

DOI:10.13232/j.cnki.jnju.2020.02.010

腺苷酸激酶催化产物释放过程中的水化动力学研究

孔剑阳*, 李文飞, 王 炜
(南京大学物理学院, 南京, 210093)

摘 要:腺苷酸激酶(Adenylate Kinase, AdK)是一种多底物反应酶,催化 $\text{ATP}\cdot\text{Mg}^{2+} + \text{AMP} \rightleftharpoons \text{ADP}\cdot\text{Mg}^{2+} + \text{ADP}$ 反应,维持机体能量平衡;其催化循环限速步骤为底物 ADP(Adenosine Diphosphate)释放,并伴随蛋白质的构象变化和关键位点水化(hydration)过程. 以往的研究表明,底物 ATP(Adenosine Triphosphate)和产物 ADP 共存的复合物共存态(ATP-ADP 共存态)有助于作为限速步骤的产物释放. 基于分子动力学模拟和哈密顿量副本交换方法研究 AdK 产物释放过程中, Mg^{2+} 、产物磷酸根、底物磷酸根以及催化位点关键氨基酸的水化过程. 分子模拟数据表明,在产物 ADP 释放过程中,与 Mg^{2+} 结合的磷酸根氧原子逐步被水分子取代,表现出配位交换过程,其中 ATP-ADP 共存态相较于 ADP-ADP 共存态表现出更为显著的配位交换. Mg^{2+} 周围水分子径向分布函数的差别也表明 ATP-ADP 共存态下, Mg^{2+} 的水化过程需要更多的水分子进入 Mg^{2+} 的第一配位壳,表现出与双产物共存状态(ADP-ADP 共存态)所不同的行为. 另外,还详细研究了产物 ADP 以及结合位点关键氨基酸的水化过程. 由于 AdK 核心区域的水化过程会影响其产物释放,关于水化过程的研究有助于理解 AdK 催化循环中的产物释放等物理过程的分子机制.

关键词:腺苷酸激酶,水化过程,分子动力学,产物释放,催化循环

中图分类号:O641

文献标识码:A

Hydration process in the product releasing of the enzymatic cycle of Adenylate Kinase

Kong Jianyang*, Li Wenfei, Wang Wei
(School of Physics, Nanjing University, Nanjing, 210093, China)

Abstract: Adenylate kinase (AdK) is a multisubstrate enzyme catalyzing the reversible phosphoryl transfer reaction $\text{ATP}\cdot\text{Mg}^{2+} + \text{AMP} \rightleftharpoons \text{ADP}\cdot\text{Mg}^{2+} + \text{ADP}$ and maintaining the energy balance of the body. The rate-limiting step of the whole AdK catalytic cycle is the product ADP releasing which is coupled with conformational change and hydration process. Recent research reveals that the substrate ATP and product ADP cobound state tends to facilitate the rate-limiting product releasing. In this work, by using all-atom molecular dynamics simulations with hamiltonian replica exchange and umbrella sampling, we simulated the hydration process of the Mg^{2+} , phosphate groups of the products/substrates and the key residues in the binding sites during the disassociation of product ADP. The results show that the oxygen atoms of the phosphate groups coordinated with Mg^{2+} can be gradually replaced by water molecules during the releaing process of the product ADP, demonstrating a coordination exchange process. Meanwhile, the results show that the coordination exchange is more prominent in the substrate-product cobound state than that in the two-product bound state. In addition, the radial distribution function of water molecules around the Mg^{2+} reveals that more water molecules enter into the fist coordination shell in the substrate-product cobound state. We also analyzed the detailed hydration process of the product ADP and the key residues in the binding sites. As the hydration process can affect the product releasing, our work provides insight into the detailed molecular mechanism of the product release of the enzymatic cycle of AdK.

基金项目:国家自然科学基金(11574132)

收稿日期:2019-07-23

* 通讯联系人, E-mail: njukongjy@163.com

Key words: Adenylate Kinase, hydration, molecular dynamics, product release, enzymatic cycle

酶是催化生物化学反应的重要生物大分子机器,主要由蛋白质分子构成.酶在生物体内行使包括信号传导、基因调控、能量代谢平衡、物质运输等功能^[1-2].在酶的催化作用下,细胞内本来发生很慢的化学反应能够在生物学相关时间尺度内完成,从而在调控生物过程和实现生物功能中起了至关重要的作用.酶的催化循环不仅包括化学反应步骤,还包括底物结合和产物释放等物理过程,并依赖于酶分子的大尺度构象运动.近年来,随着分子动力学模拟方法和单分子实验技术的发展,人们对酶催化循环中的关键步骤做了深入研究,揭示出酶催化循环中的多个重要物理和化学特征^[3-6].然而,自然界酶分子实现高效率催化的微观物理机制仍未被完全研究清楚,多个问题有待进一步深入研究.

