

ミミズ S-9 画分による立体選択的 *p*-ニトロアセトフェノン還元 の速度論的解析

上井 幸司, 布施 典子, 佐々木直子, 竹下 光弘*

Kinetic Analysis of the Enantioselective Reduction of *p*-Nitroacetophenone by Earthworm S-9 Fraction.

Koji UWAI, Noriko FUSE, Naoko SASAKI, and Mitsuhiro TAKESHITA *

(Received November 22, 2005)

p-Nitroacetophenone was enantioselectively reduced in the presence of earthworm (*Eisenia fetida*) S-9 fraction to give predominantly (*S*)-1-(*p*-nitrophenyl)ethanol. The kinetic parameters of the reaction were determined by HPLC analysis.

Key words — enantioselective reduction; earthworm; S-9 fraction; *Eisenia fetida*

環形動物門 (*Annelida*) (*Oligochaeta*) 貧毛綱に属するミミズは, 3目21科に分類される約8,000種が知られており, 植物が共存するほとんど全ての地中に存在する. その乾燥させたものを地竜と称し, 漢方薬では発熱や, 気管支喘息の発作などに用いられる. さらに, 近年では, その血栓溶解作用についても注目されており, フィブリン溶解酵素などが報告されている¹⁻³⁾.

また, ミミズは腐植質や厩肥中で容易に増殖させることが可能であるため, 大量に入手が可能であることから, ミミズが有する酵素の性質を明らかにし, その利用法を開発することは, 新しい物質変換へのアプローチとなる事が期待される. そこで, 本研究では, ミミズS-9画分による *p*-ニトロアセトフェノン還元を酵素反応の速度論的解析により検討した.

実験の部

1. 使用動物

実験には, ミミズ (*Eisenia fetida*, 相模浄化サービス, 神奈川) を用い, 実験に供するまで牛堆肥 (相模浄化サービス) 及び水道水を定期的 (牛堆肥は2週間に1回, 水道水は毎日) に与

え, 室温下で飼育した.

2. 酵素の調製

ミミズを水道水で洗浄し, 重量を測定した後, 細切し, 氷冷した0.1 M K, Na-リン酸緩衝液 (PBS, pH7.4) を湿重量の4倍量加えホモジネートした. ミミズホモジネート液を9,000 × g, 20分間冷却遠心後, その上清画分を酵素源として使用した.

3. タンパク定量

タンパク濃度は, Bradfordの方法⁴⁾に従い, 牛血清アルブミン (BSA) を標準物質とした比色定量により測定した.

4. HPLCによる1-(*p*-ニトロフェニル) エタノールの定量

p-ニトロアセトフェノンの代謝物である1-(*p*-ニトロフェニル) エタノールのHPLCによる分析において, ポンプはWaters 510 HPLC Pump (Waters, Milford MA, USA) を用い, 検出器としてWaters 486 Tunable Absorbance Detector (Waters) を接続した. カラムはCHIRALCEL AD-H (4.6x250 mm; DAICEL, Tokyo, Japan) を

使用し, 移動相として hexane-EtOH (97:3, *v/v*) を流速 1.0 ml/min. で通導し, 検出波長 254 nm にて測定を行った. クロマトグラム上のピークは, データ解析処理装置 (Chromatocorder 21, SIC, Tokyo, Japan) により得られた面積より算出し, 定量した. なお, 内標準物質として, 2-アセチルピロール (保持時間: 23.6 min) を用いた. また, 4-ニトロアセトフェノン, (S)-(+)-および (R)-(-)-1-(*p*-ニトロフェニル) エタノールの保持時間は以下ようになった. 4-ニトロアセトフェノン: 27.0 min; (S)-1-(*p*-ニトロフェニル) エタノール: 31.2 min; (R)-1-(*p*-ニトロフェニル) エタノール: 33.7 min.

