



Title	化学修飾によるトリプトファンナーゼの活性部位の構造 解明
Author(s)	柿菌, 俊英
Citation	大阪大学, 1987, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/1076">https://hdl.handle.net/11094/1076</a>
rights	
Note	

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

# 化学修飾によるトリプトファナーゼの 活性部位の構造解明

1987年

柿 菌 俊 英

# 化学修飾によるトリプトファナーゼの 活性部位の構造解明

柿 蘭 俊 英

# 目 次

第1章 緒 論	1
第2章 ニトロチオシアノ安息香酸 (NTCB) の 修飾をうけるシステイン残基の機能	
第1節 緒言	7
第2節 実験材料と方法	9
第3節 結果および考察	
(1) 自然失活酵素の再活性化	12
(2) NTCBによるSH基の修飾	13
(3) NTCB修飾酵素の性質	16
(4) 酵素のスペクトル変化のpH依存性	18
第4節 要約	19
第3章 テトラニトロメタン (TNM) 修飾をうける チロシン残基の機能	
第1節 緒言	21
第2節 実験材料と方法	23
第3節 結果および考察	
(1) TNM修飾に対する補酵素アナログの保護効果	25
(2) TNM修飾酵素の補酵素に対する親和性	27
(3) TNM修飾酵素の吸収スペクトル解析	30
第4節 要約	33

第4章	1-エチル-3 (3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド (EDC) の修飾をうける カルボキシル基の機能	
第1節	緒言	34
第2節	実験材料と方法	35
第3節	結果および考察	
	(1) EDC修飾の速度論	37
	(2) EDC修飾に対する補酵素、補因子および 基質アナログの効果	40
	(3) EDC修飾失活のpH依存性	43
	(4) EDC修飾酵素の諸性質	46
第4節	要約	50
第5章	総括	52
	引用文献	55
	本論文に関係のある報告	59
	謝辞	60

# 第1章 緒 論

生体構成成分であるタンパク質のうちで生体内の様々な反応を触媒する酵素は、現在約 3,000 種類が知られている。これらの酵素の中には、その酵素作用の発現のために、非タンパク質性の因子として補酵素を要求する酵素が多数存在する。このような補酵素要求性酵素のうち、ビタミンB<sub>6</sub>の活性型であるピリドキサル 5'-リン酸（以下PLPと略する）を補酵素とするいわゆるビタミンB<sub>6</sub>酵素群は、細菌から高等動物まで広く分布し、生体内アミノ酸代謝に関与する極めて重要な一群の酵素である。ビタミンB<sub>6</sub>酵素群の特徴は、その触媒する反応の多様性にある。国際純正および応用化学連合(IUPAC)、および国際生化学連合(IUB)の提唱する酵素の六大分類では、ビタミンB<sub>6</sub>酵素群は、転移酵素、加水分解酵素、脱離酵素、異性化酵素の四主群に広がり、その種類も 100 を越えている。その多岐多方面に及ぶ反応は、生体内のアミノ酸代謝系全般を支え、アミノ基転移を始め、加水分解、脱炭酸、脱離・置換、合成、ラセミ化、アミン酸化等を含み、他の補酵素を必要とする酵素が、特定の限定された反応を触媒するのと大きく異なっている<sup>1-6)</sup>。

ビタミンB<sub>6</sub>酵素において補酵素活性を有するPLPが、その比較的単純な構造にもかかわらず、多彩な反応を触媒できるのは、次のようなPLPによる基質の活性化様式に起因する (Fig.1-1)。PLPは酵素内で

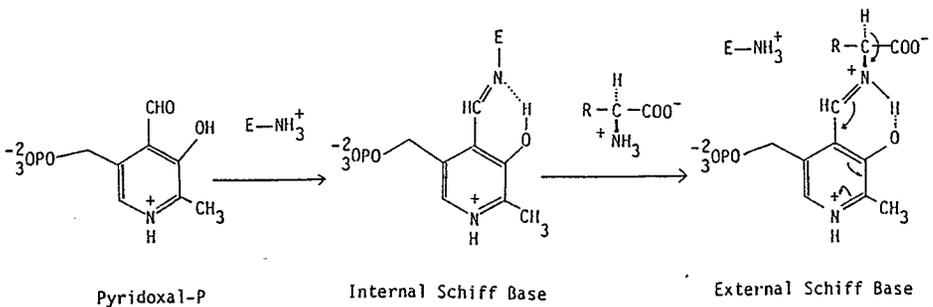


Fig.1-1 Transaldimination in vitamin B<sub>6</sub> enzyme

はその4'位のホルミル基が、特定のリジン残基のε-アミノ基と脱水縮合して、 Schiff塩基すなわち、アルドイミン結合を形成している。α-アミノ酸型の基質が存在すると、このSchiff塩基は、リジンのε-アミノ基から基質のα-アミノ基へと転移し、基質のα-アミノ基とPLPの間に新たにアルドイミン結合を生じる。すべてのビタミンB<sub>6</sub>酵素に共通したこのアルドイミン転移反応は、イミン窒素およびピリジン環窒素という二つの正電荷を帯びた窒素原子を補酵素-基質複合体内に生じる。これらの窒素原子の電子吸引性によって、基質のα-炭素周辺の電子密度が低下し、特定のσ結合が切断されて酵素反応が進行する (Fig. 1-1)。その際、C-HとC-COOHのいずれの結合が不安定化され、さらにその結合切断後、どのような方向に反応が進行するのかは、酵素タンパク質内の基質の立体配置によって規定される<sup>5,6)</sup>。このようにアミノ酸のラセミ化、アミノ基転移、脱炭酸、脱離・置換の4つの主な反応のうちいずれの反応が進行するかは、補酵素PLPではなくて、基質の配向性を規定するアポ酵素の活性域の構造に依存するのである。したがって、ビタミンB<sub>6</sub>酵素においては、基質特異性はもとより、反応特異性もアポ酵素側によって決定されることになる。

このようなビタミンB<sub>6</sub>酵素群中、脱離・置換反応を触媒する酵素には、その活性発現に一価陽イオンを要求する酵素や、α,β-脱離、β-置換あるいは合成反応を触媒する、いわゆる多機能ビタミンB<sub>6</sub>酵素が含まれる。これらの酵素群は、ビタミンB<sub>6</sub>酵素の中でも特異であり、その代表的な酵素に、トリプトファンナーゼがある。

本研究では、多機能ビタミンB<sub>6</sub>酵素のトリプトファンナーゼを材料として、その機能発現の基盤となる活性部位の構造をより明確にするため、化学修飾法により酵素の触媒活性に関与するアミノ酸残基を同定し、ついで酵素反応におけるそれらの役割を解明することを目的とした。

トリプトファンナーゼは、L-トリプトファン<sup>1</sup>のα,β-脱離だけではなく

その合成も触媒するので、L-トリプトファンの酵素法による合成や酵素によるPLPの定量法に使用される有用酵素である。この酵素の活性と構造の相関が明らかになり、酵素側の情報を含めたL-トリプトファンの合成、分解の反応機構の詳細が解明されれば、より一層有効な酵素の活用が可能となる。本研究の要約を述べる前に、すでに明らかにされ、第2章以下の研究のもととなるトリプトファンナーゼの諸性質について述べる。

トリプトファンナーゼ [EC 4.1.99.1] は、Fig. 1-2<sup>8,9)</sup> に示すように、L-トリプトファンとその類縁体を基質として、 $\alpha$ 、 $\beta$ -脱離とその逆反応および $\beta$ -置換反応を触媒する<sup>8)</sup>。

トリプトファンナーゼの起源には、大腸菌 B/1t7-A 株<sup>8)</sup>、K-12 株<sup>25, 33)</sup>、Bacillus alvei<sup>56)</sup>、Proteus rettgeri<sup>57)</sup> などの細菌があり、それぞれ単離精製されているが、本研究で用いた大腸菌 B/1t7-A 株由来のトリプトファンナーゼ<sup>8)</sup>については、分子量 55,000 のサブユニットが四量体構造をとり、サブユニットあたり 1 個の補酵素結合部位を有する。さらに補因子として、 $K^+$  または  $NH_4^+$  イオンを必要とする<sup>28)</sup>。アミノ酸組成も明らかで、474 アミノ酸残基からなる<sup>15)</sup>。基質 L-トリプトファンに対するミカエリス定数 ( $K_m$ ) は、0.33 mM、補酵素に対しては、2.0  $\mu$ M である。

L-トリプトファン分解、合成反応の中間体についても、各種の基質または基質アナログ存在下での吸収スペクトルから、各々の中間体に対し特有の吸収が帰属されている (Fig. 1-2<sup>8,9)</sup>)。すなわち、基質との複合体を形成するアルドイミン転移では、補酵素-基質のシッフ塩基に由来する 420 nm の極大吸収が現れる。ついで、 $\alpha$ -プロトンが引き抜かれると 500 nm 付近に吸収をもつキノイド中間体あるいはカルボアニオンが生成する。これは以後の  $\beta$ -脱離反応の起こらない L-アラニンなどの基質アナログを用いる際に顕著に現れる。またこの  $\alpha$ -プロトン脱離はキノ

イド中間体生成の律速段階である<sup>10)</sup>。引き続きβ位のインドールが脱離する際には、引き抜かれた同じα-プロトンが、インドールのC-3位に付加される<sup>11)</sup>。最終中間体のα-アミノアクリル酸は、492 nmに極大吸収をもつが、不安定なため容易にピルビン酸およびアンモニアへと、非酵素的に加水分解されて、α,β-脱離反応が完結する<sup>8)</sup>。

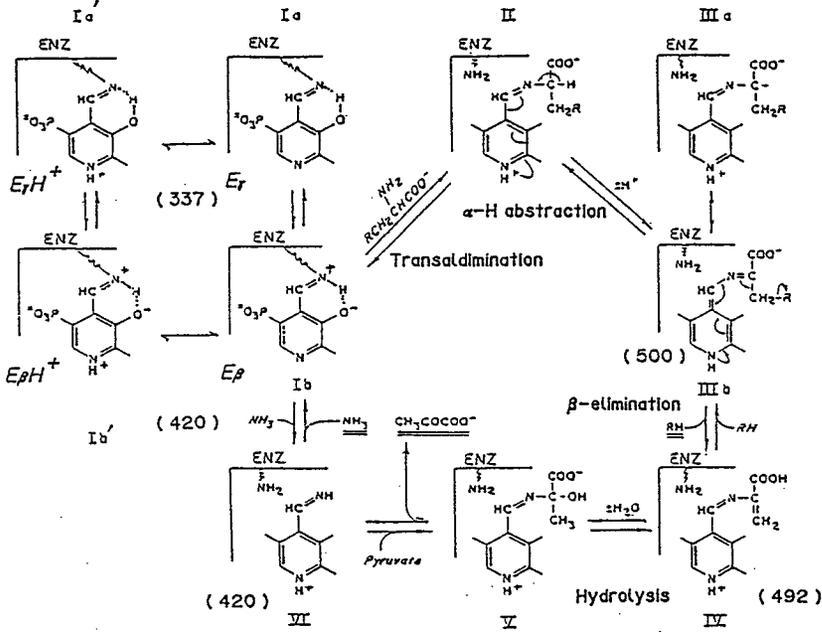


Fig.1-2 The mechanism for the reactions catalyzed by tryptophanase. The scheme represents a combination, with some modification of Snell (1975) 8) and June et al.(1981) 9). The specific absorption maxima of the reaction intermediates are shown in the parentheses.

トリプトファンナーゼの活性発現に関与するアミノ酸残基については、6種のアミノ酸残基(リジン、システイン、アルギニン、トリプトファン、ヒスチジン、チロシン)が報告されていた。それらの役割についても、システイン残基を除いて、補酵素と Schiff塩基を形成するリジン残基(Lys270)<sup>14, 15, 33)</sup>を初めとして、アルギニン残基<sup>18)</sup>は基質のα-カルボキシル基と相互作用し、チロシン残基<sup>19)</sup>およびトリプトファン残基<sup>20, 21)</sup>は補酵素との結合に関与し、ヒスチジン残基<sup>23)</sup>には基質のα-プロトンの引き抜きが推定されている。

システイン残基の化学修飾<sup>24-26)</sup>については、チオニトロベンゾイル基のかさ高い置換基の導入により酵素活性が失われることから、SH基が必須であるとされたが、その機能は不明である。

他の活性部位の構造に関する報告は、基質結合部位<sup>16,17)</sup>について、インドールのようなかさ高い疎水性基と作用する結合部位 I と、基質のアミノ酸の基本骨格と作用する結合部位 II の二つが存在すると推定されている。また補酵素の結合部位<sup>22)</sup>には、補酵素の 5'-リン酸基と静電的に結合する正電荷領域がある。

以上のような報告を筆者が総合し、トリプトファナーゼの活性域の構造を模式的に示したのが、Fig.1-3 である。この活性中心の構造に不分明な点は、まず第一にシステイン残基が活性発現に関与することの正否および、関与する場合の具体的な役割、第二に、補酵素結合部位であるチロシン残基と補酵素との相互作用の様式、第三に、X線結晶解析によりアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼの活性部位に見いだされたようなカルボキシル基が、トリプトファナーゼにも存在するのかという

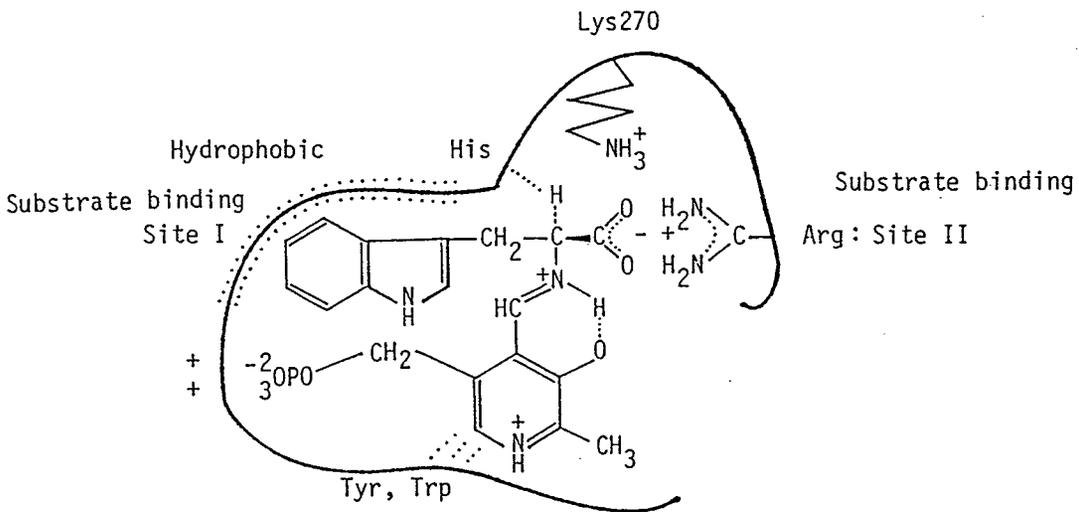


Fig.1-3 The proposed structure of the active site in tryptophanase 14-23)

点であろうと考えられ、この三点について検討を加えたのが本研究である。

まず第2章では、このシステイン残基側鎖のSH基について検討した。SH基の化学修飾の際には、導入される置換基の立体的な影響をできるだけ抑えるため、SH基修飾試薬としては、最小のシアノ基を導入するニトロチオシアノ安息香酸を用いた。その結果、活性発現に必須のSH基がモノマーあたり活性域に1-2個存在し、酵素の活性型と不活性型の相互変換に携わることを明らかにした。

