

( 続紙 1 )

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                       |    |       |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|-------|
| 京都大学                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 博士 ( 農 学 )                                                                                                                            | 氏名 | 実森 啓二 |
| 論文題目                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | Studies on dehalogenase that catalyzes defluorination of fluoroacetate and related enzyme<br>(フルオロ酢酸の脱フッ素反応を触媒する脱ハロゲン酵素および類縁酵素に関する研究) |    |       |
| (論文内容の要旨)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                                                                                                                       |    |       |
| <p>有機ハロゲン化合物は、化学工業における最終製品や合成中間体として大量生産されてきた。これらの化合物の中には環境汚染の原因物質として問題視されるものも多い。有機ハロゲン化合物を酵素的に分解する研究が精力的に行われ、これまでに種々の有機ハロゲン化合物を分解する脱ハロゲン酵素が発見されてきた。しかし、これらのほとんどは安定な有機フッ素化合物には作用しない。フルオロ酢酸デハロゲナーゼは例外的に脂肪族有機フッ素化合物に作用する脱フッ素酵素である。本論文は、フルオロ酢酸デハロゲナーゼによる酵素的脱フッ素機構の解析、および脱ハロゲン酵素の類縁酵素である L-アゼチジン-2-カルボン酸加水分解酵素の構造解析を行ったものであり、それらの成果は以下のように要約される。</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                       |    |       |
| <p>1. <i>Burkholderia</i> sp. FA1 由来のフルオロ酢酸デハロゲナーゼ (FAc-DEX FA1) の結晶構造を解明するために、結晶化条件を検討した。15-18% PEG8000、40 mM MgCl<sub>2</sub>、100 mM Tris-HCl pH8.5 を用いたハンギング・ドロップ法 (4℃) により、X 線結晶構造解析に適した単結晶が得られた。空間群は C2、格子定数は a = 85.9 Å、b = 137.6 Å、c = 52.9 Å、β = 95.1° であった。X 線結晶構造解析により、分解能 1.5 Å、R<sub>factor</sub> 18.1%、R<sub>free</sub> 20.3% で、FAc-DEX FA1 の構造を精密化した。本酵素はホモダイマー構造をとり、各サブユニットは α-ヘリックスから構成された Cap ドメインと α/β ヒドロラーゼフォールドを有する Core ドメインの 2 つのドメインから構成されていた。活性に必須の残基である Asp104 と His271 は、Cap ドメインと Core ドメインの境界に存在した。Asp104、His271、Asp128 から成る catalytic triad の近傍には、Phe34、Arg105、Arg108、Tyr147、His149、Trp150、Trp179、Tyr212、Phe272 が存在し、これらの残基によって活性部位が構成されることが明らかとなった。つぎに、本酵素の脱フッ素に必須の残基の同定を目的として、活性部位の残基を改変した変異型酵素の機能解析を行った。その結果、W150F 変異型酵素では、クロロ酢酸に対する脱塩素活性は野生型酵素と同程度であるのに対して、フルオロ酢酸に対する脱フッ素活性は完全に消失することが明らかとなった。Trp150 は本酵素の脱フッ素反応に関与する重要な残基であることが示された。</p> |                                                                                                                                       |    |       |
| <p>2. FAc-DEX FA1 が触媒する反応における基質と活性残基の相互作用を解明するために、基質複合体 (エステル中間体およびミカエリス複合体) の結晶構造解析を行った。His271 は触媒塩基として機能し、水を活性化してエステル中間体を加水分解すると推定されている。そこで、His271 を Ala に改変した H271A 変異型酵素を用いることで、エステル中間体が加水分解されずに反応が止まった状態の結晶構造を捉えることに成功した。結晶構造からも本酵素の脱ハロゲン反応は、エステル中間体を経</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                       |    |       |

由して進行することが明らかとなった。一方、D104A 変異型酵素とフルオロ酢酸の複合体の結晶構造解析を行った。基質の  $\alpha$ -炭素を求核攻撃する Asp104 を Ala に改変した D104A 変異型酵素を用いることにより、フルオロ酢酸が活性部位に取り込まれた状態のミカエリス複合体の結晶構造を捉えることに成功した。他の細菌由来のフルオロ酢酸デハロゲナーゼ RPA1163 の D110N 変異型酵素とフルオロ酢酸の複合体の結晶構造と比較したところ、両酵素の活性部位におけるフルオロ酢酸の結合様式が互いに異なることが明らかとなり、基質の結合様式が二通りあることが示唆された。フルオロ酢酸の脱フッ素反応の quantum mechanical/molecular mechanical (QM/MM) 解析からは、フルオロ酢酸のフッ素原子が His149、Trp150、Tyr212 から形成されるハロゲン結合サイトに収容されて脱フッ素反応が進行するものと考えられた。フッ素原子と His149、Trp150、Tyr212 の水素結合による相互作用が、脱フッ素反応の活性化エネルギーの低減に大きく寄与していると考えられた。

