

平成21年 5月 21日現在

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2006～2008

課題番号：18350085

研究課題名（和文）プロトン・電子移動を伴うビルトイン型キノン補酵素依存性酵素の精密反応機構

研究課題名（英文）Structural and kinetic studies for the refined reaction mechanism in built-in-cofactor dependent quinone enzymes mediating proton and electron transfers

研究代表者

岡島 俊英 (OKAJIMA TOSHIHIDE)

大阪大学・産業科学研究所・准教授

研究者番号：10247968

研究成果の概要：

ビルトイン型キノン補酵素を含む銅含有アミン酸化酵素およびキノヘモプロテイン・アミン脱水素酵素を対象に、X線結晶解析による反応中間体の構造解析と溶液中の詳細な速度論解析を組み合わせることによって、その反応メカニズムを解析した。酵素反応を効率的に進行させるために、酵素反応におけるプロトンと電子移動が、補酵素と酵素構造の連携によって、精密に制御されていることがわかった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	8,400,000	2,520,000	10,920,000
2007年度	3,000,000	900,000	3,900,000
2008年度	3,000,000	900,000	3,900,000
年度			
年度			
総計	14,400,000	4,320,000	18,720,000

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：①酵素 ②蛋白質 ③トンネル効果 ④X線結晶解析 ⑤補酵素

## 1. 研究開始当初の背景

(1)酵素によって触媒される化学反応は、基本的に各種のプロトンと電子の移動を伴う。酵素触媒反応のメカニズムを理解することにおいて、反応過程における両者の移動の詳細を調べることの重要性はいうまでもない。これまでに、研究代表者らは、タンパク質に共有結合し、アミノ酸残基のひとつとしてポリペプチド結合中に組み

込まれたペプチド・ビルトイン型キノン補酵素を含む酵素群を対象に、プロトンと電子の出入りを含むその反応機構を詳細に解析してきた。しかし、補酵素を含む酵素の反応機構を解明する際には、補酵素自体の反応性と直接触媒反応に関与する残基に目が向けられており、それらを囲むタンパク質構造がどのように反応場を提供しているのかあまり注目されていなかった。例えば、酵素の活性

中心から大きく離れたアミノ酸の変異が反応効率に大きく影響していることが多くの酵素において報告されている。このような知見は、タンパク質構造の活性中心ばかりでなく、構造全体が酵素反応触媒に重要であることを端的に示している。

(2)また、これまで酵素反応に関しては、主に古典力学の範疇でその触媒機構が論じられてきたが、トンネリングなどの量子化学的効果

により、その反応が加速されているケースがいくつか見つかってきている。すなわち、酵素は、反応物に遷移状態のような高いエネルギー障壁

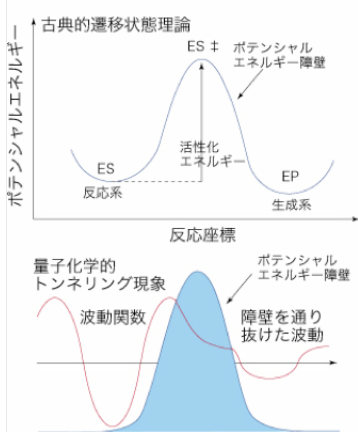


Fig. 1 トンネリングの概念

を越えさせて、化学反応進行させるばかりでなく、量子化学的効果によって障壁をすり抜けることによって反応進行を可能にしている (Fig. 1)。一般的に軽い粒子ほど波動性が高く、トンネリング現象によって移動できる粒子の移動距離は長くなる。例えば、プロトンに比べて電子でははるかに長い距離を移動することができる。したがって、量子化学的なプロトントンネリングの指標として、プロトンと重水素の場合の反応速度の比率、同位体効果が用いられる。古典論におけるその同位体効果の理論的限界値は約 8 であるが、プロトントンネリングが起こる酵素反応においては、80 を越えるような同位体効果さえ報告されている。重要な仮説として、タンパク質全体の熱的なゆらぎがプロトン移動距離を短縮させ、周囲のアミノ酸残基が作り出す環境にも影響し、プロトントンネリングの効率を高めているということが提唱されている。

(3)本研究では、トパキノン (TPQ) 補酵素を含む *Arthrobacter globiformis* 由来銅含有アミン酸化酵素 (AGAO) とシステイントリプトフィルキノン (CTQ) 補酵素を含む *Paracoccus denitrificans* 由来キノヘモプロテイン・アミン脱水素酵素 (QHNDH) を対象とする。両酵素とも 1 級アミンを酸化し、アルデヒドとアンモニアを生成する酵素であるが、前者は生じた 2 電子を酸素分子に手渡し過酸化水素を生じるのに対し