在对酶的研究中,一个重要的模型蛋白是腺苷酸激酶(Adenylate Kinase, AdK)^[7].AdK是一种磷酸转移酶,催化如式(1)所示的可逆反应,负责维持细胞内ATP(Adenosine Triphosphate)相关的能量代谢平衡^[8]:

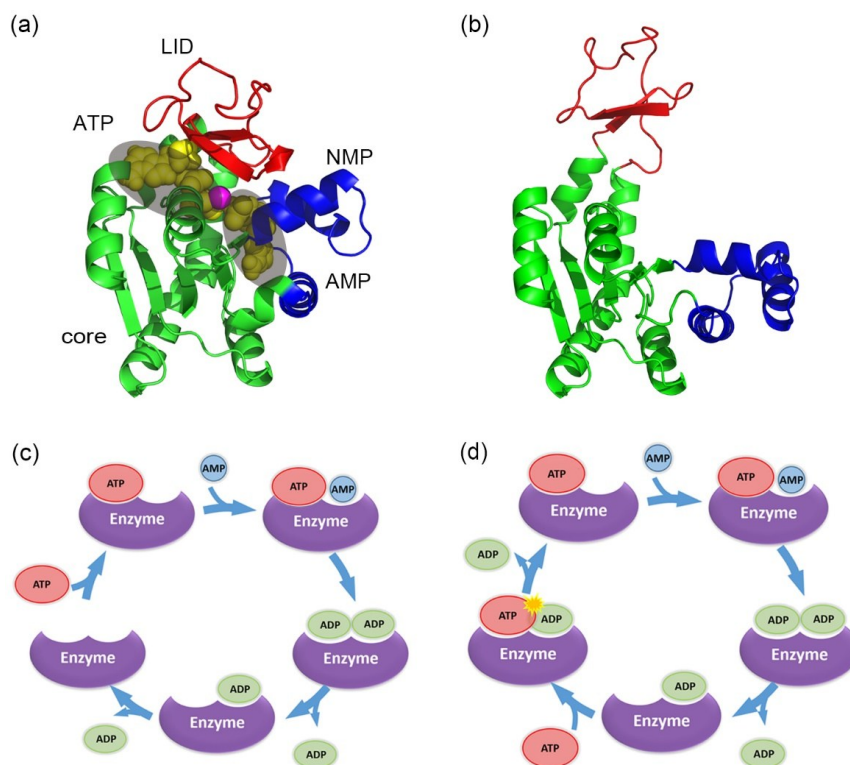


腺苷酸激酶包含core, LID(lid)和NMP(Nucleoside Monophosphate)三个结构域(图1a和图1b),可见特异性的结合底物AMP(Adenosine Monophosphate)和ATP或者产物ADP(Adenosine Diphosphate).其中,底物ATP结合在LID和core结构域之间,底物AMP结合在NMP和core结构域之间.化学反应步骤结束后,两个位点结合相应的产物ADP.有实验研究表明,LID结构域和NMP结构域在催化过程中需要做频繁的开关构象运动,形成“打开”或者“闭合”的构象状态^[3,7].在闭合状态下,LID和NMP结构域与core结构域的距离相对较近,蛋白内部的活性位点残基和底物被隔离于外部的水环境,并且为化学反应提供合适的场所,如图1a所示.随着构象的打开,LID和NMP结构域与core结构域的距离会逐渐变远,有利于产物释放和底物结合,如图1b所示.

在以往的研究中,人们利用实验和分子模拟的方法,从结构和动力学上探讨了AdK的催化循环过

程^[9-14].例如,Wang et al^[13]通过双势阱模型对AdK的构象变化自由能面及其动力学机制做了详细研究,并深入刻画了底物分子结合与蛋白质构象运动之间的耦合机制.Hanson et al^[5]通过单分子FRET实验跟踪了酶分子在整个催化循环中的构象分布,发现即使在没有结合底物的情况下,AdK仍有很大概率处于构象“关闭”状态.Ye et al^[14]基于常规分子模拟和加速采样方法对整个催化循环进行了模拟,提出了催化循环中底物结合和构象运动的可能耦合机制.特别是,Adkar et al^[15]基于分子动力学模拟发现,AdK在催化循环中存在“半开半闭”的构象状态,并且这种状态的稳定性来源于水分子和极性氨基酸(精氨酸和组氨酸)之间的特异性相互作用.最近,人们也开始关注 Mg^{2+} 和水分子在催化循环中的作用.例如,Kerns et al^[4]基于结构生物学方法深入探讨了 Mg^{2+} 在催化循环中的作用,发现 Mg^{2+} 不仅在磷酸根转移反应中起了关键作用,还有助于通过静电屏蔽效应促进催化产物释放.崔大超等^[16]也报道了 Mg^{2+} 与催化产物ADP的配位情况.另外,关于催化循环路径的研究也取得了重要进展.例如,以往认为AdK的催化循环过程遵循图1c的流程,即产物完全释放后才有底物结合^[4].最近的研究发现,在AdK的催化循环中,底物分子可以在限速产物释放之前结合形成底物-产物共存态^[17].这种底物-产物共存态会导致结合位点的空间阻挫效应,并能够促进产物释放(图1d).

通过全原子模拟和哈密顿量副本交换加速采样方法,本文研究了产物释放过程中AdK的 Mg^{2+} 、关键位点残基以及产物分子的水化(hydration)过程及其动力学特征.分子动力学模拟结果表明: Mg^{2+} 在AdK产物释放过程中存在配位交换现象,特别是产物-底物共存态(ATP-ADP态,简称TD态)和双产物共存态(ADP-ADP态,简称DD态)存在显著差别;在TD态,更多的水分子需要进入 Mg^{2+} 配位壳层.通过对产物ADP以及结合位点关键氨基酸的水化过程的研究讨论了配位对于产物释放的可能作用.相关结果有助于理解产物-底物共存态在催化循环中的作用,并对理解AdK产物释放微观物理机制具有参考意义.



