

2-ブロム-4'-ニトロアセトフェノン(2-Bromo-4'nitroacetophenone) :

ウサギ骨格筋ピルビン酸キナーゼの化学修飾

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2012-05-09 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 藤井, 豊, 中井, 昇 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10098/5364

2-ブロム-4'-ニトロアセトフェノン (2-Bromo-4'-nitroacetophenone) — ウサギ骨格筋ピルビン酸キナーゼの化学修飾 —

藤井 豊 ・ 中井 昇

化学教室

(平成2年11月6日受理)

求電子試薬 2-ブロム-4'-ニトロアセトフェノン (2-bromo-4'-nitroacetophenone:BrNAP) は μM (10^{-6}M) の比較的低い濃度で、ウサギ骨格筋ピルビン酸キナーゼ (PK-M₁) を一次反応速度論的に失活させる。このPK-M₁の失活速度定数 (擬一次反応速度定数: $\text{k}\cdot\text{min}^{-1}$) のpH依存性から、 $\text{pK}_a \approx 9.5$ のアミノ酸残基がBrNAPにより化学的に修飾されたものと考えられる。PK-M₁の必須金属イオン・ Mg^{2+} は本失活反応を有意に抑える。また、基質であるホスホエノールピルビン酸はこの Mg^{2+} イオンの保護効果に対して相乗的であった。このことより、 Mg^{2+} イオンはPK-M₁とホスホエノールピルビン酸の結合に重要な役割を果たしており、また、 $\text{pK}_a \approx 9.5$ のアミノ酸残基と配位結合しているものと考えられる。

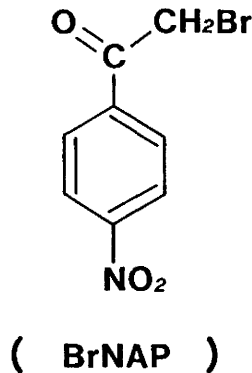
はじめに

酵素を化学的にある反応性の高い試薬で修飾することは長年行なわれており、化学修飾法として確立している。多くの酵素の活性部位あるいは触媒機構に関する情報が化学修飾法により得られたことは特筆に値する。現在、X線回折の高度化およびプロテインエンジニアリングの進展に伴い、化学修飾法は主役の座を退いた感があるがその有用性には変わりはない。近年、酵素に親和性を持つ基質やコファクターなどの誘導体を用いたアフィニティーラベル法も盛んに行なわれている。

BrNAPはモノヨード酢酸などと共に α -ハロケトン誘導体であり、メチオニン (Met)⁽¹⁾、ヒスチジン (His)⁽²⁾あるいはシステイン (Cys) 残基⁽³⁾などを求電子的にアシル化することが知られている (図1)。類似の化合物として、2-bromoacetophenone⁽⁴⁾、2-bromo-4'-bromoacetophenone^(5,6)、2-bromo-4'-azidoacetophenone⁽⁷⁾及び2-bromo-3'-nitro-4'-

hydroxyacetophenone⁽⁸⁾ などが知られている。一般的に、pH 2-3 付近でアスパラギン酸 (Asp) のカルボキシル基、pH 4-6 付近でメチオニン残基及びpH 6-8 付近でシステインやヒスチジン残基の修飾反応が知られている (図2)。ウシ肺プロスタグランジンF合成酵素は中性領域でBrNAPによって速やかに失活したが⁽⁹⁾、これらの知見に従えばヒスチジンあるいはシステイン残基の修飾を想定しなければならない。

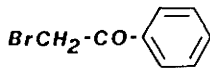
2-Bromo-4'-nitroacetophenone



1. Met (Chymotrypsin, pH 5.6)
Sigman, D.S. et al. (1969)
2. His (Epoxide hydrase, pKa 7.6)
DuBois, G.G. et al. (1978)
3. Cys (Cytochrome P-450c, pH 7.4)
Parkinson, A. et al. (1986)
4. ? (Prostaglandin F synthetase, pH 6-8)
Fujii, Y. et al. (unpublished)

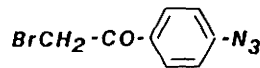
図1. 2-ブロム-4'-ニトロアセトフェノン (BrNAP) の構造

2-bromoacetophenone



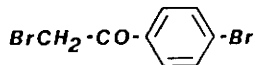
Met, His (Chymotrypsin, pH 4.7)
Glover, G.I. et al. (1976)

