酵素反応の機構

福留秀雄*

§1. はじめに

最近のX線回折による酵素の立体構造の研究の進歩によって酵素反応機構を酵素の立体構造と関連させて実体的水準で研究することが可能になってきた。特にいくつかの酵素—リゾチーム、 α -キモトリプシンおよびいくつかのセリンプロテナーゼ、リボヌクレアーゼ、カルボキシペプチダーゼ、パパイイン等—については酵素と基質の結合および反応機構の立体化学的なモデルが提出されるようになってきている。そうした研究は近年中に急速に深化され他の酵素にも拡大されることは疑いない。今後酵素反応機構の研究はX線回折による立体化学的モデルの精密化と拡大およびそのモデルの他の方法による検証と共に、立体構造の知識と反応のダイナミックな様相の研究とに基づいて反応機構のより定量的な解明を目指す方向に進むであろう。この総説では立体構造と反応機構についての研究が最も進んでいる酵素の中から α -キモトリプシン、リゾチーム、およびカルボキシペプチダーゼAを例として酵素反応機構に関する問題を定量的様相に留意しながら展望して見たい。なおX線回折による酵素の立体構造について、その全体的構造に関してはPerutz¹⁾、活性部位構造に関してはBlowとSteitz²⁾の総説があり、酵素反応の化学的な面についてはJencksおよびBrice³⁾とBenkovic⁴⁾の本がくわしい。また酵素反応機構の理論的、モデル的問題についてはKoshlandとNeet⁵⁾の総説がある。

§2. キモトリプシンとセリン—プロテナーゼ

キモトリプシン(chymotrypsin)は活性部位にセリンを持つ蛋白質分解酵素セリン—プロテナーゼ(Serine-Proteinase)の一つであり、芳香族アミノ酸のC端側に隣接するペプチドあるいはエステル結合を特異的に加水分解する。キモトリプシンには π , δ , α , γ の4つ

の異性体があり、それらは前駆体キモトリプシノーゲンのトリプシンおよびキモトリプシン自身による限定分解によって次のように作られる。⁶⁾

活性があるのは π , δ , α であり、 γ と α はコンホメーションがちがっていると考えられている。

α -キモトリプシンは反応機構が最も詳細に知られている酵素の一つである。それを要約すると

1) 基質はセリン195と反応の中間段階でアシル共有結合をし、反応はアシル化と脱アシル化の2段階を経て進み、脱アシル化反応はアシル化反応の逆反応になっている。したがってキモトリプシンの反応路は次のようになる。

ここにXは $-\text{O}-\text{R}'$ (エステル)あるいは $-\text{NH}-\text{R}'$ (ペプチド)である。

2) エステル基質のアシル化活性のpH依存性はベル型であり $\text{pK} \sim 7$ および $\text{pK} \sim 9$ の活性基を含む。脱アシル化段階のpH依存性はシグモイド型であり $\text{pK} \sim 7$ の基を含む。この $\text{pK} \sim 7$ の基は光酸化などの化学修飾あるいは pK の重水素によるずれからヒスチジンと同定され、 $\text{pK} \sim 9$ の基はイソロイシン16の α -アミノ基であることが他のアミノ基全部をアセチル化することによりわかった。

3) 結合段階のpH依存性はベル型で $\text{pK} \sim 7$ および $\text{pK} \sim 9$ の基を含む。 $\text{pK} 7$ の基はカチオン酸で、 $\text{pK} 9$ の基は中性あるいはイオン対酸である。活性部位はpH 7~9の範囲で-1の荷電を持っている。⁸⁾

The Mechanisms of Enzymatic Reactions:

* Hideo FUKUTOME 京都大学理学部物理学第1教室
(Department of Physics, Faculty of Science, Kyoto University)

4) 基質フェノール酢酸によるアシル化段階およびベンゾイル化酵素による脱アシル化段階の反応速度の置換基効果を見ると Hammett の $\sigma-\rho$ 直線則に従う。そして両者の ρ 値は共に正の値を持つ。したがってエステル基質のアシル化および脱アシル化反応の律速段階は求核的反応である。一方アニリド基質はアシル化段階が律速的であるが、その置換基効果の ρ 値は負の値を持ち反応の律速段階は親電子的である。このようにエステル基質とアニリド基質で反応の律速段階の電子的性格がことなることからアシル化および脱アシル化反応に4面体中間状態の存在することが推定される。

5) エステル基質のアシル化および脱アシル化反応とアニリド基質のアシル化反応の速度に対する重水素置換の効果はいずれも $k_H/k_D=2\sim3$ の値を与える。したがって反応の律速段階はプロトン移動であり、置換基効果の結果と合わせると、エステル基質では一般塩基触媒反応、アニリド基質では一般酸触媒反応が律速段階になっている。

以上をまとめて、アシル化反応に対する次のモデルが考えられた。

ここで a) における B はヒスチジンのイミダゾール, OH はセリンのヒドロキシル基である。脱アシル化反応は c) の XH を H_2O に置き換えた逆反応である。反応 $a \rightarrow b$ と $c \rightarrow b$ は一般塩基触媒反応であり, 反応 $b \rightarrow c$ と $b \rightarrow a$ は一般酸触媒反応である。エステルのアシル化反応では $a \rightarrow b$ が律速で, アニリドに対しては $b \rightarrow c$ が律速である。

α -キモトリプシンの X 線回折による立体構造研究はケンブリッジの Blow らのグループによって進められていたが、最近になってその活性部位構造とインヒビターおよびアシル化結合した半基質の酵素への結合状態が明らかにされ、反応機構の立体化学的なモデルが提出されるに至った。またトシル化酵素の座標も発表された。¹¹⁾ その結果を要約すると

1) 触媒部位はアスパラギン酸 102 (以前は誤ってアスパラギンとされていた), ヒスチジン 57, セリン 195 よりなる。アスパラギン酸 102 はヒスチジン

57 の下に埋もれた位置にありヒスチジン 57 の $\text{N}^{\delta 1}$ と水素結合している。ヒスチジン 57 の $\text{N}^{\delta 2}$ は表面にあって表面に上向きに出ているセリン 195 の O^{γ} と水素結合している。アスパラギン酸 102 はセリン 214 の O^{γ} およびヒスチジン 57 の NH 基とも水素結合し得る位置にある。

2) 特異性部位はセリン 214~シスチン 220—191~アスパラギン酸 194 とつながる鎖でふちどられ, セリン 189, セリン 190 が底をなすポケットである。活性部位構造の概念図を図 1 に示す。

図 1.

インヒビターおよびアシル結合した半基質の結合状態については、

3) インヒビターおよびアシル化半基質の両方についてその芳香族側鎖はポケットの中に入っている。側鎖のN端側の NH 基は酵素のセリン 214 の CO 基と水素結合している。

4) インヒビター-酵素複合体については酵素の構造に大きな変化は見られないが、アシル化酵素においてはセリン 195 の O^{γ} は $\text{C}_\alpha-\text{C}_\beta$ 軸の回りにほぼ 120° 回転し下向きになった位置でアシル結合している。その他ヒスチジン 57 が $0.3\text{\AA}$ 外向きに動き, メチオニン 192 の S^{γ} が $1.0\text{\AA}$, シスチン 191—220 の $\text{S}-\text{S}$ 基が $0.35\text{\AA}$ 移動している。

5) アシル化酵素においてはヒスチジン 57 の $\text{N}^{\delta 2}$ とエステルのカルボニル O が水を介して水素結合している。

これらの知見から Blow らはアスパラギン酸 102 の負荷電がヒスチジン 57 との水素結合を通じてセリン 195 の O^{γ} に移動しセリン 195 O^{γ} の求核性を高めるというモデルを提出した。また Henderson は半基質のアシル化結合において5)に述べた水素結合水が良い基質においてはヒスチジン 57 の $\text{N}^{\delta 2}$ と相互作用しつつエステルの C を攻撃できる位置にくるのではないか、という考えに立って良い基質の結合状態を推測し、反

図 2.

