

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：12608

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25630363

研究課題名(和文) 生体触媒におけるメタン水酸化反応制御に寄与する触媒部位への電子伝達経路の解明

研究課題名(英文) Electron transfer pathway regulating methane monooxygenase activity

研究代表者

宮地 輝光 (MIYAJI, AKIMITSU)

東京工業大学・総合理工学研究科(研究院)・助教

研究者番号：40452023

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、メタンからメタノールへの酸化反応に活性な銅含有メタン酸化酵素における高酸化活性種生成の制御機構に関わる、銅含有メタン酸化酵素触媒部位への電子伝達経路を特定することを目的とした。単核銅欠損型メタン酸化酵素の調製方法を確立した。この酵素のメタンからメタノールへの酸化反応への活性は、電子供与体に依存した。この結果から、銅含有メタン酸化酵素の単核銅部位が、細胞膜内の電子伝達系から電子を受容していることを明らかにした。すなわち、細胞膜内の還元型キノンから単核銅を経由して、触媒中心である二核銅へと電子が供与されることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the electron transfer pathway from the electron donor in bacterial membrane to the catalytic site of copper-containing methane monooxygenase. We established the method for removing a copper ion selectively from the mono-copper site of the copper-containing methane monooxygenase. The copper-deficient methane monooxygenase showed the activity for methane hydroxylation only when duroquinol, which can donate electrons directly to the catalytic site (di-copper site) of the copper-containing methane monooxygenase, was used as the electron donor. This result indicates that mono-copper site plays a role in the electron mediation from the electron donor in bacterial membrane to the catalytic site of copper-containing methane monooxygenase.

研究分野：生体触媒化学

キーワード：メタン水酸化 生体触媒 電子伝達 活性酸素

1. 研究開始当初の背景

(1) メタン酸化細菌は、天然ガスの主成分であるメタンを炭素源として生育する。この微生物の細胞膜には銅含有メタン酸化酵素と呼ばれる機能性タンパク質が結合している。この機能性タンパク質は、常温常圧条件でメタンを選択的にメタノールへ変換することができる。つまり銅含有メタン酸化酵素は、天然ガスをメタノールに変換するために利用可能な生体触媒といえる。

(2) メタンは、炭化水素の中で最も不活性である。このような不活性な化合物にも関わらず、その酸化反応が銅含有メタン酸化酵素によって進行する。これは生体内で最も反応性の高い酸化活性種が銅含有メタン酸化酵素タンパク質分子内部において生成していることを示している。

(3) 生体内での酸化反応の多くは、タンパク質に結合する「金属中心」が触媒部位である。この触媒部位において酸素分子がより反応性の高い酸素活性種へと活性化される。

(4) 金属中心における酸素分子の活性化は、タンパク質分子内およびタンパク質分子間の電子伝達によって制御されている。電子がタンパク質分子に供与され、その電子によってタンパク質に結合した金属中心が還元されなければ、酸素活性種は生成できない。したがって、銅含有メタン酸化酵素においてもそのタンパク質の分子内あるいは分子間における電子伝達により酸素活性種の生成を制御している可能性が高い。

(5) これまでに明らかになっている銅含有メタン酸化酵素への電子伝達系を図1に示す。銅含有メタン酸化酵素へ直接電子を供与する化合物はメタン酸化細菌の細胞膜内のキノンプールに存在する還元型キノンであることが特定されている (Miyaji et al. *Biotechnol. Lett.* 2004)。また、銅含有メタン酸化酵素には銅イオンが結合する部位が二か所ある (単核銅部位と二核銅部位) ことも明らかになっている (Hakemian et al. *Biochemistry* 2008)。

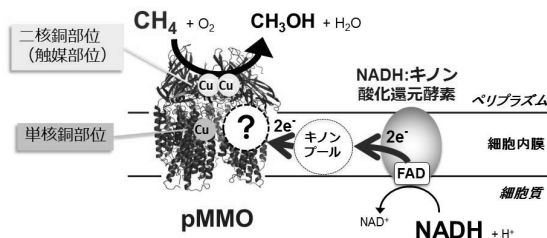


図1 銅含有メタン酸化酵素への電子伝達系

キノンプールの還元型キノンが電子を供与する銅含有メタン酸化酵素の銅結合部位を

明らかにすれば、銅含有メタン酸化酵素によるメタン酸化反応を制御する電子伝達経路を明らかにすることができる。

2. 研究の目的

(1) メタンからメタノールへの酸化反応に活性な銅含有メタン酸化酵素における高酸化活性種生成の制御機構に関わる、銅含有メタン酸化酵素触媒部位への電子伝達経路を特定することを目的とする。

