

シトクロム *c* の多量体形成におけるアニオンの影響に関する理論的研究

<sup>1</sup>琉大院理工, <sup>2</sup>九大院理, <sup>3</sup>奈良先端大, <sup>4</sup>琉大理  
 ○根木秀佳<sup>1</sup>, 吉田紀生<sup>2</sup>, 廣田俊<sup>3</sup>, 東雅大<sup>4</sup>

**Theoretical Study on Anion Effects  
 on Oligomer Formation of Cytochrome *c***

○Hideyoshi Motoki<sup>1</sup>, Norio Yoshida<sup>2</sup>, Shun Hirota<sup>3</sup>, Masahiro Higashi<sup>4</sup>

<sup>1</sup> *Chemistry, Biology, and Marine Science, Graduate School of Engineering and Science, University of the Ryukyus, Japan*

<sup>2</sup> *Department of Chemistry, Graduate School of Science, Kyushu University, Japan*

<sup>3</sup> *Graduate School of Materials Science, Nara Institute of Science and Technology, Japan*

<sup>4</sup> *Department of Chemistry, Biology and Marine Science, Faculty of Science, University of the Ryukyus, Japan*

**【Abstract】** Cytochrome *c* (cyt *c*) forms oligomers by successive domain swapping, where the C-terminal helices are replaced by the corresponding helices of other cyt *c* proteins, and loses its electron transfer function. The amount of oligomer formation depends on the chaotropic and kosmotropic nature of the anions. However, the detailed mechanism is still unclear. We have been studying the thermodynamic stability of the domain-swapped dimer of cyt *c* by using the molecular dynamics (MD) simulation and the three-dimensional reference interaction-site model (3D-RISM) theory. In the present study, we investigated the anion effects on the stability of dimer. We calculated the enthalpy difference in aqueous solution, 1 M NaCl solution, and 1 M NaNO<sub>3</sub> solution. The calculated results are in reasonable agreement with the experimental ones. It was found that structural change induced by the anion plays an important role in the stability of dimer.

**【序】** シトクロム *c* は、シトクロム *bc<sub>1</sub>* 複合体からシトクロム *c* オキシターゼに電子を伝達するヘムタンパク質であり、多量化することでその電子伝達の機能が失われることが知られている。近年の研究から、シトクロム *c* は互いの C 末端ヘリックスを交換するドメインスワッピングにより多量化することが明らかになった(Fig. 1) [1]。また、多量体の形成にはアニオンの種類と濃度に依存することも明らかになっている[2,3]。しかし、これらの詳細な理由は明らかになっていない。

これまで我々は、この多量体形成のメカニズムを目指して、分子動力学シミュレーション(MD)と液体の積分方程式(3D-RISM)理論を用いてシトクロム *c* の単量体と二量体の熱力学安定性について解析を行ってきた[4,5]。これまでの研究で、周囲の水溶媒が二量体の安定化に重要であることを明らかにしている。本研究では、さらにアニオンの影響を解明するために、様々な溶媒中のシトクロム *c* の単量体と二量体の熱力学的安定性の解析を行った。

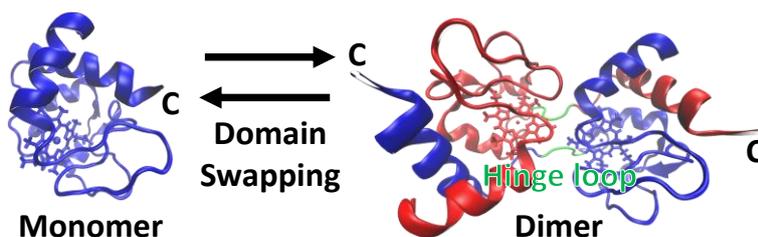


Fig. 1. Domain swapping of cytochrome *c*.

