

QM/MM 法を用いたリン酸化反応の遷移状態モデリング

李 秀栄, 杉田有治*

Modeling the Transition State of Enzyme-catalyzed Phosphoryl Transfer Reaction Using QM/MM Method

Suyong RE and Yuji SUGITA*

RIKEN Advanced Science Institute, 2-1 Hirosawa, Wako, Saitama 351-0198, Japan

(Received April 6, 2011)

Reversible phosphorylation of proteins is a post-translational modification that regulates diverse biological processes. The molecular mechanism underlying phosphoryl transfer catalyzed by enzymes, in particular the nature of transition state (TS), remains a subject of active debate. Structural evidence supports an associative TS, whereas physical organic studies point to a dissociative character. In this article, we briefly introduce our recent effort using the hybrid quantum mechanics/molecular mechanics (QM/MM) simulations to resolve the controversy. We perform QM/MM simulations for the reversible phosphorylation of phosphoserine phosphatase (PSP), which belongs to one of the largest phosphotransferase families characterized to date. Both phosphorylation and dephosphorylation reactions are investigated based on the two-dimensional energy surfaces along phosphoryl and proton transfer coordinates. The resultant structures of the active site at TS in both reactions have compact geometries but a less electron density of the phosphoryl group. This suggests that the TS of PSP has a geometrically associative yet electronically dissociative character and strongly depends on proton transfer being coupled with phosphoryl transfer. Structure and literature database searches on phosphotransferases suggest that such a hybrid TS is consistent with many structures and physical organic studies and likely holds for most enzymes catalyzing phosphoryl transfer.

Key words—nature of transition state; reversible phosphorylation; phosphoserine phosphatase; two-dimensional energy surface; quantum mechanics/molecular mechanics (QM/MM) calculation

1. はじめに

計算分子科学は過去半世紀の間に大きな進歩を遂げた。量子化学計算は低分子の構造や分光学的性質、反応機構を知る有力な手段となった。薬の候補となる低分子化合物の設計などにも広く応用されている。古典分子動力学計算は結晶構造解析とともにタンパク質の構造・機能を明らかにする上で欠かすことのできない手段となった。今、これら各階層毎に発展してきた計算科学手法を融合し、階層を超えた生命現象の理解に向け挑戦が行われている。

1976年に Warshal と Levitt によって考案された Quantum Mechanics / Molecular Mechanics (QM/MM) 法は、その名の通り量子化学計算と古典分子

力場計算を組み合わせた計算手法である。¹⁻⁴⁾ 酵素反応や表面反応に対して、化学反応に係わる部分(活性部位)のみ高価な量子化学計算を行い、それ以外の部分は安価な分子力場で記述する近似法である。化学現象を精度よく記述しながらも、大規模系の反応解析を高速に行うことができる。計算アルゴリズムと計算機資源の進歩に伴い、近年では実用的な反応解析ツールとなってきた。量子化学計算や分子動力学計算の汎用パッケージには、既に QM/MM 用のインターフェイスを備えているものも多い。また、ChemShell のように独立した QM/MM インターフェイスも公開されている。本稿では、QM/MM 法の応用例として、酵素反応の遷移状態モデリングについて紹介したい。

2. リン酸転移反応

酵素によるリン酸転移は、最も基本的な生化学反応の1つである。タンパク質がリン酸化されると、ときに大きな構造変化をもたらす。リン酸化に伴う

理化学研究所基幹研究所 (〒351-0198 埼玉県和光市広沢 2-1)

*e-mail: sugita@riken.jp

本総説は、日本薬学会第 130 年会シンポジウム SS03 で発表したものを中心に記述したものである。

構造変化がスイッチとなり、生体内の代謝や筋弛緩、DNA複製など、物質輸送や情報伝達を伴う多くの機能が制御されている。⁵⁾リン酸転移の反応速度は、リン酸転移酵素の触媒を受け溶液中に比べ生体内で著しく早い。その加速は最大 10^{21} 倍にも及ぶと言われている。リン酸転移酵素の高い触媒能を知る鍵は遷移状態 (TS) にあるが、その特徴については長年議論が絶えない。

Figure 1 にリン酸転移の一般的な反応スキームを示す。この反応はリン原子上での求核置換反応である。その反応機構は、求核攻撃と脱離反応が起こるタイミングにより異なる。求核攻撃が脱離反応に先立って起これば (P-O_{nuc} 結合の形成が P-O_{lg} 結合の開裂に先立って起これば)、遷移状態でリン原子は 5 価となる (5 つの P-O 結合を持つ)。活性部位の構造は基底状態に比べコンパクトになる。共有結合を介して求核剤の負電荷がリン酸基 (-PO₃) へと流れ込むため、リン酸基上の負電荷は増加する。対照的に、脱離反応が求核攻撃に先立って起これば (P-O_{lg} 結合の開裂が P-O_{nuc} 結合の形成に先立って起これば)、遷移状態でリン原子は 3 価となる (2 つの P=O 結合と 1 つの P-O 結合を持つ)。活性部位の構造は広がり、脱離基が負電荷を担うため、リン酸基上の負電荷は減少する。前者は、「会合的 (associative)」, 「ホスホラン様」な遷移状態などと呼ばれるのに対して、後者は、「脱離的 (dissociative)」, 「メタホスフェイト様」な遷移状態などと呼ばれる。

酵素反応の遷移状態が「会合的」なのか、「脱離

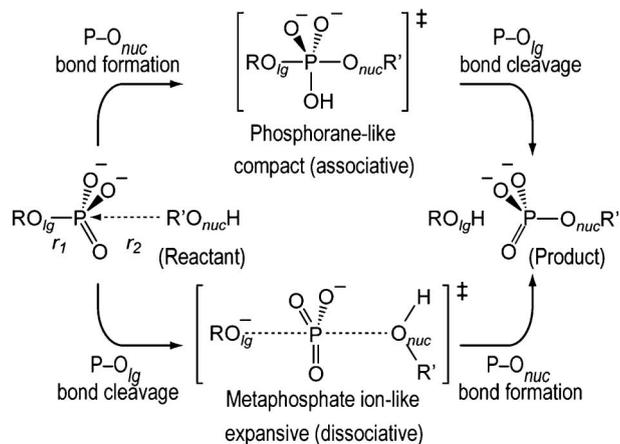


Fig. 1. Two Possible Transition States of Phosphoryl Transfer Reaction

的」なのか、若しくはそれらの中間なのか長年議論が行われてきた。遷移状態類似体を用いて安定化したリン酸転移酵素の結晶構造は、そのほとんどが構造的にコンパクトな活性部位を持つ。つまり、遷移状態が「会合的」であることを示唆する。⁶⁻⁸⁾「会合的」な遷移状態モデルは、リン酸転移酵素の活性がしばしば Mg²⁺ や Lys といった正電荷を帯びた残基を必要とする事実と相容れる (イオンや正電荷を帯びた残基は、負電荷の増した遷移状態とより強く結合し反応障壁を下げる)。しかしながら、活性化エントロピーがほぼ 0 であること、⁹⁾ 反応速度の顕著な脱離基依存性、^{10,11)} 脱離基酸素の大きな ¹⁸O 同位体効果、リン酸基酸素の負の ¹⁸O 2 次同位体効果など、¹²⁻¹⁵⁾ 物理有機化学的な実験データはどれも「脱離的」な遷移状態を支持する。^{14,15)}

