

平成 31 年 4 月 5 日現在

機関番号：12614

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18685

研究課題名(和文) 基質特異性の改変によるDDT初期分解経路の構築

研究課題名(英文) Construction of initial degradation system of DDT using enzymes with modified substrate specificity

研究代表者

岡井 公彦 (Okai, Masahiko)

東京海洋大学・学術研究院・助教

研究者番号：00596562

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：DDT(dichloro diphenyl trichloroethane)は有機塩素系農薬で、分解菌の報告例はあるものの、分解経路については未知のままである。本研究ではDDT分解にかかわるLinAの改変に向けたスクリーニング法を確立するとともに、DDT分解のできるDDEに酸素を添加する酵素EtbAa2-Ab2の立体構造を決定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

POPs(persistent organic pollutants)の中でHCH(hexachlorocyclohexane)は完全な分解経路が解明されているが、DDT(dichloro diphenyl trichloroethane)の分解経路を明らかにした研究報告例はない。DDT分解経路を創出することは、環境浄化の産業応用に貢献するものである。さらに、他の菌のDDT分解に関わるアイソザイムも推定できることから、学術的な貢献にも寄与する。

研究成果の概要(英文)：DDT(dichloro diphenyl trichloroethane) is an organo-chlorine pesticide. There is a few report about DDT-degrading bacteria, but the degradation pathway is unknown. In this study, we established a screening method for obtaining modified dehydrochlorinase LinA which can degrade DDT and determined the crystal structure of DDE-degrading oxygenase EtbAa2-Ab2.

研究分野：構造生物学

キーワード：酸素添加酵素 結晶構造解析 環境浄化

1. 研究開始当初の背景

残留性有機汚染物質 POPs (Persistent Organic Pollutants) は毒性が強く、生物蓄積性もあることから人の健康や環境に悪影響を及ぼすことが懸念されており、協調した国際的な廃絶、削減が求められている。その中で意図的に製造された有機塩素系農薬は製造・販売が禁止された後、埋設による処分が実施され、容器の腐食等による周辺地域への拡散が危惧されている。広範囲にわたる低濃度汚染地域の処理には微生物を用いた分解技術の創出が有効であると期待されている。

意図的に製造された化合物の中で最も埋設量の多い HCH (hexachlorocyclohexane) は *Sphingobium japonicum* UT26S で全体の分解経路が明らかにされている。しかし、次に埋設量の多い DDT (dichloro diphenyl trichloroethane) では分解菌の報告例はあるものの、分解経路については未知のままであり、酵素の改良ができない状況にある。その中で、HCH 分解酵素群の 1 つである脱塩化水素酵素 LinA が DDT の分解にも応用でき、さらに *Rhodococcus* 属の PCB 分解酵素群 (EtbAa2-Ab2、BphB、EtbC) と組み合わせることで DDT の環を開裂できる可能性のあることが分かってきた (Figure)。

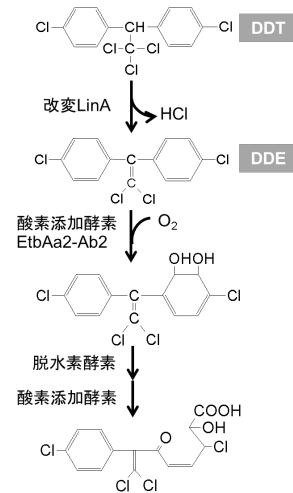


Figure DDTの初期分解ステップ

2. 研究の目的

本研究では DDT 分解の最上流でかかわる LinA と EtbAa2-Ab2 の酵素を対象として、DDT 分解機構を明らかにすることを目的としている。既に立体構造が既知の LinA では、活性に影響を与える可能性のあるアミノ酸を置換することで、DDT 分解活性を解析する。EtbAa2-Ab2 に関しては立体構造を明らかにすることで反応機構を解明し、高活性化に向けた基盤情報を取得する。

3. 研究の方法

A) 脱塩化水素酵素 LinA の基質特異性の改変

LinA の構造情報を基に基質結合ポケット入り口のアミノ酸を変異させる。また、進化工学による改変では、変異導入率を調節して無数の改変タンパク質の遺伝子を作成する。大腸菌で改変蛋白質を発現させ、DDT 分解活性を測定する。

B) 酸素添加酵素 EtbAa2-Ab2 の立体構造解析

大腸菌を用いた発現系を構築し、アフィニティ、イオン交換、ゲルろ過の各種クロマトグラフィーを用いて精製する。精製タンパク質はスクリーニングキットを用いて結晶のスクリーニングを行う。放射光施設で X 線結晶データの取得を行い、そのデータを用いて立体構造を決定する。

4. 研究成果

A) 脱塩化水素酵素 LinA の基質特異性の改変

DDT 分解で放出される H⁺ が溶液の pH 低下につながることに着目し、フェノールレッ

ドを指標として吸光度を測ることで、マルチプレートリーダーによる多検体の迅速な測定方法を確立した。基質結合ポケットの入口に位置している10種類のアミノ酸をアラニンに置換した変異体とランダム変異を導入した変異体を用いて、DDT分解活性試験を行った結果、顕著に活性を上昇させる酵素は得られなかったが、ランダム変異の条件をさらに検討することでDDT分解活性を上昇させる酵素の創出を行っていく。

B) 酵素添加酵素 EtbAa2-Ab2 の立体構造解析

分子置換法で EtbAa2-Ab2 の立体構造を分解能 3.2 Å で決定した。反応が行われる EtbAa2 と類似性の高い酵素との比較を行った結果、*Rhodococcus jostii* RHA1 由来 biphenyl diogenase BphA1 と最も構造の類似性が高く、RMSD は 1.4 Å であった。また、類似性の高い他の Biphenyl dioxygenase BphALB400、BPDO_{B356}、BPDO-O_{B1} とも比較した結果、EtbAa2 は活性部位周辺のアミノ酸のいくつか(A215、G295、S296、S299)形の小さなアミノ酸に置換されていることが明らかになった。これらのアミノ酸の違いは、EtbAa2-Ab2 が大きな化合物を基質にできることを示唆していた。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：該当なし

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：該当なし

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。