

第3章

酵素の構造の化学

生化学の歴史の中で、酵素の実体については20世紀初頭に長年にわたる論争があった。酵素の実体がタンパク質であることが示されたのは、1926年にウレアーゼがタンパク質の結晶として取り出されたことによる。多種多様な化学反応を加速する触媒の基本骨格として、生物が、糖や核酸などでなく他ならぬタンパク質を選んだのは、タンパク質を構成する20種類のアミノ酸の側鎖の物理・化学的性質の多様性によるところが大きい。後で述べるように、酵素の活性部位に結合した基質と酵素側の官能基との間には、水素結合、イオン結合、疎水性相互作用などさまざまな作用が働き、プロトンの授受や共有結合の生成・開裂が起こるが、そのような多様な作用を網羅しうる多様な官能基を備えた生体高分子はタンパク質だけである*。

* 長らくの間、触媒活性をもつ生体高分子はタンパク質のみであると考えられていたが、ある種のリボ核酸(RNA)にも触媒活性を示すものがあることが1980年代に見いだされた。これらはリボザイム(ribozyme)とよばれているが、その生体内における役割はRNAの加工・成熟化に限られている。

タンパク質 protein
アミノ酸 amino acid

3-1 タンパク質化学のキーワード

酵素の本体は**タンパク質**である。タンパク質は、20種類のアミノ酸(表3-1)を単量体として、それらが直鎖状に重合したポリマーである。これらのアミノ酸がさまざまな順番で直列につながることによって、大きさも、立体構造も、機能もさまざまに異なる酵素が生み出される。20種類のアミノ酸は、いわば特定の構造や機能をもつタンパク質を書き上げるための文字であり、酵素の本体であるタンパク質を理解するためにはまずアミノ酸の性質をよく理解する必要がある。それらの内容は生化学の教科書に記述されているので、本書では重複を避けるため、以下の項目の解説は他の生化学の教科書に譲る。

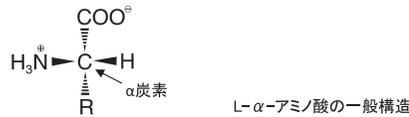
アミノ酸の化学：アミノ酸の構造、 α アミノ基、 α カルボキシ基、アミノ酸の側鎖の親水性と疎水性、ヒドロパシー、アミノ酸の電気的性質、解離基、酸解離指数(pK_a)、等電点(pI)、タンパク質性アミノ酸(20種類)の名称の3文字表記と1文字表記

ペプチドとタンパク質の化学：ペプチド結合、ペプチド、アミノ酸残基、オリゴペプチド、ポリペプチド、アミノ末端(N末端)、カルボキシ末端(C末端)、主鎖、アミノ酸配列、一次構造

タンパク質の立体構造：ペプチド結合と2面角、ラマチャンドランプ

表 3-1 タンパク質を構成するアミノ酸の種類、性質と構造

(a)



(b)

アミノ酸名		三文字 表記	一文字 表記	側鎖 (R-) の構造 ^{†1}	pK _a			ハイドロパシ ^{†2} (kJ・mol ⁻¹)
和名	英名				α-カルボキシ基	α-アミノ基	側鎖	
1. 水素原子または小さなアルキル基をもつアミノ酸								
グリシン	glycine	Gly	G	-H	2.4	9.8		0.67
アラニン	alanine	Ala	A	-CH ₃	2.4	9.9		1.0
プロリン	proline	Pro	P		2.0	10.6		-0.29
2. 疎水性アミノ酸								
(1) 分岐鎖アミノ酸								
バリン	valine	Val	V		2.3	9.7		2.3
ロイシン	leucine	Leu	L		2.3	9.7		2.2
イソロイシン	isoleucine	Ile	I		2.3	9.8		3.1
(2) 芳香族アミノ酸 ^{†3}								
フェニルアラニン	phenylalanine	Phe	F		2.2	9.3		2.5
チロシン	tyrosine	Tyr	Y		2.2	9.2	10.5	0.08
トリプトファン	tryptophan	Trp	W		2.5	9.4		1.5
(3) 含硫アミノ酸								
メチオニン	methionine	Met	M	-CH ₂ -CH ₂ -S-CH ₃	2.1	9.3		1.1
システイン	cysteine	Cys	C	-CH ₂ SH	1.9	10.7	8.4	0.17
3. 極性アミノ酸								
(1) 非荷電の極性アミノ酸								
セリン	serine	Ser	S	-CH ₂ OH	2.2	9.2		-1.1
トレオニン	threonine	Thr	T		2.1	9.1		-0.75
アスパラギン	asparagine	Asn	N		2.1	8.7		-2.7
グルタミン	glutamine	Gln	Q		2.2	9.1		-2.9
(2) 酸性アミノ酸								
アスパラギン酸	aspartic acid	Asp	D		2.0	9.9	3.9	-3.0
グルタミン酸	glutamic acid	Glu	E		2.1	9.5	4.1	-2.6
(3) 塩基性アミノ酸								
リシン	lysine	Lys	K	-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -NH ₃ ⁺	2.2	9.1	10.5	-4.6
アルギニン	arginine	Arg	R		1.8	9.0	12.5	-7.5
ヒスチジン	histidine	His	H		1.8	9.3	6.0	-1.7

†1 pH 7.0 で支配的な構造。

†2 アミノ酸残基を脂質二重層の内部から水に移行させるときの自由エネルギー変化。値が正に大きいほど側鎖の疎水性が高い。

†3 チロシンとトリプトファンは 280 nm に特に大きな吸収帯をもつ。このことを利用して溶液の 280 nm における吸光度からタンパク質濃度を見積もることができる。

ロット，立体配座（コンホメーション），リボンモデル，二次構造， α ヘリックス， β ストランド， β シート，平行 β シート，逆平行 β シート，ターン，ループ，三次構造，超二次構造またはモチーフ，ドメイン，三次元構造，単量体，二量体，ホモ二量体，ヘテロ二量体，オリゴマー，サブユニット，サブユニット構造，四次構造

タンパク質の構造を支える相互作用：双極子-双極子相互作用（塩橋，イオン結合，イオン対（イオンペア）形成），水素結合，ファンデルワールス力，疎水性相互作用，ジスルフィド結合

3-2 酵素の本体がタンパク質であることがわかるまで

植物色素の構造研究でノーベル化学賞（1915年）を受賞していたドイツの有機化学の権威**ヴィルシュテッター**は，酵素の純化にも取り組んでその実体の解明を試みた。その結果，彼は，酵素活性の本体はタンパク質に吸着した低分子性の触媒物質であり，タンパク質はその担体に過ぎないと主張した。これに対して米国の若手の酵素学者**サムナー**は1926年に，酵素（ウレアーゼ）をタンパク質の**結晶**として単離することに初めて成功した。当時，**結晶化**は物質の純化の手段として最も重要であり，結晶の取得は純粋であることの証とされていた。サムナーは，酵素活性の本体をタンパク質の結晶として単離できたのだから，酵素活性の本体はタンパク質であると主張した。また超遠心実験を行って，ウレアーゼが高分子物質であることも示した。しかしながらヴィルシュテッターは，結晶中にごく微量の低分子性触媒物質が存在するはずであるとして譲ることはなかった。現在の知識に照らせば，ウレアーゼに関する限りヴィルシュテッターの考えは必ずしも間違いではない。ウレアーゼの活性には酵素に結合したニッケル（Ni）イオンが必要であり，それを除去したタンパク質部分のみでは酵素活性を示さないことがわかっている。一方，同じく米国の**ノースロップ**は，別の酵素（ペプシン，トリプシン，キモトリプシン；表1-3参照）を次々に結晶化し，結晶化を幾度繰り返しても酵素活性は一定のままであることを示し，酵素活性の本体はタンパク質であることを改めて主張した（1929年～）。その後，酵素の結晶化の事例が増えるに従って，酵素はタンパク質からできると次第に信じられるようになっていった。ただしその当時は，タンパク質は不特定多数のアミノ酸が無規則に結合したものと考えられていた。個々のタンパク質が一定の**アミノ酸配列**をもった一定の構造体であることが確立されたのは，それから約20年も経ってからであり，英国の**サンガー**が**インスリン**のアミノ酸配列を決定したことによる。サムナーと

ヴィルシュテッター
Willstätter, R.

サムナー Sumner, J. B.
結晶 crystals
結晶化 crystallization

ノースロップ Northrop, J. H.

アミノ酸配列 amino acid sequence
サンガー Sanger, F.
インスリン insulin

ノースロップは、酵素の主体がタンパク質であることを明らかにした業績によって1946年に、またサンガーはインスリンのアミノ酸配列を決定した業績によって1958年に、それぞれノーベル化学賞を受賞した(第1章, コラム1-1)。

3-3 単純タンパク質と複合タンパク質

タンパク質はアミノ酸が直列に脱水縮合したものである。アミノ酸のみから構成されるタンパク質を**単純タンパク質**という。タンパク質の中にはアミノ酸以外の有機または無機成分を含有するものも多数あり、それらを総称して**複合タンパク質**とよぶ。複合タンパク質には、金属を含有する**金属タンパク質**、糖鎖が結合した**糖タンパク質**、リン酸基が結合した**リンタンパク質**、脂質と複合体を形成している**リポタンパク質**などがある。酵素の中には、**補助因子**とよばれる有機または無機成分を含むものが多数存在し、それらも複合タンパク質であるといえる。その詳細は3-12~3-14で述べる。

単純タンパク質 simple protein

複合タンパク質 conjugated protein

金属タンパク質 metalloprotein

糖タンパク質 glycoprotein

リンタンパク質 phosphoprotein

リポタンパク質 lipoprotein

補助因子 cofactor

3-4 酵素タンパク質の高次構造形成と活性部位の形成

タンパク質の二次構造は主鎖間の水素結合で維持され、三次構造と四次構造(またはサブユニット構造)は、側鎖-側鎖間や側鎖-主鎖間の相互作用(双極子-双極子相互作用、水素結合、ファンデルワールス力、疎水性相互作用)やジスルフィド結合によって維持されている(図3-1)。

二次構造 secondary structure

主鎖 main chain

水素結合 hydrogen bond

三次構造 tertiary structure

四次構造 quaternary structure

サブユニット構造 subunit structure

双極子-双極子相互作用

dipole-dipole interaction

ファンデルワールス力

van der Waals force

疎水性相互作用

hydrophobic interaction

ジスルフィド結合 disulfide bond

ポリペプチド鎖 polypeptide chain

折りたたみ folding

3-4-1 酵素タンパク質の全体構造の形成における疎水性相互作用の役割

水中におけるポリペプチド鎖の折りたたみの主な駆動力となるのは疎水性相互作用である。水中では、ポリペプチド鎖内の疎水性側鎖は疎水性相互作用によって互いに集合し、溶媒水分子の乱雑さを増大させるように働く。この疎水性相互作用により酵素タンパク質分子内部から水分子が排除され、ポリペプチド鎖は分子全体として内側が**疎水性**で表面が**親水性**に富んだ**球状構造**を形成する。**ドメイン構造**を有するタンパク質では、ドメインごとにそのような球状構造が形成され、またドメインとドメインの境界面にも疎水性相互作用が働くこともある。こうした疎水性相互作用に基づく折りたたみの結果、一次構造上互いにかげ離れたところに位置するアミノ酸残基どうしが空間的に接近し、側鎖と側鎖の間、

疎水性 hydrophobicity

親水性 hydrophilicity

球状構造 globular structure

ドメイン構造 domain structure

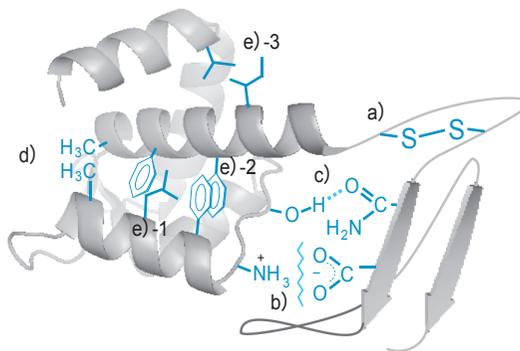


図 3-1 三次構造を維持する相互作用

a) ジスルフィド結合, b) 双極子-双極子相互作用, c) 水素結合, d) ファンデルワールス力, e)-1~e)-3 疎水性相互作用.

