

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月1日現在

機関番号：15401
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22550153
 研究課題名（和文） 銅イオン輸送タンパク質として発見したキャディによるチロシナーゼ活性化の分子機構
 研究課題名（英文） A molecular mechanism for copper transportation to tyrosinase that is assisted by a metallochaperone, caddie protein
 研究代表者
 杉山 政則 (Masanori Sugiyama)
 広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・教授
 研究者番号：30106801

研究成果の概要（和文）：

キャディと名付けたタンパク質と複合体を形成したチロシナーゼの結晶に、銅イオンをソーキングすると、チロシナーゼの活性中心に2つの銅イオンが導入された。また、キャディ分子中に2つの銅結合部位が見出され、キャディがチロシナーゼへの銅輸送を担うと考えられた。本研究では、ソーキング時間の異なるチロシナーゼ・キャディ複合体の結晶構造、および、チロシナーゼと銅イオン輸送能力が低下したキャディ変異体との複合体の結晶構造を、高分解能で解析した。その結果、キャディがチロシナーゼの活性中心に銅イオンを輸送する分子機構を明らかにすることができた。

研究成果の概要（英文）：

The Cu(II)-soaked crystal structure of tyrosinase in a complex with a protein, designated “caddie”, which has previously determined by us, displays to possess two copper ions at the catalytic center. We observed two copper-binding sites in the caddie protein, speculating that the copper bound to caddie may be transported to the tyrosinase catalytic center. In the present study, at the 1.16 to 1.58 Å resolution, we determined the crystal structures of tyrosinase complexed with a caddie prepared by altering the soaking time of the copper ion and the structures of tyrosinase complexed with a few mutants of a caddie which displays no or little ability to activate tyrosinase. Based on these structures, we propose a molecular mechanism to transport two copper ions to the tyrosinase catalytic center, which is assisted by a caddie as a metallochaperone.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：構造生物学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：チロシナーゼ, X線結晶構造解析, 銅イオン, 金属シャペロン

1. 研究開始当初の背景

チロシナーゼはメラニン色素合成の律速段階を触媒する酵素である。本酵素はL-チロ

シンをL-ドーパへ変換するモノオキシゲナーゼ反応と、L-ドーパをL-ドーパキノンへ変換するオキシダーゼ反応の両方を触媒する。生

じたドーパキノン、自発的な重合反応にてメラニン色素へと変換されるため、チロシナーゼ活性を阻害すれば、メラニン色素の生成を抑制できる。

チロシナーゼは活性中心に近接した2個の銅イオンを含む酵素であり、ヒトから細菌に至るまで広く分布している。このうち、放線菌由来のものは、キャディと名付けたタンパク質との複合体として合成される。興味深いことに、銅イオンを除去したアポ型チロシナーゼに銅イオンを再添加しても、チロシナーゼは活性型に変換されない。しかしながら、銅イオン非結合型のチロシナーゼ・キャディ複合体に、銅イオンを加えるとチロシナーゼが活性化されることから、キャディは銅イオン輸送を助ける金属シャペロンであると考えられる。また、銅イオン輸送が完了すると、キャディはチロシナーゼから解離し、凝集体を形成する。

本研究グループは、キャディとの複合体として、世界で初めて、チロシナーゼの三次元構造を決定することに成功した (Matoba *et al.*, *J. Biol. Chem.* **281**, 8981-90, 2006)。その結果、チロシナーゼの活性中心にある2つの近接した銅イオン (Cu^{A} と Cu^{B}) のほかに、キャディにも銅イオンが結合していることが示された。キャディ中に見出された2つの銅イオン結合部位のうち、ひとつは分子表面に存在し、もうひとつは分子表面の結合部位と、複合体内部に位置するチロシナーゼの活性中心とを結ぶ経路中に存在している。このため、まず、キャディ分子表面の銅イオン結合部位に銅イオンが結合し、その後、チロシナーゼの活性中心に銅イオンが取り込まれるものと予測される。

