

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24570247

研究課題名(和文) 酵素の立体選択性におけるフレキシビリティが生まれる原因解明

研究課題名(英文) Investigating the result for emergence of flexible enzyme stereospecificity

## 研究代表者

島田 秋彦 (SHIMADA, Akihiko)

筑波大学・生命環境系・講師

研究者番号：90235614

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：一般にD-アミノ酸は酵素に不活性である。厳格な立体選択性を持つトリプトファナーゼもまたD-セリンのようなD-アミノ酸に不活性である。しかし、高濃度リン酸アンモニウム存在下では全く逆の活性基質に転じる。通常常識では、光学異性体に対する酵素の立体選択性は絶対的で変化することはないと考えられているので、このような現象は不可解である。そこで、この原因を明らかにするため今回の基盤研究Cで申請した研究計画を実施した。その結果、トリプトファナーゼの立体選択性にフレキシビリティが生じる原因は、リン酸トリアンモニウム存在下の酵素・D-セリン複合体形成のプロセスにあることがわかった。

研究成果の概要(英文)：Generally speaking, D-amino acids are inert to enzyme. Tryptophanase with absolute enantioselectivity is also inactive on D-serine. However it conversely turns around to active substrate in the presence of concentrate triammoniumphosphate. This reaction is mysterious because enzyme enantioselectivity is absolutely constant in enzymological common sense. Thereby this research, Grant-in-Aid for Scientific Research (C), was programed to figure out its reaction mechanism. It turned out that the flexible enantioselectivity was ascribed to the process of enzyme-D-serine complex formation in the presence of triammonium phosphate.

研究分野：生命の起原

キーワード：トリプトファナーゼ D-セリン リン酸トリアンモニウム ホモキラリティーの起原

### 1. 研究開始当初の背景

光学活性起原の問題は、多くの研究者の関心を惹きつけ種々の説が提案されているものの、未だコンセンサスは得られていない。この問題が難問である所以は、L-アミノ酸を排他的に選択している厳格堅牢な酵素の立体選択性のメカニズムが良く分かっていないからである。本研究はこのメカニズムを明らかにするため酵素：トリプトファンゼの立体選択性について研究してきた。トリプトファンゼの立体選択性もまた絶対的なものでD-セリンやD-トリプトファンのようなD-アミノ酸には全くのところ不活性である。しかし、驚いたことに高濃度リン酸アンモニウム存在下ではそれらは逆に活性基質に転じる。これまでの研究で、厳格堅牢だったはずの酵素の立体選択性は意外にもフレキシビリティのあるものだということがわかってきた。そして、このことは分解反応のみならず合成反応においても確かめることができた。特に合成反応でそのようなことが起きたことは、ホモキラリティーの起原を考える上でも意義深い。この現象を調べれば難問であったホモキラリティー起原問題も解明できるのではないかと期待できる。

### 2. 研究の目的

酵素の立体選択性の絶対性は生命の生存にとって、また生命の誕生にとっても重要なもので絶対不変で安定したものでなければならない。しかしながら、光学異性体に厳格な立体特異性を持つはずのトリプトファンゼの立体選択性に関するこれまでの一連の研究で、それは意外にも可逆的に変化できるフレキシブルなものであるということがわかってきた。さらに、このような現象が合成反応においてもみられるのかどうか確かめたところ、実際にリン酸3アンモニウム(TAP)存在下でトリプトファンゼがD-セリンを基質としてインドールとともにL-トリプトファンを合成するという反応を起こすことがわかった。本研究では、高濃度TAPでD-セリンがトリプトファンゼ活性部位内で活性基質化しインドールと結合してL-トリプトファンを合成する反応系を詳しく調べ、フレキシブルな立体選択性が生まれる原因を明らかにすることを研究目的とした。さらに、この研究結果に基づいてホモキラリティーの起原についても検討した。

