

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 1 日現在

機関番号：	34401
研究種目：	基盤研究(C)
研究期間：	2009～2011
課題番号：	21570120
研究課題名（和文）	ピリドキサル・キノン酵素反応の多元的エネルギー解析
研究課題名（英文）	Multidimensional energy analysis of pyridoxal-enzyme and quinoenzyme reactions
研究代表者	
	林 秀行 (Hayashi Hideyuki)
	大阪医科大学・医学部・教授
研究者番号：	00183913

## 研究成果の概要（和文）：

2つのピリドキサル酵素（セリンパルミトイル転移酵素およびトレオニン合成酵素）とキノン酵素（銅アミン酸化酵素）について多元的エネルギー解析を行った。多種の反応を触媒する能力を持つピリドキサルリン酸が、酵素に結合した場合、特定の反応を触媒するようになる機構を構造エネルギー論的に明らかにした。また、銅アミン酸化酵素については、超高解像度構造解析の結果を合わせ、酵素タンパク質のダイナミズムが量子トンネル効果による触媒を進める基盤となっていることを明らかにした。

## 研究成果の概要（英文）：

Multidimensional free energy analysis of the reactions of the catalytic reactions of two pyridoxal enzymes (serine palmitoyltransferase and threonine synthase) and a quinoenzyme copper amine oxidase were carried out to elucidate the energetic mechanism of these enzymes. The mechanisms by which the versatile catalyst pyridoxal phosphate is organized to catalyze only one type of reaction, i.e., a stereochemical mechanism and the product-assisted catalysis, were clarified. Analysis of the reaction of copper amine oxidase, together with the ultra-high-resolution structure of the enzyme, revealed that the dynamic motion of the enzyme provides the basis for the quantum tunneling effect that promotes its catalysis.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：プロトン移動, ピリドキサル酵素, キノン酵素, 反応機構, エネルギー準位, セリンパルミトイル転移酵素, トレオニン合成酵素, 銅アミン酸化酵素, 立体化学

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 酵素はきわめて効果的かつ特異的な触媒能力を持っているが、これは酵素蛋白質の中で多くの触媒過程が酵素蛋白質によって制御されることで、単純な触媒では成しえない高度な反応が可能となっていると考えられている。最近の X 線結晶解析を中心とする構造解析方法の進歩により、活性部位の触媒基の場所が明らかになってきた。

(2) ところが、触媒反応の円滑かつ特異的な進行のためには、これらの触媒基は適切な空間的配置を取るだけでは不十分であり、触媒過程の各段階で適切なプロトン化や酸化還元電位が調節される必要がある。従来の酵素反応論ではそのような調節が都合よくおこなわれている反応スキームが書かれているが、反応の進行を感知しつつ適切な配置を行うということが具体的にどのような機構でなされるかということについては、ほとんど解明されていないと言ってよい。

## 2. 研究の目的

(1) 酵素反応機構を真に理解するためには、酵素-基質の相互作用がどのように変換されて活性部位の解離性残基のプロトン化状態や酸化還元電位を制御する力となっているかということを知りたい。

(2) その駆動力を構造と結び付けて評価する方法として我々は「三次元エネルギー図」を開発した。これは従来の反応進行度を表す反応軸に加えて、各中間体のプロトン化状態を表すプロトン数軸を取ったものである。このプロトン数軸の代わりにコンフォメーションや電子状態の軸を取ることで、より一般化された酵素反応解析を行うことができる。

(3) 本研究はプロトン移動過程および電子移動過程を分光学的に取り扱うのに適したピリドキサル酵素およびキノン酵素について反応過程を追跡し、それを三次元エネルギー図において解析することにより、基質・生成物を含めた反応中間体と酵素の相互作用の構造がどのようにして酵素の触媒機能に結び付くかという道筋をプロトン移動・電子移動・コンフォメーション変化という多元的な面から明らかにしようとするものである。

