

## 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 24 年 5 月 23 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22770102

研究課題名（和文） オロチジナーリン酸脱炭酸酵素の基質の歪みを利用した反応触媒機構の解析

研究課題名（英文） Investigation of the reaction mechanism of orotidine monophosphate decarboxylase using the distortion of the substrate

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

研究成果の概要（和文）：

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)をウリジンーリン酸(UMP)に変換する脱炭酸反応を、酵素の非存在下に比べて 10 の 17 乗倍加速する酵素である。この酵素の反応触媒機構を解明するために、いくつかの基質アナログや変異体を用いた解析や、計算機による反応シミュレーションなどを行った。今回の研究とこれまでの知見を統合して、ODCase は一般の酵素反応でよく見られる遷移状態安定化だけでなく、反応基底状態の不安定化も利用して、反応を触媒していることがわかった。

研究成果の概要（英文）：

Orotidine 5'-monophosphate decarboxylase (ODCase) accelerates the decarboxylation of orotidine 5'-monophosphate (OMP) to uridine 5'-monophosphate (UMP) by 17 orders of magnitude. We have determined several crystal structures with ligand analogues and performed computer simulations of the enzyme's short-lived intermediates. The results show that ODCase catalyzes the decarboxylation reaction utilizing both ground state destabilization and transition state stabilization.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：X線結晶解析

## 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) を脱炭酸し、ウリジンーリン酸 (UMP) を生成する酵素である (図 1a 主反応)。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。その反応加速率は 10 の 17 乗倍に及び、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))。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、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 (Topics in Current Chemistry 238, Springer, Berlin (2004))。

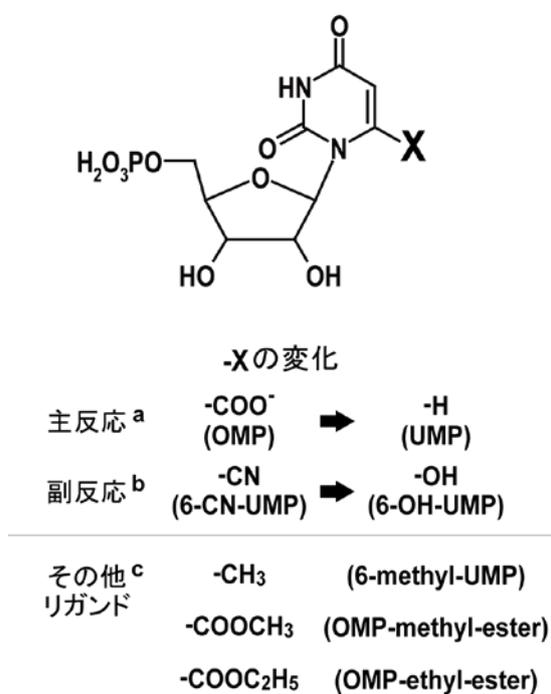


図1: (a) ODCase の触媒する主反応 (b) 逆反応。(c) 本研究で用いた基質

研究代表者は、これまでの研究により、この酵素が OMP の脱炭酸反応に加えて、6-シアノウリジン酸 (6-CN-UMP) を 6-ヒドロキシウリジン酸 (6-OH-UMP) に変換する副反応を触媒することを見いだした (図 1b 副反応, Fujihashi, M. et al., *J Am Chem Soc* **127**, 15048-50 (2005).文献 10)。またこの副反応は数時間かけて進行することを利用して、反応前・反応中・反応後の結晶構造の解析を行った (Fujihashi, M. et al., *J Mol Biol* **387**, 1199-210 (2009))。これにより、基質ピリミジン環の置換基である CN 基が大きく折り曲げられた後に、OH 基に変換されることを明らかにした (図 2)。

一般に酵素の反応触媒機構は、遷移状態をどのように安定化するのかの視点で述べられることが多い。しかしながら ODCase の場合、主反応の脱炭酸反応は求電子置換様の反応であるが、副反応のシアノ基の置換は求核置換反応である。これら二つの反応は ODCase の同一部位で起こることが X 線結晶構造解析により確認されているが (Fujihashi, M. et al., (2009); Poduch, E., Fujihashi, M. et al. *J Med Chem* **49**, 4937-4945 (2006)), 求電子・求核反応双方の遷移状態を同時に安定化する

機構、すなわち同位置の正負両方の電荷を安定化する機構を考えることは難しい。このことから ODCase は反応を触媒するにあたって、一般的によく見られる遷移状態の安定化だけでなく、基底状態の基質構造を歪めて不安定化する機構も使って反応を触媒していると考えられる。

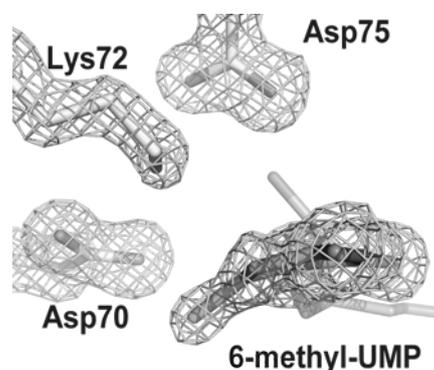


図2: 6-cyano-UMP を 6-hydroxy-UMP に変換しつつある ODCase の活性中心。A は cyano 基、B は hydroxy 基。(Fujihashi, M. et al., *J Mol Biol* **387**, 1199-210 (2009))

