

プロリン異性化酵素Pin1における 反応ダイナミクスの理論的研究

¹分子研, ²総研大
○森 俊文^{1,2}, 齊藤 真司^{1,2}

Theoretical study of the reaction dynamics in the peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerizase Pin1

○Toshifumi Mori^{1,2}, Shinji Saito^{1,2}
¹ Institute for Molecular Science, Japan
² SOKENDAI, Japan

【Abstract】 Protein flexibility is essential for enzymes to function, yet the mechanism of catalytic reactions has been highly controversial. Here we study the *cis-trans* isomerization reaction catalyzed by Pin1 to discuss how protein and ligand conformational changes occur along the reaction. While free energy profiles can explain the catalytic effect, we show that the enzymatic reaction proceeds through specific conformations, i.e. excited conformational states formed in the reactant. The transition trajectories therefore do not overcome the barrier in a simple thermodynamic manner. Furthermore, since the excited conformational state is formed by specific hydrogen bonds, the reaction occurs via bond-alternations and the excess energy is efficiently dissipated. As a result, the reaction path is direction-dependent and possesses directionality, i.e. different paths are used depending on the reactant character. We expect that the excited conformational states and specific bond switching mechanisms are embedded in broader enzymes.

【序】 タンパク質の構造は、結晶構造などで見られる最安定構造にとどまらず、様々な時間スケールでダイナミックに動いており、さらにその構造揺らぎが酵素反応において重要な役割を果たすことが近年の NMR や一分子計測などの実験から明らかになってきた。一方で、酵素反応のメカニズムは、主に自由エネルギー面が調べられることがほとんどであり、酵素の構造揺らぎがどのように反応に関与しているか、特にタンパク質の（遅い）集団運動と、化学反応のような局所的な構造変化がどのような相関を持って動いているかなどの動的側面はあまり理解されていない。

本研究では、プロリンのペプチド結合の *cis-trans* 異性化を触媒する酵素である PPIase の一つである Pin1 を例に、基質の異性化と Pin1 の構造変化が反応過程でどのように起こるかを分子シミュレーションにより明らかにする。Pin1 はタンパク質のフォールディングを助ける機能を持ち、その阻害が癌やアルツハイマー病などを引き起こすことから、創薬のターゲットとしても重要なタンパク質である。そのため、これまで実験・理論の両面から研究が行われてきたが、その詳細なメカニズムは依然として分かっておらず、特に理論研究では自由エネルギー面が調べられているのみである。そこで、本研究では特に、自由エネルギー局面に加え、transition path sampling 法を用いて反応の遷移ダイナミクスのサンプリングと解析を行うことで、実際に構造変化が起こる過程の分子機構を明らかにすることを目指す。

【方法 (理論)】 Pin1 の初期構造は結晶構造 (PDB:2Q5A) の WW domain を除いた部分を用い、活性部位に基質として、よく調べられているペプチドである Ace-Ala-Ala-pSer-Pro-Phe-Nme を加えた。水分子として TIP3P モデルを使用し、分子力場には Amber99SBildn に加えペプチド結合の二面角のポテンシャルとして Doshi らの補正[1]を適用した。系を平衡化した後、ペプチド結合の異性化の自由エネルギー曲線を回転角 ζ に関して、 10° 毎に 200ns のサンプリングを行いながら umbrella sampling により計算した。次に、 $\zeta=90^\circ$ において 10ns のサンプリングを行い、遷移状態付近の初期構造を 100 作成し、そこから transition path sampling 法により遷移トラジェクトリの生成を行なった (~500 本)。これを、*cis*→*trans* (fw) および *trans*→*cis* (bw) の 2 つの過程について実行し、また *cis*, *trans* 平衡状態のアンサンブルを得るために、各々 1 μ s ずつのサンプリングを別に行なった。

【結果・考察】 まず、自由エネルギー曲線を基質の水溶液中 (Pin1 なし) の場合の結果と比較したところ、~6 kcal/mol の自由エネルギー障壁の低下が見られ、従来の研究とよく一致した[2,3]。一方で、fw と bw の二つの経路で、特に自由エネルギー障壁近傍に 1~2 kcal/mol 程度の差が見られ、さらに committor analysis などのダイナミクスはより顕著に異なっていたことから、2 つの経路は違っていることが示唆された。

そこで、次に遷移トラジェクトリの解析を行なったところ、まず遷移にかかる時間 (transition path time) はどちらの経路でも ~2 ps 以内に大部分が分布しており、これは Pin1 がいない場合よりも速かった。さらに、recrossing の頻度も Pin1 がある場合の方が少なく、これらは Pin1 の活性サイトが溶液内と比べて固く、異性化反応を効率的に進行させる役割を果たしていることを示唆している。また、fw, bw の 2 つの反応経路における遷移トラジェクトリ中のタンパク質環境を比較したところ、基質の構造や基質と相互作用する Pin1 のアミノ酸の配向、水素結合パターンなどに違いが見られ、またこの違いは *cis*, *trans* 平衡状態におけるタンパク質の構造を反映したものになっていることが分かった (Fig. 1)。同時に、これらの特徴的な構造は平衡状態で広く見られるのではなく、稀に、構造励起状態として存在するものであることが、平衡状態アンサンブルの分布との比較から明らかになった。

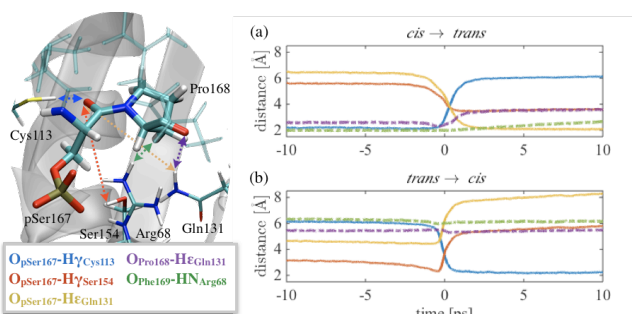


Fig. 1: Key hydrogen bond interactions during isomerization transitions

以上より、酵素反応において、基質とタンパク質の構造変化は最小自由エネルギー経路から示唆されるような同時に起こる過程ではないことが示された。代わりに、異性化反応が始まる前に反応物側の状態でタンパク質が励起構造状態として反応を触媒するような構造をとることが重要であり、そこから数 ps 程度の速い時間で異性化は進行することが分かった (Fig. 2)。この結果は、酵素反応においてタンパク質の“柔らかさ”が果たす動的な役割について分子論的な説明を与えるものであり、他の酵素反応についても同様な機構が見られるものと期待される。

【参考文献】

- [1] U. Doshi, D. Hamelberg, *J. Phys. Chem. B* **113**, 16590 (2009).
- [2] A. I. Greenword et al., *J. Biomol. NMR* **51**, 21 (2011)
- [3] H. A. Velazquez, D. Hamelberg, *J. Phys. Chem. B* **117**, 11509 (2013)

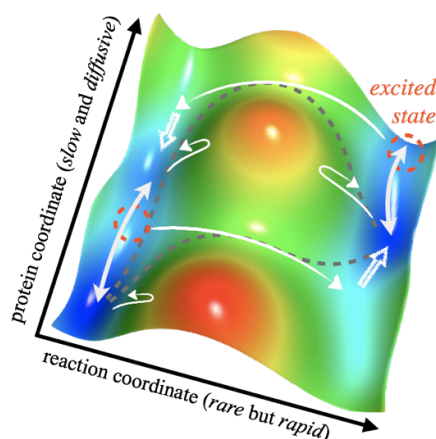


Fig. 2: Proposed reaction scheme