

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：13302

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24550173

研究課題名(和文)炭酸脱水酵素を利用した選択的二酸化炭素捕捉水和触媒の開発と固体炭酸への転換

研究課題名(英文)Development of Biomimetic System using Carbonic Anhydrase Incorporated into CO₂ Capture and Storage - Transformation of CO₂ to Solid Bicarbonate -

研究代表者

島原 秀登(Shimahara, Hideto)

北陸先端科学技術大学院大学・ナノマテリアルテクノロジーセンター・助教

研究者番号：40313704

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文): 大気又は排出CO₂を固体炭酸として貯蔵するCCS技術が注目を浴び低コストを実現する触媒開発が待望される。本研究ではCaCO₃を主成分とする貝殻の形成にCa²⁺結合型炭酸脱水酵素が関与することに着目、本酵素の3つの性質「低濃度CO₂選択的捕捉する特異性/高いCO₂水和触媒能/Ca²⁺結合能」による貝殻形成に係る仕組みが適切に模倣されれば、CO₂を効率的にCaCO₃結晶に転換する仕組みを開発することが可能となる。今回、高活性酵素変異体と新たに見出した結晶析出法を利用、固体炭酸形成反応を高効率化し、同時に本酵素触媒機構から中心的機能を抽出し、実用性の高い触媒モジュール開発を目的とする研究を行った。

研究成果の概要(英文): A shellfish carbonic anhydrase having Ca²⁺-binding site has a relation to the formation of shell that has CaCO₃ as a principal component. If the manner concerning the shell formation can be appropriately mimicked, it is possible to develop a critical method, in which CO₂ is efficiently converted into CaCO₃ crystal where ubiquitous calcium ions are seen, in the CO₂ capture and storage (CCS) technology. In this study, we are focusing on three characters of the CA enzyme: 1) the specificity to a low concentration of CO₂, 2) the high ability of CO₂ hydration, and 3) the Ca²⁺ binding affinity, to construct a catalytic module.

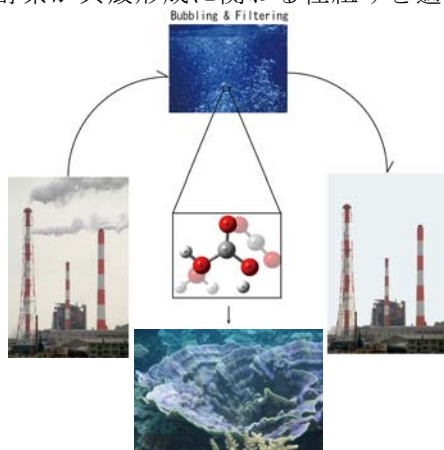
研究分野：生体触媒科学 生物物理学

キーワード：炭酸脱水酵素 バイオミメティクス 地球温暖化 二酸化炭素 固体炭酸 ナクレイン

1. 研究開始当初の背景

大気又は排出 CO₂ を固体炭酸として貯蔵する CCS (CO₂ 貯蔵回収) 技術が注目を浴び、低コストを実現する触媒開発が待望されていた。その頃、植物の光合成前段階における炭素源取込み、動物の呼吸に係る体液中 CO₂ の運搬・排出、骨/貝殻/卵殻等の固体炭酸形成といった無機-有機間炭素授受の効率的な仲介に携わる炭酸脱水酵素 (Carbonic Anhydrase, CA, これは CO₂ を HCO₃⁻ に転換する水和反応を触媒する) について、報告者は研究を行っていた。特に、CA の中で最も活性の高いヒト由来 II 型酵素 (hCAII) に、分子生物学的手法や NMR 法といった生物物理化学手法を適用することによって、その触媒機構の解明に係る研究報告を行い、そのことから (Shimahara et al, *JBC*, 2007, 282, 9646-9656), 本酵素研究の重鎮 Silverman の総説 (Silverman & Mckenna, *Acc. Chem. Res.* 2007, 40, 669-675, Mikulski & Silverman, *BBA*, 2010, 1804, 422-426) に紹介され、広く世界に知られるようになり、その触媒機構について計算科学手法を適用するといった研究展開を行っていた。

