

1P127

Horseradish Peroxidase のへムに配位したシアニドの NMR 常磁性シフト：量子化学計算モデルサイズ依存性

(¹首都大院理工・²分子研・³JST-CREST)

○山木大輔^{1,3}, 藤井 浩^{2,3}, 波田雅彦^{1,3}

【序】へムタンパク質のへム鉄周辺の配位環境を研究する上で常磁性 NMR は極めて有効な観測方法である。このような系の常磁性シフトと電子状態や分子構造の対応を考察するには量子化学計算とその解析が不可欠である。藤井らは、活性中心であるへム鉄に結合したシアニドの ¹³C-NMR 常磁性シフトが周辺環境に大きな影響を受け、シアニドは鉄周辺の電子状態の良いプローブとなることを示した (図 1)。これまでに我々は、へム鉄に配位した(1)ヒスチジン(鉄近接 His)周辺の水素結合 (図 1 内の(1))、(2) シアニド周辺の水素結合 (図 1 内の(2)) を考慮したモデルについて量子化学計算をおこない、常磁性シフトの解析をおこなった。これらのモデルの計算結果より、各種へムタンパク質の実験の傾向は(1)により説明できること、また、同一の(1)の水素結合様式を持ちながらシフトが異なる系においても、それらの差は(2)の効果で定性的に説明できることがわかった。

しかしながら、これらのモデルでは近接残基しか考慮していないため、へム中心部と周辺部間の電荷移動の効果を考慮できていない。電荷をもつアミノ酸残基がへム中心部に直接水素結合している場合は、その残基の関与する電荷移動の効果を過大評価している可能性がある。特に、horse radish peroxidase(HRP)の場合、(1)鉄近接 His と負電荷をもつアスパラギン酸(Asp)の COO⁻が水素結合しているうえ、(2) シアニドイオン側も正電荷をもつアルギニンの C(NH₂)₂⁺が水素結合しており、周辺部の効果は重要であると思われる。この系において、どこまでの範囲のアミノ酸残基が活性中心の電子状態に影響を与え、常磁性シフトを変化させているのか、どの程度の効果があるのかは、まだ解明されておらず興味もたれている。

本研究では、シアニドの配位した HRP について、常磁性シフトに寄与する残基の範囲と、その影響の程度を明らかにするため、活性中心から一定の距離の範囲内のアミノ酸を含めたモデルについて量子化学計算を行い、異なる距離範囲のモデルを比較

する。比較のためにヘム中心部が荷電残基と結合していないシアニドシトクロム c についても同様の計算をおこなう。

【方法】シアニドの配位した HRP (PDB: 7ATJ)、シトクロム c (PDB: 1I5T) の構造より、鉄原子を中心に特定の半径 R 内 ($R = 3.0 \sim 10.0 \text{ \AA}$) にあるアミノ酸残基を抽出し、モデルを構築した (図 2)。ただし、ポルフィリンの側鎖やアミノ酸の一部が範囲内に含まれている場合、側鎖・アミノ酸全体をモデルに含めた。量子化学計算には UB3LYP 法を用い、常磁性シフトの計算にはフェルミコンタクト項を考慮した。

【結果】シアニドシトクロム c の ^{13}C -NMR 常磁性シフトのモデル半径 R 依存性を図 3 に示す。半径 $R=3.0 \text{ \AA}$ では、シアニドイミダゾール鉄ポルフィリンのみを含み、シフトは -5800 ppm であった。半径 $R=4 \text{ \AA}$ 近辺では、シアニドと水素結合している Tyr の効果により正方向にシフトする。半径 $R=6 \text{ \AA}$ のモデルではポルフィリンの側鎖の影響により、さらに正方向にシフトする。半径 $R=8 \text{ \AA}$ では、負方向へ大きく変化し、 8 \AA 離れた残基も電子状態に影響を与え、常磁性シフトを変化させていることを示している。 $R=8 \text{ \AA}$ 以降では徐々に変化が小さくなり収束する傾向を示している。

以上のように荷電残基が直接水素結合していないシアニドシトクロム c の場合でも、 $R=8 \text{ \AA}$ 程度の遠方の残基の影響をうけていることを示している。シアニドの配位した HRP モデルの結果、電子状態の解析は当日発表する。

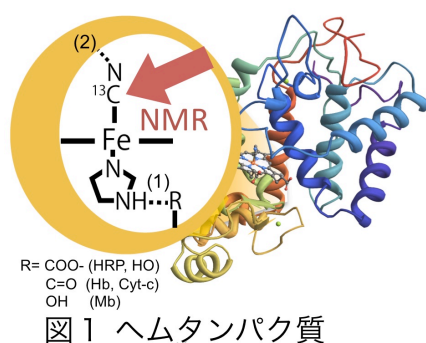


図 1 ヘムタンパク質

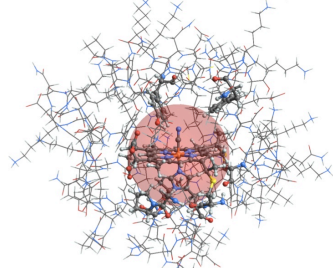


図 2 $R=6.0 \text{ \AA}$ モデル (ball&stick の部分)

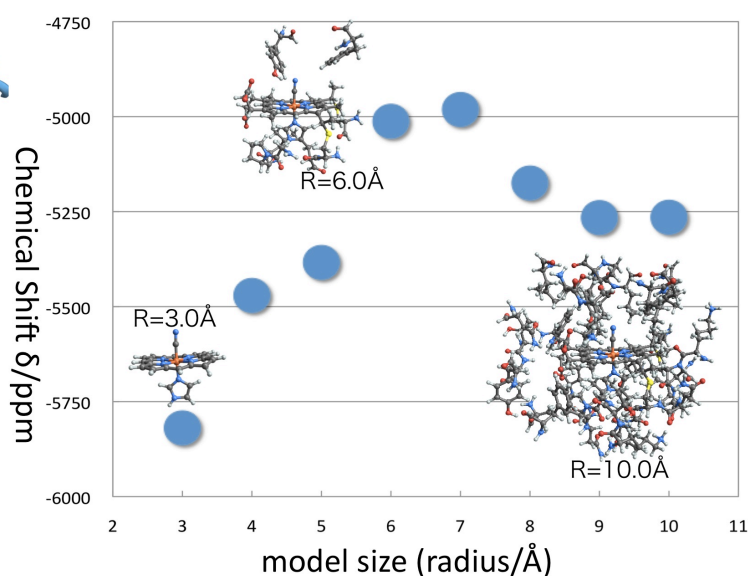


図 3 シアニドシトクロム c の ^{13}C -NMR 常磁性シフトの計算値のモデルサイズ (半径 R) 依存性