

立体構造に基づく酵素触媒反応の解析・表現法

新規機能創製を目指した酵素蛋白質の

立体構造・触媒機構の系統的解析

研究者 長野 希美

産業技術総合研究所

概要

従来の酵素の分類である酵素番号は、主に基質・産物の化学構造や触媒反応に関わる補酵素などに基づいて分類が行われており、触媒機構において重要である蛋白質の配列情報や立体構造に関する情報が全く考慮されていませんでした。そこで、酵素とリガンドの反応部位に特に注目し、酵素立体構造の PDB データにおけるリガンドとの関係の解析から酵素触媒機構の系統的な分類までを行い、酵素触媒機構データベース・EzCatDB^{1,2}を開発しました。酵素の触媒機構は、蛋白質の立体構造と同様に、階層的に分類することができます。この階層的触媒機構分類は、従来の酵素番号による分類と比べて、酵素活性部位の構造と機能との関係を大きく反映します。

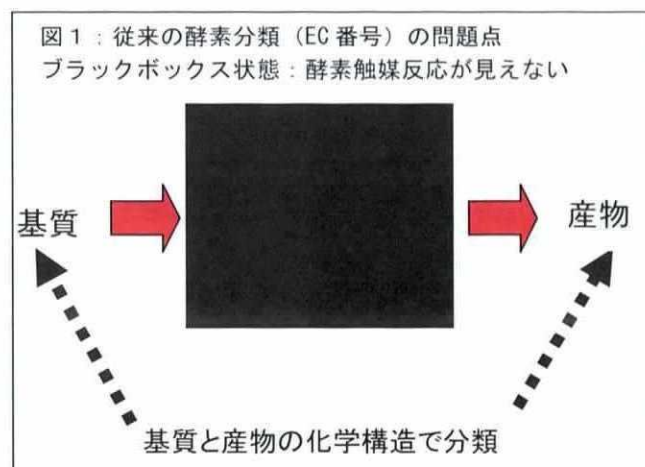
1. はじめに

酵素の立体構造、リガンドの化学構造、酵素とリガンドの相互作用など様々な角度から酵素の触媒機構を詳細に理解することから、その酵素に特有な阻害剤・活性化剤などをデザインすることが可能となると考えられます。

しかしながら、酵素に関わる情報学はまだ十分に整理されているとは言えません。従来の酵素の分類である酵素番号（EC 番号）は、図 1 のように、主に基質・産物の化学構造や触媒反応に関わる補酵素などに基づいて分類が行われており、触媒機構において重要であるタンパク質の配列情報や立体構造に関する情報が全く考慮されていません。

例えば、異なるフォールドやスーパーファミリーに属する酵素でも、類似の反応を触媒することもある反面、同じ配列ファミリーに属する酵素でも異なる戦略で触媒機能を担うこともあります。酵素番号は、そのような詳細な触媒機構を反映した分類法ではないのです。

また、酵素によっては、1 種類の反応だけでなく、複数の基本反応を組み合わせた複雑な反応を触媒することもあります。そのよ



うな場合、一つの酵素番号だけで触媒機構を表現するのは困難です。

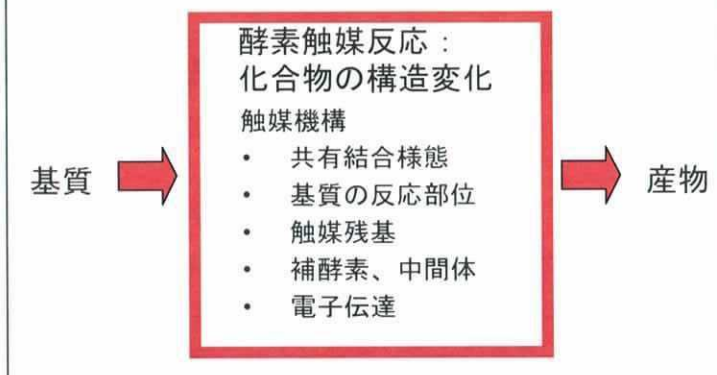
他方で、蛋白質の立体構造のデータは、現在、Protein Data Bank (PDB) に2万エントリ以上、登録されています。