Figure 2 に、最近の結晶構造解析や理論計算から報告されているリン酸転移酵素の遷移状態構造を基に作成した More O'Ferrall-Jencks (MOFJ)^{16,17)} プロットを示す。このプロットは、リン酸転移の反応機構を表すのにしばしば用いられる。縦軸はリン原子と求核剤酸素原子との距離 (結合次数)、横軸はリン原子と脱離基酸素の距離 (結合次数) となっている。「会合的」な遷移状態は対角線より上の領域に、「脱離的」な遷移状態は対角線より下の領域にプロットされる。まず、結合長に対するプロットを見ると、すべての P-O_{lg} と P-O_{nuc} 結合距離はリン原子と酸素原子のファンデルワールス半径和である 3.3 Å より短い。遷移状態でメタホスフェイトイオン (PO₃⁻) が形成されていないことを示す。¹⁸⁾ さらに、ほとんどの点は対角線より上の領域に位置しており、遷移状態が「会合的」であることを示唆する。一方、結合距離の情報を Pauling の式¹⁹⁾ を用いて結合次数に変換したプロットを見ると、結合長のプロットとは対照的に、ほとんどの点に対角線の下領域 (0.2 近傍) に集中している。つまり、遷移状態が「脱離的」であることを示唆する。構造に着目するか電子的性質に着目するかで一見矛盾した描像が得られる。構造と電子状態の両者を総合的に検討する必要があることを示す。

3. Phosphoserine Phosphatase (PSP)

Phosphoserine Phosphate (PSP) は脳セリンの生合成に含まれる律速酵素である。ホスフォ-L-セリン (P-Ser) の加水分解反応を触媒し、グリシン

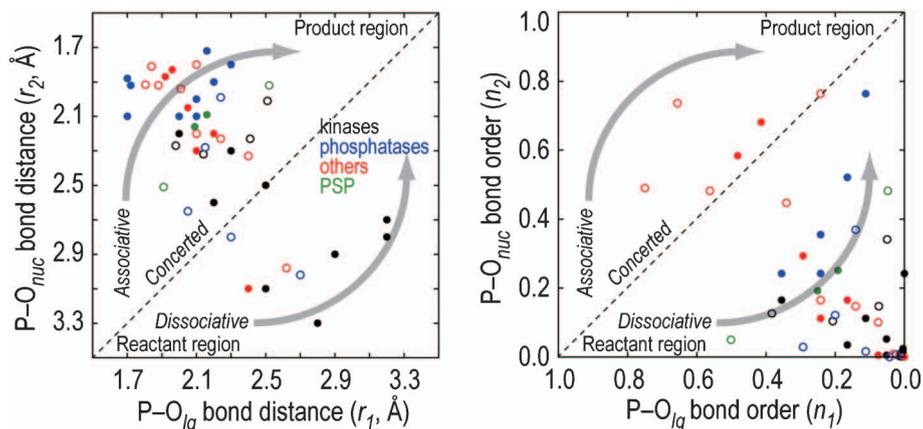


Fig. 2. More O'Ferrall-Jencks Plots along Bond Distances and Bond Orders

solid circle: crystal structures of transition state analogue complexes, open circle: theoretical calculations. The bond orders are defined using Pauling's equation: $D(n) = D(I) - 0.60 \log n$, where $D(n)$ is the bond length for bond number n (less than 1) and $D(I)$ is the bond length for a single bond (1.73 Å).

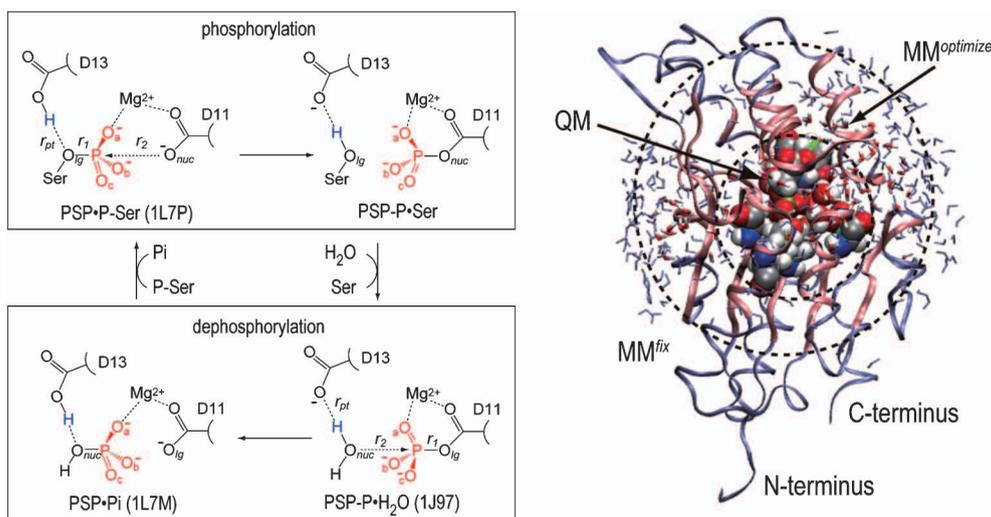


Fig. 3. Reversible Phosphorylation of PSP Proceeded *via* Phosphoenzyme Intermediate (PSP-P)

PDB ID for the corresponding crystal structure is indicated in parenthesis. The model system used for the QM/MM calculation is also shown.

や D-セリンの濃度を調節している。多くの神経系疾患とも関係しており、創薬のターゲットとしても興味深い酵素である。また、その構造が Ca^{2+} ポンプのリン酸化サイトと酷似していることから、ATP を動力源とした P-type ATPase のイオン輸送機構を知る手がかりにもなる。同時に、HaloAcid Dehalogenase (HAD) という巨大なリン酸転移酵素群²⁰⁾ に属しており、多くのリン酸転移酵素に共通する一般的な触媒機構を見出す上でも恰好なターゲットである。

PSP の加水分解反応は、リン酸化酵素中間体を経て進行することが知られている。すなわち、基質分子 P-Ser によるタンパク質のリン酸化と、リン酸

化酵素中間体の加水分解（脱リン酸化）の 2 段階で進行する (Fig. 3).²¹⁻²³⁾ 類似体を用いた結晶構造解析により、遷移状態を始め触媒サイクルに含まれる様々な状態の立体構造が明らかになっている。^{21,22)} 他のリン酸転移酵素と同様、類似体を結合した結晶構造の活性部位がコンパクトであることから、「会合的」な遷移状態モデルが提案されている。

本稿では、PSP に着目し、リン酸転移酵素の一般的な遷移状態モデルの構築を目指した QM/MM 計算の応用例を紹介する。Figure 3 に結晶構造を基に構築した QM/MM 計算の初期構造を示す。反応基質、周辺残基 (Asp11, Asp13, Glu20, Ser99, Asp167, and Lys144) 及び Mg^{2+} とその配位子を含む 80 原

