

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H03962

研究課題名(和文) アミド合成工業酵素群の分子機能解析

研究課題名(英文) Functional analyses of enzymes and the accessory proteins involved in industrial production of amide compounds

研究代表者

橋本 義輝 (HASHIMOTO, Yoshiteru)

筑波大学・生命環境系・准教授

研究者番号：00323254

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：各種アミド化合物の工業生産菌である *Pseudomonas chlororaphis* B23株と *Rhodococcus rhodochrous* J1株のニトリル合成・分解・代謝機構は高い潜在能力をもつと期待される。

本研究では特に、B23株のニトリル水和酵素(およびその変異酵素)やそのアクセサリータンパク質の発現プラスミドを構築後、大腸菌を宿主として各タンパク質を大量に調製し、ニトリル水和酵素を翻訳後活性化するアクセサリータンパク質の機能を解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究で対象としたB23株のニトリル水和酵素は、かつて(アクリロニトリルからの)アクリルアミド工業生産の第二世代触媒として使用され、また、シアノバレリアミド工業生産にも利用されてきた実用酵素である。本研究でのニトリル水和酵素のアクセサリータンパク質の解析により、実用酵素の活性化機構が明らかとなり、基礎的研究の見地からのみならず、(産業上有用な技術開発に貢献できる)応用的見地からも極めて意義深い。

研究成果の概要(英文)： *Pseudomonas chlororaphis* B23 yields nitrile hydratase (NHase) used for the production of 5-cyanovaleramide at the industrial level.

Here, we constructed several plasmids for the expression of NHases (and these mutant enzymes) in the presence and absence of each accessory protein of the NHase. Besides the expression of each of these NHases in *E. coli* carrying the resultant plasmid, we purified and characterized them. Based on the results of a series of experiments, we clarified the mechanisms for post-translational activation of NHase.

研究分野：応用微生物学

キーワード：酵素 微生物

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ニトリル分解菌 *Pseudomonas chlororaphis* B23 (以下、B23 株と略) はかつて (アクリロニトリルからの) アクリルアミド工業生産の第二世代菌として使用され、また、シアノバレリアミド工業生産にも利用されてきた実用菌である。本菌は、ニトリル水和酵素により様々なニトリルをアミドに変換し、生じたアミドをさらにアミダーゼにより酸とアンモニアに分解する。筆者らは、今後もその高い潜在能力が期待される B23 株のニトリル合成・分解・利用系に関わる酵素・機能性タンパク質・遺伝子プロモーターの機能解明を行ってきた。

一方で、筆者らは、*Rhodococcus rhodochrous* J1 株 (以下、J1 株) のニトリル分解・分解代謝機構も分子レベルで解析してきた。J1 株はニトリル代謝機構として、(高分子量型と低分子量型の) 2 種のニトリル水和酵素の他、ニトリルを直接酸とアンモニアに分解するニトリラーゼをもつ。本菌の高分子量型ニトリル水和酵素はアクリルアミド工業生産の第二世代触媒やニコチンアミド工業生産の酵素触媒として使用されている実用酵素であり、J1 株のニトリル代謝機構の解明も行ってきた。応用的見地からの成果として、誘導剤添加により著量のニトリラーゼが生成する J1 株の発現制御機構を利用し、ストレプトマイセス属放線菌での新規誘導型大量発現系を初めて開発した。基礎研究の成果として、J1 株のもつ (コバルト型) 低分子量型ニトリル水和酵素の成熟化機構解明の過程で、「同一サブユニットの置換による翻訳後活性化」を世界で初めて発見し、本現象を “Self-Subunit Swapping” と命名、新規な翻訳後修飾機構の概念を提唱した。筆者らが発見・命名した Self-Subunit Swapping が、J1 菌に存在する 2 種類のニトリル水和酵素の内、もう 1 つの高分子量型ニトリル水和酵素も本機構により翻訳後活性化が起こることを実証し、Self-Subunit Swapping が一般性のある翻訳後修飾機構であることが明らかになった。

