

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25410189

研究課題名(和文)自然界の安全な酸化・還元剤およびCO₂を用いた酵素による酸化還元反応の開発

研究課題名(英文)Enzymatic oxidation and reduction using risk-free and naturally existing oxidizing or reducing agents and carbon dioxide

研究代表者

松田 知子 (Matsuda, Tomoko)

東京工業大学・生命理工学研究科・准教授

研究者番号：10319494

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：環境にやさしく危険を伴わない、酸化・還元反応を開発することを目的として研究を行った。その結果、Fusarium sp.由来のバイヤー・ピリター酸化酵素やGeotrichum candidum由来の還元酵素を、大腸菌により大量発現して用いると、効率が良く、爆発など危険性がない反応を行えることを見出した。さらに、両酵素ともに、基質特異性が広く、立体選択性が高いことを見出した。非常に不斉合成が難しいとされている基質の反応においても、高い立体選択性を達成できた。Geotrichum candidum由来の還元酵素については、構造の予測も行った。

研究成果の概要(英文)：The oxidation and reduction reactions with risk-free reaction conditions were developed. The overexpressed enzymes (oxidase from Fusarium and reductase from Geotrichum candidum) using E-coli were used for the reactions, resulting in the very high efficiencies. Both enzymes have very wide substrate specificities, and excellent enantioselectivities. Especially, biotransformations of the challenging substrates for asymmetric synthesis were found to be also successful. Moreover, the structure of the G. candidum reductase was investigated by modeling and X-ray crystal structure determination to examine the mechanism to succeed in the excellent enantioselectivity.

研究分野：グリーン・環境化学

キーワード：グリーンケミストリー 酵素

1. 研究開始当初の背景

有機合成は、幅広い分野で必要とされ、社会に貢献するところは非常に大きい。しかし、現状では、酸化還元を伴う有機合成には爆発の恐れがある危険な試薬を用いる場合があり、安全な方法の開発が待ち望まれている。また、災害などの想定外の事故が発生した場合においても、人体や環境への影響ができるだけ少ないことも重要である。

2. 研究の目的

環境にやさしく安全な持続的社会的構築のために、本研究では、有機合成反応の中でも重要とされる酸化還元反応をターゲットとし、医農薬の材料となる光学活性体の新規合成法の確立を目指す。通常酸化還元反応では、表1に示すように、危険性の高い原材料や枯渇する恐れがある触媒や溶媒等を用いて有機合成を行う反応が一般的である。様々な危険要因を改善するため、本研究では、自然界に多数存在し、しかも安全である物質を原材料に用い、安全な有機合成反応を確立することを目的とする。

表1 通常化学試薬を使用する反応の問題点および本研究により利用可能となる環境にやさしい反応で用いる酸化剤、還元剤、触媒、および溶媒

	酸化	還元	触媒	反応溶媒 や抽出溶媒
通常化学試薬を使用する反応	高酸化状態の金属過酸化水素水	高圧水素ガスの場合もあり、爆発の危険性がある	レアメタルなどの場合もある	有機溶媒(枯渇、廃棄により二酸化炭素が増加)
本研究	空気中の酸素	アルコール、糖など	酵素(大腸菌を用いると大量発現できる。再生可能)	水や高圧二酸化炭素など

3. 研究の方法

(1)酸化反応

酵素を用いる環境にやさしく安全な酸化反応を構築するために、具体的には、図1に示すバイヤー・ビリガー酸化反応の検討を行った。バイヤー・ビリガー酸化反応とはケトンからエステルを合成する反応であるが、本反応に用いる代表的な化学試薬としては、

