

# 酵素法による食品成分分析

## 第2回 酵素はどんなものか(その2)

### 3. 酵素の構造(その2)

#### 酵素の形と活性中心

前回、酵素の形はおおよそ球形をしていると言いました。では、酵素はどのようにして触媒作用を働かせるのでしょうか。そのところを直接目で見てみたいと思うのが人情です。

幸いにしていくつかの酵素の実際の形が解明されています。一例としてリゾチームという酵素の形がわかっています。この酵素は多糖類中のN-アセチルノイラミン酸の-1,4結合の加水分解を触媒する働きをもち、グラム陽性菌の細胞壁を破壊します。鼻腔の粘膜や卵白にあって細菌からの感染を防ぐ大切な役目をしています。この酵素の大きさは分子量14,500で、酵素としてはリボヌクレアーゼ同様非常に小さい部類に入ります。大きさにすると45 x 30 x 30°(オングストローム°は長さの単位で1億分の1cm)です。光学顕微鏡で見られる細菌の大きさが約10,000°ですからその数百分の1で、電子顕微鏡を使っても全体の形がおぼろげに見える程度なのです。

酵素分子の詳しい形を知るためにはX線回折という方法を使います。精製したリゾチームの溶液から注意深く時間をかけてリゾチームの結晶を作り出します。この結晶にX線を当てるとX線が散乱しますが、結晶の規則性にしがたって特定の散乱像が得られます。この散乱点と強さを解析して図1に示す分子モデルを描くことが出来るのです。酵素分子の中央に基質を引き込む深い割れ目が見られます。

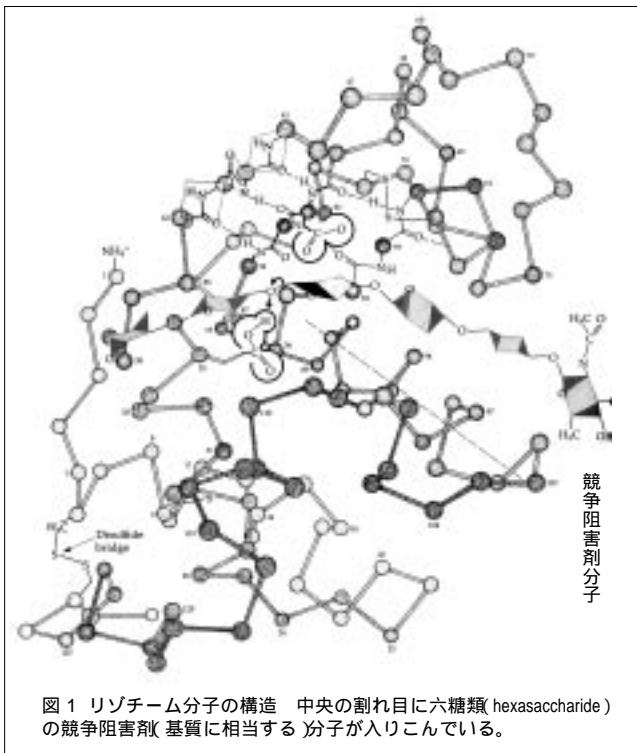


図1 リゾチーム分子の構造 中央の割れ目に六糖類(hexasaccharide)の競争阻害剤(基質に相当する)分子が入りこんでいる。

酵素と基質が結合した遷移状態にある中間体を取り出して直接目で見たいのですが、残念ながら酵素-基質複合体は非常に不安定なので取り出すことはできません。その代わりに、リゾチームの場合は幸いにして、基質と構造がよく似た競争阻害剤がいくつか知られており、その中から、リゾチームと安定な複合体(酵素-阻害剤複合体)を作る物が得られ、その複合体の立体構造が解明されました。図1にはリゾチーム分子の活性中心の割れ目の中に基質(あるいは拮抗阻害剤)の糖鎖が入り込む様子が示されています。

割れ目部分が酵素の活性中心に相当し、ここに入った基質分子との位置関係を示したのが図2です。リゾチーム分子の割れ目に6残基の糖鎖がはめ込まれ、活性部位を形作る周りのアミノ酸残基と接触する様子が覗えます。

リゾチームの例以外でも、リボヌクレアーゼやトリプシンなど、多くの酵素分子に触媒活性を示す割れ目やくぼみ(活性部位、活性中心)があり、基質がその中に取り込まれることがわかっています。



