

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：11401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24350082

研究課題名(和文) 先端の構造解析技術を駆使したニトリル水和酵素ファミリーの触媒機構と成熟化機構解明

研究課題名(英文) Elucidation of catalytic mechanisms as well as subunit-assembly of nitrile hydratase family enzymes by using advanced structural studies

研究代表者

尾高 雅文(Odaka, Masafumi)

秋田大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：20224248

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,200,000円

研究成果の概要(和文)：鉄型ニトリルヒドラーゼの R56K変異体を用いて触媒反応の時間分割結晶構造解析を行った。その結果、非ヘム鉄に配位した基質のニトリル炭素原子を Cys-SO<sub>2</sub>-配位子の側鎖O原子が求核攻撃することで環状中間体を形成することを明らかにした。更に、180ラベルした水の取込をFTIRで解析することにより、Cys-SO<sub>2</sub>-配位子の側鎖O原子が触媒サイクル中に Arg56によって活性化された水分子と交換されることを明らかにした。また、チオシアネートヒドラーゼ変異体解析から、両酵素は共通の触媒機構を有し、基質ポケットのサイズと構造が基質特異性に重要であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Catalytic reaction of a Fe-type nitrile hydratase betaR56K mutant was studied by time-resolved crystallography. The results showed that the metal-coordinated substrate is nucleophilically attacked by the O(SO<sub>2</sub>-) atom of alphaCys114-SO<sub>2</sub>-; followed by nucleophilic attack of the S(SO<sub>2</sub>-) atom by a betaArg56-activated water molecule to release the product amide and regenerate alphaCys114-SO<sub>2</sub>-; . Also, kinetic as well as crystallographic studies on the mutant SCNases revealed that both NHase and SCNase share the catalytic mechanism and that the size and shape of their substrate binding pockets are predominantly control the substrate selectivity.

研究分野：生体関連化学

キーワード：時間分割結晶構造解析 翻訳後修飾 システインスルフェン酸 酵素反応 触媒機構 反応中間体 水和反応 結晶構造

## 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ている。また、近年、シアン系廃液のバイオレメディエーションでも注目されており、産業的に極めて重要な酵素である。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利用し、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と示唆された。

一方、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。しかし、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を、NHase において同位置に存在する疎水性アミノ酸残基に置換した変異体を作成したところ、SCNase 活性を消失し、弱い NHase 活性を示すことを明らかにした。

## 2. 研究の目的

本研究課題では、以下の研究を遂行することにより、NHase 酵素ファミリーの触媒反応機構と成熟化機構を明らかにすることを目的とする。

(1) NHase の時間分割結晶構造解析。

前年度までの研究において、全ての NHase で保存されている  $\beta$  サブユニットの Arg56 を Lys に置換した変異体  $\beta$ R56K の結晶を用いて、ニトリルを基質とした時間分割結晶構造解析を行える可能性が示唆された。そこで、さらに実験を進め、 $\beta$ R56K 変異体を用いたニトリル水和反応の時間分割結晶構造解析を行う。

(2) <sup>18</sup>O ラベル水分子を用いた水和反応追跡。

<sup>18</sup>O ラベルした水分子で調製した溶媒中で水和反応を行い、<sup>18</sup>O の取り込みを追跡する。これにより、溶媒中の水分子が触媒過程でどのように取り込まれるかを決定できる。

(3) SCNase 変異体の触媒活性解析

前年度までの研究において、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である、 $\beta$ Arg90、 $\gamma$ Arg136 をそれぞれ NHase の相当する残基である Phe、Trp に置換した変異体 SCNase は本来の触媒活性を失い、弱い NHase 活性を示すことを明らかにした。本研究課題では、この両変異体をさらに解析することにより、SCNase、NHase の基質認識機構を明らかにする。

(4) SCNase 成熟化機構の解析

SCNase は  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  の 3 種のサブユニットのヘテロトリマーを構成単位とし、 $\gamma$  が NHase の  $\alpha$  に相当して Co イオンを結合し、 $\alpha$ 、 $\beta$  サブユニットは、それぞれ、NHase  $\beta$  サブユニットの C 末端側、N 末端側ドメインに相当する。また、SCNase 構造遺伝子下流には、活性化タンパク質 P15K がコードされており、これまでの研究から、P15K は  $\gamma$  サブユニットと複合体を形成して、Co イオンの取り込みと翻訳後修飾形成に関与することが示唆されている。そこで、 $\gamma$  サブユニットと P15K の複合体形成以降の成熟化機構について解析する。

