

4P129 酵素反応におけるタンパク質の役割：Chorismate Mutase の 酵素触媒機構について

(産総研 計算科学) ○石田豊和、Dmitri G. Fedorov、北浦和夫

はじめに

Chorismate Mutase は shikimate pathway (芳香族アミノ酸合成経路) で働く酵素で、chorismate を prephenate に変換する Claisen 転移反応を触媒する。この反応は酵素中のアミノ酸残基と共有結合した反応中間体を形成しない、実質単分子反応を触媒する稀な酵素として知られ、また対応した水中での反応の実験結果も存在することから、酵素の作用機構を調べるためのモデル系として、酵素の構造が決定される以前から多くの研究がなされてきた。1990年以降、Escherichia coli、Bacillus subtilis、yeast の3種類の結晶構造が得られ、原子レベルで構造の詳細が明らかとなると、理論計算によるアプローチの格好のターゲットとなり、近年多くの計算例が報告されるようになったが、原子レベルで見たタンパク質の作用の詳細は不明な点も多い。特に遷移状態における静電相互作用の安定化の効果が大きいのか、それとも基底状態で基質に対する配座を固定する効果が大きいのかに関しては、議論が分かれている現状である。本研究ではこの酵素を取り上げ、QM/MM による反応経路計算と MD を併用した自由エネルギー計算を組み合わせ、反応の自由エネルギー変化を求めることで反応の性質を議論し、さらに反応経路上で得られた構造に対して Fragment Molecular Orbital (FMO) 法によるタンパク質の全電子状態計算を実行することによって、個々のアミノ酸の遷移状態安定化の役割を *ab initio* 計算から解析することを試みた。

手法

タンパク質の初期構造は X 線構造 (2CHT) を用い、この実験構造に含まれるアナログ分子の構造をもとにして基質の構造を作成した。現状では全電子状態計算によるタンパク質の構造最適化、反応経路計算は不可能に近いので、反応経路の計算は QM/MM レベルにとどめ、得られた反応経路に沿って自由エネルギーを水溶液中で計算し、系の自由エネルギー変化を見積もった。また FMO による全電子状態計算は、QM/MM レベルで最適化された構造をもとにした一点計算に限った。

結果

QM/MM 計算のレベルは HF/6-31(+)*G**/AMBER で、この場合反応の活性化自由エネルギーは ~ 28 kcal/mol となる。これは活性化エネルギーの実験値 15.4 kcal/mol を大きく上回る値であるが、主な要因は QM 領域 (この場合は基質のみ) の波動関数の記述の程

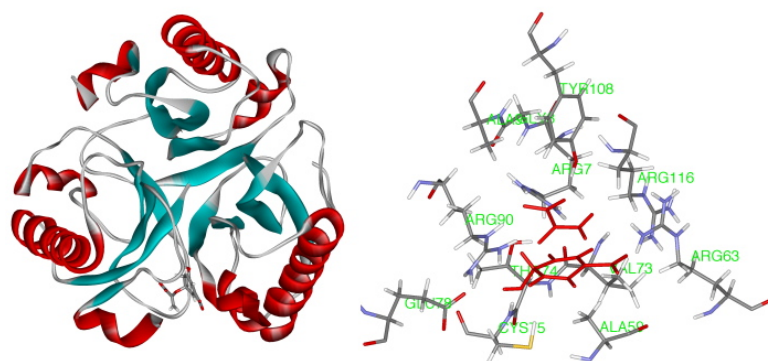


図 1: (左) B.subtilis chorismate mutase (右) 活性中心の構造 (遷移状態)

度にある。実際この反応系は電子相関が強く効く系であり、QM/MM MP2 レベル程度では電子相関を過大に評価しすぎて活性化エネルギーは ~ 8 kcal/mol 程度になってしまう。FMO による全電子状態計算の結果も、その傾向は QM/MM 計算の結果と同様の傾向を示し (2 体相互作用近似を用い、1 アミノ酸残基を 1 フラグメントとして扱い、6-31G* 基底関数を用いた場合)、活性化エネルギーの値は HF レベルで 31.7 kcal/mol、B3LYP で 11.8 kcal/mol となる (full MP2 の結果は 1.0 kcal/mol と電子相関を過大評価しすぎる)。現時点での FMO の計算結果は、単にポテンシャルエネルギーの値を評価しているのみで、実験から得られる活性化自由エネルギーの値に直接対応しない。現状では全系を標準的量子化学計算で評価した reference 的な結果が存在しないので確かなことは言えないが、FMO による計算結果は QM/MM 計算で無視されたタンパク質全体の分極効果を取り込み、また反応基質を 1 フラグメントに選んだことを考えると、その近似の枠内で妥当な値を算出しているように思われる。

酵素と基質の相互作用を QM/MM レベル、FMO レベルでそれぞれ解析した結果、定性的にはどちらも同じ様な結果を与えることが確かめられた。酵素の基質結合部位は非常に極性の強い環境で、Arg63(on domain1)、Arg7、Glu78、Arg90、Tyr108、Arg116(on domain2) などの極性残基が基質と水素結合のネットワークを形成して、遷移状態の安定化の程度をうまくコントロールしていることが分かった。実験的にも Arg90 の重要性が指摘され、種々の変異型酵素を作成してアミノ酸残基単位当たりの働きが調べられているが、現状ではその詳細が明らかにはなっていない。そこで今回、Arg90 を Lys90、Cit90 (Arg のイソアミノ酸) にそれぞれ変異させた変異型酵素の反応性も同様に理論計算で解析し、Arg90 の持つ電荷、およびその形の影響を検討した。この結果によると、アミノ酸残基のもつ電荷と固有の形の効果は明確に分けて考えることが出来る程単純な物でなく、両者が適切に作用して基質の安定化に作用することが確かめられた。詳細な解析結果は当日報告する予定である。