2-bromo-4'-azidoacetophenone



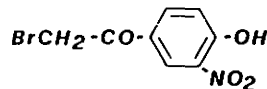
Cys (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, pH 7)
Hixson, S.H. & Hixson, S.S. (1975)

2-bromo-4'-bromoacetophenone



Asp (Pepsin, pH 2.8)
Gross, E. & Morell, J.H. (1966)

2-bromo-3'-nitro-4'-hydroxyacetophenone



His (Phospholipase A₂, pKa 6.1)
Volwerk, J.J. et al. (1974)

Cys (Papain, pH 7)
Furlanetto, R.W. & Kaiser, E.T. (1970)

図2. BrNAPの類似化合物

2-ブロム-4'-ニトロアセトフェノン (2-Bromo-4'-nitroacetophenone)

ピルビン酸キナーゼ (PK) は解糖系の律速酵素の一つであり、 Mg^{2+} および K^+ イオンの存在下ホスホエノールピルビン酸 (PEP) と ADP からピルビン酸及び ATP を生成する反応を触媒する。生体内では事実上、平衡は ATP 産生に片寄っている。PK には 4 つのアイソザイム (M_1 、 M_2 、L 及び R 型) があり、中でも骨格筋の M_1 型酵素 (PK- M_1) のみ典型的なミカエリス・メンテン型の飽和曲線を示す非調節性の酵素として知られている。PK- M_1 はサブユニット (分子量約 60,000) より成る 4 量体酵素 (分子量約 240,000) である。サブユニット当たり一つの触媒部位があり、PK- M_1 は四つの触媒部位を持つと考えられている。今回、この PK- M_1 が弱アルカリ性領域において低濃度の BrNAP で速やかに失活したので報告する。

実験方法

ウサギ骨格筋ピルビン酸キナーゼ (PK- M_1) は K-リン酸緩衝液 (含安定化剤: 2-メルカプトエタノール、硫酸マグネシウム及びグリセリン) を用いて、Red Sepharose、Sephadex G-100、Hydroxylapatite、及び Mono S のクロマトグラフィーで精製し、ドデシル硫酸ナトリウム存在下のポリアクリルアミドゲル電気泳動上単一標品となったものを使用した⁽⁹⁾。精製酵素の比活性は 250 単位/mg 蛋白質以上のものであり、使用時 1 M KCl 続いて 5 mM Na-リン酸緩衝液で十分に透析し安定化剤や塩類を除いた。

化学修飾反応は pH 6 ~ 8 では 0.1 M Na-リン酸緩衝液を、pH 8 ~ 10.5 では 0.1 M Na-ホウ酸緩衝液をそれぞれ使用して、室温で行なった。BrNAP はエタノール溶液とし、反応液中エタノール 1 % となるように調整した。1 % エタノールは PK- M_1 に殆ど影響しない。修飾反応は反応液の一部を 50 mM トリス塩酸緩衝液、pH 7.4 (含: 5 mM 2-メルカプトエタノール及び 0.2 % ウシ血清アルブミン) で希釈し停止した。

PK の活性測定は 2 mM PEP、2 mM ADP、0.1 M KCl 及び 5 mM $MgSO_4$ を含む 50 mM トリス塩酸緩衝液、pH 7.4 を用いて室温あるいは 37°C で行なった。生成したピルビン酸 (Pyruvate) を 2, 4-ジニトロフェニールヒドラジン法⁽¹¹⁾ により 510 nm で測定した。蛋白質はウシ血清アルブミンを標準として色素結合法⁽¹²⁾ を用いて定量した。

結果及び考察

図 3 は PK- M_1 の失活に対する BrNAP の濃度依存性を見たものである。pH 7.0 では 100 μ M 以上の BrNAP でわずかな失活を認めたにすぎないが、pH 9.0 では数 μ M のオーダーで速やかな失活が観察された。18°C、5 分間のインキュベーションの条件で、50% 失活に要する BrNAP はわずか 5 μ M であった。これは通常の化学修飾試薬としてはかなり低い濃度であり、特異性の高い反応と考えられる。ちなみに、30 μ M でほぼ 100% 失活に達していた。このことは、PK- M_1 自身が本修飾の反応により完全失活に達することを意味する。これまでの報告では弱酸性から中性でアスパラギン酸、メチオニン、システイン及びヒスチジン残基の化学修飾が行なわ

