

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05432

研究課題名(和文) 反応中間体の構造解析によるマルチ銅オキシダーゼの酸素還元機構の解明と応用

研究課題名(英文) Elucidation of the oxygen reduction mechanism of multicopper oxidase by structural analysis of reaction intermediates and its application.

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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：マルチ銅オキシダーゼ(MCO)は、基質を酸化した電子を用いて酸素を4電子還元し水を生成する反応を触媒する。本研究では、MCOの一種である大腸菌の一種銅酸化酵素CueOを対象に、酸素還元反応中間体の構造解析を目指して研究を実施した。三重変異の導入により中間体を安定化させることに成功し、中性子線回折に使用できる良質で大きな結晶を再現性良く作製した。また、進化分子工学的手法を用いて6種類の新規高活性型アミノ酸置換体を取得した。一部は構造解析にも成功し、ドメイン3のタワーープ領域の不安定化が活性増大を招くことを明らかにした。本研究は、MCOの反応制御に新たな方法論を与え、その産業応用に貢献する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マルチ銅オキシダーゼ(MCO)は様々な基質を電子供与体として利用できるためその応用範囲が広い。例えばラッカーゼは製紙工業におけるパルプの脱リグニン・漂白工程、繊維産業などの脱色工程や排水処理に利用されている。他にもバイオエタノール生産のためのリファイニング工程や、医薬品の合成、バイオ燃料電池のカソード電極用触媒として利用や、環境中の金属イオンの濃縮・回収に利用できるなどMCOの応用範囲が拡大している。本研究では、MCOの反応機構を解析すると同時に、指向進化によりMCOの高機能化の新たな方法論を開発した。今後のMCOの産業応用に大いに貢献する成果と言える。

研究成果の概要(英文)：Multicopper oxidases (MCOs) catalyze the oxidation of a wide range of substrates by reducing O<sub>2</sub> to H<sub>2</sub>O without releasing activated oxygen species. In this study, we aimed to elucidate the structure of the 4-electron reduction intermediate of oxygen using the cuprous oxidase CueO from *Escherichia coli*. We succeeded in stabilizing the intermediate by introducing a triple mutation, and produced a high-quality crystal that can be used for neutron diffraction. In addition, directed evolution has yielded six very active mutants. Some also succeeded in structural analysis, and revealed that destabilization of the tower loop region of domain 3 leads to increased activity. These results provide a new methodology for controlling the activity of MCOs and contribute to their industrial application.

研究分野：生化学

キーワード：マルチ銅オキシダーゼ 構造解析 反応機構 指向進化

## 1. 研究開始当初の背景

タンパク質の構造解析には広く X 線回折法が利用されているが、活性中心に金属を持つ金属含有酸化還元酵素の構造解析では、金属中心が迅速に還元され反応が進行するため、酸化型の金属中心の構造を X 線回折法で観察することは困難である。これに対し、低エネルギーの中性子線を用いる回折法では、還元反応が起こりにくく、酸化型の金属中心構造が得られると期待される。また、中性子線回折では、X 線回折法では観察が難しい水素原子の位置を決定することができるため、プロトン移動反応を正確にトレースできる。

本研究の材料であるマルチ銅オキシダーゼ (MCO) は、分子内にタイプ I, II, III 銅に分類される 3 種、計 4 個の酵素活性に必須な銅イオンを含む金属酵素で、タイプ I 銅で基質を酸化した電子を用いて、タイプ II, III 銅からなる三核銅部位で酸素を 4 電子還元し水を生成する反応を触媒する。MCO は様々な基質を電子供与体として利用できるうえ生成物が水であるため、パルプ及び繊維の漂白・脱色、染色、有害物質の分解処理、臨床検査試薬など多岐にわたり産業利用されている。また、MCO は電極からも電子を受容し、酸素を最終受容体とするため、生物燃料電池のカソード電極用酵素として大きな注目を集めている。このような MCO の酸素還元反応は、活性酸素を系外に放出することなく水にまで還元できることを特徴とし、MCO と酸素呼吸鎖の末端酸化酵素のみが実現できる。しかしながら MCO の三核銅部位における酸素 4 電子還元反応機構と三核銅部位へのプロトン移動と共役した電子移動反応 (PCET) は未だ完全には解明されておらず、酸素還元反応の制御メカニズムを明らかにして産業用酵素の機能を向上させる為にも、詳細な反応機構の解明が期待されている。

