

PHB分解酵素の結晶構造

久野 玉雄^{1*}・粕谷 健一²・岩田 忠久³
Helen Hansma⁴・齊藤 光實⁵・三木 邦夫^{1,6}

ポリヒドロキシブタン酸 (PHB) は微生物によって作られる, *R*-3-ヒドロキシ酪酸をモノマーユニットとする天然のバイオポリエステルである. 生分解性材料として注目され, その生合成機構や分解機構, 物性などに関して多くの研究がなされている. PHBの生分解においては細胞外に分泌される微生物由来の PHB 分解酵素が主となって働く. 疎水性が高く, 結晶領域を有する PHB に対して酵素はどのように認識し, 分解するのであろうか. PHB 分解酵素の結晶構造が初めて明らかにされ, 酵素による分解機構を原子レベルで理解することが可能となりつつある.

PHB分解酵素

細胞外 PHB 分解酵素はさまざまな微生物によって作られる. その多くは原核生物由来であるが, カビ由来のものもいくつか報告されている (PHB 分解酵素についての総説は文献^{1,2)}を参照). 細胞外に分泌された PHB 分解酵素の成熟体は一般に機能の異なる 3 つのドメイン (触媒, リンカー, 基質吸着ドメイン) で構成される. これらのドメインは酵素活性に必須である. 酵素は触媒ドメインの働きによって PHB のエステル結合を加水分解するが, そのためには基質吸着ドメインを介した PHB 固体表面への吸着が必要である. リンカードメインは触媒ドメインと基質吸着ドメインとの間に適当な距離をとるために必要であると考えられている. また, 基質吸着ドメインには PHB の結晶領域を物理的に破壊するという積極的な働きもあると考えられている³⁾. 各ドメインにはアミノ酸配列の特徴によっていくつかのタイプが存在する. 触媒ドメインではリパーゼ・ボックスと呼ばれる特徴的な配列 (Gly-Xaa-Ser-Xaa-Gly) (Xaa は任意のアミノ酸) が一次構造上の中央付近にあるもの (タイプ I) と N 末端側にあるもの (タイプ II) の 2 種類の存在が知られている.

PHB 分解酵素の基質特異性は一般に狭く, たとえば *Ralsotonia pickettii* T1 由来の酵素は PHB およびポリ(4-ヒドロキシ酪酸) (P(4HB)) は分解するが, ポリ(*R*-3-ヒドロキシ吉草酸) (P(3HV)) やそれより長い側鎖を持つ

ものは分解しない. また, 側鎖を持たないポリ(3-ヒドロキシプロピオン酸) (P(3HP)) やポリエチレンアジパート (PEA), ポリエチレンスクシナート (PES) は分解する⁴⁾. 基質吸着ドメインはこれらのポリマーの他, 触媒ドメインによって分解されないポリ(2-ヒドロキシプロピオン酸) (P(2HP)) やポリ(6-ヒドロキシヘキサン酸) (P(6HH)) に対しても吸着活性がある⁵⁾.

一方, 触媒ドメインだけで構成される分解酵素も存在する. カビの一種 *Penicillium funiculosum* が産生する細胞外 PHB 分解酵素は基質吸着ドメインを持たないにもかかわらず, 固体基質に対して十分な分解活性を持っている⁶⁾. この酵素は PHB 分解酵素としては珍しいことに P(3HV) に対しても分解活性を有する. 不溶性ポリマーに対する吸着活性としては, PHB のほか P(2HP), ポリプロピレン, Avicel, デンプンに対してみられ, 吸着特異性は基質吸着ドメインより幅広い.

PHB分解酵素の結晶構造

我々は *P. funiculosum* 由来のシングルドメイン PHB 分解酵素の結晶構造を明らかにした⁷⁾. これは PHB 分解酵素として初めての立体構造の報告である. 本酵素の成熟体は 319 アミノ酸残基から成り⁸⁾, 分子量は約 33,000 のタイプ II 酵素である.

全体構造 分子の概形は大きさがおよそ 52 Å × 48 Å × 41 Å の球状である. 主鎖構造の特徴として, 8 本鎖 β シートをコアとしてその周りに α ヘリックスが配置されている (図 1a, b). その他に 2 本鎖 β シートを 2 つ (β5-β6, β11-β12) と 6 つの 3₁₀ ヘリックスを持つ. ジスルフィド結合が 4 カ所で形成され, そのうち 1 つは活性部位近傍に位置している. Asn144 は糖鎖修飾されている. この残基は活性部位から離れたところに位置しており, 糖修飾は酵素機能とは関係がないと考えられる. 主鎖構造の特徴としては, リパーゼなどが属する α/β hydrolase fold⁹⁾ という構造スーパーファミリーに見られるタイプに似ているが, N 末端, C 末端の位置がまったく異なった場所にある (circular permutation) (図 1c, d). これはこの構造スーパーファミリーでは初めての例であり,

* 著者紹介 ¹ (独) 理化学研究所播磨研究所放射光科学総合研究センター (研究員) E-mail: hisano@riken.jp

² 群馬大学大学院工学研究科, ³ 東京大学大学院農学生命科学研究科, ⁴ カリフォルニア大学サンタバーバラ校, ⁵ 神奈川大学理学部,

⁶ 京都大学大学院理学研究科.

