

氏名	李 永 福
学位(専攻分野)	博士(農学)
学位記番号	農博第 1019 号
学位授与の日付	平成 10 年 9 月 24 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	農学研究科農芸化学専攻
学位論文題目	Catalytic Mechanism of L-2-Haloacid Dehalogenase from <i>Pseudomonas</i> sp. YL (<i>Pseudomonas</i> sp. YL の L-2-ハロ酸デハロゲナーゼの触媒機構)
	(主査)
論文調査委員	教授 江崎信芳 教授 林 力丸 教授 池田篤治

論 文 内 容 の 要 旨

有機ハロゲン化合物は、溶剤、冷媒、工業原料、農薬などとして広く用いられ、大量に生産される一方、自然界でも細菌や藻類のハロペルオキシダーゼなどによって生成される。生物界では有機ハロゲン化合物は主にデハロゲナーゼによって分解され、基質特異性や反応特異性の異なる多種多様なデハロゲナーゼが主として微生物から単離されている。2-ハロ酸デハロゲナーゼは2-ハロ酸を加水分解的に脱ハロゲンしてヒドロキシ酸を生成する反応を触媒する酵素で、これまでに立体特異性の異なる数種の酵素が明らかにされている。L-2-ハロ酸デハロゲナーゼ(L-DEX)は、2-ハロ酸のL異性体に特異的に作用し、D-2-ヒドロキシ酸を与える酵素で、*Pseudomonas* sp. YL株由来の酵素についてその特性解明が進められてきた。本論文は、本酵素の触媒機構を原子レベルで解明することを目的として、質量分析やX線結晶構造解析を駆使して詳細な検討を行ったもので、その結果は以下のように要約される。

1. タンパク質の分子量を質量分析で直接測定することにより、触媒機構に関する重要な新知見を得た。すなわち、野生型酵素を基質2-ハロ酸とともにインキュベートすると、D10が基質によって直ちにエステル化されることを見いだした。基質が消費し尽くされるまで、酵素分子は大部分エステル中間体の形で存在することから、エステル中間体の加水分解が本酵素反応における律速段階と推論した。また、活性をもたない各種の部位特異的変異酵素も、基質添加後直ちにエステル中間体を形成することを見いだした。各変異酵素におけるエステル中間体生成速度の違いから、T14, S118, K151, Y157, S175, N177は主にエステル中間体の加水分解の段階に関与するのに対し、R41とD180はエステル中間体生成の段階においても重要な役割を果たすと推論した。

2. S175A変異酵素の結晶をモノクロロ酢酸、2-クロロ酪酸、2-クロロメチル酪酸ならびに2-クロロメチル吉草酸の溶液に各々浸漬することによりエステル中間体を形成させ、それぞれの立体構造を解析した。不斉化合物を基質とした場合にはエステル中間体のヒドロキシ酸部分の立体配置はいずれも2*R*であることを見だし、エステル中間体を生成する段階で基質の立体反転が起こることを明らかにした。モノクロロ酢酸の場合と他の基質の場合では、D10由来の2個のエステル酸素の配向は逆転しており、エステル中間体形成の段階で、基質アルキル基の立体障害によってD10のカルボキシル基が回転すると推論した。さらに、D10のC γ とA175の側鎖メチル基との間に現れた新たな水分子は通常エステル中間体の加水分解に使われること、そして遊離するハロゲンイオンはR41の側鎖によって受け取られることを論証した。

3. 野生型酵素の結晶をL-2-クロロプロピオン酸溶液に浸漬し、生成物D-乳酸との複合体結晶を得た。X線結晶構造解析の結果、D-乳酸はS175A酵素のエステル中間体におけるヒドロキシ酸部分の場合に比べD10を中心に反時計周りに約90度回転した位置に移動していることを明らかにした。S175A酵素のエステル中間体で見られた新たな水分子はD-乳酸複合体の場合には見いだされず、エステル中間体の加水分解に使われて消失したと推論した。さらに、D10のカルボキシル基はD180のカルボキシル基およびS175の水酸基とそれぞれ水素結合していることを見だし、エステル中間体加水分解におけるS175, N177ならびにD180の役割を明らかにした。

論文審査の結果の要旨

デハロゲナーゼは有機ハロゲン化合物の微生物分解において中心的な役割を果たしている。2-ハロ酸デハロゲナーゼは細菌に広く分布し、立体反転を伴う加水分解的脱ハロゲン反応を触媒する。本研究は、*Pseudomonas* sp. YL株由来のL-DEXを対象に、質量分析やX線結晶構造解析を駆使してその触媒機構を原子レベルで究明したものであり、評価すべき点は以下の通りである。

1. 野生型酵素や各種の部位特異的変異酵素が基質2-ハロ酸とエステル中間体を形成することを質量分析法によって実証するとともに、エステル中間体形成ならびに加水分解に関与するアミノ酸残基を明らかにした。
2. S175A変異酵素を用いることによって、モノクロロ酢酸、2-クロロ酪酸、2-クロロメチル酪酸ならびに2-クロロメチル吉草酸とのエステル中間体結晶の立体構造解析に成功した。エステル中間体のヒドロキシ酸部分の立体配置はいずれも2*R*であることを見だし、エステル中間体を生成する段階で基質の立体反転が起こることを実証した。エステル中間体形成の段階で、基質アルキル基の立体障害によってD10のカルボキシル基が回転することや、新たに観測された水分子が通常はエステル中間体の加水分解に使われること、そしてR41が基質から遊離するハロゲンイオンの結合部位であることなどについて、各々精緻な論拠を示した。
3. 野生型酵素と生成物D-乳酸との複合体のX線結晶構造解析に成功した。エステル中間体におけるヒドロキシ酸部分とD-乳酸分子の占める立体的位置関係の違いを明らかにするとともに、D-乳酸複合体においては、エステル中間体に見いだされた新たな水分子が加水分解に使われたとする論拠を示した。さらに、D10のカルボキシル基がD180のカルボキシル基およびS175の水酸基とそれぞれ水素結合していることを見だし、S175、N177、D180の役割をそれぞれ明らかにした。

以上のように本論文は、*Pseudomonas* sp. YL株由来のL-DEXについて触媒機構を原子レベルで解明しており、酵素化学およびタンパク質工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10年7月16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。