

イソニトリル・ニトリルの新規代謝経路の発見と 新規酵素の分子機能解析

橋本 義輝

イソニトリル ($R-N\equiv C$) の代謝を新しく解明し、それに関わる新規酵素 (イソニトリルヒドラーゼ, *N*-置換ホルムアミドデホルミラーゼ) を発見, その酵素科学的諸性質を詳細に解析し, 炭素-窒素結合切断を触媒する反応機構を解明した. また, ニトリル ($R-C\equiv N$) の合成に関わるアルドキシムデヒドラーゼの酵素科学的・物理化学的諸性質を詳細に解析することで炭素-窒素結合合成を触媒する反応機構を解明するとともに, ニトリルのさらなる代謝経路の存在も実証した. 新たに探索してきた微生物だけでなく単離されてから 25 年以上経つ微生物から, 新しい代謝経路や (新規酵素番号が与えられた) 酵素が見つかったことで微生物の持つ無限の可能性の一端を示すことができた. 小さな微生物から発見した新しい機能を本稿で紹介する.

1. イソニトリル代謝経路の発見

イソニトリル ($R-N\equiv C$) はイソシアニドとも呼ばれ, ニトリル ($R-C\equiv N$) の構造異性体である. イソニトリルの最も大きな特徴は, イソシアノ基 ($-N\equiv C$) が一酸化炭素とよく似たユニークな共鳴構造をとる点にあり, このためイソシアノ炭素は求核性・求電子性の両方の性質を示す. 合成化学上, この性質は有用であり, 特に Ugi 反応などの多成分反応系において活用されている¹⁾. 一方, イソニトリル化合物は天然物としても存在することが見出されている. 例えば, *Penicillium notatum* から xanthocillin (図 1) が分離されており, その後, 種々の原核・真核生物からイソニトリル構造を持つ化合物が発見されている. 天然のイソニトリル化合物 (図 1) は, 大別すると陸上生物由来のものと, 海洋生物由来のものがある^{2,3)}. 前者は, 主に糸状菌により生産され, その構造には多様性がありアミノ酸

骨格を基礎とするものが多い. 一方, 後者は, 天然イソニトリルの大部分を占めており, 海綿・ウミウシなどにより作られる. 構造的には, テルペノイド骨格を基本とし, 対応するイソチオシアネート ($R-N=C=S$), *N*-置換ホルムアミド ($R-NH-CH=O$) としばしば同時に見出される. これらの化合物の大部分はなんらかの生理活性を有することから, 実用上興味深いものが多い. 例えば, 7,20-diisocyanisocycloamphilectane (図 1) は, *in vitro* で強力な抗マラリア活性を示し, 新規マラリア治療薬開発のリード化合物として期待できる⁴⁾. この活性は, イソシアノ基の存在に由来することが示唆されており, これからヒントを得て合成されたいくつかのイソニトリル化合物は *in vivo* でマラリアに効果を示すことが認められている. また, 10-isocyano-4-cadiene (図 1) は, 貝類の付着防止作用を示す⁵⁾. フジツボなどの貝が船の外板の没水部に付着するのを防ぐための船底塗料として, 生物忌避効果や成長阻害効果のある有機スズ化合物が従来から用いられてきた. しかし, 近年, 環境保全の見地から使用を全面禁止する条約が採択されたため, イソニトリル化合物はその代替品となり得る可能性を秘めている.

このようにイソニトリル化合物が自然界に存在することから, 生物によるイソニトリル化合物の生合成とともに, イソニトリル化合物分解が行われていることは容易に想像

筑波大学大学院生命環境科学研究科生物機能科学専攻
(〒305-8572 つくば市天王台 1-1-1)

Discovery and functional analysis of new enzymes involved
in isonitrile and nitrile metabolism

Yoshiteru Hashimoto (Graduate School of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba, 1-1-1 Tenno-dai, Tsukuba, Ibaraki 305-8572, Japan)

本総説は 2006 年度奨励賞を受賞した.

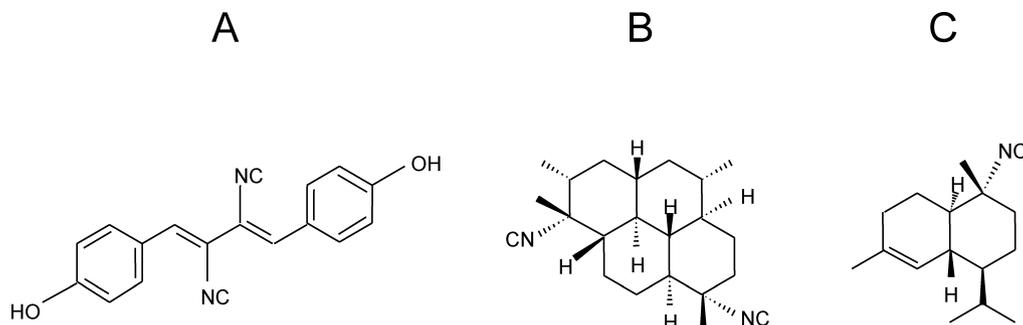


図1 天然界のイソニトリル化合物

(A) xanthocillin, (B) 7,20-diisocyanisocycloamphilectane, (C) 10-isocyano-4-cadiene

できる。天然イソニトリルの代謝については若干の研究成
果は挙げられているものの、未解明の部分極めて多いの
が現状である。これまで多くの「取り込み実験」が行われ、
その結果、いくつかの天然イソニトリルについては前駆体
化合物が推定された^{2,3)}。しかし、イソシアノ基の炭素原子
や窒素原子として導入される前駆体化合物は必ずしも同一
ではなく、いろいろな多様性があると想像できる。また、
イソシアノ基の由来の大部分は未知のままである。一方、
イソニトリルの分解経路についても報告が極めて少なく、
海綿においてイソニトリルが分解されることでイソチオシ
アネート・N-置換ホルムアミドが作られることが示され
ている。しかし、これらの報告は全て *in vivo* レベルの解
析によるものである。どのような反応経路を経て各種前駆
体化合物がイソシアノ基に変換されるのか、また、生じた
イソニトリルがいかなる反応経路によってさらに分解され
ていくのか、それらを解明するためにタンパク質・遺伝子
レベルでの詳細な解析が不可欠であるが、分子レベルでの
解析研究はこれまで全く報告がなかった。

このような背景のもと、筆者らは自然界からのイソニ
トリル分解酵素の探索を試みた。イソニトリル化合物として
シクロヘキシルイソシアニドを単一窒素源とする液体培地
に、土壌サンプルを分離源として集積培養を行った。28℃
で約2ヶ月間培養した後、平板培地上には数百個のコロ
ニーが出現した。これらの外見は多様であり、イソニトリ
ル分解酵素が多様な生物種に分布していることが示唆され
た。これらの微生物の培養菌体によりシクロヘキシルイ
ソシアニド分解を行い、反応溶液を高速液体クロマトグラ
フィーで分析した結果、有意な分解活性を示す全ての菌に
ついて、シクロヘキシルイソシアニドの減少に伴い、同一
の新規化合物の出現が認められた。質量分析などにより、
本化合物をN-シクロヘキシルホルムアミドと同定した。
これによりイソニトリルがN-置換ホルムアミド (R-NH-
CHO) に変換される代謝経路を初めて同定した。また、
このイソニトリルの代謝は、イソニトリルに水一分子を付
加する新規酵素が関わっていることが示唆され、本酵素を

