

令和 2 年 5 月 29 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (特設分野研究)

研究期間：2017～2019

課題番号：17KT0094

研究課題名(和文) 生物発光における脱CO₂酵素反応の遷移状態構造とその制御の計算物質的科学研究

研究課題名(英文) Theoretical study for exhaust carbon dioxide enzyme reaction in bioluminescence

研究代表者

樋山 みやび (Hiyama, Miyabi)

群馬大学・大学院理工学府・准教授

研究者番号：90399311

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：生物発光は、食品検査・遺伝子発現・土壌/水質汚染検査などに利用されているため、発光機構の解明はこれらの検査方法の発展に重要となる。生物発光の本質は、タンパク質酵素内において酸素が反応系に取り込まれ二酸化炭素を脱離する化学反応にある。生物発光を理解するためには、化学反応の問題にタンパク質酵素の影響と溶媒の影響が複雑に絡んでいることを考慮した理論研究が必要である。本研究では、分子動力学計算と量子化学計算を組み合わせた方法により発光体への溶媒とタンパク質酵素の影響について調べた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生物発光は基礎的な化学・生物学的分野だけでなく、工学・医学・薬学等の広い分野に関わっており、我々の生活に深く関係している。生物発光の中でも特に有用なホタル生物発光に着目した本研究成果により、今後の発光機構解明が進めば、食品検査や土壌/水質汚染検査などの応用面での研究も発展すると期待できる。

研究成果の概要(英文)：Because bioluminescence is useful tool for food inspection, gene expression, and water pollution examination, the elucidation of the mechanism of bioluminescence is important for development of such inspection methods. The essence of bioluminescence is the chemical reaction in enzyme. In this study, the influence of solvent and enzyme on emitter were investigated using both quantum chemical calculations and the first-principles Born-Oppenheimer molecular dynamics simulations.

研究分野：物理化学

キーワード：生物発光 量子化学計算 水和 第一原理分子動力学計算 反応経路

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生物発光は、食品検査・遺伝子発現・土壌/水質汚染検査などに利用されるため、基礎的な化学・生物学的分野だけでなく、工学・医学・薬学等の広い分野に関わる、利用価値の高い反応をおこす機構である。例えばホタルやウミホタル等の生物発光は、高い定量性・測定の手軽さから腫瘍増殖・病原菌感染などの発現観測・個々の細胞の遺伝子発現そのものの観測・微生物検査や食品製造ラインでの清浄度検査などの食品衛生検査に用いられている[今井・近江谷 2006, パイオ・ケミルミネッセンスハンドブック、丸善]。発光利用における最も重要な課題の一つは発光量の制御である。

発光における化学反応について明らかにする必要があるため、化学反応を理論的に調べる研究が数多くなされてきた。研究開始当初までの研究から明らかになってきたことは、生物発光では化学反応の問題にタンパク質酵素の溶媒の影響が複雑に絡んでいるということである。最も研究されているホタル生物発光であっても、従来の理論研究では、気相中の簡単なモデル系、あるいは特定の間体と特定の発光体を仮定したポテンシャル計算のみである。溶媒については、連続誘電体モデルを仮定している[Min et al. CPL 2011, 506, 269-275, Navizet et al. ChemPhysChem, 2011, 12, 3064-3076]。

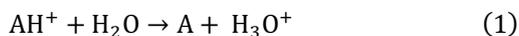
2. 研究の目的

これまで研究代表者は、ホタル生物発光の発光体であるオキシルシフェリンの水溶液中での吸収・蛍光スペクトルの解析を行ってきた。この系は詳細な実験データがあるため、理論計算レベルの検証に適している。基盤 C(15K05379)により実施した標準的な連続誘電体モデルを用いた理論計算によるオキシルシフェリン吸収の実験スペクトル解析から、溶媒の pH によって、水溶液中に存在する主要化学種の構造が異なることがわかった。また、発光体であると考えられているオキシルシフェリンのケト型アニオンには、特別な水和の影響がある可能性を指摘した。さらに、発光に関与すると考えられるオキシルシフェリンアニオンの場合、連続誘電体モデルは正しい溶媒効果を与えないことを示した。

