

研究種目：若手研究（A）  
 研究期間：2007～2009  
 課題番号：19685007  
 研究課題名（和文）新規アルコール脱水素酵素による超臨界二酸化炭素中での酸化還元反応の  
 開発  
 研究課題名（英文）Novel alcohol dehydrogenase catalyzed oxidation and reduction  
 in supercritical carbon dioxide  
 研究代表者  
 松田 知子（MATSUDA TOMOKO）  
 東京工業大学・大学院生命理工学研究科・講師  
 研究者番号：10319494

研究成果の概要（和文）：超臨界二酸化炭素中での *Geotrichum candidum* 由来の新規アルコール脱水素酵素による酸化還元反応の検討を行った。また、本反応に関与する2種類の酵素の単離精製に成功し、諸性質の解明を行った。1種類については、ほぼすべてのDNA配列を決定することができた。さらに、酵素の固定化法の検討を行い、超臨界二酸化炭素存在下での酵素の安定性を大幅に向上させることに成功した。

研究成果の概要（英文）：Oxidation and reduction reactions by *Geotrichum candidum* in supercritical carbon dioxide (scCO<sub>2</sub>) were examined. The isolation and purification of two kinds of enzymes catalyzing the reactions were also conducted. Furthermore, the enzyme were successfully stabilized by immobilization for the use in the presence of scCO<sub>2</sub>.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	8,900,000	2,670,000	11,570,000
2008年度	3,200,000	960,000	4,160,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
総計	13,500,000	4,050,000	17,550,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・合成化学

キーワード：アルコール脱水素酵素、超臨界二酸化炭素、酸化還元反応、酵素反応、環境技術、  
 化学工学、合成化学、二酸化炭素排出削減

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 申請者は、以前にチチカビ由来のアルコール脱水素酵素を超臨界二酸化炭素中で用いる不斉還元反応の初歩的な研究を始めていた。また、脱炭酸酵素の逆反応を利用する二酸化炭素の固定化反応や、リパーゼを超臨界二酸化炭素中で用いる研究を通して、系統的に超臨界二酸化炭素の中でどのような酵素が効率的に用いることができるのかを検討する必要性を感じ、本研究を開始した。

(2) 超臨界流体中での酵素反応の研究は例が少なく、アルコール脱水素酵素を用いる研究は非常に独創性の高いものであり、本分野の研究が待ち望まれているため、本研究を開始した。

## 2. 研究の目的

(1) チチカビ中には、アセトフェノン誘導体を立体選択的に還元し、光学活性アルコールを生成する酸化還元酵素が、2種存在する。それらは NADH 及び NADPH 依存性で、広い基質特異性を有しており、さらに基質中のフッ素置換数を認識し、また、それぞれ異なった高い立体選択性を示す、優れた酵素である。本研究では、それらの酵素を超臨界流体中で用い、さまざまな合成反応へ応用することを目的とする。

(2) これらの酵素の生化学的な特性や基質認識の機構などを明らかにし、また大量発現系を構築することで、より自在な超臨界二酸化炭素中での不斉還元反応の開発を行うことが本研究の目的である。

(3) フッ素官能基を含む光学活性化合物は医薬品や液晶の材料として用いられており、それらを高立体選択的に合成する技術は非常に有用である。現在、これらは主に化学的

な合成法により生産されているが、既存の手法では多大なエネルギーを必要とし、環境への負荷が大きい。また、より高い立体選択性を実現できる高効率なプロセスの開発が求められている。そこで、本研究では、これらの問題を解決する手段として、酵素を超臨界流体中で用いた光学活性物質の合成法を研究し、含フッ素光学活性化合物の新たな合成法の構築を目指している。

## 3. 研究の方法

(1) 超臨界二酸化炭素中で使用する酵素の大量発現を行うために、最初にチチカビの乾燥菌体から二種のアルコール脱水素酵素を硫安分画(30-70%)及び各種クロマトグラフィー(HQ:強アニオン交換カラム、HP:疎水カラム、Blue:アフィニティークラム、ResourceQ:アニオン交換カラム、HAP:ハイドロキシアパタイトカラム、Gel:ゲルろ過カラム)により単離精製した。