て、後者は 2 電子を直接、電子受容体タンパク質チトクローム  $c_{550}$  (cyt $c_{550}$ ) に受け渡す点で大きく異なっている。電子移動については、QHNDH ではおおまかに、基質アミンが補酵素 CTQ と反応し、生じた還元型補酵素から 2 電子が 2 つのヘムを経て、分子外の cyt $c_{550}$  へと転移されると想定されている。タンパク質分子内の環境によって、この電子の転移速度が制御されることが予想されるが、その詳細は明確ではない。AGAO では短距離の電子移動のみが認められる。本研究で着目する触媒塩基 Asp298 によるプロトン引き抜き過程においては、重水素化アミン基質を用いた解析から、基質 C1 *pro-S* プロトンが 99% 以上立体特異的に引き抜かれることを明らかにした。興味深いことに、重水素化基質における同位体効果の違いから判断して、プロトン引き抜き反応は、基質フェニルエチルアミンでは古典的な遷移状態理論で理解されたが (同位体効果 約 4)、基質チラミンでは、トンネリング効果が関与していることが予想された (同位体効果 約 14)。類似した基質であるにもかかわらず、なぜ片方の基質でのみ量子化学的な効果が観測されたのか全く不明であり、今回の研究を計画する大きなきっかけとなった。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、これらキノ補酵素含有酵素における電子転移とプロトン転移に焦点を絞り、転移がタンパク質側の構造によってどのように精密に制御されているのか、X 線結晶解析による反応中間体の構造解析と溶液中の詳細な速度論解析を組み合わせることによって解析することにある。すなわち、量子化学的効果を中心に酵素の触媒反応の加速化機構がどのようなキノ補酵素含有酵素の構造的要因で作り出されているのか明らかにしたい。

## 3. 研究の方法

(1) 銅含有アミン酸化酵素の調製と反応速度論的な解析

①野生型 AGAO は、大腸菌を宿主とした組換え体発現系において、アポ酵素として大量発現させた。精製されたアポ酵素は、CuSO<sub>4</sub> 存在下において一晚透析することによって、TPQ 補酵素を含有する活性型に変換した。基質ポケットのアミノ酸残基への変異導入は、QuikChange 法によって行った。

②嫌気的条件下における還元的半反応中のスペクトル変化の測定は、高速ストップフロー分光光度計 SX.17MV (Applied Photophysics) を用いて行った。酵素溶液や基質水溶液あるいは分光計経路内は、全て予め嫌気状態にして測定を行った。得られた野生

型及び各変異型酵素の還元的半反応におけるスペクトル変化から、グローバルアナリシス法により、各反応ステップにおける反応速度定数を算出した。

(2) 銅含有アミン酸化酵素の反応中間体立体構造の解明

野生型と各変異型酵素の結晶化は微量透析法により行った。生成した結晶は、X線結晶回折測定の前に抗凍結剤として45% (v/v) のグリセロールを加えた結晶化バッファーでソーキングし、基質であるフェニルエチルアミンと嫌気性条件下において反応させた。結晶は約40-60分間の基質ソーキングの後、液体四フッ化炭素にて急速凍結した。これらの結晶は、X線結晶回折測定の前に結晶顕微分光測定を行った。X線回折測定は100 Kのクライオストリーム中で、X線波長0.9 Å、DIP6040検出器(Bruker-AXS)を用いてSPRING 8ビームラインBL44XUで行った。回折データの処理とスケーリングはMOSFLM及びSCALAをそれぞれ用いた。構造精密化、電子密度マップの計算、および溶媒分子の配置はCNSを用いた。また、マニュアルモデリングにはCootを用いた。

(3) キノヘモプロテイン・アミン脱水素酵素の電子伝達の解析

組換え体QHNDHの発現は、元々の宿主菌*P. denitrificans*を用いて行った。広宿主ベクターpBBR-322上にブチルアミン誘導プロモーターとHis-tagが付加されたαサブユニット遺伝子を連結して導入し、αサブユニット発現ベクターpKO81を構築した。αサブユニットに対する変異導入は、QuikChange法によって行った。この系でQHNDHを発現させた場合、ペリプラズム画分には宿主由来の野生型酵素とαサブユニット変異型酵素が混在することになる。しかし、αサブユニット変異型酵素ではαサブユニットのN末端にHisタグが存在するため、Niアフィニティークラムを用いて精製することによって、αサブユニット変異型酵素のみを得ることができる。

