

タンパク質性の熱電変換素子の開発とその利用

Development of protein thermo-electric energy converters and its application

研究代表者 広島大学大学院生物圏科学研究科 助教授 三本木 至宏

Graduate School of Biosphere Science, Hiroshima University,

Associate Professor, Yoshihiro Sambongi

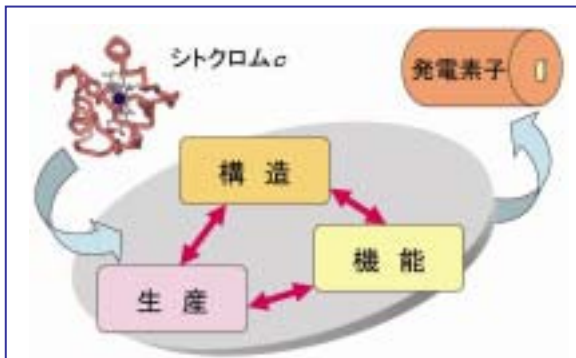
現在われわれの生活を支えているエネルギーは、化石燃料や原子力による電気エネルギーが主流である。しかし、環境への負荷という観点から、これら従来の大型・集中型とは異なるエネルギー生産技術体系を構想すべき時期であると考え。本研究では、環境負荷が少ない「生体分子で構成される発電装置」を開発し、それが社会的なエネルギー問題にどのように貢献するかを調査する。科学技術的な側面を中心に研究を展開し、生物学、化学、さらには工学を統合した学際的な立場をとる。具体的には、自然界に存在する多種多様な微生物の電子伝達タンパク質シトクロム *c* の立体構造、安定性、および電子伝達反応の関係を明らかにし、その作用機構を多面的に理解する。さらに、これらの知見を基礎として、シトクロム *c* を用いて廃熱から電気を生み出すエネルギー変換装置の開発を行い、その社会的な波及効果を考える。

A goal of this project is to gain a detailed insight into biological energy metabolism through dissecting molecular mechanisms underlying protein stability and redox property of bacterial cytochrome *c*. The cytochrome *c* molecule will be deeply characterized from a multidisciplinary standpoint. This project will give a fundamental insight into a practical approach for using cytochrome *c* as a biological conductive material, with the aim of developing a molecular device that controls electron flow at nano meter scale. In the course of this project, we will also construct a prototype of thermo-electric energy converter cell using the cytochromes *c*. The system should contribute to the establishment of a new technology, leading to an alternate energy generator with existing ones derived from fossil fuel and nuclear power.

1. 研究目的

本研究の目的は、タンパク質性の熱電変換素子を開発することである。具体的な達成目標は、電子伝達タンパク質シトクロム *c* の構造と安定性の関係を明らかにするこ

と、その分子構造に基づき電子伝達機能を解明すること、シトクロム *c* の生産技術を確立し、バイオ電池としての利用を図ること、である(図表1)。



図表 1. 研究の全体像

シトクロム *c* の構造, 安定性, 機能, そして生産様式を調べ, その付加価値を見出したり, 人工的に高める。それを発現素子として利用する。

本研究は, 熱から電気エネルギーを生み出す生物系素材から成る分子装置を開発することを戦略的なコンセプトとする。このような方策を設定する背景には, 昨今のエネルギー問題に対する懸念がある。地球環境への負荷という観点から, 化石燃料や原子力による電気エネルギーなど従来の大型・集中型とは異なるエネルギー生産技術体系を構想すべき時期である。また, 申請者は生物のエネルギー代謝に関する研究実績があり, 昨今のエネルギー問題に対して自身の強みが活かせると考えて, 本研究計画を提案した。

具体的な研究目的は, 「生体分子で構成される発電装置」を開発することであり, 自然界に存在する多種多様な微生物の電子伝達タンパク質シトクロム *c* に焦点を当てる。シトクロム *c* の立体構造, 安定性, および電子伝達反応の関係を明らかにし, その作用機構を多面的に理解する。さらに, これらの知見を基礎として, シトクロム *c* を用いて廃熱から電気を生み出すエネルギー変換装置の開発を行う。すなわち, 生物学, 化学, さらに工学を統合した学際的な立場から社会的なエネルギー問題に貢献でき

