

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：13301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26650031

研究課題名(和文) 酵素過程の逆反応実現により水から還元力を取り出す試み

研究課題名(英文) Attempts to obtain electrons from water molecules by realizing the reversed reaction of enzymatic process

研究代表者

櫻井 武 (Takeshi, Sakurai)

金沢大学・物質化学系・教授

研究者番号：90116038

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：マルチ銅オキシダーゼは基質から引き抜いた電子を三核銅部位に分子内長距離輸送し、共基質である酸素を4電子還元し水を生成する。本研究ではこの反応を逆向きに回転させることを目的とし、変異導入によってタイプ1銅の酸化還元電位を正電位シフトさせる戦略を立てた。Cue0のタイプ1銅配位子及びその外圏に種々の改変を施し、タイプ1銅の酸化還元電位を正電位シフトさせることに成功し、様々の電極材料を用いて直接電気化学測定を行った。また、酸化還元電位が元来高いビリルビンオキシダーゼについて電気化学測定を行ったが、酸素の発生を示唆する電気化学応答は得られなかった。別の酵素について同様の検討を継続中である。

研究成果の概要(英文)：Multicopper oxidase is a class of enzymes to perform the four-electron reduction of dioxygen at the trinuclear copper center by utilizing electrons from substrates extracted at the type I copper center. The aim of this study is to realize the reverse reaction of this four-electron reduction of dioxygen. Our strategy to realize this attempt was to shift the oxidation-reduction potential of the type I copper center towards positive direction by performing mutations at the ligands to type I copper and/or amino acids located in the outer coordination spheres. Mutations on Cue0 and bilirubin oxidase were succeeded but we could not realize the reverse reaction to form dioxygen even utilizing a variety of electrode materials. We are trying to realize our aim by using other multicopper oxidases.

研究分野：生物化学

キーワード：マルチ銅オキシダーゼ 逆反応 酸素4電子還元 水の酸化

1. 研究開始当初の背景

- (1) 我々は CueO、ビリルビンオキシダーゼなど数種のマルチ銅オキシダーゼの大量発現系に構築に成功しており、それらに対して任意の改変を行うことができる状況にあった。
- (2) マルチ銅オキシダーゼは末端酸化酵素とともに酸素を4電子還元することのできる酵素であり、酵素活性と活性部位の酸化還元電位の関係が明らかになりつつあった。
- (3) マルチ銅オキシダーゼは膜結合性タンパク質である末端酸化酵素とは異なり、水溶性のタンパク質であることから、現時点において実用化はされていないが、バイオセンサーや生物燃料電池の電極触媒としての利用を目指す研究が欧米では盛んに行われている。
- (4) 人工光合成の研究が活発になり、水から酸素を発生する酸素発生中心に関する研究が脚光を浴びつつある。しかしながら逆反応過程を触媒することの出来るマルチ銅オキシダーゼを利用した研究は全く行われていなかった。

2. 研究の目的

- (1) マルチ銅オキシダーゼのタイプ1銅の酸化還元電位を、遺伝子改変によって正電位方向または負電位方向へシフトさせ、酸素還元を行うことのできる可能性のある三核銅部位の酸化還元電位まで近づけるか、または、電位の正負関係を完全に逆転させる。
- (2) マルチ銅オキシダーゼの改変は、活性部位を構成する銅配位子またはその外圏(第2配位圏)にとどめて、タンパク質の構造変化まで及ばないように配慮する。
- (3) マルチ銅オキシダーゼの改変体の直接電気化学を、メディエーターなどを用いることなく実現し、電極触媒として用いることによって、高い電位における水の酸化(酸素の4電子還元)の逆反応に相当する)を実現する。

3. 研究の方法

- (1) CueO およびビリルビンオキシダーゼのタイプ1銅配位子の一つであるメチオニン(メチオニン)を菌類のラッカーゼで見られる非配位性のアミノ酸であるロイシン、イソロイシン、バリンなどに変換した変異体を作成して、酸化還元電位を天然型酵素の酸化還元電位よりも正電位方向にシフトさせる。
- (2) CueO およびビリルビンオキシダーゼのタイプ1銅配位子のメチオニンをグルタミンに変異させ、酸化還元電位を天然型酵素の酸化還元電位よりも負方向にシフトさせる。この実験は(1)の実験と正反対の改変を行うことにより、タイプ1銅と酸化還元電位の関係について対照的に検討することを目的としている。
- (3) CueO のタイプ1銅配位子であるヒスチジンのイミダゾール基の一つに水素結合した

