

2P084

分子動力学法による Ferredoxin - NADP⁺- Reductase の構造解析
(金沢大院・自然) ○菅野 龍馬, 井田 朋智, 瀬尾 悌介, 水野 元博

Structural Analysis of in Ferredoxin -NADP⁺- Reductase by Molecular Dynamics Simulation

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

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

【序論】

フラビン-ニコチンアミドの電子伝達機構を有するフラビンタンパク質はヒトの体内やシアノバクテリア、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。NADP 酸化還元酵素である Ferredoxin-NADP⁺-Reductase(EC.1.18.1.2, FNR)は、植物やシアノバクテリアに関する非循環型光合成反応における電子伝達機構を担う事から、FNR に対する知見が様々な分野において報告されている。FNR の機能と構造に関して、X 線構造解析により、FNR の種の間で共通する構造が解明されており、共通構造に対する変異導入実験により、その重要性などが示唆されている。これらの実験から、共通構造の中で、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おり、残基の芳香属性が酵素活性への影響を与えるとも考えられている[1,2]。一方、*re* 面の TYR に関しては、SER 変異体に関し、FAD の還元速度は減少するものの、NADP の還元速度は上昇することが報告されている。その理由として、野生型において、*re* 面側の TYR308 が FAD-NADP 結合部位に stack し、NADP の結合を阻害するが、SER308 では stack を形成せず、NADP が優位に結合できるためと言われている[3]。しかし、この双方の TYR の構造と酵素活性の関係性については明確となっていない。そこで本研究では分子動力学法を用い、*in vitro* 条件下における野生型および変異型の FNR の構造を明確にするとともに、NADP 結合前-結合後及び野生型-変異型間の構造の差から、野生型の酵素活性の機構及び、変異型の酵素活性の変化に対する知見を得る。

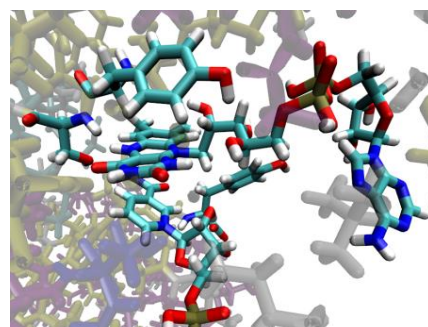


Fig.1 FAD 周辺の構造

【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。変異体 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 の電荷計算には Hartree-Fock/6-31*を選択し、Gaussian 09 にて行った。また、MD 計算には Amber 12 を用い、力場は learprc.ff12SB 及び learprc.gaff とし

た。まず、NPT アンサンブル条件下において、時間刻み 2fs で 5,000,000 Steps アニメーションを行った後、NVT アンサンブルにて構造データをサンプリングした。

【結果】

NADP 結合前後での構造解析の結果、NADP 結合後にヘリックスの N 末端の正電荷が NADP に結合するため、270-285 残基で構成されるヘリックスの挙動が変化し、また、NADP 結合残基が隣接する 168-180 ヘリックスにおいても挙動の違いが確認された。このことから、ヘリックスの構造変化は FNR の酵素活性に影響を与えるのではないかと予測される。

野生型-Y308S 変異型間の酵素活性の変動において、すでに報告されている stack した TYR308 残基の NADP 結合阻害は、その配置と Y308S 変異体との 308 残基の揺らぎの差から確認することができた。また、2つのタイプ間での挙動の違いを確認する為、各残基の主鎖 (CA,C,N 原子) の RMSF(Root mean square fluctuation)を測定した(Fig.2)。野生型では、NADP 結合に参与する 2つのヘリックス(168-180,270-285)の揺らぎに関し、N 末端側の RMSF は小さく、C 末端側の RMSF は大きくなることがわかった。このことから、NADP が結合する N 末端は、NADP 結合前から束縛を受けていると考えられる。

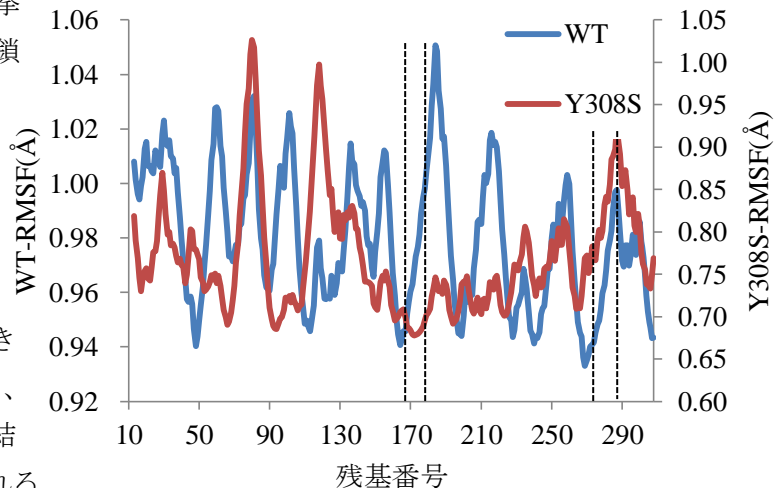


Fig.2 全残基の RMSF

Y308S においては、末端ではなく、ヘリックス内に RMSF の小さな残基を含む場合や、RMSF が極小値を取る残基がヘリックスから離れているなど異なる挙動を示した。

また、局所構造での変化を確認するため、野生型及び Y308S 変異体において、FAD-308 残基の重心原子間の距離と FAD-ligand 残基間の水素結合距離を測定したところ(Table1)、Y308S において SER308 は stack 結合を形成できないため、FAD との距離が大きく開き、ligand としての機能を失うが、それ以外の FAD の ligand となる残基との結合距離に大きな変化は見られず、FAD 周辺での構造変化は小さいと予測される。

Table 1 100ns 区間における FAD-308 残基の重心平均距離及び FAD-ligand 残基との水素結合平均距離。括弧内はその標準偏差を示す。

308 残基	LEU88O(Å)	TYR89OH (Å)	SER90N(Å)	CYS108O(Å)	LYS110N(Å)	
Wild	6.42(0.53)	2.91(0.13)	2.72(0.16)	3.64(0.15)	2.94(0.13)	3.48(0.32)
Y308S	8.53(1.07)	2.75(0.12)	2.66(0.13)	3.05(0.16)	3.21(0.16)	3.59(0.29)

【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