子程度を QM 領域とし、その他の部分は MM 領域とした。QM 領域には密度汎関数法 (B3LYP/6-31+G(d)) を、MM 領域には CHARMM27 力場^{24,25)}を用いた。QM 領域と MM 領域の境界は Link atom 法²⁶⁾を用いて取り扱った。QM/MM 計算は Q-Chem²⁷⁾ と CHARMM(34b1)²⁸⁾を用いて行った。

4. 遷移状態モデリング ～リン酸転移とプロトン移動～

4-1. 活性部位の水素結合ネットワーク Figure 4 にリン酸化及び脱リン酸化反応における始状態 (酵素複合体 PSP・P-Ser と PSP・P・H₂O) の最適化構造 (活性部位部分) を示す。両構造ともに結晶構造とよく一致している。^{21,22)} 反応基質と求核剤は、ともに Mg²⁺ に配位している。その結果、求核剤酸素 (O_{nuc}), リン原子, 脱離基酸素 (O_{lg}) は直線上に並び求核置換反応に適した配向をとっている。注目すべきは、Lys144, Ser99, Asp13 といった周辺残基との水素結合ネットワークによりリン酸基上の負電荷が安定化されている点である。特に Asp13 はリン酸転移反応と直接係わる脱離基酸素 (P-Ser の O_{lg}) や求核剤 (W4) と水素結合を形成しており、この水素結合を介したプロトン移動がリン酸転移と深く係わっていることを示唆する。このことを裏付けるために、分子液体論に基づき平衡状態の溶媒分布を求める 3D-RISM (reference interaction site model)²⁹⁻³⁴⁾ の計算を行った。3D-RISM 計算は水素結合などの局所的な溶質-溶媒間相互作用の正しい描像を与える。計算結果から活性部位の溶媒分布は QM/MM 法を用いて最適化した水分子の位置・配

向とよく対応していることがわかる。活性部位の水素結合ネットワークが特異的であり、ネットワークを介したプロトン移動がリン酸転移となんらかの形で係わっていることを示唆する。

4-2. 遷移状態の特徴 プロトン移動とリン酸転移の遷移状態との係わりは、これまで報告されているリン酸転移酵素の QM/MM 計算にもみられる。³⁵⁻⁵³⁾ 例えば、求核剤からリン酸基酸素へのプロトン移動を伴うリン酸転移に対しては「会合的」な遷移状態が、³⁷⁻⁴³⁾ 脱離基酸素と酸塩基触媒として働く残基間のプロトン移動を伴う反応に対しては「脱離的」な遷移状態⁴⁴⁻⁵²⁾ がそれぞれ提案されている。ただし、多くの場合、リン酸転移の反応座標のみを用いて遷移状態を求めている。すなわち、リン原子-脱離基酸素原子間の距離 (P-O_{lg}, r₁) とリン原子-求核剤酸素原子間の距離 (P-O_{nuc}, r₂) の差 (rc=r₁-r₂) を反応座標としている。しかし、リン酸転移座標のみを用いた 1 次元的な反応解析からは、リン酸転移の正しい遷移状態を求めることができない。Figure 5 に QM/MM 計算から求めた PSP リン酸化反応のエネルギー曲線を示す。反応座標はリン酸転移座標 (rc) のみとした。QM 領域に Hartree-Fock (HF) 法及び B3LYP 法を用いたエネルギー曲線では、いずれも遷移状態直後に不連続的なエネルギーの低下がみられる。エネルギー低下の前では Asp13 がプロトン化しているのに対して、エネルギー低下の後では P-Ser がプロトン化している。エネルギー曲線に見られるこの不連続的なエネルギーの変化は、Asp13 から P-Ser へのプロトン移動と関連した他の

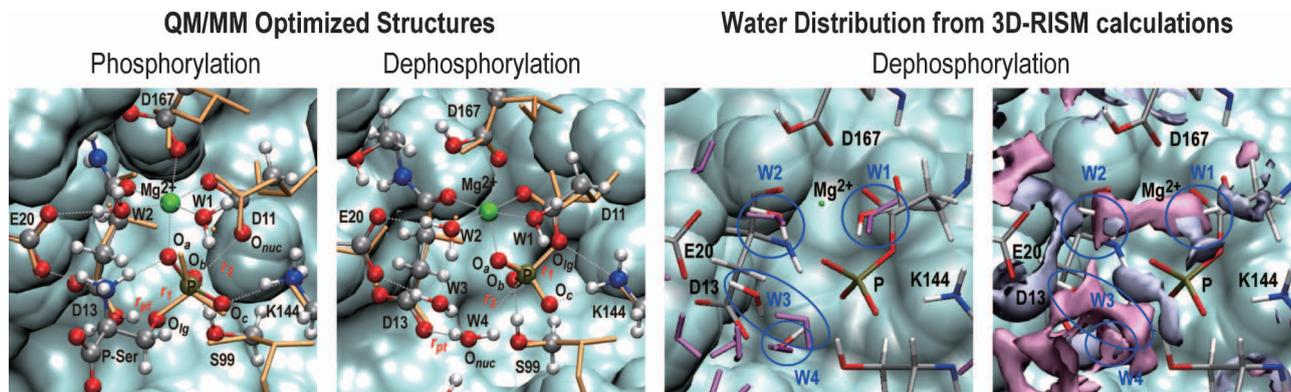


Fig. 4. The Active Site Structures of the Optimized PSP・P-Ser and PSP・P・H₂O Complexes (ball-and-stick representation) with Those of the Corresponding Crystal Structures, 1F5S and 1J97, Respectively (orange licorice representation)

Isosurface representation of the 3D distribution functions, $g(r) > 4$, of water oxygen (pink) and water hydrogen (ice blue) inside the active site of PSP・P・H₂O complex obtained from the 3D-RISM calculation and the most probable water configurations (pink) mapped on the modeled complex.

反応経路が存在することを示唆する。

Figure 6に、リン酸転移座標 (rc) と Asp13 との
プロトン移動座標 (r_{pt}) を反応座標とした2次元エ
ネルギー面を示す。リン酸化及び脱リン酸化反応
は、ともに1つの遷移状態(リン酸化ではTS1, 脱
リン酸化ではTS2)を経て進行する。リン酸化転移

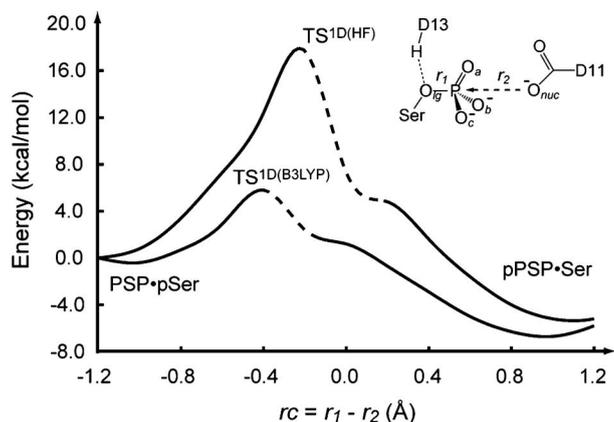


Fig. 5. One Dimensional Potential Energy Curves of the Reaction at the HF/6-31G(d) and B3LYP/6-31+G(d) Levels along the Phosphoryl Transfer Coordinate (rc)