れていたが、今回、弱アルカリ性で顕著な失活が観察されたことは上記以外の求核性のアミノ酸残基の修飾が推察される。

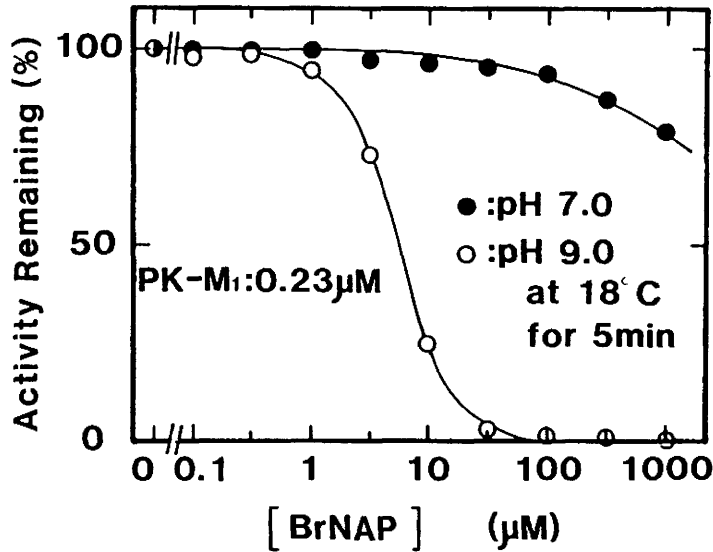


図3. ウサギ骨格筋ピルビン酸キナーゼの失活に対するBrNAPの濃度依存性

失活反応はpH 7.0 (0.1 M Na-リン酸緩衝液、●) 及びpH 9.0 (0.1 M Na-ホウ酸緩衝液、○) 18℃、5分で行なった。反応液 (10 μl) を100倍希釈して反応を停止し (0℃)、残存活性を実験方法に従って測定した。用いたPK-M₁濃度 (0.23 μM) はサブユニット当たり約1 μMに相当する。以後この条件で修飾反応を行なった。

5 μMのBrNAPによるPK-M₁失活の経時変化を調べたのが図4である。6分まで直線関係が認められたことより本失活反応は一次 (正確には、擬一次) 速度式に従うことが判明した。しかし、6分以後失活速度は低下していた。これは水酸イオン (OH⁻) によるBrNAPの分解に起因するものと考えられる。事実、アルカリにより分解することが分光光学的に観察されている。本失活反応が一次速度式に従うということは、ある特定のアミノ酸残基がBrNAPにより修飾されることを強く示唆する。この特定のアミノ酸残基を推定する目的で、直線性のある範囲内において本失活速度定数 ($k \cdot \text{min}^{-1}$) のpH依存性を調べたのが図5である。pH10.5以上ではアルカリによる酵素PK-M₁自身の失活が激しく、またBrNAPの分解も極めて速いため失活速度定数の測定は極めて困難であったが、本図よりpH 9.5付近にpKaを持つアミノ酸残基のBrNAPによる修飾が考えられる。この付近にpKaを持つものとしてチロシン (Tyr) 残基 (フェノール性水酸基: OH, pKa=9.11) がある。モノヨード酢酸アミドを修飾試薬として使用したときにも、同様の条件下でチロシン残基の修飾が知られている⁽¹³⁾。今回の場合、PK-M₁のチロシン残基がBrNAPにより特異的に化学修飾され完全失活するものと考えられる。

