

機関番号：14401

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20350082

研究課題名（和文） 酸素運搬タンパク質ヘモシアニンの機能改変と応用

研究課題名（英文） Functional Modification of Oxygen Carrier Protein Hemocyanin and Its Application

研究代表者

伊東 忍 (ITO SHINOBU)

大阪大学・工学研究科・教授

研究者番号：30184659

研究成果の概要（和文）：

軟体動物や節足動物の血液中で酸素のキャリアーとして機能している二核銅タンパク質ヘモシアニンに尿素などの変性剤を作用させることによって、チロシナーゼと同様の酸化機能を発揮することを見出し、その分光学的特性や酸化活性種である( $\mu$ - $\eta^2$ : $\eta^2$ -peroxy)dicopper(II)種の同定、および酸化反応機構の詳細を明らかにした。さらに、それらを触媒とする環境調和型の酸化反応系の構築に着手した。

研究成果の概要（英文）：

Hemocyanin functions as the oxygen carrier and storage protein in the hemolymph of many mollusks and arthropods. In this study, we have found that hemocyanin can also act as a monooxygenase enzyme when it is treated with denaturant such as urea. Spectroscopic features of the active oxygen species, ( $\mu$ - $\eta^2$ : $\eta^2$ -peroxy)dicopper(II), as well as the oxygenation mechanism of phenols have been explored in detail. Furthermore, catalytic oxygenation reaction of phenols by hemocyanin has been developed as an environmentally benign oxygenation process.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	6,900,000	2,070,000	8,970,000
2009年度	6,600,000	1,980,000	8,580,000
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
年度			
年度			
総計	15,300,000	4,590,000	19,890,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

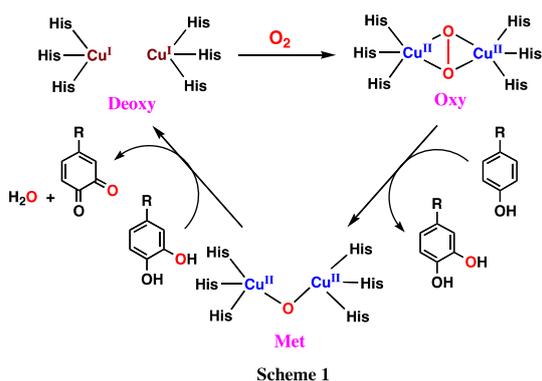
キーワード：銅タンパク質、ヘモシアニン、チロシナーゼ、機能改変、分子状酸素の活性化、フェノールの酸素化反応、ペルオキシ二核銅酸素錯体、酸化反応機構

## 1. 研究開始当初の背景

チロシナーゼ (EC 1.14.18.1) は分子状酸素 ( $O_2$ ) によるフェノール類の酸素化反応 (フェノラーゼ活性) やカテコール類の酸化反応 (カテコラーゼ活性) を司る銅含有酸化酵素である。この酵素は微生物から菌体、植物、

動物に至る幅広い生態系に存在し、リグニン、フラボノイド、タンニン、カテコールアミン、メラニン色素などの生合成過程に深く関わっている。酵素活性中心には磁氣的に強く相互作用した二つの銅イオン (二核銅活性中心: タイプ3銅) が存在し (E. I. Solomon, *et*

al. *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 2563)、二つの銅イオンが一価の状態である Deoxy 体が分子状酸素と反応することにより Oxy 体に変わる (Scheme 1)。次に、Oxy 体と基質フェノールが反応し、Met 体とカテコール生成物を与えるが、この Met 体は、さらにカテコールと反応して Deoxy 体が再生され触媒サイクルが回る。生成したキノン誘導体は多段階を経てメラニン色素などに変換される。Scheme 1 に示した反応機構は非常に単純化されたものであるが、実際には数々の副反応を含むため、反応機構の詳細については不明な点が多く残されている。



一方、軟体動物や節足動物の血液中で酸素運搬タンパク質として機能しているヘモシアニンの酸素結合部位にも上述のチロシナーゼと同様の二核銅中心が含まれており、Scheme 1 に示したような side-on 型ペルオキシ二核銅(II)錯体を含む Oxy 体と二核銅(I)錯体を含む Deoxy 体との間で可逆的に酸素分子の吸脱着が行われている。

