

第一原理分子動力学法に基づく生体内化学反応解析

○¹重田育照、²神谷克政 (¹大阪大学院基礎工、²筑波大院物質創成)

shigeta@cheng.es.osaka-u.ac.jp

タンパク質内の化学反応は、化学者が達成出来ないほどの効率と、精緻な制御機構を兼ね備えている場合があり、その知見が物質科学の発展に寄与する事は疑いようのない事実である。生体内の化学反応を解析する為には、タンパク環境を露に取り込んだ電子状態変化を解析し、安定構造や準安定構造、また遷移状態のエネルギー曲面の探索が極めて重要である。しかしながら、タンパク環境やその周りの溶液環境は非常に多くの自由度を有するため、エンタルピーの寄与ばかりでなく、エントロピーの寄与も無視出来ない効果をゆうする。つまり、反応座標に沿った自由エネルギー曲面の解析が必要になる。本発表では、QM/MM Car-Parrinello 分子動力学シミュレーションとメタダイナミクス法に基づく生体内化学反応解析の例を2つ紹介する。

①チトクロム酸化酵素内プロトン輸送経路でのプロトン移動反応

チトクロム酸化酵素は呼吸鎖の末端に位置する巨大な膜タンパク質である。この酵素が触媒する反応は、酸素を水へと還元する酸素還元反応と、それと共役して生じるチトクロム *c* から4電子を受け取る電子移動反応、およびプロトンポンプ反応である。プロトンの輸送経路としては3つの経路が存在する事が示唆されており、各々の入り口を構成する残基の頭文字に由来してH経路・D経路・K経路と呼ばれている。濃度勾配に逆らったプロトンポンプ反応では、酵素は水相のプロトンを捕まえ、それを内部にある輸送経路に能動的に供給しなければならない。これは、プロトンチャネルで知られている受動的なプロトンの拡散現象とは一線を画しており、その反応機構を明らかにする事は大変意義深い。

複数のプロトン化状態をもつアミノ酸は、タンパク質が多くの機能的な活性状態をとりうる原因の一つとなっている。ヒスチジン(His)-アスパラギン酸(Asp)ダイアドはプロトンポンプのプロトン移動経路における主要構成要素としても働いている。D経路入り口にもHis-Aspダイアドが存在するが、その間には水分子が挿入されており、これらがどの様にプロトンポンプ機能と結びついているのかは明らかにされていない。

本研究では、局所的なアミノ酸残基の配置とプロトンポンプ機能の関係を明らかにする事を目的としている。良く知られている様に、プロトン化状態は周りの環境に応じて変化している。このような系を取り扱うためには、水素結合の切断を記述する必要があるため、本研究では密度汎関数理論(HCTH汎関数、擬ポテンシャル、平面波基底法)に基づく量子論的な解析法を用いた。この手法により、D経路入り口付近のプロトン移動経路とそのエナジेटイクスを詳細に解析し、機能との相関を考察した。

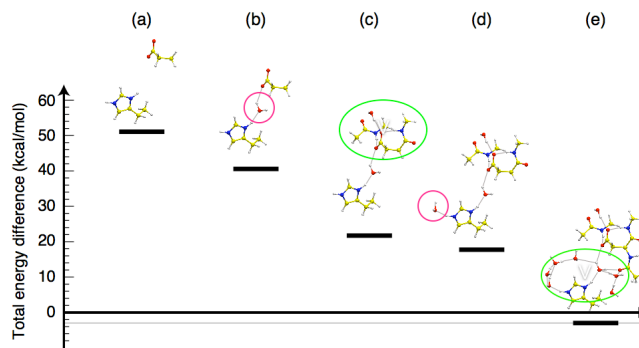


図1 中性-電荷分離状態のエネルギー差の環境効果

His がプロトン化された時（経路の外）と Asp がプロトン化された時（経路の内側に運ばれた状態）とのエネルギー差は高々6kcal/mol 程度であった。その原因を探するため、His-Asp ダイアドに段階的に構成要素を増やす解析をした所（前ページ図 1 参照）、His-Asp ダイアドの周りにおける水素結合環境が元来 50kcal/mol もあったエネルギー差を巧みに解消していると言う事実を見いだした。また、メタダイナミクス法による解析により、2 状態間の自由エネルギー差も同程度で在る事が分った。

