

## STRUCTURAL BASIS OF THE EVOLUTION OF NYLON-OLIGOMER HYDROLASE, NylB

Yoshiki Higuchi<sup>1</sup>, Naoki Shibata<sup>1</sup>, Yasuyuki Kawashima<sup>2</sup>, Taku Ohki<sup>2</sup>, Seiji Negoro<sup>2</sup>

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

<sup>2</sup>Graduate School of Engineering, University of Hyogo, 2167 Shosha, Himeji, Hyogo 671-2201, Japan

[hig@sci.u-hyogo.ac.jp](mailto:hig@sci.u-hyogo.ac.jp)

Fax: 0791-58-0177

(Received December 3, 2009; Accepted December 29, 2009)

### (Abstract)

*Arthrobacter* sp. (formerly *Flavobacterium* sp.) KI72 has enzymes which are responsible for the degradation of nylon-6 industry by-products (nylon-oligomer). NylB encoded on plasmid pOAD2 is one of these enzymes and has a specific activity toward the degradation of 6-aminohexanoate-linear dimer (Ald). The plasmid, pOAD2, has also an analogous protein, NylB', which has 88 % homology to NylB but only about 0.5 % of the specific activity. We constructed Hyb24 (a hybrid between the NylB and NylB' with NylB'-level activity), Hyb24DN (with double mutation of G181D and H266N with NylB-level activity) and Hyb24DNA (a mutant of Hyb24DN with an additional mutation of S112A at the active site) proteins and solved the three-dimensional structures by x-ray crystallography. In case of Hyb24DNA, the structure of a complex with substrate, Ald, was determined. The overall structures of three proteins are almost identical with a two-domain structure that is categorized in  $\beta$ -lactamase fold. On the basis of the spatial arrangements of amino acid residues at the active site of Hyb24DN and Hyb24DNA-Ald complex, we conclude that the nylon-oligomer hydrolase has evolved from the ester hydrolysis enzymes, of which essential residue is nucleophilic Ser112, with a  $\beta$ -lactamase fold as an ancestral protein by substitution of two residues G181D and H266N at the active site pocket.

### (Keywords)

nylon-oligomer hydrolase, x-ray crystal structure analysis, molecular evolution, serine protease esterase

## ナイロンオリゴマー分解酵素・NylBの構造と進化

樋口芳樹<sup>1</sup>, 柴田直樹<sup>1</sup>, 河島康之<sup>2</sup>, 大木卓<sup>2</sup>, 根来誠司<sup>2</sup>

<sup>1</sup>兵庫県立大学大学院生命生理学研究科

兵庫県赤穂郡上郡町光都 3-2-1

<sup>2</sup>兵庫県立大学大学院工学研究科

兵庫県姫路市書写 2167

[hig@sci.u-hyogo.ac.jp](mailto:hig@sci.u-hyogo.ac.jp)

Fax: 0791-58-0177

### 1. 緒論

細胞内で転写・翻訳・代謝・シグナル伝達など様々な働きを担うタンパク質・酵素は、その生物の生活する環境に応じて巧みに進化を遂げてきた。酵素は、塩基の局所的・広範囲の置換、フレームシフトや融合・重複、そしてタンパク質複合体の形成などのような「変異—再構築」の繰り返しの後、より有利になる変化が生き残る形で進化してきた。微生物には人類が化学合成し、環境に放出してきた人工物質を分解する能力を持つものがある。*Arthrobacter* sp. KI72 株は、プラスミド・pOAD2 (45,519 bp) 上に、ナイロン-6 の合成時に生成される副産物の直鎖状ナイロンオリゴマー-2 量体を分解する酵素 NylB を持つ[1]。ここで副産物のうち、2 量体の 6-aminohexanoate linear dimer を Ald、またその単量体は Ahx と略す。この NylB 酵素群は、加水分解の活性残基としてセリンを有するアミダーゼの一種であり、エステルを加水分解する触媒活性を持つこともわかった。また、この菌株は、NylB より酵素活性ははるかに低いが (Ald 分解についてはおよそ 1/180)、アミノ酸配列に高い類似性 (88 %) を示す NylB'を持つの。これらの事実は、NylB や NylB'は、これらと類似のアミノ酸配列を有する原始タンパク質の重複の結果生成され、その後、アミノ酸の変異により進化してきたことを示唆するものであった[2-4]。このような研究背景の下に、根来等は NylB と

