

研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19770094
 研究課題名（和文）ヘム型二原子酸素添加酵素の反応中間体解析による酸素活性化の化学原理の解明
 研究課題名（英文）Analysis of oxygen activation mechanism in the heme-containing dioxygenases
 研究代表者
 杉本 宏 (SUGIMOTO HIROSHI)
 独立行政法人理化学研究所・城生体金属科学研究室・専任研究員
 研究者番号：90344043

研究成果の概要：

2つのヘム含有二原子酸素添加酵素 (IDO, TDO) の反応メカニズムを明らかにするために共鳴ラマン分光法により IDO の反応中間体である酸素結合型の電子状態を明らかにした。また、IDO 変異体の機能解析・X線結晶構造解析・共鳴ラマン分光解析により明らかにした活性中心のタンパク質残基の役割とDFT法による理論計算結果から、新しい反応スキームを提案した。さらに、TDOの協同的基質結合性とそのメカニズム明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,300,000	0	2,300,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	330,000	3,730,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物学

キーワード：ヘムタンパク質・共鳴ラマン分光・X線結晶学・トリプトファン

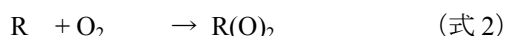
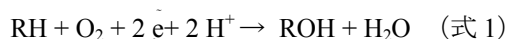
1. 研究開始当初の背景

我々人間を含む好気性の生物は、呼吸によって空気中から酸素分子(O₂)を体内に取り入れて生きている。取り入れられた酸素分子の95%以上は、チトクロム酸化酵素によって水に変換され、その際に生じるエネルギーを用いてATPが合成されている。残り約5%の酸素は、酸化反応によって、生体内の物質代謝や生理活性物質の生合成に使われており、どちらも我々が生きていく上で

不可欠な生理反応である。後者の反応を触媒する酵素、すなわち酸素添加酵素は生物界に幅広く存在し、多くの生理反応に関係している事が示されてきた。

酸素添加反応には、酸素分子のうち1つの酸素原子だけが基質に取り込まれ、他方は水に変換される一原子酸素添加反応(式1)と、2つの酸素原子が取り込まれる二原子酸素添加反応(式2)の二種類があり、それぞれに鉄、銅、マンガンなどの金属イ

オンを活性中心に含む多種多様な金属酵素が関与している。



上記の反応は生理的に重要なだけでなく O-O 結合を開裂し C-O 結合を生成させるという化学的にも大変興味深い反応である。近年になり、数多くの酸素添加酵素の結晶構造が明らかになってきた。

哺乳類のヘム型二原子酸素添加酵素として indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) と tryptophan 2,3-dioxygenase (TDO)の二つだけが知られている。いずれもトリプトファン (Trp)をN-ホルミルキヌレニンに変換し、生体内でのTrp代謝経路 (キヌレニン経路)の第一かつ律速段階の酵素である (最終産物はビタミンB₃)。二原子酸素添加酵素は1956年の早石らによる発見以来、酵素学的な研究が1980年代まで行われ、IDOの発現がIFN- γ によって誘導されることや、1998年に生体内でのTrpの枯渇がT細胞の増殖を抑制し、マウス妊娠期の胎児拒絶に重要な役割をしていることが明らかとなり (Munn, *Science*, 1998; Platten, *Science*, 2005)、再び注目を浴びた。また、日本のグループによってIDOと加齢性白内障の関連や、アルツハイマー患者の脳にはTrp代謝物やIDOが過剰に存在することが明らかされている (Takikawa, *Adv Exp Med Biol.*, 2003)。そのためIDOはT細胞の寛容性や神経系の病態に関連した創薬のターゲットとなっている。そのような生理学的な重要性が示されてきたにもかかわらず、その化学的性質としての反応機構の理解は立体構造情報の欠如のためにほとんど進歩が見られていない。

