

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 1 日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21350089

研究課題名（和文）ニトリルヒドラターゼファミリー酵素の触媒中心形成と触媒機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of mechanisms for catalytic center maturation and catalysis of nitrile hydratase family enzyme

研究代表者

尾高 雅文 (ODAKA MASAFUMI)

東京農工大学・大学院工学研究院・准教授

研究者番号：20224248

研究成果の概要（和文）：

鉄型ニトリルヒドラターゼの時間分割結晶構造解析を行い、反応中間体と思われる立体構造を得ることに成功した。また、同ファミリー酵素であるチオシアネートヒドロラーゼの基質ポケット変異体の解析から、基質ポケットのサイズと表面電荷が基質選択性の決定に重要であることを明らかにした。触媒中心形成機構に関しては、チオシアネートヒドロラーゼの活性化タンパク質が触媒サブユニットの立体構造形成、金属の結合、翻訳後修飾形成を促進し、その後解離した触媒サブユニットに他のサブユニットが会合するという成熟過程の概要を解明することに成功した。

研究成果の概要（英文）：

By performing time-resolved X-ray crystallography of Fe-type nitrile hydratase (NHase) whose  $\beta$  Arg56 were substituted by Lys, we obtained the structure of the enzyme-substrate complex. By replacing two Arg residues resided in the active site pocket of a NHase family enzyme, thiocyanate hydrolase (SCNase), we showed that the size as well as the surface charge of the substrate binding pocket was important for the substrate specificities of SCNase. As for the maturation mechanism, we found that the SCNase activator protein, P15K, is responsible for the refolding, metal-insertion and post-translational modification of Cys ligand in the catalytic subunit,  $\gamma$ . The metal-incorporated  $\gamma$  subunit form the complex with the other subunits,  $\alpha$  and  $\beta$ , to form the mature SCNase.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	6,000,000	1,800,000	7,800,000
2010年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
2011年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
年度			
年度			
総計	14,800,000	4,440,000	19,240,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：水和反応、加水分解、酵素反応、結晶構造解析、時間分割構造解析、翻訳後修飾、タンパク質成熟化、アクセサリタンパク質

## 1. 研究開始当初の背景

ニトリルヒドラーゼ (NHase) はニトリルを水和してアミドを合成する反応を触媒し、アクリルアミドやニコチンアミドの工業生産に広く利用される、産業的に重要な酵素である。NHase は  $\alpha$ ,  $\beta$  サブユニットのヘテロダイマーを構成単位とし、システインスルフィン酸 (Cys-SO<sub>2</sub>H)、スルフェン酸 (Cys-SOH) という酸化修飾を受けたシステインを配位子とする非ヘム鉄または非コリンコバルトを  $\alpha$  サブユニットに有する。NHase はこの特異な金属反応中心で高い触媒活性を示すと考えられるが、詳細は明らかにされていない。我々は NHase の高分解能結晶構造を世界に先駆けて報告し、システイン酸化修飾が酵素活性に不可欠であることを明らかにした。これらの結晶構造や生化学的知見をもとにモデル錯体や理論計算による研究が進められ、金属反応中心は Lewis 酸として機能するという幾つかの反応モデルが提唱されている。近年、我々は NHase がイソニトリル (R-NC) をアミン (R-NH<sub>2</sub>) と CO に加水分解する弱い触媒活性を持つことを見出した。そこで、非ヘム鉄反応中心に一酸化窒素(NO)を結合させた不活性型 NHase の結晶に基質として t-butylisonitrile を添加し、NO を光解離させることで酵素を活性化し、触媒反応の時間分割結晶構造解析を行った。その結果、非ヘム鉄は -NC 基を結合することで基質を固定し、Cys-SOH 配位子の O 原子が近傍の溶媒分子を活性化して反応を引き起こす可能性が強く示唆された。

我々は、チオシアネートヒドラーゼ (SCNase) が NHase ファミリーに属する新規酵素であることを明らかにした。両酵素はシステイン酸化修飾も含めて極めて良く似た立体構造をもつが、基質ポケットの大きさと表面電荷には違いがあり、互いの触媒活性は示さない。

また、NHase ファミリー酵素はホロ酵素としての発現に特異的な活性化タンパク質を必要とする。我々は SCNase 活性化タンパク質 P15K が SCNase 成熟化に重要な働きを示すことを明らかにした。予備的な実験から P15K は金属結合サブユニットと複合体を形成し、Co の結合と翻訳後修飾形成に関与すると思われたが、反応機構の詳細は明らかになっていなかった。

## 2. 研究の目的

本研究では、これまでに得られた研究成果を更に発展させ、以下の課題に取り組み、NHaseファミリー酵素の触媒中心形成と反応機構を分子レベルで明らかにすることを目的とする。

(1) 本来の基質であるニトリルを基質とした NHase 反応機構。本来の基質であるニトリルの触媒過程の時間分割構造解析を行う。

(2) 中性子構造解析。水素原子に関する情報は原理的に結晶構造解析からは得られない。そこで、システイン酸化修飾のイオン化状態や基質ポケット周辺の水和水、水素結合ネットワーク等に関する情報を得るため、中性子結晶構造解析を行う。

(3) システイン酸化修飾が触媒として機能するメカニズム。システイン酸化修飾を持たない酵素を調製し、機能解析を行う。

(4) ニトリルヒドラターゼファミリー酵素の基質認識機構。SCNaseの基質ポケットとNHaseのそれとの違いとして、SCNaseの基質ポケット深部に存在する2つのアルギニン残基に着目し、その変異体を作製する。

(5) システイン酸化修飾の生成機構。これまでの研究から、SCNaseの成熟化過程では、金属結合サブユニットである $\gamma$ サブユニットが活性化タンパク質P15Kと複合体を形成して立体構造形成、Coの導入、翻訳後修飾形成を行い、その後、P15Kから解離して、他のサブユニットと集合するというモデルを提唱した。このモデルでまだ明らかにされていない $\gamma$ サブユニットとP15K複合体へのCoの導入、翻訳後修飾形成、P15Kの解離過程を明らかにする。

### 3. 研究の方法

反応機構解析と中性子構造解析にはNOの結合と光解離で触媒活性を制御できる*Rhodococcus erythropolis* N771 由来 Fe 型 NHase を用いた。システイン酸化修飾が触媒として機能するメカニズムの解析には、アポ型の調製も可能な *Pseudonocardia thermophila* JCM 3095 由来 Co 型 NHase を用いた。ニトリルヒドラターゼファミリー酵素の基質認識機構とシステイン酸化修飾の生成機構に関しては、類縁酵素である SCNase を用いた。

(1) 本来の基質であるニトリルを基質とした NHase 反応機構。生化学的解析から触媒活性に重要であると報告されている  $\alpha$ Ser113 配位子と近傍の  $\beta$ Tyr72 を Ala、Phe に置換した変異体を作製し、その生化学的解析と結晶構造解析を行った。さらに、NO 結合型  $\alpha$ S113A 変異体結晶に基質として t-butyl nitrile (tBuCN) を加え、触媒反応の時間分割構造解

析を試みた。また、システイン酸化修飾に水素結合する  $\beta$ Arg56 を Lys に置換した変異体は水和活性が野生型の 1/500 以下に減少する。そこで、 $\beta$ R56K 変異体を用いて、tBuCN 水和反応の時間分割構造解析を行った。

(2) 中性子構造解析。中性子構造解析には一辺が 1mm 以上の巨大な結晶が必要である。そこで、sitting drop 法でタンパク質溶液を順次加えながら結晶化することにより、巨大結晶の作製を試みた。

(3) システイン酸化修飾が触媒として機能するメカニズム。未修飾の Co 型 NHase の調製を行う。方法としては、Co 型 NHase 組換え体を嫌気条件下で発現させる。

(4) ニトリルヒドラターゼファミリー酵素の基質認識機構。SCNase の基質ポケット深部に存在する  $\beta$ Arg90,  $\gamma$ Arg136 をそれぞれ NHase の相当する残基である Phe, Trp に置換し、両変異体の生化学的解析、結晶構造解析を行う。

(5) システイン酸化修飾の生成機構。SCNase  $\gamma$  サブユニットと P15K 複合体 ( $\gamma$ -P15K) への Co イオンの導入、 $\gamma$ -P15K の解離過程、翻訳後修飾形成過程について解析する。

### 4. 研究成果

(1) 本来の基質であるニトリルを基質とした NHase 反応機構。各変異体  $\alpha$ S113A、 $\beta$ Y72F の触媒活性を測定したところ、 $\alpha$ S113A では野生型と同等 Km を示したが、kcat は野生型 (WT) の 1/1000 にまで低下し、 $\beta$ Y72F の活性は検出限界以下であった。 $\alpha$ S113A の結晶構造は WT とほとんど同一であった。 $\alpha$ S113A 結晶に基質としてトリメチルアセトニトリルを加え、反応時間による基質電子密度の変化を追跡したところ、反応開始 60 分以降では第 6 配位座に水分子が結合し、水分子から

2.80 Å 上方にトリメチルアセトアミドの電子密度が観測された。 $\beta$ Y72F の構造も WT とほとんど同一であったが、 $\alpha$ Cys114-SOH が Cys-SO<sub>2</sub>H に酸化されていた。そのため、 $\beta$ Y72F が酵素活性を示さない原因が変異によるのか、 $\alpha$ Cys114-SOH の酸化に起因するのかは特定できなかった。以上の結果から  $\alpha$ S113 は基質親和性に関与するものの、必須ではないと結論した。

$\beta$ R56K は  $K_m$  については野生型よりもやや大きな程度であるが、 $k_{cat}$  は野生型の 1/500 まで低下する。そこで、 $\beta$ R56K を用いて時間分割構造解析を行った。その結果、基質である tBuCN は反応開始 2 分間後では野生型に加えた tBuNC と同じ位置に観測され、180 分後では、電子密度に変化がみられた (図 1)。基質の電子密度のうち、tBu 基は明瞭に観察されていないが、tBu 基とニトリル基(-CN)の C-N 間の結合が三重結合の直線ではなく、屈曲しているように観測される。また、ニトリル基の炭素原子に Cys-SOH 配位子の酸素原子が直接相互作用しているように観測された。残念ながら、2011 年 3 月の震災と節電のため、これ以上のデータ収集はできなかったが、反応機構解明のための新たなデータを得ることに成功した。

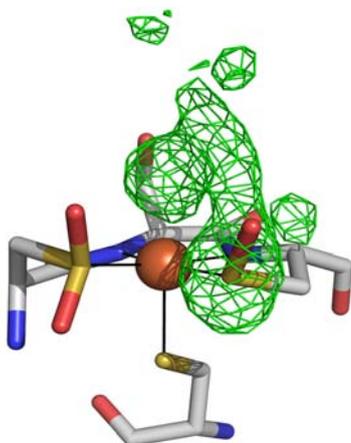


図 1.  $\beta$ R56K の NO 結合型結晶に tBuCN をソーキングし、180 分光照射して反応後に測定した Fe 反応中心近傍の構造。Fo-Fc map を緑色のメッシュで示す。

(2) 中性子構造解析。Sitting Drop 法で結晶化したドロップに、タンパク質溶液を順次加える方法で、巨大結晶を作製した。その結果、一辺が 0.5 mm の結晶を得ることに成功したが、2011 年 3 月の震災と節電のために実験を中断せざるを得ず、また、中性子ビームラインも停止していたので、この実験は断念し、次の課題とした。

(3) システイン酸化修飾が触媒として機能するメカニズム。*Pseudonocardia thermophila* JCM 3095 由来 Co 型 NHase の大腸菌による組換え体発現系の構築を行ったが、Co イオンの効率よい導入ができなく、大部分がアポ型として発現した。そのため、*Rhodococcus* 属宿主ベクター系を利用した発現系を構築した。安定してホロ型を発現させることが可能となったが、宿主を嫌気条件下で発現させることは不可能であった。そのため、現在、アポ型酵素への金属の導入、ならびにホロ酵素の酸化修飾を還元する方法を検討している。

(4) ニトリルヒドラターゼファミリー酵素の基質認識機構。 $\beta$ R90F,  $\gamma$ R136W のいずれの変異体も SCNase 活性を全く示さないが、NHase 活性を示した (表 1)。いずれの変異体の  $K_m$  も野生型 SCNase の SCN<sup>-</sup> に対する  $K_m$  (11mM) に近い値を示したが、いずれの変異体も  $k_{cat}$  は野生型の SCN<sup>-</sup> に対する値よりも著しく大きく、鉄型 NHase のニトリル基質に対する  $k_{cat}$  の約 20% に達した。次に  $\gamma$ R136W 変異体の結晶構造を 2.73 Å 分解能で決定した。野生型 SCNase においては、基質ポケットへのチャンネルは非常に狭い。一方、SCNase $\gamma$ R136W 変異体においては、置換された  $\gamma$ Trp136 のインドール環がチャンネルに沿った状態に位置し、かつ隣接する Gln の側鎖が  $\gamma$ Trp136 のインドール環の立体障害のために移動しているために、基質ポケット容積が増大していた。また、野生型 SCNase の基質ポケット表面は

Arg 側鎖のグアニジル基のために正に帯電しているのに対し、SCNase $\gamma$ R136W 変異体のそれは中性に近い状態であった(図 2)。以上の結果から、SCNase と NHase の触媒反応機構は基本的に保存されており、基質ポケットの大きさと表面荷電が基質選択性を決定していることが示された。

表 1. SCNase 変異体の反応力学的パラメータ

	SCNase <sup>(1,3)</sup> WT	$\beta$ R90F <sup>(2)</sup>	$\gamma$ R136W <sup>(2)</sup>	NHase <sup>(2)</sup> WT
$K_m$ (mM)	~11	13	7.9	0.75
$k_{cat}$ ( $10^3 s^{-1}$ )	0.093	0.27	0.16	1.6
$k_{cat}/K_m$ ( $s^{-1}mM^{-1}$ )	~8.5	22	20	$2.1 \times 10^3$

(1) SCNase 活性; (2) メタアクリロニトリルを基質とした NHase 活性 (3) Katayama, Y. et al., *J. Biol. Chem.* 267, 9170 (1992)

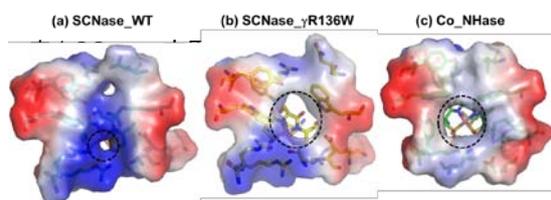


図 2. (a) 野生型 SCNase、(b) SCNase $\gamma$ R136W 変異体、(c) Co 型 NHase の基質ポケット近傍の表面電荷図。

(5) システイン酸化修飾の生成機構。近年、類縁酵素であるニトリルヒドラーゼにおいて、特異的活性化タンパク質と結合した金属結合サブユニットがアポ酵素のサブユニットと交換して成熟化する subunit swapping 機構が報告された。SCNase も同様の活性化タンパク質 P15K を必要とするため、成熟化機構を解析した。P15K を  $\gamma$  と共発現させると複合体  $\gamma$ -P15K を形成し、Co を結合した。一方、Co 添加培地で P15K と  $\gamma$  を共発現させると、 $\gamma$ -P15K 複合体の他に、遊離の  $\gamma$  が大量に発現した。Co 添加培地で  $\gamma$  を単独で発現させると封入体となることから、P15K は  $\gamma$  の立体構造形成と Co の結合に関与し、Co の結合後に  $\gamma$  から解離すると考えられた。そこで、in vitro で Co 結合型  $\gamma$ -P15K 複合体から P15K

が解離する条件を調べたところ、新生  $\gamma$  サブユニットを添加することで、Co 結合型  $\gamma$  の解離が促進されることがわかった。最後に Co 結合型  $\gamma$  の存在下で  $\alpha$ ,  $\beta$  サブユニットを in vitro タンパク質合成系で発現させたところ、 $\alpha$ ,  $\beta$  の順に Co 結合型  $\gamma$  に結合し、SCNase 活性を示した。すなわち、SCNase では subunit swapping ではなく、P15K の結合で  $\gamma$  の立体構造形成と金属取込が誘導され、その後、遊離  $\gamma$  に  $\alpha$ ,  $\beta$  が結合して成熟化することが明らかになった。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

1. Yamanaka Y., Hashimoto K., Ohtaki A., Noguchi K., Yohda M., and Odaka M.: Kinetic and structural studies on roles of the serine ligand and a strictly conserved tyrosine residue in nitrile hydratase, *J. Biol. Inorg. Chem.*, 15, 655-665 (2010). (査読有)
2. Ohtaki A., Murata K., Sato Y., Noguchi K., Miyatake H., Dohmae N., Yamada K., Yohda M., and Odaka M.: Structure and characterization of amidase from *Rhodococcus* sp.N-771: Insight into the molecular mechanism of substrate recognition, *Biochim. Biophys. Acta*, 1804, 184-192 (2010). (査読有)
3. Arakawa T., Kawano Y., Katayama Y., Nakayama H., Dohmae N., Yohda M., and Odaka M.: Structural basis for catalytic activation of thiocyanate hydrolase involving metal-ligated cysteine modification, *J. Am. Chem. Soc.*, 131, 14838-14843 (2009). (査読有)

[学会発表] (計 38 件)

1. Yamanaka Y., Arakawa T., Namima S., Hori S., Ohtaki A., Noguchi N., Katayama Y., Yohda M., and Odaka M.: Effect of arginine residues around the substrate binding pocket on the substrate specificity of thiocyanate hydrolase, 12th European Biological Inorganic Chemistry Conference, Vancouver, Canada, August 10 (2011).
2. Yohda M., Hashimoto K., and Odaka M.: Catalytic Mechanism of Nitrile Hydratase Proposed by Time-Resolved X-Ray Crystallography, The 12th International

- Conference on QiR(Quality in Resarch), Bali, Indonesia, July 5 (2011).
3. Yamanaka Y., Hashimoto K., Ohtaki A., Noguchi K., Yohda M. and Odaka M.: Biochemical and structural studies on roles of the serine ligand and a strictly conserved tyrosine residue in Nitril Hydratase, EUROBIC 10 (10th European Biological Inorganic Chemistry Conference), Thessaloniki, Greece, July 22 (2010).
  4. Odaka M., Arakawa T., Kartayama Y., Nakayama H., Dohmae N., Yohda M.: Structural Basis for Catalytic Activation of Thiocyanate Hydrolase Involving Metal-Ligated Cysteine Modification, EUROBIC 10 (10th European Biological Inorganic Chemistry Conference), Thessaloniki, Greece, July 22 (2010).
  5. 尾高雅文, 橋本浩一, 山中保明, 大滝証, 野口恵一, 養王田正文: アクリルアミド生産に使われる酵素ニトリルヒドラーゼの反応機構, 日本化学会第90年会 ATP シンポジウム「物質・エネルギー変換材料」, 大阪, 3月26日 (2010)
  6. 尾高雅文: アクリルアミド生産に使われる酵素ニトリルヒドラーゼの触媒機構解明の現状, H21 年度生命物質構造解析研究会, 東京, 1月15日 (2010)
  7. Odaka M., Hashimoto, K., Suzuki, H., Taniguchi, K., Noguchi, T., Yohda, M.: Catalytic mechanism of nitrile hydratase proposed by time-resolved X-ray crystallography using a novel substrate, tert-butylisonitrile, The 14th International Conference on Biological Inorganic Chemistry (ICBIC14), Nagoya, Japan July 30 (2009).

[その他]

ホームページ等

<http://www.tuat.ac.jp/~yohda/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

尾高 雅文 (ODAKA MASAFUMI)

東京農工大学・大学院工学研究院・准教授

研究者番号：20224248

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

黒木 良太 (KUROKI RYOTA)

独立行政法人日本原子力研究開発機構・量子ビーム応用研究部門・ユニット長

研究者番号：30391246