金属酵素の展望

中 村 隆 雄*

Metal Enzymes, A Review

Takao NAKAMURA*

Characteristics of the catalytic activity of the enzymes are discussed in relation to their structure and the nature of their cofactors including metal ions. Metal ions exhibit various and important roles in the catalytic activity of the enzymes: in the formation of the enzyme-substrate complex, in the activation of the substrate molecule and in the activation of the enzyme catalytic site as a nucleophile or an acid-base catalyst.

1. はじめに

うるし(ウルシの木の樹液)は東洋各国で有史以前から塗料または接着剤として利用されてきた。塗料としての美しさ、耐久力は抜群で、さきに発掘された中国の馬王堆の副葬品や朝鮮半島楽浪郡遺跡の出土品の中にみられる漆器は2,000年の長い間土中に埋まってもその光輝が保たれている。

漆器は英語で“japan”とよばれるほどわが国と縁が深いがこの塗膜はうるし中に含まれるウルシオールとよばれるカテコール誘導体が空気酸化して重合しさらに樹液中の蛋白質等と結びついて固化したものである。ウルシオールの化学構造は日本の真島¹⁾によってはじめて明らかにされわが国の天然物有機化学のさきがけとされている。同じ日本の吉田²⁾は1883年(明治16年)にうるし液中にウルシオールの空気酸化を触媒する蛋白性の触媒(ラッカーゼ)が存在することを始めて指摘した。吉田はその論文の中で、うるし中に含まれる触媒はアルコール不溶性冷水に可溶性の窒素を含む物質で作用時に湿気(水分)を要求すること、20℃で活性が高いが熱処理により失活することをのべている。これらの記述は酸化酵素が蛋白性のものであることを当時において実験的に明らかにした最初の記録である。のちにこの酵素は

Keilin³⁾らによってCuイオンを含むものであることが示された。純粋のラッカーゼは美しい青色を呈する。

これらの研究をさきがけとして、数多くの酵素があるいは特定の金属イオンを作用基として堅く結合しておりまたあるものはその活性をあらわすため特定の金属イオンの添加が必要であることが知られた。今日その存在が確かめられている酵素の数は1,000種またはそれ以上ともいわれているが金属イオンを結合または要求するものはそのうち1/4をこえていて、その酵素としての活性も酸化還元酵素、酸素添加酵素または種々の合成分解・基転移酵素など生物の物質代謝、エネルギー代謝のほとんどあらゆる面にわたっている、生物体の構成と活動における金属イオンの役割は酵素の触媒能だけではないがこの一面だけをとりあげても金属イオンが生物にとって如何に重要であるかが理解できる。

以下の各節においてはまず酵素の一般的な性質についてそのあらましを整理したのち酵素に含まれる金属イオンの種類、存在状態と働きについて概観したい。さらに酵素の利用の問題についてもふれる。

2. 酵 素

酵素は生物が体内にもっている、あるいは体外に分泌する触媒で、生命の活動力はすべて酵素の触媒作用に依存しているといっても過言ではない。酵素は今まで知られているものはすべて蛋白質である。普通20種類のアミノ酸からできたポリペプチドで、その配列(一次構造)は遺伝的に決定されており一定の高次構造をとって

* 大阪大学理学部生物学教室 ()

* Department of Biology, Faculty of Science, Osaka University ()

る。分子量は約 10,000~数十万であるが数百万に達するものも報告されている。ただし分子量が約5万をこえるものは相等しいまたは異なったポリペプチド鎖(サブユニット)の集合体であることが多い。また触媒活性をもったサブユニットと活性制御作用をもったサブユニットから構成されている場合もある。酵素のサブユニットは非共有性の結合で結ばれているので条件によって可逆的に解離し、それに伴って活性の促進抑制がおこる。生体内の化学反応は生体の必要に応じて促進され不必要な時は抑制されなければならないが、制御サブユニットの働きまたは可逆的なサブユニットへの解離により化学反応速度の制御がなされる。

生物体内における複雑な化学反応を円滑に進めるため一連の反応を触媒するいくつかの酵素が集合体をつくっている場合がある。ピルビン酸デヒドロゲナーゼ系は

の反応を触媒するが、これは三個の酵素反応からなっておりそれぞれの反応を触媒する3種の酵素ピルビン酸デヒドロゲナーゼ(分子量 153,000) 3分子、リポアミドデヒドロゲナーゼ(分子量 109,000) 6分子、リポ酸アセチルトランスフェラーゼ(分子量 1,980,000) 1分子が集合して経 210~250 Å の正多面体状の複合体をつくり図の反応を能率よく進めている⁴⁾。

Fig. 1 Pyruvate Dehydrogenase System.

