

有機水銀分解酵素・重原子結合型の高分解能結晶構造解析 Crystal structure analysis of organomercurial lyase and its heavy atom derivatives

喜田昭子¹、森本幸生^{1,*}

¹京都大学複合原子力科学研究所, 〒590-0494 大阪府熊取町朝代西 2 丁目

Akiko Kita¹ and Yukio Morimoto^{1,*}

¹Institute for Integrated Radiation and Nuclear Science, Kyoto University,
Kumatori, Osaka, 590-0494, Japan

1 はじめに

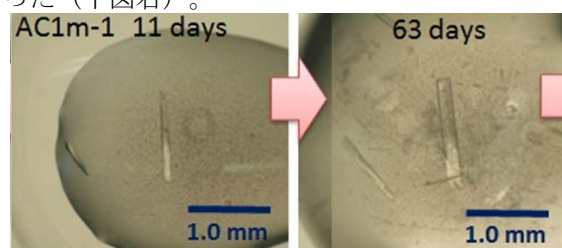
一般に生体内における重金属原子は反応性が高く、蛋白質分子内のアミノ酸残基などに求核的に反応し本来の機能を阻害するものが多い。水俣病をはじめとする重金属中毒症状は、水銀など重金属がピルビン酸脱水素酵素など酵素蛋白質分子内の解離性アミノ酸に非特異的に結合し、活性残基を破壊して酵素機能を喪失させることによって引き起こされる。分子内にある Cys-SH 基、Asp-COOH 基への脱水素反応・結合が最も有力な機能阻害の要因として考えられているが、その原子レベルでの詳細な検討は報告されていない。本研究で対象とした有機水銀分解酵素 (MerB) は、1986 年に T.P.Begley らより (Biochem., 25, 7186-7192 (1986)) 初めてバクテリア型酵素として単離され様々な物性が研究されてきた。その後海外を中心に、水銀・メチル間の結合を MerB が切断し Hg(II)とした後、MerA が Hg(0)無機水銀化へと変換し解毒、放出する経路が提唱された (Che et.al., 2006)。しかしながらその反応の主たる機構 (活性部位と水銀化合物基質の関係、反応経路など) の詳細は明らかになっていなかった。2009 年に、アメリカ J.Parks ら (JACS, 131, 13278-13285) と、カナダ J.L-Vanasse ら (J.Biol.Chem., 284, 938-944) チームが、独立に MerB の結晶構造解析を発表した。その中では炭素・水銀間結合を切断する反応スキームが提唱されているが、そのプロトン供給源(二つの Cys-SH, 隣接する Asp と水分子) は未だに決定されていない。本課題は中性子解析データとともに放射光高分解能解析によってこれらの活性残基の挙動を明らかにする。さらに 2 段階反応最終段階での MerA との複合体化の際に誘導されるアロステリック構造変化も含めた複合体形成機構解明の基礎とする。

有機水銀分解酵素 (MerB) における水銀有機化合物の脱プロトン、炭素-水銀結合切断機構を、水銀化合物フリーおよび結合構造を X 線結晶構造解析によって明らかにする。電子数が多く電子密度がマスクされやすい水銀周りの水素位置を高分解能データ収集によって明らかにする。

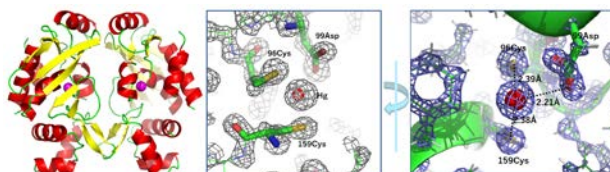
2 実験

本酵素の結晶化を進めている。基質複合体を含め各種結晶を調整するため、大腸菌による発現系を構築

し、大量培養、精製、結晶化を進めた。PEG を沈殿剤とした蒸気拡散法において、透明柱状の結晶を得ることができた。大きさは約 0.5 ミリ程度であるが結晶化溶液補充法 (下図左) によりさらに大きくすることができ長さ方向は約 1mm を超えるものもあった (下図右)。



これらの結晶を用いて 1.5Å 分解能のデータ収集・解析を行った。さらに、Hg フリー体に加えて、基質である水銀化合物の添加を行い、Hg 結合型の結晶化を行い分子置換法により MerB の二量体構造を決定した。構造精密化により、 R 値は 25.9% ($R_{free}=28.9%$) である。



A schematic drawing of the MerB dimer (left), and electron density map on the 96, 159Cys and 99Asp at 1.42Å resolution (right). Hg atoms are depicted by red spheres.

3 結果および考察

上図中央に 1.42Å 分解能で得られた活性部位周辺の電子密度を示している。これは 2 量体の片側 (A 分子) であるが、もう一方の B 分子も同様であった。図左にあるように、本酵素は 2 量体で 2 個の水銀原子を結合している。右電子密度が得られている精密化において、水銀原子の占有率を求めても、A, B 分子とも占有率 1.0 であり定量的に結合していることがわかった。また水銀・イオウあるいは酸素原子間の距離は、2.2-2.4Å であり、両者の間には水素原子が存在する。この距離・配位とエネルギー非依存的で、かつ定量的に Hg-C 結合を切断する機構がどのようなものか興味深い。

4 まとめ

有機水銀分解酵素の水銀結合型構造を明らかにした。水銀・解離性残基の相互作用を考察した。

*morimoto@rri.kyoto-u.ac.jp