

平成 22 年 5 月 20 日現在

研究種目：特定領域研究

研究期間：2005～2009

課題番号：17073015

研究課題名（和文） イオン液体による酵素反応のブレイクスルー

研究課題名（英文） Innovation of an Enzymatic Reaction Using Ionic Liquids

研究代表者

伊藤 敏幸 (ITO TOSHIYUKI)

鳥取大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号：50193503

研究成果の概要（和文）：イオン液体による酵素反応のブレイクスルー

研究成果の概要（英文）： Innovation of an Enzymatic Reaction Using Ionic Liquids

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005 年度	8,100,000	0	8,100,000
2006 年度	8,100,000	0	8,100,000
2007 年度	8,100,000	0	8,100,000
2008 年度	12,600,000	0	12,600,000
2009 年度	11,500,000	0	11,500,000
総計	48,400,000	0	48,400,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：

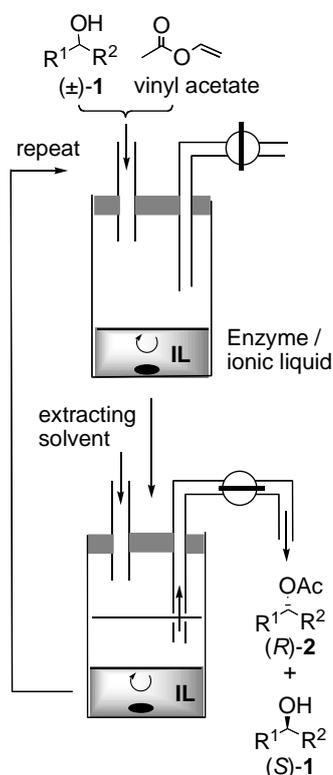
キーワード：イオン液体，リパーゼ，不斉反応，酵素活性化

## 1. 研究開始当初の背景

人類の活動には様々な化学物質が利用され、その合成においては「環境に優しい持続可能な発展を望める化学と化学技術」としてグリーンケミストリー推進が求められている。酵素は再生可能資源であり大気中、室温で機能し、自然界で再生産でき、タンパク質であるために容易に分解される。正に究極のグリーンケミストリー触媒である。

筆者は酵素反応の反応媒体としてイオン液体に着目した。酵素は水溶媒中で化学反応を触媒するというのが生物学的な常識であり、水以外の反応媒体に関しては従来あまり関心が払われてこなかった。ましてや塩であるイオン液体を溶媒に酵素反応を行うというのは常識外れの発想のようであるが、加水分解酵素であるリパーゼがイオン液体中でアルコール類のアシル化反応を触媒することがわかり、さらに、「イオン液体

という反応媒体に酵素を固定化」して再使用する酵素反応システムを構築することができた (Fig.1).



**Fig. 1.** Lipase recyclable use system based on the use of ionic liquids

この研究の過程で、市販のセライト担持リパーゼをジイソプロピリエーテルやヘキサン中に入れておくと数日で完全に酵素活性が消失するが、イオン液体、1-ブチル-2,3-ジメチルイミダゾリウム=テトラフルオロボラート([bdmim][BF<sub>4</sub>])中ではリパーゼが1ヶ月以上完全な活性が保持されることを見いだした。

## 2. 研究の目的

先述の知見を基盤として、酵素反応=水溶媒という常識を打破して、イオン液体という新しい溶媒システムを用いる酵素反応を展開し、イオン液体の機能を使う革新的な酵素反応を実現することを目

的に研究を行った。

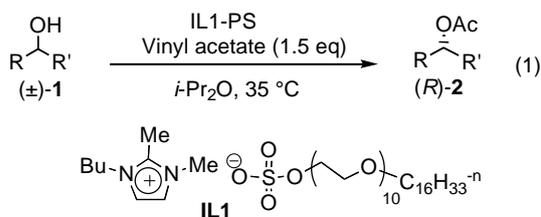
## 3. 研究の方法

イオン液体がリパーゼ反応の溶媒に利用できることがわかったが、どのようなイオン液体でも反応が起こるわけではない。酵素反応に応じてイオン液体を適切にデザインすることが大切である。また、これらの研究の過程でイオン液体を単に酵素反応の溶媒としてのみならず酵素タンパクの活性化試薬に利用できるという手ごかりを得た。そこで、1) イオン液体による酵素活性化、2) イオン液体による酵素反応制御法を検討し、特に酵素活性化能力を持つイオン液体のデザインを行った。

