

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K04639

研究課題名(和文) 分子間重合酵素リアクターによる高効率な生理活性物質の合成技術の開発

研究課題名(英文) Development of efficient synthetic techniques for bioactive compounds using cross-linked enzyme reactors

研究代表者

山口 浩 (Yamaguchi, Hiroshi)

東海大学・阿蘇教養教育センター・准教授

研究者番号：00466236

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、分子間架橋技術により酵素をマイクロビーズ表面へ高濃度に固定化することで、酵素溶液または従来の手法による固定化酵素では成しえなかった、(1)高い触媒活性、(2)反応温度や有機溶媒に対する高い安定性および(3)長時間かつ再利用が可能な酵素リアクターを開発した。この酵素リアクターを利用して、パーキンソン病のプロドラッグであるL-Dopaの効率的な合成法を開発した。また、固定化酵素の利点を活かし、内分泌攪乱物質であるビスフェノール類の効率的な分解反応にも応用した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we prepared enzyme-immobilized microbeads via an enzyme cross-linking reaction. The aggregated enzyme on microbeads (PEGA resins) was based on poly-Lys supported cross-linked enzyme aggregates. Compared with the free enzymes, immobilized enzymes were more stable at high temperatures, in the presence of a chemical denaturant, or in an organic solvent. They were recycled without appreciable loss of activity. Immobilized tyrosinase was applied for L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) synthesis. L-DOPA is used to treat Parkinson's disease. Immobilized tyrosinase catalyzed the conversion of tyrosine to L-DOPA. The result was much better than those reported for batch processes that used tyrosinase immobilized on carrier materials. In addition, immobilized laccase was applied for the degradation of endocrine-disrupting chemicals such as bisphenol A. The degradation efficiency of the immobilized laccase was better than those of conventional bioreactors.

研究分野：ナノマイクロシステム

キーワード：固定化酵素 酵素リアクター PEGA樹脂 酸化酵素

## 1. 研究開始当初の背景

近年、環境調和という観点から、有機化合物合成における反応触媒として酵素の利用が考えられている。しかしながら、酵素はタンパク質であるため、一般にその構造安定性は低い。その為、安定性の高い酵素の自然界からの単離・同定、またはアミノ酸置換による変異体の作製などが行われているが、合成分野で広く利用できる触媒としては、コストや反応の種類などに問題がある。その為、酵素の触媒活性を損なわずに長時間かつ再利用可能な酵素の技術開発は、産業的にも有用と考えられる。

ガラスなどの支持体に化学的に固定化された酵素(固定化酵素)は、(1)高濃度の酵素を反応場に提供できる、(2)反応生成物と酵素の単離が容易である、(3)安定性が向上する、などの特徴を示す。その為、合成化学や分析化学の分野での技術開発が国内外で進められている。しかしながら、一部の安定な酵素を除いて、一般的に固定化の際の化学修飾による酵素分子の立体構造変化は、触媒活性の低下・機能喪失をもたらす為、大きな問題となる。

研究代表者はこれまで、酵素の触媒機能を低下することなく固定化する汎用的な技術開発とその応用研究を行ってきた。具体的には、酵素分子表面のアミノ基を分子間架橋し、膜状に重合体を形成させてテフロンチューブ内壁に固定化する技術である。この固定化技術の汎用性を高めるため、アミノ基を表面にほとんどもたない酸性の酵素とポリリジンとの複合体を重合し、酵素膜として固定化する技術の応用研究を行った。これらの固定化法は従来法とは異なり、種々の酵素を固定化する事が可能である。得られた固定化酵素は、長時間その触媒活性が持続した。また、高温および有機溶媒・変性剤存在下においても、その触媒活性が酵素溶液と比較して向上した。この固定化酵素の示す高い熱安定性と質量分析計との組み合わせにより、迅速なタンパク質の翻訳後修飾部位の解析方法を開発した。加えて、異なる酵素を固定化したマイクロリアクターを連結することで、これまでの酵素溶液反応では不可能と考えられる多段階の酵素反応システムの開発を行い、タンパク質の配列解析の分析分野に応用した。