座標のみを用いて求めた遷移状態(赤い点線上の
TS1 (1D))は、2次元エネルギー面上ではもはや
遷移状態ではない。プロトン移動の取り扱いがいか
に重要であるかがわかる。2次元反応解析から求め
た遷移状態には2つの特徴がみられる。1つは、プ
ロトン移動が著しく進行していることである。TS1
では Asp13 のプロトンが P-Ser 側へ、TS2 では水
分子のプロトンが Asp13 側へそれぞれ移動してい
る。プロトン移動がリン酸転移の駆動に直接係わっ
ていることを示唆する。もう1つの特徴は、活性部
位の構造が始状態の時に比べ縮小している点である。
 $O_{lg} \dots O_{nuc}$ 距離を活性部位の大きさを示す尺度とす
ると、始状態の距離に比べて、リン酸化の遷移状態
では 0.06 \AA 、脱リン酸化の遷移状態では 0.66 \AA
の短縮がみられる。すなわち、遷移状態は「会合的」
である。

三方両錐形を持つ AlF_3 は、リン酸化反応の遷移
状態を表すのに適した類似体であることが知られて
いる。⁵⁴ PSP の結晶構造解析でも、遷移状態類似体
として AlF_3 が用いられている。²² 計算から求めた

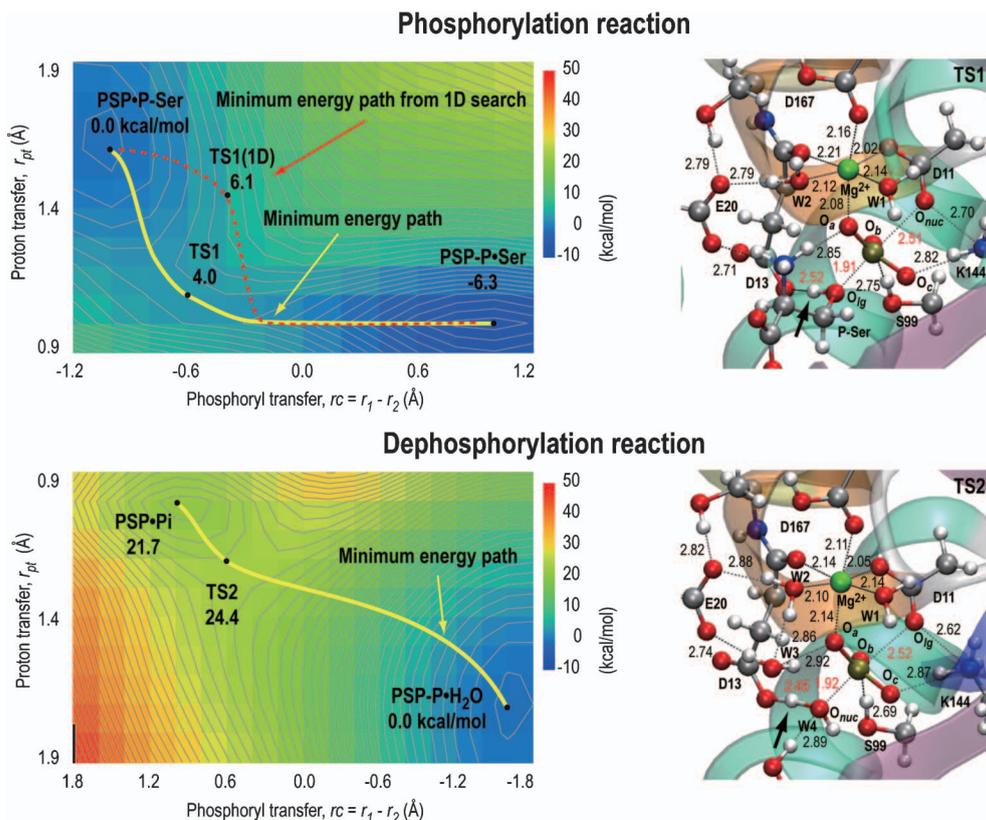


Fig. 6. Two-dimensional Potential Energy Surface and the Active Site of the Optimized Transition State Structure for the Phosphorylation and the Dephosphorylation, Respectively

Table 1. Differences in r_2 Distances between E·S and TS Analogue Complexes with AlF_3

	Experiment [§]		QM/MM calculations	
	Phosphorylation	Dephosphorylation	Phosphorylation	Dephosphorylation
$r_2(\text{P-O}_{nuc})$ (E·S)	2.90	3.54	2.74	3.35
$r_2(\text{P-O}_{nuc})$ (TS1/TS2)			2.51	1.92
$r_2(\text{Al-O}_{nuc})$ (TS)	2.09	2.16	1.87, [†] 1.93 [‡]	2.06, [†] 1.90 [‡]
$\Delta(\text{E} \cdot \text{S} \ominus \text{TS})$	-0.81	-1.38	-0.87, [†] -0.81 [‡]	-1.29, [†] -1.45 [‡]

[†] Value of the $\text{PSP} \cdot \text{H}_2\text{O} \cdot \text{AlF}_3$ complex. [‡] Value of the $\text{PSP}(\text{H}^+) \cdot \text{OH}^- \cdot \text{AlF}_3$ complex. [§] Ref. [22], P-O_{nuc} distances are taken from $\text{PSP} \cdot \text{PO}_4^-$ complex (PDB code: 1F5S) and the $\text{PSP} \cdot \text{BeF}_3^-$ complex (PDB code: 1J97) for the phosphorylation and dephosphorylation, respectively. Al-O_{nuc} distances are taken from the $\text{PSP} \cdot \text{AlF}_3$ complex (PDB code: 1L7N).

遷移状態モデルは、類似体 (AlF_3) を用いた結晶構造とよく一致しており、ともに「会合的」な性質を支持する (Table 1). しかし、 AlF_3 を用いて安定化した結晶構造では、計算から求めた遷移状態に比べ、 $\text{O}_{lg} \dots \text{O}_{nuc}$ 距離が短く、活性部位 ($\text{O}_{lg} \dots \text{P} \dots \text{O}_{nuc}$) は対称的な構造になっている。 AlF_3 を用いた結晶構造解析は遷移状態の「会合的」な性質を強調する傾向にあると言える。

QM/MM 計算による反応のエネルギー障壁は、リン酸化反応で 4.0 kcal/mol, 脱リン酸化で 24.4 kcal/mol であり、後者が反応の律速段階であることを示唆する。この結果は、実験的に得られた k_{cat} (pH 7.5, 70°C で 20 min⁻¹)²²⁾ を基に遷移状態理論を用いて算出した自由エネルギー障壁 (21 kcal/mol) とよく対応している。¹⁾ アセチルリン酸の加水分解反応は 10 kcal/mol 程度の発熱反応である。⁵⁵⁾ 計算結果では、脱リン酸化反応は 21.7 kcal/mol の吸熱反応となっており、真の終状態に到達していないものとする。PSP·P-Ser と PSP·Pi の活性部位は、互いに 2 つの異なる配向を取ることが知られている。²²⁾ 基質結合と生成物の放出過程で活性部位の再配向を伴うさらなる変化があると考えられる。触媒サイクルの反応エネルギーを評価するためには、このような効果も取り込んだ計算が必要となる。

