

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26288076

研究課題名(和文) マルチ銅オキシダーゼによる酸素還元機構の解明と機能改変体の電極触媒としての利用

研究課題名(英文) Study on Dioxygen Reduction Mechanism by Multicopper Oxidases and Application of Function Modulated Mutants as Electrode Catalyst

研究代表者

櫻井 武 (Sakurai, Takeshi)

金沢大学・その他部局等・名誉教授

研究者番号：90116038

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,600,000円

研究成果の概要(和文)：マルチ銅オキシダーゼによる酸素の4電子還元が共通した反応機構で進行することを CueO及びビリルビンオキシダーゼのタイプI銅配位子並びにプロトン輸送に関与するアミノ酸への変異導入によって明らかにした。この時、三核銅部位の外圏に配置されたアミノ酸が電子供与体として機能しないことがわかった。酸素還元過程の詳細をさらに詳しく解明するため中性子回折を行うことを計画し、重水中でCueOを結晶化した。また、緩衝液起源の酢酸イオンがタイプII銅に結合することを見出した。さらに、タイプI銅の外圏部の改変により酵素活性を高め、なおかつ、優れた電極応答を実現し、生物燃料電池の電極触媒としての利用の道を開いた。

研究成果の概要(英文)：Studies on the three-domain multicopper oxidases such as CueO and bilirubin oxidase by the mutations at the type I copper ligand and/or the acidic amino acid located in the proton transport pathway revealed that the four-electron reduction of dioxygen proceeds according to a common reaction pathway. Amino acids located in the outer-sphere of the trinuclear copper center were found not to play a role as the fourth electron donor. From the finding that an acetate ion from buffer solution was bound to type II copper, it was found that this exogenous anion reaches deep inside protein molecule and enhances enzymatic activities. Further, we performed crystallization of CueO in heavy water for neutral diffraction to reveal the reaction mechanism. We also succeeded in enhancing enzymatic activities by performing mutations at the amino acids located in the outer-coordination spheres of type I copper and obtained excellent electrochemical responses suitable as cathodic enzyme for biofuel cell.

研究分野：生化学

キーワード：マルチ銅オキシダーゼ 酸素4電子還元 機能改変 電極触媒 CueO ビリルビンオキシダーゼ

1. 研究開始当初の背景

(1) タイプ I 銅(T1Cu)部位で様々の基質を酸化した後、取り出した電子をタイプ II 銅(T2Cu)とタイプ III 銅からなる三核銅部位(TNC)に分子内長距離輸送し、活性酸種を生成または放出すること無く、共基質である酸素分子を水にまで 4 電子還元することの出来るマルチ銅酸化酵素(MCO)に関する研究が世界的に活発になり始めていた。

(2) 我々は MCO のうちウルシラッカーゼ、ピリルピンオキシダーゼ(BOD)、CueO(Copper Efflux Oxidase)の構造・機能研究をすでに開始しており、天然型酵素や変異体から、2 種の酸素還元中間体を捕捉し、そのうち一種(中間体 2)について X 線結晶構造解析に成功していた。

(3) 酸素の水への 4 電子還元の際して、外国の研究グループは 2 回の 2 電子還元過程で進行するという単純な反応機構を提唱していた。しかし、我々は、第 4 番目の電子ドナーとして寄与する可能性のあるいくつかのアミノ酸が TNC 近傍に存在することに着目し、これらの反応への寄与の有無について検証する必要を感じていた。

(4) MCO の酵素活性を決定する因子として、T1Cu の酸化還元電位が関係していることがわかりつつあった。また、T1Cu と類似した Cu 部位を有するブルー銅タンパク質において、配位アミノ酸や配位グループへの水素結合によって酸化還元電位が制御されているというデータが蓄積されつつあった。

(5) MCO を生物燃料電池のカソード触媒として利用することが世界的に模索され始めており、複雑系金属含有酵素である MCO の構造および反応に関する基礎および応用研究が注目されるようになっていた。

