トピックス

ラジカル反応の初期過程の 構造生物化学： B₁₂補酵素関与ジオールデヒドラ ターゼの放射光による研究

姫路工業大学理学部 安岡則武, 柴田直樹

岡山大学工学部 虎谷哲夫

1. はじめに

腸内細菌 *Klebsiella oxytoca* 由来のジオールデヒドラターゼは、3つのサブユニット α , β , γ の2量体として存在し、その分子量は220 Kである。補酵素の化学修飾や

アポ酵素であるジオールデヒドラターゼの精製、キャラクタリゼーションなどの30余年の研究により、我々はそれらの活性部位の決定や反応機構の提案をしてきた¹⁾。その後、遺伝子組換え技術の応用により、一次構造の決定、大量発現系の構築による酵素化学的な研究が展開できた。B₁₂酵素の研究にX線結晶学の手法がとり入れられたのはあまり古いことではない。1994年にメチオニン合成酵素のB₁₂結合ドメインの構造が発表された²⁾のを皮切りに、メチルマロニルCoAムターゼが1996年に³⁾⁵⁾、そして1999年にグルタミン酸ムターゼと我々のジオールデヒドラターゼが同時⁶⁾⁷⁾に発表されるということになった。このようにX線解析によって立体構造が解明されることによってB₁₂酵素の科学は大きい飛躍を遂げたといえる。本稿ではジオールデヒドラターゼと補酵素類似体の構造解析とその際に見出されたラジカル反応の初期過程とも見なすことのできる構造について述べる。

ビタミンB₁₂とその誘導体の化学式を、図1にまとめて示す。シアノコバラミンがビタミンB₁₂とよばれるものである。ビタミンB₁₂が欠乏すると悪性貧血を惹き起

アデノシルコバラミン

アデニルベンチルコバラミン

シアノコバラミン

L = - CN

メチルコバラミン

L = - CH₃

図1 ビタミンB₁₂関連の化合物の構造式。

Lとして示した置換基の線分の原子がコバルトに配位している。

Structural Biological Chemistry of a Radical-Catalyzed Enzymatic Reaction in Vitamin B₁₂-Dependent Diol Dehydratase

Noritake YASUOKA*, Naoki SHIBATA* and Tetsuo TORAYA**

* Department of Life Science, Faculty of Science, Himeji Institute of Technology

**Department of Bioscience and Biotechnology, Faculty of Engineering, Okayama University

こす。ヒトはビタミンB₁₂を生成することができないので食物の摂取によって補給する。レバーの中に多く含まれている。また腸内細菌によって合成されたものが吸収される。シアノコバラミンは、細胞内で活性な補酵素に転換されるが、それには2つの形がある。1つがアデノシルコバラミンであり、もう1つはメチルコバラミンである。アデノシルコバラミンと結合する酵素は炭素骨格の組換え、ヘテロ原子の脱離反応、アミノ基の分子内転移などを触媒し、メチルコバラミンと結合する酵素はメチル基転移反応を触媒する。化学反応もこのように違うが、さらに特筆すべき相異は反応機構にある。アデノシルコバラミンにおいては、Co-C結合がホモリティックに開裂してアデノシルラジカルを生成し、これが触媒種となって基質から水素原子を引き抜くことから反応が開始される。一方メチルコバラミンにおいては、Co-C結合がヘテロリティックに開裂し、メチル基がメチルカチオンとして転移する。同じコバラミン骨格を用いながらアデノシルコバラミンはラジカル機構の反応に関与し、メチルコバラミンはイオン機構の反応に関与するのはなぜか。メチル基およびアデノシル基は、上方配位子とよぶのが通例である。下方配位子はジメチルベンズイミダゾールで、この下方配位子とCoとの結合の性質が影響するという考えもある。しかし、何といっても酵素との複合体がどのような構造をとるかを解明することがその解答を得る近道である。そこで我々はジオールデヒドラターゼとシアノコバラミンの複合体の結晶構造解析に着手した。

2. 結晶化, 放射光実験, 位相決定, 構造

ジオールデヒドラターゼは膜結合性ではないが溶解度が低く、精製の過程で界面活性剤が必要である。膜タンパク質の結晶化に利用されている界面活性剤を検索し、それにならうことにした。また沈殿剤としては、硫酸アンモニウム、ポリエチレングリコール (PEG)、2-メチル-2,4-ペンタンジオール (MPD) などを用いた。ジオールデヒドラターゼは基質であるプロバンジオールが共存すると安定であり、また酵素作用の発現のためには1価のカチオンを必要とする。したがって酵素の精製にはプロバンジオールとKClを添加して行った。精製標品にシアノコバラミンを加えて37℃に保って複合体を形成させ、結晶化実験に供した。沈殿剤と界面活性剤、タンパク質濃度など多くの組み合わせで実験を行った。不成功に終わった多くの実験ののち、最初の結晶が得られたのはプロジェクトを開始してから3年を経過した時点であった。そのときの結晶はまだクオリティが高くなかったが、その後の結晶化条件の探索によりサンドイッチドロップ蒸気拡散法がよい結晶を与えることを確立できた。単斜晶と斜方晶が得られたが、分解能は斜方晶のほうがよかったので、この結晶について実験を進めた⁸⁾。

