特集:タンパク質の化学構造から生物機能に迫る

D-アミノ酸酸化酵素の様々な構造と反応機構

二科安三

ブタ腎臓の p-アミノ酸酸化酵素 (DAO) は最も研究されてきたフラビン酵素の一つで ある. DAO は p-アミノ酸を酸化してイミノ酸にする反応を触媒する酵素で,基質特異性 が広い. 中性 p-アミノ酸は良基質,塩基性 p-アミノ酸は貧基質であり,酸性 p-アミノ酸 は基質にならない. 基質類似体との複合体と反応中間体の活性部位の構造が結晶構造解析 により明らかにされた. この構造を基礎に酸化型,セミキノン型,還元型酵素におけるフ ラビンの荷電状態,基質類似体の結合特性,基質特異性,フラビン周りの水素結合ネット ワークについて具体的に議論できるようになった.基質類似体 o-アミノ安息香酸との複 合体の構造を出発モデルに DAO-基質 (p-ロイシン) 複合体のモデル化が行われた. この モデルとこれまで蓄積された物理化学的ならびに酵素化学的研究の結果に基づいて新たに 提案された反応機構を紹介する.

1. はじめに

D-アミノ酸酸化酵素 (DAO) は生物界に広く分布し、微 生物から高等動物にいたるまでその様々な臓器・組織に存 在している. ブタ腎臓由来の DAO は Hans Krebs によって 1935年に初めての FAD 酵素,初めての高等動物のフラビ ン酵素として発見され¹⁾、それ以来莫大な数の研究がなさ れてきた²⁾. この酵素のX線結晶構造解析は1996年に著 者らとイタリアのグループによりそれぞれ独立に報告され た^{3,4)}. その年にカナダで開かれた「第12回フラビンおよ びフラビンタンパク質に関する国際シンポジウム | での両 グループの報告は注目された. それは、この"古い"フラ ビン酵素の三次元構造がやっとわかったこと, DAO の研 究の歴史が長く、DAO を対象に研究したことのある研究 者が多くいること、また、長年論争されている反応機構に 決着がつくのではとの期待からかもしれない. DAO の生 理的役割は長らく不明であったが, 脳内に比較的高濃度に 存在し、神経伝達物質として作用する D-セリンの代謝を

熊本大学医学部保健学科(〒862-0976 熊本市九品寺 4-24-1)

Structure and reaction mechanism of _D-amino acid oxidase Yasuzo Nishina (School of Health Sciences, Kumamoto University, Kuhonji 4–24–1, Kumamoto 862–0976, Japan) 介しての神経伝達の調節への関与が指摘されている⁵.

DAOは、p-アミノ酸を酸化してα-イミノ酸にする反応 を触媒する. α -イミノ酸は非酵素的に加水分解されて α -ケト酸とアンモニアになる.DAOの基質特異性は広く、 D-プロリンのような中性 D-アミノ酸は良基質であり, D-ア ルギニンのような塩基性 D-アミノ酸は貧基質である.た だし,酸性アミノ酸である p-アスパラギン酸や p-グルタ ミン酸は基質にならず、これらを酸化する別のフラビン酵 素 D-アスパラギン酸酸化酵素がある.フラビン酵素が触 媒する酸化酵素反応は一般に二つの半反応、すなわち還元 的半反応と酸化的半反応からなる. DAO では、還元的半 反応で基質から電子をもらい還元されたフラビンは、酸化 的半反応で酸素によって再酸化され、過酸化水素を生じる (図1). 基質が中性 D-アミノ酸では下のループ,塩基性 D-アミノ酸では上のループで反応が進む. E・FAD⁻…P はそ の特徴的な色にちなんで紫色中間体 (purple complex) と呼 ばれ、還元型 DAO と生成物イミノ酸との電荷移動複合体 である.紫色中間体は塩基性 D-アミノ酸の場合には観測 されない. ここまでは、反応速度論的研究などによって確 立している. 論争の一つは, 還元的半反応の機構として提 案された「カルボアニオン機構⁶|と「協奏反応機構^{7,8}| である.前者はタンパク質の触媒塩基が基質のα-水素を 引抜き、カルボアニオンを生ずるのが特徴である、後者は



図1 DAOの触媒サイクル S:基質 D-アミノ酸 RCHNH₂COOH, P:生成物イミノ 酸 RC=NH₂COOH. Pは非酵素的に加水分解し2-ケト 酸とアンモニアになる.紫色中間体はアニオン型還元 型フラビンと両性イオン型イミノ酸との複合体であ る.中性アミノ酸は下のループ,塩基性アミノ酸は上 のループの経路で反応する.

