

4C01

ラマン分光法によるインスリンアミロイド線維の天然化過程の解析
(関西学院大学*, 大阪大学**) ○古川達也*, 山本茂樹**, 尾崎幸洋*

Raman Spectroscopy Study on Naturation Process of Insulin Amyloid Fibril
(Kwansei Gakuin University*, Osaka University**)
○Tatsuya Furukawa*, Shigeki Yamamoto**, Yukihiro Ozaki*

【序論】アミロイド線維はタンパク質の天然構造が崩れ、 β シート構造からなる凝集体を形成したものであり、アルツハイマー病やパーキンソン病、狂牛病などに深く関係していると言われている。インスリンは加熱することでアミロイド線維を形成することが知られており、アミロイド線維の良いモデルとして研究されてきた^[1]。しかし、アミロイド線維への変性過程における二次構造は未だ明らかとなっていない。本研究では、ラマン分光法を用いてウシ由来インスリンがアミロイド線維から天然状態へ回復する過程のタンパク質構造変化を調べた。アミド I およびアミド III 振動、さらにチロシン側鎖由来のピークの時間変化から、アミロイド線維の天然化過程における主鎖および側鎖の構造変化の解明を試みた。

【実験方法】インスリンを 0.1 M 塩酸水溶液に溶解させ、天然状態のインスリン水溶液を作製し、そのラマンスペクトルを測定した。

インスリン水溶液をガラスキャピラリーに封入し、湯浴を用いて各温度(55, 60, 70, 80, 90°C)において 20 分加熱した。その直後(湯浴から取り出した後、1 分経ってから測定)を 0 分とし、室温においてラマンスペクトルの測定を行った。また、室温において放置した試料が変性状態から天然状態へ回復する過程を測定した。

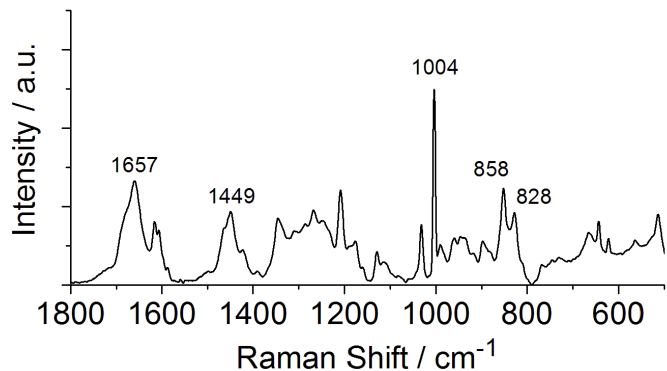


図1 天然状態のインスリンのラマンスペクトル

【結果・考察】天然状態のインスリンのラマンスペクトルを示した(図1)。1657 cm^{-1} のピークは α ヘリックス構造に特徴的なピークと帰属されており^[2]、天然状態のインスリンの主な二次構造は α ヘリックス構造であるといえる。55°C で加熱変性させたインスリンが天然状態へ変化する際の時間変化ラマンスペクトルを示した(図2)。加熱直後のアミド I のピーク位置は β シート構造に特徴的なピーク^[2]である 1668 cm^{-1} に観測されたが、室温において 12 時間放置した試料については、 α ヘリックス構造に特徴的なピークである 1657 cm^{-1} に観測された。加熱後に 12 時間放置したインスリン試料は、天然状態に回復したと考えられる。インスリンのア

ミロイド状態から天然状態への構造変化をラマンスペクトルによって観測することが出来た。

加熱直後のインスリンアミロイド線維のアミドIのピーク位置は、加熱温度に依存して変化した(図 3)。55–70°C で加熱したインスリンは 1669 cm⁻¹ 付近に、80°C および 90°C で加熱した場合は 1673 cm⁻¹ 付近とより高波数側にピークが観測された。さらに、55–70°C で加熱し 12 時間放置したインスリンでは、アミドIのピークが加熱前と同じ位置に観測されたのに対し、80°C および 90°C で加熱したインスリンでは 12 時間放置してもピーク位置に変化がみられなかった。80°C および 90°C で加熱したインスリンは 12 時間放置しても天然状態に回復しなかったと考えられる。ランダムコイル構造を主とするタンパク質のアミドIのピークは、βシート構造に特徴的なピークである 1668 cm⁻¹ よりも高波数側に観測される^[2]ことから、80°C および 90°C で加熱したインスリンはアミロイド線維ではなく、ランダムコイル構造に変性したと考えられる。

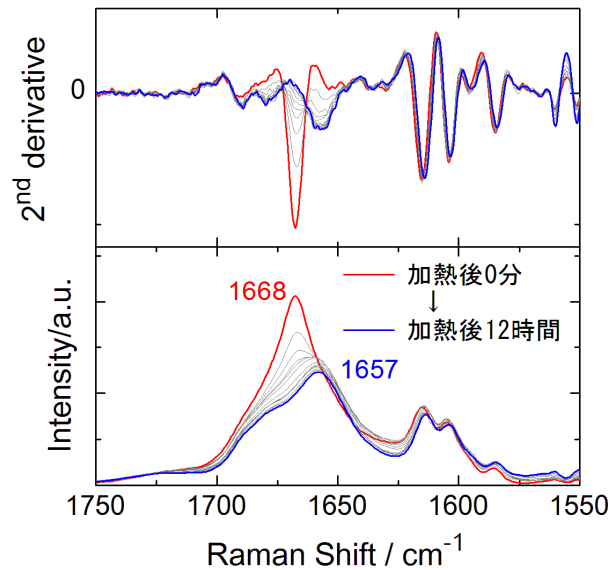


図 2 アミドI領域の時間変化スペクトル

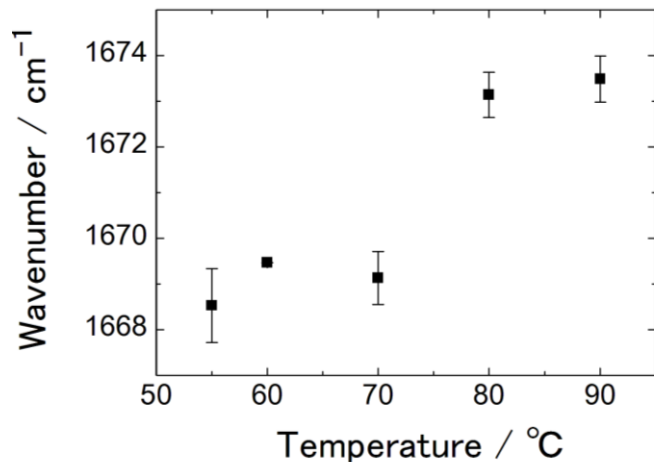


図 3 アミドIのピーク位置における加熱温度依存性

[1]M. Bouchard, J. Zurdo, E.J. Nettleton, C.M. Dobson, C.V. Robinson, *Protein Sci.*, **2000**, 9, 1960-1967.

[2]N.C. Maiti, M.M. Apetri, M.G. Zagorski, P.R. Carey, V.E. Anderson, *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, 126, 2399-2408.

