

ピリドキサル酵素の反応機構

林 秀行

研究しつくされたと思われている酵素反応機構は実はまだまだ不明な点ばかりである。その理由はタンパク質の中での反応が溶液中の反応に比べて大きく異なることによる。この問題を考えるのに格好の材料であるピリドキサル酵素の反応機構について、ピリドキサールの化学がどのように酵素タンパク質の中で実現しているかを紹介する。これを通じて、プロトン移動がタンパク質によってどのように制御され、多機能触媒であるピリドキサルリン酸がそれぞれの酵素で反応特異性を発揮しているかということが示される。また、プロトン移動の制御をもたらすエネルギー論的考察が重要であり、それを怠ると酵素反応機構の解釈において思わぬ誤りを犯すことも、この小論を通じて明らかにする。

1. はじめに

酵素反応機構は1960年代の速度論的解析、70年代の化学修飾、80年代の遺伝子操作、そして90年代のX線結晶解析というさまざまな研究手法の発展に伴って詳細に解析されるようになってきた。酵素反応機構はまさに化学反応の過程であるが、これはもう研究しつくされたと思われているようである。確かに細胞で起こる過程には多くの未知のことが隠されており、それに比べると、酵素反応には不思議な点というものは、少なくとも原理的なものに関していえば、ないように思える。ところが実際は、酵素反応を研究すればするほどわからないことが次から次へと出てくるのである。それはなぜであろうか？ 酵素反応が化学反応の一つであるならば、一般の有機化学反応ほどに我々の理解が進んでいないのはなぜなのか？ 結論を急げば、詰まるところ“タンパク質についての我々の理解の程度にその原因がある”ということになりそうである。

酵素反応機構の図を書くと、タンパク質がなければ通常の有機化学反応のようにみえなくもない。ところが、その「書かれていない」タンパク質の場の中では、溶液中の反応からは想像がつかないことが起こっている。

そのような問題を考えるのに格好の材料を提供するのが補因子を有する酵素である。補因子はさらに金属イオンと補酵素に分けられる。多くの場合、これらは酵素の中で触

媒の中心として機能している。補因子の化学はモデル反応として詳細に研究されているが、それがタンパク質という「場」の中でどのように“変調されて”いるかということを追求することが、上記の問題の解決に結びつくと考えられる。

この小論ではそういった補酵素の一つであるピリドキサル5'-リン酸 (pyridoxal 5'-phosphate : PLP) を有するピリドキサル酵素について、ピリドキサールの化学がどのように酵素タンパク質の中で実現しているかを紹介し、タンパク質の中での触媒というものを考えるきっかけとなることを目指す。

2. ピリドキサル5'-リン酸 (PLP) の化学

酵素反応においてはタンパク質を構成するアミノ酸残基、とりわけ側鎖官能基が重要な働きを示す。しかし、通常タンパク質を構成する20種類のアミノ酸のR基（タンパク質となったときに側鎖になる部分）の官能基は求核性のものが多いが、求電子性のものはないといった「偏り」がみられる。これは無理のない話であり、もしも求核性のR基を持つアミノ酸と求電子性のR基を持つアミノ酸の両方がタンパク質を構成するアミノ酸として使われると、互いに側鎖間で共有結合を形成し、タンパク質分子内・分子間におびただしい数の架橋が形成されてしまう。そこで不活性なR基以外は求核性のR基か求電子性のR基かのどちらかに限定される必要があるが、アミノ酸がアミノ基という求核性の基を有している以上、R基も求核性のものにならざるをえなかったと考えられる。しかし、それは同時に酵素を求核性触媒に限定し、触媒する反応の種類を制限することになってしまった。そこで、酵素は求電子性の触媒あるいはラジカルとなって触媒を行うような補酵素・

大阪医科大学総合教育講座化学教室 (〒569-8686 大阪府高槻市大学町 2-7)

Reaction mechanism of pyridoxal enzymes

Hideyuki Hayashi (Department of Chemistry, Division of Liberal Arts, Osaka Medical College, 2-7 Daigakumachi, Takatsuki, Osaka 569-8686, Japan)

金属イオンを有するようになった。多くの補因子が求電子中心を有していることはその現れである。

PLPの求電子中心の一つがアルデヒド基であることは容易にわかる。しかし、このアルデヒド基は基質アミノ酸と共有結合するための道具にすぎず、触媒において重要な役割を果たすのはもう一つの求電子中心であるピリジン環であると考えられている。このことは後であらためて議論する。アルデヒド基に対してアミノ酸等のアミノ基が求核攻撃を行うと、シッフ塩基が形成される。このシッフ塩基のイミノ基はピリジン環と共役しており、そのためにC α の周りの結合から電子が π 軌道を通じてピリジン環へと引き寄せられる(超共役)。これによりC α の周りの結合が活性化され、図1に示す多彩な反応が開始する。この理由で、PLPのピリジン環は“電子溜め electron sink”としての役割を有していると表現される。

反応は教科書をはじめとして諸文献¹⁻³⁾に記載されているので詳細は省略するが、本質的なところを説明する。

1) PLP-Lys \rightarrow A \rightarrow Qの過程

ピリドキサール酵素においてPLPはほとんどの場合、特定のLys残基とアルジミンを形成している。ここに基質であるアミノ酸(あるいはアミン)が入るとイミノ基交換反応が起こり、基質アミノ酸(アミン)とPLPのアルジミン(A)が形成される。上記のPLPピリジン環の“電子溜め”としての作用のために、C α から電子を残して基(あるいは原子)が外れ、C α のカルボアニオンが生ずる。この電子は全体に非局在化するのので、生じたカルボアニオンにはその共鳴の極限構造式の一つに由来する“キノノイド中間体”(Q)という名称が与えられている。後述するが、図1はピリジン環N1がプロトン化されているという前提で

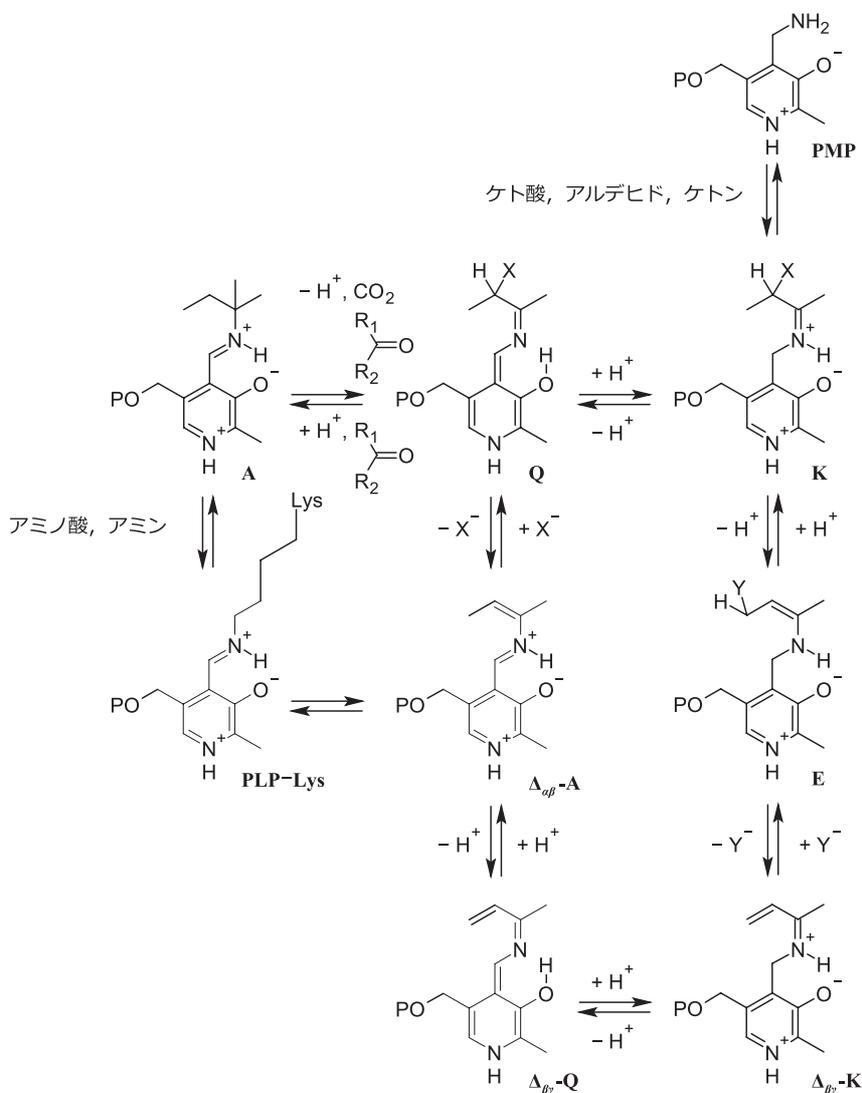


図1 PLPの反応

ほとんどのピリドキサール酵素における補酵素と基質の反応は基本的にここに示した中間体で説明される。PLP-Lys: 酵素のLys残基側鎖 ϵ -アミノ基とPLPのアルデヒド基の間に形成されたアルジミン, PMP: ピリドキサミン5'-リン酸, A: アルジミン, Q: キノノイド, K: ケチミン, E: エナミン, $\Delta_{\beta\gamma}$ -K: β , γ -不飽和ケチミン, $\Delta_{\alpha\beta}$ -Q: β , γ -不飽和キノノイド, $\Delta_{\alpha\beta}$ -A: α , β -不飽和アルジミン。

書かれている。もしも N1 がプロトン化されていなければキノイド構造ではなく電子が非局在化したカルボアニオンとみなすべきであるが、便宜的にキノイド中間体 Q で統一的に表現することにする。この A→Q の過程を起こす反応として脱プロトン化、脱カルボキシル化、あるいは C β にヒドロキシ基があればアルドール解裂、が起こる。

なお、PLP と結合していた Lys 残基は A が形成されたあと PLP から遊離するが、後述するようにその後の触媒反応において重要な役割を果たす。そこでこの残基を Lys^{PLP} と表現することにする。

2) Q からの過程

Q は電子が余っているため、これから起こる反応としては、求電子剤が結合するか、求核剤が外れるかのいずれかとなる。

a. 求電子剤の結合

結合する求電子剤としては H⁺ やカルボニル基を有したものの (アルデヒドやアシル CoA: アシル CoA のチオエステルのカルボニル基は通常のエステルよりも求電子性が強い) がある。これらのうち、H⁺ は C α と C4' の両方に結合する場合が知られているが、カルボニル基を有したものは、現在のところ、C α に結合する場合しか知られていない。C α への求電子剤の結合は A→Q でみられる反応の逆反応として起こっていることもある (H⁺ やアルデヒドの結合)。

i. Q→A: Q の C α にプロトンやカルボニル基を有したものが結合して A となると、再びイミノ基転移反応が起こり、PLP-Lys が再生するとともに、A と Q の間を行き来する間 (あるいは後述のように Q からほかの経路を経て再び Q に戻ってくる間に) に修飾を受けて元の形から変わったアミノ酸やアミンが生成物として外れる。

ii. Q→K→PMP: Q の C4' にプロトンが結合するとケチミン (K) となる。K が加水分解を受けると、ケト酸やケトンが外れ、補酵素部分はピリドキサミン 5'-リン酸 (PMP) となる。これはアミノトランスフェラーゼにおいて起こる半反応である。第二の半反応として新たなケト酸やケトンが PMP と反応し、逆の経路をたどって新たなアミノ酸やアミンを生成する。アミノトランスフェラーゼは 2 種類以上のアミノ酸 (アミン) と PLP の半反応を触媒することができ、二つの半反応を組み合わすことでアミノ基転移反応を進行させる。

iii. Q→K→E: K は C β に電子を残して外れるような置換基 X (H を含む) があると、X が外れたあとエナミン (E) となる。E の C β は電子密度が高いので以下の反応が起こる。

① E の C β が再び求電子剤を受け取ると K となる。現在知られているピリドキサル酵素では、この求電子剤は H⁺ であり、PLP-Lys から E までの道を逆

