

第7章 ポリウレタン分解酵素遺伝子の解析

第1節 緒言

第3章において、*Comamonas acidovorans* TB-35株由来のポリウレタン (PUR) 分解酵素 (PURエステラーゼ) を精製し、その諸性質について検討した。その結果、本酵素はエステル結合の加水分解を触媒する活性部位の他に、基質であるPUR表面に付着する部位を有することが推察された。また、第6章においては、PURエステラーゼ遺伝子を導入した*E. coli*が、PUR分解活性の異なる2種類のエステラーゼ (エステラーゼ(I)、エステラーゼ(II)) を発現することが明らかとなった。TB-35株においても同様にPUR分解活性の異なる2種類のエステラーゼ (菌体付着型; PURエステラーゼ、菌体外型; CBSエステラーゼ) が分泌されることより、両酵素は同一の遺伝子産物であることが示された。また、両酵素のPUR分解活性の差異は、酵素分子内のPUR付着部位の立体構造が異なるためであると考えられた。

酵素分子内で、活性部位と基質付着部位がどのような立体配置をとっているかを知るためには、X線結晶構造解析等によって立体構造を決定しなければならない。しかし近年、その立体構造が既知のタンパク質と一次構造を比較することにより、立体構造を予測する、いわゆるホモロジーモデリングが行われるようになった。精密な計算に基づくものから、一次構造の比較によるものまでそのアプローチは様々であるが、この手法により構造既知のタンパク質と一次配列の相同性 (ホモロジー) が高いタンパク質の立体構造が予測されるようになった。近年では、アセチルコリンエステラーゼとブチリルコリンエステラーゼ(38)、*Bacillus cereus* 由来と*B. thermoglucosidasius* 由来のオリゴ-1,6-グルコシダーゼ(39)、マルトース結合タンパク質とスペルミジン/プトレシン結合タンパク質(40)、*B. cereus* 由来のスフィンゴリエリナーゼとウシ膵臓デオキシリボヌクレアーゼ(41)等が、ホモロジーモデリングの結果、その立体構造の類似性が高いとされた。

本章では、全塩基配列より推定したTB-35株由来のPURエステラーゼの一次配列より、データベースを用いて相同性の高いタンパク質を検索した。また、三次構造既知のタンパク質の構造をもとにPURエステラーゼの立体構造を予測し、そのPUR分解機構について考察した。また、予測された活性中心アミノ酸残基に変異を導入し、活性中心の同定を行った。

第2節 実験材料及び実験方法

2-1 塩基配列及びアミノ酸配列の解析

第5章において、TB-35株由来のPURエステラーゼ遺伝子をクローニングし、その全塩基配列を決定した(図5-4)。得られたアミノ酸配列の情報をもとに、国立遺伝学研究所のDNAデータベース(DDBJ)上のプログラム(BLAST, FASTA)より、相同性の高いタンパク質を検索した。また、塩基配列及びアミノ酸配列の分析には、GENETYX-MAC program ver. 8を用いた。3次元構造の解析には、Protein Adviser program ver. 3(富士通九州システムエンジニアリング社製)を用いた。

2-2 発現系の構築

PURエステラーゼ遺伝子をpUC19に挿入したプラスミドであるpUR22(第5章)を鋳型としてPCRを行った。PURエステラーゼのN末端側に相当する塩基配列に*Bgl* IIサイトを付加した24 merのオリゴヌクレオチドをフォワードプライマーに、C末端側に相当する塩基配列に*Eco* RIサイトを付加した27 merのオリゴヌクレオチドをリバースプライマーとした(表7-1)。PCRサイクルは、94°C-5分を1サイクル、98°C-20秒、63°C-10秒、74°C-30秒を25サイクルとした。ポリメラーゼには、TOYOBO社製のKOD DNA polymeraseを用いた。PCR反応は、Applied Biosystem社製のGeneAmp PCR System 9600を用いた。PCRの結果得られた約1.6 kbpのバンドをアガロースゲルより切り出し、*Bgl* II及び*Eco* RIで切断した。これをpET25b(+)(Novagen社製)の*Bam* HI/*Eco* RIサイトに挿入した。これをpUR-petとし

