

先端科学技術研究科 博士論文要旨

所属研究室 (主指導教員)	情報機能素子科学研究室 (浦岡教授)		
学籍番号	2321052	提出	令和 6 年 12 月 17 日
氏名	和山 文哉		
題目	標的分子を選択的に変換するための酵素電極 (Enzyme electrode for selective conversion of target molecules)		
物質生産においては、環境への負荷が少なく、効率の良い生産方法が求められている。この中で、バイオテクノロジーは将来の経済発展に寄与する重要な技術であり、物質生産の大きな成長につながると注目されている。環境負荷を低減する手段としてのバイオテクノロジーでは、酵素や微生物などの生体触媒を利用した物質生産技術を指す。これらの生体触媒は、常温、常圧、水溶媒という極めて穏やかな条件下で反応し、高い反応性と特異的な立体認識による物質変換を実現している¹⁾。 酵素は幅広く産業利用されているが、酸化還元酵素の活用例はほとんどない。酸化還元酵素を用いることで、標的分子の構造や特性を大きく変えることなく、高機能な変換が可能となる。酸化還元酵素が産業活用されていない理由として、一度標的分子と反応すると不活化し、外部から酸化力または還元力を伝達して再活性化させないと繰り返し反応させることができないことが挙げられる。酸化還元酵素を連続的に活性化して繰り返し使用することができれば、産業活用がより進むと考えられる。 生物は、酸化還元酵素を用いてジスルフィド結合を特異的に還元し、機能性タンパク質の活性調節を行っている。例えば、植物では光合成によって得られた電子により、補酵素 NADP⁺ が NADPH に還元され、その還元力でチオレドキシン還元酵素 (NTR) を活性化し、基質であるチオレドキシン (Trx) の作用で、機能性タンパク質のジスルフィド結合を特異的に開裂させて活性を調節している²⁾。この生体反応を模倣することで、酸化還元酵素を繰り返し活性化できると考え、酸化還元酵素の産業活用に向けた反応コンセプトの実現に着手した。 本研究では、電極、電子メディエータとしてのメチルビオロゲン (MV)、補酵素 NADPH、酵素 NTR、酸化還元タンパク質 Trx を用いた電子授受反応により、植物の生体反応を分散系で人工的に再現し、酸化還元酵素の繰り返し活性化反応を実現した。しかし、この反応では酵素などの材料を全て反応溶液中に添加するため、食品中に酵素などが残留することや、食事ごとに材料を添加する必要があるため膨大なコストがかかることなどが実用化に向けた問題となる。したがって、食品への材料の添加を必要としないデバイス化が求められている。これを実現するために、電子メディエータや酵素材料を電極基板上に固定化し、電極上で酵素反応を繰り返すことができる酵素電極の開発を目指した。 酵素電極の開発において、電子メディエータ (MV)、NADP⁺、NTR、Trx をすべて固定した電極を作製することは、使用する材料が多いために固定化が非常に煩雑で困難である。また固定化できた場合でも、			

反応効率の大幅な低下や電極性能の再現性の低下が課題となる。したがって、酵素電極の実現に向けた酸化還元酵素連続活性化システムの構築が必要である。そこで、酵素を NADP^+ を必要とせず MV と電子授受可能な FTR に置き換え、FTR と Trx を結合させて 1 つの複合酵素とすることで、電極上に固定する材料を 2 つに減らした。この新しいシステムでもジスルフィド結合が還元できることを確認した。また、従来の反応に比べて還元量が 1.4 倍に向上し、反応効率の向上も達成された。

MV と複合酵素の固定化については、アルキルチオールを用いて金基板上に自己組織化膜を形成する手法を採用した (図 1)。MV は一方のメチル基をブタンチオールに置換した 1-butanethiol-1'-methyl-4,4'-bipyridine (BMB) を設計・合成した。複合酵素は金電極上にメルカプトカルボン酸を固定した後、アミンカップリングにより、金電極上のカルボキシル基と複合酵素のもつアミノ基を結合させることで金電極上へ固定化した。なお、メルカプトカルボン酸は分子長が BMB より長い 10-メルカプトデカン酸を使用した。この手法で作製した BMB-複合酵素固定化電極を用いて、ジスルフィド結合を有するタンパク質溶液に -1.05V の電圧を 8 時間印加した結果、約 30 %のジスルフィド結合の還元に成功した。さらに、複合酵素の固定化の配向性制御、MV と複合酵素の固定化比率を最適化することにより、ジスルフィド結合の還元量を最大化し、食品への材料の添加なしに標的分子を還元可能な酵素電極を実現した。

実用化を目指して、実食品における本電極の有用性を確かめるため、市販の牛乳中に存在するジスルフィド結合をもつたんぱく質の一つである β -ラクトグロブリンを標的分子として、牛乳に電極処理を行った。8 時間の処理で約 25%のジスルフィド結合が還元されたが、ほぼ 100 %還元される標品と比較すると、処理量が大きく低下する結果となった (図 2)。この原因として、夾雑物による反応阻害や電極の汚染、食品のもつ粘性が考えられる。今後は、電極の表面処理や電圧印加方法による夾雑物の影響の最小化、さらに溶液の攪拌方法の最適化を行い、実食品においても標品と同程度の処理量を目指す。

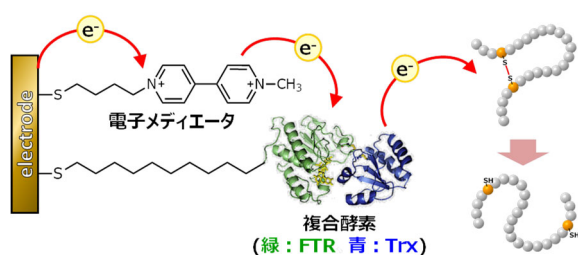


図 1 標的分子の変換する酵素電極

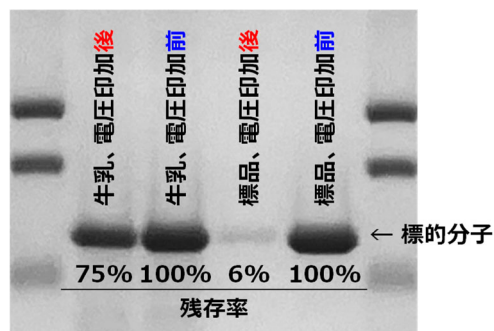


図 2 酵素電極による標的分子の分解

【参考文献】

- 1) Bornscheuer, U. T.; Huisman, G. W.; Kazlauskas, R. J.; Lutz, S.; Moore, J. C.; Robins, K. Engineering the Third Wave of Biocatalysis. *Nature* **2012**, *485*(7397), 185–194.
- 2) Serrato, A. J.; Pérez-Ruiz, J. M.; Spínola, M. C.; & Cejudo, F. J. A novel NADPH thioredoxin reductase, localized in the chloroplast, which deficiency causes hypersensitivity to abiotic stress in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry*, **2004**, *279*(42), 43821–43827.

氏 名	和山 文哉
-----	-------

(論文審査結果の要旨)

本論文は、環境負荷が少なく、効率の良い物質生産の実現に向けて生体材料の活用を目指す中で、酸化還元酵素の産業利用についての独自課題を解決し、実用化を促進するために研究されたものである。生体反応を模倣して酸化還元酵素を生体外でも利用可能にする新たな反応システムの構築、および実用化に向けたデバイス化について検討を行い、以下に示す成果を得ている。

(1) 生体内反応であるチオレドキシンシステムと NADP^+ を還元する独自の電気化学反応を組み合わせ、酸化還元酵素を繰り返し活性化して標的分子のもつジスルフィド結合を還元する新たな反応システムの構築に成功した。植物では光合成反応によって電子供給を行っている反応を、電極反応に置き換えて模倣することで、酸化還元酵素への電子供給および酸化還元酵素の繰り返しの活性化を実現した。従来のジスルフィド結合の還元では、標的分子に対して過剰量の酸化還元酵素が必要であり、効率良く還元できているとは言い難かった。本研究の手法は、電気化学的に酸化還元酵素を繰り返し活性化できるため、少量で効率的に標的分子を還元できる有望なアプローチとなる可能性を示している。

(2) 酸化還元酵素を用いた物質生産を産業活用するための酵素固定化電極を実現した。前述した反応システムのデバイス化に向けて、電子メディエータと独自酵素で反応系を再構築し、さらに電極の反応効率向上に向けた分子設計、固定化比率の最適化、配向性制御によって、標的分子のジスルフィド結合を還元可能な酵素電極を構築した。従来の酵素固定化電極が酵素から電極への電子移動を観測して電流値を計測するセンサーとしての使用であったのに対し、本電極は電極から酵素へ、さらには酵素から試料中の標的物質へ電子を可能にしているため、標的分子の還元に有用な電極であると考えられる。また、この電極が実食品においても有用であることも示された。

このように、本論文は、酸化還元酵素を生体外で用いるための新たな反応システムの構築に成功するとともに、実用化に向けたデバイス化を実現し、酸化還元酵素の産業活用の可能性を示した点で理学的に高い価値を有し、生体材料を活用した物質生産技術の発展に大きく寄与するものと考えられる。よって審査員一同は本論文が博士（理学）の学位論文として価値あるものと認めた。