

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：24506

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2013

課題番号：22360350

研究課題名(和文) ナイロンオリゴマー分解酵素(Ny1ABC)の分子設計と物質生産への応用

研究課題名(英文) Molecular design of nylon oligomer degradation enzyme and its application to bioproduction

研究代表者

根来 誠司(Negoro, Seiji)

兵庫県立大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：90156159

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,900,000円、(間接経費) 4,470,000円

研究成果の概要(和文)：ナイロン分解酵素Ny1CはAsn266-Thr267間で分断され、活性型酵素へ変換される。自己分断部位への変異導入で、前駆体として得られる変異体を構築した。その立体構造解析から自己分断の分子機構モデルを提案した。また、同酵素はテトラマー構造をとるが、耐熱性に影響を与える変異の大半が、各モノマー分子の接触界面に位置する。特に122位の置換は耐熱性に大きく影響するため、同部位に着目した変異体を構築した。構造解析の結果、熱安定性の高い変異体では、隣接モノマーとの距離が近接しており、より強い分子間相互作用が働いていることが分かった。さらに、親型酵素から耐熱性が36℃上昇した変異酵素の取得にも成功した。

研究成果の概要(英文)：Nylon hydrolase is a member of the N-terminal nucleophile hydrolase superfamily that is responsible for the degradation of nylon-6. X-ray crystallographic analysis revealed that the enzyme constitute four identical heterodimers, which resulted from the autoprocessing of the precursor protein (36 kDa). The catalytic residue of Ny1C was identified as the N-terminal Thr-267 of the 9-kDa subunit. Amino acid mutations at subunit interfaces of the tetramer were observed to drastically alter the thermostability of the protein. In particular, four mutations (D122G/H130Y/D36A/E263Q) of wild-type Ny1C enhanced the protein thermostability by 36 °C.

研究分野：プロセス工学

科研費の分科・細目：生物機能・バイオプロセス

キーワード：ナイロン 結晶構造解析 耐熱性 生分解 加水分解

1. 研究開始当初の背景

ナイロンは、強靱で、耐熱性、耐薬品性に優れている。そのため、繊維・プラスチックとして広く利用されており、合成ポリアミド全体の約90%を占めるが、生物分解を殆ど受けない素材である。強靱性と柔軟性とを併せ持ったナイロン固有の特性は、各ポリマー分子鎖が規則正しく並び水素結合により安定化した結晶性領域と、不規則な非晶領域とが、適切に混在しているためである。我々は、これまで、ナイロン工場排水などを分離源として、6アミノカプロン酸(Ahx)オリゴマーを加水分解する約10種類の微生物を取得した。何れも、同基質を唯一の炭素源・窒素源とした培地で増殖する。代表的な分解性微生物について生化学的検討を行った結果、分解様式の異なる3種の酵素、Ny1A(環状2量体分解酵素)、Ny1B(エキソ型オリゴマー分解酵素)、Ny1C(エンド型オリゴマー分解酵素)を見いだした。特に、Ny1Cはポリマー鎖内部のアミド結合を加水分解することから、ポリアミド酵素変換への産業応用が期待できる。そこで、本課題では、立体構造を基盤とした同酵素の耐熱化機構についての基盤研究を実施した。

2. 研究の目的

Ahxオリゴマーをエンド型様式で分解する酵素Ny1Cは、これまで、*Arthrobacter* (pOAD2保持株)、*Agromyces*、*Kocuria*属細菌に見出されている(各々、Ny1C_{p2}、Ny1C_A、Ny1C_Kと命名)。これら3種のNy1Cは、アミノ酸残基が5~15カ所で異なり、熱安定性も8~15°C異なる。3酵素のアミノ酸配列の違いを基に、Ny1C_{p2}($T_m = 52$)に、Ny1C_AおよびNy1C_K型のアミノ酸置換を行い熱安定性の変化を確認した結果、4アミノ酸置換(D36A/D122G/H130Y/E263Q)によって、耐熱性が36上昇した変異体(Ny1C-GYAQ)の取得に成功した($T_m = 88$)。本研究では、Ny1C酵素の耐熱化、および自己分断機構について解析する。さらに、得られた知見を基盤として、合成ポリアミドの酵素変換への応用の可能性について検討した。

3. 研究の方法

(1) 酵素の耐熱化機構

Ny1Cの熱安定性は、サブユニット界面に位置するアミノ酸置換により47の範囲で変化する。Ny1CのモノマーAとモノマーBの122位は、いずれも隣接サブユニット界面に位置するが、耐熱性に大きく影響することから、この部位に着目した種々の変異体を調製後、変異体の熱安定性をCD測定から検討する。また、同酵素を結晶化し、結晶構造解析を実施する。溶液状態でのサブユニット間相互作用は、超遠心分析から明らかにする。

