

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年8月26日現在

機関番号：32670

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22570136

研究課題名（和文）新規ペルオキシダーゼファミリーを代表する酵素 DyP の触媒メカニズムの解明

研究課題名（英文） Characterization of the catalytic mechanism of DyP which is a representative novel peroxidase family.

研究代表者

菅野 靖史（SUGANO YASUSHI）

日本女子大学・理学部・教授

研究者番号：90282855

研究成果の概要（和文）：これまで未解明であった DyP の触媒メカニズムの内、過酸化水素の酸化反応に関与するアミノ酸残基としてアスパラギン酸 171 番を特定した。アスパラギン酸 171 番をアスパラギンに置換することで、過酸化水素の酸化活性が失われた。この時、DyP の構造全体のゆがみは検出されず、アスパラギン酸 171 番が活性残基であることが明らかとなった。さらに、反応メカニズムとしてスイングメカニズムを提唱した。この研究は、国際的に高く評価され、新しい酵素番号 EC 1.11.1.19 が割り当てられ、注目されている。

研究成果の概要（英文）：So far, the catalytic mechanism of DyP was unknown. In this study, we have proved that aspartic acid 171 is the catalytic residue because the mutant of aspartic acid to asparagine has lost the activity completely. We've also proposed that the catalytic mechanism depends on the swinging movement of the aspartic acid. Throughout the whole research, DyP has been assigned a new EC number (EC 1.11.1.19) and has been taken notice over the world.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：理学

科研費の分科・細目：機能生物科学

キーワード：DyP、触媒メカニズム、X線結晶構造解析

1. 研究開始当初の背景

ペルオキシダーゼは、 H_2O_2 を一次基質として、様々な二次基質を酸化する酵素であり、 $2AH_2 + H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + 2AH\cdot$ の反応を触媒すると定義される。その研究の歴史は古く、19世紀にまでさかのぼる。このため、触媒サイクルの解明、基質の選択性、立体構造など様々な視点から研究され、すでに研究し尽くされた感があった。これまで、植物、微生物由来のペ

ルオキシダーゼの多くを植物型ペルオキシダーゼとし、動物由来のペルオキシダーゼは動物型ペルオキシダーゼとしてきた。ところが、私たちが発見した微生物由来の酵素 DyP は、ペルオキシダーゼ型の反応を示し、これまでの植物型ペルオキシダーゼとは一次構造も立体構造も全く異なっていた。当初は、この違いは単に例外的なものと考えられていたが、ここ 1, 2 年で、私たちが発見した

DyP と類似の酵素が他の生物種で明らかになるにつれて、DyP 型ペルオキシダーゼファミリーという新しいペルオキシダーゼファミリーが誕生した。その結果、これまで植物型ペルオキシダーゼと呼ばれていたファミリーは、非動物型ペルオキシダーゼファミリーと呼ばれるようになった。このように、DyP の発見とその研究成果は、単に新しいペルオキシダーゼファミリーの提唱にとどまらず、従来のペルオキシダーゼファミリーの見直しにまで波及しており、今後の研究の展開が国際的に注目されている。

2. 研究の目的

新規のペルオキシダーゼ型酵素 DyP は、従来のペルオキシダーゼとしての機能に加えて、加水分解反応も触媒すると考えられ、様々な分子を基質とすることができる。そこで、ペルオキシダーゼが加水分解反応も引き起こす触媒メカニズムを解明する。

3. 研究の方法

基質結合部位の解析を重点的に行った。そこで、二次基質となるアントラキノン化合物の結合に関与すると推定される Lys20 と、その周辺の残基に変異を施した。部位特異的変異体の作製は、大腸菌と PCR を用いた常法によって行った。基質はアントラキノン染料のモデル化合物である 1-amino-2-sulfonyl-4-aminomethyl-9,10-anthraquinone (AQ-2), 2,6-ジメトキシフェノール、アスコルビン酸を用いた。これまでの研究で、反応生成物にフタル酸が含まれることがわかっているため、加水分解反応が起きていることは明らかである。私たちは、この加水分解に関与する水分子は、反応溶媒中の不特定多数の水分子ではなく、 H_2O_2 由来の水分子であると推定した。私たちは、この水分子が加水分解反応に寄与すると考え、アントラキノン骨格のカルボニル基を攻撃するならば、開裂して生じたカルボニルの酸素原子は、反応した水分子由来の酸素となると考えた。そこで、酸素を ^{18}O で標識した安定同位体の H_2O_2 を用い、反応後に生成したフタル酸の質量数を調べた。この場合、生成物の質量は、通常のフタル酸よりも 4 大きくなるはずである（アントラキノンにはカルボニルが 2ヶ所あるため）。この質量数の変化を ESI-LC-MS により検出する事を試みた。合わせて、AQ-2 との共結晶体の作出を試みた。共結晶作製は二通りで行っ

