

令和元年6月17日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K05573

研究課題名(和文) 補欠分子族含有酵素におけるプロトン・電子移動の協同的制御機構の解明

研究課題名(英文) Concerted proton/electron transfer mechanism in cofactor-dependent enzyme

研究代表者

林 秀行 (HAYASHI, Hideyuki)

大阪医科大学・医学部・教授

研究者番号：00183913

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：生体内で起こる化学反応の触媒である酵素は水素イオンと電子の移動を円滑に進行させているが、その駆動力の由来についてはまだ十分に検討がなされていない。本研究においてはその移動の機構を見通しよく探るための方法論を開発した。これは反応中間体を水素イオンと電子の数によって分類して並べ、それらのもつエネルギーを縦軸に取った鳥瞰図を描き、さらに精密な構造との対応付けを行うことで、酵素の触媒反応がどのような構造的な力をもとにどのような道筋で進行するかということを明らかにするものである。その成果はアミノ酸化酵素やトレオニン合成酵素といった生理的、産業的に重要な酵素の反応機構の解明に応用された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今までの酵素反応機構の研究は現象の追跡に終始していたが、本研究はその現象がどのような力によってもたらされているかという、本質的な要因を明確にする方法論を確立したところに学術的な意義がある。また、この方法論によって酵素反応機構を明らかにする研究の方向性が明確になることは、現在、洗剤などの日常生活から薬品や各種素材の製造といった工業分野に至るまで酵素の触媒能力が応用されている領域において、望みの機能を持った酵素の開発を容易にすることにつながるという社会的意義がある。

研究成果の概要(英文)：Enzymes, which are the catalysts for the chemical processes in living cells, promote the movements of protons and electrons. However, not much effort has been paid for elucidating the origin of the driving forces for these movements. In this study, a methodology was developed in order to clarify the driving force for the most probable reaction pathway. In this methodology, the reaction intermediates with all possible protonation and redox states are first classified according to the numbers of protons and electrons, and then the energy level is plotted against the coordinates of the reaction step, protonation state, and the redox state. The obtained energy landscape can be used to draw the reaction pathway, and combined with high-resolution structural methods, elucidate the structural elements of the driving force for the proton and electron movements.

研究分野：生体関連化学

キーワード：酵素反応機構 プロトン移動 電子移動 エネルギー準位図 反応駆動力 X線結晶解析 反応速度論  
補欠分子族

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

酵素反応機構の解明は、生命現象の根幹を担うタンパク質の機能の主要な部分を明らかにすることであり、学問としての生命科学において重要な意義を有している。その一方で、思い通りの機能を持つ酵素を作り出すという実用的な見地からの意義も有している。

これらの研究は個々の酵素について大きな成果をもたらしてきたが、現在もなお未解決の問題が山積している。それらとはつまるところ、何が酵素反応を進行させているのか、その駆動力はどこから来るのか、という問題に突き当たるのである。換言すれば、数多くの研究成果によって速度論的パラメータや精密な立体構造が解明されても、それらを総合して熱力学的に解釈する視点が世界的に未整備なのである。

研究代表者のプロトン移動に関する方法論はそのプロトン移動の駆動力の本体を構造論的に理解するためのものである。その端的な成果はアスパラギン酸アミノ基転移酵素 (AAT) についての従来の現象論的なプロトン移動過程を、酵素に内在する歪みの解消によって発生したエネルギーを用いて反応の遷移状態への坂を上る過程として描き出すことに成功したことである。

ところが、酵素一般を見渡すと、プロトン移動過程と並んで重要なものが電子移動過程である。そして、この両者は複雑に絡み合って酵素反応を進行させている。したがって、上記の方法論を拡張し、それをプロトン移動と電子移動の駆動力とそれによるプロトン・電子移動の統一的理解のために生かすことが求められたのである。

