

好熱菌のアラニンラセマーゼによるラセミ化反応の 反応中間体に関する理論的研究

三重大院工

○三谷昌輝

Density Functional Study on Reaction Intermediates of Alanine Racemase from *Bacillus stearothermophilus*

○Masaki Mitani

Graduate School of Engineering, Mie University, Japan

【Abstract】 Alanine racemase from *Bacillus stearothermophilus* (BsAlr) is the pyridoxal 5'-phosphate (PLP)-dependent enzyme which catalyzes the interconversion between L- and D-alanine. The racemization reaction proceeds with the two-base mechanism, in which Tyr265' and Lys39 act on L- and D-alanine as catalytic bases to abstract the α -hydrogen. The abstracted proton is transferred between the hydroxyl group of Tyr265' and the ϵ -amino group of Lys39. Two reaction mechanisms with the different pathway of proton transfer have been proposed: the proton transfer is mediated by (a) the carboxyl group of substrate alanine and (b) water molecules. In this study, stable structures for the reaction intermediates of BsAlr were examined by B3LYP/6-31G* calculations. Model system was constructed from the X-ray structure of BsAlr bound with L-alanine (PLP-L-Ala, PDB ID: 1L6F). The relative energies of PLP-L-Ala, the most unstable intermediate, and PLP-D-Ala are 5.8, 14.6, and 3.3 kcal/mol and 0.0, 15.0, and 2.3 kcal/mol for models (a) and (b), indicating that no significant difference is seen in stability of the most unstable intermediates for two reaction mechanisms.

【序】 好熱菌のアラニンラセマーゼ (BsAlr) は、ピリドキサル 5'-リン酸 (PLP) 依存酵素であり、L 体と D 体のアラニンを相互変換する反応を触媒する。ラセミ化反応は二塩基機構で進行し、Tyr265' と Lys39 がそれぞれ L-アラニンと D-アラニンから α -水素を引き抜く。引き抜かれたプロトンは Tyr265' の水酸基と Lys39 の ϵ -アミノ基の間でプロトン移動するが、これまでに基質アラニンのカルボキシル基を経由する機構[1]と水分子が媒介する機構[2]の二つが提案されており、反応機構の詳細は不明である。本研究では、二つの反応機構について、ラセミ化の各反応過程に対応する反応中間体の構造を密度汎関数計算により決定し、相対安定性を検討した。

【計算】 Fig. 1 に示す L-アラニンが PLP と結合した BsAlr の X 線構造 (PDB ID: 1L6F) [1] から PLP-L-Ala および Lys39 と Tyr265' を含む周辺のアミノ酸 25 残基と 6 個の水分子を取り出し、ペプチド結合を水素原子で終端してモデル分子とした。酵素のアミノ酸残基主鎖の N, C α , C を X 線構造の位置に固定して、B3LYP/6-31G* 計算により構造最適化を行った。

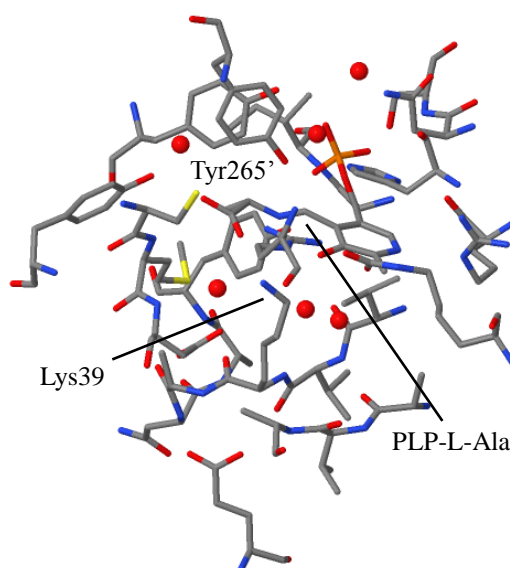


Fig. 1. X-Ray Structure of BsAlr Bound with L-Alanine.

L-アラニンから D-アラニンへの変換過程について、二つの反応機構のプロトン移動をまとめると、(a) PLP-NH-C α HCH₃-COO⁻ (アラニンの α -水素) \rightarrow Tyr265'-OH (水酸基の酸素) と Tyr265'-OH (水酸基の水素) \rightarrow PLP-NH-C α HCH₃-COO⁻ (カルボキシル基の酸素) の協奏的移動 \Rightarrow PLP-NH-C α ⁻CH₃-COOH (カルボキシル基の水素) \rightarrow Lys39-NH₂ (ϵ -アミノ基の窒素) と Lys39-NH₂ (ϵ -アミノ基の水素) \rightarrow PLP-NH-C α ⁻CH₃-COOH (アラニンの α -炭素) の協奏的移動 \Rightarrow PLP-NH-C α HCH₃-COO⁻ [1], (b) Tyr265'-OH (水酸基の水素) \rightarrow H₂O \rightarrow 系外の移動 \Rightarrow 系外の水素 \rightarrow H₂O \rightarrow Lys39-NH₂ (ϵ -アミノ基の窒素) の移動 \Rightarrow PLP-NH-C α HCH₃-COO⁻ (アラニンの α -水素) \rightarrow Tyr265'-O⁻ (水酸基の酸素) の移動 \Rightarrow Lys39-NH₃⁺ (ϵ -アミノ基の水素) \rightarrow PLP-NH-C α ⁻CH₃-COO⁻ (アラニンの α -炭素) の移動 \Rightarrow PLP-NH-C α HCH₃-COO⁻ [2]となる. これらのプロトン移動経路に沿って、反応中間体を探索した.