近年、酸素の運搬タンパク質であるヘモシアニンの酸化還元機能について検討が行われ、加水分解酵素や変性剤で処理することにより、カテコールの酸化活性 (カテコラーゼ活性) が発現することがわかってきた (H. Decker, et al. *ChemBioChem*, **2004**, *5*, 163)。しかし、ヘモシアニンをを用いた、より高難度の酸素添加反応 (モノオキシゲナーゼ活性) を達成した報告例は殆どない。

## 2. 研究の目的

芳香族化合物の触媒的水酸化反応の開発は、有機合成化学や有機工業化学の分野において非常に重要な研究課題の一つであり、古くから活発に研究が展開されてきた。しかし、常温・常圧下での効率的かつ選択的な触媒的水酸化反応を達成した例は非常に少ない。一方、生物無機化学の分野においては、特に最近、各種遷移金属錯体による分子状酸素の活性化についての研究が精力的に展開され、活性酸素錯体の構造や物性および反応性の詳細が明らかにされてきた。しかしながら、そ

れらの遷移金属錯体を実際の触媒反応へ応用した例は殆どない。更に、最近の環境問題解決のための社会的ニーズから、水を溶媒とする反応系の開発が急務となっている。また、生化学分野においても金属酵素の構造や機能に関する研究が活発に行われているが、金属酵素自身を触媒として用いた炭化水素の水酸化反応に関する研究例は非常に少ない。そこで本研究では、本来酸素分子のキャリアーとして働くヘモシアニンの機能を積極的に改変して、酸化反応や酸素化反応を司るオキシダーゼ (酸化酵素) やモノオキシゲナーゼ (一原子酸素添加酵素) に変換し、これを利用した新しいタイプの環境調和型酸化反応触媒の開発を目指した。

## 3. 研究の方法

節足動物 (ワタリガニ) の血液中からヘモシアニンを単離・精製し、それらの酸化機能の発現と酸化触媒への応用を図る。また、分子生物学的手法を用いた、タンパク質の大量発現系の構築と分子状酸素の活性化機構の解明にあたり、より効率的な環境調和型酸化触媒の開発を達成する。具体的な研究内容は下記の通りである。

- (1) ヘモシアニンの超分子集合体、サブユニット、および最小活性ユニット g の単離・精製
- (2) 最小活性ユニット g の分子生物学的大量発現系の構築
- (3) 部位特異的突然変異誘発 (ポイントミューテーション) を利用した最小活性ユニット g の改変
- (4) 二核銅活性中心における酸素分子の活性化機構の解明
- (5) 酸化反応基質のスクリーニング
- (6) 酸化反応機構の解明と触媒反応への応用
- (7) 加水分解酵素をプラットフォームとした人工二核銅酸化酵素の構築

## 4. 研究成果

### 【1】タイプ3銅タンパク質を用いた芳香族化合物の直接的水酸化反応

生きたワタリガニから血リンパ液を採取し、陰イオン交換カラムを用いてヘモシアニンの各単量体 I~V および6量体を単離・精製した (Figure 1, 2A)。得られた各サブユニットと6量体の紫外可視吸収スペクトル測定を行ったところ、いずれも338 nmと580 nmに ( $\mu$ - $\eta^2$ : $\eta^2$ -ペルオキシ) 二核銅(II)種に起因する吸収極大を持ち、これらのヘモシアニンが oxy 体として単離されたことを確認した。またこのペルオキシ種は3 Mの尿素存在下、嫌気下でも比較的安定に存在することが紫外可視吸収スペクトルや円二色性偏光スペ

クトル (CD) の測定からわかった。

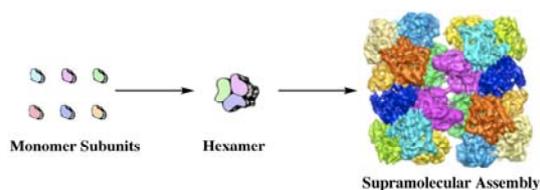


Figure 1. Quaternary Structure of Arthropod Hemocyanin

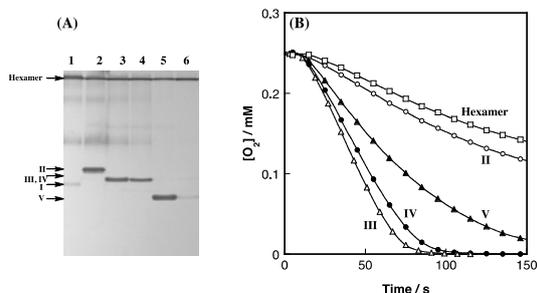


Figure 2. (A) Native PAGE; lane 1 ~ 5: isolated hemocyanin subunits I ~ V, respectively, lane 6: hexameric hemocyanin. (B) Time courses of  $O_2$  consumption observed in the monooxygenase reaction of *p*-cresol (12 mM) by the hemocyanin subunits (II ~ V) and the hexamer (26 mM based on the  $(\mu-\eta^2, \eta^2$ -peroxo)dicopper(II) unit) in a borate buffer containing urea (3 M) at pH 9.0.

次に各サブユニットと6量体のモノオキシゲナーゼ活性について、酸素電極を用いて検討した(Figure 2B)。反応溶液中の酸素濃度が基質 (*p*-cresol) の添加により著しく減少することから、それぞれのサブユニットおよび6量体は、尿素 (3 M) を作用させる事によりモノオキシゲナーゼ活性を発現することを見いだした。生成物である 4-methylcatechol の生成は HPLC で確認した。本反応では溶媒にホウ酸緩衝液を用いているため、ホウ酸イオンが生成物のカテコールと錯形成し、キノン体への酸化が抑制され、選択的にカテコール体のみが得られる。各サブユニットの触媒活性は6量体の場合よりも高く、また、各々のサブユニット間にも触媒活性に違いがみられた。このような触媒活性の違いは、各サブユニット間の立体構造の違いに起因するものと思われる。

次に、反応機構の詳細を明らかにするため、嫌気性条件下で  $\mu\eta^2:\eta^2$ -ペルオキシ二核銅(II)種と各種 *p*-置換フェノールとの反応を速度論的に検討した。活性の評価は、ペルオキシ種由来の 338nm の吸収の減少速度を紫外可視吸収スペクトルを用いて追跡する事により行った。嫌気性条件下における各種 *p*-置換フェノールとの反応は、ヘモシアニン6量体の場合、異なる活性を持ったサブユニットが数種類存在する為に反応の速い過程と遅い過程が存在し、単純な1次反応として解析する事が出来なかった。しかしサブユニット V の場合は、きれいな一次反応として解析する事が可能であった (Figure 3A)。得られた  $k_{obs}$

を基質濃度に対してプロットすると Michaelis-Menten 型の飽和曲線が得られ、Hanes-Woolf プロットより  $K_m$ 、 $V_{max}$  をそれぞれ求めた。更に各種 *p*-置換フェノール誘導体 ( $X = Me, F, Cl, Br, CN$ ) を基質として用いて同様に速度論的検討を行い基質置換基の電子効果について検討したところ、置換基の電子ドナー性が上がるにつれて  $V_{max}$  の値も増大し、 $V_{max}$  の log 値をハメットの  $\sigma^+$  に対してプロット (Hammett プロット, Figure 4B) すると、 $\rho$  値は -1.6 であった。この値は、これまで我々の研究室で明らかにしたマッシュルームチロシナーゼによるフェノールの酸素化反応における  $\rho$  値、-2.4 や、軟体動物のマダコ由来のヘモシアニンの触媒反応における  $\rho$  値、-2.0 という値と非常に一致を示した。以上のような結果から、サブユニット V のモノオキシゲナーゼ反応は、芳香族求電子置換反応で進行していることが明らかになった。またこの反応メカニズムは負の同位体効果 ( $k_H/k_D = 0.94$ ) が得られたことから支持された。

