

# 博士學位論文

内容の要旨  
および  
審査結果の要旨

令和6年3月

近畿大学大学院  
生物理工学研究科

## 学位論文審査結果の報告書

氏名

伊藤 健司

生年月日

1990年 1月 16日

本籍(国籍)

大阪府

学位の種類

博士(工学)

学位記番号

生 第 64 号

学位授与の条件

学位規程第5条該当

(博士の学位)

論文題目 ヒメツリガネゴケ由来ペルオキシダーゼ(Prx34)の大腸菌  
での生産と特徴づけ

学位論文受理日

2024 年 1 月 24 日

学位論文審査終了日

2024 年 2 月 15 日

審査委員

(主査) 石丸 恵

(副主査) 森本 康一

(副主査) 秋田 求

指導教員

秋田 求

## 論文内容の要旨

クラスIIIペルオキシダーゼ (Prx, EC 1.11.1.7) は、植物の分泌型のペルオキシダーゼであり、多様な役割を有している。Prxの触媒する反応は、過酸化水素を介して他方の基質を酸化するペルオキシダーゼサイクルと酸素を利用するオキシダーゼサイクルに分けられる。過酸化水素を用いるペルオキシダーゼサイクルは、多様な基質を酸化することができるため、産業的にも広く用いられている。一方のオキシダーゼサイクルは、過酸化水素を必要とせずに還元性基質を酸化することができ、また活性酸素種 (ROS) の生成源となっている。このサイクルについてはペルオキシダーゼサイクルに比べて知見が少ない。これらのことは、西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) をモデルとしてよく研究されている。

Prxは、その利用範囲の広さから医療や研究、食品、工業などの多様な分野で利用される。例えば、臨床や研究分野では 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) (ABTS) や 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) を発色試薬とした酵素結合免疫吸着法 (ELISA) や、ルミノールを使用することで検出感度を上げた化学発光酵素免疫測定法 (CLEIA) などに用いられる。工業分野では、重合化反応による廃水処理やポリマー合成に用いられている。このように、多様な反応に用いるためには、それぞれの基質に対する高い反応性や反応の安定性が求められる。HRP だけでは、要求される全ての条件に対応することはできないため、様々な Prx の生産と特徴づけは有意義である。また、HRP のように植物から天然型の酵素を得て精製することは非常に効率が悪く、環境への負荷も大きい。そこで、ペルオキシダーゼの異種生産系が研究されてきた。中でも、大腸菌はタンパク質生産に第1に用いられるツールであり、ペルオキシダーゼでも多くの研究例がある。しかし、大腸菌内の還元的な環境下では、ペルオキシダーゼの折り畳みに必要なジスルフィド結合を正確にできず、そのため、多くの場合で封入体 (IB) として生産される。IB からの可溶化とリフォールディングにより、活性型のペルオキシダーゼを回収することはできるが、可溶性発現と比べると、工程が複雑で、収率も悪い。一方で、ペルオキシダーゼを大腸菌で可溶性に発現させた例もあるが、生産性は悪い。

ヒメツリガネゴケ由来のキトサン誘導性ペルオキシダーゼ (Prx34) は、ヒメツリガネゴケへのキトサン処理により放出される性質を持ち、カビに対する抵抗性において重要な役割を担うことが報告されている。また、キトサン処理時の ROS 生成にも関わっていることが明らかになっている。本論文は、この Prx34 の大腸菌における生産性を議論し、組換え Prx34 (rPrx34) の性質を明らかにすることで産業用酵素としての利用可能性と生体内での役割を考察することを目的とした。

本論文は三章からなる。第一章では、rPrx34 が大腸菌で可溶性発現することを示し、その比活性と生産性を他の組換えペルオキシダーゼの報告と比較した。可溶態で菌体内と培地に生産された rPrx34 は、アフィニティークロマトグラフィーと陽イオン交換クロ