研究開始当初までの研究から、発光量を見積もることのできる高精度な遷移状態構造の解明のためには、異なる pH における分子構造情報と、水分子・酵素を露にとり入れた励起状態についての情報を先に得て、発光反応の本質を反映したモデル系を作成することが必要であると考えた。これらの研究成果と考察を踏まえて、本研究課題では、酵素や水分子の影響を受けた遷移状態構造の解明を目的とした。

3. 研究の方法

過去の研究では中間体とオキシルシフェリンについてそれぞれ一つの化学種を仮定しているが、研究代表者のこれまでの研究から、オキシルシフェリンは pH によって構造が異なることがわかったため、中間体も pH ごとに異なると予想された。そこでまず、溶媒の扱いについて標準的な方法である連続誘電体モデルを用いて pH に対して異なる反応経路を解明することを目指した。反応に関与する化学種の安定構造を量子化学計算により得た。また、自由エネルギーから得られる pKa 値を補正することにより、相対的な自由エネルギーを見積もった。ここでは水和している化学種 AH⁺からのプロトンの脱離を



と仮定した。(1)式のそれぞれの化学種の基底状態に対する DFT 計算とその振動解析から得られる自由エネルギーを用いて、AH⁺の pK_a を決定した。それぞれの計算において溶媒は連続誘電体モデルで近似している。この値を、pK_a^{calc}(AH⁺)とする。次に、それぞれの化学種に対する pK_a を

$$\text{pK}_a(\text{AH}^+) = \text{pK}_a^{\text{calc}}(\text{AH}^+) + \{\text{pK}_a^{\text{expl}}(\text{BH}) - \text{pK}_a^{\text{calc}}(\text{BH})\} \quad (2)$$

により補正した。ただし、BH は実験値 pK_a^{expl} が得られている参照分子であり、さらに AH⁺の H⁺がついている原子の結合状況と似ている結合状況にある化学種である。

タンパク質を含む系に対する古典 MD 計算には、Amber14 を用いた。タンパク質の構造は、タンパク質データバンクに登録されているゲンジボタルルシフェラーゼの結晶構造(2d1r) から、野生型のゲンジボタルルシフェラーゼの配列を得た。水分子をあらわに含むオキシルシフェリンアニオンの系に対する第一原理分子動力学計算には CPMD プログラムを用いた。この第一原理 MD 計算で得られる構造に基づき、時間依存(TD)DFT 計算を行った。同時に、実験スペクトルと比較することで、計算レベルの検証を行った。DFT と TDDFT 計算には量子化学計算プログラムコード Gaussian09 を用いた。

4. 研究成果

まず、ルシフェリン・ルシフェリル AMP 中間体・ジオキセタン中間体・オキシルシフェリンの水溶液中での安定構造を DFT 計算(B3LYP-D3/6-31+G(d, p))により求めた。ベンズチアゾール環の OH 基からプロトン脱離したアニオンの形状になっている ATP 中間体の構造を図 1 に示す。水溶液中での ATP 中間体構造(図 1 (a))とルシフェラーゼ結晶中の ATP 中間体構造(図 1 (b))は明らかに異なることがわかった。また、ジオキセタン中間体は非常に収束しにくいことがわかった。オキシルシフェリンについて、これまで報告した構造との比較を行ったところ、基底状態、励起状態ともに基底関数の違いによる安定構造の違いは見られなかった。

振動解析を行い、(2)式の補正法をもちいて相対的な自由エネルギーを見積もることで、タンパク質内の環境に相当する pH7-9 領域での反応経路を求めた。反応経路のポテンシャルエネルギープロファイルによると、ATP 中間体構造は pH > 8 で図 1(a)のようなプロトン脱離した構造をとることがわかった。一方、ジオキセタン中間体は pH によらずプロトン脱離した構造をとるため、タンパク質内の環境に相当する pH 領域では、僅かな pH の違いで反応経路が異なることが明らかになった。これらの成果は The 55th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan にて発表した。

