

生分解性プラスチック分解酵素の反応機構についての 計算化学的手法による解析

(広島大院理¹・広島大QuLiS²・産総研³・酒総研⁴)

○榮 慶丈^{1,2}, 相田美砂子^{1,2}, 近藤英昌³, 正木和夫⁴, 家藤治幸⁴

【序論】地球環境の保護と地球資源の有効利用という視点から、生分解性プラスチックと呼ばれる物質が注目されている。これは、自然界において、微生物が関与し、低分子化合物に分解されるプラスチックのことであり、今後汎用高分子の替わりになる材料の一つとして期待されている。最近、生分解性プラスチックの一つであるポリ乳酸を強く分解する酵素 (*Cryptococcus* sp. S-2 由来 リパーゼ) が酒類総合研究所の正木らにより発見された。この酵素については、ポリ乳酸だけでなく PCL (ポリブチレンサクシネート) や PBS (ポリε-カプロラクトン) といった他の生分解性プラスチックについてもその分解性能に関する研究が現在おこなわれている。しかしながら、この酵素の触媒反応のメカニズムについてはまだほとんど分かっていない。そこで本研究では、酵素 (*Cryptococcus* sp. S-2 由来 リパーゼ) による触媒反応機構を計算化学的アプローチにより明らかにすることを目的とする。

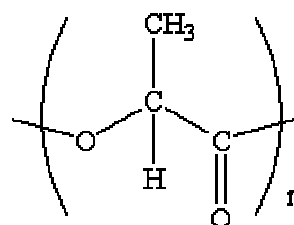


図1 ポリ乳酸

【方法】我々は触媒反応機構を理解するための手順として、まず酵素 (*Cryptococcus* sp. S-2 由来 リパーゼ) と基質 (ポリ乳酸) の結合したときの構造を予測することとした。これを実現するため、我々は酵素と基質の複合体に対し、古典力学モデルによる分子動力学シミュレーションをおこなった。次に、予想した構造を触媒反応の初期構造と考え、化学反応経路を量子化学的手法により決定することとした。

【結果と考察】実験により、3つのアミノ酸 (Ser85, His180, Asp165) が触媒反応に関わっていることがすでに知られているため、我々はまず、これらの3つのアミノ酸とこれらの空間的な位置関係から、本研究の対象とする酵素はセリンプロテアーゼと同様の触媒機構をもつと仮定した。この仮定を用いて、乳酸二量体を酵素 (*Cryptococcus* sp. S-2 由来 リパーゼ) の結合部位と予想される位置に配置し、これを初期構造とした分子動力学シミュレーションをおこなった (AMBER を使用, また基質の電荷決定には RESP 法を使用) (図2)。その結果, Thr17 とポリ乳酸および Gln86 と Ser85 の間にそれぞれ水素結合が形成されていることを見出した。Thr17 の触媒作用への関与は、実験的にはこれまでに知られていなかった新しい知見である。続いて、酵素 (*Cryptococcus* sp. S-2 由来 リパーゼ) の触媒反応が進んだと考えられる系, すなわち Ser85 の側鎖の OH の H⁺ が His180 へ移動した系について同様のシミュレーションをおこなった。その結果, ポリ乳酸とその活性部位と考えられる部分 (Ser85 の側鎖の O) との距離が、触媒反応を考慮しない系よりも近づく傾向にあることが分かった。Thr17 がポリ乳酸と水素結合することを考慮したときの電荷分布から電荷の値を新たに決定し直したとき

