

# MD シミュレーションによるアスパラギン酸ラセマーゼの機能解析

宮田 裕介、野口 恵一、養王田 正文\*  
東京農工大学大学院工学府 生命工学専攻

東京都小金井市中町 2 - 24 - 16

E-mail: yohda@cc.tuat.ac.jp

(論文受付日 October 2, 2007; 公開日 January 31, 2008)

**要旨:** 本研究では、超好熱性古細菌 *Pyrococcus horikoshii* 由来アスパラギン酸ラセマーゼ活性部位への D-Asp の取り込み過程を分子動力学シミュレーションで解析した。D-Asp 側鎖の酸素原子が、静電相互作用により Lys164 側鎖の窒素原子に近づく。次に D-Asp 主鎖の酸素原子と Arg48 側鎖の窒素原子の静電相互作用によって、Lys164 から D-Asp が受け渡される。そしてこの相互作用が保たれたまま、Cys82、Cys194 の硫黄原子間に D-Asp がドッキングされることが明らかとなった。この過程は、先に我々が報告した L-Asp と PhAspR のドッキング過程とほぼ同様のものではあった。

**Abstract:** In this study, we have performed MD simulation of aspartate racemase from a hyperthermophilic archaeon, *Pyrococcus horikoshii*, (PhAspR) for capturing the substrate. At first, the side chain of D-Asp was attracted to the side chain of Lys164 by electrostatic interaction. D-Asp was then transferred to Arg48. Keeping electrostatic interaction with Arg48, D-Asp entered the catalytic site between Cys82 and Cys194. The docking pathway was almost same that for L-Asp.

**キーワード:** D-amino acid, racemase, molecular dynamics, docking, hyperthermophile

## 1. 序論

アミノ酸ラセマーゼは L-アミノ酸と D-アミノ酸間の異性化反応を触媒する酵素であり、ピリドキサルリン酸 (PLP) を補酵素として必要とするものと、必要としないものに大別される。我々は、PLP 非依存型酵素の一つアスパラギン酸ラセマーゼの反応機構に関する知見を得ることを目的に、超好熱性古細菌 *Pyrococcus horikoshii* 由来アスパラギン酸ラセマーゼ (PhAspR) 野生型 (WT) [1] と阻害剤複合体 [2]

の結晶構造解析、変異体を用いた触媒反応の速度論解析、および至適温度近傍における触媒部位の構造変化と基質取り込み機構に関する MD シミュレーション [3] を行ってきた。

基質である L-Asp と PhAspR とのドッキングシミュレーションの結果、基質取り込みの初期段階において触媒部位入口付近に位置する Lys164 との静電相互作用により認識された L-Asp が、触媒部位近傍の Asp47 と Arg48 との相互作用を経て、触媒残基である Cys82 と Cys194 との間に導かれていく過程が観察で

きた。この結果は、Lys164 を Leu、Arg、Ala に変異させたいずれの変異体においても著しい活性の低下が見られたことから支持された。

また、Lys164 に近接した Tyr160 が触媒部位のゲートとして機能している可能性が、Tyr160 のフェニル基の運動性に関する MD シミュレーション結果から推測された。3 種の変異体 K164L、K164R、K164A のいずれについても酵素活性の低下が観測できたが、Lys と同じ塩基性アミノ酸である Arg に変異させた場合でも活性が低下する点、および低下の程度がアミノ酸の種類により異なる点 (Leu > Arg > Ala) などから、Lys164 は静電相互作用により基質を認識するだけでなく、Tyr160 の運動性にも影響を与えていると考えられた。

そこで、3 種の変異体 K164L、K164R、K164A について MD シミュレーションを行い、Tyr160 のゲート開閉運動がアミノ酸の変異により、WT に比べどのように変化するかについて検討を行った。また、D-Asp と PhAspR とのドッキングシミュレーションを行い、D-Asp の取り込み機構に関して検討した。

