

1. アミノ酸 (第4章)

*必須アミノ酸(人間の体内で合成できないアミノ酸)
ヒスチジンは幼児期のみ必須

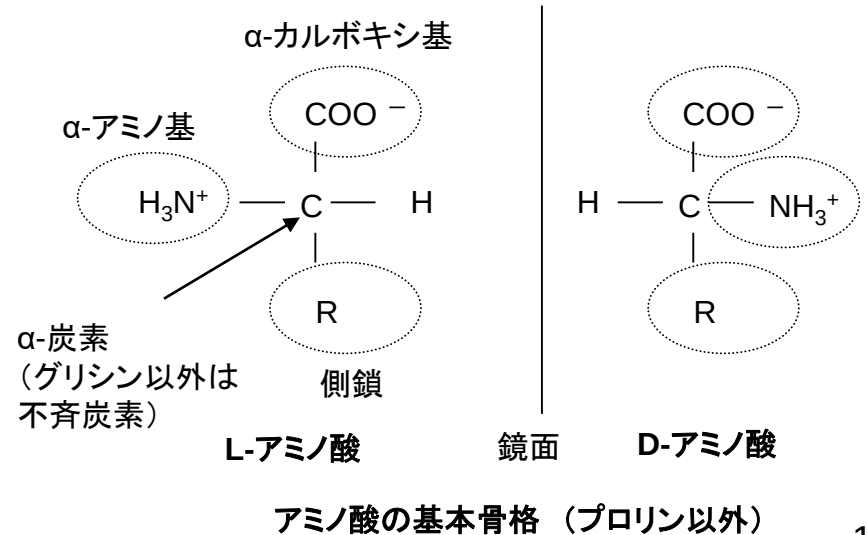
1-1 アミノ酸の種類と特性 (p.52,53)

表 4-1 タンパク質に含まれる標準アミノ酸の構造、略号、タンパク質中の含量、および解離基の pK 値

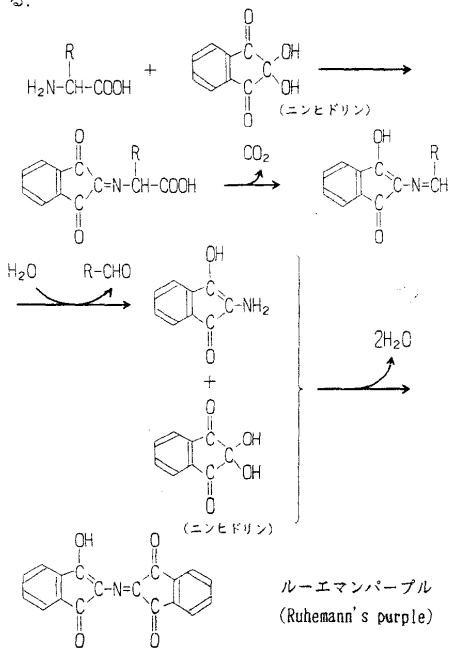
名 称 三文字表記 一文字表記	構 造 式 ¹⁾	残基質量 (Da) ²⁾	タンパク質中の 平均含量(%) ³⁾	pK ₁ α-COOH ⁴⁾	pK ₂ α-NH ₃ ⁴⁾	pK _a 側鎖 ⁵⁾
無極性側鎖 アミノ酸						
グリシン Gly G		57.0	7.1	2.35	9.78	
アラニン Ala A		71.1	8.2	2.35	9.87	
バリン Val V		99.1	6.9	2.29	9.74	
ロイシン Leu L		113.2	9.7	2.33	9.74	
イソロイシン Ile I		113.2	6.0	2.32	9.76	
メチオニン Met M		131.2	2.4	2.13	9.28	
プロリン Pro P		97.1	4.7	1.95	10.64	
フェニルアラニン Phe F		147.2	3.9	2.20	9.31	
トリプトファン Trp W		186.2	1.1	2.46	9.41	
極性無電荷側鎖 アミノ酸						
セリン Ser S		87.1	6.6	2.19	9.21	
トレオニン Thr T		101.1	5.3	2.09	9.10	
アスパラギン ⁶⁾ Asn N		114.1	4.1	2.14	6.72	
グルタミン ⁶⁾ Glu Q		128.1	3.9	2.17	9.13	
チロシン Tyr Y		163.2	2.9	2.20	9.21	10.46 (フェノール基)
システイン Cys C		103.1	1.4	1.92	10.70	8.57 (-SH 基)

名 称 三文字表記 一文字表記	構 造 式 ¹⁾	残基質量 (Da) ²⁾	タンパク質中の 平均含量(%) ³⁾	pK ₁ α-COOH ⁴⁾	pK ₂ α-NH ₃ ⁴⁾	pK _a 側鎖 ⁵⁾
酸性電荷側鎖 アミノ酸						
リシン Lys K		128.2	5.9	2.16	9.06	10.54 (ε-NH3+)
アルギニン Arg R		156.2	5.5	1.82	8.99	12.48 (グアニジ ニウム基)
* ヒスチジン ⁶⁾ His H		137.1	2.3	1.80	9.33	6.04 (イミダ ゾール基)
アスパラギン酸 ⁶⁾ Asp D		115.1	5.4	1.99	9.90	3.90 (β-COOH)
グルタミン酸 ⁶⁾ Glu E		129.1	6.8	2.10	9.47	4.07 (γ-COOH)

1) 構造は pH7.0 におけるイオン型で示す(ヒスチジンは除く)。グリシン以外の C α 原子および * 印をつけた原子はキラル中心で、構造をフィッシャー投影式(8-4-2)で示す。側鎖両端化合物には有機化合物命名法による番号をつけた。
2) 残基質量はキラル中心の窒素と、側鎖アミノ酸の分子質量を求めるには H 2 O の分子質量 18.0Da を加える。側鎖だけの質量を求めるにはペプチド部分の値、56.0Da を引く。
3) 完全 SWISS-PROT データベース (<http://www.swissprot.ch/gpro/updates/releas.html>)、Release 2013_13 の平均アミノ酸組成、個々のタンパク質のアミノ酸組成はこの値から大きくずれることがある。
4) 出典: R.M.C. Dawson, D.C. Elliott, W.H. Elliott, K.M. Jones, "Data for Biochemical Research (Oxf Ed.)", p.1-31, Oxford Science Publications (1986)。
5) アスパラギン酸/アスパラギン酸の区別ができないときは文字表記では Asx、一文字表記では B。グルタミン酸/グルタミン酸の区別ができないときは Glx、一文字表記では Z。標準アミノ酸以外のアミノ酸は文字表記では X で表す。
6) ヒスチジンの pK_a は 7.0 に近いので pH7.0 では非イオン化型とプロトン化型の両方がある。



1-2 アミノ酸の定性・定量反応

アミノ酸の呈色反応 (定性反応)		
すべてのアミノ酸に共通の呈色反応		
反応名	試薬・操作など	【呈色】・特異性
ニンヒドリン反応 ninhydrin反応	アミノ酸の中性～弱酸性溶液にニンヒドリンを加えて加熱すると、定量的に CO_2 を発生し、赤紫色を呈する。  （ニンヒドリン） （ニンヒドリン） ルーエマンパープル (Ruhemann's purple)	【赤紫色】 脂肪酸に結合したアミノ基 吸収極大 570 nm 呈色物質 アミノ酸 ペプチド タンパク質 アミン アミノ糖 (例外) 【黄色】 proline hydroxyproline
特定のアミノ酸の呈色反応		
ホリナー シオカルト反応	Na_2CO_3 アルカリ性で、フェノール試薬を加える。 (フェノール試薬：リンモリブデン酸とリンタングステン酸の混液)	【青色】 tyrosine tryptophan cysteine (還元性アミノ酸)
Folin-Ciocalteu 反応	(タンパク質については定量も可能。)	
ミロン反応 Millon 反応	ミロン試薬を加えて加熱する。 (ミロン試薬：水銀を発煙硝酸に溶解後、希釈したもの。)	【赤褐色】 tyrosine (フェノール性化合物)

キサントプロテイン反応	濃硝酸を加えて、加熱する。 (アンモニアルカリ性になると、橙黄色になる。)	【黄色】 tyrosine phenylalanine tryptophan (ベンゼン環がニトロ化されるためである。)
xanthoprotein 反応		(ベンゼン環をもつもの)
ホプキンスー コール反応	グリオキシル酸を加え、濃硫酸を器壁に沿って流下する。	【赤紫色】 tryptophan (indole 化合物)
Hopkins-Cole 反応	$\begin{matrix} \text{CHO} \\ \\ \text{COOH} \end{matrix}$ (アルデヒド基がインドール環の α 位に縮合して色素を形成する。)	
エールリッヒの アルデヒド試験	p-ジメチルアミノベンズアルデヒドの塩酸溶液を滴下する。	【赤紫色～紫色】 tryptophan (indole 化合物)
Ehrlich aldehyde test	(アルデヒド基がインドール環の α 位に縮合して色素を形成する。)	
硫化鉛反応	強アルカリ性にして、酢酸鉛を加えて、加熱する。	【黒色沈殿】 cystine cysteine (methionine は陰性)
lead sulfide 反応	(黒色沈殿は PbS の生成による。)	
ニトロプルシド 反応	硫酸アンモニウムとニトロプルシドナトリウムを加えて、アンモニアルカリ性にする。	【紫色】 cysteine (-SH 化合物)
nitroprusside 反応		
パウリ反応	Na_2CO_3 アルカリ性にし、ジアゾベンゼンスルホン酸 (塩酸性下でのスルファニル酸と亜硝酸ナトリウムの混液) を加える。	【赤褐色】 histidine (アゾ色素の生成による。)
Pauly 反応		【黄褐色】 tyrosine tryptophan
坂口反応	水酸化ナトリウムで強アルカリ性にし、 α -ナフトールのアルコール溶液数滴、および次亜塩素酸ナトリウム (NaClO) 溶液または次亜臭素酸ナトリウム (NaBrO) 溶液を加える。	【紅色】 arginine (グアニジノ基)
Sakaguchi 反応		

Topics

アミノ酸に関する雑学

①アミノ酸飲料と味の素

かつてブームになったアミノ酸飲料は、手軽にアミノ酸が摂取できることから、今でも根強い人気があります。しかし、アミノ酸飲料を飲むだけで、ヒトに必要なアミノ酸摂取量が補えるのでしょうか？体重50kgの人の場合、一日の必要なアミノ酸量は約50gです。一方、アミノ酸飲料に含まれるアミノ酸は約1~4gです。従って、かなり不足していることが分かります。また、こうしたアミノ酸飲料ではアスパルテーム(Asp-Phe-O-Me)などの人工甘味料が含まれている場合があります。アスパルテームは糖類ではなく、アミノ酸が2個つながった化合物です。アスパルテームは、摂取量によっては脳腫瘍や白血病などを引き起こすという報告もあり、安全性に対する論争が続いています。

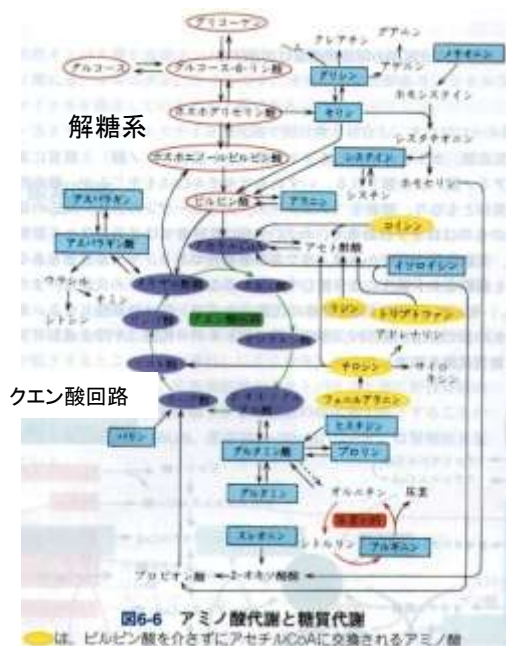
また、アミノ酸を利用した製品として、味の素があります。味の素はうまみ成分であるL-グルタミン酸ナトリウムを97.5%含む調味料です。以前L-グルタミン酸ナトリウムは化学合成されていましたが、現在は発酵法が主流となっています。L-グルタミン酸ナトリウムは動物実験で毒性等の報告はほとんどありませんが、L-グルタミン酸ナトリウムを一度に大量にとると、一部の人に「中華料理症候群」と呼ばれる過敏症が起こることが知られています。「中華料理症候群」は1968年にアメリカの中華料理店でL-グルタミン酸ナトリウム入りのワンタンスープを飲んだ人たちにあらわれたもので、顔、首、腕にかけてのしびれや灼熱感、動悸、めまい、倦怠感などの症状が見られます。他のアミノ酸ではこうした報告は少ないのですが、L-Tyr, L-Lysなどは動物実験で胎児の発育に影響をあたえるとの報告もあります。しかし、こうしたアミノ酸の製品を過剰に摂取しなければ安全と考えられています。(渡辺雄二、食べてはいけない添加物、食べてもいい添加物、だいわ文庫より)



②アミノ酸の味と役割

アミノ酸の初めての発見は、1806年フランスでアスパラガスの芽から発見されたアスパラギンでした。その後次々にアミノ酸が発見され、1935年にローズが20番目のアミノ酸としてトレオニンを発見し、タンパク質を構成する20種の標準アミノ酸が明らかとなった。また、人が体内で合成できないアミノ酸(9種)を必須アミノ酸といい、一つでも足りないアミノ酸(制限アミノ酸という)があると他のアミノ酸の利用効率も下がる。もっとも足りないアミノ酸(第一制限アミノ酸)は、植物性食品ではリシンである。従って、食事においてアミノ酸のバランスが大変重要になる。標準アミノ酸のうち、うまみ・酸味成分はGlu、Aspの酸性アミノ酸で、これらを多く含むものはおいしいと感じる。一方甘み成分は、Gly, Ala, Thr, Pro, Ser, Glnであり、苦み成分はPhe, Tyr, Arg, Leu, Ile, Val, Met, Hisである。発酵食品では、微生物の作用によりタンパク質の分解が進み、アミノ酸含量が増えることで独特の味が出る。(味の素HPより)

