



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Characterization of the vanadium-dependent bromoperoxidase from the red alga <i>Laurencia nipponica</i> [an abstract of entire text]
Author(s)	金子, 賢介
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/
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/2115/56732
Type	doctoral thesis
File Information	Kensuke_Kaneko_summary.pdf



学 位 論 文 の 概 要

環境起学専攻：博士（環境科学）

氏 名 金 子 賢 介

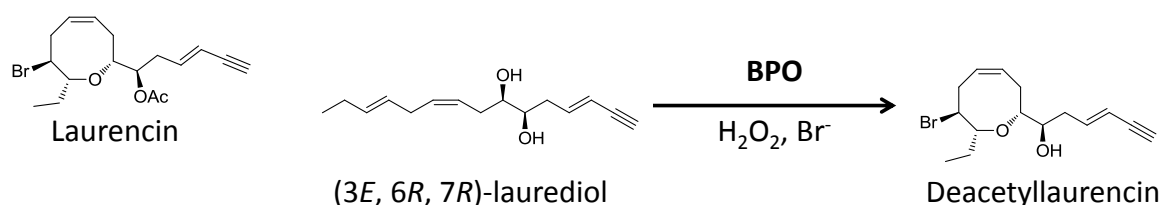
学 位 論 文 題 名

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)

Chapter I 背景

紅藻ソゾ属 (*Laurencia*) は、多様なハロゲン化合物 (主に臭素) を産生することで知られており、現在までに 600 を超える化合物が単離・報告されている¹⁾。このように多様な臭素化合物がソゾ類より単離されている一方で、それらの生合成に関する研究は断片的で、不明な点が多い。村井らは、ソゾ由来代謝産物の臭素付加過程に着目し、触媒酵素の候補として、ブロモペルオキシダーゼ (BPO) をウラソゾ (*Laurencia nipponica*) から部分精製した²⁾。部分精製 BPO は、同じくウラソゾ由来の含臭素環状エーテル laurencin^{3,4)} の推定前駆体 laurediol⁵⁾ を用いた臭素付加実験に供し、同酵素の laurencin 生合成における臭素付加過程への関与を評価した。その結果、部分精製 BPO は、laurediol から deacetyl laurencin への臭素付加・環形成を触媒することが示された (Scheme 1)²⁾。Deacetyl laurencin は、laurencin 生合成における最終前駆体であることから、laurencin 臭素付加過程は、BPO により触媒されることが示唆された。しかしながら、BPO は、色素成分との分離が困難といった理由から、部分精製であったため、BPO の構造・生化学的知見は、現在に至るまで明らかとされていない。



Scheme 1

一方で、他の紅藻 *Corallina* 属などでは、BPO は遺伝子・タンパク質両面で詳細な解析が行われており、活性中心にバナジン酸 (VO_4^{3-}) を要求する、バナジウム依存型 BPO (VBPO) であると報告されている⁶⁾。そこで本研究では、ソゾ由来臭素化合物の臭素付加過程触媒酵素の同定のため、ウラソゾより VBPO 遺伝子クローニングと、大腸菌発現系を用いた組み換え VBPO タンパク質の精製を行った。また、精製した組み換え VBPO タンパク質について、臭素付加における標準人工基質と推定生合成前駆体を用いて、臭素付加活性の評価を行った。

Chapter II ウラソゾ VBPO cDNA クローニングと異種発現系の確立

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、2 種類のウラソゾ VBPO 全長配列 (*LnVBPO1* および *LnVBPO2*) を取得した。これまでに報告されている他海藻由来 VBPO (紅藻 *Corallina pilulifera*, *C. officinalis*, 褐藻 *Ascophyllum nodosum*

など) のアミノ酸配列と比較した結果、*LnVBPOs* は、紅藻由来 VBPO と最も同一性が高く(40%程度)、VBPO において共通に保存されている活性中心のアミノ酸残基も良好に保存されていた。一方で、*LnVBPOs* に特異的な点として、Gln リッチな挿入配列が確認された。*LnVBPO1*, *LnVBPO2* 遺伝子は、それぞれ大腸菌発現系に導入後、可溶画分を抽出し、硫酸アンモニウム塩析と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* 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た。また、組み換え *LnVBPOs* のゲルろ過による分子量は、最大で 750 kDa 程度であり、10 量体を形成していることが示唆され、紅藻サンゴモ由来 VBPO (12 量体)^{7,8)} の知見と概ね一致した。

次に、同様な精製方法を用いて、ウラソゾ藻体から BPO を部分精製し、クローニングされた *LnVBPOs* とアミノ酸配列を比較した。両者を還元下による SDS-PAGE に供したところ、ともに 75 kDa 付近にメインバンドが確認された。そこで、これらのバンドをゲルより切り出してトリプシン消化を施し、nanoLC-MS/MS を用いてペプチド断片の同定を行った。NanoLC-MS/MS の結果、組み換え *LnVBPOs* と、藻体から部分精製された BPO との間で、一致する断片配列が複数得られた。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。

