

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580131

研究課題名(和文) バイオ燃料電池の実用化に必須である高反応性カソード電極用酵素の研究開発

研究課題名(英文) Research and development of the highly-active cathodic enzyme necessary for the practical use of the bio-fuel cell

研究代表者

片岡 邦重 (KATAOKA, KUNISHIGE)

金沢大学・物質化学系・教授

研究者番号：40252712

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：バイオ燃料電池の実用化に必須である白金代替酸素還元触媒の創成を目的として、酸素の4電子還元反応を触媒するマルチ銅オキシダーゼをターゲットに、高反応性酵素の探索と既存酵素のタンパク質工学的な機能化を行った。探索研究では、嫌気性細菌のラッカーゼと、昆虫のクチクラ硬化ラッカーゼ遺伝子の発現系を構築し、前者が既存酵素と全く異なる性質を持つ事を明らかにした。さらに、微生物由来の既存酵素をベースとしたタンパク質工学的な改変により、酸素還元活性、電極反応性の向上に成功した。

研究成果の概要(英文)：For the development of the platinum-substitute anodic enzyme catalysts for bio-fuel cell, I performed the in silico screening to find new multi-copper oxidases and the mutations against the common enzymes to improve their oxygen reduction activity. In the screening for the new multi-copper oxidases, I found two laccase genes from an anaerobic bacterium and an insect. The heterologous expression systems for the laccase genes were successfully constructed, and the recombinant laccase from anaerobe was found to have unreported properties so far. Furthermore, the improvements of the bacterial common enzymes in the oxygen-reduction activity and the electrode response were achieved by protein engineering.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物化学

キーワード：バイオ燃料電池 マルチ銅オキシダーゼ ラッカーゼ 酵素電極 機能改変

## 1. 研究開始当初の背景

酵素が触媒する電極反応はバイオエレクトロカタリシスと呼ばれ、この反応を利用した電池、すなわちバイオ燃料電池が提案されている。バイオ燃料電池は、非常に温和な条件下での作動が可能であり、また、様々なバイオマスを燃料として直接利用できるという特徴を持つことから、家庭用電源、モバイル機器電源、使い捨て電源、体内埋め込み電源など次世代の電源として多方面への応用が期待されている。バイオ燃料電池は、アルコールや糖などを燃料として脱水素酵素や酸化酵素を用いて電子を取出す燃料酸化極(バイオアノード)と、酸素を電子受容体に水まで還元する酸素還元極(バイオカソード)により構成される。分子状酸素を直接水分子にまで還元できるマルチ銅オキシダーゼは、バイオカソード用酵素の最有力候補である。白金などの無機触媒を用いる反応と異なり、酵素による酸素還元反応では過酸化水素などの活性酸素種が酵素から放出されることなく反応が完結し、生成物は安全な水であるため、電極性能の低下を招きにくい。しかしながら、研究が先行している菌類のラッカーゼ、ピリルピンオキシダーゼ(BOD)、植物のアスコルビン酸オキシダーゼなどの酵素では、電極との電子移動効率や、酸素親和性・触媒活性が低く、電流値が実用レベルに到達しないなど問題も多い。バイオ燃料電池の実現には、高反応性・高安定性マルチ銅オキシダーゼの開発が急務である。欧米に於いても、オバマ政権のグリーンニューディール政策に代表される環境関連予算の重点配分により、バイオ燃料電池の研究に新規参入する研究者が増加し、酵素電極の開発競争は激化している。

一方、本研究代表者らは、マルチ銅オキシダーゼの遺伝子クローニング・発現系構築から反応機構解析、機能改変まで10年以上に渉る研究の蓄積があり、内外から高い評価を得ると同時に、BODのバイオ燃料電池への応用に関する京都大学との共同研究を通じ、高反応性酵素の必要性を早くから認識していた。平成21年度までの新エネルギー・産業技術総合開発機構からの委託研究を通じて、マルチ銅オキシダーゼの一種である大腸菌の一価銅オキシダーゼ(CueO)が、電極との直接電子移動による高効率な酸素還元反応を触媒することを見出し、本酵素をバイオカソードに用いると、BODより格段に優れた電極特性を示すことを報告した。しかしながら本酵素は、他のマルチ銅オキシダーゼより酸素還元の過電圧が高く、電池の出力が低いという欠点があり、そのままでは実用化に不十分な性能であった。