表7-1 PCRに用いたプライマーの配列

	Primer	Sequence (mer)	
Construction of pUR-pet	P1	5' -GAAGATCTGTGCGGTGGCAGCGAC-3'	(24)
	P2	5' -CGGAATTC AAAAGTCAGTGATGTCCA-3'	(27)
Mutation of Ser ¹⁹⁹	P1	5' -CATGGTGTGGATCCACGGCGGCCT-3'	(26)
	P2	5' -TGAAGCCGCCGGC <u>GNB</u> TTCGCCGAAGATGG-3'	(30)
	P3	5' -CCATCTTCGGCGAA <u>VNC</u> GCCGGCGGCTTCA-3'	(30)
	P4	5' -CGTGGTGAATGCGGT <u>TCGCGAG</u> CTGGTTG-3'	(28)
Mutation of His ⁴³³	P1	5' -CAACCAGCT <u>TCGCGA</u> CCGCATTACCACG-3'	(28)
	P2	5' -GTACTGG <u>GAGCTC</u> ATACGT <u>GWH</u> ACCTGCCCC-3'	(30)
Mutation of Glu ³²⁴	P1	5' -CGTGGTGAATGCGGT <u>TCGCGAG</u> CTGGTTG-3'	(28)
	P2	5' -CGAAGTACGACCAS <u>SVN</u> GTCTTGGTTGGAGCC-3'	(31)
	P3	5' -GGCTCCAACCAAGAC <u>NBS</u> TGGTCGTACTTCG-3'	(31)
	P4	5' -CCATGCTGG <u>CCTGCAGG</u> TCGCGGTGTT-3'	(27)

NはA, G, C, Tを、VはA, C, Gを、BはC, G, Tを、HはA, T, Cを、WはA, Tを、SはG, Cを表す。
 下線は制限酵素認識部位を、二重下線は変異を導入した位置を示す。

た。これにより、PudAのN末端にペリプラズム画分へ移行するためのリーダーペプチドの付与を、C末端にヒスチジンタグの付与を行った。

2-3 組換え型酵素の発現

pUR-petを有する*E. coli* BL21を、100 µg/mlのアンピシリンを含むLB平板培地に植菌し37℃で1晩培養した。これを100 µg/mlのアンピシリンを含むLB培地に植菌し、30℃で3時間培養した後、IPTGを添加し30℃で4時間誘導を行った。培養液を8,000 rpmで5分間遠心して菌体を得た。ペリプラズム画分へ蓄積した酵素の回収には、浸透圧ショック法(42)を用いた。

2-4 組換え型酵素の精製

TOYOBO社製のMagExtractor for HisTag Kitを用いて、ペリプラズム画分よりヒスチジンタグを有する発現産物を精製した。方法は、キットに付属のマニュアルに従った。

2-5 酵素活性の測定

発現産物のエステラーゼ活性の測定は、第2章に準じた。また、平板培地上でのポリジエチレングリコールアジペートの分解確認は、第5章に準じた。

2-6 PCRを用いた変異導入

変異導入のためのPCRは、Yolovらの方法に従った(43)。用いたプライマーの配列を表7-1に示した。PCRサイクルは、94℃-5分を1サイクル、98℃-20秒、70℃-20秒を30サイクルとした。

第3節 実験結果

3-1 相同性（ホモロジー）検索

PURエステラーゼと、一次配列上で相同性の高いタンパク質をデータベースより検索した。その結果、*Torpedo californica* 由来のアセチルコリンエステラーゼ (T AChE) (30.1% identity) (44)、ラット由来の60kDa carboxyl esterase 1 (30.7% identity) (45)、ヒト由来の cholinesterase (29.4% identity) (46)、*Geotrichum candidum* 由来のリパーゼ (GcL1) (26.7% identity) (47)をはじめとして真核生物由来のカルボキシルエステラーゼやアセチルコリンエステラーゼに30%前後の一致が認められた。細菌由来では唯一 *Bacillus* sp.由来の *p*-nitrobenzyl esterase(49)と34%の相同性を示した他は、エステラーゼ、リパーゼや Poly(hydroxyalkanoate) (PHA)デポリメラーゼとは相同性を示さなかった。

3-2 活性中心付近の一次配列の比較

PURエステラーゼと真核生物由来エステラーゼ (*T. californica* 由来のアセチルコリンエステラーゼ、Human由来のブチリルコリンエステラーゼ、*Geotrichum candidum* 由来のリパーゼ isoform 1) および細菌由来のPHAデポリメラーゼ (*P. lemoignei* 由来のPHBデポリメラーゼ、*P. pickettii* 由来のPHBデポリメラーゼ) の活性中心付近の一次配列を比較した結果を表7-2に示した。リパーゼボックス (Gly-X1-Ser-X2-Gly, X1; Glu, X2; Ala) の5つのアミノ酸配列はPURエステラーゼと真核生物由来エステラーゼ間で完全に一致し、その周辺の配列にも相同性が見られた。また、これらのエステラーゼにおいてSerと共に活性中心とされているGlu、His付近の配列とPURエステラーゼにおけるGlu³²⁴、His⁴³³付近の配列に高い相同性が見られた。一方、細菌由来のPHAデポリメラーゼの活性中心であるSer、Asp、His周辺との相同性は認められなかった。

