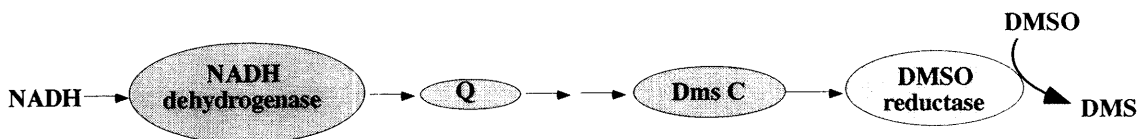


論文題目 脱窒光合成細菌の生産する DMSO 還元酵素の反応に関する研究

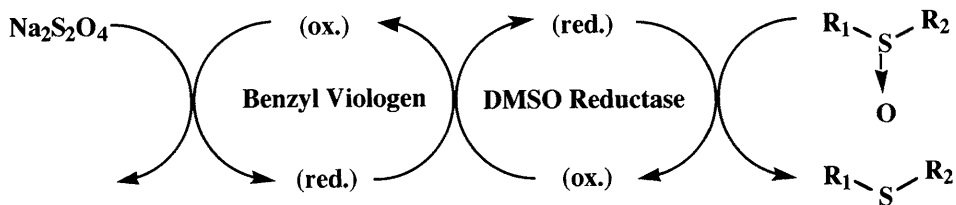
氏名 安保 充

近年、微生物、酵素を用いた物質変換が、様々な産業で利用されるようになった。発酵食品やアミノ酸生産といった食品分野や、抗生物質生産といった医薬品分野に加え、光学活性体調製といった合成化学分野においても利用されている。筆者は、生体の代謝系において重要な酸化還元酵素に着目し、本論文では、脱窒光合成細菌 *Rhodobacter sphaeroides* f. sp. *denitrificans* の DMSO (ジメチルスルホキシド) 呼吸の末端酵素である DMSO 還元酵素の反応に関する基礎と応用について研究を行った。本酵素の基質特異性、鏡像選択性といった基礎的なデータを調べると同時に、本酵素の有機合成化学を中心とした物質変換への応用について併せて検討した。

DMSO 還元酵素は、*R. sphaeroides* が DMSO 存在下、嫌気明条件で DMSO 呼吸を行う際に、菌体のペリプラズムに誘導合成される酵素で、DMSO を DMS (ジメチルスルフィド) に還元する反応を触媒する。*In vivo* では、還元に必要な電子は、NADH から何らかの電子伝達体 (推定) を介して、最終的に DmsC から DMSO 還元酵素に伝達されると推定されている (図 1)。

図 1 *In vivo* での DMSO 還元酵素の反応系

一方、*in vitro* で本酵素は、メディエーターと呼ばれる電子伝達活性をもつ幾つかの人工低分子化合物から電子を受け取り、還元反応を触媒することができる。本研究では、還元剤としてジチオナイト (Sodium hydrosulfite) あるいは電極、メディエーターとしてピオロゲン系の化合物を用いて反応を行った。ジチオナイトを用いた場合の反応系を示す (図 2)。

図 2 *In vitro* での DMSO 還元酵素の反応系

本酵素の反応特異性とその応用研究についてまとめる。

1. DMSO 還元酵素の基質特異性

上記の系を用いて、DMSO 還元酵素の基質特異性を調べた。DMSO 還元酵素の本来の基質は、DMSO、TMAO（トリメチルアミン *N*-オキシド）といった天然に存在する低分子の酸化物であるが、その他にメチオニンスルホキシド、クロレートなど多彩な化合物に対して還元活性を示す。そこで、本研究では主にアルキルアリールスルホキシドの反応性を調べた。この基質は、アルキル部分の大きさを合成によって任意に変えることにより、酵素の立体特異性を調べることができると同時に、アリール部分の置換基をハロゲン基、メチル基、アルコキシ基にかえることによって基質の電子的な性質を変化させることができる（図 3）。