これら CueO 及び BOD に関する研究成果を踏まえ、また、欧米の研究動向に鑑み、バイオ燃料電池の実現には電極利用に特化した酵素が必要であると考えに至った。

そこで本研究は、既存の酵素に比べて酸素還元の触媒電流値が大きく、反応の過電圧が

小さいという特性を合わせ持ち、且つ酸素に対する親和性・還元活性の高い新規マルチ銅オキシダーゼを検索、または既存酵素をタンパク質工学的に機能改変することによって作出し、酸素還元極に応用することでバイオ燃料電池の性能を実用レベルまで引き上げることを目標とする。

## 2. 研究の目的

バイオ燃料電池は、次世代の電源として家庭用電源、モバイル機器電源、体内埋め込み電源など多方面への応用が期待されている。そこで本研究では、バイオ燃料電池の実用化に必須である白金代替酸素還元触媒の創成を目指し、酸素の4電子還元反応を触媒するマルチ銅オキシダーゼをターゲットに、高反応性酵素の探索とタンパク質工学的な高機能化を行う。探索研究では、酸素反応性が高いと期待される嫌気性細菌のラッカーゼと、高い安定性が期待される昆虫のクチクラ硬化ラッカーゼを標的として、新規ラッカーゼの発現系を構築する。同時に、微生物由来の既存酵素をベースとしたタンパク質工学的改変により、酸素還元活性、電極反応活性、安定性の向上を図り、バイオ燃料電池の酸素還元極用酵素の性能を実用レベルまで引き上げることを目標とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 新規マルチ銅オキシダーゼの検索と異種発現系の構築

*in silico* スクリーニングによる標的酵素の選定

酸素に対する親和性と触媒活性が高いと期待される嫌気性細菌のラッカーゼと、高い安定性と既存酵素と全く異なる基質特異性・電気化学特性が期待される昆虫のクチクラ硬化ラッカーゼを標的に DNA データベースを検索した。検索には、既知マルチ銅オキシダーゼの銅結合モチーフをコードする DNA 配列をプローブとして用いた。

### 新規ラッカーゼの異種発現系構築

*in silico* スクリーニングにより選択した、偏性嫌気性細菌 *Clostridium beijerinckii* の 2 ドメイン型ラッカーゼ(CbLac)と、貯穀害虫コクヌストモドキ *Tribolium castaneum* のラッカーゼ(TcLac2A)の構造遺伝子を全合成した。それぞれの ORF または成熟タンパク質コード配列を発現ベクターに連結し、大腸菌または昆虫培養細胞を用いた発現系の構築を行った。発現系の構築では、可溶性タグや、His-Tag を用いて活性な可溶性タンパク質の発現を検討した。また培養条件を検討し、安定な発現系の構築を目指した。

### 新規ラッカーゼ構造・機能解析

活性を持つ酵素の高発現に成功した CbLac を精製し、UV-Vis 吸収、CD、EPR スペクトル分析、原子吸光スペクトル分析等の分光学

的測定、さらに反応速度論など酵素化学的性質の検討を行った。

#### (2)変異導入による既存酵素の機能向上

以下の全ての変異導入実験では、DpnI 法による変異導入を行なった。変異は DNA シーケンスにより確認し、変異体は均一に精製してその後の実験に用いた。

##### CueO の電極反応特性の改善

CueO のタイプ I 銅配位残基 Cys500 と主鎖のアミド水素との水素結合を切断する (Leu502Pro 等) または追加する (Pro444Ala 等) 部位特異的変異導入を行い、また、Asp439Ala、Met510Leu と上記置換を組み合わせることで、タイプ I 銅電位の精密制御を行なった。

##### 既存酵素の機能解明と機能制御

a) CueO 三核銅部位近傍の変異導入による排水チャンネルの機能解明と活性制御

CueO の三核銅部位近傍の疎水性残基 Trp139 への変異導入と、三核銅部位から酵素外部へ生成物である水を排出する排水チャンネルに対する変異導入 (Gln451Ala/Leu, Glu106Phe/Ala) を行なった。

b) BOD タイプ I 銅近傍の構造と機能

ラッカーゼに於いてタイプ I 銅部位近傍に保存された酸性残基 Asp を BOD に導入する変異体 (Ser231Asp/Glu)、タイプ I 銅近傍分子表面に存在する Trp396、Asn197、Ser198 に変異を導入し、タイプ I 銅部位の疎水的環境が酵素活性に与える影響を検討した。