アスパラギン酸を中性アミノ酸に変異させる。これは、配位子の電子供与性を穏やかに微調整することにより、タイプ1銅の酸化還元電位を正方向にシフトさせるとともに、電子伝達経路に対して摂動を加えることを目的としている。

(4) CueO のタイプ1銅配位子であるシステイン残基の側鎖-SH基と水素結合可能な位置に配置されているプロリン残基(イミノ酸であるため、ポリペプチド中では水素結合不可能)を他のアミノ酸に変異させることにより(ペプチド結合を形成した時、水素結合可能な-NH<sub>2</sub>を有する)酸化還元電位を正方向にシフトさせる。

(5) 以上の様々な変異を2ないし3種類組み合わせ、それらの相乗効果により、変異導入の効果を増大させる。

(6) 天然型酵素および変異体のサイクリックボルタンメトリーを酸素の存在下と非存在下の両方で行い、酸素還元過程を追跡する。また、逆反応の可能性を検討する。これらの測定には、プロモータを自己集合させた修飾金電極または最近、種類の増えつつある様々なカーボン電極を用いることにより、それぞれの酵素に最適な電気化学系を探索する。

4. 研究成果

(1) 変異体の作製とキャラクタリゼーション: CueO およびビリルビンオキシダーゼの様々なシングル、ダブル、および、トリプルミュータントを作成し、タンパク分子あたりの銅含量や各種スペクトル測定(紫外可視吸収、円二色性、電子スピン共鳴スペクトルなど)から、変異導入に成功していることを確認した。また、4つの銅部位に致命的な構造や性質の変化が起こっていないことを確認した。ただし、一部のビリルビンオキシダーゼ変異体では、銅含量の低下や還元体としての発現などが見られたが、酵素活性の発現に必要な4つの銅原子は全て含有していたことから、酵素活性には影響ないと判断した。また、休止状態の相違は酵素活性には影響しないことを確認した。これは、ターンオーバーさえ可能であれば、出発の状態は関係ないからである。

(2) 変異体の電気化学挙動: 各変異体の酵素活性とタイプ1銅の酸化還元電位を測定したところ、予想通りタイプ1銅の酸化還元電位の正方向へのシフトが観測され、酵素活性が上昇する傾向と良く対応していた。一方、逆に、酵素活性が低下する場合もあり、最も期待していた三重変異体では酵素活性は消失していた。変異導入によって、電子の受容部位であるタイプ1銅と酸素の還元部位であるタイプ2銅と一対のタイプ3銅からなる三核銅部位の酸化還元電位の相対的な正負関係が逆転するほど大きく変化し、酸素から水への変換の逆反応が可能な状況へと変換することが出来た。

しかしながら、電気化学測定では、電極反

応が起こりにくくなっていた。これは、酸化還元電位が大きく正電位シフトしたため、変異体の作成後、電子欠損状態で酸素との反応が進行し、その結果生じた活性酸素種によりタンパク質の電子移動に関わる部分がダメージを受けたためかもしれない(X線結晶構造解析を行えば確認できる可能性があるが、本研究テーマから逸脱しているので、何が起こったかまでは追跡していない)。タイプ1銅のスペクトル的な性質には異常は見られないことから、銅結合部位そのものへの摂動は起こっておらず、その周辺部での予期せぬ改変が原因であると考えられる。

そこで、三重変異体の利用はあきらめて、期待通りの改変効果を示した二重変異体を用いて電気化学的な測定実験を行うこととした。

(3) 新規な電子移動経路：ビリルビンオキシダーゼではタイプ1銅に配位したヒスチジンにトリプトファンが共有結合していることが明らかとなり、この経路が電子輸送経路として機能していることが予想されたことから、トリプトファンに変異導入し、電気化学的挙動を調べた。その結果、翻訳後修飾により生じた新しい結合が、タンパク質中における新規な電子伝達経路として機能している可能性が高いことが明らかとなった。この知見は新規な研究テーマへとつながるものであり、今後様々な方法論によるアプローチがなされるものと期待される。

