



Title	鏡像異性体のどちらにも相互作用するヘム酵素はどちらの鏡像異性体に対しても反応性を示すのか？
Author(s)	
Citation	令和6（2024）年度学部学生による自主研究奨励事業研究成果報告書. 2025
Version Type	VoR
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/101261">https://hdl.handle.net/11094/101261</a>
rights	
Note	

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

## 令和6年度大阪大学未来基金「学部学生による自主研究奨励事業」研究成果報告書

ふりがな 氏名	おのづかゆきな 小野塚幸菜		学部 学科	理学部化学科	学年	3年
ふりがな 共同 研究者氏名			学部 学科		学年	年
						年
						年
アドバイザー教員 氏名	水谷泰久		所属	理学研究科化学専攻		
研究課題名	鏡像異性体のどちらにも相互作用するヘム酵素はどちらの鏡像異性体に対しても反応性を示すのか？					
研究成果の概要	研究目的、研究計画、研究方法、研究経過、研究成果等について記述すること。必要に応じて用紙を追加してもよい。(先行する研究を引用する場合は、「阪大生のためのアカデミックライティング入門」に従い、盗作剽窃にならないように引用部分を明示し文末に参考文献リストをつけること。)					

### ■ 研究目的、背景

生体内タンパク質は、構成原子は同じだが立体配置のみが異なる鏡像異性体を見分けることができる。鏡像異性体間で味、匂い、薬理作用が異なることが知られている。

アミノ酸のほとんどは鏡像異性体であり、L-アミノ酸と D-アミノ酸が存在するが、一般に生体内タンパク質は L-アミノ酸しか認識できないため、D-アミノ酸には生理活性がないと言われている。

私は、なぜタンパク質は L-アミノ酸しか認識しないのか、D-アミノ酸は認識しないのかが気になった。

そこで、L-チロシン(L-Tyr)を L-DOPA に変換するヘム酵素であるチロシンヒドロキシラーゼ(TyrH)を対象として、TyrH が D-Tyr も認識するのかを調べた。

D-Tyr を TyrH に添加した時のヘムの状態を紫外可視分光法、共鳴ラマン分光法で観測した結果、D-Tyr も TyrH と相互作用し、その相互作用は L-Tyr とは異なっていることが明らかになった。

しかし、D-Tyr が TyrH によって反応するのかはまだ明らかにされていないため、今回は、TyrH による D-Tyr の反応性を調べることにした。

### ■ 研究方法

1. 大腸菌の培養

2. TyrH の精製

3. 試料の作成

酵素なしの緩衝液に L-Tyr、D-Tyr、L-Tyr と D-Tyr の等量混合物を入れたもの、TyrH を含んだ緩衝液に L-Tyr、D-Tyr、L-Tyr と D-Tyr の等量混合物を入れたものの計 6 種類の試料を作成した。

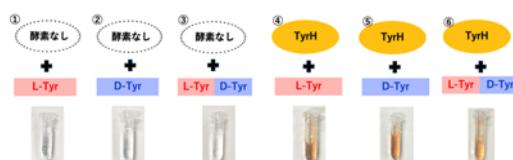


図1 6種類の試料

#### 4. 反応剤の添加、反応の観察

用意した試料それぞれに1分ごとに反応剤である過酸化水素を添加し、色の変化を観察した。

#### 5. 吸収スペクトル測定

反応開始前と反応開始10分後のタイミングで各試料の吸収スペクトルを測定した。

#### 6. 赤外吸収スペクトル測定

反応生成物の同定のために、L-Tyr、D-Tyrの反応生成物、L-DOPA、D-DOPAの赤外吸収スペクトルを測定した。

### ■ 研究結果、考察

#### -D-Tyr の TyrH による反応性-

酵素を含む場合、基質がL-Tyrの時は、L-TyrからL-DOPAの反応が進行するため、反応開始後黒くなるが、基質がD-Tyrの時でも、反応開始後黒くなった。このことからD-Tyrもこの酵素によって反応することがわかった。(図2)

