

平成 30 年 6 月 26 日現在

機関番号：13301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14709

研究課題名(和文) 古代色素「貝紫」生合成酵素の高選択的臭素化反応メカニズムの解明と応用

研究課題名(英文) Investigation and application of highly selective bromination reaction mechanism of biosynthetic enzyme of Tyrian purple, an ancient pigment

研究代表者

片岡 邦重 (KATAOKA, Kunishige)

金沢大学・物質化学系・教授

研究者番号：40252712

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：二臭化インディゴの分子構造をもつ貝紫は、紀元前1,600年以前から使用されている希少な動物性天然染料である。本研究では、アカシガイの鰓下腺から貝紫色素前駆体の臭素化反応を触媒するプロモペルオキシダーゼ(BPO)の精製を試みた。BPOは鰓下腺に微量しか存在していないため、均一精製には至らなかったが、膜画分に存在するBPOの活性発現に、可溶性活性化タンパク質が必要であることを明らかにした。2成分で構成されるBPOはこれまでに報告例のない新規の酵素である。

研究成果の概要(英文)：Tyrian purple having a molecular structure of 6,6'-dibromoindigo is a rare animal natural dye used since 1,600 BC. In this study, we tried to purify bromoperoxidase (BPO), which catalyzes the bromination reaction of purple pigment precursor from the hypobranchial gland of the shellfish, *Rapana venosa*. Since BPO exists only in trace amounts in shellfish, it could not be purified homogeneously, but revealed that a soluble activating protein is necessary for the activity of BPO present in the membrane fraction. BPO composed of two components is a novel enzyme, which has never been seen before.

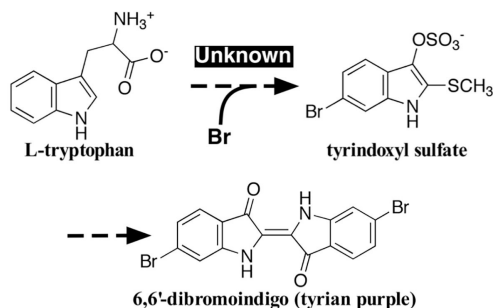
研究分野：応用生物化学

キーワード：bromoperoxidase haloperoxidase Tyrian purple shellfish

1. 研究開始当初の背景

現在利用されている多くの薬剤は、陸生の植物・動物由来の天然化合物を基に開発されているが、近年、海洋生物由来の化学物質が調査され、新規の有用な天然化合物が発見されている。海洋生物由来の有機化合物は、陸上生物由来の化合物と異なる珍しい構造をもつ物質も多く、中でもハロゲン化したヘテロ環化合物が数多く発見されている。それら海洋性含ハロゲン化合物のいくつかは、抗菌剤、抗真菌剤、抗がん剤として臨床的に有用であることがわかっており、海洋性軟体動物では捕食者への化学的防御機構または捕食のための毒として含ハロゲン化合物を使用している。肉食性であるアッキガイ科の巻貝は、含ハロゲンインドールを毒として用い、獲物を麻痺させて捕食するが、この化合物は動物性色素「貝紫」として、その鮮やかな発色と色素の堅牢性の高さ故、古代から珍重されてきた。貝紫は、紀元前 1,600 年頃のフェニキアのティルスで生産されたことからティルス紫とも呼ばれるが、ローマ帝国の滅亡と共に 19 世紀まで染色は途絶えていた。ティルス紫 (6,6'-二臭化インディゴ) は、アッキガイ科巻貝の鰓下腺から分泌されるインドール誘導体の硫酸テリンドキシルが、酵素脱硫酸の後、空気酸化と紫外線による縮合で生成する事がこれまでに明らかにされているが、インドール誘導体が臭素化され前駆体が生成するステップに関しては全くわかっていない。1987 年にわずかに 1 報、鰓下腺にプロモペルオキシダーゼ活性が観察される事実がアメリカの研究グループにより報告されているが、粗酵素液の性質が解析されたのみで前駆体生成反応については検討されていない。近年、オーストラリアの研究グループが、豪州産の小型巻貝を材料に精力的に貝紫の研究を行っているが、プロモペルオキシダーゼの研究はなされていない。これは、酵素源の鰓下腺が微量しか得られず、貝紫色素の形成により酵素精製が大変困難であることが主な原因である。そこで本研究では、3 年の研究期間内に、日本産アッキガイ科の巻貝の鰓下腺から本酵素を均一に精製し、その構造と反応メカニズムを解明することに挑戦する。本酵素の反応機構を明らかにできれば、3,600 年もの永い間未解明である貝紫生合成経路の全貌を明らかにすることになり、世界に大きなインパクトを与えるものと予想される。また、ティルス紫前駆体はインドール環 6 位が特異的に臭素化されることから、本酵素は海藻などを起源とする他のハロペルオキシダーゼと比較して高い位置選択性を示すことを特徴とする。最近、臭素化インドール誘導体が抗がん活性を示すことが明らかになり、海洋生物の二次代謝産物の薬理活性がにわかに注目されているが、本酵素の高い位置選択的臭素化反応の制御メカニズムを明らかにすることにより、有機化合物の位置特異的ハロゲン化触媒の設

