

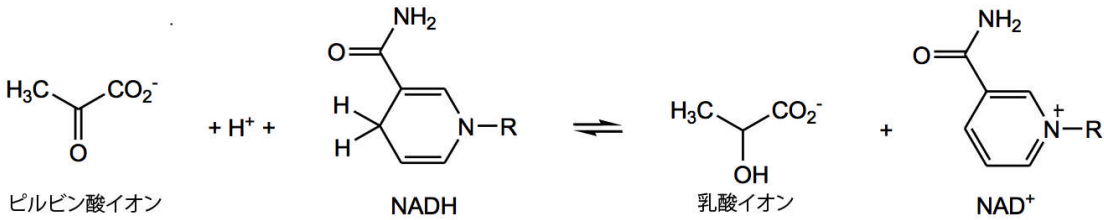
# Preparatory Problems IChO 2012

## Theoretical Problems

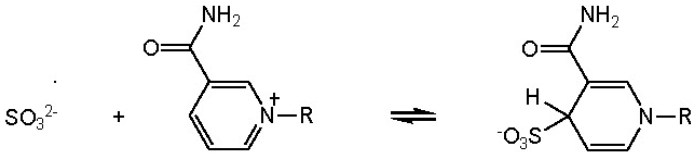
### 問題 20 乳酸デヒドロゲナーゼの触媒反応の反応機構

タンパク質を構成する 20 種類のアミノ酸の構造式はこの問題の最後に記載されている。

乳酸デヒドロゲナーゼは、還元剤である NADH を用いて、ピルビン酸イオン(pyruvate)を乳酸イオン(lactate)に還元する可逆反応を触媒する。この反応では、NADH からピルビン酸イオンにヒドリドイオン(H<sup>-</sup>)が転移している。

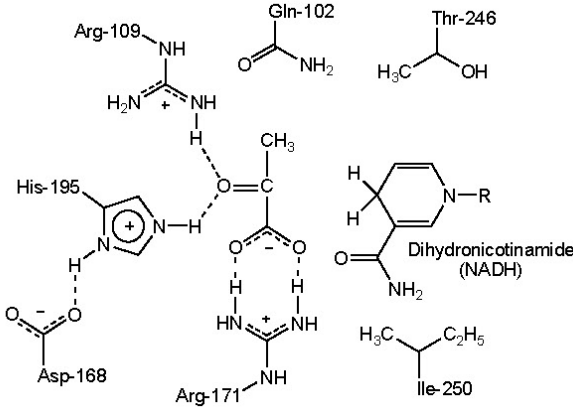


乳酸デヒドロゲナーゼは、亜硫酸イオンと NAD<sup>+</sup>の反応も触媒する。



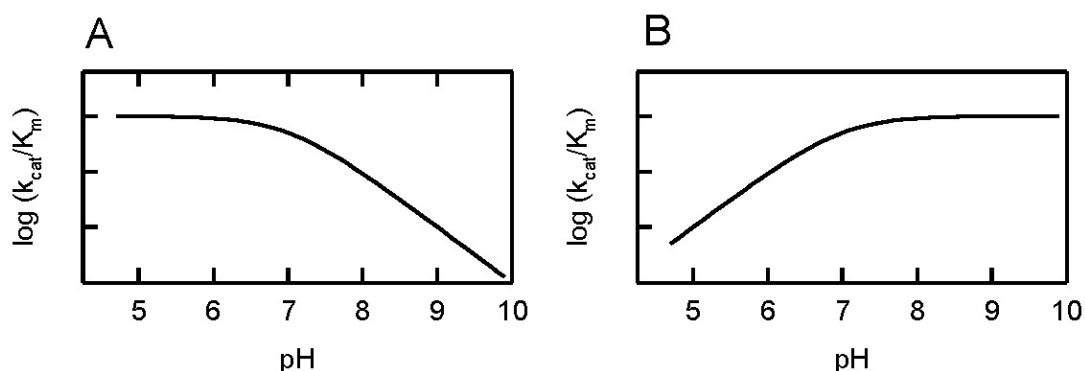
乳酸デヒドロゲナーゼの活性部位に結合するピルビン酸イオンと NADH の構造を、Scheme 1 に示す。活性部位のいくつかの重要なアミノ酸残基も示してある。乳酸デヒドロゲナーゼの一部に描かれている点線は、活性部位における官能基間の弱い分子間相互作用を示している。

Scheme 1



乳酸デヒドロゲナーゼが触媒する、基質がピルビン酸イオンと NADH である正反応と、基質が乳酸イオンと NAD<sup>+</sup>である逆反応の反応速度を測定することで、乳酸デヒドロゲナーゼの反応速度の pH 依存性を調べた。測定結果より pK<sub>a</sub>=7 の官能基が触媒反応に関与していることが分かり、これに対応するのは乳酸デヒドロゲナーゼの His-195 である。

pH に対する反応速度 [ $\log(k_{\text{cat}}/K_m)$ ] のグラフは、下に示すように、ピルビン酸イオンと NADH が反応する正反応と、乳酸イオンと NAD<sup>+</sup>が反応する逆反応では異なるものとなった。



- a) 上のグラフのうちどちらがピルビン酸イオンと NADH の反応を示したもののか。またどちらが乳酸イオンと NAD<sup>+</sup>の反応を示したもののか。

Scheme 1 から分かるように、Arg-109 と His-195 の側鎖がピルビン酸イオンのカルボニル基にかなり接近している。

- b) ピルビン酸イオンのカルボニル基と Arg-109 及び His-195 の間に働く弱い分子間相互作用は何か。この相互作用の原理を電子論に基づいて説明せよ。

Scheme 1 から分かるように、Ile-250 の側鎖は NADH のジヒドロニコチンアミドの環の平面の真下に存在する。

- c) Ile-250 の側鎖と NADH の間に働く弱い分子間相互作用は何か。

乳酸デヒドロゲナーゼの触媒反応における Arg-109 の役割を、部位特異的突然変異導入法を用いて研究した。Arg-109 をグルタミンに置き換え、変異酵素 (mutant enzyme) の触媒活性を測定した。その結果は以下ようになった。

- ▲ 変異酵素で触媒されたピルビン酸イオンと NADH の反応の反応速度は、野生型酵素 (wild-type enzyme) に比べて 1/1400 になった。
- ▲ 変異酵素の活性部位がピルビン酸イオンに結合する力も低下したが、野生型酵素に比べて 1/15 にしかなかった。

△ 亜硫酸イオンと NAD<sup>+</sup>の反応の反応速度は変異の影響を受けなかった。

d) 上記の結果から、乳酸デヒドロゲナーゼによる触媒反応における Arg-109 の役割は何か。

Scheme 1 にあるように、Asp-168 の側鎖は His-195 の側鎖と共有結合ではない作用で相互作用していると考えられている。乳酸デヒドロゲナーゼによる触媒反応における Asp-168 の役割について、2つの仮説が立てられた。

1. Asp-168 と His-195 の相互作用によって、His-195 をピルビン酸イオンと相互作用するのに適した位置に保つことができているのかもしれない。
2. Asp-168 と His-195 の相互作用によって、His-195 はより分極し、より強い塩基となっているのかもしれない。

これらの仮説を検証するため、Asp-168 をアラニン(Ala)に置き換えた変異酵素 2 と、アスパラギン(Asn)に置き換えた変異酵素 1 を作製し、変異酵素の性質を野生型酵素の性質と比較した。

結果は以下の表にまとめてある。

Constant	Wild-type (Asp-168)	Mutant 1 (Asn-168)	Ratio: Wild-type / Mutant 1	Mutant 2 (Ala-168)	Ratio: Wild-type / Mutant 2
<b>Forward reaction:</b>					
$K_m$ (pyruvate), mM	0.06	10	0.006	3.3	0.018
$k_{cat}$ , s <sup>-1</sup>	250	20	12.5	5.5	45
$k_{cat}/K_m$ , M <sup>-1</sup> ·s <sup>-1</sup>	$4.2 \cdot 10^6$	$2 \cdot 10^3$	2080	$1.7 \cdot 10^3$	2500
<b>Reverse reaction:</b>					
$K_m$ (lactate), mM	40	120	0.33	80	0.5
$k_{cat}$ , s <sup>-1</sup>	9	0.12	75	0.09	100
$k_{cat}/K_m$ , M <sup>-1</sup> ·s <sup>-1</sup>	$2.2 \cdot 10^2$	1	225	1.13	200

e) 以上の事実を基に、(1)と(2)の仮説のどちらがより適切と考えられるか。

タンパク質を構成する 20 種類のアミノ酸 (側鎖は灰色の影が付けられている)

