

## 論文の内容の要旨

応用生命工学専攻  
平成 18 年度博士課程 入学  
氏名 小川 徳之  
指導教員名 祥雲 弘文

論文題目 カビのヘム-チオレート含有酸化酵素の研究

### 第一章 序論

化成品の原料は炭化水素である石油であるが、そこに付加価値をつけるためには酸素の導入が重要なステップとなる。不活性な炭化水素を酸化するため、現在は重金属をはじめとした化学触媒による酸化反応が用いられているが、環境に負荷をかけることが多く、環境にやさしい酸化反応が求められている (Green sustainable chemistry)。その方法のひとつとして酵素反応が期待されている。シトクロム P450 (以下 P450)は、その多彩な酵素機能からそのような工業的利用において魅力的である。しかし実際の応用に際しては困難な障壁も存在する。一方 P450 において酸素 ( $O_2$ ) や NADPH に依存せず、過酸化水素 ( $H_2O_2$ ) などの過酸化由来の酸素原子を用いて基質を酸化するペルオキシド・シャント反応が古くより知られていたが、 $H_2O_2$  を利用する場合、とくにペルオキシゲナーゼ (Pox) 反応と呼ばれる。Pox 反応は、P450 の工業的利用に際しての欠点を克服することが期待され、また近年、Pox を生理反応とする P450 も発見されている。すべての P450 の中で工業的利用にもっとも期待されているものは P450BM3 である。P450BM3 は P450 と還元酵素が融合しているため self-sufficient であり、また turn-over が速い (モノオキシゲナーゼ P450 で最速)。P450BM3 に Pox 活性を付与する指定進化 (directed evolution) など、その工業的利用を目指した研究が盛んに行われている。一方、カビ *Cardariomyces fumago* 由来の Chloroperoxidase (以下 CPO) は  $H_2O_2$  を用いて有機基質を塩素化する変った反応を触媒するが、加えてさまざまな有機物を基質とする Pox 活性を示すことで注目される。CPO は CO 型 Soret 帯を 450 nm 付近に持つヘムタンパク質であるが、そのアミノ酸一次配列は P450 に相同性を示さず、従って P450 スーパーファミリーには属さない。CPO のようにヘム第 5 配位子が P450 と同様にシステインのチオレートアニオンであるが P450 スーパーファミリーには属さないものを、ヘム-チオレートタンパク質と総称する。CPO 以外の例として NO 合成酵素 (NOS)、CooA などのセンサータンパク質がある。

当研究室ではカビ *Fusarium oxysporum* より P450BM3 によく似た融合タンパク質である P450foxy が発見され、遺伝子のクローニングもなされている。本研究では上記のような工業的応用を念頭に置いて P450foxy の改変を試み、またカビ遺伝子情報より有用酵素（とくに CPO）の探索を行い、クローニング、機能解析を行うことを目的とした。さらに結晶構造がまだ解明されていない P450foxy の結晶化検討も行った。

## 第二章 *Aspergillus oryzae* ゲノムからのChloroperoxidase様酵素のクローニング

*A. oryzae*のゲノム解読は 2005 年に完了しており、他の*Aspergillus* 属のカビと比較して 2 割ほど大きなゲノムサイズであり、代謝に関する酵素群が多く存在していることが明らかになっている。*A. oryzae*のゲノムに対して、CPOのアミノ酸配列を用いてBlast searchしたところ、第五配位子ヘム-チオレート構造およびヘム結合領域周辺が保存された配列 AOPE (*Aspergillus oryzae* peroxidase : AO0902000344)を見出した(Fig.1)。CPOと比較してAOPEの予想分子量は 10 kDa以上小さく、アライメントした結果ではギャップも多かった。現在までにHaloperoxidase以外にヘム-チオレート構造を持つ酵素の研究例はなく、サイズの小さな類似配列の存在は興味深い考え、AOPEの機能解明を目的としてクローニングを試みた。(Table.1)。

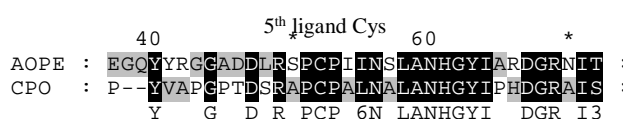


Fig. 1 Alignment of CPO heme region and putative heme binding region of AOPE.

