

NADH - シトクロム b5 還元酵素の構造と反応に関する理論的研究

(阪府大¹・阪市大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。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PPP法で理論的に研究し、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⁾。今回、NADH-シトクロムb5還元酵素を対象にQM/MM計算を用いて構造と反応性について解析したので報告する。

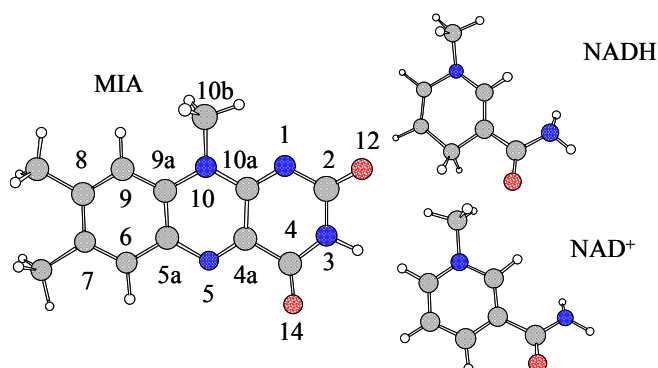


図1 メチルイソアロキサジン骨格(MIA), NADH と NAD⁺ のモデル分子構造

【方法】ab initio MO計算と力場を組み合わせたQM/MM計算のプログラムを作成した。全系のハミルトニアンは(1)式で与えられる。

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

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。力場にはAmber99を用いた。補酵素であるFADとNADHの原子電荷は、二段階RESP (restrained electrostatic potential)フィット²⁾により決定した。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。さらにFADとNADHを含む活性中心から半径35 Å以内に水分子を3598個配置し、系の水和モデルとした。

酵素の酸化還元反応のサイクルでは、NADHからFADへのヒドリドイオン移動が実験的に観測されている。しかしながら結晶構造では、NADHのHとFADのN(5)との原子間距離が約9Åも離れている。そこで、ヒドリドイオンの移動に関与する原子間に仮想的な調和力を与えて室温における力場の分子動力学(MD)シミュレーションを行った。得られた構造からNADHと補酵素FADの活性サイトを取り出した後、ab initio MO (RHF/6-31G(d))計算を行ってヒドリドイオン移動の反応経路を解析した。

水和した全系の構造最適化にはQM/MM(RHF/6-31G(d):Amber99)計算を、MDシミュレーションは計算時間の制約から力場のみを用いて行った。

【結果と考察】

従来、NADH から FAD へヒドリド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きた(図 2)。しかしながら、FAD と NAD⁺の活性中心のモデルについて ab initio MO 計算を行った結果、昨年の本討論会で示したように、H⁺ が O12 に付加した後、協奏反応の機構で N1 と N5 へ H⁺ が付加した還元型が生成すると結論づけた。

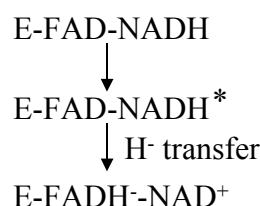


図 2 従来の反応機構

本報では、図 1 に示した MIA と NADH の二量体モデルにおける NADH から MIA へのヒドリドイオン移動について RHF/6-31G(d)レベルで反応経路を解析した。結果を Table1 に示す。

Table1. Calculated energies for the hydride ion transfer reaction

	MIAH ⁺ (O12)+NADH		MIA+NADH	
	E/a.u.	ΔE/kcal/mol ⁻¹	E/a.u.	ΔE/kcal/mol ⁻¹
Reactant	-1282.847523	0.0	-1282.467037	0.0
TS	-1282.784503	39.6	-1282.376644	56.8
Product	-1282.885577	-23.9	-1282.440876	16.4

MIA の O12 位にプロトン付加した構造 MIAH⁺(O12)と NADH の反応では、23.9kcal/mol の発熱反応であるのに対して、プロトンが付加していない構造 MIA と NADH の反応では 16.4kcal/mol の吸熱反応であることがわかった。また、反応が進行するために必要な活性化エネルギーは前者で 39.6kcal/mol、後者で 56.8kcal/mol であることがわかった。以上の結果から、O12 にプロトンが付加した後、ヒドリドイオンが NADH から FAD に移動するモデルはここでも妥当であると結論することができる。当日は、より信頼性の高い計算レベルを用いた結果を示す予定である。

つぎに、力場を用いて室温における MD シミュレーションを実行し、各アミノ酸残基が NADH-FAD とタンパク質の結合にどのような影響を与えているかを自由エネルギーレベルで評価するため、MM-PBSA 計算とアラニンスキャン³⁾を行った(Table2)。得られた結合の自由エネルギー変化は実験で報告されているミカエリスメンテン定数の

Table2. Binding free energy in kcal/mol using alanine scanning method

Alanine Mutation	ΔG	ΔΔG	K _m ^{NADH} (μM)
WT	-44.99		3.1±0.3
ARG63	-37.19	7.80	104±18
TYR65	-50.14	-5.15	4.2±0.4
THR66	-42.08	2.91	2.9±0.2
LYS82	-18.95	26.04	
TYR84	-32.53	12.46	
LYS97	-42.34	2.65	4.4±0.3
SER99	-38.66	6.33	26±2

傾向をほぼ再現し Arg⁶³ と Ser⁹⁹ が重要に寄与している結果を得た。さらに、実験値が得られていない残基 Lys⁸² と Tyr⁸⁴ は Arg⁶³ と比較して、より大きく結合に寄与している結果となった。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) P.Cieplak, W.D.Cornell, C.Bayly, and P.A.Kollman *J.Comp.Chem.* **1995** 16, 1357.
- 3) T.Asada, H.Gouda, and P.Kollman *J.Am.Chem.Soc.* **2002** 124 12535.