

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25年 5月31日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22550139

研究課題名（和文） 脱炭酸酵素による超臨界および高圧二酸化炭素を利用するカルボキシル化反応の開発

研究課題名（英文） Carboxylation by decarboxylases using supercritical and high-pressure 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）：CO₂を反応物として用いる酵素反応を検討し、有用物質の合成法を見出すことを目的とする本研究において、まず、代表的な炭酸固定化反応関連酵素であるリンゴ酸酵素を、高圧CO₂下で安定化させることに成功した。一方、他の要素に対して耐性のあるイソクエン酸脱水素酵素につき、発現系の構築に成功し、高圧CO₂条件下で非常に安定性が高いことを確認した。この発現系で調整されたイソクエン酸脱水素酵素を用いたCO₂固定化反応に成功し、加圧条件下において反応効率の改善を期待できる結果が得られた。

研究成果の概要（英文）：Carboxylation using decarboxylases such as a malate dehydrogenase and an isocitrate dehydrogenase had been investigated to establish an efficient production method for the useful materials. Overexpression of a stable enzyme has been achieved. Furthermore, efficient carboxylation reaction using the enzyme was also successful established.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2012年度	100,000	30,000	130,000
年度			0
年度			0
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

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：グリーンケミストリー・超臨界二酸化炭素

1. 研究開始当初の背景

（1）申請者はこれまでに、酸化還元反応を触媒するアルコール脱水素酵素を超臨界CO₂

中で用いる反応を検討し、世界で始めてアルコール脱水素酵素が超臨界CO₂中で活性を示すことを見いだした。また、加水分解酵素に

より超臨界CO₂のフロー系の装置を用いて、光化学活性化化合物の大量合成を達成できた。これは酵素と超臨界CO₂を用いることで有機溶媒を全く使わない系であり、その立体選択性は非常に高い。また、超臨界CO₂の性質を圧力変化により制御することで、立体選択性を制御できることも見いだした。さらに、脱炭酸酵素を用いる反応についても、限られた酵素や基質を用いる場合ではあるが、すでに、超臨界CO₂を用いることにより、逆反応(カルボキシル化反応)が効率的に進行することを見いだしている。

(2) CO₂を高圧にすることで得られる超臨界流体は、高拡散性や高溶解性を持ち、(1)で述べたように、反応速度の向上や疎水性基質への応用が見込めるが、高圧条件下で生体触媒によるCO₂固定化反応の報告例はまだ非常に少ないため、本研究において検討することで、全世界的な問題となっているCO₂を有効活用し、その削減に貢献することを目指した。

2. 研究の目的

(1) 超臨界CO₂は、新しい高機能性溶媒として注目を浴びており、抽出溶媒としては、カフェインやポップエキスの抽出などに利用され、これらのプロセスは工業化に至っている。また、化学反応の溶媒として用いた研究も進んできている。

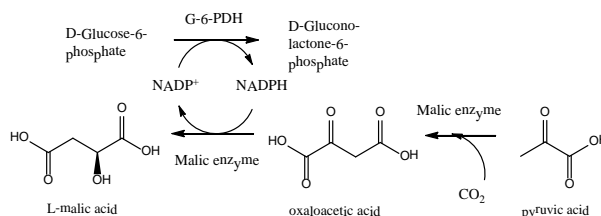
(2) 超臨界CO₂中の酵素反応は優れた特徴を有し、環境への負荷を低減する技術として位置づけられ、どのような酵素が効率的に働くのかを検討し、実用化できるような酵素反応系の構築を目指すことは重要だと考えられる。よって本研究においては、初歩的な研究に踏み出した脱炭酸酵素の超臨界CO₂中での反応を研究し、より効率的に機能するものへと改良する。

(3) 自然界由来の材料のみを用いて、反応物と溶媒にCO₂を使用し、生成物の有機溶媒に

よる抽出の必要がない系を確立することで、環境に非常にやさしい化学合成法の開発にもつながり、エコイノベティブなバイオグリーンケミストリーの発展に貢献することを目指す。

3. 研究の方法

(1) リンゴ酸酵素

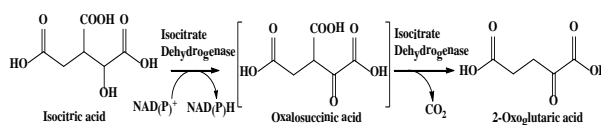


①有用な脱炭酸酵素を持つ微生物を見つけるため、*Brevundimonas diminuta*(NBRC 13182)菌対を一晩培養し、超音波破碎により得られた cell-free extract のリンゴ酸酵素活性を調べるため、L-リンゴ酸を基質とした正反応を行い、340 nm で NAD(P)H の吸光度変化を測定した。また、常圧条件下、35°C、24 時間の炭酸固定化反応を行い、HPLC による反応の分析を行った。

