

平成 30 年 6 月 29 日現在

機関番号：11401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H03832

研究課題名(和文)新奇環状反応中間体の立体構造に基づくニトリル水和酵素触媒機構の全容解明

研究課題名(英文) Uncovering the catalytic mechanism of nitrile hydratase based on the structure of the novel cyclic reaction intermediate

研究代表者

尾高 雅文 (ODAKA, MASAFUMI)

秋田大学・理工学研究科・教授

研究者番号：20224248

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：ニトリル水和酵素(NHase)は、非ヘム鉄に配位したニトリル炭素を Cys-SO₂-配位子の側鎖O原子が求核攻撃することで環状反応中間体を形成する。シリアルフェムト秒時間分割構造解析(SFX)を用いて環状中間体形成以降の触媒反応機構を明らかにするため、以下の研究を行った。既知の立体構造をもとにしたQM/MM法によって環状中間体に作用すると予測された Tyr37の変異体の結晶構造を決定した。また、顕微紫外可視吸収スペクトル法によって触媒反応中間体の補正に成功した。更に、SFXに使用可能なNHase微結晶の作成条件の最適化を行った。

研究成果の概要(英文)：In the hydration mechanism of nitrile hydratase (NHase), the substrate nitrile molecule, coordinated to the non-heme iron is attacked nucleophilically by the O-atom of the cysteine-sulfonate ligand, to form a novel cyclic intermediate. To uncover the reaction mechanism followed by the cyclic intermediate by serial femtosecond crystallography, we performed the following researches. Tyr37, which was suggested to be involved in the proton-transfer to the N-atom of the cyclic intermediate based on the hybrid quantum mechanics/molecular mechanics (QM/MM) method, was substituted by Phe, Ile or Ala. All mutant NHases showed significant catalytic activity. And, the crystal structure of the Y37K mutant was basically unchanged except for the substituted residue. We identified the reaction intermediate species of NHase by using time-resolved microspectroscopy. We determined the crystallization condition which is enough small for SFX analyses.

研究分野：生体関連化学

キーワード：触媒反応機構 反応中間体 翻訳後修飾 時間分割結晶構造解析 顕微分光法 SFX XFEL

1. 研究開始当初の背景

ニトリル水和酵素(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、ニコチンアミドなどの生産に広く利用される、工業的に最も成功した酵素である。我々は、鉄型酵素の質量分析と結晶構造から、NHase が二つの主鎖アミド窒素とシステインスルフィン酸 (Cys-SO₂)、システインスルフェン酸 (Cys-SO) という酸化修飾を受けたシステインを配位子とする特異な金属反応中心をもち、高い触媒活性を示すこと、Cys-SO修飾が触媒反応に不可欠であること等を明らかにした。他のグループにより報告されたコバルト型酵素の結晶構造・生化学的研究成果とモデル錯体や理論計算等の研究から、金属反応中心は Lewis 酸として機能すること、システイン酸化修飾の機能が予測され、変異体解析から触媒に重要なアミノ酸残基が報告されたが、触媒機構の解明には至らなかった。

鉄型 NHase は一酸化窒素(NO)の結合と光解離で酵素活性を制御できる。そこで、我々は、NO 結合型の鉄型 NHase 結晶を基質存在下で光活性化することにより、イソニトリル(R-NC)をアミンと一酸化炭素(CO)に分解する新規触媒活性の時間分割結晶構造解析を行い、Cys-SO修飾が触媒過程に直接含まれることを明らかにした。一方、Holzらのグループは、コバルト型 NHase とホウ酸誘導体複合体の結晶構造から、Cys-SO修飾が触媒反応において求核基として機能する可能性を報告した(Martinez S. et al., JACS (2013))。更に、2014年1月には、Hopmann がホウ酸誘導体複合体の構造をもとに理論計算を行い、Cys-SOの求核攻撃で生じた中間体のイオウ原子を他のシステイン配位子が攻撃してジスルフィド中間体を形成するという新たな反応モデルを提唱した(Hopmann K., Inorg. Chem. (1014))。しかし、ホウ酸誘導体は低分子を含む広汎な化合物中の-SO基を求核基として反応する(Liu C.T. and Benkovic J.C., JACS(2013))ため、上記複合体が反応中間体の構造を反映するかどうかは明確でない。また、ジスルフィド中間体の形成に関する構造学的・生化学的データは得られていない。本酵素のように、新規触媒中心をもつ酵素の反応機構を理解するには、反応中間体の構造を知ることが本質的に重要である。

