

令和 2 年 6 月 2 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04751

研究課題名(和文) 酵素基質間の静電的反発が関わる反応触媒機構の実験的解明と抗マラリア薬の開発

研究課題名(英文) Experimental analysis of the electrostatic repulsion between enzyme and substrates to elucidate the reaction mechanism, and development anti-malaria agent

研究代表者

藤橋 雅宏 (Fujihashi, Masahiro)

京都大学・理学研究科・助教

研究者番号：10397581

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：酵素基質複合体の不安定化の詳細を解析するために、X線による結晶の損傷の影響を避けた上で、高分解能でX線結晶構造解析を行うための基盤を構築した。はじめに従来の数倍のスケールでの試料調製を可能にした。続いて題材酵素であるオロチジンーリン酸脱炭酸酵素(ODCase)の複数の結晶型のうち、解析に最も適したものを特定し、その調製法を確立した。また、結晶の吸収線量と酵素内部構造の損傷の関係を解析し、最高で0.99 Å分解能のX線回折データを得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

酵素基質複合体の不安定化は、理論的には全ての酵素が利用可能な機構であるにもかかわらず、実験的な解析例はほとんど無い。また、酵素と基質の間には引力が働くと考えるのが常識であり、静電的な反発が活性に関わるなどの報告は存在しない。本研究はこのように、理論的に可能でありながら、これまでに報告例のない機構の解明を目指して、これに必要な試料の調製方法の確立、データ取得手法の検討、ならびにデータ取得などを行った。

研究成果の概要(英文)：In order to elucidate the details of the destabilization of the enzyme-substrate complex, we established a base for high-resolution X-ray crystallographic analysis while avoiding the influence of crystal damage by X-rays. First, we enabled large-scale sample preparation comparing to several times larger than conventional ones. We then identified the crystal form which is the most suitable for analysis and established the protocol for its preparation. Also, we analyzed the relationship between the absorbed X-ray dose of the crystal and the damage of the internal structure of the enzyme. The analysis enabled us to collect damage-less diffraction dataset. The best resolution of the obtained dataset was 0.99 Å.

研究分野：構造生物学

キーワード：酵素 X線結晶構造解析

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

酵素反応は、酵素基質複合体が遷移状態を経て生成物に変換される際のエネルギー障壁を小さくすると加速される。この作用は酵素による遷移状態安定化と酵素基質複合体の不安定化の組み合わせで実現される。全ての酵素はこの両方を様々な比率で利用すると考えられるが、多くの研究は遷移状態安定化のみに着目して反応機構を説明しており、複合体を不安定化させる要素の詳細な解析例はほとんど見られない。特に、酵素の活性中心の静電的な反発が反応加速に貢献するという報告はこれまでに無く、そのような機構を実証できれば世界初の例となるが、一般的な結晶構造解析は必要な解析精度を全く満たさないため、詳しい議論は行われていないのが実情であった。

2. 研究の目的

本研究では、酵素基質複合体の不安定化機構の詳細の解明として、オロチジンーリン酸脱炭酸酵素(ODCase)を題材とした解析を行う。これまでの研究で申請者らは、この酵素が、酵素基質複合体の不安定化を反応の加速に活用している事を示した(文献 1)。この不安定化に、酵素と基質の間の一部分に生じる静電的反発が関わる事を実験的に示す。これにより「酵素と基質の間には主に引力が働き、立体障害を除いて斥力はほとんど触媒機構に関わらない」とする広く信じられている学説を転換し、新しい概念の酵素反応機構論の開拓に繋げる。

