

学位論文題名

Energetics of Catalytic Reaction of Acetylcholinesterase (AChE) with Acetylcholine (ACh) : Role of the Oxyanion Hole

(アセチルコリンエステラーゼの酵素触媒メカニズムに関する
量子化学的研究：オキシアニオンホールの役割)

学位論文内容の要旨

緒 言

アセチルコリン (以下 ACh) は、主に神経終末の細胞質とシナプス小胞の両方に含まれ、神経筋接合部と呼ばれるシナプスにおいて信号を伝達する神経伝達物質である。ACh により引き起こされたシナプス後電位は、酵素アセチルコリンエステラーゼ (以下 AChE) が ACh を不活性化 (加水分解) することにより、短時間で静止電位に戻る。ACh の過剰によりパーキンソン症候群を、また不足によりアルツハイマー病を発症することが知られ、神経系の病気と密接に関連している。したがって AChE による ACh の不活性化反応の詳細を知る事は、ACh の過不足と関連し、新たな薬剤を設計する上で重要な情報になると考えられる。

AChE は高い触媒効率で ACh をコリンと酢酸へ加水分解する。この加水分解反応は2つの過程 (アシル化と脱アシル化) を経て進行する。ヒトの AChE の場合、His440 によりプロトンが引き抜かれた Ser200 の求核的水酸基が ACh のカルボニル基の炭素を攻撃し、テトラヘドラル (正四面体) 中間体ができる。酸触媒反応により、脱離基が His440 のイミダゾリウムイオンからプロトンを受け取り、Ser200 のアシル化が起こる。これがアシル化過程である。脱アシル化過程は、アシル化された酵素が水によって加水分解し、元の形に戻る反応である。大まかな反応はこのように説明されるが、反応メカニズムの詳細な分子論的解釈はほとんどなされていない。例えば、反応に要する障壁のエネルギーや活性サイト近傍に存在するオキシアニオンホール (以下 OAH) の役割については全く分かっていない。本研究では、アセチルコリンエステラーゼの酵素触媒反応のポテンシャルエネルギーダイアグラムを、モデル分子を用いた密度汎関数理論 (DFT) 計算および非経験的分子軌道 (ab-initio MO) 計算し、反応のメカニズムを理論的に明らかにすることを目的とした。

計 算 方 法

AChE の活性サイトは、3つの残基 Ser200、His440、Glu327 から構成される catalytic triad と呼ばれる錯合体である。本研究では、これら3つの残基をそれぞれ C_2H_5OH 、 $C_3N_2H_4(CH_3)$ 、 CH_3COO^- でモデル化した。また活性サイトにおいて、基質 ACh はオキシアニオンホール (OAH) と呼ばれている残基 (Glu118、Glu119 および Ala201) と水素結合によって相互作用していると考えられている。本研究において、OAH のモデルとして $H_2N(CO)CH_2NH_2$ 分子を仮定し、さらに基質 ACh は $C_2H_5COOCH_3$ によりモデル化した。以下 AChE で表現する catalytic triad (Ser200-His440-Glu327) の初期配置は、native enzyme (*T. californica*, PDB entry code 1EA5) の X 線実験データを参考に組み立てた。相対分子間角度を実験値に固

定し、その後、他の構造パラメーターを HF/3-21G(d) レベルで構造最適化した。AChE および OAH に対する ACh の初期配置は、阻害剤・AChE (m-(N,N,N-trimethylamino)tri-fluoroacetophenone·AChE (PDB entry 1AMN)) の結晶構造を参考に組み立て、その後構造と相対位置を HF/3-21G(d) レベルで最適化した。AChE、AChE·ACh、および AChE·ACh·OAH 系の構成分子の構造を、HF/3-21G(d) で構造最適化し、その後、B3LYP/6-311G(d,p) レベルで系のエネルギーを計算した。

結果と考察

1. 反応座標に沿ったポテンシャルエネルギー曲線

Ser200·His440·Glu327 と ACh が求核付加反応する際のポテンシャルエネルギー曲線 (PEC) を Ser200 と ACh の距離 (R) の関数として計算した。ACh が、Ser200 に接近するにつれ、エネルギーは大きくなり、PEC は反発型曲線となった。さらに近づくと、R=1.7 Å 付近でエネルギーは最大値をとり、その後エネルギーは安定化し、テトラヘドラル中間体を形成した。次に、ACh が OAH に水素結合された系について、同様なポテンシャル曲線を計算した結果、反応障壁は、OAH が無い場合の約 1/2 となり (10.7 kcal/mol)、OAH が反応の障壁を著しく低下させていることが明らかになった。さらに、テトラヘドラル中間体のエネルギーレベルも OAH が存在することで、著しく安定化 (-18.1 kcal/mol) した。

2. 反応のエネルギーダイアグラム

Ser200·His440·Glu327 と ACh から、テトラヘドラル中間体が形成されるまでの反応経路について、構造最適化を行い、エネルギーレベルの計算を行った。得られた結果から、ポテンシャルエネルギーダイアグラムを作成した。錯合体 AChE·ACh からテトラヘドラル中間体を形成するのに必要な活性化エネルギーは、20.5 kcal/mol であった。ただし、エネルギーの基準点は AChE·ACh に取った。また、テトラヘドラル中間体は、錯合体 AChE·ACh と比較して 18.03 kcal/mol 不安定であった。

反応のエネルギーに対する OAH の効果を解明するため、OAH·ACh·AChE に対するポテンシャルエネルギーダイアグラムを作成した。錯合体 OAH·ACh·AChE からテトラヘドラル中間体を形成する活性化エネルギーは 10.4 kcal/mol であった。テトラヘドラル中間体は、錯合体 OAH·ACh·AChE と比較して、わずか 3.04 kcal/mol だけ高エネルギーにあり、OAH の存在により、反応障壁の低下および中間体のエネルギー的安定化が起こることが明らかになった。

3. 結論

本研究では、アセチルコリンエステラーゼの酵素触媒メカニズムを非経験的分子軌道 (ab-initio MO) および密度汎関数理論 (DFT) 計算により研究した。この反応は生成物へ進行するため活性化障壁を必要とした。OAH が無い場合の反応において、活性化障壁は 20.5 kcal/mol と計算した。OAH が、基質である ACh と水素結合した場合、活性化障壁は 10.4 kcal/mol に減少した。このことは ACh への Ser200 の求核付加反応の活性化障壁が、ACh と相互作用している OAH の存在により低くなることを意味している。本計算で得られた 10.4 kcal/mol という活性化障壁の値は、最近の実験からの推定値 12.0 kcal/mol を直接的にサポートするものである。本研究で明らかにされた分子論的知見は、今後薬の設計の発展に役立つと考えられる。

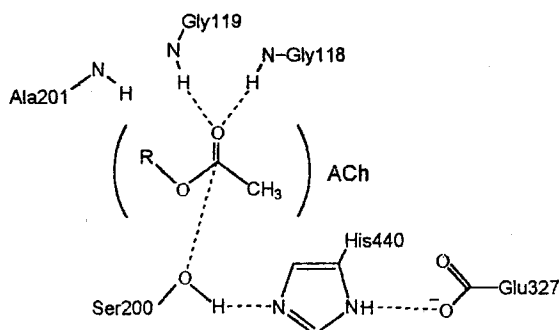


図1 AChE の活性化部位付近の模式図

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 上 田 哲 男

副 査 教 授 石 橋 輝 雄

副 査 教 授 吉 岡 充 弘

学 位 論 文 題 名

Energetics of Catalytic Reaction of Acetylcholinesterase (AChE) with Acetylcholine (ACh) : Role of the Oxyanion Hole

(アセチルコリンエステラーゼの酵素触媒メカニズムに関する
量子化学的研究：オキシアニオンホールの役割)

