

平成 22 年 4 月 5 日現在

研究種目：基盤研究（B）  
 研究期間：2007～2009  
 課題番号：19350081  
 研究課題名（和文） 銅の解毒に関わるマルチ銅オキシダーゼの金属イオン特異性、酸素 4 電子還元と機能創製  
 研究課題名（英文） Metal Ion Specificity, Four-Electron Reduction of Dioxygen, and Creation of Functions of a Multicopper Oxidase Involved in Detoxification of Copper  
 研究代表者  
 櫻井 武 (SAKURAI TAKESHI)  
 金沢大学・物質化学系・教授  
 研究者番号：90116038

研究成果の概要（和文）：銅排出酵素系において特異的に Cu(I) を酸化する酵素 Cue0 から 50 残基のアミノ酸を除去し、有機基質に対する酸化活性を創製するとともに、触媒部位への配位アミノ酸への変異導入や水素結合の切断や形成によって、触媒機能を高めることに成功した。また、Cue0 の組換え体および変異体を、生物燃料電池のカソード触媒やヘアカラー色素作成酵素としての利用することを可能とした。さらに、変異体の反応によって、酸素の 4 電子還元機構を明らかにし、反応に関与する非配位性の酸性アミノ酸を特定した。

研究成果の概要（英文）：Cue0, which is involved in the Cu efflux system of *E. coli*. and specifically oxidize Cu(I) to Cu(II), was deleted its 50 amino acids from the region covering the substrate binding site, and specificities to oxidize organic substrates were newly created. In addition, catalytic activities of Cue0 were enhanced by mutating the axial ligand to the type I copper center and by performing mutations to break down or to form a hydrogen bond with the ligand groups to the type I copper. Cue0 and mutants appeared to be applicable as a cathodic enzyme of biofuel cell and a catalyst to produce dyes used for hair color. Further, the reaction mechanism of the four-electron reduction of dioxygen was disclosed from the reactions using mutants. The non-coordinating acidic amino acids located adjacent to the trinuclear copper center were found to concern in the binding of dioxygen and proton donation to the reaction intermediates.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	8,300,000	2,490,000	10,790,000
2008 年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
2009 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
総計	14,400,000	4,320,000	18,720,000

研究分野：生物無機化学・生化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：マルチ銅オキシダーゼ、Cue0、ビリルビンオキシダーゼ、酸素 4 電子還元

## 1. 研究開始当初の背景

銅イオンを特異的に酸化するマルチ銅酸

化酵素(MCO)Cue0 の存在が発見されたのは 21 世紀になってからであり、当然ながら、その特異性発現の仕組みや反応機構は学術的

に意義深い。一方、MCO は有用な有機物質を酸化することができることから、臨床検査、色素合成、デニムの脱色、食品への添加など様々の分野に実用化されているが、研究開始時点では、新たに、生物燃料電池やバイオヘアカラーへの応用が模索され始めていた。また、活性酸素種を生じることなく酸素を水にまで4電子還元することのできるMCOの反応メカニズムは、基礎から応用に至るまで幅広い分野で注目されるようになっていたことから、この機構の解明を目的とするに至った。

## 2. 研究の目的

これまで発見されている唯一の Cu(I) オキシダーゼである Cue0 が Cu(I) を特異的に選択する仕組みを明らかにすることが、まず、第一の研究目的である。通常、酵素は有機物をターゲットとしているが、金属イオンに対する選択性を発現するには、サイズ効果や非共有性相互作用を使うことができない。そこで、Cue0 から 50 アミノ酸残基を削除し、Cue0 の基質選択性を銅イオンから有機分子に改変することが可能かどうか、検証することにした。次いで、酵素機能を高めることを目指して、活性部位に変異導入することにした。基質からの電子の受容部位であるタイプ I 銅部に対して変異導入して、酸化還元電位を正電位にシフトさせる原理を見いだすこととした。第3の目的は、酵素機能の後半部分にあたる酸素の4電子還元機構解明である。そのため、銅への配位子や活性部位近傍に位置する非配位性のアミノ酸残基に着目し、中間体を捕捉し、キャラクタリゼーションすることとした。一連の研究によって、作成した変異体の電気化学的検討も行い、生物燃料電池への応用をもはかることとした。

