

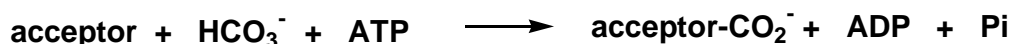
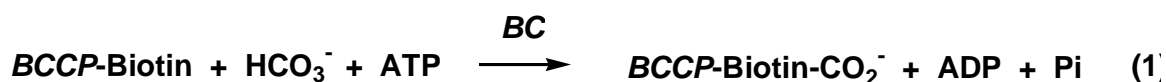
2P100

ビオチンカルボキシラーゼ(BC)の反応機構に関する理論的研究

(九工大情報工*, 九大先導研**) 伊藤祐子*, 塩田淑仁**, 吉澤一成**, 近藤寛樹*

【序】

ビオチン依存性カルボキシラーゼには5種知られていて、いずれもビオチンカルボキシラーゼ(BC)、カルボキシルトランスフェラーゼ(CT)、ビオチンカルボキシルキャリアプロテイン(BCCP)の3つのサブユニットないしはドメインから成る。これらは2段階の反応によって炭酸イオンを有機化合物に固定する。1段階目の反応はBCを触媒としてビオチンに炭酸を固定する反応で(式1)、2段階目の反応はCTを触媒としてビオチンに固定された炭酸をカルボキシルアクセプターに転移させる反応である(式2)。1段階目のBCの反応は5つのビオチン依存性カルボキシラーゼに共通の反応で、2段階目のCTの反応が基質特異性を示す。この2つの反応の橋渡しをするのがBCCPでビオチンの担持、炭酸の固定、運搬を担っている。



BCの反応(式1)は炭酸イオンを一時的に固定しカルバミン酸誘導体を作るという点で化学的にも興味深い。この反応の仕組みに対しては諸説があるが、まだ完全に決着はついていない。どの経路で反応が進行するにせよ、想定される反応中間体が極度に不安定なためその存在を実験的に証明するのが困難なためである。現在までにBCの立体構造はATP結合型、非結合型に対して明らかになっている¹⁾⁻³⁾。それによればBCはA, B, C 3つのドメインから成り、ATP結合時にBドメインが大きな構造変化を起こすことが報告されている²⁾。しかしながらその後活性部位でどのような化学変化が起こるかは全く不明である。そこで本研究では量子化学計算を用いてBCの反応経路を解析し、反応機構を明らかにすることにした。

【計算方法】

構造最適化および振動解析は密度汎関数のひとつであるB3LYP法を、基底関数として6-31G**基底を用いた。全ての計算にはGaussian03プログラムを用いた。

【結果】

BCの反応に対する現在の最も有力な仮説は、まずATPと炭酸が反応して不安定なカルボキシルリン酸中間体を生成し(ステップ1)、次にカルボキシルリン酸中間体の炭素とビオチン

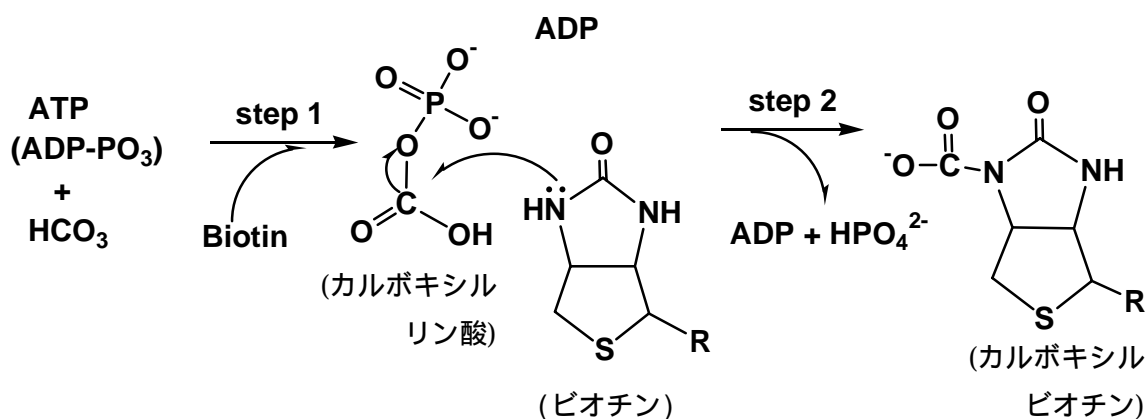


図 1、ビオチンカルボキシラーゼ (BC) の推定反応機構

の窒素が結合し(ステップ 2)、カルボキシビオチンが生じる(図 1)^{4),5)}。本研究ではこの機構を中心にして、提案されている仮説以外の反応経路についても計算を行った。その結果、遷移状態や仮想的な中間体の安定性(エネルギー)から見てBCの反応はやはり図 1 に示した経路で進行すると考えるのが最も妥当であることが分かった。炭酸によるATPの 1 位のリン酸への求核攻撃は 7.5 kcal/mol の活性化エネルギーを越えて発熱反応で進行し、第二ステップであるカルボキシリン酸中間体がビオチンの 1 位の窒素と反応しカルボキシビオチンを生成する反応は 21.4 kcal/mol の活性化エネルギーを経て反応が進行するという結果が得られた。つまり後半の反応がBCの反応の律速段階になっている。さらにこの第二ステップの反応は中間体のリン酸によるビオチンの窒素上の水素の引き抜き、ビオチンの窒素によるカルボキシリン酸中間体の炭素への求核攻撃、中間体の炭素-酸素間結合の切断、の 3 つの反応が協奏的に 1 段階で進行することも分かった。第一、二ステップ共に遷移状態の構造の振動解析を行ったところ、虚のモードが 1 つしかないことからこの構造が確かに遷移状態であることを確認した。その上で極限的反應座標(IRC)計算を実行した結果、妥当な反応経路を見ることができた。

【参考文献】

- 1) Waldrop, G. L., Rayment, I., Holden, H. M. (1994) *Biochemistry* **33** 10249-56
- 2) Thoden, J. B., Blanchard, C. Z., Holden, H.M., Waldrop, G. L. (2000) *J. Biol. Chem.* **275** 16183-90
- 3) Kondo, S., Nakajima, Y., Sugio, S., Yong-Biao, J., Sueda, S., Kondo, H. (2004) *Acta Crystallogr. D* **60** 486-92
- 4) Cronan, Jr. J. E., Waldrop, G. L. (2002) *Prog. Lipid Res.* **41** 407-435
- 5) Ogita, T., Knowles, J. R. (1988) *Biochemistry* **27** 8028-33