3-3 Ser¹⁹⁹、His⁴³³及びGlu³²⁴への変異導入

PCRを用いた変異導入の結果、199番目のSerがAsp、Ile、Asn、Thrへ変換した変異体、及び433番目のHisがAla、Val、Tyrへ変換した変異体、324番目のGluがArg、Tyrへ変換し

表7-2 PURエステラーゼとSer-Glu-Hisタイプの加水分解酵素及びPHAデポリメラーゼの活性部位
付近のアミノ酸配列の比較

	Serine (S)	Glutamate (E) or Aspartate (D)	Histidine (H)
PudA	199 FGGDKSNVTIFGESAGGFSV	324 GSNQDEWSYF	433 GAGHTYELQYLF
T AChE	200 FGGDPKTVTIFGESAGGASV	327 GVNKDEGSFF	440 GVIHGYYEIEFVF
H ChE	198 FGGNPKSVTLFGESAGAAASV	325 GVNKDEGTAF	438 GVMHGYEIEFVF
CcL1	218 FGGDPPKVMIFGESAGAMSV	354 GNQEDEGTAF	463 GTFHGNELIFQF
Consensus	FGGdp--VtiF GESAG* -SV	G-n-DEg*-F	G--HgyE*-f-F
PhaZ1 <i>Ple</i>	117 IDPSRVKVTGLSAGAFMT	195 IWHGSSDYTV	253 GMGHGTFVDPG
PhaZ1 <i>Ppi</i>	140 IDPNQVYVAGLSSGGGMT	215 VW-GTSDYTV	274 GMAHAWPAGTG
Consensus of PHA-Depolymerases	IDp _n q _v YV-GLSsGg-Mt	**-GtsDyTV	GM-HawP---G

配列の前の数字は、Ser, GluまたはAsp, Hisの位置を示す。

Pud A : *C. acidovorans*由来のPURエステラーゼ

T AChE : *T. californica*由来のアセチルコリンエステラーゼ (44)

H ChE : Human由来のコリンエステラーゼ (46)

CcL 1 : *Geotrichum candidum*由来のリパーゼisoform 1 (47)

PhaZ1 *Ple* : *P. lemoignei*由来のPHAデポリメラーゼ (48)

PhaZ1 *Ppi* : *P. pickettii*由来のPHAデポリメラーゼ(48)

た変異体が得られた。これらの変異遺伝子の発現産物を精製しエステラーゼ活性を測定した結果、いずれの変異酵素もエステラーゼ活性は検出されなかった（表7-3）。しかし精製酵素をSDS-PAGEに供した結果、wild typeと同一の移動度に変異酵素のバンドが認められた（図7-1）。

3-4 *T. californica* 由来のアセチルコリンエステラーゼとの二次構造の比較

DDBJ SSTRHEAD programを用いて予測したPURエステラーゼの二次構造（ α ヘリックス及び β シート）を、図7-2に示した。その配列と位置は、X線結晶構造解析により決定された*T. californica* 由来のアセチルコリンエステラーゼ（T AChE）の二次構造と類似していた。また、PURエステラーゼのCysの位置は、T AChEにおいてジスルフィド結合を形成している6つのCysの位置と類似していた。

3-5 *T. californica* 由来のアセチルコリンエステラーゼとの疎水性プロフィールの比較

GENETYX-MAC program ver. 8を用いて解析した、PURエステラーゼ及びT AChEの疎水性プロフィールを図7-3に示した。両酵素は類似した疎水性プロフィールを示したが、PURエステラーゼにはT AChEには存在しない3つの疎水領域（I、II、III）が認められた。

第4節 考察

PURエステラーゼと相同性の高いタンパク質を検索したところ、真核生物由来のエステラーゼと30%前後の相同性を示した。中でも*T. californica* 由来のアセチルコリンエステラーゼ（T AChE）と*Geotrichum candidum* 由来のリパーゼisoform 1（GcL1）は、既にX線結晶構造解析によって立体構造が決定されている。これらの酵素と活性中心付近のアミノ酸配列を比較したところ、高度に保存されている領域が認められた。エステラーゼ、リパーゼ、セリンプロテアーゼ等の加水分解酵素には、-Gly-Xxx1-Ser-Xxx2-Gly-という5つのア

表7-3 Ser¹⁹⁹、Glu³²⁴、His⁴³³の変異酵素の活性及び発現

Mutant	Esterase activity (U/ml)	Clear zone ^a	Expression ^b
Wild type	3.6	+	+
S199D	N.D. ^c	-	+
S199I	N.D.	-	+
S199N	N.D.	-	+
S199T	N.D.	-	+
E324R	N.D.	-	+
E324Y	N.D.	-	+
H433A	N.D.	-	+
H433V	N.D.	-	+
H433Y	N.D.	-	+

^a Clear zone formation on pDEGA plate.

^b Expression of 62 kDa protein on SDS-PAGE.

