

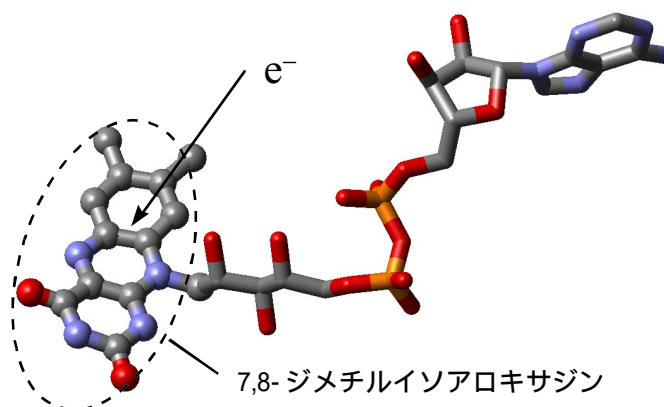
## 4E07 タンパク質中の FAD の 1 電子還元に伴う自由エネルギー変化の量子化学的研究

( 阪大院基礎工 ) 高橋英明 \*、大野 創、古川信一、中野雅由

**1. はじめに** タンパク質や溶液系などの凝縮系の化学過程を扱うための優れた方法論としてハイブリッド型の第一原理分子動力学法 (QM/MM法) がある。この方法は電子の第一原理計算に関わるコストが低い上に、環境部位が反応の活性部位に与える影響を考慮出来るという利点がある。電子状態の計算とならんで重要な課題は、対象となる化学過程に伴う自由エネルギー変化の計算である。自由エネルギーは、通常の統計平均値とは異なり計算することが困難な統計量である。我々は、最近、実空間グリッドを基底とするQM/MM法[1]と新しい溶液の理論(エネルギー表示の理論[2])を組み合わせることによって、自由エネルギー変化を効率良く且つ正確に計算する方法 (QM/MM-ER法) を開発した[3,4]。

Cholesterol oxidase (1B4V)は、補酵素FAD (Flavin Adenine Dinucleotide) を内包する酵素であり、生体内で電子伝達に関わるタンパク質として重要な働きをしている。FAD( 図1参照) はアポタンパクの中心付近に位置する反応の活性サイトであり、アポタンパクとは非共有結合によって繋がっている。1B4V中のFADは、最終的には2電子還元されることによりコレステロールを酸化するが、一電子還元体も中間体として存在することが知られている。本研究では、タンパク質の機能を解明することを目的として、タンパク質及び水溶液中の補酵素FADの1電子還元に伴う自由エネルギー変化をQM/MM-ER法によって計算する。

図1 FAD (Flavin Adenine Dinucleotide) の水素を除いた分子模型。楕円で囲んだ部分はイソアロキサジン環であり、電子付加反応の活性サイトとして働く。QM/MM計算では、イソアロキサジン環中の2つのメチル基は、水素原子によって置換した。



**2. 理論と計算方法** エネルギー表示の理論では、通常の溶液の理論とは異なり、溶質-溶媒間の相互作用エネルギーの分布関数を基本変数として溶質の溶媒和自由エネルギー  $\Delta\mu$  を記述する。溶質と溶媒間の相互作用ポテンシャルが2体的であるとすると、 $\Delta\mu$  は正確に、

$$\Delta\bar{\mu} = -k_B T \int d\varepsilon \left[ (\rho(\varepsilon) - \rho_0(\varepsilon)) + \beta \omega(\varepsilon) \rho(\varepsilon) - \beta \left( \int_0^1 d\lambda \omega(\varepsilon; \lambda) \right) (\rho(\varepsilon) - \rho_0(\varepsilon)) \right] \quad (1)$$

と表せる。ここで、 $\rho(\varepsilon)$ 、 $\rho_0(\varepsilon)$ はそれぞれ溶液系、参照系のエネルギー分布関数で、 $\beta$ は $k_B T$ の逆数である。溶質-溶媒間の平均力ポテンシャルの間接項 $\omega(\varepsilon)$ のカップリングパラメータ $\lambda$ に関する積分には、PYおよびHNC近似を用いる。

