

3A12

Chorismate Mutase の反応機構：全電子状態計算による解析

(産業技術総合研究所 計算科学研究部門) ○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であり、詳細な 3次元構造が解かれた 1990 年以降、酵素の作用機構を調べるためのモデル系として多くの研究がなされてきた。アナログ分子を取り込んだ酵素の結晶解析によると、基質のエーテル酸素に隣接した位置に Arg (*Bacillus subtilis*) や Lys (*yeast*) と言った電荷を持ったアミノ酸残基が存在することが認められ、これより反応の遷移状態において誘起される部分電荷をタンパク質環境が安定化する事が重要な触媒要因だとの仮説が出された。この点を調べる為に、エーテル酸素に隣接するアミノ酸残基 (*Bacillus subtilis* では Arg90) を種々のアミノ酸に変異させた酵素の活性が調べられたが、天然に存在するアミノ酸の変異体では、電荷が保存した Lys 変異体でも活性が大きく低下する事が認められ、活性中心の形の効果が重要なのか電荷の影響が主なのかは明らかではなかった。この問題を回避するため、Arg90 を Cit90 (Arg の中性イソアミノ酸) に置換した変異体酵素の活性が調べられ、この実験結果より活性中心の電荷の影響が主であるとの報告がなされた。しかし原子レベルで見たタンパク質の触媒機構の詳細は全く不明と言ってよく、本研究ではこの酵素を取り上げ、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、遷移状態の安定化に寄与する個々のアミノ酸の役割を *ab initio* 計算から明らかにする事を目的とした。天然型酵素とともに Lys90、Cit90 変異型酵素の反応も同様に解析して、これらを比較する事で遷移状態における活性中心の形/電荷の効果を検討した。

計算手順

すべての計算は *Bacillus subtilis* Chorismate Mutase の X線構造 (2CHT) を用い、実験構造に含まれるアナログ分子の座標をもとにして基質の構造をモデル化した。このタンパク質はモノマー 3 量体から成り、各ドメイン間に活性中心が存在するが、話を単純にするため単一の活性サイトだけに注目する。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 (*ab initio* QM/MM RHF/6-31(+)*G***/AMBER (parm.96))、FMO による全電子状態計

算解析は、QM/MM レベルで最適化された構造を用いた一点計算に限った。Lys90、Cit90 mutant の構造は、wildtype の反応経路計算で得られた構造をもとにモデル化し、QM/MM レベルで同様に構造を最適化した。FMO 計算については、FMO2-RHF/6-31G(+)*レベルの計算で妥当性を確認した上で、multilayer FMO モデルを適応して、タンパク質-基質の相互作用の詳細を調べた (FMO2-RHF:MP2/6-31(+)*G*レベル)。

結果

ab initio QM/MM 計算による天然型酵素の反応経路解析によると、活性中心内で基質は主として、Arg63 (in domain1)、Arg7、Glu78、Arg90、Tyr108、Arg116 (in domain2) と言ったアミノ酸残基と水素結合している事が認められた。この中でも Arg63、Arg116、Arg7、Tyr108 は基質の2つのカルボキシル基と強い水素結合を形成し、主に反応過程において基質の配座を固定する役割を行うことが認められた。反応経路に沿って構造変化が見られる部位は、基質自身の異性化を除くと Glu78-Arg90-基質の三者間の水素結合長の微妙な変化で、これにより反応物/遷移状態の相対的安定性をコントロールしている事が確かめられた。FMO による全電子状態計算の解析により、遷移状態で基質と強く相互作用するアミノ酸残基を調べると、Arg90、Glu78、Arg7 と言った極性残基の大きな寄与が認められたが、これはアナログ分子を取り込んだ酵素の結晶構造解析から予想されたことに近い。

Lys90 mutant の場合、タンパク質環境の及ぼす触媒効果は、およそ天然型酵素に近い事が確かめられた。この場合酵素活性は大きく低下するが、その主な原因は、Lys90 の導入に伴った Glu78-Lys90-基質間の水素結合のバランスが崩れ、相対的に反応物を強く安定化する事にある。結果として Lys90 残基の触媒活性の寄与は、天然型の Arg90 と比較して大きく減少する。Cit90 mutant の場合、変異の導入による Glu78-Cit90-基質間の構造変化に加えて、タンパク質が基質を分極させる効果も失われ、大きく分極した遷移状態を静電相互作用で安定化する寄与もなくなる事が認められた。

以上3つの反応系を比較/解析する事で天然型酵素の持つ酵素活性、とくに Arg90 の役割が明らかになり、次の2つの役割に集約される事が分かった：(1) Glu78-Arg90-基質の三者間の水素結合長をうまく調節して、遷移状態の相対的な安定化を図る (2) 反応系路上に於いて遷移状態で最も基質を分極させ、タンパク質との静電相互作用による安定化を稼ぐ