### 2. 研究の目的

酵素は反応加速という触媒としての基本的な能力に加え、単純な触媒にはない基質特異性と反応特異性を有している。最近の種々の解析方法の進歩により、反応機構すなわちプロトン移動・電子移動の過程の詳細が次第に明らかになってきている。しかしながら、それらの駆動力の本体については明らかではない、本研究ではそれらがどのような構造的要因に基づいてもたらされているのかということ、プロトン・電子移動の追跡に適した補欠分子族、具体的にはピリドキサルリン酸 (PLP) およびトパーキノン (TPQ) を含有する酵素を用いて明らかにしようとするものである。

### 3. 研究の方法

本研究においては、プロトン・電子移動の過程を分光学的に追跡することの容易な補欠分子族として PLP を含む酵素であるトレオニン合成酵素 (ThrS)、TPQ を含む酵素である *Arthrobacter globiformis* アミン酸化酵素 (AGAO) を題材に選んだ。それについて以下の方法で解析を行った。

#### (1) 速度論的解析

種々の基質・基質アナログと酵素の反応の遷移相速度論的解析を種々の pH において行うことによりプロトン移動を、またそれらを分光学的に追跡することによって電子移動を、それぞれ詳細に解析する。

#### (2) X 線結晶解析

(1) で見出された各中間体の構造を X 線結晶解析によって明らかにする。

#### (3) 変異体解析

中間体の構造にもとづき、副反応ルートを見出し、それらのルートに対するエネルギー障壁を形作る構造を部位特異的変異、基質・生成物アナログを用いた解析により検証する。

#### (4) 理論化学的解析

量子力学 / 分子力学混合法 (QM/MM 法) を中心とする量子化学的計算によって主反応経路と副反応経路を解析し、(3) で見出された構造的要因が特異的な反応を可能にする理論的根拠を明らかにする。

(1) ~ (4) を合わせてプロトン移動と電子移動が多元的に絡み合った酵素反応において、プロトン移動の駆動力と電子移動の駆動力が、酵素タンパク質と基質・生成物の相互作用とその結果起こるコンフォメーション変化によってどのように形成され、協同的に働き、個々の酵素に特異な反応過程が可能となっているかを明らかにする。その機構の妥当性は酵素タンパク質の部位特異的変異や基質・生成物の分子的改変を通じて検証する。

### 4. 研究成果

#### (1) AGAO の反応機構

AGAO は補欠分子族として  $\text{Cu}^{2+}$  に加え、ピルトイン補欠分子族であるトパーキノン (TPQ) を有している。AGAO の反応は 2 段階で進行し、第 1 段階として基質アミンと TPQ の反応によってアミンがアルデヒドに酸化され TPQ が還元のアミノ化を受けてアミノレゾルシノール (TPQ(amr)) となる反応が進行し、第 2 段階としてこの TPQ(amr) が酸素と反応してアンモニアを遊離するとともに TPQ に再酸化される反応が進行する。TPQ(amr) は  $\text{Cu}^{2+}$  に配位した型 (on-copper) と配位していない型 (off-copper) の 2 つが存在するが、従来から知られたハロゲン化物イオンによる AGAO の阻害は、ハロゲン化物イオンが  $\text{Cu}^{2+}$  に配位することで TPQ の再酸化の過程を阻害することが時分割スペクトルの解析の結果判明した。従来は off-copper 型は袋小路 (dead-end) 中間体であると考えられていたが、これによって、TPQ(amr) が on-copper 型を取ることで TPQ(amr) から酸素への  $\text{Cu}^{2+}$  を介する電子移動が起こっていることが

判明し、反応機構が大きく改変された。さらに、溶液の粘性を変化させつつ遷移相速度論的解析を行ったところ、TPQ(amr) の  $\text{Cu}^{2+}$  への配位の際に TPQ(amr) が大きくコンフォメーションを変化させていることが分かった。