具体的には、ODCase の結晶構造解析を解離性置換基のプロトン化状態を観察できる精度で行うことにより、酵素反応中心における静電的反発を実験的に証明する。本研究では結晶やデータ取得法の改良を行いながら、超高分解能 X 線結晶構造解析や中性子線構造解析を行うことによって、「酵素反応中心における静電的な反発」が酵素基質複合体の歪みを通して反応に関わることを実証する。実証した構造を基に、連携研究者と協力して計算機シミュレーションを行い、信頼度の高い反応経路の全体像を得ることも目指す。また ODCase 阻害剤はマラリア治療薬(特許 2)としても期待されていることから、ODCase 阻害剤のマラリア治療薬としての改善も目指す。

文献および特許

- 1: "Substrate distortion contributes to the catalysis of orotidine 5'-monophosphate decarboxylase", Fujihashi, M. *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **135**, pp. 17432-17443, (2013)
- 2: "ODCase inhibitors for the treatment of malaria", Kotra, L. P., Fujihashi, M. *et al.*, European Patent # EP1931691 B1, (2013) (欧州特許・認定済), Chinese Patent # CN101321775 B, (2012) (中国特許・認定済), Patent U.S.A. # US8067391 B2 (2011) (米国特許・認定済), World Patent # WO2007038859A1 (2006) (国際特許・出願済), Patent Canada # CA2665370 A1 (2006) (カナダ特許・出願済)

3. 研究の方法

高分解能での X 線結晶構造解析を行う。タンパク質の X 線結晶構造解析は広く行われているが、解離性置換基のプロトン化状態を実験的に明らかにしている例は極めて少ない。これは、プロトン化状態の可視化には、超高分解能 X 線結晶構造解析や中性子線構造解析が必須であるが、これに必要な大型・良質の結晶を得るのは容易ではないためである。本研究では、これまでに私が様々な研究を積み重ねてきた、*Methanothermobacter thermautotrophicus* 由来 ODCase (MT-ODCase) を題材として、大型で良質の結晶を得るための系を構築する。このため、MT-ODCase の発現・精製・結晶化の手法を効率化する。

続いて得た MT-ODCase の結晶から、高分解能の X 線回折データまたは中性子回折データを取得する。X 線回折データの取得にあたっては、X 線による結晶の損傷の影響を分析し、結晶を損傷させない吸収線量での回折データ収集を行う。得たデータを基に構造解析を行い、活性中心の解離性置換基のプロトン化状態可視化を通して、「酵素反応中心における静電的な反発」を実証する。

4. 研究成果

はじめに、従来の数倍のスケールで大腸菌を培養し、MT-ODCase を大量に発現させる系を確立した。これにより、精製・結晶化に供することの出来る試料の量を大幅に増加させた。続いて精製条件の再検討を行った。従来の方法で精製した MT-ODCase は、Native PAGE で分析すると、複数バンドになることがわかっていた。バンドが複数あることは、試料状態が均一でないことを示唆しており、これを均一のバンドにすることができれば結晶の質がより向上することが期待できた。そこで従来の最終精製標品を単体の粒子径が非常に小さい陰イオン交換カラムである MiniQ カラムで更に精製したところ、Native PAGE の各バンドに対応する成分を、ある程度まで分離することができた。

続いて結晶化条件の再検討を行った。MT-ODCase は、従来より我々が用いてきたクエン酸を中心とした結晶化試薬の他に、ポリエチレングリコール(PEG)によっても結晶が得られることが他グループにより報告されていた。二つの方法について比較したところ、PEG を用いた方法は、大型で形の良い結晶を得やすいものの、そこから得られる X 線回折データの分解能は最高で 1.2 Å 程度にとどまった。一方クエン酸を用いた方法では、良質な結晶を得るための歩留まりが悪いものの、最高で 0.99 Å 分解能の X 線回折データを得ることができた。このため、クエン酸を用いた結晶化法を継続することとした。

