

Title	Heteronuclear NMR Study on Catalytic Mechanism of Human Carbonic Anhydrase II : Tautomerism of Histidine Residues
Author(s)	島原, 秀登
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	http://hdl.handle.net/11094/39955
DOI	
rights	
Note	

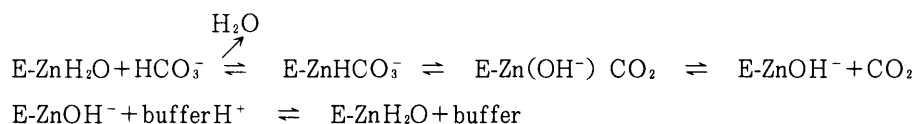
Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

氏名	嶋原秀登
博士の専攻分野の名称	博士(理学)
学位記番号	第 12945 号
学位授与年月日	平成9年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 理学研究科生物化学専攻
学位論文名	Heteronuclear NMR Study on Catalytic Mechanism of Human Carbonic Anhydrase II -Tautomerism of Histidine Residues- (異核種核磁気共鳴法によるヒト炭酸脱水酵素IIの触媒機構の解析 -ヒスチジン残基の tautomerism-)
論文審査委員	(主査) 教授 京極 好正 (副査) 教授 崎山 文夫 教授 福山 恵一 教授 小林 祐次

論文内容の要旨

炭酸脱水酵素は動物、植物界に広く存在し、生体内ではCO₂に関わる数多くの調節機構に重要な位置を占めている。触媒反応は分子表面から15Åと酵素の内部に埋もれた位置にある亜鉛原子上で下記の式のように起こる。



その亜鉛原子と酵素表面の間には、1つのヒスチジン残基(His64)を含む幾つかの極性残基で構成される隙間が存在している。触媒反応の進行にはbuffer分子が必須であるが、buffer分子はその大きさから酵素分子の隙間を通して内部の亜鉛と直接関与するとは考え難く、プロトンのみを受け渡す機構があるとの考えが有力である。現在、その機構は隙間の極性残基がプロトンを静電力で触媒部位に導くらしいことが結晶構造上、理論上示唆されている。本研究では、His64をNMRで解析することによってこの機構の妥当性を検証することを目的とした。

まず、259残基からなる本酵素のHis64の帰属を行った。二重標識法と三次元HNCA法を適用しHis64の主鎖を、ついで各種二重共鳴二次元NMR法を組み合わせることで側鎖を帰属した。その結果、His64のtautomerismの解析に必要な¹⁵N δ1, ¹⁵N ε2核のシグナルを帰属し、各NMRパラメータ(周波数、線幅、シグナルの平均化)を解析した。試料には、組み換え遺伝子操作法によって取得したGly-His二重アミノ酸要求性菌を利用し、[1-¹³C] Glyと[α-¹⁵N] Hisで標識した酵素、His残基のすべての窒素核と炭素核を¹⁵N, ¹³Cで標識した酵素、及び酵素中のすべての窒素核を¹⁵Nで標識した酵素を使用した。

次に、イミダゾールの2つの窒素核(¹⁵N δ1と¹⁵N ε2)のシグナルの平均化を考慮しNMRスペクトルを解釈したところ、pH依存性曲線によって互変異性体間の動的な交換状態を簡単に解釈できることを見出した。この方法を本酵素のHis64に適用し、His64のtautomerismを決定したところ、His64は両方の異性体が1対1で存在しかつ速く交換するtautomerismであり、そのpK値は酵素活性と同じ7.3であった。また、他のヒスチジン残基のシグナルの挙動から、亜鉛に結合するもの、分子内部に存在するもの、分子表面に存在するもののように分類でき、これらのtautomerismをも決定した。

以上の結果に基づき、炭酸脱水酵素のHis64のtautomerismと機能の相関についてつぎのように考察した。pHに依存する酵素活性とHis64の挙動の関係から、His64はイミダゾール正電荷状態が非活性型、異性体交換状態が活性

型であり、酵素活性は His64 の tautomerism に依存していると判断した。そして、結晶構造上で、酵素内部の亜鉛原子から外部の buffer まで、His64 と水分子が帯状に繋がっていることから、これに沿ってプロトンの移動反応を担う水素結合ネットワークが存在していると考え、結論として、触媒反応に必須な His64 はプロトンを触媒部位に導くポンプの役割を担っていることを提言した。

論文審査の結果の要旨

島原君はヒト炭酸脱水酵素の活性に重要な役割を果たしている His64 に注目し、その挙動を異核種核磁気共鳴法で明らかにした。すなわち、12個のヒスチジンの NMR シグナルの中から、二重標識法により His64 由来のシグナルのみ帰属し、これを解析することにより、中性において1個のプロトンがヒスチジン環の2つの窒素核にほぼ同等に存在することを見出した。これまでにこのような状態であるヒスチジン残基は見出されたことが無く、この2つの異性体間の早い交換が、分子内部にある活性中心の Zn と分子表面の基質との間の早い反応を仲介しているとした炭酸脱水酵素の新たな反応機構を提唱した。以上、島原君の研究は酵素の活性中心に多くあるヒスチジン残基の挙動を確実に示す方法を確立した点で博士（理学）として十分価値あるものと認める。