

最終講義

サッカロピン・デヒドロゲナーゼの想いで

藤 岡 基 二

富山医科薬科大学学生化学第 2 教室

サッカロピン・デヒドロゲナーゼ

サッカロピン・デヒドロゲナーゼは還元型ピリジンヌクレオチド(哺乳動物では NADPH, 酵母などでは NADH) 存在下にリジンと α -ケトグルタル酸を還元的に縮合し, サッカロピンを生成する酵素である(式 1)。



リジンはタンパク質の構成アミノ酸の一つであり, タンパク質の構造の維持や機能の発現に重要な役割を果たしていることが多い。哺乳動物ではリジンは必須アミノ酸の一つで, 生体内で合成されないが, 分解は受けて, 最終的にアセチル CoA に代謝される。サッカロピン・デヒドロゲナーゼは哺乳動物のリジン代謝の最初の反応を触媒する酵素である。一方, 酵母など菌類においてはリジン生合成過程の最終の酵素である。哺乳動物のサッカロピン・デヒドロゲナーゼは主として肝臓に存在するが, 含量が低く精製が困難であるのに反し, 酵母からは比較的簡単に酵素を単離することができた。このため, 以下に述べるサッカロピン・デヒドロゲナーゼの反応機構の研究は酵母の酵素を用いて行った。酵母の酵素は分子量約 3.9 万の単量体, 塩基性の単純タンパク質である¹⁾。

サッカロピン・デヒドロゲナーゼの 反応速度論的性質

酵素の反応初速度と基質濃度の関係は, Michaelis-Menten の式で表されることは, よく知られている

が, Michaelis-Menten 式は基質が一つと考えた場合のものである。実際の生体内反応の殆どすべては, 二つ以上のリアクタント(基質および生成物)が関与する反応で, この場合, すべてのリアクタントを同時に考慮に入れると, 反応速度式は非常に複雑になってくる。酵素反応の機構はピンポン機構と逐次機構に区別される。ピンポン機構は, 一つの基質が酵素に結合して触媒作用を受け, 基質の一部が酵素に移され, 残りが生成物として解離し, ついで, 第二の基質が修飾された酵素に結合, 第一の基質部分に移されて第二の生成物と, もとの酵素を生じるものである。逐次機構では, すべての基質が酵素活性中心に結合して, はじめて触媒作用を受け, 生成物に変換される。逐次機構には基質の結合に一定の順序のある定序機構と, いずれの基質も遊離の酵素に結合し得るランダム機構がある。ある酵素反応がどのメカニズムに従うかは, 初速度解析, 生成物阻害実験, ゆきどまり阻害実験などを総合して判定することができる²⁾。これらの解析により, サッカロピン・デヒドロゲナーゼ反応は定序逐次機構に従い, NADH, α -ケトグルタル酸, リジンの順に基質を結合し, サッカロピン, NAD⁺の順に生成物を放出することが分かった^{3,4)}。

サッカロピン・デヒドロゲナーゼの 活性中心残基

ピリジンヌクレオチド依存性脱水素酵素には, 酸化還元の際して, ニコチンアミド C-4 の pro-R 水素を利用するもの(A 面特異的)と pro-S 水素を利用するもの(B 面特異的)がある。サッカロピン・デヒドロゲナーゼをリジン, α -ケトグルタル酸, および [4A-³H]NADH または [4B-³H]NADH とインキュベ

ートすると、pro-*R*水素が定量的にサッカロピンに移行し、pro-*S*水素は完全にNAD⁺に残留することが分かった。また、サッカロピンのプロトンNMRによって、NADHの水素はサッカロピンのグルタル酸部分のC-2に移ることが証明された⁵⁾。これらの事実はサッカロピン・デヒドロゲナーゼはリジンのε-アミノ基とα-ケトグルタル酸との間に生じたシッフ塩基(イミン)をNADHのpro-*R*水素によって直接に還元することを意味する。

シッフ塩基形成のメカニズムに関しては二つの可能性が考えられる。一つはα-ケトグルタル酸が先ず酵素のリジン残基のε-アミノ基とシッフ塩基を形成し(ケトグルタル酸はリジンの前に酵素に結合する)、ついで、基質リジンとの間にシッフ塩基の交換(transimination)が起こる可能性で、もう一つは基質リジンとα-ケトグルタル酸が直接にシッフ塩基を形成する可能性である。これらの可能性を検討するために、酵素、NADH、α-ケトグルタル酸を含む反応液(NADHはα-ケトグルタル酸の結合に必要である)に³H]NaBH₄を加えたところ放射能は酵素に固定されず、また、酵素活性の消失も認められなかった。したがって、第一の可能性は除外され、基質リジンがα-ケトグルタル酸と酵素表面上で直接にシッフ塩基を作ることが分かった。