## 3. 研究の方法

本研究で使用した酵素は一貫して大腸菌の Cue0 であるが、平行して、糸状菌由来のビリルビンオキシダーゼを用いて、同様の実験を行うことによって、結果の一般性をチェックした。研究目的を達成するための研究方法は、点変異または大規模なセグメント除去を行い、改変した Cue0 を作成することである。改変酵素は、紫外-可視、円二色性、電子スピン共鳴(EPR)、原子吸収スペクトルなどによって、キャラクタリゼーションを行うとともに、必要に応じて高分解能の X 線結晶構造解析も行った。ESR の測定では、極低温で行う必要があることから、クライオ

スタットは本研究で整備した。また、酵素機能を調べるため、活性測定や電気化学測定を行った。

## 4. 研究成果

Cue0 の基質結合部位を覆う 50 のアミノ酸残基からなるセグメントを除去し、GlyGly リンカーで逆平行・鎖を結んだ改変体・・5-7 を作成することに成功した。期待通り・・5-7 では Cu(I) に対する特異性が低下し、有機基質に対する新規な活性が創製された。この結果から、金属イオンに対する特異性を発現するには、活性部位近傍への有機基質の接近を阻害する分子構造が必要であることがわかった。また、Cu(I) など特定の金属イオンに対する特異性を発現するには、金属酵素の触媒部位を形成する配位子とは異なる配位子の選択が必要であることが明らかとなった。配位アミノ酸に変異導入してみたが、Fe(II) 以外の金属イオンに対する基質特異性は見られなかった。この新規かつ大規模な酵素の改変は、外国の研究者や産業界で高く評価されている。

次いで、酵素機能を自在に操ることを目指して、基質からの電子の入口であるタイプ I 銅の酸化還元電位のチューニングに挑戦した。まず、軸位に配位した Met を Gln に置換し、酸化還元電位を負電位にシフトさせることである。実験の結果、予想通り酵素活性が低下した。一方、酸化還元電位が正電位にシフトすると予想して作成した Phe や Ile 等への置換では、期待したように方向に正電方向に酸化還元電位がシフトし、酵素活性も高まった。これらの結果から、MCO の酵素活性は、基質とタイプ I 銅間の電位差が支配的な因子のひとつであることを実証できた。

さらに、酸化還元電位をチューニングする方法として、タイプ I 銅配位子への水素結合を生成または除去する方法を開発した。まず、タイプ I 銅配位子のひとつである His443 と Asp439 間の水素結合を切断すべく変異体 Asp439 に変異導入したところ、タイプ I 銅の酸化還元電位が正電位にシフトし、酵素活性も上昇した。また、タイプ I 銅に配位した Cys500 の S 原子には Leu502 のアミド窒素が NH-S 水素結合を形成しているが、もう一カ所水素結合可能な位置には Pro444 が配置されていて水素結合は存在しない。そこで、この Pro を Glu, Ala, Leu に変異させたところ、銅イオン含量は低下したが、タイプ I 銅の酸化還元電位が正電位にシフトし、酵素活性の上昇も認められた。タイプ I 銅の軸配位子や水素結合を利用した本研究原理は一般性の高いものであり、すべての MCO に適用することができる。

次いで、タイプ II, III 銅からなる三核銅部位での酸素 4 電子還元の間mediate捕捉にチャレンジした。まず, Cys500 を Ser に置換すると, タイプ I 銅部位が空位となることが明らかとなった。この変異体と酸素との反応から, 中間体 (中間体 I) が捕捉された。中間体 I は特徴的な吸収スペクトルを示すこと, EPR サイレントであることから, 酸素が 2 電子還元された種であると考えられた。しかしながら, 共鳴ラマンスペクトルは還元のため測定することができず, 構造に関する直接的な証拠は得られなかった。Cys500Ser に加えて, 三核銅部位近傍に位置する非配位性の Asp112 を Asn に変異させた二重変異体を作成し, 酸素と反応させたところ中間体 I の生成速度が遅く, またその生成量も少ないことから Asp112 が酸素の結合に関与することがわかった。

中間体 I に続く中間体 II は三核銅部位近傍に位置する Glu506 に変異導入することによって捕捉することに成功した。中間体 II の極低温の EPR より, 酸素は 4 電子還元されているが, 三核銅部位の中心に切断された酸素原子が存在しており, 一方, 銅はすべて Cu(II) で, 磁氣的相互作用していることがわかった。Glu506 は休止状態へ移行するために必要なプロトンの供給に預かることが明らかとなった。本研究により, 酸素の 4 電子還元には 2 つの酸性アミノ酸が必須であることを明らかにすることができた。

