

図3 エリトリトール (E) およびトレイトール (T) のトリフルオロアセチル誘導体のガスクロマトグラム
 (A) 標準エリトリトールおよびトレイトール
 (B) D-エリトロース4-リン酸基質の酵素反応液を処理して得た試料

を基質にして反応後、水素化ホウ素ナトリウムで直接還元すると糖はすべてポリオールへ変換されるから酸性ホスファターゼで脱リン酸したのち反応液をAmberlite CG-120カラム (脱カチオン) およびAmberlite IRA-47カラム (脱アニオン) の順に通過させ濃縮乾固後、トリフルオロアセチル化してガスクロマトグラフィーにかける。標準のエリトリトールおよびトレイトールの分別定量を確認 (図3のA) した上で酵素反応 (後述) の試料を分析するとエリトリトールに加えトレイトールが検出 (図3のB) された。このトレイトールが単にエピメラーゼ反応に由来するD-トレオース4-リン酸 (アルドテトロース) をあらわしているのか、あるいはイソメラーゼ反応に由来するD-エリトロース4-リン酸 (ケトテトロース) をあらわしているのかこの段階では断定できない。そこで重水素化ホウ素ナトリウム還元するとアルドースとケトースでは重水素の導入位置が異なることに着目し、ガスクロマトグラフィー・マススペクトロメトリー (GC/MS) を行って炭素3個のフラグメントについての連立方程式を解きD-トレオース4-リン酸とD-エリトロース4-リン酸を分別定量した。この新しく

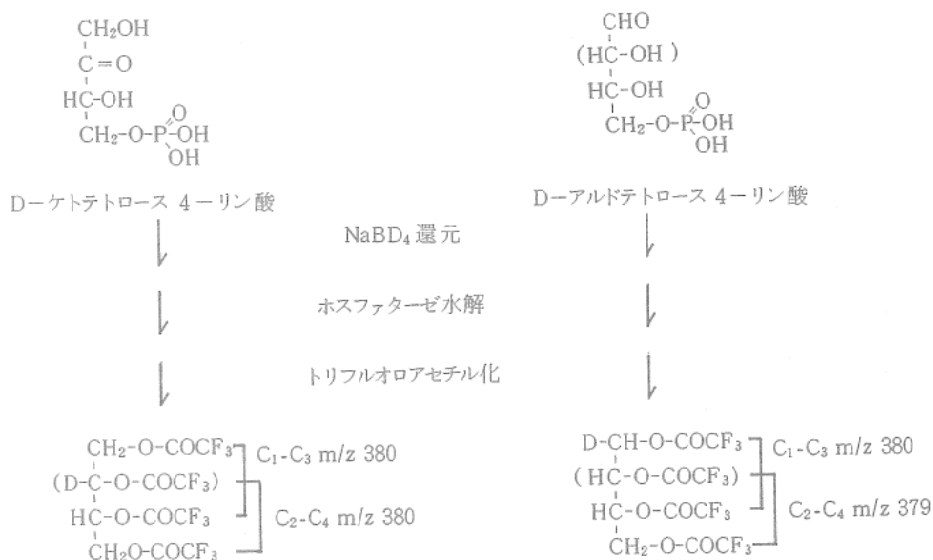


図4 D-アルドテトロース4-リン酸またはD-ケトテトロース4-リン酸の重水素化ホウ素ナトリウム還元とそのマスフラグメンテーション

考案した方法の概略は図4に示してあり、アルドテトロース起源のマスフラグメント (m/z) は380 (C₁-C₃) および379 (C₂-C₄) の2種が、またケトテトロース起源のそれは380の1種が得られることを意味している。還元、酵素水解ならびにイオン交換樹脂処理、トリフルオロアセチル化後、GC/MSによる分析の順に若干複雑な操作を行うものの、この方法によって酵素反応の追跡が可能になった⁴⁾。またD-エリトロース4-リン酸は酵素法によっても定量できることを明らかにした⁵⁾。以上の定量法を踏まえ酵素反応は Bis-Tris 塩酸緩衝液 pH 7.0 中、基質 Ery 4 P および酵素標品を混合し30℃、30分間保温して行ない、2%重水素化ホウ素ナトリウムを添加して酵素反応を停止した。

