酵素の高次構造と活性部位

稲 田 祐 二*

よく生体高分子は複雑なものでえたいの知れないものであると考えられがちであるが、ある意味においてはこれほど実体のはっきりした高分子はない。たとえば馬のヘモグロビンでは、そのアミノ酸組成は決まっているし、したがって、その分子量も、たとえば馬ヘモグロビンでは66,700と明確なものであり20種類のアミノ酸の配列順序(1次構造)まで決まっている。したがって、現在取り扱われている合成高分子と違って、平均分子量とか橋かけ度などのような平均的性質を議論する必要もないし、性質は類似していても少しずつ違っている分子の集合体を取り扱うよりもいっそう厳密な議論をすることができる。決まっているのは1次構造だけではない。配列しているペプチド鎖は立体的にも一定の構造を取ることが知られている。上述の馬のヘモグロビンの場合もそのペプチド鎖の中の約70%が α -ヘリックス構造(2次構造)を取っており、このようなヘリックスはさらに折たたまれて一定の球状の構造(3次構造)を形成している。 α -ヘリックス構造はペプチド結合に関与しているNH基とCO基間の水素結合に基くものに対して、3次構造はアミノ酸残基の側鎖間の相互作用によって保持されている。後者の例としてチロシン残基のフェノール性OH基とアスパラギン酸残基のカルボキシル基間の水素結合とか、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン残基間の疎水結合などが考えられる。ヘモグロビン分子はこのような3次構造を取っている球状体すなわちサブユニットが4個集合してできている(これを4次構造として区別する人もあり、また3次、4次構造を含めて高次構造ともいわれる)。詳しくは α -サブユニットおよび β -サブユニットと呼ばれるものがそれぞれ2個ずつ結合したものである。最初に述べた複雑なようで実体ははっきりしているというのはかかる立体構造までが、かなりはっきりとわかりつつあるということで、生体が示す複雑なようで精妙の確なる諸現象なり諸性質は、そのもとをただせばタンパク、核酸、酵素などの生体高分子の諸性質の現われであるということができる。

かかる性質を示す代表的なものが酵素であることは古

くから知られていたけれども、それを再びこのようにわかってきた高次構造をもとに見直す時期が現在きている。酵素を触媒の一種として見た場合に、能率が良いだけでなく、特定の反応だけを触媒するという、いわゆる特異性が高い点が注目される。かかる性質もその酵素タンパクの高次構造に基因するものである。したがって、酵素タンパク分子中に活性部位(active site)なるものを考えた場合に、まず特定の構造を有する基質分子だけと結合する役目を行なっている特異性決定部位(specificity determining site)とか吸着中心(adsorption center)とかいわれている部分と、結合した基質に作用して実際に反応を行なう触媒部位(catalytic site)に分けて考える必要が生じてくる。結局この活性部位におけるアミノ酸の種類と配列および立体構造が問題になるわけであるけれども、それではその他のタンパク部分は無用の物かという、活性部位における特異の構造を保持するためにはかなりの長さのペプチド鎖とそれによる立体構造の形成とが必要と考えられる。たとえば H_2O_2 が O_2 と H_2O に分解する反応に対する触媒能、すなわち、カタラーゼ活性を考える場合に、鉄錯塩であるヘムは水酸化第2鉄と比較して3000倍の活性を有しているが、このヘム基が4個特定のタンパクと結合してできている酵素、すなわちカタラーゼの活性はヘムのさらに 10^7 倍である。したがって、カタラーゼのタンパク部分がヘム基にかかる高い活性を賦与しているものと考えざるをえない。特異性とてもタンパクによるものであることは明らかであって、同一ヘム基がグロビンなるタンパクに結合すれば酸素の運搬役となるし、チトクロームタンパクに結合すれば電子伝達を行なって、特定の基質に対して酸化還元触媒能を示すようになる。触媒の専門分野では従来の無機触媒より錯塩触媒に移行しつつあると聞いているけれども、錯塩触媒の活性と特異性とをもう一步高めたのが酵素であるといっても過言ではなく、かかるすぐれた性質はそれぞれ酵素分子が取っている特定の構造に基因するものと考えられる。本講座では酵素の1次、2次、高次構造がその活性および特異性とどのような関係にあるか、また活性部位の構造はどのようなものであるか、現在わかりつつあるこの方面の進歩の状況を取り上げて解説する。

* Yuji INADA 東京工業大学助教授・理博
The Tertiary Structures of Proteolytic Enzymes
and their Active Sites

1. 活性部位に関与するアミノ酸残基

酵素の構造および機能を明らかにするには、まずそれぞれの酵素分子のアミノ酸配列順序を知る必要がある。現在まで全アミノ酸配列順序が決定された酵素は、リゾチーム^{13,2)}、リボヌクレアーゼ³⁾、キモトリプシンノーゲン、キモトリプシン^{4),5)}、トリプシンノーゲン、トリプシン^{6),7)}などであり、活性部位近傍、または部分的に1次構造の決定された酵素は数多くある。酵素の活性部位に関与するアミノ酸残基を調べる方法として酵素にある試薬を働かせ、あるアミノ酸残基が修飾され、その結果酵素活性が消失した場合、修飾されたアミノ酸残基は活性に関係があると考えられる。もちろん試薬によって酵素分子の高次構造を破壊しないでアミノ酸残基と反応するのが望ましい。現在まで酵素の活性部位として知られているアミノ酸残基は多数あるが、代表的な残基、すなわちセリン残基、システイン残基、ヒスチジン残基の例を次に示そう。

加水分解酵素 (esterase) の中でセリン酵素と呼ばれる一群の酵素があるが、これらの酵素に DFP (diisopropyl-phospho-fluoridate) を作用させると、酵素1分子に1分子の DIP (diisopropyl-phosphoryl 基) が結合し、同時に酵素活性が失われる。酵素分子中の DIP 化されたアミノ酸残基を調べると、常にセリン残基の OH 基が1個リン酸化される。第1表は種々の加水分解酵素の DIP 化されたセリン残基の近傍のアミノ酸配列順序を示したもので、動物源より得た (1)~(7) までの加水分解酵素のアミノ酸配列順序で共通な部分は -glu (Asp) -Ser- で、DIP 化されるセリン残基の隣はアスパラギン酸またはグルタミン酸残基である。カビ、細菌より得た加水分解酵素 (8), (9) においては -Thr-Ser- でセリン残基の隣はトレオニン残基である。上記いずれの酵素においても酵素1分子中に10ないし20以上の多数セリン残基が存在するが、DIP 化されるセリン残基は常に1個であり、そのセリン残基の隣はグルタミン酸 (アス

パラギン酸) 残基またはトレオニン残基であるという一般性が存在する。このことはセリン酵素群がその酵素活性を示す場合にセリン残基を中心としてその近傍のアミノ酸配列順序が重要な役割を果たしていると思われる。また生体内でリン酸化する酵素、ホスホリラーゼ¹⁷⁾、リンの転移を行なう、ホスホグルコムターゼ¹⁸⁾、脱リン酸を行なう、アルカリホスファターゼ、などのリン酸の代謝をつかさどる酵素の一群はいずれもセリン残基の OH がリン酸の反応に直接関与し (放射性 P を使った実験より証明された) そのセリン残基の1次構造上の位置も決定されている^{17)~19)}。

SH 酵素と呼ばれる一群の酵素は酵素分子にパラクロマーキューリーベンゾエート (PCMB)、ヨード酢酸、N-4-ジメチル-3, 5-ジニトロマレイミド、などの試薬を作用させると、失活する。これは酵素分子中のシステイン残基に上記の SH 試薬が反応するためである。SH 酵素群の中でパバイン²⁰⁾、フィシン²¹⁾、グリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素²²⁾、については試薬の反応するシステイン残基の1次構造上の位置がすでに決定されている^{20)~23)}。システイン酵素の隣は常にセリン残基 (-Ser-CysH-) が存在し、両残基ともに酵素活性になんらかの役割を果たしていると思われる。

酵素は基質に対して特異性がある。酵素にその基質類似物質 (substrate analogue) を結合させて、結合に関与する酵素分子中のアミノ酸残基の種類、および1次構造上の位置を決定することができれば活性部位の解明に有力な手段となるであろう。トリプシン、キモトリプシン、ペプシンについて、この目的にかなう試薬が見出されたので紹介しよう。トリプシン、キモトリプシンはいずれもタンパク分解酵素であり、前者はポリペプチド中の塩基性アミノ酸残基 (リジン、アルギニン) のカルボキシル基側を切断し、後者は芳香性アミノ酸残基 (チロシン、フェニルアラニン) のカルボキシル基側を切断する特異性がある。またペプシンもタンパク分解酵素であり芳香性アミノ酸の残基のカルボキシル基側を切断する

第1表 加水分解酵素の活性セリン残基近傍のアミノ酸配列

Enzyme	Sequence	Reference
(1) Chymotrypsin	Ser-Cys-Met-Gly-Asp-Ser-Gly-Gly-Pro-Leu-Val	8)
(2) Trypsin	Cys-Glu-Gly-Asp-Ser-Gly-Pro-Val-Cys-Ser	9)
(3) Thrombin	Asp-Ser-Gly	10)
(4) Elastase	Asp-Ser-Gly	11)
(5) Butyryl Cholinesterase	Phe-Gly-Glu-Ser-Ala-Gly	12)
(6) Acetylcholinesterase	Glu-Ser-Ala	13)
(7) Liver aliesterase	Gly-Glu-Ser-Ala-Gly-Gly	14)
(8) Subtilisin	Asp-Gly-Thr-Ser-Met-Ala-Ser-Pro-His	15)
(9) Mold protease (Aspergillus oryzae)	Thr-Ser-Met-Ala	16)

が、上記両酵素が中性付近で最大の活性を示すが、ペプシンは強酸性 (pH 1.8) で最大の活性を示す特殊な酵素である。まずトリプシンに N^{α} -トシル-L-リジンのクロ

ロメチルケトン体 (TLCK)^{27), 28)} を作用させるとトリプシン1分子に対し1分子の TLCK が結合し完全に失活する。またキモトリプシンについては、 N^{α} -トシル-L-フ

ェニルアラニンのクロロメチルケトン (TPCK)^{29), 30)} を働かせると、キモトリプシン1分子に対し1分子の TPCK が結合し失活する。両試薬とも両酵素の基質と構造が類似しており、しかも化学量論的に反応して失活する。これらの試薬と反応するアミノ酸残基の種類は1個のヒスチジン残基であり、その残基の1次構造上の位置も決定されている^{59), 60)}。今までヒスチジン残基の活性への関与は、光酸化の実験²⁴⁾、活性の pH 依存性の実験^{25), 26)} より推定されていたが、上記の実験より直接証明されたわけである。DIP-トリプシン、DIP-キモトリプシンに TLCK, TPCK は反応しない。これは両酵素のセリン残基の OH をリン酸化すると、リン酸の立体障害のために TLCK, TPCK が反応しなくなるのか、あるいはリン酸によって高次構造の変化を起こすためであろう。いずれにせよ両酵素の活性部位にセリン残基とヒスチジン残基

