

平成30年6月30日現在

機関番号：94309

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K05408

研究課題名(和文) 光受容体ロドプシンとDNA・RNA螺旋構造における弱い相互作用の理論研究

研究課題名(英文) Theoretical study of weak interactions in photoreceptor rhodopsin and DNA/RNA helical structures

研究代表者

宮原 友夫 (Miyahara, Tomoo)

特定非営利活動法人量子化学研究協会・研究所・部門長

研究者番号：70397595

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：DNAとRNAの二重螺旋構造の円二色性(CD)スペクトルの295nmの符号は、右巻と左巻だけでなくDNAとRNAでも異なっている。SAC-CI CDスペクトルはDNAとRNAの実験スペクトルを再現し、核酸塩基対間のスタッキング相互作用の強さが295nmに現れる負のピークの起源であることを解明した。

光駆動イオン輸送型ロドプシンにはH⁺を輸送するバクテリオロドプシン、Cl⁻を輸送するハロロドプシン、Na⁺を輸送するロドプシンがあり、異なる波長の光を吸収して、異なるイオンを輸送する。SAC-CI研究により、各中間体のレチナール周辺の構造を明らかにし、各ロドプシンのイオン輸送機構を解明した。

研究成果の概要(英文)：The signs at around 295 nm of the CD spectra of the DNA and RNA double-helical structures are much different between the right- and left-handed structures as well as between DNA and RNA. The SAC-CI CD spectra reproduced the features at around 295 nm of the experimental CD spectra of each DNA and RNA, and elucidated that the strong stacking interaction between the two base pairs is the origin of the negative peaks at 295 nm of the CD spectra for both DNA and RNA.

The microbial rhodopsin contains a proton pumping bacteriorhodopsin (BR), a chloride pumping halorhodopsin (HR) and a sodium-ion pumping rhodopsin (KR2). The SAC-CI studies elucidated the geometries of amino acids and water around the retinal in each intermediate, and proposed the ion-pumping mechanisms of BR, HR and KR2.

研究分野：量子化学

キーワード：弱い相互作用 DNA・RNA 光生命科学 シミュレーション

1. 研究開始当初の背景

色素が生体内で機能を発揮するためには、色素と蛋白質との弱い相互作用が鍵となるが、弱い相互作用を定量的に議論できる理論はなかった。円二色性(CD)スペクトルは、対象となる分子の立体配座、分子の周辺環境など、分子間の弱い相互作用を反映して変化する。しかし、これを理論的に明らかにできる方法論は、SAC-CI 以外に存在していない。そこで、本研究では、高精度理論である SAC-CI 法を基礎とすることで、生命科学に重要な弱い相互作用を理論的に解明することを目的とする。

2. 研究の目的

(1) DNA/RNA 二重螺旋構造の CD スペクトル

DNA と RNA は両方とも右巻きと左巻きの安定な二重螺旋構造が存在する。DNA は右巻きと左巻きで正負逆の CD スペクトルが観測されるが、DNA と RNA でも正負逆の CD スペクトルが観測される。すなわち DNA の左巻きの CD スペクトルの特徴は、RNA の右巻きの CD と同じである。これまでの研究で DNA の右巻きと左巻きの CD スペクトルが異なる理由を明らかにしたが、DNA と RNA でこのような違いが起こる理由を明らかにする。

(2) 微生物型ロドプシンのイオン輸送機構

ロドプシンはレチナル色素とオプシン(蛋白質)からなり、レチナルはオプシンのリシン側鎖と結合している。レチナルは光異性化反応を起こし、微生物型では all-trans から 13-cis に、動物型では 11-cis から all-trans に異性化する。微生物型ロドプシンは細胞膜に存在し、プロトンを送るバクテリオロドプシン(BR)や塩化物イオンを送るハロロドプシン(HR)などがあり、さらに、ナトリウムイオンを送るロドプシン(KR2)が2013年に神取教授らのグループにより発見された。この3種類の光駆動イオン輸送ロドプシンのメカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

