

【序】

アズリンは電子伝達の機能を持つ銅一核の金属タンパク質として、バクテリア内に存在し、シトクロム *c* からシトクロム *c* 酸化酵素への電子伝達の媒介的役割を担っている。また、その構造は 128 残基から構成され、機能中心となる反応活性部位は中心となる銅イオンと五つの配位残基からなっている(図 1)。銅イオンは His46、Cys112、His117 と強い配位結合を持ち、また Gly45 及び Met121 と弱い結合を持つことから、活性部位はひずんだ三方両錐形となっている。アズリンに関する研究はこれまでも実験、理論の両面から様々な研究が行われ[1]、X線構造解析からは多くのタイプの構造が明らかとされてきた。本研究ではその中でも *Pseudomonas aeruginosa* 由来の酸化型アズリンの構造[2]をもとに溶媒中で分子動力学(MD)シミュレーションを行い、溶媒中での構造と性質に対するより詳細な考察を行うことを目的とし研究を行った。これまでの研究で我々は活性部位付近の分子振動及び主鎖のダイナミクスに関する研究を進め、MD シミュレーションから計算したスペクトルと実験の共鳴ラマン(Resonance-Raman)スペクトルの比較、溶液中でのアズリンの反応活性部位の安定構造の解析などアズリンの構造、機能性に関する総合的理解を試みてきた[3]。これらの研究から、溶媒中のタンパク質はタンパク質のゆらぎや残基ジャンプ運動と呼ばれる原子同士の協調的運動などが確認出来た。本研究ではこの MD シミュレーションでの活性部位付近の平均構造に対し密度汎関数計算を行うことで、電子状態に関する考察を行った。

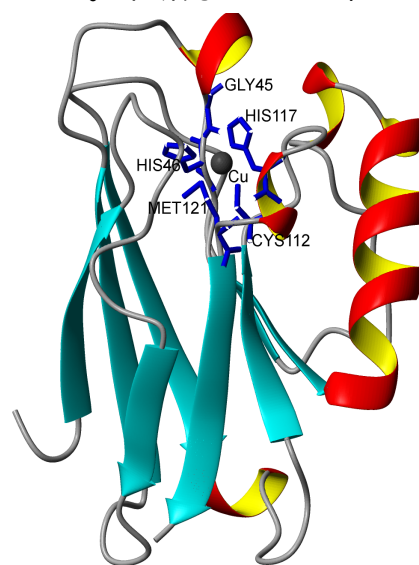


図 1 アズリン(4AZU)の 2 次構造と活性部位付近の残基

【計算方法】

本研究で実行した MD シミュレーションの方法について説明する。初期座標には X 線構造解析による *Pseudomonas aeruginosa* 由来の酸化型アズリンの結晶構造(PDBID:4AZU)を用い、力場は AMBER99 force field[4]を使用し計算を実行した。この時、活性部位付近の力場および電荷は量子化学計算によって見積もったものを使用した。本シミュレーションは溶媒水分子には TIP3P 剛体モデルの水分子を 6075 個使用し、溶媒のボックスサイズは(X, Y, Z)=(60.586, 54.668, 60.787)(Å)の状況下、カットオフ半径 8 Å、静電相互作用の計算では Particle Mesh Ewald 法を用いカットオフ半径 10 Å で行った。また、H 原子の結合部分は SHAKE 法によって固定して計算を行った。解析は系の平衡化後、周期境界条件の下、NVT アンサンブル(1MDstep:2fs)で 3ns 間のシミュレーションした結果をもとに行った。上述の MD シミュレーションの結果から得られた平均構造を用いて、活性部位付近の残基のみからなるクラスタモデルを構築し、密度汎関数計算(UB3LYP/6-31G**)によって電子状態の解析を行った。このとき活性部位付近には 2 つの安定な配置があることから 2 つのモデルを作った。

