

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：34401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23770127

研究課題名(和文)超高分解能X線および中性子線結晶構造を基盤とした銅含有アミン酸化酵素の反応解析

研究課題名(英文)Structural studies for the refined reaction mechanism of copper amine oxidase.

研究代表者

村川 武志 (Takeshi, Murakawa)

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) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は土壌細菌由来の銅/トパキノン含有アミン酸化酵素(AGAO)について、超高分解能X線結晶構造解析、および中性子線結晶構造解析を中心とした解析により、タンパク質のダイナミクスによる酵素触媒反応の進行の詳細を明らかにすることを目的とした。

研究期間内において、基質フリー状態での超高分解能X線結晶構造解析、反応中間体アナログのX線結晶構造解析、および中性子回折測定用の超大型結晶の作成に成功し、得られた精密な立体構造情報に基づき、AGAOの構造変化や揺らぎを伴う反応機構について新たな知見を得た。

研究成果の概要(英文)：Copper amine oxidases (CAOs) catalyse the oxidation of various aliphatic amines to the corresponding aldehydes, ammonia and hydrogen peroxide. I focused on the structural insights into the catalytic mechanism of a CAO from *Arthrobacter globiformis* (AGAO) using an ultra-high resolution X-ray crystallography and neutron crystallography method. For the ultra-high resolution X-ray crystallography, the crystal structure of AGAO was determined at 1.08 Å resolution in the substrate-free form. Based on the structure, the oxygen pathway to the active site was estimated. On the other hand, on the basis of the structure of the AGAO complexed with irreversible inhibitors, structural insights of the substrate specificity were obtained. Furthermore, a large crystal of AGAO for a neutron crystallography was prepared.

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：トパキノン 高分解能X線結晶解析 中性子線結晶構造解析

1. 研究開始当初の背景

近年、分解能が1Åに迫る超高分解能X線および中性子線による結晶構造解析がタンパク質の持つ動的・機能的構造情報(ゆらぎやプロトン化状態)を得る新しい手段として注目されている。従来、X線結晶解析法は‘geometric’な情報は得られても、タンパク質分子の‘flexibility’や‘chemical reactivity’に関する情報を得ることは難しかった。しかし極めて高い分解能の回折データであれば、占有率の低い multiple conformation の検出やプロトン化状態、異方性温度因子の導入が可能となり、タンパク質分子のゆらぎやプロトン化状態に関する詳細な情報を得ることが可能となる。一方、触媒反応の中心である活性部位ではゆらぎが大きく、超高分解能X線解析をもってしてもプロトン化状態を正確に判断できない。中性子線結晶構造解析はこれを補完する役割を担う。すなわち、重水素の原子核散乱能が炭素と同程度であるため、重水素置換した結晶を用いることによって、中程度(2.5 Å程度)の分解能でも水素(正確には重水素)の位置が同定でき、活性部位のプロトン化状態を判定することが可能である。ただしいずれも、良質の結晶を得ることが鍵となり、特に酵素など大型タンパク質での成功例は少ない。しかしながら、酵素反応の本質を理解するためにはこれらの方法論に基づく研究が必須である。

2. 研究の目的

申請者たちは、これまで土壌細菌由来の銅/トパキノン(TPQ)含有アミン酸化酵素(AGAO)の触媒機構を解析し、一つ目の律速段階である触媒塩基 Asp298 によるプロトン引き抜き過程が量子論的なプロトントンネリングによって進行すること、また、二つ目の律速段階であるセミキノン中間体の形成過程は補酵素 TPQ の大きなコンフォメーション変化を伴うことを明らかにしてきた。これらの過程の特異的な進行のためには補酵素 TPQ や銅イオン自体の化学的反応性に加えてタンパク質分子の方向性を持った局所的・全体的なゆらぎや柔軟性が必須の要因となっている。このタンパク質のダイナミクスによる酵素触媒反応の進行の詳細を、反応中間体の超高分解能X線結晶構造解析、および中性子線結晶構造解析を中心とした研究によって明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 基質アナログ複合体構造を基にした基質特異性の解明

