微生物ペルオキシダーゼの機能解析とその利用†

清水 昌

(京都大学農学部)

微生物由来のペルオキシダーゼが注目されるようになったのは、1980年以降のことである。臨床検査などの分析の分野で酵素的分析法が定着し、計測の最終信号としての過酸化水素の検出にペルオキシダーゼの有用性が認識されたこと、木質資源の高度利用の研究の中心課題の1つとして木材腐朽菌などによるリグニン分解に関与するペルオキシダーゼの研究が活発化したことがその背景にあるものと思われる。本稿では、筆者らが見出したいくつかの微生物ペルオキシダーゼを中心にその機能と利用について紹介する。

1. 微生物のペルオキシダーゼ

カビ、担子菌、細菌由来のものが報告されている(表1)。カビおよび担子菌の酵素はいずれも菌体外に産生され、分子量が30,000~40,000前後の単量体酵素である。*Arthromyces ramosus*の酵素(ARP)⁽¹⁾は生産性が高く、本菌をグルコース、ペプトン、酵母エキス、麦芽エキスを含む単純な培地で振とう培養すると10 unit/ml以上の生産が可能である。菌体外に産生される酵素の分子種は単一で、容易に均一な酵素が得られる。これは、西洋ワサビの酵素(HRP)や*Phanerochaete chrysosporium*⁽²⁾、*Trametes versicolor*、*Phlebia radiata*などのリグニン分解性担子菌の生産する酵素(リグニンペルオキシダーゼ、Mnペルオキシダーゼなど)が種々のisozymeの混合物として産生されるのと比べると顕著な特徴の1つである。その後の検討で*Coprinus cinereus*など*Coprinus*属の担子菌のあるものがARPと類似の酵素(CCP)を生産することが明らかにされている⁽²⁾。ARPとCCPの類似点は、分子量、アミノ酸組成、トリプシン処理後のペプチドマッピングの挙動、RZ値、pI、

免疫学的性質、基質特異性などで認められている。両酵素とも高マンノース型の糖鎖を含むがグリコシル化の度はARPのほうが高い⁽³⁾。

細菌では*Escherichia coli*⁽³⁾、*Halobacterium halobium*⁽⁴⁾、*Flavobacterium meningosepticum*⁽⁵⁾の酵素が詳細に検討されている。いずれも菌体内酵素であり、上記のカビや担子菌の酵素と比べると分子量が大きいこと(100,000~400,000)、グアヤコールなどの典型的なペルオキシダーゼ基質に対する比活性が低いなどの特徴がある。また、*E. coli*の酵素はペルオキシダーゼ活性の約100倍のカタラーゼ活性を示すことも特徴的である。*F. meningosepticum*の酵素(FMP)の生産は、本菌の過酸化水素生成型ヌクレオシドオキシダーゼの生産に依存的であり、ヌクレオシドオキシダーゼの産生が認められる培養条件下(たとえば2'-デオキシングアノシン、 Fe^{3+} 、 Cu^{2+} の存在下)でのみその活性が検出される。したがって、FMPはヌクレオシドオキシダーゼと共役してヌクレオシドの酸化的分解に際して生成する過酸化水素を解毒する役目を担っているものと考えられる(下式参照)。

FMPはペルオキシダーゼの一般的阻害剤であるNaCN、 NaN_3 、NaFに対する感受性がきわめて低いこと、逆にHRPやARPが阻害を受けない HgCl_2 で強く阻害されること、過酸化水素に対する K_m 値が低いこと(4-アミノアンチピリン/フェノールの系で9.5 μM)が特徴的である。

以上、微生物由来のペルオキシダーゼを概観したが、これらのうちARPは大量生産が容易であることに加えて、水素供与体に対する特異性が広いこと、熱やpHに対する安定性が高いこと、ルミノールなどの化学発光反

† Function and Applications of Microbial Peroxidases.

Sakayu SHIMIZU (Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture, Kyoto University, Kyoto 606)

