

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：22604

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K15610

研究課題名(和文)担持金クラスター触媒による補酵素再生系の構築

研究課題名(英文)Construction of coenzyme regeneration system using supported gold cluster catalyst

研究代表者

西垣 潤一(Nishigaki, Jun-ichi)

東京都立大学・都市環境科学研究科・特任准教授

研究者番号：60646496

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文):生体触媒である酵素は毒性が低く、基質特異的な反応を温和な条件下で達成する優秀な環境調和型触媒である。しかし、多くの酸化還元酵素において反応に要求される補酵素がコストを増大させ、有機合成への応用の障壁となっている。代表者は、金クラスター触媒がO<sub>2</sub>およびH<sub>2</sub>を酸化/還元剤として、補酵素であるニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(NADH)の酸化還元反応を触媒することを明らかにした。さらに、実際の酵素反応に金クラスターおよび金-白金合金触媒を添加し、系中で不活性化した補酵素の再生(酸化/還元)をさせ、酵素-金クラスターハイブリッド触媒として機能させることに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

酵素を利用した有機合成法は、加水分解酵素がその大部分を占めてきた。一方、酸化還元反応を触媒する酵素である脱水素酵素は反応に高価な補酵素NADH/NAD<sup>+</sup>を利用するものが多く、コストの増加が課題であった。これを解決するため不活性化した補酵素を再活性化する方法が模索されてきた。本研究では、補酵素の再生に金クラスターを触媒を用い、O<sub>2</sub>あるいはH<sub>2</sub>という非常にありふれた材料を用いて機補酵素を再生できることを示した。この反応は廃棄物に水のみを生じる非常にクリーンな反応である。実際の酵素でもこの補酵素再生法が機能することを示し、酵素を利用した新たな有機合成法の足がかりを発見した。

研究成果の概要(英文):Enzymes have low toxicity and are environmentally friendly catalysts that achieve substrate-specific reactions under mild conditions. However, the coenzyme, especially dehydrogenases, required coenzyme such as nicotinamide adenine dinucleotide (NADH), which increases the cost and is a barrier to application to organic synthesis.

We have shown that gold cluster catalyzed redox conversion of NADH and NAD<sup>+</sup> using O<sub>2</sub> and H<sub>2</sub> as oxidation / reducing agents.

Furthermore, we succeeded in adding a gold cluster and a gold-platinum alloy catalyst to the enzyme reaction to regenerate the inactive coenzyme to active and make it function as an enzyme-gold cluster hybrid catalyst.

研究分野：ナノ化学

キーワード：金クラスター 酸化還元 脱水素酵素 補酵素再生

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

温和な条件下で機能し、酸化還元反応により有用化合物を合成する脱水素酵素類はその反応に補酵素 (NADHおよびNAD<sup>+</sup>) を必要とする。近年、これらの酵素反応を利用した有機合成法の開発が進められているが、反応に必要な補酵素の添加が莫大なコストの増加を引き起こすため、消費した補酵素を再還元する補酵素再生系の開発が不可欠となっている。これまでに、系中に補酵素の再生を担う別の酵素を添加する手法や電気化学的手法が検討されてきたが、新たな基質の要求とそれに伴う廃棄物の増加、あるいは大型設備の開発と莫大な電力の消費が課題であった。代表者は環境負荷の低いAuクラスター触媒に注目し、クラスターサイズ (<3 nm) のAuクラスターを触媒を用いた場合に、安価な水素および酸素を還元・還元剤として利用し補酵素NADHとNAD<sup>+</sup>の変換反応が可能であることを明らかにしている。上記背景をもとに、補酵素再生触媒の活性向上と実際の酵素反応への応用を検討した。

