

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23510275

研究課題名(和文) 微小電力を駆動力とした微生物酵素によるアゾ分解反応系の開発

研究課題名(英文) Development of the reduction system of azo dyes by microbial enzymes using micro power as a driving force

研究代表者

木島 龍朗(Kijima, Tatsuro)

山形大学・理工学研究科・准教授

研究者番号：50272084

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：『電極における補酵素再生システムを有するアゾ分解酵素反応系の開発』を行うために、補酵素であるNADにフェロセンを分子導入したフェロセン修飾NADを合成し、得られた修飾補酵素は、少なくとも4つのNAD依存性酵素に対して活性であり、基質に対する立体障害や阻害効果は認められないことを明らかにした。残念ながら、得られたフェロセン修飾NADは、高い電極活性を示さなかったが、新たに2酵素カップリングによるアゾ分解反応は、カップリングさせる酵素を変えることで、色の変化でわかる新規バイオセンサーに応用展開できることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Development of the coenzyme regeneration system for reduction of azo dyes by azoreductase on the electrode, NAD modified by ferrocene moiety was synthesized and was active for four other NAD needed enzymes without inhibitions. Unfortunately, obtained ferrocene modified NAD was indicated low electrode activity. It was found that the coenzyme regeneration system for reduction of azo dyes by azoreductase with coupling to another reductase were promising for new biosensor of dramatic color change.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子化学・ケミカルバイオロジー

キーワード：フェロセン修飾補酵素 NAD アゾ還元酵素 フェロセン 補酵素再生系

1. 研究開始当初の背景

アゾ化合物 (アゾ基 (-N=N-)) を持つ合成色素の総称) は製造が容易で安定なことから、印刷、染色、着色料、化粧品など様々な用途で大量に使用されている。だが、その高い安定性のために一度環境中に放出されると自然界の浄化作用では容易に分解されずに環境汚染を引き起こすことが報告されている。中には、遺伝子変異を引き起こすなどの有害性があるものも数多く存在することが知られている。このような環境汚染物質を浄化する技術開発が急務となっている中、微生物の酵素を利用した浄化システムは、化学的浄化システムと比較して低コストかつマイルドな条件下で安全に環境汚染物質を分解できることから現在、最も注目を浴びている。

アゾ化合物を分解する酵素は、「アゾ還元酵素: アゾリダクターゼ」と呼ばれ、連携研究者である北海道大学の井原らは、『*Bacillus* sp. B29 株 (バチルス菌) 由来のアゾ還元酵素は、耐熱性を有し (70 まで安定)、pH6.0~9.0 の範囲で安定で発色団のアゾ結合を効率よく分解してアミノ化合物に変換する』と報告している。通常、アゾ還元酵素は、微生物細胞内にあり、中に取り込んだアゾ化合物のアゾ結合を還元して分解するため、色素自体や分解アミンが細胞毒性を持つ場合があり、微生物自身が不安定になって寿命が短い、アゾ化合物に対する細胞の膜透過性が良くないなど問題点も多い。しかし酵素分解反応に必要な補酵素: NADH は高価なために、一度反応に用いられて、酸化体となった NAD⁺ は、還元体: NADH にリサイクルして利用するのが必須条件である。

そこで、本研究では電極を利用して NAD⁺ を NADH に再生する方法によりリサイクルする技術を提案した。通常、NAD⁺ は電極で直接電気化学的に還元を行っても二量体となり、酵素活性な NADH は得られないが、我々は、NAD⁺ にフェロセンを化学修飾して結合させたフェロセン修飾 NAD⁺ が、電極にて二量体化することなく酵素活性な還元体になることを報告している。従って、これらを組み合わせることで「電極を用いた補酵素再生系による細胞外でのアゾ分解反応」が期待できると考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、『微小電力を用いて酵素反応を動かすアゾ色素分解系の開発』である。微生物由来のアゾ還元酵素は細胞外に取出しても反応を触媒するが、細胞内では自動供給される補酵素: NADH が無いため、人為的に外部から与える必要がある。今回我々は、フェロセンを化学修飾したフェロセン修飾 NAD⁺ を用いて、電極での補酵素再生 (酸化体: NAD⁺ → 還元体: NADH) と酵素反応とをカップリングさせる「エネルギーを電力で供給する補酵素再生系による微生物細胞外でのアゾ分解反応系」を構築する。