は不可欠の残基であり、両残基は1次構造上では離れた位置に存在するが立体構造上接近した位置にあると考えられている。同様にペプシン分子は、パラブロモフェナシルブロマイド³³⁾ (p-bromophenacyl bromide) が化学量論的に結合し失活する。この試薬の結合はアスパラギン酸残基のカルボキシル基であり古くから多くの実験により推論されていたカルボキシル基の活性への関与^{31), 32)} が直接証明された。

2. 酵素-基質複合体の構造

酵素分子が基質に作用するとき、まず酵素と基質が結合して、

酵素-基質複合体を形成する。先に述べたごとく酵素分子中には特異性決定部位と触媒部位とが存在し、この両部位は酵素分子中で割合接近した位置に存在すると考えられる。そしてこれらの部位は一種のアミノ酸残基によってきまるのではなく、数種のアミノ酸残基がある特定の立体配置をなしているのであろう。酵素-基質複合体を形成する場合、酵素分子の構造変化や、アミノ酸残基の変化が、当然起こるのである。これらの変化は酵素分子のヘリックス含量の測定や、化学修飾およびアミノ酸状態識別試薬を用いて詳細に調べることができが、ここではX線解析によって得られた酵素および酵素-基質複合体の電子密度分布より、酵素分子内における基質の存在状態が観察されるのでそれについて述べる。

卵白リゾチームは分子量約 15,000 塩基性タンパクで 129 のアミノ酸より成る。その1次構造は第1図に示す

実線: α -ヘリックス構造をとっている部分

○: 基質と結合または接触しているアミノ酸残基

第1図 リゾチームのアミノ酸配列順序³⁵⁾

陰影はジ-N-アセチルキトビオスによる電子密度の増加の部分

第2図 リゾチーム阻害剤複合体のX線解析によるモデル³⁴⁾

第3図 リゾチーム分子の立体構造の模式図³⁵⁾

ごとくであって^{1),2)}, 1分子あたり4個の-S-S-結合を有し、図中の黒い線はヘリックス構造の部分を示す。この酵素は細菌の細胞膜を溶解する作用があるが、また細胞膜の構造と類似するジ-N-アセチルキトビオースは、拮抗的阻害剤としてリゾチーム分子と結合する。第2図はリゾチーム-キトビオース複合物について6Å分解能のX線解析よりの電子密度分布を基にして得られたモデル³⁴⁾である。リゾチームについてはすでに2Å分解能のX線解析によって電子密度分布³⁵⁾が調べられているので、両方を比較することによってキトビオースの存在による電子密度の増加した部分を知ることができる。したがってキトビオースのリゾチーム分子内における位置がわかる。またリゾチーム分子の電子密度分布とリゾチームの1次構造より、リゾチーム分子の立体構造が推定されている(第3図)。さらにキトビオースがリゾチーム分子中のどのアミノ酸残基と結合あるいは接触しているかを知ることでもできる(第1図)。従来リゾチームの活性部位を明らかにするために、化学修飾の方法を用い、N末端より62番目³⁶⁾および108番目³⁷⁾のトリプトファン残基が活性に重要な役割を果たすと報告されていたが、X線解析の結果によってもリゾチームとキトビオースとが結合している部位には、3個のトリプトファン(N末端より62, 63, 108番目)が存在しており化学修飾の結果を支持している。リゾチーム分子中には1個のヒスチジン残基があり、光酸化の実験より活性に必要なアミノ酸残基と考えられていたが、X線の解析結果は、ヒスチジン残基が、キトビオースと接触していないので活性に無関係と推論することができる。しかしX線解析で得られる結果は、酵素の結晶状態の構造であり、実際に反応を触媒

する溶液状態において、どのような構造をしているのかについては現在の段階ではわかっていない。ただ結晶状態と溶液状態であり差がないという結果がミオグロビンについて得られている³⁸⁾。いずれにせよ酵素分子の高次構造を研究するためにX線解析法は有力な手段であり、酵素分子の主鎖の構造や高次構造を保持している側鎖の存在状態について有力な資料を提供する。

このほか酵素-基質複合体のX線解析は、肝臓のアルコール脱水素酵素についても始められている³⁹⁾。また酵素だけのX線による立体構造の解析はリボスクレアーゼ⁴⁰⁾、キモトリプシンノーゲン⁴¹⁾などについて発表されつつある。

3. 高次構造とアミノ酸残基の状態

酵素分子内におけるアミノ酸残基の状態が注目され始めたのは比較的近年のことである。各種の酵素について1次構造が決定され、また2次構造に関してもそのヘリックス含量が測定できる現在、残された問題は高次構造に関連した問題である。高次構造とはそれを保持しているアミノ酸残基の側鎖間の相互作用、さらにその結果生ずるそれぞれの残基の状態であり、酵素分子がその活性を示すのに重要な役割を果たす。