② ナイロン分解酵素の加水分解反応の解析

ナイロンオリゴマー分解酵素は、触媒中心の残基として Ser112, Lys115, および Tyr215 を有する、6-アミノヘキサン酸直鎖状オリゴマーを分解する加水分解酵素である（反応機構を図 2 にしめす）。この酵素は、非天然合成化合物の環境浄化や微生物の環境適応を調べるためのモデル酵素として工業的にも大変注目されている。6-アミノヘキサン酸2量体 (Ald) 結合型酵素の X線構造 (PDBID:2ZMA) より、この酵素に基質が結合する際に Tyr170 が誘導適合する事により基質結合安定性を向上させるばかりでなく、反応性にも寄与している事が様々な変異体解析から示唆されているが、その詳細は未だ不明である。

そこで本研究では、Ald に対する酵素-基質複合体の水溶液中における 1 気圧、温度 300K の熱平衡構造を分子動力学法により求め、酵素-基質間の相互作用を解析することで分子レベルでの基質結合特性を検証した。また、得られた構造から QM/MM メタダイナミクス法（計算条件は①と同じ）により、反応座標に沿った自由エネルギー変化を算出し、その反応経路解析を行った。

分子動力学シミュレーションの結果より、基質の C 末端の構造が水に露出し、結晶構造と大きく離れた構造が得られたが、反応に関与する残基は結晶構造のそれと大きな違いは見られなかった。結晶構造では氷晶防止剤としてグリセロールが添加されており、それが C 末端の安定化に繋がっていた為であり、実験環境の水溶液中では我々のシミュレーションのように C 末端が露出している方が正しいものと思われる。この構造から出発した QM/MM 計算による反応解析の結果を図 3 に示す。この自由エネルギー差は 17~18kcal/mol であり、セリンプロテアーゼと同等である事が分った。また、実験から提案されていた Tyr170 は反応に大きく関与していると言う事実は見られず、主に安定性に寄与していると言う描像を得た

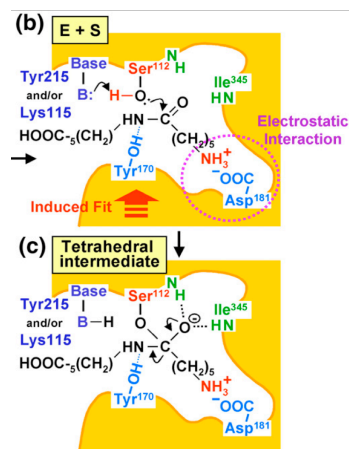


図 2 Ald加水分解反応機構

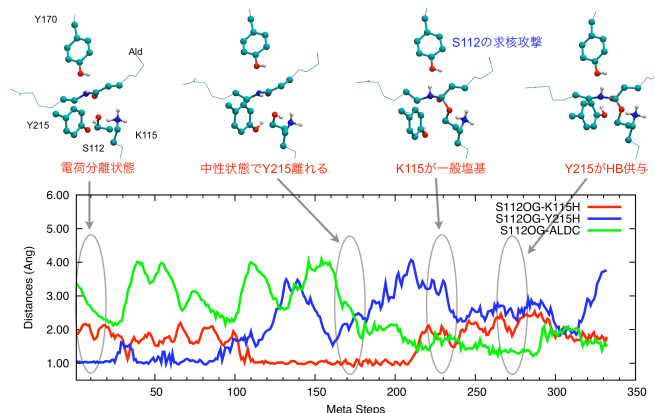


図 3 Ald加水分解反応における反応座標の変化