QM/MM 計算では、イソアロキサジン環を QM 領域とし、タンパク質、水、及びイソアロキサジン環以外の FAD を MM 領域として扱う。FAD の一電子還元に伴う自由エネルギー変化を QM/MM-ER 法によって計算する場合、イソアロキサジン環に付加する余剰電子 1 個を溶質とし、それ以外の部分をいくつかの分子種からなる混合溶媒とみなす。この方法では、FAD の SOMO を占有する余剰電子と QM 分子として扱うイソアロキサジン環との間の相互作用エネルギー  $v_{\text{QM}}$  を定義する必要がある。我々は、 $v_{\text{QM}}$  を

$$v_{\text{QM}} = \langle \Psi_{N+1} | H_0^{\text{QM}} | \Psi_{N+1} \rangle - \langle \Psi_N | H_0^{\text{QM}} | \Psi_N \rangle \quad (2)$$

によって導入した。式(2)において、 $\Psi_{N+1}$  はタンパク質のつくる外場中の還元後の電子の固有関数であり、 $\Psi_N$  は還元前の固有関数である。また、 $H_0^{\text{QM}}$  は孤立系の電子のハミルトニアンである。余剰電子と他の溶媒分子とのエネルギー座標の導入の仕方はこれまでと同様である。この方法では、溶質-溶媒間相互作用の多体の寄与は全て  $v_{\text{QM}}$  に含まれる。余剰電子が FAD に付加した状態(還元型)を溶液系、脱離した状態(酸化型)を参照系とし、これらの系について相互作用エネルギーに対する分布関数  $\rho(\epsilon)$ 、 $\rho_0(\epsilon)$  を QM/MM シミュレーションによって構成する。得られた分布関数を式(1)に代入することによって、 $\Delta\mu$  を算出する。

QM 系の電子状態は、実空間グリッドを基底とする Kohn-Sham の密度汎関数法により決定し、電子の交換相関汎関数には BLYP を用いた。MM 系は、498 個の残基からなる一本のペプチド鎖とそれを内包する 7579 個の水分子、及び反応に関与しない FAD の部分で構成した(総原子数は約 3 万)。これらの分子の動力学的時間発展は Charmm を力場とする Tinker package によって行った。まず、純古典の MD シミュレーションにより PDB の初期構造を溶媒水の中で緩和させた後、溶液系、参照系について、それぞれ 50 ps の QM/MM シミュレーションを行い、エネルギー分布関数  $\rho(\epsilon)$ 、 $\rho_0(\epsilon)$  を算出した。イソアロキサジン環 + 水の系についても同様の計算を行い、タンパク質及び水溶液中の自由エネルギー変化を比較する。

**3. 結果と考察** QM/MM-ER 法により、水溶液中のイソアロキサジン環の一電子還元の自由エネルギー  $\Delta\mu$  は、 $-69.8$  kcal/mol と得られた。気相中でのエネルギー差は  $-45.7$  kcal/mol であるので、水和により還元の自由エネルギーがおよそ 24 kcal/mol も減少することが分かる。 $\Delta\mu$  は、さらに、QM 系として扱うイソアロキサジン環からの寄与  $\Delta\mu(\text{QM})$  と、溶媒水からの寄与  $\Delta\mu(\text{MM})$  に分解することが出来、それぞれ、 $\Delta\mu(\text{QM}) = -39.7$  kcal/mol 及び、 $\Delta\mu(\text{MM}) = -30.1$  kcal/mol と計算された。タンパク質中のエネルギー分布関数の計算は現在進行中であり、結果は当日報告する。

## Reference

1. H. Takahashi, H. Hori et al, J. Comp. Chem. **22**, 1252 (2001).
2. N. Matubayasi and M. Nakahara, J. Chem. Phys. **113**, 6070 (2000).
3. H. Takahashi, N. Matubayasi et al, J. Chem. Phys. **121**, 3989 (2004).
4. H. Takahashi, Y. Kawashima et al, J. Chem. Phys. **123**, 124504 (2005).