LID domain is colored in red, NMP domain is colored in blue and core domain is colored in green.

图 1 (a) AdK 构象关闭状态的晶体结构(PDB code: 1AKE^[18]); (b) AdK 构象打开状态的晶体结构(PDB code: 4AKE^[19])
(c, d) AdK 的两种可能的催化循环路径, 路径(c)不涉及底物 ATP 与产物 ADP 共存的状态(ATP-ADP 共存态),
路径(d)经由 ATP-ADP 共存态

Fig. 1 (a) Crystal structure of the AdK at the closed state (PDB code: 1AKE), (b) crystal structure of the AdK at the open state (PDB code: 4AKE), (c, d) two possible pathways of the enzymatic cycle

In the pathway (c), the new substrates bind to the enzyme after the fully release of the products, whereas in the pathway (d), the new substrate ATP binds to the enzyme before the release of the product ADP in the NMP domain, forming the substrate-product cobound state (ATP-ADP).

1 模拟方法

1.1 分子动力学模拟细节 分子动力学模拟使用腺苷酸激酶的构象闭合态作为初始结构(PDB code: 1AKE)^[18]. 底物和产物分子的坐标由构象闭合态晶体结构(PDB: 1AKE)中的配体分子 Ap5A 构建. 由于晶体结构 1AKE 中没有 Mg^{2+} 的位置信息, 在分子模拟中, Mg^{2+} 的位置基于 Berry and Phillips^[20] 给出的晶体结构(PDB code: 1ZIO)重建. 蛋白质 AdK 放置在一个边长为 27 Å 的截角正八面体水盒子, 共包含约 8000 个 TIP3P 水分子^[21]. 分子动力学模拟采用了 Amber14 软件^[22], 蛋白质的力场选用了 Amberff14SB 力场^[23], ATP 和 ADP 的力场使用了 Meagher et al^[24] 给出的参

数; Mg^{2+} 参数选自 Allnér et al^[25]. 另外, 在模拟体系中加入 Na^+ 来维持系统的电中性^[26]. 所有的模拟中, 非键相互作用的截断距离被设置为 9 Å, 并使用了 PME 方法来计算长程静电相互作用^[27]. 所有与氢原子相连的共价键采用 SHAKE 算法进行约束^[28], 模拟的时间步长设置为 2 fs.

在模拟之前, 使用最速下降法和共轭梯度法^[29], 对初始结构进行 5000 步的能量最小化. 然后, 在 NVT 系综下, 将体系分阶段逐渐加热到 298 K. 在升温过程中, 对蛋白质分子的原子位置施加谐振子约束. 约束的强度在升温的不同阶段由 $24 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{Å}^{-2}$ 逐渐减弱为 $0.2 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{Å}^{-2}$. 最后, 对系统在 NPT 系综下做了时长为 40 ps 的弛豫分子模拟, 压强设为一个大气

压. 以上得到的结构作为下一步哈密顿量副本交换伞型抽样计算的初始结构.

1.2 哈密顿量副本交换伞型抽样方法 为了研究底物的脱离过程, 加快分子模拟采样的收敛, 本文采用哈密顿量副本交换伞型抽样方法来加速采样^[30]. 哈密顿量副本交换方法已经成功运用于多个 AdK 模拟过程^[31]. 在模拟中, 首先使用 $2 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{\AA}^{-2}$ 的拉力将产物 ADP 逐步从结合位点拉出至与蛋白质距离为 $20 \text{ \AA}$ 以上, 从而得到伞型抽样的初始结构. 为了防止因为产物的快速脱离而导致的构象变化, 以上制备初始结构的模拟中对 AdK 原子加了强度为 $0.1 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{\AA}^{-2}$ 的位置约束.

所有的哈密顿量副本交换伞型抽样模拟是在 298 K 的 NVT 系综下完成的. 采用的反应坐标是 NMP 位点的产物 ADP 与整个蛋白质分子 C_α 质心之间的距离, 变化范围是 $9 \sim 31 \text{ \AA}$, 共分为 24 个伞型抽样窗口, 伞型势采用了力常数为 $2 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{\AA}^{-2}$ 的谐振子势. 为了增强采样质量, 相邻伞型抽样窗口的模拟系统原子坐标依据哈密顿量副本交换规则进行交换^[31]. 在伞型抽样过程中, 每个窗口的模拟时长为 10 ns , 每 1 ps 记录一次轨迹, 副本交换成功率在 0.05 到 0.40 之间. 另外, 为了研究构象开态的产物结合以及水化性质, 利用 Targeted 分子动力学模拟方法^[32]将处于构象关闭态且结合底物/产物分子的 AdK 拉到构象开态, 拉伸所采用谐振子势的力常数为 $2 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{\AA}^{-2}$.