正に帯電した白金微粒子のタンパク質結晶への集積化
 ((株) コンポン研究所*、東大院・総合**) ○武田佳宏*、真船文隆**
 Self-assembly of Positively Charged Platinum Nanoparticles in
 Lysozyme Crystal
 (Genesis Research Institute, Inc.* , The University of Tokyo**)
 ○Yoshihiro Takeda* , Fumitaka Mafuné**

【序】 金属微粒子の集積化の方法は、気液界面法など様々あり、触媒や医療など多くの分野で応用されている。それらの中で、生体分子を足場として集積化する方法は、生体分子の自己組織化を利用するため投入エネルギーも少ない有望な方法である。我々はこれまで結晶中のタンパク質を足場として金属微粒子を集積化する方法を開発した [1]。具体的には、金微粒子(AuNP)をリゾチーム結晶中に集積化した。さらに集積化の際、溶液中で負に帯電した AuNP と正に帯電したリゾチーム分子の静電的相互作用で AuNP がリゾチーム結晶に取り込まれることを明らかにした。本研究の目的は、この静電的相互作用が他の金属微粒子の集積化の場合にもあてはまる一般的なメカニズムかどうかを明らかにすることである。そのためにゼータ電位が正と負の 2 種類の白金微粒子(PtNP) を作製し、結晶への集積化を試み、そのメカニズムについて考察した。

【実験】 純水 5 mL に 55 mg の PVP を溶解し、この溶液の底部に白金プレートを設置した。これに波長 1064 nm、パルス幅 10 ns のパルスレーザーを照射し、レーザーアブレーション法で溶液中に分散した PtNP を作製した。さらにこの PtNP を水溶液中で 3 ヶ月間インキュベーションした。この微粒子を以後、「Pt'NP」と記す。PtNP および Pt'NP の TEM 観察を行った結果、それぞれ直径が 9.4 ± 5.4 nm と 7.5 ± 2.6 nm であった。またこれら微粒子のゼータ電位を計測した (図 1)。次に 4% NaCl を沈殿剤とした結晶化条件に整えた溶液に PtNP および Pt'NP を共存させ、293 K で数日間静置し、PtNP および Pt'NP を集積化したリゾチーム結晶を作製した。

【結果と考察】 異なるゼータ電位を持つ PtNP 安定化剤の PVP 高分子は両親媒性の非イオン性物質であり、微粒子の表面のゼータ電位に影響を与えない。従って、PtNP および Pt'NP のゼータ電位は微粒子表面の電荷状態を反映している。

PtNP および Pt'NP のゼータ電位の pH 依存性は、微粒子表面の一部の酸化された白金原子に結合したヒドロキシル基の平衡 ($\text{Pt-OH} \rightleftharpoons \text{Pt-O}^-$) の pH 依存性とみなすことができる。pH が表面のヒドロキシル基の pKa より低い場合は、Pt-OH が優勢であり、pH が pKa より大きい時は Pt-O⁻ が優勢である。pH が 8.0 よりも高い時は、微粒子のゼータ電位は、pH の増加とともに急激に減少したことから、表面のヒドロキシル基の pKa は ~8 と推定される。pH が 8 以下の場合、PtNP および Pt'NP のゼータ電位は pH の低下とともに増加し、それぞれの pH 3 で 1 mV と -5 mV に近づいた。酸性溶液中の PtNP の正電荷は、表面上の Pt 原子の部分的な電荷移動による Pt^{δ+} またはプロトンが Pt 原子に付着し Pt-H⁺ による。そのため、PtNP のゼータ電位は溶液の pH が pKa ~8 以下の時に正になる。一方、Pt'NP の表面上の Pt 原子は、水溶液中での 3 ヶ月のインキュベーションにより PtNP より酸化されたため、Pt'NP のゼータ電位は pH が pKa 以下の時でもマイナスと考えられる。すなわち PtNP および Pt'NP

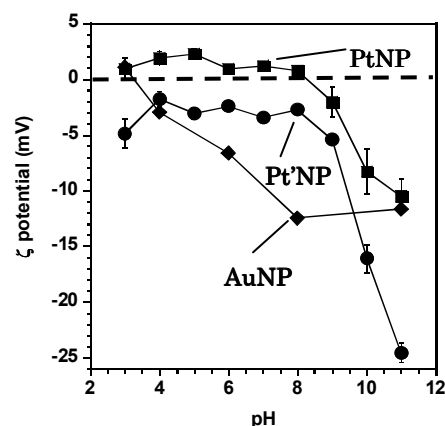


図 1 ゼータポテンシャルの pH 依存性

の表面上の酸化された Pt 原子の数の差が、pH が 8 以下でのゼータ電位の符号が異なる原因と考えられる。

PtNP の集積化のメカニズム リゾチームの過飽和溶液に PVP 安定化した PtNP および Pt'NP を加えた時の結晶の析出状態を実体顕微鏡で観察した結果を図 2 に示す。PtNP はリゾチームの結晶に取り込まれ、Pt'NP はあまり取り込まれていないことが、結晶が白金黒色にな

っているかどうかで判別できる。さらに PtNP のリゾチーム結晶への分配係数の pH 依存性を測定した結果を図 3 に示す。pH が 3~7 では PtNP の分配係数は 1 より大きく、結晶に集積化しやすく、一方、Pt'NP の場合は 1 より小さく、結晶に集積化しにくいことがわかった。PtNP の集積化は PtNP、

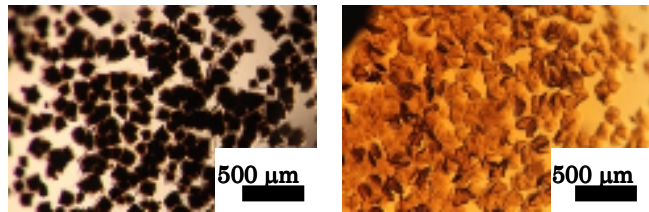


図 2 PtNP (左) および Pt'NP (右) を集積化したリゾチーム結晶

リゾチーム、NaCl の 3 因子の相互作用で説明できる。酸性溶液中でリゾチーム分子のゼータ電位は約 12mV である。したがって、NaCl の Cl⁻ が正帯電したリゾチーム分子に吸着する。その結果、PtNP 周囲の Cl⁻ の濃度は減少し、pH 8 以下において、Cl⁻ による PtNP のゼータ電位の遮蔽効果は減少する。さらに正帯電している PtNP

は数にして 10⁵ 倍存在する正帯電しているリゾチーム分子に囲まれている。したがって、PtNP はリゾチーム分子との反発力で溶液中に分散している。この結果、PtNP は良く分散した状態で結晶表面と相互作用できる。一方、Pt'NP は pH 8 以下においては負に帯電しており、したがって、NaCl の Na⁺ によって効率よく遮蔽される。その結果、Pt'NP は結晶表面と相互作用する前に凝集する傾向を持つ。さらに pH が 8 に近づくと PtNP のゼータ電位もリゾチーム分子の正電荷も減少する。よって、リゾチーム吸着していた Cl⁻ が自由になるため、Cl⁻ による PtNP の正電荷を遮蔽する効果は大きくなる。したがって、PtNP 同士の反発力は低下し、PtNP の分散性は低下する。その結果、pH が 8 に近づくと PtNP は凝集しやすくなり、PtNP の分配係数は低下する。さらに pH が 8 になると、PtNP の分配係数は急速に減少する。これは PtNP のゼータ

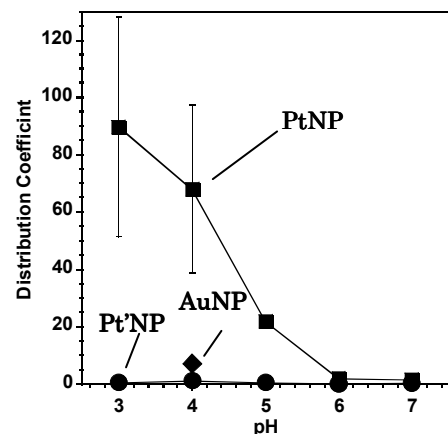


図 3 分配係数の pH 依存性

電位が 0 になり、PtNP が激しく凝集するためである。pH が 8 から 11 の間では、PtNP のゼータ電位は負であり、PtNP の電荷は Na⁺ によって遮蔽され、さらに PtNP は正に帯電したリゾチーム分子と強く結合し共沈する。そのためにリゾチーム結晶も生成せず、PtNP の分配係数は計測できなかった。金微粒子の場合は、pH 4 において、ゼータ電位は Pt'NP よりも小さい。よってナトリウムイオンの遮蔽効果があっても安定に溶液中に分散する。よって、pH 4 において AuNP の分配係数は Pt'NP よりも大きい。

以上をまとめると、以前、我々は負に帯電した AuNP と正に帯電したリゾチーム分子の静電的相互作用によって AuNP は集積化すると結論した[1]。このことと本研究を考え合わせると、微粒子が結晶表面と相互作用する前の微粒子の分散性が良いことが第一の関門で、微粒子と結晶表面のリゾチームの静電的相互作用は第二の関門と考えられる。PtNP と Pt'NP については第一の関門の分散性の違いが集積化効率の違いの原因になっていると考えられる[2]。

