

Pseudomonas sp. B-0831 由来 3 α -HSD と補酵素複合体の結合における pH 依存性に関する理論的研究

(環境材料設計) 岩田和也

1. 序論

3 α -hydroxysteroid dehydrogenase (3 α -HSD) は NAD(P)⁺ を補因子に持ち 3 α -hydroxysteroid と 3 α -ketosteroid の間の可逆的な酸化還元反応を触媒する酵素である。3 α -HSD は多くの哺乳類や微生物に見られるが、その中で肝機能の診断薬として使われているのがバクテリアの *Pseudomonas* sp. B-0831 由来の 3 α -HSD (Ps3 α HSD) である。Ps3 α HSD は同じタンパク質ファミリーの 3 α -HSD の中で最も研究されている *Commamonas testosteroni* ATCC11996 の 3 α -HSD (Ct3 α HSD) と 50% のアミノ酸配列の相同性をもつ。しかし Ct3 α HSD が補因子として NAD⁺ としか結合できないのに対し、Ps3 α HSD は NAD⁺ だけでなく NADH や NADP(H) とともに結合性を示す。このため、より高性能な触媒の開発に必要な情報を得るべく Ps3 α HSD の基質特異性や補因子特異性についての研究が様々な角度から行われている。最近の織田らの実験により、溶媒の pH によって酵素-補酵素間の結合性が変化することが分かっている。しかし、実験では補酵素との結合における個々のアミノ残基の役割を明らかにするのは困難である。そこで、酵素-補酵素複合体の結合の pH 依存性に大きな影響を与えるアミノ残基を特定し、Ps3 α HSD の補因子結合特異性を明らかにすることを目的とし、量子化学計算を用いた研究を行った。

2. 計算方法・モデル化

2.1. 計算方法

Ps3 α HSD-NAD⁺/NADH 複合体モデルの骨格は X 線結晶構造解析 (図 1) によって得られたものを用いた。タンパク質 Ps3 α HSD から必要と考えられる数個のアミノ残基を選出し、これに NAD⁺/NADH を加えて複合体のモデル化を行った。各モデルにおいて水素の幾何学構造は B3LYP/6-31G を用いた構造最適化により求めた。複合体の結合エネルギー ΔE の計算には、基底関数に 6-31G と分極関数を加えた 6-31G(d,p) を使い、アミノ残基と NAD⁺/NADH の複合体における全電子エネルギーから各化合物の全電子エネルギーの和を引くことによって求めた。また、実験値の自由エネルギー変化 ΔG と直接比較するため、振動解析により得られる ΔG の計算も行った。

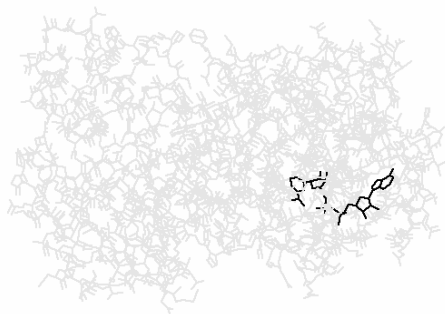


図 1. Ps3 α HSD-NADH 複合体の X 線結晶構造。黒が NADH.

2.2. モデル化

NAD(H)は周囲にある Ps3 α HSD のいくつかのアミノ残基と相互作用しているが、本研究ではその中でも活性部位と近接している NAD(H)の Nicotinamide 環に注目し、その周囲に存在するタンパク質のアミノ残基との相互作用の pH 依存性について調べた (図 2)。

この pH 依存性を調べるにあたり、Nicotinamide 環に近接するイオン性のアミノ残基に注目した。その中に触媒残基といわれる Ser114, Tyr153, Lys157 が含まれるが、そのうち、互いの配列に近い Tyr153, Lys157 に注目し、それぞれについて NAD⁺/NADH との結合性を調べた。この Tyr, Lys はイオン性のアミノ残基であるので、pH 変化によってイオン化が起きている。そこで、それぞれのアミノ残基においてイオン化前後の NAD⁺/NADH との結合エネルギーを計算することで複合体形成の pH 依存性を調べた。

