

酵素の構造と機能についての理論的研究(第一報): D-アミノ酸酸化酵素の活性部位の構造と基質との相互作用

(阪府大総科) 麻田俊雄、(岡山理科大) 西本吉助

[序] すべての生物は自由エネルギーの供給源である ATP に依存して生きている。ATP は TCA サイクルで合成されている。このサイクルで、NAD は二電子還元、チクロム C は一電子還元しかできないのに対し、ビタミン B2 を基本骨格とする FAD を補酵素にもつフラビン酵素は二電子還元と一電子還元の両方を行う最も重要な酵素である。フラビン酵素が欠乏すると体に大きな障害が起こる。また、2003 年にはフラビン酵素は DNA の修復に関わっていることがわかり、大きな関心もたれている。

われわれは、1978 年からフラビン酵素の研究を積み重ねてきた。まずフラビン酵素の活性部位であるイソアロキサジン骨格(ISO)の電子状態を理論的に研究し、N5 で触媒反応が起こることを明らかにした。ついで、フラビンとタンパクの水素結合を研究し、水素結合による電子スペクトルの変化を理論的に明らかにした。フラビン酵素の中でも D-アミノ酸酸化酵素(DAO)は多くの実験的研究が行われてきた。D-アミノ酸は生体にとって毒であるのでそれを速やかに分解しなければならない。われわれは、1999 年 DAO による D-アミノ酸の触媒的分解反応メカニズムを *ab initio* 計算で研究した¹⁾。われわれのメカニズムでは活性化エネルギーは約 20kcal/mol になる。2000 年に DAO の高精度構造解析が行われ、基質と ISO との非常に詳しい構造化学的知見が得られた。われわれは、この構造を基にして触媒反応のメカニズムを詳細に研究するため QM/MM 計算を行っている。今回は、Amber 用の基質・フラビンとの相互作用パラメータを決定し、いくつかの知見を得たので報告する。

[計算] *Ab initio* MO 計算(HF/6-31G*レベル)の結果を用いて、タンパク以外の FAD・(peroxide)PER・(D-alanine)DAL・(glycerol)GOL の原子電荷を分子周辺の静電場を再現するように RESP(reproduced electrostatic potential) フィットで決定し、ついで、結合・変角・二面角のパラメータは Amber99 パラメータを基にして決定した。X 線構造解析の結果は、水素原子の位置が不明である。そこで本研究ではすべての水素原子を標準的な座標に配置した。ついで X 線構造解析から得られた構造をもとにして、活性中心から半径 50 Å 以内に水分子を約 4500 個配置し、Amber7 を用いて力場計算を行いエネルギー極小構造を計算した。

[結果] 1. エネルギー極小構造の計算 作成したパラメータを用いた計算は X 線構造解析から得られたグローバルな構造を完全に再現した。従って、パラメータは非常に有用であることがわかる。バックボーン RMS は 0.09 Å であった。

2. CH₂ と N5 との特別な相互作用 今まで推測でしか議論できなかった DAL と ISO との反応の初期配置がエネルギー極小構造の計算から明らかになった。CH₂ の水素は明確に反応部位 N5 を向いており、水素原子と N5 との距離は 2.42 Å であった。別途計算により、この相互作用は CH₂-N 型であることがわかった。

3. フラビン酵素の基質認識と *ab initio* 計算 結晶構造を元に三点認識の様式を整理し、*ab initio* 計算により相互作用エネルギーの大きさを計算した結果、合理的な結論を得た。

4. 紙面の都合で MD の結果は当日に報告する。

[参考文献] 1) K.Nishimoto, K.Higashimura, T.Asada, *Theor. Chem. Acc.*, **102**, 355-365 (1999)

