

基質の歪みを利用する酵素の反応触媒機構

Catalytic mechanism of an enzyme utilizing substrate distortion

藤橋雅宏

Masahiro Fujihashi

京都大学大学院理学研究科 化学専攻

Department of Chemistry, Graduate School of Science, Kyoto University

Life is an assembly of reactions, and such reactions are controlled by various enzymes. Most of the enzymatic reactions are explained by the transition state stabilization. Here, I summarize the mechanism of orotidine-5'-monophosphate decarboxylase (ODCase), which utilizes an alternative catalytic mechanism, substrate distortion, in addition to the transition state stabilization. The contribution of substrate distortion to catalysis is estimated to be 10-15% of the transition state stabilization.

1. はじめに

生命は多数の化学反応の集合で成立している。食物を消化しエネルギーを取り出す反応、病原菌などの外来因子に戦うための反応、自らの遺伝子を子孫に残すための反応、遺伝子に従って細胞を構築するための反応など、生命体内では無数の反応が制御されながら進行している。これらの化学反応のほとんど全ては、酵素に触媒されて進行する。本稿では、これまでに筆者が解析した酵素タンパク質のうち、化学結合の歪みを利用して反応を進行させる酵素であるオロチジンーリン酸脱炭酸酵素の三次元構造と反応触媒機構について述べる。

2. 酵素反応と自由エネルギー

多くの生化学の教科書で、酵素触媒反応の進行に伴う自由エネルギーの変化は、図 1A のように説明されている[1]。この図を見れば、反応を速く進ませるためには遷移状態を安定化させれば良いことがわかる。しかしながらこの図では、酵素の大きな特徴の一つである、特定の基質について選択的に働くという事実の説明が出来ない。実際、酵素が働く細胞内は、無数の化合物が混ざり合って構成されている。この雑多な化合物の混合溶液から、特定の化合物のみを目的の化合物に変換できる触媒がなければ、細胞は活動を維持できない。

酵素の基質選択性を説明するためには、図 1A を図 1B のように書き換える必要がある。図 1B においては、酵素はまず特定の基質と結合して酵素基質複合体を形成し、自由エネルギー的に安定化される。続いてこの酵素基質複合体は遷移状態に移行し、基質が生成物に変換される。酵素反応の速度は、この酵素基質複合体から遷移状態への変化の、山の高さに依存して決まる。

多くの酵素について、遷移状態をより強く安定化することでこの山の高さが低くなり、反応は加速されると説明されている。もう一つの反応加速機構として、酵素基質複合体のエネルギー状態を安定化させすぎないというものがある。しかし、この酵素基質複合体のエネルギー状態を安定化させすぎない（不安定

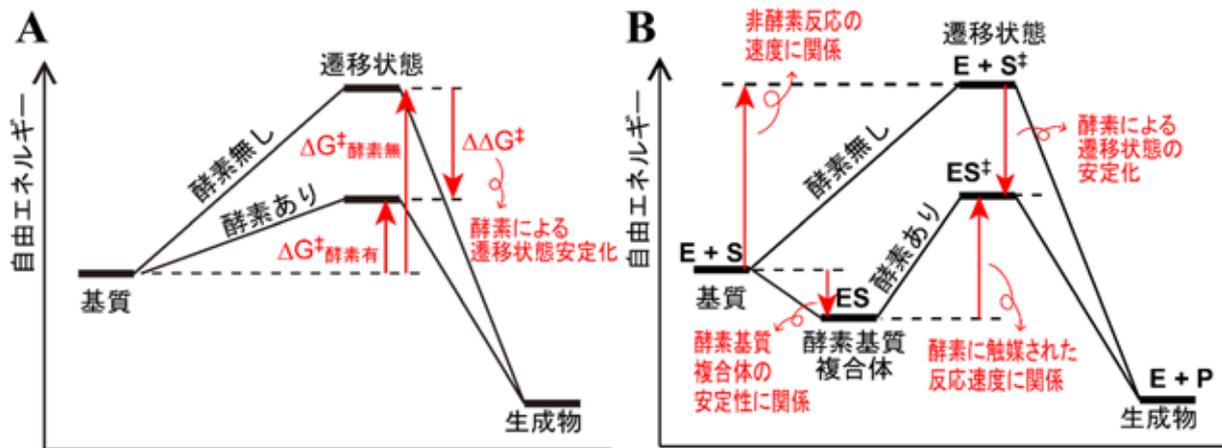


図1 酵素反応の進行に伴う自由エネルギー変化. A: 多くの生化学の教科書で用いられる模式図. B: 酵素基質複合体の形成を考慮した図.