二原子酸素添加酵素の反応の化学的に興味深い点は、酵素が補酵素ヘムを利用して基底状態にある分子状酸素(O₂)を活性化状態へ移行させ、両方の酸素原子を基質へ取り込ませるためにどのような構造的な仕組みがあるのかである。また、式2に示したように活性部位へe⁻とH⁺の供給が必要ない。この特異な反応を分子レベルで議論することはこれまでは不可能であった。

2. 研究の目的

2006年に申請者はヒトIDO (hIDO)の結晶構造(基質フリー型)を決定した (Sugimoto, *PNAS*, 2006)。その結果から、他のヘム酵素には見られないような「ヘム鉄に結合した酸素が基質の脱プロトン化をおこなう」のが反応の第一ステップであるというモデルを提唱した。つまり、酵素の活性ポケット内で起こる反応に直接関与するのはヘムと酸素と基質だけであり、酸素分子活性化のための特別な役割をタンパク質側は持っていないのである。その代わりに、三者複合体「IDO:基質:酸素」の三者の間の厳密な立体配置が必要であることが示唆された。しかし、この仮説は間接的な証拠に基づくもので、直接的に反応の中間状態である三者複合体の構造を見たわけではない。IDOおよびTDOの立体構造に基づいて「二原子酸素添加反応」における活性化状態の構造的な「仕組み」を明らかにすることが本研究の目的である。

3. 研究の方法

(1)三者複合体のラマン分光解析

共鳴ラマン分光法により溶液中でのhIDOに結合した酸素分子の性質 (Fe-O 結合の伸縮振動モードやヘムの振動モード) を測定する。基質結合状態と基質非存在下での値の比較や、他のヘムタンパク質での値と比較することで、鉄イオンに結合した-O-Oの電子状態を明らかにする。

(2) TDOの協同性の解析

IDOとTDOは、アミノ酸配列の相同性はなく、TDOはホモ四量体として、IDOは単量体として機能する (図1)。本研究ではまず、ヒトのTDO (hTDO)の特異な酵素反応における基質認識機構および反応機構を分子レベルで理解することを目的として、基質 (L-Trp) 結合に伴う構造変化を、共鳴ラマン分光法ならびに可視吸収スペクトル法を用いて追跡した。また、近年解析されたバクテリアの *Xanthomonas campestris* TDO (xcTDO) の L-Trp 結合型の結晶構造を参考に、酵素活性と基質結合に重要な役割を担うであろう Tyr42 と His76 に着目して変異体

を調製し、野生型と同様の実験を行った。

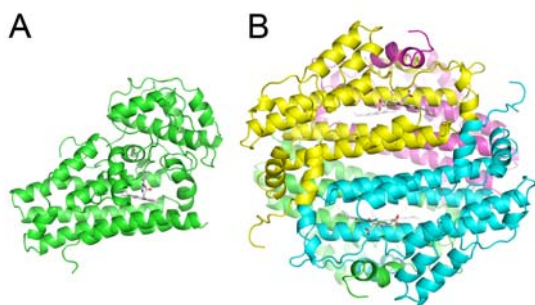


図 1 二原子酸素添加酵素の結晶構造 (A) ヒト IDO, (B)バクテリア由来 IDO

(3) IDO の構造解析

IDO の 20 種類以上の変異体に関して酵素活性・UV-可視分光法による基質解離定数・フラッシュフォトリシス法等によるリガンド結合速度を測定し、野生型のものと比較する。これにより基質：タンパク質間の特異性を発揮するのに必要な活性部位残基の構造的条件を明らかにするとともに、変異体 X 線結晶構造解析および CO 結合型 hIDO の共鳴ラマン分光法による解析を行った。

(4) DFT 法による反応中間体の検証

密度汎関数(DFT)法により、各ステップにおける反応中間体および遷移状態の電子状態を計算することで、いくつか提案されている各反応スキームの検証を行った。計算には単純化したポルフィリンと基質モデルを用いた。