シッフ塩基形成には酸・塩基触媒の関与が考えられる。サッカロピン・デヒドロゲナーゼ活性はモノヨード酢酸などのSH試薬⁶⁾、ジエチルピロカーボネイト⁷⁾、ピリドキサルリン酸⁸⁾、ブタンジオン⁹⁾などによって完全に消失した。失活はそれぞれシステイン残基、ヒスチジン残基、リジン残基、アルギニン残基の修飾によるものであるが、何れかの基質によって保護され、これらの残基が活性中心に存在

することが示唆される。

サッカロピン・デヒドロゲナーゼ反応の V_{max} 、NADHに対する K_m はpHによって大きく変化しなかったが、α-ケトグルタル酸およびリジンに対する K_m は大きく変化し、 V_{max}/K_m のpH依存性からα-ケトグルタル酸およびリジンの結合、触媒作用に関与するアミノ酸残基の種類を推定することができた¹⁰⁾(表1)。これらの残基は、いずれも化学修飾によって活性中心に存在することが示唆されたものであり、サッカロピン・デヒドロゲナーゼの反応機構として、図1のスキームが考えられる。すなわち、プロトン化したヒスチジン残基は基質リジンのカルボキシル基と相互作用し、この基質の結合に関与する。また、酵素の塩基グループ(ヒスチジン残基?)がε-アミノ基の正電荷を中和する。一方、α-ケトグルタル酸のカルボニル酸素はプロトン化したリジン残基と水素結合を作り、基質リジンのプロトンを失ったε-アミノ基のカルボニル炭素への求核攻撃を容易にする(1-2)。生じたカルボニルアミンから水を取り除くためには、Nの正電荷を消去することが必要で、システイン残基のSH基が、これに関与すると考えると都合がよい(3)。このように生成したシッフ塩基はNADHによって立体特異的に還元され、さきにプロトン化された塩基グループがサッカロピンにプロトンを与えて反応を終了する(5-7)。

おわりに

以上のサッカロピン・デヒドロゲナーゼの反応メカニズムの研究は1970年代の始め頃から1980年代の半ばにかけて行ったものである。今、振り返ってみれば、この時代は酵素化学が最も盛んな時代で、触媒作用の解析法やタンパク質化学の方法論も確立し、種々の酵素についての理解も深まりつつあった時代である。酵素化学者にとって古きよき時代といえるかも知れない。1980年の後半には遺伝子組み換えの技術が急速に進歩し、この技術は遺伝子のヌクレオチド配列からのタンパク質一次構造の決定、組み換え体タンパク質の大量生産、ひいてはタンパク質中の特定のアミノ酸残基の置換等を

表1 サッカロピン・デヒドロゲナーゼの酸・塩基触媒

基質	結合/触媒作用に関与する残基の		
	pK	型	種類
リジン	6.3	塩基	His
	8.0	酸	His
α-ケトグルタル酸	8.4	酸	Lys
サッカロピン	6.0	塩基	His
	7.1	塩基	Lys

