

特集：タンパク質の化学構造から生物機能に迫る

モリブデンによる水酸化反応中間体の構造と反応機構

岡 本 研, 西 野 武 士

モリブドプテリンを補酵素とする反応系は進化の早い段階で発生し、多くの生物種が利用している生体システムである。これら酵素ファミリーの中で最も研究が進んでいるキサンチン酸化還元酵素はヘテロ環化合物の窒素原子に隣接する炭素原子を選択的に水酸化する。導入される水酸基の酸素原子は水由来であり、同時に基質は2電子を失う酸化的水酸化反応である。この反応様式は同酵素と類縁酵素に特有のものである。反応中間体複合体の結晶構造では水酸基酸素原子を介してモリブデンと生成物が共有結合しており、モリブデン配位子-O⁻による炭素原子への求核攻撃の機構が明らかになった。また近傍のグルタミン酸の酸塩基触媒機能、周囲残基による水素結合を介した基質活性化システムについても解説する。

1. モリブデン酵素について

モリブデンは海中に含まれる遷移金属のうち最も豊富に含まれるものの一つであり、生命誕生時の海水にも同様に豊富に含まれていた。モリブデンは生理的な条件下で酸化状態 (Mo⁶⁺) と還元状態 (Mo⁴⁺) を安定に取ることができ、途中 Mo⁵⁺ も遷移的にとりうるので、生体にとっては1電子あるいは2電子のやり取りをする酸化還元システムを構築しやすい。このような理由から、モリブデンは生命発生当初より現在に至るまで生命のシステムに取り入れられてきた^{1,2)}。モリブデン含有水酸化酵素は細菌からヒトにいたる多くの生物種に存在する。触媒する反応は多岐にわたり、主なものとして亜硝酸還元酵素 (EC1.6.6.1)、亜硫酸酸化酵素 (EC1.8.3.1)、キサンチン酸化還元酵素 (xanthine oxidoreductase; XOR) (EC1.1.3.22)、アルデヒド酸化酵素 (AO) (EC1.2.3.1) がある。これらすべては代謝システムの根幹を成すものであり、炭素、窒素、硫黄代謝の重要な段階を触媒する^{1,3)}。

2. モリブドプテリンと周囲タンパク質構造

水酸化反応を触媒する場所はモリブドプテリンと呼ばれる補酵素である (図 1A)。モリブデンはジチオレート²の2個の硫黄原子によりプテリン環と結合している。プテリンの構造は生物種により異なっていて、真核生物は一リン酸末端を持つが (図 1A)、原核生物ではシトシン、アデノシン、グアノシン、イノシンがジヌクレオチドとして結合している。モリブドプテリンの生合成経路は最近になりほぼ解明された。モリブデンの細胞内への取り込み、貯蔵、補酵素の生合成にいたるまで多くのタンパク質が関与する複雑なシステムである⁴⁾。この生合成システムはすべての生物種が保有しており、ヘム合成系ですら持たない生物種が存在することと比べると、いかに起源が古く重要な補酵素であるかわかる。

モリブドプテリンはモリブデンに配位する原子のパターンから3種に分けられる。XOR, AO はプテリンのリガンド原子を除くと2個の酸素原子と、1個の硫黄原子が配位する (図 1B 左)。亜硫酸酸化酵素、亜硝酸還元酵素はシステイン残基の硫黄原子がモリブデンに配位する (図 1B 中)。DMSO 還元酵素の補酵素はプテリンとモリブデン原子の量比が2:1となっている。4個のプテリン硫黄原子とともに1個の酸素原子が配位し、第6のリガンドはセリン、セレノシステイン、システイン、水分子のいずれかと

日本医科大学大学院医科生物化学分野 (〒113-8602 東京都文京区千駄木 1-1-5)

Structure and mechanism of molybdenum hydroxylase
Ken Okamoto and Takeshi Nishino (Department of Biochemistry, Nippon Medical School, 1-1-5 Sendagi, Bunkyo-Ku, Tokyo 113-8602, Japan)

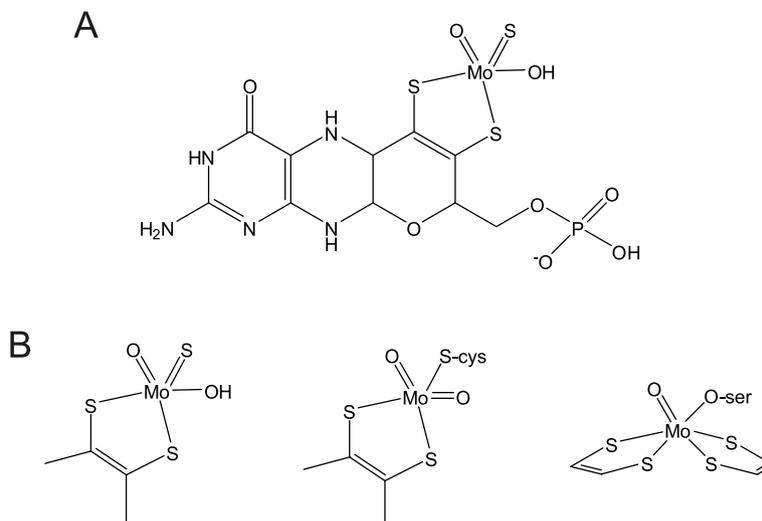


図1 A 哺乳類 XOR モリブドプテリンの化学構造
B モリブドプテリンの分類

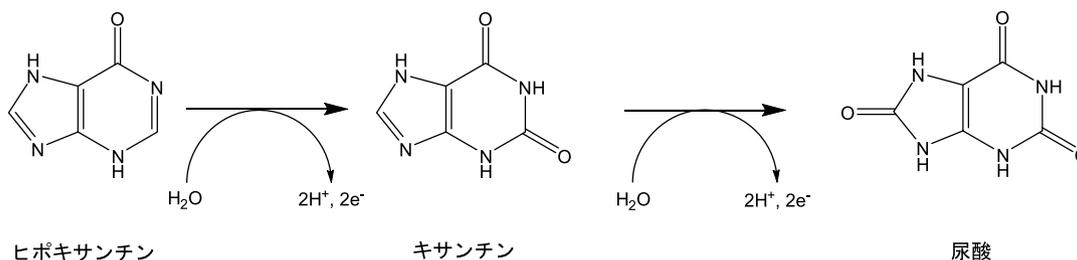


図2 XORが触媒する反応

なる (図1B右)³⁾.

