

一酸化窒素還元酵素が関わる複合体の構造安定性と機能の理論解析

理研・杉田理論分子科学¹, 理研SPring-8², 兵庫県立大・生命理学³, 理研iTHES⁴,
理研AICS⁵, 理研QBiC⁶

○山田 健太¹, 森 貴治^{1,5}, 八木 清¹, 當舎 武彦², 城 宜嗣³, 杉田 有治^{1,4,5,6}

Theoretical analyses of the structural stability and function of $cd_1NiR:cNOR$ complex

○Kenta Yamada¹, Takaharu Mori^{1,5}, Kiyoshi Yagi¹, Takehiko Tosha²,
Yoshitsugu Shiro³, Yuji Sugita^{1,4,5,6}

¹RIKEN Theoretical Molecular Science Lab., ²RIKEN SPring-8, ³Graduate School of Life Sci., Univ. of Hyogo ⁴RIKEN iTHES, ⁵RIKEN AICS, ⁶RIKEN QBiC, Japan

【Abstract】 Denitrification is a microbial process, where nitrate is converted to nitrogen gas via intermediates. One of them is nitric oxide (NO) molecule; its various roles in biological processes and its high cytotoxicity are well known. Thus, denitrifying enzymes have to regulate the behavior of NO from its production to elimination. Using *Pseudomonas aeruginosa*, a complex of periplasmic nitrite oxide reductase (cd_1NiR) producing NO and membrane-integrated NO reductase (cNOR) eliminating it was derived from X-ray structure analysis. To gain insights into the stability of the complex, we performed all-atom molecular dynamics (MD) simulations of two systems where the complex was embedded into a model membrane and small-diameter nanodisc. By analyzing the trajectories, the degree of fluctuation in d_1 domain of cd_1NiR , which interacts with the membrane, is different between the systems, while that in c domain, which binds to cNOR, is similar to each other. Thus, we suggest that the complex is maintained with strong cd_1NiR -cNOR interaction once formed.

【序】 地球上の窒素原子は形態を変えながら、大気、土壌、海洋、動植物の間を巡っている。この窒素循環の維持に不可欠な過程の1つである脱窒を担う脱窒菌における一連の還元反応では、まず亜硝酸塩(NO_2^-)が、ペリプラズムに存在する亜硝酸還元酵素(Nitrite Reductase, NiR)により一酸化窒素(NO)に変換される。続いて、ペリプラズムと細胞質を隔てる形質膜に貫通して存在する一酸化窒素還元酵素(Nitric Oxide Reductase, NOR)によって亜酸化窒素(N_2O)まで変換される。中間体 NO は細胞毒性をもつこと、および、脱窒菌からの放出は観測されないことから、NO の酵素間輸送を制御する機構が、酵素群に存在していると考えられる。

最近、脱窒菌の一種である緑膿菌を用いて $cd_1NiR:cNOR$ 複合体の X 線結晶構造が求められた[1]。この構造に基づいた全原子分子動力学(MD)シミュレーションにより、1)形質膜と接触するように傾いた配向が見出された cd_1NiR は、脂質分子と水素結合を生成することから、その膜と親和的に相互作用すること、2) cd_1NiR と cNOR を結びつける唯一の塩橋は、その周囲における過渡的な水素結合ネットワークの生成によって、よく維持されること、3)ペリプラズムに排出された NO は、直ちに膜に吸収され、cNOR の疎水性チャネルを通して活性部位まで輸送される経路を示した。

本研究では、 $cd_1NiR:cNOR$ 複合体構造の安定性に寄与する 1)と 2)のどちらがより重要であるか吟味するために、脂質二重膜を使った系(Bilayer 系)に加えて、小さな直径のナノディスクを用いた系(Nanodisc 系)に対して MD シミュレーションを実施した(Fig. 1)。Bilayer 系に比較して、Nanodisc 系では膜と cd_1NiR 間で生成される水素結合が少なく、 cd_1NiR の揺らぎの度合いが大きくなると予想される。そこで、各系に対し、膜と相互作用する cd_1NiR 単量体のドメイン(d_1 domain)の揺らぎの違いを検討し、その揺らぎが cNOR と結合する cd_1NiR 単量体のドメイン(c domain)に及ぼす影響を調査した。

