

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24658275

研究課題名(和文) 難分解性有機ハロゲン化合物汚染環境を修復する生体触媒の開発

研究課題名(英文) Development of Biocatalysts for Remediation of Environments Polluted with Persistent Organohalogen Compounds

研究代表者

栗原 達夫 (Kurihara, Tatsuo)

京都大学・化学研究所・教授

研究者番号：70243087

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：難分解性の有機ハロゲン化合物に作用する微生物酵素の構造と触媒機構を解析した。フルオロ酢酸デハロゲナーゼの触媒反応では、基質のフッ素原子とHis149、Trp150、Tyr212の相互作用が脱フッ素反応に重要であることが示唆された。DL-2-ハロ酸デハロゲナーゼにおいては基質結合部位が2箇所あり、このうちの1箇所です脱ハロゲン反応が進行することが示唆された。2-ハロアクリル酸ヒドラーターゼについては、X線結晶構造解析に供する結晶を取得するためのタンパク質精製条件を確立し、結晶化の条件検討を行った。

研究成果の概要(英文)：Structures and catalytic mechanisms of microbial enzymes that catalyze the degradation of persistent organohalogen compounds were studied. As to fluoroacetate dehalogenase, it was suggested that interaction of the fluorine atom of the substrate with His149, Trp 150, and Tyr212 is important for the defluorination reaction. As to DL-2-haloacid dehalogenase, two substrate-binding sites were found, and it was suggested that the dehalogenation reaction proceeds in one of these sites. As to 2-haloacrylate hydratase, we established a protein purification method and searched for crystallization condition for X-ray crystallographic analysis of the enzyme structure.

研究分野：分子微生物科学

キーワード：酵素 応用微生物 有機ハロゲン化合物 デハロゲナーゼ

## 1. 研究開始当初の背景

有機ハロゲン化合物による環境汚染は深刻な社会問題となっている。オゾン層を破壊するフロン（クロロフルオロカーボン）や温室効果の大きい代替フロン（ハイドロフルオロカーボン）の大気中への放散、ゴミの焼却にもなって生成する猛毒ダイオキシンの土壌への蓄積、溶剤として多用されるトリクロロエチレンの環境への漏洩などには特に早急な対応が求められる。これら有機ハロゲン化合物を分解し環境を浄化する手段として注目されるのが、脱ハロゲン酵素（デハロゲナーゼ）や、その生産菌である。これまでに、さまざまな有機ハロゲン化合物を分解する酵素が、世界各国で単離されてきた。

有機ハロゲン化合物には、上述のような環境汚染物質としての側面がある一方、化学工業における最終製品や合成原料として重要であり、今後も有機化学工業において多用されることが予想される。有機ハロゲン化合物の酵素的変換法の開発はグリーンケミストリーの実現に寄与するものと期待される。有機ハロゲン化合物を位置選択的、立体選択的に生成・変換する手法の開発は特に医薬品や農薬等を合成するファインケミカルの分野で重要な課題である。有機ハロゲン化合物変換酵素にはこのような選択的物質変換への利用も期待される。

このような観点から有機ハロゲン化合物に作用する種々の酵素が単離され機能解析されてきたが、その一方で、このような酵素の作用を受けにくい有機ハロゲン化合物も多い。これまでに単離されてきた有機ハロゲン化合物変換酵素の多くは飽和脂肪族有機ハロゲン化合物または芳香族有機ハロゲン化合物に作用するものであり、不飽和脂肪族有機ハロゲン化合物に作用する酵素についての知見は限定的である。不飽和脂肪族有機ハロゲン化合物に作用する酵素の数少ない例として、本研究代表者らが 2-クロロアクリル酸資化性土壌細菌から見いだした 2-ハロアクリル酸ヒドラターゼがあげられる。本酵素は 2-クロロアクリル酸や 2-ブromoアクリル酸の炭素-炭素二重結合への水付加反応を触媒し、その結果生成する 2-ヒドロキシ-2-ハロプロピオン酸からの自発的な脱ハロゲン化水素によりピルビン酸が生成する。