## 3. 研究の方法

(1) NHase の時間分割結晶構造解析。

$\beta$ R56K 変異体が大腸菌にて組換え体として発現させ後、暗所において NO 発生剤である NOC7 とインキュベートすることで不活性な NO 結合型にし、暗所にて精製した。NO 結合型  $\beta$ R56K 変異体 NHase を暗所にて結晶化した後、基質として pivalonitrile を母液に添加して蒸気拡散によって結晶にソーキングした。室温において 0 ~ 700 分間光照射して触媒反応をさせた後、冷却した窒素ガスで急冷し、触媒反応を停止させた。各触媒反応時間の結晶の X 線回折強度データを収集し、結晶構造を決定した。

(2)  $^{18}\text{O}$  ラベル水分子を用いた水和反応追跡  
凍結乾燥させた NO 結合型野生型 NHase を  $^{18}\text{O}$  ラベル水で調製した緩衝液に溶解し、過剰のメタアクリロニトリルを加えて触媒反応をさせた。遠心ゲル濾過法によって生産物を除去した後に NOC7 によって酵素を再度 NO 結合型とし、照射前後の FTIR スペクトルを測定した。

(3) SCNase 変異体の触媒活性解析

SCNase の  $\beta\text{R90F}$  と  $\gamma\text{R136W}$  両変異体の NHase 活性を詳細に検討するとともに、両変異体酵素の結晶化を試みた。良質な結晶を得られた  $\gamma\text{R136W}$  変異体の結晶構造を決定し、野生型 SCNase との構造比較から、両酵素の基質特異性について考察した。

(4) SCNase 成熟化機構の解析

SCNase  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  各サブユニットと P15K、Co イオン間の相互作用を解析し、SCNase 成熟化機構を解析した。

#### 4. 研究成果

(1) NHase の時間分割結晶構造解析。

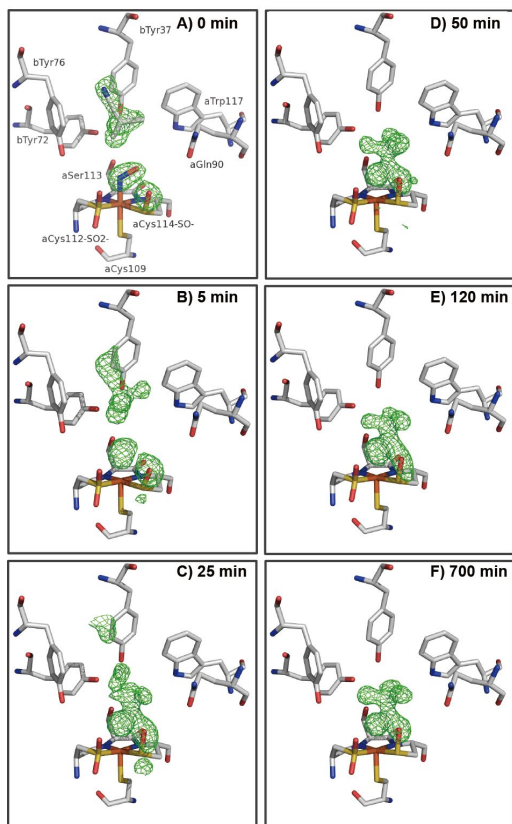


図 1.  $\beta\text{R56K}$  変異体による pivCN 水和反応の時間分割結晶構造解析。A 0 min, B 5 min, C 25 min, D 50 min, E 120 min, F 700 min 間照射条件下で反応させたときの基質ポケット近傍の構造を示す。緑のメッシュは各反応時間において、基質、NO、Cys114-SO の O 原子を除いて計算した Omit マップを示す。

NO 結合型  $\beta\text{R56K}$ -pivalonitrile (pivCN) 複合体に 0~700 分間照射したときの活性中心近傍の構造を図 1 に示す。照射前の結晶構造においては、NO が非ヘム鉄の第 6 配位座に結合しており、基質ポケット無いに、1 分子の pivCN がニトリル基をポケット上方に向けた状態で存在していた。照射開始 5 分後の構造では、大きな変化はみられないが、25 分間照射後では、もとの位置の基質由来電子密度が減少し、代わりに、非ヘム鉄に配位した基質と思われる新たな電子密度が観察された。50 分間照射後以降の構造では、基質由来と思われる電子密度が鉄の第 6 配位座に配位している構造が観測され、照射開始後 120 分までの測定で電子密度の形状に変化は見られなかった。興味深いことに、基質のニトリル炭素に相当する電子密度には  $\alpha\text{Cys114-SO}$  の側鎖酸素原子が共有結合しており、生産物である pivalamide に極めて似た構造を形成していた。すなわち、基質が鉄の第 6 配位座に結合した後、 $\alpha\text{Cys114-SO}$  の側鎖酸素が基質のニトリル炭素に求核攻撃して新規な環状反応中間体を形成することが示された。この環状中間体のニトリル由来炭素または Cys-SO 由来イオウに水分子が攻撃することで、基質が生成すると考えられた。

(2)  $^{18}\text{O}$  ラベル水分子を用いた水和反応追跡。

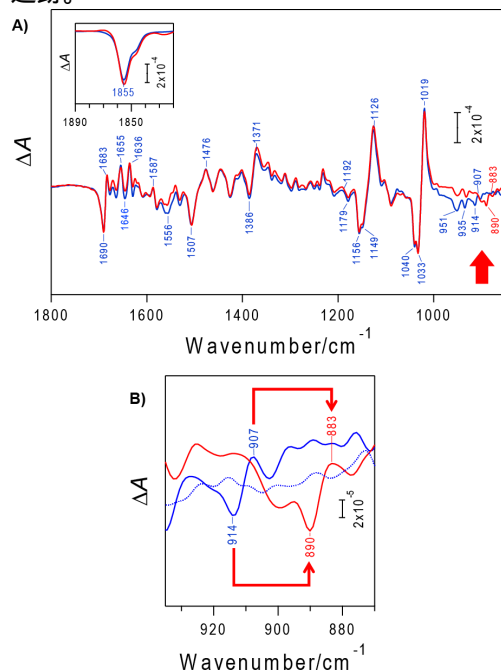


図 2. 野生型 NHase の FTIR サスペクトル(光活性化後から光活性化前を差し引いたもの)。A は測定領域全体、B は Cys-SO 伸縮領域の拡大図。赤の実線は  $\text{H}_2^{18}\text{O}$  緩衝液中で触媒反応をさせたもの、青の実線は触媒反応をさせていないもの、青の点線はベースラインを、それぞれ示す。

図 2a に触媒反応を行わない野生型酵素(青実線)と触媒反応を行った野生型酵素(赤実線)の照射前後の FTIR 差スペクトルを示す。両差スペクトルは極めてよく一致しているが、Cys-SO<sub>2</sub>由来のシグナル領域には違いがみられた。図 2b の拡大図にみられるように、Cys-SO<sub>2</sub>由来のバンドは、24 cm<sup>-1</sup> 低波数側にシフトしており、これは、<sup>16</sup>O→<sup>18</sup>Oの置換による理論値 32 cm<sup>-1</sup>によく一致していた。このことから、Cys-SO<sub>2</sub>残基の O 原子は触媒サイクル中に溶媒の水分子と交換されることが明らかになった。以上のことから、図 3 に示す反応モデルを提唱した。すなわち、ニトリル基質が基質ポケット内で非ヘム鉄に配位すると、Cys-SO<sub>2</sub>残基の O 原子がニトリル炭素を求核攻撃し、環状中間体を形成する。続いて、βArg56 と Cys-SO<sub>2</sub>残基の O 原子に水素結合を形成している水分子の水素原子がニトリル窒素に引き抜かれて活性化し、Cys-SO<sub>2</sub>残基の S 原子を求核攻撃する。その結果、Cys-SO<sub>2</sub>残基の O 原子は生産物アミド基の O 原子となり、反応が終結する。本成果は、反応中間体の結晶構造に基づいて提唱された初めての NHase 触媒反応モデルである。