次に、第3章では、補酵素の結合部位にあるとされた<sup>19)</sup>チロシンの結合様式を調べるため、テトラニトロメタンによるチロシン残基の修飾に対する補酵素アナログの保護効果を検討した。その結果、修飾をうけるチロシン残基は、PLPのピリジン環窒素と水素結合を通じて補酵素と結合することが判明した。さらに、修飾酵素の性質から、この水素結合が基質の $\alpha$ -プロトン脱離を誘起することを示唆した。

第4章では、水溶性カルボジミドを用いて化学修飾を行い、酵素の活性発現に必須のカルボキシル基が、活性域に1個存在することを示した。さらに修飾酵素が、アルドイミン転移を行えないこと、および修飾が $\alpha$ -アミノ基をもつ基質によって保護されることから、このカルボキシル基が基質の $\alpha$ -アミノ基と相互作用すると結論した。その相互作用の結果、このカルボキシル基が、基質の $\alpha$ -アミノ基の脱プロトン化を通じて、アルドイミン転移に貢献すると示唆した。

## 第2章 ニトロチオシアノ安息香酸の修飾をうけるSH基の機能

### 第1節 緒 言

システイン残基の側鎖であるSH基はアミノ酸側鎖中で最も求核性に富む官能基である。そのため、多くの酵素の活性中心に位置し、SH基を触媒活性に必要とするデヒドロゲナーゼを始め、オキシダーゼ、プロテアーゼ、アミノ酸・糖質・脂質代謝系の酵素などは、SH酵素と呼ばれる。またSH基は、そのきわめて高い反応性によって、アルキル化やアシル化、酸化、SHとS-Sの交換反応、電荷リレー系複合体形成など多種多様の化学反応を誘因する。SH基に選択的な化学修飾試薬もアミノ基修飾試薬について多数開発されており、SH基の性質やその機能への関心は高い<sup>27)</sup>。

トリプトファナーゼにおいても、ジチオビスニトロ安息香酸<sup>24)</sup> (以下DTNBとする) や N-エチルマレイミド<sup>25, 28)</sup> (以下NEMとする)、ブromopilbin酸<sup>17, 26)</sup>などのSH基特異的修飾試薬によって、酵素活性が失われることから、SH基が酵素活性に必要であるとされたが、いずれの場合においても、修飾されるSH基の役割については不明のままであった。

特にDTNBやNEMによる化学修飾では、導入される置換基がかさ高いので、修飾をうけるSH基が、活性に関与しない場合でさえ導入された置換基による立体障害の結果、酵素が活性発現に必要なコンフォメーションをとれずに、失活がもたらされた可能性がある。

ブromopilbin酸を用いる化学修飾<sup>17, 26)</sup>に関しては、補酵素による修飾に対する保護の有無について、二つの報告に違いがある。

また、保存中に失活したトリプトファナーゼは、SH基還元剤のジチ

オスレイトール（以下DTTと略する）で処理すれば、再びその活性を回復できることが経験的に知られており<sup>30)</sup>、これも、SH基が活性に関与することを示唆するが、SH基の活性への関与やその機能についていまだよくわかっていないのが現状であった。

ビタミンB<sub>6</sub>酵素には、ピリドキサルリン酸に由来する可視部-近紫外の吸収がある。トリプトファナーゼの場合、ホロ酵素には吸収スペクトル的に、2つの酵素種、337 nm 種と 420 nm 種が知られている<sup>31)</sup>。森野ら<sup>31)</sup>は、両者がpHに依存して相互に変換し合うこと、および、酵素反応の至適pH付近では、337 nm 種が優勢であることから、337 nm 種が活性型で、420 nm 種が不活性型であるとし、両者の相違は、酵素内シッフ塩基のイミン窒素のプロトン解離に由来することがモデル化合物の研究から示されている (Fig. 2-1)<sup>32)</sup>。しかし、その相互変換の機構については、そのpK<sub>a</sub>値が 7.2 であること<sup>31)</sup>以外ほとんど知られていない。

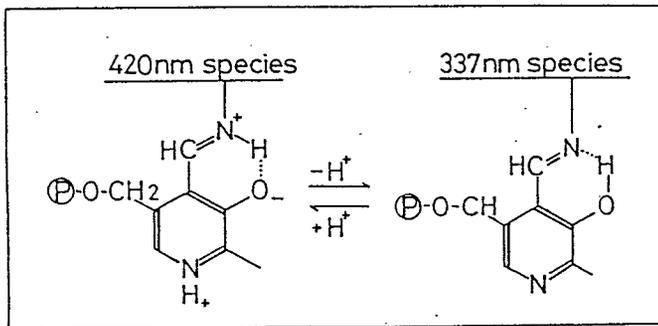


Fig.2-1 Interconversion between active enzyme species (337 nm) and inactive enzyme species (420 nm) in tryptophanase

本研究では、保存中の自然失活の原因とSH基の修飾の関連を調べることを契機に、SH基の酵素活性における機能を解明することを目的とした。その結果、自然酸化失活酵素、あるいはSH基修飾試薬のニトロチオシアノ安息香酸（以下NTCBと略する）による修飾酵素が、いず

れも不活性型の 420 nm 種を生じること、および、これらの失活酵素が S H基還元剤による再活性化をうけると、活性型の 337 nm 種を再生することを明らかにした。さらに、N T C Bによる失活反応速度の解析から、モノマーあたり1個のS H基が、酵素活性に必須であることを示し、その修飾をうけるS H基が 337 nm 種と 420 nm 種の相互変換に携わると結論した。

## 第2節 実験材料および方法

### (1) 実験材料

トリプトファナーゼは、大腸菌 B/1t7-A 株<sup>8)</sup>から調製した。培養液 1,000 ml あたり、酵母エキス 10 g, トリプトン 10 g, リン酸二カリウム 5.0 g, コハク酸ナトリウム 1.0 g, L-トリプトファン 0.5 g, インドール 0.1 g (pH 7.0) から成る培地を用い、50 l 醗酵槽(丸菱)によって、37°Cで 20 時間培養した。菌体を遠心分離後、鏡山ら<sup>14)</sup>の方法に従って、酵素を精製した。すなわち、超音波による細胞破碎に続いて、硫酸塩析、熱処理、DEAE-セルロースカラム、Sephrose 6B カラムを行った。酵素の純度が均一であることを、Laemmli<sup>33)</sup>の方法による SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって確認し、以後これを精製酵素標品として使用した。

N T C Bの調製は、Degani ら<sup>34)</sup>の方法に従った。すなわち、重炭酸カリウム 7.5 g、シアン化カリウム 2.0 g を含む 150 ml の水溶液に 3.0 g の 5,5'-ジチオビス-(2-ニトロ安息香酸)(以下 D T N Bと略する)を混合しながら添加し、30 分後 3% 臭化シアン水溶液を色が消えるまで加えた。氷酢酸でその pH を 5.0 に調整してから、窒素ガスを

12 時間吹き込んだ。6 N 塩酸でその pH を 2.3 に調整して、NTCB の白色結晶を析出させた。これを冷水にて洗浄後風乾した。

塩酸グアニジン は熱エタノールに溶解後、活性炭で処理して、再結晶させた。ドデシル硫酸ナトリウム (以下 SDS と略する) も熱エタノールに溶解後、冷却し再結晶してから用いた。

## (2) 酵素活性の定量

Newton ら<sup>12)</sup>の方法に従って、インドール生成を指標に L-トリプトファンの分解反応の活性を測定した。1 mM 補酵素ピリドキサルリン酸、1 M 2-メルカプトエタノール、1 M リン酸カリウム緩衝液 (pH 8.0) 各 0.1 ml から成る反応液 0.3 ml に酵素液 0.2 ml、トルエン 5.0 ml を添加し、37°C で 10 分間予備保温した。20 mM L-トリプトファンを 0.5 ml 添加して反応を開始し、10 分間振とうした。2 N 水酸化ナトリウム 0.2 ml を加えて酵素反応を停止し、生成したインドールをトルエンで抽出後、そのトルエン層 2.0 ml に対して Ehrlich 試薬 2.0 ml を混合して、20 分間室温に放置後、570 nm の吸光度を測定した。酵素の希釈には、5 mM 2-メルカプトエタノールを含む 0.1 M リン酸カリウム緩衝液 (pH 8.0) (以下 KPB と略する) を使用した。

## (3) 酵素濃度の定量

タンパク質の濃度は、牛血清アルブミンを標品とした Lowry ら<sup>35)</sup>の方法によるか、または吸光係数  $A^{1\%}_{278} = 7.95$ <sup>31)</sup>を用いてその紫外吸収から測定した。

#### (4) 酵素の再活性化

保存中に失活した酵素に、その 1/10 容の 4.0 mM PLP を添加し、37°C で 20 分間保温後、さらにその 1/10 容の 0.1 M DTT を加えて、37°C で 90 分間処理した<sup>30)</sup>。

#### (5) アポ酵素の調製

再活性化した酵素に、その 1/10 容の 0.2 M DL-ベニシラミン (Aldrich Chem.) を加え、37°C 20 分間の反応によって、PLP を遊離させ、Sephadex G-25 カラムにかけて脱塩した。その溶出には、0.05 M トリエタノールアミン塩酸緩衝液 (pH 8.0) (以下 TEA とする) を用い、タンパク質画分に 1/10 容の 1 M KCl を添加した。

#### (6) ホロ酵素の調製

再活性化後、あるいは NTCB 修飾後、0.1 mM PLP を含む 0.1 M KPB に対して、透析し、平衡化した。

#### (7) 酵素の NTCB 修飾

アポ酵素に対して、指示濃度になるように NTCB を加え、指示した時間、37°C で反応させた。1/10 容の 1.0 M 2-メルカプトエタノールを添加して修飾反応を停止させ、残存活性を測定した。

## (8) SH基の定量

酵素液 0.7 ml に 9.0 M 塩酸グアニジン 1.6 ml を加え、37°Cで 20 分間保温して、酵素を変性させた。その後、Ellman<sup>36)</sup>の方法に従って、未反応の遊離のSH基を、NTCB濃度の 20 倍のDTNBと 37°Cで 20 分間反応させた。これを 6.0 M 塩酸グアニジンを含む 0.1 M KPB 500 ml に対して、6 時間透析後、50 mM DTTを 0.1 ml を添加して、遊離したチオニトロ安息香酸陰イオンを 412 nm の吸収から定量した。そのモル吸光係数には、 $13,600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ を用いた。酵素濃度は、サブユニットの分子量を 55,000 として計算した。

## 第3節 結果および考察

### (1) 自然失活酵素の再活性化

4 °Cで 6 ヶ月間保存した酵素は、その 95 % の酵素活性を失っていた。この自然失活酵素の吸収スペクトルは、420 nm の不活性型が優勢であり、337 nm の活性型が劣勢であった (Fig. 2-2A)。Goldberg<sup>30)</sup>らの方法に従って、DTT処理を 37°Cで 90 分間行くと、ほぼ 100 % の活性が回復した (Fig. 2-2A, 2B)。DTT処理中、酵素の吸収スペクトルを経時的にモニターすると、不活性型の 420 nm 種が減少するにつれて、337 nm 種が増加することが判明した (Fig. 2-2A, 2B)。この二つの酵素種のモル吸光係数<sup>9)</sup> ( $\epsilon_{420} = 4,600$ ,  $\epsilon_{337} = 3,500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) にもとづいて、両者酵素種の量を算出すると、不活性型から活性型への変換は、ほぼ 1対1の対応で進行していることが明らかになった。また、酵素活性の回復につれ、モノマーあたりの遊離のSH基の個数が、3.6 個から 5.9 個へと

### 2.3 個増えることが明らかになった。

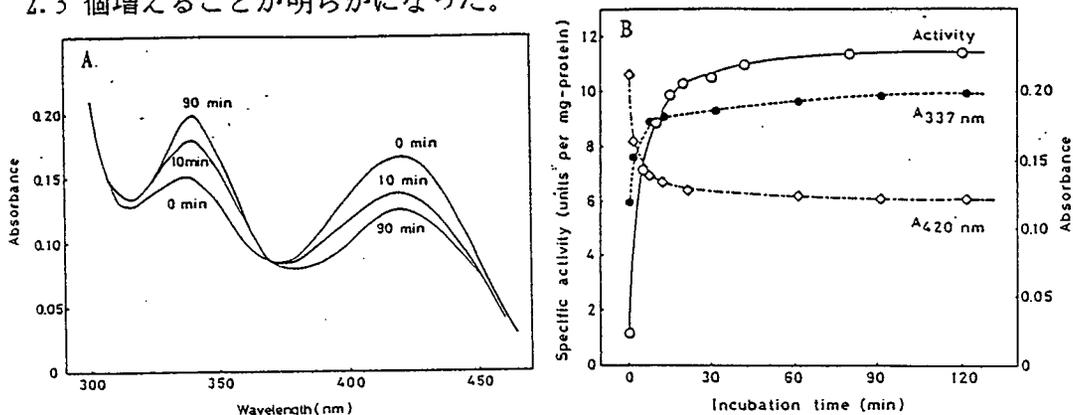


Fig.2-2 Effect of dithiothreitol treatment on the inactivated tryptophanase during storage. (A) Absorption spectra of active-site-bound pyridoxal-P. (B) Time course of enzyme activity, absorption at 337 nm and 420 nm. Apoenzyme stock solution was dialyzed at 4 °C against 0.1 M potassium phosphate buffer (pH8.0) containing 0.2 mM pyridoxal-P with two changes. To the dialysed enzyme (0.9 ml, 38.2  $\mu$ M) was added 0.1 ml of 0.1 M dithiothreitol dissolved in the dialysis buffer, and the mixture was incubated at 37 °C. At the indicated time an aliquot (10  $\mu$ l) was taken for activity measurement

このように、モノマーあたり約 2 個のSH基が回復することにより、不活性型から活性型への変換、および酵素活性の回復がみられることから、これらSH基の自然酸化によって、酵素が失活するのは、337 nmの活性型から 420 nmの不活性型を生じたためであり、また逆に、還元剤処理によってSH基が再生して酵素活性が回復するのは、420 nmの不活性型から 337 nmの活性型を生じたためであろうと推定した。

#### (2) ニトロチオシアノ安息香酸によるSH基の修飾

自然酸化による酵素の失活は穏やかではあるが、その酸化の機構が明らかではなく、さらに、自然酸化の速度や程度などの条件を設定するのは非常に困難であるので、失活の速度論を扱うことができない。そこで、

トリプトファンナーゼにおけるSH基の役割をいっそう詳細に検討することを目的として、SH基の化学修飾を行うことにした。修飾試薬としては、導入される置換基による立体障害を最小にとどめるため、SH基修飾試薬のうちでも、最小の置換基であるシアノ基を導入するニトロチオシアノ安息香酸（以下NTCBと略する）を合成し、これを用いて酵素の化学修飾を行った。

