密度汎関数法による馬心筋一酸化炭素ミオグロビン 活性中心モデル計算 - 遠位ヒスチジンが電子状態に及ぼす影響 -

千葉 貢治^a, 平野 敏行^b, 佐藤 文俊^{b*}, 岡本 正宏^a

^a 九州大学大学院システム生命科学府, 〒 812-8581 福岡市東区箱崎 6-10-1

^b 東京大学生産技術研究所, 〒 153-8505 目黒区駒場 4-6-1

*e-mail: satofumi@iis.u-tokyo.ac.jp

(Received: July 1, 2008; Accepted for publication: August 18, 2008; Advance publication: September 24, 2008)

馬心筋一酸化炭素ミオグロビン (MbCO) における, 遠位ヒスチジン (HIS) イミダゾール基の水素の位置の違いによるヘムと配位子への電子構造の影響を調べるため, いくつかの活性中心モデルを用いて密度汎関数計算を実行した. 遠位 HIS イミダゾール基の水素が一酸化炭素 (CO) 配位子側に向く ϵ 位に水素が付いたモデルでは, δ 位に水素が付いたモデルに比べてヘム鉄-CO 結合部位近傍の静電ポテンシャルが正に高く, 準位が高いヘム鉄由来の被占コーン・シャム軌道準位が安定化した. 水素の位置の違いは結合した CO にも影響を与えており, 炭素のマリケン電荷の変化量は 0.016 に及んだ. MbCO においても, 遠位 HIS とヘムおよび配位子との相互作用は大きく, 配位子結合状態の記述には遠位 HIS を量子化学的にあらわに考慮する必要があることが示された.

キーワード: 一酸化炭素ミオグロビン, 密度汎関数法, 遠位ヒスチジン, 水素化部位

1 はじめに

ミオグロビン (Mb) は, 脊椎動物の筋肉中で酸素の貯蔵・輸送に携わるタンパク質である. 世界で初めて結晶構造解析が行われたタンパク質であり, 構造・機能はじめ様々な面で詳細な研究がおこなわれている. MbCO は Mb の配位子吸着状態の研究に盛んに用いられているが, その詳細な電子状態の解析はこれからの課題である.

MbCO の電子構造における興味の一つに遠位 HIS の関与がある. 本来の基質である酸素分子が結合する場合, 遠位 HIS のイミダゾール基の ϵ 位に水素が存在し, これが酸素分子と水素結合することによって, 配位安定性に関与することが知られている. 一方, MbCO では唯一行われたマッコウクジラ MbCO の中性子解析で, CO 配位子とは反対側の δ 位に水素が付いていることが明らかにされた [1]. マッコウクジラ MbCO で

は CO のヘムへの配向がばらついているうえ [2, 3], CO 伸縮振動に由来する赤外吸収スペクトルのピークが複数に分裂することから [3], CO の配向はヘムポケット内で比較的自由であり, CO の吸着状態 (コンフォーマ) が複数あると考えられている. しかし, 馬心筋 MbCO の赤外吸収スペクトルはマッコウクジラ MbCO のそれと異なり, 一つのピークが大勢を占めることが報告されている [4].

これまで, pH 依存性 [5] やミューテーション [5–7], あるいは理論計算 [3, 8–13] などにより各状態のアサインが試みられている. ϵ 位が水素化されていることを示唆する報告がある一方, 実際の水素位置を特定できる中性子解析の結果は文献 1 のみであり, コンフォーマの構造に関しては未だ統一した見解には至っていない.

量子計算によるアプローチでは, 多くの場合プロトヘムの置換基を水素に置き換えポルフィンとして取り扱われている [3, 8]. 計算技術ならびにハードウェアの

進化もあり，Rovira は QM/MM によりタンパク質部分の効果を古典的に取り入れた計算 [11] を行ったが，遠位 HIS は MM で取り扱われている．遠位 HIS の存在をあらわに取り扱った量子化学計算として Sigfridsson らの報告 [12] が挙げられるが，遠位 HIS を模したイミダゾールの構造はタンパク質の立体構造を考慮せず最適化されており，その位置は結晶構造解析の構造から大きくずれている．また Rovira らは，遠位 HIS とヘム CO 部位の相互作用を見積もるため遠位 HIS を取り入れた量子計算 [13] も行っているが，その計算モデルは近位 HIS の取り扱いが不明なうえ，計算サイズが小さい．