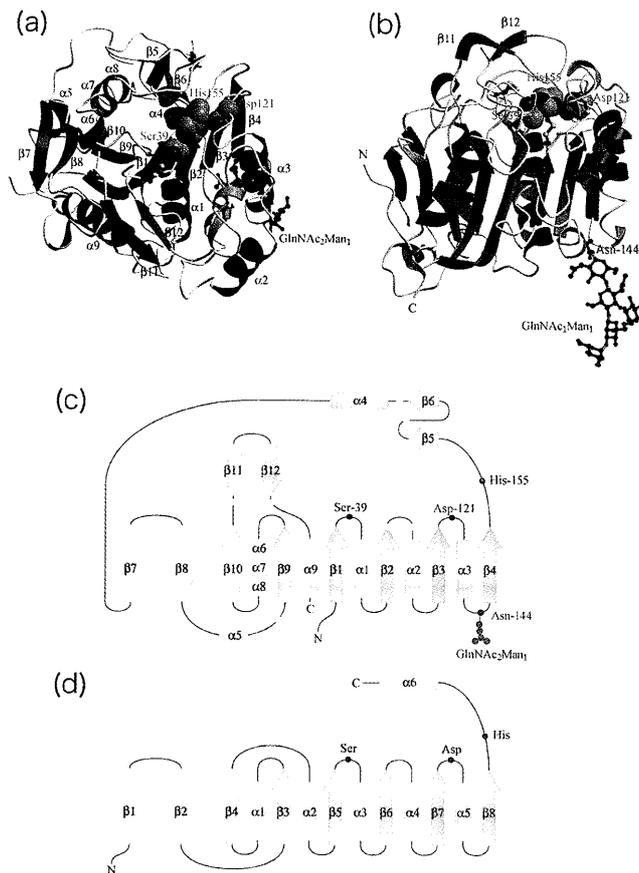


図1. (a), (b) *P. funiculosum* 由来PHB分解酵素の結晶構造 (PDB ID: 2D80). (b) は (a) を水平な軸の周りに90°回転させた図. 青い矢印は β ストランド, 赤紫のリボンは α ヘリックス, 黄色のリボンは 3_{10} ヘリックスを表す. 触媒三残基をCPKモデルで, 4つのシスチンおよび糖鎖をball-and-stickモデルで示した. (c) *P. funiculosum* 由来PHB分解酵素の二次構造トポロジー図. 触媒残基を赤丸で, シスチンを黄丸で, Asn144と糖鎖を灰丸で示した. (d) 典型的な α/β hydrolase foldの二次構造トポロジー図.

タンパク質フォールドの分子進化を考える上で興味深い. PHB分解酵素の活性部位はリパーゼなどとは異なり, バルク溶媒に露出している. その点ではクチナーゼやカルボキシエステラーゼと類似している.

活性部位・基質結合部位 PHB分解酵素の基質結合部位では疎水的なポリマーとどのような相互作用をして特異的な基質認識をするのだろうか. 酵素分子表面には細長い形のくぼみが形成され, その内部に活性部位および基質結合部位が存在する. 活性部位にはSer39, Asp121, His155の触媒三残基が配置されている (図2, 3a). このことから本酵素によるエステルの加水分解反応はセリン残基を求核残基とし, アシル化酵素を経由する, リパーゼやセリン・エステラーゼと同様の反応機構によって進むことが示唆される. 反応過程の四面体中間体を安定化するオキシアニオンホールはSer40, Cys250の主鎖アミドによって形成される.

