

X線結晶構造に基づく B₁₂ 補酵素がラジカル酵素反応を制御する仕組みの解明

柴田直樹

兵庫県立大学大学院生命理学研究科 〒678-1297 兵庫県赤穂郡上郡町光都 3-2-1

末吉由依

兵庫県立大学理学部生命科学科 〒678-1297 兵庫県赤穂郡上郡町光都 3-2-1

樋口芳樹

兵庫県立大学大学院生命理学研究科 〒678-1297 兵庫県赤穂郡上郡町光都 3-2-1

虎谷哲夫

岡山大学 〒700-8530 岡山市北区津島中 1-1-1

要旨

ビタミン B₁₂ はコリン環と呼ばれる、ヘムに類似したテトラピロール様骨格を有する化合物であるが、ヘムに比べて多数のアミド側鎖をもつ。これらのアミド側鎖は、酵素タンパク質と B₁₂ 化合物との複合体を安定に維持することが主な役割であると考えられてきた。今回、我々は B₁₂ 酵素ジオールデヒドラターゼとエタノールアミンアンモニアリアーゼについて、ビタミン B₁₂ の補酵素型の 1 つであるアデノシル B₁₂ との複合体の X 線結晶構造解析を行い、 α 側鎖が基質の有無に応じて、アデノシル基のリボース部の動きと連動して構造変化することを明らかにした。すなわち、活性部位に基質が結合すると、アデノシル基は超活性種であるアデノシルラジカルとなり基質と反応するが、 α 側鎖はアデノシルラジカルの生成を促進し、かつそれを適切な位置に保持する働きによりラジカル反応を精密に制御すること、また、基質の通り道に対してゲートとしての役割も果たすことが明らかとなった。

1. はじめに

ビタミン B₁₂ は必須微量栄養素の 1 つであり、サプリメントや目薬の成分としてもなじみ深い。生体内ではアデノシル B₁₂ (アデノシルコバラミン, AdoCbl, AdoB₁₂) やメチル B₁₂ に変換され (Fig. 1(a, b)), 補酵素として酵素反応に関与する。メチル B₁₂ はメチル基転移反応の補酵素として働き、例えばメチオニン合成酵素ではホモシステインにメチル基を渡す役割をもつ。一方、アデノシル B₁₂ はラジカルという高い反応性を有する超活性種を発生し、炭素骨格の組換え (異性化)、脱離、アミノ基転移など化学的に困難な反応を触媒する^{1,2)}。一般にラジカル反応は制御が難しく、副反応によってラジカルが消滅したり、本来の生成物とは異なる物質が生じたりしやすいという欠点があるが¹⁾、アデノシル B₁₂ 関与酵素にはそのような副反応を起り難くする仕組みがあることが筆者らの酵素・B₁₂ 複合体の構造研究から示唆された。しかし、これまではアデノシル B₁₂ そのものが酵素に結合した状態での精密な立体構造が明らかではなかったためにその詳細はわからなかった。

ビタミン B₁₂ は、ヘムやクロロフィル類に類似したコリン環と呼ばれるテトラピロール様骨格をもつ化合物であ

り、ヘムの鉄イオンやクロロフィル類のマグネシウムイオンに相当する位置にコバルトイオン (Co) が結合している。ビタミン B₁₂ は広い意味では、Co が結合したコリン環及びその側鎖と Co の下方配位子 (5,6-ジメチルベンズイミダゾール) をもつ化合物全体を指し (Fig. 1(a, b)), コバラミンとも呼ばれる。アデノシル B₁₂ は Co の上方に 5'-デオキシ-5'-アデノシル基 (アデノシル基) が共有結合 (Co-C シグマ結合) したものである。酵素に結合した補酵素のアデノシル基は、基質が結合していない状態ではほとんどが非解離型で存在するが、基質が結合するとホモリシスによって大部分が解離し、アデノシルラジカルが生成する。アデノシルラジカルは基質から特定の水素原子を引き抜くことで、基質に対する反応を開始する (Fig. 1(c))^{1,2)}。水素原子を引き抜かれた基質は基質ラジカルとなり、そのラジカルに隣接した炭素原子上の置換基が転移し、生成物ラジカルとなる。一方、水素原子を引き抜いたアデノシルラジカルは 5'-デオキシアデノシンとなる。その後、生成物ラジカルが 5'-デオキシアデノシンから水素原子を引き抜き返して生成物となり、アデノシルラジカルが再生する。以上がほとんどのアデノシル B₁₂ 酵素に共通の反応サイクルである。アデノシル B₁₂ は非常に複雑な有機金属化合物であるにも関わらず、酵素反応に直接関与す

