

電子転移酵素シトクロム b5 の活性に関する理論的研究

(阪府大院理、阪市大*) ○麻田俊雄、西本吉助*、小関史朗

[序論]

フラビン系酵素 NADH-シトクロム b5 還元酵素 (b5R) は、1 回の触媒サイクルで NADH から 2 個の電子を受け取り、2 つの電子転移酵素シトクロム b5 (b5) に 1 電子ずつ受け渡す働きをしている。このサイクルでは、NAD が 2 電子還元しかできないのに対し、ビタミン B2 を基本骨格する FAD を補酵素にもつフラビン系酵素では 2 電子還元と 1 電子酸化の両方を行う最も重要な酵素として機能している。われわれは、これまでに b5R 中において FAD や NADH の補酵素がどのアミノ酸残基と強く相互作用しているかについて、結合自由エネルギー計算とアラニン置換の手法を用いて明らかにしてきた¹⁾。さらに、b5R と b5 の結合モデルを分子動力学 (MD) シミュレーションによって予測し、2 つのタンパク質の結合がドッキング部位に集中した電荷をもつアミノ酸残基間の静電相互作用から生じていること明らかにした。またドッキングモデルから b5 に含まれるヘムが活性中心の FAD に接近することによって、電子移動がドッキングしていない場合と比べて容易に進行するようになることを QM/MM 計算による研究で明らかにし、この酸化還元反応サイクルの初期のメカニズムを提案した²⁾。今回、これまでとは別のかたちのドッキング構造を対象に QM/MM 計算を用いて構造と反応性について解析したので報告する。

[方法]

補酵素 FAD と NADH の原子電荷は、RESP (restrained electrostatic potential) 電荷を用いた。b5R と b5 の構造はそれぞれの X 線結晶構造を元に水素原子を標準的な座標に配置することで生成した。さらに b5/b5R を含む一辺 70 Å 以内に TIP3P 水分子を 9986 個配置し、系の水和モデルとした。現在までドッキング構造を実験的に捉えることには成功していない。そこで b5R に含まれる FAD と b5 に含まれるヘムとの距離ができるだけ接近するようにドッキングモデルを作成した後、余分なエネルギーを取り除くために構造最適化を行った (図.1)。続いて 300K までの昇温過程、300K、1 気圧の 2nsec にわたる MD シミュレーションを経て、平衡構造を生成した。以上の計算には AMBER99 力場を用いている。続いて MD 計算で FAD と NADH が最接近した構造をもとに、QM/MM 計算を行い NADH から FAD へのヒドリドイオン(H-)移動の反応経路を解析した。QM/MM 計算の QM 領域を図 2 に示す。ひとつは b5R の活性中心である NADH のニコチンアミド部位(青色)と FAD のイソアロキサジン部位(赤色)、もうひとつは b5 の活性中心であるヘム(黄色)とヘム面に垂直な位置に存在する二つのヒスチジン残基(グレー)を含んでいる。

QM 領域の計算レベルは ROHF/LanL2DZ を用い、MM 領域は AMBER99 力場を使った。

結合自由エネルギーは、水和自由エネルギー計算として静電的な寄与は Poisson-Boltzman(PB) モデルを、さらに、非静電的な自由エネルギー項の計算には表面積近似(SA)を用いて評価した。この方法は PB/SA 近似として知られている。QM/MM 計算は自作のプログラムを用いて行い、ab initio MO 計算には Gaussian03 を用いた。

[結果と考察]

今回、新しいドッキング構造を作成して解析を行った。**b5** と **b5R** において結合に関与できる電荷を持ったアミノ酸はいずれも四角形の頂点ライクな位置に結合部位をもっているため、三次元構造としては 180 度回転した 2 個のドッキング構造をとることが可能である。図 1 には今回使ったドッキング構造を示した。180 度回転した従来の構造では、結合の自由エネルギーが -146.6kcal/mol ²⁾であったのに対し、今回用いた構造では、 -173.0kcal/mol とより安定であることがわかった。この要因として、**b5** と **b5R** 間の静電相互作用が 67.7kcal/mol 程度不安定化した分、脱水和による自由エネルギー不安定化が

99.4kcal/mol 抑えられたことによるものであることがわかった。この事実は、静電相互作用の結合への安定化は自由エネルギー的には不安定化に作用することと対応する。

さらに、アラニン置換の方法によって、結合に重要に関与するアミノ酸残基を特定した。これは、実験³⁾からすでに報告されている重要なアミノ酸残基と対応している。

MD シミュレーションから、活性部位の NADH と FAD が接近した構造を元にして H^- 移動による NADH から FAD への 2 電子移動のポテンシャル変化を計算した。その結果、ヘムが存在しない場合、 $+28.8\text{kcal/mol}$ のエネルギー障壁が存在したのに対し、**b5** と **b5R** が接近したドッキング構造では、 $+21.9\text{kcal/mol}$ と低く抑えられることを明らかにした。また、同時に生成物のエネルギーも同時に低下することがわかった。以上のことから、遠距離相互作用である静電相互作用により、**b5** と **b5R** が相互作用してドッキング構造を形成し、これが引き金になって、NADH から FAD への H^- 移動が加速されるモデルが妥当であると結論できる。以上、詳細は当日に発表する。

[文献]

- 1) Asada, T.; Nagase, S.; Nishimoto, K.; Koseki, S. *J.Phys.Chem.B*, **2008**, *112*, 5718.
- 2) Asada, T.; Nagase, S.; Nishimoto, K.; Koseki, S. *J.Mol.Liquid*, 2008, submitted.
- 3) Iyanagi, T. *Biochemistry* **1977**, *16*, 2725.

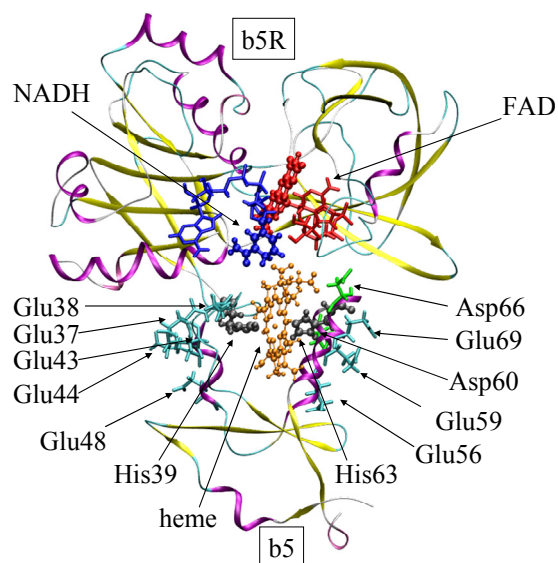


図 1 AMBER99 力場による最適化された **b5/b5R** のドッキング構造

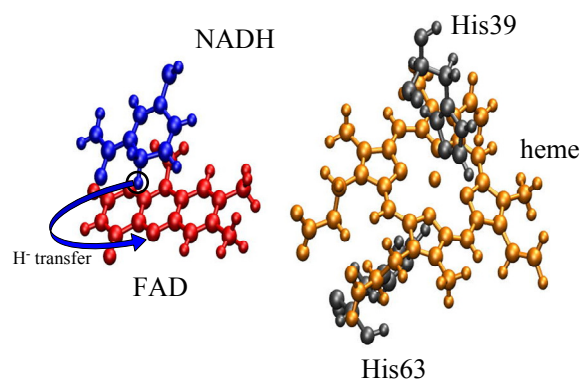


図 2 QM/MM 計算における QM 領域