3. 研究の方法

本研究は、微生物による分解反応全体の中から酵素反応の部分に焦点を絞り『電極における補酵素再生システムを有するアゾ分解酵素反応系の開発』をめざす。具体的には、「フェロセン修飾補酵素の合成」、「補酵素再生系を有するアゾ分解反応系の最適化」と「酵素電極の作製」をおこない、酵素単体での電極における補酵素作用機構を明らかにする。アゾ還元酵素の培養・精製と遺伝子工学的手法を用いる細胞表面への酵素発現 (表面提示菌体の作製) 検討は、連携研究者 (北海道大学: 大井俊彦准教授) が担当し、本研究において、「電力駆動型の微生物反応系」の可能性を明らかにする。

4. 研究成果

本研究では下図1のような『電極における補酵素再生システムを有するアゾ分解酵素反応系の開発』を目的として (1) フェロセン修飾補酵素の合成 (2) 修飾補酵素の活性評価 (3) 補酵素再生系を有するアゾ分解反応系の最適化の検討を行った。

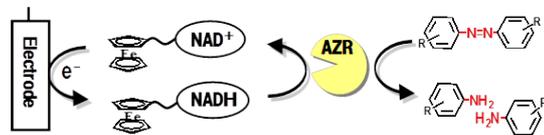


図1 電極における補酵素再生システムの原理

(1) フェロセン修飾補酵素の合成

フェロセン修飾補酵素は、NAD⁺ のアデニン環 N6 位にフェロセンを一炭素鎖で導入、三炭素鎖で導入、四炭素鎖で導入した2つの誘導体の計4タイプの合成に成功した。(一炭素鎖タイプの合成例を図2に示す)

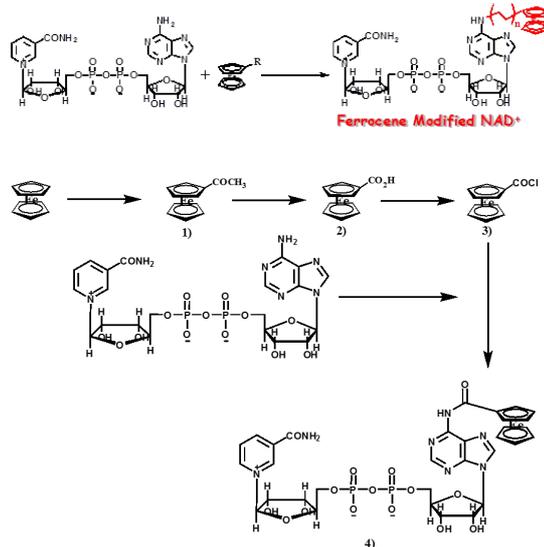


図2 一炭素鎖タイプのフェロセン修飾 NAD⁺ の合成経路

(2) 修飾補酵素の活性評価

得られた修飾補酵素は、NAD 依存性酵素の

アルコール脱水素酵素：ADH，乳酸脱水素酵素：LDH，グルコース脱水素酵素：G-6-PDH，アゾ還元酵素：AZRにて、それぞれの酵素反応での補酵素活性（340nmにおける修飾NADHの生成を示す吸光度増大）を調査し、フェロセン導入後も大きな活性の低下や酵素活性部位における立体障害、阻害効果が認められないことを明らかにした。