酵素は巨大分子であるが反応を受ける物質(基質)は多くは小分子でありプロテアーゼやアミラーゼの場合の

ように基質が巨大分子のときも酵素と基質の一回の接触において作用を受ける結合は一部に限られている。そのことからわかるように酵素分子の表面には活性に特別に関係の深い部分(活性部位)が存在し、これはさらに(基質)結合部位と触媒部位とに区別される、酵素はアミノ酸のみから構成される単純蛋白質である場合と、反応に直接関与するアミノ酸以外の原子団、金属イオンをふくむ場合(複合蛋白質)とがある。前者においてはポリペプチド鎖の一部または幾つかの部分が集合して活性部位を構成する。後者の場合蛋白質に結合して触媒活性に中性的役割を担うものを作用分子族と呼ぶ、プロトヘムおよびヘム a (Fe をもつ)、ビタミン B₁₂ (Co をもつ)、

Fig. 2

フラビン, ピリドキサルリン酸, ビオチン, リボ酸などがこれで, 金属イオンとしては Fe, Cu, Zn, Mn, Mg, Co, Mo, Ca, K, Na などがある。作用分子族は電子伝達, アミノ基転移反応, 脱炭酸反応などの仲介をするもので, 共有結合により蛋白部分に結合しているものと, 水素結合などで結ばれていて可逆的解離が可能なものがある。金属イオンの場合結合が強固で酵素の抽出精製の段階においてそのまま保持されるもの (metalloenzyme) と, 結合がゆるやかで反応に際し反応液に添加して活性が発現するもの (metal-activated enzyme) とがあるがその区別は相対的で本質的なものではない。また金属イオンと酵素とが直接に結合せず, 基質が特定の金属イオンとキレートをつくって酵素と結合してはじめて酵素の作用を受ける場合がある。ここではこれらを全部含めて広義の金属酵素と呼ぶことにする。このほかに α -アミラーゼの Ca^{2+} イオンの如く酵素分子の安定化に必要と考えられる場合もあるがこのようなものはここでは除外する。

酵素は特定の基質にのみ作用し特定の反応だけを触媒する。この性質を酵素の特異性とよんでいる。ウレアーゼは尿素のみに作用しアセトアミド, オキサミド, グアニジン等の類似物質には作用せず尿素の加水分解のみを触媒する。グルコースオキシダーゼによる D-グルコースの酸化は β -D-グルコース, α -D-グルコースに対する活性比が 100:0.64 であって立体特異性を有するといわれる。L-アミノ酸オキシダーゼは L-アミノ酸の酸化を, D-アミノ酸オキシダーゼは D-アミノ酸の酸化を触媒するので光学特異性を有するといわれる。酵素と基質の間には立体構造的な適合により多数の水素結合, フェンデルワールス結合, 疎水性相互作用をふくむ結合が形成される結果種々の特異性が発現される。上記のように厳密でなくとも類似構造をもつ基質に対し段階的に異なった活性を示すことも多い (ペプチダーゼ, プロテイナーゼの相対特異性) おなじ L-リシンに働いても反応特異性により酵素によってそこに起こる反応は異なる。たとえば

L-アミノ酸オキシダーゼによって

リシンモノオキシゲナーゼによって

リシンデカルボキシラーゼによって

リシンラセマーゼによって

酵素反応の特異性を決定するものは活性中心を構成するアミノ酸残基の種類とその立体構造である。複合蛋白酵素においてもたとえば L-アミノ酸オキシダーゼ, D-アミノ酸オキシダーゼ, リシンモノオキシゲナーゼはいずれも FAD (フラビンアデニンジヌクレオチド) を作用分子族として結合している。FAD の働きは電子伝達, O_2 の活性化であって基質特異性, 反応特異性をきめるのは蛋白部分の構造の違いによる。