戻りすることによってアミノ酸を遊離すると、C β の置換基 X が H となったアミノ酸が生成する。このような反応を起こすのは、アスパラギン酸 β -デカルボキシラーゼ、キヌレニナーゼ、システインデスルフララーゼ、セレノシステインリアーゼなどである。

② E において C γ に脱離基 Y が存在すると、Y は電子を持って外れ、 β, γ -不飽和ケチミン ($\Delta_{\beta, \gamma}$ -K) ができる。

(a) $\Delta_{\beta, \gamma}$ -K の C γ に新たな求核剤が付加を起こすと、PLP-Lys から $\Delta_{\beta, \gamma}$ -K までの道を逆戻りすることによって Y が置換された新たなアミノ酸ができる。これが γ -シターゼの反応である。代表的な γ -シターゼとしては植物・細菌に存在するメチオン合成系の酵素シスタチオニン γ -シターゼがある。この酵素の触媒によりスクニルホモセリン、ホスホホモセリンのスクニル基、リン酸基がシステインと置換してシスタチオニンが生成する。

(b) $\Delta_{\beta, \gamma}$ -K は $\Delta_{\beta, \gamma}$ -Q を経て、後述の β -リアーゼ、 β -シターゼの中間体である $\Delta_{\alpha, \beta}$ -A になることができる。これによって γ 位での反応が β -リアーゼ、 β -シターゼの反応と結びつくことになる。 $\Delta_{\beta, \gamma}$ -K から生成した $\Delta_{\alpha, \beta}$ -A がイミノ基転移を起こすとケト酸ができる。これは γ -リアーゼの反応である。また、 $\Delta_{\alpha, \beta}$ -A の C β に求核剤が付加を起こすと、Q→A を経てアミノ酸を生成する。このアミノ酸では最初の基質アミノ酸の γ 位の置換基が外れ、 β 位に新たな置換基を有するアミノ酸となる。この PLP 酵素のすべての中間体を通ることになる反応を触媒する酵素は、トレオニンシターゼが現在知られている唯一のものである。

b. 求核剤の脱離

C β に求核剤があれば、Q の余った電子に押し出されるようにして、電子を持って外れ、 α, β -不飽和アルジミン ($\Delta_{\alpha, \beta}$ -A) が生じる。これがイミノ基転移反応を起こすと、エナミン (生成物であり、E とは別のもの) が遊離する。これはイミンに互変異性化し、加水分解を受けてケト酸あるいはケトンが生成する。これは β -リアーゼの反応である。たとえば、 $\Delta_{\alpha, \beta}$ -A として PLP- α -アミノアクリル酸アルジミンを考えると、これからエナミンとして α -アミノアクリル酸が生じ、イミンとして α -イミノプロピオン酸になり、加水分解を受けてケト酸としてピルビン酸が生じる。また、 $\Delta_{\alpha, \beta}$ -A に新たな求核基が付加を起こし、Q→A を経てイミノ基転移によって新たなアミノ酸を生成することもある。これは β -シターゼの反応である。

3. ピリドキサル酵素

ピリドキサル酵素はフォールドタイプで 7 種類に分類

されている⁴⁾。それぞれのフォールドタイプは一次構造から高次構造まで相同性がなく、個別に進化したものと考えられている。それぞれの酵素が触媒反応においてたどる中間体をみると、構造と反応機構にある程度の相関があることがみてとれる。

フォールドタイプ I

最も大きな集団であり、さらにいくつかのファミリーに分かれる。

- デカルボキシラーゼ II ファミリー (反応は A, Q, A)
- デカルボキシラーゼ III ファミリー (A, Q, A)
- アミノトランスフェラーゼ II ファミリー [A, Q, K: ω -アミノ酸に対するアミノトランスフェラーゼを中心とし、ジアルキルグリシンドカルボキシラーゼ (アミノ基転移を伴う) も含まれる]
- アミノトランスフェラーゼ I ファミリー (多くの α -アミノ酸のアミノトランスフェラーゼ A, Q, K および アスパラギン酸 β -デカルボキシラーゼ A, Q, K, E, K, Q, A)
- γ -ファミリー (γ -シクターゼ A, Q, K, E, Δ K, E, K, Q, A, γ -リアーゼ A, Q, K, E, Δ K, Δ Q, DA, および シスタチオン β -リアーゼ A, Q, DA)
- キヌレニナーゼファミリー^{注1)} (キヌレニナーゼ, システインデスルフラナーゼ, およびセレノシステインリアーゼ; A, Q, K, E, K, Q, A)
- α -オキサミンシクターゼファミリー (A, Q, A)
- アミノトランスフェラーゼ IV ファミリー (ホスホセリンおよびセリンのアミノトランスフェラーゼ A, Q, K)
- デカルボキシラーゼ I ファミリー (グリシン解裂系 A, Q, A, アルドラーゼ A, Q, A, 芳香族アミノ酸の β -リアーゼ A, Q, Δ A, およびセレノシステインシクターゼ A, Q, Δ A, Q, A)

進化系統樹を図 2 に示す。まず共通祖先からデカルボキシラーゼ II, III ファミリーとその他に分かれ、続いて後者の集団がさまざまな反応機構を有する酵素群に分かれていっているが、それらのほとんどが A, Q, K の経路を共有

注 1 キヌレニナーゼ, システインデスルフラナーゼ, アスパラギン酸 β -デカルボキシラーゼ, およびセレノシステインリアーゼは InterPro では Aminotransferase, class V/Cysteine desulfurase という domain に分類されている。Aminotransferase, class V は図 2 のアミノトランスフェラーゼ IV ファミリーであるが、この class 分類が提唱されたころは一次構造が未知のピリドキサル酵素が多く、図 2 の系統樹が未完成であった。図 2 をみるとこの InterPro の名称が明らかに不適當であることがわかる。キヌレニナーゼ, システインデスルフラナーゼ, アスパラギン酸 β -デカルボキシラーゼ, およびセレノシステインリアーゼのファミリー名は現在のところ定まっていなかったが、本稿では最も早く発見された酵素の名称より、キヌレニナーゼファミリーと呼ぶことにする。

していることが注目される。すなわち、アミノトランスフェラーゼを基盤として、K に引き続いて起こる触媒反応が発展していったと考えられる。

フォールドタイプ I の酵素には共通して、PLP-Lys シッフ塩基の *re* 面 (図 1 の A でいえば紙面の手前側) にあって PLP のピリジン環とスタッキングする芳香族アミノ酸残基が一次構造上対応する位置に存在する。また、PLP のピリジン環 N1 は Asp 残基と水素結合をしており、このために常にプロトン化した状態で存在する。

フォールドタイプ II

基質の β 位の置換基が電子を持って外れ、置換する反応を触媒する β -リアーゼおよび β -シクターゼが属する。反応は A, Q, Δ A である。ただし、チロシンとトリプトファンが基質の場合は、フォールドタイプ I のデカルボキシラーゼ I ファミリーの酵素によってフェノール、インドールが外れる。

トレオニンシクターゼは最終的には β -シクターゼの反応で終了するが、そこに至るまでは γ -リアーゼと同じ経路をたどり、全体として A, Q, K, E, Δ K, Δ Q, Δ A, Q, A の反応である。また、セリンラセマーゼは酵素名に代表される反応は A, Q, A であるが、高い β -リアーゼ活性、すなわちセリンデヒドラターゼと同じ活性を有している。

構造上の重要な特徴の一つは、PLP のピリジン環 N1 が Ser あるいは Thr 残基と水素結合を形成し、そのために非プロトン化状態で存在することである。したがって、このタイプの酵素では図 1 の各構造の N1 はプロトン化せず、また Q の構造は共役系全体に非局在化したカルボアニオンとみなすことになる。

フォールドタイプ III

このフォールドタイプのピリドキサル酵素は多様である。アラニンラセマーゼ、真核生物のオルニチンデカルボキシラーゼ、細菌の生合成型アルギニンデカルボキシラーゼ、ジアミノピメリン酸デカルボキシラーゼ (以上、反応は A, Q, A), および真核生物の D-セリンデヒドラターゼ (A, Q, Δ A) が属する。

構造上も多様性があり、PLP のピリジン環 N1 の相互作用する残基は、*Bacillus stearothermophilus* アラニンラセマーゼでは Arg, マウスオルニチンデカルボキシラーゼと *Helicobacter pylori* ジアミノピメリン酸デカルボキシラーゼでは Glu, ニワトリ D-セリンデヒドラターゼ⁶⁾では Tyr と、塩基性、酸性、中性アミノ酸残基のいずれも見いだされている。興味深いことに、フォールドタイプ I では酸性アミノ酸残基として Asp, フォールドタイプ II ではヒドロキシ基を有する中性アミノ酸残基として Ser が使われているが、III ではより嵩高いアミノ酸残基が使われており、アラニンラセマーゼの Arg 残基の大きさに見合ったものになっている。また、ニワトリ D-セリンデヒドラターゼには亜鉛イオンが結合し、 β 位のヒドロキシ基の活性化を

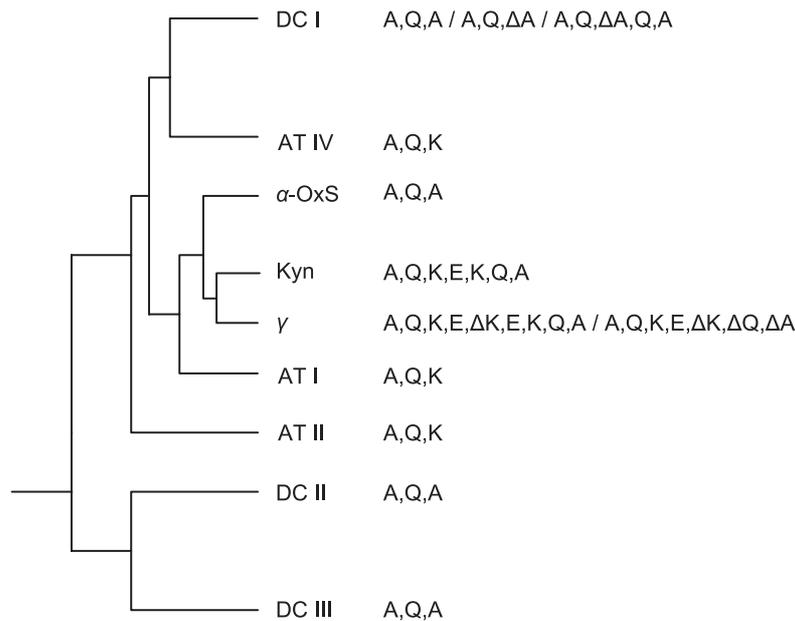


図2 フォールドタイプIのピリドキサル酵素の進化系統樹

右側に触媒の中間体を示す。DC：デカルボキシラーゼファミリー，AT：アミノトランスフェラーゼファミリー，Kyn：キヌレニナーゼファミリー， α -OxS： α -オキサミンシンターゼファミリー。系統樹の距離は概算である。文献5)をもとに作成。

行っている。

フォールドタイプIV

アミノトランスフェラーゼIII (D-アミノ酸アミノトランスフェラーゼおよび分枝アミノ酸アミノトランスフェラーゼ，反応はA, Q, K) と4-アミノ-4-デオキシコリスミ酸リアーゼ (A, Q, Δ A) が属する。

構造上の特徴は，アミノトランスフェラーゼIIIがほかのアミノトランスフェラーゼと活性部位が鏡像の関係になっていることである。これは一種の収斂進化と考えることができる。

フォールドタイプV

ホスホリラーゼ (総説⁷⁾参照) であり，ピリドキサルリン酸のピリドキサル部分ではなくリン酸エステル部分を触媒に使用しており，ほかの酵素と反応機構は大きく異なる。

フォールドタイプVI

D-リシン5,6-アミノムターゼ⁸⁾で，PLPのほかS-アデノシルコバラミンを有する。

フォールドタイプVII

L-リシン2,3-アミノムターゼ⁹⁾で，PLPのほか亜鉛イオンとFeS-クラスターを有する。

D-リシン5,6-アミノムターゼ，L-リシン2,3-アミノムターゼとも，基質アミノ基とPLPのシッフ塩基を形成したあと，アミノ基に隣接する炭素でラジカルを形成し，そ

