

QM/MM法を用いた3 α -Hydroxysteroid dehydrogenase に対する補酵素NAD⁺結合のpH依存性に関する理論的研究

(材料設計) 田中 佳樹

1. 緒言

3 α -hydroxysteroid dehydrogenase (3 α -HSD) は、ステロイド核のC3位のヒドロキシ基とオキソ基の可逆変換を触媒する酵素であり、多くの哺乳類、微生物の中に存在する。その酸化還元反応において、触媒残基であるTyrやLysが水素移動に強く関与するとされている。3 α -HSDは補酵素選択性を示す。特に胆汁酸濃度の診断薬として実用化されている *Pseudomonas* sp.B-0831 株由来の3 α -HSD (Ps.3 α -HSD) は、補酵素としてNAD(H)、NADP(H)、thio-NADの3者を利用することができるのだが、そのうちNAD(H)と最も親和性が高い[1]。

実験及び計算を用いた先行研究によって、Ps.3 α -HSD はpHが高い状態ではNAD⁺との複合体がより安定で、pHが低い状態ではNADHがより安定であることが分かっている[1][2]。しかし、先行研究では触媒残基、NAD(H)との結合部位周辺に対する量子化学 (QM) 計算は行われてきたが、その周囲のタンパク質全体の影響は考慮されていない。そこで本研究では、今まで考慮されていなかった領域を点電荷で近似しMM領域とし、NAD⁺および結合部位周辺のペプチド鎖をQM領域とするQM/MM計算を行うことで、その影響を確認した。

また、分子動力学 (MD) 計算によって触媒残基 (Tyr、Lys、Ser) の脱プロトン化、プロトン化による酵素の構造変化の検証を行ってきた。先行研究において、MD計算に用いられるAmber力場には含まれていないアミノ酸残基についてのパラメーターが作成されたが、電荷の偏りが大きいなどの課題が残されていた。そこで本研究ではmultiple conformation fittingとRESP近似を用いたパラメーター化[3]を行い、MD計算を行うことを目標とした。

2. 計算方法及びモデル

全ての計算でPs.3 α -HSDとNADHの複合体の幾何構造は、X線結晶構造 (PDB ID:2dkn) からholo体のみを切り出したものに基づいている。補酵素と結合していないPs.3 α -HSDの構造としては、2dknのholo体から補酵素を削除したものをを用いた。QM/MM計算のモデルにおいて、Ps.3 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る触媒残基Tyr153及びLys157を含むpeptide152-158 (Figure 1 CPK) をQM領域とし、それ以外のアミノ酸残基 (Figure 1 wireframe) は点電荷で近似してMM領域とした。QM領域の末端は、水素原子でcapした。

TyrとLysはイオン性の性質を持っており、pHの高低によって、Tyrは脱プロトン化型 (Tyr153⁻) または中性型 (neutral) をとり、Lysは中性型 (neutral) またはプロトン化型 (Lys157⁺) をとる。そのためpHの変化を表現するために、QM領域の中のLys157

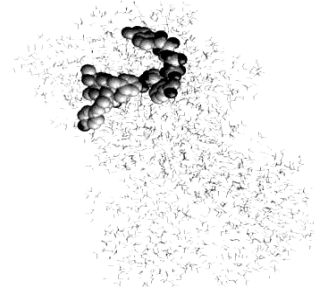


Figure 1 QM/MM モデル

と Tyr153 のプロトン化、脱プロトン化（イオン化状態）の違いによって、相対的な pH の高さを表し、それぞれ、pH 高、pH 中、pH 低の 3 つのモデルを用いた（Table 1）。

Table 1 pH 変化を表現するために計算で用いたモデル

pH	Lys157 と Tyr153 のイオン化状態	
高	Lys157(neutral)	Tyr153-
中	Lys157+	Tyr153-
低	Lys157+	Tyr153(neutral)

QM 領域に対して、水素原子の位置の最適化を B3LYP/6-31G で行い、その最適化構造の全電子エネルギーを B3LYP/6-31G(d,p) レベルの一点計算で求めた。計算には Gaussian98 及び Gaussian03 program package を用いた。結合安定化エネルギーは、複合体のエネルギーから、結合していない Ps.3 α -HSD と NAD のエネルギーの合計を引くことで評価した。

脱プロトン化した Tyr (Tyr⁻) を含む複合体の MD 計算のためのパラメーター作成は、ペプチド結合を考慮した Figure 2 のモデルを用いて行う。Amber99 力場の作成方法[3]にならい、複数の conformation を発生させ、それぞれについて MM 計算により安定化構造を求める。この安定化構造に対して、HF/6-31G(d)計算を行い、Electrostatic potential (ESP)を計算する。さらに Restrained ESP(RESP)を求め、構造パラメーターとともに力場とする。

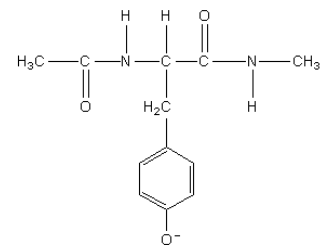


Figure 2 Tyr⁻のモデル

3. 結果と考察

結合安定化エネルギーは、pH 高(Lys157/Tyr153⁻)の複合体の QM 領域のみにおいて-68.13 kcal/mol と非常に大きい。現在、MM 領域の影響を含めた QM/MM 計算結果を解析し、周りのタンパク質の影響について調べている。また、pH 中(Lys157⁺/Tyr153⁻)と pH 低(Lys157⁺/Tyr153)の状態での HSD-NAD 複合体については、QM 領域の水素原子の幾何学構造の最適化中である。

また、アミノ酸残基のパラメーター生成を行い、MD 計算の準備をしている。

【参考文献】

- [1] 野口志保, 「3 α -Hydroxysteroid dehydrogenase 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」 京都府立大学卒業論文, 2012
- [2] 鴻上亜希, 「DFT 計算を用いた *Pseudomonas* sp.B-0831 由来 3 α -Hydroxysteroid dehydrogenase の補酵素 NAD⁺/NADH の結合性に対する pH 依存性に関する研究」 京都府立大学修士論文, 2011
- [3] Cieplak P., Cornell W.D., Bayly C., Kollman P.A., "Application of the Multimolecule and Multiconformational RESP Methodology to Biopolymers: Charge Derivation for DNA, RNA, and Proteins", *J. Comput. Chem.*, vol.16, No.11, 1257-1377, 1995