

トロンビン分子内部空洞内の水分子移動が 基質会合速度に及ぼす影響に関する理論的研究

¹名大院・情報, ²CREST
○栗崎以久男^{1,2}, 長岡正隆^{1,2}

Theoretical study on the effect of water transfer inside thrombin molecular interior cavity on substrate-association rate

○Kurisaki Ikuo^{1,2}, Masataka Nagaoka^{1,2}
¹Graduate School of Informatics, Nagoya University, Japan
²CREST, JST, Japan

【Abstract】 It is an important issue of protein structure-function relationship to understand how water transfer inside protein contributes to protein functional expression. In the present study, we examined role of internal water in substrate binding process considering thrombin, a serine protease playing key role in blood coagulation. Using molecular dynamics simulations, we analyzed the effect of evolutionally conserved 228th tyrosine located inside thrombin interior. Our simulation results revealed that replacing the tyrosine with alanine promotes substrate binding via the specific intermolecular interaction formation. Room to improve the activity rather suggests that moderate thrombin activity is important in correct regulation of blood coagulation cascade. We concluded that such promotion of substrate binding is associated with increased mobility of water in thrombin interior.

【序】 タンパク質内部空間にある水分子の移動とタンパク質機能発現の関係を理解することは、タンパク質構造機能相関研究における重要な課題の一つである。そこで本研究では、血液凝固に関わるセリンプロテアーゼ・トロンビンについて、基質結合空洞 (S1 ポケット) にある水分子に注目し、その挙動が基質会合に果たす役割を調べた。トロンビンのアスパラギン酸 189 (Asp189) と基質分子のアルギニン P1 (ArgP1) が水素結合を形成する際、これらの残基を空間的に隔てる水分子は、トロンビンの Na⁺結合空洞を通り排出される (Fig. 1) [1]。一方、Na⁺結合空洞の近傍にあるチロシン 228 (Tyr228) は、アラニン 183 (Ala183) および Asp189 と協同して、水分子を捕捉することが示唆されている (Fig. 2)。このチロシンは、トロンビンだけでなく、セリンプロテアーゼについても高い割合で保存されている。その変異はトロンビン内部空間での水分子の挙動に影響し、基質結合の障害に働くと考えられる。この仮説を検証するために、分子動力学 (molecular dynamics: MD) シミュレーションを用いて、Tyr228Ala 変異が基質会合の進行に及ぼす影響を調べ、更に、そのメカニズムを S1 ポケット近傍での水分子移動の動的性質に基づき解明することを試みた[2]。

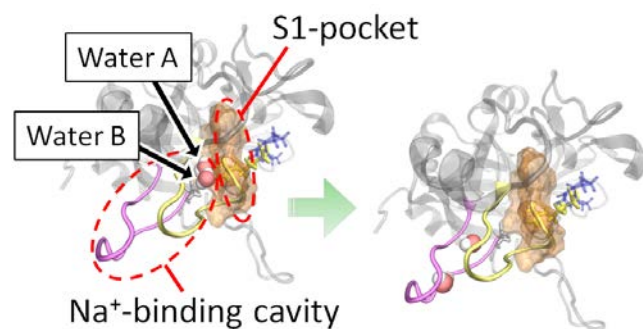


Fig. 1. Evacuation of water molecules separating Asp189 and ArgP1 upon substrate binding.

【方法 (実験・理論)】 140 mM NaCl 水溶液条件を模した周期的境界ボックスに天然型トロンビン- 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。NPT 条件下 (300 K, 1 bar) で 50 ns の MD シミュレーションを行い、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得た。この構造を天然型トロンビン- Na^+ -基質複合体系 (WT) の初期構造とした。また、これを用いて *in silico* モデリングを行い、トロンビン Tyr228Ala 変異体- Na^+ -基質複合体系 (Y228A) の初期構造を用意した。各々の系について、(1) NPT 条件下 (300 K, 1 bar) の steered MD (SMD) で基質会合過程をシミュレートし、(2) その分子運動トラジェクトリーから取り出した構造を用いて NVT 条件下 (300 K) でアンブレラサンプリングシミュレーションを行い、(3) その結果を元に基質会合の平均力ポテンシャル (potential of mean force: PMF) を計算した。熱揺らぎの PMF への影響を考慮して、この手続きを 60 回繰り返した。この 60 本の SMD トラジェクトリーから 12 本を任意に選び、基質分子の ArgP1 が Asp189 に接近する直前の構造を用いて、NPT 条件下 (300 K, 1 bar) で 50 ns の MD シミュレーションを行った。この計算結果を用い、S1 ポケット内部での水分子移動の動的性質を解析した。