のラジカルがイミノ基を攻撃して三員環中間体を経てアミノ基とラジカルが隣接炭素への移動が起こるといふ反応機構を有する。これら反応機構については本稿では省略することにする (それぞれの文献^{8,9)}を参照)。

それでは，多彩な反応を触媒するPLPは，それぞれのピリドキサル酵素においてどのように制御されて，反応特異性を発揮しているのであろうか。前節でも見たように，PLPの触媒反応は本質的にプロトン移動の過程である。ピリドキサル酵素におけるプロトン移動について十分な考察をしておくことが必要である。そのことについて重要な知見を次に紹介する。

4. 二つのピリドキサル酵素におけるプロトン移動過程

アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (aspartate aminotransferase: AAT) は生物界に普遍的に存在する酵素であり，多くの生物種においてアミノ酸を基質とするピリドキサル酵素の中で最も量の多いものである。そのため，ピリドキサル酵素の中で最も古くから最も詳細に研究されてきた酵素でもある。

図3にAATの精密反応機構を示す¹⁰⁾。AATにおいては，PLPはLys258とシッフ塩基を形成している。このシッフ塩基のイミノ基窒素の pK_a は大腸菌酵素の場合6.8であり，生理的条件においてプロトン化した状態 (E_LH^+) とプロトン化されていない状態 (E_L) の二つの状態をとる。基質のアスパラギン酸は，よく知られているように，中性においては二つのカルボキシ基はいずれもほとんど解離しているが，アミノ基については大部分がプロトン化した形

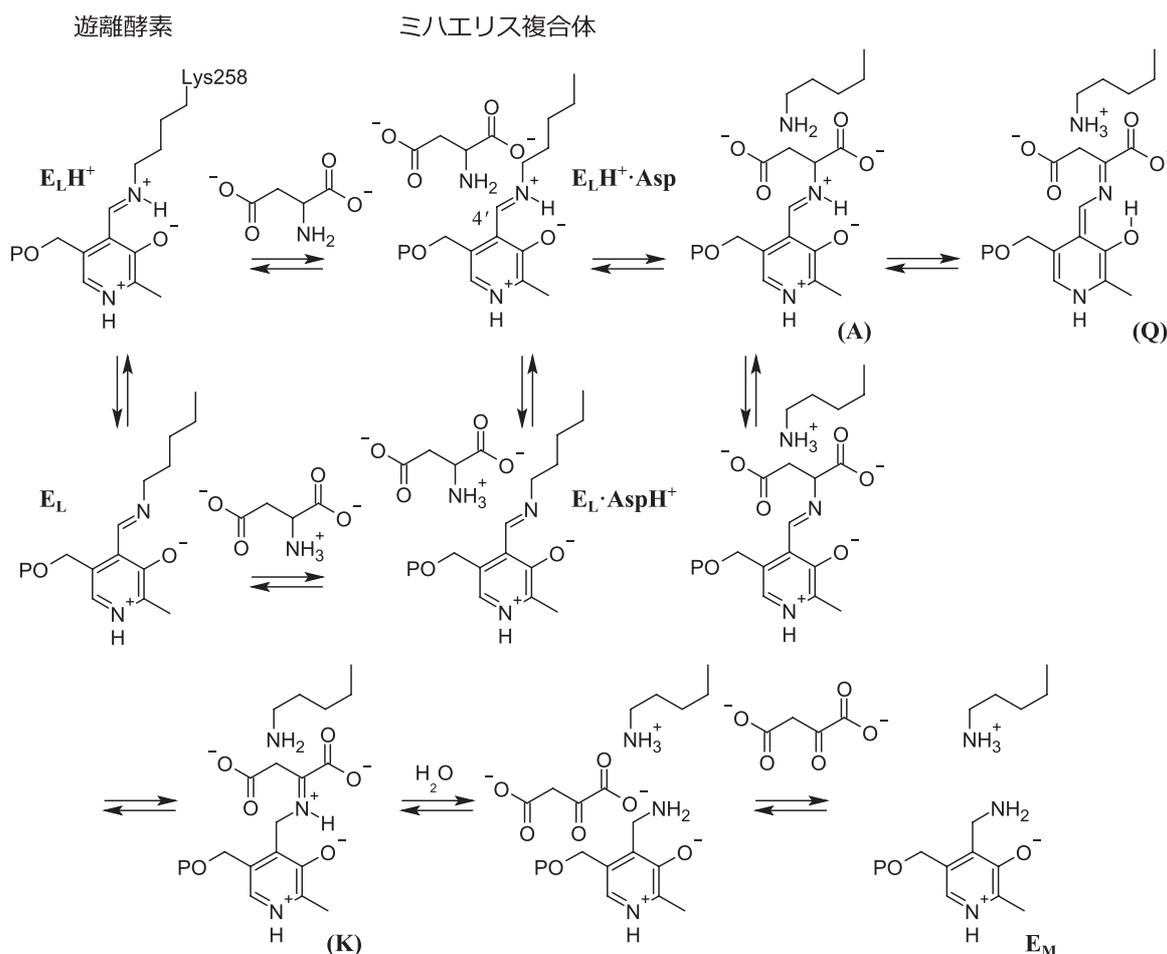


図3 アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼの反応機構

E_L : PLPを結合し、 Schiff塩基がプロトン化されていない酵素. E_LH^+ : PLPを結合し、 Schiff塩基がプロトン化されている酵素. E_M : ピリドキサミン5-リン酸を結合した酵素.

($AspH^+$), 一部はプロトン化していない状態 (Asp) で存在する. AATの反応機構は Ivanov, Karpeisky らによって詳細に研究され, 古典的な反応機構が提唱された¹¹⁾. それによると, AATの E_L の形が $AspH^+$ を結合してミハエリス複合体 $E_L \cdot AspH^+$ を形成する. そしてこのミハエリス複合体の中で, アスパラギン酸のアミノ基の上のプロトンが PLP-Lys258 Schiff塩基のイミノ基窒素の上に移動し, $E_LH^+ \cdot Asp$ となる. この形においてはアミノ基がプロトン化されていない状態であり (=非共有電子対があらわとなり), 一方, イミノ基窒素がプロトン化されているためにイミノ基炭素 ($C4'$) の求電子性が高まる. これによってアスパラギン酸のアミノ基が PLP-Lys258 Schiff塩基の $C4'$ を容易に求核攻撃し, イミノ基転移によってアスパラギン酸と PLPの Schiff塩基 (A) を形成する. このときに Lys258 は ϵ -アミノ基が非プロトン化状態で外れるため, この ϵ -アミノ基が $C\alpha$ のプロトンを引き抜いて Q を形成したあと $C4'$ へと運び (1,3-プロトトロピックシフト), K を生成する. Kにおいても Lys258 の ϵ -アミノ基は非プロトン化状態であるため, 一般塩基触媒として Kの加水分解を促進し, PMPを結合した酵素とオキサロ酢酸を生成

する. これが前半の半反応であり, 後半の半反応は PMPを結合した酵素と α -ケトグルタル酸から始まって, 本質的に同じ経路を逆行し, グルタミン酸と PLP-Lys258 Schiff塩基を再生した酵素が生じる.

この反応機構は非常にすっきりとしており, とりわけ最初の基質アスパラギン酸のアミノ基から Schiff塩基のイミノ基窒素にプロトンが移ることで基質と補酵素の両方が同時に活性化される機構はエレガントさを感じさせるものである. このため, この機構はピリドキサル酵素の反応機構研究の規範のように考えられてきた. ところが, よく考えていくと, いくつかの疑問が生じてくる. まず, 基質アスパラギン酸のアミノ基から Schiff塩基のイミノ基窒素にプロトンが移る機構を実現するために, 中性において Schiff塩基のイミノ基窒素がプロトン化されていない状態の比率を高めるよう, その pK_a を低く抑えているということであるが, それをもたらす要因は逆に基質アミノ基からイミノ基窒素へのプロトンの移動に不利に働くはずである. Ivanov-Karpeisky 機構ではこれは基質のアスパラギン酸のカルボキシ基を結合するために用意されている正電荷の側鎖 (後に α -カルボキシ基を結合する Arg386 と β -カルボキ

シ基を結合する Arg292 として同定される) のために、通常の PLP のシッフ塩基の pK_a (ピリジン環 N1 がプロトン化されている場合, 9.5 付近) に比べて大きく下がっており、基質結合による電荷の中和によってイミノ基窒素の pK_a が上昇すると説明されてきた¹¹⁾。しかし、酸性アミノ酸だけを基質とする AAT のみならず、構造的にきわめて近い芳香族アミノ酸アミノトランスフェラーゼにおいても中性アミノ酸である芳香族アミノ酸の結合によってこの pK_a が同程度上昇し¹²⁾、AAT と同様の機構で反応が進行することを説明できない。次に、イミノ基転移によって遊離した Lys258 の ϵ -アミノ基は、遊離の状態であれば $pK_a = 10.5$ であるが、なぜ非プロトン化状態を維持できるのかということも疑問である。酵素の中の疎水的環境ではプロトン化が抑制されていると説明することも可能であるが、それは逆に $C\alpha$ のプロトンの引き抜きに不利に働くはずである。酵素反応機構の説明において往々にして出くわすことであるが、ある素過程を促進する要因を強調すればするほど、その次の素過程の進行に不利に働いてしまうものである。Ivanov-Karpeisky 機構もそのような呪縛からは逃れられない。

それではということで、AAT のプロトン移動過程が詳細に調べられた。まずは基質結合過程である¹³⁾。Ivanov-Karpeisky 機構では $E_L + \text{AspH}^+ \rightarrow E_L \cdot \text{AspH}^+ \rightarrow E_L \text{H}^+ \cdot \text{Asp}$ という順序であったが、中性においてわずかとはいえ存在する Asp (アミノ基が非プロトン化状態) が $E_L \text{H}^+$ と結合して直接 $E_L \text{H}^+ \cdot \text{Asp}$ を形成する可能性はないものだろうか。よく知られているように、教科書的にはこの二つの過程は速度論的に区別ができない(速度論的等価性原理¹⁴⁾) はずである。これは、速度式を立てると、この二つの過程の速度が同じ pH 依存性を示すために、pH 依存性を調べることによって二つの過程の区別がつかないというものである。ところが、幸いなことに pH ジャンプを行うと、 E_L と $E_L \text{H}^+$ の相互転換の速度はストップフロー分光装置で十分追跡が可能なほどのオーダーであることがわかった (E_L は 358 nm に、 $E_L \text{H}^+$ は 430 nm に吸収極大を有し、容易に区別ができる)。そこで、 $E_L \text{H}^+$ と E_L の混在する pH において基質アスパラギン酸との反応をストップフローで追跡すると、 E_L が速やかに消失して PMP 結合酵素 E_M となり、それに遅れて $E_L \text{H}^+$ が消失することがわかった。ここで、 $E_L \text{H}^+$ がまず E_L に変化してからアスパラギン酸と反応するというスキームに基づいて $E_L \text{H}^+$ の消失の速度式を立てると、pH が低く基質濃度が低い領域では実験結果と比較的よい一致を示したが、pH や基質濃度の上昇に伴って実験結果から顕著にずれるようになった。pH や基質濃度の上昇に伴って増加するのは Asp (アミノ基が非プロトン化状態) の濃度である。そこで、 $E_L \text{H}^+ + \text{Asp} \rightarrow E_L \text{H}^+ \cdot \text{Asp}$ の過程を含めたスキームに基づいて $E_L \text{H}^+$ の消失の速度式を立てると、実験結果を説明することができ、またこの過程の速度定数が $5.1 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ と求められた。このように、AAT と基質アスパラギン酸の結合はプロトン化状態を異