イソニトリルヒドラーゼと命名した (式1)⁶⁾。



2. 新規酵素 イソニトリルヒドラーゼ

単離した微生物の中で最も高いイソニトリル分解活性を
示した微生物 (N19-2 株) を *Pseudomonas putida* と同定し、
本株からイソニトリルヒドラーゼの精製を試みた。本酵
素は各種イソニトリルを培地に加えた場合のみ発現する誘
導酵素であり、0.02% シクロヘキシルイソシアニド添加
により最大の活性が得られた。この条件で大量培養し、無
細胞抽出液を各種クロマトグラフィー操作により精製する
ことで、単一酵素標品 (16.2 units/mg protein) を得た⁶⁾。
本酵素は、分子量 29,000 のサブユニットから成るホモダ
イマーであり、補酵素を必要とせず、また金属原子を含ま
なかった。さらに、各種イソニトリルに対して活性を示す
一方で、ニトリル・アミドなどの類縁化合物には一切作用
せず、本酵素は基質特異性が既知のいずれの酵素とも異
なっていた。さらに本酵素の生理的役割がイソニトリル分
解であることを実証し⁶⁾、本酵素は新規酵素として認定さ
れ、新規酵素番号 EC 4.2.1.103⁷⁾ が与えられた。

本酵素と類似の反応を触媒する酵素に、ニトリルヒド
ラーゼがある⁸⁾。本酵素はニトリルを水和してアミドに変
換する (式4)。ニトリルヒドラーゼは (アクリロニ
トリルから) アクリルアミドの工業生産に使われる有用酵
素であるため、比較的良好に解析が進んでいるが、これは鉄⁹⁾
またはコバルト¹⁰⁾を活性中心に持つ金属酵素である。本酵
素は、炭素-窒素三重結合を持つ官能基を基質とし、一分
子の水を付加する反応を触媒し、イソニトリルヒドラー
ゼと類似した反応式を示す。イソニトリルヒドラーゼは
金属酵素ではなく、その活性中心はニトリルヒドラーゼ
の活性中心と全く異なるものと示唆され、触媒する反応の
類似性とは興味深い対比をなしている。

精製酵素のN末端および内部の部分アミノ酸配列を基
に定法に従い、本酵素の構造遺伝子 (*inhA*) 全長を取得し、
全塩基配列を決定した¹¹⁾。 *inhA* 遺伝子は、228 アミノ酸か

らなる推定分子量 24,211 のタンパク質をコードしていた。推定アミノ酸配列を基にデータベース検索を行った結果、本酵素全長にわたり高い相同性を示す既知の酵素はなく、このことから本酵素の新規性が示唆された。しかしながら、本酵素は、高度好熱性アーキアである *Pyrococcus horikoshii* および *Pyrococcus furiosus* 由来の細胞内プロテアーゼ (PH1704 および PfpI) と 25% 程度の相同性を示した。PH1704 は、結晶構造解析から Cys100-His101-Glu74 を catalytic triad とするシステインプロテアーゼと推定されている¹²⁾。イソニトリルヒドラーゼにおいてもこのシステイン残基は対応する位置 (Cys101) に保存されていた。このため、イソニトリルヒドラーゼの Cys101 に変異導入することで活性がどう変化するかを調べた。野生型酵素および C101A 変異酵素の発現ベクターを構築し、大腸菌の可溶性画分に大量発現させ、単一に精製したところ、前者は *P. putida* N19-2 由来の酵素標品と同等の酵素活性 (17.3 units/mg protein) を示したのに対し、C101A 変異酵素は一切の活性を示さなかった。さらに、PH1704 の His101 に対応する位置に存在する本酵素の Thr102 も変異導入により活性が 92% 減ったことから、重要なアミノ酸残基であることが判明したが、その役割は不明である。Cys101 がイソニトリルヒドラーゼの活性に必須であり、触媒上、重要な役割を果たすアミノ酸残基と示唆された結果を基に新規な反応機構を提唱した¹¹⁾。さらに、窒素-炭素三重結合 (R-N≡C) を切断する本酵素と炭素-窒素単結合 (ペプチド結合) を切断するプロテアーゼが進化的に関連することを初めて明らかにした。両者は Cys 残基を同じ活性中心とするものの、ペプチド結合 [-NH-CO-] とイソシアノ基 [-N≡C] は電子分布状態が大きく異なり、また、イソニトリルヒドラーゼが水和、PH1704 が加水分解と触媒する反応も異なる。イソニトリルヒドラーゼがいかなる触媒機構を持つか、それがプロテアーゼの触媒機構とどのように類似あるいは相違するかは非常に興味深い。(プロテアーゼとの) 活性中心の進化的関連性や、(ニトリルヒドラーゼとの) 反応の類似性をも考慮しつつ、立体構造学的アプローチからの本酵素の反応機構解析を行った。

3. イソニトリルヒドラーゼの立体構造

より詳細なイソニトリルヒドラーゼの反応機構に関する知見を得ることを目的として、X線結晶構造解析を行った。結晶化条件を検索し約 0.4×0.2×0.02 mm の良質の板状結晶を得ることができた。セレノメチオン置換酵素も大量調製し、本置換酵素においても良質の結晶を得ることができた。得られた結晶で X線回折像が得られることの確認および回折データ収集を行った。さらに位相を決定するため、セレノメチオン置換酵素結晶の回折データを

用い初期位相の決定、さらに初期モデルの構築に成功した。構造精密化を行った結果、イソニトリルヒドラーゼの立体構造解析に成功した。イソニトリルヒドラーゼは非対称単位中でダイマーを形成しており、ダイマー全体でラグビーボール状の形をしている (図 2)。ダイマーには非結晶学的 2 回軸が存在し、図 2 の誌面垂直方向にその 2 回軸がある。それぞれの分子は 7 本の α ヘリックスと 1 本の 3_{10} ヘリックス、11 本の β ストランドで構成されている。

イソニトリルヒドラーゼは α/β 構造をとっており、中央の 7 本の β ストランドからなる β シートは、モノマー内側から 3 本のヘリックス、外側から 5 本のヘリックスに挟まれた構造をしている。モノマーの会合領域について見てみると、会合面には塩橋が形成されておらず、Leu·Ala·Val·Ile などの疎水的なアミノ酸残基で構成されている。また二つのモノマー間には 26 本の水素結合が形成されていることがわかった。さらに、分子の表面には基質 (シクロヘキシルイソシアニド) の大きさに対して少し大きめのくぼみ (直径約 7 Å) がダイマーあたり二つ存在し、その底には活性中心と予測される Cys101 が位置していた。

イソニトリルヒドラーゼが相同性を示し、立体構造が決定されている *P. horikoshii* 由来の細胞内システインプロテアーゼ (PH1704)¹²⁾ の構造と比較したところ、アミノ酸レベルでの相同性は 24% と低いながらも、その立体構造はよく似ていることが判明した (図 3)。活性中心と予測される Cys101 の周辺と、PH1704 において電荷リレー系を構成し活性中心 (Cys100, His101, Glu74) と考えられている領域と比較したところ、イソニトリルヒドラーゼの Cys101 と Thr102 は、PH1704 の Cys100, His101 とほぼ同じ位置にあるが、PH1704 の Glu74 に対応すると予想されていた Glu79, Glu81 は全く異なる場所に位置することが明らかとなった。PH1704 の電荷リレー系を構成する Glu74 に対応するアミノ酸残基は存在せず、(相同性があった) PH1704 とは全く異なる活性中心構造を形成していることが判明し、新しい反応機構の存在が強く示唆された。本酵素は新規酵素でもあり、ユニークな反応機構解析など、今後さらに詳細な酵素科学的解析を行いたい。

4. N-置換ホルムアミド代謝経路の発見

新規酵素イソニトリルヒドラーゼによりイソニトリルは水和され、N-置換ホルムアミドに変換される (式 1)⁶⁾。N-置換ホルムアミドの分解酵素として、数種類の天然酵素が既に報告されており、これらの酵素は一般にデホルミラーゼと称され、N-置換ホルムアミドを加水分解してアミンとギ酸への変換反応を触媒する。具体的な例として、トリプトファン代謝に関わるキヌレニンホルムアミドデホ