タンパク質の触媒塩基による α-水素の引抜きとアミノ基 の窒素からフラビンへの電子移動が協奏的に起こるとする ものである.どちらの機構も基質の α-水素を引抜くため の塩基の存在を前提としている.ところが,結晶構造解析 で明らかにされた活性部位の構造は,これらの両機構を明 確に否定するものであった.活性部位には α-水素を引抜 くための触媒塩基になるようなアミノ酸残基が存在しな かったのである.それでは,DAOの反応はどのようなし くみで進むのだろう.

ブタ腎臓のDAOに続いて,酵母由来,ヒト由来の DAOの結晶構造解析がなされた^{9,10)}.また,DAOの構造, 機能,触媒機構に関する総説が最近発表されている^{11~15)}. 本稿では,長年の研究でデータの蓄積があり,著者らが研 究対象としてきたブタ腎臓のDAOに対象を絞り,明らか になった立体構造を基礎に,蓄積されたデータの解析がど のように進んだか,新たにどのような研究がなされたか, そして否定された反応機構に代わって提案された反応機構 を紹介する.

2. DAO-基質類似体複合体の三次元構造

結晶解析に用いた DAO は大腸菌による発現系を利用し て精製した.最初の解析は DAO-安息香酸複合体について 行った³⁾.数多く知られる基質類似体の中にあって,安息 香酸は代表的なものであり,DAO 精製時の熱安定化剤と しても利用されている.次に *o*-アミノ安息香酸(OAB)と の複合体の構造を解析した¹⁶⁾.OAB は分子内に近接して カルボキシル基とアミノ基をもち,基質と特に類似した構 造をしている.後でこの複合体の構造を出発モデルとした 酵素-基質複合体のモデル化を紹介する.両複合体の全体 構造はほぼ同じで二量体構造をとっており,二つのサブユ ニットは非結晶学的 2 回軸によって関係づけられている (図 2).各サブユニットは,α/β構造と,擬バレル構造の



図2 DAO-安息香酸複合体の二量体構造 FADと安息香酸は ball & stick モデルで示している.DAOの全 体構造は、二つの同一のサブユニットからなる二量体で細長い 楕円形をしており、各サブユニットは、非結晶学的二回軸で関 係づけられている.

二つの領域からなっている.FADのフラビン部分は二つ の領域の境界付近にあり,擬バレル構造の壁によって活性 部位の大きさが決められている(図3).FADは、伸びた コンホメーションをとっており、ADP部分はN末端部の βαβジヌクレオチド結合モチーフに近接し、この部分のα ヘリックス双極子がピロリン酸の負電荷を安定化してい る.βαβモチーフのC末端から始まるループは、FADの ピロリン酸部分からリビチル部分に沿ってフラビン環の N(5)に関してのsi-面(図4の説明を参照)にまで伸び ていて、Val47-Ala48-Ala49-Val50の疎水性残基がsi-面を 覆い、基質のsi-面からの接近を妨げている(図8を参照).

両複合体における安息香酸とOABの活性部位での配置 も概ね同じだった.OABの結合領域をみると(図4), OABはFADのフラビン環と互いに面が平行で,フラビン 環のre-面に位置している.これらのことは,DAOの反応 が,フラビン環のre-面側で進行するという立体化学と一 致している¹⁷⁾.OABのカルボキシラートは,Arg283とイ オン対を作り,さらにTyr228の水酸基と相互作用してい る.カルボキシル基が解離していることは共鳴ラマン分光 の実験で確認されている¹⁸⁾.一方,アミノ基は,フラビン のウラシル部分の上部に位置する Gly313の主鎖 C=O と水



図3 DAO-OAB 複合体の単量体構造 FAD と OAB は ball & stick モデルで示している. FAD のフラ ビン部分は、 α/β 構造と擬バレル構造の二つの領域の境界付近 にある. N(1) に α へリックスが向かっているのがわかる. 素結合している.図には示していないが,このC=Oは結 合水と水素結合しており,この水はGly53の主鎖C=Oお よびTyr224の水酸基とも水素結合している.Tyr224のベ ンゼン環は,OABのベンゼン環と平行になっており, OAB平面は,フラビン環とTyr224のベンゼン環に挟まれ るような配置にある.OABのベンゼン環は,図には示し ていないがLeu51, Ile215, Ile230の側鎖が作る疎水性の 環境にあり,DAOが非極性側鎖アミノ酸に高い親和性を もつことと符合する.

