

【本件リリース先】

文部科学記者会、科学記者会、  
広島大学関係報道機関



広島大学

NEWS RELEASE

広島大学広報グループ

〒739-8511 東広島市鏡山 1-3-2

TEL : 082-424-3749 FAX : 082-424-6040

E-mail: koho@office.hiroshima-u.ac.jp

本件の報道解禁につきましては、平成 31  
年 1 月 1 日(月)午前 4 時以降にお願いいた  
します。

平成30年12月28日

## メラニン生成酵素チロシナーゼの詳細な反応機構を解明

### 【本研究成果のポイント】

- チロシナーゼという酵素は、活性化すると肌のシミの原因となるメラニンを生成しますが、その酵素反応機構については明らかにされていませんでした。
- 分光学的解析法とX線結晶構造解析法を駆使して、チロシナーゼの反応機構の詳細な解明に世界で初めて成功しました。
- 今回の結果は、機能性の高い酸化酵素や低分子触媒の開発に役立てることが期待できます。

### 【概要】

広島大学大学院医歯薬保健学研究科（薬科学専攻）の杉山政則教授と、元同研究科的場康幸准教授（現 安田女子大学薬学部）の研究グループは、分光学的解析法とX線結晶構造解析法を用いてメラニンを生成する酵素「チロシナーゼ」の反応機構を明らかにしました。

メラニン色素をつくる *Streptomyces* 属放線菌のチロシナーゼと、チロシナーゼの触媒活性に必要な銅イオンを輸送するためのタンパク質「キャディー」との複合体においては、チロシナーゼの活性中心にキャディーのチロシン残基（Tyr<sup>98</sup> 残基）が存在しています。本研究グループは、兵庫県立大学の研究グループと協働し、質量分析、紫外可視吸収スペクトル、共鳴ラマンスペクトル等の解析技術を駆使して、チロシナーゼに結合した銅イオンが還元された後に酸素分子と結合すると、キャディーの Tyr<sup>98</sup> 残基が反応性の高いドーパキノンへと変換されることを明らかにしました。また、X線結晶構造解析を駆使し、Tyr<sup>98</sup> 残基がドーパキノンに変換される詳細な分子機構を明らかにしました。

本研究成果は、アメリカ東部標準時間の 2018 年 12 月 31 日午後 2 時（日本時間 2019 年 1 月 1 日午前 4 時）に「PLOS Biology」オンライン版へ掲載される予定です。

### <発表論文>

#### 論文タイトル

Catalytic mechanism of the tyrosinase reaction toward the Tyr<sup>98</sup> residue in the caddie protein

#### 著者

的場 康幸<sup>1</sup>、木原 章吾<sup>1</sup>、坂東 尚彦<sup>1</sup>、吉津 裕成<sup>1</sup>、坂口 美幸<sup>2</sup>、萱間 紅絵<sup>2</sup>、柳澤 幸子<sup>2</sup>、小倉 尚志<sup>2</sup>、杉山 政則<sup>1</sup>

1 広島大学大学院医歯薬保健学研究科

2 兵庫県立大学大学院生命理学研究科

#### 掲載雑誌

PLOS Biology (2017 年の impact factor = 9.163)

**【背景】**

メラニンを生成する酵素は「チロシナーゼ」と呼ばれ、この酵素が機能するためには銅イオンが必要です。チロシナーゼはチロシン（アミノ酸の1種）にアタックしてドーパキノン生成させますが、ドーパキノンは反応性が高いので、酵素がない条件下で重合してメラニン色素が生成します。このため、安全性の高いチロシナーゼ阻害剤は、美白化粧品の素材として利用できる可能性があります。

一般に、鉄や銅と結合して活性化する酵素は酸素と結合し、さまざまな有機化合物を酸化します。この反応は水溶液中で進み、かつ、分子状酸素を利用するので、近年、環境に優しい酸化酵素として注目されています。このような金属酵素の反応機構を理解することは、新規の化学触媒を創出するためにも必要であることから、金属酵素であるチロシナーゼの反応機構の解明は、機能性の高い酸化酵素や低分子触媒の開発に役に立つことが期待できます。

チロシナーゼの反応機構を解明する研究は、基質と酵素の複合体構造から類推する研究、小分子化合物を用いた研究、およびコンピューターシミュレーションを用いた研究に大別されます。しかしながら、チロシナーゼ酵素（タンパク質）自体を用いた直接的な研究は未だ知られておらず、その反応機構に関する結論は得られていません。

本研究グループは、1996年以降、メラニン色素を高生産する放線菌 *Streptomyces castaneoglobisporus* HUT6202 のチロシナーゼに注目して研究を進めてきました (Ikeda et al.: Appl. Microbiol. Biotechnol. 45 巻、1-2 号、80-85 頁、1996 年)。その成果として、まず、チロシナーゼに銅イオンを運ぶタンパク質を見出し、それを「キャディー (caddie)」と命名しました。続いて、チロシナーゼとキャディーは複合体として産生されますが、その複合体に銅イオンを添加すると、チロシナーゼの触媒活性中心に銅イオンが取り込まれ、キャディーの遊離を促して、チロシナーゼが活性型に変わることを見出しました。さらに、キャディーとチロシナーゼの複合体タンパク質の三次元構造を、米国生化学分子生物学会が発行する国際学術誌に発表しました (Matoba et al.: J. Biol. Chem. 281 巻、13 号、8981-8990 頁、2006 年)。

