

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：24506

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05698

研究課題名(和文) ストップフロー共鳴ラマン分光法によるヘム含有2原子酸素添加酵素の反応機構研究

研究課題名(英文) Reaction mechanism study of heme containing dioxygenase by stopped-flow resonance Raman spectroscopy

研究代表者

柳澤 幸子 (Yanagisawa, Sachiko)

兵庫県立大学・理学研究科・准教授

研究者番号：60557982

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトインドールアミン2,3ジオキシゲナーゼ1(IDO)はトリプトファン(Trp)に酸素2原子を添加するヘム酵素である。この反応はヘムによる唯一の二原子酸素添加反応である。その一方で、この反応が免疫抑制に関与することから、IDOは癌の免疫療法のターゲットである。しかしながら反応機構全容は不明である。本研究では反応機構解明を目指し、酵素反応の一部始終を分光学的に追跡して反応中間体の構造と状態について調べた。その結果三者複合中間体が二状態存在し、また次のステップに進むためにTrpが高い反応性をもつことの重要性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

IDOは免疫療法のターゲットであり、治療薬としてのIDO阻害剤の探索が盛んに行われている。本研究では、既報の中間体が2状態存在し時間経過に伴って増減する様子を捉え、また、この中間体の安定化の原因を示唆した。中間体が安定に存在することは、活性を低下させる要因であり、阻害剤をデザインする上で有益な情報といえる。同時に、ヘム酵素による唯一の二原子酸素添加反応の反応機構解明の鍵となる、未検出中間体を検出するための実験をデザインする上でも有益な情報である。

研究成果の概要(英文)：Indoleamine 2,3-dioxygenase, which is a heme containing enzyme, incorporates two oxygen atoms into Tryptophan. This reaction is the only dioxygenase reaction catalyzed by heme enzyme. On the other hand, this reaction is involved in immune suppression, and thus IDO is an immunotherapeutic target. However, the reaction mechanism of IDO is not yet fully understood. In this study, we monitored a whole enzymatic reaction by spectroscopy and assigned the structure and state of reaction intermediates to understand the reaction mechanism. As a result, a presence of two different types of ternary complex intermediates and the importance of a high reactivity of Trp are suggested.

研究分野：生物物理学、生物無機化学

キーワード：ヘム酵素 二原子酸素添加酵素 ストップフロー 共鳴ラマン 免疫抑制

### 1. 研究開始当初の背景

ヒトインドールアミン 2,3 ジオキシゲナーゼ 1(IDO)は、Trp 主要代謝経路の最初の反応を触媒するヘム含有 2 原子酸素添加酵素である。体内に取り込んだ Trp の約 95%がこの反応によって代謝される。IDO は誘導酵素として胎盤や癌化した組織で高発現し、‘免疫療法’のターゲットとして阻害剤探索が盛んである。IDO と同様にヘム含有 2 原子酸素添加酵素であるトリプトファン 2,3 ジオキシゲナーゼ(TDO)は肝臓の構成酵素としてこの反応を触媒し、IDO と TDO による Trp への 2 原子酸素添加反応はヘム酵素による唯一の 2 原子酸素添加反応である。酸素を基質とするヘム酵素のうち、酸素還元酵素と 1 原子酸素添加酵素の反応にはプロトンと電子が必要だが、Trp への 2 原子酸素添加反応では収支としてプロトンと電子を必要とせず、この反応はヘム酵素による触媒反応として特異と言える。反応機構研究においては、2006 年に初めて報告された IDO の X 線結晶構造<sup>1</sup>と、2009 年から 2010 年にかけて振動分光法により決定された IDO 反応中間体の配位構造<sup>2,3</sup>に基づき、図 1 に示すような、酸素分子から 1 原子ずつ二回に分けて酸素添加する機構が提案された。ヘム酵素として、酸素化型とフェリルオキシ型 ( $Fe^{4+}=O$ ) による酸素添加反応は極めて異例で、この反応は反応中の基質とタンパク質が作り出す最適な反応場が可能にすると考えられるが、その構造情報はなく、反応機構全容解明には至っていない。阻害剤結合型 IDO の X 線結晶構造は本研究開始当初においても複数報告されており、図 2<sup>4</sup> に示すようにヘムポケットが柔軟でかつ大きいため、阻害剤の取りうる構造が多様であることが見て取れる。このヘムポケットの柔軟性は L-Trp のみならず D-Trp も基質としうる IDO の特徴といえる。また、IDO は基質濃度がある程度以上に上昇すると基質そのものにより活性が阻害されるという、基質阻害の性質があり、フェリルオキシ中間体は基質濃度が高い条件で報告されている。一方の TDO は L-Trp のみを基質とし、基質阻害の性質はなく、フェリルオキシ中間体の報告もなされていない。