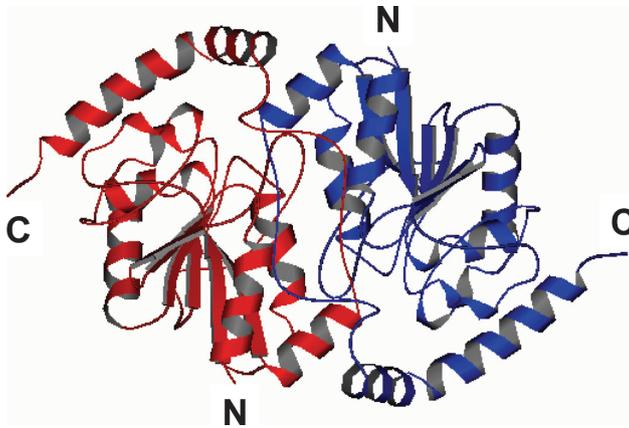


図2 イソニトリルヒドラターゼの全体構造 (リボンモデル表示)

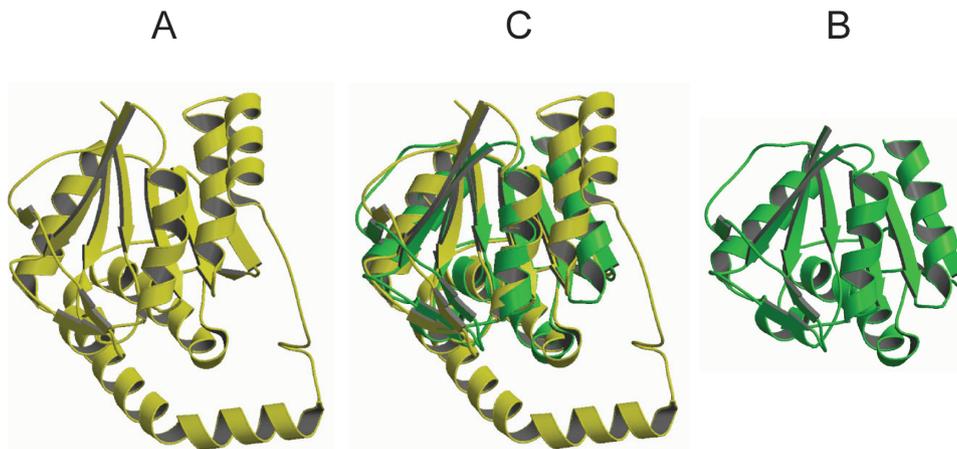


図3 イソニトリルヒドラターゼ(A)と *P. horikoshii* 由来システインプロテアーゼ(B)の立体構造重ね合わせ(C)

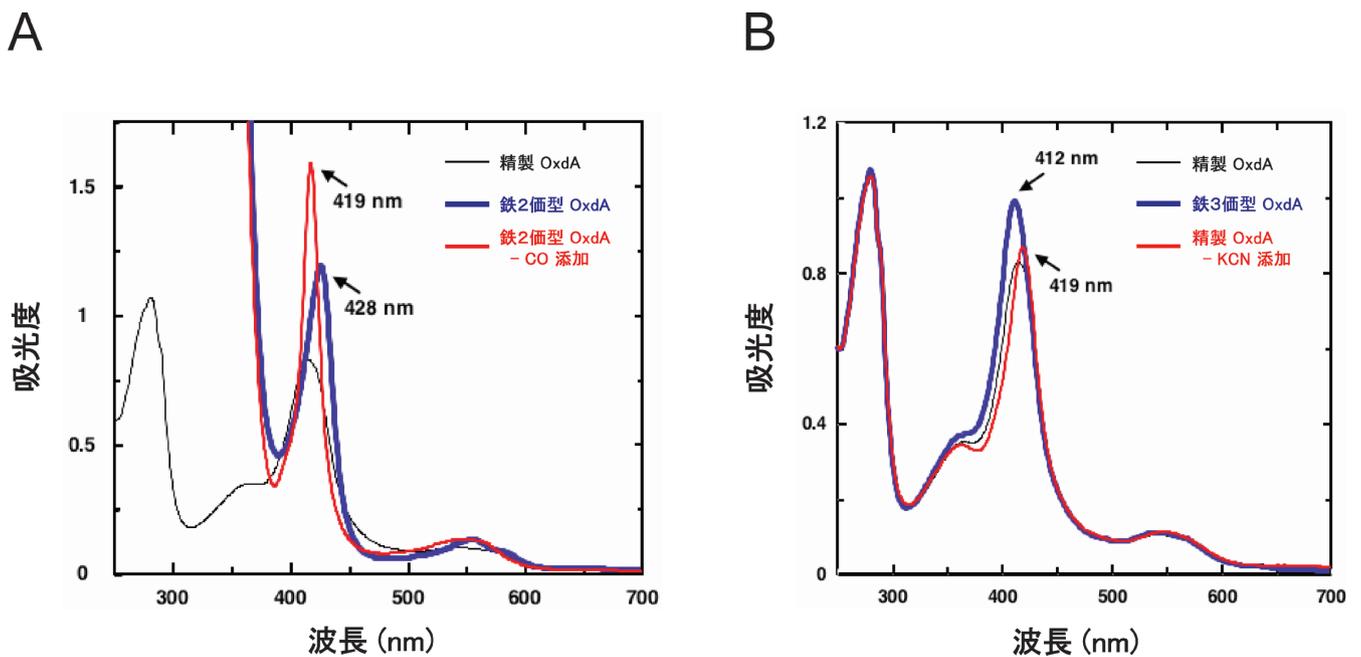
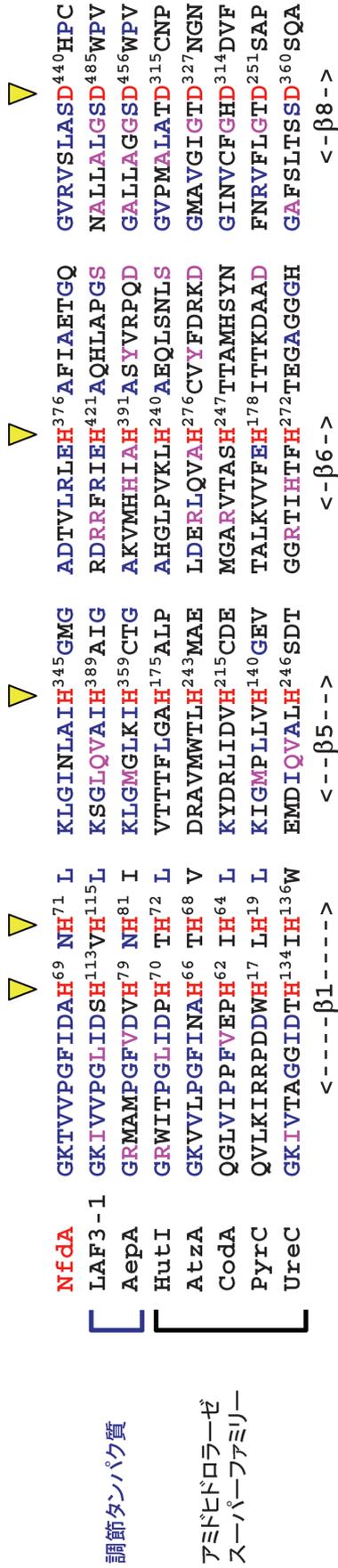
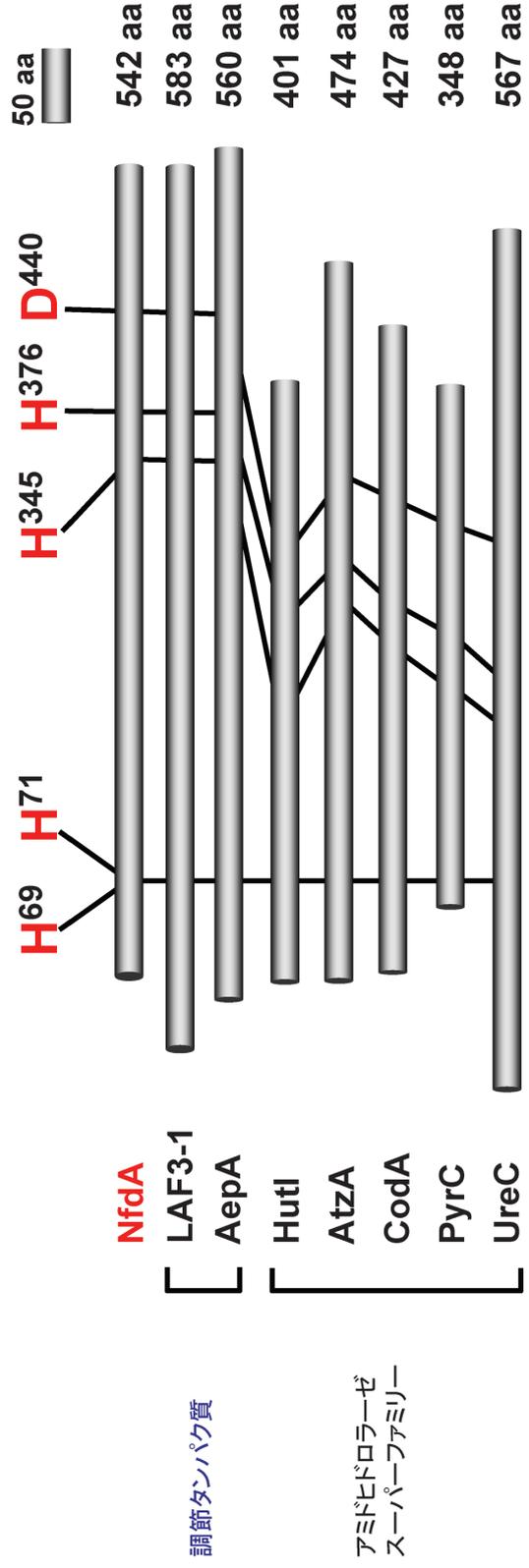