こうして摂取されたアミノ酸は、我々の細胞、組織、器官を形成するタンパク質や、代謝をつかさどる酵素(タンパク質の一種)の構成要素として重要である。その他、アミノ酸は分解され、ピルビン酸(解糖系)、アセチルCoA、2-オキソグルタル酸やオキサロ酢酸(クエン酸回路)などを生成し、最終的にCO₂、H₂O、尿素などに代謝されるか、ブドウ糖の生成(糖新生)に使われる。また、非必須アミノ酸の合成にも一部は使われる。これらの過程はATP合成などのエネルギー代謝に関与するため、アミノ酸は生物が生命活動をする上で、極めて重要な物質である。



2-1 タンパク質とは

- ①アミノ酸同士がペプチド結合でつながったもの。
- ②タンパク質に使われるアミノ酸としては、プリントで配った20種のアミノ酸がある。
- ③どのアミノ酸がどういう順番で、何個のアミノ酸がつながるかにより、タンパク質のアミノ酸配列(アミノ酸の並び、一次構造ともいう)は膨大な数の組み合わせが存在する。
- ④タンパク質の機能は、これら一次構造と、さらに官能基同士の相互作用で形成される三次元立体構造により決定される。
- ⑤その構造としては、一次構造、二次構造、三次構造、四次構造がある(右の図)。

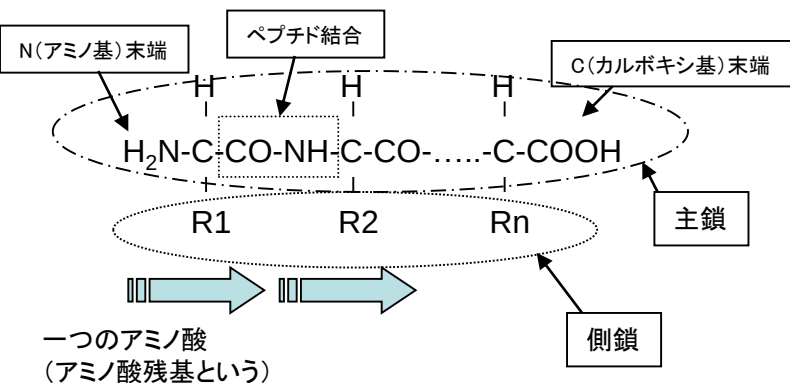
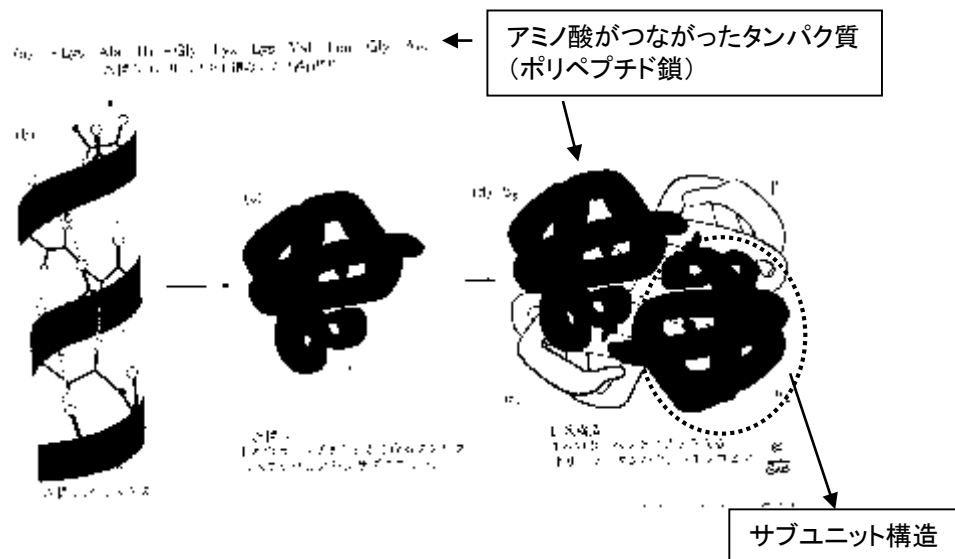

$$\text{His} = \text{Pro} = \text{Val} = \text{Glu} = \frac{11}{6}, \text{Cys} = \text{Gly} = 1.91, \text{Ala} = \text{Ser} = \frac{15}{10}, \text{Ile} = \text{Ser} = \text{Leu} = \frac{1}{2}, \text{Cln} = \text{Leu} = 0.25, \text{Asn} = \text{Tyr} = \text{Gln} = \frac{25}{9}$$

図 5・1 ウラニン系リンの一次構造 前内は1が塩基、2がホスファ、3が糖である

タンパク質の表記法： アミノ酸の並んでいる順番に、左から書く。従って、一番左の官能基はNH₂、一番右の官能基は-COOHとなる。アミノ酸略記号は一字でも三文字でもよいが、長い配列を表記する際は一字記号が良く使われる。左から1番目、2番目...と数える。

2-2 タンパク質の構造階層



二次構造

主鎖の官能基(ペプチド結合)同士の相互作用により形成される立体構造。らせん状に巻いた α -ヘリックスや、ひだ状になった部分が平行もしくは逆平行になった構造(β -シート)がある。

三次構造

主鎖および側鎖の官能基同士の相互作用により形成される立体構造。共有結合、イオン結合、疎水性相互作用、分子間力、水素結合などにより形成される。

四次構造

サブユニット構造(四次構造を形成する一本のポリペプチドをサブユニットという)ともいい、そのタンパク質がどのようなサブユニット構成から成り立っているかを示したもの。この図の場合4つのサブユニット($\alpha_2\beta_2$)から成り立っている。

2-3 タンパク質の機能

表5.2 単純タンパク質と複合タンパク質のいろいろ

タンパク質の種類	性質	存在例
単純タンパク質		
アルブミン	水溶性、硫酸で沈殿	血清アルブミンなど
グロブリン	水に不溶性	血清グロブリンなど
グルテリン	薄い酸に可溶	グルテニン(コムギ)など
プロラミン	70%アルコールに可溶	グリアジン(コムギ)など
ヒストン	水溶性	真核生物の核内(塩基性)
プロタミン	水溶性	サケ、ニシンの精子など(塩基性)
硬タンパク質	水に不溶性	コラーゲンなど
複合タンパク質		
リントタンパク質		カゼイン(乳汁)など
糖タンパク質		ムチン(唾液)など
リポタンパク質		血清リポタンパク質
金属タンパク質		フェリチン(Fe)など
色素タンパク質		ヘモグロビン(ヘム鉄)など
核タンパク質		デオキシリボ核タンパク質(DNP)
核タンパク質		リボ核タンパク質(RNP)

単純タンパク質: アミノ酸だけからなるタンパク質

複合タンパク質: ポリペプチド鎖にリン酸や糖などが結合したタンパク質

機能に基づくタンパク質の分類

表5.3 機能に基づくタンパク質の分類とその例

分類	例
酵素	リボヌクレアーゼ、トリプシン
貯蔵タンパク質	オボアルブミン、カゼイン、フェリチン、グリアジン
運搬タンパク質	血清アルブミン、ヘモグロビン、ミオグロビン
収縮タンパク質	アクチン、ミオシン
構造タンパク質	コラーゲン、ケラチン、フィブリン、エラスチン
防御タンパク質	抗体、フィブリノーゲン、トロンビン
ホルモン	インシュリン、成長ホルモン、副腎皮質ホルモン
生物毒素	リシン、蛇毒、ボツリヌス毒素、ジフテリア毒素

① 酵素

化学反応を触媒するタンパク質。次のスライド参照

② 貯蔵タンパク質

細胞や組織、個体に蓄えられるタンパク質
カゼインは乳タンパク質の主成分でCa貯蔵
フェリチンは肝臓などに存在し、Fe貯蔵

③ 運搬タンパク質

生体内で物質を運搬するタンパク質
血液中のヘモグロ빈は酸素を運搬
血清リポタンパク質は脂肪を運搬

④ 収縮タンパク質(アクチン、ミオシン)

ATPをエネルギー源として、アクチンやミオシンは筋収縮を行う

⑤ 抗体タンパク質、防御タンパク質

抗原に対し、生体内で免疫反応により生産されるタンパク質。
または、生体防御にかかわるタンパク質。

⑥ 毒性タンパク質

生物が産生するタンパク質で毒性を示すもの。ボツリヌス毒素やジフテリア毒素など

⑦ 構造タンパク質

生体の細胞や組織、器官を構成するタンパク質
ケラチン(角質: 皮膚、毛髪、爪など)
コラーゲン(動物の細胞外基質の原材料、細胞間接着に重要)

⑧ ホルモン

細胞間の情報伝達にかかわる物質のうち、タンパク質性のものは、インシュリン、成長ホルモン、副腎皮質刺激ホルモンなどがある。

2-4 タンパク質の分離法(第5章、p62~)

あるタンパク質の性質や一次構造を調べたい

まず、天然の組織や細胞から目的のタンパク質を単離する(精製という)。タンパク質の特性に応じて、下記の技術を使う

性質	分離法
荷電	イオン交換クロマトグラフィー 電気泳動
極性	疎水性相互作用クロマトグラフィー 逆相クロマトグラフィー
大きさ	ゲルろ過クロマトグラフィー SDS-PAGE 超遠心分離
溶解度	透析法 塩析法
結合特異性	アフィニティークロマトグラフィー

考慮すべきタンパク質の性質

タンパク質は熱、pH、化学試薬、共存する分解酵素などにより、タンパク質の立体構造が壊れ、機能を失う(変性という)。したがって、目的のタンパク質を変性させないように精製しなければならない。

pHは至適のpHに維持
温度は低温で行う
分解酵素を阻害する
酸化を防ぐ。

②クロマトグラフィーを利用した分離法

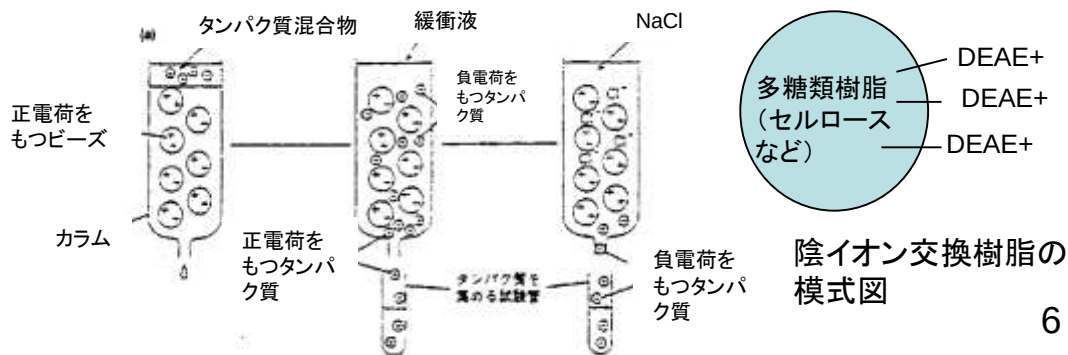
クロマトグラフィー:担体として固体のポリマー樹脂を用い(固定相)、分離する種々のタンパク質を緩衝液などに溶解する(移動相)。タンパク質の種類により、固定相との相互作用が異なるので、その性質の差を利用してタンパク質を分離する方法である。

(A) イオン交換クロマトグラフィー (p.66)

タンパク質の電荷の差を利用して分離する。

陰イオン交換樹脂:陽イオンが結合した樹脂に、タンパク質の負電荷が結合する。例 DEAE担体

陽イオン交換樹脂:陰イオンが結合した樹脂に、タンパク質の正電荷が結合する。例 CM担体



①タンパク質の溶解度の差を利用した分離法(p.65)

塩析法:タンパク質が溶けている溶媒に、タンパク質が変性しない塩(硫酸アンモニウムなど)を加え、タンパク質の溶解度を減少させて沈殿として回収する。

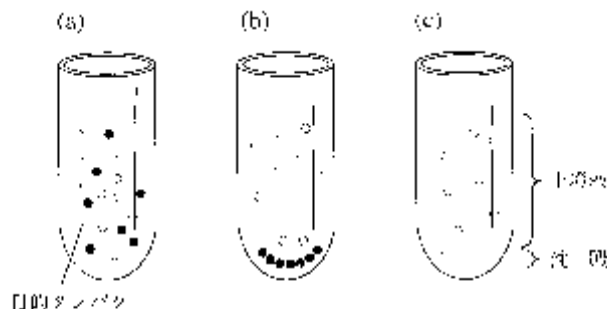
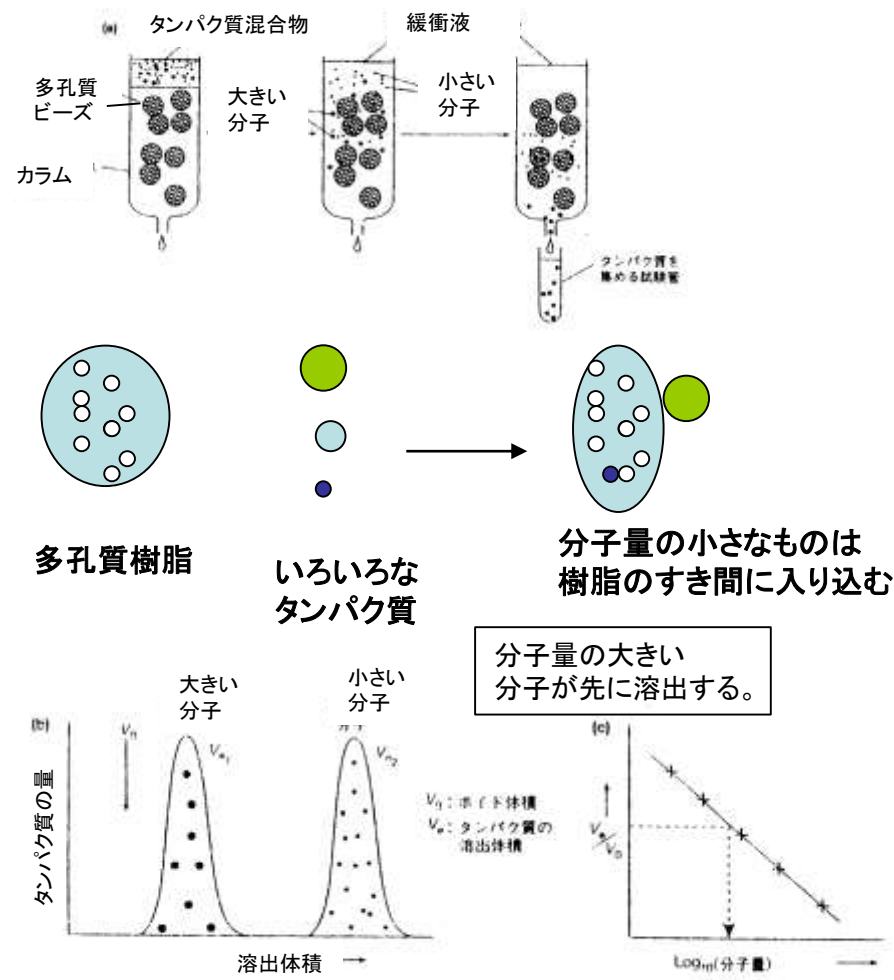


