

平成22年5月21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（NEGORO SEIJI）
 兵庫県立大学・大学院工学研究科・教授
 研究者番号：90156159

研究成果の概要（和文）：

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（NylB）、およびNylB類似カルボン酸エステル分解酵素（NylB'）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NylB/NylB' およびその基質複合体の立体構造を解析した。また、立体構造から触媒機能に重要と推定されるアミノ酸残基（Ser112, Lys115, Asp181, Tyr215, Asn266, Tyr370）を選定後、各種の変異酵素を取得した。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した。さらに、NylB/NylB' は、微水系で効率的にアミド合成反応を触媒するが、合成／分解活性の比が181位、187位のアミノ酸置換で大きく影響する現象を見いだした。変異酵素の立体構造解析から非天然アミドの高効率合成に必要な構造基盤を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

Arthrobacter sp. strain KI72 produces NylB' carboxylesterase, which is 88% homologous to functional nylon oligomer hydrolase (NylB). Both NylB and NylB' utilize Ser112-Lys115-Tyr215 residues as catalytic triads. NylB' possesses approximately 0.5% of the level of the 6-aminohexanoate linear dimer (Ald)-hydrolytic activity of NylB. Three substitutions (G181D, H266N and D370Y) in NylB' -type carboxylesterase were sufficient to increase the level of the Ald-hydrolytic activity to that of the wild-type NylB enzyme. The triple mutant efficiently catalyzed the amide-synthetic reaction in organic solvent containing low concentration of water by reverse reaction of hydrolysis. We analyzed the structural requirements of the enzymes for effective amide-synthetic reaction.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	5,700,000	1,710,000	7,410,000
2007年度	5,200,000	1,560,000	6,760,000
2008年度	2,200,000	660,000	2,860,000

2009年度	2,200,000	660,000	2,860,000
年度			
総計	15,300,000	4,590,000	19,890,000

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、 β ラクタマーゼ、
カルボン酸エステル分解酵素

1. 研究開始当初の背景

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 (6-aminohexanoate-linear dimer (Ald) hydrolase [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。本課題を申請した当初、X線結晶構造解析に適した良好な結晶が得られていたことから、同酵素の構造進化、触媒機構、分子進化工学・タンパク質工学による機能改良に関する研究を計画した。

2. 研究の目的

β -ラクタマーゼ酵素群は、類似フォールドを有しながら、 β -ラクタム加水分解、カルボン酸エステル加水分解、DD-ペプチド加水分解、DD-ペプチド転移など、多様な機能を有し、同一起源のタンパク質の機能分化を解析するモデル系となる。また、分子進化工学的手法により、カルボン酸エステル分解酵素 (Hyb-24) から、ナイロン基質分解活性が段階的に上昇した変異酵素を取得できているので、触媒中心形成過程を実験的に解明する恰好の系となる。そこで、変異酵素の作成お

よび酵素・基質複合体の立体構造解析から、本酵素の触媒機構を明らかにするとともに、産業応用への可能性を検討する。

3. 研究の方法

(1) 触媒中心アミノ酸残基の同定

Arthrobacter sp. KI72 株由来のナイロンオリゴマー分解酵素 (Ny1B)、低比活性の類似タンパク質 (Ny1B')、およびその変異酵素を精製後、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 6-aminohexanoate (Ahx)] 溶液に浸漬後、構造解析を行った。触媒部位・基質結合部位と推定されたアミノ酸残基について、オリゴヌクレオチドを用いた部位特異的変異処理による機能変化を確認した。

(2) 分子進化工学的機能改良

Ny1B と 88%の相同性を有するカルボン酸エステル分解酵素 (Ny1B') の遺伝子を変異誘発型PCRにより増幅後、ベクターpUC18にクローン化した。細胞抽出液を用いて、AldからAhxへ変換後、薄層クロマトグラフィー (TLC) で分画した。変換率をイメージアナライザーで定量化し、変換率の高い上位5%のクローン (400クローン中の20クローン) を選別した。そのDNA混合物を2回目の

材料とした。変異誘発型 PCR と高機能化クローンの選別を 4 回繰り返して、Ald 分解活性が上昇した酵素について、構造解析を行った。

(3) 微水条件におけるアミド合成

微水条件におけるアミド合成の可能性を検討するため、種々の有機溶媒を用い、10% 水との混合系でのアミド合成の可否を検討した。特に、合成活性が高かった *t*-ブタノールについては、含水量を変化させて合成活性を検討した。Ny1B 型酵素 Hyb-24DN (G181D/H266N 変異を有する) は 90% *t*-ブタノール/10% 水の反応系では、加水分解の逆反応により効率的にアミド合成反応が進行するが、興味深いことに、合成/分解活性比 (初速度の比)、及び最終生成物濃度がアミノ酸置換で大きく変動した。この分子機構を構造レベルで明らかにするため、変異酵素とモノマー基質との複合体の立体構造解析を行った。

