

## ハロアルカンデハロゲナーゼの構造と機能 Structure-Function Relationships of Haloalkane Dehalogenases

永田 裕二\*, 津田 雅孝  
YUJI NAGATA and MASATAKA TSUDA

東北大学大学院生命科学研究科生態システム生命科学専攻 〒980-8577 宮城県仙台市青葉区片平2-1-1

\* TEL: 022-217-5682 FAX: 022-217-5699

\* E-mail: aynaga@ige.tohoku.ac.jp

Department of Environmental Life Sciences, Graduate School of Life Sciences, Tohoku University,  
2-1-1 Katahira, Aoba-ku, Sendai 980-8577, Japan

キーワード: ハロアルカンデハロゲナーゼ, 有機塩素系化合物, 環境汚染物質, タンパク質工学

Key words: haloalkane dehalogenases, organochlorine compounds, environmental pollutants, protein engineering

(原稿受付 2006年10月3日/原稿受理 2006年11月5日)

### 1. はじめに

ハロアルカンデハロゲナーゼは、元々有機ハロゲン系環境汚染物質分解資化能を有する細菌から、それら物質の分解資化に関わる酵素のひとつとして同定され、主に環境汚染物質分解の観点から研究が進められてきた。本酵素は、加水分解による反応機構が比較的単純で *in silico* 解析しやすいこともあり、変異導入などのタンパク質工学的研究を中心とした酵素研究のよいモデル材料である。また、本酵素は基質特異性が広いことから応用範囲が広く、実用的な面からも注目されている。さらに、最近、本酵素遺伝子ホモログが全ゲノム配列が解読された根粒菌や結核菌およびその類縁菌などに比較的広く分布していることが明らかになり、その生理的意義や酵素進化の観点からも興味を持たれている。本稿では、ハロアルカンデハロゲナーゼに関する著者らの最新の研究成果を中心に紹介し、本酵素の基礎学問領域と応用研究領域での可能性について論じてみたい。

### 2. ハロアルカンデハロゲナーゼ

細菌由来の脱ハロゲン酵素であるハロアルカンデハロゲナーゼ (EC 3.8.1.5) は、 $\alpha/\beta$ -hydrolase family に属する加水分解酵素の一員であり、水を利用して基質のハロゲンを水酸基に置換し、アルコールとハロゲン化水素を生じる反応を触媒する<sup>9)</sup>。反応機構は図1に示した通りで、求核置換反応 ( $S_N2$  反応) により、基質-酵素がエステル結合したアルキル中間体を生じ (a)、これが活性中心で活性化された水によって加水分解される (b)。従って、求核性のアミノ酸残基 (D108: 以下、特に断らない限りは  $\alpha$ -プロテオバクテリアの *Sphingobium japonicum* UT26 株由来のハロアルカンデハロゲナーゼ LinB のア

ミノ酸残基の番号を表記する) と、水を活性化するためのヒスチジン (H272) と酸 (E132) からなる catalytic triad が反応に必須である。さらに、遊離したハロゲンイオン  $X^-$  を一時的に安定化させるためのアミノ酸残基 (W109 と N38) も反応に必要であり、これらを含めて catalytic pentad と総称することもある。逆に、こうしたアミノ

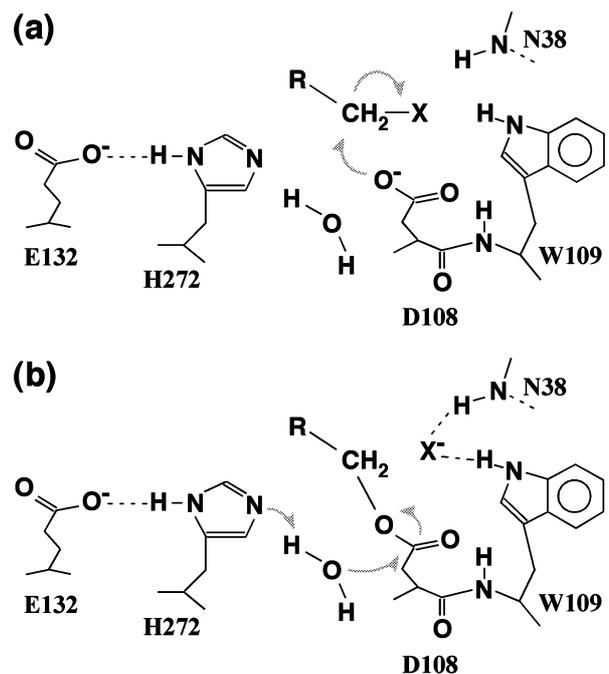


図1. ハロアルカンデハロゲナーゼ LinB の反応機構。  
求核置換反応により基質-酵素がエステル結合したアルキル中間体が生じ (a)、これが活性化された水により加水分解される (b)。詳細は本文参照。