## 3. 研究の方法

ピリドキサル酵素としてセリンパルミトイル転移酵素 (SPT)・トレオニン合成酵素 (TS)、キノン酵素として銅アミン酸化酵素 (AGAO) を選び、基質と酵素の結合がこれらの活性部位解離基の状態をどのように変化させ、酵素反応にとって都合のよいプロトン移動・電子移動を起こしているかを明らかにする。その具体的な方法論は以下の通りであ

る。

(1) 基質および基質アナログと酵素の反応の広 pH 領域における解析と三次元エネルギー図の作成

ストップフロー分光分析により、酵素と基質の遷移相での反応を追跡する。得られた速度論パラメータより三次元エネルギー準位図の反応軸方向の、またこれを広い pH 領域で解析することによりプロトン数軸方向の、各々の相対的エネルギー準位を決定する。

(2) X 線結晶解析による精密立体構造の解明

(1) によって描かれた三次元エネルギー準位図の中で、反応のトラジェクトリー (ポテンシャル曲面の「谷」) の両側をはさむポテンシャルの「壁」はプロトンの制御された動きを生み出す重要なものである。そのポテンシャルの壁と底に対応する酵素-基質複合体の構造を、適切な pH およびアナログの存在下で結晶化した酵素の X 線結晶解析を行うことで解明する。

(3) エネルギー準位上昇・低下の構造的要因の探索

ポテンシャルの壁を作っている構造的要因を明らかにする。これらの壁をもたらず歪みを減弱させるような変異を酵素 (あるいは基質) に導入する。また逆にポテンシャルの底の構造について歪みを導入するような変異を導入する。得られた酵素について (1)、(2) を行って、想定した構造的要因が正しいかどうかを検証する。

## 4. 研究成果

(1) SPT の詳細な反応機構の解析を行った。SPT は第一の基質 L-セリンのみを結合した状態では  $\alpha$ -プロトンは脱離せず、第二の基質パルミトイル CoA が結合して初めて  $\alpha$ -脱プロトン化が起こる。そのために L-セリンのアミノ基転移などの副反応が抑えられている。この制御が補酵素ピリドキサルリン酸 (PLP) と L-セリンのシッフ塩基の二面角の制御によって立体化学的に行われていることが示され、通常反応座標に反応中間体の二面角の座標を導入するという新たな三次元エネルギー解析によって SPT の高度な反応制御機構を説明することができた。また、このエネルギーランドスケープを形作る構造的基盤として His159 が中心的な役割を果たしていることを明確に示すことができた。即ち、His159 は PLP-L-セリンシッフ塩基の L-セリン由来カルボキシル基と水素結合することにより、同シッフ塩基の N-Ca 結合の二面角を  $\alpha$ -脱プロトン化に不利な角度に保っているが、パルミトイル CoA が結合するとそのカルボニル基が代わりに His159 に結合

し、カルボキシル基が Arg390 と結合するようになり、上記の二面角が変わって Ca-H がシッフ塩基と PLP ピリジン環の平面に垂直となって脱プロトン化が進行するわけである。この His 残基はピリドキサール酵素の中でも SPT と類縁の酵素群にのみ保存されており、その意義がこの解析によって初めて明確に示された。(以上、雑誌論文①②)

さらに、この立体化学的反応制御機構を詳細に検討し、種を越えて保存されている Arg390 が基質のカルボキシル基とイオン対・水素結合を形成することで基質・補酵素の配向を反応の各段階で決定する重要な役割を有していることを明らかにした。(以上、雑誌論文③)

(2) 第二のピリドキサール酵素である TS について、詳細な反応解析を行うことにより、同酵素が「生成物支援触媒」という特筆すべき反応機構を有し、それが反応特異性を決定していることを示した。