NylB'のキメラ型タンパク質 (Hyb24) を作成し、そのいくつかのアミノ酸に変異を与えた酵素 (Hyb24DN, Hyb24DNA) を創成することにより、その Ald 分解活性を NylB 酵素に近づけることに成功した (Fig. 1)。それらのうち Hyb24 酵素群について X 線結晶解析を進め、その立体構造から酵素機能の進化について研究してきた。ここでは、「NylB 酵素の活性部位がどのようにして形成されたか」について構造化学的に議論する。

### 2. 実験

#### 2.1. Hyb24 酵素群 (Hyb24, Hyb24DN および Hyb24DNA) 発現系の構築と酵素の精製

Hyb24 酵素を効率的に発現するプラスミド・pHY3 は、NylB 酵素の遺伝子・*nylB* を含むプラスミド pKT1 と NylB'の遺伝子・*nylB'* を持つ pKT3 を連結することにより構築した。Hyb24 酵素の N 末端 24 残基は NylB 由来で C 末端側は NylB' 由来である。また、本研究では、C 末端側の Gly181 と His266 をそれぞれ Asp181 と Asn266 に変異させた酵素 (Hyb24DN)，さらには活性触媒残基と思われる Ser112 を Ala に変異させた酵素 (Hyb24DNA) の発現系も構築した[5-7]。

プラスミド・pHY3 およびその変異体を移入して形質転換した大腸菌・KP3998 株は TB 培地 (12 g Bacto tryptone, 24 g Bacto yeast extract, 4.0 g glycerol, 2.3 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 12.5 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1000 ml,

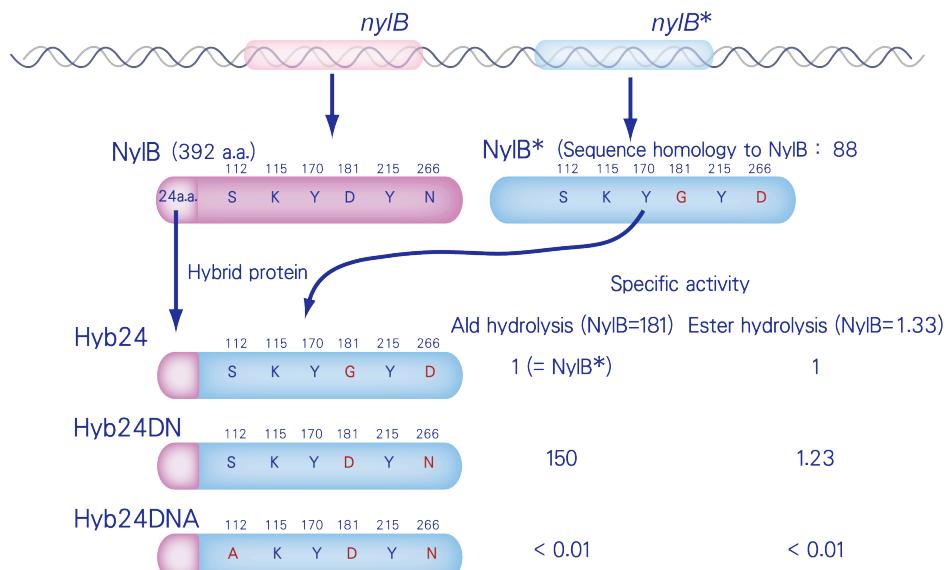


Fig. 1. Strategy to design artificial enzymes which have a catalytic activity for degrading nylon-6 linear dimers (Ald) from NyIB' protein. Hyb24 is a hybrid protein between NyIB and NyIB'. In Hyb24, N-terminal 24 residues are from NyIB, whereas remainders are from NyIB'. Specific activity is expressed as a ratio for the activity of the Hyb24 ( $0.023 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  for Ald hydrolysis;  $4.81 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  for *p*-nitrophenylacetate hydrolysis). Activity for Ald hydrolysis of Hyb24 is about 1/180 of NyIB, but Hyb24DN, in which two amino acids are substituted, G181D and H266N, has a similar activity to NyIB. Hyb24DNA, in which the most responsible catalytic residue, Ser112, is substituted by an alanine, is designed to see the complex structure with a substrate, Ald, by x-ray crystal structure analysis.

distilled water, pH 7.0) にampicillin ( $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) を加え, 310 Kにて濁度 ( $\text{OD}_{600}$ ) が0.6になるまで培養した後, isopropyl-1-thio- $\beta$ -galactosideを最終濃度が1mMになるように加えてさらに24時間培養してHyb24酵素を発現誘導した[5].