(2) 本研究では、細胞膜内のキノンプールに存在する還元型キノンから銅含有メタン酸化酵素が電子を受け取る部位を、銅含有メタン酸化酵素分子内に複数存在する銅イオン結合部位の中から特定する。

(3) さらに、銅含有メタン酸化酵素の触媒部位で生成する酸素活性種を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 銅含有メタン酸化酵素の調製

銅含有メタン酸化酵素を得るため、メタン酸化細菌 *Methylococcus capsulatus* Bath および *Methylosinus trichosporium* OB3b を培養し、遠心分離により回収した。得られた各々の菌体を超音波破碎し、超遠心分離によって銅含有メタン酸化酵素を含む細胞膜画分を得た。

この細胞膜画分から銅含有メタン酸化酵素を精製するため、膜画分に界面活性剤を加え、4、1時間、窒素雰囲気下で攪拌した。水相に可溶化した膜タンパク質をカラムクロマトグラフによって分離することで銅含有メタン酸化酵素を得た。

(2) メタンからメタノールへの酸化反応

銅含有メタン酸化酵素によるメタン酸化反応はシュレンク管を用いて行った。酵素を溶解した MOPS 緩衝液をシュレンク管に入れ、気相をメタン/空気が1となるよう置換した。この反応容器に電子供与体 (還元型キノンあるいは NADH) を所定量加えることでメタン酸化反応を開始した。メタン酸化反応における反応生成物の定量にはガスクロマトグラフを用いた。

(3) 単核銅欠損型銅含有メタン酸化酵素の調製

銅含有メタン酸化酵素の単核銅部位から銅イオンを選択的に解離させ、単核銅欠損型銅含有メタン酸化酵素 (図2) を調製する。銅含有メタン酸化酵素を含む細胞膜画分に所定量の金属キレート試薬を加え、4、12時間、窒素雰囲気下で攪拌した。超遠心分離により細胞膜画分を回収した。(1)に示した方法で細胞膜画分より銅含有メタン酸化酵素を精製し、その銅含有量を原子吸光分析

により定量した。また、単核銅結合部位の銅イオンを測定するため、電子スピン共鳴スペクトルを測定した。

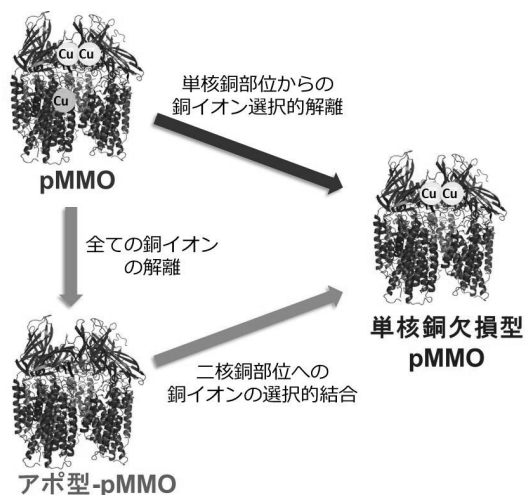


図2 単核銅欠損型およびアポ型銅含有メタン酸化酵素 (pMMO)

(4) 酸素活性種の測定

銅含有メタン酸化酵素において生成する酸素活性種を検出するため、電子スピン共鳴法を用いた。スピントラップ試薬によって活性酸素種を捕捉した。

4. 研究成果

(1) 銅含有メタン酸化酵素の酵素活性安定性

銅含有メタン酸化酵素を得るためメタ酸化細菌 *Methylococcus capsulatus* Bath および *Methylosinus trichosporium* OB3b から銅含有メタン酸化酵素を得た。各々の銅含有メタン酸化酵素についてメタン転化反応を行った。その結果、*Methylosinus trichosporium* OB3b の銅含有メタン酸化酵素は、微生物細胞より単離した後、窒素雰囲気、4 の条件下では、比較的安定な酵素活性を示すことがわかった。