3. キサンチン酸化還元酵素について

XORは細菌から高等植物, ヒトを含む高等動物まで広範囲の生物種が有している酵素である. どの生物種の酵素も分子量, 酸化還元反応中心の構成, 位置関係がほぼ同じであり, 2種の [2Fe-2S] 型の鉄硫黄中心, FAD, モリブドプテリンを有する. 本酵素が発見・抽出されたのは早く, 1902年にシャルディンガー酵素として牛乳から抽出され報告されたのが最初である⁵⁾. 以来, Beinertらによる鉄硫黄中心のESR (electron spin resonance) 解析⁶⁾, BrayらによるモリブドプテリンのESR解析のさきがけとなり⁷⁾, 酵素学, 生物物理学の分野で多くの研究がなされている⁸⁾. XORの基質特異性は広く, プリン, プテリン, プテリジン, アルデヒドなど, 様々なヘテロ環化合物を水酸化するのが特徴である³⁾. 生体内での主な機能はプリン分解系の最終の2段階の触媒であり, ヒポキサンチンの2位炭素原子を水酸化してキサンチンに, さらにキサンチンの8位炭素原子を水酸化して尿酸に代謝する (図2). ヒトにおいては尿酸がプリン排泄系の最終産物であり, 体内に蓄積した場合に痛風, 抗尿酸血症をきたす. このため XOR

阻害剤は抗高尿酸血症薬, 抗痛風薬として医学的に重要な化合物である⁹⁾. XORでは水酸化反応において, 基質に導入される酸素原子は水分子由来であり, その際酵素側に2電子が移行する酸化的水酸化反応を触媒する. 多くの水酸化反応 (例えば P450) では基質に導入される水酸基は酸素原子由来のオキシゲナーゼ反応であり, 水酸化反応に伴い還元型ピリジヌクレオチドを消費する反応であることと対照的である. このような反応様式は XOR とそのファミリー酵素である AO に特有の反応である^{3,10)}.

XORは NAD^+ を電子受容体とするキサンチン脱水素酵素 (xanthine dehydrogenase; XDH) として組織中に存在するが, 哺乳類の酵素のみは酸素を主な電子受容体とするキサンチン酸化酵素 (xanthine oxidase; XO) へと活性が変換する¹¹⁾. 活性変換は分子内のジスルフィド結合の形成により可逆的に, プロテアーゼによる部分分解により不可逆的に生ずる. XOは NAD^+ との反応性を失う一方で, 酸素を還元してスーパーオキシドアニオン (O_2^-), 過酸化水素を産生する. 産生される活性酸素による組織障害が, 虚血再還流障害をはじめとする種々の病態の原因であるとする説が医学における病態生理研究の分野で示されている¹²⁾. また, 乳汁中では他の組織とは異なり XO として存在する

こと、XORのノックアウトマウスでは乳腺細胞内の脂肪滴の蓄積、子の発育異常などが観察されることから、活性変換は乳汁分泌に必要な過程であると推測されている¹³⁾。このようにXORの活性変換は病態生理、生理学の両面から注目を受けている。これら2種酵素の変換機構については酵素学的、構造生物学的にその詳細が解明され^{14~17)} 総説として解説してある^{18~21)}。

本総説では最近進展した結晶構造の知見に基づき、モリブデンにおける水酸化機構に着目して解説する。

4. XOR モリブドプテリンの構造

モリブドプテリンの紫外部/可視部の吸収は弱く、FAD、鉄硫黄中心の吸収スペクトルと重なるため通常は観察されない。モリブドプテリン単独の吸収スペクトルは、昆虫細胞により発現させたデモリブド酵素の解析より明らかになった²²⁾。それによると620nmより短波長側に幅広い吸収を持ち、330nm付近に弱いピークがある。ウシ、ニワトリデフラボ型酵素の吸収スペクトルに差が無いことから考えて、生物種間での軽微な差は周囲タンパク質環境によるものと考えられる。Mössbauer法²³⁾、とcircular dichroism法²⁴⁾による分光学的解析も行われているが、主要な解析はESRによるものである。ESRにおいてMo⁵⁺は‘rapid’シグナルを生じ、不活性であるデサルフォ型酵素は‘slow’シグナルが観察される。‘rapid’シグナルはさらにproton hyperfine splittingの性質により“type 1”と“type 2”に分類されている²⁵⁾。

当初ウシおよび*Rhodobacter capsulatus* XORの結晶構造が解明されたときには解像度の点から、モリブデン周囲の原子配置は明らかでなかったが、モリブデン周囲に原子がピラミッド上に配置されていることが観察された^{14,26)}。分光学的解析により2個のジチオレン(=S₂)、サルフォ(=S)、オキシ(=O)、水酸基か水分子(OH)が存在していると予想されていた²⁷⁾。初期の結晶解析では、酵素に30%ほどのデサルフォ型(S=がO=に変換した不活性型)を含み、その解像度の限界からその配位子のジオメトリーは*Desulfovibrio. gigas* AOの原子配置^{28,29)}と同様であると仮定し、=Sを頂点とする仮モデルを置き、報告された¹⁴⁾。その後完全活性型の酵素の結晶の改善が行われ、さらに安定な還元型として、自殺基質である4-[5-pyridin-4-yl-1H-[1,2,4]triazol-3-yl]pyridine-2-carbonitrile (FYX-051)との複合体結晶構造を基にそのジオメトリーが明らかになった。得られた電子密度ではMo=Sは、モリブデンの還元とともにプロトン化され、Mo-SHとなっているが、当初予測されたモリブデン配位子が構成するピラミッドの頂点方向ではなく、水平方向に存在していた³⁰⁾(図3)。これらのアサインメントはmagnetic circular dichroism³¹⁾とX-ray absorption spectroscopyでも確かめられており、さらに詳細な結合距

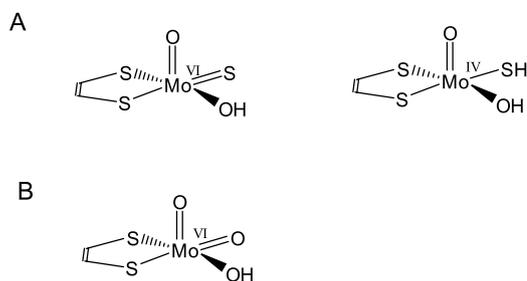


図3 XOR モリブデン原子周囲の原子配置
A; 活性型 左; 酸化状態 右; 還元状態
B; デサルフォ型 (不活性型)