5. 還元活性と酵素反応時間の検討

反応溶液は, ミミズ S-9 画分 (2.5 mg protein/ml) 5.6 ml, NADPH 再生系 (NADP 1.3 mM, G-6-P 10 mM, G-6-P-DH 0.4 unit/ml, MgCl₂ 2.5 mM) 4.3 ml, *p*-ニトロアセトフェノン (2.3 mg, 13.8 μmol) を含み, PBS により全量を 10 ml となるように調製し, このものを 37°C, 15, 30, 60, 90, 120, 1440 分間, それぞれ好氣的条件下にて恒温浸漬した. 反応溶液に内標準物質 (2-アセチルピロール) の AcOEt 溶液 5 ml を加え抽出後, 有機層を分取し, 減圧下溶媒を留去した. 残渣を hexane-EtOH (97:3, *v/v*, 10 ml) に溶解させ, HPLC 分析試料とした.

6. 還元活性と酵素濃度の検討

反応溶液は, ミミズ S-9 画分 (0, 0.156, 0.312, 0.625, 1.25, 2.5, 5 mg protein/ml) 5.6 ml, NADPH 再生系 (NADP 1.3 mM, G-6-P 10 mM, G-6-P-DH 0.4 unit/ml, MgCl₂ 2.5 mM) 4.3 ml, *p*-ニトロアセトフェノン (2.3 mg, 13.8 μmol) を含み, PBS により全量を 10 ml となるように調製し, このものを 37°C, 60 分間, それぞれ好氣的条件下にて恒温浸漬した. 反応溶液に内標準物質 (2-アセチルピロール) の AcOEt 溶液 5 ml を加え抽出後, 有機層を分取し, 減圧下溶媒を留去した. 残渣を hexane-EtOH (97:3, *v/v*, 10 ml) に溶解させ, HPLC 分析試料とした.

7. 還元活性と基質濃度の検討

反応溶液は, ミミズ S-9 画分 (2.5 mg protein/ml) 5.6 ml, NADPH 再生系 (NADP 1.3 mM, G-6-P 10 mM, G-6-P-DH 0.4 unit/ml, MgCl₂ 2.5 mM) 4.3 ml, *p*-ニトロアセトフェノン (最終濃度 0, 2.34×10^{-2} , 4.69×10^{-2} , 9.38×10^{-2} , 1.88×10^{-1} , 3.75×10^{-1} , 0.75×10^{-1} , 1.50, 3.00, 6.00, 25.00 mM) を含み, PBS により全量を 10 ml となるように調製し, このものを 37°C, 60 分間, それぞれ好氣的条件下にて恒温浸漬した. 反応溶液に内標準物質 (2-アセチルピロール) の AcOEt 溶液 5 ml を加え抽出後, 有機層を分取し, 減圧下溶媒を留去した. 残渣を hexane-EtOH (97:3, *v/v*, 10 ml) に溶解させ, HPLC 分析試料とした.

8. 還元活性と pH の検討

反応溶液は, ミミズ S-9 画分 (2.5 mg protein/ml) 5.6 ml, NADPH 再生系 (NADP 1.3 mM, G-6-P 10 mM, G-6-P-DH 0.4 unit/ml, MgCl₂ 2.5 mM) 4.3 ml, *p*-ニトロアセトフェノン (最終濃度 1.38 mM) を含み, 0.1 M K, Na-リン酸緩衝液 (pH 6.5, 7.0, 7.23, 7.4, 8.0, 8.5) により全量を 10 ml となるように調製し, このものを 37°C, 60 分間, それぞれ好氣的条件下にて恒温浸漬した. 反応溶液に内標準物質 (2-アセチルピロール) の AcOEt 溶液 5 ml を加え抽出後, 有機層を分取し, 減圧下溶媒を留去した. 残渣を hexane-EtOH (97:3, *v/v*, 10 ml) に溶解させ, HPLC 分析試料とした.

9. 還元活性と温度の検討

反応溶液は, ミミズ S-9 画分 (2.5 mg protein/ml) 5.6 ml, NADPH 再生系 (NADP 1.3 mM, G-6-P 10 mM, G-6-P-DH 0.4 unit/ml, MgCl₂ 2.5 mM) 4.3 ml, *p*-ニトロアセトフェノン (最終濃度 1.38 mM) を含み, PBS により全量を 10 ml となるように調製し, このものを 0, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55°C, 60 分間, それぞれ好氣的条件下にて恒温浸漬した. 反応溶液に内標準物質 (2-アセチルピロール) の AcOEt 溶液 5 ml を加え抽出後, 有機層を分取し, 減圧下溶媒を留去した.