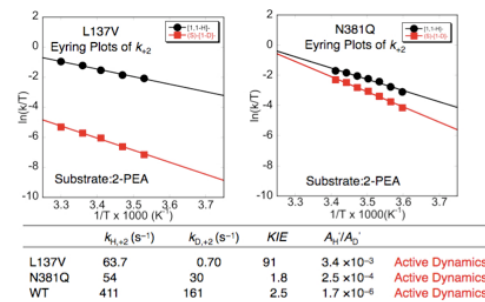
#### 4. 研究成果

(1) 銅含有アミン酸化酵素の基質ポケット変異によるプロトン引き抜き反応への影響

① 銅含有アミン酸化酵素において、7種類の基質ポケット変異型酵素を作製し、その定常状態速度論を行った。基質には、通常の2-phenylethylamine (PEA)、tyramine、および0-methyl-tyramineとそれらの重水素標識化合物を基質として、 $k_{cat}$ の比率か

らみかけの同位体効果を調べた。その結果、Y302V、Y302S、L137V変異型酵素などにおいてPEAを基質としたときに、プロトン引き抜きにおいてプロトントンネリングの可能性を示す大きな同位体効果があることが判明した。さらに、トンネリングのメカニズムを明らかにするため、ストップドフローを用いた前定常状態解析によって、プロトン引き抜きの反応のみにおける同位体効果の温度依存を解析した(Fig. 2)。PEAに対して、同位体効果は大きく異なるが、周囲の熱振動によって促進されるActive dynamicsによって、プロトントンネリングが起きていることが明らかとなった。

② Active dynamicsによるトンネリングを引き起こすために、どのような相互作用が必要なのか構造情報を得るために、X線結晶解析によってL137Vの基質アナログ結合型の立体



$A_H/A_D$ の上昇より、WTと比較してgatingが低下している

Fig. 2. プロトン引き抜き反応の同位体効果の温度依存

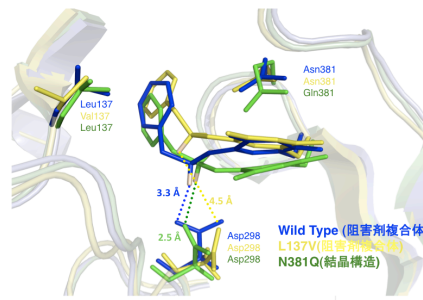


Fig. 3. L137VおよびN381Q変異型酵素のSSB中間体構造

構造を決定した(Fig. 3)。その結果、基質シッフ塩基中間体のコンフォメーション変

化に大きな変化が見られ、触媒塩基であるAsp298と引き抜かれるプロトンとの間の距離が大きく増大していることがわかった。おそらく、この距離の違いは静的な状態を見ているものであり、実際に引き抜かれる状態は熱的な振動によって、距離が近接するものと考えられるが、L137Vではプロトンの移動距離は大きく増大していると考えられる。このため、熱的な振動による促進効果は、



野生型酵素に比較してL137Vでは低下していることがわかった。

(2) コンフォメーション変化による銅含有アミン酸化酵素のセミキノンラジカル反応中間体の形成

①銅型酵素結晶と Ni および Co 金属置換型結晶を嫌気条件下、過剰の基質アミンでソーキングし、それらを瞬間凍結した。結晶の顕微分光スペクトルの解析結果より、銅型酵素においては TPQsq 反応中間体が形成され、Ni および Co 金属置換型結晶ではプロダクトシッフ塩基反応中間体が含まれていることが予想された。実際に X 線結晶解析によって構造決定してみると、銅型酵素においては、TPQ は基質と adduct を形成しておらず、TPQsq 反応中間体が形成されていることを裏付けた (Fig. 4)。一方、Ni および Co 金属置換型結晶ではプロダクトシッフ塩基反応中間体と還元型 TPQ / 生成物アルデヒドが混在していた。興味深いことに TPQsq 反応中間体は銅イオンに直接配位した構造を形成していた。得られた構造より、TPQsq の形成は TPQ がコンフォメーション変化し、還元型 TPQ から銅イオンへの移動距離が短くなることによって、効率的に進行することがわかった。