2. 研究の目的

本研究では、キャディによるチロシナーゼへの銅イオン輸送、並びに、銅イオン結合型チロシナーゼとキャディの解離について、詳細な分子メカニズムを明らかにすることを目的とした。ここで着目すべきは、チロシナーゼの活性中心における2つの銅イオンが、極めて近接して存在しているという事実である。このため、1つ目の銅イオンを活性中心に導入することは容易であると考えられるものの、静電的な反発に逆らって2つ目の銅イオンを導入するには、精巧な分子メカニズムが要求されると考えられる。また、銅イオン輸送が完了した後に、いかなる分子メカニズムで両タンパク質が分離するのかという点も、構造化学的観点から、興味深い。

これまでの知見として、チロシナーゼ・キャディ複合体の結晶に、銅イオンをおよそ40時間以上ソーキングすると、チロシナーゼの活性中心に2つの銅イオン (Cu^{A} と Cu^{B}) が取り込まれることが判明した。加えて、その

結晶構造中において、キャディにもひとつの銅イオンが結合していた。興味深いことに、ソーキング時間が短いと Cu^{C} の位置に、ソーキング時間が長いと Cu^{D} の位置に結合し、それぞれの結合状態で配位子の配座が異なる (図1)。また、キャディの Tyr⁹⁸ 残基はチロシナーゼの活性中心付近に存在し、活性中心周辺の水素結合ネットワークの形成に関与している。

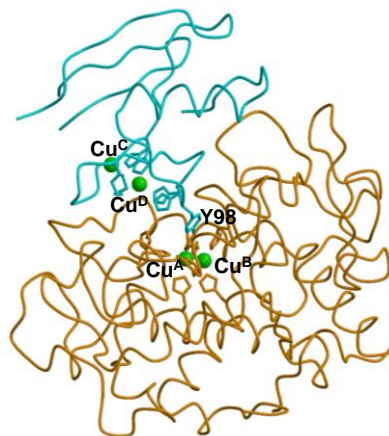


図1. チロシナーゼ・キャディ複合体の全体構造
チロシナーゼおよびキャディは、それぞれ、オレンジおよびシアンで示されている。緑色の球は銅イオンを示す。

そこで、本研究では、野生型複合体を用い、X線結晶構造の経時的解析、質量解析、および、種々の分光学的解析を実施するとともに、部位特異的に変異を導入した変異型複合体を用い、カイネティクス解析とX線結晶構造を実施することで、キャディによるチロシナーゼ活性化機構の全貌解明を目指した。

3. 研究の方法

チロシナーゼ・キャディ複合体の結晶は非常に良質であり、SPring-8を利用すると、最高で1.1 Å分解能程度まで回折する。最初の検討として、結晶に対する銅イオンのソーキング時間を変えて、活性中心の構造がいかに変化するかを追跡した。

また、キャディ中の銅イオン結合部位に関していえば、 Cu^{C} は His⁸², Glu⁶⁷, His⁶⁸ と結合し、 Cu^{D} は His⁸², Met⁸⁴, His⁹⁷ と結合している。 Cu^{C} が結合した状態と、 Cu^{D} が結合した状態では、His⁸², Met⁸⁴, His⁹⁷ の配座が異なる。さらに、活性中心に存在する Cu^{A} の配位子である His⁵⁴ は不安定であり、His⁹⁷ の近くに存在する配座もとりうる。これらの知見を踏まえ、キャディの H82Q, M84L, H97Q, Y98F 変異体を発現するプラスミドを作製し、キャディに変異が導入された複合体を精製した。得られた複合体を用い、溶液中のカイネティクス解析と結晶構造解析を実施した。

また、チロシナーゼは、タンパク質の分子

表面にあるチロシン残基を反応性の高いドーパキノンに変換することにより、タンパク質の凝集を促進するとの報告がある。このため、チロシナーゼへの銅イオン輸送が完了した後、キャディ中のチロシン残基がドーパキノンに変換され、キャディの凝集が促進されるとの仮説が立てられる。ただし、チロシン残基をドーパキノンに変換するためには、チロシナーゼに結合した2価の銅イオンが還元され、さらに、分子状酸素と結びつくことにより、オキシ型チロシナーゼが形成される必要がある。このため、チロシナーゼ・キャディ複合体に、硫酸銅とヒドロキシルアミンを加え、その後の変化を、吸収スペクトルやラマンスペクトルを測定することで、経時的に追跡するとともに、質量分析を行い、翻訳後修飾が起こっているかどうかを調査した。

