

2P064 NADH-シトクロム b5 還元酵素の構造と機能についての理論的研究

(阪府大¹・岡山理科大²・分子研³) ○麻田俊雄¹, 西本吉助², 小関史朗¹, 永瀬茂³

【序】NADH-シトクロムb5還元酵素は、電子供与体のNADHから2電子をFADに受け取り、シトクロムb5やフェリシアン化カリウムなどの電子受容体に1電子ずつ渡す反応を触媒することが知られている。このサイクルで、NADは二電子還元しかできないのに対し、ビタミンB2を基本骨格とするFADを補酵素にもつフラビン酵素は二電子還元と一電子還元の両方を行う最も重要な酵素として機能している。フラビン酵素が欠乏すると体に大きな障害が起こることが知られている。また2003年にはフラビン酵素がDNAの修復に関わっていることもわかってきた。われわれは、これまでにフラビン酵素の活性部位であるメチルイソアロキサジン骨格(MIA)の電子状態を理論的に研究し、N5位で触媒反応が起こることを明らかにした。また1999年にはD-アミノ酸の触媒的分解反応を*ab initio* MO計算で研究し、FADの酸化還元反応のメカニズムを提案した¹⁾。われわれのメカニズムでは活性化エネルギーは約20 kcal/mol になる。今回、ONIOM法を用いて基質とフラビンとの相互作用を計算し、いくつかの新しい知見を得たので報告する。

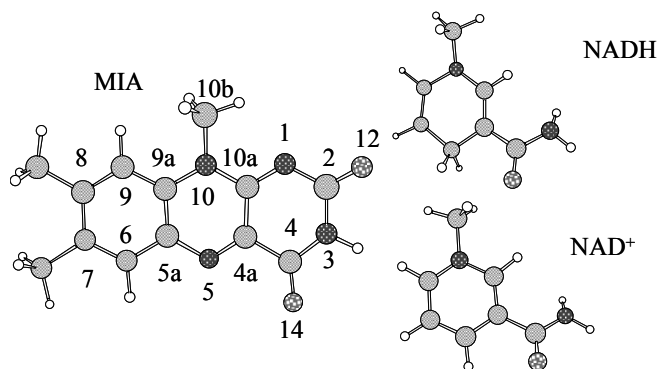


図1 メチルイソアロキサジン骨格(MIA), NADH と NADH の構造

【方法】活性中心付近だけを切り出したモデル系について、*ab initio* MO(RHF/6-31+G*)計算を行い構造最適化、プロトン親和エネルギーと水素陰イオン親和エネルギーの計算を行った。分子Xのプロトン親和エネルギーは XH^+ とXの分子のエネルギー差を、また、水素陰イオン親和エネルギーは、 XH^- とXのエネルギー差から計算した。

さらに、Amber99力場と*ab initio* MO計算を組み合わせたONIOM法のプログラムを作成した。全系のハミルトニアンは次のとおりである。

$$\mathbf{H}_{\text{total}}^{A+B} = \mathbf{H}_{\text{MM}}^{A+B} - \mathbf{H}_{\text{MM}}^A + \mathbf{H}_{\text{QM}}^A \quad (1)$$

ここで、Aは量子力学的(QM)に扱う領域を、Bは力場(MM)で扱う領域を意味している。力場部分の追加パラメータは、補酵素であるFADとNADHの原子電荷をRESP(restrained electrostatic potential) フィットにより決定した。これは、*Ab initio* MO計算(HF/6-31G*)によって得られる分子周辺の静電場を最もよく再現するように、各原子上の点電荷を最小自乗法を用いて決定する方法である。結合・変角・二面角パラメータはAmber99力場から決定した。

X 線構造は水素原子の位置が不明である。そこで本研究ではすべての水素原子を標準的な座標に配置した。ついでFADとNADHを含む活性中心から半径35 Å以内に水分子を約3598個配置し(water cap)、水和系の全体モデルとした。(図2参照)

全体モデルに対してONIOM法およびAmber7を用い、エネルギー最適化や相互作用エネルギー計算等²⁾、理論的解析をおこなった。

【結果と考察】。

従来、NADH から FAD へ水素陰イオンが直接移動する触媒サイクルの初期プロセスが提案されている(図 3)。そこで、FAD の活性中心モデルである MIA と NAD⁺ の誘導体について ab initio MO 計算を行い、水素陰イオン親和エネルギーを計算した(Table 1 参照)。その結果、NAD⁺ の水素陰イオン親和エネルギーが MIA のどの原子に水素陰イオンが付加するよりも大きな値を示している。一方、Table 2 には、計算したプロトン親和エネルギーをまとめた。この表より、MIA の O12 と N1 位へのプロトン付加が最も安定であることがわかる。そこで、MIA の O12 および N1 にプロトン付加した各 MIAH⁺ への水素陰イオンの親和エネルギーを計算し、Table 3 に示した。結果はグリシンの酸化反応と同じく MIAH⁺(N1+N5)が最も安定化している。しかし、N1 に最初にプロトンが付加するのは、立体障害で難しく、まずは、プロトンは、O12 に付加し、次に、競争反応の機構で N1+N5 に進む。なお、これらはいずれも Table 1 で示した NAD⁺の親和エネルギーよりも安定であることから、NADH から FADH⁺へ H⁻移動が生じやすいことを示唆している。

結晶構造から得られる FAD と NADH の相対配置は、近いところで 6 Å 程度離れている。そこで、まず Amber7 を用いてタンパク質全体が室温付近においてどの程度の構造揺らぎを持つのかについて、解析を行い、ついで、ONIOM 法による最適化を行って、FAD と NADH の相互作用を解析した。結果の詳細は、当日に発表する。

【文献】

- 1) K.Nishimoto, K.Higashimura and T.Asada *Theor. Chem. Acc.* **1999** 102 355.
- 2) T.Asada, H.Gouda, and P.Kollman *J.Am.Chem.Soc.* **2002** 124 12535.

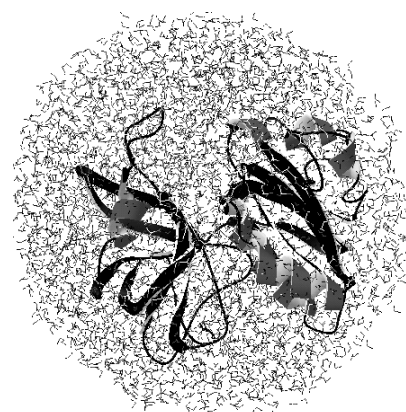


図 2 水和した全系モデル

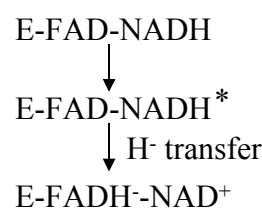


図 3 従来の反応機構

Table 1. Calculated Hydride Affinities (in kcal/mol)

| Molecule | RHF/6-31+G* | RHF/6-31G* |
|------------------|-------------|------------|
| MIA(N1) | 354.3 | 358.9 |
| MIA(N5) | 389.0 | 383.9 |
| MIA(O12) | 341.3 | 335.9 |
| MIA(O14) | 361.6 | 356.3 |
| NAD ⁺ | 484.3 | 475.8 |

Table 2. Calculated Proton Affinities (in kcal/mol)

| Molecule | RHF/6-31+G* | RHF/6-31G* |
|----------|-------------|------------|
| MIA(N1) | 233.1 | 233.3 |
| MIA(N5) | 214.8 | 214.5 |
| MIA(O12) | 236.6 | 236.5 |
| MIA(O14) | 222.2 | 221.6 |

Table 3. Calculated Hydride Affinities (in kcal/mol)

| Molecule | RHF/6-31+G* | RHF/6-31G* |
|------------------------------|-------------|------------|
| MIAH ⁺ (O12+N5) | 481.3 | 482.0 |
| MIAH ⁺ (O12+O14) | 443.6 | |
| MIAH ⁺ (O12+O14b) | 426.0 | |
| MIAH ⁺ (O12+N1) | 398.1 | |
| MIAH ⁺ (N1+N5) | 502.4 | 496.5 |
| MIAH ⁺ (N1+O14) | 461.4 | |
| MIAH ⁺ (N1+O14b) | 444.5 | |