^c N.D.; not detected



図7-1 精製後の変異酵素のSDS-PAGE

Lane 1; S199D, lane 2; S199I, lane 3; S199N, lane 4; S199T,
lane 5; E324H, lane 6; E324Y, lane 7; H433A, lane 8; H433V, lane 9; H433Y,
lane 10; pUR-pet, lane 11; pET25b(+) (control).

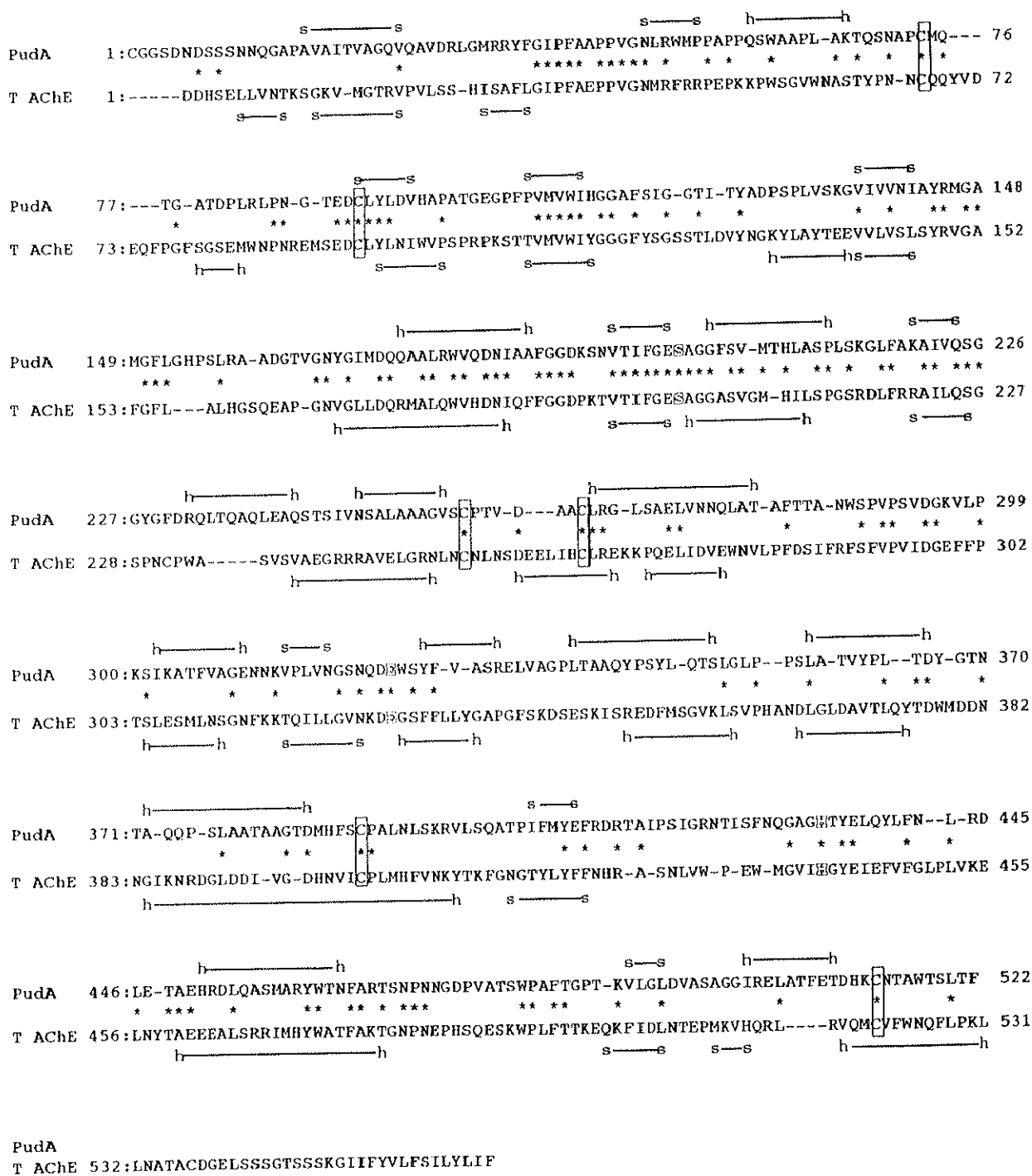


図7-2 PUR分解酵素と *Torpedo californica* 由来アセチルコリンエステラーゼの二次構造比較

上段 (PudA) にPUR分解酵素を、下段 (T AChE) に *Torpedo californica* 由来アセチルコリンエステラーゼの一次配列を示した。活性中心を構成するSer, Glu, Hisは袋文字で表示した。一致したアミノ酸を*で示し、ジスルフィド結合を形成するCysを四角で囲った。s—sで α ヘリックスを、h—hで β シートを示した。

