

令和元年6月11日現在

機関番号：24506

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2018

課題番号：26289317

研究課題名(和文) ナイロン加水分解酵素の分子設計と産業応用への基盤研究

研究課題名(英文) Molecular design of nylon hydrolase and industrial application of the enzyme

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) 12,300,000円

研究成果の概要(和文)：6ナイロンは、カプロラクタムの開環重合により合成されるが、副産物として合成が途中で停止した6-アミノヘキサン酸オリゴマーを生じる。同基質に作用する酵素として、NyIA(環状2量体分解酵素)、NyIB(直鎖状2量体分解酵素)、NyIC(エンド型オリゴマー分解酵素)を見いだしている。NyIBは、Ahx直鎖状2量体のみならず、5～10量体の直鎖状オリゴマーをエキソ型様式で分解する酵素である。本研究では、NyIBの構造進化・触媒機構を解析するとともに、加水分解の逆反応によるアミド合成において、酵素反応の方向性とアミド合成収率に影響を与える変異効果について、酵素の内部平衡の観点から検討を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

加水分解酵素の逆反応によるアミド・エステル合成では、合成収率は基本的には、化学平衡で決定される。NyIBでは、水分含量の高い条件、90% t-ブタノール / 10%水系で、高収率でアミド合成反応を触媒する。同条件では、有機溶媒と水が溶解した1相系であり、基質・生成物とも溶解しているが、アミド合成の収率は80%以上に達する。これに対し、高い加水分解機能を有するにもかかわらず、合成反応が殆ど進行しない変異体を取得した(1%以下)。さらに、両変異体では、アミド合成・分解の触媒機能に大きな差異がある。このように、触媒中心近傍の構造と反応方向性を変化させることが可能であるという結果を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：Amide/ester compounds have been synthesized by using the reverse reaction of hydrolases by limiting water content in the reaction mixtures. In thermodynamically controlled synthesis, the final yields are essentially determined by the water content within the solvent environment. The yields of amide-synthesis obtained by reverse reaction using 6-aminohexanoate-dimer hydrolase in 90% t-butyl alcohol were drastically varied following several amino acid substitutions located at the entrance of the catalytic cleft of the enzyme. A movement of a loop region and a flip-flop of Tyr170 in the enzyme generate the local hydrophobic environment at the catalytic center. Here, we propose that the shift of the internal equilibrium between enzyme/substrate complex and enzyme/product complex by the "water-excluding effect" alters the rate of the forward/reverse reactions, and that the local hydrophobic environment potentially provides a reaction center suitable for efficient amide synthesis.

研究分野：タンパク質工学

キーワード：ナイロン分解酵素 アミド合成 タンパク質工学

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

1. 研究開始当初の背景

6 ナイロンは カプロラクタムの開環重合により合成されるが、副産物として合成が途中で停止した 6-アミノヘキサン酸オリゴマー (ナイロンオリゴマー) を生じる。ナイロンオリゴマーの酵素分解には、分解様式が異なる 3 種類の酵素、NyIA (環状 2 量体分解酵素) NyIB (直鎖状 2 量体分解酵素) NyIC (エンド型オリゴマー分解酵素) が関与することを見いだしている。一方、モノマーの 6-アミノヘキサン酸 (Ahx) については、最近、NyID (アミノトランスフェラーゼ) および、NyIE (デヒドロゲナーゼ) により、ほぼ定量的にアジピン酸まで変換されることを確認している。さらに、NyIC は、微弱ながら、6 ナイロン、66 ナイロン等の脂肪族ナイロンへ作用することが明らかとなっている。一方、NyIB は、Ahx 直鎖状 2 量体 (Ald) のみならず、5 ~ 10 量体の直鎖状オリゴマーをエキソ型様式で分解する酵素であり、これまで、酵素進化のモデル系、立体構造解析と計算科学に基づく酵素反応機構について、検討を行ってきた。本研究では、NyIB の構造進化・触媒機構を検討するとともに、加水分解の逆反応によるアミド合成において、酵素反応の方向性とアミド合成収率に影響を与える変異効果について、計算科学的手法を併用した解析を実施した。

