

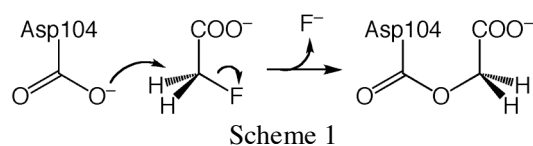
3E14

フルオロ酢酸デハロゲナーゼの基質特異性に関する理論的研究

(九大先導研¹、京大化研²)○蒲池高志¹、中山智則¹、実森啓二²、
江崎信芳²、栗原達夫²、吉澤一成¹

【序】有機ハロゲン化合物は数多く合成され、除草剤から殺虫剤、合成樹脂、さらには溶剤に至るまで用途は幅広い。しかし、その多くは生物に有害であり環境汚染の原因となるものである。微生物中に存在する脱ハロゲン化酵素は炭素-ハロゲン結合を切断し、有機ハロゲン化合物を無害化する作用がある。なかでもフルオロ酢酸デハロゲナーゼは強固な C-F 結合を含むフルオロ酢酸の脱フッ素化反応を触媒する高い反応性を有する。

栗原らは *Burkholderia* sp. FA1 からフルオロ酢酸デハロゲナーゼを単離することに成功し、三次構造を明らかにした。[1]また、この酵素は他のハロ



酢酸の脱ハロゲン反応も触媒するが、フルオロ酢酸に対して特異的に作用すると報告されている。Scheme 1 に示すように、活性点近傍の Asp104 が基質の α -炭素を求核攻撃することにより、ハロゲンが脱離しエステル中間体が生成する。

本研究では、DFT 計算によりフルオロ酢酸デハロゲナーゼによるフルオロ酢酸の脱ハロゲン化反応の機構について理論的解析をおこなった。また、QM/MM 計算を用いたより厳密な計算により、酵素-基質複合体の構造について検討し、フルオロ酢酸デハロゲナーゼの基質特異性の起源について考察した。

【計算方法】酵素-基質複合体の構造を明らかにするため、CHARMm ベースの分子動力学ドッキングプログラムである CDOCKER を用いて解析した。基質としてフルオロ酢酸とクロロ酢酸とのふたつを検討した。得られた構造について QM/MM 法により再び構造最適化を行うことで、高精度なエネルギーの評価を実現した。QM 領域には基質と反応に関与する活性点近傍の Asp104、Arg105、Arg108、His149、Trp150、Tyr212、His271 の 7 残基を含めた。構造最適化は B3LYP/SV(P)を用いて行った。MM 領域には力場パラメータのひとつである CHARMm 力場を用いた。計算プログラムは ChemShell を用い、QM 領域・MM 領域それぞれを TURBOMOLE、DL_POLY を組み合わせて用いた。

【結果と考察】docking シミュレーションの結果、エネルギー的に接近した多くの配座が存在していることが明らかになった。Fig. 1 にフルオロ酢酸とクロロ酢酸のそれぞれについて最安定から 3 kcal/mol 以内の配座を重ね合わせて示した。(フルオロ酢酸 15 配座、クロロ酢酸 7 配座) フルオロ酢酸の場合、水色で示したフッ素原子が Arg108 の方向に向いているものから His149 を向いているものまで様々であった。このため最安定構造を決定するためにはより精密な検討を行うことが必要と

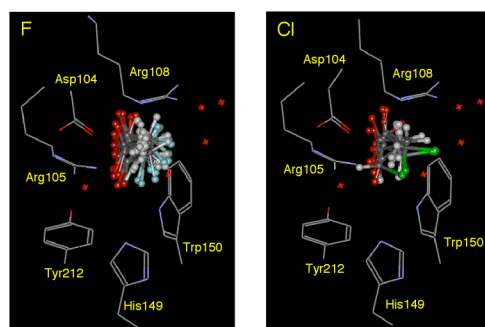


Fig. 1 Docking シミュレーションから得られたフルオロ酢酸とクロロ酢酸の安定構造

なった。そこで docking シミュレーションから得られたこれらすべての配座を初期構造とし、QM/MM 法によりレセプター部分も含めて構造最適化を行った。MM 領域には 1 万を超える原子が含まれており、多数の local minimum が存在する。このため通常の構造最適化では QM 領域の基質の配座の違いにより、MM 領域の構造およびエネルギーが大きく異なる local minimum が得られることがある。この問題を解決するため、各配座に対する最適化構造のなかで最も MM 部分のエネルギーが低い構造を選び、その基質結合部位に構造を保ったまま他の配座と交換したのち再構造最適化を行う。この作業を繰り返すことで各配座間のエネルギー差を正確に見積もることが可能となった。

フルオロ酢酸について最終的に 4 つの基質の配座が得られた。そのうちエネルギー的に安定なふたつの配座を Fig. 2 に示す。再安定な構造 (RC1-F) においてはフッ素原子が Arg108 と水素結合を形成しているのに対し、RC1-F より 2.4 kcal/mol 不安定な配座 (RC2-F) ではフッ素原子が His149、Trp150、Tyr212 の三つのアミノ酸残基により安定化されている。この構造は最近栗原らおよび Chan[2]らが決定した結晶構造と一致する結果となった。Fig. 3 に C-F 結合開裂の遷移状態の構造を示す。以前の我々計算結果[3]で予想されたように、最も活性化エネルギーが低い遷移状態では脱離するフッ素イオンが先の三つのアミノ酸残基によって安定化されている (TS1-F)。これに比べ Arg108 は十分に安定化できず、活性化エネルギーが TS1-F より 9.2 kcal/mol 高いものとなった。

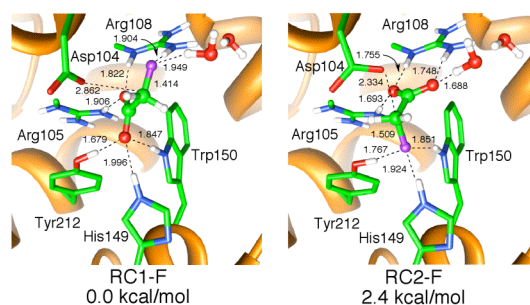


Fig. 2 QM/MM 法による構造最適化から得られたフルオロ酢酸の安定構造

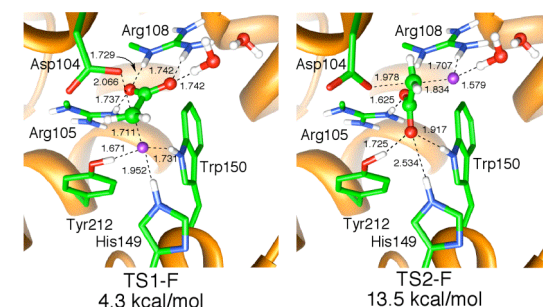


Fig. 3 フルオロ酢酸の C-F 結合開裂の遷移状態

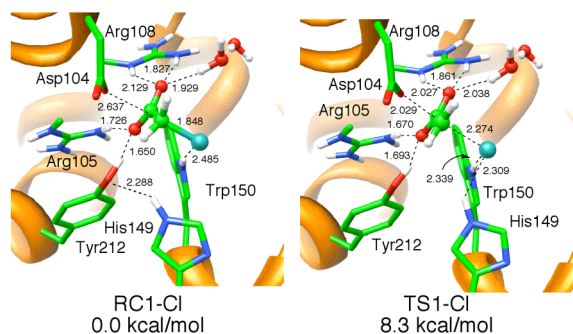


Fig. 4 クロロ酢酸の基質複合体と遷移状態の構造

Fig. 4 に示すとおり、クロロ酢酸の塩素原子は Trp150 と水素結合を形成し、フルオロ酢酸とはその最安定配座が異なることが明らかとなった。この配座の違いは C-Cl 結合が C-F 結合に比べて 0.4 Å も長いこと、およびフッ素の方が塩素に比べて Arg と強く結合することに由来することが明らかになった。このためクロロ酢酸が TS1-F に対応する反応性の高い配座をとることができ

ず、活性化エネルギーがフルオロ酢酸に比べて高くなることが判明した。

【引用文献】

1. K. Jitsumori, R. Omi, T. Kurihara, A. Kurata, H. Mihara, I. Miyahara, K. Hirotsu, N. Esaki, *J. Bacteriol.* **2009**, *191*, 2630.
2. P. W. Y. Chan, A. F. Yakunin, E. A. Edwards, E. F. Pai, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 7461.
3. T. Kamachi, T. Nakayama, O. Shitamichi, K. Jitsumori, N. Esaki, K. Yoshizawa, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 7394.