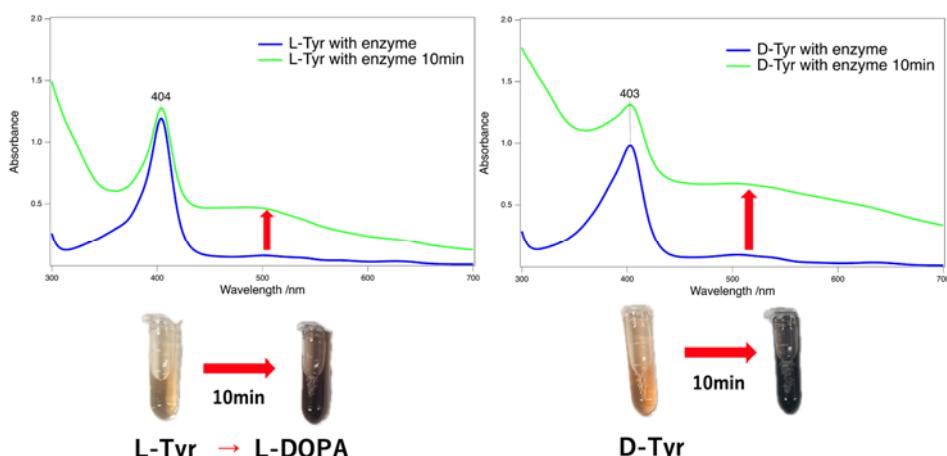


図2 酵素ありのL-Tyr(左)とD-Tyr(右)の反応前後の吸収スペクトル

反応開始後、1分ごとに写真を撮ってみると、黒くなるタイミングがD-Tyrの方が速く、このことから、D-Tyrの方が酵素による反応が速く進行することもわかった。(図3)

また、L-TyrとD-Tyrの等量混合物を基質としたとき、L-Tyrのみを基質とした時よりも黒くなるタイミングが速く、D-Tyrのみを基質とした時よりも黒くなるタイミングが遅くなることから、L-TyrとD-Tyrが等量ずつ存在する場合、D-Tyrの速い反応が、L-Tyrによって抑制されていることがわかった。(図3)



図3 酵素ありのL-TyrとD-TyrとL-Tyr+D-Tyr(1:1)の反応開始後の色の変化

反応開始前において、L-Tyr と D-Tyr の等量混合物を基質とした場合の吸収スペクトルが、L-Tyr のみを基質とした場合の吸収スペクトルと全く一致していたが、D-Tyr のみを基質とした場合の吸収スペクトルとは異なっていたことから(図 4)、L-Tyr が酵素に優先的に結合することがわかった。これが、L-Tyr と D-Tyr の等量混合物を基質とした場合の方が D-Tyr のみを基質とした場合よりも黒くなるタイミングが遅くなった原因であると考えられる。

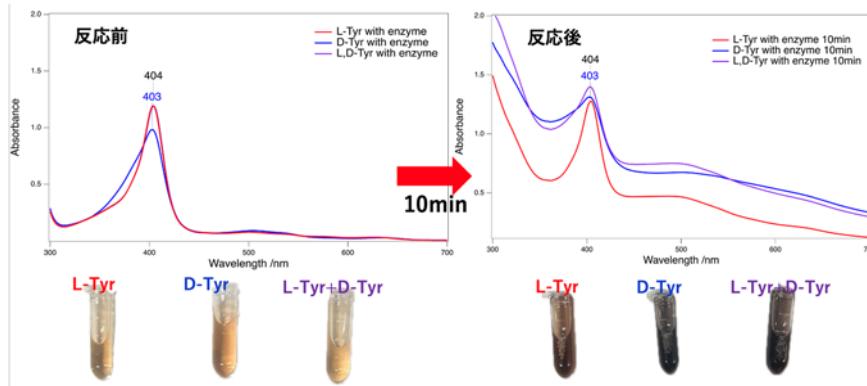


図4 図3の反応開始前(0分)と反応開始後(10分)の各試料の吸収スペクトル

本来の基質ではない D-Tyr の方が酵素反応が速く進行した原因として、D-Tyr の方が、活性部位に存在するヘムと His 残基と相互作用しやすい位置にいるということ、D-Tyr の反応生成物の D-DOPA の方が酵素との親和性が低く、酵素反応のターンオーバー数が高くなるということが考えられる。