一方、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報告例もほとんどない。炭素-フッ素の結合エネルギーは、他の炭素-ハロゲンの結合エネルギーに比べてはるかに大きく、大部分の酵素は、塩素、臭素、ヨウ素化合物に作用しても、フッ素化合物には作用しない。有機フッ素化合物の脱フッ素を触媒する酵素として例外的な存在がフルオロ酢酸デハロゲナーゼである。本酵素はフルオロ酢酸の加水分解的脱フッ素反応を触媒する。本酵素の構造や反応機構を明らかにすることは、さまざまな有機フッ素化合物を分解する新しい酵素の開発の足がかりとな

る可能性が期待される。

## 2. 研究の目的

本研究では、難分解性有機ハロゲン化合物として知られる不飽和脂肪族有機ハロゲン化合物および脂肪族有機フッ素化合物の分解を触媒する微生物酵素を主な研究対象とする。それらの構造と触媒機能を解析することで、環境修復や有用物質生産に有用な酵素を開発するための基盤的知見を得ることを目的とする。具体的には、不飽和脂肪族有機ハロゲン化合物の一種である 2-ハロアクリル酸の脱ハロゲン反応を触媒する 2-ハロアクリル酸ヒドラターゼと、脂肪族有機フッ素化合物の一種であるフルオロ酢酸の脱フッ素反応を触媒するフルオロ酢酸デハロゲナーゼを主な研究対象とする。また、酵素としては例外的に光学異性体の D-体、L-体の両者に作用する DL-2-ハロ酸デハロゲナーゼも対象とし、本酵素のユニークな基質特異性が発現するメカニズムの解明に向けて、構造と触媒機構の解明にも取り組む。それぞれの酵素に関する研究目的は以下の通りである。

(1) *Burkholderia* sp. FA1 が生産するフルオロ酢酸デハロゲナーゼはフルオロ酢酸の加水分解的脱フッ素反応を触媒し、グリコール酸をあたえる（引用文献①）。結晶構造解析、計算機科学的手法、分光学的解析などにより、炭素-フッ素結合の切断を可能にする本酵素の構造的特徴を明らかにする。

(2) *Methylobacterium* sp. CPA1 が生産する DL-2-ハロ酸デハロゲナーゼは 2-ハロ酸の D、L 両異性体の加水分解的脱ハロゲン反応を触媒し、対応する L-体と D-体の 2-ヒドロキシ酸を生成する（引用文献②）。本酵素が光学異性体の両方を基質とする機構を明らかにするため、本酵素の基質結合部位の構造的特徴を明らかにする。

(3) *Pseudomonas* sp. YL が生産する 2-ハロアクリル酸ヒドラターゼ (Caa67<sub>YL</sub>) は、還元型フラビン (FADH<sub>2</sub>) 依存的な 2-クロロアクリル酸への水付加反応を触媒する（引用文献③）。これにより生成した 2-クロロ-2-ヒドロキシプロピオン酸から塩化水素が自発的に脱離してピルビン酸が生成する。本酵素反応は難分解性有機ハロゲン化合物の分解系として注目されるほか、一般的に酸化還元反応の補酵素として機能するフラビンが水和反応に要求される点で酵素化学的にも興味深い。本酵素によるユニークな脱ハロゲン反応の触媒機構の詳細を明らかにするため、X 線結晶構造解析に適した結晶を生成させるための条件を明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) フルオロ酢酸デハロゲナーゼの触媒反応機構解析：本酵素反応の第一段階（触媒中心

アスパラギン酸残基の基質  $\alpha$  炭素への求核攻撃によるエステル中間体形成)に関与する Asp104 を Ala に改変した変異型酵素を用いて、基質が活性部位に取り込まれるが反応が進行しないミカエリス複合体の X 線結晶構造解析を行った。また、第二段階(エステル中間体の加水分解によるグリコール酸の生成と酵素の再生)に関与する His271 を Ala に改変した変異型酵素を用いて、エステル中間体の X 結晶構造解析を行った。これらの構造情報に基づいて、quantum mechanical/molecular mechanical (QM/MM) 解析を行い、反応の進行に適した酵素と基質の相互作用様式を推定した。また、種々の基質を添加したときのトリプトファン残基の蛍光スペクトル解析から、基質と酵素の相互作用様式を解析した。

