

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 27 日現在

機関番号：34401  
 研究種目：基盤研究(C) (一般)  
 研究期間：2012～2015  
 課題番号：24570140  
 研究課題名(和文)ピリドキサル酵素の反応特異性制御機構の解明

研究課題名(英文)Reaction specificity of pyridoxal enzymes

## 研究代表者

林 秀行 (Hayashi, Hideyuki)

大阪医科大学・医学部・教授

研究者番号：00183913

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)：トレオニン合成酵素(TS)の反応機構を詳細に解析した。TSと基質O-ホスホホモセリン(OPHS)との反応で生成するリン酸イオンが活性部位に留まり、反応中間体のヒドロキシ基と水素結合を行うことで、副反応である $\gamma$ -アミノクロトン酸の遊離よりも主反応のL-トレオニン生成を特異的に促進するという、生成物支援触媒の本体を解明した。また、このリン酸イオンおよびその前駆体であるOPHSの中のリン酸エステルは重要な触媒基であるLys61の位置を調節するなどにより、TSの考えられる様々な副反応を抑制しているという、基質支援・生成物支援触媒によって反応特異性が生み出されている機構を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The reaction mechanism of threonine synthase (TS) was studied. The phosphate ion released from the reaction of TS with its substrate O-phosphohomoserine (OPHS) remains at the active site and forms a hydrogen bond with the hydroxy group of the reaction intermediates at the active site, thereby lowering the transition states of the pathway leading to the formation of L-threonine (normal reaction) rather than that of the release of  $\gamma$ -aminoacrylate (main side reaction). This phosphate ion and its precursor, the phospho group of OPHS, were found to interact strongly with the principal catalytic group Lys61, and by controlling the position of the side chain of Lys61, suppress various side reactions which are expected from the versatile catalytic ability of the coenzyme pyridoxal 5'-phosphate. These results revealed the unique mechanism of TS in which the reaction specificity is brought about by substrate-assisted and product-assisted catalysis.

研究分野：生物物理化学

キーワード：酵素反応機構 ピリドキサルリン酸 反応速度論 遷移相速度論 反応中間体 反応特異性 基質支援触媒 生成物支援触媒

### 1. 研究開始当初の背景

酵素の反応特異性、とりわけプロトン移動の特異性については、活性部位に配置された触媒基群の  $pK_a$  が反応の進行に応じて個々に適切に調節され、プロトンの選択的な移動を可能にしているためであると説明されている。しかしながら、どのようにしてそのように都合のよい  $pK_a$  の空間的・時間的な制御が可能になっているかという本質的なところについては、ほとんどわかっていないのが実情である。

このような問題の原因の一つは例えばプロトン移動のような酵素反応の本質的な部分を真の意味で熱力学的に解析して来なかったのが原因である。申請者は、プロトン移動の過程を熱力学的に評価するために、従来の反応座標とエネルギー準位の座標に加えてプロトン数を座標とする三次元エネルギー準位図を提出した。

これに加えて、最近申請者らは生成物支援触媒が反応特異性を支配することを見出した。トレオニン合成酵素 (TS) はピリドキサル 5'-リン酸 (PLP) を補酵素とする酵素の考えられる反応中間体をすべて経由するというきわめて複雑な反応機構を持つ。TS の反応の後半部分を詳細に解析したところ、基質 O-ホスホホモセリン (OPHS) との反応で生じたリン酸イオンが活性部位にとどまり、 $\alpha$ -アミノクロトン酸中間体への水分子の付加の塩基触媒として機能することで副反応である  $\alpha$ -ケト酪酸生成を抑えていることを発見した。このように複雑な反応機構においては活性部位残基だけでは不十分で生成物を触媒に利用しているということの発見は、酵素反応特異性の問題の研究にさらに新しい視点を提供した。

### 2. 研究の目的

酵素は反応加速という触媒としての基本的な能力に加え、単純な触媒にはない基質特異性と反応特異性を有している。最近の種々の解析方法の進歩により、反応加速すなわち活性化エネルギーの低減の機構や特異的な基質認識機構の詳細が次第に明らかになってきている。その一方で、反応特異性の機構、すなわち酵素がいかに副反応の進行を抑え、特異的な反応を可能にしているかということについてはまだ十分に解明されていない。本研究はその機構を、プロトン移動過程を分光学的に取り扱うのに適し、かつ多様な反応を制御しているピリドキサル酵素について明らかにしようとするものである。

