

平成 22 年 6 月 7 日現在

研究種目：	若手研究(B)
研究期間：	2007～2009
課題番号：	19770118
研究課題名(和文)	速度論および構造解析に基づく酵素触媒反応におけるプロトントンネリング機構の解明
研究課題名(英文)	Kinetic and X-ray crystallographic analysis of quantum mechanical hydrogen tunneling in enzyme-catalyzed reaction
研究代表者	
	村川 武志 (Murakawa Takeshi)
	大阪医科大学・医学部・助教
研究者番号：	90445990

研究成果の概要(和文)：プロトントンネリング現象は、プロトン移動を伴う一般の化学反応のみならず、近年では酵素触媒における新しい反応促進機構としても受け入れられつつある。プロトントンネリングは、プロトンが移動する環境の違いにより著しく異なると考えられているが、プロトントンネリングの効率と酵素反応中の環境との関わりについて調べられた例は殆どなく、プロトントンネリングに必要な構造上の要因は不明である。本研究では、土壌細菌由来銅アミン酸化酵素の触媒機構を詳細に解析することにより、酵素触媒反応におけるプロトントンネリングの実態に迫った。

研究成果の概要(英文)：It is becoming widely accepted that the hydrogen tunneling is a general feature of the enzyme-catalyzed reaction at room temperature, especially in the reaction requiring high activation energy such as C-H bond cleavage. We analyzed stereospecific abstraction of substrate α -proton catalyzed by copper amine oxidases from *Arthrobacter globiformis* (AGA0) by transition-state kinetics and X-ray crystallographic analysis. These results provide new finding for enzyme-enhanced hydrogen tunneling.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	900,000	0	900,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,200,000	690,000	3,890,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学，機能生物化学

キーワード：プロトントンネリング，ビルトインキノン補酵素，同位体効果

1. 研究開始当初の背景

原子核の波動性に基づきプロトンがエネルギー障壁をすり抜けて移動するトンネル効果(プロトントンネリング，図1)は、近年では、酵素触媒における新しい反応促進機構としても受け入れられつつある。すなわち、

酵素は一般に遷移状態のエネルギー障壁を低くすることで触媒効果を発揮するが、エネルギー障壁の形状を変化させてプロトンが障壁に侵入しやすくすることによりプロトン移動を促進する機能も有している。

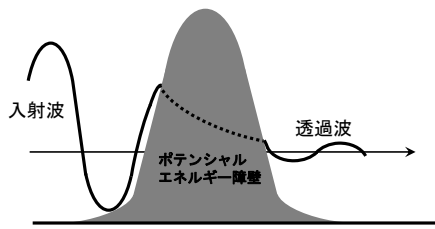


図1 プロトントンネリング現象

酵素科学におけるプロトントンネリングは、1989年にカルフォルニア大学のKlinmanらによる最初の報告以来、さまざまなモデルが提唱されているが、現在、最も支持されていると考えられるモデルが‘Dynamic barrier model’と呼ばれるものである。

Dynamic barrier modelでは周りのタンパク質の動きを‘Passive dynamics’あるいは‘Active dynamics’の2通りの熱振動としてとらえることができるとして、その分類の指標に反応速度定数の重水素・三重水素同位体効果の温度依存性を用いている。Passive dynamicsとは、Reorganizationと呼ばれるタンパク質の熱振動による活性部位環境の微調整によりプロトン移動効率を高めてトンネリングを促進させるものであり、温度が上昇するほどその促進効率は上がり反応速度は上昇するが、同位体効果は温度に依存せず常に一定の値を示す。一方、Active dynamicsはGatingと呼ばれる熱振動によるプロトン移動距離の直接的な減少により反応を進行させるものであり、水素、重水素、三重水素ではそれに必要なエネルギーも温度によって異なる。このためActive dynamicsにおいては、反応速度のみならず同位体効果も温度に依存する。

前述のとおり、プロトントンネリングは、プロトンが移動する環境の微細な違いにより著しく異なると考えられている。しかし、酵素反応中の原子間の環境とプロトントンネリングとの関わりについて調べられた例はほとんどなく、プロトントンネリングに必要な、構造上の要因は不明であった。そこで我々は、土壌細菌 *Arthrobacter globiformis* 由来の銅アミン酸化酵素 (AGAO) について、その反応過程での Asp298 による・位プロトン引き抜き反応 (図2) を詳細に調べた。