(5) 抗がん剤治療薬候補となる新規 IDO 活性阻害剤の開発

IDO は T 細胞の寛容性や神経系の病態に深く関与している。IDO を標的としたがん治療に関する創薬を目指すために、新規阻害剤の合成を行い、その阻害能を評価した。

4. 研究成果

(1) hIDO 反応中間体のラマン分光解析

反応の最初のステップである酸素結合型の共鳴ラマンスペクトルを測定し、 $^{16}\text{O}_2$ - $^{18}\text{O}_2$ 同位体差スペクトルから Fe(II)-O₂伸縮振動モード($\nu_{\text{Fe-O}_2}$)を 569 cm^{-1} に検出した (図 2 A)。ヘム型ジオキシゲナーゼの Fe-O 結合の振動モードを観測したのは世界的にも初めての

成果である。この値は O-O 結合の開裂が起こるペルオキシダーゼの値 (562 cm^{-1})よりも大きく、ミオグロビンが示す値 (569 cm^{-1})とほぼ同等であると言える。

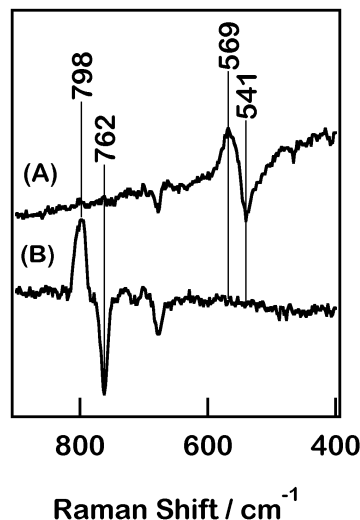


図 2 IDO 反応中間体の共鳴ラマン差スペクトル ($^{16}\text{O}_2$ - $^{18}\text{O}_2$) (A)基質存在下での酸素化型(B)基質存在下でのオキシ型反応種

この結果から以下のように考察した。観測に成功した $\nu_{\text{Fe-O}_2}$ の値の大きさは、ヘムの第 5 配位子である proximal His 残基の環境や、酸素の結合する第 6 配位座側 (distal side) のタンパク質環境に由来するものだと考えられる。つまり、過酸化水素を用いて基質の酸化反応を触媒するペルオキシダーゼでは、proximal 側 Asp および His 側鎖による電子の強い供与に加え、distal 側の His および Arg による電子の吸引 (いわゆる push-pull) 効果で酸素を活性化することで O-O 間の結合を切断することが可能になっている。ミオグロビンの場合では、proximal His は特に相互作用する相手がおらず、中性的であるためである。一方、hIDO の場合は distal 側の残基にはヘム鉄に結合した酸素と相互作用できるような極性残基は存在しないことは結晶構造解析から明らかであり、hIDO の Fe-O₂ 間結合の電子状態が酸素を可逆的に脱着することが可能なミオグロビンと良く似ているという結果は、ヘム鉄に結合した酸素分子の O-O 結合は切断される前に基質に取り込

まれるというスキームを支持するものである。

また、酸素化型 IDO では酸素が鉄にエンドオンで配位し、鉄に配位していない方の酸素が Fe-O 伸縮振動数に影響を与えていない。この状態は、酸素分子のうち鉄に配位していない方の酸素原子が強く水素結合している場合と、酸素分子がポルフィリン平面に対して平行に配位している場合の二種類が考えられる。

反応機構を理解するためには、基質結合によって Fe-O 間、O-O 間の結合の電子状態がどのように変化するかを解析する必要がある。そこで、基質 L-Trp 存在下での酸素結合型 hIDO の共鳴ラマンスペクトルの測定実験を行った。実験では $^{16}\text{O}_2$, $^{18}\text{O}_2$, $^{16}\text{O}^{18}\text{O}$ などの同位体を用いて平衡状態において測定を行い、それらの差スペクトルから 798 cm^{-1} に新たなラマン線を検出した (図 2 B)。この分子種は鉄に酸素 1 原子が配位しているオキソ型 Fe(IV)=O の配位構造をとっていることがわかった。しかし、活性に基質阻害が観測される基質濃度 1 mM 以上の条件下においてのみ観測されることから、この反応種の観測は以下の 2 種類の可能性が考えられる。a) 基質阻害のおかげで反応中間状態がトラップされているために寿命が長くなっている。b) 観測された反応種は dead-end complex であり、これが基質阻害の原因となっている。これらの可能性を検証するために、二液混合装置とフロー型ラマン用セルを用いて低濃度基質での測定や、質量分析により反応生成物の解析へと今後展開していく必要がある。

