

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24510114

研究課題名(和文)新規生分解性バイオポリエステル設計のための関連酵素の構造 機能研究

研究課題名(英文)Structure-function studies of metabolic enzymes for design of novel biodegradable biopolymers

研究代表者

久野 玉雄 (Hisano, Tamao)

独立行政法人理化学研究所・放射光科学総合研究センター・専任研究員

研究者番号：20312267

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：バイオポリエステルの代表的なものの一つであるポリヒドロキシアリカン酸(PHA)は生分解性を有する、微生物合成が可能なポリエステルである。本研究課題では、新規なPHAのデザインおよびその合成システムの構築に不可欠なPHA代謝に関与する酵素の構造と機能について検討した。マルチドメイン構造のPHA分解酵素を結晶化し、本酵素と基質との複合体構造を明らかにした。そしてタイプ1の触媒ドメインにおける基質結合様式を明らかにした。また、水溶性の生分解性ポリマーであるポリアスパラギン酸の分解酵素について結晶化および構造解析にも成功し、本酵素と基質との複合体構造および基質結合様式を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Polyhydroxyalkanoate (PHA) is important bacterial polyester that is degraded by specific enzymes in environment. In this study, structure and function relationships of enzymes in PHA metabolism were investigated for the sake of development of the design and synthetic system of new biopolyesters. A multi-domain PHA depolymerase was crystallized, and its crystal structure in complex with an oligomeric substrate was successfully determined. The results indicated a novel interaction mode between the PHA depolymerase with the type I catalytic domain and polymer substrate. In addition, a novel hydrolase which degrades a soluble polymer polyaspartate was successfully crystallized, and its crystal structure in complex with an oligomeric substrate were determined. The interaction mode between the enzyme and the substrate indicated similarity with that of a fungal PHA depolymerase with the type II catalytic domain.

研究分野：構造生物学

キーワード：環境調和型材料 バイオポリエステル 生分解性高分子 微生物酵素 構造と機能 結晶構造解析

## 1. 研究開始当初の背景

化石資源消費型から資源循環型への資源利用形態の転換は持続的社会的構築に不可欠である。生分解性を有するバイオポリエステルは、バイオマスを原料として合成され、また微生物によって最終的に水と二酸化炭素に分解される資源循環型材料であり、持続的社会的には必要不可欠な機能性プラスチックである。ポリヒドロキシアルカン酸 (PHA) は生分解性を有する代表的なバイオポリエステルで、さらにバイオマスから微生物によって合成することができるという特徴を持つ。PHA はモノマーユニットの化学構造により多様な物性を示すので、幅広い分野での利用が期待され、実用化が望まれている。

PHA の物性改変に向けて、様々なモノマーユニットを持つ PHA が代謝工学的手法により微生物を利用して作られてきた。しかし、PHA の生合成の際にどのようなモノマーユニットが取り込まれるかは生合成系酵素の基質特異性に依存するため、天然の酵素では合成できる PHA の種類は限られてくる。同様に分解においても、天然の分解酵素ではその基質特異性のために、特定のモノマーユニットを持つ PHA に対してしか分解活性を持たない。そのため、思い通りのモノマーユニットを持つ PHA を得るためには、思い通りの基質特異性を持つ生合成系酵素 (PHA 合成酵素、モノマー供給酵素) および分解酵素の両方を設計することが必要となってくる。

酵素の基質特異性を理論的に改変するには酵素の立体構造情報が不可欠である。これまでは PHA の生合成および分解に関わる酵素の構造研究はほとんど進んでいなかったため、それらの基質特異性を理論的に改変して新規なバイオポリエステルを設計するという試みはほとんどされていなかった。近年、我々はカビ由来のシングルドメイン構造の PHA 分解酵素とバクテリア由来でマルチドメイン構造をもつ分解酵素の構造解析に成功している。カビ由来酵素については 3 量体基質との複合体構造の構造解析に成功し、詳細な相互作用様式を明らかにしている。

## 2. 研究の目的

微生物における PHA の生合成経路は多くの生物が持つ基本的な代謝経路、すなわち解糖、脂肪酸分解、脂肪酸合成などの経路とリンクしており、これらの代謝中間物を利用して、モノマー供給酵素および PHA 合成酵素の働きにより PHA が作られる。PHA の物性は、ポリエステルのモノマーユニットの化学構造に左右され、そのモノマー構造は生合成系酵素の基質特異性と大きく関係する。一方、PHA は PHA 分解酵素によって加水分解される。このとき、ポリエステルの構造と分解酵素の基質特異性が合致していないと分解酵素は働かない。これはすなわち、これらの酵素の基質特異性を理論的に改変できれば、

思った通りの化学構造を持つポリエステルが作れ、また分解することができるという期待される。本研究では、PHA の生合成および分解に関与する酵素の立体構造を明らかにし、基質特異性に関わる構造要因を明らかにすることにより、これらの酵素の理論的な基質特異性改変を可能にし、酵素を利用した新規な生分解性バイオポリエステル合成システムを構築するための基盤作りを行うことを目的とする。