離が算定されている³²⁾。また多くのモリブデン含有モデル化合物も頂点方向に=Oが存在している³³⁾。

5. ウシ XOR の結晶構造

XORは牛乳中に大量に存在しており、結晶化の報告は古いが³⁴⁾、構造解析に用いられる質の良い結晶は永年得られなかった。不活性型酵素の存在、乳汁中の酵素が脂質に結合しているため可溶化が必要であることなどの要因により結晶化が困難であった。その後葉酸をリガンドとしたアフニティークロマトグラフィーの確立³⁵⁾、高純度リパーゼ処理による精製法の改良が行われ³⁶⁾、ウシXORの結晶構造がXDHとして解像度2.1Åで、さらにその構造を基に分子置換法によりXO(パンクレアチン処理による)として2.5Åで構造決定された¹⁴⁾。XORの結晶構造は155×90×70Åの蝶型をしており、カルボキシル末端側の85kDaのドメインを介して2個のサブユニットが結合している(図4A)。一つのサブユニットは3個のドメインから構成される。それぞれのドメイン間はおおよそ60アミノ酸からなるリンカーペプチドで連結されている。

酸化還元反応中心はほぼ一直線的に配置され、モリブドプテリン、2個の[2Fe-2S]タイプの鉄硫黄中心、FADの順に並ぶ(図4B)。鉄硫黄中心はそれぞれFe/S I、Fe/S IIとよばれ、Fe/S IIの方が高電位である。モリブデンでの水酸化反応により酵素に渡った電子はFe/S I、Fe/S IIの順に經由してFADに渡り、そこで最終電子受容体である基質NAD⁺あるいは酸素分子が還元される。モリブデンとFe/S I間にはプテリン環が存在しており、プテリン環はモリブデンの保持だけでなく、電子伝達にも関与している。酸化還元反応中心のなかではFADとFe/S IIが特に接近して存在しており、FAD C7メチル基とFe/S II硫黄原子間の距離は6.6Åである。Fe/S IIは電子シンク(electron sink)として機能し、FADの反応性を調節する^{37,38)}。それぞれのサブユニット間の酸化還元中心は約50Å離れており、お互いのサブユニットの電子伝達はそれぞれ独立している。

生理的基質であるキサンチンとの反応中間体の寿命は短

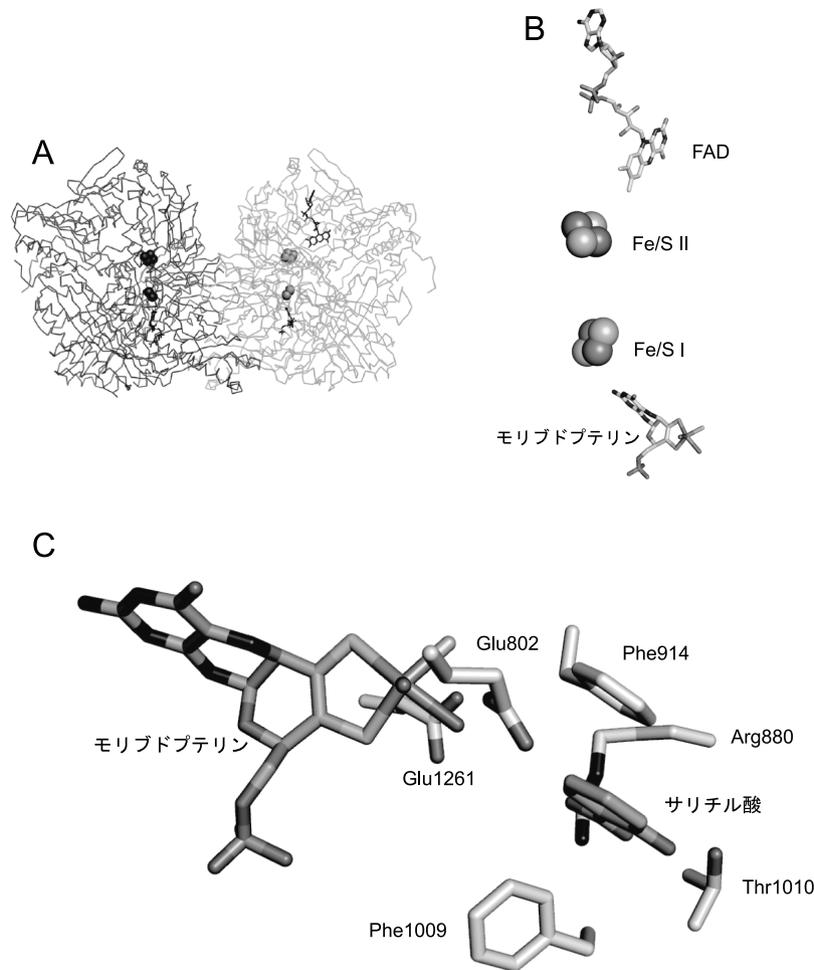


図4 A ウシ XOR 二量体結晶構造
 B 酸化還元中心のスティックモデル図
 C 基質結合部位の結晶構造, サリチル酸結合型として表示している。

いため、結晶構造では観察できない。基質結合様式を知る上で、阻害剤との複合体結晶構造が参考になる。構造解析されたのはサリチル酸¹⁴⁾、TEI-6720³⁹⁾、Y-700⁴⁰⁾、FYX-051⁴¹⁾、オキシプリノール⁴²⁾である。サリチル酸以外は強力な阻害剤 ($K_i \sim 10^{-10} \text{M}$) であり、FYX-051、オキシプリノールは自殺基質である。サリチル酸結合構造ではサリチル酸のカルボキシル基と Arg880 のグアニディウムイオン結合、Thr1010 の側鎖、および Glu1261 側鎖と水分子を介した水素結合が観察される (図 4C)。阻害剤の芳香環部分は 3.5Å の距離で Phe914 と平行に結合しているが、オーバーラップはわずかである。同時に Phe1009 のフェニル基が 3.7Å の距離にて直角に接している (edge-on interaction)。2 個のフェニル基との相互作用は芳香環を持つ阻害剤との複合体結晶構造すべてで観察される^{30, 39~41)}。Glu1261 はモリブデンの最も近くに存在する残基の一つで、この残基を変異させると酵素は完全に活性を失う^{42, 43)}。Glu802 は阻害剤のチアゾール、ピラゾール、トリアゾール環のいず