底の立体的過程を推測した。この Blow らと Henderson のモデルを示したのが図2である。a) は Michaelis 複合体の状態を示す。b) は反応の第1段階でアスパラギン酸 102 の負荷電は2つの水素結合にあづかるプロトンの連動によってセリン 195 の OH に移り、その求核性を高める。この段階ではヒスチジン 57 は一般塩基触媒として働らく。次いでセリン 195 の OH は $C_{\alpha}-C_{\beta}$ 軸のまわりに回転し基質のカルボニル炭素を攻撃する。c) は四面体中間体の状態で基質のエステル結合の酸素とカルボニル酸素は元の位置から移動し前者はヒスチジン 57 の NH_2 に付いたプロトンと後者はセリン 196 およびグリシン 193 の NH 基のプロトンと水素結合できる位置にきて遷移状態のエネルギーを低める。d) の段階ではアスパラギン酸 102 とヒスチジン 57 のプロトンの連動が再び起こり、四面体中間体に移っていた負荷電は再びアスパラギン酸 102 にもどりアシル化反応が完結する。この段階ではヒスチジン 57 は一般酸触媒として働らく。

このモデルは前に述べた α -キモトリプシンの反応機構に関する知見のすべてを矛盾することなく説明する極めて興味ある秀れたモデルである。このモデル、特に荷電リレーシステムの働きを実験的に検証するにはどうしたらよいかは極めて興味深い問題である。

Freer らによるキモトリプシノーゲンのX線回折による研究によってキモトリプシノーゲンから α -キモトリプシンへの活性化に伴う酵素の構造変化の大意が明らかにされてきた。触媒活性と関係があると思われる点を要約すると

1) アスパラギン酸 102-ヒスチジン 57-セリン 195 の水素結合系は α -キモトリプシンとほとんど同じ形でキモトリプシノーゲンに存在する。活性化に伴って、ヒスチジン 57 の回転、セリン 214 の OH のアスパラギン酸 102 への接近、ヒスチジン 57 に van der Waals

接触していたイソロイシン 99 側鎖の離れる方向への移動が見られるがいつも非常にわずかな変化であり、活性の出現とどう関係あるかはっきりしない。

2) 表面にあったイソロイシン 16 とバリン 17 は活性化に伴って内部にもぐり、イソロイシン 16 の α アミノ基はアスパラギン酸 194 とイオン対をつくる。アスパラギン酸 194 は埋もれたままであるが約 $4\text{\AA}$ 移動する。アスパラギン酸 194 の近くにあったアルギニン 145 は $9\text{\AA}$ 移動して表面へ出る。アルギニン 145 は内部と外部の2つの位置を取り得る可能性もある。

3) キモトリプシノーゲンではメチオニン 192 の側鎖が埋もれているため、特異性部位のポケットは部分的にしか形成されていない。活性化に伴ないメチオニン 192 の側鎖は $8\text{\AA}$ 移動して表面に出、ポケットが形成される。メチオニン 192 の移動はイソロイシン 16 の移動とリンクしているようである。

最近イソロイシン 16 の α -アミノ基以外のすべてのアミノ基をアセチル化した α -キモトリプシンについて、イソロイシン 16 の α -アミノ基が中性になると酵素の活性が失われ、その状態では基質が結合しないこと、その変化に伴ってキモトリプシノーゲン- α -キモトリプシンの活性化過程に見られるのと同じような旋光性の変化が見られることが報告されているが、上記の3)とにらみ合わせて興味深い。

π , δ , γ -キモトリプシンのX線については、 α -キモトリプシンとほとんど変化の見られないことが報告されている¹⁵⁾。

α -キモトリプシンと類似の他のセリンプロテナーゼトリプシン (trypsin) とエラスターゼ (elastase) についてのX線回折から、これらの酵素にも α -キモトリプシンと全く同じ形のアスパラギン酸-ヒスチジン-セリンの水素結合リレー系が存在することが知られている。これらの酵素は全体的構造も互いによく似ている。バクテリアのセリンプロテナーゼ、サブティリシン BPN' (subtilisin)¹⁸⁾ は全体的構造はかなりちがっているが、やはり同じ形の水素結合リレー系を持っている。トリプシンの特異性部位は α -キモトリプシンのセリン 189 に対応する位置のアミノ酸がアスパラギン酸で置き換っておりポケットは負荷電を持つと共に浅くなっている。またエラスターゼについては α -キモトリプシンの特異性部位の2つのグリシンに対応するアミノ酸がバリンとスレオニンに置き換っており、ポケットはふさがってしまっている。これらの特異性部位の構造の変化は、これらの酵素の基質特異性が、ト

リプシンについてはリジン, アルジニンの塩基性残基, エラスターゼについてはアラニンなどの小さな疎水性残基であることとうまく対応している。スブティリシンにおいてもポケットは存在していない。

セリン-プロテナーゼではないが、蛋白質分解酵素パパイイン (papain)¹⁹⁾ も セリン-プロテナーゼの水素結合リレー系と類似の配置を持った水素結合系, アスパラギン 175-ヒスチジン 159-半シスチン 25 の系を触媒部位に持っている。この酵素でも反応は半シスチン 25 との共有中間体を経て進行し、反応モデル(3)式の OH 基を SH 基で置き換えた形の反応路が推定されている。²⁰⁾ この酵素の水素結合系に負荷電が存在しないのは硫黄の電気陰性度が酸素よりも小さく、プロトンをイミダゾール基に渡しやすいくと関係があるかも知れない。もっともこの系の S-N 原子間の距離は 3.4 Å で水素結合距離より大きいので、S-N 原子間の水素結合は存在しないとする見方もあるが、X 線を取った結晶が不活性でありまた SH 基が部分的にブロックされているので現在のところその点を確実にすることができていない。

§ 3. カルボキシペプチダーゼ A

カルボキシペプチダーゼ A²¹⁾ (carboxypeptidase) は自由な α-カルボン酸を持つペプチド鎖の C 末端アミノ酸の隣りのペプチド基を特異的に加水分解する酵素である。またペプチド基をエステルで置き換えた基質も加水分解する。この酵素は亜鉛イオンを 1 原子強く結合しており、この亜鉛が取れると活性は消失する。亜鉛原子は他の 2 価金属原子と置換することができる。コバルト、ニッケル、マンガンの場合活性はペプチド、エステルの両方にあるが、銅では完全に消失する。興味深いのは水銀、カドミウムと鉛の場合でペプチダーゼ活性は消失するがエステラーゼ活性はあまり影響を受けない。これらの金属を置換された酵素にも基質は結合するので活性の変化は触媒段階で生じている。

亜鉛のないアポ酵素にジペプチド基質は結合し、基質結合により亜鉛原子のアポ酵素への結合は阻害される。そしてこの場合の基質のアポ酵素への結合の平衡定数は亜鉛を持つ酵素への結合定数とほぼ同じ値を持つので、ジペプチド基質の結合に亜鉛はあまり効いていないことがわかる。ところがエステル基質は亜鉛のアポ酵素への結合に何の影響も与えない。このことから、アポ酵素への結合にはペプチドの NH 基が効いており、またエステル基質の酵素への結合には亜鉛が重

要な役割を果たしていることがわかる。

アセチル化、ヨード化、光酸化などの化学修飾によりペプチダーゼ活性が消失するのに対し、エステラーゼ活性はかえって増大する。インヒビターと結合した酵素と結合していない酵素をアセチル化すると前者ではペプチダーゼ活性は消失しない。そして両者の差スペクトルからアセチル化によるペプチダーゼ活性の消失には 2 つのチロシン残基が関与していることがわかった。

またペプチダーゼ活性の pH 依存性は pH 7.5 に山をもつずいどいベル型であり、スペクトルの pH 変化からその活性基の内の一つは pK 7.9 を持つ異常チロシンであることが推定された。ところでエステラーゼ活性は線型の pH 依存性を示しており、同様の pH 依存性を、OH⁻ イオンに依存し金属イオンにより触媒されるアミノ酸エステルの加水分解のモデル反応が示すことが知られている。したがってエステラーゼ活性においてはペプチダーゼ活性とことなり酵素の活性基による求核攻撃の代りに OH⁻ イオンによる求核攻撃が働いていると考えられる。

カルボキシペプチダーゼ A の X 線回折による構造研究は Lipscomb らハーバードのグループによって行なわれてきた。最近反応機構の概要を示すモデルが提出され、²²⁾ 座標も発表された。²³⁾

活性部位構造の概念図を図 3 に示す。²⁾

図 3.