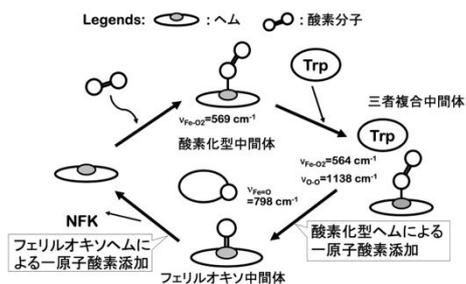


図1 提案されている反応サイクル

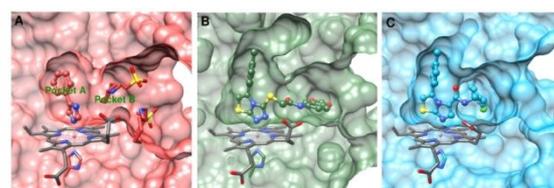


図2 IDOにおける阻害剤結合時のヘムポケット周辺誘導適合の例  
Röhrig et al. JMC, 2015, 58, 9421-9437より

### 2. 研究の目的

ヘム酵素による唯一の 2 原子酸素添加反応を触媒し、かつ、癌治療における免疫療法のターゲットとして注目される IDO の反応機構を明らかにするために、未検出 IDO 反応中間体の検出と、反応中の基質(基質中間生成物)の共鳴ラマンスペクトルの検出を目的とした。

### 3. 研究の方法

ストップフロー法はミキサー部分で基質と酵素を混合して反応を開始し、連続するセル内に試料を留めることにより、ミキサーから観測点までの不感時間を除けば、反応開始から終了までの一部始終がセル内で進行する。この装置に種々の検出手法を組み合わせれば、酵素反応の一部始終を観測可能となる。本研究ではストップフロー法に吸収分光法を組み合わせ、酵素反応生成物の増加と、活性中心ヘムの電子状態の変化を検出し、さらに、可視共鳴ラマン分光法 (RR)を組み合わせ、酵素反応中の IDO の‘ヘム’と‘基質酸素’の構造変化を検出した。本実験装

置の不感時間はおよそ 3 ms でその後数 sec の時間領域を観察した。実験開始当初は、さらに紫外共鳴ラマン分光法を組み合わせることで、'基質 Trp'や'基質中間生成物'と'タンパク質部分'の構造変化を検出することを目標とした。IDO は還元型で活性を持ち、ストップフローのミキサー部分で初めて基質酸素と混合されることで反応を開始する必要がある。そこで、本研究課題遂行期間中において、還元剤を含まない還元型 IDO と基質の混合による酵素反応追跡に十分な嫌気度を保持できる嫌気システムを開発し、試料調製方法を確立した上で、以下の方法で研究を行なった。

