

チロシナーゼ反応機構における銅活性酸素種の動的挙動

藤枝 伸宇¹, 伊東 忍²

1. はじめに

金属タンパク質や金属酵素は電子伝達や物質変換、シグナル伝達などの生命機能に関与し、古くからその作用機序について研究されてきた。特にさまざまな分光法で観測可能なヘムタンパク質に関する研究は膨大な数に上る。一方で、銅などの金属イオンが結合した非ヘム金属タンパク質は分光法での観測が容易でなく、これらに比べて、研究が進んでいなかった。しかしながら、1990年代以降、構造生物学の発展もあり、非ヘム金属タンパク質についてもさまざまな作用機構が明らかにされてきている。電子伝達タンパク質や酸化還元酵素においては、酸化数の変化に伴う構造変化を小さく保つ、いわゆる「entatic state」を形成することによって、活性化エネルギーを小さくし、反応速度を高めているとされてきた。そのため、非ヘム金属酵素においては、触媒に関与する金属は配位するアミノ酸残基に強固に保持されたまま機能すると考え、大きな変化が起こりうるとはあまり推測されない傾向があった。しかしながら、近年、反応の際に金属の配位子や配位構造が大きく変化することを示す観測結果が報告され始めている。亜鉛依存性のアルコール脱水素酵素では基質の結合に伴って、亜鉛に配位しているアミノ酸残基を変えながら反応を進行させていることが示唆され、その触媒サイクルにおいて亜鉛中心は1 Å近く位置遷移することが提唱されている^{1,2)}。さらに、ここ数年で、非ヘム金属酵素の一つである銅タンパク質チロシナーゼについて、銅中心の動的挙動が多数報告

されている。筆者らは、これまでに、チロシナーゼのX線結晶構造解析、分光学的研究を行い、チロシナーゼのモノオキシゲナーゼ反応における分子機構についての詳細な解析結果を報告してきた。本稿ではチロシナーゼの触媒サイクルについて、提唱された反応機構の変遷を解説するとともに、筆者らの研究成果に基づいた銅活性酸素種の挙動について最新の反応機構についても紹介したい。

2. 二核銅モノオキシゲナーゼ

二核銅酵素には、チロシナーゼやカテコール酸化酵素があり、メラニン生成、病原体からの保護、炭水素代謝に至るまで、多様な生化学的プロセスに関与している。その活性中心は反強磁性的に相互作用した二核の銅活性中心を持つことから、共役二核銅酵素と呼ばれる。モノオキシゲナーゼとオキシダーゼの二つの機能を持つチロシナーゼ (EC 1.14.18.1) は、メラニン生成の初発酵素であり、哺乳類、植物、真菌や細菌に広く分布するユビキタス酵素である³⁾。この酵素の二核銅中心において、二核銅(I)型(デオキシ体; 図1A, 1)が分子状酸素と結合して(μ - η^2 : η^2 -ペルオキシド)二核銅(II)体を生成する⁴⁾。この銅活性酸素体(オキシ体; 図1A, 2)が基質フェノールを水酸化し、二核銅(II)型(メット体; 図1A, 6)が生成する。このメット体がカテコールをキノンに酸化した後、デオキシ体が再生し触媒サイクルが完結する。また、植物などにはカテコール酸化酵素 (EC 1.10.3.1) が存在し、チロシナーゼと活性中心構造が非常に類似しているにもかかわらず、後者の反応のみを触媒するため、その違いに関与するアミノ酸の同定が進められているが今のところ明らかになっていない。X線結晶構造解析から、二核銅中心の各銅イオンはそれぞれ三つのヒスチジン側鎖によって保持されていることが明らかになっている⁵⁾。チロシナーゼではそれぞれの銅に配位する三つのヒスチジンには決まったアミノ酸配列モチーフ [His-X(n)-His-X(8)-His と His-X(3)-His-X(n)-His] が存在し、それぞれのモチーフに結合する銅イオンは慣習的にCuA, CuBと呼ばれる⁶⁾。また、チロシナーゼ活性は反応性の高いドーパキノンを発生させることから、活性制御ドメインやサブユニットが活性中心を遮蔽するように結合し、しばしば活性のないプロチロシナーゼとして存在し、細胞内での活性をコントロールしている^{7,8)}。

