

## QM/MM-ER 法による HIV-1 プロテアーゼの プロトン付加に伴う自由エネルギー変化の計算

(阪大院基礎工)    ○岩田祐一, 高橋英明, 岸 亮平, 中野雅由

【緒言】 HIV-1 プロテアーゼ(PDB code: 4HVP)は HIV-1 由来のタンパク分解酵素であり、その活性部位は 1 対のアスパラギン酸残基によって構成される。HIV-1 プロテアーゼによるペプチド鎖分解反応の初期段階ではアスパラギン酸 2 残基のうち一方がプロトン脱離していると考えられている。一般に、タンパク質中の酸性残基のプロトン付加反応に伴う自由エネルギー変化を調べることは酵素反応の機構を解明する上で重要である。生体分子などの凝縮系における化学過程を量子化学計算によって扱う場合、溶媒分子の作る電場やその構造の揺らぎを電子状態計算に取り入れる必要がある。また、ペプチド鎖のようにその構造が著しく揺らぐ溶質分子に対しては、溶質の分子内自由度も統計学的に考慮する必要がある。本研究では分子内自由度を有するペプチド鎖について、QM/MM-ER 法[1]の拡張を行った。HIV-1 プロテアーゼの活性部位のプロトン付加反応のモデル分子としてアミノ酸配列中にアスパラギン酸を含むペプチド鎖、シニョリン(PDB code: 1UAO)[2]を用い、アスパラギン酸に対するプロトン付加反応に伴う自由エネルギー変化  $\Delta G$  および  $pK_a$  を QM/MM-ER 法によって計算する。

【理論】 (1)プロトン付加反応に伴う自由エネルギー変化

酸 AH について、プロトン授受反応  $A^- + H_3O^+ \rightarrow AH + H_2O$  に伴う自由エネルギー変化を  $\Delta G$  とすると  $pK_a$  は  $pK_a = -\Delta G/2.303RT$  と書ける。水溶液における自由エネルギー変化  $\Delta G$  は熱力学サイクルより以下のように得られる。

$$\Delta G = \Delta G(A^- \rightarrow AH) - \Delta\mu(H_3O^+) + \Delta\mu(H_2O) + G_0(H_3O^+) - G_0(H_2O) \quad (1)$$

ここで  $\Delta\mu$  は溶媒和自由エネルギーであり、 $G_0$  は気相中の自由エネルギーである。式(2)において支配的な寄与を与えるのは第 1 項の酸 AH のプロトン付加反応に伴う自由エネルギー変化  $\Delta G(A^- \rightarrow AH) = \Delta\mu(AH) - \Delta\mu(A^-) + G_0(AH) - G_0(A^-)$  である。反応前後の分子の溶媒和自由エネルギー  $\Delta\mu$  が計算できれば式(1)より自由エネルギー変化  $\Delta G$  および  $pK_a$  が算出できる。本研究では、溶質の分子内自由度を考慮した QM/MM-ER 法を用いてペプチド鎖の溶媒和自由エネルギー  $\Delta\mu$  を計算する。

(2)構造の揺らぎを持つ溶質に対する QM/MM-ER 法の適用

QM/MM 計算において、ペプチド鎖全体を溶質とし、その活性部位を QM 領域、残りのペプチド鎖を MM 領域(MM1)として扱う。この溶質が、MM 領域として扱う溶媒水分子(MM2)に挿入される過程に伴う全溶媒和自由エネルギー  $\Delta\mu$  は次の式で表される。

$$\exp(-\beta\Delta\mu) = \frac{\int dq d\mathbf{X} \exp\left(-\beta\left\{E_{QM/MM1}(n, \mathbf{q}) + u_{MM1}(\mathbf{q}) + \sum_i v_i(n, \mathbf{q}, \mathbf{x}_i) + U_{MM2}(\mathbf{X})\right\}\right)}{\int dq d\mathbf{X} \exp\left(-\beta\left\{E_{QM/MM1}(n, \mathbf{q}) + u_{MM1}(\mathbf{q}) + U_{MM2}(\mathbf{X})\right\}\right)} \quad (2)$$