残渣を hexane-EtOH (97:3, *v/v*, 10 ml) に溶解させ、HPLC 分析試料とした。

10. 4-ニトロアセトフェノン還元反応の速度論的解析

基質の還元活性は、HPLC を用いた内標準法により算出し、基質に対するミミズ S-9 画分の速度論的パラメータ (K_m , V_{max}) は、Eadie-Hofstee plots のグラフから解析した。

結果

はじめに、*p*-ニトロアセトフェノンのミミズ S-9 による還元反応 (Scheme 1) の初速度条件を決定するために、恒温浸漬時間と S-9 タンパク量を変化させ、生成物である 1-(*p*-ニトロフェニル) エタノール量を検討した。

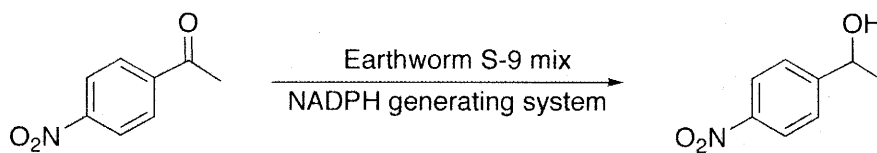
恒温浸漬時間を、15, 30, 60, 90, 120, 1440 分と

変化させたが、120 分までの範囲では、時間依存的に生成物の直線的増加が観察され、24 時間後には飽和に達した (Fig. 1)。

S-9 タンパク濃度を、0.17-5 mg protein/ml の範囲で変化させたところ、タンパク濃度 0.17 ~ 5 mg/ml の範囲で、タンパク量の増加に伴い、生成物の直線的増加が観察された (Fig. 2)。

これらの結果から、ミミズ S-9 による *p*-ニトロアセトフェノンの還元反応の初速度条件として、60 分の恒温浸漬時間と 2.5 mg protein/ml の S-9 タンパクを用いることとした。

続いて *p*-ニトロアセトフェノンのミミズ S-9 画分による 1-(*p*-ニトロフェニル) エタノールへの還元的代謝反応の速度論的解析を 2.34 nM ~ 24 mM の *p*-ニトロアセトフェノンの濃度範囲で行った (Fig. 3)。その結果、1-(*p*-ニトロフェニル) エタノールの生成は濃度依存的に上昇し、Michaelis-Menten の式に従うグラフとなった。



Scheme 1. Stereoselective reduction of *p*-nitroacetophenone by earthworm S-9 fraction.

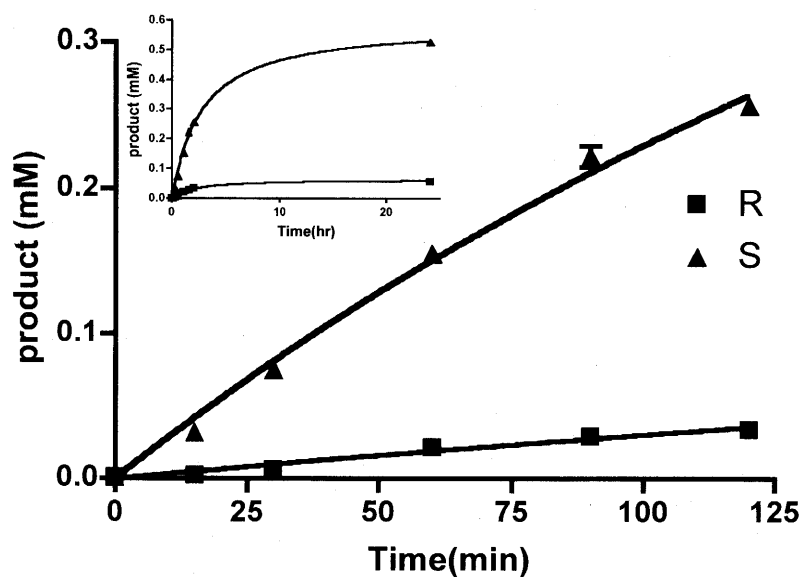


Fig. 1 Effect of incubation time on the production of 1-(*p*-nitrophenyl) ethanol from *p*-nitroacetophenone by earthworm S-9 fraction.

