

## QM/MM 法を用いた Trypsin-BPTI における 触媒反応経路最適化に関する理論的研究

(阪府大院理<sup>1</sup>、名大院・情報科学<sup>2</sup>、JST-CREST<sup>3</sup>、RIMED<sup>4</sup>)

○麻田俊雄<sup>1,3,4</sup>、竹中 規雄<sup>2,3</sup>、小谷野 哲之<sup>2,3</sup>、長岡 正隆<sup>2,3</sup>、小関 史朗<sup>1,4</sup>

**【序】** セリンプロテアーゼの一種トリプシン(Trypsin)は、すい液に含まれている消化酵素の一つであり、基質として取り込まれるタンパク質に存在する塩基性アミノ酸(リジンやアルギニン)のカルボキシル基側ペプチド結合を選択触媒的に加水分解する事が実験的に知られている。一方トリプシンインヒビターは Trypsin と結合して、この触媒作用を阻害する。触媒サイクルはアシル化反応と、それにつづく脱アルシ化反応からなり、前者に大きな活性化エネルギーが必要であるとされている<sup>1</sup>。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)の複合体について、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 法を用いて最適化したので報告する。

**【方法】 A.モデル構造** Trypsin-BPTI の初期構造には、PDB コード 2FTL<sup>2</sup>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 Trypsin 中の Asp102, His 57, Ser195, および BPTI の Lys15, Ala16 の計 5 残基を QM 領域、それ以外の領域を MM 領域とする QM/MM モデル構造を設定した(図1)。

**B. 計算方法** 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<sup>3</sup>と、nudged elastic band (NEB)法を組み合わせた FEG-NEB 法を用いた。FEG 法によると、自由エネルギーグラジエントは、アンサンブル平均を用いて(1)式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、 $A$ は自由エネルギー、 $V$ はポテンシャルエネルギー、 $q_i$ は*i*番目の原子の座標を示している。また 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のち、FEG 法で得られる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  $\mathbf{F}^{\parallel}$  と垂直成分  $\mathbf{F}^{\perp}$  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。

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

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

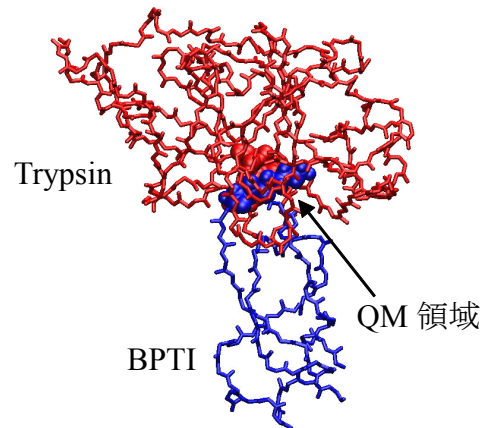


図1 Trypsin-BPTI 複合体の構造  
水分子は描画していない  
(青は BPTI, 赤は Trypsin)

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

ここで、 $\mathbf{P}_j$ は $j$ 番目の中間構造、 $k$ は任意の力の定数である。 $\mathbf{F}^{\parallel}$ はバネで中間構造どおしを結ぶことと等価であり、反応経路に沿った中間構造が両端の安定構造に収束することを防いでいる。

**【結果と考察】** 図2にFEG-NEB法で得られた活性中心付近の反応経路に沿った原子の軌跡を示した。反応経路最適化の際はQM計算にRHF/6-31G(d)法を適用し、力場領域にAmber99パラメータを用いた。中心付近のグレーの球はSer195からAla16への水素原子移動の中間座標を示している。初めに、水素原子はSer195からHis57に移動して中間構造(INT)を経た後、Ala16へ移動する結果が得られた。INT構造の存在はすでに実験から提案されている。

この反応経路に沿った自由エネルギー変化を計算した結果、図3の赤線に示すとおりINT構造を挟むように2つの遷移状態TS1とTS2が存在した。反応初期に最も高い障壁TS1が存在し、その値は実験値<sup>4</sup>と同じ30.1kcal/molとなった。自由エネルギー変化の成分解析を行った結果、主成分は分極を伴うQM領域のエネルギー変化に起因しており、QM-MM領域間の力場の寄与は各成分で最大10kcal/mol程度存在するものの、全体としては互いに打ち消し合う結果が得られた。

以上の結果、FEG-NEB法は自由エネルギー面上の反応経路最適化にとって、極めて有効な方法であることが明らかとなった。当日は、タンパク質中の各アミノ酸残基の重要性についてAlanine置換による計算結果を用いて発表する。

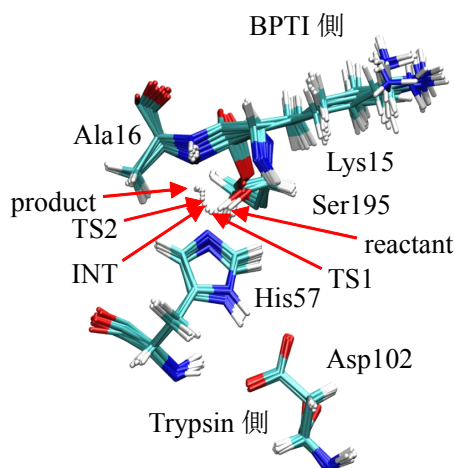


図2 FEG-NEB法で得られた反応経路に沿った原子の軌跡

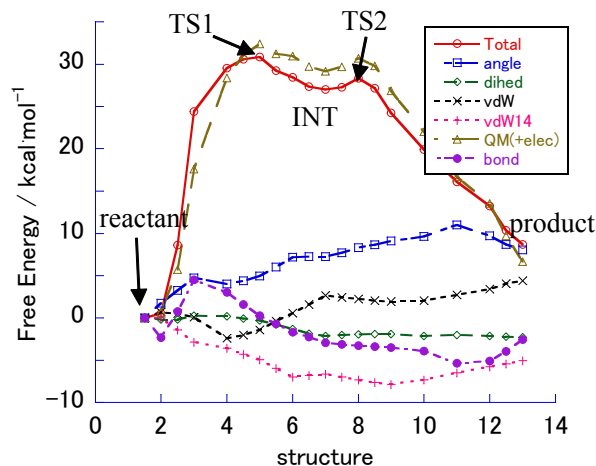


図3 反応経路に沿った自由エネルギー変化と各エネルギー成分。QM領域にはB3LYP/6-31G(d)を用いた。

### 【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. M.Peräkylä and P.A.Kollman, *J.Am.Chem.Soc.*, **122**, 3436 (2000).