図5 アルドキシムデヒドラターゼの還元剤およびCO添加時の吸収スペクトル変化(A)と酸化剤およびKCN添加時の吸収スペクトル変化(B)



調節タンパク質

アミドヒドロラーゼ
スーパーファミリー



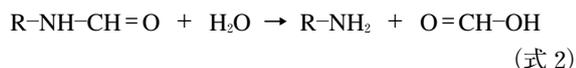
調節タンパク質

アミドヒドロラーゼ
スーパーファミリー

図4 N-置換ホルムアミドホルミラーゼ (NfdA) とホモログの配列アライメント
LAF3-1; *Arabidopsis thaliana* 由来 LAF3 isoform 1, AepA; *Brucella melitensis* 16M 由来 AepA precursor, HutI; *Caulobacter crescentus* 由来 imidazolonepropionase, AtzA; *Pseudo-*
monas sp. ADP 由来 atrazine chlorohydrolase, CodA; *E. coli* 由来 cytosine deaminase, PyrC; *E. coli* 由来 dihydroorotase, UreC; *Klebsiella aerogenes* 由来 urease α subunit.

ルミラーゼは、ニワトリ胚の正常な発育に必須な NAD の合成において重要な働きをしている¹³⁾。また、原核生物のタンパク質成熟に必須なペプチドデホルミラーゼは、近年、抗生物質の新たな標的酵素として注目されている^{14,15)}。この他にも、ヒスチジン代謝に関わる種々のデホルミラーゼが知られており、生物にとって重要な機能を果たしている¹⁶⁾。しかしながら、イソニトリル代謝により生じる *N*-置換ホルムアミドがこの先のような分解酵素により代謝されていくのかは未解明のままであった。

そこで、*N*-置換ホルムアミドの分解酵素を自然界（つくば市近郊の土壌サンプル）から探索した。*N*-置換ホルムアミドの一種である *N*-ベンジルホルムアミドを単一窒素源および単一炭素源とした液体培地に土壌サンプルを添加し集積培養を行った。28℃で約1ヶ月培養した後、生育した菌の中から60の菌株を単離した。これらの微生物の培養菌体により *N*-ベンジルホルムアミド分解を行い、反応溶液を高速液体クロマトグラフィーで分析した結果、有意な分解活性を示す全ての菌について、*N*-ベンジルホルムアミドの減少に伴い、同一の新規化合物の出現が認められた。*N*-ベンジルホルムアミドと化学構造的に類似した各種化合物の高速液体クロマトグラフィーでのピークおよび質量分析から、本生成物をベンジルアミンと同定した。これにより *N*-置換ホルムアミドがアミンとギ酸に分解される代謝経路を初めて同定した（式2）。また、この *N*-置換ホルムアミドの代謝は、*N*-ベンジルホルムアミドを加水分解してベンジルアミンとギ酸に変換する新規酵素が関わっていることが示唆され、本酵素を *N*-置換ホルムアミドデホルミラーゼと命名した¹⁷⁾。



5. 新規酵素 *N*-置換ホルムアミドデホルミラーゼ

続いて、ベンジルアミンの生成量を酵素活性の指標として、単離した60株の菌株の中から単一窒素源培地で生育する微生物（F164株）を最も *N*-置換ホルムアミド分解活性が高い菌株として選抜した。また、本菌はイソニトリルも単一窒素源として資化・生育することができ、この時に *N*-置換ホルムアミドを産物とするイソニトリルヒドラーゼ活性も検出できた。イソニトリル代謝において、イソニトリルヒドラーゼと *N*-置換ホルムアミドデホルミラーゼが協調して働く可能性が強く示唆されたことから、以後、本株を用いてより詳細な研究を行うことにした。まず、本株を形態学的試験、生理学的試験および16S rDNA配列の解析によって *Arthrobacter pascens* と同定した。次に、本株から *N*-置換ホルムアミドデホルミラーゼの精製を試みた。培養温度や培養時間の影響、培地中の単一窒素源や単一炭素源の影響、そして、金属化合物の培地中への

添加の影響など至適培養条件の検討を行った。本酵素は *N*-ベンジルホルムアミドを培地に加えた時、硫酸アンモニウムを単一窒素源とした場合の40倍活性が上昇する誘導酵素であった¹⁸⁾。決定した至適条件で大量培養し、無細胞抽出液を各種クロマトグラフィー操作などで精製し、単一酵素標品を得た¹⁷⁾。

精製酵素を用いて、本酵素の諸性質を解明した。まず、本酵素反応のストイキオメトリーを調べたところ、基質である *N*-ベンジルホルムアミドの分解量と、ベンジルアミンおよびギ酸の生成量との間には、1:1:1の化学量論比が成立していた。このことから、本酵素は、化学量論的に *N*-ベンジルホルムアミドを加水分解によりベンジルアミンとギ酸へ変換する反応を触媒していることが明らかとなった。本酵素は、分子量61,000のサブユニットから成るホモダイマーであった。本酵素の基質特異性を調べたところ、*N*-ベンジルホルムアミド、*N*-ブチルホルムアミド、アリルホルムアミド、*N*- α -メチルベンジルホルムアミド、*N*-(2-シクロヘクス-1-エニルエチル)ホルムアミドにおいて活性を示し、特に、*N*-ベンジルホルムアミドで最も高い活性を示した。一方、アミドなどには一切作用せず、基質特異性レベルにおいて既知酵素のいずれとも全く異なっていた。よって、その反応形式や基質特異性などの結果から、本酵素は既知のデホルミラーゼとは全く異なる新規なデホルミラーゼであることが明らかとなり、新規酵素・*N*-置換ホルムアミドデホルミラーゼと認定され、新規酵素番号 EC 3.5.1.91¹⁹⁾として登録された。

精製酵素の N 末端および内部アミノ酸配列の情報を基に、本酵素の構造遺伝子 (*nfdA*) を取得し、全塩基配列を決定した¹⁷⁾。*nfdA* 遺伝子は、542アミノ酸からなる推定分子量58,694のタンパク質をコードしていた。相同性検索の結果、本酵素遺伝子の推定アミノ酸配列は、既知のデホルミラーゼと有意な相同性を示さず、かつ、全長にわたって有意な相同性を持つ既知の酵素は検出されなかった。上記の酵素学的諸性質の解析結果と同様、本酵素が既知の酵素のいずれとも相同性の点で異なる点からも本酵素は全く新規酵素であることが強く支持された。興味深いことに、相同性は高くないものの、本酵素はアミノ酸配列全長にわたりある種の制御タンパク質である LAF3-1²⁰⁾や AepA²¹⁾と最大28%の相同性を示した。さらに、本酵素の N 末端領域のごく狭い領域（10数アミノ酸）においてのみ、アミドヒドラーゼスーパーファミリー²²⁾に属する酵素^{23~27)}と局所的に高い相同性を示した（図4）。このように、*N*-置換ホルムアミドデホルミラーゼはユニークな酵素であり、今後、その反応機構や立体構造の解明が期待される。しかしながら、本酵素の生産菌である F164 株からの酵素の取量は極めて少ないことから、本酵素の大量発現系を構築することにした。

まず定法に従い、大腸菌での本酵素の大量発現を試みたが、本酵素産物は発現しない、もしくは全て不溶性画分に発現した。発現条件を種々検討したが、可溶性画分に発現させることは全くできず、次に、*Streptomyces* 属放線菌を宿主²⁸⁾とする大量発現を試みた。その結果、可溶性画分において著量のタンパク質発現を確認することができた。これは、宿主が F164 株と同様に、グラム陽性、DNA の G+C 含量が高く放線菌群に属し細胞内環境が似ているためと考えられる。次に、本形質転換体から組換え酵素の精製を行い、電気泳動的に単一な酵素を大量取得することに成功した。その諸性質の解析結果から、本組換え酵素は F164 株から精製した天然酵素と酵素学的に同一であることを実証した²⁹⁾。

さらに、組換え酵素を用いて金属分析を行った結果、本酵素は亜鉛イオンを含むことが明らかとなった。しかしながら、本金属イオンが酵素内でどのアミノ酸残基によって保持されているのかについては全く分かっていない。前述のとおり、N-置換ホルムアミドデホルミラーゼはN末端領域のみアミドヒドロラーゼスーパーファミリーのメンバーと局所的に高い相同性を示す。本メンバーは一般的な特徴として、まず、(α/β) 8 バレル構造を有し、 β ストランドと α ヘリックスが交互に 8 回繰り返される二次構造をとっている。そして、本構造の $\beta 1$, $\beta 5$, $\beta 6$, および $\beta 8$ の C 末端側に高度に保存されたアミノ酸残基が存在し、これらのアミノ酸が本メンバーに属する酵素内に含まれる金属イオンとの結合に関与している。このことから、N-置換ホルムアミドデホルミラーゼにおいてもこのようなアミノ酸残基の存在が予想された。N-置換ホルムアミドデホルミラーゼと本メンバーに属する酵素とで既存の方法を用いてアライメントの作成を試みたが、相同性が低いため本酵素の金属結合アミノ酸部位を予測できなかった。しかし、二次構造情報まで考慮することで局所的な配列アライメントの作成に成功した (図 4)。本結果から、N-置換ホルムアミドデホルミラーゼにおいても $\beta 1$, $\beta 5$, $\beta 6$, および $\beta 8$ に高度に保存されたアミノ酸残基がすべて存在していることが明らかとなり、これらの His 残基、Asp 残基が本酵素の亜鉛イオンの結合に関与していると予測された。今後、部位特異的変異法により変異酵素を作成し、これらのアミノ酸が金属結合に関与していることを実証していく必要がある。本酵素は新規なデホルミラーゼであったことから、その反応機構および立体構造はユニークなものであることが示唆され、今後、本酵素の立体構造および反応機構解析など、さらに詳細な酵素科学的解析が期待されている。

6. ニトリル合成酵素 アルドキシムデヒドラターゼ

我々はこれまで、微生物におけるニトリル代謝に関わる

これらの酵素の基礎・応用研究を行ってきた。放線菌 *Rhodococcus rhodochrous* J1 株は、ニトリルを酸とアンモニアに分解するニトリラーゼを生成^{30,31)}するが、培養条件を変えることによりニトリルをアミドに変換するニトリルヒドラターゼ (NHase)³²⁾をも生成する。本 NHase (式 4) は、現在、第 3 世代の触媒として (アクリロニトリルからの) アクリルアミドの工業生産に使用されており、また、(3-シアノピリジンからの) ニコチンアミドの工業生産も同酵素によって行われている^{33,34)}。一方、ニトリル分解菌 *Pseudomonas chlororaphis* B23 株はニトリルヒドラターゼにより生じたアミドをさらにアミダーゼ (式 5) により酸とアンモニアに分解する。以前、本菌はアクリルアミド工業生産の第 2 世代菌として使用され、現在もなお、(アジポニトリルから) 農薬の中間原料シアノバレリアミドの工業生産に使われている実用菌である^{35,36)}。



本菌においてニトリル代謝関連酵素遺伝子は、アミダーゼ、ニトリルヒドラターゼの α , β サブユニット、さらに機能未知オープンリーディングフレーム (ORF) の順でクラスターを形成していることまで明らかにされていた³⁷⁾が、その上下流領域を含め遺伝子構成の全体像は不明のままであった。そこで、本菌のニトリル分解代謝機構を分子レベルで解析することを目的として、アミダーゼ遺伝子上流領域の塩基配列を決定したところ、新たに一つの ORF を見出した。相同性検索の結果、アルドキシム (R-CH=N-OH) に作用しニトリルを生成する反応を触媒する (*Bacillus* 属の) phenylacetaldoxime dehydratase³⁸⁾ と相同性 (32% のアミノ酸同一性) を示すことが判明し、上記の ORF を *oxdA* と命名した。*oxdA* 遺伝子産物を大腸菌で可溶性画分に大量発現させることに成功し、本タンパク質がアルドキシムを脱水しニトリルを生成するアルドキシムデヒドラターゼ反応 (式 3) を触媒することを明らかにした。また、スクロースを単一炭素源、硫酸アンモニウムを単一窒素源とする培地で本菌を培養した時は本酵素活性が確認できないが、ブチルアルドキシムを単一炭素窒素源とする培地で本菌が生育する時はアルドキシムデヒドラターゼ活性が確認できた。さらに、本酵素に対する抗体を作成し、アルドキシムが培地中に存在する場合のみ本酵素が発現することを確認し、細胞内において本酵素がアルドキシムの代謝に直接関わることを初めて実証した³⁹⁾。

B23 株の本酵素 (OxdA) は (phenylacetaldoxime dehydratase に続いて) アルドキシムデヒドラターゼスーパーファミリーの 2 例目であるが、phenylacetaldoxime dehydratase において反応機構・活性中心・立体構造等は未知であったこ

とから、OxdA を対象としこれらを解明するために詳細な解析を行うことにした。アルドキシムデヒドラターゼは水溶液中での反応にも関わらず脱水反応を触媒するとともに、炭素-窒素三重結合を形成するユニークな反応を触媒する希有な酵素であり、アカデミックな観点からも興味深い研究対象である。さらに、基礎面だけでなく、種々の有用なニトリルをアルドキシムから合成し得る点で応用面からも意義深い研究対象である。

