

アルドキシムデヒドラターゼのユニークな触媒機能

2017年6月

山田 優駿

アルドキシムデヒドラターゼのユニークな触媒機能

筑波大学大学院
生命環境科学研究科

博士（農学）学位論文

山田 優駿

目次

第 1 章	序論	P4-5
第 2 章	OxdA (H320D)の作成	P6-9
第 1 節	pET-oxdA(H320D)の作成	P10-14
第 3 章	Catalase 活性の検討	P15
第 1 節	酵素精製	P16-25
第 2 節	Catalase 活性の測定 (A ₂₄₀ 測定法)	P26-29
第 3 節	Catalase 活性の測定 (酸素電極法)	P30-33
第 4 章	Peroxidase 活性の検討	P34-35
第 1 節	Guaiacol を基質とした Peroxidase 活性の測定	P36-41
第 2 節	ABTS を基質とした Peroxidase 活性の測定	P42-47
第 5 章	Peroxygenase 活性の検討	P48
第 1 節	Peroxygenase 活性の測定	P49-55
第 6 章	新規 Peroxygenase 反応産物の同定	P56
第 1 節	新規反応産物の同定	P57-61
第 2 節	OxdA(H320D)の Peroxygenase 活性の測定	P62-67
第 7 章	還元電位の測定	P68
第 1 節	OxdA(WT, H320D, H320A の還元電位の測定)	P69-71
第 8 章	総括	
要約	酵素精製	P72-73
議論	Catalase 活性の測定 (A ₂₄₀ 測定法)	P74-78
総括	Catalase 活性の測定 (酸素電極法)	P79
参考文献		P80-86
謝辞		P87

第1章 序論

アルドキシムデヒドラターゼ(OxdA)は、当研究室におけるニトリル(R-C≡N)代謝に関する研究⁽¹⁻²¹⁾の中で発見された酵素である。本酵素は、かつてアクリロニトリルからアクリルアミド工業生産の第二世代菌として使用され、現在でも農薬の前駆体である 5-シアノバレルアミドを工業的に生産している *Pseudomonas chlororaphis* B23 株(以下、B23 株)⁽²²⁾のニトリル代謝クラスター (Fig. 1-1-1)の上流に発見された。当研究室での先行研究⁽²³⁻³³⁾で本酵素の諸性質を解析した結果、(i) サブユニット 1 mol 当たり 1 mol のプロトヘム IX を含むヘム酵素であり、(ii) 水溶液中での反応にも関わらず水を取り除き、(iii) 炭素-窒素 3 重結合を形成する反応を触媒することが明らかにされている。さらに共鳴 Raman 分光学的解析等により、本酵素は、(iv) ヘムの第 5 配位子が (Hemoglobin や Peroxidase などと同様に) His 残基であり、ヘムタンパク質としての特徴を持ち合わせながらも、(v) 触媒する反応は酸化還元反応ではなく、(vi)ヘムに基質が直接アプローチするなど、従来のヘムタンパク質では見られない希有な新現象を有することも判明している。

本研究ではOxdAが本来の脱水反応とは異なる反応を触媒するかに興味を持ち、酸化還元反応に着目し、カタラーゼ、ペルオキシダーゼ、ペルオキシゲナーゼ活性 (Fig. 1-1-2)を指標として検討することを目的とした。また、野生型 [OxdA(WT)]酵素だけでなく、変異酵素 (特にHis320を他のアミノ酸に置換した変異酵素)についても、それぞれの酵素活性を検討した。

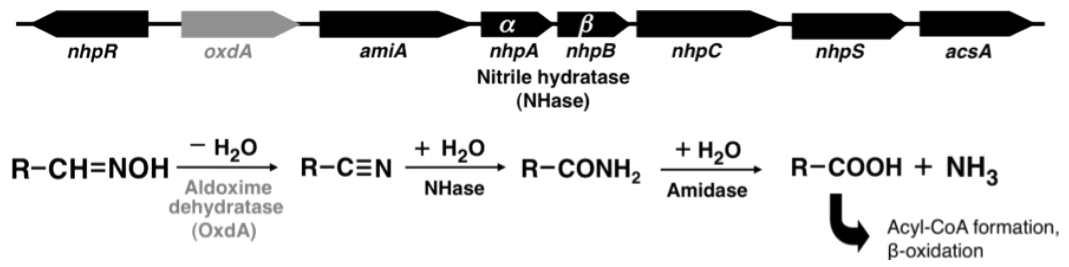


Fig. 1-1-1 ニトリル代謝クラスター

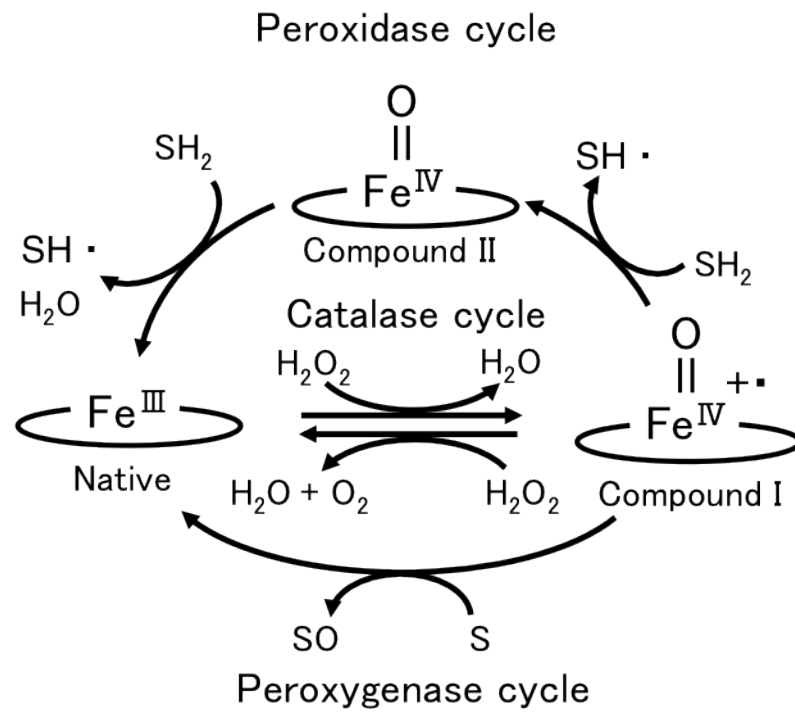


Fig. 1-1-2 Compound Iを利用した酸化還元反応

第二章 OxdA(H320D)の作成

諸言

本論文の目的である野生型 OxdA[OxdA(WT)]と変異 OxdA の酸化還元反応触媒能を比較する為に、変異型の OxdA を取得しなければならない。そこで、他のグループによる Myoglobin の研究内容⁽³⁴⁻³⁸⁾と、Chloroperoxidase の立体構造および作用機構⁽³⁹⁻⁴¹⁾と、先行研究により得られた *oxdA* の配列を元に、変異体 OxdA[OxdA(H320D)]の遺伝子配列を作成し、プラスミド pET24a(+)に挿入し、プラスミドベクター pET*oxdA(H320D)*を作成した。Chloroperoxidase の活性中心を模した同変異体は、Myoglobin の研究結果などから⁽⁴²⁻⁴³⁾、酸化還元反応触媒能の増強が期待される。

実験材料

1. 菌株

Escherichia coli DH10B

Escherichia coli BL21codonplus (DE3)RIL (Novagen)

2. プラスミドベクター

pET24a(+)

3. 培地

[2×YT 培地]

Bacto tryptone	16 g
Yeast extract	10 g
NaCl	5 g
<hr/>	
up to MilliQ	1L

調製後、オートクレーブによる滅菌を行った。

[2×YT 寒天培地]

2×YT 培地に 1.5 %の粉末寒天を加えたものを用いた。

4. 酵素

- ・ 制限酵素

Hind3(宝酒造)

Xba1(宝酒造)

- ・ PCR 用酵素

KOD-Neo DNAPolymerase (東洋紡)

- ・ その他の酵素

T7T DNA ligase(宝酒造)

5. 緩衝液

- ・ 酵素反应用緩衝液

10×M buffer(宝酒造)

10×K buffer(宝酒造)

10×T7T DNA Ligase buffer(宝酒造)

KOD-Neo buffer (東洋紡)

KOD-Neo buffer Ver.2 (東洋紡)

- ・ その他緩衝液

[50×TAE buffer]

Tris	24.2	g
Acetate	57.1	ml
0.5 M EDTA (pH 8.0)	100	ml
<hr/>		
up to MilliQ	1	L

[Big dye solution buffer]

Tris	4.895	g
2 M MgCl ₂	0.5	ml
<hr/>		
up to MilliQ	100	ml(pH 8.0)

[1×Running buffer for SDS-PAGE]

Tris	15.1	g
Glycine	94.0	g
SDS	5.0	g
<hr/>		
Up to D.W.	5.0	L

[1 M リン酸カリウム buffer(KPB) (pH 7.0)]

1 M K ₂ HPO ₄	38.5 ml
1 M KH ₂ PO ₄	61.5 ml
Total	100 ml

[2×pre sample buffer for SDS-PAGE]

250 mM Tris-HCl (pH 6.8)	25	ml
Sucrose	5	g
SDS	2	g
Bromophenol blue	2	μg
up to MilliQ	40	ml

[2×sample buffer for SDS-PAGE]

2×pre sample buffer for SDS-PAGE に 2-Mercaptoethanol を 1/4 量加えたもの（用事調製）。

6. 試薬

- ・アガロース電気泳動用試薬

[アガロースゲル]

計量した agarose が 1 % となるように 1×TAE Buffer を加え、オートクレーブにより溶解、ゲル板に流し込みコームを装着し固まったものを用いた。

Ethidium bromide

λ-*EcoR* I /HindIII digest

10×loading buffer(宝酒造)

- ・酵素反応用試薬

dNTP(宝酒造)

MgSO₄ (東洋紡)

Big Dye terminator (Applied Biosystems)

8. その他試薬・kit

high di formamide (Applied Biosystems)

Mag Extractor Genome (東洋紡)

Mag Extractor PCR& Gel Clean up (東洋紡)

Mag Extractor-plasmid (東洋紡)

X-gal

NaOAc (pH 5.2)

Ethanol

kanamycin (Km)

ampicilin (Amp)

Chloramphenicol (Cm)

IPTG

5×Protein Assay CBB solution

Bovine serum alubmin

L-(+)arabinose

Tetracycline

会社名が明記されていないものについては、全てナカライテスク、東京化成工業株式会社、和光純薬から購入したものを用了。

第 1 節 pET-*oxdA*(H320D)の作成

先行研究により得られた *oxdA* の配列を元に、変異体 OxdA[OxdA(H320D)]の遺伝子配列を作成し、プラスミド pET24a(+)に挿入し、プラスミドベクター pET*oxdA*(H320D)を作成した。

方法

a, PCR 増幅

pET-*oxdA* を鋳型に、T-GRADIENT (Biometra) を用いて PCR 増幅⁽⁴⁴⁾を行い、*oxdA* (H320D)の 0~320D と、320D~353 のインサートを作成した。増幅の確認はアガロース電気泳動により確認した。反応条件は Table 2-1-1、Table 2-1-2、Table 2-1-3 に示す。

プライマーは、

sense 鎖

PR-OxdA(H320D)-S(5'-CGGCTGTACGACGAGGTATCGGTCTCGGAC)

antisense 鎖

PR-OxdA(H320D)-AS(5'-GATACCTCGTCGTACAGCCGCAACTTTTTC)

とした。

Table 2-1-1 PCR mixtrure (sense)

pET OxdA	10 ng
T7P	1.5 μ l
H320D AS	1.5 μ l
neo 用 buffer	5 μ l
dNTP	5 μ l
10×KOD neo	5 μ l
25 mM MgSO ₄	3 μ l
<hr/>	
up to MilliQ	50 μ l

Table 2-1-2 PCR mixtrure 2 (antisense)

pET OxdA	10 ng
T7T	1.5 μ l
H320D S	1.5 μ l
neo 用 buffer	5 μ l
dNTP	5 μ l
10 \times KOD neo	5 μ l
25 mM MgSO ₄	3 μ l
up to MilliQ	50 μ l

Table 2-1-3 タイムプログラム

94 $^{\circ}$ C	2 min	} 30 cycles
94 $^{\circ}$ C	30 sec	
55 $^{\circ}$ C	30 sec	
68 $^{\circ}$ C	1 min	
4 $^{\circ}$ C		

アニーリング温度である 55 $^{\circ}$ Cの他に 50 $^{\circ}$ C、60 $^{\circ}$ Cに振って条件検討を行った。

b. アガロースゲル電気泳動

サンプルに 10 \times loading buffer を 10 分の 1 量加えたものをアガロースゲルに充填し泳動層にセット、30 分間電気泳動する。泳動層から取り出した後、0.1%ethidium bromide 溶液に浸し 10 分前後待ち、UV を照射し確認する。

c. ゲル抽出

増幅した *oxdA*(H320D)遺伝子 (0~320D、320D~353)と、pET24a(+)*プラスミド*ベクターをゲル抽出した。その際に Mag Extractor PCR&Gel clean up (東洋紡) kit を用いた。実験操作は以下の通りである。

[b]で増幅させた *oxdA*(H320D)と pET24a(+)*(一番大きいバンド)*の断片と共にアガロースゲル電気泳動し、切り出し細かくスライスし、同じエッペンドルフチューブに入れた。200 μ l の吸着液を加え、ゲルが完全に溶解するまで攪拌しながら室温に放置した。15 μ l の磁性ビーズを加え時々ボルテックスをしながら 2 分間室温に放置後、B/F 分離した。300 μ l の洗浄液を加え 10 秒間ボルテックスし、B/F 分離した。1 ml の 75% エタノールを加え 10 秒間ボルテックスを行い B/F 分離を行った。同様の操作をもう一度行った後に、遠心エバポレーター(Micro Vac MV-100 株式会社トミー)を用いて 5 分間乾燥させた。25 μ l の滅菌水を加え 10 秒間ボルテックス後 2 分間放置し、B/F 分離

により上清を回収した。DNA 濃度や純度は Nano Drop ND-1000 分光光度計を用いて確認した。

d. ライゲーション

ゲルから抽出した pET24a(+)と、*oxdA(H320D)*混合液をライゲーション反応により繋げた。Table 2-1-4 に示した反応溶液を用いて 16°Cで終夜インキュベートした。

Table 2-1-4 Ligation mixture

p ET24a(+), <i>oxdA(H320D)</i> 混合物		0.5 μ g
10×T4 DNA ligase buffer	2	μ l
T4 DNA ligase	0.5	μ l
up to MilliQ	20	μ l

e. 形質転換（塩化カルシウム法）

ライゲーション産物により *E. coli* DH10B 株の形質転換を行った。実験操作は以下の通りである。

コンピテンシーを高めた *E. coli* DH10B 株(OD₆₀₀=0.4 前後 100 μ l -80 °C保存)に[f]で作製したライゲーション産物を 5 μ l 加えた。0 °Cで約 1 時間静置後 45°Cで 90 秒間インキュベート（ヒートショック）し、0°Cで 5 分間放置した。750 μ l の 2×YT 培地を加え 37°Cで 2 時間インキュベート後、kanamycin（以下 Km）を終濃度 50 γ 、Chloramphenicol（以下 Cm）を終濃度 50 γ 加えた 2×YT 寒天培地に適量プレーティングした。37°Cで終夜培養後、生育したコロニーを pET24a(+)が導入され、かつ *oxdA(H320D)*がインサートとして入っている形質転換体として取得した。

f. プラスミド抽出

プラスミド抽出を Mag Extractor-plasmid（東洋紡）kit を用いて行った。形質転換体を 2×YT 液体培地 5 ml に植菌し、OD₆₀₀=1.0 前後になるまで 37°Cで培養した。培養液をエッペンドルフチューブに移し 6,000 rpm で 5 分間遠心分離し、上清を取り除いた。150 μ l の再懸濁液を加え 60 秒間ボルテックスし、150 μ l の溶解液を加え五回攪拌倒拌した後に氷上に 5 分間放置した。120 μ l の中和液を加え再度五回攪拌倒拌し氷上に 5 分間放置した。12,000 rpm 4°Cで 5 分間遠心分離し、上清を新しいエッペン

ドルフチューブに移した。500 μ lの吸着液、30 μ lの磁性ビーズIIを加え60秒間ボルテックスし、B/F分離を行った。次に、720 μ lの70%エタノールを加え30秒間ボルテックスを行い B/F 分離した。同様の操作をもう一度行なった後に、500 μ l の99.5%エタノールを加え30秒間ボルテックスし、B/F分離を行った。遠心エバポレーターにより15分間乾燥させ、50 μ lの滅菌水を加え60秒間ボルテックスした。12,000 rpmで5分間遠心分離した後にB/F分離により上清を回収し、プラスミドDNA抽出液とした。DNA濃度や純度はNano Drop ND-1000分光光度計を用いて測定した。

g. 配列の確認

DNA塩基配列測定用の反応溶液をTable 2-1-5のように調製し、Table 2-1-6に示す反応を行った。その後、以下に示すような塩基配列測定のための前処理を行った。

3 MのNaOAc(pH 5.2)を1 μ l加えよく混ぜ、よく冷えた99.5%エタノールを27.5 μ l(2.5倍量)加え、ピペティングし室温で2時間放置した。15,000 rpm 4°Cで15 min遠心分離し上清を完全に取り除いた。75 %エタノールを490 μ l以上加え軽く攪拌倒拌した後15,000 rpm 4°Cで1分間遠心分離を行った。同様の操作をもう一度行った後に、5分間遠心エバポレーターにより乾燥させた。high di formamideを15 μ l添加し、ピペティングを20回以上し、ボルテックスした。その後95°C 2分間boilし、氷上で急冷した。塩基配列測定用96well reaction plate(applied Biosystems)にアプライし、ABI PRISM 310(Applied Biosystems)により配列を解析した。

Table 2-1-5 sequence mixture

Sequencing mix	2.5	μ l
peT-oxdA(H320D)	0.1	μ g
primer (1.6 pmol/ μ l)	1	μ l
up to MilliQ	10	μ l

Sequencing mix は Big dye terminator(Applied Biosystems)50 μ l と Big Dye solution buffer 75 μ lを混合したもの。

primer は pET24a(+)のマルチクローニングサイトの外側の配列である HindIII (5'-AAGCTT)と Xba I (5'-TCTAGA)を用いた。

Table 2-1-6 タイムプログラム

Hot start		
96°C	2min	
96°C	10sec	} 20 cycles
50°C	5sec	
60°C	4min	
4°C		

13

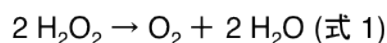
結果

Chloroperoxidase の立体構造を参考に設計した、変異体 OxdA[OxdA(H320D)]の遺伝子をプラスミド pET24a(+)に挿入し、プラスミドベクターpET*oxdA(H320D)*の作成に成功した。

第3章 Catalase 活性の検討

諸言

Catalase は H_2O_2 を水と酸素に分解する反応 (式 1) を触媒するヘム酵素である。



Catalase 反応機構の詳細は完全に解明されてはいないが、3 価のヘム (Native) と Compound I との間で行われる二段階反応であることが判明している (Fig. 3-1-1)。

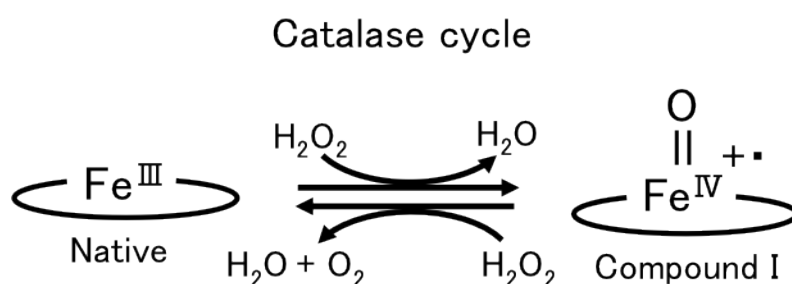
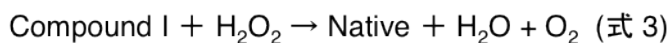


Fig. 3-1-1 Catalase の反応機構

第一の H_2O_2 分子が Catalase の活性中心へ入ると、ヘム付近に存在する遠位のヒスチジン (His) が一般酸塩基触媒として働き、 H_2O_2 からプロトンを引き抜き、ヘム鉄と過酸付加体を形成する。その後、過酸付加体の酸素-酸素結合がイオニックに開裂し、Compound I と水分子が生成する (式 2)。

続いて、第二の H_2O_2 分子が電子供与体として働き、Compound I を還元して、水と酸素分子を同時に生成する (式 3) と考えられている。



Catalase は、 H_2O_2 分子を消費して 3 価のヘム (Native) から Compound I と H_2O 分子を生成する反応 (式 2) と、 H_2O_2 分子が Compound I を 3 価のヘム (Native) に還元して H_2O と O_2 分子を生成する反応 (式 3) で 1 ターンオーバーする。結果として、Catalase は (式 1) の反応を触媒する。

