

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 1 日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2008～2011

課題番号：20245032

研究課題名（和文）異分野融合によるフッ素資源循環型システムの構築

研究課題名（英文）The construction for recycle of fluorine resource with the complex method

研究代表者

北爪 智哉（KITAZUME TOMOYA）

東京工業大学・大学院生命理工学研究科・教授

研究者番号：30092547

研究成果の概要（和文）：

フッ素系物質をフッ化物イオンへと分解可能な菌体を見だし、分解の計時変化を検討した。ATP、L-メチオニンを出発物質とし、MetK、フルオリナーゼ、MtnN 酵素類とフッ化物イオンを用いて、one-pot 反応を行い 5-FDR を創製するための最適化条件を見いだした。各種のフッ素系物質を菌体で分解し生成したフッ化物イオンを利用した系でも 5-FDR を生成可能な系を確立した。また、BTF の分解により生成したフッ化物イオンをフッ化カルシウムとして回収するシステムも確立した。

研究成果の概要（英文）：

We have found the isolation of bacterial strains capable of degrading fluorinated materials, 8 strains of Actinobacteria exhibited degradability of ethyl difluoroacetate (DFAc) was accumulated by bacteria, giving difluoroacetic acid and then fluoride ion. Further, 13 strains of Actinobacteria exhibited degradability of fluorobenzene and/or benzotrifluoride. In batch culture, growth of strains on fluorinated materials led to the release of fluoride ion. We have established the one-pot three-step continuous enzymatic synthesis of 5-fluoro-5-deoxy- D-ribose (5-FDR) from ATP and L-methionine using S-adenosyl-L-methionine synthase (MetK), fluorinase and methylthioadenosinenucleosidase (MtnN) in the presence of fluoride ion. Especially, for the purpose of the sustainable development of fluorine chemistry, we have established the reuse of fluoride ion generated from BF_4 ionic liquids and/or the biodegradation of BTF in the one-pot synthetic process to 5-FDR. Further, we have established the retransformation of fluoride ion generated from biodegradation of BTF to calcium fluoride.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	16,200,000	4,860,000	21,060,000
2009 年度	7,300,000	2,190,000	9,490,000
2010 年度	7,300,000	2,190,000	9,490,000
2011 年度	7,300,000	2,190,000	9,490,000
年度			
総計	38,100,000	11,430,000	49,530,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・環境関連化学

キーワード：酵素反応、5'-FDA、5-FDR、連続反応、資源循環、フッ素系物質、循環システム

1. 研究開始当初の背景

(1) フッ素科学の領域では、フッ素資源の循環という立場からの研究は行われてい

なかった。フッ素を分子内に導入可能な酵素としては、フルオリナーゼが報告されていたが、フルオリナーゼを利用する合成化学的な研究に

についても報告されていなかった。また、フッ素系物質を分解可能な菌体については、モノフルオロ化合物の分解菌を除いては報告されておらず、どのようなフッ素系物質がどのような種の菌体により分解可能であるのかという事柄については知られていなかった。

(2) 菌体の分解によってフッ化物イオンが生成することについても知られていなかったので、大量生産されているフッ素系物質を菌体により分解し、生成すると考えられるフッ化物イオンを再度フッ素資源として再利用するという研究は行われていなかった。大量生産されているフッ素系物質を再度フッ素源として利用し、フッ素系有用物質を創製するという研究は行われていなかった。

2. 研究の目的

(1) 有機化学の一端として発展してきたフッ素科学の分野に異分野技術であるバイオテクノロジーの技術を取り入れ、生物有機化学の立場からフッ素系物質を眺め異分野融合技術を駆使して、フッ素科学の分野に新しい領域を開拓する。

(2) フッ素系物質を分解可能な菌体を探索し、効率良くフッ化物イオンを生成する系を構築する。

(3) 分解により生成するフッ化物イオンを酵素フルオリナーゼを利用して分子内にフッ素原子を挿入するための系を構築するため、酵素により認識される原料を効率よく創製する酵素系を構築し、二段階酵素法によるフッ素系物質の創製を one-pot で行うための系を構築する。

