

## 量子化学計算によるフラビン補酵素の 1 電子還元

## におけるアポタンパク質の機能の解明

(阪大院基礎工) ○大野 創・高橋英明・岩田祐一・古川信一・中野雅由

【緒言】 Flavin Adenine Dinucleotide(FAD)は多くの生体内酸化還元反応に関与する重要な補酵素であり、その活性部位であるイソアロキサジン環の電子状態は、FAD の酸化力を理論的に研究する上で重要である。また、周囲の水分子や FAD を内包するアポ酵素が熱的に揺らぐので、反応の研究ではその過程に伴う自由エネルギー変化を計算する必要がある。本研究では、ハイブリッド型の第一原理分子動力学法(QM/MM 法)と新規な溶液論であるエネルギー表示の理論[1]をカップルさせた手法(QM/MM-ER 法[2])によって水中における FAD の 1 電子還元に伴う自由エネルギー変化  $\Delta\mu_{\text{red}}$  を計算する。さらに ONIOM 法によってアポ酵素中の FAD の 1 電子還元に伴うエネルギー変化を計算し、還元反応に対するアポ酵素の静電場の影響を研究する。

【理論と方法】 QM/MM 法は反応に関与する部分を第一原理的に記述し、それ以外の部分を古典力学で取り扱う方法であり、大規模系の第一原理シミュレーションに有効である。本研究では活性部位であるイソアロキサジン環を QM 系、それ以外の部分を MM 系とした。以下では、QM/MM シミュレーションの結果からエネルギー表示の理論により自由エネルギー変化を計算する方法を概説する。

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、溶媒和自由エネルギー  $\Delta\mu$  は溶質-溶媒間の相互作用エネルギーの分布関数によって表される。エネルギー表示の方法は相互作用点という概念を必要としないので、QM/MM 法のような第一原理的な手法との融合が容易である。エネルギー表示の理論では自由エネルギー変化  $\Delta\mu$  は近似なしに

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

と記述できる。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あり、 $\omega(\varepsilon)$  は溶質-溶媒間の平均力ポテンシャルの間接部分、 $\lambda$  は結合パラメータである。また、 $\beta$  はボルツマン定数  $k_B$  と温度  $T$  との積の逆数である。

本研究ではエネルギー表示の理論によって FAD の 1 電子還元に伴う自由エネルギー変化  $\Delta\mu_{\text{red}}$  を計算するために、イソアロキサジン環に付加する余剰電子を溶質とし、溶媒を水分子とイソアロキサジン環から成る混合溶媒とする方法を採用した。この方法では余剰電子と水分子  $i$  との間の相互作用エネルギー  $v_i$  は

$$v_i = \int n_{\text{SOMO}}(\mathbf{r}) \sum_s \frac{q_s}{|\mathbf{R}_s^i - \mathbf{r}|} d\mathbf{r} \quad (2)$$

と表される。ここで  $n_{\text{SOMO}}(\mathbf{r})$  は SOMO の電子密度であり、 $q_s$ ,  $\mathbf{R}_s^i$  はそれぞれ水分子のサイトの電荷と座標である。また、電子とイソアロキサジン環の相互作用エネルギー  $v_{\text{QM}}$  を、溶液中で電子がイソアロキサジン環に付加するときのエネルギー変化として

$$v_{\text{QM}} = \langle \Psi_{N+1} | \mathbf{H}_{\text{QM}} | \Psi_{N+1} \rangle - \langle \Psi_N | \mathbf{H}_{\text{QM}} | \Psi_N \rangle \quad (3)$$

と定義する。 $\mathbf{H}_{\text{QM}}$  は孤立した QM 系のハミルトニアンであり、 $\Psi_{N+1}$ ,  $\Psi_N$  はそれぞれ還元型、及び酸化型のイソアロキサジン環の溶液中の波動関数である。QM/MM-ER 法では、QM/MM シミュレーション

によって計算された参照系、及び溶液系のエネルギー分布関数を式(1)に代入し、自由エネルギー変化  $\Delta\mu_{\text{red}}$  を計算する。

【計算条件】 QM/MM 計算では、QM 系の電子状態は実空間グリッドを用いる Kohn-Sham の密度汎関数法によって計算した。電子の交換相関汎関数には BLYP を用いた。MM 系は 676 個の TIP3P モデルの水分子で構成し、計算ソフトは Tinker Package を使用した。MD の Time step は 1 fs、温度は 300 K とし、力場には CHARMM22 を用いた。なお、エネルギー分布関数は 5 ps の平衡化後、約 50 ps のアンサンブル平均から構成した。