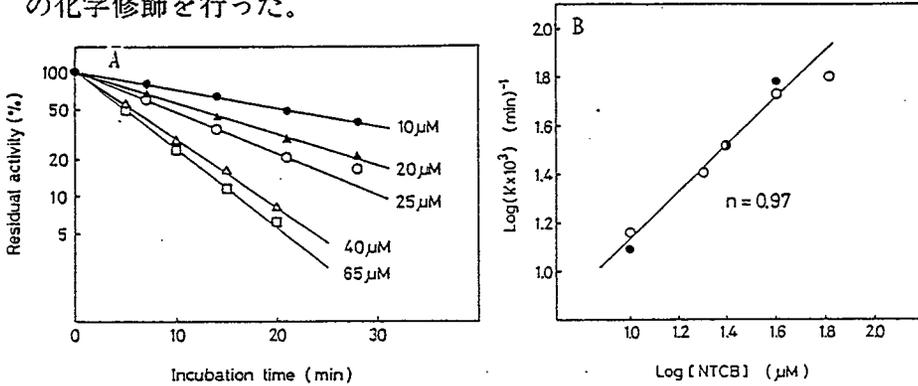
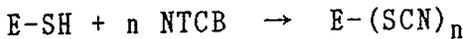


Fig.2-3 Effect of NTCB concentration (A) and kinetic determination of stoichiometry (B) of apotryptophanase inactivation. (A) After reactivation of the apo enzyme stock solution by dithiothreitol treatment in the presence of 0.4 mM pyridoxal-P, the holoenzyme was converted into the apoenzyme by DL-penicillamine treatment. Dithiothreitol was removed by gel filtration using Sephadex G-25 column. The apoenzyme, 31 μM monomer) was treated with the indicated concentration of NTCB at 37 °C. (B) The pseudo-first-order inactivation rate constant (k') was calculated from the slope of the inactivation, and was plotted against the corresponding NTCB concentration

アポ酵素をNTCBで処理すると、NTCBの濃度と修飾反応時間に依存して酵素活性が失われた (Fig. 2-3A)。NTCB修飾による失活反応は、このように酵素濃度に依らず、NTCBの濃度に依存する擬一次反応であった。NTCBと反応する酵素内のSH基の個数を求めるために、いまモノマーあたり n個のSH基がNTCBと反応して失活したと仮定すると、修飾反応は、次のように表せる。



この失活速度定数を k とすると、

$$-d[E]/dt = k [E] \times [NTCB]^n$$

NTCB濃度に依存する擬一次反応であるので、その擬一次反応速度定数を  $k'$  とすると、

$$k' = k [NTCB]^n$$

と置き換えることができる。両辺の対数をとると、次式のようになる。

$$\log k' = \log k + n \log [NTCB]$$

擬一次反応速度定数  $k'$  と NTCB濃度の両対数グラフ (Fig. 2-3B) は直線であり、その傾きが、反応するSH基の個数を与え、 $n = 0.97$ であった。したがって、NTCB修飾失活では、モノマーあたり1個のSH基がNTCB修飾を受け、その結果、酵素活性が失われたと結論した。

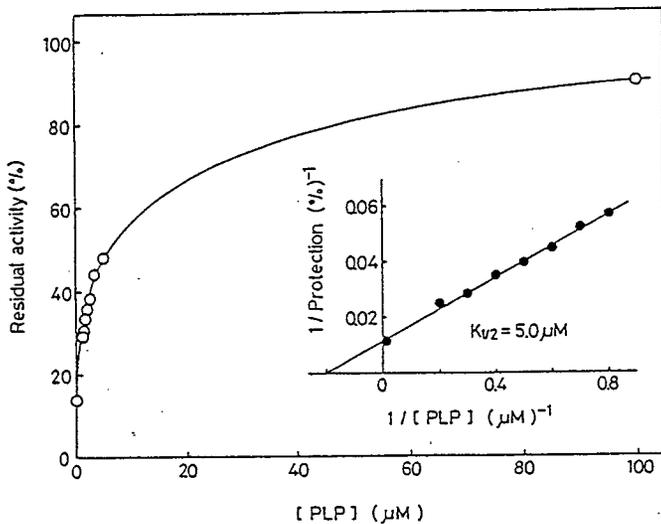


Fig.2-4 Effect of pyridoxal-P concentration on the inactivation by NTCB. Apotryptophanase (6.8  $\mu\text{M}$  monomer) was preincubated at 37  $^{\circ}\text{C}$  for 20 min with an indicated concentration of pyridoxal-P, then treated with 85  $\mu\text{M}$  NTCB for 20 min at 37  $^{\circ}\text{C}$ . Inset; protection(%) at  $x$   $\mu\text{M}$  pyridoxal-P was calculated as follows:

$$\text{Protection}(\%) = \frac{A_x - A_0}{A_{(-\text{NTCB})} - A_0} \times 100$$

where  $A_x$  is the residual activity after NTCB treatment in the presence of  $x$   $\mu\text{M}$  pyridoxal-P,  $A_0$  is that in the absence of pyridoxal-P, and  $A_{(-\text{NTCB})}$  is that in the presence of 1 mM pyridoxal-P without addition of NTCB

このNTCB修飾失活においては、補酵素の存在によって酵素が失活から保護され、その酵素の保護は、添加した補酵素の濃度に依存していた (Fig. 2-4)。50%の酵素の活性保護に必要な補酵素濃度、すなわち保護定数 $K_{1/2}$ は、 $5.0 \mu\text{M}$ と算出され、酵素反応のミカエリス定数の $K_m$ 値  $2.0 \mu\text{M}$ <sup>8)</sup>とよく一致した。したがって、NTCB修飾失活に対する補酵素による酵素の保護は、遊離のPLPに依らず、酵素の活性部位に結合したPLPに由来することが明らかになった。

### (3) NTCB修飾酵素の性質

NTCB修飾酵素は、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動における移動度、および Sepharose 6B ゲルろ過カラムにおける溶出位置が、未修飾酵素と同一であった。したがって、NTCB修飾後、酵素のサブユニット構造や立体構造に著しい変化はないと考えられる。

次にNTCB修飾後の失活酵素の補酵素に対する親和性を調べた。そ

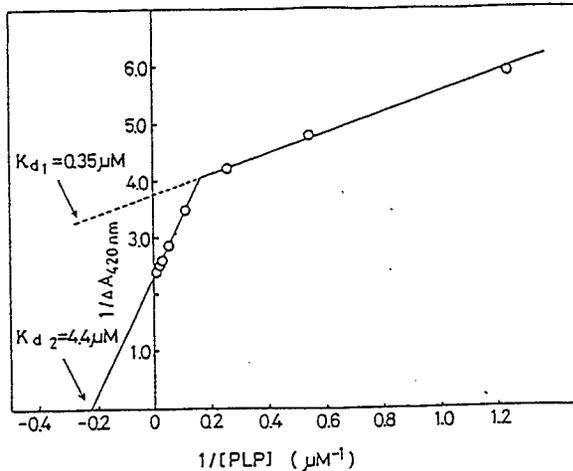


Fig. 2-5 Binding of pyridoxal-P to NTCB-inactivated apotryptophanase. Experiments were performed by a modification of the method of Kazarinoff and Snell (18) NTCB-inactivated apoenzyme ( $13.8 \mu\text{M}$  monomer) having 13.5% residual activity was used

の方法としては、NTCB修飾したアポ酵素に順次PLPを添加し、その際の420 nmの吸収増加を指標に、酵素内シッフ塩基形成量を測定した。使用したNTCB修飾酵素はその残存活性の測定により、13.5%の未修飾酵素を含むために、補酵素濃度と吸収増加に対するLineweaver-Burkのプロット(Fig.2-5)は、二相性を示した。それぞれの直線から、未修飾酵素に対して、 $0.35\mu\text{M}$ 、NTCB修飾酵素に対しては $4.4\mu\text{M}$ という補酵素の解離定数 $K_d$ 値が得られた。したがって、NTCB修飾後も、補酵素に対する親和性には大きな変化はなく、また修飾酵素の分子構造は、未修飾酵素と変わらないので、NTCB修飾がもたらした変化は、酵素の活性部位、あるいはその周辺に限定されることが明らかになった。

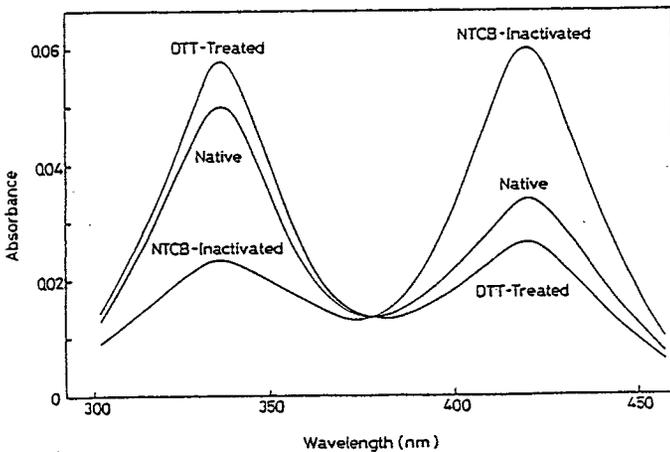


Fig.2-6 Absorption spectra of NTCB-inactivated tryptophanase before and after dithiothreitol treatment. The apoenzyme ( $18.2\mu\text{M}$  monomer) was inactivated to 20.9% residual activity by treatment with  $65\mu\text{M}$  NTCB for 20 min at  $37^\circ\text{C}$ . Absorption spectra were recorded after dialysis of the inactivated enzyme against 0.1 M potassium phosphate (pH8.0) containing 0.1 mM pyridoxal-P. The NTCB-inactivated enzyme thus obtained was further treated with 10 mM dithiothreitol for 90 min at  $37^\circ\text{C}$ , then dialyzed against 0.1 M potassium phosphate (pH8.0) containing 0.1 mM pyridoxal-P and 5 mM dithiothreitol. The absorbance was normalized to the protein concentration of 1 mg/ml

NTCB修飾酵素の吸収スペクトルは、自然失活酵素のスペクトルと

同様、420 nm 種が優勢であり、337 nm 種が劣勢であった (Fig. 2-6)。そこで、NTCB 修飾酵素を DTT によって還元して、NTCB 修飾によりシアノ化された SH 基から遊離の SH 基を再生すると、酵素活性が回復した。それと同時に、NTCB 修飾酵素の吸収スペクトルにおいても、337 nm 種が増加して再び優勢となり、420 nm 種が減少して劣勢となる逆転が起きた (Fig. 2-6)。すなわち、NTCB 修飾による SH 基のシアノ化によって、酵素活性が消失し、活性型の 337 nm 種から、不活性型の 420 nm 種が生じ、これと全く対照的に、DTT による NTCB 修飾酵素の SH 基の還元によって、酵素の活性回復と、不活性型の 420 nm 種から活性型の 337 nm 種への変換がもたらされることが判明した。

#### (4) 酵素の吸収スペクトル変化の pH 依存性

トリプトファナーゼの活性型 337 nm 種と不活性型 420 nm 種は、酵素内シッフ塩基の窒素原子のそれぞれ脱プロトン化型、およびそのプロトン化型であるとされ<sup>8, 32)</sup>、この二つの酵素種は、pH に依存して、相互に変換する。自然失活酵素は、活性な酵素と異なり、pH 8.0 において 420 nm 種から 337 nm 種へと変換できないために、不活性型の 420 nm が優勢であると考えられるので、自然失活酵素の吸収スペクトルの pH 依存性を調べ、この相互変換の  $pK_a$  値を活性な酵素の値と比較した。各 pH における 337 nm 種の増加から、その  $pK_a$  値は、再活性化酵素では 7.4 と算出され、報告値の 7.2<sup>31)</sup> とよく一致した (Fig. 2-7)。しかし、自然失活酵素では、その  $pK_a$  値は、7.9 と明らかに高い値を示した。遊離のアミノ酸とピリドキサルリン酸のイミン窒素の  $pK_a$  値は、さらに高く 10.5 付近にある<sup>32)</sup>。そのため、酵素内には、シッフ塩基のイミ

ン窒素の脱プロトン化を促進し、その  $pK_a$  値を引き下げる機構が存在すると考えられている<sup>32)</sup>。トリプトファンナーゼでは、特定のSH基が修飾されると、イミン窒素の脱プロトン化の機能が低下し、そのため、自然酸化失活酵素は高い  $pK_a$  値を示したと考えられる。

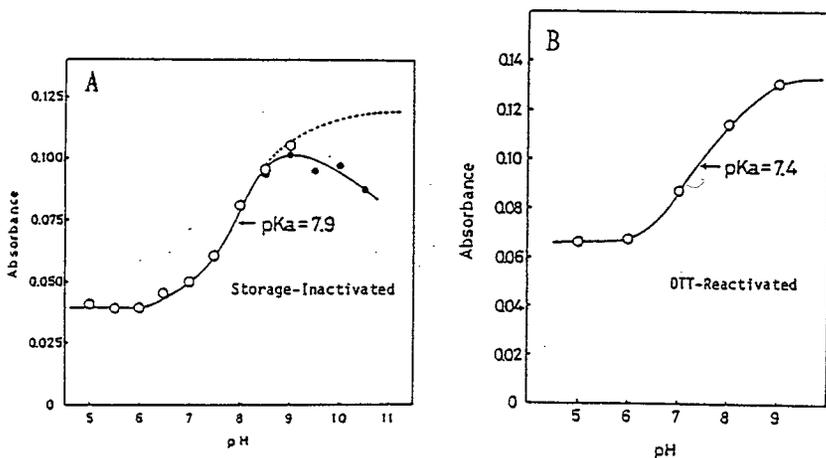


Fig.2-7 Effect of pH on the spectra of (A) storage-inactivated and (B) dithiothreitol-reactivated holotryptophanase. Buffered used were 0.1 M potassium phosphate (pH5.0-9.0), (○) or 0.1 M potassium pyrophosphate (pH8.5-10.5), (●)

以上の結果を総合すると、自然酸化およびNTCB修飾をうけるSH基は、直接的あるいは間接的に、酵素内シッフ塩基のイミン窒素の脱プロトン化に寄与し、その結果、酵素の不活性型の420 nm種から活性型の337 nm種を生成すると結論した。

#### 第4節 要約

自然酸化失活酵素、および、ニトロチオシアノ安息香酸 (NTCB) による修飾酵素において、(i) いずれの酵素も活性型の337 nm種が消失し、不活性型の420 nm種を生じること、(ii) これらの失活酵素が

S H基還元剤のDTTによるS H基の再生をうけると、不活性型の 420 nm 種が減少して、活性型の 337 nm を再び生じること (iii)自然失活酵素が、DTTによる再活性化をうけ酵素活性を回復する際、モノマーあたり2個のS H基が増加すること、(iv) NTCB修飾失活の速度論から、モノマーあたり1個のS H基が酵素の活性発現に必須であること、(v) 自然失活酵素と同様に、NTCB修飾酵素が、DTT処理によって酵素活性を再び回復することを明らかにした。したがって、自然酸化、およびNTCB修飾をうけるモノマーあたり1-2個のS H基が、酵素活性の発現に必須であり、不活性型の 420 nm 種から、活性型の 337 nm 種を生成する機構に携わると結論した。すなわち、活性型への変換におけるS H基の機能は、酵素内シッフ塩基のイミン窒素の脱プロトン化を、直接的あるいは間接的<sup>4, 19, 37)</sup>に誘因することであると示唆した。

### 第3章 テトラニトロメタン修飾をうけるチロシン残基の機能

#### 第1節 緒 言

芳香族アミノ酸のひとつであるチロシンはその側鎖に

-ヒドロキシフェニル基をもつ。そのためタンパク質内でチロシン残基は、疎水性の相互作用にくわえて、水素結合やプロトン移動、静電的な相互作用、金属イオンに対するリガンドなどの親水性の作用をも果たしうる<sup>38)</sup>。