DAOの拮抗阻害剤として莫大な数の安息香酸誘導体が 知られている¹⁹. DAOとの解離定数は安息香酸の 3µM, OABの20µMに対して, o-メチル安息香酸では3mMと著 しく大きい.また,オルト置換体の親和性は,メチル基で はメタやパラ置換体より低く,アミノ基では逆に高い.o-メチル安息香酸の親和性が低いのは活性部位での何らかの 立体障害による交換反発力が原因とされていた.o-メチル 安息香酸が結合したと想定すると,メチル基はGly313の 主鎖 C=Oに向かうかTyr224のベンゼン環に向かうかであ る.いずれにしてもメチル基はそれらの残基と立体障害を 生じるまで近接してしまい,親和性が低下すると考えられ る²⁰.一方,OABでは,Gly313の主鎖のカルボニル酸素 とOABのアミノ基が水素結合を形成することにより親和 性が高くなる.ここには示さないが,置換基が水酸基の場 合もオルト置換体の親和性が高い.おそらくこの水酸基も



図4 DAO-OAB 複合体の活性部位 フラビンの上面, すなわち OAB が配置している面が, フラビンのN(5)に関しての *re*-面であり, 下面が *si*-面である.

同様に Gly313 と水素結合をつくると考えられる.

安息香酸のメタやパラ位置換体との親和性は置換基のハ メットσパラメータ, すなわち置換基の電子供与性や電 子求引性の強さと相関する^{21,22)}.これは活性部位が広くて、 メチル基程度の置換基がメタ位やパラ位にあっても立体障 害が起こらないことを示しており、そのことは活性部位の 構造からも確認できる.置換基の電子吸引力が強いと,安 息香酸誘導体のカルボキシラートの負電荷が減少するの で、グアニジノ基とのイオン対の静電引力が小さくなると 考えられる.したがって、この静電引力だけが基質類似体 を引きつける力だとすると親和性が低下するはずである. ところが実際には、電子吸引性の強い Fや Cl などの置換 体では親和性が高くなり,電子供与性の強いメチル置換体 などでは低くなっている、そこで、イオン対による静電力 のほかにも別の相互作用があるはずで、それは安息香酸誘 導体のベンゼン環とタンパク質の側鎖の芳香環のπ軌道 の重なりによると予想された²¹⁾.電子吸引性基の置換で親 和性が高くなることから、相互作用の相手は電子供与体と 考えられる. 安息香酸まわりの構造を見ると、該当するの はTyr224で、そのベンゼン環が電子供与体、安息香酸誘 導体のベンゼン環が電子受容体として作用し、それらの間 での最高被占軌道(HOMO)-最低空軌道(LUMO)間相互 作用が結合力になっているものと考えられる.

酸化型フラビンと安息香酸誘導体のベンゼン環との相互 作用もありうるが、これは小さいと考えられる.もし逆に 大きければ、親和性とハメットのパラメータとの相関が 逆になるはずである.この場合、化学的性質から酸化型フ ラビンは電子受容体、安息香酸は電子供与体として作用す ると考えられるからである.事実、構造の情報からは安息 香酸や OAB のベンゼン環はフラビン環よりも Tyr224 の ベンゼン環との重なりが大きなことがわかる.

3. 紫色中間体の三次元構造

DAOの紫色中間体は生成物イミノ酸と還元型フラビン との電荷移動複合体である.イミノ酸は両性イオン型,還 元型フラビンはアニオン型構造であることは,共鳴ラマン 分光法と NMR による研究で示されている^{23,24)}.紫色中間 体は再酸化過程で酸素と反応する成分であり,また逆反応 におけるミカエリス複合体でもあるので,反応機構を考え る上で重要な中間体である.図5は D-プロリンを基質と したときの紫色中間体の三次元構造から明らかにされたイ ミノ酸とフラビンの配置を示している²⁵⁾.プロリンの生成 物Δ¹-ピロリジン-2-カルボン酸 (DPC)は加水分解しないの で結晶化に適した試料である.二量体構造やサブユニット の折りたたみなど全体構造は DAO-安息香酸複合体のもの とほぼ同じである.DPC のカルボキシラートは Arg283 と イオン対を形成し, Tyr228 の水酸基と水素結合している.



図5 還元型フラビンと DPC の電荷移動相互作用 紫色中間体の構造に基づき DPC の LUMO と還元型フラビンの HOMO との軌道の重なりを示している.

DPC の⁺HN=C 二重結合は還元型フラビンの N(5)-C(4a) 結合と重なり合っている. その結果,還元型フラビンの HOMO と DPC の LUMO の重なりによる電荷移動相互作 用が働くが,その軌道の重なりは大きさならびに対称性が 適した配置になっている.