このように、酵素固定化技術とそれを利用したタンパク質配列分析への有用性が示された。この酵素反応システムは数十 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の基質を1時間で数十 $\mu\text{L}$ 反応処理するため、分析化学に対して適している。しかしながら、有機化合物合成における反応には適用できない。その為、本研究は研究代表者がこれまで研究・開発してきた酵素固定化技術をより発展させ、高効率・高収量な生理活性物質の合成技術の開発を考えるに至った。

## 2. 研究の目的

本研究では、研究代表者がこれまで研究・

開発してきた分子間架橋技術を発展させ、酵素をマイクロビーズ表面へ高濃度に固定化することで、酵素溶液または従来の手法による固定化酵素では成しえなかった、(1)高い触媒活性、(2)反応温度や有機溶媒に対する高い安定性および(3)長時間かつ再利用が可能な酵素リアクターを開発する。この酵素リアクターを利用して生理活性物質の高収率合成を目指し、低コスト・低環境負荷かつ効率の良い生理活性物質の合成技術の開発を目的とした。加えて、固定化酵素の利点を活かし、内分泌攪乱物質であるビスフェノール類の高効率な分解反応への応用も目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 酵素のマイクロビーズ表面への高濃度固定化条件の確立

酵素には市販のチロシナーゼとラッカーゼを利用する。これら酵素の等電点は5付近であり、以前の研究から、酵素の固定化にはポリリジンが必要である。高い酵素重合率と触媒活性を両立する為、酵素濃度、ポリリジンの大きさ(分子量)と濃度および架橋剤であるアルデヒド濃度を検討し、マイクロビーズ表面への高濃度固定化条件を確立した。

マイクロビーズには、アミノ基がビーズ表面に修飾されている PEGA 樹脂を使用した。ビーズ上のアミノ基は、酵素もしくはポリリジンのアミノ基と容易にアミド結合を形成し、ビーズ表面に酵素を固定化できる。この方法では、酵素濃度は支持体表面の修飾基数に依存する為、一般に低い(図1左)。加えて、酵素は支持体へ一点もしくは数点で架橋しているため、自由度が高く、容易に変性し、失活が起きると考えられる。対して、ポリリジンを介した酵素固定化法では、酵素はポリリジンが形成する重合体へ取り込まれた形により、酵素をビーズ表面へ積層することで、高濃度の酵素を固定化できると考える(図1右)。

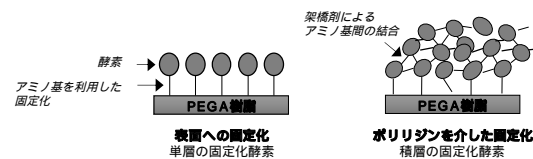


図1: 一般的なビーズ表面への酵素の固定化(左)とポリリジンを介した酵素の固定化(右)の模式図。

### (2) 固定化酵素の性能評価

固定化酵素の性能評価は各酵素の各基質に対して(1)反応処理量、(2)連続使用時間、(3)使用回数、(4)水溶性有機溶媒への耐性を行った。

## 4. 研究成果

### (1) 固定化条件の検討

高い酵素重合率と触媒活性を両立する為、

酵素濃度、ポリリジンの濃度および架橋剤であるアルデヒド濃度を検討した。マイクロビーズには、当初、N-ヒドロキシスクシンイミド (NHS 基) 修飾アガロースビーズを利用した。NHS 基は酵素もしくはポリリジンのアミノ基と容易にアミド結合を形成し、ビーズ表面に酵素を固定化できる。加えて、酵素はポリリジンが形成する重合体へ取り込まれることでビーズ表面へ積層され、高濃度の酵素を固定化できると考えたためである。酵素反応は、少量のビーズを用いてサンプルチューブ内で簡便かつ迅速に行った。その結果、酵素は期待通りに高濃度でアガロースビーズへ固定化できたが、触媒反応により得られた生成物がアガロースビーズに吸着し、回収が困難であった。

