

炭酸脱水酵素の水素結合ネットワークと His64

(金沢大院・理¹, 北陸先端大院・ナノ², 金城大・医療³, 阪大院・薬⁴, 奈女大・理⁵)
Muhamad Koyimatu¹, 島原 秀登², 杉森 公一³, 岩山 将士¹, 杉森 哲也¹, 川口 一朋¹,
 齊藤 大明¹, 吉田 卓也⁴, 中沢 隆⁵, 大久保 忠恭⁴, 小林 祐次⁴, 長尾 秀実¹

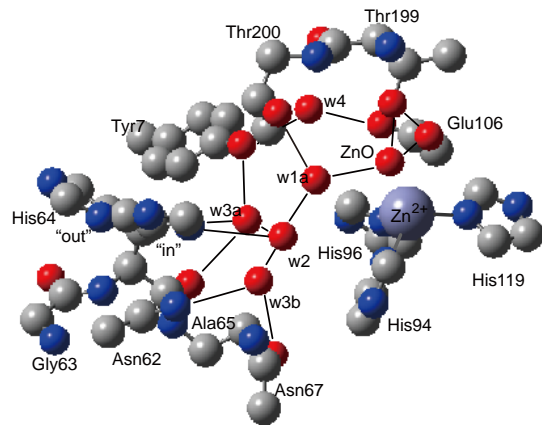
Hydrogen-bonding Network and His64 in Carbonic Anhydrase

(Kanazawa Univ.¹, JAIST², Kinjo Univ.³, Osaka Univ.⁴, Nara W. Univ.⁵)

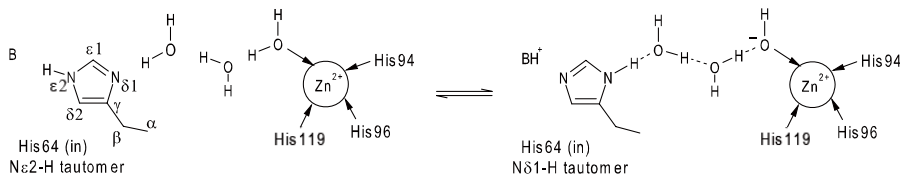
M. Koyimatu¹, H. Shimahara², K. Sugimori³, M. Iwayama¹, T. Sugimori¹, K. Kawaguchi¹,
 H. Saito¹, T. Yoshida⁴, T. Nakazawa⁵, T. Ohkubo⁴, Y. Kobayashi⁴, and H. Nagao¹

【緒言】炭酸脱水酵素(CA)は、二酸化炭素水和反応($\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$)を触媒することによって、植物の光合成前段階における CO_2 取込み、動物における呼吸、サンゴや軟体動物の石灰化といった様々な生理的過程を調節する、生物界に遍在する酵素である。ヒトにおいては、CAの機能を阻害する薬物が緑内障、てんかん、メニエル氏症候群、本態性高血圧等の治療に認可され、片やその機能を促進する薬物(アクティベーター)が精神疾患や記憶障害に有効と期待される。最近では、乳がん細胞におけるCA発現に関する研究が、新たな抗癌剤開発ターゲットとしての話題を呼び、一方ではCAの機能を模倣・利用した CO_2 を固体炭酸に転換する生触媒技術に興味もたれる。いずれにおいても、そこで行われる薬物の改良や CO_2 捕捉・貯蔵法の開発に、構造と機能の相関解析に基づく詳細に解明された触媒機構が不可欠である。

本研究では、CAのアイソザイムの中において最も高い活性を有するヒトのII型(hCAII)が興味の対象である。hCAIIは、分子量29.3 kDaの球状蛋白質であり、X線結晶解析によって、直径/深さ共に10 Å程の円錐形のくぼみの奥底に亜鉛が存在することが知られる。その解析結果から、くぼみを構成する官能基の座標とそこに観察される水の酸素原子の座標を抽出することで、右図に示す活性部位モデルは描かれる。水素結合の形成が可能と考えられる3.5 Å以下の酸素-酸素間距離を実線で結ぶと、網の目のように連なった水素結合のネットワークが浮き彫りになり、この水素結合ネットワークを通して、亜鉛結合水(ZnO)のイオン化によって生成したプロトンが溶媒に移動すると考えられている。その過程に多くの研究者が注目し、中でも、



Zn-H₂O-H₂O(w1a)-H₂O(w2)-His64 (①)において起こると考えられるプロトンの移動と His64 が有する2つの配向(“in”と“out”)との間の関係は、長年、議論の争点となっている。これまで、①を通して His64 の“in”に渡されたプロトンは、His64 が“out”に配向を変えた後溶媒へ放出されると考えられてきた。そのような中、私たちはNMR法を用いて His64 の互変異性に関わる水素結合情報を解析したところ、下式のように、亜鉛結合水のイオン化が His64 の互変異性変化と対となることで、生成物プロトンが His64 へ移動するとの提案を行うに至った。重要なことに、



