

令和元年6月11日現在

機関番号：12605

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K17703

研究課題名(和文) 溶解性多糖モノオキシゲナーゼの電極反応を利用した酵素バイオ電池の開発

研究課題名(英文) Development of enzyme-based biofuel cells using a lytic polysaccharide monoxygenase-based electrode

研究代表者

武田 康太 (Takeda, Kouta)

東京農工大学・工学(系)研究科(研究院)・特任助教

研究者番号：20781123

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：木材腐朽菌がセルロース分解プロセスの過程で分泌する酸化還元酵素に注目し、それらを電極触媒とするバイオ燃料電池の開発に向けた酵素電極反応に関連する研究を行なった。溶解性多糖モノオキシゲナーゼ(LPMO)が固定化された金ナノ粒子電極で、LPMOの直接電子移動反応による酸化還元ピーク電流が観測された。アノード触媒の酵素の一つであるCoprinosopsis cinerea由来ピロロキノリンキノン(PQQ)依存性ピラノース脱水素酵素(CcPDH)のホロ体の立体構造を明らかにした。構造情報を参考に、CcPDHの電子移動反応、電極との直接電子移動反応に関する新たな知見を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

学術的意義は、LPMOへの電子供与体を電極に置き換えたLPMO-電極共役反応系を確立した点で、本電極系によって電気化学的にLPMOの触媒機構や生理学役割について解析できる可能性が示された。直接電子移動型のアノード触媒酵素として使用できるPQQ依存性脱水素酵素に関して、効率的な酵素電極反応を実現するための重要な知見が得られた。以上の本研究成果は、木材腐朽菌の酸化還元酵素を用いたバイオエレクトロニクス分野への展開につながるものである。また、糸状菌の生体機能を利用したセルロース系バイオマス変換技術の発展に寄与できるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Wood rotting fungi are important decomposers of plant biomass and secrete not only a set of glycoside hydrolases but also numerous oxidoreductases, including lytic polysaccharide monoxygenases (LPMOs). The new insights into bioelectrocatalysis of fungal oxidoreductases were obtained with the goal of the development of enzyme-based biofuel cells using them. LPMO based on the gold nanoparticles modified electrode exhibited the direct electron transfer. For an anodic enzyme, we successfully determined holo-form of the X-ray structure in the pyranose dehydrogenase from *Coprinosopsis cinerea* (CcPDH), providing direct evidence that PQQ is a coenzyme of this enzyme. Furthermore, we demonstrated the electron transfer reaction and bioelectrocatalysis of CcPDH.

研究分野：生物電気化学

キーワード：酵素電極 糖質関連酵素 PQQ 結晶構造解析 直接電子移動 ヘム

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

自然界において、糸状菌類は植物細胞壁分解を担う主要な生物種であるため、その生物機能が注目されている。糸状菌のセルロース分解反応は、菌体外に分泌された種々のセルラーゼが触媒する一連の加水分解反応によるものと理解されてきた。しかし近年、加水分解反応だけではなく、酸化還元反応の関与も重要であることがわかってきた。セルロースを酸化的に低分子化する溶解性多糖モノオキシゲナーゼ(LPMO)は、セルラーゼと協調的に作用し、結晶性セルロースの分解効率を飛躍的に高めることから、大きく注目を浴びている。その反応機構は、外来からの電子供与を受けて、LPMOの活性中心に配位した酸素分子が活性化され、糖のC1位もしくはC4位に一原子酸素添加反応によって、糖鎖の切断が起こると考えられている。このLPMOの生理学的な電子供与体は未だ不明であるが、セロビス脱水酵素(CDH)のシトクロムドメインが、電子供与体として機能することが報告されている。

酵素を用いたバイオ燃料電池はバイオエネルギー変換技術の一つである。アノードとカソードのみからなるシンプルな設計で、再生可能な資源材料から構成することができ、安全でユビキタな電池という特徴がある。バイオ電池にはグルコースやアルコールといった可溶性基質を燃料としたものがほとんどで、それらを酸化する酵素がアノード触媒として用いられる。カソード側では一般的に、酸素の4電子還元反応を触媒とするマルチ銅オキシゲナーゼが用いられてきた。本研究では、固体基質であるセルロースを燃料とする酵素バイオ電池の開発に向けて、木材腐朽菌がセルロース分解のために発現する酸化還元酵素を酵素バイオ電池の電極触媒として着眼した。