計・開発が可能となり、医薬品製造など産業界への大きな波及効果も期待される。



2. 研究の目的

本研究では、新規プロモペルオキシダーゼを節足動物である巻貝から単離・精製し、構造と機能を解明することを目指している。これまでに海藻類を起源とするハロペルオキシダーゼの研究が先行し、近年では微生物のハロペルオキシダーゼの研究も進んでいる。しかしながら、ハロゲン化の特異性が低い酵素が多く、化学プロセスへの応用の観点からは有望な酵素は多くない。これに対して、ティルス紫前駆体のインドール誘導体は 6 位が特異的に臭素化を受け、他の部位に臭素化を受けた生成物は観察されていない。このように位置選択性が高い本酵素のハロゲン化反応メカニズムを明らかにすることで、含ハロゲン抗生物質、含ハロゲン抗ガン剤などハロゲン化有機化合物合成の化学プロセスに応用可能な酵素触媒の設計に大きな寄与が期待される。さらに、海藻や微生物由来のハロペルオキシダーゼは、補欠分子としてヘムまたはヘムとフラビンを持つ酵素、非ヘム金属含有酵素及び非金属酵素に大別されるが、ティルス紫前駆体の臭素化反応を触媒する本酵素は自然界に例の少ないバナジウム含有酵素と予想され、その反応機構の解明は学術的に大変意義深いものである。本研究の最大で最初の難関は、巻貝の鰓下腺 (パープル腺) からのプロモペルオキシダーゼの精製である。これまでに他の研究グループが本酵素の精製に着手しなかった最大の理由は、材料となる鰓下腺が非常に小さく、酵素精製に大量の貝が必要であることがあげられる。ティルス紫の構造決定研究を例に挙げると、実に 12,000 個のシリアツブリボラガイ *Bolinas brandaris* から、1.4 g のティルス紫しか得られていない。また、鰓下腺を貝から出すと、脱硫酸酵素が働き貝紫色素形成反応が開始される。続いて空気酸化と紫外線による反応で、ティリベルジンを経由してティルス紫となる。この色素形成により酵素の単離が非常に困難になることが指摘されている。このような理由から、ティルス紫の構造が明らかになって 100 年以上経過した現在でも本酵素の研究は進んでいない。そこで今回、敢えてこの難題にチャレンジすることで、古代ギリシア時代から利用される貝紫色素の生合成過程の全貌を明らかにするとともに、高い位置

