

研究成果報告書

(国立情報学研究所の民間助成研究成果概要データベース・登録原稿)

研究テーマ (和文) AB	ポリオール廃液から有用アルコールを効率的に産出する発酵システムのための触媒の開発				
研究テーマ (欧文) AZ	Rational designing of coenzyme B ₁₂ enzymes for biosystems converting polyol wastes into useful alcohols.				
研究氏 代表名 者	カタカナ CC	姓) シバタ	名) ナオキ	研究期間 B	2018～ 2019年
	漢字 CB	柴田	直樹	報告年度 YR	2019年
	ローマ字 CZ	Shibata	Naoki	研究機関名	兵庫県立大学
研究代表者 CD 所属機関・職名	兵庫県立大学大学院生命理学研究科・准教授				
概要 EA (600字～800字程度にまとめてください。)	<p>自動車等のロングライフクーラントの主成分であるエチレングリコール (EG) や染毛剤に含まれる 2-アミノエタノール (AE) は、いずれも化学物質排出把握管理促進法の第一種指定化学物質で毒性がある。EGとAEはいずれも2位の置換基を脱離させればエタノールを生成できるため、資源の再利用が可能になる。B₁₂酵素ジオールデヒドラターゼ (DD) は、1,2-プロパンジオール (PDO) の他、EGとも良く反応し、その生成物であるアセトアルデヒドを還元するとエタノールになる。野生型 DD は PDO に対して最も活性を示し、EG に対しては反応速度が 15%、親和性が 6 倍低い。また、V300、S301、Q336 の 3 残基は基質特異性に影響を及ぼす。本研究では、EG に対する特異性が向上する酵素の調製を目的として、V300 について 8 種類の変異体 (V300C, V300D, V300I, V300L, V300M, V300N, V300S, V300T) を調製した。これらの変異体のうち、EG に対して V300T と V300I について顕著な活性があった。EG に対する k_{cat} は両変異体で野生型 DD よりも減少したが、K_m については V300T では減少、V300I では上昇した。そこで V300T と V300I について X 線構造解析により、k_{cat} と K_m の変化の理由を探った。その結果、V300I では側鎖の体積増加による周囲のアミノ酸残基との立体障害によって側鎖が基質結合部位に傾き、基質結合部位に近づいたことが基質との反応性に影響を及ぼしたと考えられる。また、V300T は側鎖がサブユニットごとに異なるコンホメーションをとっていたため、変異による反応性への影響の理由は不明である。EG との複合体の構造から、V300 単独ではなく、S301 と Q336 についても同時に変異を導入した多点変異体が EG に対して特異性の向上のために必要であることが明らかになった。</p>				
キーワード FA	エチレングリコール	発酵システム	B ₁₂ 酵素	X 線構造解析	

(以下は記入しないでください。)

助成財団コード TA					研究課題番号 AA									
研究機関番号 AC					シート番号									

発表文献（この研究を発表した雑誌・図書について記入してください。）									
雑誌	論文標題 ^{GB}								
	著者名 ^{GA}		雑誌名 ^{GC}						
	ページ ^{GF}	～	発行年 ^{GE}					巻号 ^{GD}	
雑誌	論文標題 ^{GB}								
	著者名 ^{GA}		雑誌名 ^{GC}						
	ページ ^{GF}	～	発行年 ^{GE}					巻号 ^{GD}	
雑誌	論文標題 ^{GB}								
	著者名 ^{GA}		雑誌名 ^{GC}						
	ページ ^{GF}	～	発行年 ^{GE}					巻号 ^{GD}	
図書	著者名 ^{HA}								
	書名 ^{HC}								
	出版者 ^{HB}		発行年 ^{HD}					総ページ ^{HE}	
図書	著者名 ^{HA}								
	書名 ^{HC}								
	出版者 ^{HB}		発行年 ^{HD}					総ページ ^{HE}	

欧文概要^{EZ}

Ethylene glycol (EG) and 2-aminoethanol (2-EA) are toxic compounds that are commonly used especially for long life coolant and hair color dye. Diol dehydratase (DD) and ethanolamine ammonia-lyase eliminate the hydroxyl or amino group bound to the C2 atom of the compounds, generating acetaldehyde. Reducing acetaldehyde produces a useful compound, ethanol, and therefore these enzymes can be utilized for new recycling systems of these toxic compounds. The purpose of this research is to improve the selectivity of DD against EG over 1,2-diols, especially 1,2-propanediol (1,2-PDO), because it reacts with 1,2-PDO with higher activity than EG. We selected V300 as a target of mutation to improve the activity against EG and prepared series of mutants of the residue. V300I and V300T mutants showed lower but still significant activities. Structural analysis of the V300I mutant revealed that I300 leans toward the substrate-binding site and is likely to influence the binding geometry of the substrates and intermediates during reaction, which seems to reduce the k_{cat} and affinity against EG by the mutation. On the other hand, the V300T mutant showed an improved affinity to EG although its reason is unknown because the conformation of the side chain of T300 was unstable.