

銅代謝酵素に隠された活性調節機構を解明

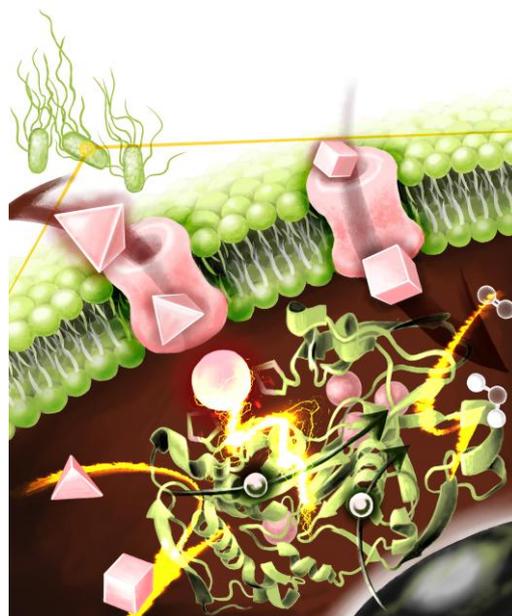
—酵素電極反応を駆使した反応機構解析—

概要

京都大学大学院農学研究科の足立大宜 特定研究員、宋和慶盛 助教、加納健司 名誉教授、金沢大学大学院自然科学研究科の竹井利忠 博士前期課程学生、西山琢巳 博士前期課程学生（当時）、理工研究域物質化学系の山下哲 准教授、片岡邦重 教授らの共同研究グループは、大腸菌由来の銅排出酸化酵素（CueO）^{*1}における直接電子移動型酵素電極反応（DET 型反応）^{*2}を解析し、銅イオンの結合が引き起こす活性調節機構を解明しました。

CueO は、細胞内の銅恒常性を維持するため、毒性の高い 1 価銅イオン（Cu⁺）を 2 価銅イオン（Cu²⁺）へと酸化する重要な役割を担っています。また本酵素は、電極から電子を受け取り、酸素を水へと還元できるというユニークな特徴を有しており、DET 型反応が可能な酵素（DET 型酵素）としても注目されています。私たちは先行研究で、CueO の DET 型反応が Cu²⁺存在下で還元的不活性化^{*3}を受けることを発見していましたが、その分子機構は明らかではありませんでした。本研究では、CueO の構造情報に基づき、第 8 の銅（Cu8）結合部位が不活性化の鍵を握ると仮説を立てました。そこで、Cu8 結合への関与が推定されるアミノ酸残基を置換することで、銅結合能を喪失させた変異体を作製し、その特性を電気化学的に評価しました。すると、ヒスチジン残基を置換した変異体において、不活性化の大幅な抑制が確認されました。また速度論解析^{*4}の結果、変異によって Cu8 の結合能と標準酸化還元電位の両方が変化することが明らかになりました。さらに、Cu8 による不活性化は溶液中の酵素反応でも観測され、生体内でも Cu²⁺/Cu⁺比を調節する仕組みとして機能している可能性が示唆されました。本研究成果は、銅代謝制御機構への理解を深めるとともに、DET 型酵素の高機能化に向けた分子設計指針を提供するものであり、生化学および電気化学分野への波及効果が期待されます。

本研究成果は、2025 年 12 月 11 日に、国際学術誌「*Inorganic Chemistry*」にオンライン掲載されました。



CueO が制御する細胞内銅代謝のイメージ

1. 背景

銅イオンは多くの生物にとって必須の金属元素ですが、過剰になると強い毒性を示します。特に、1価銅イオン (Cu^+) は2価銅イオン (Cu^{2+}) よりも細胞膜を通過しやすく、活性酸素種 (ROS) を生成するため、細胞に対してより有害です。このため、生物は銅イオンの恒常性を精密に制御しています。大腸菌 (*Escherichia coli*) では、銅排出酸化酵素 (CueO) が Cu^+ を Cu^{2+} へと酸化することで有害な反応を抑制し、さらに他の酵素や膜輸送体と連携して細胞内の $\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}^+$ 比を制御していると考えられています。

CueO はマルチ銅酸化酵素ファミリーという酵素群に属しており、タイプ1銅 (T1Cu) で電子を受け取り、三核銅クラスター (TNC) で酸素を水に還元します。T1Cu は、酸化還元分子だけでなく電極とも電子をやり取りできるため、CueO は直接電子移動 (DET) 型酵素としての機能も有しています (図1)。DET 型反応は、仲介分子を必要とせず、高効率かつ環境適合性の高い触媒反応を実現できることから、バイオセンサやバイオ燃料電池などのバイオエレクトロニクスへの応用が期待されています。

