

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05700

研究課題名(和文) 色素分解酵素DyPを利用した環境汚染物質の分解・環境浄化システムの構築

研究課題名(英文) Environmental pollutant degradation system using dye-decolorizing peroxidase

研究代表者

内田 毅 (Uchida, Takeshi)

北海道大学・理学研究院・准教授

研究者番号：30343742

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：DyP (Dye-decolorizing peroxidase) はペルオキシダーゼというタンパク質の一種で、過酸化水素を利用し、アントラキノン系の色素を分解するヘム酵素であることから、環境浄化酵素としての利用が期待された。至適pHが4と低いことが実用化へのハードルとなっていたことから、立体構造と反応機構解析をもとにアミノ酸置換を導入し、中性pHで色素を分解できるように変換し、試験管内では中性で色素分解を可能にした。培養した大腸菌で色素を分解する場合、DyPでは活性中心であるヘムを含まず発現するので、ヘムがタンパク質に共有結合で結合しているシトクロムcを色素分解酵素に変換することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

DyP (Dye-decolorizing peroxidase) はペルオキシダーゼというタンパク質の一種で、過酸化水素を利用し、アントラキノン系の色素を分解するヘム酵素であることから、環境浄化酵素としての利用が期待された。至適pHが4と低いことが実用化へのハードルとなっていたことから、立体構造と反応機構解析をもとにアミノ酸置換を導入し、中性pHで色素を分解できるように変換し、試験管内では中性で色素分解を可能にした。培養した大腸菌で色素を分解する場合、DyPでは活性中心であるヘムを含まず発現するので、ヘムがタンパク質に共有結合で結合しているシトクロムcを色素分解酵素に変換することに成功した。

研究成果の概要(英文)：DyP (Dye-decolorizing peroxidase) is a type of protein called peroxidase, and is a heme-containing enzyme that uses hydrogen peroxide to decompose anthraquinone dyes. Since the low optimum pH of 4 was a hurdle for practical application, we introduced amino acid substitutions to DyP based on the analysis of the three-dimensional structure and reaction mechanism, and converted it to degrade dyes at neutral pH. When the dye is degraded in cultured *Escherichia coli*, it was expressed without heme, the active center of DyP. Then, cytochrome c, to which heme is covalently bound to the protein, was successfully converted to a dye-degrading enzyme. The above-mentioned results have enabled us to build an environmental remediation system using microorganisms by forcing the microorganisms to express DyP.

研究分野：生体分子化学

キーワード：環境浄化 色素分解 酵素 ヘム 過酸化水素 大腸菌

1. 研究開始当初の背景

CAS (Chemical Abstracts Service) に登録されている化学物質はこの十年間に加速度的に増え、2015年には1億件を超えた。そのため、化学物質による環境負荷は年々深刻化している。例えば、繊維の着色などに用いられる合成色素は、世界中で年間100トン以上合成され、そのうち約1割が環境中に放出されていると言われていたことから、特に繊維産業が盛んな東南アジア諸国では、その適切な処理法の開発が必要とされている。

細菌やカビの一部には DyP (Dye-decolorizing peroxidase) と呼ばれるヘムを活性中心としてもつペルオキシダーゼという酵素の一種が存在する。これは過酸化水素と反応し、アントラキノン系の色素を分解する。我々は以前、遺伝子解析からコレラ菌の DyP (VcDyP) を同定し、その活性を報告した (Uchida et al., 2015)。DyP はフェノール類など一般的なペルオキシダーゼが酸化する基質だけではなく、Reactive Blue 19 (図1) のような嵩高い基質も分解するという特徴がある。結晶構造解析と変異体を用いた解析から、VcDyP にはヘムが存在するが、嵩高い基質は二量体の界面に結合し、ヘムと過酸化水素との反応で生じたラジカルがその界面に移動し、基質と反応することを明らかにした。つまり、活性部位がヘム近傍ではなく、タンパク質表面であるため、基質の選択性が広いという他のペルオキシダーゼにはない特徴をもつ。さらに、HRP (西洋わさびペルオキシダーゼ) などのペルオキシダーゼ類とは対照的に、大腸菌で可溶性タンパク質として発現し、発現量も多いため、応用利用が期待できる。しかし、至適 pH が4と低く、pH 7以上ではほとんど活性がないという問題が存在した。ペルオキシダーゼは古くから研究が行われ、その反応機構がよく理解されていることから、至適 pH の問題はヘム近傍のアミノ酸残基の置換により解決することが可能と考えられた。さらに、酵素活性の向上や分解する基質の拡張、無機材料への固定化などによる安定性の向上を組み合わせることにより、環境浄化酵素としての利用が期待されていた。