## 3. 研究の方法

*Ralstonia pickettii* T1 由来ポリヒドロキシブタン酸分解酵素の精製サンプルを神奈川大学理学部齊藤教授よりいただき、蒸気拡散法によって 4 量体基質との共結晶化を行った。得られた結晶の X 線回折強度データを大型放射光施設 SPring-8 ビームライン BL26B1/B2 において収集した。分子置換法により位相付けを行い、位相改良、モデル構築、および構造精密化を行った。

*Pedobacter* sp. KT-2 由来ポリアスパラギン酸分解酵素の発現プラスミドを理化学研究所平石専任研究員よりいただき、発現、精製、結晶化を行った。また、3 量体基質との複合体の結晶を作成した。得られた結晶の X 線回折強度データを大型放射光施設 SPring-8 ビームライン BL26B1/B2 において収集した。Native データに対する位相付けは結晶化母液に含まれるコバルトの異常分散効果を考慮した単波長異常分散法によって行った。その他のデータに対しては分子置換法により位相付けを行った。初期位相決定後、位相改良、モデル構築、および構造精密化を行った。

## 4. 研究成果

ポリヒドロキシブタン酸は微生物によって作られまた分解される、R 体 3-ヒドロキシブタン酸をモノマーユニットとする水不溶性の生分解性脂肪族ポリエステルである。ポリヒドロキシブタン酸分解酵素はポリヒドロキシブタン酸をモノマーユニット単量体または二量体にまで加水分解する。多くのポリヒドロキシブタン酸分解酵素は触媒ドメイン、リンカードメイン、ポリマー結合ドメインの 3 つのドメインから成る。これまでにバクテリア由来酵素の結晶化、X 線構造解析を行い、319 残基から成る触媒ドメインの結晶構造を明らかにしている。触媒ドメインは  $\alpha/\beta$  加水分解酵素構造スーパーファミリーに属する構造的特徴を持ち、Ser-139, Asp-214, His-276 が触媒部位を構成していた。本研究課題では本酵素の S139A 変異体と 4 量体基質を用いて酵素-基質複合体の構造を分解能 1.6 Å において明らかにした。さらにこれまで不明であったリンカードメインの結晶構造も初めて明らかにした (図 1)。基質結合領域に結合した 4 量体基質の連続した 3 量体部分のモデルを構築することができ、酵素のサブサイト S1、S2、S-1 に

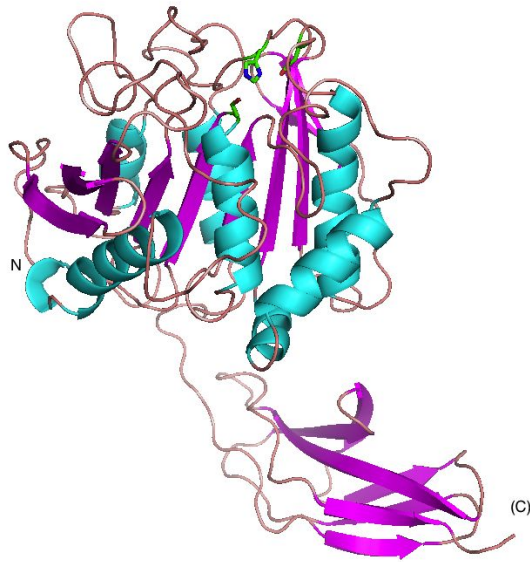


図1 マルチドメイン PHA 分解酵素の結晶構造

おける結合様式を明らかにすることが出来た。酵素のサブサイト S2 における結合様式は、以前明らかにしていたカビ由来酵素の酵素-基質複合体におけるそれとは大きく異なっていた。サブサイト S-1 における結合様式は本研究結果によって初めて明らかにされた。リンカードメインの構造はバクテリア由来キチナーゼ A1 のフィブロネクチン・タイプ3 様ドメインとよく似ていた。触媒ドメインとリンカードメインをつなぐ領域は柔軟性に富んでいることが示唆された。マルチドメイン構造の分解酵素は多くの PHA 分解菌が持っており、PHA の環境中での生分解において中心的な役割をしており、本研究結果はその生分解機構を理解する上で大きく寄与する。特に基質結合に関与するサブサイト構造は、分解酵素の機能改変を行う上で必要不可欠な構造情報である。これらは本研究において初めて明らかになったものであり、世界初の成果である。