2. 研究の目的

(1) 活性酸素を経ること無く酸素を 4 電子還元する反応は世界で最も注目されている反応のひとつであるが、今なお不明点の多い第 4 の電子ドナーの寄与の有無を検討する。酸素の 4 電子還元において、ヒドロキシラジカルのような極めて反応性の高い活性酸素種の生成を抑制または回避するために、もし第 4 の電子ドナーが存在しているならば極めて好都合であることから、TNC の近傍に存在している非配位性のアミノ酸に着目した。そして、これらに変異導入することにより、電子ドナーとしての働きの可能性について検討する。

(2) 酸素の 4 電子還元においてプロトン輸送するアミノ酸を特定し、その作用機構を明らかにする。CueO については、酸素へのプロトン輸送に関与するグルタミン酸残基が特

定出来ていたが、同様の仕組みが全ての MCO について共通であるかどうかは不明であった。そこで、CueO について行ったと同様の変異導入を BOD に対して行い、生体系における酸素 4 電子還元反応の一般性について検討する。

(3) これまでの研究から MCO の酵素活性は T1Cu の酸化還元電位によって支配されていることがわかりつつあった。そこで、T1Cu の外圏部の極性を変化させるという極めて穏やかな新規の改変を行うことによって酵素活性の上昇を目指すこととした。

(4) MCO の酵素活性は T1Cu ばかりでなく、原理的には TNC の各銅部位の酸化還元電位によってもまた制御出来る可能性があることから、TNC 近傍の極性を低下させることにより、酸素還元の際しての過電圧を低下させることを目的とした研究を行うこととした。

(5) MCO の電気化学測定を行い、大きな電流を取り出せる可能性のある電極系を探索することとした。また、嫌気下および好気下で電気化学を行い、MCO を電極触媒として利用可能な系を探索する。

(6) MCO と同様に、酸素の 4 電子還元を行う末端酸化酵素の先祖酵素と考えられる、一酸化窒素還元酵素に関する研究を展開し、ヘム-非ヘム鉄部位と TNC の酸素還元効率について比較検討するための先駆的な研究を行う。

3. 研究の方法

(1) 本研究の遂行は天然型酵素では不可能であることから、いずれの目的についても、ターゲットとするアミノ酸に対して部位得の変異導入を行い、得られた変異体の酵素活性やスペクトル性質等を詳細に検討した。単独部位への変異導入だけでは目的を満たせないときには複数箇所への変異導入を行った。そして、必要に応じ、X 線結晶構造解析を行った。特に、プロトン輸送機構については通常の X 線結晶構造解析ではプロトンが可視化できず得られる情報が不十分なことから、中性子回折を目指し、重水中において巨大結晶の作成を試みた。また、これまでの MCO の結晶化条件はいずれも弱酸性条件下であったことから、中間体の安定化を期待できる中性条件下において結晶を作成した。

(2) 中間体 2 (酸素 2 電子還元中間体) の振動分光を実現するため、より安定化の期待のできる三重変異体を設計し、凍結試料でなく、作成直後の試料を迅速に運搬し、共鳴ラマンスペクトルの測定を行った。

(3) 申請書には記述していなかったが、CueO に対してランダム変異導入を行い、酵素活性の上昇した変異体をスクリーニングでピッ

クアップし、これまで行って来たピンポイントで狙いを定めた変異導入以外の方法で、MCO の酵素活性上昇原理を探索した。

(4) これまで MCO の電気化学はプロモータで修飾した金電極を用いてきたが、酸化還元電位の測定ばかりではなく、電流値の上昇を目ざして、種々の炭素材料を用いて電気化学測定が可能かどうか検討した。

