

研究種目：基盤研究(A)
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19208008
 研究課題名（和文） N-置換ホルムアミド代謝経路の全貌解明と有用物質生産への利用
 研究課題名（英文） Analyses of the N-substituted formamide metabolic pathway and their applications to the production of useful compounds
 研究代表者
 小林 達彦 (KOBAYASHI MICHIIHIKO)
 筑波大学・大学院生命環境科学研究科・教授
 研究者番号：70221976

研究成果の概要（和文）：

未解明な部分も多い N-置換ホルムアミド代謝の全貌および代謝に関わる酵素群の機能を解明するため、N-置換ホルムアミド生成・分解系に関わる両酵素をもつ微生物を解析した。N-置換ホルムアミド生成に関わる酵素を精製し諸性質を解析した結果、これまでの酵素とは異なる新しいタイプの酵素であることを見いだした。さらに、N-置換ホルムアミド分解に関わる酵素で逆反応が進行することを発見し、N-ベンジル有機酸アミドの酵素生産に成功するとともに、本逆反応の反応機構を解明した。

研究成果の概要（英文）：

To clarify the function of enzymes involved in the N-substituted formamide synthesis/degradation, the microorganism with both enzyme activities was analyzed. Isonitrile hydratase was purified and characterize. The enzyme was found to be a new type of isonitrile hydratase. Reverse reaction of N-substituted formamide deformylase was found and the reaction mechanism was proposed. Some compounds were produced using the reverse reaction the enzyme.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	13,800,000	4,140,000	17,940,000
2008年度	12,500,000	3,750,000	16,250,000
2009年度	11,500,000	3,450,000	14,950,000
年度			
年度			
総計	37,800,000	11,340,000	49,140,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：N-置換ホルムアミド、イソニトリル、アミド、代謝、酵素

1. 研究開始当初の背景

我々は、ニトリルの構造異性体であるイソニトリルの代謝に関する研究を行っている。

イソニトリルは、イソシアノ基をもち、ニトリルと同様、一般に高い毒性を示す。自然界において、本化合物は、海綿やカビ、細菌な

どのような生物によって生産されることが分かっているが、イソニトリルの代謝は未解明であり、これまで分子レベルでの解析は全く行われていなかった。近年、我々は *Pseudomonas putida* N19-2 株からイソニトリル分解酵素であるイソニトリルヒドラーゼを世界で初めて発見・命名し、イソニトリル代謝の新しい領域を開拓した。本酵素はイソニトリルを水和して *N*-置換ホルムアミドに変換する。

しかし、生じた *N*-置換ホルムアミドがどのように代謝されるかについてはこの時点で全く解析されていなかったため、まず、*N*-置換ホルムアミド分解菌 *Arthrobacter pascens* F164 株を単離した後、本株から *N*-置換ホルムアミド分解酵素を精製し、その諸性質を調べ、本酵素が新規デホルミラーゼであることを実証し、*N*-置換ホルムアミドデホルミラーゼ (NfdA) と命名した。さらに、我々が開発した放線菌用誘導型高発現ベクター pSH19 を用いることで、本酵素の大量発現系確立・（天然酵素と酵素学的に同一である）本酵素の大量取得に成功してした。

2. 研究の目的

本研究ではこれまでの研究成果を進展させ、F164 株の *N*-置換ホルムアミド生成・分解系に関わる一連の酵素群の同定を行うとともに、未解明な部分も多い *N*-置換ホルムアミド代謝の全貌および代謝に関わる酵素群の機能を解明することを目的とした。さらに、これら一連の研究で得られた知見を有用物質生産への応用に還元することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) F164 株イソニトリルヒドラーゼの精製と諸性質の解析

イソニトリル代謝に関わる微生物・酵素の探索を行い、二つの菌株を単離し、イソニトリルはイソニトリルヒドラーゼにより *N*-置換ホルムアミドへと水和され、さらに *N*-置換ホルムアミドデホルミラーゼによりアミンとギ酸へと分解される新しい代謝経路を発見していた。F164 株は *N*-置換ホルムアミド代謝能をもつ菌として単離され、本菌から *N*-置換ホルムアミドデホルミラーゼを精製したが、イソニトリルヒドラーゼ活性も検出され、両酵素が協調して働く可能性が示唆された。F164 株のイソニトリルヒドラーゼの最適培養条件ならびに各種精製条件の検討を行い、大量に調製した精製酵素を用いて酵素科学的諸性質を明らかにする。

(2) *N*-置換ホルムアミドデホルミラーゼ酵素を触媒として利用する有用物質生産系の開発

我々が発見したイソニトリルヒドラーゼと *N*-置換ホルムアミドデホルミラーゼは標準反応条件下において分解反応を触媒する。しかし、酵素の中には、ある反応条件下において高い逆反応活性を示すものが報告されていることから、両酵素においても逆反応を行い得る可能性がある。そこで、様々な反応条件（基質濃度、pH、酵素濃度など）下での本酵素活性を調べ、逆反応化条件の探索を行う。また、本酵素を用いた *N*-置換ホルムアミド関連化合物の有効な合成法の開発も試みる。