SAC-CI法は分子の励起状態・イオン化状態などのあらゆる電子状態を計算することのできる理論であり、現在最も成功している励起状態理論の一つである。このSAC-CI法はDNA二重螺旋構造やヒト視覚ロドプシンの研究に応用し、CDスペクトルに現れるDNA中の弱い相互作用や視覚ロドプシンの色の認識機構を解明した。本研究では、このSAC-CI法を用いて、RNA中の弱い相互作用と光駆動イオン輸送ロドプシン(BR, HR, KR2)の計算を行った。

(1) DNA/RNA 二重螺旋構造の CD スペクトル

DNAとRNAの二重螺旋構造の研究では、図1に示すようにX線結晶構造から取り出した4量体モデルを用いてSAC-CI計算を行った。

B-DNA(右巻き)、Z-DNA(左巻き)、A-RNA(右巻き)、Z-RNA(左巻き)の構造は、それぞれ9BNA、1DCG、3JXQ、1T4Xを使用した。4量体モデルは、DNAとRNA中で重要な水素結合とスタッキングの相互作用の両方を含んでいる。DNAとRNA中の核酸塩基対同士のスタッキング相互作用は、2種類に分けることができるので、各DNA/RNAで2種類ずつ計算した。

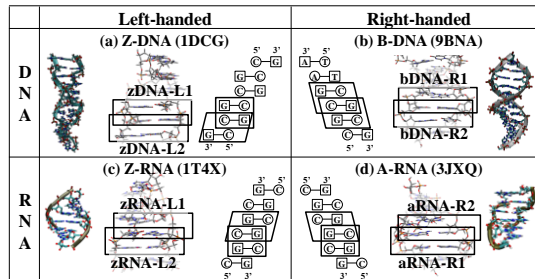


図1. DNAとRNAのX線結晶構造と4量体モデル

(2) 微生物型ロドプシンのイオン輸送機構

微生物型ロドプシンの研究では、X線結晶構造を初期構造として、QM(B3LYP)/MM(AMBER)法による構造最適化計算を行った。ただし、HRとKR2でX線結晶構造がない状態は、1個前の状態とBRのレチナルの構造から初期構造を作成しQM/MM構造最適化計算をした。得られた構造を用いて、図2に示すようにレチナル及びレチナル周辺の重要なアミノ酸と水をQM領域とし、残りをMM領域としてSAC-CI計算を行った。

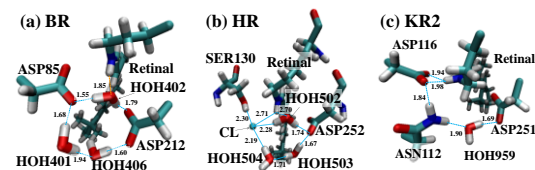


図2. BR, HR, KR2のQM構造

4. 研究成果

(1) DNA/RNA二重螺旋構造のCDスペクトル

図3で、DNAとRNAの4量体モデルのSAC-CI CDスペクトルを、実験CDスペクトルと比較している。

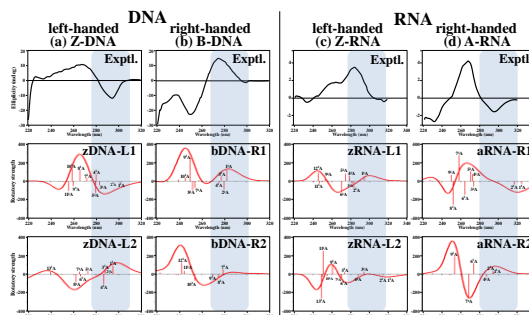


図3. DNAとRNAの実験とSAC-CI CDスペクトル

実験スペクトルの特徴は、Z-DNAとA-RNAで295nmに強い負の符号が現れ、B-DNAとZ-RNAでは正の符号になっていることである。実験ではこの特徴を利用して螺旋構造を同定している。zDNA-L1, bDNA-R1, zRNA-L1, aRNA-R1