あるいは側鎖と主鎖の間に各種の弱い相互作用（双極子-双極子相互作用, 水素結合, ファンデルワールス力）やジスルフィド結合が形成され, 三次構造がさらに安定化される.

* 同じ大きさの正負の電荷のことを（電気）双極子といい, 永久双極子（permanent dipole）と誘起双極子の2タイプがある. 永久双極子には, イオンの正負の点電荷（point charge）や, 電気陰性度の違う二原子の結合で生じる分極による双極子（分極双極子 polarized dipole）などがあり, これらは定常的な双極子である. 一方, 電気的に中性の分子が電荷の接近により分極する場合のような定常的でないタイプの双極子を誘起双極子（induced dipole）という. 電気双極子間の相互作用には以下のようにさまざまな組み合わせがあり, それらを総称して**静電相互作用**（electrostatic interaction）とよぶ.

- 点電荷間の相互作用
- 点電荷と分極双極子の間の相互作用
- 分極双極子間の相互作用
- 分極双極子と誘起双極子の間の相互作用
- 誘起双極子間の相互作用

これらのうち, 永久双極子どうしの相互作用（a, b, c）を双極子-双極子相互作用, a を**電荷-電荷相互作用**（charge-charge interaction）, **イオン結合**（ionic bond）, **塩橋**（salt bridge）, また b, c を**極性相互作用**（polar interaction）とよぶことがある. また c のうち, 水素原子が関わるものが水素結合である. また e. にはファンデルワールス力が含まれる.

単量体 monomer

3-4-2 全体構造の形成における静電相互作用*の役割

塩橋は, 酵素分子の内部の疎水環境において, 三次構造を安定化する非共有結合的相互作用として最も強力なものとなる. 一方, 酵素分子の表面に存在する双極子-双極子相互作用は, 側鎖と低分子イオンとのイオン対形成や水和によってその強さが「希釈」されてしまうため, あまり強いものとはならない. このことは静電相互作用に基づく他の弱い相互作用（水素結合やファンデルワールス力）についても同様であり, それらは酵素分子内部の疎水的環境において最も効果的に三次構造の安定化に寄与する. なお水素結合は, 極性側鎖と極性側鎖の間, あるいは極性側鎖と主鎖の N-H や C=O との間に直接形成されるばかりでなく, 水分子を介したタイプのものも頻繁に見いだされる.

3-4-3 四次構造の形成

四次構造の形成においても, 疎水性相互作用は上に述べたのと同様に最も重要な役割を果たす. 単量体タンパク質の疎水性に富んだ部分どうしの疎水性相互作用によってサブユニットの境界面から水分子が排除され, **単量体**が互いに会合する. そのようにして形成されたサブユニット境界面の疎水性環境では, 双極子-双極子相互作用, 水素結合, ファンデルワールス力が相補的かつ効果的に働き, そのタンパク質に特有の四次構造を安定化する（サブユニット間の共有結合はそれほど普遍的なものではない）.

表 3-2 イオン性・極性アミノ酸の反応性側鎖

アミノ酸	側鎖	pK _a [†]	pH 7 での電荷	化学触媒作用におけるおもな機能
アスパラギン酸	-COO ⁻	3.9	-1	陽イオン結合・プロトン転移
グルタミン酸	-COO ⁻	4.1	-1	陽イオン結合・プロトン転移
ヒスチジン	イミダゾール	6.0	ほぼ 0	プロトン転移・金属配位
システイン	-CH ₂ SH	8.4	ほぼ 0	アシル基の共有結合, プロトン転移
チロシン	フェノール	10.5	0	リガンドへの水素結合, プロトン転移
リシン	-NH ₃ ⁺	10.5	+1	陰イオン結合, プロトン転移
アルギニン	グアニジウム	12.5	+1	陰イオン結合
セリン	-CH ₂ OH		0	アシル基の共有結合

† 遊離のアミノ酸として水溶液中で存在するときの側鎖の pK_a を示す。酵素の活性部位ではこの値が大きく変化することがある (第 6 章参照)。

3-4-4 活性部位の形成

以上のようにして形成された酵素分子の構造は、触媒機能を果たすために不可欠な **コンホメーション** をとる。この構造のなかには活性部位が形成されており、そこに反応性側鎖をもつアミノ酸 (表 3-2) が適切に配置されている。ES 複合体形成後、基質がこれらのアミノ酸残基と相互作用して有機化学でよく知られた作用 (酸塩基触媒作用など) を受けることにより、遷移状態 (ES)[‡] の生成が導かれる。なお、表 3-2 に記載されていないアミノ酸残基であってもその疎水性側鎖や主鎖のアミド酸素や NH を介して基質と相互作用し、基質結合や (ES)[‡] の安定化に寄与しうる。酵素分子は通常、分子量一万~数十万の巨大なものであるが、酵素活性に直接関わる部位はそのごくわずかな部分にすぎない。事実、多くの酵素において、基質がはまりこむポケットを取り囲むのはたかだか十に余る程度のアミノ酸残基である。さらにそれらのうち、基質の結合や化学触媒作用に直接関与するのはほんの 2~3 の残基であることも多い。しかしながら低分子ペプチドではアミノ酸残基に限られた距離や角度でしか配向できないため、それらを触媒作用に必要な形に配置できない。数百のアミノ酸残基からなるポリペプチド鎖ならば、それ自身で折れ曲がったり、らせんを巻いたり、相互に会合したりして活性部位を形成することができる。言い換えれば、ポリペプチドの二次構造、三次構造、さらには四次構造の形成を通じて、触媒作用に必要な残基を三次元的に正確に配置することができるのである。したがってこのことはまた、酵素タンパク中で触媒作用に直接関与しない他の多くのアミノ酸も、酵素の適切な立体構造を維持する重要な役割を担っていることを意味している*。図 3-2 (a)~(c) には、一次構造上かけ離れた位置に存在していたアミノ酸残基が、ポリペプチド鎖が適切に折りたたまれることによって互いに空間的に近づいて、触媒作用に適した配置をとる例を示した。また 1 つの活性部位が、異なるポリペプチド鎖 (サブユニッ

コンホメーション conformation

* ただし、酵素が巨大分子であることについては、左記のことだけでは説明できない部分も残されている。例えばナタマメのウレアーゼは分子量約 91000 のサブユニットタンパク質からなる六量体であり、大腸菌のβ-ガラクトシダーゼは分子量約 112000 のサブユニットタンパク質からなる四量体であるが、尿素や乳糖というごく小さな分子を分解するために、生物がなぜこれほどまでに巨大な酵素分子を用意しなければならなかったのかといった点について、明快な解答はまだ得られていない。

ト)のアミノ酸残基からつくり上げられている例も多数知られており、図3-2 (d) にその一例を示した。

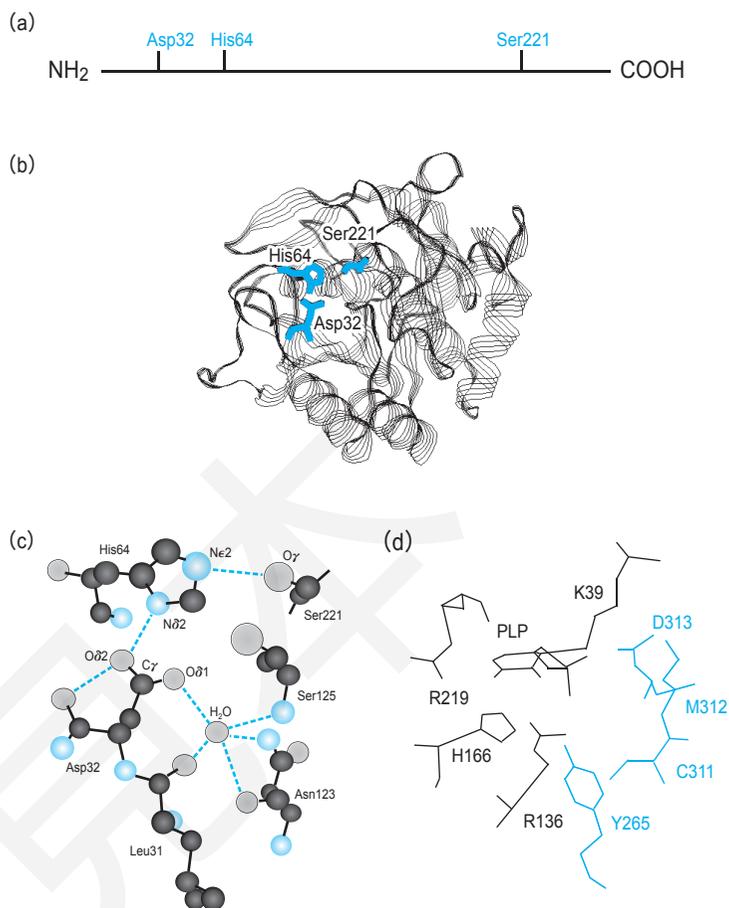


図3-2 一次構造上かけ離れたところに存在するアミノ酸残基により構成される活性部位

(a-c) セリンプロテアーゼであるサチライシン (グラム陽性細菌 *Bacillus lentus* 由来) は 269 アミノ酸残基からなり、触媒活性に重要な 3 つアミノ酸残基 (Asp32, His64, Ser221) は立体構造中では触媒トライアドとよばれる水素結合ネットワークを形成している。この触媒トライアドはほぼすべてのセリンプロテアーゼに見いだされるものである。

(a) ポリペプチド鎖を一本の紐と見立てたときの Asp32, His64, Ser221 の所在。

(b) *B. lentus* のサチライシンの立体構造のリボンモデル。5 本の細線で表現されるリボンはこの酵素のポリペプチド鎖を表す。らせん状に巻いている構造は α ヘリックス、伸びた帯状の構造は β ストランドである。触媒トライアド構成アミノ酸残基は太い青色のスティックで表してある。

(c) *B. lentus* のサチライシンの触媒部位 (触媒トライアド) のクローズアップ。黒い球は炭素原子を、水色の球は窒素原子を、灰色の球は酸素原子を、また点線は水素結合を表す。

(d) *B. stearothermophilus* のアミノ酸ラセマーゼ活性部位のクローズアップ。青色で示した残基は隣接するサブユニットのものである。アルファベットはアミノ酸残基の一字表記であり、数字は残基番号である。PLP はリシン 39 とシッフ塩基を形成して結合する補酵素ピリドキサル 5'-リン酸である。

