

トロンビン基質結合ポケットの脱水和における  $\text{Na}^+$ 結合空洞の役割(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>Role of the  $\text{Na}^+$ -binding cavity for dewetting of thrombin substrate-binding pocket(Graduate School of Information Science, Nagoya University<sup>1</sup>, CREST-JST<sup>2</sup>)○Ikuro 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[1]。このタンパク質は  $\text{Na}^+$ 結合能力を持つことから、 $\text{Na}^+$ との部位特異的相互作用により酵素機能が活性化されると考えられてきた。ところが現在、トロンビンの基質認識ポケット(S1 ポケット)、 $\text{Na}^+$ 結合空洞および活性部位の構造は、 $\text{Na}^+$ 結合によりほとんど影響を受けないことが知られている (図 1A) [2]。さらに、トロンビンは Asp189 により基質の arginine (ArgP1) を認識するが、この ArgP1 と結合  $\text{Na}^+$ とは空間的に近いため、斥力相互作用を及ぼすことでトロンビン-基質複合体を不安定化する可能性がありうる (図 1B)。これらの事実は、部位特異的なトロンビン- $\text{Na}^+$ 相互作用が、機能の活性化とは無関係で、むしろ複合体形成を阻害し、機能発現を抑制することを示唆している。それにも関わらず、実験の技術的制限から、この可能性についての議論はなされてこなかった。そこで、本研究では分子シミュレーションを用いトロンビン-基質複合体形成における  $\text{Na}^+$ 結合の影響を再検証した。

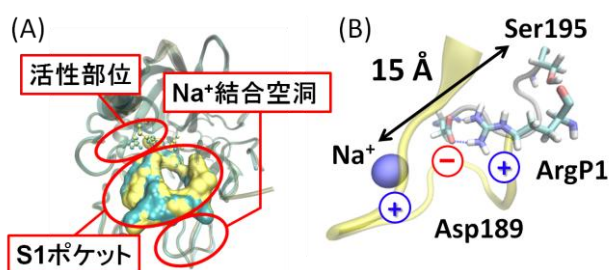


図 1. トロンビンの立体構造。(A)トロンビン(青)とトロンビン- $\text{Na}^+$ (黄)の構造比較。(B)トロンビンの活性部位および  $\text{Na}^+$ 結合空洞。

【方法】140 mM NaCl 水溶液中にトロンビン- $\text{Na}^+$ 複合体と基質分子を配置した。基質のモデル分子として Ace-Pro-Arg-Nme を用いた。500 ns の分子動力学 (molecular dynamics: MD) シミュレーションを行い、トロンビン-基質複合体形成反応が自発的に起こる分子運動トラジェクトリーを得た。基質分子が S1 ポケットに侵入した時点の構造スナップショットを用いて、トロンビン- $\text{Na}^+$ -基質系とトロンビン-基質系をそれぞれ用意した。各々の系について、steered MD シミュレーションを 96 回繰り返して行い、トロンビン-基質複合体形成に必要な仕事を計算した。

【結果・考察】トロンビン-基質複合体形成に必要な仕事を計算したところ、 $\text{Na}^+$ 結合により、3 kcal/mol ほど増加することが分かった。この変化は、 $\text{Na}^+$ と ArgP1 の間に働く斥力相互作用に由来すると考えられる[3]。上記の予想通り、 $\text{Na}^+$ 結合は複合体形成を阻害すると結論した。

これを踏まえ、トロンビンの  $\text{Na}^+$ 結合空洞の役割を再検討することにした。基質分子の基質結合ポケットへの侵入直後では、ArgP1 と

Asp189 はポケット内の水分子により隔てられていた (図 2 左)。そのため複合体形成にはポケットの脱水和が伴う。一方、図 3 に示すように、S1 ポケットは  $\text{Na}^+$ 結合空洞および、他の2つの領域と隣接しており、チャンネルを形成している。このことから、S1 ポケットの脱水和に、このチャンネルが関与している可能性が考えられる。

そこで、トロンビン-基質複合体形成が起こるトラジェクトリーを用いて、Asp189 と基質分子の ArgP1 間の水素結合形成過程のメカニズムを解析した。まず、トロンビンのチャンネル内では、水分子の移動が定常的に起こっていることがわかった (表 1)。また、水素結合形成の直前に ArgP1 と Asp189 を隔てていた水分子は、シミュレーションの最初からその位置にあったわけではなく、系の時間発展に伴い溶媒からチャンネルの中に侵入し、これらの残基の間に移動していたことが確認された [4]。

さらに、脱水和でのチャンネルの役割を明らかにするため、ArgP1-Asp189 間の水素結合形成が起こる際、これらの水分子が ArgP1 と Asp189 の間から移動する経路を調べた。水分子はポケットから直接溶媒中へ移動するのではなく、 $\text{Na}^+$ 結合空洞などの他の空洞へ移動してから、溶媒中に放出されることが分かった (図 2 右)。このことは、基質結合ポケットの脱水和にチャンネルが関与していることを示している。以上の結果を踏まえると、 $\text{Na}^+$ 結合空洞の存在は、 $\text{Na}^+$ 結合能力よりも、むしろ、基質ポケットの脱水和を促進するためにあると考えられる。

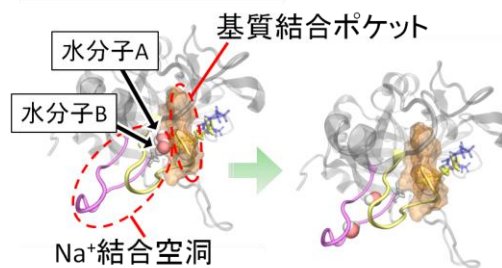


図 2. Asp189 と基質の Arg を隔てる水分子の移動

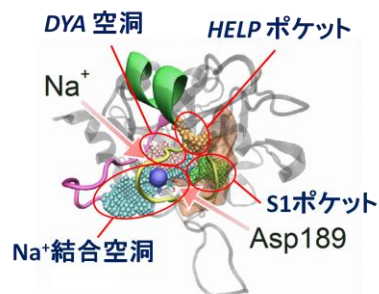


図 3. トロンビン分子内のチャンネルを形成する領域

表 1. チャンネルを形成する領域間での水分子の移動頻度

領域のペア	領域間における水分子の移動頻度 [ $\text{ns}^{-1}$ ]
S1ポケット vs $\text{Na}^+$ 結合空洞	12.51
S1ポケット vs HELPポケット	1.04
S1ポケット vs DYA空洞	53.03

【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] Kurisaki I., Takayanagi M., Nagaoka M., *J. Phys. Chem. B*, 2016, **120**, 4540-4547; [4] Kurisaki I., Takayanagi M., Nagaoka M., *J. Phys. Chem. B*, 2015, **119**, 15807-15812.