

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24550191

研究課題名(和文) ビタミンB12誘導体とヒト血清アルブミンによる可視光利用人工酵素の開発

研究課題名(英文) Development of the artificial enzyme using visible light with vitamin B12 derivatives and human serum albumin.

研究代表者

増子 隆博 (MASUKO, Takahiro)

九州大学・工学(系)研究科(研究院)・技術専門職員

研究者番号：40457445

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：土壌や地下水には、過去に農薬や洗浄用溶剤として使用された有機ハロゲン化合物が残存している。これらは自然界において難分解性という性質があり、長期的な環境汚染・生物への影響が懸念されている。一方で、天然に存在するビタミンB12依存性酵素のリダクティブデハロゲナーゼは、テトラクロロエチレンの脱塩素化反応を行なうことが知られている。本研究では、このような有機ハロゲン化合物を水系かつ可視光照射という温和な条件で触媒的に進行させる人工酵素の構築に成功した。

研究成果の概要(英文)：The organic halide used for a pesticide is left to soil and the groundwater at long time. These continue affecting the creature until it is decomposed. On the other hand, it is known that the dehalogenase of the naturally occurring vitamin B12-dependent enzyme does de-chlorination reaction of the tetrachloroethylene. In this study, I succeeded in the development of the artificial enzyme using visible light with vitamin B12 derivatives and human serum albumin in water catalytically.

研究分野：錯体化学

キーワード：ビタミンB12 触媒反応 金属酵素 光触媒 バイオインスパイアード

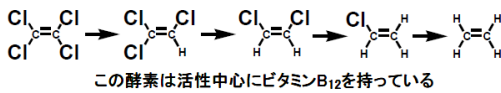
1. 研究開始当初の背景

過去に農薬や洗浄用溶剤として使用された有機ハロゲン化合物は、自然界では分解されにくい性質のため、長期的に土壌や地下水などに残存し、生物に影響を及ぼし続ける。これを温和な条件で効率よく分解する方法が求められている。

2. 研究の目的

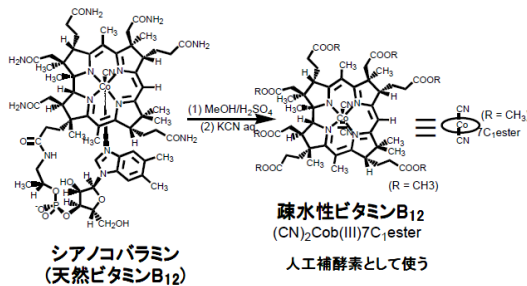
天然に存在するビタミン B12 依存性酵素の一つ、リダクティブデハロゲナーゼは、有機ハロゲン化合物からハロゲンを脱離させることが可能である。この反応を効率よく温和な条件で進行させるため、活性中心であるビタミン B12 を化学的に修飾させ、ヒト血清アルブミン (HSA) と組み合わせた人工酵素を構築した。

脱ハロゲン化酵素 Reductive Dehalogenase による脱塩素化反応



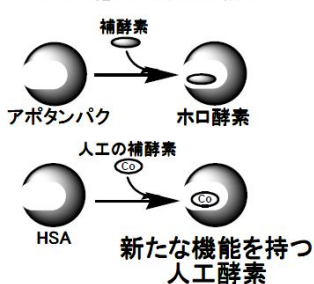
ヒト血清アルブミン (HSA) は疎水的なポケットに有機物を取り込み運搬する作用を持っている。このポケットにビタミン B12 を固定させ、触媒反応の場として利用することを考えた。ビタミン B12 は本来水溶性であるが、化学修飾し水に溶けにくくした疎水性ビタミン B12 を合成した。

疎水性ビタミンB12(人工補酵素)の合成



疎水性ビタミン B12 と HSA を組み合わせた人工酵素に、光増感剤であるルテニウム錯体を加え、可視光を照射することで脱ハロゲン化反応が進行する触媒系を構築した。

ビタミンB12人工酵素の構築



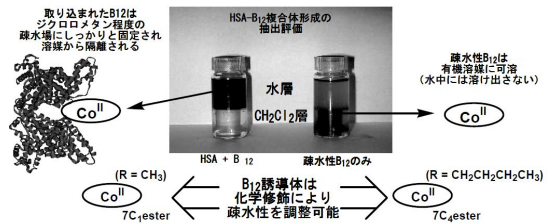
ビタミン B12 の中心にはコバルトが配位しているが、コバルトの価数が1価の時に、超求核性を有することが知られている。光増感剤によってこのコバルト1価を発生させ、有機ハロゲン化合物からハロゲンをマイナスイオンとして脱離させる。これは臭素やヨウ素のようにもともと脱離しやすいものだけでなく、アルキル鎖の塩素も脱離させる事が可能である。また、イオンとして脱離するため、有害な塩素ガスは発生しない。

HSA には本来このような触媒的な機能は無いが、活性中心を組み合わせることで新たな機能を付与させることができ、水系での反応に用いることが可能となる。

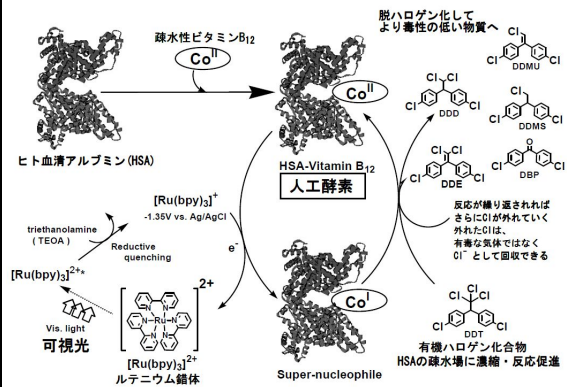
3. 研究の方法

天然のビタミン B12 を化学修飾し側鎖をアミド結合からエステル結合に変換することで疎水性ビタミン B12 を合成した。この側鎖であるアルキル鎖の長さを調整することで HSA の疎水場への取り込み挙動が変化した。

