

研究ノート

## B6 酵素 Tryptophanase の 活性域の構造

仁 平 卓 也\*

人間の必須栄養素の一つであるビタミンB<sub>6</sub>には、ピリドキシン、ピリドキサミン、ピリドキサルおよびそれらのリン酸エステルがあるが、その生体内での活性型（すなわち補酵素型ビタミンB<sub>6</sub>）は、主にピリドキサル5'-リン酸(図1)であることが知られている。このビタミンを補酵素として要求する酵素(B<sub>6</sub>酵素)は、植物、動物、微生物界に広く分布し、 $\alpha$ -ケト酸の代謝にビタミンB<sub>1</sub>酵素が不可欠なごとく、 $\alpha$ -アミノ酸の代謝に必須の役割を果している。このB<sub>6</sub>酵素群の特長は、その触媒する反応が極めて多岐にわたることであり、代表的な反応に、アミノ基転移反応、脱炭酸反応、 $\alpha$ - $\beta$  ( $\alpha$ - $\gamma$ ) 脱離・置換反応、ラセミ化反応がある(図2)。

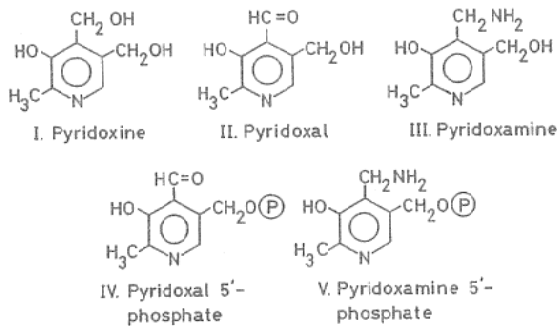


図1 Structural Formulas of Various Forms of Vitamin B<sub>6</sub>

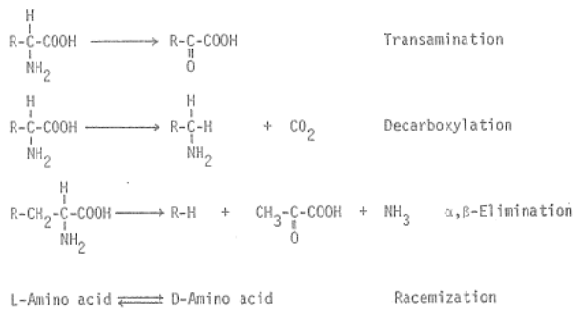


図 2

従って、ピリドキサルリン酸という1種類の補酵素が、上述のような異なった反応を触媒しうるわけであるが、このような場合どの反応を行うかの決定権は、該当するアポ酵素の側にあることになる。我々の研究室では、B<sub>6</sub>酵素の発揮する反応特異性の問題を解明する為、 $\alpha$ 、 $\beta$ -脱離反応を触媒する Tryptophanase を材料として、その活性域の構造を検討してきている。本稿では、今までに我々の得た知見をまとめてみた。

Tryptophanase は、L-Trp を基質とし、indole, pyruvate, ammonia に分解、あるいは、その逆反応を触媒する酵素で、分子量22万、4ケの identical protomer よりなる tetramer である。各々の protomer には、1ケのピリドキサル結合部位、すなわち触媒部位があることが証明されている。この Tryptophanase は、補酵素ピリドキサルリン酸以外にK<sup>+</sup>、NH<sub>4</sub><sup>+</sup>などの無機一価陽イオンをその活性発現に必要とすることが従来より知られており、その役割

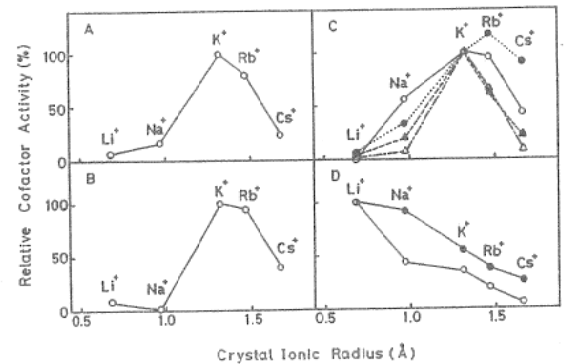


図3 Comparison of Tryptophanase and  $\beta$ -Tyrosinase with Other Monovalent Cation Activated-Enzymes in Monovalent Cation Selectivity