酸残基を有することがハロアルカンデハロゲナーゼの特徴といえる。

ハロアルカンデハロゲナーゼは, (i) 加水分解による反応機構の詳細が明らかになっている, (ii) 約 30 kD の比較的分子量の単量体であり, コンピューター解析が比較的容易である, (iii) 基質となるハロアルカン類の種類が多く, それらの構造が多様性に富む, (iv) 基質特異性の異なる複数の酵素の立体構造が既に解かれている, などの理由により, 酵素の構造-機能相関の研究に最も適した材料のひとつとなっている。

広い基質域を持つ本酵素は, 応用面でも注目されている。まず, 有機塩素系農薬などの様々なハロアルカン系環境汚染物質の分解に応用可能で, 本酵素活性を有する細菌細胞を固定化させたバイオリクターが欧州では実用化されている。また, 後述するように, 物質の化学合成の際に生じる反応副産物の除去や, 毒ガス (マスタードガス) の分解への応用も可能である。さらに, 脱ハロゲン反応により酸が生じることを利用して, pH メーターと本酵素を組み合わせて, ハロゲン系物質による汚染を感知するためのバイオセンサーとしての利用も検討されている。一方, 最近では, アルキル中間体を加水分解できない変異酵素を目的のタンパク質と融合させ, 長鎖アルカン系の蛍光物質を咬ませることによりそのタンパク質の局在を明らかにする真核細胞用の分子生物学ツ

ルとしても用いられるなど, 用途は様々である。このような応用面を考えても, 本酵素の反応機構の詳細および構造-機能相関を明らかにすることは重要である。

### 3. ハロアルカンデハロゲナーゼ LinB

著者らは, 長年, 有機塩素系殺虫剤  $\gamma$ -hexachlorocyclohexane (HCH) 分解資化能を有するグラム陰性細菌 *Sphingobium japonicum* UT26 株の研究を行ってきた<sup>4,12,15</sup>。その研究過程で,  $\gamma$ -HCH 分解の 2 段階目の反応を触媒する酵素として LinB を同定した<sup>9</sup> (図 2) が, 本酵素は  $\gamma$ -HCH の分解代謝中間体以外にも, 1-chlorobutane をはじめとする様々なハロアルカン類を基質にできるハロアルカンデハロゲナーゼであることを見出した<sup>10</sup>。著者らは X 線結晶構造解析により LinB の立体構造を決定すると共に<sup>7</sup>, 基質特異性の異なる他の 2 種類のハロアルカンデハロゲナーゼ (*Xanthobacter autotrophicus* 由来の DhlA と *Rhodococcus* 属細菌由来の DhaA) の立体構造情報と併せて, 本酵素群の構造-機能相関に関する研究を進めている。これら 3 種の酵素の基質特異性の違いは, 活性中心ポケットの形と大きさでおおむね説明できるが, 酵素反応全体を解析するには酵素のダイナミクスも考慮する必要がある。また, これら 3 種の酵素は, 反応に必要な遊離したハロゲンイオンを一時