酵素分子 (またはサブユニット) の基質結合部位は多くは 1 分子中 1 個であるから, 基質濃度が低い時は基質結合の飽和度が低く, 反応速度 (単位時間中につくられる反応生成物の量) は基質濃度にほぼ比例する。しかしある程度以上に基質濃度が高まると飽和が起こりそれ以上基質濃度を高めても反応速度は一定限界値 (最大速度) 以上には大きくならない。従って不均一触媒反応における Langmuir の吸着等温式に類似した関係式が基質濃度と反応速度の間に成立する。酵素反応速度論においてこの関係を示す式をミカエリスメンテンの式と呼ぶ。すなわち酵素を E 基質を S とすると, まず E と S から ES 複合体がつくられこれは第二の反応段階で E と P (反応生成物) に解離する。

ここで k は反応速度定数をあらわす。この式から反応の定常状態 (ある時間範囲内における基質の濃度変化の割合が充分小さくて, 反応が一定速度で進むとみなせる場合) 反応速度 v は

$$v = \frac{d[\text{P}]}{dt} = \frac{V_m[\text{S}]}{[\text{S}] + K_m}$$

であらわされる。ここで V_m は最大速度で K_m はミカエリス定数とよばれる。基質濃度が K_m に等しいとき v は $V_m/2$ となる。 K_m はその基質の酵素に対する親和度をあらわす指標とに扱われる。

多くの酵素は中性の pH で安定で活性も最高であるが中には例外的に胃液のペプシンのように酸性で安定で活性の高いものもある。活性が最高となる pH は至適 pH とよばれ, それより酸性, アルカリ性に離れると失活し, 酵素の変性が起こる。酵素の反応速度は一般の化学反応と同じく温度を高くすれば促進されるがある程度 (40~50°C) 以上高温では熱変性による失活がおこり反応速度は低下する。ただし好熱細菌の酵素などでは 80~90°C まで安定なものもある。酵素反応は基質アナログにより阻害されまた酵素の化学修飾により失活や反応特異性の変化がおこる。金属酵素においては特に金属イオンと特

異的に結合し、または金属イオンを蛋白部分から切り離してしまう試薬(青酸、アジドなど)により失活し、また Hg^{2+} イオンは金属イオンを置換して失活させることがある。これらの阻害実験の結果は、活性部位の構造、金属イオンの種類、結合様式、反応機構をしらべる上で有用である。

酵素の厳密な特異性から酵素分子の基質結合部位と基質の構造の上にはカギ穴とカギのように厳密な相補的な関係があらかじめ用意されていると想像された。これは一面において真実であるが、また基質結合によって酵素の構造にも変化がおこりペプチド鎖の高次構造の変化、酵素分子内でのアミノ酸残基の空間的な移動がひきおこされることも判明した。この構造変化により基質分子は酵素とより親密に適合する(induced fit, 誘導適合)。このような効果により基質は反応を受けやすい位置に固

定され、触媒部位の作用により電荷の局在化が起こり、求核的または求電子の攻撃を受けやすい形となって触媒反応が能率よく進行する。これらの事実は酵素および酵素基質複合体の結晶のX線解析による立体構造の解明、核磁気共鳴、電子スピン共鳴、円偏光二色性、吸光およびケイ光スペクトルなどの物理化学的な方法による研究の結果次第に明らかにされたものである。

3. 金属酵素

表1に金属酵素の例をあげる。金属酵素は数が多くその触媒能も多種多様であってここでそのすべてを網らすることはできないが、これらの例によってその作用の多様性をうかがい知ることができよう。これらを通覧して金属イオンの種類とその酵素的機能の間に規則性を見出すことは困難であるが一般的な傾向として

