

## トピックス

## ピリドキサル酵素と光 Pyridoxal Enzymes and Light

従来からピリドキサル酵素を扱う際には完全な遮光とまでは行かなくとも、不必要に光を当てることがないようにということが言われてきた。これは光を当てることによって補酵素ピリドキサル 5'-リン酸 (PLP) あるいは酵素タンパク質に不可逆的な変化が生じ、酵素が生理的な状態ではなくなるため、その酵素の機能解析に障害をきたすことが考えられるからである。

PLP の光による影響は 1950 年代から知られており、光照射によって PLP は 3 種類の化合物に変化することが示された<sup>1)</sup>。それらはピリジル (1)、ピリドイン (2)、そしてピリドキシン酸 (3) である (図 1)。最初に光反応によって生成するのは 2 であり、それが酸化を受けて 1 になる<sup>1)2)</sup>。

ピリドキサル酵素は既存・新規のアミノ酸やその誘導体の生産などで有用な酵素群であるため、その安定性の確保は重要な課題である。KTH Royal Institute of Technology の Berglund らのグループが見いだした *Silicobacter pomeroyi* のアミンアミノ基転移酵素 (SpATA)

は生理的には 4-アミノ酪酸とピルビン酸のアミノ基転移をつかさどっているが、1-フェニルエチルアミンとピルビン酸のアミノ基転移も良好に触媒することから、非常に基質特異性が広く、物質生産への応用が期待される<sup>3)</sup>。このことから、Berglund らのグループはさまざまな条件下での SpATA への光照射の影響について調べた<sup>4)</sup>。まず暗所 22°C、pH 9 で PLP を緩衝液に加えずに温置すると、活性低下の半減期は 100 mM CHES では 28 h、100 mM Tris では 23 h であった。類縁酵素である *Vibrio fluvialis*<sup>5)</sup> や *Chromobacterium violaceum*<sup>6)</sup> のアミンアミノ基転移酵素においても同様の失活が起こり、その解析の結果、この温置による失活は二量体酵素の単量体への解離によるものと考えられた。活性部位が二量体の界面にあること、また単量体への解離によって PLP のリン酸基を受け入れる構造が開き、PLP が外れるために失活が起こることが考えられた<sup>6)</sup>。このことは逆に PLP が二量体構造を維持することを意味する。確かに 10 mM の PLP の存在下、SpATA の活性の半減期は 720 h (CHES) および 140 h (Tris) に延長した。論文<sup>4)</sup>には書

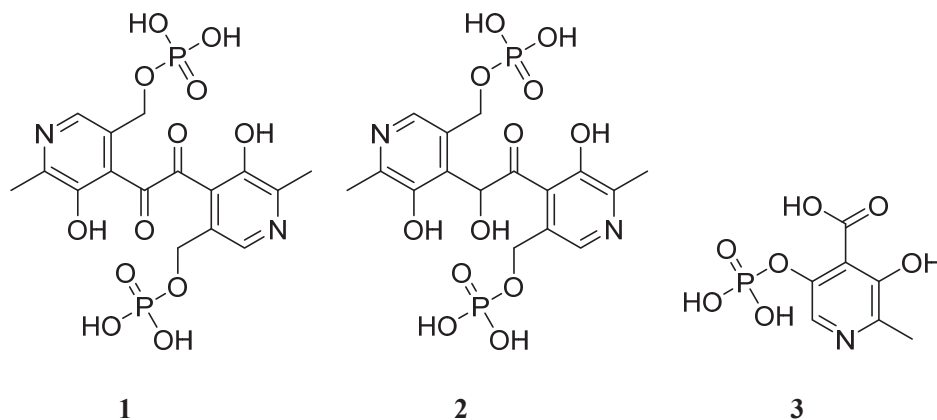


図 1 PLP への光照射によって生じる化合物

かれていないが、よく知られているように Tris は PLP とシッフ塩基を形成することから、Tris 緩衝液中では実質的な PLP の濃度が低下したために酵素の失活が CHES 緩衝液中に比べて早いと解釈することができる。確かに 100 mM Tris 緩衝液に 1 mM PLP が存在するときの吸収スペクトルは 410 nm のピークのみが観察され、遊離の PLP の吸収極大である 388 nm の箇所にはピークや肩が観察されなかった。このことは、100 mM Tris 緩衝液中では添加する PLP が 1 mM までは PLP を添加しても失活の半減期の延長が観察されず、10 mM の添加によって初めて半減期の延長が現れ始めたことと符合する。

引き続き、光照射の実験が行われた<sup>4)</sup>。1000 lx の日光に曝露することによる経時的な失活を調べたところ、PLP 非存在下では CHES、Tris いずれの緩衝液中でも PLP を加えない場合、活性の半減期が 10–12 h と失活速度が 2 倍になった。ところが、添加する PLP の濃度を増加させていくと、活性の半減期が延長し、特に 10 mM PLP を含む Tris 緩衝液中では 138 h と顕著に延長した。

この実験系では光照射によって緩衝液中に存在する PLP が図 1 のいずれかの化合物になると考えられる。そこで光照射による吸収スペクトルの継時変化を観察したところ、100 mM CHES 緩衝液中の 1 mM PLP は経時的に 388 nm の吸収が減少し、それに伴って 300 nm に新たな吸収帯が出現した。これは **1** あるいは **2** の構造のものであり、文献値<sup>1)</sup>の 288 nm よりも長波長にシフトしているのは pH が異なるためと考えられた。一方、100 mM Tris 緩衝液中の 1 mM PLP では吸収スペクトルの変化が観察されなかった。これは PLP が Tris とシッフ塩基を形成することによって光による反応を受けなくなることを示している。Tris 緩衝液中では PLP が光の影響から保護され、しかも 10 mM の高濃度の PLP 存在下ではわずかに存在する遊離の PLP が酵素の活性を維持するように働くことが、100 mM Tris 緩衝液、10 mM PLP の条件で光による失活が顕著に抑えられる理由と考えられる。

光照射による酵素の失活の原因として第一に、PLP の濃度が減少し、それによって酵素の単量体化が促進される可能性が考えられる。ところが、失活した酵素に PLP を添加しても活性の回復はほとんど起こらなかった<sup>4)</sup>。これは単量化に伴って酵素タンパク質の構造が不可逆的に変化したためと解釈することもできるが、PLP を含む緩衝液に 24 h 光照射を行って完全に PLP が消失したものを酵素溶液に加えると経時的に酵素の失活が起こった<sup>4)</sup>ことから、光照射の結果生成し

た **1** や **2** がカルボニル基の部分で酵素の活性部位に共有結合し、それによって酵素が失活するためと考えられる。

各種ピリドキサル酵素の活性に対する光の影響は少し前に Rother らのグループによっても調べられている<sup>8)</sup>。興味深いことに、*Bacillus megaterium* の ATA は SpATA と同様に光照射による失活が起こるが、*Vibrio fluvialis* の ATA は光照射による失活が起こらず、また抗糖尿病薬 sitagliptin 生産のために改変された *Arthrobacter sp.* の ATA (AsATAmut11) では逆に光照射によって 50% 程度の活性の上昇が認められた。また、*Selenomonas ruminantium* および大腸菌のリシン脱炭酸酵素はいずれも光照射によって顕著に失活が起こった。これらの理由については論文<sup>8)</sup>では考察されていないが、リシン脱炭酸酵素の失活については以下のような議論が可能であろう。*Selenomonas* のリシン脱炭酸酵素はピリドキサル酵素のフォルドタイプ III、大腸菌の酵素はフォルドタイプ I と全体構造は異なるものの、いずれも PLP のピリジン環とスタッキングする位置にヒスチジン残基のイミダゾール環が存在している (*Selenomonas* 酵素は PDB 5GJM、大腸菌酵素は PLP を結合した構造がないが、類縁の *Pseudomonas aeruginosa* 酵素の構造 PDB 6Q6I を参照)。PLP はヒスチジン残基やシステイン残基の光酸化を仲介している<sup>7)</sup>ことから、このヒスチジン残基がこれらのリシン脱炭酸酵素が光による失活を受けやすいことの原因となっている可能性がある。このように光による失活はそれぞれのピリドキサル酵素によって起こりやすさや機構が異なっており、各酵素の構造的、機能的特徴に依存していると言える。

最後に、PLP が光によって図 1 に示す化合物を生成する理由について考察したい。**2** は 2 分子の PLP がベンゾイン縮合したものであり、**1** はそれが酸化されたものである。この酸化は、ピリジン環に挟まれた  $-(C=O)-CHOH-$  の CH が容易に脱プロトン化を受けるため、生じたカルボアニオンが  $O_2$  と反応することによって容易に進行すると思われる。ベンゾイン縮合は通常は芳香族アルデヒドと HCN とのシアノヒドリンの形成を通じて行われる<sup>9)</sup>が、HCN やチアミンのような触媒がなくても、光照射によって行われることが知られている。その機構は図 2 (A) に示すとおりである<sup>10)</sup>。この機構では光によって励起されたベンズアルデヒドから水素ラジカルがもう 1 分子のベンズアルデヒドに移動してラジカルのペアを形成し、それが結合してベンゾインを形成する。PLP でも同様の機構で反応が進行し、ピリドイン **1** が形成されると考えられる。一方、PLP-Tris シッフ塩基は水溶液中で図 2 (B)

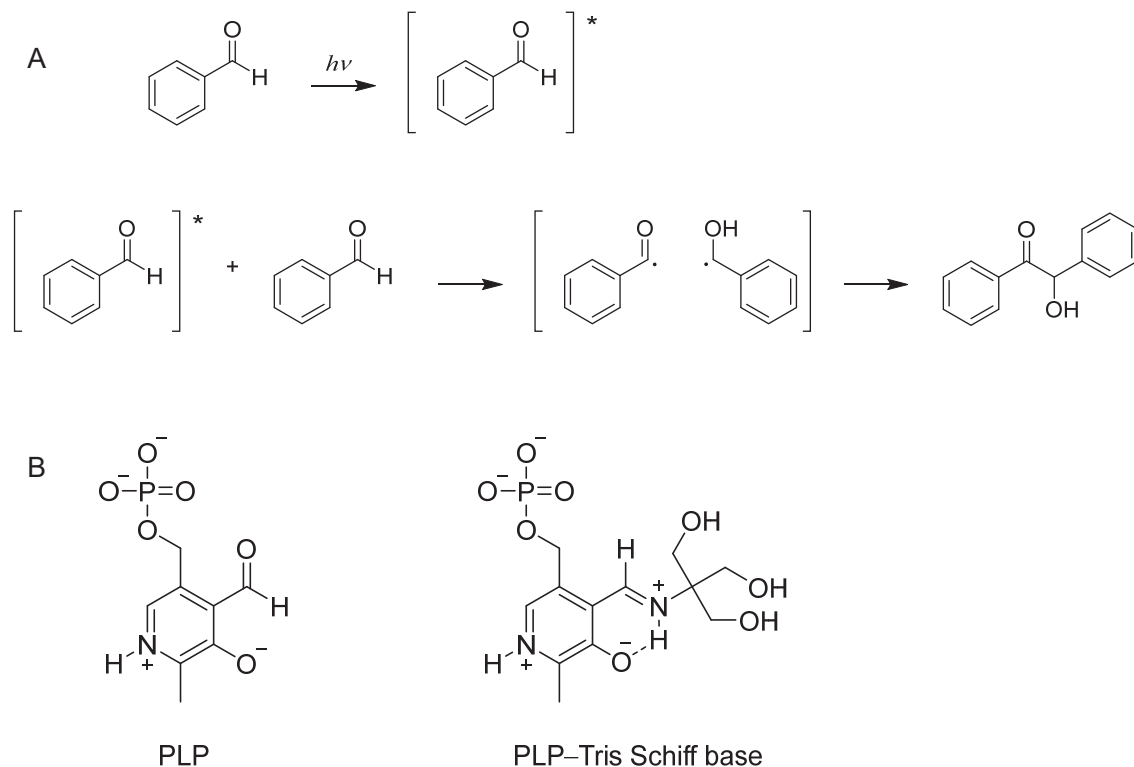


図2 (A) 光反応によるベンゾイン縮合の反応機構. (B) 中性水溶液中の PLP および PLP-Tris シッフ塩基

に示すような分子内水素結合を形成するため、ピリドイン様の構造を形成する際に立体障害が発生することが考えられる。また、励起状態分子から基底状態分子への水素ラジカルの移動が基底状態分子の非共有電子対においてなされるのであれば、非共有電子対を持たないプロトン化シッフ塩基では水素ラジカルの移動が行われなくなる。もしもそうであれば、Tris 緩衝液中では光によるピリドインの形成が抑えられることを説明できることになる。

また、ラジカルペアのそれぞれの構造は  $O_2$  と反応しやすいため、ペルオキシラジカルを形成したのちに一連の反応を経てカルボキシ基を形成することが期待される。これが起こっているとすれば、光による **3** の生成を説明することになる。

上述のようにピリドキサル酵素はそれぞれの特性により光感受性に大きな差がある。いま一度、研究対象のピリドキサル酵素の光による失活や吸収スペクトルの変化を調べておくことは重要と考えられる。

**Key words** : pyridoxal 5'-phosphate, pyridoxal enzymes, light, benzoin condensation, oxidation

Professor Emeritus, Osaka Medical and Pharmaceutical University

Hideyuki Hayashi

大阪医科薬科大学名誉教授

林 秀行

利益相反自己申告：申告すべきものなし

(2023.6.15 受付)

## 文 献

- Morrison, A. L., and Long, R. F. (1958) 45. The photolysis of pyridoxal phosphate. *J Chem Soc*, 211–215
- Reiber, H. (1972) Photochemical reactions of vitamin B6 compounds, isolation and properties of products. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj* **279**, 310–315