しからばいかなる状態が考えられるであろうか。まず側鎖間の相互作用に着目すれば、結合状態(bound state)にあるものと遊離状態(free state)のものがある。結合の性質には、親水性側鎖間における水素結合(hydrogen bond)と疎水性側鎖間における疎水性結合(hydrophobic bond)とがある。次に酵素分子中における残基の位置に着目すれば、分子の表面に存在する露出状態(exposed state)の残基と分子内部にある埋没状態(buried state)の残基とが考えられる。また酵素分子の活性部位に存在するアミノ酸残基、特にその中で吸着部位として働く残基は基質分子との結合により遊離状態より遮へい状態(masked state)に移行するであろう。

以上のようなアミノ酸残基の異なった状態を識別定量する方法として、1) 紫外部における酵素の吸収帯の変化を利用する方法がある^{42),43)}。すなわち、チロシン、トリプトファン、フェニルアラニン残基の状態の相違に基く、わずかな紫外部吸収帯の変化を測定する方法⁴⁴⁾、およびチロシン残基のフェノール性OH基の解離速度とpK値をその解離によるスペクトル変化より測定する方法である。2) 最近開発された状態識別試薬を用いる方法である^{42),45)}。ある化学試薬が特定のアミノ酸残基と反応して、そのアミノ酸残基と結合するか、その側鎖の化学構造を変化せしめることができ、しかもその試薬の反応性が適度であって、遊離または露出状態のアミノ酸残基とのみ反応すれば、かかる試薬によって状態を異にする残基を定量することができる。また反応した残基の1次構

造上の位置も決定できる。このような目的にかなう状態識別試薬として、チロシン残基に対してフッ化シアヌル (CyF)⁴⁶⁾、ヒスチジン残基にジアゾ-1-H-テトラゾール (DHT)⁴⁷⁾、トリプトファン残基に H₂O₂-ジオキサン⁴⁸⁾、アルギニン残基にグリオキサール (GAL)⁴⁹⁾ アミノ基について、 β -ナフトキノ-4-スルホン酸 (NQS)⁵⁰⁾ および、クロロフロロキノ (CFQ)⁵¹⁾ が開発された。

3-1. 酵素分子中のアミノ酸残基の状態

上述の状態識別試薬を種々の酵素に適用してアミノ酸残基の状態を調べた結果を第 2, 3 表に示す。なお、チロシン残基については状態識別試薬 CyF による方法以外にチロシン残基の OH 基の解離に基づくスペクトルの変化より、各種状態に分類した結果を示す。表中 n_t は酵素 1 分子中に存在する残基の総数を、 n は各状態の残基数を示す。 C_m は識別試薬との反応を完結するに要する最低の試薬濃度を mM で表わしている。たとえばリゾチーム分子の 3 個のチロシン残基のうち、2 残基は速イオン化型でしかも、CyF を反応するが、残りの 1 個は高い pK 値を示し、しかもイオン化に時間を要する。またこの残基は CyF と反応しない。このことは全 3 個のチロシン残基のうち 1 個はなんらかの結合状態または埋没状態にあると思われる。またヒスチジン残基の 1 個は C_m の値が異常に大きく多分結合状態にあると思われる。トリプトファン残基は全 6 個のうち 5 個がまず酸化され、次に残りの 1 個が酸化され、2 種類の反応性を異にするトリプトファン残基が存在する。またアミノ基については NQS と CFQ でその反応性の程度が異なり、

全 7 個のうち NQS では 3 個 CFQ で 4 個が試薬と反応せず、非反応型アミノ基である。

リボヌクレアーゼ、キモトリプシンノーゲン、キモトリプシン、トリプシンノーゲン、トリプシンについてはそれぞれ第 2, 3 表を参照されたい。これらの方法による高次構造の研究は酵素のみに限らず、生体内の重要なタンパク質、たとえばヘモグロビン、チトクローム、インシュリンなどの高次構造の研究にも適応され重要な結果を得ることができる。たとえばチトクローム c のヘム鉄に配位するアミノ酸残基がヒスチジン残基である⁵⁷⁾。インシュリン分子中の全 4 個のチロシン残基のうち CyF 非反応型は 1 個存在し⁴⁶⁾、その 1 次構造上の位置が決定された。そしてこの結合型チロシン残基はアルギニン残基およびリジン残基と水素結合対を形成している^{50), 58)}。

3-2. チモーゲン活性化に伴うアミノ酸残基の状態変化

一般にタンパク分解酵素は生体内で前駆体の形で生成され、これが構造変化を受けて活性化されるが、この際の 1 次構造の変化は僅少である。たとえば α -キモトリプシンはキモトリプシンノーゲンから Ser-Arg, Thr-Asp なる 2 個のジペプチドが取れたものに相当し、トリプシンはトリプシンノーゲンからその N 末端より 6 個のアミノ酸よりなるペプチドが切り取られたものに相当する。このように 1 次構造の差異は僅少であるが、一方は酵素活性が皆無であり、他方は活性を有する。このことは活性化に際して単に 1 次構造のみならず高次構造も大きく変化してこれが活性発現に重要な役割を果たしていること

第 2 表 リゾチーム、リボヌクレアーゼ分子中のアミノ酸残基の状態

Enzyme	Residue	n_t	n (状態特性)	文 献
Lysozyme	Tyr	3	2 (pK=10.5, 速イオン化型, CyF 反応型)	43)
			1 (pK=12.8, 遅イオン化型, CyF 非反応型)	46)
	His	1	1 ($C_m=6$)	47)
	Try	6	5 ($C_m=5$), 1 ($C_m=10$)	48)
	Arg	11	11 ($C_m=40$)	49)
	Amino 基	7	4 ($C_m=3$, NQS 反応型)	50)
			3 (NQS 非反応型)	
			3 ($C_m=1.3$, CFQ 反応型)	51)
			4 (CFQ 非反応型)	
Ribonuclease	Tyr	6	3 (速イオン化型)	52)
			3 (遅イオン化型)	
	His	4	2 ($C_m=2$)	53)
			1 ($C_m=4$)	
			1 ($C_m=6$)	
	Amino 基	11	7 ($C_m=4$, NQS 反応型)	50)
			4 (NQS 非反応型)	
			7 ($C_m=1$, CFQ 反応型)	51)
			4 (CFQ 非反応型)	

C_m は各識別試薬との反応を完結するに要する最低濃度を mM にて表わす。 n_t は残基総数を、 n は各状態の残基数を示す。

を示している。高次構造の変化からは当然アミノ酸残基の状態変化が期待される。ここではキモトリプシノーゲンおよびトリプシノーゲンが活性化される際のアミノ酸残基の状態変化について述べる^{47), 49), 54), 55)}。キモトリプシノーゲン分子には7個のトリプトファン残基が存在する。これに H₂O₂-ジオキサンを作用させると最初5個の残基が反応しつづいて1個、さらに1個と含まれている7個の残基がすべて反応する。すなわち、キモトリプシノーゲン分子中のトリプトファン残基は三つの異なった状態で存在することがわかる。α-キモトリプシンの場合には2段目まではキモトリプシノーゲンと同一であるが、残りの1個のトリプトファン残基は反応しない。このことは活性化に際して1個のトリプトファン残基の状態変化が起こったことを示している。またキモトリプシノーゲンに含まれる2個のヒスチジン残基は DHT 試薬に対し反応性が小であるが活性化により、2個のヒスチジン残基はともに反応性が大きくなり、遊離の状態に近づいたと結論される。次のチロシン残基についてはキモトリプシノーゲンの4個のチロシン残基は第3表に示すようにそれぞれイオン化の性質を異にする。すなわち、速イオン化型でそれぞれ10.7と12.4なるイオン化の pK

値を有する2個、遅イオン化型の1個、全くイオン化しない1個とである。これらの残基は活性化によっていっそう遊離の状態へ近づく。α-キモトリプシンについて CyF との反応を調べたところ速イオン化型が反応型で残りの2個が非反応型である。以上の結果を総合すると1個のトリプトファン残基が活性化によりいっそう結合状態へ近づくが、ヒスチジン残基、チロシン残基はその大部分がいっそう遊離の状態へ近づくと結論される。

トリプシノーゲンからトリプシンへの活性化に際しては第3表より明らかなように、少なくとも1個のトリプトファン残基とヒスチジン残基がいっそう遊離の状態へと変化するが、特に顕著な変化はチロシン残基に見られる。すなわち、トリプシノーゲンは4個の速イオン化型、6個が遅イオン化型のチロシン残基を有するが、遅イオン化型の中の2個が活性化によって速イオン化型に変化している。

3.3. 基質または阻害剤共存下における酵素のアミノ酸残基の状態⁵⁵⁾

α-キモトリプシンの4個のチロシン残基のうち2個は CyF 反応型である。これに対して α-キモトリプシンの基質であるベンゾイルアルギニンメチルエステルを

第3表 α-キモトリプシン (CT), トリプシン (Tr), およびその前駆体, キモトリプシノーゲン(CTg), トリプシノーゲン (Trg) のアミノ酸残基の状態

Residue	Enzyme	n_i	n (状 態 特 性)	文 献
Try	CTg	7	5 (Cm=1.4), 1 (Cm=3.3), 1 (Cm=4.8)	48)
	CT	7	5 (Cm=1.6), 1 (Cm=3.3), 1 (非反応型)	
	Trg	4	2 (Cm=1.4), 1 (Cm=4.0), 1 (非反応型)	
	Tr	4	2 (Cm=0.8), 1 (Cm=4.0), 1 (非反応型)	
His	CTg	2	1 (Cm=3), 1 (Cm>7)	47)
	CT	2	1 (Cm=3), 1 (Cm=6)	
	Trg	3	2 (Cm=3), 1 (Cm=5)	
	Tr	3	3 (Cm=2.5)	
Tyr	CTg	4	1 (pK=10.7 速イオン化), 1 (pK=12.4 速イオン化)	54)
			1 (pK>13, 遅イオン化), 1 (非イオン化)	
	CT	4	1 (pK=10.2, 速イオン化, CyF 反応型)	54)
			1 (pK=11.3, 速イオン化, CyF 反応型)	55)
			1 (pK=12.5, 遅イオン化, CyF 非反応型)	
			1 (非イオン化, CyF 非反応型)	
	Trg	10	4 (pK=10.4, 速イオン化), 4 (pK>11.5 遅イオン化)	56)
			2 (遅イオン化)	
	Tr	10	6 (pK=10.0, 速イオン化, CyF 反応型)	54)
			4 (pK=10.8, 遅イオン化, CyF 非反応型)	64)
Amino 基	CTg	15	13 (Cm=7, NQS 反応型), 2 (NQS 非反応型)	50)
			8 (Cm=1.0, CFQ 反応型), 7 (CFQ 非反応型)	51)
	CT	17	14 (Cm=7, NQS 反応型), 3 (NQS 非反応型)	
			10 (Cm=1.3, CFQ 反応型), 7 (CFQ 非反応型)	

Cm は各識別試薬との反応を完結するに要する最低濃度を mM にて表わす。 n_i は残基総数を、 n は各状態の残基数を示す。

共存させると、このうち1個のチロシン残基の反応性が弱められる。これは α -キモトリプシンの活性部位に1個のチロシン残基が存在しており、このチロシン残基が酵素-基質複合体の形成に関与したために CyF に対する反応性が弱められたものと考えられる。DIP-キモトリプシンのチロシン残基と CyF との反応は基質共存下の α -キモトリプシンの場合と全く同様で、このことは2個の反応型チロシン残基のうち1個が DIP 化によって基質共存下でみられた状態と同一の反応しにくい状態に変化したことを示している。 α -キモトリプシンの2個のヒスチジン残基の状態も、7個のトリプトファン残基の状態も基質の共存によって影響を受けない。さらに α -キモトリプシンの17個のアミノ基は基質共存、非共存にかかわらずそのうち14個が NQS と反応した10個 CFQ と反応する。しかし α -キモトリプシンを DIP 化するとチロシン残基以外にヒスチジン、トリプトファン残基およびアミノ基のあるものが状態変化を受ける。したがって α -キモトリプシン分子は DIP 化により、基質共存による以上の大きな高次構造の変化を受けていると考えられる。

4. 高次構造と活性部位

酵素が強酸、強アルカリ、有機溶剤、重金属、グアニジン、界面活性剤、熱、紫外線などの作用を受けると失活し、いわゆる変性 (denaturation) を受けた状態になる。尿素、グアニジンは酵素分子中の水素結合対を切断し、界面活性剤は疎水結合を破壊する。また、紫外線は -S-S- 結合を切断し、さらにトリプトファンなどのアミノ酸残基を光分解する。このように変性した酵素はその変性方法によって異なるが一般に高次構造が変化を受け、活性部位近傍のアミノ酸残基は秩序正しい立体的配置から無秩序な状態に変化する。酵素はこのようにその活性を保持するには一定の高次構造を保つことが必要とされるが、前述のように酵素と基質が共存し触媒作用を営むとき、あるいは酵素前駆体より活性化される場合には活性部位近傍のアミノ酸残基の状態がその本来の機能を発揮するに適した状態へと変化する。酵素の活性部位につ

イタリックはトリプシン、() はキモトリプシン、その他は両酵素共通のアミノ酸残基、数字はトリプシン分子の N 末端よりの番号

第4図 トリプシン、 α -キモトリプシンの活性部位近傍の構造

いては多くのモデルが提案されているけれども、ここではトリプシン、キモトリプシンの場合について考察してみよう。トリプシン、キモトリプシンの活性部位近傍の1次構造を第4図に示す。(1) Asp-Ser はエステラーゼ共通の活性に直接関与するペプチドであり、両酵素は化学量論的に DFP の作用を受け、トリプシンの場合には Ser 183 が、キモトリプシンの場合には Ser 195 が DIP 化されて失活する。キモトリプシンに基質 N-アセチルニトロチロシンエチルエステルを作用させると Ser 195 の OH 基がアシル化されるので⁶¹⁾、これらのセリン残基が触媒作用に関与しているものと思われる。(2) ヒスチジンはそれ自身エステラーゼ活性を示すアミノ酸である。両酵素のヒスチジンの活性への関与は、光酸化²⁴⁾、ジニトロフェニル化^{62), 63)}、活性の pH 依存性^{25), 26)}より証明されているが、ヒスチジン残基が1個活性に関与しているか、2個関与しているか現在まだわかっていない。しかし2個のヒスチジン残基の関与の方がより多くの人人によって支持されており^{64), 65)}、これら2個のヒスチジン残基は第4図に示されているように、トリプシンでは29, 46 番目 (His 29, His 46)、キモトリプシンでは40, 57 番目 (His 40, His 57) の位置に存在し、1次構造上相対的に同じ位置にある。この事実も2個のヒスチジン残基の必要性を示しているようである。基質類似物質 TLCK, TPCK はそれぞれトリプシンの His 46⁶⁰⁾、キモトリプシンの His 57^{60), 65)}に化学量論的に反応し、酵素を失活せしめるので、このヒスチジン残基の活性への関与は疑いないようである。両酵素のヒスチジン残基はそれぞれ Ser 183 (トリプシン)、Ser 195 (キモトリプシン) と水素結合対を形成しているものと考えられている^{60)~63)}。(3) トリプシン分子中のチロシン残基については第3表に示されたように、合計10個のチロシン残基のうち4個が結合状態にあり、この4個の結合型チロシン残基のうち少なくとも1個が活性に重要な役割を果たしていることがアルカリによるチロシンの解離曲線および失活よりまた CyF の実験より推論されている^{44), 65)}。活性部位近傍には Tyr 28, Tyr 48 が存在し、そのいずれかが活性に関与するチロシン残基であることが考えられる。しかも次のような理由により結合状態にあることが推定される。すなわち、Tyr 28 は His 29 の隣りに存在し、-Tyr-His-なるペプチドを形成しており、この His 29 は (2) で示したように Ser 183 と水素結合対をなしていることを考え合わせると Tyr 28 が Ser 183 の隣りの Asp 182 と水素結合対を形成していると考えることができ、さらにこのように仮定することにより、トリプシンおよびキモトリプシンの特異性を決定しているアミノ酸残基の問題も都合よく説明することができる。すなわち、チロシン残基はアスパラギン酸またはグルタミン酸残基のように酸性アミノ酸残基だけではなく、ア