にする二重の過程で行われることが判明した。

基質結合過程が明らかになったところで、反応が A の状態とどまるような α -メチルアスパラギン酸 ($C\alpha$ に H がいないために $A \rightarrow Q$ の反応が起こらない) と AAT の反応をストップフロー分光器で分析し、ミハエリス複合体と A の吸収スペクトルを得た¹⁰⁾。その結果、いずれも PLP シッフ塩基のイミノ窒素が部分的にプロトン化されているスペクトルが得られた。ところが、驚くべきことに、pH を変えてもこのスペクトルが変化しなかったのである。つまり、AAT においてはミハエリス複合体の中の PLP-Lys (PLP-Lys258 シッフ塩基) も A もイミノ基窒素が溶媒の pH に無関係に部分的にプロトン化された状態を保っているということである。Lys258 を Ala 残基に変異した AAT と α -メチルアスパラギン酸の複合体はすべて A となるが、この場合は pH9.5 まで調べた限りイミノ基窒素はすべてプロトン化されていた¹⁰⁾。このことは、AAT の A においては Lys258 の ϵ -アミノ基窒素と A のイミノ窒素が一つのプロトンを共有すると考えると説明がつく(図 3)。そのようなことが可能であるのは、両方ともプロトン化されると正電荷どうしの反発、両方とも非プロトン化状態であると非共有電子対どうしの反発のためであると考えられる。同様の議論をミハエリス複合体に当てはめると、PLP-Lys258 シッフ塩基のイミノ基窒素と α -メチルアスパラギン酸のアミノ基窒素の間で一つのプロトンを共有していると考えられることになる。スペクトルからイミノ基窒素のプロトン化の割合を算出することで、それぞれのアミノ基とイミノ基窒素の本来の pK_a (イミノ基の存在しないときのアミノ基の pK_a およびアミノ基が存在しないときのイミノ基の pK_a) の差を求め、それからイミノ基窒素の pK_a を見積もると、遊離酵素で 6.8 であったのが、ミハエリス複合体では 8.8、さらに A においては >10 となった。

次にこのような段階的なイミノ基窒素の pK_a の上昇が何によってもたらされているかが調べられた。いくつかの AAT の X 線結晶解析による構造をみると、PLP-Lys258 シッフ塩基の C3-C4-C4'-N の二面角が安定な 0° から大きくずれており、ここに歪みがかかっていることがわかった。そこで、この歪みを解消すべく Lys258 を Ala に置換し、メチルアミンを加えることでシッフ塩基を再構成した AAT を作製したところ、イミノ基窒素の pK_a が 9.6 と 2.8 も上昇した。すなわち、イミノ基窒素がプロトン化しているときに形成される分子内水素結合が切断されるような歪みのために $E_L \text{H}^+$ が不安定となり、 pK_a が低下するという機構が明らかになったのである(図 4A)。また、この機構によって、ミハエリス複合体では AAT のコンホメーション変化によって歪みが部分的に解消し、A においてはほぼ完全に歪みが解消するため pK_a が大きく上昇することが説明された(図 4B)¹⁰⁾。

同じ機構は芳香族アミノ酸アミノトランスフェラーゼにおいても明らかとなった¹⁵⁾。一方、AAT ともう一つの基質であるグルタミン酸との反応においては、A ではアスパ

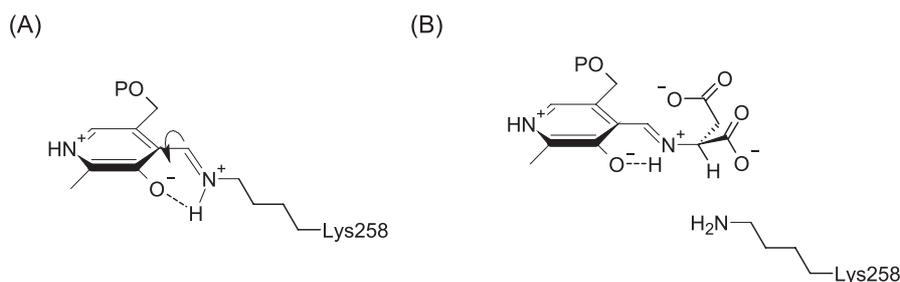


図4 アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼの Schiff 塩基の歪み
(A) 遊離酵素における PLP と Lys258 の Schiff 塩基の歪み. (B) PLP と基質アスパラギン酸の Schiff 塩基では歪みが解消される.

ラギン酸との反応の場合と同様に一つのプロトンを共有する結果が得られたが、ミハエリス複合体では PLP-Lys258 のイミン窒素とグルタミン酸のアミノ基は独立にプロトン化を起こすと考えられた¹⁶⁾. これはグルタミン酸とのミハエリス複合体においては、アスパラギン酸とのミハエリス複合体と異なり、酵素タンパク質が閉じた構造ではなく開いた構造のままであり、そこに伸びたコンホメーションで結合したグルタミン酸のアミノ基が PLP-Lys258 のイミノ基窒素と遠ざかる方向を向いているためであると説明された. これが A になるときは、AAT が閉じた構造になってグルタミン酸を曲げることによって PLP との Schiff 塩基を形成させるため、グルタミン酸に対する K_m が高いことが説明される.

以上のように、AAT におけるプロトン移動では、当初考えられたような静電的な制御のみならず PLP や酵素タンパク質のコンホメーションの制御によって駆動力が形成されていることが判明した.

ただし、AAT の反応機構はピリドキサル酵素のなかでも若干特殊であることがわかってきた. 前述のとおり、AAT の PLP-Lys イミン窒素の pK_a は 6.8 であるが、このように低い値を持つものはフォールドタイプ I の中のアミノトランスフェラーゼ I の集団のみである. ほかの酵素ではこの pK_a はおおむね 10 以上で、中性においてこのイミン窒素は常にプロトン化した状態にある. したがって、二重の基質結合過程によって基質-PLP の Schiff 塩基 A を形成するという機構はほかの大多数の酵素には通用しない機構である. それならば、中性においてアミノ基がプロトン化された基質アミノ酸はどのようにして PLP との Schiff 塩基を形成するのであろうか? この点を明らかにするために、フォールドタイプ I のデカルボキシラーゼ II に属する芳香族アミノ酸デカルボキシラーゼ (aromatic amino acid decarboxylase: AADC) とドーパ (3,4-ジヒドロキシフェニルアラニン) の反応がさまざまな pH において調べられた¹⁷⁾. その結果、基質ドーパはアミノ基がプロトン化された状態のものとプロトン化されていない状態のものの両方が AADC に結合して 2 種類のミハエリス複合体を形成する. ミハエリス複合体においてドーパのアミノ基の pK_a は溶液中の 8.7 から 6.6 へと低下する. こうしてドーパのア

ミノ基がプロトン化されたミハエリス複合体 ($E_LH^+ \cdot DopaH^+$) からアミノ基上のプロトンが溶液中へ放出されてドーパのアミノ基が非プロトン化されたミハエリス複合体 ($E_LH^+ \cdot Dopa$) になり、このミハエリス複合体において非プロトン化状態のアミノ基が PLP-Lys303 のイミノ基炭素を攻撃して A を形成するというものである (図 5). この機構は PLP-Lys Schiff 塩基のイミノ基窒素がプロトン化されている大部分のピリドキサル酵素に適用できる反応機構と考えられる.

以上をみていくと、AAT のアスパラギン酸や芳香族アミノ酸に対する触媒作用においては厳密なコンホメーションの制御によってプロトン化状態が大きく制限されているのに対し、AAT とグルタミン酸の反応や AADC の反応においてはプロトン化状態の制限が緩やかになっていることがうかがえる. ピリドキサル酵素の反応機構の解明で重要な課題の一つは個々の酵素において反応特異性がどのようなにもたらされているかということであるが、その特異性の発揮において、プロトン移動の厳密な制御が必要であることは明らかである. プロトン移動の制御に関する AAT と AADC の対照的な振る舞いが反応特異性を論じる上でどのような意義を持つかを考えつつ、反応特異性の問題に迫ろう.

5. 反応特異性をもたらす機構

1) PLP-Lys \rightarrow A \rightarrow Q の過程

この最初の過程においては古くから Dunathan の仮説が提唱されていた¹⁸⁾. これは $C\alpha$ の周りの結合のうち、イミン-ピリジン環の平面に垂直のものが優先的に切断される

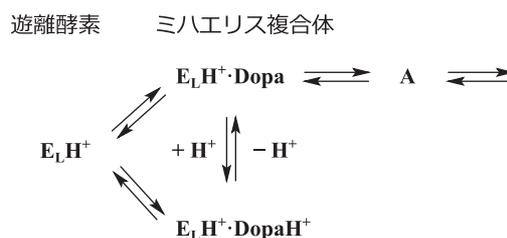


図5 芳香族アミノ酸デカルボキシラーゼにおける基質結合過程

というものである (図6)。これは有機化学的に妥当な機構である。Aの構造をC α とNの間で仮想的に分割して二つの部分の間での反応と考えると、C α 周囲の結合の σ 軌道のHOMOとイミン-ピリジン環の π 軌道のLUMOの相互作用が重要になる^{注2}。C α 周囲の結合のHOMOは三つの結合に対応して三つあるが、その中でイミン-ピリジン環に垂直のものがイミン-ピリジン環のLUMOと最も強く相互作用し、電子がイミン-ピリジン環に流れ、その結合が優先的に切断されるわけである。このDunathanの仮説はAATをはじめとする種々の酵素と基質・基質アナログとのX線結晶解析の結果によって支持されている。すなわち、イミン-ピリジン環に垂直の結合がC-Hの場合はH⁺が、C-COO⁻の場合はCO₂が、また、 β 位にヒドロキシ基のあるR基の場合は、R基がアルデヒドとして外れる。基質をこのような立体配座に保つのは当然ながら酵素タンパク質の役割である。

この過程が立体化学的な要請によって明確に規定されるのに対し、以後の過程はさまざまな要素によって反応の進行が決まる。

2) Qからの過程

QからはQ \rightarrow K, Q \rightarrow A, Q \rightarrow $\Delta_{\alpha, \beta}$ -Aの反応が起こる。Kができる過程についてみていくと、AATの反応では上で紹介したように、PLPを結合していたLys残基の ϵ -アミノ基がC α からH⁺を受け取ってプロトン化された状態になり、それがC4'にH⁺を渡す機構が考えられている¹⁹⁾。すなわち、溶媒のH⁺とのランダムな交換ではなく、活性部位のアミノ酸残基による方向性を持ったH⁺の移動である。AATのプロトン移動機構で紹介したように、AATでは活性部位のプロトン化状態に対する制限が強いためこのようなことが可能と思われる。ほかのアミノトランスフェラーゼでも同様の機構で進行するかどうかは現在のところ、AATほど反応機構が詳細に研究された酵素はないた

め不明であるが、少なくともフォールドタイプIに属するAATの類縁酵素では同様であると考えられる。

これに対して、Q \rightarrow Aとなる酵素の中で、ラセマーゼの反応とデカルボキシラーゼの反応はA \rightarrow Qの過程がそれぞれH⁺の解離およびCO₂の解離で互いに異なっているが、Q \rightarrow Aの過程はいずれもH⁺のC α への結合である。これは明らかにQ \rightarrow Kの過程と競合する。アミノトランスフェラーゼではPLPを結合していたLysがC4'にH⁺を渡すためにQ \rightarrow KがQ \rightarrow Aと競合しつつも進行するが、Q \rightarrow Aの反応が起こってもそれは生成物に戻るだけで副反応にはならないので、アミノトランスフェラーゼでは副反応が起こる心配は不要である。しかし、ラセマーゼもデカルボキシラーゼもC4'にプロトン化が起きてしまったら、副反応すなわちアミノ基転移反応 (これは abortive transamination と呼ばれる) への道を一步踏み出したことになるので、Q \rightarrow Kの過程は抑制されなければならない。AATは活性部位のプロトン化状態に対する制限が強いはというものの、C4'のプロトン化を起こすわけであるから、AATのといったプロトン移動の制御機構をこれらの酵素が使うわけにはいかない。この機構として興味深いのはラセマーゼの一種、アラニンラセマーゼである。

