

## 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<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* の有する agaritine が知られている。また isonicotinic acid hydrazide は結核の治療薬として有名であるが、ウサギ体内のアミダーゼ酵素活性によって isonicotinic acid と hydrazine に分解されることが示唆されている。しかし、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 は約130アミノ酸残基からなる高度に保存された Gly、Ser リッチな領域が特徴的である。また、この配列中に含まれる活性中心 Ser-Ser-Lys によってアミド結合を切断できる。Hydrazidase の配列中にも活性中心のアミノ酸残基 Lys80、Ser155、Ser179 が確認出来た。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。そのため、多くの酵素の研究がこれまでに進められてきた。Amidase Signature family に属する酵素の立体構造も10件程度報告されている。また、これらにおいて反応機構の研究も多く行われている。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。そこで、本研究では hydrazidase の立体構造解析を行うことで、その解明を目指すこととした。

### 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、回折データ収集を PF にて行った。初期構造の決定は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

今回結晶化スクリーニングにより、3つの異なる空間群に属する結晶を得た。このうち C2, I4 に属するものは溶媒含有量が約70%であり、分解能が2.0Å、C22<sub>1</sub>に属するものは溶媒含有量が約60%であり、分解能が1.6 Åまで得られた。Hydrazidase は既知の amidase 同様 ホモ2量体を形成していた。活性部位に存在する Ser-Ser-Lys の3残基の配位および周辺の構造も amidase とほぼ同じであった。一方、近傍に非保存性の Cys 残基が位置しており、hydrazidase の活性に関連する可能性が考えられた。

### 4 まとめ

Hydrazidase の立体構造をはじめて明らかにした。今後は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