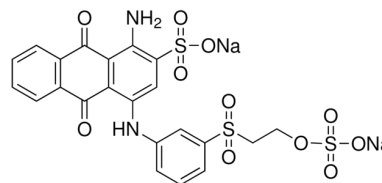


図1 Reactive Blue 19 の構造

2. 研究の目的

DyP (Dye-decolorizing peroxidase) はペルオキシダーゼというタンパク質の一種で、過酸化水素を利用し、アントラキノン系の色素を分解するヘム酵素である。多くのヘム酵素と異なり、活性部位がヘム周辺ではなく、タンパク質表面のチロシンやトリプトファンであることから、嵩高い基質を分解することができる。また、酵素と基質の関係は鍵と鍵穴の関係で例えられるように厳密な認識機構があるのが一般的であるが、タンパク質表面が活性部位である DyP は、基質の選択性が広く、比較的多様な物質を分解することが可能である。このような特徴は、一見すると酵素として不利に思えるが、種々の物質を分解する環境浄化酵素としては理想的である。そこで、DyP を使った難分解性化合物の分解への応用利用を試みる。ただし、至適 pH が4と低いことが実用化へのハードルとなっているので、アミノ酸置換を導入し、至適 pH の中性への変換を試みる。さらに DyP を強制発現させた微生物による環境浄化という手順により、アントラキノン系の合成色素の分解に加え、構造が類似したダイオキシシンや抗生物質などの排水中の有害物質を安価で効率的に分解する環境浄化システムをタンパク質レベルと微生物レベルの両面のアプローチから構築する。

3. 研究の方法

(1) アミノ酸変異に至適 pH の変換: DyP による色素分解反応の至適 pH は4付近であり、pH 7以上ではほとんど活性がない。しかし、環境浄化酵素として利用する場合、中性付近で活性が高い方が望ましいため、至適 pH の変換を試みる。酵素反応の至適 pH とヘム近傍に存在するアミノ酸残基の pKa が関連していることが知られる。VcDyP の至適 pH が4であるのは、アスパラギン酸 144 (Asp144) が酸-塩基触媒として機能しているためと考えられる。そこで、VcDyP の Asp144 をヒスチジンに置換することにより、至適 pH を変化させる。

(2) 環境浄化細菌としての利用: 事故による環境汚染のような場合は上記のような改良型酵素を利用するが、下水中に存在する抗生物質を分解するような場合は、大腸菌などの微生物に高活性化させた VcDyP を導入し、強制発現させることにより、微生物そのものによる化合物の分解を試みる。基質分子が大きく、細胞質内部まで取り込まれない場合は、取り込みを容易にするため、ペリプラズム空隙で分解反応を行うため、発現系を変更する。また、菌体内の過酸化水素の濃度を高めるために、過酸化水素の除去酵素であるカタラーゼやペルオキシレドキンなどの遺伝子に変異を加え発現を抑える。

4. 研究成果

(1) 至適 pH の変換

DyP を環境浄化酵素として利用する場合、至適 pH が 4 と低く、中性領域ではほとんど活性がないことが実用化へのハードルとなっていた。そこで、アミノ酸置換により至適 pH の中性への変換を試みた。多くのヘム酵素では、酵素反応の至適 pH とヘム近傍に存在するアミノ酸残基の pK_a が関連していることが知られている。我々が明らかにした VcDyP の立体構造によると (Uchida et al., 2015)、活性部位にはアスパラギン酸 144 (Asp144) が存在し、酸-塩基触媒として機能しているためと予想された (図 2)。そのため、VcDyP の至適 pH が 4 であるのは、この Asp144 が原因であると考えた。そこで、VcDyP の Asp144 を pK_a が中性のヒスチジンに置換することにより、至適 pH を変化させることを試みた。しかし、酵素活性そのものが消失してしまっ。モデル構造の解析から、挿入したヒスチジンが活性部位に近すぎるのが原因と考えられたため、少し離れた位置にヒスチジンを導入したところ、活性が回復した。しかし、至適 pH は 4 のままであった。このことから、VcDyP の至適 pH はヘム近傍のアミノ酸残基には依存せず、多くのヘム酵素とは機構が異なることがわかった。

