

氏 名	ひさのたまお 久野玉雄
学位(専攻分野)	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	理 博 第 1848 号
学位授与の日付	平 成 9 年 3 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	理 学 研 究 科 生 物 物 理 学 専 攻
学 位 論 文 題 目	L-2-ハロ酸デハロゲナーゼの脱ハロゲン機構に関する構造生物学的研究

論文調査委員	(主 査) 教 授 高 橋 敏 教 授 前 田 章 夫 教 授 藤 吉 好 則
--------	--

論 文 内 容 の 要 旨

この論文において申請者は、脱ハロゲン化酵素、L-2-ハロ酸デハロゲナーゼ (EC 3.8.1.2) の脱ハロゲン機構に関する構造生物学的研究をおこなった。炭素-ハロゲン結合を開裂する酵素は多くはないが、環境中に存在する各種の有機ハロゲン化合物の分解に有用なものではないかと期待がもたれているものである。

申請者はまず *Pseudomonas* 菌 YL 株が産生する L-2-ハロ酸デハロゲナーゼ (EC. 3.8.1.2) の三次構造の決定をおこなった。これは既到大腸菌による大量発現が報告されており、実験にはそれを用いた。結晶化の初期条件検索にはハンギング・ドロップ蒸気拡散法を用い、PEG 8,000 共存下の条件で最初の結晶が得られた。PEG 濃度を検索したが良好な結果が得られなかったので、シッティング・ドロップ蒸気拡散によるシーディング法によって 15%PEG-1%1-プロパノール共存下 (ドロップの平衡化到達速度が遅い条件下で)、pH 5.5 で X 線結晶解析に適した大型の単結晶を得ることが出来た。得られた結晶は単斜晶系に属し、空間群は C_2 、格子定数 $a=92.21 \text{ \AA}$, $b=62.78 \text{ \AA}$, $c=50.84 \text{ \AA}$, $\beta=122.35^\circ$ で、単位格子中に 4 サブユニットを含み (本酵素は二量体)、溶媒としての水含量は 48% である。浸漬法で重原子置換を試み、適当な重原子置換結晶としてウラニル誘導体と金-シアノ錯体誘導体を得られた。これらのネイティブ結晶及び重原子置換体結晶につき R-AXIS IIC により X 線結晶解析をおこなった。重原子の異常分散効果を考慮した多重同型置換法 (MIRAS) により位相を決定し、分解能 $2.5 \text{ \AA}$ までの解析をおこない、更にネイティブ結晶について分解能 $2.0 \text{ \AA}$ の高分解能データを集積して分子モデルの構築と構造の精密化をおこなった。本酵素は二量体であって非対称単位中には一つのサブユニットが含まれるので、モデル構築は 1 サブユニットに対しておこない、初期モデルを分子動力学的手法 X-PLOR によってサブユニット原子座標を精密化し、分解能 $2.0 \text{ \AA}$ での三次構造を決定した。結晶学的 R 値は 19.3% である。得られた原子座標は米国ブルックヘヴン国立研究所の蛋白質データバンクに登録済みである (アクセッションコード: 1JUD)。これらの解析は pH 5.5 で得られた結晶についてのものであるが、本酵素の至適 pH は 9.5 であり、pH の違いが構造を左右するものかどうかを明らかにすべく、pH 5.5 の結晶を浸漬法で pH 9.0

とした結晶についても解析をおこなったが、構造はほとんど同じであった。

決定された本酵素の三次構造をみると、サブユニットは2つのドメインを持っており、それぞれコア・ドメイン、サブドメインと名付けられた。コア・ドメインは $\alpha\beta$ タイプの構造を持ち、6本の平行 β ストランドからなる β -シートと、5本の α ヘリックスから構成される。その二次構造トポロジーはいわゆるNAD結合モチーフと類似している。サブドメインは α タイプの構造を持ち、4本の α ヘリックスがバンドル様にパッキングされている。このサブドメインはコア・ドメインの一つ目の β ストランドと α ヘリックスの間に挿入されている。生化学的に決定されていた活性部位はこれら二つのドメインの間に存在する。そこには活性に重要なアミノ酸残基、Asp-10, Thr-14, Arg-41, Ser-118, Lys-151, Tyr-157, Ser-175, Asn-177, Asp-180が集まっている。活性部位は親水的な環境にあり、これらのアミノ酸残基は9個の水分子と複雑な水素結合ネットワークを形成している。

本酵素の反応機構の解析のために、酵素—基質複合体の結晶化を試み、ヨード酢酸との複合体の結晶解析に成功した。分解能2.1 Åの反射から、結晶学的R値24.6%の構造が得られた。全体の構造にはほとんど変化がないが、活性部位周囲のアミノ基には動きがみられる。この結果、基質の結合位置が明らかになったので、そのモデルに基づきいくつかの活性部位残基の役割を考察し、ハロゲン原子と相互作用する残基としてTyr-12がもっとも有力な候補であるという結論を得た。また本酵素には阻害剤としてヒドロキシルアミンが知られており、その解析は酵素反応機構の解明のために非常に役立つものと考えられるので、酵素-ヒドロキシルアミン、酵素-クロロプロピオン酸（基質）-ヒドロキシルアミンのそれぞれの複合体結晶についても解析をおこなった。

