



研究ノート

# 金属酵素の活性部位のペプチド鎖とその運動の方向性

上山 憲一\*

## 1. はじめに

高活性、高特異的触媒反応を行う酵素の統一した反応機作を解明することは、生物の生命維持活動におけるエネルギーの流れを知る上で重要である。また同じような反応を行う触媒を合成的に作ることは先端技術の大きなターゲットでもある。最近の酵素の研究の流れの中で、蛋白質のアミノ酸残基のコンホメーションのゆらぎと反応メカニズムとの関係が明らかになりつつある。

## 2. molecular dynamics の研究の始まり

以前にX線結晶構造解析によって蛋白質の静的な構造が数多く決定された。活性部位に基質が結合できるくぼみがあることから、酵素と基質はジグソーパズルのような関係にあるとイメージされるようになった。この時期に反応電荷点の配置を考慮して、シクロデキストリン、クラウンエーテルなど大環状化合物を使ったモデル物質の合成が試みられている。

その後、基質を結合した複合蛋白質の結晶構造が明らかになると、基質が存在しない蛋白質の構造とは異っていることが判明した。両者の間で突然の構造変化が起っていることを示す。従ってこの複合体こそがジグソーパズルの関係にある構造として、モデル物質の分子設計とその合成が盛んに行われている。

この両者の構造間のジャンプを説明するためにペプチドのコンホメーションのエネルギー計算が盛んに行われ、その結果蛋白質は意外に柔軟にゆらいでいる分子であることがわかってきた。一見ジグソーパズルではあてはまらない小

分子でも複合体が作られ、両者の構造間の変換の通り道でたまたまは適合するくぼみが存在する場合に阻害剤となると理解されるようになった。

こうしてmolecular dynamicsの重要性が強調されるようになり、数多くの蛋白質で計算されてきた<sup>1)</sup>

## 3. 酵素反応におけるペプチド鎖のダイナミックス

図1に示したように酵素はあるくぼみを持ち(a)、基質と構造変化を伴いながら複合体を作る(b)。この構造から遷移状態に導くように構造を変化させながら(c)、最後に生成物は解離し酵素は元に戻る。酵素反応に特徴的な活性化エネルギーの低下はCの遷移状態の安定化によるもので、これが基質が生成物に変化するゲートになっている。阻害物質は複合体を作り得るがこのゲートは通れない。

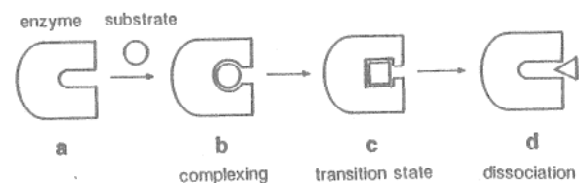


図1 酵素の活性部位のダイナミックス

最近、本来は生体内の異物と複合体を作り、破壊するための標識として作用する抗体に、エステル加水分解の触媒活性を持たせることに成功している。すでにこの反応の遷移状態は四面体炭素を経ることが知られているので、この構造に近いリン酸エステルを利用してこのモノクロナール抗体が合成された<sup>2)</sup> この抗体が酵素と同じように活性を持つことから、このゲートを簡単に通れることが活性化エネルギーを低下させることになる事実を示している。

\*上山憲一(Norikazu UHEYAMA), 大阪大学理学部, 高分子科, 講師, 高分子化学構造論

### 5. 蛋白質に特徴的な分子運動

蛋白質のゆらぎで反応に関与する特徴的なモードがある振動数で現れる。模式的に示すと図2のようになり、I) アミノ酸残基の側鎖と主鎖の局所的な細かい運動とそれらが組み合わさってある軌跡をたどるような方向性を持った運動領域、II) ゆらぎの方向づけを行う弱い相互作用（例えば水素結合）は溶媒に依存するがこのブロードに現れる中間モード、III) 方向性をもった中間領域がさらに組み合わさった大きな運動などに分類できる。簡単な分子や合成高分子では局所的な運動に方向性はなく、溶媒の関

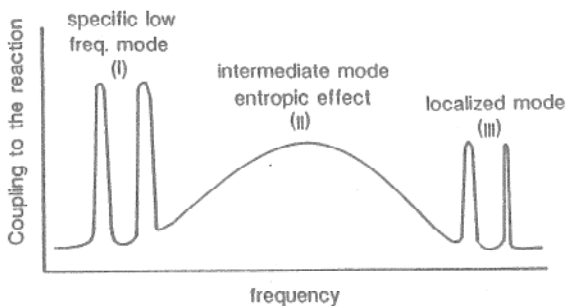


図2 反応に関与している蛋白質の motion とタイムスケール

与も特異的でないために、巾広いモードを持つのみである。これはペプチド鎖の (NHCHRCO) 単位で自由度が小さく細かい衝突をしながら、かつ2次構造を持つ場合に一定方向に動くためである。さらにペプチド鎖は疎水性部分や極性部分など不均一な構造（実際は動的に規則性を持つ）をとり、複合体の形成などの大きな運動になって現れる。

