

分子シミュレーションによる金属プロテアーゼと リガンド間の特異的相互作用の解析

(豊橋技科大院・工¹、トロムソ大・薬理²)

○出立 兼一¹、Khan Mahmud Tareq Hassan²、Sylte Ingebrigt²、栗田 典之¹

【序】 サーマライシン (TLN) は *Bacillus stearothermophilus* 由来の金属プロテアーゼであり、活性部位に亜鉛イオン、構造内に4つのカルシウムイオンを持ち、それらのイオンが TLN の機能と構造の維持に重要な役割を果たしている。また、TLN は人工甘味料アスパルテームの製造に利用されるなど、産業的に重要な酵素である。そのため、TLN によるペプチドの加水分解反応の機構や、様々な阻害剤による TLN の活性阻害の機構などは、これまでに実験・理論の両面から広く研究されてきた。

最近の我々の実験[1]より、TLN の活性は2つのアミノ酸がペプチド結合した dipeptide により阻害されること、及び阻害活性の強さは dipeptide のアミノ酸の種類に大きく依存することが明らかになった。しかし、その原因は解明されておらず、また、TLN と dipeptide 間の特異的な相互作用を電子レベルで解析した研究も存在しない。本研究では、TLN と実験で用いた7種類の dipeptide 間の特異的な相互作用を古典分子力学 (MM) 計算、及びフラグメント分子軌道 (FMO) 計算を用いて、水中で解析した。

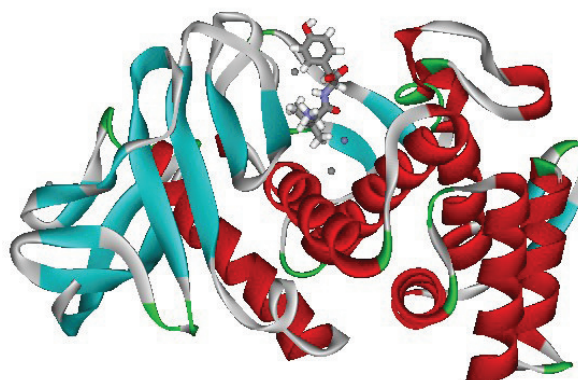


Figure 1 TLN-IY の X 線解析構造

【計算手順】 実験[1]では、TLN に7種類の dipeptides (IY (Ile-Tyr)、LW (Leu-Trp)、VY (Val-Tyr)、WV (Trp-Val)、IW (Ile-Trp)、WL (Trp-Leu)、FW (Phe-Trp)) を結合させ、dipeptide による阻害活性を解析している。また、TLN-IY (Fig.1) と TLN-LW の複合体の構造が、X 線解析により決定されているが[1]、その他の dipeptide と TLN の複合体の構造は未解明である。本研究では、TLN-IY/LW 以外の複合体の構造を得るために、TLN-IY/LW の dipeptide のアミノ酸を他の5種類の dipeptide のアミノ酸に置換し、置換部位のみを MM 力場 Amber99 で最適化した。置換及び最適化には分子設計支援ソフトウェア HyperChem を用いた。次に、各複合体に対し、水和水を付加し、古典分子力学計算プログラム AMBER9 を用い最適化した。そして、TLN と dipeptide 間の特異的相互作用を電子レベルで解析するために、各複合体の最適化構造の電子状態を、FMO 計算 [2,3] により求めた。FMO 計算には multilayer 法を用い、亜鉛イオンと dipeptide、及びそれらから 5 Å 以内に存在する水分子と TLN のアミノ酸を MP2/6-31G 法で計算し、それ

以外のアミノ酸と水分子は HF/6-31G 法で計算した。最後に、各複合体の振動特性を AMBER9 を用い解析し、TLN と各複合体間の結合自由エネルギーを求めた。

【結果と考察】 Table 1 に TLN のアミノ酸及び水分子と、IY/LW 間の相互作用エネルギーを降順で示す。Glu143、Asn112、Arg203 及び His231 は IY と LW の両方の dipeptide と強く相互作用する。さらに、幾つかの水分子も IY/LW と強い相互作用を持つ。これらのアミノ酸及び水分子は、dipeptide のバックボーン部位と水素結合している。従って、TLN と dipeptide の結合に重要であると考えられる。

