

パラベンを分解する酵素の構造機能解析 Characterization of a paraben degrading enzyme

竹野谷美穂子, 平塚孔章, 伊藤晋作, 佐々木康幸, 矢嶋俊介*

東京農業大学生命科学部バイオサイエンス学科

〒156-8502 東京都世田谷区桜丘 1-1-1

Mihoko TAKENOYA, Yoshiaki HIRATSUKA, Shinsaku ITO, Yasuyuki SASAKI and Shunsuke YAJIMA*

Department of Bioscience, Faculty of Life Sciences,

Tokyo University of Agriculture,

1-1-1 Sakuragaoka, Setagaya-ku, Tokyo 156-8502, Japan

1 はじめに

非天然のヒドラジド化合物である 4-hydroxybenzoic acid 1-phenylethylidene hydrazide (HBPH) を唯一の炭素源として生育可能な細菌として *Microbacterium hydrocarbonoxydans* が単離された。これはこの菌が有する hydrazidase が HBPH を 4-hydroxybenzoic acid (4-HBA) と acetophenone hydrazone に分解することで、4-HBA が菌体内で代謝され達成されることが示されている[1]。Hydrazidase は amidase superfamily に分類される。また、当該菌の全ゲノム配列解析の結果から、hydrazidase は転写因子の下流に位置し、さらに ABC トランスポーター遺伝子を含むオペロン中に存在していることが分かっている。以前の hydrazidase の立体構造解析の結果からは、活性部位付近に位置するヒスチジン残基が水分子を介してヒドラジド化合物との結合に関与し、基質特異性に重要な役割を果たしていることを明らかにしている[2]。さらに、データベース検索から、そのヒスチジン残基の保存性も含め、複数の放線菌がこのオペロンと相同性を有するオペロンを有していることが分かっている。

このようにこのオペロンが放線菌において生理的な意義を有すると考えられる一方、hydrazidase の基質であるヒドラジド化合物は非天然化合物であり、天然の基質は不明であった。Hydrazidase と合成基質との複合体構造から、基質に必要な部分構造として 4-hydroxyphenyl 基が必要と予想され、それをもとにデータベースで検索をかけたところ、パラベン類が候補化合物として考えられた。そこで *M. hydrocarbonoxydans* に加え、同オペロンを有する *Pseudonocardia acaciae* から hydrazidase ホモログをクローニングし、活性測定および X 線結晶構造解析を行い、パラベンを基質とするかどうか解析を行った。

2 実験

P. acaciae は National Bio-Resource Project を通じて RIKEN BRC より取得した。当該菌ゲノムを鋳型として PCR を行い、amidase とアノテーションされる

hydrazidase ホモログを pET28b にクローニングし C 末端に His x 6 タグを付加し、大腸菌 Rosetta2(DE3) を用いて大量発現させた。結晶化はハンギングドロップ蒸気拡散法により行い、20°C に静置して結晶を得た。回折データの取得は、結晶が細い針状であったことから BL-1A にて行い、データ処理は XDS と aimless によるパイプラインにて得ている。初期構造は hydrazidase の PDB ID: 5H6T をサーチモデルとして Molrep により得て、Refmac5 による計算と Coot を用いた手動モデリングを繰り返し、精密化を行い最終構造を得た。構造座標および構造因子は Protein Data Bank に ID: 8XAC として登録した。

3 結果および考察

Hydrazidase ホモログである *P. acaciae* amidase (Paam) の結晶は、空間群 $I4_1$ 、格子状数 $a = b = 165.3$, $c = 160.6$ Å で、非対称単位に 4 分子が含まれていた。分解能は 3.0 Å であり、結晶化条件等のスクリーニングによる分解能の改良を試みたが向上は図れなかった。