得られた菌体を超音波破碎し, 遠心分離上清を分取し、粗酵素液とした。これを陰イオノン交換クロマトグラフィー (Hi-Trap Q-Sepharose) およびゲル濾過クロマトグラフィー (Sepacryl S-200HR) 処理することによりHyb24酵素を分離精製した。得られた酵素試料の純度はSDS電気泳動上に单一のバンドを示した。Aldの分解活性は, 20mMのリン酸緩衝液 (pH 7.0) 中にて10 mM Aldを加えて303 Kで反応させ, 得られるAhxを逆相HPLCにて定量した[5].

## 2.2. Hyb24 酵素群の結晶化および結晶解析 [5-7]

結晶化は, Emerald Biostructures 社のWizard IおよびIIを用いてsitting-drop蒸気拡散法にて初期スクリーニングを行い, その結果をもとに条件を改良した。結晶解析に用いた結晶は, 0.1 M MES緩衝液, pH 6.5, ammonium sulfate (2.0–2.2 M), lithium sulfate (0.1–0.2 M), 10 °Cの条件で得られた。重原子誘導体結晶は, ネイティブ結晶を0.1 mMのmethylmercuric chloride溶液に浸潤させることにより調製した。X線回折データは, 兵庫県のSPring-8のBL-44B2 (Hyb24, Hg誘導体) およびBL-41XU (Hyb24DN, Hyb24DNA) ビームラインにて収集した。収集したX線回折データの統計値はTable 1に示す。Hyb24の結晶構造解析における位相決定は, プログラム・SHARPを用い, 異常分散を考慮した單一同形置換法により行った。

初期分子モデルはARP/wARPを用いて構築し, CNSによる精密化と, XFITによる手動のモデル修正をくり返し行い, 最終の精密化モデルを得た。原子座標データは, Protein Data Bankに登録済みである (Hyb24 : 1WYB, Hyb24DN : 1WYC, Hyb24DNA : 2DCF) .

## 3. 結果と考察

### 3.1. 構造解析と分子構造

Hyb24, Hyb24DNおよびHyb24DNAの結晶構造はそれぞれ1.80, 1.58, 1.40 Å分解能の精度で決定された。また, 構造の正確さの指標である結晶学的なR値はHyb24, Hyb24DN, Hyb24DNAについて, それぞれ18.5, 18.1, 18.3 %であった (Table 1) [6,7].

Hyb24の全体構造は, 2つのドメインから構築されていた (Fig. 2a) . ひとつは11本の $\alpha$ -ヘリックスからなる $\alpha$ -ドメインで (Fig. 2aのピンク色), もうひとつは8本の $\beta$ -ストランドで構成された $\beta$ -シートの両側に $\alpha$ -ヘリックスを配置した $\alpha/\beta$ ドメインである (Fig. 2aの青色) . セリンプロテアーゼの酵素活性に必須のセリン残基は2つのドメインの中間に位置していた (Fig. 2aに緑色のVDWモデルでセリンの側鎖原子を示す) [6]. 得られた立体構造を立体構造比較プログラム DALIに送り, 類似構造を持つタンパク質を調べたところ, d-Ala-d-Ala ペプチダーゼ (PDB-ID:3PTE), カルボキシエステラーゼ (PDB-ID: 1 CI8),  $\beta$ -ラクタマーゼ (PDB-ID:1BTL) などが見つかった。それらのうち,  $\beta$ -ラクタマーゼの立体構造をFig. 2bに示す。両タンパク質のフォールディングは非常によく似ており, また酵素活性に必須のセリン残基の位

Table 1. Data collection and refinement statistics

| Data collection                       | Hyb-24              | Hyb-24DN              | Hyb-24DNA <sup>112</sup> /Ald |
|---------------------------------------|---------------------|-----------------------|-------------------------------|
| Space group                           | P3 <sub>2</sub> 1   | P3 <sub>2</sub> 1     | P3 <sub>2</sub> 1             |
| Unit cell parameters                  |                     |                       |                               |
| <i>a</i> = <i>b</i> (Å)               | 96.37               | 96.71                 | 96.62                         |
| <i>c</i> (Å)                          | 113.09              | 112.79                | 112.60                        |
| Wavelength (Å)                        | 1.0000              | 1.0000                | 1.0000                        |
| Resolution (outer) (Å)                | 50-1.80 (1.90-1.80) | 50-1.58 (1.64-1.58)   | 50-1.40 (1.45-1.40)           |
| Total reflections                     | 663,588             | 840,408               | 1,297,201                     |
| Unique reflections (outer)            | 57,052 (6,013)      | 83,758 (8,272)        | 119,444 (11,807)              |
| Completeness (outer) (%)              | 99.9 (100.0)        | 100.0 (99.9)          | 99.9 (100.0)                  |
| *R <sub>merge</sub> (outer shell) (%) | 0.085 (0.477)       | 6.7 (38.6)            | 14.2 (33.6)                   |
| <I / σ(I)>                            | 17.6                | 10.5                  | 13.3                          |
| Resolution (outer) (Å)                | 28.0-1.80           | 44.3-1.58 (1.64-1.58) | 39.2-1.40 (1.45-1.40)         |
| R <sub>work</sub> (outer) (%)         | 0.185               | 18.1 (24.4)           | 18.3 (23.3)                   |
| R <sub>free</sub> (outer) (%)         | 0.251               | 19.5 (25.8)           | 19.5 (24.6)                   |

