

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24550183

研究課題名(和文) マルチヘムタンパク質の部位特異的変異による光機能化

研究課題名(英文) Site direct mutagenesis of multiheme protein

研究代表者

蒲池 利章 (Kamachi, Toshiaki)

東京工業大学・生命理工学研究科・准教授

研究者番号：30272694

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：マルチヘムタンパク質である硫酸還元菌由来のシトクロムc3の部位特異的変位導入により特定のヘム近傍の環境を変化させる。これにより、元来有している電子伝達機能に加え新機能を付与することができた。特に、本申請研究ではシトクロムc3に触媒機能を付与し、電子移動反応に加え触媒機能をタンパク質一分子内で実現した。さらに、高機能化したシトクロムc3の作成をめざし、反応機構の基づいた複数の部位特異的変異導入により高活性化を実現した。

研究成果の概要(英文)：Site directed mutagenesis of cytochrome c3 from *Desulfovibrio vulgaris* was carried out for the addition of enzymatic activity to the electron transfer protein. Cytochrome c3 was tetraheme electron transfer protein and our previous study reveals the role of each heme. one of the heme plays an important role in electron donation to physiological electron acceptor, hydrogenase. So in this study, heme coordination sphere of the heme was changed by the site direct mutagenesis. Obtained cytochrome c3 can carry out both enzymatic activity and electron transfer activity.

研究分野：生物無機化学

キーワード：電子伝達タンパク質

#### 1. 研究開始当初の背景

電子伝達タンパク質を遺伝子工学的に改変し、本来の機能を改変した研究が多く行われている。しかし、マルチヘムタンパク質を用いた研究は少なく、これを用いれば、本来有している機能に加え、新たな機能が付与でき、高機能化が達成できると考えられた。

#### 2. 研究の目的

マルチヘムタンパク質である硫酸還元菌由来のシトクロム  $c_3$  の部位特異的変位導入により特定のヘム近傍の環境を変化させる。これにより、元来有している電子伝達機能に加え新機能を付与することができる。特に、本申請研究ではシトクロム  $c_3$  に光増感機能を付与し、光励起電子移動反応をタンパク質一分子内で実現する。さらに、光機能化したシトクロム  $c_3$  とヒドロゲナーゼを組み合わせることでより高効率な光水素発生系の構築を試みる。

#### 3. 研究の方法

これまでに、シトクロム  $c_3$  の4個のヘムの機能を明らかにしている。これらの結果を踏まえ、まず Heme I を遺伝子工学的に欠損させた  $\Delta$ heme I シトクロム  $c_3$  を調製する。この  $\Delta$ heme I シトクロム  $c_3$  に Zn プロとポルフィリン IX など光増感作用を有するポルフィリンを再構成することにより光機能化シトクロム  $c_3$  を調製する。光機能化シトクロム  $c_3$  の光学的な性質を物理化学的手法により解明し、さらにヒドロゲナーゼと組み合わせることで高効率光水素発生系の構築を行う。具体的には下記の項目を実施する。

#### 4. 研究成果

本研究ではマルチヘムタンパク質である硫酸還元菌由来のシトクロム  $c_3$  の部位特異的変位導入により特定のヘム近傍の環境を変化させ、元来有している電子伝達機能に加え新機能を付与することを目的とする。特に、本申請研究ではシトクロム  $c_3$  に光増感機能を付与し、光励起電子移動反応をタンパク質一分子内で実現し、さらに、光機能化したシトクロム  $c_3$  とヒドロゲナーゼを組み合わせることでより高効率な光水素発生系の構築を試みた。光エネルギーの化学エネルギー変換のためには光励起、電荷電荷分離、電子伝達、触媒反応のすべての段階が効率よく進行する必要がある。本申請研究では、光機能化シトクロム  $c_3$  を用い、一分子内で光励起と電荷分離を達成する光機能化電子伝達タンパク質を調製した。初年度に光機能化の条件検討を行い、様々な遺伝子工学的な変異体の作成を行っている。それらの光機能化を行い、非常に低い収率ではあるものの、光機能化シトクロム  $c_3$  を得ることができた。今年度は収率の向上を目指し、金属置換シトクロムを調製し、光機能化シトクロム  $c_3$  を得ることができた。光機能化シトクロム  $c_3$  の機能解明を目指し、光機能化シトクロム  $c_3$  とピオローゲンとを組み合わせた光還元系を構築した。この系に光照射を行うと、ピオローゲンが還元さ