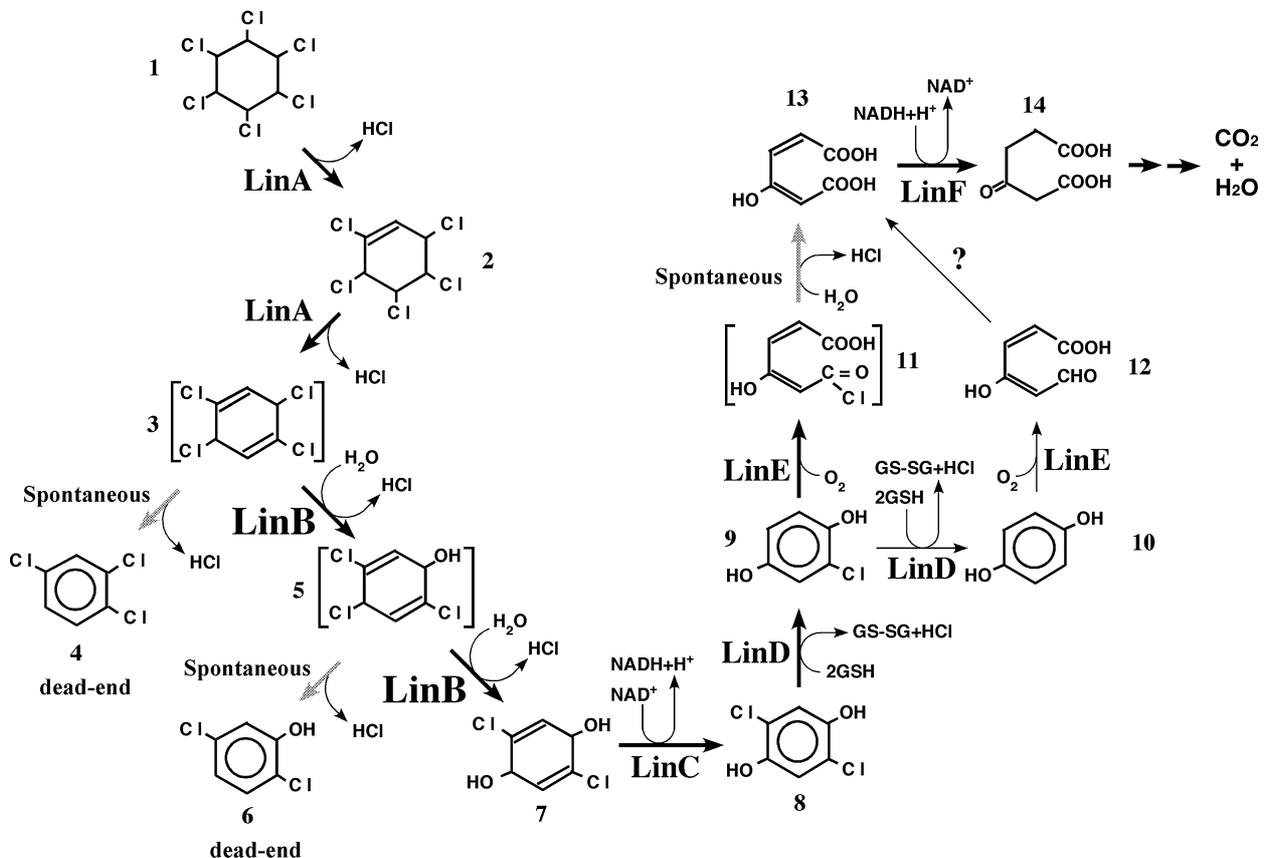


図 2. *Sphingobium japonicum* UT26 株の有機塩素系農薬  $\gamma$ -HCH 分解代謝経路。

カッコ内の物質は不安定であり, 直接の検出はできていない。物質名: 1,  $\gamma$ -HCH; 2,  $\gamma$ -pentachlorocyclohexene; 3, 1,3,4,6-tetrachloro-1,4-cyclohexadiene; 4, 1,2,4-trichlorobenzene; 5, 2,4,5-trichloro-2,5-cyclohexadiene-1-ol; 6, 2,5-dichlorophenol; 7, 2,5-dichloro-2,5-cyclohexadiene-1,4-diol; 8, 2,5-dichlorohydroquinone; 9, chlorohydroquinone; 10, hydroquinone; 11, acylchloride; 12,  $\gamma$ -hydroxymuconic semialdehyde; 13, maleylacetate; 14,  $\beta$ -ketoadipate. 略称: GSH, グルタチオン (還元型); GS-SG, グルタチオン (酸化型)

的に安定化させるためのアミノ酸残基に多様性が見られた<sup>1)</sup>。先に、このようなアミノ酸残基がハロアルカンデハロゲナーゼとしての特徴として必要と述べたが、相同性のレベルが低い場合、単純に配列情報からだけではこれらを予測することは困難である。さらに、生化学的解析の結果、これら3種の酵素は反応の律速段階がそれぞれ異なっていた<sup>1)</sup>。すなわち、それぞれ基質が異なるが、LinBではエステル中間体の加水分解のステップ、DhlAではハロゲンイオンの放出のステップ、DhaAではアルコール産物の放出のステップが律速段階となっていた。このことは、極めて類縁性の高い酵素であっても、反応効率を上げたい場合にどのステップを改変するのが最も効率的であるかは、それぞれのケースに応じて異なっている可能性があることを意味している。

#### 4. ハロアルカンデハロゲナーゼの機能改変

反応機構の詳細が明らかになれば、理論に基づいた機能改変がある程度可能になると期待できる。以下に、著者らが行った理論に基づいたハロアルカンデハロゲナーゼの機能改変を3例ほど紹介する。

##### 4.1. LinBのトンネル部アミノ酸残基の改変

酵素の理論的機能改変を試みる際、基質が結合し反応

する活性中心付近に注目し、その近辺のアミノ酸残基を操作するケースが多いが、劇的な効果が期待される反面、それだけ変異酵素が失活する確率も高い。そこで、著者らは基質や産物の出入りも酵素の反応特性を規定する重要な因子であることを考慮し、酵素の表面から活性中心へ至るトンネル部分に注目した機能改変を実施した<sup>3)</sup>。LinBの177番目のロイシン(L177)は、立体構造上、トンネル部分の内側に突き出している。さらに、他のハロアルカンデハロゲナーゼと比較したところ、L177に相当するアミノ酸残基は活性中心ポケットを構成するアミノ酸残基の中で最も多様性が見られるものでもあり、系統学的な観点からも基質特異性への関与が予想された。そこで、このL177を他の19種類全てのアミノ酸への置換を実施したところ、作製した19種類の変異酵素のうち15種類が活性を保持していた。さらに、これら15種類の変異酵素について12種類の基質に対する特異性を検討したところ、これら全ては、わずか1アミノ酸残基の違いで互いに異なる基質特異性を示した(表1)<sup>3)</sup>。以上の結果は、変異導入による失活の可能性の低いトンネル部分の操作というアプローチでの酵素の機能改変が有効であることを意味している。LinBのL177にあたるアミノ酸残基は、後述するDhaAの進化工学的研究<sup>2)</sup>や、LinBの活性中心を結核菌由来のハロアルカンデハロゲナーゼの活性中心に累積置換する実験<sup>11)</sup>でも基質特異性に重

