特異な翻訳後修飾アミノ酸を有する金属酵素の機能解析および新規創製

大阪府立大学大学院生命環境科学研究科　藤　枝　伸　宇

はじめに

近年，種々のペプチドやタンパク質分子内で，従来の翻訳後修飾（リン酸化等）の枠組みを超える化学的に高度な修飾を受けたアミノ酸側鎖が相次いで発見されてきた．アラニンが脱水素したデヒドロアラニンやシステインが酸素化を受けたスルフェン酸・スルフィン酸，芳香族アミノ酸から生じるキノン様の側鎖は，配位子や補欠分子族としてタンパク質の中枢機能を司り，Protein-Derived Cofactors（PDC, 図1）と呼ばれている．その機能は構造安定化に加え，酸化還元・求電子的性質，クロモフォアなど多岐にわたる．現在までにPDCは30種類以上発見され，未だ新規な補欠分子族やクロモフォアを持つタンパク質の存在が示唆されるとともに，その機能の詳細はビタミン学を始めとする農芸化学分野に広く影響を与えると考えられる．講演では，以下に述べるこれまでの研究成果をまとめ，PDCに関する研究を紹介する．

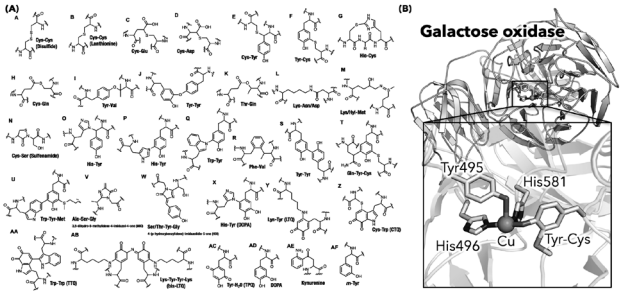

図1.　特異な翻訳後修飾アミノ酸（PDC）の例：（A）現在までに発見されている特異な翻訳後修飾部位の例：TyrやTrpが単独で修飾されたTOPAキノン（TPQ, AC）やキヌレニン（AE），そして，それらが他のアミノ酸によって架橋されたCross-linked PDC（CPDC），ガラクトース酸化酵素のTyr–Cys（F），アミン脱水素酵素のトリプトフィルキノン（TTQ, AA）や青色タンパク質（Ranasmurfin）のクロモフォア（bis-リジルチロシルキノン，bis-LTQ, AB）等（B）Tys–Cysと銅イオンが協同的に機能するガラクトースオキシダーゼの活性中心．

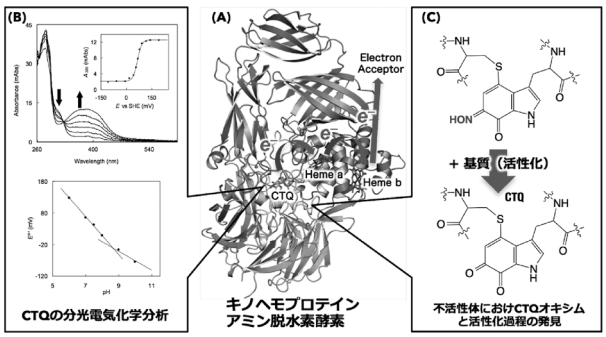

図2.　CTQとヘムを有するアミン脱水素酵素の機能解析と活性中心成熟機構

1.　物理化学・触媒化学的機能解析

従来の生化学的な手法に加え，新規な電気化学測定法を駆使することによって，システイントリプトフィルキノン（CTQ）および2つのヘムを持つキノヘモプロテインアミン脱水素酵素の物理化学特性評価に取り組んだ（図2A）．複数の補因子を持つ酵素ではそれぞれのスペクトルが重なりあうため，個々の挙動を見ることが困難であったが，サブユニットの単離，酸化還元の速度やpH条件などを精密に制御することにより電位及び分光特性評価に成功した．分子内電子移動経路を特定し，CTQの酸化還元電位pH依存性より，CTQを開始点とする電子移動が可能であることを明らかにした（図2AB）．この知見によってヒスタミンセンサーなどのバイオエレクトロニクスへの応用が可能であることが示唆された．また，二核の銅中心を持つ麹菌由来チロシナーゼについて，原子レベルの分解能（1.39Å）で結晶構造を決定することに成功し，ヒスチジンとシステインからなる架橋構造（His–Cys架橋）が活性中心の銅に直接配位していることを証明した（図3A）．この架橋構造を部位特異的変異導入（C92A）によって欠損させた変異体を利用し，ハメットプロット，同位体実験を含めた詳細な有機化学・触媒化学的特性評価によって，チロシナーゼにおける水酸化反応では芳香族求電子置換反応で触媒サイクルが進行することを確認した（図3B）．また，His–Cys架橋によって反応活性が一桁向上していることも見出した（図3B）．