### 2. 研究の目的

本研究では、Au クラスターを補酵素再生系とする酵素-Au クラスターハイブリッド触媒系の開発を目指した。まず、補酵素を再生する Au クラスター触媒の性能向上を目指した担体や反応条件のスクリーニングを行い、実際の脱水素酵素反応の系中に Au クラスター触媒を添加することで、補酵素再生系として機能させ、酵素-金触媒ハイブリッド触媒の構築を目指した。

### 3. 研究の方法

これまでの研究代表者の触媒設計に関する知見に基づき、NADH と NAD<sup>+</sup>の相互変換を行う触媒の開発を行った。NADH の NAD<sup>+</sup>への酸化反応では触媒担体として主に酸性金属酸化物を用い、NAD<sup>+</sup>還元反応では塩基性金属酸化物を用いて Au クラスター触媒の調製を行なった。NAD<sup>+</sup>還元反応では Au クラスターの活性が低いため AuPt 合金を用いた触媒反応の検討も行なった。

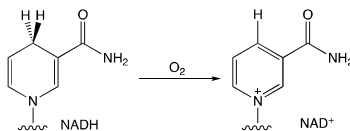
これらの触媒をグルコース脱水素酵素 (GDH) によるグルコース酸化反応および乳酸脱水素酵素 (LDH) によるピルビン酸の還元反応に添加し、補酵素再生系としての機能の評価を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) Au クラスター触媒による NADH 酸化反応

Au クラスター触媒は温和な条件下 (37°C, 0.1 MPa O<sub>2</sub>) で NADH を NAD<sup>+</sup>に酸化する。Table 1 に示したように、その活性は Au 粒子の大きさおよび担体の酸性度に依存した。3 nm 付近のサイズの Au クラスターを持つ触媒を比較すると担体の酸性度が高いほど NADH 酸化活性が高かった。NADH 酸化反応には 1 分子の H<sup>+</sup>が必要であり、また反応溶液の pH が低いほど NAD<sup>+</sup>の酸化反応が速く進行することから、担体の酸性度が反応場の H<sup>+</sup>濃度を変化させ、これが活性に影響していると推測される。一方、ナノダイヤモンド (ND) および酸化ニオブ (Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) を担体として粒子サイズの効果を比較すると、Au クラスターの粒径が小さいほど NADH 酸化活性が高いことがわかった。これは Au 原子数あたりの活性 (MTY) として示された。なお、Au/SiO<sub>2</sub> は特に高い活性を示したが、一部の Au 粒子が溶出した。一方、実際に表面に露出している金原子あたりの活性 (TOF) は粒径が大きいほど高かった。これは、Au クラスターと担体の接合面でなく、主として Au 粒子の平滑面において NADH 酸化反応が進行することを示唆する結果である。