#### -D-Tyr の TyrH による反応生成物の同定-

次に、D-Tyr の反応生成物は D-DOPA なのかを調べるために、D-Tyr の反応生成物を粉末にしたものと D-Tyr と D-DOPA を過酸化水素水溶液で溶かしてその後粉末にしたもの IR スペクトルを測定した。(図 5)

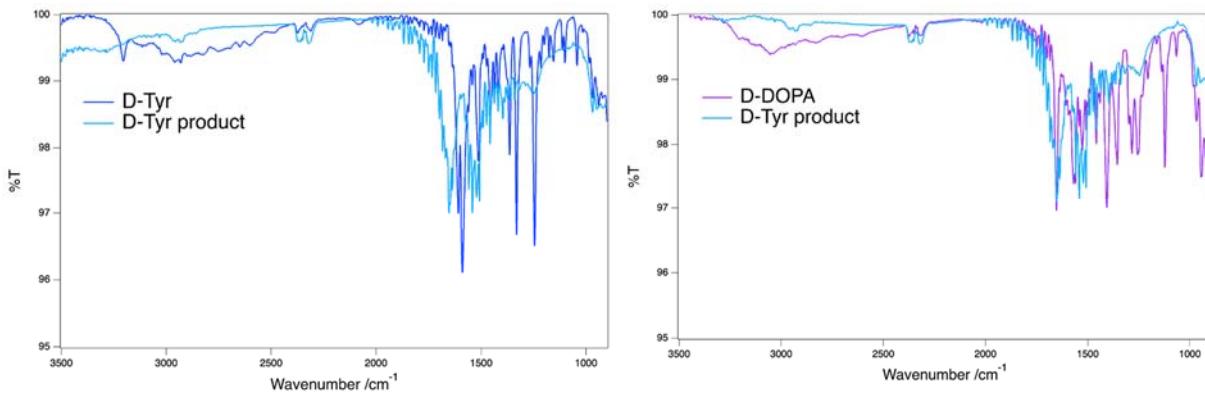


図5 D-Tyr と D-Tyr の酵素反応生成物の IR スペクトル(左)と  
D-DOPA と D-Tyr の酵素反応生成物の IR スペクトル(右)

D-Tyr と D-Tyr の反応生成物のスペクトルは、 $1500\text{-}1600\text{cm}^{-1}$  の領域でピーク位置に違いが見られたため、D-Tyr が酵素によって反応したことがわかり、D-Tyr の反応生成物と D-DOPA のスペクトルは比較的似ていたことから、その反応生成物は D-DOPA であると予想できるが、一部ピーク位置にずれが見られたため、これだけでは反応生成物が D-DOPA であることを確認できなかった。

TyrH による D-Tyr の反応生成物は、D-Tyr の OH 基からみて OH 基がオルト位についていた化合物(D-DOPA とする)とメタ位についていた化合物(m-DOPA とする)の二通りが考えられるので、実際に測定した D-Tyr の反応生成物の IR スペクトルと、量子化学計算によって求めたそれらの化合物の IR スペクトルとを比較することで、D-Tyr の反応生成物が D-DOPA なのかを調べることにした。(図 6)

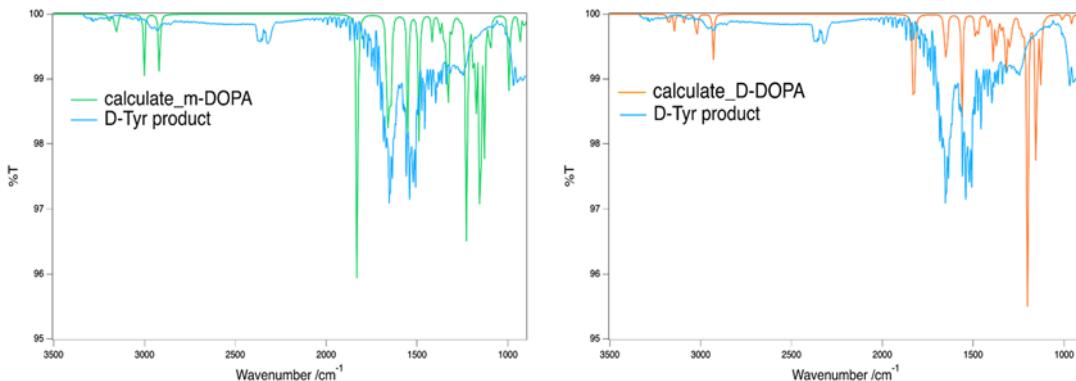


図 6 m-DOPA の計算スペクトルと D-Tyr の酵素反応生成物の IR スペクトル(左)と  
D-DOPA の計算スペクトルと D-Tyr の酵素反応生成物の IR スペクトル(右)