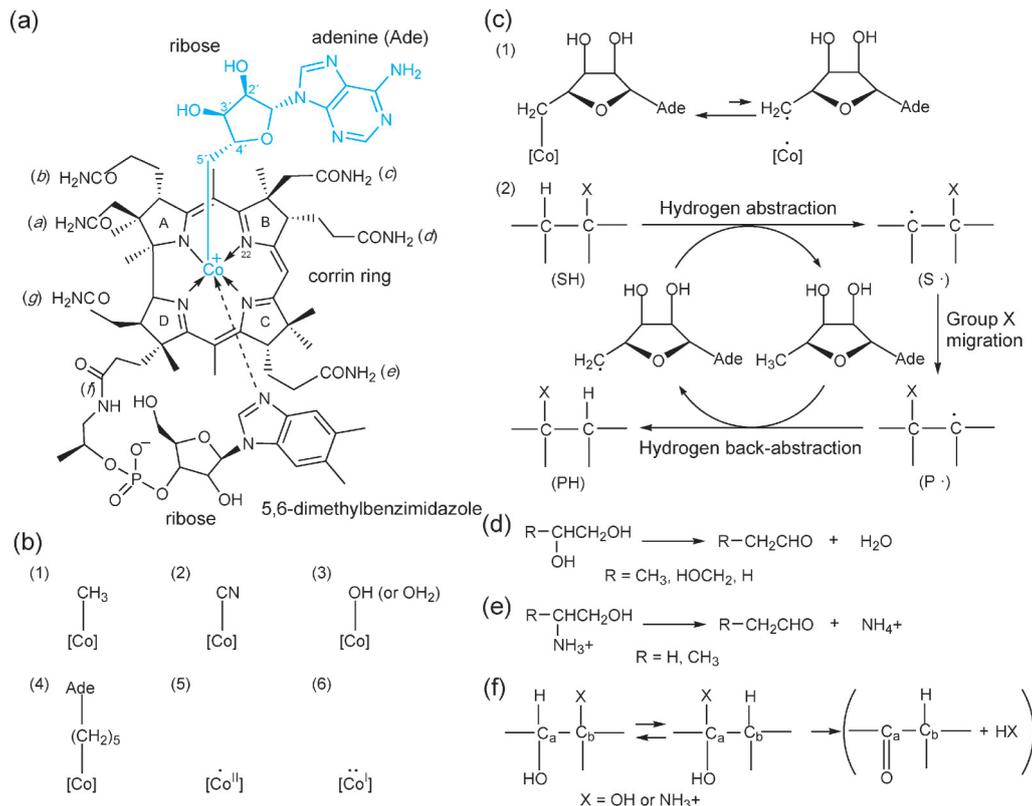


Fig. 1 Cobalamin coenzymes, B₁₂-dependent isomerases (eliminating), and the minimal mechanism of AdoCbl-dependent rearrangements. (a) Adenosylcobalamin (AdoCbl). Adenosyl group and cobalt atom in blue. (b) Other B₁₂ compounds. Methylcobalamin (MeCbl) (1), cyanocobalamin or vitamin B₁₂ (CN-Cbl) (2), hydroxocobalamin (OH-Cbl) or aquacobalamin (aqCbl) (3), adeninylpentylcobalamin (AdePeCbl) (4), cob(II)alamin (5), and cob(I)alamin (6). [Co] in (1)–(6), cobalamin. (c) Minimal mechanism of AdoCbl-dependent rearrangements. Homolysis of the coenzyme Co–C bond (1) and adenosyl radical-catalyzed rearrangements (2). [Co], cobalamin; X, generic migrating group; Ade, 9-adeninyl; SH, substrate; PH, product. (d) Reactions catalyzed by DD and GD. (e) Reactions catalyzed by EAL. (f) Common feature of AdoCbl-dependent rearrangements catalyzed by B₁₂-dependent isomerases (eliminating).

るのは上方配位子であるアデノシル基である。それではコバラミン自体はこの反応サイクルの間、単なる傍観者なのだろうか？コリン環には多数のアミド側鎖が存在するが、これらの側鎖は反応に寄与しないのだろうか？

ビタミン B₁₂ はヘムやバクテリオクロフィルとウロポルフィリノーゲン III (Fig. 2(a)) まで共通の前駆体を経て生合成される。ウロポルフィリノーゲン III において、テトラピロール骨格には酢酸基とプロピオン酸基がそれぞれ4つずつ結合しているが、ヘム及びバクテリオクロフィルの経路に進むと、プロトポルフィリノーゲン IX (Fig. 2(b)) の段階までに、全ての酢酸基が脱炭酸されてメチル基に、2つのプロピオン酸基が酸化されてビニル基となり、2つのプロピオン酸基だけが残る。一方、ビタミン B₁₂ の合成経路では、脱炭酸酵素によって1つの酢酸基がメチル基に変換されるが、それ以外の3つの酢酸基と4つのプロピオン酸基は維持され、その後アミド化される。これらは a~g 側鎖と呼ばれ、a, c, g 側鎖がアセトアミド基、b, d, e, f 側鎖がプロピオンアミド基である (Fig. 1

(a))。なお、f 側鎖には Co の下方配位子を含んだヌクレオチドが結合し、残りはフリーのアミド側鎖として存在する。これまでに筆者らは、3つのプロピオンアミド側鎖の1つを加水分解したモノカルボン酸誘導体を調製し、b 側鎖での水素結合供与が補酵素機能発現に最重要であることを示してきたが、アセトアミド側鎖についてはモノカルボン酸誘導体の調製が困難で機能解析が不可能であった。そのためアミド側鎖には、酵素に結合するための錨のように働くという間接的な役割が唆されていたのみであった。

ジオールデヒドラターゼ (DD)、グリセロールデヒドラターゼ (GD)、エタノールアミンアンモニアリアーゼ (EAL) は、古くから研究されているアデノシル B₁₂ 酵素であり、それぞれ 1,2-プロパンジオール (1,2-PDO)、グリセロール、エタノールアミン (EA) の2位の水酸基またはアミノ基を1位の水素原子と交換・転移させた後、水分子またはアンモニアとして脱離する反応を触媒する (Fig. 1(d-f))¹⁾。DD と GD は互いに非常によく似た酵素であり、どちらも同じ反応を触媒する。グリセロールと反応

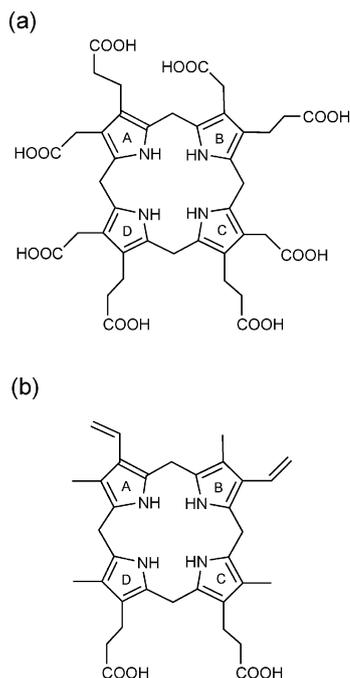


Fig. 2 Chemical structures of uroporphyrinogen III (a) and protoporphyrinogen IX (b).