## 4. 研究成果

### 4-1. イオン液体コーティングによる酵素活性化法の開発

イオン液体溶媒中の酵素反応の研究を推進するなかで、リパーゼタンパクが安定に保存できるイオン液体が見つかった。そこで、イオン液体の酵素安定化機能を生かし、酵素の活性化にイオン液体を活用すべく検討した。アルキル PEG とのハイブリッドイオン液体を合成できれば、酵素安定化や活性化のための試薬に利用できると考え、アルキル PEG 官能基を持つイオン液体、アルキル PEG スルホン酸=1-ブチル-2,3-ジメチルイミダゾリウム(IL1)を合成し、リパーゼ PS (*Burkholderia cepacia*) 溶液に IL1 を溶解して凍結乾燥を行い「イオン液体コーティング酵素」(IL1-PS) を調製した。IL1-PS は非水有機溶媒中のアシル化反応 (Eq. 1)において比類のない高活性を示した (Table 1)。



**Table 1.** Results of activation effect by IL1-coating on the lipase PS-catalyzed enantioselective acylation of ( $\pm$ )-**1**

Substrate	Rate <sup>[a]</sup> (upper) and E value (below)		Specific activity <sup>[c]</sup> of IL1-PS vs. PS-C
	Lipase PS	IL1-PS	
 ( $\pm$ )- <b>1b</b>	Rate: 65 E 16	Rate: 1000 E >200	15
 ( $\pm$ )- <b>1c</b>	Rate: 100 E 39	Rate: 9800 E 40	98
 ( $\pm$ )- <b>1d</b>	Rate: 13 E >200	Rate: 14 E >200	1
 ( $\pm$ )- <b>1e</b>	Rate: $1.0 \times 10^{-2}$ E 199	Rate: 11 E >200	1100
 ( $\pm$ )- <b>1f</b>	Rate: $1.2 \times 10^{-2}$ E >200	Rate: 6 E >200	500
 ( $\pm$ )- <b>1g</b>	Rate <sup>[b]</sup> : 52 E >200	Rate <sup>[b]</sup> : 85 E >200	2
 ( $\pm$ )- <b>1h</b>	Rate <sup>[b]</sup> : 32 E >200	Rate <sup>[b]</sup> : 163 E >200	5
 ( $\pm$ )- <b>1i</b>	Rate <sup>[b]</sup> : 7.3 E >200	Rate <sup>[b]</sup> : 133 E >200	18

[a] Rate: mM hr<sup>-1</sup> mg(enzyme)<sup>-1</sup>. Rate was determined by GC analysis. [b] Rate was determined by the data of %conv. because the reaction proceeded slowly. [c] Specific activity was calculated by the rate of IL1-PS divided by that of PS-C.

非水有機溶媒としてジイソプロピルエーテル(*i*-Pr<sub>2</sub>O)を利用し、酢酸ビニルをアシル化剤に用いて各種の第2級アルコールの不斉アシル化を行ったところ、酵素活性はアルキル PEG 構造とイミダゾリウム塩双方の構造に依存し、ポリオキシエチレン(10)セチル硫酸イオンを対アニオンとするイオン液体 **IL1** が最も優れていた。イオン液体コーティング酵素 **IL1-PS** はエナンチオ選択性を保持したまま、市販リパーゼ **PS-C** に較べて数十

倍から 1000 倍の反応加速を示した (Table 1)。IL1-PS は万能ではないが、基質によっては劇的な反応改善効果を示し、潮解性について留意する必要があるが、冷蔵庫で 1 年以上保存しても活性が低下しない。このため、本研究で開発したイオン液体コーティング酵素は、現在、東京化成工業から市販されている。