これらの結果をもとにして、申請論文では本酵素の反応機構を解析しているが、Asp-10がハロゲンと結合している炭素原子を求核攻撃してエステル中間体に導くこと、このものが水分子によって加水分解されて生成物を与えること等が明確になった。また本酵素では触媒過程において大きな構造変化を引き起こし、この構造変化によって基質との親和性を高め、且つ脱ハロゲン反応を進みやすくしていることが示唆されている。

論文審査の結果の要旨

近代科学の発展に伴い、多様な有機ハロゲン化合物が冷媒、潤滑剤、絶縁材、可塑剤、除草剤、殺虫剤、殺菌剤など多種多様な用途に用いられ、我々の身の回りに広く存在する物質となっている。しかしながらこれらハロゲン化合物は難分解性であり、且つ毒性も強く、環境汚染の原因の一つとなっていることは著名な事実でもある。現在のところこれらハロゲン化合物の処理は高温での焼却が唯一の手段であるが、微生物が作る炭素—ハロゲン結合を切断する酵素が見つかっており、このような酵素を蛋白質工学的に変換することにより、酵素反応というきわめて穏和な条件下で環境汚染物質を分解することが出来るようになれば、人類の生活にとって大きな意味を持つと思われる、また大変望まれるところである。その為にはこのような酵素の構造を明らかにし、その反応機構を解明することが研究の基礎として必須である。申請者はこの点に挑戦した。

Pseudomonas 菌 YL 株が産生する L-2-ハロ酸デハロゲナーゼは補因子なしに L-2-ハロ酸を D-2-ヒド

ロキシ酸に変換する。この酵素は高い耐熱性を持ち、またアルキル鎖の長い L-2-ハロ酸にも作用することが出来て、医薬品の原料などとして重要なアルキル鎖の長い D-2-ヒドロキシ酸を生成する。申請者はこの酵素の炭素-ハロゲン結合の切断機構及び光学活性な基質の立体認識機構を解明するために、X 線結晶解析の手法を用いて分解能 2.0 Å における立体構造を明らかにすることが出来た。これは L-2-ハロ酸デハロゲナーゼファミリーにおいて明らかにされた最初の構造である。更に本酵素と基質の一つであるヨード酢酸との複合体、及び、触媒過程の阻害剤であるヒドロキシルアミンも加わった酵素-基質-阻害剤という三者複合体の結晶も得てそれらの立体構造も明らかにした。X 線結晶解析は用いる結晶の出来不出来で結果が決まるが、申請者は注意深い実験で良好な結晶を作成し、2.0 Å という高分解能、R 因子 20% 以下の三次構造を得ている。これらの結果から、この酵素分子は 2 サブユニットからなる 2 回軸を持つ対称な立体構造を持ち、それぞれのサブユニットは二つのドメインからなること、活性部位（そのアミノ酸残基は生化学的な実験から推定されていた）はその二つのドメインで挟まれる部分であることが明らかになり、活性部位にある各アミノ酸残基の位置が明確になった結果、この酵素の実体的な反応機構を議論することが出来るようになったことは申請者の最も重要な貢献である。酵素-基質、及び酵素-基質-阻害剤との複合体の解析は必ずしも明確なものとはいえず、反応中間体と予想されるエステル中間体もとらえられてはいないが、これはおそらくこの酵素の性質を反映しているものであり、今後の議論の基盤を与えるものとして充分であると考えられる。

L-2-ハロ酸デハロゲナーゼは NAD 結合モチーフ類似のトポロジーを持つコア・ドメインを持ちながら加水分解という異なる機能を持ち、またその活性部位残基はこれまでよく研究されてきたプロテアーゼ、エステラーゼ、リパーゼなどの加水分解酵素、あるいは炭素-ハロゲン結合を切断する別のタイプの酵素、ハロアルカンデハロゲナーゼなどに見られるような活性残基の三つ組みを持たないという大変特異なものである。一般にデハロゲナーゼ類は金属などの補因子を持たず、何がハロゲンを活性するかが問題である。ハロアルカンデハロゲナーゼでは詳細な原子座標の決定がおこなわれており、これはトリプトファンであるとされている。申請者は L-2-ハロ酸デハロゲナーゼの構造を明らかにしたことによって、本酵素においてハロゲンを活性化しているのはチロシン残基であると推論している。いずれにせよ芳香環によるハロゲン原子の固定・活性化は反応論上大変興味ある問題を提起している。

申請者が L-2-ハロ酸デハロゲナーゼの原子座標を決定したことは極めて重要である。これによってこの酵素の反応過程を原子レベルで追跡することが初めて可能になった。結果の解釈には推論を伴い、時代のレベルを反映して推移もあるだろうが、ここに得られている立体構造という結果は精密さという点を別にすればこれは不変であって、今後永く自然科学に貢献できるものであり、申請者の貢献もまた不変であろう。X 線結晶解析は技術であるが、しかし極めて高度の技術である。申請者はこの高度の技術をよく消化・吸収しており、L-2-ハロ酸デハロゲナーゼの立体構造決定によって今後この酵素の機能研究において原子レベルでの議論を可能にした点、斯界に対する貢献も大きく、博士（理学）の学位論文に値するものと判定した。