

## 4P123

### RuBisCO の活性中心近傍モデルを用いた炭素固定反応シミュレーション

(東大院工\*, 東大生研\*\*) ◦堀 将人\*, 平野 敏行\*\*, 佐藤 文俊\* \*\*

#### 【序】

ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase(RuBisCO)は地球上で最も多量に存在するタンパク質であり、植物の光合成における炭素固定反応を触媒する酵素である。RuBisCO の低い触媒効率を改善するために、アミノ酸残基置換による高効率炭素固定 RuBisCO の創出[1]が行われているが、試行錯誤が必要である。炭素固定反応の反応機構を解析するため、活性中心 D-ribulose 1,5-bisphosphate(RuBP)の約半分の構造と近接 7 アミノ酸残基の側鎖の一部分を切り出したモデル(Model 1、図 1)を用いた計算化学が行われている[2]ものの、周辺アミノ酸残基の効果を明らかにするには不十分であり、置換すべきアミノ酸残基の特定には至っていない。本研究では炭素固定反応における RuBisCO 活性部位周辺のアミノ酸残基の効果、及び律速段階を明らかにするため、活性中心近傍モデル(Model 2、図 2)を用いて、RuBisCO の反応過程として考えられている (a)カルボキシル化、(b)水和、(c)C2-C3 結合開裂、(d)C2 プロトン化の各段階(図 3)について、密度汎関数計算を行った。

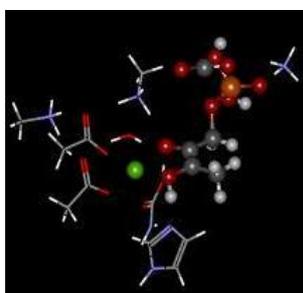


図 1 Model 1(77 原子)の構造

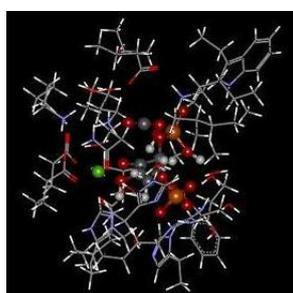


図 2 Model 2(371 原子)の構造

活性中心を Ball&Stick で、アミノ酸残基を Line で描いている。緑色の Ball は  $Mg^{2+}$  である。

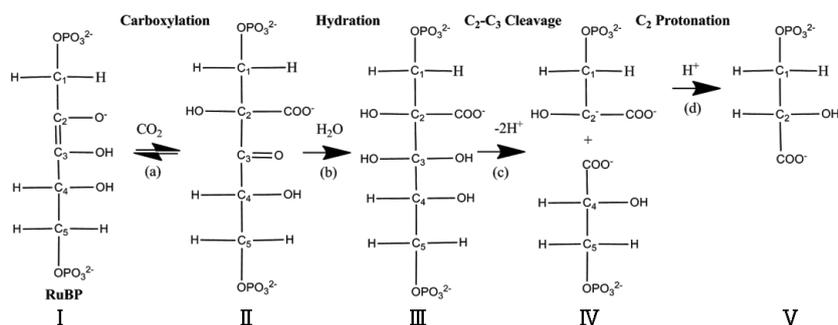


図 3 RuBisCO が触媒する RuBP と  $CO_2$  の反応

#### 【計算モデル】

モデル分子としてホウレンソウの RuBisCO の X 線結晶構造解析結果(PDB ID:8RUC)を元に、活性中心 RuBP とその周囲(半径 4 Å 以内)に存在する 1:Thr173, 2:Lys175, 3:Lys177, 4:Kcx201, 5:Asp203, 6:Glu204, 7:His294, 8:Arg295, 9:His298, 10:His327, 11:Lys334, 12:Leu335, 13:Ser379, 14:Gly380, 15:Gly381, 16:Phe402, 17:Gly403, 18:Gly404, 19:Glu60\*, 20:Thr65\*, 21:Trp66\*, 22:Asn123\*を含むモデルとして Model 2 を作製した。ここで、1:, 2:, …は Model 2 におけるアミノ酸残基の通し番号、アスタリスクは隣接サブユニットに含まれるアミノ酸残基である。各アミノ酸残基の  $C\alpha$ 原子をメチル基として末端処理した。原子数は 371 であった。