以上の背景から、我々は、放線菌 *Rhodococcus erythropolis* N771 由来鉄型 NHase (ReNHase)を材料とし、NO の光解離を利用した時間分割結晶構造解析による触媒反応機構

解析を進めてきた。時間分解能を考慮し、 k_{cat} が 1/500 程度に減少するのに対して K_m は大きく変化しない $\beta R56K$ 変異体を使用した。NO 結合型 $\beta R56K$ 変異体結晶に基質として Pivalonitrile を加えて光活性化させ、0~700 分間反応させた後、1.2Å 分解能で立体構造を決定した。その結果、50~700 分のデータにおいて、基質由来の電子密度が酵素の非ヘム鉄に配位した構造を得た。解析の結果、基質由来の電子密度は生産物である Pivalamide の構造と非常に良く一致しており、Cys-SOの O 原子がニトリル基の C 原子に結合し、新規な環状の反応中間体を形成していた。即ち、NHase の触媒機構では、(i) 基質のニトリル窒素が金属中心に配位し、(ii) Cys-SOの-SO基が基質を求核攻撃して新規環状反応中間体を形成することが明らかとなった。

2. 研究の目的

1. に述べたように、我々は、酵素への基質の結合過程ならびに新奇環状中間体の構造を明らかにした。残された課題は、反応する水分子の活性化と環状反応中間体から生産物が解離する機構の解明である。そのために最も重要な研究は、野生型酵素によるニトリル水和反応の反応中間体構造の決定である。しかし、既存の X 線結晶構造解析では時間分解能が不足してしまう。そこで、X 線レーザーを使用したシリアルフェムト秒時間分割構造解析(SFX)を行うことを計画した。この目的のため、本研究課題では、以下の研究を遂行することにより、NHase の触媒反応機構を明らかにすることを目的とした。

- (1) 既存の結晶構造に基づく理論計算と新たな変異体 NHase の X 線結晶構造解析
我々が決定した ReNHase の結晶構造をもとに QM/MM 法で触媒機構を解析する。得られた反応モデルをもとに、新たな変異体を構築し、生化学的特性解析と従来法による X 線結晶構造解析を行い、触媒機構への寄与を調べる。
- (2) 時間分解顕微分光法によるニトリル水和反応の反応中間体の解析
SFX を行うためには、予め、分光法など原理の異なる他の解析方法で反応中間体の情報を得ておくことが必要不可欠である。そこで、時間分解顕微分光法により、野生型酵素の光活性化条件を検討するとともに、ニトリル水和反応の反応中間体の情報を得る。
- (3) 微結晶の大量調製法の検討
SFX では、大量の微結晶を連続的にスプ

レーし、X線レーザーを照射して構造解析を行う。そのための準備として、微結晶作製条件を検討した。

3. 研究の方法

(1) 既存の結晶構造に基づく理論計算と新たな変異体 NHase の X 線結晶構造解析

野生型 *Re*NHase の基質無しの結晶構造と β R56K 変異体の環状中間体構造をもとに QM/MM 法を用いて触媒機構を解析した。得られた反応モデルに基づき、水和反応寄与すると予測されるアミノ酸残基を特定して変異体を作製した。得られた変異体のニトリル水和活性を測定した後、結晶化して X 線結晶構造解析を行った。

(2) 時間分解顕微分光法によるニトリル水和反応の反応中間体の解析

野生型 *Re*NHase の NO 結合型の結晶に室温または 100 K 環境下で、308 nm のポンプ光を照射し、照射前後の顕微紫外可視吸収スペクトルを測定した。また、不活性な NO 結合型 *Re*NHase 結晶に基質 pivalonitrile を添加した状態で同様な測定を行った。

(3) 微結晶の大量調製法の検討

SFX に必要な大量の微結晶調製法の検討を行った。具体的には、まず、大量の酵素を調製するために、NHase を高発現する菌体の選択から精製法までを再検討した。次に、得られた NHase をバッチ法で微結晶化する条件の探索を行った。

4. 研究成果

(1) 既存の結晶構造に基づく理論計算と新たな変異体 NHase の X 線結晶構造解析

我々が決定した野生型 *Re*NHase の結晶構造をもとに QM/MM 法で触媒機構の研究がなされたところ、Hopmann らと同様に、新奇環状反応中間体の形成後に、非ヘム鉄中心の軸配位子となる Cys のチオール基が Cys-SO⁻の -SO⁻基を攻撃してジスルフィド結合を形成する反応モデルが得られた。この反応モデルでは、非ヘム鉄中心上部に位置する β Tyr37、 β Tyr72、 α Ser113 の間でプロトン移動が起こって基質 N 原子が水素化されることがジスルフィド形成に寄与すると考えられた。そこで、次に、 β R56K 変異体の環状中間体構造をもとに QM/MM 法による計算を実施したところ、 β R56K 変異体では環状中間体からジスルフィド結合を形成するためのエネルギー障壁が大きくなってしまい、ジスルフィドを形成できないことがわかった。すなわち、環状中間体の構造が得られたのは、変異によってそ

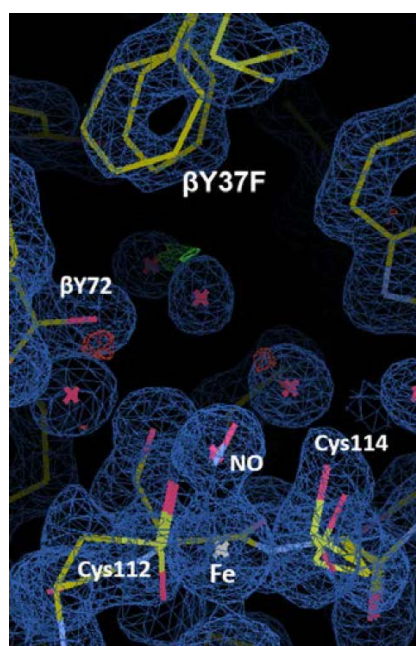


図 1. β Y37F 変異体 NHase の結晶構造。活性中心近傍の構造を示す。図中、炭素、窒素、酸素原子を黄色、青色、赤色のスティックで示す。紺色のメッシュは電子密度を示す。

れ以降の触媒反応が進みにくくなったためと考えられる。そこで、ジスルフィド結合形成に寄与すると予測された β Tyr37 を Phe、Ile、Ala に置換した変異体 (β Y37F, β Y37L, β Y37A) を構築した。いずれの変異体も野生型の 30% 以上の触媒活性を示した。 β Y37F の結晶構造を決定したところ、 β Phe37 はダブルコンフォメーションをとっていたが、それ以外の構造は変化していなかった (図 1)。 β Tyr37 \rightarrow Phe の変異だけでは、時間分割構造解析を実施するには触媒活性が大きすぎると考えられた。これまでに、我々は、同じ水素結合ネットワークに含まれる α Ser113 を Ala に置換した変異体を作製しており、やはり、立体構造の変化は局所のみであり、野生型酵素の約 40% の触媒活性を示すことを明らかにしている (Yamanaka, Y. *et al.*, *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2010)。そこで、今後、両者の二重変異体の大腸菌による発現系を構築し、得られた変異体による触媒反応の時間分割構造解析を行うことを計画している。

(2) 時間分解顕微分光法によるニトリル水和反応の反応中間体の解析

まず、NO 結合型 *Re*NHase の NO の光解離による活性化に必要な光照射条件を確認するため、室温と 100 K において 308 nm のポンプ光を照射し、照射後のスペクトル変化を測定した。その結果、室温では NO 結合型 *Re*NHase に特徴的な 370 nm の正のピークが光

照射後に減少した(図 2A)。この吸収スペクトル変化は溶液中における NO 結合型 *ReNHase* の光応答に伴う吸収スペクトル変化と同一であり、この条件で結晶中の NO 結合型 *ReNHase* をポンプ光により光活性化可能なことが明らかとなった。一方、100 K 環境下では、吸収スペクトル変化は観測されなかった。次に、NO 結合型 *ReNHase* 結晶に基質として pivalonitrile をソーキングによって添加した後、室温で同様にポンプ光による光照射前後のスペクトルを測定した。その結果、基質を加えない場合と同様に、370 nm の正のピークが光照射後に減少し、更に光照射後では 450 ~ 500 nm 付近にブロードな正のピークを生じていた(図 2B)。図 2C に基質を添加した場合と添加しなかった場合における光照射後の差スペクトルを示す。この差スペクトルは、Holz らのグループが鉄型 *NHase* 溶液を用い

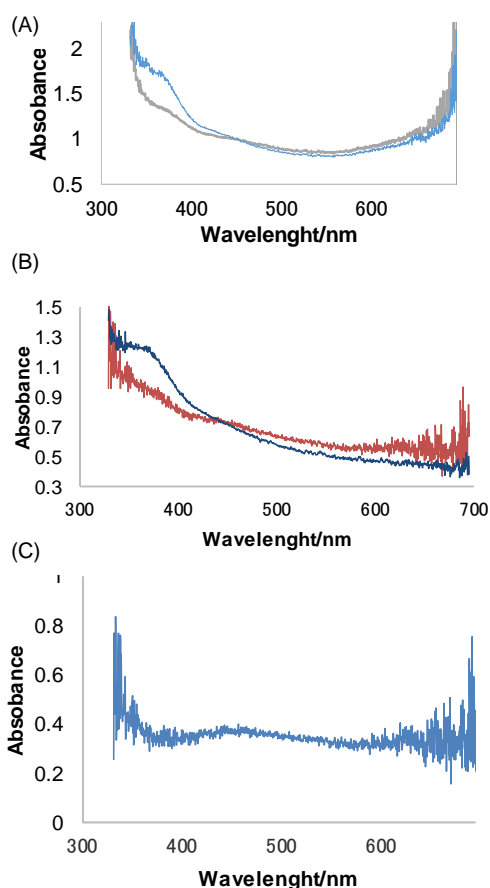


図 2. 野生型 *ReNHase* の顕微紫外可視吸収スペクトル。(A) 室温で測定した NO 結合型 *NHase* のスペクトル。光照射前(灰色)、光照射後(薄青色)。(B) 基質 pivalonitrile をソーキング後に室温で測定した NO 結合型 *NHase* のスペクトル。光照射前(赤色)、光照射後(青色)。(C) 基質を添加した場合と添加しなかった場合における光照射後の差スペクトル。基質添加後のスペクトルから基質添加前を差し引いたもの)

たストップフロー分光法で報告した吸収スペクトル変化と酷似しており、結晶中で触媒反応中間体のスペクトルを補足することに成功したと考えられる。

(3) 微結晶の大量調製法の検討

まず、不活性な NO 結合型 *ReNHase* を大量に調製するために、*R. erythropolis* N771 株をスクリーニングし、目測で菌体総タンパク質の 20%以上を *ReNHase* として発現する株を選別した。次に、菌体の培養条件を最適化した後、菌体破碎液に NO 発生試薬 NOC7 を加え、酵素を完全に不活性化できる条件を決定した。この条件では、1 L の培養液から約 50 mg の酵素を精製可能であった。

従来、*ReNHase* は、不活性な NO 結合型を暗条件下で、ハンギングドロップでマイクロシーディング法を用いて結晶化することで、最も長い辺が 100 μm 程度の良質な結晶を得ることができる。しかし、SFX においては、各辺が数 μm 程度の微結晶を大量に用いる必要があるため、微結晶作成条件の検討を行った。100 mM Tris-HCl, pH 7.5, 24% PEG8000, 360 mM MgCl_2 を沈殿剤とし、60 mg/mL に濃縮した NO 結合型 *ReNHase* 溶液を体積比 1:1 で混合し、20°C においてバッチ法で結晶化させたところ、従来より小型の長辺が 50 μm 程度の結晶を得ることができた。更に条件を検討したところ、タンパク質溶液と沈殿剤を体積比 5:6 で混合することで、長辺が 10 μm 程度の微結晶が得られることを見いだした。以上のことから、本条件を最適化することで、SFX 測定に十分なサイズの微結晶を多量に得られると考えられた。

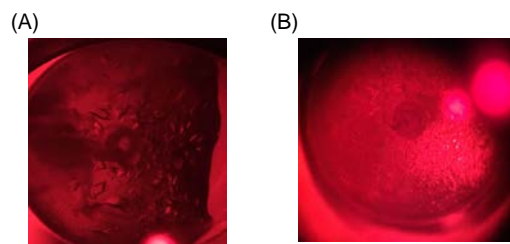


図 3. NO 結合型 *ReNHase* の微結晶作成条件の検討。(A) 100 mM Tris-HCl, pH 7.5, 24% PEG8000, 360 mM MgCl_2 を沈殿剤とし、60 mg/mL の NO 結合型 *ReNHase* を体積比 1:1 で混合し、20°C でバッチ法により結晶化したもの。(B) 酵素溶液と沈殿剤を体積比 5:6 で混合し、20°C でバッチ法により結晶化したもの。

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 4 件)

1. Light K. M., Yamanaka Y., Odaka M., Solomon E.I., Spectroscopic and computational studies of nitrile hydratase: Insights into geometric and electronic structure and the mechanism of amide synthesis, *Chem. Sci.*, 査読有, Vol. 6, No. 11, 6280-6294, 2015, doi: 10.1039/C5SC02012C.
2. Watanabe F., Yu F., Ohtaki A., Yamanaka Y., Noguchi K., Yohda M., and Odaka M., Crystal structures of halohydrin hydrogen-halide-lyases from *Corynebacterium* sp. N-1074, *Proteins*, 査読有, Vol. 83, No. 12, 2230-2239, 2015, doi: 10.1002/prot.24938.
3. Kayanuma M., Shoji M., Yohda M., Odaka M., Shigeta Y., Catalytic mechanism of nitrile hydratase subsequent to cyclic intermediate formation: a QM/MM study, *J. Phys. Chem. B.*, 査読有, Vol. 120, No. 13, 3259-1366, 2016, doi: 10.1021/acs.jpcc.5b11363.
4. Watanabe F., Yu F., Ohtaki A., Yamanaka Y., Noguchi K., Odaka M., and Yohda M.: Improvement of enantioselectivity of the B-type halohydrin hydrogen-halide-lyase from *Corynebacterium* sp. N-1074, *J. Biosci. Bioeng.*, Vol. 122, No. 3, 270-275, 2016, doi: 10.1016/j.jbiosc.2016.02.003.

[学会発表] (計 8 件)

1. Odaka M., Yamanaka Y., Kato Y., Hashimoto K., Iida K., Nagasawa K., Nakayama H., Dohmae N., Noguchi K., Noguchi T., and Yohda M., Snapshots of the reaction intermediate of nitrile hydratase reveal a role for the cysteine-sulfenic acid ligand as a catalytic nucleophile, the 17th International Conference on Biological Inorganic Chemistry (ICBIC17), 2015, July, Beijing
2. Yamanaka Y., Kato Y., Hashimoto K., Iida K., Nagasawa K., Nakayama H., Dohmae N., Noguchi K., Noguchi T., Yohda M., and Odaka M., Time-resolved crystal structures of the reaction intermediate of nitrile hydratase reveal a role for the cysteine-sulfenic acid ligand as a nucleophile, the Korean Society for Microbiology and Biotechnology, 2016, June, Daejeon
3. Yamanaka Y., Kato Y., Hashimoto K., Iida K., Nagasawa K., Nakayama H., Dohmae N., Noguchi K., Noguchi T., Yohda M., and Odaka M., Time-resolved crystal structures of the reaction intermediate of nitrile hydratase: revealing a role of cysteine sulfenic acid ligand as a catalytic nucleophile, The Fifth Symposium on Advanced Biological Inorganic Chemistry

(SABIC-2017), 2017, January, Kolkata

4. 高畑祥平、北條晴佳、松村洋寿、野口恵二、養王田正文、尾高雅文: β Tyr37 置換変異体によるニトリルヒドラーターゼの触媒機構解析, 第 44 回生体分子科学討論会, 2017 年, 6 月, 秋田
5. 林英輝、高畑祥平、北條晴佳、松村洋寿、當舎武彦、久保稔、杉本宏、野口恵二、養王田正文、尾高雅文: ニトリルヒドラーターゼの触媒反応機構解析—時間分割結晶構造解析 に向けた取組, 第 11 回バイオ関連化学シンポジウム, 2017 年, 9 月, 東京
6. 高畑翔平、北條晴佳、松村洋寿、野口恵二、養王田正文、尾高雅文: β Tyr37 置換変異体によるニトリルヒドラーターゼの触媒機構解析, 酵素工学研究会第 78 回講演会, 2017 年, 10 月, 秋田
7. 林英輝、高畑翔平、北條晴佳、松村洋寿、小川信明、野村高志、當舎武彦、城宜嗣、野口恵二、養王田正文、尾高雅文: ニトリルヒドラーターゼの触媒反応機構解析—時間分解紫外可視顕微分光スペクトル解析, 酵素工学研究会第 78 回講演会, 2017 年, 10 月, 秋田
8. 林英輝、北條晴佳、松村洋寿、小川信明、野村高志、當舎武彦、城宜嗣、野口恵二、養王田正文、尾高雅文: ニトリルヒドラーターゼの触媒反応機構解析—シリアルフェムト秒結晶構造解析に向けた取組, 2018 年度量子ビームサイエンスフェスタ, 2018 年, 3 月, 水戸

6. 研究組織

(1)研究代表者

尾高 雅文 (ODAKA MASAFUMI)
秋田大学・大学院理工学研究科・教授
研究者番号: 20224248

(2)研究分担者

野口恵一 (NOGUCHI KEIICHI)
東京農工大学・学術研究支援総合センター・
准教授
研究者番号: 00251588

松村洋寿 (MATSUMURA HIROTOSHI)
秋田大学・大学院理工学研究科・講師
研究者番号: 60741824

(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

養王田正文 (YOHDA MASAFUMI)
東京農工大学・大学院工学研究院・教授
研究者番号: 50250105