Table 1 Examples of Metallo- and Metal-activated Enzymes

Trivial Name	Reaction	Metal Ion (or other prosthetic group)
① Oxidoreductases		
Alcohol dehydrogenase	alcohol + NAD^+ → aldehyde + NADH	Zn
Lactate dehydrogenase	D-lactate + 2 cytochrome c(Fe^{3+}) → pyruvate + 2 cytochrome c(Fe^{2+})	Flavin(FMN), Protoheme
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	D-glyceraldehyde-3-phosphate + NAD^+ + phosphate → 1,3-diphosphoglycerate + NADH	Zn
Xanthine oxidase	xanthine + O_2 + H_2O → urate + H_2O_2	Fe, Mo, Flavin(FAD)
Succinate dehydrogenase	succinate + Coenzyme Q(CoQ) → fumarate + $CoQH_2$	Fe, Flavin(FAD)
Monoamine oxidase	monoamine + O_2 + H_2O → aldehyde + NH_3 + H_2O_2	Cu, Pyridoxalphosphate
Cytochrome oxidase	4 cytochrome c(Fe^{2+}) + O_2 → 4 cytochrome c(Fe^{3+}) + 2 H_2O	Heme a, Cu
Phenol oxidase	phenol + O_2 → quinone + H_2O	Cu
Laccase	2 <i>p</i> -diphenol + O_2 → 2 <i>p</i> -quinone + 2 H_2O	Cu
Catalase	2 H_2O_2 → 2 H_2O + O_2	Protoheme
Hydrogenase	H_2A (reduced ferredoxin=Fe protein) → H_2 + A	Fe
Superoxide dismutase	2 O_2^- → O_2 (triplet) + H_2O_2	Cu, Zn (or Mn only)
Tryptophan 2,3-dioxygenase	tryptophan + O_2 → formylkynurenine	Protoheme
Dopamine β-hydroxylase	dopamine + ascorbate + O_2 → norepinephrine + dehydroascorbate + H_2O	Cu
Cytochrome P-450-adrenodoxin (Fe-Sulfur protein)	steroid 11-β hydroxylation	Protoheme, Fe
② Transferases		
Homocysteine methyltransferase	homocysteine + N^5 methyltetrahydrofolate → methionine + tetrahydrofolate	vitamin B ₁₂
Serine hydroxymethyltransferase	glycine + 5,10-methylenetetrahydrofolate + H_2O → serine + tetrahydrofolate	Mn, Pyridoxalphosphate
Hexokinase	adenosine triphosphate(ATP) + D-hexose → adenosine diphosphate(ADP) + D-hexose-6-phosphate	Mg
NAD kinase	ATP + NAD^+ → ADP + NADP ⁺	Mg
Pyruvate kinase	ATP + pyruvate → ADP + phosphoenolpyruvate(PEP)	Mg, Mn and monovalent cation
Creatine kinase	ATP + creatine → ADP + phosphocreatine	Mg
FMN adenytransferase	ATP + FMN → FAD + pyrophosphate	Mg
Choline phosphotransferase	cytidine diphosphate(CDP) - choline + 1,2-diglyceride → cytidine monophosphate(CMP) + lecithine	Mg
Luciferase(firefly)	luciferine + ATP → AMP(adenosine monophosphate) - luciferine + pyrophosphate AMP-luciferine + O_2 → oxyluciferine + AMP + light	Mg

Trivial Name	Reaction	Metal Ion (or other prosthetic group)
Glycogenphosphorylase kinase	2 phosphorylase b + 4 ATP → phosphorylase a + 4 ADP	Ca
③ Hydrolases		
5'-Nucleotidase	5'-ribonucleotide + H ₂ O → ribonucleoside + phosphate	Mg
Carboxypeptidase A	Hydrolyses peptides, splitting off the C-terminal L-amino acid residue unless this is a basic residue or proline	Zn
Carboxypeptidase B	Hydrolyses peptides having a C-terminal lysine or arginine residues, splitting off this residue	Zn
Glycylglycine dipeptidase	glycylglycine + H ₂ O → 2 glycine	Co
Pyrophosphatase	pyrophosphate + H ₂ O → 2 phosphate	Mg
Myosin	ATP + H ₂ O → ADP + phosphate (Contraction of Muscle)	Ca, K
Na-K-ATPase	ATP + H ₂ O → ADP + phosphate (active transport of ions)	Na, K
④ Lyases		
ATP-citrate lyase	ATP + citrate + CoA → Acetyl CoA + oxalacetate + ADP + phosphate	Mg
Carbonic anhydrase	H ₂ CO ₃ → H ₂ O + CO ₂	Zn
Phosphoenolpyruvate carboxykinase	oxalacetate + inosine triphosphate (ITP) → PEP + inosine diphosphate (IDP) + CO ₂	Mn
Phosphoenolpyruvate carboxylase	oxalacetate + phosphate → PEP + CO ₂ + H ₂ O	Mn
Oxalacetate decarboxylase	oxalacetate → pyruvate + CO ₂	Mn or Mg
Malate Synthetase	acetyl CoA + glyoxalate + H ₂ O → malate + CoA	Mg
⑤ Isomerases		
Uridinediphosphate (UDP)-glucose epimerase	UDP-glucose → UDP-galactose	Mg
Methylmalonyl CoA mutase	methylmalonyl CoA → succinyl CoA	Vitamine B ₁₂
⑥ Ligases		
Tyrosyl-t-RNA Synthetase	ATP + tyrosine + t-RNA → AMP + pyrophosphate + tyrosyl t-RNA	Mg, K
Acetyl CoA Synthetase	ATP + acetate + CoA → AMP + pyrophosphate + acetyl CoA	Mg, K
Glutamine Synthetase	ATP + L-glutamate + NH ₃ → glutamine + ADP + phosphate	Mg
Glutathione Synthetase	ATP + L-glutamate + L-cysteine → L-γ-glutamylcysteine + ADP + phosphate	Mg, K
Pyruvate carboxylase	ATP + pyruvate + CO ₂ + H ₂ O → oxalacetate + ADP + phosphate	Mg, Biotin Acetyl CoA