表 1 微生物由来および西洋ワサビのペルオキシダーゼの諸性質の比較

	<i>Arthromyces ramosus</i> ⁽¹⁾	<i>Coprinus cinereus</i> ⁽²⁾	<i>Pellicularia filamentosa</i> ⁽³⁾	<i>Escherichia coli</i> ⁽⁴⁾	<i>Halobacterium halobium</i> ⁽⁵⁾	<i>Flavobacterium meningosepticum</i> ⁽⁶⁾	Horse-raddish
分子量	41,000	41,600	28,000	337,000	110,000	220,000	40,000
サブユニット分子量	1	1	1	4	1	4	1
吸収極大 (nm)	415, 540, 640	425, 545	nd	405	406	410, 500, 630	400, 500, 640
酸化型還元型	438, 557, 585	nd	nd	nd	440, 558, 591	435, 550	435, 557, 590
RZ値	2.7	1.95	nd	0.55	nd	1.14	
等電点	3.4	3.5	nd	nd	nd	4.2	
比活性 (unit/mg)	1,800 ^{a)} , 290 ^{b)}	194 ^{b)}	nd	15.2 ^{c)}	35.3 ^{a)}	51 ^{b)}	
H ₂ O ₂ に対する K _m (mM)	0.19	nd	nd	nd	0.077	0.0095	0.24
補欠分子族	protoheme K	protoheme	nd	protoheme K	protoheme	protoheme	protoheme K
糖鎖の有無	+	+	nd	nd	nd	-	+
カタラーゼ活性の有無	-	-	nd	+	+	-	-
Halide に対する特異性	I ⁻	I ⁻	nd	nd	nd	I ⁻	I ⁻
反応の至適 pH	6.0	6-9	4.8	6.5	nd	5.5-6.0	6.0-6.5

a) 対グアヤコール; b) 対 4-アミノアンチピリン-フェノール; c) 対 O-ジアニニジン。

応においてきわめて高い発光強度を与えることなど、HRP には認められないユニークな性質を有するため、以下に述べるような基礎、応用両面からのさまざまな研究が展開されている。

2. *Arthromyces ramosus* ペルオキシダーゼ (ARP) に関する研究の展開

ARP について展開されている研究の主なものは、遺伝子のクローニングと異種宿主における発現⁹⁾、X線結晶構造解析⁽¹⁰⁾ (本ミニレビュー福山の総説参照)、化学発光反応への利用⁽¹¹⁾、洗剤などの工業用酵素としての利用などである¹²⁾。

(1) ARP 遺伝子のクローニング ARP 遺伝子をコードする cDNA と染色体 DNA が得られ、cDNA の塩基配列から ARP をコードする領域は翻訳開始コドン ATG から終止コドン TGA まで 364 アミノ酸残基よりなることが明らかになっている。開始コドンに対応する Met 以下の 20 アミノ酸残基はシグナルペプチド、成熟型酵素は Gln 21 (ピログルタミン) から始まる 344 アミノ酸残基からなり、Asn 143 に糖鎖が N-グリコシル結合している。ARP と他のペルオキシダーゼのアミノ酸配列の相同性は、*P. chrysosporium* のリグニンペルオキシダーゼ H 8 および Mn ペルオキシダーゼでそれぞれ 44%, 43%, HRP では 25% である。図 1 に ARP と他のペルオキシダーゼのヘム近傍のアミノ酸配列を比較した。活性型 ARP の発現は酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*, *Candida boidinii*) および糸状菌 (*Aspergillus* 属糸状菌) で成功している。

(2) 化学発光への利用 ルミノールの酸化に伴う化学発光反応の触媒として ARP を用いたときの発光強度を HRP の場合と比較すると、同じ発光量を与えるのに必要な酵素量は ARP では HRP の 1/100 以下であること、筆者らの設定した条件下では過酸化水素の検出限界は 8 nM (約 5 pmol) であることなどが明らかにされている。また、ストップフロー法による発光の速度論的解析の結果からは、過酸化水素に対する K_m 値は両酵素ともほぼ同じ (ARP, 7×10⁻³ mM; HRP, 15.5×10⁻³ mM) であるが、ARP の単位酵素量当たりの発光最大初速度 (V_m) は HRP の約 500 倍大きいことが確認されている (図 2a)。このような ARP のユニークな化学発光反応触媒能は CCP でも確認されている。このように ARP を触媒とすると、化学発光における低量子収率の問題が克服され、さまざまな生体成分の高感度測

	Distal histidine															proximal histidine														
ARP	47	V	R	K	I	L	R	I	V	F	H	D	A	I	59	D	E	V	V	D	L	L	A	A	H	S	L	A	187	
BALiP	39	A	H	Q	A	I	R	L	T	F	H	D	A	V	51	L	E	T	V	W	G	L	I	A	H	T	V	G	180	
PCLiP	38	A	H	E	S	I	R	L	V	F	H	D	S	I	50	L	E	L	V	W	M	L	S	A	H	S	V	A	179	
PCMnP	37	A	H	E	V	I	R	L	T	F	H	D	A	I	49	F	E	V	V	S	L	L	A	S	H	T	V	A	176	
Turnip	33	G	A	S	I	L	R	L	F	F	H	D	C	F	45	R	D	M	V	A	L	S	G	A	H	T	I	G	171	
SCCCP	43	G	P	V	L	V	R	L	A	W	H	T	S	G	55	R	E	V	V	A	L	M	G	A	H	A	L	G	177	
HRP	33	A	A	S	I	I	R	L	H	F	H	D	C	F	45	S	D	L	V	A	L	S	G	G	H	T	F	G	173	

