

ニトリルヒドラーゼの触媒機構に関する理論的研究

(筑波大院システム情報*, 筑波大院数理物質**) ○栢沼愛*, 庄司光男**, 重田育照**

A QM/MM study of catalytic mechanism of nitrile hydratase

(Univ. Tsukuba) ○Megumi Kayanuma, Mitsuo Shoji, Yasuteru Shigeta

【序論】

ニトリルヒドラーゼ (NHase) は、ニトリルを水和しアミドを生成する微生物由来の酵素で、化学工業においてアミドの合成に広く用いられている重要な生体触媒の一つである[1]。NHase の活性中心には Fe(III)又は Co(III)イオンが位置し、主鎖の窒素2つおよび3つのシステイン残基(そのうち、1つは-SO、1つは-SO₂に酸化されている)が配位している。しかし、その触媒機構の詳細は未だ明らかにされていない。先行理論研究では、活性中心を切り出したモデル構造を用いて量子化学計算による解析を行っているが [2-4]、周囲のタンパク質環境まで考慮した研究はなされておらず、また、モデルのサイズの違いにより結果が影響をうけている可能性も大いに考えられる。本研究では、量子力学/分子力学混合法 (QM/MM 法)を用いて、Fe(III)を活性中心に持つ NHase に対し、タンパク質環境下において複数の反応経路を同じ条件下で比較することにより、反応機構の解明を行った。

【計算方法】

初期構造として PDB の 3A8O を用い[5]、QM 領域は Fig. 1 に示したとおりである。QM 法には密度汎関数法 (DFT) の B3LYP 汎関数を用い、基底関数として Fe に LANL2DZ、他の原子には 6-31G(d)を用いた。MM 法には AMBER99 力場を用いた。基質のニトリル基の炭素が酸素 (水または α C114 のスルフェン基) と結合を形成する、反応の初期のステップに関し、先行研究で示唆されている4つの反応経路 (Fig. 2) の中間体及び遷移状態構造の探索を行った。

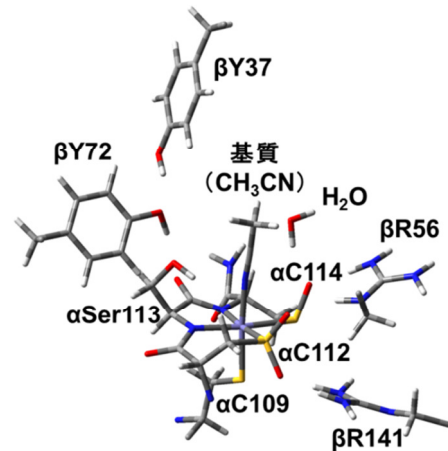


Fig. 1 QM 領域の構造

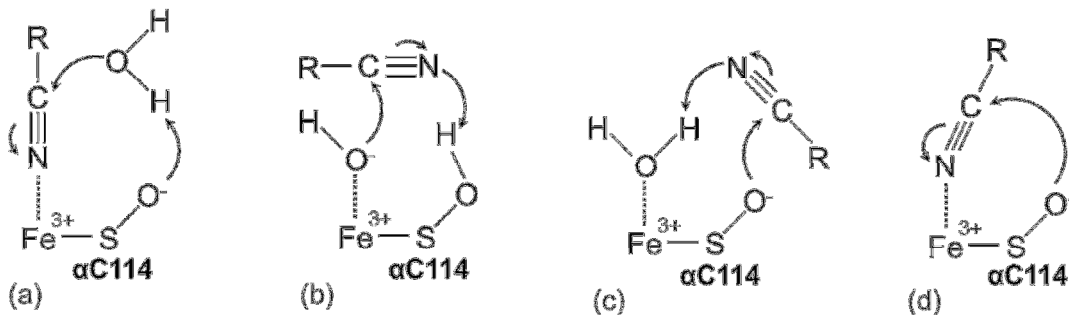


Fig. 2 基質のニトリル基炭素と酸素が結合を形成する4種の反応経路

【結果と考察】

Feに基質が配位した構造よりも、水分子が配位した構造の方が10 kcal/mol エネルギーが低くなった。これは、配位エネルギーの差に加え、後者では広い範囲にわたり水素結合ネットワーク($\beta Y37$ - $\beta Y72$ - $\alpha S113$ -water- $\alpha C112/\alpha C114$ - $\beta R141/\beta R56$)が形成されていることによると考えられる。

