2C07　リパーゼのアシル化反応におけるコンフォーメーション依存性

(UCLA, Department of Chemistry and Biochemistry) ○鷹野　優，K. N. Houk

【序】生命活動において分子認識は免疫反応や神経伝達など様々な形で重要な役割を果たしている。生体内の化学反応の触媒するために遷移状態を安定化する様な活性部位を構成している点で酵素も分子認識を利用している。リパーゼは種によって分子量やアミノ酸配列が大きく異なるにも関わらず、X 線により得られた結晶構造から非常に似た活性部位や折りたたみ構造を与えることが分かっている。[1] 特に酵素－阻害剤複合体の結晶構造で阻害剤であるホスホン酸エステルは特異的なコンフォーメーション（図 1，2）を示している。そこで密度汎関数法を用いて、リパーゼによるエステルの加水分解で見られるアシル化反応の遷移状態および四面体中間体を求め、それらのコンフォーメーションとの関係を調べた。[2]

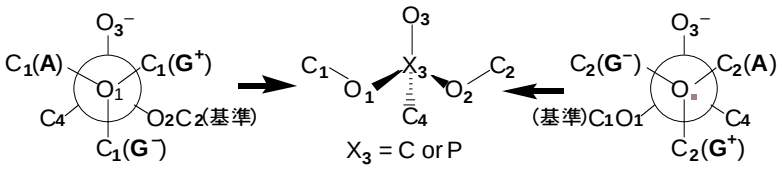

図１　コンフォーメーションの定義

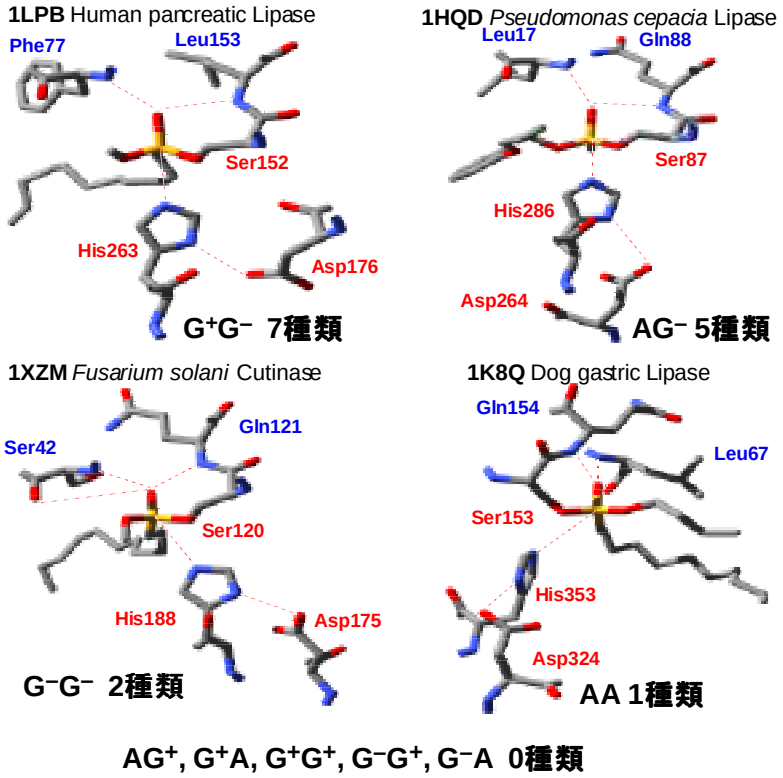

図２　リパーゼに結合したホスホン酸エステルのコンフォーメーション

【計算手法】本研究ではリパーゼのアシル化反応のモデルとして酢酸メチルのエステル交換反応（$MeO^- + MeCO_2Me \rightarrow MeCO_2Me + MeO^-$ (1)）を選んだ。B3LYP/6-31+G(d)法を用いてその反応経路を調べた。反応物、生成物、中間体、遷移状態の構造は全て最適化さ

れ、基準振動解析により遷移状態は虚の振動が反応の方向に進んでいることを確認した。水およびタンパク質環境の溶媒効果を PCM［3］を用い HF/6-31+G(d)法によって計算した。比誘電率はそれぞれ 78.39（水中）および 4.0（タンパク質環境）［4］とした。計算には Gaussian98 および Gaussian03 を使用した。[5]

