

トピックス

量子化学計算が解明するピリドキサル酵素の反応機構

Quantum Chemistry in Elucidation of the Reaction Mechanisms of PLP-dependent Enzymes

補酵素の多くは、その機能が専一であり NAD(P)⁺ は酸化還元反応、チアミンピロリン酸は脱炭酸反応と、それぞれ特異な酵素反応に関与する。しかし、ピリドキサルリン酸(PLP)はアミノ基転移、脱炭酸、ラセミ化、 α 、 β 位または γ 位の共有結合の切断または形成などに関与し、さらにラジカル転移にも関与し、多様性を発揮できる点でユニークであり、その反応メカニズムは魅力的な謎に満ちている。どの反応を引き出すかを決定するのは、PLPを使う酵素自身であり、さらに厳密に言えば PLP 周辺のアミノ酸残基群の寄与に負うところが大きい。近年、QM/MM 計算が PLP 酵素の多彩な反応機構を理解する上でめざましい成果を上げつつある。QM/MM 計算とは、補酵素とその周辺領域を含む狭い範囲で進行する化学反応を量子化学計算で解析して、化学反応を伴わない領域は分子力場計算または分子動力学計算に切り分けて酵素反応のシミュレーションを行う包括的な酵素の計算化学である。本稿では PLP 酵素の反応機構の解明における計算化学の最前線を紹介したい。

反応開始前の PLP は、活性中心のあるリジン残基にシッフ塩基結合した内部アルジミン構造を持つ。基質のアミノ基がリジン残基と交換する反応過程を L-オルニチン脱炭酸酵素(2000.pdb)をモデルとして QM/MM で計算すると、外部アルジミン形成までの3反応過程は全体としてエネルギー的に下り坂($\Delta G = -12.0$ kcal/mol)であり、もっともエネルギー障壁が高い過程は gem-ジアミン状態において2つの窒素原子のプロトンが一減一増する過程であると予測された¹⁾。このメカニズムを解明するために、プロトン授受反応に周辺残基が関与する可能性を検討した結果、アミノ酸残基ではなく水分子の介添えによるプロトン与奪機構が最も低いエネルギー障壁で進行すると予測された。その反応機構では PLP の3位のフェノレート基($-O^-$)が重要な役割を担うと提案されている。つまりフェノレート基が、基質側 $-NH_2^{+}$ の1つの水素原子と水素結合を形成して、もう一方のプロトンが脱離しやすくな

り水分子を介してリジン- ϵ NH₂へとリレーされるという考察である(図1)。従来 PLP の反応機構を考える際にピリジン環 N1 の解離状態が注目されてきたが、3位のフェノール基もまた触媒機能に重要な役割を担っている。このことは、以下に述べるアミノ基転移酵素、脱炭酸酵素、ラセミ化酵素などについても同様である。

PLP が基質と結合した外部アルジミン構造は多様な触媒反応に向かう分岐点であり PLP 酵素反応の共通の中間体でもある。同位体標識した PLP を取り込ませた酵素の ¹⁵N-NMR 解析によれば、酵素と結合している状態ではピリジン環窒素(N1)は近傍の Asp 残基や Arg 残基など特異な残基と異なる強さで水素結合を形成する²⁾。また外部アルジミン構造において、正と負に分極したケトエナミン(K)状態と分極なしのエノールイミン(E)型の互変異性の相互変換が平衡状態となる(図2)。イミン N とフェノール基(O3)の間に共有されるプロトンが O3 により近い位置にあれば平衡は E