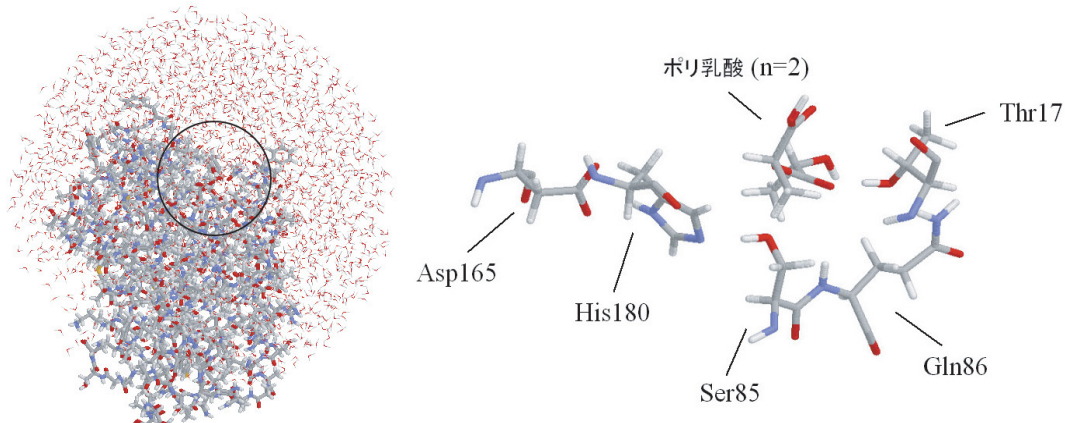


図2 シミュレーションをおこなった系の全体図（左）と活性部位付近の原子群（右）

のシミュレーションもおこなった。この場合についても、元の電荷の値によるシミュレーション結果と比較して、ポリ乳酸が Ser85 の側鎖の O により近づくことが示された。次に、Thr17 の触媒反応への寄与をさらに調べるために、Ser85 による乳酸二量体の切断反応過程（加水分解反応の1ステップ）（図3参照）のエネルギー変化を Thr17 を考慮した場合とそうでない場合について求めた（Gaussian98 を使用）（図4）。ここで、反応の過程において R 以外のすべての構造は最適化している。その結果、Thr17 が存在することによって、この反応が進行しやすくなることがわかった。この結果より、触媒反応への Thr17 の関わりがさらに裏付けられた。

本研究の結果として、仮定した触媒反応機構を促すような働きをするアミノ酸残基が古典力学モデルのシミュレーション及び量子化学計算の結果から新たに見出された。ポリ乳酸分解に関する触媒反応のすべてのステップについて、関与するアミノ酸残基やその役割について明らかにするための計算をすすめている。

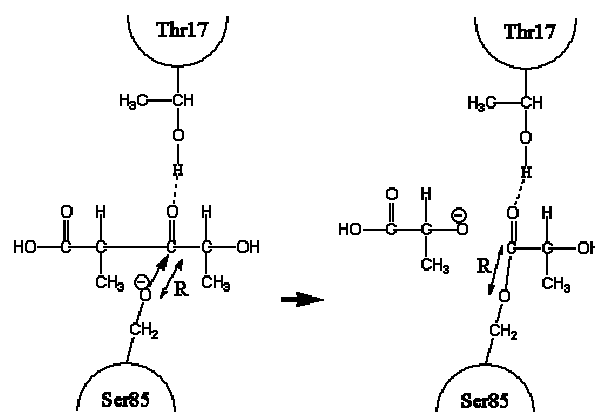


図3 Ser85 による乳酸二量体の切断 (Thr17 を考慮した場合)

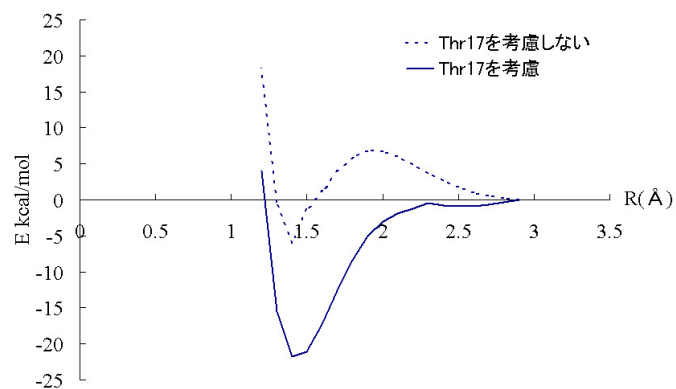


図4 Ser85 による乳酸二量体の切断反応のエネルギー変化（横軸は Ser85 と乳酸二量体間の距離 R (Å), 縦軸はエネルギー(kcal/mol) (HF/6-31G*)