ルギニンまたはリジンのような塩基性の残基を相手としても水素結合をすることが最近わかってきている^{50), 53)}。したがってトリプシンの Tyr 28 が基質分子が近づくまでは Asp 182 と水素結合をしていても、基質タンパク分子が近づくと、その塩基残基を吸着し、その際、隣りに存在する His 29…Ser 183 なる水素結合対により、その隣りのペプチド結合が加水分解されるとすると、特異性も含めてトリプシンの酵素作用を説明することができる。さらに都合のよいことには、同じ相対位置にあるアミノ酸がキモトリプシンの特異性をも決定していると仮定してもよさそうである。すなわち、キモトリプシンの場合には Tyr 28 の代わりに Phe 39 が存在している。フェニルアラニン残基はその芳香性より考えて、同一芳香性を有するフェニルアラニン、チロシン、またはトリプトファン残基をより優先的に吸着するであろう。キモトリプシンが示す芳香性残基の隣りを加水分解するという特異性もこのようにして一応説明が可能である。かかる仮定なり説明に対する実証についてはまだ十分とは考えられないが、今後酵素の活性およびその高度の特異性がかかるアミノ酸残基の側鎖間の水素結合、疎水結合、芳香性結合などの相互作用と、それによって形成される高次の立体構造に基因することの一つの証左として今後の発展が期待される問題と思われる。従来はX線解析のみが高次構造解決の鍵のように考えられてきたけれども、同解析としても固体状態の構造に関する知識を与えてくれるとはいうものの、溶液中特に基質共存下における構造に関しては別の手段なり角度から検討してみることが必要とされる。その一つの糸口として本講ではアミノ酸の状態に焦点を合わせて紹介を試みたつもりである。合成高分子領域の専門家が1人でも生体高分子の精密巧妙なる仕組に興味を持たれる一助となれば幸いである。

文 献

- 1) R. E. Canfield, C. B. Anfinsen : *J. Biol. Chem.*, **238**, 2684 (1963)
- 2) R. E. Canfield : *J. Biol. Chem.*, **238**, 2698 (1963)
- 3) D. G. Smyth, W. H. Stein, S. Moore : *J. Biol. Chem.*, **238**, 227 (1963)
- 4) K. A. Walsh, H. Neurath : *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **52**, 884 (1965)
- 5) D. L. Kauffmann : *J. Mol. Biol.*, **12**, 929 (1965)
- 6) B. S. Hartley : *Nature*, **201**, 1284 (1964)
- 7) B. Keil, Z. Prusik, F. Sorm : *Biochim. Biophys. Acta.*, **78**, 559 (1963)
- 8) B. S. Hartley : *Proc. 5th Internat. Congress, Biochem., Moscow, Symp. IV*
- 9) G. H. Dixon, D. L. Kauffmann, H. Neurath : *J. Biol. Chem.*, **233**, 1373 (1958)
- 10) J. A. Gladner, K. Laki : *J. Am. Chem. Soc.*, **80**, 1263 (1958)
- 11) M. A. Naughton, F. Sangar, B. S. Hartley, D. C. Shaw : *Biochem. J.*, **77**, 149 (1960)
- 12) H. S. Jansz, D. Brons, M. G. P. J. Warringa : *Biochim. Biophys. Acta.*, **34**, 573 (1959)
- 13) N. K. Schaffer, C. S. May, W. H. Summerson : *J. Biol. Chem.*, **206**, 201 (1954)
- 14) H. S. Janz, C. H. Posthumus, J. A. Cohen : *Biochim. Biophys. Acta.*, **33**, 396 (1959)
- 15) F. Sangar, D. C. Shaw : *Nature*, **187**, 872 (1960)
- 16) F. Sangar : *Proc. Chem. Soc.*, 76 (1963)
- 17) C. Meistein, F. Sangar : *Biochem. J.*, **79**, 456 (1961)
- 18) E. H. Fischer, D. J. Graves, E. R. S. Chrittenden, E. G. Krebs : *J. Biol. Chem.*, **234**, 1698 (1959)
- 19) J. H. Schwartz, A. M. Crestfield, F. Lipmann : *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **49**, 722 (1963)
- 20) A. Light, D. Frater, J. R. Kimmel, E. L. Smith : *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **52**, 1276 (1964)
- 21) R. C. Wong, I. E. Liener : *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **17**, 470 (1964)
- 22) L. W. Cunningham, A. M. Schepman : *Biochim. Biophys. Acta.*, **73**, 406 (1963)
- 23) I. Harris, B. P. Meriwether, J. H. Park : *Nature*, **197**, 154 (1963)
- 24) L. Weil, A. R. Buchert : *Arch. Biochem. Biophys.*, **46**, 266 (1953)
- 25) H. Gutfreund, J. M. Sturtevant : *Biochem. J.*, **63**, 656 (1956)
- 26) H. Gutfreund : *Trans. Faraday Soc.*, **51**, 441 (1955)
- 27) M. Mares-Guia, E. Shaw : *Fed. Proc.*, **22**, 528 (1963)
- 28) E. Shaw, M. Mares-Guia, W. Cohen : *Biochem.*, **4**, 2219 (1965)
- 29) G. Schoellmann, E. Shaw : *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **7**, 36 (1962)
- 30) G. Schellmann, E. Shaw : *Biochem.*, **2**, 252 (1963)
- 31) H. Fraenkel-Conrat : *Fed. Proc.*, **16**, 810 (1957)
- 32) R. M. Herriott : *J. Gen. Physiol.*, **45**, 57 (1962)
- 33) B. F. Erlanger, S. M. Vratsanos, N. Wassermann, A. G. Cooper : *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **23**, 243 (1966)
- 34) L. N. Johnson, D. C. Phillips : *Nature*, **206**, 761 (1965)
- 35) C. C. F. Blake, D. F. Koenig, G. A. Mair, A. C. T. North, D. C. Phillips, V. R. Sarma : *Nature*, **206**, 757 (1965)

