

平成 22 年 5 月 1 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2007～2009

課題番号：19750144

研究課題名（和文） チオエステル化酵素の高い立体選択性発現機構の解明

研究課題名（英文） Investigation into the mechanism for high enantioselectivity of the thioesterification enzyme

研究代表者

加藤 太郎 (KATO DAI-ICHIRO)

兵庫県立大学・大学院工学研究科・助教

研究者番号：60423901

研究成果の概要（和文）：「光る虫」といえば「ホタル」とすぐに連想できるほど、我々にとってホタルは身近で、かつ心が惹きつけられる存在である。このようにホタルルシフェラーゼといえば発光反応を触媒する酵素だと思われがちであるが、実は立体選択的なチオエステル化という、もう一つの触媒活性があることを発見した。例えば構造中に1つの不斉点を有するケトプロフェンを基質とした場合、ヘイケホタル由来ルシフェラーゼはR体を優先的にチオエステル体へと変換する。本研究では、本酵素がどのように基質の不斉を識別しているのかを明らかにするために、ホタルルシフェラーゼを用いたチオエステル化反応の詳細な機構解析やMDシミュレーション、および結晶構造解析を試み、その理由の一端を明らかにすることができた。

研究成果の概要（英文）：Firefly is an insect which is felt familiar and attractive to us because with which the word of lighting insect is closely associated. Thus firefly luciferase is generally supposed to be bioluminescence enzyme, however, we have found another catalytic activity, "enantioselective thioesterification activity", in this enzyme. When ketoprofen, which has an asymmetric center in the molecule, was subjected to firefly luciferase catalyzed thioester formation reaction, R-form would be preferentially transferred to the corresponding thioester. In this research, by detailed kinetics measurements, MD simulation and X-ray crystallographic analysis we could have throw light on a reason why firefly luciferase can distinguish the absolute configuration in the molecule.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,700,000	0	1,700,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	480,000	3,780,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：生物有機化学・生体認識

## 1. 研究開始当初の背景

酵素タンパク質と基質小分子との相互作用に関する研究は、酵素タンパク質による基質認識機構を解明するだけにとどまらず、医学・農学・生物学の分野においては生理活性物質の作用機構解明に繋がる必須の研究領域である。文部科学省が平成 14 年度より開始しているタンパク 3000 プロジェクトでは、疾患に関連するタンパク質の構造及び機能を網羅的に解析することによって基質-酵素間相互作用の予測精度を向上させ、創薬プロセスを大幅に短縮することを目標としてきた。本プロジェクト推進の結果、これまでに多種類のタンパク質の立体構造と活性部位残基が明らかにされている。また、反応に必須の補因子とタンパク質との相互作用に関しても多くの解析がなされ、情報も蓄積されつつある。しかし、最も重要と考えられる基質-酵素複合体の解析に関しては現在のところ満足のいく結果は得られていないように感じた。モデリングによる本相互作用の予測精度を向上させるためにも、実際に基質-酵素複合体の結晶を作成し、解析することが大変重要である。

また、酵素を用いた物質変換の利点の 1 つに高い立体選択性が挙げられるが、その選択性が生じる理由を基質-酵素複合体像を用いて構造生物学的な視点から解明しようとする試みはこれまでほとんど見当たらない。つまり、基質-酵素複合体構造が明らかにされ、触媒機構の解明がなされた場合においても、酵素タンパク質の立体選択性が生じる理由まで解析している研究は未だ少数である。これは立体選択性の発現が、基質の各エナンチオマーと酵素との間のわずかな親和性の違いによって生み出されているため、それを詳細に議論するためには基質-酵素複合体のデータを高い解像度にて回収しなければならないためだと考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究において申請者は、酵素と光学活性な反応中間体アナログとの複合体像を解析することによって、酵素タンパク質と基質のエナンチオマー間におけるわずかな親和性の差異がどのような基質-酵素間相互作用によって生じるのかについて確認し、酵素による立体選択性発現機構の原理を見出すことを目標とした。