Catalase の反応速度は非常に早く、細菌の持つ Catalase においては、その最大速度は 1 秒間に 54,000 から 833,000 回ものターンオーバーを示す。

OxdA(WT) および OxdA(H320D) の Catalase 活性の有無の検討にあたり、基質である H_2O_2 の減少をそれ自体が持つ 240 nm の吸収を測定することにより検出を試み、反応で生じる酸素の増加を酸素電極により検出を試みた。

第 1 節 酵素精製

諸言

Catalase 活性の検討に用いるために、OxdA の高純度精製を行った。

実験材料

1. 菌株

Escherichia coli BL21codonplus (DE3) RIL (Agilent Technologies, California, USA)

2. プラスミドベクター

pET-oxdA⁽²⁹⁾

pET-oxdA(H320A)⁽²⁹⁾

pET-oxdA(H320D) (第 2 章 1 節)

3. 培地

2×YT 培地

Bacto tryptone	16 g
Yeast extract	10 g
NaCl	5 g
<hr/>	
up to H ₂ O	1 L

調製後、オートクレーブによる滅菌を行った。

2×YT 寒天培地

2×YT 培地に 1.5%の粉末寒天を加えたものを用いた。

4. 緩衝液

1×Running buffer for SDS-PAGE	Tris	3 g	
	Glycine	19 g	PAGE
	SDS	1 g	
	up to D.W.	1 L	

1 M リン酸カリウム buffer (KPB) (pH 7.0)

1 M K_2HPO_4	38.5 ml
1 M KH_2PO_4	61.5 ml
Total	100 ml

2×pre sample buffer for SDS-PAGE

250 mM Tris-HCl (pH 6.8)	25 ml
Sucrose	5 g
SDS	2 g
Bromophenol blue	2 μ g
up to MilliQ	40 ml

2×sample buffer for SDS-PAGE

2×pre sample buffer for SDS-PAGE に 2-Mercaptoethanol を 1/4 量加えたもの（用事調製）。

Potassium chloride (KCl) (ナカライテスク株式会社、京都)

Ammonium sulfate (硫酸アンモニウム) (ナカライテスク株式会社)

5. 試薬

SDS-PAGE 用試薬

12% Resolving gel solution⁽⁴⁵⁾

MilliQ	15.7 ml
30% acrylamide mix	20.8 ml
1.5 M Tris-HCl (pH 8.8)	12.5 ml
10% SDS	0.5 ml
10% APS	0.5 ml
TEMED	0.02 ml
Total	50 ml

5% Stacking gel solution

MilliQ	6.8 ml
30% Acrylamide mixture	1.7 ml
1.0 Tris-HCl (pH 6.8)	1.25 ml
10% SDS	0.1 ml
10% APS	0.1 ml
TEMED	0.01 ml
Total	10 ml

ゲル作製方法

12% Resolving gel solution をゲル板に流し込み、飽和 Butanol を適量重層して約 30 分間固まるまで室温放置する。飽和 Butanol を取り除いた後に 5% Stacking gel solution を重層し、コームを入れて約 1 時間室温放置して SDS-PAGE 用 polyacrylamide gel を作製した。

30% acrylamide mixture

Acrylamide	73 g
<i>N, N'</i> -Methylenenisacrylamide	2 g
Up to MilliQ	250 ml

染色液

Methanol	450	ml
Acetate	90	ml
CBB R-250	2.5	g
up to MilliQ	1	L

脱色液

Methanol	450	ml
Acetate	90	ml
up to MilliQ	1	L

6. その他試薬

Kanamycin (Km) (ナカライテスク株式会社)

Chloramphenicol (Cm) (ナカライテスク株式会社)

IPTG (ナカライテスク株式会社)

5 × Protein Assay CBB Solution (ナカライテスク株式会社)

方法

a. 形質転換（塩化カルシウム法）

既に pET24a(+) に B23 株の *oxdA* インサート配列が組み込まれている pET-*oxdA*⁽²⁹⁾、pET-*oxdA*(H320A)⁽²⁹⁾ もしくは pET-*oxdA*(H320D) を用いて、*E. coli* BL21codonplus (DE3)RIL 株の形質転換を行った。実験操作は以下の通りである。

E. coli BL21codonplus (DE3)RIL 株のコンピテントセルに pET-*oxdA*、pET-*oxdA*(H320A) もしくは pET-*oxdA*(H320D) を加えた。0°C で約 1 時間静置後、45°C で 90 秒間インキュベート（ヒートショック）し、0°C で 5 分間放置した。750 μl の 2×YT 培地を加え 37°C で 2 時間インキュベート後、Km を終濃度 50 γ、Cm を終濃度 30 γ 加えた 2×YT 寒天培地に適量プレーティングした。37°C で終夜培養後、生育した形質転換体をピックアップした。

b. 培養・無細胞抽出液の調製

形質転換体を Km 50γ と Cm 30γ を加えた 5 ml の 2×YT 液体培地で 37°C、12

時間培養し、同様の抗生物質を加えた 500 ml の 2×YT 液体培地 (2 L 坂口フラスコ) に 1% 植菌した。37°C で 2 時間培養後に終濃度 0.1 mM になるように IPTG を加え、16°C で 3 日間培養した。これを 2 L 坂口フラスコで 12 本、6 L 培養を行った。

OxdA を高発現させた大腸菌培養液を 500 ml 遠沈管に加え、6,000 rpm、4°C で 10 分間遠心分離し菌体を回収した。菌体に 0.01 M KPB (pH 7.0) 100 ml を加え懸濁し、6,000 rpm、4°C で遠心分離し上清を除去し、-80°C で保存した。菌体破碎時には、約 40 g の菌体に対し 0.1 M KPB (pH 7.0) を総量が 240 mL になるように加えて懸濁し、INSONATOR 201M (株式会社久保田製作所、東京) を用いて超音波破碎した。破碎後、9,000 rpm、4°C で 30 分間遠心分離し、上清を無細胞抽出液として回収した。

c. 硫酸アンモニウム分画

硫酸アンモニウムで分画を行い、30-65% 硫酸分画サンプルを回収した。

得られた無細胞抽出液を氷上で冷やしたビーカーに注ぎ、マグネチックスターラーを用いて攪拌し、pH を調整しながら硫酸アンモニウムを徐々に加え、30% 飽和硫酸溶液とした。そのまま 30 分間攪拌した後、2 時間氷上で放置した。そのサンプルを 13,000 rpm、4°C で 15 分間遠心分離し、上清と沈殿物に分けた。

得られた上清の pH を調整しながら、65% 飽和になるように硫酸アンモニウムを徐々に加え、遠心後の沈殿物を 30-65% 飽和硫酸アンモニウム分画サンプルとした。

d. 透析

[第 3 章 第 1 節 方法 c] で得られたサンプルには大量に塩が含まれているため、以降に行う活性測定や SDS-PAGE の操作を阻害してしまう。それを防ぐために透析を行った。

得られた沈澱を 0.1 M KPB (pH 7.0) に溶かし、オートクレーブ処理によりグリセロールや保存剤を除去した透析膜 (ダイアライシスマンブレン、和光純薬) に入れ、冷却した 10 mM KPB (pH 7.0) がサンプル量に対して 100 倍量以上入ったビーカーに入れた。4°C 以下の低温下でスターラーにより攪拌しながら 2 時間以上透析した。外液を捨て、新しい 10 mM KPB (pH 7.0) を同じ量だけ加え、同様に攪拌しながら 2 時間以上透析した。同じ操作をもう一度繰り返し、透析後サンプルとした。

e. DEAE-Sephacel

[第 3 章 第 1 節 方法 d] で得たサンプルを DEAE-Sephacel (GE Healthcare UK Ltd.) により精製した。方法、溶出条件は Table 2-1-1 に準じた。

Table 2-1-1 DEAE-Sephacel カラム溶出条件

カラム	: DEAE-Sephacel (オープンカラム)
カラム容量 (CV)	: 200 ml
溶出条件	: 0-0.5 M KCl in 10 mM KPB (pH 7.0) / 5 CV リニアグラジエント
流速	: 1.2 ml/min

1 M KCl in 10 mM KPB (pH 7.0)による担体の wash、10 mM KPB (pH 7.0)による平衡化の後にサンプルをアプライし、1.5 CV の 10 mM KPB (pH 7.0)により非特異的タンパク質を除去後、溶出条件によりリニアグラジエント溶出した。溶出条件での溶出液を I フラクション 10 ml ずつフラクションコレクターにより回収した。

f. SDS-PAGE

[第3章 第1節 方法 e] で得た溶出後のフラクションを 10 μ l ずつ回収し、エッペンドルフチューブに入れた。それぞれに 2xsample buffer for SDS-PAGE を等量加えたものを 5 分間湯煎した。泳動槽にセットした SDS-PAGE 用 poly acrylamide gel に湯煎後のサンプルを各 7 μ l ずつ充填し、40 mA 定電流で 45 分間電気泳動した。泳動槽から取り出しゲルを染色液に浸して 10 分間振盪し、染色液を捨てた。その後は脱色液を用いて脱色されるまで同様の操作を行った。マーカースとして LMW (GE Healthcare UK Ltd.)を用いた。

g. 硫酸アンモニウム沈澱、透析

SDS-PAGE 後の結果から夾雑タンパク質が少ないフラクションを集めた後に、濃縮のために硫酸沈澱した。サンプルを氷上においたビーカーに注ぎ、マグネチックスターラーを用いて攪拌し、pH を調整しながら 70%飽和になるように硫酸を徐々に加えた。そのまま 30 分間攪拌した後、2 時間氷上で放置した。そのサンプルを 13,000 rpm、4°C で 15 分間遠心分離し、沈澱を回収した。回収サンプルを、[第3章 第1節 方法 d]に準じた操作で透析を行ったが、透析先バッファを疎水カラムにかけるために 20%飽和硫酸 in 10 mM KPB (pH 7.0)とした。

h. Butyl-Toyopearl 650M

[第3章 第1節 方法 g] で得たサンプルを、Butyl-Toyopearl 650M (東ソー株式会社、東京)により精製した。オープンカラムを用いた精製を行い、溶出条件は Table 2-1-2 に示した。

Table 2-1-2 Butyl-Toyopearl 650M カラム溶出条件

カラム	: Butyl-Toyopearl 650M (オープンカラム)
カラム容量 (CV)	: 200 ml
溶出条件	: 20-0%飽和硫酸 10 mM KPB (pH 7.0) / 5 CV リニアグラジエント
流速	: 1.3 ml/min

10 mM KPB (pH 7.0)による担体の wash、20%飽和硫酸 in 10 mM KPB (pH 7.0)による平衡化の後にサンプルをアプライし、1.5 CV の 20%飽和硫酸 in 10 mM KPB (pH 7.0)により非吸着タンパク質を除去後、溶出条件によりリニアグラジエント溶出した。サンプルアプライ後は全ての溶出液を1フラクション10 ml ずつフラクションコレクターにより回収し、SDS-PAGE [第3章 第1節 方法 f]を行った。

i. 硫酸アンモニウム沈澱、透析

[第3章 第1節 方法 h] で得たサンプルを濃縮、透析した。方法は[第3章 第1節 方法 d] に準じた。

j. RESOURCE Q

[第3章 第1節 方法 i] で得たサンプルを、RESOURCE Q (GE Healthcare UK Ltd.)により精製した。AKTA (GE Healthcare UK Ltd.)を用いた精製を行い、溶出条件は Table 2-1-3 に示した。

Table 2-1-3 RESOURCE Q カラム溶出条件

カラム	: RESOURCE Q (AKTA)
カラム容量 (CV)	: 6 ml
溶出条件	: 0-0.5 M KCl in 10 mM KPB (pH 7.0) / 5 CV リニアグラジエント
流速	: 2.5 ml/min

1 M KCl in 10 mM KPB (pH 7.0)による担体の wash、10 mM KPB (pH 7.0)による平衡化の後にサンプルをアプライし、5 CV の 10 mM KPB (pH 7.0)により非特異的タンパク質を除去後、溶出条件によりリニアグラジエント溶出した。サンプルアプライ後は全ての溶出液をフラクションコレクターにより回収し、SDS-PAGE [第3章 第1節 方法 f]を行った。

k. 限外ろ過

Amicon Ultra-15 30k NMWL (メルク株式会社、東京)を使用して、サンプルの濃

縮と脱塩を行った。

Amicon Ultra-15 30k NMWL は、使用前に内部をエタノールと MilliQ で洗浄を 2 回ずつ洗浄し、MilliQ を 3,000 g、4°C で 10 分間遠心分離する操作を 2 回行った。

[第 3 章 第 1 節 方法 j] で得たサンプルを Amicon Ultra-15 30k NMWL に注ぎ、4,500 g、4°C で 15 分間遠心分離する操作を行った。濃縮・脱塩が完了した後に、サンプルの平衡化のために 1 mM KPB (pH 7.0) を適量加えた後に、再び 4,500 g、4°C で 15 分間遠心分離する操作を 2 回行い、総量が 5 ml 以下になるようにした。

I. CHT Type1

[第 3 章 第 1 節 方法 k] で得たサンプルを、CHT Type1 (バイオ・ラッド ラボラトリーズ株式会社、東京) により精製した。AKTA を用いた精製を行い、溶出条件は Table 2-1-4 に示した。

Table 2-1-4 CHT Type1 カラム溶出条件

カラム	: CHT Type1 (AKTA)
カラム容量 (CV)	: 5 ml
溶出条件	: 1-100 mM KPB (pH 7.0) / 5 CV リニアグラジェント
流速	: 1 ml/min

500 mM KPB (pH 7.0) による担体の wash、1 mM KPB (pH 7.0) による平衡化の後にサンプルをアプライし、5 CV の 1 mM KPB (pH 7.0) によりより非特異的タンパク質を除去後、溶出条件によりリニアグラジェント溶出した。サンプルアプライ後は全ての溶出液をフラクションコレクターにより回収し、SDS-PAGE [第 3 章 第 1 節 方法 f] を行った。

m. 限外ろ過

[第 3 章 第 1 節 方法 i] で得たサンプルを限外ろ過により濃縮、透析した。方法は [第 3 章 第 1 節 方法 k] に準じたが、サンプルの平衡化には 50 mM KPB (pH 7.0) を使用した。

n. Hi Load 16/60 Superdex200 prepgrade

[第 3 章 第 1 節 方法 m] で得たサンプルを、Hi Load 16/60 Superdex200 prepgrade (GE Healthcare UK Ltd.) により精製した。AKTA を用いた精製を行い、溶出条件は Table 2-1-5 に示した。

Table 2-1-5 Hi Load 16/60 Superdex200 prepgrade

カラム	: Hi Load 16/60 Superdex200 prepgrade (AKTA)
カラム容量	: 120 ml
溶出条件	: 150 mM KCl in 50 mM KPB (pH 7.0) / 1.5 CV イソクラティック
流速	: 0.5 ml/min

MilliQ による担体の wash、150 mM KCl in 50 mM KPB (pH 7.0)による平衡化の後にサンプルをアプライし、同緩衝液で溶出した。サンプルアプライ後は全ての溶出液をフラクションコレクターにより回収し、SDS-PAGE [第3章 第1節 方法 f]を行った。

o. 限外ろ過

[第3章 第1節 方法 n] で得たサンプルを限外ろ過で濃縮、脱塩した。方法 [第3章 第1節 方法 k] に準じた。濃縮・脱塩後のサンプルは、100 μ l の 100 mM KPB (pH 7.0)を加えた後に回収し、-80°Cで保存した。

結果

精製後の SDS-PAGE の結果から、OxdA のアミノ酸配列からの推定分子量 (40.127) と一致した単一のバンドを確認した (Fig. 3-1-1)。この精製 OxdA および OxdA(H320D)と OxdA(H320A)を用いて、Catalase 活性の検討を行った。

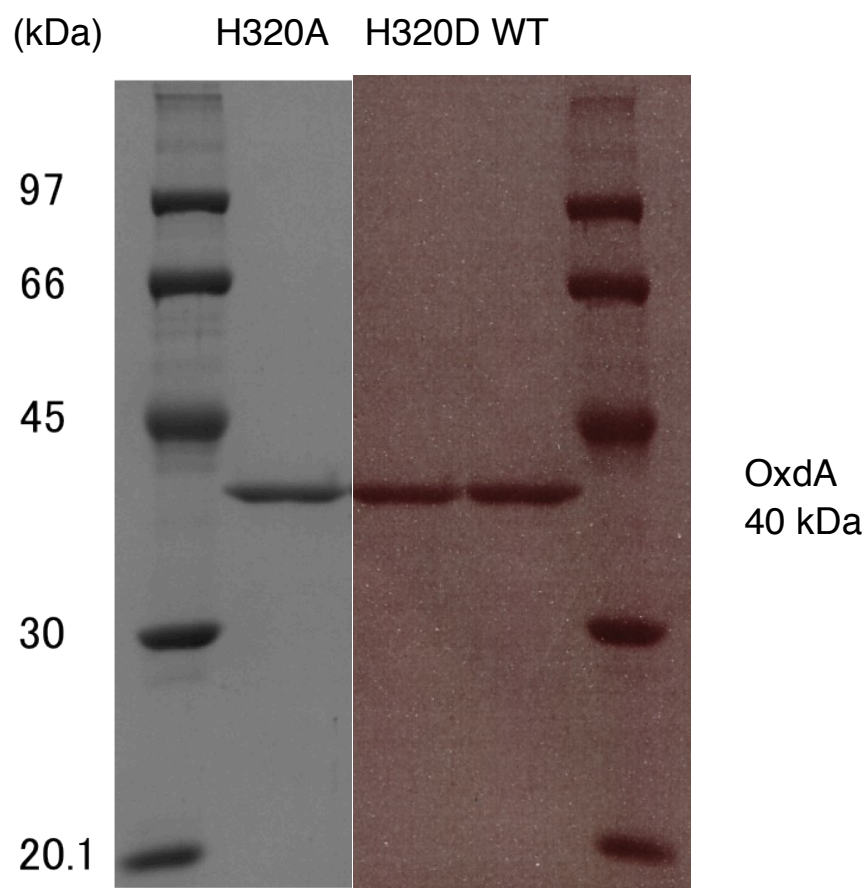


Fig. 3-1-1 精製後の OxdA(WT)、OxdA(H320D)、OxdA(H320A)の SDS-PAGE

第 2 節 Catalase 活性の測定 (A_{240} 測定法)

諸言

第 1 節で精製した OxdA を用いて、 H_2O_2 を基質とした Catalase 活性の測定を行った。 H_2O_2 が Abs_{240} に吸収波長を持つことを利用し、Catalase 反応液中の H_2O_2 を定量した。

実験材料

1. 酵素

OxdA (第 2 章 第 1 節の実験手法で得られたもの)

2. 緩衝液

1 M KPB (pH 7.0) (実験材料 第 3 章 第 1 節 実験材料を参照)

3. Catalase 反応試薬

30% H_2O_2 (ナカライテスク株式会社)

方法

a. タンパク質濃度の測定

精製 OxdA (WT, H320D, H320A) をブラッドフォード法により測定した。エッペンドルフチューブに 790 μ l の MilliQ と 10 μ l の 100 倍希釈したサンプルを加え転倒攪拌した。5 \times Protein Assay CBB Solution を 200 μ l 加え、再度、転倒混和し 15 分から 30 分静置した。コントロールとして、800 μ l の MilliQ と 200 μ l の 5 \times Protein Assay CBB Solution を加え、転倒攪拌後、同時間静置した。

その後、分光光度計 UV-1700 (株式会社 島津製作所、京都) により Abs_{595} の値を測定した。あらかじめ BSA 溶液により作製しておいた検量線を基に、タンパク質濃度を算出した。

b. Catalase 活性の測定

基質である H_2O_2 溶液と酵素溶液を用意し、酵素溶液 (4 μ M) を 50 μ l と、様々な濃度の H_2O_2 溶液 150 μ l で混合し、全容量が 200 μ l で酵素反応を行った。

基質溶液の濃度は、酵素反応液の終濃度に対して 4/3 倍に調製した。

酵素溶液と基質溶液は、作成時に終濃度が 100 mM になるように 1 M KPB (pH

7.0)を加え、調製した。

H₂O₂ 溶液を 150 μl をエッペンチューブにとり、20°Cで3分間、前保温した。その後、H₂O₂ 溶液を石英セルに移し、分光光度計 UV-1700 にセットし、酵素溶液を添加して反応を開始した。Abs₂₄₀ の測定を、0.5 秒間隔で5分間行った。

反応液の組成および条件を Table 2-2-1 に示した。

Table 3-2-1 Catalase 活性測定 1

Reaction mixture	Final conc.
KPB (pH7.0)	100 mM
H ₂ O ₂	10 mM
OxdA	4 μM
Total	200 μl

c. 比活性 (Specific activity)の算出

H₂O₂ に対する検量線を作製し、その検量線を基に H₂O₂ の減少量を算出した。

1 unit (U)の定義は、上記反応条件により1分間に1 μmol の H₂O₂ を減少させる酵素量とした。比活性は、U/mg で表した。

結果

Catalase 活性を測定した結果、基質である H_2O_2 の分解を示す Abs_{240} の減少を検出した (Fig. 3-2-1)。このことから、OxdA が Catalase 活性を有する事が初めて示唆された。

