

## 1B02

### タンパク質内アミノ酸側鎖の酸解離定数の新規算出法と応用

(阪大院理<sup>1</sup>, 阪大院基礎工<sup>2</sup>, 兵庫県立大院生命理<sup>3</sup>, 筑波大院数物<sup>4</sup>)○松井 亨<sup>1,2</sup>, 馬場 剛史<sup>3</sup>, 安田 奈都美<sup>1</sup>, 神谷 克政<sup>4</sup>, 北河 康隆<sup>1</sup>, 重田 育照<sup>2</sup>, 奥村 光隆<sup>1</sup>

【序】 プロトンは DNA やタンパク質等の生体分子内での化学反応において重要な役割を果たしている。そのプロトンの存在を決める一つの要素が酸解離定数( $pK_a$ )であり、その大小でアミノ酸がプロトンを持つか否かを決定している。一方、タンパク質等の生体分子内部のアミノ酸に関して酸解離定数を実験的に求めることは難しい。理論についても分子動力学法による計算では電子状態の変化する金属を含む酵素では定量的な議論ができず、また電荷等のパラメータに依存することが多い。量子化学計算を用いた酸解離定数の導出に関しては、現状ではコストの問題に加えてプロトンのエネルギーを計算手法(密度汎関数や基底関数、溶媒和モデルの種類)に依存せずに一定値とするために十分な精度が得られないために正確に求めるのは困難である。我々はそれに対して、溶媒和モデルを用いることで、特定の官能基に関して  $pK_a$  値の変化とギブスエネルギーの変化に線形関係があることを示し、5 位置換したウラシルにおけるイミノプロトンのギブスエネルギーを計算手法に依存した形で導出することに成功した[1]。これらの計算手法をアミノ酸側鎖の  $pK_a$  に注目し、小さいタンパク質を構成するアミノ酸の側鎖に適用することを本発表の目的とする。

【理論・計算手法】  $pK_a$  は通常水溶液中での酸解離反応 ( $HA \rightarrow H^+ + A^-$ ) のギブスエネルギーの差  $\Delta G(aq) = G(A^-, aq) - G(HA, aq) + G_H$  で(1)のように書き下せる。

$$pK_a = \Delta G(aq) / 2.303RT \quad (1)$$

ここで、 $R$  は gas constant,  $T$  は絶対温度である。本研究ではプロトンのエネルギーを最初から分からないものとして定数  $G_H$  とおく。また水溶液中の化合物のギブスエネルギーは連続誘電体モデル(PCM)と振動計算により導出可能とし、ギブスエネルギーに誤差を補正するスケールリングファクター  $s$  をかけて、 $s/2.303RT$ ,  $s \cdot G_H / 2.303RT$  をそれぞれ  $k$ ,  $C_0$  とおくと(1)式は

$$pK_a = k \{ G(A^-, aq) - G(HA, aq) \} + C_0 = k \Delta G_0 + C_0 \quad (2)$$

と近似できる。よって、 $\Delta G_0 = G(A^-, aq) - G(HA, aq)$  と  $pK_a$  は線形関係にあるので、計算した  $\Delta G_0$  と  $pK_a$  の実験値から  $k$ ,  $C_0$  をフィッティングすれば、他の化合物の  $\Delta G_0$  を計算で求めることで  $pK_a$  を算出可能となる。この方法をアミノ酸側鎖に適用するために、特定の官能基を持つ化合物の実験値を利用した。本研究では、特に断らない限り PCM を使い、B3LYP/6-31++G(d,p) レベルの計算を行っている。

【結果】 この理論を用いることで、特定の官能基を持つ化合物に対して半定量的に  $pK_a$  を導出することができる。今回はその一例を示す。

#### 1. サリチル酸を用いたテスト計算

サリチル酸において分子内の水素結合が  $pK_a$  に与える影響を考えるため、図 1 にあるような 2 つの構造を考えて COOH、フェノールのプロトンが順にとれる二段階の脱プロトン反応に