2. 研究の目的

6-アミノヘキサン酸オリゴマーの酵素分解は、当初、ナイロン工場の排水処理が目的であったが、その後、非天然物質に対する酵素進化のモデル、立体構造と触媒機構の解明、タンパク質工学と分子進化学による機能改良へ展開した。さらに、特異性の異なるナイロン分解関連酵素群を統合的に利用することで、ナイロンの酵素的な再資源化や、別の有用物質への変換、バイオマスからのナイロンモノマー生産が可能となる。本研究では、酵素の耐熱化機構、および、有機溶媒中におけるナイロン加水分解反応の特徴、および、逆反応によるアミド合成において、酵素反応の方向性に影響を与える構造基盤を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) ナイロン分解酵素 NyIB の触媒中心アミノ酸の同定: ナイロンオリゴマー分解酵素 (NyIB) および各種変異酵素を精製後、結晶化し、SPRING-8 において、X 線回折強度データを収集した。得られた電子密度から、立体構造を解析した。基質複合体は、触媒中心 Ser112 を Ala に置換して不活性化した酵素を調製後、同様に結晶化し、基質 (Ald またはモノマー Ahx) 溶液に浸漬後、構造解析を行った。

(2) NyIB のタンパク質工学、および、分子進化学: NyIB と 88% の相同性を有するカルボン酸エステル分解酵素 (NyIB') の遺伝子を変異誘発型 PCR により増幅後、ベクター pUC18 にクローン化し、酵素活性の高いクローンを選別した。その DNA 混合物を 2 回目のシャッフリング実験に供した。計 4 回の選別後、活性が上昇した代表的酵素について構造解析を行った。

(3) 有機溶媒中の NyIB 反応: 微水条件におけるアミド合成の可能性を検討するため、90% *t*-ブタノール・10% 水混合系でのアミド合成を、HPLC 分析から定量的に分析した。

4. 研究成果

(1) NyIB の立体構造と触媒機構

NyIB は、 γ -ラクタマーゼファミリー酵素と高い構造類似性を示し、短鎖 ~ 中鎖カルボン酸エステルに対して高い活性を有する。NyIB は、Ser112-Lys115-Tyr215 からなる触媒トリアドが、エステル分解、

アミド分解の何れの触媒機能においても必須である。アシル化段階では、Ser112-OH 基が基質のアミドまたはエステル結合のカルボニル炭素を求核攻撃することから反応が開始する (図 1)。その後、正四面体中間体を経由して、アシル酵素が形成

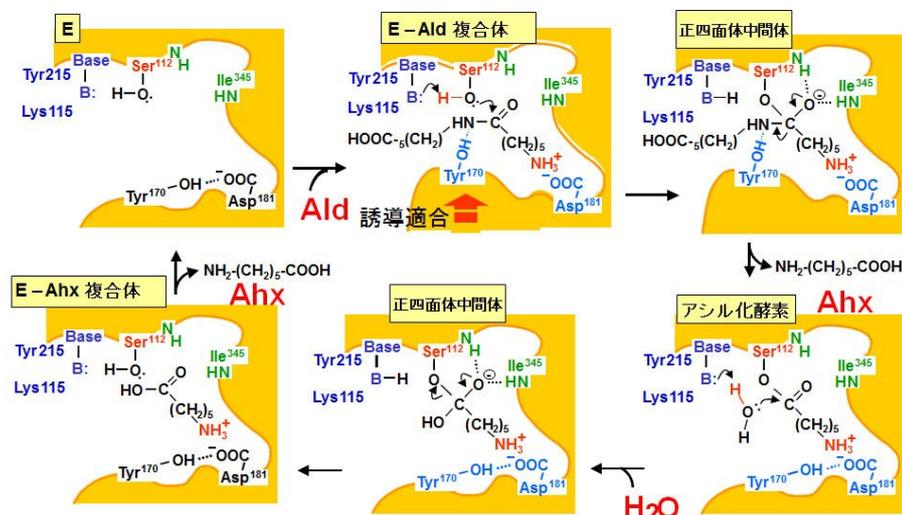


図 1 ナイロン分解酵素 NyIB の触媒機構モデル

される。脱アシル化段階では、水分子が求核剤となり、再度、正四面体中間体を經由して、反応前の遊離型酵素の状態に戻り、反応が完結する（図1）。しかし、エステル結合に比べて、強固なナイロンのアミド結合の分解では、同触媒トリアドに加えて、Tyr170が触媒活性に必要である。

特に、基質 Ald の結合に伴う誘導適合（Tyr170の配向変化とループ移動）が必須であり、誘導適合が起こらない変異体では、活性が認められないか、或いは、非常に低くなる。例えば、誘導適合により基質に近接する Tyr170 をフェニルアラニンに置換した酵素（Y170F）ではナイロン分解活性は約 1/70 に低下するが、同変異はエステル分解活性には殆ど影響を与えない。

