

4E09 QM/MM 法によるジオールデヒドラターゼ変異体の反応性解析

(九大先導研¹・岡大工²) 蒲池高志¹, 虎谷哲夫², 吉澤一成¹

【序】ビタミン B12 は生体内に取り込まれると、アデノシルコバラミンに変換され、十数種の酵素の補酵素として働く事が知られている。このうちジオールデヒドラターゼは、1,2-プロパンジオール等の主に炭素数 4 以下の *vic*-ジオールの脱水反応を触媒する酵素である。本酵素による反応は、アデノシルコバラミン中の Co-C 結合がホモリティックに開裂することにより始まる(Fig. 1)。これにより生じたアデノシルラジカルが基質の 1 位の炭素から水素を引き抜き、1,2-diol radical が生成する。この後、水酸基の転移から 1,1-diol radical を経てアルデヒドと水分子に分解される。1961 年の Abel らによる本酵素の発見以来、70 年代後半までに集中的に研究がなされ、以上のような大まかな反応機構や、反応全体の同位体効果($k_H/k_D = 10$)より反応の律速段階は、ラジカル反応的な水素の転移であるということがわかっている。加えて、K⁺またはこれと同程度のイオン半径を持つモノカチオンが、ホロ酵素の形成及び酵素反応の進行に必須である事が知られている。

近年、Toraya、Yasuoka らはジオールデヒドラターゼの X 線構造解析を行い、基質 1,2-プロパンジオールはアデノシルコバラミン中の Co から約 11.7 Å の距離にある K⁺に配位していることを見出した(Fig. 2)[1]。以前我々のグループではこの X 線構造に基づき、全原子(約 13500 原子)を含む現実モデルを構築し、QM/MM 法を用いてこの反応の理論的解析を行った[2]。本研究では活性部位アミノ酸残基の反応への寄与を推定するため、活性部位残基のいくつかを置換することで変異体モデルを構築し、それらの触媒機能を考察した。

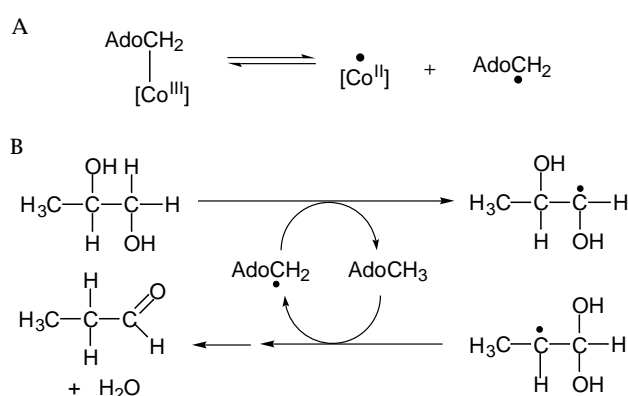


Fig. 1. The minimal reaction mechanism of diol dehydratase. A: Homolytic cleavage of the Co-C bond in the adenosyl-cobalamin. B: Dehydration by the enzyme. AdoCH₂, adenosyl group.

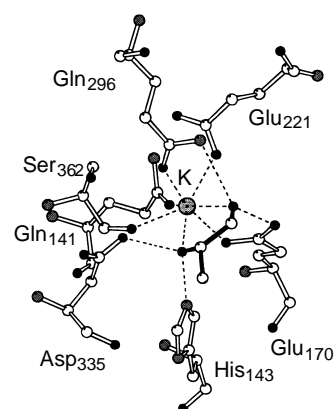


Fig. 2. X-ray structure of diol dehydratase around potassium ion.

【計算方法】全ての QM/MM 計算には Gaussian 03 に含まれる ONIOM 法を用いた。QM 領域として Fig. 3 に示すようにカリウムイオン、基質、アデノシルラジカルのリボース部位、及び 6 つの周辺アミノ酸残基を選択した。QM 計算には密度汎関数法のひとつである B3LYP 法を、基底関数には 6-31G*を用いた。MM 計算には AMBER 力場を使用した。

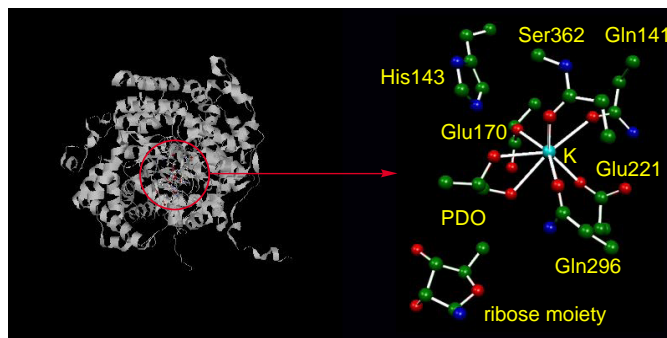


Fig. 3. Diol dehydratase model with 13,500 atoms. The QM region includes the ribose moiety, K⁺ ion, PDO, and truncated models of Gln141, His143, Glu170, Glu221, Gln296, and Ser362.

【結果と考察】我々はこの反応において重要なアミノ酸残基と考えられてきた His143 を Ala に置換したジオールデヒドラターゼ変異体 His143Ala および、Glu170 を置換した Glu170Gln、Glu170Ala、Glu170Ala/Glu221Ala の合計四つの変異体について QM/MM 計算によりその触媒機構を明らかにした。これらの変異体についても、野生型と同様に基質から 1,1-diol radical への転換は水素引き抜きと水酸基転移の二段階で進行する。Fig. 4 に Glu170Gln 変異体での水酸基転移の遷移状態の最適化構造を示す。このとき活性化エネルギーは 17.4 kcal/mol となり、野生型での活性化エネルギー 13.6 kcal/mol に比べて、大きく上昇することが判明した。実験的にもこの変異体は野生型の 1% 以下の活性しかないことが知られており、この高い活性障壁が反応の進行を妨げていると予想される。野生型においては Glu170 が 1 位の水酸基からのプロトンを引き抜くことで遷移状態を安定する(pull effect)のに対して、Glu143Gln 変異体では、導入された Gln は弱い塩基であるため基質との相互作用が弱い。これが変異体での反応性低下の直接的原因であることが判明した。

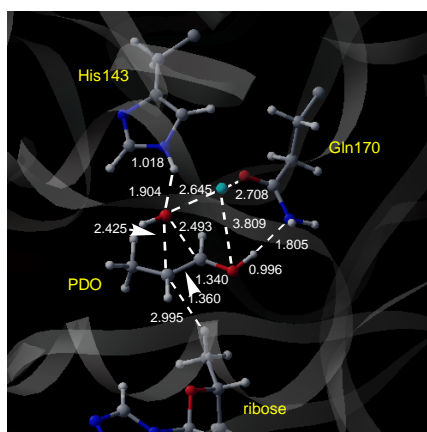


Fig. 4. The OH group migration in the His143Gln mutant of diol dehydratase.

[1] Toraya, T. *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 2095.

[2] Kamachi, T.; Toraya, T.; Yoshizawa, K. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 16207.