$E_{QM/MM1}$  は溶質分子内の QM 領域と MM 領域の相互作用、 $u_{MM1}$  は溶質の MM 領域の分子内ポテンシャル、 $v_i$  は溶質-溶媒間相互作用、 $U_{MM2}$  は溶媒間相互作用である。 $n$  は溶質の電子密度、 $\mathbf{q}$  は溶質の分子内座標、 $\mathbf{x}_i$  は  $i$  番目の溶媒分子の座標、 $\mathbf{X}$  は全溶媒分子の座標を集合的に表したものである。 $\beta$  はボルツマン定数  $k_B$  と温度  $T$  の積の逆数である。

溶液系および参照系(純溶媒系)における溶質の電子密度の平均分布  $\bar{n}_{sol}$ 、 $\bar{n}_{ref}$  を導入すると、 $\Delta\mu$  は以下のように表される。

$$\Delta\mu = \Delta\bar{\mu} + \delta\eta + (\bar{E}_{sol} - \bar{E}_{ref}) + (\delta\mu_{sol} - \delta\mu_{ref}) \quad (3)$$

$\Delta\bar{\mu}$  は水溶液における平均の電子密度  $\bar{n}_{sol}$  を持つ溶質の溶媒和自由エネルギー、 $\delta\eta$  は溶質の電子密度が気相中における平均分布  $\bar{n}_{ref}$  から水溶液における平均分布  $\bar{n}_{sol}$  に変化するときの自由エネルギー変化、 $\bar{E}$  は QM 領域のエネルギーのアンサンブル平均、 $\delta\mu$  は電子密度  $n$  がその平均分布  $\bar{n}$  の周りに揺らぐことによる寄与である。式(2)において、全溶媒和自由エネルギー  $\Delta\mu$  に対して支配的な寄与を与えるのは第 1 項の  $\Delta\bar{\mu}$  であり次の式で表される。

$$\exp(-\beta\Delta\bar{\mu}) = \frac{\int dq d\mathbf{X} \exp\left(-\beta\left\{E_{QM/MM1}(\bar{n}_{sol}, \mathbf{q}) + u_{MM1}(\mathbf{q}) + \sum_i v_i(\bar{n}_{sol}, \mathbf{q}, \mathbf{x}_i) + U_{MM2}(\mathbf{X})\right\}\right)}{\int dq d\mathbf{X} \exp\left(-\beta\left\{E_{QM/MM1}(\bar{n}_{sol}, \mathbf{q}) + u_{MM1}(\mathbf{q}) + U_{MM2}(\mathbf{X})\right\}\right)} \quad (4)$$

エネルギー表示の理論では溶媒和自由エネルギー  $\Delta\bar{\mu}$  は近似無しに次の式で表される。

$$\Delta\bar{\mu} = -k_B T \int d\varepsilon \left[ \rho(\varepsilon) - \rho_0(\varepsilon) + \beta \omega(\varepsilon) \rho(\varepsilon) - \beta \left( \int_0^1 d\lambda \omega(\varepsilon; \lambda) \right) (\rho(\varepsilon) - \rho_0(\varepsilon)) \right] \quad (5)$$

$\rho$ 、 $\rho_0$  はそれぞれ溶液系、純溶媒系における溶質-溶媒間相互作用のエネルギー分布関数である。 $\omega$  はエネルギー分布関数の間接部分、 $\lambda$  は溶質の挿入過程を示す結合パラメータである。式(3)において、 $\delta\eta$  は充分小さいと考えられ、 $\delta\mu$  は溶液系の値と純溶媒系のそれが打ち消し合うと予想されるので、2項と4項は良い近似で無視出来ると考えられる。

ペプチド鎖のように構造の揺らぎが大きい場合、溶質分子の分子内自由度  $\mathbf{q}$  上の溶液系および純溶媒系の分布関数  $p$ 、 $p_0$  の重なりが小さくなる恐れがあり、通常のシミュレーションによるサンプリングでは数値的な問題が発生する。この場合は、松林らによって提案された純溶媒系の分子内ポテンシャル[3]を以下のように導入する。

$$(E_{QM/MM1}(\tilde{n}_{sol}, \mathbf{q}) + u_{MM}(\mathbf{q})) - k_B T \log \left( \frac{P(E_{QM/MM1}(\tilde{n}_{sol}, \mathbf{q}) + u_{MM}(\mathbf{q}))}{P_0(E_{QM/MM1}(\tilde{n}_{sol}, \mathbf{q}) + u_{MM}(\mathbf{q}))} \right) \quad (6)$$