3. ユリ科植物が生産する L-アゼチジン-2-カルボン酸は、L-プロリンの構造アナログで生体内に取り込まれると高い毒性を示す。Pseudomonas sp. A2C 由来の L-アゼチジン-2-カルボン酸ヒドロラーゼ (A2CH) は、L-アゼチジン-2-カルボン酸を加水分解的に開環することで、2-ヒドロキシ-4-アミノ酪酸に変換する。本酵素は、L-2-ハロ酸デハロゲナーゼと配列相同性を示すが 2-ハロ酸に対する脱ハロゲン活性を示さなかった。そこで、A2CH の野生型酵素の結晶構造を決定し活性部位の構造を明らかにした。Pseudomonas sp. YL 由来の L-2-ハロ酸デハロゲナーゼにおいては Arg41 がハロゲンアクセプターとして基質からのハロゲンの脱離に重要な役割を担うことが知られている。この Arg41 に相当する残基は A2CH では Arg50 として保存されていた。しかしながら、A2CH の結晶構造から、Arg50 の側鎖は溶媒側に配向しハロゲンアクセプターとして機能しないことが明らかとなった。そのため、A2CH は脱ハロゲン活性を示さなかったと考えられる。脱ハロゲン活性には、ハロゲンアクセプターの存在が重要であると考えられた。

注) 論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせて、3,000字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 wordsで作成し  
審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

(続紙 2 )

(論文審査の結果の要旨)

さまざまな微生物が、有機ハロゲン化合物の炭素-ハロゲン結合の切断を触媒する酵素を生産するが、これらの脱ハロゲン酵素のほとんどは安定な有機フッ素化合物には作用しない。フルオロ酢酸デハロゲナーゼは例外的に脂肪族有機フッ素化合物であるフルオロ酢酸の炭素-フッ素結合を開裂可能な脱フッ素酵素として知られている。しかし、脱フッ素反応機構の詳細は明らかにされていない。本論文は、フルオロ酢酸デハロゲナーゼの結晶構造に基づいて、本酵素によるフルオロ酢酸の脱フッ素機構を解析したものである。また、脱ハロゲン酵素の類縁酵素である L-アゼチジン-2-カルボン酸ヒドロラーゼの構造解析を行い、脱ハロゲン酵素との比較によって、脱ハロゲン酵素に要求される構造的特徴を解析したものである。評価すべき点は以下のとおりである。

1. フルオロ酢酸デハロゲナーゼの結晶構造を明らかにした。これは、脂肪族有機フッ素化合物の炭素-フッ素結合を切断する酵素の結晶構造を明らかにした初めての例であり、酵素化学的および構造生物学的に特筆に値する研究成果である。また、結晶構造解析から明らかになった活性部位のアミノ酸残基について部位特異的変異実験による機能解析を行い、脱フッ素反応に重要なアミノ酸残基を同定した。脱フッ素反応機構を明らかにする上で重要な手がかりを与えた意義深い研究成果である。
2. 活性部位アミノ酸残基を置換した変異型酵素を用いることにより、フルオロ酢酸デハロゲナーゼのミカエリス複合体とエステル中間体の結晶構造を明らかにした。活性部位アミノ酸残基と基質の相互作用を明らかにしたものであり、酵素的脱フッ素反応のメカニズムを明らかにする上で重要な知見であり、高く評価される。
3. L-アゼチジン-2-カルボン酸ヒドロラーゼの結晶構造を明らかにし、類縁の脱ハロゲン酵素との比較から、脱ハロゲン反応に要求される構造的要件に関する重要な知見を得た。酵素化学的に意義深い研究成果といえる。

以上のように本論文は、酵素による炭素-ハロゲン結合の切断機構、特に炭素-フッ素結合の切断機構に関する重要な知見を得たものであり、分子微生物科学、酵素化学、構造生物学に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成24年2月9日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。

注) Webでの即日公開を希望しない場合は、以下に公開可能とする日付を記入すること。  
要旨公開可能日：                      年                      月                      日以降