【結果】 モデル(a)とモデル(b)は反応の出発構造において Tyr265'の水酸基の配向が異なっており、水酸基の水素は、モデル(a)では L-Ala のカルボキシル基の酸素と水素結合し、モデル(b)では水分子の酸素と水素結合する. X線構造では L-Ala と PLP の間の-NH=CH-結合が PLP のピリジン環と同一平面にない構造となっており、L-Ala のアミノ基の水素が Lys39 の ϵ -アミノ基の窒素と水素結合した最適化構造 (**1a**, **1b**) が得られたが、この-NH=CH-結合が PLP のピリジン環と同一平面にある構造にすると、L-Ala のアミノ基の水素が PLP のピリジン環の酸素と水素結合した最適化構造 (**2a**, **2b**) が得られた (Fig. 2). **2a** は **1a** より 12 kcal/mol 安定であり、**2b** は **1b** より 17 kcal/mol 安定であるため、二つの反応機構の出発構造は **2a** と **2b** であると考えた.

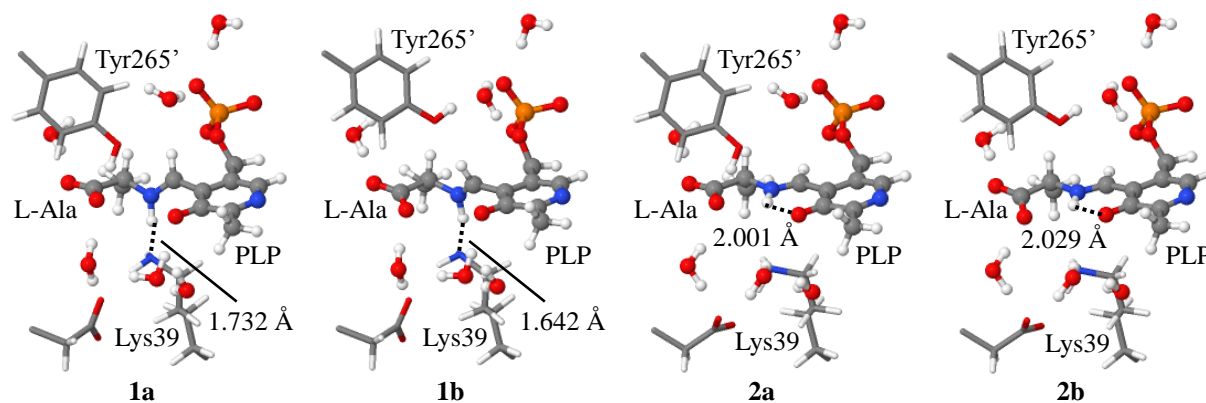


Fig. 2. Optimized Structures of Reactant for Models (a) and (b).

反応機構(a)では、プロトン化した L-Ala のカルボキシル基が回転して Lys39 の ϵ -アミノ基と水素結合し、プロトンはカルボキシル基 \rightarrow ϵ -アミノ基と ϵ -アミノ基 \rightarrow α -炭素で協奏的に移動すると提案されているが、モデル計算(a)では、プロトンはカルボキシル基 \rightarrow 水分子 \rightarrow ϵ -アミノ基 \rightarrow α -炭素と逐次的に移動する中間体を得られた. モデル計算(b)では、反応機構(b)で提案されたプロトン移動に対応する中間体を得られた.

反応物の PLP-L-Ala, 最も不安定な中間体, 生成物の PLP-D-Ala の相対エネルギーは、モデル(a)では 5.8 kcal/mol, 14.6 kcal/mol, 3.3 kcal/mol, モデル(b)では 0.0 kcal/mol, 15.0 kcal/mol, 2.3 kcal/mol であり、二つの反応機構において最も不安定な中間体の安定性に顕著な差は見られない.

【参考文献】

- [1] A. Watanabe *et al.* *J. Biol. Chem.* **277**, 19166 (2002).
 [2] M. A. Spies *et al.* *Biochemistry* **42**, 5099 (2003).