(4) 様々な電極材料によるマルチ銅オキシダーゼの電気化学：天然型および各種変異体の電気化学測定を酸素の非存在下と存在下の両方で測定した。作用電極としては各種プロモータで修飾した金電極および各種炭素電極(メソポーラスカーボン、ケッチェンブラック、MgO テンプレートカーボン、カーボンナノチューブ)を用いた。メソポーラスカーボンとしては従来から用いられてきた疎水性のカーボン以外に、より高い電流密度を得ることが期待される親水性カーボンを用いた。しかしながら、親水性のカーボンは単独では容易に電極表面から剥離してしまったため、疎水性と親水性のメソポーラスカーボンを混合して使用した(良好な電気化学応答を得るためには、80:20の比率が、最適であることがわかった)。

(5) 電極とタンパク質のフォームによる相互作用の相違と触媒過程逆回転の試み：アルゴン下と酸素下の両方で天然型および各種変異体のサイクリックボルタンメトリーを行ったところ、多くの場合においてタイプ1銅に由来する酸化還元波が測定された。カーボン系電極材料の測定では対称的な電気化学応答にならなかったことから、酸化状態と還元状態においてタンパク質とカーボン電極との相互作用には相違があるものと思われる。

酸素存在下では、タイプ1銅を経由して電極から効率的にマルチ銅オキシダーゼに電

子が供給されることにより、さらに電流密度が増大した。すなわち、多くの変異体は天然型酵素よりも、高い電位で酸素を還元する触媒作用を示したことから、燃料電位の電極触媒として最適であることがわかった。一方、酸素非存在下では、高い電位において水の酸化に対応する電流が認められず、目的とする酵素の逆回転は、再現性良く認められなかった。本研究ではマルチ銅オキシダーゼの中でも酸化還元電位が比較的負電位側に寄っている Cue0 を中心に用いたが、酸化還元電位がより正側にある微生物起源のラッカーゼを準備中であり、同様の実験を継続する予定である。

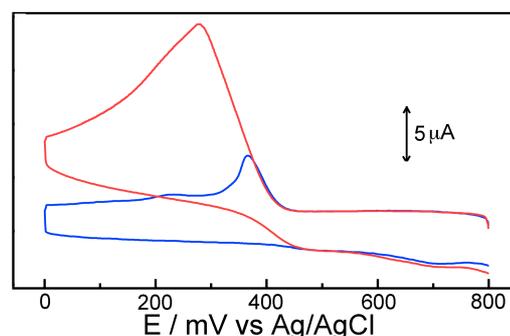


図1 メソポーラスカーボンを用いたビリルビンオキシダーゼの Ar(青)および O<sub>2</sub>(赤)下でのサイクリックボルタンメトリー

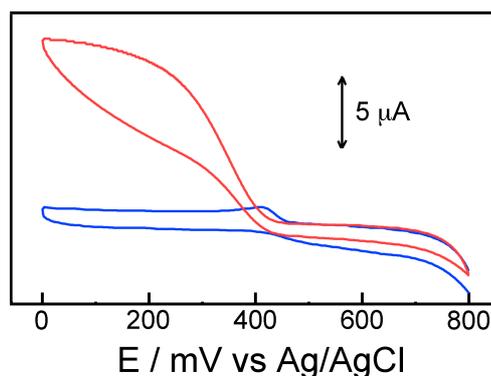


図2 疎水性と親水性の混合メソポーラスカーボンを用いた Cue0 の二重変異体 D439A/M510L の Ar(青)および O<sub>2</sub>(赤)下でのサイクリックボルタンメトリー

## 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 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

ビリルビンオキシダーゼのタイプ1銅部に隣接する Trp396 の役割、奥田葉子、片岡邦重、櫻井武、日本化学会平成27年度北陸地区講演会と研究発表会、金沢大学、平成27年11月27日

基質特異性の改変を目的としたビリル

ピンオキシダーゼのタイプI銅部位近傍  
への酸性アミノ酸導入、奥田葉子、押川  
直美、片岡邦重、櫻井武、錯体化学会第  
65回討論会、奈良女子大学、平成27  
年9月21-23日

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

櫻井 武 (SAKURAI TAKESHI)  
金沢大学・物質化学系・教授  
研究者番号：90116038