酵素反応におけるラジカル触媒を考える

虎谷哲夫*

酵素反応は水溶液中で起こることから、当然イオン機構（極性機構）で進行するという先入観念があった。しかしこれは必ずしも正しくなく、ラジカル機構（非極性機構）で触媒する酵素もあることがわかってきた。多くの酵素の活性部位が疎水的であることが知られている現在では不思議ではない。これらの酵素反応の機構は従来提出されてきた酵素触媒の概念だけでは説明できず、ラジカル触媒とも呼ぶべき別の概念の導入が必要である。

水のように極性の大きな溶媒中では溶媒和の効果が強く働くので、イオン機構（極性機構）が有利である。これは有機化学的には真理である。では、酵素反応においてはどうか。生化学者達は一種の先入観念により、“酵素反応は水溶液中で起こるのだから、当然イオン機構で進行する”と考えてきたように思われる。確かに多くの酵素反応がイオン機構で進むことは事実である。しかし、X線結晶解析などにより、多くの酵素の活性部位は疎水的であることが実証されてきており、必ずしもイオン機構だけを考える必然性はない。

近年、いくつかの酵素が、活性中心にフリーラジカルを含有あるいは生成し、そのラジカル種が触媒機能に重要な役割を演じていることが報告された。すなわち、上記の先入観念は一部の酵素については覆されつつあるのである。しかし、ひるがえってみれば、このことは新しい発見ではなく、実は先例がある。酵素反応の系でラジカルが最初に確認されたのは、1969年のビタミン B₁₂ 補酵素（アデノシルコバラミン；AdoCbl）関与酵素、および1972年の B₁₂ 不関与リボスクレオチドレダクターゼ（RNR）の例に

遡ることができる。これらはいずれも特殊な例とされ、長い間一般の注目を集めるには至らなかったが、近年のラジカル酵素の再発見により、ようやく関心が高まってきたのが現状である。本稿では、フリーラジカルが酵素触媒において本質的な役割を担っている例を紹介し、酵素反応におけるラジカル触媒の概念について私見も交えて解説したい。

フリーラジカルによって触媒される酵素反応とその機構

フリーラジカルが触媒として関与することが示

表 1 ■ ラジカルが触媒として関与する酵素反応

反応の型および酵素	ラジカル/コファクター
H・引き抜きによる隣接位 C-O, C-N 結合の活性化	
ジオールデヒドラーゼ	AdoCbl
グリセロールデヒドラーゼ	〃
エタノールアミンアンモニアラーゼ	〃
リシン 2,3-アミノムターゼ	AdoMet/PLP/Co/Fe-S
リボスクレオチドレダクターゼ	
大腸菌（好気）など細菌、ファージ、動物、植物	Tyr ラジカル/Fe
乳酸菌など細菌、原虫	AdoCbl
大腸菌（嫌気）、T4 ファージ	Gly ラジカル/Fe-S
<i>Brevibacterium</i> など	ラジカル(?) /Mn
H・引き抜きによる隣接位 C-C 結合の活性化	
メチルマロニル CoA ムターゼ	AdoCbl
グルタミン酸ムターゼ	〃
2-メチレングルタル酸ムターゼ	〃
ピルビン酸ギ酸リアーゼ	Gly ラジカル
H・引き抜きによる置換基の導入	
シトクロム P 450	ヘム
メタンモノオキシゲナーゼ	Fe
プロスタグランジン-シンターゼ	ヘム
リボキシゲナーゼ	Fe
その他	
ガラクトースオキシダーゼ	Tyr-Cys ラジカル/Cu

Radical Catalysis in Enzymatic Reactions

* Tetsuo TORAYA, 岡山大学工学部

された酵素を，触媒する反応の型により分類し，ラジカル種/コファクターとともに表1に示した．酵素反応とラジカルの関わり方によって大別すると，ラジカルが基質の活性化に不可欠の役割を果たしている場合と，そうでない場合とがある．後者としては，1電子移動過程を含む酸化還元反応があげられるが，それらはラジカル触媒とは趣を異にするので，ここではとり上げない．含有または生成するラジカル種によって分類すると，AdoCbl あるいは S-アデノシルメチオニン (AdoMet) のようなコファクターに由来するものと，蛋白質のアミノ酸残基に由来するものとがある．AdoCbl がラジカル反応のための補酵素であることはすでに確立されているが，AdoMet も同様にラジカルの供給源になることが見いだされたのは比較的最近のことである．図1に示したような構造の類似性を考えれば，うなずけることであろう．

