

## ヒドラジン分解酵素の立体構造解析 Structural analysis of hydrazine degradation enzyme

秋山友了<sup>1</sup>, 佐々木康幸<sup>1</sup>, 高谷直樹<sup>2</sup>, 矢嶋俊介<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>東京農業大学バイオサイエンス学科, 〒156-8502 世田谷区桜丘 1-1-1

<sup>2</sup>筑波大学大学院生命環境科学研究科, 〒305-8572 つくば市天王台 1-1-1

Tomonori Akiyama<sup>1</sup>, Yasuyuki Sasaki<sup>1</sup> Naoki Takaya<sup>2</sup> and Shunsuke Yajima<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Tokyo University of Agriculture, 1-1-1 Setagaya-ku, Tokyo, 156-8502, Japan

<sup>2</sup>University of Tsukuba, 1-1-1 Tennodai, Tsukuba, 305-8572, Japan

### 1 はじめに

ヒドラジン( $H_2NNH_2$ )は有機合成化学の分野において、還元剤、または反応中間体として重要な化合物である。ヒドラジン誘導体のうち、ヒドラジンとカルボン酸が脱水縮合した構造をもつ化合物をヒドラジド( $R_1C(=O)NR_2NR_3R_4$ )と呼ぶ。天然のヒドラジド誘導体としてはマッシュルーム *Agaricus bisporus* に含まれる agaritine が知られているが、例は少なく、これらの物質の生体における代謝や生合成については未解明な部分が多い。

我々のグループでは近年、ヒドラジン誘導体のうち、4-hydroxybenzoic acid 1-phenyl ethylidene hydrazide (HBPH)を資化可能な *Microbacterium* sp.58-2 株を単離した。更に、本菌が有するヒドラジド分解活性をもとに、hydrazidase を単離、同定した。本酵素はアミノ酸配列において既知の Amidase Signature family に属する酵素と約30%の相同性を有し、ヒドラジドのアミド結合を加水分解する活性を有していた。また、基質として HBPH の他に 4-hydroxybenzoic acid hydrazide (HBH) と 4-hydroxybenzamide (HBA)を加水分解できることも明らかとなった。

Amidase Signature family に属する酵素の一般的な触媒反応はアミド基の脱離、転移であるが、生物学的機能やそれぞれの酵素の基質特異性は多岐にわたる。一方で活性部位には Lys-Ser-Ser の保存された3残基が存在する。これらは hydrazidase の配列中では Lys80、Ser155、Ser179 として存在する。しかしながら、hydrazine を基質として分解する amidase の存在や、その反応機構については詳細な解析が行われていない。前回、立体構造を明らかにすることに成功し(図1)、今回基質との複合体を得ることで反応機構の解明を目指した。

### 2 実験

*Microbacterium* sp.58-2 株由来 hydrazidase 遺伝子を pET28a(+) に組み込み、宿主として BL21(DE3)を用いて組換え体の発現を行った。Ni カラムおよび陰イオン交換カラムにより精製を行い、目的蛋白質を得

た。結晶化は、ハンギングドロップ蒸気拡散法により行い、基質の一つである HBH を用いソーキングにより複合体の取得を行った。回折データ収集を NW12A にて行った。初期構造の決定はアポ構造をターゲットとして分子置換法を用いた。Refmac5 による計算と Coot によるモデル構築を繰り返し、精密化を行った。

### 3 結果および考察

今回、基質の一つである HBH を用いて複合体結晶の取得を試みた。分解能 1.6 Å のデータを得ることができた。その結果、Ser179 に共有結合していると考えられる分子の電子密度が観察された。その形から、結合している分子は HBH の反応生成物である 4-hydroxybenzoic acid であると考えられた。もし反応生成物が共有結合しているとする、反応中間体であると予想されるが、用いた蛋白質は野生型であるため、なぜ中間体が得られたのかは不明である。

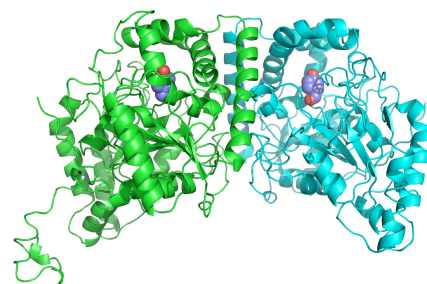


図 1

### 4 まとめ

反応中間体と思われる複合体構造の取得に成功した。今後は変異体や他の基質複合体などの取得により、より詳細な基質認識機構の解明を目指す。

### 謝辞

データ測定にあたり PF スタッフの方々に深く感謝致します。

\*yshun@nodai.ac.jp