4. フラビンの荷電状態

反応がいかなる経路で進むかにかかわらず,還元的半反応では、全体としてヒドリドイオン(H⁻)と等価なものが、基質からフラビンに移動することになる.DAOの活性部位は疎水的であり、水溶液中に比べて静電力が大きいので、基質認識や反応進行に静電相互作用の関与が大きいと考えられる.したがって、活性部位にどのような電荷があるのかを知ることが重要である.活性部位にはアミノ酸残基に由来する電荷としてはArg283の正電荷しかない.他に活性部位に電荷を持ち込めるものは基質(基質類似体)か補酵素のフラビンである.フラビンはそれぞれの酸化還元状態(酸化型,一電子還元されたセミキノン型,還元型)で、異なるイオン状態が存在する(図6).

フラビンは DAO に結合すると,酸化型,セミキノン 型,還元型フラビンの pKa 値が水溶液中に比べてそれぞ れで,10→9.2,8.3→4.0,6.7→<1のように小さくなる (セミキノン型と還元型 DAO の pKa 値は推定値²⁰⁾).酸化 型 DAO の pKa 値の低下(0.8pH 単位)は活性部位に正電 荷が存在することによると推定されたが¹⁹⁾,活性部位を見



図6 フラビンの酸化還元状態とイオン化状態

ると該当するのは Arg283 の正電荷である. セミキノン型 や還元型 DAO の pKa 値の低下 (それぞれ4.3と5.7pH 単位以上) はかなり大きい. これは Arg283 の正電荷に加 えてフラビンの N(1) 近傍に存在する α へリックス双極 子がアニオン型を安定化することによる (図3). また, 還元型 DAO で pKa 値が極端に低下するが,その最大の要 因は,還元型フラビンの N(1) にプロトンが結合した場 合,その水素原子が,図には示していないが,Gly315 の N-H の水素原子と立体障害を起こすことにあると考えら れる²⁰.

Arg283の正電荷とフラビンの荷電状態を考えると,生 理的な pH では活性部位に,酸化型では+1の電荷がある が,セミキノンおよび還元型では Arg283の正電荷がフラ ビンの負電荷で打ち消されるので全体として電荷はない. 活性部位は疎水的な環境なので,実効電荷があると熱力学 的に不安定になる.酸化型 DAO にモノアニオンである安 息香酸が結合すると,そのカルボキシラートが Arg283の グアニジノ基とイオン対をつくり,全体として電荷を打ち 消すので,フラビンの中性型が安定であり,N(3)-Hの pKa 値が大きくなる¹⁹.

一方,両性イオン型リガンドであるトリゴネリン (*N*-メチルイソニコチン酸)が結合すると,同様のイオン対を 作った後に,トリゴネリンの窒素に正電荷が残ることにな り,活性部位からプロトンを放出しやすくなる.その結 果,フラビンのN(3)-HのpKa値は8.0に低下する²⁶⁾. 基 質 D-アミノ酸はアミノ基に解離できるプロトンをもつ両 性イオン型をしているので,活性部位に入ると活性部位の 中性を維持するためにカチオン型のアミノ基からプロトン が解離すると考えられる.これは触媒過程での基質活性化 に重要であり,後で DAO-OAB 複合体の構造をモデルと してミカエリス複合体モデルを構築する根拠の一つであ る.

セミキノン型 DAO では、トリゴネリンのような両性 イオン型リガンドが結合すると、カルボキシラートは Arg283 とイオン対を作り、アニオン型セミキノンの負電 荷は窒素原子上の正電荷で相殺される.その結果、活性部 位の荷電状況には変化がなく、静電的に安定である.一 方、安息香酸のようなモノアニオンが入ると安息香酸のカ ルボキシラートと Arg283 のグアニジノ基とのイオン対に より負電荷が一つ残ることになる.したがって、全体とし て負電荷を打ち消すためにセミキノンはプロトンを取り込 んだ中性型が安定化する²⁷⁾.

酸化型 DAO に対する親和性が高い安息香酸が還元型 DAO になぜ結合しないのか,著者らは長年不思議に思っ ていた.原因は、上で説明したようなしくみで還元型 DAO のフラビンの pKa 値が<1と極端に低いことにあっ た.安息香酸は中性の還元型 DAO には結合できるだろう が、あまりに pKa 値が低くて安息香酸を高濃度に共存さ せても中性型還元型 DAO に十分シフトできないのであ る.以上をまとめると,酸化型 DAO に結合する基質や基 質類似体はモノアニオン型が有利であり,アニオン型のセ ミキノンや還元型 DAO では両性イオン型が有利である. これは活性部位が疎水的であり,実効電荷が存在すると熱 力学的に不安定になることに起因する.

5. 基質特異性

DAO は基質特異性が広く、多くのアミノ酸を酸化する ことができる.しかし、D-アミノ酸の荷電状態の点からす ると厳密な特異性があるといえる.すなわち中性 D-アミ ノ酸は良基質であり、塩基性 D-アミノ酸は貧基質であり、 酸性 D-アミノ酸は基質にはならない.最近神経系に D-セ リンや D-アスパラギン酸の存在が知られており、DAO が D-セリンを基質とするが D-アスパラギン酸を基質としない 特異性は神経伝達の調節にとって重要である.