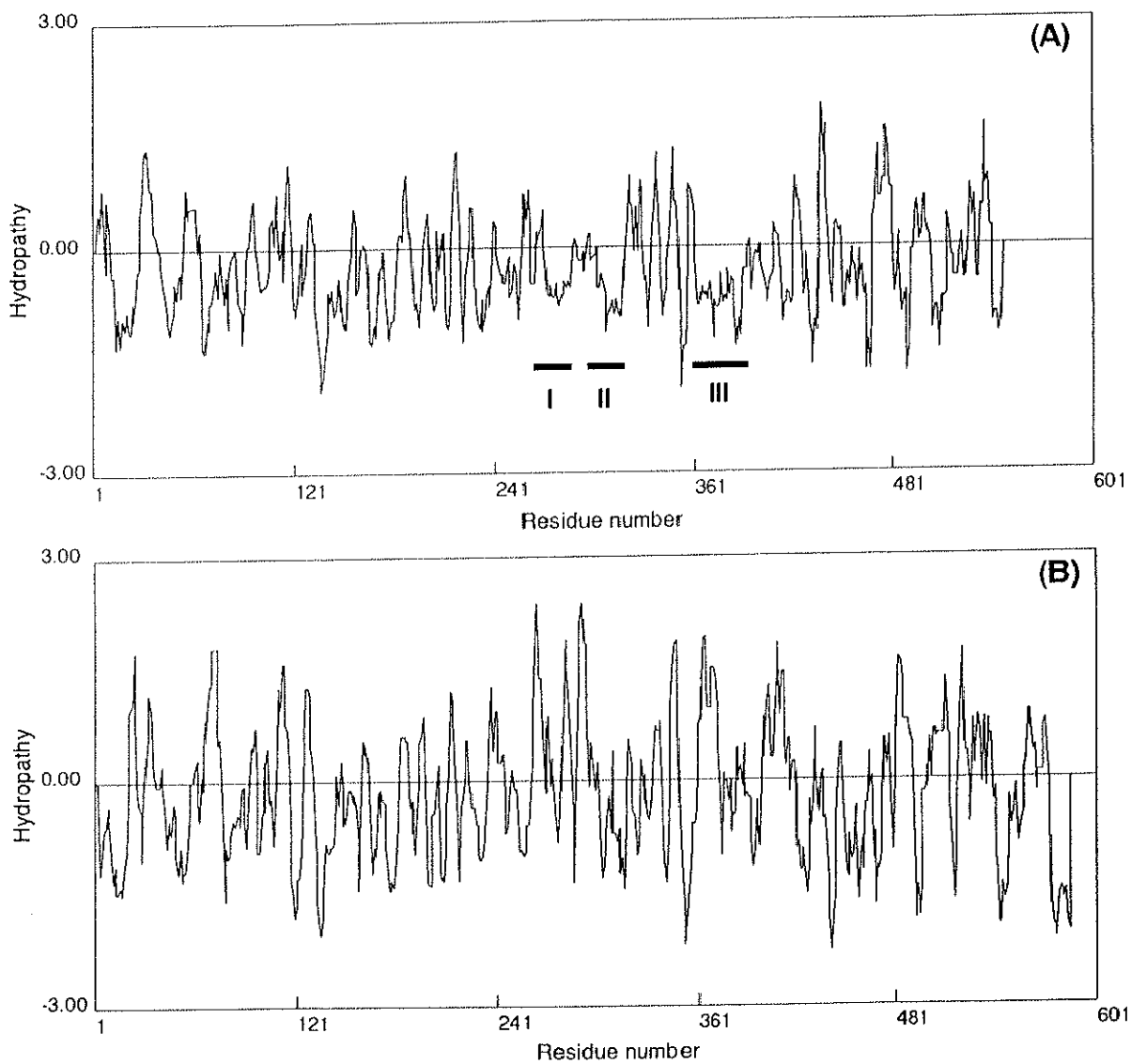


図7-3 PURエステラーゼと *T. californica* 由来AChEの疎水プロット

Hydropathyの数値が正の領域は疎水性が低く、負の領域は疎水性が高いことを表す。

(A) : PURエステラーゼ；疎水性領域をI, II, IIIで示した。

(B) : *T. californica* 由来アセチルコリンエステラーゼ

ミノ酸からなる配列（リパーゼボックス）が保存されている。表7-2に示した真核生物由来のエステラーゼのリパーゼボックス（-GESAG-）と、PURエステラーゼにおける197から201番目の配列は完全に一致した。また、活性中心を構成するGluとHisの周辺部の配列も保存されていたことから、PURエステラーゼの活性中心は、Ser¹⁹⁹、Glu³²⁴、His⁴³³からなると推察された。この予測をもとに、Ser¹⁹⁹、Glu³²⁴、及びHis⁴³³を他のアミノ酸へ置換した変異酵素を作成したところ、エステラーゼ活性が完全に失われた変異酵素の発現が確認された。Ser¹⁹⁹をIleへ変換した酵素（Ser199Ile）では発現量がやや減少したが、変換により酵素の安定性が若干低下したためであると考えられた。Ser199Ile以外は、wild typeと同等の発現量であった。この結果より、本酵素の活性中心にはSer、Glu及びHisが含まれることが明らかとなった。これまで、エステラーゼの活性中心はSer、Asp、Hisからなるとされてきたが、近年Aspの代わりにGluが活性中心となっているエステラーゼの一群が報告されるようになった(50)。表7-2に示した真核生物由来のエステラーゼは、このファミリーに属する。これまでに、このSer-Glu-Hisを活性中心とする細菌由来のエステラーゼの報告はなく、TB-35株由来のPURエステラーゼはSer-Glu-Hisファミリーに属する新規の細菌由来のエステラーゼであることが明らかとなった。しかし、PURエステラーゼにリパーゼ活性（トリオレイン分解活性）及びAChE活性（アセチルチオコリン分解活性）は認められなかった。また、市販のリパーゼ（*Rhizopus arrhizus*由来）及びAChE（ウシ赤血球由来）にはPUR分解活性が認められなかったことより、同じSer-Glu-Hisファミリーに属しながら、その基質特異性には明確な区分があることが示された。

既に立体構造が決定されているT AChEの二次構造と、計算によって求めたPURエステラーゼの二次構造を比較したところ、 α ヘリックスと β シートの位置が類似していた。また、T AChEにおいてジスルフィド結合を形成しているCysの位置及び周辺の配列が、両酵素間ではほぼ一致した。このように両酵素の二次構造モチーフに高い相同性が認められたことより、PURエステラーゼの立体構造はT AChEと類似していることが推察された。Cyglerらは、T AChE及びGcL 1の一次配列をもとに相同性の高いタンパク質を検索し、Ser-Glu-Hisの活性中心及び高次構造の保持に重要な領域における相同性を指標として、29種類の加水分解酵素をひとつのファミリーに分類した(50)。このファミリーには、真核生物由来

