

対掌体に対する酵素活性及び活性部位の比較に基づくホモキ
ラリティーの起原の検討

(課題番号 10680560)

平成10～11年度科学研究費補助金 (基盤研究(C)(2))研究成果報告書

平成12年3月

研究代表者 島田秋彦
(筑波大学応用生物化学系講師)

はしがき

ホモキラリティーの起原の問題はパスツールが光学活性体を発見して以来多くの科学者の興味を引きつけてきた。この問題はこれまで非生物的要因、すなわち物理・化学から検討されてきた。しかし、光学異性体を選択しているのは酵素であることは自明であるにもかかわらず、酵素反応機構に基づいて検討した例はない。この原因として考えられることは、L-アミノ酸とD-アミノ酸に対する活性を同一酵素上で比較検討できる反応系が見つからなかったからである。なぜなら、光学異性体に対する酵素の基質特異性は極めて厳格なので、アミノ酸のうちL体を選択されれば当然D体が排除されるわけでそのような反応系が見つからないのは当然といえは当然である。とはいえ、光学異性体選択の機構を解明するには L-アミノ酸とD-アミノ酸に対する活性を同一酵素上で比較検討出来る系の構築が必要不可欠なので、まず最初にそのような酵素反応系を見つけることが求められる。本研究では幸いにもトリプトファナーゼでそれを見つけることができた。トリプトファナーゼは、通常の条件ではD-トリプトファンに全く反応せずL-トリプトファンに対してだけ活性を示す立体特異性の厳格な酵素であるが、高濃度のリン酸水素2アンモニウム溶液中のトリプトファナーゼはD-トリプトファンに対して活性になる。この反応系の発見により対掌体の活性及び活性部位について比較検討することが可能となり、酵素における光学異性体の選択機構を解明する手段が得られた。この結果、その選択機構の解明が進むと思われるとともにパスツール以来の謎であったホモキラリティーの起原の問題に対して酵素側からの解答を出すことができると思われる。本研究では、D-トリプトファンに対する活性部位とL-トリプトファンに対する活性部位の相対的な位置関係を決定することを目指した。実験研究の結果、次のようなことが明らかとなった。

1. 反応は高濃度のリン酸水素2アンモニウム中で行うので、基質であるトリプトファンがラセミ化する可能性ある。そこで反応中のトリプトファンをクラウンパックで分割しCD検出器でチェックした。この結果、トリプトファンのラセミ化は無いということが分かった。
2. L-トリプトファン分解時の阻害剤としてピルビン酸カリウム、インドールピルビン酸が用いられそれぞれそれらの阻害型が調べられた。その結果、前者は競争型、後者はリン酸水素2アンモニウム濃度とともに競争型から非競争型に変化した。
3. 線照射されたトリプトファナーゼにたいしてD-トリプトファンはリン酸水素2アンモニウムの有無に関係なく競争型阻害を示すだけであった。
4. 以上のデータに基づいてD体とL体に対する活性部位の関係を明らかにすることができた。すなわち、リン酸水素2アンモニウムによるトリプトファナーゼの構造変化でD

-トリプトファンへのヘテロサイクリック部分の結合部位はL-トリプトファンのそれとは異なる位置で結合する。その位置はD-トリプトファンにとってトリプトファンナーゼの触媒部位とちょうどうまく接触できるような角度にあると考えられる。その結果、D-トリプトファンは活性になるのである。

5. このことからいままで酵素の立体選択性は厳格であると考えられてきたけれども、必ずしもそうとはいえず酵素周囲の環境の変化によってそれは変わりうるものだということがわかった。今後は、キラリティーの選択性に影響を与える酵素の構造変化とはどのようなものなのか定量的に調べることが重要であろう。

本研究成果は論文にまとめられ発表された。ここに、研究組織、研究経費、学会誌・口頭発表・出版物等を一覧にまとめたものを綴じると共に発表論文も併せて綴じた。

研究組織

研究代表者： 島田秋彦（筑波大学応用生物化学系講師）
（研究協力者： 中村以正, 赤星光彦）

研究経費

平成10年度	2500千円
平成11年度	800千円
計	3300千円

研究発表

(1) 学会誌等

Shimada A., Shishido H., Kogure H., H., Nakamura I., Fujii N. and Akaboshi M., Evolutionary significance of active site for D-tryptophan on tryptophanase, *Viva Origino*, **26**, 219-228 (1998).

Shimada A., Koda T. and Nakamura I., Concanavalin A-agarose gel system capable of accumulating extracellular glucoamylase produced by immobilized *Saccharomycopsis*

fibuligera, *J. Ferment. Bioeng.*, **85**, 542-545 (1998).

Shimada A., Nakamura I. and Akaboshi M. Preliminary investigation about by-products from γ -irradiated amino acids, *KURRI Progress Report 1998*, 167 (1998).

Shimada A., Akaboshi M. and Nakamura I., Active site of tryptophanase for D-tryptophan degradation, *Amino Acids*, **17**, 97 (1999).

Shimada A. Wobby stereospecificity of tryptophanase in highly concentrated salt solution and its significance for chiral homogeneity, *Origins of Life and Evolution of the Biosphere*, in press.

Shimada A., Shinohara K., Moriguchi K. and Nakamura I., Methyl α -D-mannopyranoside-responsive release of microencapsulated glucoamylase, *J. Biosci. Bioeng.*, **87**, 551-553 (1999).

(2) 口頭発表

島田秋彦, 幸田司, 中村以正, 菌体外分泌酵素グルコアミラーゼを濃縮するコンカナバリンA-アガロースゲルシステム, 日本生物工学会, 平成10年10月, 東広島

島田秋彦, 中村以正, トリプトファンナーゼによるD-トリプトファンの合成, 生命の起原と進化学会, 平成11年3月, 桐生

Shimada A., Stereospecificity of tryptophanase in highly concentrated salt solution, 12th International Conference on the origin of Life and 9th ISSOL Meeting, 平成11年7月, San Diego.

Shimada A., Akaboshi M. and Nakamura I., Active site of tryptophanase for D-tryptophan degradation, 6th International Congress on Amino Acids, 平成11年8月, Bonn.

島田秋彦, 中村以正, リン酸水素2アンモニウム溶液中におけるトリプトファンの合成, 生命の起

原と進化学会, 平成12年3月, 横浜

Shimada A. and Nakamura I., A mechanism of stereospecificity of enzyme reflecting processes of chiral homogeneity, The First Annual Astrobiology Science Conference, 平成12年3月, NASA Ames Research Center in California.

(3) 出版物

Shimada A., Shishido H., Kogure H., Nakamura I., Fujii N. and Akaboshi M., Tryptophanase-catalysed *D*-tryptophan degradation reaction and its significance for chiral homogeneity, Role of Radiation in the Origin and Evolution of Life, Kyoto, *In* Akaboshi, M. (ed.), Kyoto University Press, Kyoto, pp. 243-257 (1999).

以下の頁は著作権者の許諾を得ていないため、公表できません。

p. ~p.

p. ~p.

p. ~p.

p. ~p.

p. ~p.