

平成 30 年 6 月 29 日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26440037

研究課題名(和文) 動的・機能的構造情報に基づく銅/トパキノン含有アミン酸化酵素の反応解析

研究課題名(英文) X-ray and neutron crystallographic structure 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) 3,900,000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、酸化型酵素(基質フリー状態)およびセミキノン中間体の超高分解能X線および中性子結晶構造解析に成功した。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) catalyze the oxidation of various aliphatic amines to the corresponding aldehydes, ammonia and hydrogen peroxide. We focused on the structural insights into the catalytic mechanism of a CAO from *Arthrobacter globiformis* (AGAO) using an ultra-high resolution X-ray and neutron crystallography. We determined the structure of oxidized-form (substrate-free form) of AGAO at 1.72/1.14 angstrom by neutron/X-ray crystallography. Based on the precise three-dimensional structure information obtained, we got new knowledge on reaction mechanism accompanied by structural change and fluctuation of AGAO. Further, we also obtained the neutron and X-ray diffraction data of semiquinone intermediate. We are currently refining the structure.

研究分野：タンパク質科学

キーワード：中性子結晶構造解析 X線結晶構造解析 トパキノン

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、柔軟性やプロトン化状態)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目を担う。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

研究代表者らはこれまで、分光学、速度論および構造学的解析により、土壌細菌由来銅/TPQ 含有アミン酸化酵素 (AGAO) の反応機構(図 1)について以下の事柄を明らかにした。

セミキノン中間体は他とは異なる On-Cu 型であった。

セミキノン中間体の割合が pH により変動した (pKa=5.9, 7.6 に変曲点を持つベル型曲線を描く)。

Off-Cu 型では触媒塩基 Asp298 による酸塩基反応, On-Cu 型では銅イオンとの電子移動および基質酸素分子の還元反応を行くことが示唆された。

上記知見は非常に興味深いですが、その考察の基盤となる構造的知見が不足しており、今回の課題の設定へと至った。本課題の準備として、研究代表者らは結晶化条件などの徹底的な見直しを行い、酸化型酵素で、大型タンパク質(AGAO:サブユニット分子サイズ 72 kDa

のホモダイマー)としては世界トップに並び 1.08Å の X 線結晶構造決定、および 3 mm³ の大型結晶の作成に成功した。中性子線は強度が極めて弱く、回折データ取得には非常に大きな結晶が必要である。本結晶について、日本原子力研究開発機構が保有する研究用原子炉 JRR-3 にて予備測定を行った結果、十分な回折像が得られ、測定課題として採択された。

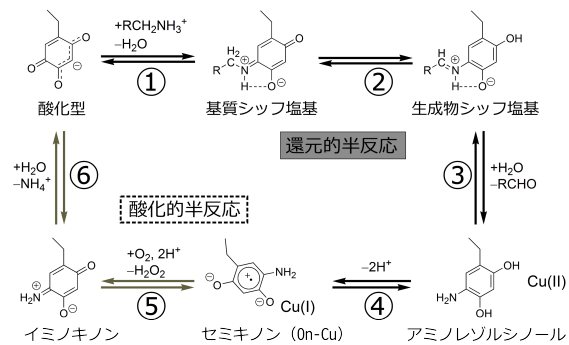


図 1 AGAO の反応機構

本課題では反応過程のうち銅イオンへの 1 電子移動に焦点を当てる。反応開始前の参加型酵素と On-Cu 型であるセミキノン中間体について超高分解能 X 線結晶構造解析・中性子線結晶構造解析を行う。超高分解能 X 線結晶構造解析より得られた知見から、構造のゆらぎの大きさ、方向、大きく揺らいでいるのが反応に直接かわる部分のみなのか、あるいは活性部位全体なのか、といった情報を得る。また、中性子線結晶構造解析により得られた知見から、活性部位のプロトン化状態、pKa を明らかにし、On-Cu/Off-Cu のコンフォメーション変化に関与する解離基を同定する。

さらに本課題では、得られた結果を基に計算化学(量子化学計算, 分子動力学計算を予定)による解析を行う。近年、タンパク質の立体構造を基にした化学計算が実用化されつつあるが、計算系に精密な初期情報を与えられるかどうか、結果の精度を上げるうえでの大きなカギとなる。ゆらぎ、柔軟性といった情報に加え、酵素反応における実際の反応の担い手である水素の位置を全て実験的に求めて初期構造として与えることができれば、計算精度を飛躍的に高められる。

3. 研究の方法

(1) 酸化型およびセミキノン中間体酵素結晶の調製

酸化型酵素の結晶は、予備測定後もさらに酵素精製および結晶化条件の改良を続けることにより、大型かつ傷などのない高品質の結晶を多数調製した。得られた結晶は、重水素置換及び抗凍結剤添加を兼ねて、高濃度の重水素化マロン酸ナトリウム溶液に2週間程度浸漬した。

セミキノン中間体の結晶は基質ソーキング法によって調製した。セミキノン中間体は前半の還元的半反応の最終産物であるため、嫌気状態において酸化型酵素の結晶を十分な時間(12時間程度)基質を含む母液に浸漬した後、凍結した。

(2) 超高分解能 X 線および中性子結晶解析

中性子線回折測定は JRR-3 を予定していたが、東日本大震災以来停止しているため、日本原子力研究開発機構担当者との協議の結果、JRR-3 に加え、平成 20 年より稼働した、より高性能な大強度陽子加速器施設 J-PARC へも測定課題申請を行った。J-PARC であれば測定時間も大幅に短縮され、スムーズに実験を進められる。

X 線結晶回折測定は高エネルギー加速器研究機構が保有する Photon factory(PF)にて行った。中性子線回折測定が終了した結晶を PF へ持参し、X 線回折測定を行った。中性子および X 線回折データを用いた同時構造精密化により、構造決定を行った。

4. 研究成果

酸化型酵素については同一結晶を用いて分解能: 1.72 Å (中性子) / 1.14 Å (X 線) の回折データの取得に成功し、これらを用いて中性子・X 線同時精密化を行った。これまでタンパク質の中性子結晶構造解析は 30 種類程度行われているが、分子量が 1,000-2,000 程度の小型のものが大半であり、AGAO (サブユニット分子量 72000 のホモダイマー) はこれを大幅に上回る。現在構造精密化はほぼ終了し、予想外の位置に水素(重水素)の核密度が検出された。補酵素 TPQ がこれまでに考えられていたエノール(エノレート)型だけでなくケト型との平衡状態にあることや、銅に配位したヒスチジン残基のうちの一つがアニオン型である (Metal-induced histidine

deprotonation) ことなど、現在論文の作成を進めており詳細は記載しないが、これまでに提案された反応機構を大幅に書き換えることが見込まれる。

セミキノン反応中間体については、基質ソーキングの条件を検討することにより、分解能 1.6 Å 程度の中性子回折データセットの取得に成功し、現在積分を行っている。また本結晶を用いて 2018 年五月下旬に PF において X 線回折測定を行ったところ、分解能 1.07 Å 程度の X 線回折データの取得に成功し、両データを用いた同時構造精密化を予定している。

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 1 件)

- (1) Takeshi Murakawa, Akio Hamaguchi, Shota Nakanishi, Misumi Kataoka, Tadashi Nakai, Yoshiaki Kawano, Hiroshi Yamaguchi, Hideyuki Hayashi, Katsuyuki Tanizawa, Toshihide Okajima, Probing the Catalytic Mechanism of Copper Amine Oxidase from *Arthrobacter globiformis* with Halide Ions. The journal of biological chemistry. Vol. 290, pp 23094 – 23109. 2015 年 (査読あり)

〔学会発表〕(計 7 件)

- (1) 庄司光男, 村川武志, 重田育照, 岡島俊英 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. 日本蛋白質科学会 2017 年.
- (2) Hiroshi Yamaguchi, Takeshi Murakawa, Misumi Kataoka, Yoshiaki Kawano, Hideyuki Hayashi, Katsuyuki Tanizawa, and Toshihide Okajima. Analysis of the Catalytic Mechanism of Copper Amine Oxidase from *Arthrobacter Globiformis*. ISDSB2016 2016 年.
- (3) Toshihide Okajima, Tadashi Nakai, Katsuyuki Tanizawa, Takeshi Murakawa, and Hideyuki Hayashi. X-ray crystallographic structure of semiquinone radical intermediate formed in bacterial copper amine oxidase. ICC05-AEM2016 2016 年.
- (4) 村川武志 銅含有アミン酸化酵素の大型結晶調製と予備的中性子回折実験. 茨城県平成 27 年度 第 3 回(第 11 回) iBIX 研究会. 2015 年.

- (5) 村川武志, 中西将太, 元山暁仁, 林秀行, 谷澤克行, 岡島俊英. 銅含有アミン酸化酵素のTPQ生成反応と触媒反応における保存性 Asn の役割. 日本蛋白質科学会 2014 年.
- (6) Takeshi Murakawa, Hideyuki Hayashi, Katsuyuki Tanizawa, Toshihide Okajima. Conformational flexibility of the topa quinone cofactor in copper amine oxidase revealed by site-specific mutagenesis of the neighboring conserved asparagine residue. ICC04 2014 年.
- (7) 村川武志, 中西将太, 元山暁仁, 林秀行, 谷澤克行, 岡島俊英. 銅アミン酸化酵素のTPQ補酵素とその前駆体 Tyr 残基のコンフォメーション制御の分子機構. 日本生化学会. 2014 年.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

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