1. H・引き抜きによる隣接位 C-O, C-N 結合の活性化

水酸基やアミノ基を除去したり，隣接位に転移させたりする酵素反応においては，C-O 結合や C-N 結合の活性化・開裂が起こらなければならない．このような活性化は隣接炭素から水素を引き抜くことによって達成される．酸・塩基反応的に活性化されていない C-H 結合に対しては，酵素はラジカルの高い反応性を利用して H・を引き抜いて基質を活性化すると考えられる (式1)．

AdoCbl 関与アミノムターゼおよびリアーゼ

ラジカル機構で進行することが最も早く証明された酵素は，エタノールアミンアンモニアリアーゼ (EAL)，ジオールデヒドラーゼ (プロパンジ

図1 ■ アデノシルコバラミンと S-アデノシルメチオニンの構造

オールデヒドラーゼ ; PDD), 乳酸菌 RNR など，AdoCbl 関与の酵素群であった．AdoCbl は自然界に初めて見いだされた有機金属化合物であり (図1)，アポ酵素に結合すると，そのコバルト-炭素 (Co-C) 結合が活性化されて開裂し，補酵素機能が発現する．PDD や EAL では電子常磁性共鳴 (EPR) により反応中に Co(II) と有機ラジカルの生成が認められ，作用機構として図2-Aに示したようなラジカル機構が提出された⁽¹⁻³⁾．この機構は，当初は一部の化学者の強い反論を呼んだが，現在では広く受け入れられるに至っている．その概要は次の通りである．

遊離の AdoCbl では Co-C 結合は光を当てない限り安定であるが，補酵素がアポ酵素に結合すると Co-C 結合は活性化される．そして，基質存在下では Co-C 結合はホモリティックに開裂し，アデノシルラジカル (RCH₂・) と Co(II) を生じる．この有機ラジカルが酵素触媒の直接の担い手となるわけであり，基質の C-1 から水素原子 (H・) を引き抜いて基質ラジカルを生成し，自らは 5'-デオキシアデノシン (RCH₃) となる．基質ラジカルの C-2 の水酸基は，おそらくは一般酸触媒により水分子として脱離し，カチオンラジカルを経由して1位に転移する．生じた生成物ラジカルは，5'-デオキシアデノシンから H・を引き抜いて生成物となる．RCH₂・は Co(II) と再結合し，AdoCbl に戻る．

このように，AdoCbl は反応性の高い1級炭素

A) AdoCbl 関与酵素

(1) ホロ酵素の生成と Co-C 結合の活性化

(2) ジオールデヒドラーゼの作用機構

(3) メチルマロニル CoA ムターゼの作用機構

B) AdoMet 関与リシン 2,3-アミノムターゼ

(1) 酵素の活性化

(2) 作用機構

図 2 ■ アデノシルラジカルが関与する酵素反応の機構

RCH_2 : アデノシル基, R_1 : CH_3 , H または $HOCH_2$, R_2 : $H_3^+N(CH_2)_3$

ラジカルを安定に保存し、必要な時だけ生成させる生化学的ラジカル発生剤であると見なすことができる。アポ酵素がいかにして AdoCbl の Co-C 結合を活性化し、補酵素機能を引き出すかという機構については、補酵素アナログを用いて詳しく研究されている⁽³⁾。

乳酸菌などの RNR は AdoCbl 関与の酵素であり、リボヌクレオシド三リン酸 (NTP) をデオキシリボヌクレオシド三リン酸 (dNTP) に還元する反応を触媒する。反応中に $Co(II)$ と有機ラジカルが生成することから、大腸菌の AdoCbl 不関与酵素の場合 (図 4-A 参照) と同様に反応はラジカル機構で進行する。基質の C-3' から $H\cdot$ を引き抜くラジカルはアデノシルラジカルそのものではなく、それから二次的に生成する何らかのアミノ酸残基由来ラジカルであろうと考えられ、AdoCbl 不関与酵素の場合と同様にチールラジカ

ルが想定されている⁽⁴⁾。

AdoMet 依存酵素

リシン 2,3-アミノムターゼ (LAM) は *Clostridium* 属細菌による L-リシン代謝の最初の段階に関与する酵素であり、L- α -リシンと L- β -リシンの相互転換を触媒する。本酵素はピリドキサール 5'-リン酸 (PLP)、高スピン $Co(II)$ および鉄-硫黄 (Fe-S) クラスターを含む。本酵素は精製過程で失活するが、嫌気下でヒドロサルファイト、SH 剤、PLP と保温して還元型とした後、AdoMet を作用させると活性化される⁽⁵⁾。この活性化の過程で何らかのアデノシルコファクターが生じ、アデノシルラジカル ($RCH_2\cdot$) が生成すると考えられている (図 2-B)。

活性化された酵素に α -リシンを作用させると、 $RCH_2\cdot$ が PLP- α -リシンシッフ塩基の C-3 から $H\cdot$ を引き抜いて 5'-デオキシアデノシン (RCH_3)

図 3 ■大腸菌 (好気) リボヌクレオチドレダクターゼの立体構造

A: チロシルラジカル/2核 Fe 中心近傍 (R2) (P. Nordlund, A. Aberg, U. Uhlin & H. Eklund: *Biochem. Soc. Trans.*, 21, 736 (1993) より), B: 活性部位 (R1) (U. Uhlin & H. Eklund: *Nature*, 370, 537 (1994) より)

となる⁽⁶⁾。生じた基質ラジカルはアゾシクロプロピルカルビニルラジカル中間体を経由して、生成物ラジカルへと転位する。そして、 RCH_3 から $\text{H}\cdot$ を引き抜いて、 β -リシンとなり、 $\text{RCH}_2\cdot$ が再生される。酵素反応中に EPR で検出される有機ラジカルは、 β -リシンの C-2 上の π -ラジカルであることが最近証明された⁽⁷⁾。LAM の反応は、 $\text{RCH}_2\cdot$ が直接 $\text{H}\cdot$ の引き抜きに関与し、その C-5' 上の水素を生成物に与えるという点で、Ado-Cbl 関与の酵素反応と類似している。PLP 関与酵素でありながら、通常の PLP 酵素とはまったく異なり、ラジカル機構で反応を触媒することは興味深い。

アミノ酸残基上にラジカルを有する酵素

アミノ酸残基上にラジカルが存在することが最も早く発見された酵素は、大腸菌の B_{12} 不関与 RNR である。本酵素はリボヌクレオチドニリン酸 (NDP) を相当するデオキシ体 (dNDP) に還元する反応を触媒し、DNA 合成のための素材供給の中心的役割を担っている。(R1)₂(R2)₂ のサブユニット構造をもち、R2 にサブユニット1個当たり1個の活性発現に必須のチロシル (Tyr) ラジカル (Tyr 122) と μ -オキシ 2核 Fe(III) 中心を含み、R1 には活性部位 (基質結合部位) とアロステリックエフェクター結合部位とがあ

る⁽⁸⁾。

最近、本酵素の R2 は $2.2\text{\AA}$ 、R1 は $2.5\text{\AA}$ の分解能でX線結晶解析がなされ、立体構造が明らかになっている^(9,10)。その結果によれば、R2 の Tyr ラジカルは表面から約 $10\text{\AA}$ の深部にあり、最も近い Fe イオンから $5.3\text{\AA}$ 離れて存在する (図 3-A)。両者の間のポケットに O_2 が結合して、Tyr 122 と 2核 Fe 中心の酸化が起こると考えられている。

一方 R1 では、反応に関与している 5つの Cys のうち、2つ (Cys 225 と Cys 462) はジスルフィド結合形成能があり、酸化還元活性をもつことが確認された。必須残基である Cys 439 は基質のリボース環をはさんでこれらと反対側に見いだされた (図 3-B)。カルボキシ末端側の Cys 754 と Cys 759 はX線解析では位置が決められないフレキシブルアームにあるという。これらの構造的知見を踏まえて、本酵素の作用機構は図 4-A のように考えられている⁽¹⁰⁾。

R1 サブユニット中の Cys 439 のチールラジカル ($\text{S}\cdot$) が基質 NDP の C-3' より $\text{H}\cdot$ を引き抜く。生じた基質ラジカルは隣接炭素 (C-2') から一般触媒により水分子が脱離し、 $\text{O}^{3'}$ 上の正電荷は Glu 441 により安定化される。R1 の Cys 225 と Cys 462 により C-2' の還元が起こった後、

Cys 439 の SH から C-3' ラジカルへ H・が返されて dNDP が生成し、S・が再生される。ジスルフィドへと酸化された Cys 225 と Cys 462 は狭い活性部位内にあるが、R1 のカルボキシル末端側のフレキシブルアームにある Cys 754 と Cys 759 を酸化還元シャトルとし、チオレドキシン系またはグルタレドキシン系を介して、最終的には NADPH により元のジチオールに還元される。in vitro では、ジチオスレイトール (DTT) やジヒドロリポ酸が外部還元剤として用いられるが、これらは直接 Cys 225 と Cys 462 を還元する。R1 の C439 上に S・が生じる機構としては、この基から 10Å 以上も離れた R2 の Tyr ラジカルへの電子移動によると考えられ、Tyr 730 および Tyr 731 が R1 から R2 への電子の出口になっているという可能性が示唆されている。

RNR には、大腸菌酵素の他に表 1 に示したような 4 つのクラスの酵素が知られている。これらはいずれもラジカル酵素であり、活性部位ラジカルを生成する機構が異なるものの、作用機構は共通しているのではないかと推定されている。

2. H・引き抜きによる隣接位 C-C 結合の活性化

C-C 結合の開裂をひき起こすことは、脱炭酸や逆アルドール開裂のような特殊な例を除けば容易ではない。しかし、隣接位から水素原子を引き抜

図 4 ■ アミノ酸残基由来ラジカルが関与する酵素反応の機構

いてラジカルを生成させれば起こり得るようになる (式 2)。このような反応を触媒するラジカル酵素が知られている。

AdoCbl 関与イソメラーゼ

AdoCbl 関与酵素の中でメチルマロニル CoA ムターゼ⁽¹¹⁾、グルタミン酸ムターゼ⁽¹²⁾、2-メチレングルタル酸ムターゼ⁽¹³⁾は炭素骨格の組換えを伴う異性化反応を触媒する。最近、これらの酵素反応中にもラジカル種が出現することが EPR により確認された。これらの反応においても、ホロ酵素の Co-C 結合のホモリシスが初発段階であり、アデノシルラジカルによって H・が引き抜かれる (図 2-A)。その後、β位の C-C 結合がホモリティックに開裂し、CoA チオエステル、グリシ

ン、またはアクリル酸の部分が隣接位に転移するという機構が有力である。メチルマロニル CoA ムターゼ反応の場合を図 2-A に示した。

アミノ酸残基上にラジカルを有する酵素

ピルビン酸ギ酸リアーゼ (PFL) はグルコースの嫌氣的代謝において重要な役割を果たす酵素であり、式 3 の反応を触媒する。本酵素には活性型

と不活性型とがあり、活性化酵素と不活性化酵素により相互に変換される⁽¹⁴⁾。活性型はラジカルを含み、このラジカルは主鎖の Gly 734 の C-2 上に不対電子を有するグリシル (Gly) ラジカルであることが最近証明された⁽¹⁵⁾。この酵素は金属イオンを含んでいない。自殺基質や部位特異的変異を導入した酵素を用いた実験結果から、図 4-B に示したような作用機構が提案されている⁽¹⁶⁾。すなわち、ピルビン酸が Cys 419 と付加体を形成した後、Gly ラジカルから Cys 418 のチールラジカル (S•) が生じ、チオヘミケタル中間体のカルボキシル基に付加する。水素移動の後 C-C 結合がホモリティックに開裂し、ギ酸が生成する。その後 Cys 418 の S• から Gly 734 の Gly ラジカルが再生され、CoASH へのアセチル基転移によりアセチル CoA が生成する。この酵素の場合も RNR における Tyr ラジカルと同様に、Gly ラジカルは実際に機能するラジカルを必要とときに発生させる役割を果たしている。Gly 734 と Cys 418 の距離がわからないので、S• の生成が H• 引き抜きによるのか、電子移動によるのかは不明である。

PFL の Gly ラジカルは主鎖上のラジカルとして初めて同定されたものである。Gly ラジカルは酸素分子 (O₂) と反応して C-2 上にペルオキシラジカルを生じ、速やかにペプチド鎖の開裂をひき起こす⁽¹⁵⁾。このため、活性型の PFL は O₂ にさらすと速やかに失活し (20°C で *t*_{1/2} ~ 10 秒)、EPR シグナルが消失する。同様の現象は同じく Gly ラジカルを有する大腸菌の嫌気 RNR においても観察されている。

3. H• 引き抜きによる置換基の導入 (オキシゲナーゼ反応)

アルカンを生理的条件下で制御しつつ酸化することは困難に思えるが、動物や細菌にはアルカンをアルコールに酸化する酵素が存在する。これらは式 4 の反応を触媒するモノオキシゲナーゼであ