Fe(ヘム), Cu, Mo は酸化還元酵素, 酸素添加酵素において O₂, H₂O₂ の活性化, 電子伝達の仲介として,

Zn, Co は加水分解酵素において基質の結合と活性化に, Mg, Mn, Ca は基質 (リン酸化合物) とキレートをつくってこれを活性化し,

K⁺, NH₄⁺ は結合部位は明らかでないがリン酸化合物の関与する反応, 一部の酸化還元反応において活性化作用を示し, ビタミン B₁₂ は基転位反応の中間媒体として働いていることがわかる。もちろん金属イオンは酵素反応において単なる補助因子ではないから上記の役割のいくつかを併せもつ場合が大部分であろう。

金属イオンは遊離の状態でも弱いながら触媒作用をもっている。カタラーゼは Fe³⁺ を有するヘミンをもっているがヘミンまたは Fe³⁺ イオン単独でもある程度 H₂O₂ の分解を促進する。ただしその触媒能は Fe³⁺ : ヘミン : カタラーゼ = 1 : 3,000 : 10⁷ といわれ酵素の触媒能は桁違いに大きい。金属イオンは酵素に結合したとき単

にその触媒活性が増大されるのみでなく反応の形式も異なる。簡単な例ではアスコルビン酸の空気酸化の際遊離 Cu イオンによる触媒反応は比較的ゆるやかで O₂ から H₂O₂ が生成される。Cu イオンをもつアスコルビン酸オキシダーゼの触媒作用の下においては反応は極めて速やかで O₂ は H₂O にまで還元される。アスコルビン酸オキシダーゼのカタラーゼ作用は極めて弱いので反応の機構自体が遊離 Cu イオンによるものと異なっていることが示唆される。酸化還元以外の反応についてみると金属イオンと配位結合をつくるときリガンドは加水分解, アミノ基転移反応, アルドール縮合反応, または脱炭酸反応の促進をうけることが知られているが, 非酵素的触媒反応では基質特異性, 反応特異性は酵素の場合ほど明瞭ではない。酵素の反応機構が記述されるためにはまず次の事柄が明らかにされなければならない。それは活性部位の立体的・電子的構造および基質の結合によりそれが如何に変化するか, 最終生成物に至るまでの反応がど

のような段階から成立っているか、反応中間体の構造と各反応段階の機構、反応中間体の相互変換の速度と遷移状態分子の推定される構造、などである。

これらの事項は金属酵素に限らず一般のいかなる酵素についてもその反応機構研究における中心課題である。特に金属酵素の場合には、ある特定の反応を触媒するため特定のイオンが酵素によって選択され利用されているがその選択の基準はどのようなところにあるのであろうか。ヘモグロビン、ヘモシアニン、ヘムエリスリンなど O_2 運搬体蛋白質にみられるように、ヘム、Cu または Fe イオンはタンパクと結合して O_2 を可逆的に結合する能力をもつ。これと対応して O_2 、 H_2O_2 を結合し活性化する酵素（酸化酵素、酸素添加酵素、カタラーゼ）はヘム、Cu または Fe イオンを作用基としてもつものが多い。電子伝達の仲介として働く酵素のばあい、種々の原子価をとり得る Fe, Mo が利用されている。イオンは蛋白と結合することにより酸化還元電位が変化して電子伝達に好都合な電位をもつ。ラッカーゼは4個の Cu イオンをもっている。遊離イオンの $Cu^{2+} + e \rightleftharpoons Cu^+$ の $E^\circ = +153 \text{ mV}$ であるのに対しラッカーゼ中の Cu イオンは4個のうち1個が $E^\circ = 415 \text{ mV}$ 3個が $E^\circ = 460 \text{ mV}$ であってこれらは吸収スペクトルも異なっており O_2 の活性化と基質への電子伝達とにその役割が分担されていると考えられている⁹⁾。チトクロームオキシダーゼはヘム a と Cu, キサンチンオキシダーゼは Fe, Mo, フラビンをもち、 O_2 の活性化、基質結合、酵素分子内における電子伝達に役割の分担と協同作業が営まれているとされている。しかしくわしい機構はまだ充分に明らかにされているとはいえない。

