

金属プロテアーゼ Thermolysin とその阻害剤間の特異的相互作用の理論的解析

(豊橋技術科学大学¹、東海大学²、トロムソ大学³)○藤田聖也¹、平川達也¹、大山達也¹、出立兼一²、Khan Hassan³、Sylte Ingebrigt³、栗田典之¹

【序】

Thermolysin (TLN) は *Bacillus stearothermophilus* 由来の金属プロテアーゼであり、活性部位に 1 つの亜鉛イオン、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。最近の実験 [1] より、TLN の活性はアミノ酸の dipeptide により阻害されること、及び阻害活性の強さは dipeptide を構成するアミノ酸の種類に大きく依存することが明らかになり、それらの dipeptide を用いた新規リガンドが提案された。しかし、TLN と dipeptide 間の特異的相互作用は、電子レベルでは未解明である。

本研究では、TLN と実験で使用された 6 種類の dipeptide 間の特異的な相互作用を、古典分子力学 (MM) 法、古典分子動力学 (MD) 法、及びフラグメント分子軌道 (FMO) 法 [2] を用い、水中で解析した。



Figure 1 X-ray crystal structure of TLN-IY

【計算手順】

実験 [1] では、TLN に 6 種類の dipeptides (IY (Ile-Tyr)、LW (Leu-Trp)、FW (Phe-Trp)、IW (Ile-Trp)、VY (Val-Tyr)、WL (Trp-Leu)) を結合させ、dipeptide 結合による TLN 活性の変化を解析している。また X 線解析により、TLN-IY (Fig.1) と TLN-LW の結晶構造が決定されている。本研究では、TLN-IY/LW 以外の複合体の構造を得るため、TLN-IY/LW の dipeptide の一つのアミノ酸を他のアミノ酸に置換し、置換部位のみを Amber99 力場で最適化した。次に、各複合体の周囲に水和水を付加し、古典 MM/MD 計算プログラム AMBER9 を用いて水和構造を最適化した。さらに、TLN-dipeptide 複合体の安定構造をより広範囲に探索する目的で、複合体の水和構造に対して 300 K での MD 計算を 1 ns 実行した。その結果から、1000 個の構造を取得し、構造類似性を基に 10 個のクラスターに分類した。各クラスターの代表構造を MM 計算を用いて最適化し、その中で全エネルギーが最安定な構造をその複合体の安定構造として決定した。最後に、FMO 法 [2] により複合体の電子状態を計算し、TLN と dipeptide 間の特異的相互作用を解析した。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 TLN のアミノ酸残基と水分子を MP2/6-31G 法で計算し、それ以外の箇所は HF/6-31G 法で計算した。また、各複合体の振動解析を AMBER9 を用いて解析し、TLN と各 dipeptide 間の結合エネルギー (BE)、及び結合自由エネルギーを求めた。

【計算結果と考察】

まず、TLN-IY と TLN-LW 複合体に対し、TLN と dipeptide 間の BE を求めた。その値は、それぞれ、-264.04 (TLN-IY) 及び -242.63 (TLN-LW) kcal/mol であり、IY の方が LW よりも強く TLN に結合することが分かった。この結果は、実験結果 [1] と定性的に一致している。この相違の原因を明らかにするため、TLN 中の各アミノ酸と IY/LW 間の相互作用エネルギーを解析した。Table 1 に示すように、TLN のアミノ酸の中で、Glu143、Asn112、Arg203、His231、Phe114 は両方の dipeptide と強く相互作用する。また、幾つかの水分子も IY/LW と強い相互作用を持つ。TLN-IY/LW における BE が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の数の違いが考えられる。Fig.2 (a) に示すように、TLN-IY では 2 個の水分子 (Wat345 と Wat350) が、TLN のアミノ酸と IY 間をブリッジし水素結合を形成している。一方、TLN-LW においては、Fig.2 (b) に示すように、そのような水分子は存在しない。このように、dipeptide 周辺に存在する水分子が、TLN と dipeptide 間の相互作用に影響を与える可能性があることが、今回の計算で明らかになった。

これまでの計算より、dipeptide の C 末端側に親水性のアミノ酸を含むと、そのアミノ酸の周囲に水分子が多く水和し、その中の幾つかが TLN のアミノ酸と水素結合し、その結果、水分子を介して dipeptide と TLN 間に水素結合が形成されることが分かった。そこで、これまでの実験において、TLN との結合が最も強い IY の Tyr 残基を親水性のアミノ酸に置換した新規 dipeptides を作成し、TLN との結合特性を解析中である。その結果を基に、TLN の活性をより効果的に制御できる新規 dipeptide を提案したいと考えている。計算結果の詳細は、当日のポスターで発表する。

Table 1 Interaction energies (kcal/mol) between amino acid residues of TLN and dipeptide IY and LW

TLN-IY		TLN-LW	
Residue	Energy	Residue	Energy
Glu143	-76.3	Glu143	-80.6
Asn112	-73.0	Asn112	-77.1
Wat331	-44.0	Wat333	-46.3
Wat340	-22.6	Arg203	-24.7
Wat345	-22.0	Wat353	-22.5
Wat346	-21.6	Wat364	-17.5
Arg203	-20.0	Wat350	-16.3
Phe114	-19.5	His231	-15.5
His231	-18.7	Phe114	-14.5
Wat350	-11.1	Wat323	-10.7
Wat323	-9.9	Wat361	-8.2
Asn111	-8.3	Wat330	-7.0
Wat356	-7.9	Asp138	-6.7
Asp138	-7.8	Wat342	-6.4
Wat336	-6.0	Asp124	-5.5

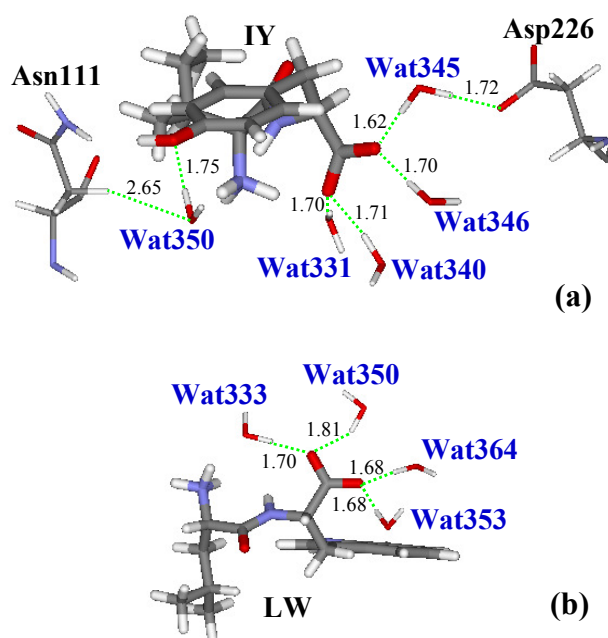


Figure 2 Hydrogen bonds between amino acid residues of TLN and (a) IY or (b) LW

【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.