酵素が特異的に基質と反応する機構を説明するいろいろなモデルが提唱されてきました。100年以上前にドイツのフィッシャーが「鍵と鍵穴」説を提唱していました。基質と酵素の活性部位との関係は鍵と鍵穴の関係にあり、分子の構造が鍵穴にうまく適合する物質のみが基質として反応するという説です。つまり、上のリゾチームの例からも見られるようにこの古典的な説が大筋においては正しかったことがわかります。

基質はなぜ酵素の活性部位の割れ目やポケットに入るのでしょうか。リゾチームの例(図2)からもわかるように、酵素の活性部位の表面にはいくつかのアミノ酸残基の側鎖が露出しています。これらの側鎖と基質分子との間で、水素結合、イオン結合、疎水結合と、それぞれの足し合わされた力で引き合うことによって起こると考えられます。この点は酵素分子の立体構造の形成時にペプチド鎖が折り畳まれる状況と同様です。

#### 酵素の動的柔構造と触媒作用のメカニズム

酵素が基質特異性を示すのは鍵と鍵穴の関係によって活性中心に合致する化合物だけを選択的に引き込むことによるのであろうと述べました。図2に示したリゾチームの例では、基質の入る割れ目は両側の14個のアミノ酸残基で囲まれています。このうち直接的に糖鎖の切断に関与する触媒基はAsp52とGlu35で、糖残基のDとEの間で切るということがわかっています。

つまり活性中心といわれる部位をさらに詳細に見ると、基質を見分けて結合し固定する部位と、触媒作用を表す部位の2つの機能に分けて考えることが出来ます。

では鍵が鍵穴に入った後どうなるのでしょうか。鍵穴に相当する酵素分子の側は鉄製の錠前のように硬いものではなく柔軟性に富んだものとして理解する必要があります。

触媒作用を正確に説明すると余りに専門的になりすぎ、まだまだ十分解明されていない点も多いのでイメージ的な話にとどめて置きます。

- 1)基質分子が酵素分子の結合部位に結合します。
- 2)基質分子が結合したというシグナルが伝わり酵素分子の立体構造に変化が起って、触媒作用を進めるのにちょうどよい位置に触媒基が配置されます。酵素分子の立体構造が変化することにより、一方の基質分子の側も歪みやゆがみを受けます。ここで、なぜ酵素分子は通常基質分子より大きいのか、わかりますね。いわばコブラツイストをかけるには巨漢のプロレスラーの方がわざの効きがよいのと似ています。この結果として基質分子の反応する部分と、酵素の触媒基とが接近し接触するようになります。

3)基質分子が触媒基と反応して「酵素-反応中間体」を作ります。この反応中間体は前回(F-Kit News No. 16, p.3)で述べた白金触媒の例に照らすと、H<sub>2</sub>分子、O<sub>2</sub>分子が白金表面上で「遷移状

態」になることに相当します。

「反応中間体」の具体例として、セリン型たんぱく分解酵素での例がよく知られています。基質であるペプチド鎖が加水分解される過程で、酵素の触媒基と不安定ながら共有結合で結合し、複合体を作るのです。トリプシン、キモトリプシン、エラスターゼなどではいずれも触媒基がセリン残基であり、セリン側鎖の OH が図3に示すように基質と反応中間体を作ります。セリンのHが出てペプチド鎖を切って生じたN端のアミノ基に入り、他方のC端の CO はセリン残基につながり「アシル 酵素中間体」を作ります。