モデルのSAC-CI CDスペクトルは、実験CDスペクトルの280-300nmの特徴を再現している。計算で求めた励起状態の数が足りないため、高エネルギー(低波長)領域では、必ずしも一致していないが、螺旋構造を同定している低エネルギー領域(295nm)の符号は一致した。

一方、zDNA-L2とaRNA-R2モデルのSAC-CI CDスペクトルは、zDNA-L1とaRNA-R1モデルのものとは反対の符号を示している。すなわち、実験で観測されたCDスペクトルは、zDNA-L1とaRNA-R1モデルの構造を反映していると考えられる。また、zDNA-L1とaRNA-R1モデルの最低励起状態は、グアニンからシトシンへのスタッキングを通じた電荷移動型(CT)の励起である。従って、295nmの負の符号が、核酸塩基対間のスタッキング相互作用の強さを表していると考えられる。

B-DNAとZ-RNAの295nmの符号は、bDNA-R1とzRNA-L1モデルで正となり実験と一致している。一方、zRNA-L2モデルは核酸塩基対間の重なりが大きく295nmの符号は負であるが、核酸塩基対は互いに並行ではなく傾いているためスタッキング相互作用が弱く、結果としてCDの強度も弱くなっている。

以上より、DNAとRNAの二重螺旋構造のCDスペクトルにおいて、295nmの強い負の符号は核酸塩基対間のスタッキング相互作用が強いためであることが明らかになった。DNAとRNAでCDスペクトルの特徴が逆になっているが、これはDNAでは左巻きのZ-DNA、RNAでは右巻きのA-RNAで核酸塩基対間のスタッキング相互作用が強いためである。

最後に、DNA二重螺旋構造中のスタッキング相互作用とCDスペクトルの295 nmのピークとの関係を調べるために、zDNA-L1モデルで、核酸塩基対間の距離を変化させたときのSAC-CI CDスペクトルの変化を計算した(図4)。

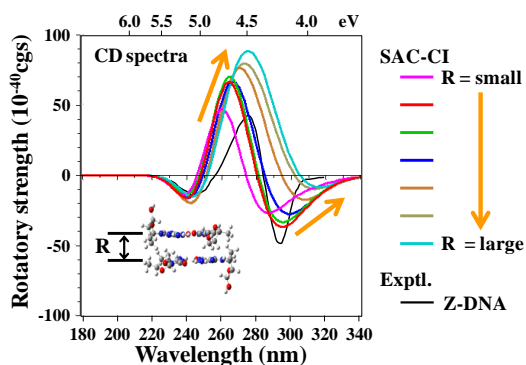


図4. zDNA-L1モデルのCDスペクトルにおける核酸塩基対間の距離依存性

核酸塩基対間の距離(R)の増加とともに、295nmに対応するCDスペクトルの強度が弱くなっていることがわかる。これはX線結晶構造のときの最低励起状態は、スタッキングを通じたグアニンからシトシンへの電荷移動型(CT)の励起状態であるが、核酸塩基対間の距離が長くなるにしたがって、このCT励起状態は高エネルギー領域にシフトし、最低励起

状態ではなくなるためである。すなわち、CDスペクトルの295nmの負のピークの強度が、DNAとRNAの二重螺旋構造のスタッキング相互作用の指標になっていると結論できた。

(2) 微生物型ロドプシンのイオン輸送機構

① バクテリオロドプシン(BR)

BRは、図5に示すように、レチナールがall-transから13-cisに光異性化した後、レチナールのシッフ塩基からASP85にプロトンが移動し、そのプロトンは細胞外へと運ばれる。シッフ塩基は細胞内からプロトンを受け取り、最後にレチナールが熱異性化してall-transに戻る。これらの過程でK, L, M, N, Oと呼ばれる中間体が存在し、吸収スペクトルが観測されている。

