

2013/02/08



炭素-窒素三重結合形成反応を触媒するヘム鉄タンパク質の立体構造と 反応メカニズムの解明に成功！

—低環境コストでのニトリルの工業生産の実現に向けた基礎研究の進展—

1 発表者

筑波大学

- 小林 達彦 (筑波大学大学院生命環境科学研究科 教授)
野村 純平 (筑波大学大学院生命環境科学研究科 大学院生)
橋本 義輝 (筑波大学大学院生命環境科学研究科 准教授)
和田 浩一 (筑波大学大学院生命環境科学研究科 大学院生)
老沼 研一 (筑波大学大学院生命環境科学研究科 助教)

横浜市立大学

- 橋本 博 (横浜市立大学大学院生命ナノシステム科学研究科 准教授)

九州大学

- 成田 吉徳 (九州大学先導物質化学研究所 主幹教授)
太田 雄大 (九州大学先導物質化学研究所 助教)

2 本研究のポイント

❖ どのような成果を出したのか

筑波大学の小林教授グループは、横浜市立大学の橋本准教授との共同研究により、アルドキシム化合物(※1)を脱水反応によってニトリル化合物(※2)に変換する「アルドキシム脱水酵素(OxdA)(※3)」の分子構造をX線結晶構造解析法(※4)により決定しました。

また、同グループは、遺伝子組換えで各種変異体OxdA酵素を調製し、それらの酵素化学的諸性質を解析することによって、酵素反応に重要な役割を果たすアミノ酸残基を明らかにしました。

さらに、九州大学の成田主幹教授および太田助教と共同研究を行い、共鳴ラマン分光法（※5）を用いて OxdA 酵素の活性中心に含まれるヘム鉄（※6）およびその近傍の分子構造を明らかにし、タンパク質構造と反応性の相関の解明に貢献しました。

❖新規性（何が新しいのか）

OxdA 酵素の立体構造を決定し、酵素反応中心のヘム鉄および周辺のアミノ酸残基の役割を解明し、炭素-窒素三重結合形成の反応メカニズムを明らかにしました。

❖社会的な意義と将来の展望

バイオテクノロジーにより、有用なニトリル化合物を低い環境負荷で工業的に生産するための技術へと発展することが期待されます。

3 発表内容

ニトリルは、C-N 三重結合のシアノ基を有する極めて毒性が高い一群の化合物の総称です。しかしながら一方で、ニトリルは化学工業の出発物質あるいは合成中間体として広く使われており、非常に有用な化合物です。例えば、アセトニトリルは溶媒として、アクリロニトリルはアクリル繊維や合成樹脂の原料として、アジポニトリルは 6,6-ナイロン製造の重要な中間体として広く使用されています（図 1）。今日のニトリル化合物の工業生産では、高温でかつ強酸性条件下といった環境負荷が高い方法が用いられていることから、中性かつ穏和な条件での合成が可能な効率的な触媒もしくはバイオリアクター（※7）として機能する酵素の発見が強く望まれています。

これまで、微生物によるニトリル分解代謝に関する研究の過程で、筑波大学の小林教授グループは、*Pseudomonas chlororaphis* B23（※8）株において、酵素ニトリルヒドラターゼによるニトリル分解系と OxdA によるニトリル合成系が遺伝子および代謝上、リンクしていることを発見しました（参考文献 1）。OxdA は、活性中心にヘム鉄を含み、有機基質（アルドキシム）が直接、ヘム鉄に結合することで（図 2）化学反応が進行するユニークな酵素です。ヘム鉄は、ヘモグロビンやカタラーゼなど、様々なタンパク質（酵素）の活性中心に含まれており、2 原子からなる気体分子（酸素(O₂), 一酸化窒素(NO), 一酸化炭素(CO)) と結合して生理的機能を発現することが知られていますが、OxdA はそのような気体分子を介さず（図 2）、しかも、水存在下であるにもかかわらず脱水反応を触媒し、炭素-窒素三重結合を形成する驚くべき酵素です（参考文献 2, 3, 4）。

