

## 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：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24655051

研究課題名(和文) ビタミンB12およびF430含有メチル基転位酵素の実践的機能モデル構築

研究課題名(英文) Functional Model of Vitamin B12 and F430-dependent Enzymes

研究代表者

林 高史 (Hayashi, Takashi)

大阪大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：20222226

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、メチオニン合成酵素の作用機序解明のため、精密なモデル構築を行った。具体的にはメチオニン合成の活性中心であるコバラミン補因子を非天然の簡単なコリンコバルト錯体に置き換えて、アポミオグロビンに挿入した再構成タンパク質を調製した。得られたコバルト錯体を含むタンパク質は、Co(II)種を安定化し、さらにタンパク質内でコバルト-メチル錯体の形成および、遠位ヒスチジンへのメチル基転移反応の進行を引き起こすことを確認した。特に、タンパク質内でCo(II)種の結晶構造を初めて明らかにし、これまで予測されていたとおりCo(II)種構造が軸配位子が離脱した4配位の構造で存在していることを示した。

研究成果の概要(英文)：Methionine synthase is responsible for the methylation of homocysteine to yield methionine. Our group has recently prepared an enzyme model using a unique conjugate between apomyoglobin and a cobalt tetrahydrocorrin complex. The Co(II) tetrahydrocorrin complex as an artificial cofactor is inserted into the heme pocket of apomyoglobin with axial ligation of His93, which is characterized by EPR spectroscopy and X-ray crystal structure analysis. Reduction of the protein upon addition of dithionite is found to provide a Co(I) complex. The crystal structure of the Co(I) complex in the protein clearly reveals the tetra-coordinate species which forms due to the cleavage of the axial ligation. This behavior has been proposed to occur during formation of cob(II)alamin as a reaction intermediate. The addition of methyl iodide to the Co(I) species provides a photoactive species and the ESI-TOF MS spectrum of the species supports the formation of a Co-CH<sub>3</sub> bond in the heme pocket.

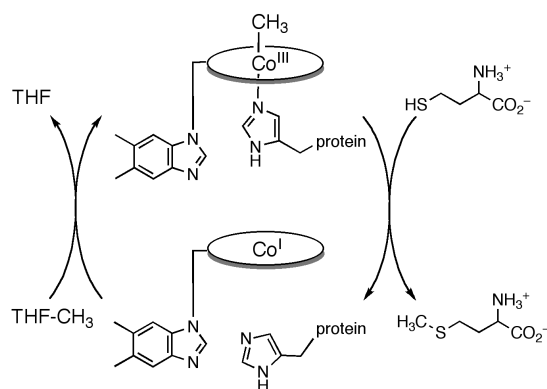
研究分野：生物無機化学

キーワード：メチオニン合成酵素 ミオグロビン コバルトコリン メチル基転移 酵素モデル

## 1. 研究開始当初の背景

(1) メチオニン合成酵素 (methionine synthase) は、ホモシステインをメチル化し、メチオニンへ変換する反応を支援している。この酵素は非常に大きく、さらに4つのサブユニットから構成されていて、まだ全体の構造は明らかにされていない。メチル化は、ビタミン B12 類縁体のコバラミンを補因子として有するサブユニット内で進行する。この活性中心のコバラミンは、環状テトラピロールを配位子としたコバルト錯体である。この配位子の骨格は、天然に多く存在するヘム (ポルフィリン鉄錯体) の配位子骨格と類似しているが、前者はコロール環、後者はポルフィリン環からなる。しかしながら、コバラミンは、ポルフィリンに比べて非常に複雑な分子構造を有している。このような事情から、ヘムに比べてコバラミンに対する厳密なモデル反応の再現や触媒への応用例が、極めて少ない。

