

1D16

分子動力学法によるリパーゼのアシル化反応における四面体中間体の コンフォーメーション解析

(UCLA¹, 阪大蛋白研²) ○鷹野優^{1,2}, Houk, K.N.¹

ytakano@protein.osaka-u.ac.jp

【序】酵素は生体内の化学反応において遷移状態を安定化する活性部位を提供している。そのためX線結晶構造解析は酵素反応機構の解明に大きく寄与している。カルボン酸エステルの加水分解を触媒する酵素である、リパーゼやエステラーゼは、種によってアミノ酸配列が大きく異なるにも関わらず、X線結晶構造解析の結果から非常に似た活性部位を形成することが分かっている。リパーゼとホスホン酸エステルの酵素-阻害剤複合体の結晶構造からホスホン酸エステルはある特定のコンフォーメーションをとる。(図1、2)

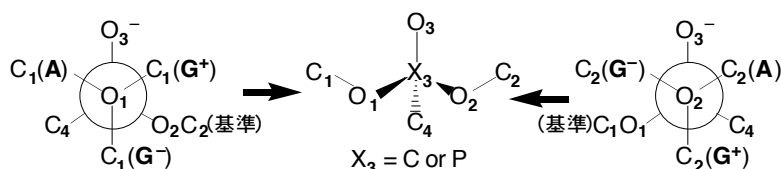


図1 コンフォーメーションの定義

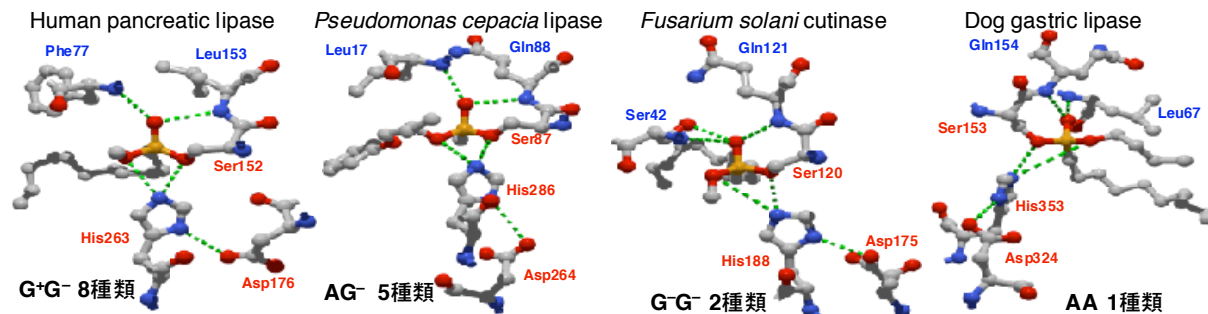


図2 リパーゼに結合したホスホン酸エステルのコンフォーメーション

ホスホン酸エステルのコンフォーメーションの特異性と酵素により触媒されるエステル加水分解の反応機構との関係性を明らかにするため、分子動力学法を用いてリパーゼ・エステラーゼのカルボン酸エステル加水分解反応(アシル化反応)における四面体中間体のコンフォーメーション選択性を調べ、密度汎関数法によって得られた酢酸メチルのエステル交換反応におけるコンフォーメーション選択性、ホスホン酸エステルのコンフォーメーションと比較した。[1,2]

【計算方法】 リパーゼ(エステラーゼ)と四面体中間体のモデルは、リパーゼとホスホン酸エステルの酵素-阻害剤複合体の結晶構造をもとにして構築し、約7000個のTIP3P水分子モデルで水和させた。そのようなモデルに対して周期境界条件の下で、水和構造の安定化、構造最適化、平衡化を行った後、

300K, 1気圧の定圧定温分子動力学シミュレーションを時間幅1fsで1ns行い、0.5ps毎に四面体中間体のコンフォメーションをサンプリングした。シミュレーションにはAMBER7.0プログラムを用いた。[3]

【結果・考察】分子動力学法により得られた*Fusarium solani* cutinase (PDB ID: 1XZM) に結合した四面体中間体のコンフォメーション分布を図3に示す。X線結晶構造で見られるホスホン酸エステルのコンフォメーション(G^-G^-)と異なり、 AG^- や G^+G^- コンフォメーションがより多くサンプリングされており、酢酸メチルのエステル交換反応での中間体のコンフォメーション選択性に類似していた。このようなリパーゼと四面体中間体の酵素中間体複合体のコンフォメーション特異性は活性部位を構成するアミノ酸残基と四面体中間体との立体障害および、水素結合を含んだ八員環の形成により生じることが明らかとなった。

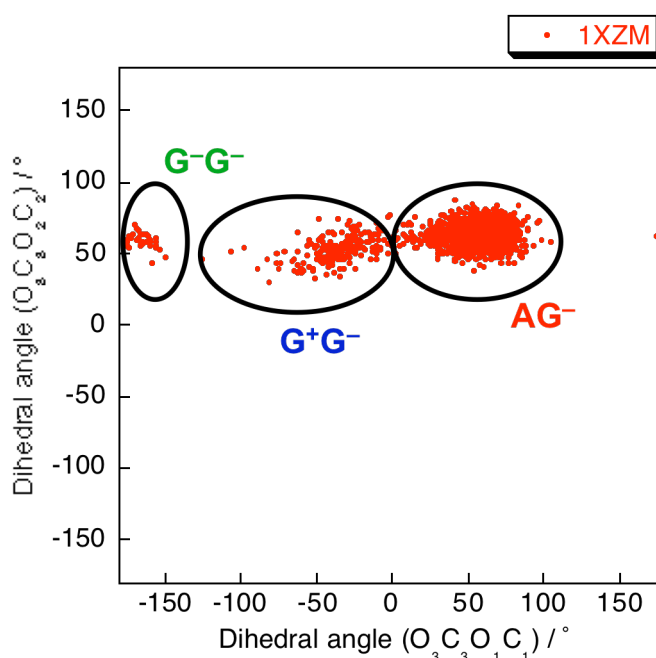


図3 分子動力学シミュレーションで得られた四面体中間体のコンフォメーション分布

【参考文献】

- [1] Takano, Y.; Houk, K. N. *J. Phys. Chem. A* **2004**, *108*, 11740–11751.
- [2] Takano, Y.; Houk, K. N. in preparation.
- [3] Pearlman, D. A.; Case, D. A.; Caldwell, J. W.; Ross, W. S.; Cheatham, T. E.; DeBolt, S.; Ferguson, D.; Seibel, G.; Kollman, P. AMBER, a package of computer programs for applying molecular mechanics, normal mode analysis, molecular dynamics and free energy calculations to simulate the structural and energetic properties of molecules. *Comp. Phys. Commun.* **1995**, *91*, 1–41.