2 结果讨论

2.1 处于构象开态与构象闭态的 Mg^{2+} 水化性质

蛋白质内的水分子是蛋白质的重要结构组成部分, 对蛋白质的功能和构象变化起到至关重要的作用. 例如, Adkar et al^[15]的研究发现水分子对 AdK 的半开半闭构象状态的稳定性起了关键作用. 为了理解不同状态下水分子与 Mg^{2+} 之间的相互作用, 本文模拟了 DD, TD 态下, AdK 分别在构象闭态和构象开态中, 水分子与 Mg^{2+} 的配位情况. 在判断水分子是否与 Mg^{2+} 配位结合时, 截断距离设置为 $2.6 \text{ \AA}$. 所采用的截断距离能够包含典型的 Mg^{2+} -O 配位距离^[33]. 如图 2a 所示, 在 DD 态下, AdK 在构象闭态和构象开态平均结合的水分子数目分别为 2.2 和 2.8 个. 相应的代表性结构在图 2b 中给出. 对比 TD 态与 DD 态配位水分子数目的变化可以看出, 在 TD 态时, 构象闭态和构象开态的 Mg^{2+} 只与一个水分子配位; 而在 DD 态时, 构象闭态和构象开态的 Mg^{2+} 可以分别与两个和三个水分子配位. 进一步的分析发现, 这种 TD 态和 DD 态的水合现象的差异来源于 Mg^{2+} 与磷酸根的不同结合模式. 在 DD 态, Mg^{2+} 分别与两个 ADP 的末端磷酸根结合. 而在 TD 态, Mg^{2+} 倾向于与 ATP 的两个磷酸根以及 ADP 的末端磷酸根结合; 从而只可以在有限的空间方向上配位一个水分子. 这种 TD 态的 Mg^{2+} 与 ATP 磷酸根的结合模式使得其水分子配位数即使在构象打开

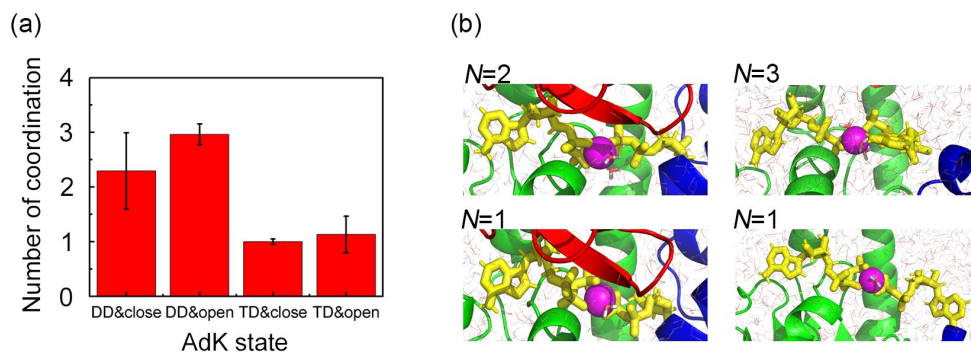


图2 (a) DD, TD 态下 AdK 在构象闭态和构象开态中 Mg^{2+} 配位水分子数目 (误差棒表示对应状态的水分子数目的标准误差);

(b) Mg^{2+} 配位结构示意图, 左上、右上、左下、右下依次为 DD 态的构象闭态、DD 态的构象开态、TD 态的构象闭态以及 TD 态的构象开态, Mg^{2+} 由绛红色小球表示

Fig. 2 (a) Average number of H_2O coordinating with Mg^{2+} in DD and TD states at the closed and open states (error bar indicates the standard error of the number of H_2O in the corresponding state), (b) representative structures showing the coordination between Mg^{2+} and H_2O in DD and TD states at the closed and open state

后也不会有显著变化,表现出与 DD 的水分子配位情况的显著差别. 这种 Mg^{2+} 在 TD 态和 DD 态的不同位配位模式可能会进一步影响蛋白质的局部氢键网络结构,进而影响蛋白质的构象变化和产物释放过程.

2.2 底物-产物共存态的 Mg^{2+} 在产物释放过程的配位交换 为了更进一步研究产物脱离过程中 Mg^{2+} 的配位性质,本文模拟了 Mg^{2+} 与水分子以及底物/产物磷酸根 O 原子之间配位数在产物释放过程中的变化. 以往的研究发现 NMP 结构域的 ADP 释放是 AdK 催化循环的限速步骤,因此,本论文重点关注 NMP 结构域产物 ADP 释放过程中 Mg^{2+} 的配位交换行为.

图 3a 给出的是 DD 态下 NMP 结构域产物 ADP 释放过程中 Mg^{2+} 配位数的变化情况. 可以看出,随着产物 ADP 与蛋白质分子质心距离的增大, Mg^{2+} 与磷酸根中的 O 原子配位数从最初的 3 减少到 2. 与此同时, Mg^{2+} 与水分子配位数从最初的 2 增加到 3. 以上结果说明在产物 ADP 释放过程中,存在配位交换现象,即 Mg^{2+} 配位壳的磷酸根氧原子被水分子取代的现象. 对比图 3c 和图 2b 的结构示意图可以看出,DD 态下由于构象的打开而增加的 Mg^{2+} 配位水分子处于与 DD 连线相垂直的方向;而由于产物 ADP 释放所增加的配位水分子处于原 ADP 的磷酸根氧原子位置,表现出配位交换现象. 这种残基和水分子竞争的现象也在其他的系统中被观察到^[34]. 另外,在 AdK 的不同晶体结构中,与 Mg^{2+} 配位的水分子数目也有所不同^[33].

