

3P071

## ***Candida antarctica* Lipase Bによる $\beta$ -lactam開環重合反応に対する 基質配向効果に関する理論的研究**

<sup>1</sup>名古屋大院・情報科学, <sup>2</sup>名古屋大学院・情報学, <sup>3</sup>JST CREST  
○伊藤克浩<sup>1</sup>, 栗崎以久男<sup>2,3</sup>, Chantal Barberot<sup>1,3</sup>, 鈴木雄一<sup>2</sup>, 長岡正隆<sup>2,3</sup>

### **Theoretical study on the effect of substrate orientation on $\beta$ -lactam ring opening polymerization reaction by *Candida antarctica* Lipase B**

○Katsuhiro Ito<sup>1</sup>, Ikuo Kurisaki<sup>2,3</sup>, Chantal Barberot<sup>1,3</sup>, Yuichi Suzuki<sup>2</sup>, Masataka Nagaoka<sup>2,3</sup>  
<sup>1</sup>Graduate School of Information Science, Nagoya University, Japan  
<sup>2</sup>Graduate School of Informatics, Nagoya University, Japan  
<sup>3</sup>CREST-JST

**【Abstract】** *Candida antarctica* Lipase B (CALB) can catalyze the polymerization reaction of poly( $\beta$ -alanine) using  $\beta$ -lactam as a substrate. Meanwhile, poly( $\beta$ -alanine) obtained from this reaction is three times shorter with regard to the average degree of polymerization than that derived from conventional methodologies, then being still insufficient for practical use. Remembering improvement of the performance of this CALB catalyzed polymerization reaction, we examined the reaction mechanism on the basis of energetics by employing QM/MM calculations. It has been supposed that  $\beta$ -alanine can be generated from  $\beta$ -lactam ring opening reaction and hydrolysis of CALB- $\beta$ -alanine acyl-enzyme intermediate, referred to as Path-A and Path-B, respectively. However, our QM/MM calculations show the preference of Path-B because the activation energy is lower by 20 kcal/mol than that of Path-A. Preference of Path-B suggests that poly( $\beta$ -alanine) elongation can occur via two different pathways, nucleophilic attack of  $\beta$ -alanine to CALB- $\beta$ -alanine acyl-enzyme intermediate and nucleophilic attack of poly( $\beta$ -alanine) to CALB-poly( $\beta$ -alanine) acyl-enzyme intermediate. According to this suggestion, we are now examining practically-employed elongation pathway by calculating free energy profile of CALB-poly( $\beta$ -alanine) association. The details will be shown on the board.

**【序】** 酵素の一種である *Candida antarctica* Lipase B (CALB)は、有機溶媒中で poly( $\beta$ -alanine)の合成反応を行うことが知られており、自然環境への負荷を軽減できる代替手段として注目されている。一方、この反応から得られる生成物は平均重合度および最大重合度において従来の手法で得られる poly( $\beta$ -alanine)の三分の一程度と、実用上、未だ十分ではない。そこで、CALB による poly( $\beta$ -alanine)合成反応の改善を念頭に、本研究では  $\beta$ -alanine 生成経路の反応メカニズムの解明に取り組んだ。この反応では、実質的な単量体分子である  $\beta$ -alanine が  $\beta$ -lactam の開環反応を経て反応溶液中に供給される。 $\beta$ -alanine 生成経路には、 $\beta$ -lactam の in situ 開環反応 (Fig. 1 の Path-A) と、CALB- $\beta$ -alanine アシル化酵素中間体の加水分解反応 (Fig. 1 の Path-B) の二種類が想定されている[1,2]。そこで、我々は計算化学的手法を用いて、 $\beta$ -alanine 単量体生成経路である Path-A および Path-B の反応エネルギープロファイルを計算し[3]、Path-A と Path-B の活性化エネルギーを比較することから、これらの反応の相対的な起こりやすさを調査する。さらに、これを踏まえて、poly( $\beta$ -alanine)の合成反応において、基質である poly( $\beta$ -alanine)の配向が合成反応に及ぼす効果について考察する。これによって、poly( $\beta$ -alanine)合成反応の改良に向けた方針を得ることができると期待している。

【方法 (実験・理論)】 Path-A および Path-B 各々について、反応物に対応する CALB 構造-基質分子複合体を用意し、2769 個のトルエン分子で溶媒和した。363 K の定温定積条件下で 4 ns の分子動力学シミュレーションを行い、QM/MM 計算に用いる構造を得た。反応中間体および生成物の構造は反応物の構造を元に、*in silico* モデリングで作成した。QM/MM 計算を B3LYP/6-31G(d,p) レベル/Amber Force Field 99SB[4]で行い、反応エネルギープロファイルを計算した。また、アンブレラサンプリングを用いて自由エネルギープロファイルを調べた。