筆者らは，CO 伸縮振動実験において一つのコンフォーマが大勢を占める馬心筋 MbCO において，タンパク質の立体構造を反映した遠位 HIS がヘム鉄-CO 結合状態に与える影響を調べる目的で，遠位 HIS を取り込んだ比較的大きな活性中心モデルを構築し，密度汎関数法による電子状態計算をおこなった．特に遠位 HIS の水素の位置の違いによる電子状態変化に着目した．

2 計算方法

計算に用いた分子構造モデルは，馬心筋 MbCO の Protein Data Bank のエントリ 1DWR[14] を初期構造とし，以下の手順で構築した．欠損 C 末端残基 (GLY153) を付加後，AMBER8[15] の Leap 機能で水素を付加した．ただし，遠位 HIS はマッコウクジラ MbCO 中性子線構造解析の報告 [1] から δ 位に水素を付加した．Generalized Born モデル [16] により溶媒効果を考慮したうえで主鎖に拘束 (力定数：10,000 kcal/molÅ²) を

かけ，AMBER8 により構造緩和を行ったのち，解離残基に対してカウンターイオン (Na⁺, Cl⁻) を配置し電荷中性とした．配置したカウンターイオンは，密度汎関数計算では点電荷として取り扱った．得られた構造から，最終的に 63-65 (遠位 HIS (HIS64) 側)，88-101 (近位 HIS (HIS93) 側) 番目のアミノ酸残基ならびにプロトヘム，CO からなる領域を計算対象とし，HID モデルとした (Figure 1)． ϵ 位が水素化している HIE モデルは，水素化位置の違いに着目する観点から， δ 位の水素を ϵ 位に付け替えた以外は HID モデルの原子座標を踏襲した．

Table 1. Basis and auxiliary function sets for computation

Atom	CGTO ^a set for molecular orbital	Auxiliary function set for the electron density & XC potential ^b
Fe	(43311/42111/311) ^c	13s4p4d
S	(6321/521/1)	9s4p4d
C, O (ligand)	(621/41/1)	7s3p3d ^d
N, C, O	(621/41)	7s2p
H	(41)	4s1p

^a CGTO stands for Contracted Gaussian-type orbital.

^b The 7s2p and 4s1p sets were prepared by removing d-functions [20–22].

^c Modified CGTO set was used. The three outer diffuse s-functions were replaced by two tighter functions with the exponents 0.25 and 0.10 from the original CGTO set (43321/4211/311) [22].

^d A1 fitting sets were employed.

Table 2. Mulliken charges around ligand and iron atom in the heme.

Model name	CO	FePor-Imd-CO	92-94	88-101	HID	HIE
Distal side	-	CO	CO	CO	CO, 63-65	CO, 63-65
Proximal side	-	Imidazole	92-94	88-101	88-101	88-101
O	-0.008	-0.085	-0.088	-0.090	-0.095	-0.105
C	0.008	0.379	0.376	0.379	0.419	0.363
Fe	-	0.246	0.250	0.247	0.247	0.247
Porphyrin (except Fe)	-	-	-2.647	-2.530	-2.564	-2.496
Imidazole of proximal HIS	-	-0.041	0.100	0.087	0.080	0.085
Imidazole of distal HIS	-	-	-	-	-0.050	-0.047

Figure 1. Computational structure of HID model. In the case of HIE model, the hydrogen of imidazole ring in distal HIS was replaced at position as shown in the circle in this figure. Yellow, gray, blue, red, white, and green atoms are iron, carbon, nitrogen, oxygen, hydrogen, and counter ions, respectively.

Figure 2. Eigenvalue plots of HID, 88-101, HIE models. Longer lines indicate the highest occupied states.

Figure 3. 3-dimensional pictures of the three highest occupied Kohn-Sham orbitals of HIE model. (a) The highest occupied orbital, (b) next highest one, (c) and the next. The isosurface value is ± 0.02 .

Figure 4. Electrostatic potential difference ($ESP^{\text{HIE}} - ESP^{\text{HID}}$) map around the reaction center (color map: red 0.05, green 0.0, linear gradation). The map was shown on the plane perpendicular to the heme plane including Fe and two N atoms of the porphyrin ring. CO was slightly out of the plane. Distal HIS was placed behind the plane around the red colored area.