4. 研究成果

(1) 触媒中心アミノ酸残基の同定

X 線結晶構造解析の結果、本酵素は 2 つのドメイン (α/β , α) からなっており、 α/β ドメインは中心の 8 本の β -sheet を両側から合計 3 本の α -helix が挟む構造をとること、 β -lactamase フォールドをとる酵素群と構造類似性を示すことを明らかにした (図 1)。

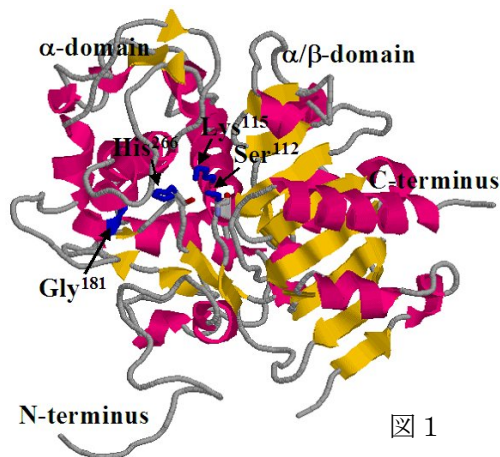


図 1

Ser112 の水酸基から 2.5-2.8 Å 離れた位置に、Lys115, Tyr215 があり、触媒残基と推定できた。そこで、Ny1B および Hyb-24DN の Lys115, Tyr215 について、

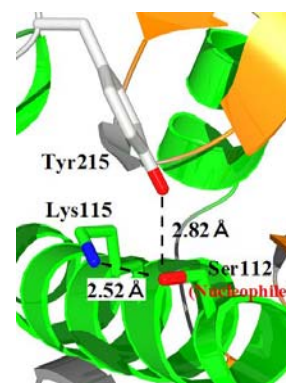


図 2

オリゴヌクレオチドを用いた部位特異的変異処理により、Phe, Ala 等の他のアミノ酸へ変化させた。これらの変異酵素では、分解機能が検出限界以下に低下し、Ser112, Lys115, Tyr215 が触媒残基と同定できた (図 2)。さらに、酵素・基質複合体の結晶構造解析、類似酵素との比較、各種変異酵素の速度論解析から、同酵素の触媒機構を推定した。

(2). 酵素触媒機能の改良

分子進化工学的手法により、Ny1B' 型低活性酵素 (Hyb-24) の Ald 分解高機能化には、G181D → H266N の 2 置換が関与する系統 (タイプ A)、D370Y → R187S → F264C の 3 置換が関与する系統 (タイプ B) が確認でき、少なくとも 2 系統の適応歩行があることを見いだした (図 3)。さらに、これらの置換を組み合わせ、加水分解機能 (k_{cat}/K_m) が、

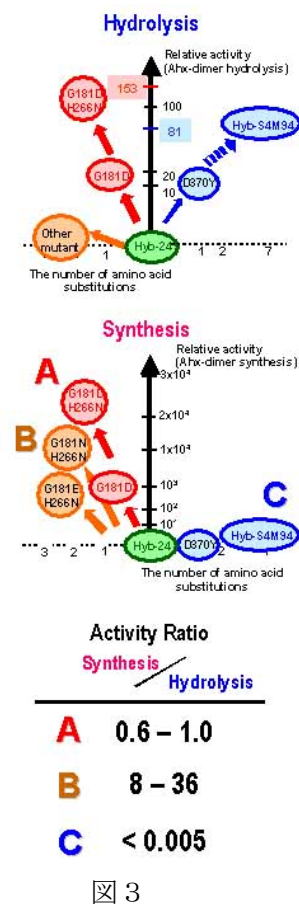


図 3

自然界から分離された酵素 (Ny1B) より、約 5 倍上昇した変異酵素の構築に成功した。

(3) Ny1B 型酵素を用いたアミド合成

上述したタイプ A 変異酵素 (Hyb-24DNY) は 90% *t*-ブタノール系で、遊離カルボン酸とアミンの直接縮合を高効率で触媒する。同酵素を用いたアミド・エステル合成では 合成 (90% *t*-ブタノール中) / 分解 (水溶液中、及び 90% *t*-ブタノール中) の活性は、ほぼ同レベルであった (合成/分解活性比=0.6~1) (タイプ A) (図 3)。興味深いことに、基質結合に必須の 181 位のアミノ酸置換、基質進入部位に位置する 187 位のアミノ酸置換は、合成/分解活性比率に大きく影響することを見いだした。すなわち、分解活性のみを有する変異酵素 (合成/分解活性比 < 0.005) (タイプ B)、合成側機能が強い変異酵素 (合成/分解活性比=8~36) (タイプ C 変異酵素) が得られた (図 3)。さらに、合成/分解活性比に相関して、アミド合成の収率も 81%~0% と大きく変化した (図 4)。この結果は、酵素分子内の 1 アミノ酸置換により、同一溶媒においても、基質 \rightleftharpoons 生成物の平衡関係における (準) 安定化状態が異なること示唆する。

