高圧力による酵素反応生成物の制御

Control of Products for the Enzyme Reaction by High Hydrostatic Pressure

松本 正

巻本 彰一*

谷口 吉弘**

Tadashi MATSUMOTO

Shoichi MAKIMOTO

Yoshihiro TANIGUCHI

To investigate the possibility that pressure can control the products for the enzyme reactions, pressure effects on the time course of the products' composition accompanying the hydrolysis of maltooligosaccharides [maltotetraose (G4), maltopentaose (G5), and maltohexaose (G6)] and amylose catalyzed by porcine pancreatic α -amylase (PPA) were measured up to 300 MPa at 30 °C. The composition of products for the hydrolysis of G5 substrates changed slightly by compression. But for G4, G6 and amylose substrate, pressure induced some changes in the composition of the products. These results tell us that pressure is one of the efficacious tools to control the products of enzyme reaction of α -amylase. The mechanism of an interesting pressure-induced reaction catalyzed by PPA is discussed in terms of the volume differences among enzyme-substrate (ES) complexes.

[pressure, control of enzyme reaction, porcine pancreatic α -amylase, maltooligosaccharides, amylose, volume difference]

1. はじめに

近年、遺伝子組み換え等バイオテクノロジーの発展により酵素が安価に生産できるようになり、醸造、食品加工、洗剤、繊維加工等種々の分野で各種の酵素が使用されるようになった[1,2]。しかし、酵素反応は一般に特異性が高く、基質や生成物が限定される場合が多いため、工業的に有用な物質を採算の取れる有利な方法で生産できる酵素を見つけ出すのは容易ではない。もし、酵素の特性を変えることにより反応生成物を変更することが容易にできれば、工業的に有用な物質を優先的に生産することができる。このようなことを実現するため、従来は酵素分子を種々の有機官能基で修飾し、酵素機能の変換を行う試みが研究されてきた[3]。しかし、酵素分子を有機官能基で修飾するには複雑な有機合成反応が必要であり、手間がかかるうえに修飾反応途中で酵素が失活するという問題[3]もあり、もっ

と簡便に酵素の機能特性を変換する技術が求められている。筆者らは、高圧下で酵素反応を行えば酵素分子や酵素基質(ES)複合体が高圧力により何らかの影響を受ける結果、常圧下の反応とは異なった生成物や生成物組成になるのではないかと予想した。ここで、圧力により生成物が変化するのであれば、常圧下で得られないような機能性を持った新規物質の開発が期待でき、生成物の組成が変化するのであれば圧力により有用な物質の方を優先的に製造する技術の開発が可能になる。本稿では、ブタ膵臓 α -アミラーゼ(PPA)をモデル的な酵素として、マルトテトラオース(G4)、マルトペンタオース(G5)、マルトヘキサオース(G6)の3種のマルトオリゴ糖とアミロースの加水分解生成物に及ぼす圧力の影響から、これら4種の基質の加水分解機構に及ぼす圧力の効果を酵素-基質(ES)複合体の体積的な観点から考察を行った結果[4,5]をまとめ、高圧力による酵素反応制御の可能性を検討した。

〒520-3004 栗太郡栗東町上砥山 232 滋賀県工業技術総合センター技術第2科
Industrial Research Center of Shiga Prefecture, 232 Kamitoyama, Ritto, Shiga 520-3004

* 〒612-8522 京都市伏見区深草藤森町1 京都教育大学教育学部理学科

Department of Science, Faculty of Education, Kyoto University of Education, 1 Fukakusa-fujinomori-cho, Fushimi-ku, Kyoto 612-8522

** 〒525-8577 草津市野路東 1-1-1 立命館大学理工学部応用化学科

Department of Chemistry, College of Science and Engineering, Ritsumeikan University, 1-1-1 Nojihigashi, Kusatsu-city, Shiga 525-8577

2. ブタ膵臓 α -アミラーゼ (PPA) の性質

PPA は澱粉、グリコーゲンや各種のオリゴ糖の α -D-(1,4)-グルコシド結合の加水分解を触媒する典型的なエンド型アミラーゼで、496 個のアミノ酸残基より構成され、分子量は約 55,000、最適 pH は 6.9 であることが知られている[6,7]。また、反応パターンの動力的研究により、Fig. 1 に示すように PPA の活性部位はそれぞれグルコース残基を 1 つずつ結合する 5 つのサブサイトより構成され、基質のグルコシド結合を加水分解する触媒部位は、基質の還元末端側から数えてサブサイト 2 と 3 の間に存在することが知られている[8,9,10]。したがって、加水分解生成物の種類 (重合度) はサブサイトと基質の結合様式に依存すると考えられる。PPA に関しては、酵素分子の化学修飾[11,12,13]、基質の化学修飾[14,15,16,17]、基質アナログ[18]、反応 pH[19,20] 等が反応パターンあるいは基質との結合様式に及ぼす影響について既に多数報告されている。しかし、PPA の反応パターンに及ぼす圧力の影響については全く報告されておらず、PPA の反応パターンに及ぼす圧力の影響は興味があるところである。

Fig. 1. Schematic drawing of subsite structure of PPA-substrate (G5) complex. The active site of PPA consists of five subsites that can bind consecutive glucose residues, with cleavage occurring between subsites 2 and 3 [8,9,10]. The numbers 1-5 refer to individual subsites. The hydrolysis point in substrate is indicated by an arrow. Symbols: $\bigcirc$, glucose residue; $\diagup$, reducing end glucose residue; —, α -1,4- glucoside bond; $\triangle$, catalytic site of PPA. Reprinted with permission from [4,5]. Copyright 1997, Elsevier Science and American Chemical Society.

3. 実験方法の概要

酵素溶液 1 ml と基質溶液 3 ml をすばやく混合して、ポリエチレン製の容器に封入し、すばやく高圧試験装置 (三菱重工業 (株) 製 MFP-7000 型) に入れ、所定の圧力を加えた。所定の圧力において所定の時間反応させた後、すばやく容器を取り出し、20% -スルフォサリチル酸 0.1 ml を添加することによ

り酵素反応を停止した。

次に、反応生成物の分析を行うため、反応溶液の一部を分画分子量 10,000 の遠心式カットフィルターで濾過し、この濾液を高速液体クロマトグラフを用いて分析を行い、加水分解反応物中に含まれるマルトオリゴ糖の濃度を定量した。

4. 加水分解反応に及ぼす圧力の影響

4.1 G4の加水分解反応に及ぼす圧力の影響

4.1.1 反応圧力による生成物の変化

0.1、100、200 および 300 MPa において G4 を基質とした場合の PPA による加水分解生成物および基質のタイムコースを Fig. 2 に、初期反応の生成物濃度から最小二乗法により求めた各生成物の反応初速度を Table 1 に示す。 v_{G1} 、 v_{G2} および v_{G3} はそれぞれグルコース (G1)、マルトース (G2) およびマルトリオース (G3) が生成する際の反応初速度である。Fig. 2 および Table 1 から、圧力の増加に伴いわずかではあるが G2 の生成比率が増加し、G1 と G3 の比率が減少していくことがわかる。これは、本酵素反応では圧力により生成物の組成が変化すること、すなわち圧力により反応生成物の比率を制御できる可能性を示す。

4.1.2 加水分解反応機構の推察と熱力学的解析

基質と生成物の構造および G1 と G3 が同じ速度で生成することから、G4 を PPA により加水分解し

Fig. 2. The time course of the maltooligosaccharides from hydrolysis of maltotetraose catalyzed by PPA at 0.1, 100, 200, 300 MPa and 30 °C. The initial substrate and enzyme concentrations were 5.6 mM and 4.6 nM in 50 mM TES buffer, pH 6.9 containing 25 mM sodium chloride. Reprinted with permission from [4]. Copyright 1997, Elsevier Science.

サブサイト 2～4 は ES₁ と ES₂ で同じ構造であるので、この間の両者の水素結合には違いがない。したがって、ES₁ から ES₂ へ結合様式が変化する際の PPA のサブサイトと G4 の間の分子間相互作用の変化は、次に示す 5 つの水素結合の変化から計算できる (Fig. 4 参照)。すなわち、ES₁ から ES₂ へ結合様式が変化する際には ① G4 の還元末端から数えて 4 番目のグルコース残基の OH-4 と Val-163 のペプチド鎖カルボニルとの間で水素結合が生成し、② G4 の 1 番目のグルコース残基の OH-2 と PPA の Glu-240 の OE1 との間、③ PPA の Lys-200 の NZH と G4 の 1 番目のグルコース残基の O-2 との間、④ Lys-200 の NZH と 1 番目のグルコース残基の O-3 との間に生成していた 3 つの水素結合が切断することが予想できる。また、これらの切断に伴って⑤ Lys-200 の NZH と Glu-240 の OE1 との間に新たに水素結合の生成が起こることが予想できる[4]。

水素結合の生成に伴う体積変化は、生成前後の A donor と B acceptor との距離の変化から Hamann の方法[26]により見積もることができる。水素結合に関与する原子の X 線データおよびファンデルワールス半径をもとに、Hamann の方法による計算式 (8) および (9) 式により計算した A-H...B 生成前後の体積変化を Table 2 に示す。

$$\Delta V = \pi (r_B)^2 N \Delta d \quad (8)$$

$$\Delta d = r(B...H) - r_H - r_B \quad (9)$$

ここで、 r_B , N , Δd はそれぞれプロトンアクセプター B の原子半径、アボガドロ数、 $r_0 = 152$ pm, $r_N = 155$ pm, $r_H = 120$ pm のファンデルワールス半径を使って求めた水素結合生成前後の原子間の距離の差を示す。これらの計算式を用いて求めた ES₁ から ES₂ への変化に伴う理論的な総体積変化は $2.6 \text{ cm}^3/\text{mol}$ [①

Fig. 4. Schematic drawing of the hydrogen-bonds around the subsite 1 (a) and 5 (b) in the active site of PPA-G5 complex [25].

(-2.2) + ⑤(-3.8) + ②(+3.8) + ③(+2.3) + ④(+2.5)] となった。理論的計算値である $2.6 \text{ cm}^3/\text{mol}$ は、実験から求めた値 $1.2 \pm 2 \text{ cm}^3/\text{mol}$ とよく一致し、2 種の ES 複合体間の体積差は水素結合の違いによることが推察された。

4.2 G5の加水分解反応に及ぼす圧力の影響

0.1、100、200 および 300 MPa において G5 を基質とした場合の PPA による加水分解生成物および基質のタイムコースを Fig. 5 に示す。G5 の PPA 触媒による加水分解反応においては、先ほどの G4 を基質とした場合とは違い、どの圧力においても G2 と G3 がほぼ等速度で生成し、反応圧力が変化しても生成物の比率は変化しなかった。この原因は、G5 分子の鎖長は PPA の活性部位のサブサイト構造にぴったりと一致することから、PPA による G5 の加水分解反応では Fig. 1 に示した結合様式が他の結合様式に比べて絶対的に安定であり、この結合様式が常に優先的にとられるためと考えられる。Robyt は PPA が 0.1 MPa、pH 4.0～9.3 において、G5 の 1 つの部位のみを加水分解すると報告[9]しているが、

Table 2. The distance between the hydrogen of donor (A) and acceptor (B), B...H, and volume changes (ΔV) for the formation of various hydrogen-bonding systems (A-H...B) in the site of PPA-G4 complex. Reprinted with permission from [4]. Copyright 1997, Elsevier Science.

Subsite	Donor	Acceptor	Distance (B...H) / pm	ΔV^a / $\text{cm}^3 \text{ mol}^{-1}$
5	G-4 OH-4	Val-163 O	223 ^b	-2.2
1	G-1 OH-2	Glu-240 OE1	185 ^b	-3.8
	Lys-200 NZH	G-1 O-2	220 ^b	-2.3
	Lys-200 NZH	G-1 O-3	215 ^b	-2.5
	Lys-200 NZH	Glu-240 OE1	186 ^c	-3.8

^a Calculated from [26] ^b From [25] ^c From [27]

Fig. 5. The time course of the maltooligosaccharides from hydrolysis of maltopentaose catalyzed by PPA at 0.1, 100, 200, 300 MPa and 30 °C. The initial substrate and enzyme concentrations were 4.5 mM and 4.6 nM. Reprinted with permission from [4]. Copyright 1997, Elsevier Science.

今回の結果は反応圧力が変化しても加水分解位置が変化しないことを示すものである。すなわち、G5を基質とした場合は、反応圧力により生成物の組成を制御し難いと言え、同じ酵素を用いた反応であっても基質によって圧力による反応制御の可能性が異なることがわかった。

4.3 G6の加水分解反応に及ぼす圧力の影響

4.3.1 反応圧力による生成物の変化

0.1、100、200 および 300 MPa において G6 を基質とした場合の PPA による加水分解生成物のタイムコースを Fig. 6 に、初期反応の生成物濃度から最小二乗法により求めた各生成物の反応初速度を Table 3 に示す。 v_{G1} 、 v_{G2} および v_{G3} はそれぞれマルトース (G2)、マルトトリオース (G3)、マルトテトラオース (G4) が生成する際の反応初速度である。Fig. 6 および Table 3 より、圧力の増加に伴い G2 および G4 の相対的な生成速度 (比率) が減少し、この代わり G3 の相対的な生成速度が増加していくことがわかる。すなわち、G6 を基質として PPA により加水分解反応を行うと、G4 を基質とした場合と同様に、圧力により反応生成物の生成比率が変化することが明らかになった。しかも、G4 の場合に比較して生成物の比率が変化する割合が 4 ~ 5 倍程度大きく、圧力により反応生成物の比率を制御できる可能性が大きくなった。この原因は、G4 を基質とした場合と同様に ES 複合体間の体積差に起因す

Fig. 6. The time course of the maltooligosaccharides from hydrolysis of maltohexaose catalyzed by PPA at 0.1, 100, 200, 300 MPa and 30 °C. The initial substrate and enzyme concentrations were 15 mM and 2.3 nM. Reprinted with permission from [4]. Copyright 1997, Elsevier Science.

Table 3. Initial rates of formation of G2, G3, and G4 from hydrolysis of G6 catalyzed by PPA.

Pressure / MPa	0.1	100	200	300
$v_{G2} / \mu\text{M min}^{-1}$	78	98	95	99
$v_{G3} / \mu\text{M min}^{-1}$	75	123	140	185
$v_{G4} / \mu\text{M min}^{-1}$	79	99	99	99
<hr/>				
$K^* = v_{G3} / (v_{G2} + v_{G4})$	0.48	0.62	0.72	0.93

Fig. 7. Schematic drawing of the two kinds of stable ES complexes between PPA and G6. Reprinted with permission from [4]. Copyright 1997, Elsevier Science.

ると考えられる。

4.3.2 加水分解機構の推察と熱力学的解析

本反応についても、G4 を基質とした反応の場合と同様に加水分解機構について推察を行い熱力学的に解析を行った。PPA と G6 との間で形成されるエネルギー的に安定な ES 複合体は、G6 の鎖長と PPA

のサブサイト構造から類推して2種類存在することが考えられ、それらの模式図を Fig. 7 に示す。また、加水分解反応は G4 を基質とした場合と同様、(1) 式に従い進行するものと考えられ、(2)～(7) 式はそのまま適用できる。Fig. 7 より PPA による G6 の加水分解反応において、反応初期の (G6 が1回だけ加水分解を受けたときの) 主生成物は、1 分子ずつの G2 と G4 あるいは2分子の G3 であり、1 分子ずつの G2 と G4 および2分子の G3 とはそれぞれ Fig. 7 に示す ES₁ および ES₂ から G6 のグルコシド結合の切断が起こり生成すると考えられる。また、圧力の増加による生成物の変化から、圧力の増加に伴い ES₁ と ES₂ の間の平衡が ES₂ が生成する方向に移動したことを示し、ES₂ の方が ES₁ よりも部分モル体積が小さいと考えられる。各圧力における ES 複合体間の平衡定数 K (Table 3 に示す) の圧力依存性から (7) 式より ES₁ と ES₂ の間の部分モル体積差 ΔV は熱力学的に $-5.4 \text{ cm}^3/\text{mol}$ と見積もられた。

4. 3. 3 ES複合体間の体積差の分子構造的考察

ES₁ はサブサイト 5 の外側に自由な (サブサイトに結合していない) 非還元末端グルコース残基を持ち、ES₂ はサブサイト 1 の外側に自由な還元末端グルコース残基を持つ以外は ES₁ と ES₂ のサブサイト 1～5 には構造上違いはなく、2 つの ES 複合体の違いはサブサイトの両側にはみ出した自由なグルコース残基に起因するものと考えられる。4.1.3 においても参考にした PPA [27,28] や PPA と pseudopentasaccharide との複合体の X 線解析結果 [24] より、ES₂ では還元末端の自由なグルコース残基が PPA の Glu-240 の OE2 近傍に存在することがわかっており、G6 の1番目のグルコース残基の OH 基と Glu-240 の OE2 との間で何個かの水素結合の生成が予測できる。通常、OH...O タイプの水素結合の生成に伴う体積変化は約 $-5 \text{ cm}^3/\text{mol}$ と測定されている [29] ので、実験値である $-5.4 \text{ cm}^3/\text{mol}$ は ES₁ から ES₂ への移行に伴い1つないしは2つの水素結合が生成していることを示す。すなわち、1つないしは2つの水素結合の生成が ES₁ と ES₂ の間の体積差ひいては反応圧力により生成物の比率が変化する原因であると考えられる。将来、PPA と G6 との複合体の構造が X 線回折や分子シミュレーション等によりより精密に解析され、完全な立体構造データが提供されれば、水素結合の数や位置が明らかになり ES 複合体間の体積差に対するより深い考察が可能になるものと期待される。

Fig. 8. The time course of maltooligosaccharides for the hydrolysis of amylose catalyzed by PPA at 0.1, 100, 150, 200, 300 MPa and 30 °C. The substrate and enzyme concentrations were 7.5 mM and 2.3 nM in 50mM TES buffer, pH 6.9 containing 25mM sodium chloride. 0.1 MPa* is the time course of products for the hydrolysis of amylose catalyzed by PPA, which was treated for 90 min at 300 MPa and 30 °C. Reprinted with permission from [5]. Copyright 1997, American Chemical Society.

Table 4. Initial rates of formation of G2,G3, and G4 from hydrolysis of amylose catalyzed by PPA. Reprinted with permission from [5]. Copyright 1997, American Chemical Society.

Pressure / MPa	0.1	100	150	200	300
$v_{G2} / \mu \text{ M min}^{-1}$	81	88	72	63	33
$v_{G3} / \mu \text{ M min}^{-1}$	14	20	19	19	12
$v_{G4} / \mu \text{ M min}^{-1}$	6.6	7.4	6.3	5.6	3.2
$K_{12}^* = v_{G3} / v_{G2}$	0.17	0.23	0.26	0.30	0.36
$K_{23}^* = v_{G4} / v_{G3}$	0.47	0.37	0.33	0.29	0.27
$K_{13}^* = v_{G4} / v_{G2}$	0.081	0.084	0.088	0.089	0.097

* K_{12} , K_{23} , and K_{13} values are the equilibrium constants between ES₁ and ES₂, ES₂ and ES₃, and ES₁ and ES₃ for amylose substrate, respectively.

4. 4 アミロースの加水分解反応に及ぼす圧力の影響
4. 4. 1 反応圧力による生成物の変化

0.1、100、150、200 および 300 MPa において酵素合成による完全直鎖アミロース (平均分子量 10^6) を基質とした場合の PPA による加水分解生成物のタイムコースを Fig. 8 に、各生成物の生成初速度を Table 4 に示す。生成物は各圧力とも G2、G3 および G4 であり、圧力の増加に伴い G2 の生成比率が減少し、これに対して G3 の生成比率が増加しているのがわかる。また、G2 に対して G4 の生成速

度がわずかに増加しているのもわかる。すなわち、アミロースを基質とした場合においても G4 や G6 を基質とした場合と同様に、圧力の増加に伴い生成物の比率（各生成物の生成速度比）が変化すること、すなわち圧力により生成物の比率を制御できる可能性があることが判明した。なお、300 MPa で 90 分間処理を施した PPA を 0.1 MPa でアミロースに反応させると、無処理の PPA を 0.1 MPa で反応させた場合とほとんど同じ生成物のタイムコースが得られることから、圧力の増加により生成物の比率が変化する現象は可逆的なものであり、圧力の作用しているときのみの効果であることがわかる。

4.4.2 加水分解機構の推察と熱力学的解析

次に G4 や G6 を基質とした場合と同様に、加水分解機構を推察し反応経路に及ぼす圧力の影響を検討した。PPA はマルチプルアタック頻度の最も高い α -アミラーゼとして知られており、1 回の酵素基質複合体形成により平均 7 回の切断が起こることが Robyt らにより明らかにされている [9,30,31]。つまり、PPA はマルチプルアタックの間はあたかもエキソ型アミラーゼのような振る舞いをし、生成物として G2、G3、G4 と言った重合度の小さなオリゴ糖を生成する。マルチプルアタックにより酵素分子がアミロース分子と結合したまま分解していく過程において、エネルギー的に安定な ES 複合体として PPA のサブサイト構造と生成物の種類から類推して Fig. 9 に示す 3 つの複合体が考えられる。これら 3 種の ES 複合体は互いに平衡状態にあり、反応圧力が増加すると部分モル体積が小さな ES 複合体の方向に平衡が移動し、この ES 複合体より生成する生成物の速度が大きくなるものと考えられる。

ここでは、紙面の都合上詳細な説明や式の誘導は省略するが、Fig. 9 に示す 3 種の ES 複合体間の平衡定数は、G4 や G6 を基質とした場合と同様に、それぞれの ES 複合体から生成する生成物の速度の比として (10)～(12) 式のように表される。（詳細は文献 [5] を参照されたい。）

$$K_{12} = v_{03}/v_{02} \quad (10)$$

Fig. 9. Schematic drawing of the three kinds of ES complexes between PPA and amylose through the multiple attack. Reprinted with permission from [5]. Copyright 1997, American Chemical Society.

$$K_{23} = v_{04}/v_{03} \quad (11)$$

$$K_{13} = v_{04}/v_{02} \quad (12)$$

K_{12} 、 K_{23} および K_{13} はそれぞれ ES_{n1} と ES_{n2} の間、 ES_{n2} と ES_{n3} の間および ES_{n1} と ES_{n3} の間の平衡定数である。Table 4 に示した K_{12} 、 K_{23} および K_{13} の圧力依存性より、 ES_{n1} と ES_{n2} の間の部分モル体積差は約 $-6.3 \text{ cm}^3/\text{mol}$ 、 ES_{n2} と ES_{n3} の間には $4.8 \text{ cm}^3/\text{mol}$ 、 ES_{n1} と ES_{n3} との間は $-1.5 \text{ cm}^3/\text{mol}$ と見積もられた。ここで、体積差が正の値の場合は先の方の ES 複合体の体積が小さく、負の場合は先の複合体の体積が大きいことから、 ES_{n1} 、 ES_{n3} 、 ES_{n2} の順に部分モル体積が小さくなることがわかる。なお、 ES_{n1} と ES_{n2} の間の体積差 $-6.3 \text{ cm}^3/\text{mol}$ は、G6 を基質とした場合と同様な 2 種の ES 複合体間の体積差 $-5.4 \text{ cm}^3/\text{mol}$ とほぼ同程度の値となった。

4.4.3 ES複合体間の体積差の分子構造的考察

アミロースを基質とした場合、ES 複合体間に体積差の生じる原因は明らかに還元末端側のグルコース残基にあるものと考えられる。なぜなら、Fig. 9 に示す 3 種の ES 複合体において、非還元末端側は 3 種ともほぼ同じ構造（グルコースの長い鎖が連なっている）であるので、体積差の生ずる原因が非還元末端側には見い出せないからである。

ES_{n1} から基質がグルコース残基 1 つ分還元末端側へシフトし ES_{n2} を生成した場合に体積が $6.3 \text{ cm}^3/\text{mol}$ 減少するのに対し、さらにもう 1 残基シフトすると逆に体積が $4.8 \text{ cm}^3/\text{mol}$ 増加するのは非常に興味深い現象であるが、次のように考えれば理解できる。 ES_{n2} においては ES_{n1} に存在する水素結合に加えてアミロースの還元末端グルコース残基の OH-2 あるいは OH-3 と PPA の Glu-240 の OE2 との間、および還元末端グルコース残基の OH-1 と Gly-238 のカルボニル酸素との間で 2 つの水素結合が生成する。一方、 ES_{n3} では還元末端から 2 番目のグルコース残基の OH-2 あるいは OH-3 と Glu-240 の OE2 との間の水素結合は生成するが、このグルコース残基の OH-1 は既にアミロースの主鎖を形成する結合に使われているため、PPA の Gly-238 との間に水素結合は生成

しない。すなわち、ES₅₁を基準にするとES₅₃では水素結合が1つ多く、ES₅₂では水素結合が2つ多い。一般に水素結合が生成すると部分モル体積は小さくなる[29]ので、この順番に部分モル体積が小さくなっていったものと考えられる。

5. おわりに

本稿においては、酵素機能を圧力で変換したり制御する技術の開発を目的に、PPAをモデル酵素とし、G4、G5、G6 およびアミロースを基質として、酵素反応生成物に及ぼす圧力の影響を検討した。その結果、G5を基質とした場合には圧力が変化しても生成物は変化しなかったが、G4やG6およびアミロースを基質とした場合には、反応圧力によって生成物の比率が変化した。そして、反応圧力によって生成物の比率が変化する原因は、加水分解反応の過程で平衡状態にある複数個のES複合体が形成され、これらのES複合体間に体積差が存在するため、圧力これらのES複合体間に体積差が存在するため、圧力の増加に伴いル・シャトリエの法則により体積の小さなES複合体の方に平衡が移動するためと考えられた。また、PPA-基質間に生じる水素結合の数の違いがそれぞれのES複合体間の体積差の要因となるものと考えられた。なお、G5については、主に1種類のES複合体のみを生成するため、圧力の変化によっても生成物の比率が変化しないものと考えられた。以上の結果より、PPAに限らず何種類かのES複合体を生成し、それらのES複合体間に体積差が存在するような加水分解酵素反応においては、PPAの場合と同様に圧力によりその生成物の比率を制御あるいは変換できる可能性があることが類推でき、圧力による酵素反応デザインの可能性を示唆するものである。今後この分野の研究が幅広い種類の酵素にまで拡大し、来る21世紀には工業的に利用されることを期待するものである。

