2C09　QM/MM 法によるジオールデヒドラターゼの反応機構解明；活性中心におけるアミノ酸残基の触媒機能

(九大先導研[1]・岡大工[2]) ○蒲池高志[1]，虎谷哲夫[2]，吉澤一成[1]

【序】ビタミン B12 は生体内に取り込まれると、アデノシルコバラミンに変換され、十数種の酵素の補酵素として働く事が知られている。このうちジオールデヒドラターゼは、1,2-プロパンジオール等の主に炭素数 4 以下の *vic*-ジオールの脱水反応を触媒する酵素である。本酵素による反応は、アデノシルコバラミン中の Co-C 結合がホモリティックに開裂することにより始まる(Fig. 1)。これにより生じたアデノシルラジカルが基質の 1 位の炭素から水素を引き抜き、1,2-diol radical が生成する。この後、水酸基の転移から 1,1-diol radical を経てアルデヒドと水分子に分解される。1961 年の Abel らによる本酵素の発見以来、70 年代後半までに集中的に研究がなされ、以上のような大まかな反応機構や、反応全体の同位体効果(k_H/k_D = 10)より反応の律速段階は、ラジカル反応的な水素の転移であるということがわかっている。加えて、K+またはこれと同程度のイオン半径を持つモノカチオンが、ホロ酵素の形成及び酵素反応の進行に必須である事が知られている。

近年、Toraya、Yasuoka らはジオールデヒドラターゼの X 線構造解析を行い、基質 1,2-プロパンジオールはアデノシルコバラミン中の Co から約 11.7 の距離にある K+に配位していることを見出した(Fig. 2)[1]。以前我々のグループではこのカリウムイオンと基質である 1,2-プロパンジオールのみから成るモデルを用いて、密度汎関数法によりこの反応の理論的解析を行った[2]。しかし、このモデル計算では周辺タンパクの環境を考慮していないため、律速段階が水酸基の転移過程と見積もられるなどの問題が発生した。そこで、本研究では X 線構造に基づき、全原子(約 13500 原子)を含む現実モデルを構築し、QM/MM 法を用いて基質と周辺アミノ酸残基の相互作用がこの反応に及ぼす触媒機能を考察した。

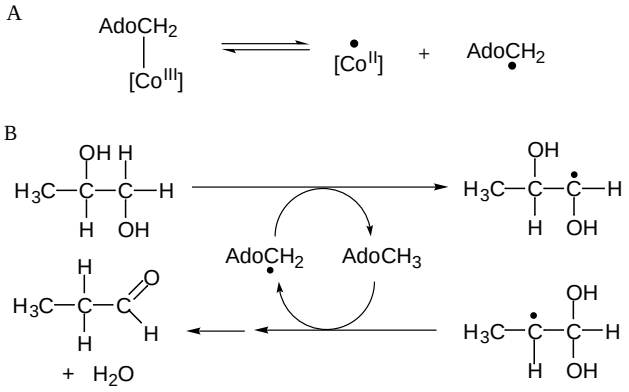


Fig. 1. The minimal reaction mechanism of diol dehydratase. A: Homolytic cleavage of the Co-C bond in the adenosyl-cobalamin. B: Dehydration by the enzyme. $AdoCH_2$, adenosyl group.

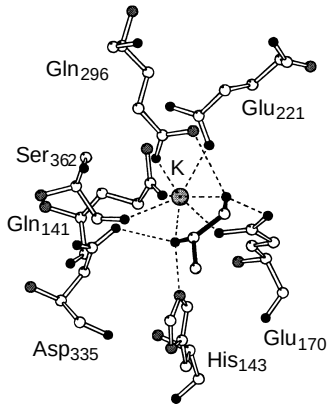


Fig. 2. X-ray structure of diol dehydratase around potassium ion.