図 6 から、1300-2000cm⁻¹ の領域に注目すると、D-Tyr の反応生成物のスペクトルは、m-DOPA よりも D-DOPA の計算スペクトルの方とピーク位置の共通点が多いことがわかった。ここから、D-Tyr の生成物はオルト位に OH 基がついた D-DOPA である可能性が高いと考えられる。

#### -シミュレーションによる D-Tyr の反応の予想-

Tyr と TyrH のドッキングシミュレーション(図 7)と MD シミュレーション(図 8)を行ったところ、D-Tyr も OH 基は L-Tyr の場合と同じで、His88 と Tyr230 と相互作用するのが安定であるということがわかった。ここから、D-Tyr も L-Tyr と同様に、His88 による OH 基の脱プロトン化から始まる水酸化反応が起きる可能性が高く、その場合は、反応機構上、オルト位に OH がつくので、ここからも D-Tyr の反応生成物は D-DOPA であると予想できた。

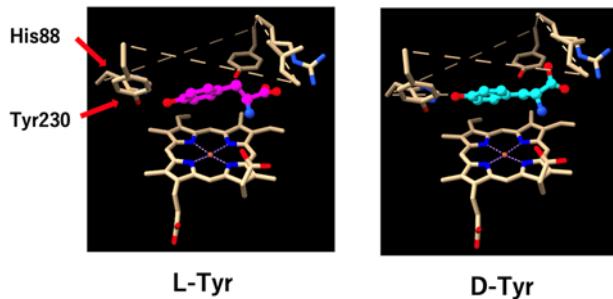


図 7 ドッキングシミュレーションにより予測された L-Tyr と D-Tyr の  
TyrH の活性部位での最安定構造

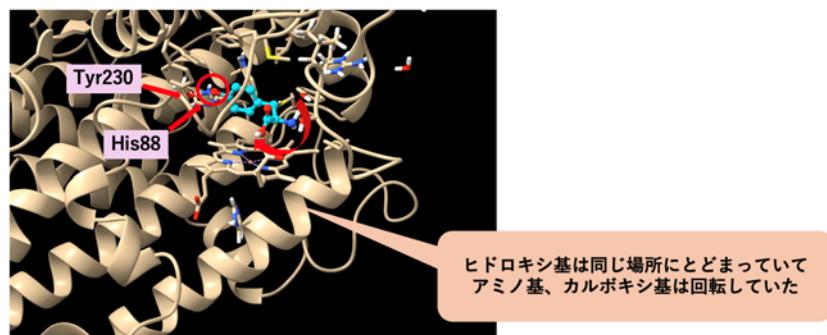


図8 MD シミュレーションで予測された D-Tyr の活性部位での様子

### ■ 結論、課題

L-Tyr と D-Tyr のどちらも認識するヘム酵素の TyrH は、本来の基質ではない D-Tyr の水酸化反応も触媒することがわかった。また、D-Tyr の TyrH による反応は、L-Tyr と同様の反応機構で進行し、D-DOPA を生成する可能性が高いことが本研究から示唆された。しかし、この結果を証明するには、D-Tyr の TyrH の活性部位での構造、水酸化反応機構の詳細を明らかにする必要がある。

### ■ 参考文献

- [1] Yifan Wang, Ian Davis, Inchul Shin, Hui Xu, and Aimin Liu, Molecular Rationale for Partitioning between C-H and C-F Bond Activation in Heme-Dependent Tyrosine Hydroxylase. *J. Am. Chem. Soc.* **2021**, 143, 4680-4693.
- [2] Luciana Capece, Ariel Lewis-Ballester, Marcelo A. Marti, Dario A.E. Estrin, and Syun-Ru Yeh, Molecular Basis for the Substrate Stereoselectivity in Tryptophan Dioxygenase. *Biochemistry* **2011**, 50, 10910-10918