表1. ハロアルカンデハロゲナーゼ LinB の L177 変異酵素の相対活性<sup>a</sup> (文献3より)。

Substrate	WT	A	C	G	F	K	T	W
1-chlorobutane	100	142	37	94	229	61	ND	138
1-chlorohexane	100	106	179	125	215	100	143	89
1-bromobutane	100	356	243	380	243	201	553	60
1-iodobutane	100	133	210	344	126	131	424	58
1,2-dichloroethane	ND							
1,2-dibromoethane	100	155	52	78	70	97	107	7
1,3-diiodopropane	100	360	192	164	130	132	108	117
1,2-dichloropropane	ND							
1,2,3-trichloropropane	ND							
chlorocyclohexane	100	ND	ND	33	ND	ND	ND	139
bromocyclohexane	100	115	298	398	267	117	198	80
3-chloro-2-methylpropene	100	199	157	200	98	110	96	91

Substrate	WT	D	H	I <sup>b</sup>	M	P <sup>b</sup>	Q	R	S	V	Y
1-chlorobutane	100	104	56	ND	144	ND	54	46	60	74	55
1-chlorohexane	100	44	75	ND	162	ND	165	31	104	80	80
1-bromobutane	100	347	224	ND	227	ND	458	165	381	132	112
1-iodobutane	100	259	208	ND	187	ND	373	161	363	101	97
1,2-dichloroethane	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
1,2-dibromoethane	100	77	55	ND	126	ND	123	68	84	84	16
1,3-diiodopropane	100	209	140	ND	202	ND	159	127	123	206	102
1,2-dichloropropane	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
1,2,3-trichloropropane	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
chlorocyclohexane	100	38	ND	ND	79	ND	ND	ND	21	91	ND
bromocyclohexane	100	63	43	ND	104	ND	120	37	156	41	41
3-chloro-2-methylpropene	100	25	82	ND	100	ND	138	83	65	79	78

<sup>a</sup> 各変異酵素の12種類の基質に対する活性を野生型酵素 (WT: L) の活性を100とした相対活性で表した。

<sup>b</sup> 変異酵素 I と P は、タンパク質の折りたたみが異常であることをCDスペクトルで確認した。

ND=Not Detectable (活性が検出限界以下)

要であることが明らかになっており、理論的アプローチが進化工学的手法などの理論的裏付けを必要としないアプローチと同様の結果を得た好例であるといえる。また、T の変異を導入した場合、野生型 *LinB* の良好な基質である 1-chlorobutane が基質とならなくなる (表1) などのケースは、本アプローチがそれなりに劇的な変化も期待できることを示している。しかし、残念ながら、逆に元々 *LinB* が全く、あるいはほとんど基質としない 1,2-dichloroethane, 1,2-dichloropropane, 1,2,3-trichloropropane (1,2,3-TCP) などの物質が変異導入により新たに基質になるという、応用的により意味の大きい結果は得られなかった (表1)。

#### 4.2. DhaA のスロット部の改変

1,2,3-TCP は、エポキシ樹脂等の原料である epichlorohydrin を化学合成する際の副産物として生じる有害な塩素化合物である。DhaA は微弱ながらも 1,2,3-TCP 分解活性を示し、error-prone PCR により、触媒係数が約 8 倍上昇した変異酵素 M2 (C176Y+Y273F) が取得されている<sup>2)</sup>。コンピューターによる Molecular dynamic シミュレーションの結果、M2 の 1,2,3-TCP に対する活性の上昇の主要因は、C176Y 変異により、基質および反応産物の出入り口がメイントンネルから脇のスロットに変わったことによるものと予想された (図3)。さらに、立体構造情報からスロットの大きさを規定する主因子として I135, W141, V245, L246 が同定された (図3)。このうち、W141 にあたるアミノ酸残基はほぼ全てのハロアルカンデハロゲナーゼで W か F であり、このいずれかのアミノ酸残基でなければならない機能上の必然性が予想されたため、まず M2 に W141F の変異を導入し、変異酵素 M3 (C176Y+Y273F+W141F) を作製した。M3 は M2 より若干強い 1,2,3-TCP 分解活性を示した。さら