基質が活性部位に入り ES 複合体を作ると,先に説明し た理由でカチオン型アミノ基(-NH^{*})はプロトンを解離 させるだろう.その結果,中性,塩基性,酸性 D-アミノ 酸はそれぞれモノアニオン,両性イオン,ジアニオン型に なる.したがって,安息香酸(モノアニオン),トリゴネ リン(両性イオン),テレフタール酸(ジアニオン)は, 荷電状態の点でいえば DAO に結合した各基質のよいモデ ルになる.DAO は安息香酸よりトリゴネリンに親和性が 小さく,テレフタール酸には親和性がない.この親和性の 違いが基質特異性の一つの要因と考えられる.

塩基性 D-アミノ酸が紫色中間体を形成できないことも 貧基質である理由の一つである.酸素との反応性が低い遊 離の還元型 DAO から再酸化が進むことになるからであ る.紫色中間体を形成できないことは、活性部位にある荷 電を考えると理解できる.還元型酵素の活性部位には、 Arg283の正電荷と還元型フラビンの負電荷があり全体と して実効電荷がない.基質が中性の D-アミノ酸では、生 じた両性イオン型のイミノ酸がその還元型 DAO の活性部 位で複合体を作ることになり全体として電荷はない.とこ ろが、塩基性 D-アミノ酸の場合、1 個余分に正電荷をもち 込むことになり、熱力学的に不安定で紫色中間体を形成で きないと考えられる.

6. DAO-基質モデル

DAO-OAB 複合体は 700nm あたりの長波長までブロー ドな吸収帯をもつ. この吸収帯は OAB からフラビンへの 電荷移動相互作用に基づくとされており,そのことは共鳴 ラマン分光法により証明された²⁸⁾. OAB の C(2)-N がフラ ビンの O=C(4) に重なり,OAB のカルボキシラート炭素 がフラビンの N(5) にかさなった配置をとっている(図 4).電荷移動相互作用は電子供与体の HOMO と電子受容



図7酸化型フラビンと OAB の電荷移動相互作用 DAO-OAB の構造に基づき OAB の HOMO と酸化型フラビン の LUMO との軌道の重なりを示している.

体の LOMO の重なりによって生じる.この複合体では, 化学的性質から酸化型フラビンは電子受容体そして OAB が電子供与体と考えられる.図7は OAB の HOMO とフ ラビンの LUMO の軌道を示している.軌道の重なりは対 称性と原子軌道の大きさを含め電荷移動相互作用に適して いることがわかる.先に述べたように,OAB は基質 p-ア ミノ酸と同じくアミノ基とカルボキシル基を近接してもつ ことに加え,次の理由からすぐれた基質類似体と考えられ る.OAB は DAO によって酸化はされないが,フラビンと 電荷移動複合体を形成し,電荷の一部がフラビンへ移った とみなすことができる.したがって,著者らは DAO-OAB 複合体は遷移状態アナログあるいはミカエリス複合体アナ ログと考えた.そうだとすると,OAB の結合状態を詳細 に検討すれば基質とフラビンとの反応のしくみに関して有 益な情報が得られるに違いない.

そこで、DAO-OAB 複合体の構造を出発モデルとして、 DAO-基質(D-ロイシン) 複合体を分子力学計算によって モデル化した(図8).先に示した安息香酸や OAB との複 合体同様、カルボキシラートは Arg283 のグアニジノ基と イオン対をつくり、さらに Tyr228 の水酸基と水素結合し ている.しかし、アミノ基はイオン対を作らず中性型であ る.D-ロイシンのアミノ基は Gly313 の主鎖のカルボニル 基と水素結合をしている.アミノ基の不対電子軌道はフラ ビンの C(4a) の方向に向かっている.別の重要な点は、



図8 DAO-D-ロイシン複合体モデル DAO-OAB 複合体の構造を出発モデルとして,分子力学計算によりモデル化した.フラビン環に みられる水素結合も示してある.

D-ロイシンの α-水素がフラビンの N(5)の不対電子に向かっていることである.

フラビン分子の反応性はフラビン環をめぐる水素結合 ネットワークによって微妙に調節されることがフロンティ ア分子軌道計算により示唆されている²⁹⁾.このネットワー クは、Thr317の水酸基がフラビンのC(2)=Oと水素結合 している以外はタンパク質主鎖との間で見られる.T317A の変異体では、この水素結合が消失していることが NMR ならびに共鳴ラマン分光法による研究で支持された³⁰⁾.こ の変異体では FAD との親和性が低下し、紫色中間体から 生成物が解離する速度(図1のk₃)が大きくなった.これ は Thr317 が紫色中間体の安定化を通じて酵素活性の最適 化に寄与していることを示唆している³⁰⁾.