4. 研究成果

(1) 酸素 4 電子還元反応中間体 I (ペルオキシ中間体) の捕捉とキャラクタリゼーション

MCO の T1Cu 配位子の一つである Cys を部位特異的に Ser に変異させたり、T1Cu 部位を酸化状態とし TNC を還元状態とした混合原子価状態を作成することにより、酸素を水にまで還元する過程で 1 電子欠損した状態を人工的に作成し、中間体 I を捕捉出来ることはこれまでの研究からわかっていた。先行する Cue0 に関する研究では、さらに、TNC までプロトン運搬する水と酸性アミノ酸からなる水素結合ネットワークに配置された Glu に着目し、これを Gln に置換することにより中間体 I 状態が長寿命化することに成功していたが、全ての MCO で同じ手法が使えるかどうかは不明であった。そこで、BOD に対して、対応する Glu463 に変異導入した二重変異体 Cys457Ser/Glu463Gln および Cys457Ser/Glu463Ala を作成した。結果、Glu463 をプロトン供給不可能なアミノ酸に変異させることによって中間体 I を安定化することができた (すなわち、準安定状態とすることができた)。そして、吸収、円偏光二色性、電子スピン共鳴スペクトル測定を行い、中間体 I が複数の電子スピンの相互作用した状態であることを確認した。また、MCO による酸素の水への変化過程は、全ての MCO において共通のプロセスをたどることが確認出来た。次いで、Cue0 ならびに BOD の中間体 I の構造を共鳴ラマンスペクトルによりさらに詳細に検討することを試みたが、レーザー光による還元のため、中間体 I は容易に 0-中心の TNC 構造を有する中間体 II へと変化してしまっただ。そこで、TNC 近傍に位置する芳香族アミノ酸の影響を排除することを計画し、Cue0 の Trp139 を Phe に置換した三重変異体を作成したところ、より明瞭な遷移スペクトルを与える中間体 I が作成出来た。そして、この中間種の共鳴ラマンスペクトル測定を試み、初めてラマンバンドを観測することができた。しかしながら、予期しない波数であるため、今後アイソトープを用いた確認実験が必要である。一方、X 線結晶構造解析によって中間種の構造を決定することを目指すこととし、中間種の減衰を抑制した中性条件下で微結晶を作成した。今後、この結晶が構造解析可能なサイズとなれば、欧米の研究グループを凌駕するブレークスルーとなることが期待される。

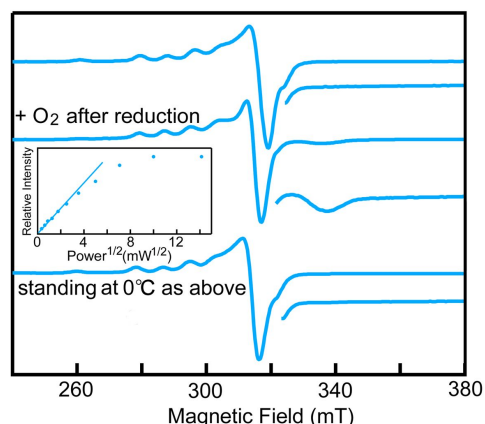


図 1. Cys500Ser/Glu463Gln と酸素の反応から得られた中間体 I (上) の X バンド ESR スペクトル(7K)とそのマイクロ波飽和挙動(図内)ならびに減衰後のスペクトル(下)高磁場のシグナルが中間体 II 由来

(2) 酸素還元における第 4 の電子ドナーの存在の有無に関する検討

TNC で進行する酸素の 4 電子還元の際して、中間体 I の生成によって、エネルギー的に不利なスーパーオキサイドを経由する 1 電子過程が回避され、その後過程は、エネルギー的にダウンヒルとなる。しかし、1 電子欠損過程であるためヒドロキシルラジカルを経る危険性を低下させる仕組みは不明のままである。そこで、不足している第 4 の電子を TNC 近傍に位置するアミノ酸から供給する仕組みが備わっているものと作業仮説し、Cue0 の TNC 近傍に位置する Trp、Tyr、Cys に対して変異導入した。酵素活性が若干変化する傾向も見られたが、基本的には重要な変化は見られなかったことから、第 4 の電子は T1Cu から迅速に中間体 I に供給されるか、もしくは、T1Cu から T2Cu または T3Cu に T1Cu から 1 電子輸送が行われた後、2 電子過程で反応が進行するものと考えられ、Cue0 のような 3 ドメイン型の MCO の反応機構は独自のものであるとの結論に至った。