2.　成熟化機構

キノヘモプロテインアミン脱水素酵素は精製時に，サブユニット構造が同一で全く活性を示さない不活性体が得られた．この不活性体は基質であるアミンと反応させると還元的に活性

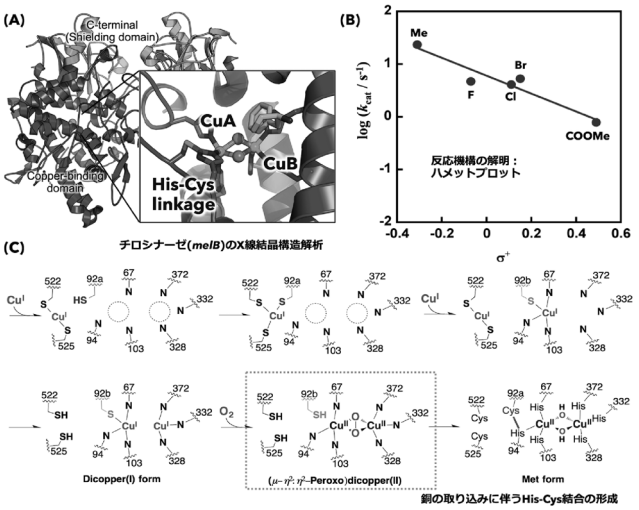

図3.　His–Cys架橋と銅補因子を有するチロシナーゼの機能解析と活性中心成熟機構

を示し，成熟することが明らかとなり，前駆体と考えられた．そこで，質量分析や分光分析によってCTQ部位を詳細に解析すると，オキシム体の構造をとっていることが明らかとなった（図2C）．一方で，チロシナーゼでは結晶構造において活性を示す銅結合ドメインとは別の活性制御ドメインが存在していることが明らかとなった．この活性制御ドメインはCXXCモチーフを持ち，この2つのシステインがHis–Cys架橋を形成するシステインと合わせ，銅の取り込み過程に関与していることを明らかとした．そして，その過程において銅酵素活性中心近傍のHis–Cys架橋形成において銅–活性酸素種が駆動する酸化的なカップリング反応が関与することを示唆した（図3C）．また，組み換え体が活性を示さないことから，プロテアーゼでの加水分解や酸性緩衝液に作用させることで活性型に変換可能であることを見いだした．このように，活性制御ドメインが銅の取り込みを補助する金属シャペロンとしても機能することに加え，チロシナーゼ分子としての成熟化にも寄与していることを示した．特に，PDCの形成には酸化還元反応が深く関与していること，さらにガラクトースオキシダーゼでTyr–Cys形成において関与が示唆されている類似の銅–活性酸素種がHis–Cys架橋形成にとっても必要であることを明らかにした．つまり，水系において酸化数の変化しやすい金属，特に生体内ではCuやFeがPDC形成における鍵反応種の一つであることを示唆した．