参考文献

- [1] シーエムシー編集部編:「酵素製品の開発と応用」, シーエムシー(1985).
- [2] 一島英治編:「食品工業と酵素」, 朝倉書店(1983).
- [3] 崎山文夫:「現代の酵素化学」(今堀和友編), 化学同人(1975), p.75.
- [4] T. Matsumoto, S. Makimoto, Y. Taniguchi: *Biochim. Biophys. Acta*, **1343**, 243 (1997).
- [5] T. Matsumoto, S. Makimoto, Y. Taniguchi: *J. Agric. Food Chem.*, **45**, 3431 (1997).
- [6] Y. Sakano, S. Takahashi, T. Kobayashi: *J. Jpn. Soc. Starch Sci.*, **30**, 30 (1983).
- [7] L. Pasero, Y. Mazzei-Pierron, B. Abadie, Y. Chicheportiche, G. Marchis-Mouren: *Biochim. Biophys. Acta*, **869**, 147 (1986).
- [8] J. F. Robyt, D. French: *J. Biol. Chem.*, **245**, 3917 (1970).
- [9] J. F. Robyt: *J. Jpn. Soc. Starch Sci.*, **36**, 287 (1989).
- [10] E. Probanov, C. Seigner, G. Marchis-Mouren: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **122**, 75 (1984).
- [11] K. Ishikawa, H. Hirata: *Arch. Biochem. Biophys.*, **272**, 356 (1989).
- [12] H. Yamashita, H. Nakatani, B. Tonomura: *J. Biochem.*, **110**, 605 (1991).
- [13] H. Yamashita, H. Nakatani, B. Tonomura: *Biochim. Biophys. Acta*, **1202**, 129 (1991).
- [14] Y. C. Chan, P. J. Braun, D. French, J. F. Robyt: *Biochemistry*, **23**, 5795 (1984).
- [15] P. J. Braun, D. French, J. F. Robyt: *Arch. Biochem. Biophys.*, **242**, 231 (1985).
- [16] P. J. Braun, D. French, J. F. Robyt: *Carbohydr. Res.*, **141**, 265 (1985).
- [17] P. J. Braun, D. French, J. F. Robyt: *Carbohydr. Res.*, **143**, 107 (1985).
- [18] H. Kondo, H. Nakatani, K. Hiromi: *Carbohydr. Res.*, **206**, 161 (1990).
- [19] K. Ishikawa, I. Matsui, K. Honda: *Biochemistry*, **29**, 7119 (1990).
- [20] K. Ishikawa, I. Matsui, K. Honda, S. Kobayashi, H. Nakatani: *Arch. Biochem. Biophys.*, **289**, 124 (1991).
- [21] K. Hiromi: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **40**, 1 (1970).
- [22] K. Hiromi, M. Ohnishi, A. Tanaka: *Mol. Cell. Biochem.*, **51**, 79 (1983).
- [23] 廣海啓太郎: 澱粉科学, **32**, 84 (1985).
- [24] M. Qian, R. Haser, G. Buisson, E. Duee, F. Payan: *Biochemistry*, **33**, 6284 (1994).
- [25] R. Casset, A. Imberty, R. Haser, F. Payan, S. Perez: *Eur. J. Biochem.*, **232**, 284 (1995).
- [26] S. D. Hamann: "High Pressure Physics and Chemistry", R. S. Bradley (ed), Academic Press (1963); Vol. 2, Chapter 7.
- [27] S. B. Larson, A. G. Greenwood, D. Cascio, J. Day, A. McPherson: *J. Mol. Biol.*, **235**, 1560 (1994).
- [28] M. Qian, R. Haser, F. Payan: *J. Mol. Biol.*, **231**, 785 (1993).
- [29] M. Van Eldik, W. J. Le Noble: *Chem. Rev.*, **89**, 549 (1989).
- [30] J. F. Robyt, D. French: *Arch. Biochem. Biophys.*, **122**, 17 (1967).
- [31] J. F. Robyt, D. French: *Arch. Biochem. Biophys.*, **138**, 662 (1970).

[2000年2月9日受理]