【結果】

MD シミュレーション

3ns 間の MD シミュレーションにより多くの残基において複数の安定した配置があることが分かった。特に活性部位付近の残基では Met121 がジャンプ運動により二つの安定構造を行きかう様子が確認された。図 2 に活性反応部位付近の残基に対する 3ns 間の RMSD を示す。Met121 の二つの安定構造が確認される。平衡化初期段階の構造は X 線構造解析の構造と近い構造(Low type(LT))であったが、直ぐにジャンプ運動によって変化した構造(High type(HT))となる。それぞれの構造での平均滞在時間は約 224ps(LT)、及び約 526ps(HT)、また総滞在時間は約 0.9ns(LT)、及び約 2.1ns(HT)であった。

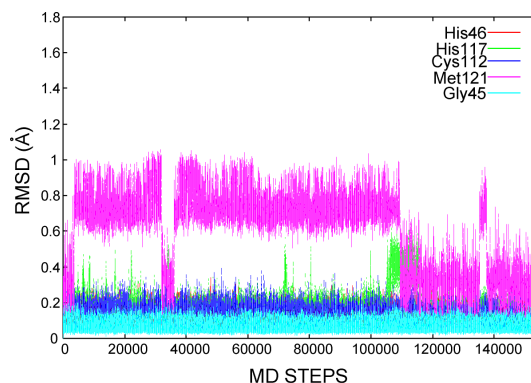


図 2 活性部位付近の残基の RMSD (3ns 間)

電子状態計算

MD シミュレーションによって見出された活性部位付近の二つの安定配置での平均構造から構築した 2 つのクラスタモデル(LT 及び HT)に対して密度汎関数計算を行った。この結果、SOMO の解析から両モデル共、銅イオンの $3d_{x^2-y^2}$ に対し N イオン(His46,His117)が σ 的に配位し、S イオン(Cys112)が π 的に配位している。さらに HT では Met121 からの配位が強く見られる(図 3:左(a),(b))。また、スピン密度分布は二つのモデルでは大きな違いは現れず、それぞれ Cu に約 51%、S(Cys112)に約 40%を占める結果となった(図 3:右(a),(b))。

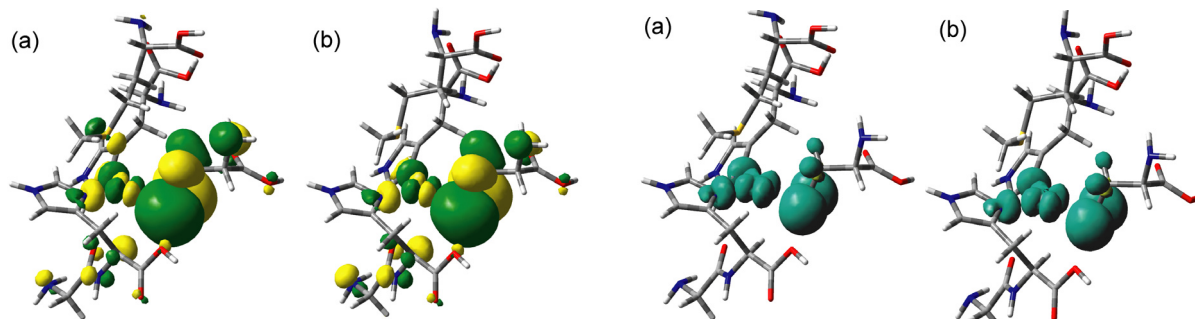


図 3 SOMO 及びスピン密度 (a)HT (b)LT

より詳細な MD シミュレーションの結果及び、二つのクラスタモデルでの酸化還元電位差等密度汎関数計算からの考察については当日報告する。

References

- [1] E. I. Solomon, R. K. Szilagyi, S. D. George, L. Basumallick, *Chem. Rev.* **104**, 419 (2004).
- [2] H. Nar, A. Messerschmidt, R. Hubewr, *J. Mol. Biol.* **221**, 765 (1991).
- [3] A.Sugiyama, et al. AIP conference proceeding, **708**, 362 (2004).
- [4] D.A.Pearlman, D.A.Case, J.W.Caldwell, W.S.Ross, T.E.Cheatham, S. DeBolt, D. Ferguson, G. Seibel & P. Kollman. AMBER, a package of computer programs for applying molecular mechanics, normal mode analysis, molecular dynamics and free energy calculations to simulate the structural and energetic properties of molecules. *Comp. Phys. Commun.* **91**, 141 (1995).