ニトリル代謝関連酵素の分子レベルでの研究過程で、以下の幾つもの興味深い性質を発見した。(1) B23 株の鉄型ニトリル水和酵素の翻訳後成熟化に関与するアクセサリタンパク質と予想される *NhpC*; (2) J1 株の低分子量型ニトリル水和酵素の翻訳後活性化で最も重要な役割を果たす “Self-Subunit Swapping” シャペロンタンパク質複合体の機能および翻訳後修飾機構; (3) 少なくとも 20 量体以上を形成し、際立った高い安定性への関与が示唆される J1 株の高分子量型ニトリル水和酵素の多量体構造 などが、これらの性質・機能は詳細が未解明のままであった。

### 2. 研究の目的

本研究ではこれまでの研究を進展させ、B23 株と J1 株のニトリル分解に関わる酵素・機能性タンパク質・遺伝子プロモーターの機能の詳細な解明と、得られる知見の有用物質生産への応用的フィードバックを目的とする。即ち、いまだ未解明ではあるが上記の興味深い性質の基となる各タンパク質および新規翻訳後修飾機構の詳細な機能を生化学的に解明する。

### 3. 研究の方法

B23 株と J1 株のニトリル分解に関わる酵素・機能性タンパク質・発現制御遺伝子プロモーターの機能の詳細を解明する。

本研究において、ニトリル水和酵素の酵素および遺伝子は

*P. chlororaphis* B23 株由来の *nhpABC*

*R. rhodochrous* J1 株由来の *nhhBAG* (高分子量型ニトリル水和酵素)、*nhlBAE* (低分子量型ニトリル水和酵素) を使用した。

### 4. 研究成果

#### (1) B23 株ニトリル水和酵素アクセサリタンパク質の機能解析

B23 株の鉄型ニトリル水和酵素構造遺伝子 (*nhpAB*) のみをもつ DNA 断片、鉄型ニトリル水和酵素構造遺伝子およびアクセサリタンパク質と推定される遺伝子 (*nhpABC*) をもつ DNA 断片を PCR によりそれぞれ増幅後、pET-24a(+) を使用して発現プラスミドを構築した。各々のプラスミドを大腸菌 BL21-CodonPlus (DE3)-RIL 株に導入し (以下、*nhpAB* 発現株および *nhpABC* 発現株とする)、硫酸鉄を含む栄養培地で、IPTG 添加により誘導発現させ、様々な温度で培養を行った。集菌した後、無細胞抽出液を調製し SDS-PAGE に供した結果、*nhpC* 遺伝子の有無に関わらず鉄型ニトリル水和酵素のバンドが確認できた。しかし、いずれの条件においても *NhpC* のバンドは確認できなかった。ガスクロマトグラフィーによる活性測定を行った結果、*nhpABC* 発現株にのみ

ニトリル水和酵素活性が認められたことから、*nhpC* 遺伝子産物が本酵素の翻訳後の活性発現に何らかの影響を与えることが示唆された。

*nhpABC* 発現株では酵素活性を指標に、*nhpAB* 発現株では SDS-PAGE 上でのバンドを指標として、それぞれから酵素 [以下、酵素 (AB) および酵素 (ABC) とする] の精製を行った。精製した酵素 (AB) は無色、酵素 (ABC) は淡緑色を呈し、どちらの酵素も、SDS-PAGE 上で約 25 kDa の単一バンドであり、N 末端アミノ酸配列の決定により  $\alpha$ 、 $\beta$  両サブユニットで構成されていた。ゲルろ過で分子量を決定した結果、酵素 (AB) は 2 量体、酵素 (ABC) は 4 量体であった。活性測定を行った結果、酵素 (ABC) のみ高いニトリル水和酵素活性を示した。活性に必須の鉄の含量は、酵素 (ABC) は  $\alpha\beta$  あたり 0.91、酵素 (AB) は 0.21 であった。分光学的解析を行った結果、両者の二次構造、鉄の配位が互いに異なることが示唆された。以上の結果から、酵素 (ABC) を鉄が配位したホロ酵素、酵素 (AB) をアポ酵素と同一し、NhpC は本酵素の翻訳後の活性発現に関与するアクセサリータンパク質であり、B23 株では、コバルト型ニトリル水和酵素の翻訳後成熟化に関わる Self-Subunit Swapping シャペロンとは異なる機構でニトリル水和酵素は翻訳後活性化されることが示唆された。