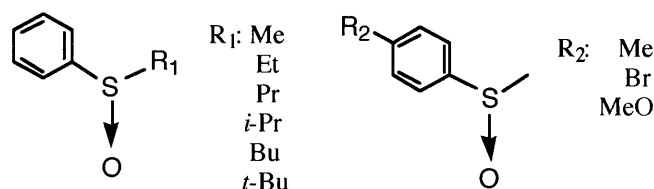


図 3 アルキルアリールスルホキシドの構造式

その結果、1) スルホキシドの一方の置換基にフェニル基が付くことによって、DMSO 以上の反応性を示すこと、2) アルキル部分がメチル、エチル、プロピルとかさ高くなるにつれ、その反応速度が遅くなること、3) スルホキシドの 2 つの置換基が共に大きなジフェニルスルホキシドや *t*-ブチルフェニルスルホキシドは、本酵素の基質とならないこと、4) アリール側のパラ位の置換基の電子吸引-供与性は、反応速度にそれほど強い影響を与えないこと、5) 図 4 に示すような、スルホキシド以外の官能基を持った基質に対しては、そのスルホキシド部分のみを還元し、本酵素が極めて広い基質特異性を持つことが示された。

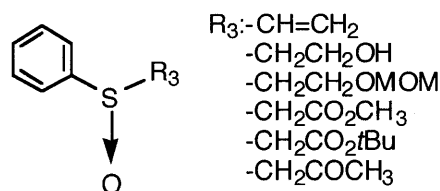


図 4 スルホキシド以外の官能基を持った DMSO 還元酵素の基質

2. DMSO 還元酵素の鏡像選択性

スルホキシドは、2 つの置換基が異なる場合、安定な鏡像体を与える。DMSO 自身には鏡像異性体は存在しないが、DMSO 還元酵素がスルホキシドの不斉を認識することができるのか、極めて興味深い結果が期待された。そこで、キラルなスルホキシドを各種合成して調べた。図 5 に還元反応スキームを示すが、ラセミ体のキラルスルホキシドを本酵素と反応させ、反応溶液中に残ったスルホキシドの鏡像体純度を Daicel Chiralcel OB-H を用いて分析した。

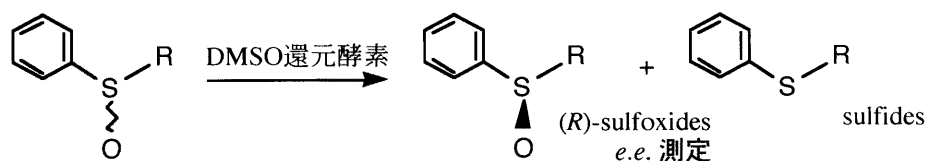


図5 DMSO還元酵素のラセミ体スルホキシドとの反応スキーム

その結果、アルキルアリールスルホキシドの(S)-体を優先的に還元することが明らかになった。回収スルホキシドの鏡像体純度は、スルホキシドの α -位に芳香環があるもので>99% *e.e.* と極めて高く、芳香環は、ベンゼン環だけでなく、ピリジン環、ナフタレン環であっても、スルホキシドの α -位にあれば、その鏡像体純度は高かった。一方、ベンジル基といったスルホキシドと芳香環の間にメチレン基をはさんだ基質や、シクロヘキサン環といった芳香環でない置換基では、その鏡像体純度の低下が観察された。(図6)。

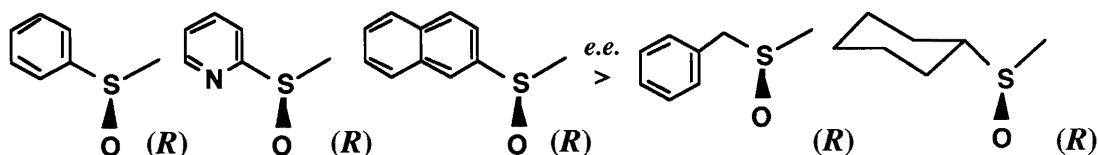


図6 DMSO還元酵素の鏡像選択性

3. DMSO還元酵素の不斉有機合成への応用

酵素の極めて高い鏡像選択性を利用して、不斉有機合成への応用を試みた。光学活性スルホキシドは、不斉有機合成の分野において、光学活性な合成原料、あるいは合成中間体として利用されており、その新たな調製法を開発することを目的とした。ここでは、スルホキシド以外に官能基を持ったスルホキシドを中心に調べた。具体的に検討した調製法は1) *R. sphaeroides* を直接用いる菌体反応、2) 電極-DMSO還元酵素を用いる電気化学的酵素反応の二つである。