この酵素で観察されたような、炭素等の軽原子のみが関係する結合の歪みを直接観測できる酵素は非常に珍しい。加えて、申請者が用いている *M. thermoautotrophicus* 由来 ODCase の結晶は、1.05Å を超えて X 線を回折することを確認している。この分解能はこれまでに報告されている様々な生物種由来の ODCase の中で最も高く、基質の歪みの精密な測定を可能にするものであり、また、化学反応機構を理解する上で不可欠な水素原子位置の同定に必要な分解能に迫るものである。

## 2. 研究の目的

これまでの研究をふまえ、ODCase によって歪んだ基質を含む構造を精密に決定し、その歪みがどのように引き起こされたのか、またどのように速度向上に関わるのかを明らかにする。

## 3. 研究の方法

図1の X に相当する置換基を様々に変化した基質と、高分解能での解析が可能な *M. thermoautotrophicus* 由来 ODCase の複合体の X 線結晶構造解析を行う。解析には活性残基の変異体も使い、それらの残基の基質への歪

みや反応触媒機構への貢献を明らかにする。並行して計算機シミュレーションを行い、基質の歪みを含む反応素過程の解析を行う。

#### 4. 研究成果

始めに予備実験で、methyl 基が折れ曲がることがわかっていた、6-methyl-UMP と野生型 ODCase の複合体構造の構造を、1.59 Å で精密化した。その結果、methyl 基が折れ曲がるだけでなく、pyrimidine 環平面も歪んでいることがわかった。methyl 基の近傍には、活性残基である Asp70 と Lys72 が位置していた(図 3)。

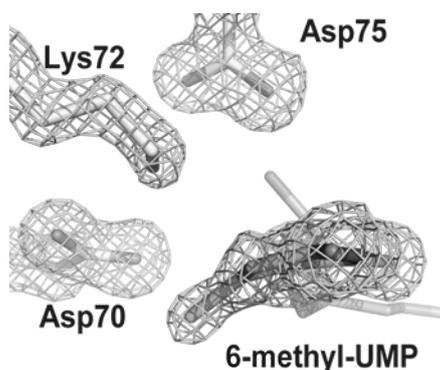


図 3: ODCase に結合した 6-methyl-UMP。methyl 基が pyrimidine 環平面から外れていること、pyrimidine 環の平面性が崩れていることがわかる。

ここで得た 6-methyl-UMP の構造を、これまでに得られている様々な *M. thermoautotrophicus* 由来 ODCase の構造 (Wu, N. *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 2017-22 (2000), Wu, N. *et al.*, *Biochemistry* **41**, 4002-11 (2002), Wu, N. *et al.*, *J. Biol. chem.* **277**, 28080-7 (2002), Fujihashi, M. *et al.*, Poduch, E., *et al.* (2006)) と重ね合わせた。図 4 に示すように、野生型と K72A 変異体で、pyrimidine 環の結合位置に顕著な違いが見いだされた。このことは Lys72 が、基質の歪みに一定の貢献をしていることを示唆している。

次に、より本来の基質に近い化合物である OMP-ester と ODCase の複合体構造の精密化を、1.26-1.69Å 分解能で行った。OMP-ester としては、OMP の carboxyl group に methyl 基および ethyl 基を付加させたものを用いた(図 1c)。解析の結果、OMP の ester group は、pyrimidine 環平面から回転した状態で ODCase に結合していた(図 5)。この回転は、methyl, ethyl どちらの ester でも見られた。また、活性残基の一つである Lys72 を Ala に置

換したときも、ester 基は同様に回転することがわかった(図 6)。

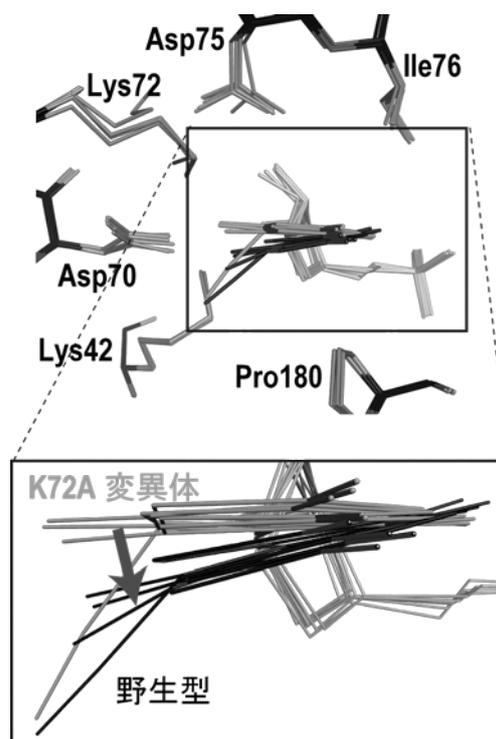


図 4: 野生型 ODCase と K72A 変異体 ODCase に結合した基質の結合位置。Lys72 が Ala に弛緩されることで、基質の結合位置がずれることははっきりとわかる。