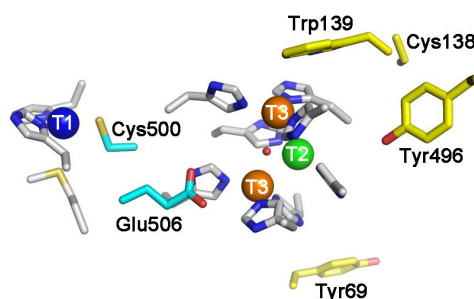


図 2. Cue0 の活性部位 TNC 近傍に位置する Tyr69、Cys138、Trp139、Tyr496 を Phe に変異

(3) 酸素還元のためのプロトン輸送に関する研究

酸素を水にまで還元する過程にはプロトン供給が必須であるが、これはタンパク質分子内に形成された酸性アミノ酸と水分子からなるウォーターワイヤによって実現される。この水素結合ネットワークを可視化するため、MCO を中性子回折することを計画した。Cue0 の重水中での巨大結晶作成に挑戦して来たが、現時点は路半ばという所である。しかしながら、着実に前進していることから、間もなく MCO で初めて中性子回折測定にこぎつけ、欧米の研究グループの研究を遙かに凌駕出来るであろう。

MD 計算によるネットワークの動的構造の検討についてはなお進行中であるが、現時点では、外部から Glu までの水分子は溶媒と交換可能であること、Glu と T3Cu 間に架橋したヒドロキシ基の間に存在する水分子は酸素由来である可能性が高いことまで確認できた。

MCO の反応は pH が低いほど迅速に進行することがわかっているが、これは酸素へのプロトン供給と関連していると予想し、酢酸緩衝液で結晶化した Cue0 の構造解析により、酢酸イオンがタンパク分子内奥深く TNC まで到達しうることを見いだした。これは構造解析においてマイナーな電子密度に重要な情報が隠れていることを示す発見となった。

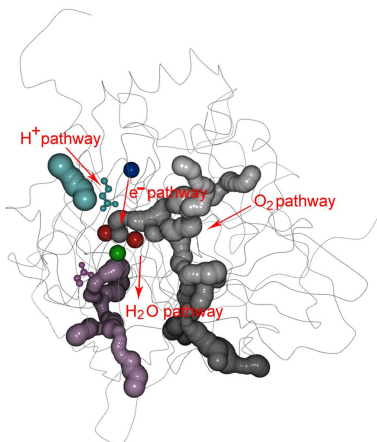


図 3. Cue0 の全体構造 (ワイヤモデル) と活性部位へと続くトンネル

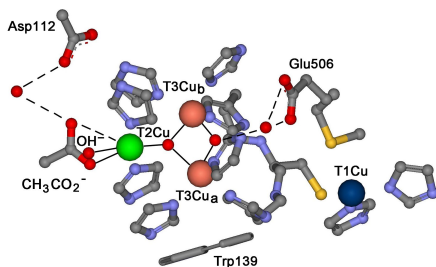


図 4. T1Cu に緩衝液由来の酢酸イオンが T2Cu に結合しているフォームと通常の水分子が結合しているフォームが存在

(4) T1Cu および TNC の Cu センターの酸化還元電位のシフトによる酵素活性の調整

これまで T1Cu への配位アミノ酸の変換や配位アミノ酸への水素結合の形成・切断で T1Cu の酸化還元電位を自在にシフトさせ MCO の酵素活性を上昇または低下させることに成功しているが、新たに、T1Cu や TNC の外圏部への改変により MCO の酵素活性の上昇を目指した。具体的には、T1Cu の外圏部に存在するアミノ酸をより疎水性の高いものに置換することで極性低下に至り、酸化還元電位が正電位シフトし、活性が上昇するものと予想した。Cue0 の Asp439 を種々のアミノ酸に置換したところ期待通りの結果となり、他の酵素でも適用可能な一般的な酵素改変法を初めて実現することができた。

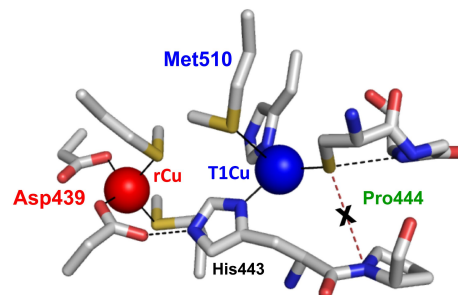


図 5. Cue0 の T1Cu 配位子に対する水素結合の形成または除去による酵素活性制御

(5) 改変 MCO の電気化学

酵素活性が上昇した Cue0 や BOD の変異体の直接電気化学をプロモータで修飾した金電極や各種カーボン電極を用いて電気化学を行い、メソポーラスカーボンの使用により良好な電気化学応答が得られることが分かった。また、生物燃料電池の電極触媒として利用可能なレベルの電極電位と電流密度に到達した。