ジオールデヒドラターゼ・シアノコバラミン複合体のX線回折実験はSPRing-8 BL41XUで行った(277 K)。ネイティブ結晶のデータはフォトンファクトリー (PF) においても測定したが、重原子誘導体のデータの測定も行うことができた。重原子誘導体としては、チオサリチル酸エチル水銀 (EMTS) とEtHgClのデータを収集

図2 ジオールデヒドラターゼとシアノコバラミン複合体の構造。

2量体の一方をワイヤーモデルで、他方をリボンモデルで示している。右側のリボンモデルにおいて、ほぼ中央にコバラミンがあり、スティックモデルで示されている。その下の球がカリウムイオンである。コバラミンを挟んで上方がβサブユニット、下方がαサブユニットであり、γサブユニットはαサブユニットの表面に接触しており、図の右側にある。それぞれのサブユニットについてアミノ酸残基番号を50おきに示している。

し、位相問題を解決することができた。最終的にはネイティフはSPRing-8, EMTS 誘導体はPF, EtHgCl 誘導体は実験室と、三者三様の装置を利用したことになる。非対称単位に $(\alpha\beta\gamma)_2$ が存在しており、ほぼ非結晶学的な2回対称をもっていたのでそれを利用した平均化が位相の改善に役立った。得られた空間群は $P2_12_12_1$, 格子定数 $a = 76.2, b = 122.3, c = 209.6 \text{ \AA}$, $R = 0.188, R_{\text{free}} = 0.236$ である。

図2のように酵素複合体は $(\alpha\beta\gamma)_2$ として存在する。 α サブユニットの接触で2量体を形成している。非結晶学的な2回軸の関係にあって構造には差はない。シアノコバラミンは α サブユニットと β サブユニットの境界に見出された。図中にスティックモデルで示されている。上方配位子(CN)が α に、下方配位子が β 側にある。基質であるプロパンジオール(スティックモデル)と、必須であるカリウムイオン(球)が α サブユニットのアミノ酸残基とそれぞれ水素結合、イオン・双極子相互作用を形成している構造が見出された。これは酵素反応機構の解明について大きな寄与をする知見であり、新しい反応機構を提案する基礎となった。

3. ラジカル反応の初期過程

酵素反応の始まりが、

という開裂であり、以後はこの炭素ラジカルが基質との反応に関与する。シアノコバラミン複合体においてはシアノ基の炭素がラジカル炭素に相当するのであるが、この構造解析においては、実はシアノ基の電子密度が非常に低かった。メチオニン合成酵素の構造においてもメチル基の電子密度が見出されていない。これは何を意味するのであろうか。

X線回折実験であるからX線(放射光)が照射される。

そのX線によってシアノ基からラジカルが発生してもとの位置に止まらないために電子密度が見られないということが考えられる。測定温度を下げれば電子密度が見られる可能性もある。一方、酵素反応の解明のためには、補酵素であるアデニルコバラミンにできるだけ構造が似たものを使うことが望ましい。そこでアデニン基とCoをペンタメチレン基でつないだアデニルペンチルコバラミンとの複合体の構造研究もあわせて行うことにした。アデニルペンチルコバラミンは光で容易に分解する。したがって、暗黒下で結晶調製・回折実験を行うことが必要なので困難を極めたが、安全光を使うことにより何とか遂行することができた⁹⁾。アデニルペンチルコバラミン複合体はシアノコバラミン複合体と類似であったので、後者の原子座標のうち共通部分を用いて概略の構造を得た。そして両者の相異について注意を払いながら精密化を進めた。

アデニルペンチル基は α サブユニットの側に存在するがその窒素原子が α サブユニットを構成するアミノ酸の主鎖や側鎖の原子と直接にまたは水分子を介して水素結合を形成している。その相互作用の様態を図3に示す。アデニルペンチル基はもちろんアデノシル基を模してデザインされているので、これらの水素結合によってアデニン部分が保持されている状況はアデノシル基と酵素の結合の状況を表していると考えるのは妥当であろう。こうして考えてみると、アデノシル基はアデニン部分において酵素に捕らえられている形でCo-C結合のホモリティックな解離が起こりラジカル反応に関与していくと考えられる。これを adenine-anchored radical とよんでいる。

ところでアデニルペンチルコバラミンが光に対して不安定であることは先に述べた。光が当たると分解するというのは、Co-C結合が切れることを意味している。暗黒の中で行った回折実験を光照射下で行うと、ラ