研究目的である「未検出反応中間体の検出」をするために、律速段階が変わるような反応条件を検討し、反応の一部始終を追跡した。これまでに報告されている反応中間体は酸素化型中間体、三者複合中間体、フェリルオキソ中間体の 3 種類 ( 図 1 ) であり、中間体を検出するためには中間体が寿命を持つ、すなわち、その中間体のが次の中間体に代わるステップが律速段階であることが必要になる。そこで本研究では律速段階が変わるような溶液条件を検討し各溶液条件で吸収分光法により反応追跡を行い、生成された分子種のスペクトルを抽出可能なグローバルフィッティングにより解析する方法をもちいた。予想されている反応サイクルにおいて基質 Trp と基質酸素間でプロトンのやりとりを伴うと考えられていることから、高い pH 条件で H<sup>+</sup>が減少した場合、重水条件でプロトンが重くなった場合、また、インドール環の C2C3 の開裂には C2-C3 の二重結合性と活性化された酸素との相互作用が必要と考えられていることから、立体配座の観点で悪影響を及ぼさず、かつインドール環の二重結合性を変えるように C5 に置換基を入れた L-Trp の誘導体を用いた。具体的な条件は以下の通り；溶液条件：pH 条件 ( pH 7.4、8.0、8.5、9.0、9.5 ) 重水条件 ( pD 8.1 ) 基質条件：Trp 誘導体 ( L-Trp, 5-OCH<sub>3</sub>-L-Trp, 5-Br-L-Trp, 5-OH-L-Trp, 5-CH<sub>3</sub>-L-Trp )。また、基質阻害の影響を考慮がないように基質 Trp と IDO の濃度を等しくして実験を行った。この解析結果で特徴が見られた反応条件について、405 nm 励起可視共鳴ラマン分光法による反応追跡を行った。可視共鳴ラマン分光法では、基質酸素として <sup>16</sup>O<sub>2</sub> と <sup>18</sup>O<sub>2</sub> の 2 種類の酸素を用い、それぞれの反応追跡時に得られたスペクトルの差スペクトルを計算して酸素同位体差スペクトルを得、反応中間体の配位構造を決定した。

#### 4 . 研究成果

【種々の溶液条件における反応追跡】基質阻害がない条件として酵素濃度と基質濃度を等しくした。また、反応を遅くするためにストップフロー装置に装着した循環水式の恒温装置の温度を 4 度に設定した。上記の方法の欄で述べた溶液条件について、反応開始から 100 ms までは 1 ms 間隔、その後 12 秒までは 100 ms 間隔で 300~600 nm の波長範囲において吸収スペクトルを取得することにより反応を追跡した。時々刻々のスペクトル変化を式 1 から求めた。

$$A(\lambda, t) = A_0(\lambda) - A_1(\lambda) \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau_1}\right) - A_2(\lambda) \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau_2}\right) \dots - A_n(\lambda) \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau_n}\right) \text{ (式 1)}$$

ここで A は吸光度、λ は波長、t は測定開始からの時間、τ は時定数、n は想定する時定数の数である。この解析からスペクトル変化の時定数 ( τ<sub>1</sub>~τ<sub>n</sub> ) と各時定数で起きるスペクトル変化 ( A<sub>n</sub>(λ) を波長順にならべたスペクトル ) が得られる。得られたスペクトルを既報の中間体のスペクトルと比較しスペクトルの帰属を行った。また、時定数を比較して各中間体の寿命を比較した。検討したほぼ全ての条件で還元型から酸素化型中間体、酸素化型中間体から三者複合中間体、三者複合中間体から酸素化型中間体へとスペクトルが変化する様子が検出された。すなわち、基質阻害がない条件下でフェリルオキソ中間体は検出されなかった。また、三者複合体が関与する時間領域にけるスペクトル変化を比較すると、L-Trp およびいくつかの L-Trp 誘導体のスペクトル変化

と 5-Br-L-Trp のスペクトル変化の形状に違いがあったことから、異なるスペクトル種が含まれていることが示唆された。また、5-Br-L-Trp では三者複合体形成が L-Trp に比べて 3 倍速く、Br-NFK の生成は 5~6 倍遅かった。