- 36) K. Hayashi, T. Imoto, G. Funatsu, M. Funatsu: *J. Biochem.*, **58**, 227 (1965)
- 37) 浜口浩三: 生化学, **38**, 1 (1966)
- 38) J. C. Kendrew: *Brookhaven Sym. Biol.*, **15**, 216 (1962)
- 39) H. Theorell, T. Yonetani: "Structure and Activity of Enzyme", 131 (1964) Academic Press
- 40) D. Harker, J. Bello, D. R. Harris, H. H. Mills, R. Parthasarathy, E. E. De Jarnette: "Structure and Activity of Enzyme", 15 (1964) Academic Press
- 41) J. Kraut: "Structure and Activity of Enzyme" 75 (1964) Academic Press
- 42) 柴田和雄: 生化学, **37**, 381 (1965)
- 43) Y. Inada: *J. Biochem.*, **49**, 217 (1961)
- 44) Y. Inada, A. Matsushima, M. Kamata, K. Shibata: *Arch. Biochem. Biophys.*, **106**, 326 (1964)
- 45) 栗原堅三, 堀西宥夫, 柴田和雄: 蛋白質核酸酵素, **10**, 483 (1965); **10**, 759 (1965)
- 46) K. Kurihara, H. Horinishi, K. Shibata: *Biochim. Biophys. Acta.*, **74**, 678 (1963)
- 47) H. Horinishi, Y. Hachimori, K. Kurihara, K. Shibata: *Biochim. Biophys. Acta.*, **86**, 477 (1964)
- 48) Y. Hachimori, H. Horinishi, K. Kurihara, K. Shibata: *Biochem. Biophys. Acta.*, **93**, 346 (1964)
- 49) K. Nakaya, H. Horinishi, K. Shibata: *J. Biochem.*, in press
- 50) A. Matsushima, Y. Hachimori, Y. Inada, K. Shibata: *J. Biochem.*, in press
- 51) K. Nakaya, H. Horinishi, K. Shibata: *J. Biochem.*, in press
- 52) C. Tanford, J. D. Hauenstein, D. G. Rands: *J. Am. Chem. Soc.*, **77**, 6409 (1956)
- 53) H. Horinishi, O. Takenaka, K. Shibata: *Arch. Biochem. Biophys.*, **113**, 371 (1966)
- 54) Y. Inada, M. Kamata, A. Matsushima, K. Shibata: *Biochem. Biophys. Acta.*, **81**, 323 (1964)
- 55) Y. Hachimori, K. Kurihara, H. Horinishi, A. Matsushima, K. Shibata: *Biochem. Biophys. Acta.*, **105**, 167 (1965)
- 56) L. B. Smillie, C. M. Kay: *J. Biol. Chem.*, **236**, 112 (1961)
- 57) H. Horinishi, K. Kurihara, K. Shibata: *Arch. Biochem. Biophys.*, **111**, 520 (1965)
- 58) M. Aoyama, K. Kurihara, K. Shibata: *Biochem. Biophys. Acta.*, **107**, 257 (1965)
- 59) V. Tomášek, E. S. Severin, F. Šorm: *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **20**, 545 (1965)
- 60) B. Meloun, D. Pospíšilová: *Biochem. Biophys. Acta.*, **92**, 152 (1964)
- 61) Y. Shalitin, J. R. Brown: *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **24**, 817 (1966)
- 62) J. R. Whitaker, B. J. Jandorf: *J. Biol. Chem.*, **233**, 751 (1956)
- 63) V. Massey, B. S. Hartley: *Biochim. Biophys. Acta.*, **21**, 361 (1956)
- 64) M. L. Bender, F. J. Kézdy: *J. Am. Chem. Soc.*, **86**, 3704 (1964)
- 65) E. B. Ong, E. Shaw, G. Schoellmann: *J. Am. Chem. Soc.*, **86**, 1271 (1964)
- 66) P. Desnuelle, in P. D. Boyer, H. Lardy, K. Myrbäck: "The Enzymes", Vol. 4, 93 (1960), Academic Press
- 67) H. Neurath, G. H. Dixon: *Federation Proc.*, **16**, 791 (1957)
- 68) Y. Hachimori, A. Matsushima, M. Suzuki, Y. Inada, K. Shibata: *Biochim. Biophys. Acta.*, **124**, 395 (1966)

レオロジーハンドブック

高分子学会編

A 5 判
892 ページ
6,000 円

発売所 丸善株式会社

当学会編集の「レオロジーハンドブック」は会員に限り一割引でお頒ちすることができます。ご希望の方は直接学会あてにお申し込み下さい。

なお、本書に対する内容紹介は「高分子」Vol. 14, No. 162, 778 ページの書評をごらん下さい。