図3 アデニルペンチル基のアデニン部分と酵素のアミノ酸側鎖との相互作用。図中の数値は原子間距離(Å)を示す。

ジカルの発生を観察することができるのではないかと
いうアイディアが浮かんだ。そこで暗黒下で行った実験
ののち、電灯で照射しつつ回折実験を行った。構造解
析でラジカルが直接見えるわけではない。何が見える
か。アデニルペンチル基が根元のところでCoと結合
していて、そこが切れてラジカルになるのだからペン
チル基が見えなくなるということで確認できるだろ
う。実際、電子密度図でははっきりしなくなっている。
原子間距離や原子価角に制限を加えて温度因子を精密
化すると、光照射下ではペンチル基の温度因子が平均
15 Å²から25 Å²と非常に大きくなり(実際にはどこへ
行ったかはっきりしなくなり)、一方アデニン部分は不
変であるという結果が得られた。

アデノシルコバラミンの場合は光でラジカルを発生
するわけではない。光のないところで化学的にラジカ
ルを発生するのであるが、機構は異なるとしてもアデ
ニン部分で酵素に捕らえられている状況でラジカルを
発生し反応を触媒する過程における描像の1つとして
重要な知見である。

4. おわりに

長年積み重ねてきた生化学的・分子生物学的な研究
から酵素反応の重要な知見が得られていた。例えばア
デニン基の窒素原子が酵素のアミノ酸残基と水素結合
を形成していることが反応にとって重要であることが
、アデニン基に化学的修飾を施したものをを用いるこ
となどによって結論づけられていた。今回のX線解析
によって解明された構造はこれらすべての知見ともの
の見事に対応するものであった。なかでも重要であっ
たのは、カリウムイオンがアミノ酸残基の酸素原子に
配位していたことであり、そして6配位めの位置にブ
ロパジオールの2つのOH基が配位していたことであ
る。この配位座を利用して酵素反応が進行することが
明確に示された。これらの知見を総合すると、アデノ
シルコバラミンを補酵素とするジオールデヒドラター
ゼの反応の機構をはっきりとした描像として示すこと
ができた。反応の経過を構造解析で見ることができ

ばもっと確実である。いろいろのタンパク質や酵素に
ついての動的構造解析研究が取り組まれているが、ジ
オールデヒドラターゼのように酵素とアデノシルコバ
ラミンが複合体を形成すると直ちに反応が起こる場合
には対応できない。しかし、いろいろな工夫をこらした
構造研究でもっと細部に迫ることができると考え、取
り組んでいるところである。さらに進歩した研究成果
を近い将来に発表できると期待している。

この研究は姫路工業大学理学部安岡研究室と岡山大
学工学部虎谷研究室との共同の仕事であり、引用した
原報⁶⁾⁸⁾⁹⁾の共著者に厚く感謝する。また平成9年度～
10年度科学研究費補助金(基盤研究(B)(2))課題番
号: 09480180のサポートをいただいたものであり厚
く感謝する。

文 献

- 1) Toraya, T. (2000) *Cell. Mol. Life Sci.* **57**, 106-127.
- 2) Drennan, C. L., Huang, S., Drummond, J. T., Matthews, R. G. and Ludwig, M. L. (1994) *Science* **266**, 1669-1674.
- 3) Mancina, F., Keep, N. H., Nakagawa, A., Leadley, P. F., McSweeney, S., Rasmussen, B. Boesecke, P., Diat, P. and Evans, P. R. (1996) *Structure* **4**, 339-350.
- 4) Mancina, F. and Evans, P. R. (1997) *Structure* **6**, 711-720.
- 5) Mancina, F., Smith, G. A. and Evans, P. R. (1999) *Biochemistry* **38**, 7999-8005.
- 6) Shibata, N., Masuda, J., Tobimatsu, T., Toraya, T., Suto, K., Morimoto, Y. and Yasuoka, N. (1999) *Structure* **7**, 997-1008.
- 7) Reitzer, R., Gruber, K., Jogl, G., Wagner, U. G., Bothe, H. and Kratky, C. (1999) *Structure* **7**, 891-902.
- 8) Masuda, J., Yamaguchi, T., Tobimatsu, T., Toraya, T., Suto, K., Shibata, N., Morimoto, Y., Higuchi, Y. and Yasuoka, N. (1999) *Acta Crystallogr.* **D55**, 907-909.
- 9) Masuda, J., Shibata, N., Morimoto, Y., Toraya, T. and Yasuoka, N. (2000) *Structure* **8**, 775-788.

安岡則武(やすおか のりたけ)
姫路工業大学理学部生命科学科教授
連絡先: 〒678-1297 兵庫県赤穂郡上郡町光都3-2-1
E-mail: yasuka@sci.himeji-tech.ac.jp
柴田直樹(しばた なおき)
姫路工業大学理学部生命科学科助手
連絡先: 〒678-1297 兵庫県赤穂郡上郡町光都3-2-1
E-mail: shibach@sci.himeji-tech.ac.jp
虎谷哲夫(とらや てつお)
岡山大学工学部生物機能工学科教授
連絡先: 岡山市津島中3-1-1
E-mail: toraya@biotech.okayama-u.ac.jp