Table. 1 Comparison of AOPE and Chloroperoxidase characters.

	AOPE (AO0902000344)	Chloroperoxidase (CAC16733.1)
Organism	<i>A. oryzae</i>	<i>Cardariomyces fumago</i>
Amino acids	272	373
M.W.	30.1 kDa	42 kDa
Feature	Heme-thiolate enzyme Internal protein	Heme-thiolate enzyme Secretion enzyme Glycoprotein

RT-PCR による発現条件の検討を行った結果、AOPE は恒常的に発現している酵素であることが明らかになった。また、RACE 法による配列解析により、AOPE は配列中にイントロンを含まないことがわかった。AOPE のクローニングは、大腸菌発現系、酵母発現系では達成できなかったため、*A. oryzae* の AOPE の過剰発現株作製を試みた。*A. oryzae* cDNA ライブラリーより、PCR により C 末端に 6His tag を導入した AOPE 遺伝子を増幅し、発現プロモータとして P-glaA142 を含む pNGA142 ベクターに導入し、発現ベクターを構築した。*A. oryzae*  $\Delta$ niaD 株にプロトプラスト法による形質転換を行い、AOPE 過剰発現株を作製した。RT-PCR により、組換え AOPE の mRNA レベルでの発現を確認した。過剰発現株を DPY 液体培地で培養し、得られた菌体を液体窒素を用いて破碎し、Ni<sup>2+</sup>キレートリングカラムに供したところ、SDS-PAGE 上で予想分子量に相当するタンパク質を部分精製することができた(Fig.2)。CO 差スペクトル測定を行ったところ、ヘム-チオレート構造を持つ酵素の特徴である 450 nm 付近の吸収極大を確認することができた。粗精製試料を用いた活性測定を行ったところ、ABTS(2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline)-6-sulfonic acid)

に対してペルオキシダーゼ反応を示すことが見出された(Fig.3)。

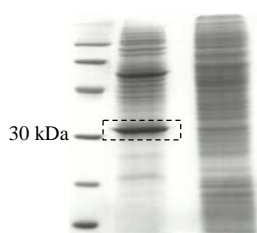


Fig. 2 SDS-PAGE of AOPE after HisTrap column.

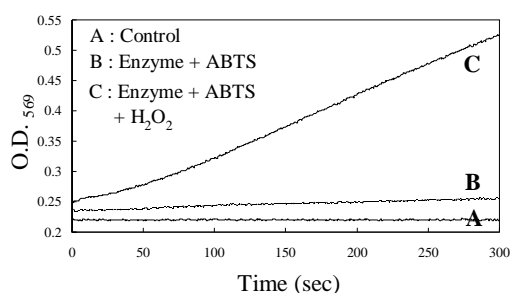


Fig. 3 Activity assay of AOPE using ABTS as a substrate.

AOPE の反応回転は  $94.7 \text{ min}^{-1}$  であり、ペルオキシダーゼ反応としてはかなり遅いことがわかった。CPO の基質に対する反応性は見出されず、CPO と同条件でのハロゲン導入反応も現在のところ確認されていない。CPO は遠位に酸塩基触媒として機能する Glu が存在するが、AOPE では保存されておらず、この点が低い活性に関係している可能性も考えられた。研究を進める上での問題点として AOPE の発現量はかなり少なく、不安定な酵素であったため、発現量の増加検討および性状解明を進めている。本研究は P450、haloperoxidase 以外のヘム-チオレート含有酵素のクローニングに成功し、ペルオキシダーゼ反応を持つことを確認した初めての例であり、菌体内酵素であるのも特筆すべき点であった。