選択性を示すバナジウム含有酵素の構造と機能を世界に先駆けて明らかにし、さらにその応用をも見据えて本研究計画を立案した。このチャレンジを実現可能にする材料が日本産のアッキガイ科の巻貝、アカニシガイ *Rapana venosa* やイボニシガイ *Thais clavigera* である。特に日本産アカニシガイは体長 10~15 cm 程度の中型の貝で、その鰓下腺が比較的大きく、ティルス紫の合成量も多いことからプロモペルオキシダーゼの含有量が高いと予想される。また、アカニシガイは本研究代表者の居住する石川県近海（能登半島近海）にも生息し、新鮮な状態で実験材料を確保できることも、酵素精製に有利な条件となる。

ティルス紫は、藍染の色素インディゴの 6 および 6'位が臭素に置換した構造（6,6'-二臭化インディゴ）であり藍染と全く同じ方法で染色が可能である。しかしながらティルス紫の化学合成では多段階の反応が必要で、安価なインディゴを材料とする位置選択的な直接臭素置換を行うことができないため、貝紫染は希少な天然染料に頼っている。本研究では、プロモペルオキシダーゼの cDNA クローニングと異種発現系の構築を行い、組換え型酵素の安定供給を目指す。組換え型酵素を用いることで、インディゴ前駆体であるインドキシルやインディゴへの位置特異的直接臭素化により安価にティルス紫を合成できる可能性がある。安価なティルス紫の供給が可能となれば、染色業界にも大きな影響を与えることが期待される。

3. 研究の方法

研究材料

プロモペルオキシダーゼの精製には、アカニシガイ *R. venosa* を材料に用いた。アカニシガイは体長 10~15 cm 程度の中型の貝であり、大きめの貝の場合は 1 個体から 1~2g の鰓下腺を摘出することができる。アカニシガイは一般には市場に出回らないが、地元の漁師の協力を得て入手した。

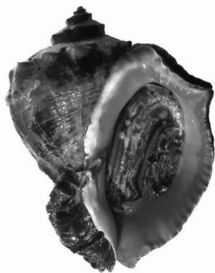


図 1. *R. venosa*

粗酵素液の調製

約 5 kg の能登産のアカニシガイから、75.4 g の鰓下腺を取り出し液体窒素で凍結した。氷冷した乳鉢を用い 2 g の鰓下腺に海砂 5 g、アルミナ 5 g を加え、プロテアーゼインヒビターカクテル(Nacalai tesque)を添加した 0.5 M Tris-H₂SO₄, pH 8.0 を少量ずつ 15 ml 加えながら摩砕した。15,500 xg, 15 min, 4 °C で遠心分離した上清を、0.1 M の同緩衝液に透析することで 13 ml の鰓下腺抽出液を得た。この抽出液を 100,000 xg, 60 min, 4 °C で超遠心分離し、得られた上清を可溶性画分とした。沈殿した

膜画分に上記可溶性画分と同体積の 0.1 M Tris-H₂SO₄, pH 7.0 を加え、テフロンホモジナイザーを用いて均一に懸濁したサンプルを膜画分とした。

プロモペルオキシダーゼ活性の測定

活性測定には、終濃度 0.1 M KPi (pH 6.5), 0.1 M KBr, 8.8 mM H₂O₂, 8.8 mM モノクロロジメドン(MCD)を含む 1 ml の反応系を用い、25 °C における臭素化に伴う MCD の吸光度 (290 nm)の減少を追跡した。

可溶性活性化タンパク質の精製

1) 疎水性クロマトグラフィー

鰓下腺抽出液の可溶性画分に固形硫酸アンモニウムを 30%飽和なるまで加え、遠心分離により沈殿を除去した。30%飽和硫酸アンモニウムを含む 20 mM Tris-H₂SO₄, pH 7.0 で平衡化した TOYOPEARL Butyl-650M カラム (TOSOH)に重層し、同緩衝液で洗浄後、30%→0%飽和硫酸アンモニウムの直線濃度勾配により溶出した。活性化作用のある画分を集め、Centriprep YM10 (Millipore)を用いた限外ろ過により濃縮した。