アシル化段階が反応全体の律速段階になっているが、基質のアミド結合距離とセリン求核攻撃距離を反応座標に設定した2次元自由エネルギー空間解析から、アシル化段階の活性化エネルギー障壁（88kJ/mol）を求めることに成功した（図2）。さらに、遷移状態を經由してアシル化酵素に至る各分子構造とエネルギー変化から、触媒トリアド各残基の役割が明らかになるとともに、ナイロン分解に固有の残基 Tyr170 は正四面体中間体からアシル化酵素への変換に重要であることが明らかになった。

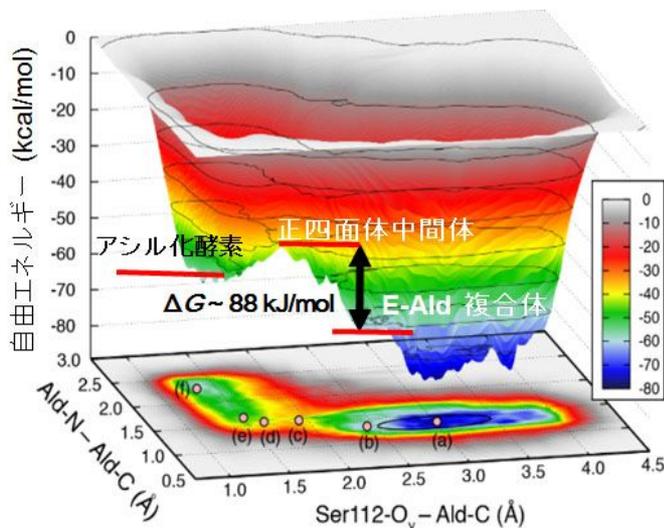


図2 アシル化段階の2次元自由エネルギー空間

(2) NyIB機能の分子進化工学的改良

NyIBの進化起源がラクタマーゼフォールドを有するカルボン酸エステル分解酵素と想定し、ナイロン分解の高機能化に伴い、どのようなアミノ酸置換が選択されるのかを検討した（図3）。その結果、独立した3回の実験中2回は、まず、G181D変異を含む変異体を選択された。この置換は、以前、NyIB型とNyIB'型の200倍の活性差をもたらす変異として特定されていた置換と同一であり、NyIB機能の上昇のために必然的に選択されたと考えられる。すなわち、G181D置換が選択後、H266Nが選択されて、NyIB型酵素に至ったと推定できる（系統Aの適応歩行）（図3）。

一方、別系統の適応歩行（系統B）により、親型NyIB'よりAld分解活性が11倍上昇する変異（D370Y）を確認した。さらに、変異導入と高活性変異体選別を組み合わせた操作を4回繰り返し、Ald分解活性が約80倍上昇した変異酵素（Hyb-S4M94）を取得した。活性上昇に寄与する置換の特定から、同変異体に導入された7置換の中で、D370Y-R187S-F264Cが活性上昇に重要であることが明らかとなった（図3）。

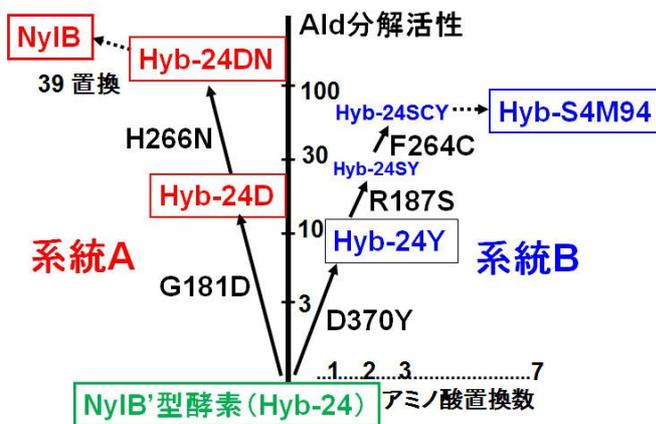


図3 分子進化工学手法によるカルボン酸エステル分解酵素からのナイロン分解活性の高機能化

(3) 加水分解の逆反応によるアミド合成：酵素の内部平衡に影響を与える変異

加水分解酵素の逆反応によるアミド・エステル合成では、合成収率は基本的には、化学平衡で決定される。有機溶媒・水の2相系では生成物を有機相に移動させることにより、また、1相系においても、得られた生成物を沈殿として系外に除去することで、平衡を合成側にシフトさせることが可能である。しかし、1相系で基質・生成物が共に溶解した系では、反応系中の水分含量を可能な限り低く（1%以下に）抑制することが必要である。興味深いことに、親型NyIB（系統A）では、水分含量の高い条件、90% t-ブタノール / 10%水系で、高収率でアミド合成反応を触媒する。同条件では、有機溶媒と水が溶解した1相系であり、基質・生成物とも溶解しているが、アミド合成の収率は80%以上に達する。これに対し、分子進化工学的な方法で構築した

