様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科研費 KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　６ 年　５ 月 ２３ 日現在

機関番号：１０１０１
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2021～2023
課題番号：２１Ｋ０５１２４

研究課題名（和文）電極支持生体膜反応場を用いたタンパク質間相互作用の理解とカスケード反応への展開

研究課題名（英文）Understanding protein-protein interactions on electrode-supported membranes for cascade reactions

研究代表者
加藤　優（Kato, Masaru）

北海道大学・地球環境科学研究院・准教授

研究者番号：７０７０９６３３

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）：本研究では電極表面において擬似生体膜を構築し，タンパク質-タンパク質間相互作用における酵素活性等への影響を調べるための反応場として利用した．具体的には，膜貫通型金属酵素であるシトクロムc酸化酵素をAu電極表面に固定化後，そのタンパク質を起点として，リン脂質からなる脂質二分子層を構築し，更に，水溶性酸化還元タンパク質であるシトクロムcとの相互作用による電気化学酵素活性への影響をタンパク質フィルム電気化学により調べた．その結果，酵素活性が脂質二分子層の流動性の違いに伴い向上すること，また，タンパク質間相互作用によっても向上することが明らかとなった．

研究成果の学術的意義や社会的意義
本研究によって，酸化還元酵素およびタンパク質における脂質ータンパク質およびタンパク質ータンパク質相互作用により酵素活性が変化することが明らかとなった．電極を支持基板として用いることで，電子源としての試薬等を加えることなく，金属タンパク質への電子移動，すなわち酵素の酸化還元状態や活性を制御可能となる．そのため，プロテオリポソーム等の反応場では困難なタンパク質相互作用のみによる酵素活性への影響を理解することができた．今後はこの反応場を利用することで，様々な膜貫通型金属酵素の酵素反応機構の理解やバイオセンサー・デバイスの開発へと進展すると期待している．

研究成果の概要（英文）：In this work, lipid bilayer membranes with metalloenzymes were constructed on the electrode surface to investigate the effect of protein-protein interaction on the enzymatic activity. A transmembrane metalloenzyme of cytochrome c oxidase was immobilized on the surface of a gold electrode, and then lipid bilayer membranes consisting of phospholipids were constructed around the protein. Protein film electrochemistry revealed that the interactions with a water-soluble redox protein of cytochrome c and phospholipids enhanced the enzymatic activity.

研究分野：電極触媒

キーワード：タンパク質フィルム電気化学　表面増強赤外吸収分光法　脂質二分子層　金属酵素　シトクロムc酸化酵素　自己組織化単分子層　電極触媒　酸素還元反応

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

１．研究開始当初の背景

膜タンパク質は細胞膜を構成する脂質分子や他の可溶性タンパク質等と相互作用しながら電子移動することで，細胞膜を介したシグナル伝達やエネルギー生産といったタンパク質機能を発現することが知られている.膜タンパク質–リン脂質間やタンパク質-タンパク質間相互作用といった比較的弱い相互作用を膜タンパク質が機能している状態で直接観察することができれば，生体内反応の理解，医薬品やバイオセンサー開発等の促進が期待できる．そのためには，膜タンパク質の機能を外部制御可能な反応場の構築が不可欠である．

２．研究の目的

本研究では，膜タンパク質–リン脂質間やタンパク質–タンパク質間相互作用と酵素活性相関の理解を可能とする，人工生体膜固定化電極の構築を目的とした.特に膜タンパク質の中でも生体内電子移動や酵素反応において重要なヘムを含む膜貫通型金属酵素，シトクロム *c* 酸化酵素 (C*c*O) に着目し，C*c*O と脂質二分子層 (BLM) や水溶性酸化還元タンパク質であるシトクロム *c* (cyt *c*) との相互作用による酵素活性への影響を電極界面に構築した擬似生体膜を反応場として用いることで調べた.