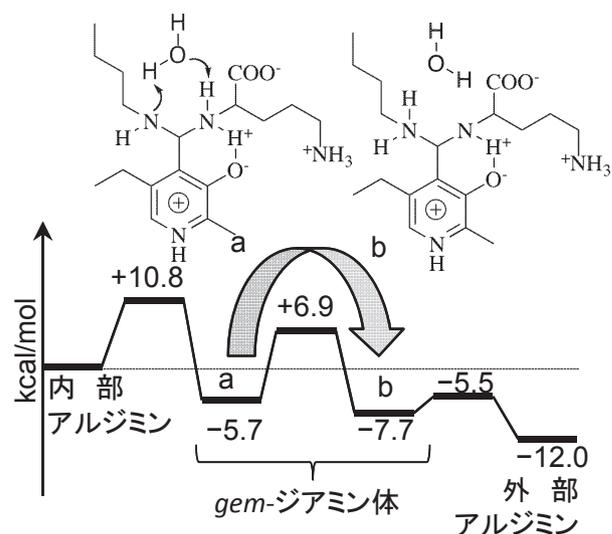


図1 OrnDC のアルジミン転移過程

水分子が介する H⁺ 授受が最も高いエネルギー障壁(12.6 kcal/mol)を持つ。(文献1を参照して作成)

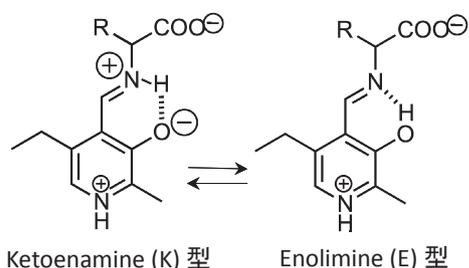


図2 外部アルジミンの互変異性

イミノ基とフェノール基の解離状態によってK型とE型の互変異性は平衡状態にある。

(エノールイミン)型で、共有プロトンがイミンNに接近すれば zwitter ion を有するK(ケトエナミン)型となる。PLP分子内にはプロトン授受に関わる原子が5つあり、その3つがピリジン環N1、フェノールO3、イミノ基Nであり、これらはPLPの電子状態と反応性に直接関わる。残りはリン酸基の2つのOH基で、これらも反応に関わる場合も報告されている³⁾⁴⁾。外部アルジミン構造と相互作用するアミノ酸残基群は、PLPの解離状態を制御することによって、引き出すべき化学反応を決定しているといえる。

Chandraらはアスパラギン酸アミノ基転移酵素(AspAT)のQM/MM計算を行い、外部アルジミン状態にあるAsp-PLPの互変異性体はK型がE型より安定であることを示した⁵⁾。この分子メカニズムはN1へAsp222によるプロトン付加による正電荷付与、解離したO3のフェノレートアニオンに対してはAsn194のアミド水素とTyr225のOH(水酸基)が安定化に寄与している(図3)。ここでTyr225の作用は補助的かつ可逆的でありE型に異性化したときは水素供与基として寄与するので、この互変異性をK型優勢に導いているのはAsp222の役割といえる。B3LYP/6-311G**:PM3を用いた高精度な量子化学計算によれば活性中心においてK型はE型よりも7 kcal/mol安定で、K型からE型へのエネルギー障壁は7.5 kcal/molと見積もられた。このQM/MM計算では、外部アルジミン状態Asp-PLPと周辺7残基が*ab initio*(第一原理による)計算の対象となった。周辺7残基とは、基質Aspの α 、 β -カルボキシル基と相互作用するArg386, Arg292'の両残基、ピリジン環N1にプロトン供与するAsp222、PLPのフェノレートO3に相互作用するAsn194とTyr225、さらに内部アルジミンを形成していたLys258である。各残基の β 炭素より先が量子化学計算の対象とされており、 α 炭素を含む主鎖構造は量子化学計算の対象外となっている。

