

(続紙 1)

京都大学	博士 (農 学)	氏名	日比野 佑哉
論文題目	Improvement of direct electron transfer-type bioelectrocatalytic property of D-fructose dehydrogenase by protein engineering approach (フルクトース脱水素酵素による直接電子移動型バイオエレクトロカタリシスのタンパク質工学的的手法による特性改良)		
(論文内容の要旨)			
<p>酸化還元酵素反応と電極反応の共役系をバイオエレクトロカタリシスという。電極を一方の基質とみなす直接電子移動 (direct electron transfer: DET) 型バイオエレクトロカタリシスは、シンプルな系を構築できることから、電気化学デバイスへの応用面で注目されている。酵素を構成するペプチド鎖は絶縁性であるため、DET型反応は、酵素内部のコファクターと電極間での長距離電子移動反応により進行する。しかし、DET型反応が実現された酵素の報告例は少なく、基質から電極への電子伝達メカニズムの詳細は不明な点が多い。</p> <p>DET型触媒活性を持つ酵素の一つに<i>Gluconobacter japonicus</i>由来のフルクトース脱水素酵素 (FDH) がある。FDHはヘテロトリマー構造 (FdhS、FdhC、FdhLサブユニット) を持つ膜結合型酵素で、非常に高いDET型触媒活性をもつ。そのため、DET型バイオ電池やバイオセンサへの展開が試みられてきている。また、FDHのDET型反応のメカニズム解明を目指した研究も行われてきた。FdhCサブユニットには3つのヘムc結合モチーフが、FdhLサブユニットにはフラビン (FAD) 結合モチーフが存在し、基質であるフルクトースはFADで酸化され、電子はヘムcを介して電極へ渡されることが明らかとなっている。さらに、DET型反応における電子移動では、3つのヘムcのうち1つは、反応に関与しない可能性が高いことが先行研究で示唆されている。</p> <p>本論文では、タンパク質工学的手法を用いて種々のFDH変異体を作製し、DET型触媒反応特性を比較・解析することで、FDH内部の電子移動経路を明らかにした。さらに、得られた知見をもとにDET型反応特性を向上させたFDH変異体を作製した。</p> <p>第一章では、DET型反応における酵素内電子移動経路の推測を行った。FDHは結晶構造が未だ不明であるため、結晶構造に基づいた電子移動経路の推測は困難である。そこで、対象となる個々のヘムcの酸化還元電位を負電位側へシフトさせたことによる反応特性の変化から電子移動経路を推測することとした。そのために、3つのヘムcの第六軸配位子であるMetを、ひとつずつ電子供与性の高いGlnに置換した変異体を3種作製した。本研究では、便宜上3つのヘムcをそれぞれN末端から順にヘム1c、2c、3cと呼ぶ。これら変異体を金電極上に吸着させ、フルクトース存在下でDET型触媒の定常電流-電圧曲線を測定・解析した。その結果、FDHのDET型反応において、電子は酵素内部でFAD→ヘム3c→ヘム2c→電極の順に移動し、ヘム1cはDET型電子移動に関与しないと結論づけた。これは、先行研究の推測を支持するものである。</p> <p>また、M450Q_FDH (ヘム2cの第六軸配位子を置換した変異体) では、電流-電圧曲線は負電位側へシフトした。この電極反応特性は、フルクトース酸化の過電圧を低減</p>			

できることを意味し、バイオ電池等のデバイスに応用する際には非常に有用である。

第二章では、前章で結論した電子移動経路を基に、ヘム1cを含む領域を大きく欠損させた変異体 $\Delta 1c_FDH$ を作製した。 $\Delta 1c_FDH$ は明瞭なDET型触媒活性を示し、前章の結論を強く支持した。また、 $\Delta 1c_FDH$ 修飾電極のDET型触媒電流密度は、FDHのそれに比べて約1.5倍大きかった。これは、バイオ電池の高出力密度化およびバイオセンサの高感度化につながり、電気化学デバイスへの応用面でも非常に有用な特性となる。電流-電圧曲線の理論解析の結果、この特性は酵素のダウンサイジングに起因する表面濃度の増加によると結論した。

DET型反応においてヘム1cは電子移動に無関係と結論したが、生体内での役割は不明である。そこで、FDHおよび $\Delta 1c_FDH$ を大量発現した菌体による、培養液中のフルクトース代謝に由来する酸素消費速度を測定した。その結果、菌体内の呼吸鎖電子伝達において、ヘム1cは必須であることが明らかになった。このことは、生体内での触媒反応とDET型触媒反応では電子移動経路が異なることを示唆している。