L-アラニンとD-アラニンの相互転換を触媒する *Bacillus stearothermophilus* のアラニンラセマーゼ (alanine racemase: AlaR) はフォールドタイプIIIに属し、PLPピリジン環素と水素結合している残基がArgである。Arg残基のグアニジノ基のpK_a (~13) から考えて、このArg残基は活性部位においてもプロトン化されているため、ピリジン環素のプロトン化は不可能と考えられる。PLPの化学からすれば、これではピリジン環の“電子溜め”としての機能は十分発揮できないことになり、準安定中間体であるQのエネルギー準位が十分に下がらず、触媒反応にとって不利となるはずである。ところがAlaRはPLP酵素の中でも高い回転数 ($k_{cat}=1,000\text{ s}^{-1}$) を有している。それではどのようにQを安定化しているのだろうか? このことを明らかにするためには、AlaRにおけるQのエネルギー準位を知らなければならない。Qは特徴的な鋭く強い (~40,000 M⁻¹cm⁻¹) 吸収を450~500 nmの領域に示す。そこで、L-アラニンとD-アラニンを十分量共存させてほとんどが酵素-基質複合体 (Qと2種類のAのみで構成される) となったようなAlaRのスペクトルをとれば、Qの存在比率がわかり、Aに対する相対的エネルギー準位がわかるはずである。しかし、高濃度の酵素を用いても、吸収スペクトル上Qは検出限界以下であった²⁰⁾。それでは、AlaRではQを経ずに反応が起こっているのだろうか? 確かにその可能性はある。AlaRではL-アラニンの α -HはTyr265-O⁻により、D-アラニンの α -HはLys39-NH₂によって引き抜かれると考えられている。ここで、たとえばL-アラニンからD-アラニンに変わる反応でいうならば、L-アラニンの α -プロトンがTyr265-O⁻に移動すると同時にLys39-NH₂からプロトンがC α に移動するという“協奏反

注2 原子にさまざまなエネルギー準位の電子の軌道 (原子軌道) があるのと同じように、分子にもさまざまなエネルギー準位の電子の軌道 (分子軌道) があり、最も低いエネルギー準位の分子軌道から順番に電子が入っていく。HOMOは最高被占軌道 (highest occupied molecular orbital) の略であり、電子の入った分子軌道のうちで最高エネルギー準位のもの、またLUMOは最低空軌道 (lowest unoccupied molecular orbital) の略であり、電子の入っていない分子軌道のうちで最低エネルギー準位のことを指す。化学反応は一つの分子のHOMOともう一つの分子のLUMOが重なることによってLUMOの電子がHOMOに非局在化し、エネルギーが低下することによって引き起こされる (一般にHOMOとLUMOはエネルギー準位が最も近い被占軌道と空軌道の組み合わせとなり、相互作用によるエネルギーの低下が最も大きい)。分子内反応の場合、分子を仮想的に分割して一方のHOMOと他方のLUMOの相互作用とみなすことによって、分子間反応と同様の取り扱いをすることができる。

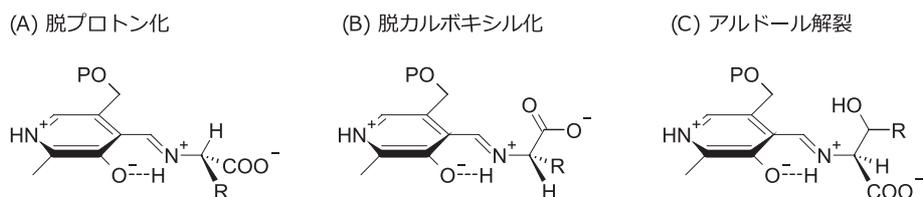


図6 Dunathanの仮説

(A)ではC-H結合, (B)ではC-COO⁻結合, (C)ではC-C結合がピリジン環とイミノ基を含む平面に垂直になる.

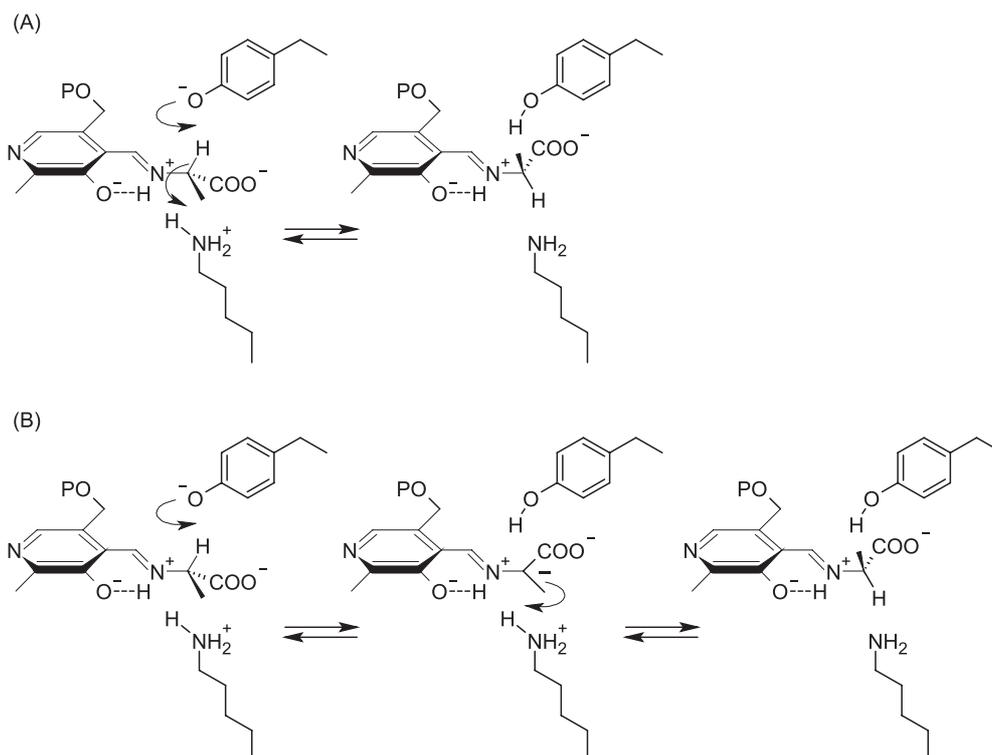


図7 ラセマーゼの反応機構

(A) 協奏反応機構. (B) 2段階反応機構.

応”の機構であれば、**Q**が生成しない。また、**Q**が生成しないのであれば、**Q**からの**Q**→**K**や**Q**→ $\Delta_{\alpha,\beta}$ -**A**といった反応が起こらず、特異的にラセミ化の反応のみが進行することになり、これは大変魅力的な話になる(図7A)。

では、はたして実際にそうなのだろうか？ それをどのように検証すればよいのだろうか？ ここで威力を発揮するのが速度論的同位体効果である。L-アラニン、D-アラニンの α -Hを重水素化すると、よく知られているようにその引き抜きの速度が減少するために全体の反応も遅くなる。ところが、この速度論的同位体効果は、反応を重水中で行わせると減弱したのである²¹⁾。重水中では、 α 位から引き抜かれるものとは反対の側からC α へ移動するものがプロトンではなくデューテロン(重陽子)となる。もしも協奏反応で起こっているのであれば、重水中ではこの過程が全体の反応の中でより律速段階となる。そのために速度論的同位体効果は変わらない(もともと完全に律速段階の場合)か増強されるはずである。それに対して段階的な反応であれば、第1段階の α -H/Dの引き抜きのあと、重水

中では第2段階の速度が低下(C α へのプロトンの移動よりデューテロンの移動の方が遅い)するために、第2段階が部分的に律速となり第1段階に由来する同位体効果が減弱する。したがって、AlaRでは段階的な反応でプロトンの移動が起こっていること、すなわち、分光学的には検出されないが**Q**を通して反応が進行していること(図7B)がわかった²⁰⁾。

ここで、少し脇道にそれるようであるが、AlaRにおけるPLPとアポタンパク質の役割について考えてみよう。基質アラニンの α -HのpK_aは水溶液中で30付近と見積もられている。この α -Hを引き抜くLysおよびTyrの側鎖のpK_aは水溶液中で10.5、10.1である。酵素の内部では基質やアミノ酸残基側鎖のpK_aが変化するとしても、30と10の相対的な差は大きすぎる。Richardらによれば、グリシンのC α のpK_aは水溶液中で29であるが、ピリジン環窒素がプロトン化したPLPとシッフ塩基を形成すると17になる²²⁾。したがって、AlaRがほかの多くのPLP酵素と同様にプロトン化したPLPピリジン環を有していれば、

PLPの“電子溜め”の働きを主体として触媒反応が進行するが、実際にはピリジン環がプロトン化されていないために、この機構で進行することは期待できない。そうするとPLPに加えて何らかの機構でさらにこの pK_a の値を下げる必要があるとわかってくる。

MajorらはこのArg残基をほかの多くのPLP酵素と同様の酸性残基であるGlu残基に変えた変異型酵素(R219E AlaR)と野生型酵素(WT AlaR)についてQM/MM計算による反応過程の比較を行った²³⁾。興味深いのは、触媒反応に伴う電荷分布の移動である。L-アラニンとAからQに変化する際に、C α に生じた-1の電荷が非局在化してピリジン環、イミノ基、基質カルボキシ基(カルボキシラートの形)のそれぞれにどの程度流れ込むかを調べると、WT AlaRにおいてそれぞれ-0.14, -0.20, -0.30であり、R219E AlaRにおいて-0.09, -0.22, -0.36であった。すなわち、WT AlaRとR219E AlaRでAからQへの過程における電荷移動はほとんど差がなく、意外なことに基質カルボキシ基への流れ込みが一番多いということである。一方、これをアポタンパク質がないPLPモデル反応で行ってみると、ピリジン環窒素がプロトン化した場合も脱プロトン化した場合もともに-0.4近くがピリジン環に流れ込んでいた。すなわち、アポタンパク質が存在すると、基質カルボキシ基の電子吸引力が増加するわけである。カルボキシラートとして存在する基質カルボキシ基が電子を吸引するのは不思議に思えるが、これは基質カルボキシ基がArg136(Arg219と別のものであることに注意)の側鎖およびMet312の主鎖アミド基と相互作用し、Qを静電的あるいは立体的に安定化するためと考えられる。そうすると、AlaRのアポタンパク質の役割はPLPのピリジン環の電子吸引力ではなく、基質カルボキシ基の電子吸引力を高めることで基質C α の pK_a を下げていくことになる。

こうなってくると不思議に思えるのは、なぜAlaRが“ここまでして”ピリジン環の電子吸引力を発揮させないようにしているのか、ということである。繰り返し述べているように、Qからは副反応の可能性がある。AlaRが協奏反応ではなく段階的な反応を選んだ以上、Qからの副反応は避けたい。さいわい基質がアラニンであるので、Q $\rightarrow\Delta_{\alpha,\beta}$ -Aが起こる可能性はないが、Q \rightarrow Kは起こる可能性がある。もしもAlaRがQの生成を必要最小限度にして、Q \rightarrow Kの起こる可能性を抑えているとしたらどうであろうか？面白い考え方であるが、すぐに考えられる反論は、速度論的に考えて、QのC α における再プロトン化による正常反応とQのC4'におけるプロトン化による副反応の速度の比はQの濃度に依存しない、というものである。Toneyはこれに対して、QのC4'におけるプロトン化はおそらくLys39-NH $_3^+$ が起こっており、それがC4'に近づく前にC α のプロトン化が起ってしまうと説明している²⁰⁾。確かに、Lys39-NH $_3^+$ とQが共存しているのはLys39-NH $_2$ がD-アラニンのC α からプロトンを抜き取った直後であ