(4) 二段階酵素法により創製させたフッ素系物質を有用なフッ素系合成中間体へと変換するための酵素法を開発する。菌体によるフッ素系物質の分解、生成したフッ化物イオンの酵素フルオリナーゼによるフッ素原子の組み込みを経て、最終的には三段階連続酵素法を one-pot で行うフッ素系合成中間体創製法を構築し、フッ素資源循環システムを構築する。

3. 研究の方法

(1) フッ素系物質を分解可能な菌体、特に放線菌を中心に菌体を探索する

(2) フッ素系物質が菌体により分解されて生成するフッ化物イオンを再利用し、酵素フルオリナーゼによる 5'-FDA の創製条件を検討する。

(3) 5'-FDA の原料である高価な SAM を ATP と L-メチオニンから創製可能な酵素

系を構築し、酵素フルオリナーゼを活用する系と融合させ、one-pot で ATP と L-メチオニンから 5'-FDA を創製する系を検討する。

(4) 5'-FDA から合成中間体として有用と期待される 5-FDR を生成する酵素系を確立し、三段階酵素法を one-pot で行う系を構築する。

(5) フッ素系物質を菌体で分解し、生成するフッ化物イオンをフッ素源とする フッ素資源循環システムを構築し、合成中間体として有用な物質を創製する

4. 研究成果

(1) フッ素系物質を分解可能ないくつかの菌体を見いだした。特に、菌体 (065240 株) は分解能が優れており、フルオロベンゼン (FB)、ベンゾトリフルオリド (BTF) や多フッ素化合物の分解も可能であることを見いだした。

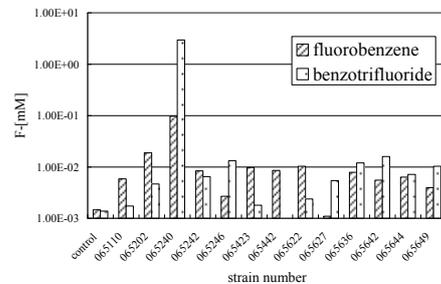


Fig.1 Biodegradation of fluorobenzene or benzotrifluoride by bacteria

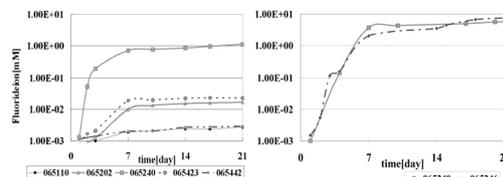
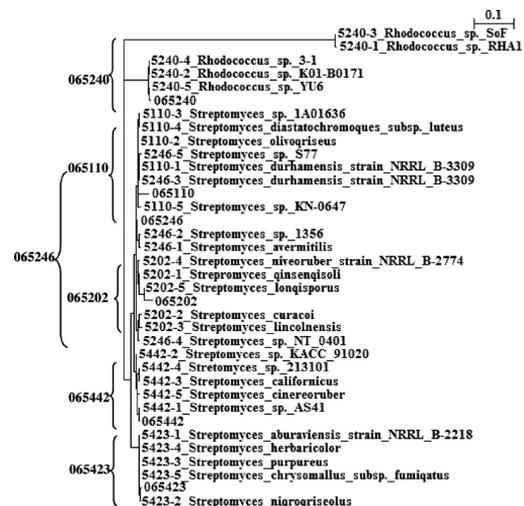


Fig.2 Time course of F⁻ concentration [FB] [BTF]

