

論文の内容の要旨

論文題目 Operando microbio-electrochemical study of deca-heme
 flavocytochrome under non-equilibrium condition
(非平衡で駆動する多核ヘムフラボシトクロムの微生物電気化学的研究)

氏 名 徳納 吉秀

1. 諸言

光合成や呼吸鎖電子伝達といった生命維持に必須な生体エネルギー獲得システムは、高効率に働くタンパク質内一方向電子移動反応によって駆動している。生体電子移動反応は、電子伝達タンパク質のみならず脱水素酵素をはじめとした酸化還元酵素の基礎反応として働くことを踏まえると、その機構の理解と制御は生命活動そのものを理解する基礎学問の観点から重要である^[1]。さらに、タンパク質や生体模倣系を用いた電極触媒や電気化学センサーといった応用技術の開発の面からも、生体電子移動機構の理解は重要な課題である^[1]。

そこで本研究では、生体電子移動反応の制御機構の解明を目的とし、細菌外膜に局在化するシトクロム複合体(OM *c*-Cyts)の電子移動機構について研究を進めてきた。これまでも様々な生体分子を利用して研究は行われており、その多くはマーカス理論に代表される基礎理論をもとに平衡状態での分子構造の維持を前提とした議論が進められてきた^[2]。しかし常に生体分子と相互作用し、動的に構造を変化させる生細胞内での電子移動を必ずしも再現できるわけではない。実際、OM *c*-Cyts の結晶構造を基に推定された電子移動速度と実測値との間には約 10 倍の誤差が生じている^[3]。ここで、この乖離を解消しうる理論として、常に電子の流れる非平衡系でのみ実現する電子移動機構の存在が提唱されている^[3]。すなわち電子の流れに伴うエネルギー散逸過程が分子の構造変化を促し電子移動をさらに加速する、という分子構造—電子移動間に働くフィードバック機構である。酸化還元に応じてその大きさが大幅に変化するという高い構造柔軟性を OM *c*-Cyts が有していることを踏まえ^[4]、本研究では生体環境における OM *c*-Cyts が構造変化を軸としたフィードバック機構のもと電子移動を駆動しているのではないかという仮説を立てた。これまでも単離された OM *c*-Cyts の構造は平衡条件のもと解明され一部のサブユニットの結晶構造は明らかになっているが^[2]、実際に電子の流れる生体内環境での構造追跡は困難とされてきた。そこで本研究では、生体内 OM *c*-Cyts の構造を取得する方法論を確立し種々の電気化学解析と組み合わせることで、電子の流れる非平衡環境での動的な構造変化を追跡し、電子移動の鍵となる因子の解明を目指した。

2. MtrC 内ヘム間相互作用の動的変化の観測^{1,2,9)}

10 個のヘムを有する MtrC は OM *c*-Cyts の最表面に位置するサブユニットであり、グラム

陰性菌 *Shewanella oneidensis* MR-1 と細胞外固体との間の電子移動(細胞外電子移動, Extracellular Electron Transfer, EET)を律速過程として媒介する^[5]。そのため、生きた MR-1 株に外部電位を直接印加することで、MtrC を介した電子の流れの有無を切り替えることが可能である。また、フラビン分子(Flavin mononucleotide, FMN)の 1 電子還元セミキノン体(Sq)が結合することで、MtrC を介した電子移動が加速する^[5]。フラビン Sq 体が結合し EET 速度が向上することで OM *c*-Cyts の酸化還元電位が変化することを踏まえると^[5]、電子の流れに伴って MtrC 内ヘムの構造や周辺環境が変化している可能性がある。そこで本章では、Sq 結合型 MtrC の構造変化、中でも電子移動速度を決定づける最大の要因の一つであるヘム間相互作用を細菌環境中で捉える方法論を考案した。