$$*R = \sum_{hkl} || F_{obs} | - k | F_{calc} || / (\sum_{hkl} | F_{obs} |)^{-1}, k : \text{scaling factor}$$

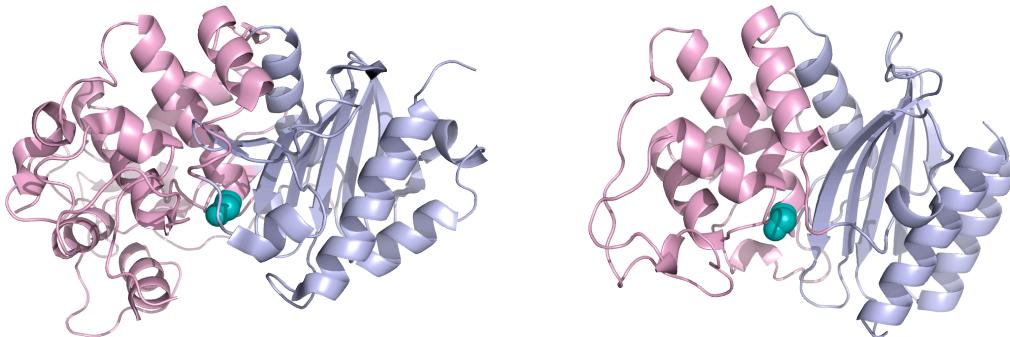


Figure 2. Overall structures of Hyb24 (a) and β-lactamase (b). Serine residues at the active site are depicted as a VDW model (green) at the interface of α/β domain (blue) and α domain (pink) in the both structures.

置と配向もほぼ保存されていた。これらの事実は、NylB'酵素がβ-ラクタマーゼの基本構造に特異的な変異を起こし、ナイロンオリゴマー分解の触媒活性を得たことを強く示唆するものであった[6]。

Hyb24はN末端の24残基以外の酵素活性に重要な部分についてはNylB'を基本構造としているため、ナイロンオリゴマーを分解する触媒活性はNylBのおよそ1/180である。ところが、Hyb24のGly181

とHis266の2残基を、NylBに対応するAsp181とAsn266に置換したところ、その活性はほぼNylB酵素と同じになった(Fig. 1)。Hyb24DNとHyb24DNA分子の結晶構造を解析したところ、全体構造はHyb24とほとんど同じであった[7]。Hyb24DNAについては、活性残基のSer112をアラニン残基に置き換えたため、基質・Aldとの複合体の結晶解析に成功した。Fig.3a,bにそれぞれHyb24DNおよびHyb24DNA・Ald複合体の活性部位近傍の構造を示す。Fig.3aおよびbからわかるように、Hyb24DNは、エステルの加水分解に必要なSer112、Lys115、Tyr215の3残基の立体配置はそのまま維持されており、さらにAsp181とAsn266が触媒活性ポケットに加わることでAld

を加水分解する能力を得たものと考えられた。Fig.3bでは基質・AldのN末端側をAsp181とAsn266が活性部位に固定している様子がはっきりとわかる。また、Tyr170も、酵素が基質を触媒ポケットに取り込んだ後に基質側に大きく側鎖を移動させ、側鎖の酸素原子はAldのアミド窒素原子と水素結合して基質を安定化していた。このTyr170の側鎖の移動は、活性部位をオープン型からクローズ型に変化させる適合誘導の役割も担っていると考えられる[7]。

#### 4. 結論

Hyb24、Hyb24DNおよびHyb24DNA・Ald複合体について結晶構造を明らかにした結果、NylBはSer112を活性中心としたエステラーゼ(β-ラクタマーゼを基本構造とする)にAsp181およびAsn266が活性に加わって基質のN末端側を活性部位のポケットに安定化して配置させることが可能になり、ナイロンオリゴマー分解の触媒活性を獲得したと考えられる。最近、根来らは進化分子工学的手法(error-prone PCR, DNA shuffling)を利用して様々なNylB'変異体を調製し、元酵素(NylB)よりも80倍以上の