(2) 単核銅欠損型メタン酸化酵素を調製する方法の確立

Methylosinus trichosporium OB3b の銅含有メタン酸化酵素を用いて、種々キレート剤による単核銅部位の銅イオン除去を検討した。その結果、エチレンジアミン四酢酸を用いた時、単核銅イオンを選択的に取り除くことに成功した。

(3) 単核銅欠損型メタン酸化酵素によるメタン酸化反応

単核銅欠損型メタン酸化酵素によるメタンからメタノールへの酸化反応を行った。その結果、単核銅欠損型銅含有メタン酸化酵素では水溶性の還元方キノンであるテトラメ

チルヒドロキノンに依存したメタン酸化活性はほとんど影響を受けなかった。一方、細胞膜に内在する還元型キノンに依存したメタン酸化活性は阻害された。この結果から、銅含有メタン酸化酵素の単核銅部位は細胞内の電子伝達系から電子を授受する役割を果たしていることがわかった。

(4) タンパク質相同性から見た銅含有メタン酸化酵素の触媒部位の特定

銅含有メタン酸化酵素とその類縁タンパク質でメタン酸化反応に活性を示すアンモニア酸化酵素のアミノ酸配列を比較し、銅結合部位のアミノ酸側鎖の違いと銅結合部位に近接する空洞構造を明らかにした(図3)。さらに、アルカン酸化反応におけるアルコール位置・立体異性体への選択性を明らかにし、活性点へのアルカン配向性を推定することで、メタン酸化酵素とアルカン酸化酵素のアルカン配向性の違いを明らかにした。これら結果から、二核銅結合部位が銅含有メタン酸化酵素の触媒部位であることを明らかにした。

(I)

PmoC-MC	58	YEGVYGVWSAGLDSFAPEFETYW	158	TWHQTIVRDT
PmoC-MT	41	YEQIYQWRACLDSFAPEFQTYW	131	TWIMTVIRDT
AmoC-NE	46	YQRYFAYSHGSDSMEPEFDRVW	138	SWHQVILRDT
PmoA-MC	185	CYNYVVRIGTPEY		
PmoA-MT	190	GFHFVVRIGMPEY		
AmoA-NE	190	GHLVYVRIGTPEY		

PmoB-MC	33	HGEKSQ	84	DVAFLNVGMPEGPVFIK	130	ARRPGDWHVHTMNVQGGPILGPGKMITVEG
PmoB-MT	40	HGEKSQ	92	KSSFLNAGEPGPVLR	137	ARRAGRWHVHAQINVEGGPILGPGQWLEIKG
AmoB-NE	38	HGEKRSQ	90	DFSFFNVGSPSPVFR	135	ARIPGRHMHAMLNKVDAGPIAGPGAMNITG

(II)

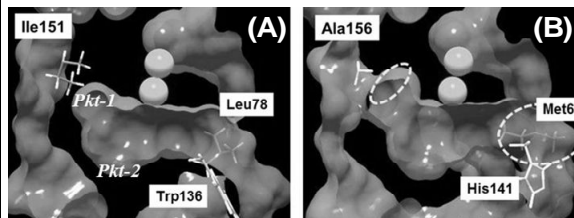


図3 (I)銅結合部位のアミノ酸配列相同性 (II)二核銅部位に近接する反応場空洞構造

(5) 銅含有メタン酸化酵素において生成する酸素活性種の細胞毒性

メタンからメタノールへの酸化反応に活性な銅含有メタン酸化酵素の銅イオン配位構造を明らかにするため、酵素へのアミノ酸側鎖置換を行った。その結果、アミノ酸置換した銅含有メタン酸化酵素は、酵素を生合成する微生物細胞内において強い毒性を示すため、酵素が合成できないことがわかった。一方、メタン以外のアルカンを酸化できる酵素に種々のアミノ酸側鎖置換を行った場合、酵素を合成する細胞への毒性は観測されなかった。この結果は、銅含有メタン酸化酵素の銅イオン配位構造を明らかにするためには、この細胞毒性を回避する新たな酵素合成法を確立する必要があることを示している。