【結果・考察】真空中、タンパク質環境、および水中における酢酸メチルのエステル交換反応の反応経路を図 3 に示す。図 3 からこの反応は四面体中間体を介する求核置換反応であり、反応経路は反応式(1)から予測される通り左右対称な形になることが判明した。またリパーゼの X 線結晶構造解析で見られた三種類のコンフォーメーション(**AG**$^-$（TS1，Int1)、**G**$^-$**G**$^-$（TS3，Int2)、**G**$^+$**G**$^-$（TS2))が酢酸メチルのエステル交換反応にも中間体および遷移状態として関わることが明らかとなった。このようなコンフォーメーション特異性の原因はメトキシ基－メトキシ基とメトキシ基－カルボニル基の超共役効果、双極子－双極子相互作用、メトキシ基－メトキシ基間の立体反発によって説明されることを電荷密度分布や NBO の解析[6]により明らかにした。コンフォーメーションの安定性に関しても比較したところ、X 線結晶構造解析で見られた結果は（**G**$^+$**G**$^-$ > **AG**$^-$ > **G**$^-$**G**$^-$ > **AA**）はエステル交換反応の場合（**AG**$^-$ > **G**$^+$**G**$^-$ > **G**$^-$**G**$^-$）とは異なり、むしろフリーのホスホン酸エステルのもの（**G**$^+$**G**$^-$ ≈ **AG**$^-$ > **G**$^-$**G**$^-$）に近かった。

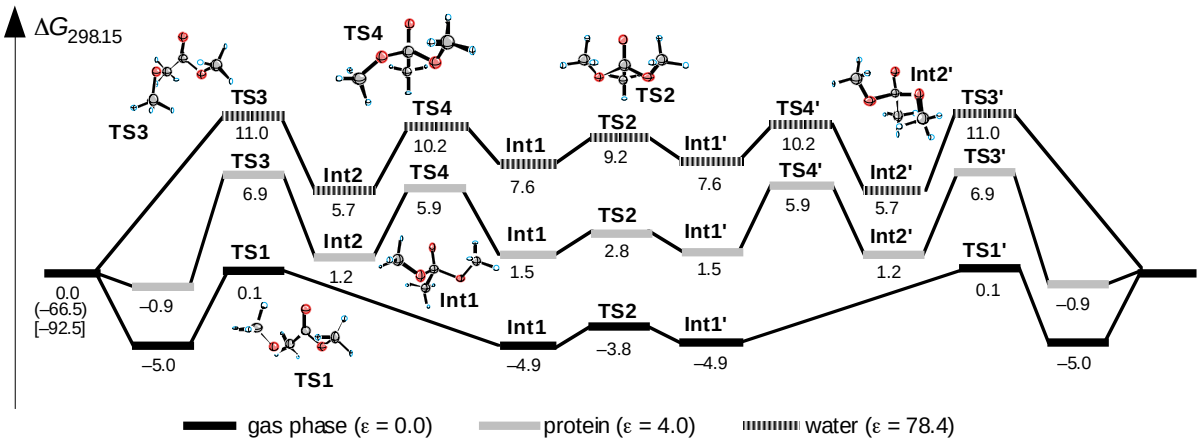

図 3 酢酸メチルのエステル交換反応の反応経路

【参考文献】

1. (a) Quinn, D. M.; Feaster, S. R. Esterases and Lipases In *Comprehensive Biological Catalysis: A Mechanistic Reference*; Sinnot, M. Ed.; Academic Press: San Diego, U.S.A., 1998; Vol. 2, Chapter 12. (b) Schmid, R. D.; Verger, R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 1608–1633.
2. Takano, Y.; Houk, K. N. submitted for publication.
3. (a) Barone, V.; Improta, R.; Rega, N. *Theor. Chem. Acc.* **2004**, *111*, 237–245. (b) Takano, Y.; Houk, K. N. submitted for publication.
4. Gilson, M. K.; Honig, B.H. *Biopolymers*, **1986**, *25*, 2097–2119.
5. Frisch, M. J. et al. *Gaussian98* and *Gaussian03*, Gaussian, Inc.: Pittsburgh, PA.
6. (a) Reed, A. E.; Curtiss, L. A.; Weinhold, F. *Chem. Rev.* **1988**, *88*, 899–926. (b) Glendening, E. D.; Badenhoop, J. K.; Reed, A. E.; Carpenter, J. E.; Weinhold, F. *NBO 4.M;* Theoretical Chemistry Institute, University of Wisconsin, Madison: Wisconsin.