させると 3-ヒドロキシプロピオンアルデヒドを生成し、これを還元すると、優れた衣料用繊維であるポリトリメチレンテレフタレートや生分解性プラスチックの原料の 1 つである 1,3-プロパンジオールが得られるため、GD を利用した発酵法による 1,3-プロパンジオールの生産に関する研究が盛んに行われている³⁾。

我々は DD^{4,7)}, GD⁸⁾, EAL^{9,10)} についてアデノシル B₁₂ の不活性アナログを用いて構造研究を行ってきたが、これらの不活性アナログではラジカルが生成するリボース部の構造情報が得られないことが問題であった。アデノシル B₁₂ がこれらの酵素に結合した複合体（ホロ酵素）は不安定で徐々に失活し、結晶が得られる頃にはほぼ完全に不活性化されてしまう。しかし、仮に不活性化されていても、リボース部の構造情報が得られればラジカル生成の分子機構がより明確になると考え、DD 及び EAL について、アデノシル B₁₂ そのものとの複合体の構造解析を行うことにした¹¹⁾。

2. DD 及び EAL の試料調製と結晶化

DD は α , β , γ サブユニット、EAL は α , β サブユニットをもつ¹²⁾。どちらの酵素も β サブユニットの (DD は γ サブユニットにも) N 末端領域に数十残基から成る不溶性の原因となる配列がある。これらの配列があると結晶化の障害になるため、対応する塩基配列を遺伝子から取り除き、 β サブユニットの N 末端に 6xHis-tag を付加した大腸菌

発現系を用いた。大腸菌の破砕液上清を Ni アフィニティカラムと SEC カラムで精製した後、 α サブユニットと β サブユニットの解離を防ぐために添加していた基質 (1,2-PDO または EA) を、 K_m の 10 倍の濃度となるように透析を行った。次に、基質を完全に除去するため試料中の酵素のモル数に対して 1/100 となるようにアデノシル B₁₂ を添加し、30°C で 30 分間反応させた。なお、アデノシル B₁₂ は光によって Co-C 結合が開裂するためアデノシル B₁₂ を取り扱う作業は全て赤色光下で行った。その後速やかに過剰量のアデノシル B₁₂ を添加し、アポ酵素全てにアデノシル B₁₂ を結合させるため再び 30°C で 30 分間インキュベートした (複合体形成)。当初、複合体形成は好気条件下で行っていたが、構造解析の結果、DD ではアデノシルラジカルが生成する部位に余分な電子密度が現れることが判明した (未発表データ)。これはアデノシルラジカルが酸素と反応したことによると考え、DD については試料精製までは好気下で行い、透析以降を嫌気チャンパー内で行った。このように調製した DD 及び EAL とアデノシル B₁₂ との複合体 (DD/AdoCbl, EAL/AdoCbl) の結晶化を行った。基質との複合体の結晶は、DD/AdoCbl の結晶を 1,2-PDO を含む沈澱剤溶液にソーキングして調製した。DD/AdoCbl の場合は、基質が活性部位に完全に結合するためには 5 時間以上必要であった。一方、EAL の場合は EAL/AdoCbl の結晶を非生理的基質である 2-アミノ-1-プロパノール (2-AP) を含む沈澱剤溶液に 10 分間ソーキングすることで構造変化が見られた。

3. 回折実験・構造解析

DD/AdoCbl, EAL/AdoCbl の回折データ測定は、それぞれ SPring-8 BL26B1, BL44XU, 基質溶液にソーキングした結晶 (DD/AdoCbl/1,2-PDO, EAL/AdoCbl/2-AP) については SPring-8 BL38B1, BL26B1 で行った。測定自体は標準的な条件で行ったが、結晶のセンタリングに使用するライトに赤色のフィルターを被せ、ハッチ内の蛍光灯を消した状態で回折実験を行った。

構造解析は不活性補酵素アナログとの複合体の構造 (EAL: PDB ID 3ABR, DD: PDB ID 1IWB) をモデルとした分子置換法によって行った。EAL/AdoCbl (2.00 Å 分解能)、DD/AdoCbl (1.70 Å 分解能) では、従来不明であったリボース部、DD/AdoCbl/1,2-PDO (1.55 Å 分解能) ではリボース部と 1,2-PDO の電子密度が明確に現れ (Fig. 3(a, c, d)), これらの部分を含めた構造を決定することが出来た。その結果、DD では基質の有無に関係なく Co-C 結合が解離し、ラジカル中心となる炭素原子 (C5') は基質結合部位の方に向いていた (Fig. 3(c, d))。一方、EAL/AdoCbl では C5' は Co の近傍にあり、基質結合部位から離れていた (Fig. 3(a))。EAL/AdoCbl/2-AP (2.05 Å 分解能) については、リボース部の電子密度が不

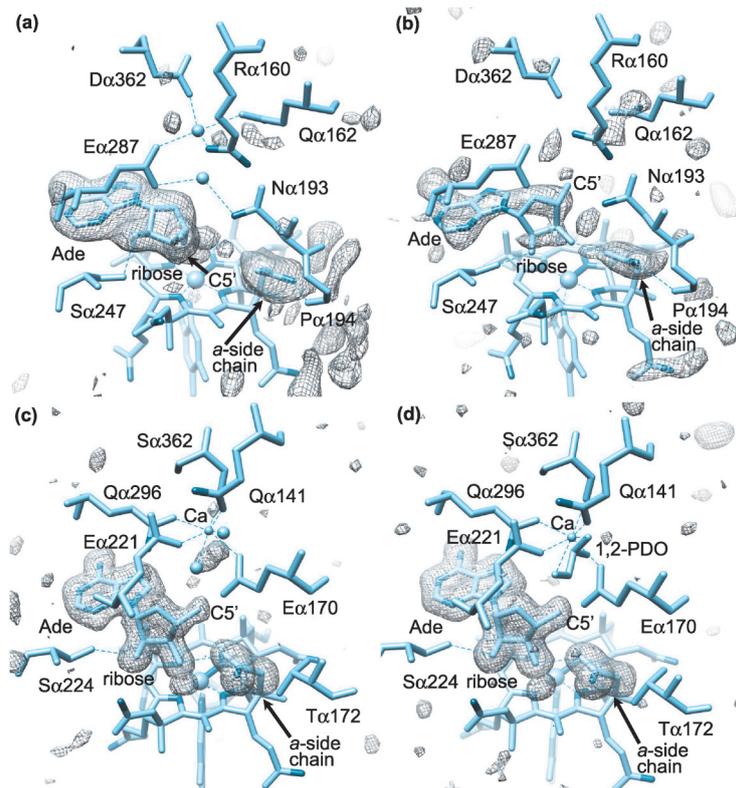


Fig. 3 *Fo-Fc* omit map around the adenosyl group of DD and EAL. EAL/AdoCbl (a), EAL/AdoCbl/2-AP (b), DD/AdoCbl (c), and DD/AdoCbl/1,2-PDO (d). The contributions of the adenosyl group and α -side chain of the corrin ring were omitted when calculating the electron density maps. Side chains of Pro α 194 of EAL/AdoCbl and EAL/AdoCbl/2-AP are omitted to clarify the view.