３．研究の方法

電極表面における CcO 固定化法および BLM 構築法は図 1 に示した通りである

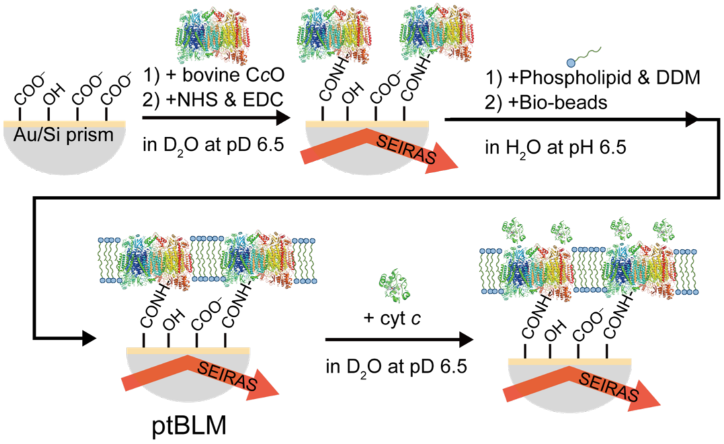

図 1. C*c*O 修飾電極の作製手順と cyt *c* との相互作用

Si プリズム表面を無電解メッキ法により Au 薄膜で被覆し，その表面に 3-mercaptopropionic acid (MPA)と 3-mercapto-1-propanol (MPL) のモル比 3:1 もしくは 1:3 からなる混合自己組織化単分子層 (SAM) を構築した．なお以降では，MPA:MPL = 3:1 と 1:3 の SAM をそれぞれ SAM_{COOH} と SAM_{OH} と略記する．その後，C*c*O の表面アミノ酸残基と MPA の末端官能基であるカルボキシ基との間にアミド結合を形成させることで酵素固定化を行った. 次いで, 界面活性剤 *n*-dodecyl-*β*-D-maltoside (DDM) で可溶化させたリン脂質 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DMPC) もしくは 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DPPC) を加え，非極性ポリスチレンビーズ吸着剤 (bio-beads) により DDM のみを吸着除去することで，膜貫通型タンパク質である C*c*O を起点とした BLM (protein-tethered BLM, ptBLM) を構築した．

各構築過程は表面増強赤外吸収 (SEIRA) 分光測定により追跡した．また，各状態の C*c*O の酵素活性は酸素飽和水溶液中におけるタンパク質フィルム電気化学測定 (サイクリックボルタンメトリー測定) により，C*c*O 修飾電極の酸素還元反応活性を調べた．

４．研究成果

BLM 構築過程を SEIRA 分光測定によって追跡した結果, DMPC と DPPC のリン脂質の種類の違いにより，BLM の流動性 (パッキング密度) に差が生じることが明らかとなった．DMPC の場合，$\nu(CH_2)$のピークトップ波数が最終的に 2923 cm^{-1} まで低波数シフトした．一方の DPPC では 2919 cm^{-1} まで低波数シフトした．DPPC で観測された波数は固体中でアルキル鎖が水にパッキングした場合の波数 (~2918 cm^{-1}) に近い．そのため，DPPC で構成される BLM は C*c*O を取り囲んだ状態で非常に密にパッキングしている, すなわち, BLM の流動性が低いと考えられる．

リン脂質–タンパク質間相互作用による酵素活性を調べるために，DMPC または DPPC を用いて得られた ptBLM 修飾電極の電気化学測定を行った．その結果，DPPC を用いた電極の方がより高い電極触媒活性を示した．実際の生体膜では，流動モザイクモデルのような非常に流動性が高い膜環境で C*c*O が機能していると考えられている．しかしながら，本実験で得られた結果は，その描像とは逆であり，酵素活性のみにおいては必ずしも膜の流動性が高い必要がないことが明らかとなった．今後，コレステロールなどを用いたより流動性の高い ptBLM 条件での実験により，BLM と酵素活性の関係性の詳細が明らかにできると考えている．

ptBLM 修飾電極中の C*c*O と cyt *c* の相互作用の有無を SEIRA 分光測定により調べた．具体的には，電極を浸漬している水溶液に cyt *c* を滴下し，その後，cyt *c* における特徴的な amide I と amide II のバンドの時間変化および洗浄前後でのスペクトル変化を調べた．その結果，$\mathrm{SAM_{COOH}}$ を用いた電極においては，それらのバンド強度の増加および電極洗浄後でもバンドが観察されたが（図 2），$\mathrm{SAM_{OH}}$ の場合ではほとんどバンド強度の増加が確認できなかった．これらの結果は，$\mathrm{SAM_{COOH}}$ と $\mathrm{SAM_{OH}}$ の末端官能基の比の違いにより，C*c*O の電極表面でのタンパク質配向が異なることを示唆している．$\mathrm{SAM_{COOH}}$ を用いた C*c*O の pt-BLM でのみ，cyt *c* の吸着サイトが水溶液側に露出しているため，cyt *c* の吸着が観察されたと考えている．