化させる) ことによる触媒反応加速の実体を, 詳細に調べた例はあまりない.

3. オロチジナーリン酸脱炭酸酵素 (ODCase) について

オロチジナーリン酸脱炭酸酵素 (ODCase) は, 図 2A に示す反応を触媒する酵素であり, DNA や RNA を構成する物質の一種であるピリミジンの合成に関わる[2]. ピリミジンは生命維持に必須の物質であるが, 我々ヒトは ODCase の関わらないピリミジン合成経路をもつため, ODCase の活性を阻害しても生存が可能である. しかし, 例えばマラリア原虫はピリミジンの合成経路として ODCase の関わる経路しか持っていないため, ODCase の働く仕組みを解き明かし, その活性を止める薬を發明すれば, 現在でも年間 2 億人が感染し 60 万人が亡くなるマラリアの治療薬となる可能性が高い[3]. また図 2A の反応は ODCase の存在下では数十ミリ秒で完了するが, ODCase の非存在下では半減期が概ね数千万年と, 恐竜時代から今に至る時間に等しい膨大な時間が必要であるとわかっている[4]. この大きな反応速度の加速はどのようにして成し遂げられているのか, 大きな興味を持たれている.

著者らはこの酵素の反応阻害剤候補の一つとして合成された 6-cyano-UMP (6-CN-UMP, 図 2B) について, ODCase との複合体の結晶を作成し, 1.45Å 分解能での X 線結晶構造解析を行った[5]. 結晶は 100K 程度の窒素気流中で凍結し, シンクロトロン放射光施設でのデータ取得まで低温センターより供給される液体窒素中に保管している. 解析により得られた 6-CN-UMP の電子密度を図 2C (左) に示す.

X 線結晶構造解析は, 結晶中の電子分布を可視化する技術である. 電子は分子を構成する原子の周辺に局在するので, 分子の構造を決定できる. ここで分解能 1.45Å は, 無機物や有機小分子の X 線結晶構造解析としてはかなり低い分解能であるが, 酵素は分子量が数万程度と非常に大きいものが多いため (ODCase の場合は分子量約 27,000 の単量体が 2 分子集まり, 分子量約 54,000 の二量体を形成する), 酵素の X 線結晶構造の分解能としては比較的良いものである. これぐらいの分解能だと, 水素原子の電子密度の検出は困難だが, 炭素(電子数 6), 窒素(電子数 7), 酸素(電子数 8)を, 電子密度の濃さの違いとして見ることが可能である.

そのような知識を基に改めて図 2C (左) の電子密度を観察すると, CN 基に相当する電子密度が見当たらない (図 2C 赤矢印の部位). CN の代わりに酸素原子をあてはめると, 妥当な電子密度の解釈が出来る (図 2C (右)). そこで ODCase が 6-CN-UMP の CN 基を OH 基に変換する反応を触媒したのではないかと考え質