②高圧CO₂存在下における酵素の安定性と安定化法を検討するため、0.5~5 MPaのCO₂によって35°C、1時間加圧処理し、L-リンゴ酸を基質とした正反応により、NADPHの吸光度変化を測定し、残存活性を調べた。また、固定化法及び添加剤による酵素の安定化も試みた。

③0.5~2 MPaの圧力を加えて35°C、24時間、補酵素再生系を伴った炭酸固定化反応を行い、HPLCにより、高圧条件下での炭酸固定化反応を検討した。

(2) イソクエン酸脱水素酵素



①好熱菌 *Thermoplasma acidophilum* のゲノム DNA より PCR にて増幅したイソクエン酸

脱水素酵素遺伝子 (*Taidh*) の断片を、pET21b(+)プラスミドベクターにサブクローニングし、構築したものを発現用大腸菌宿主に形質転換した後、IPTGを加えて培養することで、*TaIDH*の発現を試みた。

② 高圧CO₂条件下における安定性を検討するため、*TaIDH*の粗精製酵素溶液に、35℃、0～7 MPa、水-CO₂の二層系で1時間加压処理を行い、その残存活性を調べた。

③ *TaIDH*を用いたCO₂固定化反応を検討するため、基質を溶かしたpH6.5の逆反応溶液に酵素溶液を加え、35℃、24時間、0.1 MPa～7 MPaのCO₂加压条件下で反応を行った。

4. 研究成果

(1) リンゴ酸酵素

① 得られた cell-free extract につき、吸光度測定により NADPH 依存のリンゴ酸酵素活性を確認した。これを用いた炭酸固定化反応では、補酵素再生系として、

Glucose-6-phosphate dehydrogenase

(G-6-PDH)の有無による比較を行ったところ、補酵素再生系を伴った反応が50%の収率で進行し、補酵素再生系を伴わない場合の5%と比較して収率が大幅に向上していることがわかった。

② 高圧CO₂存在下では、2種の酵素 cell-free extract 及びG-6-PDHは、両酵素とも、5 MPaでほぼ失活した。これを改善するため、固定化法と添加剤(グリセロール、トレハロース、ベタイン-水和物)による酵素の安定化を試みたところ、cell-free extract は、固定化法では良好な結果は得られなかったが、トレハロースを1.0 M添加することにより、5 MPaの圧力処理後でも60%以上の活性を得ることができ(Fig. 1)、また、G-6-PDHは、添加剤による安定化効果は得られなかったが、セラミック系担体である Toyonite200AGA、及びToyonite200AG-PEIに

固定化することにより、同条件で50%程度の酵素活性を保持させることができた(Fig. 2)。

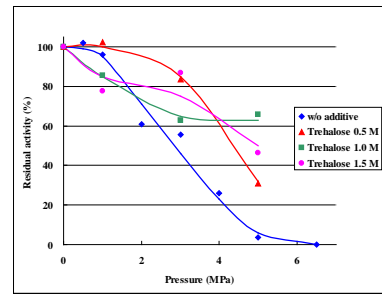


Fig.1 Trehalose effect on pressure stability of malic enzyme

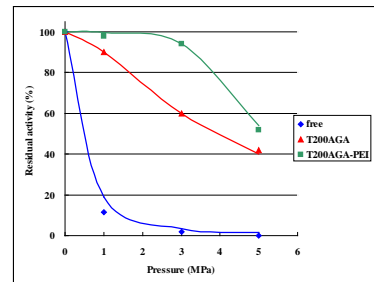


Fig.2 Pressure stability of immobilized G-6-PDH

③ 酵素の安定化を伴わない場合、圧力を加えることによって0.5 MPaでは28%、2 MPaでは17%の収率となった。また、トレハロース1.0 Mを加えて反応を行った結果、粘性の上昇により2 MPaでは反応の進行が確認できなかった。

④ 以上のように、リンゴ酸酵素及びG-6-PDHにつき、トレハロースの添加及び固定化法により、高圧CO₂条件下において、安定化させることに成功した一方、圧力による収率の大幅な向上はみられなかった。この結果より、他の要素に耐性のある酵素を用いて同様な実験を行うことにより、より有用な酵素を見出せると考えられるため、異なる酵素につき、検討を進める。

