

金属酵素が機能を制御する分子メカニズムをさぐる

統合バイオサイエンスセンター戦略的方法論研究領域 藤井 浩

1. はじめに

私たちの体の中にはたくさんの金属酵素と呼ばれるタンパク質が存在し、私たちの生命活動を支えている。金属酵素は、金属イオンを含む酵素を意味し、多くの場合、この金属イオンが酵素反応と直接関係している。例えば、体中の鉄分が足りなくなると貧血を起こすのも、赤血球中のヘモグロビンと呼ばれる金属タンパク質が関係している。私たちが必要とする金属イオンは、鉄、銅などわずか十数種類だが、金属酵素が行う反応の種類は莫大な数になる。どうしてわずかな金属イオンからこんなにたくさんの種類の反応ができるのであろうか？ 私たちの研究グループでは、この問題に答えるため金属酵素がどのようなからくりで働いているかを分子レベルで研究している。金属酵素の研究と聞くと生化学のように思われるが、酵素も1つの分子であり、生体内の分子科学である。ここでは、私たちのグループが行ってきた酸素活性化に関わる金属酵素の研究を紹介する。

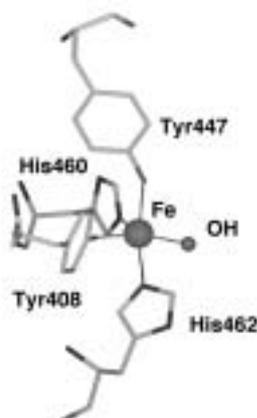


図1 カテコールジオキシゲナーゼの活性中心の構造

2. 金属イオンの電子状態が酵素の反応場の形を決める

私たち地球上の生物の多くは、呼吸により酸素を体内に取り入れて生活している。体内に取り込まれた酸素は、生活のエネルギーを作るため、体内に侵入してきたバイ菌をやっつけるため、生理活性物質の合成や代謝などさまざまな目的に使われる。生物が酸素をさまざまな目的に使うために多くの金属酵素が働いている。その一例としてカテコールジオキシゲナーゼの活性中心のX線結晶構造解析を図1に示した。この酵素は、地中のバクテリアの中で酸素活性化を行い芳香環の代謝過程に関わっている。活性中心には鉄イオンがあり、ここで反応が起こる。鉄イオンには、チロシン残基のフェノレート基が2つ、ヒスチジン残基のイミダゾール基が2つ、水分子が1つ配位し、全体として三角両錐の特異な構造をとっている。私たちのグループでは、この酵素の活性中心の構造と酸素活性化機構の関わりを解明するため、この活性中心のモデル化を試みた。この酵素のモデル錯体を作るために、サレンに着目した。サレンは、1分子内にフェノレート基を2つ、イミン基を2つもち、酵素と類似の活性中心をとることが期待できる。しかし、サレンは平面性の高い配位子であるため、分子間相互作用によりダイマーを容易に形成してしまう問題があった。酵素では、タンパク質が活性中心を分子間相互作用から保護している。そこで、立体的にかさだかいメシチル基(2,4,6-トリメチルフェニル基)をサレン配位子の周囲に導入し、酵素のタンパク質のように活性中心を保護する

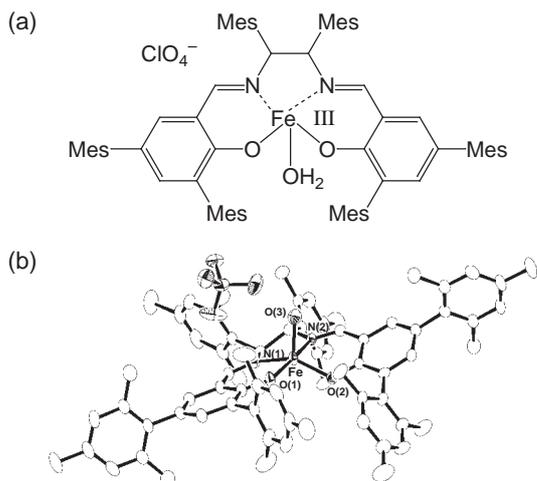


図2 カテコールジオキシゲナーゼのモデル錯体 a) とそのX線結晶構造 b)

