

# ATP 依存型ジアゾ化酵素 CmaA6 の X 線結晶構造解析 X-ray Crystallographic Analysis of the ATP-Dependent Diazotase CmaA6

川合誠司<sup>1</sup>, 勝山陽平<sup>1,2</sup>, 大西康夫<sup>1,2</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> 微生物科学イノベーション連携研究機構, 〒113-8657 東京都文京区弥生 1-1-1

Seiji KAWAI<sup>1</sup>, Yohei KATSUYAMA<sup>1,2</sup> and Yasuo OHNISHI<sup>1,2</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> Collaborative Research Institute for Innovative Microbiology, The University of Tokyo, 1-1-1  
Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8657, Japan

## 1 はじめに

微生物が生産する天然物は、その化学構造と生物活性の多様性から、医薬品や染料の有用な資源として活用されている。このような天然物の生成に関与する酵素機能を理解するために、古くから多くの研究がなされてきた。現在も、特徴的な化学構造の形成を触媒する酵素に関する研究が国内外のグループによって精力的になされている。

近年、ジアゾ基をはじめとする窒素-窒素 (N-N) 結合形成を触媒する酵素が複数発見されている [1]。特に、1 級アミンに亜硝酸を縮合させることでジアゾ基合成を触媒する酵素は、複数報告があり、その多くが I 型ジアゾ化酵素と分類される ATP 依存型の酵素であることがわかっている。著者らのグループをはじめとした、国内外の複数の研究グループによる生化学実験から、I 型ジアゾ化酵素は、まず、ATP を用いて亜硝酸を活性化 (AMP 化) し AMP-nitrite を形成後、1 級アミンと AMP-nitrite を縮合することでジアゾ化反応を触媒することが明らかになっている [1]。しかしながら、I 型ジアゾ化酵素の立体構造や、ジアゾ化反応の詳細な触媒機構は未知であった。

本研究では、著者らが以前同定した I 型ジアゾ化酵素 CmaA6 [2] を対象として、ジアゾ化酵素の触媒機構の解明を目指した。X 線結晶構造解析により得られた 2 状態の構造を基に各種解析を実施した。

## 2 実験

ATP 依存型ジアゾ化酵素 (I 型ジアゾ化酵素) の触媒機構を明らかにするために、タンパク質の収量・安定性に優れる CmaA6 の構造解析に取り組むこととした。なお、著者らの以前の研究から、CmaA6 は 3-アミノクマル酸 (3-ACA) のアミノ基に ATP 依存的に亜硝酸を縮合させることでジアゾ化し、3-ジアゾクマル酸 (3-DCA) を形成する反応を触媒することがわかっている (図 1) [2]。まず、CmaA6 の組換えタンパク質を大腸菌 BL21(DE3) に生産させ、Ni<sup>2+</sup>アフィ

ニティークロマトグラフィーと陰イオン交換クロマトグラフィーにより高純度に精製した。

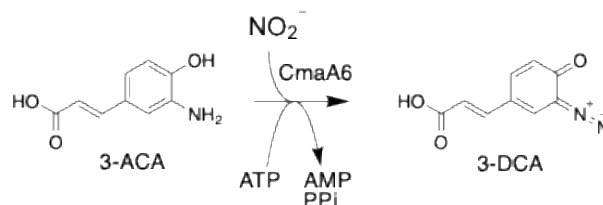


図 1: CmaA6 が触媒するジアゾ化反応。

得られた CmaA6 の組換えタンパク質に対して、スクリーニングキット (Index, Crystal Screen, Wizard I&II) を用いた結晶化スクリーニングを実施したところ、Index 92 (100 mM magnesium formate dihydrate, 15% (W/V) PEG3350) のリザーバー溶液を用いた際に微小結晶が得られた。この条件をもとに結晶化条件の最適化を行い、得られた結晶に対して BL-1A にて X 線を照射した。その結果、200 mM magnesium formate dihydrate, 12% (W/V) PEG3350 をリザーバー溶液とした際に得られた結晶で高分解能の回折像が取得された。さらに、CmaA6 の AMP との共結晶の取得を試みたところ、150 mM magnesium formate dihydrate, 12% (W/V) PEG3350 をリザーバー溶液とした際に得られた結晶で高分解能の回折像が取得された。

上述のデータセットに対して、分子置換法による位相決定と、構造の精密化を試みた。その結果、CmaA6 の構造を最高分解能 2.7 Å で、AMP との共結晶の構造を最高分解能 2.9 Å で取得することに成功した。