マトグラフィーで容易に精製された。このときの rPrx34 の比活性は、15000 U/mg を示し、他の組換えペルオキシダーゼ生産の報告と比べても、高いものであった。rPrx34 が高い比活性をもちかつ可溶態で生産されることは、他の組換えペルオキシダーゼ生産系と比べて優れていると考えられた。一方、生産性は芳しくなかった。この問題の解決策として、ガス透過性フィルム製バックによる液体静置培養の利用を試みた結果、従来法に比べて約 1.5 倍の生産性を実現した。しかし、この結果でも生産性を十分とはいえず、今後課題を残した。

第二章では、rPrx34 が培地中に生産された原因について検討した。Prx34 タンパク質の N 末端には、シグナル様配列が存在する。第一章に用いた rPrx34 発現プラスミドでは、このシグナル様配列を含む全長を使用しているものの、大腸菌などで機能することが知られている分泌シグナルは使用していない。そこで、Prx34 のシグナル様配列を欠失させたところ、大腸菌から分泌されなくなった。また、このシグナル様配列は、SignalP により細菌の SEC 機構に認識されるシグナルであると予測された。N 末端を His タグで標識するとコバルトカラムに結合しなかったことから、このシグナル様配列の領域は分泌過程で切断されたと考えられた。シグナル様配列を EGFP に連結して発現させた大腸菌では、培地で蛍光が観察され、その存在はウエスタンブロット解析でも裏付けられた。一般的に真核生物と原核生物のシグナル配列は異なるが、ヒトやマウス、酵母のいくつかのシグナルペプチドが大腸菌でも機能し、異種タンパク質がペリプラズムに分泌されることが報告されている。しかし、少なくとも知る限りにおいて、植物のシグナルペプチドがそのまま大腸菌でペリプラズムに分泌に働いたとする報告は 1 例のみであり、さらに大腸菌の外膜を越えて分泌された初めての例である。

第三章では、代表的なペルオキシダーゼ基質と化学発光試薬に対する反応性と、熱や pH に対する安定性を解析した。rPrx34 の ABTS と TMB、OPD に対する反応の速度論的解析を行い、これらの基質に対する親和性を測定した。 $K_m$  と  $k_{cat}$  を HRP と比較すると rPrx34 は、これら基質に対する基質結合能は HRP より低い、基質に対する反応性が高いと予測された。このことは、AlphaFold2 で予測された Prx34 の立体構造から、活性中心近傍の環境に起因すると考察された。そして、ABTS と TMB、過酸化水素に対して高い触媒効率を持つことを明らかにした。rPrx34 は pH2 から 12 の条件に 16 時間曝しても失活することがなく、高い pH 保存安定性を示すことがわかった。また、100°C の処理でも完全な失活は観察できなかった。この結果は、ペルオキシダーゼを産業利用する多くの場面に rPrx34 の使用が期待できることを示唆している。rPrx34 のこの高い反応性と pH 安定性は、予測された Prx34 構造と既知の HRP 構造の比較からも説明することができた。また、rPrx34 とルミノールとの特徴的な反応およびキトサンやグルコサミンとの反応時の ROS 生成反応の詳細を考察した。rPrx34 は、ルミノールなど化学発光試薬に対しても高い反応性を示した。ルミノールとの反応では、HRP では見られない興味深い現象、すなわち、rPrx34 はルミノールを基質としてポリルミノールを合成することを

