

論文の内容の要旨

応用生命工学専攻
平成 13 年度博士課程入学
氏 名 全 昭映
指導教員 祥雲弘文

論文題目

Function and structure of hydrolase variants of cumene degrading pathway (クメン分解系加水分解酵素変異体の機能と構造)

1. 序論

ポリ塩化ビフェニル(PCB)やビフェニルを始めとする芳香族化合物は分解されにくく、環境に悪影響を与えることが問題になっているが、微生物による難分解性の芳香族化合物分解・環境修復の可能性が期待されている。芳香族化合物の代謝系では、一般に芳香環に直接に水酸基を導入する初発酸化により dihydrodiol 体となり、dihydrodiol dehydrogenase による脱水素反応、dioxygenase による環開裂(オルト開裂、メタ開裂)を経て、それぞれメタあるいはオルト開裂経路により分解され、最終的に TCA サイクルに入る。*Pseudomonas fluorescens* IP01 株は、トルエンとビフェニルの中間的な化学構造を有するクメン(イソプロピルベンゼン)を唯一の炭素源として生育できる菌である。この株はクメン以外にトルエンやベンゼンなどの単環芳香族化合物で同様に生育できるのに対し、ビフェニルでは生育できない。これは、クメンのメタ開裂化合物の C-C 結合を切る加水分解酵素である CumD(図 1)の基質特異性による。CumD はトルエン由来の基質よりもクメン由来の基質に対して高い分解活性を示すが、ビフェニル由来の基質に対する活性は非常に低い。つまり、基質であるメタ開裂物質の C6 位側鎖の大きさが基質特異性に関係する。これまで CumD の立体構造は活性中心 Ser103 を Ala に置換した変異体だけで決められており、基質結合ポケットの構造や、基質の C6 位側鎖の結合に関わると考えられる残基についてある程度の知見が得られている。本研究では CumD の基質特異性を改変することを目指して、CumD の基質結合ポケットを構成しているアミノ酸残基を中心に BphD(ビフェニル分解系の加水分解酵素)や TodF(トルエン分解系の加水分解酵素)などを参考に変異体を作り、4 種類の 6-HODA 基質(6-メチル,6-エチル,6-イソプロピル,6-フェニルの各 HODA 誘導体)に対する CumD の変異体の k_{cat} , K_m を決定した。得られた変異体の中

には、活性の上昇したものがあり、このうち A129V 変異体は、野生型 CumD では得られなかった結晶を形成したので、X 線結晶構造解析を行い、基質特異性や活性中心 Ser の役割などについて解明することをめざした。

2. 基質結合ポケットに関わるアミノ酸を置換した変異体の解析

CumD と BphD との比較で、基質結合ポケット構成残基の中で相異している L139, V142, W143, V226 について、変異体を作成してみると、調べた限りでは、野生型 CumD に比べて k_{cat}/K_m の低下を示すものが多かった。6-フェニル HODA に対して分解活性が大幅に上昇したものは見当らなかった。これらのアミノ酸残基は、一残基だけ置換しても基質特異性を大幅に変換することはできず、触媒効率の低下をもたらすことが分かった。また、S34 は、S103A 変異体の構造解析から、反応産物であるイソ酪酸の酸素原子と水素結合を形成してオキシアニオンホールを形成し、メタ開裂物質の C-C 結合の分解に関与すると考えられることから、2 つの変異体を作った。そのうち、S34G が 6-フェニル HODA に対して野生型より k_{cat}/K_m の値が約 7 倍上がった。これは K_m の減少によるもので、 k_{cat} も減少していた。一方、基質 C6 位側鎖結合ポケットを構成するアミノ酸残基を CumD の S103A 変異体の構造をもとに BphD や TodF の対応する残基とおきかえて、 k_{cat} , K_m の変化を調べた。CumD の変異体の中で基質の横の位置を占めている A129, I199, V227 の変異体は野生型 CumD に比べて単環芳香族由来基質に対する k_{cat}/K_m の値が 4 - 10 倍に上がった。 k_{cat}/K_m の高い順に基質を並べると、6-エチル-HODA > 6-メチル-HODA > 6-イソプロピル HODA >> 6-フェニル HODA となっており、 k_{cat} の増加と K_m の減少が同時に起こることが多かった。これらの 3 つの残基は、CumD と TodF (*Pseudomonas putida* F1 由来)との比較で、基質側鎖結合ポケット構成残基の中で相異している残基であり、CumD に対応する TodF のアミノ酸残基へと変換したものである。得られた変異体は、野生型 CumD より高い k_{cat}/K_m を示しただけでなく、TodF と比較しても 6-エチル-HODA を基質とした場合 2 - 5 倍、6-methyl-HODA を基質とした場合 4 - 10 倍の k_{cat}/K_m を示した。TodF は 6-イソプロピル HODA はほとんど分解しない。以上のことから、A129, I199, V227 の 3 残基を置換することによって野生型 CumD や TodF よりも触媒効率のすぐれた、基質特異性の広い変異体を得られることが分かった。