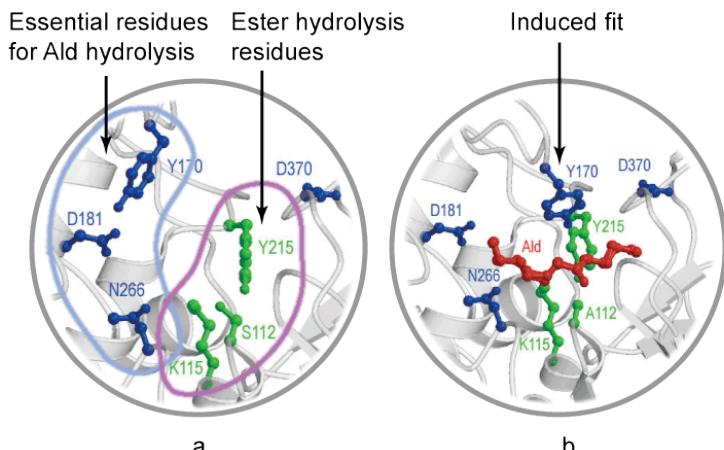


Fig. 3 Structure around the active site of Hyb24DN (a) and Hyb24DNA complexed with a substrate, Ald (b).

活性を示す酵素の調製に成功している。これらの変異体についても酵素活性と構造の関係について調査した結果、R187S/F264C/D370Y の 3 個の変異が酵素活性の上昇に必須の要素であることを見出した[8]。これは、 $\beta$ -ラクタマーゼ構造もつエステラーゼを原始酵素とした場合、ナイロンオリゴマーの分解活性能の獲得においては、複数の進化ルートが存在することを示唆するものである。

#### 文献

1. Kinoshita, S., Terada, T., Taniguchi, T., Takene, Y., Masuda, S., Matsunaga, N. and Okada, H. Purification and characterization of 6-aminohexanoic acid oligomer hydrolase of Flavobacterium sp. KI72, Eur. J. Biochem. 116, 547–551 (1981).
2. Negoro, S., Taniguchi, T., Kanaoka, M., Kimura, H. and Okada, H. Plasmid-determined enzymatic degradation of nylon oligomers, J. Bacteriol. 155, 22–31 (1983).
3. Okada, H., Negoro, S., Kimura, H. and Nakamura, S. Evolutionary adaptation of plasmid-encoded enzymes for degrading nylon oligomers, Nature 306, 203–206 (1983).
4. Kato, K., Fujiyama, K., Hatanaka, H. S., Prijambada, I.D., Negoro, S., Urabe, I. and Okada, H. Amino acid alterations essential for increasing the catalytic activity of the nylon-oligomer degradation enzyme of Flavobacterium sp., Eur. J. Biochem. 200, 165–169 (1991).
5. Ohki, T., Mizuno, N., Shibata, N., Takeo, M., Negoro, S. and Higuchi, Y. Crystallization and X-ray diffraction analysis of 6-aminohexanoate-dimer hydrolase from Arthrobacter sp. KI72, Acta Crystallogr. F61, 928–930 (2005).
6. Negoro, S., Ohki, T., Shibata, N., Mizuno, N., Wakitani, Y., Tsurukame, J., Matsumoto, K., Kawamoto, I., Takeo, M. and Higuchi, Y. X-ray crystallographic analysis of 6-aminohexanoate-dimer hydrolase: molecular basis for the birth of a nylon oligomer degrading enzyme, J. Biol. Chem. 280, 39644–39652 (2005).
7. Negoro, S., Ohki, T., Shibata, N., Sasa, K., Hayashi, H., Nakano, H., Yasuhira, K., Kato, D., Takeo, M. and Higuchi, Y. Nylon-oligomer Degrading Enzyme/substrate Complex: Catalytic Mechanism of 6-aminohexanoate-dimer Hydrolase, J. Mol. Biol. 370, 142–156 (2007).
8. Ohki, T., Shibata, N., Higuchi, Y., Kawashima, Y., Takeo, M., Kato, D. and Negoro, S. Two alternative modes for optimizing nylon-6 byproduct hydrolytic activity from a carboxylesterase with  $\beta$ -lactamase fold: x-ray crystallographic analysis of directly evolved 6-aminohexanoate-dimer hydrolase, Protein Sci. 18, 1662–1673 (2009).