ことを試みた。図2(a)に示すような立体障害をもつサレン鉄錯体の合成を行った。酵素と同様に水分子が配位したサレン鉄錯体を合成し、その構造をX線構造解析した。結果を図2(b)に示したが、サレンに導入したメシチル基が活性中心を分子間相互作用から保護していることがわかった。さらに興味深いことに、この錯体の配位構造はこれまでに報告されているサレン鉄錯体とは大きくことなり、平面構造から大きく歪み、酵素と類似の三角両錐構造になっていることがわかった。配位子を酵素のものと類似させたら、配位構造までも似る結果となった。どうしてサレン配位子が大きく歪み、三角両錐構造になったのであろうか？今回サレンに導入したメシチル基同士の立体反発による歪みと考えられたので、さらにこの配位子を使ってこれまで多く報告されている塩素イオン錯体を合成した。構造解析を行って結果、塩素錯体は水錯体ほど歪んでおらず、むしろこれまでのサレン錯体と同様の四角錐構造であることがわかった。この結果は、水錯体が三角両錐構造をとるのはメシチル基の立体障害でないことを示した。そこで次に水配位子の影響を検討するため、さらにいくつかの錯体の構造解析を行った。図3に外部配位子とサレン錯体の構造ひずみの関係を示し

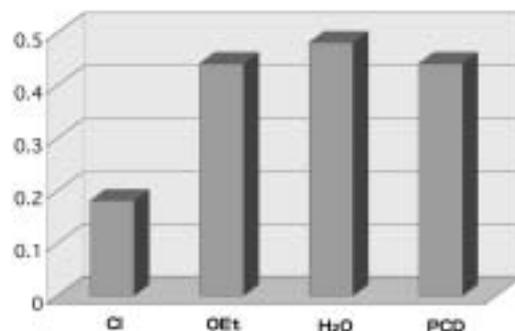


図3 外部配位子とサレン錯体の構造ひずみの関係。縦軸はτ値を示し、0が四角錐構造、1が三角両錐構造であることを示す。横軸は、外部配位子を示す。Cl：塩素錯体、OEt：エソキシド錯体、H₂O：水錯体、PCD：カテコールジオキシゲナーゼ

た。興味深いことに、サレン錯体に配位する外部配位子のドナー性が大きくなるにつれ、錯体の歪みが大きくなることがわかった。つまり、錯体の立体的な要因で歪んだのではなく、電子的な要因で歪んだことを示した。これをさらに検証するため、置換基のないサレン錯体のDFT計算を行い、最適構造を求めてみた。結果は、先の実験結果と一致し、構造歪みが電子的な要因によることを支持した。水分子からの電子供与が d_{z^2} 軌道のエネルギーを上昇させたため、それを補うために $d_{x^2-y^2}$ 軌道のエネルギーを低下させる必要があり、結果として配位子が三角両錐構造に変化したと考えられた。今回の結果は、カテコールジオキシゲナーゼの三角両錐構造がタンパク質からの立体的な要因によるものではなく、鉄イオンに配位した水分子の電子的な要因によることを示した。さらにこの水配位子は、酵素反応にも関係していると考えられる。水配位子からの電子供与は、基質からの電子移動を起こりにくくするため、酵素反応を阻害する。基質の配位による水配位子の解離が、酵素反応の進行には必須であると考えられる。

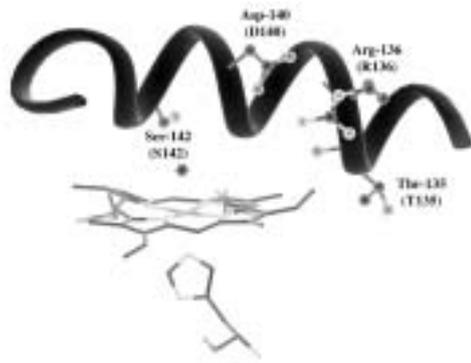


図4 ヘムオキシゲナーゼの活性中心の構造
タンパク質内のアミノ酸の配列はN末端からかぞえられる。たとえばThr-135はN末端から135番目にスレオニンがあることを意味する。