4-3. 反応経路 反応経路に沿った諸性質の変化を Fig. 7 に示す。リン酸化及び脱リン酸化反応ともに、遷移状態領域はプロトン交換領域と一致する。リン酸化反応では、 r_1 と r_2 の主な変化は遷移状態後にみられる。遷移状態での r_2 距離 (2.5 Å) は、ホスホラン分子の P-O 結合距離 (~1.7 Å)⁵⁶⁾ に比べてかなり長い。つまり、遷移状態では基質と求核剤との間に共有結合は形成されていない。実際に Wiberg 結合指標 (共有結合の多重度の指標)⁵⁷⁾

を計算してみると、遷移状態に至るまでその値に大きな変化はみられない。一方、脱リン酸化反応での r_1 と r_2 は、遷移状態に至るまで相互に変化する。遷移状態での r_1 は 2.5 Å まで伸長しており、 r_2 は 1.9 Å まで短縮している。つまり、遷移状態では求核攻撃と脱離反応ともかなり進行している。計算された Wiberg 結合指標の変化もこのことを裏付ける。

両反応の共通点は、始状態から遷移状態へ向けた r_2 の変化が r_1 の変化に比べて早いことである (Table 2)。脱リン酸化の場合、 r_2 の変化 (-1.43 Å) は r_1 の変化 (0.77 Å) のほぼ 2 倍である。つまり、両反応で求核攻撃が脱離反応に先立って起こっていると言える。すなわち、遷移状態は「会合的」である。しかし、結合指標で見ると傾向が逆転する。例えば、脱リン酸化での P-O_{lg} 結合指標の減少は P-O_{nuc} 結合指標の増加よりもやや大きい。すなわち、「脱離的」な遷移状態を示唆する。

Figure 8 に反応経路に沿ったリン酸基の変化を示す。始状態から遷移状態に向けて、リン酸化反応では 3 つの P-O 結合長 (P-O_a, P-O_b, P-O_c) が 0.02 Å 程度、脱リン酸化反応では P-O_c 結合長が 0.01 Å 程短くなっている。これらの P-O 結合で 2 重結合性が増していることを示唆する。Wiberg 結合指標の変化も 2 重結合性の増加を裏付ける。電荷分布の解析から、⁵⁸⁾ 始状態の時に比べて遷移状態でリン酸基上の負電荷が 0.03-0.05 e 程減少していることがみてとれる。リン酸基と直接相互作用する Mg²⁺ や Ser99, Lys144 の電荷の変化は、リン酸基上の変化に比べて一桁小さい。したがって、リン酸基上の負電荷は遷移状態でアキシアル酸素側へ流れていると考えられる。つまり、両遷移状態ではメタホスフェイト様の電子状態が形成されている。この結果はリ

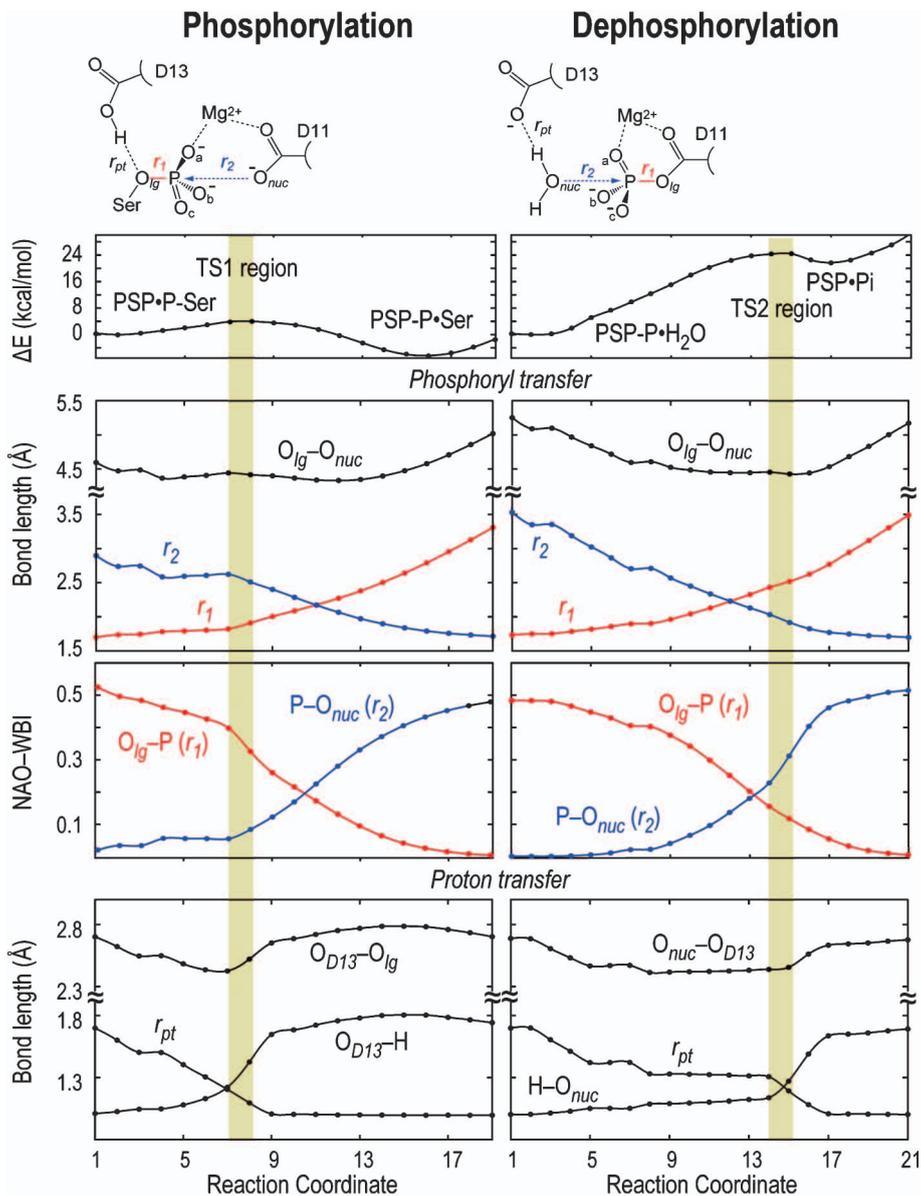


Fig. 7. Changes in the O_{lg} -P (r_1) and P- O_{nuc} (r_2) Bonding Natures along the Minimum Energy Path

From the top, relative energy, phosphoryl transfer distances and corresponding Wiberg bond index in natural atomic orbital basis (NAO-WBI), and proton transfer distances.

Table 2. Changes in Selected Parameters of the Phosphoryl Transfer Reactions upon Going from the Reactant State to Each TS

	r_1	r_2	r_{pt}	$r(O_{lg}O_{nuc})$	$r(O_{D13}O_{lg})$
Bond length (Å)					
Phosphorylation (PSP·P·Ser ⊙ TS1)	0.17	-0.23	-0.50	-0.06	-0.10
Dephosphorylation (PSP·P·H ₂ O ⊙ TS2)	0.77	-1.43	-0.50	-0.66	-0.23
Wiberg Bond index in natural atomic orbital basis					
Phosphorylation (PSP·P·Ser ⊙ TS1)	-0.17	0.05	0.32	—	—
Dephosphorylation (PSP·P·H ₂ O ⊙ TS2)	-0.36	0.31	0.26	—	—

The changes were calculated with respect to the corresponding values in each reactant state.

