

## 4P123 protoporphyrinogen IX oxidase と基質との相互作用シミュレーション

(石原産業・中研) ○赤木 俊夫

### 【序】

protoporphyrinogen IX oxidase (PPO, EC. 1. 3. 3. 4) は porphyrin 合成経路上に位置し、補酵素 FAD を用いて、protoporphyrinogen IX (PP) を還元する酵素である (図 1)。ミトコンドリア、葉緑体に存在する原核生物型と細胞質に存在する真核生物型のアイソザイムが知られており、原核生物型 PPO を阻害する分子は、クロロフィル合成を遮断することで植物を枯死に至らしめる光要求型の除草剤として古くから知られている。

我々は以前、PPO 阻害剤の構造特徴を分子軌道法、分子力場法で解析し、異なる化学構造の阻害剤の間に見られる共通特徴を提案した (図 2)<sup>1)</sup>。近年になって PPO と阻害剤との複合体の結晶構造が相次いで発表され<sup>2, 3)</sup>、これらを重ね合わせたところ、予測を実証する結果 (図 3) が得られた。そこでこれまでの研究を踏まえて、酵素反応機構に関するシミュレーションを試みた。

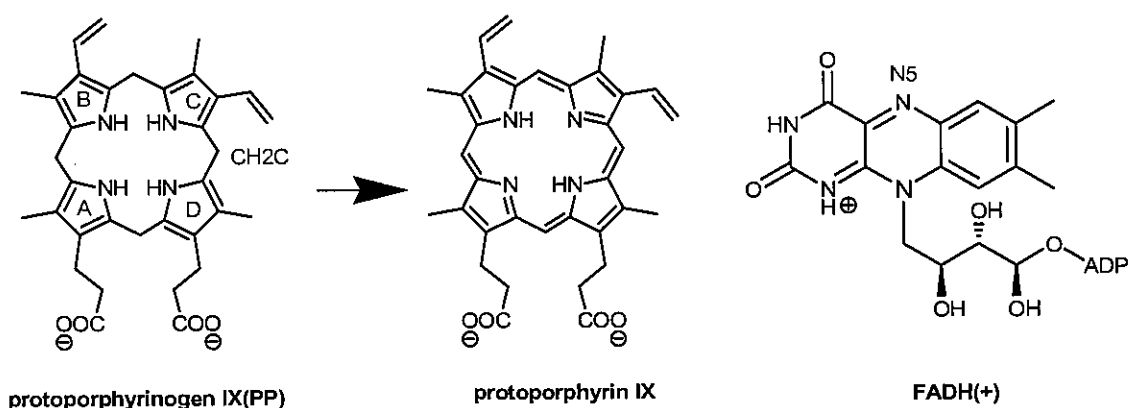


図 1 PPO の触媒反応と補酵素

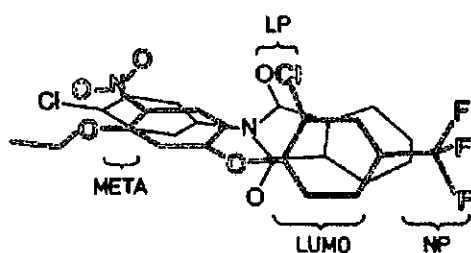


図 2 PPO 阻害剤の重なり (予測)

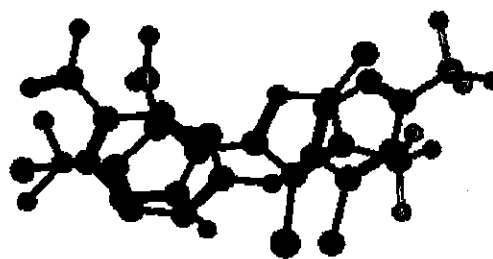


図 3 PPO 阻害剤の重なり (実測)

### 【方法】

- (1) pyrazole 系阻害剤の結合したタバコ PP02 の構造 (PDB1SEZ) において、若林らの仮説<sup>3)</sup>に基づき、pyrazole の位置に PP の A, D 環が来るように配置し、MMFF94 力場で構造最適化を行なった。途中、基質周辺の込み合ったアミノ酸側鎖のコンフォメーションを逐次補正しながらエネルギー安定構造 (MM 構造) を得た。
- (2) MM 構造中の PP と FAD (以下、反応系) の構造を一部固定しながら、UHF/PM3 を用いて水素移動の反応座標計算を行ない、得られた反応前/後錯体、遷移状態様構造について、そのコア部分の

構造を一部固定しながら B3LYP/6-31G (d) で求め、B3LYP/6-311G\* (2d, p) でエネルギー計算した。  
 (3) 反応系の PM3 構造を拘束しながら、Amber99 力場を用いて 2.5nsec の動力学計算を行なった。  
 得られた軌跡において反応前錯体を遷移状態様構造に置き換え、エネルギーの差分より各瞬間の「遷移確率」を求めた。

### 【結果】

PDB1SEZ には PP を許容する空間的余裕はなかったが、MM 最適化の過程で緩和し、PP-PP0 複合体の構造が得られた。注目すべき特徴は次のとおりである (図 4)。

- (1) pyrazole 相当部位は B, C 環が占有
- (2) B, C 環をブリッジする CH2 と FAD の N5 とが近接 (4.1Å)
- (3) Ala、Phe の骨格 CO と A, C 環の NH との水素結合
- (4) C 環側鎖 COO と FADH(+) の pyrimidine 環との salt bridge

これより CH2 から N への hydride 移動が起こっていることが示唆されたので、FAD-PP の構造を一部固定しながら水素の座標を走査し、PM3 計算を行なった。得られた反応前/後錯体、遷移状態様構造のコア部分の構造を拘束して DFT 計算を行なったところ、非常に大きな Eact (40kcal/mol) となった。反応系を取り巻くアミノ酸の効果を分子動力学で考慮したところ、少なからぬ頻度で Eact を超えることが明らかとなった。これより揺らぎによって反応系にエネルギーが供給され、hydride 移動が可能になっていることが示唆された。

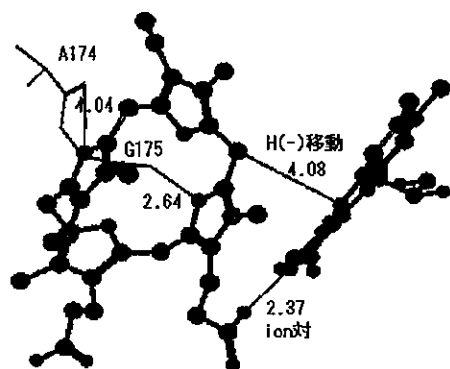


図 3 PP-FAD およびその周辺の MM 構造

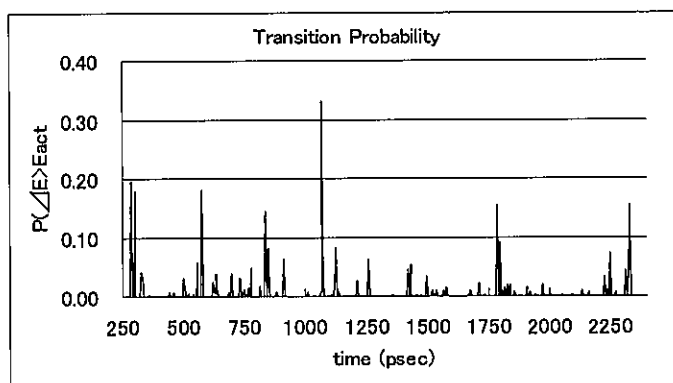


図 4 hydride 移動のエネルギー条件を満たす確率

- 1) T. Akagi, N. Sakashita; *Z. Naturforsch.* 48c, 345 (1993)
- 2) M. Koch, C. Breithaupt, R. Kiefersauer, J. Freigang, R. Huber, A. Messerschmidt; *EMBO J.*, 23, 1720 (2004)
- 3) H. R. Corradi, A. V. Corrigall, E. Boix, C. G. Mohan, E. D. Sturrock, P. N. Meissner, K. R. Acharya; *J. Biol. Chem.*, 281, 38625 (2006)
- 4) R. Uraguchi, Y. Sato, A. Nakayama, M. Sukekawa, I. Iwatani, P. Boeger, K. Wakabayashi; *J. Pestic. Sci.* 22, 314 (1997)