

平成21年 6月17日現在

研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19750126  
 研究課題名（和文） 効果的に生分解性プラスチックを分解する酵素の触媒機構  
 研究課題名（英文） Catalytic mechanism of the enzymatic hydrolysis of biodegradable plastics  
 研究代表者  
 榮 慶丈(SAKAE YOSHITAKE)  
 名古屋大学・大学院理学研究科・研究員  
 研究者番号：20397988

## 研究成果の概要：

本研究では、生分解性プラスチックをこれまで知られている酵素よりも効果的に分解することが知られている酵素 CLE (Cutinase-like enzyme) について計算化学的アプローチによる解析をおこなった。その結果、Thr17 の側鎖の水酸基が触媒反応全体を安定化させ、さらに酵素の活性部位付近に存在する結合水が、触媒反応全体の安定化に加えてこれまで律速過程であると考えられていた反応をより安定化させることが新たに分かった。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,500,000	0	1,500,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
総計	2,800,000	390,000	3,190,000

## 研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・環境関連化学

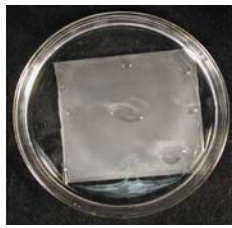
キーワード：生分解性物質，生分解性プラスチック，酵素反応，QM/MM，触媒反応，加水分解

## 1. 研究開始当初の背景

近年、地球環境保護や地球資源の有効利用の立場から、生分解性プラスチックという物質が注目されている。これは自然界において、微生物が関与し、低分子化合物に分解されるプラスチックのことであり、農業用フィルムや家庭用の包装及び容器材料などさまざまな分野において研究・開発が進んでいる。酒類総合研究所の正木らは、廃水処理用酵母 *Cryptococcus* sp. S-2 によって分泌生産される酵素 CLE (Cutinase-like Enzyme) (以下、目的酵素と呼ぶ) が、各種生分解性プラステ

ックに対して、これまで知られていた分解酵素よりも高い分解能力をもつことを実験により示した (K. Masaki et al, *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 7458-7550, 2005)。例えば、生分解性プラスチックの1つである PLA (ポリ乳酸) について、これまで知られている酵素である Proteinase K よりも 500 倍以上の活性をもつことが知られている。図1には生分解性プラスチックの1つである PBS (ポリブチレンサクシネート) の酵素分解の様子を示している。

現在、目的酵素についての最適な分解条件



酵素添加前



酵素添加後 5 時間



酵素添加後 12 時間



酵素添加後 20 時間

図1 PBSの酵素分解 (サイズ 10cm×10cm, 質量 0.3g)

に  
 に関する研究や、目的酵素の大量生産技術に関する研究などがおこなわれている。しかしながら、目的酵素の触媒機構についての理論的説明ははまだほとんどなされていない。そこで研究代表者は、目的酵素がこれまでに知られている他の酵素と違って、どこが特徴的で、なぜ触媒反応が進みやすいのかを理論的に明らかにし、この結果を元にさらに高い分解能力をもつ酵素の分子設計をおこなうことを目標として研究をおこなっている。またこの研究を通じて、「酵素触媒反応」さらには「生体内反応」の分子設計へ向けた、より一般的な手法の開発へとつなげていきたい。

目的酵素は X 線結晶構造解析によりその立体構造が明らかとなっている (図 2 上)。これまでの実験結果及び研究代表者のおこなった理論化学的研究により、この酵素は触媒残基としてセリン残基が中心となって働く酵素 (セリンプロテアーゼ) であり、触媒反応に不可欠な 3 つのアミノ酸 (Ser85, His180, Asp165) 及び触媒反応をサポートする 2 つのアミノ酸 (Thr17, Gln86) が存在していることが分かっている (図 2 下)。

研究代表者は、セリンプロテアーゼに共通の触媒機構を元に、量子化学計算 (42 原子モデル, B3LYP/6-31G\*\*) によって目的酵素の触媒反応過程のエネルギー変化を調べ、律速課程となる反応を予測した。さらに、この律速課程に注目したより高精度の量子化学計算 (68 原子モデル, B3LYP/6-31G\*\*) をおこなうことで、これまで知られていなかった目的酵素特有の触媒反応を提案することができた。図 3 には、律速過程と予測された反応についての新しい反応機構の様子を示す。

