

L-イソアスパラギン酸またはD-アスパラギン酸を含むペプチド基質と
PIMT とのドッキングシミュレーション

○野地郁彦¹、小林佳奈¹、小田彰史^{1, 2}、高橋央宜¹

¹東北薬科大学（〒981-8558 宮城県仙台市青葉区小松島 4-4-1）

²大阪大学蛋白質研究所（〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 3-2）

【緒言】

近年、生体内には存在しないと考えられていた D-アミノ酸がタンパク質やペプチド中、および遊離型として広く見出されるようになった。タンパク質中の D-アスパラギン酸は加齢にともなって増加し、白内障患者の水晶体やアルツハイマー病患者の β -アミロイドタンパク質中などから検出されており、加齢性疾患との関連性が示唆されている。また D-アスパラギン酸に加えて L-イソアスパラギン酸も同様に検出されている。天然の L-アスパラギン酸が反転・異性化するとき L-スクシンイミド中間体を介す反応機構が提唱されているが、この中間体のラセミ化が生成物に影響を与える。すなわち D-スクシンイミド中間体から D-アスパラギン酸が、L-スクシンイミド中間体から異性化した L-イソアスパラギン酸が生成される。これら 2 つのアスパラギン酸によりペプチド主鎖にコンフォメーション変化が生じ、タンパク質の異常凝集、活動の損失、分解の感受性の変化をもたらすことで加齢性疾患が起こると考えられている。生体内のタンパク質中で見出されている D-アミノ酸が主にアスパラギン酸であるのは、アスパラギン酸が五員環イミド中間体を經由しやすいので容易に反転が生じるためと考えられている。

Protein L-isoaspartate(D-aspartate) O-methyltransferase (PIMT)は D-アスパラギン酸と L-イソアスパラギン酸を天然の L-アスパラギン酸に修復する酵素である。また PIMT は S-adenosyl-Methionine (SAM)を補酵素として使用する。PIMT は SAM から L-イソアスパラギン酸、D-アスパラギン酸のカルボキシル基にメチル基を転移させることで、自発的に環化したスクシンイミド中間体の形成を誘導する。生成したスクシンイミド中間体から天然の L-アスパラギン酸や L-イソアスパラギン酸、D-アスパラギン酸、D-イソアスパラギン酸のいずれかが生成される。本研究では、PIMT がどのように L-イソアスパラギン酸、D-アスパラギン酸を認識するかを計算化学的に検討した。

【方法】

初期構造として PDB にあるヒトの PIMT (PDB ID:1i1n)の構造を用いた。まず結晶構造中の S-adenosyl-homocystein (SAH)を用いて SAM を作成し構造最適化を行った。PIMT の欠損残基を補完した後、補完した PIMT と SAM の複合体を作成し構造最適化、分子動力学 (MD)シミュレーションを行った。PIMT はタンパク質、ペプチドを基質とする酵素であるため、induced fit することが考えられるので、PIMT の基質として、ペプチド基質としてよく使われる Val-Tyr-Pro-L-isoAsp(D-Asp)-His-Ala から 3 残基を取り出した Pro-L-isoAsp(D-Asp)-His を用いてドッキング

を行った。得られた複合体構造に対して MD シミュレーションを行い、構造の精密化を行った。構造最適化、MD には Amber9.0 を使い、モデリングには Discovery Studio 2.0 を、ドッキングには LibDock を用いた。タンパク質の力場には ff03 を、リガンド及び補酵素には GAFF を使用した。溶媒は TIP3P モデルの水分子を使用し、温度は Langevin 法に基づいて 300 K で維持した。タイムステップを 2 fs にし、トータルで 10 ns のシミュレーションを行った。カットオフは 10 Å である。

【結果】

例として PIMT と 3 残基 Pro-L-isoAsp-His のドッキング結果を図に示す。また、PIMT が基質とドッキングするとき基質の C-末端側と水素結合をすることが重要であるという報告があるが、計算においても同様の水素結合が確認された。ヒトの PIMT においては、L-イソアスパラギン酸を含むペプチドの方が D-アスパラギン酸を含むペプチドよりも結合親和性が高いことが知られている。今回 Pro-L-isoAsp-His の C-末端側には 2 つの水素結合が確認されたが Pro-D-Asp-His の C-末端側では水素結合が見られなかった。これが結合親和性の違いをもたらしている可能性がある。複合体の MD の結果については当日発表する。

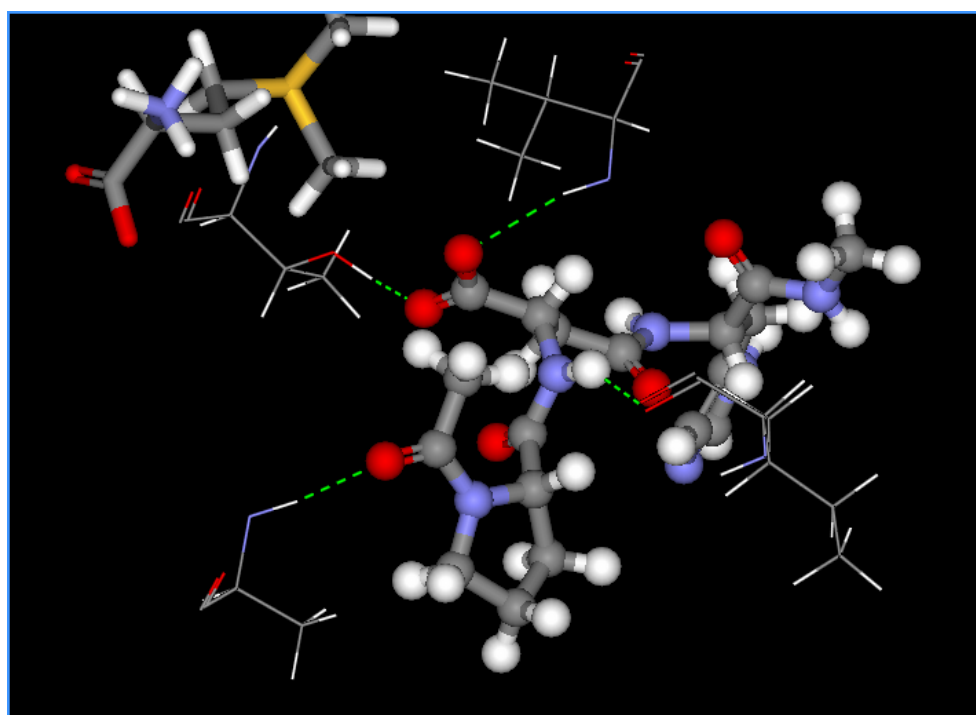


図. PIMT と Pro-L-isoAsp-His の複合体の基質周辺

【参考文献】

- S. C. Griffith, M. R. Sawaya, D. R. Boutz, N. Thapar, J. E. Katz, S. Clarke and T. O. Yeates, *J. Mol. Biol.* (2001) **313**, 1103-1116.
- N. Thapar, S. C. Griffith, T. O. Yeates, and S. Clarke, *J. Biol. Chem.* (2002) **277**, 1058-1065.
- 藤井紀子、本間 浩、*実験医学* (2008) **26**, 1278-1284.