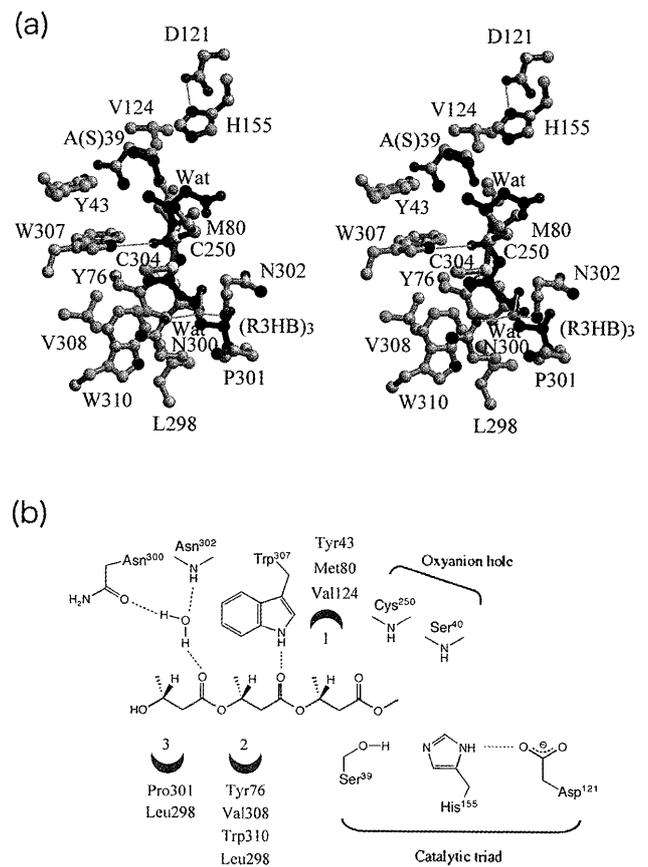


図2. (a) 活性部位の拡大図 (ステレオ図) (PDB ID: 2D81). アミノ酸残基を白色で, 触媒三残基 (Ser39はAlaに変異) を水色で, 結合した3HB3量体を黒色で示した. 基質非結合型構造のSer39 (赤) を重ね合わせている. 水素結合を緑色の実線で示した. (b) 3HB3量体の結合モードの模式図.

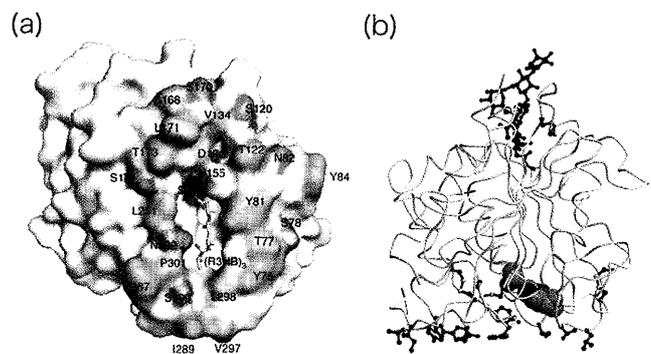


図3. (a) くぼみの周りの基質吸着部位. 分子表面表示している. 疎水性残基を紫色で, 親水性残基を緑色で, 触媒三残基を青色で示した. (b) 基質吸着部位を下に向けて横から見た図. 主鎖を線モデルで, 触媒三残基をCPKモデルで示す. 疎水性残基 (紫色のball-and-stickモデル) が平面的に並んでいる様子が判る.

本酵素と3HB3量体のメチルエステル基質との複合体の構造解析によって基質結合部位における酵素と基質との相互作用様式が明らかとなった (図2). 本酵素は連続したモノマーユニットに対して少なくとも3つの結合部位 (サブサイト) を持っていることが判った (Ser39に

特 集

近い方からサブサイト S1-S3 とする) (図 2b). 各サブサイトでは主に疎水的な相互作用により基質の側鎖を結合しているが, 親水的な相互作用によるエステルの認識も行っている. S1 では4つの疎水性残基 (Trp307, Tyr43, Met80, Val124) の側鎖に囲まれた疎水的なポケットが形成され, 3HB ユニットの側鎖がすっぽりとはまっている. S2 でも同様に Trp307, Tyr76, Val308, Trp310, Leu298 の側鎖によって疎水的なポケットが形成されている. また, S2 では 3HB ユニットのカルボニル酸素が Trp307 の側鎖と水素結合をすることでエステルの認識をしている. このようなポリマーの側鎖の認識とエステルの認識により, モノマーユニットに対する主鎖および側鎖の炭素鎖長特異的, そして光学異性体特異的な認識がなされる. 一方, S3 は分子表面に近いところにあり, モノマーユニットの側鎖に対して S1 や S2 のようなポケットは形成されていない. また, 3HB ユニットのカルボニル酸素は酵素との直接的な相互作用はなく, 水分子を介して Asn300 および Asn302 の主鎖アミドと水素結合をしている. このことから, 3HB ユニットに対する親和性および特異性は他の2つに比べて低いと思われる.