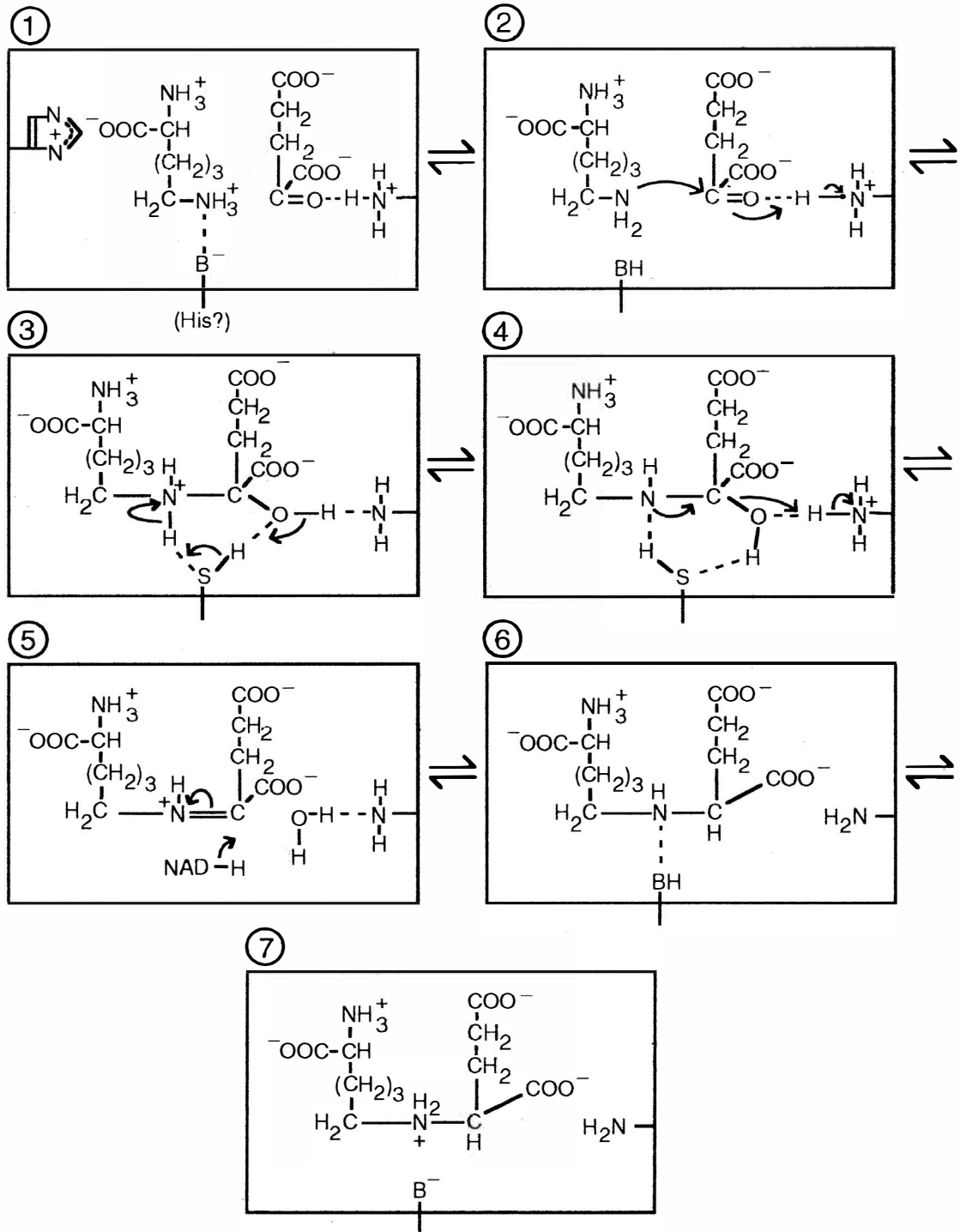


図1 サッカロピン・デヒドロゲナーゼの反応機構

可能にし、酵素化学に新風をもたらした。組み換え体酵素や変異酵素の作成が容易になった現在、酵素の三次構造を決定し、活性中心残基の触媒作用における役割を詳細に検討することが可能になった。現時点でこの酵素の研究を続けるとすれば、遺伝子工学の手法を利用して、構造と機能に関する理解が一層深まることが期待される。しかしながら、幸運に

も酵素の立体構造や基質との相互作用が決定できても、最終的な触媒機構の解明には、従来の酵素化学の方法論、とくに分光学的手法や反応速度論的解析を駆使することが必要であるのは言うまでもない。

文 献

- 1) Ogawa H. and Fujioka M. : Purification and characterization of saccharopine dehydrogenase from baker's yeast. *J. Biol. Chem.* **253** : 3666—3670, 1978.
- 2) Cleland W. W. : Determining the chemical mechanisms of enzyme-catalyzed reactions by kinetic studies. *Adv. Enzymol. Rel. Areas Mol. Biol.* **45** : 273—387, 1977.
- 3) Fujioka M., and Nakatani Y. : A kinetic study of saccharopine dehydrogenase reaction. *Eur. J. Biochem.* **16** : 180—186, 1970.
- 4) Fujioka M., and Nakatani Y. : Saccharopine dehydrogenase : interaction with substrate analogues. *Eur. J. Biochem.* **25** : 301—307, 1977.
- 5) Fujioka M., and Takata Y. : Stereospecificity of hydrogen transfer in saccharopine dehydrogenase reaction. *Biochim. Biophys. Acta* **570** : 210—212, 1979.
- 6) Ogawa H., Okamoto M., and Fujioka M. : Chemical modification of the active site sulfhydryl group of saccharopine dehydrogenase (L-lysine-forming). *J. Biol. Chem.* **254** : 7030—7035, 1979.
- 7) Fujioka M., Takata Y., Ogawa H., and Okamoto M. : The inactivation of saccharopine dehydrogenase (L-lysine-forming) by diethyl pyrocarbonate. *J. Biol. Chem.* **255** : 937—942, 1980.
- 8) Ogawa H., and Fujioka M. : The reaction of pyridoxal 5'-phosphate with an essential lysine residue of saccharopine dehydrogenase (L-lysine-forming). *J. Biol. Chem.* **255** : 7420—7425, 1980.
- 9) Fujioka M., and Takata Y. : Role of arginine residue in saccharopine dehydrogenase (L-lysine-forming). *Biochemistry* **20** : 468—472, 1981.
- 10) Fujioka M. : Chemical mechanism of saccharopine dehydrogenase (NAD⁺, L-lysine-forming) as deduced from the initial rate pH study. *Arch. Biochem. Biophys.* **230** : 553—559, 1984.