### 3. 研究の方法

本研究計画では TS の反応過程において副反応の進行を抑制し、正常反応を進行させるような、残基・基質・中間体・補酵素間相互作用と、それらによって生まれる駆動力の実体を明らかにすることを目指す。その具体的な方法論は以下の通りである。

#### (1) 速度論的解析

種々の基質・基質アナログと TS の反応の遷移相速度論的解析を種々の pH において行い、プロトン移動を中心とした TS の反応の素過程を詳細に解析する。

#### (2) X 線結晶解析

(1) で見出された各中間体の構造を X 線結晶解析によって明らかにする。

#### (3) 変異体解析

中間体の構造にもとづき、副反応ルートを見出し、それらのルートに対するエネルギー障壁を形作る構造を部位特異的な変異、基質・生成物アナログを用いた解析により検証する。

#### (4) 理論化学的解析

量子力学 / 分子力学混合法 (QM/MM 法) を中心とする量子化学的計算によって主反応経路と副反応経路を解析し、(3) で見出された構造的要因が特異的な反応を可能にする理論的根拠を明らかにし、(1) ~ (3) と合わせて TS の反応特異性の全体像を明らかにする。

### 4. 研究成果

#### (1) 速度論的解析

ピリドキサル酵素の中で最も複雑な反応機構を有する TS は様々な副反応を起こす可能性があるが、まず、最も主要な副反応の分岐点である L- $\alpha$ -アミノクロトン酸-PLP シッフ塩基 (AC) からの正反応と副反応の詳細な解析を行った。生成物の L-トレオニンから AC を経て副反応性生物である  $\alpha$ -ケト酪酸が生成する過程のストップフロー分光法による解析を広 pH 領域で行ったところ、AC への水分子の付加の過程が pH 依存性を示すことが判明し、この段階における生成物リン酸イオンによる生成物支援触媒を支持する結果が得られた。すなわち、リン酸イオンが 1 つだけプロトン化した  $HPO_4^{2-}$  の状態が触媒を發揮する形であることが示唆された。

また、L-トレオニンの TS への結合は大きな pH 依存性を示し、L-トレオニンの  $\alpha$ -アミノ基が脱プロトン化し、 $\alpha$ -カルボキシル基が解離した構造が TS との productive binding を起こすことが判明した。これは最終反応中間体である L-トレオニンと PLP のシッフ塩基が Lys61 のアミノ基の求核攻撃を受けてアルジミン (シッフ塩基) 交換反応を起こし、 $\alpha$ -アミノ基が脱プロトン化した L-トレオニンが脱離するというメカニズムと一致する。

引き続き、AC 中間体に至る直前までの反応前半部の速度論的解析を行った。正常基質 OPHS と TS の反応では反応が最後まで進行するために解析が複雑になることが予想される。そこで、OPHS のエステル酸素を炭素で置換することにより、リン酸イオンが脱離できないためにエナミン中間体の所で反応が停止するような 2-アミノホスホペンタン酸 (AP5) を合成し、これと TS との反応を詳細に解析した。その結果、L-トレオニン

との反応と同様, AP5 は  $\alpha$ -アミノ基が脱プロトン化し,  $\alpha$ -カルボキシル基が解離した構造が TS との productive binding を起こすことが判明した. このことは PLP 酵素の代表例であるアスパラギン酸アミノ基転移酵素をはじめ, いくつかの酵素で示されている, 中性で主たる分子種である  $\alpha$ -アミノ基がプロトン化した基質アミノ酸を取り込み, その後で脱プロトン化した PLP-Lys シッフ塩基がプロトン化した  $\alpha$ -アミノ基のプロトンを奪う機構が TS では働かず, TS においては中性において主ではない  $\alpha$ -アミノ基が脱プロトン化した基質アミノ酸を取り込むという方式を取っていることがわかる. このことは UV/Vis 吸収スペクトルから分かるように TS の PLP-Lys61 が常時プロトン化していることと整合性が取れている (学会発表).

