

平成21年 5月 15日現在

研究種目：基盤研究（B）  
研究期間：2006～2009  
課題番号：18360400  
研究課題名（和文） ナイロンオリゴマー分解酵素の立体構造解析と人工アミド合成への応用  
研究課題名（英文） Structural analysis of nylon oligomer hydrolase and application to enzymatic synthesis of unnatural amides  
研究代表者  
根来 誠司（SEIJI NEGORO）  
兵庫県立大学・大学院工学研究科・教授  
研究者番号：90156159

研究分野：工学

科研費の分科・細目： プロセス工学・生物機能・バイオプロセス

キーワード：ナイロンオリゴマー、X線結晶構造解析、酵素進化、 $\beta$ ラクタマーゼ

## 1. 研究計画の概要

近代化学工業の進歩に伴い膨大な量の化学物質が合成され、多方面に利用されているが、これらの中には、生物毒性や内分泌攪乱作用を有するものも含まれており、環境中への拡散による生態系への影響が懸念されている。*Arthrobacter* sp. KI72 株が保持するプラスミドpOAD2 上には、高機能型ナイロンオリゴマー分解酵素（Ny1B）、およびNy1B類似カルボン酸エステル分解酵素（Ny1B\*）がコードされており、非天然物質に対する微生物の適応・進化を分子レベルで解析する上で恰好の系である。本研究では、下記の課題について検討する。

## (1) ナイロンオリゴマー分解酵素の構造

Ny1B/Ny1B' の酵素分子単独、酵素・基質複合体の立体構造を解析する。さらに、触媒機能に重要と推定されるアミノ酸（Lys115, Tyr170, Asp181, Tyr215, Asn266, Tyr370）を他アミノ酸へ変えた変異酵素を取得し、機能変化との相関から、触媒機能に関わるアミノ酸残基を特定する。

さらに、Ny1A, Ny1C についても、その構造

を解析する。これらの結果を基に、非天然アミド化合物変換反応を触媒する酵素の設計原理創出を試みる。

## (2) 逆反応による非天然アミド合成

ナイロンオリゴマー分解酵素（Ny1B/Ny1B'）は、微水系で効率的にアミド合成反応を触媒する。その分子基盤を明らかにし、非天然アミド結合を有する有用物質の生産（逆反応を利用した非天然アミド合成）に応用する。

## 2. 研究の進捗状況

Ny1B' 型の低活性酵素に Ny1B 型の 2 アミノ酸置換（G181D, H266N）を導入すると高活性型に変換できること、高活性型酵素（Hyb-24DN）では、基質非存在下（Open 型）、基質結合時（Closed 型）の構造変化（誘導適合）が起こることが確認できた。現在、X線結晶構造解析の分解能は 1.10～1.05 Å まで高まっている。その結果、水素の位置が特定でき、触媒機構の詳細が明らかになりつつある。また、Ny1A, Ny1C の結晶化に成功しており、X線回折データが得られている。

### 3. 現在までの達成度

自己点検： おおむね順調に進展 (区分②)

理由： 当初計画した3酵素の立体構造解析は終了し、これら結果をもとに、酵素の触媒機構モデルを提案した。また、実験室内進化により、自然界で起こった進化とは別系統の進化経路を見だし、その構造基盤も明らかにした。また、微水系の条件でも本酵素活性は失われず、逆反応を用いた非天然アミドの合成が期待できることが分かった。

### 4. 今後の研究の推進方策

構造情報と、分子モデリングの結果とを併せて、有用アミド・エステルの高効率合成が可能な触媒中心付近の構造を明らかにする。さらに、 $\alpha$ ペプチド類、アシル化アミノ酸、有用ペプチドへの適用を試みる。さらに、有望なアシル化アミノ酸加水分解酵素を生産する新規微生物も取得済みである。これらの研究を進展させ、酵素分子内疎水の反応場を原理とした物質生産系を企業との共同研究として発展させる。

### 5. 代表的な研究成果

[雑誌論文]

(関連主要論文 下記7件、その他5件)

1. Kawashima Y, Ohki T, Shibata N, Higuchi Y, Takeo M, Kato D, & Negoro S. (2009). Molecular design of a nylon-6 byproduct-degrading enzyme from a carboxylesterase with a  $\beta$ -lactamase fold. *FEBS J.* **276**, 2547-2556.
2. Ohki T, Shibata N, Higuchi Y, Kawashima Y, Takeo M, Kato D, & Negoro S (2009). Two alternative modes for optimizing nylon-6 byproduct hydrolytic activity from a carboxylesterase with a  $\beta$ -lactamase fold. *Protein Science* (in press).

3. Negoro S, Shibata N, Kato D, Takeo M, & Higuchi Y (2007). Nylon-oligomer degrading enzyme/substrate complex.

*J. Mol. Biol.* **370**, 142-156.

4. Yasuhira K, Tanaka Y, Shibata H, Kato D, Takeo M, & Negoro S (2007). 6-Amino-hexanoate oligomer hydrolases from the alkalophilic bacteria *Agromyces* sp. strain KY5R and *Kocuria* sp. strain KY2. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 7099-7102.
5. Yasuhira K, Uedo Y, Takeo M, Kato D, & Negoro S (2007). Genetic organization of nylon-oligomer-degrading enzymes from an alkalophilic bacterium *Agromyces* sp. KY5R. *J. Biosci. Bioeng.* **104**, 521-524.
6. Ohki T, Wakitani Y, Takeo M, Yasuhira K, Shibata N, Higuchi Y & Negoro S (2006) Mutational analysis of 6-amino-hexanoate-dimer hydrolase. *FEBS Lett* **580**, 5054-5058.
7. Yasuhira K, Shibata N, Negoro S, Takeo M & Higuchi Y. (2006). Crystallization and X-ray diffraction analysis of 6-aminohexanoate-cyclic dimer hydrolase from *Arthrobacter* sp. KI72. *Acta Cryst.* **F62**, 1209-1211.

[産業財産権]

○出願状況 (計 1件)

名称：遊離カルボン酸・アミンの直接縮合反応を触媒する酵素の設計方法及びナイロンオリゴマーの酵素的製造方法

発明者：根来誠司、武尾正弘、加藤太一郎、樋口芳樹、柴田直樹

番号：特願2006-239119 (2006)

[その他]

ホームページ

<http://www.eng.u-hyogo.ac.jp/msc/msc3/top.html>