



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

Studies on Directed Evolution of Catalase of  
Bacillus sp. TE124

メタデータ	言語: English 出版者: 公開日: 2008-02-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 倪, 金鳳 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/20.500.12099/2610">http://hdl.handle.net/20.500.12099/2610</a>

氏名(本国籍)	倪金鳳 (中華人民共和国)
学位の種類	博士(農学)
学位記番号	農博甲第269号
学位授与年月日	平成14年3月13日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科及び専攻	連合農学研究科 生物資源科学専攻
研究指導を受けた大学	静岡大学
学位論文題目	Studies on Directed Evolution of Catalase of <i>Bacillus</i> sp. TE124 ( <i>Bacillus</i> sp. TE124 カタラーゼの機能改変に 関する研究)
審査委員会	主査 静岡大学 教授 田原康孝 副査 静岡大学 助教授 徳山真治 副査 岐阜大学 教授 河合啓一 副査 信州大学 教授 寄藤高光

### 論文の内容の要旨

土壌から分離した*Bacillus* sp. TE124は比較的安定なカタラーゼを生産する。このカタラーゼは現在工業的に有用な酵素として使用されている。本研究は、本酵素の遺伝子をクローニングし、本酵素生産菌のカタラーゼ高生産株を構築するとともに、本カタラーゼの機能を分子進化工学的に改変しようとしたものである。得られた結果の要旨はつぎの通りである。

#### 1. *Bacillus* sp. TE124由来カタラーゼの精製と性質

*Bacillus* sp. TE124の生産するカタラーゼをSDS-PAGEで単一標品にまで精製した。精製酵素の単量体の分子量は55 KDaで、N-末端アミノ酸配列はMSSNKLTTSWGAPVGGNQDDMであった。このN-末端配列は*Bacillus subtilis* KatAの配列と高い相同性を示した。精製酵素の比活性は35.2 KU/mgタンパクで、至適pHは8.5、至適温度は30°Cにあった。本酵素はpH7.0~10.5の比較的アルカリ側で安定であり、55°C、30分の熱処理で100%の活性を維持した。

#### 2. カタラーゼ遺伝子のクローニングと多量発現

本酵素のN-末端とヘム結合領域のアミノ酸配列からオリゴヌクレオチドを合成し、染色体DNAをテンプレートとして、1.1 KbのDNA断片をPCR増幅した。このPCR増幅断片をプローブにして、λZAPIIベクターを用いたブランクハイブリダイゼーションによって本酵素遺伝子をクローニングした。本遺伝子のオープンリー

ディングフレームは1452bpで、推定アミノ酸残基は483、推定分子量は54.7KDaであった。この分子量は精製酵素のそれと一致した。本遺伝子は、*B. subtilis* カタラーゼ遺伝子(*katA*)と98.8%の相同性を示し、大腸菌の組換え株で本カタラーゼを多量生産した。本遺伝子を枯草菌と大腸菌のシャトルベクターpHY300PLKに挿入し、この組換えプラスミドをに*Bacillus* sp.TE124にセルフクローニングすることによって、組換え株のカタラーゼの生産量は親株のそれに比べて約24倍に増加した。

### 3. 分子進化工学的方法を用いたカタラーゼの機能改変

カタラーゼはその構造と機能の違いによって、カタラーゼ、カタラーゼーペルオキシダーゼ、マンガンカタラーゼの3つに分けられている。前者の2つはヘム酵素であり、両酵素の違いは、カタラーゼーペルオキシダーゼがカタラーゼ活性に加えてペルオキシダーゼ活性を持つことによる。酵母チトクロームcのカタラーゼが部位特異的変異によってカタラーゼーペルオキシダーゼに機能改変されている他は、この分野の研究はまったく行われていない。そこで、本菌の生産するカタラーゼが典型的カタラーゼであることを注目し、分子進化工学的方法を用いて、本酵素のカタラーゼーペルオキシダーゼへの機能改変を行った。