TS と AP5 が結合してミハエリス複合体を経た後, PLP-Lys61 シッフ塩基とアルジミン交換反応を起こし, PLP と AP5 の外アルジミン複合体が生じ, 続いて AP5 の  $\alpha$ -炭素における脱プロトン化による明瞭なカルボアニオン (キノノイド) 中間体の生成が起こり, 引き続いてケチミン/エナミン中間体が生成するという反応素過程が明らかになった. 興味深いことに, カルボアニオン中間体は一旦, 最初の外アルジミンとは別の種の外アルジミンと速やかな平衡に達した後, それよりも緩やかな速度でケチミン/エナミン中間体に変換することがわかった. この過程をさらに詳細に解析するため, 広い pH 領域での遷移相速度論的解析を行った. その結果, pH 6~8 の領域においてはこの2つの外アルジミン中間体-カルボアニオン中間体-ケチミン/エナミン中間体の相互変換の速度論的パラメータには著変がなく, これら中間体のプロトン化状態が pH にかかわりなく一定であることが示された (学会発表).

X 線構造解析の結果と照らし合わせて検討すると, カルボアニオン中間体にプロトンを与えて第2のカルボアニオン中間体を生成している解離基として最も考えられるのは AP5 のホスホノ基であった. このホスホノ基が  $\alpha$ -炭素の近傍にあるとすると, Lys61 の  $\epsilon$ -アミノ基との相互作用が考えられる. そして, これらの解離基を含む中間体構造が溶媒 pH の影響を受けないことは, これらの解離基が強い相互作用をして, 一定のプロトン化状態を作り出していることを示している.

このことの意義については, AP5 のホスホノ基 (正常基質であればリン酸基) が Lys61 の  $\epsilon$ -アミノ基のプロトン化状態を一定に保つ役割, すなわち, Lys の  $\epsilon$ -アミノ基は  $pK_a = 10.5$  のためプロトン化されやすいのをリン酸基との相互作用によって脱プロトン化された構造を増加させ, 基質  $\alpha$ -炭素における脱プロトン化を促進している役割が考えられる.

AP5 のホスホノ基は AC 中間体において存在する, 生成物支援触媒の本体であるリン酸

イオンと完全に同一の位置に結合しており, このことから, このリン酸イオンと Lys61 の  $\epsilon$ -アミノ基の相互作用, すなわち, リン酸イオンは Lys61 の  $\epsilon$ -アミノ基の脱プロトン化にもかかわっていることが期待される.

また, ケチミンからの副反応であるアミノ基転移反応は  $\alpha$ -炭素への水分子の求核攻撃によって引き起こされるが, これにおいては Lys61 の  $\epsilon$ -アミノ基が塩基触媒として作用することが考えられる. したがって, OPHS のリン酸基と Lys61 の  $\epsilon$ -アミノ基の強い相互作用は Lys61 の  $\epsilon$ -アミノ基と基質 (=OPHS) の位置的關係を制御し, このような Lys61 の  $\epsilon$ -アミノ基の副反応促進の働きを食い止める働きが期待される.

## (2) X 線結晶解析および変異体解析

生成物支援触媒であるリン酸イオンが TS の反応特異性を支配する重要な因子であることが判明したので, そのリン酸イオンを支えている Thr88, Asn154, Ser155, Arg160, Asn188 を Ala に置換した変異体を作成し, その X 線解析と触媒反応を調べた. その結果, Arg160 の変異体のみ活性を完全に消失していたが, 活性部位にはリン酸イオンを保持していた. ただし, リン酸イオンの位置は他の変異酵素に比べて大きくずれており, このことから Arg160 がリン酸イオンが触媒作用を発揮するための位置を決める最重要の構造因子であることが判明した. 次に, Asn154 は他の変異酵素と構造的な顕著な差は見られなかったが, OPHS からの L-トレオニンの生成の特異性は 41% に低下し, 59% が副反応である  $\alpha$ -ケト酪酸の生成へと向かっていた (学会発表). この構造論的原因については現在のところ不明であり, 静的な X 線結晶解析では検知できない動的な要因が考えられ, 現在, 分子動力学を用いた解析を行っているところである.

## (3) 理論化学的解析

AC 以降の正反応と副反応をリン酸イオンが制御し, 正反応を特異的に進めるメカニズムについて理論化学的解析を行った.

QM/MM 法)を用いたリアリステックな酵素・基質複合体モデルで高精度理論解析を行った. 中間体のプロトン化状態や水素結合ネットワークの組換えの考えられる全ての可能性について網羅的な理論探索を行い, 最も可能性の高い反応経路を決定した. その結果, エネルギープロファイルと UV-Vis スペクトルを完全に再現したのみならず, 実験的に求められなかったシッフ塩基交換過程の中間体と遷移状態を求める事に成功した.