- Steffen-Munsberg, F., Vickers, C., Thontowi, A., Schätzle, S., Meinhardt, T., Svedendahl Humble, M., Land, H., Berglund, P., Bornscheuer, U. T., and Höhne, M. (2013) Revealing the structural basis of promiscuous amine transaminase activity. *ChemCatChem* **5**, 154–157

- 4) Merz, L. M., van Langen, L. M., and Berglund, P. (2023) The role of buffer, pyridoxal 5'-phosphate and light on the stability of the *Silicibacter pomeroyi* transaminase. *ChemCatChem* **15**, e202201174
- 5) Chen, S., Campillo-Brocal, J. C., Berglund, P., and Humble, M. S. (2018) Characterization of the stability of *Vibrio fluvialis* JS17 amine transaminase. *J Biotechnol* **282**, 10–17
- 6) Chen, S., Land, H., Berglund, P., and Humble, M. S. (2016) Stabilization of an amine transaminase for biocatalysis. *J Mol Catal B Enzym* **124**, 20–28
- 7) Rippa, M., and Pontremoli, S. (1969) Pyridoxal 5'-phosphate as a specific photosensitizer for histidine residue at the active site of 6-phosphogluconate dehydrogenase. *Arch Biochem Biophys* **133**, 112–118
- 8) Gerlach, T., Nugroho, D. L., and Rother, D. (2021) The effect of visible light on the catalytic activity of PLP-dependent enzymes. *ChemCatChem* **13**, 2398–2406
- 9) Nagendrappa, G. (2008) Benzoin condensation. *Resonance* **13**, 355–368
- 10) Theodoropoulou, M. A., Nikitas, N. F., and Kokotos, C. G. (2020) Aldehydes as powerful initiators for photochemical transformations. *Beilstein J Org Chem* **16**, 833–857