

氏 名	朴 清
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	農 博 第 1008 号
学位授与の日付	平成 10 年 5 月 25 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	Enzymological Studies of Bacterial DL-2-Halo Acid Dehalogenases (細菌のDL-2-ハロ酸デハロゲナーゼの酵素学的研究) (主査)
論 文 調 査 委 員	教 授 江 崎 信 芳 教 授 清 水 昌 教 授 加 藤 暢 夫

論 文 内 容 の 要 旨

有機ハロゲン化合物は、溶剤や冷媒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。これらの有機ハロゲン化合物の多くは、主に微生物の生産するデハロゲナーゼによって分解される。2-ハロ酸デハロゲナーゼは2-ハロ酸の加水分解的脱ハロゲン反応を触媒し、対応する2-ヒドロキシ酸を生成する酵素で、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。DL-2-ハロ酸デハロゲナーゼ(DL-DEX)は、2-ハロ酸のD, L両異性体に作用し、各々LおよびD-2-ヒドロキシ酸を与える。本酵素は、D, L両異性体に同等に作用する点でラセマーゼに似ているが、加水分解によって基質と異なる生成物を与える点で、他に類例がない。本論文は、*Pseudomonas*属細菌の生産する基質特異性の異なる2種のDL-DEXを対象に、生成物への ^{18}O の取り込みや部位特異的変異実験によってその触媒機構を明らかにしたもので、その結果は以下のように要約される。

1. *Pseudomonas putida* PP 3の生産するDL-DEX (DL-DEX312)を均一状態に精製するとともに、その酵素化学的諸性質を明らかにした。本酵素は2-ハロ酸のみならず2-ハロ酸アミドにも作用し、それぞれ対応する2-ヒドロキシ酸アミドを生成することを見いだした。一方、*Pseudomonas* sp. 113の生産するDL-DEX (DL-DEX113)は、2-ハロ酸アミドには全く作用せず、2-ハロ酸のみを基質とした。両酵素について、D-およびL-2-ハロ酸相互の阻害作用を調べたところ、いずれの場合にも、一方の異性体他方の脱ハロゲン反応を拮抗的に阻害した。各基質に対する阻害定数 K_i は、脱ハロゲン反応における各々の K_m 値とよく一致したことから、D, L両異性体の脱ハロゲン反応は同一の部位で触媒されると推論した。

2. 酵素1分子当たり平均1回以上ターンオーバーできないように基質と酵素とのモル比を設定し、 H_2^{18}O 中で反応を行った。DL-DEX312によって2-クロロプロピオン酸から生成した乳酸の分子量を質量分析法で測定したところ、D, Lいずれの異性体を用いた場合も、生成した乳酸の大部分が ^{18}O 標識体であった。一方、 H_2^{18}O 中で脱ハロゲン反応に供した酵素をリシルエンドペプチダーゼで切断し、得られたペプチド断片の分子量を質量分析法で測定したところ、いずれも各々の推定分子量とよく一致した。DL-DEX113を用いた場合にも同様の結果が得られたことから、両酵素の脱ハロゲン反応においてはいずれも、酵素と基質とのエステル中間体は形成されず、基質は直接加水分解されると推論した。

3. DL-DEX113とDL-DEX312の間には、触媒基として機能しうるアミノ酸残基が合計26個保存されている。これらのアミノ酸残基を各々部位特異的に他のアミノ酸に置換し、酵素活性への影響、特に2-ハロ酸のD, L両異性体に対する脱ハロゲン活性が各々どのように変化するかを調べたところ、いずれの変異酵素においても、D, L両異性体に対する活性はほぼ同じ比率で低下していた。DL-DEX113にはCys177、DL-DEX312にはCys39とCys282の2つのシステイン残基が含まれるが、いずれも両酵素の間で保存されていない。DL-DEX312においてはDL-DEX113の場合と異なり、2つのシステイン残基をアラニンに置換すると各々完全に活性が消失した。DL-DEX312においては、これらのシステイン残基は活性に必須な役割を果たしており、この点で両酵素は大きく性質が異なることを明らかにした。

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、2-ハロ酸のD、L両異性体に同等に作用するユニークな特質をもつDL-DEXを対象に、基質特異性の異なる2種の酵素を対比しながら、D、L両異性体に対する触媒部位が同一かどうかという点を中心にして、触媒機構やアミノ酸残基の役割を詳しく解析したもので、評価すべき点は以下の通りである。

1. *Pseudomonas putida* PP3の生産するDL-DEX312は2-ハロ酸のみならず2-ハロ酸アミドにも作用することを見いだし、2-ハロ酸アミドに作用しない*Pseudomonas* sp. 113のDL-DEX113と対比しつつ、各々の触媒機構を解析し、いずれの酵素においても2-ハロ酸のD、L両異性体の脱ハロゲン反応は同一の活性部位で触媒されることを示した。
2. H_2^{18}O 中で2-ハロ酸の脱ハロゲン反応を行い、 ^{18}O が生成物あるいは酵素タンパク質に取り込まれるかどうかを質量分析法を駆使して解析することによって、両DL-DEXによる2-ハロ酸の脱ハロゲン反応では、酵素と基質とのエステル中間体は形成されず、水分子による求核置換によって直接2-ヒドロキシ酸が生成することを示した。
3. 両DL-DEXに保存されているアミノ酸残基を部位特異的に他のアミノ酸残基に置換することによって、機能上重要なアミノ酸残基を検索するとともに、活性の低下した変異酵素はいずれも、D、L両異性体に対する活性を同程度に失っていることを見いだし、共通の触媒部位が両異性体の反応に関与していることを示した。また、DL-DEX312のもつ2つのシステイン残基は、DL-DEX113の場合とは異なり、必須の機能を果たしていることを見いだし、相同性の高い両酵素の違いを明確にした。

以上のように本論文は、基質特異性の異なる2種のDL-DEXを対象に、両者の構造と機能における共通点と相違点を解析するとともに、両酵素による2-ハロ酸の脱ハロゲン機構を明らかにしており、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4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。