

ナイロンオリゴマー分解酵素の産業利用を目指した構造基盤解析 Structural insight into nylon-oligomer degrading enzymes for industrial use

柴田直樹*, 樋口芳樹

兵庫県立大学大学院生命理学研究科, 〒678-1297 兵庫県赤穂郡上郡町光都 3-2-1

Naoki Shibata and Yoshiki Higuchi

Graduate School of Life Science, University of Hyogo, 3-2-1 Koto, Kamigori, Ako-gun, Hyogo 678-1297, Japan

1 はじめに

ナイロンは、強靱で、耐熱性、耐薬品性に優れ、繊維・プラスチックとして広く利用されているが、分解されにくいいため環境への負荷が大きいのが問題である。ナイロンはこれまで、酵素作用を殆ど受けないと考えられてきた。しかし、兵庫県立大学工学研究科の根来教授は、NylB が 6 ナイロンダイマー、NylC はより重合度の高い 6 ナイロンオリゴマーを分解することを発見し、本申請者らと両酵素の構造化学的・生化学的研究を展開してきた。根来教授は、NylC の耐熱性を大幅に上昇させることに成功し、同耐熱化酵素が 60 °C の酵素反応でポリマーの 6 ナイロンに作用することを確認した。ナイロンポリマーの分解は高温の方が有利であるため、高耐熱性は産業応用には重要なポイントとなる。産業面での応用として、1. 市販の 6 ナイロン、66 ナイロンなどのポリアミドの表面加工、2. ナイロン繊維の効果的な洗浄、3. 同酵素の分解性を指標とした生分解性ナイロン開発ツールとしての用途 4. ナイロンの酵素的ケミカルリサイクルへの応用が想定できる。このうち 3, 4 については同酵素が効率的に分解できる新規ナイロン樹脂を原材料から開発することを意味する。

本研究では NylB, NylC 両酵素の 1 Å 分解能に迫る高分解能 X 線結晶解析による構造を基盤として、計算化学による分子設計からより高性能の酵素を創出し、将来的に合成ポリアミドの酵素変換を可能にする革新的なバイオシステムの構築を目指している [1-6]。具体的には、66 ナイロンダイマーに対して分解活性を獲得することが最近明らかになった NylB G181D/H266N/G316I/D370V 変異体（実際には活性残基 S122 のアラニン置換不活性変異体を用いる）と 66 ナイロンダイマーとの複合体を解析し、NylB が 66 ナイロンダイマーに対して分解活性を発揮するための分子基盤を明らかにし、より高い分解活性を有する変異体を創成することを目指す。一方、NylC は野生型の変性温度が 52 °C であるが、これに比べ顕著に高い耐熱性を獲得した以下の変異体について高分解能での解析を行い、高精度の立体構造から高耐熱性獲得のための酵素改変の指針を得ることを目的とする。

D122K 変異体

D122R 変異体

D122G/H130Y 変異体

2 実験

これまでに試料精製と結晶調製を行った試料の内、NylB G181D/H266N/G316I/D370V 変異体と 66 ナイロンダイマーとの複合体結晶及び NylC D122K 変異体結晶の回折強度データ測定は PhotonFactory BL-17A にて行った。他の変異体については他の放射光施設において測定を行った。

NylB A112/G181D/H266N/G316I/D370V 変異体/66 ナイロンダイマーの構造解析は野生型酵素[1]をテンプレートとして分子置換法によって構造解析を行った。精密化にはプログラム CNS を用いた。

3 結果および考察

表 1 及び表 2 に回折強度データ測定の結果を示す。

表 1: 回折強度データ測定結果
(NylB G181D/H266N/G316I/D370V 変異体)