明瞭であったが、DDと同様にC5'が基質結合部位の近くに位置していた (Fig. 3(b))。このことから、少なくともEALでは基質の添加に伴い、アデノシル基のリボース部がCo近傍から基質の方向に移動する様子を観測することが出来た。しかし、EAL/AdoCbl/2-APでは2-APの電子密度が明確には現れなかったため、基質分子の構造を決定することは出来なかった。

4. アデノシル B₁₂ の構造

DD, EAL いずれもアデノシル B₁₂ は α サブユニットと β サブユニットの間に挟まれるように結合し、基本的にコリン環の上側は α サブユニット、下側は β サブユニットに覆われている (Fig. 4)。アデノシル基はコリン環の上方にあり、その更に上方に基質結合部位がある。3で述べた通り、EAL/AdoCblではC5'はCoの近傍にあり、基質から離れた位置にある (Fig. 3(a)) ことから、これは脱離酵素で初めて休止状態のホロEALの構造が観測されたものと考えられる。Co-C間の距離はアデノシル B₁₂ 単独の場合よりも長くなり (2.00 Å→3.00 Å)、結合角についてはN22-Co-C5'の角度 (コリン環から見たCo-Cの角度) にはほとんど変化がない (84.3°→83.5°) が、Co-C5'-

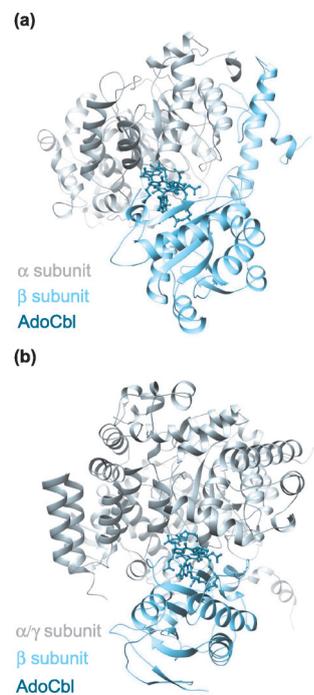


Fig. 4 Overall folds of the minimal functional units of EAL/AdoCbl (a) and DD/AdoCbl (b). Ball-and-stick models: AdoCbl. Gray ribbon models: α subunit and γ subunit (DD only). Light blue ribbon models: β subunit.

C4' の角度が直線的に (124.4°→151.1°) 歪んだ状態になっていた。これは、アデノシル B₁₂ が酵素に結合すると Co-C 結合が活性化され、アデノシルラジカルが生成しやすくなることを構造面から支持する結果である。また、このような Co-C 結合の歪みは異性化酵素であるグルタミン酸ムターゼ (GM) とアデノシル B₁₂ との複合体 (GM/AdoCbl) の結晶構造¹³⁾でも観測されていることから、アデノシル B₁₂ 酵素に共通の性質であると考えられる。一方、DD/AdoCbl では、基質が存在していないにも関わらず Co-C 結合は完全に開裂し、C5' は基質結合部位の近くまで移動していた (Fig. 3(c))。また、DD/AdoCbl/1,2-PDO ではアデノシル部の電子密度の形状と、1,2-PDO の電子密度がはっきりと現れていたことから、アデノシル部はアデノシルラジカルではなく、基質との反応性がない 5'-デオキシアデノシンであると判断した (Fig. 3(d))。EAL/AdoCbl については結晶中でも Co-C 結合が存在し、活性を維持している可能性があると考え、結晶を沈澱剤溶液で洗浄後、緩衝液に溶かした試料について活性測定を行った。その際、反応溶液にアデノシル B₁₂ を添加した条件 (+AdoCbl) と添加しない条件 (-AdoCbl) で測定した。また、比較のため DD/AdoCbl の結晶についても同様に活性測定を行った。その結果、精製直後の比活性と比較して、EAL/AdoCbl の結晶では 24% (+AdoCbl), 0.03% (-AdoCbl) であったのに対し、DD/AdoCbl の結晶では 1.3% (+AdoCbl), 1.2% (-AdoCbl) であった。EAL/AdoCbl でアデノシル B₁₂ を反応溶液に添加した場合は 24% の活性が得られたのに対し、添加しない場合は 0.03% と低い値になったのは、試料が反応溶液で希釈されたためにアデノシル B₁₂ の濃度が K_m よりも顕著に低くなり、アデノシル B₁₂ が酵素からほとんど解離してしまった可能性がある。一方、DD/AdoCbl の結晶では、極めて低い活性しか示さず、すでに不活性化された状態にあることが示唆された。これは、不活性化により生じた B₁₂ 部由来の生成物が活性部位に固く結合したまま留まるためである^{1,12)}。また、5'-デオキシアデノシンはアデノシルラジカルが基質から水素原子を引き抜いて生じるので、本研究でホロ酵素が基質不在下でも不活性化されて 5'-デオキシアデノシンを生じたのは、酵素精製後の基質除去が不十分で、実際には微量の 1,2-PDO が残存していたためかもしれない。

5. 基質結合によるリボース部の構造変化

DD では基質の有無に関わらず Co-C 結合が開裂し、C5' が基質結合部位の近くまで移動していたため、基質結合によるリボース部の構造変化を観測することが出来なかった。しかし、EAL では基質非結合状態で C5' が Co の近傍に位置していたことから、基質の結合によってリボース部の構造変化が起こると仮定して、EAL/AdoCbl と

DD/AdoCbl/1,2-PDO についてアデノシル B₁₂ の構造を比較した。その結果、リボース部についてはアデニン環とリボース部の間の N-グリコシド結合の回転と、リボース部のコンホーメーションが C3'-endo から C2'-endo へと変化することによって C5' が基質近傍に到達することが示唆された。次に、基質結合によってリボース部が Co 近傍から基質結合部位に移動する様子を観察出来るかどうか調べるため、EAL/AdoCbl の結晶を、基質 2-AP を含む沈澱剤溶液にソーキングした。ソーキング時間は 1 分、10 分、1 時間の 3 条件を試し、10 分以上のソーキングでリボース部の電子密度に顕著な変化を確認した (Fig. 3(b))。ソーキング時間 10 分と 1 時間の電子密度を比較したところ、10 分の方がリボース部の電子密度が明瞭であったので、こちらを採用し、構造精密化を進めた (EAL/AdoCbl/2-AP)。EAL/AdoCbl/2-AP のリボース部の電子密度は DD/AdoCbl/1,2-PDO に比べて薄く、不明瞭であった。しかも基質結合部位においても基質分子をフィッティング出来るだけの電子密度を確認出来なかったため、基質分子のモデルを最終構造に含めることが出来なかった。その理由として、1) EAL/AdoCbl ではアデノシル B₁₂ の活性が維持されていたため、2-AP のほとんどが生成物 (プロピオンアルデヒド) に変換されてしまった、2) ソーキングによって結晶がダメージを受けたため回折データの質が悪くなった、ことが考えられる。EAL/AdoCbl/2-AP のリボース部の電子密度が不明瞭であった理由も同様であると考えられるが、アデノシルラジカルが酸素と反応した後、一部がアデニン等に分解した可能性もある¹⁴⁾。これについては現在検証中である。