標的酵素としては、ホタルルシフェラーゼを選択した。本酵素は一般に、D-ルシフェリンを基質として ATP,  $Mg^{2+}$  存在下、発光反応を触媒する。しかし基質を 2-置換カルボン酸とし、さらに CoASH を添加することによってチオエステル化反応をも触媒できることを申請者は最近見出している。特に、ラセミ体の 2-アリアルプロパン酸に対しては立体選択

的なチオエステル化反応が進行し、高い選択性をもって速度論的光学分割が可能であることを確認している。ラセミ体のケトプロフェンを基質とした場合には、鏡像体分離能(E 値)<sup>35</sup>にて効率よく両鏡像体を分割できる。

ルシフェラーゼの立体構造は 1996 年に既に解明されており、また 2005 年には京都大学の中津らによって、発光過程の反応中間体アナログである 5'-O-[N-(dehydro-luciferyl)sulfamoyl]adenosine (DLSA) との複合体像も報告されている。本検討によって DLSA が確かに酵素の活性部位に結合することは確認できたが、本アナログは、基質分子の不斉中心を消失させたジヒドロルシフェリンを用いているため、酵素の不斉認識能力についての情報は全く得られていなかった。そこで本研究では、ホタルルシフェラーゼの不斉識別機構を解明することを目的とし、DLSA の構造を参考として、分子中に不斉炭素を残した 2-アリアルプロパン酸の中間体アナログを設計・合成し、これを用いて結晶構造解析を行うことで基質-酵素間相互作用の議論を試みることにした。また、分子動力学シミュレーションソフト AMBER を用いた酵素-基質複合体の動的解析を行い、得られた情報を基に変異導入を行うことによって、各種変異体のチオエステル化活性にどのような変化がみられるのかを確認することとした。

## 3. 研究の方法

ホタルルシフェラーゼはアシル-AMP 生成酵素スーパーファミリーに属する酵素であり、チオエステル化反応時においても、同様のアシル-AMP 中間体を經由して反応が進行することが予想される。そこで、基質-酵素間相互作用の議論を行うための基質として、本中間体を設定することとした。本中間体とホタルルシフェラーゼとの結晶構造解析あるいは MD シミュレーションを行うことによって、本酵素の高い立体選択性発現機構の原理を理解するために必要な情報を収集することとした。

### (1) 反応中間体アナログの合成

本研究では、反応中間体と酵素間における相互作用の解析を通じて、酵素の高い立体選択性発現機構の解明を目指しているが、実際の反応中間体(アシル-AMP 中間体)は高エネルギー化合物であり、それを合成して結晶中に添加・解析することは不可能である。そこで、水溶液中においても安定に存在し、かつ反応中間体と同様の生理活性を示すアナログである N-acyl sulfamate 誘導体(図 1a)を合成した。本化合物は、ACS の属する AMP-生成酵素スーパーファミリーに共通して見られる中間体のアナログであり、結晶構造解析検討の際、基質-酵素複合体を形成する可能

性が極めて高い。実際、ジヒドロルシフェリン誘導体(DLSA, 図 1b)についての合成例が最近報告されており、本アナログがルシフェラーゼの活性部位に確かに結合することが確認されている。

### (2) 結晶化条件の検討と立体構造解析

ホタルルシフェラーゼは、市販の発現ベクターを用いて大量に発現することとした。このようにして調製した高濃度酵素溶液に N-acyl sulfamate 誘導体を添加し、基質-酵素複合体の結晶作成を試みた。具体的には、市販の結晶化スクリーニングキットを用いた結晶析出条件の検討と、その結果をもとにした最適条件の決定を行った。最適化した結晶化条件を用いて得られた結晶を用いて、回折実験を行い、高次構造情報を収集した。本構造解析については京都大学薬学部の中津亨助教授の協力を得て研究を展開した。得られた結果を解析することによって基質の不斉点周りと酵素活性部位のアミノ酸残基との相互作用の可視化を行い、酵素がどのような戦略にて基質の不斉点を認識しているのかについて議論した。

