

平成22年 4月 26日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2008～2009年度

課題番号：20770081

研究課題名(和文) オロチジナーリン酸脱炭酸酵素の反応に伴う構造変化と触媒機構の解析

研究課題名(英文) Investigation of the structural change of orotidine 5'-monophosphate decarboxylase during the reaction and its catalytic mechanism

研究代表者

藤橋 雅宏 (FUJHASHI MASAHIRO)

京都大学・理学研究科・助教

研究者番号：10397581

研究成果の概要(和文)：

オロチジナーリン酸脱炭酸酵素(ODCase)の、6-cyano-UMPをBMPに変換する副反応について、反応進行にともなう基質の構造変化をとらえた。反応中間体構造では、6-cyano-UMPのcyano基はODCaseとの複合体中でピリミジン環平面から大きく屈曲しており、その後ヒドロキシ基に置換されることが明らかになった。他の解析結果も併せて考えると、ODCaseはその反応を触媒する過程で、基質を強く歪めて反応を進行させることがわかった。

研究成果の概要(英文)：

Crystal structures of substrate-product complexes of orotidine 5'-monophosphate decarboxylase (ODCase), obtained at various steps in its catalysis of the unusual transformation of 6-cyano-uridine 5'-monophosphate into barbituric acid ribosyl monophosphate, show that the cyano substituent of the substrate, when bound to the active site, is first bent significantly from the plane of the pyrimidine ring and then replaced by an oxygen atom. The structure together with other observation showed that ODCase distorts the C6 substituent on its substrate during the reaction.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：構造生物学

科研費の分科・細目：生物化学・構造生物化学

キーワード：酵素・触媒反応機構・X線結晶構造解析・基質構造の歪み

1. 研究開始当初の背景

オロチジナーリン酸脱炭酸酵素(ODCase)は、オロチジナーリン酸(OMP)から二酸化炭素を脱離させ、RNAの部品であるウリジン-

リン酸(UMP)を合成する反応を触媒する。この反応は、酵素なしで進行するには数千万年が必要であるが、酵素の存在下では数十ミリ秒で完了する。その反応加速効率は 10^{17} 倍に

及び、世界で最も高効率な酵素の一つとして認知されている(Radzicka, A. *et al.*, *Science* **267** 90-3 (1995))。このような背景から、いくつかの研究グループがその触媒機構の解明に取り組んでいるが、反応中間体の構造を直接観測した例が無いこと、高い分解能で部位特異的変異酵素や基質類似化合物を利用した構造解析例が少ないことなどから、それぞれのグループがそれぞれ異なる反応機構を提案している(Appleby, T.C *et al.*, *PNAS* **97** 2005-10 (2000); Miller, B.G. *et al.*, *PNAS* **97** 2011-6 (2000); Wu N. *et al.*, *PNAS* **97** 2017-22 (2000); Harris P. *et al.*, *Biochemistry* **39** 4217-24 (2000))。本研究では、X線結晶構造解析や反応速度論の解析によって、ODCase の反応触媒機構を明らかにすることを目的としている。

2. 研究の目的

本若手研究(B)開始時点までの研究により、*M. thermoautotrophicum* 由来 ODCase は、通常の触媒反応とは異なる副反応として、6-cyano-UMP を BMP に変換することを明らかにしている (Fujihashi, M. *et al.*, *J Am Chem Soc* **127** 15048-50 (2005))。この反応について、酵素と基質の複合体の構造が時間的に変化していく様子を実験的にとらえる。

この中間体構造の解析に加えて、変異体と基質アナログとの構造解析や、現在得ている高分解能データの取得および分析方法の再検討を通じて、ODCase による 10^{17} 倍にも及ぶ反応の加速メカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

6-cyano-UMP を BMP に変換する副反応(図1)は、完了までに48時間程度と極めてゆっくりと進行するので、反応進行中の酵素の結晶を瞬間凍結することで、中間体構造を直接とらえる。その際、結晶化条件や反応開始から結晶凍結までの時間を詳細に制御して、目的の反応中間体構造を得る。