1) 酵素表面には亜鉛原子に至る浅い溝があり、その奥に深いポケットがある。基質はこの溝に結合しその C 端アミノ酸はポケットに入る。

2) 亜鉛原子にはグルタミン酸 72 の O⁻ と 2 つのヒスチジン 69, 196 の N⁺ が配位しており、第 4 配

位子座には水分子が配位しており、4つの配位子はほぼ正四面体をなしている。グルタミン酸72の負荷電のため亜鉛の有効荷電は+1である。第4配位子座の水と相互作用する位置にグルタミン酸270がある。

3) ポケットの首の位置にアルギニン145があり、そのN⁺はグルタミン酸155のCO基のOと水素結合し、その隣りのアラニン154のCO基のOはグルタミン249のN⁺と水素結合している。チロシン248の残基はアルギニン145と反対の側にありそのOnは水分子を通じてグルタミン249のOnと水素結合している。こうしてアルギニン145とチロシン248は水素結合のリンクを通じて相互に連結し合っている。

この酵素は基質の結合により活性部位構造に大きな変化を示す。基質グリシル-L-チロシンの結合の概念図を図4に示す。

図 4.

1) 基質のペプチドのCO基は亜鉛に配位していた水分子を置き換えた位置にき、そのOが亜鉛の第4配位子座に入り、そのCはグルタミン酸270と相互作用し得る位置にくる。

2) 基質の α -カルボン酸はアルギニン145とイオン対結合を作る。その際アルギニン145は2Å程動く

3) アルギニン145が動くことによってチロシン248に至る水素結合リンクがこわれる。そしてチロシン248のフェノール基はC_α-C_β軸の回りに回転し、そのOH基は約12Å下方に動く。

4) その結果チロシン248のOH基は基質のペプチド面に対しグルタミン酸270と反対の方向からペプチドNHと水素結合する位置にくる。基質のペプチドはチロシン248のOH、グルタミン酸270および亜鉛でつつみ込まれた形になる。

基質グリシル-L-チロシンはいわゆる貧基質で基質-酵素複合体は4°Cで1週間程度も安定である。したがって、良い基質の結合はこれと少しちがったもので

なければならない。Lipscombらはグリシル-L-チロシンのグリシン α -アミノ基が図5aに示すように水を介してグルタミン酸270と水素結合していることから、この場合にはグルタミン酸270を通してのCO炭素への攻撃ができないのであろうと考え、良い結合状態は図5bのようなものであろうと推定している。そして反応機構として図5cあるいはc'のようなモデルを提出している。²²⁾

図 5.

Michaelis 複合体(図5b)において正荷電を持つ亜鉛に配位することによりペプチドのCOは強く分極する。そしてまたペプチドNHとチロシンOHの水素結合によりペプチドNに電子が引き付けられこの両効果によりペプチドCの有効正荷電が増大する。そして反応の中間状態として予想される4面体中間体はペプチドCがグルタミン酸270の方向に動くことによって形成されると考えられるので、この分極効果とグルタミン酸270の負荷電は4面体中間体を安定化させる方向に働らく。図5cはグルタミン酸270に助けられた水分子による一般塩基触媒の反応路であり、図5c'はグルタミン酸270とのアシル中間体を経る反応路である。このいずれの反応路に対してもチロシン248のOHはプロトンの供与基として働らく。前に述べたエステル基質のpH依存性および、エステル基質に対する重水素効果が $k_H/k_D \sim 2$ の値を示すことから、エステル基質に対しては水による一般塩基触媒反応が律速的になっている。しかしこの律速段階が図5cあるいはc'のいずれの場合にあたるかは現在のところ決定

できない。

カルボキシペプチダーゼAにおいては基質の結合によるチロシン248の移動が触媒活性に本質的に重要であり、基質をつつみ込むような形の結合は induced fit 機構によってのみ実現できる。この酵素においては α -キモトリプシンに比べて反応の立体回路はずっと複雑であり、その全体像を知るにはより詳細な活性部位および複合体の立体構造の解析が必要であろう。

§4. リゾチーム

リゾチーム (lysozyme) はその立体構造と反応機構の立体的モデルが最初に提出された酵素である。²⁴⁾ リゾチームに関してはすでにいくつかの総説²⁶⁾があるのでここではなるべく簡単に反応機構を要約する。

リゾチームは N-アセチルムラミン酸 (NAM) と N-アセチルグルコサミン (NAG) の間あるいは NAG 間の β -グリコシド結合を特異的に加水分解する。

1) リゾチームの表面には深い溝があり、この溝に基質分子が結合する。基質の糖の結合部位は6つ並んであり、ABCDEF とよばれている。NAM はB, D, F 部位にしか結合できないが、NAG はどの部位にも結合できる。基質の結合によりトリプトファン62残

基は $0.75 \text{ \AA}$ 基質の方へ移動する。

2) D部位への結合において、基質の CH_2OH 基と酵素との間の立体障害のため、基質の糖環は安定な椅子形コンホメーションでは結合できなく、不安定な半椅子形コンホメーションに変形して初めてぴったり結合できる。

3) 加水分解反応はD, E部位間の β -結合について起こる。この β 結合の O1の近くにはグルタミン酸35があり、D部位でのピラノース環の変形により O1はグルタミン酸35のOと水素結合を形成する位置にくる。変形したピラノース環のグルタミン酸35と反対の側にはアスパラギン酸52が変形したピラノース環のC1とC5に相互作用できる位置にいる。

4) グルタミン酸35の周囲は疎水性であり、活性のある状態では荷電を持っていないと考えられる。アスパラギン酸52の周囲は親水性で、負荷電を持っていると考えられる。

以上の知見から Phillips らはリゾチームの反応機構に対する図6のようなモデルを提出した。²⁴⁾

図6a)は Michaelis 複合体の状態、グルタミン酸35と O1の水素結合、アスパラギン酸52の負荷電によって C1-O1結合は分極し、またピラノース環の半椅子形への変形で O5のn電子と C1-O1結合の σ 電子との間に共軛が生じ、これらの効果によって C1-O1結合は弱められた状態にある。またピラノース環の変形のエネルギーも遷移状態へのエネルギー差をちめる方向に働らく。図6b), c)はカルボニウムカチオン中間体を経る反応路で、図6b'), c')はアスパ

図 6.

