

β -HCH 脱塩素酵素の数アミノ酸残基の違いが反応特性に及ぼす影響

○伊藤通浩、大坪嘉行、永田裕二、津田雅孝

東北大院・生命科学 遺伝情報動態分野

Several amino acid residues differing among β -HCH dechlorinases have critical effects
on their activity profiles toward HCH-related compounds

Michihiro Ito, Yoshiyuki Otsubo, Yuji Nagata, and Masataka Tsuda

Laboratory of Microbial Genetics, Graduate School of Life Sciences, Tohoku University

Key words: hexachlorocyclohexane (HCH), *Sphingobium*, dehalogenase

【目的】かつて農薬として使用された hexachlorocyclohexane (HCH)の工業原体には主に4種の立体異性体 (α -, β -, γ -, δ -体)が含まれ、このうち β -HCH は最も難分解性で現在でも環境汚染が深刻である。我々はこれまでに β -HCH 分解細菌 *Sphingobium* sp. MI1205 を分離し、本菌株の有する β -HCH 分解酵素 LinB (LinB-MI)を取得している。本酵素は β -HCH を一段階のみ脱塩素化する *Sphingobium japonicum* UT26 由来の LinB (LinB-UT)と 296 アミノ酸残基中わずか7アミノ酸残基のみ異なる (98 % identical) ものであるが、LinB-UT と異なり β -HCH を基質として二段階の脱塩素反応を触媒する。これら 2 種の LinB の反応特性の違いの要因とその生理的意義は非常に興味深い。そこで本研究ではそれらの間で異なっているアミノ酸残基に着目し、2 種の LinB の中間型変異酵素を作製して反応特性の比較検討を行った。

【方法】変異酵素はPCR法を利用した部位指定変異導入により作製した。各酵素には 6x His を付与し、大腸菌中で大量発現させて精製した。HCH およびその分解産物の定量は 5 ppm の基質を含むバッファー中に精製酵素を添加して反応させ、反応液の酢酸エチル抽出物を GC (ECD)分析することにより行った。

【結果と考察】LinB-MI と LinB-UT とで異なっている 7 アミノ酸残基のうち、活性部位に存在する 134 番目と 247 番目の 2 つのアミノ酸残基が反応特性の違いに関与していると考えられたため、これら 2 アミノ酸残基について双方の LinB に置換を導入して計 6 種類の変異酵素を作製した。これらと 2 種の野生型 LinB の計 8 種類について β -HCH の脱塩素能を検討した結果、LinB-MI の 2 アミノ酸残基は二段階の脱塩素能を向上させることが示されたが、それら以外の 5 つのアミノ酸残基も少なからず反応特性の違いに関与していることが判明した。2 種の *linB* 間の塩基置換は全て非同義置換であり、このことからそれぞれのアミノ酸置換が反応特性の変化に関与し、何らかの環境条件で有利に働いて共通の祖先型酵素から分岐したと考えられるが、酵素活性の検討結果はこの仮説を支持した。LinB は β -HCH の初発分解酵素であるとともに、 γ -HCH の分解代謝経路における二番目の分解酵素であることから、それぞれの LinB の γ -HCH 分解代謝における機能についても現在検討を行っている。

伊藤通浩 Michihiro Ito : michihi@ige.tohoku.ac.jp