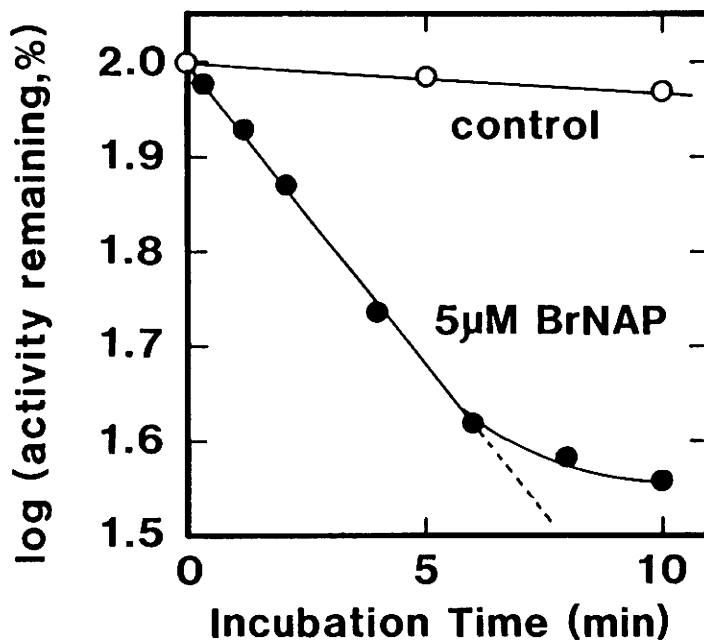


図4. BrNAPによるPK-M₁失活の経時変化

失活反応はpH 9.0、18℃で行なった。インキュベーション時間は10秒、1、2、4、6、8、および10分で、図3に記述したように反応を停止し、残存活性を測定した。コントロールは5 μM BrNAPの代わりに1%エタノールを用いて0、5、及び10分間インキュベートした。また、コントロール、0分の時のPK-M₁活性を100%とした。

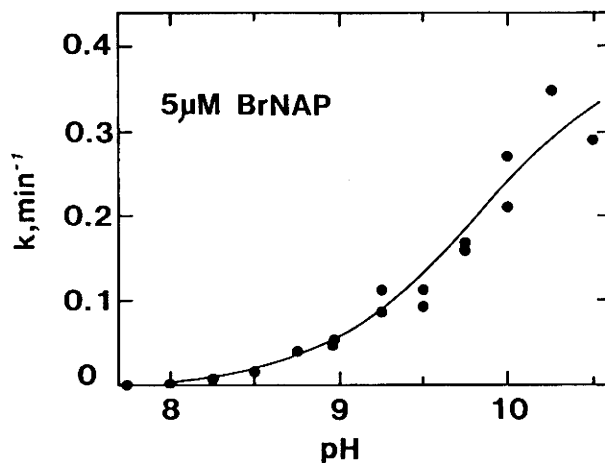


図5. BrNAPによるPK-M₁失活速度定数のpH依存性

失活反応は18℃、5 μM BrNAPで行なった。縦軸の失活速度定数 ($k \cdot \text{min}^{-1}$) は図4に見られる直線の傾きとして求め、コントロール (0 μM BrNAP、1%エタノール) の自然失活速度を各測定点で補正してある。直線性が確認されたインキュベーション時間はそれぞれ、pH 8.0まで25分、pH 8.5まで15分、pH 9.0まで6分、pH 9.5まで3分、pH 10.0まで1.5分及びpH 10.5まで1分間であった。一般的に、得られたS字曲線の変曲点におけるpHからpKaが求められる。

本失活反応に対するPK-M₁の基質及び金属イオンの効果を検討したのが表1である。2 mM MgCl₂の存在下では58.8%の残存活性を示し、コントロール（添加物なし）の21.9%のそれと比較して有意の保護効果が見られた。次いで、2 mM PEPで36.1%とやや有意であった。しかし、他のKCl、ピルビン酸、ADP、ATPなどには保護効果は認められない。分光光学的検討から、ここで用いた基質および金属イオンはBrNAPの分解を促進あるいは抑制することなく、Mg²⁺イオンやPEPに見られた保護効果はこれらとPK-M₁との相互作用の結果と結論できる。K⁺イオンは単独では効果はないかあるいは失活をやや促進しているが、PEPとの併用で36.1%から50.0%とPEPの保護効果を相乗的に増強している。K⁺イオンはPK-M₁とPEPの結合に寄与していると以前から報告されている⁽⁶⁾が、この結果はそれを裏付けるものである。Mg²⁺イオンとPEPの併用で86.3%にまで保護効果が強められるが、相乗的か相加的か判断できない。一般的に、PKのようなキナーゼ類の酵素はATPあるいはADPと結合するためにMg²⁺イオンを必要とする、それはMg²⁺-ATPあるいはMg²⁺-ADP錯体が真の基質となるからである。ところが今回のように、Mg²⁺イオンが単独でPK-M₁と結合するという知見は初めてのことであろう。最大の保護効果はK⁺-Mg²⁺-PEPの共存下で観察された。