電子状態計算には RI 法によるガウス型基底密度汎関数計算プログラム ProteinDF/QCLO system[17] [18, 19]ver.1.2 を用いた．基底関数は全般にスプリットバレンス基底を採用し，Fe および配位子である CO にはスプリットバレンス + 分極関数規模の基底を用いた．詳細を Table 1 に示す [20–22]．計算方法は RKS 法，交換相関汎関数には svwn[23] を採用した．Fe の電子配置は $3d^6$ 低スピン状態を指定した．

3 結果と考察

3.1 マリケン電荷の変遷

Table 2 にヘム鉄，配位子 CO のマリケン電荷の値ならびにヘム部位（ヘム鉄を除く），近位，遠位両 HIS のイミダゾール環のマリケン電荷の合計値を示す．比較のため，CO のみ，近位 HIS 側の残基数が少ない（あるいはイミダゾール環のみ）計算モデルにおける値も併せて載せた．モデル名は，CO は CO のみ，FePor-Imd-CO は鉄ポルフィンにイミダゾール環と CO が配位したモデル，92-94，88-101 はそれぞれ近位 HIS を含む 92-94 番目の残基群（近位 HIS は 93 番目），88-101 番目の残基群がヘム鉄に配位するモデルに対応する．HID，HIE は 88-101 モデルに 63-65 番目のアミノ酸残基群（遠位 HIS は 64 番目）を追加したモデルで，HID はイミダゾール環の δ 位，HIE は ϵ 位に水素が付加されており，Figure 1 に示した立体構造を持つ．行 O，C，Fe の値がそれらの原子のマリケン電荷，他の 3 行は各構成原子のマリケン電荷の合計値である．

CO に着目すると，配位前の電荷はほぼ 0 であるが，ヘム鉄に結合することによりカルボニル C は正に，O は負に分極する．本モデルにおいては，近位 HIS 部位のサイズ変化がヘム鉄，CO に与える影響は比較的単調なうえ，88-101 モデルで変化の割合もほぼ収束している．これらの結果より，遠位 HIS の影響を調べるには，近位 HIS 側に 88-101 モデルを採用することが妥当であると判断した．

遠位 HIS の導入による変化は，モデルにより異なる．HID モデルの場合は，88-101 モデルからカルボニル C の電荷が 0.04 正に増加し，O は 0.005 とわずかに負に値が増加した．一方 HIE モデルでは C，O とともにそれぞれ 0.016，0.01 負に値が増加した．また，ヘム鉄を除いたポルフィリンと近位 HIS のイミダゾール環の電荷は正に増加している．興味深いことに，ヘム鉄の電荷に変化はない．増加分の電子はポルフィリンと

近位 HIS のイミダゾール環から供給されていることが明らかとなった．また，遠位 HIS のイミダゾール環全体のマリケン電荷の変化は 0.003 とわずかであり，上述の変化は水素位置の違いが大きく影響していることがうかがえる．

3.2 軌道準位と静電ポテンシャルの比較

Figure 2 に HID，HIE 両モデルならびに遠位 HIS 側残基群（63-65 残基）を含まない計算モデル（88-101 モデル）のフェルミ準位近傍の軌道準位を示す．縦軸に固有値をとり，HID，88 - 101，HIE 各モデルの軌道準位を左から並べた．固有値が $-3.5 \sim -4$ eV にある長い横線は最高被占準位を表す．88-101 モデルを基準として，最高被占以下，数本の被占軌道に着目すると，HID モデルでは準位が上昇，HIE モデルでは低下した．これらの軌道に対し遠位 HIS は HID の場合は不安定化，HIE の場合は安定化に寄与したことを示している．最高被占軌道はヘム鉄の $3d_{xy}$ 軌道が主成分である（Figure 3 (a)）．また，次の 2 つの被占軌道ではヘム鉄 $3d_{yz, zx} \pi^*(CO)$ で表わされる逆供与が観測され（Figure 3 (b), (c)），ヘム鉄-CO 結合部位由来の被占軌道が HIE モデルではともに安定化されることがわかった．