複合体構造は, PHB の切断後のカルボキシ末端が生じる方の断片の結合状態を示しているのかもしれない. 結合した 3HB3 量体のコンフォメーションは伸びきり鎖に近いが, カルボキシ末端付近では主鎖の向きが大きく曲がっている. この状態では求核攻撃を受けるカルボニル炭素は Ser39 の側鎖水酸基 (求核種) からは遠すぎる位置にある. 従って切断前のポリマー鎖ではこの部分は異なるコンフォメーションをとると思われる.

また, 分解反応が起こるためには水酸基末端が生成する断片側のモノマーユニットも切断前に酵素に結合する必要があるであろう. すると対応するサブサイトが少なくとも1つ (S1') 存在するはずであるが, 得られた複合体構造ではその場所は明らかではない.

基質吸着部位 マルチドメイン酵素では基質吸着ドメインがポリマー表面に強固に吸着する. 触媒ドメインは単独ではポリマーに対して結合できない. 一方, シングルドメイン酵素では1つのドメインに触媒機能とともに吸着機能をも併せ持つ. シングルドメイン酵素はどのようにしてポリマー表面と相互作用するのであろうか. ポリマー鎖1本が取り込まれるくぼみの周囲には疎水的なアミノ酸残基が配置されおり, これらが PHB の疎水的な表面と相互作用すると考えられる (図 3a). すなわちこの領域はポリマー表面に対する吸着部位であろう. これらの疎水的な残基の多くはマルチドメイン酵素では親水性の残基になっており, 触媒ドメインのポリマーに対

する親和性の違いと大きく関係していると考えられる.

これらの疎水性残基は平面的に配置されている (図 3b). このような構造は, PHB の結晶領域に結合するのに都合がよいのかもしれない. もしそうならば, ポリマー鎖を活性部位に取り込むために基質吸着部位が積極的に PHB の結晶領域の物理的な破壊を行う可能性が大いに考えられる.

タイプ I 酵素との比較 *P. funiculosum* 酵素と他のタイプ II 酵素とは 37-50% の配列相同性がある. 一方, タイプ I 酵素とは circular permutation を考慮すると約 28% 前後の相同性があることが判った. 4つのジスルフィド結合も保存されている. これは, タイプ I, II は進化的に関係がある, すなわち共通の祖先分子から派生してきたことを示す. タイプ I 酵素の立体構造は典型的な α/β hydrolase fold であると考えられるが, circular permutation を考慮して配列を比較すると, タイプ II とタイプ I では構造が大きく異なる領域があることが判った. 興味深いことに, タイプ II の $\beta 11-\beta 12$ の領域はタイプ I では欠失している. *P. funiculosum* 酵素ではこの領域に Tyr287, Ile289, Val297, Leu298 が含まれ, 平面的な PHB 吸着部位を形作っている. 一方, タイプ I では $\beta 4$ の C 末端側と触媒残基 His155 との間に 24 残基ほどのフラグメントが挿入されている. このフラグメントがどのような構造をとり, どのような機能を果たすのか興味深い.

今後の展望

酵素による疎水的なポリマーの認識のメカニズムが原子レベルで明らかとなったことで, 今後 PHB あるいは他のポリマーを分解する酵素の機能改変を目指した研究が進むと期待される. さらに, 酵素の機能改変とリンクさせた新規な生分解性ポリマーの設計も可能となるかもしれない. 一方, 酵素とポリマー表面との相互作用はまだ完全には判っていない. 酵素によってポリマーの結晶領域の物理的な破壊が起こっているとすれば, 基質吸着部位の構造情報はそのメカニズムの解明のための重要な手がかりとなるであろう.

文 献

- 1) Jendrossek, D. and Handrick, R.: *Ann. Rev. Microbiol.*, **56**, 403 (2003).
- 2) Kim, D.-Y. and Rhee, Y.-H.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **61**, 300 (2003).
- 3) Nobes, G. A. *et al.*: *Macromolecules*, **29**, 8330 (1996).
- 4) Kasuya, K. *et al.*: *Int. J. Biol. Macromol.*, **19**, 35 (1996).
- 5) Kasuya, K. *et al.*: *Int. J. Biol. Macromol.*, **24**, 329 (1999).
- 6) Miyazaki, S. *et al.*: *J. Polym. Environ.*, **8**, 175 (2000).
- 7) Hisano, T. *et al.*: *J. Mol. Biol.*, **356**, 993 (2006).
- 8) Kasuya, K. *et al.*: *Macromol. Symp.*, **249-250**, 540 (2007).
- 9) Ollis, D. I. *et al.*: *Protein Eng.*, **5**, 197 (1992).