2 つの酸素還元中間体の構造情報を得るため中間体 I 種で安定化する二重変異体 Cys500Ser/lu506Gln の X 線結晶構造解析を行ったところ, 中間体 II の構造が得られ, 中間体 I が水和電子によって容易に還元されることが明らかとなった。水和電子による MCO の還元は報告されていないので, 休止体の X 線結晶構造解析を行ったところ, 中間体 II の骨格構造が得られたことから, 中間体の構造についてはさらに詳細な検討が必要であることがわかった。欧米の研究者はこの事実を未だ認識していないので, 反応機構の研究は我々が大きくリードしていると思われる。

以上の知見を取り入れて電気化学研究もを行い, 生物燃料電池のカソード触媒として Cue0 および変異体が実用化されているレベルの高い電流密度与えたことから, 酵素電極触媒を用いた生物燃料電池が実用化可能なことを示すことができた。

## 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 19 件)

1. Kataoka, K., Sugiyama, R., Hirota, S., Inoue, M., Urata, K., Minagawa, Y., Seo, D., Sakurai, T., Four-Electron Reduction of Dioxigen by a Multicopper Oxidase, Cue0, and Roles of Asp112 and Glu506 Located Adjacent to the Trinuclear Copper Center, *J. Biol. Chem.*, 284, 14405-14413 (2009), 査読有.
2. Kurose, S., Kataoka, K., Shinohara, N., Miura, Y., Tsutsumi, M., Tsujimura, S., Kano, K., Sakurai, T., Modification of Spectroscopic Properties and Catalytic Activity of Escherichia coli Cue0 by Mutations of Methionine 510, the Axial Ligand to the Type I Cu, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 82, 504-508 (2009), 査読有.
3. Miura, Y., Tsujimura, S., Kurose, S., Kamitaka, Y., Kataoka, K., Sakurai, T., Kano, K., Direct Electrochemistry of Cue0 and Its Mutants at Residues to and near Type I Cu for Oxygen-Reducing Biocathode, *Fuel Cells*, 9, 70-78 (2009), 査読有.
4. Kataoka, K., Tsukamoto, K., Kitagawa, R., Ito T., Sakurai, T., Compensatory Binding of an Asparagine Residue to the Coordination-Unsaturated Type I Cu Center in Bilirubin Oxidase Mutants, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 371, 416-419 (2008), 査読有.
5. Sakurai, T., Kataoka, K., Structure and Function of Type I Copper in Multicopper Oxidases, *Cell. Mol. Life Sci.*, 64, 2642-2656 (2007), 査読有.
6. Sakurai, T., Kataoka, Basic and Applied Features of Multicopper Oxidases, Cue0, Bilirubin Oxidase, and Laccase, *Chem. Rec.*, 7, 220-229 (2007), 査読有.
7. Kataoka, K., Komori, H., Ueki, Y., Konno, Y., Kamitaka, Y., Kurose, S., Tsujimura, S., Higuchi, Y., Kano, K., Seo, D., Sakurai, T., Structure and Function of the Engineered Multicopper Oxidase, Cue0 from Escherichia coli - Deletion of the Methionine-Rich Helical Region Covering the Substrate Binding Site -, *J. Mol. Biol.*, 373, 141-152 (2007) 査読有.
8. Kamitaka, Y., Tsujimura, S., Kataoka, K., Sakurai, T., Ikeda, T., Kano, K., Effect of Axial Ligand Mutation of the Type I Copper Site in Bilirubin Oxidase on Direct Electron Transfer-Type Bioelectrocatalytic Reduction of Dioxigen: *Electroanal. Chem.*, 601, 119-124 (2007) 査読有.

[学会発表] (計 45 件)