(2) 菌体 (065240 株) がどのような種の菌体に属するのかを決定するための検討を行い、菌体



は *Rhodococcus* sp. であることを明らかにした。

(3) フッ素系物質の分解により生成したフッ化物イオンを活用し、菌体 *S. cattleya* NBRC14057 を用いて物質 SAM へのフッ素化が進行することを確認するための反応を行った。まず、フッ素系物質を *Rhodococcus* sp. で分解し、フッ化物イオンを含む上澄み液を菌体 *S. cattleya* NBRC14057 の培養液に添加することにより、5'-FDA を創製するフッ素化反応を経て最終生成物である 4-フルオロトレオニンを生産することを確認した。フッ素系イオン液体の分解により生成したフッ化物イオンを利用した系においても酵素フルオリナーゼにより 5'-FDA を効率良く創製可能であることを見いだした。

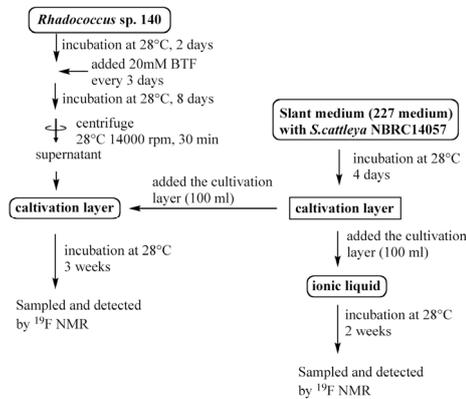
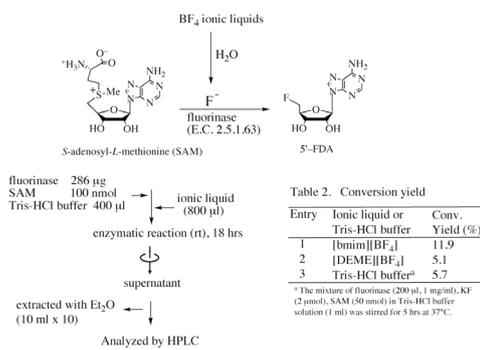


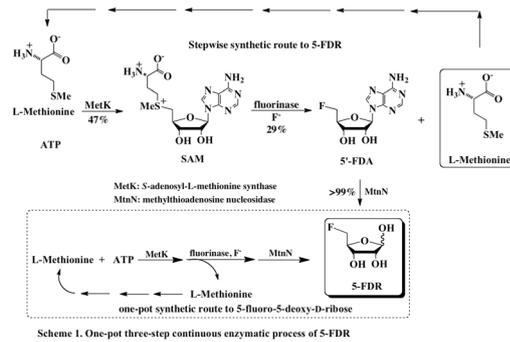
Figure 1. The recycle of fluorine resource generated from BTF and/or ionic liquid with *Streptomyces cattleya* NBRC14057.



Scheme 1. Recycle of fluorine resource exploiting fluorinase

(4) ATP、L-メチオニンを出発物質とし、MetK、フルオリナーゼ、MtnN 酵素類とフッ化物イオンを用いて、図示したようなプライマーを駆使したのち、one-pot 反応を行い ATP から変換効率 20%以上で 5-FDR を創製する条件を見いだした。

さらに、5'-FDA 創製における KF と L-メチオニンの量比について検討し、表 2 の結果を得ている。

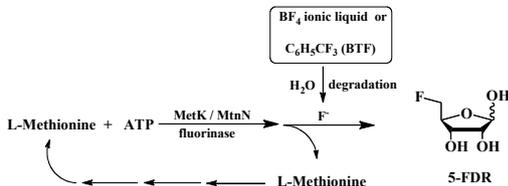


Scheme 1. One-pot three-step continuous enzymatic process of 5-FDR

各種のフッ素系物質を菌体などで分解し生成したフッ化物イオンを利用した系でも 5-FDR を変換効率 10% 以上で生成可能な系を確立した結果を表 3 に示した。

Primer name	Sequence (5' to 3')	Comment
metK-His f	ata tta cat atg gca aac cac ctt ttg ac	including NdeI site
metK r	gcc atg gaa ttc gag ctc gtt act tea ga	including EcoR I site
mtnN f	agt aaa cat atg aaa atc gcc	including NdeI site
mtnN	gac agg tgc acc agc gcc ctg a	including Sall site
T7	taa tac gac tca cta tag gg	for sequence
RV	cag gaa aca gct atg ac	for sequence
metK414	tat cac cta tgc aca ccg tc	for sequence