DNAシャプリングとエラーブロンPCRを用いて、*Bacillus* sp.TE124のカタラーゼ遺伝子の変異ライブラリーを作製し、そのなかからカタラーゼ活性が減少し、ペルオキシダーゼ活性が上昇した変異酵素(R47H/R356C/D374N)を取得した。R47H、R356C、D374Nがそれぞれ1箇所変異したの3つの変異酵素を作製し、これら3つの変異部位を解析した結果、酵素の基質特異性に変化を与える変異部位は、ヘム結合領域とは離れて存在するアルギニン47残基であることを明らかにした。このアルギニン47残基を他の8つのアミノ酸(アラニン、リジン、アスパラギン酸、グルタミン酸、グルタミン、フェニルアラニン、トリプトファン、チロシン)に部位特異的に置換して、得られた変異酵素の酵素活性を測定した。その結果、ペルオキシダーゼ活性がもっとも高く、カタラーゼ活性の低い変異酵素はR47Wであり、このトリプトファンが典型的カタラーゼのペルオキシダーゼ酵素反応で重要な役割を果たしていることを明らかにした。グルタミン酸とグルタミンによるアルギニン47残基の置換は、カタラーゼとペルオキシダーゼの活性がともに高い値を示した。本研究は、細菌の典型的カタラーゼをカタラーゼーペルオキシダーゼに機能改変した最初の報告であり、カタラーゼとカタラーゼーペルオキシダーゼの触媒反応を理解するうえで重要な情報を提供するものである。

## 審 査 結 果 の 要 旨

本研究は、土壌から分離した*Bacillus* sp. TE124の生産するカタラーゼ遺伝子をクローニングし、カタラーゼ高生産株を構築するとともに、本カタラーゼの機能を分子進化工学的に改変しようとしたものである。得られた結果の概要はつぎの通りである。

(1) *Bacillus* sp.TE124の生産するカタラーゼを単一標品にまで精製した。精

製酵素の単量体の分子量は55 KDaで、N-末端アミノ酸配列はMSSNKLTTSWGAPVGGNQDDMであった。本酵素の至適温度は30°Cにあった。本酵素はpH7.0~10.5のアルカリ側で安定であり、55°C、30分の熱処理で100%の活性を維持した。

(2) 本酵素の遺伝子をλZAPIIベクターを用いたプラークハイブリダイゼーションによってクローニングした。本遺伝子の塩基数は1452bpで、推定アミノ酸残基は483、推定分子量は54.7KDaであった。本遺伝子をpHY300PLKに挿入し、この組換えプラスミドを*Bacillus* sp. TE124にセルフクローニングすることによって、組換え株のカタラーゼの生産量は親株のそれに比べて約24倍に増加した。

(3) DNAシャフリングとエラープロンPCRを用いて、*Bacillus* sp. TE124のカタラーゼ遺伝子の変異ライブラリーを作製し、そのなかからカタラーゼ活性が減少し、ペルオキシダーゼ活性が上昇した変異酵素(R47H/R356C/D374N)を取得した。R47H、R356C、D374Nがそれぞれ1箇所変異したの3つの変異酵素を作製し、これら3つの変異部位を解析した結果、酵素の基質特異性に変化を与える変異部位は、ヘム結合領域とは離れて存在するアルギニン47残基であることを明らかにした。このアルギニン47残基を他の8つのアミノ酸(アラニン、リジン、アスパラギン酸、グルタミン酸、グルタミン、フェニルアラニン、トリプトファン、チロシン)に部位特異的に置換して、得られた変異酵素の酵素活性を測定した。その結果、ペルオキシダーゼ活性がもっとも高く、カタラーゼ活性の低い変異酵素はR47Wであり、このトリプトファンが典型的カタラーゼのペルオキシダーゼ酵素反応で重要な役割を果たしていることを明らかにした。本研究は、細菌の典型的カタラーゼをカタラーゼーペルオキシダーゼに機能改変した最初の報告であり、カタラーゼとカタラーゼーペルオキシダーゼの触媒反応を理解するうえで重要な情報を提供するものである。

このように本論文の内容は、微生物カタラーゼの研究に新しい知見を与えるものであり、カタラーゼおよびカタラーゼーペルオキシダーゼの基礎研究と応用研究の発展に大きく貢献するものと評価された。本審査委員会は論文の構成、内容ならびに下記に示す学位論文の基礎となる学術論文等について慎重に審議し、審査委員の全員一致をもって本論文が博士の学位を授与されるに値すると判定した。

#### <学位論文の基礎となる学術論文>

- ・ Ni, J. F., Tokuyama, S., Sogabe, A., Kawamura, Y., and Tahara, Y: Cloning and high expression of catalase gene from *Bacillus* sp. TE124. *J. Biosci. Bioeng.*, 91, 422-424 (2001).
- ・ Ni, J. F., Sasaki, Y., Tokuyama, S., Sogabe, A, and Tahara, Y: Conversion of a typical catalase from *Bacillus* sp. TE124 to a catalase-peroxidase by directed evolution. *J. Biosci. Bioeng.*, 93, 31-36 (2002).