[1] Y. Takeda, T. Kondow, F. Mafuné *Chem. Phys. Lett.* 504, p175 (2011)

[2] Y. Takeda, F. Mafuné *Chem. Phys. Lett.* 604, p110 (2014)

4C03

炭酸脱水酵素の触媒反応に見られるプロトン移動の
解明に向けた実験・理論的アプローチ

(北陸先端大院・ナノ¹, 金沢大院・理²)

○島原 秀登¹, ムハマド コイマツ², 杉森 公一², 齋藤 大明², 川口 一朋², 長尾 秀実²

Experimental and Theoretical Approach to Proton-transfer
in Catalysis by Carbonic Anhydrase

(JAIST¹, Kanazawa Univ.²)

H. Shimahara¹, M. Koyimatu², K. Sugimori², H. Saito², K. Kawaguchi²,
and H. Nagao²

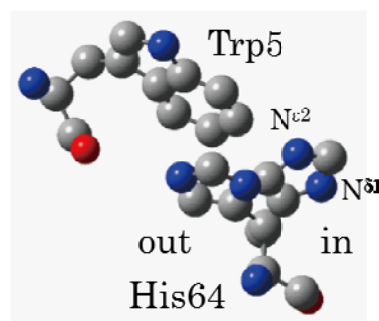
【序】ヒト由来炭酸脱水酵素 II (hCAII) は、ヒスチジン調節型水素結合リレーによって高度に制御されたプロトン移動を理解するためのモデルとして長く研究されている。そこでは、亜鉛結合水の解離によって生じた生成物プロトンが、幾つかの水分子を経由して His64 残基に渡され、そしてその生成物プロトンをもつ His64 残基に互変異性変化が起こるとの移動経路が広く受け入れられる。これまで、その生成物プロトンを His64 残基から酵素外部に放出するための経路として、1) イミダゾール環の回転に起因するある動的な挙動に基づくもの、2) イミダゾール環の互変異性変化に起因するより静的な挙動に基づくもの、の2つが提案されてきた。本研究は、核磁気共鳴(NMR)法に部位特異的の変異法を組み合わせた実験的手法と量子化学(QM)計算による理論的手法の両面から、これら2つの経路のうちどちらが尤もらしい機構か検証することを目的とする。本発表 4C03 では、実験的手法によるアプローチについて述べ、次発表 4C04 において理論的手法によるそれを述べる。

【実験】X線結晶構造によると、N末端から数えて約20までの残基は、酵素活性部位が存在するくぼみの近くを取り巻くように存在することがわかっている。我々は、部位特異的によって、それらの残基の内の一つがAlaに置換されるようにhCAII遺伝子に遺伝子組換え操作を施し、その遺伝子組換え体をもつ大腸菌大量遺伝子発現系を用いて、¹⁵N標識された変異Alaをもつ酵素(¹⁵N-XnA-hCAII; X = amino acid, n = residual number, A = Ala)を得た。このような変異導入操作をN末端から順に酵素に施すことによって、Ala一残基変異をもつ複数の¹⁵N-XnA-hCAIIを得た。これらの標識酵素について、2次元¹⁵N-¹H相関NMR(HSQC or HMB)法(Bruker500MHz NMR装置)を用いてpH滴定実験を行い、それぞれの酵素に存在するHis64の2つのイミダゾール窒素に由来する4つの相関シグナル($N^{\delta 1}-H^{\delta 2}$, $N^{\delta 1}-H^{\epsilon 1}$, $N^{\epsilon 2}-H^{\delta 2}$, $N^{\epsilon 2}-H^{\epsilon 1}$)

の挙動を観察する実験 (Ala-scanning 実験) を行った。

【結果】 ある一つの ^{15}N -XnA-hCAII を含む試料について、pH 5.3 における 2 次元 NMR 測定を行ったところ、スペクトルのイミダゾール領域において観測されるある 1 つの His 残基に由来する 4 つの相関シグナルのケミカルシフトは、野生型の His64 のそれと同じであった。しかし、その試料の pH を上昇させ、同測定を行ったところ、pH 6.1, pH 6.8 におけるスペクトルにおいて、それぞれのシグナルはスプリットし、2 つの対をなす計 8 つ (4 つの相関シグナル \times 2 対) の相関シグナルが観察されるという野生型にみられない挙動がみられた。特に、pH 6.8 のスペクトルにおいて、より低磁場側 (スペクトルの左側) にみられる一対のシグナルに注目すると、他の ^{15}N -XnA-hCAII の同じ pH における His64 シグナルのそれに重なることがわかった。このことから、より高磁場側 (スペクトルの右側) にみられるもう一対のシグナルの出現がこの変異体に特有にみられる His64 の挙動であると考えられた。このシグナルは、pH 7.3 以上に pH を上昇させると消失するという特徴をもっていた。従って、この変異体の His64 のイミダゾール環は、pH 6.1 と pH 7.1 との間において、二つの異なる環境にあり、それらの環境の間で、NMR 時間軸上十分遅い化学交換をもつことがわかった。

【考察】 X 線結晶構造において、His64 のイミダゾール環は中性領域において右図のように二つの配向をもつことが報告されている。活性部位くぼみの底にある亜鉛イオンの方向を向いているイミダゾール環は「内向き (図 in)」, 酵素の外を向いているそれは「外向き (図 out)」と呼ばれる。この配向は pH 依存的に変化し、pH 5.3 のとき「外向き」、pH 9.1 のとき「内向き」となることがわかっている。



一方、外向きのイミダゾール環は、Trp5 インドール環面の垂直方向に存在し、 $\text{H}^{\delta 2}$ と $\text{H}^{\delta 1}$ は環電流効果によって高磁場側にシフトすると予想される。これらのことから考えて、より低磁場側にみられる一対のシグナルは、「内向き」に由来するもの、他の一対のそれが「外向き」に由来するものである可能性が高い。もしこの帰属が正しいならば、それらの間の化学交換は NMR 時間軸上十分遅いことから判断して、この変異体において、「内向き」と「外向き」の間の回転が、高いターンオーバーをもつ触媒反応に関わることは考えられない。結論として、上述の生成物プロトンの放出について、「イミダゾール環の回転に起因するある動的な挙動に基づく経路」が明らかに除外されることが導かれる。現在、その帰属の妥当性に係る実験とこの変異体の反応速度を野生型酵素のそれと比較する実験を計画する。

Theoretical Study of Tautomerization and Conformations of His64 in Human Carbonic Anhydrase II

(Kanazawa University*, Japan Advanced Institute of Science and Technology**)

o Muhamad Koyimatu*, Hideto Shimahara**, Kimikazu Sugimori*, Kazutomo Kawaguchi*, Hiroaki Saito*, Hidemi Nagao*

[Introduction]

The specific manner of Histidine 64 (His64), in which the transfer of productive proton is mediated during catalysis of CO₂ hydration reaction in human carbonic anhydrase II (HCAII), has been explored on the basis of structural information. X-ray analysis of HCAII suggests that His64 undergoes a pH-dependent conformational change in which either an “in” or “out” conformation can be adopted in the active site cleft at a neutral pH [1], whereas ¹⁵N-NMR analysis of HCAII suggests that the interconversion of two N₁-H and N₂-H tautomers of His64 can associate with the proton-transfer in which imidazole nitrogen atoms serve as both a donor and acceptor [2].

Our previous work reported that the existence of the π -stacking interaction between Trp5 and the “out” conformation of His64 in HCAII [3]. We also determine the relation of the π -stacking interaction in the His64 rotation of motion on a simple model, consist of Trp5, Gly63, His64 and Ala65. The result indicates that the π -stacking interaction cause an increase in energy barrier of rotational motion [4,5].

In this study, we performed *ab initio* calculation with electronic correlation (MP2) for the imidazole in the Trp5-containing cluster models constructed to estimate the energetic effect of the tautomerization of His64 coupled with the ionization of zinc-bound water *via* water-bridge on the rotation of χ_1 angle of His64 in the active site cleft of HCAII. The goal of our study is to detail the mechanism responsible for the catalytic manner of human carbonic anhydrase II.