图 3b 给出的是 TD 态下 NMP 结构域产物 ADP 释放过程中 Mg^{2+} 配位数的变化情况. 图 3d 的结构图表明,在 TD 态下, Mg^{2+} 与磷酸根中的 O 原子配位数从最初的 4 减少到 2;相应地,配位的水分子数目从最初的 1 增加到 4. 和 DD 态的情况相比,在 TD 态下,随着 ADP 的脱离,配位水分子数目增加了 3,即在产物 ADP 释放过程中,更多的水分子进入 Mg^{2+} 配位壳,表现出更为显著的配位交换现象. 另外,不论是 DD 态还是 TD 态,当产物 ADP 与蛋白质分子质心距离增加为 15 Å 时, Mg^{2+} 的配位交换过程已经完成. 以上结果有助于理解以往工作中人们观测到的底物-产物共存态对催化循环的促进作用,即 TD 共存态不仅影响蛋白质残基的局部氢键网络,也会影响活性位点附近的水化行为.

2.3 Mg^{2+} 的配位水分子径向分布函数 径向分布函数通常被用来表征离子的水化现象. 本文基于伞型抽样模拟数据计算了产物释放过程中 Mg^{2+} 周围水分子的径向分布函数(图 4a 和图 4b). 总体而言,在 DD 和 TD 态下,随着产物的脱离,蛋白质核心区域内部的水分子数目逐渐增多. 通过对比 DD 态和 TD 态的径向分布函数,发现在产物结合状态下,处于 TD 态的蛋白的 Mg^{2+} 配位水分子数目较少. 当产物脱离至 9 Å 时, TD 态开始发生配位交换,水分子分布概率增加,DD 和 TD 态表现出相似的水分子分布情况. 而当产物进一步脱离时,随着配体交换的增多,TD 态的水分子分布概率进一步增大. 这些结果表明处于 TD 态的产物不仅易于脱离^[17],而且当产物脱离完成后,蛋白质内部的水分子将增多,这可能有助于蛋白质构象的进一步打开,并为结合新底物创造条件.

2.4 底物、产物以及关键氨基酸的水化过程 为了进一步研究产物释放过程中的水化性质,本工作也计算了 LID 和 NMP 结构域底物/产物结合位点的关键氨基酸的水分子配位数(图 5a 和图 5b). 其中, LID 结构域的 ATP 和 ADP 结合位点均由如下残基构成: 9-15, 119, 123, 132-134, 137 和 200-202. NMP 结构域的 ADP 位点残基为: 31, 36, 53, 57, 59, 64, 85, 86, 88, 92, 123, 156 和 167. 水分子的氧原子与氨基酸的 N 或 O 原子的距离小于 3.6 Å 即认为水分子与蛋白质残基有配位结合. 其中所采用的截断距离能够完全包含水分子径向分布函数中的第一个峰位^[35]. 总的来说,无论在 DD 态还是 TD 态,底物释放过程中结合位点氨基酸的配位水分子数目变化不太显著,即产物释放过程不涉及大量水分子进入到结合口袋区域. 可能的原因是产物的释放不需要 NMP 结构域的完全打开,因此限制了水分子的进入. 同时,从 LID-core 结构域质心距离(图 5e)和 NMP-core 结构域质心距离(图 5f)在产物释放过程中的变化可以看出,产物释放过程中, LID 结构域构象无明显变化,这主要是由于未对 LID 结构域的底物/产物施加伞型约束势从而限制 LID 结构域的底物/产物和蛋白质分子的运动. 相对而言, NMP 结构域可以有小幅的构象打开运动,但远没有达到完全打开态. 在 TD 态, NMP 结构域在产物结合态附近具有比 DD 态更大的平均 NMP-core 距离. 但是,在 DD 态,产物的完全释放需要 NMP 具有更大的打开程度,从

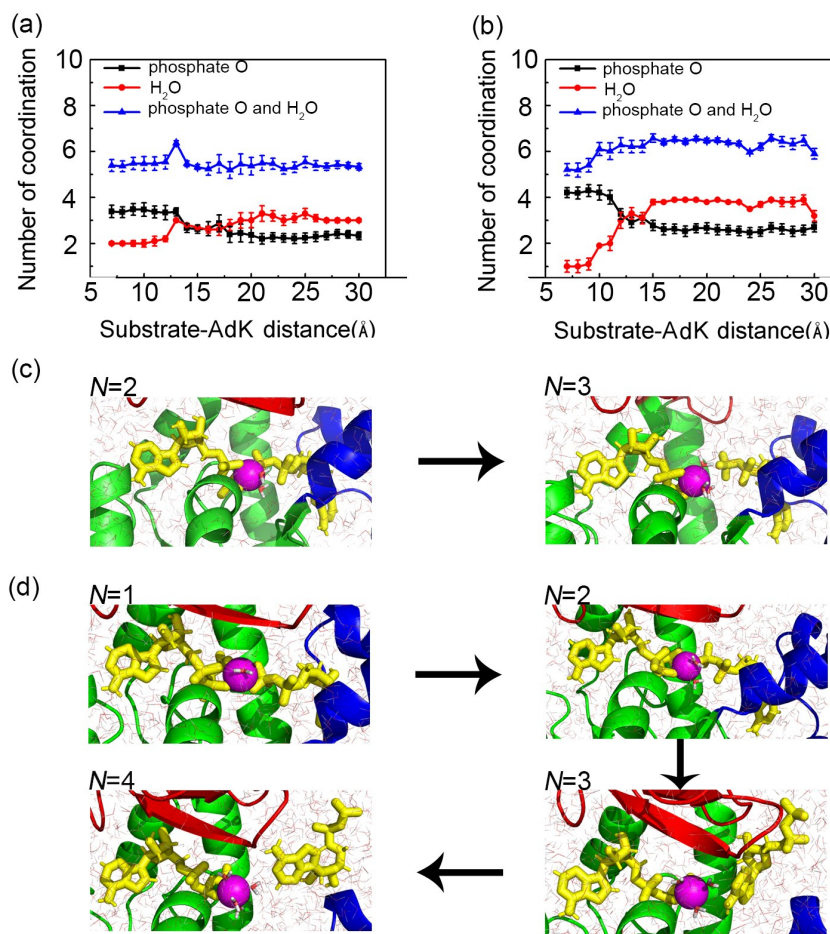


图3 DD态(a)、TD态(b)下NMP结构域产物ADP释放过程中Mg²⁺配位数的变化;

DD态(c)、TD态(d)下NMP结构域产物ADP释放过程中Mg²⁺配位结构变化示意图

Fig. 3 Number of coordination of Mg²⁺ during the disassociation of NMP product ADP in the chemical states of DD (a) and TD (b), representative structures showing the coordination of Mg²⁺ during the disassociation of NMP product ADP in the chemical states of DD (c) and TD (d)

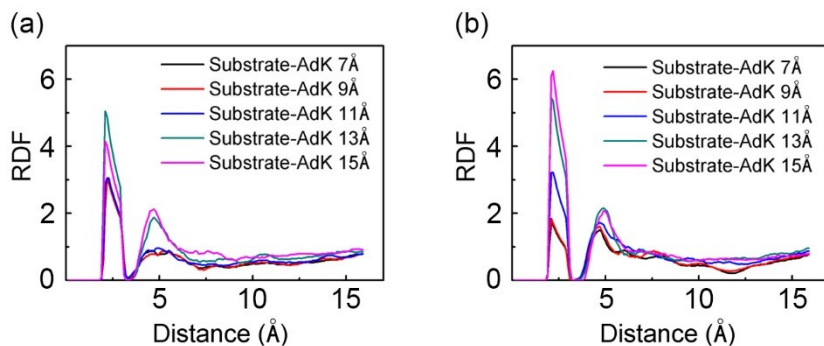


图4 DD态(a)、TD态(b)下,NMP产物ADP释放过程的不同阶段Mg²⁺周围水分子的径向分布函数

Fig. 4 Radial distribution function (RDF) of H₂O around the Mg²⁺ during the disassociation of NMP product ADP in the chemical state of DD(a) and TD(b)

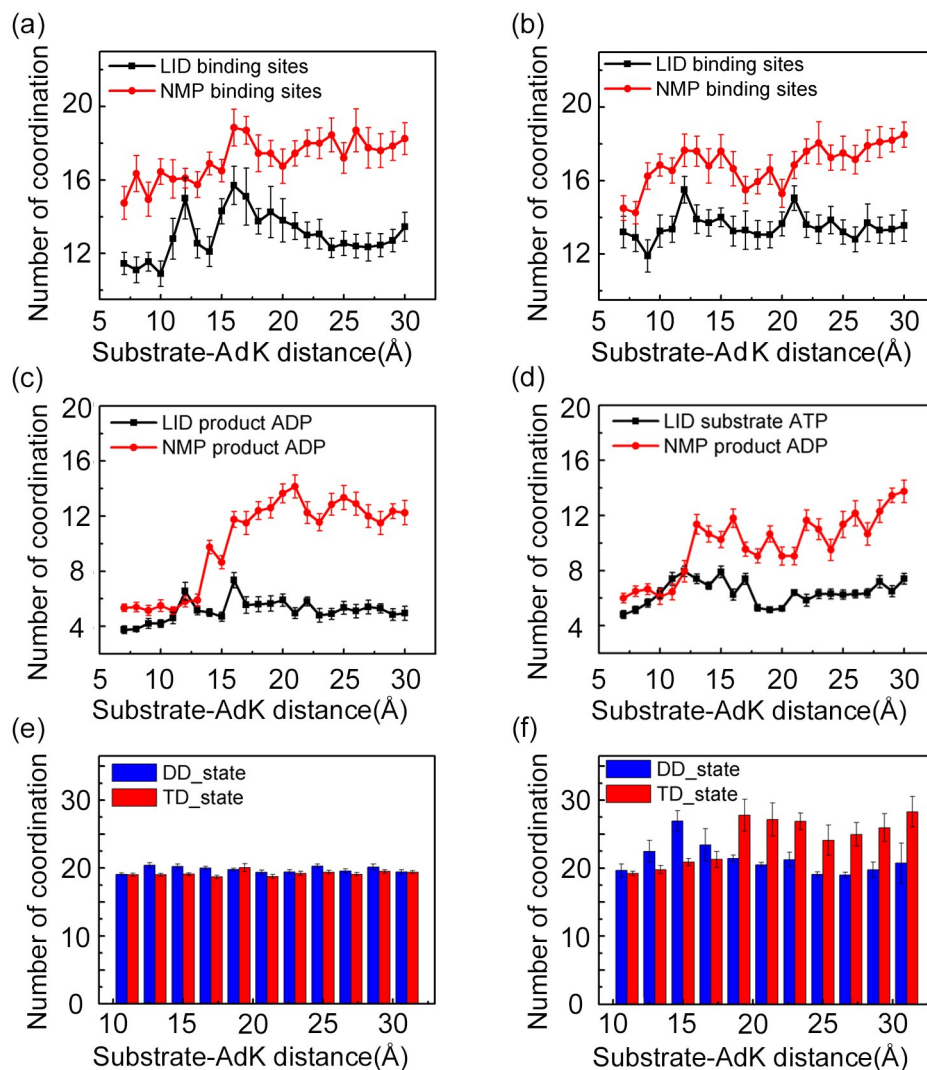


图5 (a,b) DD态(a)和TD态(b)下,与蛋白质底物/产物结合位点关键氨基酸结合的水分子数目;(c,d) DD态(c)和TD态(d)下,与底物/产物分子结合的水分子数目;(e,f) DD态和TD态下,LID-core结构域质心距离(e)和NMP-core结构域质心距离(f)变化。

Fig. 5 Number of H_2O coordinating with binding sites in the chemical state of DD (a) and TD (b) state, number of H_2O coordinating with substrate/product in the chemical state of DD (c) and TD (d) state, LID-core distance (e) and NMP-core distance (f)

而可能会增加产物所需要克服的能垒。

另外,对产物释放过程中底物/产物的配位水分子数的统计表明(图5c和图5d),无论是DD态还是TD态,LID结构域的产物/底物的配位水分子数目变化不太明显。这主要是在伞型抽样过程中,LID结构域的产物/底物没有施加伞型偏置势,因此在NMP结构域产物ADP的释放过程中没有显著的位置变化,仍被包埋在结合位点。而对于NMP结构域的ADP,随着其离开结合位点,更多的水分子与其结合。特别是,不论对于DD态还是TD态,配位水分子的增加主要发生在

质心距离为10~15 Å之间。这一区间也是 Mg^{2+} 发生配位交换的区间。这种 Mg^{2+} 配位交换与产物ADP水化过程的相关性说明 Mg^{2+} 与产物ADP之间配位键的断开可能是决定产物释放的关键事件。

3 结 论

产物ADP的释放是AdK催化循环的限速步骤,因此对产物释放过程进行深入细致的刻画对理解自然界酶实现高效率催化的微观物理机制具有重要意义。在本论文中,通过全原子分子动力学模拟和哈密顿量

副本交换伞型抽样方法,研究了AdK产物释放过程中的水化性质. 计算结果显示 Mg^{2+} 和产物ADP之间配位键的断开是产物ADP释放过程的关键事件之一,并伴随着 Mg^{2+} 的配位交换和产物ADP的水化过程. 当AdK处于底物与产物共存的状态时,配位交换现象更显著,产物释放过程需要有更多的水分子进入 Mg^{2+} 的配位壳. 另外,分子模拟数据表明,由于产物的释放不需要NMP结构域的完全打开,因此NMP结构域的关键氨基酸位点的配位水分子数目在产物的释放过程未发生显著变化. 本工作关于水化过程的研究有助于理解AdK催化循环中的产物释放等物理过程的可能分子机制. 在将来的研究中,可以对水化过程在产物释放中的关键作用及其分子机制做进一步的定量研究. 另外,本文在伞型抽样模拟中,仅选择了产物ADP质心与蛋白质分子的质心距离为反应坐标,在后续研究中,可以在产物脱离和蛋白质构象运动两个反应坐标同时施加伞型偏置势,得到更加充足的构象空间采样.

致 谢 感谢南京大学高性能计算中心提供的计算机时.

参考文献

- [1] Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. The cell cycle and programmed cell death//Molecular biology of the cell. The 4th Edition. New York: Garland Science, 2002: 983—1027.
- [2] Hammes G G. Multiple conformational changes in enzyme catalysis. *Biochemistry*, 2002, 41(26): 8221—8228.
- [3] Henzler-Wildman K A, Thai V, Lei M, et al. Intrinsic motions along an enzymatic reaction trajectory. *Nature*, 2007, 450(7171): 838—844.
- [4] Kerns S J, Agafonov R V, Cho Y J, et al. The energy landscape of adenylate kinase during catalysis. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2015, 22(2): 124—131.
- [5] Hanson J A, Duderstadt K, Watkins L P, et al. Illuminating the mechanistic roles of enzyme conformational dynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, 104(46): 18055—18060.
- [6] Saavedra H G, Wrabl J O, Anderson J A, et al. Dynamic allostery can drive cold adaptation in enzymes. *Nature*, 2018, 558(7709): 324—328.
- [7] Müller C, Schlauderer G J, Reinstein J, et al. Adenylate kinase motions during catalysis: An energetic counterweight balancing substrate binding. *Structure*, 1996, 4(2): 147—156.
- [8] Knowles J R. Enzyme-catalyzed phosphoryl transfer reactions. *Annual Review of Biochemistry*, 1980, 49(1): 877—919.
- [9] Ariyaratne A, Wu C H, Tseng C Y, et al. Dissipative dynamics of enzymes. *Physical Review Letters*, 2014, 113(19): 198101.
- [10] Qu H, Zocchi G. How enzymes work: A look through the perspective of molecular viscoelastic properties. *Physical Review X*, 2013, 3(1): 011009.
- [11] Pislakov A V, Cao J, Kamerlin S C L, et al. Enzyme millisecond conformational dynamics do not catalyze the chemical step. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, 106(41): 17359—17364.
- [12] Chu W T, Wang J. Energy landscape topography reveals the underlying link between binding specificity and activity of enzymes. *Scientific Reports*, 2016, 6(10): 27808.
- [13] Wang Y, Gan L F, Wang E K, et al. Exploring the dynamic functional landscape of Adenylate Kinase modulated by substrates. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 2013, 9(1): 84—95.
- [14] Ye C, Ding C T, Ma R S, et al. Electrostatic interactions determine entrance/release order of substrates in the catalytic cycle of adenylate kinase. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 2019, 87(4): 337—347.
- [15] Adkar B V, Jana B, Bagchi B. Role of water in the enzymatic catalysis: Study of $\text{ATP} + \text{AMP} \rightarrow 2\text{ADP}$ conversion by Adenylate Kinase. *Journal of Physical Chemistry A*, 2011, 115(16): 3691—3697.
- [16] 崔大超, 任卫同, 李文飞等. 腺苷酸激酶催化循环后期 Mg^{2+} 转移的分子动力学模拟. *物理化学学报* 2016, 32(2): 429—435. (Cui D C, Ren W T, Li W F, et al. Metadynamics simulations of Mg^{2+} transfer in the late stage of the adenylate kinase catalytic cycle. *Acta Physical-Chimica Sinica*, 2016, 32(2): 429—435.)
- [17] Li W F, Wang J, Zhang J, et al. Overcoming the bottleneck of the enzymatic cycle by steric frustration. *Physical Review Letters*, 2019, 122(23): 238102.

- [18] Bellinzoni M, Haouz A, Graña M, et al. The crystal structure of Mycobacterium tuberculosis adenylate kinase in complex with two molecules of ADP and Mg^{2+} supports an associative mechanism for phosphoryl transfer. *Protein Science*, 2006, 15(6): 1489—1493.
- [19] Müller C W, Schlauderer G J, Reinstein J, et al. Adenylate kinase motions during catalysis: an energetic counterweight balancing substrate binding. *Structure*, 1996, 4(2): 147—156.
- [20] Berry M B, Phillips G N. Crystal structures of *Bacillus stearothermophilus* adenylate kinase with bound Ap_5A , Mg^{2+} Ap_5A , and Mn^{2+} Ap_5A reveal an intermediate lid position and six coordinate octahedral geometry for bound Mg^{2+} and Mn^{2+} . *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 1998, 32(3): 276—288.
- [21] Jorgensen W L, Chandrasekhar J, Madura J D, et al. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *Journal of Chemical Physics*, 1983, 79(2): 926—935.
- [22] Case D A, Babin V, Berryman J, et al. *Amber 14*. San Francisco: University of California Publish, 2014.
- [23] Hornak V, Abel R, Okur A, et al. Comparison of multiple Amber force fields and development of improved protein backbone parameters. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 2006, 65(3): 712—725.
- [24] Meagher K L, Redman L T, Carlson H A. Development of polyphosphate parameters for use with the AMBER force field. *Journal of Computational Chemistry*, 2003, 24(9): 1016—1025.
- [25] Allnér O, Nilsson L, Villa A. Magnesium ion - water coordination and exchange in biomolecular simulations. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 2012, 8(4): 1493—1502.
- [26] Joung I S, Cheatham T E. Determination of alkali and halide monovalent ion parameters for use in explicitly solvated biomolecular simulations. *Journal of Physical Chemistry B*, 2008, 112(30): 9020—9041.
- [27] Darden T, York D, Pedersen L. Particle mesh Ewald: An $N \cdot \log(N)$ method for Ewald sums in large systems. *The Journal of Chemical Physics*, 1993, 98(12): 10089—10092.
- [28] Andersen H C. Rattle: A “velocity” version of the shake algorithm for molecular dynamics calculations. *Journal of Computational Physics*, 1983, 52(1): 24—34.
- [29] Fletcher R, Powell M J D. A rapidly convergent descent method for minimization. *The Computer Journal*, 1963, 6(2): 163—168.
- [30] Torrie G M, Valleau J P. Nonphysical sampling distributions in Monte Carlo free - energy estimation: Umbrella sampling. *Journal of Computational Physics*, 1977, 23(2): 187—199.
- [31] Pelz B, Žoldák G, Zeller F, et al. Subnanometre enzyme mechanics probed by single - molecule force spectroscopy. *Nature Communications*, 2016, 7: 10848.
- [32] Schlitter J, Engels M, Krüger P. Targeted molecular dynamics: A new approach for searching pathways of conformational transitions. *Journal of Molecular Graphics*, 1994, 12(2): 84—89.
- [33] Rutkowska-Zbik D, Witko M, Fiedor L. Ligation of water to magnesium chelates of biological importance. *Journal of Molecular Modeling*, 2013, 19(11): 4661—4667.
- [34] Dudev T, Cowan J A, Lim C. Competitive binding in magnesium coordination chemistry: Water versus ligands of biological interest. *Journal of the American Chemical Society*, 1999, 121(33): 7665—7673.
- [35] Liu C, Zhang Y Y, Zhang J, et al. Interplay between translational diffusion and large-amplitude angular jumps of water molecules. *The Journal of Chemical Physics*, 2018, 148(18): 184502.

(责任编辑 章 强)