

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：13401

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K14782

研究課題名（和文）酵素電気化学反応の向上を目指した主成分分析法による酵素変異体の分子設計指針の確立

研究課題名（英文）Establishment of molecular design guidelines for enzyme mutants by principal component analysis aiming at improving enzyme electrochemical reaction

研究代表者

高村 映一郎（TAKAMURA, Eiichiro）

福井大学・学術研究院工学系部門・講師

研究者番号：30843015

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、酵素-電極間での直接電子移動が可能な直接電子移動型酵素の酵素電気化学反応の向上を目指した。ランダム変異体ライブラリに対して従来の酵素活性スクリーニングではなく、電気化学スクリーニングを実施し、スクリーニング結果から変異体ライブラリを階層クラスター分析によって分類したところ、優れた電極触媒性能を示す変異体と似た性質を示す変異体には類似した変異が導入されていた。酵素の酸化還元電位に焦点を当て、変異導入による酸化還元電位への高影響部位を特定し、飽和変異ライブラリを複製・評価したところ、配列空間全体の0.1%のスクリーニング数のみで酸化還元電位が約70 mV変化した変異体が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果によって、直接電子移動型酵素における電気化学スクリーニングの重要性が示された。また、本研究における高影響部位の特定までの手法は、これまでの指向性進化法における大量のスクリーニングや、部位特異的変異導入法における構造的知見を必要としない。そのため、一次配列と機能さえ明らかであれば少ないコストで性能向上変異体を得ることが可能となり、新規酵素の実用化までの時間短縮などに貢献すると考えられる。

研究成果の概要（英文）：In the present study, we aimed to improve the electroenzymatic reaction of direct electron transfer-type enzymes, which are capable of direct electron transfer between enzyme and electrode. Electrochemical screening, rather than conventional enzyme activity screening, was performed on random mutant libraries. From the screening results, mutant libraries were classified by hierarchical cluster analysis. Mutants exhibiting similar properties to those showing superior electrocatalytic performance had similar mutations introduced. Focusing on the redox potential of the enzyme, the high effect sites on the redox potential due to the introduction of mutations were identified. A saturating mutation library was prepared and evaluated, and mutants with redox potential changes of approximately 70 mV were obtained with only 0.1% of the total sequence space screened.

研究分野：生物電気化学

キーワード：直接電子移動型酵素 電気化学スクリーニング 酵素分子設計 多変量解析

1. 研究開始当初の背景

近年、生体触媒である酵素を電極触媒としたバイオエレクトロニクス用デバイスは、医療用モニタリングセンサからバイオ電池まで盛んに研究されている。酵素を用いて基質の有する化学エネルギーを電気エネルギーに変換するバイオ電池では、電気エネルギー生産の効率を向上させるために優れた酸化還元電位(陽極は低電位、陰極は高電位で酵素電気化学反応が起こる方が電極触媒として優れている)を有する、もしくは高い電極触媒活性を有する酸化還元酵素を用いる必要がある。酵素-電極間の電子伝達をメディエータ(低分子酸化還元物質)が補助するメディエータ仲介(MET)型電極ではメディエータの酸化還元電位に影響を受ける。メディエータが不安定なことや固定化の煩雑さから、近年ではメディエータを用いず、酵素-電極間で直接電子移動が起こる直接電子移動(DET)型電極が主流となっている。陰極は陽極よりもかなり早い時期からDET型電極の研究が盛んに行われている。なぜなら、陽極は対象とする燃料によって酵素を変える必要があり、DETが起こらない酵素も存在するからである。一方で、陰極ではほとんどのバイオ電池で図1のようなO₂から水への4電子還元を触媒しDET可能なマルチ銅オキシダーゼ(MCO)が用いられているため、MCOの電極反応に関する知見は陽極よりも蓄積されている。また、MCOは3つのタイプ(T1, T2, T3)に分類される4つの銅原子を有している。その中で、電極から電子を受け取り、電気化学的なO₂の還元電位の決定要因であるT1銅のみを有したアズリンという銅タンパク質がモデル酵素として存在しているため、アズリンの知見を利用したMCOの酸化還元電位改変は多く報告されている。申請者もこれまでに、バイオ電池の長寿命化のために長期安定性に優れた超好熱性アーキア *Pyrobaculum aerophilum* 由来 MCO (McoP) を陰極触媒として用いて、部位特異的変異導入によって野生型(WT) McoP と比較して +80 mV の酸化還元電位改変を達成してきた。酸化還元電位改変によって酵素活性が変化することは明らかになっているが、それとともに、酸化還元電位改変に伴う酵素活性の向上によって必ずしも電極触媒活性が向上するわけではないことも申請者の以前の研究も含めて明らかになっている。現在、電極触媒としてのMCOの機能改変研究は合理的設計(部位特異的変異導入)によるものが大半である。申請者も含めランダム変異導入による指向性進化研究も行われているが、図2(A)で示すように人工酸化還元色素との電子授受を評価する通常の酵素活性測定を用いたスクリーニングであるため、図2(B)のように電極を電子授受の対象とするDET型酵素には適していない。そのため、真にDET型電極触媒としてMCOを設計するためには、変異体ライブラリの酵素電気化学反応に基づくスクリーニング(ECスクリーニング)を行い、電極触媒活性を向上させるための知見を蓄積することが必要である。これまでに酵素工学においてECスクリーニングが行われなかったのは、常温菌由来酵素では電気化学反応を妨げる夾雑タンパク質の除去操作が煩雑だったためである。本研究では、超好熱菌で唯一報告されているMCO(McoP)を用いることで、熱処理のみで多くの夾雑タンパク質を除去可能である。予備実験として、作製したMcoP変異体ライブラリの中で56変異体の従来の酵素活性評価、電気化学測定による電極触媒活性の評価をしたところ、図3のNo.15, 20のように酵素活性と電極触媒活性に相関のないMcoP変異体が複数見出された。また、従来のスクリーニングと比較して検討要素(酵素活性、電極触媒活性、酸化還元電位等)が多いため、統計解析の一種である主成分分析を用いて変異体の分類を検討した。主成分分析は多くの検討要素(変数)を1点に圧縮することで、多くの変異体サンプルの関連性を容易に比較することが可能となる。予備