## 4. 研究成果

### (1)新規マルチ銅オキシダーゼの検索と異種発現系の構築

*in silico* スクリーニングによる標的酵素の選定

マルチ銅オキシダーゼは原核微生物、菌類、高等植物、節足動物から哺乳類まで、多くの生物種に見出されている。本研究では、酸素及び活性酸素種のスカベンジャーとして働いている可能性が高く、酸素に対する親和性と触媒活性が高いと期待される嫌気性細菌のラッカーゼと、高い安定性と既存酵素と全く異なる基質特異性・電気化学特性が期待される昆虫のクチクラ硬化ラッカーゼを標的に DNA データベースを検索し、目的酵素遺伝子の選定を行った。この *in silico* スクリーニングにより、アセトン・ブタノール発酵能を持つ偏性嫌気性細菌である *Clostridium beijerinckii* のゲノム DNA 上に 2 ドメイン型ラッカーゼの遺伝子、貯穀害虫でモデル甲虫であるコクヌストモドキ *Tribolium castaneum* のゲノム配列に 3 ドメイン型ラッカーゼ遺伝子 (TcLac2A) を見出した。

#### 新規ラッカーゼの異種発現系構築

a) CbLac の大腸菌発現系の構築

偏性嫌気性細菌 *C. beijerinckii* の 2 ドメイン

型ラッカーゼ (CbLac) 構造遺伝子の全合成を行い、マルトース結合タンパク質 (MBP) との融合タンパク質として大腸菌を宿主とする異種発現に成功した。MBP 融合タンパク質を均一に精製した後、MBP を切除した組換え型 CbLac の分光学的性質を検討した。CbLac は、UV-Vis スペクトルで 615 nm に対称性の高い吸収帯を示し、EPR スペクトルではタイプ I 銅のシグナルが rhombic となる等、これまでマルチ銅オキシダーゼで報告の無い軸位に酸素配位子をとるタイプ I 銅部位部位を持つと考えられた。このため、CbLac はタイプ I 銅の酸化還元電位は低く、基質の酸化活性が低いことも明らかになった。バイオ燃料電池のカソード極に応用するためにはタイプ I 銅の酸化還元電位を正にシフトさせる必要がある。Asp281 が CbLac のタイプ I 銅軸位の配位残基であると示唆されたことから、この残基をメチオニンに置換する変異導入を行なったが、変異体は銅を含まないアポ型酵素として発現し、ベクター、ホスト、培養条件等々を検討したが活性を持つ変異型酵素は得られなかった。

b) TcLac2A の昆虫培養細胞発現系の構築

貯穀害虫でモデル甲虫であるコクヌストモドキ *T. castaneum* のラッカーゼ (TcLac2A) 構造遺伝子の全合成を行い、昆虫培養細胞 Sf9 を宿主とした一過性発現系を検討した。昆虫ラッカーゼに特有の、Cys 残基を多く含む 133 アミノ酸残基からなる N 末端領域を削除した TcLac2A $\Delta$ N 遺伝子を、マウス IgG の分泌シグナルを利用して細胞外に組換え型酵素を分泌発現させることに成功したが、この欠失変異体は、銅を含まず活性を示さないアポタンパク質であった。そこで、構造遺伝子全領域の合成を行い、Sf9 を宿主とした異種発現系の構築を試みた。この結果、初めて活性を示す TcLac2A の異種発現に成功し、野生型の分泌シグナルと Cys 残基に富む領域が活性発現に重要な役割を果たす事が明らかになった。しかしながら、組換え型 TcLac2A の発現量と活性は低く、今後、発現量と銅含量の増大を目指す必要がある。

(2) 変異導入による既存酵素の機能向上

##### CueO の電極反応特性の改善

大腸菌の一価銅オキシダーゼ CueO を改変ベースタンパク質に用いて、電極反応特性の向上を目的とした機能改変を行った。CueO のタイプ I 銅配位残基と周辺の主鎖・側鎖の間に存在する水素結合のうち、配位残基 Cys500 と主鎖のアミド水素との水素結合を切断する Leu502Pro と、追加する Pro444Ala 変異体を作製し、タイプ I 銅の電位と酵素活性の制御を試みた。また、タイプ I 銅の配位残基 His443 と Asp439 間の水素結合の切断 (Asp439Ala) と、配位残基 Met510 の置換を同時に導入した二重、三重変異型酵素を作製しその性質を検討した。この結果タイプ I 銅電

位は、野生型酵素の 0.36 V から、Asp439Ala、Pro444Ala では 0.43 V、二重変異体の Asp439Ala/Met510Leu、Asp439Ala/Pro444Ala ではそれぞれ 0.39、0.46 V に上昇し、これに伴い野生型酵素の 10~100 倍以上の触媒活性を示すことが明らかになった。しかしながら、Asp439Ala/Pro444Ala/Met510Leu の三重変異体では活性を失った。以上の様に、変異導入によりタイプ I 銅部位の電位と酵素活性の制御に成功し、マルチ銅オキシダーゼの酵素機能向上に対する方法論を確立した。