ラギン酸 52 との共有中間体を経る反応路である。この両反応路について反応はグルタミン酸 35 のプロトンの O1 への移動によって進む。b) においては C1 の位置はプロトン移動によって変わらないのに対し、b') においては C1 は少しアスパラギン酸 52 の O の方向に動きその間に結合が形成される。基質の半分が離脱した後、c) においてはカルボニウムカチオン中間体が、c') においてはアスパラギン酸 52 との共有中間体ができる。加水段階の反応では反応はこれらの逆反応として進む。

この 2 つの反応路のどちらが良いかは現在のところあまりはっきりしない。c) のカルボニウム中間体はアスパラギン酸 52 の負荷電と C1-O5 間の電子の共軌によって安定化されているとはいってもエネルギーの高すぎるおそれがあるし、c') の共有中間体ではピラノース環の変形のエネルギーが残っているにしてもエネルギーが低くなりすぎるおそれがある。実際にはこの中間の状態になっている可能性も充分考えられる。

リゾチームの反応機構として基質のアセトアミド基²⁹⁾の分子内触媒作用によるという説も出されていたが、これはアセトアミド基を持たない

が、リゾチームによって加水分解されることから否定された。また(5)の C1 位置の水素を重水素で置換し 2 次アイソトープ効果を見た結果、 $k_H/k_D \sim 1.11$ という $S_N 1$ 型のカルボニウムイオン反応に期待される値 1.14 に近い値が得られたので、反応中間体かかなりの

確率でカルボニウムカチオンの状態になっていることが裏付けられた²⁷⁾。

§ 5. 酵素反応機構の解析

1) 酵素による加速の程度

酵素の基本的な特徴はその高能率の触媒能と基質特異性である。酵素反応の速度と対応する非酵素反応の速度を定量的に比較することは、酵素反応が Michaelis 複合体を通じて進行する 1 次反応であるのに対し、非酵素反応が一般に 2 次以上の速度式に従う反応なので、そう簡単なことではない。酵素反応と非酵素反応の速度を直接比較できる数少ない例として、尿素の加水分解反応がある³⁾。尿素の加水分解反応は pH に依らない 1 次反応なので、酵素ユレアーゼ (urease) による尿素の加水分解反応の速度と直接比較することができる。表 1 からユレアーゼによる加水分解速度は非酵素的な加水分解速度に比べ 10^{14} 倍速く、活性化自由エネルギーで 22 kcal/mole の減少が見られる。多くの酵素反応ではそれに対応する非酵素反応が全く観測できない程おそいので、酵素による加速の程度はユレアーゼの場合よりもっと大きい場合も多いであろう。

表 1. 尿素の加水分解速度の比較

	100°C (sec ⁻¹)	20.8°C (sec ⁻¹)	ΔF (kcal/mole)
非酵素	4.15×10^{-5}	3×10^{-10} (外挿)	32.7
ユレアーゼ	—	3×10^4 (pH 8)	11

2) Michaelis 複合体

i) 結合過程 酵素と基質あるいはインヒビターの結合および解離の速度定数 k_1 と k_{-1} は多くの酵素に

表 2. α -キモトリプシンとリゾチームへの基質結合、解離の速度

酵 素	基質, インヒビター	k_1 (M ⁻¹ sec ⁻¹)	k_{-1} (sec ⁻¹)
α -キモトリプシン	フリルアクリロイル-L-トリプトファンアミド	6.2×10^6	$2.7 \times 10^{3*}$
	トリフルオロアセチル-D-フェニルアラニン	1.0×10^4	4.9×10^2
	プロフラビン	1.1×10^8	$2.15 \times 10^{3*}$
リゾチーム	メチル- α -NAG	1.4×10^5	5.5×10^3
	メチル- β -NAG	1.6×10^5	4.5×10^3
	α -NAG	3.5×10^5	8.5×10^3
	β -NAG	1.4×10^5	3.3×10^3
	(NAG) ₂	3.6×10^6	720
	"	4.56×10^6	950 *
	(NAG) ₃	4.44×10^6	28 *

* T-jump それ以外は NMR 緩和

ついて高速反応あるいはNMR緩和の方法を用いて測定されている。表2にリゾチーム²⁸⁾と α -キモトリプシン²⁹⁾の例を示す。生理的な基質については結合速度は大抵 10^6 から 10^8 $M^{-1}sec^{-1}$ の程度のことが多く、拡散律速過程に対して期待される値 10^{10} $M^{-1}sec^{-1}$ に近づいているがそれよりは小さいのが普通である。それに対し非生理的基質はより小さな結合速度を示すことが多い。またリゾチームの場合、単糖と2糖の間では結合速度の加速があるのに対し、2糖と3糖ではほとんど速度の変化が無いのは興味深い。これに対し解離の速度は糖の長さが大きいほど小さくなっているがこれは結合エネルギーが基質の長さと共に大きくなるためであろう。

リゾチームとメチル- β -NAGの結合、解離の活性化エンタルピーとエントロピーが測定されているが、表3に見るように、結合の活性化エンタルピーが負の

表 3. メチル- β -NAG のリゾチームへの結合の活性化エンタルピーとエントロピー

		$\Delta H^\ddagger$ (kcal/mole)	$\Delta S^\ddagger$ (eu)
k_1	$1.6 \pm 0.8 \times 10^6$ ($M^{-1}sec^{-1}$)	-2.9 ± 0.5	-44 ± 9
k_{-1}	$4.5 \pm 1.7 \times 10^3$ (sec^{-1})	$+4.4 \pm 0.7$	-27 ± 6

値を持っていると共に、エントロピーが大きく減少している。また、解離の際にも大きなエントロピーの減少が見られる。これは結合、解離の自由エネルギー障壁がエントロピー性であることを示している。基質分子が結合部位の近くにきた時に示すこの大きな自由度の凍結は、基質分子が特定の方向を向いた時にのみ酵素と結合し得るという効果も含むであろうが、それだけで説明するには大きすぎ、どうしても溶媒の水分子の運動の凍結を考えなければ説明できない。

表4に α -キモトリプシンへのインヒビターの平衡³¹⁾結合によるエンタルピーとエントロピーの変化を示す。

pH 7.8 においてはエンタルピー、エントロピーの両方に非常に大きな減少が見られる。このような大きなエンタルピー、エントロピーの減少はインヒビターと酵素の相互作用だけによっては説明が困難である。一つの可能性はインヒビター結合により酵素のコンホメーション変化が誘起されているとすることである。これに対し pH 5.6 では pH 7.8 のような大きなエンタルピー、エントロピーの変化は見られない。

多くの酵素について、基質あるいはインヒビターの酵素への結合過程が速い速度とおそい速度の2段階から成っており、このおそい段階の時定数は $1 \sim 10^{-4} sec$ の程度である。³⁰⁾ キモトリプシンについても結合が2段階であることが認められている。RNase の場合などで、このおそい過程の時定数の依存性の解析から、この過程は基質結合によって生じる酵素のコンホメーション変化と推定されている。

表4において、pH 7.8 と pH 5.6 でエンタルピー変化とエントロピー変化の値が大きくちがっているのに対し、自由エネルギーの変化値はほとんど変わっていない。水溶液中の化学反応において、エンタルピー変化 ΔH とエントロピー変化 ΔS の値は溶媒条件—混合溶媒や pH—を変えるとそれぞれが変化するが、その際 ΔH と ΔS の変化の間に比例関係の成り立つこと（エンタルピー・エントロピー保償現象）³²⁾ が広く認められている。同様の比例関係は酵素反応においても見られることが知られている。表4はその一例である。³³⁾ Lumry と Rajender は、この現象が溶媒の水に特有な性質によるものと考えられる多くの傍証を挙げ、 ΔH と ΔS の比例関係の存在がその過程への水の関与の証拠となし得るとしている。彼らはこの比例関係がキモトリプシンの基質の平衡結合や触媒過程またヘモ

表 4. α -キモトリプシンへのインヒビター平衡結合のエンタルピーとエントロピー変化*

インヒビター	ΔG (kcal/mole)		ΔH (kcal/mole)		ΔS (cal/deg·mole)	
	pH 7.8	5.6	pH 7.8	5.6	pH 7.8	5.6
ヒドロキシナメート	-3.71	-3.80	-15.7 ± 1.0	-5.8 ± 0.3	-40 ± 3	-7 ± 1
N-アセチル-D-トリプトファン	-3.29	-3.71	-19.0 ± 0.6	-5.5 ± 0.3	-52 ± 2	-6 ± 1
フェノール	-3.05	-3.05	-13.5 ± 0.5	-4.1 ± 0.3	-35 ± 2	-3 ± 1
インドール	-4.31	-4.31	-15.2 ± 0.8	-6.4 ± 0.3	-37 ± 3	-7 ± 1

* 25°Cでの測定値。

グロビンへの配位子結合過程において見られることから、これらの過程においても水の関与があるとし、蛋白質の小さな(0.5%程度)体積変化による水の構造変化をその原因とする説を提出している。

