

Ps3 α -HSD に対する補酵素 NAD(H)結合の pH 依存性に関する理論的研究

(材料設計) 野口 志保

1. 緒言

3 α -Hydroxysteroid dehydrogenase(3 α -HSD)は、steroid 核の C-3 位置の hydroxy group と oxo group の可逆的な相互変換を触媒する酵素である。ここで 3 α -HSD によって触媒される酸化還元反応では、触媒三残基である Tyr や Lys が H 移動に特に強く関与するとされている。又、3 α -HSD は触媒作用に伴い補酵素選択性を示す。特に *Pseudomonas* 由来の 3 α -HSD (Ps3 α -HSD) は、NAD(H)、NADP(H)、thio-NAD の 3 者と結合が可能であり、その内 NAD と最も親和性が高いことなどが実験から明らかとなっている。

実験及び計算化学を用いた先行研究によって、Ps3 α -HSD は NAD(H)の結合安定性が pH に依存して異なることが明示されている。しかし、先行研究では触媒サイト及び NAD(H)結合サイト付近に限定された狭い領域のみを対象とした DFT 法を用いて計算されており、その周囲のタンパク質全体の影響が考慮されていない。このことから、本研究では今まで考慮されなかった領域を点電荷で近似する QM/MM 計算を用いることで周囲のタンパク質の影響を確認した。さらに、プロトン化、脱プロトン化に伴うタンパク質の全体的な構造変化が考慮されていないため、MD 計算を用いて Tyr や Lys の脱プロトン化、プロトン化による酵素の構造変化を検証した。

2. 計算方法及び model

全ての計算で NADH 複合体の幾何学構造は結晶構造 (PDB ID: 2dkn) を基にした。また、補酵素と結合していない Ps3 α -HSD の構造は 2kdn から補酵素を削除したものをを用いた。

QM/MM 計算の model (Fig.1)に関しては、QM 領域を、Ps3 α -HSD の中で補酵素結合や基質結合に関与すると考えられ、かつ触媒三残基を含む peptide152-158 とし、MM 領域は 152-158

以外のアミノ酸残基に対して点電荷で近似 (a) を行うこととした。QM 領域に対して水素原子の最適化を B3LYP/6-31G で行い、結合エネルギーなどの計算においては最適化構造に対して B3LYP/6-31G(d,p)を用いて一点計算を行った。計算に際しては Gaussian03

program package を用いた。

MD 計算においては、fig1(b)に示すモデルを用い、NVT ensemble、310K、40 Å droplet (tip3p model)、force field AMBER99、time step 2 fs、total time 200 ps の条件で行った。計算には myPrest 4.0 を用いた。

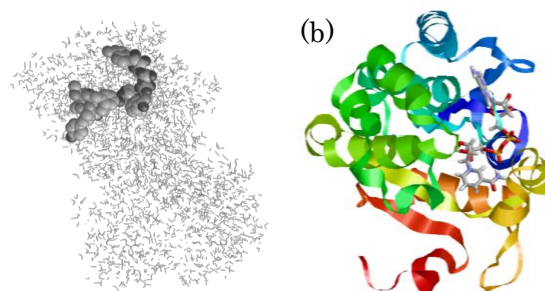


Fig.1 計算で用いた NAD(H)複合体モデル。
(a) QM/MM model。CPK、wireframe で表示された部分がそれぞれ QM、MM 領域を示す。
(b) MD model。(b) ribbon、tube で表示された部分はそれぞれタンパク質、NAD(H)を示す。

4. 結果と考察

peptide152-158 model と NAD⁺との結合安定性の pH 依存性について調べた。pH の違いは Lys や Tyr のプロトン化、脱プロトン化によって表現する。Lys157 と NAD⁺との水素結合配向性の異なる初期構造 (H1,H2,H3) で DFT を用いた最適化を行ったところ、異なる初期構造でも同じ最適化構造に収束し、結合安定化エネルギーについてもほぼ同様の値を示した (Table 1)。Tyr153 が脱プロトン化された model は、中性の model と比較して安定化することが確認された。これは、pH が高い条件下で安定化が大きくなるという先行研究の結果と一致する。また、初期構造を変えても同じ構造へと収束したことから、水素結合が強く働いていることが示唆される。このとき、pH が低い model では 6 本の水素結合、高い model では 5 本の水素結合を形成する構造に収束ことが確認された。QM/MM 法によって周囲の影響を考慮した計算を行い、現在結果を解析中である。

次に Lys や Tyr のプロトン化、脱プロトン化に伴う酵素全体の構造変化について調べた。MD 計算を行うためには力場 DB が不可欠であるが、アミノ酸の Amber 力場 DB には脱プロトン化した Tyr が含まれていないため、不足している Tyr⁻に関する情報を力場 DB に組み込み、新たな力場 DB の作成を行った。力場 DB を修正する際に使用した Tyr⁻の model として、小さいフラグメントである T-1 と比較的大きなフラグメントである T-2 model を比較検討した。初めに作成した単純な Tyr⁻ model である T-1 では末端の N や CO に大きな電荷が局在していたため、ペプチド結合を考慮し、末端の電荷の偏りの比較的小さい T-2 の電荷情報を採用した (Fig. 2)。作成した力場 DB を用いてトポロジーファイル等を作成し、これらを基に Tyr153 の脱プロトン化した複合体について MD 計算を実行した。HSD

Table 1 DFT に基づく HSD-NAD⁺安定化エネルギー/kcal/mol⁻¹

model	H1	H2	H3
neutral K157	-20.27	-18.04	-20.63
neutral Y153			
neutral K157	-46.93	-47.13	-46.93
deprotonated Y153			



Fig. 2 力場モデル作成に使用した T-2 model

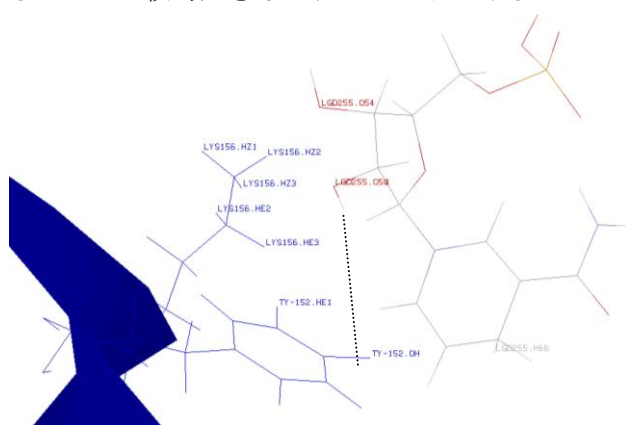


Fig. 4 Tyr153⁻を用いた MD 計算に基づく HSD-NAD⁺間の水素結合

−NAD⁺間に形成された水素結合を比較したところ、今回の Tyr153⁻を用いた model では、新たに OH⁻⋯H66 に結合が見られた (Fig. 3)。このことから、Tyr153 の脱プロトン化によって Tyr153⁻の O⁻と NAD のニコチンアミド環の H が水素結合を形成し、酵素-補酵素結合がより安定した構造を取ると考えられる。酵素全体の構造変化について解析中である。