

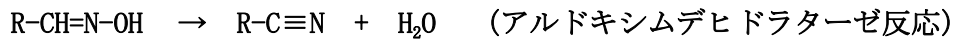
CN合成酵素の構造機能解析および有用物質生産への応用

橋本 義輝

(筑波大学大学院生命環境科学研究科)

研究の目的

我々は、ニトリル分解菌 *Pseudomonas chlororaphis* B23 を対象に以下のことを既に明らかにしている。本菌のニトリル分解酵素遺伝子クラスター中には、(ニトリルの分解に関わる酵素遺伝子のみならず) ニトリルを合成する酵素アルドキシムデヒドラターゼの構造遺伝子が存在する。本酵素がプロトヘム IX を含むヘム酵素であり、水溶液中での反応にも関わらず、水を取り除き、炭素-窒素 3 重結合を形成する反応を触媒することを明らかにした。



さらに分光学的解析等により、本酵素は、ヘムの第 5 配位子が (ヘモグロビンやペルオキシダーゼなどと同様に) His 残基であり、ヘムタンパク質としての特徴を持ち合わせながらも、触媒する反応は酸化還元反応ではなく、ヘムに基質が直接アプローチするなど、従来のヘムタンパク質では見られない希有な新性質を有することも明らかにした。精製酵素に対する共鳴 Raman 分光学的解析等により既に活性型酵素が (ヘム近位側にヒスチジン (His) が結合した) 5 配位高 Spin ヘム (2 価) を持つことを実証した。さらに、部位特異的変異法・分光学的解析 (UV 可視・共鳴 Raman 等) により、本酵素のヘムに配位する近位 His を同定した。その過程で、ヘム周辺に位置し本反応に重要な役割を果たす遠位 His (His320) を発見し、Stopped-flow 法などから His320 がプロトン化した状態で基質に対しプロトン付加する役割を担う触媒反応モデルを提唱した。本研究では、不明のままである触媒反応中の詳細なヘム環境 (構造と機能) を解析し、詳細な反応機構を解明することを目的とする。

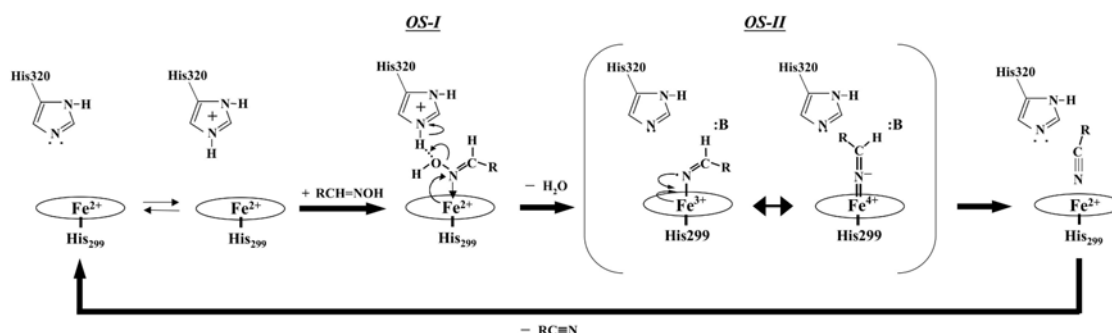
方法

B23 菌のアルドキシムデヒドラターゼ (OxdA) は、本酵素の発現ベクターを導入した大腸菌形質転換体から精製し、酵素標品を得た。高い酵素活性を示す活性型 OxdA は精製酵素に嫌気条件下、ジチオナイトを加えヘム鉄を還元することで調製した。酵素反応産物をガスクロマトグラフィーで定量する一般的な酵素諸性質分析と各種分光学的解析 (UV-Vis 吸収スペクトル解析、共鳴 Raman スペクトル解析) を組み合わせて解析を行った。

結果

反応中間体の捕捉条件を検討した結果、低濃度の酵素に対して大過剰の基質を添加することにより、長寿命の新しい反応中間体 (OS-II) が生成することを見出した。酵素と基質を混合した直後に生成した OS-II スペクトルは約 10 分間そのスペクトルを保持した後、徐々に resting state である ferrous form (鉄 2 価) へと変化した (本反応で

は不純物が生成せずにブチロニトリルを生産することを確認済)。このOS-IIの構造解析を詳細に行うため、¹⁵N置換した標識ブチルアルドキシムを利用した共鳴ラマン測定等を行い、OS-IIの非常に興味深い以下の2つの特徴を明らかにした。まず一つはOS-IIのヘム鉄を2価あるいは3価と考えるには波数が高すぎる ν_4 (1379 cm⁻¹) バンドを観測したことであり、もう一つはOS-IIのヘム鉄と基質のNの結合を単結合と考えるには高すぎるFe-N伸縮振動(857 cm⁻¹)バンドを観測したことである。以上の実験結果より、OS-IIがFe(IV)=Nを含む構造を持つと考察し、新規な反応機構(下図)を提唱した。



結論

本研究課題により、B23株の新規なヘム酵素 OxdA が基質をヘム鉄にダイレクトに結合させ、高酸化状態ヘムを形成することを初めて明らかにした。

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) Oinuma, K-I., Kumita, H., Ohta, T., Konishi, K., Hashimoto, Y., Higashibata, H., Kitagawa, T., Shiro, Y. & Kobayashi, M. "Stopped-flow spectrophotometric and resonance Raman analyses of aldoxime dehydratase involved in carbon-nitrogen triple bond synthesis" *FEBS Lett.*, **579**, 1394-1398 (2005)
- (5) 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. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 564-568 (2006)