れの窒素原子とも水素結合している。この水素結合においては阻害剤ヘテロ環窒素原子のプロトン化は化学的に考えがたく、Glu802 のカルボキシル基がプロトン供与体として作用していると考えられる。Arg880 はサリチル酸結合構造においてはサリチル酸のカルボキシル基と水素結合している。ヒト XOR においてこれらに相当する残基 (Glu803 と Arg881) をそれぞれ変異させると、プリンに対する水酸化活性が大きく減少する⁴³⁾。Aspergillus nidulans⁴⁴⁾、R. capsulatus XDH の変異酵素解析結果⁴⁵⁾ から同アルギニンの重要性が確認されている。

6. キサンチン酸化還元酵素の反応中間体構造 —自殺基質との複合体構造—

酸化状態の XOR ではモリブデンは Mo^{6+} であり、 $=\text{O}$ 、 $-\text{OH}$ 、 $=\text{S}$ と 2 個のジチオレンの硫黄原子 ($-\text{S}-$) が配位し、上述したように配位原子団のうち、 $=\text{O}$ が頂点方向、その他が水平方向に配位し、全体としてピラミッド型を呈する

(図3)³⁰⁾. ターンオーバーの過程で, リガンド原子のうちの“一方の酸素原子が基質に導入され, 溶液中の酸素原子が置き換わり再生されることが¹⁸Oラベルをした水を用いた実験と⁴⁶⁾, ラマンスペクトル解析により確認されている⁴⁷⁾. 酸素の由来がMo=OであるかMo-OHであるかは議論が分かれていた³⁾. 化学的にはDMSO還元酵素と同様の=Oによるオキソトランスファーモデル, Howesらによる一時的にMo-C結合が形成されるとするモデル^{48,49)}が提唱されていた. しかし, *D. gigas* AOの結晶構造解析から, モリブデン近傍のグルタミン酸残基が塩基触媒として機能することにより促進され形成されたMo-O⁻による求核攻撃が基質炭素原子に対して起こり, 一時的にMo-O-C結合が生じ, その後ヒドリド(H⁻)としてMo=Sに電子が渡るとする説⁵⁰⁾が提唱された. 最後の説は当時想定されていたMo=Sを頂点とする原子配置にはふさわしくない説とされていた. しかし現在では, Mo-OHが基質に組み込まれることは, その後の¹⁷Oを用いたENDOR (electron nuclear double resonance)解析の結果⁴⁶⁾, ラマン分光による解析⁴⁷⁾, 変異酵素による解析^{42,43)}, モデル錯体による理論計算⁵¹⁾, さらに決定的証拠として下記に述べる結晶構造による反応中間体の構造解析^{30,41)}からほぼ確かであると考えられる.

FYX-051 (図5A)は自殺基質であり, 好気条件下であってもMo⁴⁺と安定な複合体を形成する. 複合体半減期は22

時間(25℃)ときわめて長い(松本, 未発表データ). 複合体から分離した化合物は2-OH-FYX-051であり, 複合体は水酸化反応中の安定な形をとり存在すると考えられた. 実際にFYX-051との複合体結晶構造では水酸化の過程を説明する重要な反応中間体が捕捉された. 結晶構造ではモリブデン原子と水酸化を受けるFYX-051ピリジン環C2の間に高電子密度のブリッジが観察された³⁰⁾(図5B). 両者の距離は3.3Åであり, 中間で152°の角度で屈曲しているため, Mo-Cの直接の結合は考えがたく, 水酸化を受けた基質とモリブデン原子が水酸基酸素原子を介して共有結合していると考えられる. この場合, Mo-O間の距離は2.0Å, O-C間の距離は1.3Åとなり(図5B), それぞれモリブデン酸素間の単結合, 六員環炭素と酸素間単結合に妥当な距離となる.

さらに結晶構造ではMo-OHに隣接してGlu1261のカルボキシル基が存在しており, Glu1261が酸塩基触媒としてMo-OHからプロトンを引き抜き, Mo-O⁻が基質炭素原子に求核攻撃する, その過程でMo-O-Cが形成されるとするモデル⁵⁰⁾と合致するものである. Glu1261に対応するグルタミン酸残基はすべての生物種のXOR, AOにて保存されており⁵²⁾, ヒトおよび*R. capsulatus* 酵素にてGlu1261に相当するGlu1262とGlu730の変異を行った場合, 酵素活性の完全な消失が起こる^{42,43)}. プロトン化されたGlu1261