図 3-4 塩析による分離 (a) 目的タンパクが沈殿するまで少し過剰な塩(硫酸アンモニウムなど)を加え、(b) 沈殿を分離して不要タンパク(水溶性)を除き、(c) 上清液に目的タンパクが溶解したまま塩を追加する。尚途中分離で目的タンパク(沈殿)を除く。上澄み液になる。

タンパク質の分離法(つづき)

(B) ゲルろ過クロマトグラフィー (p.67)

タンパク質の分子量の差を利用して分離する。HPLCなどで条件を一定にすることで、分子量も決定できる。



高速化、自動化した装置
HPLC(高速液体クロマトグラフィー)などに、
各種カラムを接続する

(C) アフィニティークロマトグラフィー (p.68)

タンパク質とある特定の物質との相互作用を利用する。

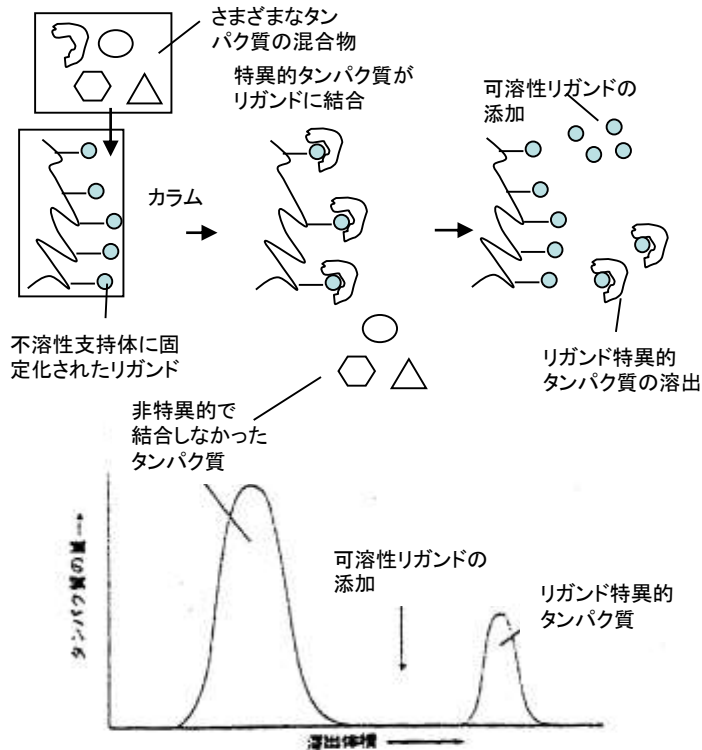


図3. アフィニティークロマトグラフィー。(a) アフィニティークロマトグラフィーの概略図。(b) 溶出の様子を示した図。非特異的なタンパク質は固定化されたリガンドに結合せず、カラムをそのまま通り抜けるのに対し、特異的なタンパク質は固定化されたリガンドに結合し、可溶性のリガンドを加えることで初めて溶出される。

(D) 疎水性(相互作用)クロマトグラフィー

タンパク質の疎水性の差を利用して分離する。不溶性支持体に疎水基が結合した固定相にタンパク質を結合させ、硫酸アンモニウム溶液を移動相として、徐々に移動相濃度を下げることにより溶出させる。

(E) 逆相クロマトグラフィー

非極性の固定相(多孔質シリカゲルに直鎖上炭化水素(C4,C18など)が結合したもの)にタンパク質を結合させ、極性の移動相(アセトニトリルなど)で溶出させる。通常はHPLC(高速液体クロマトグラフィー)で行い、一次構造解析用のタンパク質やペプチドの分離に用いられる。

2-5 タンパク質の検出・定量法

①電気泳動法 (p.68)

タンパク質は荷電アミノ酸や末端荷電基(アミノ基、カルボキシル基)を含むため、電荷を帯びている。そのため、固定化された支持体上でタンパク質に電圧をかけると、支持体上をタンパク質が移動する。これを電気泳動という。

ポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)

ポリアクリルアミドゲルに種々のタンパク質を添加し、電気をゲル上に流す。タンパク質はそれぞれの電荷や分子量、立体構造に応じて、ゲル中を移動する(電気泳動)。泳動終了後、色素でゲルを染色し、タンパク質を検出する。

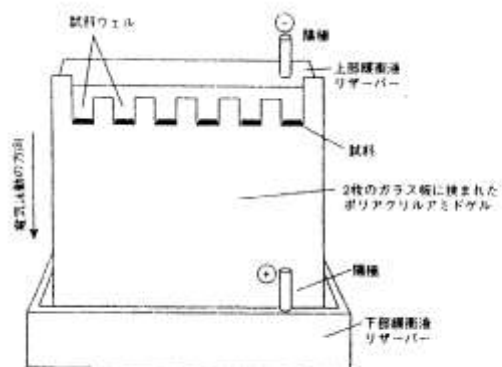
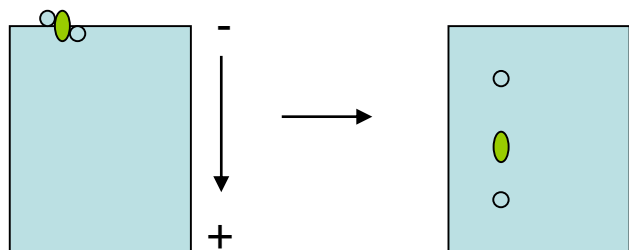
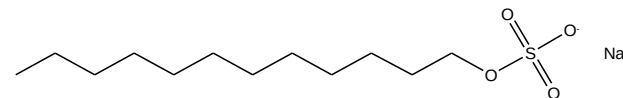


図1. 未変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動。タンパク質試料はゲルの上端につくられた試料ウェルの中に添加する。電流はゲルの上から下に向かって流し、タンパク質はゲルを通過して下に移動する。タンパク質が小さく正味の負電荷が大きいほど、移動度が大きくなる。

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)

タンパク質の変性剤であるSDSの入ったポリアクリルアミドゲルに種々のタンパク質を添加し、電気をゲル上に流す。SDSの結合したタンパク質は、電荷が分子量に依存して一定になり立体構造も崩れ、ゲル中を移動する。従って、その分子量のみに依存して電気泳動される。よって、ゲルの移動度から分子量を求めることができる。



ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)

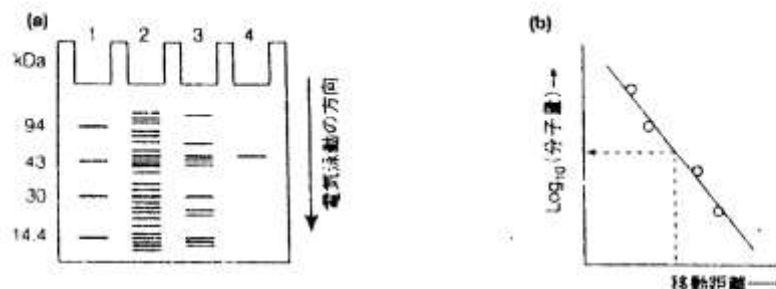
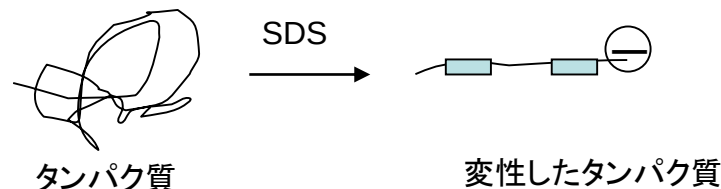


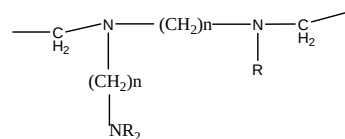
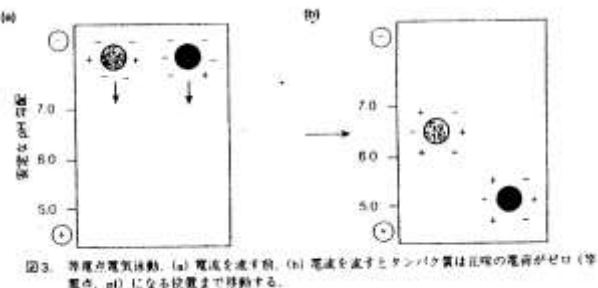
図2. SDS-PAGE. (a) SDS ポリアクリルアミドゲルでの電気泳動後のタンパク質の様子。レーン1: 分子量既知のタンパク質(マーカー)。レーン2: 未精製のタンパク質混合物。レーン3: 部分的に精製したタンパク質。レーン4: 見かけ上均一に精製されたタンパク質。(b) 未知タンパク質の電気泳動の移動度(移動距離)と分子量既知のタンパク質(マーカー)の移動度との比較による、分子量の定量。

2-5 タンパク質の検出・定量法

①電気泳動法 (p.68)

等電点電気泳動

タンパク質は両性電解質であり、分子の電荷が0になるpHが存在する。支持体として両性電解質を加えたポリマーゲル、陽極側に酸、陰極側に塩基を用いる。両極間に電圧をかけると、ゲル上にpH勾配が形成され、タンパク質の等電点に応じて泳動度が異なる。



Ampholine
R=H, $-(\text{CH}_2)_n\text{-COOH}$

二次元電気泳動

一次元目にストラップゲルで等電点電気泳動を行い、二次元目にスラブゲルでSDS-PAGEを行う。タンパク質の分離やプロテオーム解析に適している

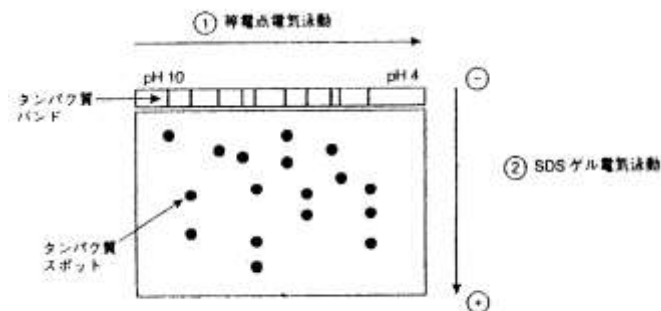
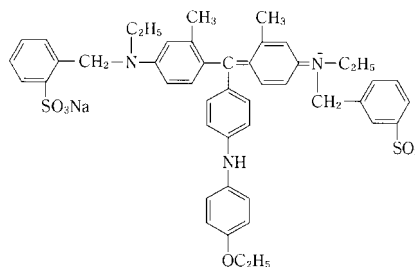


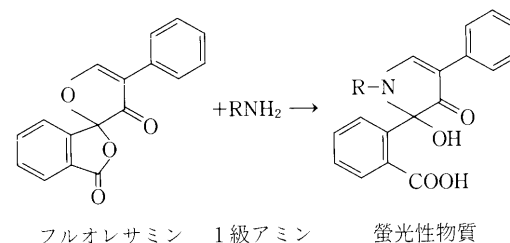
図4. 二次元ゲル電気泳動。タンパク質試料はまず一次元で等電点電気泳動にかけられ、その後、第二の次元でSDS-PAGEにかけられる。

②タンパク質の定量法

方法	原理
ビウレット法	Cu^{2+} がアルカリ溶液中でポリペプチドと錯体を形成し呈色する。
Lowry法	チロシン、トリプトファン、システインとフェノール試薬の反応をビウレット法と組み合わせた。
ビスニコニン酸法(BCA法)	アルカリ溶液中で Cu^{2+} がペプチド結合、チロシン、トリプトファン、システインによって還元される Cu^+ を定量する。
色素結合法(CBB法)	タンパク質と色素(CBBなど)の結合により、色素のスペクトルが変化する。
ニンヒドリン法	加水分解後、アミノ酸をニンヒドリンと反応させる。
蛍光法	フルオレサミンが一級アミンと反応し、蛍光物質となることを利用。



Coomassie Brilliant Blue G-250



その他、紫外吸収法(280nm, 230nm, 205nm)、o-フタルアルデヒド(OPA)法などがある。紫外吸収法はタンパク質の簡便な検出に用いられる。

2-6 タンパク質の反応・分析法

アミノ酸組成分析

タンパク質を強酸性で加熱し、アミノ酸単位に加水分解する。遊離アミノ酸を蛍光物質で標識し、ODSカラムを用いた逆相HPLCなどで分離・同定する。

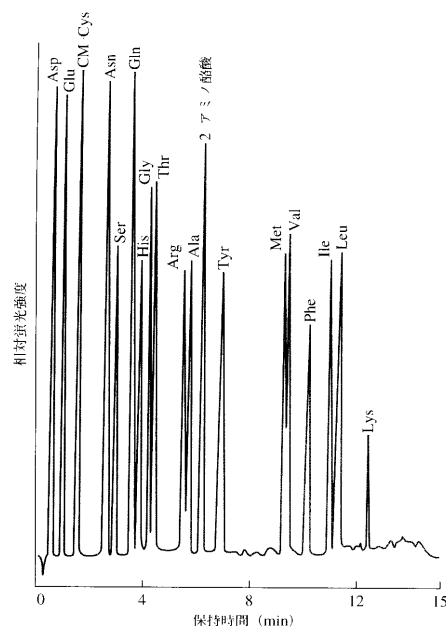


図 5-14 アミノ酸分析 アミノ酸はHPLCの前に蛍光をもつ誘導体しておく [M.W. Hunkapiller, J.E. Strickler, K.J. Wilson, *Science* 226, 309 (1984)]