しかし、同方法では感度が低く、OxdA の弱い Catalase 活性の詳細な解析を行う事が出来なかった。また、反応の前後の反応溶液のスペクトルを測定したところ、(240 nm を含む)OxdA 自体の吸収が大幅に減少しており (Fig 3-2-2)、240 nm の減少は、Catalase の基質である H_2O_2 の分解を直接示すものではないことが分かった。このことから、同活性測定方法では、OxdA の Catalase 活性を測定できない事がわかった。

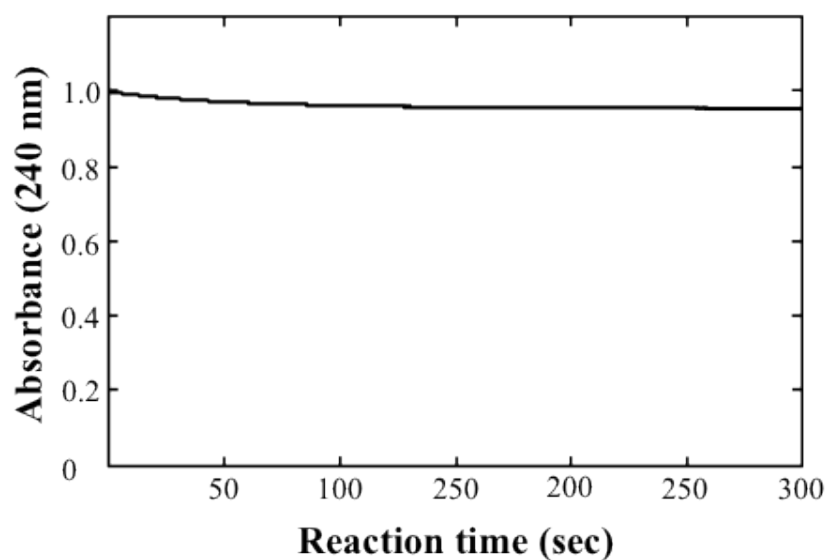


Fig. 3-2-1 OxdA の Catalase 活性測定

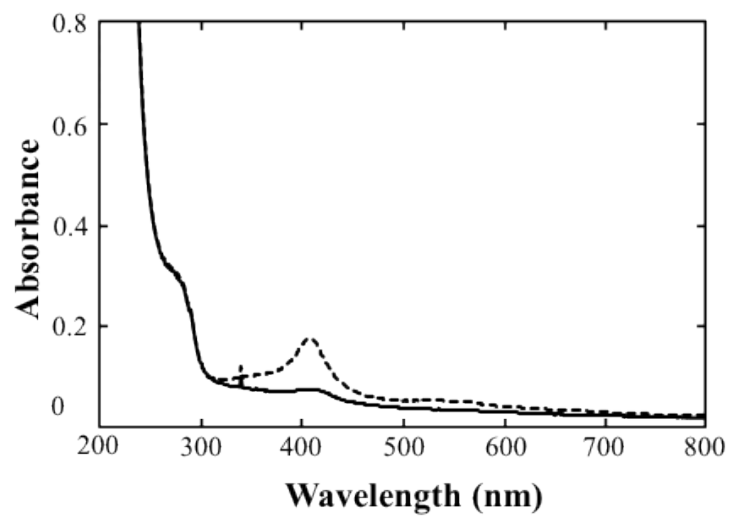


Fig. 3-2-2 OxdA の Catalase 反応溶液のスペクトル
反応前(破線)、反応 3 分後(実践)

第3節 Catalase 活性の測定 (酸素電極法)

諸言

第2節の H_2O_2 の吸収である A_{240} を測定する手法では、OxdA の弱い Catalase 活性を測定する事ができなかった。そこで、酸素電極を用い Catalase 反応により生じる酸素を定量することで、OxdA [OxdA(WT)]、およびその変異体 [OxdA(H320A)、OxdA(H320D)] について、Catalase 活性の測定を行った。また、様々な H_2O_2 濃度で活性測定を行い、それぞれの Catalase 活性のキネティックパラメーターを算出した。

実験材料

1. 酵素

OxdA (第3章 第1節の実験手法で得られたもの)

2. 緩衝液

1 M KPB (pH 7.0) (実験材料 第3章 第1節 実験材料を参照)

3. Catalase 反応試薬

30% H_2O_2 (ナカライテスク株式会社)

4. 酸素電極 (Hansatech Inst. Ltd)

方法

a. タンパク質濃度の測定

精製 OxdA をブラッドフォード法により測定した。(第3章第2節 方法を参照)

b. Catalase 活性の測定

基質である H_2O_2 溶液と酵素溶液を用意し、酵素溶液 (2 μM) を 200 μl と、様々な濃度の H_2O_2 溶液 800 μl で混合し、全容量が 1000 μl で酵素反応を行った。

基質溶液の濃度は、酵素反応液の終濃度に対して 5/4 倍に調製した。

酵素溶液と基質溶液は、作成時に終濃度が 100 mM になるように 1 M KPB (pH 7.0) を加え、調製した。

H_2O_2 溶液を 800 μl を酸素電極のセルにとり、30°C で 3 分間、前保温し、酸素

量の安定を待った。

その後、酸素量の測定を開始し、30秒たった時点で、酵素溶液 200 μ l をセルに移し、反応を開始した。

反応液の組成および条件を Table 3-3-1 に示した。

Reaction mixture	Final conc.
KPB (pH7.0)	100 mM
H ₂ O ₂	10~400 mM
OxdA	0, 2 μ M
OxdA(H320D)	0, 0.5 μ M
OxdA(H320A)	0, 1 μ M
Total	1000 μ l

d. 比活性 (Specific activity)の算出

1 unit (U)の定義は、上記反応条件により1分間に1 μ mol の H₂O₂ を減少させる酵素量とした。比活性は、U/ mg で表した。

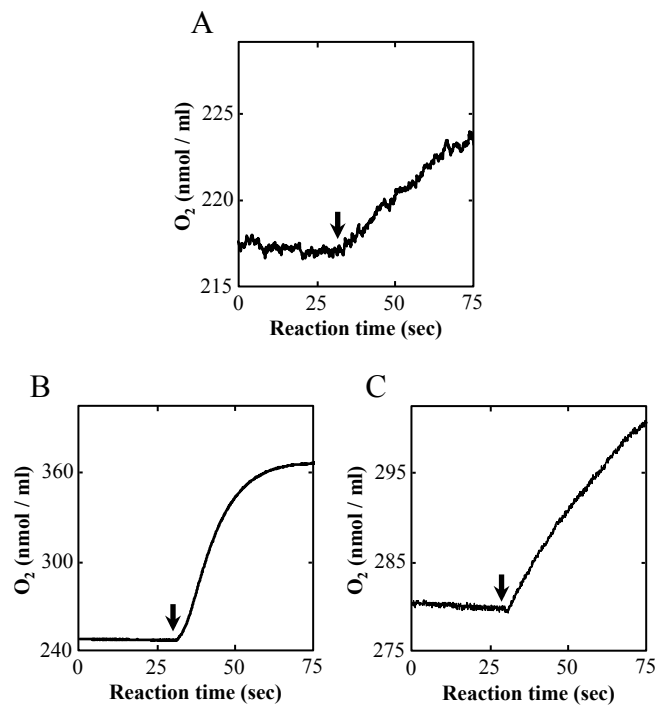


Fig. 3-3-1 OxdA(WT, H320D, H320A)の Catalase 活性測定
OxdA(WT) (A)、OxdA(H320D) (B)、OxdA(H320A) (C)

e. キネティックパラメーターの決定

各種 OxdA (WT, H320D, H320A)について、様々な濃度の H_2O_2 を用い、活性測定を行った。

方法は関しては[第3章 第3節 方法 b]に準じた。

得られた比活性を Sigma Plot で解析し、キネティックパラメーターを決定した。

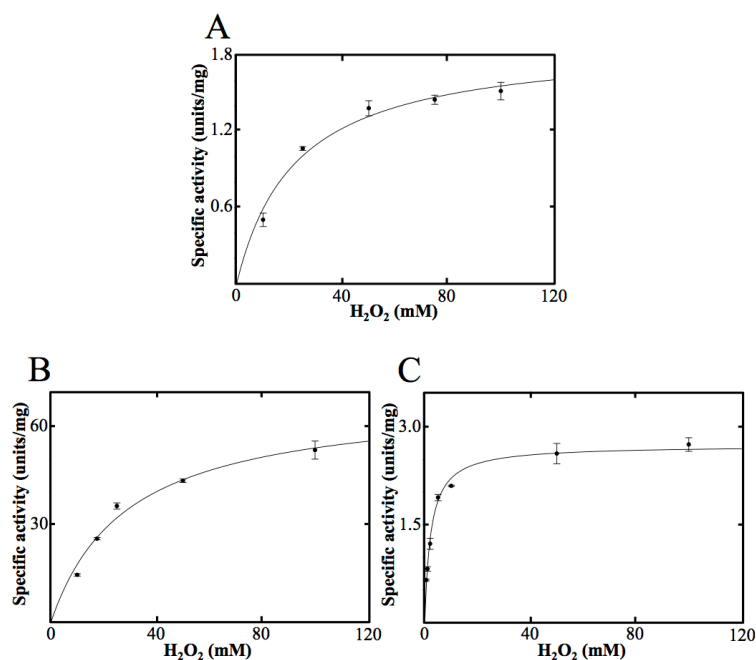


Fig 3-3-2 ABTS を基質とした OxdA(WT, H320D, H320A)の peroxidase 活性のミカエレスメンテン式

OxdA(WT) (A)、OxdA(H320D) (B)、OxdA(H320A) (C)

結果

Catalase 活性を測定した結果、産物である O₂ の生産を検出した (Fig. 3-3-1)。このことから、同活性測定法においても OxdA の Catalase 活性が認められた。また、様々な H₂O₂ 条件下で、活性測定を行い、OxdA の Catalase 活性のキネティックパラメーターを決定した結果 (Fig 3-3-2)、OxdA の Catalase 活性の V_{max} は 1.9 U/mg、K_m は 22 mM となり、既存の Catalase 数千倍~数万倍遅い結果となった (Table 3-3-2)。

つづいて、Chloroperoxidase の構造を参考に作成した酸化還元活性強化型変異体、OxdA(H320D)について、Catalase 活性を検討した結果、同活性の検出に成功した。さらに、キネティックパラメーターを決定したところ、V_{max} は 69 U/mg、K_m は 29 mM となり、V_{max} は野生型 OxdA [OxdA(WT)]の 30 倍以上高く、活性の増強を確認した。一方、K_m は OxdA(WT)とあまり変わらず、基質との親和性の差はあまりなかった (Table 3-3-2)。

最後に OxdA 本来の触媒活性である Aldoximedehydratase 活性を持たない変異体、OxdA(H320A)について、Catalase 活性を検討した結果、同活性の検出に成功した。さらに、キネティックパラメーターを決定したところ、V_{max} は 2.7 U/mg、K_m は 2.3 mM となり、V_{max} は OxdA(WT)に比べ少し高い程度になった。一方、K_m 値は OxdA(WT)や OxdA(H320D)より約 10 倍低く、基質との親和性が上昇したことが確認された (Table 3-3-2)。

Table 3-3-2 OxdA (WT, H320D, H320A)の Catalase 活性

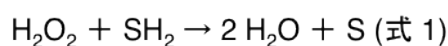
Enzyme	K _m (mM)	V _{max} (units/mg)	k _{cat} (s ⁻¹)	k _{cat} /K _m (s ⁻¹ mM ⁻¹)
OxdA(WT)	22 ± 4	1.9 ± 0.1	1.3 ± 0.1	0.057
OxdA(H320D)	29 ± 4	69 ± 4	46 ± 3	1.6
OxdA(H320A)	2.3 ± 0.2	2.7 ± 0.1	1.8 ± 0.0	0.80

第 4 章 Peroxidase 活性の検討

諸言

第 3 章で OxdA の Catalase 活性が認められたことから Peroxidase 活性の検討を行った。

Peroxidase は(式 1)の反応を触媒する酵素である。



その反応機構は、Catalase と同様に H_2O_2 による Compound I の形成から始まる(式 2)。Compound I 形成後、Compound I が基質を一電子酸化して Compound II を形成し(式 3)、さらに Compound II が基質を一電子酸化して Native の状態へ戻る(式 4)。2 段階の反応過程で 2 分子の SH_2 (基質)が一電子酸化され、2 分子の $\text{SH}\cdot$ となる。(Fig. 3-1)

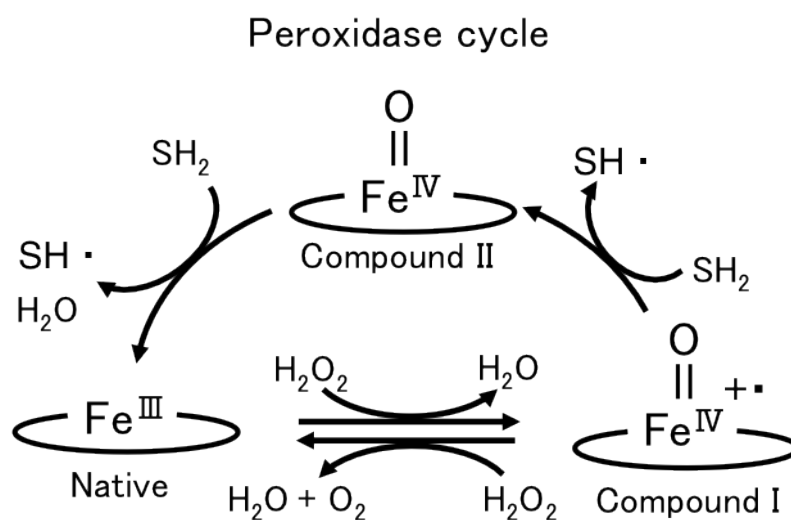
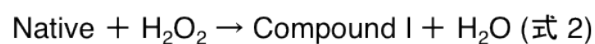
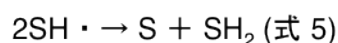


Fig. 3-1 Peroxidase の反応機構

Peroxidase 反応により生成された 2 分子の $\text{SH}\cdot$ は、(式 5)の反応を行うと考えられている。



Peroxidase は、3 価のヘム (Native)からの Compound I の形成 (式 2)に始まり、Compound I から Compound II、Compound II から Native の状態にもどる 2 段階の反応過程で 2 分子の基質の一電子酸化を行い (式 3) (式 4)、1 ターンオーバーとなる。

S (基質)が一電子酸化されて生成された 2 分子の SH \cdot は、(式 5)の反応を行うと考えられ、結果として Peroxidase は、(式 1)の反応を触媒する。

Peroxidase 活性の検討を行うにあたり、Guaiacol⁽⁴⁶⁾および ABTS⁽⁴⁶⁾を基質とした 2 種類の Peroxidase 活性の測定を行った。

第1節 Guaiacol を基質とした Peroxidase 活性の測定

諸言

Guaiacol と H_2O_2 を基質とした Peroxidase 活性の測定を行った。

Peroxidase 反応によって生じる Tetraguaiacol に特徴的な 470 nm の吸光度の増加量を定量して本活性を測定した⁽⁴⁶⁾ (Fig. 4-1-1)。

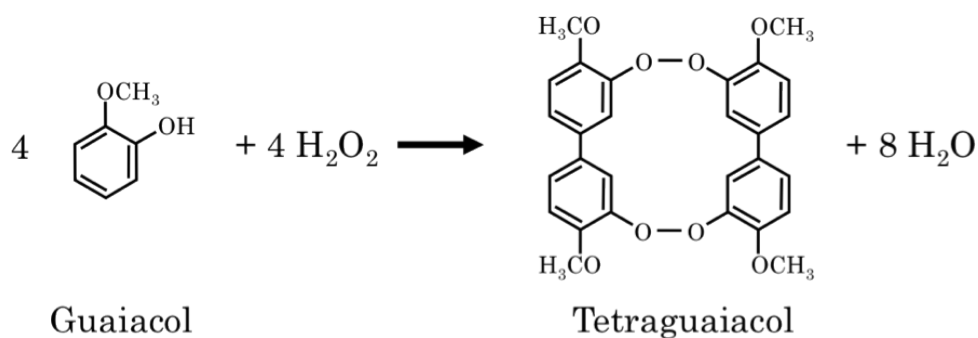


Fig. 4-1-1 Guaiacol と H_2O_2 を基質とした Peroxidase 反応

実験材料

1. 酵素

OxdA(WT) (第3章 第1節の実験手法で得られたもの)

OxdA(H320D) (第3章 第1節の実験手法で得られたもの)

OxdA(H320D) (第3章 第1節の実験手法で得られたもの)

2. 緩衝液

1 M KPB (pH 7.0) (実験材料 第3章 第1節 実験材料を参照)

3. Peroxidase 反応試薬

Guaiacol (東京化成工業、東京)

30% H_2O_2 (ナカライテスク株式会社)

4. UV-1700 (分光光度計) (Shimadzu Co.)

方法

a. タンパク質濃度測定

方法に関しては[第3章 第2節 方法 a]に準じた。

b. 吸光度測定

Guaiacol と H_2O_2 の2つの基質溶液と酵素溶液を用意し、酵素溶液が 50 μl 、 H_2O_2 溶液が 50 μl 、Guaiacol 溶液が 100 μl で、全容量が 200 μl の酵素反応液とした。

基質溶液の濃度は、酵素反応液の終濃度に対して H_2O_2 は4倍、Guaiacol は2倍に調製した。酵素溶液の濃度は、酵素反応液の終濃度に対して4倍に調製した。酵素溶液と基質溶液は、作成時に 1 M KPB (pH 7.0) を加え、終濃度が 100 mM になるよう調製した。

H_2O_2 溶液を 50 μl 、Guaiacol 溶液を 100 μl をエッペンチューブ内で混合した後、20°C で3分間、前保温した。 H_2O_2 と Guaiacol の混合基質溶液を石英セルに入れ、分光光度計 UV-1700 にセットし、酵素溶液を添加して反応を開始した。 Abs_{470} の測定を、0.2 秒間隔で2分間行った。

Table 4-1-1 Peroxidase 活性測定 (基質: Guaiacol)1

Reaction mixture	Final conc.
KPB (pH7.0)	100 mM
H_2O_2	100 mM
Guaiacol	0.01~10 mM
OxdA	0, 1 μM
OxdA(H320D)	0, 0.25 μM
Total	1000 μl

c. 比活性 (Specific activity)の算出

[第4章 第1節 方法 b]の結果から反応時間と吸光度のグラフを作成し、Tetraguaiacol のモル吸光係数 ($\epsilon_{470} = 3.8 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)⁽²³⁾ を使用して Tetraguaiacol の生成量を計算した。

1 unit (U)の定義は、上記反応条件により1分間に 0.25 μmol の Tetraguaiacol を生成する酵素量とした。比活性は、U/mg で表した。これは、1分間に 1 μmol の H_2O_2 を減少させる酵素量と等しい。

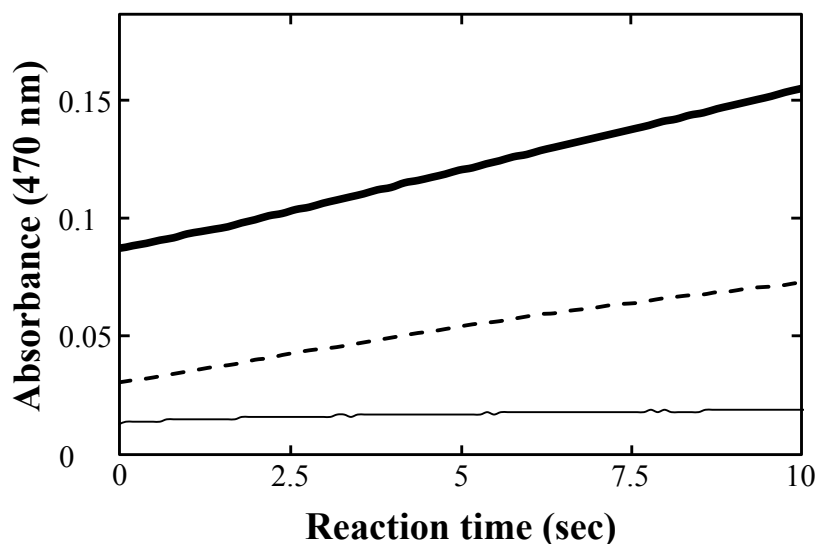


Fig. 4-1-2 Guaiacol を基質とした OxdA (WT, H320D, H320A)の Peroxidase 活性測定

OxdA(WT) (太線)、OxdA(H320D) (破線)、OxdA(H320A) (細線)

d. 最適な H_2O_2 濃度の測定

OxdA(WT)、OxdA(H320D)、OxdA(H320A)共に、peroxidase 活性が検出されたため (Fig. 4-1-2)、より詳細な解析を行う前に、基質の1つである H_2O_2 の最適濃度の測定を行った。測定には、Table 4-1-2 の組成の反応溶液を用い、様々な濃度の H_2O_2 濃度条件下で活性測定を行った。

