

マシコヒゲムシ巨大ヘモグロビン構造の温度依存性に関する研究

○山本 哲徳¹, 西川 佳吾¹, 杉山 歩¹, 長尾 秀実^{1,3}, 沼本 修考^{2,4}, 三木 邦夫^{2,4}, 福森 義宏^{1,3}
 (金沢大院・自然¹, 京大院・理², 金沢大・フロンティア科学³, 理化学研究所⁴)

【序】

ごく最近、有鬚動物マシコヒゲムシ(*Oligobrachia mashikoi*)巨大分子ヘモグロビンの構造がX線構造解析により解明された[1]。有鬚動物とは口、肛門、消化管が無く細長い触手を頭部に持つ左右対称の真体腔動物のことである。マシコヒゲムシは体長約 10cm、太さ 1mmであり石川県能登半島の九十九湾海底の硫化水素臭のするヘドロの中だけに生息する。ヒトヘモグロビンのように酸素を運ぶだけでなく、有鬚動物が必要な酸素O₂と化学合成細菌が必要な硫化水素H₂Sを同時に運搬する。

巨大ヘモグロビンは 4 種類の Subunit を持っているが、これらが六つずつ会合して全体で 24 量体を形成しており、全体として直径約 120 Å の球状構造で内部に直径約 50 Å の空洞が存在する。また、巨大ヘモグロビンは 24 量体構造が球を半分に分割した 12 量体構造が会合し、12 量体は 4 種類の Subunit が一つずつ集まった 4 量体が三つ会合した構造となっている。その 4 量体構造も、2 量体構造が会合した構造を持つ。それぞれの Subunit 内で一つずつ、また Subunit 間でも多くのジスルフィド結合が形成されており、とくに Subunit 間で形成されたジスルフィド結合は半球状の 12 量体構造の淵に沿うように配置されていて、それらのブロック同士をとつなぎ止めるように働くことで、巨大な複合体構造を安定的に保っている。

本研究では分子動力学シミュレーションを行い、温度変化による根平均二乗変位(RMSD)、慣性半径(R_g)、Subunit-Subunit間の結合自由エネルギーの評価などから溶媒中での動的構造の考察を行う。

【計算方法】

本研究で用いたタンパク質構造はマシコヒゲムシ巨大ヘモグロビン 24 量体の結晶構造(PDB : *Oli_Hb_24mer*[1])を使用し、Subunit A~X中の E(残基数 140), F(残基数 142), G(残基数 145), H(残基数 147)を切り取り初期座標とした。4 量体(総残基数 574, 全原子数 8625)の立体構造を図 1 に示す。また、本シミュレーションを遂行するにあたり、遷移金属原子であるヘム鉄とその周辺部の正確な電荷分布を見積もる必要がある。本研究では各Subunitにそれぞれ活性部位クラスタモデルを作成し、量子化学計算により電子状態を求めた。活性部位クラスタモデルは核の鉄Feとポルフィリン環(HEM), ヒスチジン(His)からなりそれぞれFeと配位結合を持っている。さらに、酸素O₂はヒスチジンの反対側からFeに結合し、上方の残基の分子間力によって支えられている(図 2)。

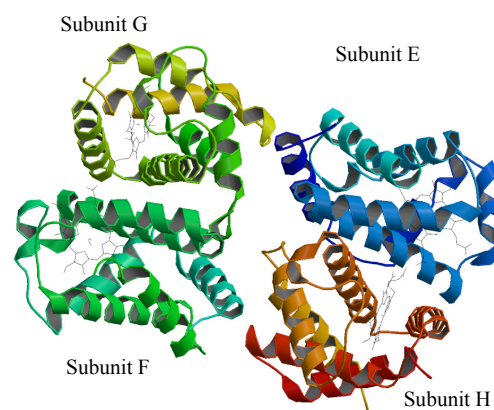


図1：マシコヒゲムシ4量体の立体構造

表1：各Subunitの活性部位モデル

Subunit	Residue
E	HEM, His62, His94
F	HEM, His62, His94
G	HEM, His66, His98
H	HEM, Gln64, Val68, His96