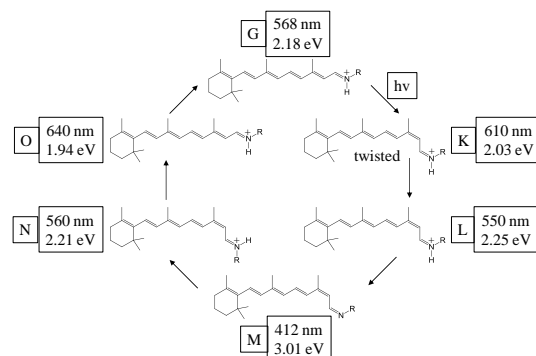


図5. BRの光サイクル

レチナールの近くに存在しているARG82は、水に囲まれているため簡単に回転することができる(図6)。そこで回転による励起エネルギー変化をSAC-CI法で計算したところ、基底状態(G)と中間体K, M, OはARG82の回転による影響をほとんど受けないが、中間体L, NはARG82の回転により励起エネルギーが大きく変化し吸収スペクトルに大きな影響を与えることが分かった(表1)。以上より中間体NではARG82が回転していることが示唆された。

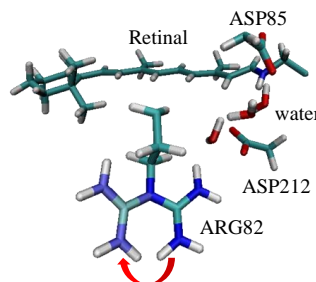


図6. BRのARG82の回転

表1. BRの励起エネルギー(eV).

State	SAC-CI		Exptl. ^a	Δ	
	X-ray	Rotation		X-ray	Rotation
G	2.11	2.15	2.18	-0.07	-0.03
K	1.78	1.78	2.03	-0.25	-0.25
L	2.05	2.27	2.25	-0.20	+0.02
M	3.14	3.18	3.02	+0.12	+0.16
N	1.79	2.01	2.21	-0.42	-0.20
O	1.69	1.70	1.94	-0.25	-0.24

^a J. Phys. Chem. B, 101,10746 (1999).

②ハロドロプシン(HR)

HRでは、BRのASP85がTHR126に置換しているため(図7)、光異性化してもシッフ塩基のプロトンは移動しない。代わりに、シッフ塩基の回転に伴い、塩化物イオンが移動する。

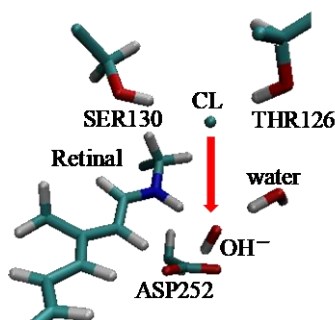


図7. HRのレチナル周辺の構造変化

HRの基底状態(G)と中間体L, Nの励起エネルギーはSAC-CI値と実験値とよく一致した(表2)。一方、中間体Oの励起エネルギーは実験値より0.4eV低く計算された(表2のO1)。そこで、レチナル周辺のARGの回転(O2)と水が水酸化物イオン(OH⁻)となっているモデル(O3)を検証したところ、基底状態(G)でシッフ塩基の近くにあった塩素イオンの代わりに、中間体Oではシッフ塩基と水素結合している水が水酸化物イオン(OH⁻)となっていることが示唆された(図7)。

表2. HRの励起エネルギー(eV).

State	SAC-CI	Exptl.	Δ
G	2.34	2.15 ^a	+0.19
		2.14 ^b	+0.20
L(K)	2.34	2.34(L) ^{a,*}	± 0.00
		2.13(K) ^{a,*}	+0.21
N	2.45	2.14 ^a	+0.31
		2.38 ^b	+0.05
		2.40 ^c	+0.07
O1	1.62		-0.45
			-0.42
O2(ARG)	1.71	2.07 ^{a,b}	-0.36
		2.04 ^c	-0.33
O3(OH)	2.19		+0.12
			+0.15

^a *Biochemistry*, 34, 14490 (1995), ^b *Biophysical J.* 108,2680 (2015), ^c *Biochemistry*, 52, 9257 (2013).