## 3 結果および考察

上述の X 線結晶構造解析から取得された CmaA6 の結晶構造では、非対称単位中に 8 分子の CmaA6 が存在しており、その構造は互いによく似ていた。AMP

との共結晶の構造では、非対称単位中に 4 分子の CmaA6 が存在しており、そのうち 1 分子に AMP が結合していた。なお、本プロジェクトと並行して、KEK において実施したクライオ電子顕微鏡単粒子解析法 (Cryo-EM-SPA) から、4 量体を形成する CmaA6 の単体構造が、最高分解能 3.48 Å で取得された。

上記の 3 つの構造は、それぞれよく似ていたが、C 末端ドメインの構造に差異が見られた。単体の構造では、C 末端ドメインが開いた構造を取ると同時に、C 末端領域の一部が disorder していた。その一方で AMP との複合体においては、C 末端ドメインが開いた構造を取り、その全域の電子密度が観測され

た (図 2 AB)。また、Cryo-EM-SPA による CmaA6 の単体構造では、C 末端ドメインの全域が disorder しており、C 末端ドメインが柔軟な構造をとることが示唆された。

AMP 複合体構造を基に、亜硝酸の結合位置を精査したところ、His224、Phe267、Lys533 によって亜硝酸が保持されると推定された (図 2 C)。これら 3 残基に対する部位特異的変異導入実験を行ったところ、いずれの変異体においてもジアゾ化活性が著しく減少あるいは消失した。従って、CmaA6 の触媒機構において、上記 3 残基が重要であり、亜硝酸の認識に関わっていることが示唆された。

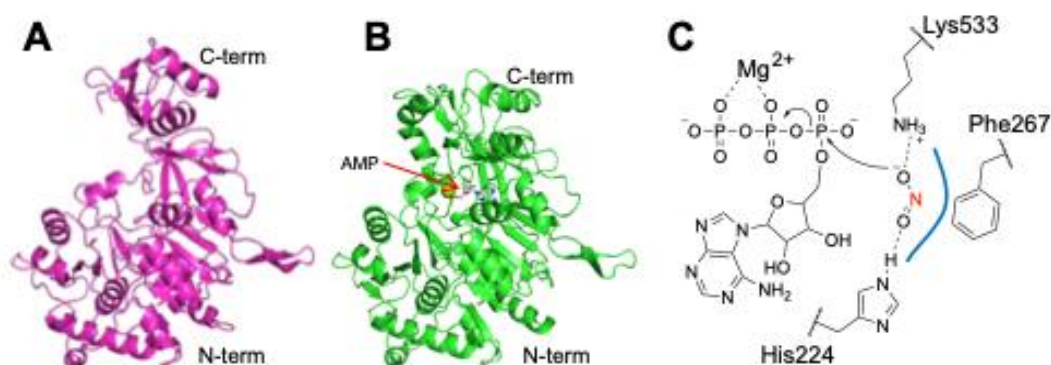


図 2 : CmaA6 の構造と亜硝酸の推定認識機構。(A) CmaA6 の単体の結晶構造。(B) CmaA6 の AMP 複合体の結晶構造。(C) 本研究で提唱された、His224、Phe267、Lys533 残基による亜硝酸の認識機構。

#### 4 まとめ

本研究では、X 線結晶構造解析により、ATP 依存型ジアゾ化酵素 (I 型ジアゾ化酵素) に関する初の構造情報の取得に成功した。さらに、本研究で得られた構造情報を基にした、各種分子シミュレーション解析・変異酵素の解析・反応速度論解析などから、I 型ジアゾ化酵素が触媒するジアゾ化反応の一連の触媒機構の提唱にも成功した [3]。以上のから、本研究は天然物の生合成経路における、ジアゾ化反応を理解をする上で、極めて重要な知見を与えるものであるといえる。

- 川合誠司、唐澤昌之、森脇由隆、寺田透、勝山陽平、大西康夫『ATP 依存型ジアゾ化酵素 CmaA6 の反応機構の解明』日本農芸化学会 2025 年度 札幌大会

\* aykatsuhko@g.ecc.u-tokyo.ac.jp

#### 参考文献

- [1] C. Angeli *et al.*, *ACS Catal.* **2025**, 15, 310-342
- [2] S. Kawai *et al.*, *Beilstein. J. Org. Chem.* **2024**, 20, 1-11
- [3] S. Kawai *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2025**, 64, e202505851

#### 成果

1. S. Kawai *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2025**, 64, e202505851
2. ○川合誠司、勝山陽平、大西康夫『ATP 依存型ジアゾ化酵素 CmaA6 の構造機能解析』2023 年度 (第 36 回) 日本放線菌学会