

ODCase の酵素触媒機構

(産業技術総合研究所 計算科学研究部門) ○石田豊和

はじめに

酵素反応における触媒加速要因としては、「反応遷移状態の相対的な安定化」が重要な概念となっている。実際に数多くの実験的、および（特に近年の）理論/計算化学的研究から、「酵素が触媒する反応の遷移状態をタンパク質の極性環境が安定化する事が反応加速の主要因」だとする報告が多く出されている。しかしこれとは異なる概念として、「反応の基底状態（酵素基質複合体、ES錯体）を不安定化する事により、相対的に遷移状態と ES 錯体間の活性化自由エネルギーを低下させる事も可能」とする作業仮説もある。本研究においては、後者のメカニズムにより基質の分解を加速していると考えられている酵素、ODCase を題材に選んで、理論計算を用いたアプローチによりタンパク質環境の触媒効果について考察した。

オロチジナーリン酸脱炭酸酵素（Orotidine 5'-mono-phosphate decarboxylase、以下 ODCase）は種々の生物体内でピリミジン環を新規合成する過程で必須の酵素であり、オロチジナーリン酸（Orotidine 5'-mono-phosphate、以下 OMP）からカルボキシル基を引き抜いてウリジナーリン酸（Uridine 5'-mono-phosphate、以下 UMP）を生成する反応を触媒する酵素である。この酵素は非常に興味深い酵素活性を示すのみならず、その触媒サイクルを阻害する事が種々の創薬の対象となる事から近年盛んに研究が成されており、特にここ最近、複数の生物種に対して高解像度の X 線結晶構造が報告されている。分子科学的な観点から見た場合に特に興味を引く点は、酵素の非存在下の参照系の化学反応と比べて反応を $\sim 10^{17}$ ものオーダーで加速しようと言う事実である。常温下の化学反応において、金属イオンや補欠因子を含まずにこれほどの反応の加速率を示す酵素はこれまで殆ど知られていない。速度論的な実験結果から、非酵素反応下の OMP から UMP への半減期は 7800 万年程度と見積もられるのに対して、ODCase の触媒反応サイクルに要する時間はミリ秒のオーダーである事が報告されている。2000 年前後からいわゆる QM/MM 計算が本格的に普及し始めた結果、タンパク質環境を露に扱った量子計算が可能となり、ODCase に対しても反応の分子論的起源を調べるために複数のグループにおいてそれぞれ異なった QM/MM 計算による反応解析が報告されている。しかし現時点ではそれぞれのグループが異なった反応機構を提唱している段階で予測される反応エネルギーにも大きなばらつきがあり、現状では分子レベルで基本的な反応機構の同意が得られていない状況である。

そこで本研究では、*ab initio* QM/MM 計算と分子動力学計算を主とした複合モデリング手法を用いて反応過程をモデル化し、酵素活性の主要因を明らかとする為の一連の解析を行なった。

目的、計算手法

現在多くの生物種（*Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Methanobacterium thermoautotrophicum*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Plasmodium falciparum*, など）に対して結晶構造が報告されて

いるが、(1) いずれもサブユニット 2 個がダイマーを形成して酵素活性を示す事、(2) どの構造においても活性中心は溶媒から遮蔽されたダイマー間の境界に存在すること、(3) そして酵素活性に必須な 4 個のアミノ酸残基の並び (Lys-Asp-Lys-Asp) はすべて保存されていること、などが確認されている。近年の高解像度の結晶データに基づく反応機構の考察では、異なった生物種間で反応機構が異なる可能性も推測されているが、本研究においては主として Wolfenden らにより解かれた *Saccharomyces cerevisiae* 由来の構造データ (PDB code, 1DQX) を用いてモデリングを行なった。計算に必要なプログラムはこれまで独自に開発を行なって来たコードを利用して、分子動力学計算におけるポテンシャル関数、および *ab initio* QM/MM 電子状態計算での MM 部分には、AMBER(parm. 96) を採用している。

計算、解析結果

モデリングに用いた実験構造では、基質の代わりに遷移状態アナログであるヒドロキシウリジン-リン酸 (6-hydroxy uridine 5'-mono-phosphate、以下 BMP) が強く結合した構造が得られているだけである。OMP と BMP では基質の脱炭酸部分の構造と荷電状態も異なる事から、結晶構造への単純なドッキングでは ES 錯体の適切なモデリングは困難であると予想される。そこで ES 錯体に対して水中での分子動力学計算を実行し、自由エネルギー的に安定な構造を複数抽出して初期構造のサンプリングを行ない、各構造に対して QM/MM 計算による構造最適化を実行する事で ES 錯体の構造を決定した。QM/MM 計算で最適化された構造は、いずれも遷移状態アナログ結合体と似た配座で活性中心に結合していたが、ピリミジン環に結合するカルボキシル基がいずれもねじれて曲がった構造を取る事が確認された。これは基質に対して酵素が立体的な歪みを加えて基質の構造を不安定化する事を示唆している。次に得られた複数の初期配座に対してそれぞれ反応経路を計算した。幾つかの予想される反応パターンがある中で、ここでは最も単純な direct decarboxylation path を複数計算して反応の energetics を評価した。複数の反応経路モデルでは脱炭酸の結果生成する反応中間体がタンパク質環境下で安定化される事を示しており、これは脱炭酸とプロトン移動が段階的に進行して UMP が生成される事を示唆している。また近年の高解像度結晶データが発表された事に刺激を受け、藤橋らにより決定された *Methanobacterium thermoautotrophicum* 由来の ODCase を用いて同様のモデリングを実行し、活性中心近傍の構造パラメータ、およびタンパク質由来の静電環境の度合いを電子状態計算から評価して先の計算と比較検討を行った。これら計算結果の詳細は当日報告する予定である。

謝辞

ODCase の構造解析、及び反応機構に関する実験的側面に関して、京都大学理学研究科 藤橋雅宏博士に多くを教えて頂きました。この場をかりてお礼を申し上げます。