

放射線科学

酵素の反応過程を原子レベルで見る

佐々木 教祐

細胞内でつくられるタンパク性の生体触媒、酵素によって触媒される化学反応を酵素反応と言いますが、生体内の化学反応はほとんどすべてが酵素反応であり、物質代謝はすべて酵素系に依存しています。酵素の作用を受けて変化する物質を基質と呼び、エステルやアミドなどの基質を加水分解する加水分解酵素（ヒドロラーゼ）は、生物が食べたものを分解し栄養として吸収するために重要な酵素であり、また細胞外酵素として放出されることも多いので昔からよく知られています。それでは、これらの酵素はどのような反応の道筋を通して、分解反応をすすめていくのでしょうか。

まずタンパク質などのペプチド結合（ $-\text{CO}-\text{NH}-$ ）を加水分解する一群の酵素で、触媒活性に必須なセリン残基をもつセリンプロテアーゼと呼ばれる酵素の反応メカニズムを例にとって基本的な性質を説明してみましよう。この一群を代表する酵素として、キモトリプシン、トリプシンなどの動物由来の酵素と、枯草菌の生産するサブチリシンなどのような微生物由来の酵素が知られています。

まず酵素はどんな形をしているのでしょうか。酵素はアミノ酸が連なった1本の枝分かれない鎖みたいなものです。鎖の1つの環が1つのアミノ酸分子と考えると、図1のキモトリプシンは245個の環が繋がった鎖で、図2の ω -アミノ酸ピルビン酸・アミノ基転移酵素は449個の環からできた鎖ということになります。これらのアミノ酸の並び順番は遺伝子DNAのコードによって決められており、酵素ごとに異なっています。アミノ酸の種類は20個あり、この組み合わせによって沢山の種類の酵素ができます。できた酵素は自然に複雑な立体的な形ができ、例えばキモトリプシンと同じアミノ酸の並びの鎖を人工的につくれば、自然に図1の形ができるのです。できた立体構造の中には、コイルの形をした α -ヘリックス、隣を走っている鎖と水素結合と呼ばれる、弱いつながりをつくってできる β -シートの2種類の堅い構造を作ります。

図1の矢印の形の①～⑥の番号の付いているのがβ-シートで、図2の中にたくさんあるコイル状のところがα-ヘリックス部分です。この2種類の構造が酵素の形を支えており、それらの間にある糸状の所は非常に動きやすい柔らかいところです。

図1のキモトリプシンに代表されるセリンプロテアーゼがタンパク質などのペプチド結合を切るとき、最も大事な役目をするアミノ酸残基に、アスパラギン酸、ヒスチジン、セリンという3個のアミノ酸があり、特にセリンは図1②に示したように、分解するペプチドのカルボニルの炭素と結合をつくり、次に反応中間体としてエステルを作ると考えられています。反応の過程として①まず切断されるタンパク質などを切断部分がセリンの水酸基（-OH）の近くに来るように固定します。②セリンのOとペプチド結合のCと結合して四面体型遷移状態中間体をつくります。③この中間体と水が反応して、NH₂がついた部分が切れて離れていきます。④酵素のセリンと結合してできたエステルが分解して元の酵素に戻ります。これが最もよく知られている酵素の反応の進み方です。

それでは酵素の反応過程を推定するにはどのような手法が使われているのでしょうか。最も良い方法は、②の構造を3次元的に決定することですが、②の構造は安定に存在せず、すぐに壊れて③、④に進んでしまうため構造を決めることは不可能なのです。そこで②に近い形で酵素と結合して安定な中間体をつくる物質を探しますと、生体内には酵素の反応をストップさせるインヒビターと呼ばれる物質があり、酵素反応をコントロールしているものが見つかります。このインヒビターは酵素と結合して、①の反応は起こしますがそれ以上進行させない物質です。このインヒビターと酵素が結合したものを複合体と呼び、この構造をX線結晶構造解析して三次元の分子構造を決定すれば酵素の中の活性中心が分かり、酵素反応の過程を推定することができます。

今年度から5年計画で、高エネルギー物理学研究所の坂部教授を代表者にタンパク質の構造、特に結晶構造を研究している人が集まって、放射光（シンクロトロンで作られる強いX線）を使って、ミリ秒単位で酵素反応過程の複合体の構造変化を追跡する研究が文部省の科学研究補助金・重点領域研究としてスタートしました。すなわちX線解析法の一つであるラウエ法によって、強力な放射光を利用して短時間に多量のデータを得るデータ測定装置を開発し、ミリ秒ごとに酵素と基質の構造変化を見ようというのです。現在予備実験としてω

ーアミノ酸ピルビン酸・アミノ基転移酵素の結晶を使って、1ミリ秒の露光でラウエ写真を撮ることができました。これには医療用として富士写真フィルムが開発した、被曝の少ないX線写真が撮れる感度の高いイメージングプレートが、私たちの研究を大きく発展させたのです。このイメージングプレートを検出器にを使って、ミリ秒単位で十万点以上のデータを収集する計画です。