(6)銅含有酵素において生成する酸素活性種メタン以外の基質分子を酸化する銅含有酵素において、電子スピン共鳴 - スピントラップ法によって生成する活性酸素を測定した。その結果、これら酵素においてヒドロキシラジカルや一重項酸素が生成することを明らかにした。これら酵素の生成において細胞毒性を示さなかったことから、これら活性種そのものが細胞毒性の要因ではないと考えられる。一方、活性酸素種の生成量は酵素のアミノ酸置換に依存した。すなわちアミノ酸置換の影響により、これら活性酸素種の生成量が増えることで高い細胞毒性を発現する可能性が示唆された。

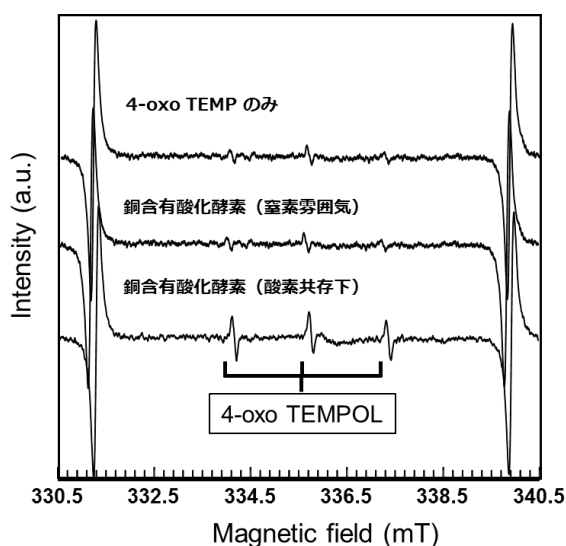


図4 銅含有酵素において生成する一重項酸素との反応で生成した 4-oxo TEMPOL の電子スピン共鳴

(7)まとめ

単核銅欠損型メタン酸化酵素の調製方法を確立した。この酵素によるメタンからメタノールへの酸化反応結果から、銅含有メタン酸化酵素の単核銅部位が、細胞膜内の電子伝達系から電子を受容していることを明らかにした。すなわち、細胞膜内の還元型キノンから単核銅を経由して、触媒中心である二核銅へと電子が供与されることが明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

Akimitsu Miyaji, Teppei Miyoshi, Ken Motokura, Toshihide Baba “Discrimination of the Prochiral Hydrogens at the C-2 Position of *n*-Alkanes by Methane/Ammonia Monooxygenase Family Proteins” *Organic and Biomolecular Chemistry*, 2015, 13, 8261-8270 doi: 10.1039/c5ob00640f.

Akimitsu Miyaji “Product Selectivity in

Alkane Conversion within Cavities of Enzymes and Zeolites: Influence of Cavity Volume on Product Selectivity” *Journal of Japan Petroleum Institute*, 2016, 59, 35-45

Akimitsu Miyaji, Masahiro Kohno, Yoshihiro Inoue, Toshihide Baba “Singlet Oxygen Generation during the Oxidation of L-Tyrosine and L-Dopa with Mushroom Tyrosinase” *Biochemical Biophysical Research Communications*, 2016, 471, 450-453 doi: 10.1016/j.bbrc.2016.02.056.

〔学会発表〕(計4件)

宮地 輝光・馬場 俊秀 “酵素による炭化水素の部分酸化反応” 高難度選択酸化反応研究会シンポジウム(招待講演), 2014年1月24日, 東京工業大学

宮地 輝光・中川 聡矢・本倉 健・馬場俊秀 “シトクロム P450BM-3 の *n*-ペンタン・*n*-ヘキサンからアルコール位置・立体異性体への選択性に及ぼすパーフルオロアルカン酸の影響” 第44回石油・石油化学討論会, 2014年10月16~17日, 旭川グランドホテル

宮地 輝光・本倉 健・馬場 俊秀 “シトクロム P450BM-3の直鎖アルカンからアルコール異性体への選択性に及ぼす活性点近傍アミノ酸側鎖の影響” 第114回触媒討論会, 2014年9月25~27日, 広島大学

宮地 輝光・翟 汶佳・馬場 俊秀 “シトクロム P450BM-3のAla328へのアミノ酸側鎖置換が直鎖ヘキサンからヘキサノール異性体への選択性に及ぼす影響” 第116回触媒討論会, 2015年9月16日, 三重大学

〔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

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