

| | |
|-------------|--|
| 氏名 | 黒瀬 伸治 |
| 学位の種類 | 博士(理学) |
| 学位記番号 | 博甲第873号 |
| 学位授与の日付 | 平成19年3月22日 |
| 学位授与の要件 | 課程博士(学位規則第4条第1項) |
| 学位授与の題目 | マルチメタルセンターを有する酸化還元酵素の機能研究 |
| 論文審査委員(主査) | 櫻井 武(自然科学研究科・教授) |
| 論文審査委員(副主査) | 片岡 邦重(自然科学研究科・助教授), 池田 修(自然科学研究科・教授), 鈴木 正樹(自然科学研究科・教授), 宇梶 裕(自然科学研究科・教授) |

Multimetalloproteins such as multicopper oxidase and nitric oxide reductase contain multiple metal centers to exert their enzyme activities. In these enzymes, electrons supplied from substrate or electron carrier are supplied via the electron-mediator center to the catalytic centers comprised of more than two metal centers such as the trinuclear Cu center in multicopper oxidase and the heme b_3 -non heme Fe center in nitric oxide reductase. The present study aimed at elucidating the mechanisms how dioxygen is reduced to two water molecules by the trinuclear Cu centers in multicopper oxidases and how nitric oxide is reduced to nitrous oxide by the heme b_3 -non heme in nitric oxide reductase. By mutating at Asp112 adjacent to the trinuclear Cu center in CueO, cuprous oxidase from *Escherichia coli*, we revealed that this amino acid functions as the proton donor to dioxygen during the four-electron reduction process of dioxygen. By giving a perturbation on nitric oxide reductase from *Halomonas halodenitrificans* we revealed that the binuclear Fe center is bridged and antiferromagnetically interacted at the resting state. As the next stage of the study, we prepared the four mutants of CueO, from which the region covering the substrate-binding site was partly or fully removed, exhibiting that the truncated region functioned to produce the unique substrate specificity as cuprous oxidase. Finally, we performed the application studies to establish a large heterologous expression system of a novel laccase from *Flammulina velutipes* and to construct a biofuel cell using CueO as cathodic enzyme.

マルチメタルプロテインは分子内に2つ以上の金属イオンを有するタンパク質であり、エネルギー獲得や様々の代謝過程に関わっている。金属イオンとしては銅イオンを有するマルチ銅オキシダーゼや鉄イオンを有する一酸化窒素還元酵素などがあり、多種多様なマルチメタルプロテインが存在している。マルチメタルプロテインの金属中心は多くの場合、電子伝達を担う部位と反応を行う担う活性中心から構成されており、いずれの金属中心も酵素作用の発現に必要な欠くべからざる補因子である (Fig.1)。

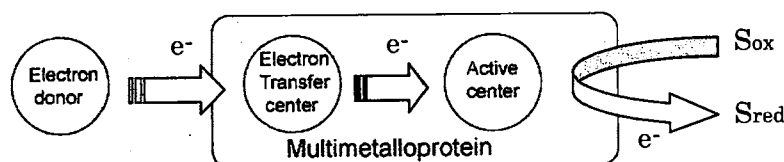


Fig.1 マルチメタルプロテインの概略

マルチ銅オキシダーゼは分子内に分光学的、磁気学的に性質の異なる3種の銅(Type I銅, Type II銅およびType III銅)を有している。Type I銅は電子伝達中心であり、有機化合物や金属イオンから電子を引き抜き、Type II銅とType III銅から構成される活性部位である

三核銅中心に分子内長距離移動を行う。三核銅中心では最終的な電子アクセプターである酸素分子の4電子還元が行われる。マルチ銅オキシダーゼとしては、ラッカーゼ、アスコルビン酸オキシダーゼ、ピリルビンオキシダーゼ、CueOなどがあり、微生物から哺乳類にまで広く存在している。マルチ銅オキシダーゼは基質特異性が幅広く、様々な分野での工業的利用価値が高い。マルチ銅オキシダーゼは反応に際して活性酸素を系外に放出しないこともまた、マルチ銅オキシダーゼの潜在的用途が広い理由である。しかし、熱やpHに対する安定性、示適pH領域などに制限があり、その利用は極めて限定的なレベルにとどまっている。そこで構造、機能に関する基礎的研究のみならず応用をも視野にいれて本研究を行った。さらに、マルチ銅オキシダーゼと機能の点で共通性の高い末端酸化酵素の先祖酵素と考えられる一酸化窒素還元酵素において、活性部位である高スピンヘム b_3 と非ヘム鉄 Fe_B からなる複核部位に摂動を与えることによって、構造および反応機構に関する知見を得た。