additives	Activity Remaining (%)						
	None	KCl	MgCl ₂	PEP	Pyruvate	ADP	ATP
		0.1M	5mM	2mM	2mM	2mM	2mM
None	21.9	15.7 ¹⁾	58.8 ²⁾	36.1	22.1	20.3	23.4
KCl	- ¹⁾	-	64.1 ³⁾	50.0	18.6	ND	ND
MgCl ₂	- ²⁾	- ³⁾	-	86.3	67.1	62.1	60.6
K ⁺ ,Mg ²⁺	- ³⁾	-	-	93.5 ⁴⁾	72.3	70.0	70.9
K ⁺ ,Mg ²⁺ ,PEP	- ⁴⁾	-	-	-	93.2	91.0	94.4

pH9, 10μM BrNAP, at 18°C, for 6min

ND, not determined

表1. BrNAPによるPK-M₁失活に対する基質及び金属イオンの効果

失活反応はpH 9.0、18°C、10 μM BrNAP、6分間で行なった。それぞれの添加物の濃度は本酵素の活性測定のために合わせた。これに対応して、ピルビン酸（Pyruvate）及びATPの濃度を2 mMとした。

2-ブロム-4'-ニトロアセトフェノン (2-Bromo-4'-nitroacetophenone)

我々は Mg^{2+} イオンの保護効果を定量的に評価するために、失活速度定数の Mg^{2+} イオン濃度依存性を調べてみた(図6)。図中の逆S字曲線より、失活速度を半分に抑える Mg^{2+} イオンの濃度は2.4 mMと求められた。一方、2 mM PEPの共存下では0.3 mMと約1/10に Mg^{2+} イオンの必要濃度が低下している。このことは Mg^{2+} イオンとPK-M₁の結合がPEPにより相乗

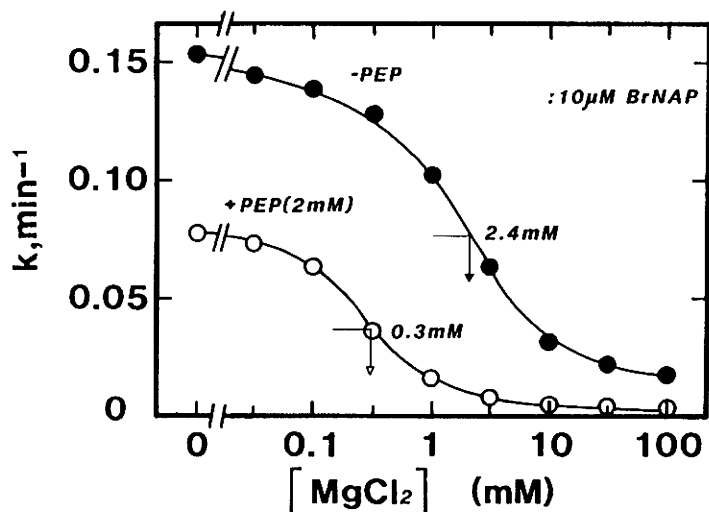
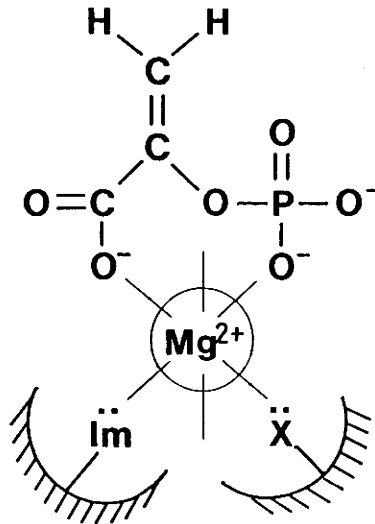


図6. BrNAPによるPK-M₁失活に対する Mg^{2+} の保護効果と基質PEPの併用効果

失活反応はpH 9.0、18℃、10 μM BrNAPで行なった。 Mg^{2+} の保護効果は基質PEPの存在下 (○)及び非存在下 (●)で行なった。矢印はそれぞれの条件で、コントロール(0 mM Mg^{2+} イオン)における失活速度定数($k \cdot \text{min}^{-1}$)を半分に抑えるときの Mg^{2+} イオン濃度を示す。