CueO の特徴の一つに、T1Cu や TNC に加えて複数の銅イオン結合部位を持つことが挙げられます。このうち、第5-7の銅 ($\text{Cu}5\text{-Cu}7$) は人工電子受容体との反応や Cu^+ 酸化に関与することが報告されていますが、第8-10の銅 ($\text{Cu}8\text{-Cu}10$) の役割は不明でした。また、私たちは先行研究で、CueO の DET 型反応が Cu^{2+} 存在下で還元的不活性化を受けることを発見していましたが、その分子機構の解明は未解決の課題でした。そこで本研究では、TNC と T1Cu の比較的近傍に位置する $\text{Cu}8$ が不活性化に関与している可能性を検証しました。

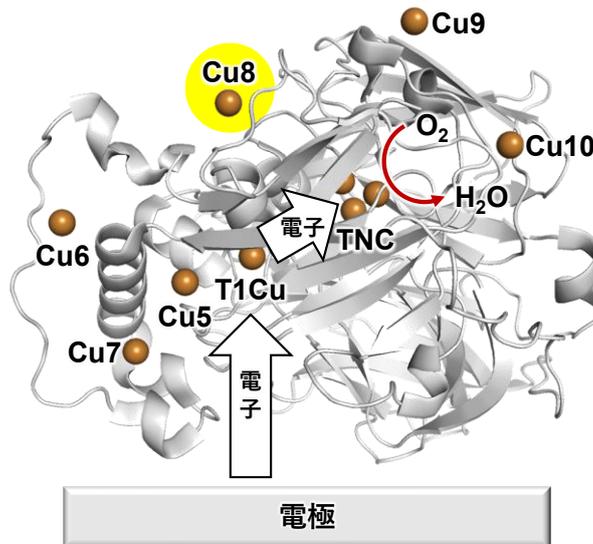


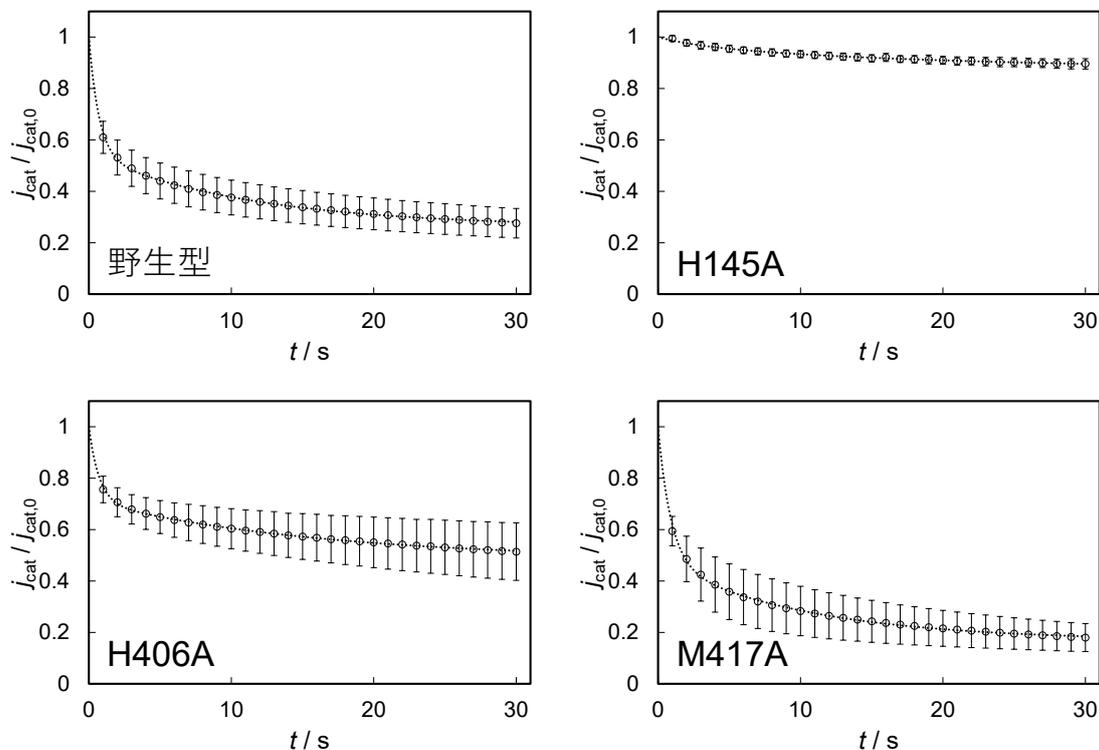
図1：CueO による DET 型反応の模式図

2. 研究手法・成果

2-1. 還元的不活性化の原因が $\text{Cu}8$ であることを解明

まず、CueO の構造情報に基づき、 $\text{Cu}8$ への結合が推定される3種のアミノ酸残基 (His145・His406・Met417) について、それぞれ金属結合能を持たないアラニン残基に置換した変異体を作製しました。そして、CueO にとって最適な DET 型反応場であるアミノ基修飾カーボンナノチューブ ($\text{NH}_2\text{-CNT}$) を電極として用い、CueO における銅イオン結合と電子移動、そして活性調節の関係を電気化学的に明らかにすることを試みました。図2は、還元的環境、すなわち低電位を印加した状態での各種 CueO 変異体の Cu^{2+} 耐性を表しています。His145 置換変異体では不活性化が大幅に抑制され、His406 置換変異体でもある程度の抑制効果が確認されました。一方、Met417 置換変異体では、 Cu^{2+} 耐性が若干低下しました。これらの結果から、His145 が $\text{Cu}8$ の主要な結合残基、His406 が補助的な結合残基として不活性化に関与し、Met417 は $\text{Cu}8$ 結合環境の安定化に寄与していることが示唆されました。

