バイオポリエステル分解酵素の吸着機構解明と高性能酵素の創出

物質系専攻　076122 小宮　直也
指導教員：前田瑞夫（教授）

キーワード：ポリヒドロキシブタン酸分解酵素、基質吸着部位、アミノ酸置換、速度論的解析

＜緒言＞代表的なバイオポリエステルであるポリヒドロキシブタン酸(PHB)は再生可能資源から生産される上、環境中の微生物が分泌する分解酵素により分解されるため、自然界のリサイクルシステムに組み込まれる環境に優しい材料として注目されている。そのため、PHB が幅広い分野で利用されるには、PHB の酵素分解性の制御が重要な課題の一つと言える。PHB の酵素分解は、まず酵素が基質吸着部位(SBD)を介して PHB 表面に吸着した後、触媒部位による高分子鎖加水分解が続く二段階で進行する(**Figure 1**)。従って、PHB の生分解性制御には、分解反応の開始段階である酵素吸着機構を解明し、これを制御することが重要である。そこで当研究室では、*R. pickettii* T1 由来酵素を研究対象とし、PHB 分解酵素の SBD 領域のみにランダム変異を導入し、変異クローンの吸着活性の変化と変異導入傾向との相関関係から基質吸着に寄与しているアミノ酸残基を推測してきた。しかしながら、依然として同定には至っておらず、これらのアミノ酸残基が分解反応にどのように貢献しているかもわかっていなかった。そこで、本研究の第一の課題として、吸着能が変化した変異酵素の PHB への吸着及び変異酵素による PHB 分解反応の速度論的解析を行い、吸着・分解反応に関与しているアミノ酸残基の機能解明を行った。

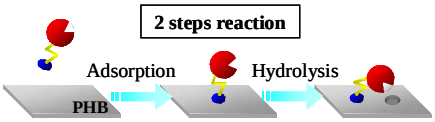

Figure 1. Model of PHB biodegradation

一方、上述の環境依存型リサイクルシステムでは、プラスチック使用後の分解過程に数ヶ月から数年の期間が必要であることから、システムとして完全であるとは言い難い。そこで、PHB を回収して素早くモノマー化し、再重合化するケミカルリサイクルが注目されており、高性能分解酵素の創出が望まれている。本研究の第二の課題として、第一の課題で得られた酵素吸着に関する知見を基に、PHB 分解酵素の高性能化を行った。

＜実験＞変異 PHB 分解酵素は大腸菌内で発現させ、可溶性画分から疎水性相互作用及び陽イオン交換カラムを用いて精製した。円二色性(CD)分光分析は、光路長 0.1 cm の石英セルを用いて、溶媒を 10 mM リン酸緩衝液(pH7.0)とし、20 °C、波長範囲 200-250 nm で行った。酵素の水溶性基質に対する加水分解活性測定には、*p*-ニトロフェニルブチレート(PNPB)を基質として用いた。0.5 mM PNPB を含む 10m M リン酸緩衝液(pH 7.0)に分解酵素を終濃度 1 μg/mL となるように加えて反応を開始した。反応は 37 °C で行い、400 nm における吸光度の増加を測定した。PHB 分解反応は、0.04 %PHB を含む 50 mM Tris-HCl 緩衝液(pH 7.5)に酵素溶液を添加し、37 °C で撹拌しながら 600 nm の吸光度減少を測定した。PHB 分解反応の酵素濃度依存性は、酵素濃度 0.5 から 4 μg/mL の範囲で調べた。表面プラズモン共鳴(SPR)測定は、ポリ(L-乳酸) (PLLA)薄膜を作製したセンサーチップを用いて、37 °C、流速 20 μL/min で行った。酵素溶液を 40 μL 送液後、緩衝液を送液して酵素の吸着及び解離反応を観測した。

＜結果と考察＞これまでの研究から、変異導入頻度と酵素活性との相関から 10 残基程度が酵素吸着に関与していると推定されている。そこで、本酵素の二次構造予測を行ったところ、L441, Y443 及び S445 は、βシート構造を形成してその側鎖は同一方向を向いていると推測された(**Figure 2**)。従って、これらのアミノ酸残基は、PHB 表面との相互作用に関与している可能性が極めて高いと

