

酵素学の基礎

小 倉 安 之
編 集



編 集 者 小 倉 安 之
発 行 者 朝 倉 鑛 造
 東京都新宿区新小川町2の10
印 刷 者 小 酒 井 益 三 郎
 東京都新宿区神楽坂1の2

発 行 所

株式 朝 倉 書 店
会社

東京都新宿区新小川町2の10
郵 便 番 号 1 6 2
電 話 東 京 (260) 0141 (代)
振 替 口 座 東 京 8 6 7 3 番
自 然 科 学 書 協 会 会 員

© 1972

研究社印刷・渡辺製本

~~←無断転載・複写を禁ず→~~

3345-161004-0032

執筆 者

お	ぐら	やす	ゆき	
小	倉	安	之	東京大学名誉教授・理学博士
ひろ	み	けい	た	ろう
廣	海	啓	太	郎
				京都大学教授・理学博士
やま	さき	まこと		
山	崎	誠		東京大学助教授・理学博士
とび	た	とおる		
飛	田	亨		千葉大学助教授・理学博士
はま	ぐち	こう	そう	
浜	口	浩	三	大阪大学教授・理学博士
むら	ち	たかし		
村	地	孝		名古屋市立大学教授・医学博士
や	ぎ	さわ	しろ	き
八	木	沢	皓	記
				東京大学理学部生物化学教室

(執筆 順)

3

生体酵素シリーズ刊行のことば

酵素は今世紀のはじめまではいわゆる *vital force* に結びついた神秘的な存在であった。複雑にくりひろげられる生命現象の裏にあってわれわれの手の届かないところに存在して操り人形の糸をさばく人形師のようにも思われた。しかし 1897 年 Büchner 兄弟が酵母の細胞をつぶして発酵をこころみて以来、ようやく生物学者は細胞と生命現象との一体観から解放され、その結果酵素ははじめて神秘の仮面をぬいだ。ついで 1926 年 Sumner がウレアーゼの結晶化に成功して以来、酵素はタンパク質にほかならないという概念が確立されるに至った。この過程は物理学における量子の概念の確立にも比較できるのではなからうか。今世紀初頭 Planck の作用量子の仮説から発展して 1905 年 Einstein は光子の考えに到達し、1926 年には Schrödinger の波動方程式が生まれた。物理学における量子力学、生物学における酵素学は同じような時間的経過をたどって、前者は物理学における基本概念として確立されていき、後者は生物学における生命現象の解明に本質的な役割を演じるものとみなされるようになった。

超遠心法、分光学的方法、クロマトグラフ、その他いろいろの物理的化学的方法の進歩にともなって酵素精製が長足の進歩をとげ、多くの酵素が精製結晶化され、ついで一次、二次、高次構造の解明へと進んでいった。これらはいわば酵素研究のハイウェイであり一つの必然的な研究方向である。また、酵素のいちじるしい触媒効果、巧妙な特異性発現に対する酵素学者の強い関心は、反応動力学的研究を通じて酵素作用機作の解明へと進んでいった。

このような酵素をめぐる学問の進歩の段階において、本シリーズの執筆者のかたがたはいろいろの立場から酵素を取り扱われ長年にわたって独自の研究を通じて学界に貢献され、その業績は海外でも高く評価されている。本シリーズの刊行によって第一に期待されることは、執筆者のかたがたが貴重な体験を記録に残され、後につづく人びとの酵素研究の心の糧となることである。