次に、変異体間の微細な変化を定量的に評価するため、電流値の時間依存性を表した理論式を導出し、速度論解析を実施しました。その結果、実験値と理論値はよく一致し、得られたパラメータ ($k_a \cdot k_d \cdot k_f \cdot k_b$) を比較したところ、Cu8 結合残基の置換が Cu8 の結合能および標準酸化還元電位の両方に影響を与えることが明らかとなりました。以上の結果より、CueO を含む様々な金属酵素において、結合残基が金属イオン補因子の化学的特性を微細に調節していることが示唆されました。



$$\frac{j_{\text{cat}}}{j_{\text{cat},0}} = \frac{1 + \frac{k_d}{k_a} + \frac{k_f}{2k_b} \left\{ \left(1 + \frac{k_a + k_d - \frac{k_a - k_d}{k_a + k_d} k_f - k_b}{\sqrt{D}} \right) \exp\left(-\frac{k_a + k_d + k_f + k_b - \sqrt{D}}{2} t\right) + \left(1 - \frac{k_a + k_d - \frac{k_a - k_d}{k_a + k_d} k_f - k_b}{\sqrt{D}} \right) \exp\left(-\frac{k_a + k_d + k_f + k_b + \sqrt{D}}{2} t\right) \right\}}{1 + \frac{k_d}{k_a} + \frac{k_f}{k_b}}$$

$$D \equiv (k_a + k_d - k_f - k_b)^2 + 4k_d k_f$$

図 2：各種 CueO 変異体の Cu²⁺耐性と、速度論解析で用いた理論式

丸印：実験値、点線：速度論解析に基づく理論曲線

2-2. 溶液中の酵素反応でも Cu8 の影響を確認

還元的不活性化が DET 型反応特有の現象かどうかを検証するため、溶液中での酵素反応における各種 CueO 変異体の Cu²⁺応答性を評価しました。フェロセンジメタノール (Fc) を電子供与体とした反応系において、高濃度 (10 mM) の Cu²⁺存在下で、Cu8 に起因する不活性化が観測されました (図 3)。本反応系では、Cu5 による反応促進効果も同時に見られましたが、特に His145 置換変異体では不活性化が抑制され、DET 型反応と同様の傾向を示しました。なお、Fc と Cu²⁺/Cu⁺の標準酸化還元電位を比較したところ、後者の方が約 0.3 V 低く、強い還元力を有します。これは、生体内で Cu⁺を電子供与体とする反応において、還元的不活性化が起こり得ることを示しています。以上の結果より、Cu8 が引き起こす CueO の還元的不活性化によって、生体内での銅代謝が調節される可能性が示唆されました。