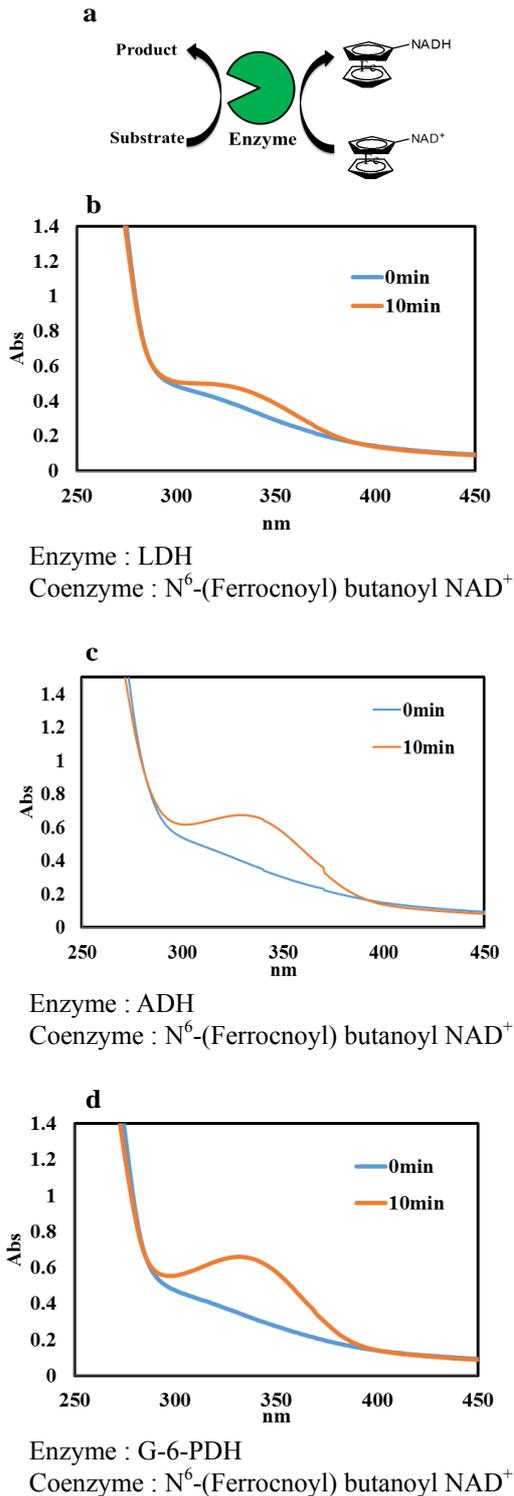


図3 NAD依存性酵素を用いた修飾補酵素の活性評価(a. 反応図 ,b. LDH ,c. ADH , d. G-6-PDH)

(3) 補酵素再生系を有するアゾ分解反応系の最適化

二酵素による補酵素再生系の検討

修飾補酵素（一炭素鎖および三炭素鎖）を用いた二酵素による補酵素再生系を用いてアゾ分解反応系の検討を行った結果を図4に示す。アルコール脱水素酵素：ADHを補酵素再生用酵素とし、アゾ還元酵素：AZRとカップリングさせたアゾ分解反応系を行い、メチルレッドの色素分解を検討した。

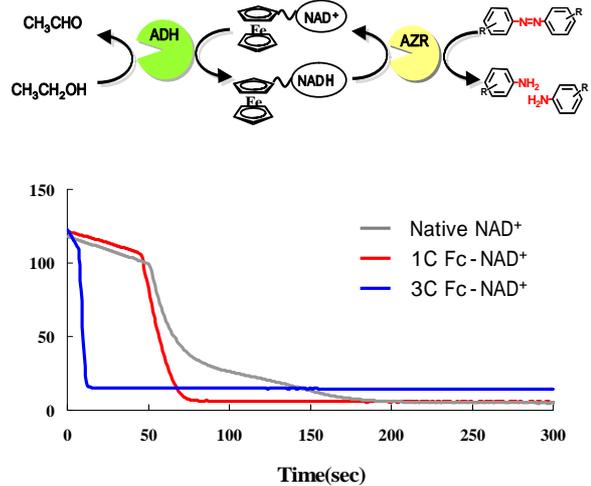
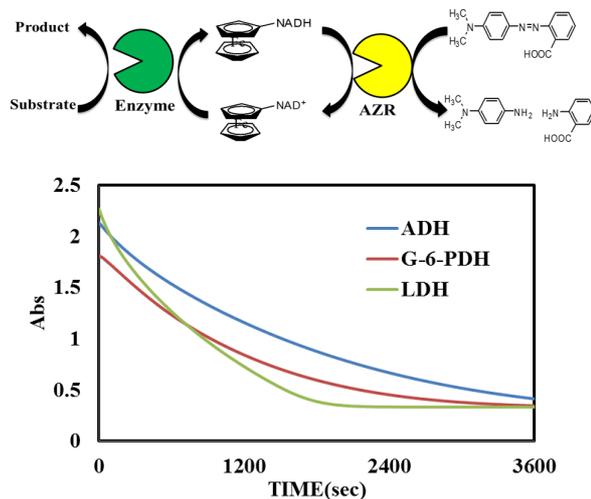