このうち酵素の立体構造データには、蛋白質のみならず、基質・産物・補酵素や反応中間体、あるいはそのアナログ化合物や遷移状態のアナログなど重要なリガンド情報も多数含まれており、PDB そのものが、創薬を行う際の、リード化合物に関する有用情報の宝庫となっていると考えられます。

それにも関わらず、PDB などの従来の立体構造データベースでは、酵素蛋白質とリガンドとの関係がアノテーションされていません。

そこで、構造生物学や創薬を支援する観点から、図2に示しますように、酵素の活性部位とリガンドの反応部位に特に注目し、酵素立体構造の PDB データにおけるリガンドのアノテーションから酵素触媒機構まで包括的に取り入れて、酵素の系統的な分類まで行った、酵素触媒機構データベース・EzCatDB^{1,2}を開発しました。

図2：構造生物学を基にした新しい酵素分類
触媒機構を包括的なシステムとして解析・分類すべきである。



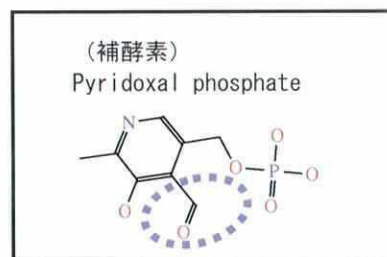
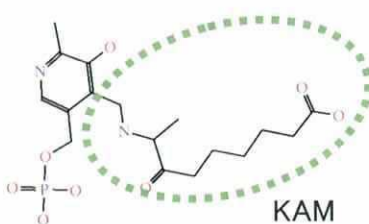
2. 酵素に結合する化合物の解析

従来の酵素関連のデータベースでは、初期化合物である基質及び最終化合物である産物の化学構造などは解析・分類されていますが、触媒反応の過程で生成する中間体、あるいは遷移状態の構造に注目してはいませんでした。しかしながら、酵素の触媒機構を考慮する上では、こうした途中過程の化合物の構造も解析しなければいけないと考え、EzCatDB では、そうした化合物やそれらの類似化合物を解析した結果を検索できるようにしています。図3には、EzCatDB による化合物データによる酵素検索の例を示しています。

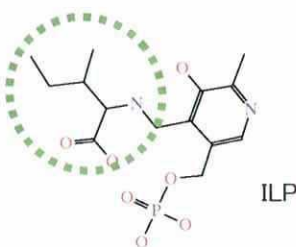
図3の右上の枠中に示してい

図3：Pyridoxal phosphate を補酵素とする酵素の中間体

8-amino-7-oxononanoate synthase



Branched-chain amino acid aminotransferase



Ornithine aminotransferase



1つピリドキサルリン酸 (Pyridoxal phosphate) を補酵素として結合し、さらに PDB のデータに中間体もしくはその類似化合物(アナログ)が結合する酵素を検索すると、該当する酵素がヒットします。

それらの酵素データを解析すると、図3に示されるような中間体化合物もしくはその類似化合物(アナログ)が結合していることが分かります。

これらの化合物は、ピリドキサルリン酸 (Pyridoxal phosphate) の水色の点線枠の部分で、緑色の点線枠に囲まれた部分で示した基質などによって置換した中間体の構造をとっています。また、右下には、酵素データに結合している反応中間体に類似したアナログ化合物のデータが示されています。基質や産物のアナログ化合物だけでなく、こうした中間体・遷移状態などのアナログ化合物から阻害剤などもデザインできると考えています。

3. 酵素触媒機構の階層的分類法の開発

本研究では、酵素の活性部位とリガンドの反応部位を考慮して、加水分解反応、転移反応に関して、次のような階層的分類 (RLCP) を行いました。

第1階層；基本反応(R)、

第2階層；リガンドの反応部位の構造(L)、

第3階層；触媒機構の種類(C)、

第4階層；酵素側の触媒残基、補酵素の種類など(P)

ここで、第1、第2階層は、基本的に従来の酵素番号と相関のある分類ですが、第3、第4層では、それぞれ、触媒機構、活性部位の構造を考慮しています。ここで、第3層の触媒機構は、触媒機構を酵素・リガンド分子の分子内・分子間の小ネットワークとして捉え、触媒基がどのように作用しているかを記述することによって、分類を行っています。

