

## 長期間派遣成果報告書

### *Sphingomonas paucimobilis* UT26 由来ハロアルカンデハロゲナーゼ LinB の酵素 活性中心へのトンネル部入口の機能についてのタンパク質工学的研究

長浜バイオ大学 中村 卓

派遣期間 2004年4月22日—2005年3月7日

研究機関 National Centre for Biomolecular Research (NCBR), Masaryk University,  
Kotlarska 2, 611 37 Brno, Czech Republic

研究指導者 Dr. J. Damborsky

研究題目の研究については研究指導者と、研究指導者のスケジュール、研究から得られる結果について相談の結果、1, 2 ヶ月で終わるのではないかということで秋以降スタートする予定であったが、最終的に急を要しないテーマだということで行われなかった。その代わりに、私の実験経験を研究指導者に見込まれて、研究題目とは別に「*Sphingomonas paucimobilis* UT26 から単離されたハロゲン化脂肪族化合物分解酵素 LinB の酵母 *Pichia pastoris* での大量発現」についての研究を行った。また、私の本来の渡航目的が、タンパク質のコンピュータ分子モデリングに必要なテクニックを勉強するということだったので、モデリングの研究テーマとして「Locally Enhanced Sampling (LES)法を用いた、ハロアルカンデハロゲナーゼ DhaA の 1,2,3-trichloropropane (TCP) 分解反応における基質コンフォメーションの解析」を行った。以下、それぞれの結果について述べる。

#### (1) *Sphingomonas paucimobilis* UT26 から単離されたハロゲン化脂肪族化合物分解酵素 LinB の酵母 *Pichia pastoris* での大量発現

ハロアルカンデハロゲナーゼは、ハロアルカン化合物をハロゲンイオンとアルコールに分解する酵素であり、工業的に生産され、難分解性を示すと思われるハロゲン化合物の分解に利用できないかと期待されている。ハロアルカンデハロゲナーゼは、基質特異性と単離される微生物から主に3種類に分類されるが、そのうち *Sphingomonas paucimobilis* UT26 から単離された LinB は、結晶構造、物理化学的性質など実験的なデータだけでなく、コンピュータ分子モデリ

ングを利用して反応機構の解析や突然変異導入部位のデザインが行われるなど実験と計算両方のアプローチからよく研究されている。LinB をバイオリアクターなどの実用的な研究に応用するためには、大量の酵素が必要である。そこで、大腸菌よりも有効なタンパクの大量発現系として注目されている酵母 *Pichia pastoris* を用いて LinB を真核生物で発現させることができるか、また大腸菌の系よりもタンパクを大量に得ることができるかを検討した。

種々のタンパク発現条件の検討を行った結果、LinB は *P. pastoris* で発現された。しかしながら、タンパクの発現効率は大腸菌におけるものよりも悪いことがわかった。そこで、大量発現という目標はあきらめ、酵母で発現される LinB の酵素活性、構造安定性、グリコシル化されているかなどを調べ、大腸菌から発現されるものとの比較を行った。まず、SDS-PAGE、エンドグリコシダーゼによる酵素反応、質量分析の結果から、*P. pastoris* で発現される LinB はグリコシル化されていることが明らかになった。次に、このグリコシル化された LinB の CD スペクトルによる 2 次構造の違い、熱安定性を調べたところ、大腸菌から発現されるものと同じ性質を示した。また、酵素活性、酵素活性の熱安定性についても大腸菌から発現されるものと同様であった。発現量の改善について課題を残すものの、LinB を真核生物で発現させることができたこと、またグリコシル化された LinB の性質を同定できたということで、現在論文を作成中であり、できるだけ早く投稿する予定である。

(2) Locally Enhanced Sampling (LES)法を用いた、ハロアルカンデハロゲナーゼ DhaA の 1,2,3-trichloropropane (TCP) 分解反応における基質コンフォメーションの解析

1,2,3-trichloropropane (TCP)は天然には有機合成の中間体や原料の副生成物、土壌の燻蒸剤の分解物として土壌や排水に残留する有害化学物質で、野生型のハロアルカンデハロゲナーゼではほとんど分解することができない。ハロアルカンデハロゲナーゼ DhaA の TCP に対する触媒活性を向上させるため、方向づけられた進化 (directed evolution) を起こさせる手法により DhaA 突然変異体を作成した。その結果、Cys176Tyr、Cys176Tyr と Tyr273Phe の突然変異体において、TCP に対する分解能力の向上が見られた。次に、この分解能力向上の理由を分子レベルで解明するため、基質—タンパクのドッキングプログラムを利用して、活

性部位付近での TCP の結合様式を調べた。すると、3つの結合様式 (bm1、bm2、bm3) がほとんど同じ結合エネルギーで DhaA に結合することが明らかになった。しかしながら量子化学計算の結果と反応が起こるための TCP の配向を考慮したところ、bm1 は反応に望ましくない結合様式であることがわかった。そこで、残りの 2 つの結合様式のどちらが反応に望ましいかを調べるために、分子動力学計算ソフトウェア Amber の Locally Enhanced Sampling (LES) 法を用いて TCP の結合様式の分布を調べることにした。

Bm1 を初期構造にして、LES 法により DhaA-TCP 複合体のコピーを 10 個作り、10 種類の条件で分子動力学計算を行い、得られた系 100 個の DhaA-TCP 複合体についてその結合様式を調べた。その結果、bm2 と bm3 の結合様式が同じくらいの割合で得られた。しかしながら半数以上の複合体において、基質が反応できないくらい活性部位から離れた位置に存在しており、LES 法による TCP 結合様式の分布を調べるという方法はあまりいい方法ではないということが示唆された。ただ、興味深いことに LES 法で得られた TCP の位置が、DhaA の活性部位と外界をつなぐトンネルに沿って移動した。これは、TCP が外界からどのような経路を通して、活性部位に行くのか、あるいはどのような経路を通して活性部位から外界へと出ていくのかということを示す手がかりになるかもしれない。受け入れ先の研究室では別の計算方法を用いて、基質の、外界から活性部位への経路を研究しているが、今回の結果と比較することで何か新しい知見が得られる可能性がある。この研究テーマについては、帰国後も共同研究という形で続けていく予定である。