

QM/MM 法を用いた NADH-シトクロム b5 還元酵素の反応性の研究

(阪府大¹・阪市大²・分子研³) ○麻田俊雄¹, 西本吉助², 小関史朗¹, 永瀬茂³

【序】NADH-シトクロムb5還元酵素は、電子供与体のNADHから 2 電子をFADに受け取り、シトクロムb5やフェリシアン化カリウムなどの電子受容体に1電子ずつ渡す反応を触媒することが知られている。このサイクルで、NADHは二電子還元しかできないのに対し、ビタミンB2 を基本骨格とするFADを補酵素にもつフラビン酵素は二電子還元と一電子還元を両方を行う最も重要な酵素として機能している。本酵素の安定性に関する研究は、すでに木村ら¹⁾によって実験的に報告されているが、理論的な研究は行われていない。そこで、今回分子動力学(MD)シミュレーションとQuantum Mechanical / Molecular Mechanical法(QM/MM法)を用いて、酵素の安定性と活性部位における反応について解析したので報告する。

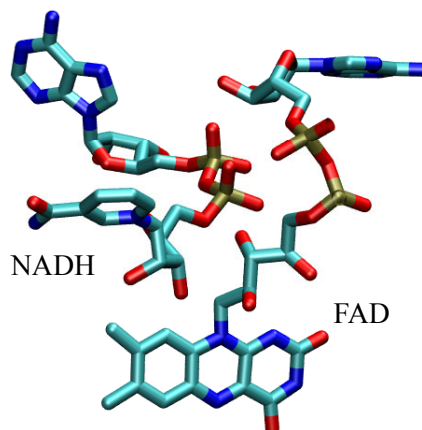


図 1 活性サイトにある FAD と NADH の分子構造

【方法】初期座標はProtein Data Bankに登録されているX線構造解析の座標を用いた。Amber力場をもとにして水素原子を標準的な座標に付加し、FADとNADHを含む活性中心から半径35 Å以内に水分子を3598個配置することで、系の水和モデルとした。補酵素であるFADとNADHの原子電荷は、二段階RESP (restrained electrostatic potential)フィット²⁾により決定した。

酵素の酸化還元反応のサイクルでは、NADHからFADへのヒドリドイオン移動が実験的に観測されている。しかしながら結晶構造では、活性サイトであるNADHのHとFADのN(5)との原子間距離が約9Åも離れている。そこで、ヒドリドイオンの移動に関与する原子間に仮想的な調和力を与えて室温における力場のMDシミュレーションを行った。得られた構造をもとにして、NADHと補酵素FADの活性サイトをB3LYP/6-31G(d)レベルで、また、それを取り囲む領域の原子をAmber99力場レベルとするQM/MM(B3LYP/6-31G(d):Amber99)計算を行い反応を解析した。MDシミュレーションは計算時間の制約から力場のみを用いている。

QM/MM計算を行うにあたり、量子力学計算にGaussian03を用いる自作プログラムを利用した。なお全系のハミルトニアンは(1)式で与えられる。

$$\mathbf{H}_{\text{total}}^{\text{A+B}} = \mathbf{H}_{\text{MM}}^{\text{A+B}} - \mathbf{H}_{\text{MM}}^{\text{A}} + \mathbf{H}_{\text{QM}}^{\text{A}} \quad (1)$$

ここで、Aは量子力学的(QM)に扱う領域を、Bは力場(MM)で扱う領域を指す。自由エネルギーの計算は、誘電連続モデルの一つ Molecular Mechanical - Poisson Boltzmann/ Surface Area 法(MM-PBSA法)を用いた。

【結果と考察】はじめに、酵素の構造安定性を解明する目的で、特定のアミノ酸をアラニンに置換した際の、酵素と FAD および NADH との結合自由エネルギー変化を計算した(Table1)。この方法は、アラニンスキャンとして知られ一度の分子動力学シミュレーションから得られる分子座標のトラジェクトリーから置換後の自由エネルギーを見積もることができる。一方、置換による酵素の構造緩和は考慮できない。従来のアラニンスキャンの方法は、置換することで切除される元の残基の側鎖空間が置換後に水分子で満たされるモデルを用いている。今回、新たに切除された側鎖の空間は構造緩和による効果から水分子で満たされないことと近似するモデルを提案した。この方法を用いると、従来の方法では再現することが困難であった Tyr65Ala を含めた残基の重要性について、実験結果の傾向をうまく再現することができる。ここで、結合自由エネルギー変化 $\Delta\Delta G$ が正の値をとることは、元のアミノ酸残基が安定性にとって重要な残基であることを意味している。さらに Lys82 は唯一、FAD と NADH のリン酸基のいずれにも水素結合していることから安定性にきわめて重要に寄与していると結論できる。

Table1. Calculated binding free energy difference in kcal/mol using alanine scanning method.

Alanine Mutation	$\Delta\Delta G^a$	$\Delta\Delta G^b$	$k_{cat}^{NADH}/K_m^{NADH}(\mu M^{-1}s^{-1})^c$
WT			354±61
Thr66Ala	-0.2	-0.2	339
Lys97Ala	2.1	2.1	240±21
Tyr65Ala	-3.8	2.8	42.9±4.8
Ser99Ala	6.8	6.8	16.7±1.6
Thr153Ala	8.2	8.2	
Arg63Ala	8.4	8.4	3.9±0.9
Lys82Ala	16.2	16.2	

^a Conventional PBSA

^b Modified PBSA

^c experimental data

次に、QM/MM 計算を用いて酵素中の NADH から FAD へのヒドリドイオン移動について解析した。結果を Table2 に示す。ヒドリドイオン移動反応は局所的な反応であり、活性化エネルギー33.4kcal/mol が得られた。また、酵素が存在しない水中では、遷移状態の結合自由エネルギーが 25.6kcal/mol となることから、反応は進行しないと考えられる。一方、酵素中では遷移状態の結合自由エネルギーが 0.2kcal/mol 程度に低下することから、水中に比べてかなり進行しやすくなることがわかる。エネルギー変化だけをみれば、NADH が持つ 2 個のリン酸基と正電荷をもつアミノ酸残基が静電的に強く結合することから、大きな結合エネルギーをとっている。溶媒は静電相互作用を遮蔽することで結合自由エネルギーはそれほど大きな値をとっていない。以下、詳細は当日に発表する。

Table2. Calculated energy and free energy changes for the hydride ion transfer reaction

	with Enzyme		without Enzyme	
	$\Delta E/kcal/mol^{-1}$	$\Delta G/kcal/mol^{-1}$	$\Delta E/kcal/mol^{-1}$	$\Delta G/kcal/mol^{-1}$
Reactant	-458.6	-33.2	-28.6	-7.8
TS	-425.2	0.2	4.8	25.6
Product	-453.2	-28.0	-23.2	-2.4

【文献】

- 1) S.Kimura, M.Kuwamura, and T.Iyanagi, *J.Biol.Chem.* **2003** 278, 3580.
- 2) P.Cieplak, W.D.Cornell, C.Bayly, and P.A.Kollman *J.Comp.Chem.* **1995** 16, 1357.