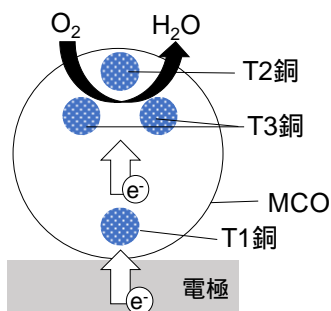


図1 MCOの概要

(A)従来のスクリーニング (B)DET型酵素と電極の電子授受

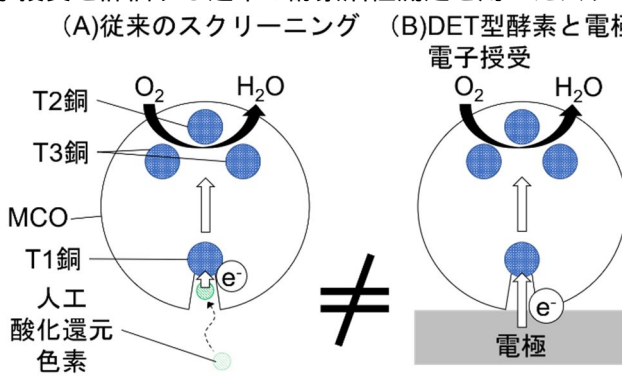


図2 (A)通常の酵素活性測定と(B)酵素電気化学反応

図3のNo.15, 20のように酵素活性と電極触媒活性に相関のないMcoP変異体が複数見出された。また、従来のスクリーニングと比較して検討要素(酵素活性、電極触媒活性、酸化還元電位等)が多いため、統計解析の一種である主成分分析を用いて変異体の分類を検討した。主成分分析は多くの検討要素(変数)を1点に圧縮することで、多くの変異体サンプルの関連性を容易に比較することが可能となる。予備

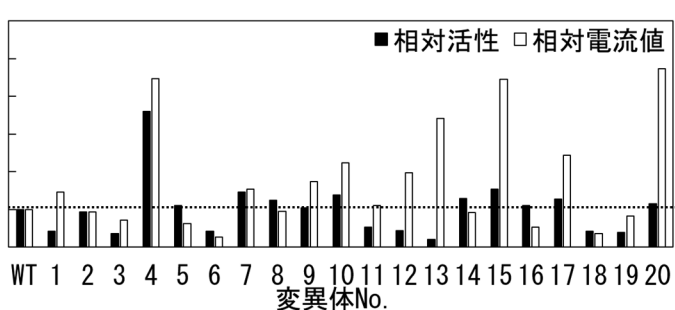


図3 予備実験結果(一部抜粋)

実験に用いた変異体を主成分分析により解析した。その結果を図4に示す。解析の結果、点線内の変異体番号のように、各々の変異体が野生型とどれだけ異なるか、または類似した傾向を示すかを客観的統計に基づいて判断可能である。さらに、アミノ酸の各指標（疎水性度等 566 種のパラメータ）を数値化したデータベースである AAindex を、変異体の置換されたアミノ酸情報と共に変数として加えることで、どの種のアミノ酸がどの部位に置換されると、各アミノ酸の有するどの性質がどのような影響を与えるかの知見を網羅的に得ることが可能である。そのため、電極触媒として優れた McoP を EC スクリーニングにより取得し、主成分分析を用いて極めて多くの情報から簡便に機能向上への知見を得て、高い電極触媒活性を示す McoP の設計指針を確立することが本研究の解決する課題である。

