



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	The Reaction Mechanism Analysis of Enzymes with Degrading Persistent Dyes and its Rational Designs [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	大村, 翼世
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(理学)
Dissertation Number	甲第15393号
Issue Date	2023-03-23
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/89558
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	OMURA_Issei_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（理学） 氏名 大村 翼世

学位論文題名

The Reaction Mechanism Analysis of Enzymes with Degrading Persistent Dyes and its Rational Designs (難分解性色素分解酵素の反応機構解析とその合理的設計)

第一章では本学位論文の背景として、難分解性色素分解酵素に着目した理由について述べている。合成化学物質は我々の暮らしを豊かにする反面、その化学的な安定性から自然界では分解されにくく、健康や生態系に悪影響を与える諸刃の剣である。このような化学物質の処理において、低コストで環境への負荷が少ない生物学的手法は、環境浄化の技術開発において魅力的なアプローチである。色素分解酵素 DyP は、ダイオキシンなどの環境汚染物質同様に、複数の芳香環を有するアントラキノン系染料を特異的に分解することから、環境浄化への利用が期待されるが、この活性の至適 pH は pH 3-4 と低く、中性条件下ではほとんど色素を分解できない。一方、土壌や河川の多くは中性付近の環境にあるため、色素分解活性の pH 依存性が DyP を利用した環境浄化の障壁となっていた。近年の研究で、DyP では、ヘムと過酸化水素との反応で生じたラジカルがタンパク質表面の Trp や Tyr へと移動し、色素を分解することが提案されているものの、中性域で色素を分解する活性は実現していない。そこで、本学位論文では、DyP の色素分解反応の機構を解析し、中性条件下で難分解性色素を分解可能な人工酵素の設計と創成を試みると共に、環境浄化に利用可能な手法の探索を行なった。

第二章では、まず、結晶構造が既知のコレラ菌由来 DyP (*VcDyP*) を用いて、中性条件下に至適 pH をもつ変異体酵素の設計を試みた。*VcDyP* の色素分解反応は、酸性域ではヘムで生成したラジカルが基質結合部位近傍の Tyr129 や Tyr235 に移動することで基質と反応、分解するが、中性域では基質結合部位から離れた Tyr109 や Tyr133 へと移動し、両残基の共有結合形成に消費される。先行研究では、ヘム近傍の His178 が Thr278 と高 pH で水素結合を形成するが、低 pH ではこの水素結合が開裂し、His178 周辺構造が変化することで、ラジカルの移動経路が制御される可能性が提案されている。そこで、この Thr278 を水素結合形成できない Val に置換しアントラキノン系色素の RB19 を用いて色素分解活性を測定したものの、活性の至適 pH は酸性域のままであった。一方で、His178 は近傍の Asp138 と水素結合を形成することから、こちらの水素結合に注目し、Asp138 を Val に置換した D138V 変異体を作成したところ、この変異体の色素分解活性の至適 pH は 6.5 となり、野生型と比較して中性付近での色素分解活性が約 9 倍の活性を示した。このことは、Asp138 と His178 の水素結合が色素分解反応の pH 依存性に重要な役割を果たしていることを意味し、Asp138 の Val への置換は、His178 周辺構造に摂動を与え、中性域で基質結合部位へのラジカル移動が促進されたと考えられる。以上より、中性域で色素分解が可能な変異体を作成することができたことから、この

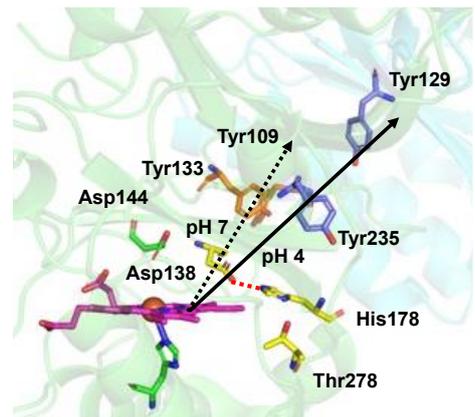


Fig. 1 *VcDyP* の推定ラジカル移動経路

変異体酵素の環境浄化に利用可能な手法を探索した。このような生体内で機能するように設計されている酵素を細胞外環境で利用することは、酵素の安定性が低下し失活する恐れがあることから、変異体 *VcDyP* を発現させた大腸菌による色素分解を試みた。RB19 存在下で培養し、色素添加直後と 24 時間培養後の培地の上澄みの RB19 由来の吸光度の差分をもとに、この変異体を発現する大腸菌の色素脱色能を調べたところ、中性域での活性が低い野生型 *VcDyP* を発現させた大腸菌と比較して、その差分はおよそ 1.4 倍であり、酵素活性測定から期待される分解活性の向上はみられなかった。このような活性上昇が小さい要因を検討するため、大腸菌から精製した変異 *DyP* の吸収スペクトルを測定したところ、その多くがラジカル生成に必須なヘムと結合していない状態で発現していた。先行研究より、*VcDyP* のヘムに対する解離定数 K_d の値は、細胞内でヘムと結合して発現するミオグロビンの K_d の値の 100 倍であることから、菌体内では変異体 *VcDyP* は十分量のヘムを結合できないことが想定され、菌内でヘムと高い親和性で結合するタンパク質を用いた難分解性色素分解酵素を作成する必要があると考えた。