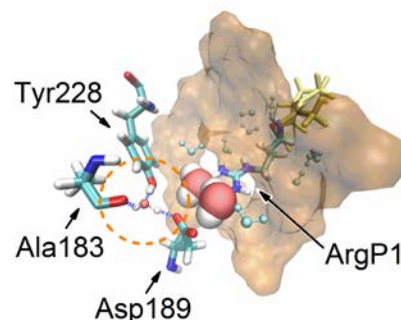


Fig. 2. Water capturing with Ala183, Asp189 and Tyr228 (highlighted in orange circle).

【結果・考察】 Fig. 3 に基質会合過程の PMF を示す。Y228A 変異により基質会合の活性化障壁が低下する。すなわち WT よりも基質会合が起こりやすくなる。それにも関わらず、Tyr228 が進化的に保存される理由は、一つは、チロシンからアラニンへと変異する過程で、アルギニンのように、基質会合を阻害することでトロンビンの機能を損なうアミノ酸残基が現れるためかもしれない。一方で、セリンやフェニルアラニンなど、比較的アラニンと性質が近い残基を経て、Y228A に至る経路も存在する。それでもアラニンへの変異が起こらない理由は、トロンビンの活性の増加が血液凝固反応系を不安定化し、個体の生存に不利に働くためではないかと思われる。

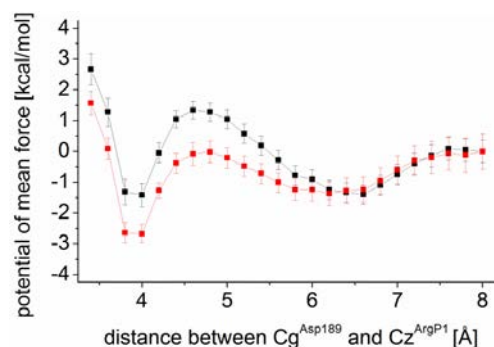


Fig. 3. Potential of mean force for ArgP1's heading for Asp189. Black and red lines are for WT and Y228A.

次に、Tyr228Ala 変異により活性化障壁が低下するメカニズムを明らかにするため、Asp189-ArgP1 結合部位近傍での水分子に注目、12 本の MD シミュレーションから得られた分子運動トラジェクトリーを用いて、Asp189 と ArgP1 の間にある水分子移動の動的性質を解析した。Asp189 と ArgP1 の間への水分子滞在の時定数 (τ_{res}) および、そこから水分子が放出されるまでの時定数 (τ_{lat}) は、WT よりも Y228A の方が小さいことが分かった (Table 1)。これを踏まえ、Asp189 と ArgP1 の間から水分子が排出されやすいほど、ArgP1 が Asp189 に接近する機会が増え、その結果、基質結合過程の活性化障壁の低下につながると結論した。

Table 1. Time constant for transfer dynamics of water appearing around Asp189 and ArgP1.

system	time constant [ps]	
	τ_{res}	τ_{lat}
WT	69.84 ± 4.16	161.90 ± 15.06
Y228A	48.85 ± 2.10	87.91 ± 6.50

【参考文献】

- [1] Kurisaki I., Barberot, C., Takayanagi M., Nagaoka M., *J. Phys. Chem. B*, 2015, **119**, 15807-15812.
- [2] Kurisaki I., Nagaoka M. *To be submitted.*