Hydrazidase と Paam のアミノ酸配列は 57% の相同性を持つことから、全体構造の重ね合わせでは RMSD が 0.95 Å と高い一致度を示した。一方で、構造的に大きな違いが、活性部入り口付近のループ構造に見られた。この領域は、アミノ酸配列においても両酵素で違いが見られる部分である。図 1 に示すように、Paam のループ構造は活性部位の入り口を閉じるように位置しているのに対し、hydrazidase では活性部位の入り口が比較的開いている構造になっていた。パラベンとヒドラジド化合物を基質とした酵素活性測定において、hydrazidase では HBPH に対する K_m 値がパラベン類 (メチル、プロピル、ブチル) よりも小さいのに対し、Paam では逆にパラベン類の K_m 値が HBPH よりも小さい値であった。HBPH とパラベン類では、HBPH の方が嵩高い構造であることから、活性部位の入り口が小さい Paam

では HBPH にとって活性部位内部へのアクセスに不利に働いていると考えられた。[3]

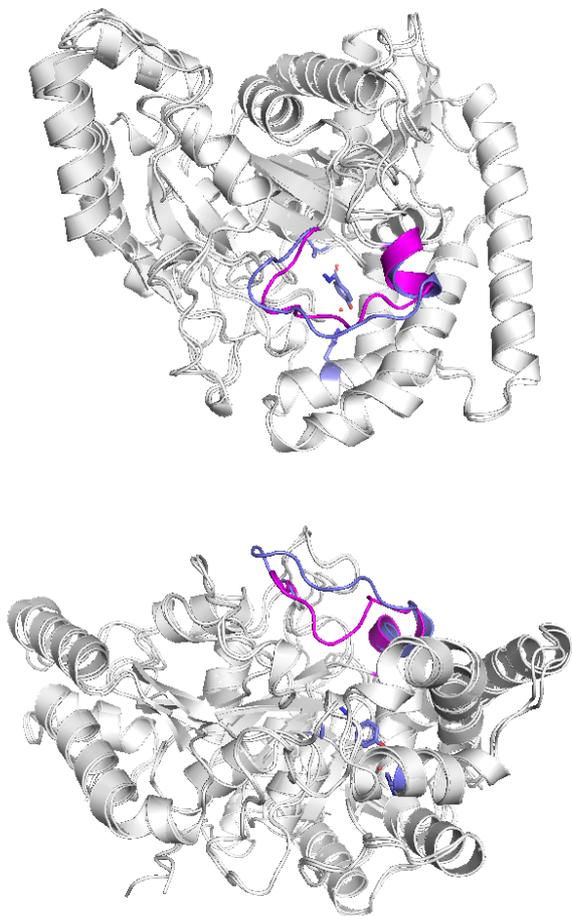


図1 : Hydrazidase と Paam との構造重ね合わせ
上図を横から見た図が下図。明瞭化のために、活性部位入り口のループ部分のみ色をつけている。青が hydrazidase、赤が Paam。また内部に PDB ID: 5H6S 由来のヒドラジド化合物、水分子、ヒスチジン残基についても色をつけている。

4 まとめ

構造解析と平行して、hydrazidase と Paam のパラベン類に対する kinetic 解析や、パラベンを唯一の炭素源として *M. hydrocarbonoxydans* の生育解析、またオペロン遺伝子の発現誘導解析を行った結果、パラベン類が基質として働く可能性を示すことができた。パラベンは植物中にも存在することが報告されていることから、土壌細菌であるこれらの放線菌が天然の基質としてパラベンを利用していることが示唆された。一方で、hydrazidase と Paam で kinetic parameter に差が見られたことから、パラベン以外の天然基質の探索も必要であると考えられた。

謝辞

PF スタッフの支援により成果を得ることができました。ここに感謝致します。

参考文献

- [1] K. Oinuma *et al.*, *J. Bacteriol.* **197** (2015).
- [2] T. Akiyama *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **482**, (2017).
- [3] M. Takenoya *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biotechnol.* (2024) doi: 10.1093/bbb/zbae083

* yshun@nodai.ac.jp