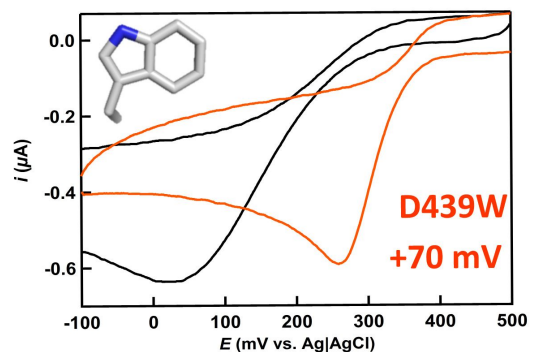


図 6. Asp439Trp Cue0 の直接電気化学 黒は Cue0 組換え体、赤は Asp439Trp のサイクリックボルタモグラム

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計7件)

Mahfuza Akter, Chika Inoue, Hirofumi Komori, Nana Matsuda, Takeshi Sakurai, Kunishige Kataoka, Yoshiki Higuchi, Naoki Shibata, Biochemical, Spectroscopic and X-ray Structural

Analysis of Deuterated Multicopper Oxidase CueO Prepared from a New Expression Construct for Neutron Crystallography, Acta Crystallographica, 査読有, Vol. F72, No. 10, 2016, 788-794

DOI:<http://dx.doi.org/10.1007/S2053230X1601400X>

Hirofumi Komori, Kunishige Kataoka, Sakiko Tanaka, Nana Masuda, Yoshiki Higuchi, Takeshi Sakurai, Exogenous Acetate Ion Reaches the Type II Copper Centre in CueO through the Water-Excretion Channel and Potentially Affects the Enzymatic Activity, Acta Crystallographica, 査読有, Vol. F72, No. 7, 2016, 558-563
DOI:<http://dx.doi.org/10.1007/S2053230X16009237>

Hirotohi Morishita, Daisuke Kurita, Kinishige Kataoka, Takeshi Sakurai, Study on Dioxygen Reduction by Mutational Modifications of the Hydrogen Bond Network Leading from Bulk Water to the Trinuclear Copper Center in Bilirubin Oxidase, Biochemical and Biophysical Research Communications, 査読有, Vol. 450, No. 1, 2014, 767-772

DOI:<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.06.052>

〔学会発表〕(計 16 件)

Takeshi Sakurai, Multicopper Oxidase - Basic and Application Studies on the Enzymes Containing Multiple Copper Centers - The 3rd International Conference on Mathematics, Science, and Education, 平成28年9月3-4日,スマラン(インドネシア)

櫻井 武, ビリルビンオキシダーゼの酵素機能を支配する翻訳後修飾と基質特異性, 第43回生体分子科学討論会, 平成28年6月24-25日, 名古屋大学野依記念館(愛知県・名古屋市)

Takeshi Sakurai, Mutations at the Potential electron Donors Located in the Coordination Sphere of the Trinuclear Copper Center in CueO, Pacificchem 2015, 平成27年12月15-20日, ホノルル(米国)

Takeshi Sakurai, Dual Effect of the Mutational Modification of the Proton Transfer Pathway and a Type I Cu Ligand on Properties and Function of the Trinuclear Copper Center in CueO, Eurobic 12, 平成26年8月24-28日, チューリッヒ(スイス)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.kanazawa-u.ac.jp/biochem.web.fc2/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

櫻井 武 (SAKURAI, Takeshi)
金沢大学・その他部局等・名誉教授
研究者番号: 90116038

(2) 研究分担者

片岡 邦重 (KATAOKA, Kunishige)
金沢大学・物質化学系・教授
研究者番号: 40252712

(3) 連携研究者

小森 博文 (KOMORI, Hirofumi)
香川大学・教育学部・准教授
研究者番号: 30382261

辻村 清也 (TSUJIMURA, Seiya)

筑波大学・数理物質科学研究科・准教授
研究者番号: 30362429

井田 朋智 (IDA, Tomonori)

金沢大学・物質化学系・准教授
研究者番号: 30345607