(2) メチオニン合成酵素の触媒反応は、まず超求核力を有するコバラミンの  $\text{Co(I)}$  種が、メチル葉酸からメチル基を奪い、 $\text{Co(III)-CH}_3$  種であるメチル錯体を形成する。次に、このコバルトに結合したメチル基がホモシステインに転移して、メチオニンが得られ、コバラミンは  $\text{Co(I)}$  種に戻る (図1参照)。しかしながら、 $\text{Co(I)}$  種のタンパク質中での構造はまだ明らかにされていない。一方で、 $\text{Co(III)-CH}_3$  からのメチル基転移の反応機序も、まだ曖昧な点が多い。したがって、コバラミンの実践的機能モデルの研究は、これらを補因子として有する酵素の詳細な反応機構を明らかにするとともに、高機能生体類似触媒の構築の可能性を秘めており、錯体化学及び生物無機化学の分野に対して、大変興味



深い内容である。

図1. メチオニン合成酵素の触媒反応スキーム

## 2. 研究の目的

(1) 本研究は、生体内で金属-炭素結合を経由するメチル基転移反応を触媒するコバラミン含有酵素 (メチオニン合成酵素) のモデル系の構築と反応の追跡を実施し、まだ曖昧なメチル基転移反応の分子化学的作用機序を明らかにすることを目的としている。具体的には、コバラミンに対する新しいモデル錯体

分子を合成する。次に、得られた錯体をアボ化したミオグロビンのヘムポケットに挿入し、タンパク質マトリクスの中で錯体の物性・反応性を詳細に検討し、当該金属酵素反応に関連する新しい知見を得る。これまでにコバラミンの機能モデルを簡単なタンパク質の中で構築し、触媒として反応を追跡した例はなく、非常にユニークな試みと言える。(2) 本研究内容は、これまで不明瞭な点の多い複雑なコバラミンを含む酵素のメチル基転移反応に対して、新しい切り口のモデルを構築し、その反応メカニズムを明らかにし、生体類似触媒としての応用を図るものである。特に、酵素モデルではあるが、反応中心をタンパク質マトリクス内に設置し、あくまで水中でタンパク質の効果を意識しながら、反応系を組み立てる点に、本研究の特色がある。学術的な意義としては、

(i) 低原子価コバルト錯体へのアルキル基転移の機構の解明

(ii) アルキル錯体の構造・電子状態と反応性の相関

など、有機金属化学や生物無機化学にかかわる基本的かつ重要な錯体の反応性を改めて検証する契機になると考えた。

## 3. 研究の方法

(1) 上述のようにコバラミンは環状テトラピロール配位子を有するコバルト錯体であるが、その構造は非常に複雑である。本研究では、テトラピロール配位子の構造と電子状態をできるだけ維持した単純な錯体としてテトラヒドロコリンコバルト錯体 ( $\text{CoTDHC}$ ) を合成し、取扱の容易なミオグロビンのヘムポケットに挿入することにより、水中で機能する新しい酵素モデルの構築に挑戦した。得られた再構成タンパク質を用いて、求核力の強い  $\text{Co(I)}$  種の生成、 $\text{Co(I)}$  種のメチル化反応と  $\text{Co(III)-CH}_3$  錯体の形成、メチル基の転移など、天然の酵素が触媒する重要なモデル反応を一つ一つ試み、その反応の中間体を種々の分光法を用いて同定し、反応速度解析、生成物解析を実施した。

本研究では、水中で機能する酵素類似反応の実践を重要な課題と位置づけ、特にコバラミン含有酵素が触媒するメチル基転移反応に着目して、以下に示す項目を実施し、幾つかの点を明らかにすることを試みた。