これまでラマン分光法や蛍光タグを利用したイメージング手法など、タンパク質の構造を生体条件下で追跡する技術が展開されてきたが、10 個のヘム間相互作用を包括的にリアルタイムで計測することはできない^[6]。また、ヘムの空間配置を反映する分光法として円偏光二色性(CD)測定が知られているが、その用途は精製されたペプチドやタンパク質に限られている。ここで、MtrC は最短距離 4Å で密に並ぶ特徴的なヘム配置を有していることから^[2]、励起子間相互作用に由来する極めて強いソーレー帯シグナルが期待される。そのため測定条件を整えることで、生きた MR-1 株から直接 MtrC のヘム空間配置を反映する CD スペクトルが取得できる可能性がある。そこで、生体内 MtrC のヘム配置を反映した CD スペクトルの取得を試みた。

【実験】 波長 600nm における散乱光強度(Optical Density; OD)を用いて MR-1 細胞の濃度を OD = 1.32 に調整し、光路長:1.0 cm、バンド幅 5.0 nm の条件のもと懸濁液の CD スペクトルを得た。酸化還元状態は溶存酸素、30 mM の乳酸により調整した。外膜シトクロム複合体の一部が欠損した遺伝子破壊株($\Delta mtrC$)の作成は、相同性遺伝子組換え法により行った。三電極電気化学 CD 測定では、作用極である白金メッシュ(表面積 0.9 cm²)上に MR-1 のバイオフィルムを形成し、Pt 線(対極)と Ag/AgCl, KCl_{sat}(参照極)を用いた光路長 0.1 cm のキュベットを用いた。

【結果と考察】 細菌 CD 測定の最大の問題点は、細菌表面による入射光の散乱と MtrC 以外のヘムタンパク質に由来するシグナルが MtrC のスペクトルに干渉する点である。そこで、細菌密度と測定条件を最適化し、さらに MR-1 野生株と $\Delta mtrC$ 株の差分スペクトルを取得することでバックグラウンドシグナルを最小限に抑えることに成功した。本研究で見いだされた条件にて測定を行うと、溶存酸素で酸化状態となった細菌内 MtrC のスペクトルから単離 MtrC とピーク強度、波長、形状がほとんど一致したソーレー帯 CD シグナルが得られた。さらに MR-1 株内 MtrC 濃度に正比例してシグナル強度が増加したことから、本測定手法は MR-1 内 MtrC のヘム空間配置を反映する CD シグナルを与えることが明らかとなった。一方で、30 mM の乳酸を加えた還元体 MtrC のソーレー帯 CD ピーク強度は単離体の約半分にとどまり、細菌内の還元体 MtrC は単離体と異なるヘム配置を持つことが示唆された。これは還元体 MtrC 構造の柔軟性を示唆しており、電子の流れによってその構造が変化するという我々の仮説を支持するものである。

非平衡条件における MtrC 構造を検討するため、フラビン存在下で白金メッシュ電極に吸着した MR-1 の CD スペクトルを測定した。すると、開放電位(V_{oc})時に比べ、電子の流れる +0.40 V (vs SHE)印加時には MtrC 内ヘムに対応する 421 nm のピーク強度が約 30% 減少し、再度開放電位を印加することでピーク強度が回復する可逆的な変化が観測された。一方で

フラビンを添加せずに+0.40 ~0.80 V (vs SHE)を印加した場合には、EET に由来する電流値が観測されたにもかかわらず V_{oc} との間で変化が見られなかった。このことから、フラビン分子の結合は非平衡条件における MtrC の動的な構造変化を駆動するトリガーとして働いていることが示唆された。さらに、電極の無い細菌懸濁液ではフラビン添加によるソーレー帯 CD ピーク強度に変化が観測されなかったことから、フラビン結合により駆動する MtrC の構造変化は電子の流れる非平衡系に特有の現象であることが支持された。励起キラルリティ法に基づき CD スペクトル変化を解析したところ、MtrC 内電子移動の加速に十分な大きさのヘム間相互作用変化が生じていることが示唆された。これは実際に観測されたフラビン分子による EET 加速現象と一致する。