3. A129V 変異体の構造と機能

野生型 CumD よりも高い k_{cat}/K_m を示す A129V の変異体を用いて結晶化を行った。従来、野生型 CumD では結晶化が困難であったが、A129V 変異体は良好な結晶を生じ、その X 線回析像から、分解能 1.65 Å で、 $R=17.3\%$ 、 $R_{free}=19.1\%$ まで精密化された構造を得た。A129V 変異体の構造は、これまでに得られた S103A 変異体と、全体的に良く似た構造をとっていた。A129V 変異体の結晶は、非対称単位中に CumD 分子

(Asn3-Ala273)が1サブユニット、水が372分子とリガンド原子が11個(塩素イオン x 1 + リン酸イオン x 2)入っていた。

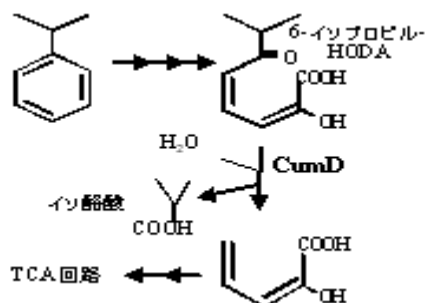


図1 CumDの触媒する反応

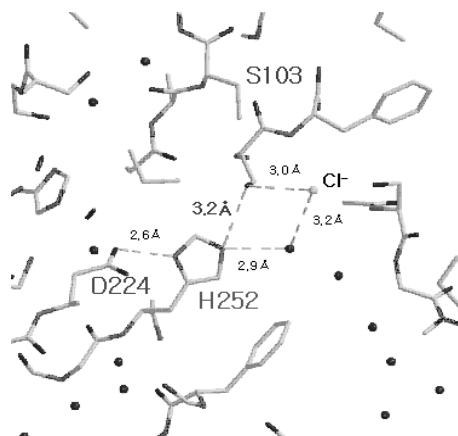


図2 CumD A129V変異体の活性中心残基と付近の残基

また、活性中心 Ser103 付近には、水より大きい単原子分子のものと見られる電子密度ピークが見られた。結晶化溶液の組成から、この原子を塩素イオンと判断して精密化した。Ser103 の O γ 原子は、Ser103 とともに catalytic triad を構成している His252 の N ϵ 2 原子と 3.2 Å の弱い水素結合を形成していた(図2)。

最近、CumDの類似酵素である大腸菌由来の MhpC で提唱されている反応機構から、CumD で His252 のイミダゾール基の N 原子が水分子のプロトンを引き抜く可能性が考えられている。他方、CumD の Ser103 のヒドロキシル原子が水分子からプロトンを引き抜き、His252 との水素結合がその反応を助けているという可能性も考えられる。これらの二つの可能性を考慮して、CumD の反応機構を図3のように推定した。A129V 変異体の結晶構造中には、Ser103 の付近に塩素イオンが結合していた(図2)。MhpC で提唱されている反応機構では、基質はいったんオキシアニオン中間体を取り、これを安定化するオキシアニオンホールが存在すると考えられる。今回の立体構造では、塩素イオンが結合するサイトがオキシアニオンホールに相当すると考えられる。このサイトは、Phe104、Ser34 の主鎖の N 原子によって静電的に安定化されていると考えられる。また、CumD の S34A および S34G 変異体では k_{cat} が大幅に低下した。これは、Ser34 の側鎖のオキシアニオン中間体への配位も、その安定化に関わっていることを示唆するものである。A129V 変異体と、S103A 変異体のイソ酪酸複合体、S103A 変異体のプロピオン酸複合体の結晶構造の重ね合わせて見ると、A129V 変異体では側鎖が大きくなることによりポケットの空間が埋まり、短い側鎖を持つ基質の結合を安定化していることが分かる。また、A129V 変異体構造の A129 付近の主鎖は、他の2つの構造に比べて基質側に少しシフトしている。これが A129V 変異によるものなのか、塩素イオンの結合によるものかは不明であるが、この動きもポケットのサイ