3-5 誘導適合

基質は酵素に結合し、その活性部位にある反応性のアミノ酸残基に接近する。その際、酵素の方もそのコンホメーションを変化させることにより、活性部位のアミノ酸残基の空間配置をシフトさせ、それらが基質と相互作用できるようにしたり、別の基質がさらに結合したりできるようにしたりする（図3-3 (a)）。これは1968年に米国のコーシュランドにより提案された「誘導適合理論」とよばれるものであるが、酵素の構造の誘導適合が実際に起こっていることはこれまでに多数の酵素について確認されている（図3-3 (b)）。したがって誘導適合理論は、酵素の活性部位は固定されたものであると考える「鍵と鍵穴」仮説（第2章）よりも、活性部位の性質をより正確に表していると考えられている。

コーシュランド
Koshland Jr., D. E.
誘導適合理論 induced-fit theory

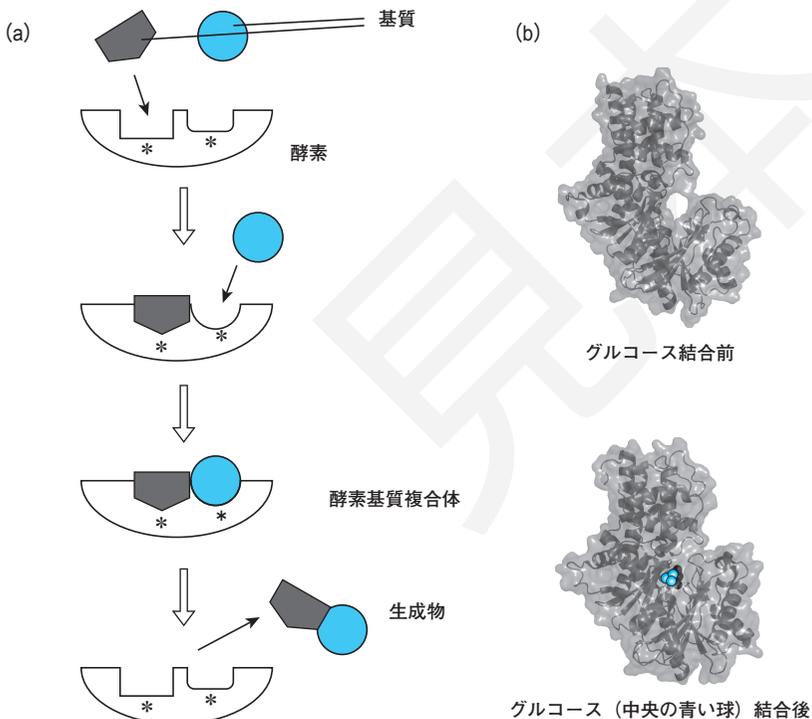


図3-3 誘導適合理論

(a) 2基質1生成物反応における誘導適合の例。基質結合部位はくぼみとして描いてある。*印は酵素活性に必要なアミノ酸残基を表している。最初の基質（黒色）が酵素に結合すると酵素のコンホメーションが変化し（五角形のくぼみ）、第二の基質（青色）の結合が促される（丸形のくぼみ）。酵素反応が終了すると生成物が放出され、酵素は誘導適合していない状態に復帰する。(b) 酵母ヘキソキナーゼ (pdb id: 1IG8, 3B8A) に見られる誘導適合*。基質分子の1つであるグルコース（青色の球）の結合により、酵素分子全体の立体配座が「開いた構造」から「閉じた構造」に変化する。ヘキソキナーゼの構造は空間充填モデルと主鎖のリボンモデルを重ね合わせて表示した。

* pdb idとはタンパク質の立体構造データベース Protein Data Bank (PDB, <https://rcsb.org>) に登録されているタンパク質立体構造のID番号である。上記URLにアクセスしてpdb idを入力すれば立体構造を閲覧したり、座標を入手したりすることができる。

3-6 アロステリック遷移

* 酵素タンパク質に結合する基質、生成物、調節物質、金属イオンなどを総称してリガンドとよぶ。

アロステリック遷移
allosteric transition

サブユニット間の非共有結合的な相互作用は、タンパク質へのリガンド*の結合によって影響を受けることがある。そのような場合には、サブユニットのコンホメーションが変化し、タンパク質の機能にも変化がもたらされる。この変化は可逆的であり、リガンドがタンパク質からはずれることによってサブユニットのコンホメーションはもとに戻り、タンパク質機能ももとに戻る（図3-4）。このような変化はアロステリック遷移とよばれ、生体機能の調節に重要な役割を果たしている。本書では、その詳細を第7章で学ぶ。

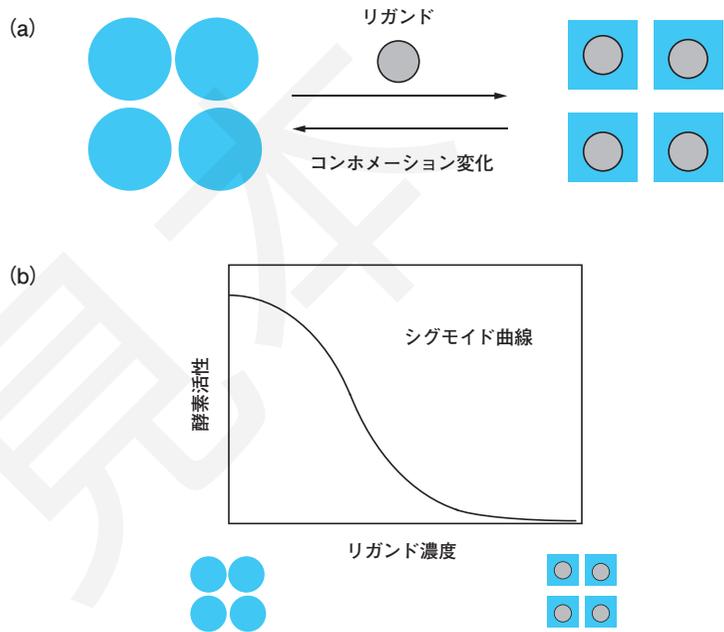


図3-4 オリゴマー酵素のアロステリック遷移の模式図

(a) 青い丸や四角は酵素のサブユニットタンパク質を示し、形の違いはコンホメーションの違いを表す。リガンドのうち調節物質（エフェクター）は酵素の活性部位とは異なる部位に結合する。(b) 酵素活性とリガンド濃度および酵素の状態の関係。

3-7 酵素分子の物理化学的性質

3-7-1 親水性と疎水性

酵素分子の親水性・疎水性は、酵素分子の表面に露出する極性アミノ酸残基の多寡によって支配される。タンパク質の水への溶解は、分子表面の極性残基と溶媒（水）分子との間の水素結合の形成（水和）によるものである。酵素分子表面の極性残基の割合が高いほど水に対する

水和 hydration

タンパク質の溶解度は大きくなる。分子表面の疎水性の違いを利用したタンパク質の分離方法として疎水性相互作用クロマトグラフィーがある(第8章参照)。

酵素タンパク質の水に対する溶解度はまた、共存する塩や有機溶媒の種類と濃度にも影響を受ける。一般に水溶性タンパク質の溶解度は、低濃度の塩の存在によって増大し(これを**塩入**という)、高濃度の塩の存在によって逆に減少する(これを**塩析**という)。塩によって塩析効果の大きいものとそうでないものがある。**硫酸アンモニウム(硫安)**は塩析効果のもっとも大きい塩の1つであって、その塩析効果はタンパク質分子の水和状態を変化させることによるものであると理解されている。タンパク質の種類によって、飽和濃度の30%程度の硫安で容易に沈殿するものもあれば、90%飽和の硫安でも沈殿しないものもある。こうした硫安濃度の違いに基づくタンパク質の溶解度の差を利用してタンパク質を分画する方法は**硫安分画**とよばれ、タンパク質の精製に広く利用されている(第8章参照)。

細胞内で**生体膜**に結合しているタンパク質を**膜タンパク質**という。膜タンパク質のなかには、膜内部に埋もれているタイプ(**膜内在性タンパク質**)、膜を貫通しているタイプ(**膜貫通型タンパク質**)、膜表面にへばりついているタイプ(**周辺タンパク質**)などがある。膜内在性タンパク質や膜貫通型タンパク質は一般に難溶性である。膜貫通型タンパク質のアミノ酸配列中には疎水性アミノ酸残基に富んだ領域が存在し、その領域が生体膜の**脂質二重層**の疎水性部分と疎水性相互作用をすることにより、**膜貫通領域(膜貫通ドメイン)**として作用する。膜タンパク質には酵素活性をもつものも多数存在し、生体膜との相互作用を通じて生命活動に必須な働きをつかさどっている。膜タンパク質の膜貫通ドメインの所在や数は、そのアミノ酸配列の**ハイドロパシープロット**を解析することにより予測することができる(図3-5。ハイドロパシーについては表3-1を参照)。

3-7-2 酵素分子の電気的性質

酵素分子の表面には極性アミノ酸残基が露出しており、そのなかには**荷電性側鎖**をもつアミノ酸残基も含まれる。pHの変化は、タンパク質分子のN末端アミノ基、C末端カルボキシ基、および荷電性側鎖の電荷を変化させ、その正味の結果としてタンパク質分子全体の**実効電荷**を変化させる。タンパク質の**滴定曲線**の計算例を図3-6に示す。中性領域では、**酸性アミノ酸残基**(表3-1参照)に富むタンパク質(**酸性タンパク質**)は負に荷電し、**塩基性アミノ酸残基**に富むタンパク質(**塩基性タ**

塩入 salting in

塩析 salting out

硫酸アンモニウム(硫安)
ammonium sulfate

硫安分画
ammonium sulfate fractionation

生体膜 biological membrane

膜タンパク質

membrane-bound protein

膜内在性タンパク質 integral protein, membrane intrinsic protein

膜貫通型タンパク質

transmembrane protein, membrane-spanning protein

周辺タンパク質 peripheral protein

脂質二重層 lipid bilayer

膜貫通領域(膜貫通ドメイン)

