

QM/MM 法を用いたジオールデヒドラターゼの  
グリセロール脱水反応に関する研究

(九大先導研<sup>1</sup>・岡山大工<sup>2</sup>) 土井富一城<sup>1</sup>・蒲池高志<sup>1</sup>・虎谷哲夫<sup>2</sup>・吉澤一成<sup>1</sup>

Mechanism of Glycerol Dehydration by Dio Dehydratase  
from Combined QM/MM Calculations

(IMCE Kyushu Univ.<sup>1</sup>, Okayama Univ.<sup>2</sup>) Kazuki Doitomi<sup>1</sup>, Takashi Kamachi<sup>1</sup>,  
Tetsuo Toraya<sup>2</sup>, Kazunari Yoshizawa<sup>1</sup>

【緒言】

ジオールデヒドラターゼ(DD)はアデノシルコバラミン依存の酵素であり、1,2-ジオールを相当するアルデヒドへと変換する。この酵素による反応はアデノシルコバラミン(AdoCbl)中の Co-C 結合が均等に開裂することにより始まる。これにより生じたアデノシルラジカルが基質の 1 位の炭素から水素を引き抜き、反応物ラジカルが生成する。次に水酸基の転移が起き生成物ラジカルを経て 1,1-ジオールを生成する(図 1)。この 1,1-ジオールから水分子が脱離することで、アルデヒドが得られる。この酵素はグリセロール(GOL)の脱水反応を触媒する際に不活性化されやすいことが知られている。Bachovchin は重水素化することで GOL の立体異性体を作成し、反応性を調べた[1]。その結果、不活性化への寄与が小さい構造(G<sub>R</sub>)と寄与が大きい構造(G<sub>S</sub>)というふたつの基質結合構造が提案された。

最近、虎谷らによって GOL が結合した DD の X 線結晶構造が明らかにされた[2]。本研究では QM/MM 法を用いて G<sub>R</sub> と G<sub>S</sub> というふたつの構造における脱水反応と副反応の機構について検討を行い、G<sub>S</sub> 構造で不活性化しやすい理由を明らかにした。

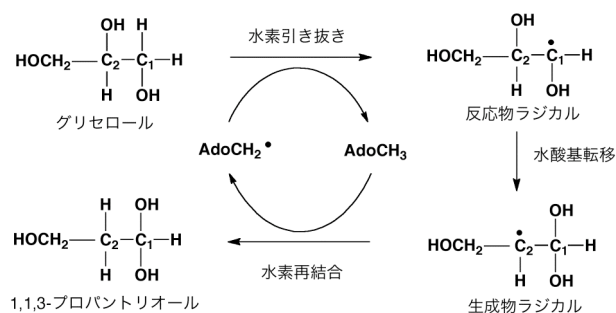


図 1. ジオールデヒドラターゼによる脱水反応機構

【計算方法】

酵素の全原子計算を行うために QM/MM 法を用いた。QM/MM 法は高精度で計算負荷が大きい量子化学計算(QM)と安価で高速な分子力場計算(MM)を組み合わせた方法である。QM 領域の原子は反応に重要な 10 個のアミノ酸残基, 金属イオン(Ca<sup>2+</sup>), GOL, アデノシルラジカルのリボース部位の全 109 原子とした。QM 領域では TURBOMOLE プログラムを用いて B3LYP 法で計算を行い、基底関数は SV(P)を適

用した. それ以外の領域を MM 領域として力場に CHARMm を適用し, 計算を DL\_POLY プログラムで行った. 計算のインターフェイスとして ChemShell プログラムを用いた.

### 【結果と考察】

図 1 に示す水素引き抜き, 水酸基転移, および水素再結合過程を解析し, 反応に伴うエネルギー変化を評価した. 図 2 に示すのは脱水反応のエネルギーダイアグラムである. 反応の律速段階はどちらの構造においても水素再結合であり, 水素再結合の活性化エネルギーは基質結合構造に依存しなかった. 一方, 水酸基転移の活性化エネルギーは  $G_S$  が 5.2 kcal/mol 高くなった. このエネルギー差の多くは反応物ラジカルの安定性に起因する.

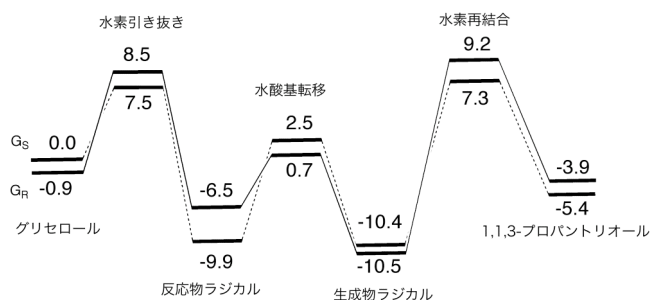


図 2. 脱水反応のエネルギーダイアグラム

我々は図 3 に示す不活性化に寄与する副反応を提案した. この反応の最初のステップである水素移動反応は水酸基転移反応と競争的に進行する. 水素移動反応では基質の 3 位の水酸基から C1 に水素が移動して, 酸素中心ラジカルが生成される. この反応の活性化エネルギーは  $G_S$  と  $G_R$  においてそれぞれ 23.6, 22.8 kcal/mol であり基質結合構造に依存しなかった. この酸素中心ラジカルは非常に不安定なのでグリコールラジカルとホルムアルデヒドに分解される. 可視紫外分光スペクトルはホルミル基と Co の相互作用の可能性を示しており[1], この副反応を支持する. 当日はこれまで得られた知見を基に不活性化と基質結合構造の関係性について議論する.

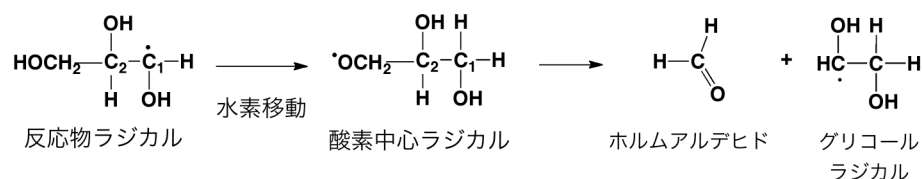


図 3. 本研究により提案された副反応の機構

- [1] Bachovchin, W. W.; Eagar, J. R. G.; Moore, K. W.; Richards, J. H. *Biochemistry* **1977**, *16*, 1082.
- [2] Yamanishi, M.; Kinoshita, K.; Fukuoka, M.; Saito, T.; Tanokuchi, A.; Ikeda, Y., Obayashi, H.; Mori, K.; Shibata, N.; Tobimatsu, T.; Toraya, T. *FEBS J.* **2012**, *279*, 793.
- [3] Doitomi, K.; Kamachi, T.; Toraya, T.; Yoshizawa, K. *Biochemistry*, submitted.