2) ゲルろ過クロマトグラフィー

0.1 M の NaCl を含む 20 mM Tris-H₂SO₄, pH 7.0 で平衡化した Superdex 200 10/300 カラム (GE ヘルスケア)にアプライし、同緩衝液で溶出した。

3) イオン交換クロマトグラフィー

20 mM Tris-H₂SO₄, pH 7.0 で平衡化した Mono Q HR 5/5 カラム (GE ヘルスケア)にアプライし、同緩衝液で洗浄した。0→0.5 M NaCl の直線濃度勾配により溶出した。

膜画分（プロモペルオキシダーゼ）の可溶性 2種のイオン性界面活性剤及び12種の非イオン性界面活性剤を用いて、鰓下腺抽出液を超遠心分離して得た膜画分からプロモペルオキシダーゼの可溶性を検討した。臨界ミセル濃度の 10 倍の濃度の各種界面活性剤を含む 50 mM Tris-H₂SO₄, pH 7.0 用いて膜画分を懸濁し、氷温下で 1 時間攪拌・可溶化した後、再度超遠心分離した上清の酵素活性を測定した。

4. 研究成果

本研究では、アカニシ内蔵抽出液からプロモペルオキシダーゼ活性の検索を行った。鰓下腺抽出液で MCD の吸収減少が観察され、KBr, H₂O₂ を欠くネガティブコントロールでは反応が見られないことから、鰓下腺抽出液にプロモペルオキシダーゼが含まれることが明らかになった。しかしこの酵素活性は微弱であり、超遠心分離で分けた可溶性画分と膜画分それぞれにはほとんど活性が検出されなかった。これは、地中海産ツロツブリ *Murex trunculus* から部分精製されたプロモペルオキシダーゼ活性が鰓下腺抽出液の膜画分に存在すると報告されていることから、ア

カニシ内蔵抽出物を超遠心分離して得た沈殿（膜画分）のみを対象に酵素活性の検索を行ったことが原因であった。鰓下腺の破碎条件を検討することで、本研究最終年度に初めて高いプロモペルオキシダーゼ活性を有する抽出液の調製に成功し、超遠心分離後の膜画分だけでは微弱な酵素活性しか示さないことが明らかになった。超遠心分離後の可溶性画分には全くプロモペルオキシダーゼ活性が観察されなかったが、懸濁した膜画分に可溶性画分を添加することでプロモペルオキシダーゼ活性が回復することから、可溶性画分が酵素活性に必須であることが明らかになった。また、可溶性画分による活性化効果には量依存性があり、沸騰水浴中で加熱した可溶性画分では活性が回復しないことから、可溶性の活性化成分はタンパク質であることが示唆された（図2）。アカニシ鰓下腺抽出液のプロモペルオキシダーゼ活性は、ツロツブリ *Murex trunculus* の粗酵素液と同等の活

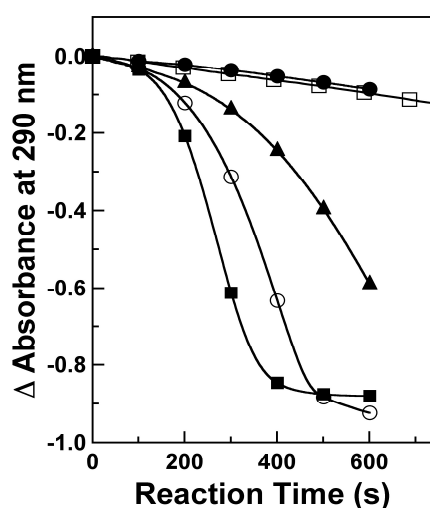


図2. 可溶性画分の活性化効果
膜画分 20 μ l に加えた可溶性画分量(μ l)
0, 20, 40, 80, 20(熱処理後)