Subunitそれぞれの活性部位クラスタモデルを表 1 に示す。密度汎関数計算(Gaussian03)には基底関数 6-31G(d)を用い、方法はRB3LYPを用いた。MDシミュレーションはAMBER8プログラムパッケージ(Amberforce field 03)[2]を用いて、NVTアンサンブル、TIP5P剛体モデルの水分子 15476 個の水溶液中、計算時間は 2.0ns(1MDstep=2fs)とした。MD計算は周期境界条件を用い、温度変化による動的性質を見るために温度を 250K, 300K, 350Kそれぞれに対しシミュレーションを行った。

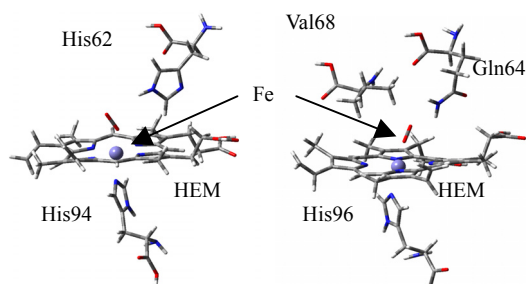


図2 : Subunit E(左), H(右)の活性部位クラスタモデル

【結果】

• 電子状態計算

量子化学計算で見積もられた活性部位付近の RESP 電荷の分布を図 3 に示す。

• MD シミュレーション

温度依存によるマシコヒゲムシ巨大ヘモグロビン 4 量体の広がり を考察するために、慣性半径(radius of gyration)を 250K, 300K, 350K それぞれの温度において求めた(図 4)。表 2 にそれぞれの温度の慣性半径の値を示す。温度が高いほど慣性半径は増大することが示唆される。

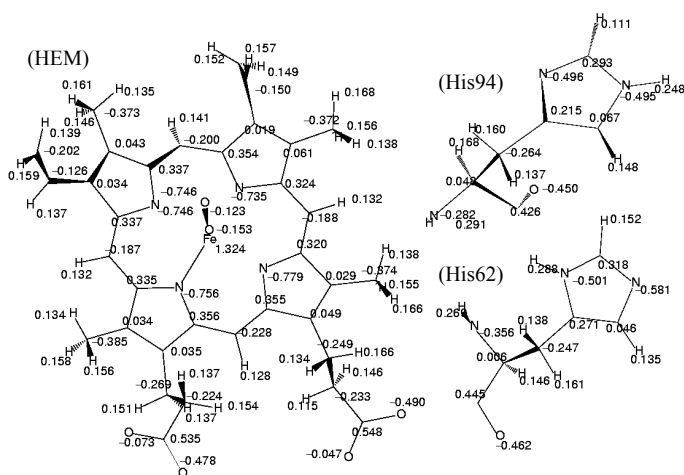


図3 : Subunit EのRESP電荷

さらに、各 Subunit E, F, G, H についても慣性半径を求めた。250K から 300K に温度が高くなるにつれて各 Subunit の慣性半径は大きくなる、すなわち 4 量体全体として広がるが、各 Subunit ではあまり変化が見られなかった。これより 250K から 300K の慣性半径の増加は各 Subunit 間の距離が増加したことによるものと考えられる。同様の傾向が 300K から 350K の場合にも確認された。

また、各 Subunit 間の結合自由エネルギーを解析した。Subunit の組により結合自由エネルギーの値が著しく変化した。尚、各 Subunit 間の結合自由エネルギーのより詳細な考察については当日報告する。

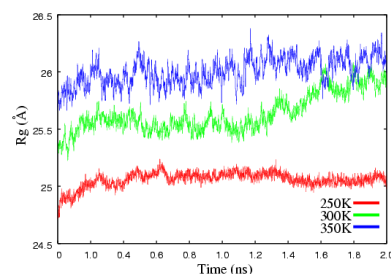


図 4 : 250K, 300K, 350K における慣性半径

表 2 : タンパク質全体の慣性半径

T (K)	$\langle R_g \rangle$ (Å)	ΔR_g (Å)
250	25.060	0.065
300	25.635	0.168
350	26.005	0.121

References

- [1] N. Numoto, T. Nakagawa, A. Kita, Y. Sasayama, Y. Fukumori, K. Miki, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1750**, 173-176, 2005.
- [2] D.A.Pearlman, D.A.Case, J.W.Caldwell, W.S.Ross, T.E.Cheatham, III, S. DeBolt, D. Ferguson, G. Seibel & P. Kollman, *Comp. Phys. Commun.*, **91**, 141, 1995.