方法は関しては[第4章 第2節 方法 b]に準じた。

最も高い活性を示した H_2O_2 濃度を、最適濃度とし、各酵素の Guaiacol を基質とした Peroxidase 活性のキネティックパラメーターの決定に用いた。

Table 4-1-2 Peroxidase 活性測定 (基質: Guaiacol)2

Reaction mixture	Final conc.
KPB (pH7.0)	100 mM
H_2O_2	10~400 mM
Guaiacol	10 mM
OxdA (WT, H320A)	0, 1 μ M
OxdA(H320D)	0, 0.25 μ M
Total	1000 μ l

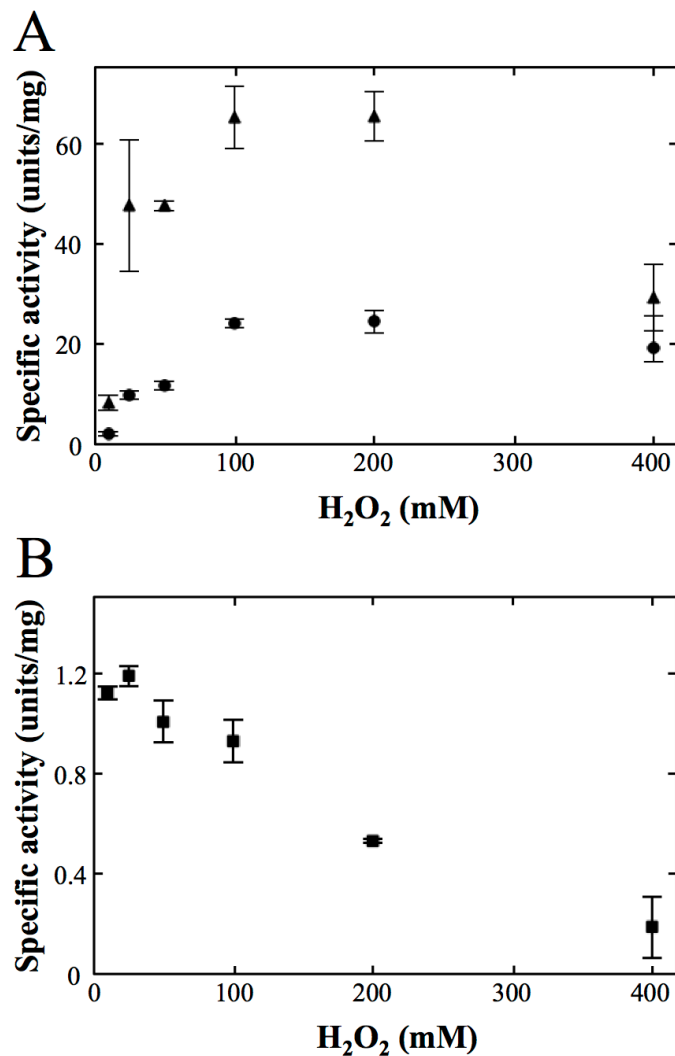


Fig. 4-1-3 OxdA (WT, H320D, H320A)の Guaiacol を基質とした peroxidase 反応における最適 H₂O₂ 濃度の測定
 上 OxdA(WT) (黒丸)、OxdA(H320D)(黒三角)、下 OxdA(H320A)

e. キネティックパラメーターの決定

最適な H₂O₂ 濃度の測定の結果、OxdA (WT, H320D, H320A)の反応液の H₂O₂ の終濃度を 100 mM、OxdA(H320A)は 25 mM とし、様々な濃度の Guaiacol を用い、活性測定を行った。

方法は関しては[第 4 章 第 1 節 方法 b]に準じた。

得られた比活性を Sigma Plot で解析し、キネティックパラメーターを決定した。

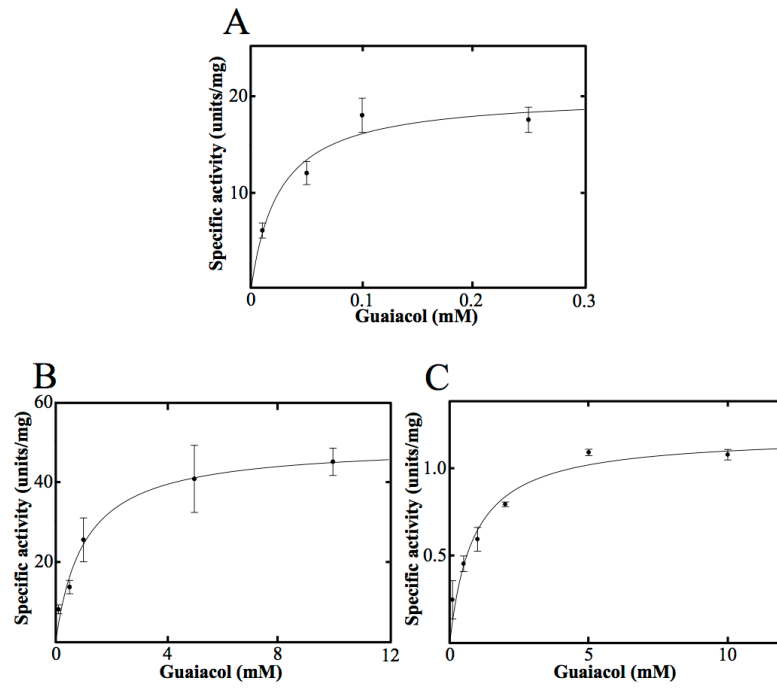


Fig 4-1-4 Guaiacol を基質とした OxdA(WT, H320D, H320A)の Peroxidase 活性の
 ミカエレスメンテン式
 OxdA(WT) (A)、OxdA(H320D) (B)、OxdA(H320A) (C)

結果

OxdA(WT)の Peroxidase 活性を測定した結果、産物である Tetraguaiacol の生産を示す Abs₄₇₀ の増加を確認した (Fig. 4-1-2)。このことから、OxdA の Peroxidase 活性を初めて検出することに成功した。また、OxdA(H320D)と OxdA(H320A)においても、同様に Tetraguaiacol の生産を示す Abs₄₇₀ の増加を確認し、Peroxidase 活性を検出することにも成功した (Fig. 4-1-2)。

さらに、様々な H₂O₂ 条件下で、活性測定を行い、基質として guaiacol を用いた Peroxidase 活性測定における、最適な H₂O₂ 濃度を測定した結果、OxdA(WT)、OxdA(H320D)共に 100 mM、OxdA(H320A)は 25 mM が最適濃度であると判明した (Fig. 4-1-3)。

つづいて、最適濃度の H₂O₂ および、様々な guaiacol 濃度条件下で活性測定を行い、キネティックパラメーターを決定した結果 (Fig 4-1-4)、OxdA(WT)の V_{max} は 20 U/mg、 K_m は 0.026 mM となり、OxdA(H320D)の V_{max} は 50 U/mg、 K_m は 1.0 mM となり、OxdA(H320A)の V_{max} は 1.2 U/mg、 K_m は 0.84 mM となった。OxdA(H320D)の V_{max} は野生型 OxdA [OxdA(WT)]の 2 倍以上高く、OxdA(H320D)の変異による活性増強を確認した。一方、OxdA(H320D)の K_m は OxdA(WT)より約 40 倍高く、OxdA(H320D)の変異により、基質である guaiacol との親和性が劇的に下がった (Table 4-1-3)。また、OxdA(H320A)の V_{max} は、OxdA(WT)より約 20 倍低く、H320A の変異によって、著しく Peroxidase 活性が阻害されたことを示した。さらに、OxdA(H320A)の K_m は OxdA(WT)より約 30 倍高く、OxdA(H320A)の変異により、基質である guaiacol との親和性が劇的に下がった (Table 4-1-3)。

Table 4-1-3 OxdA (WT, H320D, H320A)の Peroxidase 活性 (基質: Guaiacol)

Enzyme	K_m (mM)	V_{max} (units/mg)	k_{cat} (s ⁻¹)	k_{cat}/K_m (s ⁻¹ mM ⁻¹)
OxdA(WT)	0.026 ± 0.010	20 ± 2	14 ± 1	530
OxdA(H320D)	1.0 ± 0.4	50 ± 5	33 ± 3	32
OxdA(H320A)	0.84 ± 0.17	1.2 ± 0.1	0.81 ± 0.05	0.97

第2節 ABTS を基質とした Peroxidase 活性の測定

諸言

2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid ammonium salt (ABTS)と H_2O_2 を基質とした Peroxidase 活性の測定を行った。

Peroxidase 反応によって生じる ABTS radical に特徴的な 430 nm の吸光度の増加量を定量して本活性を測定した⁽⁴⁶⁾ (Fig. 4-2-1)。

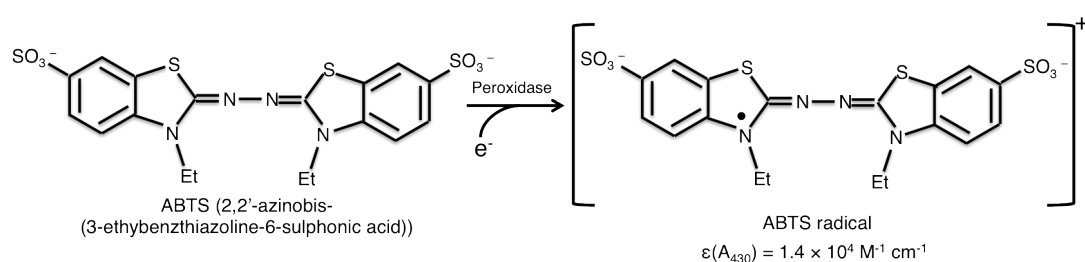


Fig. 4-2-1 ABTS と H_2O_2 を基質とした Peroxidase 反応

実験材料

1. 酵素

OxdA(WT) (第3章 第1節の実験手法で得られたもの)

OxdA(H320D) (第3章 第1節の実験手法で得られたもの)

OxdA(H320A) (第3章 第1節の実験手法で得られたもの)

2. 緩衝液

1 M KPB (pH 7.0) (実験材料 第3章 第1節 実験材料を参照)

3. Peroxidase 反応試薬

ABTS (東京化成工業、東京)

30% H_2O_2 (ナカライテスク株式会社)

4. UV-1700 (分光光度計) (Shimadzu Co.)

方法

a. タンパク質濃度測定

方法に関しては[第3章 第2節 方法 a]に準じた。

b 吸光度測定

ABTS と H₂O₂ の2つの基質溶液と酵素溶液を用意し、酵素溶液が 50 μl、H₂O₂ 溶液が 50 μl、ABTS 溶液が 100 μl で、全容量が 200 μl の酵素反応液とした。

基質溶液の濃度は、酵素反応液の終濃度に対して H₂O₂ は 4 倍、ABTS は 2 倍に調製した。酵素溶液の濃度は、酵素反応液の終濃度に対して 4 倍に調製した。酵素溶液と基質溶液は、作成時に 1 M KPB (pH 7.0) を加え、終濃度が 100 mM になるよう調製した。

H₂O₂ 溶液を 50 μl、ABTS 溶液を 100 μl をエッペンチューブ内で混合した後、20°C で 3 分間、前保温した。H₂O₂ と ABTS の混合基質溶液を石英セルに入れ、分光光度計 UV-1700 にセットし、酵素溶液を添加して反応を開始した。Abs₄₃₀ の測定を、0.2 秒間隔で 2 分間行った。

Table 4-2-1 Peroxidase 活性測定 (基質: ABTS)1

Reaction mixture	Final conc.
KPB (pH7.0)	100 mM
H ₂ O ₂	100 mM
ABTS	0.01~5 mM
OxdA	0, 1 μM
OxdA(H320D)	0, 0.25 μM
Total	200 μl

c. 比活性 (Specific activity) の算出

[第4章 第1節 方法 b]の結果から反応時間と吸光度のグラフを作成し、ABTS radical のモル吸光係数 ($\epsilon_{430} = 1.4 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)⁽²³⁾ を使用して ABTS radical の生成量を計算した。

1 unit (U) の定義は、上記反応条件により 1 分間に 1 μmol の ABST radical を生成する酵素量とした。比活性は、U/mg で表した。これは、1 分間に 1 μmol の H₂O₂ を減少させる酵素量と等しい。

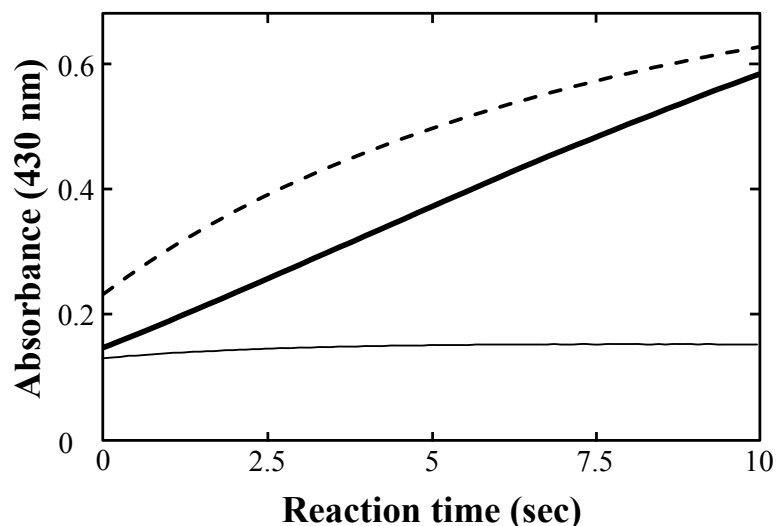


Fig. 4-2-2 ABTS を基質とした OxdA (WT,H320D, H320A)の Peroxidase 活性測定
OxdA(WT) (太線)、OxdA(H320D) (破線)、OxdA(H320A) (細線)

d. 最適な H_2O_2 濃度の測定

OxdA(WT)、OxdA(H320D)、OxdA(H320A)共に、Peroxidase 活性が検出されたため (Fig. 4-2-2)、より詳細な解析を行う前に、基質の1つである H_2O_2 の最適濃度の測定を行った。測定には、Table 4-1-2 の組成の反応溶液を用い、様々な濃度の H_2O_2 濃度条件下で活性測定を行った。

方法は関しては[第4章 第2節 方法 b)]に準じた。

最も高い活性を示した H_2O_2 濃度を、最適濃度とし、各酵素の ABTS を基質とした Peroxidase 活性のキネティックパラメーターの決定に用いた。

Table 4-2-2 Peroxidase 活性測定 (基質: ABTS)2

Reaction mixture	Final conc.
KPB (pH7.0)	100 mM
H_2O_2	5~100 mM
ABTS	5 mM
OxdA	0, 1 μ M
OxdA(H320D)	0, 0.25 μ M
Total	200 μ l

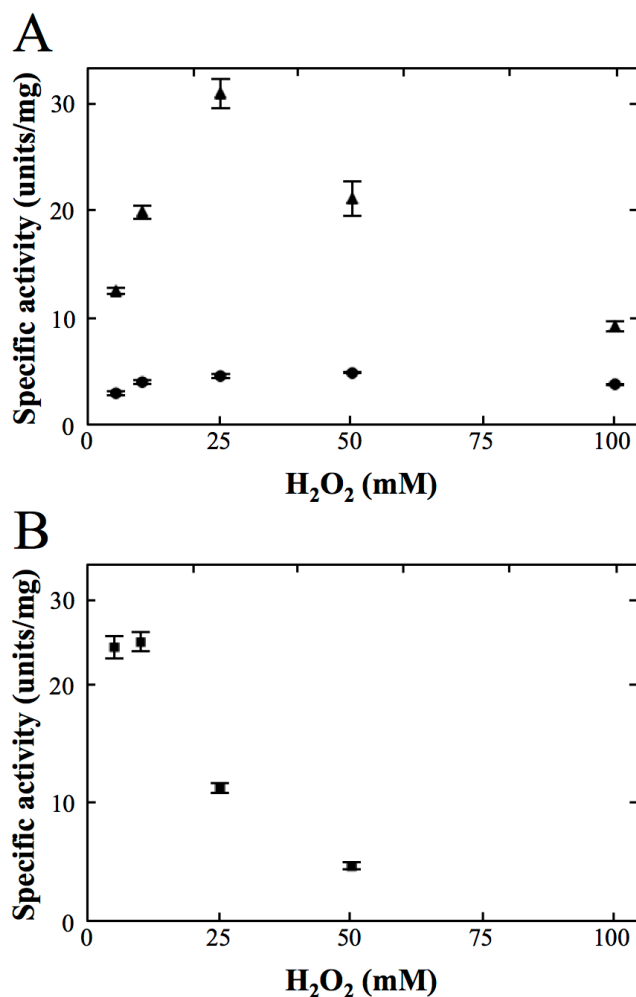


Fig. 4-2-3 OxdA (WT, H320D、H320A)の ABTS を基質とした peroxidase 反応における最適 H₂O₂ 濃度の測定
 上 OxdA(WT) (黒丸)、OxdA(H320D)(黒三角)、下 OxdA(H320A)

f. キネティックパラメーターの決定

最適な H₂O₂ 濃度の測定の結果、反応液の H₂O₂ の終濃度を 25 mM、および 10 mM とし、様々な濃度の ABTS を用い、活性測定を行った。

方法は関しては[第 4 章 第 2 節 方法 b)]に準じた。

得られた比活性を Sigma Plot で解析し、キネティックパラメーターを決定した。

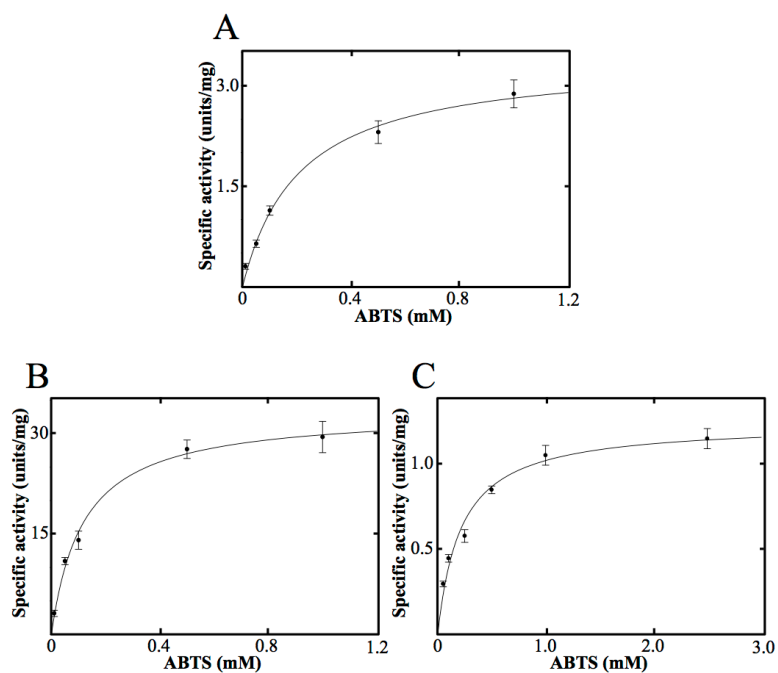


Fig 4-2-4 ABTS を基質とした OxdA(WT, H320D, H320A)の Peroxidase 活性のミカエレスメンテン式

OxdA(WT) (A)、OxdA(H320D) (B)、OxdA(H320A) (C)

結果

OxdA(WT)の ABTS を基質とした Peroxidase 活性を測定した結果、産物である ABTS radical の生産を示す Abs₄₃₀ の増加を確認した (Fig. 4-2-2)。このことから、ABTS を基質とした場合も、OxdA の Peroxidase 活性を検出することに成功した。また、OxdA(H320D)と OxdA(H320A)においても、同様に ABTS radical の生産を示す Abs₄₃₀ の増加を確認し、同活性を検出することにも成功した (Fig. 4-2-2)。

さらに、様々な H₂O₂ 条件下で、活性測定を行い、基質として ABTS を用いた Peroxidase 活性測定における、最適な H₂O₂ 濃度を測定した結果、OxdA(WT)、OxdA(H320D)共に、25 mM が最適濃度であると判明した (Fig. 4-2-3)。