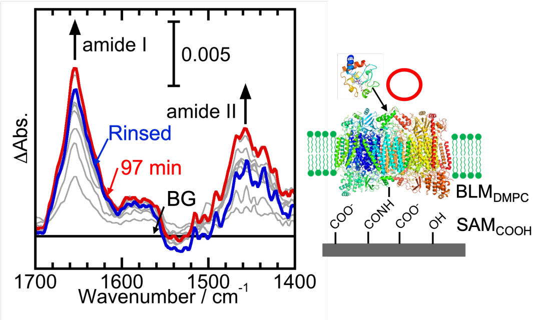

図 2. C*c*O-ptBLM/$\mathrm{SAM_{COOH}}$/Au/Si プリズム基板を浸漬している水溶液への cyt *c* の添加後の SEIRA 差スペクトルの時間変化．

C*c*O とリン脂質とのタンパク質–リン脂質間相互作用と cyt *c* とのタンパク質–タンパク質間相互作用は共に，C*c*O の酵素活性（電極触媒活性）を向上させることがタンパク質フィルム電気化学測定により明らかとなった（図 3）．生体内においては，cyt *c* は C*c*O への電子伝達体として機能している．そのため，プロテオリポソームなどを用いて C*c*O の活性を調べるためには，cyt *c* の還元体などを用いて，cyt *c* と C*c*O のタンパク質間で相互作用させた後に，電子移動をさせる必要がある．本研究で用いたタンパク質フィルム電気化学法では，電極が電子の供給源となり，cyt *c* と C*c*O のタンパク質–タンパク質間相互作用のみを切り出すことで，酵素活性に対する影響を明らかにすることができた．

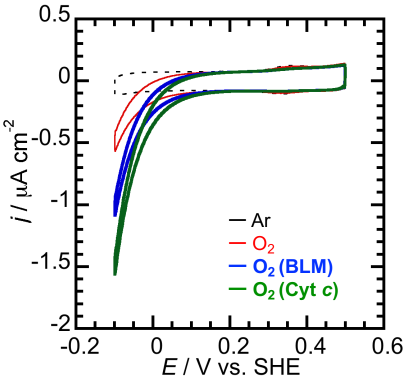

図 3. Ar 雰囲気下（点線）および O_2 雰囲気下での $\mathrm{BLM_{DPPC}}$ の無（赤線），$\mathrm{BLM_{DPPC}}$ が有（青線），更に，cyt *c* 共存下（緑線）における C*c*O/$\mathrm{SAM_{COOH}}$/Au 電極のサイクリックボルタモグラム．

本研究で得られた知見は生体内反応の理解だけでなく，金属酵素を模倣した人工触媒の設計・開発指針になることを期待している．

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計3件（うち査読付論文　2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 Oka Sayuki、Kato Masaru、Yoshimoto Soichiro、Yagi Ichizo	４．巻 53
２．論文標題 Dependence on the crystallographic orientation of Au single crystal surfaces modified with homocysteine toward enantioselective redox reactions	５．発行年 2024年
３．雑誌名 Chemistry Letters	６．最初と最後の頁 upad041
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/chemle/upad041	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 加藤優	４．巻 23
２．論文標題 金属酵素に学ぶ電極触媒の設計と開発	５．発行年 2023年
３．雑誌名 燃料電池	６．最初と最後の頁 49-57
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 Kato Masaru、Sano Ryoya、Yoshida Narumi、Iwafuji Masatoshi、Nishiyama Yoshito、Oka Sayuki、Shinzawa-Itoh Kyoko、Nishida Yuya、Shintani Yasunori、Yagi Ichizo	４．巻 13
２．論文標題 Effects of Interfacial Interactions on Electrocatalytic Activity of Cytochrome c Oxidase in Biomimetic Lipid Membranes on Gold Electrodes	５．発行年 2022年
３．雑誌名 The Journal of Physical Chemistry Letters	６．最初と最後の頁 9165～9170
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.jpclett.2c01765	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15件（うち招待講演　5件／うち国際学会　0件）

