

1E03

計算ミュレーションを用いた酵素反応の解析

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

Computational mutation analysis for enzymatic reaction

(¹IMCE Kyushu Univ., ²Okayama Univ.) Kazuki Doitomi¹, Takashi Kamachi¹,

Tetsuo Toraya², Kazunari Yoshizawa¹

【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由来の酵素であり、1,2-ジオールを相当するアルデヒドへと変換する反応を触媒する。図1に示すのはこの酵素の反応機構である。最初アデノシルラジカルにより1,2-propanediol (PDO)のC1の水素が引き抜かれ、1,2-diol radicalになる。次に2位の水酸基が1位に転移する水酸基転移反応が進行し、1,1-diol radicalが生じる。その後、水素の再結合が起こり、1,1-propanediolが生じる。図2に示すのはPDOが結合したDDの構造である。中心には金属イオンが存在し、基質の水酸基が金属イオンに直接配位している。虎谷らはこの金属イオンをKと推定した。近年、我々はQM/MM計算により中心金属の再同定を行い、中心金属をCaであると予見した[1]。その後、虎谷らは酵素の活性がCaに大きく依存していることを確認し、中心金属はCaと訂正された。また、虎谷らはSite-Directed Mutagenesisにより変異型酵素を作成し、それらの活性を測定した。変異型では水酸基転移反応の活性化エネルギーの低下に寄与するHis143とGlu170を置換したHis143Ala、Glu170Gln、Glu170Alaの活性を求めた。His143AlaとGlu170Gln変異型の活性はそれぞれ野生型の5.1%と0.02%となり、Glu170Ala変異型では活性はほとんどなかった(<0.01%)。今回、計算ミュレーションを用いてアミノ酸残基の役割および活性に与える影響について検討した。

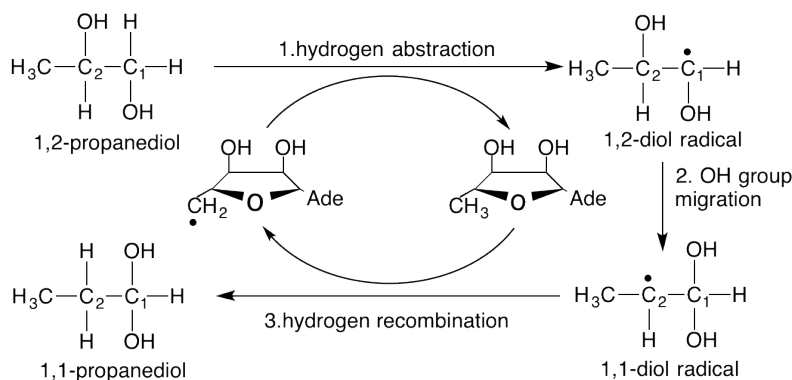


図 1. ジオールデヒドラターゼの反応機構

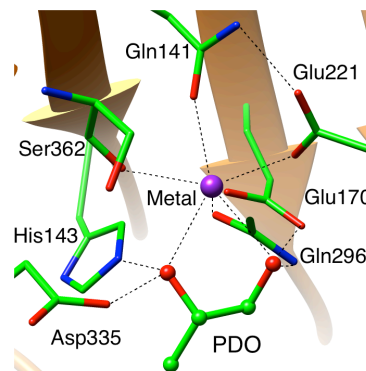


図 2. 活性中心近傍の構造

【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(QM)計算と安価で高速な分子力場(MM)計算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 7 個のアミノ酸残基、金属イオン(Ca²⁺)、基質(PDO)、アデノシルラジカルのリボース部位とした。変異型では His143 をアラニンに Glu170 をグルタミンとアラニンに置換した。

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】

表1に野生型および3個の変異型の各ステップにおける反応の活性化エネルギーを示す。変異導入により水酸基転移反応の活性化エネルギーが大きく上昇していることがわかる。図3に示すように野生型では水酸基転移反応においてC2-O2結合がヘテロリティックに切れることにより電子の非局在化がおき、遷移状態が安定化することが知られている。一方、His143Ala変異型ではこの結合がホモリティックに開裂し、ラジカルが転移する水酸基に局在することが判った。また、Glu170Gln、Glu170Ala変異型では水素を引き抜く残基が存在せず、共鳴安定化が確認されなかった。これらの結果から、His143はとGlu170による相乗効果により遷移状態が安定化することが明らかになった。また、律速段階の活性化エネルギーから計算された酵素の相対活性は実験により得られた相対活性をよく再現しており、酵素反応の解析だけでなく、設計に応用することも期待させる結果となった。当日はこれまでに得られた知見を基に理論計算を用いた酵素反応の解析、および最適化に関して議論する。

表 1. 野生型および変異型の各ステップの活性化エネルギーと相対活性

	Activation energy (kcal/mol)			Relative activity (exp)
	TS1	TS2	TS3	
Wild-type	8.4	12.5	15.9	1.0 (1.0)
His143Ala	8.8	18.0	17.1	3.3×10^{-2} (1.6×10^{-2})
Glu170Gln	12.0	17.4	19.3	4.0×10^{-3} (2.0×10^{-4})
Gln170Ala	17.3	21.0	17.8	2.5×10^{-4} ($< 1 \times 10^{-4}$)

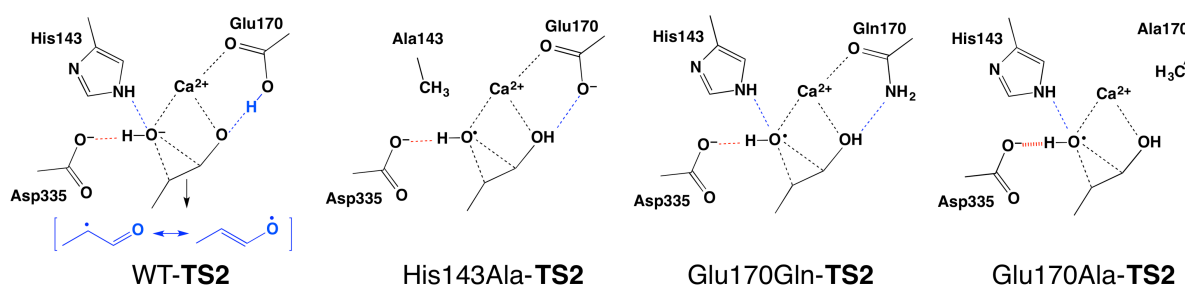


図 3. 野生型および変異型の水酸基転移反応の遷移状態の構造

[1] Kamachi, T.; Takahata, M.; Toraya, T.; Yoshizawa, K. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 8435.

[2] Kamachi, T.; Doitomi, K.; Takahata, M.; Toraya, T.; Yoshizawa, K. *Inorg. Chem.* **2011**, *50*, 2944.

[3] Doitomi, K.; Kamachi, T.; Toraya, T.; Yoshizawa, K. *to be submitted*