小林教授グループは、*Pseudomonas chlororaphis* B23 菌から単離した OxdA 遺伝子が大腸菌体内に組み込み、組換え大腸菌で OxdA を菌体内で発現させた後、高純度まで単離精製することに成功しました。その精製酵素を用いて、横浜市立大学の橋本准

教授は OxdA の結晶化に成功し、つくばフォトンファクトリーの放射光 X 線を用いて X 線結晶解析を行い、OxdA 酵素の立体構造を 1.8 Å の分解能で決定しました (図 3)。アルドキシム脱水酵素の結晶構造としては唯一、*Rhodococcus* sp. N-771 (※9) 菌の酵素が報告 (参考文献 5) されていましたが、詳細な反応機構は未解明でしたので、部位特異的変異法や分光学的手法などを用いて、さらに以下の実験を行いました。

小林教授グループは、活性中心近傍の種々のアミノ酸を人為的に変異させた酵素の発現に成功し、各変異酵素の活性を始め酵素化学的諸性質を解明しました。また、九州大学先導物質化学研究所の成田教授および太田助教は、酵素の活性中心を構成する (反応に重要な役割を果たす) アミノ酸の役割を解明するために、化学的環境に感度良く応答する一酸化炭素を各種 OxdA のヘム鉄に結合させ、その振動構造を、振動分光法の一つである共鳴ラマン分光法を用いて解析しました (図 4)。

以上の研究によって、(i) セリン 219 は基質とヘム鉄の結合の安定化に貢献していること、(ii) ヒスチジン 320 が酸塩基触媒として働くこと、(iii) アルギニン 178 の側鎖がヒスチジン 320 のイミダゾール環の求電子性を増加させていることを明らかにし、ニトリル合成の酵素反応メカニズムの全貌を解明しました。この精密に制御された機構は、バイオテクノロジーにより低い環境負荷でニトリル化合物を工業的に合成するための技術に貢献することが期待されます。

参考資料



図 1 有用な工業製品の原料となるニトリル

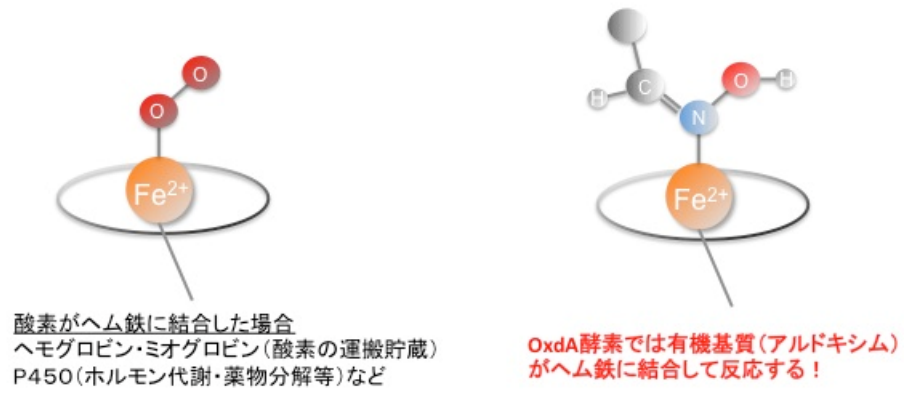
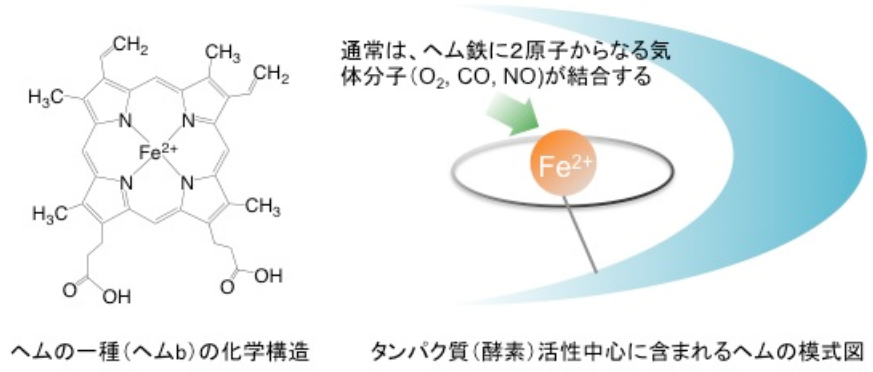