## 2. 方法

MD シミュレーションには AMBER パッケージを使用し、力場は parm96 を用いた[4]。結晶中において PhAspR はダイマー構造を形成していた。そこで、報告されている X 線結晶構造 (PDB code : 1JFL) からモノマー分子 (chain A) を取り出し、これを MD シミュレーションの初期構造とした。Tyr160 の運動性に関するシミュレーションは、孤立境界条件下、300K で 1ns、350K で 2ns、375K で 10ns の計算を行った。また Lys164 を Leu、Arg、Ala に変異させた各変異体に関して同様のシミュレーションを行った。

D-Asp ドッキングシミュレーションでは、PhAspR の活性中心である Cys82、Cys194 の S 原子の midpoint から 15 Å 離れた位置に基質である D-Asp の C 原子を配置し、その位置で基質を回転させて計 10 個の初期構造を作成した。Tyr160 を open コンホメーション (後述) とした状態から周期境界条件の下、375K で 1ns シミュレーションを行った。

計算結果の構造と運動性の解析、および作図にはプログラム VMD を用いた[5]。

## 3. 結果と考察

### 3.1 164 番目の残基が Tyr160 の運動性に与える影響

結晶中における PhAspR 活性部位周辺の構造を図 1 に示す。結晶構造中では、活性部位付近に位置している Tyr160 の phenol 基が、外部から活性部位への

基質の侵入を妨げるようなコンホメーションをとっていた。そこで、MD シミュレーションにより Tyr160 側鎖の運動性について検討したところ、350K 以下の温度では結晶中で観測された構造から大きく変化することはなかったが、375K では側鎖 phenol 基が C-C 結合周りにねじれ角にして 120° 程度の比較的大きな配向変化を示した[3]。結晶中で観測された二面角  $\text{N-C-C-C}$  が -60 度となるコンホメーションでは Tyr160 の phenol 基が活性部位への基質の侵入を妨げているのに対し (close 状態)、 $\text{N-C-C-C}$  が 180 度になると基質の侵入口が大きく開くようになる (open 状態)。触媒部位のゲートとして機能していると考えられる Tyr160 に対して 164 番目のアミノ酸残基が及ぼす影響について、WT に加え 3 種の変異体 K164L、K164R、K164A の MD シミュレーションにより検討した。

350K 以下の温度でのシミュレーションではいずれの変異体についても二面角  $\text{N-C-C-C}$  の値に大きな変化は見られなかったが、375K では WT で見られたような 120° 程度の大きな変化が 10ns のシミュレーションの間に K164L、K164R、K164A について、それぞれ 5 回、2 回、4 回観測された (図 2 b-d)。

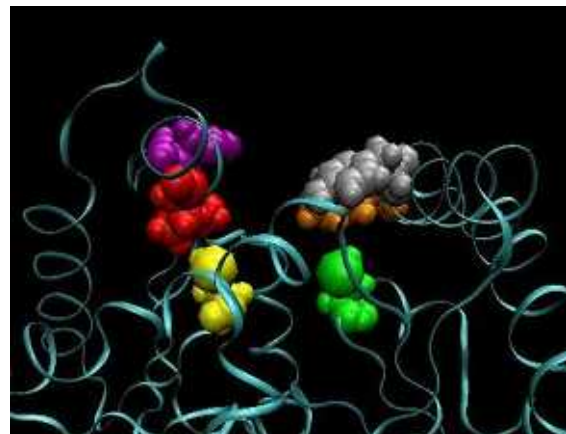


図 1 PhAspR 活性部位周辺の構造

WT のシミュレーションでは同様な二面角の変化が 10ns の間に 6 回観測されていた (図 2 a)。375K での 10ns の間のシミュレーションの間に open 状態のコンホメーションであったトータル時間は、WT、K164L、K164R、K164A でそれぞれ 4950 ps、6040 ps、1680 ps、1450 ps であった。K164L の Tyr160 は WT と同程度の時間 open 状態となっているが、WT に比べ K164L の活性が低下しているのは、基質の取り込み過程において Lys に比べ Leu は基質と強く相互作用をしないためであると考えられる。他方、K164R、K164A では Tyr160 が open 状態となる時間が短いことが活性の低下する原因の一つであると予想される。

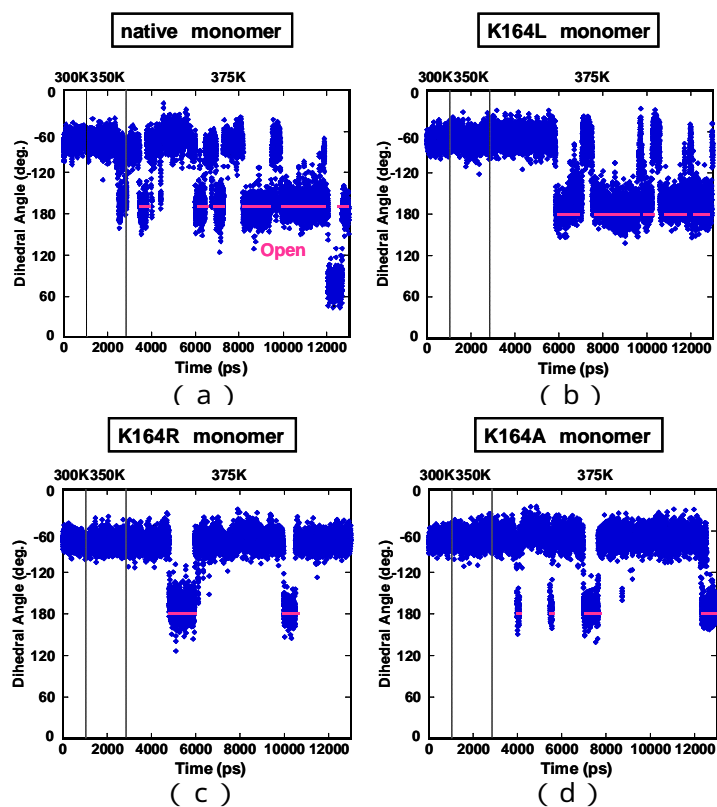


図 2 375K での MD シミュレーションにおける Tyr160 側鎖の配向変化；  
(a) WT, (b) K164L, (c) K164R, (d) K164A

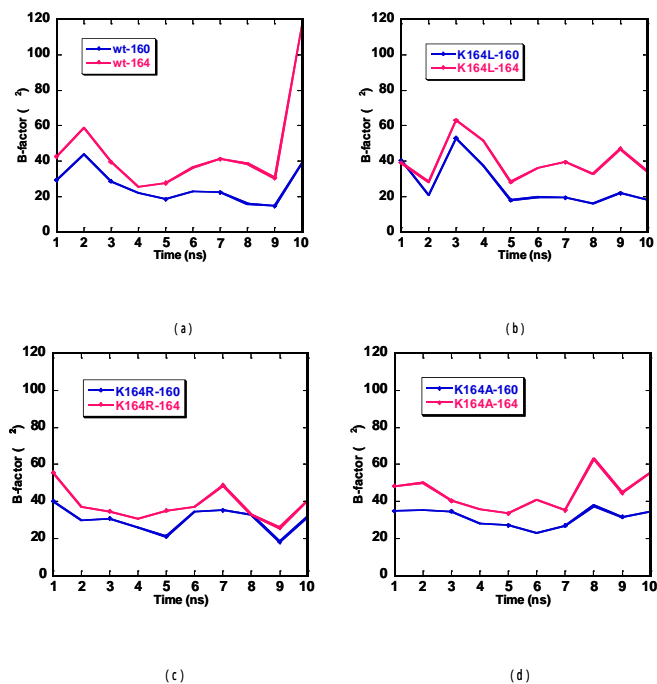


図 3 375K での MD シミュレーションにおける Tyr160 と 164 番目のアミノ酸の温度因子変化；  
a) WT, (b) K164L, (c) K164R, (d) K164A

MD シミュレーション結果をもとに、Tyr160 と 164 番目のアミノ酸残基の運動の詳細について検討したところ、WT では、Lys164 の側鎖は Tyr160 の側鎖に比べて激しく運動しており、Lys164 側鎖の比較的大きな動きに伴い Tyr160 のフェニル基の配向が変化することがわかった (図 3a)。したがって、ゲートの開閉には Tyr 側鎖と Lys 側鎖間の静電相互作用が重要な役割を果たしていると考えられる。K164L 変異体でも WT と同様に Leu 側鎖の大きな運動に伴い、Tyr160 側鎖のコンホメーションに変化が生じていた (図 3b)。しかし、この配向変化は、Tyr 側鎖が Leu 側鎖との van der Waals 接触を避ける為に生じたものであると考えられ、一旦 open 状態になった Tyr 側鎖は、Leu 側鎖の配向がもとに戻っても open 状態を継続している場合も見られた。

一方、K164R でも Tyr 側鎖の配向は Arg 側鎖の運動にともない変化していたが、Arg164 は活性部位近傍に存在する Glu196 と強く静電的な相互作用をするため、Arg 側鎖の運動は Lys や Leu に比べ小さなものであった (図 4)。このため、Tyr 側鎖の運動も制限され open 状態となる時間が短くなっていたと考えられる。さらに、塩基性の Arg 側鎖は基質の取り込みに有利であると予想されたが、Glu196 側鎖との相互作用により運動が制限されるため、基質の取り込みを効果的に行えないと考えられる。また、側鎖の小さい Ala164 は Tyr 側鎖とあまり相互作用しないため、Tyr 側鎖のコンホメーション変化には影響を及ぼさないと考えられた。

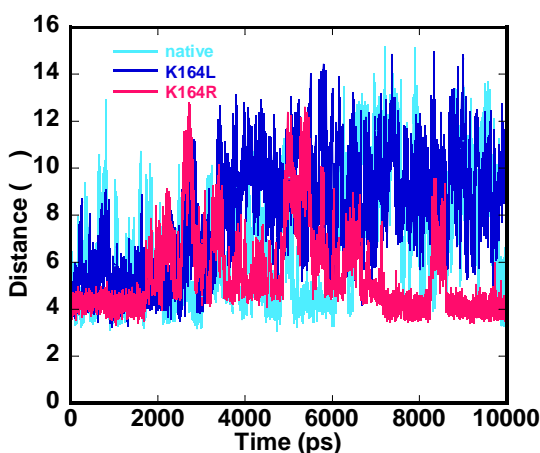


図 4 PhAspR WT、および変異体の 164 番目のアミノ酸残基側鎖と Glu196 側鎖間の距離の時間変化

以上の MD シミュレーションの結果より、Lys164 は基質取り込みの初期段階において静電相互作用により基質を認識するだけでなく、Tyr160 の運動性にも影響を与えていると考えられた。

### 3.2 D-Asp と PhAspR のドッキング過程

D-Asp の PhAspR 活性部位へのドッキング過程について MD シミュレーションを 10 回実施したところ、基質の活性部位への侵入過程を 6 回観測することができた。活性部位の D-Asp の取り込み過程について詳細に検討するために、N(Lys164) ... O (D-Asp)、O(Asp47) ... N(D-Asp)、N(Arg48) ... O (D-Asp)、S(Cys82) ... C (D-Asp)、S(Cys194) ... C (D-Asp) の 5 つの非結合原子間距離の時間変化を追跡した (図 5)。

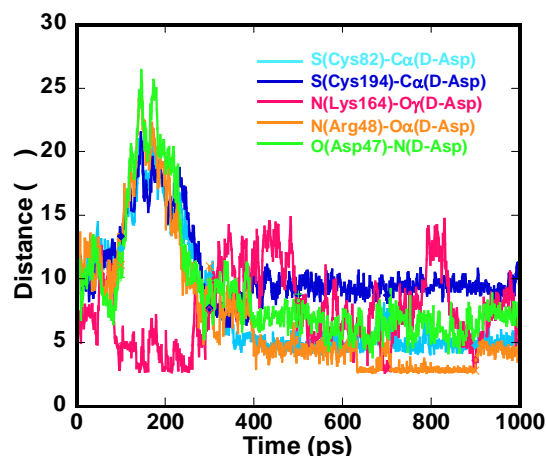


図 5 活性部位への D-Asp の取り込み過程の活性部位のアミノ酸と D-Asp 間の距離変化；  
N(Lys164) ... O (D-Asp) (red)、  
O(Asp47) ... N(D-Asp) (green)、  
N(Arg48) ... O (D-Asp) (yellow)、  
S(Cys82) ... C (D-Asp) (cyan)、  
S(Cys194) ... C (D-Asp) (blue)

シミュレーション開始後 100ps を経過すると、Lys164 の窒素原子と D-Asp の O 酸素原子間の距離が 3-4 程度となり、この状態が 250ps あたりまで継続していた。このことから、Lys164 と D-Asp との間の静電的相互作用が、活性部位への基質取り込みの第一段階でのドライビングフォースとなっている可能性が示唆された。他の原子間距離についても経過時間 180ps あたりから減少する傾向が見られたが、300ps あたりで Asp47 の酸素原子と D-Asp の窒素原子間の距離、Arg48 の窒素原子と D-Asp の O 酸素原子間の距離が 5 程度まで減少し、他方、Lys164 と D-Asp 間の距離は経過時間 250ps 以降次第に増加していく様子が観測された。したがって、D-Asp は Lys164 から Asp47 と Arg48 の近傍へと移動したことがわかる。経過時間 300ps 以降 Asp47 と D-Asp 間距離、Arg48 と D-Asp 間距離とともに、Cys82 と Cys194 の硫黄原子と D-Asp の C 炭素間の距離も減少して



いく傾向が観察され、400ps 以降これらの原子間距離に大きな変化は見られなくなった。このことから、基質である D-Asp は活性部位近傍に取り込まれたものと考えられ、経過時間 400ps 以降の原子間距離から、D-Asp は Arg48 (3-4 Å)、Cys82 (5 Å) と主に相互作用していることがわかる。また、経過時間 500-700ps の間、および 900ps 以降、D-Asp と Lys164 との距離が再度減少していることから、活性部位において基質は Lys164 とも相互作用している可能性が考えられる (図 6)。

以上の D-Asp のドッキング過程をまとめると、まず D-Asp 側鎖の酸素原子が、静電相互作用により Lys164 側鎖の窒素原子に近づく。次に D-Asp 主鎖の酸素原子と Arg48 側鎖の窒素原子の静電相互作用によって、Lys164 から D-Asp が受け渡される。そしてこの相互作用が保たれたまま、Cys82、Cys194 の硫黄原子間に D-Asp がドッキングされることが明らかとなった。この過程は、先に我々が報告した L-Asp と PhAspR のドッキング過程とほぼ同様のものではあった [3]。

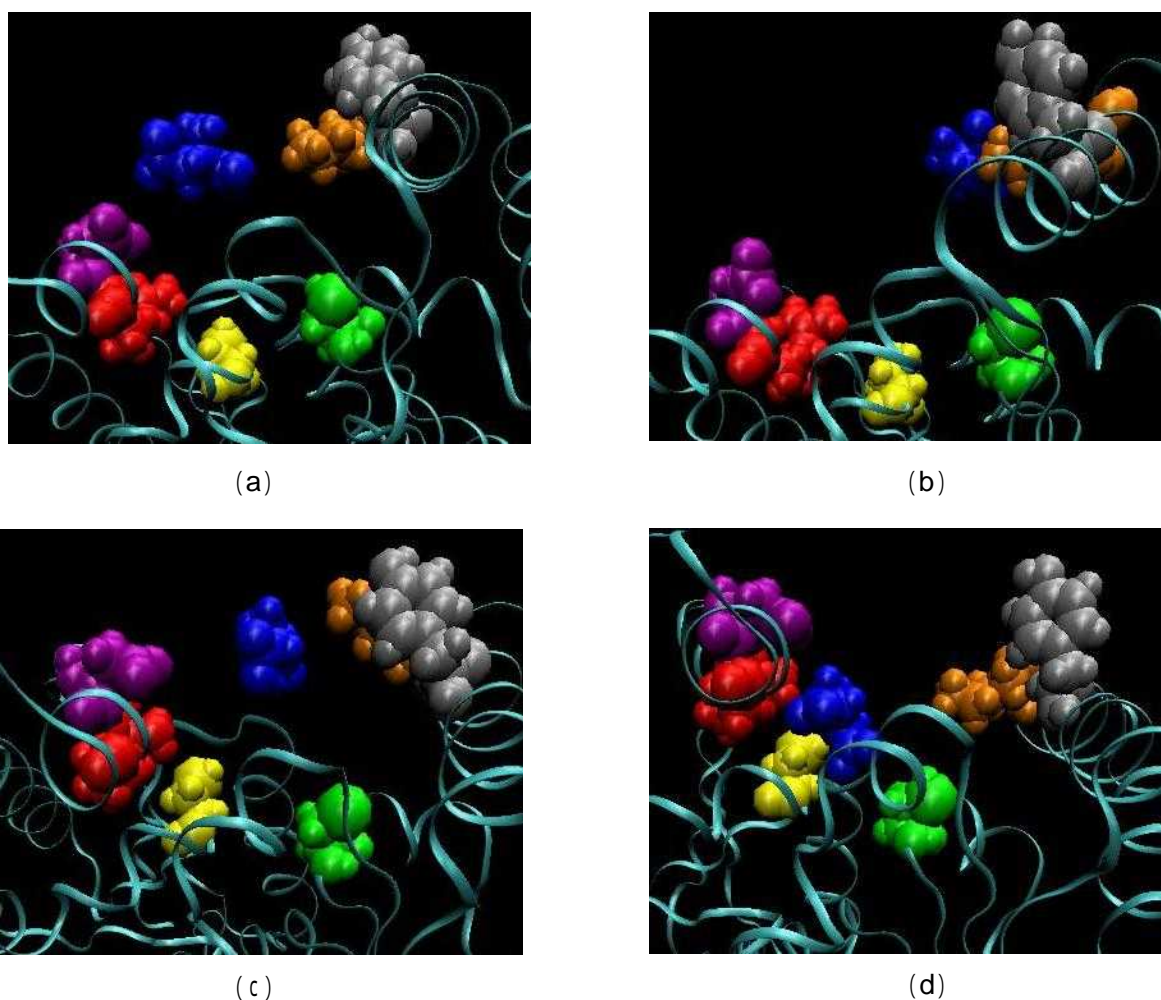


図 6 活性部位への D-Asp の取り込み過程 ;  
(a)  $t = 30$  ps, (b)  $t = 130$  ps,  
(c)  $t = 270$  ps, (d)  $t = 500$  ps

## 参考文献

- [1] L. Liu, K. Iwata, A. Kita, Y. Kawarabayasi, M. Yohda and K. Miki, Crystal Structure of Aspartate Racemase from *Pyrococcus horikoshii* OT3 and Its Implications for Molecular Mechanism of PLP-independent Racemization, *J. Mol. Biol.*, 319, 479-489 (2002).
- [2] A. Ohtaki, Y. Nakano, R. Iizuka, T. Arakawa, K. Yamada, M. Odaka and M. Yohda, Structure of aspartate racemase complexed with a dual substrate analogue, citric acid, and implications for the reaction mechanism, *Proteins*, in press.
- [3] T. Yoshida, T. Seko, O. Okada, K. Iwata, L. Liu, K. Miki and M. Yohda, Roles of conserved basic amino acid residues and activation mechanism of the hyperthermophilic aspartate racemase at high temperature, *Proteins*, 64, 502-512 (2006).
- [4] D. Case, D. Pearlman, J. Caldwell, T. Cheatham III, W. Ross, C. Simmerling, T. Darden, K. Merz, R. Stanton, A. Cheng, J. Vincent, M. Crowley, D. Ferguson, R. Radmer, G. Seibel, U. Singh, P. Weiner and P. Kollman, *AMBER 6*. San Francisco: University of California (2000).
- [5] W. Humphrey, A. Dalke and K. Schulten, VMD: Visual molecular dynamics, *J. Mol. Graphics*, 14, 33-38 (1996).