今回研究代表者が新たに注目するのは、目的酵素の活性部位付近に存在する水分子の動きである。目的酵素の触媒反応は加水分解反応であるので、水分子が重要な働きをする。特に研究代表者が注目してきた反応過程では、水分子が活性部位付近に近づくことが不可欠である。セリンプロテアーゼの 1 つであるキモトリプシンの理論化学的な研究では活性部位付近に存在する Arg61 の側鎖の-NH と水分子による水素結合ネットワークの存在が確認されている (M. Topf, GR. Richards,

*J. Am. Chem. Soc.*, 126, 14631-14641, 2004)。

同様に目的酵素についても活性部位付近で水分子による安定した水素結合ネットワークが存在し、水分子が基質分子にとっても近づきやすい環境にあるならば、このことが高い触媒能力を要因の 1 つであると考えられる。

## 2. 研究の目的

目的酵素に限らず多くの加水分解酵素にとって、活性部位付近に水分子が安定して存在することは重要である。本研究では目的酵素の活性部位付近に存在する水分子の動きを調べ、水分子が形成する水素結合ネットワークがどの程度安定して存在しえるのかを解析する。そのために、まず水分子の安定性

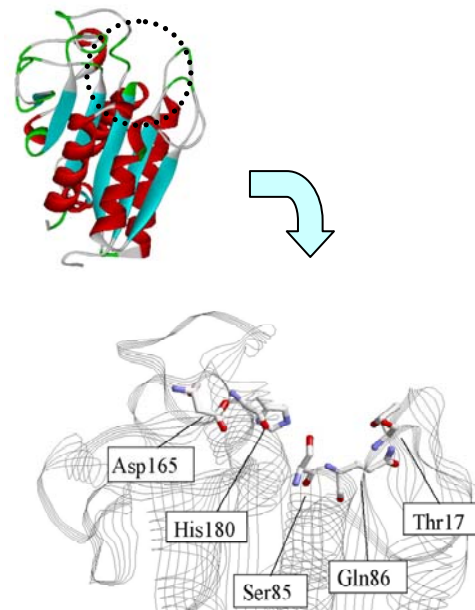


図2 X線結晶構造より得られた酵素 CLE(Cutinase-like enzyme)の立体構造 (上) と触媒反応に必要な 5 つのアミノ酸 (下)

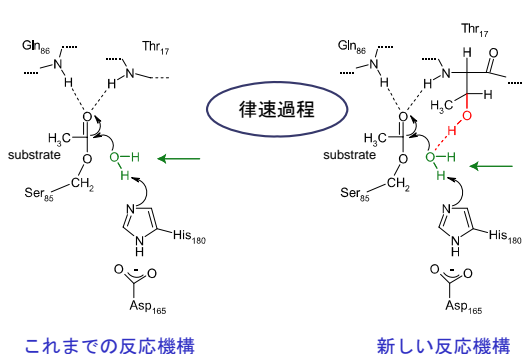


図3 研究代表者の提案した新しい反応機構

に寄与すると考えられるアミノ酸を決定する。X線結晶構造回折から得られた立体構造やこれまでの研究結果、及び水分子を取り入れた分子シミュレーションを新たにおこなうことで目的のアミノ酸を予測する。その後、水分子を多数含む大規模な分子シミュレーションをおこない、水分子の安定性を評価する。さらにこのアミノ酸や立体構造上近い位置にあるアミノ酸を他のアミノ酸に置換することで、より安定化する酵素の発現を目指す。

### 3. 研究の方法

(1) 本研究の目的は、活性部位付近に存在する水分子の働きを調べることにある。そこでまずは酵素のまわりに水分子を配置した大規模なシミュレーションをおこない、水分子の動きをとらえる。シミュレーションは、分子シミュレーションプログラムの1つである AMBER を利用し、NPT アンサンブルによる分子動力学法でおこなう。目的酵素には AMBER のタンパク質用の力場 (AMBER03) を用い、目的酵素のまわりに配置する水分子は TIP3P モデルを用い、約 17,000 配置した (図4)。基質分子には GAFF (general amber force field) の力場を用いる。ただし、基質分子に対して、膨大な原子数の重合体を扱うことは計算機的能力上不可能なので、乳酸分子2つが結合した分子 (PLA の2量体) を用いる。シミュレーション時間は、100ps の平衡化後、100ps の解析をおこなった。

