

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

Exploring the Steric Superfine Structures and Dynamics as the Basis of Substrate Recognition and Catalysis of Multifunctional Biocatalysts

(研究プロジェクト番号: JSPS-RFTF 96L00506)

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

コアメンバー

林 秀行 大阪医科大学医学部・助教授

江崎 信芳 京都大学化学研究所・教授

老川 典夫 関西大学工学部・助教授

熊谷 英彦 京都大学大学院農学研究科・教授

倉光 成紀 大阪大学大学院理学研究科・教授

谷澤 克行 大阪大学産業科学研究所・教授

虎谷 哲夫 岡山大学工学部・教授

広津 建 大阪市立大学大学院理学研究科・教授

三浦 洵 熊本大学医学部・教授



酵素は生物の体内で起こっている物質の変化(「反応」という)を進めるもので、化学の言葉で「触媒」と呼ばれるもののひとつである。生物個体にはこの酵素が何万種類と詰まっており、それぞれ特定の反応の進行を担っている。これらの酵素の協同的な働きによって「生命」が営まれているのである。また、酵素は醗酵・医薬品合成を始めとする有用物質の生産やそれ自体が洗剤の成分となっているなど、われわれの生活にも関わり合いが深いものである。

ところが、このような酵素がどのように働くのかということについては酵素が発見されてから1世紀が経つにもかかわらず、なお明らかになっていない。そのために、たとえばなぜ癌が発生するのか、アルツハイマー病や狂牛病がなぜ起こるのか、という酵素がかかわる重大な生命現象が十分に説明できないでいる。また応用面についても、試行錯誤を繰り返して役に立つものを見つけるといった原始的な方法に頼って研究が行われてきたために、最近では新たな技術開発が滞っていると見える状態であった。

もしも酵素のはたらきの本質的なことがわかれば、生命現象の根本的なことについての理解が得られ、また工学的な面においても目的の反応を触媒する酵素を設計することも可能になるであろう。いままでの酵素反応論が長い間足踏み状態にあったのは、精密な反応論を展開するに耐える「酵素の立体構造」が得られていなかったためである。本プロジェクトは生命現象の最新の解析手段である「構造生物学」の手法を駆使し、重要な酵素群の反応機構を徹底的に解析し、それを通じて今までの酵素反応触媒論を抜本的に見直し、新しい時代の生命科学・生物工学技術の礎となる酵素触媒論を確立することを目指した。

「反応」は電子が物質間で移動することであるが、これが起こるためにはそれぞれの物質における電子の通り道(=「軌道」)がお互いに重なり合う必要がある。ところが、単にこれらが重なり合うように設計しても、なかなかうまく反応がいかない。ビタミン B₂ 酵素においてこの点を詳しく調べたところ、軌道の「形」だけでなく、その「色」の組み合わせが厳密に行われていることが判明した(図1)。

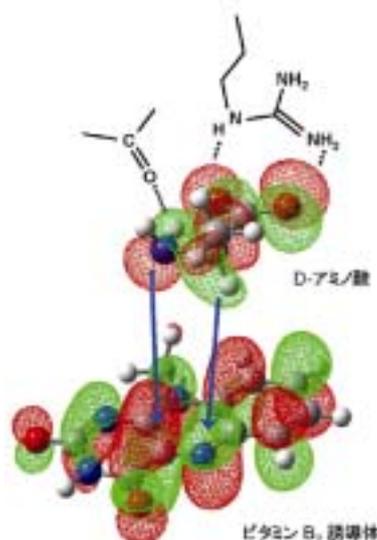


図1 酵素の内部で2つの分子の軌道の形と色が適合することで電子の移動が起こる。このような正確な対応は酵素蛋白質がこれらの物質をしっかりと保持するために可能となる。

このような軌道の「色」は量子力学によって説明できるものである。量子力学は最近「量子エレクトロニクス」などでなじみの深い言葉となってきているが、誕生から1世紀ほどの比較的新しい学問である。この