\*仁平卓也(Takuya NIHIRA), 大阪大学工学部附属生物工業国際交流センター, 助手, 工博, 生物有機化学

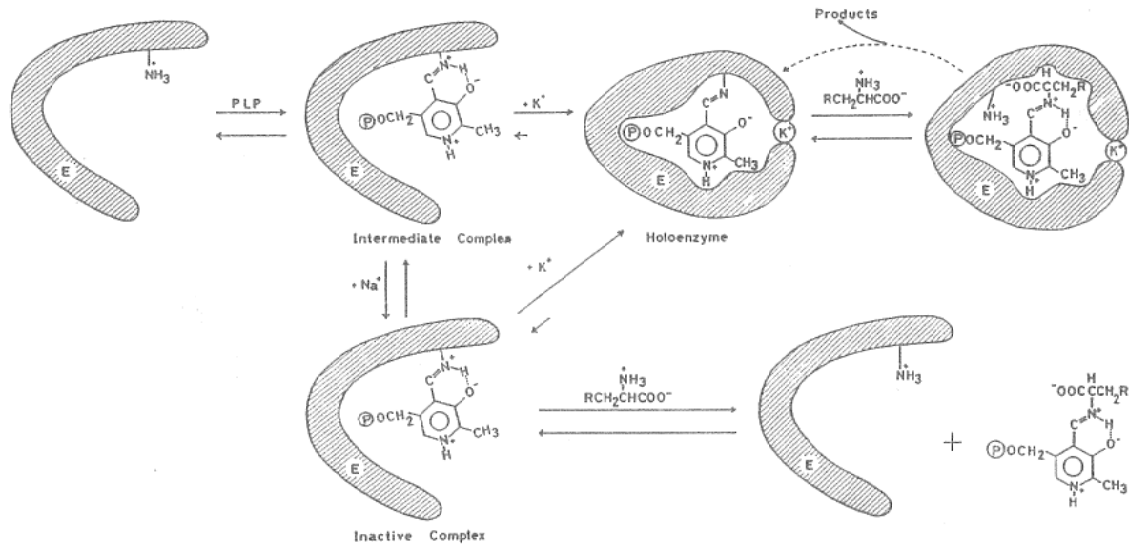


図4 Schematic Representation of Conformational Changes Induced by Potassium Ion

に興味をもたれていた。Escherichia coli B/1t-7A株より精製した酵素を用いて、無機一価陽イオンの効果を詳細に検討したところ、図3-Aに示すように、活性発現能は一価陽イオンのイオン半径と密接に関連していることが判明した。この際  $K^+ \sim Rb^+$  が最適で、より小さい ( $Li^+, Na^+$ ) 或は、より大きい ( $Cs^+$ ) 一価陽イオンでは効果が低いという傾向は、類似  $B_6$  酵素  $\beta$ -Tyrosinase (図3-B) でも見られる。過去の文献より、一価陽イオンを要求する酵素は、 $K^+$  を至適とする  $K^+$  型 (図3-C) と、 $Li^+, Na^+$  を至適とする  $Na^+$  型の二つに大別できることが分かる。両者の数を比較すると、 $K^+$  型が圧倒的に多く、 $K^+$  のもつイオン半径は、自然界の共通因子のように思われ興味深い。さて、この一価陽イオンの役割であるが、各種のゲル濾過実験を行った結果、(アポ酵素-ピリドキサルリン酸) 複合体それ自身は、触媒的に不活性であり、 $K^+$  などの有効な補因子の存在によって、はじめて触媒的に活性なホロ酵素に変換されることが明らかとなった (図4)。 $Na^+$  などの存在下では、酵素中に適切な活性部位が形成されていないと考えられ、実際に補酵素ピリドキサルリン酸及び、基質 L-Trp に対する親和性が極度に低下している (表1)。活性に有効な一価陽イオン ( $K^+, NH_4^+, Rb^+$ ) は、一旦形成されたホロ酵素を安定に保