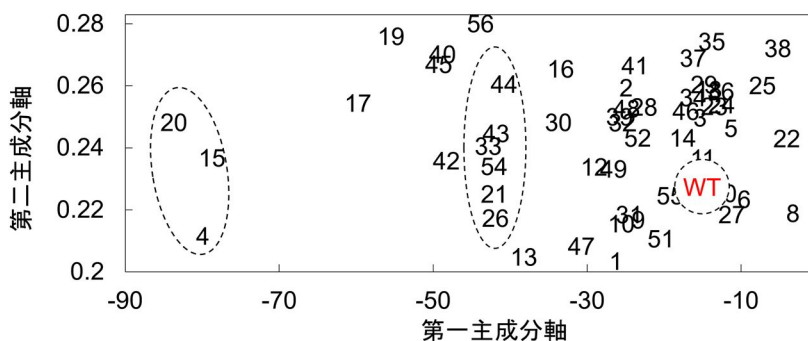


図4 主成分分析による解析結果
(酵素活性、電極触媒活性、酸化還元電位)

2. 研究の目的

本研究の目的は、電極触媒として優れた性質（酸化還元電位、電極触媒活性）を有するマルチ銅オキシダーゼ変異体を取得し、得られた変異体のアミノ酸配列情報を主成分分析によって解析することで酸化還元部位 - 電極間の電子伝達に関する構造情報を明らかにし、McoP 変異体の設計指針を確立することである。

3. 研究の方法

1. McoP 変異体スクリーニングおよびシークエンス解析結果の階層クラスター分析

(1) McoP 変異体のスクリーニングおよび階層クラスター分析による変異体分類

McoP 変異体ライブラリの McoP 修飾金電極を作用極としたサイクリックボルタンメトリーによる EC スクリーニング、および ABTS を基質とした酵素活性スクリーニングを行った。EC スクリーニングでは電極触媒活性と O₂ 還元開始電位が得られ、酵素活性スクリーニングでは基質に対する活性が得られる。結果を基に階層クラスター分析を行い、O₂ 還元開始電位に焦点を当て、シークエンス解析を行う変異体を決定した。シークエンス解析を行い、McoP 変異体のアミノ酸配列情報を取得した。

(2) 各変異体のアミノ酸配列情報からの O₂ 還元開始電位に対する高影響部位の特定

各変異部位と O₂ 還元開始電位のデータを紐づけし、それらをアミノ酸配列順に並べた。その後、それらの配列を 3、5、7 残基ごとの小配列に区切り、それらの小配列ごとの O₂ 還元開始電位の平均値と分散を算出した。各小配列の平均値と分散をそれぞれ比較し、それらに共通している小配列およびその小配列の配列範囲に存在する最大値を示した部位を探索し、O₂ 還元開始電位シフトにおける高影響部位の特定を行った。

2. 特定された高影響部位についての飽和変異ライブラリの作製・評価

(4) McoP 変異体 (A272X、P326X、D332X、M393X、V441X、ADMV) ライブラリの作製・評価

O₂ 還元開始電位についての高影響部位に対して単一および多重飽和変異ライブラリを作製した。1st ライブラリと同様に評価した。

4. 研究成果

本研究では、McoP 遺伝子に対して、平均 6 個の変異が導入されるように Error prone PCR を行った。McoP ランダム変異ライブラリ (652 変異体) のスクリーニングの結果、野生型と比較して比活性が 300% 以上向上した変異体が 19 株、電極触媒活性が向上した変異体が 40 株得られた。また、野生型よりも O₂ 還元開始電位が 50 mV 以上正側へシフトした変異体は 25 株得られた。全変異体のスクリーニング結果を用いて階層クラスター分析 (HCA) により解析した結果を右図 5 に示す。類似性 80% 以上で 30 のクラスターに分類された。分類分けしたクラスターの中からスクリーニングによって O₂ 還元開始電位が正側へシフトした上位 10 変異体を含んでいるクラスターを探索した。その結果、O₂ 還元開始電位が正側へシフトした上位 10 変異