### 3. 研究の方法

もともと不活性であったD-セリンがトリプトファンゼ活性部位内で活性基質に転じるためには、ピリドキサル5-リン酸(PLP)とエックスターナルアルディミン結合することが不可欠だがこの結合を可能にする手段として次の2点が考えられる。

- (1) TAP存在下でD-セリンが化学的にL-セリンにラセミ化したのち、トリプトファンゼ活性部位内でインターナルアルミディン結合していたPLPがラセミ化したL-セリンとエックスターナルアルディミン結合する。
- (2) 通常ではD-セリンはトリプトファンゼの活性部位内への侵入は阻止されるか、あるいは阻害剤として作用するのみであるが、TAP存在下ではトリプトファンゼが僅かに立体構造するため、その影響でインターナルアルミディン結合していたPLPがD-セリンとエックスターナルアルディミン結合が可能となる。

本研究では、上の2つの可能性を検討するために以下の～の研究方法で研究計画を立てた。

#### D-L-セリンの光学異性体形の決定

本研究では、まず上記1の可能性について検討した。光学分割はHPLC用分割カラムCrown Pack(+)(ダイセル)を用いて、高速液体クロマトグラフィー(655 Liquid Chromatography, 日立)を使用した。溶離液は蒸留水に過塩素酸を滴下しpH1.0に調整したものを溶離液として用いた。流速は0.1 mL/min、カラム温度は0とした。この溶離液のUV吸光度を0、円二色性の楕円率を0 mdegとした。セリンは $\lambda = 230 \text{ nm}$ においてUVとCDでUV-CD検出器(CD-1595、日本分光)で同時に検出した。反応混液の組成は、30%飽和濃度TAP、100 mM D-セリン、0.4 mM PLP、5.4 mM インドールである。この反応混液を55℃で0～6時間反応させ、D-セリンからL-セリンへのラセミ化の有無について検討するため、2時間毎にD-セリンを含む反応混液の20  $\mu\text{L}$ をこの光学分割HPLCシステムにかけて分析した。下記にこの分析方法をわかりやすくするために便宜的にフローチャートにして示した。

#### D-セリンのラセミ化の検討

30%飽和濃度TAP、100 mM D-セリン、0.4 mM PLP、5.4 mM インドールを含む反応混液を55℃で0～6時間反応

反応混液の20  $\mu\text{L}$ をHPLC用光学分割カラムシステムに注入

反応混液中のD-セリンの光学分割

$\lambda = 230 \text{ nm}$ で吸光度と円二色性を同時検出

反応混液中のD-セリンと対照のL-セリンのクロマトグラムを比較し、D-セリンラセミ化の有無を決定

D-セリンが活性基質化する反応最適条件

D-セリンとPLPがアルディミン結合をするための重要なファクターは、塩の種類、塩濃度、反応温度なのでこれらの条件をいろいろ変えて最適な反応条件を求めた。反応混液は0.4mMのPLP、5.4mMのインドール、100mMのD-セリン、0.46μMのトリプトファナーゼを加えた。TAPの飽和濃度を10~40%、反応温度を30~80の範囲で変化させた。反応混液の全量は500μLとし、ブレンダーで均質に混合した。生成されたL-トリプトファンは光学分割カラムシステムで光学異性体型と生成量を分析した。溶離液は蒸留水に過塩素酸を滴下してpH2.0に調整した溶液を使用し、室温で0.9mL/minの流速で流した。この溶離液の円二色性の楕円率を0mdegとした。トリプトファンはλ=230nmにおいてCDで光学異性体型を同定し、UVで生成物の定量を行った。