これら安定化の要因として，水素の位置の違いによるヘム鉄-CO 結合部位周辺の静電ポテンシャルの変化が挙げられる．Figure 4 に HID，HIE 両モデル間の静電ポテンシャル差（ $ESP^{HIE} - ESP^{HID}$ ）の断面マップを示す．断面はヘム鉄とポルフィリン環の 2 つの N を含み，ポルフィリン環にほぼ直交する．CO はわずかに面から図の手前にはみ出してあり，遠位 HIS は静電ポテンシャル差が正である赤い領域の後ろに位置する．

正に分極した水素の存在により，遠位 HIS 近傍の静電ポテンシャルが，HID モデルに比べて HIE モデルの方が正に偏っていることが分かる．両計算モデルとも，先に述べた準位の高い被占軌道は主としてヘム鉄と CO に由来することから，近傍の静電ポテンシャルの差が軌道準位に影響を与えていることが強く示唆された．

共鳴ラマンの実験による Unno らの報告では，馬心筋 MbCO では遠位 HIS の ϵ 位に水素が存在する可能性が示唆されている [7]．この報告では， ϵ 位に水素が存在し，かつ CO の O と ϵ 位の水素の間に水素結合があると仮定すると，その水素結合が C-O 間の結合を弱め，ヘム鉄-C 間の結合を強めるため，測定されたヘム

鉄-C 伸縮振動のブルーシフトおよび C-O 伸縮振動のレッドシフトが説明できると指摘している。Figure 3 (b) (c) で示した 2 つの軌道は、ヘム鉄から $\pi^*(\text{CO})$ への逆供与である。本計算結果から、水素結合の有無によらず ϵ 位の水素の存在自体で軌道準位が下がり、ヘム鉄-カルボニル配位子の結合の強弱に対して同様の効果があることが示された。

88-101 モデルと 63-65 残基群の全エネルギーを HID, HIE 各モデルの全エネルギーから引き去ることで、63-65 残基群の取り込みによるエネルギー利得を計算したところ、HID モデルで -10.2 kcal/mol, HIE モデルで -10.7 kcal/mol であった。両者の差は 0.5 kcal/mol とわずかではあるものの、HIE モデルの方が系を安定化したことが全エネルギーからも示された。

4 まとめ

馬心筋 MbCO の活性中心モデルに対する電子状態計算を実行した。遠位 HIS をあらわに取り扱い、その水素の位置の違いによる電子状態変化について考察した。遠位 HIS のイミダゾール基の水素の位置の違いは、ヘム鉄-CO 結合部位近傍の静電ポテンシャルを大きく変え、軌道準位や配位子の電荷に影響を与えることがわかった。Mb における配位子の結合状態を記述するためには、遠位 HIS を量的に取り扱う必要が示された。

本研究による計算結果では、馬心筋 MbCO では遠位 HIS のイミダゾール基は ϵ 位に水素がつく方がエネルギー的に安定である。このことから、 δ 位に水素がつくマッコウクジラ MbCO とは異なる構造を持つ可能性が示唆された。さらに大胆に推論を進めると、 δ 位に水素がある場合は相対的にヘムポケットが広くなるため CO の配向は自由になりコンフォーマの数が増え、 ϵ 位に水素があるとポケットが狭くなると同時に静電的な効果で CO の配向が安定し、1 つのコンフォーマが支配的になるというストーリーが浮かんでくる。