チロシン残基に特異的な化学修飾試薬のうち、中性付近で比較的穏やかな条件の下で反応するテトラニトロメタン（以下TNMと略する）は、チロシン残基のフェノール環の

-位にニトロ基を導入する。仁平ら<sup>19)</sup>はこのTNMを用いてトリプトファナーゼを化学修飾し、次のように結論している。(i) 失活の速度論およびTNM修飾酵素のアミノ酸組成から、酵素のモノマーあたり1-2個のチロシン残基が修飾をうけ、その結果酵素活性が失われる。(ii) TNM修飾が酵素に結合したPLPの存在によって保護されること、およびTNM修飾酵素のPLPに対する親和性が著しく低下していることから、TNM修飾をうけるチロシン残基が補酵素との結合に関与する。しかし、修飾をうけるチロシン残基と補酵素PLPとの間の相互作用がどのような性質であるのかという問題は残されていた。

この章では、この問題に対して、TNM修飾をうけるチロシン残基と補酵素間の結合の性質を明らかにすることを目的とした。チロシン残基は疎水性と親水性の性質を合わせもつため、補酵素PLPとの相互作用には、次の2つの様式を考えた (Fig. 3-1)。

まず第一にチロシン残基のフェノール環と補酵素のピリジン環の間の $\pi$ 電子のスタッキング（積み重ね）による相互作用がある。これに類似

の相互作用は、フラボドキシンの結晶構造解析において、リボフラビンのフラビン部位とタンパク質側の Tyr98 が面平行にある例<sup>39)</sup>や、グルタミン酸デヒドロゲナーゼにおいて、この酵素のアロステリック因子であるGTPのプリン部位が、Tyr262 とスタッキングによる疎水性の相互作用をする例<sup>40)</sup>などに知られている。

第二の作用様式は、チロシン残基が補酵素のピリジン環チッ素（以下窒素原子をNとする）にプロトンを供与するという親水性相互作用のモデルである。Ivanovら<sup>2)</sup>の総説によれば、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼの円二色性スペクトルの解析の結果から、ピリジン環Nにプロトンを供与するのはチロシン残基である可能性が高いが、これを確かめる実験証拠はその後見いだされていない。

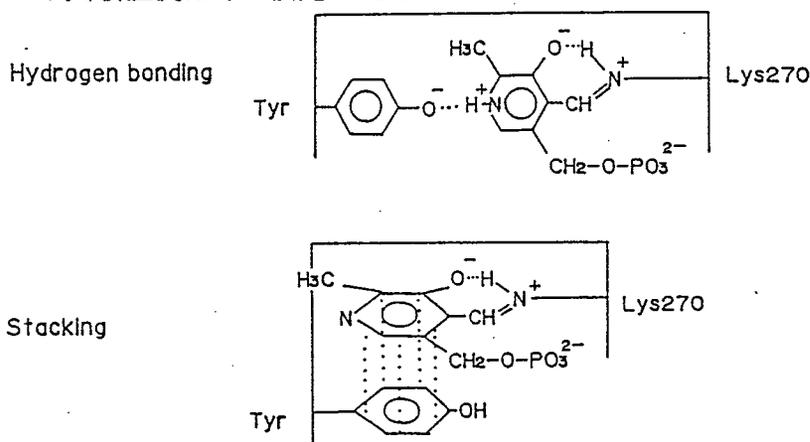


Fig.3-1 Possible interactions between pyridoxal-P and the tyrosyl residue in tryptophanase

そこで、TNM修飾をうけるチロシン残基が、これらのうちいずれの作用機作にもとずいて補酵素と相互作用するのかを検討した。次に、このチロシン残基はPLPの結合部位としてだけではなく、酵素反応に積極的に関与している可能性が考えられる。そこでTNMによるチロシン残基の修飾が、L-トリプトファン分解反応の四段階の反応、すなわちアルドイミン転移、 $\alpha$ -プロトンの引き抜き、インドールの脱離、および $\alpha$

-アミノアクリル酸の加水分解のいずれの段階を阻害して失活をもたらしているのかについても検討した。

## 第2節 実験材料および方法

### (1) 実験材料

酵素の調製は第1章第2節に述べた。TNMは丸若化学から購入した。使用に際しては分解物のニトロホルムを蒸留水で抽出除去した。またTNMの希釈には99.5%エタノールを用いた。補酵素アナログのピリドキサルリン酸N-オキシド(PLPN-オキシド)は、安藤ら<sup>41)</sup>および福井ら<sup>42)</sup>の方法に従って次の三段階で合成した。

(i) 4'-ホルミル基の保護<sup>41)</sup> ピリドキサル塩酸塩(和光純薬)8.0gをメタノール50mlに懸濁して15分間還流し冷却後炭酸水素ナトリウムを3.3g添加し90分間還流した。冷却後沈澱した塩化ナトリウムをろ別し冷メタノールで洗浄した。これを凍結乾燥してピリドキサルモノエチルアセタール(PLMMA)13.5gを合成した。

(ii) N-オキシド化<sup>41)</sup> 5gのPLMMAをテトラヒドロフラン(THF)500mlに溶かして、5.4gのm-クロロ安息香酸を含む50mlのTHFを加え0-5℃で90分間かくはんした。一夜室温で放置後、ろ過してPLMMA N-オキシドを3.2g分離した。この水溶液を塩酸酸性にし氷中で冷却して3.0gのPLN-オキシドを調製した。

(iii) 5'-リン酸化<sup>42)</sup> p-トルイジンで4'-ホルミル基を再び保護して五酸化リン-リン酸系を用いてピリドキサルN-オキシドをリン酸化した。0.05N塩酸中で60℃に10分間保温し、ポリリン酸を加水分解した。2N KOHを用いてpHを3-4に調整しPLPN-オキシドのp-トルイジン

シッフ塩基を沈澱させて回収した。これを 2N NaOH に溶解して遊離する p-トルイジンをエーテル抽出除去した。Dowex 50-X8 (H<sup>+</sup>型)カラムにかけて 390 nm の画分を集め PLP N-オキシド 0.3 g を単離した。

その純度は、tert-ブタノール：アセトン：ジエチルアミン：水=40:35:5:20 の溶媒系でセルロース薄層クロマトグラフィーを行って、R<sub>f</sub>=0.30の単一スポットを確認した。また官能基の同定において、フェノール性水酸基（塩化鉄陽性）、アルデヒド基（2,4-ジニトロフェニルヒドラジン陽性）、リン酸基（モリブデン酸アンモニウム）ならびに遊離ピリジン環N（Gibbs 試薬陰性）、アミノ基（ニンヒドリン陰性）を確認した。

## (2) TNM修飾ホロ酵素の調製

再活性化および DL-ペニシラミン処理によって調製したアポ酵素 (8.0 μM) に 1/10 容の 1M KCl を加えた後、10 倍濃度の TNMと 37 °Cで 10分間保温して修飾反応を行った。1/6 容の 1M 2-メルカプトエタノールを添加して反応を終結し、1/10 容の 4 mM PLPを添加してホロ酵素に再構成した。これを3万カットの限外ろ過 Immersible CX-30 (Millipore) を用いて濃縮し、再度 SephadexG-25 ゲルろ過カラム(φ2.0 x 16 cm)にかけて脱塩し、0.1 M KCl, 1 mM DTTを含む 0.05 M トリエタノールアミン緩衝液 (pH8.0) (以下 TEAと略する) で溶出した。この際残存活性は 8.2 %であった。

## (3) 酵素活性および補酵素・タンパク質濃度の測定

酵素活性の定量は第2章第2節に述べた。補酵素 PLPは和田ら<sup>43)</sup>の方法に従い、フェニルヒドラジンをを用いて定量した。すなわち、試料

0.85 mlに対し 100 (w/v)% トリクロロ酢酸水溶液 0.15 ml を添加して、変性したタンパク質を 3,500 rpmで 10分間遠心分離した。2 % フェニルヒドラジンを含む 10 N 硫酸 0.1 mlを、この上清液に加え室温で 10分間放置して 410 nmの吸収から標準曲線をもとにPLPを定量した。

タンパク質濃度は吸光係数  $A^{1\%}_{278} = 7.95$ <sup>44)</sup> を用いて紫外吸収を測定するか、またはタンパク質-色素結合法<sup>45)</sup> によって定量した。すなわち 0.01 % クマジーブリリアントブルー G-250 (Sigma 社), 4.7 % エタノール, 8.5 % リン酸からなるタンパク定量試薬 2.0 mlを試料 0.1 ml に加え室温で 3分間放置後 595 nm の吸収から定量した。その際の標準曲線の作成にはアポ酵素を用いた。吸収スペクトルのモニターには日立 557 型二波長分光光度計を使用した。

### 第3節 結果および考察

#### (1) TNM修飾に対する補酵素アナログの保護効果

TNM修飾をうけるチロシン残基と補酵素との間の相互作用には、前述したように2つの様式が考えられる。そこで、TNM修飾に対するビタミンB<sub>6</sub>化合物とそのアナログの保護効果を検討した。0.1 mM の補酵素アナログの存在下にTNMを 37°Cで10分間酵素に作用させ残存活性を測定した。PLPは極めて効率よく酵素を保護したが、一方、ピリドキサミンリン酸、ピリドキシンリン酸、ピリドキサールには全く保護効果がない (Table 3-1) ので、効果的な保護には、ピリジン環骨格に対して 4'-アルデヒド基および 5'-リン酸基の両方が必要であることが判明した。

一般にビタミンB<sub>6</sub>酵素では、補酵素のPLPからこれらの官能基のう

ち、いずれか一方が欠落した補酵素アナログは、本来の補酵素に比べ酵素の活性中心への結合が著しく弱い<sup>46)</sup>。したがって、この二つの官能基が修飾に対する酵素の保護に必要であるという結果は、補酵素のPLPが強固に酵素へ結合した場合にのみ、TNM修飾失活から酵素が保護されることを示している。

Table 3-1. Protective effects of vitamin B<sub>6</sub> compounds on TNM inactivation of tryptophanase

Vitamin B <sub>6</sub>	Residual activity ( % )
Pyridoxal-P	72.2
Pyridoxamine-P	3.9
Pyridoxine-P	2.1
Pyridoxal	2.3
Pyridoxamine	2.1
Pyridoxine	2.9
Pyridoxal-P N-oxide	4.5
None	2.0
Without TNM treatment	100

Apotryptophanase (1.0 μM) was incubated in 0.05 M triethanolamine-HCl (pH8.0) with a 30 molar excess of TNM for 10 min at 37 °C in the presence of various vitamin B<sub>6</sub> (0.1mM). The modification was terminated with 0.14 M of 2-mercaptoethanol, and then the reaction mixture was diluted ten times. After reconstitution with 0.1 mM of pyridoxal-P for 20 min at 37 °C, residual activity was determined.

しかし、補酵素活性のあるPLP N-オキシドの場合には、前述の他のビタミンB<sub>6</sub>化合物と異なり、トリプトファンナーゼに強固に結合することが知られている<sup>42)</sup>。すなわち、PLP N-オキシドのミカエリス定数K<sub>co</sub>値は5.0 μMとPLPの2.0 μMに対しほぼ同程度の親和性を示し、またV<sub>m</sub>値においてもPLPの場合を100%として、その65%の補酵素活性をもつ<sup>42)</sup>ことから、PLP N-オキシドは本来の補酵素PLPと同程度の結合力ならびに結合様式でトリプトファンナーゼの活性域に結合すると考えられる。ただし、ただ一点だけ異なるのは、PLP N-オキシドではピリジン環Nに酸素原子が結合しているため、PLPでは可能な

ピリジン環Nを介しての水素結合が、PLP N-オキシドでは不可能である点である。

したがって、チロシン残基との相互作用について可能な二つの様式のうち、PLP N-オキシドにはチロシン残基との間にPLPの場合と同程度の十分なスタッキング作用が期待できる一方、チロシン残基間との水素結合は、ピリジン環Nに導入された酸素原子がその妨げとなるため不可能となる (Fig. 3-1)。

このようなPLP N-オキシドの性質から、TNM修飾に対するPLP N-オキシドの保護能を検討すれば、チロシン残基と補酵素の間の相互作用の様式を区別することができる。すなわち、スタッキングが主な相互作用であれば、PLPと同程度の保護効果が予想される一方、水素結合形成が主な相互作用であれば、PLP N-オキシドには酵素を修飾から保護する能力はないと予想される。Table 3-1の結果より、PLP N-オキシドには保護能はみられず、チロシン残基と補酵素との間の相互作用は、フェノール性水酸基とピリジン環N間の水素結合であると結論した。

アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼのX線結晶解析によると、その活性域に2個のチロシン残基が存在し Tyr70 は5'-リン酸基と、Tyr225 は補酵素のフェノール性水酸基とそれぞれ水素結合することが示されている<sup>7)</sup>。しかし、トリプトファンナーゼにおいては、このような相互作用ではTNM修飾に対するPLPとPLP N-オキシドの保護効果の有無を説明できないので、これら二つの可能性は低い。

## (2) TNM修飾酵素の補酵素に対する親和性

以前に、仁平ら<sup>19)</sup>は補酵素添加時の430 nmの吸収増加を指標にシップ塩基の形成能を測定し、TNM修飾失活酵素についてPLPの解離定数( $K_d$ )が $51\mu\text{M}$ と、未修飾酵素の $0.7\mu\text{M}$ に比べて著しく増加している

ことを見いだしている。この Schiff 塩基形成能は、PLP への親和性を表すひとつの指標であるが、酵素-補酵素複体内では、Schiff 塩基形成後、酵素のコンフォメーションに変化が生じ、PLP のリン酸基などと酵素との間に非共有結合が形成され、これらの結合が酵素-補酵素複合体中の PLP の結合強度に大きく寄与すると予想される<sup>8)</sup>。そのため、この Schiff 塩基形成能は、酵素-補酵素複合体中の PLP の結合強度をそのまま代表する尺度ではない。

そこで、TNM 修飾酵素について、(酵素-補酵素)複合体中の補酵素の結合強度を調べるため、Sephadex G-25 カラムを用いるゲルろ過法により (TNM-修飾酵素-補酵素) 複合体からの補酵素の解離速度について検討した。すなわち、補酵素で再構成した TNM 修飾酵素を Sephadex G-25 ゲルろ過カラムにかけ、溶出するタンパク質画分の PLP 濃度を測定し、酵素モノマーあたりの PLP のモル比を PLP 含量として表した。

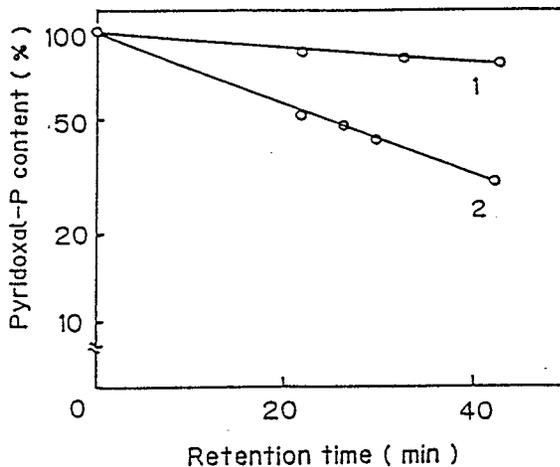


Fig.3-2 Kinetics of the pyridoxal-P dissociation from the native and TNM-modified tryptophanase on gel filtration. The native and TNM-modified holoenzyme were passed through a Sephadex G-25 column (1.0 x 22 cm) with various flow rates eluting with 0.05M triethanolamine-HCl (pH8.0) containing 0.1M KCl and 1mM DTT. 1, The native enzyme; 2, the TNM-modified enzyme. Protein concentration was determined by means of a dye binding assay. Pyridoxal-P content was determined as described in Materials & Methods.

