

1P084

分子動力学法による DHFR の構造変位に対する自由エネルギー変化

(金沢大院・自然)

○西村めぐみ，齋藤大明，川口一朋，AcepPurqon，長尾秀美

【序論】ジヒドロ葉酸還元酵素(DHFR)はニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸(NADPH)を補酵素として、ジヒドロ葉酸(DHF)をテトラヒドロ葉酸(THF)に還元する酵素である。この触媒反応によって生成された THF は、生体の DNA 構築においてチミンの生成で基質の役割を果たし、細胞の分裂、成長に重要な役割を果たしている。このことから DHFR は制がん剤のターゲットのタンパク質とされてきた。酵素の機能発現のためには、酵素の構造変位が重要な役割を果たしていることが知られており、この構造変位を理解することが酵素の機能を理解する上で重要な課題である。

DHFR の触媒サイクルでは、DHFR の 10~24 残基の Met20 ループと呼ばれる構造が、closed 状態、open 状態、occluded 状態と構造を変位させることによって、補酵素の NADPH と基質の DHF が DHFR に結合、解離し触媒サイクルが進行すると考えられている[1][2]。この触媒サイクルは初めに、DHFR と NADPH が結合した状態で、Met20 ループが図 1 左図の closed 状態になっている。その後、Met20 ループが図 1 右図の open 状態になり DHF が結合する。またその後に、Met20 ループが closed 状態になることによって DHFR の活性化部位に NADPH と DHF が結合し、NADPH のプテリン環の C6 原子から DHF の N5 原子に水素が付加され DHF は THF に還元される。次に、Met20 ループが occluded 状態となり、DHFR から NADPH が酸化された NADP^+ が解離する。最後に NADPH が DHFR に結合し、THF が解離することによって触媒サイクルが完了する。本研究では、この一連の触媒サイクルにおいて、DHFR と NADPH が結合している状態に基質 DHF が結合する前後での、Met20 ループの構造変位に対する自由エネルギー曲線を求め、構造安定性に寄与している相互作用について議論する。

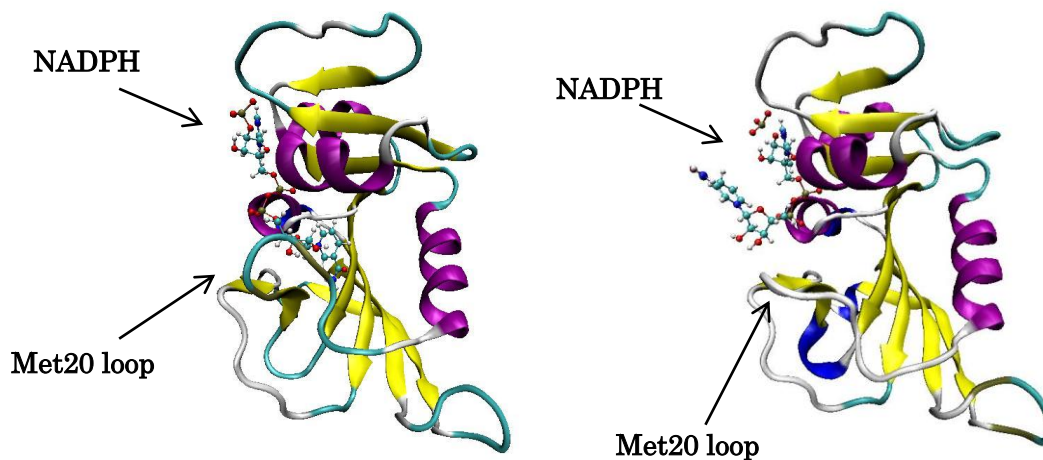


図 1: NADPH が結合している DHFR の構造

(左図: Met20 ループが closed 状態 右図: Met20 ループが open 状態)

【計算方法】

DHFR と NADPH が結合している初期構造には、X 線結晶構造解析から報告されている PDB コードの Met20 ループが closed 状態である 1DRH、Met20 ループが open 状態である 1RA1 の構造を用いた。DHFR は総原子数 2489、総残基数 159 残基、 β シートが 8、 α ヘリックスが 4 のタンパク質である。

Met20 の構造変位による構造安定性を求めるため、アンブレラサンプリング法を用いて自由エネルギー曲線を求める。まず、NEB 法 (Nudged Elastic Band Method) を用いて、Met20 ループの closed 状態、open 状態の中間状態を用意する。NEB 法とは、初期状態と最終状態の間で必要なエネルギーが最も低くなる状態を探し出し、最小エネルギー経路を探索する手法である。初めに、DHFR の Met20 ループが初期の状態 (closed 状態) と最終の状態 (open 状態) を線形補間していくつかの DHFR の構造を作成し、隣り合った構造同士を仮想的なバネでつなぐ。バネでつながれている各中間状態の構造の経路に垂直に働く力の成分、平行に働く力の合力を最小化することによって最小エネルギー経路を探索する。

次に、求めたそれぞれの中間状態から DHFR の構造をサンプリングする。サンプリングした構造から反応座標を RMSD として Weighted Histogram Analysis Method (WHAM 法) を用い、自由エネルギー曲線を求めるため Potential of Mean Force (PMF) を計算し構造の安定性について考察する。

計算プログラムには AMBER10 を用いた。溶媒モデルに GB モデルを用い Born 半径 25 Å、力場には Amberff03 力場を用いた。カットオフ距離 30 Å、SHAKE 法を用いて水素原子を拘束し、温度制御には Langevin dynamics 法を用いて計算を行う。

DHFR の Met20 ループ構造変位に対する自由エネルギー曲線やその構造変位に寄与する相互作用についての考察、また、基質 DHF が結合することによって変化する Met20 ループの構造安定性についての考察など、計算結果については当日発表する。

【参考論文】

- [1] Michael R. Sawaya and Joseph Kraut, *Biochemistry*, **36**, 586-603 (1997)
- [2] David D. Boehr, et al, *Science*, **313**, 1638 (2006)