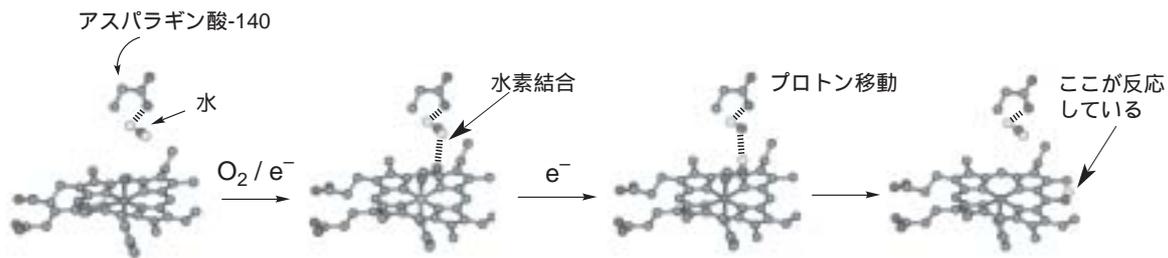


図5 ヘムオキシゲナーゼによる酸素活性化機構

3. タンパク質が作る水素結合ネットワークが酵素機能を制御する

金属酵素の活性中心にある金属イオンは、金属酵素にとっては必須であるが、金属イオンの力だけで酵素反応はできない。実際、鉄錯体を使った酸素の活性化は非常に困難であり、たとえ酸素活性化してもその反応性を制御できず、酵素のような選択的な反応はできない。酵素が酵素たる所以は、やはりタンパク質にある。ここではヘムオキシゲナーゼという私たちの肝臓で胆汁を作っている酵素を題材に、酸素活性化や酵素の機能制御にタンパク質がどのように関わっているかを研究した成果を報告する。

ヘムオキシゲナーゼは、私たちの肝臓や脾臓、さらには脳や睾丸に多く存在する。肝臓や脾臓にある酵素は消化液の一つである胆汁を作ることに変わり、脳や睾丸にある酵素は生体内情報伝達物質である一酸化炭素の合成に関わっていると考えられている。興味深いことに一酸化炭素は私たちの体には有毒であるにもかかわらず、体の中で合成されて情報伝達(たとえば概日リズム)にかかわっている。ヘムオキシゲナーゼは、約30年前に初めて生体細胞から

単離され、研究が進められてきたが、多くの不明な点があった。その一つに、この酵素がいかにして酸素を活性化しているかという点であった。私たちは、ヘムオキシゲナーゼの活性中心にあるアミノ酸残基がこれに関わっていると考え(図4)、それらのミュータント酵素を作成した。図4に示すように、スレオニン-135、アルギニン-136、アスパラギン酸-140、セリン-142をそれぞれアラニンに置換したミュータントを作成し、それらの酵素機能を研究した。その結果、アスパラギン酸-140が酵素機能を支配するアミノ酸残基であることを見いだした。さらに、アスパラギン酸-140をグルタミン酸、アスパラギン、ロイシン、フェニルアラニンに置換したミュータントの作成を行い、詳細な研究を行った結果、アスパラギン酸は酸素分子活性化に必要なプロトンを提供していることが明らかとなった。図5に本研究による酸素活性化機構を示す。ヘムオキシゲナーゼに取り込まれたヘムは、鉄3価から鉄2価に還元された後、酸素錯体を形成する。アスパラギン酸-140は、ヘム鉄に配位した酸素分子と直接水素結合を作るには遠く、水分子がこれらの間に入り水素結合ネット

