

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21510102

研究課題名（和文） 新規バイオポリエステルのデザイン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 enzymes for design of novel biopolyesters

研究代表者

久野 玉雄 (HISANO TAMAO)

独立行政法人理化学研究所・城生体金属科学研究室・専任研究員

研究者番号：20312267

研究成果の概要（和文）：

バイオポリエステルの代表的な一つであるポリヒドロキシアルカン酸（PHA）は生分解性を有し、かつ微生物によって作られる重要なポリエステルである。本研究課題では新規な構造を持つPHAのデザイン・合成システム構築に向けて、PHA分解に関与する酵素の構造と機能について検討するため、マルチドメイン構造を持つPHA分解酵素を結晶化し、タイプ1触媒ドメインの結晶構造を初めて明らかにした。また、芳香族バイオマスを利用するPHA合成システム構築に向けて、フェニル酢酸分解系酵素の結晶構造解析を行った。

研究成果の概要（英文）：

Polyhydroxyalkanoate (PHA) is an important bacterial polyester that is degradable in environment. For establishment of a design and synthetic system of a novel PHA from aromatic components of biomass, crystal structures of PHA depolymerase and phenylacetic acid degradation protein PaaG were determined.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・環境技術・環境材料

キーワード：バイオポリエステル・生分解性・微生物酵素・結晶構造解析・構造と機能

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。

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、これらの中間代謝物を利用して、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結晶化を行った。得られた結晶の X 線回折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。また、得られた結晶を用いて白金誘導体を作成し、同じく SPring-8 においてデータ収集を行った。白金誘導体データを用いて白金の異常分散効果を利用した SAD 法により初期位相を得、モデル構築および構造精密化を行った。得られた分子モデルを用いて、native データに対して分子置換法により位相付けを行い、さらなるモデル構築、構造精密化を行った。

Pseudomonas aeruginosa 由来 R-ヒドラーゼ (東京工業大学大学院総合理工学研究科柘植准教授) の結晶化条件を検討した。本酵素は組み替え大腸菌を用いて発現させ、陰イオン交換クロマトグラフィーおよびゲル濾過クロマトグラフィーによって精製した。精製試料を用いて蒸気拡散法により結晶化を行った。

好熱菌由来 PaaG の結晶化を蒸気拡散法によって行った。得られた結晶の回折データを SPring-8 ビームライン BL44B2 において収集した。また、オスミウム誘導体およびセレンメチオニン置換体の結晶を作成し、同じくデータ収集した。オスミウムデータを SAD 法によって位相付けし、その位相を用いてセレンメチオニンデータからセレン原子のサイトを決定した。セレンの座標情報を用いてセレンメチオニンデータの位相を計算し、モデル構築した。さらに native データを用いて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分解酵素は PHA の一つである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。触媒ドメインは触媒セリン残基の一次構造上の位置により 2 つのタイプに分けられる。タイプ 1 の触媒ドメインを持つ *Ralstonia pickettii* T1 由来酵素 (Rp 酵素) の結晶化、X 線構造解析を行った。結晶は空間群 P2₁ に属し、格子定数 $a = 66.9 \text{ \AA}$, $b = 150.8 \text{ \AA}$, $c = 77.3 \text{ \AA}$, $\beta = 93.4^\circ$ であった。構造解析の結果、触媒ドメインのみの電子密度が得られ、319 残基から成る触媒ドメインの結晶構造を分解能 1.7 \AA において明らかにした。触媒ドメインは α/β hydroase fold と呼ばれる構造的特徴を持ち、Ser-166, Asp-241, His-300 が触媒部位を構成していた。基質結合に関与する残基、すなわち疎水性ポケット残基や基質のカルボニル酸素と相互作用する残基を推定し

た。疎水性ポケットは基質ポリエステルの側鎖と相互作用する領域であり、この酵素の基質特異性を規定していると考えられた。基質のカルボニル酸素と相互作用する部位は、この酵素の基質ポリエステルの主鎖に対する特異性を規定していると考えられた。これらの構造は、すでに立体構造を明らかにしているタイプ2の触媒ドメインを持つ *Penicillium funiculosum* 由来酵素 (Pf 酵素) と比べると、保存性は低い但類似性が高い (性質が似ている) 残基によって構成されていた。基質結合領域周辺の分子表面は Pf 酵素と異なり負の静電ポテンシャルを帯びていた。このことは、マルチドメイン酵素 (Rp 酵素) とシングルドメイン酵素 (Pf 酵素) では疎水性基質ポリマーとの相互作用様式に違いがあることを示唆している。両タイプの触媒ドメインの立体構造はN末端C末端の位置の違いはあるものの、構造的な特徴は非常によく似ていた。両者は互いに circular permutation の関係にあることが判り、進化的に関係があることが示唆された。PHA 分解酵素については、研究代表者らはこれまでにシングルドメイン構造を持つ分解酵素の結晶化、構造解析に世界に先駆けて成功していたが、分解酵素として一般的なマルチドメイン構造を持つ分解酵素についてはまだ結晶化・構造解析に成功していなかった。本成果によりマルチドメイン酵素の結晶化に成功した。しかし、構造解析できたのは触媒ドメイン領域のみであった。今後さらに結晶化条件を検討して、酵素全長の構造解析を行う。全長の構造解析によって、分解酵素のポリマーに対する相互作用および分解様式が詳細に明らかになると期待される。

