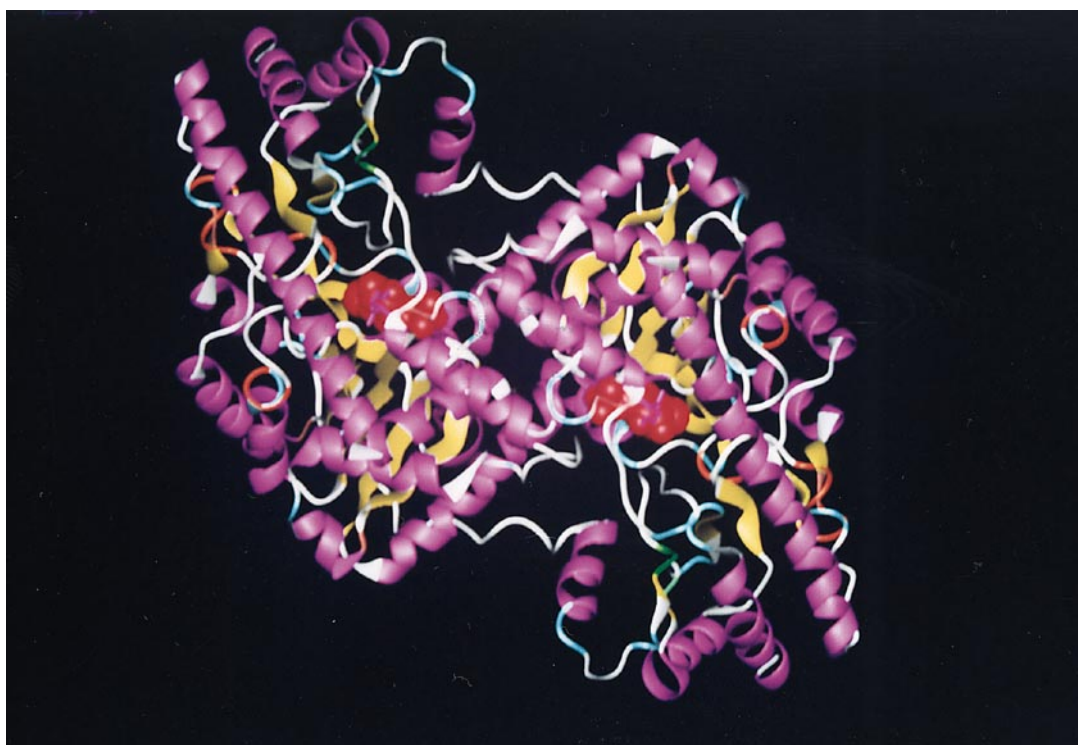


Exploring the Steric Superfine Structures and
Dynamics as the Basis of Substrate Recognition and
Catalysis of Multifunctional Enzymes
多機能性生体触媒の基質認識・触媒機能を
支える立体的微細構造の動態に関する研究

プロジェクトリーダー 鏡 山 博 行

大阪医科大学 医学部 教授



アスパラギン酸アミノ基転移酵素の立体模型

1. 研究の目的

21世紀の生命科学で最も重要なテーマは、蛋白質の機能の仕組みを解明することと考えます。なかでも酵素蛋白質の触媒作用の精密な理解は不可欠です。細胞は生命活動を支える何千種類という化学反応が行われる場です。しかし細胞内は温度や pH など極めて温和な環境ですので、個々の化学反応が生命を維持して行くのに必要な速さで進むためには、特別な触媒すなわち酵素が要るのです。それゆえ、酵素は「生体触媒」とも呼ばれ、温和な条件下で何千という化学反応を極めて速やかに、しかも整然と進行させています。また、人類は酵素の働きを利用して、様々な飲料や食品を産み出し、医薬品や家庭用品として利用しているものも少なくないのです。

そのような酵素の本体は蛋白質であり、20種類のアミノ酸が数百個、様々な並び方をすることによって数千種類という酵素が存在します。一つ一つの酵素は、各々構造が異なり、触媒する反応の種類や作用を及ぼす化合物（基質）が決まっています（反応特異性と基質特異性）。このような特性はどのようにして決まるのでしょうか。際立って高い触媒効率（ $10^6 \sim 10^{10}$ 倍）で反応が進行するのはどのような仕組みによるのでしょうか。それは、天然が長い期間に作り上げてきた蛋白質分子の設計の中に秘められているのです。

本プロジェクトは、酵素反応の実態を、系統的・総合的に解明し、従来の酵素化学が踏み込めなかった研究領域を開拓し、生体機能のメカニズムの解明に貢献することを目的とします。高効率で安定な人工生体触媒の開発、非天然有用物質の生産、有害物質の分解を高効率で行う蛋白質分子のデザイン、新しい医薬品の開発などにもつながり、社会的貢献も大きいと考えています。

2. 研究の内容

近年遺伝子操作技術が急速に進み、目的とする酵素遺伝子のクローニング・塩基配列決定・アミノ酸配列決定が容易に行えるようになりました。またその結果、その酵素の大量生産系の構築も可能となり、アミノ酸残基置換体の作製やX線結晶解析への道も拓かれ、新しい酵素化学の時代に入ったといえます。特に蛋白質の機能を解明するために、X線結晶解析による立体構造の解析は欠かすことのできない手段です。