L-Met conc. (mM)	KF conc. (mM)					
	0.1	0.316	1	3.16	10	31.6
0.032	0	0.014	0.039	0.054	0.035	0.025
0.1	0.018	0.041	0.071	0.086	0.052	0.030
0.316	0.032	0.052	0.069	0.084	0.056	0.034
1	0.031	0.010	0.024	0.036	0.055	0.029
3.16	0.028	0.003	0.007	0.014	0.026	0.025



Scheme 2. One-pot synthesis of 5-FDR exploiting BF₄ ionic liquid or BTF

Ionic liquid or BTF	Conversion yield (%) ^a
[emim][BF ₄]	10.2
[bmim][BF ₄]	4.6
[hexylmim][BF ₄]	3.1
BTF	12.7

^a Yield from ATP

(5) ベンゾトリフルオリド(BTF)を見いだした菌体 *Rhodococcus* sp. で分解した時の分解曲線を図に示したが、途中で塩化カルシウムを系に添加することにより生成したフッ化物イオンはフッ化カルシウムへと変換されることを見いだした。さらに、使用する塩化カルシウムの量と生成するフッ化カルシウムとの関係についても検討し、生成したフッ化物イオンを 60%以上の収率で回収するシステムを確立した。

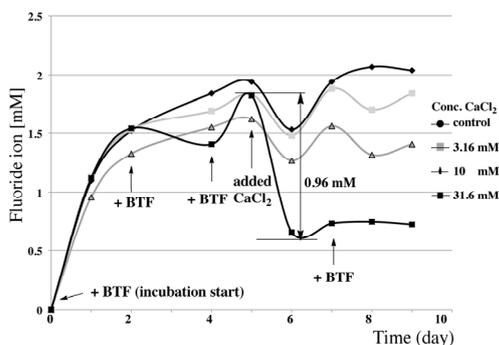


Figure 1. The time course for the retransformation of fluoride ion after adding calcium chloride

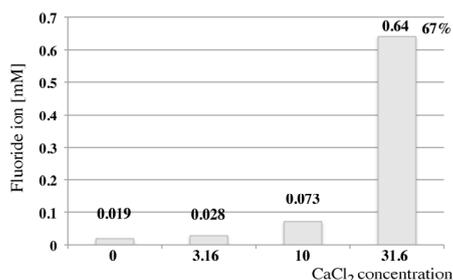


Figure 2. The concentration of fluoride ion based on the calcium fluoride generated from the different amounts of calcium chloride

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線)

[雑誌論文] (計 11 件)

1. Retransformation of fluoride ion generated from the biodegradation of benzotrifluoride to calcium fluoride N. Iwai, Y. Watanabe, T. Kitazume
J. Fluorine Chem., **2012**, *135*, 350-353. (有)
2. One-pot three-step continuous enzymatic synthesis of 5-fluoro-5-deoxy-D-ribose N. Iwai, Y. Kitahara, T. Kitazume
J. Mol. Catal. B: Enzymatic **2011**, *73*, 1-4. (有)
3. Synthesis and antibacterial activity of alaremycin derivatives for the p porphobilinogen synthase N. Iwai, K. Nakayama, J. Oku, T. Kitazume
Bioorg. Med. Chem. Lett. **2011**, *21*(10), 2812-2815. (有)
4. Antibacterial activities of imidazolium, pyrrolidinium and piperidinium salts N. Iwai, K. Nakayama, T. Kitazume
Bioorg. Med. Chem. Lett. **2011**, *21*(6), 1728-1730. (有)
5. Synthesis of an advanced intermediate toward the hNK-1 antagonist with the cyclopentane core K. Nakata, Y. Kiyotsuka, T. Kitazume, Y. Kobayashi
Synlett, **2011**, (19) 2872-2874. (有)
6. Enzymatic fluorination using fluoride ion generated from degradation of fluorinated materials N. Iwai, Y. Tsuboki, M. Kitazume, T. Kitazume