- eliminationの検討

D-セリンがトリプトファナーゼによって - eliminationを起こす可能性を検討するため反応中間体であるピルビン酸の定量を行った。ピルビン酸定量はF-キットピルビン酸(JKインターナショナル)で行った。測定操作法は緩衝液1.0mL、NADH0.1mL、試料2.0mLを混和して、25℃、3min加温後、試料とブランクの340nmの吸光度を測定した。さらにL-乳酸脱水素酵素0.02mLを添加し混和後、再び25℃で5~6分間加温して反応を完了させ、試料)とブランクの340nmの吸光度の測定を行った。測定試料は小試験管に30%TAP飽和水溶液、0.4mMPLP、100mMD-セリンまたはL-セリン、0~21.6mMの間の濃度のインドール、5.4μMトリプトファナーゼを加え、リン酸緩衝液で全量を2mL、pH7.8に調整し、ピルビン酸の定量を行った。また5.4mMのインドールを加えたものと加えていないものとを対照にしてD-セリンまたはL-セリンにおける0~6時間の生成ピルビン酸量を経時的に測定して、インドールが生成ピルビン酸量に与える影響について検討した。

リン酸3アンモニウム溶液中でのトリプトファナーゼの蛍光および円二色性スペクトル測定

3種類のリン酸アンモニウム(リン酸1アンモニウム(MAP),リン酸2アンモニウム(DAP),TAP)溶液中に0.46μ

Mのトリプトファナーゼ、0.4mMのPLPを加えてリン酸緩衝液で全量を2mLに調整した。蛍光剤には疎水性アミノ酸に感応するBis-ANS(4,4'-diaminino-1,1'-binaphthalene-5,5'-disulfonic acid)を使用した。0.3mg/mLになるようにBis-ANSをリン酸緩衝液に完全に溶かし、20μL加えた。各拌後は15分間静置し、蛍光分光器(F4500,日立ハイテクノロジーズ)でスペクトル変化を測定した。励起波長はλ=395nm、測定範囲をλ=420~650nmに設定し、1cmセルを使用した。CDスペクトル測定においては、Circular dichroism spectrophotometer(J805,JASCO)を用いて測定した。CDスペクトルの測定範囲はλ=200~400nmに設定し、0.1cmセルを使用した。

#### 4. 研究成果

今回の研究計画により(1)~(5)の研究成果が得られた。以下順に述べる。

(1)TAP溶液中でのD-セリンラセミ化の検討

TAP存在下におけるDL-セリンのリテンションタイムは、D-セリンが20min、L-セリンが23minであった。L-セリンのCDのピークはプラス側に、D-セリンではピークはマイナス側に現れた。30%飽和濃度のTAP存在下で100mMのD-セリンを55℃、0~6時間反応させたときのD-セリンを光学分割したクロマトグラムをL-セリンのクロマトグラムと比較させたところ、L-セリンが溶離するリテンションタイムには全くピークは検出されなかった。これはUVでもCDでもそうであった。このことから、TAP存在下で55℃にD-セリンを熱してもD-セリンは安定でL-セリンには全くラセミ化されないということがわかった。D-セリンの活性基質化はトリプトファナーゼ活性部位内で主鎖のリジンとインターナルアルディミン結合していたPLPが、直接D-セリンとエックスターナルアルディミン結合に入れ替わることによって起きることがわかった。

(2)D-セリンからのL-トリプトファン合成反応の最適条件

TAP飽和濃度を10~40%に変化させてD-セリンからL-トリプトファン合成反応を行ったところ、飽和濃度が高くなるにつれ反応活性が上昇し、30%飽和濃度のとき最大活性を示した。それ以上の濃度では活性は徐々に低下していった。次に最適濃度が決まったので、最適温度を求めた。30%飽和濃度のTAP存在下で反応温度を

30 - 80 に変化させたところ、反応温度が上昇するにつれてL - トリプトファン生成量も増加し55 で最大活性を示した。それ以上の温度では急激に活性は低下し80 で活性が完全になくなった。55 の最大活性のときに生成されたL - トリプトファンは、0.32 mMであった。この結果から、最適反応条件は、TAP飽和濃度が30%、反応温度が55 であることがわかった。L - セリンからのL - トリプトファン合成量を求めると最大活性で3.15 mMであった。したがって、D - セリンからのL - トリプトファン合成量はL - セリンからのその10.1%ということになった。さらに、DAP存在下でのD - セリンからのL - トリプトファン合成量を調べたところ0.13 mMであった。この値はL - セリンからのものと較べると4.1%である。このことからTAPはDAPよりも活性を2.5倍高めることがわかった。3種類のリン酸アンモニウム塩でも、MAPは活性が0で酵素に悪い影響を与えるが、DAPとTAPはD - セリンの活性基質化にプラスの影響を与えることがわかる。さらに、TAPはDAPよりもより良い効果を生むことがわかる。

### (3) D - セリンからのL - トリプトファン合成反応経路

D - セリンを基質とする反応経路は以下の①～③の可能性が考えられる。

TAP溶液中でのD - セリンのラセミ化によるL - トリプトファン合成

- e l i m i n a t i o n によって生じたピルビン酸を再利用するL - トリプトファン合成

- r e p l a c e m e n t によるL - トリプトファン合成

上記 のTAP溶液中でD - セリンがL - セリンにラセミ化し、このL - セリンが基質となりトリプトファン上でL - トリプトファンに合成されるという考え方は、TAP溶液中でのD - セリンのラセミ化は起こらないことが(1)で論証されたので、この経路は否定された。次の は、D - セリンがトリプトファン活性部位内で - e l i m i n a t i o n を起こし、その結果D - セリンがピルビン酸に分解される。このピルビン酸がインドールとアンモニアに再結合されL - トリプトファンが合成されるという反応経路である。このことが実際に起きているかどうか調べるために0~21.6 mMのインドールとセリンからのピルビン酸生成量の関係を調べた。D - セリン、L - セリンどちらを基質にしても、反応開始時にはほぼ0であったピルビン酸量は経時的に直線的に増加した。また生成されたピルビン酸量はD - セリンを基質とした場合で最大0.0133  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、L - セリンを基質とした

場合で最大0.0139  $\mu\text{g}/\text{mL}$ と同量のD - セリンまたはL - セリンを基質としたときの生成L - トリプトファン(D - セリンを基質とした場合: 14  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、L - セリンを基質とした場合: 90  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )と比較して無視できる生成量であった。次にピルビン酸生成に対するインドールの影響を調べた。D - セリン、L - セリンのどちらを基質にした場合においてもインドールの増加に伴い、生成されたピルビン酸量は直線的に減少した。インドールはL - またはD - セリンが - e l i m i n a t i o n 反応してピルビン酸を生成することを阻害した。トリプトファンナーゼによるピルビン酸の生成はインドール濃度が5.0 mMで完全に止まることが分かった。本研究で用いられたインドール濃度は5.4 mMであったので、この条件ではピルビン酸生成は完全に抑制されている。したがって、D - セリンからのL - トリプトファン合成反応は - e l i m i n a t i o n 経路を通らないで起こっていることがわかった。この結果、の可能性が残った。D - セリンから合成されるL - トリプトファンは、- r e p l a c e m e n t 反応によって行われるものであることが明らかとなった。このことは、D - セリンを基質とした場合でもL - セリンを基質としたときのL - トリプトファン合成反応経路とほとんど同じ経路をたどっていることを示した。D - セリンがトリプトファンナーゼの活性部位に入ったとき、TAPが無いときは阻害剤として働くがTAPが存在すると活性基質化し - r e p l a c e m e n t 反応によってL - トリプトファンが合成されるわけである。このことから単なる阻害剤から活性基質化するカギはもちろんTAPが握っているわけだが、より重要なのはインターナルアルディミン結合していたPLPがD - セリンとエックスターナルアルディミン結合に切り替える瞬間にあることがわかる。この変化を追跡することが大変重要になる。この変化は当然TAPによるトリプトファンナーゼの立体構造の変化によっても影響を受けるはずなので次にそれを調べた。

### (4) TAP溶液中でのトリプトファンナーゼの立体構造の変化

リン酸緩衝液(PB)と3種類のリン酸アンモニウム塩(MAP, DAP, TAP)を用いてトリプトファンナーゼの立体構造の変化を調べた。蛍光スペクトル測定の結果、次のことがわかった。PB、3種類のリン酸アンモニウム溶液中のトリプトファンナーゼの蛍光強度は、 $\lambda = 490 \text{ nm}$ 付近が極大であった。また、TAPは他塩のなかで最もPBに近い蛍光強度を示した。DAPはTAPよりも大きな蛍光強度を示した。MAPは最も大きな蛍光強度を示した。MAPはトリプトファンナーゼの疎水領域を最も激しく表面

に露出させたことが分かった。反応温度を37から60に上昇させたとき、TAPとDAPはPBと比べてわずかに蛍光強度が強くなった。一方、MAPの蛍光強度は37のとき以上に大きく、DAPやTAPのものを凌駕した。さらに反応温度を80にしたときPB以外は蛍光強度に複数のピークが現れた。このことは酵素の立体構造が大きく変化し失活したことを示した。どの温度でも蛍光強度はMAPが最も大きく、DAP、TAP、PBの順で、TAPとPBとの差は小さかった。次に、反応温度によるトリプトファンゼの蛍光スペクトルの変化を塩ごとに調べた。PBでは37に比べて60、80のときに蛍光強度が強くなったが、60と80の蛍光スペクトルに差はなかった。MAPは高温になるにつれ蛍光強度は強くなり、80のときは蛍光強度に2つのピークに割れた。このことは完全にトリプトファンゼの立体構造が壊れていることを示した。DAPはMAPと同様に80で蛍光強度は大きく、37、60と比べて蛍光スペクトルにも変化が見られた。TAPは室温に比べて60、80の方が蛍光強度は強く、60と80の蛍光スペクトルはわずかな差しかなかった。これらの結果から、37、60、80のいずれの反応温度においても、リン酸アンモニウム塩が存在することでトリプトファンゼの立体構造に変化が生じることが分かった。そして、いずれの塩存在下でも高温になると蛍光強度が大きくなることから、トリプトファンゼの立体構造の変化は温度に大きく依存することが分かった。

次にTAP、DAP、MAP、PB溶液のトリプトファンゼのCDを測定した。PBに対してTAP、DAP存在下では200-250nmの2次構造部分にわずかな変化が見られた。TAPとPBとの差はDAPとPBの差よりもさらに小さいものであった。蛍光スペクトルでトリプトファンゼの立体構造に大きな変化を示したMAPは、CDスペクトルでもTAPやDAPと大きな差があった。蛍光スペクトルとCDスペクトルの結果から、MAPのようにトリプトファンゼを失活させるような塩は酵素内部側にある疎水性アミノ酸を表面側に露出させるくらい大きく変化を立体構造に与えるが、D-セリンに活性を誘起させるTAPやDAPではPBと僅少な差しか示さなかった。このことから、TAPなどのリン酸アンモニウム塩存在下でのD-セリンの活性基質化はトリプトファンゼの立体構造の微小変化によってもたらされるものであることがわかった。

#### (5) 結論

以上、今回の研究計画で得られた成果を簡条書きにしてわかりやすくなるようにまとめた。

高濃度TAP存在下でD-セリンがトリプトファンゼ活性部位内にあるとき、D-セリンの炭素に結合するHが解離し逆位側に結合してラセミ化を起こすかどうか調べたが、このようなことは起こらなかった。この結果、D-セリンはラセミ化しないことが明らかとなった。

D-セリンからのL-トリプトファン合成はreplacement反応によるものであることがわかった。

TAP存在下でトリプトファンゼの立体構造が僅かに変化することによりD-セリンを活性基質化することがわかった。D-セリンが阻害剤として作用するか活性基質として作用するかは、最初の反応第一段階のD-セリンとPLPがエックスターナルアルディミン結合できるか、どうか依存しこれをコントロールしているのがTAPであることがわかった。

今回の研究で、D-セリンを排除するシステムは反応の最も初期の段階のD-セリン+PLPのエックスターナルアルディミン結合の可否にあることがわかった。今後は、D-セリンがトリプトファンゼの活性部位内で阻害剤としての存在形式を確定し、TAPの添加によりどのようなプロセスを経てPLPとアルディミン結合し活性基質化するのか、その瞬間を光学的に捉える必要がある。そのためにはms単位で刻々と変化する酵素・D-セリン複合体の吸収スペクトルを瞬時に測定して、どのような反応中間体が形成されていくのが調べることが必要である。例えば、UV-VIS高速スキャンストップフローシステムのような高価な装置を用いD-セリンがどのような反応中間体に変化してL-トリプトファンに変化していくのが調べればよからう。その結果、阻害剤としてのD-セリンがどのようなプロセスを経て活性基質に転じることができるのか明らかにすることができるはずである。

この立体選択性のフレキシビリティの原因を明らかにすることができれば、酵素がどのようなメカニズムでD-アミノ酸を排他的に排除するのか明らかにできて、延いてはホモキラリティーの起原、すなわち酵素のD-アミノ酸の排他的排除のメカニズムを明らかにできよう。さすれば何故にアミノ酸のL体を選択しなければならないのかが解明でき生命誕生の謎の解明に大きく貢献できるだろうと考えている。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 3 件)

Ikumi Otsuka, Ayako Hirano, Akihiko

Shimada, Ammonium  
phosphates-producing flexible  
tryptophanase stereoselectivity,  
Origins Life Evol. Biosph. 査読有,  
印刷中  
<http://link.springer.com/journal/11084>

DOI:10.3390/life2020215  
Akihiko Shimada, No homochirality-no  
life, Viva Origino, 査読有, 40, 2014,  
40-46.

<http://www.origin-life.gr.jp/vivaorigino.html>

Akihiko Shimada, Haruka Ozaki,  
Flexible enantioselectivity of  
tryptophanase attributable to benzene  
ring in heterocyclic moiety of  
D-tryptophan, Life, 査読有, 2,2012,  
215-228.

〔学会発表〕(計 5 件)

Ikumi Otsuka, Akihiko Shimada,  
Flexible tryptophanase  
stereoselectivity induced from  
triammoniumphosphate, 2<sup>nd</sup>  
International Conference of D-Amino  
Acid Research, 2014年9月4日、栃  
木県総合文化センター(栃木県宇都宮市)  
Ikumi Otsuka, Akihiko Shimada,  
Flexible stereoselectivity of  
tryptophanase in the presence of  
ammonium phosphates, Origins2014, 2  
014年7月8日、奈良県新公会堂(奈良  
県奈良市)

大塚郁美、平野絢子、島田秋彦、トリプ  
トファナーゼの立体選択性に立体反応的  
影響を及ぼす塩の探索、生命の起原およ  
び進化学会、2014年3月15日、広  
島修道大学(広島県広島市)

中畑 涼、島田秋彦、ペンタクロロフェ  
ノール分解能を有する土壌細菌の探索と  
その進化的意義、生命の起原および進化学  
会、2013年3月16日、九州大学  
(福岡県福岡市)

平野絢子、島田秋彦、トリプトファナー  
ゼによるL-セリンからのトリプトファン  
合成反応に対するD-セリンの阻害作  
用、生命の起原および進化学会、201  
3年3月16日、九州大学(福岡県福岡  
市)

〔図書〕(計 1 件)

Akihiko Shimada, Ikumi Otsuka, Nova  
Science Publishes, New Developments in  
Tryptophan Research, 印刷中

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

島田秋彦 (SHIMADA, Akihiko)

筑波大学・生命環境系・講師

研究者番号: 90235614