鉄型ニトリル水和酵素の翻訳後の活性発現に不可欠なアクセサリータンパク質である NhpC の N 末端領域は、ABC ATPase スーパーファミリーに属する (ウレアーゼ成熟過程で重要な Ni 取り込みに関わる) ウレアーゼアクセサリータンパク質、(ヒドロゲナーゼ成熟過程の Ni 取り込みに関わる) ヒドロゲナーゼアクセサリータンパク質、(コバルト含有コバラミンの生合成に関わる) CobW と弱いながらも相同性を示した。さらに、NTPase におけるヌクレオチドのリン酸基結合配列である P ループ構造が NhpC と相同性をもつ他のタンパク質内で保存されていた。部位特異的変異法により NhpC の P ループ構造中のアミノ酸残基 (23 番目のリジン残基、24 番目のスレオニン残基) を各々アラニンに置換した (鉄型ニトリル水和酵素および NhpC 遺伝子をもつ) 発現プラスミドを構築した。大腸菌で発現させ、無細胞抽出液を調製し、SDS-PAGE により鉄型ニトリル水和酵素の発現が、また、Western 解析により NhpC の発現がそれぞれ確認できた。しかしながら、ガスクロマトグラフィーによる活性測定を行った結果、ニトリル水和酵素活性が認められず、ニトリル水和酵素は活性を全く示さないアポ酵素として発現していた。以上のことから、ニトリル水和酵素の翻訳後活性化への NhpC の機能において 23 番目のリジン残基、24 番目のスレオニン残基を含む P ループ構造が必須であり、NhpC は NTP を分解しそのエネルギーを用いて鉄型ニトリル水和酵素の翻訳後活性化因子としての機能を果たしている可能性が示唆された。

## (2) J1 株ニトリル水和酵素の翻訳後修飾機構の解析

J1 株のニトリル水和酵素の翻訳後修飾では、低分子量型ニトリル水和酵素において (Self-Subunit Swapping に関わる) e タンパク質が、Self-Subunit Swapping シャペロン、サブユニットにコバルトを取り込む金属シャペロン、サブユニット内のコバルトが配位するシステイン残基を酸化する酸化反応触媒の 3 つの機能をもつことを発見し、ニトリル水和酵素活性化の役割を担うことが示唆されているが、活性化の詳細は分かっていない。

まず、高分子量型ニトリル水和酵素遺伝子クラスターを含むプラスミドと、このプラスミド内の  $\alpha$  サブユニットをコードする *nhhA* 遺伝子にシステイン残基酸化修飾を調べるための変異 (トリプシン切断部位) を導入したプラスミドを構築し、発現用宿主 *Rhodococcus rhodochrous* ATCC12674 株を形質転換した。それぞれの形質転換体から無細胞抽出液を調製し、ニトリル水和酵素活性を測定したところ、後者の活性は前者に比べて低かった。システイン残基酸化修飾を簡易に調べるためのトリプシン切断部位の導入がニトリル水和酵素の発現に影響を及ぼしていることが示唆された。そこで、前者をベースとして、高低分子量型ニトリル水和酵素の翻訳後修飾に関わる g タンパク質をコードする *nhhG* 配列内で高分子量型ニトリル水和酵素の活性化に関わると推測したアミノ酸残基を Ala に置換した変異体を含む多数の発現プラスミドを構築した。活性化に関わるアミノ酸残基として、低分子量型ニトリル水和酵素の翻訳後修飾に関わる e タンパク質、高低分子量型ニトリル水和酵素の翻訳後修飾に関わる g タンパク質、およびそれらと相同性を示すタンパク質の間で保存されているアミノ酸残基を候補とした。構築したプラスミドそれぞれを用いて発現用宿主 *R. rhodochrous* ATCC12674 株を形質転換した。しかし、すべての形質転換体から調製した無細胞抽出液中でニトリル水和酵素活性がみられたものの、変異の入っていないプラスミド導入株と同等かそれ以上のニトリル水和酵素活性が認められたため、高分子量型ニトリル水和酵素の活性化に関わる活性アミノ酸残基を決定できなかった。そこで、夾雑タンパク質の影響を考慮し、陰イオン交換カラムを用いて高分子量型ニトリル水和酵素の粗精製を行ったが、変異の入っていないプラスミド導入株より顕著にニトリル水和酵素活性の減少した変異体はなかったため、*Rhodococcus* 属微生物を宿主とする発現系での実験を断念した。