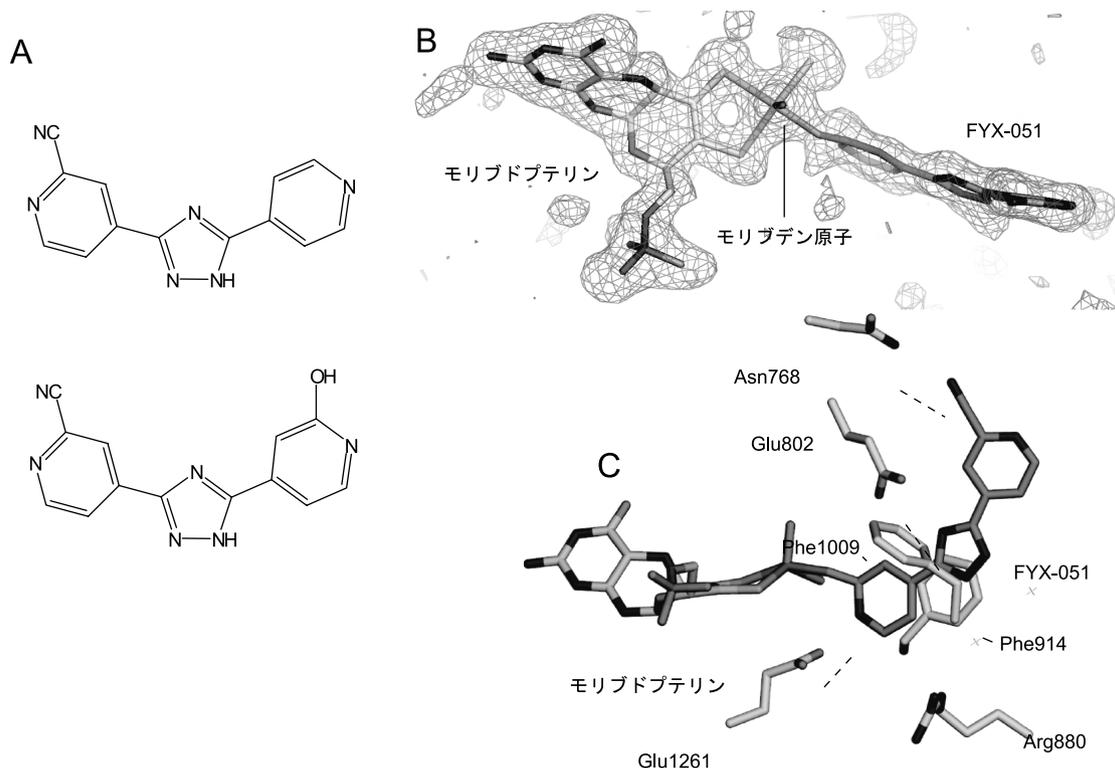


図5 A FYX-051 (上)と2-OH-FYX-051 (下)の化学構造
 B ウシ XOR-FYX-051 複合体の結晶構造電子密度図 2fo-fc map, $\sigma = 1.5$
 C ウシ XOR-FYX-051 複合体の結晶構造 スティックモデル 水素結合を点線で示す.

は FYX-051 のピリジン環 N1 原子と水素結合を形成している (図 5C)。水素結合は、ピリジン環の電子を吸引し Mo-O⁻ による求核攻撃を促進すると考えられる。この事実は水酸化されるヘテロサイクル基質において、水酸化され得る炭素の隣は常に窒素原子であること^{3,25)}と相応している。さらにモリブデン還元のプロセスで頂点ではなく、水平にある Mo=S と水酸化を受ける炭素原子とは、ヒドリドが移動するのに最適な位置、距離にある。このため、共有結合が生じた後に、炭素原子から Mo=S へとヒドリドが移動し、モリブデンの 2 電子還元とともに Mo-SH が生じる。分光学的に他の酸化還元中心への電子の移行は観察されず、複合体は Mo⁴⁺ の状態で安定している。この後に水分子による -OH 基の置き換え、生成物の離脱が起こる。しかし FYX-051 複合体結晶構造においてはモリブデン周囲に水分子が存在しないため安定な構造となっていると考えられる。

7. 酵素-基質アナログ複合体の結晶構造

オキシプリノールはキサンチンの異性体であり、XOR の阻害剤である (図 6A)。キサンチンとは C8 と N7 の位置が入れ替わっているため、水酸化を受けることなく Mo⁴⁺ と安定な複合体を形成し、反応が停止する⁵³⁾。2.1 Å の解像度で決定されたウシ XOR との複合体結晶構造では、オキシプリノール N2 窒素とモリブデン間に共有結合

が観察される⁴¹⁾(図 6B)。両者の距離は 2.3 Å であり、FYX-051 複合体のように中間の屈曲が無いので、両者は直接結合していると考えられる。つまり N2 窒素がモリブデン -OH リガンドを置きかえる形で配位結合している。オキシプリノールは共有結合だけでなく、周囲アミノ酸 (Glu 1261, Glu802, Arg880) との水素結合も観察される (図 6B)。これら残基はいずれも酵素反応に不可欠なものである。これら残基を変異させるとオキシプリノールによる酵素阻害は起こらない^{43,44)}、また哺乳類 AO は Glu802, Arg 880 に相当する残基がバリン、メチオニンに変わっているが、オキシプリノールによる阻害は無い^{54,55)}。これら残基は水素結合により複合体を安定化していると考えられる。Truglio らは *R. capsulatus* XOR とオキシプリノールとの複合体結晶構造を 3.0 Å の解像度で報告しているが、複合体の構造はほぼ同じである²⁶⁾。

8. 周囲残基の機能と天然基質であるキサンチン水酸化機構

XOR の基質結合部位の残基 (Glu802, Arg880, Phe914, Phe1009, Glu1261) (図 4C) はすべての生物種間で保存されている^{3,52)}。ここでは反応機構にも関わっていると考えられる Glu802, Arg880 の 2 残基について述べる。Glu1261 と異なりもう一方のグルタミン酸 Glu802 は主に基質結合に関わっており、すでに述べたとおり水酸化の触媒として

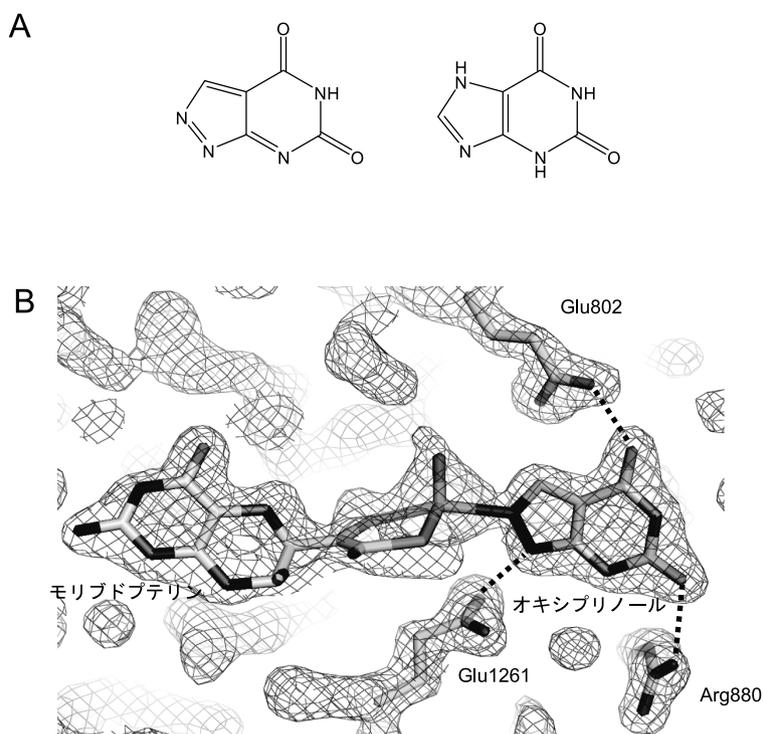


図 6 A オキシプリノール (左) とキサンチン (右) の化学構造
B ウシ XOR-オキシプリノールの結晶構造電子密度図 2fo-fc map, $\sigma=1.5$, 水素結合を点線で示す。

も働くと考えられる。Glu802は阻害剤複合体結晶構造解析より生理的pHにおいてカルボキシル基はプロトン化されている^{30,39,40}。ヒト酵素にて相当するGlu803をバリンに変異させた場合、ヒポキサンチンを基質とした場合活性が殆ど消失し、キサンチンを基質とした場合は k_{cat} が1%以下となる⁴³。