(i) コバラミンの分子構造を単純化したコバルト錯体  $\text{CoTDHC}$  の設計・合成

(ii) 上記錯体のヘムタンパク質への挿入と得られる再構成タンパク質の調製

(iii) 再構成タンパク質中での酵素モデル反応の追跡と中間体 (アルキル錯体) 同定への挑戦

(iv) 観測した反応から得られる情報をもとに、実際の酵素のメカニズムを言及

#### 4. 研究成果

(1) 複雑なメチオニン合成酵素のモデルとして、我々のグループでは単なる低分子のコバルト錯体をモデルとするのではなく、タンパク質の効果も加味したより高度なモデル構築に取り組んだ。まずタンパク質側は、人工のモデル補因子を結合させる必要があるため、酸素貯蔵タンパク質として良く知られているミオグロビンを選んだ。ミオグロビンはヘムを補因子として有し、既知の操作によって、ヘムの除去と人工補因子を用いた再構成が可能である。一方、補因子コバラミンのモデルとしてテトラデヒドロコリンコバルト(II)錯体 Co(II)TDHC を合成した。コリンはコバラミンの環状テトラピロール配位子と類似の骨格を有し、ポルフィリンよりも、より精密なモデル配位子として適していると考えられる。また、図2に示すように、ミオグロビンのヘムポケットに挿入するため、コリン骨格にヘムと同様に2つのプロピオン酸を導入した。得られた Co(II)TDHC を常法にしたがってヘムを除去したアポミオグロビンに加え、安定な再構成タンパク質を得て、質量分析、UV-vis 等でタンパク質の同定を行った。さらに、単結晶を得ることに成功し、X線結晶構造解析を行い、高分解能で、再構成タンパク質の構造を明らかにした(図3)。Co(II)TDHC は、通常ヘムポケットに位置し、天然ミオグロビンでもヘムの軸配位子として機能する His93 が、再構成タンパク質中でもコバルト中心に配位し、5配位構造を有していた。また全体の構造も良く保持しており、天然ミオグロビンとの構造的差異を示す RMS 値は 0.223 Å と非常に小さかった。また結晶中の構造に加えて、電子スピン共鳴分光法(EPR)では二価のコバラミンと非常に良く似た、8本に分裂したシグナル( $g_z = 1.99$ )が得られた。さらにそれぞれのシグナルにおいて超超微細構造に由来する分裂が観測され、溶液中においてもN原子が軸配位していることが明らかになった。上記のように、タンパク質マトリクスを含むコバラミン含有酵素のモデルを作成した。

