

## 亜硝酸の脱離を触媒する酵素 CreD の X 線結晶構造解析 X-ray crystallographic analysis of CreD catalyzing elimination of nitrous acid

勝山陽平<sup>1,\*</sup>、佐藤優花里<sup>2</sup>、菅井佳宣<sup>1</sup>、東山洋輔<sup>1</sup>、千田美紀<sup>2</sup>、千田俊哉<sup>2</sup>、大西康夫<sup>1,\*\*</sup>

<sup>1</sup> 東京大学大学院農学生命科学研究科, 応用生命工学専攻,

〒113-8657 東京都文京区弥生 1-1-1

<sup>2</sup> 高エネルギー加速器研究機構 (KEK), 物質構造科学研究所, 構造生物学研究センター,

〒305-0801 つくば市大穂 1-1

Yohei Katsuyama<sup>1</sup>, Yukari Sato<sup>2</sup>, Yoshinori Sugai<sup>1</sup>, Yousuke Higashiyama<sup>1</sup>, Miki Senda<sup>2</sup>, Toshiya Senda<sup>2</sup>, Yasuo Ohnishi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Biotechnology, Graduate School of Agricultural and Life Sciences,  
The University of Tokyo, 1-1-1 Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8657, Japan

<sup>2</sup>Structural Biology Research Center, Institute of Materials Structure Science, High Energy  
Accelerator Research Organization (KEK), Tsukuba 305-0801, Japan

### 1 はじめに

放線菌は多様な構造をもった二次代謝産物を生産することで知られており、それらの多くは医薬品の重要な資源となっている。これまで我々のグループでは、興味深い構造を有する放線菌二次代謝産物の生合成機構の解明に取り組んできた。放線菌 *Streptomyces cremeus* が生産する二次代謝産物 *cremeomycin* はジアゾ基を持つが、天然においてジアゾ基がどのように生合成されるかは明らかになっていなかった。我々は *cremeomycin* の生合成遺伝子クラスターを同定し、クラスター内にコードされた遺伝子の機能解析を行うことで、このジアゾ基は CreE と CreD と名付けた二つの酵素により生産される亜硝酸に由来することを明らかにした[1]。CreE はアスパラギン酸のアミノ基を酸化し、ニトロコハク酸を合成し、CreD はニトロコハク酸からの亜硝酸の脱離を触媒する。この亜硝酸生合成経路は放線菌において二次代謝産物の生合成に用いるために進化してきた特殊なものであり、*cremeomycin* 以外にも多くの二次代謝産物の生合成に関わっていると考えられる。

CreD は aspartase/fumarase super family に属するが、本ファミリーに属する酵素の中で亜硝酸の脱離を触媒する酵素は CreD が初めての報告例であった。そこで本研究では、CreD がどのように亜硝酸の脱離を触媒するかを明らかにするため、CreD の X 線結晶構造解析を行った。

### 2 実験

まず、CreD の組換えタンパク質を大腸菌 BL21 (DE3) と pCold システムを用いて調製した。得られた組換えタンパク質を Ni<sup>2+</sup>アフィニティークロマトグラフィーで精製したのちに、Factor Xa で処理した。ヒスチジンタグが切断された CreD を陰イオン交換

クロマトグラフィーにより精製し、結晶化スクリーニングに供した結果、いくつか良質な結晶が得られる条件を見出した。これらの結晶化条件をもとにさらに最適な結晶化条件を探索したところ、最終的に 0.1 M Tris-HCl, pH 8.2-8.5, 1.8-2.0 M ammonium sulfate をリザーバーとして用いた条件より得られた結晶で高分解能のデータを得ることに成功した。位相の決定は 1.9 Å の波長で得た回折像を元にした MR-Native-SAD により行った。また、ソーキングにより生成物との共結晶の構造の取得を試みた。

### 3 結果および考察

上述の実験により、CreD 単独の構造と CreD と生成物の一つであるフマル酸との共結晶のモデルを構築することに成功した。CreD は他の aspartase/fumarase super family に属する酵素と同様に 3 つのドメインからなり、四量体を形成していた。フマル酸は一つの CreD に、2 分子結合していたが、そのうちの一つは活性中心と思われる部位に結合していた。CreD 単独の構造と CreD-フマル酸複合体の構造はほとんど変化がなかった。また、活性中心付近の構造から CreD は Ser286 を塩基触媒、Arg325 を酸触媒として利用していると予測した。これらのアミノ酸残基をアラニンに置換したところ、亜硝酸脱離活性が完全に失われたことから、これら 2 アミノ酸残基が活性中心を構成することが強く支持された。

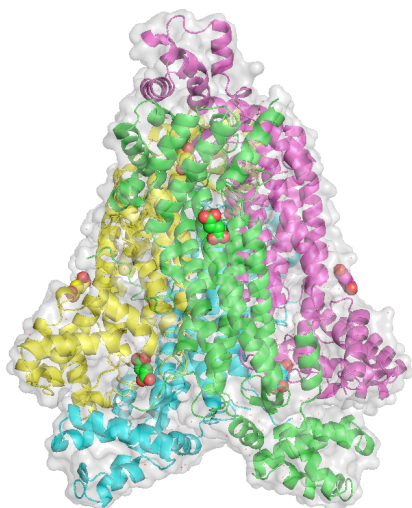


図 1 : CreD-フマル酸複合体の全体構造

#### 4 まとめ

本研究を通して、CreD の持つニトロコハク酸から亜硝酸を脱離する反応の触媒メカニズムを提唱することに成功した。本メカニズムは他の aspartase/fumarase super family との構造比較のみからでは予想が難しく、CreD の構造解析を行うことで初めて明らかとなったものである。

#### 参考文献

[1] Y. Sugai *et al.*, Nat. Chem. Biol. 12, 73-75 (2016).

#### 成果

1. Structural Elucidation of the Nitrosuccinate Nitrite-Lyase CreD Involved in Cremeomycin Biosynthesis. ○Yohei Katsuyama, Yukari Sato, Yoshinori Sugai, Yousuke Higashiyama, Miki Senda, Toshiya Senda, Yasuo Ohnishi (2017), 18th International Symposium on the Biology of Actinomycetes (International Convention Center JEJU)
2. Cremeomycin 生合成において亜硝酸生産を担う酵素 CreD の X 線結晶構造解析 ○勝山 陽平、佐藤 優花里、東山 洋輔、菅井 佳宣、千田 美紀、千田 俊哉、大西 康夫 (ポスター発表) 第 31 回 (2016 年度) 日本放線菌学会大会 (東京)

\* aykatsu@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp

\*\* ayasuo@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp