安定な酵素中間体を含むアロステリック酵素の協同性

岡山大学歯学部口腔生化学教室 高橋 浩二郎
谷口 茂彦

negative cooperativity / half-of-the-sites reactivity / all-of-the-sites reactivity / dissociation and association of oligomer enzyme / alkaline phosphatase / aldehyde dehydrogenase

酵素反応の進行中に、酵素自体の触媒部位が共有結合性のリン酸化とかアシル化といった修飾を受ける場合にも酵素活性は調節される。その際、この安定な酵素中間体の分解速度が律速段階となるためアロステリックな現象は非常に複雑となり、その調節機構は“アロステリック酵素に対するリガンドの結合速度及びその酵素のアロステリックな構造変化の転移速度の両方が非常に速い”と仮定している従来のアロステリック・モデル^{*)}の単純な適用では解釈できそうもない。この解説では、二量体酵素のアルカリホスファターゼ (ALP) 及び四量体酵素のアルデヒド脱水素酵素 (ALDH) で観測される協同性とこれらの酵素の反応性^{**)}との関連及び協同性の出現における安定な酵素中間体の役割について考察する。

1. 調節酵素の協同性と反応性

まず、アロステリックな調節酵素の協同性の基本的な考え方と協同性に関連する反応性について説明する。

アロステリックな二量体酵素のリガンドとの相互作用 (下記のスキームの結合定数: K_1 と K_2) の変化は、

その酵素のサブユニット間相互作用の強弱と表裏一体の関係にある。一般的には、最初のリガンドの結合 (K_1) によって変化するサブユニット間相互作用を反映して二番目のリガンドの結合性 (K_2) が変化する。この協同性の定量的な表現は、Hill 係数 (n_H) を指標として(1)式を用いてなされる。

$$n_H = 2 / [1 + (K_1/K_2)^{1/2}] \quad (1)$$

$$K_1 = K_2 : n_H = 1 \text{ (協同性なし: M-M型)} \quad (1-1)$$

Cooperativity of Allosteric Enzymes Involving the Stable Enzyme-Intermediate

Kojiro TAKAHASHI, & Shigehiko TANIGUCHI
Department of Biochemistry, Okayama University Dental School

$$K_1 < K_2 : 2 > n_H > 1 \text{ (正型の協同性)} \quad (1-2)$$

$$K_1 > K_2 : 1 > n_H > 0 \text{ (負型の協同性)} \quad (1-3)$$

二つの結合定数の間の大小関係によって出現する協同性には次の三通りがあり、それぞれの理論曲線が[S]-Y プロット, Scatchard プロット, Hill プロットの形で図1に示してある¹⁾。今までのところ、これらの協同性の現われ方のうち、協同性のない Michaelis-Menten (M-M) 型の実験的な報告はなく、一方正型は実験的及び理論的な報告がよくなされている。また、負型は、理論的な予想以外に複雑な要素が加わる場合が多く、定性的な説明さえも満足なものがない現状である。

アロステリックな調節酵素の反応性には、序文の脚注で述べたように H-S 反応性と A-S 反応性がある。これらの反応性の現れ方も、協同性と同様にサブユニット間相互作用の変化に起因している。二量体酵素を例にすると、何等かの作用に基づいて強いサブユニット間相互作用が生じた結果として一つの活性部位が機能できなくなった時は H-S 反応性を、その束縛が除かれた時には A-S 反応性を示す。実際には、H-S 反応性に対応して観測される協同性のほとんどが負型であることから、“H-S 反応性とは、負型の協同性の非常に強い極限的な状態である”という定義もなされてきている²⁾。しかし、この定義はある矛盾を含んでいるので、次章でその詳細を議論する。

^{*)} Monod, Wyman, Changeux による正型の協同性だけが説明可能な一斉対称 (Concerted Symmetry) モデルと、Koshland, Nemethy, Filmer による正型及び負型の協同性の両方とも説明可能な逐次作用 (Sequential Interaction) モデル。これらのモデルについては通常の生化学の教科書等の代謝調節等の項を参照。

^{**)} 調節酵素系での反応性と言う語句は、オリゴメリック酵素の各サブユニットに存在する触媒部位のうち実際に機能している部位の数を表現するために用いられており、全触媒部位のちょうど半分だけが機能している半減的反応性 (Half-of-the-Sites Reactivity: H-S 反応性) と全触媒部位のすべてが機能している全部位反応性 (All-of-the-Sites Reactivity: A-S 反応性) の二通りがある。

図1. 単純な二量体酵素での協同性の理論的な様相 (a): $[S]$ - V プロット, (b): Scatchard プロット, (c): Hill プロット. 用いた式: $\bar{Y} = [S]^n / (1 + [S]^n)$.

2. 二量体酵素の協同性

最も簡単なサブユニット間相互作用を持つ二量体酵素である AIP の協同性の実例³⁾を図2に示す。これらの現象のうち、従来のアロステリック・モデルで解釈できるのはアルカリ pH の高温での正型の協同性だけであり、アルカリ pH の低温での M-M 型及び酸性 pH での負型を帯びた複雑な現象の解釈は従来のモデルだけでは不可能である。

図1の統一的な解釈のために、まず、アルカリ pH の低温側での M-M 型の問題を取り上げる。二量体酵素で M-M 型になる状況として、(a): 前章で述べた (1-1) の状態、(b): 単量体への解離で二つの同等な活性部位の生じる状態、(c): どちらかの部位の基質結合によってサブユニット間に強い相互作用が働き、残りの部位が完全に機能できなくなる状態、の三つが考えられる。このうち、(a)は上述したように実例がないばかりか高温では正型の協同性(図2の(b))が観測されること、(b)は $pK_a < 5$ の不活性型単量体への解離しか観測されないこと⁵⁾から、これらの可能性は除外される。従って、(c)の H-S 反応性の状態が現状では最も妥当である。

もし、アルカリ pH での M-M 型が実際に H-S 反応性に起因するならば、従来の負型の協同性に限定された H-S 反応性の定義(1章最後)との矛盾を解決する必要があるが、そもそもその定義そのものに重大な欠陥がある。まず、言葉の使い方として、協同性に対しては“強い”よりも“効果が大きい”の表現が妥当

であり、“強い”の表現はサブユニット間相互作用に当てはまる。次に、本来の H-S 反応性とは、二量体では、一つの活性部位しか機能しない状態であるから、平衡定数は基本的に一個だけである。逆説的に言えば、どんなに協同性の効果が大きかろうとも協同性を考慮する限りでは、二個の平衡定数が関与している A-S 反応性であるべきである。

以上の M-M 型と H-S 反応性の考察から、我々は新しく“AIP の反応は、低温では強いサブユニット間相互作用によって H-S 反応性で、高温ではその相互作用の弱まった A-S 反応性で進行する”と言う仮説を導入した。この仮説によれば、図2のすべての現象が解釈できる。中性 pH の低温で機能する AIP の唯一の触媒部位は、基質濃度の上昇で増加する P_i によってブロックされ易くなる。この P_i 阻害は、中性から酸性 pH の低温で触媒基のセリン残基が過剰な P_i で共有結合性のリン酸化を受けること⁶⁾に起因する。一方、中性とアルカリ pH の高温での A-S 反応性の状態では、高い基質濃度になると一つの部位でのリン酸エステルの加水分解が他方の部位の基質結合に伴うサブユニット間相互作用の変化によって促進される。

最後は、pH 変化と協同性の転移^{***)}の問題であるが、これも AIP の触媒基のリン酸化状態の安定性を考慮すれば解決できる。アルカリ pH では非共有結合性のリン酸化状態(2式)が、酸性から中性 pH では共有結合性のリン酸化状態(3式)が安定である^{7,8)}。

($E \cdot P$ と $E-P$ は安定性を、 $\Rightarrow$ は律速段階を示す)

従って、アルカリ pH では、 P_i の解離と基質の結合が競争的であり、結果として正型の協同性が現れる。この協同性を結合型協同性 (Binding Cooperativity) と

***) 協同性の転移とは、図2や3に示される様な、温度、pH 或は何等かのエフェクター等の作用によって協同性のパターンが変化すること。今までのところ、結果として現れた協同性の個々の解釈は成されてきているけれども、転移の様相とかその理論的な解釈という問題は全く研究されていない様である。

図2. コウシ骨 AIP による p-Nitrophenyl Phosphate の脱リン酸化反応の温度依存性 [(a): pH7.5での基質飽和曲線. (b): pH10.2での Eadie-Scatchard プロット⁴⁾ (横軸: $v' = v_0/V_m$, 縦軸: $v'/[S]^*$)]

言う。一方、酸性から中性 pH では、 P_i の解離や基質の結合の効果以上にその酵素中間体の存在そのものがサブユニット間相互作用に何等かの影響を与え、負型の協同性が現れる。この協同性を速度論型協同性 (Kinetic Cooperativity) と言う。

3. 解離会合系を含む四量体酵素の協同性

ウマ肝ミトコンドリアの ALDH (sub μ M 以上の濃度) は、 Mg^{2+} 存在下の酸性から中性 pH で、或は Mg^{2+} 非存在下のアルカリ pH で、四量体から二量体への解離と共に H-S 反応性から A-S 反応性へと変化する^{9,10)}。ALDH によるプロピオンアルデヒドの脱水素反応の基質飽和曲線は、 Mg^{2+} 非存在下で負型を帯びた協同性を、 Mg^{2+} 存在下で正型の協同性を示している (図3)¹¹⁾。前者の協同性では、酵素濃度の減少に伴って n_H は増加し、測定された最小濃度では $n_H = 1$

図3. ALDH の協同性の酵素濃度依存性 [最初の数値: 酵素濃度. () の数値: Hill 係数. 反応条件: 25°C, pH7.5. (a): Mg^{2+} 非存在下. (b): 0.7mM の Mg^{2+} 存在下]

で協同性はなくなっている。この協同性の消失は、ALDH が二量体から更に単量体へと解離しているためであろう。後者の協同性では、酵素濃度の減少と共に n_H も減少するが、その最小濃度でもまだ $n_H > 1$ である。このわずかに残る正型の協同性は、ALDH の単量体の Mg^{2+} による二量体への会合と関係しているだろう。

図3の最も高い酵素濃度でのデータの Hill プロットを図4に示す。正型の協同性の場合 ($n_H=1.7$)、二番目の部位の親和性は一番目より約30倍である。一方、負型を帯びた協同性の場合 ($n_H=0.5$)、H-S 反応性で二つの部位しか機能してないと仮定すれば、一番目の部位の親和性は二番目より約9倍である。しかし、後者のプロットでは、50%飽和以上の高い基質濃度で見かけ上“正型の協同性”を帯びた変化も現れている。この型を以前から“正負混合型の協同性”と呼んでい

図4. ALDHの脱水素反応のHillプロット | 図3の500nMの酵素濃度のデータ |

て、実際に機能する活性部位の増加と結び付けた解釈¹²⁾等が行われてきているが、未だ完全なモデルは出されていない。

4. 安定な酵素中間体の役割

今までの協同性の研究では、正型の協同性で理論と実験がよく一致しているようである。その理由は、結合型協同性に関連したデータが、リガンドの結合やアロステリックな構造変化が非常に速い平衡系を仮定した従来のモデルとよく対応しているからである。一方、速度論型協同性に関連したデータと理論との不一致の理由として、オーバーオールな反応中に(3)式のように実質的な不可逆過程 (msec から sec で分解する安定な酵素中間体の存在) が含まれる場合が多く、平衡系を対象とした従来のモデルの単純な適用の非妥当性も指摘されている。

AIP と ALDH では、共に、測定条件の変化により結合型と速度論型に対応する協同性が観測される。このような協同性の転移を解釈するためには、基本的には反応機構の解析からスタートすべきである。中性 pH では、AIP と ALDH の両方とも反応のタイムコースにバースト相 (Burst Phase) を含む。(但し、約 20nM 濃度以下の ALDH では単量体の関与するラグ相 (Lag Phase) が現れる¹¹⁾。そのバースト相の出現は、反応が(3)式のような三段階機構に従い、共有結合性の酵素中間体 (E-P) の分解が律速段階になることを意味している¹³⁾。この中間体の安定な存在そのものが、サブユニット間相互作用に何等かの影響を与える構造変化を誘導し、負型の協同性を引き起こしている。更

に、AIP の中性 pH の高温での現象と同様に Mg^{2+} 非存在下の ALDH でも、基質濃度が高くなると一つの活性部位でのエステルの加水分解が他方の部位の基質結合に伴うもう一つの構造変化によって促進される結果として活性化現象が誘導される。一方、アルカリ pH の高温での AIP 反応の脱リン酸化過程の促進と同様に、ALDH でも Mg^{2+} によって脱アシル化過程が促進されるとすれば、ALDH の Mg^{2+} 存在下には生成物 (カルボン酸) の解離と基質の結合とが競争的な結合型 (正型) の協同性になる。以上のことから、協同性の転移は反応条件による酵素中間体の安定性の変化に起因していると結論できる。