【結果・考察】 Path-B に比べて、Path-A の活性化エネルギーは 20 kcal/mol 大きいことがわかった(Fig. 2)。このことは、 $\beta$ -alanine 単量体の生成が主に Path-B によることを示唆している。その結果、poly( $\beta$ -alanine)の伸長反応は、CALB- $\beta$ -alanine アシル化酵素中間体に対する poly( $\beta$ -alanine)の求核攻撃 (伸長サイクル 1) と、CALB-poly( $\beta$ -alanine)アシル化酵素中間体に対する  $\beta$ -alanine 単量体の求核攻撃 (伸長サイクル 2) の 2 通りで進行し得ると言える。特に、伸長サイクル 1 はこれまで注目されていなかった。

伸長サイクル 1 と 2 との違いは、poly( $\beta$ -alanine)のアミノ基が CALB の触媒三残基の一つである Ser<sup>105</sup> 側を向くか、カルボキシ基が Ser<sup>105</sup> 側を向くかにある(Fig. 3)。こうした、活性部位内で poly( $\beta$ -alanine)が取る基質の配向の効果は、伸長サイクルの相対的な起こりやすさに関わると考えられる。そこで、現在、poly( $\beta$ -alanine)と Ser<sup>105</sup> の会合過程の自由エネルギープロファイルを調査している。その詳細な結果については発表当日に報告する予定である。

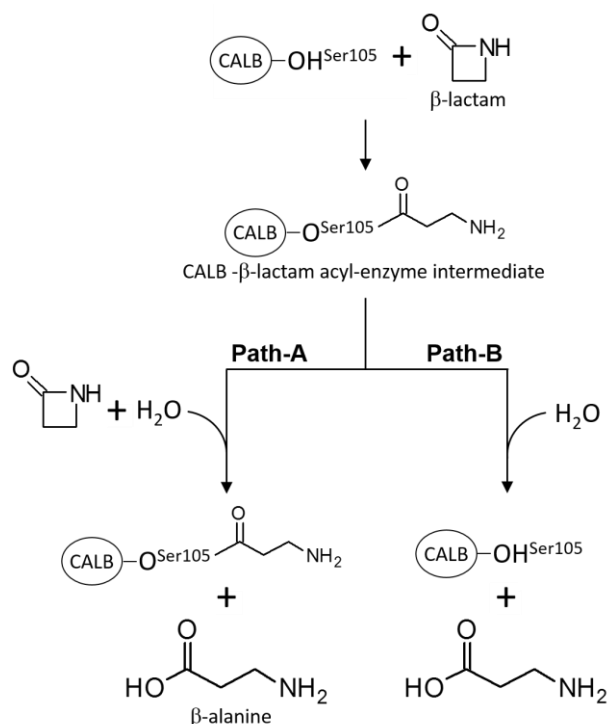


Fig. 1.  $\beta$ -alanine monomer generation pathway.

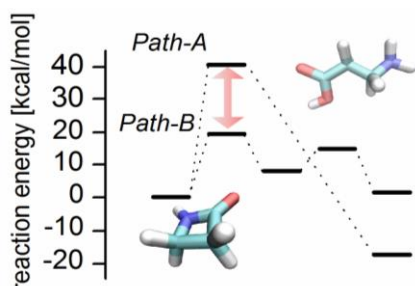


Fig. 2 Activation energies of Path-A and Path-B derived from the QM/MM calculations.

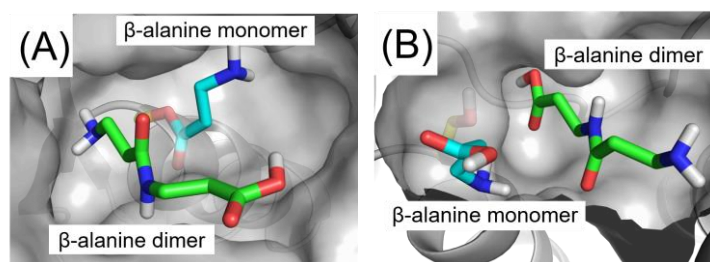


Fig. 3 Orientation of  $\beta$ -alanine dimer to Ser<sup>105</sup> in the active site of CALB. (A) Elongation cycle 1. (B) Elongation cycle 2.

### 【参考文献】

- [1] L. W. Schwab, R. Kroon, A. J. Schouten, K. Loos, *Macromol. Rapid Commun.*, **29**, 794-797 (2008).
- [2] I. Baum, B. Elsässer, L. W. Schwab, K. Loos, G. Fels, *ACS Catal.*, **1**, 323-336 (2011).
- [3] C. Barberot, I. Kurisaki, Y. Suzuki, K. Ito, M. Nagaoka, submitted for publication to *J. Phys. Chem. B*.
- [4] V. Hornak, R. Abel, A. Okur, B. Strockbine, A. Roitberg, C. Simmerling, *Proteins: Struct. Funct. Bioinf.*, **65**, 721 (2006).