4. 研究成果

活性中心の結晶構造を詳しく観察すると、銅イオン非結合状態では、His⁵⁴が2つの配座をとり、そのそれぞれで、水分子の構造も異なっていると解釈される(図2)。すなわち、His⁵⁴の側鎖が活性中心の方を向いているとき、Wat⁵とWat⁶が存在し、His⁵⁴がもうひとつの配座をとったとき、Wat⁸が存在している。また、長時間の銅イオンソーキングで得られた銅イオン結合型の構造では、2つの銅イオンの間に、2つの酸素原子が存在し、それぞれWat³およびWat⁸と近い位置に存在している。これらの酸素原子は、2つの銅イオンの間に生じる静電的反発を抑えるための水酸化物イオンであろうと推測できる。また、銅イオンの取り込みに伴い、Wat¹とWat²が消失している。2つの銅イオンを取り込む際に、2つの水分子が消失するのはエントロピーの観点から理にかなっているのかもしれない。

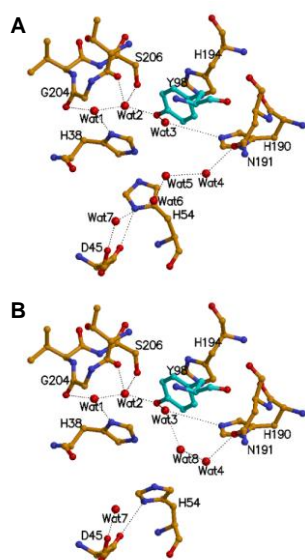


図2. 銅非存在下におけるチロシナーゼ活性中心の2つの構造
A. チロシナーゼHis⁵⁴が活性中心の方を向いている場合
B. チロシナーゼHis⁵⁴が活性中心の方を向いていない場合

まず、ソーキング時間を変えて、活性中心の構造がいかに変化するのかを追跡した(図3)。40時間ソーキング後の構造では、Cu^Aの電子密度が、2つの位置に分裂していた。これは、結晶中において、Cu^Aの結合位置が異なる分子種が混在しているためであると解釈できる。Cu^Bから遠い方をCu^{A-1}、近い方をCu^{A-2}と名付けた。また、Cu^{A-1}、Cu^{A-2}およびCu^Bの含有率の和は1.5程度であった。一方、20時間後の構造では、Cu^{A-2}とCu^Bの位置に電子密度が観察されたが、含有率の和は1以下であった。また、80時間後の構造ではCu^{A-2}とCu^Bの位置に電子密度が観察され、どちらの含有率も1に近づいた。また、時間変化とともに、2つの銅イオンの間にある酸素原子のうち、Wat⁸の電子密度が濃くなり、Wat¹とWat²に対応する密度が薄くなっていた。