### 6. 活性部位における局所的なゆらぎとこれらが組み合わさった運動

局所的なゆらぎはCPKモデルを回転させることで直感的に予想できるが、X線構造解析の温度因子、振動およびNMRスペクトルなどで知ることができる。しかし、水素結合などで環形成が起るとこの予想は極めて困難になる。このような弱い相互作用で活性部位の反応電荷点の配置が決定され、同時にこれらのゆらぎに方向性が生じる。このとき我々の直感を離れてし

まう。この状態が molecular dynamics の計算で現在盛んに計算されている。しかし溶媒を計算に入れることが出来ないのも、方向性を持つゆらぎの予測もあいまいである。また弱い相互作用と反応との関係も明らかでない現段階では多くの酵素についてスペクトルを駆使した多方面の研究が必要である。

著者らは簡単な金属蛋白質の活性部位において金属イオンから5 Å以内にあるアミノ酸残基が種に依存しない invariant になっている部分配列を持つことに着目し、これが方向性を持つゆらぎを決定づけていると考えてきた。そこでこの部分配列を持つモデル錯体を合成し、金属イオンの反応性を制御している弱い相互作用を分離抽出して調べてきた。

### 7. 電子伝達系金属蛋白質のペプチドモデル錯体

ルブレドキシンは4個のシステインチオラートで囲まれた1個の鉄イオンを持つ電子伝達蛋白質である。ラマン、ESRスペクトルから鉄イオンは特殊な歪みを持つと考えられている。鉄イオンから5 Åの範囲内の invariant な部分配列は2種のCys-X-Y-Cysである。種々の  $[Fe(Z-cys-X-Y-cys-OMe)_2]^{-2-}$  (X-Y=Ala-

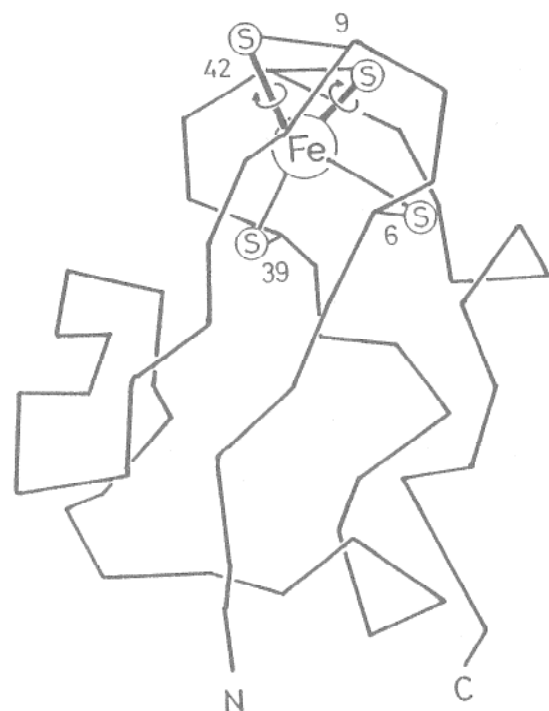


図3 ルブレドキシンの活性部位における Fe-S 結合

Ala, Pro-Leu, Thr-Val) を合成し, 電気化学的に調べたところNH……S水素結合形成で酸化還元電位を正側にシフトさせ, 同時に鉄イオンは歪んでいることが判明した<sup>3)</sup> この歪みはCys-X-Y-Cysのキレート配位で前と後のFe-Sの $\pi$ 結合性に差が生ずることによることがEHMO計算でわかった。molecular dynamicsの計算では, Cys-Pro-Leu-Cysの四面体鉄イオンへのキレート配位によってFe-Sのtorsion角を変化させる方向のゆらぎが大きく, 前と後のCysのFe-Sではその平均コンホマーに差が生ずることがわかった。これらの結果はこの金属蛋白質の活性部位の歪みが局所的なキレート部分で導入されていることを示す。しかも図3に示すように $\pi$ 結合性のFe-Sを外側に出し, 電子の出入口となっていると同時に加水分解や酸化的解離を防いでいる。

## 8. む す び

簡単な金属蛋白質でも電子伝達の活性化エネルギーの低下のためにペプチド鎖は特殊な方向性を持つゆらぎを含むと予測される。簡単な蛋白質でも機能に関係する未知の相互作用があると考えられ一層の研究が必要である。しかし人工酵素や分子素子の開発には避けては通れないプロセスであると考ええる。

## 参 考 文 献

- 1) M. Karplus and J.A. McCammon, *Ann. Rev. Biochem.* 53, 263 (1983).
- 2) A. Tramontano, K.D. Janda, and R.A. Lerner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, 6736 (1986).
- 3) N. Ueyama, M. Nakata, M. Fuji, T. Terakawa, and A. Nakamura, *Inorg. Chem.* 24, 2190 (1985). N. Ueyama, T. Sugawara, K. Tatsumi, and A. Nakamura, *Inorg. Chem.* 26, 1978(1987).