②銅含有アミン酸化酵素の反応中間体における電子移動とプロトントンネリング反応に必要なコンフォメーション変化を解明するため、ストップドフローにおいて各反応素過程の反応定数の粘度依存性を解析した。その結果、電子移動を伴う還元型 TPQ からセミキノンラジカルが形成される過程にのみ溶液の粘度の影響が見られるばかりでなく、この効果は活性中心に入りうる低分子増粘剤のみ観測された。この結果は、反応中間体の電子移動には還元型 TPQ のコンフォメーション変化が重要であることを強く支持する。

(3) プロトンと電子の移動に関する TPQ のコン

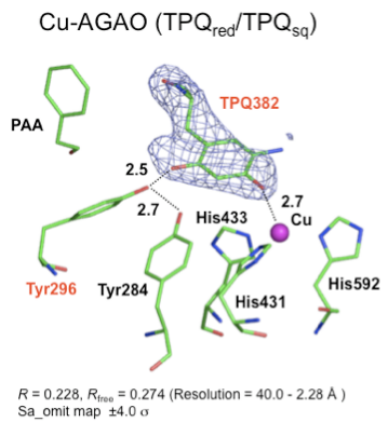


Fig. 4. TPQsq 反応中間体の立体構造

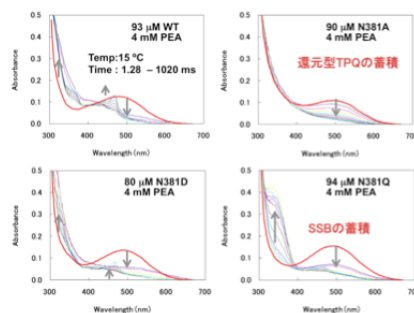


Fig. 5. N381 変異型酵素の還元の半反応におけるスペクトル変化

フ  
オ  
メ  
ー  
シ  
ョ  
ン  
変  
化  
の  
解  
析  
①  
TP  
Q  
の  
N  
末  
端  
側

に隣接する Asn 残基は、TPQ のコンフォメーションの制御に関与し、触媒活性に対して重要な影響を与えると考えられているが、その分子機構の詳細は明らかではない。そこで、AGAO の保存性 Asn381 を、Ala、Asp、Gln に置換し、それら変異型酵素の X 線結晶構造解析や反応速度論的解析を行うことにより、Asn381 が、プロトンと電子の移動に関与する TPQ のコンフォメーション変化に果たす役割を検討した。

②PEA を基質として定常状態速度論的解析を行った結果、いずれの変異型酵素も野生型酵素に比べ触媒活性がかなり低下しており、Asn381 が触媒に必須な残基ではないものの、重要な役割を担うことが裏付けられた。嫌気条件下で基質を加え還元的半反応における TPQ のスペクトル変化を調べたところ (Fig. 5)、どの変異型酵素も野生型酵素に比べ TPQ のセミキノンラジカルの生成量が顕著に減少していた。Stopped flow 装置を用いた前定常状態の吸収スペクトルの変化から、還元的半反応において N381D では野生型と同様のスペクトル変化を示したが、N381A、N381Q では野生型と大きく異なり、それぞれ還元型 TPQ と基質シッフ塩基の蓄積が示唆された (Fig. 5)。嫌気基質ソーキングによって、還元的半反応を結晶中で行わせたところ、TPQ が還元型もしくはセミキノンラジカル型で存在する野生型酵素の結晶と異なり、N381A では Flipped form の還元型 TPQ のコンフォメーションが見られ、N381D では野生型と同様の Copper-on 型のセミキノンラジカルが形成していたが、N381Q の結晶中ではシッフ塩基反応中間体が主要な TPQ の分子種として蓄積していることが判明した。これらの知見から、反応中間体のコンフォメーションの制御に対しても 381 番残基は大きな影響を与えていることが分かった。

③N381Q変異型酵素の反応中間体のX線結晶解析によって、触媒塩基とプロトンの距離は近接していることがわかった (Fig. 3)。しかし、速度論解析の結果、トンネリング効果は

減少しており、プロトン移動において、触媒塩基とプロトンの距離だけでなく、周囲との相互作用効果によるポテンシャルカーブの重なりが大きさが重要であることが判明した。

#### (4) QHNDH の電子伝達機構の解析

① QHNDH のヘムを中心とした電子伝達機構の解析を行うため、2つのc型ヘムを結合している $\alpha$ サブユニットの発現系を構築した。実際に *P. denitrificans* に導入したところ、プチルアミン誘導下、His-tag が付加された $\alpha$ サブユニットは正常にペリプラズムに分泌され、 $\alpha\beta\gamma$ ヘテロ三量体を形成していた。さらに、精製された His-tag 付加 QHNDH は、通常の QHNDH とほぼ同じ比活性を示した。