り、そのときにはLys39のプロトン化された ϵ -アミノ基はC α の近傍にある。QがAに比べて17 kJ/mol以上不安定ということから²⁰⁾、Q \rightarrow Aの速度はA \rightarrow Qの速度の10³倍以上である。そうすると、Q \rightarrow Aの速度は10⁶ s⁻¹以上ということになる。果たしてこの速度がLys39側鎖の動きより十分に速いのかどうかは今後の研究を待たなければならないが、興味深い点である。R219E AlaRで副反応が促進されているという実験事実は、Glu219がLys39のプロトン化された ϵ -アミノ基をC4'に近づけているためと解釈されている。そうすると、Arg219の役割は、静電的反発力によってLys39のプロトン化された ϵ -アミノ基をC4'から遠ざけ、副反応を抑制していると考えられる。そして、このために低下したピリジン環の電子吸引力を補うようにArg136とMet312主鎖アミド基を配置して基質カルボキシ基の電子吸引力を高め、C α の pK_a を下げていくという解釈が成り立つ。

ただ、注意しなければならないのは、このような機構がラセマーゼに普遍的なものとはいえないということである。分裂酵母*Schizosaccharomyces pombe*²⁴⁾や細胞性粘菌*Dictyostelium discoideum*²⁵⁾、ヒト、マウス²⁶⁾のセリンラセマーゼはフォールドタイプIIに属し、ピリジンNと相互作用する残基はSerである。これらの酵素においてどのようにしてQ \rightarrow Kの反応を回避しているかに興味を持たれる。

デカルボキシラーゼの中でも、リシン合成の最終段階を触媒する酵素ジアミノピメリン酸デカルボキシラーゼはC α において脱カルボキシル化とそれが起こる側と反対側からプロトンの供与を受けるというワルデン反転を伴う協奏反応によって進行する²⁷⁾。そのためQを経由しないので副反応が起こらない。しかしほかの多くのデカルボキシラーゼは脱カルボキシル化が起こった側と同じ側で溶媒からのプロトンがC α に結合することで生成物のアミンが作られており、協奏反応は期待されない²⁷⁾。そこでQを経由すると考えられるが、興味深いことに、現在知られている限り、デカルボキシラーゼでQが分光学的に観測された例はない。このことは脱カルボキシル化が律速であり、その後のプロトン化が律速ではないことを示している。しかし、アラニンラセマーゼの場合と同じ議論で、QのC α における再プロトン化による正常反応と、QのC4'におけるプロトン化による副反応の速度の比はQの濃度に依存しない。事実、デカルボキシラーゼにおいては、脱カルボキシル化後にQのC4'におけるプロトン化による脱カルボキシル化依存性アミノ基転移が数千回に1回の頻度で起こることが知られている(例としてAADCでは1,500回に1回²⁸⁾)。これはこの副反応の存在にも関わらず、C α への優先的なプロトン化機構の存在を示しているともいえる(実際にアスパラギン酸 α -デカルボキシラーゼではTyr38がその機能を果たしているという報告がある²⁹⁾)。アラニンラセマーゼのようなPLP結合Lysの側鎖の動きによるプロトン移動の制御が不可能なために起こる反応特異性

の低下とみなすこともできる。

巧みな機構で $Q \rightarrow K$ の副反応を抑えて $Q \rightarrow A$ の正常反応を進行させているのが α -オキサミンシンターゼファミリーと呼ばれる集団である。これらは $Q \rightarrow A$ の過程でカルボアニオン性の $C\alpha$ とアシル CoA が反応し、CoA が脱離して $C\alpha$ がアシル化される反応（クライゼン縮合に類似の反応）を触媒する。このファミリーの酵素の一つのセリンパルミトイル転移酵素を例にとって説明する^{30,31}。酵素に第一の基質 L-セリンが結合して生じた **A** において、L-セリンのカルボキシ基は His159 と水素結合し、これによって $C4'-N-C\alpha-H$ の二面角が約 60° になり、 $C\alpha$ の脱プロトン化が進みにくいようになっている³²。ここで、第二の基質パルミトイル CoA が入るとこのカルボニル基が **A** の L-セリン部分のカルボキシ基と置き換わって His159 と水素結合を形成し、L-セリン部分のカルボキシ基は新たに Arg390 と水素結合/イオンの相互作用によって結合する。これによって **A** のコンホメーションが変化し、 $C4'-N-C\alpha-H$ の二面角がほぼ 90° となって脱プロトン化が起こり、**Q** となる（図 8）。ここで注目すべきことは、第一の基質 L-セリンが結合しただけでは **Q** が生成せず、**Q** が生成するときは必ず第二の基質パルミトイル CoA が結合しており、そのカルボニル基が $C\alpha$ の近傍に位置するということである。

2-オキソヘプタデシル CoA は、パルミトイル CoA のチオエステルの炭素と硫黄の間にメチレン基を挿入し、クライゼン型縮合が進行しないようにしたアナログである³³。あらかじめ L-セリンを結合させた酵素と 2-オキソヘプタデシル CoA を混合してストップフロー分光器で追跡すると、**Q** の蓄積が観測され、 $C\alpha$ の脱プロトン化の速度は 2.6 s^{-1} という値が得られた。一方、同様の反応を通常基質のパルミトイル CoA を用いて行っても **Q** の生成は確認できなかった。また、2-オキソヘプタデシル CoA を用いた上記の反応を重水中で行うと、分光学的に得られた $C\alpha$ の脱プロトン化の速度 2.6 s^{-1} に見合った $C\alpha$ のプロトンの減少が観測されるが、通常基質のパルミトイル CoA を用いた反応を重水中で行っても、 $C\alpha$ のプロトンの減少は

きわめて緩やかであった。このことから、通常の反応では $C\alpha$ の脱プロトン化速度よりも C-C 結合の生成の方がはるかに速く、前者が 2.6 s^{-1} （アナログとの反応のストップフロー分光法による解析で得られた値）であると仮定すると、C-C 結合の生成は 75 s^{-1} 以上の速度で進行する計算になった³³。このように **Q** の蓄積を避けることにより、アラニンラセマーゼと同様の理由で $Q \rightarrow K$ の反応が抑制されている可能性がある。

Q からの反応のもう一つは $Q \rightarrow \Delta_{\alpha,\beta}\text{-A}$ である。この反応を触媒する酵素、すなわち β -リアーゼおよび β -シンターゼからすれば、 $C\alpha$ のプロトン化による $Q \rightarrow A$ の反応は元に戻るだけで副反応とはならないが、 $C4'$ のプロトン化による $Q \rightarrow K$ の反応は副反応である。 β -シンターゼの一つ *O*-アセチルセリンスルフィドヒドラーゼ (*O*-acetylserine sulfhydrylase : OASS) では $C\alpha$ での脱プロトン化と $C\beta$ での酢酸イオンの脱離が起こって α -アミノアクリル酸と PLP のシッフ塩基 $\Delta_{\alpha,\beta}\text{-A}$ が形成される。基質の *O*-アセチルセリンの α -H の重水素化による速度論的同位体効果は 2.8 であり、逆反応を重水中で行わせることによる速度論的同位体効果は 2.4 であった。もしも脱離反応が段階的な E1cB 機構で起こるのであれば、逆反応において $C\alpha$ への溶媒からのプロトンの付加が律速となるので、**Q** の蓄積が起こるはずである。しかし、ストップフロー分光器で測定したところ、**Q** に由来する吸収はまったく観察されなかった。したがって、E1cB 機構は否定され、協奏的な E2 機構で起こることが示された（図 9A）。そうすると、OASS においては **Q** が生成しないので、**Q** からの副反応 $Q \rightarrow K$ は起こらないことになる。このようにして OASS の反応特異性が担保されているということがわかった³⁴。

しかしながら、OASS における脱離反応が E2 機構で進行するのは、基質の $C\beta$ にあるのが良好な脱離基であるアセトキシ基であるからであり、もしもこれがヒドロキシ基のように良好でない脱離基であれば E1cB 機構で進行する必要があり、**Q** が生成する。これらにおいてはどのようにして副反応 $Q \rightarrow K$ が起こらないようになっているのであろうか。

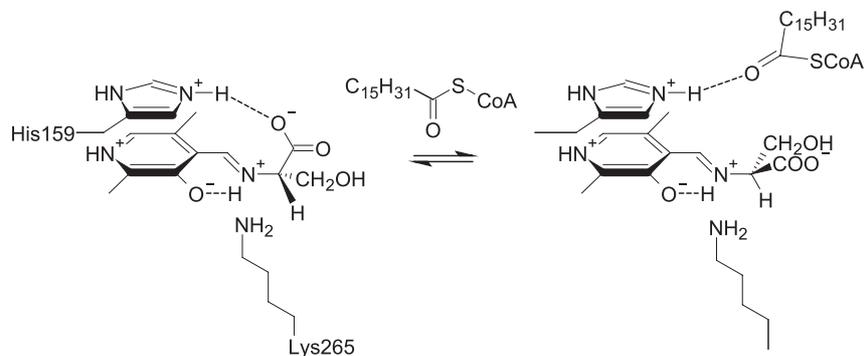


図 8 セリンパルミトイル転移酵素における反応制御機構
第一の基質 L-セリンの脱プロトン化は抑制されているが、第二の基質パルミトイル CoA が結合することで L-セリン部分が回転し、脱プロトン化が進行する。

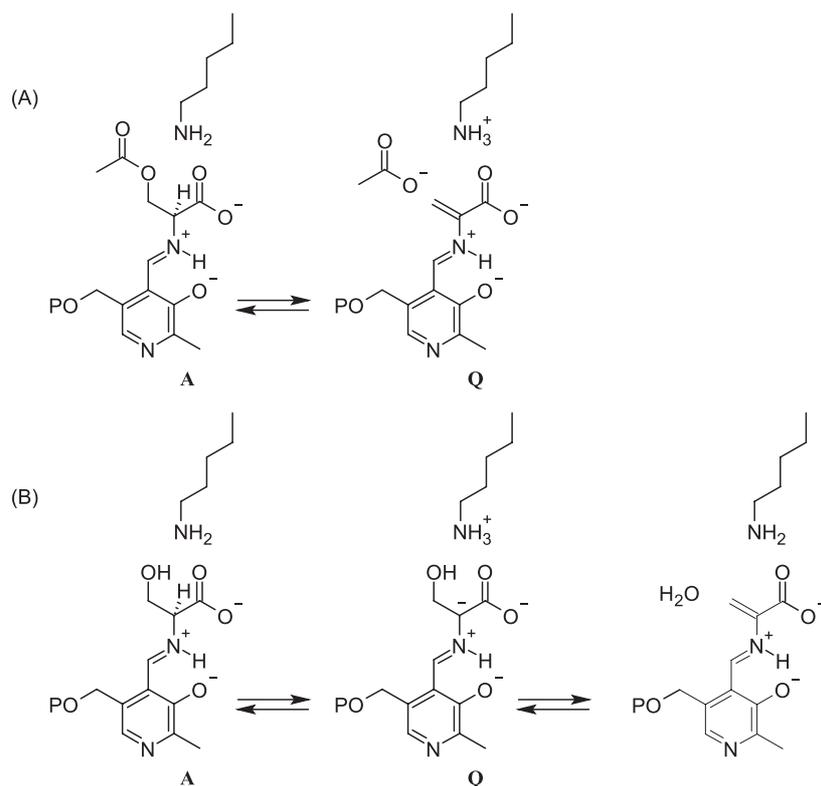


図9 β -リアーゼの反応機構

(A) β 位に良好な脱離基のある場合、協奏反応で進行する。(B) β 位の脱離基がプロトンの付加を受けることが脱離に必要な場合、Lys^{PLP}の ϵ -アミノ基がC α から引き抜いたプロトンがその目的に使われる。

良好でない脱離基はプロトン化が起こることによって脱離しやすくなる。Qが生成する際にはC α のプロトンはPLPを結合していたLys残基の ϵ -アミノ基に移動する。この ϵ -アミノ基とC β の脱離基との距離はC4'との距離よりも近いので、脱離基へのプロトン化の方が優先的に起こることが期待される(図9B)。もしもそうであるなら、これによってE1cB機構で進行する場合でも反応特異性が保たれることが説明される。