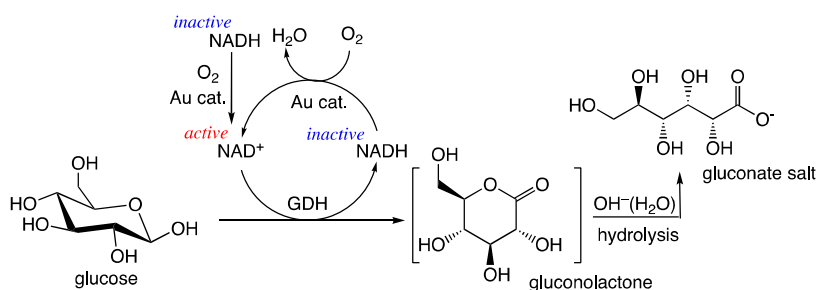
**Table 1.** Au クラスタ触媒による NADH の酸化反応



Catalyst	Size /nm <sup>a</sup>	Conv. /% <sup>c</sup>	Yield /% <sup>c</sup>	MTY <sup>d</sup> /mol <sub>NAD+</sub> mol <sub>Au</sub> <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup>	TOF <sup>d</sup> /mol <sub>NAD+</sub> mol <sub>Au</sub> <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup>
Au <sub>3.0</sub> /CeO <sub>2</sub>	3.0 <sup>e</sup>	39	38	1.56×10 <sup>-3</sup>	2.89×10 <sup>-3</sup>
Au <sub>3.3</sub> /ZrO <sub>2</sub>	3.3±1.8	47	47	1.85×10 <sup>-3</sup>	4.33×10 <sup>-3</sup>
Au <sub>3.5</sub> /Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	3.5±2.4	50	48	1.30×10 <sup>-3</sup>	3.24×10 <sup>-3</sup>
Au <sub>1.9</sub> /Nb <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	1.9±0.5	-	-	5.79×10 <sup>-3</sup>	7.79×10 <sup>-3</sup>
Au <sub>3.0</sub> /Nb <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	3.0±1.0	76	74	4.92×10 <sup>-3</sup>	1.22×10 <sup>-2</sup>
Au <sub>5.7</sub> /Nb <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	5.7±1.9	-	-	5.07×10 <sup>-3</sup>	2.04×10 <sup>-2</sup>
Au <sub>1.4</sub> /ND	1.4±1.0	-	-	4.21×10 <sup>-3</sup>	4.21×10 <sup>-3</sup>
Au <sub>2.2</sub> /ND	2.2±1.0	66	63	2.85×10 <sup>-3</sup>	4.43×10 <sup>-3</sup>
Au <sub>4.9</sub> /ND	4.9±1.5	-	-	2.70×10 <sup>-3</sup>	6.31×10 <sup>-3</sup>
Au <sub>1.2</sub> /SiO <sub>2</sub>	1.2±0.3	>95	>95	-	-

<sup>a</sup> Estimated by HAADF-STEM. <sup>b</sup> Reaction conditions: NADH (0.042 mmol), Au cat. (Au 1.8 mol%), pH 6.5 phosphate buffer (3.0 mL), O<sub>2</sub> balloon, 37 °C, 2 h. <sup>c,d</sup> Reactions were performed at pH 7.0. MTY and TOF values were calculated from absorbance in UV-vis using 10–20% conversion data. <sup>e</sup> Estimated from coordination number by curve-fitting analysis of XAFS

( 2 ) Au クラスタ触媒を補酵素再生系とする GDH によるグルコース酸化反応



Scheme1 補酵素再生系を利用したグルコース酸化反応

NADH の酸化反応が、脱水素酵素が高い活性で機能する pH7 付近で機能することが明らかとなったため、実際に GDH を用いて補酵素再生系として機能するか確認した。GDH は NAD<sup>+</sup> を酸化剤としてグルコースを酸化し、NADH は GDH によるグルコース酸化反応に対して不活性である。このため、Au 触媒非存在下において NADH を加えてもグルコース酸化反応は進行しない。ここに Au クラスタ触媒を添加し O<sub>2</sub> 存在下で反応を行うと、NADH が Au クラスタにより酸化され NAD<sup>+</sup> となり、GDH によるグルコース酸化反応が進行し (Scheme1) Au クラスタ触媒は実際に補酵素再生系として機能することが確認された (Table 2)。

**Table 2.** 不活性状態の補酵素 NADH を用いた GDH グルコース酸化反応<sup>a</sup>

Au catalyst	Enzyme	glucose Conv./% <sup>b</sup>	gluconate Yield / % <sup>c</sup>
none	GDH		0
Au <sub>1.4</sub> /ND	none		2
Au <sub>1.4</sub> /ND	GDH	36	32
Au <sub>1.9</sub> /Nb <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	none		trace
Au <sub>1.9</sub> /Nb <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	GDH	70	66

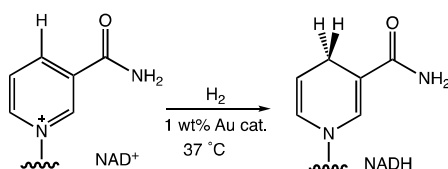
<sup>a</sup> Reaction conditions: glucose (0.05 mmol), NADH (0.05 mmol), GDH (5 U), Au cat (20 mg, Au 2.0 mol%), pH 6.5 phosphate buffer (5.0 mL), O<sub>2</sub> balloon, 37 °C, 1.5 h. <sup>b</sup> Calculated by <sup>1</sup>H NMR. <sup>c</sup> Calculated by <sup>1</sup>H NMR