今後、本研究で得られた知見をもとに、振動解析計算を基にした理論研究が進展し、複数の振動ピークの由来となるコンフォーマの同定につながることを期待される。

参考文献

- [1] X. Cheng and B.P. Schoenborn, *Acta Cryst.*, **B46**, 195-208 (1990).
- [2] J.T. Sage and W. Jee, *J. Mol. Biol.*, **274**, 21 (1997).
- [3] P. M. Kozlowski, K. M. Vogel, M. Z. Zgierski and T. G. Spiro, *J. Porphyrins Phthalocyanines*, **5**, 312 (2001).
- [4] K. Chu, E. H. Frauenfelder, J. R. Mourant, G. U. Nienhaus, and R. Philipp, *Phys. Rev. Lett.*, **74**, 2607 (1995).
- [5] J. T Sage, D. Morikis and P. M. Champion, *Biochemistry*, **30**, 1227 (1991).
- [6] D. Morikis, P. M. Champion, B. A. Springer and S. G. Sligar, *Biochemistry*, **28**, 4791 (1989).
- [7] M. Unno, J. F. Christian, S. Olson, J. Timothy Sage and P. M. Champion, *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 2670 (1998).
- [8] P. Jewsbury and T. Kitagawa, *Biophys. J.*, **67**, 2236 (1994).
- [9] B. G. Schulze and J. D. Evanseck, *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 6444 (1999).
- [10] S. D. Dalosto, J. M. Vanderkooi and K. A. Sharp, *J. Phys. Chem. B*, **108**, 6450 (2004).
- [11] C. Rovira, *J. Phys.: Condens. Matter*, **15**, S1809 (2003).
- [12] E. Sigfridsson and U. Ryde, *J. Biol. Inorg. Chem.*, **4**, 99 (1999).
- [13] C. Rovira, B. Schulze, M. Eichinger, J. D. Evanseck, and M. Parrinello, *Biophys. J.*, **81**, 435 (2001).
- [14] K. Chu, J. Vojtechovsky, B. H. McMahon, R. M. Sweet, J. Berendzen and I. Schlichting, *Nature*, **403**, 921 (2000).
- [15] D. A. Case, T. A. Darden, T. E. Cheatham III, C. L. Simmerling, J. Wang, R. E. Duke, R. Luo, K. M. Merz, B. Wang, D. A. Pearlman, M. Crowley, S. Brozell, V. Tsui, H. Gohlke, J. Mongan, V. Hornak,

- G. Cui, P. Beroza, C. Schafmeister, J. W. Caldwell, W. S. Ross and P. A. Kollman, *AMBER 8*, University of California, San Francisco (2004).
- [16] G. D. Hawkins, C. J. Cramer and D. G. Truhlar, *Chem. Phys. Lett.*, **246**, 122 (1995).
- [17] W. Kohn and L. J. Sham, *Phys. Rev. A*, **140**, 1133 (1965).
- [18] F. Sato, T. Yoshihiro, M. Era and H. Kashiwagi, *Chem. Phys. Lett.*, **341**, 645 (2001).
- [19] The software can be downloaded from the following URL:
<http://www.ciss.iis.u-tokyo.ac.jp/rss21/result/download/index.php>
- [20] N. Godbout, D. R. Salahub, J. Andzelm and E. Wimmer, *Can. J. Chem.*, **70**, 560 (1992).
- [21] J. Andzelm, E. Radzio and D. R. Salahub, *J. Comp. Chem.*, **6**, 520 (1985).
- [22] M. Castro, D. R. Salahub and R. Fournier, *J. Chem. Phys.*, **100**, 8233 (1994).
- [23] S. Vosko, L. Wilk and M. Nusair, *Can. J. Phys.*, **58**, 1200 (1980).

A Density Functional Study on Reaction Center Models of Horse Heart Carbonmonoxy Myoglobin – Effect of Distal Histidine to the Electronic States –

Kouji CHIBA^a, Toshiyuki HIRANO^b, Fumitoshi SATO^{b*} and Masahiro OKAMOTO^a

^aGraduate School of Systems Life Science, Kyushu University
6-10-1 Hakozaki, Fukuoka, 812-8581, Japan

^bInstitute of Industrial Science, the University of Tokyo
4-6-1 Komaba, Meguro, Tokyo, 153-8505, Japan

*e-mail: satofumi@iis.u-tokyo.ac.jp

Density functional calculations were carried out on some reaction center models of horse heart carbonmonoxy myoglobin (MbCO) to investigate, from a quantum chemical perspective, the relationship between the heme-ligand moiety and the imidazole hydrogen in the distal histidine. Compared to the δ positioned model, the ϵ positioned one, in which the hydrogen is close to the carbonyl (CO) ligand, produced positive electrostatic potential around the heme Fe-CO moiety, and stabilized the energy levels of the highest occupied states originated in heme Fe. The difference in the hydrogen position also influenced the CO, and the amount of the difference in Mulliken charge on the CO carbon was 0.016. The interaction between the distal histidine and heme-ligand in MbCO was remarkable, and it was suggested that quantum chemical study to take distal histidine into consideration is indispensable in the representation of the electronic structure of the MbCO reaction center.

Keywords: Carbonmonoxy myoglobin, Density functional calculations, Distal HIS, Hydrogenation sites