Qから $\Delta_{\alpha,\beta}$ -Aが生じる反応においては立体化学的な要素も考慮する必要がある。C β の脱離基はQの平面に垂直になっていなければならない。実際にチロシンフェノールリアーゼでは脱離するヒドロキシフェニル基がそのような位置にある³⁵⁾。興味深いことに、セリンパルミトイルトランスフェラーゼでは基質セリンとの反応によるAにおける構造³²⁾からすると、Qにおいて平面に垂直になる可能性がある。しかし、このヒドロキシ基はPLPのリン酸基と水素結合を形成し、リン酸基に対する水素供与体となり、Qからの脱離基とはなりにくくなっているため、Qから $\Delta_{\alpha,\beta}$ -Aへの反応が抑制されていると考えられる。

6. Kからの機構

KからはPMPになる経路とEになる経路に分かれ、さらにEからは元の経路に引き返す機構、ひとたび $\Delta_{\beta,\gamma}$ -K

となって元の経路に引き返す機構、また、 $\Delta_{\beta,\gamma}$ -Kから先に進む機構とさまざまである。そしてこれらの機構の違いはプロトンの移動がどのように行われるかによっているので、プロトン移動の制御機構が反応制御の本質である。しかしながら、Kまでの機構と異なり、Kからの機構はその複雑性もあってあまり研究が進んでいない。そこで現時点では、実験的裏づけのない考察になってしまうが、理論的にどのようなことが可能性として考えられるかということを中心に説明していこう。

A \rightarrow Q \rightarrow Kの経路で作られたKにおいてはLys^{PLP}の ϵ -アミノ基は非プロトン化状態にあり、C α を求核攻撃する水分子が存在すれば、塩基触媒として働いてKを加水分解し、PMPと α -ケト酸を生ずる。したがって、Kにおいてこの場所に水分子が存在することが、PMPを形成する、すなわちアミノ基転移が起こるための必要条件となる。そこで、K \rightarrow PMPの反応が副反応であるような酵素では、この場所への水分子の侵入を防ぐことが副反応の防止策となる。

アスパラギン酸 β -デカルボキシラーゼはL-アスパラギン酸を基質とし、A \rightarrow Q \rightarrow Kの経路で作られたKからC β の脱カルボキシル化によってEが生成し、その後C β にプロトンが付加して再びK \rightarrow A \rightarrow Lys-PLPの経路を通してL-アラニンを生産する。ストップフロー分光分析³⁶⁾と¹³C同位体標識³⁷⁾の結果により、脱カルボキシル化は律速では

なく、その後の $K \rightarrow A \rightarrow \text{Lys-PLP}$ のいずれかの過程が律速となっていることがわかった。本酵素は反応特異性が低く、アミノ基転移反応が高率で起こってピルビン酸が生成することが知られている。これは K が蓄積するとすればオキサロ酢酸との K よりむしろピルビン酸との K と考えられることと合致している。E において PLP 結合 Lys の ϵ -アミノ基はプロトン化されていないままであり、 $C\beta$ へプロトンを付加する残基も見当たらない。そこで、溶媒の水から供給されることが考えられるが、そうすると活性部位に水分子が侵入し、 $C\alpha$ に接近して $K \rightarrow \text{PMP}$ の副反応を起こす可能性が高いと説明される。アスパラギン酸 β -デカルボキシラーゼと同じ機構で進行するキヌレニナーゼ³⁸⁾、セレノシステインリアーゼ³⁹⁾ において同様にアミノ基転移反応が起こりやすいことはこの仮説を支持している。なお、キヌレニナーゼにおいては $C\beta$ の置換基 (アントラニル基) が外れる際には加水分解が起こっているが、この反応の塩基触媒は Lys^{PLP} ではなく (近傍の Tyr 残基または PLP のリン酸基と考えられている)、E において Lys^{PLP} はプロトン化されていないと考えられる。

γ -リアーゼおよび γ -シターゼにおいては、E は Lys^{PLP} が $C\beta$ からプロトンを引き抜くことで生成する。基質の $C\gamma$ の脱離基が良好な脱離基 (たとえばシスタチオン γ -シターゼのスクシニル基やリン酸基) であれば、E が生成すると容易に $\Delta_{\beta,\gamma}\text{-K}$ が生成する。つまり、 Lys^{PLP} のプロトンは使用されずに残る。そうすると、シスタチオン γ -シターゼにおいては、再び求核性の基質システインのチオール基が $C\gamma$ を攻撃して E が生成する際の塩基触媒として Lys^{PLP} が使えないということになり、何が一般塩基触媒であるかという問題が生じる。一方、基質の $C\gamma$ の脱離基が一般酸触媒の働きを必要とする脱離基である場合、たとえばシスタチオン γ -リアーゼやメチオン γ -リアーゼの場合、その一般酸触媒として Lys^{PLP} が使えないことになり、何が一般酸触媒となっているかという問題がある。後者についてはメチオン γ -リアーゼの場合、特定の Tyr 残基がその機能を持つ可能性が指摘されているが、普遍的なものかどうかはわからない。

「机上の化学」でこのように考える際にいつも問題になるのが、活性部位と溶媒の水との間のプロトンの交換である。4 節においてプロトン化状態が制限された AAT と制限の緩い AADC を説明したが、AADC のように溶媒との間でプロトンを活発に交換する酵素であれば、 Lys^{PLP} はそれまでの履歴に関係なくプロトン化、非プロトン化の状態を取ることができ、上記のような問題は起こらないことになる。ただし、そのようなプロトン化状態の制限の緩やかな酵素においては逆にプロトン移動の制御は難しくなることが考えられる。

以上のように、 K から先の反応制御機構は不明の点ばかりであり、今後の研究の進展が待たれる。その中で、最近になって高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8 のトレオニンシターゼの反応機構が解明されつつあり、それに

よってこの領域に新たな光が当てられている。

7. トレオニンシターゼにおける反応制御⁴⁰⁾

トレオニンシターゼ (threonine synthase: ThrS) は動物を除く多くの生物種において、L-アスパラギン酸からの L-トレオニンの生合成の最終段階を触媒する酵素であり、フォールドタイプ II に属する。この酵素は PLP 酵素の触媒反応で考えられるすべての中間体とすべての反応過程を経由するという、PLP 酵素の中で最も複雑な反応機構を持っている。

基質 *O*-ホスホ-L-ホモセリンが ThrS に結合し、A から 1,3-プロトトロピーによって K 、次いで $C\beta$ での脱プロトン化によって E を形成し、エナミンの $C\beta$ の高い電子密度によって $C\gamma$ からのリン酸イオンの脱離が起こり、 $\Delta_{\beta,\gamma}\text{-K}$ となる。その後、プロトトロピーによって $\Delta_{\alpha,\beta}\text{-A}$ となり、 $C\beta$ への水分子の付加によって L-トレオニンとの A となり、これから L-トレオニンが遊離する。ただし、ThrS は微弱ながら唯一の副反応として γ -リアーゼ活性を持っており、全体の 1% が $\Delta_{\alpha,\beta}\text{-A}$ から α -アミノクロトン酸を遊離して直接 ThrS を再生し、 α -アミノクロトン酸は α -ケト酪酸に変化する。つまり $\Delta_{\alpha,\beta}\text{-A}$ が本来の反応と副反応の分岐点となっている。この反応特異性の機構を探るために、直接 $\Delta_{\alpha,\beta}\text{-A}$ を生成する L-ビニルグリシンを基質とした反応を調べたところ、L-ビニルグリシン単独では α -ケト酪酸の生成のみが観測された。ところが、リン酸イオンを共存させると、*O*-ホスホ-L-ホモセリンを基質としたときと同様の反応特異性 (99%) および k_{cat} 値で L-トレオニンの生成が観測された。一方、リン酸イオンと同様の大きさを持つ硫酸イオンを共存させた場合は、L-ビニルグリシン単独の場合と同様に α -ケト酪酸の生成のみが観測された。さらに ThrS のアポ酵素に $\Delta_{\alpha,\beta}\text{-A}$ のアナログ (PLP とピルビン酸のアルドール縮合反応物) を加え、リン酸イオンの共存下で結晶を作製し、X 線解析を行ったところ、2-アミノ-5-ホスホペンタン酸を結合した ThrS の結晶構造 (E のアナログ構造) のホスホ基の場所とまったく同じところにリン酸イオンが存在していた。以上のことと、リン酸イオンを外から加えることなしに基質 *O*-ホスホ-L-ホモセリンから高い反応特異性と効率で L-トレオニンが生成することから、 $E \rightarrow \Delta_{\beta,\gamma}\text{-K}$ において脱離したリン酸イオンがその場所にとどまり、 $\Delta_{\alpha,\beta}\text{-A} \rightarrow \text{Q} \rightarrow \text{A} \rightarrow \text{PLP-Lys}$ の反応、すなわち α, β -二重結合への水分子の付加を促進しているという機構が明らかになった (図 10)。 $\Delta_{\alpha,\beta}\text{-A} \rightarrow \text{Q} \rightarrow \text{A}$ の過程はこのリン酸イオンがないと検出不可能な (硫酸イオンによって代替できない) 反応であり、リン酸イオンによる反応速度の上昇はきわめて高く、ThrS の反応特異性に決定的な役割を担っていることが特筆される。

リン酸イオンがこの過程を促進する機構が、 α, β -二重結合への水分子の付加におけるリン酸イオンによる一般塩基触媒であるのか、あるいはリン酸イオンが一般塩基触媒と

い出すだけの電子を $C\alpha$ に確保できないため、置換基の脱離には不利に働くと論じた⁴²⁾。このファミリーの酵素の立体構造はおろか一次構造もわかっていなかったころのこの予言があたっていたことは、酵素反応機構の解明においてモデル反応の果たす役割を示して興味深い。

8. 酵素の中の解離基

以上、ピリドキサル酵素の触媒反応機構について述べてきた。本質的にプロトン移動過程であるこれらの過程を正しく理解するためには、プロトン移動の駆動力の由来を知ることがいかに大切であるかがわかってくる。これはほかの酵素の触媒反応機構にも通ずることである。それを端的に示すエピソードを紹介してこの小論の括りとしたい。

AAT のエレガントな基質活性化の機構に触発されて、基質アミノ酸のアミノ基を、求核攻撃を目的に遊離の状態（プロトン化されていない状態）にする機構が、AAT 以外のさまざまな酵素について考えられている。たとえば、大腸菌のシスタチオニン γ -シクターゼにおいては、PLP にスタッキングする芳香族アミノ酸残基が Tyr101 である。そのフェノール性ヒドロキシ基がミハエリス複合体基質アミノ酸のアミノ基の近傍に来ることから、このヒドロキシ基が脱プロトン化したフェノラートの形のもが基質アミノ酸のプロトン化されたアミノ基からプロトンを奪って基質を活性化するという機構が提唱された⁴³⁾。同様の仮説はほかのさまざまな酵素、たとえばサルモネラ *Salmonella typhimurium* の D-セリンデヒドラターゼにおける Tyr214 あるいは Asp236⁴⁴⁾、シュードモナス属 *Pseudomonas* sp. の 1-アミノシクロプロパン-1-カルボン酸デアミナーゼにおける Tyr294⁴⁵⁾、シロイヌナズナ *Arabidopsis* のシスタチオニン β -リアーゼにおける Tyr181⁴⁶⁾ についても提唱されてい

る。

ところで、AAT のプロトン移動をエネルギー論的に明確に表す三次元ギブスエネルギー図で示すと、AAT においては、基質のアミノ基に結合していたプロトンを受け取るシッフ塩基の pK_a が遊離酵素とミハエリス複合体で異なるようにすることができ、さらに、その pK_a の制御を遷移状態のエネルギー準位に無関係に行うことができる（図 11 左）。さらに重要なことは、遊離酵素におけるシッフ塩基の pK_a の低下がシッフ塩基の歪み（これは遷移状態においては解消される）によってなされているのであり、それは k_{cat}/K_m をもたらすことになる。