6. リボース部の構造変化に伴うコリン環側鎖と周辺構造変化

アデノシルラジカルは反応性が高く、副反応を起こしやすいため、酵素内ではこれを安定に保つ仕組みがあるはずである。GM/AdoCbl では C5' が Co 側にある場合と基質側にある場合の N-グリコシド結合の角度に違いはほとんど無く、主にリボース部のコンホーメーション変化 (C2'-endo→C3'-endo) によって C5' が移動する¹³⁾。その際、リボース部と周辺のアミノ酸残基との水素結合は、配向の変化と若干の組換えがあるものの、ほとんどが維持される。DD と EAL の場合、上述の通り、N-グリコシド結合の角度とリボース部のコンホーメーション変化の両方が起こるので、GM に比べてリボース部が大きく構造変化する。その際、リボース部と周囲との水素結合ネットワークは維持されるのであろうか？ EAL/AdoCbl ではリボース部の 2'-OH が α サブユニットの Ser247 (Serα247)、3'-OH が水分子 (Wat76) と水素結合している (Fig. 5(a))。EAL/AdoCbl/2-AP では 2'-OH と Serα247 との水素結合は維持されたままであったが、3'-OH は水分子との水素結合が

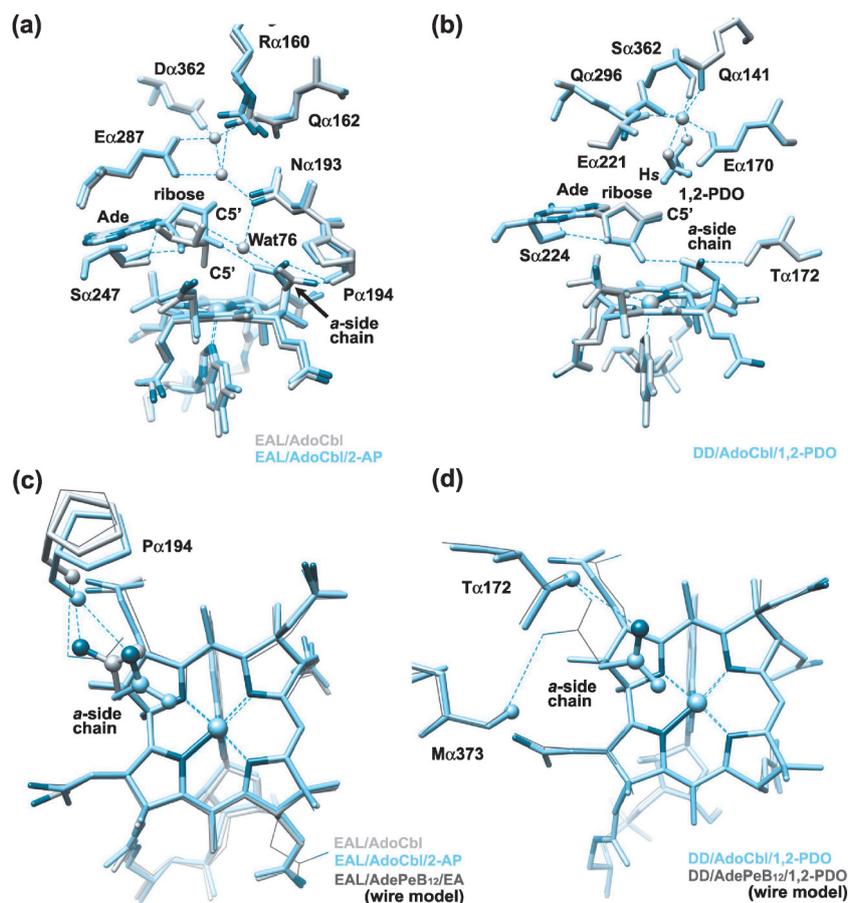


Fig. 5 Comparison of the active sites of EAL (a) and DD (b) and the structures of cobalamin moieties in EAL (c) and DD (d). Hs indicates the *pro-S* hydrogen atom of 1,2-PDO modeled based on the structure of DD/AdoCbl/1,2-PDO.

観測されず、代わりにコリン環 *a* アセトアミド側鎖のアミド酸素原子と水素結合していた。この *a* 側鎖は EAL/AdoCbl ではコリン環から見て外側に向いていたが、EAL/AdoCbl/2-AP ではコリン環の内側に向きを変え、3'-OH と水素結合していた (Fig. 5(a, c))。この結果から、*a* 側鎖はリボース部が Co 側から基質分子の方向に移動する際に、それと同期してコリン環の外側から内側に向きを変え、リボース部と水素結合することによってアデノシルラジカルの C5' を適切な位置に保持する働きがあると考えられる。また、ポストホモリシス状態を安定化することにより Co-C 結合の開裂を促進すると考えられる。

それでは DD でも同様に *a* 側鎖の構造変化はあるのだろうか？ DD の場合は DD/AdoCbl, DD/AdoCbl/1,2-PDO いずれの場合もリボース部が基質または基質結合部位の方に向いていたため、EAL/AdoCbl のように C5' が Co 近傍に位置した状態の構造がない。しかし、DD/AdoCbl と DD/AdoCbl/1,2-PDO の構造比較を行うことで、*a* 側鎖の構造変化が基質結合そのものではなく、リボース部の構造変化に依存することを証明することが出来る。DD/AdoCbl, DD/AdoCbl/1,2-PDO いずれの構造でも、*a* 側鎖