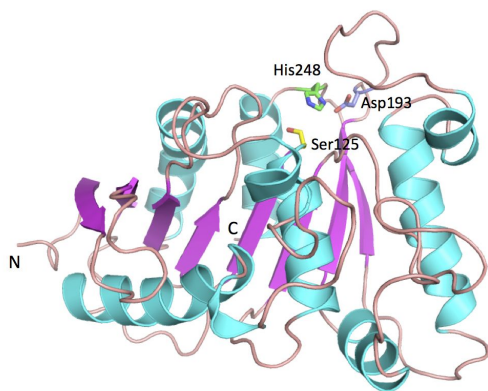


図2 ポリアスパラギン酸分解酵素の結晶構造

ポリアスパラギン酸は生分解性をもつ非天然の水溶性高分子で、非生分解性水溶性合成高分子であるポリアクリル酸の代替物質として注目されている。バクテリア由来のポリアスパラギン酸分解酵素はポリアスパラギン酸の  $\beta$ - $\beta$  アミド結合を加水分解してアスパラギン酸オリゴマーを生成する酵素である。本酵素の大腸菌組換え体の精製試料を用いて蒸気拡散法による結晶化を行い、六方晶系に属する結晶を得た。結晶化条件に含まれるコバルトの異常分散効果を考慮した単波長異常分散法により構造解析に成功した。また、3 量体基質との複合体の結晶を作成し、構造解析を行った。本酵素はアミノ酸残基 265 個からなる単量体酵素である。構造解析により、本酵素は PHA 分解酵素と同じく  $\alpha$ / $\beta$  加水分解酵素構造スーパーファミリーに属し、8 本の  $\beta$  ストランドと 8 本の  $\alpha$  ヘリックスをもつシングルドメイン構造であることが判った(図2)。Ser125、Asp193、および His248 が触媒部位を構成していた。複合体の結晶構造解析の結果、 $\beta$  アスパラギン酸 3 量体のうちの 2 量体部分が基質結合部位に結合した構造が得られた。基質のコンフォメーションはカビ酵素における R-3-ヒドロキシブタン酸 3 量体のコンフォメーションと比較的よく似ており、バクテリア酵素に結合した基質のコンフォメーションとは異なっていた。サブサイト 1 では Arg214 が基質側鎖のカルボキシル基と静電的相互作用をしており、サブサイト 1 における  $\beta$  アスパラギン酸ユニットに対する特異性が高いことが示唆された。結晶化条件に含まれていたコバルト・イオンは酵素分子表面に酵素 1 分子当たり 3 個結合していた。そのうちの 1 つは His245 のイミダゾール環窒素と配位結合し、さらに結晶中で隣接する酵素分子の Asp213 の側鎖カルボキシル基と静電的相互作用していた。この相互作用によって結晶パッキングが影響を受け、結晶性が向上したと考えられる。本研究結果は、生分解性を有する水溶性高分子のデザインを検討する上で重要な情報を与える。これらも本研究において初めて明らかになったものであり、世界初の成果である。PHA 分解酵素の構造情報と合わせ、疎水性高分子および水溶性高分子に対する高い親和性をもった相互作用がどのような構造によってなされるのかが比較検討によってより理解が深められるであろう。

## 5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 8 件)

久野玉雄、平石知裕、南皓介、榎田エリ子、阿部英喜、前田瑞夫、城宜嗣「ポリアスパラギン酸分解酵素の基質複合体の結晶構造」平成 26 年度日本結晶学会年会、2014 年 1 月 1 日～3 日、東京大学弥生キャンパス(東京)

久野玉雄、平石知裕、南皓介、榎田エリ子、

阿部英喜、前田瑞夫、城宜嗣「ポリアスパラギン酸分解酵素の結晶構造」第63回高分子討論会、2014年9月25日、長崎大学文教キャンパス(長崎)

Tamao Hisano, Tomohiro Hiraishi, Kosuke Minami, Eriko Masuda, Hideki Abe, Mizuo Maeda, Yoshitsugu Shiro. “Enzymatic hydrolysis of the  $\beta$ - $\beta$  amide linkage in poly- $\beta$ -aspartate”, 23rd Congress and General Assembly of the International Union of Crystallography, 2014-Aug-06-08, Montreal (Canada)

Tamao Hisano “Introduction to Protein Crystallography”, Introduction to Protein Crystallography A Hands-On Workshop, 2014-Jan-21, Universiti Sains Malaysia (Penang, Malaysia)

久野玉雄、平石知裕、南皓介、榎田エリ子、阿部英喜、前田瑞夫、城宜嗣「ポリ- -アスパラギン酸分解酵素とオリゴマー基質との複合体の結晶構造」第36回日本分子生物学会年会、2013年12月3日、神戸ポートアイランド(神戸)

久野玉雄、平石知裕、南皓介、榎田エリ子、阿部英喜、前田瑞夫、城宜嗣「ポリアスパラギン酸分解酵素の結晶構造解析」平成25年度日本結晶学会年会、2013年10月13日、熊本大学(熊本)

Tamao Hisano, Tomohiro Hiraishi, Kosuke Minami, Eriko Masuda, Hideki Abe, Mizuo Maeda, Yoshitsugu Shiro. “Crystal structure of poly- $\beta$ -aspartate hydrolase from *Pedobactor* sp. KP-2”, The 4th International Conference on Biobased Polymers (ICBP2013), 2013-Sep-26, 漢陽大学校 (Seoul, Korea)

久野玉雄、平石知裕、南皓介、榎田エリ子、阿部英喜、前田瑞夫、城宜嗣「ポリアスパラギン酸分解酵素の結晶構造」第13回日本蛋白質科学会年会、2013年6月14日、とりぎん会館(鳥取)

## 6. 研究組織

久野 玉雄 (HISANO TAMAO)  
独立行政法人理化学研究所・放射光科学総合  
研究センター・専任研究員  
研究者番号：20312267