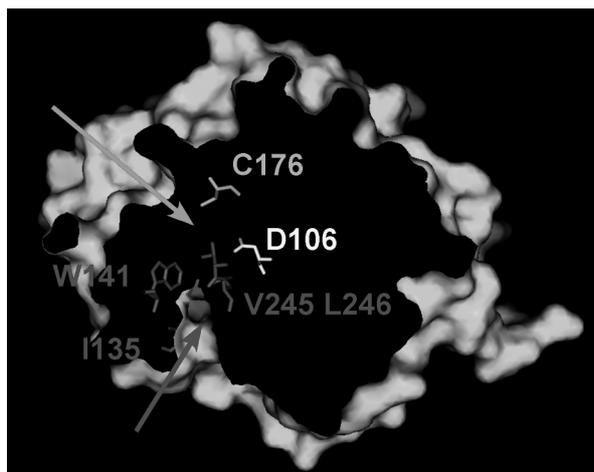


図3. ハロアルカンデハロゲナーゼ DhaA の活性中心ポケットの構造。

DhaA タンパク質の表層を描画し、その断面図を示す。活性中心の D106, 1,2,3-TCP に対する活性が上昇した変異酵素 M2 の活性上昇の主因であると考えられる変異が導入された C176, スロットを形成するアミノ酸残基 (I135, W141, V245, L246) を示した。C176Y の変異導入により、基質及び産物の出入りがメイントンネル (左上矢印) から、スロット (左下矢印) に変わることによって活性が上昇したと予想されている。

に、M2 と M3 の I135, V245, L246 に対して saturated mutagenesis を実施したところ、M2 の数倍から10倍程度、すなわち野生株の100倍程度に活性が上昇した変異酵素が複数取得できた (Pavlova, M. et al. 未発表データ)。これは、実用化を検討するレベルの活性の強さであり、現在、これら変異酵素の詳細な解析を進めている。

#### 4.3. LinB の $\beta$ -HCH 分解代謝能

$\beta$ -HCHは、6つの塩素原子がすべてエクアトリアルな位置に存在することから、 $\gamma$ -HCH 合成の際の HCH 工業原体に含まれる4つの主な立体異性体 ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -異性体) の中で化学的に最も安定であり、環境への残留性も高く、汚染も深刻である。我々は  $\gamma$ -HCH 分解においては2段階目の反応を触媒する *LinB* (図2) が直接  $\beta$ -HCH に対する分解活性を微弱ながら持つことを明らかにした<sup>19)</sup> (図4)。さらに、我々が HCH 汚染土壌より新たに単離した  $\gamma$ -HCH 分解質化菌 *Sphingomonas* sp. MI1205 株は、UT26 株に比べて顕著に強い  $\beta$ -HCH 分解活性を示すと共に、 $\beta$ -HCH が変換されて生じる 2,3,4,5,6-pentachlorocyclohexanol (PCHL) を 2,3,5,6-tetrachlorocyclohexane-1,4-diol (TCDL) に変換する活性も有していた。そこで、MI1205 株中で PCHL から TCDL の変換活性を担う酵素を明らかにしたところ、*LinB*<sub>UT26</sub> と極めて高い相同性 (98%) を示す *LinB*<sub>MI1205</sub> が同定された。*LinB*<sub>MI1205</sub> は、*LinB*<sub>UT26</sub> とわずか7アミノ酸残基の違い (296アミノ酸残基中) にもかかわらず、 $\beta$ -HCH に対して強い活性を示すのみならず、2段階目の PCHL から TCDL を生じる反応も触媒した (Ito, M. et al. 未発表データ) (図4)。同様の結果は、最近、インドと中国の研究グループにより、*Sphingobium indicum* B90A 株の *LinB*<sub>B90A</sub> と *Sphingomonas* sp. BHC-A 株の *LinB*2 (いずれも *LinB*<sub>MI1205</sub> と100%同一) でも報告された<sup>19,20)</sup>。さらに、*LinB*<sub>MI1205</sub> と *LinB*<sub>UT26</sub> の間で異なる7つのアミノ酸残基のうち、134番目と247番目の2つのアミノ酸残基 (MI1205 ではそれぞれ V と H, UT26 では I と A) が立体構造上、活性中心ポケットの表面に出ていることから、*LinB*<sub>MI1205</sub> と *LinB*<sub>UT26</sub> のこの2つのアミノ酸残基にそれぞれ変異を導入する実験を我々は行った。その結果、*LinB*<sub>UT26</sub> の変異酵素 I134V+A247H には PCHL 変換能が付与され、*LinB*<sub>MI1205</sub> の変異酵素 V134I+H247A の PCHL 変換活性は著しく弱まったことから、この2つのアミノ酸残基が PCHL 変換活性に重要であることを確認した (Ito, M. et al. 未発表データ)。しかし、この2つのアミノ酸残基だけでは反応特性の違いを完全に説明することはできず、両者の DNA レベルでの相違が全て非同義置換であることとも併せて、他の5つのアミノ酸残基も反応性の違いに少なからず関与していることが示唆された。また、 $\delta$ -HCH に対しても *LinB*<sub>UT26</sub> が1段階の反応しか触媒しないのに対して、*LinB*<sub>B90A</sub> は2段階の反応を触媒することをインドの研究グループが示している<sup>19)</sup>。UT26 株が  $\gamma$ -HCH だけをまき続けた試験圃場から単離された分解菌であるのに対して、MI1205 株、BHC-A 株、B90A 株が他の異性体も含む汚染土壌から単離されたものであることから、選択圧の違いが反応特性の大きく異なる2種類の *LinB* を産み出したのではないかと推測している。反応特性の相違を産み出す詳細な

