

2P130

大腸菌由来のグルタミン酸デカルボキシラーゼにおける 分子内アルジミンから分子外アルジミンへの転換過程に関する DFT 計算

(三重大院工) ○三谷 昌輝

Density functional study on conversion process from internal aldimine to external aldimine in glutamate decarboxylase from *Escherichia coli*

(Mie Univ.) ○Masaki Mitani

【序】大腸菌において、生育環境が酸性になると脱炭酸反応によりプロトンを消費して酸性度を緩和する、5つの耐酸性機構 (AR1~AR5) が知られている [1]。AR2~AR5 はピリドキサール 5'-リン酸 (PLP) 依存の脱炭酸酵素と対向輸送体から構成されており、AR2 の脱炭酸酵素 (GadB) は L-グルタミン酸 (Glu) から二酸化炭素と γ -アミノ酪酸 (GABA) を生成する反応を触媒する。一般に、PLP 依存酵素の反応機構として、分子内アルジミンから分子外アルジミンへの転換により、PLP のピリジン環と垂直に配向する基質アミノ酸の C_{α} の結合が解離すると考えられている (図 1)。

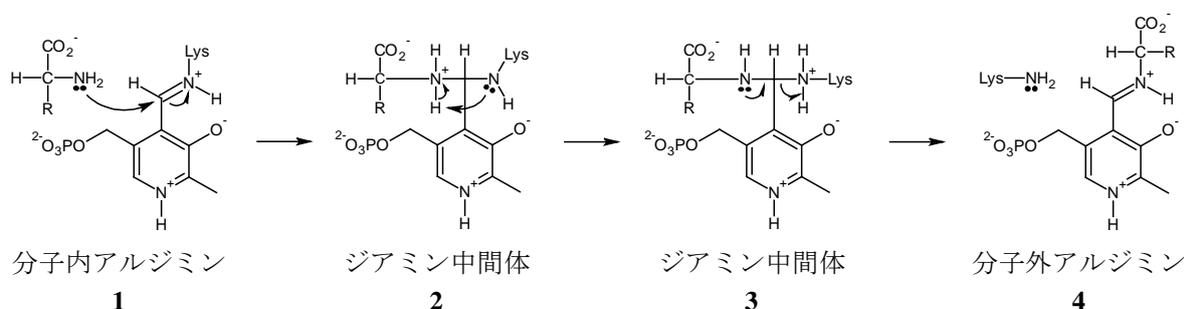


図 1. 分子内アルジミンから分子外アルジミンへの転換反応

しかしながら、阻害剤が結合した酵素の X 線構造は報告されているが [2]、GadB の反応機構の詳細は不明である。本研究では、分子内アルジミンと分子外アルジミン及びその間に存在するジアミン中間体の安定構造を密度汎関数計算により決定し、相対安定性から反応機構を検討した。

【計算】GadB の X 線構造は pH = 7.6 (PDB ID: 1PMO) 及び 4.6 (PDB ID: 1PMM) での構造が報告されており [2]、酵素活性を示す 1PMM 構造では反応活性部位に阻害剤の酢酸イオンが結合している (図 2)。酢酸イオンの結合位置は Glu の側鎖の結合位置と対応すると考えられるので、1PMM 構造から PLP と周辺のアミノ酸 26 残基を取り出し、ペプチド結合を水素原子で終端してモデル分子とした。PLP のピリジン環の窒素と Asp234 の側鎖の酸素は水素結合しており、ピリジン環がプロトン化している構造 X_{Pyr} と Asp234 がプロトン化している構造 X_{Asp} を検討した ($X = 1, 2, 3, 4$)。

密度汎関数計算には B3LYP 汎関数を用い、基底関数には 6-31G* を適用した。構造最適化は、各アミノ酸主鎖の原子 (N, C_{α} , C) を X 線構造の位置に固定して実行した。