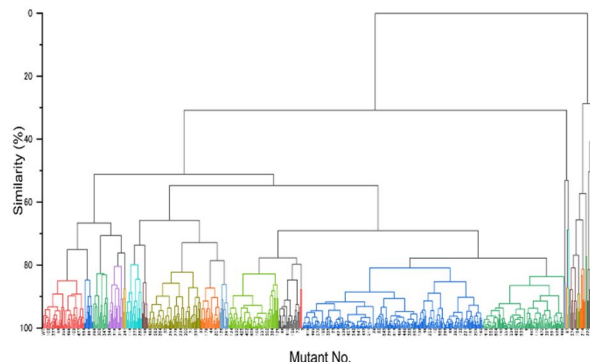


図5 階層クラスター分析結果

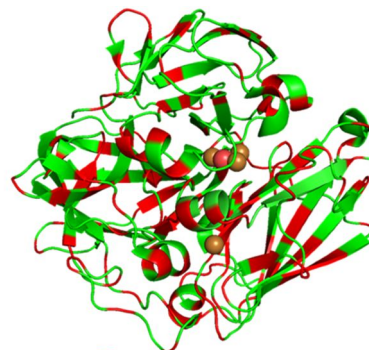
体は8個のクラスター(10, 11, 12, 13, 17, 18, 19, 21)に含まれることが判明した。これら8クラスターに含まれる変異体はO₂還元開始電位が正側へシフトした上位10変異体と類似したスクリーニング結果であるため、O₂還元開始電位に大きく影響を与える変異が導入されている変異体群であると考えられる。変異体ライブラリから当該クラスターに含まれる117変異体のDNAシーケンス解析を実施したところ、図6で示される164部位で224アミノ酸残基置換のデータが得られた。

McoPのアミノ酸配列全体を3、5、7残基ごとの小配列に区切り、それらの小配列ごとのO₂還元開始電位の平均値と分散を算出した。各小配列の平均値と分散をそれぞれ比較し、それらに共通している小配列およびその小配列の配列範囲に存在する最大値を示した部位を探索し、O₂還元開始電位シフトにおける高影響部位の特定を行った。その結果、A272、D332、M393、V441がO₂還元開始電位シフトにおける高影響部位として特定された。

高影響部位に対して、単一および多重飽和変異ライブラリを作製・評価した。4重飽和変異体ライブラリ(175株)のスクリーニングの結果、最もO₂還元開始電位が正側へシフトした変異体ADMV No.25は野生型と比較してO₂還元開始電位が+75 mV高い値を示した。1stライブラリにおけるO₂還元開始電位シフトの最大値は+66 mVであった。多重変異体ライブラリのサイズは配列空間全体(20⁴=160,000)の僅か0.018%の探索しか行われていないことから、特定された部位が高影響部位としての妥当性が高いと考えられる。さらに、4部位の個々の組み合わせにはより最適なものがあり、それらの組み合わせを探索することで、より電極触媒性能が大幅に向上した変異体が取得できると考えられる。

以上のことから、本研究における主成分分析、階層クラスター分析および小配列分割による高影響部位の特定手法は、これまでの指向性進化法のようなサイズの大きなライブラリを必要とせず、部位特異的変異導入法のような構造情報をはじめとする知見も必要としない、低コストな変異体設計法である。さらに、直接電子移動型酵素設計におけるECスクリーニングの重要性も示された。

今後は、O₂還元開始電位だけでなく、電極触媒活性も向上させた変異体設計についても検討していく予定である。



● : 置換部位

図6 配列解析結果のMcoP
立体構造における位置

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Sakamoto Hiroaki, Futamura Rie, Fujiwara Ikuya, Meboso Taichi, Li Ning, Takamura Eiichiro, Satomura Takenori, Suye Shin ichiro	4. 巻 138
2. 論文標題 Immobilization of multicopper oxidase from <i>Pyrobaculum aerophilum</i> onto an electrospun aligned single walled carbon nanotube surface via a carbon nanotube binding peptide for biocathode	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Applied Polymer Science	6. 最初と最後の頁 50937 ~ 50937
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/app.50937	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3件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 平中佑磨, 多喜俊介, 高村映一郎, 坂元博昭, 里村武範, 櫻庭春彦, 大島敏久, 末信一郎
2. 発表標題 高電圧バイオ電池構築のためのマルチ銅オキシダーゼにおけるT1銅の第2配位圏への部位特異的変異誘発
3. 学会等名 第73回日本生物工学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高村映一郎, 後藤慧史, 坂元博昭, 里村武範, 櫻庭春彦, 富永昌人, 大島敏久, 末信一郎
2. 発表標題 カーボン結合ペプチド修飾マルチ銅オキシダーゼ固定化バイオカソードの性能向上を目的としたコール酸系界面活性剤による電子伝達の効率化
3. 学会等名 第73回日本生物工学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高村映一郎, 多喜俊介, 中村卓登, 坂元博昭, 里村武範, 末信一郎
2. 発表標題 酵素の配向固定化のためのタンパク質工学によるバイオカソードにおける電子移動効率の向上
3. 学会等名 第31回日本MRS年次大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 高村映一郎, 末信一朗, 他	4. 発行年 2021年
2. 出版社 シーエムシー出版	5. 総ページ数 10
3. 書名 月刊BIOINDUSTRY 2021年5月号「改変酵素による高性能バイオカソードの構築」	

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------