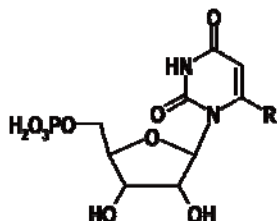


図1: ODCase の基質。ここで述べる副反応では、R = CN の 6-CN-UMP が、R=OH の BMP に変換される

また、Canada, Toronto の University Health Network の Lakshmi P. Kotra 准教授と行った共同研究を継続して行い、彼らが合成した ODCase 阻害剤と ODCase の複合体を構造解析することで、疑似反応中間体構造を解析す

る。この解析には野生型 ODCase だけでなく、活性中心付近の部位特異的変異体も用いて解析する。

さらに、これまでのほとんどの ODCase の構造解析は 1.5\AA 前後の分解能でなされている。我々はこれまでに 1.1\AA 前後の X線回折データを得ているので、この回折データを得るための結晶化条件や、データの分析法の再検討を行って、高分解能での構造解析を行う。

これらの手法で得た情報を統合して、ODCase の反応触媒機構を解明する。

4. 研究成果

オロチジンーリン酸脱炭酸酵素(ODCase)が反応を触媒する際の時系列に沿った構造の変化をとらえ、そこからこの酵素の反応触媒機構を明らかにする目的として、研究に取り組んだ。実験試料としては、*M. thermoautotrophicus* 由来 ODCase を用いた。始めに、この酵素が 6-cyano-UMP を BMP に変換する副反応について、反応進行中の結晶を瞬間凍結することによって、反応進行にもなう基質の構造変化をとらえた。反応中間体構造では、6-cyano-UMP の cyano 基は ODCase との複合体中でピリミジン環平面から大きく屈曲しており、その後ヒドロキシ基に置換されることが明らかになった(図2)。同様の屈曲構造は、ヒト由来 ODCase の活性中心変異体と主反応の基質 OMP の複合体構造などでも観察されており(図3)、ODCase はその反応を触媒する過程で、基質を強く歪めて反応を進行させることがわかった。

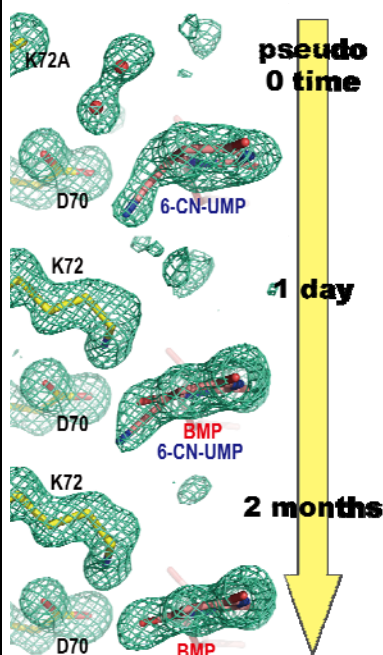


図2: 6-cyano-UMP (6-CN-UMP) が BMP に変換されていく際の構造変化。

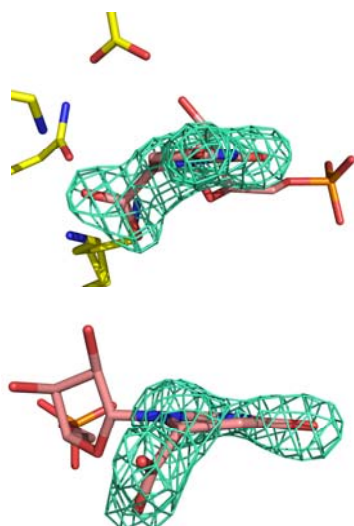


図3: 左: ヒト由来 ODCase D312N 変異体と OMP の複合体構造。右: ヒト由来 ODCase 野生型と 6-acetyl-UMP の複合体構造。どちらの構造でも 6 位の置換基が歪んでいる。

また、活性中心残基の役割を調べるために、D70A や D75N 変異体を用いたところ、K72 のアミノ基が 6-cyano-UMP の cyano 基を置き換え、酵素と基質の間に共有結合が生成することがわかった(図 4)。同様の共有結合は 6-iodo-UMP や 6-azido-UMP と野生型 ODCase の複合体でも生じる。また共有結合を形成する K72 を Ala に置換すると、6-iodo-UMP は BMP に置換される(図 5)。

