#### <u>課題番号:2005A0220-NL1-np 利用ビームライン:BL38B1</u>

ダイズ根粒菌 *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 由来ハロアルカン脱ハロゲン酵素 DbjA の構造-機 能相関に関する研究

#### 東北大学大学院生命科学研究科博士後期課程三年 佐藤 優花里

## [研究概要]

## 研究の背景

有機ハロゲン化合物は、農薬や工場の廃液等に含まれる代表的な環境汚染物質である。本物質を分解する方 法の一つとして、微生物を利用する生物的環境浄化(バイオレメディエーション)が注目されている。ハロ アルカン脱ハロゲン酵素はハロゲンと炭素の結合を加水分解的に切断する、微生物が有機塩素化合物を分解 するための最も重要な酵素である。長年研究が行われているにも関わらず、A)脱ハロゲン酵素と基質との 構造-機能相関は明らかにされておらず、B)未だ分解酵素が発見されていない1,2,3-trichloropropaneのような 環境汚染物質も依然として存在している。これまでに詳細な解析が行われた脱ハロゲン酵素の基質特異性は 短鎖または長鎖のハロアルカンのどちらかにのみ活性を示すかたよったものであった。ところが、ダイズ根 粒菌 *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 由来の脱ハロゲン酵素 DbjA は両方の種類のハロアルカンを分解でき、 さらに、β位にメチル基が存在するハロアルカンも分解できる新規の基質特異性を有していた<sup>1</sup>。

#### 研究の目的

植物共生細菌由来のハロアルカン脱ハロゲン酵素について、個々の基質との複合体構造の違いを詳細に解 析することで、本酵素特有の基質特異性を規定する要因を明らかにすることを目的とした。SPring-8 では阻 害剤である 1-Fluoropentane と共結晶化した DbjA 複合体の結晶の測定を行った。

## 3. 実験方法

## 3-1. His-tagged DbjA の精製

- (1) pYBJA2 を用いて Escherichia coli BL21 (DE3) を形質転換した。
- (2) 2L L-Broth 培地を用いて 37℃で OD<sub>660</sub>0.6 abs に到達するまで培養した。30℃に培養温度を下げ、0.5 mMの IPTG を加え、さらに4時間誘導発現を行った。
- (3) 5000 xgで菌体を回収し、50 mlの 50 mM リン酸カリウム溶液 (pH7.5) に懸濁した。
- (4) 超音波破砕機で細胞を破砕した後、20,000 xgで 30 分遠心し、上清を回収し、粗酵素抽出液とした。
- (5) 粗酵素抽出液を 30 ml の Ni 樹脂に吸着させ、150 ml の wash Buffer (125 mM imidazole、50 mM リン酸 カリウム、10% glycerol、pH 7.5) で洗った後、elution Buffer (500 mM imidazole、50 mM リン酸カリウ ム、10% glycerol、pH 9.0) で溶出した。
- (6) SDS-PAGE で目的のバンドのみが溶出されていることが確認できた画分を回収し、0.1M Glycine-NaOH with 10% glyceeol で透析した。
- (7) 透析後、タンパク質濃度を 35 mg/ml にまで濃縮した。

## 3-2. Hi-tagged DbjA の結晶化

(1) 結晶化は蒸気拡散法により行った。1µlのタンパク質溶液と結晶化溶液を混合し、4℃でインキュベート

した。

- (2) (1) で得た結晶を破砕し、10 倍に希釈した seeds 溶液を作製し、阻害剤を含むリザーバーを用いて microseeding 法により結晶化を行った。
- 3-3. データの収集と解析

データの収集は SPring-8 BL38B1 を用いて行った。

- (1) His-tagged DbjA の結晶をクライオプロテクタント(25% PEG4000、10% glycerol、20% sucrose、0.2M 酢酸カルシウム、0.1M Tris-HCl (pH 7.8))に数秒浸し、クライオループにのせ、ただちに N<sub>2</sub>ガスで凍らせた。
- (2) データの収集は ADSC Quantum 210 CCD カメラを用いて行った。
- (3) 収集したデータは HKL2000 と SCALEPACK のプログラムをそれぞれ用いてスケーリングを行った。
- (4) 結晶構造解析は MOLREP を用いて分子置換法により行った。

