

QM 法と NMR 法を用いて炭酸脱水酵素活性部位の
水素結合ネットワークで起こるプロトン輸送を読み解く

(北陸先端大院・ナノ¹, 金城大・医療², 金沢大院・理³, 阪大院・薬⁴)

島原 秀登¹, 杉森 公一², Muhamad Koyimatu³, 長尾 秀実³, 大久保 忠恭⁴, 小林 祐次⁴

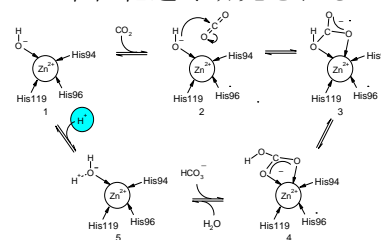
QM and NMR Approach to Proton Transfer in Hydrogen-bonding
Network of Active Site in Carbonic Anhydrase

(JAIST¹, Kinjo Univ.², Kanazawa Univ.³, Osaka Univ.⁴)

H. Shimahara¹, K. Sugimori², M. Koyimatu³, H. Nagao³, Ohkubo⁴, and Y. Kobayashi⁴

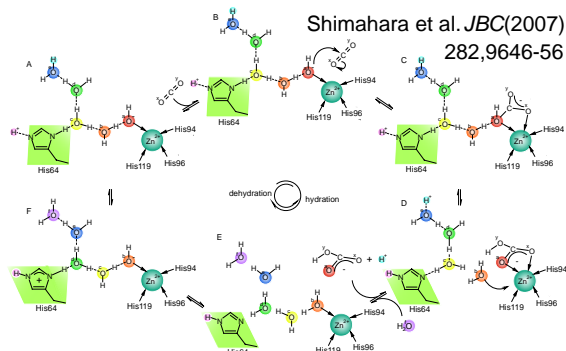
【緒言】幾つかの連なった分子の間を結ぶ水素結合の上をプロトンが次々と移動する様子は、水素結合リレーと呼ばれ、より速くプロトンを輸送する手段として広く見られる。生体系におけるこのような輸送は生物学的機能の発現に密接に関わっていることから生命の維持に極めて重要であると考えられ、その過程に多くの研究者が魅了されている。中でもヒスチジンは、側鎖イミダゾールの酸-塩基・互変異性平衡といった化学特性に加え、スウィングやフリップフロップのような回転(χ^1 , χ^2)といった多岐にわたる配向に起因するその多彩な能力から、蛋白質における効果的なプロトンドナーやアクセプターとして特徴付けられ、水素結合リレーに密接に関わる。炭酸脱水酵素(CA)は、このようなヒスチジン調節型水素結合リレーによって高度に制御されたプロトン輸送を理解するためのモデルとして半世紀近く研究される。

CAは、二酸化炭素の水和反応($\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$)を触媒することによって、生体内における CO_2 の排出や pH の調節、イオン輸送といった様々な生理学過程を調節する役割を担う。X線結晶構造解析によって、くぼみの底に位置する Zn^{2+} に3つのヒスチジンと水が配位子として配位することがわかり、その反応は、右のように、1) $\text{Zn}^{2+}\text{-OH}^-$ が基質 CO_2 の炭素を求核攻撃することで、2) $\text{Zn}^{2+}\text{-HCO}_3^-$ 複合中間体を形成させ、3) HCO_3^- がイソメライズ、4) そして HCO_3^- がもう一つの基質 H_2O と交換することで放出された後、5) そこに残る $\text{Zn}^{2+}\text{-H}_2\text{O}$ から H^+ (青丸印) が外部溶媒に放出され、始状態に戻るとの Zn-hydroxide 機構により説明される。これまで、その配位にみられる四面体構造と同様の配位構造を有する錯体化合物が触媒を模倣する複製モデルとして解析され、結合水の $\text{p}K_a$ が中性付近にあることでこの機構は成り立つとされてきた。しかし、2004年固体 ^{67}Zn -NMR 法により酵素の Zn^{2+} が直接観察された結果、pH5-8.5において $\text{Zn}^{2+}\text{-OH}^-$ 型と報告され、その機構について幾分の論争を残す。



Scheme

一方、5)の H^+ 放出は反応の律速段階であることが示され、最も触媒効率の高い酵素として数えられるヒトの II 型 (hCAII) の場合、くぼみの側面に位置する His64 によってその放出が助けられると考えられている。His64 は Zn^{2+} より近い "in" とより遠い "out" の2つの配向をもつ。その in 配向と Zn^{2+} の間に3つの水分子が観察されることから、 $\text{Zn}^{2+}\text{-H}_2\text{O}$ のイオン化に伴って生成された H^+ が水素結合リレーによって in 配向に移動することが広く受け入れられる。in 配向の χ^1 を回転させると out 配向と重なることから、それらの間にスウィング運動が生じ、out 配向の状態では H^+ が外部に放出されると、長年、予想されてきた。しかし、私たちは、 ^{15}N -NMR 法によって His64 の互変異性定数 (K_T) が 1.0 であることを決定し、 K_T と水素結合の間の

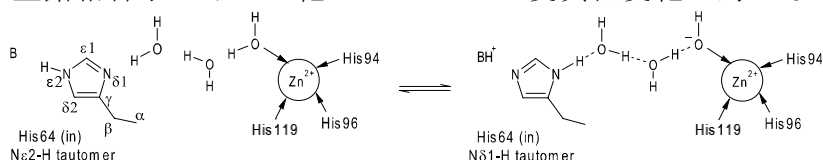


の相関解析から、左図のような互変異性モデルによって H^+ の放出を描画可能であることを報告した。そこでは、Zn-hydroxide 機構を基に His64 がスウィング運動を行うことなく H^+ が放出される。計算科学手法によって2つの配向が別々に H^+ 放出に関わることが可能なこと、活性のより高い Y7F 変異体の結晶構造において2つの配向が見られないことが相次いで報告され、現在、その運動は H^+ の放出に必要なのではと、界を二分する物議を醸す。