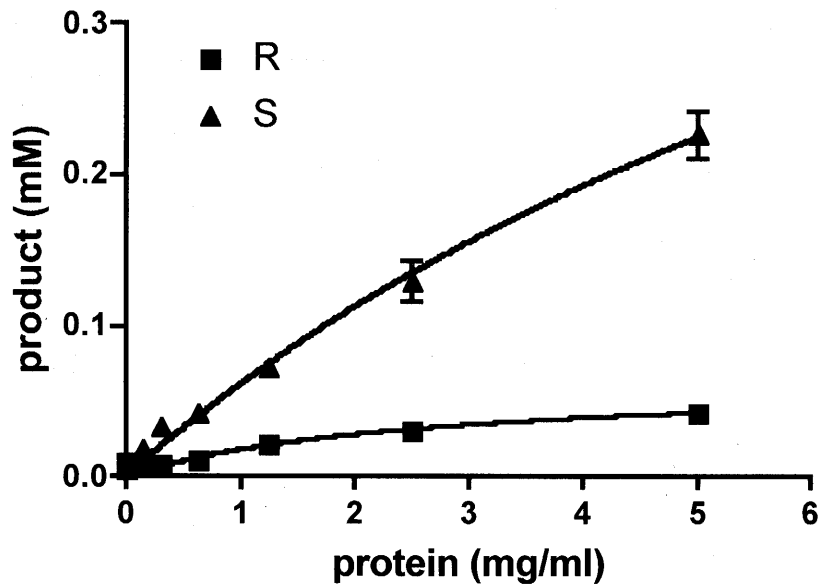


Fig. 2 Effect of amount of earthworm S-9 protein on the production of 1-(*p*-nitrophenyl) ethanol from *p*-nitroacetophenone by earthworm S-9 fraction.

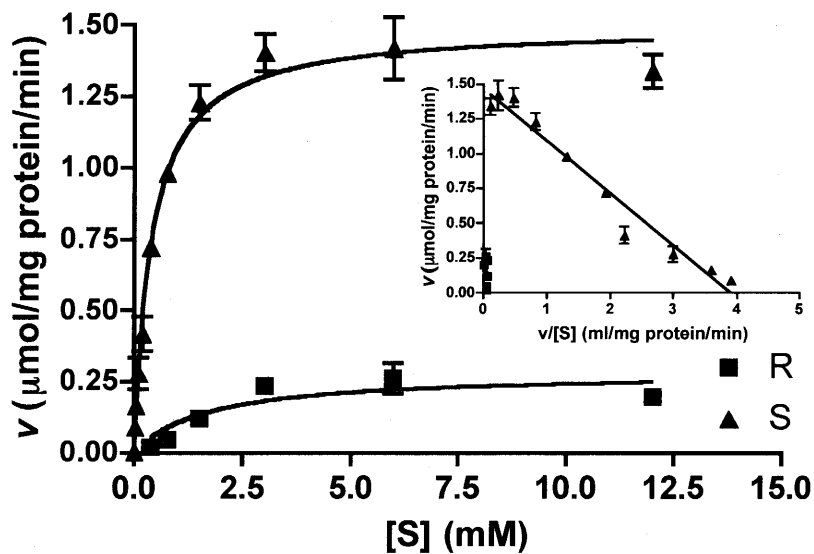


Fig. 3 Michaelis-Menten plots and Eadie Hofstee plots in the reduction of *p*-nitroacetophenone by earthworm S-9 fraction.