この回転について、産業技術総合研究所の石田博士と協力して、計算機シミュレーションを行ったところ、OMP ester 及び OMP の carboxyl 基は、立体的な制約のために pyrimidine 環から回転した状態を好むことがわかった。

また反応が進行する素過程をシミュレーションしたところ、反応が進むにつれ、基質 OMP の carboxyl 基は pyrimidine 環平面から折り曲げられた方向に離れていくという事も示された。さらに、この結合の歪みが大きいほど、酵素-基質複合体中の基質構造が不安定化され、反応進行に有利であることも示された。このことは、6-methyl-UMP や 6-cyano-UMP で示されていた、C6 置換基の歪みが反応に直接関係しているという仮説と矛盾しない。

以上より ODCase は、基質の構造を歪めながら反応を触媒していることが強く示唆される。

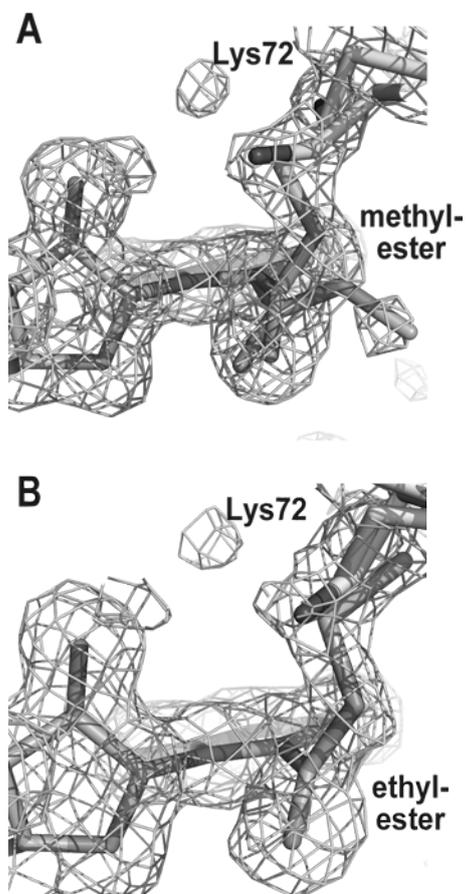


図5: 野生型 ODCase と 6-methyl-UMP (A) , 6-ethyl-UMP (B) との複合体構造。ester が pyrimidine 環平面から回転していることがわかる。

## 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)

[学会発表] (計 1 件)

オロチジンーリン酸脱炭酸酵素の反応における基質の歪みの役割

藤橋 雅宏, 石田 豊和, 黒田 新悟, Emil F Pai, Lakshmi P Kotra, 三木 邦夫

第 11 回日本蛋白質科学会年会  
ホテル阪急エキスポパーク(大阪府)

2011.6.8

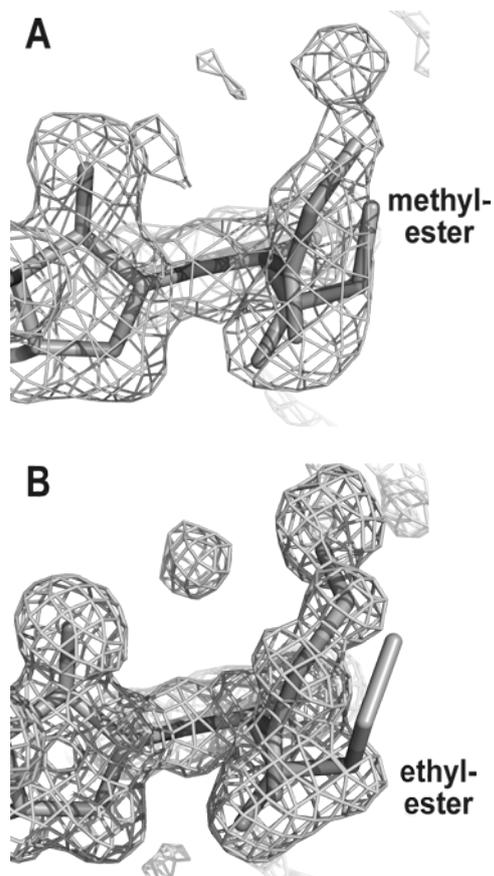


図6: K72A 変異体 ODCase と 6-methyl-UMP (A) , 6-ethyl-UMP (B) との複合体構造。野生型と同様に、ester が pyrimidine 環平面から回転していることがわかる。

## 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

石田豊和 (ISHIDA TOYOKAZU)

産業技術総合研究所・計算科学・研究員

研究者番号：70443166

### (4)研究協力者

Kotra, P. Lakshmi (トロント総合研究所)