

平成22年 6月 1日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20760527
 研究課題名 (和文) メタンからメタノールを合成する酵素の複合体形成による
 活性安定化要因の解明
 研究課題名 (英文) Mechanism for the stabilization of copper-containing
 methane monooxygenase by the protein complex formation
 研究代表者
 宮地 輝光 (MIYAJI AKIMITSU)
 東京工業大学・大学院総合理工学研究科・助教
 研究者番号：40452023

研究成果の概要 (和文)：

酵素銅含有メタンモノオキシゲナーゼ (pMMO) と酵素メタノールデヒドロゲナーゼ (MDH) との複合体を用いることで、pMMO によるメタンからのメタノール生成反応が長時間進行する要因を明らかにした。過酸化水素は、電子供与体から電子を受容する pMMO の銅イオンを酸化し、pMMO を阻害する。MDH の pMMO への結合により、過酸化水素は pMMO の銅イオンに過酸化水素が接近できない。そのため、pMMO による酵素反応は長時間進行する。

研究成果の概要 (英文)：

The mechanism for the stabilization of copper-containing methane monooxygenase (pMMO) by the formation of protein complex with methanol dehydrogenase (MDH) was elucidated. MDH protects the copper center of pMMO, which accepts electrons from the electron donor for pMMO, from hydrogen peroxide inhibiting pMMO, due to the binding of MDH to pMMO.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：工学

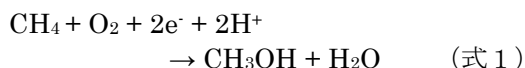
科研費の分科・細目：プロセス工学 触媒・資源化学プロセス

キーワード：酵素反応、天然ガス、触媒・化学プロセス、メタノール合成

1. 研究開始当初の背景

(1) メタンからのメタノール合成：天然ガスの有効利用は、石油代替炭素資源の確保が急務の今日、早急に達成することが望まれている技術課題である。天然ガス主成分であるメ

タンから直接メタノールを生成するメタン水酸化反応 (式1) は、種々の化学製品原料となるメタノールを合成する重要な反応である。



この反応では、原料のメタンに比べて生成物メタノールの反応性は高い。そのため、メタンを酸化できる触媒を用いた場合、メタノールの酸化反応も進行する。したがって、メタンからの選択的メタノール生成は極めて高難度な反応である。

(2) 銅含有メタンモノオキシゲナーゼ：特殊な微生物（メタン酸化細菌）の細胞膜に結合した酵素銅含有メタンモノオキシゲナーゼ（pMMO）（図1）は、室温、1気圧という穏和な条件下、メタンから選択的にメタノールを生成する。

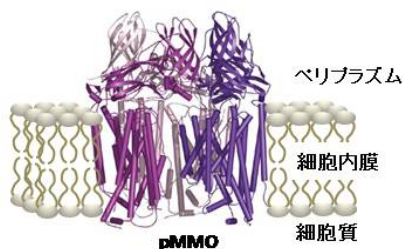


図1 細胞内のpMMO（模式図）
（細胞内膜から露出した部位に、メタンからのメタノール生成反応の銅イオン活性中心が存在する）

ただし、pMMOを用いてメタンからメタノールを合成すると、15分ほどでメタノール生成反応は停止する。すなわち、メタンからのメタノール生成反応に対するpMMOの酵素活性は極めて不安定である。この酵素活性の不安定性は、微生物細胞内に存在する酵素を細胞外に取り出して用いた場合に生じる。つまり、微生物細胞内には、pMMOが安定に酵素活性を発現するための仕組みが存在する。

(3) メタノール脱水素酵素によるpMMOの安定化：本研究代表者は、pMMOが微生物細胞内においてメタノール脱水素酵素（MDH）と複合体を形成することを発見した。図2にpMMOとMDHとの複合体を低温電子顕微鏡で観測した結果を示す。このpMMO-MDH複合体を用いたプロピレンからのプロピレンオキシド生成反応では、pMMOを用いたときに比べて長時間反応が進行することがわかった（Myronova et al. *Biochemistry* (2006) 11905-14.）。つまり、MDH-pMMO複合体では酵素活性が低下することなく反応が進行する。