### (3) シミュレーション条件

酵素-基質複合体の初期構造は、ゲンジボタル由来ルシフェラーゼとジヒドロルシフェリンのアシル-AMP 中間体アナログ(DLSA)との複合体の結晶構造(PDB ID: 2D1S)を基に作成した。酵素の構造は結晶構造をそのまま利用し、DLSA のジヒドロルシフェリン部分のみをケトプロフェンの R-体 に置換したものを KPF-R、S-体としたものを KPF-S とし、それぞれの初期構造を構築した(図 1)。このように構築した 2 種類の酵素-基質複合体に対して AMBER ver. 7.0 を用いた分子動力学シミュレーションを行った。シミュレーションにおける温度は 300 K とし、時間は 1 ns (Time step 1 fs) で行った。

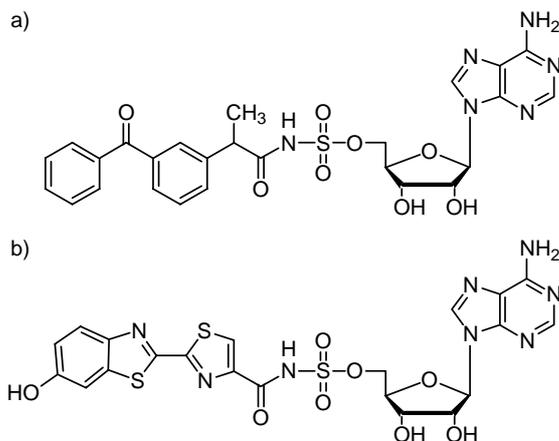


図 1. アシル-AMP 中間体アナログの構造: a) KPF-X, ケトプロフェン部分の不斉によって X が R あるいは S となる, b) DLSA

### (4) チオエステル化活性および不斉識別能力の測定

チオエステル化活性は M.-X. Wu らの方法を利用し、反応の結果放出される AMP を検出することによって測定した。また、不斉識別能力に関しては、キラルな固定相を有する HPLC カラムを用いた方法にて行った。

## 4. 研究成果

### (1) 結晶構造解析結果

ヘイケボタル由来ルシフェラーゼ(LUC-H)と N-acyl sulfamate 誘導体との結晶作成を sitting drop 蒸気拡散法にて試みた結果、12.5%(w/v) PEG-4000, 100 mM Glycine-NaOH (pH9.5) 条件下、構造解析に耐えられる結晶を得ることができた。そこで、回折データを取得し、モデル構築および構造精密化を行い構造中に含まれるアナログの不斉について確認した(図 2)。その結果、基質ケトプロフェンの不斉に関係なく、複合体中に取り込まれていることが明らかになった(図 3)。一方、本構造解析にて得られた構造データについては、p-loop 部分(199N-209G)に相当する電子密度が欠落し、モデルを構築できない状態であることが分かった。本部位は基質と相互作用できるほど近傍に存在しており、基質の不斉によって立体配置が違っているために電子密度が欠落しているのではないかと考えた。つまり、本部位が立体選択的なチオエステル化活性発現に重要な役割をはたしていることが予想された。そこで、MD シミュレーションを試み、本部位が基質の不斉によって違った挙動をとるのかを確認することとした。