そこで、Zn-hydroxide 機構の検証と互変異性モデルの検証の 2 つを行うために、hCAII と部位特異的変異法によって得られた Y7F 及び H64A 変異体そしてそれらの酵素と阻害剤(アセタゾラミド)の複合体の ^{15}N - ^1H NMR 解析を行い、QM 法を用いて得られた構造情報の考察を行った。

【実験】 1) Bruker 500 MHz NMR 装置を用いて、a) イミダゾール ϵ 1 炭素の水素-重水素交換反応を観察することによって酵素の亜鉛に結合するその溶媒接触性に関する情報を取得すること、b) 酵素、変異体、酵素-阻害剤複合体のそれぞれの亜鉛に結合するイミダゾール窒素(^{15}N)のみかけの pK_a の決定することによって亜鉛に結合水の挙動に係る情報の抽出すること、c) Y7F 変異体 His64 の K_T を決定し、 K_T と水素結合の間の相関解析を基に、その K_T から His64 が関わる水素結合の様式を予想することを行った。次に 2) 野生型酵素と Y7F 変異体の X 線結晶構造(PDB: 2CBA, 2NXT)から抽出した活性部位(Zn $^{2+}$, Tyr7/Phe7, Asn62, Gly63, His64, Ala65, Asn67, His94, His96, Glu106, His119, Thr199, Thr200, 水分子(亜鉛結合水, w1a, w2, w3a, w3b, w4))に水素を付加し、Gaussian09 搭載 NEC SX-9 装置を用いてその水素の位置について構造最適化計算(B3LYP/6-31(d, p), SMD)を行った。得られた座標について振動数解析を行い、構造のエネルギーの値から、一つの水分子とその水分子を除いた構造の 2 つのエネルギーの値を差し引くことによって、水分子が活性部位と相互作用するエネルギー(ΔE s)を見積った。

【結果と考察】 イミダゾール ϵ 1 炭素位における重水素結合は、中性において OD^- のような溶媒によって ϵ 1 水素が引き抜かれることが必要であることが知られる。1-a)の結果、亜鉛結合イミダゾールの ϵ 1 炭素に結合する水素のシグナルは、9 ヶ月経ってもなお NMR スペクトル上観察され、表面にあるヒスチジンのシグナル強度の低下($\tau_{\text{ex}}=26\text{-}123$ days)と明らかに異なった。この重水素置換に対する抵抗性は、くぼみの底にわずかに露出するように見える亜鉛結合イミダゾールが溶媒と全く接しないか、さもなければ測定された pD8.3 において正電荷イミダゾリウムであることを示しており、いずれの場合においても、そのイミダゾールがその pD(pH7.9)より低い pK_a をもつという可能性が排除された。このことに基づいて、亜鉛に結合する第四の配位子の性質を特徴付けるために亜鉛結合窒素シグナルの観察(1-b)を行った。その結果、そのシグナルは、みかけの pK_a 7.4-7.6 で pH 依存的であり、酵素阻害剤複合体において pH 非依存的であった。pH7.9 以下を示す pK_a は亜鉛結合イミダゾールのそれでないことを示し、pH 依存性の変化は、結晶解析による亜鉛結合水が阻害剤の $-\text{SO}_2-\text{NH}_2$ 基によって置換される観察に相当する変化と考えられ、その pK_a は結合水のイオン化を示すと結論した。これは、固体 ^{67}Zn -NMR の結果と一致せず、代わりに Zn-hydroxide 機構を支持するものである。一方、 K_T と水素結合の間の相関解析によると、5.2 から 0.61 の範囲の K_T の低下は、 δ 1 窒素とある酸との間の水素結合が強く引き合う相互作用から部分的に引き合うものに変化することに相当する。実験の結果、Y7F 変異体 His64 の K_T は 0.67 であったので、Y7F 変異体 His64 の δ 1 窒素はある酸との間の相互作用が、野生型と比べてより部分的なものに変化したと考えられる。結晶構造によると、His64 と水素結合相互作用が可能な酸性基は、亜鉛結合水と Glu106 のカルボキシル基である (Zn-H $_2$ O-H $_2$ O(w1a)-H $_2$ O(w2)-His64 と Glu106-H $_2$ O(w4)-(Tyr7)-H $_2$ O(w3a)-His64, 但し Y7F 変異体は Tyr7 を除く)。2)を行った結果、野生型と Y7F 変異体それぞれの w1a と w2 の ΔE s は -7~-17 kcal/mol の範囲で差が見られなかった。これに対し w3a と w4 の ΔE s は、Y7F 変異体において -2 と -13 kcal/mol, 野生型において -10 と -24 kcal/mol とそれぞれの水の間に顕著な差が見られた。これは、2 つの酵素の Zn-His64 間の相互作用は類似していること、Glu106-His64 間の相互作用は Y7F 変異体において特に弱いことを示唆している。この結果に基づく、 K_T 0.67 は、Glu106-His64 相互作用がなくかつ Zn-His64 間に部分的に引き合う相互作用に因るものと考えられ、以下の式のように、Y7F 変異体において Zn-His64 間に部分的に引き合う相互作用がみられることを提案するに至った。式は、中性 pH において亜鉛結合水のイオン化が His64 の互変異性変化と対となる様子を表しており、これを



Zn-hydroxide 機構にパズルのようにはめ込むことで互変異性モデルを描くことが成立する。 **3P084** に関連報告