表1 Effects of  $K^+$  and  $Na^+$  on Kinetic Constants for Coenzyme and Substrate

Enzyme	Km for pyridoxal-P	Km for L-tryptophan
	$\mu M$	mM
$K^+$ -Tryptophanase	1.8	0.48
$Na^+$ -Tryptophanase	>31	>14

持する役割ももつ。

次に、Tryptophanaseの活性中心にどのようなアミノ酸残基が存在するのかを知るために、各種の化学修飾による検討を行った。用いた修飾法の選択基準は、可能な限り mild な条件で修飾が行えること、及び修飾されるアミノ酸残基に関して特異性の高い方法ということである。具体的には His 残基に対して、ピリドキサルリン酸を光増感剤とする光酸化、Tyr 残基に対しては、tetranitromethane によるニトロ化、Cys 残基に対しては、nitrothiocyanobenzoate によるシアン化、Glu Asp 残基のカルボキシル基に対しては、カルボジイミドによるアミド化を採用した。

まず His 残基の場合であるが、図5に示すように、500w タングステンランプによる可視光照射下、アポ酵素は安定であるのに対して、ホロ酵素は凝一次的に失活する (図5-A)。遊離のピリドキサルリン酸ではなく、活性中心に結合したピリドキサルリン酸が、この光失

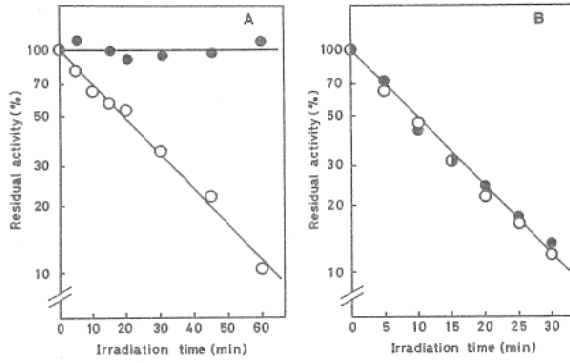


図5 Loss of Tryptophanase Activity during Irradiation

- (A) Apoenzyme, ●; holoenzyme in the presence of 400 μM pyridoxal-P, ○.
- (B) Holoenzyme freed from unbound pyridoxal-P with (○) or without 40 μM pyridoxal-P.

活に関与していることは、過剰のピリドキサルリン酸が存在してもしなくても、光失活速度に変化がないこと (図5-B)、及び光失活と酵素反応両者のピリドキサルリン酸濃度依存性が同一であることから明らかである。このように活性中心に結合したピリドキサルリン酸が光増感剤として必須であることから、修飾されるアミノ酸残基も活性中心近傍にあることが推定される。一連の残存活性を示す光失活酵素のアミノ酸含量を測定すると、His 残基の減少量と光失活度がよい相関を示し、monomer あたり1ケの His 残基の修飾により完全に失活することが判明した (図6)。この活性発現に必須の His 残基を光修飾する際には、共存する一価陽イオンが大きな影響を与える (表2)。活性なホロ酵素を形成しうる一価陽イオン ( $K^+$ ,  $NH_4^+$  など) の存在下でのみ、速やかな光失活が生じることから、活性なホロ酵素にお

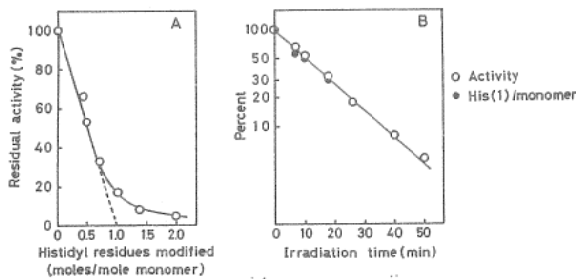


図6 Effect of Irradiation on Histidyl Residue

いて光増感剤であるピリドキサルリン酸と修飾される His 残基が、極めて近接した空間配置をとるようになるものと考えられる。

Tyr 残基の tetranitromethane (TNM) による修飾の際には、アポ酵素のみが失活し、ピリドキサルリン酸は、TNM が活性中心内部に到達するのを妨げるように働く結果、保護剤として作用する (図7)。この場合も、アミノ酸分析及び失活の反応速度論的解析から、monomer あたり1ケの Tyr 残基が存在することが判明している。TNM 修飾の際にみられるピリドキサルリン酸の保護作用も、共存する一価陽イ

