

1P090

プリンヌクレオチド生合成系における酵素反応機構の理論的解析

(千葉工大¹, 電通大²) ○安藤 祥樹¹, 三瓶 巖^{1,2}, 河合 剛太¹, 尾上 薫¹, 山本 典史¹

Computational Study about the Biosynthesis of Purine Nucleotide in Glycinamide Ribonucleotide Synthetase, PurD

(Chiba Institute of Technology¹, The University of Electro-Communications²)

○Yoshiki Ando¹, Gen-ichi Sampei², Gota Kawai¹, Kaoru Onoe¹, Norifumi Yamamoto¹

序論

プリンヌクレオチド生合成系は、14ステップの反応過程を経てアデニル酸とグアニル酸を生成する経路である。三瓶らは、この反応系で炭素付加が起こるステップが構造的に類似する酵素 (PurD, PurN, PurU) で触媒されることを明らかにした [1,2]。PurD は N ドメイン, ATP-grasp ドメイン, C ドメインで構成される。PurN は N ドメインと C ドメインのみで構成される。このことから PurD は、進化の過程で PurN に ATP-grasp ドメインが挿入することで形成されたと予想される。また PurU は、PurN のアミノ末端に ACT ドメインを持った構造である。PurD, PurN および PurU は、共通する祖先タンパク質から派生したひとつのファミリーに属する酵素であり、類似の反応機構を利用すると予想される。したがって、これらの酵素群の反応機構を解析して比較することから、これらの酵素群の形成過程を明らかにできる。

PurD は次の2つの反応 (式1と2) を促進する触媒としてはたらく。はじめにグリシン (Gly) を基質とし、ATP の加水分解を伴い、グリシルリン酸 (GP) を生成する:



続いて、ホスホリボシルアミン (PRA) のアミノ基部位が GP のカルボキシル基を求核的に攻撃することで、グリシンアミドリボヌクレオチド (GAR) を生成する:



このように PurD が触媒する反応では、ATP を利用して Gly のカルボキシル基を活性化することで進行する。一方 PurN では、ホルミル基が付加したテトラヒドロ葉酸 (N^{10} -formyl THF) を利用して GAR のホルミル転移反応が進行する:



本研究では、量子化学計算を用いた理論的解析に基づき、PurD, PurN, PurU 酵素が関与する反応のメカニズムを明らかにし、それぞれの反応機構を比較することから、これらの酵素群が形成されるに至った進化的な過程の解明に取り組んでいる。

方法

PurD と PurN 中で進行する酵素反応 (式1-3) について、基質・酵素複合体モデルを文献 (PurD [1] および PurN [2]) に基づき構築し、ストリング法 [3] を用いることで各反応の最小エネルギー経路 (MEP) を決定した。基質・酵素複合体モデルについては、QM/MM-ONIOM 法に基づき、基質部分は量子力学 (QM), 酵素部分は分子力学 (MM) として扱った。QM 部分は B3LYP/6-31(d,p) 精度, MM部分は Amber 力場を用いて計算した。すべての量子化学計算には Gaussian 09 を用いた。QM/MM 法と組み合わせたストリング法は、in-house で実装したプログラムを用いて実行した。

結果と考察

PurD 中で進行する反応 (式 1) について, 対応する MEP に沿ったエネルギー変化を図 1 に示す。エネルギー変化から, この反応の活性化エネルギーは $13.1 \text{ kcal mol}^{-1}$ であり, 終状態に至るエネルギー変化は $8.9 \text{ kcal mol}^{-1}$ であった。図 1 の 4 地点 (a-d) に対応する基質付近の構造を図 2 に示す。図 2 では, 基質分子を ball-and-stick モデル, 基質分子と相互作用するアミノ酸残基を licorice モデル, 酵素を cartoon モデルで表している。