3. MtrC を介した電子移動の制御因子の探索³⁻⁸⁾

2.により、細菌に埋め込まれた MtrC のヘム間相互作用を追跡することに成功し、電子の流れによって駆動する動的なヘム構造変化を観測することができた。興味深いことに、この構造変化にはフラビン Sq がトリガー分子として働いていることが示唆された。もし Sq がヘムから電子を受け取ることで EET 反応を媒介しているのであれば、Sq の酸化還元特性を変化させることで MtrC を介した電子移動の速度を制御できる可能性がある。そこで本章では、既に見出しているフラビン類似分子群^{5,8)}の酸化還元特性と MR-1 による EET 速度を比較することで、フラビン Sq が EET を媒介するかどうかを検討し、さらにその速度制御因子の探索を試みた。

【実験】 電極電位を+0.40V (vs SHE)に固定した嫌気条件の電気化学系(作用極:tin-doped indium oxide (ITO)ガラス、対極:Pt 線、参照極:Ag/AgCl,KCl_{sat}、電解液: 10 mM 乳酸を含む DM 培地)を用いて MR-1 細胞に由来する生成電流値を観測した。細胞濃度は OD = 0.1 に調整し、pH は 7.8 とした。フラビン類似分子として示した分子群を各々 2.0 μ M の濃度で添加した。フラビン類似分子の酸化還元電位ならびに OM c-Cyts との解離定数は既報に基づき微分パルスボルタンメトリー測定から推定し⁷⁾、 pK_a 値は熱力学サイクルを利用した量子化学計算により算出した⁸⁾。

【結果と考察】 各フラビン類似分子結合時の EET 速度(k)と各分子の酸化還元電位(E_0)を測定した。すべてのフラビン類似分子で EET が加速され、さらに微分パルスボルタンメトリー法(DPV)により 1 電子還元体が形成されていることが確認された。分子ごとに EET 速度が異なっていたことから、フラビン Sq 体が電子移動に関与することが示唆された。ここで実際に Sq 体がヘム反応中心($E_0 = +40$ mV vs SHE)から電子を受け取っているのであれば、 E_0 が正であるほど電流値は増加すると考えられる⁵⁾。しかし予想に反して E_0 の高い RS や TN を添加した際の EET 速度は低く、 k と E_0 の間に相関は見られなかった。

ここで、本研究で用いた分子群は 1 電子 Sq/Ox 反応と共役して N(5)部位のプロトン化反応が進行する。そこで、 k と補酵素 N(5) 部位の pK_a をプロットしたところ、両者の間に pK_a 約 4~11 までの広い範囲で正の相関が確認され、プロトン化のしやすさに対応する pK_a の増加に伴い EET 速度が上昇した。さらに、水和を行うプロトン供与体の接近が立体障害により阻害される DMMB では大幅に低い電流値が得られた。これらの結果は、フラビン Sq の N(5)部位プロトン化反応が EET の律速過程であることを示している。すなわち、プロトン共役した Sq/Ox 酸化還元反応が MtrC の EET を媒介していることが明らかとなった。一方で、2 電子酸化還元反応(Hq/Ox)の pK_a を比較した際には相関は確認されなかったことから、Sq 体を介した EET 機構はさらに支持された。

EET への Sq/Ox 反応の共役を裏付けるため、ITO 電極上の MR-1 単層バイオフィルムを用いてフラビン類似分子結合時の速度論的同位体効果[KIE($k(H_2O)/k(4.0\%D_2O)$)]を測定した。いずれの分子の場合でも 4.0 vol% 重水添加により電流値が低下し、明瞭な KIE が観測された。これはプロトン移動律速であることを示唆しており、Sq 体 N(5)部位のプロトン化反応が EET の律速過程であるモデルと一致する。さらに、結合分子の種類の違いにより KIE 値が変化したことから、Sq 体 N(5)部位のプロトン化反応が EET 速度を決定づけていることが裏付けられた。