#### 既存酵素の機能解明と機能制御

a) CueO 三核銅部位近傍の変異導入による排水チャンネルの機能解明と活性制御

CueO の酸素還元三核銅部位の電位制御による酵素活性向上を目的として、三核銅部位近傍の疎水性残基 Trp139 への変異導入と、三核銅部位から酵素外部へ生成物である水を排出する排水チャンネルに対する変異導入 (Gln451Ala/Leu, Glu106Phe/Ala) を行なった。Trp139Phe の活性は、野生型酵素の 50% 程度に低下したことから、方向性は逆であるが、三核銅部位の疎水性を制御する事で活性をコントロールできる可能性が示唆された。排水チャンネル近傍への変異導入では、Gln451 及び Glu106 を Ala に置換すると三核銅部位の疎水性が低下し、酸素に対する親和性が低下する事が示唆された。これらの残基を含む排水チャンネル近傍への変異導入により酵素活性を制御できる可能性を示した。

b) BOD タイプ I 銅近傍の構造と機能

BOD のタイプ I 銅近傍に存在するアミノ酸残基、Asn197, Ser198, Ser231 を、Phe, Glu, His などに置換した変異型酵素を作製した。Asn197Phe, Ser198Phe ではアミノフェノール型基質に対する活性が野生型酵素に比べて増大するなど、基質特異性が変化することが明らかになった。また、Ser231Asp, Ser231Glu ではフェノール型基質に対する相対活性が増大し、Ser231 が基質との相互作用に重要であることがわかった。また、BOD のタイプ I 銅部位近傍の分子表面に存在する Trp 残基を Thr 置換 (Trp396Thr) することで、タイプ I 銅近傍のタンパク質内部への水の接近を容易にし、タイプ I 銅電位を負にシフトさせる事に成功した。以上の結果から、BOD におけるタイプ I 銅周辺のこれらアミノ酸残基は、電極との反応性を向上させる変異導入の新たなターゲットとなり得ると考えられる。

以上の様に、銅中心の疎水的環境を改変することにより、マルチ銅オキシダーゼの銅中心の電位と酵素活性を制御する新たな方法論の開発に成功した。また水素結合による活性制御戦略を組み合わせる事で、マルチ銅オキシダーゼの機能改変の幅を広げることが可能となった。

## 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7件)

H. Komori, R. Sugiyama, K. Kataoka, K. Miyazaki, Y. Higuchi, and T. Sakurai, New Insights into the Catalytic Active-Site Structure of Multicopper Oxidases, *Acta Cryst.* **D70**, 772-779 (2014), 査読あり, DOI: 10.1107/S1399004713033051

H. Komori, T. Kajikawa, K. Kataoka, Y. Higuchi, and T. Sakurai, Crystal Structure of the CueO Mutants at Glu506, the Key Amino Acid Located in the Proton Transfer Pathway for Dioxygen Reduction, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **438**, 686-690 (2013), 査読あり, DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.07.121

K. Kataoka and T. Sakurai, Role of the Hydrogen Bond Connecting the Ligands for Substrate and Type I Copper in the Cuprous Oxidase, CueO, *Chem. Lett.* **42**, 1102-1104 (2013), 査読あり, DOI: 10.1246/cl.130422

K. Kataoka, H. Kogi, S. Tsujimura, and T. Sakurai, Modifications of Laccase Activities of Copper Efflux Oxidase, CueO by Synergistic Mutations in the First and Second Coordination Spheres of the Type I Copper Center, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **431**, 393-397 (2013), 査読あり, DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.01.040

T. Kajikawa, K. Kataoka and T. Sakurai, Modifications on the Hydrogen Bond Network by Mutations of *Escherichia coli* Copper Efflux Oxidase Affect the Process of Proton Transfer to Dioxygen Leading to Alterations of Enzymatic Activities, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **422**, 152-156 (2012), 査読あり, DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.04.127

H. Komori, R. Sugiyama, K. Kataoka, Y. Higuchi, and T. Sakurai, An O-Centered Structure of the Trinuclear Copper Center in the Cys500Ser/Glu506Gln Mutant of CueO and Structural Changes in Low to High X-Ray Dose Conditions, *Angewandte Chemie*, **51**, 1861-1864 (2012), 査読あり, DOI: 10.1002/anie.201107739

K. Kataoka, S. Hirota, Y. Maeda, H. Kogi, N. Shinohara, M. Sekimoto, and T. Sakurai, Enhancement of Laccase Activity through the Construction and Breakdown of a Hydrogen Bond at the Type I Copper Center in *Escherichia coli* CueO and the Deletion Mutant  $\Delta\alpha 5-7$  CueO, *Biochemistry*, **50**, 558-565 (2011), 査読あり, DOI: 10.1021/bi101107c

