

4C03

炭酸脱水酵素の触媒反応に見られるプロトン移動の  
解明に向けた実験・理論的アプローチ

(北陸先端大院・ナノ<sup>1</sup>, 金沢大院・理<sup>2</sup>)

○島原 秀登<sup>1</sup>, ムハマド コイマツ<sup>2</sup>, 杉森 公一<sup>2</sup>, 齋藤 大明<sup>2</sup>, 川口 一朋<sup>2</sup>, 長尾 秀実<sup>2</sup>

Experimental and Theoretical Approach to Proton-transfer  
in Catalysis by Carbonic Anhydrase

(JAIST<sup>1</sup>, Kanazawa Univ.<sup>2</sup>)

H. Shimahara<sup>1</sup>, M. Koyimatu<sup>2</sup>, K. Sugimori<sup>2</sup>, H. Saito<sup>2</sup>, K. Kawaguchi<sup>2</sup>,  
and H. Nagao<sup>2</sup>

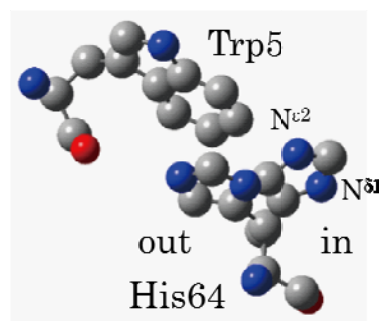
【序】ヒト由来炭酸脱水酵素 II (hCAII) は、ヒスチジン調節型水素結合リレーによって高度に制御されたプロトン移動を理解するためのモデルとして長く研究されている。そこでは、亜鉛結合水の解離によって生じた生成物プロトンが、幾つかの水分子を経由して His64 残基に渡され、そしてその生成物プロトンをもつ His64 残基に互変異性変化が起こるとの移動経路が広く受け入れられる。これまで、その生成物プロトンを His64 残基から酵素外部に放出するための経路として、1) イミダゾール環の回転に起因するある動的な挙動に基づくもの、2) イミダゾール環の互変異性変化に起因するより静的な挙動に基づくもの、の2つが提案されてきた。本研究は、核磁気共鳴(NMR)法に部位特異的の変異法を組み合わせた実験的手法と量子化学(QM)計算による理論的手法の両面から、これら2つの経路のうちどちらが尤もらしい機構か検証することを目的とする。本発表 4C03 では、実験的手法によるアプローチについて述べ、次発表 4C04 において理論的手法によるそれを述べる。

【実験】X線結晶構造によると、N末端から数えて約20までの残基は、酵素活性部位が存在するくぼみの近くを取り巻くように存在することがわかっている。我々は、部位特異的によって、それらの残基の内の一つがAlaに置換されるようにhCAII遺伝子に遺伝子組換え操作を施し、その遺伝子組換え体をもつ大腸菌大量遺伝子発現系を用いて、<sup>15</sup>N標識された変異Alaをもつ酵素(<sup>15</sup>N-XnA-hCAII; X = amino acid, n = residual number, A = Ala)を得た。このような変異導入操作をN末端から順に酵素に施すことによって、Ala一残基変異をもつ複数の<sup>15</sup>N-XnA-hCAIIを得た。これらの標識酵素について、2次元<sup>15</sup>N-<sup>1</sup>H相関NMR(HSQC or HMB)法(Bruker500MHz NMR装置)を用いてpH滴定実験を行い、それぞれの酵素に存在するHis64の2つのイミダゾール窒素に由来する4つの相関シグナル(N<sup>δ1</sup>-H<sup>δ2</sup>, N<sup>δ1</sup>-H<sup>ε1</sup>, N<sup>ε2</sup>-H<sup>δ2</sup>, N<sup>ε2</sup>-H<sup>ε1</sup>)

の挙動を観察する実験 (Ala-scanning 実験) を行った。

【結果】 ある一つの  $^{15}\text{N}$ -XnA-hCAII を含む試料について、pH 5.3 における 2 次元 NMR 測定を行ったところ、スペクトルのイミダゾール領域において観測されるある 1 つの His 残基に由来する 4 つの相関シグナルのケミカルシフトは、野生型の His64 のそれと同じであった。しかし、その試料の pH を上昇させ、同測定を行ったところ、pH 6.1, pH 6.8 におけるスペクトルにおいて、それぞれのシグナルはスプリットし、2 つの対をなす計 8 つ (4 つの相関シグナル  $\times$  2 対) の相関シグナルが観察されるという野生型にみられない挙動がみられた。特に、pH 6.8 のスペクトルにおいて、より低磁場側 (スペクトルの左側) にみられる一対のシグナルに注目すると、他の  $^{15}\text{N}$ -XnA-hCAII の同じ pH における His64 シグナルのそれに重なることがわかった。このことから、より高磁場側 (スペクトルの右側) にみられるもう一対のシグナルの出現がこの変異体に特有にみられる His64 の挙動であると考えられた。このシグナルは、pH 7.3 以上に pH を上昇させると消失するという特徴をもっていた。従って、この変異体の His64 のイミダゾール環は、pH 6.1 と pH 7.1 との間において、二つの異なる環境にあり、それらの環境の間で、NMR 時間軸上十分遅い化学交換をもつことがわかった。

【考察】 X 線結晶構造において、His64 のイミダゾール環は中性領域において右図のように二つの配向をもつことが報告されている。活性部位くぼみの底にある亜鉛イオンの方向を向いているイミダゾール環は「内向き (図 in)」, 酵素の外を向いているそれは「外向き (図 out)」と呼ばれる。この配向は pH 依存的に変化し、pH 5.3 のとき「外向き」、pH 9.1 のとき「内向き」となることがわかっている。



一方、外向きのイミダゾール環は、Trp5 インドール環面の垂直方向に存在し、 $\text{H}^{\delta 2}$  と  $\text{H}^{\delta 1}$  は環電流効果によって高磁場側にシフトすると予想される。これらのことから考えて、より低磁場側にみられる一対のシグナルは、「内向き」に由来するもの、他の一対のそれが「外向き」に由来するものである可能性が高い。もしこの帰属が正しいならば、それらの間の化学交換は NMR 時間軸上十分遅いことから判断して、この変異体において、「内向き」と「外向き」の間の回転が、高いターンオーバーをもつ触媒反応に関わることは考えられない。結論として、上述の生成物プロトンの放出について、「イミダゾール環の回転に起因するある動的な挙動に基づく経路」が明らかに除外されることが導かれる。現在、その帰属の妥当性に係る実験とこの変異体の反応速度を野生型酵素のそれと比較する実験を計画する。