②QHNDH においては、電子移動の機構を解析するために、 $\alpha$ サブユニットに対する変異導入を行った。具体的には、ヘム結合残基（ヘム A に対して Cys11 および Cys14、ヘム B に対して Cys100 および Cys103）、鉄配位子残基(ヘム A に対して Met43 と His15、ヘム B に対して His104 と His126)をそれぞれ Ala あるいは Ser 残基に変換した。その結果、発現した変異型酵素のうち (C11A、C14A、M43A、H104A、H104M、H126A、および C103S) では、C103S についてのみ、野生型  $\alpha$ サブユニットと同レベルのヘムの挿入が認められ、M43A 変異型酵素について、微量のヘムの存在が明らかとなったが、他の変異型酵素についてはヘムの挿入が観測されなかった。ヘム結合に関して、配位子残基ならびにヘム架橋残基における重要性が明らかとなった。

③  $\alpha$ サブユニットのヘム結合に関与する残基に変異導入した酵素の触媒活性を調べてみると、ほとんどが活性を消失したが、一部には活性を示すものが存在した (C103S および M43A)。これらの活性を示す変異型酵素は補酵素 CTQ とヘムを含んだが、活性のない変異型酵素は補酵素 CTQ もヘムもいずれも含有していなかった。これらの結果は、ヘムの存在が CTQ 生成に必須であることを示唆している。加えて、PVDF 膜上においてペルオキシダーゼ活性の検出を試みたところ、活性をもつ変異型酵素の  $\alpha$ -サブユニットにおいてペルオキシダーゼ活性が検出された。以上のことから、 $\alpha$ -サブユニットは、TTQ 生成に必須の役割を担う二ヘム-ペルオキシダーゼタンパク質と類似した機能を有し、そのヘム分子が補酵素形成の際の電子移動を仲介するこ

とがわかった。CTQ と類似した補酵素であるメチルアミン脱水素酵素)の TTQ 形成に機能する MauG と比較して、QHNDH の  $\alpha$ サブユニットがともに2分子のc型ヘムを含んでいる点が注目される。我々は MauG と QHNDH の  $\alpha$ サブユニットは、アミノ酸配列の相同性は低いながらも部分的に類似した立体構造をもち、同様な機構によってキノン補酵素の生成反応を触媒するという仮説を立てている。

(5)得られた成果の国内外における位置付け  
酵母アルコールデヒドロゲナーゼや大豆リポオキシゲナーゼなどの酵素触媒反応において、プロトントンネリングが起きている事例は続々と見いだされている。しかし、その詳細な機構解明はまだ不十分である。そのような状況の中で、X線結晶構造と詳細な速度論解析に基づく、我々の研究成果は海外学会においても高く評価されている。また、TPQ セミキノンラジカル反応中間体の構造決定は、アミン酸化酵素に限らず、他の酸化還元酵素を含めてもラジカル反応中間体として初めての解析例である。

#### (6)今後の展望

銅含有アミン酸化酵素における反応中間体の構造解析と詳細な速度論解析を組み合わせた我々の研究手法は、極めて強力であり、詳細かつ精緻な酵素反応メカニズムが解明された。しかし、大きな問題として、本研究で着目したプロトンはX線結晶構造解析でその位置を決定することは、原理的に非常に困難である。そこで、プロトンの座標決定が可能な中性子散乱も組み合わせることも検討する必要がある。幸いにも、日本国内において、タンパク質の構造解析に利用できる中性子のビームラインが稼働を始めている。プロトントンネリングのより詳細な理解のためには、量子化学的な理論にもとづく解析も必要になると考えられる。

#### 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 6件)

- ①分子内架橋構造をもちトリプトファン残基に由来するキノン補酵素の生合成機構。 岡島 俊英, 谷澤 克行 化学と生物、2009年、印刷中、査読無し
- ② Further insight into the mechanism of stereoselective proton abstraction by bacterial copper amine oxidase. M. Taki, K. Tanizawa(8

