

2011B1410

BL38B1

キノン型補酵素を持つ酵素の補酵素生成機構の解明 Implications for Quinone Cofactor Biogenesis in Amine-oxidizing Enzymes

喜田 昭子^a, 牟礼 美苗^b, 三木 邦夫^cAkiko Kita^a, Minae Mure^b, Kunio Miki^c^a京都大学原子炉実験所, ^bカンサス大学化学科, ^c京都大学大学院理学研究科^aResearch Reactor Institute, Kyoto University, ^bDepartment of Chemistry, The University of Kansas,^cGraduate School of Science, Kyoto University

ビルトイン型キノン補酵素依存性酵素であるアミノキシダーゼ, リジルオキシダーゼは, 活性中心のトールパキノン(DPQ) やリシンチロシルキノン(LTQ)を利用して生体内リジン末端アミノ基の酸化的脱アミノ化反応を触媒する. 本研究では, 特に不明な点が多い LTQ の生合成機構について構造生物学的な知見を得ることを目指し, アミノキシターゼ部位特異的変異体-ベンジルアミン複合体の結晶回折実験を行った.

キーワード: ビルトイン型キノン補酵素依存性酵素, リシルチロシルキノン, 結晶構造解析

背景と研究目的:

銅含有アミノキシターゼ (CAO)^[1] やリジルオキシターゼ (LOX)^[2] は, 酵素活性中心にあるビルトイン型キノン補酵素を利用して, 生体アミン, コラーゲンやエラスチンの末端アミノ基の酸化的脱アミノ化反応を触媒する酵素である. 両酵素のキノン補酵素 (CAO ではトールパキノン (TPQ), LOX では LTQ, 図 1) は, それぞれの活性中心にある特定のチロシン残基が, 銅を保持した酵素活性中心で分子状酸素と反応し, 中間体として DPQ を経て生成すると考えられてきた. 特に CAO 中の TPQ 生合成過程については構造生物学的研究も行われている^[3]. しかし, この生合成反応では反応中間体の dynamics には不明な点が多く, 詳細は明らかになっていない. また, LTQ の生合成反応も不明である.

本研究は, 補酵素 TPQ と LTQ の生合成機構, 酵素内における補酵素認識機構および反応機構を, CAO と LOX の構造生物学的研究により解明することを目的としている. TPQ と LTQ の生合成機構では共に酵素活性部位のチロシン残基が酸化されて生成した DPQ が共通の反応中間体として推定されていることから, 我々のうち牟礼らは, CAO として *Arthrobacter globiformis* 由来 phenylethyl amine oxidase (AGAO) を用い, CAO 中の DPQ から LTQ が生成されるかどうかを証明するための実験を行った^[4]. その結果, AGAO の Asp298 を Lys に変異させた D298K 変異体において, DPQ 中間体と Lys298

が反応し、LTQ 様補酵素が生成することが判った。これは、DPQ を介して LTQ が生成することを示した初めての例であった。しかし生成した LTQ 様補酵素は 4 位のヒドロキシル基が近傍のチロシン残基との水素結合により安定化されたイミノキノン型であり、かつ不活性型（キノン部位が基質アミンと反応不可能な conformation で固定化されたもの）であったため、オルソキノン型である LTQ 補酵素のモデルとしては最適ではなかった。そこで、Asp298 を Lys ではなく Ala に変更した D298A 変異体を作成し、外部からアルキルアミンおよびベンジルアミンを加えることで LTQ 型補酵素生成が捕捉されるかどうかを調べたところ、本来の TPQ とは異なる LTQ 様の UV-VIS スペクトルが得られた。またこの酵素はアミン酸化活性を保持していた。本研究では、この AGAO (D298A) - ベンジルアミン複合体の活性部位の詳細な立体構造情報を得ることを目的として、その結晶化と回折実験を行った。