1. 櫻井武, 片岡邦重, 変異導入によるマル

- チ銅オキシダーゼの触媒機能の改変と創製, 日本化学会第89回春年会, 2010年3月26日, 近畿大学(大阪府)
2. 片岡邦重, 前田康雄, 小木裕貴, 篠原尚也, 関本まどか, 櫻井武, 水素結合によるマルチ銅酸化酵素 Cue0 のレドックス制御, 日本農芸化学会 2010 年度大会, 2010 年 3 月 27-30 日, 東京大学駒場(東京都)
3. 小木裕貴, 前田康雄, 片岡邦重, 瀬尾悌介, 櫻井武, 一価銅オキシダーゼ Cue0 の水素結合による酵素活性制御, 平成 21 年度日本化学会近畿支部会北陸地区研究発表会, 2009 年 11 月 28 日, 北陸先端科学技術大学院大学(石川県)
4. 森口祐衣, 片岡邦重, 櫻井武, マルチ銅酸化酵素の触媒機能改変, 第 82 回日本生化学会大会, 2009 年 10 月 21-24 日, 神戸国際会議場(兵庫県)
5. 杉山良輔, 小森博文, 森下浩稔, 永尾俊博, 樋口芳樹, 片岡邦重, 櫻井武, マルチ銅オキシダーゼの三核銅部位に水素結合した酸性アミノ酸の酸素還元過程における役割, 第 59 回錯体化学討論会, 2009 年 9 月 25-27 日, 長崎大学(長崎県)
6. Sakurai, T., Kataoka, K., Sugiyama, R., Hirota, S., Inoue, M., Urata, K., Minagawa, Y., Seo, D., Four-Electron Reduction of Dioxygen by a Multicopper Oxidase, Cue0, and Roles of Asp112 and Glu506 Located Adjacent to the Trinuclear Copper Center, 14th International Conference on Bioinorganic Chemistry, 2009. 7. 25-27, Nagoya International Congress Center (Japan)
7. Kataoka, K., Maeda, Y., Kurose, S., Sekimoto, M., Shinohara, N., Tsutsumi, M., Miura, Y., Tsujimura, S., Kano, K., Sakurai, T., Modifications in the Redox Potential of the Type I Cu Center of Cue0 by the Mutations on the Coordinating and Non-Coordinating Amino Acids, 14th International Conference on Bioinorganic Chemistry, 2009. 7. 25-27, Nagoya International Congress Center (Japan)
8. 片岡邦重, 前田康雄, 伊藤喬洋, 小木裕貴, 栗田大輔, 櫻井武, マルチ銅酸化酵素のタイプ I 銅酸化還元電位および酵素活性における水素結合の役割, 第 36 回生体分子科学討論会, 2009 年 6 月 19, 20 日, 北海道大学(北海道)
9. 前田康雄, 関本まどか, 篠原尚也, 黒瀬伸治, 片岡邦重, 三浦侑子, 堤麻衣子, 辻村清也, 加納健司, 櫻井武, 水素結合によるマルチ銅オキシダーゼ Cue0 の酸化還元活性の制御, 第 19 回金属の関与する生体関連反応シンポジウム, 2009 年 6 月 11, 12 日, 大阪大学銀杏会館(大阪府)
10. 杉山良輔, 浦田香苗, 片岡邦重, 瀬尾悌介, 櫻井武, 銅排出系酵素 Cue0 による酸素の 4 電子還元過程の解明, 第 81 回日本生化学会大会, 2008 年 12 月 9-12 日, 神戸国際会議場(兵庫県)
11. 友寄克亮, 新村信雄, 櫻井武, 片岡邦重, 黒瀬伸治, 樋口芳樹, 小森博文, 梶野勉, Cue0 の 5-7 変異体の結晶成長, 日本中性子科学会第 8 回年会, 2008 年 12 月 1, 2 日, 名古屋大学(愛知県)
12. Tsujimura, S., Miura, Y., Kamitaka, Y., Kurose, S., Kataoka, K., Sakurai, T., Kano, K., Bioelectrocatalytic Reduction of O<sub>2</sub> Catalyzed by Multi-Copper Oxidase Cue0 and Its Mutants, 214th The Electrochemical Society Meeting, 2008. 10. 12-17, Honolulu (USA)
13. 黒瀬伸治, 三浦侑子, 片岡邦重, 辻村清也, 加納健司, 櫻井武, Cue0 のタイプ I 銅軸配位子への変異導入による電気化学的特性の改変, 第 58 回錯体化学討論会, 2008 年 9 月 20-22 日, 金沢大学(石川県)
14. Tomoyori, K., Niimura, N., Sakurai, T., Kataoka, K., Kurose, S., Higuchi, Y., Komori, H., Kajino, T., 21th Congress of the International Union of Crystallography, 2008. 8. 23-31, Osaka International Convention Center (Japan)
15. 杉山良輔, 浦田香苗, 井上めぐみ, 片岡邦重, 櫻井武, 第 18 回金属の関与する生体関連反応シンポジウム, 2008 年 6 月 5, 6 日, 名古屋市立大学(愛知県)
16. Tsujimura, S., Miura, Y., Kamitaka, Y., Kurose, S., Kataoka, K., Sakurai, T., Kano, K., 213th The Electrochemical Society Meeting, 2008. 5. 18-13, Phoenix (USA)
17. 片岡邦重, 塚本桂史, 北川理映子, 櫻井武, 三配位型タイプ I 銅部位を持つビリルビン酸化酵素の作製, 日本農芸化学会 2008 年度大会, 2008 年 3 月 25-29 日, 名城大学(愛知県)
18. 黒瀬伸治, 三浦侑子, 上高雄二, 辻村清也, 加納健司, 片岡邦重, 櫻井武, Cu(I) オキシダーゼ Cue0 のタイプ I 銅部位への部位特異的変異導入による酵素活性の改変, 第 80 回日本生化学会大会, 2007 年 12 月 10-15 日, パシフィコ横浜(神奈川県)
19. 小森博文, 片岡邦重, 植木優作, 今野佑介, 上高雄二, 黒瀬伸治, 辻村清也, 加納健司, 瀬尾悌介, 櫻井武, 樋口芳樹, マルチ銅オキシダーゼ Cue0 変異体の X 線構造解析, 日本結晶学会 2007 年度年会, 2007 年 12 月 1, 2 日, 東京工業大学(神奈川県)
20. 片岡邦重, 小森博文, 植木優作, 今野佑介, 上高雄二, 黒瀬伸治, 辻村清也, 樋口芳樹, 加納健司, 櫻井武, Cu(I) オキシダー