(2) さらに上述の分子力場によるシミュレーションに加えて、研究代表者は量子化学計算を取り入れた大規模系のシミュレーションをおこなった。ただし、系全体について量子化学計算をおこなうには膨大な計算能力が必要となるので、触媒反応や解析対象にするアミノ酸周辺のみを高精度な量子化学計算を用い、それ以外は分子力場 (AMBER の力場) を用いる計算手法 (QM/MM 法) による解析をおこなった。量子化学計算をおこなうアミノ酸は、Ser85, His180, Asp165 の側鎖, Gln86 の主鎖, Thr17 全体である。さらにプ

ロトン受容体として Gly115 と Gly166 の-OH基, Tyr183 の側鎖を含めることでより高精度な計算とした。プログラムは Gaussian03 を用い、ONIOM 法を用いた。計算手法は B3LYP, 基底関数は 6-31G\*\* とし、分子力場部分は AMBER96 の力場と基質については GAFF の力場を用いた。

### 4. 研究成果

(1) 注目するアミノ酸が周囲の水分子及び基質に与える影響を調べる有効な手段として、アミノ酸置換によるシミュレーションがある。本研究では活性部位付近のアミノ酸を他のアミノ酸に置換したときの、その周囲に存在する水分子や置換したアミノ酸の動きを解析した。オリジナルの目的酵素と Thr17 を Ala に置換した酵素を用意し、それぞれ律速過程段階と考えられている基質と酵素が結合している状態を用意し、まわりに水分子を配置したシミュレーションをおこない、活性部位付近の水分子の様子を比較した。

その結果、基質のカルボニル酸素に水素結合するアミノ酸や水分子のシミュレーション時間に対する割合が、オリジナルの酵素では、Thr17 の主鎖の-NH が 33.5%, Gln86 の主鎖の-NH が 27.3%, その他水分子が 50%以上であった。それに対し Ala17 へアミノ酸置換した酵素は Ala17 の主鎖の-NH が 0.2%, その他水分子が 19%程度と明らかな差があった。また、加水分解反応上、必要となる His180 の N $\epsilon$ 2 と水素結合する水分子の数はオリジナルの酵素で 53.8%, Ala17 へアミノ酸置換した酵素は 49.7%であった。この結果より、Thr17 の側鎖によって活性部位中の基質の構造の安定性が増していると考えられる。

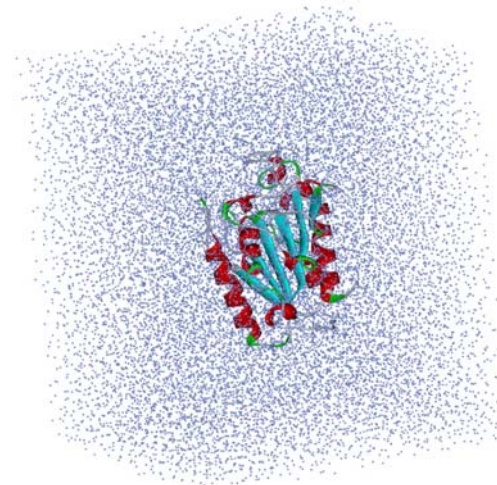


図4 シミュレーションで用いた酵素のまわりに水分子を配置した系

(2) 活性部位付近, 特に Thr17 の側鎖の影響を解析するために QM/MM 法による高精度な解析を試みた。解析は目的酵素の反応過程に沿って, すべての反応についておこなった。用いた分子モデルは, オリジナルの酵素 (モデル T), これに周囲の水分子である結合水を加えたモデル (モデル TW1 及びモデル TW2)。モデル TW1 では Thr17 の側鎖の水酸基 (-OH) は結合水と水素結合し, モデル TW2 は Thr17 の側鎖の-OH が基質のカルボニル酸素と水素結合している。さらに Thr17 を Ala17 に置換したモデル (モデル A) と結合水を加えたモデル (モデル AW) の合計 5 つの分子モデルを用いた (図 5)。これら 5 つのモデルに対し, すべての反応におけるポテンシャルエネルギーの変化を図 6 に示す。

以前提案した律速過程と予想される反応の新しい反応機構 (図 3) は, タンパク質全体の構造, すなわちまわりのアミノ酸配置を考慮した系では, 空間座標上, 安定して水素結合を作ることができないことが分かった。しかしながら, 結合水を加えることにより,