3.1. *R. sphaeroides* を直接利用する菌体反応

基質となる合成スルホキシドは、DMSO還元酵素を誘導することができず、菌体に対して毒性を示すため、まず、DMSOを添加した培地で菌を培養し、DMSO還元酵素が誘導合成された状態で合成基質を添加、反応を行った。

その結果、メチルフェニルスルホキシドの(R)-体を>99% *e.e.*、グラムオーダーで調製することに成功した。このことから、菌体反応を光学活性スルホキシドの大量調製法として利用可能であることを示した。酵素の鏡像選択的還元を利用した速度論的分割による光学活性スルホキシド調製としては、これが初めての報告となった。しかしながら、菌体を用いた反応では、反応速度の遅い基質では十分に鏡像体純度の高いスルホキシドを回収することが出来ないこと、また、エステル、ケトンといったスルホキシド以外の官能基が、菌体内の他の酵素によって変換を受けることから、様々な官能基をもつキラルスルホキシドを鏡像体純度よく調製するという点で、菌体反応の限界も示された。

3.2. 電極を用いた電気化学的酵素反応リアクターとしての応用

本酵素は電子供与体に電極を用いることによっても還元反応を行うことができる。そこで、電気化学的酵素反応システムを構築した。システムは3電極のバッチ型システムで(図7)、作用極にグラッシーカーボン電極、参照極に銀/塩化銀電極、対極は白金電極を用い塩橋で隔離した。メディエーター、酵素はいずれも遊離の系で反応を行い、数10 mgのオーダーで、光学活性スルホキシドの調製に成功した。この反応系では、スルホキシド以外の官能基を持った基質も鏡像体純度よく、その(R)-体を回収することができた。

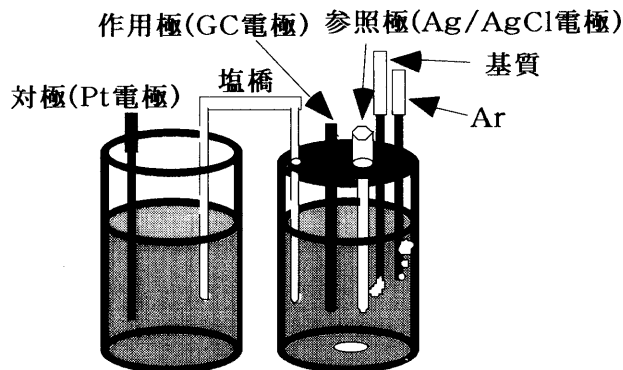


図7 電気化学的酵素反応システムの概略図

4. DMSO還元酵素のスルホキシドセンサーとしての応用

電気化学的酵素反応システムを応用し、スルホキシドセンサーを作製した。システムはリアクターの場合と同様に3電極系で、酵素はウシ血清アルブミン(BSA)と混合し、グルタルアルデヒドで架橋化することによってフィルム状に固定化した。

このスルホキシドセンサーは、検出濃度範囲 $100 \mu\text{M} \sim 7 \text{mM}$ で、応答時間は約1分となった。さらに、センサーの感度を上昇させれば、食品中のDMSO分析など、低濃度DMSO分析への応用も可能である。

以上、本論文では、脱窒光合成細菌のDMSO還元酵素の基質特異性、鏡像選択性を明らかにした。特にDMSO還元酵素の高い鏡像選択性については、はじめての報告となった。また、本酵素あるいは菌体を利用して、各種光学活性スルホキシドの調製と、その反応特性を明らかにした。さらに、電極-酵素を用いる電気化学的酵素反応リアクターの開発、およびスルホキシドセンサーの開発と応用に新たな視点を与えた。本研究は、1つの酸化還元酵素の基礎的性質の解明と、その応用に新たな進展を与えることができた。