

1P091

炭酸脱水酵素(CAII)内部の水素結合ネットワークと そのモデル錯体の触媒機構に関する理論的研究

(京大・院工) ○岡山翔太、佐藤啓文

【緒言】蛋白質を含めた生体分子において水の存在は非常に重要であり、機能や構造を知る上で水和効果を議論する必要がある。本研究で扱う、炭酸脱水酵素(CAII)は、二酸化炭素の炭酸水素イオンへの変換を触媒する酵素であり、内部に水素結合ネットワークが存在し、活性中心と bulk 間でプロトンをリレーすることで、生体内で血液や他の組織の酸-塩基平衡を維持し、組織から二酸化炭素を運び出す機能を有することが知られている。

CAII の His64 は活性中心に対する蓋のような役割を持っており、活性中心に向かって内側に入っている in 構造、活性中心と反対の bulk 側を向いている out 構造の 2 つの状態が存在する。His64 をこの 2 つの状態に変化させることで bulk とのプロトンのやり取りをする。2 つの状態で、活性中心周辺に存在する水分子の水素結合ネットワークも変化すると考えられるが、実験で観測することは難しく、詳細な研究は行われていない。本研究では CAII の反応機構を求めめるために、X 線結晶構造解析データにはない、内部の水の水素の位置や水素結合ネットワークの方向性を調べるとともに、反応の素過程に対する水の影響について研究を行なった。

CAII 内部の水素結合ネットワークは、近年本研究室で開発された並列化効率の高い積分方程式理論である MC-MOZ 法¹を用いて 3 次元溶媒和構造を計算し、X 線データとの比較を行った。また反応の素過程については、最も単純なバイオミメティック錯体であり、Zn²⁺ へのヒスチジン 3 分子と水 1 分子のテトラヘドラルな配位を有する、1,5,9-triazacyclododecane ([12]aneN₃)の Zn 錯体²を対象とし、RISM-SCF-SEDD³法を用いて計算を行なった。溶媒和効果や水素結合の有無を調べることによってモデル錯体と実際のタンパク質との相違を検討する。

【MC-MOZ 法を用いた 3 次元水和構造】

MC-MOZ 計算によって得られた CAII 活性中心付近の 3 次元水和構造を図 1 に示した。網掛けは計算で求められた水分子が高い確率で存在する領域を示している。白丸は X 線結晶構造解析で得られた水の存在位置で、Zn に配位した水から W1、W2、W3 を経てプロトンが移動すると考えられている。X 線によって求められた W3 の位置と MC-MOZ 計算によって求めた水の分布は良く一致しているが、W1、W2 とは分布が一致しなかった。また白線で囲んだ領域 V1、V2 の水分子数を数値積分したところ、そ

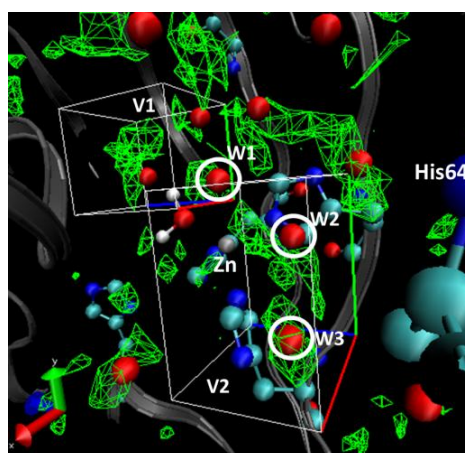


図1 活性中心付近の水の分布

それぞれの領域に約 1 個及び約 2 個の水が存在することがわかった。

【CAII モデル錯体の反応機構】

孤立系での構造最適化及び自由エネルギーを DFT(B3LYP)法を用いて、水溶液中での反応の概要を量子化学計算と積分方程式理論を組み合わせた RISM-SCF-SEDD 法を用いて調べた。二酸化炭素の炭酸水素イオンへの変換はいくつかのステップに分かれており、そのうち水素の移動に関するステップ(図 2)は Lipcomb 機構(path a)と Lindskog 機構(path b)の 2 つの経路が存在すると考えられている⁴。このステップでの孤立系

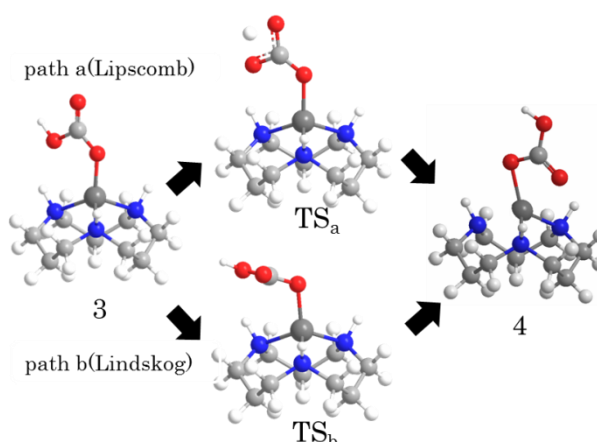


図2 水素移動の2つの経路

の自由エネルギーと水中での自由エネルギーを、反応物 3 を基準として表 1 に示した。孤立系と比較して、水中で path a での活性

表 1 気相中及び水中での自由エネルギー

| | 3 | TS _a | TS _b | 4 |
|--|-----|-----------------|-----------------|------|
| $\Delta G_{\text{gas}}(\text{kcal/mol})$ | 0.0 | 28.0 | 12.6 | -5.8 |
| $\Delta G_{\text{sol}}(\text{kcal/mol})$ | 0.0 | 30.6 | 0.6 | -1.1 |

障壁は約 3 kcal/mol 不安定化していたが、path b では水中で活性化障壁が約 12 kcal/mol 安定化した。TS_b が水中で他の構造よりも大きく安定化しているために活性障壁が低下している。これらの結果より、本錯体では path b を通って反応することがわかった。

このように CAII 及びモデル錯体による触媒反応は周辺の水から大きな影響を受ける。そのため活性中心周辺の水の分布や水和効果を求めることは反応機構を探る上で非常に重要な役割をもっていることがわかる。

【引用文献】

1. D. Yokogawa, *et al.*, *J. Chem. Phys.*, **130**, 064111 (2009).
2. E. Kimura, *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **112**, 5805 (1990).
3. D. Yokogawa, *et al.*, *J. Chem. Phys.*, **126**, 244504 (2007).
4. A. Bottoni, *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 1542 (2004).