酵素-基質の結合過程において水が重要な役割を持っていることは上記のデータから推測されるが、X線回折によっても、 α -キモトリプシンの場合は5~6コ¹¹⁾の、カルボキシペプチダーゼAの場合には少くとも4コ²⁾の水分子が基質の結合ポケットに入っており、基質の結合によってこれらの水がポケットから追い出されると推定されている。

ii) 特異性 X線回折によって酵素の基質特異性を決める主な機構が鍵と鍵穴式の基質と酵素の結合部位間の立体的適合にあることが明らかになってきた。酵素の基質結合部位には、鎖状の基質分子を結合する深い溝を持つもの(リゾチーム、RNase、パペイン)²⁴⁾³⁴⁾¹⁹⁾、基質の特異性基を結合するポケットを持つもの(α -キモトリプシン¹¹⁾¹⁶⁾、溝とポケット(RNase)²²⁾ポケットと浅い溝(カルボキシペプチダーゼA)の組み合わせ²⁴⁾や、溝自体が特異性を決定する場合(リゾチーム)²⁴⁾、溝だけでは特異性が不十分でポケットを使用しているもの(RNase、カルボキシペプチダーゼA)³⁴⁾²²⁾、ポケットも溝も持っていないもの(エラスターゼ¹⁷⁾、スブチリシン¹⁸⁾)などと、基質特異性に適合した多様な結合部位構造が見られる。

また α -キモトリプシン、トリプシン、エラスターゼなどセリン-プロテナーゼの例は同じ型の触媒活性を持ちながら異なる特異性を持つ場合の構造上の適合的变化を示すものとして興味深い(§2)。

酵素-基質結合には立体的適合と共に、基質の荷電基と酵素の荷電基間のイオン対形成(トリプシン、カルボキシペプチダーゼA)や基質の水素結合基と酵素の水素結合基間の水素結合形成も重要な役割をしており、特に後者はすべての酵素において見られる。表5にリゾチームの各結合部位における水素結合と van der Waals 接触の数および、色々な長さの基質の結合から各結合部位の間の干渉がないとして各結合部位へ割り振られた結合の自由エネルギーの値を示す³⁵⁾。D部位においては基質の構造変化のため結合エネルギーは正になっている。

リゾチームやカルボキシペプチダーゼAにおいては基質結合による酵素構造の induced fit が見られ、後者では induced fit が触媒活性にも本質的な意義を持つ。しかしリゾチームの場合の induced fit は触媒活

表 5. リゾチーム結合部位における相互作用と結合の自由エネルギー

部位	水素結合数	van der Waals 接触(<4 Å) 数	- ΔF (kcal/mole)
A	1	7	1.8~2.3
B	1	11	2.8~3.9
C	4	30	4.7~5.7
D	2	35	-2.9~-6.0
E	3	45	0.9~4.0
F	4	13	1.5~5.0

性には本質的でないと思われる。

RNase のポケットにおいては酵素のセリンとスレオニンのOH基が回転することにより、基質のユリジンとシトシン残基の両方をうまく同一のポケットに収容できる機構(adjustable pocket)^{36,2)}がX線回折による構造から推定されている、図7。

図 7.

リゾチームのように一連の結合部位がある場合に各部位への鎖状基質の結合が独立であるかどうかが問題になる。特にD部位のようにモノマー単位だけでは結合できない部位への結合には他の部位への結合との相関が重要と思われる。筆者の研究室の多田と京大基礎物理研の垣谷はリゾチームのグリコシド転位反応の kinetics が各部位への結合が独立であるとして各部位へ割振られた自由エネルギー値(表5)を用いる限り全く説明できないことを見出した。グリコシド転移反応の解析から推定された CDEF 部位への結合の平衡定数およびグリコシド結合のリゾチームによる切断、結合と加水の速度定数を表6に示す。表6に見られるように CDEF 部位への結合平衡定数は AB 部位と CDEF 部位が独立としてヘキサマーの結合の平衡定数とダイマーの AB 部位への結合の平衡定数から計算された値とは大きくちがっている。²⁵⁾

表 6. グリコシド転移反応から求めたリゾチームへの結合の平衡定数および反応の速度定数

結合の平衡定数 (M^{-1})	各部位独立として求めた値	グリコシド転移反応から求めた値
K(AB)	2×10^1	同左
K(CD)	1.6	同左
K(EF)	3.1×10^{-1}	同左
K(ABCD)	2×10^3	同左
K(CDEF)	28	1×10^{-1}
K(ABCDEF)	3.5×10^4	同左
速度定数 (min^{-1})		
k_+ (β -グリコシド結 合切断)	/	2×10^2
k_- (β -グリコシド結 合形成)		8×10^5
k_{H_2O} (水付加)		4×10^4

3) 複合体形成が触媒能におよぼす効果

i) 濃度効果 複合体の形成により、活性部位での基質の有効濃度が高くなり、基質の転換速度が早まるということが考えられるが、この効果はほとんど加速に有効にきかない。それは活性部位での基質の有効濃度は上るが活性部位の溶液中における濃度自体が小さいため溶液にある基質全体に効果が及ばないからである。

ii) 近接、固定効果 非酵素反応では基質と触媒は溶液中に別々にあって、衝突により反応が進行する。他方酵素では基質は触媒部位の近くに固定された形で反応する。この近接、固定によりどの程度反応が加速されるかは、低分子のモデル系で分子間³⁸⁾反応と分子内反応を比較することにより研究されている。立体障害

があるような場合を除いて、分子内反応は対応する分子間反応に比べ $10^2 \sim 10^4$ 程度早いことが示されている。例としてフェニルエステルの3級アミンによる加水分解反応とそれを分子内反応に移した系(図8)の結果を表7に示す。この反応は第1段階のアミンの転位反応が律速的である。表7に見られるようにこのアミンの転位反応に対するフェノール基の置換基効果から得られる Hammett の ρ の値は図8 a) b) c) の3

図 8.

つの系のいずれに対してもほぼ同じであるので反応機構は分子間、分子内のいずれでも同じであるといえる。分子内反応と分子間反応の比は 5×10^2 から 5×10^3 (M)の間にある。この系では活性化エンタルピー $\Delta H^\ddagger$ が分子間反応と分子内反応でほとんど変わっていないのに対し、活性化エントロピー $\Delta S^\ddagger$ の大きさが分子内反応では分子間反応より小さくなっており、反応基が

表 7. フェニルエステルの三級アミンによる求核反応速度、活性化エンタルピーとエントロピーの分子間と分子内反応に対する比較

置 換 基	$k_a(M^{-1}\text{min}^{-1})$	$k_b(\text{min}^{-1})$	$k_b/k_a(M)$	$k_c(\text{min}^{-1})$	$k_c/k_a(M)$
<i>p</i> -NO ₂	4.29	21.500	5010	10.000	2330
<i>m</i> -NO ₂	0.342	580	1690	255	746
<i>p</i> -Cl	0.0308	33.1	1070	19.9	646
H	0.00795	10.0	1260	3.9	490
<i>p</i> -CH ₃	—	3.50	—	1.28	—
Hammett's ρ	2.15	2.54	2.54	2.54	—
置 換 基	$\Delta H^\ddagger$	$T\Delta S^\ddagger$	$\Delta H^\ddagger$	$T\Delta S^\ddagger$	$\Delta H^\ddagger$ $T\Delta S^\ddagger$ (kcal/mole)
<i>p</i> -NO ₂	12.3	-6.3	11.9	-1.9	11.5 -2.6
<i>m</i> -NO ₂	12.1	-8.0	11.5	-4.3	11.8 -4.4
<i>p</i> -Cl	12.5	-9.1	15.9	-2.2	13.8 -4.1
H	12.9	-9.4	12.5	-5.7	12.3 -6.4
<i>p</i> -CH ₃	—	—	13.7	-5.1	14.4 -5.5

