

蛋白質の His 残基 tautomerism 解明のための NMR スペクトル

— 炭酸脱水酵素 His64 の機能について —



研究ノート

島原秀登**, 小林祐次*

NMR Spectrum for Clarification of Histidine Tautomerism in Protein — The Function of His64 in Carbonic Anhydrase —

Key Words : histidine, tautomerism, NMR, carbonic anhydrase, His64

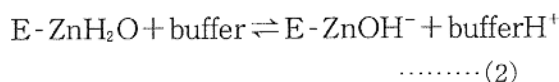
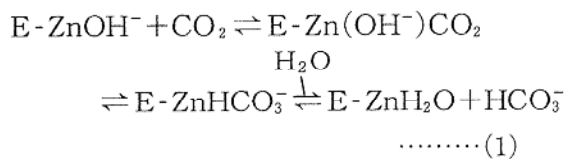
1. はじめに

近年、ヒスチジンの tautomerism にかかわる NMR 解析技術が確立され、その結果、蛋白質の構造-機能相関の解析に著しい進歩がみられる。ここでは、ヒスチジンの互変異性体と電荷の話を中心に、安定同位体標識と NMR 法を利用したヒスチジンの tautomerism の解明法について解説する。最近、私達は NMR の対象としては大きい分子である炭酸脱水酵素のヒトアイソザイム II 型 (hCA II, M. w. 29,000) の解析に成功したので、これを例として 12 個の

ヒスチジン残基の挙動から得られる情報をもとに、酵素内での様々な tautomerism について説明する。特に、His64 の特異な tautomerism と触媒機能の相関について述べる。

2. 炭酸脱水酵素の活性と His 64 の関係

炭酸脱水酵素は細胞内呼吸、眼内圧の調節、胃液や血液の pH の調節など生体内で数多くの役割をもつことで知られており、学際的に研究が為されてきた。機能解明に関するこれまでの研究は次のような触媒機構モデルを提唱している¹⁾。E は酵素、Zn は酵素内亜鉛原子を表す。



本酵素は CO₂ と H₂O を基質、HCO₃⁻ と H⁺ を生成物とする反応を触媒し、10⁶/s という速いターンオーバー数と、pH が高いほど高い活性 (pK7.3) を有する。この反応において、(2) 式が律速段階と言われている。亜鉛原子は酵素のくぼみの奥深くに位置するため、(2) 式の buffer の拡散のみによってこの速いターンオーバー数を維持できるとは解釈しがたい。そこで、His 64 がくぼみの側面に位置することから、これを経

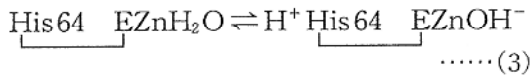
*Yuji KOBAYASHI
 1941年12月2日生
 1972年3月大阪大学大学院理学研究科博士課程高分子専攻修了
 現在、大阪大学薬学部、教授、理学博士、生物物理化学
 TEL 06-879-8220
 FAX 06-879-8224
 E-Mail yujik@protein.osaka-u.ac.jp



**Hideto SHIMAHARA
 1969年10月15日生
 大阪大学大学院理学研究科博士後期3年生物化学専攻(在学中)
 現在、大阪大学蛋白質研究所、物性部門、学生、生物化学
 TEL 06-877-9725
 FAX 06-879-8600
 E-Mail shima@protein.osaka-u.ac.jp



由してH⁺が酵素外部のbufferに受け渡される機構(プロトン輸送機構(3)式)²⁾が考えられた。



今回、私たちはこの仮説を支持するNMRデータを得た。

3. 安定同位体標識によるヒスチジンイミダゾール環の解析

今までのヒスチジンイミダゾール環の解析方法はシグナルの重なりから生じる測定精度の低さに問題があったが、最近の飛躍的に進歩した安定同位体標識技術と多次元NMR法によってイミダゾール環のすべての核を観測でき、かつシグナルの重なりを避けることができるようになった。なかでも、全¹⁵N核標識蛋白質を使った¹⁵N/¹Hシフト相関測定³⁾は、ヒスチジン tautomerism の解析にきわめて有効で、その相関スペクトルのシグナルパターンから、Nδ1-H異性体、Nε2-H異性体、プラス電荷をもつ charged 型の3タイプを、図3-1に示すように簡単に区別することができる^{4)~7)}。

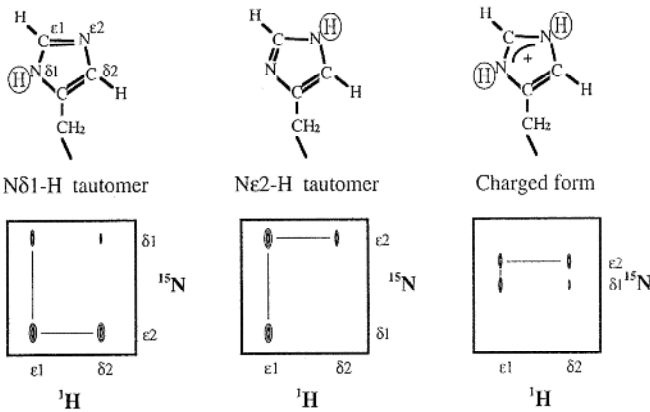


図3.1 ヒスチジンの互変異性体と¹⁵N/¹Hシフト相関スペクトルの関係

4. 炭酸脱水酵素のヒスチジン残基の tautomerism

図4-1は¹⁵N核標識hCA IIの¹⁵N/¹Hシフト相関スペクトルである。イミダゾール環¹⁵N核のpH依存性曲線を図4-2, 4-3に示す。図4-2でHis64(⑨)のpH依存性曲線は他と比べて異

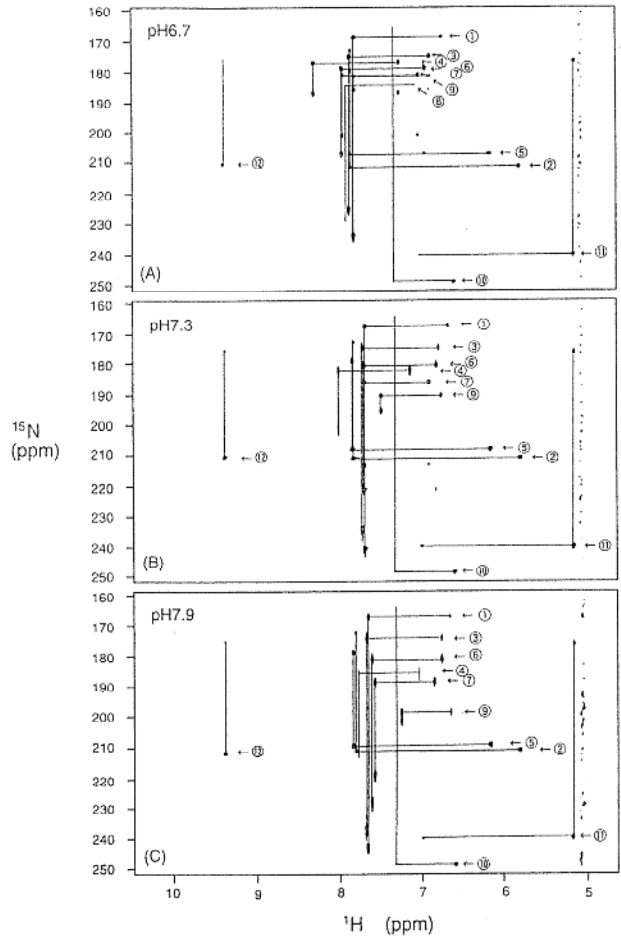


図4.1 ¹⁵N-hCA IIのHis残基イミダゾールリング領域の¹⁵N/¹H HSQC スペクトル (pH 6.7, 7.3, 7.9), 縦線と横線はそれぞれ、Hε1とNε2のレゾナンスを示す。

質な挙動を示している。そこで、この曲線からHis64の tautomerism を理解するために、曲線と tautomerism の関係を次のように解釈した。

最も一般的なヒスチジン残基は、低いpHでは charged 型、高いpHでは Nε2-H異性体型をとる。この時のpH依存性曲線は図4-4の左下に示すようになる。一方、低いpHで charged 型、高いpHで Nδ1-H異性体型をとるような場合、図4-4の右下に示すように、Nε2とNδ2のケミカルシフトの位置が相対的に入れ替わる。それでは、低いpHで charged 型、高いpHで両方の異性体型をとる場合を考えると、Nε2-H異性体型とNδ1-H異性体型の比に応じてpH依存性曲線は異なった様相を呈することになる。これら異性体間では交換が起こり、速い

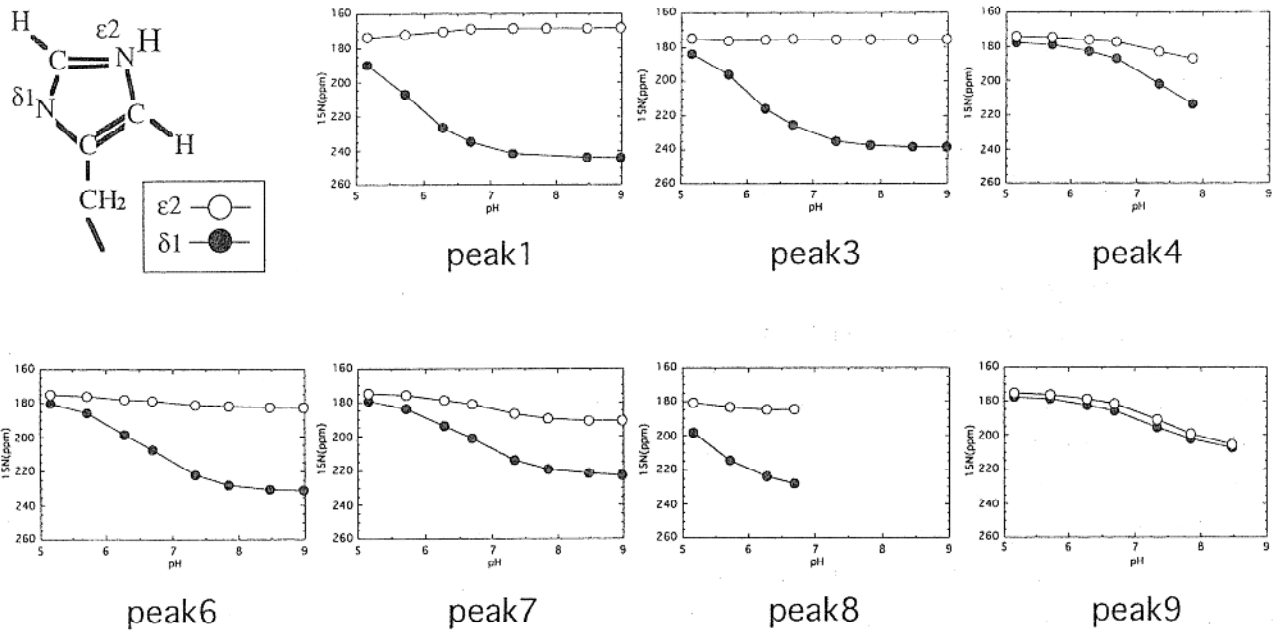


図 4.2 hCA II His 残基イミダゾール環の ^{15}N 核 pH 依存性曲線 (pH に依存するシグナル)

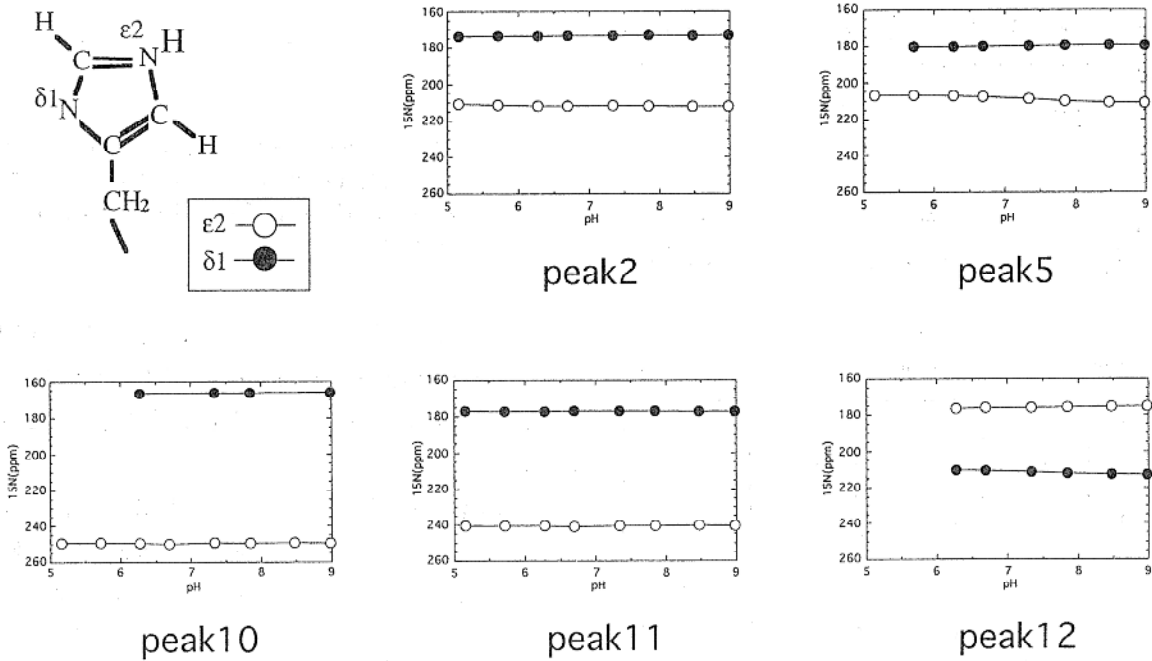


図 4.3 hCA II His 残基イミダゾール環の ^{15}N 核 pH 依存性曲線 (pH に依存しないシグナル)

交換の場合には図4-4のように $\text{N}\epsilon 2$, $\text{N}\delta 1$ の核が平均化される。ただし、遅い交換では図4-4の左下図と右下図のただ単なるたし合わせに過ぎない、4つの曲線となる。

hCA II の場合に適用してみると、酵素表面

にある6つの His 残基 (①, ③, ④, ⑥, ⑦, ⑧) は pH に依存して主に charged 型から $\text{N}\epsilon 2\text{-H}$ 異性体型となる tautomerism であり, Zn に配位した His94, 96 (② or ⑤) と酵素内部に存在する His107(⑩), His122(⑪) は pH に依存しな

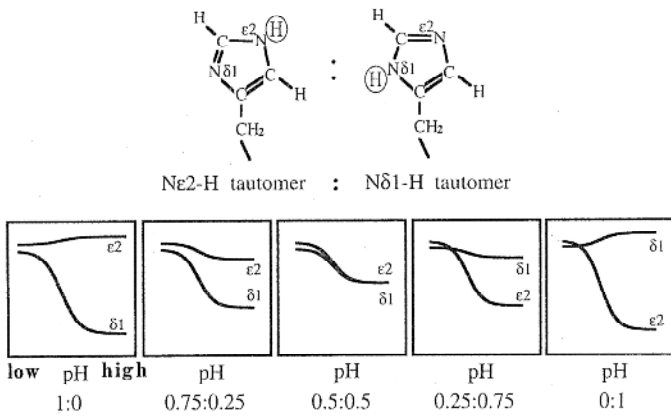


図 4.4 pH 依存性曲線と His 残基の tautomerism の関係 (2つの互変異性体が様々な比で存在する)

い $N\delta 1-H$ 異性体型, Zn に配位したもうひとつの His119(ⓐ) は pH に依存しない $Ne2-H$ 異性体型と解釈できる。そして, His64(ⓑ) は, 図 4-4 中央と一致することから, 低い pH では charged 型, 高い pH では同一比で両異性体が存在し, かつ速く交換する tautomerism であると解釈できる。

pH 依存性曲線の pK 値は His 残基がどのような環境にあるかを知る上で重要な情報である。一般にヒスチジン固有の pK 値 6.0 より高い pK をもつ His 残基は酸性環境に, 低い pK 値の場合は塩基性環境にある。各ヒスチジン残基の pK 値は 6.0 付近であり, His64 の pK 値は 7.3 と高い。

His64 の pK 値が酵素活性の pK 値と同じことから, 図 4-5 に示すような charged 型が触媒に寄与しない非活性型, 異性体の交換状態が触媒に寄与する活性型であり, 2つの異性体の

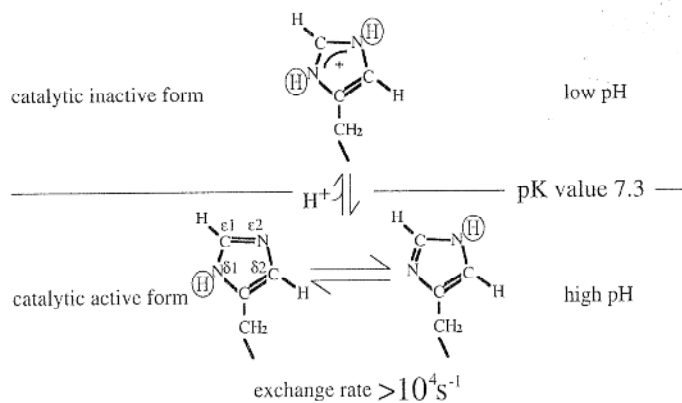
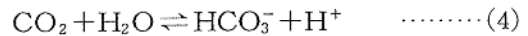


図 4.5 His64 tautomerism と性質

交換によって H^+ を輸送していると捉えることができる。また, His64 の pK 値からその環境はかなりの酸性状態にあり, 近傍の酸性残基と, 亜鉛原子に結合した超酸性水分子の影響を受けていると考えられる。従って, 酵素のくぼみの奥深くにある亜鉛原子と酵素外部との間には幾つかの酸性残基と His64 を経由して H^+ を輸送する機構が存在し, その活性は His64 の tautomerism に依存していると考えられる。

5. 生体内での His64 の役割

一般に, 酵素反応がどちら方向に進むかは基質または生成物の濃度によって決定されている。



(4)式では pH が低下すると反応は右から左へ進行するはずだが, 炭酸脱水酵素の触媒下では, pH の低下によって酵素活性が下がるので, 右から左の反応は起こりにくい。生体内ではこのような酵素の性質を使って, pH を調節している。例えば, ある細胞で盛んな活動から過剰な CO_2 が存在する場合であっても pH の過度の低下を抑制できる。また, 胃の細胞では, $H^+ - K^+$ ポンプによって H^+ を外部(消化管)に放出する。その時も, H^+ の減少が右向きの反応を誘導し, かつ酵素を活性化するため多くの H^+ を生産する。上述した His64 の tautomerism からこれらの現象をみると, 一方では His64 は両異性体の交換によって高い触媒活性を維持し(図 4-5 下段の横の関係), もう一方では低 pH 非活性 charged 型と高 pH 活性異性体型の存在比によって gradient な酵素活性のスイッチのオン・オフを担っている(図 4-5 の上下の関係)。つまり, His64 は pH 調節能をもち, かつ pH センサーとしての機能を司っているのだろう。pH 調節能は His64 の pK 値から生理的 pH7.4 では charged 型 : $Ne2-H$ 異性体型 : $N\delta 1-H$ 異性体型 = 2 : 1 : 1 で存在し, 機能の最も強い状態にある。従って, 炭酸脱水酵素は, His64 のこのような機能によって, 生理的な pH が低い状態では酵素反

応を止め、逆に生理的な pH が高い状態では酵素反応を開始し、pH を維持すると考えられる。

6. おわりに

hCA II のヒスチジン残基は様々な役割を演じている。ヒスチジン残基近傍における局所環境の多様性は tautomerism に反映されている。His64 の tautomerism の解明には、pH 依存性曲線の新たな解釈を必要とした。その結果、低い pH で charged 型、高い pH で異性体交換型をとることがわかり、構造-機能相関を語れるまでに至った。以前から、生化学の分野で酵素活性の観点からしばしば重要視されてきた蛋白質のヒスチジン残基のうち、hCA II His64 と同様な挙動をし、活性に関与するヒスチジン残基が存在しているのではないだろうか。今後、この手法が、蛋白質のヒスチジン残基 tautomerism と機能の相関の解明の一手法として応用されることが期待される。

文 献

- 1) Silverman, D. N., & Lindskog, S. (1988) *Acc. Chem. Res.* 21, 30-36.
- 2) Steiner, H. Jonsson, B. H., & Lindskog, S. (1975) *Eur. J. Biochem.* 59, 253.
- 3) Bax, A., Ikura, M. & Tschudin, R. (1990) *J. Mag. Res.* 86, 304-318
- 4) Bachovchin, W. W., & Roberts, J. D. (1978) *J. Am. Chem. Soc.* 100, 8041.
- 5) Blomberg, F., Maurer, W., & Ruterjans, H. (1977) *J. Am. Chem. Soc.* 99, 8149-8159.
- 6) Pelton, J. G., Torchia, D. A., & Roseman, S. (1993) *Protein Science* 2, 543-558.
- 7) Van Dijk, A. A., Scheek, R. M., & Robillard, G. T., (1992) *Biochemistry* 31, 9063-9072.