各種クロマトグラフィー操作などを行うことによって単離精製した本酵素は、分子量約 38,000 のサブユニットからなるホモダイマー（ネイティブ酵素の分子量は約 76,400）であった。至適 pH は 5.5 であり、また 45°C で最も高い活性を示した。また、pH 6.0 から 8.0 の間で本酵素は安定であり、温度安定性については 40°C で約 50% の活性を保持していた。本酵素 1mol 当たり、1.62mol の鉄が、また、1.58mol のカルシウムが含まれていた。精製した本菌のアルドキシムデヒドラターゼは赤茶色を呈し、ヘムタンパク質に特徴的なスペクトルを示した。ピリジンヘモクロム法により、本酵素はサブユニット 1mol 当たり、約 0.69mol の割合でプロトヘム IX を含むヘム酵素と同定した。精製酵素に還元剤ジチオナイトを添加したところ、本酵素の吸収スペクトルは大きく変化し、還元型酵素に CO を添加したところ、419nm に強い吸収ピークを持つシャープなソーレー帯が現れた。一方、酸化剤で精製酵素を処理したところ、ソーレー吸収帯に若干の変化が認められた（図 5）。ヘムの酸化還元状態が酵素活性に及ぼす影響を調べるため、様々な酸化・還元状態において酵素反応を行った結果、嫌気条件下、ジチオナイトでヘムを還元すると活性が飛躍的に（約 250 倍）上昇することが判明した。基質特異性に関しては、ブチルアルドキシムが最も良好な基質であったが、本酵素はそれ以外にも同じ脂肪族アルドキシムであるアセトアルドキシムに作用した。一方、芳香族アルドキシムにはほとんど作用しなかった。このことから、本菌のアルドキシムデヒドラターゼは脂肪族アルドキシムに特異的に作用する新規なアルドキシムデヒドラターゼであると考え、これを aliphatic aldoxime dehydratase と命名した³⁹⁾。

一方、解析を重ねた結果、酵素精製中に SH 基保護剤として添加していた 2-メルカプトエタノールは本酵素の活性維持には必要なく、むしろヘム含量を低下させる傾向にあることが判明した。これまでは精製中にヘムが一部欠落していたが、2-メルカプトエタノール非存在下で酵素精製したところ、サブユニット 1mol 当たり約 1mol のヘムを含む完全な形の酵素を精製することに成功した。ソーレー吸収帯は以前よりも大きくなり、また、ピークは 415nm ではなく 409nm に現れた。本スペクトルおよび酸化剤や還元剤の添加によるスペクトル変化は以前に精製したもの

と本質的に同じパターンを示した。また、今回新しく精製した酵素は、468units/mg という非常に高い活性を示した⁴⁰⁾。従って、以後、2-メルカプトエタノールを含まない条件下で単離精製した酵素を用いてさらに以下の解析を行った。

7. アルドキシムデヒドラターゼの反応機構解析

本酵素に対して共鳴ラマン分光学的解析を行った結果、本菌のアルドキシムデヒドラターゼのヘムは 6 配位ロースピニン型をとり、ジチオナイトによりヘム鉄を還元すると、基質がより容易にヘムにアプローチできる 5 配位ハイスピニン型に変化することが判明した。また、還元型酵素で観察された Fe-His 伸縮振動と考えられる特徴的なバンド、CO 結合型酵素のラマンスペクトルにおいて観察された Fe-CO 伸縮振動バンドの波数と C-O 伸縮振動の波数などから、アルドキシムデヒドラターゼのヘムの第 5 配位子はタンパク質内部の His 残基であると同定した⁴⁰⁾。アルドキシムデヒドラターゼファミリーに属する酵素⁴¹⁾に保存された五つの His 残基それぞれの変異酵素を作成、分光学的解析法により解析し、ヘムの第 5 配位子を His299 であると同定した⁴²⁾。さらに、その過程で得られた（酵素サブユニット 1 mol 当たりほぼ 1 mol のヘムを含んでいるものの、酵素活性はほぼ失う）H320A 変異酵素についても詳細に解析を行った結果、His320 を遠位側ヘムポケットに存在する活性アミノ酸残基と同定し、この His320 がプロトン化し（酸触媒として）基質アルドキシムの OH 基にプロトンを供与する反応機構モデルを提唱した（図 6）⁴²⁾。

続いて、本酵素の反応サイクルに関する情報を得るべく、反応中間体の分光学的解析に取り組んだ。ストップドフロー法により基質（ブチルアルドキシム）混合後、2 ミリ秒ごとに吸収スペクトル測定を行ったところ、アルドキシムデヒドラターゼの反応中間体と考えられる新規な吸収スペクトルが観察された。本反応中間体スペクトルは、ブチルアルドキシム濃度を高くするほど長時間観察され、その後次第に元のスペクトルに戻っていった。本反応中間体の崩壊がアルドキシムデヒドラターゼ反応の律速段階であり、基質存在下では常に本反応中間体が反応液中に蓄積しているものと推察した。（反応が進まない）H320A 変異酵素についても同様の解析を行った結果、本反応中間体は、基質が自身の窒素原子を介してヘムに結合した直後の状態であると示唆され、「OxdA-substrate complex I (OS-I)」と命名した⁴³⁾。さらに、低濃度の酵素に対して大過剰の基質を添加した場合に観察される（OS-I とは異なる）新規な反応中間体スペクトルを発見し、本スペクトルは何らかの反応中間体に由来するものと推察し OS-II と命名した。本中間体を詳細に解析したところ、ヘム鉄は高酸化状態（4 価の状態）をとり、鉄と窒素原子は二重結合を形成してい

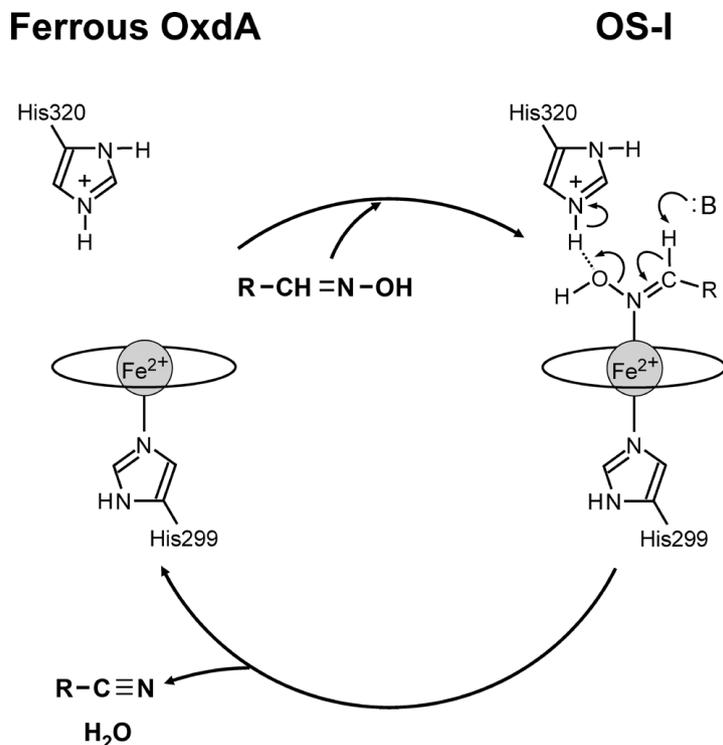


図6 アルドキシムデヒドラターゼによる脱水反応の推定反応サイクル
Ferrous OxdA；鉄2価型 OxdA

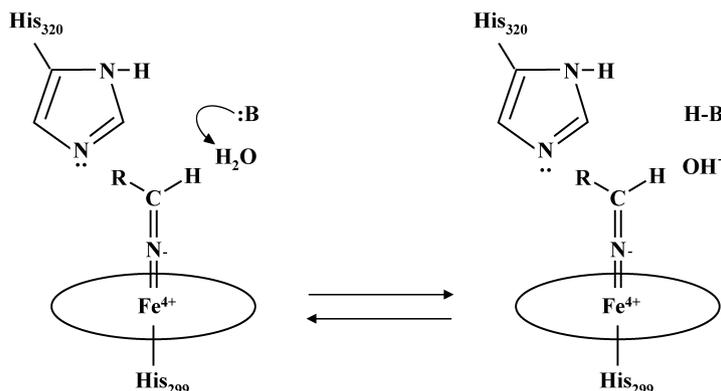


図7 アルドキシムデヒドラターゼの反応中間体 OS-II の分子構造モデル

ると考えられ、OS-IIの分子構造モデル(図7)、および、それをふまえた上でのOxdAの反応機構モデルを世界に先駆けて提案した⁴⁴⁾。

以上、我々は脂肪族アルドキシムデヒドラターゼ遺伝子を発見し、生化学的な解析を行うとともに、活性中心構造および反応中間体の解析を行い、ヘムを介したアルドキシム脱水反応メカニズムの研究を大きく進展させた。詳細に解析した本酵素の反応機構を基に、本酵素は新規酵素として再分類され、新しいEC番号4.99.1.5⁴⁵⁾が与えられた。一般的に、ヘム酵素は酸素や過酸化水素分子をヘムに結合させて反応を触媒するが、アルドキシムデヒドラターゼは基質(有機化合物)がヘムに直接結合して(酸化還元反応