3. 新規金属酵素の分子設計・創製

天然が未利用の酸化数が比較的変化しやすい金属を導入し，新たな人工金属酵素の構築に取り組んだ．三脚型配位子のtris（2-pyridylmethyl）amine（TPA）を用いたTPA-オスミウム（Os）錯体が酸化剤として過酸化水素を用い，オレフィンのcisジオール化反応に対して高い触媒活性を示すことに着目し，オスミウムペルオキシゲナーゼを設計した．同様の配位構造となる4つのヒスチジンから成る金属結合サイトを持つ好熱菌由来のキュピンタンパク質に注目し，TPAを模倣した金属酵素の土台タンパク質として用いた（図4）．この金属結合サイトには様々な金属イオンを導入することが可能であったため，オスミウム置換体を用いて，酸化剤として過酸化水素を用いたアルケンのジオール化反応に対する活性を調べたところ，ビニルナフタレンに対して9000以上の触媒回転を示した．X線結晶構造解析によって，活性中心の詳細な特性評価を行なった．その結果，cis位に空いた配位座を持ち，水分子および水酸化物イオンが配位した構造をとっていることが明らかとなった．さらには近傍のシステイン残基がスルフィン酸に翻訳後修飾されていること，加えて，配位した水分子に水素結合を形成し，反応活性種の安定化に寄与する可能性を示唆した．実際に，アラニンを変異導入により活性変化を確認したところ，触媒回転数が減少した（図4）．

おわりに

本研究の成果は，Tyr, Trp, Hisなどの芳香族アミノ酸から派生した特殊なアミノ酸残基はキノン型の求電子的な性質を始めとし，他の有機補因子にはない物理化学・触媒化学的に稀有な性質を持つことを示したものである．PDCの架橋構造がその置換基効果により，化学反応性を絶妙に調律していることを示唆しており，このような巧みな制御が人為的に可能になれば，多様な機能をタンパク質に付与する方法論の確立が期待される．つまり，現行のバイオプロセスに親和性の高いバイオ触媒に多くの知見を与えることに加え，キノン型PDCの特殊な電子移動特性を利用したナノマテリアル，バイオイメージング用の生体適合高分子などにも展開が期待される．また，天然のペプチドにおいてもPDC類似の極めて珍しいアミノ酸修飾が発見され，種々の生理・薬理活性に寄与していることが明らかになっており，その修飾法の構築が望まれている．今後，これら特異なアミノ酸残基が関わる生命現象生命現象を追求するとともに，その，形成機構とその制御方法を探求し，様々な応用手段の開発を見据えた新たな分野開拓に貢献していきたい．

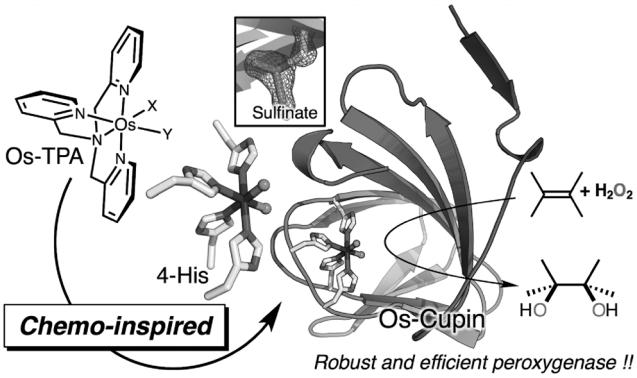

図4. 特異な翻訳後化学修飾アミノ酸（PDC）を有する酸化還元酵素の分子創製

謝　辞　本研究は，京都大学大学院農学研究科および大阪大学大学院工学研究科にて行われたものです．本研究を行う機会を与えていただくとともに，自由に研究を行う機会を与えていただいた京都大学名誉教授 池田篤治先生，公私にわたり懇切な御指導，御支援を賜りました京都大学教授 加納健司先生，化学研究の基礎をご教授いただいた大阪大学教授 伊東　忍先生に心より御礼申し上げます．また，長年にわたり激励とご助言を頂いた京都大学教授 森井　孝先生に深謝いたします．Basel UniversityのThomas R. Ward先生には，新規金属酵素設計に関する研究で有機金属化学反応についての多くの助言を頂きました深く感謝いたします．X線結晶構造解析を研究に取り入れるにあたり，大阪大学蛋白質研究所 栗栖源嗣先生に御指導・御鞭撻を賜りました深く御礼申し上げます．数多くの共鳴ラマンスペクトルを測定いただいた兵庫県立大学 故小倉尚志先生，柳澤幸子先生に厚くお礼申し上げます．また，様々な面からご支援いただいた，京都大学および大阪大学の研究室，大阪府立大学現研究室のスタッフ，学生および研究支援者の方々に深く感謝いたします．最後になりましたが，本奨励賞にご推薦くださいました日本農芸化学会関西支部長の河田照雄先生に厚く御礼を申し上げます．