Ery 4 P 異性化酵素の精製と諸性質

入手容易なウシ肝臓を材料に種々精製法を検討し次のような一連の操作で単一酵素を得ることに成功した。新鮮なウシ肝臓を100mM リン酸緩衝液 pH 8.0で抽出しアセトン50%から70%で沈殿する分画を集め次に、硫酸30%から50%で沈殿する分画を得た。このものを DEAE-セルロース (50mM リン酸緩衝液 pH 7.0平衡化)、ECTEOLA-セルロース (20mM リン酸緩衝液 pH 7.0平衡化) および DEAE-セルロース (50mM トリエタノールアミン塩酸緩衝液 pH 9.0平衡化) の順にカラムクロマトグラフィーを行い、最後に10%ポリアクリルア

ミドゲル電気泳動により精製した。それはゲル上の酵素タンパク質を蛍光発色しその部分を切り取って抽出するものである。こうして得た最終酵素は電気泳動上単一であり約7%の収率で9,000倍に精製された(表1)。本酵素の性質は表2にまとめてある。入手可能な糖および糖リン酸エステルを準備し本酵素の基質特異性を検討し表3を得た。Ery 4 P 異性化酵素は当初 Ery 4 P を基質にする酵素として見出されたがこの外に同じアルドテトロースであるD-トレオース4-リン酸とケトペントースのD-リブロース5-リン酸をも良好な基質とした。D-リブロース5-リン酸基質の活性は Ery 4 P のその約700倍に達し極めて高い。なおこの場合生成物がD-キシロース5-リン酸なのでエピメラーゼ活性である。したがって本酵素は既存のD-トリオースリン酸イソメラーゼ、D-リボース5-リン酸イソメラーゼあるいはD-グルコース6-リン酸イソメラーゼと全く相異している。もちろんこの3つの酵素はいずれも Ery 4 P を基質にしなかった。ヒト赤血球などにその存在が証明されたD-リブロース5-リン酸エピメラーゼが本酵素と類似しており異同を明らかにしなければならない問題である。

Ery 4 P 異性化酵素の反応特性

ウシ肝臓の精製酵素を用いて経時的に反応生成物を追跡し図5を得た。すなわち Ery 4 P 基質の反応^(a)もD-トレオース4-リン酸基質の

表1 ウシ肝臓D-エリトロース4-リン酸異性化酵素の精製

精製過程	総タンパク質 (mg)	総活性 (units)*	比活性 (units/mg)	収率 (%)
粗抽出液	724,000	771	0.001	100
アセン分画	11,900	356	0.030	46
硫酸分画	8,180	239	0.029	31
1回目 DEAE セルロースカラム	245	158	0.64	20
ECTEOLA セルロースカラム	82.0	93.1	1.14	12
2回目 DEAE セルロースカラム	28.6	94.0	3.29	12
ポリアクリルアミドゲル電気泳動	5.6	50.7	9.05	7

* 活性1 unit は1分間に0.5 μ molのトレイトール生成量をもって表示した。但し、基質はD-エリトロース4-リン酸とする。

表2 ウシ肝臓のD-エリトロース4-リン酸異性化酵素の諸性質

分子量	45,000
サブユニット構成	二量体 (22,500)
等電点	4.8
至適 pH	3.5
熱安定性	65°C, pH7.0, 10分間 (失活なし)
阻害剤	HgCl ₂ , CuCl ₂
細胞内局在性	シトソル

表3 D-エリトロース4-リン酸異性化酵素の基質特異性

基質	相対活性
D-エリトロース4-リン酸	1.0
D-トレオース4-リン酸	1.3
D-リブロース5-リン酸	720
D-リボース5-リン酸	0
D-グリセルアルデヒド3-リン酸	0
D-グルコース6-リン酸	0
D-エリトロース	0
D-トレオース	0
D-リブロース	0

