

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24570130

研究課題名(和文) 珍しい特徴を有する二つの酵素の立体構造に基づく触媒機構解明とその利用

研究課題名(英文) Elucidation of catalytic mechanism of two characteristic enzymes and its application based on crystal structures.

研究代表者

藤橋 雅宏 (Fujihashi, Masahiro)

京都大学・理学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：10397581

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では2種の酵素の構造と機能の関係を解明し利用することを目指した。第一の酵素ODCaseについては、生成物ウリジン酸との複合体構造(1.03 分解能)をはじめ、約10種類の結晶構造を決定した。分解能1.03 Åは、これまでに解析された200個以上のODCase構造の中で群を抜いて高い。得た構造と生化学的な解析および計算科学的手法を組み合わせ、ODCaseの触媒反応における遷移状態自由エネルギー低下の10-15%は、基質の歪みに由来することを見いだした。もう一つの酵素Cyc2については、アミノ酸配列及び機能が類似した別酵素を対象に、精製及び結晶化に取り組んでいる

研究成果の概要(英文)：This project targeted two enzymes. Regarding the first enzyme ODCase, we determined about 10 crystal structures using various mutants and/or ligands. The best resolution of the determined structures is 1.03 Å, which is much better than those of the over 200 determined ODCase structures thus far. Based on the structures with biochemical and computational analyses, we elucidated that substrate distortion contributes to 10-15% free energy decrease of the transition state by ODCase. Regarding the other enzyme Cyc2, we elucidated the enzyme is not appropriate for the crystallographic analysis. We are now attempt to purify and crystallize a homologous protein from a different organism.

研究分野：構造生物学

キーワード：基質の歪み 脱炭酸反応 結晶構造解析 高分解能結晶構造 計算機シミュレーション 酵素反応機構

1. 研究開始当初の背景

有機化学的には難しい複雑・緻密な化学反応を、酵素は効率よく行うことが出来る。本研究では、他の酵素には無い特徴が見いだされている2つの酵素、オロチジン-リン酸脱炭酸酵素(ODCase)と、Tetraprenyl- β -curcumene Synthase (Cyc2) を対象に、これらの酵素の反応触媒機構を立体構造に基づいて解明することを目指した。

第一の対象酵素 ODCase は、図 1A に示す脱炭酸反応を 10^{23} 倍にも加速する(7800 万年を数十ミリ秒に加速する)酵素であり、反応における $\Delta\Delta G^\ddagger$ の低下が最も大きい酵素として知られている (Radzicka, A. *et al.*, Science (1995)). 代表研究者は、この酵素が求電子様の脱炭酸反応とともに、シアノ基をヒドロキシ基に置換する求核置換反応を、同一の基質結合部位で触媒することを示していた(図 1B, Fujihashi, M. *et al.*, J. Am. Chem. Soc. (2005)). 単一の酵素が、求電子置換様と求核置換様の両方の反応を同一部位で触媒する例は極めて珍しい。代表研究者はこの両反応を触媒する機構として、反応途中の ODCase が基質の反応部位を歪める機構を提案していた(図 2, Fujihashi, M. *et al.*, J. Mol. Biol. (2009)).

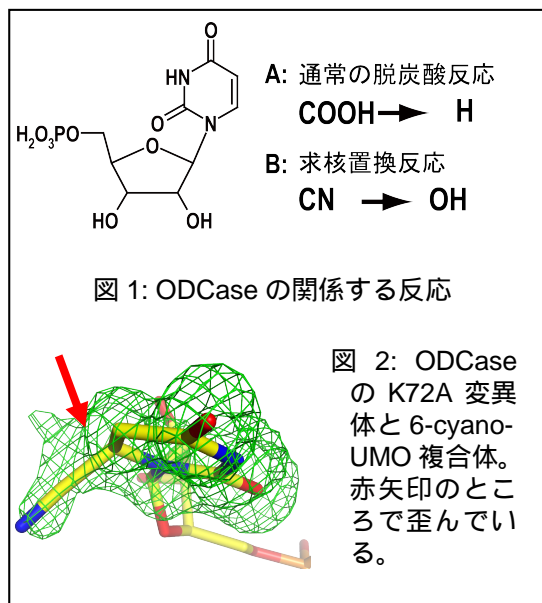
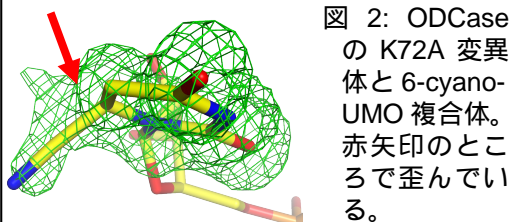


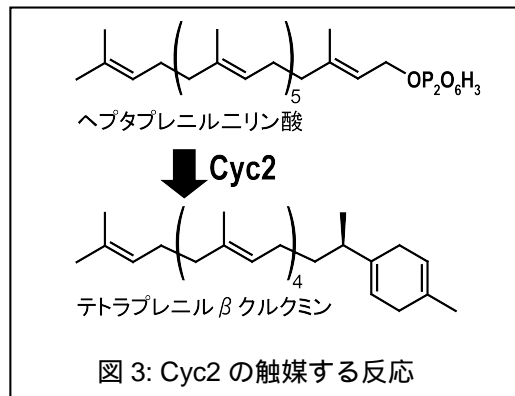
図 1: ODCase の関係する反応



この歪みは、酵素-基質複体の反応基底状態が不安定化されている可能性を示唆する。そのような機構は、従来知られている酵素反応機構とは異なる、新しい概念の反応触媒機構の展開を可能にする可能性がある。しかしながら、そのような反応基底状態を経由しない反応触媒機構も、多数提唱されていた (Topics in Current Chemistry 238, Springer (2004)).