次に、イオン液体とアミノ酸のシナジー効果による活性化を見いだした。市販リパーゼ **PS** は精製処理工程で安定化のためにグリシンを添加して凍結乾燥処理を行っている。添加したアミノ酸の違いでリパーゼ **PS** のエナンチオ選択性をチューニングできると考え、グリシンを除いた純粋な酵素タンパク溶液に、改めてグリシン、L-フェニルアラニン(L-Phe)、L-プロリン(L-Pro)を加えて凍結乾燥してアミノ酸コーティングリパーゼ **PS** を調製し、同時に **IL1** も同時に加えてコーティング処理した酵素も調製し活性を調べた。その結果、アミノ酸のみでコーティングした場合、エナンチオ選択性は変化するが反応速度は変化しないことがわかり、一方、アミノ酸とイオン液体を組み合わせで酵素タンパクをコーティングすると顕著な反応加速がおこるを見いだした。特にプロリンと **IL1** の組み合わせで高活性の酵素が得られたため、L-プロリンから誘導したピロリジニウムメチル基を持つキラルイミダゾリウム塩の合成を行い、モデル基質にラセミ体( $\pm$ )-**1b** を用いてアシル化を行い、酵素活性を調べた (Eq.2)。L-ProH, L-ProMe, D-ProH, D-ProMe などのキラルイオン液体でコーティングしたリパーゼ **PS** は **IL1** コーティングのみ、あるいはアミノ酸と **IL1** を混合してコーティングするよりもさらに高い活性を示し、極めて興味深いことに非天然 D-プロリン由来の



我々は Grignard 試薬の反応に適したホスホニウム塩イオン液体(TU-P1)の合成に成功している (TU-P1 も東京化成工業から市販中). このホスホニウムイオン液体はメトキシエチル側鎖を持つイオン液体である. TU-P1 溶媒中でイオン液体コーティング酵素 IL1-PS によるアシル化反応を試みたところ, エナンチオ選択性に影響を及ぼすことなく, 顕著な反応加速が観察された(Fig.3). 最も良い結果が得られたホスホニウム塩 TU-P1 を溶媒に使用し, イオン液体コーティング酵素 IL1-PS のリサイクル使用を試みたところ, 既存有機溶媒中で最も反応が速いジイソプロピルエーテル(*i*-Pr<sub>2</sub>O)を凌駕する速度でエナンチオ選択的アシル化が進行し, しかも初期性能をほぼ保持したまま 10 回酵素を再使用することができた.

酵素反応の場合は反応を繰り返してもイオン液体が全く劣化しないという利点がある. そこで, 反応終了後に洗浄してイオン液体の再使用を繰り返してきた. 繰り返し使用して 10 年になるイオン液体を現在も使用している. このような溶媒は従来存在しなかった. イオン液体の高いサステナブル性を示している. 本研究により, リパーゼのアシル化反応を行う場合, イオン液体は多くの点で従来の有機溶媒より優れた結果を与えることを明らかにすることができたと思われる.

筆者の研究室ではイオン液体コーティング酵素を gem-ジフルオロシクロプロパンの光学分割, 軸不斉ピアリアル誘導体, フッ素化アリルアルコールなど様々な化合物の光学分割に活用してきた. また, これらの研究の過程で様々なイオン液体を合成し, 酵素反応以外の鉄触媒反応, パラジウム触媒反応の溶媒としても

利用してきた. さらに, A03 班の南らと共同研究でイオン液体を高機能潤滑油として使用するための研究を実施し, ホスホニウム塩イオン液体が潤滑油として優れた性質を持つことも明らかにしている.

#### 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 39 件)

- 1) イオン液体を反応媒体とする酵素反応の新展開, 伊藤敏幸, 有機合成化学協会誌, 査読有, **2009**, 67, 143-155.
- 2) Design of Alkylsulfate Ionic Liquids for Lubricants, Itoh, T.; Watanabe, N.; Inada K.; Ishioka, A.; Hayase, S.; Kawatsura, M.; Minami, I.; Mori, S. *Chem. Lett.* 査読有, **2009**, 38(1), 64-65.
- 3) Remarkable Activation of an Enzyme by (*R*)-Pyrrolidine-substituted Imidazolium Alkyl PEG Sulfate, Abe, Y.; Hirakawa, T.; Nakajima, S.; Okano, N.; Hayase, S.; Kawatsura, M.; Hirose, Y.; Itoh, T. *Adv. Synth. Catal.* 査読有, **2008**, 350, 1954-1958.
- 4) Linker-oriented Design of Binaphthol Derivatives for Optical Resolution Using Lipase-catalyzed Reaction, Taniguchi, T.; Fukuba, T.; Nakatsuka, S.; Hayase, S.; Kawatsura, M.; Uno, H.; Itoh, T. *J. Org. Chem.* 査読有, **2008**, 73, 3875-3884.
- 5) Design of Phosphonium Ionic liquids for Lipase-Catalyzed Transesterification, Abe, Y.; Kude, K.; Hayase, S.; Kawatsura, M.; Tsunashima, K.; Itoh, T. *J. Mol. Catalysis B: Enzymatic*, 査読有, **2008**, 51, 81-85.
- 6) Design of Ionic Liquids as Reaction Media for the Grignard Reaction, Itoh, T.; Kude,