[Calculation Methods]

The three-dimensional structure of HCAII was obtained from the X-ray coordinate file (Protein Data Bank (PDB) code: 2CBA). The active site residues (ASR; Trp5, Tyr7, Gly63, His64, Ala65, Asn67, His94, His96, His119, Thr199, and Thr200), zinc ion, and four oxygen atoms of water molecules (named ZnO, w1a, w2, and w3a) were extracted to obtain the cluster model, as shown in Fig. 1, then two types of cluster models were constructed: models with/without three oxygen atoms, w1a, w2, and w3a, as shown in Fig. 1.

The hybrid meta-GGA density functional theory (DFT) calculations, M06-2X, has produced reliable models including transition metals and hydrogen bonding interactions. By using this method, the optimized structure was obtained. In addition, the second-order Møller-Plesset perturbation theory (MP2) is a reliable method for models having electron correlation,

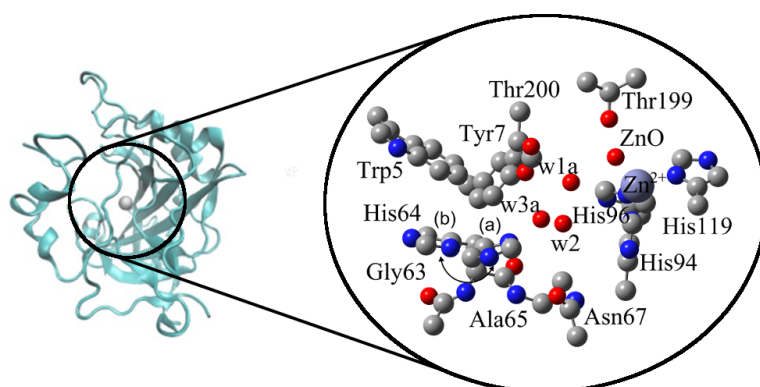


Figure 1. The representation of the active site of the HCA II

allowing the estimation of the structure having π -stacking interaction between two aromatic rings (His64 and Trp5). All calculation were performed on the Gaussian 09 program package, using 6-31G(d,p) basis set and solvent ether ($\epsilon=4.24$).

[Results and Discussion]

Comparative analysis of rotational energy surfaces indicates that a formation of water-cluster having water-bridge between His64 and zinc-bound solvent in cleft stabilizes the “in” conformation, compared to “out”, especially when the protonated form in interconversion is adopted in the way of the tautomerization (protonated form), the energetic difference for the water-cluster formation in the cleft is large (-13.6 kcal/mol) to cause the change of stability of conformation. As a result, the “in” conformation becomes $9.34 \text{ kcal mol}^{-1}$ more stable than the “out” conformation.

The interaction energy analysis of the water-cluster to the active site residues shows that energetic contributions of protonated form and N_{δ_1} -H tautomer of His64 to the water-bridge formation are -16 and -8.5 kcal/mol, respectively, while that of N_{δ_2} -H tautomer is -4.3 kcal/mol. This can be compatible with the experimental result in which the imidazole group intrinsically tends to the N_{δ_2} -H tautomer in histidine residues, unless a hydrogen bond interacts with the δ_1 -nitrogen of the imidazole ring.

In addition to the favorable interactions of the water-cluster with the protonated form and N_{δ_1} -H tautomer, these forms of His64 have a productive proton transferred from zinc-bound water in the proton-relay process. Considering them, the ring of His64 having the productive proton cannot rotate/swing from “in” to “out”. Our data indicates that the N_{δ_2} -H tautomer has the lowest rotation energy barrier (5.9 kcal/mol) compared to another forms, which have a limited possibility or rotate. These results are significantly inconsistent with that of simulations in which TIP3P bulk water model was used for HCAII [6]. These suggest that there is no occasion for His64 having the productive proton to rotate from “in” to “out” in proton-transfer process during catalysis of HCAII.

[References]

- [1]. K. Hakanson, et al.: *J. Mol. Biol.* **227** (1992) 1192-1204.
- [2]. H. Shimahara, et al.: *J. Biol. Chem.* **282** (2007) 9646-9656.
- [3]. M. Koyimatu, et al.: *AIP Conference Proceeding.* **1518** (2013) 626-629.
- [4]. M. Koyimatu, et al.: *Recent Development in Computational Science.* **4** (2013) 87-93.
- [5]. M. Koyimatu, et al.: *JPS Conference Proceeding.* **1** (2013) 87-93.
- [6]. C. Maupin and G. A. Voth: *Biochemistry.* **46** (2007) 2938-2947.

4C05

アリールスルホン誘導体によるマトリックスメタロプロテアーゼ-12の
阻害メカニズムに関する定量的構造活性相関(九大先導研¹, 徳島大院・薬²) ○比多岡 清司¹, 中馬 寛², 吉澤 一成¹QSAR study on the inhibition mechanism of
matrix metalloproteinase-12 by arylsulfone analogues(IMCE, Kyushu Univ.¹, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Univ. of Tokushima²)○Seiji Hitaoka¹, Hiroshi Chuman², Kazunari Yoshizawa¹

【序論】

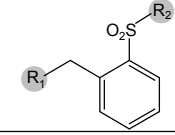
近年、主に喫煙などが原因で発症する慢性閉塞性肺疾患 (chronic obstructive pulmonary disease: COPD)による死亡者数が増加している。また、中国で深刻化しているPM2.5がCOPDに与える影響も少なくない。そのため、世界保健機関は2030年までにはCOPDが世界の死亡原因の第3位になると推定している。すなわち、COPDの治療薬開発に対する社会的ニーズは極めて高いと考えられる。このような状況の中、COPD患者由来の肺組織において、亜鉛含有のエンドペプチダーゼであるマトリックスメタロプロテアーゼ-12 (matrix metalloproteinase-12: MMP-12)が過剰に発現している実験事実 [1]は注目に値する。このことは、MMP-12がCOPDにおける重要な標的分子の一つであり、MMP-12に対する阻害剤開発がCOPDの根本的な治療につながる可能性を示唆している。















本研究では、MMP-12とその阻害剤であるarylsulfone誘導体の複合体について、定量的構造活性相関 (quantitative structure-activity relationship: QSAR)と分子科学計算をリンクさせた自由エネルギー変化の線形表現 (linear expression by representative energy terms: LERE-QSAR)などの理論解析から、阻害剤によるMMP-12の阻害メカニズムを原子・電子レベルで定量的に明らかにすることを目的とした。

【方法】

本解析では2種類の亜鉛結合基 (R₁: carboxylic acid (type I), hydroxamic acid (type II))と4種類のaryl基 (R₂)を有する合計8個のarylsulfone誘導体 [2]を使用した。そのMMP-12に対する阻害活性強度 (IC₅₀)より求まる実測の全自由エネルギー変化 (ΔG_{obs})の特徴として、2種類の亜鉛結合基の活性差および4種類のaryl基の活性変動が挙げられるが (表1), これらは自明ではない。そこで、docking計算 (CDOCKER)とQM/MM (ONIOM)計算によりMMP-12-arylsulfone誘導体の複合体構造を構築し、LERE-QSAR解析を行い、阻害剤の作用メカニズムの定量的理解を試みた。LERE-QSAR解析では、MMP-12とarylsulfone誘導体の複合体形成に伴う実測の ΔG_{obs} は、代表的な相互作用自由エネルギー変化の加成性と線形表現、entropy-enthalpy補償則に基づく式 ($\Delta G_{\text{obs}} = \gamma (\Delta E_{\text{bind}} + E_{\text{disp}} + \Delta G_{\text{sol}}) + \text{const}$)を用いて表される。なお、基本式の定式化については文献 [3]を参照されたい。ここで、 ΔE_{bind} , E_{disp} および ΔG_{sol} は、結合相互作用エネルギー、分散相互作用エネルギーおよび水和自由エネルギー変化をそれぞれ表す。 ΔE_{bind} はONIOM法 (HF/6-31G(d):Amber)を、 E_{disp} はGrimmeの分散力補正D3を、 ΔG_{sol} は一般化ボルン法を用いてそれぞれ算出した。

表1. MMP-12の阻害活性データ



compound no.	type	R ₁	R ₂	ΔG_{obs}^*
1	I			-5.75
2	I			-9.11
3	I			-8.26
4	I			-9.72
5	II			-10.6
6	II			-13.8
7	II			-11.8
8	II			-11.7

* $\Delta G_{\text{obs}} = RT \ln IC_{50}$ (T = 310 K).

【結果および考察】

疎水性パラメータ (Clog *P*)が MMP 阻害剤の活性予測に有用であることが既に報告されているため [4], まず, Clog *P*を用いた古典 QSAR 解析により実測の ΔG_{obs} の予測を行った. 図 1a に示すように, types **I**, **II** 化合物のそれぞれの系列内では疎水性の増大に伴い ΔG_{obs} が線形に増大することが確認できるが, 2 系列の化合物間の活性差, すなわち, hydroxamic acid (type **II**)のほうが carboxylic acid (type **I**)に比べて高活性であることを説明できていない. また, docking 計算により見出した最安定配座における結合エネルギー (docking energy)を用いて予測した場合も, 古典 QSAR 解析と同様の結果である (図 1b). このことは, Clog *P*や docking energy が標的受容体である MMP-12 の構造情報を含んでいないあるいは十分に評価できていないことに起因している. 一方で, LERE-QSAR 解析の結果, ΔG_{obs} の変動を定量的に説明可能な相関式 ($\Delta G_{\text{obs}} = 0.226 (\Delta E_{\text{bind}} + E_{\text{disp}} + \Delta G_{\text{sol}}) + 16.9$; $n = 8$, $r = 0.968$, $s = 0.670$, $F = 88.5$)を得ることができた. 古典 QSAR 解析や docking 計算 (図 1a, b)とは異なり, 実測値と計算値 (ΔG_{obs} と ΔG_{calc})との間には良好な線形関係があることを確認できる (図 1c).

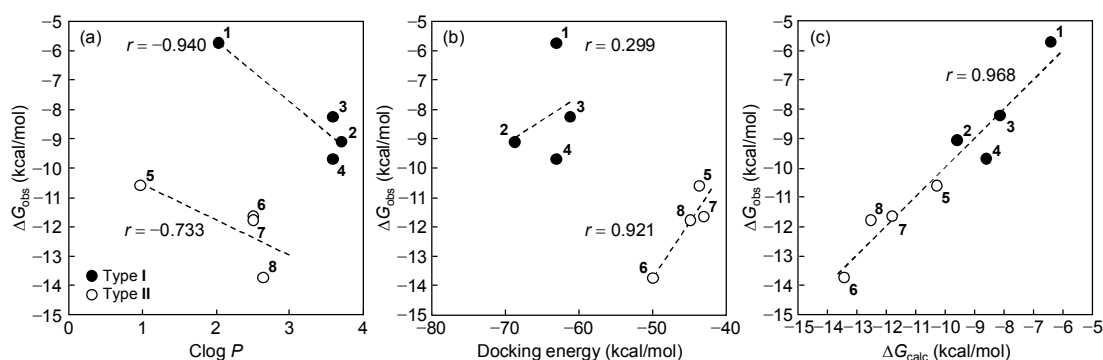


図 1. ΔG_{obs} と(a) Clog *P* (古典 QSAR 解析), (b) Docking energy (docking 計算), (c) ΔG_{calc} (LERE-QSAR 解析)のプロット

LERE-QSAR 解析により得られた各エネルギー項の寄与を図 2 に示す. ΔE_{bind} と ΔG_{sol} の変動は大きい, 両者の間には良好な逆相関関係が成立している ($\Delta G_{\text{sol}} = -0.585 \Delta E_{\text{bind}} + 89.8$; $r = -0.971$). すなわち, 結合相互作用による安定化は, 脱水和による不安定化により減弱される. しかしながら, ΔE_{bind} の寄与が ΔG_{sol} の寄与よりも相対的に大きい. その結果, 両者の和である静電相互作用エネルギー ($\Delta E_{\text{bind}} + \Delta G_{\text{sol}}$)の 2 系列の化合物間の差が, carboxylic acid (type **I**)と hydroxamic acid (type **II**)の活性差に対応することになる. 一方で, E_{disp} の変動は, 4 種類の aryl 基の活性変動と良好に相関している ($r = 0.954$ (type **I**), 0.946 (type **II**)). 以上より, MMP-12 と一連の arylsulfone 誘導体の複合体形成に伴う実測の ΔG_{obs} の変動に対して, 両分子間における分散力も含めた結合相互作用 ($\Delta E_{\text{bind}} + E_{\text{disp}}$)が最も支配的な役割を果たしていると結論づけられる.

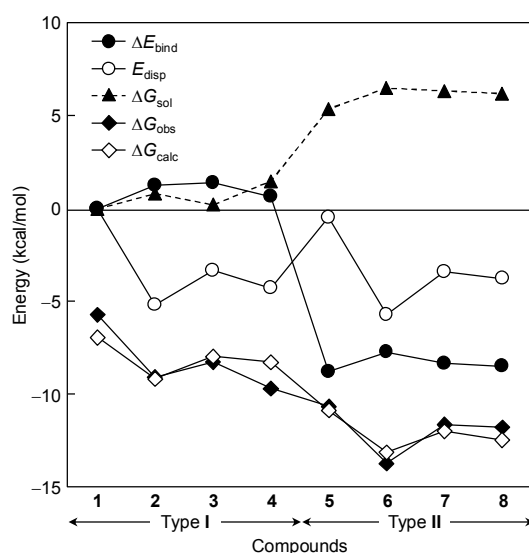


図 2. MMP-12 と arylsulfone 誘導体の複合体形成に伴う各エネルギー項の変動 (compound **1** を基準として表す)

- [1] Molet, S. *et al.*, *Inflamm. Res.* **2005**, *54*, 31–36.
- [2] Nuti, E. *et al.*, *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 6347–6361.
- [3] Hitaoka, S. *et al.*, *J. Pestic. Sci.* **2013**, *38*, 60–67.
- [4] Verma, R. P. *et al.*, *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 2223–2268.

4C06

同化型亜硝酸還元酵素における全化学反応の理論的解明

(¹筑波大、²広島大)○庄司光男,¹ 田中弥,¹ 氏家謙,¹ 栢沼愛,¹ 梅田宏明,¹ 重田育照,¹
中野祥吾,² 片柳克夫²

Theoretical elucidation on the full chemical reactions of assimilatory nitrite reductase

(¹Univ. Tsukuba, ²Hiroshima Univ.) ○Mitsuo Shoji,¹ Wataru Tanaka,¹ Yuzuru Ujiie,¹ Megumi Kayanuma,¹
Hiroaki Umeda,¹ Yasuteru Shigeta,¹ Shogo Nakano,² Katsuo Katayanagi²

[序]

同化型亜硝酸還元酵素(aNiR)は NO₂⁻を NH₄⁺に還元する反応を担っている。植物や藻類、シアノバクテリアは環境から窒素源(NO₃⁻)を吸収し、NH₄⁺に変換することでアミノ酸等の生合成の窒素源にしている。本窒素同化作用は植物の成長に著しく影響を与えているため、aNiRの反応はまさにその鍵となる反応である。

aNiRの反応は6電子移動と8つのプロトン移動が絡む極めて複雑な反応であり、反応中心にシロヘムと[4Fe-4S]クラスターの補欠分子を持つ特徴的構造を有している。そのため、理論的にも取り扱いが難しく、素反応過程については未だ明らかにされていなかった。

我々は近年片柳グループにより解かれたタバコ由来亜硝酸還元酵素の超高分解能X線結晶構造[1,2]をもとに、高精度な量子力学/古典力学混合法(QM/MM法)を用いる事で、すべての反応変化について理論的に網羅的解明を試みた。

[方法]

QM/MMモデルにはaNiRを水球で覆ったモデル(図1)を構築した。QM領域には活性中心近傍の原子を選んだ。計算レベルは(UB3LYP/6-31G*)/Amber99を用いた。本モデルはaNiRの反応を記述する為に十分なサイズと計算レベルでの取り扱いである。QM/MM計算にはNWChemプログラムパッケージを用いた。多くの計算資源が必要となるため、国内のスーパーコンピュータ(COMA@Univ.Tsukuba, SystemB@ISSP, Fx10@Univ.Tokyo)を利用した。

[結果と考察]

プロトン化と還元過程について網羅的に解析する事で、反応過程を検討した。その結果、還元は1ステップずつ起こるのが最も容易である事を明らかにした(図2)。NO結合乖離と水分子の生成箇所については、反応中間体を検出したX線結晶構造[2]の結果と良い一致が見られた。活性中心のシロヘム近傍には多くの塩基性アミノ酸残基(Arg, Lys)が存在し、正電荷のチャンネルを形成している。これらは負電荷を持つ基質(NO₂⁻)と電子移動に大きな影響を与えており、反応過程における活性中心の電荷を強く制御していた。

本研究により、aNiRの全反応機構を初めて明らかにした。得られた反応経路、反応エネルギー、活性中心における構造変化について詳しく議論する。

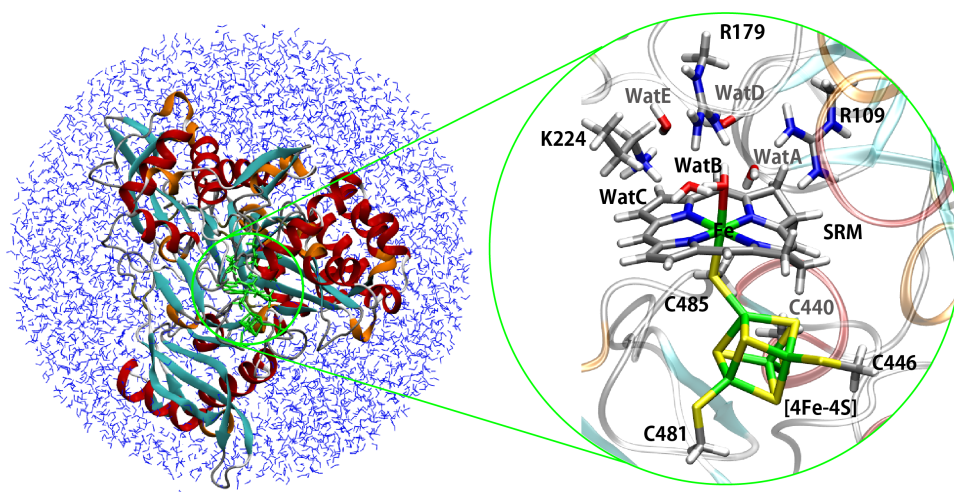


図 1. 同化型亜硝酸還元酵素(aNiR)の QM/MM 全系(左)と QM 領域拡大図(右)。

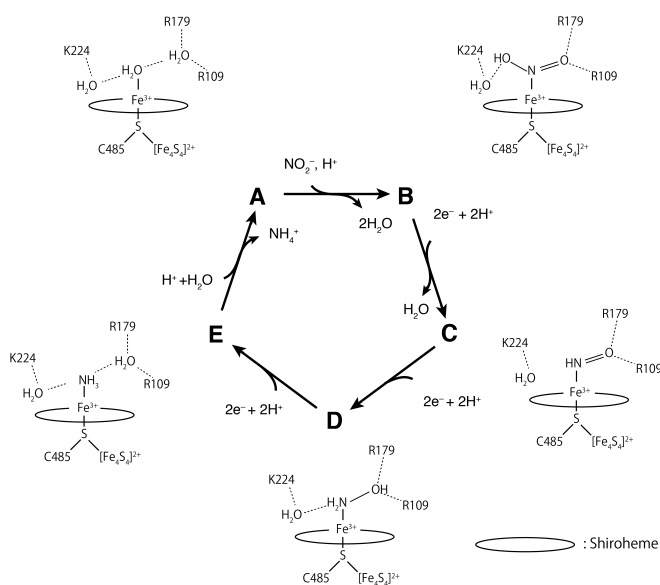


図 2. QM/MM 計算から得られた反応機構 (2 電子還元ごとの構造変化を記載)。

[謝辞]

(1)筑波大学計算科学研究センター・学際共同利用プログラム, (2)東京大学情報基盤センター・共同利用, (3) 東京大学物性研究所・共同利用

[参考文献]

- [1] S. Nakano, et al, protein science, 21, 383-395 (2012).
- [2] S. Nakano, et al, proteins, 80, 2035 (2012).

4C07 酵素の基質結合と大規模構造変化に関する理論的研究

(阪大院・基礎工¹、筑大院・数理²、JST,CREST³)

○馬場剛史¹、原田隆平²、中野雅由¹、重田育照^{2,3}

Theoretical study on substrate binding process and dynamical conformational change of enzyme

(Osaka University¹, University of Tsukuba², JST-CREST³)

○Takeshi Baba¹, Ryuhei Harada², Masayoshi Nakano¹, Yasuteru Shigeta^{2,3}

【背景】 基質は酵素に結合すると、一部の酵素は、基質の結合に伴って大きな構造変化を引き起こすことが X 線結晶構造解析などの実験から示唆されており、しばしば誘導適合と呼ばれている。本研究で対象としているナイロンオリゴマー分解酵素 (NylB) も誘導適合する酵素の 1 つである。NylB の基質である ALD(Ahx-liner dimer)が結合すると、ループ領域(Gln166-Val177)にある Tyr170 が ALD と水素結合を形成し、大規模な構造変化を起こすことが明らかにされている[1]。一般的にループ移動のような大規模構造変化や基質結合などは、通常短い時間での古典分子動力学法では、検出することは非常に困難であることが知られている。この問題を解消するために、レプリカ交換法やメタダイナミクス法などの手法が開発されているが、本研究では、PaCS-MD(Parallel Cascade Selection-MD)法を適用した[2]。本手法は、異なる初期構造が用意された多数の MD 計算を完全な分散環境で実行し、その情報をもとに構造を効率よくサンプリングする点が特徴である。本研究では PaCS-MD の重要な要素である selection ルールについて再検討し、ナイロンオリゴマー分解酵素の誘導適合過程や基質結合過程を明らかにすることに取り組んだ。

【理論と計算手法】 PaCS-MD は短い MD 計算によって得られたアンサンブルから、事前に決めた selection ルール (例えばアミノ酸残基間距離が小さくなるなど) に基づいてランキングし、その上位を初期構造として再度短い MD 計算を実行するプロセスを 1 cycle とする手法である。この一連の作業を繰り返すことで、大規模な構造変化などの検出を可能としている。本研究ではナイロンオリゴマー分解酵素に対して本手法を最適化するため、5 種類の selection ルール「距離 : (a) d_1 が小さい (b) d_2 が小さい (c) d_1, d_2 のどちらかが小さい。(50:50 で選択) RMSD:(d) 構造全体の終構造に対する RMSD が小さい(e) 構造の一部 (ループ領域と酵素) の終構造に対する RMSD が小さい」について検討した。 d_1, d_2 をそれぞれループ領域と酵素間(Glu168-Ser217)、基質と酵素間(Tyr170-Ald393)を評価する距離として定義する。その後、得られた軌跡とアンブレラサンプリング法を利用して、 d_1 と d_2 に対する自由エネルギー解析を実行した。