図4 ADH-AZRを用いたアゾ分解反応系での修飾補酵素による補酵素再生系の検討

基質であるエタノールを添加することで、アゾ色素の分解が進行し、酵素反応および補酵素の再生がスムーズに進行していることが確認された。特に三炭素鎖でフェロセンを導入した修飾補酵素を用いた場合に、NativeのNADを上回る速度で反応の進行が確認された。



Enzyme : ADH, LDH, G-6-PDH
Coenzyme : N⁶-(Ferrocenyl) butanoyl NAD⁺

図5 二酵素による補酵素再生系を用いたアゾ分解反応系の検討

また、このアゾ分解反応は、ADH 以外に LDH や G-6-PDH などの酵素に変えても、反応の進行が確認され、今回合成に成功したフェロセン修飾補酵素は、多くの NAD 依存性酵素を用いた反応系に応用できることが示唆された。

電極を用いた補酵素再生系の検討

これらの結果を踏まえて、電極を用いた補酵素再生系によるアゾ分解反応系の検討を行った。Pt 電極を用いて、フリーの AZR および 4 タイプのフェロセン修飾補酵素にて、メチルレッドの分解検討を行った。しかし、どの修飾補酵素においても反応の進行を確認することは出来なかった。

そこで固定化酵素電極として検討を行うために、新たにフェロセン誘導体と NAD⁺ をアリルアミンモノマーに結合させ、カーボン電極に重合固定化することで新規に固定化（ポリアリルアミン/フェロセン/NAD⁺）電極を得た。フリー酵素での検討と同様にアゾ還元酵素によるメチルレッドの分解検討を行ったが、反応の進行を確認することは出来なかった。

<今後の展望>

以上、現段階で本研究目的の『電極を用いた補酵素再生系』は未だ構築できていないが、Neutral Red などの新たなメディエーターとの組み合わせによる検討を続けていきたいと考えている。

一方、本研究の検討過程において得られた二酵素カップリングによるアゾ分解反応系は、NAD 依存性酵素とのカップリングにより色の变化でわかる新規なバイオセンサーに応用展開できることが明らかとなった（図 6）。

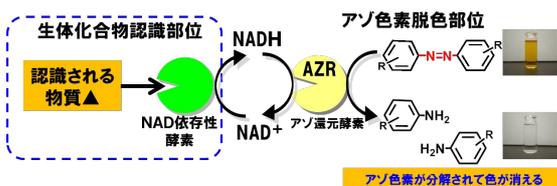


図 6 色の变化でわかる新規なバイオセンサーの原理図

現在、ヒポキサンチン脱水素酵素：XDH とアゾ分解反応系を組み合わせた鮮度センサー（図 7）やバイオマーカー検出系と組み合わせた新規バイオセンサーの研究が進展している（2012 年度、2012-2013 年度 A-STEP 探索タイプに採択）。