これらの結果を踏まえると、20時間後の構造では、活性中心にひとつの銅イオンが取

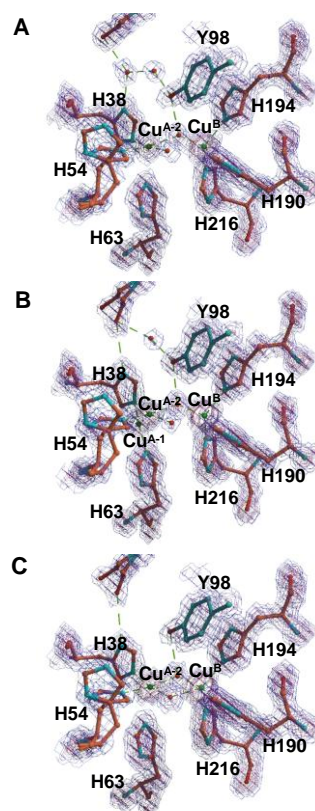


図3. 銅イオンソーキング後の結晶構造の経時変化
A. 20時間後, B. 40時間後, C. 80時間後

り込まれ、Cu^{A-2}もしくはCu^Bの位置に結合していると考えられる。一方、40時間後では、活性中心に2つの銅イオンが取り込まれた分子種の割合も増加する。このとき、ふたつの銅イオンはCu^{A-1}とCu^Bの位置にあり、およそ4.2 Å離れて存在する。さらに、80時間後では、Cu^{A-1}からCu^{A-2}の位置への移動が起こり、ふたつの銅はおよそ3.4 Å離れて存在する。

Cu^{A-1} から Cu^{A-2} の位置への移動は、ふたつの銅イオンの間の水酸化物イオンの数が1つから2つに増加することによって、促進されるものと考えられる。

続いて、変異型複合体を用い、カイネテイクス解析を実施した。興味深いことに H97Q 変異体では、高濃度の銅イオンを添加しても、活性型チロシナーゼが得られなかった。他の変異体に関していえば、銅イオン濃度が高いときの影響は少ないものの、銅イオン濃度が低いと、十分に活性化されなかった。特に、Y98F 変異体では、活性型チロシナーゼへの変換率が、恒に野生型よりも低かった。これは、Y98F 変異体において、活性中心の水分子を含む水素結合ネットワークが破壊され、水分子から水酸化物イオンへの変換が難しくなるのが原因であると考えられた。

変異型複合体の結晶構造解析も実施した。H97Q 変異体では、Cu^B の位置に含有率の低い銅イオンが取り込まれていた。また、Y98F 変異体では、チロシナーゼの His⁵⁴ とキャディの His⁹⁷ の間に、Cu^E と名付けた銅イオンが結合していた (図 4)。前述したように、H97Q 変異体は活性を失っていたが、銅イオン輸送において、Cu^E の位置への結合が必須であると考えられた。

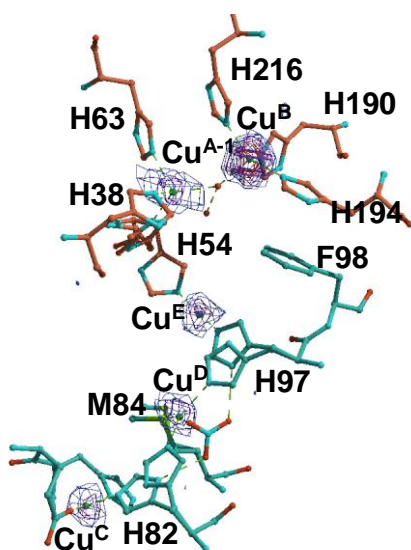


図4. Y98F変異型複合体の銅イオン結合部位

予測される銅イオン輸送機構を以下に示す。まず、1つ目の銅イオンが活性中心へ移動し、Cu^{A-2} もしくは Cu^B の位置に結合する。続いて、2つ目の銅イオンが Cu^C の位置に結合し、Cu^D を経由して Cu^E の位置に移動する。ただし、Cu^E は2つの配位子と結合しているのみであり、その結合状態は安定であるとはいえない。すなわち、Cu^E の位置に結合した2つ目の銅イオンは、Cu^D の方へ戻っていく可能性が高い。続いて、3つ目の銅イオンが Cu^C の位

置に結合する。この3つ目の銅は、Cu^F が Cu^D の方に戻るのを防ぐ役割をすると考えられる。律速段階である二核銅形成の段階では、Cu^C が Cu^D の位置へ移動するのに伴って、Cu^F が Cu^{A-1} の位置に移動する。最終的には、Cu^{A-1} が Cu^{A-2} の位置に移動するとともに、チロシナーゼ His⁵⁴ とキャディ His⁹⁷ の間に2つの水分子 (Wat⁵ と Wat⁶) が入り込み、安定な構造が形成される。

