

## QM/MM計算に基づいた一酸化窒素を還元する酵素活性部位の 非調和振動解析

<sup>1</sup>理研・杉田理論分子科学, <sup>2</sup>理研・計算科学研究セ, <sup>3</sup>理研・生命機能科学研究セ  
○山田健太<sup>1</sup>, 八木清<sup>1</sup>, 杉田有治<sup>1,2,3</sup>

### Anharmonic vibrational analysis on the active site of nitric-oxide reductase: a QM/MM study

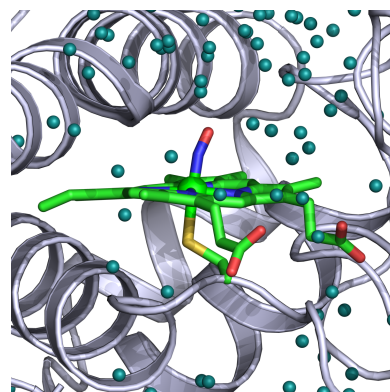
○Kenta Yamada<sup>1</sup>, Kiyoshi Yagi<sup>1</sup>, Yuji Sugita<sup>1,2,3</sup>  
<sup>1</sup>TMS, RIKEN, Japan; <sup>2</sup>R-CCS, RIKEN, Japan; <sup>3</sup>BDR, RIKEN, Japan

**【Abstract】** We have developed a QM/MM module in a MD program, GENESIS, to perform anharmonic vibrational analysis of large biological molecules by combining external QM software and SINDO, a molecular vibrational program. Using this package, such an analysis was applied to a nitric-oxide (NO)-bound state of cytochrome P450 NO reductase (P450nor). P450nor is a heme-containing enzyme that catalyzes NO reduction in soil-dwelling fungi and yeast. The intermediate NO-bound state has a six-coordinate low-spin ferric ( $\text{Fe}^{3+}$ ) heme-nitrosyl complex. QM/MM optimization and vibrational analysis were carried out for several representative structures, prepared using MD simulations on the basis of X-ray crystal structure (PDBID: 5Y5H). We found the following: 1) hydration causes an increase in the N–O stretching frequency; 2) in the previous study, the contribution of anharmonicity to N–O stretching vibration was overestimated; 3) N–O stretching frequency calculated here is higher than the experimental value by about  $100 \text{ cm}^{-1}$ .

**【序】** われわれは、QM/MM 計算に基づいた非調和振動解析を実施するために、汎用量子化学計算プログラム、および、分子振動解析プログラム SINDO[1]用のインターフェイスを分子動力学計算プログラム GENESIS[2]に組み込んだ[3]。このプログラムパッケージによる QM/MM 計算の適用例として、これまでに広く研究されてきた生体分子の 1 つである、脱窒カビ一酸化窒素 (NO)還元酵素 P450nor の NO 結合状態(Figure 1)[4]に対する計算を実施した。

P450nor は、NO 2 分子を亜酸化窒素( $\text{N}_2\text{O}$ )に還元する酵素である( $2\text{NO} + \text{NADH} + \text{H}^+ \rightarrow \text{N}_2\text{O} + \text{NAD}^+ + \text{H}_2\text{O}$ )。この還元反応の中間体である NO 結合状態では、活性部位である ferric heme に NO 1 分子が配位している。通常、6 配位 ferric heme–NO unit は  $\angle \text{Fe–N–O} (\theta_{\text{Fe–N–O}}) \approx 180^\circ$  (直線型)を示すが、結晶構造(PDBID: 5Y5H)によれば  $\theta_{\text{Fe–N–O}} = 158^\circ$ と屈曲しており(Figure 1)、この主因は軸配位子 Cys352 による強いトランス影響だと考えられている。また、溶液中と結晶での分光実験によって、NO 配位子の N–O 伸縮振動数はほぼ変化しないことが示されている[5]。

そこで、結晶構造、ならびに、溶液中の P450nor をモデリングした構造に対し、QM/MM 構造最適化と非調和振動解析を行い、それらの環境間における NO 配位子と Cys352 の構造変化、それに伴う N–O と Fe–NO 伸縮振動数の変化を調査した。



**Figure 1.** Active site of P450nor and the surrounding protein and water molecules in XtalW. These are shown, respectively, in stick, cartoon, and sphere representations.

**【計算方法】** 結晶構造、水和した結晶構造、そして NVT 計算のトラジェクトリから 5 つの代表構造を取り出し、それぞれ XtalV, XtalW, NVT1-5 とした。これらを求める MD 計算には CHARMM36 力場[6]を用いたが、NO 配位子とその配位によって生じる Fe-NO 結合伸縮項などの力場パラメータは存在しない。そのため、既存研究で提案されたパラメータや結晶構造に基づいて作成したパラメータを使用した[3, 7]。

QM 領域を、ferric heme-NO unit と軸配位子 Cys352 の側鎖に選び (QM 原子数は 79)、その他は MM 領域とした (全 MM 原子数は 123,286)。構造最適化計算では、NO ligand から 20 Å 以上離れた水分子の座標を固定した (固定する MM 原子数は 115,914)。

QM 計算は、B3LYP 汎関数と D3(BJ)分散力を用いた。基底関数は全電子基底 def2svp を採用し、Fe 原子に配位する N、S 原子と NO 配位子の O 原子には diffuse 関数を加えた (基底関数の数は 892)。この計算の実行には、Gaussian09 プログラム[8]を使用した。MM 計算には、MD 計算と同じ力場を使った。Cys352 の C<sub>β</sub>-C<sub>α</sub> 結合間の QM-MM 境界領域では、QM 領域の C<sub>β</sub> 原子にはリンク H 原子を付加し、MM 領域の C<sub>α</sub> 原子を含むグループ内のすべての原子電荷は 0.0 とした。

Macro/micro-iteration scheme によって求めた QM/MM 最適化構造を用い、heme の Fe 原子、Cys352 の S 原子、NO 配位子の N、O 両原子の 4 原子に対して基準振動解析を実施した。その後、全 12 振動モードから S 原子に大きく関わる 3 つのモードを除く 9 モードに対して 3MR-QFF と 1MR-grid ポテンシャルをつくり、VQDPT2 計算によって、非調和振動数を求めた。

**【結果・考察】** Table 1 に QM/MM 計算によって求めた、代表的な構造パラメータと振動数をまとめた。結晶構造から、水和によるタンパク質構造の緩和を考慮すると、NO 配位様式が直線型に近づいた。それに対応して、 $\nu_{N-O}$  と  $\nu_{Fe-NO}$  は高くなった。これは Cys352 によるトランス影響が、水和により弱まったためだと考えられる。非調和と調和振動数の比 ( $\nu_{N-O}/\omega_{N-O}$ ) はおよそ 0.983 であり、既存研究において非調和振動数を見積もるために使われた比 0.9614 は、この振動の非調和性を過大評価する結果を与えることが分かった。

計算で求めた  $\nu_{N-O}$  には、実験結果と異なり、結晶と溶液中の間に 20–70 cm<sup>-1</sup> の差が存在した。また、NVT1-5 では実験値より 100 cm<sup>-1</sup> 程度高くなった。XtalW より NVT1-5 において水和の効果が強くなる一因として、NVT 計算によって ferric heme-NO unit の位置が変化することが考えられる。結果ならびに考察の詳細は当日発表する。

## 【参考文献】

[1] Yagi, K., *Mol Sci* **2016**, *10*, A0085. [2] Jung, J.; Mori, T., *et al.*, *WIREs Comput Mol Sci* **2015**, *5*, 310. [3] Yagi, K.; Yamada, K.; Sugita, Y., *To be submitted*. [4] (a) Obayashi, E., *et al.*, *J Am Chem Soc* **1998**, *120*, 12964.; (b) Riplinger, C., *et al.*, *Chem Eur J* **2014**, *20*, 1602.; (c) Goodrich, L. E., *et al.*, *Inorg Chem* **2010**, *49*, 6293. [5] (a) Obayashi, E., *et al.*, *J Am Chem Soc* **1997**, *119*, 7807; (b) Tosha, T., *et al.*, *Nat Commun* **2017**, *8*, 1585. [6] Best, R. B., *et al.*, *J Chem Theory Comput* **2012**, *8*, 3257. [7] (a) Meuwly, M., *et al.*, *Biophys Chem* **2002**, *98*, 183.; (b) Mishra, S., *et al.*, *Biophys J* **2009**, *96*, 2105 [8] Frisch, M. J., *et al.*, *Gaussian 09 Rev. D.01*, Gaussian Inc., Wallingford, CT, 2009.

**Table 1.** Typical structural parameters and stretching frequencies of the P450nor active site from QM/MM calculations, together with the experimental results.

	QM/MM (Closed-shell 1et)			Exptl.
	XtalV	XtalW	NVT2	
$r_{Fe-NO}^a$	1.680	1.672	1.665	1.67
$r_{N-O}^a$	1.146	1.143	1.140	1.15
$r_{Fe-S}^a$	2.287	2.301	2.296	2.33
$\theta_{Fe-N-O}^b$	155.7	158.3	161.9	158
$\omega_{N-O}^c$	1946.2	1967.6	1988.9	–
$\nu_{N-O}^d$	1913.4	1932.1	1956.8	1853
$\omega_{Fe-NO}^c$	605.1	607.2	614.9	–
$\nu_{Fe-NO}^d$	587.7	585.6	596.2	530

<sup>a</sup>Bond lengths in Å. <sup>b</sup>Bond angles in degree. <sup>c</sup>Harmonic frequencies in cm<sup>-1</sup>. <sup>d</sup>VQDPT2 frequencies in cm<sup>-1</sup>.