¹大阪府立大学大学院生命環境科学研究科 (〒599-8531 大阪府堺市中央区学園町1-1)

²大阪大学大学院工学研究科 (〒565-08751 大阪府吹田市山田丘2-1)

Dynamic behavior of copper-oxygen species in tyrosinase mechanism

Nobutaka Fujieda¹ and Shinobu Itoh² (¹Osaka Prefecture University, Graduate School of Life and Environmental Sciences, 1-1 Gakuen-Cho, Naka-ku, Sakai-shi, Osaka 599-8531, Japan, ²Osaka University, Graduate School of Engineering, 2-1 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan)

本論文の図版はモノクロ(冊子版)およびカラー(電子版)で掲載。

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2021.930521

© 2021 公益社団法人日本生化学会

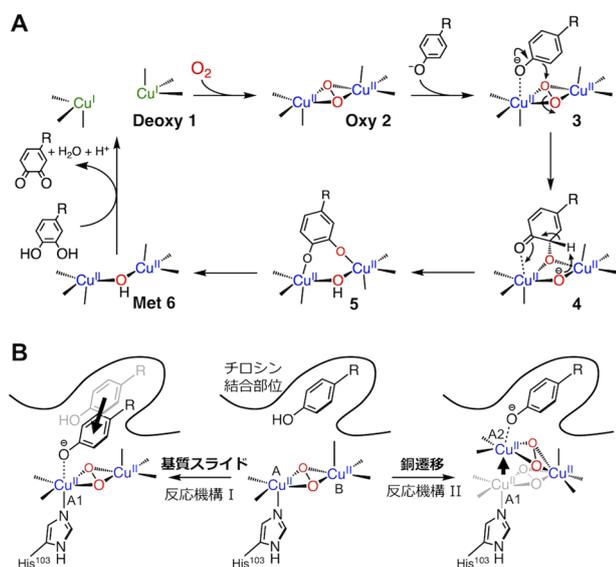


図1 提唱されてきたチロシナーゼの反応機構
(A)チロシナーゼの反応サイクルにおける状態変化と芳香族求電子置換反応。(B)モノオキシゲナーゼ反応のトリガーとなる基質スライドと銅イオンの位置遷移の模式図。(文献15より改変して引用)

3. 基質結合様式に関する議論

チロシナーゼのモノオキシゲナーゼ活性は $(\mu-\eta^2:\eta^2$ -ペルオキシド)二核銅(II)種によって引き起こされる。筆者らはマッシュルーム由来のチロシナーゼや麴菌由来チロシナーゼを用いて詳細な速度論的検討を行った。パラ位の置換基を変えたさまざまなフェノール誘導体を用いて、速度解析を行った結果、Hammettプロットにおいてその ρ 値はそれぞれ-2.4(マッシュルーム)、-1.9(麴菌)となった^{9,10}。さらに、フェノールの芳香族水素を重水素化した基質を用いた場合に、速度論的一次同位体効果(KIE)がほぼ1を示したことから、芳香族求電子置換反応機構で進行することが明らかとなった(図1A, 3→5)^{9,10}。この反応機構はモデル銅錯体を用いた系においても支持される結果が得られている¹¹。この反応機構では脱プロトン化したフェノール(フェノラート)が片方の銅に配位することで反応が開始する(図1A, 3)。そのため、基質であるL-チロシンがどのように活性中心に結合するかが長い間議論されてきた。放線菌由来のプロチロシナーゼではキャディタンパク質(ORF378)が活性中心を覆うように結合しており、キャディタンパク質のTyr98が銅中心に向かって貫入している⁵。2006年に、この構造が報告された当時、このチロシン残基をもとに基質の結合様式が議論されたものの、このチロシンは銅に直接配位できる距離にはなく、反応開始にはチロシンがCuAの方へスライドすると考えられた。その後、*Bacillus*属細菌由来のチロシナーゼでは結晶に

よってCuAの位置が1Å程度ずれることや、基質アナログの結合で銅イオンが基質アナログの方へわずかに遷移していることが報告された¹²。この結晶構造は分解能が高くなく、銅の位置遷移が実験誤差である可能性を排除できなかったものの、新たな反応機構の可能性を感じさせる結果であった。一方で、ごく最近、放線菌プロチロシナーゼの結晶を還元剤に浸漬処理するとキャディタンパク質のチロシン残基がドーパに酸化され、そのドーパに配位するように新たな銅の電子密度が現れることが報告された¹³。これにより、結合したチロシンが銅に配位するように転移する(図1B, 反応機構I)のではなく、銅中心がチロシンに向かって位置遷移する(図1B, 反応機構II)可能性が示唆された。ただ、放線菌プロチロシナーゼにおいて、キャディタンパク質由来のチロシンはタンパク質の骨格に固定されており、動きが制限されているため、そもそも基質のスライド(反応機構I)は起こりえず、単なるアーティファクトである可能性を排除できなかった¹³。このように、どちらの機構が反応のトリガーとなるのかが議論の焦点となっていた。

4. 柔軟な銅中心

筆者らは議論に決着をつけるため、麴菌由来チロシナーゼについて生化学的解析や結晶構造解析に取り組んできた^{8,14}。活性のある野生型麴菌由来チロシナーゼは精製過程において、自身の持つチロシン残基を酸化し、重合によって褐変、沈殿してしまうため、結晶化には活性を低下させたC92A変異体を用いた。このC92A変異体では活性の指標となる触媒回転数が1桁ほど低下するが、他のチロシナーゼと比較しても十分に高い活性を維持していた。この変異体を用いることで、筆者らは1.27Åの高分解能で活性型の結晶構造決定に成功した(PDB:6JU8)¹⁵。幸運にも原子分解能に近い高分解能であったため、詳細なチロシナーゼの銅中心が観測できた。今まで報告された結晶構造ではCuA, CuBともに三つのHisが配位している構造であるのに対し、筆者らのデータではCuA側で三つのHisが配位した銅イオン(CuA1)に加えて、約2Å離れた位置にもう一つの銅イオン(CuA2)がみられた。CuA2では興味深いことにHis103の配位結合が外れ、残り二つのHisと水分子一つが配位していた。CuA2サイトにおける銅イオンの占有率は29%であり、CuA1とCuA2の間で平衡があると推測された¹⁵。

さらに、基質を含んだクライオ溶液に結晶を浸漬することでL-チロシンとの複合体結晶構造を1.42Åの分解能で得ることに成功した(図2A, PDB:6JU9)。活性中心にはチロシンに由来する電子密度がはっきりと観測された。その結合様式はHis332との π - π 相互作用、Val359とのCH- π 相

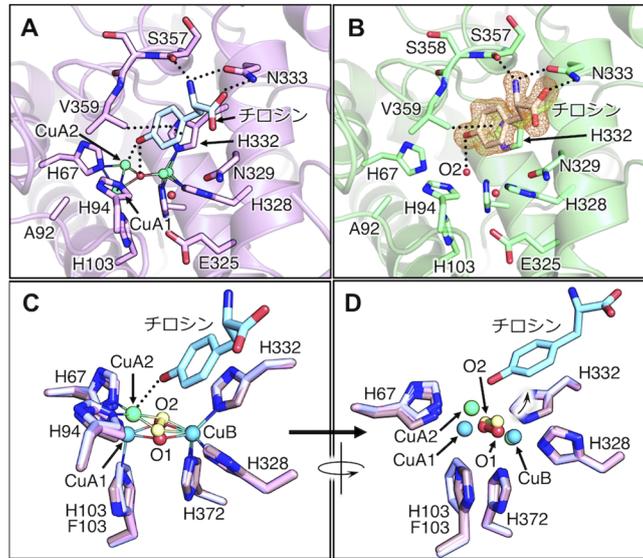


図2 基質-チロシナーゼ複合体の結晶構造解析

(A) L-チロシン-チロシナーゼ複合体 (銅結合あり), (B) L-チロシン-チロシナーゼ複合体 (銅結合なし). (C, D) C92A プロチロシナーゼ (オキシ体), C92A/H103F プロチロシナーゼ (オキシ体), L-チロシン-チロシナーゼ複合体 (銅結合あり) の重ね合わせ. (文献15より改変して引用)

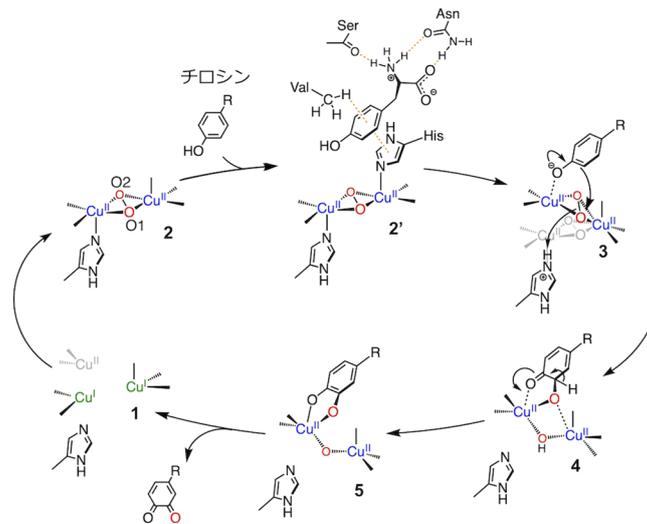


図3 チロシナーゼ反応機構

相互作用, ペプチド主鎖のカルボニル基との水素結合, そしてCuA2への配位結合であった. 相互作用に関与するアミノ酸残基をアラニンに変えると基質のL-チロシンに対する親和性を示すミカエリス定数 K_M 値が上昇し, 見かけ上親和性が低下するという結果も間接的にこれらのアミノ酸残基が基質結合に寄与していることを示唆していた. 興味深いことに, チロシンが配位することによってCuA2の占有率は37%に増加していた. さらに銅イオンを結合していないチロシナーゼとL-チロシンとの複合体結晶構造においても (図2B, PDB: 6JU7), 同じ位置にチロシンが結合している状態が観測され, チロシンは銅イオンへの配位結合

がない状態においても, 残りのアミノ酸との相互作用によって活性中心に結合することがわかった.

まとめると, チロシンが銅イオンに接近するというままでの定説 (図1B, 反応機構I) とは逆に, 銅イオンがチロシンに対して接近するという新説 (図1B, 反応機構II) を支持するものであった. これらの結晶構造をもとにアップデートしたチロシナーゼの反応機構は図3のようになる. 活性種オキシ体 (図3, 2) のチロシナーゼに対し, チロシンがこれら四つのアミノ酸残基との相互作用によって結合する (図3, 2'). そしてCuA1の状態から, ヒスチジン103が外れCuA2にシフトし, チロシンと直接結合し

た後 (図3, 2'→3), 芳香族求電子置換反応でチロシンの水酸化が進行する (図3, 3→4). その後カテコールの酸化に伴い (図3, 5→1), 銅イオンはCuA2から元のCuA1に戻り (図3, 5), 生成物の解離を促進する.

さらに, CuAの位置遷移による活性酸素種の動的挙動を酸素結合状態, オキシ体の構造を比較することによって検討した. 活性型チロシナーゼではオキシ体は不安定で発生後速やかに消失する. しかしながら, プロチロシナーゼの状態では活性制御ドメインが酸素結合部位を覆い隠すためオキシ体を安定化できる. そこで, 活性制御ドメインが残った状態のC92Aプロチロシナーゼと, さらにHis103が一つ外れたCuA2の状態のみを擬似的に生じさせる二重変異体C92A/H103Fのプロチロシナーゼを利用した. 調製後, 紫外可視 (UV-vis) スペクトルからどちらの変異体でもオキシ体の生成に成功したことが示された. また, 共鳴ラマンスペクトルを測定すると, ($\mu\text{-}\eta^2\text{:}\eta^2\text{-ペルオキシド}$) 二核銅 (II) 種に由来するピークが観測された. C92A/H103F変異体におけるO-O対称伸縮振動は 737 cm^{-1} であり, 745 cm^{-1} を示したC92A変異体のものに比べて小さくなっており, 結合が弱いことを示唆していた. 単結晶解析を行ったところ, 銅中心に結合した酸素分子に由来する電子密度が観測されなかった. X線照射による還元損傷ではないかと疑い, それぞれ18個の結晶データのうち損傷の少ない部分をマージしたところ, 酸素分子に由来する電子密度が観測された. C92A/H103F変異体では銅が完全にCuA2の位置にシフトし, 酸素-酸素間の結合距離は 1.54 \AA であり (PDB: 6JUC), C92A変異体における 1.47 \AA より長くなっていた (PDB: 6JUA). つまり, この結果は共鳴ラマンスペクトルと一致し, CuA1からCuA2への遷移によって, 酸素-酸素間の結合が弱まることが示唆された. これら二つのオキシ体 (PDB: 6JUA& 6JUC) とL-チロシンとの複合体結晶構造 (PDB: 6JU9) を重ね合わせる (図2C, D) とヒスチジンはほぼ重なっており, 銅イオンがCuA1からCuA2に遷移する際, 結合した酸素はただ引き上げられるだけでなく, 片側の酸素原子 (図2C, D; O1) がチロシンのオルト位に近づくように向きが変化することが示唆された. これらの結果から, CuA1からCuA2への遷移はペルオキシ状態をより活性化するだけでなく, 反応に適した配置に変化させると予想される¹⁵⁾.

