

平成 21 年 5 月 8 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008 年度

課題番号：19550168

研究課題名（和文） 加圧によるアルコール脱水素酵素の基質特異性制御

研究課題名（英文） Control of substrate specificity of alcohol dehydrogenase by pressurizing

研究代表者 清水昭夫

研究成果の概要：

加圧すると分子間距離を連続的に変化させることが出来る。また、酵素の活性部位は分子全体の中でも揺らぎが大きく圧力等の影響を受けやすいと考えられる。そこで単に加圧する事によりアルコール脱水素酵素（ADH）を用いて基質特異性を制御できるかどうか調べた。その結果、ADH の種類により圧力応答は異なるが Class II では特徴的な結果が得られた。反応効率の圧力依存（0.1～150 MPa）から V を求めると基質をエタノールから炭素数を 1 つずつ増やしヘキサノールまで比較すると V はアルコールの炭素数の増加と共に直線的に減少し

V の符号がブタノール付近で正から負に変化することが分かった。つまりエタノール等の小さなアルコールでは加圧と共に反応効率は下がるが、ヘキサノールのような大きなアルコールでは逆に反応効率は加圧により増加する事が明らかとなった。以上の結果から、加圧により基質特異性を制御できる可能性が示唆された。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
19 年度	1900000	570000	2470000
20 年度	1200000	360000	1560000
年度			
年度			
年度			
総計	3100000	930000	4030000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：酵素化学、高压化学

1. 研究開始当初の背景

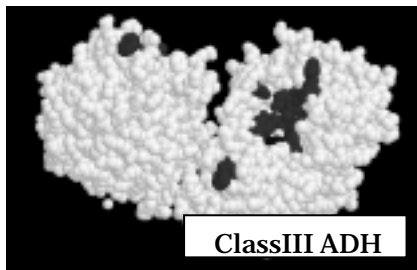
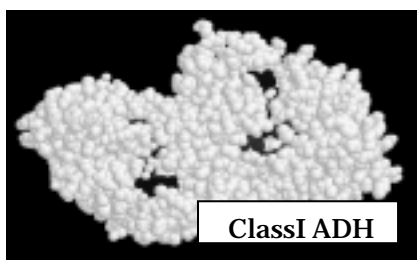
圧力は分子間距離を連続的に変化させることが可能である。一方、酵素の活性部位は分子の中でも空間が大きく、揺らぎも大きい。従って、加圧する事により活性部位のサイズが変化して基質特異性等を制御出来るのではないかと考えた。しかし、これまで酵素反応に対する圧力の影響は V に代表される熱

力学的パラメーターを求め反応機構の解明に使われるのがほとんどでこの様に単純ではあるが基本的な圧力で活性部位のサイズを変化させ基質特異性を変える事が出来るかどうかという質問に答えるような研究は行われてこなかったのが現状である。

2. 研究の目的

圧力は分子間距離を連続的に変化させることが可能である。活性部位は酵素分子の中でも空間的隙間が大きく、揺らぎも大きい。従って、加圧により活性部位の分子間距離および構造揺らぎを変化させ基質特異性を制御することが可能ではないかと考えられる。酵素の基質特異性を変化させるための一般的な方法としてはアミノ酸置換が用いられるが必ずしも目的のものが得られていない現状がある。

アルコール脱水素酵素（以下ADHと略す）は、エタノールとの親和力の違い、つまり K_m によりClass分けがされている。 K_m が数ミリモルまでのADHをClass I、数モルのものをClass II、他のものはClass IIIとClass IVの間に入る。



この酵素の特性として第一に溶液の疎水性を変化させるとClass I ADHは小さなアルコールであるエタノールに対する活性が上昇する。疎水性環境下で活性部位の揺らぎ・構造が変化（サイズが減少する）してエタノールに対する活性が上昇する可能性が示唆されている。また、第二に活性は異なるが炭素数が4~5個異なるアルコールに対して活性を示す。従って、圧力で活性部位のサイズが変わればこれらのアルコールに対する活性の違いとして反映され、この酵素が本研究を達成するのに最も適した酵素である。そこで、加圧により分子間距離を制御するという非常にシンプルな手法で基質特異性を制御可能であることを明らかにする事を目的とする。