新しい物理学の成果が生命現象の理解に必須であることが分ったわけであり、生物物理 化学の連携が今後の生命科学の重要なキーワードであることを明示した。

生体内にはミネラルと呼ばれるさまざまな金属イオンが存在しており、生命現象に必須の役割を果たしている。ところが、それらが具体的にどのように働いているかは不明の部分が多い。コバルトはビタミン B₁₂ の構成要素として必須の存在である。生体物質は本体となる骨格部分と、それから飛び出したグループと呼ばれる部分からなっているが、ときおり、1つの物質の上で、隣り合ったグループを交換するという反応が必要なことがある。これはビタミン B₁₂ の触媒反応として行われていることは知られていたが、なぜそのような反応が出来るのかについては不明であった。今回の研究で、ビタミン B₁₂ を含む酵素に物質が結合すると、ビタミン B₁₂ の上で「ラジカル」と呼ばれる極めて反応性の高い構造が生成し、それが物質と反応してその物質から1つのグループを引き抜き、そして引き抜いた場所に隣のグループを持って来ること、そしてその過程を第二の金属イオンであるカリウムイオンが助けることが明らかになった(図2)。このような反応は有機合成反応にもほとんど見られないような精密かつ驚異的な反応であり、今後「夢の触媒」の開発にも繋がるものと期待される。

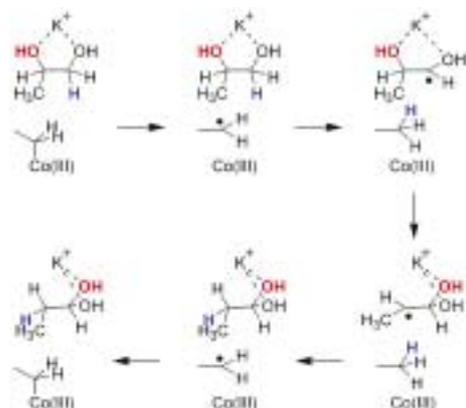


図2 ビタミン B12 とカリウムイオンを含む酵素の反応。2つの隣接したグループ(赤と青)が入れ替わるという高度な反応を起こす。途中で「ラジカル」と呼ばれる活性なものが出来る。

今回の研究によって「触媒」の概念についても重要な進歩が得られた。高等学校の教科書にも載っている説明では、ある物質が他の物質に変わるときにエネルギーの山を越えなければならず、その山の頂(「遷移状態」という)が高ければ高いほど、反応速度が低下する。触媒が存在するとその山が低くなり、反応速度が上昇するというものである。ところが、本研究で調べられた幾つかの酵素では、山の高さはそのまま

出発点を高くしていることが判明した。この方法によっても出発点と山の頂との相対的な高度差は縮まることになる。従来の概念での酵素触媒の説明は、「遷移状態に酵素分子が強く結合するために安定化する」というものであった。それに対して、今回明らかになった機構では「酵素分子自体がエネルギーを蓄えており、物質と結合するとそのエネルギーを放出し、それをういて遷移状態までの坂を登る」ということになる。

今までは人工酵素・触媒の作製において、遷移状態を安定化するような構造が設計されてきた。しかしこの新たな触媒原理を用いると、遷移状態で開放されるようなひずみを触媒に導入することで、一層の触媒能力の向上が期待される。実際に触媒抗体においてこの原理を応用して成功を収めた例が最近報告された。

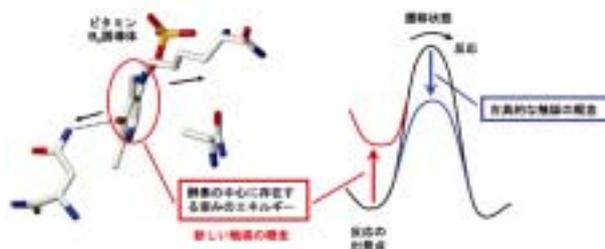


図3 酵素蛋白質とビタミン B₆ 誘導体 の間に形成された結合は酵素蛋白質によって歪みを受ける(左)。このエネルギーが出発状態を遷移状態に近づけるのに使われている。

主な発表論文

- 1) Mizutani, H., Miyahara, I., Hirotsu, K., Nishina, Y., Shiga, K., Setoyama, C. & Miura, R. (2000). Three-dimensional structure of the purple intermediate of porcine kidney D-amino acid oxidase. Optimization of the oxidative half-reaction through alignment of the product with reduced flavin. *J Biochem* **128**(1), 73-81.
- 2) Masuda, J., Shibata, N., Morimoto, Y., Toraya, T. & Yasuoka, N. (2000). How a protein generates a catalytic radical from coenzyme B(12): X-ray structure of a diol-dehydratase-adeninylpentylcobalamin complex. *Structure Fold Des* **8**(7), 775-88.
- 3) Hayashi, H., Mizuguchi, H. & Kagamiyama, H. (1998). The imine-pyridine torsion of the pyridoxal 5'-phosphate Schiff base of aspartate aminotransferase lowers its pKa in the unliganded enzyme and is crucial for the successive increase in the pKa during catalysis. *Biochemistry* **37**(43), 15076-85.