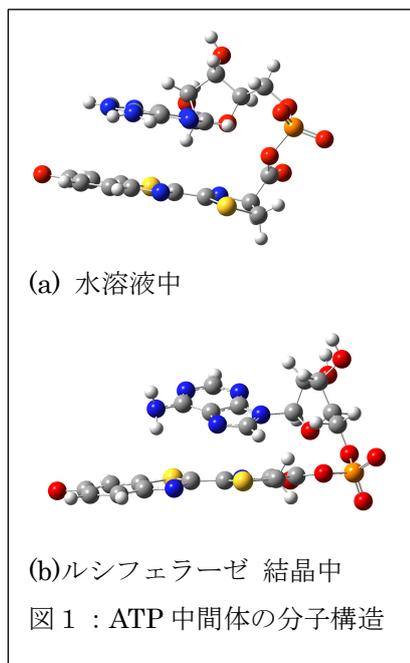
オキシルシフェリン励起状態の酵素の影響および理論計算レベルを検証するため、タンパク質構造の情報のあるゲンジボタルルシフェラーゼに着目し、ルシフェラーゼを点電荷としてあつかう計算を実施した。また、活性中心にあるケト型オキシルシフェリンアニオンを含む水溶液中のタンパク質構造を決定するために、タンパク質表面から 30, 40, 50 Å に水分子を配置した。

そのまま古典分子動力学計算を行うと、基底状態に対するオキシルシフェリンがある場合のタンパク質および溶媒の計算になってしまう。そこで、オキシルシフェリンの第一励起状態の電荷を古典分子動力学計算に用いた。古典分子動力学計算の前に、オキシルシフェリンの第一励起状態の構造最適化を行い、Natural Population Analysis により決定した。このように決定した電荷を用いたモデル系に対して、周期境界条件を課して古典分子動力学計算を行った。その結果、5 ナノ秒程度の計算時間で全エネルギーが平衡に達することがわかった。

古典分子動力学から得られる構造は、発光に直接関与しないタンパク質や水分子の構造に対しては妥当な構造を与えると考えられる。しかし、発光に直接関与するオキシルシフェリンの構造については励起状態の構造を求めるための計算が必要になると考えた。そこで、この古典分子動力学計算から得られるオキシルシフェリン構造を初期配置とし、オキシルシフェリン以外の構造は固定して時間依存密度汎関数法(TDDFT)計算による励起状態の構造最適化を行った。この構造最適化計算では水分子およびタンパク質を点電荷として近似した。水分子数に対する収束性から、オキシルシフェリンの中心より半径 50 Å の水分子を入れたモデルで十分であることを確認した。

しかしこの計算方法では、二つの問題があることが判明した。一つは、構造最適化の計算中にオキシルシフェリンの酸素原子がタンパク質の水素原子の点電荷近くに偏ってしまうことがある、という問題である。そこで、オキシルシフェリン励起状態の構造最適化計算には、タンパク質と周囲の水分子を分子力学(MM)法で扱い、オキシルシフェリンに TDDFT を用いる ONIOM 計算を実施した。その結果、構造最適化の際にオキシルシフェリンの酸素原子がタンパク質の水素原子の点電荷近くに偏る、という問題は回避することができた。

もう一つの問題は、ある時間ごとのオキシルシフェリンの構造(スナップショット)は周囲のタンパク質構造を反映して振動した構造をとるため、一つの構造から発光エネルギーを決定することができない、という問題である。古典分子動力学計算から得られたオキシルシフェリンの構造を初期配置にして、周囲のタンパク質および溶媒を固定した構造最適化を行っても、これらの構造が大きく変化することはなかった。そこで、古典分子動力学計算から 200 構造を取り出して、タンパク質と周囲の水分子を分子力学(MM)法で扱い、オキシルシフェリンを量子力学(QM)法で扱う QM/MM 計算により励起エネルギーを求めれば良いという知見を得た。



同時に、新たな問題も明らかになった。QM/MM法を用いた発光エネルギーの計算において、QM領域に用いるTDDFT法や運動方程式結合クラスター(EOM-CCSD)法など計算方法の違いにより得られる発光エネルギー値がかなり異なることがわかった。したがって、一つの構造に対してだけでも、より高精度な理論計算を実施し、コストの少ない計算方法について評価する必要がある。発光体を含む外部環境の溶媒やタンパク質も含む、超高精度な第一原理分子動力学計算が実施されれば、古典分子動力学計算のような低コストの計算結果について評価することが可能である。しかし、タンパク質を含む大規模系に対する第一原理MD計算の実施は、現状の計算機性能では非常に難しい。