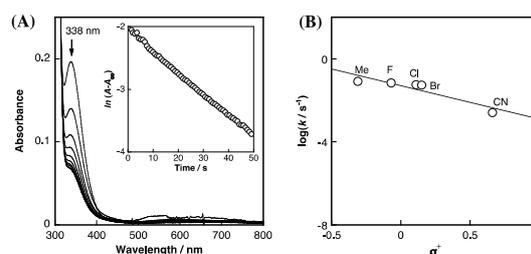


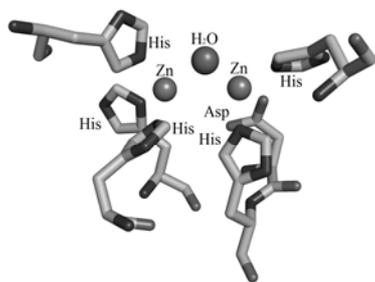
Figure 3. (A) Spectral changes observed upon addition of *p*-cresol ( $1.5 \times 10^{-2}$  M) to the oxy-form of hemocyanin monomer V ( $1.25 \times 10^{-5}$  M) in 0.5 M borate buffer (pH 9.0) containing 5 % MeOH and 3 M urea at 25 °C under  $N_2$ ; 20 s interval (Inset: First-order plot based on the absorption change at 338 nm). (B) Hammett plot.

以上本研究では、ワタリガニの体液から単離・精製したヘモシアニンを用いてフェノールの水酸化反応系の確立を目指して検討を行った。尿素などの変性剤存在下で酸素電極を用いて反応系中の酸素濃度をモニタリングしたところ時間の経過とともに酸素濃度が減少し、フェノールの水酸化反応が効率よく進行することが分かった。また、対応するカテコール誘導体は定量的に生成することが HPLC によって確認された。これらのことから、ヘモシアニンは同様に穏和な条件下で機能する環境調和型の水酸化触媒として利用できる可能性が示された。

## 【2】加水分解酵素をプラットフォームとした人工二核銅酸化酵素の構築

本研究ではさらに、二核の亜鉛中心を含有する細菌由来金属 $\beta$ -ラクタマーゼ (Figure 4) を用いて、活性中心金属の置換と部位特異的変異導入を組み合わせることで人工的に二

核銅酸化酵素構築を試みた。



**Figure 4.** The active centers of metallo-β-lactamase from *S. maltophilia* (PDB : 2FM6)

硫酸銅(II)を含む培地中、大腸菌内で発現させたところ、金属β-ラクタマーゼにおいて二核銅中心の形成が見られた。また、本来の亜鉛中心に対する配位子に注目し、すべての配位子がヒスチジンとなる変異体を作製したところ、野生型と同様の調整方法で二核銅中心の形成が見られた。さらに、野生型と比べ、カテコールの酸化活性は100倍以上に増大した。また、その二核銅中心は分光学的にタイプ3銅に類似した配位構造を取っていることが示された。

#### 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11件)

- (1) Post-translational His-Cys Cross Linkage Formation in Tyrosinase Induced by Copper(II)-Peroxo Species. Nobutaka Fujieda, Takuya Ikeda, Michiaki Murata, Sachiko Yanagisawa, Shigetoshi Aono, Kei Ohkubo, Satoshi Nagao, Takashi Ogura, Shun Hirota, Shunichi Fukuzumi, Yukihiro Nakamura, Yoji Hata, and Shinobu Itoh, *J. Am. Chem. Soc.* **133** (5), 1180-1183 (2011).
- (2) Reactions of Copper(II)-Phenol Systems with O<sub>2</sub>. Models for TPQ Biosynthesis in Copper Amine Oxidases. Kae Tabuchi, Mehmed Z. Ertem, Hideki Sugimoto, Atsushi Kunishita, Tetsuro Tano, Nobutaka Fujieda, Christopher J. Cramer, and Shinobu Itoh, *Inorg. Chem.* **50** (5), 1633-1647 (2011).
- (3) Five monomeric hemocyanin subunits from *Portunus trituberculatus*: Purification, spectroscopic characterization, and quantitative evaluation of phenol monooxygenase activity. Nobutaka Fujieda, Aki Yakiyama, and Shinobu Itoh, *Biochem.*

*Biophys. Acta*, **1804**, 2128-2135 (2010).