4. 総括及び今後の展望

本研究では細菌内 MtrC をモデル系とすることで、電子移動に伴う動的なタンパク質構造変化を検討した。電気化学 CD 測定により、MtrC 内多核ヘムの動的な構造変化を追跡することに成功し、電子の流れによって駆動する構造変化が電子移動を加速する正のフィードバック機構が示唆された。興味深いことに、本機構にはフラビン Sq 体の結合が必要であることが明らかとなった。さらに Sq 体の 1 電子酸化還元特性である pK_a 値が電子移動速度を決定づける制御因子として働いていることが明らかになり、これまでに指摘されてこなかった共役プロトン移動反応が構造—電子移動間フィードバック機構の鍵プロセスとなりうることを示唆された。今後は本知見の人工触媒系への応用へ向けた分子レベルでの機構解明が期待される。また、様々な微生物の EET 反応を含め、多核ヘムシクロムや結合フラビン分子を介した生体電子移動反応は多数存在することから⁹⁾、本研究で開拓した方法論を他の EET 菌に展開し普遍性を検討することは、生体エネルギー変換機構を理解する基礎学理の構築という観点から意義深い。さらに、フラビン類似分子設計による pK_a 制御は新たな EET 速度制御指針となりうることから、微生物を利用した発電システムの出力向上や、EET の関わる微生物鉄腐食、腸内細菌・病原菌代謝など多岐に渡る現象の制御技術への展開が期待される¹⁰⁾。

5. 発表状況

- (1) **Y. Tokunou**, P. Chinotaikul, S. Hattori, T. A. Clarke, L. Shi, K. Hashimoto, K. Ishii, and A. Okamoto, *Chem. Commun.*, **2018**, 54, 13933-13936. [Front Back Cover]
- (2) **Y. Tokunou**, and A. Okamoto, *Langmuir*, **2018**, in press, DOI: 10.1021/acs.langmuir.8b02977 [Supplementary Cover]
- (3) **Y. Tokunou**, K. Hashimoto, and A. Okamoto, *J. Vis. Exp.*, **2018**, e57584
- (4) A. Okamoto+, **Y. Tokunou+**, S. Kalathil, K. Hashimoto, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2017**, 56, 9082 +: Equal contribution
- (5) **Y. Tokunou**, K. Hashimoto, and A. Okamoto, *J. Phys. Chem. C*, **2016**, 120 (29), 16168-16173.
- (6) **Y. Tokunou**, K. Hashimoto, and A. Okamoto, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **2015**, 88, 690
- (7) A. Okamoto, **Y. Tokunou**, and J. Saito, *Biophys. Physicobiol.*, **2016**, 13, 71
- (8) **Y. Tokunou**, K. Saito, R. Hasegawa, K. H. Nealson, K. Hashimoto, H. Ishikita, and A. Okamoto, under review
- (9) **Y. Tokunou**, and A. Okamoto, in preparation

6. 参考文献

- [1] P. O. Saboe *et al.* *Energy Environ. Sci.* **2017**, 10, 14 [2]例えば(a) M. J. Edwards *et al.*, *Sci. Rep.* **2015**, 5, e11677 (b) M. Breuer *et al.*, *PNAS*, **2014** 111 (2), 611 (c) H. C. Watanabe *et al.*, *PNAS*, **2017**, 114 (11), 2916. [3] H. Tributsch *et al.*, *Science*, **1998**, 279 (5358), 1891 [4] A. Johs *et al.* *Biophys. J.* **2010**, 98 (12), 3035. [5] A. Okamoto *et al.*, *PNAS*, **2013**, 110(19), 7856 [6] A. L. Serrano *et al.*, *Protein. Sci.* **2012**, 21, 157 [7] A. Okamoto *et al.*, *ChemElectroChem*, **2014**, 1, 1808 [8] M. Schmidt *et al.*, *Chemphyschem* **2004**, 5, 1513 [9] (a) S. H. Light *et al.*, *Nature*, **2018**, 562, 140 (b) W. Buckel *et al.*, *Front. Microbiol.*, **2018**, 14(9), 401 [10] D. R. Lovley, *Nat. Rev. Microbiol.*, **2006**, 4, 497