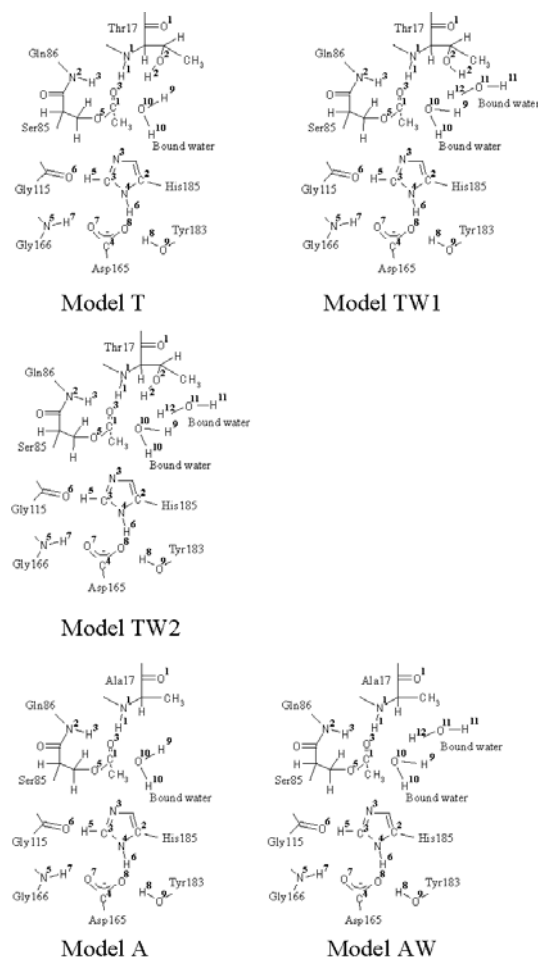


図 5 QM/MM 法による解析に用いた 5 つのモデル

Thr17 の側鎖の-OH と結合水, そして求核攻撃をする水分子との間で水素結合ネットワークを形成することができ, この結合により安定して反応が進むことが分かった (モデル TW1)。また Thr17 の側鎖の-OH が結合水と水素結合しない場合でも, 結合水があることでない場合よりも安定して反応が進むことが分かった (モデル AW 及びモデル TW2)。

モデル T では, Thr17 の側鎖の-OH は一連の反応過程において常に基質のカルボニル酸素と水素結合し, カルボニル酸素は合計 3 つの水素結合をもつことが分かった。この Thr 側鎖の水素結合を持たないモデル A と比較すると, ポテンシャルエネルギーは 5.2~7.4kcal/mol ほど安定となった。特に反応の中間状態である T-2 と T-5 では反応開始状態の T-1 と同等の安定性をもっている。

モデル TW1 では, モデル T とは異なり結合水が存在し, ポテンシャルエネルギーは前半の反応過程ではあまり変化がないが後半の反応過程では明らかに結合水によって低くなった。これは結合水の水素結合が反応を促進していることを示す。結合水によって求核攻撃する水分子の求核性が高められる。

モデル TW2 では, モデル TW1 同様結合水によって遷移状態 TS3 及び TS4 がより安定なる。加えて, Thr17 の側鎖の-OH が基質のカルボニル酸素と水素結合するために遷移状態 TS1 及び TS2 ではモデル TW1 と比較して 2.6~2.7kcal/mol 安定となった。

結果として, モデル TW2 の構造, すなわち Thr17 の側鎖の-OH が基質のカルボニル酸素と水素結合し, 結合水が基質と Thr17 の主鎖のカルボニル酸素との間で水素結合で結びついた構造の場合に最も安定に反応が進むことが示された。モデル TW2 では最もエネルギー障壁の高い反応は TW2-2→TW2-TS2→TW2-3 の基質の C-O 結合が切れるステップであり, 結果としてこのステップが律速過程であることが新たに示された。すなわちこれまで予測されてきた律速過程とは異なっていることが分かった。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

① Y. Sakae, T. Matsubara, M. Aida, H. Kondo, K. Masaki, H. Iefuji, ONIOM study of the mechanism of the enzymatic hydrolysis of biodegradable plastics, *Bulletin of the Chemical Society of Japan* **82**, 338-346 (2009) 査読有り