5. おわりに

以上, 本稿では, 麹菌由来チロシナーゼの高分解能X線結晶構造に基づいた詳細な反応機構を紹介した. これまで, 電子伝達タンパク質などではタンパク質骨格により配位構造が強固に保持されることでその機能を発揮すると提唱されているため, その金属中心は静的なイメージが潜

在していた. しかし, 本稿で紹介した筆者らの結果において, 驚くほど動き回る銅中心と酸素活性種という非ヘム金属タンパク質に対する従来とはまったく異なる動的なイメージを受け取ってもらえたかと思う. 今後, これらの結果が一般的な金属酵素における反応機構にも新たな知見を与え, 古典的な反応機構と新しい反応機構で議論を誘起し, 柔軟に動く金属活性中心という新規な観点が広まると幸いである.

謝辞

最後に, チロシナーゼの解析を行うにあたりサポートして下さった大阪大学蛋白質研究所栗栖源嗣教授, 兵庫県立大学久保稔教授・柳澤幸子准教授に心より感謝申し上げます.

文 献

- 1) Kleinfeld, O., Frenkel, A., Martin, J.M.L., & Sagi, I. (2003) Active site electronic structure and dynamics during metalloenzyme catalysis. *Nat. Struct. Biol.*, **10**, 98–103.
- 2) Baker, P.J., Britton, K.L., Fisher, M., Esclapez, J., Pire, C., Bonete, M.J., Ferrer, J., & Rice, D.W. (2009) Active site dynamics in the zinc-dependent medium chain alcohol dehydrogenase superfamily. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 779–784.
- 3) Itoh, S. & Fukuzumi, S. (2007) Monooxygenase activity of type 3 copper proteins. *Acc. Chem. Res.*, **40**, 592–600.
- 4) Kitajima, N., Fujisawa, K., Morooka, Y., & Toriumi, K. (1989) ($\mu\text{-}\eta^2\text{:}\eta^2$)-peroxo binuclear copper complex, [$\text{Cu}(\text{HB}(3,5\text{-}(\text{Me}_2\text{CH})_2\text{pz})_3)]_2(\text{O}_2)$. *J. Am. Chem. Soc.*, **111**, 8975–8976.
- 5) Matoba, Y., Kumagai, T., Yamamoto, A., Yoshitsu, H., & Sugiyama, M. (2006) Crystallographic evidence that the dinuclear copper center of tyrosinase is flexible during catalysis. *J. Biol. Chem.*, **281**, 8981–8990.
- 6) Solomon, E.I., Sundaram, U.M., & Machonkin, T.E. (1996) Multicopper oxidases and oxygenases. *Chem. Rev.*, **96**, 2563–2606.
- 7) Fujieda, N., Murata, M., Yabuta, S., Ikeda, T., Shimokawa, C., Nakamura, Y., Hata, Y., & Itoh, S. (2012) Multifunctions of Melb, a fungal tyrosinase from *aspergillus oryzae*. *ChemBioChem*, **13**, 193–201.
- 8) Fujieda, N., Yabuta, S., Ikeda, T., Oyama, T., Muraki, N., Kurisu, G., & Itoh, S. (2013) Crystal structures of copper-depleted and copper-bound fungal pro-tyrosinase: Insights into endogenous cysteine-dependent copper incorporation. *J. Biol. Chem.*, **288**, 22128–22140.
- 9) Fujieda, N., Murata, M., Yabuta, S., Ikeda, T., Shimokawa, C., Nakamura, Y., Hata, Y., & Itoh, S. (2013) Activation mechanism of melB tyrosinase from *aspergillus oryzae* by acidic treatment. *J. Biol. Inorg. Chem.*, **18**, 19–26.
- 10) Yamazaki, S. & Itoh, S. (2003) Kinetic evaluation of phenolase activity of tyrosinase using simplified catalytic reaction system. *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 13034–13035.
- 11) Itoh, S., Kumei, H., Taki, M., Nagatomo, S., Kitagawa, T., & Fukuzumi, S. (2001) Oxygenation of phenols to catechols by a ($\mu\text{-}\eta^2\text{:}\eta^2\text{-peroxo}$)Diacopper(II) complex: Mechanistic insight into the phenolase activity of tyrosinase. *J. Am. Chem. Soc.*, **123**,

- 6708–6709.
- 12) Goldfeder, M., Kanteev, M., Isaschar-Ovdat, S., Adir, N., & Fishman, A. (2014) Determination of tyrosinase substrate-binding modes reveals mechanistic differences between type-3 copper proteins. *Nat. Commun.*, **5**, 4505.
- 13) Matoba, Y., Kihara, S., Bando, N., Yoshitsu, H., Sakaguchi, M., Kayama, K., Yanagisawa, S., Ogura, T., & Sugiyama, M. (2018) Catalytic mechanism of the tyrosinase reaction toward the tyr98 residue in the caddie protein. *PLoS Biol.*, **16**, e3000077.
- 14) Fujieda, N., Ikeda, T., Murata, M., Yanagisawa, S., Aono, S., Ohkubo, K., Nagao, S., Ogura, T., Hirota, S., Fukuzumi, S., et al. (2011) Post-translational his-cys cross-linkage formation in tyrosinase induced by copper(II)-peroxo species. *J. Am. Chem. Soc.*, **133**, 1180–1183.
- 15) Fujieda, N., Umakoshi, K., Ochi, Y., Nishikawa, Y., Yanagisawa, S., Kubo, M., Kurisu, G., & Itoh, S. (2020) Copper–oxygen dynamics in the tyrosinase mechanism. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **59**, 13385–13390.

著者寸描

●藤枝 伸宇 (ふじえだ のぶたか)



大阪府立大学大学院生命環境科学研究科
応用生命科学専攻教授。博士（農学）。

■略歴 1978年兵庫県に生る。2001年京都大学農学部卒業，06年同大学院農学研究科博士後期課程修了，06年日本学術振興会特別研究員（PD），06年京都大学次世代開拓研究ユニット特定助教，09年大阪大学大学院工学研究科助教，17年大阪府立大学大学院生命環境科学研究科准教授，21年より現職。この間，13年スイスパーゼル大学客員教授。

■研究テーマと抱負 タンパク質と金属が相互作用することによるケミストリーを軸に生体機能の再現に加え，触媒やイオンポンプなど様々な新規機能の創出をめざして研究しています。

■ウェブサイト <http://www.biosci.osakafu-u.ac.jp/BPC/>

■趣味 生き物係，ライトカゴ釣り。

●伊東 忍 (いとう しのぶ)



大阪大学大学院工学研究科応用化学専攻教授。工学博士。

■略歴 1958年福井県に生る。81年大阪大学工学部石油化学科卒業，83年同大学院工学研究科石油化学専攻修士課程修了，86年同大学院工学研究科応用精密化学専攻博士課程修了（工学博士），86年大阪大学工学部・助手，94年大阪大学工学部助教，99年大阪市立大学大学院理学研究科教授，2008年10月より現職。

■研究テーマと抱負 錯体化学，触媒化学，生物無機化学。これまで，生体触媒の分子機構解明に注力してきたが，これからはそれを基盤とした触媒開発をめざす。

■ウェブサイト <http://www-bfc.mls.eng.osaka-u.ac.jp/ItohLab/>

■趣味 スポーツ観戦，ゴルフ。