れたことから、シトクロム  $c_3$  の光機能化が達成できたことがわかった。また、電子伝達機能に加え、酸化還元触媒能を付与したヘムを様々な作成し、その構造機能相関に関して研究を行った。

#### 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 9 件)

1. Characterization of a Radical S-Adenosyl-L-methionine Epimerase, NeoN, in the Last Step of Neomycin B Biosynthesis, Kudo F, Hoshi S, Kawashima T, Kamachi T, Eguchi T. *J Am Chem Soc*, 2014, **136**(39):13909-13915. (査読有)
2. A metabolomics-based approach for predicting stages of chronic kidney disease, Kobayashi T, Yoshida T, Fujisawa T, Matsumura Y, Ozawa T, Yanai H, Iwasawa A, Kamachi T, Fujiwara K, Kohno M *et al. Biochem Biophys Res Commun*, 2014, **445**(2):412-416. (査読有)
3. Exploration of novel predictive markers in rat plasma of the early stages of chronic renal failure, Kobayashi T, Matsumura Y, Ozawa T, Yanai H, Iwasawa A, Kamachi T, Fujiwara K, Tanaka N, Kohno M. *Anal Bioanal Chem*, 2014, **406**(5):1365-1376. (査読有)
4. Methane hydroxylation using light energy by the combination of thylakoid and methane monooxygenase, Ito H, Mori F, Tabata K, Okura I, Kamachi T. *RSC Advances*, 2014, **4**(17):8645-8648. (査読有)
5. Measurement of soil bacterial colony temperatures and isolation of a high heat-producing bacterium, Tabata K, Hida F, Kiriya T, Ishizaki N, Kamachi T, Okura I. *BMC Microbiol*, 2013, **13**(1):56-62. (査読有)
6. Reversible off-on fluorescence probe for hypoxia and imaging of hypoxia-normoxia cycles in live cells, Takahashi S, Piao W, Matsumura Y, Komatsu T, Ueno T, Terai T, Kamachi T, Kohno M, Nagano T, Hanaoka K. *J Am Chem Soc*, 2012, **134**(48):19588-19591. (査読有)
7. Improvement of tumor localization of photosensitizers for photodynamic therapy and its application for tumor diagnosis, Ogura S, Hagiya Y, Tabata K, Kamachi T, Okura I. *Curr Top Med Chem*, 2012, **12**(3):176-184. (査読有)

8. Investigation of the key heme in cytochrome  $c_3$  to the electron pool effect by highly sensitive EQCM technique, Kobayashi E, Hirose Y, Kamachi T, Tabata K, Okura I, Asakura N. *Electrochemistry (Tokyo, Japan)*, 2012, **80**(5):312-314. (査読有)
9. Specific surface modification of the acetylene-linked glycolipid vesicle by click chemistry, Ito H, Kamachi T, Yashima E. *Chem Commun*, 2012, **48**(45):5650-5652. (査読有)

[学会発表](計 28 件)