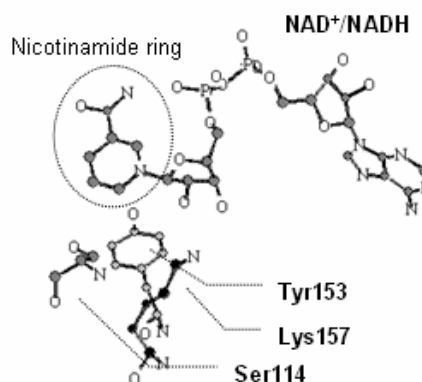


図 2. NAD⁺/NADH と Ser114, Tyr153, Lys157

3. 結果・考察

NAD⁺と NADH では複合体形成の安定化が異なっている。そこで本研究では NAD⁺, NADH それぞれの複合体における結合の pH 依存性を調べた。

まず、Tyr153 と NAD⁺ の複合体モデル (Tyr153 - NAD model, 図 3) を用いて、pH 7.4 と pH 8.5 時の複合体形成における Gibbs 自由エネルギー変化 ΔG と全電子エネルギー変化 ΔE の比較を行った (表 2)。6-31G の基底関数を用いた ΔG の計算結果は pH 7.4 (Tyr153 が中性型)では 9.03 kcal/mol, pH 8.5 (Tyr153 が脱プロトン化型) では -37.40 kcal/mol となり、pH の上昇にともない結合安定化が大きくなった。一方、 ΔE は pH 7.4, pH 8.5 でそれぞれ -9.55, -54.61 kcal/mol となり、 ΔG と同様の傾向を示した。これらは実験報告と同じ傾向を示している。以降、結合安定性の変化は計算コストの小さい全電子エネルギー変化 ΔE によって記述する。また、6-31G(d,p)の基底関数を用いると ΔE は pH 7.4, pH 8.5 でそれぞれ -7.56, -38.32 kcal/mol となり、過大評価の傾向が幾分抑えられた。これにより分極関数の重要性が示された。pH 上昇にともない Tyr153 - NAD⁺ model の結合安定化が大きくなった原因としては、Tyr153 の脱プロトン化に伴い酸素原子に負電荷が集中し、近接する NAD⁺の Nicotinamide 環の正電荷および糖の OH 基との静電相互作用が強まったためと考えられる (図 3)。

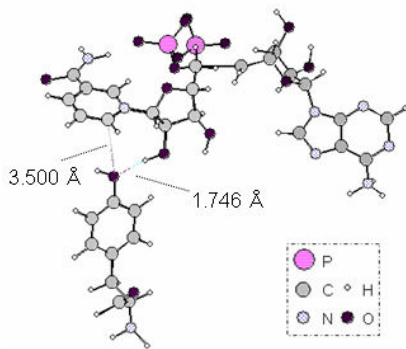


図 3. Tyr153 - NAD⁺ model.

表 2. Tyr153 - NAD⁺ model における binding energy [kcal/mol] の pH による変化

pH	Tyr153		Ps3αHSD	
	ΔE		ΔG	ΔG^a
	6-31G	6-31G(d,p)	6-31G	
7.4	-9.55	-7.56	9.03	-4.9
8.5	-54.61	-38.32	-37.40	-5.3

^a 片岡らによる (熱量測定(ITC)による実験結果. 未発表)

次に, Tyr153 と NADH の複合体モデル (Tyr153 - NADH model, 図 4) の結合安定化エネルギーは 6-31G(d,p)を用いたとき pH 7.4 (中性型) で -8.73 kcal/mol, pH 8.5 (脱プロトン化型) で 3.04 kcal/mol となり NAD⁺ の結果と比較すると pH 8.5 において, 結合性が低下している。これは, NAD⁺ に hydride が付加した NADH は Nicotinamide 環の電荷が負に帯電しているため, Tyr153 の酸素原子と反発相互作用をするためと考えられる。また, NAD⁺の結合の pH 依存性とは逆に, pH の上昇にともない結合安定化が減少した (表 3)。これは脱プロトン化によって, Tyr153 の酸素原子に負電荷がさらに集中し, Nicotinamide 環との反発が増すためであると考えられる。NADH の計算結果も, 実験報告と同じ傾向を示している。

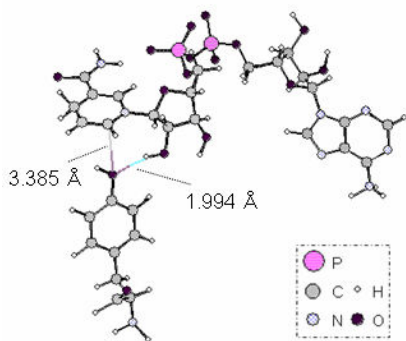


図 4. Tyr153 - NADH model.

表 3. Tyr153 - NADH model における binding energy [kcal/mol] の pH による変化

pH	Tyr153		Ps3αHSD
	ΔE		ΔG^a
	6-31G	6-31G(d,p)	
7.4	-9.92	-8.73	-7.0
8.5	7.13	3.04	-6.4

^a 片岡らによる (ITC による実験結果. 未発表)

Tyr153 と同様に Ps3αHSD の触媒作用に重要と考えられている Lys157 にも注目した。Lys157 と NADH の複合体モデル (Lys157 - NADH model, 図 5) の結合安定化エネルギーは 6-31G(d,p)を用いたとき pH 7.4 (Lys157 がプロトン化), pH 8.5 (Lys157 が中性型) に対しそれぞれ -64.19, -3.58 kcal/mol となり (表 4), Tyr153 - NADH model と同様に pH の上昇にともなって結合安定性が減少した。この原因を以下に考察する。

pH7.4 で Lys157 がプロトン化している状態では図 5 に示したように NADH の糖の部分と 2 箇所水素結合により安定化していると思われる。pH8.5 の状態では amine 基のプロトンが一つ失

われ、NADH の糖の部分との水素結合は一箇所に減少する。これに加えて、アミン基の N 原子の孤立電子対と糖の他方の OH の酸素原子の孤立電子対との反発も予想される。以上より Lys157 と NADH の結合安定性は pH の上昇にともなって減少すると考えられる。

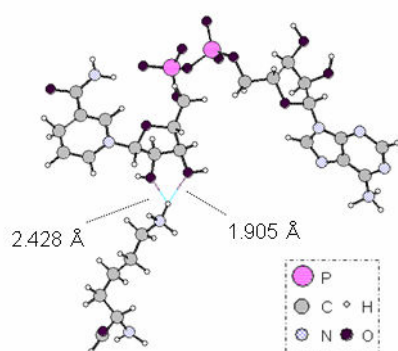


図 5. Lys157-NADH model

表 4. Lys157 - NADH model の binding energy [kcal/mol] の pH による変化

pH	Lys157		Ps3αHSD
	ΔE		ΔG^a
	6-31G	6-31G(d,p)	
7.4	-65.14	-64.19	-7.0
8.5	0.62	-3.58	-6.4

^a 片岡らによる (ITC による実験結果. 未発表)

さらに、Tyr153, Lys157 の周りのアミノ残基の役割についても検討を行った。Tyr153, Lys157 に対しそれぞれ両隣のアミノ残基を加えたペプチド、Ala152-Tyr153-Ala154 および Ser156-Lys157-Tyr158 を選出し、それぞれ安定化の大きかった pH 8.5, pH 7.5 として NAD⁺/NADH との結合安定化エネルギーを計算した。その結果、Ala152-Tyr153-Ala154 - NAD⁺ model, Ser156-Lys157-Tyr158 - NADH model を用いることによって、Tyr153 - NAD⁺ model や Lys157 - NADH model で過大に見積もられていた安定化エネルギーに改善が見られた。これは model のサイズの改善による効果とイオン化により局在化した Tyr153, Lys157 の電荷が周りのアミノ残基により緩和される効果が考えられる。Ser156-Lys157-Tyr158 - NADH model においては Ser156, Tyr158 も pH 変化によってプロトン化、脱プロトン化が起こる。この影響について現在検討中である。

表 5. NAD⁺/NADH との binding energy [kcal/mol]

	NAD ⁺ (pH8.5)		NADH (pH7.5)
^a Tyr153	-54.61	^b Lys157	-65.14
^a Ala152-Tyr153-Ala154	-21.65	^b Ser156-Lys157-Tyr158	-45.34

6-31G. ^a Tyr153 のみ脱プロトン化. ^b Lys157 のみプロトン化

参考文献

1. Shota, N., Masayuki, O., Sachiyo, K., Shigeru, U., Susumu, U., Takuya, Y., Yuji, K., & Tadayasu, O. (2006) *J. Biol. Chem.* **281**, 31876-31884
2. Shigeru, U., Masayuki, O., Shigeyuki, I., & Masatake, O. (2004) *Eur. J. Biochem.* **271**, 1774-1780
3. Shigeru, U., Masayuki, O., Shigeyuki, I., & Masatake, O. (2004) *J. Biol. Macromol.* **4**(1) 23-28
4. Yi-Hsun, C., Lea-Yea, C., & Chi-Ching, H. (2007) *J. Biol. Chem.* **282**, 34306-34314