これに対して、上にあげた酵素で提唱された Tyr 残基のように、活性部位に“ただ単に存在する”塩基は、何らかの機構で反応の進行に応じた塩基性の変化を起こさなければ、図 11 右に示すように、その残基がプロトン化した状態のエネルギープロファイルとプロトン化していない状態のエネルギープロファイルが平行移動した形で並ぶだけになってしまう。そうすると、その塩基がどのような pK_a を持とうとも、 k_{cat} や k_{cat}/K_m が変化しないことになる。すなわち、触媒にとって役に立たないということになるのである。実際に、シスタチオニン γ -シクターゼでは、Tyr101 を Phe に変えても速度論的パラメータに大きな影響がなかった⁴⁷⁾。

このことは何を意味するか？ 活性部位に存在する解離基は、触媒基になるためには、その空間的位置のみならず、反応の進行に伴って pK_a が適切に変化するように作られていなければならないことを示している。そうでなければ、その解離基は反応機構において意味のないものになるのである。

もう一度三次元ギブスエネルギー図をみると、AAT ではミハエリス複合体（および図には示していないが A）になったときにプロトン数が 1 に制限されている。これは前

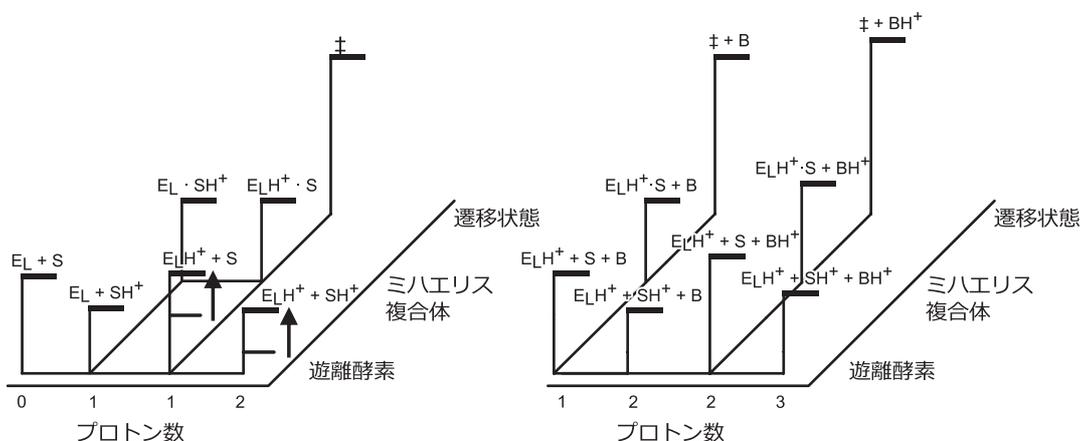


図 11 三次元ギブスエネルギー図で考えた活性部位解離基の役割

左側はアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ。シッフ塩基の歪みによるギブスエネルギーの増加が起る部分を矢印で示す。右側は PLP-Lys シッフ塩基が常にプロトン化されている酵素について、基質のプロトン化されたアミノ基からプロトンを受け取ると想定されている塩基 (B) を入れて考えたギブスエネルギー図。もしもこの塩基の pK_a が反応の進行に伴って変わらなければ、左二つと右二つのエネルギー準位は互いに平行移動したものにほかならず、この塩基は触媒に寄与しない。

述の静電的相互作用によってもたらされているが、もしもこのような制限が働かなければ Lys258 の ϵ -アミノ基がプロトン化された安定なエネルギー準位が出現し、 k_{cat} の低下を招くことになる。AAT で行われる厳密なプロトン移動の制御は AAT の高い活性のために必要な機構であったことがわかる。残念ながら、といえは観念論的にすぎるが、この AAT の“設計思想”はほかのフォールドタイプの酵素はもとより、同じフォールドタイプ I の酵素においても、アミノトランスフェラーゼ I 以外のファミリーの酵素には生かされているとはいいいくいのである。

以上、ピリドキサル酵素の反応機構の物語を述べてきたが、これを通じて、本当に意義のある反応機構を得るためには、活性部位の構造を解明するだけではなく、しっかりとした反応エネルギー論を展開することが必要であることが示されたと思う。

ピリドキサル酵素の反応機構の研究は、上述のように特に K 以降の過程など、多くの魅力的な題材を有している。その研究成果は酵素反応機構一般の研究にとっても意義のあるものとなるであろう。

稿を終えるにあたり、著者の行った研究の多くは数々の研究者との共同研究であることを記し、ここに謝意を表したい。

文 献

- Eliot, A.C. & Kirsch, J.F. (2004) *Annu. Rev. Biochem.*, **73**, 383-415.
- John, R.A. (1995) *Biochim. Biophys. Acta*, **1248**, 81-96.
- Hayashi, H. (1995) *J. Biochem.*, **118**, 463-473.
- B 6 Database : <http://bioinformatics.unipr.it/cgi-bin/bioinformatics/B6db/home.pl>
- Christen, P. & Mehta, P.K. (2001) *Chem. Rec.*, **1**, 436-447.
- Tanaka, H., Senda, M., Venugopalan, N., Yamamoto, A., Senda, T., Ishida, T., & Horiike, K. (2011) *J. Biol. Chem.*, **286**, 27548-27558.
- Helmreich, E.J. (1992) *Biofactors*, **3**, 159-172.
- Berkovitch, F., Behshad, E., Tang, K.-H., Enns, E.A., Frey, P. A., & Drennan, C.L. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 15870-15875.
- Lepore, B.W., Ruzicka, F.J., Frey, P.A., & Ringe, D. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 13819-13824.
- Hayashi, H., Mizuguchi, H., & Kagamiyama, H. (1998) *Biochemistry*, **37**, 15076-15085.
- Karpeisky, M.Y. & Ivanov, V.I. (1966) *Nature*, **210**, 493-496.
- Iwasaki, M., Hayashi, H., & Kagamiyama, H. (1994) *J. Biochem.*, **115**, 156-161.
- Hayashi, H. & Kagamiyama, H. (1997) *Biochemistry*, **36**, 13558-13569.
- Jencks, W.P. (1969) *Catalysis in Chemistry and Enzymology*, pp. 163-242, Dover Publications, New York.
- Islam, M.M., Hayashi, H., Mizuguchi, H., & Kagamiyama, H. (2000) *Biochemistry*, **39**, 15418-15428.
- Islam, M.M., Goto, M., Miyahara, I., Ikushiro, H., Hirotsu, K., & Hayashi, H. (2005) *Biochemistry*, **44**, 8218-8229.
- Hayashi, H., Tsukiyama, F., Ishii, S., Mizuguchi, H., & Kagamiyama, H. (1999) *Biochemistry*, **38**, 15615-15622.
- Dunathan, H.C. (1966) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **55**, 712-716.
- Julin, D.A., Wiesinger, H., Toney, M.D., & Kirsch, J.F. (1989) *Biochemistry*, **28**, 3815-3821.
- Spies, M.A., Woodward, J.J., Watnik, M.R., & Toney, M.D. (2004) *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 7464-7475.
- Spies, M.A. & Toney, M.D. (2003) *Biochemistry*, **42**, 5099-5107.
- Toth, K. & Richard, J.P. (2007) *J. Am. Chem. Soc.*, **129**, 3013-3021.
- Rubinstein, A. & Major, D.T. (2010) *Biochemistry*, **49**, 3957-3964.
- Goto, M., Yamauchi, T., Kamiya, N., Miyahara, I., Yoshimura, T., Mihara, H., Kurihara, T., Hirotsu, K., & Esaki, N. (2009) *J. Biol. Chem.*, **284**, 25944-25952.
- Ito, T., Maekawa, M., Hayashi, S., Goto, M., Hemmi, H., & Yoshimura, T. (2013) *Amino Acids*, **44**, 1073-1084.
- Smith, M.A., Mack, V., Ebner, A., Moraes, I., Felicetti, B., Wood, M., Schonfeld, D., Mather, O., Cesura, A., & Barker, J. (2010) *J. Biol. Chem.*, **285**, 12873-12881.
- Fogle, E.J. & Toney, M.D. (2011) *Biochim. Biophys. Acta*, **1814**, 1113-1119.
- Kawasaki, Y., Hayashi, H., Hatakeyama, K., & Kagamiyama, H. (1992) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **186**, 1242-1248.
- Saldanha, S.A., Birch, L.M., Webb, M.E., Nabbs, B.K., von Delft, F., Smith, A.G., & Abell, C. (2001) *Chem. Commun.*, 1760-1761.
- Ikushiro, H. & Hayashi, H. (2011) *Biochim. Biophys. Acta*, **1814**, 1474-1480.
- Shiraiwa, Y., Ikushiro, H., & Hayashi, H. (2009) *J. Biol. Chem.*, **284**, 15487-15495.
- Ikushiro, H., Islam, M.M., Okamoto, A., Hoseki, J., Murakawa, T., Fujii, S., Miyahara, I., & Hayashi, H. (2009) *J. Biochem.*, **146**, 549-562.
- Ikushiro, H., Fujii, S., Shiraiwa, Y., & Hayashi, H. (2008) *J. Biol. Chem.*, **283**, 7542-7553.
- Cook, P.F. (2003) *Biochim. Biophys. Acta*, **1647**, 66-69.
- Milić, D., Demidkina, T.V., Faleev, N.G., Phillips, R.S., Matković-Čalogović, D., & Antson, A.A. (2011) *J. Am. Chem. Soc.*, **133**, 16468-16476.
- Phillips, R.S., Lima, S., Khristoforov, R., & Sudararaju, B. (2010) *Biochemistry*, **49**, 5066-5073.
- Rosenberg, R.M. & O'Leary, M.H. (1985) *Biochemistry*, **24**, 1598-1603.
- Soda, K., Moriguchi, M., & Tanizawa, K. (1975) *Acta Vitaminol. Enzymol.*, **29**, 335-338.
- Esaki, N., Karai, N., Nakamura, T., Tanaka, H., & Soda, K. (1985) *Arch. Biochem. Biophys.*, **238**, 418-423.
- Murakawa, T., Machida, Y., & Hayashi, H. (2011) *J. Biol. Chem.*, **286**, 2774-2784.
- Shoji, M., Hanaoka, K., Ujiie, Y., Tanaka, W., Kondo, D., Umeda, H., Kamoshida, Y., Kayanuma, M., Kamiya, K., Shiraiishi, K., Machida, Y., Murakawa, T., & Hayashi, H. (2014) *J. Am. Chem. Soc.*, **136**, in press. doi:10.1021/ja408780c
- Martell, A.E. (1984) *Prog. Clin. Biol. Res.*, **144A**, 63-78.
- Clausen, T., Huber, R., Prade, L., Wahl, M.C., & Messerschmidt, A. (1998) *EMBO J.*, **17**, 6827-6838.
- Bharath, S.R., Bisht, S., Savithri, H.S., & Murthy, M.R.N. (2011) *FEBS J.*, **278**, 2879-2891.
- Thibodeaux, C.J. & Liu, H.-W. (2011) *Biochemistry*, **50**, 1950-1962.
- Breiting, U., Clausen, T., Ehlert, S., Huber, R., Laber, B., Schmidt, F., Pohl, E., & Messerschmidt, A. (2001) *Plant Physiol.*, **126**, 631-642.
- Jaworski, A.F., Lodha, P.H., Manders, A.L., & Aitken, S.M. (2012) *Protein Sci.*, **21**, 1662-1671.

著者寸描

●林 秀行 (はやし ひでゆき)

大阪医科大学総合教育講座化学教室教授. 医学博士.

■**略歴** 1957年兵庫県に生る. 82年大阪大学医学部卒業. 86年同大学院医学研究科博士課程修了. 同年日本学術振興会特別研究員. 87年大阪大学助手. 88年大阪医科大学講師. 94年大阪医科大学助教授. 2004年大阪医科大学教授(生化学教室). 12年より現職.

■**研究テーマと抱負** 酵素, 特に補欠分子族含有酵素の反応機構を分光学を中心とした実験を通じて明らかにしている. 最近では理論グループとの共同研究の成果が出て来ており, 今後とも実験・理論を通じて思索を深めて行きたい.

■**ホームページ** <http://www.osaka-med.ac.jp/deps/che>