酵素 (Hyb-S4M94 酵素：系統 B) では、高い加水分解機能を有するにもかかわらず、合成反応が殆ど進行しない (1%以下)。通常、正反応の酵素活性が高まれば、同時に、逆反応の活性も高まる。しかし、系統 A、系統 B の変異体では、アミド合成・分解の触媒機能に大きな差異がある。この結果は、触媒中心近傍の構造と反応方向性の関係を理解する上で興味深い。反応速度論による正逆反応の反応速度と水排除効果を基に、収率変動を説明可能な反応座標のモデルを図 4 に示した。

90% *t*-ブタノール系での反応座標 (赤実線) を水相系の反応座標 (青実線) と比較して示した。合成収率が高い Arg187 酵素では、Ahx による誘導適合を受け閉鎖型へ変化する。その結果、大きな水排除効果が得られ、反応は合成側に偏る。言い換えれば、溶媒環境には大過剰の水分子が存在するが、水排除効果により、「酵素により認識される水分子の実効濃度」は大きく低下する。一方、合成収率が低い Gly187 酵素では、基質 Ahx の結合は確認できるが、開放型の構造となっている。そのため、水排除効果が得られず、外部平衡 (反応系全体の平衡) と内部平衡 (触媒中心近傍の平衡) とは、類似した関係となる。これは、一般的な触媒では、反応の最終的な到達濃度が化学平衡濃度とほぼ一致するという結果に対応する。

Ser187 酵素では、中程度の水排除効果があるため、Arg187 型と Gly187 型の中間的な挙動をとる。さらに、合成機能を有さないタイプ B 変異体 (Hyb-S4M94) では、酵素結晶に Ahx (合成側基質) をソーキングしても触媒中心に基質が確認されないが、Ald (分解側基質) では、誘導適合が起こり基質の存在が確認できる。その結果、Ahx 側の化学ポテンシャルが相対的に低くなり、加水分解側に特化した触媒となる。

Ny1B による加水分解反応では、律速段階であるアシル化反応が非水反応であるため、疎水性反応場の形成が重要であるが、この効果は酵素反応の方向性制御の点からも重要である (図 5)。

加水分解とアミド合成の方向性が変動する理由として、1) 反応成分としての水分子の実効濃度が変異酵素間で異なること、2) 分解側基質 Ald と合成側基質 Ahx により、誘導適合の効果が異なることが挙げられる。また、非酵素反応による活性化エネルギーに比べて、酵素反応における活性化エネルギー (図 4 赤実線) は遙かに小さいため、基質

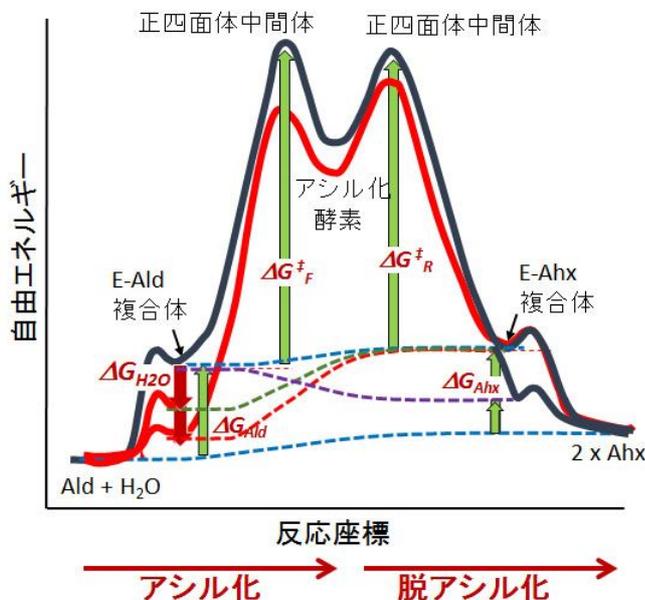


図 4 Ny1B の可逆的アミド合成反応の反応座標

生成物に至る分子の割合として、前者の寄与は無視できる。一般化すれば、反応方向性と見かけの平衡濃度は、溶媒系全体の平衡ではなく、触媒部位における局所的な化学ポテンシャルの差により変化すると考えられる (図 5)。