- (4) Oxygenation Chemistry at Mononuclear Copper(II)-Hydroquinone System with O<sub>2</sub>. Kae Tabuchi, Hideki Sugimoto, Atsushi Kunishita, Nobutaka Fujieda, and Shinobu Itoh, *Inorg. Chem.* **49** (15), 6820-6822 (2010).
- (5) Catalytic oxygenation of phenols by arthropod hemocyanin, an oxygen carrier protein, from *Portunus trituberculatus*. Nobutaka Fujieda, Aki Yakiyama, and Shinobu Itoh, *Dalton Trans.* **39** (12), 3083-3092 (2010).
- (6) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-reactivity of nickel(II) complexes supported by TPA ligands with 6-phenyl substituents Ph<sub>n</sub>TPA. Tetsuro Tano, oshitaka Doi, Masayuki Inosako, Atsushi Kunishita, Minoru Kubo, Hirohito Ishimaru, Takashi Ogura, Hideki Sugimoto and Shinobu Itoh, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **83** (5), 530-538 (2010).
- (7) Mononuclear Copper(II)-Superoxo Complex that Mimics the Structure and Reactivity of the Active Centers of PHM and D·H. Atsushi Kunishita, Minoru Kubo, Hideki Sugimoto, Takashi Ogura, Kazunobu Sato, Takeji Takui, and Shinobu Itoh, *J. Am. Chem. Soc.* **131** (8), 2788-2789 (2009).
- (8) Ni(II)/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Reactivity in Bis[(pyridin-2-yl)methyl]amine Tridentate Ligand System. Aromatic Hydroxylation Reaction by Bis(μ-oxo) dinickel(III) Complex. Atsushi Kunishita, Yoshitaka Doi, Takashi Ogura, Hideki Sugimoto, and Shinobu Itoh, *Inorg. Chem.* **48** (11), 4997-5004 (2009).
- (9) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Reactivity of Copper(II) Complexes Supported by TPA Ligands with 6-Phenyl Substituents. Atsushi Kunishita, Minoru Kubo, Hirohito Ishimaru, Takashi Ogura, Hideki Sugimoto, and Shinobu Itoh, *Inorg. Chem.* **47** (24), 12032-12039 (2008).
- (10) Monooxygenase Activity of Octopus vulgaris Hemocyanin. Kenji Suzuki, Chizu Shimokawa, Chiyuki Morioka, and Shinobu Itoh, *Biochemistry* **47** (27), 7108-7115 (2008).
- (11) Reactivity of Mononuclear Alkylperoxo Copper(II) Complex. O-O Bond Cleavage and C-H Bond Activation. Atsushi Kunishita, Hirohito Ishimaru, Satoru Nakashima, Takashi Ogura, and

Shinobu Itoh, *J. Am. Chem. Soc.* **130** (13), 4244-4245 (2008).

[学会発表、招待講演のみ記載] (計 20 件)