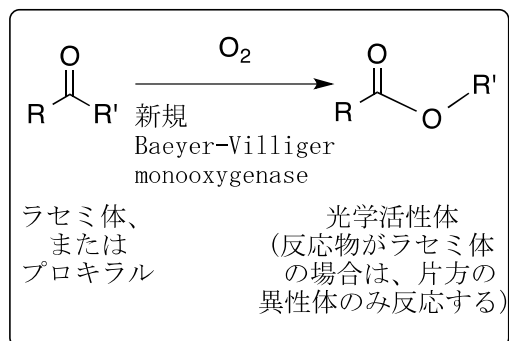


図1 空気中の酸素を酸化剤とする酵素によるバイヤー・ビリガー酸化反応

*m*CPBA(*m*-クロロ過安息香酸)などの過酸があげられ、爆発性である。本研究では、新規バイヤー・ビリガー酸化酵素を用いる研究を行った。本酵素は、空気中の酸素を酸化剤として用いる。具体的には、*Fusarium* sp.由来のバイヤー・ビリガー酸化酵素を用いた。基質としては、環状や鎖状の様々なケトンを用いた。

(2)還元反応

また、酵素を用いる環境にやさしく安全な還元反応を構築するために、具体的には、図2に示すケトンのアルコールへの不斉還元反応の検討を行った。酵素としては、チチカビ(*Geotrichum candidum*)由来のアセトフェノン還元酵素(APRD)を用いる反応を検討した。

4. 研究成果

(1)酸化反応

本研究では、*Fusarium* sp.由来のバイヤー・ビリガー酸化酵素による酸化反応の研究を行った。酸化剤としては、空気中の酸素を酸化剤として用いた。*Fusarium* sp.から本酵素を大量に得るために培養条件の検討を行った。最初に、培養期間を最適化した。また、さまざまな炭素源を検討した。その結果、菌体の増殖には、グルコースなどの通常の炭素源を用いることが可能であるが、酵素の誘導には、アセトンが最も適する事を見出した。アセトンがバイヤー・ビリガー酸化反応を経て、エネルギー源となっていることを確かめるために、D₂O中でアセトンを基質とした反応を行ったところ、BV酸化による代謝の生成物であるメタノールの生成が確認できた。

しかし、菌体反応は水中の反応であるため、疎水性基質の反応は効率が悪いことが難点であった。また、*Fusarium* sp.によるバイヤー・ビリガー酸化酵素の誘導には時間がかかることや、本菌体内に存在する他酵素によりBV酸化生成物が加水分解を受けてしまうことも問題であった。本研究では、有機溶媒を共溶媒とすることにより、疎水性基質の

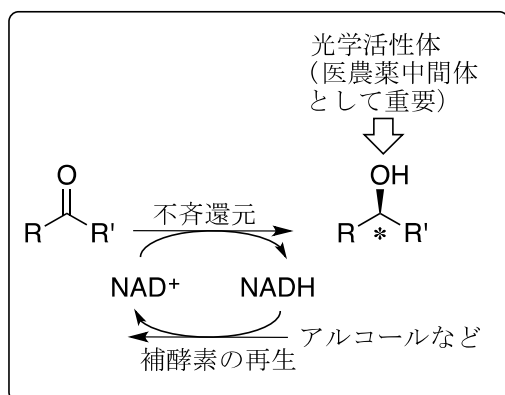


図 2 チチカビ(*Geotrichum candidum*)由来のアセトフェノン還元酵素によるケトンの不斉還元反応

反応の効率を向上できた。また、本酵素の大腸菌を用いた発現系の構築を行った。さらに、大量発現した酵素を用い、幅広いケトンを経質として反応を行った。また、不斉炭素と反応部位が離れている場合においても、高い立体選択性で酸化反応が進行することを見出した。さらに、スルフィドの酸化反応により光学活性なスルフォキシドを合成する反応も検討した結果、高い立体選択性で反応が進行することを見出した。

(2) 還元反応

本研究では、チチカビ(*Geotrichum candidum*)由来のアセトフェノン還元酵素(APRD)酵素による不斉還元反応の研究を行った。これまでに、芳香族及び脂肪族のケトンを還元し、その立体選択性が高いことを見出しており、本研究により、高い立体選択性で還元することが難しいとされている小さな脂肪族を経質として、諸性質を検討した。経質特異性を調べた結果、メチルケトンを選択的に還元することが分かった。また、温度の影響を検討した結果、50 °Cで最も高い不斉収率が得られた。