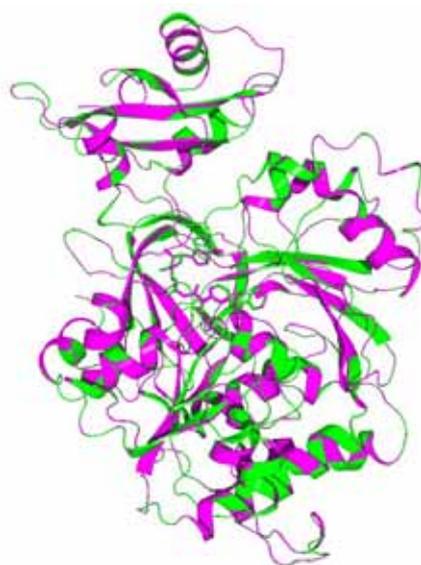


図 2. ヘイケボタル由来ルシフェラーゼ(LUC-H)とアシル-AMP 中間体アナログとの複合体像  
黄緑: R-アナログ導入時, 赤紫: S-アナログ導入時

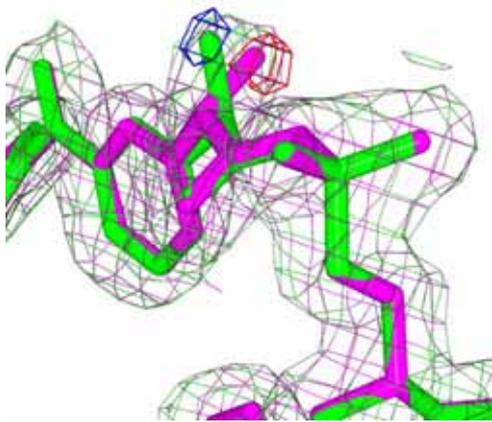


図 3. 構造精密化後のケトプロフェン基質の不斉点周辺の電子密度比較  
 黄緑:R-アナログの電子密度, 赤紫: S-アナログの電子密度, 赤: R-アナログの差フーリエ, 青: S-アナログの差フーリエ

### (2) シミュレーション結果と構造の比較

本シミュレーションにおいて、系全体が安定した状態で行われていることを確かめるため、各シミュレーションの熱力学的諸量および酵素全体の構造について確認した。その結果、系全体のトータルエネルギーの揺らぎは平均二乗変動(RMS fluctuation)で KPF-R、KPF-S 共に全エネルギーの約 1.7%程度しかなく、安定した状態でシミュレーションが行われたことが確認された。系の温度についても、設定温度である  $300 \pm 2$  K のごく僅かな揺れであることが判明した。また酵素全体の構造も、2D1S と比較した RMSD が KPF-R で 1.7、KPF-S で 2.0 であった。このことからシミュレーション中は、酵素全体が僅かに熱的な揺らぎを起こしているだけであることを確認した。つまり本シミュレーションにおいて、基質を置換したことによる酵素全体の大きな構造変移は起こっておらず、水中における安定した酵素-基質複合体の系が再現されていることを確認できた。また KPF-R、KPF-S 間で、酵素構造の明らかな違いは見受けられなかった。

### (3) 基質と周辺アミノ酸の関係

酵素全体では不斉による明らかな違いが見受けられなかったため、次に基質とその周辺アミノ酸について詳細な解析を行った。その結果、導入基質の不斉の違いによって Ser200 と Ser201 を含むループの挙動や配座に大きな違いが生じていることが判明した(図 4)。特に、Ser200 に関してはシミュレーション後の距離がおよそ 6.8 Å も違っていることが明らかとなった。例えば KPF-R についてみると、Ser200 は基質のスルホ酸素と 3 Å という水素結合が可能な位置まで移動し、また Ser201 についてもスルホ酸素と 2 Å 以下の原子間距離を保持しており強固な水素結合を形成していると考えられた。このことから、

それぞれのアミノ酸残基が基質分子に明らかな影響を与えていることが確認できた。一方、KPF-S についてみると、Ser200 の初期構造は KPF-R とほぼ同様であったにもかかわらず、その距離は徐々に遠ざかり、シミュレーション終了時には基質分子に直接的な影響を与えるには困難な位置にまで移動していることが明らかとなった。また Ser201 についても、KPF-R で見受けられたような距離の保持はなく揺らいでいる様子が確認された。以上の結果より、導入基質の不斉の違いによる Ser200 および Ser201 の挙動の違いが不斉選択性を発現する要因であることが強く示唆された。