【*Flammulina velutipes* 由来ラッカーゼの異種発現系構築と組換え体のキャラクタリゼーション】

バイオリソースとして有用なラッカーゼを探索し、最もポピュラーな食用キノコのひとつである *Flammulina velutipes* (エノキタケ) 由来のラッカーゼ Flac1 をスクリーニングによって見出した。このラッカーゼは中性領域に示適 pH を有する新規のラッカーゼであることが選定のポイントとなった。しかしながら、*F. velutipes* の培養には2ヶ月を要し、その収量もまた低いものであった(約 108 unit/L)。また、この酵素の精製は容易でなく、野生型 Flac1 の精製は部分精製にとどまった。そこで、Flac1 の工業的利用を視野に入れ、異種大量発現系の構築を試みることにした。研究の順序としてはまず、Flac1 遺伝子の塩基配列を決定し、次いで酵母を宿主とする異種発現系を構築し、発現した組換え型酵素の特性を評価した。

Flac1 の N 末端アミノ酸配列および白色腐朽菌ラッカーゼで高く保存されている銅結合部位周辺の配列をもとにして作製したプライマー、またはオリゴ dT プライマーを用い、*F. velutipes* から抽出した mRNA を鋳型とした逆転写反応により、成熟 Flac1 をコードする cDNA (1,491 bp) を得た。この cDNA を酵母発現用プラスミドに組み込み、酵母の α -factor 分泌シグナルを用いて Flac1 の菌体外発現を試みたが、組換え体は菌体内にしか発現をしなかった。そこで、酵母を宿主として分泌発現の実績を持つ *Pleurotus sajor-caju* 由来のラッカーゼのシグナルを使用することにより、酵素の菌体外分泌に成功した。

分泌酵素を含む培養上清から各種クロマトグラフィーによって組換え型 Flac1 (rFlac1)の精製を行った。収量は野生型酵素と同程度であったが、培養に要する時間は約 1/10 に短縮された。得られた rFlac1 の吸収、CD、および ESR スペクトルを測定したところ、マルチ銅オキシダーゼに特徴的な Type I 銅、Type II 銅、および Type III 銅を確認することができた。また組換え型酵素は野生型酵素と同様に中性領域に至適 pH を示した。しかしながら、この組換え体の安定性はあまり良好ではなかったことから、発現系のさらなる改良には着手せず、研究対象を CueO に移した。

【CueO の基質特異性とプロテインエンジニアリング】

CueOは大腸菌のペリプラズムに存在する分子量 53.4 kDaのマルチ銅オキシダーゼであり、銅のホメオスタシスを維持する役割を担っている。他のマルチ銅オキシダーゼと同様に、分子内にType I 銅 1 個、

Type II 銅 1 個、Type III 銅 2 個を有しているが、これら 4 個の銅結合部位以外に、結合力の弱い 5 番目の銅結合部位を、タイプ I 銅部位を覆うメチオニンに富む部位に持つことが明らかになっている (Fig.2)。CueOはCu(I) に対する酸化活性が著しく高いが、他のマルチ銅オキシダーゼと比較して有機基質に対する酵素活性は極めて低いか、または

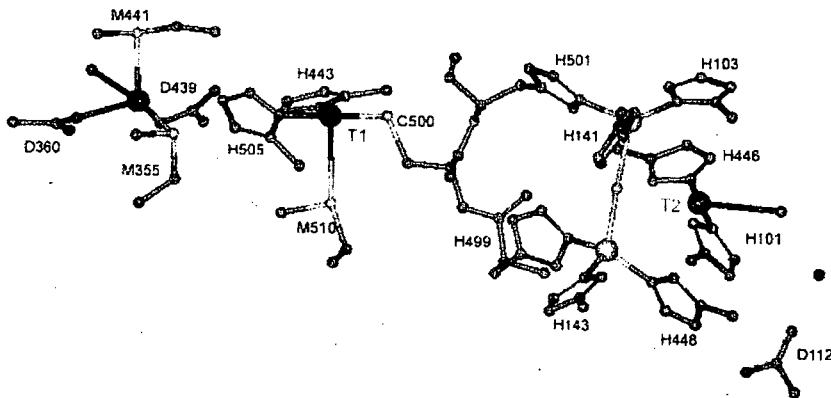


Fig.2 CueO の活性部位近傍の結晶構造 (Robert et al. 2004)