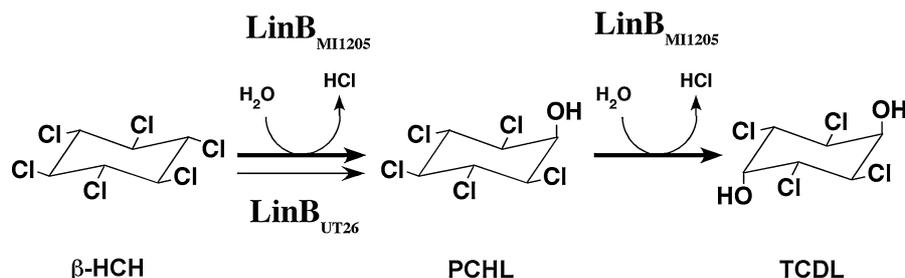


図4. LinBによる $\beta$ -HCHの分解経路。

UT26株由来のLinBは最初の反応しか触媒せず活性も弱いものに対して、MI1205株のLinBは2段階の反応を触媒し、活性も強い。詳しくは本文参照。

機構については不明であるが、以上の結果は、少なくとも数アミノ酸残基の置換で酵素の反応特性を劇的に改変することが可能であることを示している。

### 5. ダイズ根粒菌由来のLinBホモログDbjA

前項で述べたように、ハロアルカンデハロゲナーゼでは、改変のターゲットを絞り既存の酵素の機能改変を行うことはある程度有効であるが、完全に理論に基づいた思いのままの機能改変は少なくとも現段階では不可能である。逆に、4.3で挙げた例のように、自然に存在する酵素が機能改変のホットスポットを教えてくれる場合もある。そこで、我々は、より多くの遺伝子資源からハロアルカンデハロゲナーゼ遺伝子を取得するために、これまでの研究で未開拓であったと考えられる遺伝子資源として (i) 細菌のゲノム情報と (ii) 難培養性細菌の遺伝情報も含む環境DNAに注目した研究を進めている<sup>8,14</sup>。本稿では、遺伝子の取得と解析が進んでいる前者についてのみ紹介する。

LinBのホモログ遺伝子は、結核菌を含む *Mycobacterium* 属細菌<sup>9</sup> や根粒菌<sup>18</sup> など、比較的多くの細菌株のゲノム配列中に見出される。我々は、このうち、特にダイズ根粒菌 *Bradyrhizobium japonicum* USDA110株由来のハロアルカンデハロゲナーゼ DbjA について X線結晶構造解析を含めた詳細な研究を進めている。その大きな理由のひとつに、DbjAが大腸菌中で良好に高発現し、大量の精製酵素が比較的容易に取得できることが挙げられる。ミヤコグサ根粒菌 *Mesorhizobium loti* MAFF303099由来の DmlA は、融合タンパクにしたり、シャペロンタンパク質を用いたりするなどの複雑な方法で発現・精製が可能である<sup>18</sup> が、構造解析や詳細な生化学的解析に資するほどの量を精製することは現時点では不可能である。また、*Mycobacterium avium* N85由来の DhmA は、大腸菌の系では十分量の酵素を精製することは不可能であったが、*Mycobacterium* 属細菌と同じグラム陽性菌の *Rhodococcus* を用いた発現システムである程度の量の酵素が精製でき、catalytic pentad を明らかにすることができた<sup>16</sup>。このように、酵素の発現・精製は未開拓遺伝子資源から取得した新規酵素遺伝子の機能解析を行う上でも大きな障害となっている。さて、DbjAは精製が容易であるだけでなく、既知のハロアルカンデハロゲナーゼに比べて、枝分かれするなどしてかさ高い (bulky な) 基質に対して強い活性を示した。さ

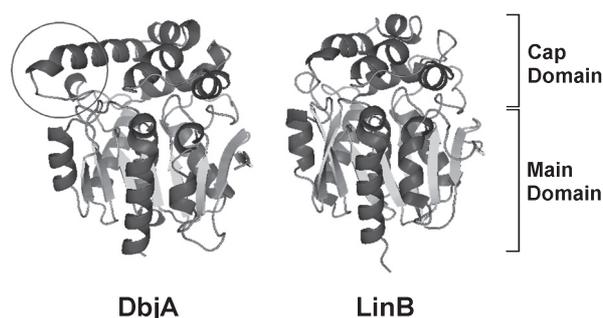


図5. 根粒菌由来のハロアルカンデハロゲナーゼ DbjA と LinB の立体構造比較。

DbjA に特異的な EB 配列に相当する部分を丸で囲った。

らに、LinB など解析の進んでいる既知のハロアルカンデハロゲナーゼは、一般に鏡像異性体認識のレベルが低く、生理活性物質の生産などには向かないが<sup>9</sup>、DbjA は 2-bromopentane などに対して高い鏡像異性体認識活性を示した (Prokop, Z. et al. 未発表データ)。ハロアルカンデハロゲナーゼは、保存性の高いメインドメインと、多様性に富み基質特異性を左右するキャップドメインから構成され、活性中心はその間に位置する (図5)。X線結晶構造解析の結果、DbjA は、メインドメインからキャップドメインへ繋がるループと、それに続くキャップドメインの  $\alpha$ -helix (図5中、丸で囲った部分: EB 配列と命名) が他のハロアルカンデハロゲナーゼに比べて長い特徴を持つことが明らかになった (Sato, Y. et al. 未発表データ) (図5)。さらに EB 配列を削った変異酵素や、逆に EB 配列を付与した他のハロアルカンデハロゲナーゼの解析から、DbjA 特異的な性質が EB 配列に由来することを強く示唆する結果を得ている (Sato, Y. et al. 未発表データ)。高い鏡像異性体認識機構の詳細については現在解析中であるが、DbjA はゲノム情報を遺伝子資源として有効活用した好例であると考えている。

一方、なぜ結核菌や根粒菌などがハロアルカンデハロゲナーゼ活性を有しているのか、その生理的意義や本来の基質については未だ不明である。有機ハロゲン系の化合物を産生する真核生物との生物間コミュニケーションに関与している可能性も考えられるが、現段階では推測の域を出ない。今後、遺伝子破壊株を用いた実験などにより、こうした可能性が検証されよう。

## 6. まとめと今後の展望

基質特異性が広く、環境汚染物質・毒ガス・有害な工業的副産物の分解など応用範囲の広いハロアルカンデハロゲナーゼは、反応機構の詳細までかなり理解が進んだといえよう。さらに、理論的にターゲットを絞ることにより、本酵素群の実際の応用面を見据えた機能改変がある程度可能であることも示された。このような意味において、ハロアルカンデハロゲナーゼは酵素工学の可能性を示す良い例であると考えられる。しかし、それでも、完全に理論に基づいて思いのままの活性を有する酵素を作り出すことは现阶段では困難であり、さらなる知見の蓄積が必要である。そのためには、実験室内で創出した変異酵素の反応特性の理論的理解と共に、未開拓遺伝子資源から取得した新規機能を有する本酵素遺伝子のホモログを解析することが有効であろう。

## 謝 辞

本研究は東北大学大学院生命科学研究所において南澤究教授、大坪嘉行博士、佐藤優花里氏、伊藤通浩氏、Martina Pavlova 氏らと行ったものである。また、コンピューター解析等はチェコ・マサリク大学の Jiri Damborsky 教授、Zbynek Prokop 博士らの研究グループ、X線結晶構造解析は産業技術総合研究所の千田俊哉博士らの研究グループとの共同研究である。ここに記すと共に謝意を表したい。また、筆者グループらの研究は、文部科学省科学研究費補助金の特定領域研究、日本学術振興会科学研究費補助金の基盤研究、農林水産省から助成を受けている。

