

## 4P080

### 分子動力学法による Ferredoxin - NADP<sup>+</sup> - Reductase の活性部位の構造解析

(金沢大院・自然) ○菅野 龍馬, 井田 朋智, 瀬尾 倅介, 水野 元博

### Structural Analysis of Catalytic Active Site in Ferredoxin -NADP<sup>+</sup>- Reductase by Molecular Dynamics Simulation

(Graduate School of Natural Science and Technology, Kanazawa University)

○Ryoma Kanno, Tomonori Ida, Daisuke Seo, Motohiro Mizuno

#### 【序論】

Ferredoxin-NADP<sup>+</sup>-Reductase(EC.1.18.1.2, FNR)は微生物、植物などに存在し、自然界に広く分布する多様な生物の酸化還元代謝に関与する酵素である。その中でも特に、緑色植物やシアノバクテリアに見られるフェレドキシンを介した NADP の酸化還元反応は、非循環型光合成反応において重要な役割を果たしており、FNR に関する知見が様々な分野において報告されている。X線構造解析により、FNR の補酵素である Flavin Adenine Dinucleotide(FAD)のイソアロキサジン環の *si* 面と *re* 面、双方に位置する Tyrosine(TYR)が種に関係なく共通する構造であり、2つの TYR が FAD のドメインとなることが報告されている [1]。特に、*si* 面の TYR と FAD のイソアロキサジン環の距離や環の傾きが、特異的な配置を取るにも関わらず、異なる起源でも共通して見られる構造であることから、FNR において重要な因子であると考えられている。また、この2つの TYR に対する変異体導入実験より、*si* 面の TYR が FAD の還元反応に、*re* 面の TYR が NADP の還元反応に大きく寄与するのではないかと報告されている[2-3]。本研究では、分子動力学(MD)法を用いることにより、*in vitro* な条件下における Wild Type 及び Mutant FNR の構造解析を行うことで、Wild Type の基質である FAD 周辺の共通構造の構造安定性を解明すると共に、Wild Type, Mutant 間の動的及びその平均構造の変化を調べることから、FAD 及び NADP の還元反応との関連性について解析する。

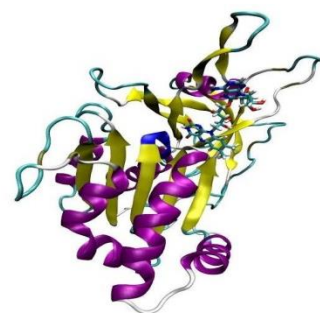


Fig.1 FNR Bio unit 構造

#### 【計算方法】

MD 計算の初期構造として Wild Type Pea-FNR 1 ユニットの X 線構造解析結果を用い、溶媒に TIP3P 水分子を用いた。Mutant FNR の初期構造は、Wild Type の X 線構造より Amber tool を用いて作成した。基質である FAD の電荷計算は Gaussian 09 にて行った。また、MD 計算には Amber 12 を用い、力場は leaprc.ff12SB 及び leaprc.gaff とした。まず、300K, 1atm の NPT アンサンブル条件下において、アニーリングを行った後、NVT アンサンブルにて構造データをサンプリングした。

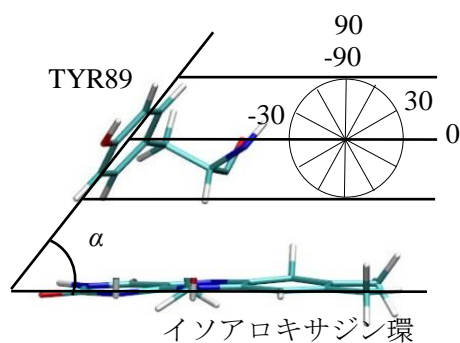


Fig.2 TYR のフェノール環の傾き  $\alpha$

*si*面に位置する TYR に関する電子状態計算は、MD 計算より得られた平均構造から、TYR 及び隣接する LEU, SER と FAD を選択し、FAD のイソアロキサジン環と TYR のフェノール環の角度  $\alpha$  を変数として、M06-2X/6-311G\*にて全電子エネルギー計算を行った(Fig.2)。

### 【結果】

酵素 FNR 及び補酵素 FAD と基質 NADP<sup>+</sup>に関する MD 計算の結果から、NADP<sup>+</sup>が近接していない時の構造は *re* 面の TYR が FAD に stack している形を取るのに対し、NADP<sup>+</sup>接近時は、TYR の代わりに、NADP<sup>+</sup>が stack する構造が得られた。このことから、Wild Type の NADP<sup>+</sup>の還元反応における酵素活性は、*re* 面の TYR-FAD 間の stack の解離と NADP-FAD 間の stack の形成が大きく影響していると推察される。

Wild Type における MD 計算の結果、Fig.2 に示すフェノール環とイソアロキサジン環の傾き  $\alpha$  の揺らぎは大きく、強い束縛はないと考えられる(Fig.3)。また、Arakaki らは自由エネルギーの  $\alpha$  依存性の計算において、FNR に共通な傾きが、局所的に安定な自由エネルギーに由来すると報告していたが、TYR 周辺の残基を考慮した計算を行った結果、比較的広い  $\alpha$  の領域で安定なエネルギーを取ると推察される(Fig4)。また、安定なエネルギーを取る  $\alpha$  の範囲と MD 計算の揺らぎの値は比較的良い一致を見せる。以上のことより、 $\alpha$  の値が酵素活性に与える影響は小さく、揺らぎの平均構造として、同一の値が観察されているだけであると考えられる。

FNR の Wild Type 及び Mutant における、基質 NADP<sup>+</sup>の有無に対する MD 計算の結果と電子状態計算の詳細な結果は当日ポスターにて報告する。

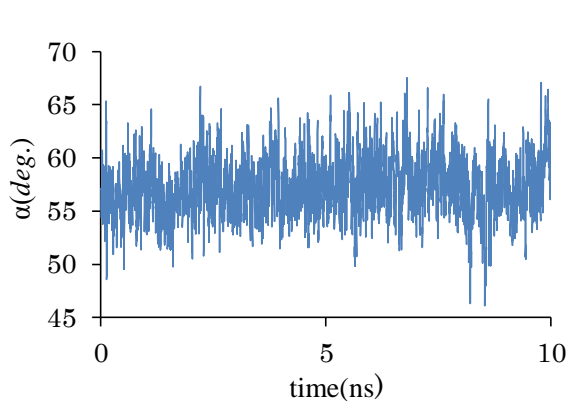


Fig.3 MD 計算における  $\alpha$  の揺らぎ  
Wild Type に関する MD 計算における  $\alpha$  の  
10ps 当たりの移動平均。

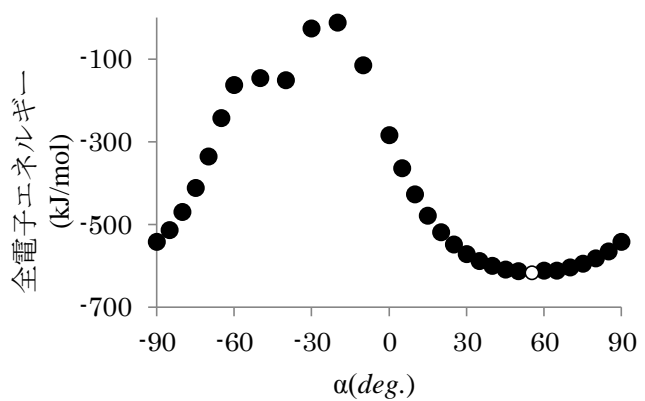


Fig.4  $\alpha$  の変化における全電子エネルギー変化  
図中○は MD 計算における平均構造の  $\alpha$  の値を  
示す。

### 【参考文献】

- [1] Arakaki, A.K., Ceccarelli, E.A., and Carrillo, N.(1997) *FADEB J.* 11, 133-140
- [2] Arakaki, A.K., Orellano, E.G., Calcaterra, N.B., (2001) *J. Biol. Chem* 276, 44419-44426
- [3] Nora, B.C., Guillermo, A.P., Elena, G.O., Eduardo, A.C.,(1995) *Biochemistry* 34, 12842-12848