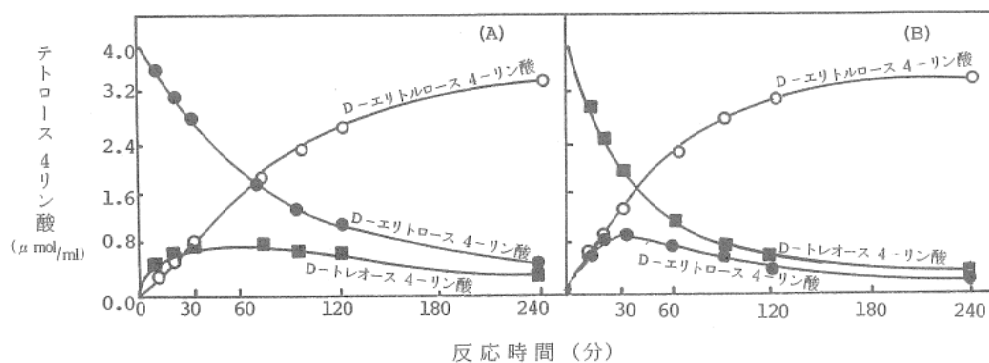


図5 D-エリトロース4-リン酸異性化酵素の反応生成物の経時変化
(A), D-エリトロース4-リン酸基質 (B), D-トレオース4-リン酸基質

反応(b)もともにケトースのD-エリトルロース4-リン酸を生成し、かつアルドース相互の変換 (Ery 4 P からD-トレオース4-リン酸の生成またはD-トレオース4-リン酸から Ery 4 P の生成) が同時に進行した。D-エリトルロース4-リン酸を生成する反応はイソメラーゼ反応であり、アルドース相互の変換反応はエピメラーゼ反応 (図1) である。アルドースの Ery 4 P およびD-トレオース4-リン酸を基質にすると最終的にその約90%がケトースのD-エリトルロース4-リン酸へ異性化される。これは異性化の平衡がケトースへ片寄っているためである。このように本酵素はアルドース・アルドースの相互変換 (エピメラーゼ活性) とアルドース・ケトースの相互変換 (イソメラーゼ活性) を同時に触媒することを意味している。

おわりに

単一酵素タンパク質がイソメラーゼ活性とエピメラーゼ活性を兼ね備えているという全く新しい現象を見出した。目下のところ本酵素反応のメカニズムが最大の関心事である。一般に糖およびそのリン酸エステル異性化酵素は反応中間体にエンジオール構造を経由するとされている。それは構造類似体による阻害から推定された仮説である。Ery 4 P 異性化酵素も同様にエンジオール中間体の仮説に従うとすればアナログの3-ホスホ-D-グリセリン酸の阻害が観察されるはずである。しかしこのものによる阻害を検討したが明白でなかった。Ery 4 P 異性化酵素の反応メカニズムとして図6のエンジオール中間体形成を想定したが全く別の触媒メカニズムを考える必要があるかもしれない。

終りに臨み本稿執筆の機会を与えていただいた大阪大学薬学部三浦喜温教授に深謝致します。

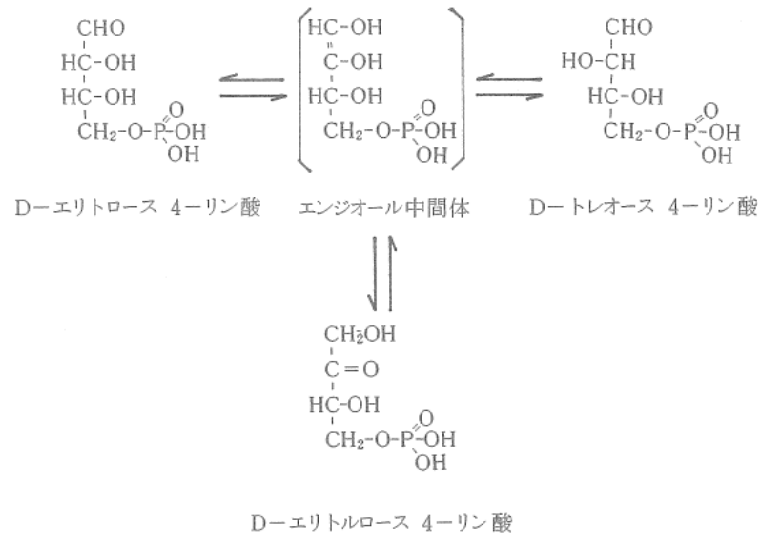


図6 D-エリトロース 4-リン酸異性化メカニズム

す。また本研究の大部分は当研究室の細見三郎博士および寺田知行博士によるものであり、ここに併記して謝意を表します。

文 献

- 1) Williams, J. F. (1980) Trends Biochem. Sci., 5, 315-320
- 2) Wood, T. & Gascon, A. (1980) Arch. Biochem. Biophys., 203, 727-733
- 3) Ohashi, K., Terada, T., Kohno, T., Hosomi, S., Mizoguchi, T., & Uehara, K. (1984) Eur. J. Biochem., 142, 347-353
- 4) Terada, T., Mukae, H., Ohashi, K., Hosomi, S., Mizoguchi, T. & Uehara, K. (1985) Eur. J. Biochem., 148, 345-351
- 5) Morii, K., Hosomi, S., Terada, T. & Mizoguchi, T. (1985) Anal. Biochem., 151, 188-191
- 6) Karmali, A., Drake, A. F., & Spencer, N. (1983) Biochem. J., 211, 617-623