

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 9 月 10 日現在

機関番号：24302

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02120

研究課題名（和文）クチナーゼCut190のCa²⁺結合に伴う動的構造変化とPET分解分子機構の解明研究課題名（英文）Structural dynamics of cutinase Cut190 upon Ca²⁺ binding and molecular mechanism of PET degradation by Cut190

研究代表者

織田 昌幸（Oda, Masayuki）

京都府立大学・生命環境科学研究科・教授

研究者番号：20318231

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,900,000円

研究成果の概要（和文）：PET分解酵素Cut190の高機能化と反応効率の上昇、さら同酵素のCa²⁺結合に伴う活性発現機構の解明を目指して、本研究を行った。Cut190の分子内にジスルフィド結合を導入し、PETのガラス転移温度付近でも安定、かつ十分な活性を保持する高機能化変異体の作製に成功した。PET monomerやPET trimerとの複合体のX線結晶構造解析に成功し、さらに分子動力学計算により、Ca²⁺結合に伴うCut190の動的な構造変化を明らかにした。またPET分解を70、100 MPaの高温高圧下で行うことで、反応効率が増加することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

廃棄プラスチック問題など、プラスチック製品の再利用は、世界的な課題であり、酵素を用いてプラスチックを分解する取り組みは、低エネルギーの観点からも注目されており、本研究で高機能化に成功した酵素は、今後の応用利用も期待され、社会的意義は高いと考えられる。酵素反応の効率化に、加圧が寄与する結果も興味深く、SDGsの観点からも有望である。また金属イオン結合により機能制御される酵素は数多く、本研究成果は、既存技術では観測しづらい「弱い」金属イオン結合の重要性、同結合に伴う動的な構造変化と機能との相関を、実験と計算の両面から解析し、得られた成果は、学術的意義も高いと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Enzymatic degradation of polyethylene terephthalate (PET) is one of the most promising solutions for chemical recycling with a low environmental impact. PET-degrading enzyme, Cut190, could be stabilized by introduction of disulfide-bond, and the mutant will be useful for the chemical recycling. The crystal structures of Cut190 mutants with Ca²⁺ and PET-like substrates that contain aromatic rings were determined at high resolution, showing the substrate recognition mechanism and Ca²⁺ induced conformational change of Cut190. Multicanonical molecular dynamics simulations and subsequent analyses of the free energy landscapes revealed a novel intermediate form that occurs during the enzymatic reaction cycle. The catalytic activity of Cut190 mutant was increased under the condition of high pressure, 100 MPa.

研究分野：生物物理化学

キーワード：酵素 PET分解 構造機能相関

1. 研究開始当初の背景

廃棄プラスチック問題など、プラスチック製品の再利用は、世界的な課題であり、酵素を用いてプラスチックを分解する取り組みは、低エネルギーの観点からも注目されている。本研究対象の放線菌 *Saccharomonospora viridis* AHK190 由来の Cut190 は、セリンエステラーゼで、ポリエチレンテレフタレート (PET) のエステル結合も分解することから、これまで同酵素の応用利用を見据えつつ、基礎研究を進めてきた。本酵素の特徴は、Ca²⁺存在下で活性化し、熱安定性も上昇することである。さらに着目すべきは、Ca²⁺結合力は、他の二価金属イオンよりも低く (K_dで mM レベル)、数百 mM までの広い Ca²⁺濃度範囲で Cut190 の機能や物性を制御する特性は、弱い結合ゆえと考えられる。本研究開始時点までに、Ca²⁺や Zn²⁺、脂肪族基質との複合体の一連の結晶構造解析結果に基づき、我々は図 1 に記載の反応モデルを提唱した。すなわち、Ca²⁺結合により open 型になって基質と結合、Ca²⁺解離により engaged 型になって加水分解し、再び Ca²⁺結合により open 型になって反応産物を放出する。また PET の酵素分解において、そのガラス転移温度となる約 70 °C での反応が求められ、酵素の耐熱性がネックとなるが、Cut190 では分子内にジスルフィド結合を導入することで、70 °C 以上で機能する高機能化に成功した。

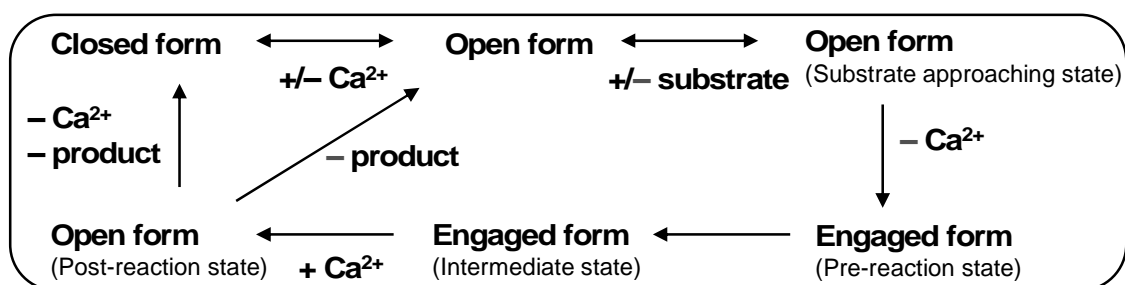


図 1. Cut190 の Ca²⁺制御による酵素反応モデル

2. 研究の目的

酵素による PET 分解の応用利用に向けて、酵素分解効率を高めるべく、Cut190 の高機能化変異体をデザインし、その機能を評価するとともに、加圧下など反応条件の検討を行う。また得られる各種高機能化変異体の構造機能相関の解明に向けて、特に芳香環を持つ PET 様基質との複合体の立体構造解析を進める。さらに結合力の低い Ca²⁺が Cut190 の活性化や安定化に寄与する要因を解明すべく、他の二価金属イオンの結合効果とも比較する。

3. 研究の方法

Cut190 各種変異体の既知の立体構造情報や、類似した関連酵素の高機能化情報を参考に、各種変異体をデザインして、大腸菌発現系により大量調製した。精製した各種変異体の活性評価は、微粉化した PET を酵素処理し、反応産物を逆相 HPLC により分析した (図 2)。各種金属イオンとの結合は、等温滴定熱量計 (ITC) により熱力学的に解析するとともに、同金属イオン添加に伴う熱安定性の変化や、活性の変化を観測することにより行った。立体構造解析には、Cut190 高機能化変異体と各種金属イオン、及び基質との共結晶化を行い、得られた結晶の X 線結晶構造解析を行った。金属イオン添加に伴う溶液中での構造変化を解析すべく、サイズ排除クロマトグラフィー付き X 線小角散乱 (SEC-SAXS) 実験を行った。さらに金属イオン添加に伴う構造変化や、

各種変異に伴う高機能化の分子機構を解明すべく、分子動力学計算 (MD) を行った。

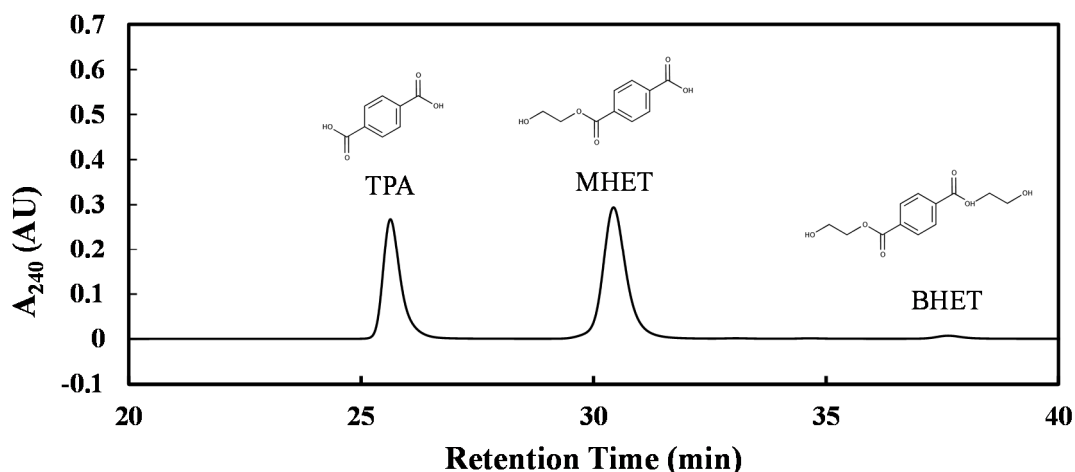


図2 . 逆相 HPLC による反応産物の解析

TPA; terephthalic acid, MHET; mono-(2-hydroxyethyl)terephthalic acid, BHET; bis(2-hydroxyethyl) terephthalate