ン酸基酸素が負の ¹⁸O 2次同位体効果を示すことと一致しており、「脱離的」な遷移状態を支持す

る。^{12,14,15)}

4-4. 遷移状態モデル 最後に, QM/MM 計

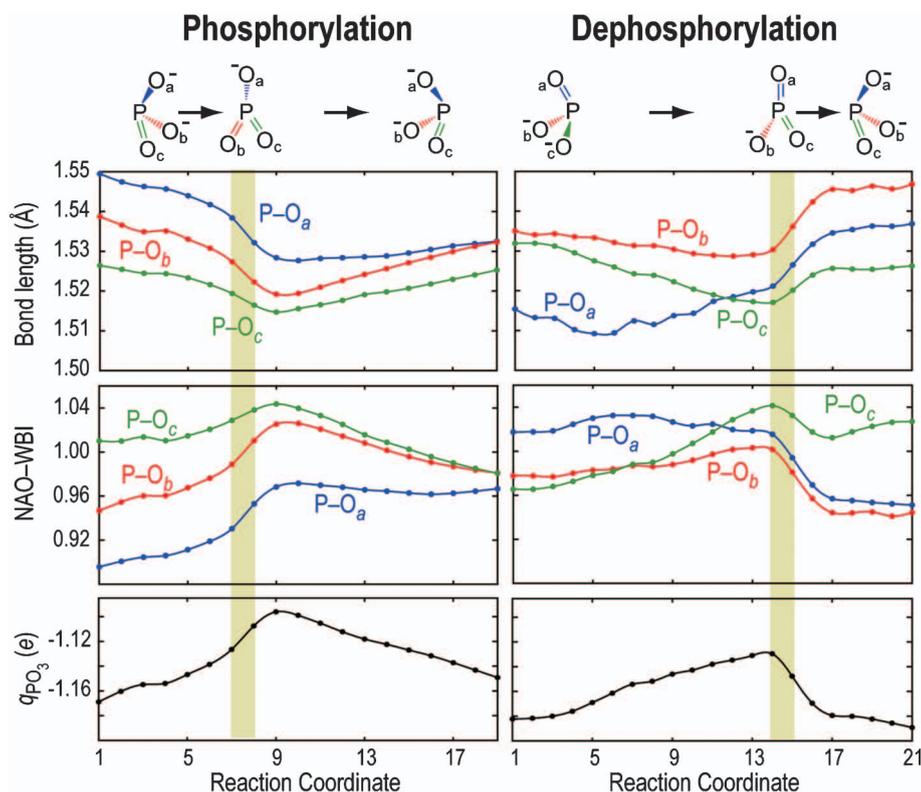


Fig. 8. Changes in the Geometry and Electronic Structure of the PO_3 Moiety along the Minimum Energy Path
From the top, P-O bond length and the corresponding Wiberg bond index in natural atomic orbital basis (NAO-WBI), and the sum of atomic charges of the PO_3 group.

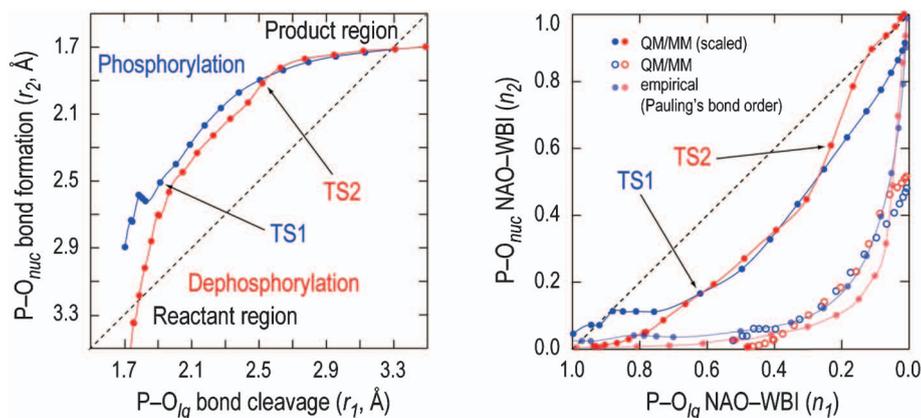


Fig. 9. More O'Ferrall-Jencks Plots Showing the Reaction Pathway Obtained from the QM/MM Calculations of the Reversible Phosphorylation of PSP

算から求めた反応経路上の構造を用いて作成した MOFJ プロットを Fig. 9 に示す。リン酸化及び脱リン酸化反応ともに反応経路に沿った r_1 と r_2 の変化は対角線の上を辿る。つまり、求核攻撃が脱離反応に先立って起こり、遷移状態は「会合的」である。これとは対照的に、QM/MM 計算から求めた Wiberg 結合指標の変化は対角線の下を辿る。脱離

反応が求核攻撃に先立って起こり、遷移状態は「脱離的」である。経験的な Pauling の関係式を用いて求めた結合指数も同様な変化を示す。以上の結果から、PSP のリン酸転移反応は、構造的には「会合的」であるにもかかわらず電子的には「脱離的」な遷移状態を経て進行するものと結論付けられる。

5. 触媒機構について

今回紹介した PSP の QM/MM 計算は、リン酸転移反応の遷移状態が「会合的」か？「脱離的」か？という長年の疑問に対して、「構造的には会合的で電子的には脱離的」な遷移状態モデルを提案し、触媒機構についても新たな視点を与える。その鍵となるのがプロトン移動である。酵素の活性部位の様に限られた空間で起こる反応には、コンパクトな構造をもつ「会合的」な遷移状態が望ましい。一方で、5 価を有することでリン酸基上に負電荷が集中するのは好ましくない。多くのリン酸転移酵素がその活性に Mg^{2+} や正電荷を帯びた残基を必要とするのは、この負電荷との結合を通して遷移状態を特異的に安定化するためと考えられる。⁵⁹⁾しかし、PSP の計算結果が示すように、プロトン移動がリン酸転移と相関して起こることで、遷移状態の構造をコンパクトに保ちつつリン酸基の負電荷を十分に分散することができる。プロトン移動とリン酸転移の相関は、酵素が高い触媒能を引き出すために備えた巧みな仕組みと考えられる。 Mg^{2+} や正電荷を帯びた残基は、この「仕組み」を利用するために反応分子の位置や向きを整える役割を担っていると言える（溶液中では大きな溶媒最配向エネルギーが必要である。）⁶⁰⁾ 実際には、PSP の活性に対する Ca^{2+} の阻害効果が Mg^{2+} と Ca^{2+} の配位構造の違いに関連していることが報告されている。⁶¹⁾