(2) 精製した酵素を用いて諸性質の検討(反応至適 pH、反応至適温度、pH 安定性、熱安定性、阻害剤および金属イオンによる活性への影響、基質特異性、速度論的解析)を行い、さらに N 末端アミノ酸配列および内部アミノ酸配列を決定した。

(3) 超臨界二酸化炭素中の反応に適する酵素の固定化法を見出すため、さまざまな固定化の方法を検討した。

## 4. 研究成果

(1) 単離精製の結果、NADH 依存酵素が回収率 7.1%, NADPH 依存酵素が回収率 5.0%で、121 倍、131 倍に精製された。また、NADH 依存酵素については、内部アミノ酸配列の決定にも成功した。

(2) アセトフェノン還元酵素のN末端アミノ酸配列は12残基はXGKVPETXKGYVFTと決定された。FASTA分析により、10アミノ酸は、*Saccharomyces bayanus*由来のアルコール脱水素酵素1と80%の類似を示し、*Geotrichum capitatum*由来の*N-benzyl-3-pyrrolidinol*脱水素酵素ともいくつかの一致もみられた。内部配列の15残基はAENRTNYGLGYPGGYと決定され、その配列はFASTA分析によって、13アミノ酸は*Geotrichum capitatum*由来の*N-benzyl-3-pyrrolidinol*脱水素酵素と、69%の同一性を示した。さらにこの酵素をコードするDNA配列のほぼ全てを決定することができた。このDNA配列をFASTAによる相同性検索を行ったところ、*G. capitatum*由来の*N-benzyl-3-pyrrolidinol*還元酵素と、62%の相同性を示した。

(3) アセトフェノン還元酵素をイオン交換樹脂に固定化し、ケトンの不斉還元反応を行ったところ、固定化前よりもエナンチオ選択性、耐熱性、耐酸性、及び耐アルカリ性が向上し、超臨界二酸化炭素中でも高い不斉収率を維持できることも確認できた。さらに超臨界二酸化炭素中で使用した固定化酵素でも数回の再利用が可能であった。このように生体触媒を用いた二酸化炭素を原料とする反応の効率化、光学活性体の合成に成功した。

(4) フルオロケトン還元酵素は収率5.0%、131倍に精製、単離された。分子量を測定した結果、ヘテロ二量体であると思われる。速度論的解析により、本酵素はジフルオロメチル基>トリフルオロメチル基>モノフルオロメチル基の順に $V_{max}$ および $k_{cat}/K_m$ が高いことがわかった。内部配列の解析のため、ペプチドシーケンサやMALDI-TOF-MASによる分析を試みたが、既知の酸化還元酵素などとの相同性の一致が見られず、本酵素は新規酵

素である可能性が高いと考えられる。

(5) フルオロケトン還元酵素を、補酵素であるNADPHを再生するGlucose-6-Phosphate Dehydrogenaseとともに固定化した。セラミック担体であるToyonite-200Aにアルデヒド基を付加した担体(Toyonite-200AGA)、さらにリニアアモномерであるPolyethylenimineを付加した担体(Toyonite-200AGA-PEI)(Fig. 1)のそれぞれを用いることで固定化に成功した。特にToyonite-200AGA-PEIを用いた固定化法により、pH安定性と熱安定性が向上した。

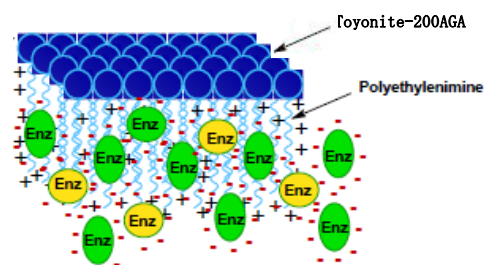
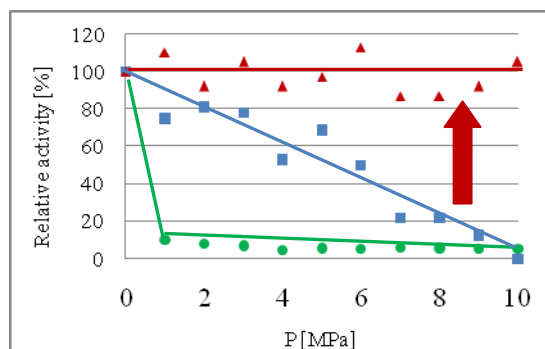


Fig. 1 Immobilization by Toyonite-200AGA-PEI.