最後に、25 mM、および 10 mM H₂O₂ および、様々な ABTS 濃度条件下で活性測定を行い、キネティックパラメーターを決定した結果 (Fig 4-2-4)、OxdA(WT)の V_{max} は 3.4 U/mg、 K_m は 0.21 mM となり、OxdA(H320D)の V_{max} は 33 U/mg、 K_m は 0.12 mM となり、OxdA(H320A)の V_{max} は 1.3 U/mg、 K_m は 0.21 mM となった。OxdA(H320D)の V_{max} は野生型 OxdA [OxdA(WT)]の約 10 倍高く、OxdA(H320D)の変異による活性増強を確認した。さらに、OxdA(H320D)の K_m は OxdA(WT)の約半分であり、OxdA(H320D)の変異により、基質である ABTS との親和性が上昇した (Table 4-2-3)。一方、OxdA(H320A)の V_{max} は野生型 OxdA [OxdA(WT)]の約 3 倍低く、OxdA(H320A)の変異による活性減少を確認した。また、OxdA(H320A)の K_m は OxdA(WT)と同等であり、OxdA(H320A)の変異により、基質である ABTS との親和性は変化しない事が分かった。

Table 4-2-3 OxdA (WT, H320D, H320A)の Peroxidase 活性 (基質: ABTS)

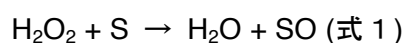
Enzyme	K_m (mM)	V_{max} (units/mg)	k_{cat} (s ⁻¹)	k_{cat}/K_m (s ⁻¹ mM ⁻¹)
OxdA(WT)	0.21 ± 0.04	3.4 ± 0.2	2.3 ± 0.1	11
OxdA(H320D)	0.12 ± 0.02	33 ± 2	22 ± 1	190
OxdA(H320A)	0.21 ± 0.03	1.3 ± 0.1	0.85 ± 0.07	4.0

第5章 Peroxygenase 活性の検討

諸言

第2章で OxdA の Catalase 活性が認められたことから Peroxygenase 活性の検討を行った。

Peroxygenase は(式 1)の反応を触媒する酵素である。



その反応機構は、Catalase と同様に H_2O_2 による Compound I の形成から始まる(式 2)。Compound I 形成後、Compound I が基質に酸素分子を付加して Native の状態へ戻る(式 3)。

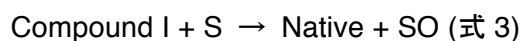


Fig. 5-1 Peroxygenase の反応機構

Peroxygenase は、3 価のヘム (Native)からの Compound I の形成(式 2)に始まり、Compound I から Native の状態にもどる 2 段階の反応過程で基質に対し、酸素分子の付加を行い(式 3)、1 ターンオーバーとなる。

Peroxygenase 活性の検討を行うにあたり、1-Methoxynaphthalene(以下 1-MN)を基質とした Peroxygenase 活性の測定^(47, 48)を行った。

第 1 節 Peroxygenase 活性の測定

諸言

1-MN と H_2O_2 を基質とした Peroxygenase 活性の測定を行った。

Peroxygenase 反応によって生じる Russig's blue に特徴的な 610 nm の吸光度の増加量を定量して本活性を測定した^(47, 48) (Fig. 5-1-1)。

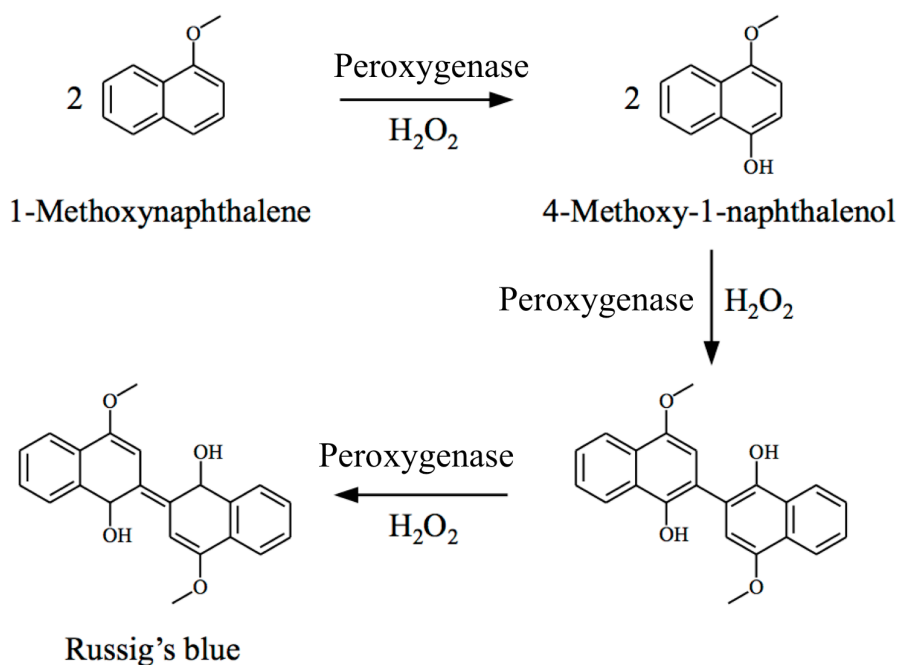


Fig. 5-1-1 1-MN と H_2O_2 を基質とした Peroxygenase 反応

実験材料

1. 酵素

OxdA(WT) (第 3 章 第 1 節の実験手法で得られたもの)

OxdA(H320D) (第 3 章 第 1 節の実験手法で得られたもの)

OxdA(H320A) (第 3 章 第 1 節の実験手法で得られたもの)

2. 緩衝液

1 M KPB (pH 7.0) (実験材料 第 2 章 第 1 節 実験材料を参照)

3. Peroxygenase 反応試薬

1-MN(東京化成工業、東京)
30% H₂O₂ (ナカライテスク株式会社)
Ethanol (ナカライテスク株式会社)

4. UV-1700 (分光光度計) (Shimadzu Co.)

方法

a. タンパク質濃度測定

方法に関しては[第2章 第2節 方法 a]に準じた。

b. 吸光度測定

1-MN と H₂O₂ の2つの基質溶液と酵素溶液を用意し、酵素溶液が 50 μl、H₂O₂ 溶液が 50 μl、1-MN 溶液が 100 μl で、全容量が 200 μl の酵素反応液とした。

基質溶液の濃度は、酵素反応液の終濃度に対して H₂O₂ は4倍、1-MN は2倍に調製した。酵素溶液の濃度は、酵素反応液の終濃度に対して4倍に調製した。

酵素溶液と基質溶液は、作成時に 1 M KPB (pH 7.0)を加え、終濃度が 100 mM になるよう調製した。

石英セルに、酵素溶液 50μl を入れ、そこに、H₂O₂ 溶液を 50 μl、1-MN 溶液を 100 μl を加え、直ちに混合し、分光光度計 UV-1700 にセットし、酵素溶液を添加して反応を開始した。Abs₃₃₄ の測定を、0.2 秒間隔で2分間行った。

Table 6-1-1 Peroxygnase 活性測定

Reaction mixture	Final conc.
Ethanol	20 %
KPB (pH7.0)	100 mM
H ₂ O ₂	5 mM
1-MN	0.01~0.5 mM
OxdA	0, 1 μM
OxdA(H320D)	0, 0.25 μM
OxdA(H320A)	0, 1 μM
Total	200 μl

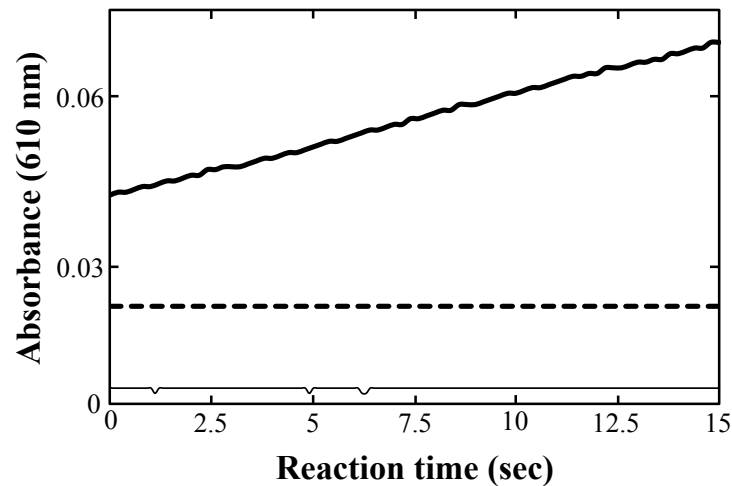


Fig. 5-1-2 OxdA (WT, H320D, H320A)の Peroxygenase 活性測定
OxdA(WT) (太線)、OxdA(H320D) (細線)、OxdA(H320A)(破線)

c. 比活性 (Specific activity)の算出

[第 5 章 第 1 節 方法 b]の結果から反応時間と吸光度のグラフを作成し、Russig's blue のモル吸光係数 ($\epsilon_{470} = 1.45 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)⁽²³⁾を使用して Russig's blue の生成量を計算した。

1 unit (U)の定義は、上記反応条件により 1 分間に 0.25 μmol の Russig's blue を生成する酵素量とした。比活性は、U/mg で表した。これは、1 分間に 1 μmol の H_2O_2 を減少させる酵素量と等しい。

d.最適な H_2O_2 濃度の測定

OxdA(WT)において、Peroxygenase 活性が検出されたため (Fig. 5-1-1)、より詳細な解析を行う前に、基質の 1 つである H_2O_2 の最適濃度の測定を行った。測定には、Table 5-1-2 の組成の反応溶液を用い、様々な濃度の H_2O_2 濃度条件下で活性測定を行った (Fig 5-1-3)。方法は関しては[第 4 章 第 2 節 方法 b]に準じた。最も高い活性を示した H_2O_2 濃度を、最適濃度とし、OxdA の Peroxygenase 活性のキネティックパラメーターの決定に用いた。

Table 5-1-2 Peroxygenase 活性測定 2

Reaction mixture	Final conc.
KPB (pH7.0)	100 mM
H ₂ O ₂	1~100 mM
1-MN	0.5 mM
OxdA	1 μM
Total	200 μl

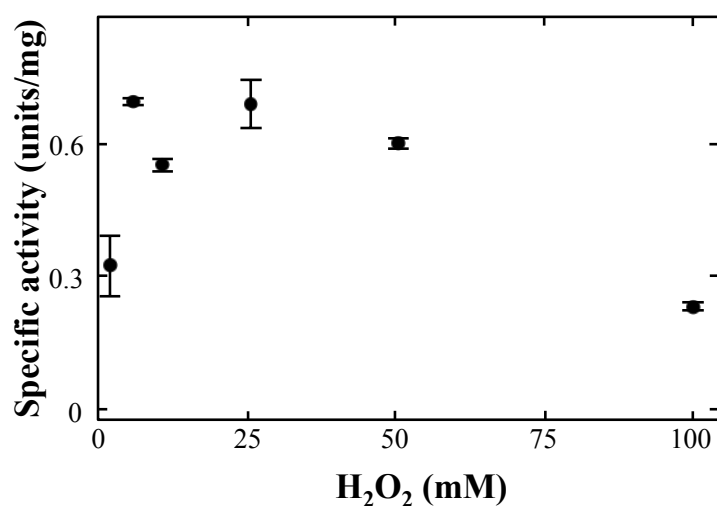


Fig. 5-1-3 OxdA(WT)の 1-MN を基質とした Peroxygenase 反応における最適 H₂O₂ 濃度の測定

e. キネティックパラメーターの決定

最適な H₂O₂ 濃度の測定の結果、反応液の H₂O₂ の終濃度を 5 mM とし、様々な濃度の 1-MN を用い、活性測定を行った。

方法は関しては[第 5 章 第 1 節 方法 b]に準じた。

得られた比活性を Sigma Plot で解析し、キネティックパラメーターを決定した。

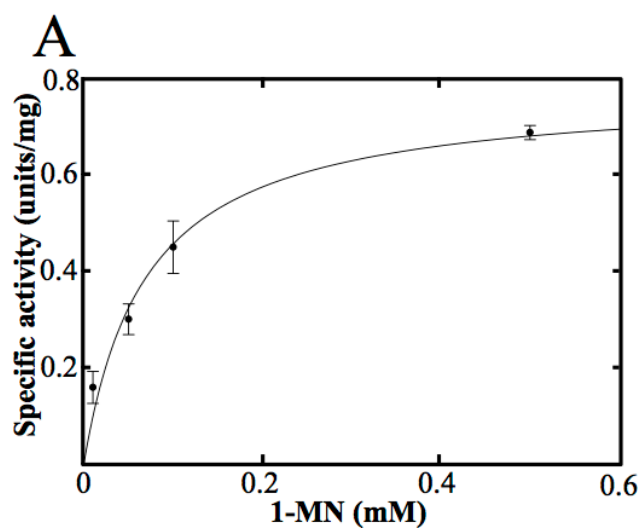


Fig 5-1-4 OxdA(WT)の Peroxygenase 活性のミカエレスメンテン式

f. 吸収スペクトルの測定

[第5章 第1節 方法 b]の結果から、OxdA(H320D)と、OxA(H320A)は、russig'sbluを生成せず、OxdA(H320D)については、OxdA(WT)とは、異なる発色反応を示す事が分かった (Fig 5-1-5)。そこで、OxdA (WT, H320D, H320A)の Peroxygenase 反応溶液 [第5章 第1節 方法 e]の吸収スペクトルを、分光光度計 UV-1700 で測定した (Fig 5-1-6)。

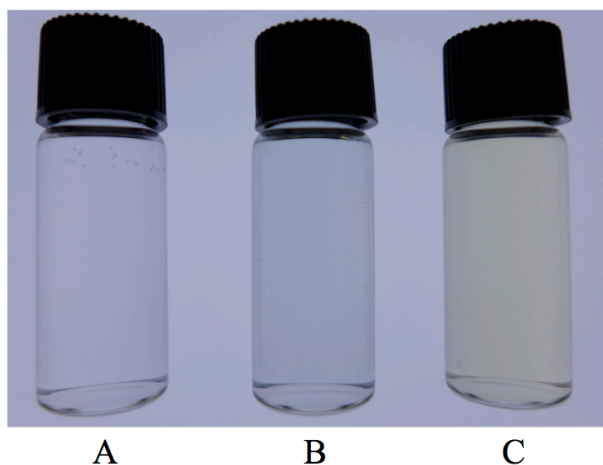


Fig. 5-1-5 OxdA (WT, H320D)の Peroxygenase 反応溶液の写真
酵素無し(A)、OxdA(WT) (B)、OxdA(H320D) (C)

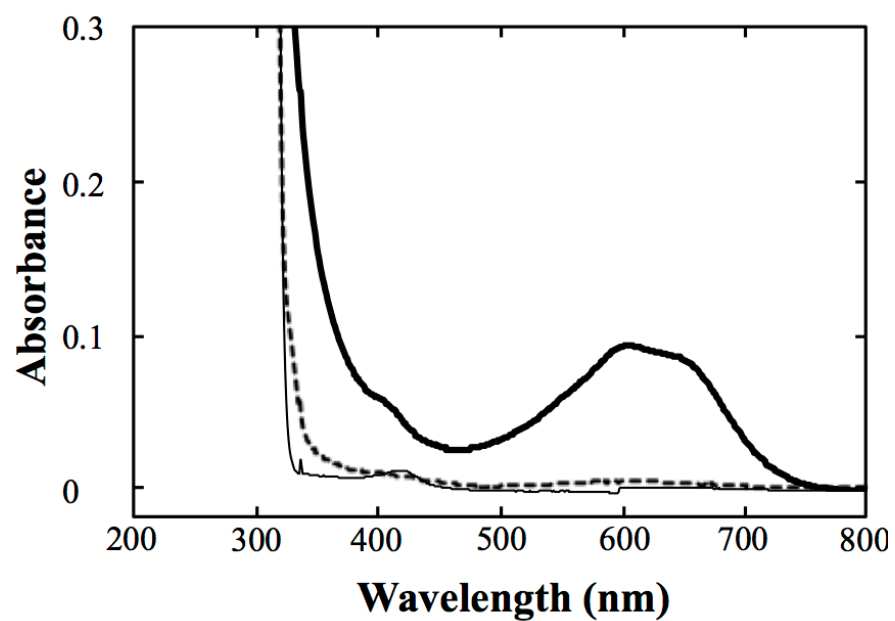


Fig. 5-1-6 OxdA (WT, H320D, H320A)の Peroxygenase 反応溶液の吸収スペクトル
OxdA(WT) (実線)、OxdA(H320D) (破線)、OxdA(H320A) (細線)

-

結果

各種 OxdA (WT, H320D, H320A)の Peroxygenase 活性を測定した結果、OxdA(WT)を含む反応液のみ、産物である Russig's blue の生産を示す Abs₆₁₀ の増加を示し、OxdA が Peroxygenase 反応を触媒する事を始めて示唆した (Fig. 5-1-2)。一方、変異体の OxdA(H320D, H320A)では、Abs₆₁₀ の増加を確認されず、同反応を触媒しない事が分かった。また、OxdA(H320D)の反応溶液においては、OxdA(WT)とは、異なる発色反応が確認され、異なる産物を生成していることが示唆された (Fig 5-1-5,6)。

さらに、OxdA(WT)の Peroxygenase 活性について、様々な H₂O₂ 条件下で、活性測定を行い、基質として 1-MN を用いた Peroxygenase 活性測定における、最適な H₂O₂ 濃度を測定した結果、5 mM が最適濃度であると判明した (Fig. 5-1-3)。

最後に、5 mM H₂O₂ および、様々な 1-MN 濃度条件下で活性測定を行い、OxdA(WT)のキネティックパラメーターを決定した結果 (Fig 5-1-4)、OxdA(WT)の V_{\max} は 0.77 U/mg、 K_m は 0.070 mM となった (Table 5-1-3)。

Table 5-1-3 OxdA の Peroxygenase 活性

Enzyme	K_m (mM)	V_{\max} (units/mg)	k_{cat} (s ⁻¹)	k_{cat}/K_m (s ⁻¹ mM ⁻¹)
OxdA(WT)	0.070 ± 0.017	0.77 ± 0.06	0.52 ± 0.04	7.4

第6章 新規 Peroxygenase 反応産物の同定

諸言

第5章の1-MNを基質とした Peroxygenase 活性の検討において、既知の反応を触媒した OxdA(WT)に対し、(Fig 6-1)、OxdA(H320D)は同反応系において、未知の発色反応を触媒した (Fig 5-1-3)。このことから、OxdA(H320D)における、未知の発色反応の産物の同定を試みた。

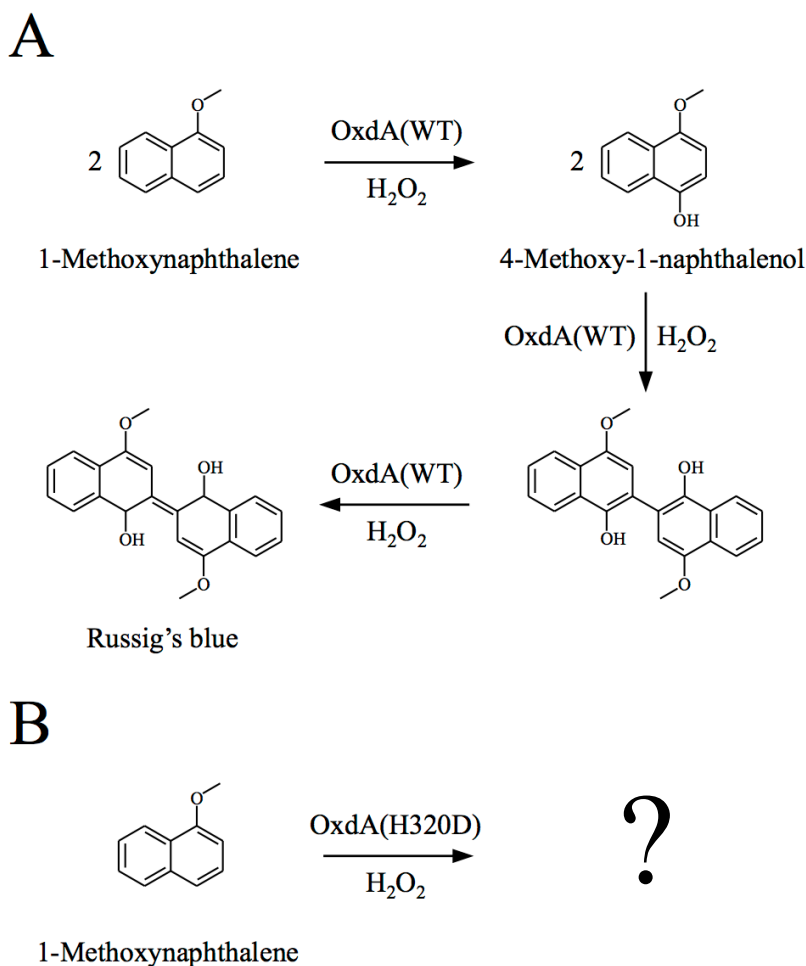


Fig. 6-1 1-MN を基質とした OxdA(WT, H320D)の Peroxygenase 反応経路 1
OxdA(WT) (A)、OxdA(H320D) (B)

反応産物の同定を行うにあたり、酢酸エチル抽出および HPLC で産物の生成を行い、LCMS、NMR で精製産物を分析した。

第 1 節 新規反応産物の同定

諸言

1-MN と H_2O_2 を基質とした OxdA(H320D)の反応において、確認された未知の反農産物を同定する為に、酢酸エチル抽出と HPLC により、精製を試みた。

実験材料

1. 酵素

OxdA(H320D) (第 2 章 第 1 節の実験手法で得られたもの)

2. 緩衝液

1 M KPB (pH 7.0) (実験材料 第 2 章 第 1 節 実験材料を参照)

3. Peroxidase 反応試薬

1-MN(東京化成工業、東京)

30% H_2O_2 (ナカライテスク株式会社)

Ethenol (ナカライテスク株式会社)

4. UV-1700 (分光光度計) (Shimadzu Co.)

Shimadzu Prominence system (SPD-M20A, LCMS-8030) (Shimadzu Co.)] (HPLC, LCMS)

AVANCE-600 NMR spectrometer (Bruker Co.)