酵素分子は、触媒サイクル中にダイナミックな構造変化を起こすため、反応方向性制御に必要な構造の分子設計には困難を伴うが、新規の触媒開発を進める上で、今後、広く検討されることを期待したい。

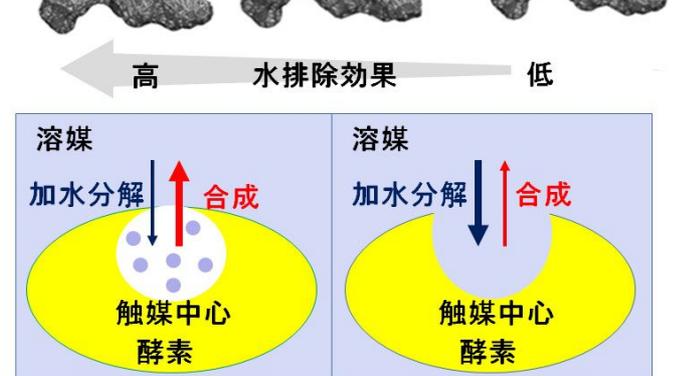


図 5 Ny1B 触媒中心近傍における水排除効果による反応方向性の変化

生成物に至る分子の割合として、前者の寄与は無視できる。一般化すれば、反応方向性と見かけの平衡濃度は、溶媒系全体の平衡ではなく、触媒部位における局所的な化学ポテンシャルの差により変化すると考えられる (図 5)。

酵素分子は、触媒サイクル中にダイナミックな構造変化を起こすため、反応方向性制御に必要な構造の分子設計には困難を伴うが、新規の触媒開発を進める上で、今後、広く検討されることを期待したい。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計7件)

- Negoro S, Shibata N, Lee YH, Takehara I, Kinugasa R, Nagai K, Tanaka Y, Kato D, 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 D, 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 Vol. 102 No. 2, 2017, 801-814. DOI 10.1007/s00253-017-8657-y
- Takehara I, Kato D, Takeo M, Negoro S. Draft genome sequence of the nylon oligomer-degrading bacterium *Arthrobacter* sp. strain K172. 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, 3133-3143. DOI 10.1002/1873-3468.12354.
- Baba, T, Boero M, Kamiya K, Ando H, Negoro S, Nakano M, Shigeta Y. Unraveling the degradation of artificial amide bonds in nylon oligomer hydrolase: from induced-fit to acylation processes. Phys. Chem. Chem. Phys. Vol.17, 2015, 4492-4504. DOI 10.1039/c4cp04419c
- Kamiya,K, Baba T, Boero M, Matsui T, Negoro S, Shigeta Y. Nylon-oligomer hydrolase promoting cleavage reactions in unnatural amide Compounds. J. Phys. Chem. Lett., Vol. 5, 2014, 1210-1216. DOI 10.1021/jz500323y
- Nagai K, Iida K, Shimizu K, Kinugasa R, Izumi M, Kato D, Takeo M, Mochiji K, Negoro S. Enzymatic hydrolysis of nylons: quantification of the reaction rate of nylon hydrolase for thin-layered nylons. Appl.Microbiol Biotechnol. Vol.98, 2014, 8751-8761. DOI 10.1007/s00253-014-5885-2.

〔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、総野 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 太一郎、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

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：武尾 正弘
ローマ字氏名：(TAKEO, masahiro)
所属研究機関名：兵庫県立大学
部局名：工学研究科
職名：教授
研究者番号(8桁)：40236443

研究分担者氏名：加藤 太一郎
ローマ字氏名：(KATO, daiichiro)
所属研究機関名：鹿児島大学
部局名：理工学研究科
職名：助教
研究者番号(8桁)：60423901

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：樋口 芳樹
ローマ字氏名：(HIGUCHI, yoshiki)

研究協力者氏名：柴田 直樹
ローマ字氏名：(SHIBATA, naoki)

研究協力者氏名：重田 育照
ローマ字氏名：(SHIGETA, yasuteru)

研究協力者氏名：後藤 祐児
ローマ字氏名：(GOTO, yuji)

研究協力者氏名：永井 圭介
ローマ字氏名：(NAGAI, keisuke)

研究協力者氏名：竹原 一起
ローマ字氏名：(TAKEHARA, ikki)

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。