## 2. 研究の目的

本研究では、次の二つの研究目標を設定した。第一に、中性子線構造解析の手法を用いて MCO 反応中間体の水素原子座標を決定し、プロトネーションによる酸素還元反応の全容を解明する。中性子線回折には大型結晶の作成が必要であるため、まずは CueO を改変して結晶性の向上を図るとともに、X 線結晶構造解析で高解像度の解析が可能な質の高い結晶の作成を目的とする。

第二に、進化分子工学的手法を用いて、酸素還元活性中心 (三核銅部位) 近傍に変異を導入することで、酸素還元反応の直接制御技術を開発する。これまでの変異導入による酵素活性化は、電子受容部位であるタイプ I 銅部位の酸化還元電位を制御することで達成されていたが、この電位が三核銅部位の電位より正側にシフトすると分子内電子移動が不利となり活性が低下する。三核銅部位の電位をシフトさせ、また、三核銅部位へのプロトンや酸素の供給、生成物である水の排出に關する残基に置換が起こると活性が増大する可能性がある。そこで、CueO 遺伝子に error-prone PCR 法でランダム変異を導入し、ライブラリーをスクリーニングすることで三核銅周辺の変異が酵素活性に及ぼす影響を検討する。指向進化による新規の高活性化変異と、タイプ I 銅部位の酸化還元電位の制御を組み合わせることで、酵素活性の飛躍的増大を目標とする。

## 3. 研究の方法

### (1) CueO を用いる反応中間体の構造解析

変異導入プライマーによる PCR 法を用いて、反応中間体の状態で安定に存在する CueO 二重変異体遺伝子 (C500S/E506Q) をテンプレートに、三重変異体 (C500S/E506Q/W139F) 遺伝子を作製し、同様に発現・精製した。WT CueO と同様、10~20% PEG3350 及び 0.1 M KNO<sub>3</sub> を含む母液を用い、ハンギングドロップ蒸気拡散法により結晶化を試みた。結晶化ドロップはタンパク質と母液を 1:1 で混合し、計 2 マイクロリットルとなるように調整し、20°C でインキュベートして

軽水中で結晶化を行った。

## (2) 三核銅部位の変異導入による酸素還元反応の直接制御

### a) CueO 及びピリルビン酸化酵素へのランダム変異導入

CueO 遺伝子へのランダム変異導入には Error-prone PCR 法を用いた。ランダム変異を誘発した CueO 遺伝子を持つプラスミドで大腸菌を形質転換し、約 10,000 個のコロニーからなる変異型 CueO 遺伝子ライブラリーを調製した。ABTS 酸化による着色を指標に高活性化株をスクリーニングした。WT CueO 発現株と比較して着色が顕著な変異体の DNA 配列を解析し、特に大きく活性が増大した変異体 (G304E, RCueOmut1, No.54,133,196)を得た。部位特異的変異導入により多重変異体のアミノ酸置換の影響を調べ、E476G, F210L, E476P, F310D, F210A 変異体及び D439F/E476G 二重変異体を得た。

### b) 高活性化型変異体の構造解析

大腸菌で大量発現させた CueO の高活性化型変異体(G304E, M305I)を精製・濃縮し、10~20% PEG3350 及び 0.1 M KNO<sub>3</sub> を含む母液を用い、蒸気拡散法により結晶化した。結晶化ドロップはタンパク質と母液を 1:1 で混合し、計 2 マイクロリットルとなるように調整し、20°Cで約 1 週間後にクラスター状のプレート結晶または直方体型の単結晶が再現性良く得られた。結晶は、SPring-8 の BL32XU ビームラインにおいて、自動測定プログラムである Zoo を利用して X 線回折測定を行なった。得られたデータセットを用い、野生型の CueO 結晶構造(PDB ID: 3OD3) をサーチモデルとして分子置換法により構造決定を行なった。得られた初期構造を Coot および REFMAC5 プログラムにより精密化を繰り返し、wwPDB validation サービスによって検証を行い、Protein Data Bank への登録を行なった。