FTIR と GC/MS を用いた分析により明らかにした。キトサンとの ROS 生成反応では、グルコサミン残基のアミノ基が標的になって ROS が生成されることを明らかにした。ペルオキシダーゼのオキシダーゼサイクルにより反応することが報告されている IAA を rPrx34 と混合すると ROS 生成が見られたことから、rPrx34 とグルコサミンの反応でも、同様のサイクルでグルコサミンがラジカル化されていると予想した。生体内でもこの働きにより ROS が生産され、病原体に対する抵抗性に寄与しているのかもしれない。rPrx34 とグルコサミンとの反応液を FTIR と LC/MS を用いて分析した結果、6 位の炭素がアルデヒド化され、さらにアルデヒド基がアミノ基と脱水縮合してグルコサミン重合物を形成していることを示した。ペルオキシダーゼのオキシダーゼサイクルは、未だ完全に解明されておらず、この反応系を用いた重合反応の報告も知る限り存在しない。また、これらのルミノールの重合反応とオキシダーゼサイクルによるグルコサミンの反応は同時に起こり、結果、ルミノールとグルコサミンの共重合物が生成されることも示した。これらの結果は、酵素化学的には、ペルオキシダーゼの反応機構や重合反応機構の研究に寄与するものであり、かつ、rPrx34 の産業利用の可能性を強く示唆している。さらに、ペルオキシダーゼが行う 2 つのサイクルを同時に進行させる反応の新たなモデルになるかもしれない。

本論文では rPrx34 の様々な特徴づけを行った上で、ヒメツリガネゴケから放出された Prx34 が病原体に作用している可能性と多様な分野への応用可能性を示した。つまり、rPrx34 は生物学的にも産業的にも研究価値のある酵素であると考えられる。

## 論文審査結果の要旨

この博士論文は、蘚苔類のヒメツリガネゴケから見出されていたペルオキシダーゼ (Prx34) を大腸菌に発現させ、それを特徴付けするとともに、著者が新たに見出した反応について詳細な解析を行ったものである。

最初の章では、大腸菌に発現させたときの組換え Prx34 タンパク質 (rPrx34) 生産に関して興味深い現象を報告している。大腸菌に組換えタンパク質を生産させるときには、しばしば封入体が形成されるが、Prx34 の全長を発現させたとき、組換えタンパク質が培地中と可溶性画分に存在することを見出した。大腸菌は扱いやすく、組換えタンパク質の発現宿主としては優れている。しかし、組換えタンパク質を分泌生産させたいときに使用できる既知の機構は限られ、しかもそのほとんどはペリプラズムまでの発現にとどまる。封入体として生産させると生産量は数字的には大きくなるが、可溶化し巻き戻す工程が必要になって、必ずしも効率良い生産法とはいえない。しかし、本タンパク質は、もとの配列のまま発現させて大腸菌の外膜を越える。異種由来のタンパク質をそのまま発現させて分泌生産された例は過去にも報告されているが、植物由来のものがそのまま大腸菌で、しかも外膜を越えて存在するようになるという例は知る限りない。さらに、組換え Prx34 の比活性は、従来から広く使用されている HRP (西洋ワサビペルオキシダーゼ) よりも著しく高い。このように2つの観点から意義深い発見といえる。ただし、本組換えタンパク質の生産量は少ない。この生産量の少なさが、菌体外生産されることそのものに関係しているかも知れないことは、続くシグナルペプチドに関する研究結果にも関連して重要な問題になりうる。生産性の低さについて、フィルムバッグを用いる新しい培養方法により改善されるという結果を得ているが、さらに産業利用するためには、今後のさらなる研究が待たれる。

次の章では、Prx34 のN末端に存在するシグナル配列に起因して、大腸菌のおそらく SEC 機構によって、外膜を越えて培地中にタンパク質が移行していることを発見した。シグナル配列は、その過程で切断され、切断位置も SignalP によって予想されるとおりであることを確かめた。上記のとおり、このような例は非常に珍しい。この結果は同時に、本研究で明らかになったシグナル配列が、大腸菌における組換えタンパク質生産系に利用される可能性を示すものであり、バイオテクノロジーの発展に寄与する有益な発見と言える。今後、その機構の詳細を明らかにすることが待たれる。