しかしながらこの方法で結晶試料を量産してみたところ、外見上は同じであるが、内部構造の違う結晶が存在することが明らかになった。これら複数の型の結晶は、同じ組成の結晶化試薬から得られる。それぞれの結晶の分析を進めたところ、高分解能にまで X 線を回折する結晶は、複数の型のうちの 1 つだけであることがわかった。この高分解能を与える結晶は、結晶化を行う過程でシーディングを行う際の、種結晶に注意を払うことで、得やすくなることがわかった。このようにして結晶化条件の最適化をすすめ、従来よりも大型の MT-ODCase と 6-hydroxy-UMP との複合体の結晶を得ることができた。

このようにして得た結晶を、X 線による結晶の損傷に注意しながら多数のデータを収集した。先行研究により、結晶の損傷は吸収線量に依存しておこることが知られている。そこで得たデータのそれぞれを精密化し、吸収線量ごとに構造の比較を行った。MT-ODCase の活性中心付近では水素結合や静電的結合が複雑にネットワークを形成しているため、もし活性中心付近の各残基の電離状態が変化すれば、炭素・窒素・酸素原子が移動すると考えられる。解析の結果、活性中心付近で、最も顕著に占有率が低下したのは水分子であり、吸収線量 500 kGy で 5%程度、1 MGy で 10%程度の占有率が低下していた。MT-ODCase のアミノ酸残基としては、活性中心に位置する Asp70 の占有率が、1 MGy で 5%、2 MGy で 10%程度低下していた。

今後、この占有率の低下を考慮に入れた解離性置換基のプロトン化状態をすすめ、酵素反応中心における電荷分布を決定する計画である。これを基に、計算機シミュレーションによる反応経路の全体像の解明、および抗マラリア薬の開発に取り組む。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 藤橋雅宏, Emil F. Pai, Lakshmi P. Kotra, 三木邦夫
2. 発表標題 オロチジンーリン酸脱炭酸酵素の酵素基質複合体における基質歪みの由来の分析
3. 学会等名 第17回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 藤橋雅宏
2. 発表標題 取得効率やX線損傷を考慮したデータ収集例
3. 学会等名 第2回 タンパク質結晶構造解析ビームライン中級者向け講習会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 岩原卓哉, 藤橋雅宏, Emil F. Pai, Lakshmi P. Kotra, 三木邦夫
2. 発表標題 オロチジンーリン酸脱炭酸酵素の活性中心における静電反発の解析
3. 学会等名 日本結晶学会 2017年度年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 藤橋雅宏
2. 発表標題 酵素の結晶構造解析とその利用
3. 学会等名 東大薬学部特別講演会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤橋雅宏
2. 発表標題 生合成酵素の立体構造とその利用
3. 学会等名 新潟大学 第三回技術セミナー（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Masahiro Fujihashi
2. 発表標題 Determination and application of enzyme structure
3. 学会等名 Scientific Symposium in Honor of professor emil F. Pai (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤橋雅宏
2. 発表標題 全自動測定ビームタイムを使ってみて
3. 学会等名 第3回 タンパク質結晶構造解析ビームライン中級者向け講習会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岩原卓哉, Emil F. Pai, Lakshmi P. Kotra, 三木邦夫, 藤橋雅宏
2. 発表標題 オロチジナーリン酸脱炭酸酵素の活性中心における負電荷反発の解明
3. 学会等名 日本結晶学会 2018年度年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Masahiro Fujihashi, Toyokazu Ishida, Lakshmi P. Kotra, Emil F. Pai, and Kunio Miki
2. 発表標題 Contribution of the substrate distortion to the reaction of orotidine 5' -monophosphate decarboxylase
3. 学会等名 The Fifth International Conference on Cofactors & Active Enzyme Molecule 2016 (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 藤橋雅宏, 石田豊和, Emil F. Pai, Lakshmi P. Kotra, 三木邦夫
2. 発表標題 オロチジンーリン酸脱炭酸酵素の反応時における基質歪みの由来
3. 学会等名 日本結晶学会平成28年度年会
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	石田 豊和 (Ishida Toyokazu) (70443166)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・ナノ材料研究部門・ 研究員 (82626)	