金属イオンが酵素と基質の結合の仲介となるとき適合する金属イオンの種類はその荷電、イオン半径または配位結合の距離などによって規定されるだろう。同時に結合に伴うタンパクおよび基質の配座の構造変化も起こる (induced fit)。ヘモグロビンの場合を例にあげるとヘモグロビンのヘムの Fe は Fe^{2+} のまま $deoxy \leftrightarrow oxy$ の変化に伴って高スピン型 $\leftrightarrow$ 低スピン型に変換する。プロトヘムの相対するピロール核の N と N の間の距離は $2.01 \text{ \AA} \times 2$ でありまた Fe-N の距離は高スピン型で 2.18

$\text{\AA}$, 低スピン型で $1.99 \text{ \AA}$ とされている。従って oxy 型では Fe^{2+} はヘムの平面内に収まっているのに反し $deoxy$ 型では平面から $0.83 \text{ \AA}$ 外れていることになる。そしてこの変化は結晶の X 線解析の結果実証された⁶⁾。リガンド結合に伴って起こる金属イオンのこのようなわずかな空間的な動きはヘモグロビンのタンパク部分のペプチド鎖の動きに増幅され C 末端に近いチロシン残基の空間的移動、C 末端ヒスチジンイミダゾール基の pK 変化、さらにサブユニット間相互作用を引起していることが明らかにされている。金属酵素のばあいこのような変化がはっきり実証された例は少いが今後の研究の進歩に伴い反応中心における酵素の構造変化の詳細が明らかにされれば同様の効果が見出されることが期待され酵素の特異性、活性は蛋白部分の極めて微妙な特異的構造に由来するものであることが明らかになってゆくと思われる。

多くの酵素反応機構は一種の酸塩基触媒反応として理解されている。金属酵素において金属イオンは電子供与体または受容体として働き蛋白触媒基の求核的または求電子的攻撃能力を増強またはそれ自身が求電子試薬ともなり得る。一方基質は金属イオンとキレートをつくることによって触媒基による攻撃を受けやすい位置に固定されその構造にひずみを受ける。金属イオンの正電荷による電子の引きつけの結果たとえば基質のカルボニル基に分極化をおこし酵素触媒基の求核的攻撃を受けやすい

Fig. 3 Structure of carboxypeptidase A

W.N. Lipscombe, et. al., *Pro. N.A.S. (U.S.)*, 64, 28 (1969)

Fig. 4 Reaction mechanism of carboxypeptidase A
W.N. Lipscomb, et. al., *Pro. N.A.S. (U.S.)*
64, 28 (1969)

状態がもたらされるであろう。

図3はカルボキシペプチダーゼAの三次構造を示す。Znイオンは分子(分子量34,000)のほぼ中央に位置し、69 His*, 72 Glu, 196 Hisを配位している。基質としてグルシルチロシンを用いたときの酵素基質複合体の結晶のX線解析の結果によれば(図4)基質のフェノール側鎖が酵素の疎水性ポケットに入って酵素基質複合体ができる。この時酵素の構造に変化が起り145 Argの正電荷が基質のカルボキシルに、248 Tyrのフェノール性水酸基がペプチドのアミドNとグリシンのN末端アミノ基に、 Zn^{2+} は切断されるべきペプチドのカルボニルにそれぞれ接近し基質分子にひずみを生じさせる(図4a)。この状態で270 Gluのカルボキシル基がペプチドのCに求核的攻撃を行い245 Tyrがプロトン供与体となってペプチドは切断される(図4b)。こうしてできるアシル化酵素が加水分解されると遊離のグリシンとチロシンが生成される。