## 4. 研究成果

### (1) CueO を用いる反応中間体の構造解析

反応中間体の状態で安定に存在する CueO 三重変異体 (C500S/E506Q/W139F) を作製し、その諸性質を検討した。三重変異体は、改変ベースタンパク質である C500S/E506Q 二重変異体 (H. Komori *et al.*, *Acta Cryst.* D70, 772-779 (2014))と同様の性質を示した。WT CueO と同様の条件で、軽水中で三重変異体の結晶化を行ったところ、これまでになく大きな直方体型結晶を得ることに成功した。この結晶を使用した X 線回折実験の結果、2.8 Å 分解能程度までの反射が得られ、3.18Å 分解能までの全データセットを収集することができた。

## (2) 三核銅部位の変異導入による酸素還元反応の直接制御

### a) CueO 及びピリルビン酸化酵素へのランダム変異導入

Error-prone PCR 法によるランダム変異導入を用いて作製した変異型 CueO ライブラリーを対象に、酵素活性の増大を指標にスクリーニングしたところ、酵素活性が優位に増大した変異体を得ることに成功した。シークエンスを確認したところ、新規の高活性化アミノ酸置換体、F210L, G304E, M305I, F310S, E476G, 及び L502V が得られ、野生型酵素の ABTS 酸化活性と比較して 4 倍から 20 倍の活性化が観察された (Table 1)。続いて E476G 変異に、高電位型タイプ 銅部位変異である D439F を組合せた D439F/E476G 二重変異体を作製したところ活性が WT CueO の 43 倍に大きく増大した。

G304E 変異体の ABTS 酸化活性は WT CueO の 8 倍に増大し、タイプ 銅酸化還元電位は WT CueO より約 50 mV 正電位側にシフトしていた。同様に近傍の Met305 が Ile に置換した M305I、Met305 と近接する Phe210 の置換体も活性が増大していたことから、Gly304、Met305 の位置するループが構造と活性に影響することが強く示唆された。そこで、G304E 及び M305I の構造解析を試みた。

Table 1. Enzymatic activity and T1 Cu potential

Mutants	Specific Activity (Unit / mg)				$E^{\circ}$ (mV) vs. Ag/AgCl
	ABTS		ADPA		
	-Cu	+Cu	-Cu	+Cu	
WT CueO	0.4±0.016	6.6±0.086	12±0.56	118±2.1	370mV
No. 54	8.5±0.21	20.6±0.46	37±1.3	145±3.0	-
E476G	8.1±0.34	19.4±0.90	33±0.77	120±7.3	420mV
E476P	5.7±0.032	17.6±0.24	37±2.5	132±3.8	-
No. 133	4.6±0.041	9.7±0.28	26±0.33	111±5.6	-
F310S	4.6±0.041	9.7±0.28	26±0.33	111±5.6	-
F310D	2.6±0.082	11.3±0.045	28±0.22	130±3.5	420mV
No. 196	0.8±0.010	2.3±0.012	14±0.16	84±3.3	-
F210L	3.1±0.031	7.2±0.029	24±0.17	94±5.4	-
F210A	1.2±0.13	10.4±0.30	28±0.77	138±0.60	380mV
D439F/E476G	17.2±0.46	5.6±0.59	-	-	400mV
D439F	11±0.20	5.3±0.15	-	-	410mV

#### b) 高活性化型変異体の構造解析

M305I は 10 mg/mL で結晶が得られたが、20 mg/mL で一辺が 0.3 mm 程度のプレート状結晶が得られた。また、G304E は 50 ~55 mg/mL で初めて結晶が得られ、一辺が 0.75 mm 以上の大きな結晶が得られた。今回の X 線実験には用いていないが、一辺が 1.2 mm まで成長した直方体型の結晶も複数個得られており、再現性も高いため今後の中性子回折実験への応用が期待できる。G304E および M305I の結晶からは、それぞれ 1.77Å 及び 1.49Å 分解能のデータセットが得られ、分子置換法により結晶構造を決定することができた。

