

4E10

分子軌道法によるシトクロム *c* 酸化酵素の新しいプロトン輸送経路の考察

(阪大蛋白研) ○鷹野優, 中村春木

ytakano@protein.osaka-u.ac.jp

【序】シトクロム *c* 酸化酵素は呼吸の電子伝達系において酸素から水への四電子還元で得られた自由エネルギーによってプロトン輸送を行う。X 線結晶構造解析や分光学など多くの実験が行われているが、プロトン輸送経路・機構は未だ完全に明らかにされていない。近年、月原らはウシシトクロム *c* 酸化酵素の高分解能の X 線結晶構造解析から新しいプロトン輸送経路 (H 経路) を示唆した[1]。H 経路ではペプチド結合を介したプロトン移動が関わっており (図 1(A))、それがプロトン輸送の方向を決めていると提唱されている。本研究では特にペプチド結合を介したプロトン移動に着目し、密度汎関数法によってこの経路の可能性を検証した[2]。

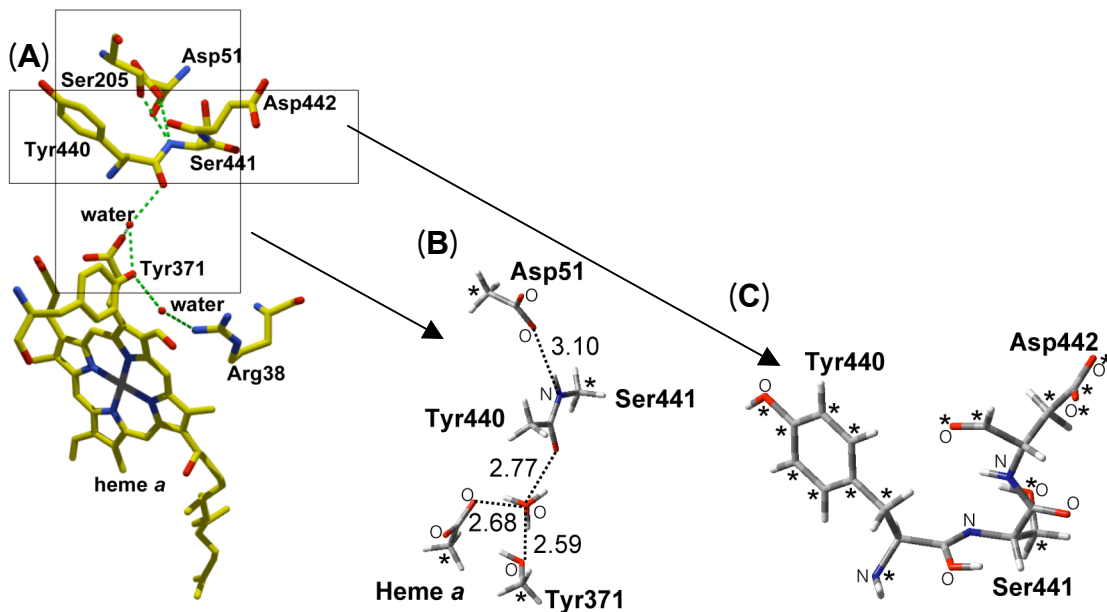


図 1. (A) ペプチド結合を介したプロトン移動に関わる水素結合ネットワークおよび
(B) 反応(i)と(C)反応(ii)の計算モデル
(*で示した原子は構造が大きく壊れるのを防ぐため固定した。)

【計算方法】提唱されているペプチド結合を介したプロトン移動は(i)エノール型ペプチド結合を形成するプロトン移動と(ii)ケト・エノール互変といった二つの反応から構成されているため、本研究ではこれらを別々に取り扱った。反応(i)ではプロトン移動に関わる結晶水、ペプチド結合(Tyr440-Ser441)、Asp51、ヘム *a* のプロピオン酸基、Tyr371 からなるモデルを構築した。計算コストを小さくするため、ペプチド結合として *N*-methyl acetamide、Asp51 として酢酸イオン、Tyr371 としてメタノールを用いた。ヘム *a* のプロピオン酸基と