ではない)反応を触媒する^{42, 43, 46)}。アルドキシムデヒドラターゼはヘムタンパク質でありながら従来のヘムタンパク質には見られない非常に興味深い特徴を有するもののまだまだ未解明な点が多く、今後のさらなる反応機構解析および本酵素の立体構造解析に期待したい。

8. ニトリルのさらなる代謝とニトリル経路

一方、B23株のニトリルヒドラターゼ遺伝子クラスター下流領域には、酸とCoAを連結する酵素(アシルCoA合成酵素)(式6)と相同性を示すORFが存在していた。大腸菌で可溶性画分に大量発現させることに成功した遺伝子産物は、実際に酸をCoAと連結しアシルCoAに変換する

活性を有しており、本 ORF を *acsA* と命名した⁴⁷⁾。単離精製し基質特異性を調べた結果、本酵素は短鎖脂肪酸に良好に作用するアシル CoA 合成酵素であることが明らかになった。非常に興味深いことに、この酵素の基質特異性の傾向は遺伝子クラスター中に同じ向きで存在するアルドキシムデヒドラターゼ³⁹⁾・ニトリルヒドラターゼ³⁶⁾・アミダーゼ⁴⁸⁾それぞれの基質特異性と非常に類似していた。B23 株はスクロースと硫酸アンモニウムをそれぞれ単一炭素源、単一窒素源とした培地で生育可能であり、この時、極めて微量のニトリルヒドラターゼは認められたものの、アルドキシムデヒドラターゼ・アミダーゼ・アシル CoA 合成酵素はいずれも全く発現しなかった。一方、B23 株は(ニトリルの前駆物質である)ブチルアルドキシムを単一炭素源かつ単一窒素源とした培地でも生育できるが、この時にはアルドキシムデヒドラターゼ・ニトリルヒドラターゼ・アミダーゼ・アシル CoA 合成酵素の全てが誘導的に発現した(図 8)。これらの結果から、B23 株内でアルドキシムを資化(単一炭素源・単一窒素源として利用)するために四つの酵素が協調的に働いていることが実証された。アシル CoA 合成酵素の役割は、アセチル CoA 合成酵素のように酢酸を基質とするエネルギー代謝や、長鎖アシル CoA 合成酵素のように長鎖脂肪酸を基質とする脂質代謝が一般的である。B23 株の本酵素は酢酸や長鎖脂肪酸にはほとんど作用せず、さらに、大腸菌のアセチル CoA 合成酵素や長鎖アシル CoA 合成酵素欠損変異株のそれぞれを相補できず、これらの機能の役割を担うことができない。ブチル酸を添加した培地で本酵素の発現が確認できることから、本菌の本酵素はアルドキシムあるいはニトリルから生じた酸のさらなる代謝を生理的役割とすることを実証した。ニトリル化合物の分解に関する研究は既に 30 年以上行われており、ニトリル分解経路は(ニトリルヒドラターゼとアミダーゼ、またはニトリラーゼのどちらの酵素が関与するにしても)ニトリルから始まり酸とアンモニアへの代謝までしか解明されておらず、ニトリルから生じる酸がどのように代謝されるのかについては未解明のままであった。しかし、この発見を基に、ニトリルから生じる酸はさらにアシル CoA を経由して、β酸化系あるいは TCA 回路へ入り、炭素源・エネルギー源として利用される新しい代謝経路が初めて明らかになった⁴⁷⁾。即ち、これまでの研究成果を踏まえ、「ニトリルの合成」・「ニトリルの酸への分解」・「酸を介する炭素源・エネルギー源としての利用」に関与する一連の四つの代謝酵素の遺伝子がクラスターを形成しており、これらの酵素からなるニトリル経路(アルドキシム→ニトリル→アミド→酸→アシル CoA)が解明された(図 8)。さらに、極く最近、他の微生物においても(アシル CoA 合成酵素遺伝子を含む)同様の一連の代謝酵素遺伝子が同一クラスター中に存在することが報

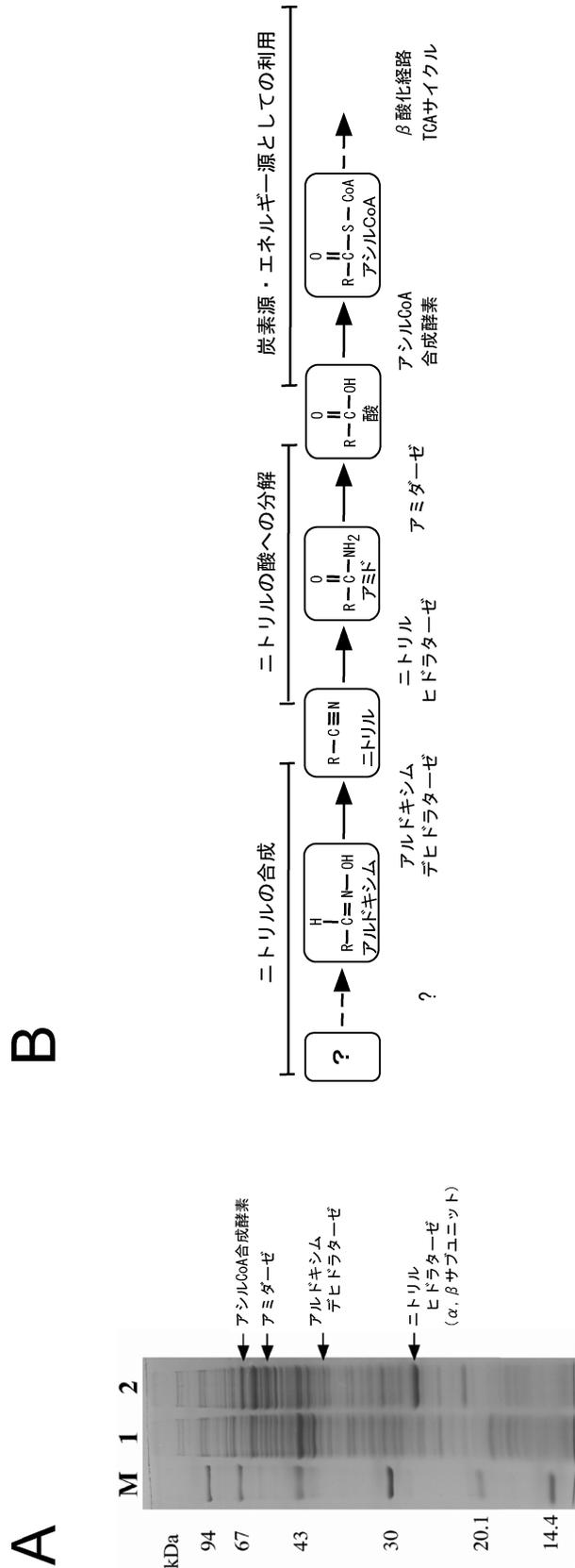


図 8 B23 株のアルドキシム利用時におけるニトリル合成・分解酵素群の誘導発現(A)とニトリル経路(B)

告⁴⁹⁾されたことで、このニトリル経路は共通の機構であると考えられる。

微生物がわざわざ毒性化合物であるニトリルを合成・分解し、最終的に炭素源・エネルギー源として利用する経路の存在・共通性が明らかになるにつれ、生体内におけるニトリル経路の存在意義やニトリルの役割が見え始めてきた。しかし、これらを解明する研究は端緒が開けたばかりであり、今後、ニトリルの前駆物質であるアルドキシムの生合成経路の解明などアルドキシムからアシル CoA までしか解明できていないニトリル経路の全般的な解明が必要である。