は EAL/AdoCbl/2-AP と同様にコリン環の内側に存在し、リボース部の 3'-OH と水素結合していた (Fig. 5(b, d))。また、リボース部の 2'-OH は Ser α 224 (EAL の Ser α 247 に相当) と水素結合していた。EAL/AdoCbl の構造を基にモデリングを行ったところ、C5' が Co の近傍に位置する場合には、*a* 側鎖がコリン環の内側に移動しても、3'-OH と水素結合することは不可能であることが分かった。我々は、以前にリボース部をペンタメチレン鎖に置換した不活性アナログであるアデニルペンチル B₁₂ (AdePeCbl) (Fig. 1(b)) と EAL, DD との複合体の構造を解析した^{4,10}。AdePeCbl との複合体では、基質の有無に関わらず、いずれも EAL/AdoCbl のように *a* 側鎖がコリン環の外側にあることから、*a* 側鎖がコリン環の内側に移動するためにはリボース部との相互作用が必要であることは明らかである (Fig. 5(c, d))。以上により、*a* 側鎖のコリン環内側への移動は、リボース部が *a* 側鎖と水素結合することが可能な位置、つまり、基質結合部位近傍に存在する場合にのみ起こると結論出来る。

Table 1 Kinetic parameters of mutant DDs.

DD	k_{cat} , s ⁻¹ (%)	K_m		$k_{cat}/K_m \times 10^{-6}$ (s ⁻¹ M ⁻¹)	k_{inact} (min ⁻¹)	$k_{cat}/k_{inact} \times 10^{-4}$
		1,2-PDO (mM)	AdoCbl (μ M)			
Wild type [†]	336(100)	0.15 ± 0.02	0.94	2.2	0.027	75
T α 172S	34 ± 3 (10)	0.16 ± 0.01	1.02 ± 0.02	0.21	0.049	3.8
T α 172A	0.50 ± 0.02 (0.15)	0.031 ± 0.07	0.87 ± 0.01	0.016	0.010	0.29
S α 224C	12 ± 2 (2.6)	0.51 ± 0.01	0.20 ± 0.01	0.024	0.16	0.58
S α 224A [†]	64 (19)	0.15 ± 0.01	0.36	0.43	0.46	0.8
S α 224N [†]	17 (5)	1.90 ± 0.01	3.4	0.009	0.070	1.5

[†] From ref. 15

7. α 側鎖によるアデノシルラジカルの位置安定化の重要性

DD 及び EAL とアデノシル B₁₂ との複合体の構造解析の結果、 α 側鎖がアデノシルラジカルの生成とその後のリボース部の構造保持に重要な役割を果たしていることが示唆された。このことは、ラジカル中心 C5' の基質に対する位置が安定に保持されることが副反応防止に重要であることを示す。そこで、リボース部の構造安定性が酵素活性にどの程度寄与しているのかを明らかにするために、リボース部の構造安定化に寄与しているアミノ酸残基について変異型酵素を調製し、それらの活性を調べた。EAL の S α 247, DD の S α 224はいずれも側鎖でリボース部と直接水素結合しているため、アミノ酸置換によって水素結合を失わせることが出来る。EAL の Pro α 194, DD の Thr α 172は、どちらもリボース部とは直接水素結合はしていないが、 α 側鎖がコリン環の内外どちら側にあっても α 側鎖と水素結合してその構造安定化に寄与している。EAL の Pro α 194は側鎖に親水基がなく、主鎖のカルボニル酸素原子と水素結合しているため、他のアミノ酸に置換してもこの水素結合をなくすことは出来ない。一方、DD の Thr α 172では側鎖を使って水素結合しているため、変異によってこの水素結合を失わせることが出来る。以上により、DD の Thr α 172と S α 224に対して変異体を調製することにした。変異によって導入するアミノ酸の種類としては、Thr α 172 はセリン (T α 172S) とアラニン (T α 172A), S α 224はシステイン (S α 224C) を選択した。T α 172S を選択したのは、ヒドロキシル (OH) 基を維持したまま側鎖の体積を減少させることが出来るので、Thr側鎖のメチル基の有無による活性への影響を確認出来るためである。T α 172A の場合は、アラニンはグリシンを除けば最もシンプルなアミノ酸であり、ペプチド主鎖の構造への影響を最小限に抑えつつ、OH 基も含めて側鎖による安定化効果の大部分を排除することが可能である。S α 224の変異体の活性については S α 224A と S α 224N について既に報告した¹⁵⁾ので、今回は野生型と骨格が同じで、水素結合を形成し難くなる S α 224C を調製することにした。

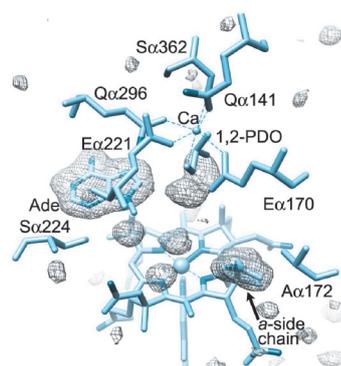


Fig. 6 $F_o - F_c$ omit map around the adenosyl group of DD (T α 172A)/AdoCbl/1,2-PDO.

変異体の活性測定の結果を Table 1 に示す。Thr α 172の変異体では、予想通り OH 基が欠失した T α 172A では活性がほとんど失われていた (0.15%) が、T α 172S では野生型に対して10%の活性が維持されていた。S α 224の変異体では、S α 224C が2.6%, S α 224A では19%と、Thr α 172の変異体に比べて水素結合を失うことによる活性への影響は小さかった。また、 k_{cat}/k_{inact} の値は酵素1分子が不活性化されるまでの触媒回転数を示しており、Thr α 172や S α 224をアラニンに置換した酵素では副反応による不活性化の頻度が格段に高くなる事が分かる。

変異体の活性測定の結果から、最も活性が低下した T α 172A について構造解析を行うこととした (DD (T α 172A)/AdoCbl/1,2-PDO)。T α 172A は野生型 DD と同様の方法で試料調製と結晶化を行い、1.90 Å 分解能の回折データセットを SPring-8 BL41XU で測定した。この変異体ではアデニン環の部分は電子密度が明確に現れていたが、リボース部が存在する領域には断片的な電子密度しかなかったため、この部分のモデルを構築することが出来なかった (Fig. 6)。その理由として、 α 側鎖がコリン環の内側に向けた状態を安定に保つ Thr α 172 との水素結合が失われた影響で α 側鎖はコリン環の外側に向けた状態となり、その結果アデノシルラジカルの生成に不利となり、その位置も不安定になったため、活性低下と不活性化頻度の上昇を招いたと考えられる。

