

酵素反応における基質の基底状態不安定化の熱力学的特性

織田 昌幸^{1*}・円谷 健²・藤井 郁雄²

等温滴定型熱量計 (isothermal titration calorimeter, ITC) は、一定温度下で滴定に伴う熱量変化を検出する装置で、おもに分子間相互作用解析に用いられる。ITC装置のセル中にあるA分子に対して、シリンジからB分子を滴下することで、A分子とB分子が結合する際に発生する微小な熱量変化を計測し、得られる滴定曲線から、結合比 (n)、結合定数 (K_a)、結合のエンタルピー変化 (ΔH) を決定できる。さらに熱力学に関する関係式から結合のGibbs自由エネルギー変化 (ΔG) や結合のエントロピー変化 (ΔS) を算出でき、また ΔH の温度依存性から、熱容量変化量 (ΔC_p) を求められる。特筆すべきは、 ΔH を観測、正確に決定できる点で、他の測定手法に比べて、分子間相互作用の熱力学量を精度よく決定できることが挙げられる。

本稿では、ITCの適用例として、酵素反応の熱力学解析を紹介する。対象酵素は、クララムフェニコール・プロドラッグ中のエステル結合を加水分解する2種類の触媒抗体、6D9と9C10である^{2,3)}。触媒抗体は、一般的に反応遷移状態時の基質構造と立体的かつ電子的に似た化合物である遷移状態アナログ (transition-state analog, TSA) を免疫して得られるが、酵素と同様に、反応の遷移状態を安定化することにより反応を加速する⁴⁾。6D9と9C10の反応加速 k_{cat}/k_{uncat} は6D9で935、9C10で56であり、6D9の活性がより高い。さらに興味深いことに、各抗体で基質の基底状態と遷移状態に対する結合活性の差 K_m/K_i が、 k_{cat}/k_{uncat} とほぼ一致した。すなわち、基底状態と遷移状態に対する結合力の差が大きいほど、高い触媒活性を持つと言える。

6D9とTSAとの複合体のX線結晶構造はすでに報告されている(図1)⁵⁾。6D9は比較的深い抗原結合部位を形成しており、ホスホン酸エステルの酸素原子はHis^{L27d}と水素結合している。また、TSAの2個のベンゼン環は重なるようにして、抗原結合部位の深い位置に取り込まれている。TSAと基質とが同様の結合様式で抗原結合部位に結合していると仮定すると、基質のエステル部はねじれ、熱力学的に不安定な非平面構造をとっていることが示唆される。このように基質がひずむことにより、遷移状態へ到達するのを容易にしているものと考えられる。一方、9C10・TSA複合体の立体構造情報は無いものの、6D9でのTrp^{H100i}に相当するアミノ酸残基が欠損するなど、抗原結合部位の疎水性は低く、6D9と同様に基質のエステル部位がねじれた形で結合するとは考えにくい。すなわち、このねじれの程度が各触媒抗体の活性

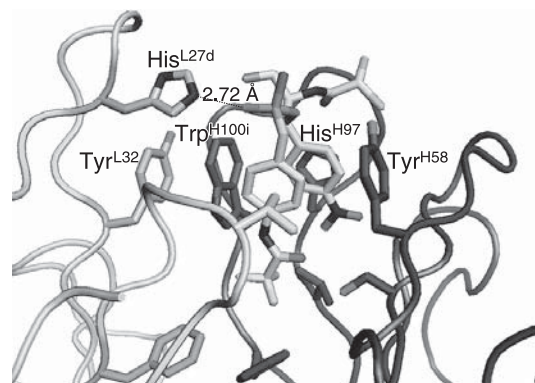


図1. 6D9とTSA複合体のX線結晶構造

に反映され、当然、結合熱力学量にも反映されるものと想定される。

ITC測定

ITCを用いて酵素反応の熱力学特性を明らかにすべく、触媒抗体6D9と9C10について、基質ならびにTSAとの結合に関する熱力学的解析を行った⁶⁾。なお、各結合の熱量変化に基質の加水分解反応熱が混在すると、結果の解釈が困難になる。そこで本研究では、少なくとも測定時間の2時間程度では触媒反応が進みにくい弱酸性緩衝液 (pH 6.0) 中でITC測定を行った。