ズをより小さいものへと変化させている。これまで、CumD の結晶構造は全て S103A 変異体で解かれていたが、今回得られた A129V 変異体の構造は、初めての活性型の酵素の構造である。これにより、活性中心や反応機構に関する議論を進めることができた。

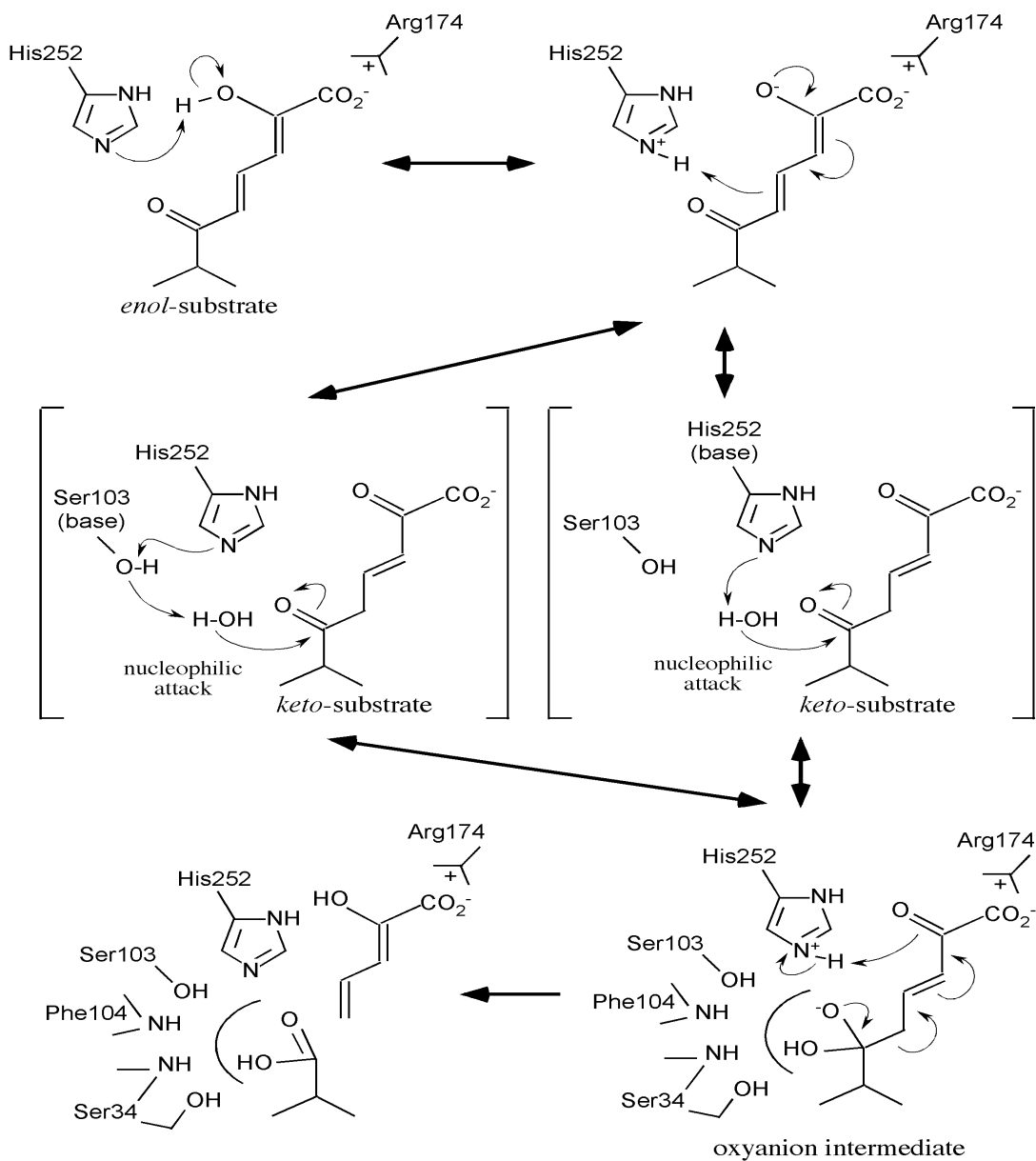


図 3. CumD の推定反応メカニズム

4. 文献

- 1) Saku et al. *J. Biosci. Bioeng.* 93, 568 (2002)
- 2) Fushinobu et al. *Protein Science* 11, 2184 (2002)