

3P063 プロリルイソメラーゼの基質特異性に関する理論化学的研究

(広島大QuLiS¹・広島大院理²・アステラス製薬(株)³)

原田隆範^{1,2}、白井文幸^{1,3}、相田美砂子^{1,2}

【序】プロリンとそのN末端側の残基とのペプチド結合(プロリル結合)は、通常のペプチド結合とは異なり、シス型とトランス型の両方のコンホメーションをとりやすいことが知られている。しかし、タンパク質中においては、プロリル結合はそのタンパク質固有のコンホメーションをとるので、タンパク質のフォールディングの進行には適切なコンホメーションをとることが必要となる。そのため、プロリル結合のシス-トランス異性化反応はフォールディング速度を決定する重要な過程となっている。

この異性化反応を触媒する酵素としてプロリルイソメラーゼが存在し、これにより反応は促進される。このとき、反応の活性値は結合する基質プロリン直前の残基の種類に依存する、すなわち基質特異性を示す。特に、プロリルイソメラーゼの1種FKBPは、シス トランス異性化反応に対して大きな基質特異性を示すことが実験的に調べられている¹⁾。本研究では、FKBPの基質特異性を決定する要因を明らかにするため、FKBPとプロリンを含む種々の基質ペプチドとの複合体についてフラグメント分子軌道(FMO)法²⁻⁶⁾による量子化学計算を行い、(1)異性化反応に伴う構造変化、(2)基質のFKBPに対する親和性について検討を行った。

【計算】タンパク質の複合体は、FKBP(PDB ID: 1FKB(107残基))にシス型・トランス型および遷移状態構造のそれぞれのプロリル結合を含む基質ペプチド(Ala-X-Pro-Phe (X = Leu, Ala, Gly, Glu))を結合させ、水分子を複合体の周囲5Å以内に配置して作成した。それぞれの複合体についてONIOM法により構造最適化したのち、FMO法によるHF/6-31Gを用いた一点計算を行い、複合体の全エネルギーおよびFKBP・基質ペプチドを構成する各残基間の相互作用エネルギーを求めた。また、FKBP-基質ペプチド(シス型)複合体から基質を取り除いたもの・基質のみについても同様のFMO計算を行い、基質の結合エネルギーを求めた。基質(シス型)を725分子の水で取り囲んだ水溶液モデルについても結合エネルギーの計算を同様にしてを行い、水中にある基質のFKBPへの結合しやすさについて比較した。

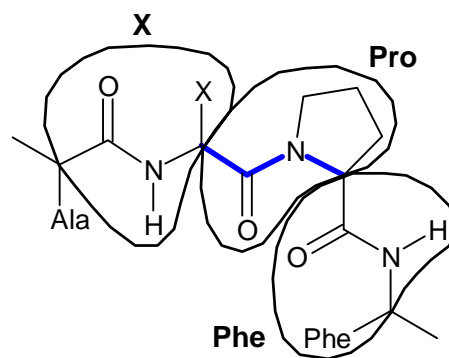


図1 FMO法におけるフラグメント分割方法(青はプロリル結合)

FMO法による計算は、FKBPと基質ペプチドは1残基を、水は1分子を1フラグメントとして行った。図1に基質プロリン前後のフラグメント分割について示した。FMO計算はGAMESSを用いて行った⁵⁾。

【結果・考察】FKBP複合体のFMO計算により得られたFKBP-基質ペプチド間の残基間相互作用エネルギーを比較すると、Xがいずれの基質においても強く相互作用するFKBPの残基は、基質近傍に存在するAsp37, Arg42およびTyr82であった。遷移状態の基質ペプチドについてこれらの残基との相互作用エネルギーのパターンを比較すると、X = Leu, Ala, GlyとX = Gluの基質で違いが見られた(図2)。このときの基質周辺の構造を比較すると(図3)、X = Leu, Ala, Glyの基質においては、いずれもプロリル結合のカルボニル基とTyr82の間に水素結合を形成して