1. 蒲池利章、銅含有メタンモノオキシゲナーゼの精製と性質、第 110 回触媒討論会、九州・九州大学 伊都キャンパス、2013/9/24-26、国内、依頼講演
2. Hiromi Kurokawa, Mai Inoue, Masahiro Inoue, Tetsuya Kadonosono, Shinae Kizaka-Kondoh, Shun-ichiro Ogura, Toshiaki Kamachi, Intracellular oxygen imaging using phosphorescence lifetime-from monolayer culture to spheroid culture-, International Marine Biotechnology Symposium, Okinawa. Okinawa Industry Support Center, 2013/3/18-19, 国内、口頭
3. 伊藤力、中澤悠、杉本太郎、田畠健治、蒲池利章、軸配位子置換による硫酸還元菌由来シトクロム  $c_3$  の調製と性質、日本化学会第 93 春期年会、滋賀・立命館大学、2013/3/22-25、国内、口頭
4. 森史也、伊藤栄紘、大倉一郎、蒲池利章、葉緑体の光還元系を利用したメタンモノオキシゲナーゼによるプロピレンの酸化反応、日本化学会第 93 春期年会、滋賀・立命館大学、2013/3/22-26、国内、口頭
5. Hidehiro Ito, Daisuke Tomioka, Mai Inoue, Chinatsu Hasegawa, Eiji Yashima, Toshiaki Kamachi, Metalloenzymes Immobilization Using Polymer Containing Cationic Side Chains, International Conference on BioInorganic Chemistry ICBIC 16, Grenoble・Alpexpo center, 2013/7/22-26, 国際会議, ポスター
6. 蒲池利章、黒川宏美、井上舞、伊藤栄紘、井上正宏、Pt ポルフィリンのリン光寿命を利用した細胞内酸素濃度イメージング、第 7 回バイオ機能関連化学シンポジウム、名古屋・名古屋大学、2013/9/27-29、国内、口頭
7. 黒川宏美、井上舞、伊藤栄紘、井上正宏、蒲池利章、Pt ポルフィリンのリン光寿命を利用した細胞塊酸素濃度イメージング、第 7 回バイオ機能関連化学シンポジウム、名古屋・名古屋大学、2013/9/27-29、国内、ポスター
8. 伊藤栄紘、原科建依、田畠健治、大倉一郎、蒲池利章、自殺基質を用いた *Methylosinus trichosporium* OB3b 由来膜結合型メタンモノオキシゲナーゼ活性中心の検討、第 1 回バイオ機能関連化学シンポジウム若手フォーラム、名古屋・名古屋大学、2013/9/26、国内、ポスター
9. 黒川宏美、井上舞、伊藤栄紘、井上正宏、蒲池利章、Pt ポルフィリンのリン光寿命を利用した細胞塊酸素濃度イメージング、第 1 回バイオ機能関連化学シンポジウム若手フォーラム、名古屋・名古屋大学、2013/9/27-29、国内、ポスター
10. 岩崎達也、伊藤栄紘、大倉一郎、蒲池利章、疎水性ポルフィリンを用いた光水素発生におけるリポソーム表面電荷の効果、第 3 回 CSJ 化学フェスタ、東京・船堀、2013/10/21-23、国内、ポスター
11. 中澤悠、伊藤力、杉本太郎、蒲池利章、部位特異的変異による軸配位子置換シトクロム  $c_3$  の調製と性質、第 3 回 CSJ 化学フェスタ、東京・船堀、2013/10/21-24、国内、ポスター
12. 森 史也、伊藤栄紘、大倉一郎、蒲池利章、葉緑体の光合成明反応を利用したメタンモノオキシゲナーゼによるメタン酸化反応、第 43 回石油・石油化学討論会、北九州・北九州国際会議場、2013/11/14-15、国内、口頭
13. Toshiaki Kamachi, Kenji Tabata, Direct oxidation of methane to methanol by methane monooxygenase from *M. trichosporium* OB3b, International Conference on Bio/Mimetic Solar Energy Conversion, 大阪・大阪市立大学、2013/11/22-24, 国際会議 (国内開催), 招待
14. 黒川宏美、井上舞、伊藤栄紘、矢野重信、井上正宏、蒲池利章、Pt ポルフィリンのリン光寿命と共焦点光学系を利用した細胞内酸素イメージング、第 11 回 がん & ハイポキシア研究会、仙台・東北大学、2013/12/13-14、国内、ポスター
15. 蒲池利章、リン光寿命測定による細胞内酸素濃度イメージング、第 2 回細胞凝集研究会、福岡・福岡、2014/、招待
16. 岩崎達也、伊藤栄紘、大倉一郎、蒲池利章、ヒドロゲナーゼを用いた光水素発生におけるリポソーム膜表面電荷の効果、日本化学会第 94 春期年会、名古屋・名古屋大学、2014/3/27-30、国内、口頭
17. 尾台俊亮、八馬彬、伊藤栄紘、黒川宏美、蒲池利章、ポルフィリンコア末端グルタミン酸デンドリマーの合成と性質、日本化学会第 94 春期年会、名古屋・名古屋大学、2014/3/27-30、国内、口頭
18. 中澤悠、伊藤力、杉本太郎、田畠健治、蒲池利章、部位特異的変異による 5 配位構造のヘムを有するシトクロム  $c_3$  の調製と性質、日本化学会第 94 春期年会、名古屋・名古屋大学、2014/3/27-30、国

- 内、口頭
19. Toshiaki Kamachi, Methanol production from methane using methane monooxygenase, China-Japan Forum on Advanced C0/C1 Biotechnology, Tsinghua University, 2014/7/5, 国際会議, 招待
  20. Hidehiro Ito, Fumiya Mori, Kenji Tabata, Ichiro Okura and Toshiaki Kamachi, Methane hydroxylation using light energy by the combination of thylakoid and methane monooxygenase, EUROBIC12, Switss, Zurich, 2014/8/24-30, 国際会議, ポスター
  21. 黒川宏美、富岡大輔、伊藤栄紘、田畠健治、蒲池利章、酸素応答性を有するリン光性ビーズの調製と性質の検討、第2回バイオ関連化学シンポジウム若手フォーラム、岡山・岡山大学、2014/9/10、国内、ポスター
  22. 伊藤力、中澤悠、杉本太郎、田畠健治、蒲池利章、軸配位子置換によるシトクロム c3 への酸化触媒機能の付与、第2回バイオ関連化学シンポジウム若手フォーラム、岡山・岡山大学、2014/9/10、国内、ポスター
  23. 伊藤栄紘、森史也、田畠健治、大倉一郎、蒲池利章、葉緑体とメタンモノオキシゲナーゼを利用した光駆動型メタン酸化反応、第8回バイオ関連化学シンポジウム、岡山・岡山大学、2014/9/11-13、国内、ポスター
  24. 黒川宏美、富岡大輔、伊藤栄紘、田畠健治、蒲池利章、酸素応答性を有するリン光性ビーズの調製と性質の検討、第8回バイオ関連化学シンポジウム、岡山・岡山大学、2014/9/11-13、国内、ポスター
  25. 伊藤力、中澤悠、杉本太郎、田畠健治、蒲池利章、軸配位子置換によるシトクロム c3 への酸化触媒機能の付与、第8回バイオ関連化学シンポジウム、岡山・岡山大学、2014/9/11-13、国内、ポスター
  26. Toshiaki Kamachi, Photoinduced energy conversion using metalloprotein, Artificial photosynthesis work shop, Nagoya, Nagoya Institute of Technology, 2014/10/6, 国際会議 (国内開催), 招待
  27. 伊藤栄紘、岩崎達也、大倉一郎、蒲池利章、リポソーム再構成膜結合型ヒドロゲナーゼを用いた光水素発生、旭川大会 (第44回石油・石油化学討論会)、旭川・旭川グランドホテル、2014/10/16-17、国内、口頭
  28. 蒲池利章、リン光寿命測定による細胞内酸素濃度イメージング、第2回細胞凝集研究会、福岡・福岡、2014/12/6、国内、口頭

〔図書〕(計 0 件)

なし

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
 発明者：  
 権利者：  
 種類：  
 番号：  
 出願年月日：  
 国内外の別：

○取得状況 (計 件)

名称：  
 発明者：  
 権利者：  
 種類：  
 番号：  
 出願年月日：  
 取得年月日：  
 国内外の別：

〔その他〕  
 ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

蒲池 利章 (Kamachi, Toshiaki)

東京工業大学・生命理工学研究科・准教授

研究者番号：30272694

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：