〔学会発表〕(計 15 件)

押川直美, マルチ銅オキシダーゼの酸素 4 電子還元における第 4 の電子ドナーの探索, 錯体化学会 第 63 回討論会, 2013 年 11 月 2 日~11 月 4 日, 琉球大学

原唯歩, *Clostridium* 属細菌由来の新規マルチ銅オキシダーゼの異種発現と性質, 錯体化学会 第 63 回討論会, 2013 年 11 月 2 日~11 月 4 日, 琉球大学

押川直美, ビリルビンオキシダーゼの酸素還元部位近傍に配置された Trp132 への変異導入, 第 86 回 日本生化学会大会, 2013 年 9 月 11 日~9 月 13 日, パシフィコ横浜

片岡邦重, マルチ銅酸化酵素における酸素還元反応中心への水素結合ネットワークによるプロトン輸送, 第 86 回 日本生化学会大会, 2013 年 9 月 11 日~9 月 13 日, パシフィコ横浜

片岡邦重, マルチ銅酸化酵素 CueO における酸素還元反応中心へのプロトン輸送経路, 2013 年度 酵素補酵素研究会, 2013 年 6 月 21 日~6 月 22 日, 立命館大学

山本萌, Contribution from a tryptophan residue stacked on the histidine ligand to a type III copper in multicopper oxidases on the four-electron reduction process of dioxygen, 第 23 回 金属の関与する生体関連反応シンポジウム, 2013 年 6 月 21 日~6 月 22 日, 武蔵野大学

櫻井武, マルチ銅オキシダーゼ CueO の三核銅部位近傍に配置された酸性アミノ酸残基の酸素 4 電子還元における役割, 第 40 回 生体分子科学討論会, 2013 年 6 月 7 日~6 月 8 日, 大阪大学

原唯歩, *Clostridium* 属細菌に由来する新規金属オキシダーゼの異種発現と性質, 日本農芸化学会 2013 年度大会, 2013 年 03 月 24 日~03 月 27 日, 東北大学

原唯歩, *Clostridium* 属細菌ゲノムに見出された新規 2 ドメインラッカーゼの異種発現, 第 85 回日本生化学会大会, 2012 年 12 月 14 日~12 月 16 日, マリンメッセ博多

櫻井武, Modifications of Hydrogen Bond Network by Mutations of CueO Affect the Process of Proton Transfer to Dioxygen Leading to Alterations of Enzymatic Activities, 錯体化学会第 62 回討論会, 2012 年 9 月 21 日~9 月 23 日, 富山大学

片岡邦重, マルチ銅酸化酵素 CueO における酸素還元反応中心へのプロトン輸送, 2012

年度酵素補酵素研究会, 2012 年 7 月 27 日~7 月 28 日, 名古屋大学

片岡邦重, Enhancement in Enzymatic Activities for the Copper Efflux Oxidase, CueO by Tuning the Redox Potential of Type I Cu, The 12th Japan-China-Korea Joint Symposium on Enzyme Engineering, 2012 年 5 月 28 日~5 月 31 日, 金沢市

小木裕貴, Type I 銅部位の電位制御によるマルチ銅オキシダーゼ CueO の反応特性改変, 第 84 回日本生化学会大会, 2011 年 9 月 21 日~9 月 24 日, 京都国際会議場

中佐英利加, 好熱性細菌 *Geobacillus kaustophilus* 由来マルチ銅オキシダーゼの異種発現と諸性質, 第 84 回日本生化学会大会, 2011 年 9 月 21 日~9 月 24 日, 京都国際会議場

小木裕貴, マルチ銅オキシダーゼ CueO のタイプ I 銅第二配位圏への変異導入による酸化還元電位の制御と酵素活性, 錯体化学会第 61 回討論会, 2011 年 9 月 17 日~9 月 19 日, 岡山理科大学

〔図書〕(計 1 件)

T. Sakurai and K. Kataoka, John Wiley & Sons, Inc., New Jersey, Multicopper Proteins, in Copper-Oxygen Chemistry, (Eds by K.D. Karlin and S. Itoh), 131-168 (2011)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

片岡 邦重 (KATAOKA, Kunishige)  
金沢大学・理工研究域物質化学系・教授  
研究者番号: 40252712

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

加納 健司 (KANO, Kenji)  
京都大学・大学院農学研究科・教授  
研究者番号: 10152828

樋口 芳樹 (HIGUCHI, Yoshiki)  
兵庫県立大学・大学院生命理学研究科・教授  
研究者番号: 90183574