

氏名	いし だ とよ かず 石 田 豊 和
学位の種類	博士 (理 学)
学位記番号	理 博 第 2715 号
学位授与の日付	平成 15 年 11 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科・専攻	理学研究科化学専攻
学位論文題目	Theoretical Perspectives on the Reaction Mechanism of Serine Proteases (セリンプロテアーゼの反応機構についての理論的考察)
論文調査委員	(主 査) 教授 加藤重樹 教授 寺嶋正秀 教授 谷村吉隆

### 論 文 内 容 の 要 旨

酵素反応をはじめとする生体内化学反応の機構を明らかにすることは、現在の理論化学研究の重要な課題の一つである。酵素反応を取り扱うためには、数千から数万にのぼる原子を含む系のエネルギーを求める必要があるが、申請者は、反応部位を量子化学的手法により扱い、それを取り囲むタンパク質部分を分子力場法で扱うQM/MM法を用いて反応の自由エネルギー面を求めている。具体的には、ペプチド結合を開裂する代表的な酵素であるセリン・プロテアーゼの反応機構を明らかにするため、トリプシンを取り上げ、最初の反応段階であるアシル化の過程を詳細に調べている。

まず、申請者は、QM/MM法に基づいて酵素・基質結合体から四面体中間体への最低エネルギー反応経路を求め、更に、分子動力学法による自由エネルギー摂動法を用いて、反応経路に沿った自由エネルギー変化を求めている。更に、四面体中間体からアシル化酵素への自由エネルギー曲線を計算している。得られた自由エネルギー曲線から、この反応の場合、反応の律速段階は四面体中間体を生成する過程であり、活性化エネルギーは17.8kcal/molと見積もっている。また、四面体中間体は、アシル化酵素への進む際の活性化エネルギーが、3.3kcal/molと小さく、その寿命は $10^{-10}$ 秒と極めて短いことを明らかにしている。申請者は、この計算結果に基づき、これまで知られている実験結果と矛盾することのない反応機構を提案している。特に、これまで考えられてきた遷移状態の構造とエネルギーについて、新しい知見をえている。また、この酵素反応の場合、四面体中間体を安定化させる上で、極性の強いタンパク質残基による静電ポテンシャルが重要な役割を果たしていることを強調している。

申請者は、次に、反応を効果的に進める上での、Asp102残基の役割について考察している。このセリン・プロテアーゼについては、2個のプロトンが同時に移動するチャージ・リレー機構が、古くから提案されており、この場合、Asp102は、プロトンの受容体として働く。申請者は、チャージ・リレー機構とAsp102をAsn102に置換した変異体の反応について、上と同様の方法を用いて自由エネルギー曲線を求めている。結果は、チャージ・リレー機構の場合、Asp102が中性となり、タンパク質場による静電安定化が小さくなり、上で述べた1個のプロトンが移動する機構に比べて四面体中間体が不安定化することを明らかにしている。また、Asp102では酵素・基質結合体が反応の進行に有利な立体構造を取るのに対し、Asn102変異体では、反応を進める上で構造の変化が必要なこと、及び四面体中間体の静電安定化が小さいことを明らかにしている。Asp102上のマイナス電荷が反応を進行させる上で、重要な役割を果たしていることを結論としている。

実験により酵素反応の機構を調べる上で、NMRの化学シフトの測定は中心的な役割を果たし、提案されている反応機構モデルの多くがNMRによる実験結果に基づいている。最近、酵素反応についての有力な機構として、低障壁水素結合機構が提案され、セリン・プロテアーゼの反応もこの機構に基づいて解釈され、その根拠として四面体中間体における $^1\text{H}$ 化学シフトの異常な低磁場シフトがあげられている。申請者は、上で求めた、反応の経理に沿ってQM/MM法に基づき $^1\text{H}$ 、 $^{15}\text{N}$ 、 $^{13}\text{C}$ の化学シフトを計算し、実験結果と整合的な結果を得ている。更に、低障壁水素結合に与るプロトンの自由エネルギー曲線を求め、セリン・プロテアーゼの場合は、低障壁水素結合機構が該当せず、この機構を仮定することなくNMRの

実験結果を説明することができることを明らかにしている。

### 論文審査の結果の要旨

酸素反応をはじめとする生体内化学反応の機構を明らかにすることは、現在の理論化学研究の重要な課題の一つである。酵素反応を取り扱うためには、数千から数万にのぼる原子を含む系のエネルギーを求める必要があるが、申請者は、反応部位を量子化学的手法により扱い、それを取り囲むタンパク質部分を分子力場法で扱うQM/MM法のプログラムを自作し、反応の自由エネルギー面を求めている。具体的には、ペプチド結合を開裂する代表的な酵素であるセリン・プロテアーゼの反応機構を明らかにするため、トリプシンを取り上げ、最初の反応段階であるアシル化の過程を詳細に調べている。

先ず、申請者はQM/MM法に基づいて最低エネルギー反応経路を求め、更に、分子動力学法による自由エネルギー摂動法を用いて、反応経路に沿った自由エネルギー変化を求めている。得られた自由エネルギー曲線から、この反応の場合、律速段階は四面体中間体を生成する過程であり、活性化エネルギーは17.8kcal/molと見積もっている。また、四面体中間体は、アシル化酵素への進む際の活性化エネルギーが、3.3kcal/molと小さく、その寿命は $10^{-10}$ 秒と極めて短いことを明らかにしている。申請者は、この計算結果に基づき、遷移状態の構造とエネルギーについて、新しい知見をえている。また、この酵素反応の場合、四面体中間体を安定化させる上で、極性の強いタンパク質残基による静電ポテンシャルが重要な役割を果たしていることを強調している。

申請者は、反応を効果的に進める上での、Asp102残基の役割について考察している。このセリン・プロテアーゼについては、2個のプロトンが同時に移動するチャージ・リレー機構が、古くから提案されており、この場合、Asp102は、プロトンの受容体として働く。申請者は、チャージ・リレー機構とAsp102をAsn102に置換した変異体の反応について、上と同様の方法を用いて自由エネルギー曲線を求めている。結果は、チャージ・リレー機構の場合、Asp102が中性となり、タンパク質場による静電安定化が小さくなり、上で述べた1個のプロトンが移動する機構に比べて四面体中間体が不安定化することを明らかにしている。また、Asp102では酵素・基質結合体が反応の進行に有利な立体構造を取るのに対し、Asn102変異体では、反応を進める上で構造の変化が必要なこと、及び四面体中間体の静電安定化が小さいことを明らかにしている。Asp102上のマイナス電荷が反応を進行させる上で、重要な役割を果たしていることを結論としている。

実験により酵素反応の機構を調べる上で、NMRの化学シフトの測定は中心的な役割を果たし、提案されている反応機構モデルの多くがNMRによる実験結果に基づいている。最近、酵素反応についての有力な機構として、低障壁水素結合機構が提案され、セリン・プロテアーゼの反応もこの機構に基づいて解釈され、その根拠として四面体中間体における $^1\text{H}$ 化学シフトの異常な低磁場シフトがあげられている。申請者は、上で求めた、反応の経路に沿ってQM/MM法に基づき $^1\text{H}$ 、 $^{15}\text{N}$ 、 $^{13}\text{C}$ の化学シフトを計算し、実験結果と整合的な結果を得ている。更に、低障壁水素結合に与るプロトンの自由エネルギー曲線を求め、セリン・プロテアーゼの場合は、低障壁水素結合機構が該当せず、この機構を仮定することなくNMRの実験結果を説明することができることを明らかにしている。

以上、申請者の研究は、これまで多くの論争が行われてきたセリン・プロテアーゼの反応機構を理論的に明らかにしたものと高く評価でき、博士（理学）の学位論文として十分な内容を含むものと考えられる。

なお、本申請論文に報告されている研究業績を中心として、これに関連した分野について試問した結果、合格と認めた。