図 1 ARP と他のペルオキシダーゼのヘム近傍のアミノ酸配列. BALiP, *Bjerkandera adusta* lignin peroxidase; PCLiP, *Phanerochaete chrysosporium* lignin peroxidase; PCMnP, *P. chrysosporium* Mn peroxidase; Turnip, カブ peroxidase; SCCC, *Saccharomyces cerevisiae* cytochrome *c* peroxidase.

図 2 化学発光反応における ARP と HRP の比較⁽¹¹⁾. a, ストップフロー法による発光強度; b, コレステロールの検量曲線.

定が可能である。一例として、コレステロールの定量結果を図 2b に示す。ARP を用いると HRP の場合の 100 倍以上の高感度化が可能である。また、単位酵素当たりの量子収量が高いという ARP の特性は、エンザイムイムノアッセイの場合にはとくに重要と思われるが、この点についても ARP の有用性が確認されている⁽¹³⁾。

(3) 工業用酵素としての利用 これまで、廃水中の有毒なフェノール性化合物の分解または高分子化による除去、パルプ脱色におけるリグニンの酸化、繊維工業や家庭での洗濯における色移り防止などの分野でペルオキシダーゼ反応の有用性が指摘されてきたが、このような分野でペルオキシダーゼを用いることは、酵素の生産コストや安定性の観点から不可能視されていた。しかし、ARP の発見を端緒に状況が変わりつつある。遺伝子組換え技術により糸状菌を宿主とする ARP の大量生産方式が確立され、工業用酵素としての新しい利用分野が開かれようとしている。

おわりに

本稿では ARP の特性と利用を中心に紹介したが、ペルオキシダーゼの利用分野としては、上記以外に有用物質の合成・変換への利用も今後の展開が期待される分野といえよう。微生物由来のペルオキシダーゼの組織的な探索をととして、今後さらにユニークなペルオキシダーゼが見出されることが期待される。

- (1) Y. Shinmen, S. Asami, T. Amachi, S. Shimizu, and H. Yamada: *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 247–249 (1986).
- (2) Y. Morita, H. Yamashita, B. Mikami, H. Iwamoto, S. Aibara, M. Terada, and J. Minami: *J. Biochem.*, **103**, 693–699 (1988).
- (3) K. Ichikawa, K. Okazaki, K. Kimoto, and Y. Watanabe: *Agric. Biol. Chem.*, **45**, 1297–1299 (1981).
- (4) A. Claiborne and I. Fridovich: *J. Biol. Chem.*, **254**, 4245–4252 (1979).
- (5) Y. Fukumori, T. Fujiwara, Y. Okada-Ta-

- kahashi, Y. Mukohata, and T. Yamanaka : *J. Biochem.*, **98**, 1055—1061 (1985).
- (6) 古賀晋治, 崔 亮文, 清水 昌, 山田秀明 : 農化, **65**, 170 (1991).
- (7) M. S. A. Leisola, B. Kozulic, F. Meussdoerfer, and A. Fiechter : *J. Biol. Chem.*, **262**, 419—424 (1987).
- (8) M. Kjalke, M. B. Andersen, P. Schneider, B. Christensen, M. Schulein, and K. G. Welinder : *Biochim. Biophys. Acta*, **1120**, 248—256 (1992).
- (9) 畠中治代 : 酵素工学研究会第 29 回講演会講演要旨集, 仙台, 1993, pp. 10—13.
- (10) N. Kunishima, K. Fukuyama, H. Matsubara, H. Hatanaka, Y. Shibano, and T. Amachi : *J. Mol. Biol.*, **235**, 331—344 (1994).
- (11) K. Akimoto, Y. Shinmen, M. Sumida, S. Asami, T. Amachi, H. Yoshizumi, Y. Saeiki, S. Shimizu, and H. Yamada : *Anal. Biochem.*, **189**, 182—185 (1990).
- (12) Novo Nordisk Annual Report, 26 (1992).
- (13) B. Kim, V. Pisarev, and A. Egorov : *Anal. Biochem.*, **199**, 1—6 (1991).
-