第三章では、二章で明らかとなったヘム結合の問題点を解消するために、菌内でヘムが共有結合によりタンパク質部分に固定される *cytc* に着目した。*cytc* は 6 配位構造のヘムを有し、呼吸鎖において電子伝達の役割を担う一方で、脂質との相互作用により、ヘム鉄から一方の配位子である Met80 が乖離し、*DyP* 同様、過酸化水素との反応によってラジカル種を生成する。過酸化水素存在下で RB19 溶液に *cytc* を添加したところ、色素分解反応は進行したものの、Michaelis-Menten 解析により算出された触媒効率 k_{cat}/K_m は野生型 *VcDyP* の 57% と低いことから、*DyP* のヘム近傍構造を考慮してより触媒効率の高い変異体 *cytc* を設計することを試みた。まず、軸配

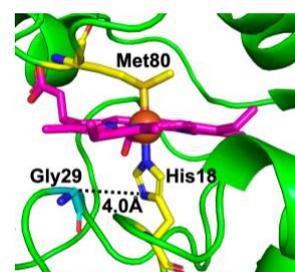


Fig. 2 *cytc* のヘム周辺構造

位子 Met80 をヘム鉄に配位できない Val に置換したところ、過酸化水素との反応性は 56 倍と大幅に向上したが、色素分解活性は野生型の 1.5 倍程度の改善にとどまった。軸配位子 Met80 への変異導入では色素分解活性の改善に限界があることから、次に軸配位子 His18 側の構造に着目した。*DyP* をはじめとするペルオキシダーゼ類に保存されている軸配位子 His と Asp の水素結合は、軸配位子 His の電子供与性を高め、ラジカル種の生成を促進することから、このような水素結合を *cytc* に導入することを試みた。結晶構造をもとに、軸配位子 His18 から 4 Å の位置に存在する Gly29 (Fig. 2) を His18 と水素結合が可能な Asp に置換した変異体を作成したところ、 k_{cat} には顕著な増大は見られず、変異による水素結合の形成やそれによる反応性の向上は明確ではなかった。一方で K_m が劇的に減少し、触媒効率は野生型の 80 倍を示したことから、このヘム近傍への極性アミノ酸残基の導入が、ヘム周辺構造に摂動を与え、新たな基質反応部位が生成したことが示唆された。そこで、この高い活性を示す変異体 *cytc* を発現させた大腸菌を作成し、色素分解を試みたが、その反応はほとんど進行しなかった。この *cytc* 変異体の色素分解反応時の吸収スペクトルから、菌体内ではそのヘムが過酸化水素によって容易に分解されることが示された。以上の結果は、*cytc* は高活性な難分解性色素分解酵素へと変換可能であるものの、大腸菌を用いた色素分解を達成するためには、ヘムの安定性が向上した *cytc* 変異体を探索するなど、更なる検討が必要であることを示している。

第四章では本学位論文において得られた結果や今後の展望をまとめている。*DyP* は環境浄化酵素としての利用が期待されるが、酸性域でのみ色素分解が可能であるという pH 依存性が課題となっていた。本学位論文では、*DyP* の色素分解反応の pH 依存性は、ヘム近傍の Asp-His 間の水素結合形成の影響を受け、そこに構造的摂動を与えることにより、中性条件下でも難分解性の色素を分解可能な人工酵素を創製できた。さらに、*DyP* の色素分解活性向上の過程で得られた知見を元に、電子伝達タンパク質 *cytc* においても野生型 *cytc* の 80 倍の触媒効率を示す変異体の創製に成功した。以上の成果は、反応機構の解析により高活性な色素分解酵素を創製可能であることを示す一方で、これらの酵素を発現させた大腸菌による色素分解反応では十分な成果が得られなかった。今後、高い色素分解活性だけでなく、菌内での安定性が高い酵素を探索するとともに、酵素の熱安定を向上させ、その連続使用を可能とするメソ多孔体などの高分子材料への酵素の固定化を検討することで、酵素を用いた新たな環境浄化技術の創出に重要な知見を得られると期待される。