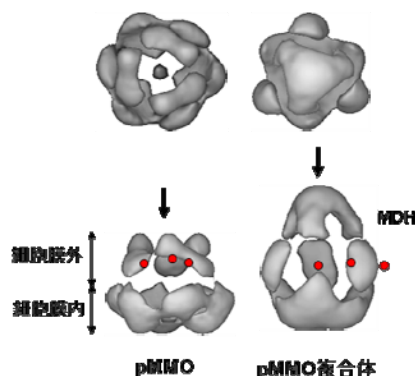


図2 低温電子顕微鏡画像解析により観測されたpMMOおよびpMMO複合体の3次元構造（赤丸で活性中心の部位を示す）。上段は、下段の構造を矢印の方向から見たもの。

2. 研究の目的

本研究では、MDH-pMMO複合体を用いることで、pMMOによるメタンからのメタノール生成反応が安定に進行する要因を見出すことを目的とした。そのため、pMMOによるメタンからのメタノール生成反応の阻害因子を特定し、阻害機構を解明した。また、その阻害因子がpMMOによるメタノール生成反応において生成する機構を明らかにした。これら阻害効果にMDHが及ぼす影響とMDH-pMMO複合体立体構造から、MDHによりpMMOの酵素活性を安定化する要因を明らかにした。

3. 研究の方法

(1) メタン酸化細菌からの酵素の精製：メタン酸化細菌は、メタンと空気存在下、硝酸無機培地で培養した。pMMOが細胞内で発現するため、培養液中の銅イオン濃度を10 μMとした。100 ml 培養液で約3日間培養したメタン酸化細菌を、3 L 培養液で1週間培養した。増殖速度が最大となるため、培養液の温度を30℃に保ち培養した。培養したメタン酸化細菌の回収には遠心器を用いた。

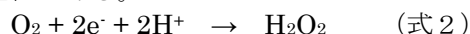
pMMOおよびpMMO-MDH複合体は、培養したメタン酸化細菌から単離した。窒素雰囲気下でメタン酸化細菌細胞を超音波破碎した後、超遠心分離によりpMMOを含む微生物細胞膜画分を得た。細胞膜画分に界面活性剤を加え、1時間4℃で攪拌後、超遠心分離によりpMMOを含む可溶化画分を得た。この可溶化画分からカラムクロマトグラフを用いてpMMO、およびMDH-pMMO複合体を精製した。

(2) pMMO活性測定：pMMOの活性測定には、メタンからのメタノール生成反応を用いた。

また、MDH が存在する場合、メタノールが酸化されるため、プロピレンからのプロピレンオキシド生成反応を pMMO の活性測定に用いた。反応は pH 7.0、30°C で行った。反応生成物はガスクロマトグラフで定量した。

4. 研究成果

(1) pMMO に及ぼす過酸化水素の阻害効果：本研究によって、pMMO によるメタンからのメタノール生成反応を過酸化水素が阻害することを明らかにした。pMMO によるメタンからのメタノール生成反応では、過剰量の電子供与体ジュロキノールを反応液中加入している。その際、(式 2) の反応が進行する可能性がある。



この反応は (式 1) においてメタンが存在しない場合の反応である。実際、メタンからのメタノール生成反応における反応液中の過酸化水素量を測定したところ、約 10 μM の過酸化水素が観測された。そこで、過酸化水素が pMMO 活性に及ぼす影響を調べた。その結果、過酸化水素は pMMO 活性を可逆的に阻害することがわかった。すなわち、pMMO によるメタンからのメタノール生成反応において過酸化水素が生成し、この過酸化水素が pMMO を阻害する。そこで、反応中に生成する過酸化水素を除去するため、過酸化水素分解酵素カタラーゼの共存下、pMMO によるメタンからのメタノール生成反応を行った。その結果、メタノール生成速度が増大した (図 3)。またカタラーゼを添加することで、無添加の時に比べて長時間反応が進行した。カタラーゼを加えたときの pMMO によるメタノール生成速度は、MDH-pMMO 複合体によるメタノール生成速度と同程度であった。

