

令和 5 年 6 月 27 日現在

機関番号：11401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H02667

研究課題名(和文)XFELと中性子ビームを用いたニトリルヒドラーゼ触媒反応の遷移状態構造の解明

研究課題名(英文)Structural determination of the reaction intermediate of nitrile hydratase by XFEL and neutron beam

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) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：ニトリルヒドラーゼ触媒反応の遷移状態を、XFELを用いた時分割シリアルフェムト秒X線結晶構造解析(時分割SFX)と中性子構造解析という最先端の結晶構造解析法を用いて明らかにすることを目的とした。そのため、鉄型ニトリルヒドラーゼの微小結晶の大量調製法並びに時分割SFXに必要な高粘度溶媒条件を決定した。また、鉄型とコバルト型ニトリルヒドラーゼの中性子構造解析に向けた巨大結晶の作製条件を検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ニトリルヒドラーゼはアクリルアミドやニコチンアミドの工業生産に利用される産業的に最も成功した酵素の一つである。また、申請者らが明らかにしたように、本酵素は、酸化修飾を受けたシステイン残基を配位子とする極めて特異な活性中心をもち、高い触媒活性を示すことがわかっている。本研究では、その特異な活性中心による触媒機構を最先端の結晶構造解析法で明らかにすることによって本酵素の新規な触媒機構を解明し、より低コストかつ高効率な触媒法の開発を目指すものである。

研究成果の概要(英文)：We aimed to determine the structure of the reaction intermediate of nitrile hydratase by time-resolved serial femto-second X-ray crystallography using XFEL and by neutron crystallography. We optimized the methods to obtain small crystals (less than 30 micron) of Fe-type NHase reproducibly. Also, we determined the high-density carrying medium to be 30%(w/v) hydroxyethyl cellulose. For the neutron crystallography, we optimized the crystallization condition of Fe-type and Co-type nitrile hydratases.

研究分野：生体関連化学

キーワード：遷移状態 反応中間体 XFEL 時分割結晶構造解析 中性子構造解析 触媒反応機構 ニトリルヒドラーゼ システインスルフェン酸

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

### 1. 研究開始当初の背景

酵素の触媒反応機構を理解する上で、遷移状態に近い反応中間体の構造を決定することは極めて重要である。しかし、反応中間体は不安定であるため、結晶構造解析等で全体構造を決定することは極めて難しい。我々はニトリルヒドラターゼ (NHase) の触媒機構を研究している。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 ( $\alpha$ Cys112-SO<sub>2</sub>H)、システインスルフェン酸 ( $\alpha$ Cys114-SOH) (アミノ酸番号は *Rhodococcus erythropolis* N771 由来 NHase に基づく) 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つこと、Cys-SOH 修飾が触媒反応に不可欠であること等を明らかにした。その後、他のグループによるコバルト型 NHase の結晶構造決定、我々や他のグループによる生化学的研究、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。

そこで、我々は、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ことを利用し、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、触媒反応の時間分解結晶構造解析を開始した。野生型のニトリル水和反応は早すぎてモニターできないため、 $k_{cat}/K_m$  が大きく減少する 6R56K 変異体による触媒反応の時間分解構造解析を行った。その結果、光照射前では非ヘム鉄に NO が配位し基質がポケット内に存在していたのに対し、光照射 25 分後では基質の電子密度が非ヘム鉄に結合する位置に移動し、50 分以降では鉄に結合した状態で観測された。解析の結果、システインスルフェン酸の O 原子がニトリル基の C 原子に結合した環状反応中間体の結晶構造を 1.2 Å 分解能で決定することに初めて成功した。この結果、NHase の触媒反応では、(i) 基質のニトリル窒素が金属中心に配位し、(ii) Cys-SOH の -SOH 基が基質を求核攻撃して環状の反応中間体を形成することが反応中間体の立体構造をもとに明らかにされた。こうして、NHase の触媒機構における基質の結合からニトリル炭素への酸素原子が結合して形成される環状中間体の生成までのステップは立体構造的に明らかにされた。

