

科学研究費助成事業(基盤研究(S))公表用資料
[研究進捗評価用]

平成23年度採択分
平成26年3月14日現在

炭素-窒素結合切断および合成酵素群の

統括的機能解明と応用開発

Comprehensive elucidation and application of the function of enzymes involved in cleavage and synthesis of a carbon-nitrogen bond

小林 達彦 (KOBAYASHI MICHHIKO)

筑波大学・生命環境系・教授



研究の概要

ペプチド結合以外の炭素-窒素 (C-N) 結合を切断する酵素や合成する酵素は、基礎・応用面で重要であるにも関わらずプロテアーゼほど精力的に行われていない。既知の C-N 結合切断酵素や合成酵素のみならず、反応機構が異なる種々のタイプの酵素群を対象としてタンパク質・遺伝子レベルから解析し、C-N 結合切断および酵素群の統括的機能解明を目的とする。さらに、その触媒機能を利用した有用物質生産系基盤技術の構築を目指す。

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物化学、応用微生物学

キーワード：酵素、反応

1. 研究開始当初の背景

プロテアーゼが作用するペプチド結合以外の炭素-窒素 (C-N) 結合を切断する酵素や合成する酵素について、反応機構を始めとする生化学的解析はプロテアーゼほど精力的に行われていないのが現状である中、我々はこれまで、特に C-N 三重結合 [C≡N] を切断する酵素や C-N 単結合 [O=C-NH] を切断する酵素を対象としタンパク質・遺伝子レベルから解析してきた。その過程で、同じ反応を触媒しながら反応機構の異なる酵素の発見およびそれらの活性アミノ酸残基の相違など多くの興味深い発見を行った。これらの知見は(従来の反応機構とは異なる)未だ発見されていない種々のタイプの C-N 結合切断酵素群が自然界に存在する可能性を示唆するものである。

2. 研究の目的

本研究では、①本研究者が取得することに成功しているオリジナルな C-N 結合切断酵素類、②活性中心が従来とは異なる種々のタイプの新規 C-N 結合切断酵素、および、③C-N 結合合成酵素を対象とし、構造機能(反応機構を含む)を生化学的に明らかにすることを目的とする。さらに本研究では、④得られる情報を基に(その触媒機能を利用し)有用物質生産系の基盤を構築することを目的とする。

3. 研究の方法

既存の C-N 結合切断酵素・C-N 結合合成酵素

(Aldoxime dehydratase、Isonitrile hydratase、*N*-Substitute formamide deformylase など)だけでなく、従来知られていないタイプの酵素も対象とし、酵素および遺伝子レベルで詳細に解析する。酵素の反応速度論的解析や分光学的解析により諸性質や機能を解明するだけでなく、立体構造や反応機構の観点からも詳細に比較解析を行う。

いずれの酵素においても、構造情報の利用や変異酵素の作製を通して、高機能化した酵素を作製するとともに、触媒機能(正反応)・逆反応・(本来の酵素反応とは異なる)酵素反応の多様性を利用した有用物質生産系開発を行う。

4. これまでの成果

(1) C-N 結合を持つ化合物の最少培地で生育できる微生物の土壌からの単離に成功し、分解菌を同定した。さらに、本化合物の分解産物を同定し、分解経路を決定した結果、本分解反応を触媒する酵素の報告例はこれまでになく、新規 C-N 結合切断酵素であることが強く示唆された。

(2) 本研究者はイソニトリルを *N*-置換ホルムアミドに水和する反応を触媒する2種の C-N 結合切断酵素：N19-2 株由来 Isonitrile hydratase および F164 株由来 Isonitrile hydratase の発見に成功している。両者は同じ反応を触媒するものの、互いにアミノ酸配列の相同性がないことから触媒反

応に関与する活性アミノ酸残基や反応機構が全く異なると考えられる。F164 株由来 Isonitrile hydratase について詳細な解析を行った結果、本酵素が Isonitrile hydratase / Nitrilase の両活性を触媒することを発見した。さらに、変異酵素を構築・精製し、酵素活性測定することで、Isonitrile hydratase の酵素反応触媒上重要な活性アミノ酸残基の内、システイン残基の同定に成功した。

