

触媒リレー系における低障壁水素結合

(京大院理) ○石田豊和、加藤重樹

はじめに

活性中心にセリン残基を持ちセリンプロテアーゼと総称される一群の加水分解酵素は、過去に多くの研究がなされて現在では最も良く分かった酵素の一つと言われている。すべてのセリンプロテアーゼは活性部位に His57、Asp102、Ser195 といったアミノ酸残基の組 (catalytic triad) を持つが、個々のアミノ酸残基が触媒過程でどのような役割を果たすかの詳細は現在でも良く分かっていない。かつては Asp102 の負電荷が His57 の互変異性を介して Ser195 に移り、水酸基をアルコキシド基に解離させて反応性を高めるという「電荷リレー仮説」が注目を集めたが、多くの実験的、理論的研究から現在では支持されていない。Ser195 の求核性を説明する最も有力な反応機構として現在注目を集めているのが、いわゆる「低障壁水素結合」仮説である。この仮説は、His57 と Asp102 の間に結合距離が短くて強い水素結合が形成されて、遷移状態が安定化される事が活性化エネルギーの低下に重要だと主張する。低障壁水素結合仮説を支持する実験的根拠は幾つかあるが、最も強い証拠として考えられているのは NMR 化学シフトの異常な低磁場側へのシフトである。実験的には遷移状態中間体が補足できないので、アナログ分子を用いた実験から NMR スペクトルが計られ、仮説に矛盾しない結果が得られているが、現段階では異論も多い。そこで理論的手法でこの仮説の妥当性を検証するために、タンパク質環境を考慮した具体的な分子モデルに基づいて化学シフトを計算する事を試みた。

計算方法

すべての計算は、研究室で独自に作成した *ab initio* QM/MM 電子状態計算プログラムを基に行っている。化学シフトを計算するルーチンも、QM/MM の枠組みの下で上記のプログラムに組み込んだ。MM 部分の記述には AMBER(parm. 96) を使用して、タンパク質からの影響は MM 原子のサイト上に定義される部分電荷のみに依るものとし取り扱っている。計算手法は標準的な QM/MM-GIAO で、現在の段階では HF レベルの計算を行っている。

対象となる分子システムとして、過去の研究で用いたトリプシン-基質複合体の構造を使用した。本研究において注目する点は、反応の進行に伴って変化する catalytic triad 内外の水素結合の構造変化と、それに比例した NMR 化学シフトとの相関である。また His57-Asp102 の水素結合の強さとの比較を明確にするため、天然型酵素に加えて Asn102 変異型酵素を用いた計算も行った。すべての計算においては、過去の自由エネルギープロファイル解析の結果から得られた、反応座標に沿って構造最適化された構造をもとに行った。電子状態計算における基底関数は 6-31(+)G*(*)、(aug)-cc-pVDZ の 2 種類を比較し、

また QM 領域の大きさを変化させて得られる値を検討した。基本的に化学シフトは、構造最適化された rigid なタンパク質の構造をベースに一点計算で得られた値を評価しているが、現在問題にしている「強い」特殊な水素結合に対しては、分子内運動に起因した熱平均をとることが重要だと考えられる。そこで、His57 から Asp102 へのプロトン移動に伴った自由エネルギープロファイルを *ab initio* QM/MM、MD-FEP 計算によって求めて、これを用いて熱平均値を算出した。

結果

ES 錯体形成時の His57-Asp102/Asn102 間のプロトン化学シフトを、天然型酵素、Asn102 mutant の両者に対して計算して、隣接残基が His57 の電子的な性質に及ぼす影響を調べた。変異型酵素の場合、His57-Asn102 間のプロトン化学シフトは 10.8 ppm で、Ser195 のヒドロキシルプロトンの化学シフトは 5.2 ppm である。これに対して天然型は、それぞれ 15.6 ppm、6.9 ppm といった値を示し、Asp102 の存在下で His57 の性質が大きく変化し、さらにこれは His57 を介して His57-Ser195 間の水素結合にも大きな影響を与えている事が確認された。両者の比較から、天然型酵素の場合 ES 錯体形成時から His57 の δ 位のプロトンは異常な電子環境に置かれている事が確かめられた。

また天然型酵素の場合、四面体中間体を形成した際には His57-Asp102 間の水素結合距離は短くなり (~ 2.65 Å)、実際に化学シフトが低磁場側 (~ 17.8 ppm) に大きくシフトしている事が確認された (変異体酵素では認められない)。アナログ分子で Ser195 を阻害したキモトリプシンを用いた場合の実験値では、 ~ 19 ppm と報告されている。上記の rigid な構造を基に算出した値は若干小さく出るが、His57-Asp102 間のプロトン移動に伴った自由エネルギープロファイルをもとに熱平均をとった場合では、 ~ 21.2 ppm と、かなり低磁場側にシフトした値が得られる。今回用いた手法を考えると、動的平均を考慮した値を正しく見積もる事は難しいが、定性的に実験結果をよく再現できている結果が得られた。同様に His57 と Val213 ~ Ser214 の主鎖間での一種の水素結合の存在も、His57 の ϵ 位のプロトンの化学シフトの計算から確かめられた (四面体中間体を形成した時には、1 ppm 程低磁場側にシフトしている)。

過去に報告したように、セリンプロテアーゼの触媒作用で最も重要なファクターは、遷移状態 (反応中間体) に対するタンパク質内の極性環境に由来した静電相互作用である。本研究で得られた結果は、主として水素結合形成による静電相互作用が重要だとする反応機構を、さらに裏付ける結果となったと言える。