してはプロトン化状態がわからないので酢酸イオンと酢酸の両方を用いた。(図 1(B)) 反応(ii)ではプロトン移動の媒介となるペプチド結合を含むトリペプチド(Tyr440-Ser441-Asp442)から構築した。(図 1(C))

反応経路は B3LYP/6-31++G(d,p)//HF/3-21G 法を用いて調べられた。タンパク質環境の溶媒効果に関しては PCM (比誘電率 4.0) [3]を用いて HF/6-31+G(d)法により計算した。全ての計算には Gaussian03 を使用した[4]。

【結果・考察】密度汎関数法を用いて得られたペプチド結合を介したプロトン移動の反応経路をまとめたものを図 2 に示す。反応(i)ではプロピオン酸基がプロピオン酸イオンでは反応が進行せず、プロトン化によりプロピオン酸になることで反応が進行したことから、プロピオン酸基の pK_a の減少が必要であることがわかった。そのときには H_3O^+ からペプチド結合へのプロトン移動によるイミド酸の生成が活性化エネルギーなしで進行した。またイミド酸のアミドプロトンの移動も非常に小さい活性化エネルギーで起こった。反応(ii)では、エノールプロトンが直接窒素に移る経路は活性化エネルギーが約 60 kcal/mol と非常に大きくなった。一方、水分子や周りの残基などを利用してプロトンの受け渡しを行うプロトンワイヤモデルでは約 22 kcal/mol と大きく減少することがわかった。また、逆反応では約 45 kcal/mol の活性化エネルギーを必要とすることから、この異性化反応が律速段階であり反応の一方方向性を決定していると考えられる。

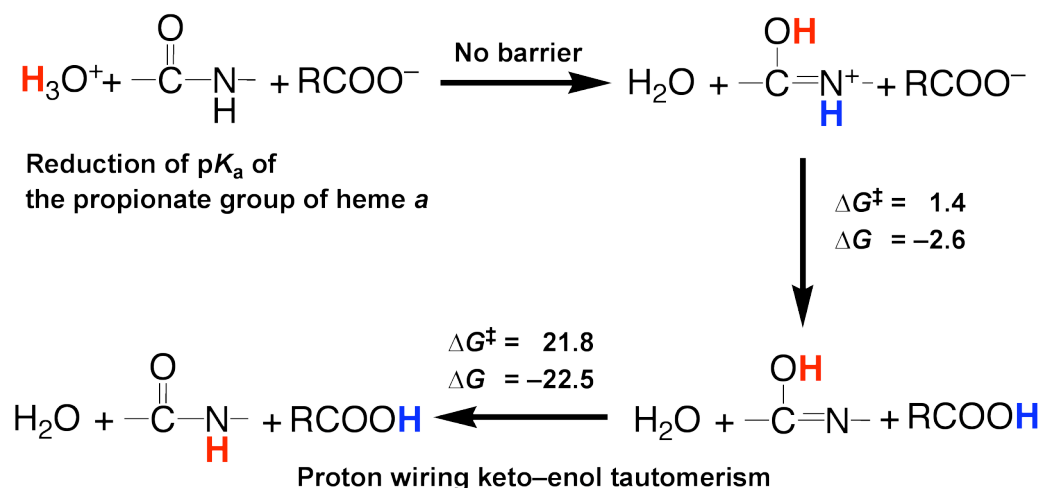


図2 ペプチド結合を介したプロトン移動の反応経路のまとめ

【参考文献】

1. T. Tsukihara et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100 (2003) 15304.
2. Y. Takano and H. Nakamura submitted for publication.
3. (a) V. Barone, R. Improta, N. Rega, Theor. Chem. Acc. 111 (2004) 237.
(b) Y. Takano and K.N. Houk, J. Chem. Theory Comput. 1 (2005) 77.
4. M.J. Frisch et al., Gaussian03, Gaussian, Inc.: Pittsburgh, PA.