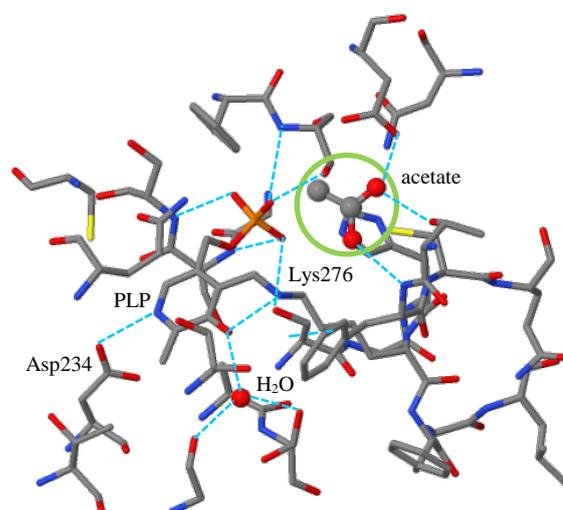


図 2. GadB の反応活性部位の X 線構造

【結果】1~4の安定構造のそれぞれについて、幾つかの異性体の最適化構造が得られた。最安定な構造について、ピリジン環がプロトン化している場合の最適化構造を図3に、相対エネルギー及び結合の生成・解離が起きる炭素(PLP)と窒素(Glu, Lys276)の原子間距離を表1に示す。分子内アルジミンでは1_{Py}rは1_{Asp}より約1 kcal/mol不安定で、ジアミン中間体では2_{Py}rと3_{Py}rは2_{Asp}と3_{Asp}より約2 kcal/mol安定で、分子外アルジミンでは4_{Py}rは4_{Asp}より約1 kcal/mol安定である。1~4に対して、プロトン化状態の違いはPLP-Glu及びPLP-Lys276の結合に大きな影響は与えない。

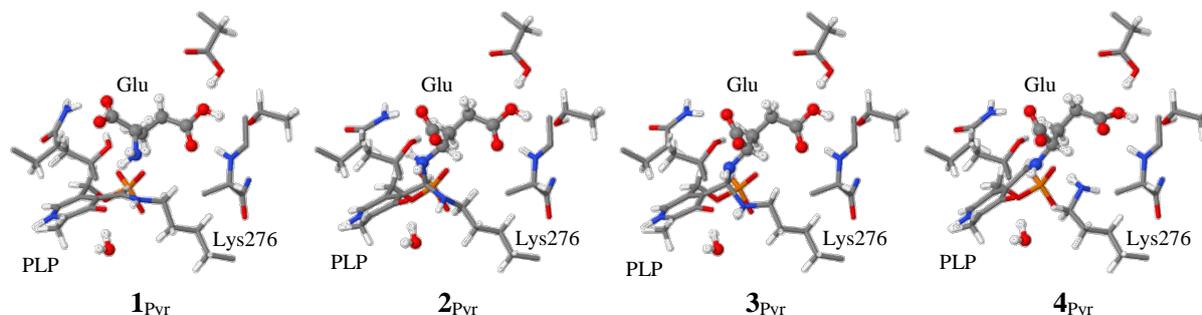


図3. 分子内アルジミン、ジアミン中間体、分子外アルジミンの最適化構造

表1. 分子内アルジミン、ジアミン中間体、分子外アルジミンの相対エネルギーと原子間距離

モデル	E_{tot} (Hartree)	E_{rel} (kcal/mol)	PLP-Glu (Å)	PLP-Lys (Å)
1 _{Py} r	-11683.815118	0.94	3.908	1.304
1 _{Asp}	-11683.816609	0.00	3.979	1.308
2 _{Py} r	-11683.814253	1.48	1.557	1.423
2 _{Asp}	-11683.810489	3.84	1.557	1.425
3 _{Py} r	-11683.818660	-1.29	1.398	1.605
3 _{Asp}	-11683.815160	0.91	1.400	1.605
4 _{Py} r	-11683.816885	-0.17	1.302	3.375
4 _{Asp}	-11683.815710	0.56	1.304	3.388

2 → 3の反応過程ではGluのアミノ基の水素がLys276のアミノ基の窒素へ移動するが、これまでに、直接移動するのではなく、水分子を介して移動する、または、PLPのピリジン環の酸素を経由して移動する、という機構が提案されている。Gluのアミノ基からPLPの酸素へプロトン移動した構造5と5の構造でGluのアミノ基の水素が反転した構造6について、ピリジン環がプロトン化している場合の最適化構造を図4に示す。相対エネルギー(kcal/mol)は、それぞれ、 E_{rel} = 8.50(5_{Py}r), 8.40(5_{Asp}), 8.13(6_{Py}r), 7.54(6_{Asp})である。

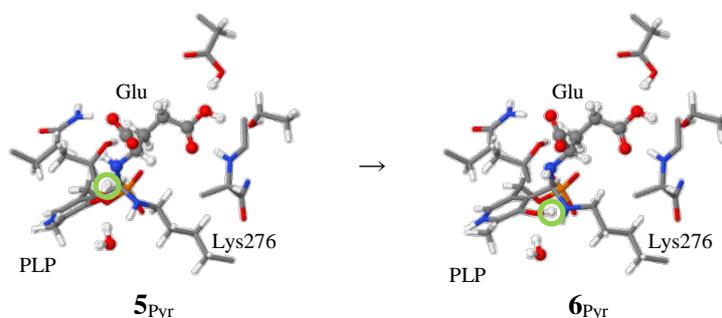


図4. GluからLys276へのプロトン移動における中間体の最適化構造

[1] B. Zhao, W. A. Houry, *Biochem. Cell Biol.*, **88**, 301-314 (2010).

[2] G. Capitani, D. De Biase, C. Aurizi, H. Gut, F. Bossa, M. G. Grütter, *EMBO J.*, **22**, 4027-4037 (2003).