た。すなわち

①結晶化溶液に DyP と AQ-2 を同時に加え結晶化する方法

②DyP の結晶作製後に、AQ-2 溶液にゾーキングする方法
を行った。

4. 研究成果

1) 過酸化水素の酸化反応を担うアミノ酸残基である Asp171 が、どのようなメカニズムで反応するか、Asp171Asn 変異体と、過酸化水素の結合モデル分子種として使われるシアノイオンとの複合体結晶構造解析により解明した。図 1 は、native-DyP, D171N 変異体、native-DyP-CN 複合体、D171N-CN 複合体の各種結晶構造解析の結果をへム面を基準として重ね合わせて示したものである。これによると、触媒残基 Asp171 の側鎖は、最大 37 度の範囲で振り子のように動く事が解った。つまり、D171 は管理自由とその側鎖を動かすことが可能であると結論付けられる。これを基に推定したのが図 2 に示す触媒反応時のスイングモデルである。過酸化水素の酸化反応の際に、振り子のように D171 の側鎖が触れる事で水素の引き抜き反応を行うことが考えられた。

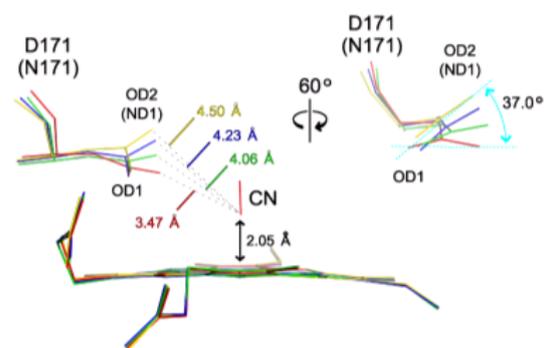


図1 D171およびN171の側鎖の動き

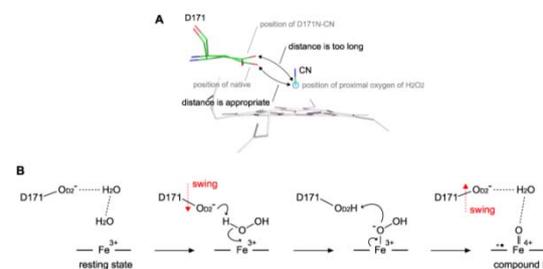


図2 図1の結果を基に推定した過酸化水素の酸化反応に伴うスイングモデル

2) 残念ながら AQ-2 と DyP の複合体結晶を得ることはできなかった。その代わりに、アントラキノン化合物ではないものの DyP の基質である 2,6-ジメトキシフェノールとアスコ

ルビン酸の結合部位を決定する事が出来た。両基質の結合部位は、共通であり、DyP 分子の表面近くに存在していた。ここから活性中心のヘムまでは、かなりの距離があるが、合理的な水素結合ネットワークが存在し、このネットワークを通じて分子表面からヘムまで電子伝達が可能であると推定された。

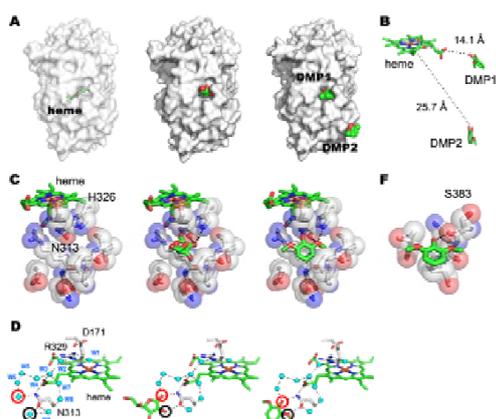


図3 A, アスコルビン酸、ジメトキシフェノール(DMP)がDyPに結合した複合体構造 B, DMPとヘム鉄までの距離; C, 基質とヘムの空間関係; D, DyP分子表面のN313からヘム面につながる水素結合ネットワーク

3) ^{18}O を用いた過酸化水素を用いて、DyP とアントラキノン化合物の開裂反応によって生じるフタル酸に ^{18}O が入るかどうかをESI-LC-MSを用いて確認したが、明確に ^{18}O の入ったフタル酸を検出することは出来なかった。おそらく、加水分解に関与する水分子は、過酸化水素分子由来に限らないものと考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計3件)

1. T. Yoshida, H. Tsuge, T. Hisabori, Y. Sugano. Crystal structures of dye-decolorizing peroxidase with ascorbic acid and 2,6-dimethoxyphenol. FEBS Letters 586(24), 4351-4356, 2012.

2. T. Yoshida, H. Tsuge, H. Konno, T. Hisabori, Y. Sugano. The catalytic mechanism of dye-decolorizing peroxidase DyP may require the swinging movement of an aspartic acid residue. FEBS Journal 278(13), 2387-2394, 2011.

3. N. Gomi, S. Yoshida, K. Matsumoto, M. Okudomi, H. Konno, T. Hisabori, Y. Sugano. Degradation of the synthetic dye amaranth by the fungus *Bjerkandera adusta* Dec 1: Inference of the degradation pathway from an analysis of decolorized products. Biodegradation, 22(6), 1239-1245, 2011

[学会発表] (計0件)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菅野 靖史 (SUGANO YASUSHI)

日本女子大学・理学部・教授

研究者番号：90282855

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

津下 英明 (TSUGE HIDEAKI)

京都産業大学・総合生命科学部・教授

研究者番号：40299342