カラム内の保持時間を調節してゲル担体との物理的相互作用時間を変え、PLP含量の経時変化をプロットし、得られた直線の傾きから補酵素解離速度( $k_d$ )を求めた。未修飾酵素ではほとんど補酵素は解離せず、 $k_d = 3.87 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ を与えたのに対し、TNM修飾酵素では、補酵素は著しく解離し、その $k_d$ 値は  $2.69 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$ であり、その解離速度には7.0倍の増加が認められた (Fig. 3-2)。

基質の存在下では酵素の 特定のリジン残基との間のシッフ塩基が開裂するので、補酵素を酵素内に維持するのは、5'-リン酸基の静電気的なイオン結合<sup>18)</sup>およびピリジン環Nとチロシン残基間の水素結合の二点に限られ、さらに、TNM修飾酵素では後者も形成されない (Fig. 3-3)。

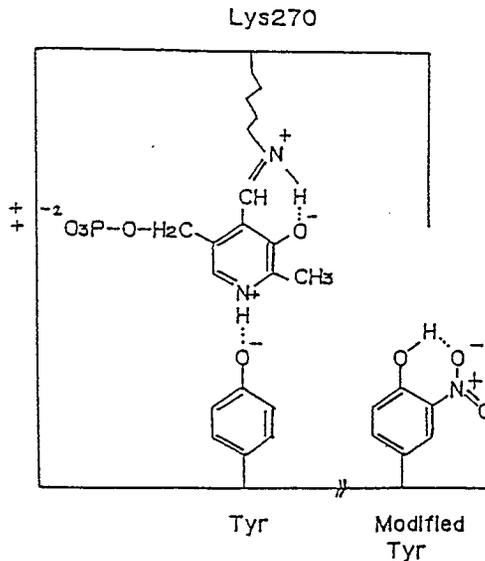


Fig.3-3 Possible interactions between pyridoxal-P and, the TNM-modified and unmodified tyrosyl residue in tryptophanase

したがって  $\alpha$ -アミノ基をもつ基質の存在下では、ゲルろ過に際してTNM修飾酵素は著しく補酵素を遊離しやすいと予想される (Table 3-2)。実際に、L-トリプトファン、L-アラニン、アンモニウムイオンを添加すると、無添加時に比べPLPの解離がよく促進されたのに対し、 $\alpha$ -アミノ基をもたない3-インドールプロピオン酸やインドールにはこのよう

な補酵素解離を促進する効果はほとんどない。未修飾酵素の場合には、同一条件下で基質添加による補酵素の解離はほとんどみられないことが判明している<sup>47)</sup>。したがって、酵素-補酵素複合体中の補酵素の結合強度も、TNM修飾酵素では未修飾酵素にくらべ著しく低下していることが確認できた。

Table 3-2. Effects of substrates and substrate analogs on the resolution of TNM-modified tryptophanase

Substrate ( $K_m$ or $K_i$ value) mM	Protein $\mu\text{M}$	Pyridoxal-P $\mu\text{M}$	Pyridoxal-P content
None before gel filtration	13.1	10.9	0.83
None after gel filtration	1.82	1.28	0.70
Tryptophan 10 (0.33)	3.64	0.90	0.25
Alanine 100 (30)	2.84	0.90	0.32
3-Indolepropionic acid 2.5 (0.5)	3.00	1.56	0.52
Ammonium chloride 1800 (345)	2.89	0.51	0.18

TNM-modified holotryptophanase (13.1  $\mu\text{M}$ , monomer) was incubated with various substrates or substrate analogs at the indicated concentrations for 20 min at 37 °C, and then applied to a Sephadex G-25 column (1.4 x 7.0 cm). Protein concentration was determined by means of a dye binding assay.

### (3) TNM修飾酵素の吸収スペクトル解析

トリプトファンゼの代表的な反応中間体は、それぞれの特異的な極大吸収スペクトルにもとづいて同定されている (Fig. 3-4)<sup>8)</sup>。すなわち、第2章で述べた酵素-補酵素複合体の酵素内シッフ塩基の吸収に由来する 337 nm 種と 420 nm 種に始まり、420 nm の補酵素-基質複合体の酵素外シッフ塩基および 500 nm 付近のキノイド中間体、492 nm の  $\alpha$ -アミノアクリル酸である (Fig. 3-4および Fig. 3-5、左図)。

TNM修飾をうけるチロシン残基が補酵素結合部位としての働き以外の役割を担っているか否かを調べるため、TNM修飾酵素がこのような酵素反応経路中いずれの段階まで触媒できるかを、基質アナログ添加時の吸収スペクトル変化から検討した (Fig. 3-5、右図)。

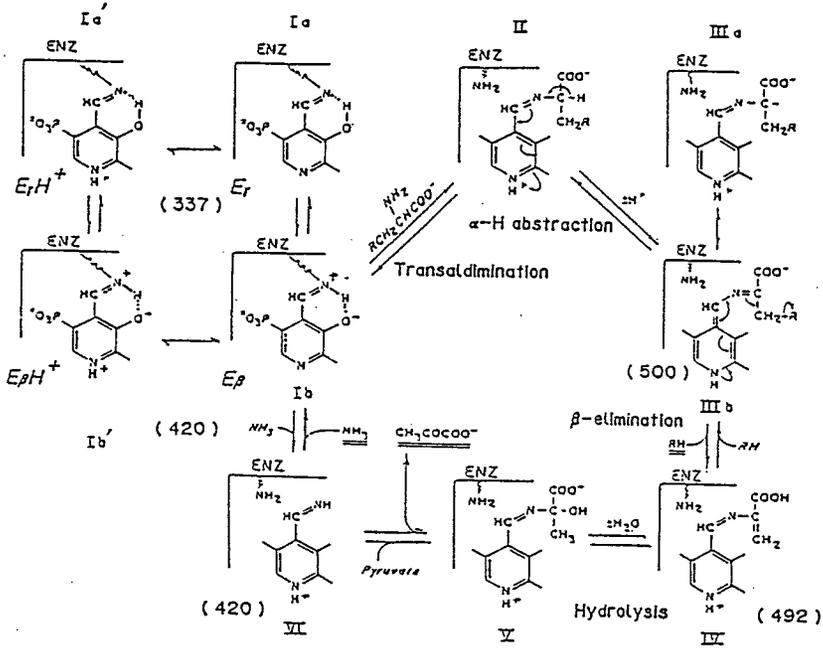


Fig.3-4 The mechanism for the reactions catalyzed by tryptophanase. The scheme represents a combination, with some modification of Snell (1975) 8) and June *et al.* (1981) 9). The values in parentheses show the specific absorption maxima of the reaction intermediates.

TNM修飾酵素に充分量の L-アラニンを追加しても、未修飾酵素にみられる 500 nm のキノイド中間体を与えないので、TNM修飾酵素は $\alpha$ -プロトン脱離できないことが判明した。ところが、L-トリプトファンや L-アラニン、塩化アンモニウムを加えると、420 nm の特徴的な Schiff 塩基の吸収が現れたので、TNM修飾酵素は酵素から基質へのアルドイミン転移を触媒できることが明らかになった。June<sup>9)</sup>らは、トリプトファンナーゼにおいてピリジン環Nと相互作用する塩基性残基の存在を想定し、この塩基がその共役酸としてピリジン環Nのプロトン化に関与する

と提唱した。TNM修飾をうけるチロシン残基はこの塩基性残基に相当すると考えられる。

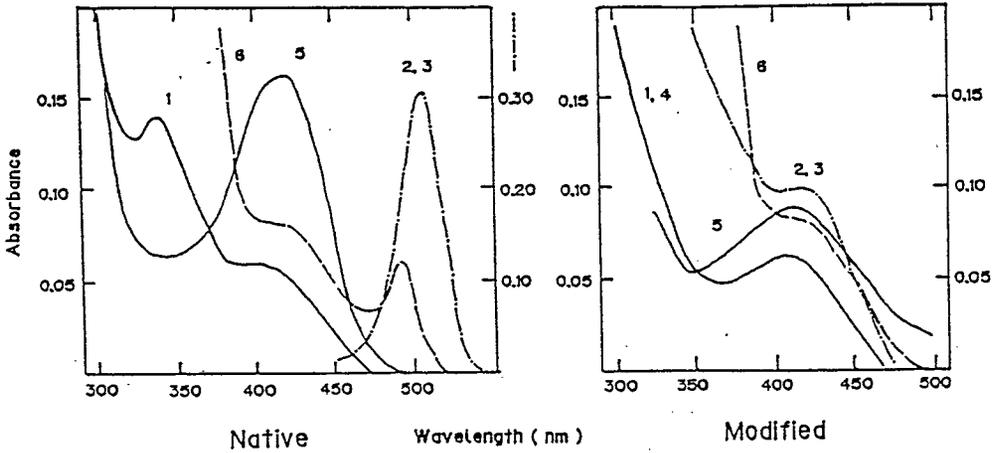


Fig.3-5 Effect of substrates and substrate analogs on the absorption spectra of TNM-modified tryptophanase. The native holoenzyme (1.0 mg/ml) and the TNM-modified holoenzyme(0.83 mg/ml) were incubated with various substrates or substrate analogs for 20 min at 37 °C, and then subjected to absorption spectral analyses in 0.05M triethanolamine-HCl (pH8.0) containing 0.1M KCl and 1mM DTT. The native enzyme, left; the TNM-modified enzyme, right; 1, None; 2, 10mM L-tryptophan; 3, 100mM L-alanine; 4, 2.5mM 3-indolepropionic acid; 5, 1.8M ammonium chloride; 6, 1.8M ammonium chloride and 0.2M potassium pyruvate.

以上の結果を総合すると、TNM修飾をうけるチロシン残基はPLPの結合部位に存在し、ピリジン環Nと水素結合を介して相互作用する。その結果、シッフ塩基に始まる $\pi$ -イミン共役電子系に、チロシン残基のベンゼン環が延長されるので、ピリジン環Nの電子吸引力がいつそう強化されると考えられる (Fig.3-6)。したがって、チロシン残基はピリジン環Nと水素結合する結果、基質の $\alpha$ -プロトンの不安定化にも貢献することが示唆される。

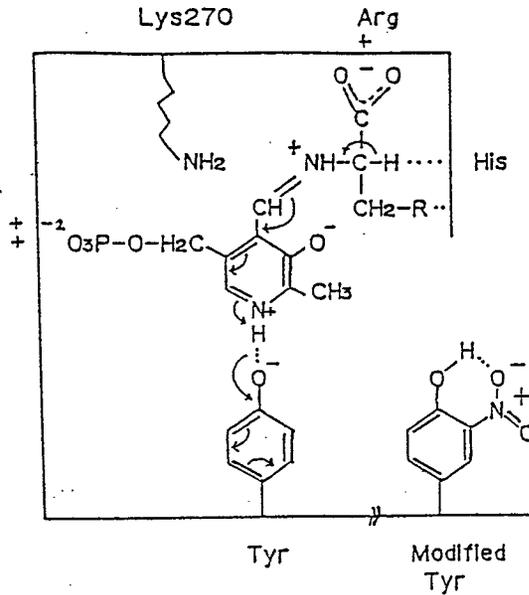


Fig.3-6 The catalytic function of the TNM-modifiable tyrosyl residue in tryptophanase

#### 第4節 要 約

トリプトファナーゼの活性域に存在する1個のチロシン残基がテトラニトロメタンによって修飾をうけ酵素活性が失われる<sup>19)</sup>。この修飾失活は、補酵素ピリドキサルリン酸によってのみ保護され、他のビタミンB<sub>6</sub>化合物やピリドキサルリン酸 N-オキシドには保護効果は認められなかった。したがって、修飾されるチロシン残基は、ピリドキサルリン酸のピリジン環窒素と水素結合すると考えられる。修飾酵素の補酵素に対する親和性は低下しており、ゲルろ過によって容易に補酵素を解離した。また基質存在下では、補酵素の解離がいっそう促進された。修飾酵素は、その吸収スペクトルの解析から、アルドイミン転移を触媒しうるが、基質の $\alpha$ -プロトンを脱離できないことが明らかになった。したがって、修飾されるチロシン残基は、補酵素との水素結合を介して、 $\alpha$ -プロトンの不安定化にも貢献すると示唆した。



で反応して O-アシル尿素を生成する。アミンを加えると、EDCと置換して新たにアミド結合が形成される。この中間体の O-アシル尿素は不安定で加水分解をうけたり、あるいは分子内転移を起こして安定な N-アシル尿素に変換する (Fig. 4-1)<sup>48, 49)</sup>。

トリプトファンゼはもとより他のビタミンB<sub>6</sub>酵素にも、そのカルボキシル基に対して化学修飾が行われた例はほとんどない。またカルボキシル基の酵素活性への関与は、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼの結晶構造解析において唯一 Asp222 がピリジン環窒素と水素結合することが示されているだけである<sup>7)</sup>。

本章では EDCを用いる化学修飾にもとづいて、その修飾をうけるカルボキシル基が酵素活性の発現に関与するか否か、さらに関与する場合には、そのカルボキシル基の機能を調べることを目的とした。EDC修飾に関してその修飾失活の速度論、pH依存性および補酵素、補因子による保護効果を検討した結果、モノマーあたり1個のカルボキシル基が活性域に存在することが判明した。さらにEDC修飾酵素の性質および基質による保護効果から、このカルボキシル基が基質の  $\alpha$ -アミノ基との結合に関与することを示唆した。

## 第2節 実験材料と方法

### (1) 実験材料

酵素の調製は第2章第1節に示した。1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド (EDC) は、Sigma 社から購入した。L-トリプトファンのアナログであるオキシインドリル-L-アラニン (または2-ヒドロキシ L-トリプトファン) は、Savigneら<sup>50)</sup>の方法に従って

て合成した。すなわち L-トリプトファン 2 g を 98 % ギ酸 10 ml に溶かし、これにフェノール 0.2 g を含むジメチルスルフォキシド 1.8 ml と 12 N 塩酸 10 ml の混合液を加え、28-30°C で 30 分間保温した。減圧濃縮後、10 % 酢酸 20 ml に溶かし Amberlite IRA-45 イオン交換樹脂カラム (φ2.8 x 23 cm), Sephadex G-10 ゲルろ過カラム (φ2.4 x 60 cm) を用いて精製した。その純度は、n-ブタノール:ピリジン:酢酸:水=10:15:3:12 のシリカゲル薄層プレート上の単一スポット ( $R_f = 0.82$ ) で確認した。元素分析、質量スペクトル分析、融点 (260°C) はいずれも理論値および報告値<sup>50)</sup> とよく一致した。

## (2) EDC 修飾反応

再活性化後のアポ酵素またはホロ酵素に EDC を加え、37°C で 0.1 M KCl、0.1 M グリシンエチルエステルを含むトリエタノールアミン-塩酸 (以下 TEA と略する) 緩衝液中で修飾反応を行った。次に、1 mM PLP、1 M 2-メルカプトエタノール、1 M リン酸カリウム緩衝液 (pH8.0) 各 0.1 ml から成る反応液 0.3 ml を氷中に置き、これに修飾した酵素液 0.2 ml を加えて反応を停止した。残存酵素活性の測定には、さらに 20 mM L-トリプトファン 0.5 ml を加え 37°C で 10 分間反応させた。EDC 修飾酵素を調製する際には、分子量 3 万カットの限外ろ過 Immersible CX-30 (Millipore) を用いて濃縮し Sephadex G-25 ゲルろ過カラム (φ2.0 x 16 cm) によって脱塩した。溶出には 0.1 M KCl、1 mM ジチオスレイトール (DTT) を含む TEA 緩衝液を使用した。