### (3) SCNase 変異体の触媒活性解析

メタクリロニトリルを基質とし、50 mM の時の比活性が変異体 SCNase γR136W が 0.4 U/mg、変異体 SCNase βR90F が 0.6 U/mg であった。次に変異体 SCNase γR136W 変異体を結晶化に成功し、X 線結晶構造解析を行った。γR136W の立体構造はほとんど野生型と同様の構造を取っていたが、変異を加えた γTrp136 と近傍に存在する γGlu141 の側鎖の向きが大きく変わっていた。その結果、基質ポケットが大きくなっており、基質ポケット上部の正電荷が減少していた。しかしながら、タンパク質表面からポケットまでの基質経

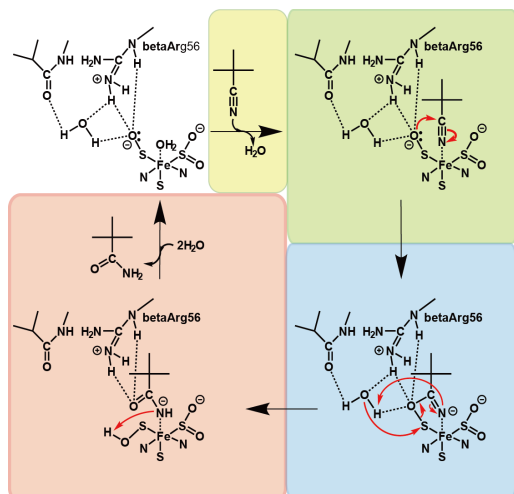


図 3. 提唱された NHase 触媒反応モデル。

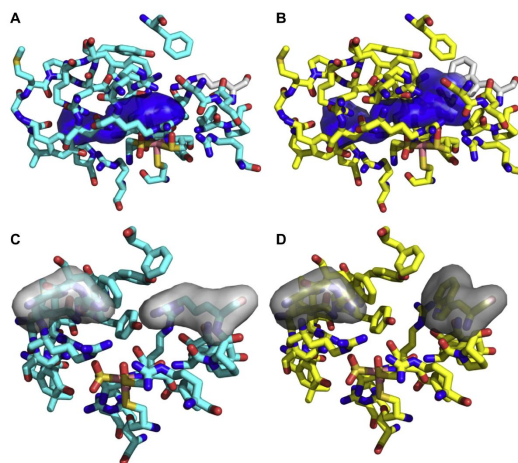


図 4. 野生型(A,C)と γR136W 変異体 SCNase の基質ポケット近傍の構造。(A,B)ポケット表面の表面電荷図。青色は正に帯電していることを示す。(C,D)βArg90と γArg136(Dでは Trpに置換されている)の側鎖が占める空間を灰色で示している。

路や Co イオン上部のポケット表面は強く正に帯電しており、SCN<sup>-</sup>イオンが結合するのに十分なスペースが存在する(図 4)。従って、γR136W 変異体が SCNase 活性を示さない理由は表面電荷では説明できなかった。(1)の結果と同様に、基質が金属中心に配位することを考えると、野生型 SCNase のポケットは SCN<sup>-</sup>イオンが結合する程度のスペースはあるが、ニトリル基質は側鎖が大きすぎて結合できない。一方、γR136W 変異体では、変異させた γTrp136 のコンホメーション変化のために、ポケット体積が増大し、ニトリル基質の結合に十分なスペースが存在する。以上のことから、SCNase と NHase の触媒反応機構は基本的に同様に、基質ポケットの大きさによって基質を選択し、金属中心に結合した基質によって反応性が異なると考えられた。

### (4) SCNase 成熟化機構の解析

P15K を大腸菌で発現させ、CD スペクトルを測定したところ、αヘリックスに富んだ構造をもつことがわかった。また、Co イオン存在、非存在下での紫外可視吸収スペクトルおよび等温滴定熱量測定(ITC)から Co を結合しないと考えられた。P15K と SCNase γサブユニットを共発現させると、Co イオン非存在下では 1:1 の複合体(γP15K)として、Co イオン存在下では γP15K ならびに遊離の γサブユニットとして発現した。いずれの条件で調製した γP15K も高イオン強度条件では一部が単離 γサブユニットに解離した。単離 γサブユニットと γP15K に対する Co イオンの結合を等温滴定カロリーメトリーで測定したところ、いずれも  $K_A \approx 3 \times 10^4$  M の親和性を示した。また、Co イオンを結合した γP15K 複