(3) Au および AuPt 合金クラスター触媒による NAD<sup>+</sup> 水素化反応

脱水素酵素を用いた選択的な水素化反応はより重要な反応であり、光学活性アルコールの合成などへの応用が期待されている。この時 NAD<sup>+</sup> の NADH への水素化が補酵素再生反応となる。

Au クラスター触媒はによる NAD<sup>+</sup> の NADH への水素化反応は 3 nm 以下の粒径を持つ金クラスターを塩基性担体に固定した場合のみ進行し、反応には高圧(1 MPa)の H<sub>2</sub> が必要であった。一方、Pt および AuPt 合金クラスターを用いた場合には、塩基性担体を用いらずとも 0.1 MPa の水素化で速やかに水素化反応が進行することが明らかとなった。Pt を用いることで金属原子あたりの触媒回転数 (TON) が Au クラスターに対して大きく向上したが、AuPt 合金とした場合にも TON は維持されており、合金化により Pt 原子あたりの活性は向上した (Table 3)。

**Table 3** Au クラスターおよび AuPt クラスター触媒による NAD<sup>+</sup> の水素化反応



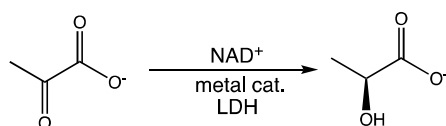
Catalyst	Size /nm <sup>b</sup>	pH	H <sub>2</sub> /MPa	Au/Pt loading /wt% <sup>c</sup>	Time /h	Conv. /% <sup>d</sup>	Yield /% <sup>d</sup>	Selec. /%	TON <sup>e</sup> /mol <sub>NADH</sub> mol <sub>metal</sub> <sup>-1</sup>
Au <sub>2.3</sub> /HT	2.3±3.7	8	1.0	1.07/-	12	16	10	62	5.5
Au <sub>2.3</sub> /HT	2.3±3.7	6.5	1.0	1.07/-	12	1.8	1	56	0.5
Au <sub>4.6</sub> /HT	4.6±1.3	8	1.0	1.04/0	12	0	0	—	—
Au <sub>3.0</sub> /CeO <sub>2</sub>	3.0 <sup>e</sup>	8	1.0	1.01/0	12	15	10	66	5.9
Au <sub>3.0</sub> /CeO <sub>2</sub>	3.0 <sup>e</sup>	6.5	1.0	1.01	12	trace	trace		
Pt <sub>1.9</sub> /ND	1.9±0.7	7.5	0.1	-/0.83	0.5	51	31	61	22
AuPt <sub>3.0</sub> /ND	3.0±0.7	7.5	0.1	0.49/0.37	0.5	60	41	69	28

<sup>a</sup> Reaction conditions: NAD<sup>+</sup>·xH<sub>2</sub>O (0.045 mmol), 1 wt% Au(AuPt) catalyst (15 mg, Au 1.8 mol%), 0.1 M sodium phosphate buffer solution (3.0 mL), 37 °C. <sup>b</sup> Au particle size was estimated by HAADF-STEM. <sup>c</sup> Measured by AAS. <sup>d</sup> Conversions and yields were calculated from <sup>1</sup>H NMR spectra of the filtered reaction solutions. <sup>e</sup> The amount of NADH produced per metal atom.

