

遷移状態における基質の歪みの 酵素触媒反応機構に及ぼす影響に関する理論的研究

(材料設計学) 古田美紗子

1. 緒言

酵素触媒反応において、酵素の役割は活性化エネルギーを低下させ、反応速度をあげる役割を有する。多くの場合、活性化エネルギーの低下において、遷移状態構造の安定化として議論される場合が多いが、基質-酵素複合体形成時に基質に歪みを生じさせ不安定化させることによって、活性化エネルギーを低下させる場合もある。このような基質の歪みを複合体形成によって生じさせる触媒抗体として Figure 1 に示すクロラムフェニコール・プロドラッグ中のエステル結合を加水分解(Figure 1)する 6D9 が実験によって報告されている[1]。触媒抗体は一般的に遷移状態アナログ(transition-state analog, TSA)を免疫して得られる。6D9 と TSA との複合体の X 線結晶構造はすでに報告されており、Figure 2 に示すように TSA の 2 個のベンゼン環は重なるようにして結合している。TSA と基質とが同様の結合様式で抗原結合部位に結合していると仮定すると、基質のエステル部はねじれ、本来の安定構造とは異なった熱力学的に不安定な構造をとっていることが示唆されている。

本研究では 6D9 によるクロラムフェニコール・プロドラッグの加水分解反応における基質の歪みの反応機構に及ぼす効果について量子化学計算を用いて調べた。

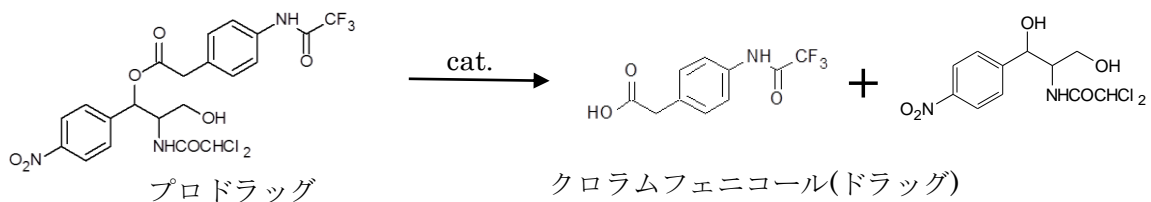


Figure 1 プロドラッグの加水分解反応

2. 実験方法

全ての計算を Gaussian 03 program package で行った。基底関数 6-31G(d,p)、B3LYP 近似の電子密度汎関数法(Density Functional Theory)を用いた。TSA は触媒抗体(6D9)との複合体の X 線結晶構造(pdbID=2dqu)から抽出して作成した。TSA、基質、Figure 1 の反応式中の生成物それぞれについて真空中で構造最適化した。

3. 結果と考察

3.1 基質と TSA の立体構造および基質の歪みによる効果

最適化後の基質と TSA の構造を Figure 2 に示す。TSA の 2 つのベンゼン環の二面角は $d1=94.01^\circ$ $d2=35.39^\circ$ で、基質のそれは $d1=133.6^\circ$ $d2=21.10^\circ$ であった。基質の 2 つのベンゼン環とは異なり TSA の 2 つベンゼン環はほぼ平行で少し左右にずれており、基質と TSA の構造に大きな違いがみられた。次に基質における歪みの及ぼす効果を確認するために、基質の立体構造の $d1$ と $d2$ を TSA のものに固定して最適化を行い、基質-d モデルとした。歪みによって 7.45 kcal/mol の不安定化がみられた。

3.2 加水分解反応機構

基質の加水分解の反応熱を求めるために Figure 1 に示した反応経路に沿って DFT 計算を行っ

た。この反応は溶媒和効果が非常に重要であると考えられるので水中においても同様に計算した。その結果を Figure 3 に示す。生成物は 3 kcal/mol 安定化し、基質-d の安定性には水の溶媒効果はほとんど見られなかった。

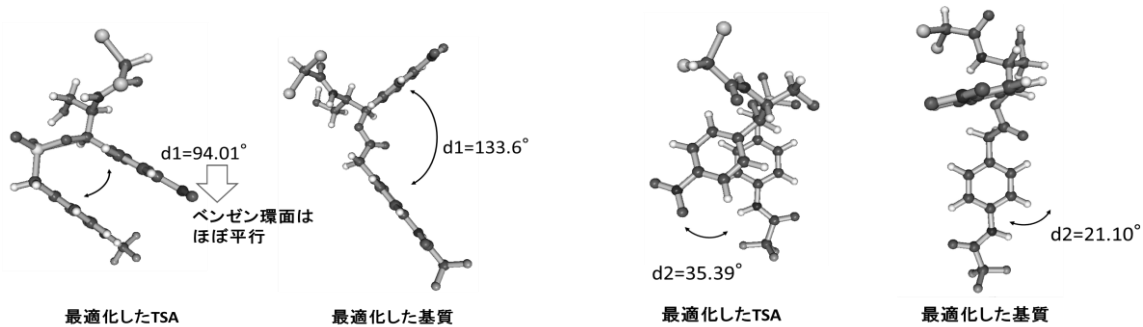


Figure 2 TSA と基質の最適化構造

水中での酸加水分解反応ではまず、カルボニル酸素もしくはエーテル酸素へのプロトン付加が起こると考えられる[2]。そこでカルボニル酸素とエーテル酸素の孤立電子対に注目して、歪みとその分子軌道にどのような影響を与えるか調べた(Figure 4)。カルボニル酸素の孤立電子対は基質-dの方が安定していた。一方でエーテル酸素の孤立電子対は基質-dの方が不安定であった。 $n_{c=O}$ は基質-dにおいて-OH基と分子内相互作用することにより、安定化が起きている。弱酸における加水分解反応は一般的に、カルボニル酸素にプロトンが付加することで始まる。しかし、この反応経路は途中で不安定な四面体中間体を形成するため進行しにくい。そのため、エステル酸素にプロトンが付加して始まる、新たな反応経路が検討されている[2]。以上より、基質と基質-dでは反応経路が異なることも予想される。現在、これらの反応機構について検討中である。

[参考文献]

[1]Masayuki Oda,Nobutoshi Ito,Takeshi Tsumuraya,Kayo Suzuki,Masayoshi Sakakura and ikuo Fujii ,Thermodynamic and Structural Basis for Transition-State Stabilization in Antibody-Catalyzed Hydrolysis, J.Mol.Biol,369,pp198-209,2007

[2]池永裕、堀憲次、計算科学を用いた有害物質の分解性評価システムの開発 pp33-34

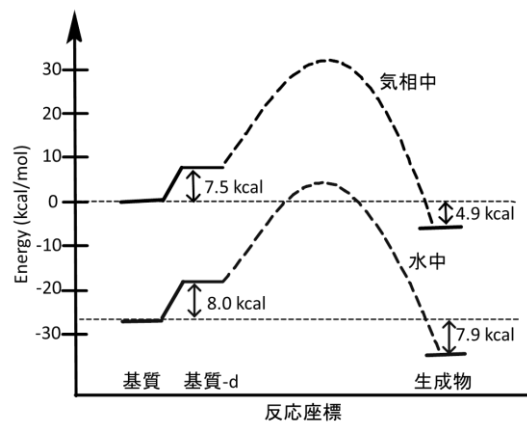


Figure 3 基質の加水分解反応のエネルギーダイアグラム

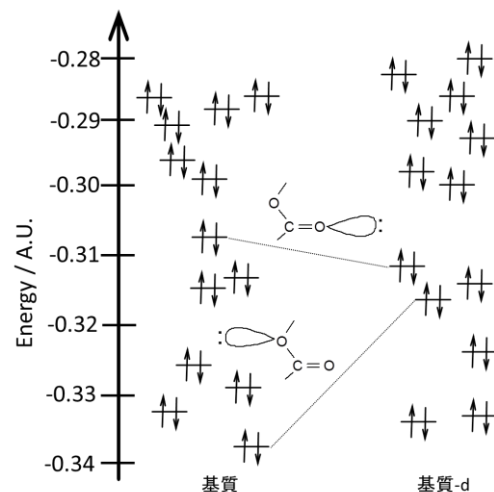


Figure 4 基質と基質-d の分子軌道図