



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_review.pdf, 審査の要旨



学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（理学） 氏名 大村 翼世

審査担当者	主査	教授	佐田 和己
	副査	教授	松本 謙一郎
	副査	教授	村上 洋太
	副査	教授	石森 浩一郎
	副査	准教授	内田 毅

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)

本学位論文は、難分解性色素であるアントラキノン系色素を効率よく分解する色素分解酵素 DyP の反応機構を解析することでその至適 pH の変換を試み、そこで得られた知見を基に、新たな色素分解蛋白質を設計、創製し、それを菌体内に発現させることで環境浄化に応用可能な微生物を得ることを試みた内容で、全 4 章からなる。

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 DyP に着目した理由について述べ、その環境浄化への応用の可能性とその課題について説明している。DyP はヘムペルオキシターゼの一種で、過酸化水素と反応し、ラジカルを生じることで色素分解反応を触媒するが、先行研究により、このラジカルが特定の蛋白質表面部位に移動することにより、色素分解反応が進行するものの、そのラジカル移動経路は pH に依存し、中性域では色素と反応する部位とは異なった部位に移動するため、色素分解活性が著しく低下することが報告されており、このことが DyP を環境浄化酵素として用いるうえで克服すべき点であるとしている。

第二章では、代表的な色素分解酵素であるコレラ菌由来 DyP (VcDyP) の酸性側の至適 pH を、中性域に移動させるため、先行研究において、His178 周辺構造が変化することで、そのラジカルの移動経路が制御される点に注目している。この His178 はその近傍の Thr278 や Asp138 と水素結合していることから、それぞれを水素結合形成できない Val に置換し、その色素分解活性をアントラキノン系色素の RB19 を用いて測定した結果、Thr278 の変異体の至適 pH は酸性域のままであったが、Asp138 を Val に置換した D138V 変異体の色素分解活性の至適 pH は 6.5 となり、中性付近での色素分解活性が約 9 倍となることを見出した。この結果から、Asp138 の Val への置換は、His178 周辺構造に摂動を与え、中性域でも色素分解部位へのラジカル移動が促進されたと結論付けている。次に、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、この変異体酵素の環境浄化の可能を検討するため、変異体 VcDyP を発現させた大腸菌による色素分解を試みている。この変異体を発現する大腸菌を RB19 存在下で培養し、その色素脱色能を調べたものの、野生型 VcDyP の 1.4 倍程度であり、酵素活性測定から期待されるような分解活性の向上は観測されなかった。このような活性上昇が小さい要因として、VcDyP のヘムに対する結合親和性が低く、菌体内では変異体 VcDyP は十分量のヘムを結合できないと推定し、菌内でヘムと高い親和性で結合する蛋白質を用いた難分解性色素分解酵素を作成する必要性を指摘している。

第三章では、二章で明らかとなった低いヘム親和性を解消するために、菌内でヘムが共有結合により蛋白質部分に固定される cyt c に着目している。cyt c 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、ヘム鉄から一方の配位子である Met 80 を乖離させることで、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ことが報告されている。過酸化水素存在下で RB19 溶液に cyt c を添加したところ、色素分解反応は進行したものの、その触媒効率 k_{cat}/K_m は野生型 VcDyP の 57% と低いことから、軸配位子 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 倍程度の向上に留まったと報告している。次に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

合を cyt c に導入することを試み、軸配位子 His18 から 4 Å の位置に存在すると推定される Gly29 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、kcat には顕著な増大は見られなかつたものの、Km が劇的に減少し、野生型の 80 倍の触媒効率を示す変異 cyt c を得ることに成功した。そこで、この高い活性を示す変異 cyt c を発現させた大腸菌を作成し、色素分解を試みているが、その色素分解反応はほとんど進行せず、これは、菌体内においてこの cyt c 変異体は、そのヘムが過酸化水素によって容易に分解されることによると推定している。以上の結果は、電子伝達蛋白質である cyt c を高活性な難分解性色素分解酵素へと変換したということで、蛋白質の機能変換という点では興味深い成果を挙げたものの、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 cyt c 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おり、大腸菌による環境浄化を目指した色素分解反応では十分な成果が得られなかつたものの、反応機構の解析により色素分解酵素の活性を制御することに成功し、蛋白質の機能変換により野生型酵素を超える色素分解活性を示す蛋白質を創製することができた。

以上の成果は蛋白質機能の設計と制御という点で新たな知見とその実証例を示したものであり、学術的にも重要でその応用にもつながることから博士（理学）の授与に値すると判断する。