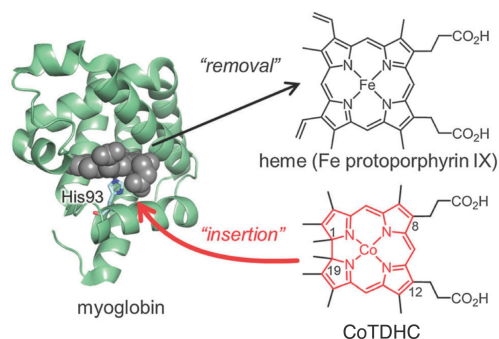


図2. CoTDHC の分子構造および再構成タンパク質調製の模式図

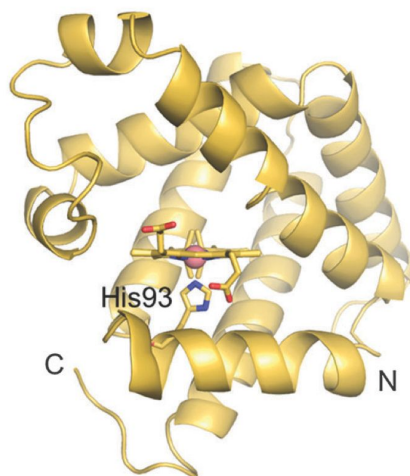


図3. Co(II)TDHC を含む再構成タンパク質の結晶構造

(2) メチオニン合成酵素の重要な中間体の1つを再現するために、得られた再構成タンパク質についてジチオナイトを用いて還元した。吸収スペクトルにおいて、Co(II)TDHC に特徴的な 500 nm のシャープなピークの消失と、新たに 530 nm 付近の幅広い Co(I)TDHC に特徴的な吸収の出現を確認した。また EPR においてシグナルが観測されなかったことから反磁性の化学種である Co(I)種の生成を支持している。一方で、紫外域における CD スペクトルにおいては Co(II)TDHC を含む再構成タンパク質とほとんど変化がなく、還元後も溶液中においてタンパク質内に補因子が保持されていることを示唆している。また再構成タンパク質における Co(II)/Co(I)酸化還元電位を分光電気化学測定法により評価したところ、pH 7.0 において -0.13 V vs SHE であった。メチオニン合成酵素中のコバラミンの値が -0.5 V であることから、この値は再構成タンパク質中の Co(I)種がメチオニン合成酵素よりも熱力学的に安定であることを示唆している。溶液中と同様に Co(II)種を含む再構成タンパク質の結晶をジチオナイト溶液に浸し、還元を試みたところ、色の変化が観測された。この結晶に対して X線結晶構造解析を行ったところ、高分解能で構造を得ることができ、Co(II)種において配位していた His93 がフリップし、4配位構造を有していることが明らかになった(図4)。この4配位構造は、これまで天然の酵素において予想されていたが、構造情報について決定的な証拠はなく、本結果がこれまでのコリンコバルト錯体において、Co(I)種が4配位を示すことを結晶構造で明らかにしたのはじめての例である。また、ユニークなことにフリップした His93 は CoTDHC のプロピオン酸と相互作用していた。His93 を含むヘリックス(Fヘリックス)については、原子の揺らぎを示す温度因子が大きく上昇していることが明らかとなった。一方で、軸配位

子のフリップという大きな構造変化を示したにもかかわらず、Fヘリックスを含めて全体の構造は還元前とほとんど変化はなかった(RMS値 = 0.204 Å)。また本系は、軸配位子が補因子から外れた4配位の構造を有するミオグロビンとしても非常に興味深い。以上の結果は、メチオニン合成酵素においても還元のプロセスで軸配位子であるヒスチジンのフリップが必要であることを支持している。

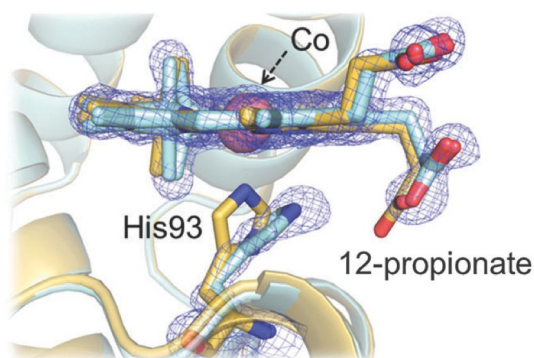


図4 .CoTDHCを含む再構成タンパク質の結晶構造。青：Co(I)種、黄：Co(II)種。メッシュはCo(I)種の電子密度 ( $2F_o - F_c$ ,  $\sigma = 1.0$ )

(3) 次にアルキル錯体の形成を試みた。Co(I)種を含む再構成タンパク質にヨウ化メチルを加えたところ、吸収スペクトルに変化が見られたが、EPRはシグナルが観測されないままであった。また、得られた化学種は光照射によって容易に分解することが明らかになった。これはアルキルコバルト錯体の典型的な性質であり、再構成タンパク質内でのCo(III)-CH<sub>3</sub>種(メチル錯体)の生成を支持している。また質量分析からもメチル錯体の生成が確認されている。さらに、生成したメチル錯体は遠位のヒスチジンへのメチル基転移反応を起こすことがin source decay法のMALDI MS分析等により明らかになった。したがって、再構成タンパク質はメチル錯体の生成と続く転移反応についても良いモデルとして機能することが示された。

上記のように、本研究で得られたCoTDHCを含む再構成ミオグロビンは、メチオニン合成酵素の良いモデルとして機能し、特に今まで示されていなかったCo(I)種の4配位構造を、結晶構造により明らかにした。またメチル錯体と続くメチル基転移反応を引き起こす機能モデルとして働くことが確認された。今後、本モデルの詳細な評価は、メチオニン合成酵素の作用機序の解明につながると期待される。