神秘であった酵素は、数十年の知識の集積によってあまりにもわれわれに身近なものになってしまった。タンパク質としての酵素はうっかりすると無機物質との間に大きな差を

感じないくらいになってきた。酵素はもちろんタンパク質にすぎない。ただいわゆる活性域がわずかに特定の構造をとり、場合によっては補酵素と相互作用をするにすぎない。しかし多くの酵素においてはタンパク構造全体がこの活性域の構造と機能を与えるのに決して無意味な存在ではない。酵素の構造と機能を生命現象のいとなみに関連づけて考えると、今後なお多くの基礎的・応用的研究の発展が望まれる。現在われわれは、かつて先人がいだいた神秘的な気持を敬虔な気持にかえて酵素を見直す必要があるのではないだろうか。いままで多くの生命現象の機構がつつぎと解明されてきたが、なお依然として問題は問題を生み、つつぎからつつぎへと未踏の分野が拓けていくのは科学一般に通じることである。1950年以後の核酸と遺伝の生化学分野における画期的な進歩は分子生物学といわれる大きな分野に発展したが、この進歩も酵素学の進歩によって支えられるところが大きかった。また今後、DNAの複製・修復、RNAの合成、タンパクの合成の機作なども酵素学的に解明されてはじめてわれわれの理解を満足させるものとなるだろう。さらに生物の発生・分化の研究領域でも酵素が足がかりになることは当然のことと思われる。それは生命現象の存在するところにはかならず酵素のはたらきが存在することにもとづいている。さらにつきつめると酵素のはたらき自体のなかに生物の principle というようなものを含んでいるとさえいえるのではないだろうか。本シリーズを生体酵素シリーズと監修者が名付けた気持は酵素のこのような特徴を強調したかったからである。酵素については酵素化学、酵素生理、臨床酵素、応用酵素学、酵素研究法といった面から、わが国においてもすでにすぐれた著書が出版されている。それにもかかわらず本シリーズの刊行を企てたのは、以上のような理由で、すでにいちじるしく発展をとげた酵素に対する知識の現状を整理して、生命現象解明の基礎となる酵素の重要性を再認識したいという意図にもとづく。このような認識は、生物学、生物物理、生化学、医学、薬学、農学、工学など広範囲な研究分野において、あるいは思考方法によって貢献することもありうるだろうし、あるいは実際的な知識が応用されて役立つこともありうると思われたからである。本シリーズの第二の期待は著者の貴重な体験の記録の行間にのぞかれる将来への展望・抱負を読者が汲みとっていただき、読者の日常の研究や教育にあたりそれぞれの分野で活用されることである。

早 石 修
山 野 俊 雄

まえがき

そもそも酵素学は、生物的・生理的現象の解析的な研究により芽生え、それとともに発展してきたものである。したがって酵素の種類によって関連する生物的または生理的現象が異なるため、その研究目的が異なり、ひいてはその手段・方法までが違ってくるのは当然といえよう。たとえば、酸化還元酵素の研究は生物の呼吸現象の機構を解析的に説明するうえに基礎的な意味をもっているし、一方アミラーゼ、タンパク質分解酵素のいくつかは容易に純化され、かつ多量に得られ、またその反応の特殊性から、医・薬その他の工業を目的とした、いわゆる利用面を目的として研究が進められてきた。同時に、分子量が小さく、タンパク質として純粋な点から、これらの水解酵素は、有機化学的に、また物理化学的に、基礎的なタンパク質化学の面でも発展してきたのである。

したがって、これら各種の酵素について、「酵素自体」として1つの筋を通し、読者の理解を容易ならしめるような書物を編集することは、かなり困難なことではあるが、それだけに必要性も大きいと思われる。

純化された、分子量の小さいいくつかの水解酵素で、一次構造についてX線回折による立体構造が明らかにされ、その活性と構造に関する情報がかなり得られるようになってきたので、このような状況をふまえて、リゾチーム、 α -キモトリプシン、カルボキシペプチダーゼAを中心に、一次構造、二次および三次構造、それらの活性中心の性質および構造、さらに反応機構を展開することが、現時点においてもっとも筋を通した行きかたであると考え、本書では生物現象または生理現象との連関において酵素を理解するのではなく、直接酵素そのものの活性と構造に重点をおいて、酵素自体を論ずることにした。