得られた反応経路では, 速度論的解析から予想されたように, リン酸イオンは  $\text{HPO}_4^{2-}$  の状態で触媒となり, その触媒としての本体は, AC への水分子の付加のあと, Lys61 の  $\epsilon$ -アミノ基から  $\alpha$ -炭素にプロトンが移動する際にリン酸イオンの OH が AC に付加して生

じたヒドロキシ基の酸素に水素結合し、 $\alpha$ -炭素を Lys61 の  $\epsilon$ -アミノ基に引き寄せてプロトン化を容易にすること、また、この水素結合は L-トレオニン生成のアルジミン転移反応の遷移状態をも安定化しており、副反応である  $\alpha$ -アミノアクリル酸生成のアルジミン転移反応はこの水素結合を欠いているために遷移状態が相対的に不安定になっていることが判明した。以前に明らかにした、この生成物支援触媒のリン酸イオンは硫酸イオンで代替できないことは、硫酸イオンの  $pK_a$  が低く、酵素が働く pH でプロトン化されないためにリン酸イオンで形成されたような水素結合が形成されないためであることが説明された(論文発表)。

以上のようにして、反応分岐点である AC 以降の正反応と副反応について理論的に考えられる詳細な機構を提示した。

#### 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 1 件)

Shoji, M., Hanaoka, K., Ujiie, Y., Tanaka, W., Kondo, D., Umeda, H., Kamoshida, Y., Kayanuma, M., Kamiya, K., Shiraiishi, K., Machida, Y., Murakawa, T., and Hayashi, H. A QM/MM Study of the L-Threonine Formation Reaction of Threonine Synthase: Implications into the Mechanism of the Reaction Specificity. *J. Am. Chem. Soc.* 査読有, 2014, 136, 4525–4533.

[学会発表](計 8 件)

庄司光男, 氏家謙, 栢沼愛, 重田育照, 村川武志, 林秀行. トレオニン合成酵素における生成物支援触媒機構についての理論的解明. 第 53 回日本生物物理学会年会. 2015-09-14, 金沢.

Mitsuo Shoji, Yuzuru Ujiie, Ryuhei Harada, Megumi Kayanuma, Yasuteru Shigeta, Takeshi Murakawa, Hideyuki Hayashi. Molecular dynamics study on the key catalytic intermediates of threonine synthase, The 29th Annual Symposium of the Protein Society. 2015-07-22, Barcelona, Spain.

林秀行, 村川武志, 庄司光男. トレオニン合成酵素の触媒過程前半部分の解析. 日本化学会第 95 春季年会. 2015-03-28, 船橋.

町田康博, 村川武志, 庄司光男, 林秀行. トレオニン合成酵素の触媒反応前半部分の反応機構解析. 第 61 回日本生化学会近畿支部例会, 2014-05-17, 京都.

庄司光男, 氏家謙, 田中弥, 栢沼愛, 梅田宏明, 町田康博, 村川武志, 林秀行. トレオニン合成酵素の反応機構についての理論的研究: 反応特異性決定過程の解明. 日本化学会第 94 春季年会, 2014-03-29, 名古屋.

庄司光男, 花岡恭平, 氏家謙, 田中弥, 梅田宏明, 栢沼愛, 神谷克政, 白石賢二, 町田康博, 村川武志, 林秀行. トレオニン合成酵素における反応特異性決定過程の理論解明. 第 13 回日本蛋白質科学会年会, 2013-06-13, 鳥取.

庄司光男, 花岡恭平, 氏家謙, 田中弥, 栢沼愛, 梅田宏明, 町田康博, 村川武志, 林秀行. トレオニン合成酵素におけるリン酸脱離以降の反応経路についての理論的検証. 日本農芸化学会 2013 年度大会, 2013-03-24, 仙台.

町田康博, 村川武志, 庄司光男, 林秀行. トレオニン合成酵素の触媒性リン酸イオン結合残基の役割. 第 85 回日本生化学会大会. 2012-12-16, 福岡.

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

林 秀行 (Hayashi Hideyuki)

大阪医科大学・医学部・教授

研究者番号: 00183913

(2) 研究分担者

村川 武志 (Murakawa Takeshi)

大阪医科大学・医学部・助教

研究者番号: 90445990

(3) 連携研究者

庄司 光男 (Shoji Mitsuo)

筑波大学・数理物質科学研究科・助教

研究者番号: 00593550