

DNA ポリメラーゼにおける酵素活性についての密度汎関数計算

(筑波大院化) 倉野尾和広, 守橋健二

【序論】

DNA 鎖が伸長する過程で関与する DNA ポリメラーゼの酵素活性は、活性部位に含まれる二つの Mg イオンが重要な役割を演じている。DNA 鎖の合成反応 (Scheme 1) において活性部位を図 1 のようにモデル化した反応系 [1] で、プライマー水酸基のプロトン (図 1 中 H^* で示した) 移動を段階的に考えた、初期構造から生成物までの構造を B3LYP/6-31G(d,p) において構造最適化を行った。我々は酵素のサイズが小さく扱いやすいことから、DNA ポリメラーゼ [2] (PDB file: 2fmp) を計算対象にした。その結果、二つの Mg イオンは六配位構造を取ることで反応物同士を近づけ、またプライマー-O'酸素原子の負電荷を強めることで、律速段階である求核攻撃を起こりやすくする役割があることが分かった。

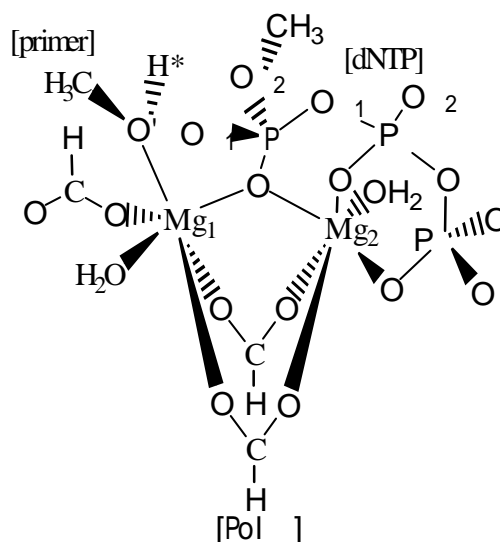
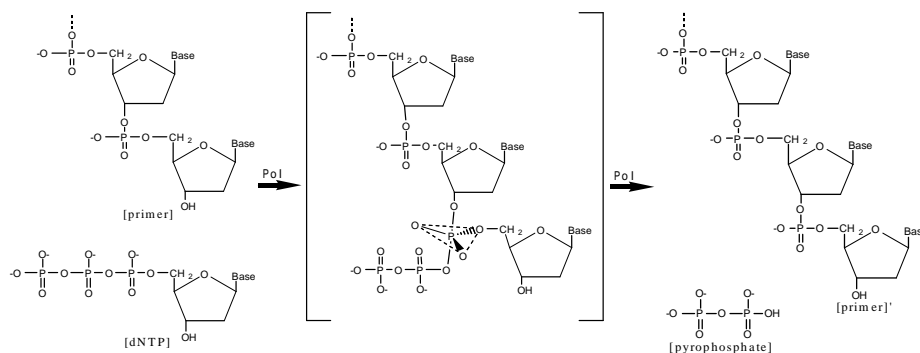


図 1 モデル化した反応系

だが、図 1 は元の反応系から見ると非常に簡略化されている。よって、このモデルをより大きな系にして元の反応系に近づけた場合、同様の計算結果が得られるかどうかを検討した。



Scheme 1

【計算方法】

図 1 のモデルでは、計算負荷を下げるために dNTP とプライマーの糖・塩基部位をメチル基へ、酵素残基の三つのアスパラギン酸をギ酸イオン (-COOH) へ置換している。これらのメチル部位に Scheme 1 にあるような糖の五員環を一つずつ付加させた。プライマー、dNTP の塩基部位をプロトンで置換した。このモデルを用いて、上記同様にプロトン移動を考えた構造を HF/3-21G にて構造最適化を行った。その後、得られた構造を B3LYP/6-31G(d,p) にて一点エネルギー計算を行って各構造の相対エネルギーを考えた。また、プログラムには ABINIT-MP を用いた。

【結果と考察】

計算の結果、先述の簡単なモデルで求められた構造とほぼ同じ関係の構造が得られた。図3において、移動したプロトン (H^*) を矢印で示す。B3LYP/6-31G(d,p)で求めた各構造の相対エネルギーも以下に示した。また、初期構造の最適化構造 a はX線で得られた活性部位の Mg 配位結合距離[2]をほぼ再現する構造である。また、 $H^* \dots O_2$ の水素結合を作るように再配向した構造 b でも、X線で得られた活性部位の Mg 配位結合距離をほぼ再現している。その後、 $O' - P$ 結合が作られた構造 c はリン五配位構造を含んでおり、本反応中で最もエネルギーが高い中間体となっている。

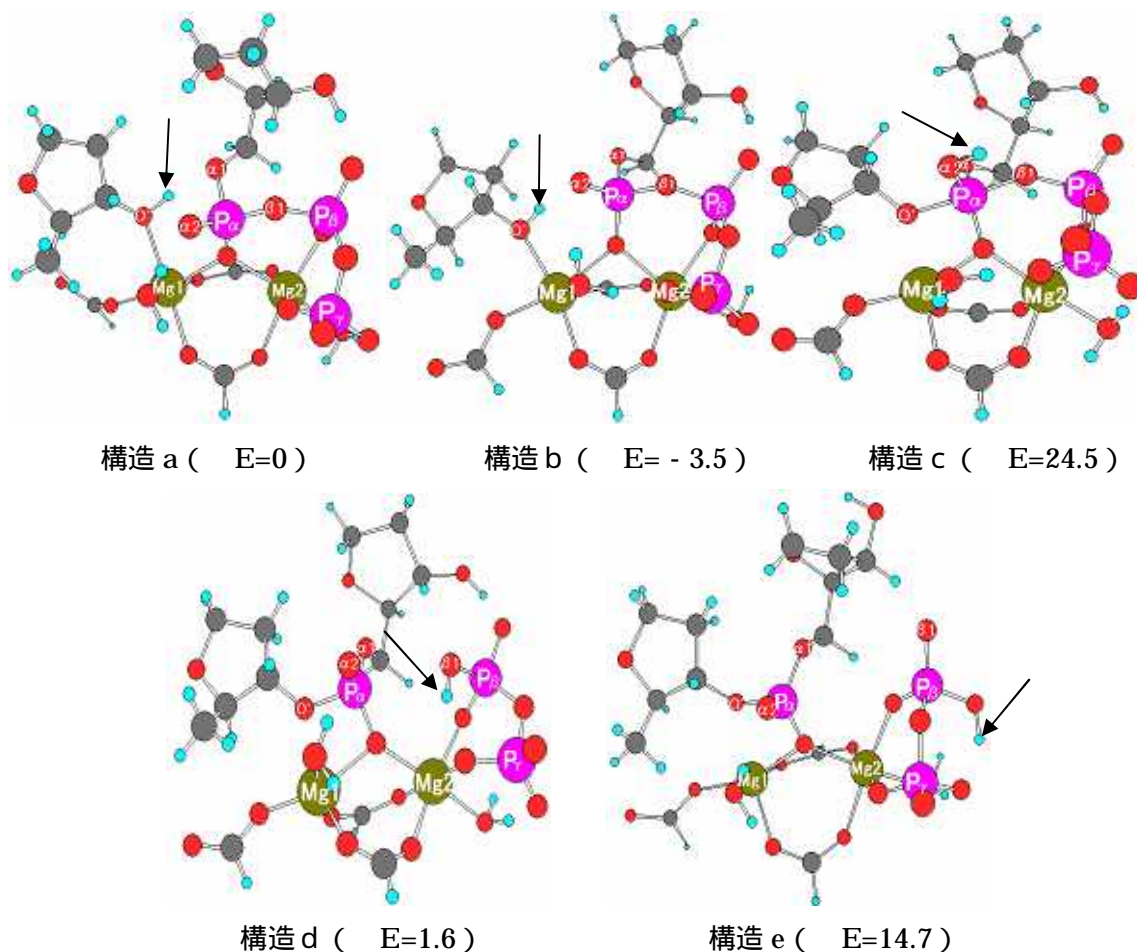


図2 各反応段階の構造と相対エネルギー(kcal/mol)

構造 b と構造 c 間のエネルギー差が 28.0 kcal/mol と最も大きいことからプライマー酸素原子 O' によるリン原子 P への求核攻撃が律速段階であると考えられる。よって、先述の研究[1]と同じく Mg イオンは求核攻撃を起しやすくする役割があると考えられる。また、構造 b が構造 a よりもエネルギーが低いことは、二つの五員環の立体反発が関わっていると考えられる。構造 b では構造 a に比べて五員環同士の位置が約 1 Å 離れている。実際の酵素環境において、この再配向が起こるかは明確ではない。なぜなら、実際には活性部位は残基に囲まれており、構造 a から構造 b への変化のように五員環同士が離れることが可能であるか分からないためである。

【参考文献】

- [1] M. D. Bojin and T. Schlick, *J.Phys.Chem.B*, **111**, 11244 (2007).
- [2] V. K. Batra et al., *Structure*, **14**, 757 (2006).