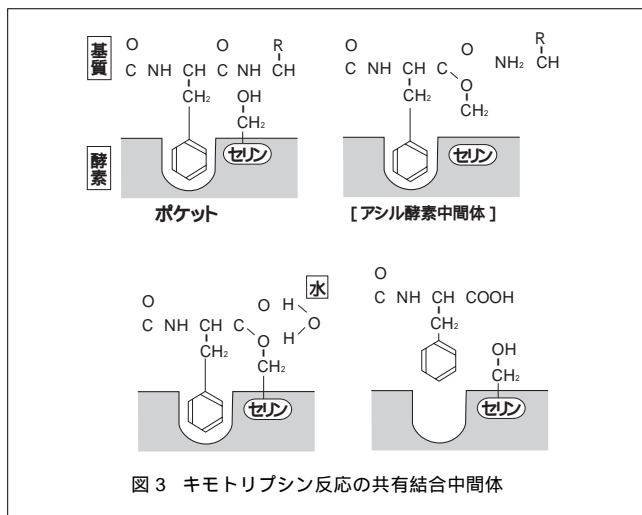


図3 キモトリプシン反応の共有結合中間体

4)このアシル 酵素中間体は不安定で、すぐ加水分解されてセリン残基に戻り、アシルの方は遊離酸(つまり生成物)として酵素から離れてゆきます。

以上が酵素の触媒作用の大まかなイメージで、イラスト(図4)のようになります。ポイントは基質が酵素の触媒基と反応中間体を作る点です。ただ多くの酵素では、反応中間体は必ずしも上例の「アシル 酵素中間体」のように実体が明確なものではなく、むしろきわめて不安定で検出できないほど瞬間的にしか存在しないことの方が多いのです。また酵素によって反応中間体は一つではなく、数ステップの反応中間体を順次経過して変化してゆく、と考えられます。つまり移りゆく「遷移状態」と呼ばれるゆえんです。反応中間体として酵素に結合しているのは正確に言うと、もはや基質ではなく基質が変化したもので、生成物になる前のものです。

たんぱく分解酵素は全てセリン残基を触媒基にしている訳ではありません。各種の酵素の活性中心を調べてみると、触媒基となるものとしてはヒスチジンの側鎖が多く、システインの SH基、グルタミンの NH<sub>2</sub>、アスパラギン酸残基の COOHなどが見られますが、いずれもH原子の授受をする基です。多くの化学反応では、強酸や強アルカリを用いて苛酷な条件下で反応を進めることが多いのに、酵素反応では中性付近でうまく進む不思議さを前回に(F-Kit News No. 16、p. 3)述べました。この秘密は、酵素の活性中心にあるこれらの触媒基がH原子やH<sup>+</sup>の出し入れをしていること(つまり酸・アルカリとして働いていること)にあるのです。酵素の分子上のある限られた部分のみが一時的に酸性またはアルカリ性になった、と考える事もできます。さらに触媒反応をエネルギーの視点で見ると：

前回に(F Kit NEWS, No. 16、p. 3) 化学反応が進むためには活性化エネルギーの障壁を越えることが必要で、酵素の役割はこの活性化エネルギーという障壁の山を低くすることであると言いました(前回の図2を参照)。では上で述べた酵素の触媒作用のメカニズムのステップは活性化エネルギーの山を低くすることとどう関係するのでしょうか。

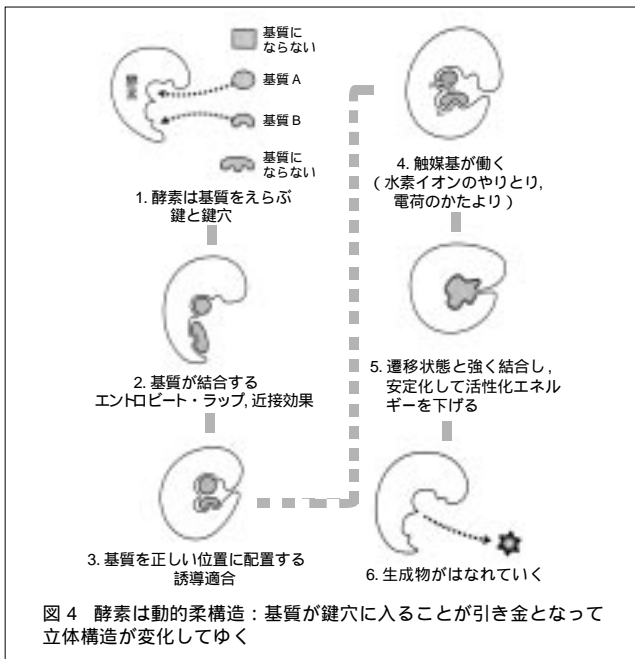


図4 酵素は動的柔構造：基質が鍵穴に入ることが引き金となって立体構造が変化してゆく

酵素がないとき(化学反応では) 反応物の濃度を上げ、熱をかけて山を一気に駆け上がらねばなりません。酵素があれば山の途中で一休みしながら迂回路を通ってゆくことができると言いました。一休みしながらの迂回路とは、基質と酵素の結合であり、基質の構造の歪みであり、「酵素 反応物中間体」の形成に相当します。活性中心の中で遷移状態を経ることは、つまり山の途中で迂回路に入り、脇道から低い峠を越えることに相当します。高い活性化エネルギーの頂を登ることなく、楽に通り返れることができるのです。

