HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Characterization of the vanadium-dependent bromoperoxidase from the red alga Laurencia nipponica [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_review.pdf, 審査の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文 審 査 の 要 旨

環境起学専攻：博士（環境科学）　氏名　金 子　賢 介

審査委員　主査　准教授 沖 野 龍 文
副査　教 授 田 中 俊 逸
副査　教 授 森 川 正 章
副査　助 教 鷲 尾 健 司
副査　教 授 大 利　徹（大学院総合化学院）

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）

船底防汚塗料に使われていた有機スズ化合物がその毒性のため使用禁止されたため，代替の防汚物質が必要とされている。紅藻ソゾ類の含臭素化合物の中にはタテジマフジツボキプリス幼生付着阻害作用をもつものが多い。特に，八員環エーテルを有するlaurencinは，毒性が非常に低いにもかかわらず顕著な付着阻害活性を有することから期待される化合物である。本化合物の生合成機構を解明することは，活性および安全性がより高い化合物を生合成酵素の改変によって得ることにつながる。特に，生合成における臭素化反応は長い間注目を浴びてきた。９０年代に北海道大学の村井らが粗酵素の解析を行ったが，酵素の精製が十分ではなく構造情報が得られなかった。各種海藻から臭素化反応に関わるブロモペルオキシダーゼが報告されているが，汎用的な基質によって実験されており，本来の基質を使ってその反応を示したものはほとんどない。このような状況の下，申請者は紅藻ウラソゾの臭素化反応に関わるバナジウム依存型ブロモペルオキシダーゼ(VBPO)の性状解析を試みた。

申請者は，小樽市忍路湾で採集されたウラソゾからVBPO cDNAクローニングを行った結果，２種類のVBPO全長配列を取得した。大腸菌発現系に導入して，２種の組み換えタンパク質を精製した。また，天然藻体からも同様の精製方法により得られた粗酵素タンパク質をnano-LC-MS/MSにより組み換えタンパク質と比較することにより，同一であることが確認された。９０年代に粗酵素が報告され，２０００年代に入っても構造情報がないまま解析が進められていたソゾ類のブロモペルオキシダーゼの実体が初めて明らかになった。

高純度に精製された組み換えタンパク質を用いて，ハロペルオキシダーゼ活性を高感度に検出できる一般的な基質モノクロロジメドンに対して活性試験を行った。高い臭素化活性が認められる一方，塩素化活性は認められなかった。紅藻サンゴモのブロモペルオキシダーゼに比べて熱安定性が低かった。申請者は，塩素化活性と活性中心のアミノ酸配列，熱安定性と生育環境との関係を考察した。

さらに，藻体における本来の基質と推定されるlaurediolおよびトリメチルシリル基で保護した誘導体に対して活性試験を実施した。反応産物をLC-MS/MSにより予想産物のdeacetyllaurencin標品と保持時間およびMS/MSフラグメントを比較したところ一致した。このことによりlaurediolがブロモペルオキシダーゼによりdeacetyllaurencinに変換され，その後デアセチル化することでlaurencinが生合成されることが強く示唆された。

また，ウラソゾの他のケミカルレースおよびミツデソゾのブロモペルオキシダーゼのクローニングに成功し，代謝産物の多様性に比べて，本酵素が非常に類似していることを明らかにした。忍路湾におけるアメフラシの成分組成をLC-MSにより分析し，各種ソゾ類と比較した。これらは，今後のソゾの代謝産物の多様性を生合成機構から解明する研究の基礎的知見となると考えられる。

以上のように，申請者は，長い間注目されてきたソゾ類のブロモペルオキシダーゼの実体を解明した。また，多くのブロモペルオキシダーゼの研究が，反応性の高い一般的な基質を用いているのに対して，本来の基質と考えられる化合物を用いて，藻体内で起こっていると予想される反応を解析したという点で，非常に高く評価される。本研究結果を基にソゾ類の含臭素化合物の生合成機構の解明が進めば，船底防汚塗料開発につながる付着阻害物質を創製できることが期待される。

審査委員一同は，これらの成果を高く評価し，また研究者として誠実かつ熱心であり，大学院博士課程における研鑽や修得単位などもあわせ，申請者が博士（環境科学）の学位を受けるのに充分な資格を有するものと判定した。