

氏名（本籍地） さとう ゆかり 佐藤 優花里

学位の種類 博士（生命科学）

学位記番号 生博第85号

学位授与年月日 平成19年3月27日

学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当

研究科，専攻 東北大学大学院生命科学研究科
（博士課程）生態システム生命科学専攻

論文題目 根粒菌由来ハロアルカン脱ハロゲン酵素の基質特異性と立体構造に関する研究

博士論文審査委員 （主査）教授 津田 雅 孝
教授 南 澤 究
教授 清 水 透
助教授 永 田 裕 二
主任研究員 千田 俊哉
（産業技術総合研究所）

1. 研究の背景と目的

農薬や工場廃液に含まれる有機ハロゲン化合物は、毒性が高く化学的に安定であるために環境中からの除去が問題となっている。微生物を利用して有機ハロゲン化合物を分解除去する場合、炭素とハロゲンの結合を切断する脱ハロゲン反応が最も重要である。加水分解的脱ハロゲン酵素であるハロアルカン脱ハロゲン酵素は、反応に補因子を必要とせず、加水分解的脱ハロゲン酵素の中で最も基質特異性の幅広い酵素である。従来、この反応を触媒するハロアルカン脱ハロゲン酵素は有機ハロゲン化合物を唯一の炭素源として分解資化できる菌から単離されてきたが、これらの酵素でも 2-chloropropane、1,2,3-trichloropropane などの環境汚染物質を分解することができなかった。このため、新規の基質特異性を有する脱ハロゲン酵素を単離するための新しい単離法が求められていた。このような背景のもと、マメ科植物の共生窒素固定菌として知られるダイズ根粒菌 *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 やミヤコグサ根粒菌 *Mesorhizobium loti* MAFF303099 などの環境汚染物質分解能が知られていない菌株のゲノムにもハロアルカン脱ハロゲン酵素遺伝子と有意な相同性を示す配列が存在することが全ゲノム解読から明らかになった。

そこで本研究ではこれら根粒菌由来のハロアルカン脱ハロゲン酵素相同遺伝子配列を解析することによって、従来の集積培養法では単離できない新規の基質特異性を有するハロアルカン脱ハロゲン酵素遺伝子を獲得できるのではないかと考え、(1) 根粒菌由来のハロアルカン脱ハロゲン酵素遺伝子相同配列に関する機能的知見を得ること、(2) (1) で得た酵素の基質特異性と立体構造の相関に関する知見を得ることを目的とした。

2. 研究方法

- (1) 有機塩素系農薬 γ -hexachlorocyclohexane (γ -HCH) 分解資化菌 *Sphingobium japonicum* UT26 由来のハロアルカン脱ハロゲン酵素遺伝子 *linB* の相同性検索を行った。
- (2) *linB* 相同配列が検出された根粒菌の有機ハロゲン化合物分解能を検討すると共に、これらの細菌から脱ハロゲン酵素遺伝子を単離し、大腸菌中で大量発現させ、精製酵素または粗酵素抽出液を用いて基質特異性を解析した。
- (3) 取得したハロアルカン脱ハロゲン酵素のうち、環境汚染物質分解能に加えて、他の同酵素群よりも優れた鏡像異性体認識能（エナンチオ選択性）を有し、生体触媒としての応用の可能性も高い DbjA の X 線結晶構造解析を行い、native（基質（反応産物）非結合型）構造と反応産物複合体、および変異体の結晶構造を決定した。
- (4) 脱ハロゲン酵素の構造-機能相関を明らかにするために変異体の活性測定を行った。

3. 結果

(1) 根粒菌における基質特異性の異なるハロアルカン脱ハロゲン酵素の分布の判明

根粒菌の有機ハロゲン化合物の分解能と、これらの細菌が保持していた脱ハロゲン酵素の基質特異性を解析したところ、根粒菌の遺伝子には LinB とアミノ酸レベルで 40 % 程度の identity を示し、新規な基質特異性を有するハロアルカン脱ハロゲン酵素が分布していることが明らかになった。ハロアルカン脱ハロゲン酵素 DbjA (*Bradyrhizobium japonicum* USDA110)、DmlA (*Mesorhizobium loti* MAFF303099)、DbeA (*Bradyrhizobium elkani* USDA94)、DatA (*Agrobacterium tumefaciens* C58)、DsmA (*Sinorhizobium meliloti* 1021) の精製酵素の比活性値を測定したところ、DbjA は、根粒菌由来の脱ハロゲン酵素の中で最も比活性値が高く、有機塩素化合物分解菌由来の脱ハロゲン酵素と同程度の酵素活性を有していた。根粒菌由来の脱ハロゲン酵素は有機塩素化合物より有機臭素化合物に対して高い分解活性を示し、C-Cl 結合の解離に特化した有機塩素化合物分解菌由来の脱ハロゲン酵素とは異なる挙動を示した。