#### 4. 酵素と補酵素、補助因子

ご存知のように酵素はたんぱく質でできています。しかし酵素分子の中にはしばしばたんぱく質以外の低分子物質を含んでいます。これらの低分子を補助因子(または補欠分子族、コファクター、など)といい、酵素が働くときに道具として使われています。われわれが作業をする際、布を切るのに鋏を使い、魚を取るのに釣竿を使うように、それぞれの酵素作用に適した補助因子が必要とされます。補助因子としては大別して 補酵素と金属イオンがあります。補酵素と酵素本体のたんぱく質との結合は共有結合ではなくゆるやかな結合で、多くの場合透析やゲルろ過などで分離することが出来ます。

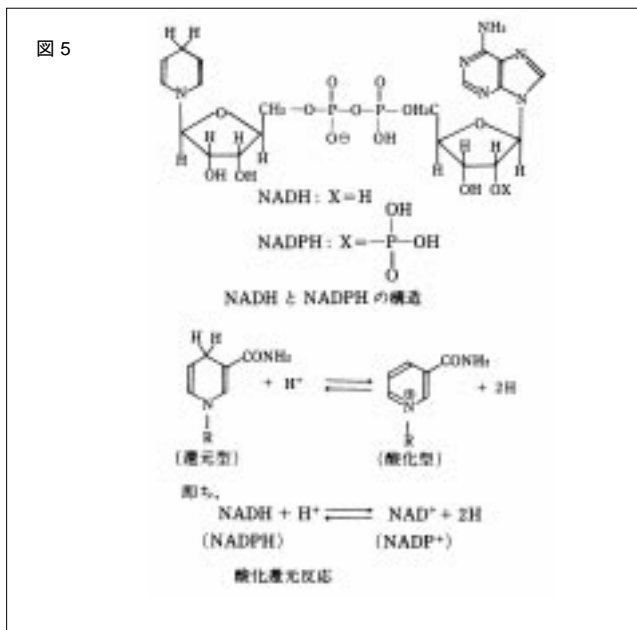
表1：補酵素とビタミン

補酵素	関与する主な反応	生成元となるビタミン
ピオシチン	カルボキシ基化	ピオチン
コバミド補酵素	アルキル化、など	コバラミン(B12)
テトラヒドロ葉酸	炭酸基転移	葉酸
FAD、FMN	酸化還元	リボフラビン(B2)
チアミンピロリン酸	アルデヒド転移、脱炭酸	チアミン(B1)
ピリドキサルリン酸	アミノ基転移、ラセミ化、脱炭酸、など	ピリドキシン(B6)
NAD、NADP	酸化還元	ニコチンアミド、ナイアシン
コエンザイムA	アシル基転移	パントテン酸

補酵素としては約10種類が知られており、表1にそれぞれの補酵素を道具として必要とする主な酵素反応を示しました。表からもわかるように、補酵素を必要とするのは酸化還元作用や、化学基の転移などを触媒する酵素です。加水分解反応をする酵素などは補酵素を必要とはしません。また注目すべき点は、これらの補酵素はB群のビタミンから出来ていることです。

食物から取り入れられたB群のビタミンが体の中で修飾を受けて補酵素に変わります。一例をあげると、欠乏すると脚気を引き起こすビタミンB1(化合物名：チアミン)は、体内に入るとリン酸化を受けて補酵素のチアミンピロリン酸(TPP)に変わります。TPPは糖分を燃やしてエネルギーを作る代謝にかかわる重要な酵素であるトランスケトラーゼや、ビルビン酸脱水素酵素などの補酵素として重要な働きをします。食物中のビタミンが欠乏すると生体に欠乏症状を引き起こすことからみても補酵素が生体内の反応で重要な働きをしていることがわかりますね。