今回の計算結果は、タンパク質運動と触媒機構の係わりについても 1 つの視点を提案する。一般的に、プロトン移動の効率は水素結合距離と関連す

る。例えば PSP の場合、遷移状態での Asp13—基質分子間水素結合距離 ($O\dots O_{D13}$) は非常に短くなっている ($\sim 2.4 \text{ \AA}$)。始状態の構造を用いてプロトン移動の水素結合距離依存性を調べてみると、水素結合の短縮によりプロトンが著しく動き易くなることがわかる (Fig. 10)。生理条件下ではタンパク質揺らぎにより $O\dots O_{D13}$ 水素結合距離も揺らいでいると考えられる。タンパク質運動により水素結合が短縮し、その結果としてリン酸転移と相関したプロトン移動が効率よく行われていると思われる。短い水素結合を介したプロトン移動の重要性は古くから知られてきたが、タンパク質中での短い水素結合の存在が捉えられたのは最近のことである。⁶²⁾ 短い水素結合が遷移状態をどの様に安定化するのははまだ議論の余地がありそうだが、⁶³⁻⁶⁶⁾ そのような水素結合を介してタンパク質運動とリン酸転移とが深く係わっていることに間違いはなさそうである。

6. おわりに

QM/MM 法を用いてタンパク質のような巨大分子の反応解析が比較的容易に行われるようになった。本稿で紹介したように、酵素の反応経路や遷移状態の構造・電子状態を明らかにすることで、実験データを補完し新たな反応モデルを提案することもできる。しかしながら、本来ダイナミックな生体分子機能の本質を捉えるためには、例えば、原子数の 4 乗に比例する量子化学計算コストの軽減、動的に変化したり複数ある活性部位の取り扱い、反応座標の問題、十分な構造サンプリング、長時間シミュレーションの実現など、多くの課題に取り組んで行

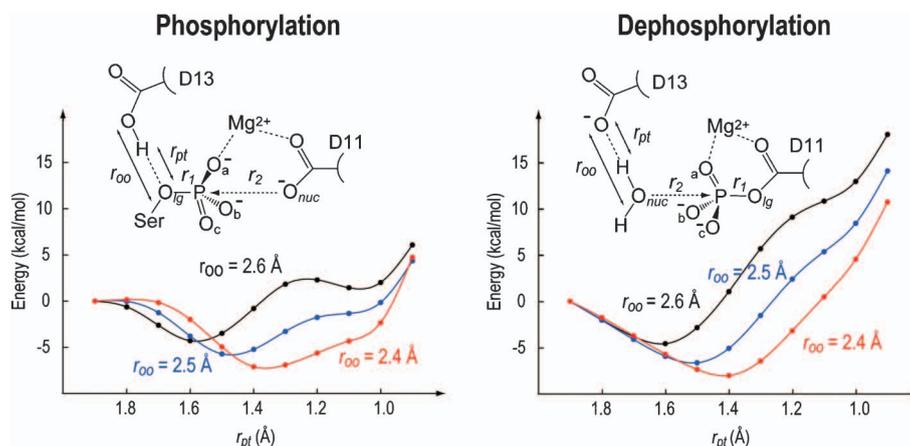


Fig. 10. Impact of the Hydrogen Bond Distance (r_{oo}) on the Proton Transfer (r_{pt}) Potential at the Reactant State of Either Phosphorylation or Dephosphorylation Calculated Using the QM/MM Method

かなければならない。既にタンパク質全体の電子状態計算や大胆な粗視化モデルを用いた長時間シミュレーションなど挑戦的な取り組みが始まっている。いずれにせよ、より高速な計算機が必要である。理研が開発を進めてきた次世代スーパーコンピュータがいよいよ稼働する。計算機性能 10 ペタの時代に突入する。計算機科学・計算科学がタグを組みハイエンド計算機を生かして挑戦的な課題に取り組む体制も整った。タンパク質の分子動力学・量子化学シミュレーションを日常的に行うようになる日もそう遠くないであろう。同様のシミュレーションをミリ秒単位で行うことができれば、タンパク質が機能する 1 サイクルを丸ごとみることもできるようになる。一昔前では夢のような話も現実味を帯びてきた。薬学・創薬分野への貢献と言った意味でも、新たな時代が開かれることと期待したい。本稿が、計算分子科学と薬学分野の新たな相補体制の構築に少しでも役立てば幸いである。

謝辞 本稿に記述した研究を行うにあたり、科学技術振興機構の CREST、文部科学省科学研究費補助金特定領域研究「膜インターフェイス」、文部科学省「最先端・高性能汎用スーパーコンピュータの開発利用」プロジェクトの支援を受けました。ここに深く感謝いたします。また、3D-RISM の解析を行って頂いた今井隆志博士に感謝いたします。本稿の計算は理化学研究所「理研スーパー・コンバインド・クラスター (RSCC)」及び自然科学研究機構の計算科学研究センター (RCCS) にて行いました。心から感謝致します。

REFERENCES

- 1) Warshel A., "Computer Modeling of Chemical Reactions in Enzymes and Solutions," Wiley-Interscience, New York, 1997.
- 2) Warshel A., Levitt, M., *J. Mol. Biol.*, **103**, 227–249 (1976).
- 3) Lin H., Truhlar D. G., *Theor. Chem. Acc.*, **117**, 185–199 (2007).
- 4) Senn H. M., Thiel W., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **48**, 1198–1229 (2009).
- 5) Dzeja P. P., Terzic A., *J. Exp. Biol.*, **206**, 2039–2047 (2003).
- 6) Madhusudan, Akamine P., Xuong N. H., Taylor S. S., *Nat. Struct. Biol.*, **9**, 273–277 (2002).
- 7) Lahiri S. D., Zhang G., Dunaway-Mariano D., Allen K. N., *Science*, **299**, 2067–2071 (2003).
- 8) Lu Z., Dunaway-Mariano D., Allen K. N., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 5687–5692 (2008).
- 9) Hoff R. H., Hengge A. C., *J. Org. Chem.*, **63**, 6680–6688 (1998).
- 10) Kirby A. J., Varvoglis A. G., *J. Am. Chem. Soc.*, **89**, 415–423 (1967).
- 11) Herschlag D., Jencks W. P., *J. Am. Chem. Soc.*, **111**, 7579–7586 (1989).
- 12) Hengge A. C., Edens W. A., Elsing H., *J. Am. Chem. Soc.*, **116**, 5045–5049 (1994).
- 13) Gorenstein D. G., Lee Y. G., Kar D., *J. Am. Chem. Soc.*, **99**, 2264–2267 (1977).
- 14) Thatcher G. R. J., Kluger R., *Adv. Phys. Org. Chem.*, **25**, 99–265 (1989).
- 15) Hengge A. C., *Adv. Phys. Org. Chem.*, **40**, 49–108 (2005).
- 16) Jencks W. P., *Chem. Rev.*, **85**, 511–527 (1985).
- 17) More O'Ferrall R. A., *J. Chem. Soc. B*, 274–277 (1970).
- 18) Mildvan A. S., *Proteins*, **29**, 401–416 (1997).
- 19) Pauling L., "The Nature of the Chemical Bond," 3rd ed., Cornell University Press, Ithaca, 1960.
- 20) Burroughs A. M., Allen K. N., Dunaway-Mariano D., Aravind L., *J. Mol. Biol.*, **361**, 1003–1034 (2006).
- 21) Wang W., Kim R., Jancarik J., Yokota H., Kim S. H., *Structure*, **9**, 65–71 (2001).
- 22) Wang W., Cho H. S., Kim R., Jancarik J., Yokota H., Nguyen H. H., Grigoriev I. V., Wemmer D. E., Kim S. H., *J. Mol. Biol.*, **319**, 421–431 (2002).
- 23) Collet J. F., Stroobant V., Van Schaftingen E., *J. Biol. Chem.*, **274**, 33985–33990 (1999).
- 24) MacKerell A. D. Jr., Bashford D., Bellott M., Dunbrack R. L., Evanseck J. D., Field M. J., Fischer S., Gao J., Guo H., Ha S., Joseph-McCarthy D., Kuchnir L., Kuczera K., Lau F. T. K., Mattos C., Michnick S., Ngo T., Nguyen D. T., Prodhom B., Reiher W. E. III, Roux B., Schlenkrich M., Smith J. C., Stote R., Straub J., Watanabe M., Wiorkiewicz-

- Kuczera J., Yin D., Karplus M., *J. Phys. Chem. B*, **102**, 3586–3616 (1998).
- 25) MacKerell A. D. Jr., Feig M., Brooks C. L. III, *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 698–699 (2004).
- 26) Field M. J., Bash P. A., Karplus M., *J. Comput. Chem.*, **11**, 700–733 (1990).
- 27) Kong J., White C. A., Krylov A. I., Sherrill D., Adamson R. D., Furlani T. R., Lee M. S., Lee A. M., Gwaltney S. R., Adams T. R., Ochsenfeld C., Gilbert A. T. B., Kedziora G. S., Rassolov V. A., Maurice D. R., Nair N., Shao Y. H., Besley N. A., Maslen P. E., Dombroski J. P., Daschel H., Zhang W., Korambath P. P., Baker J., Byrd E. F. C., Van Voorhis T., Oumi M., Hirata S., Hsu C. P., Ishikawa N., Florian J., Warshel A., Johnson B. G., Gill P. M. W., Head-Gordon M., Pople J. A., *J. Comput. Chem.*, **21**, 1532–1548 (2000).
- 28) Woodcock III H. L., Hodošček M., Gilbert A. T. B., Gill P. M. W., Schaefer III H. F., Brooks B. R., *J. Comput. Chem.*, **28**, 1485–1502 (2007).
- 29) Kovalenko A. “Molecular Theory of Solvation,” ed by Hirata F., Kluwer, Dordrecht, 2003, p. 169.
- 30) Beglov D., Roux B., *J. Phys. Chem. B*, **101**, 7821–7826 (1997).
- 31) Kovalenko A., Hirata F., *Chem. Phys. Lett.*, **290**, 237–244 (1998).
- 32) Kovalenko A., Hirata F., *J. Chem. Phys.*, **110**, 10095–10112 (1999).
- 33) Kovalenko A., Hirata F., *J. Chem. Phys.*, **112**, 10391–10402 (2000).
- 34) Imai T., Oda K., Kovalenko A., Hirata F., Kidera A., *J. Am. Chem. Soc.*, **131**, 12430–12440 (2009).
- 35) Åqvist J., Kolmodin K., Florian J., Warshel A., *Chem. Biol.*, **6**, R71–R80 (1999).
- 36) Rosta E., Kamerlin S. C., Warshel A., *Biochemistry*, **47**, 3725–3735 (2008).
- 37) Alberts I. L., Wang Y., Schlick T., *J. Am. Chem. Soc.*, **129**, 11100–11110 (2007).
- 38) De Vivo M., Cavalli A., Carloni P., Recanatini M., *Chem-Eur. J.*, **13**, 8437–8444 (2007).
- 39) Dittrich M., Schulten K., *Structure*, **14**, 1345–1353 (2006).
- 40) Li G., Cui Q., *J. Phys. Chem. B*, **108**, 3342–3357 (2004).
- 41) Schwarzl S. M., Smith J. C., Fischer S., *Biochemistry*, **45**, 5830–5847 (2006).
- 42) Webster C. E., *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 6840–6841 (2004).
- 43) Glennon T. M., Villà J., Warshel A., *Biochemistry*, **39**, 9641–9651 (2000).
- 44) Alhambra C., Wu L., Zhang Z. Y., Gao J., *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 3858–3866 (1998).
- 45) Asthagiri D., Dillet V., Liu T., Noodleman L., Van Etten R. L., Bashford D., *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 10225–10235 (2002).
- 46) Cheng Y., Zhang Y., McCammon J. A., *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 1553–1562 (2005).
- 47) Grigorenko B. L., Nemukhin A. V., Shadrina M. S., Topol I. A., Burt S. K., *Proteins*, **66**, 456–466 (2007).
- 48) Grigorenko B. L., Rogov A. V., Topol I. A., Burt S. K., Martinez H. M., Nemukhin A. V., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 7057–7061 (2007).
- 49) Hart J. C., Burton N. A., Hillier I. H., Harrison M. J., Jewsbury P., *Chem. Commun.*, 1431–1432 (1997).
- 50) Jardin C., Horn A. H. C., Schürer G., Sticht H., *J. Phys. Chem. B*, **112**, 13391–13400 (2008).
- 51) Valiev M., Kawai R., Adams J. A., Weare J. H., *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 9926–9927 (2003).
- 52) Valiev M., Yang J., Adams J. A., Taylor S. S., Weare J. H., *J. Phys. Chem. B*, **111**, 13455–13464 (2007).
- 53) De Vivo M., Ensing B., Dal Peraro M., Gomez G. A., Christianson D. W., Klein M. L., *J. Am. Chem. Soc.*, **129**, 387–394 (2007).
- 54) Xu Y. W., Moréra S., Janin J., Cherfils J., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 3579–3583 (1997).
- 55) Jencks W. P. “Handbook of Biochemistry and Molecular Biology,” Vol. 1, 3rd ed., ed. by Fasman G. D., CRC Press, Cleveland, 1976.
- 56) Davies J. E., Kirby A. J., Roussev C. D., *Acta Crystallogr.*, **E57**, O994–O995 (2001).
- 57) Glendening E. D., Badenhoop J. K., Reed A. E., Carpenter J. E., Bohmann J. A., Morales C. M., Weinhold F.; Theoretical Chemistry Institute, University of Wisconsin: Madison, 2001.

-
- 58) Reed A. E., Weinstock R. B., Weinhold F., *J. Chem. Phys.*, **83**, 735–746 (1985).
- 59) Kamerlin S. C. L., Wilkie J., *Org. Biomol. Chem.*, **5**, 2098–2108 (2007).
- 60) Brinck T., Hu C. H., *J. Phys. Chem. A*, **103**, 5379–5386 (1999).
- 61) Peeraer Y., Rabijns A., Collet J. F., Van Schaftingen E., De Ranter C., *Eur. J. Biochem.*, **271**, 3421–3427 (2004).
- 62) Yamaguchi S., Kamikubo H., Kurihara K., Kuroki R., Niimura N., Shimizu N., Yamazaki Y., Kataoka M., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 440–444 (2009).
- 63) Cleland W. W., Kreevoy M. M., *Science*, **264**, 1887–1890 (1994).
- 64) Warshel A., Papazyan A., Kollman P. A., *Science*, **269**, 102–103 (1995).
- 65) Cleland W. W., *Arch. Biochem. Biophys.*, **382**, 1–5 (2000).
- 66) Schutz C. N., Warshel A., *Proteins*, **55**, 711–723 (2004).