１．発表者名 岡紗雪、加藤優、吉本惣一郎、西田優也、新谷泰範、八木 一三
２．発表標題 ホモシステイン修飾Au(111)単結晶電極における金属酵素の電極触媒活性
３．学会等名 電気化学会第91回大会
４．発表年 2024年

１．発表者名
星野翔悟、岡紗雪、加藤優、八木一三

２．発表標題
ホモシステイン修飾Au電極におけるラッカーゼ固定化と酸素還元活性

３．学会等名
令和5年度日本表面真空学会東北・北海道支部学術講演会

４．発表年
2024年

１．発表者名
加藤優

２．発表標題
タンパク質フィルム電気化学から人工電極触媒開発への展開

３．学会等名
第132回触媒討論会（招待講演）

４．発表年
2023年

１．発表者名
加藤優

２．発表標題
金属酵素に学ぶ電極触媒の設計と開発

３．学会等名
FCDIC第30回燃料電池シンポジウム（招待講演）

４．発表年
2023年

１．発表者名
加藤 優、岩藤 理英、吉田 生未、當舎 武彦、八木 一三

２．発表標題
電気化学的活性条件での一酸化窒素還元酵素の反応追跡

３．学会等名
第 49 回生体分子科学討論会

４．発表年
2023年

１．発表者名
西山仁人、佐野綾哉、岡紗雪、新谷泰範、西田優也、加藤優、八木一三

２．発表標題
電気化学測定と分光計測を用いたチトクロム c 酸化酵素に おけるアロステリック相互作用の理解

３．学会等名
第 49 回生体分子科学討論会

４．発表年
2023年

１．発表者名
加藤優

２．発表標題
金属酵素に学ぶ電極触媒の設計と開発

３．学会等名
第29回FCDIC燃料電池シンポジウム（招待講演）

４．発表年
2022年

１．発表者名
加藤優

２．発表標題
膜貫通型金属酵素の電気化学と振動分光計測

３．学会等名
2022年電気化学秋大会（招待講演）

４．発表年
2022年

１．発表者名
加藤優

２．発表標題
金属酵素に学ぶ電極触媒開発

３．学会等名
第5回日本表面・真空学会若手部会研究会（招待講演）

４．発表年
2022年

1．発表者名 岩藤理英，吉田生未，當舎武彦，加藤優，八木一三
2．発表標題 金属酵素固定化電極における擬似生体膜の構築が電極触媒活性に与える影響
3．学会等名 化学系学協会北海道支部2023年冬季研究発表会
4．発表年 2023年

1．発表者名 加藤 優、岩藤 理英、吉田 生未、當舎 武彦、八木 一三
2．発表標題 電極表面に固定化された一酸化窒素還元酵素の反応追跡
3．学会等名 電気化学会第90回大会
4．発表年 2023年

1．発表者名 佐野綾哉、吉田生未、加藤優、八木一三
2．発表標題 シトクロムc酸化酵素修飾電極における脂質膜構築過程の追跡
3．学会等名 第36回ライラックセミナー・第26回若手研究者交流会
4．発表年 2021年

1．発表者名 加藤優、吉田生未、増田侑也、當舎武彦、八木一三
2．発表標題 電極表面での脂質二分子膜形成に対する膜タンパク質-脂質相互作用の影響
3．学会等名 第15回分子科学討論会
4．発表年 2021年

１．発表者名 佐野綾哉、吉田生未、加藤優、八木一三
２．発表標題 シトクロムc酸化酵素修飾電極における擬似生体膜の構築およびシトクロムc会合のその場観察
３．学会等名 2021年日本表面真空学会学術講演会
４．発表年 2021年

１．発表者名 佐野綾哉、吉田生未、加藤優、八木一三
２．発表標題 脂質膜修飾電極界面におけるタンパク質会合挙動の追跡
３．学会等名 化学系学協会北海道支部2022年冬季研究発表会
４．発表年 2021年

〔図書〕　計1件

１．著者名 城 宜嗣、青野 重利、齋藤 正男	４．発行年 2022年
２．出版社 エヌ・ティー・エス	５．総ページ数 472
３．書名 ヘムタンパク質の科学	

〔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