Fig. 3に上述の4種の反応経路において生成する中間体構造を示した。反応経路aでは、中間体(Fig. 3(a))の相対エネルギーが-21 kcal/mol、反応障壁が+11 kcal/molであることから、 $\alpha C114$ -SO⁻により活性化された水分子は容易に基質と反応しうることが示された。一方、反応経路bでは、中間体(Fig. 3(b))は+3.0 kcal/mol、反応障壁は+23 kcal/molであり、この経路が関与している可能性は低いと考えられる。これら2つの経路の反応障壁は、活性中心のモデル構造を用いた先行理論研究[2,3]では、同程度であると報告されていたが、タンパク質環境を考慮することによりこの経路が除外されることが判明した。今回の計算により反応経路(a)の遷移状態が低くなった理由として、 $\beta Y72$ から $\alpha S113$ 、 $\alpha S113$ から基質へとプロトンが移動することによる安定化が考えられる。この $\beta Y72$ は $\beta Y37$ とも水素結合している(Fig. 1参照、Fig. 3では省略)ため、脱プロトン化されやすいと考えられる。反応経路3の中間体は+5.0 kcal/molであるが、基質のメチル基が周囲のアミノ酸残基に近い($\alpha Q90$ 及び $\beta R56$)ことから、今回用いたアセトニトリル以外の(より大きい置換基を持つ)ニトリルにおいては、立体反発により生成しえないと考えられる為、この反応経路の可能性は除外した。反応経路4の中間体は-12.5 kcal/molであり、反応経路1の中間体と同様に、 $\beta Y72$ からのプロトン移動を伴う。

以上より、安定なFe-水配位構造から、配位子の交換が起こりFe-基質配位構造となると、反応経路1または4により基質の水和反応が起こる機構が示唆された。遷移状態に関する詳細な解析は当日報告する。

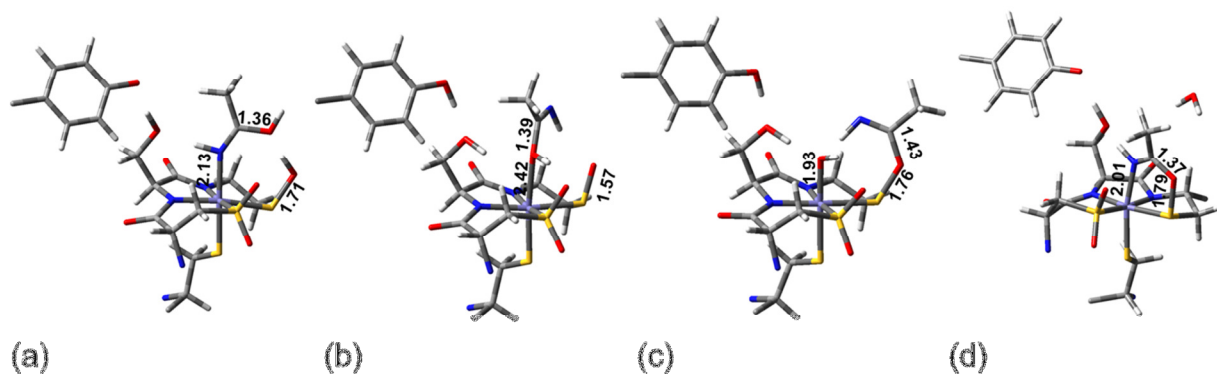


Fig. 3 中間体構造 (a, b, c, d は Fig. 2 に対応)

【参考文献】

- [1] S.Prasad, T.C.Bhalla, *Biotechnol. Adv.* **28** (2010) 725.
- [2] K.H. Hopmann, J.-D. Guo, F. Himo, *Inorg. Chem.* **46** (2007) 4850.
- [3] K.H.Hopmann, F.Himo, *Eur. J. Inorg. Chem.* (2008) 1406.
- [4] K.H.Hopmann *Inorg. Chem.* **53** (2014) 2760.
- [5] Y.Yamanaka, K. Hashimoto, A. Ohtani, K. Noguchi, M. Yohda, M. Odaka *J. Biol. Inorg. Chem.* **15** (2010) 655.