において、プロトンがある状態とない状態のギブスエネルギーの差から  $pK_a$  を見積もる。

計算の結果、分子内の水素結合の影響により **a** の方が 6 kcal/mol 程度安定である。**a** の構造では  $pK_a$  は 2.69 と 13.29, **b** の構造では  $pK_a$  は 4.10, 10.76 と算出された。実験値は 2.81 と 13.4 であることから、**a** の構造を支持している。**a** と **b** で大きく値が異なる理由は COOH が抜けることで COO<sup>-</sup> となる際に、**a** では OH が COO<sup>-</sup> と水素結合を強化しやすい形になり、脱プロトン化した状態も安定になる。この形になった場合フェノールのプロトンが脱離しにくくなり、第 2 段階目での  $pK_a$  が大幅に上昇する原因となる。一方で、**b** の構造では各々が独立しているために、安息香酸( $pK_a=4.20$ )とフェノール( $pK_a=10.02$ )と似た値になる。分子内の水素結合により、 $pK_a$  値が 2.5 程度変化しうることがこれらの結果からも示唆された。

## 2. アミノ酸側鎖の $pK_a$ 値導出

右の表は今回提案した計算手法をアミノ酸側鎖に適用した結果である。Asp, Glu, Tyr においてはほぼ文献値を再現している。その一方で、Cys, His, Lys では文献値と 0.4-0.5 程度大きくなっている。Gly-Cys-Gly などのトリペプチドにおいては、Cys の  $pK_a$  が 8.44 に下がることから、アミノ酸 ( $H_3N^+-RH-COO^-$ ) の構造、すなわちアミノ酸単体が持つ電荷の影響も原因として考えられる。

## 3. シニョリンにおけるチロシンの $pK_a$ 計算

この手法を最小タンパク質であるシニョリン (10 残基、構造を図 2 に示す) に適用した。シニョリンにはチロシンが 1 残基含まれている。そこで、B3LYP/6-31G(d)レベルの計算で最適化し、振動計算を行いチロシンの  $pK_a$  値を導出したところ、10.02 となり単体のアミノ酸の側鎖と同様の結果となった。これはチロシンがタンパク質の外側を向いていて、タンパク質を構成する他の分子と水素結合を形成していないためである。

## 参考文献

[1] T. Matsui, A. Oshiyama, Y. Shigeta, Chem. Phys. Lett. 502 (2011), 248.

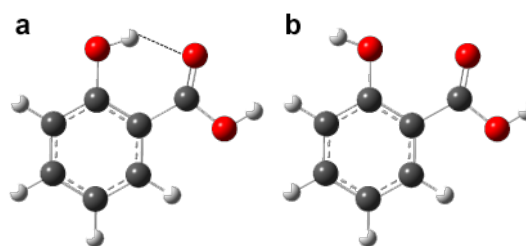


図 1: 今回検討するサリチル酸の配座 (灰、赤、白はそれぞれ C, O, H 原子) **a** では OH 基が COOH と水素結合した形を取る一方、**b** には水素結合は存在しない

表: アミノ酸側鎖における  $pK_a$  の計算値と文献値。官能基によってパラメータが異なるため、精度に違いが生じる。

	官能基	$pK_a$ 計算値	$pK_a$ 文献値
Asp	-COOH	3.78	3.86
Glu	-COOH	4.23	4.25
Cys	-SH	8.85	8.33
His	イミダゾール	6.49	6.04
Lys	-NH <sub>3</sub> <sup>+</sup>	10.92	10.53
Tyr	フェノール	10.07	10.07

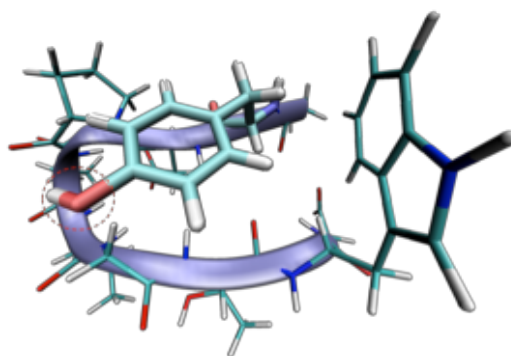


図 2: NMR によるシニョリンの構造 (PDBID: 1UAO) 点線部分が計算の対象となるチロシンのプロトンである。