

リパーゼのエナンチオ選択性の発現に関する量子化学的反応機構解析

九大院総理工

○汐見彩花, 折本裕一, 青木百合子

Quantum Chemistry Approach to the Reaction Mechanism for Enantioselectivity of Lipase

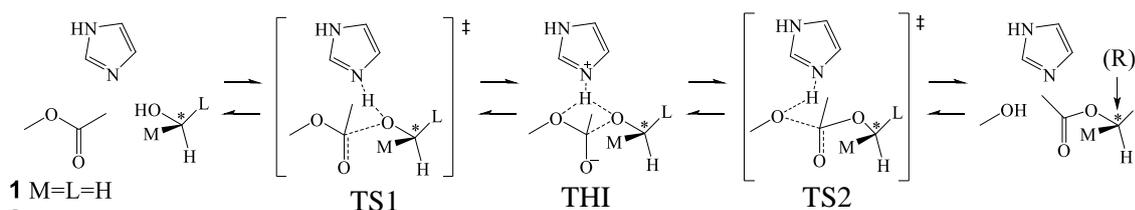
○Ayaka Shiomi, Yuuichi Orimoto, Yuriko Aoki

Interdisciplinary Graduate school of Engineering Sciences, Kyushu University, Japan

【Abstract】 In order to use an enzymatic reaction for asymmetric synthesis of compounds, it is important to understand the mechanism of enantioselectivity by enzyme from microscopic viewpoint. In this study, quantum chemistry (QC) approach was applied to clarify the enantioselective lipase-catalyzed acylation reaction of alcohol. This reaction was considered to be a two-step process through two transition states (TSs) and tetrahedral intermediate (THI), that is, acyl enzyme—alcohol bounding step (TS1) and the next detachment of acylated alcohol from the enzyme (TS2). Previous report by other group using semi-empirical calculations showed the existence of THI and enantioselective TS2 step. We analyzed the reaction mechanism by higher-level QC calculations than the previous report. Our results proposed more efficient reaction pathway without THI, and implied the importance of tryptophan around the active site for the enantioselectivity.

【序】 酵素反応を化合物の不斉合成に役立てるには、エナンチオ選択性の反応機構を微視的な立場から解明することが重要である。本研究では量子化学的手法により、加水分解酵素リパーゼを触媒とするアルコールのエナンチオ選択的アシル化反応の機構解明を試みた。半経験的計算レベル(PM3)で行われた従来研究^[1]では、本反応はアシル酵素とアルコールの結合段階(遷移状態(TS1))の後、四面体中間体(THI)を経てアシル化されたアルコールが酵素から脱離(TS2)する 2 段階反応(Scheme 1)からなり、TS2 がエナンチオマーの識別段階であると報告されている。本研究ではより高精度な量子化学計算による反応機構の解明に取り組み、さらに当グループ開発のスルースペース/ボンド解析法^[2]により軌道相互作用の観点からエナンチオマー識別機構を明らかにしていく。

【方法】 リパーゼによるアルコールのエナンチオ選択的アシル化反応のモデルとして、イミダゾールを触媒としたメチルアセテートとメタノールのエステル交換反応(1:M=L のためキラル中心は消失)を用いた(Scheme 1)。遷移状態計算を行い、振動解析、IRC(Intrinsic Reaction Coordinate)計算により反応経路を確認した。1-フェニルエタノールのエナンチオ選択的アシル化反応(2)についても同様に計算を行い、エナンチオ選択性の発現機構解明に取り組んだ。



1 M=L=H
2 M=Methyl, L=Phenyl

Scheme 1. Reaction of transesterification between alcohol and methyl acetate.^[1]

【結果・考察】 先行研究^[1]との比較のため、PM3とB3LYP/6-31G(d)の2つの計算レベルで得たモデル反応(1)のEnergy ProfileをFig. 1、2にそれぞれ示した。PM3(Fig.1)では中間体THIを通る2段階反応が得られたが、B3LYP/6-31G(d)(Fig.2)ではTHIのないより効率的な1段階反応という結果を得た。近年、同じ触媒3残基をもつセリンプロテアーゼについてTHIの有無が議論となっており^[3]、リパーゼについても同様に中間体を通過しない反応経路の可能性を本結果は示唆している。ここで1段階反応(Fig.2)のTSは、2段階反応(Fig.1)のTHIとTS2の中間的構造であることも分かった。

実験によると1-フェニルエタノールのエナンチオ選択的アシル化反応では、S体よりもR体の反応速度が大きい^[1]。今回モデル反応(2)の計算で得たR体(R-TS)とS体(S-TS)の活性化エネルギーを比較すると(Table 1)、基底関数が大きくなるとともに、S体に対するR体の優位性が顕著になった。ここで、フェニル(Ph)基が上方向を向いているR-TSと比べて、S-TSではPh基がやや下(手前)方向を向いている(Fig.3)。酵素内では活性部位の周囲にあるTryptophan(Trp)との反発のため(Fig.4)、S-TSは実際には取りえない配座である。そこで、Ph基が上方向を向いたS体の準安定な遷移構造(MetaS-TS、Fig.3)とR-TSを比較するとR体の優位性はさらに増大した(Table 1)。さらに熱補正によるGibbs自由エネルギーを考慮しても一部例外もあるがおおよその傾向は変わらないことが分かった。今後、実際にTrpを含む周囲構造を取り込んだモデル(Fig.4)に対してエナンチオ選択性に作用しているアミノ酸残基などを詳細に解析していく。

