

3-ニトロチロシンをプローブとしたリボヌクレオチド還元酵素内電子伝達反応制御機構の解析

横山 健一¹、JoAnne Stubbe^{1,2}

Massachusetts Institute of Technology, Departments of ¹Chemistry and ²Biology.

ken.yoko@mit.edu, stubbe@mit.edu

【序】 リボヌクレオチド還元酵素 (RNR) は DNA を有するほぼ全ての生物種に保存される酵素で、リボヌクレオチドを還元して 2'-デオキシリボヌクレオチドを生成し、DNA の修復や複製に必要な全ての核酸塩基を供給する。全ての真核生物および大腸菌などの一部の原核生物が有する I 型 RNR は 2 種類のタンパク質 α と β から構成される。大腸菌の RNR はそれぞれが二量体 (α_2 , β_2) として存在する。本酵素は β_2 が安定なチロシルラジカル ($Y_{122}\cdot$)- Fe^{III}_2 クラスタを有しており、この $Y_{122}\cdot$ が 35 以上離れた α_2 の活性部位中のシステイン残基 (C_{439}) を可逆的に酸化し、生じたチールラジカルを触媒的に用いてリボヌクレオチド還元反応を触媒する。このような長距離のラジカル移動は金属補因子を経由しないものとしては極めて稀で、芳香族性アミノ酸残基を用いるプロトン共役電子移動 (proton-coupled electron transfer, PCET) が提唱されている (図 1)¹。この PCET は α_2 に基質が結合することで引き起こされるタンパク質のコンフォメーション変化で制御されていると考えられているが、その機構については未解明である。 $Y_{122}\cdot$ の還元は一連の反応の第一段階であり、酵素が Y_{122} - β_2 と Fe^{III}_2 クラスタ間のプロトン移動を通じて、全体の反応を制御している可能性が考えられる。そこで本研究では、プロトンの授受を可視紫外吸光スペクトルで観測できる 3-ニトロチロシン [NO_2Y , pK_a 7.1, phenol $\lambda_{max} = 360$ nm, phenolate $\lambda_{max} = 424$ nm, $\Delta E^\circ = +210$ mV (pH 7.6 でのチロシンとの差)] をプローブとして Y_{122} - β_2 での PCET 反応機構の解析を行った。

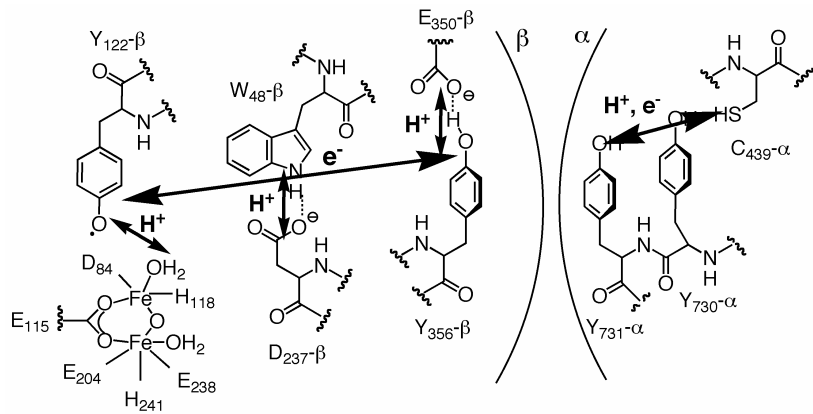


図 1. 提唱されているリボヌクレオチド還元酵素内 PCET

【実験・結果】

1. [NO_2Y]- β_2 の調製と NO_2Y ラジカル ($NO_2Y\cdot$) の観測

NO_2Y の部位特異的導入は orthogonal aminoacyl-tRNA synthetase (RS)/tRNA 法²を用いた。本方法は、 NO_2Y に特異的になるように基質認識を改変した RS³ と、この RS と TAG コドンを認識する tRNA を目的遺伝子と大腸菌内で共発現することで、 NO_2Y を TAG コドンに対応して導入するものである。様々な条件検討の結果、 NO_2Y 存在下で完全長の β を発現することに成功し、 NO_2Y の導入を精製酵素の可視紫外吸収スペクトルによって確認した。得られた酵素

から apo 型の NO₂Y-β2 を調製して Fe(II) を用いてクラスターを再構成したところ、NO₂Y (25°C における半減期 10-15 秒) を EPR において観測することが出来た。

2. [NO₂Y•]-β2 の酵素活性と速度論解析 (電子・プロトン移動の非共役化)

シチジン二リン酸 (CDP) を基質として [NO₂Y•]-β2 の酵素活性を測定したところ、NO₂Y• の約半分量のデオキシシチジン二リン酸 (dCDP) が ~120 sec⁻¹ で生成することが分かった。この dCDP 生成速度は野生型の 12-60 倍である。さらに反応中の可視吸光スペクトルを観測したところ、dCDP と同等量の NO₂Y フェノレートが 65 - 285 sec⁻¹ で生成することが分かった。以上より、本変異体では電子移動と、タンパク質コンフォメーション変化に伴うプロトン移動とが非共役化されており、そのために反応速度が上がっていると考えられる。

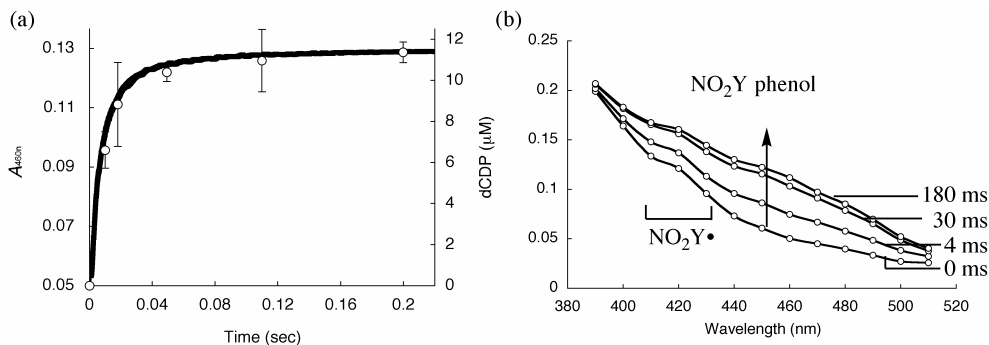


図 2 [NO₂Y•]-β2 の反応速度論的解析 (a) フェノレート (実線) と dCDP (○) 生成の経時変化 (b) UV-vis スペクトルの経時変化

3. Y₃₅₆• の捕捉

さらに本反応を迅速凍結 EPR 法によって観測したところ、~100 sec⁻¹ で NO₂Y• の約 50% が新たなラジカル種へと変換されることが分かった (図 3)。このラジカル種は Y₇₃₀F と Y₇₃₁F-α2 変異体でも観測され、Y₃₅₆F-β2 では観測されなかった。さらに Pulsed Electron-Electron Double Resonance の結果と合わせて、本ラジカル種は主に Y₃₅₆• と考えられる。

【結論】 本研究の結果から、NO₂Y• はその高い酸化還元電位のために Fe^{III}₂ クラスターからのプロトン移動がなくても W₄₈ もしくは Y₃₅₆-β2 を酸化できると考えられる (非共役)。そのため、野生型の 12-60 倍の速度で dCDP が生成した後、NO₂Y• が再生せずに PCET 経路上の Y₃₅₆• が蓄積すると考えられる。これらの結果は RNR がプロトンの授受によって電子伝達反応を制御していることを強く示唆する初めての実験的な証拠である。

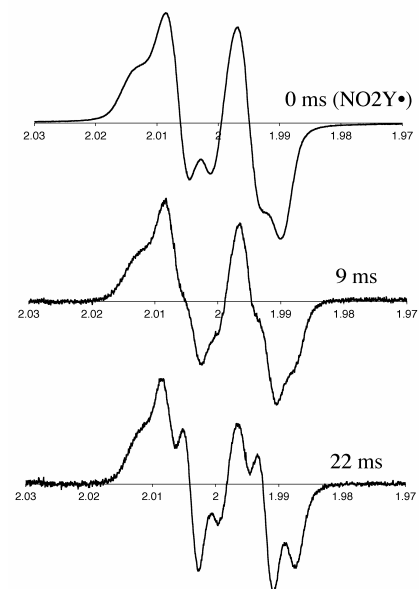


図 3 EPR スペクトルの経時変化

【引用文献】1. Stubbe, J. et al., Chem. Rev. **103**, 2167-2201 (2003); 2. Wang, J. Science **292**, 498-500 (2003); 3. Neumann, H. et al., J. Am. Chem. Soc. **130**, 4028-4033 (2008).