ブタ腎臓 DAO とヒト脳_D-アスパラギン酸酸化酵素の一 次構造を比べると,DAO の I215-N225 とそれに対応する DDO の R216-G220 に注目すべき差が見られる.DAO の I215-N225 は,基質や生成物を出し入れする際のふたの機 能をするとされる領域 (T216-Y228)³¹⁾の一部である.DAO のこの部分を DDO の R216-G220 で置き換えると D-アラニ ンに対する活性が低下し,野生型 DAO では活性がなかっ た D-アスパラギン酸に対する酸化活性が現れた³²⁾.これ は,DAO の I215-N225 が基質認識に重要なことを示して いる.

7. 還元的半反応の反応機構

還元的半反応は基質からフラビンに電子がわたり基質は 酸化されフラビンは還元される過程であり、ミカエリス複 合体モデルは、このしくみを調べるのに非常に役に立つ. 「カルボアニオン機構」と「協奏反応機構」がどちらも前 提にしていた触媒塩基となるアミノ酸残基の存在が否定さ れた.したがって、ミカエリス複合体モデルとこれまで蓄 積された物理化学的ならびに酵素化学的な研究結果に基づ いて新たに反応機構を考える必要がある.

還元的半反応では,基質の Cα-H 結合が切断されて,α-水素は解離する.したがって,反応機構を明らかにするに は,α-水素がプロトン,水素原子,ヒドリドのどの状態で 解離するのかを知ることが重要である.これを考えるの に,β-クロロ-D-アラニンと DAO との反応が参考にな る^{6,33}.この反応では通常の酸化反応以外に塩酸の脱離反 応が起こる.この脱離反応では基質のα-水素はプロトン として解離するに違いない.また,基質結合部位は一つし かないので,脱離反応と酸化反応は同一の活性部位で進ま なければならない.したがって,通常の酸化反応でも基質 のα-水素はプロトンとして解離すると結論される.

ミカエリス複合体モデル(図8)から考えると,基質ア ミノ基の窒素の不対電子からフラビンのC(4a)への電子 移動とα-プロトンのフラビンN(5)位への移動としてま とめられる.フラビンN(5)がプロトン引抜きの塩基とし



図9 DAOの還元的半反応の機構

(A) 電子-プロトン-電子移動 (EPE) 機構

図10 アニオン型還元型フラビンの共鳴構造

(B) イオン反応機構

基質アミノ基の窒素の不対電子からフラビンのC(4a) への電子移動とα-プロトンがフラビン N(5) 位へ移動するとして考えられた二つの反応機構.



還元型フラビンの酸素による再酸化はフラビンのC(4a)から酸素への電子移動によるとされており、 C(4a)の電子密度が高い共鳴構造の寄与が増すと、酸素との反応性が大きくなると考えられる.酸 素と反応しない MCADの紫色中間体のアニオン型還元型フラビンのC(4a)での電子密度は DAOの 紫色中間体の場合に比べて低いことが実験的に示されている.

て作用している.そこで,これらのことを満たす二つの反応機構を以下に示す¹⁶.

電子-プロトン-電子移動(EPE)機構:EPE 機構の概略 を図9(A)に示している.基質アミノ基からフラビンに 一電子移動しアニオン型セミキノンになり,基質は両性イ オン型のラジカルになる.次に,フラビンのN(5)が基質 ラジカルからプロトンを引抜き,中性型フラビンラジカル を生成する.最後に,モノアニオン型基質ラジカルから中 性型フラビンラジカルに一電子がわたり紫色中間体にな る.フラビンの荷電状態で議論したが,この反応機構のど の過程も,活性部位に全体として電荷を含まず静電的に安 定な状態である.

イオン反応機構:この機構は,基質アミノ基の孤立電子 対の二電子がフラビンのC(4a)と共有結合を作る過程と α-プロトンのフラビンN(5)への移動が協奏的に進むとい うものである.生じたアニオン型中間体は,引き続きその 基質部分からフラビンへ二電子が移り紫色中間体になる.

8. 酸化的半反応

紫色中間体はアニオン型還元型フラビンと両性イオン型 イミノ酸との電荷移動複合体である.図10はアニオン型 還元型フラビンの共鳴構造を示している.還元型フラビン の酸素による再酸化はフラビンのC(4a)から酸素への電 子移動によるとされている³⁴⁾.したがって,C(4a)の電子 密度が高い共鳴構造の寄与が増すと,酸素との反応性が大 きくなる.紫色中間体では、フラビンのC(4a)にDPCの プロトン付加したカチオンが近接している(図5).この 近接が紫色中間体で共鳴構造Iの寄与を大きくし,酸素と の反応性を高めていると考えられる.