transmembrane domain

ハイドロパシープロット

hydropathy plots

荷電性側鎖

charged amino acid residue

実効電荷 net electric charge

滴定曲線 titration curve

酸性アミノ酸残基

acidic amino acid residue

酸性タンパク質 acidic protein

塩基性アミノ酸残基

basic amino acid residue

塩基性タンパク質 basic protein

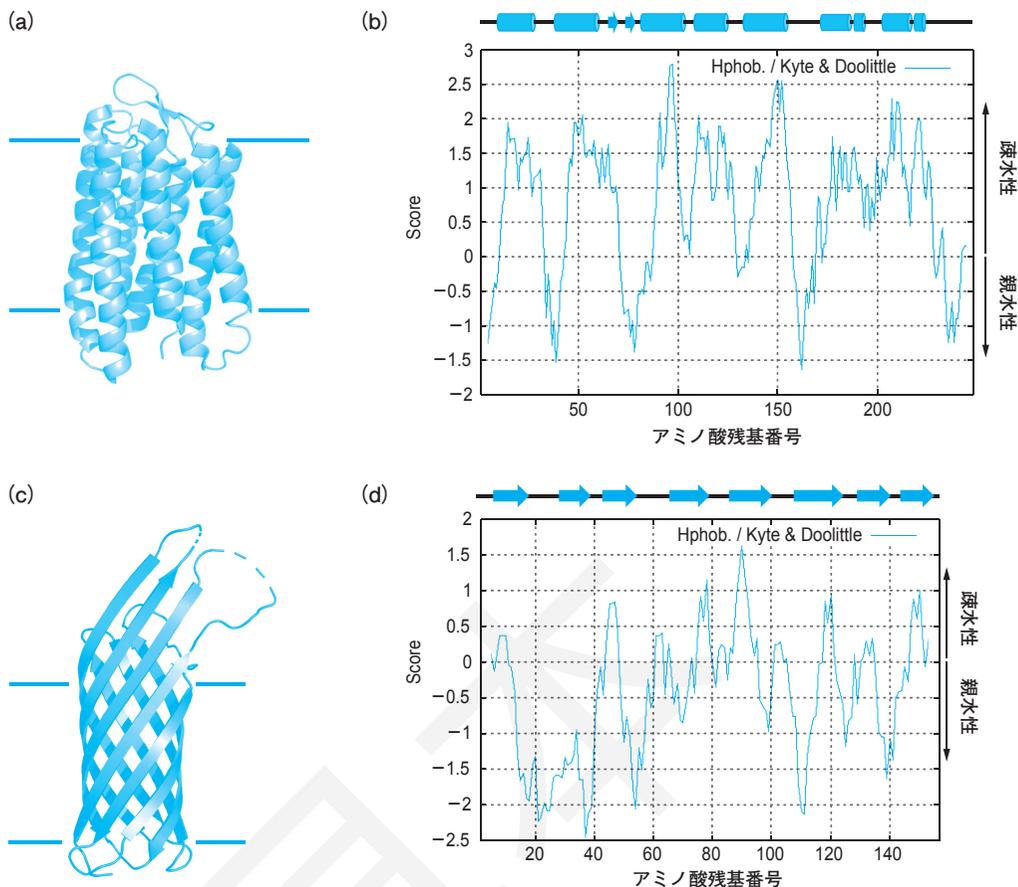


図3-5 膜タンパク質の構造とハイドロパシープロット

(a) バクテリオロドプシンの立体構造 (pdb id: 1FBB)。両わきの線に挟まれた領域がおおよその膜貫通部位。(b) バクテリオロドプシンのハイドロパシープロット。二次構造 (円筒, α ヘリックス: 矢印, β ストランド) のつながりをプロットの上に対応させた。疎水性のピークが α ヘリックスのある場所と対応している。(c) ペスト菌の外膜タンパク質 Ail の立体構造 (pdb id: 3QRA)。両わきの線に挟まれた領域がおおよその膜貫通部位。(d) Ail のハイドロパシープロット。疎水性のピークが β ストランドのある場所と対応しているようにみえる。ただし Ail のように β シートからなる膜タンパク質では、疎水性アミノ酸 (側鎖が外側を向く) と親水性アミノ酸 (内側を向く) が交互に繰り返す両親媒性構造をとる場合が多く、全体的に見るとあまり疎水性が高くないようにみえる。

等電点 isoelectric point, pI

等電点沈殿 isoelectric precipitation

イオン交換クロマトグラフィー
ion exchange chromatography

未変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動

native polyacrylamide gel electrophoresis, Native-PAGE

等電点電気泳動 isoelectric focusing

ンパク質) は正に荷電する。タンパク質分子の実効電荷がゼロになる pH を等電点 (pI) という (図3-6)。等電点ではタンパク質は電荷を失い、不溶性となって沈殿することが多い。これを等電点沈殿といい、タンパク質の分離に利用されることがある。またタンパク質の分子表面の電荷の違いを利用して、異なるタンパク質どうしを分離する技術も確立されており、その代表的な例としてイオン交換クロマトグラフィー、未変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動、等電点電気泳動、クロマトフォーカシングなどが知られている (第8章参照)。

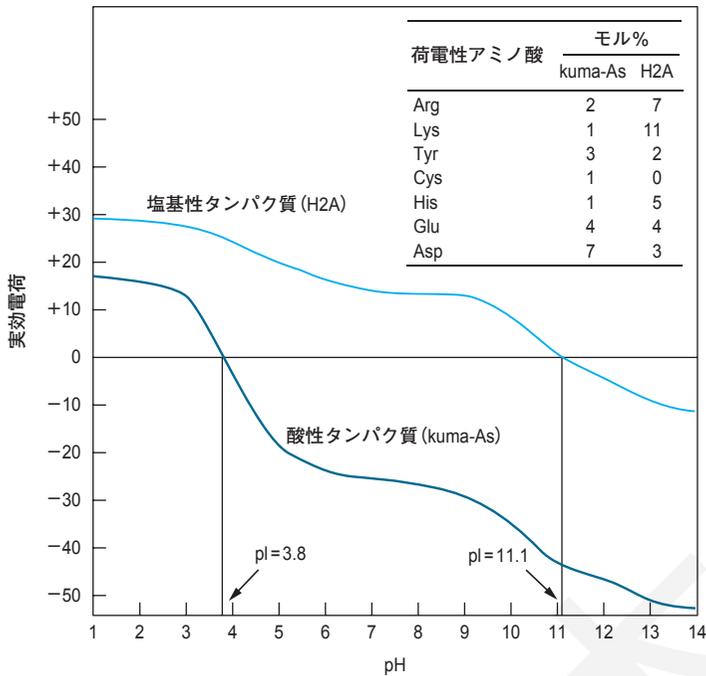


図3-6 タンパク質のpH 滴定曲線

酸性タンパク質および塩基性タンパク質の例としてそれぞれクマモライシン-As (kuma-As) およびヒストン2A (H2A) を取り上げ、それらの実効電荷をpHの関数としてプロットした。実効電荷が0となるpHが等電点である。グラフの右上に示した表は、それぞれのタンパク質に含まれる荷電性アミノ酸残基の組成をモル%で示したものである。

3-8 酵素タンパク質の変性と失活

これまでの説明から明らかなように、酵素タンパク質の立体構造と機能は、水素結合などの弱い相互作用やジスルフィド結合を通じて、ポリペプチド鎖がある一定のコンホメーションを形成することにより維持されている。この弱い相互作用を破壊する作用が酵素タンパク質に加わり、そのコンホメーションが破壊されることを**変性**という。加熱による卵白の凝固はタンパク質の変性の身近な例である。卵白の凝固の例からも明らかなように、変性によってタンパク質の物性は大きく変化し、その機能も失われる（酵素活性の喪失を**失活**という）。また多くの場合、この過程は不可逆的である（例外もある）。変性や失活をもたらす要因として、加熱、極端なpHへの曝露、変性剤の添加、物理的ストレスの付与などが挙げられる（3-8-1～3-8-5）。

変性 denaturation

失活 inactivation

3-8-1 加 熱

温度の上昇にともなって分子の振動が増大し、酵素タンパク質のコンホメーションを維持している弱い相互作用（水素結合、ファンデルワー

熱失活 thermal inactivation

ランダムコイル random coil

ルス力、双極子-双極子相互作用)が切断される。一方、疎水性相互作用は温度の上昇によりむしろ増強される。このようにして、温度の上昇により酵素タンパク質のコンホメーションを維持する力のバランスが崩れ、変性し、酵素活性は失われる。これを酵素の**熱失活**という。こうしたコンホメーションの崩壊は協調的に起こるため、変性は比較的小さな温度範囲で雪崩式に起こるのが普通である(コラム3-1も参照)。変性によって酵素分子の立体構造が完全に破壊され、そのポリペプチド鎖が特定の高次構造を形成せずにあたかも水中を漂う糸くずのようにふるまうとき、その構造を**ランダムコイル**とよぶ。

3-8-2 酵素の耐熱化

耐熱性酵素 thermostable enzyme

酵素の中には熱に安定なものもあれば、比較的低い温度で失活してしまうものもある。**耐熱性酵素**において、その耐熱化がどのように達成されているかは非常に興味深い問題である。これまでに数多くの酵素についてこの点が調べられてきたが、すべての耐熱性酵素に共通する普遍的な耐熱化戦略のようなものはみつかっていない。しかしながら耐熱性の高い酵素とそうでない酵素の構造を比較した場合、耐熱性酵素には次に挙げた特徴が少なくとも1つはみつかることが多い。

1. タンパク質分子内あるいはそのサブユニット間に、構造安定化作用をもった結合や相互作用(ジスルフィド結合、水素結合、疎水性相互作用、双極子-双極子相互作用、ファンデルワールス力)が多い。
2. タンパク質分子のループやターンの部分にプロリン残基が高頻度に存在する。
3. N末端やC末端のペプチド部分の自由度が小さい(ふらふらしていない)。
4. タンパク質分子表面に突き出たループがより短い。
5. タンパク質分子表面やループ部分に極性アミノ酸が少なく、タンパク質と溶媒の相互作用が少ない。
6. 金属酵素(3-13)においては、耐熱性の高いものほど金属結合能が高い傾向にある。

言い換えれば耐熱性を獲得するための手段は酵素タンパク質によってまちまちであって、これらの特徴を適宜組み合わせながらその効果を相加的あるいは相乗的に酵素の構造中に蓄積することにより、耐熱化がもたらされると考えられる。

3-8-3 極端なpHへの曝露

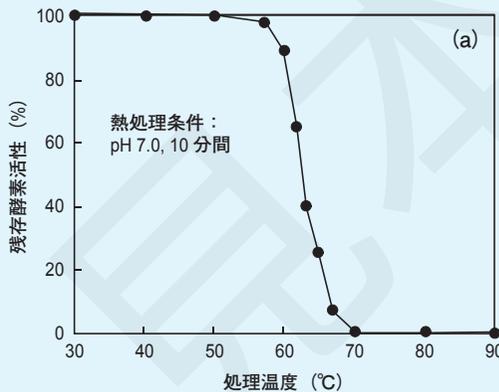
タンパク質の分子表面には極性アミノ酸残基(表3-1)が露出してお

り、そのなかには溶媒の pH によって側鎖の電荷が変化する荷電性アミノ酸が含まれる。pH の変化はこうした荷電性側鎖の電荷を変化させ、タンパク質の高次構造の礎となる弱い相互作用のネットワークの形成様式に影響を与える。極端な pH はこうしたネットワークの崩壊をもたらし、酵素タンパク質のコンホメーションを変化させ、変性させ、活性を失わせる（失活させる）。酸およびアルカリの添加によるタンパク質の変性、酵素の失活をそれぞれ**酸変性**、**酸失活**および**アルカリ変性**、**アルカリ失活**とよぶ。一般に酸変性はタンパク質を不溶化させ、逆にアルカリ変性はタンパク質を可溶化させる。トリクロロ酢酸などの添加により酸変性させたタンパク質を遠心分離で沈殿として回収することは、タンパク質の非特異的な回収方法として利用される。また酸失活やアルカリ失活は酵素反応の停止にしばしば利用される。

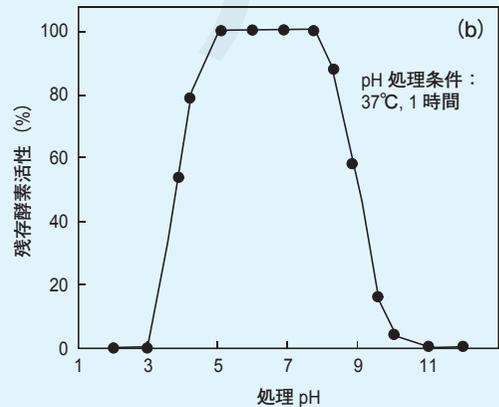
酸変性 acid denaturation
 酸失活 acid inactivation
 アルカリ変性 alkali denaturation
 アルカリ失活 alkali inactivation