# 4. 結果と考察

# 4-1. His-tagged DbjA と阻害剤との結晶化

- 結晶化を行ってから、2-3 週間後 20% PEG4000、0.2 M 酢酸カルシウム、0.1M Tris-HCl (pH 7.9-8.0)
  でツインの結晶を得た(Fig. 1-1)
- ・ ツインの結晶を seeds として microseeding 法を行った結果、阻害剤 10 mM を含む 19.5-17% PEG4000、
  0.2 M 酢酸カルシウム、0.1 M Tris-HCl (pH 7.7-8.0)、10 mM 1-Fluoropentane のリザーバー溶液で単一の結晶を得た (Fig. 1-2)



Fig. 1-1 ツインの His-tagged DbjA の結晶



Fig. 1-2 単一の His-tagged DbjA の結晶

# 4-2. データ収集

20.0-2.3Å分解能でデータ収集を行った。データ処理の結果、orthorhombic 晶系に属し、空間格子は  $P2_12_12$  で、格子定数は $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$ 、a=212.00Å、b=117.58Å、c=55.59Åだった(Table 1)。

| Unitcell parameters a | = 212.00Å, $b = 117.58$ Å, $c = 55.59$ Å |
|-----------------------|--|
| Space group           | $P 2_{1}2_{1}2$                          |
| Resolution            | 20.0-2.3 Å                               |
| Observations          | 317062                                   |
| Unique reflections    | 70643                                    |
| Rmerge                | 8.6 (32.4)                               |
| Completeness (%)      | 98.1 (84.2)                              |
| I/σ (I)               | 6.8 (6.6)                                |
| Redundancy            | 45(25)                                   |

| Table 1 Diffraction | data | collection | statistics | for | the | DbjA |
|---------------------|------|------------|------------|-----|-----|------|
|---------------------|------|------------|------------|-----|-----|------|

# 4-3. 分子置換法による DbjA と阻害剤との複合体構造の決定

DbjA 複合体の立体構造は、1-chlorobutane 分解資化菌 *Rhodococcus sp*.由来 DhaA<sup>2,3</sup> (PDB code 1BN6、DbjA と 49%相同性)を用いて分子置換法により決定した。非対称単位中に 4 個の分子の存在が  $V_m$  値より示唆された。また既知の脱ハロゲン酵素は全て単量体だったが、DbjA はゲル濾過解析と X 線結晶構造解析の結果から二量体を形成していることが示唆された (Fig. 2-1)。DbjA の単量体の立体構造は 8 本のβ-strand と 6 本の α-helix から成る main domain と 5 本のα-helix から成る cap domain から構成されるα/β hydrolase family の一員で、他のハロアルカン脱ハロゲン酵素と同様の構造だった (Fig. 2-2)。



Fig. 2-1 DbjA の二量体の立体構造

Fig. 2-2 DbjA の単量体の立体構造

 $\alpha/\beta$  hydrolase family にはプロテアーゼやリパーゼ、エステラーゼなどが含まれており、catalytic triad を構成 するアミノ酸残基と main domain が全ての酵素タンパク質で保存されている(Fig. 3)<sup>4</sup>。一方、酵素の種類の 違いによって、Fig. 3 に示した点線の領域に数アミノ酸残基や extra domain が挿入されている。DbjA を含む ハロアルカン脱ハロゲン酵素は、 $\beta$ 6-strand と $\alpha$ D-helix の間に cap domain が挿入されていた(Fig. 3 赤色の点 線で示した)。