Chapter III 生化学的特性の評価

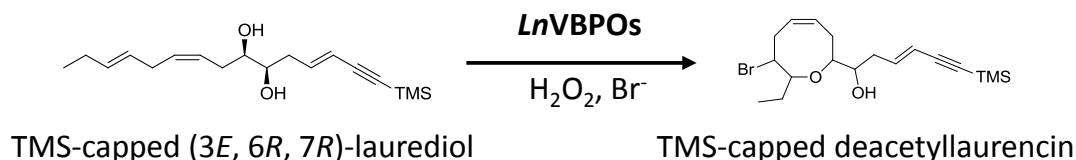
得られた組み換え *LnVBPOs* タンパク質について、ブロモペルオキシダーゼの活性試験において標準的に使用される化合物モノクロロジメドンを用いて、臭素活性と生化学的特性を評価した。*LnVBPO1* と *LnVBPO2* の臭素付加活性値は、それぞれ 265, 275 U/mg protein と、高い値を示した。また、組み換え *LnVBPOs* は、4℃ で保存することで、3 カ月経過しても精製時とほぼ同じ活性値を維持していた。一方で、藻体から部分精製された BPO は、色素成分などの不純物による影響のため、臭素付加活性値は 33 U/mg protein と組み換え体に比べて低く、4℃ 保存下で、1 週間で失活した。NanoLC-MS/MS を用いた実験によって、*LnVBPOs* と藻体由来 BPO との同一性が示唆されていたため、以降の生化学的特性の評価では、安定的な組み換え *LnVBPOs* を用いることとした。

VBPO による臭素付加反応は、過酸化水素と臭化物イオンを基質として要求するため、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由来 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℃, 75℃ で 20 分インキュベートすることによって失活した。このように、*LnVBPO1*, *LnVBPO2* の性状は似通っているものの、失活温度の違いから、*LnVBPO2* の方が、やや安定的な傾向が示された。

Chapter IV 推定生合成前駆体に対する臭素付加活性

組み換え *LnVBPOs* は、モノクロロジメドンに対する臭素付加活性を有していたため、次に、ウラソゾ由来含臭素環状エーテル laurencin の推定前駆体 laurediol に対する臭素付加活性を評価した。先行研究において、laurediol は不安定であると報告されており、部分精製 BPO を用いた *in vitro* 臭素付加実験には、101 mg の laurediol を使用していた²⁾。そこで本研究では、laurediol に対して、トリメチルシリル (TMS) 基で保護・安定化させた誘導体を調製し、4.8 mg 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²⁾。組み換え *LnVBPOs* を用いた *in vitro* 臭素付加実験は、リン酸緩衝液中で、アルゴン雰囲気下、室温

で 24 時間反応させることによって行った。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、酵素反応産物と標品の MS/MS フラグメントのほとんどが一致した。以上のことから、LnVBPOs は、TMS で保護・安定化した laurediol に対し、deacetyl laurencin までの臭素付加・環形成を触媒することが示唆された (Scheme 2)。



Scheme 2

Chapter V 他のソゾ類からの VBPO 遺伝子クローニング

最後に、VBPO が臭素化合物を産生するソゾ類において、共通酵素であるかを調べるため、他の臭素化合物を産生するミツデソゾ (*L. okamurae*) とマギレソゾ (*L. saitoi*) について¹⁾、ゲノム DNA から VBPO 遺伝子クローニングを行った。その結果、ミツデソゾからは 4 種の VBPO 全長配列 (LoVBPOs) が、マギレソゾからは 1 種の VBPO 部分配列がそれぞれ得られた。一方、臭素化合物を産生しないと報告されているクロソゾ (*L. intermedia*)¹⁾ から、同様の方法で VBPO 遺伝子クローニングを行ったところ、VBPO 配列は取得されなかった。以上のことから、VBPO は、臭素化合物を産生するソゾ類において共通酵素であることが示唆された。

Chapter VI 考察

LnVBPOs は、末端を TMS 保護することで、laurediol から deacetyl laurencin までの臭素付加・環形成を触媒することが LC-MS/MS によって推定された。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 laurencin 生合成において、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。加えて、臭素化合物を産生するソゾ類 2 種からも VBPO 遺伝子が得られたことから、VBPO は、他のソゾ類においても、臭素付加過程を触媒する酵素であると推測された。本研究において、VBPO による *in vitro* 臭素付加実験の対象化合物とした 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化合物である。加えて、ソゾ由来臭素化合物には、マギレソゾ由来の 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¹⁾。今後、ソゾ由来臭素化合物の生合成酵素に着目した研究は、多様なソゾ由来臭素化合物の全生合成経路の解明や、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・供給に貢献することが期待される。

1) M. Suzuki, and C. S. Vairappan (2005) *Curr. Top. Phytochem.*, **7**, 1.

2) A. Fukuzawa *et al.*, (1994) *Chem. Lett.*, **23**, 2307.

3) T. Irie *et al.*, (1965) *Tetrahedron Lett.*, **6**, 1091.

4) T. Irie *et al.*, (1968) *Tetrahedron*, **24**, 4193.

5) E. Kurosawa *et al.*, (1972) *Tetrahedron Lett.*, **13**, 2121.

6) A. Butler, and M. Sandy (2009) *Nature*, **460**, 848.

7) M. N. Isupov, *et al.*, (2000) *J. Mol. Biol.*, **299**, 1035.

8) J. Littlechild, and E. Garcia-Rodriguez (2003) *Coord. Chem. Rev.*, **237**, 65.