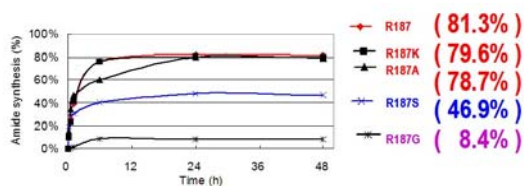


図 4

この分子機構を構造レベルで明らかにするため、各種変異酵素とモノマー基質との複合体の立体構造解析を行った。その結果、アミド合成の高機能化には、基質により誘導されるオープン型からクローズ型への酵素の構造変化、特に触媒中心クレフト周辺の疎水環境場 (水分子数・触媒部位の外部環境への遮蔽) の形成が重要であると推定した。

また、本酵素の産業応用への可能性を検討するため、食品添加物として有用な ϵ -L-リシン誘導体 (6-アミノヘキサノ酸二量体アナログ) に対する活性が上昇した変異酵素の取得を試みた。さらに、分子動力学法を用いたコンピュータシミュレーションから、D-リシンの α アミノ基による立体障害が DL 識別の主要因であることを提案した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 10 件)

1. Kawashima, Y., Yasuhira, K., Shibata, N., Matsuura, Y., Tanaka, Y., Taniguchi, M., Miyoshi, Y., Takeo, M., Kato, D., Higuchi, Y., and Negoro, S. Enzymatic synthesis of nylon-6 units in organic solvents containing low concentrations of water. *J. Mol. Cat. B: Enzymatic* 64, 81-88 (2010). (査読有り)
2. Yasuhira, K. Shibata, N., Mongami, G., Uedo, Y., Atsumi, Y., Kawashima, Y., Hibino, A, Tanaka, Y., Lee, Y-Ho, Kato, D., Takeo, M., Higuchi, Y., & Negoro, S. X-ray crystallographic analysis of the 6-aminohexanoate cyclic dimer hydrolase: catalytic mechanism and evolution of an enzyme responsible for nylon-6 byproduct degradation. *J. Biol. Chem.* 285, 1239-1248 (2010). (査読有り)
3. Higuchi, Y., Shibata, N., Kawashima, Y., Ohki, T & Negoro, S. Structural basis of the evolution of nylon-oligomer hydrolase Ny1B. *Viva Origino.* in press (2010) (査読有り)
4. 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 β -lactamase fold.

- FEBS J.* **276**, 2547-2556. (査読有り)
5. 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 β -lactamase fold. *Protein Science* **18**, 1662-1673 (2009). (査読有り)
6. Negoro S, Shibata N, Kato D, Takeo M, & Higuchi Y (2007). Nylon-oligomer degrading enzyme/substrate complex. *J. Mol. Biol.* **370**, 142-156. (査読有り)
7. 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. (査読有り)
8. 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. (査読有り)
9. 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. (査読有り)
10. 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. (査読有り)

[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 2 0 0 6 - 2 3 9 1 1 9

出願年月日：2 0 0 6 年 9 月 4 日

国内外の別：国内

[その他]

ホームページ

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

根来 誠司 (NEGORO SEIJI)

兵庫県立大学・大学院工学研究科・教授
研究者番号：90156159

(2) 研究分担者

武尾 正弘 (TAKEO MASAHIRO)

兵庫県立大学・大学院工学研究科・准教授
研究者番号：40236443

(H19→H21：連携研究者)

加藤 太一郎 (KATO DAI-ICHIRO)

兵庫県立大学・大学院工学研究科・助教
研究者番号：60423901

(H19→H21：連携研究者)

樋口 芳樹 (HIGUCHI YOSHIKI)

兵庫県立大学・大学院生命理学研究科・教授
研究者番号：90183574

(H19→H21：連携研究者)

柴田直樹 (SHIBATA NAOKI)

兵庫県立大学・大学院生命理学研究科・准教授
研究者番号：30295753

(H19→H21：連携研究者)

中野 英彦 (NAKANO HIDEHIKO)

兵庫県立大学・大学院工学研究科・教授
研究者番号：20047608

(H19→H21：連携研究者)