(4) Au および PtAu 触媒を補酵素再生系とする LDH によるピルビン酸水素化反応

LDH を用いて補酵素再生系として機能するか確認した。LDH は NADH を還元剤としてピルビン酸を水素化し乳酸を生成する酵素であり、NAD<sup>+</sup> は LDH によるピルビン酸水素化に対して不活性である。このため、クラスター触媒非存在下において NAD<sup>+</sup> を加えてもピルビン酸水素化は進行しない。一方、Au クラスター触媒あるいは AuPt クラスター触媒を添加し H<sub>2</sub> 存在下で反応を行うと、NAD<sup>+</sup> が Au/AuPt 触媒により水素化され NADH となり、LDH によるピルビン酸水素化が進行し (Table 4) Au クラスター触媒は実際に補酵素再生系として機能することが確認された。Pt および AuPt クラスター触媒は単独でもピルビン酸の水素化反応を触媒するが生成する乳酸の収率は LDH が存在する場合に比べ低く、その大部分は補酵素再生により生成した NADH を利用した酵素反応により生成したものであることも確認している。

本研究では、Au クラスター触媒を用いることで O<sub>2</sub> および H<sub>2</sub> のような非常にありふれた酸化還元剤を用いて NADH と NAD<sup>+</sup> の変換を行えることを明らかにし、これが実際の酵素において補酵素再生系として機能することを確認した。これは、脱水素酵素を利用した有機合成法開発の端緒となる大きな成果である。

**Table 4** LDH-catalyzed reduction of pyruvate using NAD<sup>+</sup> in the presence/absence of metal catalysts.

Metal Catalyst	enzyme	Temperature /°C	H <sub>2</sub> /MPa	Time / h	Yield of lactate/%
none	LDH	10	3.0	20	0
Au <sub>2.3</sub> /HT	LDH	10	3.0	20	0.5
Au <sub>3.0</sub> /CeO <sub>2</sub>	LDH	10	3.0	20	12
Pt <sub>1.9</sub> /ND	none	37	0.1	0.5	2
Pt <sub>1.9</sub> /ND	LDH	37	0.1	0.5	30
<sup>1</sup> Au <sup>1</sup> Pt <sub>3.0</sub> /ND	none	37	0.1	0.5	4
<sup>1</sup> Au <sup>1</sup> Pt <sub>3.0</sub> /ND	LDH	37	0.1	0.5	27

<sup>a</sup> Reaction conditions: NAD<sup>+</sup> (0.045 mmol), sodium pyruvate (0.05 mmol), LDH (50 U), 1 wt% Au catalyst (50 mg) or 1 wt% AuPt catalyst (15 mg), phosphate buffer (pH 7.5, 3 mL).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nishigaki Jun-ichi, Ishida Tamao, Honma Tetsuo, Haruta Masatake	4. 巻 8
2. 論文標題 Oxidation of $\beta$ -Nicotinamide Adenine Dinucleotide (NADH) by Au Cluster and Nanoparticle Catalysts Aiming for Coenzyme Regeneration in Enzymatic Glucose Oxidation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ACS Sustainable Chemistry & Engineering	6. 最初と最後の頁 10413 ~ 10422
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acssuschemeng.0c01893	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 西垣 潤一, 石田 玉青, 本間 徹生, 春田 正毅
2. 発表標題 金クラスター触媒を用いたNADH酸化反応における金粒子のサイズと担体の効果
3. 学会等名 第126回触媒討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Jun-ichi Nishigaki, Tamao Ishida, Masatake Haruta
2. 発表標題 Mutual Redox Conversion of NAD <sup>+</sup> and NADH by Gold Catalysts
3. 学会等名 The 8th Asia-Pacific Congress on Catalysis (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西垣潤一, 石田玉青, 春田正毅
2. 発表標題 金クラスターおよび金合金クラスター触媒による補酵素NAD <sup>+</sup> の還元反応
3. 学会等名 第124回触媒討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西垣潤一, 石田玉青, 間 徹生, 春田正毅
2. 発表標題 金クラスター触媒を用いたNADH酸化反応における金粒子のサイズと担体の効果
3. 学会等名 第126回触媒討論会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------