

第一原理計算による生体内酵素反応の理論研究

重田 育 照*

Theoretical studies on enzymatic reactions by first-principles calculation

Yasuteru Shigeta*

In order to clarify the role of Tyr170 in nylon oligomer hydrolase, we investigated mutational effects (Tyr170 to Phe170) on substrate-enzyme binding structures and the reaction mechanism of the hydrolysis undergoing in this enzyme by using classical and first-principles molecular dynamics simulation with a metadynamics approach. We found that the substrate bound to the Y170F mutant loses several hydrogen bonds resulting in worse stability with respect to the wild-type. The reaction mechanisms of the wild-type and Y170F mutant are close to each other except for existence of a water molecule, which causes an increase of reaction barrier by around 11 kcal/mol.

1. 研究の背景とねらい

プロテアーゼの1種であるナイロンオリゴマー分解酵素は、人工化合物であるナイロンの生成時に生じる副産物（ナイロンオリゴマー）のアミド結合を切断する。この酵素は1972年に、6-アミノヘキサ酸環状二量体を単一炭素源・窒素源として生育可能な微生物 *Arthrobacter* sp. KI72 から単離された。その後、遺伝子的・生化学的な研究から KI72 株が保持するプラスミド pOAD 2 上にコードされる作用様式の異なる3種類の酵素 (NylA, NylB, NylC) の存在が確認されている。特に、NylB に関しては、pOAD2 上に、NylB と 88% の相同性を有する類似性酵素 NylB* (活性: NylB の約 1/200) が見いだされており、NylB はエステラーゼ活性を保持していることが明らかとなった。*Arthrobacter* sp. KI72 株由来については、ナイロンオリゴマー分解酵素の構造が、2005年に、NylB と NylB* を組み合わせる事で、ハイブリット酵素の1つである Hyb-24 型酵素として初めて結晶構造解析に成功した (1)。その結果、ナイロンオリゴマー分解酵素において、112位のセリン (Ser112)、115位のリジン (Lys115) ならびに 215位のチロシン (Tyr215) が基質であるアミノヘキサ酸二量体 (Ald) 分解活性およびエステラーゼ活性に共通の必須残基であり、Ald 分解には加えて 181位アスパラギン酸、266位アスパラギンを含むアミノ酸残基が触媒中心を形成している。また、170位チロシン (Tyr170) を含むループ部位 (N167~V177) の誘導適合によって閉鎖型構造への構造変化が生じるという他の類似酵素にはないユニークな特徴を有し、Tyr170 をフェニルアラニンに変異させた変異体 Y170F において大きく活性が落ちることが明らかとなっている。

そこで、本研究ではナイロンオリゴマー分解酵素の活性低下の原因を明らかにするために、古典および第一原理分子動力学法を利用することで、変異体導入による反応機構の違いを明らかにした。

2. 理論・計算

酵素の反応過程やアミノ酸残基の酵素上での役割の解明を行うために、実験で得られている複数のアミノ酸変異から代表的な系を抽出し、古典分子動力学法を利用した酵素-基質複合体の解析 (2)、および、QM/MM Car-Parrinello 分子動力学法とメタダイナミクス法を利用したアミド加水分解の初期過程であるアシル化の反応におけるアミノ酸残基の役割の特定および、アミノ酸変異のアミド加水分解に対する効果の解析を行った。特にアミノ酸変異の効果の理解については、アミノ酸変異によって活性が低下した変異酵素 (Y170F: 活性が 1/70 低下) を中心に研究を行った。

3. 結果・考察

まず、古典分子動力学計算を用い、基質-酵素複合体の構造を結晶構造 (PDB ID:2ZMA) から推測した。その結果、Y170F 変異体では酵素-基質複合体形成時に構造が不安定になることが明らかとなった。得られた構造アンサンブルを確認すると Tyr170 を含むループ部位が大きく揺らいでいた。この変化を野生型と比較すると、従来ループ部位が基質に対して水素結合を介して酵素-基質複合体の形成環境を支えるという役割を喪失していることが明らかとなった。

次に、QM/MM Car-Parrinello 分子動力学法とメタダイナミクス法を利用して、ナイロンオリゴマー分解酵素の野生型および Y170F 変異体のアシル化反応過程について解析を行った。その結果、野生型の反応機構の解析では不明であった触媒に関与する2つのアミノ酸の役割を明らかにすることができた。具体的には、

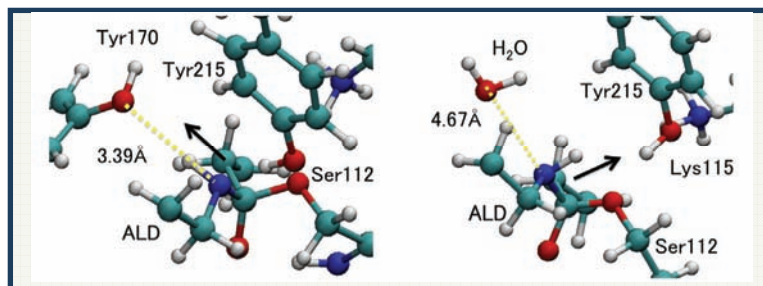


図 1. (a) 野生型、および、(b)Y170F における反応途中における NH 基の配向

Lys115 が Ser112 の求核攻撃性を上昇させるためのプロトンの引き抜く塩基としての役割を担い、Tyr215 は基質のアミド結合が切断される時に必要なプロトンを供与するという役割を担っていることが判明した。また変異体である Y170F において活性が低下するのは、基質のアミド結合切断時に基質が Tyr215 からのプロトン供与が困難な配向の形成し、結果として野生型との反応自由エネルギー差が約 11kcal/mol あることが要因である事を明らかにした。まずアシル化反応では、アミド平面に対して Ser の側鎖の酸素原子が求核攻撃する。この求核攻撃における反応途中の構造において、野生型と Y170F の間で顕著な違いが生じる。図 1 は野生型および Y170F におけるアミド NH 基の配向 (図中矢印) を示している。図 1 (a) より野生型の場合、アミドの窒素原子に結合している水素原子は Tyr170 と水素結合を形成し、そのため、窒素原子が Tyr215 の水素と水素結合する。一方、図 1 (b) より Y170F の場合はアミドの窒素原子に結合している水素原子が Tyr215 のプロトンを供与する側に配向している (NH 基が Ser112 側を向く)。つまり、Y170F における水素原子の配向は Tyr215 からプロトンを供与するには困難な環境であることが判る。一方、野生型の場合は Tyr170 の水素結合により、プロトンを受容するための非共有電子対が自発的に Tyr215 の方を向くような構造になり、酵素が反応しやすい構造を形成していること明らかになった。Y170F に関しては、さらにエネルギーの高い領域で NH 基が水分子の方へ配向することで反応が進むが、その際の構造変化には野生型よりもエネルギーを要する。この結果は、Tyr170 が加水分解反応時の基質の配向性の決定の役割を担っており、それゆえ Tyr170 は触媒中心の働きをサポートする重要な残基であることを示唆している (3)。

4. 結論・展望

本研究では様々な分子動力学法の手法を用いてナイロンオリゴマー分解酵素の基質結合状態や化学反応過程のシミュレーションを行い、E168 や Y170 のアミノ酸変異がそれぞれの反応過程に対してどのような効果をもたらすのか、そのアミノ酸残基自身の役割、原子レベルでのアシル化反応過程を明らかにすることができた。今後は、まだ未解決である野生型の基質取り込み過程や脱アシル化過程などを明らかにし、酵素反応過程全体の機構解明を行う。その結果をもとにして有用アミド合成の設計指針を提案する予定である。

REFERENCES

- (1) S. Negoro, T. Ohki, N. Shibata, K. Sasa, H. Hayashi, H. Nakano, K. Yasuhira, D. Kato, M. Takeo, Y. Higuchi, *J. Mol. Biol.* **370**, 142(2007).
- (2) T. Baba, K. Kamiya, T. Matsui, N. Shibata, Y. Higuchi, T. Kobayashi, S. Negoro, Y. Shigeta, *Chem. Phys. Lett.* **507**, 157 (2011).
- (3) K. Kamiya, T. Baba, T. Matsui, N. Shibata, Y. Higuchi, S. Negoro, Y. Shigeta 投稿準備中