ヒドラジン類は、基質アミンと同様の機構で活性部位である TPQ に結合するが、基質の Ca 位に相当する部位に窒素原子を持つため、プロトン引き抜き以降の反応が進行せず、基質シッフ塩基中間体に類似した安定な複合体を形成する。溶液中で酵素とヒドラジンを反応させた後、未反応のヒドラジンを除去した後、これら複合体の結晶を調製する。反応後に結晶化させることでソーキング結晶よりも高い分解能が期待できる。得られた複合体については、結晶顕微分光により複合体の形成を確認したのち X 線回折データ解析を行う。

(2) 超高分解構造 X 線結晶構造解析に基づくタンパク質のダイナミクス解析と基質酸素分子の同定

基質フリー型である酸化型 AGAO について、精製、結晶化条件、抗凍結剤について徹底的な見直しを行い、高分解能が得られる結晶を得る。

(3) 中性子回折測定用超大型結晶の作成

基質フリー型である酸化型 AGAO について、精製、結晶化条件、抗凍結剤について徹底的な見直しを行い、高分解能が得られる結晶を得る。

4. 研究成果

(1) 基質アナログ複合体構造を基にした基質特異性の解明

3種類のヒドラジン誘導体、ベンジルヒドラジン(BH)、4-ヒドロキシベンジルヒドラジン(4HBH)、及びフェニルヒドラジン(PH)について、AOとの複合体の結晶を調製した。結晶顕微分光及び回折データを解析した結果、得られた阻害剤複合体が基質シッフ塩基中間体に類似したヒドラゾン型であることが判明した。また、基質シッフ塩基中間体の Ca からのプロトン引き抜きに関する触媒塩基 Asp298 の側鎖カルボキシル基の酸素原

子と複合体ヒドラジンの N2 原子 (基質アミンでの Ca に相当する) の距離は, PH は, BH および 4HBH に比べ約 2 倍であった (図 1).

これらの阻害剤に対応するアミン基質について, 遷移相の速度解析を行った結果, プロトン引き抜き過程において, PH に対応するベンジルアミンの速度定数は, BH および 4HBH に対応するフェニルエチルアミンおよびチラミンに比べ, 約 1/1000 の値を示し, ヒドラジン複合体構造における Asp298 の位置は, 対応するアミンの反応性の違いをよく説明できるのではないかと考えられた.

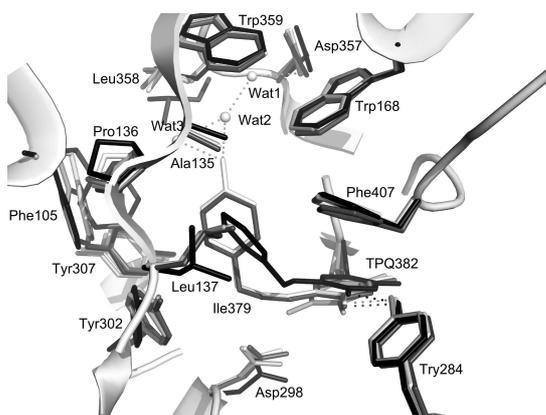


図 1 ヒドラジン複合体を含む活性中心構造の重ね合わせ

(2) 超高分解構造 X 線結晶構造解析に基づくタンパク質のダイナミクス解析と基質酸素分子の同定

AGAO の発現, 精製, 結晶化条件はこれまでと変わらず, 抗凍結剤を以前使用していたグリセロールから PEG200 に変えることによって, これまでの分解能 (1.8 Å) を大幅に超える分解能 1.08 Å の高分解構造を決定することに成功した. タンパク質分子周辺には多数の低分子量 PEG 分子が存在し, 入り込んだ PEG 分子によりタンパク質分子の揺らぎが抑えられたことが分解能の向上に寄与したと考えられる. また, 全体の約 4 割の水素原子の電子密度を検出し (図 2), 多くのアミノ酸残基が double conformer をもつことを明らかにした. さらに異方性温度因子の解析により, 活性中心残基の協奏的な揺らぎを見出したほか, 活性中心付近において, 基質である酸素分子と考えられる電子密度を観測した.