(2) 自己分断機構

Ny1Cは不活性な前駆体として、発現し、そ

の後、Asn266-Thr267間で切断されることで活性化酵素を生じるという特徴を有する(図1)。Asn266/Thr267をAla266/Ala267へ置換した酵素では、自己プロセシング能を欠失する。そこで、前駆体を精製し、X線結晶構造解析を行う。さらに、前駆体構造と成熟型酵素の原子座標データを初期値として用いて、分子動力学的手法でポリペプチド鎖安定化のシミュレーションを行う。また、自己分断部位に変異を有するその他の変異酵素についても、同様に結晶化し、自己分断による構造変化を明らかにし、自己分断機構を解明する。

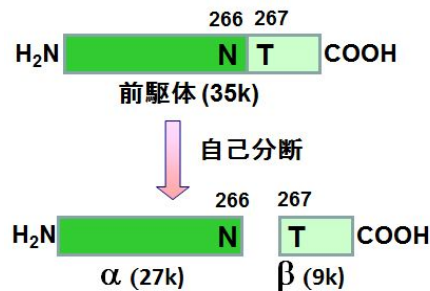


図1. Ny1C前駆体の自己分断による活性化

4. 研究成果

(1) Ny1Cの特徴と立体構造

立体構造解析から、Ny1Cは鎖と鎖がヘテロ2量体を形成し、4本の α ヘリックスが2枚の β シートを挟んだ $\alpha\beta\beta\alpha$ サンドイッチフォールドをとることが明らかとなった。この構造は、D-アミノペプチダーゼ(PDB ID: 1B65)、 β -ペプチジルアミノペプチダーゼ(PDB ID: 3N51)などの他のN-tnファミリー酵素のフォールドと類似している。さらに、ネイティブ酵素では、4分子のヘテロ2量体が会合してドーナツ型分子構造を形成する(図2)。

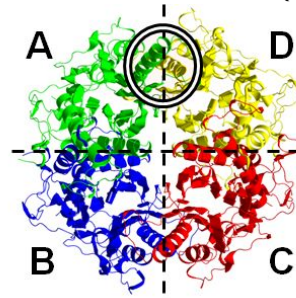


図2. Ny1Cの4次構造

(2) 自己分断の分子機構

活性型Ny1Cと前駆体の立体構造、およびファミリー酵素の知見から、Ny1Cの自己分断機構を以下の通り推定した(図3)。

前駆体のThr267-OHが、Asn266/Thr267間のカルボニル炭素を求核攻撃し、四面体中間体を生成する。

四面体中間体は、N-Oアシルシフトにより、エステル中間体に変換される。

エステル中間体は、近接水分子により加水分解される。分断で生じた鎖のN末端

残基 (Thr267) が、基質分解における触媒基となる。

鎖の C 末端領域は、構造変化により、分断部位とは離れた位置に移動する。Pro260 と Asn266 の間のループ領域の電子密度は観察されないが、Pro260 は Thr267 から 32.6 離れている。

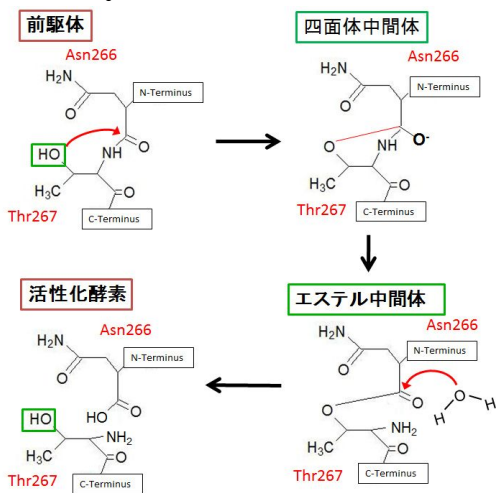


図 3 . Nylic の自己分断機構モデル

(3) 耐熱化酵素の取得と安定化機構

Nylic_A のアミノ酸配列は、Nylic_{p2} の配列と 5 カ所で異なり、Nylic_K では、共通する 5 カ所以外に、さらに 10 カ所で異なっている。Nylic_A と Nylic_K の熱安定性は Nylic_{p2} よりも、各々、8 ~ 15°C 高い。一方、触媒効率 (k_{cat}/K_m) は、何れも Nylic_{p2} よりも 13 倍高く、好アルカリ性細菌由来の Nylic は、耐熱性・活性ともに、Nylic_{p2} よりも優れている。