さらに、モデリングにより、酵素の立体構造を推測し、部位特異的な変異を導入した。さらに、経質結合サイトの近傍のみならず、経質結合サイトからは離れているが酵素の効率に影響をおよぼすと予想される部位を予測し、効率的な酵素をシミュレーションにより得た。また、実際に実験により酵素を調製し、アセトフェノンをモデル経質として用いて還元活性を測定し、より効率的な酵素反応を開発できた。

以上をまとめると、本研究では、環境にやさしく危険を伴わない、酸化・還元反応を開発することを目的として研究を行った。その結果、*Fusarium* sp. 由来のバイヤー・ピリガー酸化酵素や *Geotrichum candidum* 由来の還元酵素を、大腸菌により大量発現して用いると、効率が良く、爆発の危険性がない反応を

行えることを見出した。今後、本反応のスケールアップに関する検討を行い、幅広い天然物や生理活性物質などの有機合成反応に応用できるように研究を進める予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

1) Y. Sugiyama, M. Senda, T. Senda, T. Matsuda

Crystallization and preliminary crystallographic analysis of acetophenone reductase from *Geotrichum candidum* NBRC 4597, *Acta Crystallogr.* F71, 2015, 320-323. 査読有

2) R. Yamanaka, K. Nakamura, M. Murakami, A. Murakami

Selective synthesis of cinnamyl alcohol by cyanobacterial photobiocatalysts *Tetrahedron Lett.* 56, 2015, 1089- 1091. 査読有

3) 杉山陽祐, 千田美紀, 千田俊哉, 松田知子
Geotrichum candidum 由来の高立体選択的アルコール脱水素酵素の構造解析

Structural analysis of *Geotrichum candidum* alcohol dehydrogenase with excellent enantioselectivity *Photon Factory Activity Report*, 2014, Volume 2013 B, #31. 査読無

4) 松田知子

二酸化炭素を有効利用する酵素反応の制御 *化学工学*, 2014, 78, 471-472. 査読無

5) C. Cao, T. Fukae, T. Yamamoto, S. Kanamaru, T. Matsuda

Purification and characterization of fluorinated ketone reductase from *Geotrichum candidum* NBRC 5767, *Biochem. Eng. J.* 2013, 76, 13-16. 査読有

〔学会発表〕(計 14 件)

1) 根本 裕海, 増田彩花, 松田知子

Fusarium sp. NBRC109816 由来の Baeyer-Villiger 酸化酵素(BVMO)による酸化反応の経質特異性の検討、日本化学会第 96 春季年会、2016 年 03 月 24 日 - 2016 年 03 月 27 日、同志社大学 京田辺キャンパス

2) 星野友泰, 山部瑛美, 松田知子

Geotrichum candidum NBRC 4597 由来アルデヒド脱水素酵素の大量発現系の構築及び諸性質の検討、日本化学会第 96 春季年会、2016 年 03 月 24 日 - 2016 年 03 月 27 日、同志社大学 京田辺キャンパス

3) A. A. Koesoema, Y. Sugiyama, T. Matsuda, D. Schritt, K. Yamashita, D. M. Standley, M. Senda, T. Senda
Engineering of Butyl Group Specific Binding Pocket of *Geotrichum candidum* Acetophenone Reductase : Enantioselective Reduction of Challenging Bulky-bulky Ketones、日本化学会第 96 春季年会、2016 年 03 月 24 日- 2016 年 03 月 27 日、同志社大学京田辺キャンパス

4) 松田知子
超臨界および液体 CO₂ を利用する酵素反応による有用物質の合成、静岡大学グローバル・サステイナブル・テクノロジー(GST) 研究会(招待講演)、2016 年 03 月 18 日- 2016 年 03 月 18 日、東京工業大学大岡山キャンパス

5) 松田知子
二酸化炭素が有効利用できる酵素を触媒とする有機合成法の開発、GIC 平成 26 年度総会および特別講演会(第 37 回研修セミナー)(招待講演)、2014 年 04 月 23 日-2014 年 04 月 23 日、産業技術総合研究所 東北センター