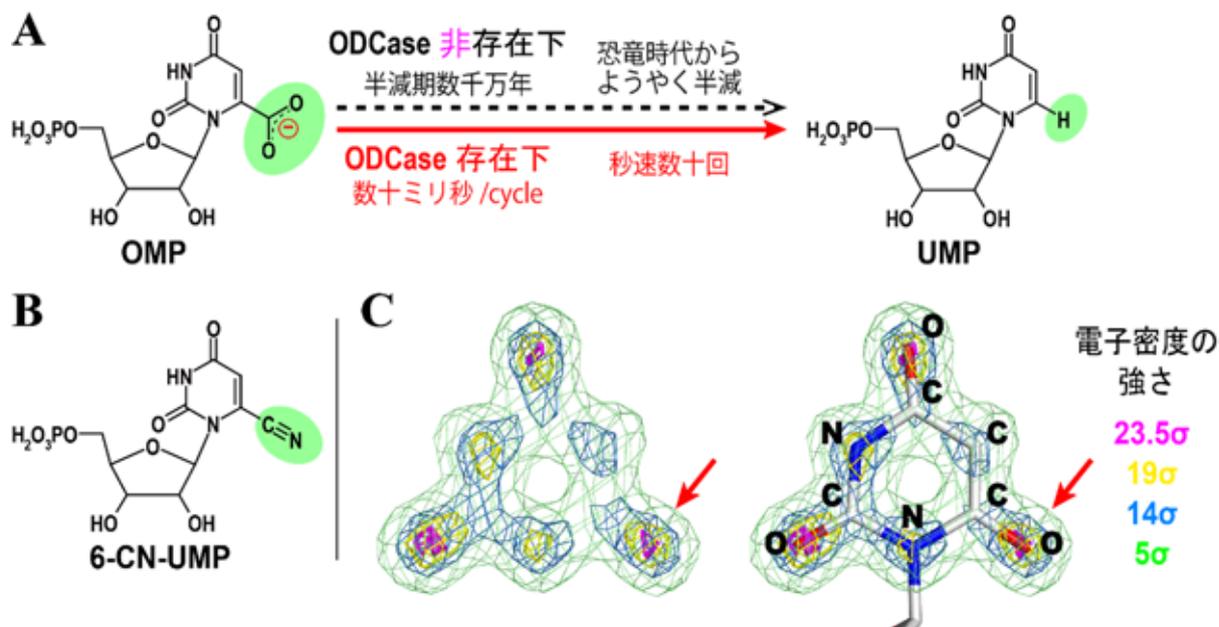


図2 A: ODCaseの触媒する反応. Orotidine-5'-monophosphate (OMP)が Uridine-5'-monophosphate (UMP)に変換される. 実際に変換される部分を緑で強調した. B: 6-CN-UMPの構造. Aで示した化合物と異なる部分を緑で強調. C: ODCaseと6-CN-UMP複合体の, ピリミジン環に相当する電子密度. 赤矢印の部分がCNである6-CN-UMPと複合体を形成させたが, 該当位置に観察された原子は酸素であった.

量分析を行ったところ, CN基からOH基への変換に相当する質量変化を検出できた. さらに分光によっても反応を追跡することに成功し, この変換反応が数時間程度で進行することを示した[5,6].

4. 従来の反応と新しく見いだした反応は正負逆の電荷を持つ中間体を経由する

ここまでで, ODCaseは従来より知られていたカルボキシル基の脱炭酸反応のみではなく, CN基をOH基に変換する反応も触媒する事が明らかになった. これら二つの反応を反応機構とともにまとめた図3は, ODCaseが似たような2種類の反応を触媒する事を示しているだけにも見えるが, 化学の視点で見ると, 強い違和感をもたらす. 図3Aの反応はCO₂が脱離し, 負電荷を持つ六員環の中間体を経て, H⁺が取り込まれる反応であることが実験的に確かめられている[7]. これに対し図3Bの反応で脱離する置換基は負電荷を持つCNであり, 正電荷を持つ六員環の中間体が形成される. 図3の反応はともに, 酵素上の全く同じ位置で触媒される事がわかっている. 正電荷は負電荷で, 逆に負電荷は正電荷によって安定化されるので, 同じ位置で正負両方の電荷を持つ中間体が安定化される機構はあり得ない.

そこで ODCaseに6-CN-UMPが結合した複合体の結晶構造解析に取り組んだ. 図3Bに示すように6-CN-UMPは6-OH-UMPに変換されてしまうが, この反応は日単位でゆっくり進むので, 低温で素早く結晶を成長させることで構造解析に成功した[8]. 実際の電子密度図を図4Aに示す. 変換を受ける前の6-CN-UMPと変換された後の6-OH-UMPの両方の電子密度が重なって観察できる. この電子密度から, 6-CN-UMPのCN基はピリミジン環の平面から折れ曲がっていることが明確にわかる. ピリミジン環は芳香族性を持っていることから, 環を構成する分子とCN基は同一平面上にあることが予測されていたが, 酵素中ではCN基は平面から歪められていることがわかった. その後の解析で, 同様に歪んだ基質の構造が複数見いだされた[8,9,10].