最後に、チロシナーゼ・キャディ複合体に銅イオンと還元剤を添加し、オキシ型チロシナーゼを形成させた後の変化を、吸収スペクトル、ラマンスペクトルおよび質量スペクトルを測定することで解析した。複合体に銅イオンと還元剤を添加すると、オキシ型チロシナーゼに特徴的な 350 nm の吸収ピークが現れた。しかしながら、このピークは時間の経過とともに減少し、400 nm の吸収ピークが顕著となった。質量スペクトル解析からは、チロシナーゼの活性中心に隣接しているキャディの Tyr⁹⁸ 残基が酵素反応を受けることが示された。また、ラマンスペクトル解析からは、350 nm の吸収ピークが $\mu\text{-}\eta^2\text{-}\eta^2\text{-}$ パーオキシ種に由来すること、400 nm の吸収ピークが Cu(II) と結合したドーパセミキノンに由来することが示唆された。これらの知見から、複合体に銅イオンと還元剤を添加すると、キャディの Tyr⁹⁸ 残基が反応性の高いドーパキノンに変換されるため、キャディの凝集が引き起こされると解釈される。

チロシナーゼは、空気中の酸素と結合し、それを還元的に活性化することで、様々な有機化合物を酸化する能力を持つ。この酸化反応は、有機溶媒を用いない水溶液中で進行し、かつ、分子状酸素を酸素源としているため、環境に優しいものとして注目を集めている。チロシナーゼの反応機構解明を目指した研究は、数多く存在するものの、統一した見解は、未だに、得られていない。チロシナーゼ・キャディ複合体の結晶が、高分解能まで回折するという特性を活かし、今後はチロシナーゼの反応機構解明に取り組みたい。

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2件)

1. 的場 康幸, 杉山 政則, 「メラニン生成酵素の三次元構造を美白化粧品開発に活かす」 **COSME TECH JAPAN**, **1** 巻, 査読なし, 2011, pp717-722
2. Matoba Y, Bando N, Oda K, Noda M, Higashikawa F, Kumagai T, Sugiyama M. “A molecular mechanism for copper transportation to tyrosinase that is assisted by a metallochaperone, caddie protein”

Journal of Biological Chemistry, 286, 査読有り, 2011, pp30219-30231

[学会発表] (計4件)

1. 的場 康幸, 坂東 尚彦, 小田 康祐, 野田 正文, 東川 史子, 熊谷 孝則, 杉山 政則, 「キャディーによるチロシナーゼへの銅輸送の分子機構」2012年度(第27回)日本放線菌学会大会, 2012年9月6-7日(府中の森芸術劇場, 東京都府中市)
2. 的場 康幸, 「チロシナーゼの構造化学的研究」(招待講演)兵庫県立大学・理学部セミナー, 2012年7月18日(兵庫県立大学・理学部)
3. 的場 康幸, 「チロシナーゼの三次元構造と酒粕由来のチロシナーゼ阻害剤」(招待講演)未来へのバイオ技術勉強会月例会「美白にまつわるエトセトラ」, 2011年12月13日(バイオインダストリー協会第1会議室, 東京)
4. 的場 康幸, 坂東 尚彦, 小田 康祐, 野田 正文, 東川 史子, 熊谷 孝則, 杉山 政則, 「キャディーによるチロシナーゼへの銅輸送機構」第5回バイオ関連化学シンポジウム, 2011年9月12-14日(つくば国際会議場)

[図書] (計1件)

1. 的場 康幸, 杉山 政則, 「チロシナーゼの三次元構造と酒粕由来のチロシナーゼ阻害剤」**微生物を活用した新世代の有用物質生産技術**(シーエムシー出版)2012年9月初版, pp186-193

[その他]

ホームページ等

<http://home.hiroshima-u.ac.jp/sugil/kenkyu.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

杉山 政則 (Masanori Sugiyama)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・教授

研究者番号：30106801

(2)研究分担者

的場 康幸 (Yasuyuki Matoba)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・准教授

研究者番号：90363051

(3)連携研究者

()

研究者番号：