有していない。しかしながら、大過剰のCu(II)の存在下では、*p*-phenylenediamineやABTS酸化活性は10~30倍以上に増大する。これは、基質結合部位に存在するCu(II)が有機基質とType I 銅間の電子移動メディエーターとしての機能を示すからであると考えられている。最近、われわれの研究グループでは、基質結合部位を覆うCueOの5~7番目の3つの α -ヘリックスと6番目と7番目のヘリックスの間に存在する 25 残基のアミノ酸を除去した変異体CueO($\Delta\alpha$ 5-7)を作製した。この大きくプロテインエンジニアリングした改変体にはCu²⁺を添加しなくとも、CueOと比較して有機基質に対する高い反応活性が創製されることを明らかにした。そこで、本研究では、この除去したかさ高い領域が金属オキシダーゼとしての基質特異性を産み出す分子構造であることを証明することを目的とし、野生型CueOとCueO($\Delta\alpha$ 5-7)の中間的な構造を持つ変異体を3種作製した。

作製した変異体の吸収、CDおよびESRスペクトルから、3種全ての変異体においても活性部位付近に大きな構造変化は起こっていないことが明らかになった。また、活性測定の結果、5-7番目のヘリックスによってType I 銅付近への有機基質のアクセスを制限することにより、Cu(I)に対する特異性が生み出されていることを証明することができた。これに付随して、最もサイズの大きな5番目のヘリックスによる立体障害が最も大きいことも明らかになった。

【CueO による酸素還元反応における非配位性 Asp の役割】

マルチ銅オキシダーゼ特有の機能のひとつは酸素の4電子還元である。この酸素4電子還元反応において、プロトンの供給は円滑なターンオーバーにとって必須である。CueOの反応過程におけるプロト

ドナーとなりうるアミノ酸の候補として Asp112 に着目した。Asp112 は Type II 銅の背後に存在し、Type II 銅の配位水や配位子としての His イミダゾール基と水素結合している(Fig.2)。この酸性アミノ酸は他のマルチ銅オキシダーゼでも高く保存されている。そこで、この Asp112 を同じく側鎖にカルボキシ基を有する Glu, Asp の側鎖がアミド化した Asn, さらに Ala に変異させ、酵素活性や各種スペクトルにどのような影響が現れるか検討した。Asp112Glu では酵素活性は約半分に低下し、一方、カルボキシを持たない Ala, Asn への変異では野生型 CueO の 10 %にまで活性が減少した。これらの結果から、112 位の Asp のカルボキシ基の存在が酸素活性の発現に必須であることがわかった。一方、Asp112 への変異によって三核銅部位に関連したスペクトルもまた変化したことから、このアミノ酸は三核銅部位の構造と性質にも関係することが明らかになった。

【CueO のバイオ燃料電池のカソードとしての利用】

燃料電池の中で生体触媒、つまり酵素や微生物自身を触媒として用いるものはバイオ電池と呼ばれている。バイオ電池は水素、糖やエタノールなど、金属触媒では一般に困難とされる様々な化合物を燃料として利用できるという特徴を有している。バイオ電池においては、負極側の酵素（グルコースデヒドロゲナーゼなど）によって糖やアルコールなどから取り出された電子は、正極側の酵素によって、酸素を水へと還元するのに使用される(Fig.3)。正極側の酵素としてはピリルビンオキシダーゼなどマルチ銅オキシダーゼが使用されるのが一般的である。アスコルビン酸オキシダーゼ、ピリルビンオキシダーゼ、ラッカーゼなど多くの酵素で、酵素と電極間での直接電子移動が確認されているが、本研究では CueO が Bioelectrocatalysis として機能するかどうか検討した。