	NylB A112/G181D/H266N/G316I/ D370V 変異体/66 ナイロン ダイマー
Beamline	Photon Factory, BL-17A
Wavelength (Å)	1.0000
Space group	<i>P</i> 3 ₂ 1
Unit cell parameters (Å)	<i>a</i> = <i>b</i> = 96.70, <i>c</i> = 112.36
Resolution (outer shell) (Å)	83.75-1.20 (1.22-1.20)
No. of observations	1869571
No. of unique reflections	189142 (9373)
Completeness (%)	99.9 (100.0)
<i>R</i> _{merge}	0.076 (0.832)
Multiplicity	9.9 (5.9)
$\langle I/\sigma(I) \rangle$	33.4 (1.97)

表 2: 回折強度データ測定結果 (NylC D122K 変異体)

NylC D122K 変異体	
Beamline	Photon Factory, BL-17A
Wavelength (Å)	1.0000
Space group	C22 ₁
Unit cell parameters (Å)	$a=70.82, b=145.06, c=128.74$
Resolution (outer shell) (Å)	83.75-1.39 (1.44-1.39)
No. of observations	2162418
No. of unique reflections	262443 (13188)
Completeness (%)	98.8 (100.0)
R_{merge}	0.160 (0.946)
Multiplicity	8.2 (8.0)
$\langle I/\sigma(I) \rangle$	11.3 (3.50)

NylB G181D/H266N/G316I/D370V 変異体 (基質フリー) 及び A112/G181D/H266N/G316I/D370V 変異体/66 ナイロンダイマーの活性部位の構造を図 1 に示す。66 ナイロンダイマーとの複合体の構造では、活性部位には 66 ナイロンダイマーの電子密度がはっきりと確認出来た。両者の構造を比較すると、66 ナイロンダイマーの結合により、特に Y170 及び Y370 の 2 つのアミノ酸残基が大きく構造変化することで、66 ナイロンダイマーの結合に寄与していることが明らかになった。Y170 はフレキシブルなループ上に存在し、野生型酵素でも基質が結合する際に大きく構造変化することが報告されている[1]。今回、66 ナイロンダイマーの場合でも同様の構造変化が確認された。得られた構造を基に、野生型酵素ではほとんど活性を示さない 66 ナイロンダイマーの分解反応が G181D/H266N/G316I/D370V 変異体では起こるのかそのメカニズムについて考察を行っている。

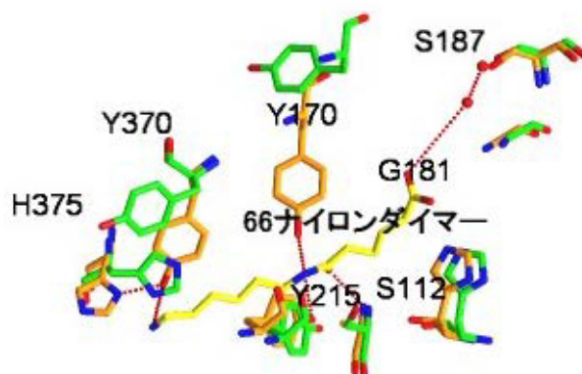


図 1 : NylB A112/G181D/H266N/G316I/D370V 変異体/66 ナイロンダイマーの構造

一方、NylC D122K 変異体については野生型酵素 [4-6] をテンプレートとして分子置換法により構造解析を行った。現在構造精密化中である。構造精密化が完了すれば、点変異による耐熱性獲得の分子機構について考察し、更なる耐熱性向上のための戦略を構築することを目指す。

謝辞

X 線回折強度データ測定の際には PhotonFactory 構造生物学ビームラインのスタッフの皆様には大変お世話になりました。この場を借りてお礼申し上げます。

参考文献

- [1] S. Negoro *et al.*, *J. Biol. Chem.* **280**, 39644 (2005).
- [2] T. Ohki *et al.*, *Protein Sci.* **18**, 1662 (2009).
- [3] S. Negoro *et al.*, *J. Mol. Biol.* **370**, 142 (2007).
- [4] S. Negoro *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **287**, 5079 (2012).
- [5] K. Yasuhira *et al.*, *Acta Cryst.* **F67**, 892 (2011).
- [6] K. Nagai *et al.*, *Acta Cryst.* **F69**, 1151 (2013).

* shibach@sci.u-hyogo.ac.jp