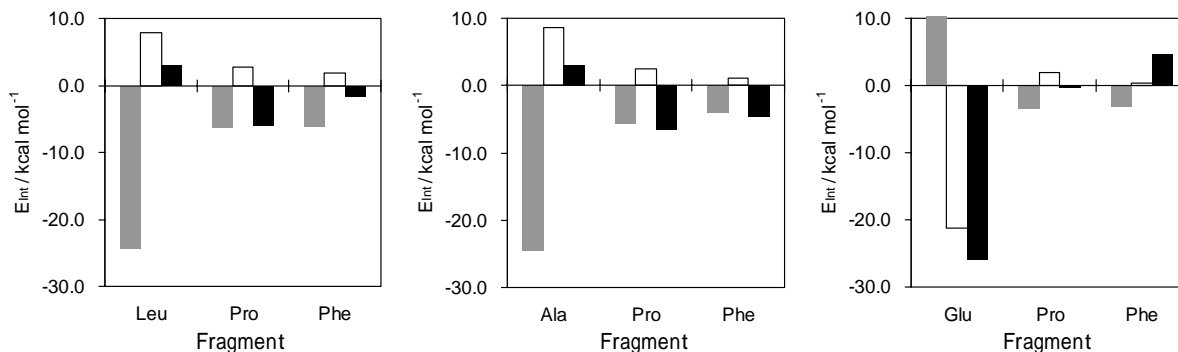


図2 FKBP - 遷移状態における基質(X = Leu, Ala, Glu)間の残基間相互作用エネルギー (□ : Asp37, ▒ : Arg42, ■ : Tyr82)
[横軸のフラグメント名は図1のものに対応(Proがプロリル結合を含む)]

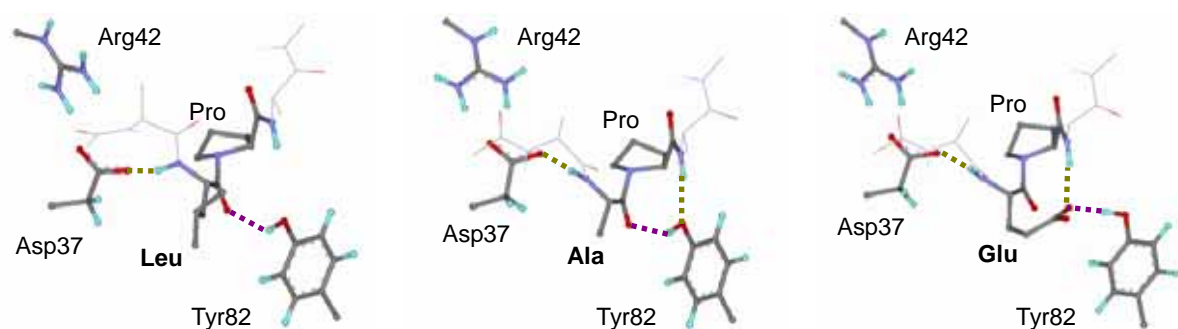


図3 遷移状態における基質(X = Leu, Ala, Glu)周辺の構造(点線は水素結合を示す)

おり、遷移状態の安定化に寄与していると考えられる。一方、X = Gluの基質においては、この水素結合はグルタミン酸側鎖により阻害されている。このことから、Tyr82との水素結合パターンが基質特異性の要因の1つであると考えられる。

それぞれの残基Xを持つ基質ペプチドの結合エネルギー(FKBP・水溶液)とその差、およびシス トランス異性化反応の活性値

を表1に示す。遷移状態におけるX = Leu, Ala, Glyの基質周辺の構造は類似しているが、FKBPへの基質の結合(ΔE_{FKBP})はX = Leuにおいて最も強く、また水中の基質がFKBPに結合するときはLeu > Ala > Glyの順に結合しやすい。この計算結果は活性値の傾向と一致している。また、X = Gluの基質は水中のほうが大きく安定であるためFKBPへの結合が起こりにくく、このことがグルタミン酸置換基質の低い活性値につながっているものと考えられる。

表1 基質の結合エネルギー(FKBP・水溶液)とその差(計算値)および活性値(実験値¹⁾)

残基 X	結合エネルギー (kcal mol ⁻¹)			活性値 (mM ⁻¹ s ⁻¹)
	ΔE_{FKBP}	$\Delta E_{\text{solution}}$	$\Delta\Delta E$	
Leu	-90.7	-125.0	34.3	640
Ala	-68.8	-110.6	41.8	53
Gly	-66.6	-135.1	68.5	1.2
Glu	-171.5	-252.9	81.4	0.6

$$\Delta E_{\text{FKBP}} = E_{\text{complex}} - E_{\text{FKBP}} - E_{\text{substrate}}$$

$$\Delta E_{\text{solution}} = E_{\text{solution}} - E_{\text{solvent}} - E_{\text{substrate}}, \Delta\Delta E = \Delta E_{\text{FKBP}} - \Delta E_{\text{solution}}$$

【参考文献】

- (1) R. K. Harrison et al., *Biochemistry* **29**, 3813 (1990).
- (2) K. Kitaura et al., *Chem. Phys. Lett.* **313**, 701 (1999).
- (3) T. Nakano et al., *Chem. Phys. Lett.* **318**, 614 (2000).
- (4) T. Nakano et al., *Chem. Phys. Lett.* **351**, 475 (2002).
- (5) D. G. Fedorov et al., *J. Chem. Phys.* **120**, 6832 (2004).
- (6) K. Fukuzawa et al., *J. Comput. Chem.* **27**, 948 (2006).