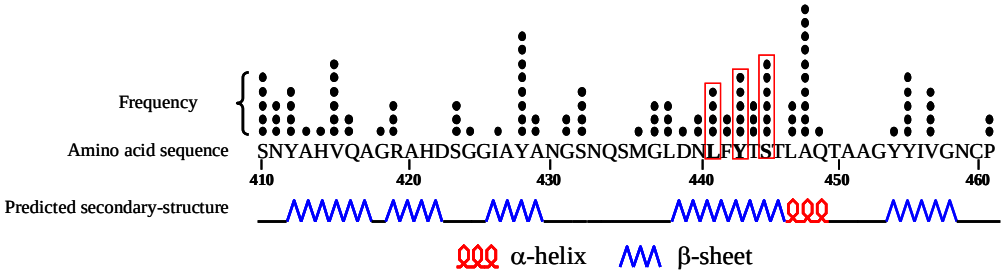

Figure 2. Frequency of single mutation and predicted secondary-structure of SBD region in PHB depolymerase

考えられる。そこで、本研究では、疎水性から親水性残基に置換された L441H 及び Y443H 変異酵素、親水性から疎水性残基に置換された S445C 変異酵素を精製してその性質を調べた。

まず、精製した変異酵素の CD スペクトルを測定したところ、野生型のものと同様であったことから、これらのアミノ酸置換は本酵素の二次構造に影響しないことが分かった。次に、これら変異酵素の水溶性基質 PNPB に対する加水分解活性を調べた。その結果、いずれの変異酵素も野生型酵素とほぼ同等の分解活性を有していたことから、これらのアミノ酸置換はエステル結合の切断反応に影響を与えないことがわかった。　そこで、L441H, Y443H 及び S445C による PHB 分解反応を行い、これらの変異が固体基質分解に与える影響を調べた。まず、酵素濃度 0.5 μg/mL で行ったところ、L441H 及び Y443H の PHB 分解速度はそれぞれ 19 μg/min および 18 μg/min であり、野生型酵素(24 μg/min)よりも遅くなった。また、S445C の分解速度(32 μg/min)は、野生型酵素と比べ若干速くなった。これらのことから、変異酵素による PHB 分解反応挙動の変化は、酵素吸着過程の変化に起因することが分かった。

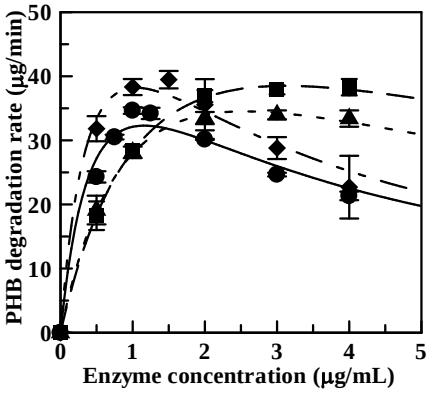

Figure 3. Concentration effects of the enzymes on the rate of PHB degradation by wild-type (●), L441H (▲), Y443H (■) and S445C (◆)enzymes

Table 1. Kinetic parameter of PHB degradation by wild-type and mutant enzymes

Enzyme	K(mL/μg)	k_s(μg/min)
wild-type	0.86±0.01	129±3.6
L441H	0.39±0.01	138±0.934
Y443H	0.32±0.01	154±0.94
S445C	0.95±0.07	152±3.7

Table 2. Kinetic parameter for interaction between PHB depolymerase and biopolyester.

Enzyme	k_d(10^{-4} s^{-1})	k_a(10^4 M^{-1} s^{-1})
wild-type	7.8±1.2	3.3±1.1
L441H	4.8±1.4	0.92±0.6
Y443H	6.1±2.2	0.96±0.8
S445C	5.5±0.5	7.9±0.6

そこで、野生型酵素及び変異酵素による PHB 分解反応の酵素濃度依存性を調べた(**Figure 3**)。野生型酵素では、分解速度は酵素濃度 1 μg/mL で最大に達した後、酵素濃度が高くなるとともに減少した。L441H 及び Y443H は、野生型より高濃度で分解速度は最大に達し、S445C は野生型と同程度の濃度で最大となった。また、Y443H 及び S445C の最大速度は野生型及び L441H より高かった。次に、これらの変異酵素による PHB 分解反応の速度論的解析を行った。本分解酵素の PHB 表面への吸着が Langmuir 吸着に従うと仮定すると、本分解反応の速度は $R=k_S K[E]/(1+K[E])^2$ (R：分解速度 $[E]$：酵素濃度 K：吸着平衡定数 ks：表面での分解速度定数)と表せる[2]。本速度式による解析結果を **Table 1** に示す。L441H 及び Y443H の吸着平衡定数 K は野生型 1/3 程度に低下しており、一方 S445C は若干上昇していた。このことから、これらの部位における疎水性相互作用が、PHB 表面への吸着において重要な役割を担っていることが分かった。また、Y443H 及び S445C では、エステル結合の切断能が野生型と等しいにもかかわらず、表面における分解速度定数が野

生型より高い値を示した。この結果から、これらのアミノ酸置換は、本酵素が有している「ポリマー表面を崩壊する能力」をより向上させ「ポリマー分子鎖の可溶化」を促進させていると推測された。

分解酵素のポリマー表面への吸着は、酵素吸着及び脱離過程からなる。上述のすべての変異酵素において吸着平衡定数が変化したことから、これらのアミノ酸置換が吸着及び脱離過程に及ぼす影響を SPR 測定によって動的に解析した(**Table 2**)。各変異酵素の解離速度定数 k_d は野生型とほぼ同様であった。また、L441H 及び Y443H の吸着速度定数 k_a は野生型より低下し、S445C は上昇していた。このことから、これらのアミノ酸置換は、酵素の吸着過程に影響を与えていることが示唆された。以上の結果から、分解酵素の吸着モデルを提案した(**Figure 4**)。本酵素は、441、443 および 445 の部位でポリマー表面と相互作用可能であり、疎水性の相互作用が重要な役割を演じている。さらに、これらの部位の疎水性度が上昇すると、酵素吸着過程が速くなり、その結果 PHB 分解反応が効率化されていると考えられる。

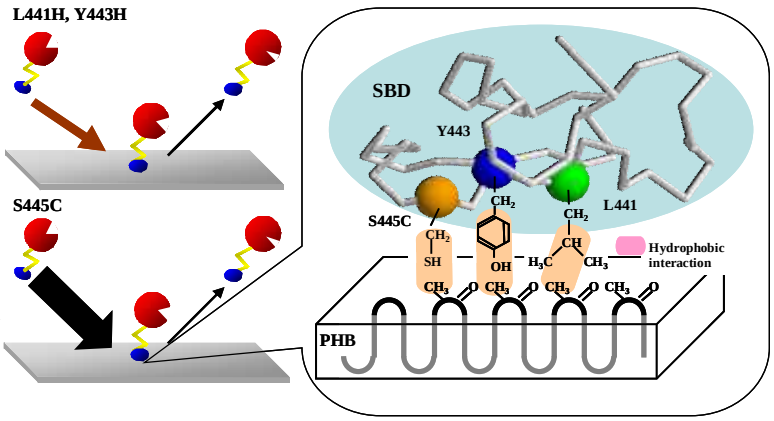

Figure 4. A schematic illustration of the interaction between the amino acid residues in the SBD and the PHB polymer chain

次にこの知見を基に、比較的疎水性度の低い Y443 を対象とし、本酵素の高性能化を試みた。変異酵素の設計には、酵素の構造を維持し、かつ疎水性が高くなるよう検討を行った。その結果、本研究では Tyr を Phe へ置換した変異酵素(Y443F)を作製してその性質を調べた。精製した Y443F 変異酵素の二次構造およびエステル結合切断能に変化がないことを確認した後、PHB 分解反応の酵素濃度依存性を調べた(**Figure 5**)。その結果、Y443F の PHB 分解速度は野生型とほぼ同じ濃度で最大に達したが、その最大速度は野生型より大きかった。そこで Y443F 変異酵素による PHB 分解反応の速度論的解析を行ったところ、K および k_s はともに野生型より向上していた(**Table 3**)。このことから、野生型の Tyr より高疎水性度の Phe への置換により、吸着活性が向上されるとともに、ポリマー分子鎖の可溶化能の向上も達成できたことがわかった。

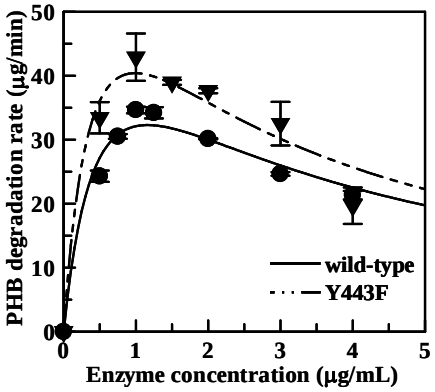

Figure 5. Concentration effects of the enzymes on the rate of PHB degradation by wild-type (●) and Y443H (▼) enzymes

Table 3. Kinetic parameter of PHB degradation by wild-type and mutant enzymes

Enzyme	K(mL/μg)	k_s(μg/min)
wild-type	0.86±0.01	129±3.6
Y443F	1.0±0.13	162±7.4

＜参考文献＞

[1]. Hiraishi, T., Hirahara, Y., Doi, Y., Maeda, M. and Taguchi, S., *Appl. Environ. Microbiol*. **2006**, 72, 7331.

[2]. Mukai, K., Yamada, K., and Doi, Y., *J. Biol. Macromol*. **1993**, 15, 361.