

## ヒドラジド分解酵素の基質特異性に関する解析 Structural basis of the substrate specificity of hydrazidase

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<sub>2</sub>NNH<sub>2</sub>)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<sub>1</sub>C(=O)NR<sub>2</sub>NR<sub>3</sub>R<sub>4</sub>)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、ヒドラジド誘導体のうち、4-hydroxybenzoic acid 1-phenylethylidene 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%の相同性を有していた。また、基質として HBPH の他に 4-hydroxybenzoic acid hydrazide (HBH)を加水分解できることも明らかとなった。[1]

Hydrazidase は amidase signature family 酵素として、活性部位に Lys-Ser-Ser の保存された3残基が存在する。しかしながら、ヒドラジド分解の反応機構については不明である。そこで、触媒残基である S179 をアラニンに置換した変異体を用いて、ヒドラジド誘導体である HBH との複合体の解析を行った。

### 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。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。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、複合体構造を 1.8 Å の分解能で得た。活性部位に結合して

いた HBH は、そのカルボニル酸素は、L176, G177, S179 からなるオキシアニオンホールに捉えられていた。また、HBH の4位の水酸基は水分子と水素結合をしており、その水分子はさらに H336 と水素結合を形成していた。また、水素結合が C129 のカルボニル酸素と HBH のアミド基との間で形成されていた。実際、H336, C129 のアラニン置換変異体を作成したところ、hydrazidase の酵素活性の低下が見られた。特に H336A では野生型の1%程度とほぼ活性を失っていた。このことから、H336 が、基質認識に重要であることと、hydrazidase における基質特異性を決める要因にもなっていると考えられた。Hydrazidase の本来の基質はまだ不明であるが、今回の HBH との複合体構造の結果から、4-ヒドロキシフェニルの構造が基質の部分構造として考えられた。

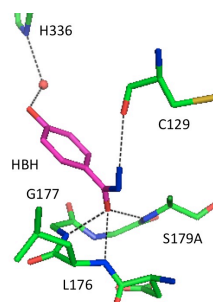


図1: HBH の結合様式

### 4 まとめ

今回の結晶構造から得られた結果から、酵素の本来の基質探索につながる事が期待される。

### 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。

### 参考文献

[1] K. Oinuma, et al., *J. Bacteriol.* **197**, 1115 (2015)

### 成果

1. T. Akiyama, et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **482**, 1007 (2017).

\* yshun@nodai.ac.jp