

## 【序論・目的】

糖鎖末端にシアル酸が結合したシアリル糖鎖は、細胞間の接着・分化、神経繊維の発達に深く関与することが知られている<sup>[1]</sup>。Fig.1 に示すように、シアリル糖鎖はシアル酸転移酵素によって合成される。シアル酸供与体(CMP-シアル酸)が糖受容体から求核攻撃を受けると、一リン酸ヌクレオチド(CMP)が脱離し、シアリル糖鎖が生成される。近年 Chiu らのシアル酸転移酵素の結晶解析により、 $S_N2$  の遷移構造に近い結晶構造が得られたことから、シアル酸転移反応が  $S_N2$  反応機構で進行するという予測がなされた<sup>[1]</sup>。一方、反応機構に関わる基質の  $\alpha$  炭素は 4 級炭素なので、 $S_N1$  反応機構とも予測もされている。しかしながら実験的に酵素反応中の構造を捉えることは大変困難であるので、 $S_N1$  と  $S_N2$  どちらの反応機構に関しても明確な見解は得られていない<sup>[2]</sup>。そこで本研究では、酵素全体を含む現実系のモデルを構築し、QM/MM 計算を用いてシアル酸転移反応機構の解析を行った。

## 【計算方法】

初めに、結晶解析で得られた構造<sup>[3]</sup>に対し応阻害剤として置換されたフッ素を水素に酵素中の基質が取り込まれる空間に糖受容してメチルガラクトースを付加させた。次に Amber プログラムを用いて酵素の周囲に溶媒(TIP3P)を付加させ、最急降下法、共役勾配による構造最適化と、分子動力学アニーリングによって構造緩和計算を実行した。

次に QM/MM 法を用いて、シアリル糖鎖合成の反応経路を計算した。QM 部分は PM3 法を、MM 部分には Amber 力場(ff03<sup>[4]</sup>)を用いた。基質全体(CMP-シアル酸、メチルガラクトース)を QM 領域とし、酵素と周辺の溶媒を MM 領域とした。反応機構を解析するために、Fig.1 に示すシアル酸転移の反応座標  $r1$ 、 $r2$  を変化させたポテンシャルエネルギー曲面 (PES)を作成した。反応座標  $r1$ 、 $r2$  は、それぞれ 1.4 (Å)から 4.0 (Å)とし、0.2 Å刻み幅に変化させた。酵素を周囲に配置させず基質のみの計算も行い、酵素の影響も考察した。

## 【結果】

Table1 に、基質のみの系と酵素も含めた系の生成エネルギー、反応障壁を示す。Fig.2 に、(a) 基質のみ、(b)酵素を含めた、二次元 PES をそれぞれ示す。Fig.2(b)には、 $S_N1$  反応経路を赤線で、 $S_N2$  反応経路を青線で示す。

Table1 および、Fig.2 の(a)と(b)の比較から、酵素を含めることで  $S_N2$  反応の反応障壁が著しく低くなることが解った。また  $S_N1$  反応で起こる CMP 解離の反応障壁も低くなった。これらの原因を考察するために、(a)、(b)の構造比較を行ったところ、酵素残基の Tyr156、Tyr162、Ser132 が基質に対して水素結合を形成し、基質を安定化させていることが解った。

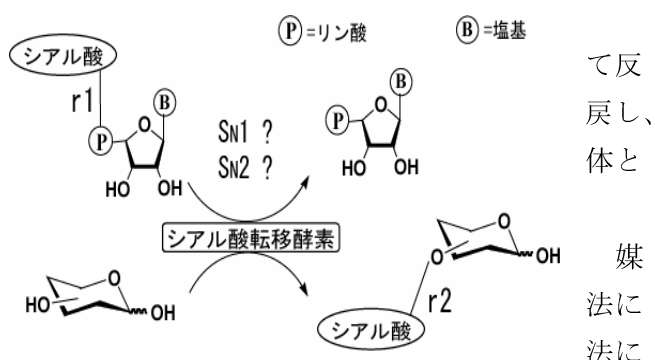


Fig.1 シアル酸転移反応

結果・考察の詳細についてはポスターで発表する。

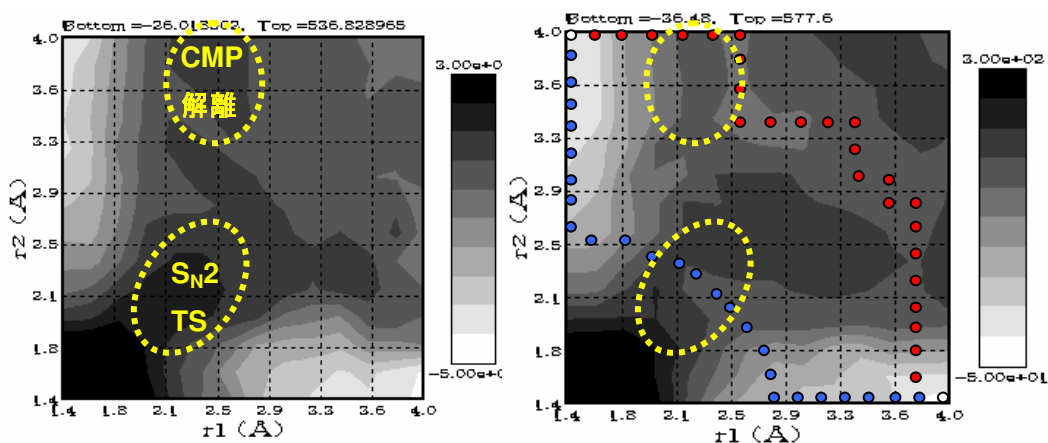


Fig.2 シアル酸転移反応の PES (kJ/mol)

(a)基質のみの結果、(b)酵素を含めた結果

Table1. 基質のみの場合と酵素を置いた場合の PES の比較 (kJ/mol)

	基質のみの結果	酵素を置いた場合の結果
生成エネルギー	26.0	36.5
反応障壁 (S <sub>N</sub> 1)	209.5	197.0
反応障壁 (S <sub>N</sub> 2)	225.4	193.8

【参考文献】

- [1]Cecilia,C. et al. Structural analysis of the sialyltransferase CstII from *Campylobacter jejuni* in complex with a substrate analog, *Nature Structural & Molecular Biology*, 11, 163-170, (2004).
- [2] Private Communication from Y.Kajihara and M.Miyano
- [3]PDB reference : 1RO7
- [4]Y. Duan et al. A point-charge force field for molecular mechanics simulations of proteins based on condensed-phase quantum mechanical calculations. *J. Comput. Chem*, 24, 1999-2012 (2003).