3. 研究の方法

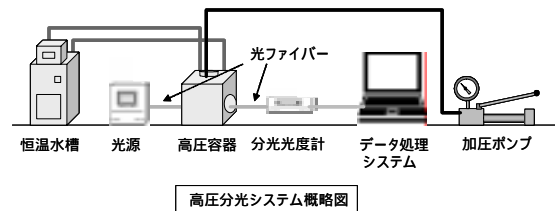
(1) 試料

Class I およびClass II ADHは大量に入手可能な馬肝臓および酵母由来の物を使用し、Class III ADHはマウス肝臓由来および発現タ

ンパク質を用いた。基質としては基質は炭素数2から6の直鎖アルコール（エタノール、プロパノール、ブタノール、ペンタノール、ヘキサノールの5種類）を用いた。

(2) 酵素活性測定

緩衝液はpH7.5、50mM TrisHCl緩衝溶液を用いた。緩衝液のpHは圧力依存がある物と無いものがあるが、TrisHClはpHの圧力依存性無いことが分かっている。反応速度は補酵素NADがNADHに変化する時の340nmの吸光度変化から求めた。高圧下で直接酵素反応を測定するために以下の様な測定システムを作った。本装置は光源からの光を光ファイバーで高圧セル内に導入し、試料通過後の光を光ファイバーを使い分光光度計で測定できるようになっている。また、材料がSUSの高圧セルには恒温水を循環させ温度を一定に保つことが出来る。この装置では反応開始後、反応液を高圧セルに入れて300 MPaまで加圧し、測定開始まで2分以内に完了する。



(3) 圧力は150 MPaまで25または50MPa間隔で測定した。温度は25℃。

(d) 各圧力、各基質に対して基質濃度は最低5点変えて測定し、Lineweaver-burk plotから、 V_{max}/K_m 、 K_m 、 k_{cat} を計算した。

4. 研究成果

馬肝臓（Class I）および酵母（Class II）ADHの反応効率(k_{cat}/K_m)、 K_m 、 k_{cat} と基質アルコールの関係をそれぞれ調べた。常圧では馬肝臓ADHの反応効率は炭素数が増加する（サイズが大きい）ほど効率よく反応した。そこで、 K_m と k_{cat} に分けて見てみると炭素数の増加とともに K_m の値は指数関数的に減少した。 k_{cat}/K_m は鐘形の傾向を示し、プロパノールで極大をもち、その後炭素数が増加すると減少した。馬肝臓ADHと基質アルコールの結合は基質アルコールの炭素数が増加（サイズが大きい）するほど強くなることが明らかとなった。従って、炭素数4~6のアルコールにおいては炭素数増加と共に反応効率が増加するのは K_m 主導型であることが分かった。一方、酵母ADHにおいて反応効率は、基質アルコールの炭素数が増加すると減少していき、ペンタノールで最小値をとり、ヘキサノールでわずかに増加した。 k_m は基質アルコールの炭素数の増加に伴って増加し、ブタノールで極大

を持ち、その後減少するのに対し、 k_{cat} は基質アルコールの炭素数の増加に伴い単調に減少した。反応効率と K_m の関係が良い相関を示したことから、常圧で酵母 ADH の反応効率が炭素数の増加とともに減少していき、ヘキサノールで一度上昇するのは K_m が主に寄与しているからだと考えられる。