これを Eadie-Hofstee プロットにて解析したところ、一相性を示したことから、本反応には単独の酵素が関与していることが示唆された。

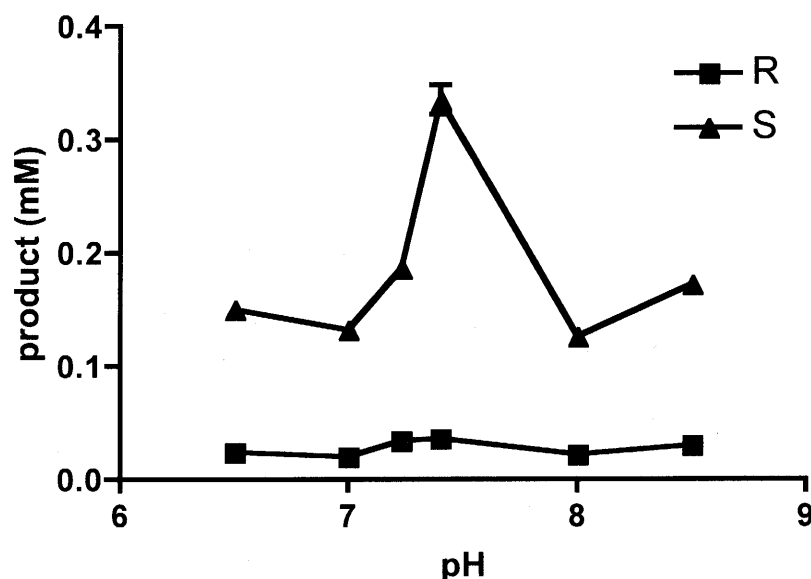
また、*R*, *S* 両対掌体の Michaelis 定数 (K_m) は、それぞれ 1.152 および 0.376 mM, 最大速度 (V_{max}) は 0.226 および $1.467 \mu\text{mol/mg protein/min}$ であった。その結果、 V_{max} 比 ($V_{max}(S)/V_{max}(R)$) は 6.5 となり、その選択性は優れてはいないものの、

本反応は (*S*)-アルコールへとより進行しやすい事が示唆された。

ところで、ミミズを細断したものの pH を測定したところ、7.23 であったため、本酵素反応の pH 依存性について検討した。pH を 6.5, 7.0, 7.23, 7.4, 8.0, 8.5 にそれぞれ調製した 0.1 M K, Na-リン酸緩衝液中で還元活性を検討したところ、本酵素反応は pH 7.23 ~ 8.0 の範囲内を頂点として最

Table 1. Kinetic parameters in the reduction of *p*-nitroacetophenone by earthworm S-9 fraction

	K_m (mM)	V_{max} (μ mol/mg protein/min)	Ratio $V_{max}(S) / V_{max}(R)$
R	1.152	0.226	6.5
S	0.376	1.467	

Fig. 4 Effect of pH of the reaction mixture on the production of 1-(*p*-nitrophenyl) ethanol from *p*-nitroacetophenone by earthworm S-9 fraction.

適な活性が得られることが示唆された (Fig. 4).

また、ミミズは変温動物であるため、酵素活性の温度による影響にも興味を持たれる。そこで、本酵素反応の温度依存性について検討した。反応温度を0, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55℃とした恒温槽中で還元活性を検討したところ、本酵素反応は40-50℃の範囲内を頂点として最適な活性が得られることが示唆された (Fig. 5)。

以上、*p*-ニトロアセトフェノンのミミズS-9画分における立体選択的還元について検討したところ、その選択性は満足のいくものではなかったものの、S配置優先性を示した。

また、本酵素反応はpH7.23-8.0の範囲内を頂点として最適な活性が得られることが示唆された。一般的に、哺乳類のアルデヒド及びケトン還元酵素は、pH5.0-8.0の領域に還元反応の最適

pHを有し、その逆反応である脱水素反応はpH10以上で最適であるため⁵⁾、本酵素源によるアルコールの酸化反応についても興味を持たれる。

ところで、本反応は一般的な実験動物由来の酵素の場合とは異なる温度 (40-50℃) で最適な反応条件が得られることが示唆された。これまでに報告されている哺乳類由来のカルボニル還元酵素による *p*-ニトロアセトフェノンの還元は、そのほとんどが生体内条件 (37℃) で検討され⁶⁾、また、ニンジン (*Daucus carota*)⁷⁾、パン酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)⁸⁾、カビ (*Mortierella isabellina*)⁹⁾、糸状菌 (*Geotrichum candidum*)¹¹⁾、*Aspergillus terreus*¹²⁾ 等の全細胞を用いた場合でも、25-35℃、あるいは室温という条件で反応させており、最適温度条件についての検討はほとんど無い。また、ラット肝3α-HSDによる