方法

a. タンパク質濃度測定

方法に関しては[第 3 章 第 2 節 方法 a]に準じた。

b. 酢酸エチル分離

1-MN と H_2O_2 の 2 つの基質溶液と酵素溶液を用意し、酵素溶液が 50 ml、 H_2O_2 溶液が 50 ml、1-MN 溶液が 100 ml で、全容量が 200 ml の酵素反応液とした。

基質溶液の濃度は、酵素反応液の終濃度に対して H_2O_2 は 4 倍、Guaiacol は 2 倍に調製した。酵素溶液の濃度は、酵素反応液の終濃度に対して 4 倍に調製した。

酵素溶液と基質溶液は、作成時に 1 M KPB (pH 7.0)を加え、終濃度が 100 mM に

なるよう調製した。

H₂O₂ 溶液を 50 μl、Guaiacol 溶液を 100 μl を抽出容器内で混合した後、10 分間常温で静置した。その後、反応溶液と等量の酢酸エチルを混合し、5 分間静置した後、酢酸エチル層を分取、乾固させ、5 ml の 100% Ethanol に溶かした。

Table 6-1-1 Peroxygenase 活性測定

Reaction mixture	Final conc.
Ethanol	20 %
KPB (pH7.0)	100 mM
H ₂ O ₂	5 mM
1-MN	0.5 mM
OxdA(H320D)	1 μM
Total	200 ml

c.HPLC による精製

[第 6 章 第 1 節 方法 b] から得られた反応産物のサンプルを、以下の条件の HPLC [Shimadzu Prominence system (SPD-M20A)] に供し (Table 6-1-2)、主立ったピークを分取した。また、熱処理酵素と反応させた反溶液も、同じ条件の HPLC に供し、反応産物ピークを同定した。さらに、精製したサンプルについても、同様に分析し、分離時間や精製度を確認した (Fig 6-1-1)。

Table 6-1-1 HPLC の分離条件

カラム	: TSK-gel ODS-80Ts (7.8 by 300 mm; Tosoh Co.)
溶出条件	: 0-100% Acetonitrile / 5 CV リニアグラジェント
流速	: 1 ml/min

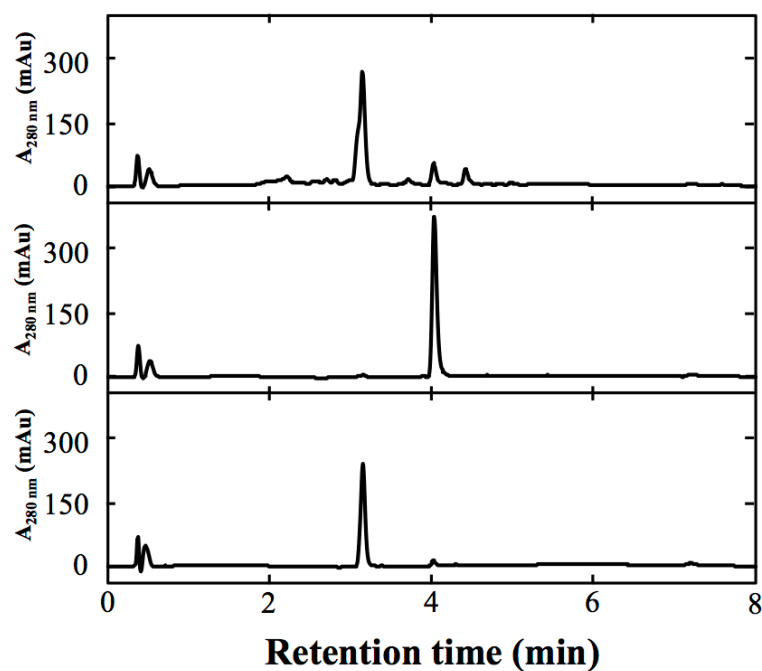


Fig6-1-1 OxdA(H320D)の Peroxygenase 反応溶液の HPLC 分析
 OxdA(H320D)の Peroxygenase 反応溶液 (上)、熱処理した OxdA(H320D)の
 Peroxygenase 反応溶液 (中間)、精製した OxdA(H320D)の Peroxygenase 反応産物
 (下)

d.LCMS による分析

[第 6 章 第 1 節 方法 c]から得られた精製反応産物を、HPLC と同条件の LCMS [Shimadzu Prominence system (SPD-M20A, LCMS-8030)]に供し (Table 6-1-2)、産物ピークの MS スペクトル (negative ion mode)を測定した。

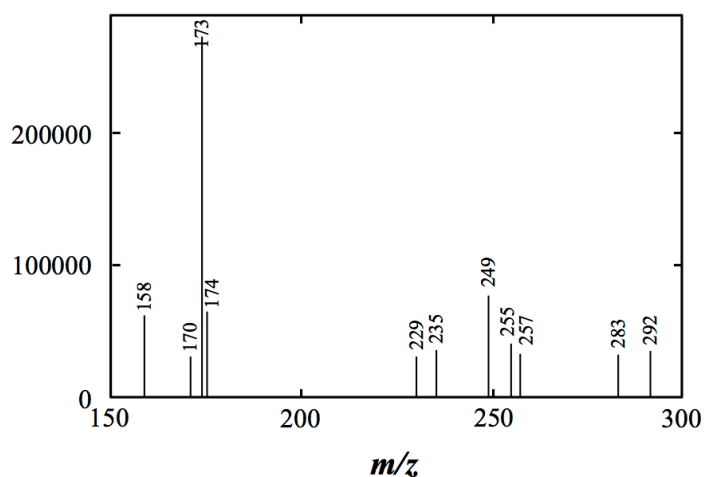


Fig 6-1-2 OxdA(H320D)の Peroxygenase 反応産物の MS スペクトル (negative ion mode)

e.NMRによる分析

[第6章 第1節 方法c]から得られた精製反応産物を乾固させ、 CDCl_3 に溶解させ、以下の条件のNMR (AVANCE-600 NMR spectrometer)に供し (Table 6-1-3)、NMRスペクトルを測定した。

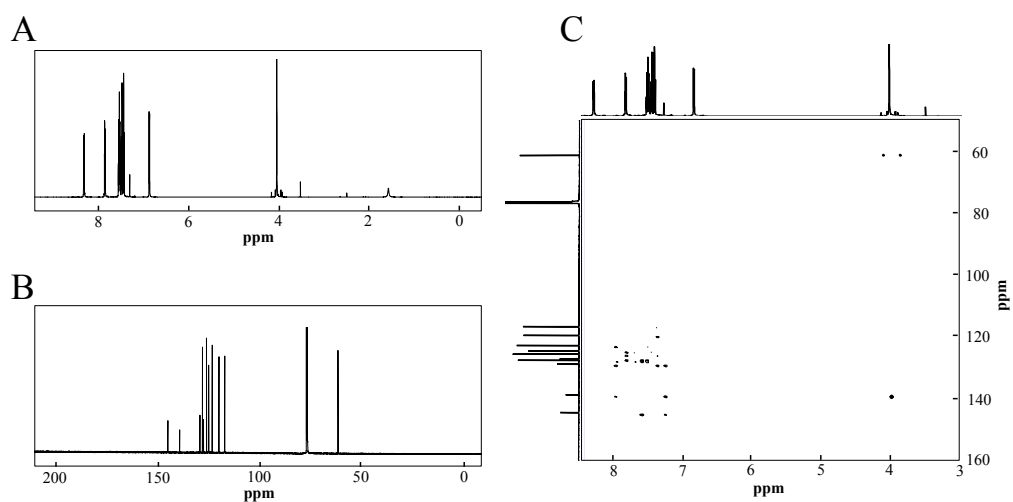
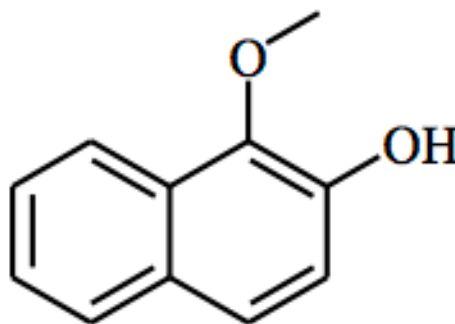


Fig6-1-3 OxdA(H320D)の Peroxygenase 反応産物の NMR 解析
 ^1H NMR スペクトル (A)、 ^{13}C NMR スペクトル (B)、HMBC スペクトル (C)

結果

酢酸エチル抽出と HPLC による分離により、OxdA(H320D)の未知の反応産物の精製に成功した。また、LCMS 解析により、未知の反応産物の分子量は 174 であると同定された。最終的に、NMR 解析によって、未知の反応産物は、1-methoxy-2-naphthalenol (分子量 174)と同定された。なお、この反応産物が、Peroxygenase 反応により生成されたという報告は初めてである。



1-Methoxy-2-naphthalenol

Fig 6-1-4 OxdA(H320D)の新規反応産物

第2節 OxdA(H320D)の Peroxygenase 活性の測定

諸言

第6章 1節において、1-MN を基質とした OxdA(H320D)の Peroxygenase 活性の新規反応産物を 1-Methoxy-2-naphthalenol と同定した (Fig 6-2-1)。そこで、この 1-Methoxy-2-naphthalenol の生成を測定する新たな Peroxygenase 活性測定法を構築し、OxdA(H320D)の Peroxygenase 活性の測定を試みた。また、OxdA(H320A)についても、OxdA(H320D)と同様に 1-Methoxy-2-naphthalenol を生成するか調査した。

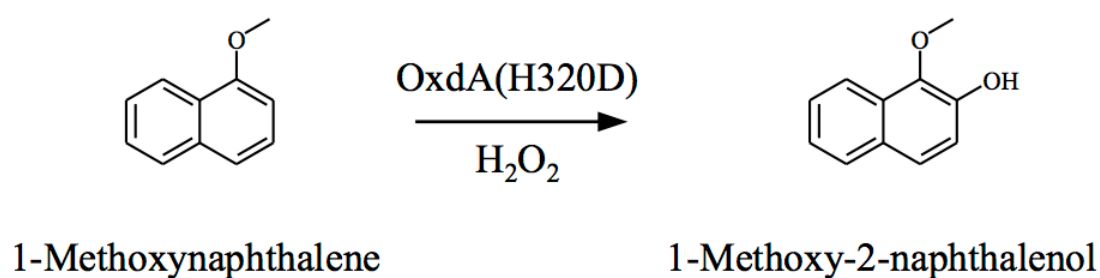


Fig. 6-2-1 1-MN を基質とした OxdA(H320D)の Peroxygenase 反応経路

実験材料

1. 酵素

OxdA(H320D) (第2章 第1節の実験手法で得られたもの)

2. 緩衝液

1 M KPB (pH 7.0) (実験材料 第2章 第1節 実験材料を参照)

3. Peroxidase 反応試薬

Ethenol (ナカライテスク株式会社)

UV-1700 (分光光度計) (Shimadzu Co.)

方法

a. タンパク質濃度測定

方法に関しては[第3章 第2節 方法 a]に準じた。

b. 1-Methoxy-2-naphthalenol のモル吸光係数の測定

精製した 1-Methoxy-2-naphthalenol (第 6 章 第 1 節の実験手法で得られたもの) を乾固させ、計量した後、Ethanol に溶解し、0.05 mM の溶液を得た。同溶液の吸収スペクトルを計測し (UV-1700 を使用)、主だったピークに関して、検量線を引いて、モル吸光係数の測定した (Fig 6-2-2)。

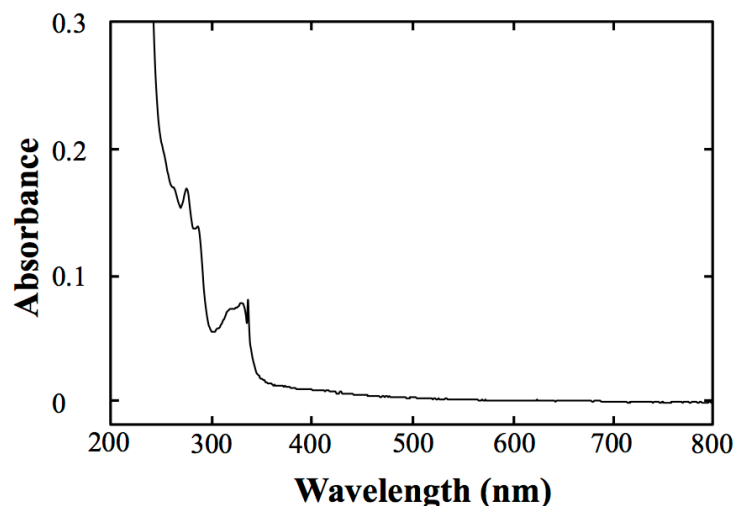


Fig 6-2-2 1-Methoxy-2-naphthalenol の吸収スペクトル

c. 吸光度測定

1-Methoxy-2-naphthalenol の主要なピークのモル吸光係数は、280 nm = $9.38 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 、334 nm = $4.76 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ だった⁽⁵³⁾。280 nm はタンパク質吸収と重複するため、活性測定には 334 nm を用いた。

測定では、1-MN と H_2O_2 の 2 つの基質溶液と酵素溶液を用意し、酵素溶液が 50 μl 、 H_2O_2 溶液が 50 μl 、1-MN 溶液が 100 μl で、全容量が 200 μl の酵素反応液とした。

基質溶液の濃度は、酵素反応液の終濃度に対して H_2O_2 は 4 倍、1-MN は 2 倍に調製した。酵素溶液の濃度は、酵素反応液の終濃度に対して 4 倍に調製した。

酵素溶液と基質溶液は、作成時に 1 M KPB (pH 7.0) を加え、終濃度が 100 mM になるよう調製した (Table 6-2-1)。

石英セルに、酵素溶液 50 μl を入れ、そこに、 H_2O_2 溶液を 50 μl 、1-MN 溶液を 100 μl を加え、直ちに混合し、分光光度計 UV-1700 にセットし、酵素溶液を添加して反応を開始した。Abs₃₃₄ の測定を、0.2 秒間隔で 2 分間行った。

OxdA(H320A)については、酵素量を 10 倍 (10 μM) まで増やしたものの、334 nm の吸収の増加は確認できず (Fig 6-2-3)、さらに、その反応溶液の吸収スペクトル (Fig 5-1-6) においても、主だった産物の吸収が認められないため、OxdA(H320A)は、1-MN

を基質とした Peroxygenase 反応は触媒しないと判断した。

Table 6-2-1 Peroxygenase 活性測定 3

Reaction mixture	Final conc.
Ethanol	20 %
KPB (pH7.0)	100 mM
H ₂ O ₂	5 mM
1-MN	0.01~0.5 mM
OxdA(H320D)	0, 0.25 μM
OxdA(H320A)	0, 1, 10 μM
Total	200 μl

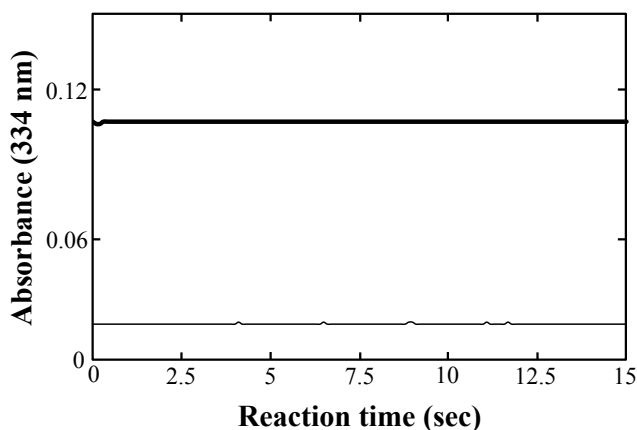


Fig. 6-2-3 OxdA (H320A)の Peroxygenase 活性測定
10 μM OxdA(H320A) (太線)、10 μM OxdA(H320D) (細線)

d. 比活性 (Specific activity)の算出

[第 6 章 第 1 節 方法 b]の結果から反応時間と吸光度のグラフを作成し、1-Methoxy-2-naphthalenol のモル吸光係数 ($\epsilon_{470} = 4.76 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)⁽²³⁾を使用して 1-Methoxy-2-naphthalenol の生成量を計算した。

1 unit (U) の定義は、上記反応条件により 1 分間に 1 μmol の 1-Methoxy-2-naphthalenol を生成する酵素量とした。比活性は、U/mg で表した。これは、1 分間に 1 μmol の H₂O₂ を減少させる酵素量と等しい。

e. 最適な H₂O₂ 濃度の測定

OxdA(H320D)において、1-Methoxy-2-naphthalenol を産物とする Peroxygenase 活性は検出されているため (Fig. 5-1-6)、より詳細な解析を行う前に、基質の 1 つ

である H_2O_2 の最適濃度の測定を行った。測定には、Table 6-2-2 の組成の反応溶液を用い、様々な濃度の H_2O_2 濃度条件下で活性測定を行った。方法は関しては [第 4 章 第 2 節 方法 b] に準じた。最も高い活性を示した H_2O_2 濃度を、最適濃度とし、OxdA の Peroxygenase 活性のキネティックパラメーターの決定に用いた。

また、OxdA(H320A) については、酵素量を 10 倍 (10 μ M) まで増やしたものの、334 nm の吸収の増加は確認できず (Fig 6-2-3)、さらに、その反応溶液の吸収スペクトル (Fig 5-1-6) においても、主だった産物の吸収が認められないため、OxdA(H320A) は、1-MN を基質とした Peroxygenase 反応は触媒しないと判断した。

Table 6-2-2 Peroxygenase 活性測定 4

Reaction mixture	Final conc.
KPB (pH7.0)	100 mM
H_2O_2	1~100 mM
1-MN	0.5 mM
OxdA(H320D)	0.25 μ M
Total	200 μ l

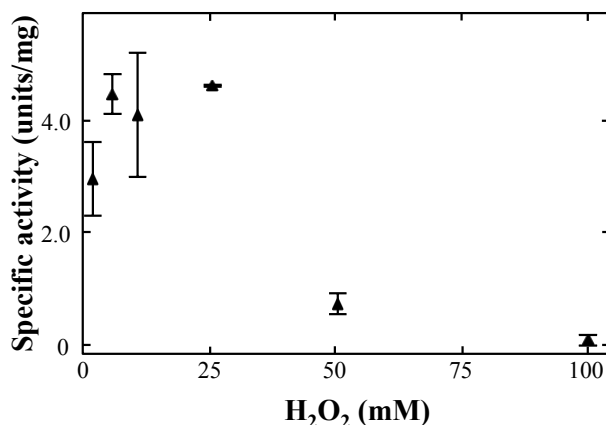


Fig. 6-2-4 OxdA(H320D) の 1-MN を基質とした Peroxygenase 反応における最適 H_2O_2 濃度の測定

f. キネティックパラメーターの決定

最適な H_2O_2 濃度の測定の結果、反応液の H_2O_2 の終濃度を 5 mM とし、様々な濃度の 1-MN を用い、活性測定を行った。

方法は関しては [第 6 章 第 2 節 方法 c] に準じた。

得られた比活性を Sigma Plot で解析し、キネティックパラメーターを決定した。

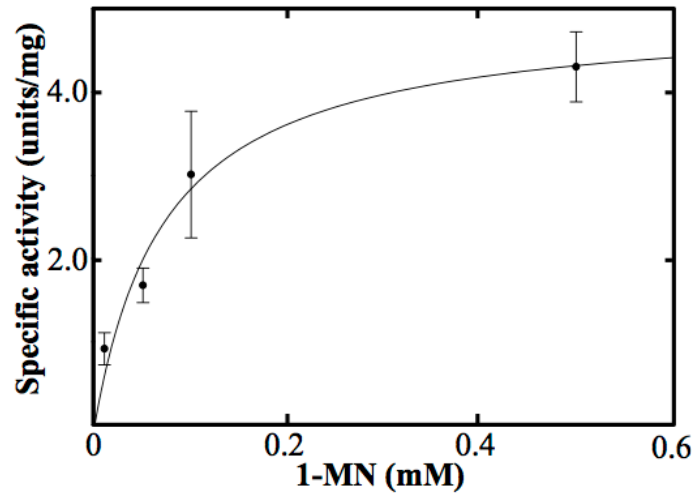


Fig 6-2-5 OxdA(WT)の Peroxygenase 活性のミカエレスメンテン式

結果

OxdA (H320D, H320A)について、1-MN を基質とし、1-Methoxy-2-naphthalenol を産物とする Peroxygenase 活性を測定した結果、OxdA(H320A)を含む反応液では、産物である 1-Methoxy-2-naphthalenol の生産を示す Abs₃₃₄ の増加は確認されず、第 5 章 1 節の結果と合わせ、OxdA(H320A)は 1-MN を基質とした Peroxygenase 反応を精製する事が確認されていたため (第 6 章 1 節)、様々な H₂O₂ 条件下で、同活性測定を行い、基質として 1-MN を用いた Peroxygenase 活性測定における、最適な H₂O₂ 濃度を測定した結果、5 mM が最適濃度であると判明した (Fig. 6-2-4)。

