

Cu、Zn を含む活性酸素除去触媒の反応メカニズムの関する理論的研究

(京府大院*, 京大院工**)

○山田 知明*, リントウルオト正美*, ユハ リントウルオト**

Theoretical study on mechanism of Cu and Zn containing Superoxide Dismutase

(Graduate School of Life and Environmental Sciences, Kyoto Prefectural University*, Graduate School of Engineering, Department of Synthetic Chemistry**)

○Chiaki Yamada*, Masami Lintuluoto*, Juha Lintuluoto**

【緒言】

ヒトの活性酸素種除去酵素である SOD には 3 種類存在し、それぞれ金属を含有し異なる部位に存在している。SOD3 は Fig. 1 に示すように銅、亜鉛を含むホモ 4 量体で細胞外に存在する (CuZnSOD3)[1]。反応サイトは Cu であり、また Zn は反応サイト周辺の電荷保持の役割を担うと考えられている。実験結果より Fig. 2 に示すような反応機構が提案されている。Cu は接近するスーパーオキシドアニオンラジカルによって酸化され、Cu と Zn の間に架橋する形で配位している His113 は活性酸素種の還元過程でプロトン化すると考えられている。

銅から 5.8 Å 離れた場所にある Arg186 は活性酸素種を活性サイトまで誘導する役割や結合を保持する役割を果たしていると考えられ[2][3]、Asp167 は Cu と Zn にそれぞれ配位している His96 と His121 に配位することで立体構造を安定化している。また、Asn180 は Cu の上部に存在し、周辺の水分子と水素結合ネットワークを形成している。

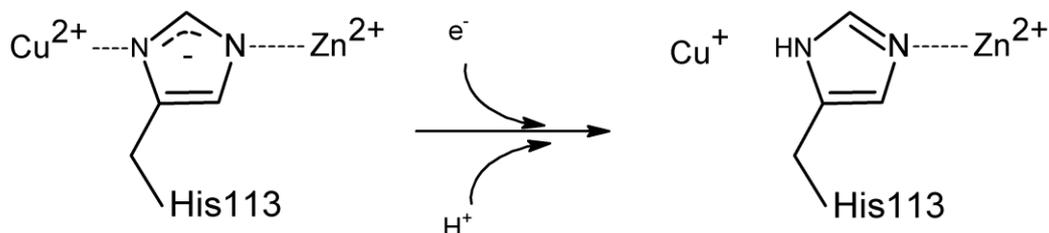
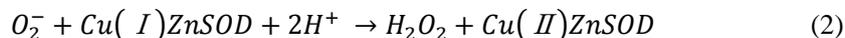
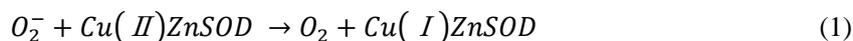


Fig. 2 提案されている SOD3 反応機構

本研究では SOD3 の反応機構の解明を目的とし、これまでの計算化学的研究において考慮されなかった第二配位圏のアミノ酸までを含んだ QM/MM モデルを用い計算を行った。

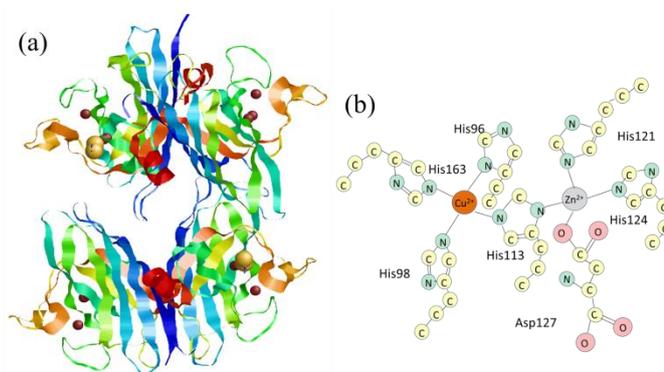


Fig. 1 SOD3の構造 (a) ホモ4量体 (PDB ID: 2jlp)

(b) SOD3の活性部位

【計算方法】

X線結晶構造解析(PDB ID:2JLP)を使用しモデル化を行った。活性サイトである Cu、Zn から 10 Å 内に存在する 56 個のアミノ酸残基、8 つの水分子を選択し、これらのうち、銅と亜鉛、銅と亜鉛に配位するアミノ酸残基(His96、His98、His121、His124、Asp127、His163)と 3 つの水分子を QM 領域、それ以外の分子を MM 領域とした。計算方法として、ONIOM(B3LYP:UFF)法を用いた。基底関数として金属には SDD、それ以外には 6-31G(d, p)を用いた。構造最適化において QM 領域および第二配位圏でも反応に寄与していると考えられる残基である Asp167、Asn180、Arg186 の構造最適化を行った。自由エネルギー計算では、QM 領域の構造最適化を行い、溶媒効果は PCM で計算した。タンパク質環境として誘電率 $\epsilon = 4.0$ を用いた。

【計算結果】

銅の還元および N^ε-His113 のプロトン化による構造変化について調べた。銅の還元ではあまり大きな変化がみられなかったが、N^ε-His113 のプロトン化により、銅周辺の構造に大きな変化が見られた。特に、銅周辺に存在する水分子の配列が大きく変化し、また Arg186 側鎖が回転し Fig. 3 に示すようにタンパク質表面上から銅が見えなくなってしまった。Arg186 の C^β-C^γ-C^δ-N^ε の二面角は N^ε-His113 のプロトン化に伴い回転し、-96.8° から

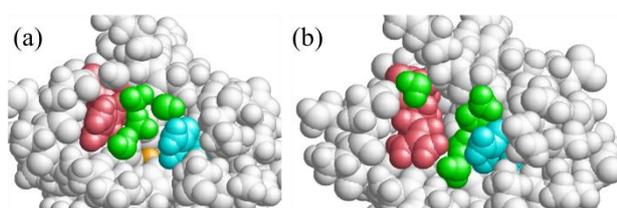


Fig. 3 構造最適化したSOD3のCPKモデル
(a) N^ε-His113のプロトン化前の構造
(b) N^ε-His113のプロトン化後の構造
オレンジ、青、ピンク、緑はそれぞれ銅、Asn180、Arg186、水分子を示す

-174.0°に変化した。Fig. 4 に示すように Arg186 の回転に伴い Cu 上部の水の配列が大きく変化していることがわかった。

次に Cu の還元電位および N^ε-His113 の pK_a を調べた。その結果、Cu の還元電位は N^ε-His113 のプロトン化によって 1.91 V から 0.08 V に変化する。また、pK_a は Cu の還元により -0.70 から 24.6 へと変化する。この数値より還元とプロトン化の順番を判断することは困難である。

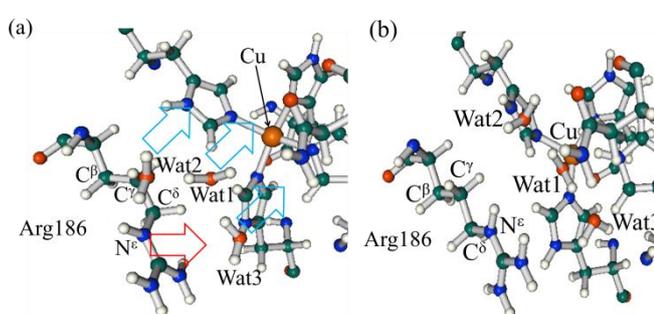


Fig. 4 N^ε-His113プロトン化前後におけるArg186 および銅周囲の水の動き
(a) N^ε-His113のプロトン化前の構造
(b) N^ε-His113のプロトン化後の構造

現在、活性酸素種の接近経路や Arg186 の揺らぎと反応機構の関連性について検討中である。

【参考文献】

- [1] Antonyuk, S.V., et.al, (2009) *J.Mol.Biol.*, **388**, 310-326
- [2] Fisher, C. L., et.al, (1994) *Proteins. Structure, Function and Genesis* **19**, 24-34
- [3] Tainer, J. A., et.al, (1982) *Nature* **306**, 284-287