酸素と反応しない脱水素酵素と比べてみよう、脂肪酸の β酸化の初段の反応を触媒する FAD 酵素アシル CoA 脱水 素酵素 (ACD) は、アシル CoA と反応して紫色中間体 (還 元型 ACD と生成物エノイル CoA の電荷移動複合体)をつ くる.この紫色中間体は DAO とは異なり、電子伝達フラ ビンタンパク質に電子を渡して再酸化される. 中鎖アシル CoA 脱水素酵素 (MCAD) の紫色中間体では、アニオン 型還元型フラビンのC(4a) での電子密度が, 遊離の還元 型フラビンや DAO の紫色中間体の場合に比べて低いこと が NMR の研究から示されている³⁵⁾.また,還元型フラビ ンのC(4a)-C(10a) 結合次数は酸化酵素より脱水素酵素の ほうが大きいことが、種々の酵素で生じる紫色中間体の共 鳴ラマン分光の研究から示された³⁶⁾.これらの結果は、脱 水素酵素の場合, N(1)-C(2)=Oの領域に負電荷がたまっ た共鳴構造(IIやIII)の寄与が大きいことを示している. その結果、C(4a)の電子密度が減少し、酸素との反応性 が抑えられる. MCAD の場合, 還元型フラビンの N(1) と Thr136の水酸基との強い水素結合が共鳴構造Ⅱを安定化 している³⁷⁾. 一方, DAO の紫色中間体では, N(1) に水素 結合はなく、C(4a)近傍に生成物の正電荷が位置するこ とで, 共鳴構造1の寄与を大きくしている. したがって, アニオン型還元型フラビンの共鳴混成の比率を変えること が、還元型酵素と酸素との反応性を制御する一つのしくみ になっているようだ.

9. おわりに

DAOの構造解析が行われたことで、蓄積されたデータ をかなり具体的に理解できるようになった.反応機構に関 しては活性部位に触媒塩基が無いことを踏まえたものとし て、EPE 機構とイオン反応機構を紹介した.また、ここ では紹介していないが、活性部位の立体構造をもとにし て、D-アミノ酸のα-水素がヒドリドイオンとしてフラビ ンのN(5) に直接移動するヒドリド移動機構が提案されて いる^{4,9,38)}.現在のところどの機構で進むのか、決着はつい ていない.最近、MCADと基質類似体 3-チアアシル CoA との電荷移動複合体の結晶構造をもとにした密度汎関数法 によるモデル計算は、電荷移動複合体の性質を明らかに し、その有効性が示された³⁰⁾.酵母の DAO-基質複合体で は高分解能(1.2Å)の構造情報が得られている⁹.ブタ腎 臓の DAO でも、今後はより分解能の高い構造情報を得る とともに,その構造情報をもとにした酵素モデルの理論計 算が,基質認識および反応機構の電子論的理解を深めるの に益々重要になると考えられる.

ここで紹介した一連の研究は、広津建、宮原郁子、水谷 尚志(大阪市立大学大学院理学研究科)、志賀潔、三浦洌、 瀬戸山千秋、佐藤恭介、玉置治彦(熊本大学医学薬学研究 部)の諸先生と共同でなされたものです.感謝申し上げま す.