その為、次にマイクロビーズとして、アミノ基で修飾された PEGA 樹脂を用いた。その結果、酵素は高濃度で固定化されかつ、反応生成物の吸着も観測されなかった。加えて、40 回以上の繰り返し利用が可能であった。この事は酵素分子の立体構造は損なわれずに、高濃度でかつ自由度が低い酵素重合体が形成されることで、長時間その触媒活性が持続し安定性が増加したと考えられた。また、PEGA 樹脂は有機溶媒中でも使用可能のため、合成応用での反応条件検討に有用な性質と期待された。

最適条件で得られた酵素固定化アガロースビーズはガラスカラムに充填し、酵素リアクターとした。

## (2) 性能評価

### 固定化チロシナーゼによる L-DOPA 合成

L-チロシンを基質として L-DOPA 合成を検討した。図 2 に固定化時の poly-Lys 濃度と各反応 pH における L-DOPA 合成の結果を示す。最適化した固定化条件と反応条件により今回得られた固定化チロシナーゼは、報告されている固定化酵素と同等もしくは高い処理能力を示した。加えて、チロシナーゼにより L-Dopa を基質として生じるキノンがチロシナーゼを失活させたため、還元剤添加の条件検討を行った。加えて、反応温度・pH を検討することで繰り返し合成可能な最適条件を見出した。

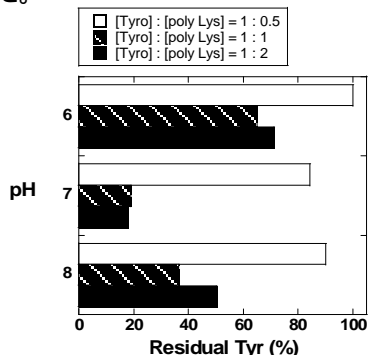


図2:固定化チロシナーゼによる L-DOPA 合成。基質である Tyr の減少率は L-DOPA の合成率を示す。

### 固定化ラッカーゼによるポリカテキン合成と内分泌攪乱物質の分解

(+) カテキンをモノマーとして抗酸化物質であるポリカテキン合成を行った。その結果、ラッカーゼ酵素による酸化反応とモノマー分子の重合反応を分けた多段階反応システムを構築することでポリカテキンが効率よく合成可能であることを見出した。

加えて固定化ラッカーゼの酸化触媒能を内分泌攪乱物質であるビスフェノール類の分解に応用した。種々反応条件を検討することで、報告されている固定化酵素と同等もしくはより高い処理能力を示した。図 3 に各反応 pH における固定化ラッカーゼのビスフェノール A (BA) の分解効率を示す。また、PEAG 樹脂に固定化した酵素は有機溶媒中でもその酵素活性を保持していた。

以上の結果より、アミノ基修飾された PEGA 樹脂は酵素の固定化支持体として有用であり、得られた固定化酵素は産業的にも広く応用可能であると期待された。

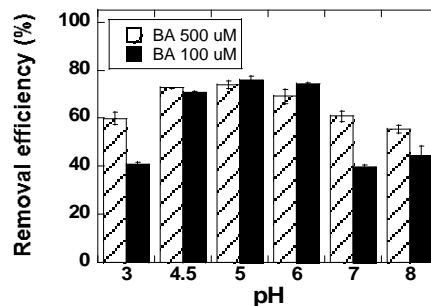


図 3: 固定化ラッカーゼによるビスフェノール A の分解。

5. 主な発表論文等  
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計1件)

H. Yamaguchi, Y. Kiyota, and M. Miyazaki  
“Techniques for preparation of cross-linked enzyme aggregates and their applications in bioconversions”  
*Catalysts*, 査読有, 8巻, 2018年, 174.

〔学会発表〕(計1件)

山口 浩ほか、「PEGA 樹脂上にポリリジンを紹介して固定化した酵素の触媒能と安定性」,  
第90回日本生化学会大会、2017年。

〔図書〕(計1件)

清田雄平、山口 浩、宮崎真佐也、シーエムシー出版、「細胞・生体分子の固定化と機能発現」, 2018年 第10章。

6. 研究組織

(1)研究代表者

山口 浩 (YAMAGUCHI, Hiroshi)

東海大学・阿蘇教養教育センター・准教授  
研究者番号：00466236