

## 2P055

### ハロ酸脱ハロゲン化酵素 (L-DEX YL) による L-2-chloro propionic acid 脱ハロゲン化反応機構の理論的解析

(神戸大院・人間発達環境<sup>1</sup>, 長浜バイオ大・バイオサイエンス<sup>2</sup>, JST-CREST<sup>3</sup>)

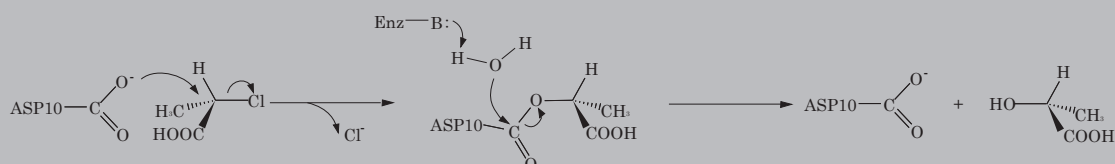
○近藤 洋隆<sup>1</sup>, 中村 卓<sup>2</sup>, 山口 梓<sup>2</sup>, 渡邊 博文<sup>1,3</sup>, 田中 成典<sup>1,3</sup>

#### 【Introduction】

L-DEX YL は *Pseudomonas* sp. YL 由来の酵素であり、L体のハロ酸をD体のヒドロキシ酸へと脱ハロゲン化する酵素である。

この酵素はX線結晶構造解析によりいくつかの構造 [1] がとられていて、変異導入の実験 [2] により反応機構の推定がなされている。

L-2-chloro propionic acid (CPA) はその代表的な基質である。脱ハロゲン化を受けてD体の乳酸になる。

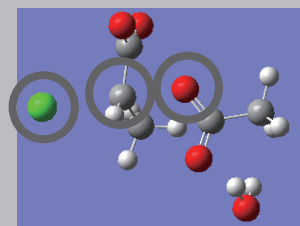


本研究は、分子動力学計算や量子力学計算を用いて、L-DEX YL による CPA の脱ハロゲン化反応機構の詳細を解明をすることを目的とする。

#### 【Methods】

##### 小さなモデル系 1 における探索

野生型 (結晶構造 [3] の S175A のアラニンをセリンに戻したもの) から基質である CPA と攻撃をする ASP10 と水を切り出した。



ポテンシャルエネルギー面の探索は Gaussian03 を使い、ASP10 の攻撃する O 原子と CPA の攻撃を受ける C 原子間の距離 (C-O)、CPA の攻撃を受ける C 原子と乖離する Cl 原子間の距離 (C-Cl) をそれぞれ別々に 0.05 Å ずつ動かし、エネルギーを計算した。

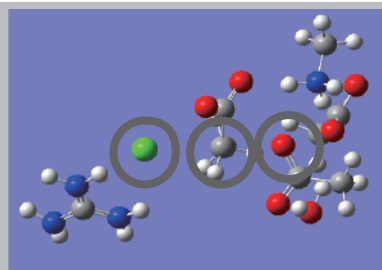
遷移状態及び反応経路の探索は、上記のエネルギー面を参考にして Gaussian03 を使い遷移状態を探索し、その構造から IRC 計算や SCAN 計算により反応経路の活性化障壁などを見た。

## より大きなモデル系 2 における探索

野生型（結晶構造の S175A のアラニンをセリンに戻したもの）から、基質である CPA と水と、フラグメント分子軌道（FMO）法によるフラグメント間相互作用エネルギー（IFIE）解析を行った結果 CPA と強く相互作用をしている 4 つの残基（ASP10, ARG41, LYS151, ASP180）を切り出した。

ASP10、ASP180 は acetate、ARG41 は guanidinium ion、LYS151 は methylamminium ion とした。

モデル系 1 と同様にエネルギー面の探索や遷移状態などの探索を行った。

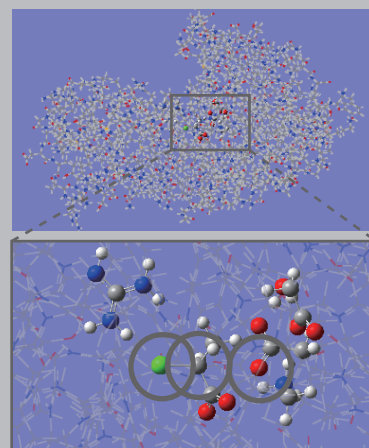


## 酵素—基質複合体全体における探索

野生型（結晶構造の S175A のアラニンをセリンに戻したもの）から、酵素—基質複合体全体を MM 領域、基質である CPA と水と、FMO 法による IFIE 解析を行った結果 CPA と強く相互作用をしている 4 つの残基（ASP10, ARG41, LYS151, ASP180）を QM 領域とした。

ASP10、ASP180 は acetate、ARG41 は guanidinium ion、LYS151 は methylamminium ion として QM 領域にした。

QM/MM 法を用い、モデル系 1 と同様にエネルギー面の探索や遷移状態などの探索を行った。



モデル系 1、モデル系 2、複合体全体の比較によって、周囲の残基の反応への関与を調べた。

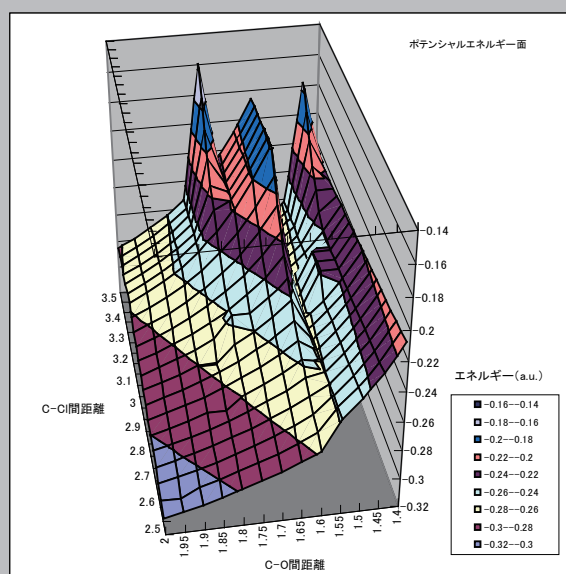
## 【Results】

モデル系 1 におけるポテンシャルエネルギー面の探索の結果を右図に示す。

右図は横軸に C-O 間距離、縦軸に C-Cl 間距離、高さにポテンシャルエネルギーにとったグラフである。

C-O 間距離を 1.4 ~ 2.0 の 13 点、C-Cl 間距離を 2.5 ~ 3.5 の 21 点、計 273 点のエネルギーをプロットした。

詳細やその他の結果は発表時に述べる。



## 【References】

- [1] T. Hisano, Y. Hata, T. Fujii, J.Q. Liu, T. Kurihara, N. Esaki, K. Soda  
J. Biol. Chem. 271, 20322-20330, 1996.
- [2] T. Kurihara, J.Q. Liu, V. Nardi-Dei, H. Koshikawa, N. Esaki, K. Soda  
J. Biochem. 117, 1317-1322, 1995.
- [3] Y.F. Li, Y. Hata, T. Fujii, T. Hisano, M. Nishihara, T. Kurihara, N. Esaki  
J. Biol. Chem. 273, 15035-44, 1998.