(2) 長い loop と $\alpha 4$ ヘリックスを構成する DbjA 特有の EB 配列の存在

DbjA は第二級ハロゲン化アルキルの R 体に高いエナンチオ選択性を示す唯一のハロアルカン脱ハロゲン酵素だった。一方、1,2-dichloroethane などの短鎖の基質とも、1-chloropentane などの長鎖の基質とも反応でき、既知の脱ハロゲン酵素よりも幅広い基質特異性を有していた。DbjA の立体構造を決定したところ、一次構造から予想された通り、2 つの domain を結ぶ部分に既知の脱ハロゲン酵素には存在しない領域 (His140-Ala150、EB 配列と命名) が存在していた(図 1)。EB 配列の一部 (His146-Glu146) を削った DbjA Δ は短鎖のハロアルカンや(図 2)、第二級ハロゲン化アルキルに対するエナンチオ選択性が減少した。DbjA Δ では DbjAwt の $\alpha 4$ ヘリックスの一部を構成していた Q147-A150 はループに変化していた。

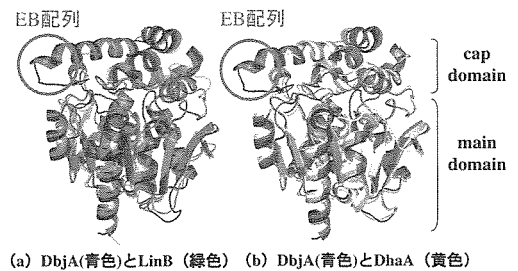


図 1. DbjA の立体構造と EB 配列

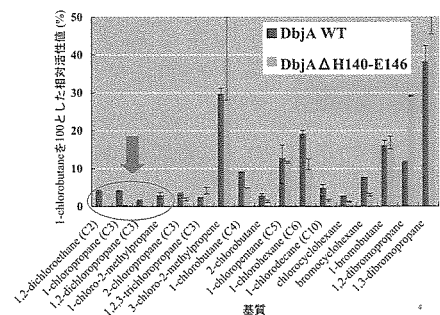


図 2. DbjA Δ の基質特異性

(3) DbjA 特有の基質特異性に必須な EB 配列の他の脱ハロゲン酵素への導入

DbjA の EB 配列を除くアミノ酸配列と 74 % の identity を示す *B. elkani* USDA94 由来の

DbjA に EB 配列を挿入したところ、エナンチオ選択性は変化した。鏡像異性体以外の基質についても比活性が野生型とは異なっていたことから、EB 配列の挿入によりハロアルカン脱ハロゲン酵素の基質特異性の変換が可能であることが示された。

(4) 2-bromopentane 反応産物の結合による EB 配列の構造変化

DbjAwt の基質結合部位に反応産物が結合すると EB 配列は反応産物の方向へ動いていた (図 3)。native 構造で position A

と B の 2 つの conformation をとっていた His139 は、position B の構造をとることで、反応産物と水素結合

していた (図 4)。また、His149 の側鎖にも、反応産物の基質結合部位

への結合に伴う構造変化が認められた。温度因子を比較したところ、基質

として反応しやすい R 体が結合したときよりも、反応しにくい S 体が結合

したときのほうが EB 配列の運動性が大きくなっていることが示され、

反応しやすい基質との結合によって、EB 配列の構造が安定化することが示唆された。一

方、2-bromopentane に対するエナンチオ選択性の低くなった DbjAΔ の native 構造と反応産物複合体では、このような構造変化は観察されなかった。したがって、DbjA の EB 配列

は基質に合わせて動きを変えることが示唆され、この性質が既知の脱ハロゲン酵素よりも幅広い基質特異性を有することと関係していると考えられた。

4. 結論

既知のものとは基質特異性の異なるハロアルカン脱ハロゲン酵素が根粒菌に広く分布していることを明らかにした。とくに、*B. japonicum* USDA110 由来の DbjA は第二級ハロゲン

化アルキルの R 体を高いエナンチオ選択性でアルコールに変換し、最も幅広い基質特異性を有するなど顕著な特徴を示した。DbjA の基質特異性の要因は、基質に合わせて動き

を変える EB 配列およびその周辺のアミノ酸配列であると考えられた。さらに EB 配列を他の脱ハロゲン酵素に導入することで基質特異性の変換が可能であることを示した。