的に強められたことを示している。従って、PK-M₁のPEP結合部位に Mg^{2+} イオンが深く係わっていると推察される。これを模式的に示したのが図7である。我々は以前、PEP結合部位にヒスチジン残基(図中、イミダゾール基: Im)の存在をメチレンブルー光増感反応により証明している⁽⁴⁵⁾。初めに、 Mg^{2+} イオンはPEP結合部位にあるイミダゾール基とBrNAPで修飾されるアミノ酸残基(図中、X: おそらくチロシン残基)と弱い配位結合をしている。ここにPEPが来ると、そのリン酸基およびカルボキシル基とさらに配位結合を作り Mg^{2+} イオンの結合を安定化していると仮定すれば、図6の結果を巧く説明できる。ただし、PEPのリン酸基およびカルボキシル基の両者が配位結合にあずかる場合7員環を作ることになるので不安定かも知れない、その場合おそらくリン酸基が配位するものと考えられる。また、図中には K^+ イオンが示されていないのが今後の課題である。

Model of PEP-binding Site of PK-M₁図7. PK-M₁の基質PEPの結合部位

斜線部分は酵素PK-M₁の一部を示している。ヒスチジンのイミダゾール基 (Im:) はメチレンブルー増感反応よりすでにその存在を証明している⁽⁴⁹⁾。本図はBrNAPによる修飾アミノ酸残基 (X:、おそらくチロシン残基) が先のイミダゾール基と共にMg²⁺イオンと配位結合しているモデルである。基質PEPはそのリン酸基やカルボキシル基を介してMg²⁺イオンと配位し、その結合部位に留まることができる。

まとめ

PK-M₁はPEP結合部位に存在するチロシン残基がBrNAPにより求電子的に化学修飾され完全失活する。Mg²⁺イオンはこのチロシン残基と配位結合することでBrNAPからの攻撃を防いでいる。また、基質PEPはMg²⁺イオンとさらに配位することで先の結合をより安定化している。すなわち、PEPはMg²⁺イオンを介した配位結合で酵素PK-M₁と結合することで真の基質と成ると考えられる。

参考文献

1. Sigman, D. S., Torchia, D. A., and Blout, E. R. (1969) *Biochemistry* 8, 4560-4566
2. DuBois, G. C., Appella, A., Levin, W., Lu, A. Y. H., and Jerina, D. M. (1978) *J. Biol. Chem.* 253, 2932-2939
3. Parkinson, A., Ryan, D. E., Thomas, P. E., Jerina, D. M., Sayer, J. M., van Bladeren, P. J., Haniu, M., Shively, J. E., and Levin, W. (1986) *J. Biol. Chem.* 261, 11478-11486
4. Glover, G. I., Mariano, P. S., and Petersen, J. R. (1976) *Biochemistry* 15, 3754-3760
5. Gross, E., and Morell, J. (1966) *J. Biol. Chem.* 241, 3638-3642

2-ブロム-4'-ニトロアセトフェノン (2-Bromo-4'-nitroacetophenone)

6. Volwerk, J. J., Pieterse, W. A., and de Haas, G. H. (1974) *Biochemistry* 13, 1446-1454
7. Hixson, S. H., and Hixson, S. S. (1975) *Biochemistry* 14, 4251-4254
8. Furlanetto, R. W., and Kaiser, E. T. (1970) *J. Amer. Chem. Soc.* 92, 6980-6982
9. Fujii, Y., Watanabe, K., Hayashi, H., Nakai, N., and Hayaishi, O. *in preparation*
10. Fujii, Y., and Nakai, N. *in preparation*
11. Kimberg, D. V., and Yielding, K. L. (1962) *J. Biol. Chem.* 237, 3222-3239
12. Schaffner, W., and Weissmann, C. (1973) *Anal. Biochem.* 56, 502-514
13. Cotner, R. C., and Claggett, C. O. (1973) *Anal. Biochem.* 54, 170
14. Kayne, F. J. (1977) *The Enzyme*, 3rd ed., (ed. Boyer, P. D.) Academic Press, New York, 8, 353-382
15. Fujii, Y., Kobashi, K., and Nakai, N. (1984) *J. Biochem.* 95, 1289-1296