② J. Nakazawa, Y. Sakae, M. Aida, Y. Naruta, Kinetic investigations of the

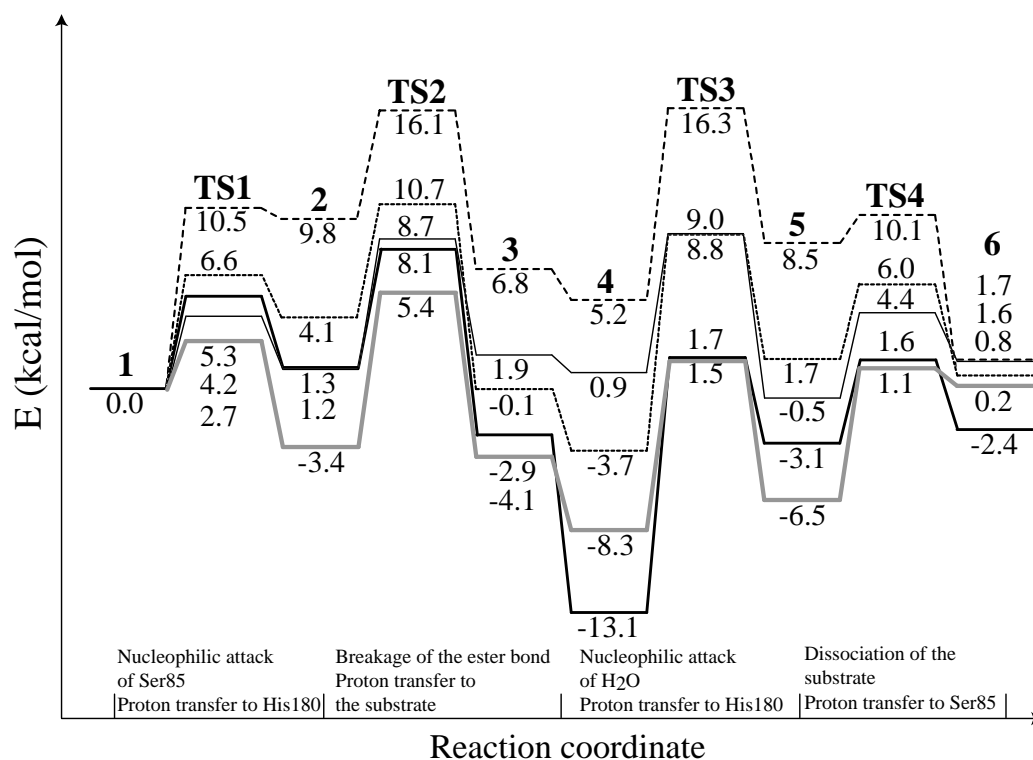


図6 5つのモデルの酵素反応過程におけるポテンシャルエネルギーの変化。実線はモデルT, 太線はモデルTW1, 灰色の太線はTW2, 破線はモデルA, 点線はモデルAWを示す。

process of encapsulation of small hydrocarbons into a cavitand-porphyrin, *Journal of Organic Chemistry* **72**, 9448-9455 (2007) 査読有り

[学会発表] (計 8件)

① 榮 慶丈, Comparison and optimization of backbone-torsion-energy parameters for protein systems, 「揺らぎと生体機能」第2回公開シンポジウム, 2009年3月16日, 岡崎

② 榮 慶丈, 2次元フーリエ級数による主鎖二面角のエネルギー項を用いたタンパク質系のシミュレーション, 日本生物物理学会第46回年会, 2008年12月4日, 福岡

③ Y. Sakae, Molecular simulations using a new torsion-energy term for protein systems, International Symposium on Frontiers of Computational Science 2008, 2008年11月28日, 名古屋

④ Y. Sakae, Development of the energy term of main-chain dihedral angles for protein systems, 「実在系の分子理論」第2回国際会議, 2008年8月4日, 岡崎

⑤ Y. Sakae, Molecular simulations using a backbone-torsion energy term by a double Fourier series, 1st International Conference of The Grand Challenge to Next Generation Integrated Nanoscience, 2008年6月7日, 東京

⑥ 榮 慶丈, CLE酵素による生分解性プラスチックの分解機構, 生物物理第45回年会, 2007年12月21日, 横浜

⑦ 榮 慶丈, 生分解性プラスチック分解酵素CLEの触媒機構, 第4回ナノ・バイオ・インフォ化学シンポジウム, 2007年12月1日, 広島

⑧ 榮 慶丈, Catalytic reaction of the cutinase-like enzyme that degrades the biodegradable plastics, CBI学会2007年大会, 2007年10月3日, 広島

[その他] (計 1件)  
(査読付国際会議論文)

① Y. Sakae, Y. Okamoto, Molecular simulations using a new torsion-energy term for protein systems, *Proceedings of*

*the International Symposium on Frontiers  
of Computational Science 2008*, Y. Kaneda,  
M. Sasai, K. Tachibana (eds.) 213-220  
(2008)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

榮 慶丈 (SAKAE YOSHITAKE)

名古屋大学・大学院理学研究科・研究員

研究者番号：20397988