のリパーゼ、コリンエステラーゼ、カルボキシルエステラーゼ、コレステロールエステラーゼ及びその他のエステラーゼが含まれ、原核生物由来のエステラーゼは含まれていない。しかし、PURエステラーゼとT AChEの立体構造の類似性より、本酵素は原核生物由来のエステラーゼとして唯一このファミリーに属する酵素であると考えられた。

PURエステラーゼとT AChEは立体構造の類似性が高いと考えられたが、PURエステラーゼにはT AChEには存在しない3つの疎水領域が存在し(図7-3)、この領域がPURエステラーゼの固体基質認識機能に関与していると考えられた。PHAデポリメラーゼでは、PHA付着部位は酵素のC末端に存在し、活性ドメインとPHA付着ドメインは自由度に富む領域、すなわちThrに富む領域または細胞外マトリックスタンパク質であるFibronectin III様の領域によって連結されている(図7-4)(48)。しかしPURエステラーゼにおいては、基質付着部位と思われる3つの疎水領域は活性ドメイン中に存在し、それらを連結する領域は認められなかったことから、本酵素の基質付着部位はPHAデポリメラーゼとは異なる構造であると考えられた。

PURエステラーゼにおける基質付着部位の構造を推測するため、プロテインデータバンクに登録されているT AChEの立体構造データをProtein Adviser program ver. 3を用いて視覚化し、これをPURエステラーゼの立体構造のモデルとして解析した(図7-5)。その結果、3つの疎水領域は酵素分子の外側に活性中心を取り囲むような形で配置していることが明らかとなった。第3章において、PURエステラーゼの酵素学的諸性質を検討した結果、本酵素の基質(PUR)付着部位は、活性部位の近隣に配置していると推察した(図3-9)が、T AChEの立体構造をモデルとして推測したPURエステラーゼの立体構造モデル(図7-6)は、それを支持するものであった。第3章において述べたように、PURエステラーゼにおいて過剰の酵素存在下では一定の分解速度を示すという性質は、活性中心を基質付着部位が取り囲んでいる立体構造に起因するものと推察された。

これまで述べてきたように、PURエステラーゼは新規のポリエステル分解酵素であるという他に、Ser-Glu-Hisファミリーに属する原核生物由来エステラーゼであるという点において、大変興味深い酵素である。アミノ酸レベルの相同性は決して高い値ではないが、活性中心付近の配列、Cys残基の位置や配列等、三次構造を形成するために必要な領域は高

