



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Characterization of the vanadium-dependent bromoperoxidase from the red alga <i>Laurencia nipponica</i> [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	金子, 賢介
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(環境科学)
Dissertation Number	甲第11494号
Issue Date	2014-06-30
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/56698
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Kensuke_Kaneko_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学 位 論 文 内 容 の 要 旨

環境起学専攻：博士（環境科学）

氏 名 金 子 賢 介

学 位 論 文 題 名

Characterization of the vanadium-dependent bromoperoxidase
from the red alga *Laurencia nipponica*

(紅藻ウラソゾ *Laurencia nipponica* 由来バナジウム依存型ブロモペルオキシダーゼの
性状解析)

ソゾ類(*Laurencia*)は世界各地の沿岸域に広く分布する紅藻であり、これまでに 600 種類を超える二次代謝産物が報告されている。これら化合物は、ウラソゾ(*Laurencia nipponica*)が生産する環状エーテル laurencin のようにハロゲン(主に臭素)を含むことが特徴的である。海藻類において、有機化合物に対して臭素の導入を触媒する酵素は、バナジウム依存型ブロモペルオキシダーゼ(VBPO)であると推定されている。とりわけ、紅藻サンゴモ(*Corallina* 属)や、褐藻 *Ascophyllum nodosum* をはじめとする数種の海藻では、VBPO が遺伝子・タンパク質レベルで単離されている。一方で、ソゾ由来 VBPO は、存在が示唆されているのみであり、塩基配列情報も報告されていない。本研究ではソゾ類が生産する臭素化合物の臭素付加過程の解明のため、ウラソゾより VBPO の cDNA クローニングを行い、大腸菌発現系にて組み換え VBPO タンパク質を作製した。得られた組み換え VBPO タンパク質は、VBPO 臭素化活性評価において標準的に利用されているモノクロロジメドンを用いて、その生化学的特性を解析した。また、天然に存在する推定基質(laurencin 推定前駆体: laurediol)を用いた臭素付加実験に供し、VBPO の触媒能力の有無を評価した。なお、laurediol を用いた臭素付加実験では、laurediol が不安定な化合物であるため、トリメチルシリル基で保護・安定化させた誘導体を使用した。

北海道忍路湾で採集されたウラソゾから定法により dsDNA を調製し、RACE PCR 法によって、ウラソゾ VBPO cDNA クローニングを行った結果、二種類のウラソゾ VBPO 全長配列(*LnVBPO1* および *LnVBPO2*)を取得した。*LnVBPO1*, *LnVBPO2* 配列は、それぞれ大腸菌発現系 BL21 (DE3) pLysS に導入後、トリス緩衝液を使用して可溶画分を抽出し、30%飽和度硫酸アンモニウム塩析と DE52 陰イオン交換クロマトグラフィによって、組み換え *LnVBPO1* および *LnVBPO2* タンパク質を精製した。得られた組み換え *LnVBPO1*, *LnVBPO2* タンパク質を、還元下による SDS-PAGE に供したところ、いずれも 77 kDa の位置に単一のバンドとして泳動され、高純度に精製されていることが確認された。次に、同様の精製方法を用いて、ウラソゾ藻体からブロモペルオキシダーゼ活性を有するタンパク質を部分精製し、*LnVBPOs* とのアミノ酸配列を比較した。Nano-LC-MS/MS によって、大腸菌発現系によって得られた組

み換え *LnVBPOs* タンパク質と、藻体から部分精製されたブロモペルオキシダーゼとの間で、一致する断片配列が得られた。このことより、クローニングされた *LnVBPOs* は、藻体内に実在するタンパク質であることが確認された。

高純度に精製された組み換え *LnVBPOs* タンパク質を、モノクロロジメドンを用いた臭素活性試験に供し、各種生化学的特性を評価した。*LnVBPO1* と *LnVBPO2* の臭素付加活性値は、それぞれ 265, 275 U/mg protein と、高い値を示した。また、VBPO による臭素化反応は、過酸化水素と臭化物イオンの 2 つの基質を要求するため、両基質のミカエリス定数(K_m 値)の算出を行った。過酸化水素に対する K_m 値は、*LnVBPO1*, *LnVBPO2* とともに 0.03 mM、臭化物イオンに対しては、*LnVBPO1* では 0.53 mM、*LnVBPO2* では 0.35 mM となり、これまでに報告されている他海藻の VBPO と同じく、両基質に対して高い親和性を示すことが確認された。また、*LnVBPOs* は、pH 7.0 において最大活性値を示し、*LnVBPO1* と *LnVBPO2* は、それぞれ 65 °C, 75 °C で 20 分インキュベートすることによって失活した。至適 pH と失活温度に関しては、詳細な解析が行われている紅藻サンゴモ由来の VBPO (*C. pilulifera* 至適 pH 6.0, 失活温度 80 °C 以上, *C. officinalis* 至適 pH 6.0), 褐藻 *A. nodosum* 由来 VBPO (至適 pH 6.5, 失活温度 70 °C 以上) に比べ、安定性の低い結果となった。このような種間における VBPO の生化学的特性の違いは、各海藻の生育環境に起因するものと推測された。

最後に、ウラボソ由来含臭素環状エーテル laurencin の推定前駆体(laurediol)に対して、トリメチルシリル基で保護・安定化させた誘導体を、*LnVBPO1*, *LnVBPO2* を用いた臭素付加実験に供し、同酵素の laurencin 生合成過程への関与の有無を評価した。Laurediol は、laurencin を原料とし、アルカリ加水分解した後、亜鉛・酢酸を用いた還元法により調製した。組み換え *LnVBPOs* タンパク質との臭素付加反応は、リン酸緩衝液中で、アルゴン雰囲気下、室温で 24 時間行った。得られた反応産物を LC-MS/MS に供し、生成が予測される最終産物である deacetyl laurencin 標品の MS/MS フラグメントと比較したところ、*LnVBPO1*, *LnVBPO2* 共に、酵素反応産物と deacetyl laurencin 標品の MS/MS フラグメントが一致した。標品とした deacetyl laurencin は、laurencin 生合成における最終前駆体であることから、VBPO がソゾ由来の代謝産物において、臭素付加過程を触媒する酵素であることが強く示唆された。

本研究で対象とした laurencin は、フジツボに対する付着阻害活性を有することから、船底防汚塗料として海洋産業への応用・実用化が期待されている。加えて、ソゾ由来臭素化合物には、thyriferol 類縁体など、強い抗腫瘍活性を示す医薬面で有用な化合物も存在する。本研究により、多様なソゾ由来臭素化合物の生合成において、鍵反応である臭素付加過程を触媒する酵素がウラボソから初めて推定された。

今後は、ソゾ由来代謝産物における他の生合成過程の解明や、生合成酵素を利用したソゾ由来有用代謝産物の異種生産系の確立・供給が期待される。