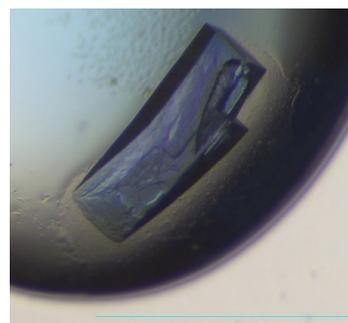


Fig. 1. G304E の結晶

既知の野生型 CueO の結晶構造 (PDB ID: 3OD3 および 1KV7) と比較すると、両変異体のドメイン 3 のタワー領域 (MR-helix : 5) 周辺に特徴的な運動性の上昇が観察された。G304E 変異体では 304 位の側鎖の電子密度が小さく、さらに近傍の MR-helix の電子密度が極めて小さかったため、主鎖をモデル化できなかった (Fig. 2)。M305I 変異体では、305 位の側鎖の電子密度は十分に大きかった反面、同じループ上に存在する 304 位および 303 位の主鎖および側鎖の電子密度が多重化しており、周辺領域のコンフォメーションが多様になっていることが推測された。さらに、近傍の MR-helix の温度因子が野生型と比較して顕著に増大しており、さらに MR-helix の C 末端側の領域がランダムコイルとして観測された (Fig. 3,

WT CueO に対応する部分はヘリックス( 6)を形成している )。

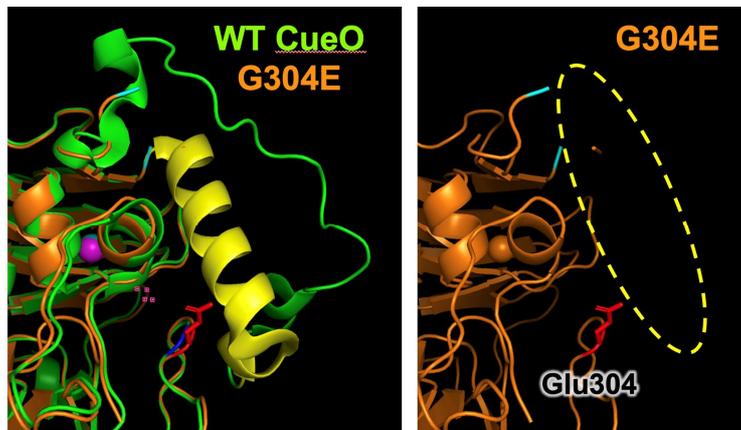


Fig. 2. G304E と WT CueO の構造比較

G304E では WT CueO の MR-helix ( 黄色 ) の構造が見えない。

構造解析により, G304E, M305I 変異体では共通して, MR-helix を中心とするドメイン 3 のタワー領域が変異により不安定化していることが明らかになった。この領域が動くことにより, タイプ 銅の酸化還元電位がシフトすると同時に, 有機基質の結合部位に摂動が起き, 活性が増大するものと考えられる。