タンパク質N末端の決定法

ダンシルクロリドとアミノ基の反応

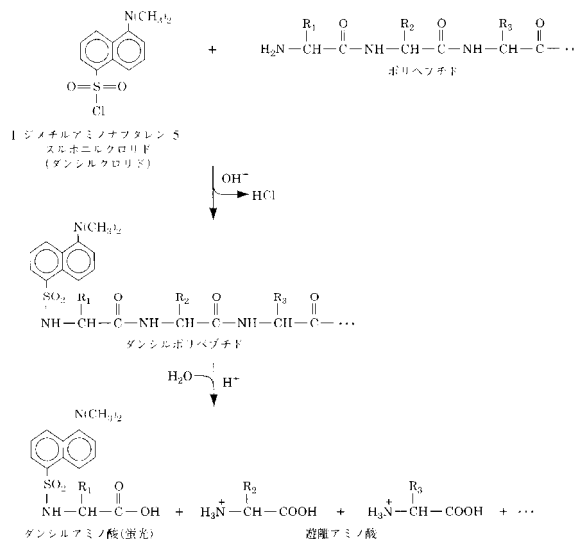
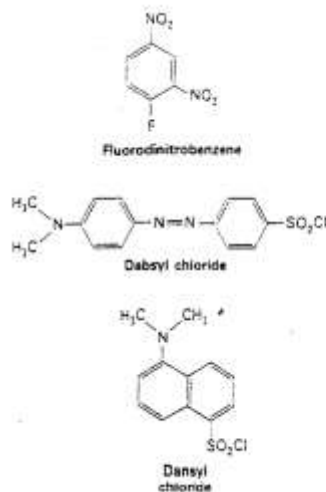


図 5-13 ダンシルクロリドによるN末端分析 ダンシルクロリドは第一級アミノ基と反応するので末端基分析に使われる。

タンパク質のN末端アミノ基との反応試薬

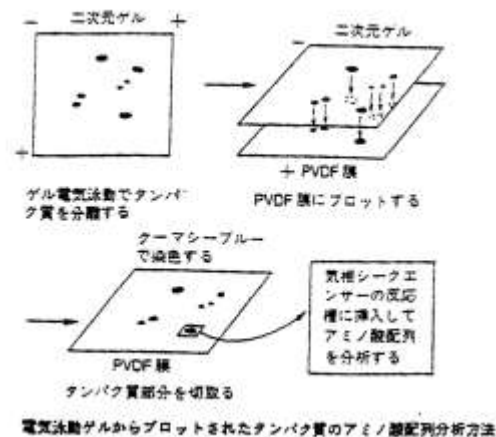


Determination of the amino-terminal residue of a peptide. Dabsyl chloride labels the peptide, which is then hydrolyzed using HCl. The dabsyl-amino acid (dabsyl-alanine in this example) is identified by its chromatographic characteristics.

タンパク質のN末端分析法

通常は精製したタンパク質を、さらに逆相HPLCなどで水系から有機溶媒系(アセトニトリルなど)に置換、精製し、アミノ酸組成分析、N末端決定法(左図)、次ページのエドマン分解などを行う。

精製が困難な試料やプロテオーム解析などでは、逆相HPLCによる精製を行わずに、電気泳動によりタンパク質を分離し、PVDF膜に転写後、膜上でN末端決定法やエドマン分解を行う。



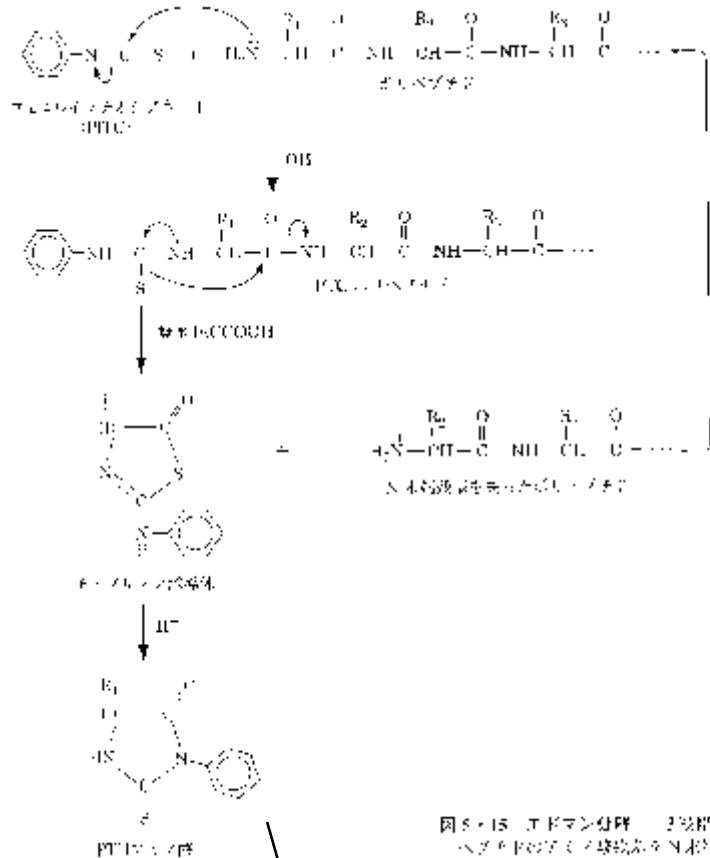
電気泳動ゲルからプロットされたタンパク質のアミノ酸配列分析

2-7 タンパク質の一次構造

一次構造: アミノ酸配列、アミノ酸がどのような順番でなっているか

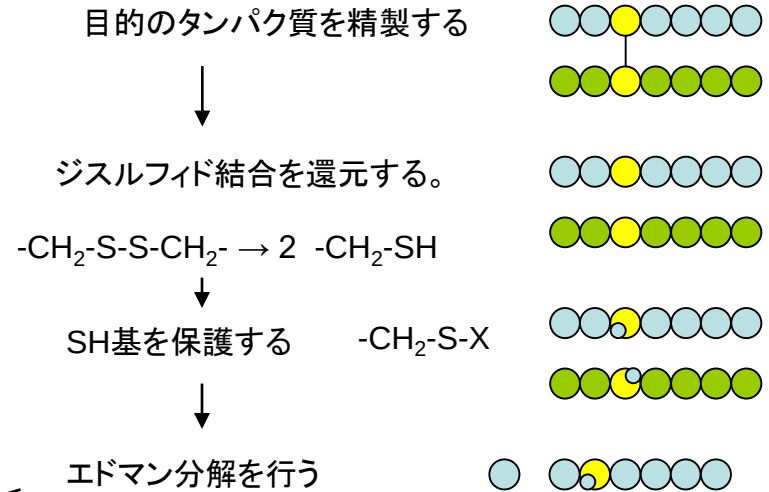
一次構造決定法

N末端側からエドマン分解により一つずつアミノ酸を遊離させて決定する。現在は自動化されている。



標準試料と比較してアミノ酸を決定する。

一般的な一次構造決定の手順



エドマン分解はサイクルを重ねるとPTHアミノ酸の収量が少なくなる。一般的には30-50アミノ酸で限界。

N ○○○○○○○○○○○○○○○○○○○ C

→ ? →



ポリペプチド鎖を何らかの方法で切断し、N末端を生成させればよい。アミノ酸配列情報を組み合わせて、最終的に全体の配列を決める。

N ○○○○○ C

N ○○○○○○○ C

N ○○○○○○○○○ C

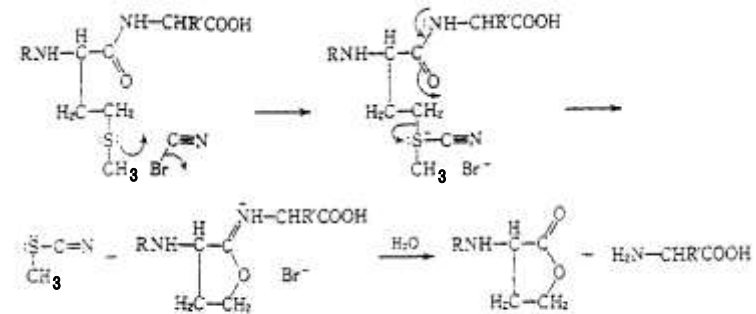
2-7 タンパク質の一次構造

タンパク質の切断法

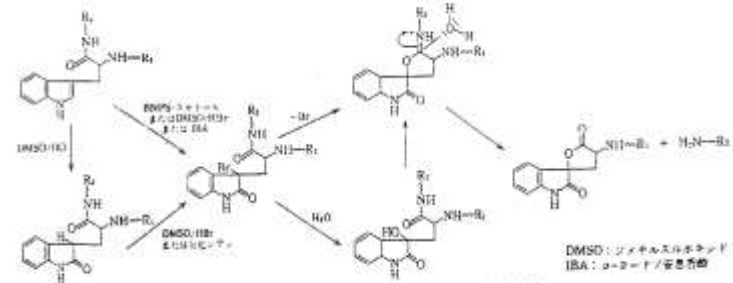
化学的切断法と酵素的切断法がある。

①化学的切断法

切断を受ける結合	方 法
Met-X Trp-X	臭化シアン (70% 希酸または 75% トリフルオロ酢酸) ① BNPS-ニカトール またはジメチルスルホキシド+HCl+HBr またはジメチルスルホキシド+HCl+臭化シアン ② α-キートン安息香酸+ククレゾール ③ メチオキシを光酸化後臭化シアン(希酸+ヘプタフルオロ酢酸) N-ブロモスクレンイミド
Trp-X, Tyr-X およびHis-X	3M NH ₄ OH, pH 9.0, 45°C, 2~4時間
Asn-Gly	pH 2.5, 37°C, 4日
Asp-Pro	pH 2.0, 108°C, 2時間
X-Asp-Y	N-O転移
X-ThrおよびX-Ser	NTCB (2-ニトロ-5-チオシアノ安息香酸), pH 8
X-Cys	DMAF-CN (1-シアノ-4-ジメチルアミノピリジウム塩), pH 3.5



臭化シアン分解の反応機構²⁾



トリプトファン結合の化学的切断の機序²⁾

②酵素的切断法

表 5-5 エンドペプチダーゼの特異性

酵素	酵素源	特異性	注
		$\begin{array}{c} R_1 \quad O \quad R_2 \quad O \\ \quad \quad \quad \\ -NH-CH-C-NH-CH-C- \\ \quad \\ \text{ペプチド結合の切断位置} \end{array}$	
トリプシン	ウシ膵臓	$R_1 =$ 正電荷をもつ残基: Arg, Lys; $R_2 =$ Pro	特異性は厳密
キモトリプシン	ウシ膵臓	$R_1 =$ 大きな疎水性残基: Phe, Trp, Tyr; $R_2 =$ Pro	つぎの残基のところも切る が速い $R_1 =$ Asn, His, Met, Leu
エラスターゼ	ウシ膵臓	$R_1 =$ 小さな中性残基: Ala, Gly, Ser, Val; $R_2 =$ Pro	
サーモリジン	<i>Bacillus thermoproteolyticus</i>	$R_1 =$ Ile, Met, Phe, Trp, Tyr, Val; $R_2 =$ Pro	$R_1 =$ Ala, Asp, His, Thr にも作用することあり 耐熱性
ペプシン	ウシ胃粘膜	$R_1 =$ Leu, Phe, Trp, Tyr; $R_2 =$ Pro	特異性は低く、何でも切る 最適 pH -2
エンドペプチダーゼ V8	<i>Staphylococcus aureus</i>	$R_1 =$ Glu	

オーバーラップ法

複数の切断方法から得られた配列情報を重ね合わせ、一次構造を決定する。

ANLKSLMVG DKAPEVVMV IEVPRGSGNK

トリプシン → → → → →

臭化シアン → → → → →

一次構造の例 (Swiss-plot database, [Q1JU86](http://au.expasy.org/uniprot/Q1JU86) (Sato, T. et al), <http://au.expasy.org/uniprot/Q1JU86>)

MSLVGKKVQPFRAQAYHNGEFIEVTEQDFMGKWSIVCFYPADFTFVCPTLEDLQDHYAT
FKELGVEVYSVSTDTHFTKAWHDTSPAISKIEYVMIGDPSHQLSRMFDVLDEEQGLAQR
GTFIIDPDGVIQAVEINADGIGRNASTLIDKIKAAQYVRNHPGEVCPAKWKEGAETLKPN
LDLVGKI