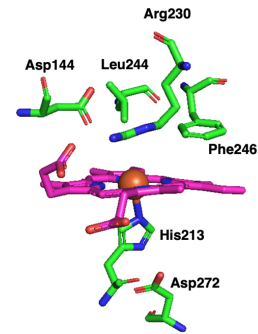


図 2 VcDyP のヘム周辺の構造

VcDyP の活性部位は過酸化水素が反応するヘムではなく、タンパク質表面のチロシンであることから、ヘムからこのチロシンへのラジカル移動経路を pathway analysis という手法を用い、推測した。その結果、ヘムからタンパク質表面の活性部位へのラジカル移動経路に Arg112, Asp138, Met139, Thr140 が存在することがわかった。そこで、これらのアミノ酸残基の置換体を作成し、それらの色素分解活性の pH 依存性を調べた。その結果、Asp138 をバリンまたはグリシンに置換した D138V, D138G 変異体において、色素分解活性の至適 pH が 6.5 になった (図 3)。当初想定した Asp144 は至適 pH に関与しなかったが、関与しているのは、その近くに存在するもう一つのアスパラギン酸 (Asp138) であった。これらの結果、中性付近で色素を分解できる酵素の作成に成功した。

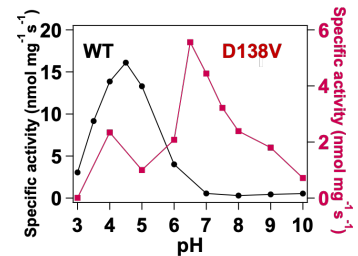


図 3 VcDyP の至適 pH の変換

(2) 大腸菌の培養による色素分解反応

VcDyP にアミノ酸置換を導入することにより、中性 pH で活性を持たせることに成功したので、これを大腸菌に発現させ、大腸菌を培養しながら、溶液内の色素を分解することを試みた。しかし、予想外に活性は著しく低く、環境浄化酵素として利用することができなかつた。活性が低い原因として、基質である色素分子 (図 1) が大腸菌内部に取り込まれないことが原因と考え、ペリプラズム空隙と呼ばれる大腸菌の外膜と内膜の間に発現するように発現系を作成した。しかし、活性に変化はなかつた。原因を検討した結果、ペリプラズム空隙発現させると活性中心であるヘムと結合していないことがわかった。ヘモグロビンなど多くのヘムタンパク質ではヘムはタンパク質と配位結合しているため、大腸菌内で発現してもヘムを含まない可能性がある。細胞質内と異なり、ペリプラズム空隙では、細胞質で合成されたヘムを利用することが難しいという問題が起こった。

(3) シトクロム c を色素分解酵素へ変換

色素分解反応の至適 pH を 4 から 8 に変換した DyP を大腸菌内で過剰発現させ、大腸菌を培養しながら、色素を分解するシステムの構築を試みたが、活性中心であるヘムを含まない状態で発現したため、色素分解活性は向上しなかつた。そこで、タンパク質とヘムが共有結合しているシトクロム c を利用することにした。シトクロム c は電子伝達タンパク質であり、分解酵素ではないので、アミノ酸置換により色素分解活性を付与させることを試みた。前年までの VcDyP の研究から、色素分解活性を発揮するためには、次の三点が考慮する必要があることがわかってい

- ① 過酸化水素との反応
- ② 活性部位となるタンパク質表面のラジカル形成部位の同定
- ③ 基質の親和性を向上させるために活性部位近傍に芳香性残基の導入

はじめに、①を達成するためにヘムの配位子である Met80 を Val に置換した。その結果、活性は 2 倍に向上した。次に、②を達成するためにタンパク質にある 4 つの Tyr を置換した結果 Tyr48 と Tyr74 が活性に関与することがわかった。そこで、この二つの残基の周辺で、側鎖が表面に露出している残基を結晶構造から探索した結果、Pro76 があつたので、この残基を Trp に置換した。その結果、活性は約 3 倍に向上した。さらに過酸化水素との反応性を上げるため、ヘムの配位子である His18 から 4 Å に存在する Gly29 を Asp に置換し、His18 と水素結合を結成させたところ、酸化反応活性は約 100 倍に増加した (図 4)。

本研究課題では、DyP を活用し、種々の難分解性化合物を分解するシステムの構築を目指した。DyP の構造解析と機能解析により得られた知識をもとに本来活性のないシトクロム *c* を色素分解酵素に変換することに成功した。過酸化水素との反応性が高すぎ、自分自身を分解してしまうという問題点が生じたため、大腸菌を利用した分解システムの構築には成功していないが、今後はヘム周辺で生成したラジカルとタンパク質表面まで移動させる経路を整備することで、ラジカルを高効率で色素分解につなげ、難分解性化合物の分解システムの構築が可能になるものと期待できる。

