

(別紙様式第3号)

学 位 論 文 要 旨

氏名: Oduor Henry Joseph Ogola

題目: Insight on Dye-decolorizing Peroxidase Family (DyP-type Peroxidases) from the
Molecular Analysis of a Novel Bacterial DyP from *Anabaena* sp. Strain PCC7120.
(*Anabaena* sp. strain PCC7120株由来新規バクテリアDyPの分子的解析から色素脱色型ペル
オキシダーゼファミリーDyP-タイプペルオキシダーゼの見解)

高い酸化還元電位をもつアントラキノン染料 (AQ) を効率的に酸化・脱色する能力から名づけられた色素脱色型ペルオキシダーゼ (DyPs) はム含有ペルオキシダーゼの新規ファミリーであり、様々な担子菌と一部の細菌で同定されている。DyPs は、古典的な植物ペルオキシダーゼと比較して、AQ に対する高い特異性、低い最適 pH、著しい活性部位の違い、ヘム結合モチーフの違い等から、注目を集めてきた。DyPs の現在までの理解は、主に広範囲に特徴づけられた植物病原性真菌類 *Thanetophorous cucumeris* Dec1 株由来の DyP に基づいており、DyP ファミリーの他のメンバーの情報は未知のままである。特に、細菌性の DyPs の研究は、ゲノム情報に基づく自動翻訳された一次構造情報に限定されている。本研究は、さらなる新規 DyP-タイプ酵素の構造機能相関と潜在的応用性を理解するために、情報の乏しい細菌性の DyP に焦点をあて、光合成のラン藻 *Anabaena* sp. PCC7120 ゲノムから、推定上の新規 DyP ホモログ (AnaPX) を同定し、クローン化し特徴づけたものである。

Anabaena sp. PCC7120 alr1585 が新規 DyP タイプペルオキシダーゼファミリー (EC 1.11.1.X) に属するヘム依存型ペルオキシダーゼをコード化していることが分かり、真菌 DyP ホモログと相同性が高く Class D の DyPs にグループ化された。alr1585 遺伝子は大腸菌にクローン化され、活性型として発現された。精製された酵素は、等電点 3.68、反応至適 pH 4.0、反応至適温度 35°C を持つ 53kDa の四量体タンパク質であった。AnaPX は、グアヤコール、4-アミノアンチピリン、ピロガロールなどの芳香族基質に広い特異性を示す、鉄プロトポルフィリン含有ヘムペルオキシダーゼであった。本酵素は Reactive Blue 5、Reactive Blue 4、Reactive Blue 114、Reactive Blue 119、Acid Blue 45 のようなアントラキノン (AQ) 染料を効率的に脱色した。Reactive Blue 5 に対する見かけ上の K_m と K_m/k_{cat} はそれぞれ 3.6 μM と $1.2 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ であり、 H_2O_2 に対する見かけ上の K_m と K_m/k_{cat} はそれぞれ 5.8 μM と $6.6 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ であった。対照的に、アゾ染料 (AZO) に対する AnaPX の脱色活性は、比較的低かったが、天然のレドックスメディエータの共存下で 2~50 倍と著しく加速された。特徴的であるのは、*T. cucumeris* Dec1 DyP がグアヤコールより RB5 へ著しく高い活性を示すのに対して、AnaPX はグアヤコールと RB5 の両方へ高い活性を示すことである。これはヘム活性部位へのグアヤコール分子のアクセスしやすさが異なっていることに起因しているものと考えられる。水素供与体と合成染料に対する広い特異性と触媒効率は、AnaPX が西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) や菌類の DyPs のより良い代替物として有望であることを示している。

AnaPX の 5 つの Met 残基を高いレドックス残基である Ile、Leu または Phe で置換した部位特異的変異導入は、 H_2O_2 に対する酵素安定性の改善のため行った。安定性の結果は、ヘムキャビティ変異体が、著しい安定性の増加を示した。驚くべきことに、M401F と M451I は、100 mM の H_2O_2 で、それぞれ、16% と 5% の活性を保持した。加えて、5mM の H_2O_2 で AQ と AZO への高い色素脱色活性を維持しており、野生型酵素(WT)よりヘム分解が遅いことが示された。AnaPX 安定化には、Met 残基の置換による、ヘムポケットの局所的な安定性の増加か、自己不活化電子伝達経路の制限のいずれかが必要であることが示唆された。

ペルオキシダーゼ触媒作用で Compound I 中間体形成のために保存された遠位のヒスチジンを持つ典型的ペルオキシダーゼとは対照的に、DyPs は代わりに全く新しい GXXDG のモチーフを形成する遠位のアスパラギン酸塩残基を持つ。植物ペルオキシダーゼの反応メカニズムにおける遠位の His の機構的役割と類似している DyPs の遠位 Asp の機能-構造上の役割を解明するために、いくつかの AnaPX Asp204 変異体が作製された。興味あることに、D204H はかなり触媒機能を示した。WT の Compound I 形成速度 ($k_1 \text{ app} = 1.18 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) は D204H 変異体 ($k_1 \text{ app} = 4.2 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) の約 103 倍速かった。両方の酵素で、特徴的な pH プロファイルが観察され、WT の Asp204 の pKa 値は、4.3 付近であると算出された。一方、D204H の His204 の pKa 値は 3.9 付近であった。EPR 解析は WT AnaPX と D204H がタンパクラジカル種として非局在化する Compound I ラジカルを形成することを示唆した。特に WT で、このラジカル生成に伴う分子内電子移動は顕著であった。HRP では、遠位 His、 H_2O_2 、遠位 Arg から成る安定な三者複合体が形成されるが、D204H では、His と Arg との間で正荷電反発が起こり、安定な三者複合体を形成するための水素結合の形成が困難となり、十分な酵素活性を発揮できないと考えられる。一方、WT AnaPX では、遠位 Asp と遠位 Arg との間で静電的相互作用による中和が起こり、安定な三者複合体を形成することができていると推察される。また、WT AnaPX は、HRP と比較して分子内長距離電子移動による Compound I ラジカルが効率よく生成し、分子表面残基がラジカル化され色素などの嵩高い基質を酸化することができるようになっている。