チロシナーゼの活性中心にある 2 つの銅イオン ( $\text{Cu}^{\text{A}}$  と  $\text{Cu}^{\text{B}}$ ) に注目すると、これら銅イオンは、それぞれ 3 つのヒスチジン残基と結合しています。また、チロシナーゼ/キャディー複合体では、チロシナーゼの活性中心にキャディーのチロシン残基 ( $\text{Tyr}^{98}$  残基) が存在しています。ただし、チロシナーゼの三次元構造が明らかになっても、その反応機構については、これまで明らかにされていませんでした。

**【研究成果の内容】**

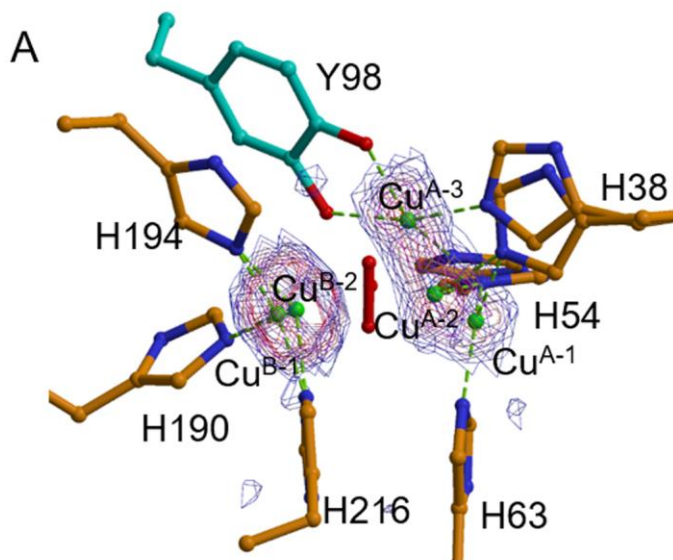
この度、同研究グループは兵庫県立大学の研究グループと協働し、質量分析、紫外可視吸収スペクトル、共鳴ラマンスペクトル等の解析技術を駆使して、チロシナーゼに結合した銅イオンが還元された後に酸素分子と結合すると、キャディーの  $\text{Tyr}^{98}$  残基を反応性の高いドーパキノンへと変換することを明らかにしました。

また、チロシナーゼ/キャディー複合体のタンパク質結晶を、硫酸銅を含む沈殿剤で長時間ソーキングし、その後の還元剤処理を経て回折強度を測定しました。その回折データに基づいて X 線結晶構造を決定した結果、還元剤添加直後には還元型の結晶構造が得られ、時間が経過するにしたがって、酸素と結合した  $\mu\text{-}\eta^2\text{:}\eta^2\text{-}$ ペルオキシ二核銅(II)や、反応が進行した  $\text{Cu}$ (II) 結合型ドーパセミキノンが生成することを観察しました。特に、酸素原子が基質に挿入される直前に  $\text{Cu}^{\text{A}}$  の位置が大きく移動し、それがキャディーの  $\text{Tyr}^{98}$  残基の水酸基に接近することで、反応が促進することを発見しました。

## 【今後の展開】

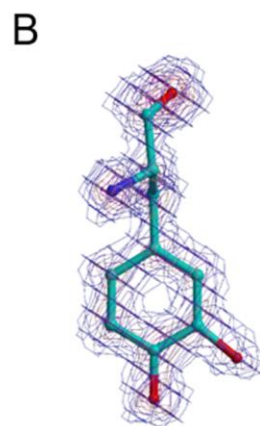
本研究では、分光学的及びX線結晶構造解析の手法により、これまで謎であったチロシナーゼの詳細な反応機構を明らかにしました。この研究成果は、近い将来、チロシナーゼを模倣した機能性の高い酸化酵素や低分子触媒の開発に役立つものと期待しています。

## 【参考資料】



異常分散差フーリエマップ：

Cu<sup>A</sup>が Tyr<sup>98</sup> 残基（図中で Y98 と表示）の水酸基の近く（Cu<sup>A-3</sup>の位置）まで移動している



Tyr<sup>98</sup> 残基のオミットマップ：

Tyr<sup>98</sup> 残基が水酸化修飾を受けたことを示している

## 【お問い合わせ先】

<研究に関すること>

広島大学大学院医歯薬保健学研究科

未病・予防医学共同研究講座 教授 杉山政則

TEL：082-257-5280 FAX：082-257-5284

E-mail：sugi@hiroshima-u.ac.jp

<報道に関すること>

広島大学財務・総務室広報グループ 佐々木

TEL：082-424-3749 FAX：082-424-6040

E-mail：koho@office.hiroshima-u.ac.jp

発信枚数：A4版 3枚（本票含む）