

## トロンビン-基質会合反応におけるナトリウムイオン分布の役割

(名大院・情報科学<sup>1</sup>, JST-CREST<sup>2</sup>)○栗崎以久男<sup>1,2</sup>, 高柳昌芳<sup>1,2</sup>, Chantal Barberot<sup>1,2</sup>, 長岡正隆<sup>1,2</sup>

## Roles of sodium ion's distribution in thrombin-substrate association reaction

(Graduate School of Information Science, Nagoya University<sup>1</sup>, CREST-JST<sup>2</sup>)○Ikuko Kurisaki<sup>1,2</sup>, Masayoshi Takayanagi<sup>1,2</sup>, Chantal Barberot<sup>1,2</sup>, Masataka Nagaoka<sup>1,2</sup>

【序論】セリンプロテアーゼの一種であるトロンビンは、 $\text{Na}^+$ 特異的な酵素活性を示す。これまで、 $\text{Na}^+$ の部位特異的相互作用がトロンビンの酵素活性の原因であると考えられてきた[1]。しかし、その後の研究から、トロンビンの基質認識ポケット、および活性部位の構造は  $\text{Na}^+$ 結合に影響を受けないこと[2]や(図 1)、 $\text{K}^+$ 結合能力を意図して設計したキメラトロンビンで、天然型と比べて、酵素活性に著しく低下することが明らかになった[3]。これらの事実は、トロンビンの酵素活性のメカニズムは、部位特異的な相互作用では、十分に説明できないことを意味する。一方、我々の行ってきた研究から、非部位特異的相互作用もタンパク質機能発現に関係することが示唆されている[4]。そこで、本研究では、トロンビン-基質会合反応において、非結合  $\text{Na}^+$ の持つ役割の検証を行った[5]。

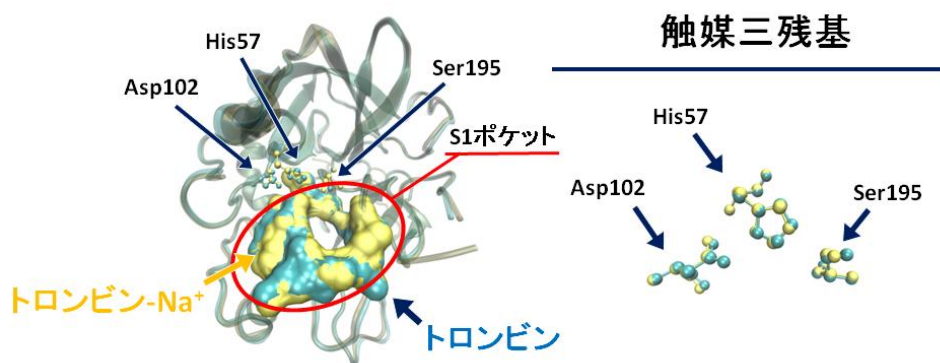


図 1. トロンビン(青)とトロンビン- $\text{Na}^+$ (黄)の構造比較。トロンビンの全体構造(左)および触媒三残基(右)。

【方法】140 mM XCl (X は Li、Na もしくは Cs)の水溶液中にトロンビン- $\text{X}^+$ 複合体分子を配置し、イオンと水分子の配置の異なる初期構造を 100 個用意した。定温定圧条件下(300 K; 1 bar)で、20 ns の分子動力学計算を行った。トロンビン結晶構造を参照構造として、C $\alpha$ 原子についての自乗平均平方根(Root Mean Square: RMS)を計算した。RMS の値が収束する 15 ns 以

降を以下の解析に用いた。トロンビンの表面へのカチオンの配位数を計算し、カチオン数密度の空間分布を可視化した。

【結果・考察】いずれの系でも、カチオン結合部位に安定に結合するカチオンに加え、トロンビンの基質認識ポケット(S1 ポケット)の周りにカチオンの分布が見られた(図 2)。さらに、イオン半径が大きいほど、トロンビンへのカチオンの配位数(Li<sup>+</sup>: 13.99 個、Na<sup>+</sup>: 5.48 個、Cs<sup>+</sup>: 1.70 個)や S1 ポケットから離れた部分での分布が減少することが分かった。トロンビンは基質分子内の正に荷電した残基、Arg や Lys を選択的に認識する。トロンビンに配位しやすい Li<sup>+</sup>は、基質分子がトロンビンと遭遇複合体を形成するのを妨げることが示唆される。Li<sup>+</sup>とは逆に、Cs<sup>+</sup>はトロンビンには配位しにくい。そのためトロンビン表面の負電荷が溶媒側に露出し、S1 ポケットから離れた部位でも、遭遇複合体を形成しやすくなると考えられる。すなわち、Li<sup>+</sup>も Cs<sup>+</sup>も、基質分子の S1 ポケット近傍への接近を阻害し、遭遇複合体形成を妨げる可能性がある。このことから、Na<sup>+</sup>は Li<sup>+</sup>と Cs<sup>+</sup>の中間的な分布を形成することで、S1 ポケット近傍でのトロンビン-基質の遭遇複合体アンサンブル形成を最適化し、会合反応速度を最大化すると考えられる。以上の結果は、非結合 Na<sup>+</sup>がトロンビン-基質会合反応に直接影響することを示唆している。さらに、これを踏まえ、トロンビン周囲の基質分子の分布に対して、カチオンが及ぼす影響を明らかにするため、基質分子を加えた計算を進めている。発表当日は、そちらの結果についても報告する予定である。

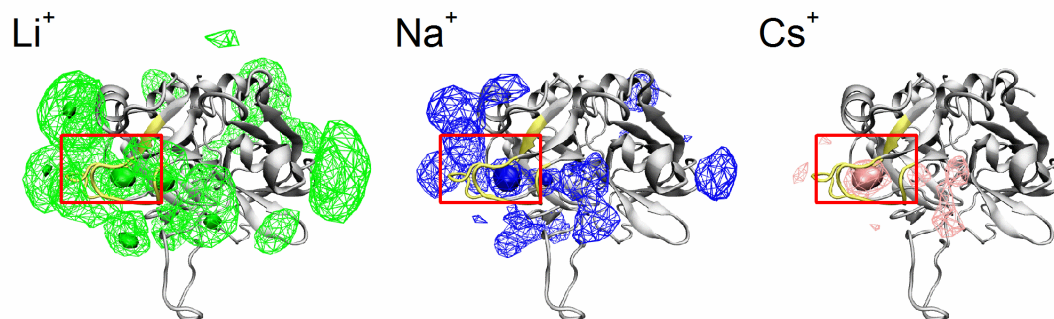


図2. トロンビン周囲のカチオン分布。赤枠はカチオン結合部位およびS1 ポケットの周辺を示す。メッシュと塗りつぶしは、それぞれ、カチオン数密度が  $5\text{\AA}^{-3}$  以上および  $50\text{\AA}^{-3}$  以上の箇所を表す。

#### 【参考文献】

- [1] Di Cera E., Page M. J., Bah A., Bush-Pelc L. A., Garvey L. C., *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2007, **9**, 1292-1306.
- [2] Pineda A. O., Carrell C. J., Bush L. A., Prasad S., Caccia S., Chen ZW., Mathews F. S., Di Cera E., *J. Biol. Chem.*, 2004, **279**, 31842-31853.
- [3] Rana S., Pozzi N., Pelc L. A., Di Cera E., *PNAS*, 2011, **108**, 5221-5225.
- [4] Tanakayagi M., Kurisaki I., Nagaoka M., *Sci. Rep.*, 2014, **4**, doi:10.1038/srep04601.
- [5] Kurisaki I., Takayanagi M., Nagaoka M., *J. Phys. Chem. B*, 2014, **119**, 3635-3642.