ONIOM 計算では、イソアロキサジン環を High level(B3LYP/Aug-cc-pVDZ)で、FAD 全体を Low level(B3LYP/3-21+G\*\*)で扱った。また、その他の部分(ADP、コレステロールオキシダーゼ(1B4V)、及び 7579 個の水分子)の作る静電ポテンシャルは全て CHARMM22 によって定義される電荷によって記述した。計算ソフトには Gaussian03 を使用した。

【結果】 気相中のイソアロキサジン環の 1 電子還元に伴うエネルギー変化は -49.3 kcal/mol(B3LYP/Aug-cc-pVDZ)であり、環の酸素原子と水素結合する二つのアミノ酸残基(Met122, Phe487)の静電場を考慮した計算では -57.5 kcal/mol となった。このことからイソアロキサジン環に配向する水素結合が自由エネルギー変化に大きな寄与を与えることが示唆された。QM/MM-ER 法による水中のエネルギー分布関数を図 1 に示す。これらの分布関数により 1 電子還元に伴う自由エネルギー変化は -69.8 kcal/mol と計算され、水和がイソアロキサジン環の還元反応を促進させることが分かった。ONIOM 計算による FAD の 1 電子還元に伴うエネルギー変化は -242.2 kcal/mol であり、真空中及び水中に比べて劇的に増大した。このことからアポ酵素の荷電性アミノ酸の静電場が FAD の還元電位に大きく影響することが分かった。アポ酵素中の FAD の還元反応の QM/MM-ER 計算は現在進行中であり、結果は当日発表する。

#### 【参考文献】

- [1] N. Matubayasi, M. Nakahara, *J. Chem. Phys.*, **113**, 6070 (2000).
- [2] H. Takahashi, N. Matubayasi, *J. Chem. Phys.*, **121**, 3989 (2004).

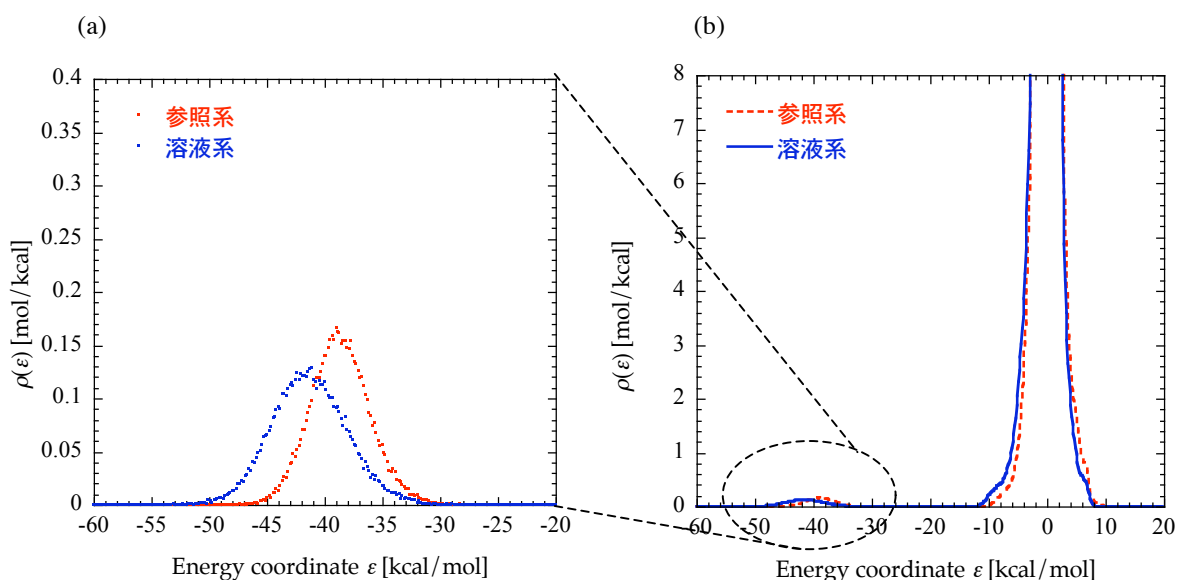


図 1. (a)余剰電子に対するイソアロキサジン環のエネルギー分布関数  
(b)余剰電子に対するイソアロキサジン環、及び水分子のエネルギー分布関数