- (1) Modeling Mononuclear Copper Reaction Centers of Copper Monooxygenases and Copper Oxidases. Shinobu Itoh, PacificChem2010 Symposium on Dioxigen Activation Chemistry and Catalytic Oxidation Reactions (#108), Hilton Hawaiian Village, Waikiki, Hawaii, USA, December 18-20, 2010.
- (2) Monooxygenase Activity of Type-3 Copper Proteins. Shinobu Itoh, Japan-Taiwan 3 University Joint Seminar on Nanostructure and Advanced Material, Kagoshima University, Japan, November 24-27, 2010.
- (3) Bioinorganic Chemistry of Dinuclear Copper(II) Peroxo Complexes. Shinobu Itoh, Post Symposium of AsBIC-5, National Taiwan Normal University, Taipei, Taiwan, November 6, 2010.
- (4) Mononuclear Copper Active Oxygen Species. Shinobu Itoh, The 5<sup>th</sup> Asian Biological Inorganic Chemistry Conference (AsBIC-5), Ambassador Hotel, Kaohsiung, Taiwan, November 2-5, 2010.
- (5) Reactivity of Mononuclear Copper(II) End-on Superoxo Complex. Shinobu Itoh, 16<sup>th</sup> Malaysian Chemical Congress, Putra World Trade Center, Kuala Lumpur, Malaysia, October 12-14, 2010.
- (6) Reactivity of Mononuclear Copper Active Oxygen Complexes. Shinobu Itoh, The 4<sup>th</sup> Chem. Commun. International Symposium on Metal Oxygen Bioinspired Chemistry, Ewha Womans University, Seoul, Korea, October 1-2, 2010.
- (7) キノン系補酵素の化学-合成と酸化還元機能-, 伊東 忍, 生体キノン研究会 第 9 回講演会、中央大学、平成 22(2010) 年 9 月 17 日
- (8) Reactivity of Copper Active Complexes, Shinobu Itoh, 8th China-Japan Joint Symposium on Metal Cluster Compounds Xi'an, China, August 10-14, 2010.
- (9) 遷移金属-活性酸素錯体の構造と反応性の精密制御、伊東 忍、日本化学会第 90 春季年会、近畿大学、平成 22 (2010) 年 3 月 25 日
- (10) 芳香族および脂肪族化合物の触媒的酸化反応、伊東 忍、第 9 回機能性分子シンポジウム、筑波大学、平成 22 (2010) 年 1 月 8 日
- (11) Monooxygenase Activity of Type-3 Copper Proteins, Shinobu Itoh, *2nd Japan-Korea Seminar on Biomolecular Sciences Experiments and Simulations*, Nagoya University, Japan, December 22-23, 2009.
- (12) Phenol Oxygenation Reaction by Dicopper(II)-Peroxo Complex. Shinobu Itoh, China-Japan Symposium on Advanced Organic Chemistry, Shanghai, China, November 28-29, 2009.
- (13) 銅-酸素錯体の機能を探る、伊東 忍、第 42 階酸化反応討論会、東北大学、平成 21 年 11 月 14 日、15 日
- (14) Monooxygenase Activity of Oxygen Carrier Protein Hemocyanin. Shinobu Itoh, *The IUMRS International Conference in Asia 2008*, Nagoya Congress Center, Japan, December 9-13, 2008.
- (15) 銅錯体および銅タンパク質による酸素の活性化と応用、伊東 忍、第 39 回錯体化学若手の会 近畿地区勉強会、大阪大学、平成 20 年 11 月 22 日
- (16) Reactivity of Copper/Active-Oxygen Complexes. Shinobu Itoh, *The 4th Asian Biological Inorganic Chemistry Conference (ASBIC-4)*, Jeju Island, Korea, November 10-13, 2008.
- (17) 銅錯体および銅タンパク質による酸素の活性化、伊東 忍、触媒学会横浜地区講演会「触媒研究最前線」、東京工業大学、平成 20 年 10 月 30 日
- (18) Structure and Reactivity of Dinuclear Copper-Oxygen Complexes. Shinobu Itoh, *The 7<sup>th</sup> Japan-China Joint Symposium on Metal Cluster Compounds (JCSMCC2008)*, Hokkaido University, Japan, October 20-23, 2008.
- (19) Monooxygenase Activity of Type 3 Copper Proteins. Shinobu Itoh, *Symposium on New Paradigm of Bioinorganic Chemistry, 58<sup>th</sup> Annual Meeting of Japan Society of Coordination Chemistry*. Kanazawa University, Japan, September 20-22, 2008.
- (20) 銅タンパク質による酸素の活性化と触媒反応への応用、伊東 忍、第 102 回触媒討論会 (生体関連触媒セッション)、名古屋大学、平成 20 年 9 月 25 日

[図書] (計 2 件)

- (1) Copper-Oxygen Chemistry, Shinobu Itoh and Kenneth D. Karlin, Eds., John Wiley & Sons, Inc., in press (2011).
- (2) ブルース・エッセンシャル有機化学 (第

2版) Paula Y. Bruice 著、大船泰史ら  
(監修)、伊東 忍ら (訳)、化学同人、  
pp 511-532 (第17章) (2010)

[その他]

ホームページ:

[http://www-bfc.mls.eng.osaka-u.ac.jp/BioFunctional\\_Chemistry/Home.html](http://www-bfc.mls.eng.osaka-u.ac.jp/BioFunctional_Chemistry/Home.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

伊東 忍 (ITO SHINOBU)  
大阪大学・工学研究科・教授  
研究者番号: 30184659

### (2) 研究分担者

### (3) 連携研究者

鈴木 晋一郎 (SUZUKI SHIN-ICHIRO)  
大阪大学・理学研究科・教授  
研究者番号: 70116052

青野 重利 (AONO SHIGETOSHI)  
大学共同利用機関法人自然科学研究機構・  
岡崎統合バイオサイエンスセンター・教授  
研究者番号: 60183729