基質の歪みは, 酵素基質複合体の自由エネルギー状態を不安定化し, 遷移状態までのエネルギー差を減

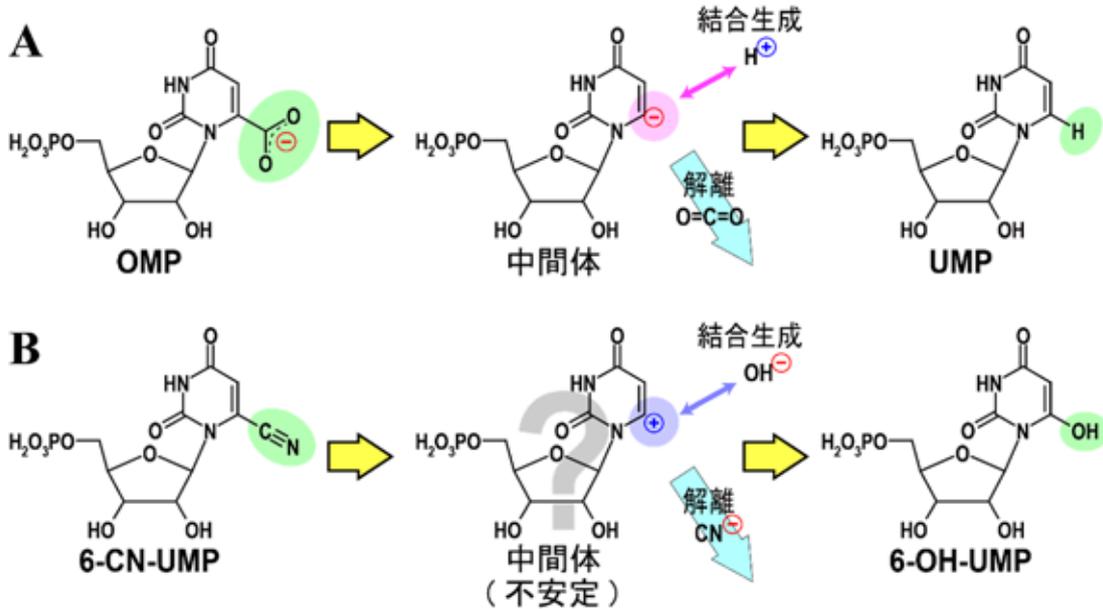


図3 A: ODCaseによる反応とその機構. 変換される部分を緑で強調した. A: 実験的に示されている OMP の UMP への変換反応の反応触媒機構[7]. B: 6-CN-UMP の 6-OH-UMP への変換反応の機構について, A と同様の中間体を考える場合の仮説. B の中間体の陽イオンは化学的に非常に不安定であり, かつ A の中間体の負電荷と, B の中間体の正電荷の両方を中和できるような酵素上の電子分布は考えにくい.

じているのかもしれない. そのように考え, 基質構造の歪みの触媒反応への貢献を明らかにすることを目的とした計算機シミュレーションを行った[9]. 図4Bに示すように, 酵素中で歪んだ基質と, 溶液中での歪んでいない構造を比較すると, 二つの構造には 6.6 kcal/mol のエネルギー差がある (図4B①). 次に遷移状態として, 解離する COO 基がピリミジン環から引き離された構造についても計算した. その結果, 酵素中における歪みを考慮する場合 (図4B②) は, 基底状態から遷移状態までに 25.7 kcal/mol のエネルギー差が