(2) hTDO の協同的基質結合とその分子機構の解明

hTDO は、基質である L-Trp と酸素の存在下で、ヘム鉄が酸化型 (Fe^{3+}) の時に高い酵素活性を有した。酸化型 (Fe^{3+}) の野生型 hTDO に、 O_2 非存在下で基質 L-Trp を滴定すると、共鳴ラマンスペクトル、可視吸収スペクトルともに大きく変化した。特に、ラマンスペクトルにおいては、鉄のスピンの状態を反映するバンド (ν_6 , ν_8)、ヘムのプロピオン酸基と 4 位のビニル基の変角振動を示すバン

ドである $\delta(\text{C}_\beta\text{C}_c\text{C}_d)$ と $\delta(\text{C}_\beta\text{C}_a\text{C}_b)_4$ の変化が最も顕著であった。これらのスペクトル変化を基質濃度に対してプロットすると、図 3 のようにシグモイド型の曲線を示した。この結果により、L-Trp 結合に伴いヘム鉄のスピンの状態、およびプロピオン酸基と 4 位ビニル基の構造が変化し、その変化にはホモ四量体 TDO のサブユニット間で協同性が存在することを初めて明らかにした。

二つの変異体 (Y42F, H76A) についても、野生型同様に酵素活性、共鳴ラマンスペクトルおよび可視吸収スペクトルを測定した。その結果、サブユニット間の密接な相互作用が協同性発現に重要であることが示唆された。また、His76 は酵素反応において、結合した基質 L-Trp の NH 基からプロトンを引き抜く役割を果たしていると考えられた (文献①)。

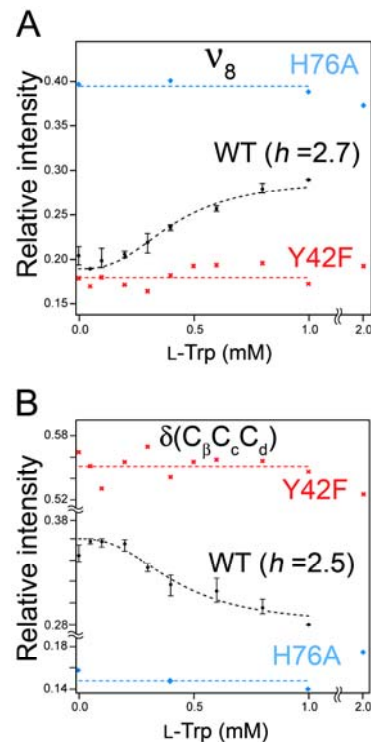


図3 ヒトTDOのL-Trp結合における協同性

(3) 結晶構造解析

① hIDO の構造解析

多数の部位特異的変異体の解析 (Table 1) によって基質阻害を示さないことを見いだした A260G および G262A 変異体は高濃度で

の基質あるいは阻害剤存在下での結晶化に有利に働くことが期待されたので結晶化スクリーニングに用いた。その結果、いずれも阻害剤 4-フェニルイミダゾール結合型の結晶が得られ、それぞれ 2.1、2.6 Å 分解能で構造決定した。一方、基質存在下では結晶は得られたが、X 線回折が確認できなかった。やはり、反応機構を正確に把握するには基質結合型の結晶構造解析が必須であるため、今後は新たな指針で結晶化を試みる必要がある。