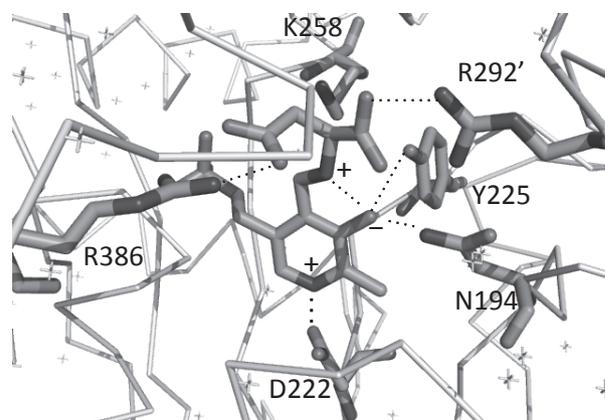


図3 AspATの外部アルジミン構造

K型異性体がE型よりも7 kcal/mol安定で、イミノ基とフェノール基間の水素はイミノ基により近い。イミノ平面とピリジン間平面はほぼ同一平面にあり、脱炭酸後に α 位の電子対がピリジン環に流れ込んでキノノイドを形成する。(文献5を参照して作成)

PLPは酵素分子内の水素結合ネットワークに取り込まれてその多彩な反応性を発揮している。AspATでは、K \rightleftharpoons Eの平衡がK状態有利になる場を提供することにより、基質Aspの α 位水素が解離しやすくなり、初発の触媒機構に大きく寄与すると理解できる。

ドーパ脱炭酸酵素DopaDCはAspATと同様にピリジン環N1に酸性残基Asp271を配しており、これがピリジン環に強い電子吸引力を付与する点では同じである。しかし、DopaDC酵素の活性中心に置かれた外部アルジミン構造を計算するとAspATとは異なり、E型優位(-1.5 kcal/mol)な電子状態を取ると予測された⁶⁾。この計算ではDopa-PLPの外部アルジミン構造をまず酵素なしでB3LYP/6-311+G(d,p)のハミルトニアンを用いた密度汎関数計算を行い、酵素に結合した状態における残基間の相互作用を半経験的パラメータAM1で補正して構築している。もともとDopaDCの外部アルジミン構造の特異な吸収極大波長(380 nm)からE型異性体の存在が想定されておりイミン平面とピリジン環が共役せず、二面角が直交している可能性が指摘されてきた⁷⁾。その先見性は、上記の量子計算化学でも支持されており、このE型の外部アルジミンではアミド平面とピリジン環平面が $79.8 \pm 34.7^\circ$ の大きな二面角で直交した安定構造が予測された。PLP分子内のイミン窒素Nとフェノール基O3との水素結合を分断している周辺残基として、O3(-OH基)に対してThr246が水素受容体として水素結合しており、フェノレートへの解離を抑制している。またイミンNにもLys303残基が3 Å近傍にあり弱い水素結合を形成してO3から引き離す役割

を担っている(図4). 互変異性をE型に導くしくみが脱炭酸にどのように効いているのか. Tonyらは, E型からの脱炭酸とK型からの脱炭酸反応を反応経路積分によって反応シミュレーションを行った結果, E型からの脱炭酸がより低い自由エネルギー経路を辿って脱炭酸反応を完結することが示されたので, E型状態に合理性があると考えた. ここで使われた経路積分とは, 原理的にはファインマン経路積分と同じ解析法であり, でこぼこの多い砂場に無数のビー玉を投げてAという状態からBという状態に結合の変化が起きるときの低いエネルギー経路を辿る解析法である. 経路積分において切れる結合と形成される結合にあらかじめ自由度を高くした設定で計算コストを節約する計算方法がXieらによって開発されており⁸⁾, Tonyらはこれを用いて経路積分の計算コストを節約している⁶⁾.

DopaDC反応シミュレーションでは, 酵素が存在せず, 水和した状態のL-Dopa-PLPのみで進行する脱炭酸反応はK型, E型ともに遷移状態に至る過程は同じエネルギー障壁高さ42 kcal/molで進むと計算されたが, これは実験値41 kcal/mol⁹⁾と極めて近い見積もりといえる. つまり外部アルジミン構造そのものが化学的にも脱炭酸反応を促すことを示唆している. 酵素なしではK型, E型の反応性は等しいが, DopaDCの活性中心という水素結合ネットワーク内に置いたとき脱炭酸過程のエネルギー障壁はさらに8 kcal/mol程度低下すると算出され, さらに酵素反応ではK型よりもE

