

4P121

QM/MM モデリング、全系量子計算による酵素触媒因子の解析

(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 は芳香族アミノ酸合成経路 (shikimate pathway) で chorismate を prephenate に変換する Claisen 転移反応を触媒する酵素である。この酵素の反応機構はその扱いやすさゆえに ((1) 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、(2) 対応した水溶液中での反応の反応速度定数も同様に測定される、など)、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。特に近年の QM/MM 法の発展にともなって、理論計算による格好の計算システムとして多くの計算例が報告されている。酵素反応機構に関する基本的な概念として、(1) 遷移状態の相対的な安定化が重要とする説と、(2) 反応物の相対的な不安定化が生じると主張する説があるが、このシステムに関してはおのおのの仮説に対してそれを示唆する計算結果が報告され、現状では議論に決着がつかない状況である。

このシステムに対してこれまで我々は、*ab initio* QM/MM レベルの反応経路計算、自由エネルギー計算、全系量子計算による複合的な解析を行っており、天然型酵素の反応とともに変異型酵素の反応プロファイルを比較する事で、遷移状態において基質の反応部位に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結果を提示して来た。本発表ではこの解析を更に押し進めて、反応の進行にともなってタンパク質-基質間の相互作用の詳細を全系量子計算から (電子相関も考慮して) 調べた。構造解析の実験から反応機構を予測する場合、実際の基質ではなく遷移状態アナログとの構造を詳細に解析して、反応機構を議論する事がよく行なわれる。そこで今回、反応する基質と遷移状態アナログ複合体の 2 者の計算を実行することによって両者の電子論的な違いを比較して、実際の反応過程におけるタンパク質の触媒作用の理解を目指した。

計算手法

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。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))、得られた反応経路に沿って

constrained MD 計算を行なって経路に沿った自由エネルギー計算を実行し、ポテンシャルプロファイルの振る舞いと比較することで、構造揺らぎの程度を最適化構造と比較した。全電子状態計算解析はフラグメント法ベースで行ない、経路に沿って得られた構造の一点計算に限った。電子相関の取り込みは、多階層モデルを用いた以前の報告とは異なり、システム全体を MP2 レベルで計算した。遷移状態アナログ複合体も同様の手続で構造を準備した。

結果

ab initio QM/MM 計算での反応経路解析から、経路に沿っての構造揺らぎはそれ程大きくなく、経路に沿った最適化構造で認められたタンパク質との水素結合長が揺らいでいる事が認められた。これは主として、Arg63 (in domain1)、Arg7、Glu78、Arg90、Tyr108、Arg116 (in domain2) と言ったアミノ酸残基との水素結合である。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、これにより反応物と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認された。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殆どである。さらに相互作用エネルギーの詳細を単純なエネルギー成分分割を行なって分極の効果を調べると、遷移状態において強く分極する残基は domain 2 上の基質と接するアミノ酸に限られ、特に Arg90 が顕著であった。これはアナログ分子を取り込んだ酵素の構造解析から得られた知見に等しいが、実際に理論計算を行なってみると遷移状態アナログと基質の遷移状態とではタンパク質間の分極の度合いが大きく異なり、反応の遷移状態でタンパク質と基質両者が大きく分極し、結果として得られる静電相互作用により反応の遷移状態が大きく安定化する事が認められた。基質と接する位置にある残基に関しては電子相関の効果も重要であるが、この程度は基質と遷移状態アナログ両者でほぼ等しく、状態間の差をとるとほぼ打ち消し合うので、触媒過程において重要なのは静電相互作用による遷移状態の安定化であることが再確認された。

References

1. Ishida, T.; Fedorov, D. G.; Kitaura, K. *J. Phys. Chem. (B)* **2006**, *110*, 1457-1463.
2. Ishida, T.; Fedorov, D. G.; Kitaura, K. submitted for publication.