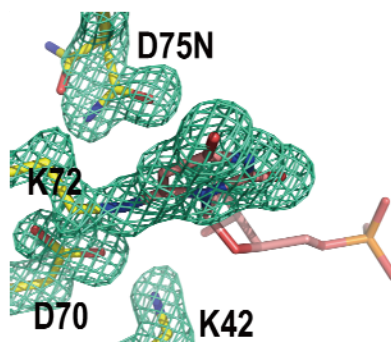
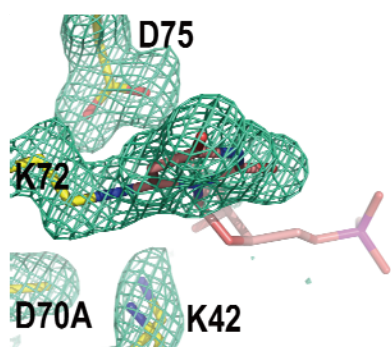


図 4: ODCase D70A 変異体(上段)および、D75N 変異体(下段)と 6-cyano-UMP の複合体構造。K72 と基質の間に共有結合が形成されている。

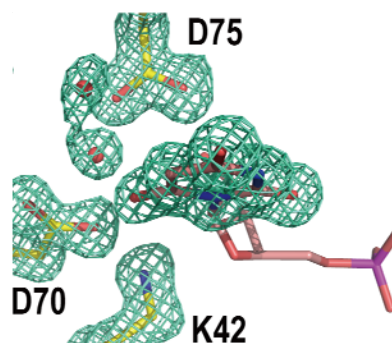


図 5: 左: ODCase K72A 変異体と 6-azido-UMP の複合体構造。6-azido-UMP が BMP に変換されている。

ODCase の主反応は求電子様の反応である脱炭酸反応であるが、本研究で明らかになった cyano 基や iodo 基の変換および共有結合生成反応は、いずれも求核反応である。以上のことから、ODCase は求核・求電子問わず様々な反応を触媒し、いずれの場合においても基質を強く歪めて反応を進行させることがわかった(図 6)。以上の成果は文献 (Fujihashi, M. *et al.*, *J Mol Biol* **387** 1199-1210 (2009)) に発表した。

また、新たな部位特異的変異を ODCase に導入し、その X 線結晶構造解析や反応速度論的解析を行った。さらに、高分解能 X 線結晶構造の精密化を完了させた。これらの情報については、現在分析を行いながら、論文を執筆中である。