性を示した。

そこでこの可溶性画分から活性化タンパク質を、疎水性、ゲルろ過、陰イオン交換の各種クロマトグラフィーによる精製を試みたところ、部分精製することができた。可溶性活性化タンパク質を加えた膜画分懸濁液を用いて、モノクロロジメドンのハロゲン化反応を検討したところ、アカニシの酵素は臭素化反応を触媒したが、塩素化反応は触媒しないことが明らかになり、本酵素がプロモペルオキシダーゼであることを初めて示すことに成功した。

プロモペルオキシダーゼが鰓下腺抽出液の膜画分に含まれていることが明らかなので、各種界面活性剤を用いて本酵素の可溶化を試みたが、現在までに有効な可溶化方法は見つかっていない。

粗酵素液の状態では本酵素の至適 pH を検討したところ、MCD 臭素化の至適 pH は pH 6.5

であることが明らかになった。

本研究では、アカニシの鰓下腺抽出液に初めてプロモペルオキシダーゼ活性を確認し、この活性発現に、可溶性タンパク質が関与することを明らかにした。これまでに、可溶性と膜結合性の異なるユニットの2成分が活性発現に必要なハロペルオキシダーゼは見つかっておらず、アカニシの酵素が最初の報告となる。今後、この可溶性活性化タンパク質を単離精製し、その構造情報から機能を推定するとともに、分子クロニングにより本タンパク質の機能解析を行いたい。また、膜結合性プロモペルオキシダーゼの可溶化を成功させ、その構造と機能を解析し、当初の目的である応用に繋げて行く予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

Sakurai N, Kataoka K, Sugaya N, Shimodaira T, Iwamoto M, Shoda M, Horiuchi H, Kiyono M, Ohta Y, Triwiyono B, Seo D, Sakurai T, Heterologous expression of *Halomonas halodenitrificans* nitric oxide reductase and its N-terminally truncated NorC subunit in *Escherichia coli*. *J Inorg Biochem.*, 査読有, **169**, 61-67 (2017)

Sakurai T, Yamamoto M, Ikeno S, Kataoka K, Amino acids located in the outer-sphere of the trinuclear copper center in a multicopper oxidase, CueO as the putative electron donor in the four-electron reduction of dioxygen. *Biochim. Biophys. Acta.*, 査読有, **1865**, 997-1003 (2017)

Komori H, Kataoka K, Tanaka S, Matsuda N, Higuchi Y, Sakurai T, Exogenous acetate ion reaches the type II copper centre in CueO through the water-excretion channel and potentially affects the enzymatic activity. *Acta Crystallogr. F Struct. Biol. Commun.*, 査読有, **72**, 558-563 (2016)

Akter M, Inoue C, Komori H, Matsuda N, Sakurai T, Kataoka K, Higuchi Y, Shibata N, Document Biochemical, spectroscopic and X-ray structural analysis of deuterated multicopper oxidase CueO prepared from a new expression construct for neutron crystallography. *Acta Crystallogr. F Struct. Biol. Commun.*, 査読有, **72**, 788-794 (2016)

〔学会発表〕(計 2 件)

前田空人, 片岡邦重, プロモペルオキシダーゼの新規活性測定系の開発, 第3回物質化学専攻フォーラム, 2016年10月31日, 於金沢大学

東田海斗, 片岡邦重, アカニシガイに含まれるプロモペルオキシダーゼの性質, 第4回物質化学専攻フォーラム, 2017年10月29日, 於金沢大学

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.chem.s.kanazawa-u.ac.jp/j/faculty/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

片岡 邦重 (KATAOKA Kunishige)

金沢大学・物質化学系・教授

研究者番号：40252712

(2) 連携研究者

櫻井 武 (SAKURAI Takeshi)

金沢大学・物質化学系・教授

研究者番号：90116038

(3) 連携研究者

林 宜仁 (HAYASHI Yoshihito)

金沢大学・物質化学系・教授

研究者番号：10231531