TS は基質 O-ホスホホモセリンから L-トレオニンを合成するが、副反応として、 $\alpha$ -ケト酪酸を生成する。この反応は正常の反応の 2% 以下に抑えられているが、その高い反応特異性をもたらす機構が長らく不明であった。 $\alpha$ -アミノクロトン酸中間体を直接生成する L-ビニルグリシンを基質として用いると L-トレオニンを生成せず、 $\alpha$ -ケト酪酸のみが生成するが、これをリン酸イオン存在下で行うと、O-ホスホホモセリンを基質としたときと同様の反応特異性と  $k_{cat}$  値をもって L-トレオニンが生成した。このリン酸イオンの効果は硫酸イオンで代替することはできず、 $\alpha$ -ケト酪酸のみが生成した。さらにグローバル遷移相速度論的解析、自由エネルギー解析を行ったところ、TS の触媒反応では基質 O-ホスホホモセリンから  $\alpha$ -アミノクロトン酸中間体が生成する際に遊離したリン酸イオンが活性部位に残り、それが  $\alpha$ -アミノクロトン酸中間体への水分子の付加の過程において一般塩基触媒として働くことが示された。これは生成物支援触媒が反応特異性を支配する興味深い例である。このことは酵素反応の解析において新たな反応軸を提供するものである。(以上、雑誌論文④)

続いて、この「生成物支援触媒」の機構を更に詳細に解析した。この酵素の広 pH 領域における遷移相速度論的解析をもとに、三次元エネルギー解析を行った。こうして得られた三次元エネルギー準位図のトラジェクトリーの両側を挟むポテンシャルの壁を構成する構造の解析を、生成物支援触媒の中心であるリン酸イオンを結合する残基の変異を通じて行った。その結果、Arg160 がこの構造の土台となっていること、また Asn154 がリン酸イオンの位置を調整し、ポテンシャル

の壁の構造を、トレオニン生成へのトラジェクトリーを切り拓くように整形していることが明らかになった。

さらに、本研究で用いた TS は *Thermus thermophilus* HB8 のものであるが、広 pH 領域における反応の解析の結果、高い pH においては、L-トレオニンとの反応において、ホモトロピックなアロステリック効果が見出された。従来は植物の TS においてメチオニン由来の S-アデノシルメチオニンによるヘテロトロピックなアロステリック効果が見出されてきたが、それ以外の種の TS においてのアロステリック効果は初めてのものである。このことは植物の TS のアロステリック効果の起源の解明への扉を開くものである。

(3) キノン酵素の AGAO の反応は前半の還元的半反応と後半の酸化的半反応からなっている。このうち、還元的半反応については 10 年前からの研究を通じて量子トンネル効果による反応機構等が解明されて来ているが、その反応機構を支える構造的基盤との関連が不明のままである。また、酸化的半反応については全くといっていいほど解明がなされていない状態であった。

我々はまず、還元的半反応の過程における広 pH 領域での遷移相速度論的解析を行い、TS のビルトイン補酵素トパキノンが気質アミノ基からプロトンを受け取ることで、気質アミノ基の活性化と自己の活性化の両方を行っていることを解明した。これは代表的なピリドキサール酵素であるアスパラギン酸アミノ基転移酵素 (AAT) の反応初期における補酵素と基質の同時活性化に対応するものであり、同機構が普遍性を持つものであることを示した。また、この結果を三次元エネルギー解析によって解釈した結果、AAT と同様、AGAO も酵素に内在した歪みのエネルギーの解放によって活性化エネルギーを下げている可能性が示された。(以上、学会発表⑥)

さらに、AGAO の三次元エネルギー図における反応トラジェクトリーの構造的要因を探るための構造解析を行った(雑誌論文⑥)が、引き続き、抗凍結剤を以前の 1.8 Å の分解能の結晶で使用していたグリセロールから PEG200 に替えることによって、分解能の大幅な向上 (1.08 Å) に成功した。この結果、活性中心付近において酸化的判反応の基質である酸素分子と考えられる電子密度が観測された。これによって銅イオンと酸素分子の反応の通り道が明らかになった。また、高分解能の結晶が得られたことから、異方性温度因子からアミノ酸残基のゆらぎについての情報が得られるようになった。特に、Arg381 の側鎖がビルトイン補酵素トパキノ

