

F₁-ATPase の触媒活性機構の理論的解析及び新規触媒活性変異体の設計

(京大院・理) ○野口 志保、林 重彦

Theoretical studies on ATP hydrolysis in F₁-ATPase and a rationally designed enzymatic reaction in its variants

(Grad. Sch. Sci., Kyoto Univ.) ○Shiho Noguchi, Shigehiko Hayashi

【序】

F 型 ATPase はミトコンドリアで ATP 合成を行う酵素であり、その F₁ サブユニットである F₁-ATPase は単独では ATP 加水分解反応を引き起こす。本研究では、F₁-ATPase の触媒反応について、ハイブリッド QM/MM 法を用いて解析を行った。まず、ATP 加水分解の反応プロファイルについて QM/MM reweighting free energy SCF 法 (RWFE 法)^[1] に基づき研究を行った。本手法では、化学反応過程におけるタンパク質の熱揺らぎの効果を効率的に取り入れることが可能である。これによって、活性におけるタンパク質の熱揺らぎの役割について議論する。次に、非天然反応である Kemp 脱離に対し触媒活性をもつ F₁-ATPase の変異体のデザインを行った。Kemp 脱離反応の基質である 5-Nitrobenzisoxazole を ATP のアデニン環の代わりにリボースと結合させ、さらに ATP 結合サイトに変異を加えた。反応速度を上げる可能性のある変異体について、QM/MM 計算によって得られた反応プロファイルに基づき議論する。

【結果と考察】

従来型の QM/MM 計算による ATP 加水分解反応プロファイルは、先行研究^[2] によって明らかにされており (Fig. 1)、律速段階は ATP の P_γ-O_β 結合の開裂 (POD) 後のプロトン移動 (PT1) であることが示唆されている。そこで、今回 ATP 加水分解反応において、反応物 (R) と反応中間体 (IM2) について RWFE 法による解析を行った。その結果から、QM 領域の構造において、従来型の QM/MM 計算との比較を Fig. 2 に示した。反応物において、r1 は従来型の計算方法では 3.07 Å であるのに対し、RWFE 法では 3.02 Å と距離が短くなった。同様の傾向が IM2 でも観察されている。これらは、RWFE 法では、Arg373 の+電

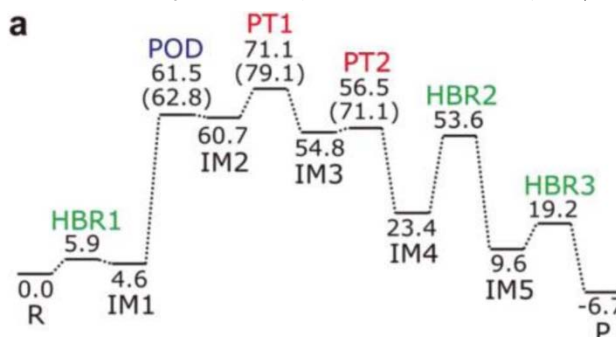


Fig. 1 Reaction profile determined by the QM/MM calculations. Energy diagram of the overall reaction path from Reactant (R) to product (P).^[2]

荷と ATP の O_{γ} の相互作用がより強くなったことを意味し、 O_{γ} がより一電荷をもっている IM2 で安定化がより大きなものとなり、それに伴い POD のエネルギー障壁も減少すると考えられる。そして、IM2 は律速段階である PT1 のひとつ前の段階であり、PT1 と IM2 の構造は似通ったものであることから、反応の活性エネルギーも下がることが期待される。

また、Kemp 脱離に対し触媒活性をもつ F_1 -ATPase の変異体のデザインについては、まず、上述した通り ATP のアデニン環の代わりに 5-Nitrobenzisoazole を結合させたもの (NTP) を作成し (Fig.3) 、 F_1 -ATPase の ATP 結合サイトに配置した。その NTP 結合サイトにある Thr を塩基としてはたらく Glu に変異させ、Glu が水を媒介して NTP のプロトンを引き抜き、Kemp 脱離を引き起こすモデルを考案した。現在、さらにエネルギー障壁を下げる変異について検討中である。詳細については当日発表する予定である。

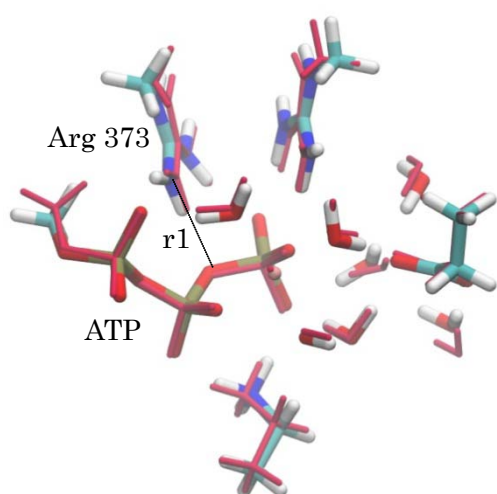


Fig. 2 reactant structure.

The optimized structure by RWFE method is depicted in a standard color code. The structure of the conventional QM/MM optimization drawn in pink is superimposed.

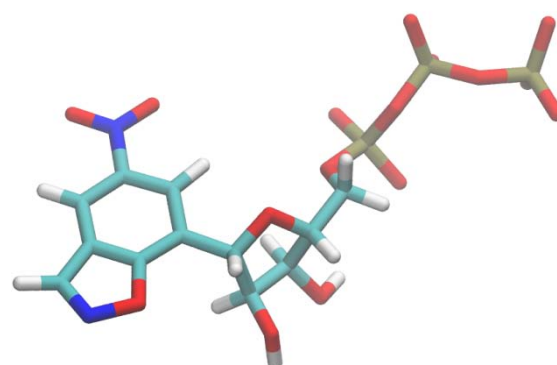


Fig. 3 NTP

【参考文献】

- [1] Kosugi, T.; Hayashi, S. *J. Chem. Theory. Comput.* 2012, **8**, 322-334.
- [2] Hayashi, S. *et al. J. Am. Chem. Soc.* 2012, **134**, 8447-8454.