

超好熱菌由来マルチ銅オキシターゼの高機能化と酵素燃料電池への応用

研究代表者： 里村 武範（工学系部門・准教授）

共同研究者： 末 信一郎（工学系部門・教授）、坂元 博昭（テニュアトラック推進本部・講師）、

概 要	
	<p>マルチ銅オキシターゼ（MCO）は分子内に4つの銅を有し、基質から抽出した電子を用いて酸素分子を4電子還元する反応を触媒する。酸素分子を過酸化水素などの有害な活性酸素種を生成せず水にまで還元できることからペースメーカーなどの生体内埋め込み式電源に用いる酵素燃料電池用素子としての応用利用が期待されている。しかしながら、これまで見出されているMCOは、酵素の安定性が低いため電池寿命が数時間程度の酵素燃料電池しか作成できず応用利用が困難であった。我々は、進化工学的手法によって、これまでにない高い安定性を有し、高い触媒活性を示す変異型MCOを創出することに成功した。本研究では、この高触媒型変異MCOの酵素化学的な性質を解析することによってMCOの高触媒化メカニズムを明らかにすることを目的として研究を行った。</p>
関連キーワード	マルチ銅オキシターゼ、カソード用素子、超好熱菌、酸化還元酵素

研究の背景および目的

マルチ銅オキシターゼ（MCO）は分子内に4つの銅を有し、基質から抽出した電子を用いて酸素分子を4電子還元する反応を触媒する。酸素分子を過酸化水素などの有害な活性酸素種を生成せず水にまで還元できることからペースメーカーなどの生体内埋め込み式電源に用いる酵素燃料電池用素子としての応用利用が期待されている。しかし、これまで報告されているMCOは、実際の酵素燃料電池作動条件では不安定であるため、電池として数時間しか作動できないという致命的な課題があった。本研究では、この課題を克服できる唯一の酵素素子である超好熱菌由来酵素に着目した。超好熱菌とは、温泉や海底火山の熱水噴出孔のような高温環境下で生育可能な微生物であり、超好熱菌が生産する酵素は熱だけではなく、有機溶媒、タンパク質変性剤に対しても高い耐性を示すことが報告されている。我々は、超好熱菌よりMCOを探索したところ超好熱菌 *Pyrobaculum aerophilum* よりMCOを見出し、詳細な酵素化学的性質とタンパク質の立体構造解析に成功している（図1）。本酵素を素子としたカソードを作成し、酵素燃料電池を構築したところ高寿命な酵素燃料電池開発に初めて成功した。しかしながら、本酵素をカソードとした酵素燃料電池は、電池寿命においては課題を克服することができたが、酵素活性の低さに起因する低出力のため、実用化にはまだほど遠いものであった。そこで、進化工学的手法によってMCOにランダムに変異を与えること

によって、酵素活性が向上した変異型酵素の探索を行った。その結果、野生型MCOよりも約10倍MCO活性の高い変異型酵素を取得することに成功した。変異型MCOの一次構造を解析した結果、本変異型酵素の高触媒化は、たった4か所のアミノ酸置換によって行われていた。しかも、これら変異が導入されたアミノ酸残基はすべて酵素表面に存在していた（図1）。これまでにMCOの進化工学的手法による高触媒化研究は他にも行われているが、どれも酵素の触媒部位に変異が入ったものばかりで酵素表面に変異が導入されて、このような高触媒化したという報告例はない。本研究では、MCO活性の向上が認められた変異酵素酵素の触媒メカニズムを明らかにするために変異導入酵素の詳細な酵素化学的性質を明らかにすることを目的として研究を行った。



図1 MCOの立体構造
変異導入箇所：stick表示

研究の内容および成果

高い触媒活性を示した変異型 MCO の一次構造を解析した結果、MCO の 197 番目のグリシン残基がセリン残基、256 番目のロイシン残基がヒスチジン残基、262 番目のフェニルアラニン残基がイソロイシン残基、313 番目のチロシン残基がアラニン残基と 4 つのアミノ酸置換が確認できた。この変異型 MCO の詳細な酵素化学的性質を解析したところ、基質である 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) に対する K_m 値が野生型 MCO と比較して 3 倍減少しており基質親和性が上昇していた。一方、至適 pH と pH 安定性、熱安定性に関しては野生型酵素と相違は認められなかった (表 1)。

表 1 変異型 MCO と野生型 MCO の性質の比較

	MCO mutant	Wild type
Optimum pH	3.0	3.0
pH stability ^a	7.5-11	7.5-11
Thermal stability ^b	90°C	90°C
Specific activity	10.7 U/mg	2.12 U/mg
K_m value	0.042 mM	0.12 mM

次に、本変異酵素の詳細な高活触媒化機構の解析を行うために 4 つのアミノ酸置換のうち単一のアミノ酸を置換した単一アミノ酸置換 MCO を構築した。それぞれの単一アミノ酸置換した変異酵素を精製し、精製酵素の MCO 活性を測定したところ、262 番目のフェニルアラニンをイソロイシンに置換した変異 MCO のみが野生型酵素に比べて高い触媒化を示した (図 2)。このことから、この MCO の高触媒化は単一のアミノ酸置換によるものであることが明らかとなった。

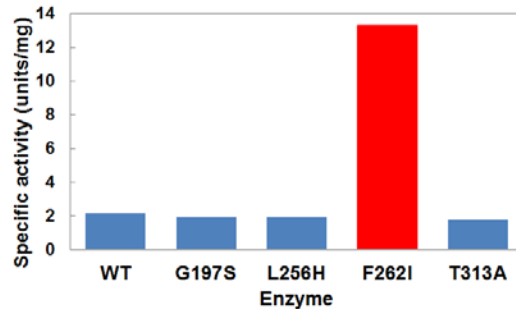


図 2 単一アミノ酸置換変異 MCO の酵素活性

そこで、この 262 番目のフェニルアラニンをイソロイシンに置換した変異 MCO (F262I) の詳細な酵素化学的性質の解析を行った。野生型 MCO と F262I それぞれの、至適 pH、熱安定性、pH 安定性、基質 ABTS に対する K_m 値を測定し比較した。至適 pH は野生型 MCO が pH 2.5、F262I が pH 3.0 であり、中性側へ 0.5 シフトしていた。また、ABTS に対する K_m 値は野生型 MCO が 0.356 mM、F262I が 0.194 mM であり、約 1.8 倍の基質親和性の向上が見られた。一方、熱安定性と pH 安定性に関しては、野生型 MCO と F262I に大きな差は見られなかった。F262I は、現在開発されているほとんどのアノード用酵素が中性付近でしか作動しないことから、至適 pH が中性へ近づいている点で優れており、加えて基質との親和性も向上していることからより有用な酵素であることが明らかとなった。

今後は F262I の結晶構造解析を行うことにより本酵素の立体構造を明らかにし、至適 pH の変化と高触媒化機構の解明を進めて行く予定である。また、本酵素を用いたカソードを作成し酵素燃料電池としての評価を進めていく予定である。

本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成への申請・獲得状況

「主な発表論文等」

「超好熱アーキア *Pyrobaculum aerophilum* 由来変異型マルチ銅オキシダーゼの機能解析」 稲垣康平、里村武範、櫻庭春彦、大島敏久、末信一朗 日本農芸化学会 2017 年度大会 京都女子大学

海外雑誌への投稿準備中

「競争的資金・研究助成への申請・獲得状況」

公益財団法人発酵研究所一般研究助成 申請中