(6) 固定化フルオロケトン還元酵素の高圧 $CO_2$ 条件下での安定性を評価したところ、Toyonite-200AGAに固定化したものでは安定性に改善がみられたが、10MPaにおいては固定化していない酵素と同じように失活してしまった。一方、Toyonite-200AGA-PEIに固定化したものは、圧力に対して非常に高い安定性を示し、臨界点7.3MPa以上の条件下では固定化していない酵素と比較して酵素の安定性が著しく向上しており、超臨界 $CO_2$ 中での酵素利用への可能性を高めることができた。



**Fig.2 Effect of CO<sub>2</sub> pressure treatment on immobilized fluorinated ketone reductase stability.**

circle: free enzyme, square: Toyonite-200AGA,  
triangle: Toyonite-200AGA-PEI.

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 8 件)

- ① Y. Nakata, T. Fukae, R. Kanamori, S. Kanamaru, T. Matsuda  
Purification and characterization of acetophenone reductase with excellent enantioselectivity from *Geotrichum candidum* NBRC 4597, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 86, 625-631, 2010. 査読有
- ② 松田 知子  
超臨界二酸化炭素中での生体触媒反応を利用したグリーンケミストリー  
Green Biocatalysis in Supercritical Carbon Dioxide, *GSCN News Letter*, グリーン・サステイナブルケミストリーネットワーク, 33, 2009. 査読無
- ③ 松田 知子  
化学工学年鑑 2009 9 章 超臨界流体 9.4 章 反応・物質変換, 化学工業, 73, 516-517, 2009. 査読無
- ④ T. Matsuda  
Asymmetric reduction of ketones by *Geotrichum candidum*: immobilization and application to reactions using supercritical carbon dioxide, *Tetrahedron: Asymmetry*, 19, 2272-2275, 2008. 査読有
- ⑤ 松田 知子  
超臨二酸化炭素を利用する酵素反応, 日本化学会 生体機能関連化学部会 ニュースレター, 23(4), 2-5, 2009. 査

読無

- ⑥ 松田 知子  
触媒は酵素! 超臨界 CO<sub>2</sub> での有機合成 CO<sub>2</sub> を有効利用するバイオプロセスの開発, *化学*, 63, 40-41, 2008. 査読無
  - ⑦ 松田 知子  
超臨界流体中における酵素反応, *化学工学会 超臨界部会 活動成果集*, 5, 171-175, 2007. 査読無
  - ⑧ 松田 知子  
超臨界二酸化炭素中における酵素反応の新展開, *Jasco Report 超臨界最新技術*, 9, 17-20, 2007. 査読無
- [学会発表] (計 3 件)
- ① 松田 知子  
超臨界二酸化炭素・水二相系を利用する酵素反応の開発, 化学工学会 第 4 1 回秋季大会, 2009. 9. 18, 広島大学
  - ② 松田 知子  
反応・物質変換: 超臨界流体を用いる有機合成, 「若手研究者・技術者向けの超臨界流体」講習会, 2009. 3. 3, 日本大学理工学部 (御茶ノ水) 1 号館
  - ③ 松田 知子, 中田 康夫, 深江 拓郎  
*Geotrichum candidum* 由来の高選択性を有する酸化還元酵素の単離精製, 日本化学会第 88 春季年会, 2008. 3. 28, 立教大学 池袋キャンパス
- [図書] (計 5 件)
- ① 松田 知子  
工学図書, 医療・診断をめざす先端バイオテクノロジー 酵素による光学活性化化合物の合成 (分担執筆), 2009, 131-140
  - ② 松田 知子  
丸善, 超臨界流体入門, 2008, 135-142
  - ③ 松田 知子  
シーエムシー出版, 超臨界二酸化炭素

を利用した生体触媒反応の開発, 2008,  
178-185

④ Tomoko Matsuda

Elsevier, Future directions in  
biocatalysis, 2007, 352

⑤ 松田 知子

エヌ・ティー・エス, 超臨界 CO<sub>2</sub> と酵素  
による有用物質の合成 (バイオプロセス  
ハンドブック), 2007, 172-178

[その他]

ホームページ

<http://www.matsuda.bio.titech.ac.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

松田 知子 (MATSDA TOMOKO)

東京工業大学・大学院生命理工学研究科・  
講師

研究者番号: 10319494

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし