

令和元年6月11日現在

機関番号：24506

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K14493

研究課題名(和文)代謝工学による6ナイロンモノマーの微生物生産

研究課題名(英文)Production of 6-nylon monomer by metabolic engineering

研究代表者

根来 誠司(Negoro, Seiji)

兵庫県立大学・工学研究科・教授

研究者番号：90156159

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：国内外でポリマーの再資源化やモノマーのバイオ生産が重要視されている。Arthrobacter sp. K172株はナイロンオリゴマー分解酵素NylA/NylB/NylCにより、6-アミノヘキサン酸(Ahx)オリゴマーをAhxまで分解する。Ahxはアミノトランスフェラーゼ(NylD)によりアジピン酸セミアルデヒドに変換され、その後、デヒドロゲナーゼ(NylE)によりアジピン酸へと代謝されること、NylDについては2種、NylEについては20種の類似遺伝子が認められること、NylD1, NylE1を共役させた反応系により、Ahxは約90%の変換率でアジピン酸へ変換されることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、繊維・プラスチックとして広く用いられているナイロンについて、6ナイロンの構成単位である6-アミノヘキサン酸の微生物代謝経路の解明、関連酵素群の取得と機能改良について、検討を行ったものである。特に、6-アミノヘキサン酸の代謝については、以前の研究例がなかったが、モノマー代謝の初段階に関与する2種類の酵素(アミノ基転移酵素と脱水素酵素)を用いて、6-アミノヘキサン酸が、90%以上の収率でアジピン酸へ変換できることが明らかとなった。本研究からNylA-E酵素群を統合的に用いることで、高収率で、6ナイロンを、66ナイロン原料であるアジピン酸まで変換可能である可能性を示すことができた。

研究成果の概要(英文)：Arthrobacter sp. strain K172 grows on a 6-aminohexanoate oligomer as a sole source of carbon and nitrogen. We cloned the two genes, nylD1 and nylE1, responsible for 6-aminohexanoate metabolism. We amplified the DNA fragments that encode these genes by polymerase chain reaction using a synthetic primer DNA homologous to the 4-aminobutyrate metabolic enzymes. We inserted the amplified DNA fragments into the expression vector pColdI in Escherichia coli, purified the His-tagged enzymes to homogeneity, and performed biochemical studies. We confirmed that 6-aminohexanoate aminotransferase (NylD1) catalyzes the reaction of 6-aminohexanoate to adipate semialdehyde using alpha-ketoglutarate, pyruvate and glyoxylate as amino acceptors, generating glutamate, alanine and glycine, respectively. For further metabolism, adipate semialdehyde dehydrogenase (NylE1) catalyzes the oxidative reaction of adipate semialdehyde to adipate using NADP⁺ as a cofactor.

研究分野：生物機能工学

キーワード：ナイロン 代謝工学 6アミノヘキサン酸

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ナイロンは、ポリエステルとともに、現在、最も多量に生産されている合成ポリマーである。特に、6ナイロンと66ナイロンは、ポリアミド全体の約90%を占め、年間、全世界で300~400万トンが生産されている。6ナイロンは工業的に、石油あるいは石炭から、ベンゼンおよびシクロヘキサンを経由して ϵ -カプロラクタムを生成し、さらにこれを開環重合することにより合成される。同様に66ナイロンは、石油原料に由来するアジピン酸とヘキサメチレンジアミンとを重合することにより合成される。しかし、将来的には、化石燃料の枯渇が懸念されており、非化石燃料資源を原料とした物質生産や、化石資源由来製品のリサイクルの試みが活発化している。生物機能を用いた手法は環境に適合した物質を用いて、比較的温和な条件下で反応を進めることが可能である。*Arthrobacter* sp. KI72株はナイロンオリゴマーを単一の窒素/炭素源として生育するバクテリアで、pOAD1、pOAD2およびpOAD3の3種のプラスミドを保有する。pOAD2上にコードされたNyIA(6アミノヘキサン酸環状2量体加水分解酵素)、NyIB(直鎖2量体加水分解酵素)およびNyIC(エンド型オリゴマー加水分解酵素、ナイロン分解酵素)の3種の酵素が、6ナイロンおよび、6アミノヘキサン酸オリゴマー(ナイロンオリゴマー)から6アミノヘキサン酸(Ahx)への分解を担っていることが明らかとなっている。本研究では、KI72株のナイロンモノマー以降の代謝経路の解明と、その代謝経路を利用した有用物質の生産のための基礎検討を実施した。

2. 研究の目的

ナイロンオリゴマー分解菌*Arthrobacter* sp. KI72株は3種類のナイロンオリゴマー分解酵素NyIA/NyIB/NyICにより、AhxオリゴマーをモノマーのAhxまで分解する。しかし、それ以降、モノマーであるAhxはKI72株のどのような酵素によって、どのような物質に変換されるかは不明である。4-アミノ酪酸(γ -アミノ酪酸: GABA)は、C4のメチレン鎖の一方の末端にアミノ基、もう一方の末端にカルボキシル基を持つ非タンパク質性のアミノカルボン酸であり、生体内では、神経伝達物質としての役割を担っている。GABAは、メチレン鎖長がAhxより2単位分短い。ほとんどの原核/真核生物に広く存在する。GABAは、生体内では、L-グルタミン酸から、グルタミン酸デカルボキシラーゼによる脱炭酸反応で得られる。また、GABAの分解には、4-アミノ酪酸アミノトランスフェラーゼ(EC 2.6.1.19)によるコハク酸セミアルデヒド(SSA)へのアミノ基転移反応により開始する。その後、SSAはNAD(P)⁺依存性コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ(EC 1.2.1.16)によりコハク酸へと酸化されるか、もしくはコハク酸セミアルデヒドレダクターゼ(EC 1.1.1.79)により β -ヒドロキシ酪酸へと還元される。本研究ではGABAとの構造類似性を基に、KI72株のナイロンモノマー以降の代謝経路の解明を目標とした検討を行った。

3. 研究の方法

(1) Ahx代謝経路の予測と候補遺伝子の探索: Ahxと構造が類似しているGABA代謝経路をもとに、Ahxの代謝経路を予測した。また、GABA代謝にかかわる酵素として、GABAアミノトランスフェラーゼ、および、コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼのアミノ酸配列を用いて、その配列と相同な配列をKI72株ゲノム配列中で確認することにより、Ahx代謝候補遺伝子を探索した。候補として抽出したGABAアミノトランスフェラーゼをNyID、コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼをNyIEと命名した。

(2) NyIDおよびNyIEの系統的解析: NyIDおよびNyIE候補配列とその他関連配列をClustal Wプログラム(<http://www.ebi.ac.uk/tools/clustalw2>, Larkin et al. 2007.)を用いて、系統的解析を行った。

(3) 発現プラスミドの構築: KI72株のゲノムDNAを鋳型に、NyIDおよびNyIE配列をPCRにより増幅した。増幅後のNyIDおよびNyIE挿入配列は制限酵素認識配列を持つようにプライマーを設計した。pCold1ベクターおよびNyID/NyIE挿入配列を制限酵素的に切断した後、16で1晩ライゲーション反応を行い、*E. coli* BL21に形質転換を行った。

(4) 酵素活性の測定: NyID/NyIEをカップリングさせた連続的な反応系を構築した。さらに、構築したNyID/NyIE共役系を用い、NyIDアミノ基転移活性測定系を確立するとともに、有望な候補遺伝子産物について生化学的な検討を行い、Ahx代謝の主役酵素についての検討を実施した。

4. 研究成果

(1) *Arthrobacter* sp. KI72のゲノム解析と6-アミノヘキサン酸代謝系の同定

得られたゲノム配列をMicrobial Genome Annotation Pipeline (MiGAP)を使用してアノテーションした。解析総塩基数3,928,103,700塩基から、105個のコンティグが得られ、4,568,574塩基の配列(総コンティグ塩基数)を決定することができた。ゲノム解析で得た105本のコンティグ配列中にGABAアミノトランスフェラーゼおよびアジピン酸/コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼと相同な配列を探索することでNyID/NyIE候補配列を抽出した。生化学的な検討か

ら、Ahx はアミノトランスフェラーゼ(NyID)によりアジピン酸セミアルデヒドに変換され、その後、デヒドロゲナーゼ(NyIE)によりアジピン酸へと代謝されること(図1)。NyIDについては2種、NyIEについては20種の類似遺伝子が認められること、NyID1, NyIE1を共役させた反応系により、Ahxは約90%の変換率でアジピン酸へ変換されることを明らかにした。以下に、酵素の系統解析、共役反応系を用いた、NyIDアイソザイムの触媒機能、類縁酵素の立体構造を基盤とした触媒機構モデルについて述べる。

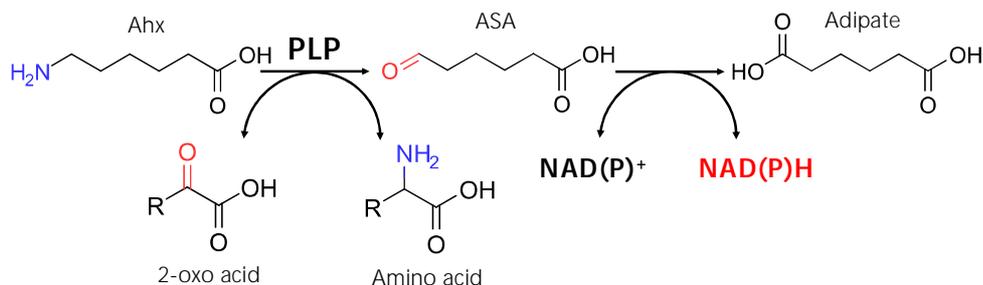


図1 6アミノヘキサン酸アミノトランスフェラーゼ(NyID)とアジピン酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ(NyIE)を共役させた酵素反応系

(2) NyIDの系統的解析

6-ナイロンモノマーであるAhxは、PLP依存性アミノトランスフェラーゼ(NyID)、および、デヒドロゲナーゼ(NyIE)の連続した反応によりアジピン酸へ変換される(図1)。PLP依存性アミノトランスフェラーゼは、系統的に、5つのサブグループに分類される。サブグループIとIIは芳香族およびアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼが、サブグループIVには分枝鎖アミノトランスフェラーゼが、サブグループVにはセリンおよびヒスチジノールリン酸アミノトランスフェラーゼが含まれる。系統的解析により、NyID₁およびNyID₂はサブグループIIIに属することが明らかとなったが(図2)、このグループにはGABAアミノトランスフェラーゼ(EC 2.6.1.19)、オルニチンアミノトランスフェラーゼ(OAT; EC 2.6.1.13)、 α -アミノ酸-ピルビン酸アミノトランスフェラーゼ(OAPT; EC 2.6.1.18)、アセチルオルニチンアミノトランスフェラーゼ(ACOAT; EC 2.6.1.11)、7,8-ジアミノペラルゴン酸アミノトランスフェラーゼ(DAPAT; EC 2.6.1.62)、2,2-ジアルキルグリシンデカルボキシラーゼ(DGD; EC 4.1.1.64)およびグルタミン酸1セミアルデヒドアミノムターゼ(GSAT; EC 5.4.3.8)が含まれる。NyID₁およびNyID₂はともにGABAアミノトランスフェラーゼに系統的に関連していることが確認された。NyID₁は*Arthrobacter aurescens*のGABAアミノトランスフェラーゼ(Ara-GABT)と95%の相同性を持つことが確認されている。さらに、NyID₁は他生物のGABT、すなわち*Rhodococcus*(Rho-GABT)、*Mycobacterium*(Myc-GABT)、*Streptomyces griseoruber*(Str-GABT)、and *E. coli*(Eco-GABT)とそれぞれ73.0、62.5、54.6、and 42.8%の相同性を持つことが確認された。NyID₁およびNyID₂は同じ菌株におけるアイソザイムであるが、NyID₂はNyID₁と比較的その相同性に大きな差があった(相同性: 49.8%)。NyIEは、同様の系統的解析から、20種類のアイソザイム(NyIE1 ~ NyIE20)が存在することを明らかにした(詳細は、文献に記載)(Takehara et al, Appl. Microbiol. Biotechnol. 102, 801-814 (2017))。

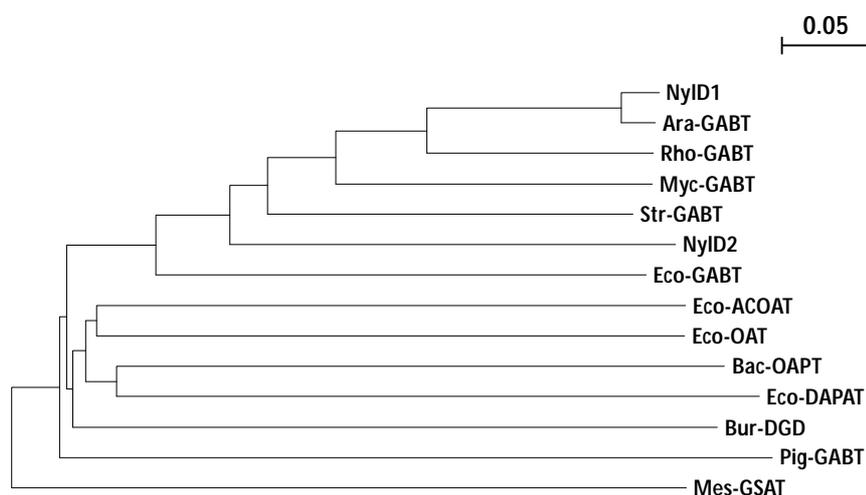


図2 アミノトランスフェラーゼのアミノ酸配列に基づく系統解析

(3) 発現プラスミドの構築と酵素精製

K172株ゲノムより NyID₁/NyIE₁配列をPCRにより増幅し、制限酵素で消化した pCold ベクターに挿入することで発現プラスミドを構築した。目的タンパク質を大量発現し、His-tag 融合タンパク質として精製を行った。デヒドロゲナーゼ(NyIE)活性は、化学合成したアジピン酸セミアルデヒドを基質とし、NADP⁺を補酵素として 30℃で反応させ、NADPHの340nmの吸収をモニターすることで確認した。アミノ基転移(NyID)活性を確認するため、反応基質として、アミノ基供与体(Ahx、または、4アミノ酪酸(GABA))、アミノ基受容体(α-ケトグルタル酸)、補酵素(NADP⁺, PLP) および、NyID活性に対して過剰量のNyIEを添加した共役系を構築し、340nmの吸光度の変化からアミノトランスフェラーゼ活性を測定した(図1)。

その結果、NyID₁に比べてNyID₂は、Ahxでは約18倍、GABAでは約2.6倍高い活性が確認できた。また、アミノ基受容体をピルビン酸等に変更した時の活性変化についても検討した。構築した共役系におけるAhx→アジピン酸変換効率は理論値の90%以上であることを明らかにした。あわせて、NyID/NyIEアイソザイムの生化学的特徴づけを行い、それらがK172株のAhx代謝にどのように関連しているかを確認した。NyIEアイソザイムのアッセイにより、Ahx/Adipate代謝にはNyIE₁が、GABA/Succinate代謝にはNyIE₂が関連していることを示唆した。また、NyIEは酸化反応に特異的な酵素で、その反応においてはNADP⁺選択性を有することを確認した。また、反応液を薄層シリカゲルプレートにスポットし、展開溶媒(1-propanol : Ethyl acetate : Water : 25% ammonia solution = 4.49 : 0.75 : 4.49 : 0.28)にて展開し、0.2%ニンヒドリン溶液を用いて反応物を検出した。その結果、α-ケトグルタル酸をアミノ基受容体として用いると、6ナイロンモノマーであるAhxがグルタミン酸に変換されることが確認できた。

(3) 触媒機構

NyID/NyIEの機能および反応機構を理解するためには、速度論的解析や結晶構造解析などの手法を用いて研究を進めることが重要である。

-アミノ酸を基質としてアミノ基転移反応を触媒する酵素Ara-GABT (GABA amino transferase from *Arthrobacter aurescens*)はその結晶構造解析がすでに行われており、PLPとカルボニル基が Schiff塩基を形成して結合した構造(内部アルジミン)およびPLPとGABAが Schiff塩基を形成して結合した構造(外部アルジミン)が明らかとなっている。その結晶構造解析により、この酵素の反応にかかわる触媒中心のアミノ酸残基とその作用が確認されている。触媒中心付近の酵素反応に関わるアミノ酸残基に着目し、NyID₁、NyID₂およびAra-GABTのアミノ酸配列を用いてアライメントを行った(図3)。その結果、Ara-GABTの活性部位のLys 295はPLPと Schiff塩基を形成する残基であるが、NyID₁およびNyID₂においても保存されていることが確認された。さらに、PLPと相互作用を有するGly 134, Ala 135, Tyr 161, Asp 266, Gln 269およびThr 324が保存され、基質と相互作用を有するMet 102, Arg 164, Gly 323およびArg 429も各酵素間でよく保存されていることが確認された。

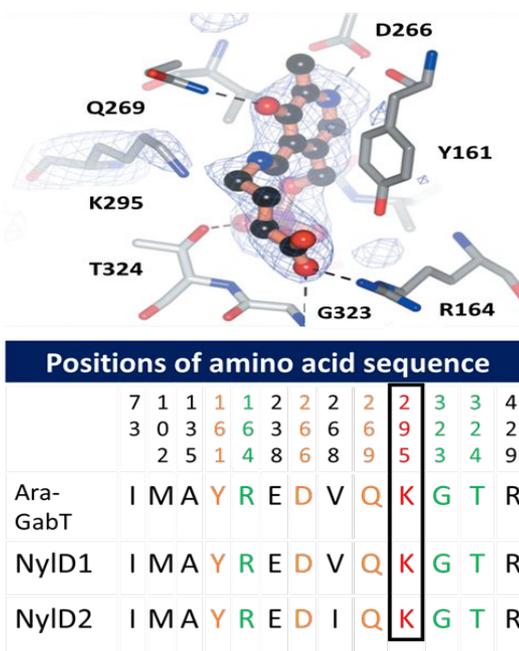


図3 Ara-GABTの触媒中心付近の立体構造図と各酵素のアミノ酸残基の保存性

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計4件)