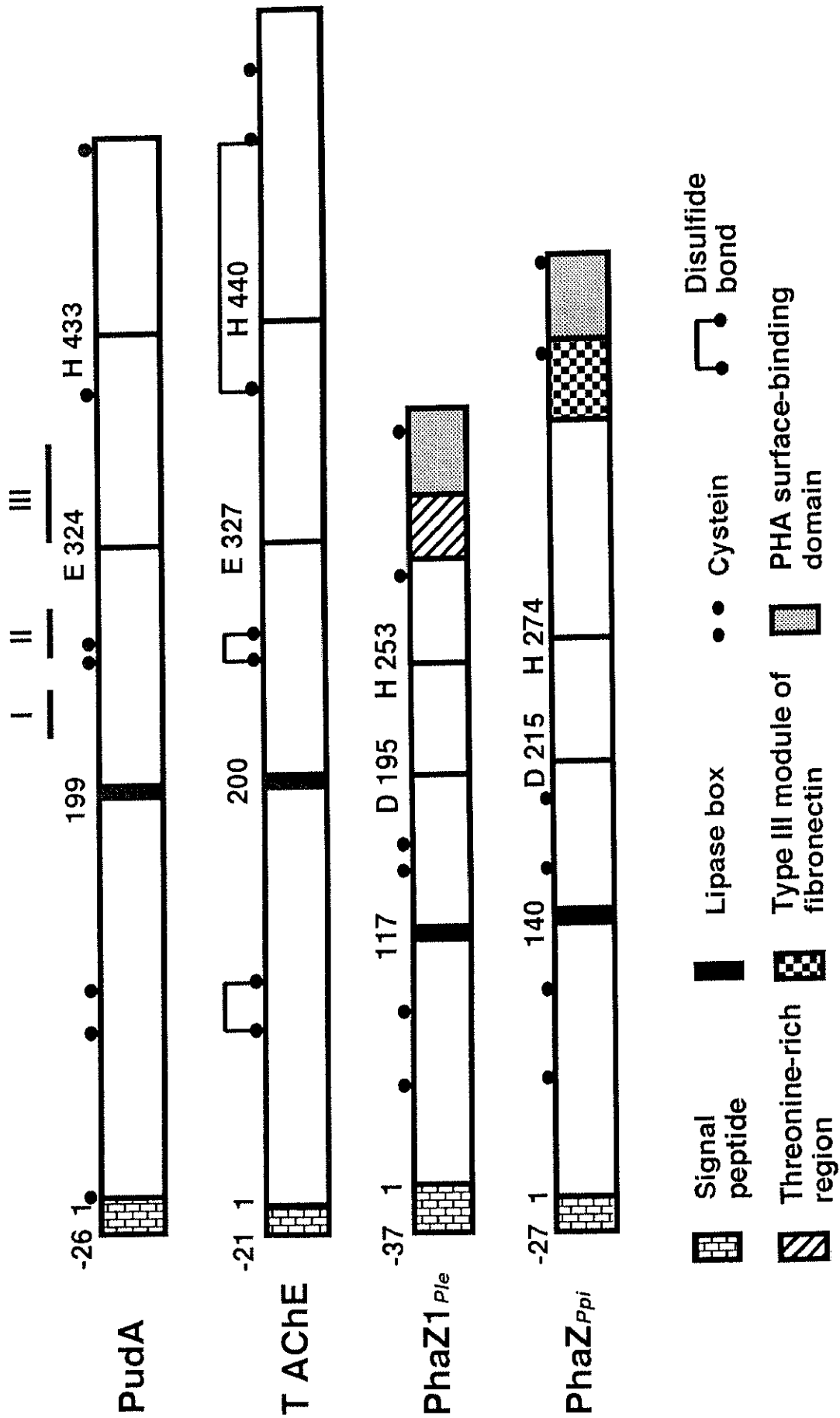


図7-4 PURエステラーゼと*T. californica*由来アセチルコリンエステラーゼ及びPHAデポリメラーゼのドメイン構造の比較

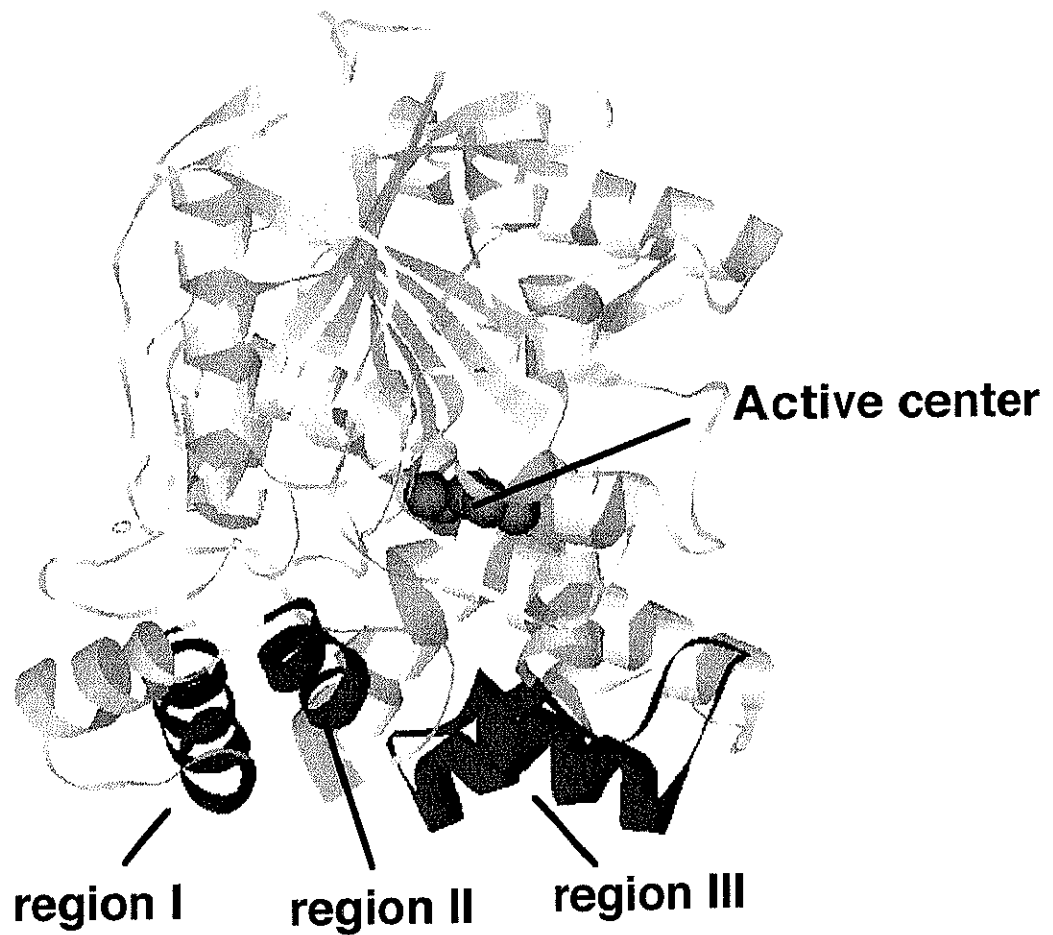


図7-5 *Torpedo californica*由来のアセチルコリンエステラーゼの立体構造(42)