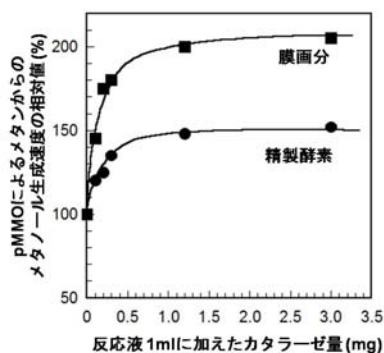
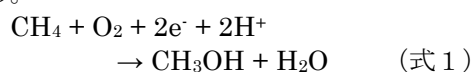


図 3 過酸化水素分解酵素カタラーゼ共存下での pMMO によるメタンからのメタノール生成速度

(2) 過酸化水素による pMMO 阻害機構：過酸化水素は電子供与体ジュロキノールから pMMO への電子供与を阻害していることを明らかにした。このことは、過酸化水素が pMMO に結合する銅イオン (Cu_{pMMO}) の配位環境や酸化還元挙動に及ぼす影響調べるために行った電子スピン共鳴 (ESR) 測定の結果に基づく。pMMO に過酸化水素を添加した場合、 Cu_{pMMO} の ESR スペクトルに変化は見られなかった。すなわち、過酸化水素による Cu_{pMMO} の配位環境は変わらない。過酸化水素存在下、pMMO の電子供与体ジュロキノールを pMMO に添加した。ジュロキノールは pMMO によるメタンからのメタノール生成反応 (式 1) において必須の電子供与体である。



過酸化水素共存下では Cu_{pMMO} のジュロキノールによる還元が観測されなかった。一方、カタラーゼによって過酸化水素を除去すると、ジュロキノールによる Cu_{pMMO} の還元は観測された。この結果から、過酸化水素はジュロキノールから Cu_{pMMO} への電子伝達を阻害することがわかった。

(3) pMMO によるメタンからのメタノール生成反応における過酸化水素生成機構：pMMO によるメタンからのメタノール生成反応において、過酸化水素は、反応溶液中に存在する銅イオンと還元剤ジュロキノールおよび酸素との反応により生成することが明らかになった。図 4 に示すように、ジュロキノールに銅イオンを加えると、ジュロキノールの酸化によるジュロキノンの生成が促進される。この際、反応溶液中には過酸化水素が生成した。したがって、過酸化水素は銅イオンで促進されるジュロキノールの酸化反応において生成する。

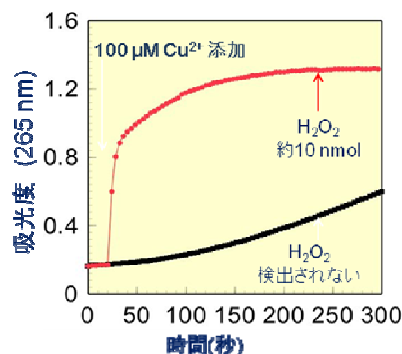


図 4 銅イオン存在下でのジュロキノールの酸化 波長 265nm における吸光度の増加はジュロキノンの生成を示す。

(4) MDH-pMMO 複合体形成による過酸化水素からの pMMO 活性中心の保護: (1)~(3)の研究結果により、反応中に生成する過酸化水素の pMMO 阻害効果によって pMMO によるメタンからのメタノール生成反応速度が低下することが明らかとなった。そこで、過酸化水素による pMMO 活性の阻害に及ぼす MDH の影響を明らかにした。

