

2P089

酵素活性における基質歪みの効果：ODCaseの酵素反応を例として

産業技術総合研究所 ナノシステム研究部門 ○石田豊和

京都大学 大学院理学研究科 化学教室 藤橋雅宏

Effects of Substrate Strain on Enzymatic Activity: Case Study of ODCase Catalysis
*Nanosystem Research Institute (NRI), National Institute of Advanced Industrial Science and
Technology (AIST)*, ○ Toyokazu Ishida

Department of Chemistry, Graduate School of Science, Kyoto University, Masahiro Fujihashi

はじめに

最近の理論/計算化学研究において、酵素反応のQM/MM（及びその類似）計算が数多く報告されるようになってきている。これら多くの計算研究を見ると、「反応遷移状態を安定化する構造論的要因」を議論する内容が殆どである。これは酵素反応における触媒要因としては「反応遷移状態における基質の相対的な安定化が鍵」という、L. Paulingの時代に遡る古くからの基本概念に由来していると言える。実際ここ数年の計算化学研究を眺める限り、「タンパク質の極性環境が静電相互作用を介し、反応遷移状態を相対的に安定化する事が酵素活性の主要因」とする報告が多い。しかしこれとは異なるアイデアとして「反応の始原系（酵素基質複合体、ES錯体）を不安定化する事により、相対的に反応障壁を低下させうる」と言う作業仮説も存在する。後者においては、古くはPhillips機構に遡る「基質の立体構造歪み」が主要因と考えられるが、現在においても主たる実験手段である結晶構造解析において、高分解能で基質歪みを検証する事が（多くの場合）困難であるため、本作業仮説の検証は理論/計算化学研究において、非常に重要な検討課題として残された問題と言える。これまで我々は、後者の典型例と考えられる酵素、オロチジナーリン酸脱炭酸酵素（Orotidine 5'-mono-phosphate decarboxylase、以下 ODCase）を題材に選び、構造生物学と理論/計算化学を組み合わせ、高分解能な結晶構造を基にしたQM/MM計算による分子モデリング、分子動力学計算による自由エネルギー計算、そしてフラグメント分子軌道法を用いた酵素全系の相互作用エネルギー解析を組み合わせる事で、本酵素の触媒活性の分子論的な起源を検討してきた。

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。本酵素にはこれまで多数の実験研究が存在するが、特に興味を引く点は、酵素非存在下の水溶液中での化学反応と比較して、その反応を $\sim 10^{17}$ ものオーダーで加速しようと言う事実である。常温下の化学反応において、これほどの反応活性を示す酵素はこれまで殆ど知られておらず、金属イオンや補酵素の副次的な作用がない中で、本酵素が示すタンパク質固有の反応場を理解する事は非常に興味深い。

研究目的と計算手法

これまで我々は *Saccharomyces cerevisiae* 由来の構造データ、および *Methanobacterium thermoautotrophicum* 由来の構造データを用いて、反応の律速過程と考えられる脱炭酸過程に注目し、QM/MM 計算を基礎とした分子モデリングと反応解析を行ってきた。今回特に、Fujihashi らにより決定された一連の高分解能結晶構造を基にして、律速過程の反応プロファイルを再検討し、基質歪みをもたらすタンパク質場の影響を分子科学の視点で再考察した。計算/解析手順は以下の通りである：1) QM/MM 計算により反応経路を決定し、MD 計算を併用する事で自由エネルギー変化を評価し、実験結果と比較検討する事でモデリングの妥当性を確認、2) 次に反応経路上の代表点で、基質とタンパク質場との相互作用をフラグメント法ベースの全系量子計算から解析し、主要アミノ酸残基の触媒寄与を見積もる、3) そして反応経路上に沿って分子動力学計算を行う事で、反応に伴うタンパク質のダイナミクス変化を並行して解析し、基質歪みを及ぼす構造論的因子を解析・抽出する。QM/MM 計算などシミュレーション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、分子動力学計算におけるポテンシャル関数、および QM/MM 計算の MM 部分には AMBER(parm. 96) を採用している。

計算/解析結果

Methanobacterium thermoautotrophicum 由来の高分解能構造でモデリングした結果、酵素反応系と溶液系での活性化自由エネルギー差が実験結果を良く再現する事が確認されたので、以後は本構造モデルを基にした計算結果で議論する。今回特に「始原系における基質の構造歪み」が酵素活性に与える影響をより詳細に検討するため、QM/MM 計算による構造最適化から得られた基質構造を用いてエネルギー成分解析を実行する事で、基質の立体歪みが化学反応に及ぼす影響を定量的に解析した。計算機による仮想実験を行い、タンパク質の反応場が基質に与える立体場/静電場の影響を徐々に取り除く事で、脱炭酸過程の活性化エネルギーへ「基質歪み」が寄与する程度を解析した。この結果は、活性化障壁に相当するエネルギー量の約 2 割程度で、相対的に反応障壁を低下させる効果が認められ、「始原系の不安定化」が酵素活性に無視出来ない寄与を持つ事が明らかとなった。さらに、反応経路に沿ってフラグメント法レベルでアミノ酸残基単位の相互作用エネルギー解析を実行する事により、始原系 (ES 錯体)、遷移状態、反応中間体をそれぞれ安定化/不安定化する主要な構造要因をアミノ酸レベルで抽出した。始原系の安定化には主として Lys42, Asp75* が、遷移状態のそれにおいては主として Asp70, Lys72 が主要な要因と確かめられた。過去の実験報告からも Asp70, Lys72 の重要性が示唆されているため、今回更にこれら同一ドメイン上に存在する 2 つのアミノ酸残基をアラニンに変異させた変異型酵素の分子モデルを作成し、同様の手順で自由エネルギー変化を解析する事で、酵素活性の低下を及ぼす分子論的な起源を詳細に検討した。これら結果の詳細は、当日にレポートする予定である。

References

1. Fujihashi, et al. *J.Am.Chem.Soc.* **2005**, *127*, 15048-15050., *J.Mol.Biol.* **2009**, *387*, 1199-1210., *J.Biol.Chem.* **2013**, *288*, 9011-9016.
2. Fujihashi, Ishida, et al. *submitted*.