PURエステラーゼにおける疎水領域を図示した。

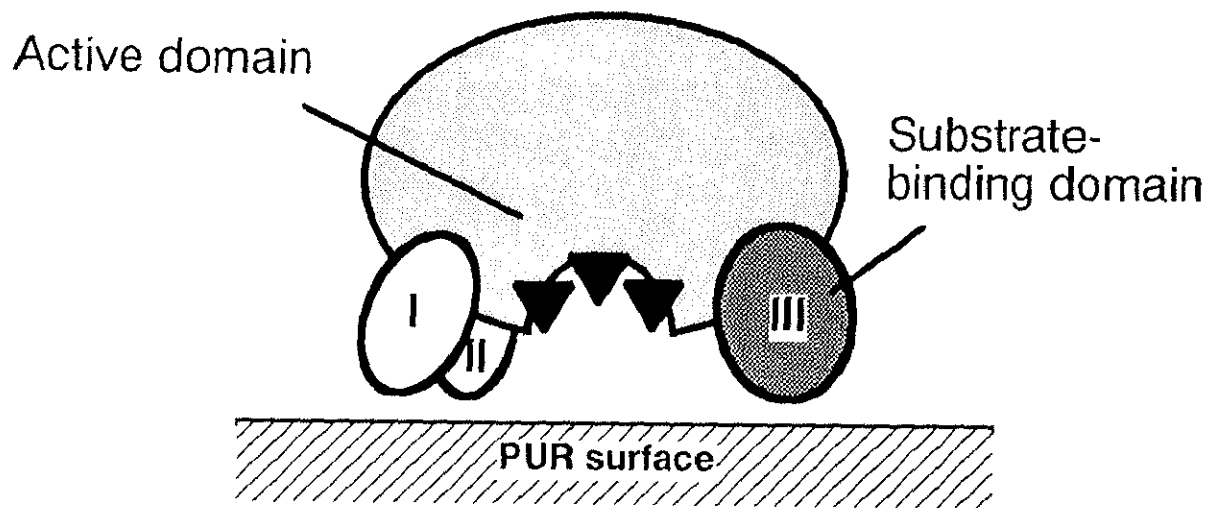


図7-6 PUR分解酵素の立体構造モデル

I, II, IIIは疎水性の高い3つの領域に相当する。

度に保存されている。このような立体構造の類似が生化学的にどのような意義を持つものかは不明であるが、本酵素の立体構造が明らかとなれば新たな知見が得られるであろう。