そのような研究の中、組換え DNA 技術によって活性の高い hCAII を実際に大量調製することが可能であったことから、排出 CO₂ 問題について実質的な解決策があるのでは、と考えられた。実際、そこでは、大気中の CO₂ を人為的に捉え水の中で HCO₃⁻ に変換するといったことは容易いものであった。しかし、これを CCS 技術に応用することを考えたとき、水溶液中の HCO₃⁻ を放っておくと自然に CO₂ に戻りまたそれが大気に返るといった性質から、CO₂ の「捕捉」について効率的であっても「貯蔵」について問題があることが露となっていた。そのような中、報告者は CaCO₃ を主成分とする貝殻の形成に貝由来 Ca²⁺ 結合型炭酸脱水酵素が関与すること、その Ca²⁺ 結合部位の構造や性質は未だ深く研究されていないことに着目した (Miyamoto et al., *PNAS* 1996, 93, 9657-9660, *Zool. Sci.*, 2005, 22, 311-315)。そこでは、生物物理化学手法を用いてそのような構造や性質を調べた上で、この酵素が貝殻形成に関わる仕組みを適切に

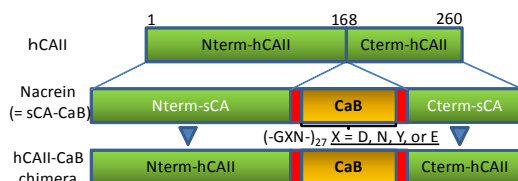


排出二酸化炭素を固定化する CCS 技術の開発

模倣するならば、CO₂ を効率的に CaCO₃ に転換する触媒/仕組みを開発することが可能となると考えられた。そこではその「貯蔵」の問題が安価な Ca²⁺ によって克服されるだろうと予想され、研究を開始することとした。

2. 研究の目的

貝由来 Ca²⁺ 結合型炭酸脱水酵素ナクレイン (Nacrein) は、-GXN- (X = D, N, Y, or E) からなるトリペプチド 27 回繰り返しアミノ酸配列を有する Ca²⁺ 結合部位 (Ca1B) をもつことが知られている。それ以外の配列について他の CA アイソザイムと比較すると、hCAII が属するグループと同じ II 型の配列を有していることがわかる (下図)。



しかし、その水和活性は、hCAII の 1/100 程度と低い。一方、組織学的解析から mRNA は殻に接する外套膜の端に偏在し、その産物が殻に微量に存在することが知られている。これまで試験管内にナクレインが存在すると CaCO₃ の結晶形成が抑制されるとの見解が報告され、ナクレインが貝殻形成に必要な CaCO₃ の沈着に何らかの形で携わっていることが示唆されている。そこで、CO₂ を効率的に CaCO₃ に転換するために、ナクレインや hCAII, Ca1B を調製し、CO₂ 水和反応/Ca1B の機能と CaCO₃ の析出との間の関係に関する知見を得ること、最終的に実用性の高い触媒モジュールの開発を行うこと目的とする研究を行った。

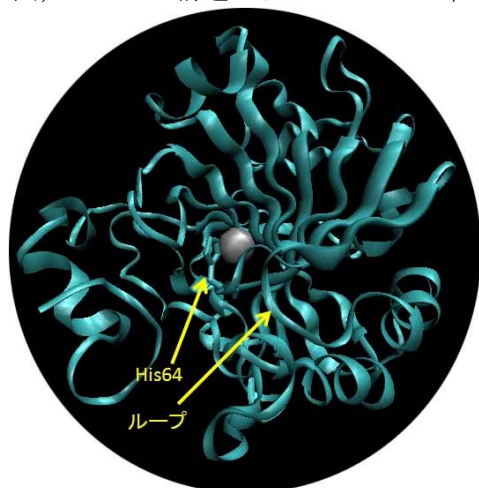
3. 研究の方法

- (1) 貝殻から抽出したナクレイン含有水溶性画分の性質と結晶析出
- (2) 酵素, Ca1B 蛋白質及びキメラ蛋白質調製
 - ①人工遺伝子合成法による Ca1B 遺伝子合成
 - ②部位得意的変異法による hCAII より高い活性をもつ変異体遺伝子の作成
 - ③高活性 hCAII 変異体-Ca1B キメラ蛋白質をコードする遺伝子の作成
 - ④大腸菌遺伝子大量発現系による hCAII, 高活性 hCAII 変異体, Ca1B, hCAII 変異体-Ca1B キメラ蛋白質, 高活性 hCAII 変異体-Ca1B キメラ蛋白質の調製
 - ⑤得られた蛋白質を高度に精製する手法の確立 (本研究費により HPLC を購入)
- (3) アッセイ系の確立
 - ①触媒反応を分光学的にアッセイする手法の確立 (本研究費により紫外可視分光光度計を購入)
 - ②電極を用いた溶液中二酸化炭素濃度を測定する手法の確立
 - ③中空糸繊維を使ったナノバブル CO₂ 溶液作成方法の確立

