

1P082

複合モデリング計算による ODCase の反応機構解析

(産業技術総合研究所 ナノシステム研究部門¹、京都大学理学研究科²) ○石田豊和¹、藤橋雅宏²

イントロ

オロチジナーリン酸脱炭酸酵素 (Orotidine 5'-mono-phosphate decarboxylase、以下 ODCase) は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として知られている。反応特異性の観点から特に注目を集める事実は、酵素非存在下の参照系の反応と比較して化学反応を $\sim 10^{17}$ ものオーダーで加速していると言う実験結果である。速度論的解析から、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。常温常圧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。

この反応特異性を説明する為に、「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」とする作業仮説が Wolfenden らにより導入され、これを検証する為に *Saccharomyces cerevisiae* 由来の構造データ、生化学データをもとに一連の実験的考察が行なわれて来た。またこの酵素は、その触媒サイクルを阻害する事が種々の創薬の対象と成りうる事から近年盛んに構造研究がされてもいる。現在では複数の生物種に対して様々な解像度の X 線構造が報告されているが、提案される反応機構および妥当な実験結果の解釈には大きな相違が見られる。

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 OMP から UMP への変換過程をモデル化し、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。特に構造解析の専門家と共同で、最新の高解像度結晶データを用いた分子モデリングを基礎に反応過程のシミュレーションを実行する事で、Wolfenden らにより導入された作業仮説の妥当性を検討した。

計算手法

まず初めに、Wolfenden らにより解かれた *Saccharomyces cerevisiae* 由来の構造データ (PDB code, 1DQX) を用いて構造モデリングを行なった。複数の反応機構が提案される中、本研究では最も可能性が高いと考えられる Direct Decarboxylation mechanism に議論を絞り、脱炭酸の反応経路に沿った自由エネルギー変化を評価している。水溶液中での参照反応である、OMP の脱炭酸過程の自由エネルギープロファイルも同様に比較し、酵素反応と非酵素反応のエネルギー差を比較する事で、モデリングの妥当性を確かめた。Wolfenden らの実験データは変異型酵素の系統的な反応速度解析のデータを提供するが、結晶構造の解像度は低いため、本研究で最終目的とする反応機構の詳細な解析 (基底状態の基質への歪み導入) には不向きな点もある。そこで今回は、

近年藤橋らにより決定された *Methanobacterium thermoautotrophicum* 由来の高解像度結晶データを用いて再度同様のモデリングを実行し、同じく脱炭酸過程の自由エネルギー変化を計算した。更に藤橋らの実験から示唆される、重要アミノ酸残基を置換した変異体酵素の反応プロファイルも同様に計算することで、天然型酵素と変異体酵素の比較を通して反応機構の詳細を議論した。

なお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おり、QM/MM 計算と分子動力学計算を組み合わせる事で近似的に自由エネルギー変化を計算する手法をとっている。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) を採用した。

計算/解析結果

基底状態における基質への立体歪みの有無を検証するため、複数の初期構造をモデル化し、QM/MM 計算による構造最適化を実行した。基質アナログを OMP で置き換える事で実際の ES 錯体の構造をモデリングし、ES 錯体に対して水中での分子動力学計算を実行することで、自由エネルギー的に安定な構造を複数抽出して QM/MM 計算用の初期構造サンプリングを行なった。*Saccharomyces cerevisiae* 由来の酵素、*Methanobacterium thermoautotrophicum* 由来の酵素ともに、QM/MM 計算で最適化された構造はピリミジン環に結合する 6 位のカルボキシル基がすべてねじれて面外変角し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しう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脱炭酸反応経路を計算した。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。この脱炭酸過程の自由エネルギープロファイルを計算した所、基本的には両生物種由来の酵素ともに良く似た活性化自由エネルギーの値を示し、また参照系反応とのエネルギー変化の比較から、タンパク質環境の静電場の効果が反応中間体を安定化する要素も無視できない事が確かめられた。

次にこれら天然型酵素の計算結果を踏まえて、*Methanobacterium thermoautotrophicum* 由来酵素のアミノ酸変異導入が酵素活性に及ぼす影響を考察した。活性中心近傍の構造パラメータ、およびタンパク質環境由来の静電相互作用の強さを電子状態計算から評価して、天然型酵素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。