分子内に束縛されることによる活性化エントロピーの減少が加速の原因であることがわかる。Bruce と Benkovic は多くのフェニルおよびチオールエステルの転移反応について、その活性化エントロピーと反応次数の間に

$$-T\Delta S^\ddagger/\text{反応次数}=4\sim 5 \text{ kcal/mole} \quad \cdots\cdots(7)$$

という関係が成立していることを見出している。したがってこの系では反応次数が一つ減少するごとに活性化自由エネルギーのエントロピー項が $4\sim 5 \text{ kcal/mole}$ 減少することになる。

運動の自由度の凍結による加速のもう一つの例としてジカルボン酸のモノフェニルエステルの分子内触媒による加水分解反応の第1段階の無水ジカルボン酸生成反応

の結果を表8に示す。表8から分子内回転の自由度が減ると共に反応の速度が増大していること、1重結合の回りの回転の自由度が1つ凍結される毎に約230倍の加速が起こることが見られる。

表 8. ジカルボン酸モノフェニルエステルの分子内無水カルボン酸生成反応速度の相対比

物 質	相 対 速 度
	1
	20
	230
	10,000
	$53,000 \approx (230)^2$

次の系

はキモトリプシンと関連して興味があるが、この場合

kintra/kinter=73 (M) という値が得られている。

また次の系

は図に示したようにアセトアミド基の分子内触媒作用により加水分解するが、この系には立体特異性があり中性では β -同位体の方が α -同位体に比べ 10^5 倍早く分解する。このアセトアミド基による分子内触媒作用をリゾチームの作用機構のモデルとする説が提出されたが、前に述べたようにこの説はリゾチームの作用機構²⁷⁾としては否定された。

iii) 特異性部位への結合の効果 多くの場合酵素の特異性は完全に厳密なものではなく、特異的基質とはちがう構造を持つ基質に対しても反応性を持つ場合がある。しかしこうした非特異的基質の反応速度は特異的基質⁴⁰⁾に比べかなりおそい。Bender らは α -キモトリプシンについて特異性部位への基質の結合が反応速度におよぼす影響について次のような分析をしている。表9に α -キモトリプシンの触媒速度を示す。上2つは特異的基質で下2つは非特異的基質である。 k_2 , k_3 はそれぞれアシル化、脱アシル化段階の速度で k_{OH^-} は水酸基による非酵素的加水分解の2次反応速度である。基質のちがいによる反応速度のちがいは、基質構造のちがいによって被反応基の電子密度などがちがっているなど、基質構造に由来する反応速度のちがいがあると考えられるがそれは、水酸基による非酵素反応にも現われるであろうから、その効果を

$$k_3' = k_3 k_{OH^-}(\text{acet}) / k_3(\text{acet}) k_{OH^-} \quad \cdots\cdots(11)$$

という式で補正する。ここに $k(\text{acet})$ は p -ニトロフェノール酢酸に対する k の値である、(11)式で求めた、基質構造自体の効果を除いた、脱アシル化の相対的速度を表10に示す。この量は基質の特異性の度合を示すものと見ることができよう。また表10には脱アシル化反応の活性化の熱力学的パラメーターの値も示す。表10から、活性化エンタルピーは基質によらずほぼ一定であるのに対し、活性化エントロピーの大きさは基質の特異性の増大と共に減少している。これは非特異的基質では特異性部位への基質の結合がゆるく、アシル中間体で基質が振動や回転の自由度を多く持っているのに対し、特異的基質では基質は特異性部位へしっかり

表 9. α -キモトリプシンの反応速度におよぼす基質特異性の効果

基 質	$k_{cat}(\text{sec}^{-1})$	$k_2(\text{sec}^{-1})$	$k_3(\text{sec}^{-1})$	$k_{OH}(\text{M}^{-1}\text{sec}^{-1})$
N-アセチル-L-チロシン-エチルエステル	193	4,000	193	76
N-アセチル-L-トリプトファン-エチルエステル	46.5	374	46.5	76
トランス-シンナモイルイミダゾール	0.125	—	0.125	1.19
パラ-ニトロフェニル酢酸エステル	0.0068	4.8	0.0068	9.5

表 10. α -キモトリプシン脱アシル化反応の活性化エンタルピーとエントロピー

基 質	k_3^1	$\Delta F^\ddagger$	$\Delta H^\ddagger$	$-T\Delta S^\ddagger(\text{kcal/mole})^*$	$\Delta S^\ddagger(\text{eu})$
表 9 と同じ	3540	14.3	10.3	4.0	-13.4
	942	17.9	12.0	5.9	-19.8
	14.7	20.1	11.2	8.9	-29.6
	1	20.4	9.7	10.7	-35.9

* $T=298^\circ\text{K}$

結合して運動の自由度が凍結されているためだと考えられる。1 結合の回転の自由度および振動の自由度の凍結によるエントロピーの減少はそれぞれ 4~6⁴¹⁾ および 2.5~7.5eu と評価されているから、酢酸化アシル酵素に比べ、N-アセチル-L-チロシン化アシル酵素の方が特異性部位への結合で約 4 結合多くの回転の自由度が凍結されていることになる。

iv) 共有中間体 多くの酵素反応は共有中間体を經由して進行するが、共有中間体が反応速度におよぼす影響についてはあまり良くわかっていない。1つの可能性としては上記の特異性部位結合の効果と同様な自由度の凍結の効果が考えられる。表11に Lumry らによってN-アセチル-L-トリプトファン-エチルエステルを基質として測定された α -キモトリプシンの全反応路(2)の各段階の熱力学的パラメーターを示す。キで示したのは各段階の遷移状態である。表11から、Michaelis 複合体 ES および EP_2H に比べアシル酵素

E-A の方がエントロピーの減少が大きいことその結果 E-A の方がエンタルピーが低いにもかかわらず自由エネルギーとしてはほぼ同じになっていること。また活性化エントロピーについて Michaelis 複合体からよりも E-A からの方が小さい値を持っていること、その結果活性化エンタルピーについては E-A からの方が大きいにも拘らず、全体として活性化自由エネルギーでほぼどの段階も等しい値になっていることが見られる。これは共有中間体で基質が Michaelis 複合体よりも強く束縛されていることを示しており、そのことがエンタルピーでの損を補償している。

v) 多重結合部位の効果 リゾチームのように一連の基質結合部位を持っている場合、長い基質の方が早く分解される。表12に NAG オリゴマーの加水分解の長さに対する相対速度を示す。ダイマーからトリマーで速度が大きくなっているのは、トリマーでは結合困難なD部位へ CDE というように両端を押えて結合で

表 11. α -キモトリプシンによる N-アセチル-L-トリプトファン-エチルエステルの加水分解反応各段階の熱力学的パラメーター

反応段階 (kcal/mole)	E+S	⇌	ES	⇌	E-A+P ₁	⇌	EP ₂ H	⇌	E+P ₂ H
$\Delta F^\ddagger$	0	?	-4.8	10.0	-5.2	10.1	-5.0	?	0
$\Delta H^\ddagger$	0	?	-9.9	-1.0	-13.3	-1.3	-8.8	?	0
$-T\Delta S^\ddagger$	0	?	5.0	11.0	8.1	11.4	3.6	?	0
$\Delta F^\ddagger$			14.9	15.2	15.2	15.1			
$\Delta H^\ddagger$	?	?	8.9	12.3	12	7.5	?	?	
$-T\Delta S^\ddagger$			6.0	2.9	3.5	7.8			

表 12. リゾチームによる NAG オリゴマー分解速度の長さ依存性

基 質	相 対 速 度
(NAG) ₂	0.003
(NAG) ₃	1.0
(NAG) ₄	8
(NAG) ₅	4,000
(NAG) ₆	30,000

きののに対しダイマーでは DE という片端を押えた結合しかできないからである。これに対しトリマーからテトラマーではほとんど加速が見られないが、これは多くのテトラマー基質が結合力の強い ABC 部位を含む、ABCD という分解のおこらない非生産的結合をするからであると考えられる。またペンタマーで大きな加速が見られるが、これはペンタマーでは ABCDE あるいは BCDEF という強い結合部位 ABC を含む生産的結合ができるからである。