おわりに

負型の複雑な協同性も、AIP や ALDH では安定な酵素中間体の考慮によって解釈できる。しかし、協同性の pH や温度による転移までもを含めた理論的な究明となるとまだまだ複雑な要因が多くある。現在、我々はそれらの実験的及び理論的な両面をなお追求中である。ここで示された ALDH の研究は、著者の一人 (K. T.) が米国 Indiana 州の Purdue 大学の Henry Weiner 教授のもとで行った。

文 献

- 1) Levitzki, A. (1975) *Subunit Enzymes: Biochemistry and Functions* (Ebner, K. E. ed.) pp. 1-41, Marcel Dekker, Inc., New York.
- 2) Seydoux, F., Malhotra, O. P., Bernhard, S. A. (1974) *CRC Crit. Rev. Biochem.* 2, 227-257.
- 3) Takahashi, K., Taniguchi, S.: in submitting.
- 4) Segel, I. H. (1975) *Enzyme Kinetics: Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady-State Enzyme Systems*, A Wiley-Interscience Publication, New York.
- 5) McComb, R. B., Bowers, Jr. G. N., Posen, S. (1979) *Alkaline Phosphatase*, Plenum Press, New York.
- 6) Lazdunski, M. (1972) *Current Topics in Cellular Regulation* (Horecker, B. L. & Stadtman, E. R. eds.) Vol. 6, pp. 267-310, Academic Press, New York.
- 7) Hull, W. E., Halford, S. E., Gutfreund, H., Sykes, B. D. (1976) *Biochemistry* 15, 1547-1561.
- 8) Chlebowski, J. F., Armitage, I. M., Coleman, J. E. (1977) *J. Biol. Chem.* 252, 7053-7061.
- 9) Takahashi, K., Weiner, H. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 8206-8209.
- 10) Takahashi, K., Weiner, H., Filmer, D. L. (1981) *Biochemistry* 21, 6225-6230.
- 11) Takahashi, K., Weiner, H. in submitting.

- 12) Teipel, J., Koshland, Jr., D. E. (1969) *Biochemistry* 8, 4656-4663.

- 13) Bender, M. L., Kezdy, F. J., Wedler, F. C. (1967) *J. Chem. Educ.* 44, 84-88.

たかはし こうじろう

1946年広島県生。1974年広島大学理学研究科博士過程修了（理学博士）後、三菱化成生命科学研究所、米国 Indiana 州 Purdue 大学を経て1981年岡山大学歯学部口腔生化学教室助手、現在に至る。教養時代に酵素の触媒作用に魅入られて20年余り、未だ“酵素って不思議ですね”が実感。現在は癌細胞の蛋白質のチロシン残基のリン酸化・脱リン酸化にも興味を持っています。趣味：広島カープ。

☎0862-23-7151 内線5231

たにぐち しげひこ

1951年 名古屋大学理学部化学科卒、1955年 同生化学助手、ブランドイス大学、カルフォルニア大学（サンディエゴ）、ノーベル医学研究所（ストックホルム）を経て、1966年 広島大学歯学部口腔生化学助教授、1981年から岡山大学歯学部口腔生化学教授、現在に至る。

☎0862-23-7151 内線5230

◀ 寄 贈 図 書 ▶

英語で科学を語る

—国際会議における口頭発表—

井口道生 著

B 6 判 1,200円

丸善株式会社

Introduction to Protein

and protein Engineering

B. Robson and J. Garnier

Dfl. 475

Elsevier Science Publishers (Bionedical Division), Amsterdam

17×24.5cm

膜物理化学

中垣正幸 著

A 5 判 2800円

喜多見書房

Bioscience Series

生命現象への化学的アプローチ

視 覚

前田章夫 著

A 5 判 2,000円

化学同人

植物栄養特性の遺伝的側面

日本土壤肥料学会編

B 6 判 2,000円

博友社

生物化学実験のてびき

③核酸の分離・分析法

⑤バイオバザード防止法

泉 美治・中川八郎

三輪谷俊夫 共編

A 5 判 各2,000円

化学同人

ライフサイエンス

基礎生化学

Larry G. Scheve 著

駒野 徹・中澤 淳/晶子

酒井 裕・森田潤司 訳

B 5 判 4,300円

化学同人