始状態 (図 2 a) では, 基質結合部位の極性残基 Lys や Arg が ATP のリン酸基とグリシンのカルボキシル基と水素結合を介してそれぞれ相互作用する。遷移状態 (図 2 b) では, グリシンのカルボニル酸素が ATP の γ -リン酸基部位を攻撃することで ATP-Gly 活性複合体を形成する。この過程 (a \rightarrow b) では, ATP-Gly 複合体の形成にともなってエネルギーはしだいに高くなり, 遷移状態で $13.1 \text{ kcal mol}^{-1}$ に至る。その後 (b \rightarrow c), ATP の β - γ リン酸結合が切断することでグリシルリン酸を生成する。この過程では, エネルギーは徐々に低くなり, グリシルリン酸を形成した時点 (図 2 c) で 0 kcal mol^{-1} に至る。このとき, Lys や Arg と基質分子が形成する水素結合の組み替わりが起こる。a の時点で ATP のリン酸基と相互作用していた Lys が, c の時点ではリボース部位と相互作用する。同様に, a の時点ではグリシンのカルボキシル基と相互作用していた Arg が, c の時点でグリシルリン酸のリン酸基と相互作用する。グリシルリン酸を生成した後 (c \rightarrow d), ADP のリン酸基が Lys と相互作用を形成し, 酵素との結合状態がさらに安定化されることで, エネルギーが低くなり, 終状態 (図 2 d) では $-8.9 \text{ kcal mol}^{-1}$ に至る。以上のように, PurD 中で進行する反応 (式 1) の MEP を解析した結果, 結合部位近傍のいくつかのアミノ酸残基が基質分子と適宜に相互作用することで, 反応が巧みに促進されることが明らかとなった。PurN 中で進行する反応の MEP 解析については, 討論会の当日にポスター発表する予定である。

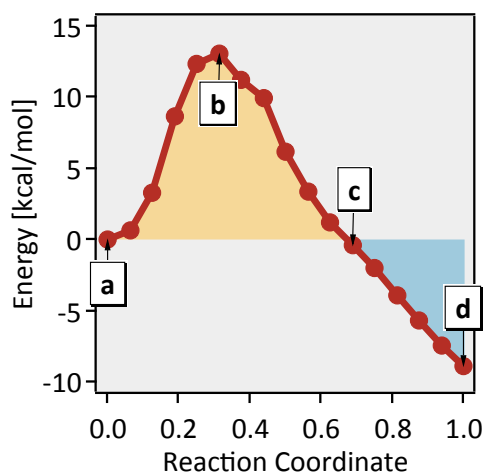


図 1. MEP に沿ったエネルギー変化

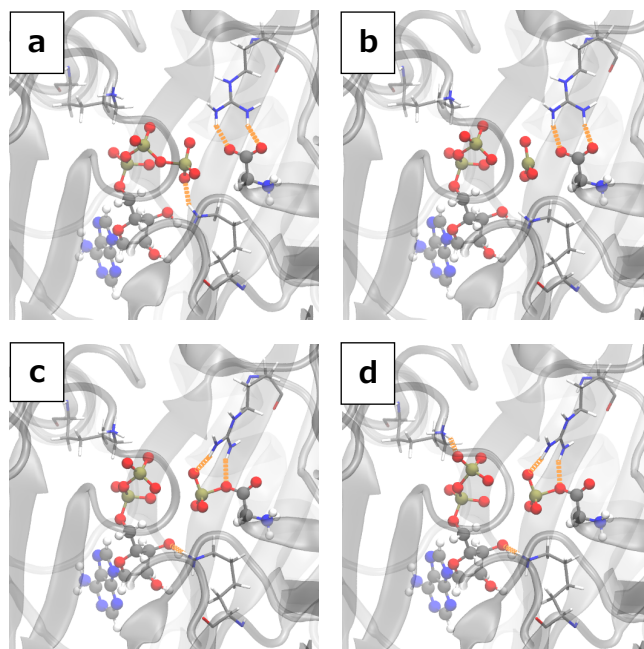


図 2. MEP に沿った構造変化

参考文献

- [1] Sampei, G., et al., *J. Biochem.*, **148**, 429 (2010)
- [2] Sampei, G., et al., *J. Biochem.*, **154**, 569 (2013)
- [3] E, W., et al., *Phys. Rev. B*, **66**, 052301 (2002)