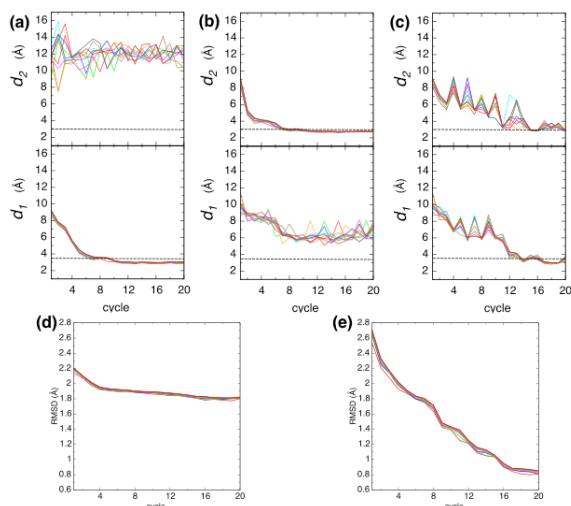


図 1 PaCS-MD の結果

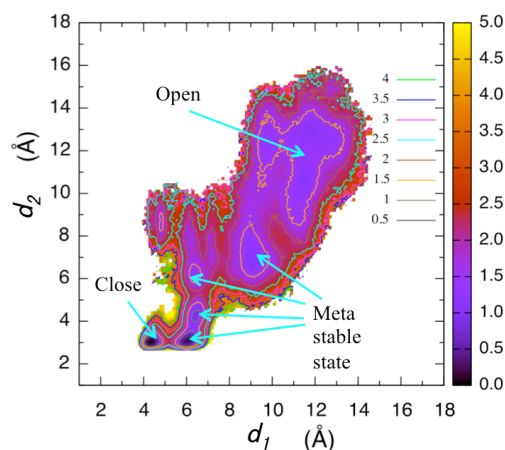


図 2 誘導適合の自由エネルギー解析結果

【結果】 図 1 に PaCS-MD を 20cycle 実行した結果を示す。その結果、距離で検討した場合、(a)や(b)のような片方の距離だけを条件にした場合うまく最終構造にたどり着かないことが判明した。これは2つの距離 (d_1 、 d_2) に関連するループ領域に含まれるアミノ酸(Glu168 と Tyr170)が協同的な構造変化をすることによってループ移動を伴う構造変化を制御していることを示唆している。実際2つの距離を考慮した (c) の場合、うまく選択されたことによって最終構造付近への構造変化が観測されている。一方、RMSD で検討した場合、全体構造に対する RMSD で評価を行った(d)では、うまく最終構造にたどり着くことはできなかった。これは、今回取り上げたループ移動の変化が酵素の一部のみで生じる変化であったことが大きく影響していると予想される。従って、変化する部位のみに着目した(e)の条件で PaCS-MD を実行したところ、素早く構造変化し、5つ条件の中で最も終構造に近づく結果となった。そこで、本研究では(e)で得られた構造変化とアンブレラサンプリング法を利用することによって、図 2 に示すような自由エネルギー地形が得られた。その結果、ループ移動前 (Open 構造) からループ移動後 (Closed 構造) への構造変化過程において4カ所の準安定点が存在することが明らかとなった。また、ループ部位の詳細な移動経路としては、今回判明した準安定点をうまく段階的に通過することによって、構造変化していることが判明した。さらに、Open 構造から Closed 構造への構造変化に伴い、約 1.4 kcal/mol の安定化が得られることも分かった。本研究では基質が酵素の外から内部へ移動する基質結合過程についても selection ルールを再検討することによって、検出することに成功しているが、その詳細な結果については当日報告する。

【参考文献】

- [1] Y. Kawashima *et al.*, *FEBS journal* (2009) 276, 2547.
- [2] R. Harada *et al.*, *J. Chem. Phys.* (2013) 139, 035103.
- [3] T. Baba, *et al. J. Comp. Chem.* (2014) 35, 1240.

4C08

超音波によるアミロイド線維の破壊過程の分子動力学シミュレーション

(分子研, 総研大) ○奥村久士, 伊藤暁

Nonequilibrium Molecular Dynamics Simulations of Amyloid Fibril Disruption by Ultrasonic Cavitation

(Inst. Mol. Sci., SOKENDAI) ○Hisashi Okumura and Satoru G. Itoh

【序】アミロイド線維はタンパク質が間違っただけで折りたたみ、凝集することによってできた不溶性の線維である。アミロイド線維は20種類以上の病気の原因と考えられている。例えばアルツハイマー病はアミロイド β ペプチドが凝集してできたアミロイド線維が原因ではないかと言われている。近年、超音波を使ってアミロイド線維を破壊する実験報告がいくつかなされている。その破壊メカニズムはキャビテーション（気泡生成）によるものではないかと指摘されているが、水中の気泡がどのようにアミロイド線維を破壊するのか原子レベルでの詳細は分かっていない。そこで我々はアミロイド β ペプチドからなるアミロイド線維に超音波をかけた非平衡分子動力学シミュレーションを行った[1]。

【方法】12本のアミロイド β ペプチドからなるアミロイド線維、10169個の水分子、12個のカリウムイオンをシミュレーションボックスに用意した。タンパク質の力場にはAMBER parm99SBを、水にはTIP3Pを用いた。静電相互作用の計算はエwald法で行なった。時間ステップ幅はタンパク質については0.5 fsに、水分子については4 fsに設定した。水分子は剛体として扱い、温度は能勢・フーバー熱浴、圧力はアンダーセンの方法を使って制御した[2]。まず平衡化のための分子動力学シミュレーションを行った。その後、気泡が発生する条件を調べるため、一定の負圧における分子動力学シミュレーションを1 ns行った。その結果、-100 MPaで気泡が発生することがわかった。以上の予備シミュレーションから以下のように-100 MPaから300 MPaの間でサインカーブ状に時間変化する圧力をかけて非平衡分子動力学シミュレーションを行った。

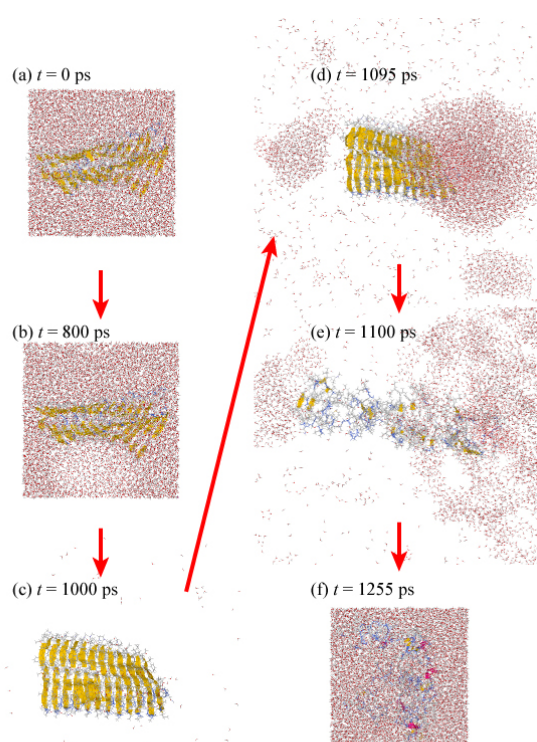


図1: アミロイド β ペプチドの非平衡分子動力学シミュレーション。気泡がつぶれるときにアミロイド線維が破壊されている。

ーションを 10 ns 行った。

【結果と考察】シミュレーションの結果を図 1 に示す。圧力が正の時はアミロイドや水の構造に大きな変化は見られないが、負になった時にアミロイドの周りに気泡が生じた。この気泡は膜貫通領域 (29-42 番目のアミノ酸残基) の疎水性残基の周りに生じることが多かった。アミロイドの周りの水がほぼ蒸発し気泡に包まれてもアミロイドは壊れなかった。その後圧力が再び正になると、気泡が崩壊し水の液滴がアミロイドにぶつかり、アミロイドが破壊された。この時、水は主に非膜貫通領域 (17-28 番目のアミノ酸残基) の親水性残基めがけて飛んでくるのが分かった。

異なる長さのアミロイド線維についても同様のシミュレーションを行ったところ、アミロイド線維が短いほど気泡はできにくく、アミロイド線維が壊れにくいことが分かった。実験によりアミロイド線維を超音波で断片化すると、その長さがほぼ等しくなることが発見されている[3]。我々のシミュレーション結果はこの実験事実を次のように説明できる。超音波をかけると、ある程度長いアミロイド線維は気泡ができて破壊されるが、短いアミロイド線維は気泡ができないので破壊されない。そのため、超音波をかけるとアミロイド線維の長さがそろるのである。

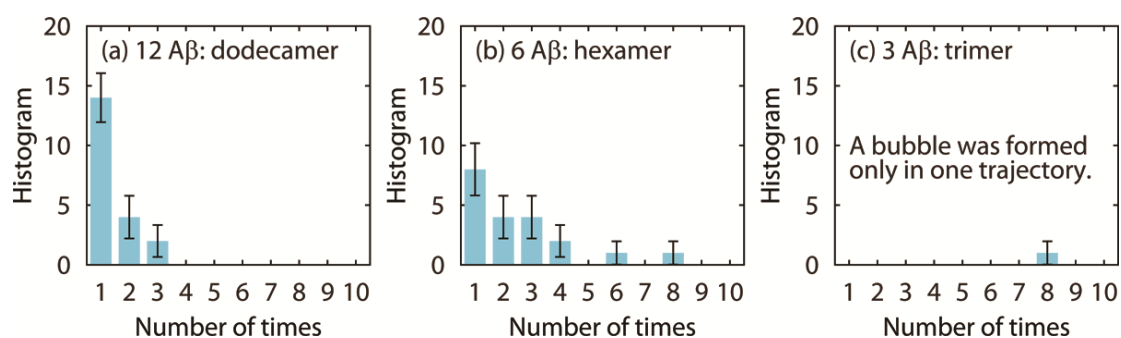


図 2 : アミロイド線維が何回目の負圧で破壊されたかを示すヒストグラム。(a) 12 量体、(b) 6 量体、(c) 3 量体。

【参考文献】

- [1] H. Okumura, S. G. Itoh: *J. Am. Chem. Soc.* **136** (2014) DOI: [10.1021/ja502749f](https://doi.org/10.1021/ja502749f)
- [2] H. Okumura, S. G. Itoh, Y. Okamoto: *J. Chem. Phys.* **126** (2007) 084103.
- [3] E. Chatani, Y. H. Lee, H. Yagi, Y. Yoshimura, H. Naiki, Y. Goto: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106** (2009) 11119.

4C09

機能を持った理想的な蛋白質の理論設計

(ワシントン大学・生化) ○小杉 貴洋, 古賀 信康, 古賀 (巽) 理恵,
Baker David

Theoretical Design of Ideal Proteins with a Function

(University of Washington, Department of Biochemistry)

○ Takahiro Kosugi, Nobuyasu Koga, Rie Tatsumi-Koga
and David Baker

【序】 機能を持つ蛋白質を新たに創り出すことは、産業的に有用であるだけでなく、設計原理を探求する過程や設計された蛋白質を評価する過程において、蛋白質の機能をより深く理解することを可能にする。そのため、これまでに数々の蛋白質が設計され、それらの蛋白質が実際に機能を持つ事が実験的に確認されてきた。しかしながら、これまでのデザインは全て天然の蛋白質を基に設計されているため、基にした構造とほぼ同じ主鎖構造を持っており、適用出来る対象や活性の向上に限界があることも報告されている。そのため、任意の対象に高活性な蛋白質を創り出すためには、主鎖構造も一から創る必要があると考えられる。

近年、David Baker らは生体高分子デザインプログラム Rosetta¹ を用いる事で、Kemp eliminase や Retro-aldase といった酵素、ステロイドのような低分子や Influenza Hemagglutinin などの蛋白質に結合する蛋白質、そして自己会合する蛋白質など様々な蛋白質のデザインに成功してきた。これらのデザインでは、望んだ機能を実現出来る可能性が高い主鎖構造を自然界に存在する蛋白質の中から選び出し、そのアミノ酸配列を部分的に変える事により、望みの機能を持たせており、これにより蛋白質のデザインの幅が大きく広がることになった。しかしながら、これらのデザインにおいてさえ、主鎖構造は自然界に存在する構造に限られるため、適用範囲や機能の最適化には限界がある。そこで、主鎖構造を最適化するために、まず自然界には存在しない主鎖構造を自由に創り出す方法が必要となる。近年、理想的な蛋白質の主鎖構造を創り出すための規則が発見され、その規則を用いる事により折りたたみに最適化された様々な理想的な蛋白質構造を一から作り出す事が可能になった²。ここでデザインされた蛋白質は理想的な構造を持っている非常に安定な蛋白質であるが、機能は持っていない。そこで、この方法を発展することにより、主鎖構造を一から創りつつ、機能を備えた蛋白質を作り出すことを試みた。

【方法】 まず、デザインしたい蛋白質の二次構造の配置とそれらのつながり（トポロジー）を決め、そのトポロジーに折りたたみやすいように理想構造を作る規則に従ってその二次構造の長さを決める。ここでは、Phosphate を結合する非常に安定な蛋白質を作るために、Phosphate Binding Loop (P-loop) モチーフが組み込まれたトポロジーを持つ α/β 蛋白質をデザインすることにした。この P-loop モチーフは Kinase などに含まれ GXXXXGK(T/S) という配列をもつ Loop 構造で ATP や ADP などの Phosphate を

結合することが知られている。まず望みのトポロジーをもつ主鎖構造を作り出すために、二次構造フラグメントライブラリからフラグメントを取り出し、それらをつなげていった。そして、このフラグメントを何度も繰り返し置き換えることにより、Rosettaのスコアが低く望みのトポロジーを持つ蛋白質の主鎖構造を作り出した。その後、この主鎖構造に対して、これらを安定にする様に側鎖を発生させた。さらに、その側鎖の二面角をモンテカルロ法により最適化し、全体の原子座標も構造最適化した。こうして候補となる構造を多数作り出し、それらの構造の中から Rosetta スコアの低い構造を選び、P-loop モチーフの近くに Ligand を置いた。そして、P-loop モチーフと Ligand の間に拘束をかけて、側鎖のデザイン、二面角の最適化、構造最適化を再び行った。最後に、デザインされた構造の中から Rosetta スコアの低いものを選び、拘束を外して構造最適化を行った。こうして出来上がったデザイン配列を用いて、何度も構造予測を行い、そこから得られた構造のアンサンブルがデザイン構造の近くまでたどり着く事やファネル状になっていることを確認した。これらを満たしたデザインに対して、実際に実験を行ってそのデザインの正しさを示した。

【結果】 計算機により設計したデザイン配列が、どのように振る舞うのかを実験により確認するために、大腸菌を用いてこの蛋白質を発現し、Ni カラムを用いて精製した。目的の蛋白質が発現されていることは、Mass スペクトルと SDS-PAGE により確認した。次に、円偏光二色性(CD)スペクトルを測定することにより、この蛋白質がデザインした通りの α/β 蛋白質であることが示された。さらに、様々な温度で CD スペクトルを測定した結果、このスペクトルは高温になっても変化することがなく、かなり安定な蛋白質であることを確認した。また、SEC-MALS により、この蛋白質が溶液中でモノマーであることも示された。以上により、デザインされた蛋白質が、適当な構造を保っていることを確認した。次に、表面プラズモン共鳴(SPR)分析法と Fluorescence Polarization 法を用いることにより、Ligand と結合していることを確認した。また、P-loop モチーフに保存されている Lys を変異することにより、Ligand が P-loop モチーフに結合している事も確認した。

【結論】 今回の研究において、デザインするトポロジーに P-loop モチーフという Phosphate を認識する配列を P-loop モチーフが安定になるようにそして結合サイトが十分に確保されるように適切に導入することにより、非常に安定な Phosphate 結合蛋白質を作り出す事に成功した。このようにして結合能力を持つ蛋白質が作られたので、今後このデザインをもとにして、人工進化によりアミノ酸配列を最適化する事や Phosphate 以外の部分も認識出来る主鎖構造や配列を用いる事で、活性を上げていく事が可能である。さらに、今回の研究と同様の手続きは Ligand を結合することが知られている様々なモチーフに対して行うことが可能であり、様々な Ligand を結合する蛋白質をデザインすることが出来る。また、Ligand の結合だけでなく、酵素の活性部位を適切に配置することにより、酵素活性を持つ蛋白質を作る事も可能である。当日時間があればこれについても報告する。

【参考文献】

- [1] Rohl, C. A., Strauss, C. E., Misura, K. M. & Baker, D. Protein structure prediction using Rosetta. *Methods Enzymol.* **383**, 66-93 (2004).
- [2] Koga, N. *et al.* Principles for designing ideal protein structures. *Nature* **491**, 222-227 (2012).