## (3) SH 基の保護と回復

第 2 章第 2 節で述べたように、SH 基を 5,5'-ジチオビス-(2-ニトロ

安息香酸) (以下DTNBと略する) によって修飾しその後EDCを加えて再修飾した。10mM DTTを加えて 37°Cに 30分間処理して、DTNBによって保護したSH基を回復させた<sup>25)</sup>。

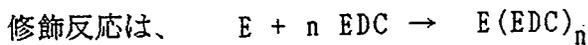
#### (4) 各種定量

酵素活性および酵素濃度の測定は第2章第2節に述べた。PLPの定量は第3章第2節で述べた。K<sup>+</sup>イオンの濃度は、PLPの場合と同様、除タンパク後原子吸光分析(日本Jarrell-Ash AA-8500 II型)によって測定した。PLPおよびK<sup>+</sup>イオンの含量は、酵素モノマーあたりのそれぞれのもル比として表した。吸収スペクトルの測定には、日立 557 型二波長分光光度計を使用した。

### 第3節 結果および考察

#### (1) EDC修飾の速度論

アポ酵素にEDCを作用させると、修飾反応時間およびEDCの濃度に依存して、擬一次的に酵素活性が失われた(Fig. 4-2A)。EDCと反応するカルボキシル基が酵素モノマーあたりn個存在すると仮定すると、



であるので、失活の反応速度式は

$$-dE/dt = k [E] \times [\text{EDC}]^n$$

表せる。失活は酵素濃度に関係せず擬一次反応的に進行したので、

擬一次反応速度定数  $k'$  を用いて

$$k' = k [\text{EDC}]^n$$

と書き改めた。両辺の対数をとると

$$\log k' = k + n \log [\text{EDC}]$$

となり、この両対数プロットから傾き  $n = 1.0$  の直線が得られた (Fig. 4-2B)。したがって EDC によって酵素モノマーあたり 1 個のカルボキシル基が修飾され、酵素を失活に導いたと結論した。

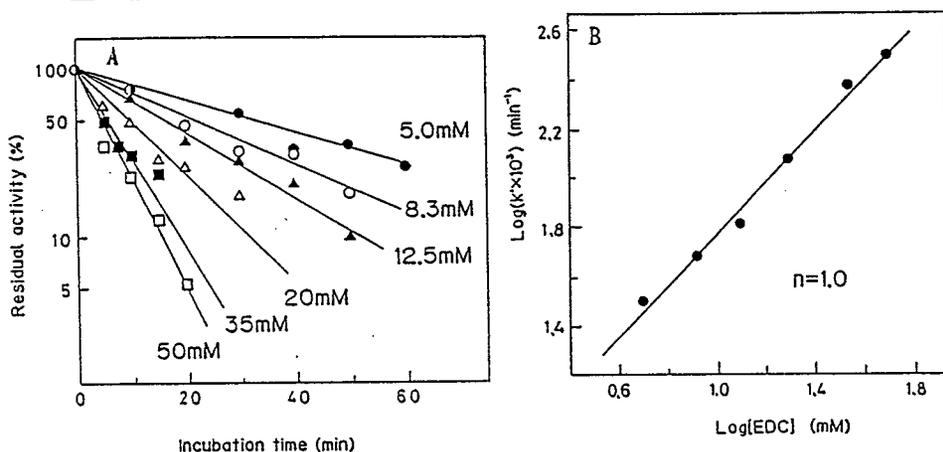


Fig.4-2 Effect of EDC concentration (A) and kinetic determination of stoichiometry (B) of apotryptophanase inactivation by EDC. A: After reactivation of the apoenzyme by DTT treatment in the presence of 0.4 mM pyridoxal-P, the holoenzyme was dissociated to the apoenzyme with DL-penicillamine treatment and subsequent gel filtration on Sephadex G-25 column. The apoenzyme, 0.135 M monomer was incubated with the indicated concentration of EDC at 37 °C. B: The pseudo-first-order inactivation rate constant,  $k'$  was calculated from the slope of the inactivation, and was plotted against the corresponding EDC concentration.

本章の第1節緒言で述べたように、EDC修飾ではアミド化物かあるいは N-アシル尿素をあたえる<sup>48, 49</sup>。トリプトファナーゼの場合 (i) 0.5M グリシンエチルエステルの有無にかかわらずEDC修飾失活速度が変わらなかったこと (ii) EDC修飾の際に添加したニトロチロシンエチルエステルが、全く酵素中に取り込まれなかったことから、N-アシル尿素が生成していると考えられる。

またEDCはカルボキシル基以外に、副反応としてシステイン残基<sup>51)</sup>やチロシン残基<sup>52)</sup>とも反応する。DTNBによるシステイン残基のSH基修飾<sup>24)</sup>は可逆的であり、DTTで処理すると酵素活性が回復する。そこでDTNBでSH基を保護したのち、EDC修飾を行いDTT処理によって活性が回復するかどうか、すなわち、EDCがSH基に反応するかどうかを検討した。DTNB単独修飾の場合にはほぼ初めの活性が回復するのに比べ、EDC修飾を行うと、もはや全く活性が戻らないので、EDCによる失活はSH基の修飾が原因ではないことが判明した (Table 4-1)。

Table 4-1 Effect of DTNB modification of thiol groups in apotryptophanase on EDC modification

DTNB treatment <sup>a)</sup>	EDC treatment <sup>b)</sup>	Residual activity (%)	
		DTT treatment <sup>c)</sup>	
		+	-
-	-	100	100
-	+	0.5	0.1
+	-	0.9	90.6
+	+	0.7	0.0

a) K<sup>+</sup>-free apoenzyme (0.32 μM monomer) was treated at 37 °C for 20 min with 12.6 μM of DTNB.

b) K<sup>+</sup>-free apoenzyme (0.31 μM monomer) was treated at 37 °C for 20 min with 25 mM of EDC.

c) K<sup>+</sup>-holoenzyme (0.30 μM monomer) was treated at 37 °C for 20 min with 5 mM of DTT in the presence of 0.1 M KCl and 0.1 mM pyridoxal-P.

チロシン残基がEDC修飾をうけた場合、0.5 M のヒドロキシルアミン処理によって活性が回復するとされている<sup>52)</sup>。EDC修飾後このような処理をしても酵素活性は戻らず、チロシン残基がEDC修飾をうけた結果、失活した可能性は低い。

(2) EDC修飾に対する補酵素、補因子および  
基質アナログの保護効果

アポ酵素のEDC修飾時に補酵素が存在すると、かなりの保護効果が認められ、酵素活性の保護はその濃度に依存していた (Fig. 4-3)。酵素活性の50%の保護に必要な補酵素濃度、すなわち保護定数 $K_{1/2}$ は $0.4\mu\text{M}$ と算出され (Fig. 4-4)、酵素反応における補酵素の $K_m$ 値の $2.0\mu\text{M}$ とよく一致した。したがって、EDC修飾に対する補酵素の保護は、遊離のPLPに依らず、酵素に結合したPLPに由来することが判明した。

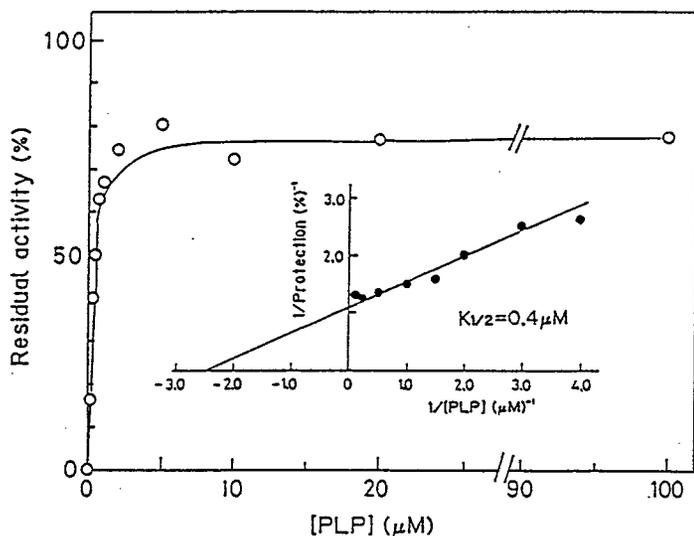


Fig.4-3 Effect of pyridoxal-P concentration in the inactivation of apotryptophanase by EDC. The apoenzyme,  $0.170\mu\text{M}$  was preincubated at  $37^\circ$  for 20 min with the indicated concentration of pyridoxal-P, then incubated with 20 mM EDC for 20 min. Inset:  
 $\text{Protection (\%)} = (A_x - A_0) / (A_{\text{EDC}} - A_0) \times 100$   
 where  $A_x$  is the residual activity after EDC treatment in the presence of  $x\mu\text{M}$  of pyridoxal-P,  $A_0$  is that in the absence of pyridoxal-P, and  $A_{\text{EDC}}$  is that in the presence of 1 mM pyridoxal-P without EDC.

他のビタミンB<sub>6</sub>化合物にはこのような保護効果はほとんど認められなかった (Table 4-2)。

Table 4-2 Effect of vitamin B<sub>6</sub> compounds on the inactivation of apotryptophanase by EDC.

Vitamin B <sub>6</sub>	Residual activity (%)
None	32.1
Pyridoxal-P	68.6
Pyridoxamine-P	40.4
Pyridoxine-P	37.4
Pyridoxal	30.0
Pyridoxamine	33.8
Pyridoxine	31.0

The apoenzyme (0.15  $\mu$ M monomer) was treated with 23 mM EDC at 37 °C for 20 min in 0.05 M triethanolamine-HCl (pH 8.0) containing 0.1 M KCl in the presence of 0.1 mM of various vitamin B<sub>6</sub> compounds. The enzyme activity determined without EDC treatment in the presence of each vitamin B<sub>6</sub> was taken as a control.

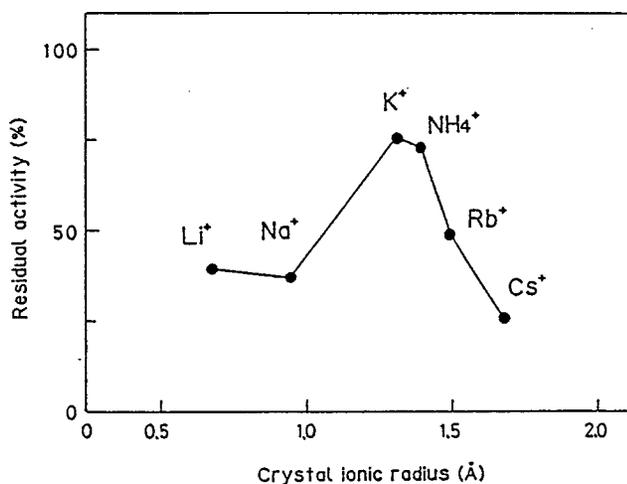
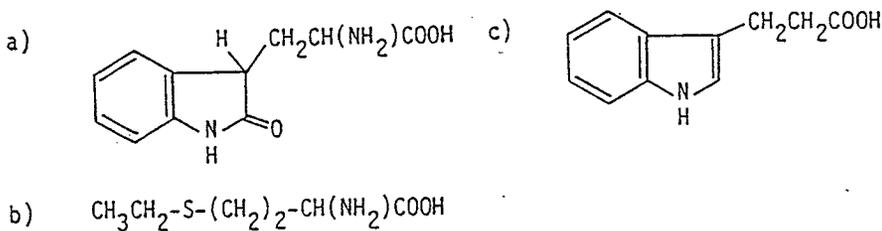


Fig.4-4 Effect of monovalent cations on EDC inactivation of holotryptophanase. Holotryptophanase (0.157  $\mu$ M monomer) was treated with 24 mM EDC at 37 °C for 20 min in the presence of 0.1 mM pyridoxal-P and 0.1 M of various monovalent cations. The enzyme activity determined without EDC in the presence of 0.1 mM pyridoxal-P and the respective monovalent cation was taken as a control.

トリプトファンナーゼは、活性なコンフォメーションを維持するために、 $K^+$ あるいは $NH_4^+$ などの1価陽イオンを補因子として要求する<sup>28, 47)</sup>。補因子としての活性は、そのイオン半径と明瞭な相関があり、 $Na^+$ や $Li^+$ は不活性なイオンである<sup>47)</sup>。Fig. 4-4 に示すように、補酵素が存在すると、 $K^+$ や $NH_4^+$ の活性な補因子にのみ、EDC修飾に対する保護効果が認められた。したがって、補酵素の存在下、活性な補因子の添加によって誘導される活性な酵素のコンフォメーションが、EDC修飾から酵素を保護するのに必要であることが明らかになった。

Table 4-3 Effect of substrate analogs on inactivation of holotryptophanase by EDC.

Substrate analog	Concentration ( $K_i$ )	Residual activity
Oxyindolyl-L-alanine <sup>a)</sup>	75 (2.5) <sup>53)</sup> $\mu$ M	86.4 %
L-Ethionine <sup>b)</sup>	2600 (520) <sup>16)</sup>	37.4
3-Indolepropionate <sup>c)</sup>	2100 (360-420) <sup>16)</sup>	9.9
Indole	300 (10) <sup>17)</sup>	8.0
None	-	5.3
Without EDC treatment	-	100



The holoenzyme, 7.74  $\mu$ M monomer in triethanolamine-HCl (pH 8.0) containing 0.1 M KCl was incubated with various substrate analogs at the indicated concentrations for 10 min at 37 °C, then treated with 40 mM of EDC for 40 min at 37 °C. After extensive dialysis against 0.05 M triethanolamine-HCl (pH 8.0) containing 0.1 M KCl and 5 mM DTT, residual enzyme activity was determined. The reported  $K_i$  value of substrate analog was shown in the parenthesis.