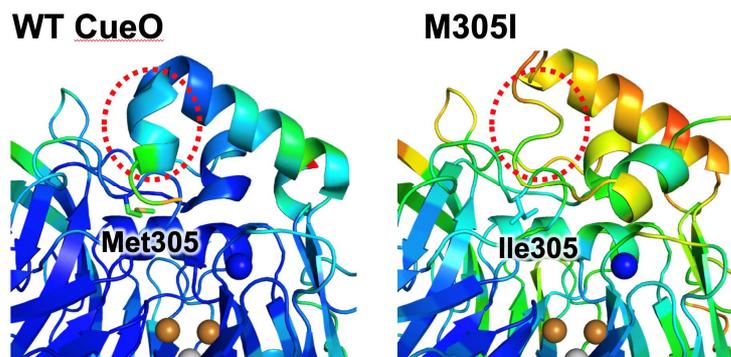


Fig. 3. M305I と WT CueO の構造比較

M305I では MR-helix 周辺の B-factor が WT CueO より顕著に大きい。

本研究で得られた知見は, MCO の反応制御に新たな方法論を与え, MCO の産業応用に大きく貢献するものである。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Adachi Taiki, Kataoka Kunishige, Kitazumi Yuki, Shirai Osamu, Kano Kenji	4. 巻 48
2. 論文標題 A Bio-solar Cell with Thylakoid Membranes and Bilirubin Oxidase	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 686 ~ 689
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1246/cl.190176	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 ADACHI Taiki, KITAZUMI Yuki, SHIRAI Osamu, KAWANO Tenta, KATAOKA Kunishige, KANO Kenji	4. 巻 88
2. 論文標題 Effects of Elimination of Helix Regions on Direct Electron Transfer-type Bioelectrocatalytic Properties of Copper Efflux Oxidase	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Electrochemistry	6. 最初と最後の頁 185 ~ 189
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5796/electrochemistry.20-00015	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Aker Mahfuza, Tokiwa Takaki, Shoji Mitsuo, Nishikawa Koji, Shigeta Yasuteru, Sakurai Takeshi, Higuchi Yoshiki, Kataoka Kunishige, Shibata Naoki	4. 巻 24
2. 論文標題 Redox Potential Dependent Formation of an Unusual His-Trp Bond in Bilirubin Oxidase	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Chemistry ? A European Journal	6. 最初と最後の頁 18052 ~ 18058
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/chem.201803798	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tokiwa Takaki, Shoji Mitsuo, Sladek Vladimir, Shibata Naoki, Higuchi Yoshiki, Kataoka Kunishige, Sakurai Takeshi, Shigeta Yasuteru, Misaizu Fuminori	4. 巻 24
2. 論文標題 Structural Changes of the Trinuclear Copper Center in Bilirubin Oxidase upon Reduction	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 76 ~ 76
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/molecules24010076	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 三原早織, 木村祐二, 山下哲, 片岡邦重
2. 発表標題 Clostridium beijerinckii由来マルチ銅オキシダーゼの大腸菌での異種発現と精製
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 東田海斗, 熊川初香, 山下哲, 片岡邦重
2. 発表標題 貝紫色素の合成に関与するプロモベルオキシダーゼの探索
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊藤晟, 山下哲, 櫻井武, 片岡邦重
2. 発表標題 大腸菌発現ビリルビンオキシダーゼの電気化学的性質
3. 学会等名 2019年度日本化学会近畿支部北陸地区研究発表会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 熊川初香, 東田海斗, 山下哲, 片岡邦重
2. 発表標題 貝紫合成に関与するプロモベルオキシダーゼの可溶性成分の精製
3. 学会等名 2019年度日本化学会近畿支部北陸地区研究発表会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 八木彩子, 澤井智也, 山下哲, 片岡邦重
2. 発表標題 大腸菌を宿主とするアスコルビン酸オキシダーゼの異種発現
3. 学会等名 2019年度日本化学会近畿支部北陸地区研究発表会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 足立大宜, 北隅優希, 白井理, 片岡邦重, 加納健司
2. 発表標題 マルチ銅オキシダーゼCue0のヘリックス欠損変異体による直接電子移動型酵素電極反応の速度論的解析と特性評価
3. 学会等名 電気化学会第87回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 片岡邦重, 重田育照, 櫻井武, 樋口芳樹, 柴田直樹
2. 発表標題 ピリルビン酸化酵素の電子受容部位の構造と機能
3. 学会等名 酵素補酵素研究会2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高田修平, 櫻井武, 片岡邦重
2. 発表標題 指向進化によるマルチ銅オキシダーゼの高活性化
3. 学会等名 ビタミンB研究委員会第455回研究協議会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 片岡 邦重, 高田 修平, 櫻井 武
2. 発表標題 ランダムおよび部位特異的変異導入による一価銅オキシダーゼ CueO の高活性化
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 足立 大宜, 北隅 優希, 白井 理, 片岡 邦重, 加納 健司
2. 発表標題 光合成をモチーフとした高出力バイオ太陽電池の構築
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	山下 哲  (Yamashita Satoshi)  (70361186)	金沢大学・物質化学系・准教授   (13301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------