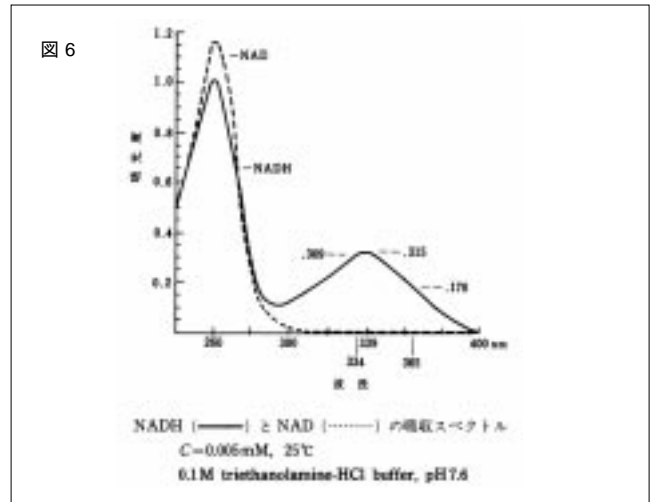
ここで最も代表的な補酵素としてNAD<sup>+</sup>とNADH<sup>+</sup>について触れておきます。この二つは酵素法による食品分析ではとりわけ重要な物質です。これらの働きは酸化還元反応においてH<sup>+</sup>の受け渡しをします。これらの構造はニコチンアデニンジヌクレオチドの名前が表すように図5の構造をしています。(NAD<sup>+</sup>はNAD<sup>+</sup>に単にリン酸残基が1つ付いたもの。)NAD<sup>+</sup>はH<sup>+</sup>を2つ受け取ってNADHになり、逆にNADHはH<sup>+</sup>を放出してNAD<sup>+</sup>に戻りますが、H<sup>+</sup>の入る部位はニコチン残基にあり、その部分の構造が図5の下のように変化することになります。



重要なことは、この構造変化に伴って光の吸収スペクトルが図6のように変化することです。酸化型(NAD<sup>+</sup>)では340nm付近に吸収がないのに還元型(NADH)では吸収が現れます。この性質を利用してNADH(またはNADPH)を含む酵素反応液の340nmでの吸光度を測定することにより、反応の度合いを知ることができ、吸光度が増加すれば還元反応量を、減少すれば酸化反応量を、簡単かつ正確に算出できます。

金属イオンとしては、マグネシウム(Mg<sup>2+</sup>)、マンガン(Mn<sup>2+</sup>)、亜鉛(Zn<sup>2+</sup>)、カルシウム(Ca<sup>2+</sup>)、銅(Cu<sup>2+</sup>)、鉄(Fe)などが酵素分子に取り込まれ、触媒作用に直接関与しています。補酵素の場合は、もっぱら酸化還元酵素や化学基の転移酵素に必要とされるのに対して、金属イオンは加水分解酵素を含め、広い範囲の酵素の補助因子として働いています。例を挙げれば、アルコールデヒドロゲナーゼやカルボキシペプチダーゼAは亜鉛を、ATPアーゼはマグネシウムを、チロシナーゼは銅、タカアミラーゼはカルシウムをそれぞれ必要とします。しかし金属イオンの種類と酵素の反応の種類との間にははっきりした規則性はありません。

逆に重金属イオンは微量でも酵素の活性を阻害することも多いので、酵素を取り扱うときには不要な金属イオンが混入しないよう注意が必要です。重金属イオンの影響を受けやすいか否かは酵素の種類によって差がありますが、一般的には酵素が金属製の容器や器具に触れることのないよう、酵素の取扱者は十



分に注意します。酵素を精製する時などは、使用する精製水の水质に注意するのは勿論ですが、金属イオンを遮蔽する目的でEDTAなどの金属キレート剤を緩衝液中に予防的に加えることもよく行われます。

## 第2章 酵素の反応とその性質

### 1. 酵素の種類とその活性

#### 酵素の分類と命名法

生物の体の中では生命現象を維持するための種々の物質がバランスをとりながら反応して流れています。それらの様々な反応は多数の酵素が各々の触媒作用に応じて分担し、連携して進めることで成り立っています。ですから多様な酵素なくしては一瞬たりとも生命活動は成り立ちません。今までに3,000種以上の酵素が知られていますが、今ではこれらの酵素を系統的に整理して分類することが行われています。生体中の諸反応をその形式によって6つに大別し、その反応形式に基づいて触媒する酵素を分類します。また酵素の正式名もこの分類法に基づいて命名することが国際生化学分子生物学連合で決められています。