しかし、 $K^+$ イオン存在下のホロ酵素も EDC 修飾から完全には保護されない (Fig. 4-3) ので、さらに  $K^+$ イオン存在下のホロ酵素に対する、基質アナログの添加の効果を調べた (Table 4-3)。強い基質阻害剤のオキシインドリル-L-アラニン<sup>53)</sup>には優れた保護作用がみられ、L-エチオニンにもかなりの保護効果があった。それに対してL-トリプトファンから  $\alpha$ -アミノ基が欠落したアナログの 3-インドールプロピオン酸、およびインドールには全く保護作用がなかった。またアポ酵素の修飾の際には、このような基質の保護効果はまったく認められなかった。すなわち  $\alpha$ -アミノ基をもつ基質によって、ホロ酵素が EDC 修飾から保護されることが判明した。したがって、修飾されるカルボキシル基が基質の  $\alpha$ -アミノ基と相互作用し、その相互作用がカルボキシル基の負電荷を中和したためか、あるいはその相互作用による立体障害のために、EDC の攻撃からカルボキシル基が保護されたと考えることができる。

### (3) EDC 修飾失活の pH 依存性

EDC 修飾では酸触媒が必要とされ、酸性領域で失活が著しいことが知られている<sup>48)</sup>。修飾時の反応液の pH を変えて EDC 修飾の pH 依存性を速度論的に検討した。アポ酵素 (Fig. 4-5A)、ホロ酵素 (Fig. 4-5B) のいずれの場合も、それぞれの pH において擬一次的に失活が進行し、酸性側で特に失活反応速度が大きいことが判明した。Fig. 4-6 に示すように、擬一次失活速度定数は pH に依存し、シグモイド型の曲線が得られた。

そこで、この pH 依存性が EDC の反応性によるのか、あるいは修飾をうけるカルボキシル基の解離度によるのかを調べた。Hoare ら<sup>54)</sup>の方法にもとづいて、酵素の修飾と同じ条件で、すなわちグリシンエチルエ

ステルの存在下で  $m$ -ニトロ安息香酸に EDC を作用させ、255 nm の増加を指標に生成する  $m$ -ニトロ馬尿酸エチルエステルを測定すると、 $m$ -ニトロ安息香酸は各 pH において擬一次的に反応した。その擬一次反応速度定数と pH の関係は、酵素の失活反応と同様、シグモイド型となった (Fig. 4-6)。

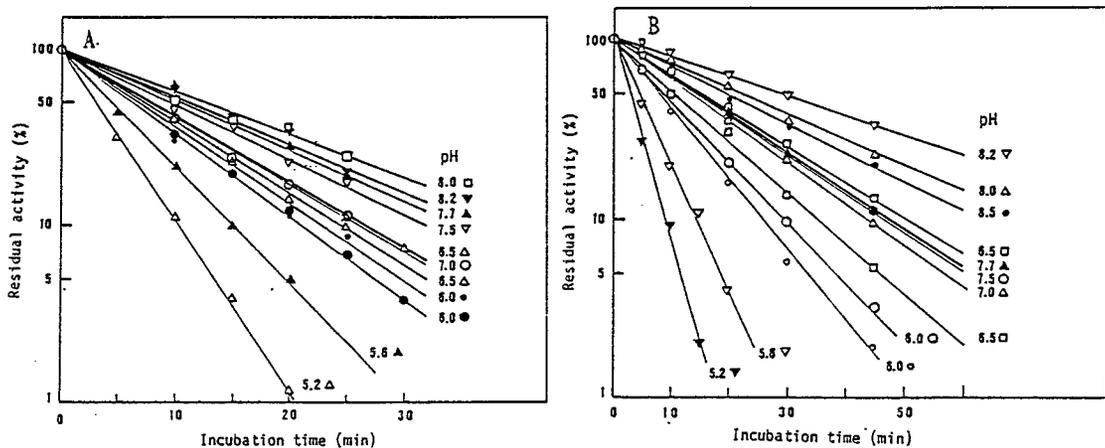


Fig.4-5 Effect of pH on EDC inactivation rate of (A) apotryptophanase and (B) holotryptophanase. The apoenzyme (2.3  $\mu$ M monomer) or the holoenzyme (2.9  $\mu$ M monomer) was treated with 40 mM EDC in 0.1 M triethanolamine-HCl (pH 6.0-8.2) and 0.05 M 2-(N-morpholino)ethanesulphonate-NaOH (pH 4.3-6.5) containing 0.1 M KCl and 0.5 M glycine ethyl ester. At the indicated time, an aliquot portion was taken out for residual activity assay.

その反応速度定数と  $[H^+]$  の両逆数プロットを解析すると、EDC による  $m$ -ニトロ安息香酸の修飾反応の解離定数は  $K = 2.18 \times 10^{-4}$  であった。したがって、そのみかけの  $pK_a$  値は 3.6 であり、 $m$ -ニトロ安息香酸のカルボキシル基の  $pK_a$  値 = 3.46 と非常によく一致する。すなわち、EDC 修飾反応の pH 依存性は、修飾試薬 EDC の反応性よりもむしろ、カルボキシル基の解離度を反映しており、プロトン型が脱プロトン型にくらべ優先的に反応すると結論した。

したがって、同じ条件下でEDC修飾をうけるトリプトファンナーゼのカルボキシル基について、Fig. 4-8 から算出されたみかけの $pK_a$ 値は5.6-5.8であり、この値は通常のペプチドにおけるカルボキシル基の $pK_a$ 値の3.5-4.5にくらべ異常に高い。一般に触媒機能にかかわるアミノ酸残基の官能基は、活性域の環境によって、他の同種官能基とは異なった異常な反応性を付与されていることが多い。したがって、EDC修飾をうけるカルボキシル基の $pK_a$ 値が高い結果からも、修飾をうけるカルボキシル基が活性域周辺にあることが推察される。

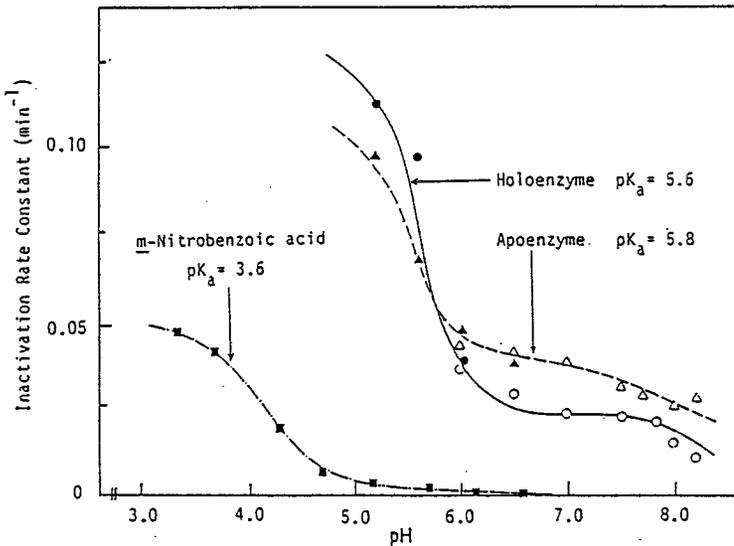


Fig.4-6 pH dependence of the inactivation rate constants of apo- and holotryptophanases by EDC, and the amidation rate of *m*-nitrobenzoate with glycine ethyl ester by EDC. Modification rate of *m*-nitrobenzoate with glycine ethyl ester in the presence of 40 mM EDC was determined according to the method of Hoare and Koshland Jr. 54) The inactivation rate constants calculated from the each slopes and the amidation rate constants were plotted against the corresponding pH. The  $pK_a$  values were calculated from the double-reciprocal plots.

#### (4) EDC修飾酵素の諸性質

EDC修飾酵素は、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動の移動度、および Sepharose 6B カラム ( $\phi 1.8 \times 44$  cm) における溶出パターンにおいて、未修飾酵素と同一であった。したがって、EDC修飾失活によって、酵素のサブユニット間の架橋や立体構造上の大きな変化は生じていないと考えられる。

##### (4.1) EDC修飾酵素の補酵素に対する親和性

EDC修飾をうけるカルボキシル基の機能を調べるため、まず始めに補酵素に対する親和性がEDC修飾後にどのように変化したかを検討した。EDC修飾酵素の補酵素に対する親和性を Kazarinoffら<sup>18)</sup>の方法に従い、酵素と補酵素の結合定数としてもとめた。すなわち、EDC修飾酵素に順次PLPを添加し、その際の430 nmの吸収増加を指標に酵素内シッフ塩基形成量として、酵素に結合した補酵素量を測定した。用いたEDC修飾酵素には、25.8%の未修飾酵素が残存していたため、この補酵素結合量をもとにして、Scatchard解析<sup>55)</sup>を行うと、2本の直線が得られ、それぞれの傾きの逆数から、補酵素の解離定数 ( $K_d$ ) をもとめた。未修飾酵素の $K_d$ 値には  $0.81 \mu\text{M}$ 、EDC修飾酵素には  $5.3 \mu\text{M}$  が算出された (Fig. 4-7)。未修飾酵素の $K_d$ 値は報告値の  $0.7 \mu\text{M}$  とよく一致し<sup>18)</sup>、EDC修飾後には補酵素への親和性が約  $1/6.5$  に低下していることが判明した。しかし、修飾酵素も酵素モノマーあたりに結合する補酵素のモル比が0.9であり、未修飾酵素の値の1.1と変わらず、補酵素に対する結合能力にはEDC修飾後にも大きな変化はない。したがって、EDC修飾をうけるカルボキシル基は補酵素との結合に関与しないと考えられる。

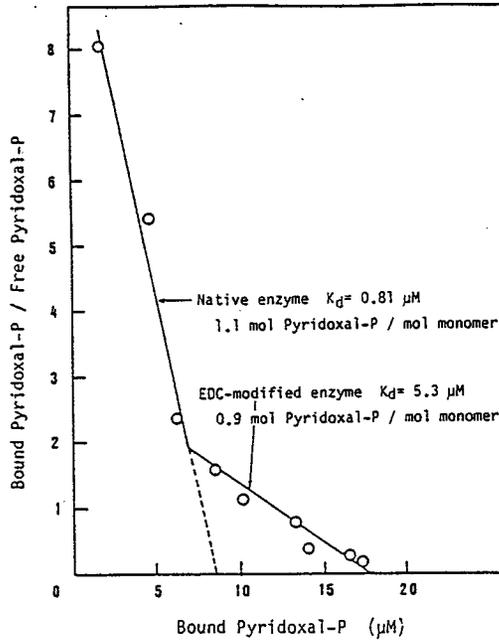


Fig.4-7 Scatchard plot of pyridoxal-P binding in native and EDC-modified apotryptophanase. Aliquots portions of pyridoxal-P were added every 20 min to 30.2  $\mu\text{M}$  of native and EDC-modified enzyme in an initial volume of 0.7 ml in 0.05 M triethanolamine-HCl (pH 8.0) containing 0.1 M KCl and 2-mercaptoethanol. The amount of pyridoxal-P bound to the enzyme was determined from the increase of absorbance at 430 nm by the addition of pyridoxal-P. The intercepts corresponded to 1.1 pyridoxal-P sites/ native monomer and 0.9 pyridoxal-P sites/ modified monomer.  $K_d$ , dissociation constant for protein-coenzyme interaction.

未修飾酵素を、補因子の $\text{K}^+$ イオンのない条件で Sephadex G-25を用いるゲルろ過カラムにかけると、 $\text{K}^+$ イオンを失うためにPLPも解離することが知られている<sup>47)</sup>。EDC修飾酵素では、同様に、 $\text{K}^+$ イオンを失ったが、補酵素は固く酵素内に維持されていた (Table 4-4)。基質の $\alpha$ -カルボキシル基の結合部位にあるアルギニン残基が、フェニルグリオキサールによって修飾されて失活したトリプトファンナーゼも、通常の補酵素解離方法では補酵素を脱離しない<sup>18)</sup>。このEDC修飾酵素の場合には、DL-ペニシラミン処理後ゲルろ過を行うと、ほぼすべての補酵素が脱離した (Table 4-4)。したがって、EDC修飾が、補酵素結合部位を含めた

活性域周辺の構造に変化を引き起こし、その結果PLPの解離を妨げたと解釈される。

Table 4-4. Effect of gel filtration through Sephadex G-25 on dissociation of pyridoxal-P and  $K^+$  from the native and EDC-modified tryptophanase.

Enzyme	Protein ( $\mu\text{M}$ )	Pyridoxal-P ( $\mu\text{M}$ )	Pyridoxal-P content	$K^+$ ion ( $\mu\text{M}$ )	$K^+$ ion content
Native	13.3	8.83	0.669	1.94	0.146
EDC-Modified	7.0	7.23	0.907	0.35	0.050
EDC-Modified + Penicillamine	8.0	0.70	0.101	-	-

The native holo enzyme and EDC-modified holoenzyme were applied to gel filtration column ( $\phi 1.0 \times 19.0$  cm) and assayed for the concentrations of pyridoxal-P and  $K^+$  as described in Materials & Methods. pyridoxal-P content and  $K^+$  content represent the respective molar ratios to the enzyme monomer.

#### (4.2) EDC修飾酵素の基質に対する親和性

次に、EDC修飾後の酵素の基質に対する親和性の変化を調べた。EDC修飾酵素が、各種酵素反応中間体を形成するかどうかを検討するため、各種基質アナログを添加し、それぞれの中間体に帰属された特異的な吸収スペクトルを測定した<sup>9)</sup>。しかし未修飾酵素と異なり、EDC修飾酵素では、L-エチオニンの添加で生じるべきキノイド中間体の500 nmの吸収、および塩化アンモニウムの添加で生じるべきシッフ塩基の420 nmのいずれの吸収も全く認められなかった (Fig. 4-8)。すなわち、 $\alpha$ -プロトンが脱離したキノイド中間体はおろか、酵素-基質の複合体である酵素外シッフ塩基すら形成されていない。したがって、特定のカルボキシル基がEDC修飾を受けた後は、酵素は基質と全く相互作用できないことが明らかになった。すなわち、EDC修飾に対する基質の保護

効果において示唆したように、EDC修飾をうけるカルボキシル基が基質の $\alpha$ -アミノ基の結合部位にあるので、EDC修飾酵素が基質に作用できないという結果は、カルボキシル基に対するEDC修飾が立体障害となって、基質が進入できなくなったためと解釈することができる。

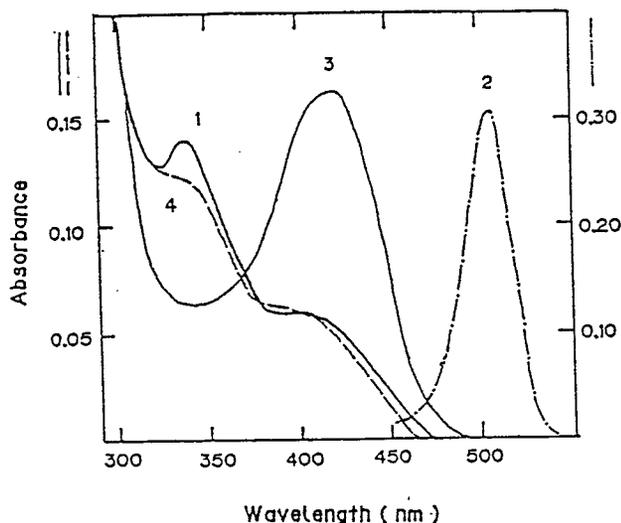


Fig.4-8 Effect of substrate and substrate analogs on the absorption spectra of EDC-modified tryptophanase and native tryptophanase. EDC-modified enzyme (16.9  $\mu$ M monomer) and the native enzyme (18.2  $\mu$ M monomer) were incubated with the indicated concentration of substrate analogs for 20 min at 37 °C, and then subjected to absorption spectral analyses in 0.05 M triethanolamine-HCl (pH 8.0) containing 0.1 M KCl and 5 mM DTT. The native enzyme (1-3), 1; none, 2; 20 mM L-ethionine, 3; 400 mM ammonium chloride, the EDC-modified enzyme 4; none, 20 mM L-ethionine, 400 mM ammonium chloride.