り、一般にヒドロキシラーゼ成分とレダクターゼ成分から成る。動物でこの型の反応を触媒するモノオキシゲナーゼとして最も重要なものは、シトクロム P 450 であり、ステロイドなどの生合成における水酸化や薬物および外来物質の酸化の役割を担っている。P 450 のコファクターはプロトヘムであり、フラビン蛋白がレダクターゼ成分として、NAD(P)H からの還元力を 1 電子ずつヘムに移動する。この反応においては、まず基質 (RH) が結合した後、Fe(III) が 1 電子還元される。生じた Fe(II) に O₂ が結合した後、もう 1 電子還元されてペルオキシ型 [HOO-Fe(III)] となる。ペルオキシ配位子がヘテロリティックに開裂し、水の脱離によって生じるオキソ Fe(IV) π-カチオンラジカルが酸素化の直接の反応種と考えられており、これが基質の H• を引き抜く (式 5)。生じた基質ラジカルが OH• を引き抜いて

アルコールを生成する、というのが現在有力な反応機構である⁽¹⁷⁾。

メタノトロフはメタンを唯一の炭素源、エネルギー源として生育できる。メタン資化の第一段階はメタンモノオキシゲナーゼ (MMO) によるメタンのメタノールへの酸化である。この反応は式 4 の一般式で表わされるが、MMO のヒドロキシラーゼ成分のコファクターはヘムではなく、μ-オキソ 2 核 Fe(III) 錯体である。Fe-S クラスタ

ーを含むフラビン蛋白質がレダクターゼ成分として NADH からの電子をヒドロキシラーゼ成分に渡し、この電子移動を第3の成分であるカップリング蛋白質が促進する。ごく最近、ヒドロキシラーゼ成分の X線結晶解析が $2.2\text{\AA}$ の分解能でなされた⁽¹⁸⁾。その結果によれば、 μ -オキソ 2核 Fe 中心は O_2 とメタンが結合すると考えられる疎水性の活性部位ポケット内にある。Fe 中心近傍の立体構造は RNR の R2 サブユニットと類似性が高く、両蛋白質の機能の相同性を反映している (Phe 208 を Tyr で置換した変異型 R2 は O_2 により自らの Tyr を DOPA* へと水酸化する⁽¹⁹⁾)。R2 の Tyr ラジカル (Tyr 122) に相当する位置には Cys 151 があるが、今のところこの残基が触媒過程に関与している証拠はない。

その他、プロスタグランジンHシンターゼやリボキシゲナーゼの触媒する反応もこの型のラジカル関与反応であるが、ここでは割愛する。

ラジカル触媒の概念

1. ラジカル触媒の必然性

異なるタイプの酵素が同じ反応を触媒する場合がある。たとえば、RNR には4つのクラスの酵素があるが、これらはいずれもラジカル酵素であるという点で共通している (表1)。ラジカルが関与しない RNR はこれまで知られていない。ジオールデヒドラーゼでも AdoCbl 関与酵素の他に不関与のラジカル酵素が存在する。これらの例は、生理的条件下では、リボヌクレオチドの還元やジオールの脱水のようなある種の生化学反応はラジカル機構でしか進行し得ないことを強く示唆している。では、ラジカル機構で進むことの必然性はどこにあるのであろうか。

フリーラジカルが基質の活性化に不可欠の役割を果たしているラジカル酵素の触媒する反応は、いずれも酸・塩基反応的に活性化されていない基質への反応である。これらは生体内のような温和な条件下では非酵素的にほとんど起こらない反応 ($k_o/k_n \sim \infty$) であることに注目してほしい。これらの反応を触媒する酵素の多くは、活性化されて

図5 ■ エネルギー図で表わしたラジカル触媒の概念

いない C-H 結合からラジカルが $\text{H}\cdot$ を引き抜くことにより炭素ラジカル ($\text{C}\cdot$) を生成させる。これにより初めて基質が活性化され、置換基の導入や隣接位 C-O 結合、C-N 結合あるいは C-C 結合の開裂が容易に起こり得るようになるのである。すなわち、ラジカル触媒というのは、酸・塩基反応的にはきわめて起こり難い反応を進行させるために、フリーラジカルの高い反応性を利用する機構であるといえよう。

このことをエネルギー図で考えてみよう。いま簡単のために、 $\text{H}\cdot$ 引き抜きによって隣接位の結合が活性化される型の反応についてのみ考えてみると、エネルギー図は図5のように表わせる。すなわち、この型の反応では、 $\text{S} \rightarrow \text{P}$ の反応は熱力学的には起こり得るが、速度論的には遷移状態 ($\text{S}^\ddagger$) のエネルギーレベルが高すぎてきわめて起こり難いと考えられる。このような反応を触媒する酵素の活性部位にフリーラジカルが導入されたとする。ラジカル ($\text{R}\cdot$) はもともと不安定で原系では高いエネルギーレベルにあるが、遷移状態において基質から $\text{H}\cdot$ を引き抜くと RH となり、大きく安定化される。その後、中間体により $\text{H}\cdot$ が引き抜かれると $\text{R}\cdot$ が再生されるので、生成系では再び不安定な状態に戻る。すなわち、このようなラジカルの水素引き抜き反応と共役することにより、遷移状態 ($\text{S}^\ddagger + \text{RH}$) が原系 ($\text{S} + \text{R}\cdot$) に比して相対的に安定化され、活性化自由エネルギー ($\Delta G_e^\ddagger$) が小さくなる結果、速度論的に起こり難い反応が容易に起こり得るようになるのである。

* 3,4-ジヒドロキシフェニアラニン

2. 触媒ラジカル種のマスキングと起源

ラジカル触媒の本質は、活性中心に活性な触媒ラジカルまたは同等な活性種を導入し、基質を活性化することにある。このような直接の作用種としてはアデノシルラジカルやチールラジカル、オキソ $\text{Fe(IV)}\pi$ -カチオンラジカルなどがあげられる。これらはエネルギーレベルが高く不安定なため、必要時以外はアデノシルラジカルは AdoCbl や AdoMet というコファクターの中に、チールラジカルは同じ酵素中に Tyr ラジカルや Gly ラジカルとしてマスキングされて保存されていると見なすことができる。Gly ラジカルはさらに遡れば AdoMet に由来することはすでに述べた。AdoCbl や AdoMet は ATP から生合成され、アデノシルラジカルを比較的弱い結合により保持している。RNR の Tyr ラジカルは Fe 中心が O_2 により酸化される過程で生成する。結局、触媒ラジカルの高い反応性の少なくともかなりの部分はすでにその前駆体の構造に内蔵されており、それが反応を駆動する力になっているといえよう。

ラジカル酵素の不活性化と再活性化

1. 酵素自身によるラジカルの再生

大腸菌の好気 RNR はヒドロキシル尿素などの酸化剤やフェニルヒドロキシルアミンなどのラジカル捕捉剤により不活性化される⁽⁸⁾。その他、生体内に存在する還元型フラビンによっても不活性化され、ラジカルが消滅する。不活性化還元型 R2 は DTT と Fe^{2+} の存在下、酸素分子により

酸化されて Tyr ラジカルと μ -オキソ 2 核 Fe 中心を再生する。おそらくは Phe 208, Phe 212, Ile 234 に囲まれた疎水性ポケットに O_2 がとり込まれて Fe 中心に結合し、Tyr 122 の側鎖および Fe 中心を酸化すると考えられる。生成するペルオキシ中間体が近くの Tyr 122 からプロトンを奪い、その結果 Tyr ラジカルへの酸化が促進されるのであろう⁽⁹⁾。

LAM は精製過程で失活するが、不活性化された酵素は嫌気下でヒドロサルファイト、チオール類、PLP と保温して還元型とした後、AdoMet を作用させると活性化される。L-リシン存在下で AdoMet による活性化を行なうと、L-メチオニン (Met) と 5'-デオキシアデノシンがほぼ等量生成する。したがって、AdoMet と活性部位の金属中心の反応によりアデノシル型のコファクターが生成することが活性化の実体であろうと考えられている (図 2-B)^(5,6)。

大腸菌の嫌気 RNR は、遺伝子の解析により $678\text{RVCYG}682$ というアミノ酸配列を有することが判明した⁽²⁰⁾。この配列は PFL の Gly ラジカルを含む配列 (RVSGY) と相同性が高いことから、Gly 681 が主鎖上の Gly ラジカルになると推定された。本酵素は Fe-S クラスターを含有し、酸素に不安定である。ラジカルを含まない不活性型として単離された酵素は、還元型フラビンのような還元剤と AdoMet で処理することにより活性化される⁽²¹⁾。この活性化により、酵素は PFL に類似した EPR シグナルを示すようになることから、

Gly ラジカルが生成するという推定が裏付けられた。図 6 に示すように、AdoMet が $[\text{Fe-S}]_{\text{red}}$ により還元的に開裂し、生じるアデノシルラジカルが Gly 681 から $\text{H}\cdot$ を引き抜くというラジカル生成機構が考えられている。

図 6 ■ S-アデノシルメチオニンと還元剤による酵素内グリシルラジカルの生成

A: アデニン

2. 別の酵素によるラジカルの導入と消去

PFL はラジカルを含まない

不活性型として生合成され、翻訳後に別の酵素である活性化酵素 (activase) の作用により、Gly ラジカルが生成して活性化される⁽¹⁴⁾。この活性化には AdoMet, Fe²⁺, DTT および還元型フラビンが必要である。図 6 に示したように、activase の活性部位において AdoMet が [Fe]_{red} により還元的に開裂し、生じるアデノシルラジカルが PFL の β ターン部に存在する Gly 734 の *pro-S* 水素を引き抜くことによって Gly ラジカルは生成する⁽²²⁾。PFL は金属を含まない酵素であるため、自身では AdoMet を還元的に開裂させることができず、ラジカルの導入に他の酵素の介在を必要とするのであろう。なお、PFL を不活性化する酵素 (deactivase) の存在も知られている。この酵素は Fe²⁺, NAD, CoASH とピルビン酸を要求し、Gly ラジカルを消去すると考えられている⁽²³⁾。

3. 不活性化された補酵素の交換による再活性化

不活性化されたホロ酵素の修飾された補酵素部分を完全なものと交換するという新しい再活性化機構を、筆者らは AdoCbl 関与酵素の一部で見いだした。ジオールデヒドラーゼ (PDD) やグリセロールデヒドラーゼ (GLD) は生理的基質であるグリセロールの脱水反応中に速やかに不活性化される。この過程で AdoCbl は Co-C 結合の不可逆的な開裂を受けるが、アポ酵素は修飾を受けない。この不活性化は正常な触媒反応と共通の中間体の 1 つから起こる自殺不活性化反応であり、ラ

ジカル中間体が副反応を起こして AdoCbl の再生が不可能になった結果と考えられる⁽⁸⁾。

グリセロールは PDD のみならず、GLD の自殺不活性化も引き起こす。これらの酵素を産生する細菌の増殖基質であるグリセロールがその代謝に必須の酵素を不活性化することは生理的に不都合であり、何らかの修復機構または不活性化防止機構の存在が予測された。トルエン処理により低分子物質に対する透過障壁をなくした系 (*in situ* の系) で調べたところ、不活性化は *in vitro* と同様に起こったが、ATP と Mg²⁺ 存在下では不活性化された Cbl が酵素から解離し、代わりに AdoCbl が結合して活性なホロ酵素が再生された (補酵素交換機構による再活性化)⁽²⁴⁾ (図 7)。これは、アデニン部分を失った Cbl は ATP と Mg²⁺ 存在下でアポ酵素に対する親和性が著しく低下するのに対し、アデニン部分をもつ Cbl は親和性が変わらないためであることが判明した⁽²⁵⁾。

この再活性化は、基質不在下 O₂ で不活性化されたホロ酵素や補酵素アナログにより自殺不活性化したホロ酵素でも起こったことから、ラジカル機構で触媒するが故に不安定なこれらの AdoCbl 関与酵素には、修復機構が備わっていることが示された。この修復に関与する因子をコードする遺伝子は筆者らの研究室で最近クローン化された。

*

これまでにラジカル触媒で進行することが示された酵素の数は酵素全体からみればごく一部にし

図 7 ■ 不活性化された補酵素の交換による AdoCbl 関与デヒドラーゼの再活性化
RCH₂: アデノシル基, SH: 基質 (グリセロールなど)

かすぎない。しかし、多くの酵素の作用機構がまだ詳細には解明されていないことを考えれば、ラジカル酵素の例は今後もっと増えると予想される。先入観にとらわれず、イオン機構で説明が困難な酵素反応については、ラジカル (非極性) 機構の可能性を大胆に考え、個々の反応について EPR などの方法論を用いて厳密に機構の検証を進めていくべきであろう。

X線結晶解析や NMR による精密立体構造の解析と遺伝子工学技術の進歩を背景として、酵素科学の研究はいま新しい段階にさしかかっている。フリーラジカルが関与する酵素も例外ではなく、いくつかの酵素でX線結晶解析が進められている。したがって、ラジカル酵素におけるフリーラジカルの生成や反応制御に関しても、精密な立体構造を踏まえた議論が近い将来に可能になるものと期待される。

