

ビリルビンオキシダーゼの構造と酸化還元電位に関する理論的研究

¹東北大院理, ²筑波大院数理, ³筑波大CCS, ⁴兵庫県立大院生命, ⁵金沢大理
○常盤恭樹^{1,2}、庄司光男³、柴田直樹⁴、樋口芳樹⁴、片岡邦重⁵、
重田育照³、美齊津文典¹

Theoretical study on the structural changes and redox potentials of bilirubin oxidase (BOD)

○Takaki Tokiwa^{1,2}, Mitsuo Shoji³, Naoki Shibata⁴, Yoshiki Higuchi⁴, Kunishige Kataoka⁵,
Yasuteru Shigeta³, Fuminori Misaizu¹

¹ Department of Chemistry, Graduate School of Science, Tohoku University

² Department of Physics, Graduate School of Pure and Applied Sciences,
University of Tsukuba

³ Center for computational sciences, University of Tsukuba

⁴ Graduate School of Life Science, University of Hyogo

⁵ Graduate School of Natural Science & Technology, Kanazawa University

【Abstract】

Bilirubin oxidase (BOD) is a member of the multicopper oxidases family and is enzyme to efficiently catalyze the oxidation of bilirubin into biliverdin concomitantly with the four-electron reduction of dioxygen to two water molecules. In this study, the role of the T1 Cu part has been studied by calculating the structural changes and the redox potentials around the T1 Cu atom for each wild type (WT) and mutation form (M469Q) using the QM/MM method. A comparison of the X-ray crystal structure with the QM/MM optimized structure shows good agreement. Covalent bond lengths of WT and distance (no bonded) of M469Q between Trp398 and His400 are 1.39-1.41 Å and 3.02-3.15 Å, respectively. Furthermore, 3.80 eV and 3.19 eV were calculated by $\Delta E (=E_{Cu^{2+}} - E_{Cu^{+}})$ for each WT and M469Q, respectively. The catalytic reaction of WT is preferred in comparison with M469Q because the $\Delta\Delta E (= \Delta E_{WT} - \Delta E_{M469Q})$ is increasing by 0.61 eV.

【序】

ビリルビンオキシダーゼ(BOD)は、マルチ銅酵素の一種であり、分子内に酵素活性に必要な、分光学的・磁氣的性質の異なる3種類の4個の銅原子を含み、銅原子が電子移動などの機能を担う酸化還元酵素である。BODは、電子受容部位であり、酵素反応のトリガーとなるType I (T1) Cu部位で基質のビリルビンを酸化してビリベルジンを生成し得た電子を、還元部位であるType II (T2), III (T3) Cu部位からなる三核銅中心に電子を渡し、それに共役してO₂を4電子還元し、H₂Oを生成する反応を触媒する[1]。酸化還元反応のまさに鍵となるT1 Cu原子近傍には、野生型(WT)ではTrpとHisの共有結合部位が存在するが、T1 Cuの配位子の1つであるMetをGlnに置換した変異型(M469Q)ではこの共有結合を失う[2]。また、ビリルビンに対する酵素活性がWTに比べて極端に低下する(~0.3%)[3]。

本研究では、柴田・片岡らのグループにより解かれた二種類(WTとM469Q)のX線結晶構造[2]をもとに、高精度な量子力学/古典力学混合法(QM/MM法)を用い、アミノ酸変異によるT1 Cu原子周辺の構造変化と酸化還元電位を算出することで、T1 Cu部位の役割について理論的に考察を行った。

【方法 (理論)】

QM/MM モデルには BOD を 9 Å の水球で覆ったモデルを構築し、QM 領域には、T1 Cu 原子とその活性中心近傍のアミノ酸 5 残基を選択した(Fig. 1)。計算レベルは、B3LYP-D3/LAN2DZ(ECP, Cu), 6-31G*(other atoms)を用い、QM/MM 計算に必要な力場は AMBER99 を設定した。また T1 Cu 原子については Cu^{2+} (Doublet)と Cu^+ (Singlet)の場合を考慮し、計算した。QM/MM 計算には NWChem プログラムパッケージ[4]を用い、計算資源には国内のスーパーコンピュータ(COMA@Univ. of Tsukuba)を利用した。

【結果・考察】

二種類の X 線結晶構造[2]の妥当性を確認するため、QM/MM 法で構造最適化した結果を解析することで検討した。その結果、それぞれの X 線結晶構造[2]と QM/MM 計算の構造が良い一致を示した。特に、M469Q において Trp398 と His400 の共有結合が失われていることを再現し、その距離が X 線結晶構造と QM/MM 計算の結果で、それぞれ 2.88 Å[2]と 3.02–3.15 Åであった。また、WT では Trp398 と His400 の共有結合が存在し、その距離が実験[2]と計算で 0.01 Å の差で一致した(Fig. 2)。

WT と M469Q で、 Cu^{2+} と Cu^+ のそれぞれに対して求めた QM/MM 計算のエネルギーを比較していくと、WT では Cu^{2+} と Cu^+ の差 $\Delta E_{\text{WT}} (= E_{\text{Cu}^{2+}} - E_{\text{Cu}^+})$ が 3.80 eV であり、M469Q ではその差 ΔE_{M469Q} が 3.19 eV と求まった。この結果から WT の方が M469Q に比べて、 $\Delta \Delta E (= \Delta E_{\text{WT}} - \Delta E_{\text{M469Q}})$ が 0.61 eV だけ高いことから酸化還元反応しやすいと考えられる。また、この結果は M469Q では WT に比べて酸化還元電位の実測値が低いことと一致する[3]。

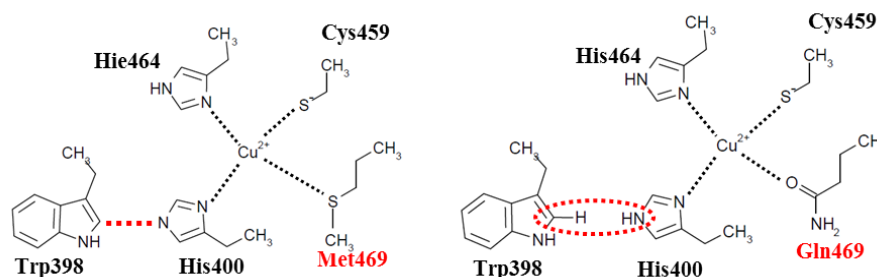


Fig.1 The QM region including T1 Cu536, Trp398, His400, Cys459, His464, and Met469 used in the QM/MM calculation. In the M469Q mutant, Met469 residue is replaced with glutamine (Left: WT, Right: M469Q).

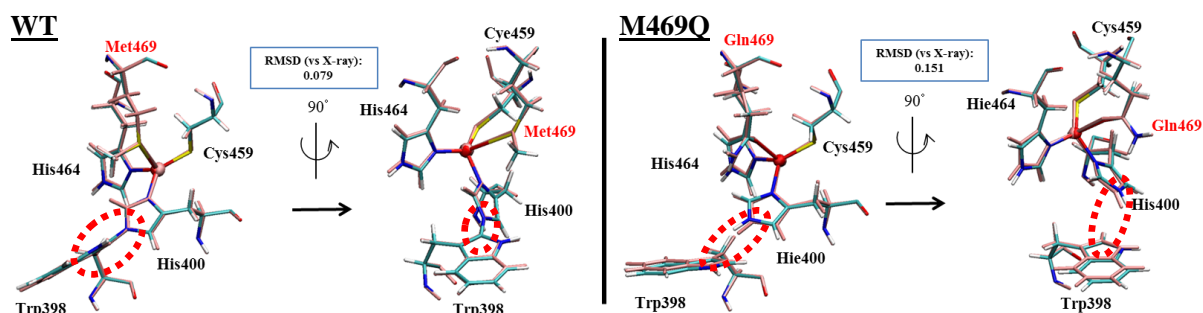


Fig.2 Structures of the QM region (Pink: X-ray, other: QM/MM optimization) around Cu^{2+} (Left: WT, Right: M469Q). The root-mean-square deviation (RMSD) for the main chain backbone between the X-ray crystal and the QM/MM optimized structures.

【参考文献】

- [1] E. I. Solomon, *et al.*, *Chem. Rev.* **114**, 3659-3853 (2014).
- [2] N. Shibata, *et al.*, to be submitted.
- [3] A. Shimizu, *et al.*, *J. Biochem.* **125**, 662-668 (1999).
- [4] M. Valiev, *et al.*, *Comput. Phys. Commun.* **181**, 1477 (2010).