以上の結果から、EDC修飾をうけるカルボキシル基は基質の結合部位に位置し、その $\alpha$ -アミノ基と相互作用すると考えられる (Fig.4-9)。したがって、このカルボキシル基は、渡辺ら<sup>17)</sup>によって、トリプトファンナーゼの活性部位に提唱された、アミノ酸の基本骨格に対応する基質結合部位 II の一部を構成すると考えられる。

さらに、EDC修飾酵素が基質とのシッフ塩基形成能を失っていることから、EDC修飾をうけるカルボキシル基は、シッフ塩基形成段階、すなわちアルドイミン転移に関与する可能性が考えられる。このアルド

イミン転移は、ホスホリラーゼを除くすべてのビタミンB<sub>6</sub>酵素に共通する第一段階の反応であるが、転移される基質の $\alpha$ -アミノ基のpK<sub>a</sub>値が9.0-10と高いため、酵素反応条件下ではその大部分がプロトン化している。しかし、この正電荷を帯びた $\alpha$ -アミノ基では Schiff 塩基のイミン炭素に対して求核反応できず、このままではアルドイミン転移反応は起こらない。したがって、ビタミンB<sub>6</sub>酵素には、基質の $\alpha$ -アミノ基を脱プロトン化する機構が存在する必要がある<sup>2,4,7</sup>)。これまでの結果を総合すると、トリプトファンナーゼでは、EDC修飾をうけるカルボキシル基が、基質の $\alpha$ -アミノ基とのイオン結合を通じて、その基質の $\alpha$ -アミノ基の脱プロトン化に関与すると考えられる。

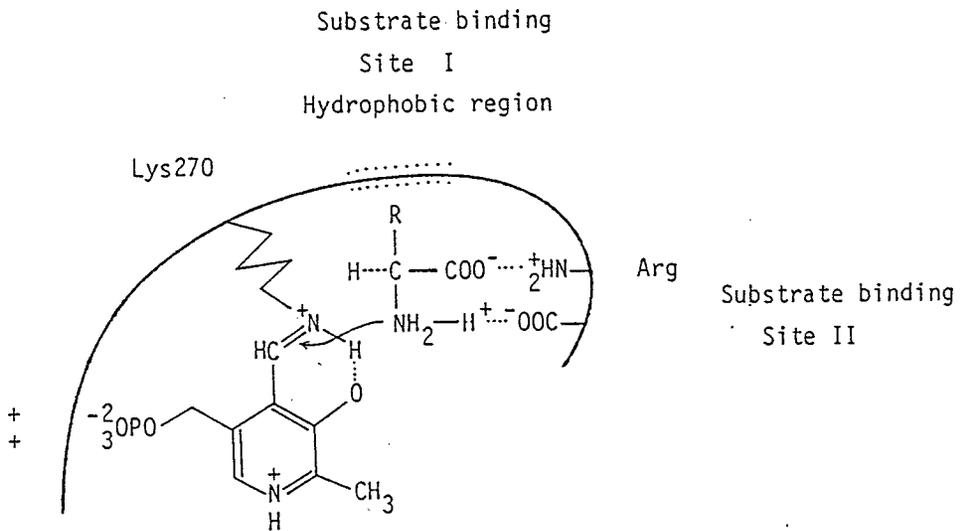


Fig.4-9 The catalytic function of the EDC-modifiable carboxyl group in tryptophanase

#### 第4節 要 約

トリプトファンナーゼは、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドによって、そのカルボキシル基が修飾をうけ、失活する。

修飾失活の速度論から、モノマーあたり1個のカルボキシル基が修飾されるために、酵素活性が失われたことが明らかになった。修飾されるカルボキシル基の $pK_a$ が高いこと、および補酵素と補因子の共存によって修飾失活から酵素が保護されることから、このカルボキシル基が酵素の活性域に存在すると考えられる。さらに $\alpha$ -アミノ基をもつ基質が、ホロ酵素を修飾からよく保護すること、および修飾酵素が全く基質に作用できないことから、修飾をうけるカルボキシル基が、基質の $\alpha$ -アミノ基との結合に関与することを示唆した。

## 第5章 総括

生体触媒である酵素には、常温、常圧の穏やかな条件下に、特定の基質に対して、特定の化学反応を触媒するという特異性がある。この酵素の基質および反応に対する特異性を決定するのは、酵素の活性域を含めたその立体構造である。したがって、酵素をいっそう有効に利用するためには、酵素の活性域の構造と酵素反応におけるその機能について十分な理解が必要である。

本研究では、ピリドキサル 5'-リン酸を補酵素とする多機能ビタミンB<sub>6</sub>。酵素のトリプトファナーゼを材料として用い、その活性部位内の構造を化学修飾法により検討し、システイン残基のSH基、およびカルボキシル基を、トリプトファナーゼの活性域に同定し、さらにチロシンのフェノール性水酸基を含めた3つのアミノ酸側鎖官能基が、触媒作用に果たす役割について明らかにした結果を本論文にまとめた。

第1章では、代表的な多機能B<sub>6</sub>。酵素トリプトファナーゼの活性部位に関する従来の研究をまとめ、その問題点を述べるとともに、本研究の目的を明らかにし、本論文の概要を述べた。

第2章では、自然酸化、およびニトロチオシアノ安息香酸の化学修飾をうけるSH基が、活性域にモノマーあたり1-2個存在することを示した。自然酸化により失活した酵素、および化学修飾により失活した酵素に対し、SH基の還元処理を行うと、SH基の再生とともに、その酵素活性が回復し、同時に酵素の不活性型の吸収スペクトル種が、活性型に変換されることが判明した。したがって、修飾をうける1-2個のSH基が補酵素結合部位に存在して、酵素内シッフ塩基のイミン窒素の脱プロトン化を誘因し、その結果不活性型を活性型に変換すると結論した。

第3章では、チロシン残基と補酵素間の結合様式を検討した。補酵素アナログを用いて酵素をテトラニトロメタン修飾失活から保護する作用を調べた結果、修飾されるチロシン残基は補酵素のピリジン環窒素と水素結合すると結論した。また修飾酵素がアルドイミン転移を触媒しうるにもかかわらず、 $\alpha$ -プロトンの脱離を行えないことから、チロシン残基は補酵素との水素結合を通して、 $\alpha$ -プロトンの不安定化をも誘因すると示唆した。

第4章では、水溶性カルボジイミドを用いる化学修飾によって、モノマーあたりの活性域に1個のカルボキシル基が存在することを示した。その修飾をうけるカルボキシル基が、アスパラギン酸の $\beta$ -カルボキシル基、グルタミン酸の $\gamma$ -カルボキシル基、あるいは酵素のカルボキシル末端のいずれであるかは、今後に残された課題であるが、EDCによる修飾失活から、酵素が $\alpha$ -アミノ基を持つ基質によって選択的に保護されること、および修飾後の酵素が、基質と全く結合できないことから、修飾されるカルボキシル基が基質の $\alpha$ -アミノ基の結合部位であると結論した。さらに、このカルボキシル基がそのイオン性の相互作用を通じて、基質の $\alpha$ -アミノ基の脱プロトン化を促進し、アルドイミン転移に関与する可能性を示唆した。

以上の結果によって、従来の研究と合わせ、化学修飾法により解明しうるトリプトファナーゼの活性域の特徴はほぼ明らかにし得たと考えられる。しかし、側鎖官能基の反応性が低いために化学修飾法を適用できないアミノ酸残基が酵素活性の発現に必須か否かの決定には、タンパク質工学の手法を用いる部位特異的なアミノ酸残基の変換が有効であると考えられ、さらにそれらのアミノ酸残基を含め、従来の化学修飾法により活性に関与すると判明したアミノ酸残基が、酵素の活性域においてどのような立体的配置をとるのかについては、酵素のX線結晶構造解析による三次構造の決定が必要であろう。これらの手法によって、トリプト

ファナーゼの活性域の具体的な構造が明確になれば、化学修飾法などから明らかにされた各アミノ酸残基の役割をもとに、トリプトファンゼに望ましい性質を付与することが可能になり、本酵素のより広範な利用をもたらすと考えられる。

[ 引用文献 ]

1. Fasella, P. (1967): *Ann. Rev. Biochem.* 36, 185-210
2. Ivanov, V. I. & Karpeisky, M. Ya. (1969): *Adv. Enzymol.* 32, 21-53
3. Snell, E. E. & Di Mari, S. J. (1970): "The Enzyme" 3rd ed. 2, 335-370, Academic Press
4. Metzler, D. E. (1979): *Adv. Enzymol.* 50, 1-40
5. 谷吉樹、緒方浩一、和田博、伊東啓、森野能昌、福井三郎 (1975): 生化学実験講座 13、ビタミンと補酵素(上)169-235、東京化学同人
6. 和田博ら (1980): ビタミン学(II)、水溶性ビタミン、131-226、日本ビタミン学会編、東京化学同人
7. Kirsch, J. F., Eichele, G., Ford, G. C., Vincent, M. G. & Jansonius, J. N (1984): *J. Mol. Biol.* 174, 497-525
8. Snell, E. E. (1975): *Adv. Enzymol.* 42, 287-333
9. June, D. S., Suelter, C. H. & Dye, J. L. (1981): *Biochemistry*, 20, 2707-2713
10. June, D. S., Suelter, C. H. & Dye, J. L. (1981): *Biochemistry*, 20, 2714-2719
11. Vederas, J. C., Schleicher, E., Tsai, M. & Floss, H. G. (1978): *J. Biol. Chem.* 253, 5350-5354
12. Newton, W. A., Morino, Y. & Snell, E. E. (1965): *J. Biol. Chem.* 242, 1211
13. Watanabe, T. & Snell, E. E. (1972): *Proc. Nat. Acad. Sci.* 69, 1086-1090
14. Kagamiyama, H., Morino, Y. & Snell, E. E. (1970): *J. Biol. Chem.* 245, 2819-2824
15. Kagamiyama, H., Matubara, H. & Snell, E. E. (1972): *J. Biol. Chem.* 247, 1576
16. Kazarinoff, M. N. & Snell, E. E. (1980): *J. Biol. Chem.* 255, 6228-6233

17. Watanabe, T. & Snell, E. E. (1977): *J. Biochem.* 82, 733-745
18. Kazarinoff, M. N. & Snell, E. E. (1977): *J. Biol. Chem.* 252, 7598-7602
19. Nihira, T., Toraya, T. & Fukui, S. (1981): *Eur. J. Biochem.* 119, 273-277
20. Tokushige, M., Fukada, Y. & Watanabe, Y. (1979): *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 86, 976-981
21. Tokushige, M., Iinuma, K., Yamamoto, M. & Nishijima, Y. (1980): *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 96, 863-869
22. Schnackerz, K. D. & Snell, E. E. (1983): *J. Biol. Chem.* 258, 4839-4841
23. Nihira, T., Toraya, T. & Fukui, S. (1979): *Eur. J. Biochem.* 101, 341-347
24. Morino, Y. & Snell, E. E. (1967): *J. Biol. Chem.* 242, 5602-5610
25. Raibaud, O. & Goldberg, M. E. (1977): *Eur. J. Biochem.* 73, 591-599
26. Honda, T. & Tokushige, M. (1985): *J. Biochem.* 97, 851-857
27. 石黒正恒 (1978): *生物化学実験法* 8, SH基の化学修飾、学会出版センター
28. Hogberg-Raibaud, A., Raibaud, O. & Goldberg, M. E. (1975): *J. Biol. Chem.* 250, 3352-3358
29. Deeley, M. C. & Yanofsky, C. (1981): *J. Bacteriol.* 147, 787-796
30. Raibaud, O. & Goldberg, M. E. (1973): *J. Biol. Chem.* 248, 3451-3455
31. Morino, Y. & Snell, E. E. (1967): *J. Biol. Chem.* 242, 2800-2809
32. Johnson, R. J. & Metzler, D. E. (1970): *Meth. Enzymol.* 18A, 433
33. Laemmli, U. K. (1970): *Nature*, 227, 680-685
34. Degani, Y. & Patchornik, A. (1971): *J. Org. Chem.* 36, 2727-2728
35. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J. (1951): *J. Biol. Chem.* 193, 265-275
36. Ellman, G. L. (1959): *Arch. Biochem. Biophys.* 82, 70-77

37. Shaltiel, S. & Cortijo, M. (1970): *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 41, 594-600
38. Smith, E. L. (1970): *The Enzymes*, 3rd ed. 1, 267-339, Academic Press
39. Watenpaugh, K. D., Sieker, L. C. & Jensen, L. H. (1973): *Proc. Natl. Acad. Sci.* 70, 3857-3860
40. Jacobson, M. A. & Colman, R. F. (1984): *Biochemistry*, 23, 6377-6382
41. Ando, M. & Emoto, S. (1975): *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 48, 1655-1656
42. Fukui, S., Ohishi, N., Nakai, Y. & Shimizu, S. (1969): *Arch. Biochem. Biophys.* 130, 584-593
43. Wada, H. & Snell, E. E. (1969): *J. Biol. Chem.* 236, 2089-2095
44. Morino, Y. & Snell, E. E. (1967): *J. Biol. Chem.* 242, 5591-5601
45. Bradford, M. M. (1976): *Anal. Biochem.* 72, 248-254
46. Snell, E. E. (1970): *Vitamins and Hormones*, 28, 265-290
47. Toraya, T., Nihira, T. & Fukui, S. (1976): *Eur. J. Biochem.* 69, 411-419
48. Carraway, K. L. & Koshland, D. E., Jr. (1972): *Meth. Enzymol.* 25, 616-623
49. Timkovich, R. (1977): *Anal. Biochem.* 79, 135-143
50. Savige, W. E. & Fontana, A. (1980): *Int. J. Peptide Protein Res.* 15, 285-297
51. Carraway, K. L. & Triplett, R. B. (1970): *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 200, 566-569
52. Carraway, K. L. & Koshland, D. E., Jr. (1968): *Biochim. Biophys. Acta*, 160, 272-274
53. Phillips, R. S., Miles, E. W. & Cohen, L. A. (1984): *Biochemistry*, 23, 6228-6234
54. Hoare, D. G. & Koshland, D. E., Jr. (1967): *J. Biol. Chem.* 242, 2447-2453

55. Dahlquist, F. W. (1978):Meth. Enzymol. 48, 270-299
56. Hoch, J. A., Simpson, F. J. & DeMoss, R. D. (1966):Biochemistry, 5,  
2229-2237
57. Yoshida, H., Utagawa, T., Kumagai, H. & Yamada, H. (1974):Agri. Biol.  
Chem. 38, 2065-2072

本論文に関係のある報告

1. Functional role of cysteinyl residues in tryptophanase.  
Takuya Nihira, Takeshi Yasuda, Toshihide Kakizono, Hisaharu Taguchi, Masakazu Ichikawa, Tetsuo Toraya and Saburo Fukui  
(1985): Eur. J. Biochem. 149, 129-133
2. Catalytic function of a tyrosyl residue in tryptophanase  
Toshihide Kakizono, Takuya Nihira and Hisaharu Taguchi  
(1986): Biochem. Biophys. Res. Commun. 137, 964-969
3. Chemical modification of a carboxyl group in tryptophanase  
with 1-ethyl-3,3-(dimethylaminopropyl)carbodiimide  
Toshihide Kakizono, Takuya Nihira, Kiyoshi Mori and  
Hisaharu Taguchi Biochem. Biophys. Res. Commun. 投稿中

## 謝 辞

本研究に対して終始御懇篤なる御指導を賜った田口久治教授に衷心より謝意を表します。また、本論文の御校閲を賜りました岡田弘輔教授ならびに山田靖宙教授に謹んで感謝の意を表します。また有益な御助言と御鞭達を下された合葉修一教授、高野光男教授、大嶋泰治教授、菅健一教授に感謝いたします。

さらに本研究の遂行に際し、絶えず御指導と激励を賜りました仁平卓也先生に感謝の意を表します。

また絶えず有益な御助言と激励を下された吉田敏臣助教授ならびに木下晋一助教授、関達治先生、岸本通雅先生に御礼申し上げます。併せて実験に協力していただいた安田武史氏、森貴芳氏および田口研究室の諸氏に深謝いたします。

