

4Pa047 アセチルコリンエステラーゼの酵素触媒メカニズム：理論的研究

(北大院医・#北大院工) ○五十嵐 学, #田地川 浩人, 西平 順, 石橋 輝雄

【序論】 アセチルコリン (ACh) は、コリンアセチル転移酵素の触媒作用により、アセチル CoA のアセチル基をコリンに転移させることによって合成される、神経伝達物質 (neurotransmitter) である。アセチルコリンは主に神経終末の細胞質とシナプス小胞の両方に含まれ、神経筋接合部と呼ばれるシナプスにおいて信号を伝達する。

神経伝達物質により引き起こされたシナプス後電位は短時間で静止電位に戻るが、このメカニズムは神経伝達物質の種類により「再吸収 (神経伝達物質を急速に回収する)」もしくは「酵素による不活性化 (酵素が神経伝達物質を壊す)」の、どちらかの機構により起こる。ACh の場合は後者、「酵素による不活性化」により後電位が終結するが、この ACh を不活性化させる (加水分解する) 酵素をアセチルコリンエステラーゼ (acetylcholinesterase: AChE) という。AChE はセリンエステラーゼの一種である。その反応機構を図 1 に示す。

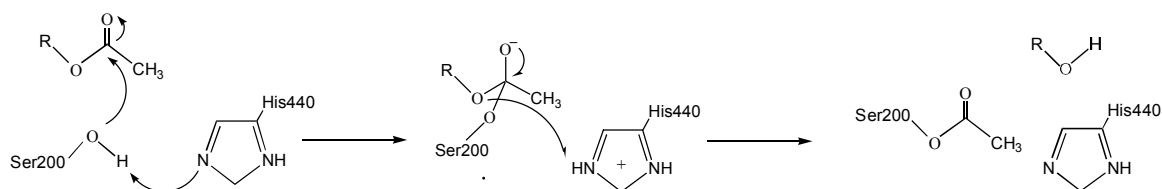
ACh および AChE に関する研究は、生体内に関連して非常に重要であるため、理論的、実験的観点から様々な研究が行われてきている。本研究では、acylation step の一段階目の反応 (正四面体中間体生成まで) について研究する。酵素反応全体としては拡散が律速であるが、基質と活性サイトが出会った後の速度を決定するのはこの段階であり、反応を支配している重要な step とも言える。本研究では、基質や oxyanion hole が反応にどのような影響を及ぼすかを、static な ab initio 計算から得られたポテンシャルエネルギー曲面 (PES) を基に議論する。

【結果と考察】

A. AChE におけるプロトン移動

Ser200-His440-Glu327 間でのプロトン移動に関するポテンシャル面を図 2 に示す。エネルギーのゼロ点は、図中 a 点であり、Ser200-His440-Glu327 において、2つのプロトンが、それぞれ、Ser および His にある状態であり、Glu327 は、RCOO⁻ アニオン状態で存在する。この a 点での位置は、 $r_1=1.794$ および $r_2=1.020$ Å である。Ser200 から His440 へプロトンが移動すると、系のエネルギーが急激に増加し、 $r_1=1.194$ 、 $r_2=1.070$ Å の位置で遷移状態を迎え、その後、エネルギーはわずかに安定化し、His440 へプロトンが移動した状態 (b 点) へ至る。a→b への活性化エネ

Acylation



Deacylation

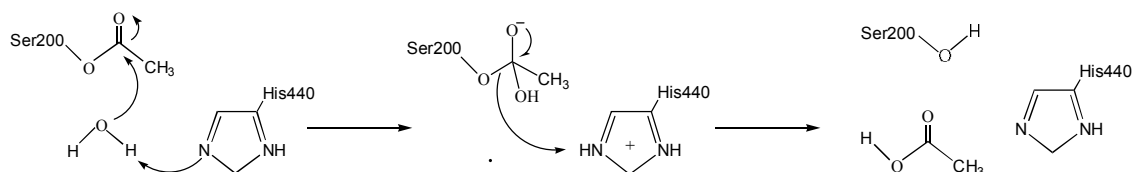


図 1 AChE 触媒による ACh の加水分解反応メカニズム

ルギーは、HF/6-31G(d)//HF/3-21G(d) レベルで、34.8 kcal/molである。この状態から、His440→Glu327への第二段階のプロトン移動が起こる (b→d) と、4.5 kcal/mol (a点に対して、38.5 kcal/mol) の活性化エネルギーでd点へ至る。d点でのエネルギーは、初期配置により35.0 kcal/mol不安定化する。a→b→dへのプロトン移動は、Ser200 から、His440 を経由して、Glu327 へのプロトン移動であり、Charge-relay に相当する。