表2 Effect of Monovalent Cations on the Rate of Photoinactivation

Addition (0.1 M)	k (min) <sup>-1</sup>	Relative rate (%)
None	0.0211	28.3
Li <sup>+</sup>	0.0216	28.9
Na <sup>+</sup>	0.0241	32.3
K <sup>+</sup>	0.0745	100
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	0.0613	82.2
Rb <sup>+</sup>	0.0525	70.5
Cs <sup>+</sup>	0.0216	28.9

$K^+$ - Holoenzyme  $\rightarrow$  Seph. G-25  
 0.05 M Triethanolamine-HCl, pH 8  
 (+20 μM PLP, +1 mM DTT)  
 $\rightarrow$   $M^+$ - free Holoenzyme  $\xrightarrow[0.1 M M^+Cl^-]{37^\circ, 20 \text{ min}}$  Photoinactivation  
 $\rightarrow$  Assay (+200 μM PLP, +0.1 M KCl)

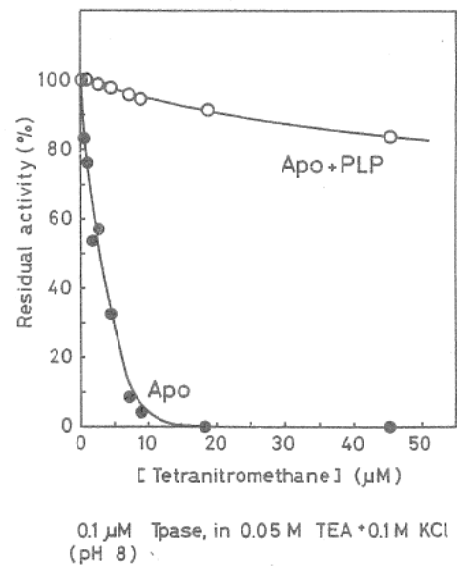


図7 Loss of Tryptophanase Activity as a Function of Tetranitromethane Concentration

表3 Effects of Monovalent Cations on the Inactivation by Tetranitromethane

Additions	Residual Activity	
	%	
K <sup>+</sup> (Apoenzyme)	0	
Pyridoxal-P	16.4	
Pyridoxal-P + Li <sup>+</sup>	7.3	
Pyridoxal-P + Na <sup>+</sup>	9.4	
Pyridoxal-P + K <sup>+</sup>	86.6	
Pyridoxal-P + NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	87.6	
Pyridoxal-P + Rb <sup>+</sup>	73.7	
Pyridoxal-P + Cs <sup>+</sup>	12.3	

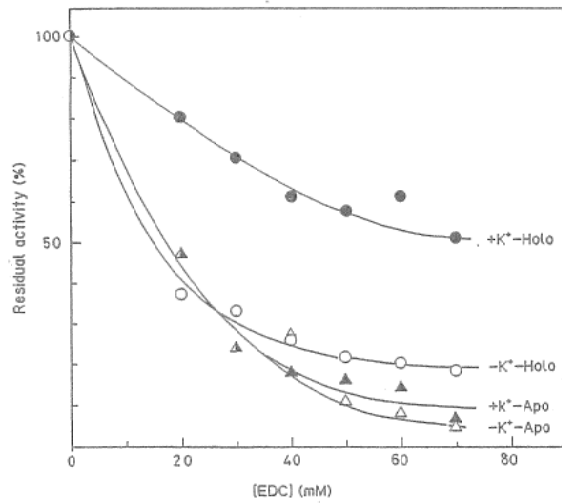
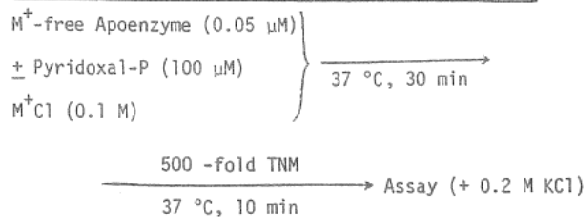