**【計算方法】** 本研究では、単量体と二量体のシトクロム *c* の初期構造はそれぞれの X 線結晶構造(PDB code: 1HRC, 3WUJ)から作成した。MD シミュレーションでは、単量体では 2 個、二量体では 1 個のシトクロム *c* を一辺が 110 Å の立方体のボックスに配置し、系を中性にするために Cl<sup>-</sup> イオンを加えた水溶媒、1M NaCl 溶液および 1M NaNO<sub>3</sub> 溶液を用意した(Fig. 2)。分子力場として、タンパク質に Amber ff99SBildn を適用し、ヘムに Amber GAFF を用いた。単量体と二量体の構造でそれぞれ 100 ns 平衡化、10 ns サンプルングの MD シミュレーションを初期条件を変えて 10 回行った。3D-RISM では、MD シミュレーションで得られた 5000 個の構造から水分子とイオンを取り除き、MD シミュレーション中と同じ条件(水溶媒では水のみ)で Kovalenko-Hirata closure を用いて溶媒和エンタルピーの計算[6]を行った。

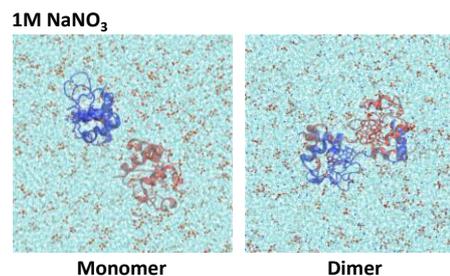


Fig. 2. MD simulation systems.

Table 1. Enthalpy data of cytochrome *c* (in kcal/mol).

solvent	$\Delta H(\text{Expt})$	$\Delta H(\text{Calc})$	$\Delta E_{\text{prot}}$	$\Delta H_{\text{solv}}$	$\Delta H_{\text{solv}}^{\text{H}_2\text{O}}$	$\Delta H_{\text{solv}}^{\text{cation}}$	$\Delta H_{\text{solv}}^{\text{anion}}$
H <sub>2</sub> O	40.0	14.4	557.5	-543.1	-543.1		
1 M NaCl	27.5	9.0 (10.0) <sup>a</sup>	574.9	-565.9	-65.0	3336.5	-3839.4
1 M NaNO <sub>3</sub>	16.5	0.6 (2.7) <sup>a</sup>	713.9	-713.3	-156.9	3099.6	-3658.3

<sup>a</sup> Solvation enthalpy was calculated with aqueous solution.

**【結果・考察】** まず、サンプルングで得られたそれぞれの構造に対して、タンパク質の構造エネルギー  $E_{\text{prot}}$ 、溶媒和エンタルピー  $H_{\text{solv}}$  の和としてエンタルピー  $H = E_{\text{prot}} + H_{\text{solv}}$  を計算した。単量体と二量体のエンタルピー差  $\Delta H = H^{\text{dimer}} - H^{\text{monomer}}$  は、全ての溶媒で正となり、単量体がわずかに安定となった(Table 1)。また、溶媒を比較すると、水溶媒、NaCl 溶液、NaNO<sub>3</sub> 溶液の順に二量体が安定化する結果になった。これらの結果は、実験結果[1,3]と定性的に一致する。二量体の安定化には溶媒和エンタルピーが重要であり、溶媒和エンタルピーの分割によりアニオンの溶媒和が大きく寄与していることが明らかになった。また、タンパク質の構造エネルギーはほとんどが静電相互作用エネルギー  $E_{\text{ES}}$  に起因しており、溶媒によって単量体、二量体の両方の静電相互作用エネルギーが大きく異なった(Table 2)。さらに、NaCl 溶液や NaNO<sub>3</sub> 溶液でのサンプルングで得られた構造で水のみで溶媒和エンタルピーを計算したが、もともとの溶媒での計算結果とほとんど変化しなかった。これらの結果は、アニオンによりタンパク質の構造が変化することが二量体の安定化に重要であることを示している。

Table 2. Electrostatic interaction energies (in kcal/mol)

	$\Delta E_{\text{ES}}$	$E_{\text{ES}}^{\text{monomer}}$	$E_{\text{ES}}^{\text{dimer}}$
H <sub>2</sub> O	580.3	-15562.8	-14982.5
1 M NaCl	562.8	-15163.2	-14600.4
1 M NaNO <sub>3</sub>	705.3	-15183.5	-14478.2

## 【参考文献】

- [1] S. Hirota *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 12854 (2010).
- [2] M. S. Deshpande *et al.* *Biochemistry*, **53**, 4696 (2014).
- [3] 竜崎 美智子, 奈良先端科学技術大学院大学 修士論文 (2014).
- [4] N. Yoshida, M. Higashi, H. Motoki, and S. Hirota, *J. Chem. Phys.*, **148**, 025102 (2018).
- [5] 根木 秀佳, 吉田 紀生, 廣田 俊, 東 雅大, *J. Comput. Chem. Jpn.*, **17**, 8 (2018).
- [6] S. Chong and S. Ham, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **109**, 7636 (2012).