第三章ではFDHの電極反応特性の改良を志向して、異なる利点を醸し出すM450Q変異と $\Delta 1c$ 変異を同時に導入した変異体M450Q $\Delta 1c_FDH$ を作製した。その結果、両変異の特徴を併せて持ち、FDHに比べて半波電位が0.2 V低く、限界電流密度が1.3倍大きいDET型触媒反応を実現した。これらの特性は、バイオ電池の出力向上、バイオセンサの小型化および高感度化に繋がるため、M450Q $\Delta 1c_FDH$ は応用において非常に有用な変異体である。また、電流-電圧曲線の理論解析の結果、M450Q $\Delta 1c_FDH$ およびM450Q $\Delta 1c_FDH$ は酵素-電極界面での電子移動速度定数が大きく、過電圧の低減に寄与していることが明らかとなった。これは、これらの変異体が野生型FDHに比べ、よりDET型触媒反応に適した配向で電極に吸着していることに由来すると考えられる。

第四章では、FDHの電極反応特性の更なる改良を志向して、ヘム1cおよび2cを含む領域を大きく欠損した変異体 $\Delta 1c2c_FDH$ を作製した。この変異は、FDHの更なるダウンサイジングによる電流密度の上昇と、酸化還元電位が低いヘム3cからの電子移動による過電圧の低下を目指したものである。 $\Delta 1c2c_FDH$ は明瞭なDET活性を示し、半波電位は期待した通り、FDHのそれに比べ0.19 V低かった。電流-電圧曲線の理論解析の結果、ヘム3cから電極へ電子移動したことが示された。また、界面電子移動反応の速度定数の増大が示された。これは、酵素のダウンサイジングによりヘム3cが酵素表面に露出し、電極との最近接距離が短縮されたことによるものと考察した。ただし、期待したような電流密度の上昇は観測されなかった。これは、極端なダウンサイジングに起因する活性低下によるものと結論した。

注) 論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせて、3,000字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 wordsで作成し
審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

電極を一方の基質とみなす直接電子移動 (DET) 型バイオエレクトロカタリシスは、電気化学デバイスへの応用が期待されている。DET型反応を可能とする酵素の報告例は少なく、基質から電極への電子伝達メカニズムの詳細は不明である。酢酸菌由来のフルクトース脱水素酵素 (FDH) は非常に高いDET型触媒活性をもつため、応用展開が期待されている。先行研究により、FDHにはFADと3つのヘムc (1c、2c、3c) が存在し、FADがフルクトースを酸化し、ヘムcが電極と電子授受することが示されている。また3つのヘムcのうち1つはDET型反応に関与しない可能性が示唆されている。このような研究背景のもと、本論文では、タンパク質工学的手法と触媒定常電流-電圧曲線の厳密な解析から、FDH内部の電子移動経路を明らかにした。さらに、その知見をもとに、生物電気化学デバイスの構築を志向した酵素改変戦略をたて、DET型反応特性を向上させた種々のFDH変異体を作製した。本論文で評価できる点は以下の通りである。

1. 結晶構造が不明であるFDHに対して、タンパク質工学の手法と電気化学的特性評価法を組み合わせることで、DET型反応における酵素内部の電子移動経路をFAD→ヘム3c→ヘム2c→電極の順であると結論し、ヘム1cは電子移動に関与しないことを明らかにした。一方、菌体内の呼吸鎖での電子移動においては、ヘム1cは必須であることを明らかにし、DET型反応と生体内での触媒反応とで電子移動経路が異なることを示した。
2. 電子移動経路の知見を基に、過電圧の低減や電流密度の上昇を可能とするような、デバイス応用の面で有用なFDHの変異体を複数作製した。また、2つの変異を組み合わせることで、両変異特性を併せ持つ非常に有用な変異体を作製することも明らかにした。これにより、電子移動経路を考慮し、複数の戦略を組み合わせたタンパク質工学的手法は、電気化学デバイスの構築を志向したDET型触媒反応の改良において、非常に有用であることを示した。

以上のように、本論文では、タンパク質工学の技術と電気化学理論に基づいた解析により、FDHのDET型触媒反応における酵素内電子移動経路を特定し、電気化学デバイス構築を志向した有用変異体の構築に成功した。その成果は、DET型反応の基礎的理解と電気化学デバイスへの応用において有用と考えられ、生物電気化学、酵素科学の発展に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士 (農学) の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成31年2月12日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士 (農学) の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。

注) 論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。

ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日以降 (学位授与日から3ヶ月以内)