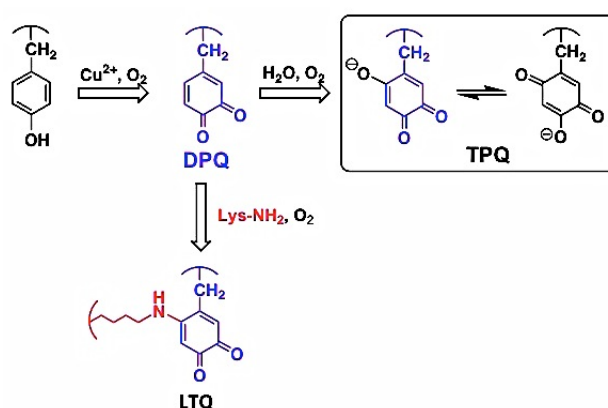


図 1. DPQ を経由する TPQ, LTQ の生合成経路。

実験：

AGAO (D298A) - ベンジルアミン複合体は、D298A にベンジルアミンを加えた後に CuSO_4 を加えて反応を進めることで得た。結晶化は、HEPBS(N-(2-Hydroxyethyl)piperazine-N'-(4-butanesulfonic acid)) 緩衝溶液 (0.1 M, pH8.0) に溶解したタンパク質溶液 (濃度 22 mg/mL) を調製し、蒸気拡散法で行った。結晶化試薬として主に PEG または酒石酸を含む条件において、LTQ の存在を示すピンク色を呈する菱形の板状結晶を得た。pH4.5~9.5 の条件で得られた結晶 5 種類について、BL38B1 において回折実験を行った。回折実験を行った結晶が得られた条件 (表 1) と、得られた結晶のうち代表的なものの写真 (条件: Cryst 2), およびその回折像の例を以下に示す (図 2)。

表 1. 結晶化条件 (結晶化試薬)

Cryst 1.	0.7 M Ammonium tartrate, sodium acetate buffer (0.1 M, pH4.5),
Cryst 2.	1.3 M Ammonium tartrate, Tris buffer (0.1 M, pH8.0),
Cryst 3.	1.0 M potassium/sodium tartrate, 0.2 M Li_2SO_4 , Tris buffer (0.1 M, pH8.5),
Cryst 4.	1.2 M potassium/sodium tartrate, CHES buffer (0.1 M, pH9.5),
Cryst 5.	1 M potassium/sodium tartrate, 0.2 M Li_2SO_4 , CHES buffer (0.1 M, pH9.5).

回折実験においては、細いビームを用い、各結晶の数カ所に照射して snap shot を撮影し、良好な反射を与える場所を検索してデータ収集を行った。最も高分解能の回折データは、Cryst 2 に対して、抗

凍結剤にグリセロールを用いてフラッシュクーリングを行い、波長 1 Å, frame 毎の振動角 1 度, 露光時間 10 秒, 検出器までの距離 220 mm の条件で測定した時に得られた. 回折実験を行ったいずれの結晶からも, 2 Å 分解能を超える反射が得られた. 回折データ処理プログラム HKL2000^[5]で反射強度データを処理したところ, 全てのデータで空間群は C2, 格子定数は概ね, $a=193$ Å, $b=63$ Å, $c=158$ Å, $\beta=117^\circ$ であった (表 2).

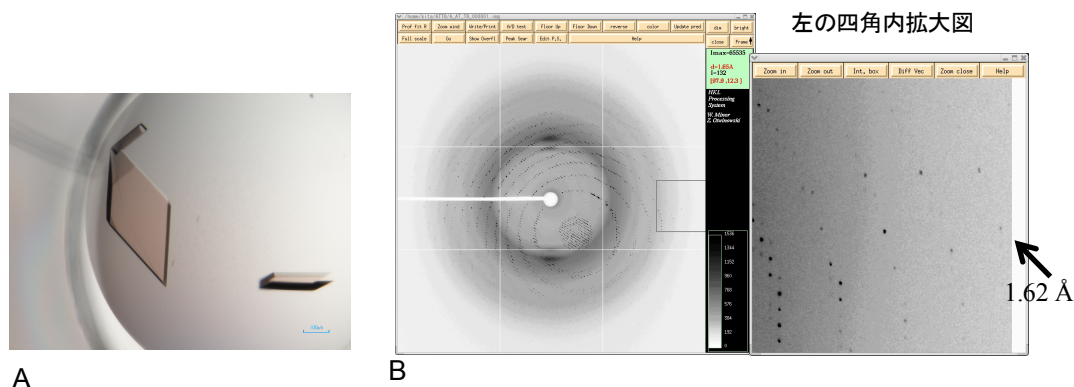


図 2. AGAO (D298A)- ベンジルアミン複合体結晶 (Cryst 2) 写真 (A) と回折像 (B).