【方法】力場パラメータには CHARMM36 を用いた[2]。静電相互作用の計算は PME 法によって行い、温度と圧力の制御には Bussi 法を使った。Bilayer 系のモデル膜は、緑膿菌の形質膜に近い組成比をもった 3 種類の脂質分子で構成されるが、Nanodisc 系では、このなかで組成比が最大である脂質分子 1 種類を採用した。各系に対して熱平衡化計算の後、初期速度の異なる 3 本のプロダクションラン(各 300 ns)を実施した。全てのシミュレーションには GENESIS ソフトウェアを用いた[3]。

【結果・考察】計 900 ns のシミュレーション時間における、脂質分子と d_1 domain の残基間で形成される水素結合(HB)数の平均とその標準誤差は、bilayer 系が 10.05 (1.31)、nanodisc 系が 1.35 (0.55)であった。MD ステップごとの HB 数と d_1 domain の重心(d_1 COM)の z 座標 (結晶構造との差 Δz) に関する 2 次元ヒストグラムを作成したところ、両系において弱い負の相関を見出した(Fig.2)。また、水素結合の多い bilayer 系のほうが、 Δz の大きい領域に高い存在確率をもつことが分かった。これは、bilayer 系では d_1 domain の親水性残基が、疎水性の膜中央部から、親水性の膜上端部に近づくためだと考えられる。トラジェクトリの解析によって、各系における d_1 domain の挙動は異なる特徴を示すが、 c domain の挙動はよく似ていることが分かった。生体内において $cd_1NiR:cNOR$ 複合体が存在するとき、 cd_1NiR の c domain と cNOR 間に働く強い親和的な相互作用が、その構造安定性により大きく寄与することを示唆する結果が得られた。

【参考文献】

[1] E. Terasaka, K. Yamada, *et al. PNAS* (2017) *in press*. [2] B. R. Brooks, *et al. J. Comput. Chem.* **30**, 1545, (2009) [3] J. Jung, T. Mori, *et al. Wiley Interdisp. Rev. Comput. Mol. Sci.* **5**, 310 (2015); www.aics.riken.jp/labs/cbrt/

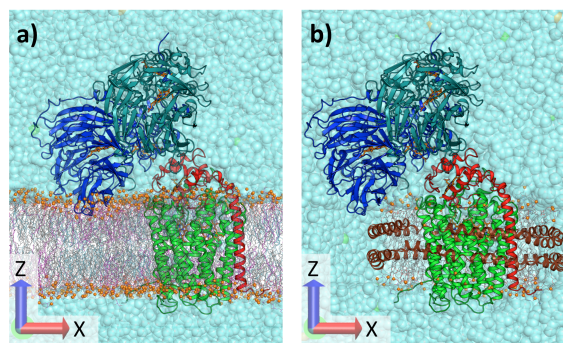


Fig. 1. Initial structures for MD simulations: a) bilayer system and b) nanodisc system. Blue and darkgreen denote cd_1NiR homodimer; green and red denote cNOR heterodimer.

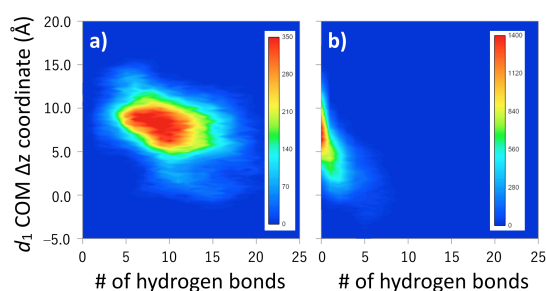


Fig. 2. Two-dimensional histograms as a function of the number of hydrogen bonds and the difference of COM z coordinate of d_1 domain between crystal structure and every structure of a) bilayer and b) nanodisc systems, obtained from MD simulations.