以上, 得られた精密な立体構造情報に基づき, AGAO の構造変化や揺らぎを伴う反応機構, 特に基質酸素分子の活性中心への進入機構について新たな知見を得た (図 3).

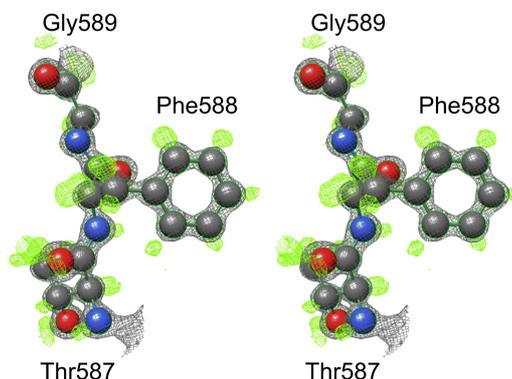


図 2 検出された水素原子の電子密度

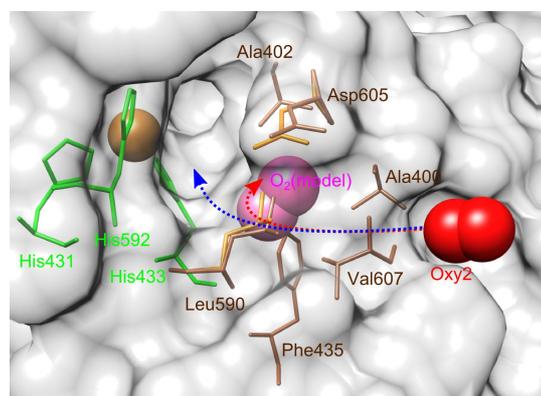


図 3 推定される基質酸素分子の活性中心への進入メカニズム

中性子回折測定用超大型結晶の作成

結晶化条件を見直すことにより測定用の大型結晶の作成 (最大 7 mm³) に成功した.

中性子回折測定については, 日本原子力研究開発機構が保有する研究用原子炉 JRR-3 にて測定を行う予定であったが, 東日本大震災の影響により停止し研究が遅れている. しかし, 同機構が保有する大強度陽子加速器施設 J-PARC の平成 26 年度測定課題に採択され, 測定の見通しが立った.

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 2 件)

Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. (2013) 69, 2483-94. High-resolution crystal structure of copper amine oxidase from *Arthrobacter globiformis*: assignment of bound diatomic molecules as O₂. Murakawa T, Hayashi H, Sunami T, Kurihara K, Tamada T, Kuroki R, Suzuki M, Tanizawa K, Okajima T.

J. Biochem. (2012) 151, 167-78. Structural insights into the substrate specificity of bacterial copper amine oxidase obtained by using irreversible inhibitors. Murakawa T, Hayashi H, Taki M, Yamamoto Y, Kawano Y, Tanizawa K, Okajima T.

〔学会発表〕(計 4 件)

村川武志, 岡島俊英, 谷澤克行, 林秀行, 銅含有アミン酸化酵素の高分解能 X 線結晶構造解析, 日本生化学会, 2012 年 12 月 15 日, 福岡.

村川武志, 岡島俊英, 谷澤克行, 林秀行, 銅含有アミン酸化酵素の高分解能 X 線結晶構造解析, 日本生化学会近畿支部会, 2012 年 5 月 19 日, 京都.

Takeshi Murakawa, Toshihide Okajima, Akio Hamaguchi, Katsuyuki Tanizawa, and Hideyuki Hayashi, Acid-base chemistry of the reductive half reaction of bacterial copper amine oxidase, 日本生化学会, 2011 年 9 月 22 日, 京都.

Takeshi Murakawa, Toshihide Okajima, Akio Hamaguchi, Katsuyuki Tanizawa, and Hideyuki Hayashi, Acid-base chemistry of the reductive half reaction of bacterial copper amine oxidase, ICC-03, 2011 年 7 月 12 日, トウルク, フィンランド.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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