

( <sup>1</sup> 阪府大院理, <sup>2</sup> RIMED ) ○野中 康太郎 <sup>1</sup>, 麻田 俊雄 <sup>1,2</sup>, 小関 史朗 <sup>1,2</sup>

## Theoretical analysis of structural basis of specificity of protein inhibitor using free energy component analysis method

( <sup>1</sup> Osaka pref. univ. , <sup>2</sup> RIMED ) ○Nonaka Kotaro<sup>1</sup>, Asada Toshio<sup>1,2</sup>, Koseki Shiro<sup>1,2</sup>

【序論】セリンプロテアーゼであるトリプシンはタンパク質中の塩基性アミノ酸 Lys および Arg を識別し、その隣にあるペプチド結合を切断する。一方その阻害剤 Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor (BPTI) はトリプシンの活性部位に結合し、その働きを阻害するが、その詳細な阻害メカニズムは明らかにされていない。そこで本研究では Free Energy Gradient(FEG) 法 <sup>1</sup> と Nudged Elastic Band(NEB) 法 <sup>2</sup> を組み合わせた FEG-NEB 法による自由エネルギー面上の反応経路最適化を行い、得られた反応経路に対して自由エネルギー成分分割法による残基間相互作用の解析を行うことで BPTI の阻害メカニズムを明らかにすることを試みた。FEG の算出は外場や分子構造の変化に対する分子の誘起分極を高速かつ高い信頼性で計算することができる Charge and atom Dipole Response Kernel(CDRK) モデル <sup>3</sup> を用いて行った。また、モデル分子として BPTI の残基配列の一部を抜き出したものを作成した上で、トリプシン-モデル複合体の反応についても同様に計算を行い、比較検討を行った。

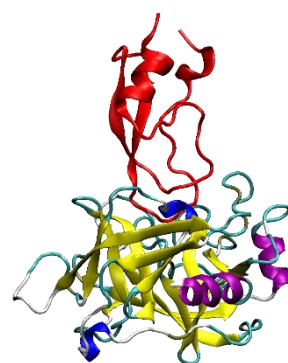


図1 トリプシン-BPTI 複合体の構造. 赤色はBPTIを表している.

【方法】反応経路最適化は FEG-NEB 法を用いて行った。さらに CDRK モデルを用いた自由エネルギー成分分割法を提案した。CDRK モデルでは下記に示す4つの応答核を用いている。

$$\chi_{ab} = \frac{\partial Q_a}{\partial v(\mathbf{r}_b)} = \frac{\partial^2 \langle \psi | \mathbf{H}_{\text{eff}} | \psi \rangle}{\partial v(\mathbf{r}_a) \partial v(\mathbf{r}_b)}, \quad \kappa_{a,rb} = \frac{\partial Q_a}{\partial \mathbf{r}_b^r} = \frac{\partial^2 \langle \psi | \mathbf{H}_{\text{eff}} | \psi \rangle}{\partial v(\mathbf{r}_a) \partial \mathbf{r}_b^r}, \quad (1)$$

$$\gamma_{ra,sb} = \frac{\partial \mu_a^r}{\partial \mathbf{r}_b^s} = - \frac{\partial^2 \langle \psi | \mathbf{H}_{\text{eff}} | \psi \rangle}{\partial \mathbf{E}^r(\mathbf{r}_a) \partial \mathbf{r}_b^s}, \quad \zeta_{ra,sb} = \frac{\partial \mu_a^r}{\partial \mathbf{E}^s(\mathbf{r}_b)} = - \frac{\partial^2 \langle \psi | \mathbf{H}_{\text{eff}} | \psi \rangle}{\partial \mathbf{E}^s(\mathbf{r}_a) \partial \mathbf{E}^s(\mathbf{r}_b)}, \quad (2)$$

$a, b$  は原子のラベルを表し、 $Q, \mu$  は原子上の電荷および原子双極子モーメントを表している。 $\mathbf{r}$  は原子の座標を表し、 $v, \mathbf{E}$  はそれぞれ静電ポテンシャルと電場を表している。CDRK モデルを用いた自由エネルギー成分分割法では、自由エネルギー変化は QM 領域のエネルギー変化と周辺アミノ酸残基からの自由エネルギー変化への寄与  $\Delta A_i$  の和として表すことができる。ここで  $\Delta A_i$  は次式となる。

$$\Delta A_i = \left\langle \frac{\partial E_{\text{QM/MM}}^{\text{pol}}}{\partial \mathbf{r}_{\text{QM}}} \Big|_i + \frac{\partial E_{\text{QM/MM}}^{\text{est}}}{\partial \mathbf{r}_{\text{QM}}} \Big|_i + \frac{\partial E_{\text{QM/MM}}^{\text{vdW}}}{\partial \mathbf{r}_{\text{QM}}} \Big|_i + \frac{\partial E_{\text{QM/MM}}^{\text{cov}}}{\partial \mathbf{r}_{\text{QM}}} \Big|_i \right\rangle_{\mathbf{r}_{\text{MM}}} \cdot \Delta \mathbf{r}_{\text{QM}} \quad (3)$$

ここで QM 領域の分極エネルギー  $E_{\text{QM/MM}}^{\text{pol}}$  および QM-MM 間の静電相互作用エネルギー  $E_{\text{QM/MM}}^{\text{est}}$  の QM 構造に関する微分は, CDRK モデルを用いると以下で表される.

$$\left. \frac{\partial E_{\text{QM/MM}}^{\text{pol}}}{\partial \mathbf{r}_a^r} \right|_i + \left. \frac{\partial E_{\text{QM/MM}}^{\text{est}}}{\partial \mathbf{r}_a^r} \right|_i = -Q_a \mathbf{E}^r(\mathbf{r}_a)_i - \sum_{t \in x,y,z} \mu'_a \left. \frac{\partial \mathbf{E}^t(\mathbf{r}_a)}{\partial \mathbf{r}_a^r} \right|_i + \sum_b \kappa_{b,ra} v(\mathbf{r}_b)_i - \sum_b \sum_{s \in x,y,z} \gamma_{sb,ra} \mathbf{E}^s(\mathbf{r}_b)_i \quad (4)$$

FEG の算出に CDRK モデルを用いる上記手法を QM(CDRK)/MM 法と呼ぶことにする. QM 領域は M06/6-31G(d) を用い, MM 領域は Amber9 の GAFF 力場を用いて計算した.

**【結果】** トリプシン-BPTI およびトリプシン-モデル複合体で起こる反応はアシル化反応と, 脱アシル化反応からなるが, 本発表では律速反応であるアシル化反応について考える. 反応経路最適化を行い, 得られた自由エネルギープロファイルを示した (図 2). トリプシン-BPTI の活性化自由エネルギーの値は 30.1kcal/mol であり, トリプシン-モデルの値 18.4kcal/mol と比較して 11.7 kcal/mol 高く, 熱力学的に不安定な反応であることが明らかである. さらにトリプシン-BPTI のアシル化反応の生成物は 9.8kcal/mol の自由エネルギーを持ち, トリプシン-モデルの値 -3.7kcal/mol と比較して 13.5 kcal/mol 不安定である. このことから速度論的にも反応が進行しにくいことを解明した.

上記の差が得られた理由を明らかにするため, 自由エネルギー成分分割法を用いた解析を行った. 下記に各複合体の分割計算の結果をまとめた (図 3). 遷移状態に及ぼす安定化の寄与に大きな差がみられた成分は, 基質側のアミノ酸残基と QM/MM 結合エネルギーであることが明らかになった.

一方, 生成物の自由エネルギー差には QM エネルギーと QM/MM 結合エネルギーの成分が主に寄与している. また, ここでは示していないがトリプシン-モデル複合体におけるアシル化反応では, 溶媒である水分子からより大きな安定化を受けることも明らかにした. 基質を構成する残基の原子単位での解析結果については, 当日発表する.

### 【参考文献】

1. M. Nagaoka, N. Okuyama-Yoshida, and T. Yamabe, *J. Phys. Chem. A*, **1998**, *102*, 8202-8208
2. N. Takenaka, Y. Kitamura, Y. Koyano, T. Asada, and M. Nagaoka, *Theor. Chem. Acc.* **2011**, *130*, 215-226
3. T. Asada, K. Ando, S. Koseki, M. Nagaoka, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2015**, *17*, 26955-26968

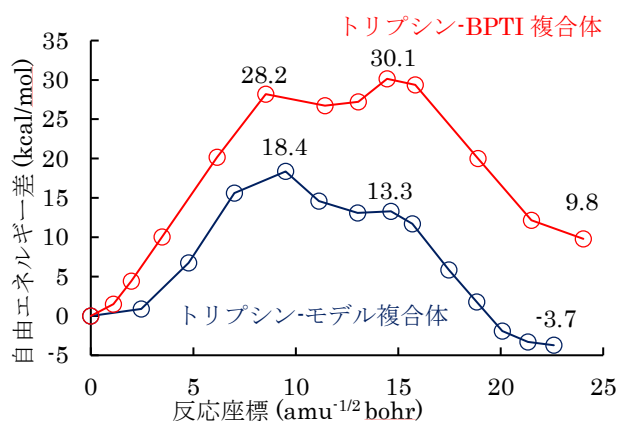


図 2 アシル化反応の自由エネルギープロファイル

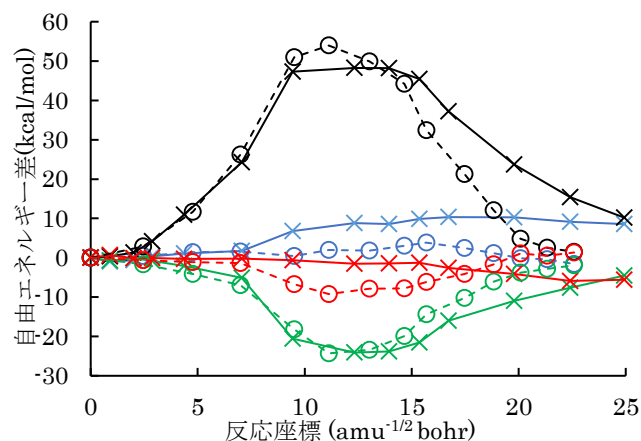


図 3 自由エネルギー成分分割法による解析

実線:トリプシン-BPTI, 破線:トリプシン-モデル, 黒: QM エネルギー, 水色: QM/MM 結合エネルギー, 赤: 基質の各残基からの寄与の和, 緑: 酵素の各アミノ酸残基から受ける寄与の和