ると考えているのである。

2. 研究経過

これまでに, 様々なシトクロム *c* の安定性を測定し, その電子伝達機能の評価として酸化還元電位を測定し, 扱っているシトクロム *c* の大量調製法を検討してきている。それぞれの項目での成果を踏まえ, バイオ電池としての利用に向かいつつある。

2 - . シトクロム *c* の安定性

シトクロム *c* の安定性の獲得機構を熱力学的な解析により定量化した。様々な温度環境に生育する微生物から相同性の高いシトクロム *c* を単離し, それらの安定性と立体構造を比較した。用いた微生物は, (i) *Aquifex aeolicus* (最適生育温度: 85 °C), (ii) *Hydrogenobacter thermophilus* (同 72 °C), (iii) *Hydrogenophilus thermoluteolus* (同 52 °C), (iv) *Pseudomonas aeruginosa* (同 37 °C), および (v) *Shewanella violacea* (同 8 °C) である。いずれの微生物も相同なシトクロム *c* (アミノ酸配列はどれも 50 % 以上相同) を持っている。これらのシトクロム *c* 遺伝子をクローニングし, 大腸菌でタンパク質を発現することに成功した。さらに, 立体構造を参照にそれぞれのシトクロム *c* に対して変異導入実験を行い, 安定性に寄与するアミノ酸残基を同定できた。安定性測定実験には, 円二色性分散計を用いた。

2 - . シトクロム *c* の電子伝達機構の解明

シトクロム *c* の生体内反応を試験管内で再現し計測する技術を確認し, 電子伝達の

機構を明らかにした。2 - に記載したシトクロム *c* の野生体およびそれらの変異体の電子伝達反応をサイクリック・ボルタメトリー (CV) によって、また酸化還元活性中心の立体構造を NMR によって測定した。なお、シトクロム *c* の電子伝達機構の解明のための実験は、筑波大学・化学系・山本泰彦教授所有の設備を使って行った。

2 - . シトクロム *c* の大量調製

シトクロム *c* タンパク質の大腸菌での生産効率を検討した。シトクロム *c* は、細胞内で翻訳後修飾を受け、ポリペプチド鎖にヘムが共有結合する。したがって、シトクロム *c* の生産量を上げるには、ポリペプチド鎖の合成のみならず、ヘムの結合を効率化する必要がある。本研究では、ヘム結合に焦点を当てた。具体的には、大腸菌でシトクロム *c* を発現させる際に、ヘム結合を触媒するタンパク質性因子 (Dsb) の寄与を検討した。さらに、大腸菌の培養条件を検討し、シトクロム *c* 発現の最適化を図った。大腸菌で発現したシトクロム *c* の精製方法についても検討した。

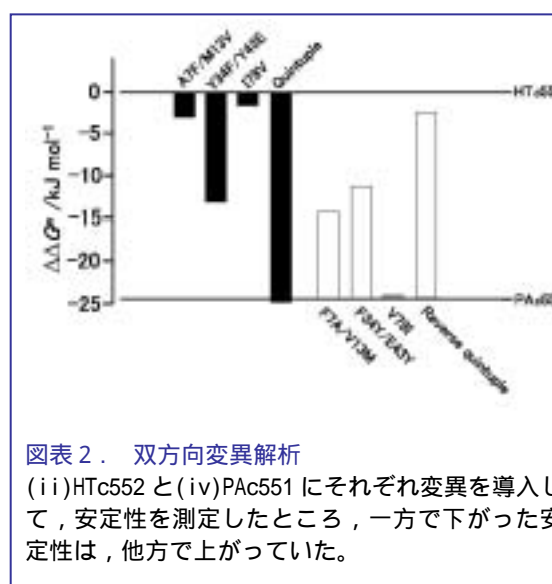
2 - . シトクロム *c* のバイオ電素子としての利用

2 - でシトクロム *c* の CV 実験の際に、温度に対応して酸化還元電位が変化することを見出した。用いたシトクロム *c* すべて高温より低温側で酸化還元電位が低い傾向にあった。この結果は、温度を変化させることで起電力を生じさせることを意味し、電位の変化が大きければ、それだけ付加価値が高いといえ、バイオ電池の素子として利用が期待できる。そこで、2 - に記載