Table 1. Activation energy (kcal/mol) for R-TS, S-TS and MetaS-TS

		$\Delta E^{a, b)}$	$\Delta G^{a, b, c)}$
B3LYP /6-31G(d)	R-TS	43.4 (0.0)	48.0 (0.0)
	S-TS	43.0 (-0.4)	47.5 (-0.5)
	MetaS-TS	45.0 (+1.6)	48.2 (+0.2)
B3LYP /6-31G(d,p)	R-TS	45.9 (0.0)	48.8 (0.0)
	S-TS	43.7 (-2.2)	47.7 (-1.1)
	MetaS-TS	45.8 (-0.1)	50.5 (+2.0)
B3LYP /6-31+G(d)	R-TS	45.4 (0.0)	50.1 (0.0)
	S-TS	45.8 (+0.4)	51.5 (+1.4)
	MetaS-TS ^{d)}	46.5 (+1.1)	52.0 (+1.9)
B3LYP /6-31+G(d,p)	R-TS	45.5 (0.0)	52.1 (0.0)
	S-TS	46.8 (+1.3)	52.4 (+0.3)
	MetaS-TS ^{d)}	47.5 (+2.0)	52.2 (+0.1)

a) Energy difference between reactant and TS. b) Parentheses show relative energy to R-TS. c) Gibbs free energy (298 K, 1atm) calculated by thermal correction of total energy. d) Single point calculation for modified model based on S-TS structure because no TS stationary point was found for the focused conformation.

【参考文献】 [1] T. Ema, J. Kobayashi, S. Maeno, T. Sakai, and M. Utaka, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **71**, 443 (1998). [2] A. Imamura, H. Sugiyama, Y. Orimoto, and Y. Aoki, *Int. J. Quantum Chem.*, **74**, 761 (1999). [3] J. Á. M.-González, M. González, L. Masgrau, and R. Martínez, *ACS Catal.* **5**, 246 (2015).

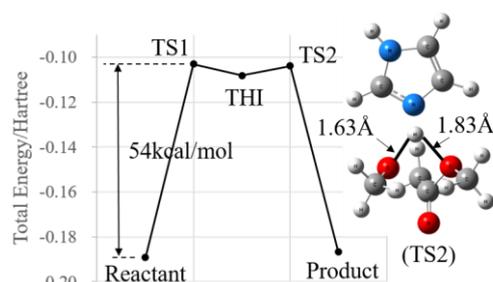


Fig 1. Energy Profile (PM3).

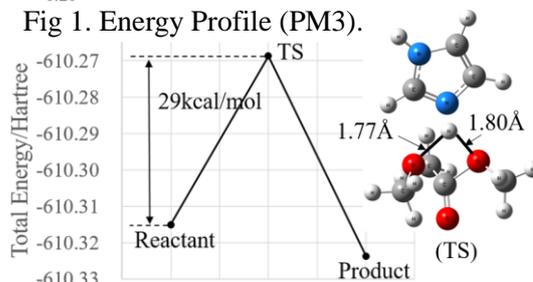


Fig 2. Energy Profile (B3LYP/6-31G(d)).

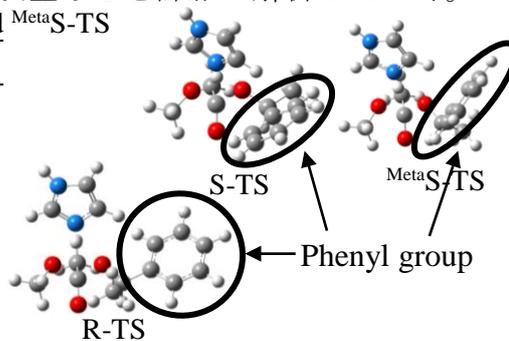


Fig 3. Structures for R-TS, S-TS, and MetaS-TS

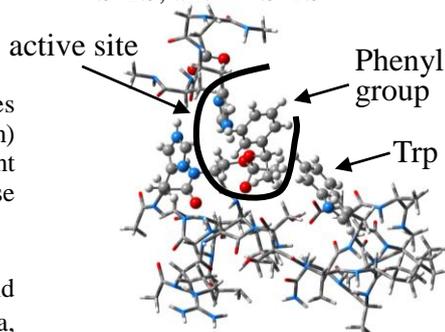


Fig 4. TS model containing the surrounding structure around active site in lipase (PDB: 4TGL).