R-ヒドラーターゼはモノマー供給酵素の一つであり、脂肪酸分解経路の中間代謝物である2-エノイル-CoA に作用して PHA 合成酵素の基質である R-3-ヒドロキシシアシル-CoA を生成する。 *Pseudomonas aeruginosa* 由来 R-ヒドラーターゼの結晶化に成功した。得られた結晶は空間群 $P2_12_12_1$ に属し、格子定数 $a = 61.9 \text{ \AA}$, $b = 67.9 \text{ \AA}$, $c = 81.6 \text{ \AA}$ であった。構造解析を分子置換法により行っている。研究代表者らはこれまでに世界に先駆け、生合成におけるモノマー供給酵素である *Aeromonas caviae* 由来 R-ヒドラーターゼの結晶構造解析に成功している。さらにこの酵素の基質特異性の改変を行い、ポリマー合成への応用を検討してきた。これはバイオポリエステル生合成系酵素として、原子構造が明らかにされ、また理論的機能改変を行ってバイオポリエステルの生合成に利用した初めての成果である。今後、 *Pseudomonas aeruginosa* 由来 R-ヒドラーターゼの結晶構造を明らかにすることにより、R-ヒドラーターゼの基質特異性のバリエーション

の構造的要因をより詳細に検討し、基質特異性変換を精密に制御できるようにする。

PHA 合成の炭素源としてフェニル酢酸に着目し、フェニル酢酸分解系酵素の結晶化、構造解析を進めている。フェニル酢酸分解系酵素のうち、PaaG はエポキシ化されたフェニルアセチル-CoA から oxepin-CoA への異性化に関与する興味深い酵素である。また、この酵素はその下流代謝ステップの β 酸化様分解にも関与する。PaaG の結晶構造を分解能 1.85 \AA において明らかにし、構造に基づき酵素の反応機構を提唱した。PaaG の結晶は空間群 $P2_12_12_1$ に属し、格子定数 $a = 74.5 \text{ \AA}$, $b = 139.4 \text{ \AA}$, $c = 156.2 \text{ \AA}$ であった。構造解析の結果、PaaG は3量体を形成し、各サブユニットがリング状に会合していることがわかった。サブユニットの構造的な特徴はクロトナーゼ・スーパーファミリーに見られるスパイラル構造であった。活性部位と推定される部位には保存された極性残基 Asp136 が存在していた。基質が結合すると推定される領域は環状化合物が結合することができる十分広い空間を持っていた。結晶の非対称単位中に含まれる6本のポリペプチド鎖の構造を比較したところ、基質結合領域に隣接する kink したヘリックスのコンフォメーションに違いがあることが判り、酵素反応過程で構造変化が起こることが示唆された。触媒残基の位置について、クロトナーゼ・スーパーファミリーにおけるいくつかの機能の異なる酵素との比較から、Asp136 の開環反応における役割を推定し、触媒反応機構を提唱した。バイオマスには芳香族化合物が多く含まれており、バイオマスから PHA を作るシステムの構築には芳香族化合物の分解作用の解明が必要である。フェニル酢酸分解の全容は最近明らかにされたが、本成果はフェニル酢酸分解の詳細な機構を明らかにする基礎となる。今後は本酵素の基質複合体構造の解析や分解経路の他の酵素の構造解析を進めていく。

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1件)

Tomoyasu Kichise, Tamao Hisano, Kazuki Takeda, Kunio Miki "Crystal structure of phenylacetic acid degradation protein PaaG from *Thermus thermophilus* HB8" *PROTEINS: Structure, Function, and Bioinformatics* **76**, 779-786 (2009) 査読あり

〔学会発表〕（計4件）

① Tamao Hisano “Crystal structures of catalytic domains of bacterial and fungal PHB depolymerases” *The 3rd International Conference on Bio-based Polymers* October 21, 2011 (Beijing)

② Tamao Hisano, Mari Shiraki, Yoshitsugu Shiro, Kunio Miki, Terumi Saito “Crystal Structure of the Catalytic Domain of Multidomain PHB Depolymerase” *XXII Congress and General Assembly of the International Union of Crystallography* August, 27-28, 2011 (Madrid)

③ 吉瀬智康、久野玉雄、竹田一旗、三木邦夫
「フェニル酢酸分解に関与する酵素 PaaG の結晶構造」 第23回日本放射光学会年会・放射光科学合同シンポジウム、2010年1月8日（姫路）

④ 吉瀬智康、久野玉雄、竹田一旗、三木邦夫
「フェニル酢酸分解系酵素 PaaG の結晶構造」 日本結晶学会2009年度年会、2009年12月5-6日（西宮）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久野 玉雄 (HISANO TAMAO)

独立行政法人理化学研究所・城生体金属科学研究室・専任研究員

研究者番号：20312267

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし