

## ミオグロビン部分鎖におけるヒスチジン-ヘム間結合の安定性に関する理論的研究

(名大院人情) ○高柳昌芳・長岡正隆

【序】 合成されたミオグロビン (Mb) は 93His のイミダゾール環にヘムが配位結合したフォールド構造をしていることはよく知られているが、リボソームで翻訳途上にあるアポミオグロビン部分鎖は共翻訳的にフォールディングを行い、ヘムと結合をすることが実験で確認されている<sup>1)</sup>。また Mb 部分鎖の2次構造も調べられており、完全な Mb 鎖に比べ、C' 末端側から数十残基を切り落とした短い部分鎖は  $\alpha$ ヘリックス構造の比率が低く、 $\beta$ シート構造の寄与が大きくなっており、残基長が短いほどこの傾向が強くなると報告されている<sup>2)</sup>。本研究では、様々な長さの Mb 部分鎖における疎水性のヘムポケットの形成度、立体構造の特徴、ヘムの取り込み過程を調査することを目的として、分子動力学 (MD) シミュレーションを用いて理論的解析を試みた。

【方法】 MD 計算は AMBER ver7.0 を用いて行った。タンパク質力場は parm99 を用いた。ただし、ヘム Fe と 93His イミダゾール環 N 間の結合ポテンシャルには、Fe<sup>II</sup>を含む五配位ヘムの力場をもとに、長距離における Fe-N 間の力を再現するようにファンデルワールスポテンシャルと同形のレナード・ジョーンズ型関数にクーロン相互作用を加えた次式

$$U_{\text{Fe-N}}(r) = \frac{A}{r^{12}} - \frac{B}{r^6} + \frac{q_{\text{Fe}}q_{\text{N}}}{r} \quad (1)$$

を付け加えた。ここで、レナード・ジョーンズパラメータ  $A$  と  $B$  は、以下で説明する分子軌道 (MO) 計算を利用してフィッティングした。 $q_{\text{Fe}}$  と  $q_{\text{N}}$  には AMBER 力場の Fe および N 原子の電荷を用いた。また、ある原子 X と Fe-N 結合間の結合角  $\theta(\text{X-Fe-N})$  に対する変角ポテンシャルは、平衡結合距離付近で、本来の結合定数  $K_{\theta}$  に一致し長距離では減少するように、平衡原子間距離に対する原子間距離の比の6乗に反比例するような有効結合定数  $\kappa_{\theta}$  を定義して、次式

$$U_{\text{X-A-B}}(\theta) = \kappa_{\theta}(\theta - \theta_{\text{eq}})^2, \quad \kappa_{\theta} \equiv K_{\theta} \cdot \left( \frac{r_{\text{X-A}}^{\text{eq}}}{r_{\text{X-A}}} \right)^6 \left( \frac{r_{\text{A-B}}^{\text{eq}}}{r_{\text{A-B}}} \right)^6 \quad (2)$$

で表わした。ここで、(A,B) = (Fe,N) あるいは (N,Fe) である。なお、Fe-N を含む二面角のパラメータはすべて 0 とした。

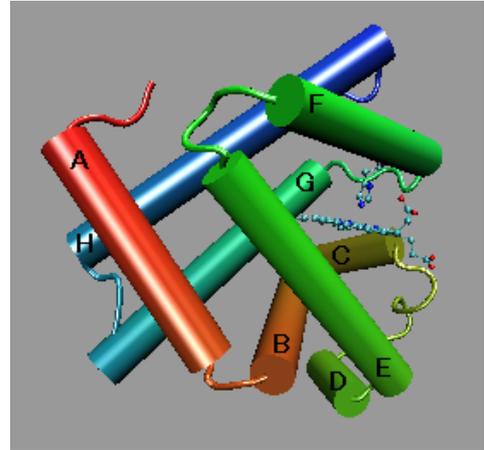


図1 ミオグロビンの立体構造 (7つのヘリックス A~H、および 93His に結合したヘムから成る)。

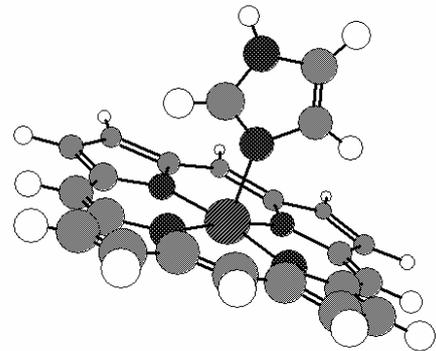


図2 ポルフィリン-イミダゾール環合体系の最適化構造  $r(\text{Fe-N})=1.96 \text{ \AA}$

ポルフィリン-イミダゾール環間の Fe-N 結合の結合エネルギーは、Gaussian98 を用いた MO 計算により求めた。まず、方法 B3LYP/ LANL2DZ により、ポルフィリン-イミダゾール環合体系の構造最適化を行った。次に、その最適化構造をもとにしてポルフィリンおよびイミダゾール環単体それぞれについて一点エネルギー計算を行い、合体系からのエネルギー差として結合エネルギーを見積もった。なお、基底関数重ね合わせ誤差 (BSSE) を矯正するために counterpoise(CP) 補正を用いた。

MD シミュレーションには、時間ステップを 1fs とした速度ベルレ法を用い、Berendsen のアルゴリズムによる温度制御を用いて、温度一定 (473K) を実現した。Mb の初期構造は PDB データベースに登録されている Sperm Whale Myoglobin の結晶構造 104M をもとに、ヘムの位置をタンパクの中心から外側に 14Å 平行移動したものをを用いた。また初期速度は、473K におけるマクスウェル速度分布に従って割り当てた。水素原子を含む結合は SHAKE で拘束し、誘電率を 1 とし、Mb 全体について真空中でシミュレーション時間 600ps の計算を行った。

**【結果及び考察】** MO 計算の結果、Fe-N の結合エネルギー 56.9 kcal/mol、平衡結合距離 1.96 Å を得た。この結合エネルギーは、BSSE 補正なしのもの比べて、およそ 10% 程度小さい。これらの値からレナード・ジョーンズパラメータ  $A$  と  $B$  はそれぞれ  $1.83 \times 10^5 \text{ kcal/mol} \cdot \text{Å}^{12}$  と  $6.45 \times 10^3 \text{ kcal/mol} \cdot \text{Å}^6$  と求まった。今回の MD 計算によって得られた、グロビンのヘム取り込み過程のスナップショットを図 3 に示した。初期構造 (スナップショット A) から数 ps のうちに、ヘムはグロビンに接近し、ヘムポケットの入り口付近で揺らぐ状態になる (スナップショット B)。その後、250ps を超えたあたりでヒスチジン残基が回転し、ヘムがポケットの中に収まる過程が観察された (スナップショット C)。

当日は MD 計算に関する詳細とともに、ヘム取り込み過程に関する解析結果や、部分鎖長の変化に伴うヘムポケットの構造の変化についても議論する予定である。

#### 【参考文献】

- 1) Komar, A. A., Kommer, A., Krasheninnikov, I. A., and Spirin, A. S. (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 10646-10651.
- 2) Chow, C. C., Chow, C., Raghunathan, V., Huppert, T. J., Kimball, E. B., Cavagnero, S. (2003) *Biochemistry* 42, 7090-7099.

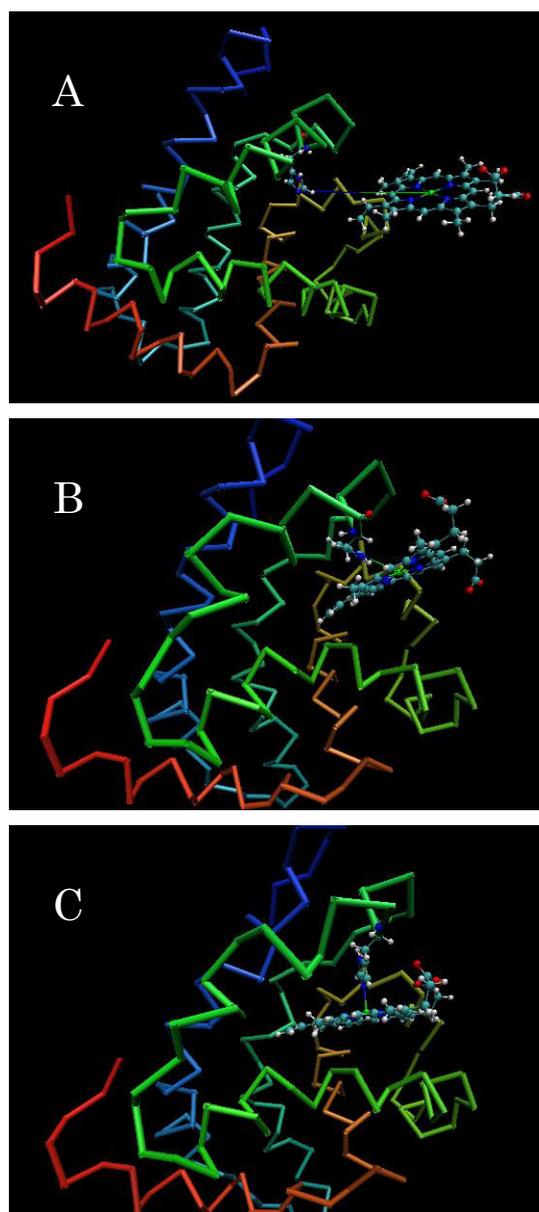


図 3 アポミオグロビンがヘムを取り込むシミュレーションのスナップショット A: 初期構造, B: 100ps 後, C: 300ps 後。