Arg880は非共有結合性阻害剤結合構造においては阻害剤カルボキシル基とグアニジウムグループがイオン結合を形成する^{14,39,40}。ヒト酵素にて相当するArg881をメチオニ

ンに変換した場合、先に述べたE803V変異酵素とは逆の結果になり、キサンチンを基質とした活性は殆ど消失し、ヒポキサンチンを基質とした活性の k_{cat} は約1%となる⁴³。*A. nidulans*にて相当する残基Arg911をグルタミン酸に変異させると、やはりヒポキサンチンを基質とした活性は残るが2-hydroxypurine(8位が選択的に水酸化される)とキサンチンを基質とした活性は消失する⁴⁴。また天然型酵素においてヒポキサンチン(6-hydroxypurine)は8位ではなく2位が水酸化され⁵⁶、その後8位が水酸化される。これ

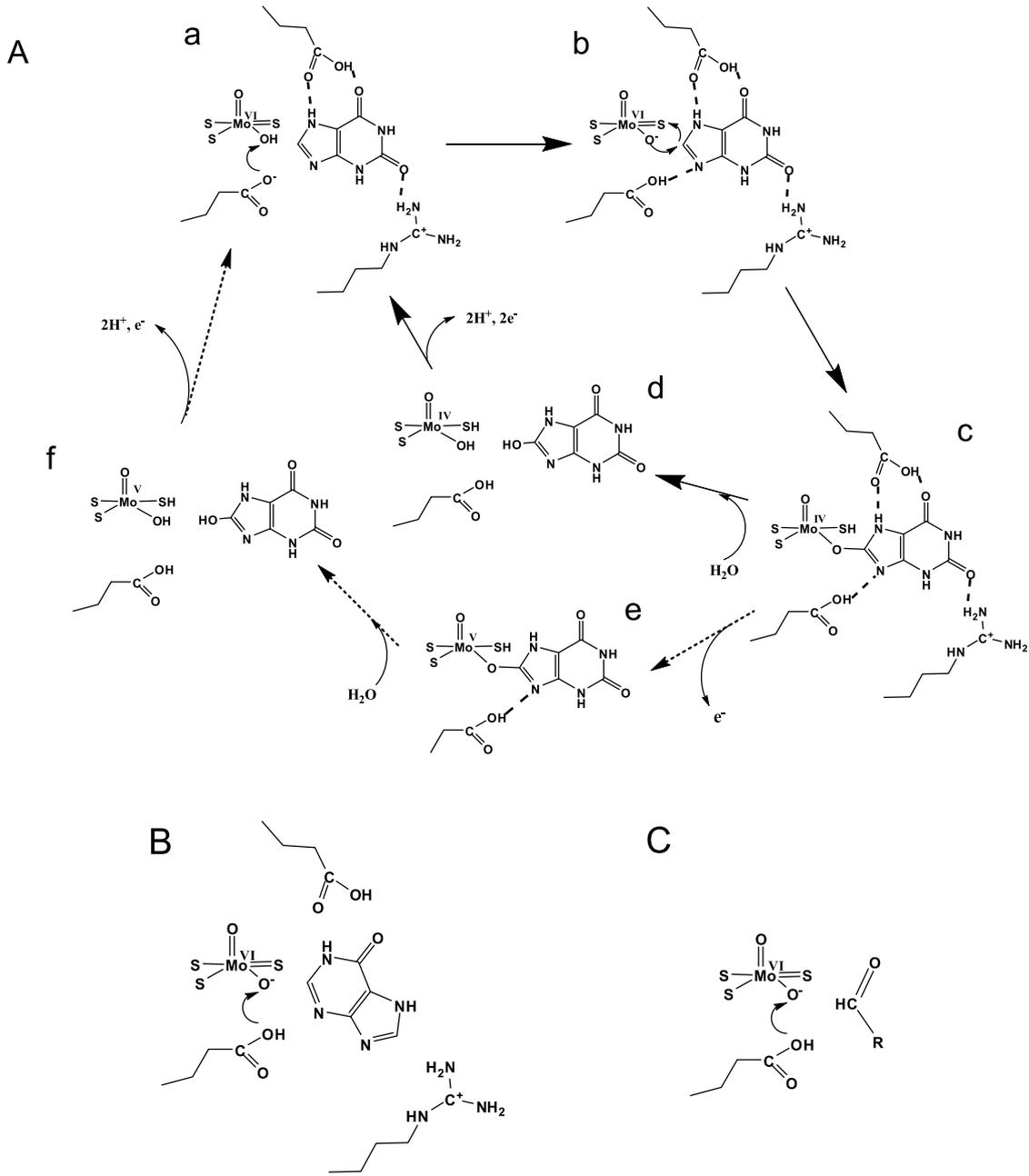


図7 A キサンチン水酸化機構のモデル
 B ヒポキサンチン結合様式
 C AOによるアルデヒド水酸化機構

らのことより Arg880 はプリン の 2 位 オキソ と 相 互 作 用 し、8 位 水 酸 化 の た め に 必 須 で あ り、構 造 的 に 8 位 を モ リ ブ デ ン 方 向 に 固 定 す る よ う 機 能 し て い る と 考 え ら れ る^{43,44)}。Pauff ら は *R. capsulatus* 酵 素 に て 相 当 す る Arg310 の 変 異 酵 素 の 解 析 と 2-hydroxy-6-methylpurine 複 合 体 結 晶 構 造 か ら、マ イ ナ ス に 荷 電 し た 6 位 -O⁻ と Arg880 が イ オ ン 結 合 す る モ デ ル を 唱 え て い る^{44,57)}。し か し そ の モ デ ル で は Glu802 が キ サ ン チ ン と 相 互 作 用 を し て お ら ず、Glu802 の 変 異 が 大 き く 活 性 を 低 下 さ せ る 理 由 を 説 明 で き な い。実 際 ラ ッ ト デ モ リ ブ ド 酵 素 と 尿 酸 と の 結 晶 構 造 で は Arg880 と 2 位 オ キ ソ と の 水 素 結 合 が 確 認 で き て い る (著 者 ら 実 発 表 デ ー タ)。