次の章では、rPrx34 の特徴付けを最初に行っている。Prx34 の植物における生産量は少ないため、その特徴付けを行った最初の例である。反応の速度論的解析を3種類の代表的ペルオキシダーゼ基質に対して行い、基質によっては HRP よりも親和性が低いこと、いっぽう、過酸化水素に対する代謝効率が高いことを示した。この違いに対して、立体構造予測と表面電荷予測を行い、予測される三次元構造から、活性中心近傍の環境、構造の剛性と脱アミド化防止、空間充填性と、基質の分子体積を考慮し、これらが

活性中心における2つの基質の結合と競合に影響すると考察している。また、rPrx34は保存中の高温と極端なpH環境にも耐えることが明らかになり、その産業利用が期待できることを報告した。HRPに対しては、過去に点変異の導入が行われ、活性を高めるいくつかのアミノ酸残基の位置が報告されている。興味深いことに、Prx34を構成するアミノ酸残基の空間的配置をそれらと照合すると、活性を高めたアミノ酸残基であったという。その原因を知ることはできないが、ペルオキシダーゼの改良をめざすときの手掛かりになると評価できる。

本研究では、rPrx34が蛍光色素、特にルミノールに対して非常に高い活性を持つことを見出した。ルミノールに対する反応性において、過去に報告された他植物由来のペルオキシダーゼと比較してその活性は格段に高く、かつその活性が広いpH域で維持されることも見出した。従ってrPrx34は、ルミノールなど化学発光試薬を用いる検査・研究に広く利用が期待できる。また、rPrx34とルミノールとの特徴的な反応およびキトサンやグルコサミンとの反応時のROS生成反応について興味深い考察を加えている。(なお、このROS生成反応も著者によって報告されたものである。)ペルオキシダーゼが行う反応は、過酸化水素を介して他方の基質を酸化するペルオキシダーゼサイクルと、酸素を利用するオキシダーゼサイクルに分けられることが知られているが、キトサンやグルコサミンとの反応時のROS生成はオキシダーゼサイクルによる可能性が高いことを本研究で示した。ペルオキシダーゼのオキシダーゼサイクルに関する研究は進んでおらず、Prx34はその解析に役立つ可能性があると考えられる。

rPrx34とルミノールの反応時に反応液が着色され、かつ沈殿物が生じること、それらが可溶性(前者)と不溶性(後者)のルミノール重合物であることを機器分析によって確かめている。HRPによるルミノールの重合化については報告があるが、ペルオキシダーゼと過酸化水素とルミノールだけで(つまり添加材無しで)重合反応が進行した例はこれまで報告が無い。可溶性のポリルミノールはバイオセンサーの作製などに、不溶性のポリルミノールは電極の材料などに利用される可能性がある。沈殿物生成における過酸化水素とルミノールの最適比は1:2であると考えられ、ペルオキシダーゼの反応サイクルと一致した。さらに、グルコサミンの重合物や、グルコサミンとルミノールの共重合物がrPrx34を使用すると合成できるらしいことを示した。つまり、rPrx34によるルミノールの重合反応とグルコサミンの重合反応は同時に起こりうること、その結果、共重合物とみられる物質が生成されること、ルミノールの重合はペルオキシダーゼサイクルにより行われ、グルコサミンの重合はオキシダーゼサイクルによって行われると推定されるため、この2つのサイクルを用いた反応は、新たな共重合反応のモデルとなる可能性があることを指摘した。グルコサミンを含む新しい水溶性の高分子など新素材の合成にPrx34が応用される可能性もあると考えられる。

ヒメツリガネゴケから放出されたPrx34は、その活性中心に、病原体のグルコサミン残基を含む細胞壁などを捉えることができ、そのときに生じるROSで病原体に抵抗し

ているのではないかという植物生理学的にも病理学的にも興味深い考察を加えている。

以上のように本研究は学術的にも産業利用的にも興味深く意義ある結果を複数得ており、種々の生物工学分野に資するところが大きいと評価できる。したがって、本論文を博士（工学）論文として価値あるものと認める。