#### 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)

〔雑誌論文〕(計 2件)

Takashi Hayashi, Yoshitsugu Morita, Eiichi Mizohata, Koji Oohora, Jun Ohbayashi, Tsuyoshi Inoue, Takashi Hayashi, Co(II)/Co(I) Reduction-induced Axial Histidine-flipping in Myoglobin Reconstituted with a Cobalt Tetradehydrocorrin as a Methionine Synthase Model, Chem. Commun., 査読有、Vol. 50, 2014, pp. 12560-12563 DOI:10.1039/C4CC054488.

Takashi Hayashi, Yohei Sano, Akira Onoda, Generation of New Artificial Metalloproteins by Cofactor Modification of Native Hemoproteins, Isr. J. Chem., 査読有、Vol. 55, 2015, pp. 76-84 DOI:10.1002/ijch.201400123

〔学会発表〕(計 9件)

Takashi Hayashi, Modification of Hemoprotein with an Artificially Created Cofactor to Generate a New Biocatalyst, 13th International Symposium on Applied Bioinorganic Chemistry, 2015. 6.14, Galway (Ireland)

Takashi Hayashi, Yoshitsugu Morita, Koji Oohora, A structure and Functional Model of Methionine Synthase: Myoglobin with a Tetradehydrocorrin Co Complex, 5th Georgian Bay International Conference on Bioinorganic Chemistry (CanBIC5), 2015. 5.22, Parry Sound (Canada)

森田能次、大洞光司、林 高史、メチオニン合成酵素モデルを指向したコバルトコリノイド錯体含有ミオグロビンが示すタンパク質内メチル基転移反応の評価、日本化学会第95春季年会、2015.3.27、日本大学(船橋市)

Takashi Hayashi, Structural Model of Methionine Synthase by Myoglobin Reconstituted with a Cobalt Corrin Derivative, 7th Asian Biological Inorganic Chemistry Conference, 2014.12.3, Gold Coast (Australia)

森田能次、大洞光司、林 高史、ミオグロビンヘムポケット中におけるコバルト(III)コリノイド錯体の配位子結合挙動、錯体化学会第64回討論会、2014.9.19、中央大学(東京都文京区)

森田能次、大洞光司、林 高史、ミオグロビンヘムポケット内のコバルトコリノイド錯体によるメチル基転移酵素類似反応の追跡、日本化学会第94春季年会、2014.3.27、名古屋大学(名古屋市)

Takashi Hayashi, Modification of Heme Protein with an Artificial Metalloporphyrinoid, The 2nd Japan-France Coordination Chemistry Symposium 2013、2013.11.25、東大寺ミュージアム(奈良市)

Takashi Hayashi, Construction of a Methionine Synthase Model by Apomyoglobin-Cobalt Corrin Complex, 16th International Conference on Biological Inorganic Chemistry (ICBIC16)、2013.7.24、Grenoble (France)

Yoshitsugu Morita, Koji Oohora, Takashi Hayashi, Construction of Vitamin B12-dependent Enzyme Model Based on Myoglobin, 4th Georgian Bay International Conference on Bioinorganic Chemistry (CanBIC5)、2013. 5.23、Parry Sound (Canada)

〔図書〕(計 1 件)

Takashi Hayashi、Wiley VCH、Coordination Chemistry in Protein Cages、2013、pp. 87-110

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

林 高史 (HAYASHI, Takashi)  
大阪大学・大学院工学研究科・教授  
研究者番号：20222226

### (2) 連携研究者

大洞光司 (OOHORA, Koji)  
大阪大学・大学院工学研究科・助教  
研究者番号：10631202

### (3) 研究協力者

森田能次 (MORITA, Yoshitsugu)