4) 触媒部位活性増大の機構

前節に述べたのは触媒部位の構造とは直接関係のない間接的な加速の機構であった。酵素には触媒部位においてもその触媒活性を高める多彩な機構が存在している。加水分解酵素について明らかになってきた触媒部位における触媒能増大の機構を整理すると次のようになる。

i) 酵素触媒部位の賦活化 反応速度を増大させるには活性化エネルギーを減少させねばならないがその

ためには基底状態エネルギーを増大させ、遷移状態エネルギーを減少させねばならない。酵素の触媒部位は酵素分子の中でもエネルギーの高い賦活化された状態にある領域であると考えられる。触媒部位の賦活化機構として次のものがある。

a) 酸、塩基触媒基および求核基の活性化

加水分解酵素の触媒部位には必ず、一般酸、塩基触媒あるいは求核試薬として働らく基が存在しているが、それらの基については、恒に異常な電離の振舞が見られる。表13に加水分解酵素の活性基の pK 値を示す⁽²⁾。少数のものを除いてこれらの異常滴定を示す基が触媒部位にある活性基であると確実に同定されているわけではないが、これらの異常滴定基が活性基であると信じられている。表13にはX線回折からわかったこれらの基の環境も示してある。これらの基の異常滴定は、それらの触媒活性と密接な関係にある。

これらの基の異常電離は、イ) 水素結合、ロ) 近傍のイオン基のクーロン場、ハ) 疎水性環境にあること、などによるプロトンの解離、結合エネルギーの変化によっている。このような近傍基との相互作用によるプロトンのエネルギー状態の変化は、触媒基の一般酸、塩基触媒能の変化をもたらす。またイ) ロ) による分極効果は触媒基の求核性をも変化させる。これらの効果が酵素の触媒能を高めていることは定性的には間違いないが、その定量的評価を行なうことは現在のところ困難である。

b) 触媒基の機械的ひずみ

上記のような触媒基の近傍基との相互作用は、触媒基に機械的なひずみをもたらしている可能性がある。図2に示したキモトリプシンの反応機構において第2段階b)でのセリン195のC_α-C_β軸回りの回転の動因の1つの可能性としては、セリン195のOH基のヒスチジン57と水素結合した位置はC_α-C_β軸回りの回転ポテンシャルエネルギーの高い位

表 13. 酵素活性基の異常滴定

酵 素	アミノ酸	pK	環 境*
リゾチーム	Asp 52	3.5	HP
	Glu 35	6.3	Hφ
キモトリプシン	His 57	6.7	Asp 102, Ser 195 と HB
	(Ile 16)	8.5	Hφ, Asp 194 とイオン対
スブチリシン	His 64	7.2	Asp 32, Ser 221 と HB
パペイン	Cys 25	8.4	(His 159 と HB)
	His 159	4.2	Asn 175 (Cys 25) と HB
	(or Asp 158) or	9.5	Hφ
カルボキシペプチダーゼ A	His 196	7.7	Zn ⁺⁺ に配位
	His 69	9.1	
	Glu 270	7.2	Hφ
	Tyr 248	7.9	HP 固定水と HB
RNase	His 12	6.2	
	His 119	5.8	

* HP: 親水性, Hφ: 疎水性, HB: 水素結合

置であり、プロトン移動によりその位置のエネルギーが解放されて回転が生じる、という機構が考えられる。こうした触媒基あるいはその周辺における機械的ひずみの問題は今後検討する必要がある。

ii) **Michaelis 複合体の活性化** 前節に述べたのは基質と相互作用していない酵素の触媒部位の賦活化であったが、基質と結合した段階においても触媒部位のエネルギーを高める機構が存在する。

a) 酵素の触媒基と基質の水素結合あるいは荷電触媒基のクーロン場による基質の分極。

これは酵素—基質の水素結合あるいはクーロン相互作用による基質の分極で、基質を電子的に高いエネルギー状態にする機構であり、リゾチーム、カルボキシペプチダーゼAにその例が見られる。またキモトリプシンにおいても図2bの段階においてセリン195の荷電によりこの機構も働かき出すと考えられる。

b) 基質の機械的ひずみ

リゾチームにその典型が見られる。酵素との結合により基質が機械的なひずみを受け活性化される。

c) Induced fit による酵素の機械的ひずみ

カルボキシペプチダーゼAのように基質結合により酵素が変形する場合、酵素に機械的なひずみがかかり、そのエネルギーが反応の加速に使われる可能性がある。しかしその具体的な機構の例はまだ知られていない。カルボキシペプチダーゼAのチロシン248の場合 induced fit 機構は触媒基の協奏的空間配置の形成に本質的であるが、ひずみのエネルギーの利用があるかどうかはまだ良くわからない。

iii) **遷移状態の安定化** 遷移エネルギー低下のもう1つの機構として、遷移状態のエネルギー低下による安定化がある。表11においてキモトリプシンの反応の各段階におけるエントロピーの減少を見てみると、Michaelis 複合体やアシル化酵素よりも遷移状態における減少の方が大きい。これは遷移状態において基質あるいは酵素の運動の自由度が最も多く凍結されていること、すなわち基質—酵素間に他の状態よりも多くの相互作用が働いていることを意味する。この相互作用により活性化自由エネルギーのエントロピー項は増大するが、エンタルピー項は減少し、全体としては活性化自由エネルギーを減少させているものと推測される。このような遷移状態エネルギーを低下させる機構として、キモトリプシンの反応モデルで想定されたような、a) 遷移状態のみに可能な水素結合、やリゾチームの場合に考えられる。b) 近傍の荷電基と強く

分極した遷移状態とのクーロン相互作用、などが挙げられる。

キモトリプシンの場合、図2cに示したような遷移状態におけるカルボニウムOのペプチドNH基との水素結合の可能性を示唆するデータが置換置換効果の実験から得られている。⁴³⁾

iv) **協奏効果** 各酵素においては上記の各機構が個々ばらばらにあるのではなく、それらが連合して働く協奏的 (concerted) な機構になっている。たとえば α -キモトリプシンにおけるアスパラギン酸 102—ヒスチジン57—セリン 195 の水素結合系において、アスパラギン酸の水素結合と負荷電はその分極効果によりヒスチジン57の $N^{\delta 2}$ の塩基触媒能を高め、またヒスチジン57の水素結合はセリン195の $O^{\delta -}$ の求核性を高めている。さらにこの系でのプロトン移動は2つの水素結合のプロトンの連動であるが、ヒスチジンへのプロトン移動は単独でおこるよりも、共軛酸からの第2のプロトン移動と連動する方が早く起こることが知られている。⁴⁴⁾ このプロトン連動によりセリン $O^{\delta -}$ へ移動する負荷電はこの $O^{\delta -}$ の求核性をより高める。

良く似た水素結合系はパペインのアスパラギン175—ヒスチジン 159—半シスチン 25 においても見られる。

リゾチームについては、D部位での基質の機械的ひずみ、アスパラギン酸52のイオン場効果、疎水環境にあるグルタミン酸35の酸触媒が協奏している。

カルボキシペプチダーゼAについては、亜鉛錯体によるイオン場および電子の共軛による分極、グルタミン酸 270 のイオン場による分極、および induced fit により接近したチロシン 248 による酸触媒が協奏している。

さらに α -キモトリプシン、リゾチームに見られるように、遷移状態安定化の機構も協奏しており、酵素は極めて見事に構成された協奏的触媒と云える。

§6. 結 論

以上、酵素反応機構についての知見の現状と問題点についてざっと展望してきたが、X線回折による反応機構の立体化学的モデルが提出される段階に至り、酵素反応の酵素構造との関係が具体的に解析可能になってきたといえる。このような段階に至って、X線による反応の立体モデルも含め、反応機構に関する定量的な解析がより深く進められることが必要であると考えられる。特に現在、触媒部位自体に備わった機構による加速がどの程度なのか、という最も中心的な問題