### 第三章 P450foxyの変異導入による機能改変

還元酵素融合型 P450foxy は、脂肪酸水酸化反応を  $3000 \text{ min}^{-1}$  という高速で進行させるため、産業応用に期待が持たれる。さらにこの特性を維持したまま基質特異性を改変させることができれば産業的価値を大幅に高めることができる。本研究では、大腸菌発現系において QuickChange 法による変異体酵素を作出し、機能改変を行うと同時に P450foxy の基質認識に関与するアミノ酸残基についての知見を得ることを目的とした。高い相同性を持つ P450BM3 の結晶構造解析の結果から、F87 は脂肪酸の末端炭素と相互作用することが明らかになっており、ヘムの真上に位置することから基質が活性部位に侵入する障害になりうる事が予想されている。P450foxy においても F88 として保存されており、第一の標的として F88 の変異を試みた。脂肪酸水酸化活性は F88V、I 変異体を除いて著しく低下したが、トリデカン酸に対する  $K_a$  の変化は小さいことから F88 は脂肪酸結合に対する寄与は小さく、活性部位内部で脂肪酸鎖を固定することでヘム上に配位しやすくしていると考えられた。F88W 変異体はトリデカン酸に対する結合能を完全に消失しており、F88 の立体が基質侵入に大きな影響を与えることが確認された。F88G、A、V、I の変異体酵素の発現培養を行うと、培地中に青色の色素の蓄積が見られた。スペクトル比較より、色素をインディゴ色素であると同定し、変異体酵素がインドール酸化能を得たことが示唆された。F88A で最も多い色素の蓄積が認められたことから、活性部位内の立体が基質認識に影響していると考え、インディゴ色素の蓄積量を指標として部位特異的変異導入によるインドール

ル酸化能の向上を試みた。V83、V75、L264、L43 についての Saturation mutagenesis の結果、F88A 変異体の 8.3 倍の色素生成能を持つ F88A V83L 変異体を取得した。さらなる活性上昇および基質認識に関与する残基を調べるため、F88A 変異体を鋳型とした Error prone PCR による変異体スクリーニングを行った。2500 コロニーのスクリーニングにより、14 種の色素生成能を持った変異体を選出し配列を確認したところ、V83 または V75 が置換された変異体が多く見出され、P450foxy の基質認識においてこの二箇所のアミノ酸の影響が大きいことを再確認した。また P450 の活性に関与するとされる I ヘリックス領域にも変異が散見された。インドールに対する  $K_a$  測定の結果、F88A 変異体で TypeI シフトが観察されるようになり、結合親和性が上昇していることが明らかになった。F88A V83L 変異体は精製時にすでに TypeI スペクトル変化が起こっており、インドール添加によるスペクトル変化は観察されなかった。このことから、F88A V83L の高色素生産能はインドールにたいする強力な結合能に由来すると推測している。精製酵素をもちいた *in vitro* 活性試験ではインドール酸化活性を再現することができず、培養中の色素蓄積は大腸菌内の他の酵素の寄与が予想される。P450foxy 全長の結晶を得ることはできていないが、P450、還元酵素各ドメインの結晶化条件を見出すことができた。十分な反射が得られていないため、結晶化条件の最適化を行っている。

#### 第四章 総括

本研究において、*A. oryzae* ゲノム上に CPO 様ヘム-チオレート含有タンパク質 AOPE の存在を見出し、クローニングを試みた。*A. oryzae* 過剰発現株を作成することでリコンビナント AOPE の発現に成功し、部分精製酵素においてペルオキシダーゼ反応を示すことを見出した。現在までに知られている Haloperoxidase は全て菌体外分泌酵素であり、菌体内に同じくペルオキシダーゼ反応を示す類似酵素が機能しているという報告例はなく、その生理的意義に興味を持たれる。さらなる性状解明に向けて発現条件および効率的精製方法の検討を進めている。

P450foxy の変異体作製により、F88 一残基の置換によって基質特異性大きく変化するという興味深い現象がみられた。F88 によりかさ高い基質の侵入が妨げられていることが示唆され、F88 を小さなアミノ酸残基に置換することで脂肪酸水酸化活性を消失する代わりに、インドール酸化反応を付与することができた。部位特異的変異導入により P450foxy の V83、V75 のアミノ酸が基質認識に影響が大きいことが示された。融合 P450 のアライメント結果から、F88 周辺は保存度が高いのに対し、V83、V75 に相当する残基は置換されることが多く、生理的な基質の違いを示唆する可能性があると考えられる。十分な反射は得られていないものの、P450foxy のドメイン毎の結晶化条件を見出すことができた。今後、条件の精密化によって結晶構造を解明し、P450foxy の反応機構に関する知見を得ることを期待している。