し で酸化還元電位を測定したシトクロム *c* すべてについて、電位変化の温度依存性を調べた。その結果、温度に対する電位の変化率が大きくなった変異体を見つけることができ、現在その原因を調べているところである。

3 . 研究成果

上記 2 - から、シトクロム *c* の安定性に寄与するアミノ酸残基を同定することができた。特に、(ii) と (iv) 由来のシトクロム *c* については、お互いのアミノ酸残基をスワップすることでタンパク質の安定性を双方向で変化させることができることを証明した (図表 2)。



図表 2 . 双方向変異解析

(ii)HTc552 と (iv)PAc551 にそれぞれ変異を導入して、安定性を測定したところ、一方で下がった安定性は、他方で上がっていた。

2 - からは、アミノ酸変異導入により、酸化還元電位と安定性に相関性があることを突き止めた。そのスピンオフとして 2 - の研究へと発展し、本研究の全体戦略の目的の達成へと大きく前進した。

2 - からは、ヘム結合を触媒する Dsb の発現制御や培養条件の最適化によって、実験室レベルでは十分な量のシトクロム *c*

タンパク質を得られるようになった。実験材料作製に大きく貢献した。

4 . 今後の課題と発展

上記 2 - では, (ii) と(iv)以外のシトクロム *c* について, タンパク質工学的な研究を展開する。安定性に関わるアミノ酸単独, あるいはそれらの相互作用の影響を明らかにする。

2 - からは, CV 測定装置の購入が課題である。実験室ですぐに酸化還元電位が測定できるように設備を整備したい。

2 - からは, 培養バッチのスケールアップが課題である。大量にタンパク質を調製したいので, ロスのない精製方法も併せて検討する。

2 - からは, シトクロム *c* を用いた発電装置の試作が今後の課題である。試作過程で問題点を洗い出し, 実際に起電力を生じるかどうか試験する。

5 . 発表論文リスト

- (1) 三本木至宏. 長い歴史をもつタンパク質の新しい機能: 化学と生物学を包括してわかったシトクロム *c* の役割. *化学*, 59, 61-62 (2004).
- (2) 山本泰彦, 三本木至宏. 疎水性コア構造変換による電子伝達タンパク質シトクロム *c* の機能調節. *機能材料*, 24, 31-37

(2004).

- (3) Tachiiri, N., Hemmi, H., Takayama, S. J., Mita, H., Hasegawa, J., Sambongi, Y., Yamamoto, Y. Effects of axial methionine coordination on the in-plane asymmetry of the heme electronic structure of cytochrome *c*. *J. Biol. Inorg. Chem.*, 9, 733-742 (2004).
- (4) Uchiyama, S., Ohshima, A., Nakamura, S., Hasegawa, J., Terui, N., Yamamoto, Y., Sambongi, Y., Kobayashi, Y. Complete thermal-unfolding profiles of oxidized and reduced cytochromes *c*. *J. Am. Chem. Soc.*, 126, 14684-14685 (2004).
- (5) Oikawa, K., Nakamura, S., Sonoyama, T., Ohshima, A., Kobayashi, Y., Takayama, S. J., Yamamoto, Y., Uchiyama, S., Hasegawa, J., Sambongi, Y. Five amino acid residues responsible for the high stability of *Hydrogenobacter thermophilus* cytochrome *c*₅₅₂: RECIPROCAL MUTATION ANALYSIS. *J. Biol. Chem.*, 287, 5527-5532 (2005).
- (6) Ichiki, S., Nakamura, S., Ohkubo, T., Kobayashi, Y., Hasegawa, J., Uchiyama, S., Nishihara, H., Mizuta, K., Sambongi, Y. Cloning, expression, crystallization, and preliminary X-ray characterization of cytochrome *c*₅₅₂ from a moderate thermophilic bacterium, *Hydrogenophilus thermoluteolus*. *Acta Crystallogr. B*, 31, 395-398 (2005).