(2) イソクエン酸脱水素酵素

① SDS-PAGEにより *TaIDH*の発現状況を確認したところ、非形質転換体に比べ、発現誘導によるものと思われるバンドが確認され、cell-free extract をもちいた正反応における活性測定では、反応によって生成する

NADPH の変化量を 340nm 吸光度変化から求めたところ、非形質転換と比べて、*Ta*IDH 誘導体で活性が 10.9 倍となった。

② *Ta*IDH が、通常条件下で生育する種由来の同種のイソクエン酸脱水素酵素と比べ、CO₂ 加圧条件下において非常に安定性が高いことが確認された (Fig. 3)。このことにより、耐熱性がある酵素が、耐高圧 CO₂ 安定性を持つとする仮定を裏付ける結果が得られた。

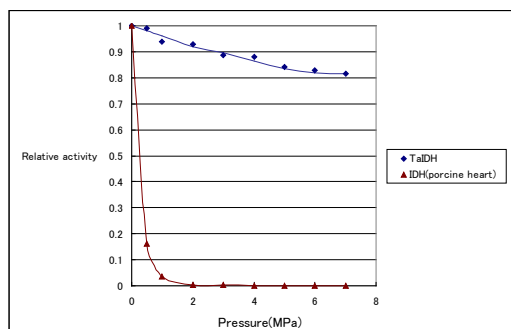


Fig.3 CO₂ Pressure Stability of *Ta*IDH and IDH (porcine heart)

③ *Ta*IDH を用いた CO₂ 加圧条件下での反応の結果、常圧で 1.9% の収率となったが、加圧条件下では目的反応物が生成せず、期待した CO₂ 加圧による効率の上昇とは逆の結果が得られた。

酵素の逆反応を用いた CO₂ 固定化反応は、他の平衡反応と組み合わせることで効率の上昇が期待されるため、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ (G6PDH) を用いて再検討したところ、イソクエン酸脱水素酵素を用いた固定化反応において、大幅な効率の上昇が HPLC にて確認された。

④ 以上のように、イソクエン酸脱水素酵素の発現系より調整した好熱菌由来のイソクエン酸脱水素酵素を用いた二酸化炭素固定化反応に成功し、加圧条件下においてはほかの平衡反応と組み合わせることで効率の改善が示唆される結果を確認することができた。

(3) 今後、この成果をもとに、新たな酵素による発現系の構築や変異による改良、酵素

の固定化そして有用物質の大量合成法を検討し、安全な有機合成反応の確立を目指したい。

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 6 件)

① T. Yamamoto, Y. Nakata, C. Cao, Y. Sugiyama, Y. Asanuma, S. Kanamaru, T. Matsuda, Acetophenone reductase with extreme stability against a high concentration of organic compounds or an elevated temperature, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 査読有、**2013**, in press. DOI: 10.1007/s00253-013-4801-5

② T. Matsuda, Recent progress in biocatalysis using supercritical carbon dioxide, *J. Biosci. Bioeng.* 査読有、**115**, **2013**, 233-241. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2012.10.002

③ 松田知子、超臨界二酸化炭素中での微生物酵素による合成反応の開発、科研費 NEWS、文部科学省 日本学術振興会、査読無、4 巻、**2011**、11-11

④ T. Matsuda, K. Nakayama, T. Abe, M. Mukoyama, Stabilization of pyruvate decarboxylase under pressurized carbon dioxide and water biphasic system, *Biocatal. Biotrans.* 査読有、Vol. 28, **2010**, 167-171

⑤ 松田知子、超臨界二酸化炭素と酵素を利用する有用化合物の合成、生物工学、査読無、88 巻、**2010**、516-519

⑥ 松田知子、超臨界 CO₂ 中での酵素を用いる有機合成反応の開発、未来材料、査読無、10 巻、**2010**、27-32

[学会発表] (計 18 件)

① 増田彩花、松田知子、*Fusarium* sp. による

新規バイヤービリガー酸化反応の補助溶媒の検討、日本化学会、2013/3/22、立命館大学（滋賀）

②田邊 知史、松田知子、*Fusarium* sp.によるシクロペンタノン誘導体のバイヤービリガー酸化反応の検討、日本化学会、2013/3/22、立命館大学（滋賀）