次に、*Rhodococcus* 属微生物より培養時間が短く、菌体破碎の容易な大腸菌を宿主として検討した。大腸菌発現用ベクター pET-24a(+) に *nhhBAG* 遺伝子を導入したプラスミド、NhhG の発現を

最適化するため *nhhBAG* 遺伝子のコドンが大腸菌発現用に最適化したプラスミドをそれぞれ構築した。両プラスミドそして *nhhBAG* 遺伝子を含まない pET-24a(+)を用い、宿主として大腸菌 BL21 (DE3)株または Rossetta2 (DE3)株を検討し、20°Cまたは 28°Cでそれぞれを培養し、調製した無細胞抽出液のニトリル水和酵素活性を測定した。その結果、*nhhBAG* 遺伝子のコドンが大腸菌発現用に最適化したプラスミドを大腸菌 BL21 (DE3)株に導入し 20°Cで培養した時に、培養液量あたりの菌体に含まれるニトリル水和酵素の総活性が最も高くなった。しかし、NhhG の発現量は SDS-PAGE 上でのバンド量から評価すると、活性化複合体  $\alpha$  サブユニット-NhhG として精製するには不十分と示唆されたことから、高分子量型ニトリル水和酵素と  $\alpha$  サブユニット-NhhG 複合体を別々のプラスミドで発現させる共発現系を構築し検討した。その結果、高分子量型ニトリル水和酵素と  $\alpha$  サブユニット-NhhG 複合体を同一プラスミドから発現させた場合よりも、より多くの NhhG の発現に成功した。そこで、前述のように多数の *nhhG* 変異体発現プラスミドを構築し、大腸菌 BL21 (DE3)株を宿主とした共発現系で検討した結果、全ての変異 NhhG は野生型 NhhG と同程度発現していた。得られた菌体から調製した無細胞抽出液を用いて活性測定を行ったところ、顕著なニトリル水和酵素活性が減少した変異 NhhG が認められ、当該変異を導入した NhhG 中のアミノ酸残基がニトリル水和酵素活性化の役割を担う残基と特定することに成功した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hashimoto Yoshiteru, Ube Yuko, Doi Shiori, Kumano Takuto, Kobayashi Michihiko	4. 巻 67
2. 論文標題 Metal chaperone, NhpC, involved in the metallocenter biosynthesis of nitrile hydratase	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of General and Applied Microbiology	6. 最初と最後の頁 24 ~ 32
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2323/jgam.2020.03.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 橋本 義輝、宇部 優子、土居志織、熊野 匠人、小林 達彦
2. 発表標題 鉄型ニトリルヒドラーゼの翻訳後活性化アクセサリタンパク質の解析
3. 学会等名 日本農芸化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 橋本 義輝、宇部 優子、熊野 匠人、小林 達彦
2. 発表標題 鉄型ニトリルヒドラーゼの翻訳後活性化因子の解析
3. 学会等名 日本農芸化学会大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	小林 達彦 (KOBAYASHI Michihiko) (70221976)	筑波大学・生命環境系・教授  (12102)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	白木 賢太郎  (SHIRAKI Kentaro)  (90334797)	筑波大学・数理物質系・教授     (12102)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関