(catalytic triad を丸で示した)

cap domain は基質と結合する catalytic triad を覆うフタのような役割を担っており、ハロアルカン脱ハロゲ ン酵素の基質特異性の違いは、cap domain の形の違いによることが提唱されている。DbjA の main domain と cap domain を結合する loop とそれに続くα-helix は既知の脱ハロゲン酵素(γ-hexachlorocyclohexane 分解資化 菌 *Sphingomonas paucimobilis* UT26 由来 LinB<sup>5,6</sup>; DbjA とアミノ酸レベルで 41%の相同性、PDB ID 11Z7、DhaA) よりも長いことが明らかになった(Fig. 4)。本領域を EB 配列と命名した。



# 4-3. 基質結合部位

基質結合部位に阻害剤である 1-fluoropentane が結合しているか観察したところ、芳香環が存在していた(Fig. 5-1))。精密化の結果、catalytic triad 付近に His-tag 断片が結合しており、阻害剤と結合できない構造であることが明らかになった(Fig. 5-2、3)。



Fig. 5-1 catalytic triad 付近に観察された 芳香環の電子密度



Fig. 5-2 catalytic triad 付近に存在する His-tag 断片



Fig. 5-3 基質結合部位に存在する His-tag 断片 (catalytic triad を 丸で示した)

EB 領域の存在により DbjA の基質結合部位の形と入り口が既知の脱ハロゲン酵素より大きくなっているこ とが Fig. 4 から示唆された。そこで、His-tag 断片と結合している DbjA の基質結合部位と反応産物 1,3-propanediol と結合している LinB の基質結合部位 (PDB ID)<sup>7</sup>を比較した (Fig. 6-1)。その結果、やはり DbjA の基質結合部位のほうが LinB よりも大きかった。したがって DbjA は、Fig. 6-2 に示したモデル図のよ うに、既知の脱ハロゲン酵素よりも大きな触媒ポケットと入り口を有していることが示唆された。





Fig. 6-1 (A) DbjA の基質結合部位に結合する His-tag 断片

Fig. 6-1 (B) LinBの基質結合部位に結合する 1,3-propanediol (PDB ID 11Z8)



DbjA 特有の大きな触媒ポケッ トとその入り口

## 5. 結論

X線結晶構造解析により、DbjAは他の脱ハロゲン酵素よりも長いloopとα-helixから構成される EB 配列を 有していることが明らかになった。本領域の存在によって、DbjAは大きな基質触媒ポケットと入り口を有し ていることが示唆された。したがって、EB 配列が本酵素特有の幅広い基質特異性の要因となっていることが 推定された。

Reference

- 1. Sato Y. et al., Two rhizobial strains, *Mesorhizobium loti* MAfF303099 and *Bradyrhizobium japonicum* USDA110, encode haloalkane dehalogenases with novel structures and substrate specificities. *Appl. Environ. Microbiol.* 2005, 71: 4372-9
- Kulakova A. N. et al., The plasmid located haloalkane dehalogenase from Rhodococcus rhodochrous NCIMB 13064 *Microbiology* 1997, 143:109-115
- 3. Newman J. et al., Haloalkane dehalogenases: structure of Rhodococcus enzyme. Biochemistry 1999, 38:16015-16114
- 4. Nardini M. et al., α/β Hydrolase fold enzymes: the family keeps growing. Curr Opin Struct Biol 1999, 9:732-737
- 5. Nagata Y. et al., Cloning and sequencing of dehalogenase gene encoding an enzyme with hydrolase activity involved in the degradation of gamma-hexachlorocyclohexane in *Pseudomonas paucimobilis*. J. Bacteriol 1993, 175: 6403-10
- 6. Marek J. et al., Crystal structure of the haloalkane dehalogenase from *Sphingomonas paucimobilis* UT26. *Biochemistry* 2000, 39:14082-14086
- Streltsov V. A. et al., Haloalkane dehalogenase LinB from Sphingomonas paucimobilis UT26: X-ray Crystallographic Studies of Dehalogenation of Brominated Substarates. *Biochemistry* 2003, 42: 10104-10112