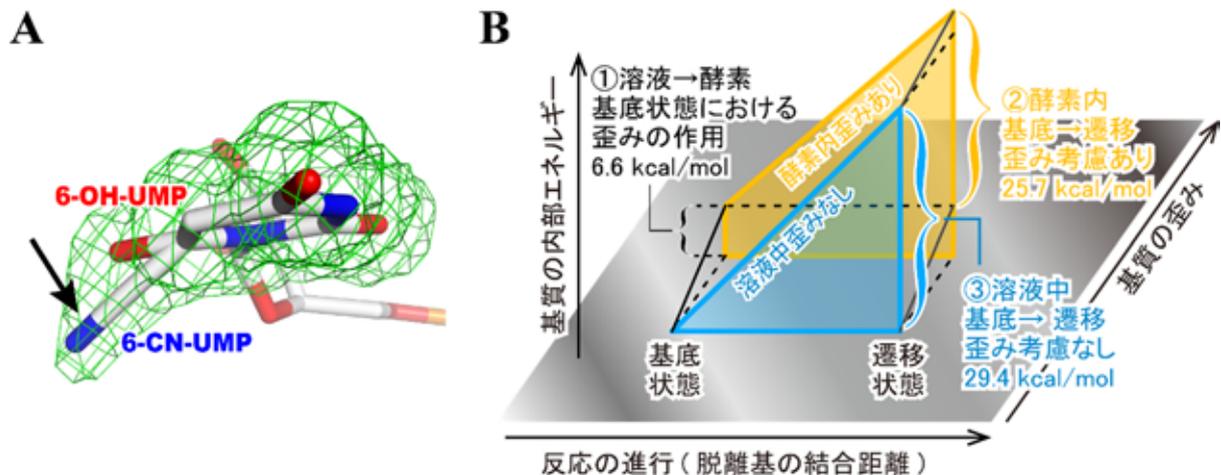


図4 A: ODCase と複合体を形成した 6-CN-UMP の電子密度. ピリミジン環が紙面にほぼ垂直になる方向からの視点で描画した. ODCase により 6-CN-UMP から 6-OH-UMP への変換反応が進むので, 6-CN-UMP と 6-OH-UMP の両方の電子密度が重なって見えている. 6-CN-UMP について, 矢印で示した部分の CN 基 (cyano 基) がピリミジンの六員環構造から折れ曲がっていることがわかる. B: 基質の歪みを考慮したときと考慮しないときの, 基質の内部エネルギーの変化.

あり、歪みの考慮が必要ない溶液中での場合 (図 4B③) は、基底状態から遷移状態までに 29.4 kcal/mol のエネルギー差があることがわかった。②と③の差 3.7 kcal/mol は、歪みの反応触媒への貢献と言える。このエネルギーは、別の実験で求められた ODCase による遷移状態安定化 (29~30 kcal/mol [4]) の 10-15%程度に相当する。

このように、基質の歪みによる酵素基質複合体の不安定化は反応加速に貢献するが、一方で酵素基質複合体の安定性は酵素の基質特異性に直結する。これについて、ODCase は 15 箇所以上で基質と水素結合や静電結合をする事が知られている。これら多くの結合によって基質特異性を高め、結合によって得たエネルギーのうちの一部を基質の歪みに使って、触媒反応を加速しているのだと考えられる。

5. おわりに

酵素による反応は、有機合成化学でも扱う反応である場合が多い。ここで酵素反応は有機合成化学と比べて、1. 複数のステップが必要な反応を一段階で進行させる、2. 溶媒は環境に優しい水である、3. 反応ステップ毎の精製の必要性が低い、等の大きな利点を持つ。一方で酵素反応は自由な設計が難しいことから、化合物の合成に広く利用されているとは言いがたい。またその反応触媒機構についても、明らかになっていない部分が多い。本稿で論じたような酵素による基質構造の歪みを正面から論じた例はこれまで少ないが、理論的には全ての酵素反応が程度の差はあれ基質の歪みを利用していると考えられることから、最近では他の酵素を対象にした同様の研究もいくつか行われている。今後、さらなる研究の進展が待たれる。

謝辞

本稿で述べた研究は、トロント大学 Emil F. Pai 教授、トロント総合研究所 Lakshmi P. Kotra 教授、産業総合経済研究所 石田豊和氏らのグループとの共同研究です。研究の多くは、京都大学大学院理学研究科 三木邦夫教授のグループで進められました。X線回折データの収集は、茨城県の Photon Factory、兵庫県の SPring-8、アメリカの Advanced Photon Source で行いました。研究を進めるにあたり、科学研究費補助金ならびに上原記念生命科学財団の支援を頂きました。この場をお借りして厚く御礼申し上げます。

参考文献

- [1] ストライヤー生化学 (東京化学同人), ヴォート生化学 (東京化学同人) など
- [2] M. Fujihashi *et al.* *J. Genet. Genomics* **42**, 221 (2015)
- [3] L.P. Kotra *et al.* World Patent # WO2007038860 (2006) 他
- [4] A. Radzicka & R. Wolfenden *Science* **267**, 90 (1995)
- [5] M. Fujihashi *et al.* *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 15048 (2005)
- [6] E. Poduch *et al.* *J. Med. Chem.* **49**, 4937 (2006)
- [7] T. L. Amyes *et al.* *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 1574 (2008)
- [8] M. Fujihashi *et al.* *J. Mol. Biol.* **387**, 1199 (2009)
- [9] M. Fujihashi *et al.* *J. Am. Chem. Soc.* **135**, 17432 (2013)
- [10] M. Fujihashi *et al.* *J. Biol. Chem.* **288**, 9011 (2013)

著者略歴



藤橋 雅宏 (FUJIHASHI Masahiro)

京都大学大学院理学研究科 化学専攻 助教

2001年3月 京都大学大学院理学研究科にて博士(理学)を取得

京都大学大学院理学研究科でのリサーチアソシエート, カナダ・トロントのオンタリオ癌研究所での博士研究員(日本学術振興会 長期在外若手研究員), 大阪大学蛋白質研究所での日本学術振興会特別研究員PDを経て, 2004年10月より京都大学大学院理学研究科 助手. 2007年4月より職名変更で現職.