表 2. 回折強度データ統計値 (空間群 C2 で処理)

	Cryst 1	Cryst 2	Cryst 3	Cryst 4	Cryst 5
Cell const.					
a (Å)	193.2	193.2	193.1	193.1	193.1
b (Å)	63.2	63.2	62.9	62.3	62.6
c (Å)	158.0	158.0	158.3	158.2	158.2
β (°)	117.7	117.8	117.9	117.9	117.8
Space group	C2	C2	C2	C2	C2
L test statistics ^a (Maximum resol., Å)	0.430 (1.97)	0.467 (1.43)	0.466 (1.63)	- (1.56)	0.473 (1.48)
MR and refinement					
Resolution (Å)	100.00-2.20 (2.24-2.20)	100.00-1.80 (1.83-1.80)	100.00-2.00 (2.03-2.00)	100.00-1.80 (1.83-1.80)	100.00-1.80 (1.83-1.80)
Unique reflections	83,970	154,260	111,687	153,814	153,799
R_{sym} (%) ^b	10.8 (44.7)	4.8 (22.6)	7.7 (27.9)	4.9 (19.6)	5.3 (21.3)
Completeness (%)	96.6 (95.8)	98.6 (97.8)	97.6 (96.8)	99.5 (99.1)	99.3 (99.8)
Redundancy	3.7 (3.7)	3.7 (3.3)	3.7 (3.7)	3.5 (2.5)	3.5 (2.5)
I/σ	15.7 (3.3)	31.6 (6.4)	18.5 (5.0)	25.5 (6.9)	32.0 (6.7)
wRfactor (MR) ^c	0.529	0.466	0.510	0.463	0.479
twin fraction ^d	0	0.009	0.004	-	0.002
R_{work} (R_{free})	0.250(0.282)	0.243 (0.285)	0.242 (0.311)	0.279 (0.325)	0.248 (0.294)

^a 全反射を用いた場合

^b $R_{\text{sym}} = \Sigma |I_h - \langle I_h \rangle| / \Sigma \langle I_h \rangle$, where I_h is the observed intensity and $\langle I_h \rangle$ is the average intensity over symmetry equivalent measurements.

^c 4 Å までの反射を使用した, molrep (CCP4i)による分子置換法適用時の R 値.

^d truncate (CCP4i)の結果, または数値を変えて R 値を計算し, 判断したもの.

結果および考察：

すでに構造が明らかになっている AGAO-5-phenoxy-2,3-pentadienylamine 複合体 (PDB code: 3kii)^[6] をモデルとした分子置換法を適用し、プログラム Molrep^[7]を用いて分子置換法による構造解析を進めた。分子置換法で得られた解は非対称単位内にホモ二量体を1つ含む、妥当なものであった。しかし、収集した5セットの反射データのうち4セットは構造解析プログラムで双晶性を示し(表2, 図3,^[8])、残る1セットも精密化を進める中で得られた電子密度はいずれも不連続な部分を含んだものであり、その解釈が困難であった。図3(A)に、プログラム truncate (CCP4i)で表示されたL statisticsを示す。そこで、一定強度以上の反射データのみを使ってのデータ処理と双晶率を変化させての剛体近似精密化、結晶格子軸の入れ替え、空間群の変換などを試みた。それらに加えて TLS-refinement^[9]も試みた。しかし、いずれの場合も結晶学的R値と電子密度図を改善することはできなかった。軸の入れ替え操作はR値が悪化し、また detwin も顕著な効果は確認できなかった。図4に、それぞれの電子密度図を示す (Cryst 1, 4 以外は detwin 操作後の反射を使用)。βシート内で構造が安定していると考えられるにもかかわらず、一義的に主鎖を追うことが困難であったり、manual fitting により分子モデルを電子密度へ収束させることが適切に行えなかった。分子構造の対称性および分子の形状が、この原因となる結晶の並び方に影響している可能性がある。

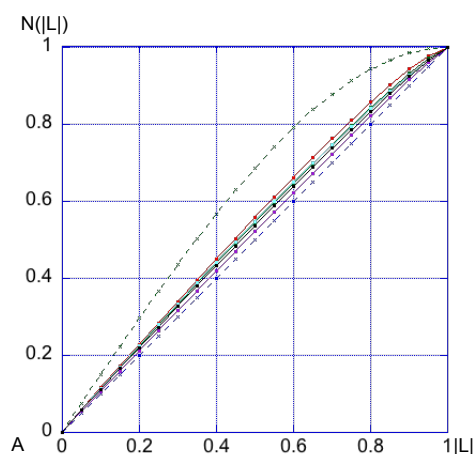


図3. (A):回折データのLtest^[8]. 青破線：完全な非双晶データ，緑破線：完全な双晶データ，赤線：Cryst 1，緑線：Cryst 2，シアン線：Cryst 3，紫線：Cryst 4，黒線：Cryst 5. Cryst 4 以外が部分的双晶であると検出されている。 $L=(I_1-I_2)/(I_1+I_2)$ ， $N(|L|)$ は $|L|$ の累積分布関数。