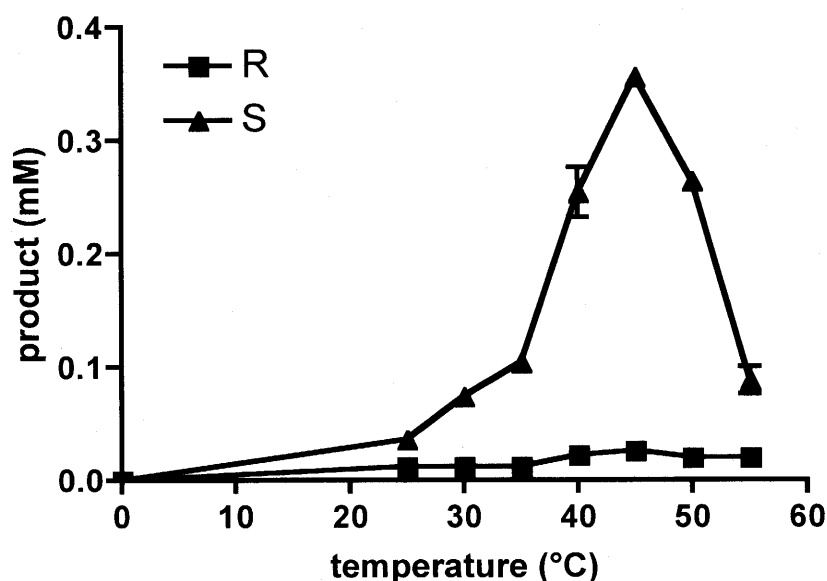


Fig. 5 Effect of incubation temperature on the production of 1-(*p*-nitrophenyl) ethanol from *p*-nitroacetophenone by earthworm S-9 fraction.

naltrexone の還元では、酵素の 45 °C の熱処理までは安定であるものの、50 °C 以上では失活していくという報告もある¹³⁾。従って、今後ミミズのカルボニル還元酵素を単離し、その構造を明らかにすることは、酵素の構造と機能を解析するうえで、極めて興味深いことであると考えられる。

以上の結果は、新しい酵素源を利用した反応を提示するとともに、ミミズが大量に入手が可能であることから、医薬品原料の製造や環境汚染物質の分解などの分野に应用されることが期待される。

REFERENCES

- 1) Nakajima N., Sugimoto M., Tsuboi S., Tsuji H., Ishihara K. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **69**, 2009-2011 (2005).
- 2) Ge T., Sun Z. J., Fu S. H., Liang G. D., *Protein Expr. Purif.*, **42**, 20-28 (2005).
- 3) Wang F., Wang C., Li M., Zhang J.P., Gui L. L., An X. M., Chang W. R., *J. Mol. Biol.*, **348**, 671-85 (2005).
- 4) Bradford C.M., *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254 (1976).
- 5) Felsted R.L., Bachur N.R., *Drug Metab. Rev.*, **11**, 1-60 (1980).
- 6) 例えば, Maser M., Bannenberg G., *Biochem. Pharmacol.*, **47**, 1805-1812 (1994).
- 7) Yadav J.S., Nanda S., Reddy P.T., Rao A.B., *J. Org. Chem.*, **67**, 3900-3903 (2002).
- 8) Takeshita M., Yoshida S., Kita R., Higuchi N., Kobayashi Y., *Chem. Pharm. Bull.*, **37**, 615-617 (1989).
- 9) Holland H.L., Bergen E.J., Chenchiah C., Khan S.H., Munoz B., Ninniss R.W., Richards D., *Can J. Chem.*, **65**, 502-507 (1987).
- 10) Homann M.J., Vail R.B., Previte E., Tamarez M., Morgan B., Dodds D.R., Zaks A., *Tetrahedron*, **60**, 789-797 (2004).
- 11) Comasseto J.V., Andrade L.H., Omori Á. T, Assis L.F., Porto Á. L.M., *J. Mol. Cat. B: Enzymatic*, **29**, 55-61 (2004).
- 12) Yamano S., Nakamoto N., Toki S., *Xenobiotica*, **29**, 917-930 (1999).