図8 The Loss of Tryptophanase Activity as a Function of EDC Concentration  
 Tryptophanase, 0.145 $\mu$ M; 37°C, 20 min.  
 +K<sup>+</sup>, +0.1 M KCl; Holoenzyme,  
 +100 $\mu$ M PLP

オンによって影響を受ける(表3). K<sup>+</sup>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, Rb<sup>+</sup> 存在下のみで, 十分な保護効果が発揮され, 補酵素ピリドキサルリン酸と Tyr 残基間での相互作用(水素結合など)が推定される. 同様に 1-ethyl-3-(3'-dimethyl-amino-propyl carbodiimide(EDC) によるカルボキシル基の修飾の際にもピリドキサルリン酸は,

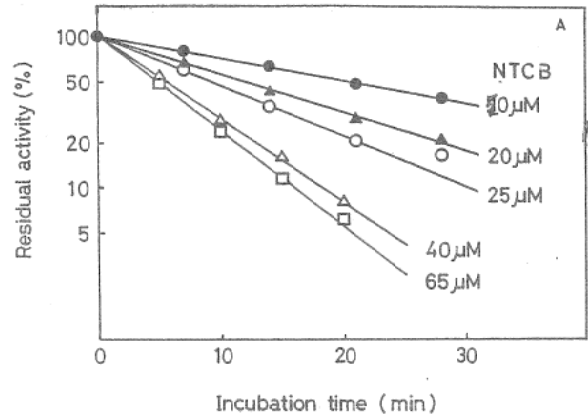


図9

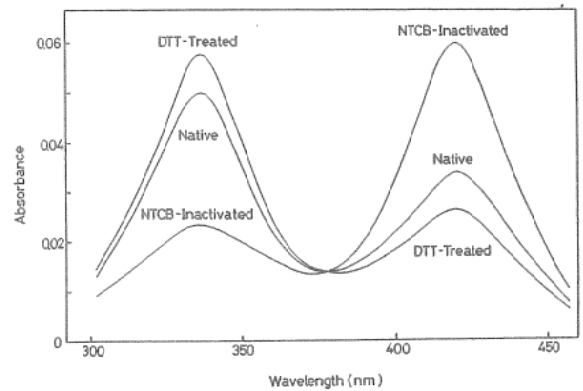


図10

修飾試薬が活性中心内部へ到達することを妨げ, 保護作用を示す(図8).

Cys 残基については, E. E. Snell らにより 1~2ケの Cys 残基が活性発現に必要なとの報告があったが, 修飾により導入された基が nitrothiobenzoate と大きく, 立体障害のために失活している可能性があり, 役割も不明であったため再検討したものである. Nitrothiocyanobenzoate (NTCB) による修飾では, -CN 残基が導入され立体障害を引き起こす可能性は少ない. 図9に示すように, NTCB 修飾により, 酵素の擬一次的失活が生じ, その反応速度論的解析から, monomer あたり1ケの Cys 残基が修飾されていることが判明した. NTCB 修飾された酵素は, native な酵素とは極めて異なったスペクトルを示し(図10), Cys 残基とピリドキサルリン酸との間の密接な相互作用を示している.

以上, B<sub>6</sub> 酵素 Tryptophanase の活性中心には, 活性発現に必須の His 残基, Tyr 残基,

Cys 残基, カルボキシル基が各々 1 ケずつ存在している。これらの残基の反応性は, 無機一価陽イオン, 或いは補酵素ピリドキサーリン酸の有無によって顕著な相違を示し, 酵素の立体構造の変化をよく反映している。これらの残基の相対的空間配置や酵素反応中にどのように相互作用しているかについては, 不明な部分が多いが, X線結晶解析技術も日進月歩である現在, 詳細に解析される日もそう遠くはないであろう。

参考文献

- 1) 虎谷, 仁平, 福井, Eur J. Biochem, 69, 411~419 (1976).
- 2) 仁平ら, Eur J. Biochem. 101, 341~347 (1979).
- 3) 仁平ら, Eur J. Biochem. 119, 273~277 (1981).
- 4) 仁平ら, Eur J. Biochem, 149, 129~133 (1985).
- 5) 仁平ら, 日農化大会講演要旨集 P.344 (1985).