文献

- 1) R. H. Abeles & D. Dolphin : *Acc. Chem. Res.*, 9, 114 (1976).
- 2) B. M. Babior : *BioFactors*, 1, 21 (1988).
- 3) T. Toraya : *Metal Ions in Biological Systems*, 30, 217 (1994).
- 4) G. W. Ashley, G. Harris & J. Stubbe : *J. Biol. Chem.*, 261, 3958 (1986).
- 5) M. L. Moss & P. A. Frey : *J. Biol. Chem.*, 265, 18112 (1990).
- 6) M. Moss & P. A. Frey : *J. Biol. Chem.*, 262, 14859 (1987) ; P. A. Frey : *FASEB J.*, 7, 662 (1993).
- 7) M. D. Ballinger, P. A. Frey & G. H. Reed : *Biochemistry*, 31, 10782 (1992).
- 8) M. Fontecave, P. Nordlund, H. Eklund & P. Reichard : *Adv. Enzymol.*, 65, 147 (1992).
- 9) P. Nordlund & H. Eklund : *J. Mol. Biol.*, 232, 123 (1993).
- 10) U. Uhlin & H. Eklund : *Nature*, 370, 533 (1994).
- 11) J. Reteý : in "B₁₂", ed. by D. Dolphin, John Wiley & Sons, NY, 1982, p. 357.
- 12) R. L. Switzer : *ibid.*, p. 289.
- 13) O. Zelder & W. Buckel : *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, 374, 85 (1993).
- 14) K. K. Wong, B. W. Murray, S. A. Lewisch, M. K. Baxter, T. W. Ridky, L. Ulissi-DeMario & J. W. Koza-rich : *Biochemistry*, 32, 14102 (1993).
- 15) A. F. V. Wagner, M. Frey, F. A. Neugebauer, W. Schaffer & J. Knappe : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 996 (1992).
- 16) J. Knappe, S. Elbert, M. Frey & A. F. V. Wagner : *Biochem. Soc. Trans.*, 21, 731 (1993).
- 17) T. J. McMurry & J. T. Groves : in "Cytochrome p-450 : Structure, Mechanism and Biochemistry", ed. by P. R. Ortiz de Montellano, Plenum, NY, 1986, p. 1 ; P. R. Ortiz de Montellano : *ibid.*, p. 217.
- 18) A. C. Rosenzweig, C. A. Frederick, S. J. Lippard & P. Nordlund : *Nature*, 366, 537 (1993).
- 19) A. Aberg, M. Ormo, P. Nordlund & B.-M. Sjöberg : *Biochemistry*, 32, 9845 (1993).
- 20) X. Sun, J. Harder, M. Krook, H. Jönvall, B.-M. Sjöberg & P. Reichard : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 777 (1993).
- 21) E. Mulliez, M. Fontecave, J. Gaillard & P. Reichard : *J. Biol. Chem.*, 268, 2296 (1993).
- 22) M. Frey, M. Rothe, A. F. V. Wagner & J. Knappe : *J. Biol. Chem.*, 269, 12432 (1994).
- 23) D. Kessler, I. Leibrecht & J. Knappe : *FEBS Lett.*, 281, 59 (1991).
- 24) S. Honda, T. Toraya & S. Fukui : *J. Bacteriol.*, 143, 1458 (1980).
- 25) K. Ushio, S. Honda, T. Toraya & S. Fukui : *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 28, 225 (1982).

お知らせ

平成8年度基礎科学特別研究員公募

科学技術庁傘下の特殊法人理化学研究所は、我が国の基礎研究を強力に推進するため、平成8年度の基礎科学特別研究員を募集します。斬新な研究課題を自主的に遂行できる若い研究者の応募を期待します。

採用予定人員：35名程度

受入機関：理化学研究所

募集分野：物理学，化学，生物科学，医科学，工学の各分野で、理化学研究所で実施可能な研究

応募資格：平成8年4月1日現在35歳未満の健康な者で、博士号取得者またはこれと同等の研究能力を有すると認められる者。日本国に永住権を有さない外国人にあっては、上記に加え次の条件を満たす者。①応募日現在で日本国に在住している者であって、②日本国の大学院博士課程を修了（見込を含む）し、博士号を取得（見込を含む）の者

待遇等：①謝金月額50万円程度（社会保険料，税込），②通

勤費実費（上限4万円/月），③住宅費，家賃の一部支給。以上のほか、研究費として138万/年程度

契約期間：連続して最長3年間を限度とし、毎年度所要の評価により契約更新

応募願書の提出締切：平成7年6月14日（水）【必着】

応募したい方は下記に平成7年5月31日（水）までに問い合わせのこと

【応募書類の頒布締切：平成7年6月1日（木）】

理化学研究所研究業務部・基礎科学特別研究員制度推進室 〒351-01 埼玉県和光市広沢2番1号

Tel. 048-462-1111 内線 2461～2463

Fax 048-462-4608

【直通 Tel., Fax 048-463-3687】

その他：本件は政府予算の成立を前提としており、その事情により変更がありえますので、その旨御承知おき下さい。