【計算方法】全ての QM/MM 計算には Gaussian 98 に含まれる ONIOM 法を用いた。QM 領域として Fig. 3 に示すようにカリウムイオン、基質、アデノシルラジカルのリボース部位、及び 6 つの周辺アミノ酸残基を選択した。QM 計算には密度汎関数法のひとつである B3LYP 法を、基底関数には基質と水素結合で相互作用していない Glu141、Glu221、Ser362 については 3-21G を残りの重要な部位には 6-31G*を用いた。MM 計算には AMBER 力場を使用した。

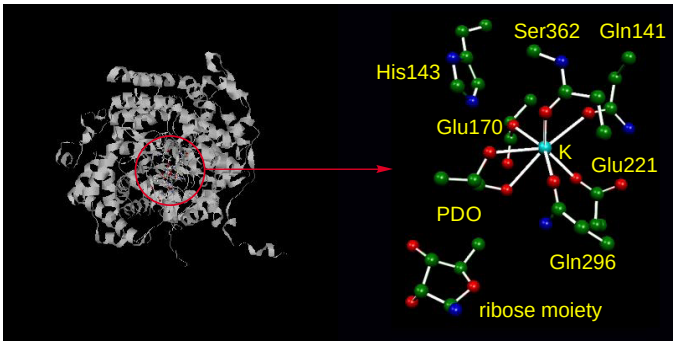
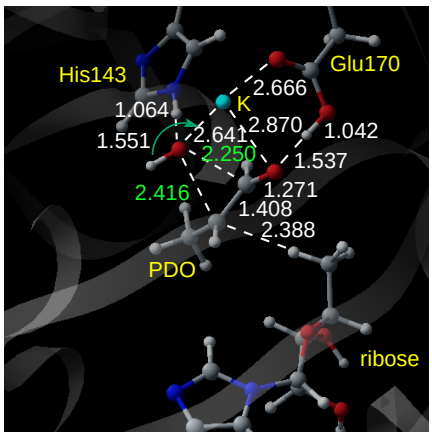


Fig. 3. Diol dehydratase model with 13,500 atoms. The QM region includes the ribose moiety, K^+ ion, PDO, and truncated models of Gln141, His143, Glu170, Glu221, Gln296, and Ser362.

【結果と考察】Fig. 4 に QM/MM 計算により得られたジオールデヒドラターゼによる水素引き抜き過程(TS1)および水酸基転移過程(TS2)のエネルギーダイアグラムを示す。水素引き抜き過程の活性化エネルギーは 13.6 kcal/mol となり、実験が示すように、この過程が律速であることが確認された。水酸基転移の遷移状態の相対エネルギーは 1.2 kcal/mol であり、水素引き抜きの遷移状態に比べて 12.4 kcal/mol も低いことが明かとなった。以前我々が行った周辺アミノ酸残基がないモデル計算では TS2 は TS1 に比べて 3.0 kcal/mol 不安定であったので、周辺アミノ酸残基が TS2 のエネルギーを大きく下げる効果を持っていると考えられる。TS2 の構造を見ると 2 位の水酸基の転移とともに 1 位の水酸基からのプロトン引き抜きが Glu170 によって引き起こされていることが判明した(pull effect)。この効果は TS2 を 5.6 kcal/mol 安定化すると見積もられ、周辺アミノ酸残基の中で Glu170 が最も TS2 の安定化に寄与することが明かとなった。



TS2 (OH group migration)

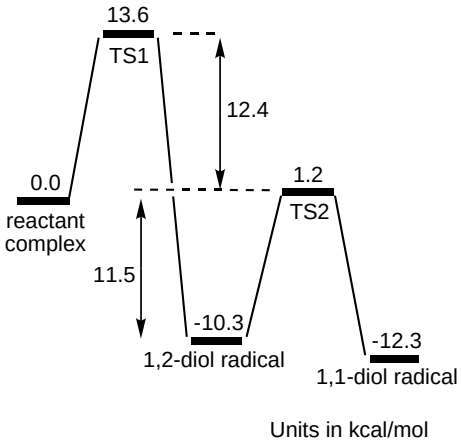


Fig. 4. Energy diagram for the hydrogen abstraction and the OH group migration.

[1] Toraya, T. *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 2095.

[2] Eda, M.; Kamachi, T.; Yoshizawa, K.; Toraya, T. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2002**, *75*, 1469.