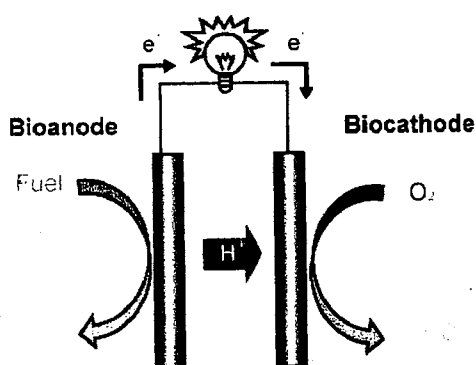


Fig.3 バイオ燃料電池の概略図

同様に直接電子移動を行うことが確認された。大過剰の Cu(II)存在下でもサイクリックボルタモグラムに大きな違いはなかった。このため、電子は電極から Type I 銅へ直接移動していると考えられ、Cu(II)存在下での有機基質に対する反応とは異なっていることが示唆された。また、回転電極を用いて測定した限界電流から、少なくとも 1,500rpm までは、酸素の供給律速になっていることがわかった。ピリルビンオキシダーゼやラッカーゼを用いた場合と比較すると、電流値はそれぞれ 8 倍と 9 倍となっており、CueO の触媒速度定数は他の直接電子移動を行うマルチ銅オキシダーゼと比べて最も高く、CueO はバイオ電池のカソード酵素として最も優れたマルチ銅オキシダーゼであることが判明したことから、今後の発展の先がけとなるデータを得ることができた。

【一酸化窒素還元酵素の活性中心と機能】

一酸化窒素還元酵素(Nitric oxide reductase, NOR)は一酸化窒素を亜酸化窒素に還元する酵素である。NORは低スピンヘム *c* を含むNorCサブユニットと、低スピンヘム *b*, 高スピンヘム *b*₃ および非ヘム鉄を含むNorBサブユニットから構成される。NOをN₂Oに還元する際に必要な電子は可溶性のシトクロム *c* のような電子供与体から与えられpH低スピンヘム *c*, 低スピンヘム *b* を経由して、高スピンヘム *b*₃ と非ヘム鉄FeBからなる複核中心へと伝えられる。この複核中心はNORの触媒中心

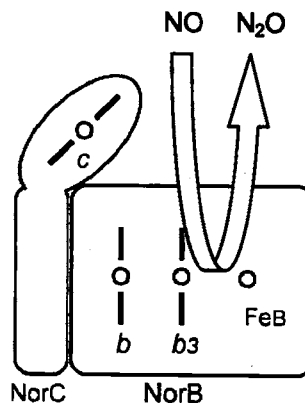


Fig.4 NORの概略図

と考えられるが、休止体や還元体の吸収、MCD, ESRスペクトルから得られる情報には限りがあった。そこで、高スピンヘム *b*₃ と非ヘム鉄FeBが反強磁性相互作用によってマルチ銅オキシダーゼのType III銅のようにESR非検出になっているとの仮定のもとに、pHを低下させるとこの部位の構造が擾動を受け複核中心に関する情報が得られるものと期待した、さらに、NORの活性部位の構造に関する詳細な情報を得るために、シアン化物イオンやアジ化物イオンのようなサイズの小さなアニオンをプローブとし、pH 7.0 と pH 5.0 で酸化状態と還元状態のNORに作用させた。これらの実験結果から、高スピンヘム *b*₃ と非ヘム鉄FeBには休止状態においてオキソ基が架橋し反強磁性相互作用しているが、低pHでは架橋基へのプロトン化により擾動をうけ、基質であるNOが活性部位に結合できることが示された。すなわち、NORはpHにより異なるメカニズムで反応が進行することが示された。

学位論文審査結果の要旨

本論文は4つの銅センターによって活性中心が構成されているマルチ銅オキシダーゼであるラッカーゼと CueO、ならびに4つの鉄中心によって活性中心が構成されている一酸化窒素還元酵素の機能に関する研究で、基礎から応用にいたる幅広い視点で取り組まれた。ラッカーゼについては実用的な視点から、中性から塩基性で活性を示す新規ラッカーゼを探索し、そのキャラクタリゼーションを行うとともに、アミノ酸配列を決定し、構築した酵母を宿主とする異種発現系によって組換えラッカーゼのキャラクタリゼーションまで行った。CueO については点変異によって酸素の4電子還元に関与するアミノ酸を特定し、また、基質結合部位に対して種々の改変を行い、基質特異性の起源を解明した。さらに、直接電気化学を行い、この酵素が生物燃料電池のカソード酵素として最適であることを見いだした。一酸化窒素還元酵素については活性部位を形成するヘム-非ヘム鉄複核部位の構造と機能を明らかにした。以上のように黒瀬伸治君は極めて複雑な活性中心を有するマルチメタル酸化還元酵素の機能に関する基礎から応用にいたる幅広い研究を行った。12月2日の口頭発表と質疑応答による予備審査に始まり、各審査員による個別審査、2月7日の学位論文審査会を行い、博士(理学)に値すると結論した。在学期間は1年であるが、短縮に関わる条件を全て満たしていることを確認した。