コラム 3-1 酵素の熱安定性や pH 安定性の調べ方

熱安定性：酵素溶液をある一定温度で一定時間処理する（**熱処理**）。この熱処理をさまざまな温度で行う。熱処理に際しては、酵素溶液が所定の温度に達するまで長時間がかからないような工夫が必要である。例えば、すでに所定の温度に保たれた緩衝液に、濃縮された酵素液をごく少量加えることによって熱処理の開始とし、そのまま所定の温度で一定時間インキュベートする。熱処理の停止は、酵素溶液の入った試験管を氷水中で急冷することにより行う。熱処理した酵素標品の**残存活性**を、酵素反応の最適条件下で測定する。これを処理温度に対してプロットすると、処理温度の比較的狭い領域で残存酵素活性が急激に変化する図 (a) のようなグラフが得られることが多い。



熱安定性 thermostability
 熱処理 heat treatment



残存活性 residual activity, remaining activity

酵素溶液をある一定温度で熱処理しながら一定量を経時的にサンプリングして水冷し、残存活性を求め、これを処理時間に対してプロットするやりかたもある。このとき、酵素の状態が未変性 (N, 残存活性 100%) と

失活の2状態モデル
two-state model of inactivation

pH安定性 pH stability

安定pH領域
pH range of enzyme stability

変性剤 denaturant

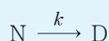
尿素 urea
塩酸グアニジン
guanidine hydrochloride
界面活性剤 detergent
クロロホルム chloroform
ヘキサン hexane

エタノール ethanol
フェノール phenol

カオトロピック試薬
chaotropic agent

ドデシル硫酸ナトリウム
sodium dodecyl sulfate

変性 (D, 残存活性 0%) の二通りがあり, 熱処理によって熱失活が次式



に従って起こるとき (k は失活の速度定数), これを**失活の2状態モデル**という. このモデルでは, 4-3-2 (2) で述べるのと同様な取り扱いによって, 失活過程は一次反応として記述することができ, 残存活性の常用対数を時間に対してプロットすると右下がりの直線が得られる (図 4-3 参照).

pH安定性: 酵素溶液をある pH にて一定温度で一定時間処理する (pH 処理). この pH 処理をさまざまな pHで行う. pH 処理の停止は, 処理 pH をその酵素の安定 pH (あらかじめ予備実験で把握しておく) に戻すことにより行う. それぞれの pH で処理した酵素標品の残存活性を, 酵素反応の最適条件下で求める. 残存酵素活性を処理 pH に対してプロットすると, 図 (b) のような台形状のグラフが得られることが多い. 酵素が安定に存在できる pH 範囲 (図 (b) では pH 5~8) を**安定 pH 領域**という. 酵素の反応最適 pH はほとんどの場合その酵素の安定 pH 領域内にあるが, 例外も知られている (第 6 章参照).

3-8-4 変性剤の添加

タンパク質を変性させる効果のある化学物質を**変性剤**といい, 有機溶媒, **尿素**と**塩酸グアニジン**, **界面活性剤**などがこれに該当する.

(1) **有機溶媒** クロロホルムやヘキサン (図 3-7 (a)) などの非極性分子は, タンパク質の非極性アミノ酸側鎖や他の疎水性部分と疎水性相互作用することにより, タンパク質の立体構造形成に寄与していた疎水性相互作用を遮断する. 極性基を有する**エタノール**, **フェノール**などの溶媒分子には, 上述の作用に加えて, 水やタンパク質分子中の極性基と水素結合を形成することによりタンパク質を変性させる効果もある.

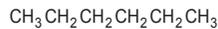
(2) **尿素**と**塩酸グアニジン** 高濃度の**尿素** (8 M, 図 3-7 (b)) や**塩酸グアニジン** (6 M) は, タンパク質の強力な変性剤である. 前に述べたように, タンパク質の立体構造形成において, 疎水性アミノ酸残基がお互いの疎水性相互作用を介してタンパク質の分子内部に集合し, コンホメーションを安定化する. 尿素や塩酸グアニジンはタンパク質分子内部に進入し, 溶媒の水分子が疎水性残基に水和するのを助ける働きをする (このような働きをもつ試薬を**カオトロピック試薬**という). 高濃度の尿素や塩酸グアニジンが存在すると, タンパク質分子内の疎水性相互作用が水和により破壊され, タンパク質の高次構造形成の基盤が崩壊することになる.

(3) **界面活性剤** **ドデシル硫酸ナトリウム** (SDS, 図 3-7 (c)) も尿素や塩酸グアニジンとならんで生化学実験で頻繁に用いられる変性剤である. この化合物は極性頭部と長い疎水性尾部をもち, タンパク質の分

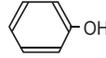
(a) 有機溶媒



クロロホルム



ヘキサン

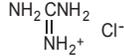


フェノール

(b) カオロトピック試薬



尿素



塩酸グアニジン

(c) 界面活性剤

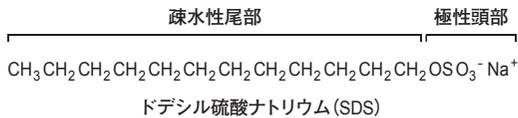


図 3-7 さまざまな変性剤

子内部に進入してその疎水性尾部の部分でタンパク質分子内の疎水性残基と相互作用することにより、タンパク質の構造を安定化していた疎水性相互作用を破壊する。

3-8-5 物理的ストレス

タンパク質溶液の激しい攪拌、泡立ち、超音波の照射などは、タンパク質を変性させることがある。

3-9 酵素タンパク質のコンホメーションは一次構造により規定される——アンフィンゼンの実験

いったん変性した酵素タンパク質の構造をもとの天然型のコンホメーションに戻すことを「再生」または「巻き戻し」という。従来は、タンパク質の変性は多くの場合不可逆的であって、変性の原因となった要因を取り除いたとしても、変性タンパク質の構造が天然型のコンホメーションに自発的に再生することはないと考えられていた。しかしながら米国のアンフィンゼンは、ランダムコイルの状態にあるリボヌクレアーゼ A (リボ核酸分解酵素の一種) を試験管内で活性化コンホメーションに巻き戻すことができることを実験的に示し、タンパク質の変性と再生が自発的かつ可逆的に起こりうることを立証した (図 3-8)。この結果は、酵素タンパク質の天然型のコンホメーション形成に必要な情報がポリペプチドのアミノ酸配列中に内蔵されていること、すなわち、酵素タンパク質の一次構造が立体構造を規定していることを意味するものであり、タンパク質の立体構造の形成機構の理解に大きなインパクトを与えた。

再生 renaturation
巻き戻し refolding

アンフィンゼン Anfinsen, C. B.
リボヌクレアーゼ A ribonuclease A

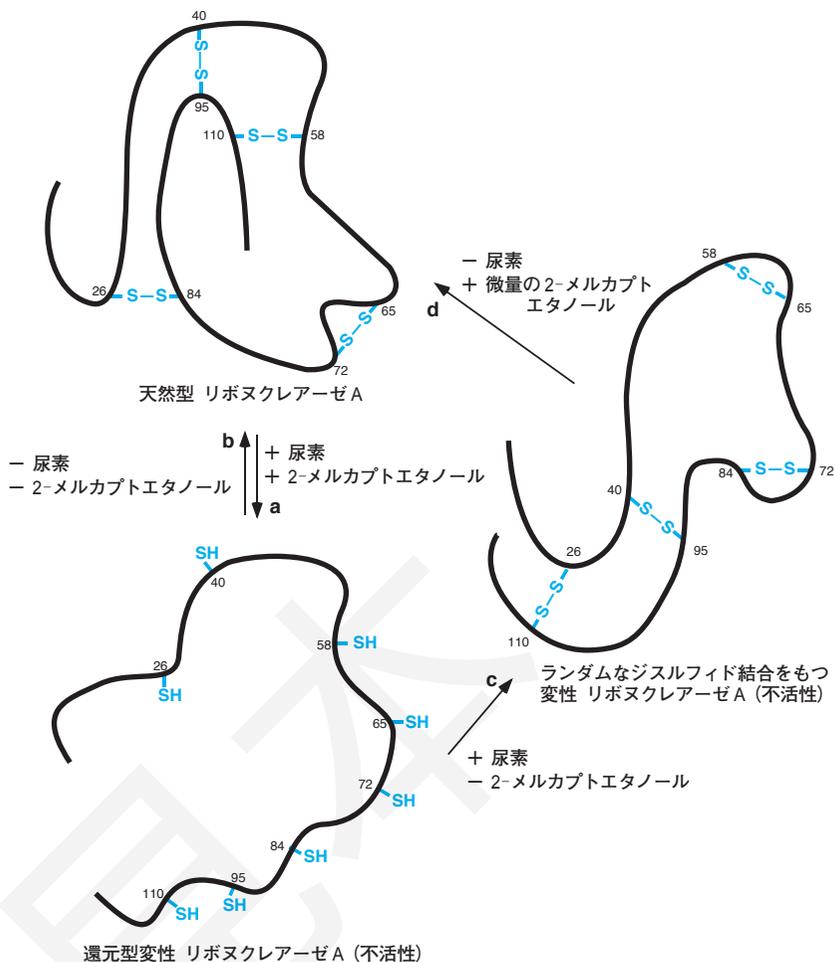


図 3-8 アンフィンゼンの実験

リボヌクレアーゼ A (黒いひも) は4つのジスルフィド結合をもち、天然の活性型では Cys26 と Cys84, Cys40 と Cys95, Cys58 と Cys110, Cys65 と Cys72 の間に架橋されている。このタンパク質を 8 M 尿素存在下、2-メルカプトエタノールで還元すると、これら8つのシステイン残基が還元された状態のランダムコイルが生成する (矢印 a)。透析によって変性剤と還元剤をゆっくり除去すると、このタンパク質は天然型に自発的に巻き戻る (矢印 b)。一方、変性剤存在下で還元剤のみを除去した場合には、ランダムコイルの状態ですルフィド結合が生成し、酵素活性をもたない変性リボヌクレアーゼ A が生成する (矢印 c)。この変性タンパク質を微量の還元剤存在下で透析すると、誤った組み合わせのジスルフィド結合が還元され、タンパク質は天然型のコンホメーションに自発的に巻き戻るとともに、正しい組み合わせのシステイン残基どうしが互いに接近し、ジスルフィド結合が正しく架け替えられる (矢印 d)。矢印 b や c-d の操作により、不活性な変性型から活性をもつ天然型が自発的に生成するという事実は、このタンパク質の立体構造がアミノ酸配列によって一義的に規定されていることを物語っている。

アンフィンゼンはこの研究成果により、1972年のノーベル化学賞を受賞した (第1章, コラム 1-1)。

3-10 タンパク質の折りたたみと分子シャペロン

酵素をはじめとして、タンパク質は、生体内では細胞内のリボソーム

においてN末端からC末端方向にアミノ酸残基を1つずつ縮合させていくことにより合成される。その場合、ポリペプチド鎖は合成の途上でずっとランダムコイルの状態が存在しているわけではない。アンフィンゼンの実験の結果はタンパク質の試験管内巻き戻しの例外的な成功事例であり、ランダムコイルの状態にある長いポリペプチド鎖がひとりでに活性なコンホメーションに正しく巻き戻るのは、実際には困難なことの方が多し。タンパク質は、細胞内ではほとんどの場合、その合成の途上でポリペプチド鎖の正しい折りたたみを補助する別のタンパク質の助けがあってはじめて、活性なコンホメーションにきちんと折りたたまれることができる。このように細胞内には、他のタンパク質と一時的に相互作用して不安定な立体構造を安定化させ、間違っただけの折りたたみを抑制して正しい折りたたみへと導くタンパク質群が存在する。そのような働きをもつタンパク質のことを**分子シャペロン**（または単にシャペロン^{*1}）という。