図2 ヘム鉄に結合する気体分子や有機基質

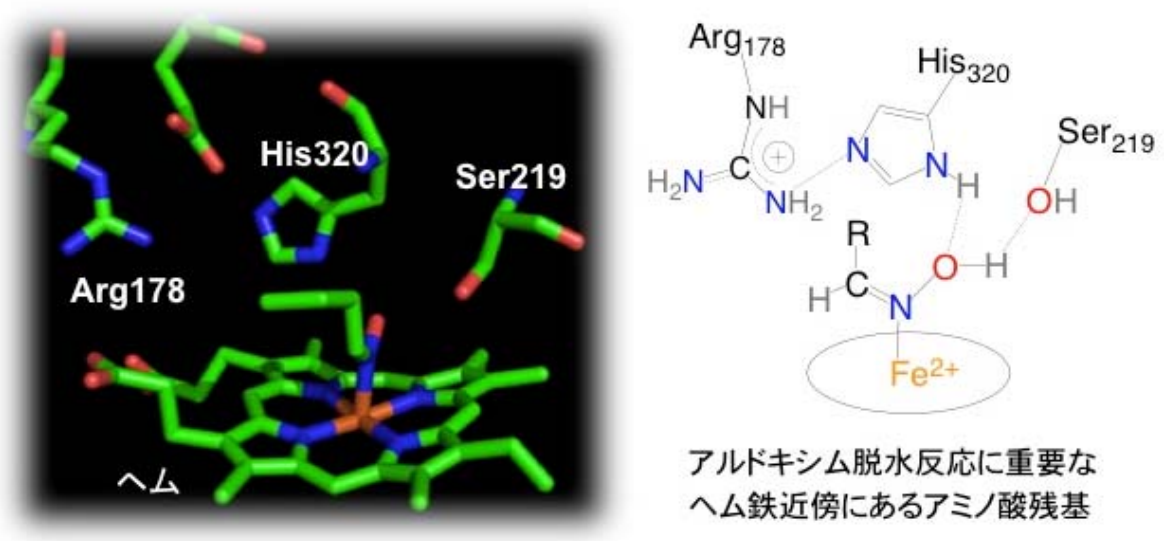


図3 OxdA酵素の結晶構造

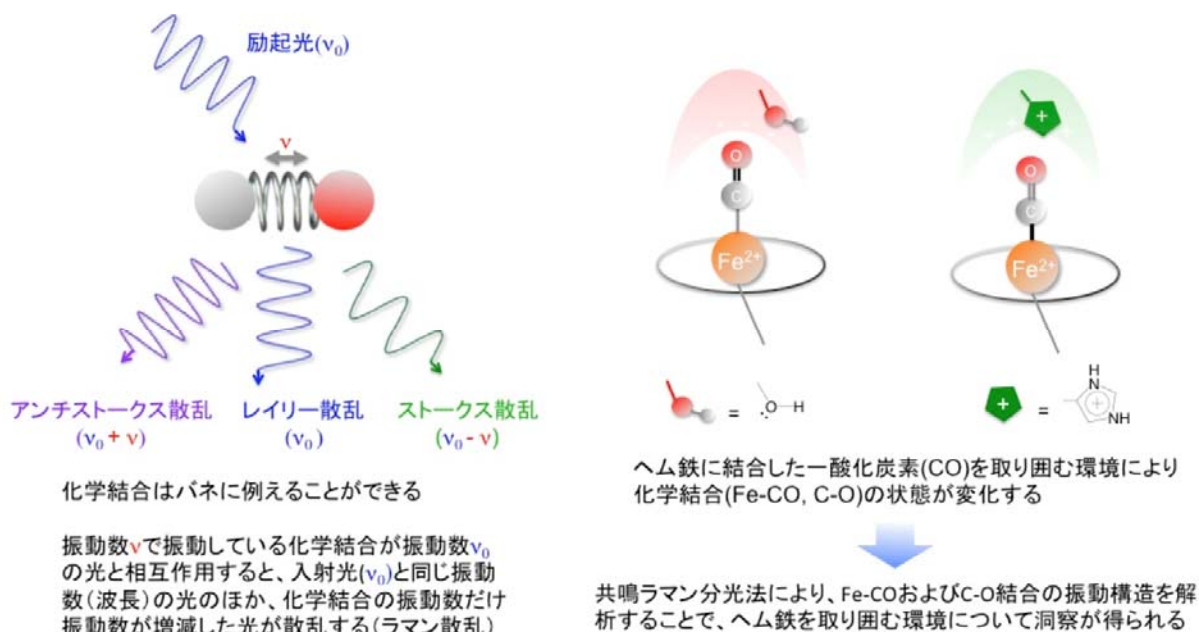


図4 ラマン効果と一酸化炭素結合型ヘムの振動構造解析

用語説明

(※1) アルドキシム化合物

R(H)C=N-OH という一般化学式で表される有機化合物

(※2) ニトリル化合物

炭素-窒素三重結合のシアノ基 (-C≡N) を含む有機化合物の総称

(※3) アルドキシム脱水酵素 (OxdA)

アルドキシム化合物から水分子を取り除き、ニトリルを生成する反応を触媒する酵素

(※4) X線結晶構造解析法

規則正しく分子が配列した結晶に、X線を照射して得られる回折X線の強度を解析することにより、結晶内の分子構造を原子レベルの解像度で決めることができる構造解析法

(※5) 共鳴ラマン分光法

ラマン効果(物質に光を入射したとき、散乱された光の中に入射された光の波長と異なる波長の光が含まれる現象)を利用した振動分光法で(図4参照)、共鳴効果(分子の電子状態を励起して得られる)により強いラマン効果が得られ、低濃度の測定試料でも選択的に解析したい化学結合の振動構造について解析できる

(※6) ヘム鉄

図2に示すようにピロールが4つ組み合わさってできた環状構造をもつ有機化合物

(※7) バイオリクター

生体触媒（酵素）を用いて生化学反応を行う装置の総称で、穏和な条件で効率的に目的化合物の生成が可能

(※8) *Pseudomonas chlororaphis* B23

細菌に属するニトリル分解菌。本菌のニトリルヒドラターゼは第2世代の触媒としてアクリルアミドの工業生産に使用された。

(※9) *Rhodococcus* sp. N-771

放線菌に属するニトリル分解菌

参考文献

- [1] Oinuma, K-I., Hashimoto, Y., Konishi, K., Goda, M., Noguchi, T., Higashibata, H., Kobayashi, M., "Novel aldoxime dehydratase involved in carbon-nitrogen triple bond synthesis of *Pseudomonas chlororaphis* B23: Sequencing, gene expression, purification and characterization" *J. Biol. Chem.*, **278**, 29600-29608 (2003).
- [2] Oinuma, K-I., Ohta, T., Konishi, K., Hashimoto, Y., Higashibata, H., Kitagawa, T., Kobayashi, M., "Heme environment in aldoxime dehydratase involved in carbon-nitrogen triple bond synthesis" *FEBS Lett.*, **568**, 44-48 (2004).
- [3] Konishi, K., Ishida, K., Oinuma, K-I., Ohta, T., Hashimoto, Y., Higashibata, H., Kitagawa, T., Kobayashi, M., "Identification of crucial histidines involved in carbon-nitrogen triple bond synthesis by aldoxime dehydratase" *J. Biol. Chem.*, **279**, 47619-47625 (2004).
- [4] Konishi, K., Ohta, T., Oinuma, K-I., Hashimoto, Y., Kitagawa, T., Kobayashi, M., "Discovery of a reaction intermediate of aliphatic aldoxime dehydratase involving heme as an active center" *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **103**, 564-568 (2006).
- [5] Sawai, H., Sugimoto, H., Kato, Y., Asano, Y., Shiro, Y., and Aono, S., "X-ray crystal structure of the Michaelis complex of aldoxime dehydratase" *J. Biol. Chem.*, **284**, 32089-32096 (2009)