J. Fluorine Chem. **2010**, *131*, 369-372. (有)

7. Screening of fluorinated materials degrading microbes N. Iwai, R. Sakai, S. Tsuchida, M. Kitazume, T. Kitazume
J. Fluorine Chem. **2009**, *130* (4), 434-437. (有)
 8. Utility of ionic liquid for improvement of fluorination reaction with immobilized fluorinase N. Iwai, T. Tanaka, T. Kitazume
J. Mol. Catal. B: Enzymatic **2009**, *59*(1-3), 131-133. (有)
 9. Utility of ionic liquid for *Geotrichum candidum*-catalyzed synthesis of optically active alcohols T. Tanaka, N. Iwai, T. Matsuda, T. Kitazume
J. Mol. Catal. B: Enzymatic **2009**, *57*, 317-320. (有)
 10. EPR study of rotational diffusion in viscous ionic liquids: Analysis by a fractional Stokes-Einstein-Debye Law Y. Miyake, T. Hidemori, N. Arai, A. Kawai, K. Shibuya, S. Koguchi, T. Kitazume
Chem. Lett. **2009**, *38*(2), 124-125.
 11. Realization of anti-S_N2' selective allylation of 4-cyclopentene-1,3-diol monoester with aryl- and alkenyl reagents K. Nakata, Y. Kiyotsuka, T. Kitazume, Y. Kobayashi
Org. Lett. **2008**, *10* (7), 1345-1348.
- [学会発表] (計 9 件)
1. 岩井伯隆、奥 純平、藤原綾奈、松尾智彰、中山恭佑、北爪智哉
ポルホビリノーゲン合成阻害剤としてのアラレマイシン類縁体
日本農芸化学会、3月26-28日(2011)、京都
 2. 矢野憲一、岩井伯隆、北爪智哉
*Rhodococcus*属細菌によるフッ素化合物の生分解
日本分子生物学会、12月7-10日(2010)、神戸
 3. 岩井伯隆、太田 敬、鈴木武蔵、北爪智哉
部位特異的変異導入によるリパーゼのフッ素認識能の解析
日本分子生物学会、12月7-10日(2010)、神戸
 4. 渡辺洋介、岩井伯隆、北爪智哉
生物機能 を利用したフッ素資源回収プロセスの構築
第34回フッ素化学討論会、10月18日(2010)、札幌
 5. 奥 純平、岩井伯隆、北爪智哉
Porphobilinogen Synthase 阻害剤の

設計と合成

第34回フッ素化学討論会、10月18日
(2010)、札幌

6. 太田 敬、岩井伯隆、北爪智哉
組換え体 *Candida rugosa* Lipase 1 によるフッ素の認識
第33回フッ素化学討論会、10月20日
(2009)、東京
7. 岩井伯隆、太田 敬、鈴木武蔵、北爪智哉
組換え発現系を用いた、改変型リパーゼの評価系構築と光学分割への応用
第31回日本分子生物学会、
12月8-12日(2008)、神戸
8. 田中孝昌、北爪智哉、岩井伯隆
固定化フルオリナーゼの活性向上とイオン液体の効果
第32回フッ素化学討論会、11月18日、
(2008)、名古屋
9. 北爪智哉、岩井伯隆、北爪麻己、土田紗規子、坪木悠斗、明石哲樹
異分野技術の融合による フッ素資源循環型フッ素資源循環型システムへの挑戦
第32回フッ素化学討論会、11月17日
(2008)、名古屋

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北爪 智哉 (KITAZUME TOMOYA)
東京工業大学・大学院生命理工学
研究科・教授
研究者番号：30092547

(3) 連携研究者

岩井 伯隆 (IWAI NORITAKA)
東京工業大学・大学院生命理工学
研究科・助教
研究者番号：80376938