残された反応ステップは水分子の活性化と環状中間体からの生産物の解離である。<sup>18</sup>O ラベルした水を用いた FTIR スペクトル解析と質量分析 (Nelp M.T. *et al.*, *J. Biol. Chem.* 2016) から、図 3 に示すように、(a) 活性化された水分子が  $\alpha$ Cys114 の S 原子を攻撃して Cys-SOH を再生することが示唆された。一方、理論計算からは、前述の反応はエネルギー障壁が高く、(b) に示すように  $\alpha$ Cys109 の S 原子が環状反応中間体の  $\alpha$ Cys114 の S 原子を求核攻撃して S-S 結合を有する新規反応中間体を形成し、その後、活性化された水分子が S-S 結合中間体の  $\alpha$ Cys114S 原子を求核攻撃して生産物が解離するという極めて特異な触媒機構モデルが提唱された (16; Hopmann K, *Inorg. Chem.* 2015)。更に、理論計算から、6R56K 変異体では環状中間体より先の反応が進行しにくいことが示された。

### 2. 研究の目的

NHase の触媒機構を理解するためには、環状反応中間体以降の反応中間体の立体構造に関するエビデンスを集め、環状中間体以降の反応経路を確定することが必要である。

この目標のため、本研究では、XEFL を用いた時分割シリアルフェムト秒 X 線結晶構造解析によって環状反応中間体形成以降の反応中間体の立体構造を決定すること、並びに、中性子構造解析によって活性中心近傍の水素結合ネットワークと触媒残基のプロトン化状態等に関する正確な情報を得ることで、NHase の触媒反応の遷移状態構造を解明することを研究目的とする。

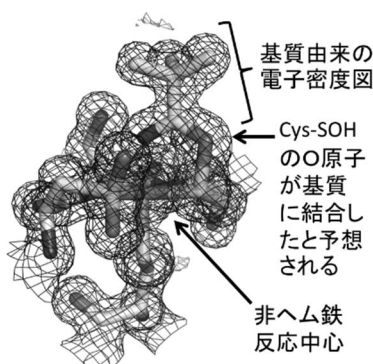


図 2. 6R56K 変異体結晶を Pivalonitrile 存在下で 120 分反応させたときの鉄反応中心近傍の構造。Pivalamide を置いて、Cys-SOH の O 原子を含めないで計算したときに見られる電子密度をメッシュで示す。

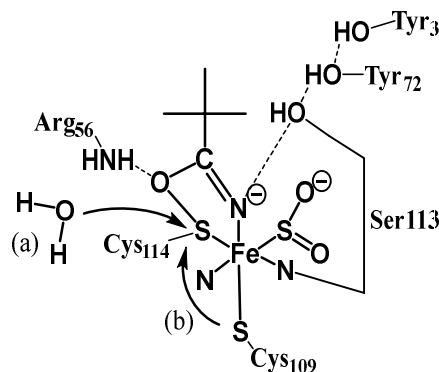


図 3. 環状反応中間体に起こると予測される求核攻撃の模式図。(a) は <sup>18</sup>O ラベルした水分子の取込実験 (Yamanaka Y. *et al.*, *Angewandte Chem. Int. Ed.*, 2015; Nelp MT *et al.*, *JBC* 2016) に基づき、(b) は理論計算 (Kayanuma M, *et al.*, *J. Phys. Chem. B*, 2016; Hopmann K, *Inorg. Chem.*, 2015) に基づいて提唱された。

### 3. 研究の方法

- (1) NHase 反応中間体の分光学的測定による捕捉 時分割 X 線結晶構造解析とは異なる原理によって、反応中間体を補足しておく必要がある。そのため、高速分光を行うことにより、反応中間体を補足することを試みる。
- (2) XFEL を用いた時分割連続フェムト秒結晶構造解析のための測定条件の検討 XFEL を用いた時間分解連続フェムト秒結晶構造解析を行うためには、微結晶の大量調製、微結晶による結晶構造の決定、微結晶を懸濁可能な高粘度溶媒条件の決定等が必要なため、これらの決定を行う。
- (3) Co 型 NHase 変異体を用いた酵素基質複合体の結晶構造解析 これまでの Fe 型 NHase 変異体を用いた時間分解結晶構造解析の結果から、変異体では変異によって律速となった段階の酵素複合体の構造が決定されることがわかる。そこで、理論計算より予想された、環状中間体以降の反応に重要と思われるアミノ酸に変異を導入した変異体の結晶に基質をソーキングし、結晶構造を決定する。この際、鉄型より好気条件でも安定な Co 型 NHase を使用する。
- (4) Fe 型並びに Co 型 NHase の中性子構造解析に向けた巨大結晶の作製 中性子構造解析では、2 mm<sup>3</sup> サイズの巨大な結晶を使用して、活性化した条件で測定を行う。そのため、新たに巨大結晶を作製する結晶化条件を検討する。また、本測定には 1 週間程度を要することから、Fe 型酵素では測定中に酸化失活が起きてしまう可能性がある。このため、好気下でも安定な Co 型 NHase についても、巨大結晶作製のための条件検討を行う。