(2) DL-2-ハロ酸デハロゲナーゼの触媒反応機構解析：本酵素の基質である 2-ブロモ-2-メチルプロピオン酸と、本酵素の活性に必須の Asp194 を改変した D194N 変異型酵素の複合体について X 線結晶構造解析を行った。構造情報に基づき、計算機科学的手法によるドッキングシミュレーションを行い、酵素と基質の結合様式を推定した。

(3) 2-ハロアクリル酸ヒドラターゼの結晶化条件検討：Caa67<sub>YL</sub> 遺伝子を T7 プロモーター制御下にもつ発現プラスミド pET-21a(+)-CAA67\_YL を構築し、*Escherichia coli* BL21(DE3) に導入した。IPTG 添加で Caa67<sub>YL</sub> を高発現した細胞の抽出液から、DEAE-Toyopearl 650M カラムクロマトグラフィと Butyl-Toyopearl 650M カラムクロマトグラフィにより、本酵素を精製した。精製タンパク質を含む溶液の粒径分布を動的光散乱法により測定した。結晶化条件の検討は、Crystal Screen 1、Crystal Screen 2、Index HT、SaltRx 1、SaltRx2、PEGRx 1、PEGRx 2 (以上 Hampton Research 社)、Wizard Classic 1、Wizard Classic 2、Wizard Cryo 1、Wizard Cryo 2 (以上 Emerald Biosystems 社)を用い、シッティングドロップ蒸気拡散法で行った。

#### 4. 研究成果

(1) フルオロ酢酸デハロゲナーゼの触媒反応機構解析

*Burkholderia* sp. FA1 由来のフルオロ酢酸デハロゲナーゼが触媒する反応では Asp104 が基質の  $\alpha$ -炭素を求核攻撃することでハライドイオンが脱離するとともに酵素と基質が共有結合したエステル中間体が生成し、これが His271 により活性化された水分子によって加水分解されることでグリコール酸が生成するとともに酵素が再生する。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反応が

エステル中間体を経由することが示された。一方、Asp104 を Ala に改変した D104A 変異型酵素を用いることで、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。本酵素にフルオロ酢酸またはクロロ酢酸を添加したときのトリプトファン残基の蛍光スペクトルを比較解析した結果、これらの基質の酵素への結合様式が互いに異なることが示唆された。フルオロ酢酸の脱フッ素反応の 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。フッ素原子とこれらの残基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。

(2) DL-2-ハロ酸デハロゲナーゼの触媒反応機構解析

*Methylobacterium* sp. CPA1 由来の DL-2-ハロ酸デハロゲナーゼの触媒反応機構を解析した。D194N 変異型酵素と、基質である 2-ブロモ-2-メチルプロピオン酸の複合体の X 線結晶構造解析、モデリング実験、および野生型酵素に見られた塩素同位体効果の解析に基づき、触媒反応機構の解析を行った。その結果、本酵素には基質結合部位が 2 箇所あり、そのうちの 1 箇所に基質が結合したのち、もう 1 箇所の結合部位に基質が移動し、その第 2 の基質結合部位において脱ハロゲン反応が進行することが示唆された。第 1 の基質結合部位では、Trp37 の側鎖 NH、Phe40 および Asp194 の主鎖 NH、Ser193 の側鎖 OH が基質のカルボキシ基と水素結合を形成するものと考えられた。一方、第 2 の基質結合部位、すなわち活性部位においては、Arg272 が基質のカルボキシ基と水素結合を形成するものと考えられた。

(3) 2-ハロアクリル酸ヒドラターゼの結晶化条件検討

① *Pseudomonas* sp. YL 由来 2-ハロアクリル酸ヒドラターゼ (Caa67<sub>YL</sub>) の精製

結晶構造解析に供することを目的として、Caa67<sub>YL</sub> の精製法を検討した。Caa67<sub>YL</sub> を高生産する組換え型 *E. coli* BL21(DE3) の菌体からタンパク質粗抽出液を調製し、DEAE-Toyopearl 650M カラムクロマトグラフィと Butyl-Toyopearl 650M カラムクロマトグラフィにより、Caa67<sub>YL</sub> の精製タンパク質を得た。5 L の培養液から、6.0 mg の精製タンパク質が得られた (収率 4.2%)。