具体的にはメチル基のように側鎖が短い場合は少しずつ水系に外れていくことが確認できたが、プロピル鎖にすることで HSA の疎水場に固定され、流出しないことが確かめられた。



この人工酵素を水系でルテニウム錯体と農薬として用いられた DDT、さらに犠牲還元剤としてトリエタノールアミンを加え嫌気下で可視光を照射し、反応後に有機溶媒で抽出を行ない、生成物を GC - MS 等で解析した。



4. 研究成果

HSAに取り込まれた疎水性ビタミン B12 は、その疎水場にしっかりと取り込まれていることが分光学的に確かめられた。具体的には可視紫外吸収スペクトル等によって、疎水性ビタミン B12 がジクロロメタンと同程度の疎水場に存在していることが確かめられた。

さらに、蛍光偏光解消測定によって、疎水性ビタミン B12 のマイクロ環境は一般の溶媒とは異なり、流動性の少ない状態に置かれていることが明らかとなった。水溶液の温度を上げると若干動きは大きくなるが、再び温度を下げるとまた動きが抑えられることも分かった。

ゲルろ過を行なったところ、HSAと疎水性ビタミン B12 は、1つのバンドとして流出してきたので、HSAから外れていないことも確認できた。

この新規人工酵素を用い、有機ハロゲン化合物である DDT に対して照射による脱ハロゲン化反応を行なったところ、DDT から塩素が1つ外れた DDD が生成することが確認できた。

HSA-B₁₂を用いたDDTの脱塩素化反応

<Condition>

[HSA-B₁₂] = 2.5 × 10⁻⁶ M

[Ru(bpy)₃]²⁺ = 1.25 × 10⁻³ M

200 mM Phosphate Buffer : 50 ml

[DDT] = 2.5 × 10⁻⁴ M (10 eq.)

[TEOA] = 0.5 M

right irradiation 24h

Condition			Conversion of DDT (%)	Product Yields (%)				
HSA (25 μM)	B ₁₂ (25 μM)	Ru(bpy) ₃ (1.25 mM)		DDD	DDE	DDMU	DBP	DDMS
○	○	○	99<	43	18	6	-5	trace
○	○	×	<10	7.7	trace	—	—	—
○	×	○	<10	trace	7	—	—	—
×	○ ^a	○	<10	5	trace	—	—	—

^a DDTの濃縮が見られず、

^b Cob(III)C₁₂esterを使用

DDDも高い毒性を有するため、このままでは良い結果とは言えないが、照射時間を長くすることにより、さらに塩素が外れていくことも確かめられた。おそらくHSAの疎水ポケットにこの生成物が留まったまま次の反応に回っているものと思われる。

塩素が2個以上外れたDBPなどになれば、毒性も低くなり、この人工酵素が有用であると言える。

HSAの疎水場は多様な物質を取り込むことが知られているので、基質特異性を有する結合サイトではなく、多種多様な有機ハロゲン化合物の脱ハロゲン化反応にも応用がきく。

酵素の活性中心を化学修飾することで、HSAの疎水ポケットを有効利用し、もともと備わっていない機能を付与させた新たな人工酵素を構築できた。これにより水系において照射という温和な条件で触媒的に脱ハロゲン化反応が進行することが可能となった。

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 3 件)

1. Tahara, K.; Mikuriya, K.; Masuko, T.; Kikuchi, J.; Hisaeda, Y., Dechlorination of DDT catalyzed by visible-light-driven system composed of vitamin B12 derivative and Rhodamine B, *J. Porphyrins Phthalocyanines*, 査読有, 17, 2013, 135-1141, DOI 10.1142/S1088424612501398
2. Tahara, K.; Matsuzaki, A.; Masuko, T.; Kikuchi, J.; Hisaeda, Y., Synthesis, Characterization, Co-S Bond of a Vitamin B12 Model Complex Having Pentafluorophenylthiolate as an Axial Ligand, *Dalton Trans.*, 査読有, 42, 2013, 6410-6416, DOI 10.1039/C3DT00042G
3. Hisaeda, Y.; Tahara, K.; Shimakoshi, H.; Masuko, T., Bioinspired Catalytic Reactions with Vitamin B12 Derivative and Photosensitizers, *Pure Appl. Chem.*, 査読有, 85, 2013, 1415-1426, DOI 10.1351/PAC-CON-12-10-05

[学会発表](計 2 件)

1. Hisaeda, Y., Bioinspired Catalysts with Vitamin B12 Derivative and Photosensitizers, 20th International SPACC symposium 2013.09.11-2013.09.14, Changchun, China
2. Hisaeda, Y., Bioinspired Catalysts with Cobalt Complexes and Photosensitizers: Lessons from Vitamin B12-dependent Enzymes, 6th International Conference on Green and Sustainable Chemistry (GSC-6), 2013.08.04-2013.08.07, The University of Nottingham

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.chem.kyushu-u.ac.jp/~yhisaeda/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

増子 隆博 (MASUKO, Takahiro)

九州大学・大学院工学研究院・技術専門職員

研究者番号：40457445

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

久枝 良雄 (HISAEDA, Yoshio)

九州大学・大学院工学研究院・教授

研究者番号：70150498