

シアン耐性酸化酵素における 酸素分子結合構造についての理論的研究

¹筑波大院・数物

○山崎笙太郎¹, 庄司光男¹, 重田育照¹

A theoretical study on the oxygen-binding structures of alternative oxidase

○Sotaro Yamasaki¹, Mitsuo Shoji¹, Yasuteru Shigeta¹

¹ Graduate School of Pure and Applied Science, University of Tsukuba, Japan

【Abstract】 Alternative oxidase (AOX) catalyzes the reoxidation of reduced ubiquinone produced by ATP production in protozoan parasite Trypanosoma, a cause of a lethal infection called sleeping sickness. AOX in Trypanosoma (trypanosome alternative oxidase: TAO) is considered an optimal drug target of sleeping sickness, and its crystal structure was revealed in 2013. In this study, based on quantum mechanical/molecular mechanical (QM/MM) calculations, we investigate on the oxygen-binding state of AOX, which is an unusual side-on type. We changed distances between an iron atom and two oxygen atoms respectively, and calculated potential energy surface extensively. We found four stable structures, and determined that end-on type structure is the most stable structure. Calculated spin density also revealed that the oxygen molecule is close to a free O₂ form (³O₂) and weakly binds to the iron atom.

【序】 シアン耐性呼吸酵素(alternative oxidase: AOX)は植物などのミトコンドリア呼吸鎖上に存在し、二核鉄中心を有する末端ユビキノール酸化酵素である。AOX は致死性の寄生虫病、アフリカ睡眠病の原因である寄生性原虫アフリカトリパノソーマにおいて、ATP 産生によって生じた還元型ユビキノンを再酸化する反応を触媒している[1]。アフリカトリパノソーマ由来の AOX を特に Trypanosome alternative oxidase (TAO) と呼ぶ。哺乳類は AOX を有さないため TAO はアフリカ睡眠病治療のための薬剤標的として最適であり、その触媒機構の解明は薬剤開発に不可欠である。また、2013 年には Kita らにより TAO の結晶構造が 2.85 Å の分解能で明らかになっている[2]。本研究では、quantum mechanics/molecular mechanics (QM/MM)法を用いて、TAO の酸素結合様式について理論的に構造を検討した。

【計算方法】 得られている酸素結合状態の結晶構造から計算モデルを作成し、2つの酸素原子と鉄原子との距離をそれぞれ変化させた。各々の構造で酸素-鉄間距離を固定した部分構造最適化エネルギーを求めることでポテンシャル面を計算し、全 Fe-O 結合状態を網羅した構造探索を行った。QM/MM モデルは、TAO の周囲に球状に水を配置し (約 30,000

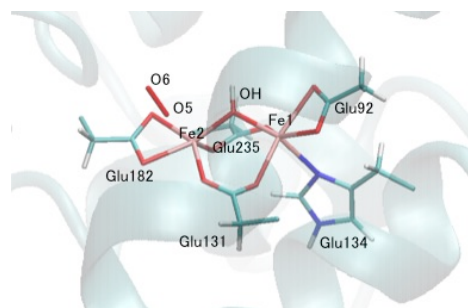


Fig. 1. Atoms in QM region

原子モデル)、分子動力学(MD)シミュレーションを行うことで構築した。QM 領域として、活性中心に位置する二核鉄と酸素分子、鉄に配位する4つのグルタミン酸残基とヒスチジン残基の計46原子を指定した(Fig. 1)。また、QM/MM 計算には汎用量子化学計算プログラム NWChem (Ver. 6.3)を用いた。QM 領域の計算レベルはハイブリッド DFT(B3LYP-D3)、基底関数は鉄原子に関しては LANL2DZ、それ以外の原子には 6-31G*を適用し、MM 領域には AMBER99 力場を用いた。

【結果・考察】 得られたポテンシャル面 (Fig. 2) から局所安定領域を見出し、さらに構造最適化計算を行うことで、4つの安定構造 (Fig. 2 中①~④) が得られた。最もエネルギーの低い構造は状態2のO5原子が結合した end-on 型の構造で、O6原子が結合した end-on 構造である状態3、状態4とのエネルギー差はそれぞれ 2.30 kcal mol⁻¹、6.07 kcal mol⁻¹ となった(Table. 1)。類似タンパク質との構造比較からも、end-on 型の構造が TAO の酸素結合状態の構造として妥当であることが分かった。ただし、他の結合様式とのエネルギー差はおよそ 6 kcal mol⁻¹ 以内と小さいため、end-on 構造が主として存在する中で他の酸素結合様式の構造も十分存在しうる。状態2の酸素結合エネルギーをクラスター系で見積もると 6.44 kcal mol⁻¹ となった。またスピン密度からも酸素分子は解離状態 (³O₂) に近く、鉄原子とは弱く結合していることが明らかとなった。実験的に観測されている構造は図中で×で示してあるが、いずれの局所安定構造とも一致せず、また結晶構造の分解能が低いことから、TAO にみられた結晶構造中の酸素結合は複数の重ね合わせ (平均化) 構造に相当すると考えられる。

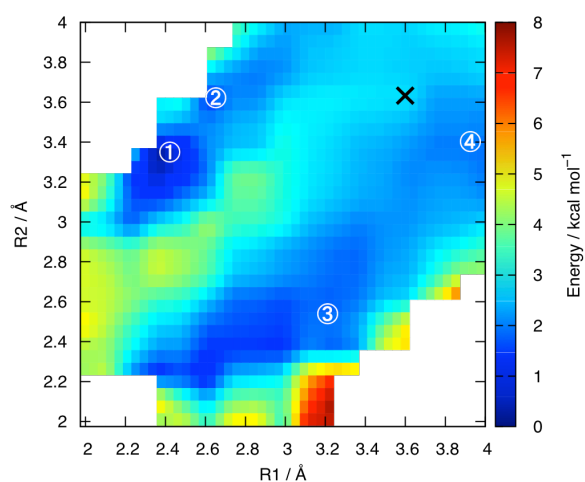


Fig. 2. Calculated potential surface. X mark and circled numbers indicate the positions of crystal structure and four stable structures, respectively.

Table. 1. Calculated energy of each structure

State	Energy / kcal mol ⁻¹	
	PES	Optimized
1	0	2.92
2	1.39	0
3	0.94	2.30
4	1.93	6.07
X	2.80	-

【参考文献】

- [1] A.L. Moore *et al.* *Annu. Rev. Plant Biol.* **64**, 637 (2013).
 [2] T. Shiba *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **110**, 4580 (2013)