多くのキナーゼ反応やホスファターゼ反応において基

* N末端から69番目に位置するヒスチジン

Fig. 5 Binding of a divalent cation to ATP

Fig. 6 Reaction mechanism of creatine kinase
A.S. Mildvan, M. Cohn, *Adv. in Enzymol.*,
33, 1 (1970)

Fig. 7 Reaction mechanism of phosphoenolpyruvate carboxykinase
R.S. Miller, et. al., *J. Biol. Chem.*, **243**, 6030 (1968)

質 ATP は Mg^{2+} , Ca^{2+} などとキレートをつくり酵素と結合する。ATP の 3 個のリン酸基のうちキレート結合の起りやすい位置は 図 5 のように考えられているがそのうちいずれが目的の酵素反応にとって最も好都合な立体構造、電子構造変化(非局在化)をもたらすかが酵素によって選択される。クレアチンキナーゼ(図 6)のばあいまず Mg^{2+} イオンとの図のような配位が酵素-クレアチン-ATP の間につくられる。さらにリン酸基の切断移転だけがおこり第二の反応ステップにおいて金属イオンのリガンド交換と蛋白の構造変化が起って反応が完結するものと考えられている。

ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼの場合まず Mn^{2+} イオンに対してイノシンニリン酸 (IDP) ホスホエノールピルビン酸 (PEP) のリン酸基および酵素蛋白のアミノ酸残基が配位して複合体が形成される。PEP のリン原子が IDP の末端リン酸基の求核的攻撃を受けるとその効果により PEP の β 炭素が求核性をおよび、二酸化炭素と結合して生成物オキサロ酢酸を生ずる。

すべてこれらの結果は酵素および酵素-基質(アナログ)複合体結晶の X 線解析, 核磁気共鳴, 電子スピン共鳴, 円偏光二色性, ケイ光および吸収スペクトル等の物理化学的手段による解析, また化学分析, 反応速度論による反応中間体の解析によって明らかにされたものである。さらに近年における金属錯塩の構造と触媒能に関する研究の進歩は酵素反応のモデル系として金属酵素の研究に対し示唆するところが大きい。それについてはさらにこのあとの章でくわしくのべられるであろう。

4. 酵素の利用

酵素は触媒として工業にまた医薬・診断にも用いられてきた。量的にはアミラーゼ, プロテアーゼの工業的利

用が大部分を占める。利用されるのはほとんどが加水分解酵素であって金属酵素としてはカタラーゼが一部に用いられているにすぎない。診断用としては各種の試験紙が実用化されている。たとえば尿, 血中のグルコースの検出に用いられる試験紙はグルコースオキシダーゼ, ペルオキシダーゼおよび発色性のペルオキシダーゼ反応基質をしみこませて乾燥したものである。検液に浸すとグルコース・グルコースオキシダーゼ反応により H_2O_2 が発生し次にペルオキシダーゼが基質を H_2O_2 により酸化して発色させる。

酵素の工業的利用における利点は中性, 常温, 常圧において高い特異性, 活性をもつことにある。工業的利用における問題点は酵素の不溶化にあると思われる。酵素も反復使用が難しい。酵素を不溶化してカラム法またはパッチ法で基質と接触させ, 反応産物を分離回収する方法が便利である。不溶化の手段としては酵素をマイクロカプセルまたはゲル格子内に包みこむ方法もあるが高分子基質に対しては不適當である。近年酵素を適当な担体(セファロース, セルロース, アガロース, メタクリル系ポリマーなどの誘導体)に不可逆的に結合または吸着させる方法が急速に発達した。現在担体のみまたは各種の酵素を担体に結合させたものが市販されており今後利用の道が大いにひろまるものと思われる。金属酵素のうちで現在不溶化市販されているものはペルオキシダーゼ, アルコールデヒドロゲナーゼ, ペプチダーゼ等がある。このような酵素の利用には不溶化処理によって酵素の特異性が保持され長期間安定で活性低下のないことが必要である。一方酵素の特異性は適当な処理によって変化させ得るものであるから逆に酵素の修飾によって特異性を变化させたものを利用することも考えられる。将来さらに進んで希望する触媒作用をもった合成ペプチド