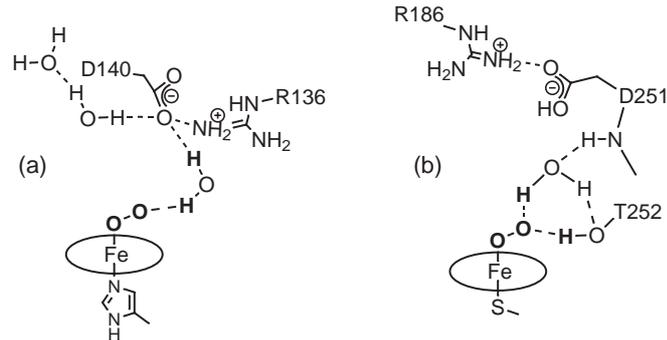


図6 ヘムオキシゲナーゼとチトクロームP450の酸素活性化反応中間体の構造の違い
(a) ヘムオキシゲナーゼ、 (b) チトクロームP450

ワークを形成する。水素結合の存在により、酸素錯体の還元電位は大きく上昇し、さらにもう一電子還元を受けることができるようになる。実際、アスパラギン酸-140をミュートンションして水素結合ネットワークを切断すると、酸素錯体までは生成するが、プロトンがないため次の電子が入らない。ヘム鉄に配位した酸素分子は、還元酵素からさらに一電子もらい、ヒドロパーオキシまで還元される。ヘム鉄に配位したヒドロパーオキシは、水素結合によりヘムの α メソ炭素方向に配向が固定される。そのため、生成したヒドロパーオキシは α メソ炭素だけを選択的に水酸化するのである。

この結果から次に、どうして酸素活性化をする酵素が生体内にはいっぱいあるのにそれぞれの働きが違うのだろう、という疑問がわいてくる。この疑問に対する答えを探すため、これまで酸素活性化酵素としてよく知られたチトクロームP450とヘムオキシゲナーゼを比較してみた。チトクロームP450は種々の外部基質を水酸化できるが、ヘムオキシゲナーゼのようにヘムを代謝できない。逆にヘムオキシゲナーゼは、種々の外部基質を水酸化できない。何が二つの酵素のそれぞれの機能を支配しているのか？ 図6にそれぞれの酵素の酸素活性化反応中間体の構造を示した。チトクロームP450では、ミュートンションの実験からスレオニン残基とアスパラギン酸残基が酸素分子活性化に必須であることが示

されている。これらの残基は近傍に存在する水分子と水素結合ネットワークを形成して、ヘム鉄に配位した酸素分子にプロトンを供給する。これは、先の書いたようにヘムオキシゲナーゼの酸素活性化機構と同じである。ところがチトクロームP450では、スレオニンとアスパラギン酸の二つの残基が機能しているため、酸素分子にプロトンを供給する経路が2つある。そのため活性化された酸素分子は $O=O$ 結合の解裂により一方の酸素原子を水として放出することができる。結果として鉄5価オキシ種を生成し、これが非常に活性なため、そばにいる外部基質を水酸化するのである。一方ヘムオキシゲナーゼでは、アスパラギン酸-140しか水素結合ネットワークに関与していない。そのため、活性化された酸素分子は $O=O$ 結合の解裂により水を放出し、鉄5価オキシ種を生成できない。したがって外部基質を水酸化することができない。そのかわりにヒドロパーオキシ種が近傍にいたヘムを酸化し、ヘム代謝へとつながるのである。つまり、チトクロームP450では二本の手で酸素結合を引っ張るため $O=O$ 結合が切れてしまうが、ヘムオキシゲナーゼでは一本の手でしか引っ張れないため $O=O$ 結合は切れなかったのである。結果としてこれが、これらの酵素の反応を異なったものにしたと考えられる。酸素活性化を行う金属酵素の機能は、水素結合ネットワークの形態にあると考えられる。

4 . おわりに

ここで紹介した研究の詳細は最後に示した文献を参考ください。これらからさらに基礎的な研究を積み重ねていき、自然のからくりの美しさの一部でも見ることができればと思っている。また、酵素機能発現に必要な因子がわかり、それらを組み換えることにより、酵素の機能を目的に応じて自由にコントロールできるようになればと夢見ている。

最後に、ここで示した研究を共に進めてくれた倉橋拓也博士（助手）に感謝する。また、X線構造解析をご指導いただいた戸村正章博士（ナノサイエンスセンター）に感謝する。

参考文献

- 1) H. Fujii and Y. Funahashi, *Angew. Chemie. Int. Ed.* **41**, 3638–3641 (2002).
- 2) H. Fujii, *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 5936–5937 (2002).
- 3) H. Fuji, X. Zhang, T. Tomita, M. Ikeda-Saito and T. Yoshida, *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 6475–6484 (2001).
- 4) R. Davydov, V. Kofman, H. Fujii, T. Yoshida, M. Ikeda Saito and B. M. Hoffman, *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 1798–1808 (2002).