【新たなスペクトル種の検出】

吸収分光法による反応追跡の結果から L-Trp を基質とした場合と 5-Br-L-Trp を基質とした場合について、三者複合体が関与する時間領域に異なるスペクトル種が含まれることが示唆されたことから、より詳細に反応中間体の構造を調べるために、405 nm 励起可視共鳴ラマン分光法による反応追跡を行った。その結果三者複合体が検出される時間領域において O-O 伸縮振動領域に違いが見出され (図 3) (A) L-Trp では幅広の 1144 cm<sup>-1</sup> のバンドを、(B) 5-Br-L-Trp では幅の狭い 1139 cm<sup>-1</sup> のバンドを検出した。L-Trp を基質にした場合さらに時間分解してより詳細な解析を行なったところ、1145 cm<sup>-1</sup> に O-O 伸縮振動を持つスペクトル種が形成され時間とともに減少し、1138 cm<sup>-1</sup> に O-O 伸縮振動を持つスペクトル種が増加してから減少する様子が検出された (図 4)。ヘム鉄に結合した酸素分子への水素結合の数や強さの違いが酸素分子の O-O 伸縮振動の違いに反映されることが報告されており、水素結合の数が多く強いほど低波数側に検出される。このことから、L-Trp ではまず、ヘム鉄に結合した酸素と L-Trp との水素結合が弱い三者複合体が形成され、その後、水素結合が強い三者複合体が形成されて反応が進むと考えられる (図 5)。後者の三者複合体の減衰と NFK 生成の時定数が一致したこともこの考えを支持する。5-Br-L-Trp では三者複合体形成の時定数が L-Trp に比べて 3 倍速く、三者複合体の減衰と Br-NFK の生成の時定数は L-Trp の場合に比べて 5~6 倍遅かった。すなわち、素早く形成された三者複合体が安定に存在していることが明らかとなった。このことは以下のように説明できる。すなわち、電子吸引基である Br 基の導入により Trp のアミノ基と酸素分子の水素結合が形成しやすくなり、水素結合が強い三者複合体が素早く形成された。しかしながら電子吸引基である Br 基の導入により、酸素分子の開裂に必要な C2-C3 の反応性が L-Trp の場合に比べて下がったために三者複合体が安定に存在した。

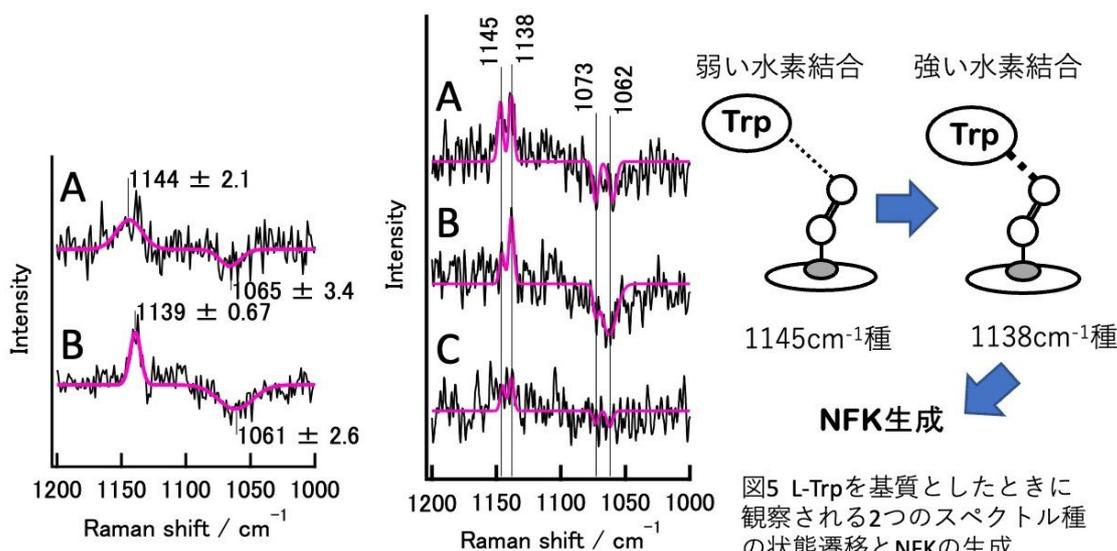


図 3 三者複合体形成時間領域における可視共鳴ラマン<sup>16</sup>O<sub>2</sub>-<sup>18</sup>O<sub>2</sub> 同位体差スペクトル (A) L-Trp を基質とした場合 (B) 5-Br-L-Trp を基質とした場合