分子シャペロンはもともと、細胞に**熱ショック**^{*2}を与えたときに細胞内に誘導されるタンパク質の一群（**熱ショックタンパク質**、hsp）として見いだされた。Hspの役割は、熱変性しかけた細胞内タンパク質に結合してこれを天然型のコンホメーションに巻き戻し、熱ショックによる細胞機能の傷害を防ぐことであると理解された。その後、熱ショックに限らず、他のさまざまなストレス（低温、重金属、有機溶媒など）でも同類のタンパク質が細胞内に発現することが見いだされ、hspは**ストレスタンパク質**とも総称されるようになった。さらにこれらのタンパク質は、タンパク質の折りたたみの補助ばかりでなく、タンパク質分子間の会合（オリゴマー形成）、細胞骨格などの細胞内構造物とタンパク質の相互作用、タンパク質の細胞内輸送、タンパク質の細胞内分解など、タンパク質が細胞内で合成されてからその役割を終えるまでのさまざまな局面で、補助的な役割を果たすことが示されている。

コラム3-2 分子シャペロン

分子シャペロンはその分子質量に基づいていくつかのファミリーに分類される（hsp10, 20, 40, 60, 70, 90, 100；数字はタンパク質の分子質量のkDa表示）。これらのファミリーはそれぞれ、原核生物、真核生物のいずれにも見いだされる。各ファミリーのhspは生物種に応じてそれぞれ固有の名称でよばれることが多い。例えば大腸菌のhsp60はGroEL、hsp70はDnaKとよばれ、酵母ではそれぞれTRiCおよびBiPなどとよばれる。hspのなかにはATPase（ATP分解酵素）活性をもち、その機能にエネルギーを要求するものもある。各hspファミリーの細胞内での役割は少しずつ異なっており、また異なるファミリー間で役割分担があることもわかっている。例えば大腸菌のタンパク質生合成では、リボソームにおいて

分子シャペロン
molecular chaperone
熱ショック heat shock

*1 もともとシャペロンとは、ヴィクトリア朝時代のイギリスにおける女性の家事使用人（メイド）の上級職の1つのことで、若い未婚の女性が初めて社交界にデビューするときに社交の礼儀作法を指導する役割を担った。その役割から転じて分子シャペロンという用語がつけられた。

*2 例えば37℃で生育する大腸菌に42℃の熱をかけるように、細胞の通常の生育温度より数度高い温度にさらすこと。

熱ショックタンパク質
heat shock protein
ストレスタンパク質 stress protein

伸張しつつあるポリペプチド鎖にまず hsp70 が貼り付いてミスフォールドを抑制しながらこれを正しい折りたたみへと導く。次いでこのポリペプチドは hsp60 に渡され、その最終的な折りたたみを完成させる。大腸菌の hsp60 も hsp70 も ATPase 活性をもち、その機能発現に ATP の加水分解を伴う。

3-11 酵素の機能進化とタンパク質工学

これまでにみてきたように、酵素はアミノ酸という構成単位からなる高分子であり、その触媒活性や特異性はアミノ酸の配列により規定される立体構造により支配される。このことはまた、この構成単位を適宜入れ換えること（**アミノ酸置換**）により、酵素の機能（触媒活性、特異性）や安定性を変化させることができる可能性を示唆している。

酵素のアミノ酸配列は DNA（**デオキシリボ核酸**）の**ヌクレオチド配列**（塩基配列ともいう）として**遺伝子**にコードされている。したがってこのヌクレオチド配列を改変すれば、酵素のアミノ酸配列を変えることができる。現在では、酵素分子中の特定の**アミノ酸残基**（あるいはペプチド領域）の置換、削除、挿入、追加等を行う技術が確立され、酵素の機能や安定性の発現のしくみを調べたり改善したりすることが可能となっている。ただし、アミノ酸配列の改変によって酵素の機能や安定性がどのように変わるのか（あるいは変わらないのか）を予測することは現在でも必ずしも容易ではない。そのようなことを調べる学問を**タンパク質工学**という。第9章で述べる洗剤用酵素など産業用酵素の多くは、使用目的に合致した条件で最良の機能を発揮するようにタンパク質工学的に改良されたものである。

自然界においても遺伝子の塩基配列の改変は偶発的に起こっている。これを**突然変異**という。生物は**進化**の過程で、突然変異の積み重ねにより多種多様な酵素を進化させてきたと考えられている。例えば、生物進化の途上である酵素遺伝子のコピーができ（これを**遺伝子重複**という）、それぞれの遺伝子にさまざまな突然変異が別個に導入されることによりアミノ酸の**置換**、**欠失**、**挿入**がもたらされ、もとの酵素とは異なる機能をもつに至ったと思われる例が多数見つかっている。このような進化様式を**分散進化**という。

酵素の分散進化に関する興味深い事例は、大腸菌のトリプトファンの生合成経路において連続した2つの反応を触媒する酵素、ホスホリボシルアントラニル酸異性化酵素（PRAI）とインドール 3-グリセロールリン酸合成酵素（IGPS）にみられる。両酵素遺伝子は互いに大腸菌ゲノ

アミノ酸置換
amino acid substitution

デオキシリボ核酸
deoxyribonucleic acid
ヌクレオチド配列
nucleotide sequence
遺伝子 gene

タンパク質工学 protein engineering

突然変異 mutation
進化 evolution

遺伝子重複 gene duplication

置換 replacement
欠失 deletion
挿入 insertion
分散進化 divergent evolution

ム DNA 配列中のごく近傍に存在し、またこれらの酵素の立体構造はすでに解明され共通の構造モチーフをとることがわかっている。そこで遺伝子工学的手法を用いて実験室内でそのような進化を模倣することにより、実際に IGPS を PRAI に作りかえる試みが行われた。IGPS 遺伝子に種々の置換、欠失、挿入変異を導入し、選抜（淘汰）を行った結果、実際に IGPS 活性を欠き、かつ高い PRAI 活性をもつ「IGPS 変異体」が得られている。このように、現在では、酵素の分子進化に寄与したと考えられるメカニズムを実験室内で短時間で人為的に模倣すること（**実験室内進化**）により、目的の性質や機能をもった酵素を創製することが可能となってきており、**分子進化学***1として注目を浴びている。

実験室内進化

experimental evolution

分子進化学

molecular evolution engineering,

directed evolution

*1 分子進化学研究の端緒を切り拓いた3名の研究者（アーノルド (Arnold, F. H.), スミス (Smith, G. P.), ウィンター (Winter, G. P.)) に2018年ノーベル化学賞が授与された。

3-12 補助因子の役割と種類

これまで、タンパク質が酵素分子の本体であることを述べてきたが、すべての酵素が、そのタンパク質部分のみで酵素活性を発現させることができるわけではない。酵素のなかにはその触媒作用の発現に低分子性の**補助因子**を必要とするものがある。こうした補助因子は金属イオンのこともあれば有機化合物のこともある*2。有機性補助因子のことを**補酵素**とよぶ。また、補助因子と酵素タンパク質の複合体を**ホロ酵素**とよび、ホロ酵素から補助因子を取り除いたタンパク部分を**アポ酵素**とよぶ。

補助因子 cofactor

補酵素 coenzyme

ホロ酵素 holoenzyme

アポ酵素 apoenzyme

*2 スイスバイオインフォマティクス研究所 (Swiss Institute of Bioinformatics) が運営するさまざまな情報科学データベースに酵素データベース ENZYME - The Enzyme Data Bank (<http://enzyme.expasy.org/>) がある。このデータベースを用いて、補助因子ごとにそれを必要とする酵素にはどのようなものがあるかを調べることができる。

酵素分子の本体を構成するタンパク質は生体高分子のなかでは化学的多様性に最も富んだものであるとはいえ、その構成単位であるアミノ酸残基の中で化学触媒作用を直接担いうるアミノ酸残基（側鎖）は8種類に過ぎず（表3-2）、生体内で必要とされるすべての化学触媒作用をそれらのみで担うことは困難である。例えば、アミノ酸側鎖のなかには求電子試薬となりうるものは存在しないし、酸化還元試薬の品揃えも不十分である。補助因子の役割の1つは、タンパク質のこうした化学的性質の限界を克服する活性基となって活性部位に結合し、化学触媒作用に直接関与することである（触媒的役割）。これにより酵素が触媒できる化学反応のレパートリーは格段に広いものとなる。反応の中心的役割は補助因子が担い、酵素のタンパク質部分はその反応に適切な場を提供する（特異性を支配する）といった機能分担がみられる場合もある。補助因子（とりわけ金属イオン）にはもう1つの重要な役割が知られている。それは、化学触媒作用に直接関与するのではなく、酵素分子中であたかも「かすがい」や「つかえ棒」のように作用してその触媒機能に必要なコンホメーションを維持することである（構造的役割）。

動物の栄養素として必須なビタミンのなかには補酵素の前駆体となる

ものがある（コラム 3-3）。微量必須元素や一部のビタミンの必須性は、酵素の補助因子としての働きとの関連で理解することができる。

コラム 3-3 ビタミンと補酵素

動物の栄養素のうちで、糖、脂質、タンパク質（アミノ酸）、無機質以外に必要とされる有機物を**ビタミン**という。ビタミンが欠乏するとさまざまな欠乏症状が現れる。生体内で補酵素に変換されるビタミンにはB群のものが多い。

ビタミン vitamin

ビタミン	関連する補酵素	欠乏症状
チアミン (B ₁)	チアミンピロリン酸	脚気、ウェルニッケ脳症
リボフラビン (B ₂)	フラビン補酵素	口角炎、脂漏性皮膚炎
ニコチン酸 (B ₃)	ビリジヌクレオチド補酵素	ペラグラ様症候群
パントテン酸 (B ₅)	補酵素 A	(鳥類での) 皮膚炎
ピリドキシン (B ₆)	ピリドキサル 5'-リン酸	皮膚炎、胸腺萎縮 (免疫能低下)
シアノコバラミン (B ₁₂)	コバラミン補酵素	悪性貧血、神経障害
ビオチン (H)	ビオチン	脱毛、皮膚炎
葉酸 (M)	テトラヒドロ葉酸	巨赤芽球性貧血

3-13 金属酵素と金属活性化酵素

活性発現に必須な金属イオンをタンパク分子内に強固に結合する酵素を**金属酵素**とよぶ。金属酵素の金属結合力は強いので、金属はタンパク分子から容易には解離しない（解離定数、nM あるいはそれ以下のレベル）。これとは対照的に金属結合力が弱いために、その活性化に比較的高濃度（ μM ~ mM レベル）の金属イオンの添加を必要とする酵素（**金属活性化酵素**）もある。これまでに知られている酵素のおよそ3分の1は金属酵素または金属活性化酵素であるといわれている。酵素に用いられている金属はおもに次の15種類であり（Seは非金属）、これらのうち遷移金属が10種類を占める。

