

酵素活性が向上した超好熱菌マルチ銅オキシダーゼ変異体の構造解析 Structural analysis of hyperthermophilic multicopper oxidase mutant with enhanced enzyme activity

里村武範¹, 平野達也¹, 稲垣康平¹, 堀永耕作¹, 高村映一郎¹, 坂元博昭¹, 大志田達也²,
大島敏久³, 櫻庭春彦^{2,*}, 末信一朗¹

¹ 福井大学大学院工学研究科, 〒910-8507 福井県福井市文京 3-9-1

² 香川大学農学部, 〒761-0795 香川県木田郡三木町池戸 2393

³ 大阪工業大学工学部, 〒535-8585 大阪市旭区大宮 5-16-1

Takenori Satomura^{1,*}, Tatsunari Hirano¹, Kohei Inagaki¹, Kosaku Horinaga¹,
Eiichiro Takamura¹, Hiroaki Sakamoto¹, Tatsuya Ohshida², Toshihisa Ohshima³,
Haruhiko Sakuraba², Shin-ichiro Suye¹

¹ Division of Engineering, Faculty of Engineering, University of Fukui, Bunkyo, Fukui, Japan

² Department of Applied Biological Science, Faculty of Agriculture, Kagawa University, Miki-cho,
Kagawa, Japan

³ Department of Biomedical Engineering, Faculty of Engineering, Osaka Institute of Technology,
Osaka, Japan

1 はじめに

マルチ銅オキシダーゼ (MCO) は基質分子の酸化を介して酸素分子の水分子への4電子還元を触媒する酵素の総称である。MCOはタイプ1 (T1) 銅で基質から電子を受け取り、タイプ2 (T2) およびタイプ3 (T3) 銅からなる三核中心で酸素の水への還元を行う。このようにMCOは電子供与体と電子受容体との電子授受を担う部位が異なる。このことから、酵素-電極間の電子伝達においてメディエーターを介さず直接電子移動が可能であるため、バイオセンサーやバイオ電池用素子への応用が期待されている。しかし、現在、主に用いられている真菌由来のMCOは高温やアルカリ条件下、塩存在下において不安定であることから、応用展開が制限されている[1]。

一方、超好熱菌に由来する酵素の多くは熱や幅広いpH領域において高い安定性を示すことが報告されている。我々は、超好熱性アーキア *Pyrobaculum aerophilum* から新規なMCO (McoP) を見出し、酵素の立体構造を含む詳細な機能解析に成功した [2]。McoPは高い熱安定性および長期安定性を有しているが、これまで見出されている他のMCOに比べ酵素活性が低いことが応用利用への課題となっている。

そこで、分子進化工学的手法を用いてMcoPをコードする遺伝子にランダムに変異の導入を行い、野生型よりも比活性が高い変異型McoPを創製することに成功した。この変異型McoPには4つのアミノ酸置換が導入されていたが、これらのうち単一のアミノ酸置換を導入した単一変異型酵素を構築して解析を行った結果、262番目のフェニルアラニンがイソロイシンに置換されたF290Iのみが有意に高い触

媒活性を示すことを明らかにした。そこで、McoPの酵素活性向上メカニズムを明らかにするためにF290I変異体の立体構造解析を行った。

2 実験

大腸菌によって発現し、精製した組換えF290I変異体を13.7 mg/mLにまで濃縮し、25% (w/v) PEG 1500、100 mM MMT緩衝液を含むリザーバー液を用いたハンギングドロップ蒸気拡散法によって結晶化を行った。結晶は25°Cで30日間成長させた。抗凍結剤には30% (w/v) PEG 1500を含むリザーバー液を用い、X線回折強度測定はBL5Aビームラインで行い、野生型McoP (PDB 3AW5) を鋳型とした分子置換法によって構造決定を行った。

3 結果および考察

F290I変異体のタンパク質立体構造 (PDB 6K3D) を1.92 Åの分解能で決定した。構造決定したF290I変異体と野生型McoPの立体構造比較を行ったところ、酵素の全体構造に大きな変化は認められなかった (図1左)。さらに、変異を導入したアミノ酸残基付近を詳細に観察すると野生型McoPに存在していたF290とF265およびW436との間のアロマトピックペアが、変異体酵素では側鎖に芳香族環を持たないイソロイシンに置換されたことによって消失していることが示唆された (図1右)。このことによりF290Iでは変異導入部位周辺の疎水性クラスターの相互作用が低下することでP390、H391、P392から構成されるループ構造の柔軟性が高まり、結果としてT1銅がより電子を受け取りやすくなった可能性が考えられた。

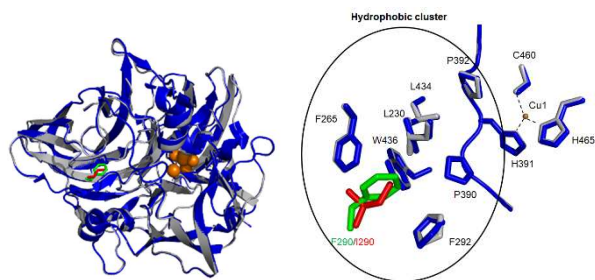


図1: 野生型 McoP (blue) と F290I 変異体 (gray) との構造比較。(左) 全体構造の比較。(右) 変異部位の拡大図。F290 (green) と F290I (red) はスティックモデルで、銅は球状モデルで示している。

そこで野生型酵素の 290 番目のフェニルアラニンと同じ芳香族環を有するチロシン (F290Y)、F290I 変異体の 290 番目のイソロイシンをバリン (F290V)、ロイシン (F290L)、アラニン (F290A) に置換した変異酵素を作成し酵素活性を測定したところ、側鎖に芳香族環を持たない F290A、F290V、F290L はいずれも野生型よりも高い比活性を示した。また、芳香族環を側鎖に有する F290Y の酵素活性は野生型酵素と変わらなかった。これらの結果から、変異導入によって McoP F290 付近の疎水性クラスターの相互作用が低下することで銅と配位するアミノ酸残基を含むループ構造の柔軟性が高まり McoP の触媒活性が向上していることが明らかとなった。

4 まとめ

F290I 変異体のタンパク質立体構造を決定し、野生型酵素との構造比較を行うことによって酵素活性向上メカニズムを明らかにした。本研究結果は国際学術誌 *Journal of biotechnology* に発表した。

謝辞

タンパク質 X 線構造解析実験を行うにあたり、ご協力いただきました Photon Factory ビームラインスタッフの方々に感謝申し上げます。

参考文献

- [1] P. Sharma et al., *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **23**, 823-832 (2007)
- [2] H. Sakuraba, et al., *Acta Crystallogr. F Struct. Biol. Commun.*, **67**, 1-5 (2011)

成果

1. T. Satomura, T. Hirano, K. Inagaki, K. Horinaga, E. Takamura, H. Sakamoto, T. Ohshida, T. Ohshima, H. Sakuraba, S. Suye, Activity enhancement of multicopper oxidase from a hyperthermophile via directed evolution, and its application as the element of a high performance biocathode. *J. Biotechnol.* **325**, 226-232 (2021)