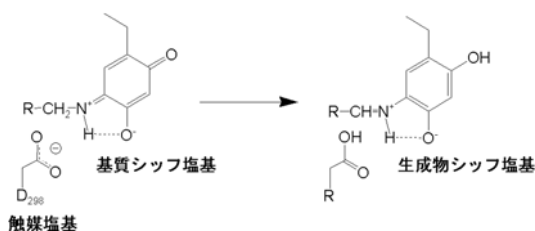


図2 アミン酸化酵素のプロトン引き抜き反応

・位水素を重水素置換した基質を用いてプロトン引き抜き反応の速度解析を行ったところ、チラミンを基質として用いた場合には Passive dynamics, フェニルエチルアミン (PEA) を基質とした場合には Active dynamics によるプロトントンネリングが観察された。PEA とチラミンは反応部位から遠く離れて反応には直接関係しないはず部分のみが異なっており、その部位での酵素-基質相互作用がトンネリングのモードに影響を与えるという結果は今までにないものであり、いくつかの国際会議でも高い注目を集めた。

2. 研究の目的

我々によって行われた、複数の基質を用いた速度論および構造生物学的研究によって、酵素反応中の原子間の環境とプロトントンネリングとの関わりについてのいくつかの新たな知見が得られた。ところが、上記の反応中間体の X 線結晶解析では、基質が PEA でもチラミンでも酵素のプロトン引き抜き残基 Asp298 と基質プロトンとの間の距離には僅かな違いしかなく、酵素-基質相互作用の僅かな違いがどのようにしてプロトントンネリングの様式を異なるものに行っているかということは依然として未解決の問題である。この問題を解決するためには、活性部位の触媒性残基にとどまらず、酵素タンパク質の触媒反応への積極的な関与を解明する必要がある。具体的には、すでに決定された変異体での反応中間体に加え、野生型酵素と構造基質アナログとの複合体構造を決定し、それらを組み合わせ、野生型酵素での精密な反応中間体 (基質 Schiff 塩基, SSB) のモデル化をおこなう。また、・プロトンの引き抜きの立体選択性についても詳細に検討する。さらに、プロトントンネリングについてより厳密にエネルギー論的に取り扱うことを目的とし、幅広い pH 領域での反応速度解析を行い、反応軸、または各中間体のプロトン数軸方向での相対的なエネルギー準位の決定を試みる。以上の知見を併せ、酵素触媒反応におけるプロトントンネリングのメカニズムを解明する。

3. 研究の方法

(1) 基質アナログ複合体の X 線結晶構造解析
銅含有アミン酸化酵素の反応阻害剤であるヒドラジン類は、基質アミンと同様の機構で TPQ に結合するが、基質の C・位に相当する部位に窒素原子を持つため、以降の反応が進行せず安定な複合体を形成する。そこで反応中間体モデルを形成する上での初期構造として、野生型 AGAO・ヒドラジン複合体の X 線結晶構造解析を行う。基質である PEA, チラミン, ベンジルアミンの構造アナログとし

て、それぞれベンジルヒドラジン (BH), 4-ヒドロキシベンジルヒドラジン (4HOH), フェニルヒドラジン (FH) を用いて、それぞれについての複合体の結晶を調製する。調製方法としては、変異体の反応中間体結晶作成時に用いた方法, すなわち酵素のみで結晶化後, ヒドラジン溶液内へ短時間ソーキングを行う方法, もしくは溶液内で反応を十分に行ったのちの結晶化法が考えられる。得られた複合体については, 結晶顕微分光を行いヒドラジン-TPQ 複合体の形成を確認したのち, X線回折データの解析を行う。またストップフロー法により, これらのヒドラジンと AGAO の複合体形成の速度論的解析を行う。さらにこれらのヒドラジンに対応するアミン基質について, 前定常状態の速度解析を行うことにより, 基質選択性についても考察を行う。

(2) プロトンの引き抜きの立体選択性

基質アミンの α -位炭素には2個のプロキラル水素が存在するが, このプロトン引き抜きの立体選択性は酵素の起源や基質ごとに大きく異なる。以前の研究において, 我々は AGAO を含むアミン酸化酵素では, 基質アミンの遠位部分と酵素との結合様式によりプロトン引き抜きの立体選択性が決定されるのではないかと推定した。そこで引き続きこの仮説の正当性を検証するため, PEA やチラミンなど大きな遠位部分をもつ基質, およびエチルアミンなど遠位部分がほとんどない基質それぞれについて, 2 個の α -水素を立体特異的に重水素化し, AGAO による α -水素引き抜きの立体選択性を解析する。さらに野生型酵素の結晶をエチルアミン溶液に短時間ソーキングすることによって, エチルアミンとの反応中間体の構造を決定する。

(3) 広 pH 領域での反応速度解析

プロトントンネリングについてより厳密にエネルギー論的に取り扱うことを目的とし, AGAO を用いて, 幅広い pH 領域での遷移相の反応速度解析を行い, 反応軸, または各中間体のプロトン数軸方向での相対的なエネルギー準位の決定を試みる。

以前の定常状態での速度解析の結果に基づき, pH 5.5~10 の範囲で, PEA を基質とするストップフロー実験を行う。得られたスペクトル変化を global 解析することにより各素過程での速度定数を算出し, これらの値を pH に対してプロットすることにより各素過程に関与する解離基の pK_a を求める。

4. 研究成果

(1) 基質アナログ複合体の X 線結晶構造解析

野生型 AGAO と 3 種類のヒドラジン誘導体, BH, 4HBH, 及び PH を反応させ, AGAO と 3 種類のヒドラジン誘導体との複合体を調製し

た。これらの複合体は以前と同一の方法で結晶化できた。TPQ とヒドラジンの複合体は, SSB に類似したヒドラゾン型, または PSB に類似したアゾ型を形成する可能性がある。回折データより得られた電子密度図 ($F_o - F_c$ omit map) に対して, 両者のモデルをあてはめることにより, 阻害剤複合体がヒドラゾン型であることを明らかにした (図 3)。また, 触媒塩基 Asp298 側鎖カルボキシル基の酸素原子と複合体ヒドラゾンの N2 原子 (基質アミンでの C α に相当する) の距離は, PH は, BH および 4HBH に比べ, 約 2 倍であった (図 4)。ストップフロー法により, これらのヒドラジンと AGAO の複合体形成の速度論的解析を行った結果, いずれの場合も反応が 2 相性を持って進行した。BH および 4HBH の場合には, SSB 形成前の中間体, カルビノールアミン中間体の吸収スペクトルを初めて検出することができた。さらに, これらの阻害剤に対応するアミン基質について, 前定常状態の速度解析を行った結果, プロトン引き抜き過程において, PH に対応するベンジルアミンの速度定数は, BH および 4HBH に対応する PEA およびチラミンに比べ, 約 1/1000 の値を示した。Asp298 はプロトン引き抜き以外にも還元的半反の様々なステップにおいて重要な役割を果たしていることから, ヒドラジン複合体構造における Asp298 の位置は, 対応するアミンの反応性の違いを矛盾なく説明できるように思われた。(現在投稿中)

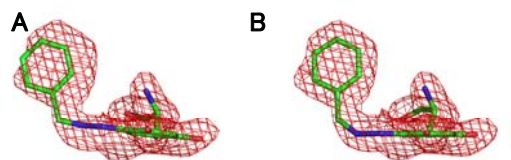


図 3 電子密度と構造モデル(A, ヒドラゾン型, B, アゾ型)

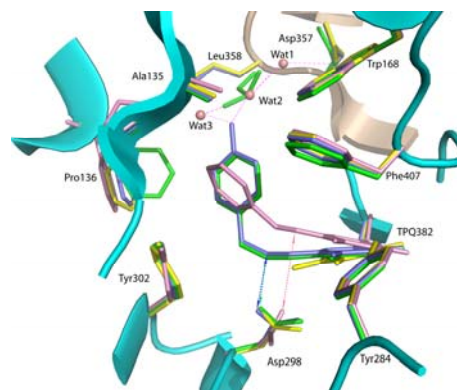


図 4 活性中心の構造モデル(緑: BH 複合体, 青紫: 4HBH 複合体, 赤紫: PH 複合体)