このコンフォメーション変化をさらに詳しく追跡した。理研の馬場らによって開発された、抗凍結方法の画期的改良法である HAG (humid-air/glue-coating) 法を用いて非凍結結晶の状態での X 線結晶解析に成功し、さらに溶液における熱力学的解析と全く同様の、温度変化による解析を結晶について行い、このコンフォメーション変化の標準エンタルピー変化および標準エントロピー変化を求めることに成功した。これにより、プロトン・電子の協同的移動過程の、構造に基づいた熱力学的解析の方法の確立を行うことができたと言える。

AGAO については更に広 pH 領域での遷移相速度論的解析を行い、プロトン移動の解明のための基礎データを蓄積した。それぞれの pH において遊離酵素、基質シッフ塩基、生成物シッフ塩基、還元型、およびセミキノンの各中間体を同定し、それらの間の相互転換の速度定数を決定することができた。これらの速度定数は顕著な pH 依存性を示し、還元型とセミキノンの相互転換は正逆方向とも pH の上昇に伴って著しく減少しており、一方、それ以外の過程の速度定数はいずれも正逆方向とも pH の上昇に伴って上昇していた。特筆すべきことは、基質シッフ塩基と生成物シッフ塩基の相互転換のいずれの向きも  $pK_a = 6.0$  から  $6.5$  の解離基が脱プロトン化した形が活性分子種となる pH 依存性を示し、活性部位の Asp298 の一般塩基触媒としての機能を初めて実際の反応の上で証明することができた。また、生成物シッフ塩基の加水分解の過程の pH 依存性からも、Asp298 が水分子の攻撃の一般塩基触媒として働くことが示され、Asp298 の触媒基としての多機能性を示すことができた。以上の基盤に立って、今後中性子線解析等の構造解析を進め、より完成された、プロトン・電子の協同的移動過程としての AGAO の反応機構の確立を目指している。

## (2) ThrS の反応機構

ThrS については、後半の反応、すなわち ThrS の反応特異性が反応生成物のリン酸イオンによる生成物支援触媒によって担われているが、この過程において、副反応を避けるような電子移動を可能にするプロトン化状態を探ることが必要であり、量子力学 - 分子力学ハイブリッド法 (QM/MM 法) を用いた計算によって一定の成果が得られていたが、自由エネルギーによる評価が行われていないために現実的な反応機構との乖離が問題であった。この点について、後半の反応における主要な 3 つの中間体に対して  $3 \mu\text{s}$  に及ぶ長時間の分子動力学 (MD) 計算を行い、また生成物支援触媒の本体であるリン酸イオンおよびリン酸イオンに類似しているが生成物支援触媒とならない硫酸イオンの存在下での各中間体の自由エネルギー差を熱力学積分法で求めた。その結果、各中間体において様々なコンフォメーションが見出され、リン酸イオンはその中でも反応に都合の良いコンフォメーションの高い比率を維持すること、逆に硫酸イオンは反応に不都合なコンフォメーションを増やし、副反応を助長していることが示された。このように理論化学の面からプロトン・電子の協同的移動過程の解析を行うことができ、(1) と併せて実験的・理論的な熱力学的解析が相補的に活用される素地ができたと考えられる。