### 4. 研究成果

- (1) NHase 反応中間体の分光学的測定による捕捉 NHase の中間体を補足するため、ニトロシル化された不活性型 Fe 型 NHase の結晶または溶液に基質を加えた後、レーザー光によって NO を解離させて活性化し、フラッシュフォトリスを行った。しかし、光活性化に伴う吸収変化のみが観測され、反応中間体形成による紫外可視領域の大きな吸収変化は観測されることが予測された。次に、光活性化後の Fe 型 NHase と基質溶液を用いて、ストップフロー解析を行った。その結果、ストップフロー解析の限界よりも速い時間領域に吸収変化が観測されるものの、その後は酵素と生産物複合体による吸収変化のみが観測された。以上の結果から、我々が使用している *Rhodococcus erythropolis* sp. N771 由来 NHase は遷移状態形成時に大きな紫外可視吸収変化を伴わないことが推定された。
- (2) XFEL による時分割 SFX 測定を念頭に、30 μm 以下の微結晶を再現性良く得られる条件を決定した。また、SPring-8 のシンクロトロン放射光を用いて、高粘度溶媒中での反射データを測定したところ、30% (w/v) セルロース溶液中にて、1.5 分解能の良好な反射データを得ることができた。しかし、Fe 型 NHase については、従来 *Rhodococcus erythropolis* N771 の菌体から精製していたが、本年度中に培地成分として使用していた酵母エキスの販売が終了してしまい、現行で販売されているもので試したところ、発現量が著しく低下していた。そこで、入手可能な酵母エキスをを用いて鉄型 NHase 発現条件を最適化した。各種酵母エキスのうち最も発現の良かった培地で保存株をスクリーニングして高発現株を選択、更に、各種培養条件を最適化し、時分割結晶構造解析に十分な酵素を精製可能な培養条件を決定した。
- (3) *Pseudonocardia thermophila* JCM 3095 由来 Co 型 NHase の変異体を使用して時間分解結晶構造解析を行うこととし、同菌由来 Co 型 NHase の組換え体発現系を構築した。鉄型 NHase の量子科学計算で触媒反応時の水素結合ネットワーク形成に重要と考えられる Ser112, Tyr68, Tyr69 を、それぞれ、Ala または Val, Phe, Phe に置換した変異体を構築した。S112V はコバルトを配位せず、他の変異体は野生型の 5% 以上の触媒活性を示し、時間分解結晶構造解析には活性が高すぎるということがわかった。従って、今後、これらの二重変異体を構築する予定である。
- (4) Fe 型 NHase の中性子構造解析に向けた大型結晶を得るための条件検討を行った。その結果、0.07 mm<sup>3</sup> (1.1 mm × 0.8 mm × 0.08 mm) の結晶を用いた中性子散乱強度のテスト測定において 3.2 分解能の反射を得ることができた。(2) に記したように、Fe 型 NHase の大量発現法の再検討が必要になったため、これ以上の大型結晶は得られなかった。Fe 型 NHase に関しては、今後、巨大結晶作製条件の最適化を試みる予定である。活性中心近傍の精密な水素結合ネットワークを明らかにするため、光応答性はないが安定性に優れる Co 型 NHase の中性子構造解析のための結晶化を行った。既報の条件で Co 型 NHase を結晶化させたところ、結晶格子の一辺が 186 Å と大きく、中性子構造解析に適さないことがわかった。そのため、結晶格子の小さな結晶を得られる条件を探索している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名	尾高雅文, 山中保明, 辻井広夢, 岩藤秀直, 林 英輝, 松村洋寿, 野村高志, 當舎武彦, 玉田太郎, 日下勝弘, 野口恵一, 養王田正文
2. 発表標題	Unveiling the catalytic mechanism of nitrile hydratase by time-resolved crystallography and neutron crystallography
3. 学会等名	令和2年度化学系学協会東北大会（招待講演）
4. 発表年	2020年