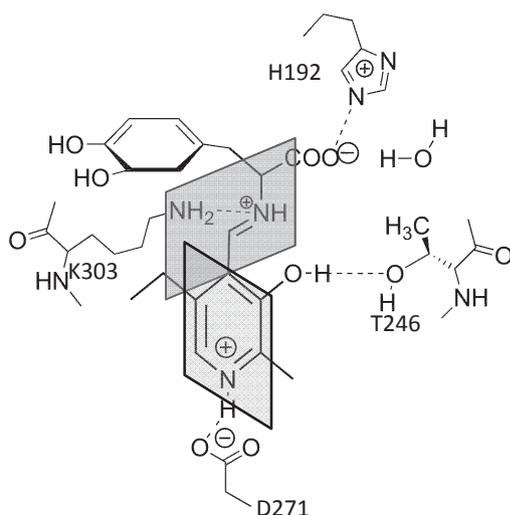


図4 DopaDCの外部アルジミン構造

E型異性体がK型よりも安定で, イミノ基とフェノール基間の水素結合は形成されない. イミノ平面とピリジン間平面が直交しており, 脱炭酸後に α 位の電子対がピリジン環に流れ込まない. (文献7を参照して作成)

型の方が脱炭酸反応が有利に進行することが示された. 脱炭酸によって α 炭素が四面体の sp^3 混成から平面 sp^2 混成軌道に変わるが, この遷移状態においてE型由来の方が sp^2 混成の要素が強く発生しており, 遷移状態から生成物に向かってエネルギーが低下するプロセスでもPLPフェノール基OHが非解離である状態の方が有利に進行する. フェノールが非解離状態に維持されることでイミノ平面とピリジン環が共役せず, 2つの面は直交に近い大きな二面角を持つ. これもたまたま効果とは, 脱炭酸によって α 炭素に形成された電子対をピリジン環に流入させないことにあると言える. つまり負電荷の非局在化によるキノイド中間体は形成せず, 塩基としてすみやかにプロトンを受け取ることで脱炭酸の素反応が完結する.

アラニンラセマーゼAlaRではピリジン環N1にpKaが高いアルギニン残基を配しており, ピリジン環N1に正荷電を与えない特異なPLP周辺環境を持つ. Ala-PLPの外部アルジミン構造から α 水素を引き抜く残基としてL-Ala-PLPに対しては, Tyr265'のフェノレート塩基-O⁻, D-Ala-PLPの場合は内部アルジミンを形成していたLys39の ϵ -アミノ基塩基-NH₂が塩基として脱プロトン反応に関わるとされている. ラセマーゼ反応は二塩基機構(double base mechanism)であり, Tyr265'-OH基はLys39の共役酸として, Lys39-NH₃⁺はTyr265'-O⁻の共役酸として α 炭素の負電荷に対してプロトンを提供する. ピリジン環N1に正荷電を持たないAlaRではPLPを電子溜(electron sink)とする α 位炭素のpKa低下という戦略は取らない. しかし, ピリジン環のO3の近傍残基Arg136の正荷電によってフェノレートアニオンを形成している. PLPの分子内水素結合によってイミノプロトンの正荷電の安定化を介して α 水素の活性化に関与している(図5). AlaRが α

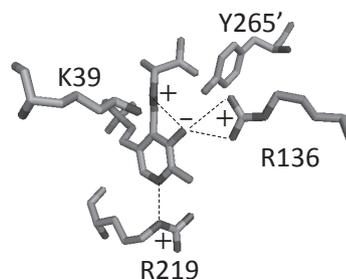


図5 AlaRのPLP周辺残基

R219の高いpKaはピリジン環Nにプロトンが付加せず電子吸引基として機能しない. 代わりにR136がフェノレート解離を促進するのでイミノは正電荷を帯びて α 炭素のpKaを低下させる. (文献10を参照して作成)

炭素の活性化戦略として、この機構を取る理由は α プロトン引き抜きの後に形成されるキノノイド中間体の形成を回避することにあるといえる。PLP のピリジン環 N1 に AspAT と同様に酸性残基を配置した R219E 型酵素と野生型酵素のアラニンラセマーゼ反応の QM/MM 計算が報告されている¹⁰⁾。この計算モデルでは、活性中心において L-Ala, D-Ala の外部アルジミン構造として 1L6F.pdb, 1L6G.pdb を出発点として阻害剤から基質への構造改変, Arg219Glu の変異も計算機上で構築して反応経路の計算を行っている。計算対象はリン酸エステル基部分を除く Ala-PLP の外部アルジミン構造とプロトン引き抜きに関わる Tyr265' と Lys39 残基のみである。さらにハミルトニアン AM1 に由来する半経験的な量子化学計算を用いているので低コストかつ最小限の計算資源といえる。計算結果が示唆した遷移状態に至るエネルギー障壁と生成物との反応物のエネルギー差など、計算予測と実験結果が極めてよい一致を示しており、Tyr265'-O⁻ フェノレートイオンは Lys39 アミノ基よりもプロトン引き抜きの障壁が高いことや、Arg219Glu 型で形成されるキノノイド中間体は、野生型酵素でのキノノイド状態よりも 9.8 kcal/mol 安定化しており、副反応としてケチミン形成に至る機構も計算機上で示されている(図 6)。野生型酵素の場合はキノノイド状態が反応前後の状態よりも 4.2 kcal/mol 高く、反応前後よりも不安定な状態なので中間体としての蓄積は認められない。また Arg219Glu 型酵素でキノノイド中間体を観測できるのは D-Ala を基質として出発した時であり、L-Ala からの反応では蓄積し

ないことも、塩基の非対称性 (-NH₂ または -Phe-O⁻) を反映した非対称な反応経路に起因していることも計算結果が示している。AM1 ハミルトニアンは、プロトン引き抜きのような酸塩基反応では実験値とよく一致することが経験的に知られているので、このようなブレンステッド型の酸塩基反応の解析には有用といえる。

本稿では、PLP を利用するアミノ酸代謝酵素としてアミノ基転移酵素 AspAT, 脱炭酸酵素 DopaDC, ラセマーゼ AlaR を取り上げた。それぞれの酵素において基質-PLP の外部アルジミン構造のどの解離基を選択的に解離促進、あるいは抑制することで触媒反応を引き出すしくみが計算化学で詳細に解析されている。基質-PLP の外部アルジミン構造を活性化している三者三様の異なるメカニズムは量子化学計算によって初めて現出するものであり、結晶構造解析では見えないプロトンの挙動を理解する上で計算化学を用いる意義は明白である。さらに量子化学計算は、静的な相互作用を計算するだけでなく、結合の切断と形成を伴う化学反応のシミュレーションと自由エネルギー変化をプロットすることで *k_{cat}* から得られる実験値とも比較できるので精密かつ有用な情報を提供する。 α 炭素上で起こる最初の素反応に続き β 位, γ 位まで及ぶ多段階の素反応を伴う PLP 酵素群、つまり L-セリン脱水素酵素, L-スレオニン合成酵素, さらにラジカル転移を含むオルニチン 4,5-アミノムターゼなど複雑な反応を触媒する酵素の解析にも計算化学は明確なビジョンを提供している。これらの研究内容の紹介についてはまた次の機会に譲りたい。

(平成 28.2.6 受付)

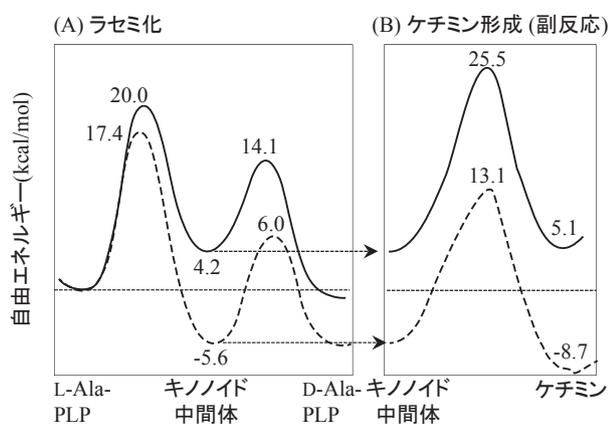


図 6 AlaR の反応経路

野生型酵素(実線)と R219E 変異酵素(破線)のラセミ化反応(A)とキノノイド中間体からのケチミン形成反応(B)。変異酵素は D-Ala を基質にしたとき、副反応としてケチミン体を蓄積してアミノ基転移反応に至る。(文献 10 を参照して作成)

Key Words: Pyridoxal enzymes, QM/MM calculation, AspAT, DopaDC, AlaR, external aldimine

Department of Bio resources Chemistry, Graduate School of Life and Environmental Science, Okayama University
岡山大学大学院環境生命科学研究科
Takashi Tamura
田村 隆

文 献

- 1) Cerqueira, N. M., Fernandes, P. A., and Ramos, M. J. (2011) Computational Mechanistic Studies Addressed to the Transamination Reaction Present in All Pyridoxal 5'-Phosphate-Requiring Enzymes. *J Chem Theory Comput* 7, 1356-1368

- 2) Chan-Huot, M., Dos, A., Zander, R., Sharif, S., Tolstoy, P. M., Compton, S., Fogle, E., Toney, M. D., Shenderovich, I., Denisov, G. S., and Limbach, H.-H. (2013) NMR Studies of Protonation and Hydrogen Bond States of Internal Aldimines of Pyridoxal 5'-Phosphate Acid-Base in Alanine Racemase, Aspartate Aminotransferase, and Poly-L-lysine. *J Am Chem Soc* **135**, 18160-18175
- 3) Zhao, Z., and Liu, H. (2008) A quantum mechanical/molecular mechanical study on the catalysis of the pyridoxal 5'-phosphate-dependent enzyme L-serine dehydratase. *J Phys Chem B* **112**, 13091-13100
- 4) Shoji, M., Hanaoka, K., Ujiie, Y., Tanaka, W., Kondo, D., Umeda, H., Kamoshida, Y., Kayanuma, M., Kamiya, K., Shiraishi, K., Machida, Y., Murakawa, T., and Hayashi, H. (2014) A QM/MM Study of the L-Threonine Formation Reaction of Threonine Synthase: Implications into the Mechanism of the Reaction Specificity. *J Am Chem Soc* **136**, 4525-4533
- 5) Banik, S. D., and Chandra, A. (2014) A Hybrid QM/MM Simulation Study of Intramolecular Proton Transfer in the Pyridoxal 5'-Phosphate in the Active Site of Transaminase: Influence of Active Site Interaction on Proton Transfer. *J Phys Chem B* **118**, 11077-11089
- 6) Lin, Y. L., Gao, J., Rubinstein, A., and Major, D. T. (2011) Molecular dynamics simulations of the intramolecular proton transfer and carbanion stabilization in the pyridoxal 5'-phosphate dependent enzymes L-dopa decarboxylase and alanine racemase. *Biochim Biophys Acta* **1814**, 1438-1446
- 7) Hayashi, H., Mizuguchi, H., and Kagamiyama, H. (1993) Rat liver aromatic L-amino acid decarboxylase: spectroscopic and kinetic analysis of the coenzyme and reaction intermediates. *Biochem* **32**, 812-818
- 8) Xie, L., Liu, H., and Yang, W. (2004) Adapting the nudged elastic band method for determining minimum-energy paths of chemical reactions in enzymes. *J Chem Phys* **120**, 8039-8052
- 9) Snider, M. J., and Wolfenden, R. (2000) The rate of spontaneous decarboxylation of amino acids. *J Am Chem Soc* **122**, 11507-11508
- 10) Rubinstein, A., and Major, D. T. (2010) Understanding catalytic specificity in alanine racemase from quantum mechanical and molecular mechanical simulations of the arginine 219 mutant. *Biochem* **49**, 3957-3964