今後の課題：

現時点で得られている反射データはいずれも高い分解能の反射を呈するが、双晶性または何らかの問題を持っており、それが構造解析を妨げている。そのため、1. 双晶性を示さない結晶を得る、2. 活性に関与しない分子表面のアミノ酸残基の特異的変異体を作り分子のパッキングを変化させる、という対策が考えられる。また、ベンジルアミンではなく他のアミンを用いて複合体を作ることが結晶系を変える可能性もある。

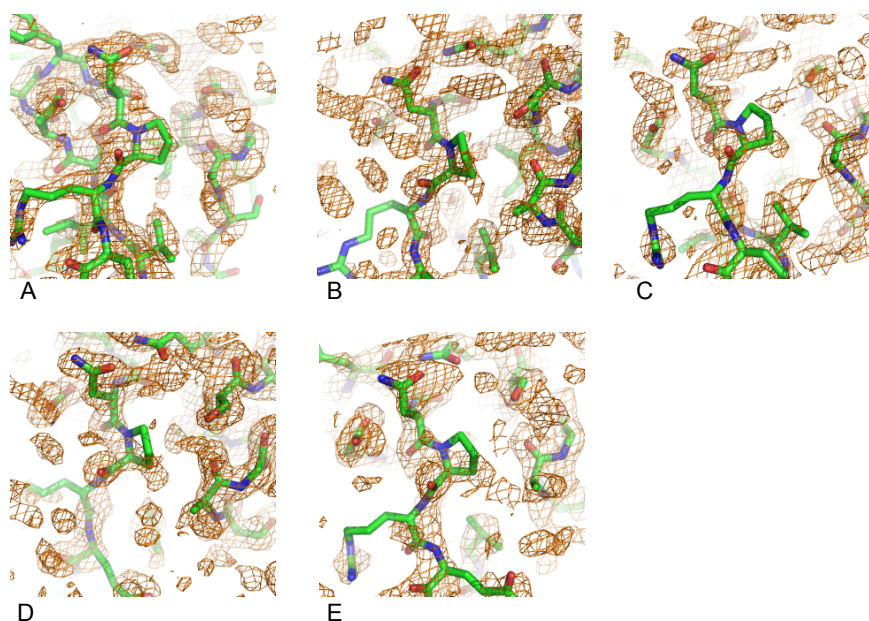


図4. 各結晶の電子密度図の一部 ($2Fo-Fc, 1\sigma$).
A: Cryst 1, B: Cryst 2, C: Cryst 3, D: Cryst 4, E: Cryst 5.

参考文献：

- [1] Janes, SM., Mu, D., Wemmer, D., Smith, AJ., Kaur, S., Maltby, D., Burlingame, AL., Klinman, JP., *Science* (1990), **248**, 981-987.
- [2] Wang, SX., Mure, M., Medzihradszky, KF., Burlingame, AL., Brown, DE., Dooley, DM., Smith, AJ., Kagan, HM., Klinman, JP., *Science* (1996), **273**, 1078-1084.
- [3] Kim, M., Okajima, T., Kishishita, S., Yoshimura, M., Kawamori, A., Tanizawa, K., Yamaguchi, H., *Nat. Struct. Biol.* (2002), **9**, 591-596.
- [4] Moore, RH., Spies, MA., CluPPER, MB., Murakawa, T., Hirota, S., Okajima, T., Tanizawa, K., Mure, M., *J. Am. Chem. Soc.* (2007), **129**, 11524-11534.
- [5] Otwinowski, Z., Minor W., *Methods Enzymol* (1997), **276**, 307-326.
- [6] Ernberg, K., Zhong, B., Ko, K., Miller, L., Nguyen, YH., Sayre, LM., Guss, JM., Lee, I., *Biochim. Biophys. Acta*, (2011), **1814**, 638-646.
- [7] Vagin, A., Teplyakov, A., *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* (2010), **66**, 22-25.
- [8] Padilla, JE., Yeates, TO., *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* (2003), **59**, 1124-1130.
- [9] Winn, MD., Isupov, MN., Murshudov, GN., *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* (2001), **57**, 122-133.

©JASRI

(Received: October 8, 2014; Early edition: December 25, 2014; Accepted: January 16, 2015;
Published: February 10, 2015)