謝辞

本総説で紹介した研究は、筑波大学大学院生命環境科学研究科・微生物育種工学研究室で行われたものであり、基礎研究のみならず応用展開も指向した研究を終始御指導いただいた小林達彦教授に心より御礼申し上げます。自然科学研究機構岡崎統合バイオサイエンスセンター（分子科学研究所）の北川禎三教授、太田雄大博士、理化学研究所の城宜嗣主任研究員、汲田英之博士、大阪市立大学大学院理学研究科の神谷信夫教授、大阪大学大学院理学研究科の野尻正樹助教、筑波大学大学院数理工学研究所の野口巧准教授をはじめ多くの先生方と実りある共同研究をさせていただいたことに感謝致します。研究の道へ誘っていただいた恩師である室岡義勝大阪大学名誉教授、研究の視野を広げていただいた京都大学大学院工学研究科の今中忠行教授に御礼申し上げます。ここで紹介した研究成果は、微生物育種工学研究科の諸先生、博士研究員、卒業生、在学生、とりわけ合田昌彦、老沼研一、小西一誠、深津寛、戸来幸男各博士の労苦をともにした多大なる努力の賜であり、あらためて深く感謝申し上げます。

なお、本研究は 21 世紀 COE プログラム「複合生物系応答機構の解析と農学的高度利用」プロジェクト (<http://www.tara.tsukuba.ac.jp/~coe21/>) (生命科学領域) の一環として行ったものである。

文 献

- Dömling, A. & Ugi, I. (2000) *Angew. Chem. Int. Ed.*, **39**, 3168–3210.
- Edenborough, M.S. & Herbert, R.B. (1988) *Natl. Prod. Rep.*, **5**, 229–245.
- Scheuer, P.J. (1992) *Acc. Chem. Res.*, **25**, 433–439.
- König, G.M., Wright, A.D., & Angerhofer, C.K. (1996) *J. Org. Chem.*, **61**, 3259–3267.
- Okino, T., Yoshimura, E., Hirota, H., & Fusetani, N. (1996) *Tetrahedron*, **52**, 9447–9454.
- Goda, M., Hashimoto, Y., Shimizu, S., & Kobayashi, M. (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 23480–23485.
- <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC4/2/1/103.html>
- Kobayashi, M. & Shimizu, S. (1998) *Nat. Biotechnol.*, **16**, 733–736.
- Endo, I., Odaka, M., & Yohda, M. (1999) *Trends Biotechnol.*, **17**, 244–248.
- Kobayashi, M. & Shimizu, S. (1999) *Eur. J. Biochem.*, **261**, 1–9.
- Goda, M., Hashimoto, Y., Takase, M., Herai, S., Iwahara, Y., Higashibata, H., & Kobayashi, M. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 45860–45865.
- Du, X., Choi, I.G., Kim, R., Wang, W., Jancarik, J., Yokota, H., & Kim, S.H. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 14079–14084.
- Bailey, C.B. & Wagner, C. (1974) *J. Biol. Chem.*, **249**, 4439–4444.
- Ragusa, S., Blanquet, S., & Meinel, T. (1998) *J. Mol. Biol.*, **280**, 515–523.
- Sereo, A., Giglione, C., Sardini, A., Martinez-Sanz, J., & Meinel, T. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 52953–52963.
- Ohmura, E. & Hayaishi, O. (1957) *J. Biol. Chem.*, **227**, 181–190.
- Fukatsu, H., Hashimoto, Y., Goda, M., Higashibata, H., & Kobayashi, M. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 13726–13731.
- Fukatsu, H., Goda, M., Hashimoto, Y., Higashibata, H., & Kobayashi, M. (2005) *Biosci. Biotech. Biochem.*, **69**, 228–230.
- <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/morenz.html#35191>
- Hare, P.D., Møller, S.G., Huang, L.-F., & Chua, N.-H. (2003) *Plant Physiol.*, **133**, 1592–1604.
- Paulsen, I.T., et al. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 13148–13153.
- Holm, L. & Sander, C. (1997) *Proteins*, **28**, 72–82.
- Nierman, W.C., et al. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 4136–4141.
- de Souza, M.L., Sadowsky, M.J., & Wackett, L.P. (1996) *J. Bacteriol.*, **178**, 4894–4900.
- Iretton, G.C., McDermott, G., Black, M.E., & Stoddard, B.L. (2002) *J. Mol. Biol.*, **315**, 687–697.
- Thoden, J.B., Phillips, G.N., Neal, T.M., Raushel, F.M., & Holden, H.M. (2001) *Biochemistry*, **40**, 6989–6997.
- Jabri, E., Carr, M.B., Hausinger, R.P., & Karplus, P.A. (1995) *Science*, **268**, 998–1004.
- Herai, S., Hashimoto, Y., Higashibata, H., Maseda, H., Ikeda, H., Omura, S., & Kobayashi, M. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 14031–14035.
- Fukatsu, H., Herai, S., Hashimoto, Y., Maseda, H., Higashibata, H., & Kobayashi, M. (2005) *Protein Expr. Purif.*, **40**, 212–219.
- Komeda, H., Hori, Y., Kobayashi, M., & Shimizu, S. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 10572–10577.
- Kobayashi, M., Suzuki, T., Fujita, T., Masuda, M., & Shimizu, S. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 714–718.
- Komeda, H., Kobayashi, M., & Shimizu, S. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 4267–4272.
- Kobayashi, M., Nagasawa, T., & Yamada, H. (1992) *Trends Biotechnol.*, **10**, 402–408.
- Yamada, H., Shimizu, S., & Kobayashi, M. (2001) *Chem. Records*, **1**, 152–161.
- Asano, Y., Tani, Y., & Yamada, H. (1989) *Agric. Biol. Chem.*, **44**, 2251–2252.

- 36) Nagasawa, T., Nanba, H., Ryuno, K., Takeuchi, K., & Yamada, H. (1987) *Eur. J. Biochem.*, **162**, 691–698.
- 37) Nishiyama, M., Horinouchi, S., Kobayashi, M., Nagasawa, T., Yamada, H., & Beppu, T. (1991) *J. Bacteriol.*, **173**, 2465–2472.
- 38) Kato, Y., Nakamura, K., Sakiyama, H., Mayhew, S.G., & Asano, Y. (2000) *Biochemistry*, **39**, 800–809.
- 39) Oinuma, K-I., Hashimoto, Y., Konishi, K., Goda, M., Noguchi, T., Higashibata, H., & Kobayashi, M. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 29600–29608.
- 40) Oinuma, K-I., Ohta, T., Konishi, K., Hashimoto, Y., Higashibata, H., Kitagawa, T., & Kobayashi, M. (2004) *FEBS Lett.*, **568**, 44–48.
- 41) Xie, S.X., Kato, Y., Komeda, H., Yoshida, S., & Asano, Y. (2003) *Biochemistry*, **42**, 12056–12066.
- 42) Konishi, K., Ishida, K., Oinuma, K-I., Ohta, T., Hashimoto, Y., Higashibata, H., Kitagawa, T., & Kobayashi, M. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 47619–47625.
- 43) Oinuma, K-I., Kumita, H., Ohta, T., Konishi, K., Hashimoto, Y., Higashibata, H., Kitagawa, T., Shiro, Y., & Kobayashi, M. (2005) *FEBS Lett.*, **579**, 1394–1398.
- 44) Konishi, K., Ohta, T., Oinuma, K-I., Hashimoto, Y., Kitagawa, T., & Kobayashi, M. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 564–568.
- 45) <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC4/99/1/5.html>
- 46) Kobayashi, K., Yoshioka, S., Kato, Y., Asano, Y., & Aono, S. (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 5486–5490.
- 47) Hashimoto, Y., Hosaka, H., Oinuma, K-I., Goda, M., Higashibata, H., & Kobayashi, M. (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 8660–8667.
- 48) Ciskanik, L.M., Wilczek, J.M., & Fallon, R.D. (1995) *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**, 998–1003.
- 49) Kato, Y. & Asano, Y. (2006) *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **70**, 92–101.
-