また、上記 2 つの変異体に加えて活性中心近傍の残基のうち G261A, S263A, A264V, R231A 変異体の CO 結合型を共鳴ラマン分光法によりヘム周辺の構造解析を行った。詳細は省略するが、その結果は活性部位の残基の中で基質を厳密な位置に結合させる構造形成に必要なのは、意外にも方向族アミノ酸ではなく、ループ領域 (260~264) であることを明らかにした。A260 と G262 は基質阻害に関与している残基であり、R231, A261, A264 は正確な三者複合体を形成に寄与している。S263 はループ領域をヘム近くにとどめておく役割を持ち、基質結合に必要であると考察される。このループ領域は柔軟な構造を持つ事が我々の結晶構造解析からも示唆されている。基質結合によりループが誘導適合することで、特異的な基質の結合およびヘム鉄に結合した酸素分子との適切なアラインメントが可能になると考えられる。

Table 1 変異体の酵素パラメータ

hIDO	K_m (μM)	k_{cat} (min^{-1})	K_i (μM)
WT	20.6 \pm 5.6	198 \pm 19	714 \pm 190
A260G	23.5 \pm 2	139 \pm 2	-
G261A	N.D.	N.D.	N.D.
G262A	26.7 \pm 2	125 \pm 2	-
S263A	N.D.	N.D.	N.D.
A264G	3.8 \pm 0.7	27.8 \pm 0.8	400 \pm 34
A264V	5.7 \pm 1	12.2 \pm 0.1	-

ヘム型二原子酸素添加酵素である IDO の触媒反応ではシトクロム P450 (一原子酸素添加酵素) やペルオキシダーゼとは異なり、

タンパク質残基に依存した酸素分子活性化をなし得るような機構を有しておらず、非ヘム鉄型二原子酸素添加酵素で提案されているような基質分子の活性化機構も存在していない。従って、本研究結果が示すように、三者複合体の形成過程が反応の進行において重要な意味をもつと考える。

② hTDO の結晶化

様々なコンストラクトの精製および結晶化を試みた結果、N 末端の 15 残基を取り除くことにより hTDO の結晶化に成功し、得られた結晶を用いて、SPRing-8 で回折実験を行った。空間群や格子定数を決定することができたが、分解能が低く (7-8Å 程度)、構造解析には至らなかった。

(4) DFT 法による反応中間体生成の検証

これまでに提案されている幾つかの反応スキームの検証を密度汎関数(DFT)法により行った。その結果が示唆する主要な反応経路を図 4 に示す。当初予想されていた基質 N1 原子からのプロトン引き抜きよりも、Fe(II)に結合した酸素のインドール C2 あるいは C3 位への直接電子付加による反応が示唆された。さらに Criegee-type の再配置による反応の進行よりも dioxitane 中間体のほうがエネルギー的に有利であることが示された (文献③)。

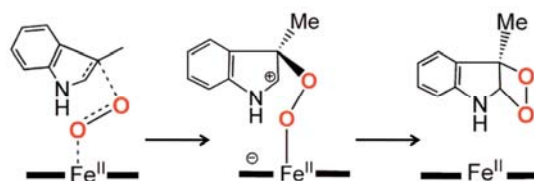


図 4 理論計算が示唆する主要な反応経路

(5) 抗がん剤治療薬候補となる新規 IDO 活性阻害剤の開発 (徳島大学掘均教授および中嶋瞳らと共同研究)

低酸素細胞特異的に細胞毒性を発揮する化学療法剤である TPZ と IDO 阻害剤とのハイブリッド型化合物をデザインし、化学合成を行った。その結果、IDO 阻害活性を示す 4 つの化合物が得られた (Table 2)。これらの化合物のうち、TX2236 (図 6) の阻害定数 K_i が最も小さく、これまでに報告されてい

る阻害剤である 1-methyl-L-Trp と同等の値を示した (文献④)。

Table 2 IDO 阻害活性

Compound	K_i (μ M)
TX-2236	76.3
TX-2235	197
TX-2228	87.1
TX-2234	367
1-methyl-L-Trp	53.2
TPZ	Not inhibited