Nylic_{p2} に、Nylic_A 型・Nylic_K 型のアミノ酸置換を行い、熱安定性の加算効果について検討した。Nylic_{p2} と Nylic_A 間で異なっている 5 アミノ酸置換のうち、D122G, H130Y, V225M は熱安定性に対してプラスに、G111S, L137A はマイナスに作用することがわかる。また、Nylic_A と Nylic_K 間で異なっている 10 置換のうち、サブユニット界面に位置する E263Q, D36A に着目し、D122G/H130Y 二重変異酵素 ($G^{122Y130}$) ($T_m = 81$) に導入したところ、 T_m 値が 88 まで上昇し、熱安定性が最も高い変異酵素 ($G^{122Y130A36Q263}$) を得ることができた。さらに、マイナスに作用する変異効果を含めると、5 アミノ酸置換で、47 の温度範囲で熱安定性が変化した (図 4)。

アミノ酸置換の立体構造上の位置から耐熱化機構を推定すると次のようになる。

1 2 2 位: Nylic テトラマーは、D2 対称をとることから、A 鎖の 122 位近傍では、塩基性アミノ酸の Lys159-NH₃⁺ (A 鎖) と酸性アミノ酸の Glu115-COO⁻ (D 鎖) とが近接しているため (2.79 Å)、両残基は静電的に安定化して

いる。Nylic_A では、122 位が Gly であるが、親型 Nylic_{p2} では、Gly122 が Asp に置換されているため、Asp122 (A 鎖) と Glu115 (D 鎖) との間で静電的反発を生じ、不安定化することが予想される。すなわち、親型 Nylic_{p2} への D122G 置換は、安定性を上昇させる。

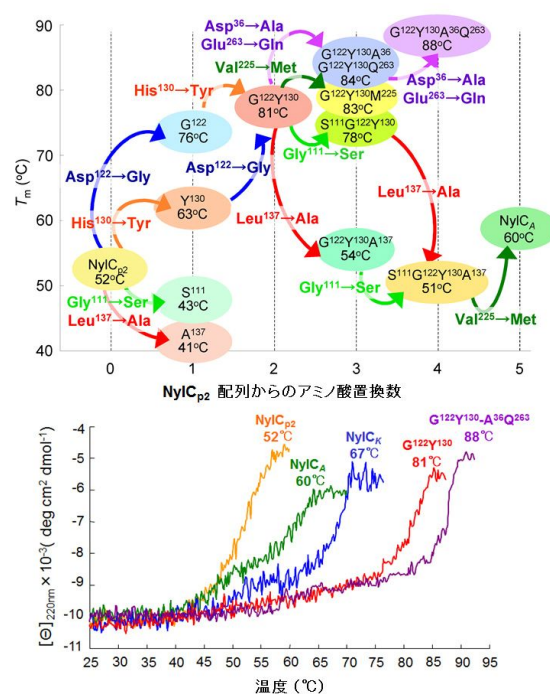


図 4 . アミノ酸置換による Nylic の耐熱性の変化

1 3 0 位: Tyr130-O_η (A 鎖) は、ヘリックス H4 末端の Glu126-O_ε と水素結合を形成し、ループを安定化する。一方、Nylic_{p2} では、Tyr130 が His に置換されているため 130 位での水素結合が失われ、ループ領域が不安定化すると推定できる。従って、親型 Nylic_{p2} への H130Y 置換は、Nylic_{p2} の耐熱性を上昇させる。

1 3 7 位: 137 位は、H130Y 変異により安定化するループの他端に存在する。G¹²²Y¹³⁰、S¹¹¹G¹²²Y¹³⁰ 変異酵素への L137A 置換は、何れも、耐熱性を 27 低下させる。従って、Leu137 では、疎水的相互作用により同ループが安定化しているが、側鎖の小さい Ala137 置換体では、疎水的相互作用による安定化効果が低下すると推定できる。

1 1 1 位: Nylic_A では、親水性残基の Ser111-O_γ (A 鎖) が、隣接する D 鎖の 3 個の疎水性残基 (Tyr98, Ala137 (Nylic_{p2} では Leu137), Leu139) と同一サブユニットの Tyr112 (A 鎖) に囲まれており、不安定化している。Nylic_{p2}、G¹²²Y¹³⁰、G¹²²Y¹³⁰A¹³⁷ 変異体では、111 位が Gly であるため、Ser111 に比べて A/D 界面における安定性が高い。従って、G111S 置換は、親型酵素の安定性を低下させる。

