

***Ps.3 α -HSD* と補因子との結合性に関する理論的研究**

(材料設計) 鴻上 亜希

1. 緒言

3 α -hydroxysteroid dehydrogenase (3 α -HSD)はステロイド3位のヒドロキシル基とケトン基を可逆変化する酵素である。様々なステロイドに対し活性を示し、多くの哺乳類・微生物の中に存在する。3 α -HSD の中でも緑膿菌に存在する *Pseudomonas* sp.由来の酵素(*Ps.3 α -HSD*)は NAD(H)との親和性が特に強く、腸機能検査の酵素薬として優れ、既に実用化されている¹⁾。しかし、*Ps.3 α -HSD* の触媒作用の詳細な機構やその特異性など解明すべき点は多く残されている。一方、バクテリアの中に存在する *Commamonas testosteroni* ATCC11996 由来の 3 α -HSD (*Ct.3 α -HSD*)については古くから研究が進められており、その構造や補因子との結合性などが既に報告されている。これら二つの酵素は同じ short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) superfamily に属しており、類似の補因子結合サイトおよび基質結合サイトを持つことが分かっている²⁾。これらの酵素は類似の構造を持つにも関わらず、*Ct.3 α -HSD* は補因子として NAD⁺にのみ結合するのに対し、*Ps.3 α -HSD* は NAD⁺だけでなく NADP(H) にも結合するなど、数々の相違点が存在する。

そこで、本研究では量子化学計算を用いて *Ps.3 α -HSD* および *Ct.3 α -HSD* と補因子との結合性を比較し、*Ps.3 α -HSD* の結合特異性を解明することを目的とした。

2. 計算方法

本研究では基底関数 6-31G を用いた B3LYP 計算を行った。*Ps.3 α -HSD* および *Ct.3 α -HSD* と NADH の複合体のモデルとして、X 線結晶構造からその骨格を抜き出したものをそれぞれ用いた。その際、切り出したアミノ残基の末端は水素で cap した。

3. 結果と考察

実験的研究から *Ps.3 α -HSD* の Arg33 が NAD(H)の糖部分付近に存在すること、また NADPH においては最近接のアミノ酸となり補因子の結合特異性に大きく影響を与えると予想されることが分かった。リン酸基との距離に着目すると、Arg33 は Fig1.に示すように糖から 2.62 Å離れた所に存在する。また、Arg33 の近くに位置し、かつ NAD(H)を取り囲む酵素の第一層目に位置しているアミノ残基は 32番から 35番である。Asp32 もまた糖の 2.91 Å

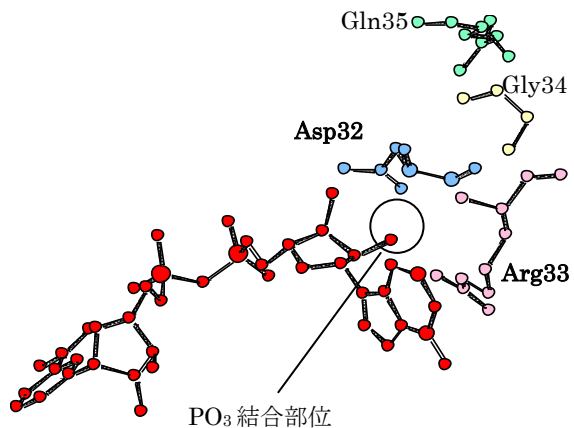


Fig 1. NADH とペプチド 32-35 の位置関係

付近に位置しており、糖近傍に存在している。一方で Gly34、Gln35 は 5.83 から 8.5 Å ほど離れている。従って、結合特異性に重要であるのは Asp32 と Arg33 であると予想される。(Fig1)

さらに 32-35 付近のアミノ酸配列を *Ps.3α*-HSD Table1 .NADH の 32-35 のアミノ酸配列

と *Ct.3α*-HSD で比較すると、Table1.に示すように Asp32 以外のアミノ酸配列が異なっていた。

<i>Ps.3α</i> -NAD32-35	<i>Ct.3α</i> -NAD32-35
Asp32	Asp32
Arg33	Ile33
Gly34	Arg34
Gln35	Asp35

NADPH との結合を考える上で、リン酸基の性質に着目した。リン酸基は親水性であるため同じく親水性のアミノ酸との相性が良い。NADPH との結合を示す *Ps.3α*-HSD において NADPH のリン酸基と

複合体形成に際し近くに存在すると予想される Asp32、Arg33 が親水基である。一方 *Ct.3α*-HSD は Asp32 が親水基であるものの、Ile33 は疎水基である。つまり *Ps.3α*-HSD はリン酸基と結合する際に静電的に有利であると予想される。さらに、*Ps.3α*-HSD の Gly34 に注目する。Gly はアミノ酸の最小構造であるため Gly34 付近に空間的余裕が生じ、NADPH との複合体形成に際し立体障害が小さいと予想される。*Ps.3α*-HSD はその空間を利用して NADPH をうまく収納できるのかもしれない。これらを踏まえ、アミノ酸配列 Asp32-Arg33-Gly34-Gln35 を *3α*-HSD のモデルとしてタンパクから切り出し採用することとした。

複合体モデルを Fig2.で示す。計算の結果、NADH と *Ps.3α*-HSD の結合エネルギーは 37.68kcal、*Ct.3α*-HSD の結合エネルギーは 4.75kcal であった。*Ct.3α*-HSD において結合エネルギーが著しく減少していることが分かる。現在、Fragment Molecular Orbital(FMO)法を用いて各アミノ残基と *3α*-HSD の Pair Interaction Energy Decomposition Analysis (PIEDA) を行い、結合特異性に対する各アミノ残基の役割の詳細について検討を行っている。

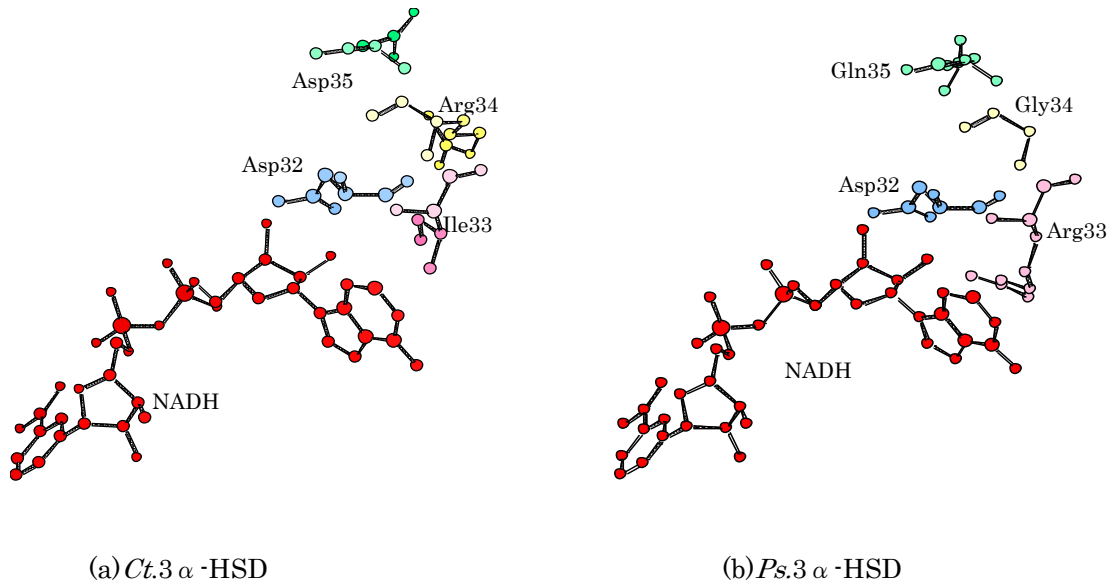


Fig2. *3α*-HSD-NADH 複合体モデル

4. 参考文献

- 1) Shigeru Ueda et al, *J.Biol Macromol.*,**4(1)** 23-28(2004)
- 2) Shigeru Ueda et al, *Eur.J.Biol.Chem.*Vol.**271**,1774-1780(2004)