もう一つの対象酵素 Cyc2 は、C35 のヘプタプレニルニリン酸を環化し、テルペノイドの一つであるテトラプレニル β クルクミンを合成する酵素である(図 3)。テルペノイドは自然界に 5 万種以上存在する化合物群で、それ

ぞれが、抗菌活性・香料・ホルモンなど多様な活性を持つ。Cyc2 はこれまでに知られているプレニルニリン酸を基質とするテルペノイド合成酵素が持つモチーフ構造を持たないため、どのような機構で環化反応を触媒しているのかは全くわかっておらず、その解明が強く待たれていた。



2. 研究の目的

第一の対象酵素 ODCase については、分解能の結晶構造解析や生化学的アッセイ、さらには構造を基にした計算機シミュレーションを密に組み合わせることで、その反応機構を明らかにする。これにより、酵素-基質複体の不安定化を利用するメカニズムを証明する。

第二の対象酵素 Cyc2 については、その結晶構造を基質複合体も含めて解明し、部位特異的変異解析などと合わせてその反応触媒機構を明らかにする。続いて得た構造をもとに Cyc2 の結合ポケットに変異を導入することで、Cyc2 に結合する基質のコンフォメーションを変化させ、新しいテルペノイド化合物を創製することを目指す。

3. 研究の方法

ODCase については、対象とする *M. thermobacterium* 由来酵素について、これまでの研究により発現・精製・結晶化の方法を確立している。

本研究では、基質の歪みを可視化するために適すると考えられる、基質アナログと ODCase 複体の結晶構造解析を、出来るだけ高分解能で行う。また必要に応じて、活性残基変異体と基質アナログ等複体の構造解析も行う。平行して、表面プラズモン共鳴などの技術も用いた、生化学的な解析も行う。これにより、残基置換により活性をほぼ消失したような変異体についても、その性質を調べることが出来る。さらに、連携研究者と協力して、計算機シミュレーションにより反応過程のエネルギー収支を定量的に見積もり、各残基ごとの遷移状態安定化や基底状態不安定化における役割を探る。

Cyc2 については、連携研究者によって確立された方法を基にして、試料の発現・精製を

行い、結晶化スクリーニングを行う。結晶が得られれば、シンクロトン放射光施設なども用いながら構造解析を行い、得られた構造と生化学的な解析結果を合わせて、この酵素の反応機構を明らかにする。

4. 研究成果

ODCase については、初年度に生成物 Uridine monophosphate (UMP)との複合体構造を 1.03 Å 分解能で決定した。この分解能は、これまでにタンパク質構造データベース (Protein Data Bank)に登録されている ODCase の 200 個以上の構造の中で、群を抜いて高い。この構造を観察したところ、UMP の pyrimidine 環と活性残基である Lys72 が互いに接触し、UMP の pyrimidine 環は平面構造が崩れていること、Lys72 は double conformation をとっていることを見いだした。また表面プラズモン共鳴法による分析を行い、Lys72 をアラニン残基に置換した K72A 変異体は、UMP との結合力が野生型と比べて 5 桁上昇することを示した。これらの結果は、Lys72 と UMP が互いに斥力を及ぼし合っていることを示す。

ODCase の反応触媒機構に、基質の歪みが利用されている仮説は古くから提唱されてきたが、歪められる置換基を持たない UMP が野生型 OMP と強くは結合しないという実験事実は、この仮説の妥当性に大きな疑念を与えてきた。本研究によりこの疑念は解消され、「基質の歪みを利用した ODCase の反応機構」の解明に、一段と近づいた。この成果は、雑誌論文 としてまとめた。

研究期間 2 年目には、酵素-基質アナログ複合体の構造を 8 つ精密化し、Protein Data Bank に登録した。解析した複合体構造で、6-methyl-UMP はその methyl 基が pyrimidine 環平面から大きく歪んだ構造をしていた。OMP-methyl-ester や OMP-ethyl-ester は、ester がピリミジン環平面から回転していた。

平行して連携研究者と密に連絡を取りながら、計算機シミュレーションを行った。シミュレーションの結果は、ODCase の基質である OMP は、carboxylate 基が pyrimidine 環から回転し、また、平面から歪んだ状態で結合するという構造解析結果と矛盾しなかった。反応のエネルギー過程を見積もったところ、酵素学的アッセイの結果から導かれる ODCase による $\Delta\Delta G^\ddagger$ の低下を非常に良く再現した。計算結果から導かれる歪みの反応への貢献は 10-15%程度であることがわかった。この成果は、雑誌論文 としてまとめた。論文