次に、常圧で上記な様な性質を示す Class および Class ADH の k_{cat}/K_m 、 K_m 、 k_{cat} がどのような圧力依存性を示すか調べた。常圧から 25 MPa 間隔で 150 MPa まで各圧力下で基質アルコールの炭素数と k_{cat}/K_m の関係を見てみると、加圧下での k_{cat}/K_m は常圧時と同様に、基質アルコールの炭素数の増加とともに増加する傾向を示した。次に、各基質アルコールに対して k_{cat}/K_m が圧力に対してどのように変化するか見てみると、エタノールを除くすべての基質アルコールで圧力の増加に伴い、増加した。この結果、加圧しても基質アルコールのサイズが大きい方が効率よく反応するという点に変化はなかったが、エタノールを除く全ての基質アルコールで k_{cat}/K_m は増加したため反応効率は加圧により促進されることが明らかとなった。 K_m の対数を圧力に対してプロットしたところ全ての基質アルコールで直線的に増加した。また、 k_{cat}/K_m がほとんど圧力依存性を示さなかったエタノールが最も大きな圧力依存性を示した。一方、 k_{cat} は全ての基質アルコールで加圧と共に増加すること分かった。従って加圧による馬肝臓由来 ADH の加圧による反応効率の増加は k_{cat} 主導型で起こることが確認された。酵母 ADH について k_{cat}/K_m の対数を圧力に対してプロットすると特徴的な結果が得られた。サイズの小さいエタノール、プロパノールにおいて k_{cat}/K_m の対数は基質は直線的に減少したが、ペンタノール、ヘキサノールでは直線的に増加し、ブタノールでは 0.1~150 MPa の範囲で加圧しても顕著な違い観測されなかった。次に K_m 、 k_{cat} に分けて見てみると K_m は、全ての基質アルコールで加圧しても変化しなかった。 k_{cat} は直線的に減少したが、サイズが大きいペンタノール、ヘキサノールでは直線的に増加し、基質のサイズが中間的なブタノールでは変化しなかったことから、加圧による k_{cat}/K_m の変化は k_{cat} 主導型で起こっていることが分かった。Class ADH (マウス) に関して、試料が少量しか得られなかったため K_m 、 k_{cat} は求めることは出来なかったが 0.1~150 MPa の圧力範囲で初速度の圧力依存性を調べた。基質としてはエタノールとヘキサノールの 2 種類を用いた。Class ADH は常圧において Class や で反応が見られる数 mM では反応が起こらず 2 M 以上の高濃度で反応が起こる。そこで、エタノール濃度 0.75 mM と 2.5 M の 2 つの濃度で実験を行った。その結果、0.75 mM では常圧では反

応が見られず、加圧しても同じで加圧することにより活性が上昇するという結果は得られなかった。2 M では常圧で反応は観測されるが加圧しても初速度はほとんど変わらない、もしくはわずかながら減少する傾向が観測された。一方、ヘキサノールを基質とした場合は加圧と共にほぼ直線的に初速度は増加し、150 MPa では常圧の約 2 倍に増加することが分かった。つまり、Class と同様に加圧により大きなサイズのアルコールをより効率的に酸化することが出来るようになることを示唆していると考えられる。圧力による活性への影響が主として活性部位のサイズ変化に起因すると仮定すると加圧することにより活性部位がつぶれるというより少し緩むあるいは広がる方向に進み、サイズの大きな基質の反応効率が上昇すると考えられる。一般に圧力により水素結合は強くなるが疎水相互作用は弱くなると言われている。酵素やタンパク質の立体構造保持には疎水性相互作用が重要な役割を示すことは広く知られている。また、ADH の活性部位には疎水性アミノ酸多く存在し、Class に比べ Class は疎水性アミノ酸を多く含む。従って、疎水相互作用が圧力で弱められることにも起因している可能性がある。

次に各基質の k_{cat}/K_m 、 K_m 、 k_{cat} の圧力依存性を定量的に取り扱うために反応体積および活性化体積を比較した。反応座標と体積の関係は図 1 に示した。(1) 式より $-V^{\ddagger}K_m$ は K_m の圧力依存性から $V^{\ddagger}k_{cat}$ は k_{cat} の圧力依存性から求めた。

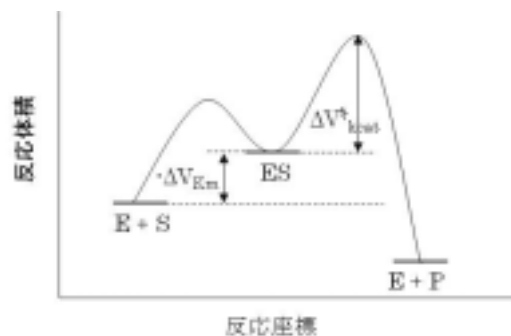


図 1 酵素反応の反応座標と体積の関係

$$\left(\frac{\partial \ln v}{\partial p}\right) = -\frac{\Delta V}{RT} \quad (1)$$

ここで、 v には K_m 、 k_{cat} のどちらかが入り、 R は気体定数、 T は絶対温度、 P は圧力を示す。また、 k_{cat}/K_m から求まる体積変化 (ΔV) は $\Delta V = -V^{\ddagger}K_m + V^{\ddagger}k_{cat}$ で得られる。結果を表 1、2 および図 2 に示した。

表1 馬および酵母 ADH の各基質アルコールの酸化反応から求めた反応体積および活性化体積

Substrate	VK _m		V [‡] k _{cat}	
	Yeast	Horse	Yeast	Horse
	/mlmol ⁻¹			
Ethanol	-22.4	9.9	23.2	0.5
n-Propanol	-15.2	19.9	4.9	-8.4
n-Butanol	-15.4	-3.3	6.6	-3.8
n-Pentanol	-20.3	-22.3	10.6	6.2
n-Hexanol	-20.2	-24.9	6.8	9.9