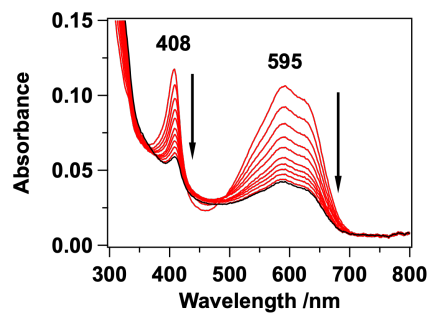


図4 シトクロム *c* 変異体 (G29D) による色素分解反応

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Uchida Takeshi, Omura Issei, Umetsu Sayaka, Ishimori Koichiro	4. 巻 219
2. 論文標題 Radical transfer but not heme distal residues is essential for pH dependence of dye-decolorizing activity of peroxidase from <i>Vibrio cholerae</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Inorganic Biochemistry	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jinorgbio.2021.111422	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Omura Issei, Ishimori Koichiro, Uchida Takeshi	4. 巻 51
2. 論文標題 Converting cytochrome c into a DyP-like metalloenzyme	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Dalton Transactions	6. 最初と最後の頁 12641 ~ 12649
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/D2DT02137D	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計14件（うち招待講演 0件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 大村 翼世、石森 浩一郎、内田 毅
2. 発表標題 環境浄化を目指した難分解性色素分解酵素の設計と創製
3. 学会等名 第55回酸化反応討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 辰巳 晶信、石森 浩一郎、内田 毅
2. 発表標題 鉄イオンが活性化するバクテロイデス由来ヘム分解酵素
3. 学会等名 第55回酸化反応討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 吉村 遥香、石森 浩一郎、内田 毅
2. 発表標題 コレラ菌由来ペルオキシダーゼ VcDyP におけるヘムを分解しない脱鉄反応
3. 学会等名 第55回酸化反応討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Issei Omura, Koichiro Ishimori, Takeshi Uchida
2. 発表標題 Converting Cytochrome c into a DyP-like Enzyme
3. 学会等名 The 10th Asian Biological Inorganic Chemistry Conference (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大村 翼世、石森 浩一郎、内田 毅
2. 発表標題 難分解性色素を効率的に分解可能なシトクロムcの設計と創製
3. 学会等名 生命金属科学 夏の合宿
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 辰巳 晶信、石森 浩一郎、内田 毅
2. 発表標題 パストレラ菌由来ヘム分解酵素の鉄イオンによる活性制御機構
3. 学会等名 生命金属科学 夏の合宿
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 辰巳 晶信、大田 一喜、竹内 祥太、石森 浩一郎、内田 毅
2. 発表標題 鉄イオンが活性化するバクテロイダ菌由来ヘム分解酵素
3. 学会等名 生命金属科学シンポジウム2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 梅津 彩加、佐々木 美穂、石森 浩一郎、内田 毅
2. 発表標題 コレラ菌由来色素分解ペルオキシダーゼによるヘムを分解しない脱鉄機構
3. 学会等名 第15回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大村 翼世、石森 浩一郎、内田 毅
2. 発表標題 電子伝達タンパク質シトクロムcを用いた色素分解酵素の創製
3. 学会等名 第54回酸化反応討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大村 翼世、石森 浩一郎、内田 毅
2. 発表標題 環境浄化を目的としたシトクロムcの色素分解酵素への転換
3. 学会等名 生命金属科学 夏の合宿
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Issei Omura, Koichiro Ishimori and Takeshi Uchida
2. 発表標題 Improving dye-degradation activity of dye-decolorizing peroxidase at neutral pH
3. 学会等名 Pacifichem 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 村西 和佳、内田 毅、石森 浩一郎
2. 発表標題 コレラ菌転写調節因子Furの機能制御機構とニッケル取り込みシステムの新たな役割
3. 学会等名 2020年度日本生物物理学会北海道支部-東北支部合同例会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中村 結奈、石森 浩一郎、内田 毅
2. 発表標題 ヘム合成系酵素フェロキラーゼのヘム結合による活性制御
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大村 翼世、石森 浩一郎、内田 毅
2. 発表標題 難分解性色素を分解可能なシトクロムcの設計と創製
3. 学会等名 第53回酸化反応討論会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------