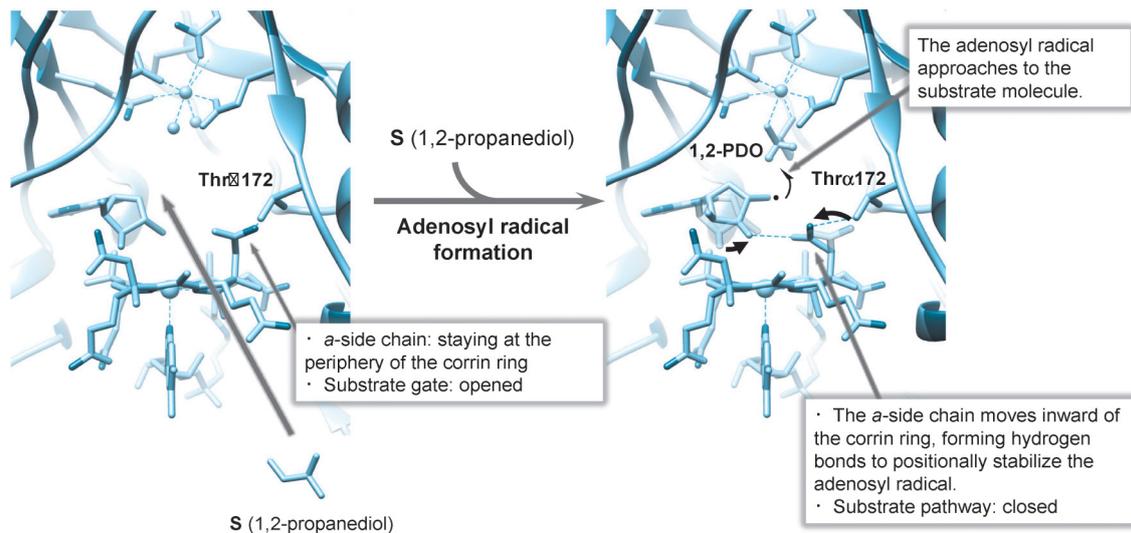


Fig. 7 Synchronized conformational changes of the peripheral α -acetamide side chain of the corrin ring with the radical shuttling motion of an adenosyl radical between the original and catalytic positions.

8. 基質の通り道のゲートとしての α 側鎖の役割

α 側鎖がアデノシルラジカルの位置安定化に大きく寄与することが分かったが、更に構造を調べると、他にも役割がある可能性が浮かんできた。基質結合部位は、 α 側鎖がコリン環の外側に存在する場合は酵素の外部から見えるが、内側に移動すると α 側鎖で隠れてしまう。すなわち、 α 側鎖には基質/生成物の通り道の開閉を司るゲートとしての役割があると考えられる。基質が結合していない場合は、 α 側鎖はコリン環の外側に位置し、通り道を開いた状態にすることで外部から基質分子が酵素内部に入ることが可能な状態にするが、基質が結合するとアデノシルラジカルが基質分子の近くに移動し、それに伴って α 側鎖がコリン環の内側に移動することで基質の通り道を閉じる (Fig. 7)。そうすることで、外部から正常なラジカル反応を妨害する物質が反応部位に侵入することを防ぐことが出来る。

9. おわりに

以前に報告した、DD 及び EAL の不活性な補酵素アナログとの複合体の構造からは、アデノシル B_{12} の 7 つのコリン環側鎖は全て周辺のアミノ酸残基または水分子とのみ水素結合していたため、単に酵素に結合するための働きしかないと考えられていたが、今回の構造解析によって、少なくとも DD と EAL ではコリン環側鎖のうち、 α 側鎖に 2 つの特別な役割があることが示された。1 つは酵素反応に直接関わり、基質が生成物に変換される間、アデノシルラジカルまたは 5'-デオキシアデノシンの構造を安定に保持してラジカル生成を促進し、かつラジカル反応を精密に制御すること、もう 1 つは反応には直接関わらないが、

基質と生成物の通り道となるチャネルを開閉するゲートとして働き、反応時に外部から妨害物質が内部に入らないようにすることである。これらはいずれもラジカル酵素反応が正常に進行するために重要なことである。

「1. はじめに」で述べた通り、本研究を始めた当初はアデノシル B_{12} が失活した状態の構造が得られることを想定して構造解析を行うことにした。確かに、少なくとも DD/AdoCbl と DD/AdoCbl/1,2-PDO ではアデノシル B_{12} は、当初の予想通り失活してしまっていたが、逆にそれによってアデノシル部と基質の両方の構造を決定することが出来た。想定外だったのは、 α 側鎖がリボース部に同期して構造変化することであった。失活してしまったタンパク質の構造を解析しても意味がないとよく言われるが、たとえ失活した状態であってもこれらの構造からリボース部の構造に関して極めて重要な知見が得られた。DD は 1999 年⁵⁾、EAL は 2010 年¹⁰⁾に最初の構造を発表して以来、不活性な補酵素アナログを用いて着実に研究を進めてきたが、今思えば失活を恐れず大胆にアデノシル B_{12} そのものを用いた研究をもっと早く行うべきであったかもしれない。

今回の構造解析では、DD/AdoCbl と DD/AdoCbl/1,2-PDO については嫌気下で複合体形成と結晶化を行った試料を用いている。これらの構造では、電子密度の形状からアデノシル基が 5'-デオキシアデノシンになったと判断したが、好気下で複合体を形成させ結晶化した試料では、C5' から帰属不明な電子密度が延びていた (未発表データ)。「2. DD 及び EAL の試料調製と結晶化」で述べたが、これはアデノシルラジカルが酸素分子と反応したことによると考えられる。アデノシル B_{12} に光照射すると Co-C 結合が開裂し、アデノシルラジカルと cob(II)alamin が生成する。酸素存在下ではこれらと酸素分子が反応し、最終的にアデノシル基は酸化修飾される^{14,16)}。アデノシル B_{12} が

光により分解される場合と酵素により活性化される場合とでは状況が異なるため、得られるスクレオシド産物の種類や割合が両者で異なるはずである。好気下及び嫌気下で調製した結晶からスクレオシドを抽出・分析し、電子密度や構造と合わせて検討することで、未だ不明であるアデノシル B₁₂ 酵素の失活のメカニズムが今後明らかになることも期待したい。