Substrate	V ¹		V ²	
	Yeast	Horse	Yeast	Horse
	/mlmol ⁻¹			
Ethanol	0.7	12.0	0.8	10.4
n-Propanol	-10.3	7.2	-10.3	11.5
n-Butanol	-8.8	-7.5	-8.8	-7.1
n-Pentanol	-9.6	-15.3	-9.7	-16.1
n-Hexanol	-13.4	-15.0	-13.4	-15.0

V¹、V² はそれぞれ k_{cat}/K_m の圧力依存から直接求めた値と K_m および k_{cat} の圧力変化から $V = VK_m + V^{\ddagger}k_{cat}$ を用いて求めた値を示す。

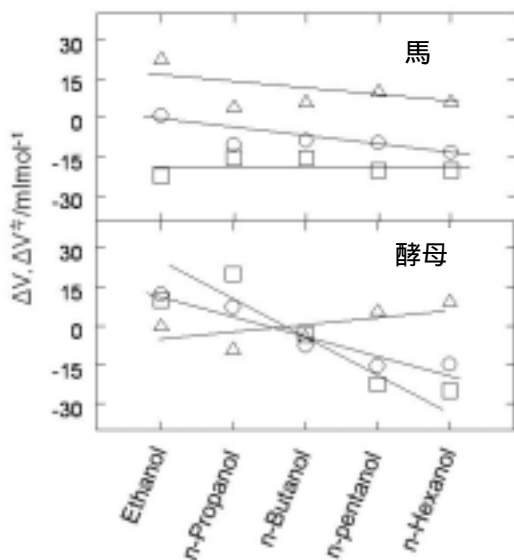


図2 馬および酵母 ADH の各基質アルコールの酸化反応から求めた反応体積および活性化体積

○ : V(k_{cat}/K_m)、△ : V[‡]k_{cat}、
□ : VK_m

図2より Class と Class ADH の V(k_{cat}/K_m)の基質アルコールの炭素数依存性を見てみるとどちらも直線的に変化し、その傾きは Class では約 3.7 mlmol⁻¹、Class では 7.5 mlmol⁻¹となり、Class の方が 2 倍大きいことが分かった。V[‡]k_{cat}、VK_m においても Class の方が変化が大きかった。つまり、圧力応答は Class の方が大きい。また、Class では V の符号がブタノール付近で変わり小さなアルコールでは正で大きなアルコールでは負に変化することが明らかとなった。V が負になれば加圧すれば反応効率が上がることを示しており、エタノールを基質とした場合正の値を取るの炭素数が増えると負に変化するということが常圧では良く反応するエタノールの反応効率は加圧により減少してヘキサノール等の炭素数の多い大きなアルコールでは逆に反応効率が上がることを示している。

以上の結果より、ADH の場合 Class により性質は異なるものの加圧により基質特異性を制御できる可能性が示唆されたものと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

(1) T. Takekiyo, L. Wu, Y.Yoshimura, A. Shimizu, and T. A. Keiderling, Relationship between the Hydrophobic Interaction and Secondary Structure for β-Hairpin Stability of Trpzip Peptides, *Biochemistry* (2009) **48**, 1543-1552.

(2) T. Takekiyo, Y. Yoshimura, A. Shimizu, M. Kato, Y. Taniguchi, Pressure-induced helix-coil transition of poly-L-glutamic acid in water, *J. Phys* (2008) **121**, 042003 (1-5).

〔学会発表〕(計 2 件)

(1) A. Chiba, R.Yoshino, T. Haseba, and A. Shimizu, **The stimulatory effect of various salts on yeast alcohol dehydrogenase**, The Joint 2nd Pacific Rim International Conference on Protein Science and 4th Asian-Oceania Human Proteome Organization (poster session). Cairns (Australia), 2008 年 6 月 24 日

(2) R.Yoshino, A. Chiba, T. Haseba, and A. Shimizu, **The effect of plant compounds from whisky cask on horse liver alcohol dehydrogenase activity**, The Joint 2nd Pacific Rim International Conference on Protein Science and 4th Asian-Oceania Human Proteome Organization (poster session). Cairns (Australia), 2008 年 6 月 24 日

6. 研究組織

研究代表者
清水昭夫