1. 発表者名	Tsujii, H., Matsumura, H., Tamada, T., Kusaka, K., Odaka, M.
2. 発表標題	Crystallization and preliminary neutron diffraction measurements of nitrile hydratase for neutron crystallography
3. 学会等名	令和2年度化学系学協会東北大会
4. 発表年	2020年

1. 発表者名	Iwato, H., Tsujii, H., Matsumura, H., Tosha, T., Shiro, Y., Yamada, D., Kubo, M., Odaka, M.
2. 発表標題	Crystallization of nitrile hydratase for XFEL crystallography
3. 学会等名	令和2年度化学系学協会東北大会
4. 発表年	2020年

1. 発表者名	Nakamoto, K., Sasaki, H., Matsumura, H., Odaka, M.
2. 発表標題	Purification of Co-type nitrile hydratase from <i>Pseudonocardia thermophila</i>
3. 学会等名	令和2年度化学系学協会東北大会
4. 発表年	2020年

1. 発表者名 仲本和義, 佐々木春弥, 松村洋寿, 尾高雅文
2. 発表標題 ニトリル加水分解酵素の反応メカニズム解析
3. 学会等名 生物工学若手研究者の集い 第二回オンラインセミナー
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岩藤秀直, 林 英樹, 松村洋寿, 小川信明, 野村高志, 當舎武彦, 城 宜嗣, 野口恵一, 養王田正文, 尾高雅文
2. 発表標題 XFELを用いたNHase触媒反応解析に向けた微結晶の作製と構造解析
3. 学会等名 生物工学若手研究者の集い 第二回オンラインセミナー
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岩藤秀直, 林 英樹, 松村洋寿, 小川信明, 野村高志, 當舎武彦, 城 宜嗣, 野口恵一, 養王田正文, 尾高雅文
2. 発表標題 XFELを用いたNHase触媒反応解析に向けた微結晶の作製と構造解析
3. 学会等名 酵素工学会第82回講演会 2020年08月 - 2020年08月
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 尾高雅文
2. 発表標題 XFELと中性子ビームを用いたニトリルヒドラターゼ触媒反応の遷移状態構造の解明
3. 学会等名 第24回iBIX研究会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 辻井啓夢, 林 英輝, 松村洋寿, 野村高志, 當舎武彦, 玉田太郎, 日下勝弘, 久保 稔, 城 宜嗣, 尾高雅文
2. 発表標題 ニトリルヒドラターの中性子構造解析に向けた取り組み
3. 学会等名 第46回生体分子科学討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 林英輝, 辻井啓夢, 岩藤秀直, 松村洋寿, 當舎武彦, 野村高志, 玉田太郎, 日下勝弘, 尾高雅文
2. 発表標題 ニトリルヒドラターゼの時間分解SFX解析と中性子構造解析に向けた取り組み
3. 学会等名 第13回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 辻井啓夢, 林 英輝, 松村洋寿, 野村高志, 當舎武彦, 玉田太郎, 日下勝弘, 久保 稔, 城 宜嗣, 尾高雅文
2. 発表標題 ニトリルヒドラターゼの中性子構造解析に向けた取り組み
3. 学会等名 第71回日本生物工学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岩藤秀直, 林 英輝, 松村洋寿, 小川信明, 野村高志, 當舎武彦, 城 宜嗣, 野口恵一, 養王田正文, 尾高雅文
2. 発表標題 XFELを用いたNHase触媒反応解析に向けた 微結晶の作製と構造解析
3. 学会等名 酵素工学研究会第82回講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 尾高雅文
2. 発表標題 Toward Full Understanding the Reaction Mechanism of Nitrile Hydratase
3. 学会等名 第32回金属の関与する生体関連反応シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2023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	當舎 武彦  (Tosha Takehiko)  (00548993)	国立研究開発法人理化学研究所・放射光科学研究センター・専任研究員   (82401)	
研究分担者	松村 洋寿  (Matsumura Hirotoshi)  (60741824)	秋田大学・理工学研究科・講師   (11401)	

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
---------	---------