ン方向に大きく揺らいでいることは、本酵素のプロトントンネリングを可能にする構造的要因を明らかにするものである。

また、酸化的半反応の詳細な解析の結果、従来、触媒反応中の袋小路の中間体 dead-end product と考えられていたセミキノ型補酵素が反応の主経路に位置し、それを通して酸素との反応が進行することが明らかになった。(学会発表①)

#### 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 Murakawa T, Hayashi H, Taki M, Yamamoto Y, Kawano Y, Tanizawa K, Okajima T. Structural insights into the substrate specificity of bacterial copper amine oxidase obtained by using irreversible inhibitors. *J Biochem.* 151, 2012, 167–178
- ② Lowther, J., Charmier, G., Raman, M.C., Ikushiro, H., Hayashi, H., Campopiano, D.J., Role of a conserved arginine residue during catalysis in serine palmitoyltransferase. *FEBS Lett.* 585, 2011, 1729–1734
- ③ Murakawa, T., Machida, Y., Hideyuki Hayashi, Product-assisted catalysis as the basis of the reaction specificity of threonine synthase. *J. Biol. Chem.* 286, 2011, 2774–2784
- ④ Moya-García, A.A., Rodríguez-Agudo, D., Hayashi, H., Medina, M.A., Urdiales, J.L., Sánchez-Jiménez, F., Analysis of mammalian histidine decarboxylase dimerization interface reveals an electrostatic hotspot important for catalytic site topology and function. *J. Chem. Theory. Comput.* 7, 2011, 1935–1942
- ⑤ Shiraiwa, Y., Ikushiro, H., Hayashi, H., Multifunctional role of His159 in the catalytic reaction of serine palmitoyltransferase. *J. Biol. Chem.* Vol. 284, 2009, 15487–15495
- ⑥ Ikushiro, H., Islam, M.M., Okamoto, A., Hoseki, J., Murakawa, T., Fujii, S., Miyahara, I., Hayashi, H., Structural insights into the enzymatic mechanism of serine palmitoyltransferase from *Sphingobacterium multivorum*. *J Biochem.* 146, 2009, 549–562

[学会発表] (計 6 件)

- ① 村川武志, 岡島俊英, 濱口章央, 谷澤克行, 林 秀行, Acid–base chemistry of the catalytic reaction of the bacterial copper amine oxidase. 第 84 回日本生化学会大会, 2011 年 9 月 22 日, 京都
- ② 村川武志, 林 秀行, 生成物支援触媒によってもたらされる酵素の反応特異性. 第 11 回日本蛋白質科学会年会, 2011 年 6 月 8 日, 吹田
- ③ 喜久川政吾, 岡島俊英, 濱口章央, 村川武志, 林 秀行, 谷澤克行, 銅含有アミン酸化酵素の触媒機構: 酸化的半反応中間体の立体構造解析. 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会, 2010 年 12 月 7 日, 神戸
- ④ 村川武志, 林 秀行, トレオニン合成酵素の分光学的および速度論的解析. 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会, 2010 年 12 月 7 日, 神戸
- ⑤ 濱口章央, 岡島俊英, 谷澤克行, 村川武志, 林秀行, 銅アミン酸化酵素反応はトパセミキノラジカル中間体を經由して進行する. 第 82 回日本生化学会大会, 2009 年 10 月 22 日, 神戸
- ⑥ 村川武志, 岡島俊英, 谷澤克行, 林秀行, 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. 第 82 回日本生化学会大会, 2009 年 10 月 22 日, 神戸

[その他]

ホームページ等  
なし

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

林 秀行 (Hayashi Hideyuki)  
大阪医科大学・医学部・教授  
研究者番号: 00183913

##### (2) 研究分担者

村川 武志 (Takeshi Murakawa)  
大阪医科大学・医学部・助教  
研究者番号: 90445990