(3) 硫酸アンモニウムやグリセロールの沈殿剤を使用したハンギングドロップ法により、C-N 結合合成酵素である Aldoxime dehydratase (OxdA) の赤色を呈した結晶を得ることができ、本酵素の立体構造を 1.8 Å の解像度で決定した。(ヘム鉄から 6 Å 以内の distal 側に位置し) 反応機構に関与する可能性のあるアミノ酸残基として、E143, S174, R178, S219, Q221, Y234, N279 を選別し、これらのアミノ酸のみをアラニンに変異させた OxdA 変異体を作成・精製した。それらと野生型 OxdA に対し、CD スペクトル解析、ヘム含有量および酵素活性測定を行った結果、H320 とともに R178 と S219 が反応機構上、重要であることを明らかにした。S219A 変異体のラマンスペクトル測定を行い、OxdA のヘム環境を詳細に調べた結果、S219 は基質に対して求核攻撃できないと結論づけ、H320 は一般酸触媒としてだけではなく、一般塩基触媒としても機能することが示唆された。OxdA の結晶構造情報および OxdA 変異体の酵素科学および物理学的特徴付けにより、(i) H320 は酸-塩基触媒として働き、(ii) R178 は H320 のイミダゾール環の求電子性を強め、(iii) S219 は基質を固定し基質の水酸基の塩基性を増加していることを明らかにし、これらが関与して C-N 三重結合を合成する Aldoxime dehydratase の反応機構の全貌を明らかにした。

(4) グラム陽性菌の細胞壁の Teichoic acid の D-アラニル化に関わる初発の反応、即ち、キャリアタンパク質である DltC のホスホパンテテイン補欠分子族に D-Alanine を結合する DltA に着目した。本酵素はチオエステル結合形成反応を触媒するが、D-Alanine と (DltC の代わりに) L-Cysteine を基質として反応させたところ、反応産物が D-Alanine と L-Cysteine がペプチド結合したジペプチドであることが判明し、本酵素がペプチド結合形成能も示すことを発見した。D-Alanine 以外のアミノ酸を L-Cysteine と反応させた場合や、L-Cysteine の代わりに L-CysteinyI を持つジペプチド・オリゴペプチドを反応させた場合もペプチド化合物の生成が認められ、種々のジペプチド、トリペプチド・オリゴペプチドの酵素的合成法を確立した。

(5) 我々が発見した新規酵素 N-substituted formamide deformylase を利

用して、アミンと、酢酸あるいはプロピオン酸を基質とした逆反応による Carboxamide の酵素合成法を開発した。特に、低級カルボン酸が 1.0 M、ベンジルアミンが 0.2 M の濃度の逆反応制御下で、16 mM の N-置換ホルムアミド、22 mM の N-置換酢酸アミド、18 mM の N-置換プロピオン酸アミドを生産する系を確立した。

5. 今後の計画

(1) 新規 C-N 結合切断酵素については単離精製し、各酵素の諸性質を解明 (特に、既知のそれらの分解酵素との反応機構の相違点について解析) する。さらに、新規 C-N 結合切断酵素の遺伝子をクローニングし、大腸菌等の宿主で酵素の大量生産系を確立後、活性中心の同定実験や、酵素を用いた物質生産系開発等に利用する。

(2) 既存の C-N 結合切断酵素や、大量精製が可能となった新規 C-N 結合切断酵素については結晶化・X 線構造解析によって 3 次元構造を解明する。立体構造から得られる情報等を基に、活性中心と予想されるアミノ酸残基を対して部位特異的変異法により変異酵素を作成し、活性測定等を行うことで活性アミノ酸残基を同定する。

(3) 各切断酵素群や合成酵素群の解析から得られる情報を基に (その触媒機能を利用し) 種々の各種有用物質の生産基盤を検討する。

6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

Nomura, J., Hashimoto, H., Ohta, T., Hashimoto, Y., Wada, K., Naruta, Y., Oinuma, K-I., & Kobayashi, M. "Crystal structure of aldoxime dehydratase and its catalytic mechanism involved in carbon-nitrogen triple-bond synthesis" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 2810-2815 (2013)

Hashimoto, Y., Sakashita, T., Fukatsu, H., Sato, H., & Kobayashi, M. "A new synthetic route to N-benzyl carboxamides through the reverse reaction of N-substituted formamide deformylase" *Appl. Environ. Microbiol.*, **80**, 61-69 (2014)

受賞: 2012 年度バイオインダストリー協会
賞受賞: 小林達彦, "微生物代謝の分子機構と物質生産への機能開発"

ホームページ等

http://www.microbes.agbi.tsukuba.ac.jp/ko_bayashi/