9. 基質結合様式と反応機構モデル

上 に 述 べ た 事 項 を 総 合 し た キ サ ン チ ン の 反 応 モ デ ル を こ こ に 述 べ る。キ サ ン チ ン は 水 酸 化 を 受 け る C8 を モ リ ブ デ ン 方 向 に 向 け る。Arg880 が 2 位 オ キ ソ と 水 素 結 合 す る 位 置 に、Glu802 が 6 位 オ キ ソ、N9 と 水 素 結 合 す る よ う 結 合 す る。Glu802 は プ ロ ト ン 化 さ れ て お り、2 個 の 水 素 結 合 を 形 成 す る の に 適 し て い る (図 7Aa)。-OH の プ ロ ト ン が 近 傍 の Glu1261 に 移 行 し、-O⁻ に よ る C8 へ の 求 核 攻 撃 が 起 こ る (図 7Ab)。そ の 際、プ ロ ト ン 化 さ れ た Glu1261 と N7 が 水 素 結 合 を 形 成 す る。C8 両 側 に 水 素 結 合 が で き る こ と で、求 核 攻 撃 は 促 進 さ れ る。反 応 中 間 体 Mo-O-C が 形 成 さ れ た 後、C8 か ら H⁻ が 隣 接 す る =S へ と 移 動 し、=S が -SH に な る と 共 に モ リ ブ デ ン が 還 元 さ れ る (図 7Ac)。最 後 に 水 分 子 が、尿 酸 と 置 き 換 わ り、他 の 酸 化 還 元 中 心 に 電 子 の 移 動 が 起 こ る こ と で 反 応 が 完 了 す る (図 7Ad)。酸 化 的 半 反 応 は 異 な る 経 路 を 取 る 可 能 性 が あ る。人 工 基 質 で あ る 2-hydroxy-6-methylpurine の タ ー ン オ ー バ ー で は モ リ ブ デ ン か ら 電 子 の 移 行 が 起 こ り Mo⁵⁺ が 生 じ る と と も に 生 成 物 の 解 離 が 起 こ る⁵⁸⁾ た め、副 経 路 と し て 1 電 子 の 移 行 と Mo⁵⁺ の 生 成 が 起 こ り、そ の の ち 水 と の 置 き 換 わ り サ イ ク ル が 戻 る と い う 経 路 を 想 定 し て い る (図 7A 点 線 で 示 し た 経 路)。ど れ ほ どの 量 が 二 つ の 経 路 を 通 る か は 基 質 の 種 類 に よ り 異 な っ て く る³⁰⁾。

も う 一 方 の 基 質 で あ る ヒ ポ キ サ ン チ ン は C2 が 選 択 的 に 水 酸 化 さ れ、Arg880 の 変 異 に よ る 影 響 が 少 な い こ と か ら、考 え ら れ る 結 合 様 式 は 図 7B で あ る。Arg880 と は 相 互 作 用 が な く、Glu802 と 2 個 の 水 素 結 合 に よ り 安 定 化 し て い る。2-hydroxy-6-methylpurine 結 合 構 造 で は、2 位 の 水 酸 基 は Arg880 と 水 素 結 合 し て お り、ま た 9 位 の N は Glu1261 と 水 素 結 合 し て お り、以 上 述 べ た キ サ ン チ ン 結 合 様 式 と 一 致 し て い る。活 性 の 弱 さ は Pauff ら の 主 張 で あ る 結 合 モ ー ド が 本 来 の 基 質 結 合 モ ー ド と 異 な る た め と い う 彼 ら の 説 明 よ り は、む し ろ Glu802 と の 水 素 結 合 の 消 失 で 説 明 で き る。

最 後 に AO の 反 応 機 構 に つ き 述 べ る。AO は Glu1261 に 相 当 す る グ ル タ ミ ン 酸 は 保 存 さ れ て い る。し か し Glu802、

Arg880 に 相 当 す る 残 基 は 疎 水 性 ア ミ ノ 酸 と な っ て い る た め、図 7C で 示 し た 水 素 結 合 に よ る 求 核 攻 撃 の 促 進 は 必 要 な い。ア ル デ ヒ ド の 場 合、求 核 攻 撃 を 受 け る 炭 素 に 電 気 陰 性 度 の 高 い =O が 存 在 し て お り、-O⁻ に よ る 求 核 攻 撃 を 受 け や す い 状 態 に な っ て い る と 考 え ら れ る。理 論 計 算 に よ れ ば、基 質 ホ ル ム ア ミ ド の 結 合 に よ り -OH か ら Glu1261 へ の プ ロ ト ン の 移 行 が 促 進 さ れ る⁵¹⁾。

文 献

- 1) Stiefel, E.I. (2002) in *Metal Ions in Biological System* (Sigel, A. & Sigel, H. eds.), pp. 1-29, Marcel Dekker, New York.
- 2) Hille, R. (2002) *Trends Biochem. Sci.*, **27**, 360-363.
- 3) Hille, R. (1996) *Chem. Rev.*, **96**, 2757-2816.
- 4) Mendel, R.R. (2007) *J. Exp. Bot.*, **58**, 2289-2296.
- 5) Schardinger, F. (1902) *Untersuch Nahrungs Genussmittel*, **5**, 1113-1121.
- 6) Beinert, H. (1985) *Biochem. Soc. Trans.*, **13**, 542-547.
- 7) Bray, R.C. (1988) *Q. Rev. Biophys.*, **21**, 299-329.
- 8) Massey, V. & Harris, C.M. (1997) *Biochem. Soc. Trans.*, **25**, 750-755.
- 9) Elion, G.B. (1989) *Science*, **244**, 41-47.
- 10) Hille, R. & Nishino, T. (1995) *Faseb J.*, **9**, 995-1003.
- 11) Nishino, T. (1994) *J. Biochem. (Tokyo)*, **116**, 1-6.
- 12) McCord, J.M. (1985) *N. Engl. J. Med.*, **312**, 159-163.
- 13) Vorbach, C., Scriven, A., & Capecchi, M.R. (2002) *Genes Dev.*, **16**, 3223-3235.
- 14) Enroth, C., Eger, B.T., Okamoto, K., Nishino, T., Nishino, T., & Pai, E.F. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 10723-10728.
- 15) Kuwabara, Y., Nishino, T., Okamoto, K., Matsumura, T., Eger, B.T., Pai, E.F., & Nishino, T. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 8170-8175.
- 16) Nishino, T., Okamoto, K., Kawaguchi, Y., Hori, H., Matsumura, T., Eger, B.T., Pai, E.F., & Nishino, T. (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 24888-24894.
- 17) Asai, R., Nishino, T., Matsumura, T., Okamoto, K., Igarashi, K., Pai, E.F., & Nishino, T. (2007) *J. Biochem. (Tokyo)*, **141**, 525-534.
- 18) 西野 武士 (1989) 蛋白質核酸酵素, **34**, 1978-1988.
- 19) 岡本 研, 桑原慶充, 西野 朋子, 西野 武士 (2004) 蛋白質核酸酵素, **49**, 625-633.
- 20) 岡本 研, 西野 武士 (2006) 実験医学, **24**, 1724-1730.
- 21) Nishino, T. (2008) *FEBS J.*, in press.
- 22) Nishino, T., Amaya, Y., Kawamoto, S., Kashima, Y., Okamoto, K., & Nishino, T. (2002) *J. Biochem. (Tokyo)*, **132**, 597-606.
- 23) Hille, R., Hagen, W.R., & Dunham, W.R. (1985) *J. Biol. Chem.*, **260**, 10569-10575.
- 24) Palmer, G. & Massey, V. (1969) *J. Biol. Chem.*, **244**, 2614-2620.
- 25) Bray, R.C. (1975) in *The Enzymes* (Boyer, P.D. ed.), vol. 12, pp. 299-419, Academic Press, New York.
- 26) Truglio, J.J., Theis, K., Leimkuhler, S., Rappa, R., Rajagopalan, K.V., & Kisker, C. (2002) *Structure*, **10**, 115-125.
- 27) Cramer, S.P., Johnson, J.L., Rajagopalan, K.V., & Sorrell, T.N. (1979) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **91**, 434-439.
- 28) Romao, M.J., Archer, M., Moura, I., Moura, J.J., LeGall, J., Engl, R., Schneider, M., Hof, P., & Huber, R. (1995) *Science*,