以上の観点から筋を通すよう試みたが、一面学生などのテキスト的な役割を果たすことも考慮した。この相反する2つの目的から編集上不満足な点も生じた

が、これはすべて編集者の責任である。編集者の方針に全面的に御協力いただいた執筆者諸兄に感謝の意を表するとともに、読者各位の忌憚なき御批判をお願いしたい。

昭和 47 年 8 月

小 倉 安 之

目 次

1. 酵素の生物的存在意義	小 倉 安 之	1
文 献		6
2. 酵素の反応論	廣 海 啓 太 郎	6
2.1 反応速度論の目的と方法, その有用性と限界		7
2.2 基礎的な実験技法		7
2.2.1 初速度を正しく求めること		14
2.2.2 データの処理, 動力学定数の定義とその求め方		18
2.3 速度式の導き方		21
2.3.1 迅速平衡法		22
2.3.2 定常状態法		32
2.4 速度式の扱い方(機構識別への応用)		52
2.4.1 簡単な基本型 $S \rightarrow P$ 型の反応に対する阻害		52
2.4.2 2つの基質から2つの生成物を生じる可逆反応		58
2.5 む す び		70
文 献		71
3. 酵素の一次構造	山 崎 誠・飛 田 亨	73
3.1 タンパク質の構成アミノ酸		73
3.1.1 タンパク質を構成するアミノ酸の種類, 構造, 性質		73
3.1.2 タンパク質のアミノ酸組成の分析法		82
3.2 酵素の抽出, 単離, 精製		86
3.2.1 タンパク質の溶解度を利用した分別沈殿		88
3.2.2 タンパク質分子の大きさと形状に基づいた分別——ゲル濾過法		88

3.2.3	タンパク質の高分子両性電解質としての性質を利用した分別・精製法	91
3.2.4	分配律を利用した分別法——向流分配法	95
3.2.5	タンパク質の相補的特異的相互作用をもちいた分離・精製法——affinity chromatography	96
3.2.6	その他	99
3.3	酵素の一次構造の決定法	100
3.3.1	タンパク質試料の純度, 均一性, 種々の性状の検討	101
3.3.2	α -NH ₂ 末端域アミノ酸配列順序の決定法	101
3.3.3	COOH 末端からのアミノ酸配列順序の決定法	110
3.3.4	精製されたタンパク質試料から単一な単純化された構造をもつポリペプチド鎖をとり出すこと	113
3.3.5	長いポリペプチド鎖を選択的に切断する方法と得られる断片ペプチドの分別・精製法	116
3.3.6	断片ペプチドのアミノ酸配列順序の決定法	124
3.3.7	アミノ酸配列順序の決定された断片ペプチドを並べて元の長いポリペプチドに組み上げる方法	128
3.3.8	ジスルフィド結合の位置の決定	133
3.3.9	Hartley の対角電気泳動法の拡大利用法	141
3.4	酵素の一次配列に関する若干の考察	144
	文 献	147
4.	酵素の二次, 三次構造	153
4.1	二次構造の基本	153
4.1.1	α -ヘリックス	153
4.1.2	β 構造	156
4.1.3	二次構造研究法	158
4.2	一次構造と二次構造の関係	172

4.3 側鎖の存在状態	174
4.3.1 側鎖の分布	174
4.3.2 側鎖の状態の研究法	175
4.4 タンパク分子の安定性	194
4.4.1 水素結合	194
4.4.2 疎水結合	195
4.5 各 論	198
4.5.1 リゾチーム	198
4.5.2 リボヌクレアーゼ A	205
4.5.3 ヌクレアーゼ	208
4.5.4 α -キモトリプシン	208
4.5.5 エラスターゼ	211
4.5.6 ズブチリジン BPN'	212
4.5.7 カルボキシペプチダーゼ A	214
4.5.8 パ パ イ ン	219
4.5.9 炭酸脱水酵素	222
文 献	222
5. 酵素の活性中心	村 地 孝 225
5.1 活性中心の概念と定義	225
5.1.1 活性中心というものの考え方	225
5.1.2 活性中心存在の実証	225
5.1.3 活性中心の定義	230
5.1.4 触媒部位, 特異性決定部位, 結合部位, 反応部位などの用語 について	231
5.1.5 活性中心の数	232
5.2 触媒部位の構造と機能	233
5.2.1 キモトリプシンの触媒部位	234