Negoro S, Shibata N, Lee YH, Takehara I, Kinugasa R, Nagai K, Tanaka Y, Kato DI, Takeo M, Goto Y, Higuchi Y Structural basis of the correct subunit assembly, aggregation, and intracellular degradation of nylon hydrolase, Scientific Reports 2018, 9725. DOI 10.1038/s41598-018-27860-w

Takehara I, Fujii T, Tanimoto Y, Kato DI, Takeo M, Negoro S. Metabolic pathway of 6-aminohexanoate in the nylon oligomer-degrading bacterium *Arthrobacter* sp. K172: identification of the enzymes responsible for the conversion of 6-aminohexanoate to adipate. Applied Microbiology and Biotechnology Vo. 102, No. 2, 2017, pp. 801-814.

DOI 10.1007/s00253-017-8657-y

Takehara I, Kato DI, Takeo M, Negoro S. Draft genome sequence of the nylon oligomer-degrading bacterium *Arthrobacter* sp. strain KI72. Genome Announcement Vol. 5, No.17, 2017, e00217-17. DOI 10.1128/genomeA.00217-17

Negoro S, Kawashima Y, Shibata N, Kobayashi T, Baba T, Lee YH, Kamiya K, Shigeta Y, Nagai K, Takehara I, Kato D, Takeo M, Higuchi Y. Mutations affecting the internal equilibrium of the reaction catalyzed by 6-aminohexanoate-dimer hydrolase. FEBS Letters, Vol. 590, No. 18, 2016, pp.3133-3143. DOI 10.1002/1873-3468.12354.

〔学会発表〕(計15件)

S. Negoro: “Protein stability and subunit assembly of nylon hydrolase; structural basis discriminating correct subunit assembly, aggregation, and intracellular degradation of precursor protein”, World Congress on Applied Microbiology 2018 (13-14 Aug., 2018, Rome, Italy) (招待講演)

S. Negoro: “Enzymes responsible for the degradation of nylons and related compounds”, Petrochemistry and Natural Resources 2018 (22-23 Oct., 2018, Prague, Czech Republic) (招待講演)

藤井 翼, 竹原 一起, 橋本 悠, 武尾 正弘, 根来 誠司, ナイロンオリゴマー分解菌 *Arthrobacter* の2種類の6-アミノヘキサ酸アミノトランスフェラーゼ NyID1・NyID2 の機能解析、第70回日本生物工学会大会 (2018年9月5日~7日、関西大学、千里山キャンパス、吹田)

生越 大輔、忍野 太貴、岡崎 秀明、武尾 正弘、根来 誠司、エチレングリコール中におけるナイロン加水分解酵素の構造と酵素活性に対する変異効果、第80回酵素工学研究会講演会 (2018年11月16日、東京工業大学、大岡山キャンパス、東京)

藤井 翼、赤木 心、岸本 彰伍、竹原 一起、武尾 正弘、根来 誠司、6-アミノヘキサ酸アミノトランスフェラーゼの速度論解析と類縁酵素の立体構造を基盤とした触媒機構モデル、第80回酵素工学研究会講演会 (2018年11月16日、東京工業大学、大岡山キャンパス、東京) 他10件

〔図書〕(計1件)

根来 誠司、武尾 正弘、柴田 直樹、樋口 芳樹、加藤 太郎、重田 育照「ナイロン分解酵素 NyIB の構造進化、触媒機構とアミド合成への応用」
食品・バイオにおける最新の酵素応用、CMC 出版 (2019年7月出版予定)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0件)

取得状況 (計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(2)研究協力者

研究協力者氏名：武尾 正弘

ローマ字氏名：(TAKEO, masahiro)

研究協力者氏名：加藤 太郎

ローマ字氏名：(KATO, daiichiro)

研究協力者氏名：竹原 一起

ローマ字氏名：(TAKEHARA, ikki)

研究協力者氏名：藤井 翼

ローマ字氏名：(FUJII, tsubasa)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。