- 270, 1170–1176.
- 29) Huber, R., Hof, P., Duarte, R.O., Moura, J.J., Moura, I., Liu, M.Y., LeGall, J., Hille, R., Archer, M., & Romao, M.J. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 8846–8851.
- 30) Okamoto, K., Matsumoto, K., Hille, R., Eger, B.T., Pai, E.F., & Nishino, T. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 7931–7936.
- 31) Jones, R.M., Inscore, F.E., Hille, R., & Kirk, M.L. (1999) *Inorg Chem.*, **38**, 4963–4970.
- 32) Doonan, C.J., Stockert, A., Hille, R., & George, G.N. (2005) *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 4518–4522.
- 33) Holm, R.H. (1990) *Cood. Chem. Rev.*, **100**, 183–221.
- 34) Avis, P.G., Bergel, F., Bray, R.C., & Shooter, K.V. (1954) *Nature*, **173**, 1230–1231.
- 35) Nishino, T., Nishino, T., & Tsushima, K. (1981) *FEBS Lett.*, **131**, 369–372.
- 36) Eger, B.T., Okamoto, K., Enroth, C., Sato, M., Nishino, T., Pai, E.F., & Nishino, T. (2000) *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, **56**, 1656–1658.
- 37) Iwasaki, T., Okamoto, K., Nishino, T., Mizushima, J., & Hori, H. (2000) *J. Biochem. (Tokyo)*, **127**, 771–778.
- 38) Nishino, T. & Okamoto, K. (2000) *J. Inorg. Biochem.*, **82**, 43–49.
- 39) Okamoto, K., Eger, B.T., Nishino, T., Kondo, S., Pai, E.F., & Nishino, T. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 1848–1855.
- 40) Fukunari, A., Okamoto, K., Nishino, T., Eger, B.T., Pai, E.F., Kamezawa, M., Yamada, I., & Kato, N. (2004) *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **311**, 519–528.
- 41) Okamoto, K., Eger, B.T., Nishino, T., Pai, E.F., & Nishino, T. (2008) *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, in press.
- 42) Leimkuhler, S., Stockert, A.L., Igarashi, K., Nishino, T., & Hille, R. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 40437–40444.
- 43) Yamaguchi, Y., Matsumura, T., Ichida, K., Okamoto, K., & Nishino, T. (2007) *J. Biochem. (Tokyo)*, **141**, 513–524.
- 44) Glatigny, A., Hof, P., Romao, M.J., Huber, R., & Scazzocchio, C. (1998) *J. Mol. Biol.*, **278**, 431–438.
- 45) Pauff, J.M., Hemann, C.F., Junemann, N., Leimkuhler, S., & Hille, R. (2007) *J. Biol. Chem.*, **282**, 12785–12790.
- 46) Xia, M., Dempski, R., & Hille, R. (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 3323–3330.
- 47) Maiti, N.C., Tomita, T., Kitagawa, T., Okamoto, K., & Nishino, T. (2003) *J. Biol. Inorg. Chem.*, **8**, 327–333.
- 48) Howes, B.D., Bray, R.C., Richards, R.L., Turner, N.A., Bennett, B., & Lowe, D. (1996) *J. Biochemistry*, **35**, 1432–1443.
- 49) Lowe, D.J., Richards, R.L., & Bray, R.C. (1997) *Biochem. Soc. Trans.*, **25**, 774–778.
- 50) Xia, M., Ilich, P., Dempski, R., & Hille, R. (1997) *Biochem. Soc. Trans.*, **25**, 768–773.
- 51) Amano, T., Ochi, N., Sato, H., & Sakaki, S. (2007) *J. Am. Chem. Soc.*, **129**, 8131–8138.
- 52) Garattini, E., Mendel, R., Romao, M.J., Wright, R., & Terao, M. (2003) *Biochem. J.*, **372**, 15–32.
- 53) Massey, V., Komai, H., Palmer, G., & Elion, G.B. (1970) *J. Biol. Chem.*, **245**, 2837–2844.
- 54) Huh, K., Yamamoto, I., Gohda, E., & Iwata, H. (1976) *Jpn. J. Pharmacol.*, **26**, 719–724.
- 55) Ichida, K., Kamatani, N., Nishino, T., Saji, M., Okabe, H., & Hosoya, T. (1998) *Adv. Exp. Med. Biol.*, **431**, 327–330.
- 56) Jezewska, M.M. (1973) *Eur. J. Biochem.*, **36**, 385–390.
- 57) Pauff, J.M., Zhang, J., Bell, C.E., & Hille, R. (2008) *J. Biol. Chem.*, **283**, 4818–4824.
- 58) Lorigan, G.A., Britt, R.D., Kim, J.H., & Hille, R. (1994) *Biochim. Biophys. Acta*, **1185**, 284–294.
-