(2) $\cdot\cdot$ プロトンの引き抜きの立体選択性
 PEA やチラミン、ベンジルアミンなど大きな遠位部分をもつ基質、およびエチルアミンなど遠位部分がほとんどない基質それぞれについて、2 個の \cdot 水素を立体特異的に重水素化した。これらの基質を AGAO と反応させ、生成物であるアルデハイドの GC/Mass による解析を行った結果、PEA など大きな遠位部分をもつ基質の反応においては、 \cdot 水素の引き抜きがいずれも 99% 以上の高い立体選択性で *pro-S* 水素特異的に進行するのに対し、エチルアミンでは *pro-S* 水素選択性が 86% にまで大きく低下した。また、得られたエチルアミンとの反応中間体は結晶顕微分光による解析の結果、SSB 中間体であった (図 5)。X 線結晶構造解析では、SSB に相当する部分の電子密度が非常に低く、コンフォメーションが一定でないことが示唆された (図 6)。以上の結果より、アミン酸化酵素による \cdot 水素の引き抜きの立体選択性は SSB のコンフォメーションにより一義的に決定される、という仮説の正当性が確かめられた。

(Biochemistry に掲載)

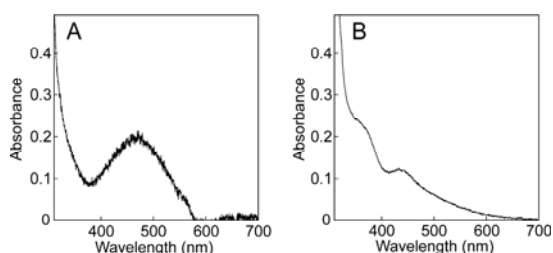


図 5 AGAO 結晶顕微分光 (A: 反応前, B: エチルアミンとの反応中間体)

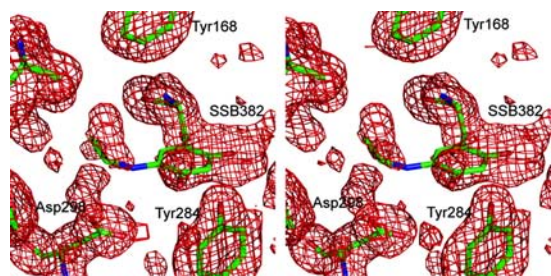


図 6 エチルアミンとの複合体での活性中心の電子密度および構造モデル

(3) 広 pH 領域での反応速度解析

以前の定常状態での速度解析の結果に基づき、pH 5.5~10 の範囲で、PEA を基質とするストップフロー実験を行った。得られたスペクトル変化を global 解析することにより各素過程での速度定数を算出し、これらの値を pH に対してプロットすることにより

各素過程に関与する解離基の pK_a を求めた。さらに結晶中に基質をソーキングすることにより、反応中間体の結晶構造を決定した。速度論、および、結晶構造から得られたデータにより、以前プロトン引き抜きの触媒塩基と同定された Asp 残基が、多くの他の素過程にも関与していることが明らかにされた。現在は、各中間体でのプロトン化状態を推定するとともに、プロトン数における相対的なエネルギー準位の決定を試みている。

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 1 件)

- ① Masayasu Taki, Takeshi Murakawa (equally contributing), Takuya Nakamoto, Mayumi Uchida, Hideyuki Hayashi, Katsuyuki Tanizawa, Yukio Yamamoto and Toshihide Okajima, Further insight into the mechanism of stereoselective proton abstraction by bacterial copper amine oxidase, *Biochemistry*, 査読有, 47 巻, 2008, 7726-7733.

[学会発表] (計 4 件)

- ① Acid-Base Chemistry in the Reductive Half-Reaction of Copper Amine Oxidase from *Arthrobacter globiformis*, Gordon Research Conference, 2010 年 1 月 24-29 日, Ventura (USA)
- ② 速度論および構造解析に基づく酵素触媒反応におけるプロトントンネリング機構の解析, 日本生化学会, 2009 年 10 月 22 日, 神戸.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村川 武志 (Murakawa Takeshi)
 大阪医科大学・医学部・助教
 研究者番号: 90445990