

# 嫌気条件下における鉄型活性型 Nitrile Hydratase の反応中心構造

○橋本浩一<sup>1,2</sup>・河野能顕<sup>1</sup>・尾高雅文<sup>2</sup>・養王田正文<sup>2</sup>・神谷信夫<sup>1,3</sup>

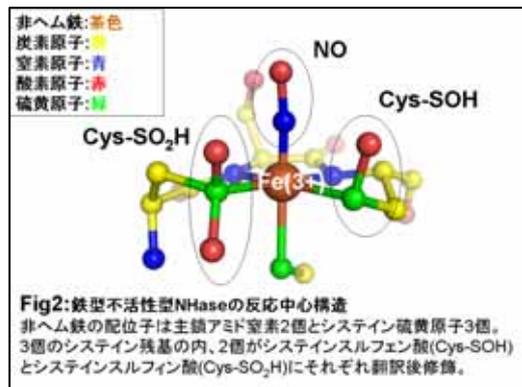
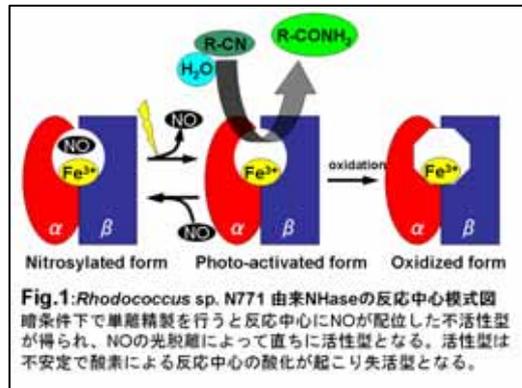
理研 播磨研<sup>1</sup>・東京農工大 工学<sup>2</sup>・大阪市大 理学<sup>3</sup>

e-mail : kounda@bel.bio.tuat.ac.jp

ニトリルヒドラーゼ (NHase : EC 4.2.1.84) は、2つのサブユニット ( $\alpha$ 、 $\beta$  : それぞれ MW=23,000) で構成される酵素であり、種々のニトリル化合物に水を付加して対応するアミド化合物を合成する反応を触媒する (Fig.1)。反応中心に非ヘム鉄 (III) または非コリノイドコバルト (III) を持つ。NHase の触媒活性は極めて高く、アクリルアミドやニコチンアミドの工業生産に応用されている重要な酵素である (1)。

*Rhodococcus* sp. N771 由来の鉄型 NHase は、反応中心に非ヘム鉄を持ち、 $\alpha$  サブユニット中の Cys109、Cys112、Cys114 の3個のシステイン残基の硫黄原子と Ser113、Cys114 の主鎖アミド窒素原子を配位子とし、そのうち、Cys112 はシステインスルフィン酸 (Cys-SO<sub>2</sub>H)、Cys114 はシステインスルフェン酸 (Cys-SOH) に翻訳後修飾されている (2) (Fig.2)。この翻訳後修飾は非コリノイドコバルト (III) を反応中心に持つコバルト型 NHase でも保存されている (3)。類似の構造を持つモデル錯体を合成し反応機構を探る研究が最近盛んに行われているが (4)、得られた錯体の触媒活性は極めて低く、NHase の触媒機構を推定することは困難である。NHase はこの特異な配位構造を分子内に構築することで、高い触媒活性を発揮する。鉄型 NHase を *Rhodococcus* sp. N771 から暗条件下で単離精製すると鉄の第6配位座に一酸化窒素 (NO) を結合した不活性型 (Fig.2) として得ることができ、不活性型 NHase は NO を光解離させることで活性化できる (5) (Fig1)。このため、酵素活性化を光で同期した時間分割解析に利用可能だと期待される。しかし、活性型 NHase は好気的環境下では不安定で、容存酸素によって Cys114-SOH が Cys114-SO<sub>2</sub>H まで酸化されるため 24 時間以内に失活してしまう (6)。

そこで、本研究では、鉄型 NHase を嫌気的環境下で結晶化する実験系を構築した。次に、得られた系を用いて、これまで明らかにされていなかった活性型 NHase なら



びに競争阻害剤との複合体の結晶構造を決定し、鉄型活性型 NHase の反応中心の構造に関する新たな知見を得たので報告する。

まず、嫌気条件下での結晶化を行うセルの開発を行った(Fig.3)。反応中心の非ヘム鉄への影響を考慮し、嫌気条件結晶化セルでは還元剤を酵素溶液中に加えず、気相中に酸素吸収剤を配置し密封することで結晶化セル内をほぼ完全嫌気状態にした。この条件では活性型 NHase は300 時間以上安定に存在していた。Fig.4 は活性型 NHase の結晶構造(PDB\_ID;2CYZ)の金属錯体近傍を示している。矢印で示したように、活性型 NHase の結晶構造では、Cys-SOH の Oδのごく近傍に水分子由来の電子密度が存在していた。この電子密度はコバルト型 NHase(3) では検出されていない。また、競争阻害剤として知られている *n*-酪酸と活性型 NHase の複合体結晶構造(PDB\_ID;2CZ1 , Fig.5)では、*n*-酪酸カルボキシル基の酸素原子が非ヘム鉄に直接配位し、もう一方の酸素原子が Cys-SOH の O と水素結合しており、活性型 NHase で新たに見出された水分子が消失していた(Fig.6)。以上の結果から、この新たに見いだされた水分子が触媒反応に関与する可能性を提案した。

#### References

- (1) Yamada, H. et al. 1996 *Biosci. Biotechnol. Biochem.*
- (2) Nagashima, S. et al. 1998 *Nat. Struct. Biol.*
- (3) Miyanaga, A et al. 2001 *Biochem. Biophys. Res. Comm.*
- (4) Chang, H. C. et al. 2004 *Inorg. Chem.*
- (5) Noguchi, T. et al. 1996 *Biochem*
- (6) Tsujimura, M. et al. 1996 *J. Biochem.*