### 【計算方法】

Model 1、Model 2 において、炭素固定反応(a)→(b)→(c)→(d)の過程で存在すると考えられる5つの反応中間体 I、II、III、IV、Vの安定構造を求めた。プログラムは Gaussian09 を用いた。Model 1 では B3LYP/6-31G(d,p)レベルの最適化構造を、Model 2 では B3LYP/3-21G レベルの最適化構造を用いて B3LYP/6-31G(d,p)レベルの一点計算を行った。

### 【結果と考察】

反応中間体 I を基準とした II、III、IV、Vの相対エネルギーはそれぞれ表 1 に示す結果となった。Model 1、Model 2 は相対的には比較的似通った傾向を示した。

表 1 構造 I を基準とした各反応中間体のエネルギー (kcal mol<sup>-1</sup>)

モデル	I	II	III	IV	V
Model 1	0.0	-4.9	-2.3	5.9	-12.2
Model 2	0.0	-30.2	-16.6	6.7	-15.7

Model 2 の構造 I において、各アミノ酸残基と(RuBP+CO<sub>2</sub>)との間の相互作用エネルギーを算出した結果が図 4 である。構造 I では Asp203、Glu204、Glu60 は RuBP を不安定化し、Lys175、Lys177、Arg295、Lys334 は安定化させる。(a)の過程において、特に Lys175 と Lys334 は (RuBP+CO<sub>2</sub>)と水素結合を形成し、これらの間の構造形成に寄与していることが示唆された。

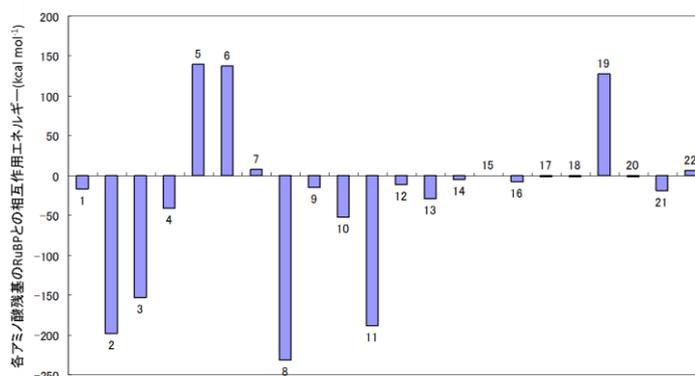


図 4 Model 2 の構造 I における各アミノ酸残基と RuBP との間の相互作用エネルギー

構造 I における RuBP を構成する 5つの炭素原子(C1~C5)と CO<sub>2</sub>の炭素原子(C<sub>CO2</sub>)の NBO 電荷を表 2 に示す。なお、Model 1 では C4 をメチル基として終端処理しているため、C4 の電荷は大きく負に偏っている。Model 2 において、(a)の過程で CO<sub>2</sub> が付加する C2 の電荷が他の C 原子に比べ最も正に帯電しており、Model 1 と異なる傾向を示した。C<sub>CO2</sub> の電荷は、CO<sub>2</sub> 単体での計算結果(1.022)に比べ、Model 1、Model 2 ともに RuBisCO の効果により僅かに正に偏った。このように、クーロン力ではなぜ CO<sub>2</sub> が C2 に結合するかを説明できない。現在、この過程の触媒反応機構を解析している。

表 2 構造 I における C1~C5、C<sub>CO2</sub> の NBO 電荷

モデル	C1	C2	C3	C4	C5	C <sub>CO2</sub>
Model 1	-0.153	0.196	0.293	-0.736	—	1.074
Model 2	-0.163	0.235	0.218	0.016	-0.148	1.058

各反応の解析、及びより大きなクラスターモデル(566 原子)を用いた計算結果は当日発表する。

### 【参考文献】

- [1] M.R.Parikh *et al.*, *Protein Engineering, Design & Selection*, 2006, **19**, 113-119
- [2] B. Kannappan *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, **130**, 15063-15080