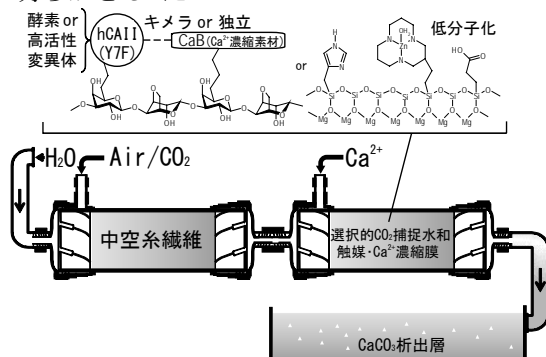
- ④電極を用いた溶液中 Ca^{2+} 濃度を測定する手法の確立
- ⑤NMR 法による酵素の活性部位側鎖の解析
 - (4) 構造的知見の取得
 - ①X線結晶構造に基づく計算化学的手法適用
 - ②分光学的手法 (NMR, CD 法) による調製蛋白質の解析
 - (5) (2)や低分子を用いた実用性の高い触媒モジュールの開発

4. 研究成果

報告者は、(1)の方法により、貝殻から抽出したナクレイン含有水溶性画分について実験を行い、 CaCO_3 結晶を析出させる方法を見だし、(2)によって調製した蛋白質によってこれを(3)の系のもとに再現した。そこで(3)-⑤では、特許を出願するに至った。(4)-①より、ナクレインにおける水和反応の活性部位と CalB が近接していることが予想され(下図、hCAII の構造においてループの位置



に CalB が挿入されていることから)、(4)-②より、CalB は、 α ヘリックスや β シートといった二次構造をもたず、 Ca^{2+} 濃度依存的なシグナルの変化をもつことから、EDTA 様の配位結合を有することが示唆された。(5)において、下図のようなモジュールの実用性を明らかとした。



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 11 件)

1. “ Π -stacking Interaction between

Heterocyclic Rings in a Reaction Field of Biological System”, Muhamad KOYIMATU, Hideto SHIMAHARA, Kimikazu SUGIMORI, Kazutomo KAWAGUCHI, Hiroaki SAITO, and Hidemi NAGAO, *Physical Society of Japan (JPS) Conference Proceeding*, vol. 1, No. 012055, pp.1-4, 2014 査読有

2. “生体高分子の触媒科学 - 金属含有蛋白質のプロトン輸送の機構解明 - ” 島原秀登, Muhamad KOYIMATU, 杉森公一, 長尾秀実 北陸先端科学技術大学院大学 共有計算サーバ使用成果報告, p34, 2014 査読無

3. “Nucleosome Structural Changes Induced by Binding of Non-histone Chromosomal Proteins HMGN1 and HMGN2”, Hideto Shimahara*, Takaaki Hirano, Kouichi Ohya, Shun Matsuta, Sailaja S. Seeram, and Shin-ichi Tate, *FEBS Open Bio*, vol. 3, pp. 84-191, 2013 査読有

4. “An Approach to Water Molecule Dynamics Associated with Motion of Catalytic Moiety”, Hideto Shimahara*, Kimikazu Sugimori, Muhamad Koyimatu, Hidemi Nagao, Tadayasu Ohkubo, and Yuji Kobayashi, *American Institute of Physics (AIP) Conference Proceeding*, vol. 1518, pp. 610-613, 2013 査読有

5. “Theoretical Model for Assessing Properties of Local Structures in Metalloprotein”, M. Koyimatu, H. Shimahara*, M. Iwayama, K. Sugimori, K. Kawaguchi, H. Saito, and H. Nagao* (*co-correspondence), *American Institute of Physics (AIP) Conference Proceeding*, vol. 1518, pp. 626-629, 2013 査読有

6. “去勢抵抗性前立腺がん治療をめぐる新薬開発競争：構造基盤阻害剤設計に布石”，島

原秀登, *ファルマシア*, vol. 49, No. 1, p. 67,

2013 査読有

7. “Theoretical Study of pi-stacking Interaction in Carbonic Anhydrase”, M. Koyimatu, H. Shimahara, K. Kawaguchi, H. Saito, and H. Nagao, *Recent Development in Computational Science*, vol. 4, pp. 87-94, 2013 査読有

8. “Theoretical Study of a π -stacking Interaction in Carbonic Anhydrase.”, Muhamad Koyimatu, Hideto Shimahara, and Hidemi Nagao, *Technical Memorandum (School of Information Science, Japan Advanced Institute of Science and Technology)*, pp. 31-32, 2013, 査読無