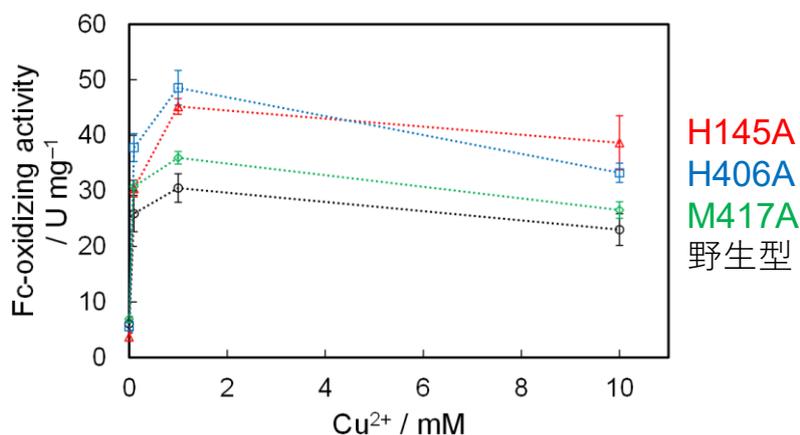


図3：各種 CueO 変異体における Fc 酸化活性の Cu²⁺濃度依存性

3. 波及効果、今後の予定

銅イオンは多くの生物にとって必須である一方、過剰になると強い毒性を示すため、その精密な制御機構の理解は生命科学における重要な課題です。本研究成果は、CueO における活性調節機構を分子レベルで解明したものであり、細菌における銅恒常性制御の理解を大きく前進させるものです。また、本研究で実施した電気化学的手法は、他の酸化還元酵素にも応用可能であり、生体内レドックス制御を理解するための有力なツールとなります。さらに、これらの手法は DET 型酵素の高機能化に向けた分子設計指針の確立にも繋がります。今後は、CueO への新たな変異導入や構造解析を進め、酵素機能の更なる解明を目指します。また、得られた知見を活用し、DET 型反応に基づく生物電気化学デバイスの開発にも取り組んでいきます。

4. 研究プロジェクトについて

本研究は、日本学術振興会 科学研究費助成事業 (JP24K17827、JP23K19281、JP22K14831)、京都大学創立 125 周年記念ファンド「くすのき・125」、国立研究開発法人 科学技術振興機構 革新的 GX 技術創出事業 (GteX) (JPMJGX23B4)、京都大学への寄附金 (加来裕生氏、王厚龍氏、濱野泰如氏) の支援のもとで実施されました。

<用語解説>

- ※1 **銅排出酸化酵素 (CueO)** : Cu⁺を Cu²⁺へと酸化する反応、および酸素を水へと還元する反応を触媒する酵素。
- ※2 **直接電子移動型酵素電極反応 (DET 型反応)** : 酵素反応と電極反応が共役した反応を“酵素電極反応”と呼びます。その中でも、酵素が電極と直接的に電子移動できるものを直接電子移動型と呼び、本文中では DET 型反応と記載しています。
- ※3 **還元的不活性化** : 還元的環境、すなわち低電位において、酵素活性が低下する現象。その逆である酸化的不活性化が確認されている酵素もあります。
- ※4 **速度論解析** : 理論式に基づく実験データの回帰分析。速度論解析により、反応に関わる各種パラメータを定量的に推定できます。

<参考文献>

Taiki Adachi, Ievgen Mazurenko, Nicolas Mano, Yuki Kitazumi, Kunishige Kataoka, Kenji Kano, Keisei Sowa, Elisabeth Lojou, Kinetic and thermodynamic analysis of Cu²⁺-dependent reductive inactivation in direct electron transfer-type bioelectrocatalysis by copper efflux oxidase, *Electrochim. Acta*, **429**, 140987 (2022).

<研究者のコメント>

本論文は、ここ3年間にわたり継続して取り組んできた成果であり、CueOの新たな反応機構を解明できた点に大きな意義を感じています。今後は、今回確立した手法を他の酵素にも展開し、電気化学的視点から酵素の生理機能を探究するとともに、高機能なDET型酵素の社会実装にも取り組んでいきます。(足立 大宜)

酸化還元酵素は、生物の代謝のみならず、地球環境における元素循環にも深く関わる重要な生体触媒です。本研究を通じて、酵素がどのようにして反応を精密に制御しているのかという「生き物の仕組み」への理解を一層深めることができました。今後は、こうした基礎的知見を起点として、持続可能な社会の実現に向けた新たなヒントを見出していきたいと考えています。(宋和 慶盛)



プロフィール写真 (左から足立、宋和)

<論文タイトルと著者>

タイトル: Roles of Labile Copper Coordinated by Histidine in Reductive Inactivation of Copper Efflux Oxidase

(ヒスチジン配位銅が銅排出酸化酵素の還元的不活性化に果たす役割)

著者: Taiki Adachi, Toshitada Takei, Takumi Nishiyama, Kenji Kano, Satoshi Yamashita, Kunishige Kataoka, Keisei Sowa

掲載誌: *Inorganic Chemistry* DOI: 10.1021/acs.inorgchem.5c03674