合体と単離  $\gamma$  はいずれも天然型 SCNase とよく似た紫外可視吸収スペクトルを示し、質量分析による解析から、 $\gamma$ Cys131 の約 50% 程度が Cys-SO<sub>2</sub><sup>-</sup> に酸化されていた。これらの結果から、P15K の主な機能は Co の取り込みではなく、 $\gamma$  のフォールディングを促進して安定な立体構造を形成させる分子シャペロンとして機能すると考えられた。また、単離  $\gamma$  に Co を添加しても Cys-SO<sub>2</sub><sup>-</sup> の酸化修飾が形成されることから、酸化修飾には Co イオンが重要であり、P15K は直接的に関与しないことが示唆された。

#### 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2件)

1. Yamanaka Y., Arakawa T., Watanabe T., Namima S., Sato M., Hori S., Ohtaki A., Noguchi K., Katayama Y., Yohda M., and Odaka M.: Two arginine residues in the substrate pocket predominantly control the substrate selectivity of thiocyanate hydrolase, *J. Biosci. Bioeng.*, 査読有, Vol.116, No. 1,2013, 22-27. doi:10.1016/j.jbiosc.2013.01.013
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, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 査読有, in press, 2015.

##### [学会発表](計6件)

1. Aihara T., Sato M., Yamanaka Y., Watanabe T., Noguchi K., Yohda M., and Odaka M. Difference in the substrate recognition among nitrile hydratase family, 12th Japan-China- Korea Joint Symposium on Enzyme Engineering, Kanazawa, Japan, May,2012.
2. Odaka M., Yamanaka Y., Hashimoto K., Noguchi K., and Yohda M.: Crystal Structure Analysis of the Reaction Intermediate of Nitrile Hydratase, The 6th Asian Biological Inorganic Chemistry Conference (ASBIC6), Hong Kong, China, November, 2012.
3. Yamanaka Y., Arakawa T., Watanabe T., Namima S., Sato M., Hori S., Ohtaki A., Noguchi K., Katayama Y., Yohda M., and Odaka M.: Two arginine residues in the substrate pocket predominantly control the substrate selectivity of thiocyanate

hydrolase, The 16th International Conference on Biological Inorganic Chemistry (ICBIC16), Grenoble, France, July, 2013.

4. Odaka M., Yamanaka Y., Arakawa T., Watanabe T., Namima S., Hori S., Ohtaki A., Noguchi K., Katayama Y., and Yohda M.: Two arginine residues in the substrate pocket predominantly control the substrate selectivity of thiocyanate hydrolase, Toyama, Japan, September, 2013.
5. Odaka M., Yamanaka Y., Hashimoto K., Noguchi K., and Yohda M.: Reaction mechanism of nitrile hydratase proposed by time-resolved X-ray crystallography, The 54th Annual Conference of Association of Microbiologists of India (AMI-2013), Rohtak, India November, 2013.
6. Yamanaka Y., Kato Y. Hashimoto K., Iida K., Nagasawa K., Nakayama H., Dohmae N., Noguchi K., Noguchi K., Yohda M., and Odaka M.: Reaction mechanism of nitrile hydratase proposed by the high resolution transition state structure of the enzyme-substrate complex, The 7th Asian Biological Inorganic Chemistry Conference (ASBIC7), Gold Coast, Australia, November, 2014.

##### [図書](計2件)

1. Odaka M. and Kobayashi M.: Cobalt proteins, Overview, eds. Kretsinger R. H., Uversky V.N., and Permyakov E.A., "Encyclopedia of Metalloproteins",2013, pp.670-678.
2. Odaka M. and Kobayashi M.: Nitrile hydratase and related enzyme, eds. Kretsinger R. H., Uversky V.N., and Permyakov E.A., "Encyclopedia of Metalloproteins",2013, pp. 1554-1561.

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

尾高 雅文 (ODAKA MASAFUMI)

秋田大学・大学院工学資源学研究科・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

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