

Trypsin-BPTI における自由エネルギー面上でのアシル化反応に関する理論的研究

(阪府大院理¹、名大院・情報科学²、JST-CREST³)

○麻田俊雄^{1,3}、竹中 規雄^{2,3}、小谷野 哲之^{2,3}、長岡 正隆^{2,3}、小関 史朗¹

【序】 トリプシン(trypsin)は、すい液に含まれている消化酵素の一つであり、セリンプロテアーゼの一種である。このタンパク質は塩基性アミノ酸(リジンやアルギニン)のカルボキシル基側のペプチド結合を選択的に加水分解する一方で、トリプシンインヒビターによって阻害を受けることが知られている。触媒サイクルはアシル化反応と、それにつづく脱アシル化反応からなり、前者に大きな活性化エネルギーが必要であると報告されている¹。今回、図1に示すトリプシンと牛キモトリプシンインヒビター(BPTI)の複合体に関して、エネルギー計算に quantum mechanical / molecular mechanical (QM/MM)法を適用し、自由エネルギー面上でのアシル化反応の反応経路を free energy gradient (FEG)法と、 nudged elastic band (NEB)法を組み合わせた FEG-NEB 法を用いて明らかにすることを試みたので報告する。

【方法】 A. モデル構造 Trypsin-BPTI の初期構造には、X線結晶構造解析から報告されている PDB コード 2FTL² の構造を用いた。結晶水を含む複合体に 15702 分子の水分子を配位させた後、活性中心に含まれる Asp102, His 57, Ser195, Lys15, および Ala16 の 5 残基を QM 領域、それ以外を MM 領域とする QM/MM モデルを設定した (図1)。

B. 理論的背景 溶媒和した系の自由エネルギー面上における反応経路を得る目的で、長岡らによって提案された free energy gradient (FEG)法³ に、 nudged elastic band (NEB)法を組み合わせた FEG-NEB 法を用いる。FEG 法では、自由エネルギー勾配は、アンサンブル平均を用いて式(1)であらわすことができる。

$$\frac{\partial A}{\partial q_i} = \left\langle \frac{\partial V}{\partial q_i} \right\rangle \quad (1)$$

ここで、 A は系の自由エネルギー、 V は系のエネルギー、および q_i は i 番目の原子の座標を示している。さ

らに FEG-NEB 法は反応経路に沿った複数の中間構造を適宜作成した後、FEG 法で得られた自由エネルギーグラジエントを用いて、式(2)~(4)により中間構造を結ぶ方向の力の成分

$\mathbf{F}_i^{j//}$ と垂直成分 $\mathbf{F}_i^{j\perp}$ を作成することで、自由エネルギー面上の反応経路の中間構造を最適化する方法である。

$$\mathbf{F}_i^{j\perp} = -\frac{\partial A(\mathbf{P}_j)}{\partial q_i} + \left(\frac{\partial A(\mathbf{P}_j)}{\partial q_i} \cdot \boldsymbol{\tau}_j \right) \boldsymbol{\tau}_j \quad (2)$$

$$\mathbf{F}_i^{j//} = \left\{ \left(k |\mathbf{P}_{j+1} - \mathbf{P}_j| - k |\mathbf{P}_j - \mathbf{P}_{j-1}| \right) \cdot \boldsymbol{\tau}_{j-1} \right\} \boldsymbol{\tau}_{j-1} \quad (3)$$

$$\mathbf{F}_i^j = \mathbf{F}_i^{j\perp} + \mathbf{F}_i^{j//}, \quad \boldsymbol{\tau}_j = (\mathbf{P}_{j+1} - \mathbf{P}_j) / |\mathbf{P}_{j+1} - \mathbf{P}_j| \quad (4)$$

ここで、 \mathbf{P}_j は j 番目の中間構造の原子座標のセットであり k は任意の力の定数である。また、

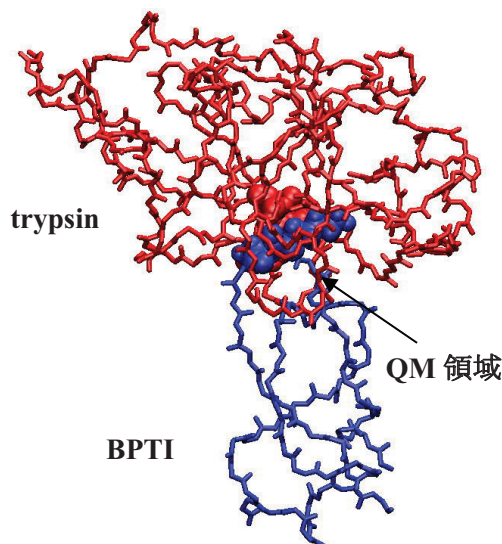


図1 Trypsin-BPTI 複合体の構造 (赤は BPTI, 青は Trypsin)

$F_i^{//}$ はバネで隣接する中間構造を結ぶことと等価であり、反応経路に沿った中間構造が安定構造に落ちることを防いでいる。

C. 計算方法 Ab initio QM/MM-MD シミュレーションを実行する目的で、我々は Gaussian と AMBER を組み合わせた AMBER/Gaussian インターフェイス⁴を開発した。FEG 最適化法および FEG-NEB 法を本インターフェイスに組み込み今回の計算に使用した。また、QM 領域には RHF/6-31G(d)法を適用し、力場領域には Amber99 パラメータによる力場を用いた。

【結果と考察】 図 2 に FEG-NEB 法を用いて計算した活性中心付近の反応経路に沿った原子の軌跡を示す。

この図において 1~7 で示したグレーの球は Ser195 から Ala16 への水素原子移動の中間座標を示している。本計算では水素原子は Ser195 から His57 に一旦移動した後 Ala16 へ移動する経路が得られた。また、His57 から Ala16 への移動は直線的ではなく、BPTI の残基付近を通過していることがわかる。一方、赤の球で示した原子は、Ser195 の水酸基中の酸素原子を表しているが、水素原子を His57 に移動しやすくするため、His57 側に若干の移動を伴った後、Lys15 の C 原子と共有結合を生成した。

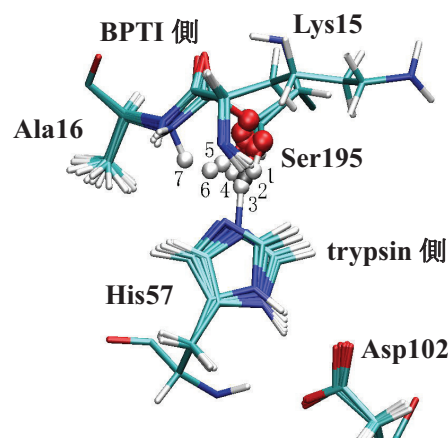


図 2 FEG-NEB 法で得られた反応経路に沿った原子の軌跡

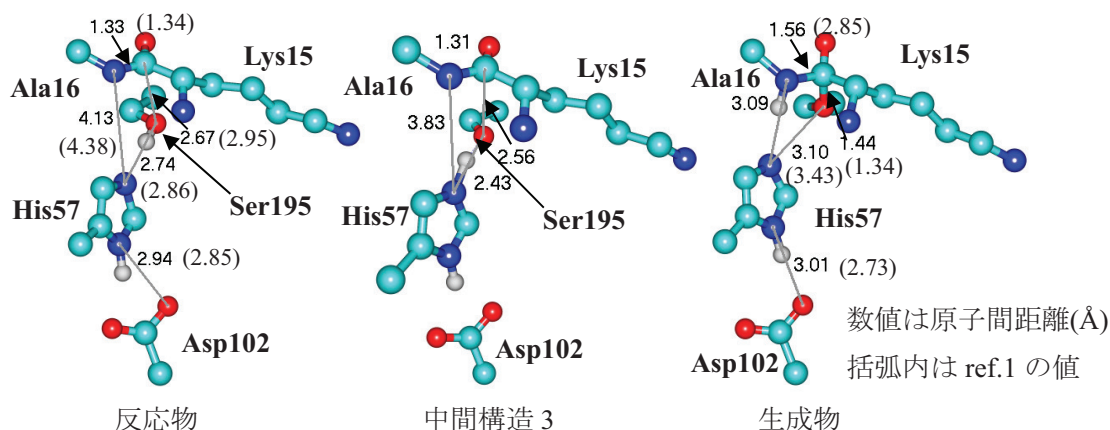


図 3 アシル化反応の構造変化

次にアシル化反応の構造変化を図 3 に示す。反応物の構造は Nemukhin ら¹によって報告されている QM/MM 計算の最適化構造と比較的良好な一致を示した。一方で、生成物の構造は Numukhin らの結果と異なり Lys15 と Ala16 間のペプチド結合が保持した結果を得た。ここで示した結果は計算途中のものであり、現在、生成物の構造不一致の原因を含め計算と解析を継続中である。当日はアシル化反応の自由エネルギー変化も含めた発表を予定している。

- 【文献】** 1.A.V.Nemukhin, B.L.Grigorenko, A.V.Rogov, I.A.Topol, and S.K.Burt, *Theor.Chem.Acc.*, **111**, 36 (2004).
 2.W.M.Hanson, G.J.Domek, M.P.Horvath, and D.P.Goldenberg, *J.Mol.Biol.*, **366**, 230 (2007).
 3.M.Nagaoka, N.Okuyama-Yoshida, and T.Yamabe, *J.Phys.Chem.A.*, **102**, 8202 (1998).
 4.T.Okamoto, K.Yamada, Y.Koyano, T.Asada, N.Koga, and M.Nagaoka, *J.Comp.Chem.*, To be submitted.