(人工酵素)の設計と合成も可能になるかと期待される。特に高温で高能率に反応させ得るという点で耐熱性細菌の酵素の分子設計が興味あるところである。いずれにしてもいろいろの面における酵素の実用的利用の将来の発展のためにはまず現在の生物がもっている酵素の構造と働きをさらに一そう詳細に解析し理解することが必要であろう。(昭和51年7月17日受理)

文 献

- 1) R. Majima, *Ber.*, **55**, 172 (1922)
- 2) H. Yoshida, *J. Chem. Soc.*, **43**, 473 (1983)
- 3) D. Keilin, T. Mann, *Nature*, **143**, 23 (1939)
- 4) M. Koike (参考書4)
- 5) N. Makino, Y. Ogura, *J. Biochem.*, **69**, 91 (1971); T. Nakamura, (参考書16)
- 6) M. F. Perutz, *Nature*, **228**, 726 (1970)

参考書

- 1) 酵素, M. Dixon, E.C. Webb 著, 江上ら訳 白水社 (1970)
- 2) 入門酵素化学, 西沢, 志村編, 南江堂 (1970)
- 3) 酵素反応速度論, 橋本隆著, 共立出版 (1971)
- 4) 酵素の反応機構, 殿村, 山崎, 中村編, 朝倉書店 (1971)
- 5) 酵素学の基礎, 小倉編, 朝倉書店 (1972)

- 6) 酵素と高分子触媒, 成田耕造, 今西幸男, 崎山文夫著, 化学同人 (1972)
- 7) 酵素の分子生物学, 西沢, 志村編, 南江堂 (1973)
- 8) 酵素反応とその機構, 福井, 松浦, 清水編, 講談社 (1973)
- 9) *Oxidases and Related Redox Systems*, King, Mason, Morrison ed. Univ. Park Press (1973)
- 10) 酸素添加酵素, 早石, 野崎編, 東大出版会 (1973)
- 11) *Molecular Mechanism of Oxygen Activation*, Hayaishi ed. Academic Press (1974)
- 12) 酵素触媒作用の化学 W.P. Jenks 著, 松浦ら訳 広川書店 (1974)
- 13) 酵素と触媒のはたらき M.L. Bender, L.J. Brubacher 著, 伊勢ら訳, 化学同人 (1975)
- 14) 入門酵素反応速度論, 小野宗三郎編著, 共立出版 (1975)
- 15) 現代の酵素化学, 今堀, 成田, 徳重編, 化学同人 (1975)
- 16) *Fe and Cu Proteins*, Hayaishi, Yasunobu ed. Plenum Pr. (1976)
- 17) *Enzyme Nomenclature* (1972) IUPAC, IUB, Elsevier publishing Co (Amsterdam); Supplement I, *Biochim. Biophys. Acta*, **429** 1~45 (1976)

協会誌バックナンバー 在庫表

下記バックナンバーが在庫致しておりますので、ご希望の方は代金・送料(現金書留)を添えてお申し込み下さい。第25巻以前のバックナンバーも多少在庫していますのでご照会下さい。(昭和51年11月現在)

巻 数	年 号	在 庫 月 号	定 価	送 料
第 26 巻	昭 43 年 '68	1 2 3 4 5 6 7 8 — 10 — —	400円/冊	37円/冊
27	44 '69	1 2 — 4 5 — 7 8 9 10 11 —	400 "	"
28	45 '70	1 — 3 4 — 6 — 8 9 10 11 —	400 "	"
29	46 '71	1 2 — 4 5 6 7 8 9 — 11 12	400 "	"
30	47 '72	1 2 — 4 5 6 7 8 9 10 11 12 記	500 "	"
31	48 '73	(全号欠本です)		—
32	49 '74	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12	700 "	(送料共)
33	50 '75	1 2 3 4 — 6 7 8 9 10 11 12	"	"
34	51 '76	— 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11	800 "	"

特 集 号			(定 価)	(送 料)
	27—10	「配位子化学小特集」	400円/冊	37円/冊
	記	「30周年特別記念号」(別冊)	1,000 "	41 "
	32—4	「微生物・酵素化学」	1,300 "	(送料共)
	10	「有機合成における一合成デザイナー考え方」	1,000 "	"
	33—11	「有機合成における酸・塩基の基礎と応用」	1,500 "	"
	34—5	「有機合成における炭酸ガスの利用」	"	"
	11	「有機合成における金属酵素」	"	"