9. “計算・実験科学両手法を用いた創薬利用ヒスチジン解析技術の開発及び CO₂捕捉・貯蔵法の開発—QM・NMR 法を用いて炭酸脱水酵素活性部位の水素結合ネットワークで起こるプロトン輸送を読み解く—”, 島原秀登, *北陸先端科学技術大学院大学共有計算サーバ使用成果報告*, pp. 29-30, 2013 査読無

10. “炭酸脱水酵素の反応機構を利用した二酸化炭素水和触媒開発”, 島原秀登, *JAIST-VBL 教育・研究活動報告書2011-北陸先端科学技術大学院大学*, pp. 1-2, 2012 査読無

11. “Theoretical Calculation for Proton Transfer in Biological System — Clarification of Catalytic Mechanism of Enzyme —”, Hideto Shimahara, *共有計算サーバ使用成果報告 2011-北陸先端科学技術大学院大学*, 45-46, 2012 査読無

[学会発表] (計 20 件)

1. 炭酸脱水酵素の触媒反応に見られるプロトン移動の解明に向けた実験・理論的アプローチ, 島原 秀登, ムハマド コイマツ, 杉森 公一, 齋藤 大明, 川口 一朋, 長尾 秀実, 第 8 回分子科学討論会, 広島大学 (広島県東広島市), 2014. 09. 21-24

2. Theoretical Study of Tautomerization and Conformations of His64 in Human Carbonic Anhydrase II, Koyimatu Muhamad, Shimahara Hideto, Sugimori Kimikazu, Saito Hiroaki, Kawaguchi Kazutomo, Nagao Hidemi, 第 8 回分子科学討論会, 広島大学 (広島県東広島市), 2014. 09. 21-24

3. 「炭酸脱水酵素を用いた培養の効率化に関する研究」島原秀登 産学意見交換会, 某会社会議室, 富山県某市, 2014. 03. 03

4. 教育活動に関するショートレクチャー—修士学生学内発表会に関する評価メッセージについて—, 島原秀登, 第 3 回若手教員授業研究会—金沢大学サテライト・プラザ, 金沢, 2014. 01. 08

5. Chemical Exchange between Two Conformations within His64 in a Mutant of Carbonic Anhydrase Is Sufficiently Slow on the NMR Timescale 炭酸脱水酵素のある変異体の His64 の 2 つの配向の間の化学交換は NMR 時間軸上十分遅い, 島原 秀登, 第 51 回日本生物物理学会年会, 国立京都国際会館 (京都府京都市), 2013. 10. 28-30

6. 理系大学院における留学生に対する教育—英語による個別指導を中心に—, 島原秀登, 大学コンソーシアム石川主催 2013 年度 第 1 回 FD・SD 研修会, しいのき迎賓館 (石川県金沢市), 2013. 10. 23