最後に、5 mM H₂O₂ および、様々な 1-MN 濃度条件下で活性測定を行い、OxdA(H320D) のキネティックパラメーターを決定した結果 (Fig 6-2-5)、OxdA(H320D)の V_{\max} は 5.0 U/mg、 K_m は 0.075 mM となり (Table 5-1-3)、OxdA(WT) と比べ、 V_{\max} は約 6 倍となり、OxdA(H320D)の変異により、Peroxygenase 活性が增強される事が分かった。一方、 K_m は OxdA(WT)とほぼ同じであり、OxdA(H320D)の変異は、1-MN との親和性にあまり影響しない事が分かった。

Table 6-2-3 OxdA (WT, H320D)の Peroxygenase 活性

Enzyme	K_m (mM)	V_{\max} (units/mg)	k_{cat} (s ⁻¹)	k_{cat}/K_m (s ⁻¹ mM ⁻¹)
OxdA(WT)	0.070 ± 0.017	0.77 ± 0.06	0.52 ± 0.04	7.4
OxdA(H320D)	0.075 ± 0.030	5.0 ± 0.7	3.3 ± 0.4	44

第 7 章 還元電位の測定

諸言

第 3~6 章で OxdA、およびその変異体の酸化還元反応触媒能が認められたことから各酵素の還元電位の検討を行った。還元電位は、ヘム酵素など、金属元素を含む酵素において、酸化還元反応触媒能の強さに関係があるとされており、一般的に電位が高いほど活性が強い。還元電位は、一般的に、酸化状態にした酵素に、還元剤を徐々に添加していき、酸化型に変化した電位を(添加した還元剤の量、元溶液の酸化度等から)計算し、計測するが、本稿ではより簡単かつ正確な分析方法を用いた。

第 1 節 OxdA (WT, H320D, H320A)の還元電位の測定

諸言

我々は各種 OxdA (WT, H320D, H320A)の還元電位を測定するため、電気化学的手法を用いた。同方法は、滴定法と比較し、実験が極めて簡単であり、測定精度も高い。ただし、タンパク質の性質 (分子構造、配向等)によって、測定できない場合が非常に多い事が知られている。また、本稿では、還元電位として、Onset-potential (酸化状態の酵素が還元状態になり始め、酵素溶液の電圧が下がり始める電位)を計測した。

実験材料

1. 酵素

OxdA(WT) (第 2 章 第 1 節の実験手法で得られたもの)

OxdA(H320D) (第 2 章 第 1 節の実験手法で得られたもの)

OxdA(H320A) (第 2 章 第 1 節の実験手法で得られたもの)

2. 緩衝液

1 M KPB (pH 7.0) (実験材料 第 2 章 第 1 節 実験材料を参照)

3. Electrochemical analyzer (CHI 611A, ALS Co., Ltd.)

方法

a. タンパク質濃度測定

方法に関しては[第 3 章 第 2 節 方法 a]に準じた。

b. 還元電位の測定

各酵素溶液を、10 μ M (1 ml)に調製し、分析用キュベットに入れた。その後 Ar ガスで、酵素溶液をバブリングし、溶存酸素を除き、作用電極として Au 電極、対抗電極として白金線、参照電極として Ag|AgCl|KCl (sat.)電極をキュベットに差し込んだ後、キュベット内を Ar ガスで置換して、分析を行った。分析条件は Table 7-1-1 に示し、Onset-potential の定義は、酵素なしのコントロール溶液から、0.5 nA 電流が低下した電位とした。

Table 7-1-1 還元電位の測定

電気化学分析器	: Electrochemical analyzer (CHI 611A, ALS Co., Ltd.)
作用電極	: Au
対抗電極	: 白金線
参照電極	: Ag AgCl KCl (sat.)
Scan rate	: 5 mV/s
温度	: 室温
置換ガス	: Ar
酵素濃度	: 10 μ M

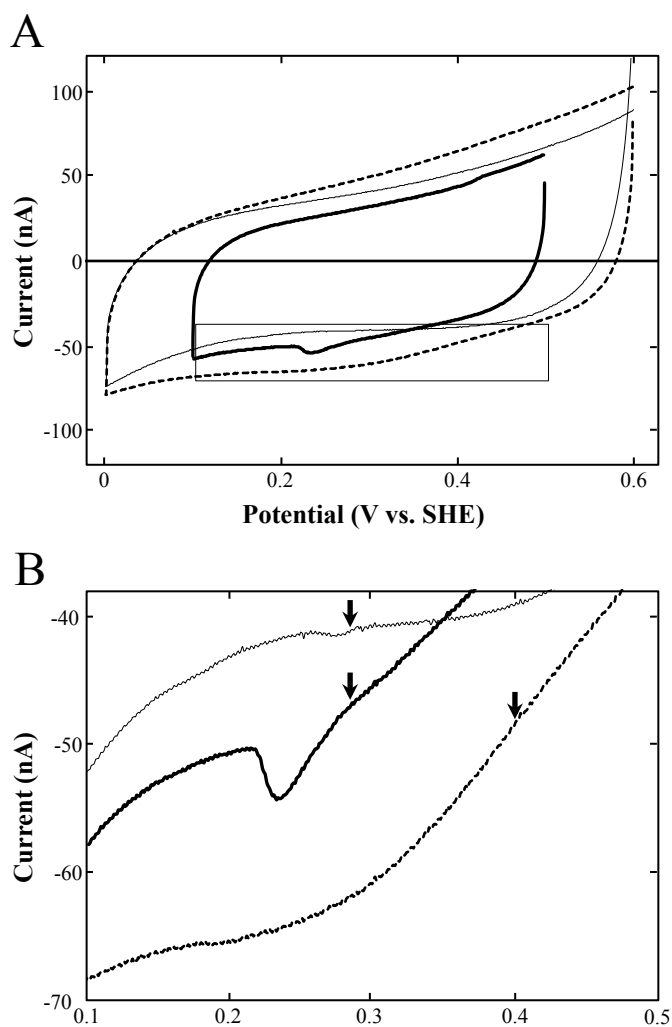


Fig 7-1-1 OxdA (WT, H320D, H320A)の Onset-potential

A 全体図、B 四角内の拡大図、OxdA(WT) (太線)、OxdA(H320D) (破線)、OxdA(H320A) (細線)、Onset-potential (矢印)

結果

各種 OxdA (WT, H320D, H320A)について、Onset-potential を測定することができた。各 Onset-potential は、OxdA(WT) = 0.28 V、OxdA(H320D) = 0.40 V、OxdA(H320A) = 0.28 V となった (Fig 7-1-1)。この結果から、OxdA(H320D)の変異は、還元電位を上昇させることが分かり、OxdA(H320D)の酸化還元反応触媒能が、他の OxdA と比べて高い理由の一つが、高い還元電位にあることを証明した。一方、OxdA(H320A)の変異は、OxdA の還元電位には影響しない事も判明した。

Table 7-1-2 OxdA (WT, H320D, H320A)の Onset-potential

Enzyme	Onset-potential (V vs. SHE)
OxdA(WT)	0.28
OxdA(H320D)	0.34
OxdA(H320A)	0.28

第 8 章 総括

要約

第 1 章では、OxdA の有用な諸性質と酸化還元反応を行うヘム酵素について述べた。

第 2 章では、OxdA(H320D)変異体の作成を行った。既知のヘム酵素であるクロロペルオキシダーゼを参考に、OxdA (H320D)をデザインし、pET-24a (+)にインサートとして組み込み、ベクターを作成した。

第3章では、各種OxdA (WT, H320D, H320A)のCatalase活性の検討を行った。基質である過酸化水素の減少量を分光学的手法で定量して本活性を測定した結果、同方法ではOxdAのCatalase活性を検出できなかった。そのため、酸素電極により、より高感度なCatalase活性測定を行い、各種OxdA (WT, H320D, H320A)のCatalase活性の k_{cat} 、 K_m をそれぞれ算出し、キネティックパラメータを決定した。

第4章では、各種OxdA (WT, H320D, H320A)のPeroxidase活性の検討を行った。本研究では基質として過酸化水素以外に、GuaiacolもしくはABSTを用いた。産物の増加量を定量して本活性を測定した結果、各種OxdA (WT, H320D, H320A)のそれぞれのPeroxidase活性の k_{cat} 、 K_m を算出し、キネティックパラメータを決定することができた。

第5章では、各種OxdA (WT, H320D, H320A)のPeroxygenase活性の検討を行った。本研究では基質として過酸化水素と1-MNを用いた。産物であるRussig's blueの増加量を定量して本活性を測定した結果、OxdA(WT)のPeroxygenase活性は検出され、 k_{cat} 、 K_m を算出し、キネティックパラメータを決定したが、OxdA(H320D)においては、Russig's blueの生成は確認されず、その反応溶液は野生型とは全く異なる色を呈した。このことは、OxdA(H320D)において、全く異なる産物が生成されたことを示唆した。また、OxdA(H320A)については、OxdA(H320D)同様、Russig's blueの生成は確認されず、発色反応も起こらなかった。

第6章では、OxdA(H320D)の未知のPeroxygenase反応産物の同定を行った。未知の反応産物は、酢酸エチル抽出により抽出し、HPLCで精製した。精製した産物は、LC/MSにより、分子量を解析し、NMRにより、1-Methoxy-2-naphthalenolと同定した。さらに、精製した産物から、1-Methoxy-2-naphthalenolのモル吸光係数を算出し、それを用いて、OxdA(H320D)のPeroxygenase活性を検出、 k_{cat} 、 K_m を算出し、キネ

ティックパラメーターを決定した。また、OxdA(H320A)は同反応も触媒しない事がわかり、5章の結果も合わせて、1-MNを基質としたPeroxygenase反応を触媒しない事が分かった。

第7章では、各種OxdA (WT, H320D, H320A)の還元電位を電気化学的手法で測定した。測定の結果、各種OxdA (WT, H320D, H320A)の還元電位 (Onset-potential)の測定に成功した。測定されたOxdA(H320D)の還元電位は、OxdA(WT)やOxdA(H320A)と比べて高く、OxdA(H320D)の酸化還元反応触媒能の強さの要因の一つが判明した。

本研究の結果から OxdA が酸化還元反応も触媒することが実証され、OxdA(H320D)の変異は、同活性を増強し、新しい機能を付与することが示唆された。さらに、OxdA(H320A)の変異は、Catalase 反応を除く、酸化還元反応触媒能を低下されることが示唆された。

議論

OxdA の酸化還元反応触媒能

OxdA は、ほとんどのヘム酵素は酸化還元反応を触媒する中で、ヘム酵素なのにも関わらず、酸化還元反応ではない脱水反応という極めて珍しい反応を触媒する希少な酵素である^(49, 50)。我々は今回、この OxdA において、一般的な酸化還元反応である Catalase, Peroxidase, Peroxygenase の 3 種の反応を触媒する事を発見した。このことは、ヘム酵素であれば、OxdA のような特殊な酵素であっても、普遍的に酸化還元反応を触媒する事を示唆した。また、本発見は、OxdA のもつ希少な触媒機構を新たに酸化還元反応に利用することで、他の酸化還元反応に関わるヘム酵素のヘムポケットでは触媒できないサイズの基質の触媒といった物質生産で新たな展開を生み出す可能性をも示した。

OxdA(H320D)の変異の影響

OxdA(H320D)は、Chloroperoxidase の活性中心を模倣し、OxdA の His320 を Asp に置換することによって構築した。OxdA(H320D)は、OxdA(WT)と同様に、3 種類の酸化還元活性 (Catalase, Peroxidase, Peroxygenase)のいずれも示し、また、その V_{max} 値は、OxdA(WT) の、36 (Catalase)、2.5 [Peroxidase(Guaiacol)]、9.7 [Peroxidase(Guaiacol)]、および 6.5 (Peroxygenase)倍を示した (Tables 3-3-2, 4-1-3, 4-2-3, 6-2-3)。同結果から、OxdA(H320D)の変異が全てのレドックス活性を増強することが判明した。OxdA(H320D)のより高い活性は、OxdA(WT) (0.28 V)より高い、Onset-potential(0.40v)によって引き起こされると考えられた (Table 7-1-2)。さらに、各活性の K_m 値は、OxdA(WT)の 130% (Catalase)、3800% [Peroxidase(Guaiacol)]、57% [Peroxidase(ABTS)] および 110% (Peroxygenase)となった (Tables 3-3-2, 4-1-3, 4-2-3, 6-2-3)。これらの知見は、H320D 突然変異が基質に対する OxdA の親和性を有意に変化させたことを示している。また、OxdA(H320D)は、1-MN を基質とした Peroxygenase 反応において、OxdA(WT)とは異なる産物 (1-Methoxy-2-naphthalenol)を生成している。このことは、OxdA(H320D)の変異により、活性中心と 1-MN との配向が変化し、異なる部位が水酸化された可能性を示唆した。

OxdA(H320A)の変異の影響

OxdA(H320A)は、OxdA の His320 を Ala に置換することによって、320 残基のチャージを除いた変異体である。OxdA(H320A)は、Catalase 反応と、Peroxidase 反応の 2 種類の酸化還元活性を示し、また、その V_{max} 値は、OxdA(WT)の、140 (Catalase)、6 [Peroxidase(Guaiacol)]、38 [Peroxidase(Guaiacol)]%を示した (Tables 3-3-2, 4-1-3,

4-2-3)。同結果から、OxdA(H320A)の変異によって、Catalase 活性の強さはあまり変化しないが、Peroxidase 活性は優位に減少し、1-MN を基質とした Peroxygenase 活性は消失することが分かった。このことから、320 残基のチャージの除去は、Peroxidase や Peroxygenase 活性を優位に減少させることが示唆された。また、OxdA(H320A)の Onset-potential (0.28 V)は、OxdA(WT) (0.28 V)と同等であった (Table 7-1-2)。さらに、OxdA(H320A)の各活性の K_m 値は、OxdA(WT)の 10% (Catalase)、3200% [Peroxidase(Guaiacol)]、100% [Peroxidase(ABTS)]となった (Tables 3-3-2, 4-1-3, 4-2-3)。この結果は、H320A 突然変異が基質に対する OxdA の親和性を有意に変化させたことを示し、特に H_2O_2 に対しての親和性が劇的に向上したことを示した。

各活性 (Catalase, Peroxidase, Peroxygenase)の H_2O_2 の最適濃度が異なる原因

本稿では、不可解な事に、各活性(Catalase, Peroxidase, Peroxygenase)の H_2O_2 の最適濃度が異なった。これは、2つの阻害要素が影響しているためと考えられる。

その1つは高濃度の H_2O_2 の持つ強い酸化力による OxdA の不活性化である。一般的に、高濃度の H_2O_2 は高い酸化力により、多くの反応を阻害する⁽⁵¹⁾。Fig 8-1 の Catalase 活性における、200 mM 以上の高濃度の H_2O_2 による阻害は、他に阻害要因がないため、動作用によるものだと考えられる。また、Guaiacol を基質とした OxdA (WT, H320D)の Peroxidase 活性も、Catalase 活性と似て、200 mM の H_2O_2 存在下から阻害を受けており (Fig 4-1-3)、高濃度の H_2O_2 の持つ強い酸化力により、OxdA の不活性化し、活性が減少したと考えられる。また、OxdA(H320D)が、他の OxdA (WT, H320A)に比べ、より強く阻害作用を受けているのは、 H_2O_2 に対する感受性が高いためだと考えられる。

もう一方の阻害要素は、2つの活性による競争である。ヘム酵素が Peroxidase 反応や Peroxygenase 反応を触媒する場合、Native のヘムが気質の一つである H_2O_2 により酸化され、反応中間体の compound I⁽⁵²⁾になり、その compound I が基質と反応して、各産物と Native ヘムを形成する (Fig 8-2)。しかし、同時に同反応系の基質のひとつである H_2O_2 も、Catalase 反応により、compound I と反応して、水と Native を形成する。すなわち、Peroxidase 活性や Peroxygenase 活性において、compound I は、同時に進行する Catalase 活性と取り合いになる。普通の活性の強い Peroxidase や Peroxygenase であれば、Catalase 活性は相対的に低くなるので、阻害要因となりえないが、OxdA のような弱い Peroxidase 活性や Peroxygenase を持つ場合、阻害要因となりうる。実際に、1-MN を基質とした Peroxygenase 活性 (15 mM で阻害)と ABTS を基質とした Peroxidase 活性(100 mM で阻害)においては、Catalase 活性の時より、低い濃度で活性阻害が起きている (Figs 4-2-3, 5-1-3, 6-1-4)。これらの測定では、ABTS や 1-MN などの基質に対し、 H_2O_2 が大過剰になったために、

Catalase 活性が優勢になり阻害が生じたと考えられる。この阻害の程度は、活性の強さや、気質との親和性、添加可能な基質の量が影響すると考えられる。また、今回阻害された反応系における 1-MN の濃度は飽和に近く、ABTS は産物の ABTS radical の測定波長である 430 nm にも弱い吸収を持つため、これ以上の濃度を添加することは難しく、H₂O₂ に対し過剰量の 1-MN や ABTS を添加する事により、阻害を解消することは困難である。

一方、OxA(H320A)については、Catalase 活性は OxA (WT, H320D)と同様に、200 mM の濃度から阻害を受けたものの (Fig8-1)、2つの Peroxidase 活性 (Figs 4-1-3, Fig4-1-2)については、OxA (WT, H320D)より、低い H₂O₂ 濃度で阻害を受けた。この原因は、OxA(H320A)の Catalase 活性の低い K_m 値にあると考えられ、OxA(H320A)においては、より低い H₂O₂ 濃度でも Catalase 活性が強く作用するため、上記の競争作用により、OxA (WT, H320D)より、低い H₂O₂ 濃度で Peroxidase 活性は阻害を受けると考えられた。

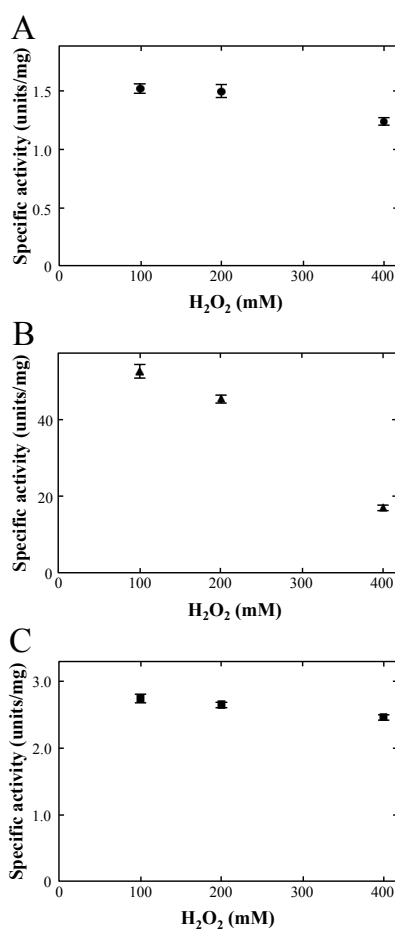


Fig 8-1 高濃度 H₂O₂ による Catalase 活性の阻害
OxA(WT) (A)、OxA(H320D) (B)、OxA(H320A) (C)