*L and K in parentheses represent the experimental values of the L and K states.

③ナトリウムイオン輸送ロドプシン(KR2)

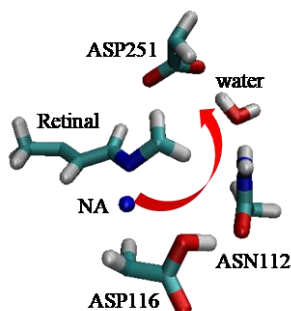


図8. KR2のNa⁺の移動経路

KR2では、光異性化反応によりプロトンがシッフ塩基からASP116に移動した後、ASP116は回転してASN112と水素結合する。このASP116の回転によりできた空洞をナトリウムイオンが通過する(図8)。

中間体KL, M, Oに加えて、ASP116が回転した状態(R)の計算をしたところ、ASP116が回転することにより、中間体OでNa⁺がシッフ塩基と結合できることが確かめられた。

中間体Oのレチナルがall-transか13-cisのどちらかを検証した。中間体Oでシッフ塩基と結合しているカチオンがNa⁺のみ(O0cis, O2cis, O1trans, O2trans)かH⁺のみ(O4cis, O4trans)の場合、SAC-CI励起エネルギーはcisの方が実験値に近い(表3)。一方、SAC-CI値はG, K, Mで高めに計算されているにもかかわらず、Na⁺とH⁺の両方がシッフ塩基と結合したモデル(O3cis, O3trans)では実験値よりも低い。従って、観測されている中間体Oのレチナルは13-cisであり、Na⁺かH⁺のどちらかがシッフ塩基と結合している状態であると考えられる。すなわち中間体OでNa⁺がシッフ塩基を通過すると同時にASP116からシッフ塩基にH⁺が移動し、最後にレチナルがall-transに異性化することが示唆された。

表3. KR2の励起エネルギー(eV).

State	SAC-CI	Exptl. ^a	Δ
G	2.49	2.36	+0.13
KL	2.29 (K)	2.05 (K)*	+0.24
		2.45 (L)*	-0.16
M	3.23	3.10	+0.13
R	3.36	---	---
O0cis (Na)	2.46		+0.27
O1cis	3.27		+1.08
O2cis (Na)	2.56		+0.37
O3cis (Na+H)	1.42		-0.77
O4cis (H)	2.39	2.19	+0.20
O1trans (Na)	2.95		+0.76
O2trans (Na)	2.74		+0.55
O3trans (Na+H)	1.94		-0.25
O4trans (H)	2.85		+0.66

^a *Nat. Commun.* 4, 1678 (2013).

*L and K in parentheses represent the experimental values of the L and K states.

微生物型ロドプシンのイオン輸送機構に関する研究成果は2018年9月末までに論文として出版する予定である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計4件)

- ① [Tomoo Miyahara, Hiroshi Nakatsuji](#), "Accuracy of Td-DFT in the Ultraviolet and Circular Dichroism Spectra of Deoxyguanosine and Uridine", *J. Phys. Chem. A*, 査読有, 122巻, 100-118 (2018).
DOI: 10.1021/acs.jpca.7b09733
- ② [Tomoo Miyahara, Hiroshi Nakatsuji](#), "Circular Dichroism Spectroscopy with the SAC-CI

methodology: A ChiraSac Study”, *Frontiers of Quantum Chemistry*, 査読無, 21-47 (2018).