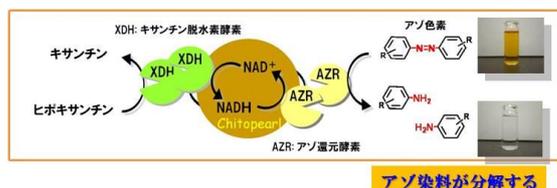


図 7 色の变化でわかる鮮度センサーの原理図

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 2 件）

Mizuguchi, H., Sakurai, J., Kinoshita, Y., Iiyama, M., Kijima, T., Tachibana, T., Nishina, T., Shida, J., Flow-based Biosensing System for Glucose Fabricated by Using Track-etched Microporous Membrane Electrodes, *Chemistry Letters*, **42**(10), 1317-1319 (2013). 査読有

Rui Zhu, Satoshi Murakami, Bunpei Hatano, Tatsuro Kijima, One-pot synthesis of polynitrostyrene from styrene monomer. *ITE-IBA Letters*, **5**, 24-27 (2012). 査読有

〔学会発表〕（計 9 件）

本間沙也加, 草苺美穂, 村上 聡, 波多野豊平, 木島龍朗, 低分子生理活性物質へのフェロセン導入とその機能性評価, 2013 年度 材料技術研究協会討論会, 2013 年 12 月 6-7 日, 東京理科大学（野田市キャンパス）

王 鑫, 草苺美穂, 村上 聡, 波多野豊平, 木島龍朗, クラウンエーテル環を有する長鎖アルキルフェロセンの合成と自己組織化, 2013 年度 材料技術研究協会討論会, 2013 年 12 月 6-7 日, 東京理科大学（野田市キャンパス）

Mei Suzuki, Toshihiko Ooi, Miho Kusakari, Bunpei Hatano, Satoshi Murakami, Tatsuro Kijima, Functions as nitroreductase activity by azoreductase from *Geobacillus stearothermophilus*, International Symposium for the 70th Anniversary of the Tohoku Branch of the Chemical Society of Japan, Sendai, Sep. 28 – Sep. 30, 2013

木島龍朗, 佐藤拓也, 池田裕美子, 村上聡, 草苺美穂, 波多野豊平, 大井俊彦, アゾ還元酵素を用いた色素分解システムによるバイオセンサーの開発, 第 65 回日本生物工学会大会, 2013 年 9 月 18-20 日, 広島国際会議場（広島市）

草苺美穂, 松本高利, 波多野豊平, 渡辺政隆, 木島龍朗, 対称性を有するオレフィン化合物の構造決定, 第 23 回 基礎有機化学討論会, 2012 年 09 月 20 日～2012 年 09 月 21 日, 京都テルサ

本間沙也加, 池田裕美子, 村上 聡, 波多野豊平, 大井俊彦, 木島龍朗, 補酵素再生系を用いたアゾ還元酵素による色素分解システム, 平成 24 年度 化学系学協会東北大会, 2012 年 09 月 15 日～2012 年 09 月 16 日, 秋田大学（手形キャンパス）

草苺美穂, 木島龍朗, 分子内に対称性を有する有機化合物の構造決定に関する研究, 第 92 回 日本化学会春季年会, 2012 年 03 月 25 日～2012 年 03 月 28 日, 慶応義塾大学（日吉キャンパス）

池田裕美子, 片岡実咲, 村上聡, 高塚由美子, 波多野豊平, 大井俊彦, 木島龍朗, 補酵素再生系を組み込んだアゾ還元酵素による色素分解システムの構築, 第63回日本生物工学会大会, 2011.9.26-29, 東京農工大学

KIJIMA Tatsuro, YAMADA Takashi, TAKANO Tetsuya, CHIBA Tomomi, MURAKAMI Satoshi, HATANO Bunpei, OHYA Norimasa, Dynamic kinetic resolution of amino acid esters in organic media using enzymatic racemisation combined with hydrolysis, The 14th Asian Chemical Congress 2011 (14 ACC), 2011.9.03-10, クイーンシリキットナショナルコンベンションセンター (バンコク市, タイ王国)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木島 龍朗 (KIJIMA Tatsuro)
山形大学・大学院理工学研究科・准教授
研究者番号: 50272084

(2) 連携研究者

大井 俊彦 (OOI Toshihiko)
北海道大学・大学院工学研究科・准教授
研究者番号: 40223713