により、本研究で目指した「ODCase が基質歪みを用いた新しい概念の反応触媒機構」を利用することを、証明できた。

最終年度には、活性中心に存在するアスパラギン酸残基と、基質 OMP の carboxyl 基の間に静電的な反発があるのかを確かめるため、より高分解能での X 線構造解析や中性子線による構造解析を目指した。このため、結

晶格子形成に関わる残基に変異を導入したり、大量の精製試料を得る方法の開発に努めた。研究期間終了後も、継続して研究を行っている。また、雑誌論文 の日本語総説、および の英語総説を執筆した。

Cyc2 については、当初は *Bacillus subtilis* 由来酵素の結晶化及び構造解析を目指してきた。2012 年度の研究により、連携研究者により確立されていた方法で精製した酵素は、不均質な多量体を形成しており、結晶化には適していないことが明らかになった。2013 年度には発現用タグの見直しや精製法の改良を行ったが、性状の改善には成功しなかった。2014 年度には、配列類似の酵素のうち、結晶化に適しているものの検索を行った。その結果、*Bacillus* 属の別の種由来の酵素が比較的性状が良いことがわかった。現在、この酵素の精製と結晶化に取り組んでいる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 4 件)

Fujihashi, M., Mito, K., Pai, Emil F. & Miki, K. Atomic-resolution structure of the orotidine 5'-monophosphate decarboxylase product complex combined with surface plasmon resonance analysis: Implications for the catalytic mechanism, *J. Biol. Chem.*, 査読有原著論文, (2013), **288**, 9011-6
DOI: 10.1074/jbc.M112.427252

Fujihashi, M., Ishida, T., Kuroda, S., Kotra, L.P., Pai, E.F. & Miki, K. Substrate distortion contributes to the catalysis of orotidine 5'-monophosphate decarboxylase, *J. Am. Chem. Soc.* 査読有原著論文, (2013), **135**, 17432-43
DOI: 10.1021/ja408197k

藤橋雅宏, 結晶構造を基にした酵素反応機構の解析 ~オロチジン-リン酸脱炭酸酵素を題材に~, *日本結晶学会誌*, 査読有総説, (2014), **56**, 236-240
https://www.jstage.jst.go.jp/article/jcrsj/56/4/56_236/_pdf

Fujihashi, M., Mnpotra, J.P., Pai, E.F., Kotra, L.P. Orotidine Monophosphate Decarboxylase – A Fascinating Workhorse Enzyme with Therapeutic Potential, *J. Genet. Genomics.*, 査読有総説, (2015), **42**, 221-234
10.1016/j.jgg.2015.04.005

[学会発表](計 5 件)

藤橋雅宏, 石田豊和, 黒田新悟, Emil F Pai, Lakshmi P. Kotra, 三木邦夫, 基質構造の歪みを利用するオロチジン-リン酸脱炭酸酵素の反応機構, 平成 24 年度日本結晶学会年会及び総会, 2012/10/25, 東北大学片

平キャンパス (宮城県仙台市)

藤橋雅宏, 石田豊和, 黒田新悟, 三登一八, Emil F Pai, Lakshmi P. Kotra, 三木邦夫, オロチジナーリン酸脱炭酸酵素の反応触媒機構の解析, 第 13 回日本蛋白質科学会年会, 2013/6/13, とりぎん文化会館 (鳥取県鳥取市)

藤橋雅宏, 石田豊和, 黒田新悟, 三登一八, Emil F Pai, Lakshmi P. Kotra, 三木邦夫, 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機構, 第 14 回日本蛋白質科学会年会, 2014/6/27, ワークピア横浜/横浜産貿ホールマリネリア(神奈川県横浜市)

Masahiro Fujihashi, Toyokazu Ishida, Shingo Kuroda, Kazuya Mito, Lakshmi P. Kotra, Emil F. Pai, Kunio Miki, Substrate distortion in the catalysis of orotidine monophosphate decarboxylase, 23rd Congress and general assembly of the International Union of Crystallography, 2014/8/6, Montreal (Canada)

藤橋雅宏, 石田豊和, 黒田新悟, 三登一八, Emil F Pai, Lakshmi P. Kotra, 三木邦夫, オロチジナーリン酸脱炭酸酵素の反応機構における基質歪みの役割, 平成 26 年度日本結晶学会年会及び総会, 2014/11/1, 東京大学農学部(本郷キャンパス弥生地区)(東京都文京区)

〔図書〕(計 0 件)

なし

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

なし

取得状況(計 0 件)

なし

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤橋雅宏 (FUJHASHI, 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

佐藤努 (SATO, Tsutomu)
新潟大学・農学部・准教授
研究者番号: 80334655

石田豊和 (ISHIDA, Toyokazu)

独立行政法人産業技術総合研究所・ナノシステム研究部門・研究員

研究者番号: 70443166