アセチルコリンとアセチルコリンエステラーゼはコリン作動性神経伝達機構において重要な機能を持っており、薬理的に極めて重要である。しかしながら、アセチルコリンエステラーゼの酵素反応メカニズムに関しては、いまだ不明な点が多い。申請者は、神経伝達物質アセチルコリンが、その分解酵素アセチルコリンエステラーゼによって加水分解する反応のメカニズムを解明することを目的とした。申請論文では、モデル化した酵素-基質系に対して、非経験的分子軌道 (ab-initio MO) および密度汎関数理論 (DFT) 計算を行い、ポテンシャルエネルギー曲線およびポテンシャルエネルギーダイアグラムを作成することにより、この酵素触媒反応のメカニズムを明らかにした。申請論文では、特に反応障壁のエネルギーとオキシアニオンホールの役割について注目し、分子論的観点からその効果を明らかにした。この加水分解反応では、系にオキシアニオンホールが無い場合、活性化障壁は 20.5 kcal/mol となった。一方、オキシアニオンホールが系に存在し、基質であるアセチルコリンと水素結合した場合、活性化障壁は 10.4 kcal/mol に減少することが明らかになった。このことは Ser200 がアセチルコリンへ求核付加反応する際の活性化障壁のエネルギーが、アセチルコリンと相互作用しているオキシアニオンホールの存在により低くなることを示している。また、反応の途中で生成するテトラヘドラル中間体のエネルギーも安定化した。すなわち、オキシアニオンホールの存在は、反応経路のエネルギーを安定化させ、反応の進行を助けていることを示している。このような分子論的知見は、新たな神経作用薬を設計していく上で重要な情報の一つとなることが期待され、今後の分子医学の分野に貢献していくものと考えられる。

公開発表では、初めに上田哲男教授から酵素をモデル化した場合の妥当性、申請論文の研究に対する将来的な展望について質問があった。申請者は、研究に用いたモデル分子は、報告されているアセチルコリンエステラーゼ阻害剤の結晶構造の結合様式を参考に組み立てたこと、またモデル化した置換基は、反応系にほとんど影響しない事を計算で確かめたことから、その妥当性について問題がないことを回答した。将来的な展望に対して、申請者は、計算する酵素の系を大きくして行くことにより、活性部位における他残基の詳細な役割についても解明できる可能性があること、また計算精度を向上させて行くことにより、より定量的な情報を得ることも可能となる点などから、申請論文は、これから更に発展して行く分野であることを示した。

続いて、吉岡充弘教授から主に次のような3つの質問があった。初めに、参考とした阻害剤は何を用いたのか、との質問に対して、アセチルコリンの類似体を用いたこと、次に、薬理学、臨床の観点からみた

場合には、加水分解反応の脱アシル化過程がより興味を持たれること、及び、どのような理由からアシル化過程を選んだか、との質問があった。申請者は、脱アシル化過程の研究も既に行っていること、また酵素反応全体としてみたときには、アシル化過程が重要である点から、アシル化過程について報告したことを説明した。第三に、オキシアニオンホール役割としては、今回の提出論文で明らかにした反応経路のエネルギーを下げる以外、他に役割があるのかとの質問があった。申請者は、スライドを用いて、酵素と基質を立体的に安定化させる基質結合部位としての役割も持つ可能性を示した。

最後に、石橋輝雄教授から酵素触媒反応の速度を決めている要因についての質問があった。申請者は、酵素反応は申請論文で報告したアシル化過程の中間体形成までが非常に重要となるが、酵素反応としては拡散が律速であることを参考文献を引用し、回答した。

本論文は、量子化学的観点からアセチルコリンエステラーゼの反応メカニズムについて研究し、生体反応を電子状態理論により分子レベルで解明した点で高く評価され、今後ナノテクノロジーなどに関連し、生体内での反応を、より詳細に明らかにしていく分子医学的な研究に発展して行くことが期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や単位取得なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。