

## 1B018 ナイロンオリゴマー分解酵素の反応機構に対する アミノ酸変異の効果

(阪大院・基礎工<sup>1</sup>、筑波大院・数理物質<sup>2</sup>、阪大院・理<sup>3</sup>、ストラスブール大<sup>4</sup>、兵庫県立大院・工<sup>5</sup>) 馬場 剛史<sup>1</sup>、神谷 克政<sup>2</sup>、松井 亨<sup>3</sup>、奥野 克樹<sup>1</sup>、マウロ ボエロ<sup>4</sup>、根来 誠司<sup>5</sup>、中野 雅由<sup>1</sup>、重田 育照<sup>1</sup>

### Mutational effect on the reaction mechanism of nylon oligomer hydrolase

(Eng. Sci. Osaka Univ.<sup>1</sup>, Univ. of Tsukuba<sup>2</sup>, Sci. Osaka Univ.<sup>3</sup>, Univ. of Strasbourg<sup>4</sup>, Univ. of Hyogo<sup>5</sup>)  
Takeshi Baba, Katsumasa Kamiya, Toru Matsui, Katsuki Okuno, Mauro Boero, Seiji Negoro,  
Masayoshi Nakano, Yasuteru Shigeta

【序】ナイロンオリゴマー分解酵素は、ナイロン工場廃水中に生息する微生物から単離された加水分解酵素である。一般的にナイロン6は、6アミノヘキサン酸(Ahx)が100ユニット以上重合した合成高分子であり、洋服など身近に使用されている。この酵素は、ナイロン合成過程で生じる副産物(Ahx-liner dimer や Ahx-cyclic dimer)を加水分解することができる。したがって、この酵素の反応機構の解明や酵素活性の改善は、「副産物を減らすことによる環境負荷の軽減」や「再利用するシステムの構築」に役立つ。

これまで複数のアミノ酸変異導入実験が報告されており、その中のいくつかについては酵素のみ、および、酵素-基質複合体の結晶構造が得られている。その結果、酵素活性に重要な役割を果たすアミノ酸残基として、Ser112、Lys115、Tyr170、Tyr215 が特定された。ナイロンオリゴマー分解酵素の反応機構は種々のプロテアーゼと類似しているが、反応機構や具体的な個々のアミノ酸の役割については不明な点が多い。例えば、プロテアーゼとナイロンオリゴマー分解酵素の大きな違いは、基質が結合する際に大きく移動するループ部位に Tyr170 が存在することである。この Tyr170 を Phe に置き換えるアミノ酸変異を導入した変異体 (Y170F) では大きく活性が低下することが明らかとなっているが[1]、基質結合能や酵素反応メカニズムにおける違いは十分に解明されていない。

そこで本研究では、本酵素の反応過程や重要アミノ酸残基の役割を解明するため、野生型と Y170F に関して (1)古典分子動力学法による酵素-基質複合体の構造解析、および、(2)QM/MM Car-Parrinello 分子動力学法とメタダイナミクス法によるアミド加水分解反応の解析を行った。特に(2)においては、加水分解の律速段階であるアシル化反応におけるアミノ酸残基の役割の特定および、アミド加水分解に対するアミノ酸変異の効果の解析を行った。

【計算の詳細】図1は(2)における QM 領域を示す。QM 領域と MM 領域の境界はプロトンキャップを採用し、密度汎関数計算における交換相関汎関数には HCTH、平面波のカ

ットオフは  $E_{\text{cut}}=70$  Ry、時間刻みは  $\Delta t = 0.097$  fs、電子の仮想質量は 400 a.u.、温度 300K で圧力 1 気圧の NPT アンサンブルでのシミュレーションを行った。また、ナイロンオリゴマー分解酵素の化学反応を記述するに当たって、メタダイナミクス反応座標として、基質のアミド結合のカルボニル炭素原子と、求核攻撃する Ser112 の側鎖の酸素原子間距離を採用した。

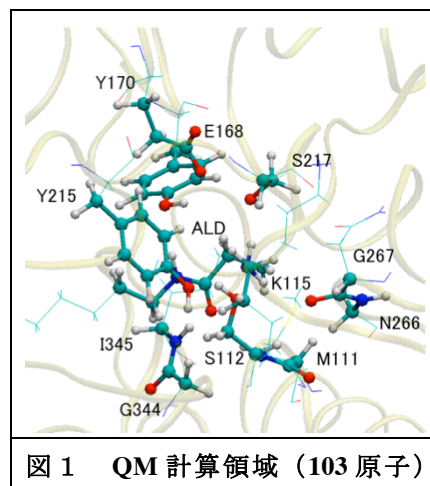


図1 QM 計算領域 (103 原子)

【結果と考察】 (1)では、Y170F の場合、酵素-基質複

合体形成時に構造が不安定化し、Tyr170 を含むループ部位が大きく揺ぐことが明らかとなった。この変化を野生型と比較すると、酵素-基質複合体の生成過程において、Tyr170 が基質と水素結合を形成することで構造を安定化させるという、従来この酵素が備える機能を喪失していることが確認された[2]。

野生型の反応機構の解析では Lys115 が塩基として働き、Tyr215 が四面中間体形成時にプロトンを供与するという役割をそれぞれ担っていることが判明した。また Y170F に関しては、四面中間体形成時に Tyr215 からのプロトン供与が困難になる配置を形成していることが判明した。野生型の場合、Tyr170 の水素結合により図 2 (a)のような配向をとり Tyr215 から自動的に水素原子を受容しやすい構造をしている。一方、Y170F の場合は図 2(b)のような構造をしているため、水素原子を受け取りにくい。また、メタダイナミクス法により算出した野生型との反応自由エネルギー差は約 11 kcal/mol の違いがあり、基質結合能および反応障壁の違いが酵素活性に影響を与えていることを明らかにした。

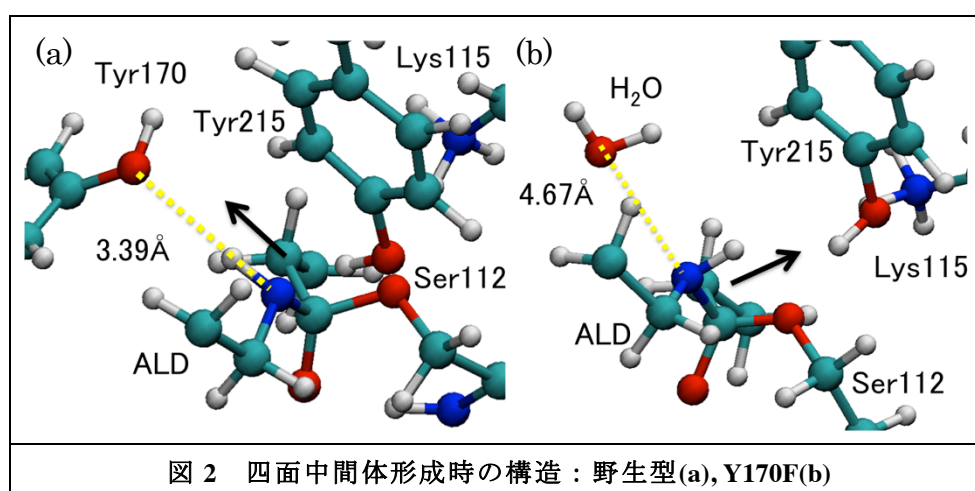


図2 四面中間体形成時の構造：野生型(a), Y170F(b)

Reference [1] S. Negoro *et al.*, *J. Mol. Biol.* **370**, 142–156 (2007). [2] T. Baba *et al.*, *Chem. Phys. Lett.* **507**, 157 (2011).