図 4 L-Trp を基質とした場合の時間分解可視共鳴ラマン<sup>16</sup>O<sub>2</sub>-<sup>18</sup>O<sub>2</sub> 同位体差スペクトル (A) 30~130 ms (B) 130~230 ms (C) 230~330 ms

図 5 L-Trp を基質としたときに観察される 2 つのスペクトル種の状態遷移と NFK の生成

以上のように、本研究では IDO による L-Trp の反応過程において、三者複合体には2つのスペクトル種、すなわち2状態が存在することを示した。また、基質濃度が十分低い条件下で反応の一部始終を追跡した結果フェリルオキシ中間体を検出しなかった。これらの結果は IDO の反応機構を考える上で重要で新しい情報であり、得られた結果から図6のような反応サイクル

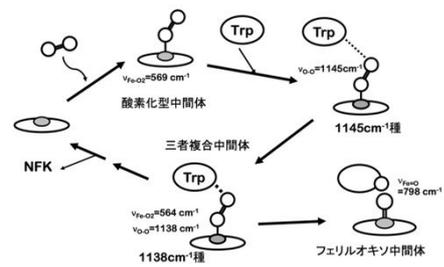


図6 考えられる反応サイクル

ルが提案される。また、三者複合体形成後の酸素分子の開裂のステップに進む上でインドール環の電子状態の重要性が示唆された。これまでも Trp 誘導体を基質とした活性の違いの報告はあった<sup>5</sup>がどのステップに影響を与えるものであるのかを示すものではなかった。その観点からも、本研究で得られた結果は IDO の反応機構の研究のみならず阻害剤をデザインする上でも重要な情報と言える。

#### <引用文献>

1. Sugimoto H. et al. (2006) *Proc Natl Acad Sci USA* 103:2611–2616.
2. Lewis-Ballester A. et al. (2009) *Proc Natl Acad Sci USA* 106:17371-17376
3. Yanagisawa S. et al. (2010) *Chem Lett* 39:36-38
4. Röhring Y. F. et al. (2015) *J Med Chem* 58:9421-9437
5. Southan M. J. et al. (1996) *Med Chem Res.* 343-352

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sachiko Yanagisawa , Kure 'e Kayama , Masayuki Hara , Hiroshi Sugimoto , Yoshitsugu Shiro , Takashi Ogura	4. 巻 117
2. 論文標題 UV Resonance Raman Characterization of a Substrate Bound to Human Indoleamine 2,3-Dioxygenase 1	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biophysical Journal	6. 最初と最後の頁 706-716
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bpj.2019.07.017	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 2件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Sachiko Yanagisawa, Arisa Yamasaki, Tomomi Nakao, Satoru Shimada, Harunobu Shimomura, Takashi Oguraa and Kyoko Shinzawa-Itoh
2. 発表標題 Visible resonance Raman study on respiratory supercomplex from bovine heart mitochondria
3. 学会等名 7th Georgian Bay International Conference on Bioinorganic Chemistry（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sachiko Yanagisawa
2. 発表標題 Ultraviolet resonance Raman characterization of a substrate bound to human indoleamine 2,3-dioxygenase 1
3. 学会等名 Pacifichem 2021（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 河村 味奈、柳澤 幸子、久保 稔
2. 発表標題 Stopped-flow ラマン・吸収同時測定装置の開発とそれを用いた IDO 酵素反応追跡の試み
3. 学会等名 第47回生体分子科学討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 河村 味奈、名定加峰、柳澤 幸子、久保 稔
2. 発表標題 ストップフローラマン・吸収分光計を用いたインドールアミン2,3ジオキシゲナーゼの反応中間体の研究
3. 学会等名 第59回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 城 宜嗣、青野 重利、齋藤 正男監修 柳澤幸子、城 宜嗣共著	4. 発行年 2022年
2. 出版社 エヌ・ティー・エス	5. 総ページ数 117-124
3. 書名 「ヘムタンパク質の科学」第1編第2章第3節「二原子酸素添加酵素」	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------