## 文 献

- Bohac, M., Y. Nagata, Z. Prokop, M. Prokop, M. Monincova, M. Tsuda, J. Koca, and J. Damborsky. 2002. Halide-stabilizing residues of haloalkane dehalogenases studied by quantum mechanic calculations and site-directed mutagenesis. *Biochemistry* 41: 14272–14280.
- Bosma, T., J. Damborsky, G. Stucki, and D.B. Janssen. 2002. Biodegradation of 1,2,3-trichloropropane through directed evolution and heterologous expression of a haloalkane dehalogenase gene. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 3582–3587.
- Chaloupkova, R., J. Sykorova, Z. Prokop, A. Jesenska, M. Monincova, M. Pavlova, M. Tsuda, Y. Nagata, and J. Damborsky. 2003. Modification of activity and specificity of haloalkane dehalogenase from *Sphingomonas paucimobilis* UT26 by engineering of its entrance tunnel. *J. Biol. Chem.* 278: 52622–52628.
- Endo, R., M. Kamakura, K. Miyauchi, M. Fukuda, Y. Ohtsubo, M. Tsuda, and Y. Nagata. 2005. Identification and characterization of genes involved in the downstream degradation pathway of  $\gamma$ -hexachlorocyclohexane in *Sphingomonas paucimobilis* UT26. *J. Bacteriol.* 187: 847–853.
- Janssen, D.B. 2004. Evolving haloalkane dehalogenases. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 8: 150–159.
- Jesenska, A., M. Pavlova, M. Strouhal, R. Chaloupkova, I. Tesinska, M. Monincova, Z. Prokop, M. Bartos, I. Pavlik, I. Rychlik, P. Mobius, Y. Nagata, and J. Damborsky. 2005. Cloning, biochemical properties and distribution of Mycobacterial haloalkane dehalogenases. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 6736–6745.
- Marek, J., J. Vevodova, I.K. Smatanova, Y. Nagata, L.A. Svensson, J. Newman, M. Takagi, and J. Damborsky. 2000. Crystal structure of the haloalkane dehalogenase from *Sphingomonas paucimobilis* UT26. *Biochemistry* 39: 14082–14086.
- Miyazaki, R., Y. Sato, M. Ito, Y. Ohtsubo, Y. Nagata, and M. Tsuda. 2006. Complete nucleotide sequence of an exogenously isolated plasmid pLB1 involved in the degradation of  $\gamma$ -hexachlorocyclohexane. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 6923–6933.
- Nagata, Y., T. Nariya, R. Ohtomo, M. Fukuda, K. Yano, and M. Takagi. 1993. Cloning and sequencing of a dehalogenase gene encoding an enzyme with hydrolase activity involved in the degradation of  $\gamma$ -hexachlorocyclohexane ( $\gamma$ -HCH) in *Pseudomonas paucimobilis*. *J. Bacteriol.* 175: 6403–6410.
- Nagata, Y., K. Miyauchi, J. Damborsky, K. Manova, A. Ansorgova, and M. Takagi. 1997. Purification and characterization of haloalkane dehalogenase of a new substrate class from a  $\gamma$ -hexachlorocyclohexane-degrading bacterium, *Sphingomonas paucimobilis* UT26. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 3707–3710.
- Nagata, Y., Z. Prokop, S. Marvanova, J. Sykorova, M. Monincova, M. Tsuda, and J. Damborsky. 2003. Reconstruction of Mycobacterial dehalogenase Rv2579 by cumulative mutagenesis of haloalkane dehalogenase LinB. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 2349–2355.
- 永田裕二, 津田雅孝. 2005. 有機塩素系殺虫剤分解細菌の出現一代謝系の構築と酵素の機能. *蛋白質核酸酵素*. 50: 1511–1518.
- Nagata, Y., Z. Prokop, Y. Sato, P. Jerabek, A. Kumar, Y. Ohtsubo, M. Tsuda, and J. Damborsky. 2005. Degradation of  $\beta$ -hexachlorocyclohexane by haloalkane dehalogenase LinB from *Sphingomonas paucimobilis* UT26. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 2183–2185.
- 永田裕二, 津田雅孝. 2005. メタゲノムの発想に基づいた新規環境汚染物質分解酵素遺伝子へのアプローチ. *化学と生物*. 43: 33–42.
- Nagata, Y., M. Kamakura, R. Endo, R. Miyazaki, Y. Ohtsubo, and M. Tsuda. 2006. Distribution of  $\gamma$ -hexachlorocyclohexane-degrading genes on three replicons in *Sphingobium japonicum* UT26. *FEMS Microbiol. Lett.* 256: 112–118.
- Pavlova, M., M. Klavana, A. Jesenska, Z. Prokop, H. Konecna, T. Sato, M. Tsuda, Y. Nagata, and J. Damborsky. 2006. The identification of catalytic pentad in the haloalkane dehalogenase DhmA from *Mycobacterium avium* N85: reaction mechanism and molecular evolution. *J. Struct. Biol.* in press.
- Prokop, Z., M. Monincova, R. Chaloupkova, M. Klavana, Y. Nagata, D.B. Janssen, and J. Damborsky. 2003. Catalytic mechanism of the haloalkane dehalogenase LinB from *Sphingomonas paucimobilis* UT26. *J. Biol. Chem.* 278: 45094–45100.
- Sato, Y., M. Monincova, R. Chaloupkova, Z. Prokop, Y. Ohtsubo, K. Minamisawa, M. Tsuda, J. Damborsky, and Y. Nagata. 2005. Two Rhizobial strains, *Mesorhizobium loti* MAFF303099 and *Bradyrhizobium japonicum* USDA110, encode haloalkane dehalogenases with novel structures and substrate specificities. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 4372–4379.
- Sharma, P., V. Raina, R. Kumari, S. Malhotra, C. Dogra, H. Kumari, H.P. Kohler, H.R. Buser, C. Holliger, and R. Lal. 2006. Haloalkane dehalogenase LinB is responsible for  $\beta$ - and  $\delta$ -hexachlorocyclohexane transformation in *Sphingobium indicum* B90A. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 5720–5727.
- Wu, J., Q. Hong, P. Han, J. He, and S. Li. 2006. A gene *linB2* responsible for the conversion of  $\beta$ -HCH and 2,3,4,5,6-pentachlorocyclohexanol in *Sphingomonas* sp. BHC-A. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* in press