2. 研究の目的

木材腐朽菌の酸化還元酵素のバイオエレクトロニクス分野への展開を提示し、セルロース系バイオマス変換技術の一つとして提案することを目指した。研究代表者は、これまでに糸状菌の一種である *Coprinopsis cinerea* から新規ピロロキノリンキノン(PQQ)依存性ピラノース脱水素酵素(CcPDH)を見出し、本酵素がセルロース分解に関連する酸化還元酵素であることを示唆する結果を得た。CcPDHは上述したCDH様のシトクロムドメインを有しており、LPMOへの電子供与体として機能することが考えられる。木材腐朽菌の菌体外酸化還元酵素を、セルロースといった多糖類を燃料とするバイオ電池の電極触媒として用いるため、アノード及びカソード反応系の構築と評価を目的とした。特に大きな進展のあったCcPDHに関して、その立体構造と活性相関、電極での直接電子移動反応についてより詳細な検討を行なった。

3. 研究の方法

(1) LPMOの大量生産系と直接電子移動反応系の構築

糖関連酵素データベース(CAZy)に分類されているLPMOのファミリーのうち、Auxiliary Activity 9(AA9)に属するLPMOがセルロースに特異的に反応する。*Neurospora crassa*由来AA9の酵母菌 *Pichia pastoris* を宿主とした組換え発現を試みた。また先行して、これまでにタンパク質調製が済んでいる、*Phanerochaete chrysosporium*由来AA9(PcAA9)の固定化電極の作製と電気化学的解析を行った。

(2) PQQ依存性ピラノース脱水素酵素の立体構造と電子移動反応の解析

担子菌 *Coprinopsis cinerea* 由来ピロロキノリンキノン(PQQ)依存性ピラノース脱水素酵素(CcPDH)は、本課題の木材腐朽菌の酸化還元酵素を利用したバイオ燃料電池のアノード側の酵素触媒の一つである。またCcPDHは自身のシトクロムドメインを介してLPMOへの電子供与体となりうるが示されている。まずはCcPDHに関する構造学的知見を得ることを目的にX線結晶構造解析を行なった。CcPDHのPQQドメイン、シトクロムbドメインをそれぞれ切り離し結晶化及び構造解析を行った。CcPDHの酵素電極反応を構築し、ドメイン間及び電極間との電子移動反応の解析を行なった。

4. 研究成果

(1) LPMOの大量生産系と酵素電極反応系の構築

pPICZαベクターに2種類の *Neurospora crassa* 由来AA9をそれぞれ導入した発現ベクターを構築した。エレクトロポレーション法により、*Pichia*へ形質転換した。メタノール誘導によってタンパク質発現を行なったが発現量が低く、発現系の改良が必要であった。

PcAA9の酵素電極は、金ナノ粒子を修飾した電極を土台にチオール分子を用いた自己組

織化単分子膜による固定化を行なった。種々の官能基を有する SAM を用いた検討の結果、オクタンチオール及び4-アミノチオフェノール SAM として電極で、LPMO の活性中心に配位した銅に由来する酸化還元ピーク電流が観測された(図 1)。サイクリックボルタモグラムから算出した中間酸化還元電位は約 60 mV (vs. Ag|AgCl, pH 4.5)と、既報で報告されている *Neurospora* 由来 LPMO と近い値であった。これより本電極系で LPMO の直接電子移動反応が進行していることが示唆された。

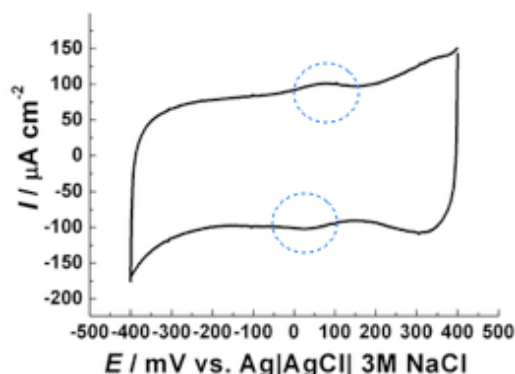


図 1. 4-アミノチオフェノール修飾金ナノ粒子金電極に固定化した *PcAA9* のサイクリックボルタモグラム。青点線で囲った範囲に LPMO の酸化還元反応に由来するピーク電流が観測された。

