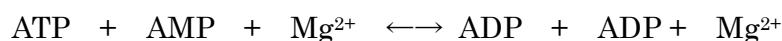


アデニル酸キナーゼ反応機構の ONIOM 法による研究

(北里大理) ○神谷健秀

[序]

アデニル酸キナーゼは以下のような ATP-ADP の変換反応を触媒するリン酸変換酵素である。



反応は Mg イオンに配位するリン酸基の転移によると考えられるが、電離度の高い基質と周辺残基および溶媒との相互作用の効果やプロトン移動の関与の可能性、結合部位の可動性の影響など、酵素による触媒反応機構の詳細を明らかにするため、我々は分子軌道法、分子力学・分子動力学法などの計算化学的手法による解析を試みた。

[方法]

酵素と阻害剤 AP5(bis(adenosine)-5'-pentaphosphate)との複合体の結晶構造 (PDB:2AKY) を元にして、ATP、AMP、Mg イオンと酵素分子を含むモデル系の構造を構築した。AP5 の余分なリン酸基を削除して ATP、AMP に変換し、AMBER99 の分子力場を用いて結晶中に観測された水分子とともに構造最適化した。溶媒分子の影響を考慮するため、Mg イオンから半径 12Å 以内の球状の領域に水分子を配置して境界に調和型拘束ポテンシャルをおき、外側の領域は固定したうえ、900K の分子動力学計算と構造最適化によってモデル構造を得た。

当初生成系の構造に関する知見がなかったため、妥当な遷移構造や生成系の構造を得るために、分子力場パラメータを始原系から生成系の値まで徐々に変えながら動力学計算を行う分子変換法を行った。得られた遷移構造近傍の構造を最適化して、エネルギーの低かったものを遷移構造決定のための初期構造とした。

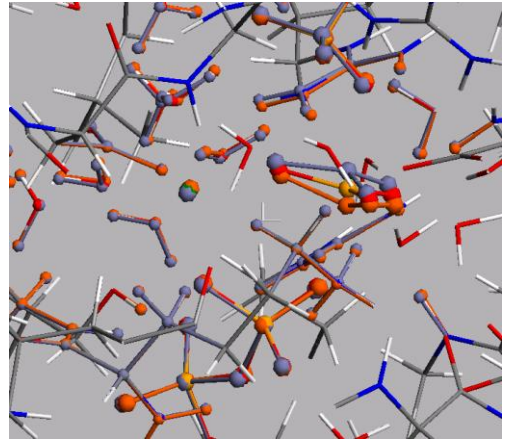
このモデルからさらに活性中心のリン酸基および Mg イオンから遠方 (10Å 以上) の領域を削除、さらに外側の領域の原子を固定して、リン酸基、Mg イオンなどを量子化学領域として ONIOM 法による構造最適化をおこなった。

[結果]

分子変換法による計算では、始原系・生成系のそれぞれの分子力場ポテンシャルを線形に内挿する 2 状態モデル、および仮想的な遷移構造のパラメータを用いる 3 状態モデルを検討した。後者は、SN1 型反応のように結合の消滅・生成が二段階で起こる場合の可能性を留意したものである。ただし、遷移構造モデルにおけるポテンシャルは一般には明らかでなく、本研究の場合でも解離したリン酸基の構造や配向が安定に保たれず、むしろ遷移構造近傍での分子力場を考慮しない 2 状態モデルによって転移する磷酸基部分がワルデン反転をおこなう SN2 型反応様の遷移構造のモデルが得られた。

ONIOM 法による計算では、全原子数を約 640 程度に絞り、量子化学領域の原子数を活性中心原子のみから周辺残基を取り込んだものまで数種類（原子数 19~89）について検討した。

その結果、リン酸基部分と Mg イオンのみを QM（19 原子）とした HF/6-31G(d) : AMBER レベルで得られた始原系・遷移構造・生成系の構造を図に示す。しかし、その反応障壁は約 3.5kcal/mol、生成系からの差は約 4.5kcal/mol と極めて小さく、さらに計算規模を上げる（周辺残基を QM にとりこむ、DFT による計算、QM に分極効果を加える等）と生成系が不安定化し、逆反応の障壁が消失することが明らかとなった。



その後発表された生成系の X 線構造 (PDB:2CDN) を参照したところ、モデル分子系の転移リン酸基の受容側 ADP のリン酸基とリボースの結合部位の配座がかなり異なっていることが判明した。この違いの影響を調べるため、現モデル構造を元にして該当部位 (C4-C5 および O4-P α) の二面体角に調和型拘束を加え、温度 300K で 10ps 程度の定温分子動力学計算の間に拘束位置を 120° 程徐々に変化を加えた。できた構造を最適化して比較すると配座が変化することで周辺残基との相互作用が変化し、約 30kcal/mol ほど安定になることがわかった。

新しいモデル構造に基づいた ONIOM 法による構造探索は現在実行中であり、詳細は当日発表する予定である。