人中6番目), and T. Okajima(8番目)  
*Biochemistry* 2008, 47, 7726-7733. 査読有り

- ③ Trapping of a dopaquinone intermediate in the TPQ cofactor biogenesis in a copper-containing amine oxidase from *Arthrobacter globiformis*. R. H. Moore, T. Okajima (8人中6番), and K. Tanizawa (7番) *J. Am. Chem. Soc.* 2007, 129, 11524-11534. 査読有り
- ④X線結晶解析と反応速度論的解析に基づく銅アミン酸化酵素の触媒機構, 岡島俊英, 谷澤克行: 日本応用酵素協会誌, 2006, 41, 1-7. 査読無し
- ⑤Involvement of a Putative [Fe-S]-Cluster-binding Protein in the Biosynthesis of Quinohemoprotein Amine Dehydrogenase. K. Ono, T. Okajima, M. Tani, S. Kuroda, D. Sun, V. L. Davidson, and K. Tanizawa *J. Biol. Chem.*, 2006, 281, 13672-13684. 査読有り
- ⑥Crystal Structures of Cytochrome c<sub>L</sub> and Methanol Dehydrogenase from *Hyphomicrobium denitrificans*: Structural and Mechanistic Insights into Interactions between the Two Proteins. M. Nojiri, D. Hira, K. Yamaguchi, T. Okajima, K. Tanizawa, and S. Suzuki, *Biochemistry*, 2006, 45, 3481-3492. 査読有り

[学会発表] (計20件)

- ① Conformational Flexibility of the TPQ Cofactor in Bacterial Copper Amine Oxidase. T. Okajima, S. Nakanishi, and K. Tanizawa 12th SANKEN International Symposium /Joint Meeting of The 7th SANKEN Nanotechnology Center Symposium/The 2nd SANKEN MSTeC Symposium/The 1st SANKEN Alliance Symposium, January 22, 2009, Suita, Osaka, JAPAN.
- ② 銅含有アミン酸化酵素補酵素生成機構の解明: 補酵素前駆体チロシン残基のフレキシビリティを制御するアスパラギン残基の役割 元山 暁仁、中西 将太、黒田 俊一、岡島 俊英、谷澤 克行 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会、神戸、平成20年12月9日-12日
- ③ キノヘムプロテイン・アミン脱水素酵素の補酵素生成機構の解明:  $\alpha$ サブユニットに結合したヘム分子の役割 米倉 弘倫、岡島 俊英、小野 和利、黒田 俊一、谷澤 克行 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会、神戸、平成20年12月9日-12日

- ④ 速度論および構造解析に基づく酵素触媒反応におけるプロトントンネリング機構の解析 村川 武志、岡島 俊英、谷澤 克行、林 秀行 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会、神戸、平成20年12月9日-12日
- ⑤ Conformational Flexibility of the TPQ cofactor in Bacterial Copper Amine Oxidase T. Okajima, S. Nakanishi, T. Murakawa, H. Hayashi, and K. Tanizawa The Second International Interdisciplinary Conference on Vitamins, Coenzymes, and Biofactors, October 26-31, 2008, Athens, Georgia, USA.
- ⑥ Involvement of an iron sulfur protein and a subtilisin-like protease in the biogenesis of quinohemoprotein amine dehydrogenase T. Okajima, K. Ono and K. Tanizawa Japan-Holland Joint Seminar on New Aspects in Enzyme Science and Biotechnology, Fukuoka, Japan, September 28-30, 2008.
- ⑦ 酵素触媒反応におけるプロトントンネリング: 反応速度論と中間体構造に基づく銅含有アミン酸化酵素の触媒機構解析 岡島 俊英 日本農芸化学会2008年度大会、名古屋、平成20年3月26日-29日

[図書] (計 3件)

- ① Copper Amine Oxidases: Structures, Catalytic Mechanisms and Role in Pathophysiology edited by G. Floris and B. Mondovi, Metal Substitution of Copper Amine Oxidases, S. Suzuki, T. Okajima, and K. Tanizawa, 2009, in press
- ② Copper Amine Oxidases: Structures, Catalytic Mechanisms and Role in Pathophysiology edited by G. Floris and B. Mondovi, Mechanism of TPQ biogenesis in prokaryotic copper amine oxidase, T. Okajima and K. Tanizawa, 2009, in press
- ③ 酵素ハンドブック第3版 岡島 俊英、谷澤 克行 (八木 達彦ら編)、朝倉書店、東京、2008年

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

岡島 俊英 (OKAJIMA TOSHIHIDE)  
大阪大学・産業科学研究所・准教授  
研究者番号: 10247968

##### (2) 研究分担者

谷澤 克行 (TANIZAWA KATSUYUKI)  
大阪大学・産業科学研究所・教授  
研究者番号: 20133134

##### (3) 連携研究者

該当なし