

2P051 プロリル結合異性化反応の基質特異性に関する理論化学的研究

(広島大QuLiS¹・広島大院理²・アステラス製薬(株)³)

原田隆範^{1,2}、白井文幸^{1,3}、相田美砂子^{1,2}

【序】タンパク質のフォールディング速度を決定する重要な要因として、ジスルフィド結合の形成の他に、プロリル結合(プロリンとそのN末端側の残基とのペプチド結合)のシス-トランス異性化反応が知られている。プロリル結合はシス型とトランス型の両方が安定に存在し得るため、フォールディングの進行のためには異性化反応を促進し、タンパク質固有のコンホメーションにする必要がある。

プロリルイソメラーゼは、この異性化反応を触媒する酵素であり、生体内に広く存在している。このような働きを持つ酵素にはFKBPやシクロフィリンがあり、いずれも反応の活性値は結合する基質ペプチド中のプロリン直前の残基の種類に依存する、すなわち基質特異性を示す。シス-トランス異性化反応に関して、これら2種のイソメラーゼを比較すると、FKBPのみ大きな基質特異性を示す¹⁾。本研究では、プロリルイソメラーゼの基質特異性の大きさの違いを引き起こす要因について調べるため、それぞれのイソメラーゼとプロリンを含む種々の基質ペプチドとの複合体についてフラグメント分子軌道(FMO)法²⁻⁶⁾による量子化学計算を行った。

【計算】タンパク質の複合体は、FKBP(PDB ID: 1FKB(107残基))およびシクロフィリン(PDB ID: 1M9Y(164残基))にシス型・トランス型および遷移状態構造のそれぞれのプロリル結合を含む4残基の基質ペプチド(Ala-X-Pro-Phe (X = Ala, Glu))を結合させ、水分子を複合体の周囲5Å以内に配置して作成した。それぞれの複合体について、ONIOM法により構造最適化したのち、FMO法によるHF/6-31Gを用いた一点計算を行い、複合体の全エネルギーおよびイソメラーゼ・基質を構成する各残基間の相互作用エネルギーを求めた。また、イソメラーゼのみ・基質(シス型)のみについても同様のFMO計算を行い、基質の結合エネルギーを求めた。基質(シス型)を725分子の水で取り囲んだ水溶液モデルについても結合エネルギーの計算を同様に行い、水中にある基質のイソメラーゼへの結合のしやすさについて比較した。

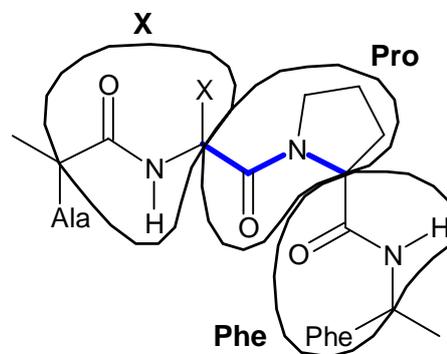


図1 FMO法におけるフラグメント分割方法(青はプロリル結合)

FMO法による計算は、プロリルイソメラーゼと基質ペプチドは1残基を、水は1分子を1フラグメントとして行った。図1に基質プロリン前後のフラグメント分割について示した。FMO計算はGAMESSを用いて行った⁴⁾。

【結果・考察】図2にFMO計算により得られたシクロフィリン複合体のシクロフィリン-基質ペプチド間の残基間相互作用エネルギーを示す。残基Xがいずれの基質においても、強く相互作用するシクロフィリンの残基は基質ペプチド近傍に存在するArg55およびAsn102であった。遷移状態の基質ペプチドについて、これらの残基との相互作用エネルギーのパターンを比較すると、プロリル結合に関する部分には大きな違いは見られなかった。このときの基質ペプチド周辺の構造は類似しており、いずれもシクロフィリンとプロリル結合との間に水素結合

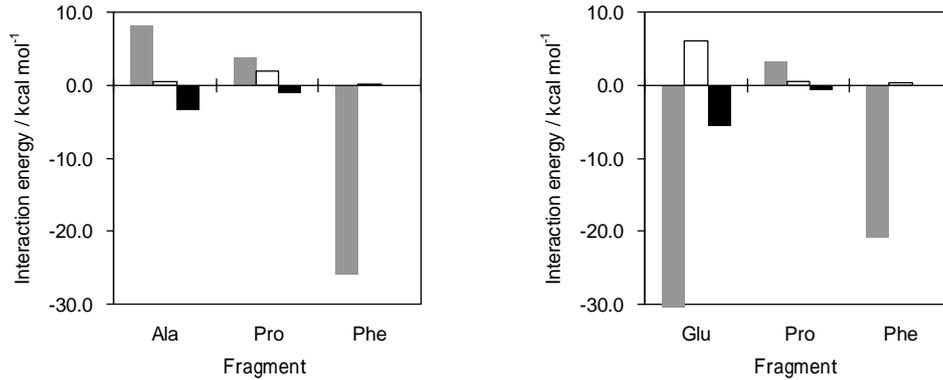


図2 シクロフィリン - 遷移状態における基質(X = Ala, Glu)間の残基間相互作用エネルギー (: Arg55, : Asn102主鎖N-H, : Asn102主鎖C=O) [横軸のフラグメント名は図1に記述(Proがプロリル結合を含むフラグメント)]

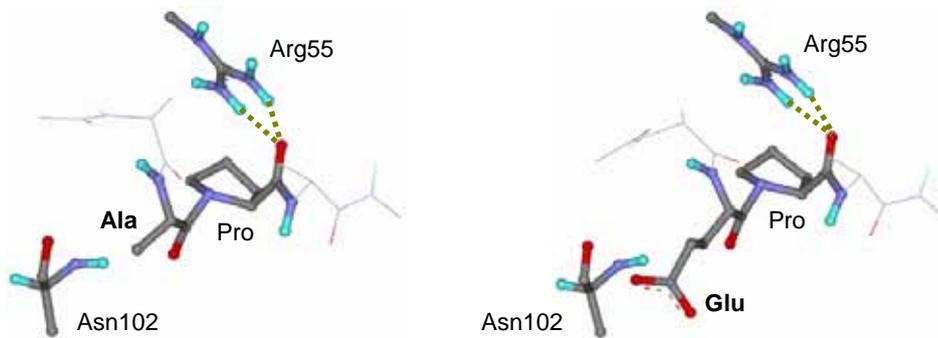


図3 遷移状態における基質ペプチド(X = Ala, Glu)周辺の構造(点線は水素結合を示す)

は形成されていない(図3)。一方、FKBPの場合は、プロリル結合との水素結合はX = Alaにおいて形成される。このことから、遷移状態におけるプロリル結合との水素結合が、イソメラーゼの基質特異性の傾向の違いにつながる要因だと考えられる。

表1にそれぞれの残基Xを持つ基質ペプチドの結合エネルギー(イソメラーゼ・水溶液)とその差、およびシス トランス異性化反応の活性値を示す。 $\Delta\Delta E$ の値を比較すると、基質ペプチドはシクロフィリンに結合しやすいため、シクロフィリンはFKBPより大きな活性を示すものと考えられる。

表1 基質ペプチドの結合エネルギー(イソメラーゼ・水溶液)とその差(計算値)および活性値(実験値¹⁾)

イソメラーゼ	残基 X	結合エネルギー (kcal mol ⁻¹)			活性値 (mM ⁻¹ s ⁻¹)
		$\Delta E_{\text{isomerase}}$	$\Delta E_{\text{solution}}$	$\Delta\Delta E$	
FKBP	Ala	-68.8	-110.6	41.8	53
FKBP	Glu	-171.5	-252.9	81.4	0.6
Cyp	Ala	-110.2	-137.9	27.7	3180
Cyp	Glu	-278.2	-285.5	7.3	2140

Cyp: シクロフィリン, $\Delta E_{\text{isomerase}} = E_{\text{complex}} - E_{\text{isomerase}} - E_{\text{substrate}}$,
 $\Delta E_{\text{solution}} = E_{\text{solution}} - E_{\text{solvent}} - E_{\text{substrate}}$, $\Delta\Delta E = \Delta E_{\text{isomerase}} - \Delta E_{\text{solution}}$

【参考文献】

- (1) R. K. Harrison et al., *Biochemistry* **29**, 3813 (1990).
- (2) K. Kitaura et al., *Chem. Phys. Lett.* **313**, 701 (1999).
- (3) T. Nakano et al., *Chem. Phys. Lett.* **351**, 475 (2002).
- (4) D. G. Fedorov et al., *J. Chem. Phys.* **120**, 6832 (2004).
- (5) K. Fukuzawa et al., *J. Phys. Chem. B* **110**, 16102 (2006).
- (6) D. G. Fedorov et al., *J. Phys. Chem. A* **111**, 2722 (2007).