DOI: 10.1007/978-981-10-5651-2_2

- ③ Tomoo Miyahara, Hiroshi Nakatsuji, Hiroshi Sugiyama, “Similarities and Differences between RNA and DNA Double-Helical Structures in Circular Dichroism Spectroscopy: A SAC-CI Study”, *J. Phys. Chem. A*, 査読有, 120, 9008-9018 (2016).
DOI: 10.1021/acs.jpca.6b08023
- ④ Tomoo Miyahara, Hiroshi Nakatsuji, “Indicator of the Stacking Interaction in the DNA Double-Helical Structure: ChiraSac Study”, *J. Phys. Chem. A*, 査読有, 119, 8269-8278 (2015).
DOI: 10.1021/acs.jpca.5b02848

[学会発表] (計 10 件)

- ① 宮原 友夫, 「NO₂⁻の光電子スペクトルと DNA 二重螺旋構造の円二色性スペクトル: SAC-CI 理論研究」、日本分光学会遠紫外分光部会 第 3 回講演会「遠/深紫外光と材料物性」、近畿大学 東大阪キャンパス(東大阪)、2018 年 1 月 26 日
- ② Tomoo Miyahara, “Photoelectron Spectrum of NO₂⁻ and Circular Dichroism Spectra of DNA Double-Helical Structures: SAC-CI study”, The 11th Japanese-Russian workshop, Awaji Yumebutai International Conference Center, Awaji Island, Japan, November 12-15, 2017.
- ③ 宮原 友夫, 中辻 博, 「SAC-CI 法による光受容膜蛋白質の理論的研究」、第 11 回分子科学討論会、東北大学 川内北キャンパス(仙台)、2017 年 9 月 15-18 日
- ④ 宮原 友夫, 中辻 博, 「光駆動イオン輸送ロドプシンのメカニズム: SAC-CI 理論による研究」、第 20 回理論化学討論会、京都大学時計台国際交流ホール(京都)、2017 年 5 月 16-18 日
- ⑤ Tomoo Miyahara, Hiroshi Nakatsuji, “Light-Driven Ion-Pumping Mechanism of Rhodopsins: SAC-CI Study”, International Symposium on Biophysics of Rhodopsins, Kyoto University, Kyoto, Japan, May 11-12, 2017.
- ⑥ 宮原 友夫, 中辻 博, 「光駆動イオン輸送型ロドプシンのイオン輸送メカニズムの解明」、第 14 回京都大学福井謙一記念研究センターシンポジウム、京都大学福井謙一記念研究センター(京都)、2017 年 1 月 27 日
- ⑦ 宮原 友夫, 中辻 博, 「光駆動イオン輸送型ロドプシンのイオン輸送メカニズムの解明」、第 10 回分子科学討論会 2016 神戸、神戸ファッションマート(神戸)、2016 年 9 月 13-15 日
- ⑧ 宮原 友夫, 中辻 博, 「DNA と RNA の二重螺旋構造と円二色性スペクトル: SAC-CI 理論による研究」、第 4 回 CUTE シンポジウム: コンピュータ化学「京コンピュータと理論化学」三重大学(津)、2016 年 6

月 16 日

- ⑨ Tomoo Miyahara, Hiroshi Nakatsuji, “Indicator of the Stacking Interaction in the Double-Helical Structures of DNA and RNA: ChiraSac Study”, 6th Japan-Czech-Slovakia International Symposium on Theoretical Chemistry (JCS-2015), Smolenice Castle near Bratislava, Slovakia, October 11-15, 2015.
- ⑩ 宮原 友夫, 中辻 博, 中嶋 浩之, 黒川 悠索, 「生体分子の円二色性スペクトルに関する理論研究:SAC-CI ChiraSAC study」第 9 回分子科学討論会、東京工業大学 大岡山キャンパス(東京)、2015 年 9 月 16-19 日

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.qcri.or.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮原 友夫 (MIYAHARA, Tomoo)
特定非営利活動法人量子化学研究協会・
研究所・部門長
研究者番号: 70397595

(2) 研究分担者

なし

(3) 研究協力者

なし