文 献

- 1) Krebs, H.A. (1935) Biochem. J., 29, 1620-1644.
- Curti, B., Ronchi, S., & Simonetta, M.P. (1992) in Chemistry and Biochemistry of Flavoenzymes (Müller, F. ed.), Vol. III, pp. 69–94, CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Mizutani, H., Miyahara, I., Hirotsu, K., Nishina, Y., Shiga, K., Setoyama, C., & Miura, R. (1996) J. Biochem., 120, 14–17.
- Mattevi, A., Vanoni, M.A., Todone, F., Rizzi, M., Teplyakov, A., Coda, A., Bolognesi, M., & Curti, B. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 7469–7501.
- Schell, M.J., Molliver, M.E., & Snyder, S.H. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92, 3948–3952.
- Walsh, C.T., Schonbrunn, A., & Abeles, R.H. (1971) J. Biol. Chem., 246, 6855–6866.
- 7) 三浦 洌, 三宅可浩, 山野俊雄(1985) 生化学, 57, 103-116.
- 8) Miura, R. & Miyake, Y. (1988) Bioorg. Chem., 16, 97-110.
- Umhau, S., Pollegioni, L., Molla, G., Diederichs, K., Welte, W., Pilone, M.S., & Ghisla, S. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA, 97, 12463–12468.
- Kawazoe, T., Tsuge, H., Pilone, M.S., & Fukui, K. (2006) Protein Sci., 15, 2708–2717.
- 11) Miura, R. (2001) Chem. Rec., 1, 183-194.
- 12) Miura, R., Setoyama, C., Nishina, Y., Shiga, K., Miyahara, I., Mizutani, H., & Hirotsu, K. (2001) J. Mol. Cat. B: Enzymatic, 12, 43–52.
- 13) Tishkov, V.I. & Khoronenkova, S.V. (2005) *Biochemistry* (*Moscow*), **70**, 40–54.
- Pollegioni, L., Piubelli, L., Sacchi, S., Pilone, M.S., & Molla, G. (2007) Cell. Mol. Life Sci., 64, 1373–1394.
- 15) Kawazoe, T., Park, H.K., Iwana, S., Tsuge, H., & Fukui, K. (2007) Chem. Rec., 7, 305–315.
- 16) Miura, R., Setoyama, C., Nishina, Y., Shiga, K., Mizutani, H., Miyahara, I., & Hirotsu, K. (1997) J. Biochem., 122, 825–833.
- 17) Manstein, D.J., Massey, V., Ghisla, S., & Pai, E.F. (1988) Biochemistry, 27, 2300–2305.
- 18) Nishina, Y., Sato, K., Shi, R., Setoyama, C., Miura, R., & Shiga, K. (2001) J. Biochem., 130, 637–647.
- 19) Massey, V. & Ganther, H. (1965) Biochemistry, 4, 1161-1173.
- 20) Nishina, Y., Sato, K., Miura, R., & Shiga, K. (2000) J. Biochem., 213–223.
- 21) Fonda, M.L. & Anderson, B.M. (1968) J. Biol. Chem., 243, 1931–1935.
- 22) Horiike, K., Shiga, K., Isomoto, A., & Yamano, T. (1974) J. Biochem., 75, 925–929.
- 23) Nishina, Y., Shiga, K., Miura, R., Tojo, H., Ohta, M., Miyake, Y., Yamano, T., & Watari, H. (1983) J. Biochem., 94, 1979-

1990.

- 24) Miura, R. & Miyake, Y. (1987) J. Biochem., 102, 1345-1354.
- 25) Mizutani, H., Miyahara, I., Hirotsu, K., Nishina, Y., Shiga, K., Setoyama, C., & Miura, R. (2000) J. Biochem., 128, 73–81.
- 26) Nishina, Y., Sato, K., & Shiga, K. (1990) J. Biochem., 107, 726–731.
- 27) Yagi, K., Takai, A., & Ohishi, N. (1972) Biochim. Biophys. Acta, 289, 37–43.
- 28) Nishina, Y., Shiga, K., Tojo, H., Miura, R., Watari, H., & Yamano, T. (1981) J. Biochem., 90, 1515–1620.
- 29) Nishimoto, K., Kai, E., & Yagi, K. (1984) Biochim. Biophys. Acta, 802, 321–325.
- 30) Setoyama, C., Nishina, Y., Tamaoki, H., Mizutani, H., Miyahara, I., Hirotsu, K., Shiga, K., & Miura, R. (2002) *J. Biochem.*, 131, 59–69.
- 31) Todone, F., Vanoni, M.A., Mozzarelli, A., Bolognesi, M., Coda, A., Curti, B., & Mattevi, A. (1997) *Biochemistry*, 36, 5853–5860.

- 32) Setoyama, C., Nishina, Y., Mizutani, H., Miyahara, I., Hirotsu, K., Kamiya, N., Shiga, K., & Miura, R. (2006) *J. Biochem.*, 139, 873–879.
- 33) Miyake, Y., Abe, T., & Yamano, T. (1972) Z. Naturforsch., 27b, 1376–1378.
- 34) Müller, F. (1991) in Chemistry and Biochemistry of Flavoenzymes (Müller, F. ed.), Vol. I, pp. 1–71, CRC Press, Boca Raton, Florida.
- 35) Miura, R., Nishina, Y., Sato, K., Fujii, S., Kuroda, K., & Shiga, K. (1993) J. Biochem., 113, 106–113.
- 36) Nishina, Y., Sato, K., Miura, R., Matsui, K., & Shiga, K. (1998) J. Biochem., 124, 200–208.
- 37) Kim, J.-J.P., Wang, M., & Paschke, R. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 7523–7527.
- 38) Pollegioni, L., Blodig, W., & Ghisla, S. (1997) J. Biol. Chem., 272, 4924–4934.
- 39) Tanaka, T., Tamaoki, H., Nishina, Y., Shiga, K., Ohno, T., & Miura, R. (2006) J. Biochem., 139, 847–855.