

カテプシンーリガンド複合体の立体配座解析

○ 杉山拓¹, 後藤仁志¹, 西垣功一²

¹豊橋技術科学大学大学院工学研究科 (〒441-8580 豊橋市天伯町雲雀ヶ丘1-1)

²埼玉大学大学院理工学研究科 (〒338-8570 さいたま市桜区下大久保 255)

【はじめに】

アスパラギン酸プロテアーゼ (アスパラギン酸を触媒とする加水分解酵素) であるカテプシン D (CTSD) と E (CTSE) はタンパク質の消化という役割の他にアポトーシスなどにも密接に関わっていることから, 癌細胞の抑制やアルツハイマー病の予防に関するターゲット酵素として盛んに研究が行われている. この2つの酵素は, 活性条件, 分布場所および機能において, いくつか異なることが知られている. 一方, 1次配列の相同性は高く (FASTA による相同性探索結果: A鎖 57%, B鎖 52%の同一アミノ酸で構成), また X線結晶構造から立体構造もよく似ていること ($C\alpha$ による重ね合わせ: RMSD=1.77 Å) が分かっている. 最近, 埼玉大学西垣等は CTSD と CTSE に強い阻害活性や促進活性を示す複数の新規ペプチドを開発した. それらの結合エネルギーなどを評価するためのタンパク質の立体構造は PDB (protein data bank) などに頼ることになるが, 部分的な座標データの欠落, 水分子の不足, 不活性体から活性体までのどの状態にある構造なのかなど, いくつかの課題を解決する必要がある. そこで本研究では, カテプシンと新規ペプチドの複合体構造を作成し分子計算を行うため, CTSE の適切な立体構造モデルの構築を目指す.

【カテプシンの活性化機序】

一般にアスパラギン酸プロテアーゼは図 1 に示すように, 前駆体酵素 (zymogene) からいくつかの中間体 (intermediates) を経て活性成熟酵素 (mature) へと適正条件下で変化することが提唱されている. その仮説に従えば, 中間体から活性部位を覆っているアミノ酸残基鎖 (図 1 (b), 橙線) がプロ配列 (酵素前駆体から成熟酵素へと変わる際に切断された CTS 断片: 図 1 (b), 黒線) の位置へ移動することで, 活性部位を露出させ, 活性状態へ変化する. そして活性状態となったプロテアーゼは, 窪み部分 (図 1 (c), 紫円) を活性部位として加水分解機能を持つ. また CTSE の構造は, 活性部位が N 末端側のペプチド鎖によって閉じられていること, プロ配列が, β シートとしてタンパク質と結合していることから中間体 2 の構造であることが分かっている.

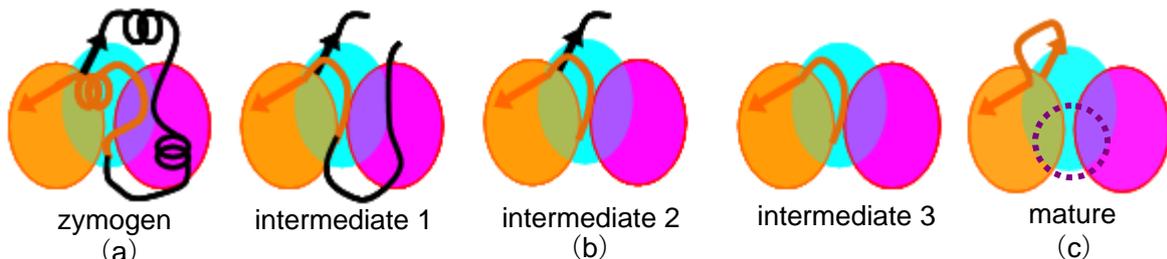


図 1 カテプシンの酵素前駆体から成熟酵素への変化

【カテプシン立体構造モデルの構築】

PDB から取得した CTSE の座標データ[1]は, 結晶構造中において不安定な部分の座標が欠落している (図 2). 実際のタンパク質構造により近づけるため, それらの不足部分のペプチド鎖を

CTSE と相同性の高い CTSD の対応する部分のペプチド鎖を用いて補完した。



図2 カテプシン E の構造補完部分

また、結晶構造において全ての水分子（結晶水）の座標が記述されているわけではない。今回、水分子が CTSE に対して与える影響を考察するため、真空モデルと PDB に記述されていた結晶水を付加したモデルを用いて、分子計算ソフト CONFLEX, 分子力場 MMFF94s による構造最適化計算を行った。その結果、CTSE の真空中を想定したモデルでは、タンパク質の構造が大きく崩れてしまった（最適化前との RMSD=5.24 Å）。一方、結晶水を付加したモデル（図3）では、結晶水がペプチド鎖ドメイン間に水素結合による架橋を形成することによって全体の立体構造を保持していることが分かった（最適化前との RMSD=1.36 Å）。これに対し、相同性の高い CTSD の同じドメインでは、ペプチド鎖の残基間相互作用によって構造を保っていることが確認できる。

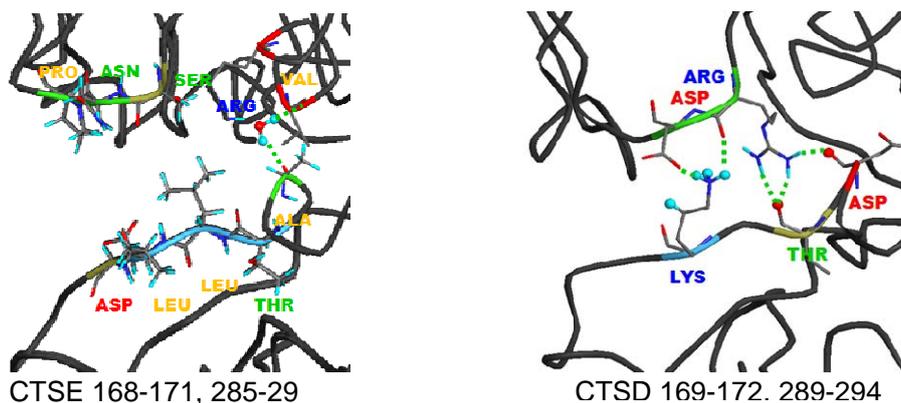


図3 カテプシン E とカテプシン D の相互作用比較

【水球モデルを使った動力学シミュレーション】

以上のことから、CTSE-ペプチド複合体の分子計算を行うために CTSE の立体構造を構築するためには、少なくとも座標が分かっている結晶水が必要不可欠であることが分かった。そして、より多くの水を付加したモデルを構築することによって、生体内で活性体状態にある CTSE の立体構造をより安定に得られると考えられる。そこで、CTSE の立体構造の保持に大きく寄与する水分子を特定するため、TIP3P を用いて明示的な水分子で CTSE を覆った二つの水球モデルを作成した：一つは水分子を真球状に配置するモデル、もう一つはタンパク質の原子から最低 15 Å の距離まで水を配置したモデルである。現在、これらのモデルについて AMBER を用いた分子動力学シミュレーションを行っている。

参考文献

- [1] N. Ostermann, B. Gerhartz, S. Worpenberg, J. Trappe, J. Eder, *J. Mol. Biol.* 342, 889-899 (2004).