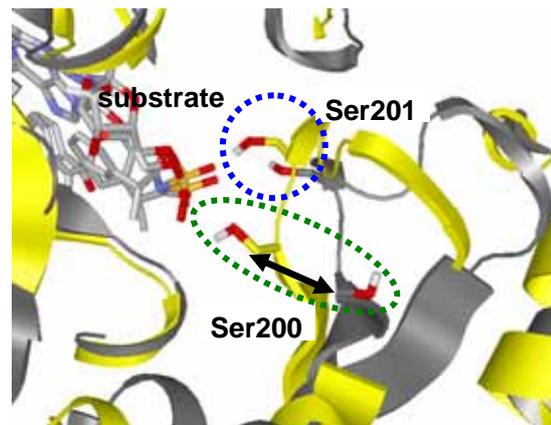


図 4. MD シミュレーション後の p-loop 周辺の比較  
 黄色:R-アナログ導入時, 灰色: S-アナログ導入時

### (4) 変異導入によるチオエステル化活性および不斉識別能力への影響

結晶構造解析および分子動力学シミュレーションの結果より、不斉識別には Ser200 と Ser201 の挙動が重要な役割を担っていることが示唆された。そこで、ヘイケボタル由来ルシフェラーゼ(LUC-H)について、これら残基に相当する部位をアラニンに置換した変異体(S200A, S201A 変異体)を作成し、チオエステル化活性および不斉識別能力に与える影響について確認を行った。これら変異体について比活性を測定したところ、S200A 変異体については、その値が検出限界以下にまで低下してしまうことが分かった。一方、S201A については、S-ケトプロフェンに対してその活性が完全に消失した一方、R-体に対しては野生型の 1/10 ながら、かろうじて活性を保持していることが分かった。また、本変異体について R-ケトプロフェンに対する速度論解析を試みたところ、 $k_{cat}$  項のみが低下することによって活性が変化していることが判明した。以上の結果より、これら p-loop 部分に存在するセリン残基がチオエステル活性の発現、立体選択性の発現に重要な役割をはたしていることを明らかにできた。

## 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4件)

A.Tagami, N.Ishibashi, D.Kato, N.Taguchi, Y.Mochizuki, H.Watanabe, M.Ito, S.Tanaka, "Ab initio quantum-chemical study on emission spectra of bioluminescent luciferases by fragment molecular orbital method.", Chem. Phys. Lett., 査読有, 472, 2009, pp.118-123.

K.Sasa, D.Kato, T.Uno, H.Hayashi, H.Nakano, "Computational Chemical Analysis of Firefly Luciferase Catalyzed Enantioselective Thioester Formation toward Ketoprofen", J. Comput. Chem. Jpn., 査読有, 7, 2008, pp.143-150.

A.Tagami, N.Ishibashi, D.Kato, N.Taguchi, Y.Mochizuki, H.Watanabe, M.Ito, S.Tanaka, "Theoretical Study on Emission Spectra of Bioluminescent Luciferases by Fragment Molecular Orbital Method", J. Com. Aid. Chem., 査読有, 9, 2008, pp.47-54.

D.Kato, K.Teruya, H.Yoshida, M.Takeo, S.Negoro, and H.Ohta, "New application of firefly luciferase - it can catalyze the enantioselective thioester formation of 2-arylpropanoic acid", FEBS J., 査読有, 274, 2007, pp.3877-3885.

### [学会発表](計13件)

加藤太一郎 : 「ホタルルシフェラーゼを用いた物質変換 - 常識にとらわれない酵素の利用展開を目指す - 」, 日本農芸化学会 2010 年度大会シンポジウム「酵素工学と生体触媒化学(4SY27)」, (平成 22 年 3 月 30 日, 東京大学 駒場キャンパス).

加藤太一郎, 平石善洋, 佐々和洋, 林治尚, 丹羽一樹, 武尾正弘, 根来誠司 : 「p-loop 部分への変異導入がホタルルシフェラーゼの酵素活性に与える影響」, 第 13 回生体触媒化学シンポジウム, (平成 21 年 12 月 3-4 日, 香川大学幸町キャンパス講堂).

加藤太一郎, 平石善洋, 佐々和洋, 林治尚, 丹羽一樹, 武尾正弘, 根来誠司 : 「ホタルルシフェラーゼのチオエステル化活性は変異導入によってどのような影響を受けるのか?」, 第 61 回日本生物工学会大会, (平成 21 年 9 月 23-25 日, 名古屋大学東山キャンパス).

加藤太一郎, 宮永佳奈, 番匠亜沙美, 中津亨, 武尾正弘, 根来誠司 : 「ホタルルシフェラーゼは基質の不斉をどのように見分けているのか?」, 第 61 回日本生物工学会大会, (平成 21 年 9 月 23-25 日, 名古屋大学東山キャンパス).

佐々和洋, 加藤太一郎, 宇野健, 林治尚, 中野英彦 : 「ホタル由来ルシフェラーゼの不斉判別に関する計算化学的解析」, 日本コンピュータ化学会 2008 秋季年会, (平成 20 年 9 月 27-28 日, 高知大学朝倉キャンパス).

加藤太一郎, 横山敬佑, 吉田裕充, 番匠亜沙美, 武尾正弘, 根来誠司 : 「ホタルルシフェラーゼの発光活性と 2-アリールプロパン酸に対する立体選択的なチオエステル化活性の関係」, 第 60 回日本生物工学会大会, (平成 20 年 8 月 27-29 日, 東北学院大学土樋キャンパス).

吉田裕充, 太田博道, 武尾正弘, 根来誠司, 加藤太一郎 : 「Brevibacterium sp. KU1073 株より単離されたチオエステル化酵素の機能解析」, 日本化学会第 88 春季年会, (平成 20 年 3 月 26-30 日, 立教大学池袋キャンパスおよび立教池袋中学校・高等学校).

加藤太一郎, 番匠亜沙美, 横山敬佑, 吉田裕充, 太田博道, 武尾正弘, 根来誠司 : 「ホタルルシフェラーゼを用いたチオエステル化反応の特徴付け」, 日本化学会第 88 春季年会, (平成 20 年 3 月 26-30 日, 立教大学池袋キャンパスおよび立教池袋中学校・高等学校).

番匠亜沙美, 横山敬佑, 吉田裕充, 太田博道, 武尾正弘, 根来誠司, 加藤太一郎 : 「ホタルルシフェラーゼによるチオエステル化反応の詳細とその応用」, 第 11 回生体触媒化学シンポジウム, (平成 20 年 1 月 24-25 日, 鳥取県民文化会館(小ホール)).

吉田裕充, 太田博道, 武尾正弘, 根来誠司, 加藤太一郎 : 「Brevibacterium sp. KU1073 株より単離されたチオエステル化酵素の特徴付け」, 第 11 回生体触媒化学シンポジウム, (平成 20 年 1 月 24-25 日, 鳥取県民文化会館(小ホール)).

加藤太一郎, 吉田裕充, 太田博道, 武尾正弘, 根来誠司 : 「ルシフェラーゼを用いた光学活性体の新規調製法」, 酵素工学研究会第 58 回講演会, (平成 19 年 10 月 12 日, 東京大学山上会館).

吉田裕充, 加藤太一郎, 太田博道, 武尾正弘, 根来誠司 : 「デラセミ化反応において立体識別を行う酵素の研究」, 化学プラットフォーム@関西 07 講演会, (平成 19 年 9 月 15 日, 兵庫県立大学書写キャンパス書写記念会館ホール).

番匠亜沙美, 加藤太一郎, 横山敬佑, 太田博道, 武尾正弘, 根来誠司 : 「ルシフェラーゼを用いた新しい光学活性体調製法」, 化学プラットフォーム@関西 07 講演会, (平成 19 年 9 月 15 日, 兵庫県立大学書写キャンパス書写記念会館ホール).

〔図書〕(計1件)

加藤太一郎, “生体触媒によるカルボン酸の変換反応と光学活性体調製”, 小宮山眞監修, 酵素利用技術体系～基礎・解析から改変・高機能化・産業利用まで～, 第5編 酵素を操る, 第1章 酵素を使った物質合成(エヌ・ティー・エス出版), pp.434-438, 2010.

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等：  
研究代表者の所属する研究グループのHP  
<http://www.eng.u-hyogo.ac.jp/msc/msc3/top.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

加藤 太一郎 (KATO DAI-ICHIRO)

研究者番号：60423901

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし