

X 線結晶構造解析に基づくチロシナーゼの成熟化および反応機構の解明

安田女子大学薬学部薬学科

的 場 康 幸

Tyrosinase (Ty) and catechol oxidase (CO) are members of type-3 copper enzymes. While Ty catalyzes both phenolase and catecholase reactions, CO catalyzes only the latter reaction. In the present study, Ty was found to catalyze the catecholase reaction, but hardly the phenolase reaction in the presence of the metallochaperon called “caddie protein (Cad)”. The ability of the substrates to dissociate the motif shielding the active-site pocket seems to contribute critically to the substrate specificity of Ty. In addition, a mutation at the N191 residue, which forms a hydrogen bond with a water molecule near the active center, decreased the inherent ratio of phenolase versus catecholase activity. Unlike the wild-type complex, reaction intermediates were not observed when the catalytic reaction toward the Y98 residue of Cad was progressed in the crystalline state. The increased basicity of the water molecule may be necessary to inhibit the proton transfer from the conjugate acid to a hydroxide ion bridging the two copper ions. The deprotonation of the substrate hydroxyl by the bridging hydroxide seems to be significant for the efficient catalytic cycle of the phenolase reaction.

1. 緒 言

メラニン色素生成に関わる酵素としてチロシナーゼ (Ty) が知られている。本酵素は、アミノ酸の一種であるチロシンをメラニン前駆物質であるドーパキノンへと変換する反応を触媒する。この反応は皮膚や毛髪のメラニン色素合成に関わっており、皮膚で過剰にメラニンが生成するとシミやソバカスの原因となる。このため、Ty 活性を阻害すれば、メラニン色素の生成を抑制できる。Ty は、その活性中心に2個の銅イオンを含むⅢ型銅結合酵素であり、ヒトから細菌に至るまで広く分布している。また、本酵素の活性中心部位を含む約250アミノ酸からなる領域は、生物種を超えてアミノ酸配列上での相同性が認められる。Ty は、チロシンやチラミンをはじめとするフェノール基質、および、ドーパやドーパミンをはじめとするカテコール基質に作用し、両者をオルトキノンに変換する。それぞれの酵素活性をフェノラーゼおよびカテコラーゼ活性という。一方、Ty と同じⅢ型銅結合酵素であるカテコールオキシダーゼ (CO) は、フェノールを基質とすることができず、カテコラーゼ活性のみ有する。

Ⅲ型銅結合酵素の活性中心は、デオキシ型、オキシ型、メト型という3つの構造をとる。デオキシ型では活性中心にある2つの銅イオンが還元されており、分子状酸素と結合してオキシ型を生じる。メト型は、活性中心にある2つ

の銅イオンが酸化されているものの、分子状酸素とは結合していない構造を指す。Ty のフェノラーゼ活性はオキシ型酵素によって触媒されるが、カテコラーゼ活性はオキシ型でもメト型でも触媒される。オキシ型酵素がフェノラーゼ活性を触媒すると、デオキシ型に変換され、次の触媒サイクルに向かう。一方、オキシ型酵素がカテコラーゼ活性を触媒するとメト型に変換され、メト型酵素がカテコラーゼ活性を触媒すると、デオキシ型に変換される。このため、Ty と CO の酵素学的違いとは、オキシ型酵素がフェノラーゼ活性を持つかどうかという点に集約できる。

研究対象としている放線菌由来 Ty は、特異的な銅輸送タンパク質 (Cad) との複合体として産生される。この複合体に銅イオンを添加すると、Ty の活性中心に銅イオンが取り込まれ、Ty は活性型に変化する。その一方で、Cad は複合体から解離し、解離した Cad は重合して凝集体を形成する。Ty・Cad 複合体の結晶構造 (図1) においては、



図1 Ty・Cad 複合体の結晶構造
Ty をオレンジで、Cad をシアンで示している。



Elucidation of maturation and catalytic mechanisms of tyrosinase based on the crystal structure

Yasuyuki Matoba

Faculty of Pharmacy, Yasuda Women's University

CadのY98残基が、Tyの活性中心にフタをするように位置している¹⁾。筆者は、CadのY98残基がTyの触媒作用により、ドーパキノンへと変換されることを発見した²⁾。また、Y98残基に対する酸化反応を時間分割X線結晶構造解析で観察することにより、触媒機構を予測することに成功した³⁾。一方、海外グループの研究により、活性中心近傍に存在するシールドモチーフや水分子がTyのフェノラーゼ活性に重要であると指摘されている⁴⁾。

本研究では、放線菌由来Tyを研究対象とし、その成熟化機構と反応機構を構造学的に明らかにすることを試みる。得られた知見は、より高等な生物の持つTyにおいても共通していることが予想され、ヒトのTyを対象にした効果的な阻害剤開発に役立つと考えられる。

2. 方 法

本研究では、活性中心近傍に存在する水分子Wat4に着目した(図2)。放線菌Tyにおいて、この水分子はE182とN191残基の側鎖と水素結合している。各種Ⅲ型銅結合酵素のアミノ酸配列を比較すると、放線菌TyのE182に対応する残基はグルタミン酸であり、高度に保存されている。一方、N191に対応する残基は、Tyでは保存されている場合が多いが、COではグリシンになっている場合が多い。そこでN191残基をグリシンに置換したN191G変異体を作成した。この変異体の酵素活性を調査するとともに、そのX線結晶構造解析を実施した。なお、本研究で使用したNH₂OHは、酵素に結合した銅イオンを還元する作用を持つため、分子状酸素存在下でNH₂OHを加えると、オキシ型酵素を生じさせることができる。

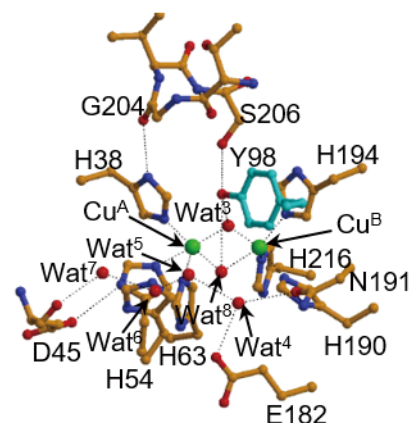


図2 Ty・Cad複合体におけるTyの活性中心の構造
Tyをオレンジで、Cadをシアンで示している。

3. 結 果

Cadと結合していない野生型Tyは調製できたが、N191G変異型Tyは調製できなかった。そこで、Cadと複合体を形成している野生型もしくはN191G変異型Tyに、0.1mM CuSO₄と1mM NH₂OHを添加し、30℃で5分間放置することで、Tyを活性化した。その後、種々の濃度の基質を加え、470nmの吸光度の増加を経時的に測定した。なお、フェノール基質としてチラミン、カテコール基質としてドーパミンを用いた。得られたカイネティクスパラメーターを表1に示す。

野生型複合体およびN191G変異型複合体の結晶を作成し、1mM CuSO₄と10mM NH₂OHを含む溶液中で24時間ソーキングした後に回折強度を測定し、その結晶構造を決定した。その結果、両複合体でY98残基に対する反応が

表1 Tyのカイネティクスパラメーター

Parameters	Wild type*	N191G*	Cad-free Ty
Dopamine catecholase activity			
k_{cat} (s ⁻¹)	42 ± 5	2.6 ± 0.2	135 ± 9
K_{m} (mM)	14 ± 3	4.5 ± 0.8	4.1 ± 0.8
$k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ (mM ⁻¹ s ⁻¹)	3.1 ± 0.7	0.58 ± 0.12	33 ± 7
Tyramine phenolase activity in the absence of dopamine			
k_{cat} (s ⁻¹)	0.047 ± 0.002	0.038 ± 0.004	9.7 ± 0.9
K_{m} (mM)	3.9 ± 0.6	4.4 ± 1.6	14 ± 3
$k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ (mM ⁻¹ s ⁻¹)	0.012 ± 0.002	0.0084 ± 0.0032	0.70 ± 0.19
Tyramine phenolase activity in the presence of dopamine			
k_{cat} (s ⁻¹)	3.6 ± 0.1	0.073 ± 0.009	
K_{m} (mM)	15 ± 2	79 ± 14	
$k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ (mM ⁻¹ s ⁻¹)	0.23 ± 0.02	0.00092 ± 0.00020	

* 銅非結合型複合体にCu(II)とNH₂OHを添加し5分後に基質を添加した。

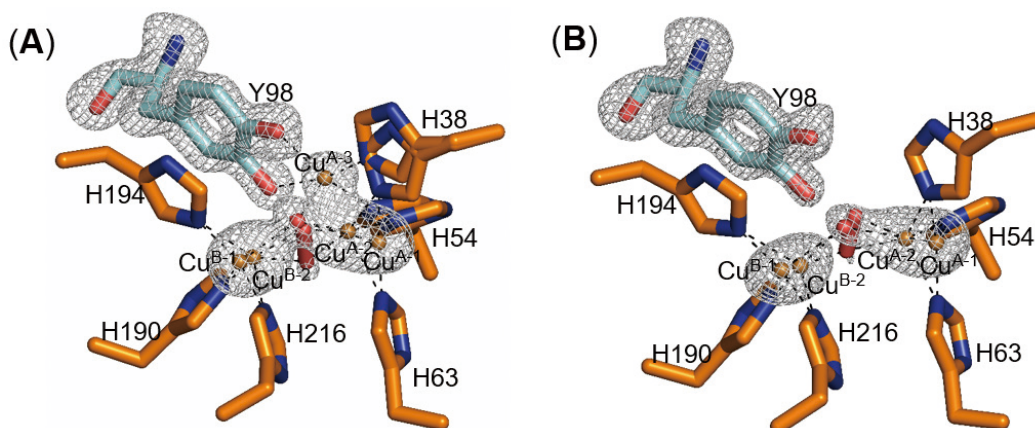


図3 Ty・Cad複合体におけるY98、Cu^AおよびCu^Bの電子密度
(A)は野生型、(B)はN191G変異型のものを示している。Tyをオレンジで、Cadをシアンで示している。

進行していることが観察された(図3)。しかしながら、野生型複合体では、Cu(II)結合型ドーパセミキノンを含む中間体と、架橋部位に水酸化物イオンを持つデオキシ中間体(デオキシ2型)の存在が示唆されたが、N191G変異型複合体ではこれらの中間体が見いだされなかった。

4. 考 察

Cadと結合していない野生型Tyを用いたときと比べ、Cadが存在するとTyのカテコラーゼ活性およびフェノラーゼ活性は減少した(表1)。ただし、フェノラーゼ活性の減少の方が顕著である。一方、ドーパミンを共存させると、Cad存在下における野生型Tyのフェノラーゼ活性が増加した。CadはTyに銅を輸送するだけでなく、活性中心をシールドする役割を持つと考えられる。すなわち、本実験結果は、フェノールに比べカテコールの方が、活性中心近傍にあるシールド部分を引きはがす能力が高いことを示唆している。またこのことは、Tyの成熟化の最終段階において、カテコール基質が基質結合ポケットに侵入し、シールド部分を取り除く作用を持つこと、および、シールド部分の存在が酵素の見かけ上の基質特異性に影響を及ぼすことを示している。一方、N191G変異型Tyはカテコラーゼ活性を有していたものの、ドーパミン添加の有無に関わらず、フェノラーゼ活性が極めて低かった。このことは、シールド部分だけでなく、活性中心近傍における水分子の安定性・塩基性も、基質特異性に影響を及ぼしていることを示唆する。