次ページに、6種類の反応形式とその酵素の分類を表2に示します。

表2：酵素反応の分類とそれに基く酵素の命名

分類名	酵素反応形式	代表的な酵素の例
1. 酸化還元酵素 オキシドレダクターゼ	酸化還元反応を触媒	デヒドロゲナーゼ(脱水素酵素) レダクターゼ(還元酵素) オキシダーゼ(酸化酵素) オキシゲナーゼ(酸素添加酵素)
2. 転移酵素 トランスフェラーゼ	ある化合物の官能基を他の化合物に移す反応を触媒	トランスアシラーゼ(アシル基転移酵素) トランスアミナーゼ(アミノ基転移酵素) ホスホトランスフェラーゼ(リン酸転移酵素)
3. 加水分解酵素 ハイドロラーゼ	加水分解反応を触媒	エステラーゼ グルコシダーゼ ペプチダーゼ(ペプシン、トリプシンなど)
4. 脱離酵素 リアーゼ	化合物中のある基を脱離し二重結合を生ずる反応、逆に二重結合にある基を付加する反応を触媒	デカルボキシダーゼ(脱炭酸酵素) アミノリアーゼ(脱アミノ酵素) ハイドラターゼ(脱水酵素)
5. 異性化酵素 イソメラーゼ	異性化反応を触媒	ラセマーゼ エピメラーゼ ムターゼ
6. 合成酵素 リガーゼ	ATPのエネルギーを利用して2つの分子をつなぐ合成反応を触媒	シクターゼ カルボキシラーゼ

どの酵素も反応の種類を表す「系統名」と日常的に使う「常用名」とが付けられ、番号が登録されています。常用名はその酵素が触媒する反応または基質の後にアーゼ(-ase)が付けられます(トリプシンなど古くから通用してきた名はそのまま用いる)。一例では常用名アルコールデヒドロゲナーゼは系統名ではアルコール:NADオキシドレダクターゼとなります。酵素番号の表し方は、たとえばアルコールデヒドロゲナーゼの場合、EC 1.1.1.1 というようにECの後に4つの数字で表します。最初の数字は6つの主分類に対応し、1はオキシドレダクターゼに当たります。2番目の数字で反応が起こる基質(この場合、アルコール)の種類を示し、3番目の数字で補酵素やもうひとつの基質の種類(この場合、NAD)を表します。最後の4番目の数字はこのサブクラスの中での通し番号となります。同じグループの乳酸脱水素酵素はEC 1.1.1.27となります。

酵素の量は酵素の活性から求める

酵素の量を測る場合、酵素そのものの量を直接求めることは(例えばたんぱく分子として重さを秤ることは)多くの場合困難です。酵素の量は分子としては通常極めて微量で低濃度であるためです。しかし酵素の触媒作用はわずかな酵素量でもはっきり現れるため、この作用の強さを酵素活性として測定し、その活性値を酵素の量として置き換えることによって求めます。酵素分子の絶対量はわかりませんが 相対的な量は正確に知ることが出来ます。一定の条件の下では酵素の量は酵素の活性に比例するからです。つまり酵素の量は活性値で規定するので「力価」として表されていると言えます。

酵素活性の単位

ある試料の中の酵素の量はその試料が示す酵素活性の強さに基づいて決められます。酵素活性は触媒作用の強さを表わし、触媒作用の強さは反応の速度(=時間当たりの反応量)で測定します。測定した反応速度を酵素の量として置き換えるのです。

酵素の1単位(Uと略します)は「一定条件下、1分間に基質の1 $\mu$ molを変化させるのに要する量」と決められています。

$$1 \text{ U} = 1 \mu \text{ molの变化 / 分}$$

(1 mol は高等学校の化学で出てきたように分子数で  $6 \times 10^{23}$ 個に相当する量)

酵素の活性は、温度、反応液のpH、基質の濃度、などの測定条件によって変わります。酵素の活性の測定は実施可能な限りその酵素反応にとって最も適した条件下(至適である)で行うことが理想です。同じ酵素でも異なる施設の測定値を比較するには測定されたときの条件の異同を確認することが必要です。(次回に続く)

執筆：深見博一(理学博士)

本文で引用した図表の出典

図1：D. E. Metzler, Biochemistry, Academic Press Inc., 1977

図2：R. K. Murray et al., Harpers Biochemistry 21st ed., Appleton & Lange, 1988

図4：藤本大三郎, 酵素反応のしくみ,(株)講談社ブルーバックス, 2001. 12. 01.