K.; Hayase, S.; Kawatsura, M., *Tetrahedron Lett.* 査読有, **2007**, *48*, 7774-7777.

- 7) Remarkable Acceleration of Lipase-Catalyzed Transesterification Using an Imizadolium PEG-alkyl Sulfate Ionic Liquid, Itoh, T.; Matsushita, Y.; Abe, Y.; Han, S-H.; Wada, S.; Hayase, S.; Kawatsura, M.; Takai, S.; Morimoto, M.; Hirose, Y. *Chem. Eur. J.* 査読有, **2006**, *12*, 9228-9237. 以下 **32** 編省略

[学会発表] (計 50 件) 国際学会の招待講演, 口頭発表 29 件, 国内学会の招待講演, 依頼講演 21 件.

- 1) 化学的に制御された生体触媒反応による環境調和型有機合成反応の開発, 伊藤敏幸, 日本化学会第 90 春季年会, 特別企画講演, 4SA-05, 近畿大学 [大阪], 2010 年 3 月 26 日-29 日.
- 2) 酵素反応と化学反応の協調による環境調和型有機合成の展開, 伊藤敏幸, 有機合成化学協会・協会賞受賞講演会、如水会館 (東京), 2010 年 2 月 19 日, 受賞講演 2009 年 2 月 5 日. (招待講演)
- 3) Ionic Liquid Type Activating Agent for Enzymes, Itoh, T.; Abe, Y.; Hirakawa, T.; Okano, N.; Hayase, S.; Kawatsura, M. 3<sup>rd</sup> Congress on Ionic Liquid Chemistry, Cairns, Australia, May 31-June 5, **2009** (招待講演) 以下 **47** 件省略

[図書] (計 10 件) 英文 5 編, 和文 5 編

- 1) イオン液体による酵素反応の新展開, 伊藤敏幸, 酵素開発・利用の最新技術～基礎・解析から改変・高機能化・産業利用まで, 監修: 小宮山 真, 編集: 秋吉一成, 中村 聡, 中山 亨, 津本浩平, 株式会社エヌ・ティー・エス, 東京, pp.146-153 (**2010**). ISBN 4-88231-557-2

2) Biotransformation in ionic liquid, Itoh, T. "Future Directions in Biocatalysis" Ed. T. Matsuda, Elsevier Bioscience, The Netherlands, Chapter 1, pp. 3-20 (**2007**). ISBN 978-0-444-53059-2.

3) イオン液体-常識を覆す不思議な塩-, 北爪智哉, 淵上寿雄, 沢田英夫, 伊藤敏幸, コロナ社, 東京 (**2005**), pp. 32-77. ISBN 4-339-06607-9. 以下 **7** 編省略

[産業財産権]

○出願状況 (計 10 件)

- 1) 「フルオロアルキル硫酸アニオンを含有する疎水性を示すイオン性液体」, 発明者: 伊藤敏幸, 立花正満, 古谷浩行, 出願人: 株式会社 カネカ (代表者 武田正利), 特願 2005-005027 . 以下 **9** 件省略

[その他]

ホームページ等

研究室ホームページ:  
<http://www.chem.tottori-u.ac.jp/~itoh/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤敏幸 (ITO TOSHIYUKI)

鳥取大学大学院・工学研究科・教授  
研究者番号: 50193503

(2) 研究分担者

川面 基 (KAWATSURA MOTOI)

鳥取大学大学院・工学研究科・准教授  
研究者番号: 50360243

早瀬修一 (HAYASE SHUICHI)

鳥取大学大学院・工学研究科・助教  
研究者番号: 50238143

和泉好計 (IZUMI YOSHIKAZU)

鳥取大学・工学研究科・教授  
研究者番号: 40026555

[平成 17～20 年度]

(3) 連携研究者