ゼ Cue0 のプロテインエンジニアリングによる機能改変, 第 40 回酸化反応討論会, 2007 年 11 月 17 日, 奈良女子大学 (奈良県)

21. 杉山良輔, 浦田香苗, 井上めぐみ, 瀬尾悌介, 片岡邦重, 櫻井武, マルチ銅オキシダーゼの酸素 4 電子還元反応の解析, 平成 19 年度日本化学会近畿支部会北陸地区研究発表会, 2007 年 11 月 10 日, 金沢大学 (石川県)

22. 植木優作, 黒瀬伸治, 片岡邦重, 櫻井武, Cu(I) オキシダーゼ Cue0 の基質結合部位への変異導入, 第 57 回錯体化学討論会, 2007 年 9 月 25-27 日, 名古屋工業大学 (愛知県)

23. 三浦侑子, 黒瀬伸治, 上高雄二, 片岡邦重, 櫻井武, 辻村清也, 加納健司, マルチ銅オキシダーゼ Cue0 変異体による電気化学的酸素還元反応の解析, 2007 年電気化学秋季大会, 2007 年 9 月 19, 20 日, 東京工業大学 (神奈川県)

24. 黒瀬伸治, 三浦侑子, 上高雄二, 辻村清也, 加納健司, 片岡邦重, 櫻井武, Cu(I) オキシダーゼ Cue0 における Type I 銅の軸配位子への変異導入, 第 34 回生体分子科学討論会, 2007 年 6 月 22, 23 日, 東北大学 (宮城県)

25. 櫻井武, 片岡邦重, 黒瀬伸治, 浦田香苗, 皆川洋一, 井上めぐみ, Cu 排出系酵素 Cue0 の Cys500Ser 変異体と酸素 4 電子還元中間体, 第 17 回金属の関与する生体関連反応シンポジウム, 2007 年 6 月 21, 22 日, 京都テルサ (京都府)

[図書] (計 2 件)

1. Multicopper Proteins, Sakurai, T., Kataoka, K., Wiley, Copper Oxygen Chemistry (Eds. by Karlin, K. and Ito, S.), 2010, in press.

2. マルチ銅オキシダーゼ, 櫻井武, シーエムシー出版, バイオ電気化学の実際 — バイオセンサ・バイオ電池の実用展開 — (池田篤治編), 2007 年, 92 頁~100 頁

[産業財産権]

○ 出願状況 (計 1 件)

名称: 電極触媒, 酵素電極, 燃料電池およびバイオセンサ

発明者: 片岡邦重, 櫻井武, 前田康雄, 伊藤喬洋

権利者: 金沢大学

種類: 特許

番号: 特願 2009-028988

出願年月日: 2009 年 2 月 10 日

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

<http://biochem.web.fc2.com/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

櫻井 武 (SAKURAI TAKESHI)

金沢大学・物質化学系・教授

研究者番号: 90116038