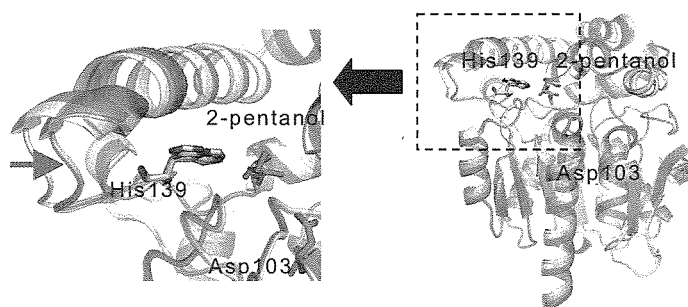


図 3. 反応産物の結合による EB 配列の動き (native; 灰、R 体 complex; 赤、S 体)

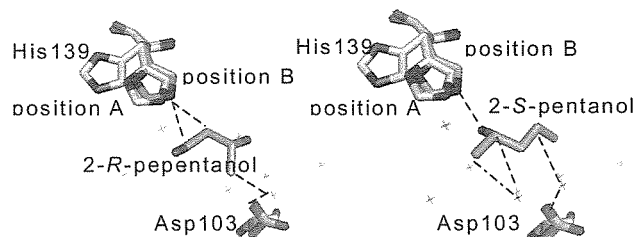


図 4. 反応産物の結合による His139 の動き (native; 白、R 体 complex; 赤、S 体
Asp103 は基質に結合する catalytic triad を構成するアミノ酸残基である。

論文審査結果の要旨

農薬や工業廃液に含まれる有機ハロゲン化合物の環境中からの除去のために、細菌由来のハロアルカン脱ハロゲン酵素の利用が考えられている。しかし、本研究以前に解析が行われていた有機塩素化合物を唯一の炭素源として分解資化できる細菌由来の脱ハロゲン酵素は、1,2,3-trichloropropane などの環境汚染物質を効率的に分解できず、新規の脱ハロゲン酵素の取得が望まれていた。本研究で、論文提出者は、ダイズ根粒菌 *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 やミヤコグサ根粒菌 *Mesorhizobium loti* MAFF303099 など、環境汚染物質分解能が知られていない細菌株のゲノムに脱ハロゲン酵素遺伝子相同配列が存在することに注目し、これら根粒菌由来の脱ハロゲン酵素に関して酵素学的な詳細な解析を実施した。

B. japonicum USDA110、*M. loti* MAFF303099、*B. elkanii* USDA94、*Sinorhizobium meliloti* 1021、*Agrobacterium tumefaciens* C58 の脱ハロゲン酵素遺伝子相同配列 *dbjA*、*dmlA*、*dbeA*、*dsmA*、*data* の遺伝子産物は有機臭素化合物に対して高い分解活性を示し、C-Cl 結合の解離に特化した有機塩素化合物分解資化菌由来の脱ハロゲン酵素とは異なる基質特異性を有していた。特に、DbjA は有機塩素化合物分解資化菌由来の脱ハロゲン酵素と同程度の酵素活性を示すと共に、既知の脱ハロゲン酵素が分解できない R 体のプロモアルカンに対する高いエナンチオ選択性などの新規の幅広い基質特異性を有していた。さらに、DbjA 特有の基質特異性は、既知の脱ハロゲン酵素には存在しない領域 (His140-Ala150、EB 配列と命名) に由来することが示唆された。

続いて、X 線結晶構造解析により DbjA と EB 配列の一部 (His140-Glu146) を削った変異酵素 DbjA Δ の立体構造、およびこれらの反応産物複合体構造が決定した。その結果、DbjA 特有の基質特異性の要因は、基質に合わせて動きを変え、基質結合ポケットの大きさを変化させる EB 配列とその周辺のアミノ酸配列であると考えられた。さらに、DbjA の EB 配列を除くアミノ酸配列と 74 %の identity を示す DbeA に EB 配列を導入したところ、エナンチオ選択性は変化した。鏡像体以外の基質についても比活性が野生型とは異なっていたことから、EB 配列の挿入により脱ハロゲン酵素の基質特異性の改変が可能であることが示された。

以上、本研究では、分子生物学的・生化学的・構造生物学的手法によって、(i) 根粒菌が新規の基質特異性の脱ハロゲン酵素を有している、(ii) EB 配列のような挿入配列が基質結合ポケットに柔軟性を付与することにより、脱ハロゲン酵素の基質特異性に重要な影響を与える、という新規性と発展性に富む極めて重要な知見が提示された。これら本研究の成果は、論文提出者が自立して研究活動を行うに必要な研究能力と学識を有することを明確に示しており、佐藤優花里氏提出の論文を博士 (生命科学) の博士論文として合格と認める。