

鉄型ニトリルヒドラターゼにおける酵素反応過程の時間分割解析

○河野能顕¹・橋本浩一^{1,2}・大須賀久織^{1,2}・野尻正樹³・神谷信夫^{1,2,4}

¹理研 播磨研・²兵庫県立大 理学・³大阪大学 理学・⁴大阪市大 理学

e-mail : ykawano@spring8.or.jp

ニトリルヒドラターゼ(NHase)は、ニトリルに水を付加してアミドを合成する酵素であり、アクリルアミドを合成する酵素として広く利用されている。*Rhodococcus*菌由来NHase(Fe-NHase)は、2つのサブユニットが会合したヘテロダイマー(α 、 β ともにMW=23KDa)として存在し、その反応中心に非ヘム鉄(III)イオンを持っている。Fe-NHaseは非ヘム鉄に一酸化窒素(NO)をひとつ結合させた状態(NO-Fe-NHase)で活性を持たないが、光を照射することによってフェムト秒オーダーでNOが光脱離し、水が結合して活性化する(Active Fe-NHase)。一方暗条件下でNOを共存させるとミリ秒のオーダーでNO再結合が進み、可逆的に不活性化することが知られている。活性中心は翻訳後修飾を受けたCys-sulfinat (Cys-SO₂⁻)とCys-sulfenat (Cys-SO⁻)がFe(III)イオンに配位した単核非ヘム鉄というまったく新規な錯体構造をしており、すでに構造解析もなされている (*Nature Struc. Biol.* 5, 347-351 (1998))。またActive-Fe-NHaseを好気条件下に放置するとCys-SO⁻が過酸化(Cys-SO⁻ > Cys-SO₂⁻)されることによって速やかに(24時間以内)失活することから、Cys-SO⁻が活性に重要な役割をしていることが予想されている。しかしながら、その酵素反応メカニズムは明らかになっておらず、現在、1) Feに配位したOHが付近の水を活性化し、その水が基質に取り込まれる。2) Feに配位したOHが直接基質と反応する。3) 基質が鉄に直接配位し、付近にある水分子が反応する。の以上3つが提唱されているに過ぎない。

これまで、我々は本酵素の反応過程を X 線結晶学の手法によって明らかとすることを目的としてさまざまな研究を行ってきた。

その結果、完全嫌気条件下での活性型 NHase の構造解析・NHase の安定化剤として知られる酪酸と活性型 NHase との複合体の結晶構造解析・基質類似化合物と活性型 NHase との複合体の構造解析等から酵素反応が鉄への配位過程を経て進行することが示唆された。

そこで、結晶のクライオ凍結法と LOT 法を用いた時間分割結晶構造解析の手法を用いて基質の酵素反応過程の追跡をおこなった。

まず、NHase の光照射による NO の光脱離過程の追跡ならびに、基質類似化合物の結合過程の追跡を行った。その結果、光脱離過程は NO-Fe-NHase に 140K で光照射を行う、また、基質類似化合物の結合過程は Cyclohexyl Isocyanide (CIC)を蒸気拡散法によって NO-Fe-NHase にソーキングした後、140K で光照射を行うことで、それぞれの

構造変化を追跡できることが明らかとなった。共に、Fe の第六配位座で電子密度の減少が見られ、また、CIC-Fe-NHase では CIC のイソシアニド基の Fe への配位が見られた。

この、基質類似化合物の配位過程の追跡実験の結果から、本酵素の基質である Cyclohexyl Carbo Nitrile (CCN)を基質類似化合物の反応過程の追跡を行うための試料の温度・実験スケジュールの条件を確定した。実験は、SPring-8 の理研ビームライン II (BL44B2) で行い、試料温度をN₂ガス吹き付け低温装置によって 140Kに設定して行った。1 データセットのデータ収集時間は 23 分であり、ただ一つの結晶を用いて、光照射開始後 40.5 時間までのデータを得ることに成功した。

その結果、基質類似化合物で見られたものと同様の電子密度変化を追跡することが出来た。このことから、CCN のニトリル基が Fe への配位という段階を経て反応が進行することが強く示唆された(図)。

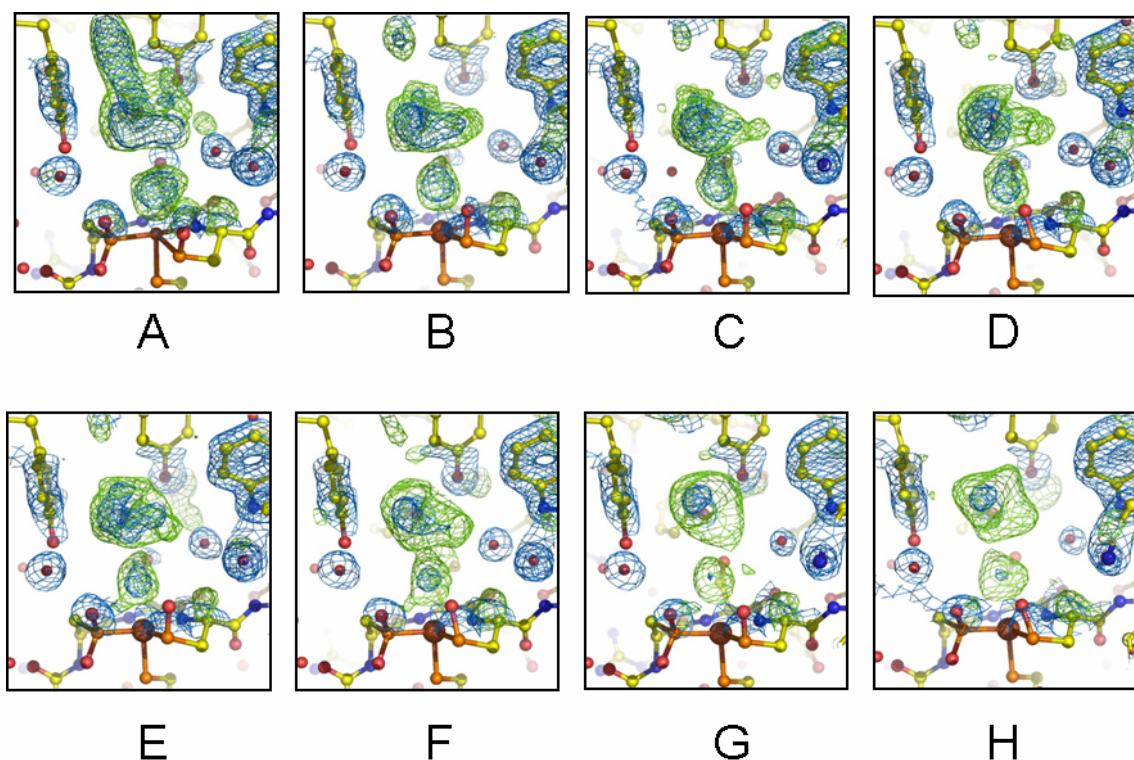


図 基質・酵素複合体の反応中心構造。

炭素：黄、窒素：青、酸素：赤、硫黄：茶、鉄：黄土。2fo-fc：青、fo-fc：緑。

A:0 時間, B:6 時間, C:12 時間, D:18 時間, E:24 時間, F:28.5 時間, G: 34.5 時間, H: 40.5 時間