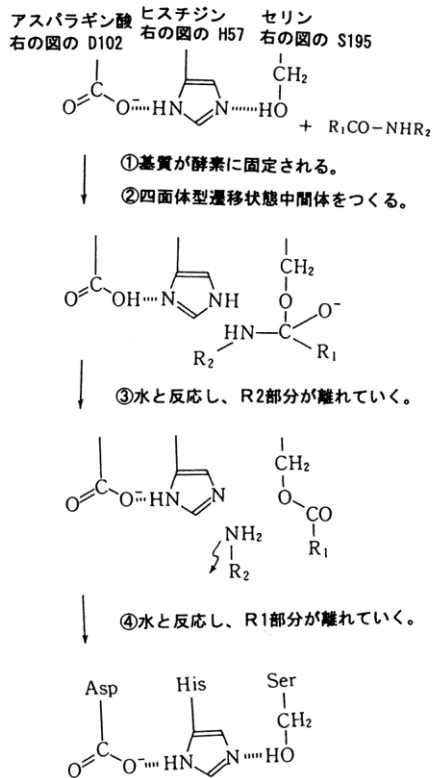
私たちは、 ω -アミノ酸ピルビン酸・アミノ基転移酵素の反応過程を構造の面から研究しています。この酵素は β -アラニンからピルビン酸にアミノ基を移動させるのを助ける役目をします。ビタミンB6類似化合物のピリドキサル5'-リン酸 (PLP) を補酵素として含み、この補酵素に一度 β -アラニンのアミノ基を受け取ってこれをピルビン酸に渡す役目を持っているもので、この補酵素がなければ酵素の機能を果たすことができません。

今の所は酵素の反応過程の構造を高速で見ることができないので、 β -アラニンも含めて大きさの似たアミノ酸を基質にを使って、種々の複合体を作り構造を解析することによって中間にできる構造を決定し、その中間体から反応の過程を推定する方法により研究を進めています。

この研究は現在進行中ですが、 β -アラニンと補酵素が結合した複合体の構造を解明できました。図2の構造をしています。私たちは基質を変えることによりもっと別の中間体で止まった構造のものが得られることを期待しているのですが、なかなか思うようにはなってくれません。現在明らかにできた複合体の構造は大事な中間体なのですが、詳細な反応過程を証明するには、推定している反応中間体を実際に得ることが必要なのです。

1つのタンパク質の構造を決めるためのデータ収集の時間は、普通の方法で数カ月、放射光を使うと1時間、この重点領域研究が完成すれば数ミリ秒と著しい発展が期待できます。さらに酵素反応のメカニズムを解明するという、今まで夢と思われてきたことが現実になるのです。薬や酵素作用を持つタンパク質を作り、それらの反応の過程を明らかにし、さらに効き目の調節など新しい効果を組み込むなどの応用もできるようになると思っています。

(名古屋大学医療技術短期大学部教授)



キモトリプシンの反応メカニズム

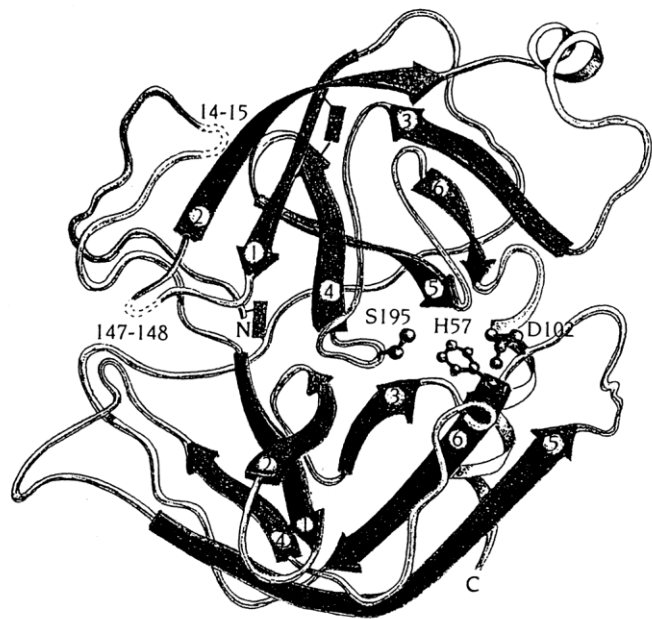
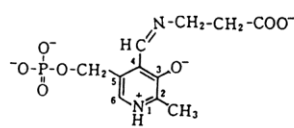


図1. キモトリプシンの構造と反応過程



β-アラニンとPLPの結合した中間体。この構造のものが右の酵素の真ん中に入っている。

図2. ω-アミノ酸ピルビン酸・アミノ基転移酵素の構造と反応中間体