これに対して、His440 から Glu327 へプロトン移動が起こった後、Ser から His440 への第二のプロトン移動が起こった場合 (経路 a→c→d) の活性化エネルギーは、37.5 kcal/mol となり、charge-relay の経路と、ほぼ同じ障壁を持つことが示された。

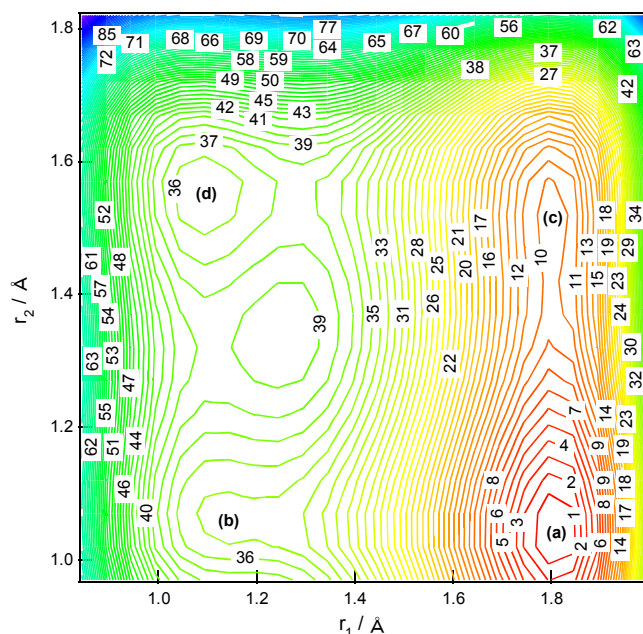


図2 catalytic triad のみのプロトン移動のポテンシャル面

B. AChE-substrate-oxanion hole 系におけるプロトン移動

次に、Ser200-His440-Glu327系に、基質およびその周りのオキシアニオンホールを加えた系でのポテンシャルエネルギー面を計算した。その結果を、図3に示す。Charge-relay メカニズムによるダブル・プロトン移動の活性化エネルギーは、a→bおよびb→dで、28.5 kcal/mol および 4.0 kcal/mol (a点に対して、30.5 kcal/mol) であった。これに対して、経路 a→c→dでは、8.8 kcal/mol および 30.5 kcal/mol と、charge-relay メカニズムと、ほぼ同程度の障壁が存在することが明らかになった。2つのプロトンが同時に、移動する経路 (a→d) の障壁は、33.5 kcal/mol となり、前述の2つの経路よりも、エネルギーが高い。また、プロトン移動が完了した配置 (d点) でのエネルギーは、基質 - オキシアニオンホールが存在しない場合よりも、9.5 kcal/mol 安定化しており、オキシアニオンホールの存在が、AChEの酵素触媒メカニズムにおいて、極めて重要であることが示された。講演では、正四面体中間体生成過程でのポテンシャル面の変化および反応メカニズムの詳細を議論する。

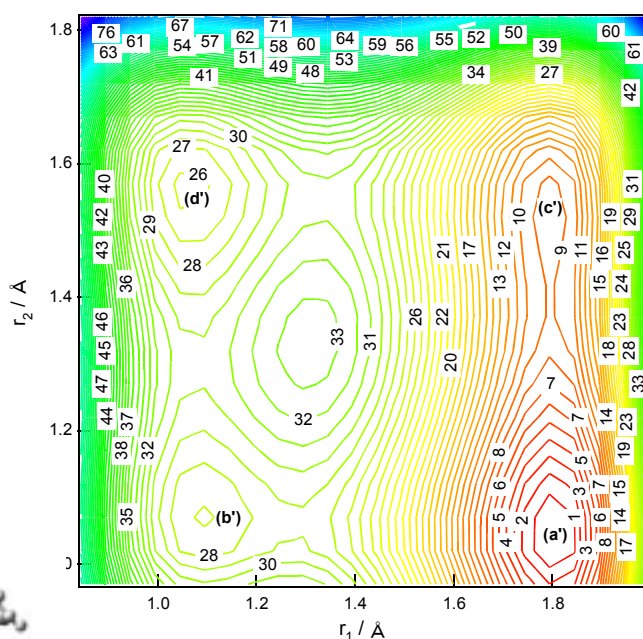


図3 catalytic triad-substrate-oxanion hole 系のプロトン移動のポテンシャル面