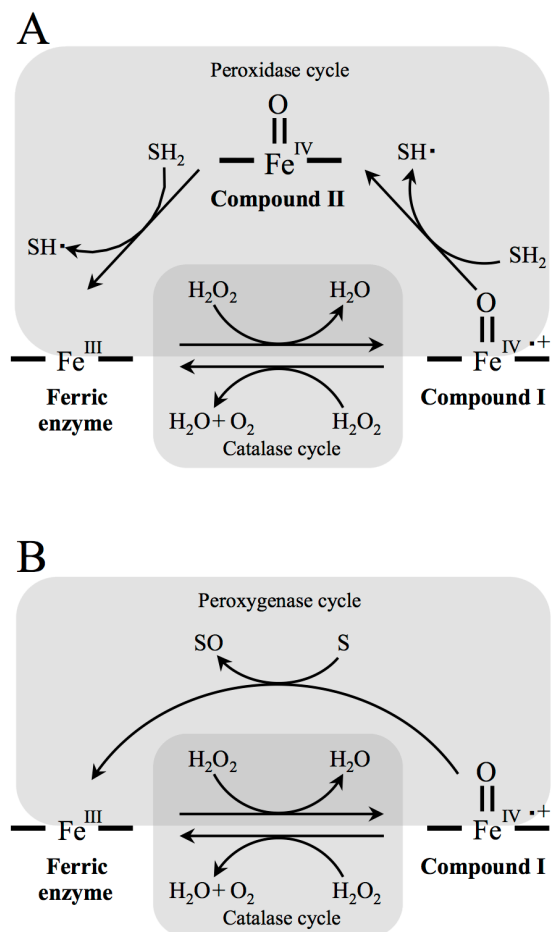


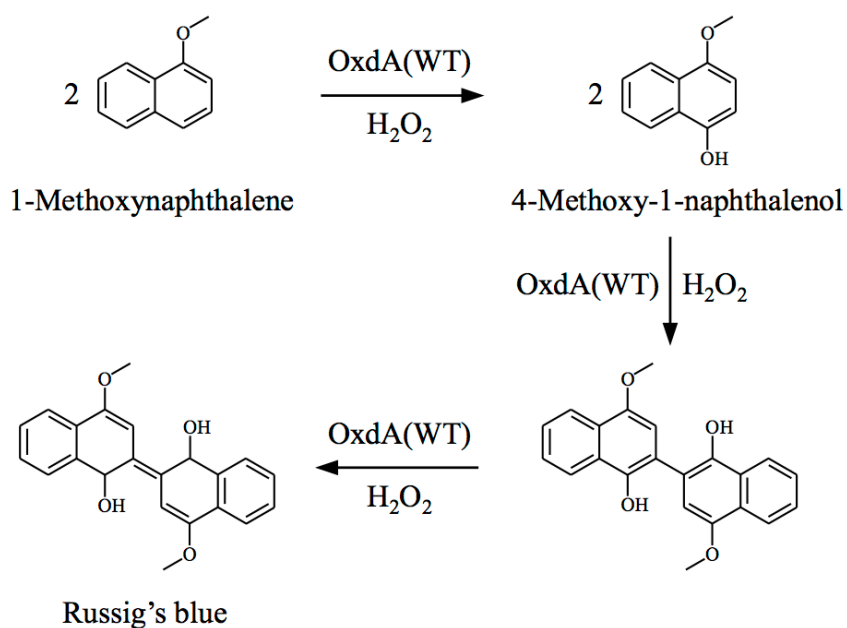
Fig 8-2 Peroxidase と Peroxygenase の反応経路
 Peroxidase (A)、Peroxygenase (B)

新規の Peroxygenase 反応産物

OxdA(WT)との反応では、Peroxygenase 反応産物として Russig's blue が形成された。一方、OxdA(H320D)の反応では、Russig's blue (610 nm)の吸光度の上昇は全く検出されず、代わりに OxdA(WT)とは大きく異なる発色を示した (Fig 5-1-5)。同発色反応を引き起こす未知の産物について同定を試み、反応産物を精製し、LCMS、NMR 等で解析したところ、1-Methoxy-2-naphthalenol であることが判明した。1-MN を基質とするこれまで知られている Peroxygenase 反応では、1-MN のナフタレン環の C-4 位がヒドロキシル化されて 4-Metnoxy-1-naphthalenol を生じる。続いて、2つのさらなる Peroxygenase 反応が、2つの 4-Metnoxy-1-naphthalenol の縮合を引き起こし、その結果、Russig's blue の生成をもたらす (Fig 8-3)。対照的に、OxdA(H320D)の産物である 1-Methoxy-2-naphthalenol は、1-MN のナフタレン環の C-2 水酸化により生成した[Fig 8-3]。しかし、さらなる Peroxygenase 反応による2つの 1-Methoxy-2-naphthalenol の縮合は起こらなかった。OxdA(WT)と

OxdA(H320D)の間の Peroxygenase 反応産物の違いは、H320D 突然変異が1つのアミノ酸残基の置換だけで、1-MN の水酸化部位を有意に変化させることを実証した。これらの知見は、ヘム鉄に対する 1-MN のナフタレン環の方向が OxdA(WT)と OxdA(H320D)の間で全く異なることを示唆している。OxdA の His320 残基は、酸化還元反応の触媒作用のための基質の配向に重要であり、その突然変異は反応産物のユニークな変化を引き起こすことが示唆される。さらに、320 残基の酸塩基を除いた OxdA(H320A)は、1-MN を基質とした Peroxygenase 活性は検出されなかった。以上の知見から、OxdA の 320 番目の残基の電荷は、1-MN のペルオキシゲナーゼ反応の触媒作用において重要な役割を持つと考えられた。

A



B

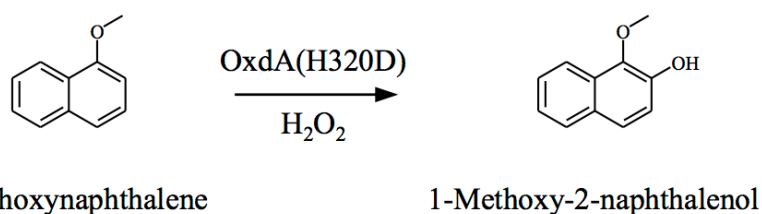


Fig. 8-3 1-MN を基質とした OxdA(WT, H320D)の Peroxygenase 反応経路 2
OxdA(WT) (A)、OxdA(H320D) (B)

総括

ヘムタンパク質に属する酸化還元酵素については、その高い触媒活性や高難度酸化を行う触媒機構に関する様々な研究がなされている。今回、私は OxdA の3つの酸化還元反応(Catalase、Peroxidase、Peroxygenase)の触媒作用を初めて発見した。これは、酸化還元反応以外の反応を触媒するヘム酵素において、酸化還元反応触媒能が確認された最初の報告である。また、私はクロロペルオキシダーゼの活性中心を参考に、OxdA の変異体 [OxdA(H320D)]を作成し、酸化還元反応触媒能を野生型の数倍~数十倍に増強する事にも成功した。さらに、OxdA(H320D)の Peroxygenase 反応において、野生型とは全く異なる産物を生成することも判明した。このことはわずか一塩基の変異で、野生型とは異なる機能を付与できることを示唆しており、今後の OxdA の応用を考える上で重要な知見である。また、OxdA は他のヘム酵素とは異なり、ヘム鉄に直接アルドキシム等の大きな基質を結合できる、特異なヘムポケットを有しており、本研究は、OxdA のもつ希有な触媒機構を新たに酸化還元反応に利用することで、他の酸化還元反応に関わるヘム酵素のヘムポケットでは触媒できないサイズの基質の触媒といった物質生産で新たな展開を生み出す可能性を秘めている。また、OxdA(H320A)の酸化還元反応触媒能の調査は、酸化還元反応における OxdA の活性中心のチャージの影響を知る上で重要な知見となり、事実、OxdA(H320A)の変異により、チャージを欠失させることで、Peroxidase 活性が減少し、1-MN を基質とした Peroxygenase 反応を触媒しなくなる事が分かった。今後はストップフロー法による分光学的な解析や、立体構造解析により、OxdA の酸化還元触媒能を更に詳細に解析していく予定である。

参考文献

1. Kobayashi M, Shimizu S. Metalloenzyme nitrile hydratase: structure, regulation, and application to biotechnology. *Nature Biotechnol.* 1998 Aug; 16(8): 733-736
2. Komeda H, Kobayashi M, Shimizu S. A novel gene cluster including the *Rhodococcus rhodochrous* J1 *nhlBA* genes encoding a low molecular mass nitrile hydratase (L-NHase) induced by its reaction product. *J. Biol. Chem.* 1996 Jun 28; 271(26): 15796-15802
3. Komeda H, Kobayashi M, Shimizu S. Characterization of the gene cluster of high-molecular-mass nitrile hydratase (H-NHase) induced by its reaction product in *Rhodococcus rhodochrous* J1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1996 Apr 30; 93(9): 4267-4272
4. Kobayashi M, Komeda H, Yanaka N, Nagasawa T, Yamada H. Nitrilase from *Rhodococcus rhodochrous* J1. Sequencing and overexpression of the gene and identification of an essential cysteine residue. *J. Biol. Chem.* 1992 Oct 15; 267(29): 20746-20751
5. Goda M, Hashimoto Y, Shimizu S, Kobayashi M. Discovery of a novel enzyme, isonitrile hydratase, involved in nitrogen-carbon triple bond cleavage. *J. Biol. Chem.* 2001 Jun 29; 276(26): 23480-23485
6. Goda M, Hashimoto Y, Takase M, Herai S, Iwahara Y, Higashibata H, et al. Isonitrile hydratase from *Pseudomonas putida* N19-2. Cloning, sequencing, gene expression, and identification of its active acid residue. *J. Biol. Chem.* 2001 Nov 29; 277(48): 45860-45865
7. Fukatsu H, Hashimoto Y, Goda M, Higashibata H, Kobayashi M. Amine-synthesizing enzyme *N*-substituted formamide deformylase: screening,

- purification, characterization, and gene cloning. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2004 Sep 21; 101(38): 13726-13731
8. Kobayashi M, Nagasawa T, Yamada H. Enzymatic synthesis of acrylamide: a success story not yet over. Trends Biotechnol. 1992 Nov; 10(11): 402-408
 9. Yamada H, Kobayashi M. Nitrile hydratase and its application to industrial production of acrylamide. Biosci. Biotechnol. Biochem. 1996 Sep; 60(9): 1391-1400
 10. Kobayashi M, Yanaka N, Nagasawa T, Yamada H. Primary structure of an aliphatic nitrile-degrading enzyme, aliphatic nitrilase, from *Rhodococcus rhodochrous* K22 and expression of its gene and identification of its active site residue. Biochemistry 1992 Sep; 31(37): 9000-9007
 11. Komeda H, Hori Y, Kobayashi M, Shimizu S. Transcriptional regulation of the *Rhodococcus rhodochrous* J1 nitA gene encoding a nitrilase. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1996 Oct 1; 93(20): 10572-10577
 12. Kobayashi M, Izui H, Nagasawa T, Yamada H. Nitrilase in biosynthesis of the plant hormone indole-3-acetic acid from indole-3-acetonitrile: cloning of the *Alcaligenes* gene and site-directed mutagenesis of cysteine residues. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1993 Jan 1; 90(1): 247-251
 13. Kobayashi M, Suzuki T, Fujita T, Masuda M, Shimizu S. Occurrence of enzymes involved in biosynthesis of indole-3-acetic acid from indole-3-acetonitrile in plant-associated bacteria, *Agrobacterium* and *Rhizobium*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1995 Jan 31; 92(3): 714-718
 14. Kobayashi M, Shimizu S. Cobalt proteins. Eur. J. Biochem. 1999 Apr; 261(1): 1-9
 15. Asano Y, Tani Y, Yamada H. A new enzyme, nitrile hydratase, which degrades

- acetonitrile in combination with amidase. *Agric. Biol. Chem.* 1980; 44(9): 2251-2252
16. Popescu V C, Münck E, Fox B G, Sanakis Y, Cummings J G, Turner I M Jr, et al. Mossbauer and EPR studies of the photoactivation of nitrile hydratase. *Biochemistry* 2001 Jun 10; 40(27): 7984-7991
 17. Kobayashi M, Fujiwara Y, Goda M, Komeda H, Shimizu S. Identification of active sites in amidase: evolutionary relationship between amide bond- and peptide bond-cleaving enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1997 Oct 28; 94(22): 11986-11991
 18. Kobayashi M, Goda M, Shimizu S. The catalytic mechanism of amidase also involves nitrile hydrolysis. *FEBS Lett.* 1998 Nov 20; 439(3): 325-328
 19. Kobayashi M, Komeda H, Nagasawa T, Nishiyama M, Horinouchi S, Beppu T, et al. Amidase coupled with low-molecular-mass nitrile hydratase from *Rhodococcus rhodochrous* J1. Sequencing and expression of the gene and purification and characterization of the gene product. *Eur. J. Biochem.* 1993 Oct 1; 217(1): 327-336
 20. Yamada H, Shimizu S, Kobayashi M. Hydratases involved in nitrile conversion: screening, characterization and application. *Chem. Rec.* 2001;1(2): 152-161
 21. Endo I, Odaka M, Yohda M. An enzyme controlled by light: the molecular mechanism of photoreactivity in nitrile hydratase. *Trends Biotechnol.* 1999 Jun; 17(6): 244-248
 22. Oinuma K-I, Hashimoto Y, Konishi K, Goda M, Noguchi T, Higashibata H, et al. Novel aldoxime dehydratase involved in carbon-nitrogen triple bond synthesis of *Pseudomonas chlororaphis* B23. Sequencing, gene expression, purification, and characterization. *J. Biol. Chem.* 2003 Aug 8; 278(32): 29600-29608

23. Nagasawa T, Nanba H, Ryuno K, Takeuchi K, Yamada H. Nitrile hydratase of *Pseudomonas chlororaphis* B23. Purification and characterization. Eur. J. Biochem. 1987 Feb 2; 162(2): 691-698
24. Hashimoto Y, Hosaka H, Oinuma K-I, Goda M, Higashibata H, Kobayashi M. Nitrile pathway involving acyl-CoA synthetase: overall metabolic gene organization and purification and characterization of the enzyme. J. Biol. Chem. 2005 Mar 11; 280(10): 8660-8667
25. Nagasawa T, Ryuno K, Yamada H. Superiority of *Pseudomonas chlororaphis* B23 nitrile hydratase as a catalyst for the enzymatic production of acrylamide. Experientia 1989 Dec; 45(11): 1066-1070
26. Kato Y, Nakamura K, Sakiyama H, Mayhew S G, Asano Y. Novel heme-containing lyase, phenylacetaldoxime dehydratase from *Bacillus* sp. strain OxB-1: purification, characterization, and molecular cloning of the gene. Biochemistry 2000 Feb 1; 39(4): 800-809
27. Sawai H, Sugimoto H, Kato Y, Asano Y, Shiro Y, Aono S. X-ray crystal structure of Michaelis complex of aldoxime dehydratase. J. Biol. Chem. 2009 Nov 13; 284(46): 32089-32096
28. Oinuma K-I, Ohta T, Konishi K, Hashimoto Y, Higashibata H, Kitagawa T, et al. Heme environment in aldoxime dehydratase involved in carbon-nitrogen triple bond synthesis. FEBS Lett. 2004 Jun 18; 568(1-3): 44-48
29. Konishi K, Ishida K, Oinuma K-I, Ohta T, Hashimoto Y, Higashibata H, et al. Identification of crucial histidines involved in carbon-nitrogen triple bond synthesis by aldoxime dehydratase. J. Biol. Chem. 2004 Nov 12; 279(46): 47619-47625
30. Konishi K, Ohta T, Oinuma K-I, Hashimoto Y, Kitagawa T, Kobayashi M.

- Discovery of a reaction intermediate of aliphatic aldoxime dehydratase involving heme as an active center. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2006 Jan 17; 103(3): 564-568
31. Oinuma K-I, Kumita H, Ohta T, Konishi K, Hashimoto Y, Higashibata H, et al. Stopped-flow spectrophotometric and resonance Raman analyses of aldoxime dehydratase involved in carbon–nitrogen triple bond synthesis. *FEBS Lett.* 2005 Feb 28; 579(6): 1394–1398
32. Nomura J, Hashimoto H, Ohta T, Hashimoto Y, Wada K, Naruta Y, et al. Crystal structure of aldoxime dehydratase and its catalytic mechanism involved in carbon-nitrogen triple-bond synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2013 Feb 19; 110(8): 2810-2815
33. Pinakoulaki E, Koutsoupakis C, Sawai H, Pavlou A, Kato Y, Asano Y, et al. Aldoxime dehydratase: probing the heme environment involved in the synthesis of the carbon-nitrogen triple bond. *J. Phys. Chem. B.* 2011 Nov 10;115(44): 13012–13018
34. Olson J S, Phillips G N Jr. Kinetic Pathways and Barriers for Ligand Binding to Myoglobin. *J. Biol. Chem.* 1996 Jul 26; 271(30): 17593-17596
35. Krishna M C, Samuni A, Taira J, Goldstein S, Mitchell J B, Russo A. Stimulation by nitroxides of catalase-like activity of heme proteins. Kinetics and mechanism. *J. Biol. Chem.* 1996 Oct 18; 271(42): 26018-26025
36. Brancaccio A, Cutruzzolá F, Allocatelli C T, Brunori M, Smerdon S J, Wilkinson A J, et al. Structural factors governing azide and cyanide binding to mammalian metmyoglobins. *J. Biol. Chem.* 1994 May 13; 269(19): 13843-13853
37. Dou Y, Olson J S, Wilkinson A J, Ikeda-Saito M. Mechanism of hydrogen cyanide

- binding to myoglobin. *Biochemistry* 1996 Jun 4; 35(22): 7107-7113
38. Yonetani T, Schleyer H. Studies on cytochrome c peroxidase. IX. The reaction of ferrimyoglobin with hydroperoxides and a comparison of peroxide-induced compounds of ferrimyoglobin and cytochrome c peroxidase. *J. Biol. Chem.* 1967 Apr 25; 242(8): 1974-1979
 39. Murthy M R, Reid T J 3rd, Sicignano A, Tanaka N, Rossmann M G. Structure of beef liver catalase. *J. Mol. Biol.* 1981 Oct 25; 152(2): 465-499
 40. Sundaramoorthy M, Ternier J, Poulos T L. The crystal structure of chloroperoxidase: a heme peroxidase--cytochrome P450 functional hybrid. *Structure* 1995 Dec 15; 3(12): 1367-1377
 41. Matsui T, Ozaki S-i, Watanabe Y. Formation and catalytic roles of compound I in the hydrogen peroxide-dependent oxidations by His64 myoglobin mutants. *J. Am. Chem. Soc.* 1999 Nov 3; 121(43): 9952-9957
 42. Hayashi Y, Yamazaki I. The oxidation-reduction potentials of compound I/compound II and compound II/ferric couples of horseradish peroxidases A2 and C. *J. Biol. Chem.* 1979 Sep 25; 254(18): 9101-9106
 43. Poulos T L, Freer S T, Alden R A, Edwards S L, Skogland U, Takio K, et al. The crystal structure of cytochrome c peroxidase. *J. Biol. Chem.* 1980 Jan 25; 255(2): 575-580
 44. Green M T, Dawson J H, Gray H B. Oxoiron(IV) in chloroperoxidase compound II is basic: implications for P450 chemistry. *Science* 2004 Jun 11; 304(5677): 1653-1656
 45. Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970 Aug 15; 227(5259): 680-685

46. Matsui T, Ozaki S-i, Liang E, Phillips G N Jr, Watanabe Y. Effects of the location of distal histidine in the reaction of myoglobin with hydrogen peroxide. *J. Biol. Chem.* 1999 Jan 29; 274(5): 2838-2844
47. Shoji O, Wiese C, Fujishiro T, Shirataki C, Wunsch B, Watanabe Y. Aromatic C–H bond hydroxylation by P450 peroxygenases: a facile colorimetric assay for monooxygenation activities of enzymes based on Russig’s blue formation. *J. Biol. Inorg. Chem.* 2010 May 19; 15(7): 1109-1115
48. Onoda H, Shoji O, Watanabe Y. Acetate anion-triggered peroxygenation of non-native substrates by wild-type cytochrome P450s. *Dalton Trans.* 2015 Jun 9; 44(34): 15316-15323
49. Liao R Z, Thiel W. Why is the oxidation state of iron crucial for the activity of heme-dependent aldoxime dehydratase? A QM/MM Study. *J. Phys. Chem.* 2012 Jul 16; 11(8): 9396-9408
50. Beltrán J, Kloss B, Hosler J P, Geng J, Liu A, Modi A, et al. Control of carotenoid biosynthesis through a heme-based *cis-trans* isomerase. *Nat. Chem. Biol.* 2015 Jun 15; 11(8): 598-605
51. Kawasaki C, Nagano H, Iio T, Kondo M. Studies on mechanisms of bactericidal action of hydrogen peroxide. *Food Hyg. Saf. Sci.* 1970 Mar 12; 11(3): 155-160
52. Valentine J. S, Foote C S, Greenburg A, Liebman J F. *Active Oxygen in Biochemistry.* Chapman & Hall. 1995
53. Masatoshi Y., Yoshiteru H., Takuto K., Seiya T., Michihiko K. New function of aldoxime dehydratase: Redox catalysis and the formation of an expected product (2017 In press)

謝辞

本研究を行うにあたり、終始ご指導、ご助言を賜りました小林 達彦教授に深く感謝いたします。

また、日頃より直接暖かくご指導くださいました橋本 義輝准教授と熊野 匠人助教に心から感謝いたします。

さらに、還元電位の測定において、ご指導、ご尽力頂いた辻村清也 准教授に心から感謝いたします。

そして、本研究のために多大なご助力をいただきました卒業生の小西 一誠博士と野村 純平博士をはじめとする、多くの面でお世話になりました微生物育種工学研究室の皆様に厚くお礼申し上げます。