③山本拓郎、松田知子、アセトフェノン還元酵素を用いた不斉合成反応の開発、日本化学会、2013/3/22、立命館大学（滋賀）

④杉山陽祐、松田知子、*Geotrichum candidum* NBRC 4597 由来新規アセトフェノン還元酵素を用いた光学活性エポキシド合成系の開発、日本化学会、2013/3/22、立命館大学（滋賀）

⑤河口のぞみ、松田知子、*Fusarium* sp.による新規Baeyer-Villiger酸化反応の開発、日本化学会、2013/3/24、立命館大学（滋賀）

⑥杉山陽祐、松田知子、アセトフェノン還元酵素による α -クロロケトンの不斉還元反応の開発、生体触媒化学シンポジウム、富山県民会館（富山）、2012/11/29

⑦山本拓郎、松田知子、アセトフェノン還元酵素を用いた不斉合成反応の開発、生体触媒化学シンポジウム、富山県民会館（富山）、2012/11/29

⑧河口のぞみ、松田知子、*Fusarium* sp.による新規バイヤービリガー酸化反応の開発（1）スクリーニング、培養条件、および反応条件の検討、生体触媒化学シンポジウム、富山県民会館（富山）、2012/11/29

⑨増田彩花、松田知子、*Fusarium* sp.による新規バイヤービリガー酸化反応の開発（2）補助溶媒の検討、生体触媒化学シンポジウム、富山県民会館（富山）、2012/11/29

⑩田邊知史、松田知子、*Fusarium* sp.による新規バイヤービリガー酸化反応の開発（3）シクロペンタノン誘導体の反応、生体触媒化学シンポジウム、富山県民会館（富山）、

2012/11/29

⑪山本拓郎、松田知子、*Geotrichum candidum* NBRC 4597 由来新規アセトフェノン還元酵素の発現系構築、精製及び性質検討、日本化学会、2012/3/25、慶應義塾大学（神奈川）

⑫曹晨、松田知子、Purification and characterization of fluorinated ketone reductases with excellent enantioselectivity from *Geotrichum candidum*、生体触媒化学シンポジウム、慶應義塾大学（東京）、2011/12/22

⑬山本拓郎、松田知子、*Geotrichum candidum* NBRC 4597 由来新規アセトフェノン還元酵素の遺伝子クローニングと発現系の構築、生体触媒化学シンポジウム、慶應義塾大学（東京）、2011/12/22

⑭河口のぞみ、松田知子、生体触媒を用いた新規Baeyer-Villiger酸化反応の開発、生体触媒化学シンポジウム、慶應義塾大学（東京）、2011/12/22

⑮浅沼慶尚、松田知子、Overexpression of malate dehydrogenase for development of carbon dioxide fixation reaction、2010 環太平洋国際会議、ハワイコンベンションセンター

2010/12/15-20

⑯曹晨、松田知子、Purification and characterization of reductases with excellent enantioselectivity from *Geotrichum candidum*、2010 環太平洋国際会議、ハワイコンベンションセンター

2010/12/15-20

⑰曹晨、松田知子、*Geotrichum candidum*由来の高い立体選択性を有する還元酵素の単離精製及び諸性質の解明、生体触媒化学シンポジウム、グランシップ静岡、2010/9/23-24

⑱松田知子、超臨界二酸化炭素を利用する酵素反応の開発、化学工学会超臨界流体部会サ

マースクール、ニューフジヤホテル(静岡)

2010/8/23-24

〔図書〕(計4件)

①松田知子、S&T出版株式会社、新しい溶媒を用いた有機合成 12 節 超臨界二酸化炭素を溶媒に用いた酵素反応、2013、11 ページ (p.109-119.)

②T. Matsuda、Wiley, In Catalytic methods in asymmetric synthesis: advanced materials, techniques, and applications, Eds. M. Gruttadauria, F. Giacalone, New Jersey, 2011, Chapter 9, 18 ページ (p. 373-390.)

③松田知子、東京工業大学出版会、生命理工系のための大学院基礎講座—有機化学(湯浅英哉 編) 5 章 酸化還元反応 -酵素化学への展開、2011、19 ページ (p. 91-109.)

④松田知子、エヌ・ティー・エス、酵素利用技術体系(小宮山真 監修)4 編 4 章 1 節 2、超臨界流体、2010、5 ページ (p 328-332)

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

山中 理央 (RIO YAMANAKA)

姫路獨協大学・薬学部・講師

研究者番号：40454764

(3) 連携研究者

なし