5.2.2	触媒部位と触媒グループ	238
5.2.3	触媒グループ決定法	240
5.2.4	触媒グループとなるアミノ酸残基	246
5.3	特異性決定部位	248
5.3.1	キモトリプシンの特異性	249
5.3.2	化学修飾と特異性の変動	251
5.3.3	特異性決定部位の分光学的研究法	257
5.3.4	特異性決定部位の拡がり	260
5.3.5	特異性決定部位を構成するアミノ酸残基	264
5.4	活性中心の硬さと柔らかさ	265
5.4.1	鍵と鍵穴のたとえ	265
5.4.2	活性中心の誘導適合説	266
5.4.3	トリプシン活性中心の硬さと柔らかさ	270
5.5	む す び	274
	文 献	276
6.	酵素の四次構造	八 木 沢 皓 記 280
6.1	酵素の四次構造の概観	281
6.2	構成単位の空間配置	290
6.3	構成単位の間の結合	295
6.3.1	構成単位の解離会合に影響する試薬	295
6.3.2	溶媒効果の定量化の試み	299
6.3.3	ヘモグロビンの構成単位間の結合	302
6.4	四次構造と酵素活性	308
6.4.1	構成単位の数と活性中心の数	308
6.4.2	四次構造と活性	309
6.4.3	allele 間相補性	310
6.4.4	酵素の四次構造と活性の制御	311

6.5 研 究 方 法	326
6.5.1 超 遠 心 法	327
6.5.2 浸 透 圧 法	332
6.5.3 光 散 乱 法	332
6.5.4 ゲ ル 洩 過 法	333
6.5.5 電 気 泳 動 法	334
6.5.6 ショ糖密度勾配遠心法	335
文 献	336
7. 酵素の作用機構	八 木 沢 皓 記・小 倉 安 之 340
7.1 酵素反応の基本的な経路	340
7.2 $E+S \rightleftharpoons ES$ および $EP \rightleftharpoons E+P$ の段階	344
7.2.1 $E+S \rightarrow ES$ および $E+P \rightarrow EP$	344
7.2.2 $ES \rightarrow E+S$ および $EP \rightarrow E+P$	349
7.2.3 E-S 複合体の構造と K_m	350
7.3 $ES \rightleftharpoons EP$ の段階	362
7.4 基 質 特 異 性	384
7.5 あ と が き	391
文 献	391
付 1. 各種酵素の一次構造	山 崎 誠・飛 田 亨 394
文 献	415
付 2. 酵素および酵素反応の類別表	小 倉 安 之 417
文 献	425
索 引	427

1.

酵素の生物的存在意義

酵素とは何か？ それは生物により生産された生体触媒で、その種類は数多く現在知られているだけでも約 800 という数である。酵素の大部分のものはそれを生産した生物の細胞内に存在し、生物体でみられるもろもろの化学反応を触媒している。たとえば生物にとって必須であるエネルギーを獲得するために、生物は呼吸、発酵等々の生物現象を具現しているが、これらの現象は生体内で起こる化学反応である。すなわち細胞内にとりこまれた化学物質が酸化、リン酸化等々の化学変化を受け、次々に異なった化学物質に移り変わっていく。このような生体内で起こる化学反応を一般に物質代謝と呼んでいるが、これら物質代謝の各段階はそれぞれ特有な酵素によって触媒されている。原則的には 1 つの化学反応には 1 つの特定な酵素が関与していると考えられるわけであるから、酵素の種類も非常に多いことになる。

現在数多くの代謝経路が知られており、これらは *metabolic map* としてまとめられている。ここで生物化学を学ぶものの多くは *metabolic map* に示された代謝のそれぞれの段階(化学反応)を触媒する酵素のみが生物学的にまたは生理学的に意義のある酵素だと思いこんでいるようである。このような酵素はその生物学的意義が解明されたものであることは確かであるが、現在 *metabolic map* と関係のない酵素は生物にとって意味のない存在なのであるだろうか？ このような酵素は現時点において教科書的には生理的意義があまりはっきりしていないことは事実である。筆者は現在 *metabolic map* に示された代謝過程とは関係ないが、これらの酵素は生物が生命維持のために必須なある種の化学反応を触媒していると考えている。生物をとりかこむ外界の条件は生物にとって必ずしも常によいものだとは考えられない。また生物体内で生起するもろもろの化学反応(あえて代