MDH-pMMO 複合体を用いてプロピレンからのプロピレンオキシド生成反応を行ったところ、pMMO 単独によるプロピレンからのプロピレンオキシド生成反応に比べ、プロピレンオキシド生成速度は高く、また長時間反応が進行した。一方、pMMO と MDH とが共存する条件で反応を行った場合、MDH-pMMO 複合体の場合とは異なり、プロピレンオキシド生成速度および反応が進行する時間は pMMO 単独の場合と同程度であった。pMMO と MDH とが共存した状態では、pMMO と MDH とが複合体を形成していないことは化学架橋法によって測定した。したがって、MDH による pMMO の活性安定化は、pMMO と MDH とが複合体を形成することで発現する。

MDH-pMMO 複合体におけるプロピレンからのプロピレンオキシド生成反応における過酸化水素生成量を測定した。MDH-pMMO 複合体、pMMO 単独、MDH と pMMO の共存条件、いずれの場合の過酸化水素生成量もほぼ同程度であった。すなわち、MDH-pMMO 複合体が示す高い活性安定性を、過酸化水素生成の抑制では説明できない。

電子供与体 ジュロキノールによる MDH-pMMO 複合体の銅イオン ($\text{Cu}_{\text{pMDH-MMO}}$) の還元反応を ESR で測定した。過酸化水素が存在する場合、pMMO 単独では銅イオンの還元が観測されないが、MDH-pMMO 複合体では銅イオンの還元が観測された。すなわち、MDH と pMMO が複合体を形成することで $\text{Cu}_{\text{pMDH-MMO}}$ へ過酸化水素が接近できないため、過酸化水素によるメタンからのメタノール生成が低下しない。

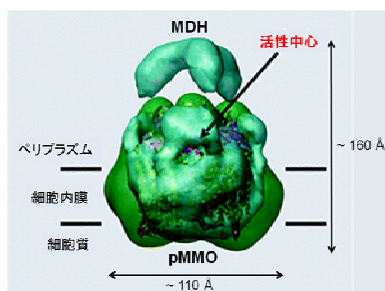


図5 pMMO-MDH 複合体の立体図
MDH は pMMO 活性中心が存在する部位を覆うように結合している。

図5に示すように、MDH は pMMO の上部に蓋をするように結合する。このような複合体形成により、過酸化水素がジュロキノールから電子を受け取る pMMO の銅イオンに接近できない。そのため MDH-pMMO 複合体では過酸化水素によって pMMO のメタンからのメタノール生成反応が阻害されない。

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2件)

① Akimitsu Miyaji, Masashi Suzuki, Toshihide Baba, Toshiaki Kamachi, Ichiro Okura, Hydrogen peroxide as an effector on the inactivation of particulate methane monooxygenase under aerobic conditions, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatics, 57, 211-217, 2009, 査読有

② 宮地輝光、馬場俊秀、膜結合型メタン水酸化酵素の精製と3次元構造解析、バイオサイエンスとバイオインダストリー、67, 29-30, 2009, 査読無

[学会発表] (計4件)

① 和佐直彦・宮地輝光・本倉健・馬場俊秀、膜結合型メタン水酸化酵素における銅イオン結合親水性ドメインタンパク質の合成、日本化学会第90年会、2010年3月29日、近畿大学(大阪)

② 宮地輝光・新田宗由記・本倉健・馬場俊秀、 Cu^{2+} 添加による膜結合型メタンモノオキシゲナーゼのプロピレンエポキシ化活性低下の要因、日本化学会第3回関東支部大会、2009年9月4日、早稲田大学(東京)

③ 宮地輝光、過酸化水素による膜結合型メタン水酸化酵素活性の阻害、第12回生体触媒化学シンポジウム、2008年12月4日、東洋大学(千葉)

④ 宮地輝光、Howard Dalton, 馬場俊秀、メタン酸化細菌のメタノール依存メタン水酸化活性、第3回バイオ関連化学合同シンポジウム、2008年9月20日、東京工業大学(神奈川)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮地輝光 (MIYAJI AKIMITSU)

東京工業大学・大学院総合理工学研究科

・助教

研究者番号：40452023

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし