (c = 0.852, CHCl₃); Enantiomerenverhältnis > 96:4 nach NMR-Analyse mit 8.5 Mol-% (+)-Eu(hfc)₃ und Vergleich mit 71:29-Mischprobe [9]. g) Siehe [2b].

sind jetzt einfach nach Schema 1 aus den entsprechenden Weinsäureestern **4** über die bekannten 2-O-Benzylthreite **5**^[5] zugänglich (drei Stufen, ca. 70% Gesamtausbeute). Der frisch bereitete Aldehyd **3** mit zunächst fruchtartigem Geruch destilliert als farbloses Öl, das beim Stehen sirupös, dann wachsartig fest und geruchlos wird, entsprechend der bei ähnlichen Hydroxyaldehyden bekannten Oligo- und Polymerisation^[6]. Tatsächlich geht **3** in Substanz in ein Gemisch von mindestens zehn Oligo-/Stereoisomeren über: Das ¹³C-NMR-Spektrum einer nach 17 h vermessenen Probe zeigte einen kleinen Peak bei δ = 202.4 (CHO), andererseits im Bereich δ = 60–100 mindestens 32 Signale statt der drei für den monomeren Aldehyd **3** erwarteten.

Wie sieht es mit der für den präparativen Wert entscheidenden Konfigurationsstabilität (C-2) aus? Die rasch eintretende Oligomerisierung [zu (Halb)Acetalen] ließ hoffen, daß die an monomeren Verwandten wie **2** beobachtete Racemisierung unterbunden sein würde. Die Drehwert-Bestimmung von frisch destilliertem (R)-**3** in Ethanol ergab einen Wert von + 21.7 (c = 1.23), der rasch sank (+ 16.1 nach 6 h), dann langsam wieder stieg und nach 19 d konstant bei + 30.3 (± 0.8) verharrte! Von (R)- und (S)-Glycerinaldehyd ist ähnliches Verhalten („Mutarotation“) bekannt^[6].

Kann nun die danach zu vermutende Konfigurationsstabilität im Oligomergemisch von **3** (bezüglich C-2) auch in Folgereaktionen, insbesondere bei CC-Verknüpfungen, bewahrt werden? Wir prüften hierzu die Umsetzungen von **3** zu Pentensäureestern **6**; analoge Horner- oder Wittig-Reaktionen mit **2** führen in E- bzw. Z-selektiver Weise zu populären C₅-Bausteinen^[2b, 7]. Das Horner-Phosphonat-Verfahren lieferte, ausgehend von (R)-**3**, mit Kaliumcarbonat als Base^[8a]

[*] Prof. Dr. V. Jäger, Dipl.-Chem. V. Wehner
Institut für Organische Chemie der Universität
Am Hubland, D-8700 Würzburg

[**] Diese Arbeit wurde vom Fonds der Chemischen Industrie, von der Deutschen Forschungsgemeinschaft sowie von Bayer AG, Wuppertal-Elberfeld, gefördert. Dem Freistaat Bayern danken wir für ein Graduiertenförderungsstipendium (V. W.), den Herren Dr. C. Hubschwerlen (Fa. Hoffmann-La Roche, Basel), Dr. A. Kleemann und Dr. K. Drauz (Degussa AG, Hanau) für Chemikalien sowie Herrn H. Sattler für experimentelle Hilfe.