図2には、ITC測定データの一例として、セル中の6D9溶液に対して、シリンジから基質を滴下したデータを示す。この測定系では、 ΔH が絶対値として小さいこともあり、高濃度の試料を用いているが、6D9とTSAや9C10とTSAおよび基質の結合実験では、この1/10程度の濃度で測定し、良好な結果を得ている。一般的にITC測定に必要な試料濃度は、その測定系に依存するので、最初は適当な濃度で測定し、その結果を見て判断することが薦められる。従来は、ITC測定には比較的大量の試料が必要であったが、最近では、高感度かつ少量試料で測定できる装置の開発も進んでおり、ユーザーからするとITC測定可能な系のバリエーションも下がっている⁷⁾。また測定にあたっては、できるだけ着目する相互作用に伴う熱量変化のみを観測すべく、セルとシリンジに充填する試料の溶媒を一致させるなどの注意を要する。相対的に高濃度となるシリンジ中の試料がセル中に滴下されることに伴い、希釈熱が発生するため、セル中の緩衝液に

* 著者紹介 ¹ 京都府立大学大学院生命環境科学研究科 (准教授) E-mail: oda@kpu.ac.jp

² 大阪府立大学大学院理学研究科

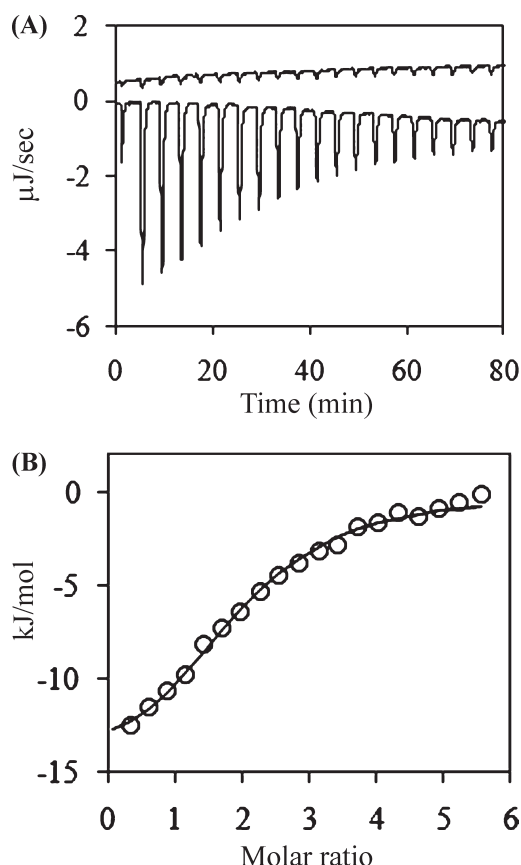


図2. ITCデータ例 (A) 25°CでのITC測定生データ。(上) 基質 (800 μM) を6D9 (30 μM) に滴下。(下) 基質 (800 μM) を緩衝液に滴下。(B) 解析データ。(A) の各滴下ピークを積分し、希釈熱分を差し引いて、セル中の基質/6D9のモル比に対してプロットし、1 : 1結合モデルでフィッティング。得られたパラメータは次の通り； $n = 1.97$, $K_a = 5.98 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, $\Delta H = -15.7 \text{ kJ/mol}$ 。

対して滴下するコントロール実験を行い、希釈熱分を差し引くことも必要となる。

それぞれの結合を異なる温度でITC測定を行うことで、結合熱力学量に関する温度依存性に関する知見を得ることができる(図3)。一般的に生理的温度範囲内では、 ΔH , $T\Delta S$ ともに高温側で値が小さくなり、両者が補償することで ΔG はほぼ一定の値をとる。また結合に伴い、緩衝液中のプロトンとの交換が起こりうるので、結合系そのものの熱力学量を決定する場合、異なる緩衝液中でのITC測定を行い、熱力学量を補正することが薦められる⁸⁾。

熱力学解析結果の解釈

本研究に用いた触媒抗体はIgGで、1分子あたり2か所の抗原結合部位を持つ。今回得られた n の値はいずれもほぼ2であり、各抗体がいずれも結合活性を有することが示唆された。一般的に n の値を指標に、対象分子の活性や変性分子の割合を見積もることもできる。

図3に示した ΔH の温度依存性から、 ΔC_p が求められ、

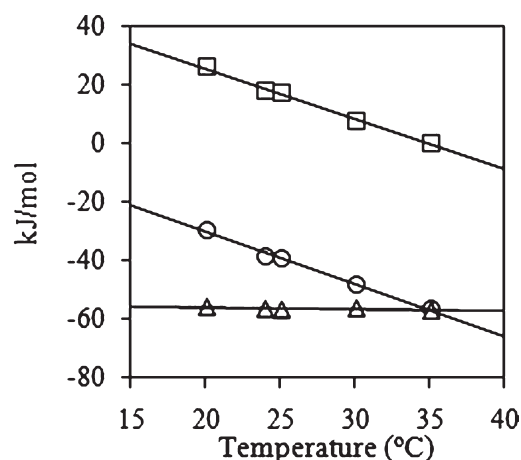


図3. 6D9の基質結合熱力学量の温度依存性。 ΔH (○), ΔG (△), $T\Delta S$ (□)。

表1. 25°Cでの結合熱力学量 (kJ/mol)

抗体	抗原	ΔG	ΔH	$T\Delta S$
6D9	基質	-37.2	-15.7	21.5
6D9	TSA	-56.4	-39.0	17.4
9C10	基質	-56.1	-68.9	-12.8
9C10	TSA	-61.5	-78.6	-17.1

6D9のTSA結合の ΔC_p は -1.77 kJ/mol K となる。立体構造情報との相関として、結合に伴う溶媒露出面積の差と ΔC_p との間に定量関係があるとの議論がある⁹⁾。6D9の場合、TSA結合前後の各結晶構造情報があるので、溶媒露出面積の差を見積もり、関係式に従って ΔC_p を求めると、実験値の1/10程度となった。同関係式の問題点については、各所で指摘されており、その要因の1つとしては、結合に伴う対イオンの水和の寄与がある¹⁰⁾。これら他の寄与も含めて、構造情報と ΔC_p の相関は重要課題であり、さらなる熱力学データの蓄積により、より正確な定量関係式の確立が期待される。

6D9と9C10の25°Cにおける基質およびTSAとの結合に関する熱力学量を表1にまとめる。このデータから、各抗体の触媒活性発現機構や抗原認識機構に関して以下に述べる重要な知見が得られた。

6D9で触媒活性が高い熱力学的根拠 一般に触媒は「基質の遷移状態を安定化する」ことが必要であるが、6D9と9C10のTSA結合を比較した場合、活性の低い9C10のTSA結合力が、むしろ高いことがわかる。前述の「基底状態と遷移状態に対する結合力の差が大きいほど、高い触媒活性を持つ」ことが、本系6D9では基質との結合力の低下、すなわち基底状態の不安定化により達成されていることがわかる。模式的に表した図4で見

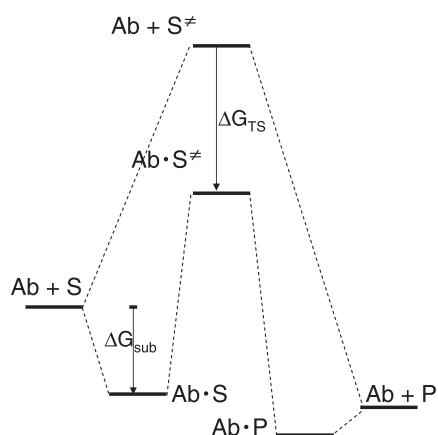


図4. 酵素触媒反応の自由エネルギー変化模式図. Ab, 触媒抗体; S, 基質; S[‡], 基質の遷移状態; P, 反応物.

ると、 ΔG_{sub} が絶対値として小さくなったことに起因する。さらにこの不安定化は、 ΔH の損失により達成されている。Jencksの説に従えば、基質の歪みが「enthalpic strain」に反映され、 k_{cat} を上昇させる¹¹⁾。本結果はまさにこの「enthalpic strain」を実験的に証明したことになる。

6D9の基質との結合における ΔH は、TSAとの結合に比して23.3 kJ/mol大きい。基質との結合においては、触媒残基His^{L27d}との水素結合は形成されないが、その ΔH は大きくても8 kJ/mol程度である。あくまで基質結合様式が結晶構造中でのTSAの結合構造と同様であるとの仮定の上だが、「enthalpic strain」の寄与が15 kJ/mol程度と見積もられる。一方、9C10で同様の見積もりをする、この「enthalpic strain」の寄与は2 kJ/mol程度となる。

各抗体の抗原認識の特徴 6D9の抗原結合熱力学量の大きな特徴として、正の ΔS 値が挙げられる。一般の抗原抗体間相互作用の ΔS は負の値であるが、6D9では基質結合、TSA結合ともに正の ΔS 値となった。通常の生体分子間相互作用では、結合に伴い分子間で水素結合やイオン結合が形成され、分子の自由度は制約されるので、負の ΔH 、負の ΔS となり、両者が補償しあう上で負の ΔG となる。今回の6D9で観測された正の ΔS の要因としては、結合に伴う脱水和の影響が考えられる。図1に示すように、芳香環同士の疎水結合が大きく寄与することから、結合前の6D9およびTSAの疎水表面に水和していた水分子が、結合に伴い脱水和し、系全体としてエントロピー量を得る方向になったと解釈できる。

9C10の抗原結合においては、負の ΔH 、負の ΔS となった。6D9の抗原結合部位と比べて、Trp^{H100i}に相当する部位のアミノ酸残基が欠損するなど、明らかに疎水の環境が低下している。この構造情報からも、抗原結合に伴う脱水和の寄与は小さいと考えられる。TSAとの結合においても、疎水結合は低下するものの、全体としての結合力は6D9より強く、他の寄与が補填しているもの

と考えられる。9C10は基質との結合においても同様に「強く結合」し、結果として触媒活性は6D9よりも低くなると言える。

まとめ

本研究では、基質の基底状態不安定化の熱力学的特性について、「enthalpic strain」の存在を実験的に示した。酵素の反応様式として、基質を歪めることの重要性は各所で述べられているが、これが熱力学的に見ると ΔH として損をさせ、結果的に基底状態と遷移状態での結合力の差を大きくすることを新たに示した。活性の高い触媒の反応機構において、一見、遷移状態の安定化のみに注目しがちであるが、基底状態を不安定化することで活性を高めうることは、意外と盲点かもしれない。

酵素の研究分野では、酵素反応速度論解析で得られる K_m や k_{cat} などに基き議論することが一般的である。本研究では、基質との結合の熱力学量から、基底状態との結合における熱力学変化量（図4での ΔG_{sub} ）を、TSAとの結合の熱力学量から、遷移状態の安定化に相当する熱力学変化量（図4での ΔG_{TS} ）を、それぞれ見積もった。これらの差が酵素の活性効率、特に6D9と9C10では $k_{\text{cat}}/k_{\text{uncat}}$ に相当する。基底状態と遷移状態の各結合熱力学量を指標に、酵素反応機構を理解しうる知見が得られたと言える。

ITCを用いた解析を含め、熱力学解析全般において、さらに定量的な議論を期待したいところである。たとえば立体構造情報と見比べ、ある水素結合の形成により、 ΔH 、 ΔS がそれぞれどの程度変わるか、といった議論である。そのような定量的議論を難しくする最たる要因の1つとして、生体分子が機能する場となる「水」の寄与が挙げられる。今後さらに熱力学解析データが蓄積され、経験的にしろ、より定量的理解が深まることを楽しみにしたい。

文 献

- 1) Wiseman, T. *et al.*: *Anal. Biochem.*, **179**, 131 (1989).
- 2) Miyashita, H. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 5337 (1993).
- 3) Fujii, I. *et al.*: *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 6199 (1995).
- 4) Lerner, R. A. *et al.*: *Science*, **252**, 659 (1991).
- 5) Kristensen, O. *et al.*: *J. Mol. Biol.*, **281**, 501 (1998).
- 6) Oda, M. *et al.*: *J. Mol. Biol.*, **369**, 198 (2007).
- 7) http://www.pssj.jp/archives/Protocol/Measurement/ITC_01/ITC_01_01.html
- 8) Fukada, H. and Takahashi, K.: *Proteins*, **33**, 159 (1998).
- 9) Spolar, R. S. *et al.*: *Biochemistry*, **31**, 3947 (1992).
- 10) Oda, M. *et al.*: *J. Mol. Biol.*, **276**, 571 (1998).
- 11) Jencks, W. P.: *Catalysis in Chemistry and Enzymology* (1969).