(2) PQQ 依存性ピラノース脱水素酵素の立体構造と電子移動反応の解析

組換え発現により得られたアポ体 PQQ ドメインに PQQ を導入し、ホロ化したサンプルを用いてバッチ法で結晶化を行った。良質な結晶が得られ、X 線結晶構造解析により 1.3 Å の分解能で立体構造を決定した。その結果、活性中心に PQQ が結合したホロ体 PQQ ドメインの立体構造を明らかにすることができ、CcPDH が真核生物由来で初めて発見された PQQ 依存性酵素であることを証明できた(図 2)。PQQ の結合様式に関して、アミノ酸配列解析と合わせて担子菌類に特徴的な PQQ の結合アミノ酸残基があることがわかった。ストップフロー法から、各 pH 条件下での基質の酸化に伴う PQQ ドメイン内の PQQ 還元速度を算出した。人工電子受容体を用いた定常状態における酵素反応速度との議論から、PQQ の再酸化反応よりも還元反応が律速となっていることが示唆された。

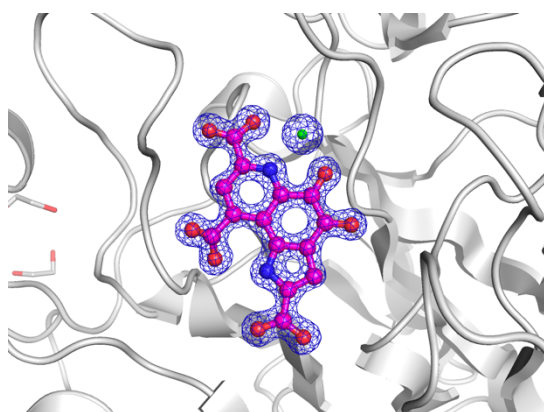


図 2. CcPDH の PQQ ドメインのホロ体の立体構造。活性中心の PQQ の電子密度マップを示した。

CcPDH は触媒反応部位である PQQ ドメインに加えて、シトクロム *b* ドメインとセルロース結合性ドメインを有したマルチドメインタンパク質で、PQQ ドメインで糖が酸化され、電子伝達部位であるシトクロム *b* ドメインへと電子が移動する(図 3 左)。最適化された酵素電極で、各ドメインとも電極への直接電子移動反応(DET)が可能である。PQQ ドメインと同様にシトクロム *b* ドメインの X 線結晶構造解析に成功した。構造からヘム周辺に特徴的なアルギニン残基によってできるヘム周辺の正電荷があることが明らかとなった(図 3 右)。このアルギニン残基を置換した変異体の結果から、ヘム周辺の正電荷が、分子内電子移動に極めて重要な役割を果たしていることを示唆する結果が得られた。酵素を固定化する上で必要な電極上に修飾した自己組織化単分子層(SAM)について、そのアルキル鎖長や官能基が CcPDH の電子移動反応に与える影響につ

いて検討した。わずかなアルキル鎖長の違いによって、PQQ ドメインから電極へと DET が進行する場合と、シトクロムドメインを介してのみ DET が進行する場合があることが明らかとなった。シトクロムドメインを介した酵素電極反応系の場合、各 pH における野生型と変異体のボルタモグラムの形状に違いがあり、変異導入が電極上でのドメイン間電子移動反応に影響していると考えられた。一方で、CDH で報告されているような金属陽イオン等の添加による電子移動反応への効果は、CcPDH には当てはまらないことが示唆された。