謝とはいわない)は生物それ自体にとって常に有利な反応であるとも限らないであろう。生物は好ましくない外界の条件に対処するため、また生体内で生産された毒物を排除するため、適当な処置を行なうであろう。さもなくば、その生物は現在地球上に生存、生育しているはずがないからである。ここで具体的な例をあげて論じてみよう。たとえばフェノール類を酸化する作用のあるチロシナーゼ、 H_2O_2 を分解するカタラーゼのごとき酵素は metabolic map で示される代謝経路の反応段階を触媒する酵素ではない。したがってこの意味において現在その生物学的意義が明らかにされていない酵素であるが、上記の酵素はいずれも動物、植物、微生物をとわず広く生物界に分布している。このようにほとんどの生物に存在している酵素が本当に意味のないものなのだろうか。チロシナーゼ反応の最終産物であるメラニンはある種の昆虫では甲殻構成物質であり、外敵からの防御の役をはたしている。一般的にメラニン形成は少なくとも動物にとって無意味な産物ではないようである。また H_2O_2 は周知のように生物にとって毒物であるが、生体内で H_2O_2 が生産されないという証拠は何もない。むしろ生体内には種々のフラビン酵素が存在するので、酸素がこれらの酵素反応の水素受容体となった場合 H_2O_2 が生体内で発生することは当然の理である。カタラーゼはこのような過程で生体内に生成した H_2O_2 を急速に取り除くため必須な酵素である。実際、酸素の存在している条件下で生育している生物はほとんどすべてカタラーゼをもっているが、無酸素状態でのみ生育しうる嫌氣的細菌はカタラーゼを欠いている。しかもこれら嫌氣的細菌が酸素存在条件下にもたらされるとき急速に死滅するという事実を考え合わせると興味深いものがあるであろう。

ここで筆者はいわゆる代謝経路に関与している酵素を代謝酵素と呼び、チロシナーゼ、カタラーゼのごとき代謝経路とは関係がないが、防御的な意味で生命維持のため必須な酵素を防御酵素と呼ぶことを提案したい。防御酵素に属するものはチロシナーゼ、カタラーゼのほかはまだ数多くのものが考えられる。

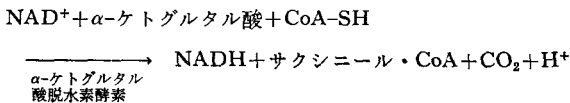
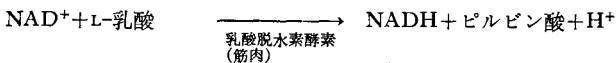
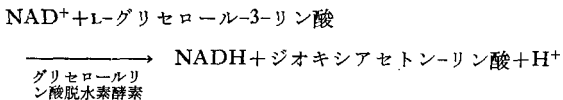
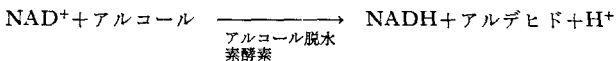
ここで注意したいのは、この話はすべての酵素を代謝酵素と防御酵素の2つだけに分類してしまうということではない。膜のイオン透過に重要な役割をしている ATPase や筋肉の収縮運動に関与しているアクトミオシン-ATPase 系は代

謝酵素といえるかどうか問題であろうし、またもちろんこれらは防御酵素ではないことは明らかである。

以上は生体内に存在し、生体内でその役割を演じている酵素についての話であるが、酵素のなかには生体外に分泌され、そこで酵素としての役割をはたしているものもある。このような分泌酵素もそれなりに生物にとって重要である。デンプンを消化する α -アミラーゼ、タンパク質を水解するトリプシン、キモトリプシンは消化器管内において消化酵素としての存在意義が知られている。またカビから分泌されるグルコース酸化酵素は培地中の D-グルコースを酸化することにより β -グルコノラクトンと H_2O_2 を生産するが、培地中に発生する細菌の発育をこの H_2O_2 により阻害し、カビ自体の生育を防御することができる。ここでカビの細胞内には一般に多量のカタラーゼが存在するためカビ自体の生育は阻害されない。このような観点からグルコース酸化酵素は分泌される防御酵素であるということができよう。