また TLN-IY と TLN-LW の複合体における結合自由エネルギーは、それぞれ、-374.37 及び -244.38 kcal/mol であり、TLN-IY の方が TLN-LW よりも TLN-dipeptide 間の結合が強いことが分かった。この結果は実験結果[1]と定性的に一致している。TLN-IY/LW における結合自由エネルギーが大きく異なる原因としては、TLN のアミノ酸と dipeptide 間をブリッジする水分子が、TLN-IY では2つ存在するが (Fig.2 (a))、TLN-LW ではそのような水分子が存在しない(Fig.2 (b))ことが考えられる。TLN-IY/LW 以外の dipeptide と TLN の複合体に対する解析結果は、当日のポスターで発表する。

Table 1 TLN のアミノ酸及び水分子と IY/LW 間の相互作用エネルギー (kcal/mol)

TLN-IY		TLN-LW	
Residue	Energy	Residue	Energy
Glu143	-78.26	Glu143	-87.01
Asn112	-63.95	Asn112	-74.26
Wat388	-25.93	Wat386	-27.11
Arg203	-25.80	Arg203	-25.86
His231	-25.24	Wat570	-25.71
Phe114	-24.30	Phe114	-23.99
Wat616	-22.22	His231	-22.35
Wat1878	-10.70	Wat1847	-21.68
Wat576	-9.88	Wat366	-13.12
Wat554	-8.05	Wat558	-7.25
Wat2053	-7.30	Asp138	-5.71
Asp138	-6.55	Phe130	-5.33
Asn111	-6.43	Glu119	-5.25
Wat2018	-5.39	Wat846	-5.21

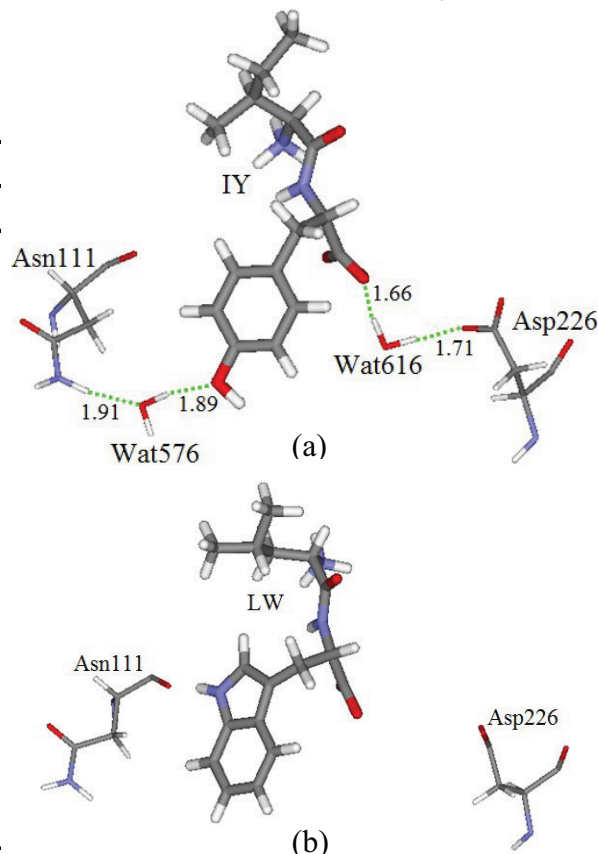


Figure 2 Asn111 及び Asp226 と IY/LW 間の水素結合構造(Å): (a)TLN-IY、(b)TLN-LW

【参考文献】

[1] M. T. H. Khan, et al., submitted for publication.
 [2] K. Kitaura, et al., *Chem. Phys. Lett.*, 1999, 312, 319-324.
 [3] D. G. Fedorov, et al., *J. Phys. Chem. A*, 2005, 109, 2638-2646.