一次構造の相同性解析の例

Geobacillus属および Anoxybacillus属細菌由来UKのアミノ酸配列比較と推定される機能部位

```
BctUK MGVKPVVIGVAGSGSGKT SVARAIYDHF GDRS ILVLEQDFYYKDQSHLPFEERLKTNYD 60
BclUK MGVKPVVIGVAGSGSGKT SVARAIYDHF GDRS ILVLEQDFYYKDQSHLPFEERLKTNYD 60
BcvUK MGVKPVVIGVAGSGSGKT SVARAIYDHF GDRS ILVLEQDFYYKDQSHLPFEERLKTNYD 60
Gka2UK MGVKPVVIGVAGSGSGKT SVARAIYDHF GDRS ILVLEQDFYYKDQSHLPFEERLKTNYD 60
GzaUK MGVKPVVIGVAGSGSGKT SVARAIYDHF GDRS ILVLEQDFYYKDQSHLPFEERLKTNYD 60
GtcUK MGVKPVVIGVAGSGSGKT SVARAIYDHF GDRS ILVLEQDFYYKDQSHLPFEERLKTNYD 60
BstUK MGVKPVVIGVAGSGSGKT SVARAIYDHF GDRS ILVLEQDFYYKDQSHLPFEERLKTNYD 60
AfiUK MGVKPVVIGVAGSGSGKT TVTKAIYEHF QGHS ILVLEQDFYYKDQSHLPFEERLKTNYD 60
* ****
HPLAFNDLLIEHILKLLRYEPI DKPVYDYTLHTRSSDVIRVEPKDVI IVEGILVLEDER 120
BctUK HPLAFNDLLIEHILKLLRYEPI DKPVYDYTLHTRSSDVIRVEPKDVI IVEGILVLEDER 120
BclUK HPLAFNDLLIEHILKLLRYEPI DKPVYDYTLHTRSSDVIRVEPKDVI IVEGILVLEDER 120
BcvUK HPLAFNDLLIEHILKLLRYEPI DKPVYDYTLHTRSSDVIRVEPKDVI IVEGILVLEDER 120
Gka2UK HPLAFNDLLIEHILKLLRYEPI DKPVYDYTLHTRSSDVIRVEPKDVI IVEGILVLEDER 120
GzaUK HPLAFNDLLIEHILKLLRYEPI DKPVYDYTLHTRSSDVIRVEPKDVI IVEGILVLEDER 120
GtcUK HPLAFNDLLIEHILKLLRYEPI DKPVYDYTLHTRSSDVIRVEPKDVI IVEGILVLEDER 120
BstUK HPLAFNDLLIEHILKLLRYEPI DKPVYDYTLHTRSSDVIRVEPKDVI IVEGILVLEDER 120
AfiUK HPLAFNDLLIEHILKLLRYEPI DKPVYDYTLHTRSSDVIRVEPKDVI IVEGILVLEDER 120
*****
LRNLMDIKVYVDTDPDIRI IRLIRDIKERGRFTDSVIE QYLSVVRPMHNOFVEPTKRYA 180
BctUK LRNLMDIKVYVDTDPDIRI IRLIRDIKERGRFTDSVIE QYLSVVRPMHNOFVEPTKRYA 180
BclUK LRNLMDIKVYVDTDPDIRI IRLIRDIKERGRFTDSVIE QYLSVVRPMHNOFVEPTKRYA 180
BcvUK LRNLMDIKVYVDTDPDIRI IRLIRDIKERGRFTDSVIE QYLSVVRPMHNOFVEPTKRYA 180
Gka2UK LRNLMDIKVYVDTDPDIRI IRLIRDIKERGRFTDSVIE QYLSVVRPMHNOFVEPTKRYA 180
GzaUK LRNLMDIKVYVDTDPDIRI IRLIRDIKERGRFTDSVIE QYLSVVRPMHNOFVEPTKRYA 180
GtcUK LRNLMDIKVYVDTDPDIRI IRLIRDIKERGRFTDSVIE QYLSVVRPMHNOFVEPTKRYA 180
BstUK LRNLMDIKVYVDTDPDIRI IRLIRDIKERGRFTDSVIE QYLSVVRPMHNOFVEPTKRYA 180
AfiUK LRNLMDIKVYVDTDPDIRI IRLIRDIKERGRFTDSVIE QYLSVVRPMHNOFVEPTKRYA 180
*****
DVI IPEGGNNVAIDLMAKIRT VLEQKAVL 211
BctUK DVI IPEGGNNVAIDLMAKIRT VLEQKAVL 211
BclUK DVI IPEGGNNVAIDLMAKIRT VLEQKAVL 211
BcvUK DVI IPEGGNNVAIDLMAKIRT VLEQKAVL 211
Gka2UK DVI IPEGGNNVAIDLMAKIRT VLEQKAVL 211
GzaUK DVI IPEGGNNVAIDLMAKIRT VLEQKAVL 211
GtcUK DVI IPEGGNNVAIDLMAKIRT VLEQKAVL 211
BstUK DVI IPEGGNNVAIDLMAKIRT VLEQKAVL 211
AfiUK DVI IPEGGNNVAIDLMAKIRT VLEQKAVL 211
*****
DII IPEGGNNVAIDLMAKIRT VLEQKAVL 211
*****
```

Bct: *Bacillus caldopenax* (Geobacillus sp. NBRC15314), Bcl: *Bacillus caldolyticus* (Geobacillus sp. NBRC15313), Bcv: *Bacillus caldovelox* (Geobacillus sp. NBRC15315), Gka2: *Geobacillus kaustophilus* NBRC102445, Gza: *Geobacillus zailiae* NBRC101842, Gtc: *Geobacillus thermocatenulatus* NBRC15316, Bst: *Geobacillus stearothermophilus* ATCC7953, Afi: *Anoxybacillus flavithermus* NBRC15317
●: 推定される活性部位*, ▲: Gtc UKで構造安定性に関与するアミノ酸, ↓: Geobacillus UKで相連の見られる残基 * Tomoike, F. et al. (2011) Biochemistry, 50, 4597-4607

相同な部位は、共通の機能に関与している場合が多い。
似たような機能を持つタンパク質は、アミノ酸配列や立体構造が類似している。



一次構造は、タンパク質の機能を類推する手がかりとなる
下記のデータベースで、相同なタンパク質の検索が可能

蛋白質関連のデータベース

[DDBJ](#) (遺伝子の塩基配列データベース)

[SRSWWW at ExPASy](#) (タンパク質一次構造データベース)

[NCBI Blast](#) (相同性検索)

[FASTA WWW System](#) (相同性検索)

[NCBI HomePage](#) (生命系データベース検索)

[IDEAS](#) (DNA・タンパクデータベース集)

[PDBj Japanese Home](#)

Protein data bank: タンパク質の三次元立体構造データベース)

2-8 タンパク質の二次構造 (p.84-)

主鎖の官能基(ペプチド結合)同士の相互作用により形成される立体構造。

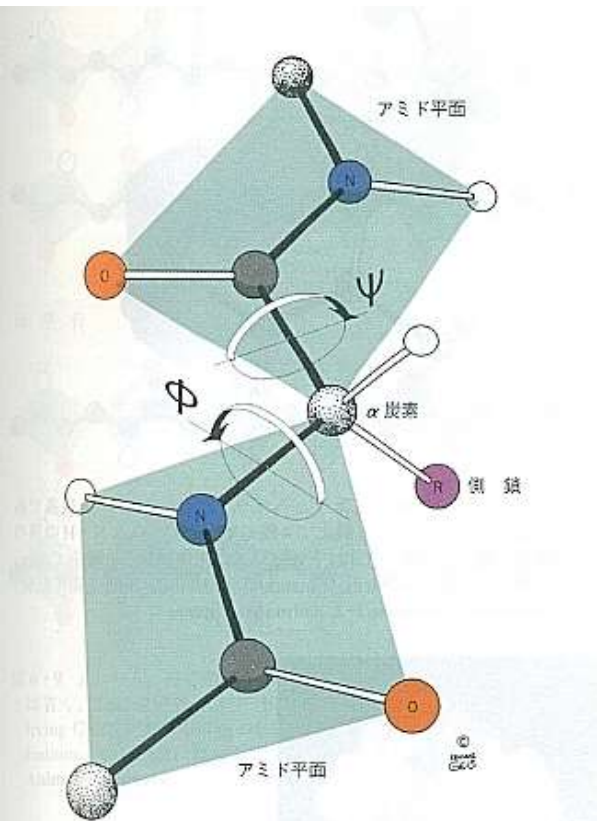
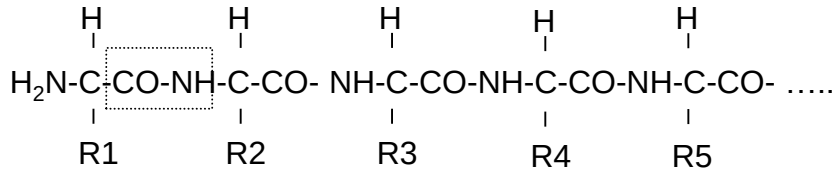
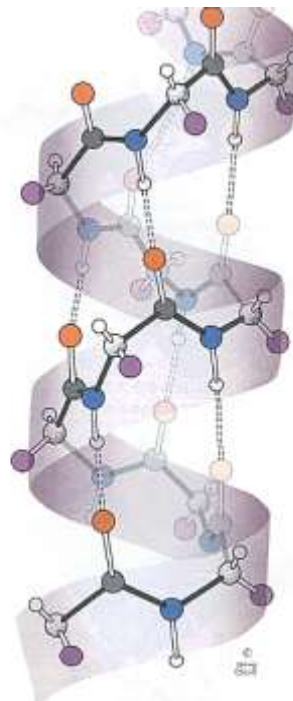


図6・4 ポリペプチド主鎖の二面角 二つのペプチド平面を示す。自由に回転できるのは $\text{C}_\alpha-\text{N}$ 結合まわり(ϕ)と $\text{C}_\alpha-\text{C}$ 結合まわり(ψ)だけ。 ϕ と ψ は、図に示すコンホメーションのときが 180° 。 C_α 原子から見て時計方向に回るときに大きくなるとするのが慣習である【イラストはIrving Geis, 画像はIrving Geis Collection/Howard Hughes Medical Institute. © HHMI. 許可を得て転載】



α -ヘリックス

n番目の残基の $\text{C}=\text{O}$ が(n+4)番目の残基の NH と水素結合を作る。その結果、らせんを巻いた構造をとる。

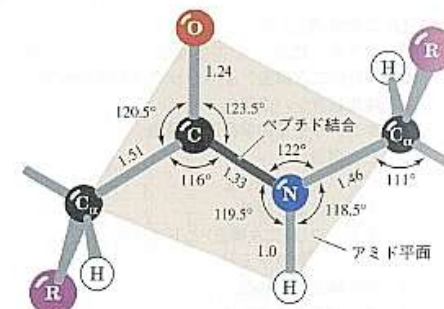
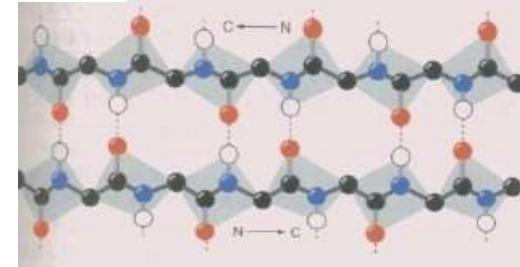


図6・2 トランス形のペプチド結合 X線結晶構造から求めた結合の長さ(Å)と角度 [R.E. Marsh, J. Donohue, *Adv. Protein Chem.* 22, 249(1967)] Kinemage Exercise 3-1

(a)逆平行



(b)平行

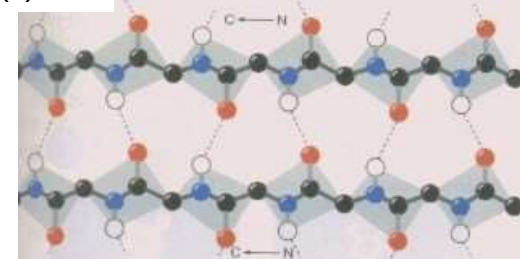
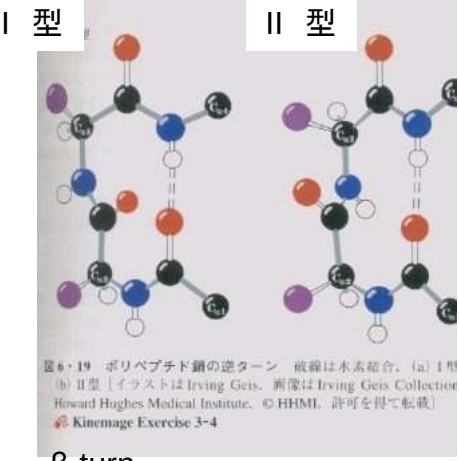


図6・9 β -シート 破線はポリペプチド鎖間の水素結合を示す。側鎖は青く、(a) 逆平行 β -シート、(b) 平行 β -シート【イラストはIrving Geis, 画像はIrving Geis Collection/Howard Hughes Medical Institute. © HHMI. 許可を得て転載】 Kinemage Exercise 3-3, Animated Figures

β -シート

ポリペプチド鎖の遠く離れた場所にある $\text{C}=\text{O}$ と NH が水素結合を作る。その結果、ひだ状の構造をとる。平行型と逆平行型がある。



β-turn

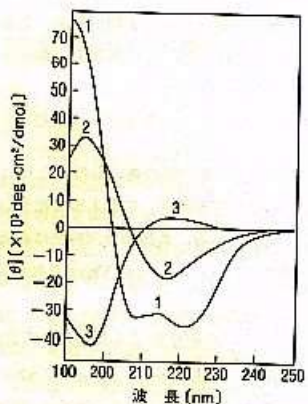
n番目の残基のC=Oと,n+3番目の残基のNHが水素結合する。



不規則構造(Random coil)
特に決まった二次構造を形成しない。

二次構造の解析

円偏光二色性(CD)スペクトルや赤外吸収(IR)スペクトルが使われる。



α-helix :208nm,222nmに負の極大
β-sheet 216nm付近に負の極大
Random coil: 190-200nm付近に負の極大

図 9・1 ポリ-L-リシンのαヘリックス(1), βシート(2), 不規則構造(3)のCDスペクトル³⁾

←CDスペクトルの例

表 9・1 ポリペプチドのアミド I, II 赤外吸収帯の振動数 (cm⁻¹) と二次構造¹⁾

基本構造	振動モード	アミド I	アミド II
不規則コイル ¹⁾		1655 (s) ¹²⁾	1535 (s)
αヘリックス ¹²⁾	$\nu_N(\theta)^{14)}$ $\nu_1(\theta)$	1630 (s) 1602 (m)	1516 (w) 1546 (s)
平行βシート ¹⁴⁾	$\nu_N(0,0)$ $\nu_1(s,0)$	1645 (w) 1630 (s)	1530 (s) 1550 (m)
逆平行βシート ¹⁵⁾	$\nu_N(0,\pi)$ $\nu_1(s,0)$ $\nu_1(s,\pi)$	1605 (w) 1632 (s) 1658 ¹⁷⁾	1530 (s) 1540 ¹⁷⁾ 1550 (w)
ナイロン66		1640	1540

1) ポリモリン, 12 振動内は振動強度で, s: 強, m: 中, w: 弱. 13 ポリ(L-グルタミン酸ベンジル). 14 ν_N, ν_1 は電荷が平行, 垂直を意味する. 括弧内はヘリックスの捻角の位置を示す. ヘリックスの捻角が n 度のペプチドが m 回軸のまわりに回転するものであるとき, $\theta = 2\pi m/n$ で与えられる. 15 β-ナタラン. 16 ポリグルタミン I. 17 計算値.
a) T. Miyazawa, "Polypeptide acid, Polypeptides and Proteins", ed. by M. Stahmann, p.201, University of Wisconsin Press, Madison (1962).