アルカリ金属：Na, K

アルカリ土類金属：Ca, Mg

第1 遷移金属：V, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn

第2 遷移金属：Mo, Cd

第3 遷移金属：W

硫黄族元素：Se

これらの金属イオンの酵素への結合のしかたは、次の3とおりに大別できる。

- 1) アミノ酸残基で形成される金属結合部位に結合する
- 2) 補欠分子族の一部として酵素に結合する（例：ヘム、モリブドプ

金属酵素 metalloenzyme

金属活性化酵素
metal-activated enzyme

表 3-3 酵素に結合する金属の例とその役割の例

金属	要求する酵素の例	結合金属数	酵素の機能発現における金属の役割 S：構造的役割 C：触媒的役割 (C1, C2, C3, C4：脚注参照)
Na ⁺ /K ⁺			
	β -ガラクトシダーゼ (<i>E. coli lacZ</i> , EC 3.2.1.23)	1 Na/活性部位	酵素の活性発現
Ca ²⁺			
	サチライシン (EC 3.4.21.62)	起源により異なる ^{†1}	S (構造の安定性維持)
	α -アミラーゼ (EC 3.2.1.1)	起源により異なる ^{†2}	S (構造の安定性維持)
	メタノール脱水素酵素 (EC 1.1.2.7)	1 Ca/ α サブユニット	C4
Mg ²⁺			
	キナーゼ (EC 2.7.-.-)		ATPの負電荷の中和
	β -ガラクトシダーゼ (<i>E. coli lacZ</i>)	1 Mg/サブユニット	S (触媒アミノ酸残基の最適な配向性の維持)
Mn ²⁺			
	アルギナーゼ (EC 3.5.3.1)	2 Mn/サブユニット	C3 (基質 (水) の活性化)
	Mn スーパーオキシドディスムターゼ (EC 1.15.1.1)	1 Mn/サブユニット	C2
	Mg ²⁺ 要求性酵素における Mg ²⁺ の代替		
Zn ²⁺			
	炭酸デヒドラターゼ (EC 4.2.1.1)	1 Zn/サブユニット	C3 (基質 (水) の活性化)
	コラゲナーゼ (EC 3.4.24.3)	1 Zn/単量体酵素	C3 (基質 (水) の活性化)
	アルコール脱水素酵素 (EC 1.1.1.1)	2 Zn/サブユニット	C3 (アルコールの活性化) および S
Co			
	ビタミン B ₁₂ 依存性酵素 (例：EC 4.2.1.28)	1 Co/サブユニット	補酵素 (アデノシルコバラミン) の構成成分
	リシン 5,6-アミノムターゼ (EC 5.4.3.4)	1 Co/ $\alpha\beta$ サブユニット界面	補酵素 (アデノシルコバラミン) の構成成分
Cu ²⁺			
	カテコールオキシダーゼ (EC 1.10.3.1)	2 Cu/単量体酵素	C2 (type III 銅)
	ガラクトースオキシダーゼ (EC 1.1.3.9)	1 Cu/単量体酵素	C2 (type II 銅, 薄い青色)
	L-アスコルビン酸オキシダーゼ (EC 1.10.3.3)	4 Cu/サブユニット	C2 (type I, 1 原子 (濃い青色); type II, 1 原子; type II, 2 原子)
	Cu/Zn スーパーオキシドディスムターゼ (EC 1.15.1.1)	1 Cu+1 Zn/サブユニット	C2 (type II 銅)
Ni ²⁺			
	ウレアーゼ (EC 3.5.1.5)	2 Ni/サブユニット	C3 (尿素の活性化)
Fe ²⁺			
	リポキシゲナーゼ (EC 1.13.11.12)	1 Fe/単量体酵素	C2
	ヘム依存性酵素 (例：ペルオキシダーゼ, EC 1.11.1.7)	1 Fe/単量体酵素	C2
	鉄硫黄クラスター		C2 (電子伝達)
	Fe スーパーオキシドディスムターゼ (EC 1.15.1.1)	1 Fe/サブユニット	C2
Mo			
	CO デヒドロゲナーゼ (EC 1.2.3.1)	1Mo+1Cu/L サブユニット	C2 (Mo はモリブドプテリンとして含有) M サブユニット (フラビンタンパク) S サブユニット (鉄硫黄クラスター)
	ニトロゲナーゼ (EC 1.18.6.1)	Fe-Mo 補酵素	C2
	キサントキシダーゼ (EC 1.17.3.2)	8Fe+2Mo/サブユニット	C2 (鉄は鉄硫黄クラスターに, Mo はモリブドプテリン補酵素に含まれる)
Se			
	グルタチオンペルオキシダーゼ (EC 1.11.1.9)	1 Se/サブユニット	C2 (セレノシステインとして含有)
V			
	ハロペルオキシダーゼ (EC 1.11.1.18)	1V/サブユニット	C2

C1, 活性中心において基質と相互作用をする；C2, 酸化還元反応に関与する；C3, 水やその他の求核試薬の活性化に関与する；C4, 求電子の効果による結合の分極

†1 単量体酵素あたり サチライシン BPN[†], 2Ca; thermitase, 3Ca; サチライシン Sph および S41, 5Ca.

†2 単量体酵素あたり ブタ臍臓酵素, 1Ca; コウジカビ酵素, 2Ca; 枯草菌酵素, 3Ca; *Bacillus amyloliquefaciens* 酵素, 4Ca.

テリン補酵素)

3) 特定の原子団に組み込まれた形で結合する (例: 鉄-硫黄クラスター)

これらの金属の具体的役割は酵素によってさまざまであるが、大まかには次のようにまとめることができる。

1) 酵素の活性や安定性に必須なタンパク質立体構造の維持 (構造的役割)

2) 触媒的役割

C1: 活性中心において基質と相互作用をする

C2: 酸化還元反応に関与する

C3: 水やその他の求核試薬の活性化に関与する

C4: 求電子的効果による結合の分極

表 3-3 は、金属酵素や金属活性化酵素の例、およびそれらにおける金属の役割を、金属別にまとめたものである。

3-14 補酵素

補欠分子族 prosthetic group

補助基質 co-substrate

ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド
nicotinamide adenine dinucleotide
フラビンアデニンジヌクレオチド
flavin adenine dinucleotide

金属と同様に補酵素にも、酵素に強固に結合するタイプと、酵素から容易に解離するタイプがある。前者のタイプの補酵素を**補欠分子族**とよぶ。後者のタイプの補酵素は酵素反応により変化したのち酵素から解離し細胞内の別の場所でもとの形に再生されるので、一種の基質とみなすことができ、**補助基質**または**基質型補酵素**ともよばれる。一方、補欠分子族は一回転の酵素反応で酵素分子内でもとの形に再生されるので**触媒型補酵素**と考えることができる。これまでに知られている補酵素のおもな役割を表 3-4 にまとめた。基質型補酵素および触媒型補酵素の典型的な例として、それぞれ酸化還元反応に重要な役割を果たす**ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NAD⁺)**と**フラビンアデニンジヌクレオチド (FAD)**の構造を図 3-9 に示す。

補酵素要求性の酵素では多くの場合、直接的な触媒作用は補酵素が担う一方、どの基質に作用するかは酵素のタンパク質部分によって決定される。また補酵素の触媒作用に幾通りかある場合、そのどれを採用するかを決めるのもタンパク質部分である。つまり酵素は自分の好みに応じて基質とその加工方法を選び、加工作業そのものは補酵素に任せているといえる。言い換えれば、基質特異性と反応特異性は酵素のタンパク質部分が支配し、触媒反応そのものは補酵素が担当するということになる。

表 3-4 いくつかの代表的な補酵素とそのおもな役割

I. 基質型補酵素	
ニコチンアミドアデニン	
ジヌクレオチド (リン酸) [NAD(P) ⁺]	酸化還元
補酵素 A (CoA)	アシル基の活性化と転移
アデノシン 5'-三リン酸 (ATP)	リン酸基転移
糖ヌクレオチド	糖転移
テトラヒドロ葉酸	1 炭素原子転移
II. 触媒型補酵素	
フラビンアデニンジヌクレオチド (FAD)	酸化還元
フラビンモノヌクレオチド (FMN)	酸化還元, プロトン転移
ピロロキノリンキノン (PQQ)	酸化還元
チアミンピロリン酸 (TPP)	脱炭酸, トランスケトララーゼ
ヘム	酸化還元
ビオチン	カルボキシル化
ピリドキサル 5'-リン酸 (PLP)	アミノ酸のアミノ基転移, 脱炭酸, ラセミ化, β-および γ-脱離
コバラミン	基の転位, メチル基転移

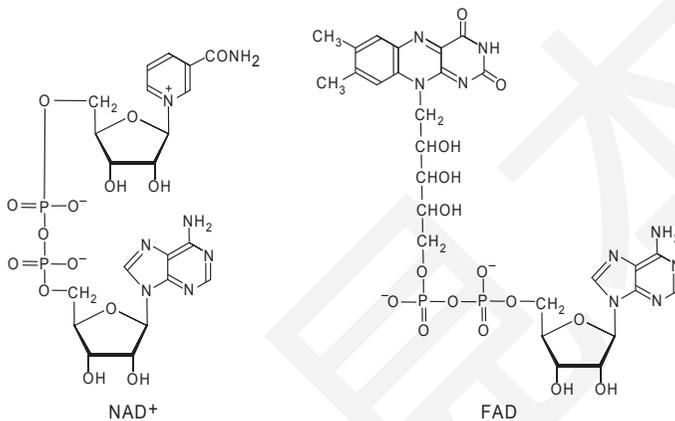


図 3-9 NAD⁺と FAD の構造

3-15 ビルトイン型補酵素

上述のように補助因子は外来性のものが多いが、タンパク質のアミノ酸残基そのものが修飾を受けて補酵素として機能する例もある (図 3-10)。これらはタンパク質の一部が補酵素に変化してその役割を果たす、いわば「タンパクに組み込まれた補酵素」ともいうべきもので、**ビルトイン型補酵素**とよばれている。ビルトイン型補酵素には酸化還元反応に関わるものが多いが、そうでないものもある (ピルボイル基)。

ビルトイン型補酵素
built-in type cofactor

3-16 タンパク質補酵素

酵素機能の発現に、それ自体では触媒活性を示さない別のタンパク質の存在を必要とする場合がある。そのようなタンパク質はタンパク質補

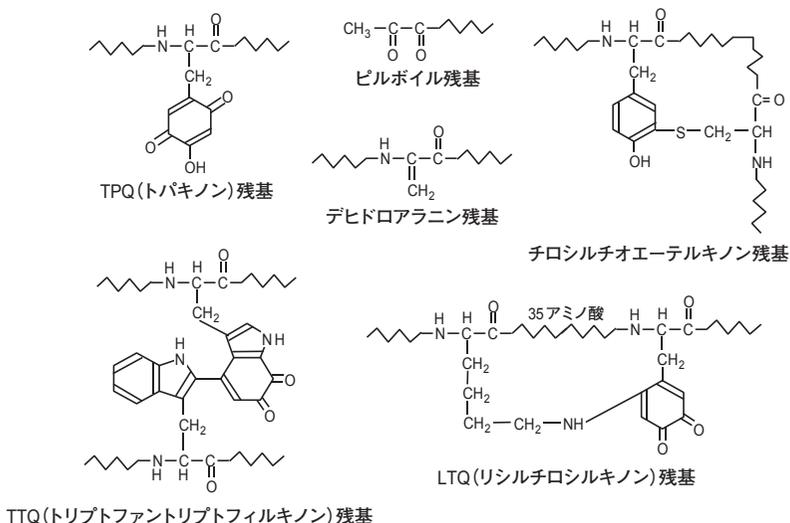


図 3-10 ビルトイン型補酵素

酵素とよばれ、通常、その分子内に補酵素機能を果たす金属イオンや補欠分子族を含んでいる。タンパク質補酵素の例として、脂肪酸の生合成でアシル基の運搬体として働くアシルキャリアプロテイン、酸化還元補酵素として機能する鉄-硫黄タンパク質やシトクロム *c* などが挙げられる。