筆者らが行ったCadのY98残基に対する時間分割X線結晶構造解析³⁾から、Tyのフェノラーゼ活性においては、オキシ型酵素による酸素添加反応後にCu(II)結合型ドーパセミキノンが生じる。その後、電子移動を伴って、デオキシ2型とドーパキノンへと変換されることが示唆された。Cu(II)結合型ドーパセミキノンの生成時には、2つの銅イオンのうちCu^Aが大きく位置を変え、基質の水酸基の方へ

と近づく。一方、デオキシ2型においては、Cu^Aは元の位置に戻る。ただし、触媒サイクルで酸素分子と結合するデオキシ型では2つの銅イオン間の架橋分子が水であるのに対し、デオキシ2型では水酸化物イオンであり、Cu^AとCu^Bの間の距離が短くなる。

Tyのモデル錯体を利用した研究から、Tyのフェノラーゼ活性は、基質のフェノール性水酸基が脱プロトン化しているときに効率よく触媒されることが示されている⁵⁾。今回、フェノラーゼ活性が低いN191G変異体では、Cu(II)結合型ドーパセミキノンとデオキシ2型中間体が見られなかった。このことは、Tyのフェノラーゼ活性が効率よく回転するためには、架橋位置に水酸化物イオンが存在するデオキシ2型中間体の生成が必要であり、この中間体の水酸化物イオンが、次のフェノール基質を脱プロトン化するのではないかと示唆される。野生型Tyにおいて、Wat4はE182とN191残基と相互作用し安定化されるとともに、塩基性が高くなっている。また、フェノラーゼ活性の触媒サイクルで水素イオンが生じる。これらのことを合わせて考えると、野生型ではWat4の部位で酵素反応中に生じた水素イオンが保持され、架橋部位が水分子に変換されるのを妨げていると推測される。一方、N191G変異体ではWat4の位置で水素イオンを保持できず、デオキシ2型が速やかに消失し、効率的な触媒サイクルを維持できないのではないかと考えられる。

5. 総 括

本研究を通じて、カテコール化合物がTyの成熟化を促進していること、および、活性中心近傍の水分子の安定性・塩基性により、Tyのフェノラーゼ活性が制御されていることが明らかとなった⁶⁾。これらの知見は美白用化粧品の開発に役立つものと考えられる。

(引用文献)

- 1) Matoba Y, Kumagai T, Yamamoto A, Yoshitsu H, Sugiyama M. Crystallographic evidence that the dinuclear copper center of tyrosinase is flexible during catalysis. *J. Biol. Chem.* **281**, 8981–8990, 2006.
- 2) Matoba Y, Kihara S, Muraki Y, Bando N, Yoshitsu H, Kuroda T, Sakaguchi M, Kayama K, Tai H, Hirota S, Ogura T, Sugiyama M. Activation mechanism of the *Streptomyces* tyrosinase assisted by the caddie protein. *Biochemistry* **56**, 5593–5603, 2017.
- 3) Matoba Y, Kihara S, Bando N, Yoshitsu H, Sakaguchi M, Kayama K, Yanagisawa S, Ogura T, Sugiyama M. Catalytic mechanism of the tyrosinase reaction toward the Tyr98 residue in the caddie protein. *PLoS Biol.* **16**, e3000077, 2018.
- 4) Pretzler, M, Rompel, A. What causes the different functionality in type-III-copper enzymes? A state of the art perspective. *Inorg. Chim. Acta* **481**, 25–31, 2018.
- 5) Itoh S, Kumei H, Taki M, Nagatomo S, Kitagawa T, Fukuzumi S. Oxygenation of phenols to catechols by a $\mu\text{-}\eta^2\text{:}\eta^2$ dicopper (II) complex: mechanistic insight into the phenolase activity of tyrosinase. *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 6708–6709, 2001.
- 6) Matoba Y, Oda K, Muraki Y, Masuda T. The basicity of an active-site water molecule discriminates between tyrosinase and catechol oxidase activity. *Int. J. Biol. Macromol.* **183**, 1861–1870, 2021.