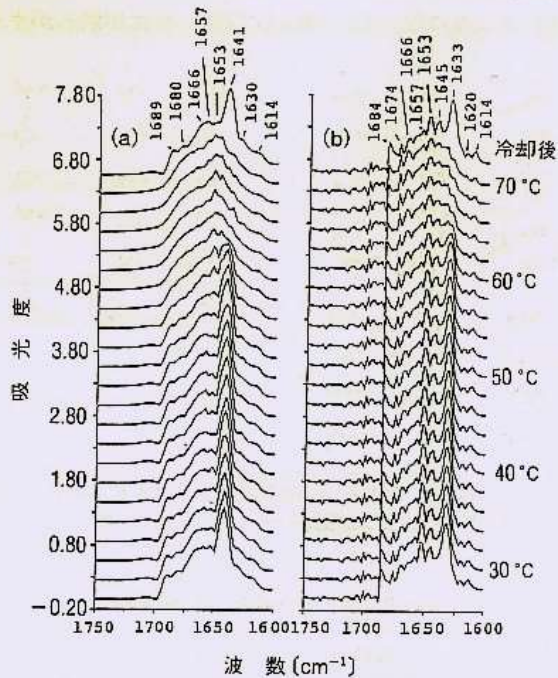


図 3・9 ウシ膵臓リボヌクレアーゼ H₂O 溶液 (a) と D₂O 溶液 (b) の 1750~1600 cm⁻¹ 領域の赤外吸収スペクトル¹⁾

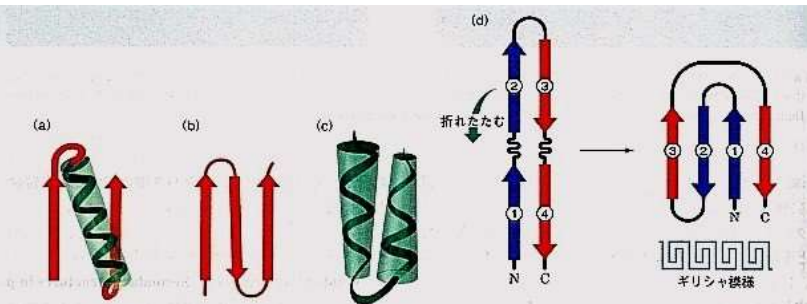
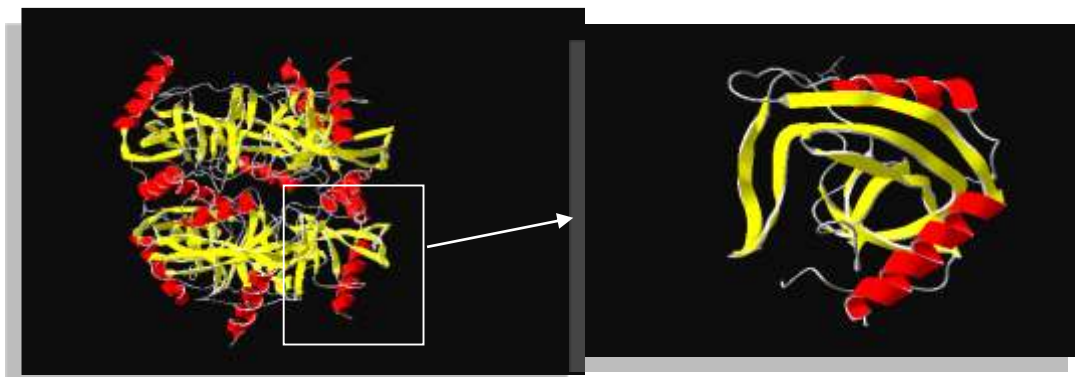


図 6・29 超二次構造の模式図 (a) βαβモチーフ, (b) βヘアピン, (c) ααモチーフ, (d) ギリシャ模様モチーフ, βヘアピンからできる。

IRスペクトルの例

2-9 三次構造(p.94-)

主鎖および側鎖の官能基同士の相互作用により形成される立体構造。



αヘリックスはリボンで、βシートは太い矢印で表す

Protein data bank (PDB) code 2PRD

<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>

蛋白質の三次元立体構造決定法

X線結晶構造解析やNMRが用いられる。



蛋白質の結晶



X線回折像

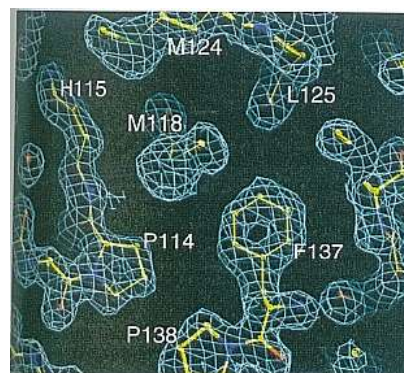


図4-23 タンパクの分解能1.5Åの電子密度図(三次元像の断面)
ある電子密度の三次元像(青)に対応するポリペプチドの骨格工モデル(C: 黄, N: 青, O: 赤)を重ねて描く。水分子は赤い球で表示
[Xinbia Ji, NCI-Frederick Cancer Research and Development Center, Frederick, Maryland の好意による]

電子密度マップ

立体構造を形成する相互作用

①共有結合

ペプチド結合のほか、Cys同士のジスルフィド結合もある。

②静電的相互作用、イオン結合(塩橋)

正電荷と負電荷、電子の分極による相互作用

③疎水性相互作用

非極性側鎖同士の相互作用

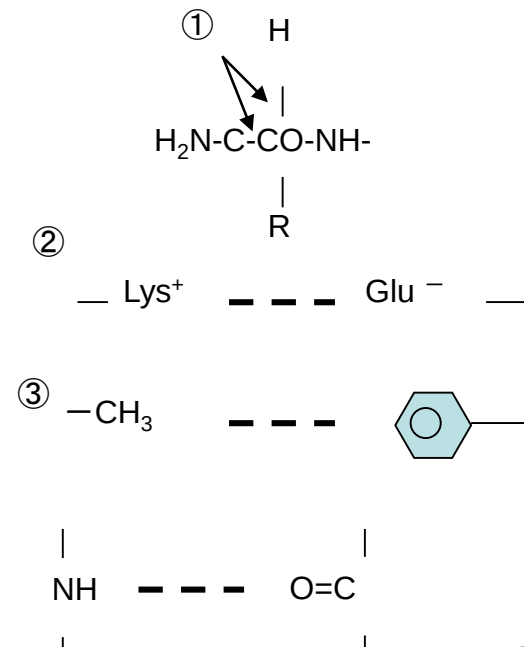
④ファンデルワールス力(分子間力)

原子同士の引力による相互作用

⑤水素結合

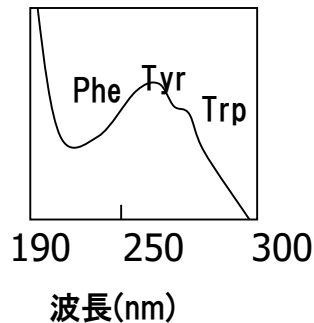
極性結合により分極した原子と同様の水素原子の間に形成される結合

結合の強さは①>③>②>⑤>④

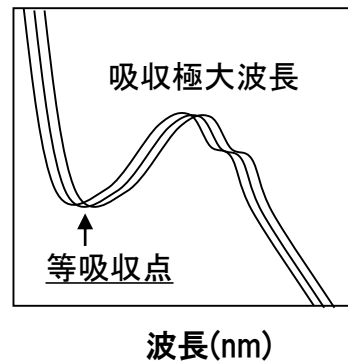


吸収スペクトル

吸光度
または ϵ

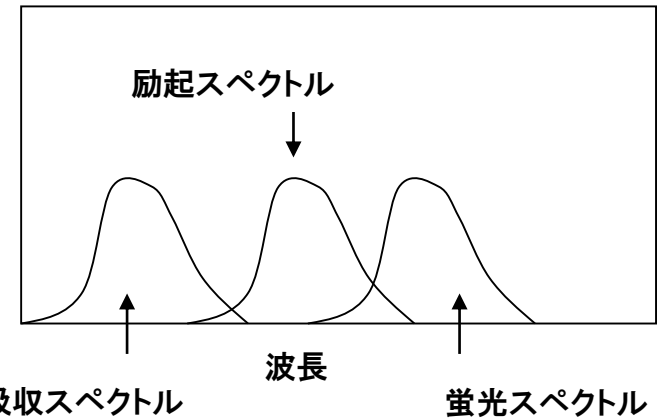


吸光度
または ϵ



濃色効果

淡色効果



紫外部

遠紫外部(190~240nm)
結合、官能基(直鎖)の吸収に由来

C=O, N-H. 205~230nm

近紫外部(240~320nm)
官能基(芳香環)の吸収に由来

Tyr 275~285nm

Trp 280~290nm

Phe 240~260nm

His 240~250nm

吸収弱い

可視部 (300~800nm)

発色団(補欠分子族)

補酵素

金属

錯体など

ヘム (405nm)

ピリドキサルリン酸 (320, 388nm)

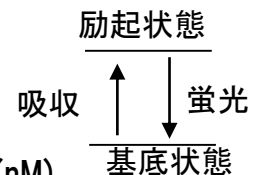
蛍光スペクトル

タンパク分子内の蛍光基→構造変化を知るための目印(プローブ)として利用

基底状態から励起一重項状態へ → 吸収

励起一重項から基底状態へ → 蛍光

タンパク質の立体構造変化を知る手段→吸収より感度がよい(nM)



蛍光スペクトルの種類

蛍光励起スペクトル→検出波長固定、励起波長のスペクトル

蛍光発光スペクトル→励起波長固定、検出波長のスペクトル

内在性蛍光プローブ

芳香族側鎖を持つアミノ酸→Trp, Tyrなどを利用

蛍光色素を導入

タンパク質の疎水基と結合,特定の官能基と結合など

励起スペクトル: 蛍光基のエネルギー変化

蛍光スペクトル: 蛍光基の相互作用

2-10 四次構造

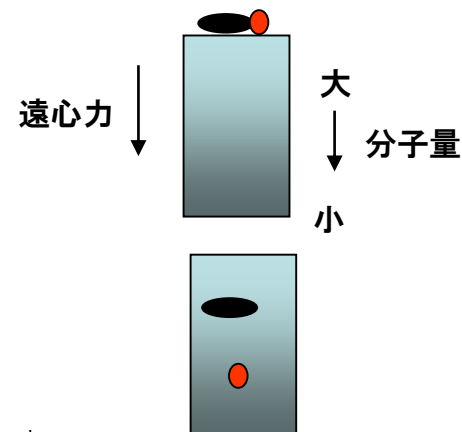
サブユニット構造(四次構造を形成する一本のポリペプチドをサブユニットという)ともいい、そのタンパク質がどのようなサブユニット構成から成り立っているかを示したもの。非共有結合で形成されている場合が多い。二つ以上のサブユニットからなるタンパク質をオリゴマーという。オリゴマーを構成する同一の構造単位を特にプロトマーという。

四次構造を持つ多くのタンパク質は、協同性(あるリガンドの結合により、他の結合部位のリガンド結合に影響を与える)を持つ。

四次構造解析法

- ・ゲルろ過法
- ・超遠心法
- ・電気泳動法
- ・質量分析法(TOF-MSなど)

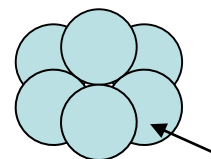
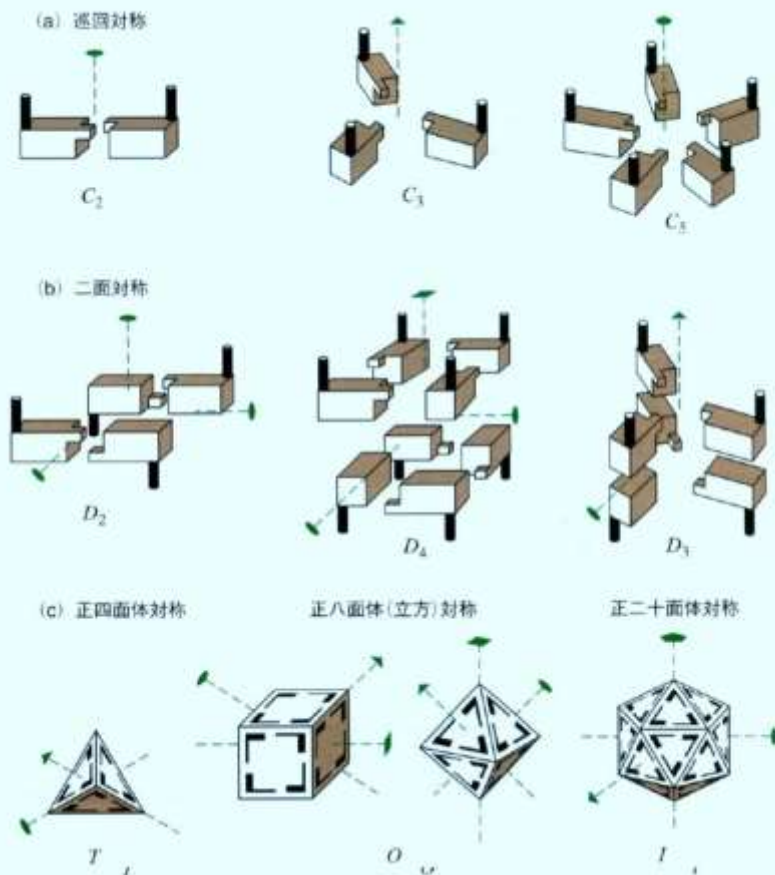
超遠心法



ある溶媒中(スクロースなどで密度勾配を形成したもの)で数万g以上の遠心力を与える

回転中心から分子量に依存して(沈降)移動する

図6.34 オリゴマータンパク質の対称性
(オリゴマータンパク質は回転対称である。)



六量体

サブユニット
(プロトマー)