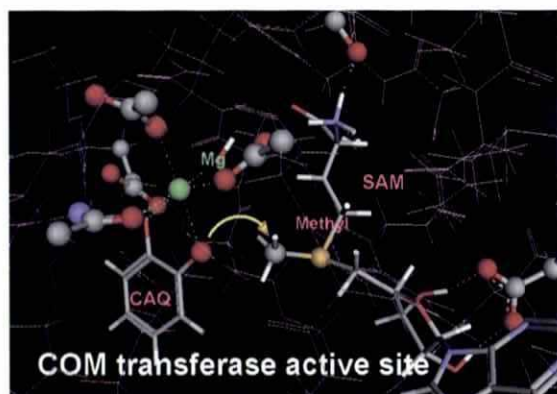
この触媒機構分類 RLCP は、従来の酵素番号による分類と比べて、酵素活性部位の構造と機能との関係を大きく反映するということが分かってきました。

例えば、リガーゼ酵素類の場合、通常、磷酸転移反応の後にアシル基転移反応を触媒します。リガーゼ類の活性部位の構造を解析すると、磷酸転移酵素の活性部位とアシル基転移酵素の活性部位の特性を併せ持つことが分かりました。従来の酵素番号では、EC 2.-.-.-に分類される転移酵素とは全く別個に、リガーゼは、EC 6.-.-.-に分類されます。しかしながら、本研究で構築した階層的触媒反応分類 RLCP を用いると、2種類の転移反応、磷酸転移反応とアシル基転移反応で記述することができます。

つまり、このような触媒機構の階層分類は、蛋白質のドメイン構造の階層的分類 (SCOP、CATH)^{3,4}と同様に扱うことができます。蛋白質立体構造の場合、各ドメインに対して、それぞれの構造分類を割り当てるのに対して、この触媒機構分類 RLCP では、各素反応に対して、触媒反応分類を割り当てます。したがって、単一ドメイン、単一反応に対しては、一つの分類で記述することができますが、複数のドメインから成るマルチ・ドメイン蛋白質、複数の反応で構成される触媒反応に対しては、複数の分類で記述することになります。従来の酵素番号が、酵素の名前に対応するのにに対して、触媒機構分類 RLCP は素反応に対応することになります。

4. 3次元的な酵素触媒機構表示法の開発

図4：三次元的な触媒機構の表示



PDB の酵素立体構造データは、触媒機構の一部のステップ、スナップショットしか示していません。また、従来の酵素触媒機構は、模式的な図でしか表現されていないことが多いのです。そこで、創薬を目指す観点からは、立体的な機構を考慮することも重要であると考え、酵素触媒機構の各ステップを三次元的なモデルで表現するシステム、3D-EzCat^{1,5}も開発しました。

図4に示しますのは、カテコール-O-メチル転移酵素の触媒部位とその基質の立体構造です。ここで、黄色い矢印は、カテコールの水酸基の酸素原子が、S-アデノシルメチオニンのメチル基を求核攻撃しているのを示しています。

本研究では、PDB に登録されている立体構造データを基に、このような触媒機構をモデリングし、さらに開発した3D-EzCatで表示することに成功しています。このように触媒機構を立体的に表現して解析することは、酵素の立体構造解析結果が増えていくにつれて、重要になってくると考えられます。

5. まとめ

本研究で開発しました加水分解反応、転移反応など触媒機構の解析・分類法をさらに他の反応にも適用し、さらに発展させることができると考えられます。例えば、脱離反応などは、比較的、転移反応などと共通する側面もあるのではないかと考えて、解析を進めています。

参考

- (1) Nozomi Nagano. (2005). EzCatDB: The Enzyme Catalytic-Mechanism Database. *Nucleic Acids Research*, **33** (1) Database Issue, *in press*.
- (2) 触媒機構データベース EzCatDB の URL : <http://mbs.cbrc.jp/EzCatDB/>
- (3) Murzin A.G., Brenner S.E., Hubbard T., Chothia C. (1995). SCOP: a structural classification of proteins database for the investigation of sequences and structures. *J. Mol. Biol.* **247**, 536-540.
- (4) Orengo, C.A., Michie, A.D., Jones, S., Jones, D.T., Swindells, M.B. and Thornton, J.M. (1997). CATH – A Hierarchic Classification of Protein Domain Structures. *Structure*, **5**, 1093–1108.
- (5) PCT 出願(PCT/JP2004/012118): 「蛋白質機能発現機構表示のための蛋白質構造三次元表示システム」(基礎: 特願 2003-306705)