## ② 動的光散乱法を用いたサンプル調製法の検討

Caa67<sub>YL</sub> の精製では 60 mM KPB (pH 7.1) を緩衝液として用いた。しかし、結晶化条件の検討では、精製タンパク質溶液中のリン酸イオンが、結晶化用試薬中の沈殿剤と反応し、不溶性のリン酸塩が生じる可能性がある。そこで、多様な結晶化条件を検討するために、精製タンパク質溶液中の緩衝液を 20 mM HEPES (pH 7.1) に交換した。緩衝液組成が Caa67<sub>YL</sub> の結晶化能に及ぼす影響を評価するために、緩衝液交換後のタンパク質溶液の粒径分布を動的光散乱法により測定した。0.02 μm 径のフィルターを用いて夾雑物を除去し、多分散度を測定した結果、緩衝液を交換することで、試料の多分散度が 35% から 22% に改善することがわかった。以上の結果をふまえて、20 mM HEPES (pH 7.1) に交換したタンパク質溶液を 0.02 μm 径のフィルターで濾過したサンプルを結晶化実験に用いることとした。

## ③ Caa67<sub>YL</sub> の結晶化条件検討

上述のように結晶化用の Caa67<sub>YL</sub> 溶液を調製し、スクリーニングキットを用いて結晶化条件を検討した。結晶化条件のスクリーニングは 192 条件下で行い、結晶はシッティングドロップ蒸気拡散法により 20°C で成長させた。その結果、沈殿剤として 0.15 M DL-Malic acid (pH 7.0)、20% w/v Polyethylene glycol 3,350 を用いた条件下で、針状結晶が得られた。得られた結晶を Izit Crystal Dye を用いて染色した結果、青く染色されたことから目的タンパク質の結晶である可能性が高いと考えられた。

## <引用文献>

- ① Keiji Jitsumori, Rie Omi, Tatsuo Kurihara, Atsushi Kurata, Hisaaki Mihara, Ikuko Miyahara, Ken Hirotsu, and Nobuyoshi Esaki: X-Ray crystallographic and mutational studies of fluoroacetate dehalogenase from *Burkholderia* sp. strain FA1. *J. Bacteriol.* (2009) **191**, 2630-2637.
- ② Rie Omi, Keiji Jitsumori, Takahiro Yamauchi, Susumu Ichiyama, Tatsuo Kurihara, Nobuyoshi Esaki, Nobuo Kamiya, Ken Hirotsu, and Ikuko Miyahara: Expression, purification and preliminary X-ray characterization of DL-2-haloacid dehalogenase from *Methylobacterium* sp. CPA1. *Acta. Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* (2007) **F63**, 586-589.
- ③ Amr M. Mowafy, Tatsuo Kurihara, Atsushi Kurata, Tadashi Uemura, and Nobuyoshi Esaki: 2-Haloacrylate hydratase, a new class of flavoenzyme that catalyzes the

addition of water to the substrate for dehalogenation. *Appl. Environ. Microbiol.* (2010) **76**, 6032-6037.

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Agata Siwek, Rie Omi, Ken Hirotsu, Keiji Jitsumori, Nobuyoshi Esaki, Tatsuo Kurihara, and Piotr Paneth: Binding modes of DL-2-haloacid dehalogenase revealed by crystallography, modeling and isotope effects studies. *Arch. Biochem. Biophys.* (2013) **540**, 26-32. 査読有  
DOI: 10.1016/j.abb.2013.09.012
  - ② Tomonori Nakayama, Takashi Kamachi, Keiji Jitsumori, Rie Omi, Ken Hirotsu, Nobuyoshi Esaki, Tatsuo Kurihara, and Kazunari Yoshizawa: Substrate specificity of fluoroacetate dehalogenase: an insight from crystallographic analysis, fluorescence spectroscopy, and theoretical computations. *Chem. Eur. J.* (2012) **18**, 8392-8402. 査読有  
DOI: 10.1002/chem.201103369
- ## 6. 研究組織
- (1) 研究代表者  
栗原 達夫 (KURIHARA, Tatsuo)  
京都大学・化学研究所・教授  
研究者番号：70243087
  - (2) 連携研究者  
川本 純 (KAWAMOTO, Jun)  
京都大学・化学研究所・助教  
研究者番号：90511238