点についての信頼できる定量的データがほとんどない状態である。今後この方向の研究が強力に進められることが必要であろう。

文 献

- 1) M. E. Perutz: *Europ. J. Biochem.*, 8, 455 (1969); 「蛋白質, 核酸, 酵素」15, No. 2, 149 (1970)
- 2) D. M. Blow, T. A. Steitz: *Ann. Rev. Biochem.*, 716 (1970)
- 3) W. P. Jencks: "Catalysis in Chemistry and Enzymology" McGraw-Hill, New York (1969)
- 4) T. C. Bruice, S. J. Benkovic: "Bioorganic Mechanism" Benjamin, Inc., New York (1966)
- 5) D. E. Koshland, K. E. Neet: *Ann. Rev. Biochem.*, 37, 359 (1968)
- 6) W. J. Dreyer, H. Neurath: *J. Biol. Chem.*, 217, 527 (1955)
- 7) M. L. Bender, F. J. Ketzdy: *Ann. Rev. Biochem.*, 34, 49 (1964); *J. Amer. Chem. Soc.*, 86, 3704 (1964)
- 8) C. H. Johnson, J. R. Knowles: *Biochem. J.*, 101, 56 (1966); H. Kaplan, K. J. Laidler: *Can. J. Chem.*, 45, 547 (1967)
- 9) M. L. Bender, K. Nakamura, *J. Amer. Chem. Soc.*, 84, 2577 (1962); M. Caplow, W. P. Fencks: *Biochemistry*, 1, 883 (1962)
- 10) T. Inagami, A. Patchernik, S. S. York: *J. Biochem.*, 65, 809 (1969); M. Caplow: *J. Amer. Chem. Soc.*, 91, 3639 (1969)
- 11) D. M. Blow, J. J. Birkoft, B. S. Hartley: *Nature*, 221, 337 (1969); T. A. Steitz, R. Henderson, D. M. Blow: *J. Mol. Biol.*, 46, 337 (1969); R. Henderson, *J. Mol. Biol.*, 54, 341 (1970)
- 12) J. J. Birkoft, B. W. Matthews, D. M. Blow: *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 36, 131 (1969)
- 13) S. T. Freer, J. Kraut, J. D. Robertus, H. T. Wright, Ng. H. Xuong: *Biochemistry*, 9, 1997 (1970)
- 14) J. R. Garel, B. Labouesse: *J. Mol. Biol.*, 47, 41 (1970)
- 15) B. W. Matthews, G. H. Cohen, E. W. Siluerton, H. Braxton, D. R. Davies: *J. Mol. Biol.*, 36, 179 (1968) G. H. Cohen, E. W. Silverton, B. W. Matthews, H. Braxton, D. R. Davies: *J. Mol. Biol.*, 44, 129 (1969); D. R. Davies, G. H. Cohen, E. W. Silverton, H. Braxton, B. W. Matthews: *Acta Cryst.*, A25, S182. (1969)
- 16) B. S. Hartley: *Phil. Trans. Roy. Soc.*, (London), B257, 77 (1970)
- 17) D. M. Shotton, H. C. Watson: *Phil. Trans. Roy. Soc.*, (London), B257, 111 (1970)
- 18) C. S. Wright, R. A. Alden, J. A. Krant: *Nature*, 221, 235 (1969); R. A. Alden, C. S. Wright, J. Krant: *Phil. Trans. Roy. Soc.*, London, B257, 119 (1970)
- 19) J. Drenth, J. N. Jansonius, R. Koekoek, H. M. Swen, B. G. Wolthers: *Nature*, 218, 929 (1968); J. Drenth, J. N. Jansonius, R. Koekoek, L. A. AE. Sluyterman, B. G. Wolthers: *Phil. Trans. Roy. Soc.*, London B257, 231 (1970)
- 20) G. Lowe: *Phil. Trans. Roy. Soc.*, (London) B257, 237 (1970)
- 21) B. L. Vallee, J. E. Coleman, in "Comprehensive Biochemistry" Vol. 12 Chap. VI, 165 (1965)
- 22) W. N. Lipscomb, J. Hartsuck, F. A. Quiocho, G. Reeke Jr.: *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 64, 28 (1969)
- 23) W. N. Lipscomb, G. N. Reeke Jr., J. A. Hartsuck, F. A. Quiocho, P. H. Bethge: *Phil. Trans. Roy. Soc.*, (London) B257, 177 (1970)
- 24) C. C. F. Blake, G. A. Mair, A. C. T. North, D. C. Phillips, V. R. Sarma: *Proc. Roy. Soc. (London)* B167, 365 (1967); C. C. F. Blake, L. N. Johnson, G. A. Mair, A. C. T. North, D. C. Phillips, V. R. Sarma: *Proc. Roy. Soc.*, (London) B167, 378 (1967)
- 25) D. M. Chipman, N. Sharon: *Science*, 165, 454 (1969); 「蛋白質, 核酸, 酵素」Vol. 13, No. 2, リゾチーム特集 (1968)
- 26) D. Piszkiwicz, T. C. Brulce: *J. Amer. Chem. Soc.*, 89, 6237 (1967)
- 27) F. W. Dahlquist, T. Rand-Meir, M. A. Raftery: *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 61, 1194 (1968)
- 28) D. M. Chipman, P. R. Schimmel: *J. Biol. Chem.*, 243, 3771 (1968); B. D. Sykes: *Biochemistry*, 8, 1110 (1969)
- 29) B. H. Havsteen: *J. Biol. Chem.*, 242, 769 (1967); G. P. Hess, J. McConn, E. Ku, G. McConkey: *Phil. Trans. Roy. Soc.*, B256, 27 (1969); B. D. Sykes: *J. Amer. Chem. Soc.*, 91, 949 (1969)
- 30) G. G. Hammes, P. R. Schimmel: in "The Enzyme" Vol. 2 Chap. 2, 67 (1970)
- 31) D. F. Shiao: *Biochemistry*, 9, 1083 (1970)
- 32) J. Leffler E. Grunwald: "Rates and Equilibria of Organic Reactions", Reactions Wiley (1963)
- 33) R. Lumry, S. Rajender: *Biopolymers*, 9, 1125 (1970)
- 34) G. Kartha, J. Bello, D. Harker: *Nature*, 213, 862 (1967); H. W. Wyckoff, K. D. Hardman, N. M. Allewell, T. Inagami, L. N. Johnson, F. M. Richards, *J. Biol. Chem.*, 242, 3984 (1967); H. P. Avey, M. O. Boles, G. H. Carlisle, S. A. Evans, S. J. Morris, R. A. Palmer, B. A. Woolhous, S. Shall: *Nature*, 213, 557 (1967)
- 35) L. N. Johnson, D. C. Phillips, J. A. Rupley: *Brookhaven Symp. Biol.*, 21, 120 (1968)
- 36) F. M. Richards, H. W. Wyckoff, N. M. Allewell: in "The Neurosciences" Schmitt. (1969)
- 37) H. Tada, T. Kakitani: 私信
- 38) M. L. Bender: *Chem. Rev.*, 60, 53 (1960); D. E. Koshland Jr.: *J. Theoret. Biol.*, 2, 75 (1962)
- 39) T. C. Bruice: in "The Enzyme" Vol. 2 Chap. 4, 217 (1970)
- 40) M. L. Bender, F. J. Ketzdy, C. R. Gunter: *J. Amer. Chem. Soc.*, 86, 3714 (1964)
- 41) H. A. Scheraga: "Protein Structure" Acad. Press (1961) p. 40; P. D. Bartlett, R. R. Hiatt: *J. Amer. Chem. Soc.*, 80, 1402 (1958)
- 42) J. A. Rupley: *Proc. Roy. Soc.*, B167, 416 (1967)
- 43) A. Williams: *Biochemistry*, 9, 3383 (1970)
- 44) M. Eigen: *Pure Appl. Chem.*, 6, 97 (1963)