前述のごとく酵素は生体触媒なりと定義したが、逆に生体触媒は必ずしも酵素を意味するものではない。酵素以外、生体触媒としてあげられるものにはビタミン、ホルモン等々があるであろう。酵素の本体はタンパク質で分子量 10,000 以上のものであるが、ここでは酵素よりはるかに低分子の有機物質、 NAD^+ (ニコチノアミド・アデニンジヌクレオチド) を非酵素的な生体触媒としてあげるのが

NAD^+ の酵素的還元反応



適当かと思われる。NAD⁺ は生物によって生合成され、細胞内に存在している。細胞内で NAD⁺ は前ページに示すような種々な NAD⁺-共役脱水素酵素 (NAD⁺-linked dehydrogenase) と適当な基質 (水素供与体) の存在で還元型 NADH となる。

生成した NADH は細胞内電子伝達系のフラビン酵素 (NADH-酸化酵素) と反応し、NADH は再び酸化され NAD⁺ となり、フラビン酵素はロイコ型フラビン酵素となる。

NADH の酵素的酸化反応

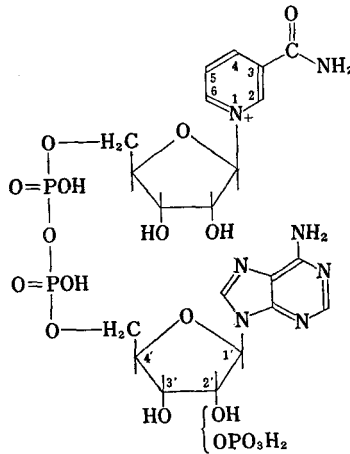
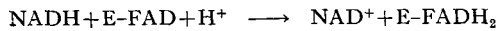
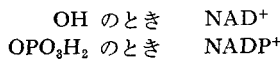


図 1.1 酸化型ピリジンスクレオチド



ここで E-FAD は酸化型フラビン酵素、E-FADH₂ は還元型フラビン酵素である (FAD: フラビン-アデニンジスクレオチド)。

このように細胞内において、NAD⁺ は適当な酵素の存在で酸化 ⇌ 還元 の反応をくり返し行なっているが、NAD⁺ 自体の消費はみられない。細胞内にとりこ

まれた基質(水素供与体)が一方的に酸化され消費される。したがってこの観点に立てば NAD^+ は触媒であるといえよう。しかし、酵素は分子構造からみてタンパク質であるので、非酵素的生体触媒とは明らかに区別される。

生物化学の教科書では NAD^+ のことをしばしば“補酵素”という言葉で表現しているが、この言葉はまったく歴史的なもので NAD^+ の役割が酵素との連

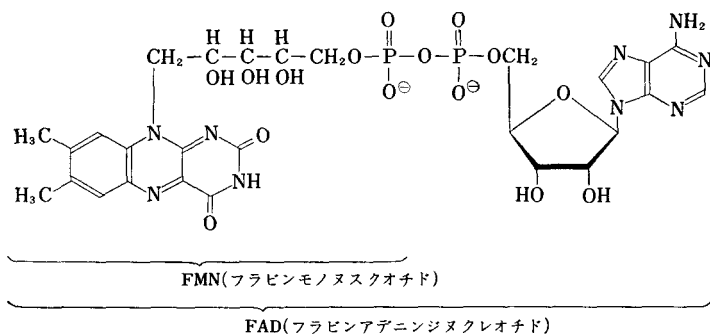


図 1.2

関において上記のごとく明白となった現時点においては不合理な言葉であると思われる。 NAD^+ の側からみれば——上述のごとき観点から——これはまぎれもなく生体触媒である。また脱水素酵素側からみれば水素受容体であり、フラビン

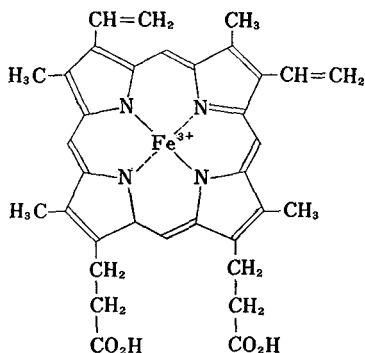


図 1.3 プロトヘマチン