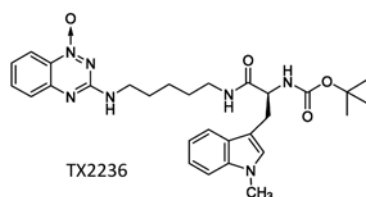


図 6 化合物 TX-2236 の構造

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① Fukumura, E., Sugimoto, H., Misumi, Y., Ogura, T., Shiro, Y. Cooperative binding of L-trp to human tryptophan 2,3-dioxygenase: resonance Raman spectroscopic analysis. *J. Biochem.* **145**, 505-515 (2009) 査読有り
- ② Hayashi, K., Sugimoto, H., Shinkyo, R., Yamada, M., Ikeda, S., Ikushiro, S., Kamakura, M., Shiro, Y., Sakaki, T. Structure-based design of a highly active vitamin D hydroxylase from *Streptomyces griseolus* CYP105A1. *Biochemistry* **47**, 11964-11972 (2008) 査読有り
- ③ Chung, L. W., Li, X., Sugimoto, H., Shiro, Y., Morokuma, K. Density functional theory study on a missing piece in understanding of heme chemistry: the reaction mechanism for indoleamine 2,3-dioxygenase and tryptophan 2,3-dioxygenase. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 12299-12309 (2008) 査読有り
- ④ Nakashima, H., Uto, Y., Nakata, E., Nagasawa, H., Ikkyu, K., Hiraoka, N., Nakashima, K., Sasaki, Y., Sugimoto, H., Shiro, Y., Hashimoto, T., Okamoto, Y., Asakawa, Y., Hori, H. Synthesis and biological activity of 1-methyl-tryptophan-tirapazamine hybrids as

hypoxia-targeting indoleamine 2,3-dioxygenase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* **16**, 8661-8669 (2008) 査読有り

- ⑤ Sugimoto, H., Shinkyo, R., Hayashi, K., Yoneda, S., Yamada, M., Kamakura, M., Ikushiro, S., Shiro, Y., Sakaki, T. Crystal structure of CYP105A1 (P450SU-1) in complex with 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃. *Biochemistry* **47**, 4017-4027 (2008) 査読有り

[学会発表] (計 4 件)

- ① 福村栄維子、三角裕子、杉本宏、永野真吾、瀧尾擴士、井柳堯、小倉尚志、城宜嗣、共鳴ラマン分光法によるトリプトファン 2,3-ジオキシゲナーゼの反応機構解析、日本生物物理学会、2008 年 12 月 3 日、福岡
- ② 福村栄維子、杉本宏、永野真吾、瀧尾擴士、井柳堯、小倉尚志、城宜嗣、ヒト由来 Tryptophan 2,3-dioxygenase の分光学的解析、日本生物物理学会年会、2007 年 12 月 21 日、横浜
- ③ 四ッ谷景子、杉本宏、大槻崇史、佐藤秀明、吉田匡、小倉尚志、城宜嗣、共鳴ラマン分光法によるインドールアミン 2,3-ジオキシゲナーゼの解析、日本生物物理学会年会、2007 年 12 月 21 日、横浜
- ④ 米谷依梨紗、杉本宏、エドワード ヴォッテロ、四ッ谷景子、吉田匡、城宜嗣、ヒト由来 Indoleamine 2,3-dioxygenase の構造に基づいた変異体解析、日本生化学会・日本分子生物学会合同年会、2007 年 12 月 12 日、横浜

[その他]

ホームページ等

- ① RIKEN リサーチハイライト「Missing piece gets a work over」
<http://www.rikenresearch.riken.jp/research/627/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉本 宏 (SUGIMOTO HIROSHI)

独立行政法人理化学研究所・城生体金属科学研究室・専任研究員

研究者番号：90344043