謝辞

本研究では SPring-8 BL26B1, BL38B1, BL41XU, BL44XU ビームラインを使用して回折強度データを測定しました。以上のビームラインスタッフの方々に感謝申し上げます。

参考文献

- 1) T. Toraya: Chem Rev **103**, 2095 (2003).
- 2) R. Banerjee: Chem Rev **103**, 2083 (2003).
- 3) T. Willke and K. D. Vorlop: Eur J Lipid Sci Technol **110**, 831 (2008).
- 4) J. Masuda, N. Shibata, Y. Morimoto, T. Toraya and N. Yasuoka: Structure **8**, 775 (2000).
- 5) N. Shibata, J. Masuda, T. Tobimatsu, T. Toraya, K. Suto, Y. Morimoto and N. Yasuoka: Structure **7**, 997 (1999).
- 6) N. Shibata, Y. Nakanishi, M. Fukuoka, M. Yamanishi, N. Yasuoka and T. Toraya: J Biol Chem **278**, 22717 (2003).
- 7) M. Yamanishi, K. Kinoshita, M. Fukuoka, T. Saito, A. Tanokuchi, Y. Ikeda, H. Obayashi, K. Mori, N. Shibata, T. Tobimatsu and T. Toraya: FEBS J **279**, 793 (2012).
- 8) M. Yamanishi, M. Yunoki, T. Tobimatsu, H. Sato, J. Matsui, A. Dokiya, Y. Iuchi, K. Oe, K. Suto, N. Shibata, Y. Morimoto, N. Yasuoka and T. Toraya: Eur J Biochem **269**, 4484 (2002).
- 9) N. Shibata, Y. Higuchi and T. Toraya: Biochemistry **50**, 591 (2011).
- 10) N. Shibata, H. Tamagaki, N. Hieda, K. Akita, H. Komori, Y. Shomura, S. Terawaki, K. Mori, N. Yasuoka, Y. Higuchi and T. Toraya: J Biol Chem **285**, 26484 (2010).
- 11) N. Shibata, Y. Sueyoshi, Y. Higuchi and T. Toraya: Angew Chem Int Ed Engl **57**, 7830 (2018).
- 12) T. Toraya: Arch Biochem Biophys **544**, 40 (2014).
- 13) K. Gruber, R. Reitzer and C. Kratky: Angew Chem Int Ed Engl **40**, 3377 (2001).
- 14) P. A. Schwartz and P. A. Frey: Biochemistry **46**, 7284 (2007).
- 15) K. Ogura, S. Kunita, K. Mori, T. Tobimatsu and T. Toraya: FEBS J **275**, 6204 (2008).
- 16) H. P. Hogenkamp, J. N. Ladd and H. A. Barker: J Biol Chem **237**, 1950 (1962).

著者紹介



柴田直樹

兵庫県立大学 大学院生命理学研究科 ピコバイオロジー専攻

E-mail: shibach@sci.u-hyogo.ac.jp

専門：構造生物学, 構造生物化学

【略歴】

1997年3月大阪大学大学院工学研究科応用精密化学専攻博士後期課程修了。1997年4月姫路工業大学理学部助手。その間2000年6月から2001年5月まで米国 University of Washington 客員研究員。2003年10月姫路工業大学大学院理学研究科助教授。2004年4月より現職 (2007年4月より名称変更により准教授)。

末吉由依

兵庫県立大学 理学部 生命科学科 B4

専門：構造生物化学

【略歴】

2017年3月兵庫県立大学理学部生命科学科卒業。



樋口芳樹

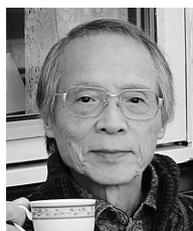
兵庫県立大学 大学院生命理学研究科 ピコバイオロジー専攻

E-mail: hig@sci.u-hyogo.ac.jp

専門：構造生物学, タンパク質結晶学

【略歴】

1984年3月大阪大学大学院理学研究科博士後期課程修了。1984年4月日本学術振興会特定領域奨励研究員。1985年11月姫路工業大学工学基礎研究所助手。1990年4月姫路工業大学理学部講師。1992年4月同助教授。その間1987年9月から1992年12月まで米国アリゾナ大学生化学教室客員教授。1995年10月京都大学大学院理学研究科助教授。2002年4月姫路工業大学大学院理学研究科教授。2004年4月より現職。



虎谷哲夫

岡山大学名誉教授

E-mail: toraya@cc.okayama-u.ac.jp

専門：生化学, 酵素科学, ビタミン学

【略歴】

1973年3月京都大学大学院工学研究科博士課程修了, 工学博士。1973年4月京都大学工学部助手 (1977年6月~1978年10月米国ブランダイス大学生化学教室博士研究員)。1982年4月京都大学教養部助教授。1989年4月岡山大学工学部教授。2005年4月岡山大学大学院自然科学研究科教授。2011年4月より岡山大学名誉教授。

Direct participation of a peripheral side chain of a corrin ring in coenzyme B₁₂ catalysis

Naoki SHIBATA Department of Life Science, Graduate School of Life Science, University of Hyogo, 3-2-1 Koto, Kamigori-cho, Ako-gun, Hyogo 678-1297, Japan.

Yui SUEYOSHI Department of Life Science, Graduate School of Life Science, University of Hyogo, 3-2-1 Koto, Kamigori-cho, Ako-gun, Hyogo 678-1297, Japan.

Yoshiki HIGUCHI Department of Life Science, Graduate School of Life Science, University of Hyogo, 3-2-1 Koto, Kamigori-cho, Ako-gun, Hyogo 678-1297, Japan.

Tetsuo TORAYA Okayama University, Tsushima-naka, Okayama 700-8530, Japan

Abstract The crystal structures of the B₁₂-dependent isomerases (eliminating), diol dehydratase and ethanolamine ammonia-lyase, complexed with adenosylcobalamin were solved in the absence and presence of substrates. The structures revealed that the peripheral *a*-acetamide side chain of the corrin ring directly interacts with the adenosyl group to hold the group in the catalytic position, and that this side chain swings between the original and catalytic positions in a synchronized manner with the radical shuttling between the coenzyme and substrate/product. Mutations involving key residues that cooperatively participate in the positioning of the adenosyl group, directly or indirectly through the interaction with the *a*-side chain, decreased the turnover rate and increased the relative rate of irreversible inactivation caused by undesirable side reactions.