同一の一次構造を持つサブユニット同士の場合はホモXX量体、異なる一次構造を持つサブユニット同士からなる場合はヘテロXX量体

四次構造は、
・サブユニット組成
・サブユニット(プロトマー)数
で表すことが多い。
(例)ヘモグロビン
組成: $\alpha_2\beta_2$
数: ヘテロ四量体

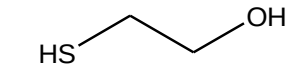
2-11 タンパク質の変性・再生

タンパク質は、極端な温度変化、pH変化、変性剤などにより、その立体構造を失う(変性、アンフォールディング)。変性状態になると、多くのタンパク質は機能を失う。

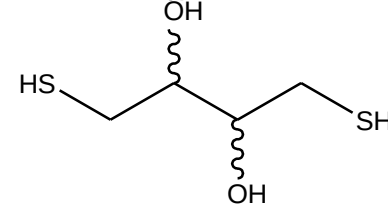
一方で、タンパク質の中には、これら変性因子を取り除くことで、元の立体構造(Native状態)に戻るものもある(再生、リフォールディング)。

タンパク質の立体構造への折りたたみをフォールディングという。タンパク質は低エネルギー、低エントロピーの状態に折りたたまれる。(図6.41)

タンパク質の還元剤(ジスルフィド結合の切断)

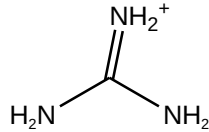


2-mercaptoethanol
(2-ME)

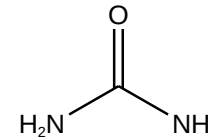


Dithiothreitol (DTT)

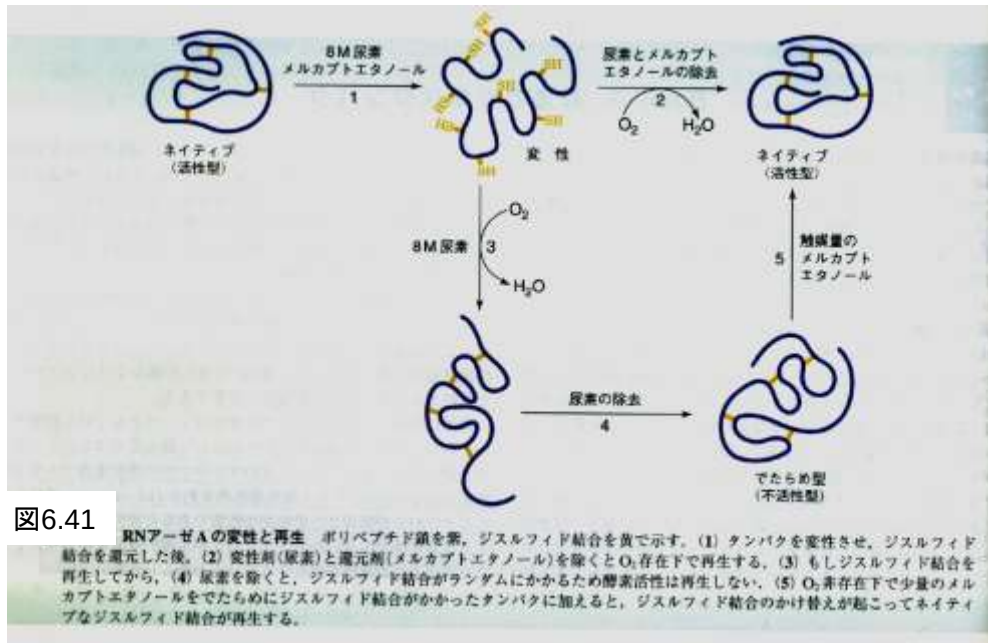
タンパク質の変性剤



Guanidinium ion
(グアニジン塩酸塩
(GdnHCl)がよく使われる



Urea



分子シャペロン

タンパク質のNative構造へのフォールディングを促進するタンパク質。シャペロンはさらにタンパク質複合体(シャペロニン)を形成して作用する。多くはATPase活性を持つ。

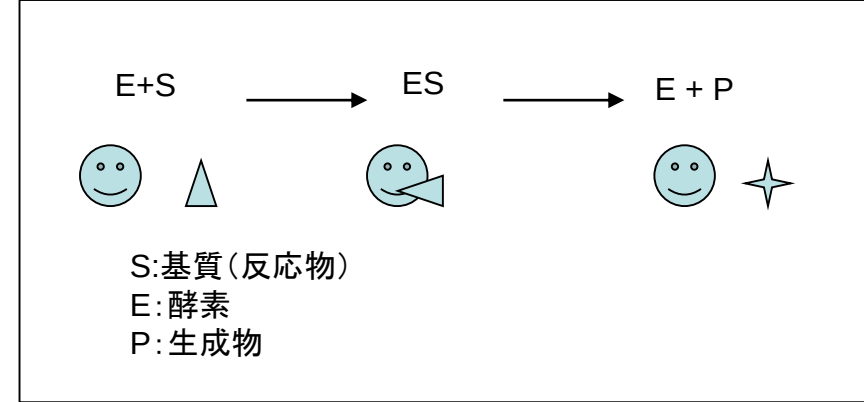
Heat shock Protein (Hsp)
Hsp70+Hsp40: 原核・真核生物

GroEL/ES(GroEL14量体+GroES7量体):
大腸菌など

3. 酵素

3.1 酵素の一般的性質

1. 反応が早い
2. 基質特異性が高い
3. 反応に対して、最適のpH、温度がある
4. 無機触媒と比べ、2. 3の性質が異なる。
5. 酵素の種類によっては、調節因子(金属、補酵素など)を必要とする。



・酵素の分類 (各酵素には分類番号(EC:Enzyme comission)が設けられている。ECは4つの数字(大分類、中分類、小分類、小分類)で、下記の①～⑥は大分類を表わす。

酵素は、その触媒反応の形式により、次の6つに分類される。

- ①酸化還元酵素 (Oxidoreductase) 酸化還元反応を触媒する。
(例)デヒドロゲナーゼ、シトクロム、カタラーゼなど
- ②転移酵素 (Transferase) 原子団転移反応を触媒する。
(例)アシル転移酵素、キナーゼ、アミノトランスフェラーゼなど
- ③加水分解酵素 (Hydrolase) 加水分解反応を触媒する。
(例)プロテアーゼ、リパーゼ、アミラーゼ、ヌクレアーゼなど
- ④脱離酵素 (Lyase) 付加および脱離反応を触媒する。
(例)炭酸ヒドラーターゼ、ピルビン酸デカルボキシラーゼなど
- ⑤異性化酵素 (Isomerase) 異性化反応を触媒する。
(例)ラセマーゼ、ホスホグリセリン酸ホスホムターゼ、グルコース6-リン酸イソメラーゼなど
- ⑥合成酵素 (Ligase, Synthetase) C-C, C-O, C-N結合などの生成反応を触媒する(ATPを要求)
(例)DNAリガーゼ、アミノアシルtRNA合成酵素、アシルCoAシンターゼ、カルボキシラーゼなど

酵素とは？

生体内のほとんどの化学変化は酵素(enzyme)というタンパク質によって触媒される。酵素と結びつき変化を受ける物質を基質(substrate)という。基質は酵素分子の表面の特定の部位(活性部位, active site)に結合し、酵素タンパク質が作り出す特殊な環境により、いったんエネルギーの高い状態の(ただし、触媒がない場合よりは低いエネルギーで済む)酵素-基質複合体を形成する。この状態から、基質は生成物(Product)へと化学形を変え、酵素から離れる。それと同時に、酵素は元の分子状態に戻り、再び次の基質と結合する。

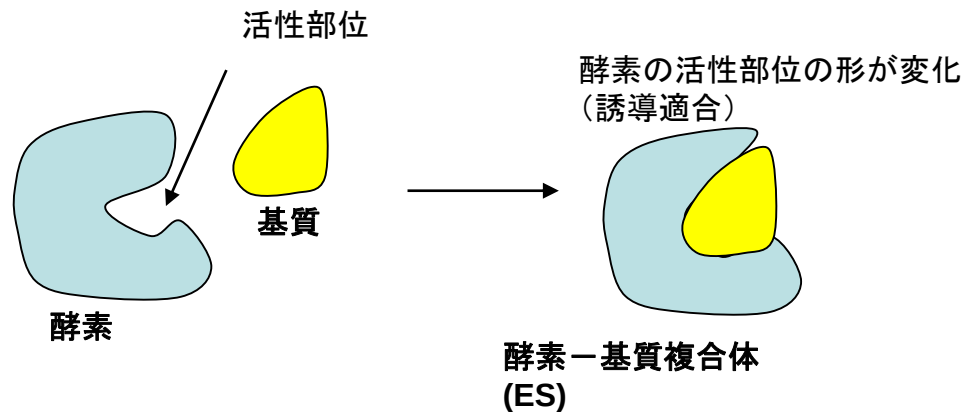


触媒反応は、酵素中の特定のアミノ酸によって起こる。

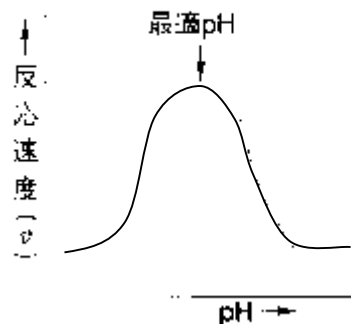
基質特異性(substrate specificity)

酵素は特定の反応だけを触媒する。また、特定の化合物または一群の化合物にしか作用しない。この性質を酵素の基質特異性という。酵素の表面には基質が結合する溝状のくぼみがある。基質はこのくぼみに結合し、変化を受ける。このような酵素の立体構造の領域を活性部位または活性中心という。一般に、活性部位の立体構造は、鍵と鍵穴の関係のように特定の基質とぴったり合うようになっている。従って、酵素は基質の立体構造を認識することができる分子といえる。

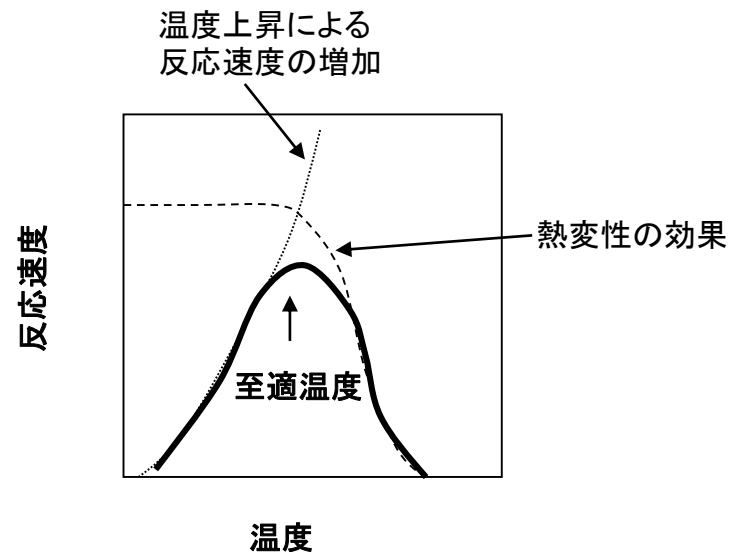
ある酵素では、特定の基質と結合する時に活性部位の立体構造が少し変化する。このように、基質によって立体構造が変化する現象を誘導適合(induced fit)という。



酵 素	最適 pH
唾液アミラーゼ	6.8
ペプシン	1.5
トリプシン	8.0
リパーゼ	8.0
カタラーゼ	7.0
アルギナーゼ	10.0



至適pH (optimum pH) 酵素が作用を発揮する最適のpHのこと。酵素の活性には種々のアミノ酸の解離性原子団が関与する。酵素活性がpHに依存するのは、それらの原子団の解離がpHによって変化するためである。



至適温度(optimum temperature) 酵素が作用を発揮する最適の温度のこと。一般に、反応速度は温度とともに上昇するが、酵素はタンパク質であるから高温では変性するため、活性が逆に低下する。

3.2 補因子と補酵素 (p.199)

補因子: 酵素が触媒反応をする際に必要な低分子物質。金属イオンなどが代表例。
Cu, Fe, Znなどは多く用いられ、酵素反応を促進する。逆にCd, Hgなどは阻害(酵素反応を妨害すること)を示す。

補酵素: 補因子の一種で有機分子。
酵素と結合して触媒反応を手助けする(共同基質)。例として、NAD, FAD, PLPなどがある。

アポ酵素

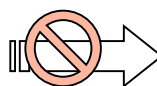


酵素

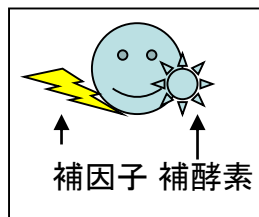
+



基質



ある種の酵素は、補因子や補酵素と結合して初めて触媒反応が出来る。

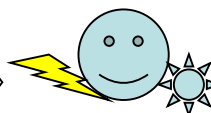
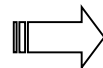


ホロ酵素

補因子 補酵素



基質



生成物(P)

【主な補酵素の名称】

NAD⁺: ニコチンアミド アデニン ジヌクレオチド(酸化型)

NADH: ニコチンアミド アデニン ジヌクレオチド(還元型)

FAD: フラビン アデニン ジヌクレオチド(酸化型)

FADH₂: フラビン アデニン ジヌクレオチド(還元型)

PLP: ピリドキサル 5'-リン酸

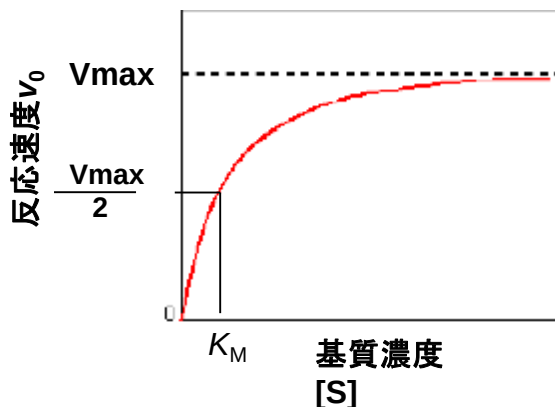
3.3 酵素反応速度と基質濃度の関係

酵素反応速度は基質濃度に従って右図のように上昇するが、酵素量が一定であれば、反応速度は、ある基質濃度で一定に達する。

V_{max} は最大反応速度で酵素が基質で飽和している状態である。 V_{max} の1/2の時の基質濃度をミカエリス定数(K_M)という。

* $[S] = K_M$ とすると、12・25式は

$v_0 = V_{max} / 2$ となる。



K_M は、酵素と基質の親和性の強さを表す。値が小さいほど、親和性が強い。

ミカエリス・メンテンの式 (p.226)