3 6 位: Asp36 (D 鎖) は、隣接サブユニット (A 鎖) の Glu126 に近接している (4.40 Å)。一方、3 種の野生型 Nylic の中で、耐熱性

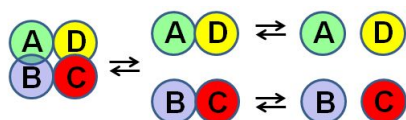
が最も高い NyIC_K では、Asp36(NyIC_{p2}, NyIC_A) が Ala に置換されている。すなわち、D36A 変異は、Asp36 (D 鎖) と Glu126 (A 鎖) との静電的反発を低減化させると推定できる。実際、G¹²²Y¹³⁰、G¹²²Y¹³⁰Q²⁶³ 変異体への D36A 置換は、耐熱性を上昇させる。

225 位: Met225 (A 鎖) は、隣接サブユニットとの直接の接触はないが、Met225 に近接する Gln299 (A 鎖) は、Arg296-N_{η2} (B 鎖) と接触する (3.01 Å)。さらに、Gln299 は His245-N_{ε2} (2.81 Å) と近接している。従って、225 位におけるアミノ酸置換は、間接的に、A/B 界面の相互作用に影響を与えると推定できる。実際、G¹²²Y¹³⁰、S¹¹¹G¹²²Y¹³⁰A¹³⁷ 変異体への V225M 変異は、両酵素の耐熱性を上昇させる。

以上の結果から、A/B 界面、A/D 界面におけるサブユニット間相互作用は、タンパク質の構造安定性と密接に関連していると結論した。

(4) サブユニット会合と安定性との関連性

本酵素のオリゴマー状態を調べるため、親型・変異酵素の分子量について、超遠心分析 (沈降平衡法) により検討した。その結果、平均分子量は、NyIC_{p2} (T_m=52) では、ダイマーとテトラマーの中間値 (90,000) であるが、A¹³⁷ 変異酵素 (T_m=41) では、モノマーとダイマーの中間値 (60,000)、NyIC_A (T_m=60)、NyIC_K (T_m=67)、G¹²²Y¹³⁰A³⁶Q²⁶³ 変異体 (T_m=88) では、テトラマーに相当する分子量 (150,000) を示し、サブユニットの会合状態が変化することが分かった (図 5)。



テトラマー ダイマー モノマー

図 5 . NyIC サブユニット会合の動的平衡

個々のアミノ酸残基について、耐熱性への寄与を解析するため、サブユニット A/D の接触界面に位置し、単独置換による効果の最も高い 122 位に着目した。部位特異的変異により、NyIC_{p2} の Asp122 を Arg、Val、Lys へ置換した変異酵素を調製した。X 線結晶構造解析を行ったところ、122 位を含む Helix4 周りの距離が短いほど、耐熱性が上昇することが示された (図 6)。

また、各サブユニットは、D2 対称の関係にあるにも関わらず、122 位周辺で対称性が部分的に崩れており、このような特徴がサブユニット会合、および、熱安定性に影響を与える可能性が示唆された。また、122 位の近傍には 127-135 位間でループ構造があり、この領域は野生型 NyIC_{p2} では不安定であるが、122

位への Gly、Val、Lys 及び Arg 変異によって安定化し、隣り合うモノマーの 30 位を含む領域と新たに相互作用することが示された。130 位への Tyr 変異によってもこのループ領域が安定化し、熱安定性が上がっていることから、127-135 位間ループの安定化が、耐熱

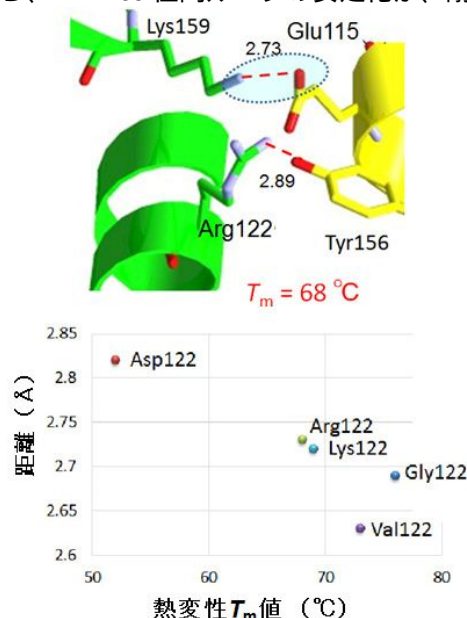


図 6 . サブユニット界面における相互作用 122 位の変異酵素における Lys159 (A 鎖) - Glu115(D 鎖)間の距離と耐熱性の関係

性に寄与することが分かった。A/B 界面の相互作用の強化を、225 位への変異で検討したところ、親型が野生型 NyIC_{p2} では発現せず、A/D 界面相互作用が強い G¹²²Y¹³⁰ を親型にすると発現した。299 位でも同様の結果が得られ、A/B 界面の相互作用強化は NyIC において大きな影響となって現れ、A/D 界面の相互作用力とのバランスをとることが重要であると結論し、NyIC のサブユニット会合のモデルを提案した。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 8 件)

1. 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.* 査読有 (in press) (2014)
2. 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.*, 査読有, **5**, 1210-1216 (2014). doi.org/10.1021/jz500323y

3. Nagai, K., Yasuhira, K., Tanaka, Y., Kato, D., Takeo, M., Higuchi, Y., Negoro, S., & Shibata N. Crystallization and X-ray diffraction analysis of nylon hydrolase (NylC) from *Arthrobacter* sp. K172 *Acta Cryst.*, 査読有、**F69**, 1151-1154 (2013)
doi: 10.1107/S1744309113024263
4. Negoro, S., Shibata, N., Tanaka, Y., Yasuhira, K., Shibata, H., Hashimoto, H., Lee, Y.-H., Oshima, S., Santa, R., Oshima, S., Mochiji, K., Goto, Y., Ikegami, T., Nagai, K., Kato, D., Takeo, M., & Higuchi, Y. Three-dimensional structure of nylon hydrolase and mechanism of nylon-6 hydrolysis. *J. Biol. Chem.*, 査読有、**287**, 5079-5090, (2012).
doi: 10.1074/jbc.M111.321992
5. Yasuhira, K., Shibata, N., Tanaka, Y., Kumagai, N., Tanaka, Y., Nagai, K., Kato, D., Takeo, M., Negoro, S., Higuchi, Y. Crystallization and X-ray diffraction analysis of nylon oligomer hydrolase (NylC) from *Agromyces* sp. KY5R. *Acta Cryst.* 査読有、**F67**, 892-895 (2011).
doi: 10.1107/S1744309111022858
6. Baba, T., Kamiya K., Matsui, T., Shibata, N., Higuchi, Y., Kobayashi, T., Negoro, S., & Shigeta Y. Molecular dynamics studies on the mutational structures of a nylon-6 byproduct-degrading enzyme. *Chem. Phys. Lett.* 査読有、**507**, 157-161 (2011).
doi.org/10.1016/j.cpllett.2011.03.046
7. 加藤太一郎、武尾正弘、根来誠司「高分子ナイロンを加水分解する酵素(NylC)の発見」(総説) 生物工学会誌、査読有、92巻特集(掲載決定)(2014年8月)
8. 根来誠司、永井圭介、大島 祥平、飯田一希、加藤太一郎、武尾正弘、持地広造、柴田直樹、樋口芳樹「立体構造を基盤としたナイロン加水分解酵素の開発と耐熱化機構」(総説) 酵素工学ニュース 査読有、69号 pp.12-18 (2013年4月)

[学会発表](計20件)

1. 根来誠司「ナイロン加水分解酵素の分子設計と生分解性ポリアミド開発への展望」(シンポジウム)(招待講演)2013年度日本農芸化学会大会、2013年3月28日、東北大学・川内キャンパス
2. 衣笠 凌、永井圭介、三田隆二、篠田昌宜、柴田 直樹、樋口芳樹、李 映昊、後藤祐児、加藤太一郎、武尾正弘、根来誠司「高

解像度 X 線結晶構造解析を基盤としたナイロン加水分解酵素(NylC)の耐熱化機構の解明」第65回日本生物工学会大会、2013年9月19日、広島国際会議場

3. 永井圭介、大島祥平、柴田直樹、樋口芳樹、馬場 剛史、重田育照、加藤太一郎、武尾正弘、根来誠司「分子動力学シミュレーションによるナイロン加水分解酵素(NylC)の自己分断機構の解析」第65回日本生物工学会大会、2013年9月19日、広島国際会議場

他17件

[その他]

ホームページ等

<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

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

(3) 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

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

後藤 祐児 (GOTO, YUJI)

大阪大学・蛋白質研究所・教授
研究者番号：40153770

池上 貴久 (IKEGAMI, TAKAHISA)

大阪大学・蛋白質研究所・准教授
研究者番号：20283939

重田 育照 (SHIGETA, YASUTERU)

筑波大学・数理物質科学研究科・教授
研究者番号：80376483

神谷 克政 (KAMIYA, KATSUMASA)

神奈川工科大学・准教授
研究者番号：60436243