4. 研究成果

F164 株の *N*-置換ホルムアミド生成・分解系に関わる一連の酵素群の中で、イソニトリルヒドラーゼと *N*-置換ホルムアミドデホルミラーゼに関して得られた成果について以下に記載する。

(1) F164 株イソニトリルヒドラーゼの精製と諸性質の解析

F164 株は *N*-置換ホルムアミドデホルミラーゼだけでなく、イソニトリルヒドラーゼ活性も有することがスクリーニング時に判明している。F164 株由来イソニトリルヒドラーゼの詳細は明らかとなっておらず、本酵素を詳細に解析するため、今回、本酵素の生成量を増加すべく、培養条件を改良した。まず、基質の探索を行い、無細胞抽出液に共存する *N*-置換ホルムアミドデホルミラーゼの影響を受けず、イソニトリルヒドラーゼ活性を正確に測定する方法を構築した。次に、培地組成、培養時間を検討し、より本酵素が大量に取得できる条件を決定した。その過程で、本菌のイソニトリルヒドラーゼが誘導酵素であることが示唆されたことから、誘導剤として添加化合物の種類などを変え、種々の条件で培養を行った。調製した無細胞抽出液の活性を測定することで、本酵素活性が最大となる最適培養条件（当初の条件に比べて比活性、全活性ともに上昇）を決定した。

各種クロマトグラフィーにより本酵素を精製し、その諸性質を決定した。まず、本酵素反応のストイキオメトリーを調べたところ、基質であるベンジルイソシアニドの分解量と、*N*-置換ホルムアミドベンジルホルムアミドの生成量との間には 1 : 1 の化学量論比が成立しており、本酵素は、化学量論的にイソニトリルを水和により *N*-置換ホルムアミドへ変換する反応を触媒していることが明らかとなった。精製した F164 株イソニトリルヒドラーゼは、SDS-PAGE 上でのサブユニット分子量が（これまでの唯一の報告例である）*Pseudomonas putida* N19-2 株由来イソニトリルヒドラーゼとは異なり、約 13kDa

大きい値を示した。また、F164株のN末端部分アミノ酸配列を決定したが、N19-2株イソニトリルヒドラーゼとは全く相同性を示さなかった。さらに、F164株イソニトリルヒドラーゼのCDスペクトルを測定した結果、N19-2株イソニトリルヒドラーゼとは異なるスペクトルを示した。サブユニットの分子量の違いやCDスペクトルの結果などから、両酵素の構造が異なることが示唆された。この違いを明らかにするため、両株由来の抗イソニトリルヒドラーゼポリクローナル抗体をそれぞれ作成し、Western解析により、同じイソニトリルヒドラーゼ由来の抗体とは交差性を示すが、異なるイソニトリルヒドラーゼ由来の抗体との交差性が全くないことを確認した。これらの結果より、両酵素が全く異なる一次構造、二次構造を有していることが判明し、F164株イソニトリルヒドラーゼはN19-2株イソニトリルヒドラーゼと同じ反応を触媒するが、構造が全く異なる新しいタイプの酵素であることが強く示唆された。

(2) *N*-置換ホルムアミドデホルミラーゼ酵素を触媒として利用する有用物質生産系の開発

N-置換ホルムアミドをアミンとギ酸に分解する新規酵素 *N*-置換ホルムアミドデホルミラーゼは、*N*-ベンジルホルムアミドに対し最大活性を示すが、本酵素を用いて(基質としてギ酸とベンジルアミンから) *N*-ベンジルホルムアミドを合成する「逆反応」の可能性を検討した結果、基質を100 mM以上の高濃度にした時に逆反応が進むことを発見した。正反応と逆反応の反応効率を比較するため、キネティクスパラメータの測定を行った結果、正反応の *N*-ベンジルホルムアミドに対する $K_m = 0.08$ mM、 $V_{max} = 52.7$ units/mg、逆反応のギ酸に対する $K_m = 3010$ mM、 $V_{max} = 33.0$ units/mg、逆反応のベンジルアミンに対する $K_m = 53.6$ mM、 $V_{max} = 22.5$ units/mgであった。反応効率を示す「 k_{cat} / K_m 」は、正反応の基質である *N*-ベンジルホルムアミドに対しては 689 S⁻¹・mM⁻¹であるのに対し、逆反応の基質であるギ酸とベンジルアミンに対してはそれぞれ 0.01 S⁻¹・mM⁻¹と 0.41 S⁻¹・mM⁻¹であり、逆反応の反応効率は、正反応と比べて低いことを明らかにした。逆反応における *N*-置換ホルムアミドデホルミラーゼの至適pHは7で、至適温度は25°Cであり、*N*-置換ホルムアミドデホルミラーゼの至適pH等の条件は、逆反応及び正反応においてほぼ同じであることを明らかにした。

本逆反応の基質特異性を調べた結果、(ギ酸の代わりに)他の有機酸を基質にした場合、対応する *N*-ベンジル有機酸アミドが産物として得られることが示唆された。

さらに、本逆反応は2基質による酵素反応であるため反応速度論的解析を行い、各基質がどのように酵素反応を受けているかを調べた。まず、基質類似化合物の中から逆反応の阻害剤となり得るものを探索し、それら阻害剤がどのような様式で逆反応を阻害するかを調べた。その結果、本逆反応はギ酸、ベンジルアミンの順で基質が酵素に結合し、酵素と基質の3元複合体が形成された後、基質が産物に変換され、産物である *N*-ベンジルホルムアミドが酵素から解離するというordered sequential機構によって反応が進行することを明らかにした。

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 Sato, H., Hashimoto, Y., Fukatsu, H. and Kobayashi, M. “Novel isonitrile hydratase involved in isonitrile metabolism” *J. Biol. Chem.*, **285**, 34793-34802 (2010) [査読有]

② Hashimoto, Y. “Development of novel expression systems for actinomycetes” *Actinomycetol.*, **21**, 70-75 (2007) [査読有]

③ 橋本義輝、“イソニトリル・ニトリルの新規代謝経路の発見と新規酵素の分子機能解析”、*生化学*, **79**, 929-940 (2007) [査読無]

[学会発表] (計13件)

① 佐藤太祐、橋本義輝、小林達彦 “*Arthrobacter* 属放線菌由来の新規イソニトリルヒドラーゼの解析” 日本農芸化学会大会、平成22年3月29日、東京

② 佐藤太祐、橋本義輝、深津寛、小林達彦 “新規イソニトリルヒドラーゼの発見と諸性質の解析” 日本生化学会大会、平成21年10月23日、神戸

③ 小林達彦 “放線菌におけるニトリル関連化合物代謝の応用酵素学的研究” 日本放線菌学会、平成21年7月16日、秋田

④ 佐藤太祐、橋本義輝、深津寛、小林達彦

"*Arthrobacter* 属放線菌由来イソニトリル分解酵素の諸性質の解析"
日本放線菌学会、平成 21 年 7 月 16 日、秋田

⑤ M. Kobayashi, T. Sakashita, H. Fukatsu, and Y. Hashimoto

"Unique function of the enzyme involved in isonitrile metabolism - A new synthetic route to *N*-benzylamides -"
Biochemical Engineering XVI、平成 21 年 7 月 8 日、バーリントン(Burlington) USA

⑥ T. Sakashita, Y. Hashimoto, H. Fukatsu, and M. Kobayashi

"Biotransformation of benzylamine to *N*-benzylformamide"
109th ASM General Meeting、平成 21 年 5 月 18 日、ペンシルバニア USA

⑦ 佐藤太祐、橋本義輝、深津寛、小林達彦
"*Arthrobacter pascens* F164 株由来イソニトリルヒドラーゼの精製"
日本農芸化学会、平成 21 年 3 月 29 日、福岡

⑧ 坂下俊秀、橋本義輝、深津寛、小林達彦
"*N*-置換ホルムアミド分解酵素の逆反応による *N*-置換有機酸アミドの生成"
日本農芸化学会、平成 21 年 3 月 29 日、福岡

⑨ 坂下俊秀、深津寛、橋本義輝、小林達彦
"*放線菌の N*-置換ホルムアミド分解酵素の逆反応解析"
日本放線菌学会、平成 20 年 7 月 10 日、山梨

⑩ 佐藤太祐、深津寛、橋本義輝、小林達彦
"*Arthrobacter* 属放線菌のイソニトリル分解酵素の誘導発現の検討"
日本放線菌学会、平成 20 年 7 月 10 日、山梨

⑪ H. Sato, Y. Hashimoto, H. Fukatsu and M. Kobayashi

"Degradation of isonitrile by isonitrile hydratase coupled with *N*-substituted formamide deformylase in *Arthrobacter pascens*"
FEBS&IUBMB、平成 20 年 7 月 3 日、アテネ

⑫ M. Kobayashi, M. Goda, H. Fukatsu and Y. Hashimoto

"New Enzymes involved in isonitrile degradation"
i-Bio-2008 World Congress、平成 20 年 5 月 18 日、中国 杭州

⑬ 佐藤太祐、深津寛、橋本義輝、小林達彦
"*Arthrobacter pascens* F164 株由来イソニトリルヒドラーゼの最適発現条件"

日本農芸化学会大会、平成 20 年 3 月 28 日、名古屋

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 達彦 (KOBAYASHI MICHIOHKO)
筑波大学・大学院生命環境科学研究科・教授
研究者番号：70221916

(2) 研究分担者

東端 啓貴 (HIGASHIBATA HIROKI)
東洋大学・生命科学部・准教授
研究者番号：20344864

橋本 義輝 (HASHIMOTO YOSHITERU)
筑波大学・大学院生命環境科学研究科・講師
研究者番号：00323254

(3) 連携研究者

なし