$P$ 、 $P_0$  はそれぞれ溶液系、純溶媒系における  $E_{QM/MM1}$  と  $U_{MM}$  の分布である。式(6)を純溶媒系の分子内ポテンシャルとして用いて溶媒和自由エネルギーを計算し、前述の方法の結果と比較する。

**【計算】** HIV-1 プロテアーゼのモデル分子としてシニョリン(Fig.1)を採用した。シニョリンは複数のタンパク質を統計的に解析することにより設計されたペプチドであり、アスパラギン酸1残基を含むアミノ酸10残基からなる。シニョリンは水溶性であり、特徴的な屈曲構造( $\beta$ -ヘアピン構造)をとることが知られている。

シニョリンの適切な QM 領域を決定するため、QM 領域内に含まれる残基数を変えて気相中におけるプロトン付加反応に伴うエネルギー変化  $\Delta E$  を計算した。(a)アスパラギン酸1残基のみ、(b)アスパラギン酸の前後の残基を含む3残基(Tyr-Asp-Pro)、について計算を行った。(b)の計算には 2-layer の ONIOM 法を用い、アスパラギン酸は High level、前後の Tyr および Pro は Low level の layer として扱った。シニョリンの10残基のうち(a)、(b)に含まれない残基は原子核上に置いた点電荷により表現した。計算プログラムは GAUSSIAN 03 パッケージを用い、密度汎関数理論に基づいてエネルギーを計算した。(a)および(b)いずれにおいてもアスパラギン酸残基は B3LYP/aug-cc-pVDZ レベルで扱った。Low level の layer は B3LYP/3-21+G\*\* レベルで扱った。

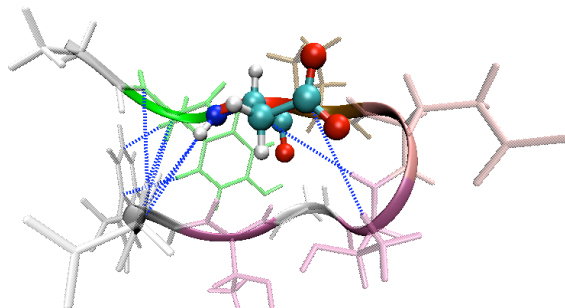


Fig.1 シニョリンの立体構造  
(アスパラギン酸はボールアンドスティックで表)

**【結果と考察】** (a)アスパラギン酸1残基のみを QM 領域として扱ったときのプロトン付加に伴うエネルギー変化  $\Delta E$  は -379.7 kcal/mol であり、点電荷を考慮しない場合は -336.9 kcal/mol と計算された。(b)アスパラギン酸を含む3残基を QM 領域として扱った場合のエネルギー変化  $\Delta E$  とその値の(a)からのずれ  $\Delta\Delta E$  を Table 1 に示す。エネルギー変化の差  $\Delta\Delta E$  は 15.5 kcal/mol となり、反応部位近傍の残基の寄与を考慮する必要があることが分かった。計算は継続中であり、詳細は当日報告する。

Table1 気相中のエネルギー変化  $\Delta E$  と(a)からのずれ  $\Delta\Delta E$  \*(単位は kcal/mol)

計算手法	$\Delta E$	$\Delta\Delta E$
B3LYP	-364.2 (-328.4)	15.5 (8.5)
HF	-367.0 (-328.2)	12.7 (8.6)

\*括弧内は点電荷を考慮しない場合の値を示す

[1] H. Takahashi, N. Matubayasi, *J.Chem.Phys.*, **121**, 3989 (2004)

[2] S. Honda, K. Yamasaki, Y. Sawada and H. Morii, *Structure*, **12**, 1507 (2004)

[3] N. Matubayasi and M.Nakahara, *J. Chem. Phys.*, **119**, 9686 (2003)