7. Theoretical Study of a pi-stacking Interaction Effect to the Orientation of His64 of Carbonic Anhydrase, Muhamad Koyimatu, Hideto Shimahara, Kimikazu Sugimori, Tetsuya Sugimori, Kazutomo Kawaguchi, Hiroaki Saito, Hidemi Nagao, 第7回分子科学討論会, 京都テルサ(京都府京都市), 2013. 9. 24-27
8. 酵素触媒を用いた二酸化炭素捕捉技術の開発, 島原秀登, 環境科学会 2013 年会, 静岡県コンベンションアーツセンター「GRANSHiP」(静岡県静岡市), 2013. 09. 03-04
9. 炭酸脱水酵素を用いた固体炭酸の作成に関する研究, 島原秀登, 産学意見交換会某会社会議室, 石川県某市, 2013. 10. 11
10. Π -stacking Interaction between Heterocyclic Rings in a Reaction Field of Biological System, Muhamad KOYIMATU, Hideto SHIMAHARA, Kimikazu SUGIMORI, Kazutomo KAWAGUCHI, Hiroaki SAITO, and Hidemi NAGAO, The 12th Asia Pacific Physics Conference (APPC12), Makuhari Messe (Chiba Pref., Chiba), Jul 14-19, 2013
11. Theoretical Study of p-stacking Interaction in Carbonic Anhydrase, M. Koyimatu, H. Shimahara, K. Kawaguchi, H. Saito, and H. Nagao, International Symposium on Computational Science 2013, Kanazawa Univ. (Ishikawa Pref., Kanazawa), 2013. 02. 18-21
12. 創薬と CO₂ 捕捉バイオミメティックスに His 調節型水素結合リレー経路を応用, 島原秀登, 第 11 回国際バイオテクノロジー展/技術会議 BIOtech2012, 東京ビッグサイト(東京都江東区), 2012. 04. 25-27
13. An Approach to Water Molecule Dynamics Associated with Motion of Catalytic Moiety, Hideto Shimahara, Kimikazu Sugimori, Muhamad Koyimatu, Hidemi Nagao, Tadayasu Ohkubo, and Yuji Kobayashi, The 4th International Symposium on Slow Dynamics in Complex Systems, Tohoku Univ. (Miyagi Pref., Sendai), 2012. 12. 02-07
14. Theoretical Model for Assessing Properties of Local Structures in Metalloprotein, M. Koyimatu, H. Shimahara, M. Iwayama, K. Sugimori, K. Kawaguchi, H. Saito, and H. Nagao, The 4th International Symposium on Slow Dynamics in Complex Systems, Tohoku Univ. (Miyagi Pref., Sendai), 2012. 12. 02-07
15. QM 法と NMR 法を用いた炭酸脱水酵素の反応機構の解明, 島原秀登, The 1st MPC WorkShop 共用計算機ユーザ研究交流会, 北陸先端科学技術大学院大学(石川県能美市), 2012. 10. 02
16. QM 法と NMR 法を用いて炭酸脱水酵素活性部位の水素結合ネットワークで起こるプロトン輸送を読み解く, 島原 秀登, 杉森 公一, Muhamad Koyimatu, 長尾 秀実, 大久保 忠恭, 小林 祐次, 第 6 回分子科学討論会, 東京大学本郷キャンパス(東京都文京区), 2012. 09. 18-21
17. Hydrogen-bonding Network and His64 in Carbonic Anhydrase, 炭酸脱水酵素の水素結合ネットワークと His64, Muhamad Koyimatu, 島原 秀登, 杉森 公一, 岩山 将士, 杉森 哲也, 川口 一朋, 齊藤 大明, 吉田 卓也, 中沢 隆, 大久保 忠恭, 小林 祐次, 長尾 秀実, 第 6 回分子科学討論会, 東京大

学本郷キャンパス(東京都文京区),
2012. 09. 18-21

18. エチレンおよびベンゼン誘導体のH/D
同位体化学シフトに関する理論的研究, 杉森
公一, 川辺弘之, 島原秀登, 第6回分子科学
討論会, 東京大学本郷キャンパス(東京都文
京区), 2012. 09. 18-21

19. 溶液NMR法を用いた炭酸脱水酵素の亜
鉛結合水のpKaの決定—H/D交換によるHis-
溶媒接触の可能性—, 島原秀登, 杉森公一,
Koyimatu Muhamad, 吉田卓也, 長尾秀実, 中
澤隆, 大久保忠恭, 小林祐次, 第12回蛋白
質科学会年会, 名古屋国際会議場(愛知県名
古屋市), 2012. 06. 20-22

20. 炭酸脱水酵素を用いた二酸化炭素分離
回収技術を有する膜の作成, 島原秀登, 産学
意見交換会, 北陸先端科学技術大学院大学
(石川県能美市), 2012. 05. 22

[産業財産権]

○出願状況(計1件)

名称: 炭酸脱水酵素阻害剤のスクリーニング
方法, 炭酸脱水酵素阻害剤, 炭酸脱水酵素阻
害剤のスクリーニングキット, 二酸化炭素水
和触媒能を有する物質のスクリーニング方
法及び選択的二酸化炭素捕捉能を有する媒
体

発明者: 島原秀登

権利者: 北陸先端科学技術大学院大学

種類: 特許

番号: 特許出願 2012-159181 特許公開
2014-018133

出願年月日: 2012年7月18日

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

島原 秀登 (SHIMAHARA HIDETO)

北陸先端科学技術大学院大学・ナノマテリ
アルテクノロジーセンター・助教

研究者番号: 40313704

(3) 連携研究者

大久保 忠恭 (OHKUBO TADAYASU)

大阪大学薬学研究科(研究院)・教授
研究者番号: 90272997

小林 祐次 (KOBAYASHI YUJI)
大阪大学工学研究科(研究院)・特任教授
研究者番号: 20127228

長尾 秀実 (NAGAO HIDEMI)
金沢大学自然科学研究科(大学院)・教授
研究者番号: 30291892

杉森 公一 (SUGIMORI KIMIKAZU)
金沢大学大学教育開発・支援センター・准教
授
研究者番号: 40581632