6) ムハマド・マウラナ・イフサン、蛭川絢南、河口のぞみ、増田彩花、福井秀介、田邊知史、松田知子、北山隆
Fusarium sp. NBRC109816 による環状ケトンの Baeyer-Villiger 酸化反応の開発、日本農芸化学会関東支部 2014 年度支部大会、2014 年 10 月 18 日-2014 年 10 月 18 日、埼玉大学

7) N.-H. Hoang, T. Matsuda
Liquid Carbon Dioxide as an Effective Solvent for immobilized *Candida antarctica* Lipase B Catalyzed Transesterification, Active Enzyme Molecule 2014, 2014 年 12 月 17 日-2014 年 12 月 19 日, Toyama International Conference Center

8) Y. Sugiyama, A. A. Koesoema, T. Hoshino, T. Matsuda, D. Schritt, K. Yamashita, D. M. Standley, M. Senda, T. Senda
Structural Analysis and Site Directed Mutagenesis of Acetophenone Reductase (APRD) from *Geotrichum candidum* NBRC 4597 日本化学会第 95 春季年会、2015 年 03 月 26 日-2015 年 03 月 29 日、日本大学理工学部 船橋キャンパス

9) N.-H. Hoang, T. Matsuda
Enhanced lipase-catalyzed transesterification using liquid carbon dioxide - a green and practical approach、日本化学会第 95 春季年会、2015 年 03 月 26 日-2015 年 03 月 29 日、日本大学理工学部 船橋キャンパス

ス

10) 横山絵里、杉山陽祐、山本拓郎、松田知子

Geotrichum candidum 由来のアセトフェノン還元 酵素の基質特異性の検討、第 17 回生体触媒化学シンポジウム、2013 年 12 月 20 日、岡山理科大学

11) 杉山陽祐、山本拓郎、横山絵里、松田知子

Geotrichum candidum 由来のアセトフェノン還元 酵素の変異体を用いる反応機構の解明、第 17 回生体触媒化学シンポジウム、2013 年 12 月 20 日、岡山理科大学

12) 蛭川絢南、河口のぞみ、増田彩花、福井秀介、田邊知史、北山隆、松田知子

Fusarium sp. による新規 Baeyer-Villiger 酸化反応の開発、第 17 回生体触媒化学シンポジウム、2013 年 12 月 20 日、岡山理科大学

13) 杉山陽祐、横山絵里、松田知子

Geotrichum candidum NBRC 4597 由来アセトフェノン還元酵素の構造および機能解析、日本化学会第 94 春季年会、2014 年 03 月 27 日、名古屋大学

14) 増田彩花、河口のぞみ、蛭川絢南、野村信夫、福井秀介、北山隆、加藤太郎、藤井幹雄、松田知子

Fusarium sp による新規新規 Baeyer-Villiger 酸化反応の開発、日本化学会第 94 春季年会、2014 年 03 月 27 日、名古屋大学

〔図書〕(計 3 件)

1) C. Cao, T. Matsuda
Chapter 3. Biocatalysis in organic solvents, supercritical fluids and ionic liquids In Organic synthesis using biocatalysis, Eds. A. Goswami, J. D. Stewart, Elsevier, 2015, p 67-99.

2) T. Matsuda, R. Yamanaka, K. Nakamura
Biocatalytic asymmetric reduction of C=O and activated C=C bonds in stereoselective synthesis, In Stereoselective synthesis of drugs and natural products, Eds. V. Andrushko, N. Andrushko, Wiley, 2013, p. 1015-1042.

3) 松田知子
第 2 章 第 7 節 超臨界流体の触媒反応場としての応用 触媒の設計・反応制御 事例集、(株)技術情報協会、2013, p.106-111.

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕 ホームページ等

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

6．研究組織

(1)研究代表者

松田 知子 (MATSUDA, Tomoko)
東京工業大学・生命理工学院・准教授
研究者番号：10319494

(2)研究分担者

山中 理央 (YAMANAKA, Rio)
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