4 . 研究成果

立体構造解析について、Cut190 の分子内にジスルフィド結合を導入し、S176A 変異により不活性化した変異体と、PET monomer、及び PET trimer との各複合体の X 線結晶構造解析に成功し、高分解能の立体構造情報を取得した。特に PET trimer のように、芳香環 3 つとの結合構造の解明は世界初で、対象酵素の PET 認識、及び加水分解活性機構の理解が深まった。また SEC-SAXS 実験の結果、Cut190 への Ca²⁺添加に伴い、慣性半径 R_g で 0.2-0.3 の減少が認められた。特にジスルフィド結合導入前では、Ca²⁺添加に伴い、熱安定性も大きく上昇することから、Ca²⁺結合に伴い、Cut190 分子内結合が強まり、 R_g が減少したものと考えられる。各種金属イオン結合の ITC 実験の結果、分子内ジスルフィド結合導入前の Cut190 では、Mn²⁺や Zn²⁺の結合熱が観測されるも、ジスルフィド結合導入後には、これらの結合熱も観測されなくなった。この結果は、ジスルフィド結合導入により、金属イオン結合力が低下し、活性への効果も低下したことを示唆する。さらに興味深いことに、ジスルフィド結合導入 Cut190 変異体の 70 以上での活性測定を行った結果、Ca²⁺など金属イオン非存在下でも、部分的に活性が認められた。この実験結果を踏まえて、MD 計算により構造分布の温度依存性を解析したところ、25 付近では、結晶構造でも認められた「open 構造」と「closed 構造」が別々に観測されたのに対して、70 付近では、両構造が 1 つに融合した分布となった。これらの結果は、各構造間のエネルギー障壁が、高温下では相対的に低くなり、構造変化が金属イオン非依存的に起こりえたと考えられる。また、これまでの立体構造解析結果に基づき、部位特異的アミノ酸置換による高機能化変異体探索の結果、F77L 変異や E184R 変異で、PET 分解能の向上が認められた。両部位は、Ca²⁺結合サイト (Site 1 と Site 3) にあり、Ca²⁺結合に伴う Cut190 の構造変化を制御することが、高機能化に繋がることを示唆する。さらに MD 計算の結果、F77L 変異により、種々の結晶構造のうち closed 型の増加が示された。Ca²⁺結合により open 型に、続いて Ca²⁺解離により closed 型に変化し、基質を加水分解する知見を踏まえると、F77L 変異が加水分解時の構造分布を増やすことで、活性が高まったと考えられる。一方、酵素の高機能化に加えて、より効率的な PET 分解反応条件について、加圧による効果を検討した結果、100 MPa 程度で効率化が認められ、同高圧下では、70 で最も高効率であることが示された。これは PET のガラス転移温度付近が最適で、より高温側では、PET の結晶化

度が高まり、分解効率が低下したと考えられる。また微粉化した PET を用いることで、分解効率は高まるが、さらに反応溶液を振盪させることでも分解効率が高まった。この結果は、PET と酵素との接触効率が、分解の効率化に寄与することを示唆する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Liao Zengwei, Oyama Takuji, Kitagawa Yumi, Katayanagi Katsuo, Morikawa Kosuke, Oda Masayuki	4. 巻 78
2. 論文標題 Pivotal role of a conserved histidine in <i>Escherichia coli</i> ribonuclease HI as proposed by X-ray crystallography	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Acta Crystallographica Section D Structural Biology	6. 最初と最後の頁 390 ~ 398
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1107/s2059798322000870	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Numoto Nobutaka, Kamiya Narutoshi, Oda Masayuki	4. 巻 1
2. 論文標題 Improvement of thermostability and activity of PET-degrading enzyme Cut190 towards a detailed understanding and application of the enzymatic reaction mechanism	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 ACS Books, Sustainable Green Chemistry in Polymer Research	6. 最初と最後の頁 89-100
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/2023.02.26.529345	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 近藤 史弥, 加藤 稔, 織田 昌幸	4. 巻 62
2. 論文標題 クチナーゼCut190のPET 分解能向上による実用化のための基盤及び実証研究	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 化学と生物	6. 最初と最後の頁 82-87
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 2件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 近藤 史弥, Gert-Jan Bekker, 神谷 成敏, 沼本 修孝, 織田 昌幸
2. 発表標題 PET分解酵素Cut190の高機能化と構造機能相関解析
3. 学会等名 日本農芸化学会関西支部 第529回講演会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 竹中 理莉、近藤 史弥、織田 昌幸
2. 発表標題 PET分解酵素Cut190の構造機能解析とLCCとの比較に基づく高機能化の検討
3. 学会等名 第96回 日本生化学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 近藤 史弥、Gert-Jan Bekker、神谷 成敏、沼本 修孝、織田 昌幸
2. 発表標題 PET分解酵素Cut190のCa ²⁺ 結合部位に着目した構造機能相関解析
3. 学会等名 第96回 日本生化学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 沼本 修孝、Gert-Jan Bekker、神谷 成敏、織田 昌幸、伊藤 暢聡
2. 発表標題 PET分解酵素Cut190のアロステリック反応機構に基づく機能向上変異体の合理的設計
3. 学会等名 第23回 日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Fumiya Kondo, Miho Emori, Masayuki Oda
2. 発表標題 Degradation of homogenized PET with cutinase-like enzyme Cut190 from <i>Saccharomonospora viridis</i> AHK190
3. 学会等名 第60回 日本生物物理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Masayuki Oda
2. 発表標題 Significance of weak metal-ion binding in enzymatic reactions
3. 学会等名 第60回 日本生物物理学会年会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 織田 昌幸
2. 発表標題 クチナーゼCut190のPET分解能向上による実用化のための基盤及び実証研究
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会（招待講演）
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	関口 博史 (Sekiguchi Hiroshi) (00401563)	公益財団法人高輝度光科学研究センター・回折・散乱推進室・主幹研究員 (84502)	
研究分担者	沼本 修孝 (Numoto Nobutaka) (20378582)	東京医科歯科大学・難治疾患研究所・准教授 (12602)	
研究分担者	神谷 成敏 (Kamiya Narutoshi) (80420462)	兵庫県立大学・情報科学研究科・特任教授 (24506)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	宮ノ入 洋平 (Miyanoiri Youhei) (80547521)	大阪大学・蛋白質研究所・准教授 (14401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関