コラム 3-4 蛍の光も酵素反応

生物発光 bioluminescence

生物にみられる発光現象を**生物発光**という。ホタルをはじめとして、夜光虫、ウミホタル、オワンクラゲなどによく知られた発光生物であり、他にもキノコ（ヤコウタケ）、貝（ラチア）、ヒトデ（ヒカリクモヒトデ）、発光細菌など、発光生物の例は多く、特に海産の生物によく見いだされる。生物発光はいずれも酵素反応で、発せられる光は可視光であり、白熱灯のような発熱体から発せられる光とは異なり赤外線をほとんど含まないため、「冷光」とよばれる。

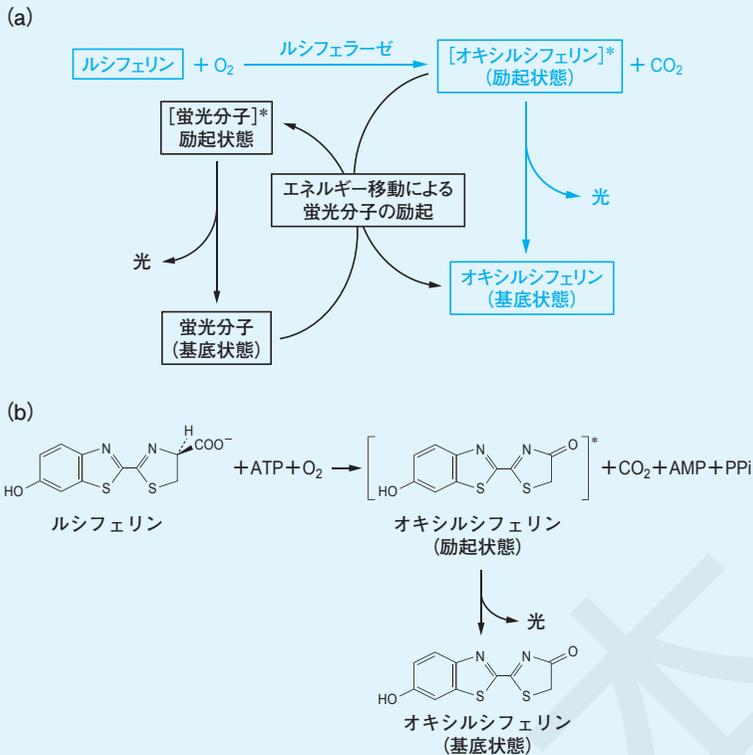
ルシフェリン luciferin

ルシフェラーゼ luciferase

生物発光反応は、**ルシフェリン**（発光基質）と総称される基質の酸化的脱炭酸反応であり、これは**ルシフェラーゼ**と総称される酵素によって触媒される。ルシフェリンの構造は発光生物種によって異なっており、ルシフェラーゼのアミノ酸配列もまた同様であるが、発光反応のしくみは、生物種を問わず次のとおりであると考えられている。ルシフェラーゼはルシフェリンを基質とするオキシゲナーゼ（第1章参照）であり、酸素分子を用いてルシフェリンを酸素化し、**オキシルシフェリン**を生成する。生成直後のオキシルシフェリンは**励起状態**にあり、これが基底状態に戻るときに放出されるエネルギーが光として発せられる（図 a, 青）。発光生物の種類によっては、励起状態のオキシルシフェリンのエネルギーを別の発光分子に渡してこれを励起させ、この励起分子が基底状態に戻るときにエネルギーが光として放出される場合もある（オワンクラゲなどの場合；図 a, 黒）。一例として、ゲンジホタルの生物発光におけるルシフェリンの構造

オキシルシフェリン oxyluciferin

励起状態 excited state



と反応式を図bに示す（ゲンジホタルのルシフェラーゼ反応ではエネルギー分子であるATPも必要とされる）。

ゲンジホタルのルシフェラーゼについて、3-11で述べたタンパク質工学との関連で興味深いのは、酵素のアミノ酸配列のわずかな違いによって発光の色が変化する点である。ゲンジホタルのルシフェラーゼタンパク質は548アミノ酸残基からなり、野生型酵素の反応ではわずかに青みがかった黄色の光が発せられる。一方、この酵素のセリン286がアスパラギンに置き換わっただけの変異型酵素（S286N）も酵素活性を示すが、発せられる光の色は赤みを帯びている。光の色の違いは波長の違いを表し、波長の違いはエネルギーの違いを表す。変異による発光色の違いは、それぞれの酵素の作用によって生成したオキシルシフェリンの励起状態と基底状態との間のエネルギー差の違いを反映している。野生型酵素ではこのエネルギー差が大きく（光の波長が短い＝青みを帯びる）、変異型酵素ではより小さい（光の波長が長い＝赤みを帯びる）。野生型酵素やS286N変異体およびそれらの酵素反応中間体の構造類似体との複合体の立体構造が解明され、このことを立体構造の面から裏づける結果が得られている。S286N変異体では、オキシルシフェリン励起状態の活性部位への収まり具合にゆらぎがあるものと推定され、エネルギーの一部が熱運動のために消費されてしまうため、その分だけ基底状態とのエネルギー差が小さくなり、光の波長が長くなると考えられている。

演習問題

1. 酵素タンパク質を構成するアミノ酸のうち、次の性質をもつものを列挙せよ。必要に応じて表3-1を参照せよ。

- (1) プロキラルなアミノ酸
- (2) 不斉炭素原子を2つもつ (2つ)
- (3) 芳香族アミノ酸 (3つ)
- (4) ヒドロキシ基をもつ (3つ)
- (5) イミノ基をもつ
- (6) 含硫アミノ酸 (2つ)
- (7) 互いに異性体の関係にある
- (8) 分岐した側鎖をもつ (分岐鎖アミノ酸)
- (9) 260~280 nm 付近に吸収極大をもつ
- (10) 疎水性側鎖をもつアミノ酸
- (11) 酸性アミノ酸 (2つ)
- (12) 塩基性アミノ酸 (3つ)
- (13) 酸アミド基側鎖をもつ (2つ)
- (14) イオン性側鎖をもつ
- (15) 求核試薬となりうる側鎖をもつ
- (16) 求電子試薬となりうる側鎖をもつ
- (17) 酸化により2量体を形成する
- (18) 側鎖が水素結合形成能をもつ

2. 次のアミノ酸のペアのうち、酵素分子内で側鎖間の (1) 共有結合, (2) イオン結合, (3) 水素結合, (4) 疎水性相互作用を形成することが期待できるものはどれか.

- Ⓐ Tyr と Glu, Ⓑ Phe と Phe, Ⓒ Asp と Arg, Ⓓ Cys と Cys, Ⓔ Leu と Ile, Ⓕ Ala と Cys, Ⓖ Lys と Asp, Ⓗ Glu と Glu, Ⓘ His と Ser, ⓷ Val と Trp

3. バリン, ロイシン, イソロイシン, メチオニン, フェニルアラニンなどのアミノ酸残基はしばしば酵素分子の内部に見いだされる. 一方, アルギニン, リシン, アスパラギン酸, グルタミン酸は酵素分子の表面に存在する. このような現象が見られる理由を述べよ.

4.

- (1) グリシルグリシンの構造を書け.
- (2) この分子のペプチド結合の回りの回転は妨げられている. ペプチド結合の共鳴構造を書き, その理由を説明せよ.

5. 酵素タンパク質の構造に関する次の用語を説明せよ.

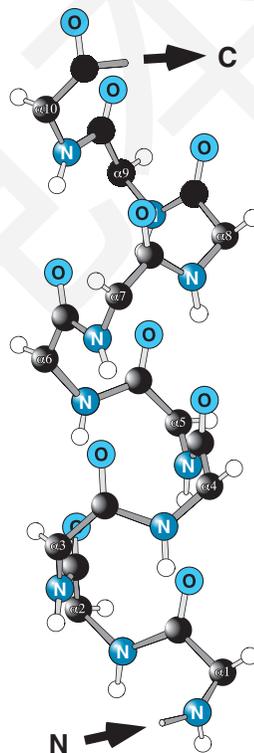
- (1) 一次構造
- (2) 二次構造
- (3) 三次構造
- (4) 四次構造
- (5) 高次構造
- (6) 超二次構造 (モチーフ)
- (7) ドメイン
- (8) ラマチャンドランプロット
- (9) ターンとループ

6. 次の文章の (1) から (12) にあてはまる最も適切な語句を書け. ただし, *を付したものについては, 語群から選んで書け.

酵素タンパク質の構造は4つのレベルに分けて考えることができる。一次構造とはアミノ酸の(1)のことであり、遺伝情報によって規定されている。ポリペプチド鎖が折りたたまれるにつれて、特徴的な繰り返し構造をもつ折りたたみが局所的に生じる。これは二次構造とよばれ、その代表的なものには(2)と(3)が挙げられる。(3)には平行型と逆平行型という2つのタイプが知られている。また、二次構造をつなぎ合せ、タンパク質を球状に折りたたむ際に必要となる方向転換の役割をもつ非繰り返し領域を(4)とよぶ。二次構造を構築する相互作用(結合)は(5*)と(6*)の間に働く(7)である。1つのポリペプチド鎖における二次構造の全体的な会合状態を三次構造とよぶ。この構造を維持する相互作用(結合)には、非共有結合性の(7)、(8)、(9)、(10)や共有結合性の(11)が知られている。非共有結合性相互作用の中では、一般に、タンパク質分子内部で形成される(8)が最も強く、(9)が最も弱い。また(10)はタンパク質に結合した水分子のエントロピーの増大と密接に関連する相互作用である。複数のポリペプチド鎖からなるタンパク質は四次構造をとる。四次構造を構成する個々のポリペプチド鎖を(12)とよぶ。

*語群：アミノ基、カルボキシ基、側鎖、主鎖、ヒドロキシ基、プリン塩基、ピリミジン塩基

7. 図は α ヘリックスの主鎖の構造である。黒い球は炭素原子、青い球は窒素原子、水色の球は酸素原子、白い球は水素原子を表す。この構造に水素結合を点線で書き込み、側鎖(—R)の位置も書き込め。



8. リボヌクレアーゼは4本のジスルフィド結合を含む単量体のタンパク質である。一方、インスリンは2つのペプチドA鎖とB鎖からなり3本のジスルフィド結合を含む。これらのタンパク質を8M尿素および10mM 2-メルカプトエタノールで処理した。次いでこれらの試薬を透析によって徐々に除き、これらのタンパク質の巻き戻しを試みた。これらのタンパク質の生物

活性を適当な方法で測定した。その結果を以下の表に記載した。

タンパク質	ジスルフィド結合の数	ジスルフィド結合のランダムな形成から予想される活性回復率 (%)	活性回復率 (実験値, %)
リボヌクレアーゼ	4	0.95	100
インスリン	3	6.7	7

- (1) この実験における尿素と2-メルカプトエタノールの役割をそれぞれ述べよ。
- (2) 透析について説明せよ。
- (3) 4つのジスルフィド結合が還元された後、再酸化によってランダムにジスルフィド結合を再生するとしたとき、活性の回復率は0.95%と計算される。このことを説明せよ。
- (4) リボヌクレアーゼの活性回復率が(3)で予想される値より著しく高い理由を述べよ。
- (5) インスリンの活性回復率が低い(巻き戻しがランダムなように見える)理由を考察せよ。