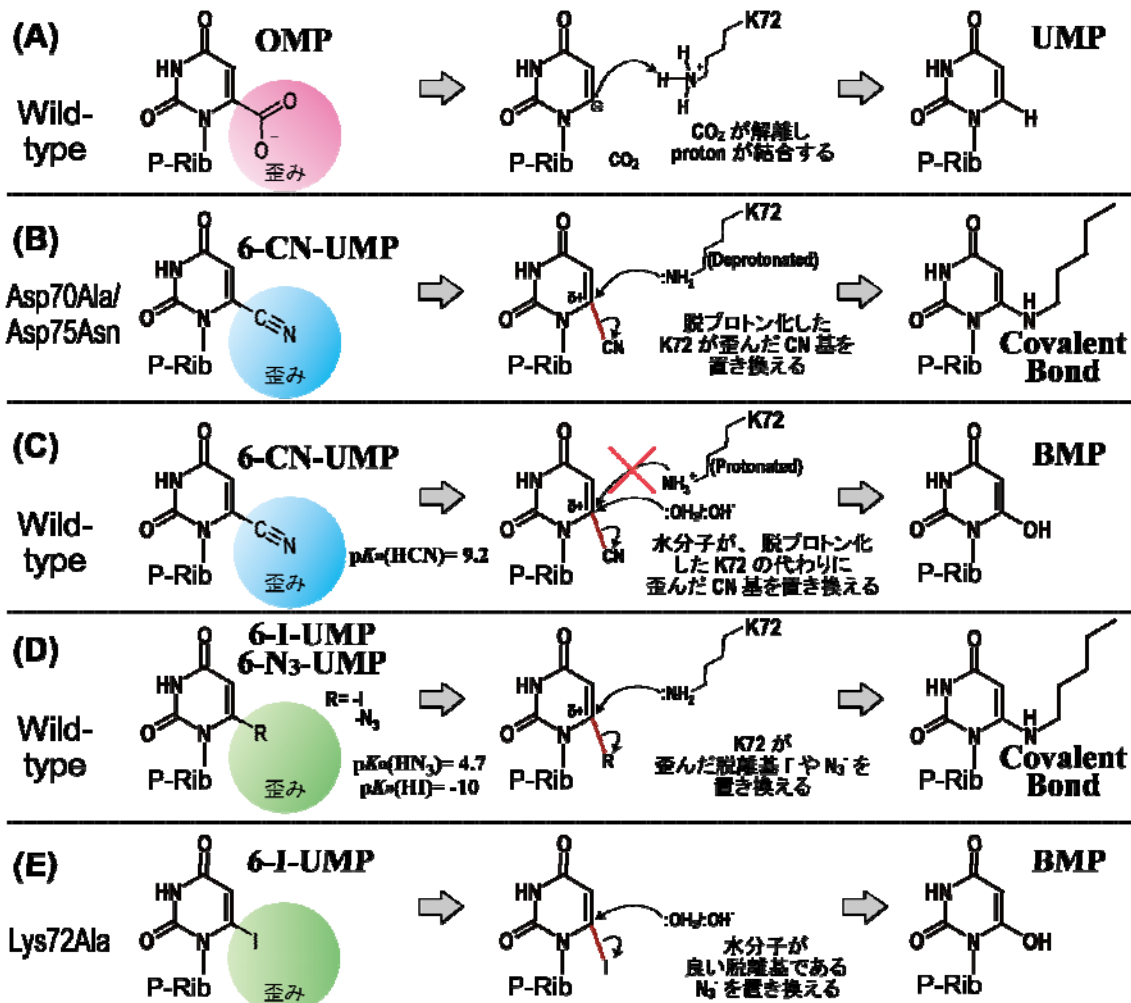


図 6: 本研究から導かれる ODCase が行う様々な反応の機構

5. 主な発表論文等
(研究代表者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

1. Masahiro Fujihashi, Lianhu Wei, Lakshmi P. Kotra, Emil F. Pai, "Structural Characterization of the Molecular Events during a Slow Substrate-Product Transition in Orotidine 5'-Monophosphate Decarboxylase", *J. Mol. Biol.* (査読有り), **387**, 2009, p.1199-1210

[学会発表] (計 6 件)

1. Masahiro Fujihashi, Lianhu Wei, Lakshmi P. Kotra, Emil F. Pai, "Distortion in Substrate-Product Transition in Orotidine 5'-Monophosphate Decarboxylase.", 2009 American Crystallographic Association Meeting, 2009/7/30, Sheraton City Centre Hotel, Toronto

2. 藤橋雅宏, Angelica M. Bello, Lakshmi P. Kotra, and Emil F. Pai, "触媒反応進行中のオロチジン-リン酸脱炭酸酵素の構造", 第 9 回日本蛋白質科学会年会, 2009/5/22, 熊本全日空ホテルニュースカイ

3. Masahiro Fujihashi, Angelica M. Bello, Lakshmi P. Kotra, Emil F. Pai, "Molecular events of a slow substrate-product transition in orotidine 5'-monophosphate decarboxylase", 237th American Chemical Society National Meeting & Exposition, 2009/3/23, Salt Lake City, UT, USA

4. Shingo Kuroda, Masahiro Fujihashi, Lakshmi P. Kotra, Emil F. Pai, Kunio Miki, "Structural investigation of orotidine monophosphate decarboxylase: the role of the catalytic lysine", 日本生物物理学会第 46 回年会, 2008/12/3, 福岡国際会議場・福岡

5. Masahiro Fujihashi, Shingo Kuroda, Lakshmi P. Kotra, Kunio Miki, “Catalytic promiscuity and mechanistic determinants of ODCase – a high-resolution investigation –”, XXI Congress and General Assembly of the International Union of Crystallography, 2008/8/29, Osaka, Japan

6. 藤橋雅宏, 黒田新悟, Angelica M. Bello, Ewa Poduch, Wanda Gillon, Lakshmi P. Kotra, Emil F. Pai, 三木邦夫, “求電子反応・求核反応をともに触媒する、オロチジンーリン酸脱炭酸酵素の反応機構の研究”, 第8回日本蛋白質科学会年会, 2008/6/10, タワーホール船堀・東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤橋 雅宏 (FUJIHASHI MASAHIRO)
京都大学・大学院理学研究科・助教
研究者番号：10397581

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし