

令和 3 年 6 月 21 日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K07317

研究課題名(和文) 非凍結結晶を用いたタイムラプスX線回折測定による酵素反応の解析

研究課題名(英文) In crystallo thermodynamic analysis of the cofactor conformational change of copper amine oxidase

研究代表者

村川 武志 (Murakawa, Takeshi)

大阪医科大学・医学部・助教

研究者番号：90445990

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：現在、タンパク質結晶のX線回折測定は、放射線損傷を低減するため極低温で行うことが多い。しかし、結晶を凍結させることにより室温で取りうる多様な構造が失われ、また得られた構造は温度情報が曖昧なため、エネルギー論的な議論を行うことが難しい。本研究では、近年開発されたHAG法(湿度調整と水溶性ポリマーのコーティングを用いたタンパク質結晶マウント法)を発展させ、土壌細菌由来銅含有アミン酸化酵素について、さまざまな温度、pH条件下において非凍結酵素結晶のX線回折測定を行い、平衡状態の構造変化を熱力学的に解析した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、機能している状態のタンパク質の構造変化を、熱力学的に理解する一般的な手法が開発された。今後さらに、各種タンパク質の機能を、立体構造や平衡状態の変化をもとに解明し、有用酵素の作製や酵素を阻害する薬剤の開発などにも役立たせる基礎的な方法論として発展が期待できる。また、今まで結晶構造は溶液構造と異なり非生理的なのではないかという懸念があったが、今回の解析で、むしろ結晶構造の方が細胞内のタンパク質の状態を反映しているという重要な知見も得られた。

研究成果の概要(英文)： Many of the protein X-ray crystallographic analyses are currently performed at cryogenic temperatures to reduce the radiation damage. However, the obtained structures are ambiguous in terms of temperature information. In this study, we applied the humid air and glue-coating (HAG) method, which was initially developed as a protein crystal-mounting method applicable to noncryogenic X-ray crystallography, to thermodynamically analyze the conformational change of the cofactor in noncryocooled crystals of bacterial copper amine oxidase. The temperature-controlled HAG method provides a technique for thermodynamic analysis of conformational changes occurring in protein crystals that are hardly scrutinized by conventional cryogenic X-ray crystallography.

研究分野：酵素科学

キーワード：トパキノン HAG法 銅含有アミン酸化酵素

## 1. 研究開始当初の背景

現在、タンパク質結晶の X 線構造解析は、放射線損傷を低減するため極低温で凍結結晶の回折測定を通じて行われることが多い。その結果得られた構造は、タンパク質が実際に機能する 20~30°C 付近での立体構造とは、基本的には大きく変わらないとされている。しかし、凍結時に室温でとりうる多彩な構造のいくつかが失われており、タンパク質が実際にどのように働くかを説明できないことが懸念されている。さらに、フラッシュクーリングによって凍結された結晶構造は温度情報があいまいなことから、エネルギー的な議論を行うことが困難であることも、酵素反応論を専門とする研究者などから指摘されていた。タンパク質を含む化学反応の解析は、一般には正確な温度条件下で行われ、その実験結果をもとに議論される。すなわち、速度的な解析や、分光学的手法を用いた構造変化の測定 (CD スペクトルや表面プラズモン共鳴など) などは、正確な温度情報と組み合わせることでエネルギー的な解釈が可能となるが、これまでの X 線結晶構造解析では、その点が考慮されていなかった。

近年、上記理由により、非凍結結晶を用いた X 線回折測定が脚光を浴びつつある。特に、高輝度光科学研究センター (JASRI) が中心となって開発した Humid Air and Glue-coating method (HAG 法) は、凍結と非凍結結晶測定のそれぞれの利点をあわせ持ち、かつ実験デザインの自由度が高いことから、多くのタンパク質研究者の注目を集めている。本研究は HAG 法を用いた銅含有アミン酸化酵素コンホメーション変化の熱力学的解析を行った。

## 2. 研究の目的

銅含有アミン酸化酵素は、微生物から哺乳動物に至る生物界に広く分布し、種々の生理活性一級アミン類の酸化的脱アミノ反応を触媒する。本酵素はサブユニット分子量 70,000~95,000 のホモ二量体構造を持ち、各サブユニットは、補欠金属の 2 価銅イオンとペプチド・ビルトイン型キノン補酵素、トパキノ (TPQ) を含有している (図 1A)。TPQ は酵素遺伝子の中でアミノ酸残基のチロシンとしてコードされており、銅と酸素の存在下で自己触媒的にチロシン残基から形成される。本酵素の触媒過程は、TPQ の酸化還元状態により、還元的半反応と酸化的半反応の二つに分けられ、各反応中間体は可視領域に特徴的な吸収スペクトルを持つ。

我々はこれまで土壌細菌 *Arthrobacter globiformis* 由来の銅アミン酸化酵素 (AGAO) を用いて、反応機構の解析を行ってきた。最近、嫌気条件下では前半の還元的半反応のみが進行し、二つの反応中間体、アミノレゾルシノール (TPQ<sub>amr</sub>) とセミキノン (TPQ<sub>sq</sub>) の平衡状態となることを明らかにした (図 1B)。TPQ<sub>amr</sub> から TPQ<sub>sq</sub> への過程は吸熱反応であり、補酵素 TPQ は銅イオンに配位しない off-Cu 型から銅イオン配位型である on-Cu 型へと大きくコンホメーション変化する (図 1A 拡大図)。分光学的な解析からは、TPQ<sub>amr</sub> と TPQ<sub>sq</sub> の平衡は、温度および pH に依存することが明らかとなった。そのため我々は、次に pH に依存した構造変化の解析を試みた。具体的には、さまざまな pH で調製した反応中間体結晶を液体窒素で凍結し、回折測定を行った。ところが同一 pH で調製しても、結晶ごとのデータのバラツキが非常に大きく、また、溶液実験のデータとも大きく異なった。これは、TPQ<sub>amr</sub> と TPQ<sub>sq</sub> の平衡は pH だけでなく温度にも依存することから、凍結作業時の温度変化により平衡が移動したためと考えられた。ここで疑問となったのが、結晶の温度である。たとえば上記実験では、結晶は以下のようにさまざま

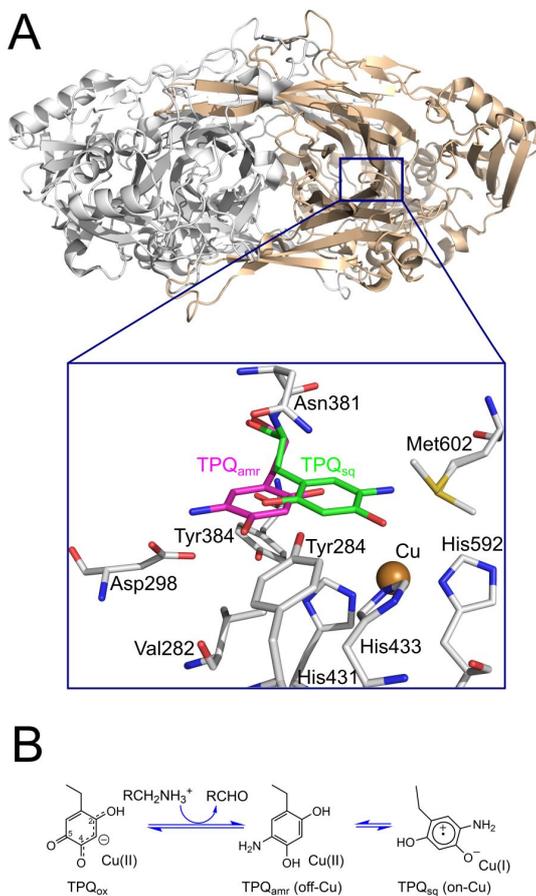


図 1 AGAO の構造と触媒メカニズム (A) AGAO の構造。拡大図は活性中心。off-Cu (TPQ<sub>amr</sub>) と on-Cu (TPQ<sub>sq</sub>) を、それぞれマゼンタと緑で色づけした。(B) 推定される触媒機構。TPQ<sub>ox</sub>: 酸化型, TPQ<sub>amr</sub>: アミノレゾルシノール, TPQ<sub>sq</sub>: セミキノンラジカル。

たとえば上記実験では、結晶は以下のようにさまざま

な温度を経由している。

- ・結晶析出 (16°C)
- ・嫌気ボックス内で嫌気化→基質溶液への浸漬 (25~30°C)
- ・結晶のピックアップ (室温~嫌気ボックス内の顕微鏡の発熱により 30~40°C?)
- ・液体窒素に浸して凍結 (およそ -200°C)

フラッシュクーリングにより凍結した結晶構造は、どの温度における構造を反映しているのだろうか? そもそも、すばやく液体窒素に浸し、結晶を凍結した場合と、徐々に液体窒素に近づけ凍結した場合には、結晶は同一条件といえるのだろうか? 化学平衡は基本的に温度の影響を受けるので、作業時の温度が異なれば、溶液組成が同じでも得られる構造は異なるはずである。すなわち、pH 依存性を正確に測定するには、温度を一定にしなければならない。また、このことは、もし結晶の温度を正確に調節できれば、温度変化による平衡の移動と、それに伴うコンホメーション変化を直接観察することが可能であることを示唆している。

### 3. 研究の方法

前節のアイデアを確かめるため、我々はタンパク質結晶の新しいマウント法である HAG 法を用いた解析を試みた。HAG 法では凍結法と同様なループ上に結晶をすくうが、ポリビニルアルコール (PVA) で結晶を包み、湿度が調節されたガス (調湿ガス) を吹きつけながら回折測定を行う。PVA が結晶と調湿ガス間で水分を緩やかに仲介することによって、結晶の乾燥が防がれる。また、凍結結晶作製の際に添加されるグリセロールなどに比べ、PVA は分子量が大きく結晶内に浸透せず、結晶が損傷しにくい。上記の利点により、凍結結晶に比べ大幅なデータの改善がみられた例がいくつか報告されている。さらに、本研究の実施時期にあわせて、いくつかの改良が既存の HAG 法装置に加えられた。まず湿度調整ガスは、これまで大気ガスを湿潤したものを室温で用いていたが、窒素ガスでの利用が可能になり、そこに温度制御装置が加えられた。さらに温度調整が可能な嫌気ワークベンチが作製され、SPring-8 のビームライン内に設置されたこれらにより、結晶への基質添加から回折測定までを、嫌気状態で、かつ温度が正確に制御された環境下で実施することが可能となった。

実験のアウトラインを以下に示す。まず著者らの研究室で AGAO 結晶の嫌気化を行い、嫌気状態を保ったまま SPring-8 に輸送した。その後、ビームラインに設置した調温嫌気ワークベンチ内で結晶温度を調節後、基質アミンを添加した。結晶の色の変化から反応が平衡に達したことを確認したのち、HAG 法により結晶をマウントし、温度と嫌気環境を保ったまま回折測定を行った。凍結条件と比べて非凍結条件での回折実験は、X 線照射による損傷が甚大である。そこで、十分な厚みのアルミニウムで X 線量を弱め、かつ比較的大きな結晶を用いて照射位置を少しずつ移動させながら X 線を照射することにより、吸収線量を 1 データあたり 4.8 kGy に抑えて測定を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) 結晶内における $TPQ_{sq}/TPQ_{amr}$ 平衡の熱力学的解析

各温度における平衡状態の構造を図 2A に示す。基質はエチルアミンとし、pH 6.0 で測定を行った。本酵素は 2-フェニルエチルアミン (2-PEA) がよい基質になるが、親和性の高い基質を用いると、生成物アルデヒドが活性中心に残り反応に影響することが示唆されている。このため、今回は親和性の低い基質 (すなわち、生成物も活性中心から速やかに排出されると期待される) を用いた。構造解析の結果、溶液での測定と同様に、温度が上昇するに従って  $TPQ_{amr}$  の割合が減少し、それに伴い  $TPQ_{sq}$  が増加した (図 2B)。また、HAG 法を用いた結晶顕微分光測定によっても、温度に依存した  $TPQ_{sq}$  の特徴的な吸収スペクトルの変化が観測され、上記の構造データとよく一致した。

構造解析により得られた中間体の比率

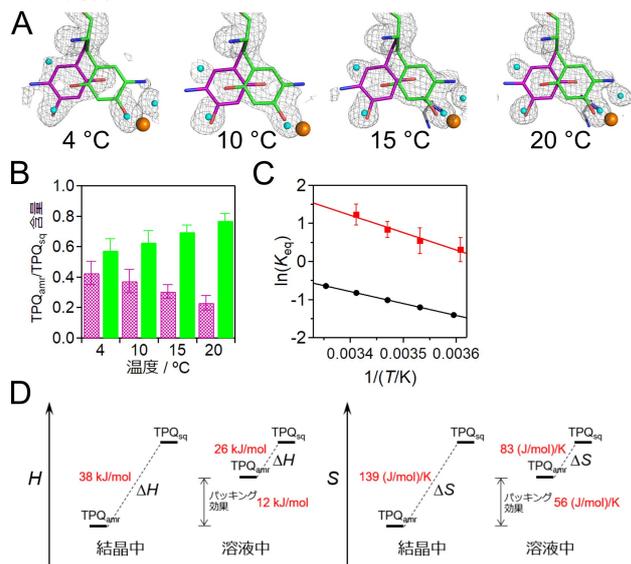


図 2  $TPQ_{sq}/TPQ_{amr}$  平衡の温度依存性 (A) 4, 10, 15, および 20°C における  $TPQ_{sq}$  (緑色) および  $TPQ_{amr}$  (マゼンタ) のモデルを TPQ についての  $F_o-F_c$  オミットマップと重ね合わせた。(B) 各温度での  $TPQ_{amr}$  および  $TPQ_{sq}$  の平均占有率。マゼンタ:  $TPQ_{amr}$ , 緑:  $TPQ_{sq}$ 。(C) 溶液および結晶中の  $TPQ_{sq}/TPQ_{amr}$  平衡の van't Hoff プロット。溶液中 (黒丸), 結晶中 (赤四角) で示した。(D) 結晶内でのパッキングによる熱力学的なパラメータへの寄与を模式的に示した。

( $TPQ_{sq}/TPQ_{amr}$ ) を van't Hoff プロットし,  $TPQ_{sq}$  形成過程の熱力学的パラメータを求めた (図 2C). その結果, 溶液中 ( $\Delta H^{\circ}_{solution} = 26 \text{ kJ/mol}$ ,  $\Delta S^{\circ}_{solution} = 83 \text{ J/mol/K}$ ) と結晶中 ( $\Delta H^{\circ}_{crystal} = 38 \text{ kJ/mol}$ ,  $\Delta S^{\circ}_{crystal} = 139 \text{ J/mol/K}$ ) の両方とも,  $\Delta H^{\circ}$  と  $\Delta S^{\circ}$  の両方が正の値であり, 本過程が, エントロピー項に依存して進行 (エントロピー駆動) することを示した. また,  $TPQ_{amr}$  から  $TPQ_{sq}$  への構造変化における熱の消費 ( $\Delta H^{\circ} > 0$ ) は, エントロピーの増加 ( $\Delta S^{\circ} > 0$ ) によってほとんど相殺され, その結果, 自由エネルギーの変化 ( $\Delta G^{\circ}$ ) はわずかであった (溶液中  $2.0 \text{ kJ/mol}$ , 結晶中  $-3.0 \text{ kJ/mol}$ ). つまり,  $TPQ_{sq}/TPQ_{amr}$  の平衡は, 結晶中と溶液中のいずれにおいても, 両方向に起こりうるエネルギー的にバランスのとれた過程といえる.

得られた熱力学的パラメータについて, 活性中心の構造 (図 1A 拡大図) に基づき考察する. off-Cu 型の  $TPQ_{amr}$  の状態では, TPQ 環が Asn381 および Tyr384/Val282 の側鎖にはさまれ, さらに Tyr284 との短い (強い) 水素結合 (約  $2.2 \text{ \AA}$ ) があるため, 動きが制限されている. 一方, on-Cu 型の  $TPQ_{sq}$  では, Met602 との弱い水素結合 (約  $3.0 \text{ \AA}$ ) はあるものの, TPQ の芳香環の周囲には, C $\beta$ -C $\gamma$  結合で回転するのに十分な空間がある. また, Asn381 および Tyr384/Val282 の側鎖自体も, TPQ をはさんでいる ( $TPQ_{amr}$ ) 状態よりも, はさんでいない ( $TPQ_{sq}$ ) 方が自由度は増す. 以上より,  $TPQ_{sq}$  は  $TPQ_{amr}$  よりも高いエントロピーを持つといえる. つまり,  $TPQ_{sq}$  への構造変化の過程で消費される熱は, 主に  $TPQ_{amr}$  と Tyr284 との強い水素結合の切断に使用され, エントロピーの増加は, TPQ 環と  $TPQ_{amr}$  周辺残基の自由度の増加によるものと考えられる. また,  $\Delta H^{\circ}$  と  $\Delta S^{\circ}$  は, 溶液中よりも結晶中の方が大きな値を示したが, この理由は以下のように説明できる. 結晶中における分子の充填効果 (パッキング) は, エネルギー的に有利な非共有相互作用をもたらすと予想されるが, これは  $TPQ_{sq}$  よりも  $TPQ_{amr}$  の方がより顕著であると考えられる. なぜなら,  $TPQ_{sq}$  と銅イオンとの結合は, 結晶と溶液の両方で基本的に同様であり, パッキングの影響は低い,  $TPQ_{amr}$  は周辺残基に柔軟に保持されているため, パッキングによる相互作用の増加 (最適化) が期待できる. つまり, 結晶内では溶液中と比べ,  $TPQ_{amr}$  のエンタルピーとエントロピーが減少し,  $\Delta H^{\circ}$  と  $\Delta S^{\circ}$  が溶液中よりも増加したと考えられる (図 2D). 得られたデータより計算した結晶内でのパッキングの寄与は,  $\Delta\Delta H^{\circ}$  ( $\Delta H^{\circ}_{crystal} - \Delta H^{\circ}_{solution}$ ) が  $12 \text{ kJ/mol}$ ,  $\Delta\Delta S^{\circ}$  ( $\Delta S^{\circ}_{crystal} - \Delta S^{\circ}_{solution}$ ) が  $56 \text{ (J/mol) /K}$  と見積もられた. このように結晶のパッキング効果の熱力学的パラメータを実験的に決定したのは, 本研究が初めてである.

## (2) 結晶内における平衡の pH プロファイル

次に我々は, 温度一定 ( $15^{\circ}\text{C}$ ) の条件で, 結晶内での  $TPQ_{sq}/TPQ_{amr}$  平衡における pH の影響を調べた. まずはエチルアミンを基質として測定したが, 結晶中の  $TPQ_{sq}$  と  $TPQ_{amr}$  の占有率は測定された pH 6.0 ~ 10.0 でほぼ一定であり (図 3A), また, 溶液中でも同様であった. この結果は, 基質として 2-PEA を用いた溶液実験の結果 ( $TPQ_{sq}/TPQ_{amr}$  平衡が pH に依存し,  $pK_a = 5.96$  および 7.74 を持つ二つの解離基が関与) と対照的であった. そこで, pH 依存性の構造的根拠を得るため, 次に 2-PEA を用いて結晶内での平衡の pH 依存性を調べた. 得られた構造は, pH により大きく異なった (図 3B). pH 6.0 では, off-Cu 型である生成物 シッフ塩基 ( $TPQ_{psb}$ ) が認められ, おそらく, 基質結合ポケット内に残存した生成物 (フェニルアセトアルデヒド:PAA) と  $TPQ_{amr}$  との縮合反応により形成されたと考えられた. pH 7.0 では 2 種類の  $TPQ_{psb}$  (pH 6 でみられた *cis* 型と, シッフ塩基二重結合に関して配置が異なる *trans* 型) が形成された. さらに pH が上昇すると, pH 8.0 では  $TPQ_{amr}$  と  $TPQ_{sq}$  の平衡状態が観察され, pH 9.0 と 10.0 で

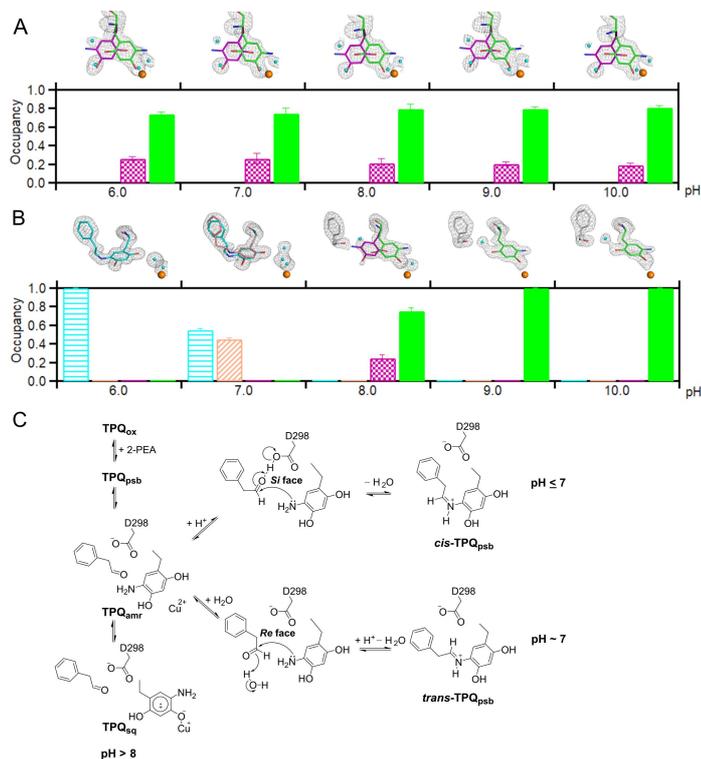


図 3 温度一定条件下における平衡構造の pH プロファイル. 基質は (A) エチルアミンおよび (B) 2-PEA を用い,  $15^{\circ}\text{C}$  で各 pH において測定した. pH 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, および 10.0 での活性部位モデルを, 残基 382 および生成物アルデヒドについての  $F_o - F_c$  オミットマップと重ね合わせた. 各 pH での中間体構造の中間体の平均占有率は棒グラフで示した. シアン: *cis*- $TPQ_{psb}$ , 茶: *trans*- $TPQ_{psb}$ . マゼンタ:  $TPQ_{amr}$ , 緑:  $TPQ_{sq}$ . (C) 2-PEA を基質とした嫌気条件下における反応スキーム.

は TPQ<sub>sq</sub> のみが得られた。また、pH 8.0, 9.0, および 10.0 では基質結合部位に PAA も結合していた。

得られた構造に基づき、2-PEA を基質とした反応について考察すると、pH > 8 における TPQ の off-Cu 型から on-Cu 型へのコンホメーション変化の推進力の一つは、おそらく、活性中心内に残存する PAA の芳香環の疎水性によるものと考えられる。Tyr284 と TPQ<sub>amr</sub> との短い水素結合は、プロトンを共有する強い極性相互作用であり、疎水性環境を好まない。プロトン濃度が低下する塩基性条件下では、PAA の疎水性の影響が増大するため、Tyr284 は共有しているプロトンを受け取り電氣的に中性となり、プロトンを解離し負電荷を持った TPQ<sub>amr</sub> は on-Cu へとコンホメーション変化することで PAA から離れたと考えられる。また、pH に依存した *cis* 型および *trans* 型の TPQ<sub>psb</sub> の形成は、異なる立体配座の PAA カルボニル炭素への *Si* または *Re* 面への求核攻撃により説明できた (図 3C)。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Murakawa Takeshi, Baba Seiki, Kawano Yoshiaki, Hayashi Hideyuki, Yano Takato, Kumasaka Takashi, Yamamoto Masaki, Tanizawa Katsuyuki, Okajima Toshihide	4. 巻 116
2. 論文標題 In crystallo thermodynamic analysis of conformational change of the topaquinone cofactor in bacterial copper amine oxidase	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America	6. 最初と最後の頁 135 ~ 140
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1811837116	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Shoji Mitsuo, Murakawa Takeshi, Boero Mauro, Shigeta Yasuteru, Hayashi Hideyuki, Okajima Toshihide	4. 巻 10
2. 論文標題 Unique protonation states of aspartate and topaquinone in the active site of copper amine oxidase	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 RSC Advances	6. 最初と最後の頁 38631 ~ 38639
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d0ra06365g	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Murakawa Takeshi, Kurihara Kazuo, Shoji Mitsuo, Shibasaki Chie, Sunami Tomoko, Tamada Taro, Yano Naomine, Yamada Taro, Kusaka Katsuhiro, Suzuki Mamoru, Shigeta Yasuteru, Kuroki Ryota, Hayashi Hideyuki, Yano Takato, Tanizawa Katsuyuki, Adachi Motoyasu, Okajima Toshihide	4. 巻 117
2. 論文標題 Neutron crystallography of copper amine oxidase reveals keto/enolate interconversion of the quinone cofactor and unusual proton sharing	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America	6. 最初と最後の頁 10818 ~ 10824
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1922538117	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 村川 武志、馬場 清喜、岡島 俊英	4. 巻 91
2. 論文標題 銅含有アミン酸化酵素触媒反応におけるコンホメーション変化のin crystallo熱力学解析	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 生化学	6. 最初と最後の頁 565 ~ 571
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14952/SEIKAGAKU.2019.910565	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 村川武志
2. 発表標題 銅含有アミン酸化酵素触媒機構の " in crystallo " 熱力学的解析
3. 学会等名 大阪大学蛋白質研究所セミナー（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 村川武志, 馬場清喜, 河野能顕, 林秀行, 矢野貴人, 熊坂崇, 山本雅貴, 谷澤克行, 岡島俊英
2. 発表標題 銅含有アミン酸化酵素触媒機構の " in crystallo " 熱力学的解析
3. 学会等名 日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐々木康, 村川武志, 谷澤克行, 岡島俊英,
2. 発表標題 銅アミン酸化酵素の補酵素生成における初期反応中間体の解析
3. 学会等名 酵素補酵素研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 村川武志, 馬場清喜, 河野能顕, 林秀行, 矢野貴人, 熊坂崇, 山本雅貴, 谷澤克行, 岡島俊英,
2. 発表標題 In crystallo thermodynamic analysisによる銅アミン酸化酵素の反応機構解析
3. 学会等名 酵素補酵素研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 庄司光男, 村川武志, 重田育照, 岡島俊英
2. 発表標題 銅含有アミン酸化酵素における触媒反応中のプロトン化状態についての理論的解明
3. 学会等名 第17回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2017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
研究分担者	林 秀行 (Hayashi Hideyuki)  (00183913)	大阪医科大学・医学部・教授  (34401)	
研究分担者	馬場 清喜 (Baba Seiki)  (00437344)	公益財団法人高輝度光科学研究センター・タンパク質結晶解析推進室・主幹研究員  (84502)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------