

Theoretical Studies on the Reactions of Diol Dehydratase by Large-Scale Quantum Chemical Calculations

井富, 一城

<https://hdl.handle.net/2324/1500681>

出版情報：九州大学, 2014, 博士（工学）, 課程博士
バージョン：
権利関係：やむを得ない事由により本文ファイル非公開（3）

論文内容の要約

ジオールデヒドラターゼはアデノシルコバラミン依存の酵素で 1,2-ジオールを相当するアルデヒドへと変換する反応を触媒する。この反応はアデノシルコバラミンの Co-C 結合がホモリティックに開裂することによりアデノシルラジカルが生じることで始まる。このアデノシルラジカルが 1,2-ジオールの 1,1-ジオールへの変換反応を触媒する。アデノシルラジカルは基質の 1 位の炭素から水素を引き抜き、反応物ラジカルと 5'-デオキシアデノシンが生成する。次に 2 位の水酸基が 1 位に移動する水酸基転位反応が起き、反応物ラジカルが生成物ラジカルに変換される。その後、生成物ラジカルが 5'-デオキシアデノシンから水素を引き抜く水素再結合反応が起こり、1,1-ジオールとアデノシルラジカルが生じる。1,1-ジオールは不安定なので容易に脱水反応が進行し、アルデヒドに変換される。本論文では量子力学 (QM) 計算と分子力学 (MM) 計算を組み合わせた、QM/MM 法に基づく大規模量子化学計算を用いて、ジオールデヒドラターゼによる 1,2-プロパンジオール、1,2,3-プロパントリオール (グリセロール) の脱水反応の解析を行い、それらの反応機構を分子レベルで明らかにした。さらに、計算機上で変異型の反応機構を解析する計算ミュレーションを用いて、アミノ酸残基の置換が反応に与える影響について評価を行った。

第 1 章では、本研究の対象であるアデノシルコバラミン依存のジオールデヒドラターゼの研究動向について概説した。また、変異型酵素の反応機構を解析する計算ミュレーションの意義についても確認した。

第 2 章では、本研究で用いた QM/MM 法について述べた。QM/MM 法は高コストな量子化学 (QM) 計算を活性中心に、安価な分子力場 (MM) 計算をそれ以外の領域に適用する方法である。この方法を用いることで、酵素などの数万原子から成る大規模な系に対しても量子化学計算を適用することが可能となった。

第 3 章では、活性中心に存在する金属イオンが 1,2-プロパンジオールの脱水反応に与える影響について議論した。最近、この金属イオンは K^+ から Ca^{2+} へと修正されている。中心金属イオン K^+ と Ca^{2+} のモデルにおける反応のエネルギーダイアグラムを求めると水酸基転位反応の活性化エネルギーに大きな違いが確認された。これは Ca^{2+} のモデルでのみ遷移状態の共鳴安定化がおきるためである。これまで中心金属イオン K^+ は水酸基転位反応の活性化エネルギーに影響を与えないとされてきたが、中心金属イオン Ca^{2+} は活性化エネルギーを下げることに積極的な役割を果たすことが明らかにされた。

第 4 章では、計算ミュレーションを用いてアミノ酸残基の置換が反応に与える影響について解析した。変異導入による活性の変化は酵素のコンフォメーションや複雑な反応機構の変化などにより引き起こされるため、実験のみからその結果を解釈することは非常に難しい。そこで、計算ミュレーションを行うことで、実験では明らかにできない変異導入の影響を理解することが可能になると期待される。本研究では His143Ala、Glu170Gln、Glu170Ala、Asp335Ala という 4 個の変異型について活性の予測を行った。その結果、His143、Glu170 は水酸基転位反応の遷移状態の共鳴安定化に重要であり、反応を促進させる残基であることが明らかにされた。一方、Asp335 は転位する水酸基との間に生じる静電反発により、水酸基転位反応の活性化エネルギーを上昇させることが判明した。また、計算ミュレーションにより求められた変異型の野生型に対する相対活性は実験値を非常によく再現しており、計算ミュレーションにより酵素の活性の予測が可能であることを示した。

第 5 章では、本来の基質ではないグリセロールの脱水反応における酵素の不活性化について議論し、これまで未解明であった不活性化に寄与する副反応を明らかにした。副反応では反応物ラジカ

ルの3位の水酸基の水素がC1ラジカルに移動する水素移動反応が起き、アルコキシラジカルが生じる。このアルコキシラジカルは不安定なので容易にグリコールラジカルとホルムアルデヒドに分解される。また、グリセロールと酵素の結合により得られるふたつの基質結合構造と不活性化の関係についても検討した。その結果、不活性化が進行しやすい構造では水素移動反応の活性化エネルギーとそれと競争的に進行する水酸基転位反応の活性化エネルギーの差がより小さく、相対的に不活性化が進行しやすいことが判明した。

第6章では、グリセロールの脱水反応において活性中心近傍のアミノ酸残基を置換した Gln336Ala、Ser301Ala 変異型が野生型より不活性化しにくい理由について計算ミューテーションを用いて検討した。不活性化の抑制は基質の結合構造の選択性の変化と不活性化に寄与する副反応の活性化エネルギーの上昇により説明された。これらの結果から、計算ミューテーションを用いることで酵素を目的の反応に最適化できることを示した。

第7章では、本論文の成果を総括した。これらの研究によりジオールデヒドラターゼの反応機構の詳細を明らかにすることができた。また、計算ミューテーションを用いることで変異型の活性の予測、およびある化学反応に対する酵素の最適化が可能であることが示された。将来、計算ミューテーションを用いることで、特定の化学反応に最適化された酵素が設計されることが期待される。