OxdA 酵素に関するこれまでの研究の背景

筑波大学の小林教授グループはこれまで、ニトリル合成とは逆のニトリル分解代謝に関する基礎と応用の研究を長年行ってきました。微生物におけるニトリル分解代謝に関与する酵素系として (1) ニトリラーゼによりニトリルを直接カルボン酸とアンモニアに分解する経路、 (2) アミドを経由する経路でカルボン酸とアンモニアに変換する経路（ニトリルヒドラターゼとアミダーゼによる経路）が知られています。ニトリルを分解することが知られている種々の微生物の中でも、放線菌 (*Rhodococcus rhodochrous* J1 菌) は、上記2つのニトリル代謝系をもっているユニークな菌です。特に、コバルトイオン存在下で、尿素を誘導物質として培地に添加した場合、菌内に著量生成される高分子量 H 型のニトリルヒドラターゼはアクリロニトリルに良好に作用してアクリルアミドに変換することが可能であることから、山田秀明京都大学名誉教授らのグループによって開発された本酵素を用いて、日東化学工業 (株) [現、三菱レイヨン (株)] でアクリルアミドの工業生産が行われるに至っております。また、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NAD) の構成成分で、ビタミンの1種でもあるニコチンアミドの工業生産も、3-シアノピリジンを経由する本酵素反応により現在、行われています。アクリルアミドは、紙の強化成分や高分子凝集剤として使用されており、世界で年間 50 数万トン以上の需要があります。その約 3 分の 1 が、この J1 菌のニトリルヒドラターゼによって生産されており、日本

だけでなく、アメリカやフランスで、バイオテクノロジーによる工業プロセスが稼動しています。この J1 菌は第 3 世代の触媒であり、それ以前は、*Pseudomonas chlororaphis* B23 菌の酵素が第 2 世代の触媒としてアクリルアミドの工業生産に使用されていました。

小林教授グループは、B23 菌のニトリルヒドラーゼを遺伝子レベルで解析した結果、ニトリル代謝上、同酵素とリンクしているアミダーゼと、ニトリルヒドラーゼ、OxdA が遺伝子クラスターを形成していることを発見しましたが、これは、富山県立大学の浅野泰久教授のグループによって報告されていた *Bacillus* 属のフェニルアセトアルドキシム脱水酵素がニトリラーゼと遺伝子クラスターを構成しているのとは好対照でした。小林教授グループは、分子科学研究所の北川禎三教授（現、名誉教授、兵庫県立大学客員教授）と太田雄大博士（現、九州大学）との共同研究によって、OxdA の活性中心にはヘム鉄に結合する近位ヒスチジンと、直接結合しないがヘム鉄遠位側にあり触媒反応に重要な機能を果たす遠位ヒスチジンが存在することを明らかにするとともに、2 種類の反応中間体 (OS-I と OS-II) の存在を解明しました。

4 発表雑誌

この研究成果に関しては、2013 年 2 月 4 日の米国科学アカデミー紀要「*Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)*」のオンライン速報版で公開されました。

電子版 : <http://www.pnas.org/content/early/2013/01/30/1200338110.full.pdf+html>

タイトル : Crystal structure of aldoxime dehydratase and its catalytic mechanism involved in carbon-nitrogen triple bond synthesis (アルドキシム脱水酵素の結晶構造と炭素-窒素三重結合形成の触媒機構)

著者名 : Junpei Nomura (野村 純平)¹, Hiroshi Hashimoto (橋本 博)¹, Takehiro Ohta (太田 雄大)¹, Yoshiteru Hashimoto (橋本 義輝), Koichi Wada (和田 浩一), Yoshinori Naruta (成田 吉徳), Ken-Ichi Oinuma (老沼 研一), Michihiko Kobayashi (小林 達彦)*

¹ 同等貢献, *責任著者

5 問い合わせ先

小林 達彦 (こばやし みちひこ)

筑波大学 生命環境系 教授