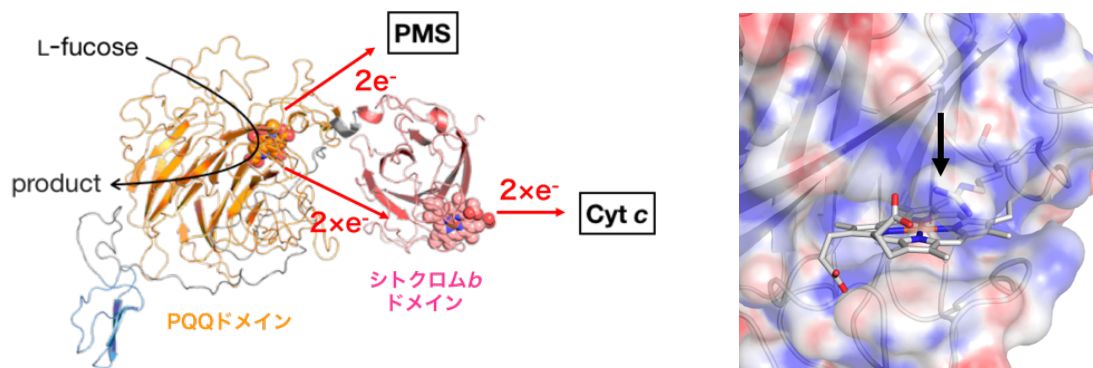


図 3. (左)CcPDH の電子移動経路。赤矢印が電子の流れを表している。PMS(フェナジンメトサルフェート)を電子受容体とする際は PQQ から直接電子を受け一方で、cyt c(シトクロム c)ではシトクロム b ドメインを介して電子が伝わる。(右) CcPDH のシトクロム b ドメインの立体構造とヘム周辺の電荷。青く表記される領域は se 正電荷で赤は負電荷を表している。矢印は電子移動経路の関わるアルギニン残基。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件) うち査読有 3 件

- 1) Takeda K, Umezawa, K, Várnai A, Eijsink G. H. V, Igarashi K, Yoshida M and Nakamura N, 「fungal PQQ-dependent dehydrogenases and their potential in biocatalysis」, 『Current Opinion in Chemical Biology』, 49 巻, Elsevier, pp113-121, 2019
 - 2) Sakuta R, Takeda K, Igarashi K, Ohno H, Nakamura N, 「Enzymes suitable for biorefinery to coproduce hexaric acids and electricity from hexuronic acids derived from biomass」, 『Energy Technology』, Wiley, 6 巻 2 号, pp273-279, 2018
 - 3) Sakurada Y, Takeda K, Ohno H, Nakamura N, 「Immobilization of pyrroloquinoline quinone-dependent alcohol dehydrogenase with a polyion complex and redox polymer for a bioanode」, 『Catalysts』, Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 7 巻 10 号, pp296, 2017
- 他 1 件

[学会発表] (計 18 件)

- 1) K. Takeda, R. Kusuoka, K. Igarashi, H. Ohno, N. Nakamura, 「Amperometric biosensor for cancer screening in urine」, 『第 28 回日本 MRS 年次大会』, 北九州国際会議場, 2018 年 12 月, (招待講演)
- 2) T. Minami, K. Takeda, M. Yoshida, K. Igarashi, H. Ohno, N. Nakamura, 「Investigation of electron transfer reaction of PQQ-dependent pyranose dehydrogenase from *Coprinosia cinerea* and its amino acid substitution mutants on electrodes」, 『9th Asian Biological Inorganic Chemistry Conference』, Singapore, 2018年12月, (国際学会)
- 3) H. Abe, R. Sakuta, K. Takeda, K. Igarashi, H. Ohno, N. Nakamura, 「Electrical energy extraction in the process of an enzymatic galactaric acid synthesis」, 『9th Asian Biological Inorganic Chemistry Conference』, Singapore, 2018年12月, (国際学会)
- 4) K. Takeda, M. Yoshida, K. Igarashi, M. Samejima, H. Ohno, N. Nakamura, 「The electrochemical behavior of a catalytic site of PQQ-dependent pyranose dehydrogenase with direct electron transfer」, 『69th Annual ISE Meeting』, Bologna, Italy, 2018年9月, (国際学会)

- 5) 南 達基、武田 康太、吉田 誠、五十嵐 圭日子、大野 弘幸、中村 暢文、「担子菌由来の細胞外PQQ依存性脱水素酵素のシトクロムドメインの電子移動反応」、『第12回バイオ関連化学シンポジウム』、大阪大学、2018年9月
- 6) 阿部 隼人、作田 陸、武田 康太、五十嵐 圭日子、大野 弘幸、中村 暢文、「バイオ燃料電池をリアクターとして用いるガラクトール酸生産」、『電気化学会秋季大会』、金沢大学、2018年9月

他12件

6. 研究組織

研究協力者氏名: 中村 暢文

ローマ字氏名: Nakamura Nobuhumi

研究協力者氏名: 五十嵐 圭日子

ローマ字氏名: Igarashi Kiyohiko

研究協力者氏名: 吉田 誠

ローマ字氏名: Yoshida Makoto

研究協力者氏名: 石田 卓也

ローマ字氏名: Ishida Takuya