酵素の基質濃度と反応速度の関係を表したもの

$$v_0 = \frac{V_{max} [S]}{K_M + [S]} \quad (12 \cdot 25 \text{式})$$

K_M : ミカエリス定数

$[S]$: 基質濃度

v_0 : 酵素の反応初速度

V_{max} : 最大反応速度

また、酵素の触媒定数(回転数) k_{cat} は、次式で定義される。単純な反応では反応速度定数 k_2 に等しい。

$$k_{cat} = V_{max} / [E]_T \quad (12 \cdot 27 \text{式})$$

$[E]_T$: 全酵素濃度

酵素の触媒効率、 k_{cat} / K_M で表す。数値が大きいほど、触媒効率が良い。

3.4 酵素の触媒機構

酵素の触媒機構としては、下記の5つがある。
多くの酵素はこれらの機構の組み合わせで反応が進行する。

1. 酸塩基触媒

酸のプロトンが移動(酸触媒)、もしくは塩基のプロトンの引き抜き(塩基触媒)により、遷移状態の自由エネルギーを下げる。

2. 共有結合触媒(求核触媒)

触媒と基質の間に、一時的に共有結合が形成され、反応が促進される。

3. 金属イオン触媒

金属酵素において、金属が触媒を促す。

- ①酵素と基質の結合の補助
- ②金属イオンの酸化状態変化による酸化還元反応の促進
- ③負電荷の安定化、遮蔽

4. 近接効果と配向効果

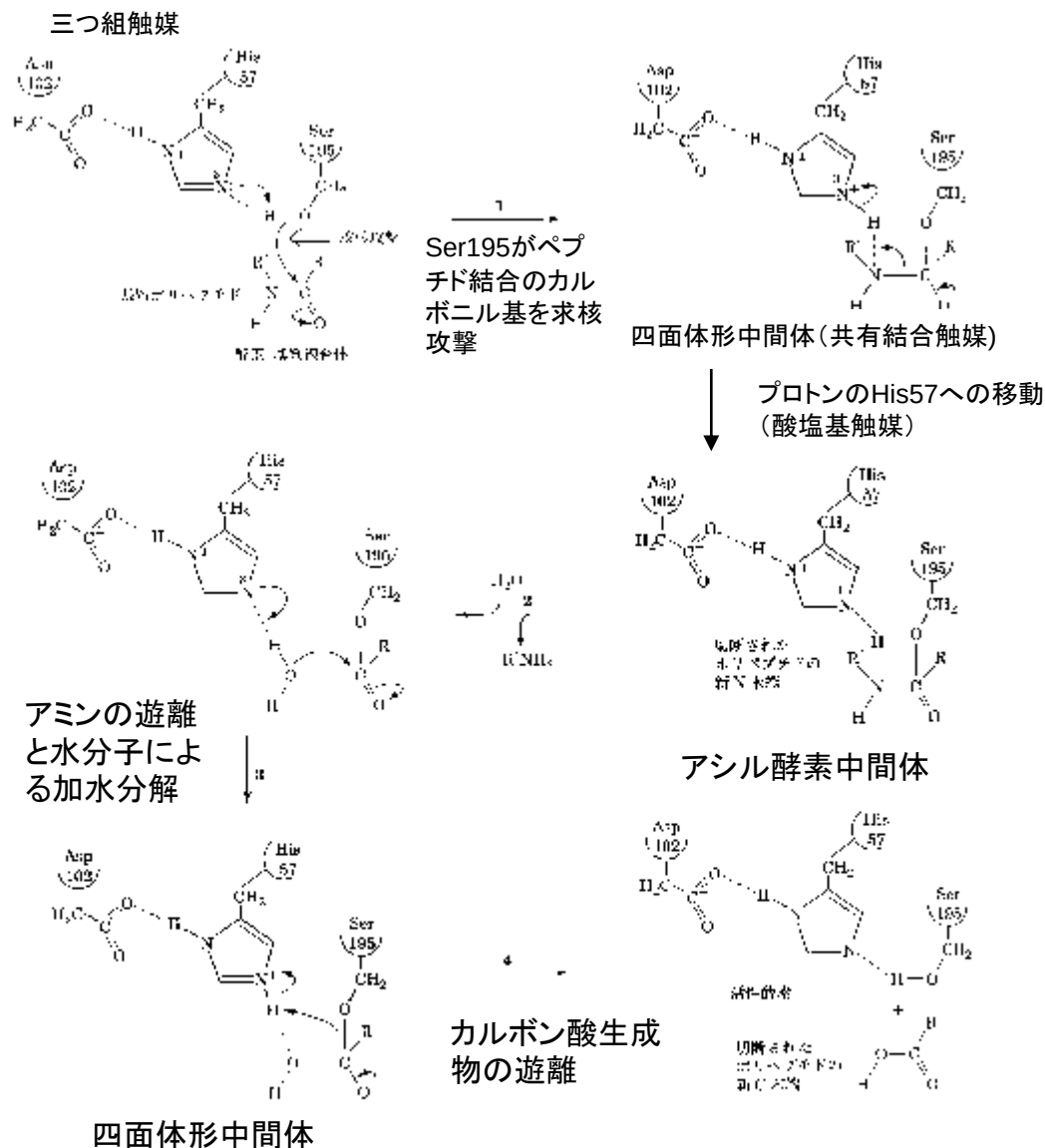
酵素は基質を近接・配向させ、反応を触媒する。

- ① 酵素は基質を触媒部位に近づけ、適切な向きに結合する。
- ② 荷電基は極性基質を結合部位に誘導する。
- ③ 酵素は基質や触媒基の回転やずれを止める。

5. 遷移狀態優先結合

酵素は基質・生成物より遷移状態に対し、より大きな親和性を持って結合する。

キモトリプシン(セリンプロテアーゼ)の触媒機構

[illegible]

3.5 酵素の阻害

酵素反応系にある物質(阻害剤)が加わることで、酵素活性(反応速度)が低下する。

阻害様式

(1) 不可逆的阻害

酵素と阻害剤が共有結合し、酵素活性が減少または消失(例)

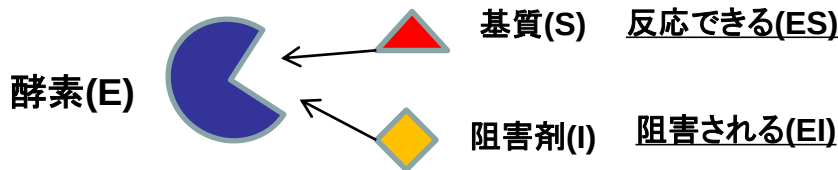
- ・モノヨード酢酸/N-エチルマレイミド→Cys残基と共有結合
- ・ジイソプロピルフルオロリン酸→Ser残基と共有結合

(2) 可逆的阻害

酵素と阻害剤の結合は可逆的(非共有結合)。阻害剤の結合様式により、以下の3種類がある。

(A) 競合阻害

酵素の活性部位に基質か阻害剤いずれか一方しか結合できない。



阻害剤の有無によるLineweaver-Burk plotの違い

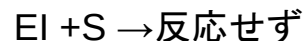
- ・最大酵素反応速度(V_{max})は変わらない。
- ・ K_m が増大する。



+

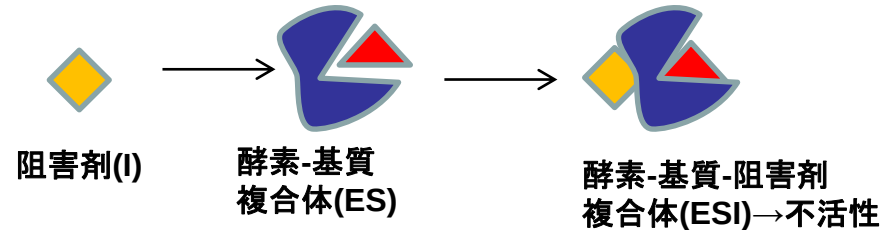
|

⇕



(B) 反競合阻害

阻害剤は、酵素-基質複合体にのみ結合し、遊離の酵素には結合しない。



阻害剤の有無によるLineweaver-Burk plotの違い

- ・ K_m と V_{max} が減少する。



+

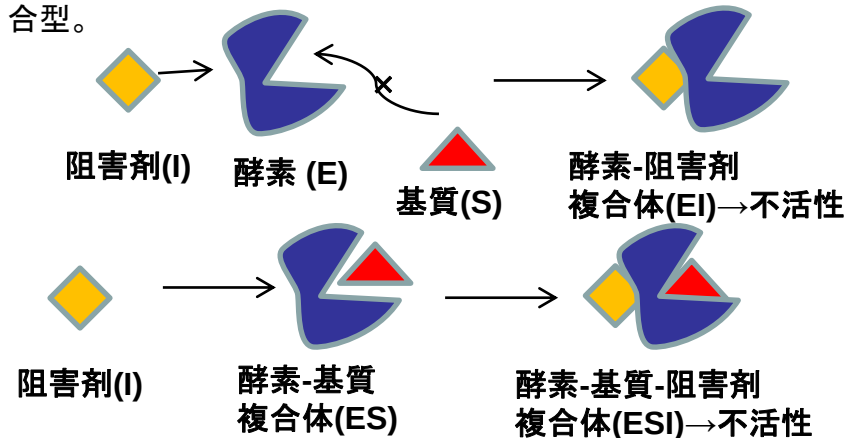
|

⇕



(C) 混合阻害

阻害剤は、酵素-基質複合体と遊離の酵素の両方に結合する。基質結合部位と阻害剤結合部位が異なる場合が多い。(A)と(B)の混合型。



阻害剤の有無によるLineweaver-Burk plotの違い

- ・最大酵素反応速度(V_{max})は減少。
- ・ K_m は増大または減少する。

3.6 アロステリック効果とフィードバック阻害

酵素活性の調節には、アロステリック効果やフィードバック阻害がある。

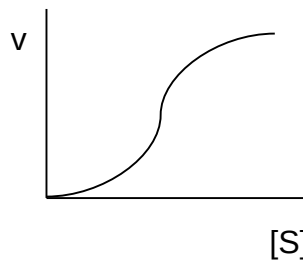
①アロステリック効果

複数のサブユニットから成る酵素では、酵素と基質の結合が1:1ではなく、あるサブユニットの活性部位に基質やエフェクター(調節因子)が結合することで、他のサブユニットの構造が変化し、次の基質分子が酵素の活性部位に結合できる。このように、サブユニット同士の相互作用(協同性)により立体構造が変化し、次々に酵素と基質が反応する現象を、アロステリック効果という。

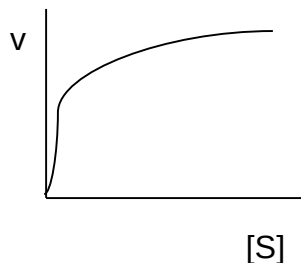
(A)正の協同性

酵素には二つ以上の基質結合部位を持つ(アロステリック酵素)。基質濃度[S]と反応速度vの関係はS字型(シグモイド)になる。

(A)



(B)



(B)を(A)に変化させる調節因子を、アロステリックエフェクターという。

②フィードバック阻害

代謝過程において、代謝の最終生成物により、代謝初期段階の酵素が阻害される現象。

(例) アスパラギン酸カルバモイルトランスフェラーゼ(ATCase)
ATCaseは下記の反応を触媒し、その後6段階を経てCTPを合成するピリミジン生合成系(ヌクレオチドの塩基)の一端を担っている。ATCaseでは、ATPが負のアロステリックエフェクターとして、CTPが正のアロステリックエフェクターとして作用している。また、ピリミジン生合成系最終生成物のCTPにより、フィードバック阻害を受け、生体内のヌクレオチド濃度により、ATCaseの反応は調節されている。

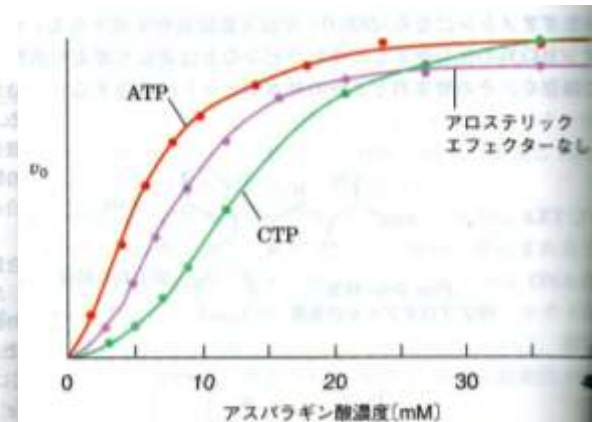
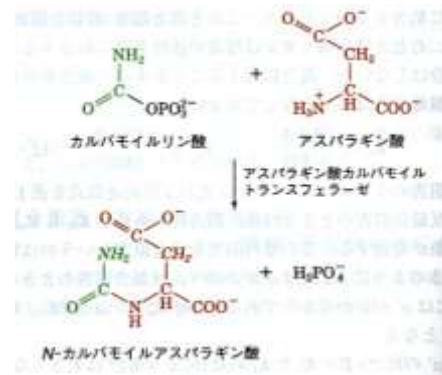


図 12・10 ATCase反応の v_0 とアスパラギン酸濃度 [S] の関係 アロステリックエフェクターの有無で反応速度をプロット。アロステリックエフェクターなし(紫)、0.4 mM CTP (阻害剤) 存在下(緑)、2.0 mM ATP (活性化剤) 存在下(赤) [E.R. Kantrowitz, S.C. Pastra-Landis, W.N. Lipscomb, *Trends Biochem. Sci.* 5, 125 (1980) による]  Animated Figures