一方、ThrS の前半の反応を解析するためには、TS と基質 *o*-ホスホホモセリン (OPHS) の反応を追跡することが考えられるが、TS は極めて多段階の反応が連続しており、解析が困難であることが予想された。そこで、OPHS のアナログとして、2-アミノ-5-ホスホノペンタン酸 (AP5) を合成した。AP5 はリン酸の脱離が起こらないため、エナミン中間体で反応が停止する。したがって、TS と AP5 の反応で前半過程の大部分を再現することが可能である。TS と AP5 の反応をフォトダイオードアレイを装備したストップフロー分光器によって追跡したところ、 $482 \text{ nm}$  においては 3 相性の変化が観察されたが、 $330 \text{ nm}$  においては第 2 相に当たる変化の変化量が極めて少なかった。このことから、単純な逐次モデルではこの吸収スペクトル変化を説明することが困難であり、カルボアニオン中間体が生成したのち、ケチミン中間体への変化とは別に第 2 の外アルジミン中間体へ枝分かれをする経路が存在することが示された。この結果を AP5 を結合した TS の X 線結晶解析で得られた構造と照合したところ、AP5 のホスホノ基からのプロトンがカルボアニオン中間体の  $C\alpha$  位に移動する過程が第 2 相の変化の実体であることが考えられた。このことから、AP5 のホスホノ基、そして基質 OPHS のリン酸基は Lys61 のアミノ基と強い相互作用を行っており、Lys61 のアミノ基が脱プロトン化した状態を一定の割合で保持し、Lys61 のプロトン移動触媒としての機能を保証することが明らかになった。なお、広 pH 領域における解析を行ったところ、pH によって変化するのは ThrS への AP5 の結合段階であり、AP5 はアミノ基が脱プロトン化した状態が優先的に ThrS に結合することが示された。それに対して、反応中間体についてはエナミン中間体までの全ての速度定数に pH 依存性がなく、AP5 が酵素に結合後は溶媒から隔離された状態にあることが示された。

## (3) 酵素反応機構の解明のための一般化

本研究で明らかになった、研究代表者の方法論の有効性は以下のとおりである。

反応機構のスキームを描く際に、可能な限りあらゆる活性部位のプロトン化状態ならびに基質・補欠分子族の酸化還元状態を網羅的に描き、プロトン化状態については総プロトン数によってグループに分ける。これらを実験的な構造と対応付け、さらに速度論的解析や構造論的熱力学解析によって得られたエネルギー準位と対応付ける。この対応付けが正しければ、これによって説明される広 pH 領域にわたる速度論的挙動が実験結果と一致するはずであり、この作業によって得られた反応機構と反応駆動力の構造的要因が検証されることになる。

この方法論は構造解析との親和性が高いことが特徴であり，特に中性子線解析など今後の構造解析方法の進展により，より精密化されることが期待される．

## 5．主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

Murakawa, T., Baba, S., Kawano, Y., Hayashi, H., Yano, T., Kumasaka, T., Yamamoto, M., Tanizawa, K., Okajima, T.

*In crystallo* thermodynamic analysis of conformational change of the topaquinone cofactor in bacterial copper amine oxidase.

Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 査読有, 2019, 116(1), 135–140.

DOI: 10.1073/pnas.1811837116

Ujiie Y., Tanaka, W., Hanaoka, K., Harada, R., Kayanuma, M., Shoji, M., Murakawa, T., Ishida, T., Shigeta, Y., Hayashi, H.

Molecular mechanism of the reaction specificity in threonine synthase: importance of the substrate conformations.

J. Phys. Chem. B 査読有, 2017, 121(22), 5536–5543.

DOI: 10.1021/acs.jpcc.7b02932

Murakawa, T., Hamaguchi, A., Nakanishi, S., Kataoka, M., Nakai, T., Kawano, Y., Yamaguchi, H., Hayashi, H., Tanizawa, K., and Okajima, T.

Probing the catalytic mechanism of copper amine oxidase from *Arthrobacter globiformis* with halide ions.

J. Biol. Chem. 査読有, 2015, 290(38), 23094–23109.

DOI: 10.1074/jbc.M115.662726

〔学会発表〕(計 10 件)

Hayashi, H., Murakawa T.

Strain as the driving force for catalysis in aspartate aminotransferase.

V Russian Congress on Biochemistry, Sochi, Russia (2016)

Hayashi, H., Murakawa T., Shoji M., Shigeta Y.

Energetics of the proton-transfer mechanism in aspartate aminotransferase.

Pacificchem 2015, Honolulu, U.S.A. (2015)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

該当なし

## 6．研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：村川 武志

ローマ字氏名：MURAKAWA, takeshi

所属研究機関名：大阪医科大学

部局名：医学部

職名：助教

研究者番号 (8 桁)：90445990

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：庄司 光男

ローマ字氏名：SHOJI, mitsuo

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。