本プロジェクトの出発点もそこにあります。本プロジェクトでは、ビタミンB₆を補酵素とするピリドキサル酵素、ビタミンB₂を補酵素とするフラビン酵素、ビタミンB₁₂を補酵素とするコバラミン酵素、分子内で自触媒的にキノンを作りそれを補酵素とするキノン酵素を研究対象としています。これら補酵素はそれ自体触媒として働き、反応機構の説明も可能なのですが、基質特異性や際立った反応速度の上昇は、それらが酵素蛋白に結合してはじめて生まれるのです。そこで、まずはX線結晶解析によって酵素蛋白全体の立体構造、反応の場（活性中心）の分子設計を知り、補酵素がその反応の場でどのようにして活性化されるのかを調べています（現在10種類）。さらに、基質類縁化合物を結合させて立体像を解析することによって、基質の構造が酵素蛋白質によってどのように認識されるのか（基質特異性の機構）ということ調べています。

桁違いに大きい反応速度が生まれるのは、基質と補酵素ならびに活性中心にある原子団が適切な配向・適切な距離に置かれることによるのですが、基質類縁化合物との複合体の結晶解析からそれを明らかにすることができます。この成果は、化学反応を正確に理解する道を拓くものであります。

一方、NMR・ESR・IR・ラマンスペクトル、ストップフロー法など分光学的、物理化学的手段や、部位特異的変異導入の方法を用いて、反応過程で生じている情報を集め、これにもとづいてX線結晶解析結果を解釈し、また逆に結晶解析の結果から予想される反応機構を検証するために新たな実験系を組むことになります。この様な中から、その酵素の活性中心に結合できる化合物の構造を知ることができますし、あるいは別の化合物を結合できる様に、部位特異的アミノ酸置換によって活性中心の構造をデザインすることも考えております。研究が進めば、触媒する反応の種類を変えることも試してみたいと思います。本プロジェクトで研究対象にしている酵素群に共通しているのは、1) アミノ酸や生理活性アミンの合成や分解に不可欠な酵素である、2) ピリドキサル、フラビン、キノンといった補酵素はアミノ酸やアミンのアミノ基との反応において共通した性質を示す、ということです。特に本プロジェクトの中心的な柱といえるピリドキサルは典型的な多機能補酵素なのです。アミノ酸と結合すると、脱炭酸・ラセミ化・アミノ基転移・脱離・置換・アルドール縮合など多様な反応を生じます。しかし個々の酵素蛋白質に結合すると、共通の補酵素を持ちながらも、反応特異性や基質特異性が生じます。これは補酵素ピリドキサルと基質、ならびにそれを取りまく酵素蛋白との動的相互作用によるのです。この様なピリドキサル酵素の特徴は、変異を導入して特異性の変換を試みるのに適していると考えます。また、これらの補酵素は天然の内部レポーターとしての役を果すことができ、活性中心での出来事を特有の吸収スペクトルの変化で知らせてくれるのです。補酵素や基質の結合、補酵素の荷電状態など反応過程を分光学的に解析することができるのも大きな特徴です。微生物から高等動物、好熱菌から好冷菌など、多様な生物種から得ることができ、構造比較を進めることができるのも特徴の一つに数えることができます。

本プロジェクトで得られる成果の波及効果が酵素一般に広がり、高効率の人工触媒の開発にもつながることを期待して研究を進めています。

3. 研究の体制等

期 間：1996年10月～2001年3月

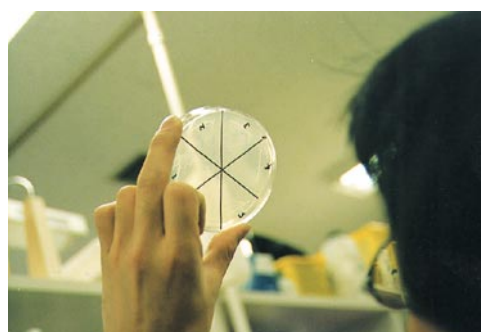
構 成：プロジェクトリーダー1名 コアメンバー3名

研究協力者8名（うち日本学術振興会研究者2名）ほか下記の研究室のスタッフが参加しています

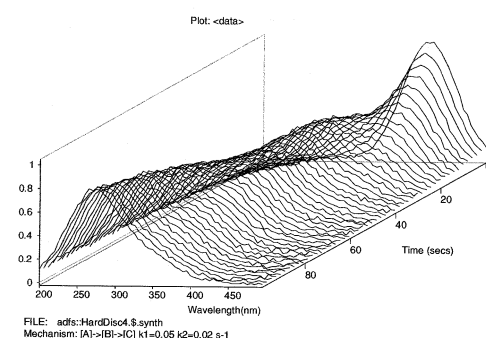
実施場所：研究拠点は大阪医科大学にあり、大阪大学産業科学研究所・理学部、京都大学農学部・化学研究所、熊本大学医学部、大阪市立大学理学部、岡山大学工学部、関西大学工学部の研究協力者と緊密な連携をとりつつ研究を進めています。



ストップフロー分光器で酵素反応の進み方を調べる



新たな機能を持った酵素産生菌のスクリーニング



分光法による酵素反応の解析