この式を、よく知られた Zn-hydroxyde 機構に組み込むと、His64 が配向を変えること

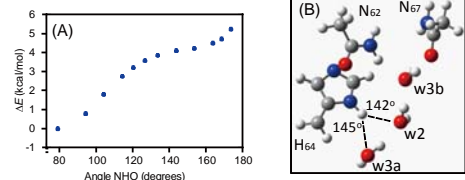
なしにそのプロトンが放出する機構(互変異性モデル)を描くことが可能であり、そのプロトン放出について議論が続いている(1B13を参照)。1B13の発表では、その①に加え、Glu106-H₂O(w4)-(Tyr7)-H₂O(w3a)-His64 (②)が His64 の互変異性に関わりをもつこと示唆する実験結果を報告した。②中の Tyr7 を Phe に置換した Y7F 変異体において②の相互作用は殆どないと見積られたため、この変異体における His64 の互変異性変化は①に起因するものと

考えられ、この場合のプロトン放出機構を考えてみると、既に描いた互変異性モデルと同じものであると考えられる。一方、野生型酵素においては、①と②の両方に相互作用があると見積もられたため、それら両方を用いてプロトンの放出を考える必要がある。そこで、X線結晶構造を基に①と②を含むモデル構造を作成し、その構造に His64 の互変異性解析によって得られた水素結合の情報を加えることによって、プロトン移動にかかる妥当なスキーム(野生型の互変異性モデル)を描くことが可能か否か検証を行った。

【方法】野生型酵素の X 線結晶構造(PDB: 2CBA)から抽出した上図の活性部位モデル(Zn²⁺, Tyr7, Asn62, Gly63, His64(in), Ala65, Asn67, His94, His96, Glu106, His119, Thr199, Thr200, 水分子(亜鉛結合水, w1a, w2, w3a, w3b, w4))に、式の左辺と右辺の構造を基にして水素を付加した(それぞれを N^{ε2}-H-His64/Zn-H₂O モデル構造と N^{δ1}-H-His64/Zn-OH⁻ モデル構造と呼ぶ)。その際、水分子について、付加された水素の位置に応じて様々な水素結合パターンが考えられるため、水素の位置の異なる約 30 以上のモデル構造を作成し、それぞれのモデル構造について、 Gaussian09 搭載 NEC SX-9 装置又は Gaussian03 搭載 NEC SX-8 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) CPCMorSMD)を行った。得られた最適化構造からプロトン移動のスナップショットと考えることが可能な幾つかの構造をピックアップし、計算によって得られた構造のエネルギー値を使用してダイアグラムを作成した。

【結果と考察】計算された N^{ε2}-H-His64/Zn-H₂O モデル構造中、最も低いエネルギー値を有する構造は水分子の水素について二つの特徴的な配置がみられた。一つは w2 と w3a が、His64 の N^{ε2}-H 互変異性体と切り離されることであり、これは δ1-窒素が水素結合によって酸と相互作用しなければ N^{ε2}-H 互変異性体になるとの側鎖イミダゾール基の傾向と一致するようにみえる。もう一つは w3b の水素原子の一つが活性部位の外を向くことであり、亜鉛結合水のイオン化が His64 の互変異性と対となるならば、この水素原子が溶媒へ放出される経路が存在すると考えられる。その経路は5つのステップよりなる。まず上記の構造(構造 1)の角度 ∠N^{δ1}-His64---H-O^{w3a} を測ったところ 78.9 度であった。その角度と 174 度との間で値を変え、12

個の異なる構造を構築、∠N^{δ1}---H-O^{w3a} を除くすべての水素の位置が最適化された。その結果、角度の関数としたエネルギー差から右図 A が描かれ、143 度~154 度に平坦域(4.22 kcal/mol)が見られた。その 154 度の構造(構造 2)において亜鉛結合水が His64 の δ1-窒素に接続され、w1a, w2, w3a よりなる水架橋が形成されると考えられる。この水架橋を通じて 4 つの水素原子を亜鉛結合水から His64 の δ1-窒素に移動させかつ ε2-水素を取り除くことで、一つの N^{δ1}-H-His64/Zn-OH⁻ モデル構造を得た。右上図 B は同様に水素の位置を最適化した構造(構造 3)から His64 の周辺部分を抽出したものである。ここでは、1) 2 つの水素結合の角 ∠N^{δ1}-H-O^{w3a} と ∠N^{δ1}-H-O^{w2} はそれぞれ 145 度と 142 度で、水素結合可能とされる 140 度以上の直線性を有すること 2) 水素原子の位置は水の双極子モーメントの配向と一致するように見えること、という 2 つの理由から His64 の δ1-窒素が w3a と w2 の両方と相互作用するだろうと考えられる。



この構造において水分子 w2 を通じて 2 つの水素原子を His64 の δ1-窒素から w3b に移動させ、w3b の水素を取り除きかつ His64 の ε2-窒素に水素原子を加えた。これは、N^{ε2}-H-His64/Zn-OH⁻ モデル構造の一つであり同様に最適化計算を行った(構造 4)。私たちの知識の範囲においてそのモデル構造の中で最も安定な構造を採した(構造 5)。構造 1 と 2 は構造 3, 4, 5 と比べて水素原子が一つ多く、構造最適化計算の際の全電荷をそれぞれ +1 と 0 と仮定したため、構造 1 と 2 は 3, 4, 5 よりプロトンが一つ多く、そのエネルギー差は 292-298 kcal/mol であった。このプロトンがバッファ分子(B) (同法全原子最適化)に受け渡されると考え、1+B ⇌ 2 + B ⇌ 3 + BH⁺ ⇌ 4 + BH⁺ ⇌ 5 + BH⁺ として右図ダイアグラムを作成した。この図を基に①と②の両方を用いたプロトン移動にかかるスキームは妥当なものと考えられる。