そこで、計算が可能である水溶液中のオキシルシフェリンの系に対し、ファンデルワールス力を考慮した第一原理MD計算を実施した。この計算には、東大物性研のスパコンを用いて300日ほど時間がかかった。第一原理MD計算から得られた構造を用いて、溶媒を含むオキシルシフェリンの量子化学計算により吸収スペクトルを得た。得られた吸収スペクトルは、実験をよく説明した。また、化学種を取り巻く環境の取り扱いについては、最低でも10個程度の水分子をあらわに取り入れた系に対する計算が必要であるという知見を得た。この成果は第13回分子科学討論会および日本物理学会の秋季大会にて発表し、投稿論文にまとめた。今後、水溶液中のオキシルシフェリンに対して古典分子動力学計算を行い、この第一原理分子動力学計算の結果と比較すれば、計算方法の検証が可能になると期待できる。本研究および基盤C(15K05379)で実施した研究を含む生物発光の理論研究成果について、専門家以外にもわかりやすいように、解説記事として原子衝突学会の学会誌で報告した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kurata Maki, Hiyama Miyabi, Narimatsu Takuma, Hazama Yuji, Ito Takashi, Hayamizu Yuhei, Qiu Xingping, Winnik Françoise M., Akiyama Hidehumi	4. 巻 189
2. 論文標題 Synthesis and quantitative characterization of coumarin-caged D-luciferin	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology	6. 最初と最後の頁 81 ~ 86
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2018.10.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Noguchi Yoshifumi, Hiyama Miyabi, Shiga Motoyuki, Akiyama Hidefumi, Sugino Osamu	4. 巻 15
2. 論文標題 Photoabsorption Spectra of Aqueous Oxyluciferin Anions Elucidated by Explicit Quantum Solvent	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Chemical Theory and Computation	6. 最初と最後の頁 5474 ~ 5482
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jctc.9b00392	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Usukura Junko, Hiyama Miyabi, Kurata Maki, Hazama Yuji, Qiu Xing Ping, Winnik Françoise M., Akiyama Hidefumi, Koga Nobuaki	4. 巻 -
2. 論文標題 Theoretical Study of the Wavelength Selection for the Photocleavage of Coumarin caged D luciferin	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Photochemistry and Photobiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/php.13212	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 樋山みやび	4. 巻 16
2. 論文標題 解説 ホタル生物発光関連分子の電子状態に関する理論的研究	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 原子衝突学会 学会誌 しょうとつ	6. 最初と最後の頁 75-86
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計19件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 6件）

1. 発表者名 薄倉淳子, 樋山みやび, 倉田麻貴, 挟間優治, Xingping Qiu, Francoise Winnik, 古賀伸明, 秋山英文
2. 発表標題 水溶液中のクマリン・ケージドルシフェリンの吸収スペクトルの理論的研究
3. 学会等名 第12回分子科学討論会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 吉井咲夢, 森勝伸, 樋山みやび, 板橋英之
2. 発表標題 ガードカラムを用いた陰イオンのイオンクロマトグラフィーと同時分離法への応用
3. 学会等名 日本分析化学会第67年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 栗本雅之, 小野稜平, 手塚大輔, 樋山みやび, 板橋英之, 大重真彦, 桂進司
2. 発表標題 発光酵素ルシフェラーゼによるDNA合成反応の検出
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Miyabi Hiyama, Yoshifumi Noguchi, Motoyuki Shiga, Osamu Sugino, Hidefumi Akiyama, Nobuaki Koga
2. 発表標題 Absorption spectra of firefly oxyluciferin from first principle molecular dynamics simulations
3. 学会等名 20th International Symposium on Bioluminescence and Chemiluminescence 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Sakura Yoshii, Miyabi Hiyama, Hideyuki Itabashi
2. 発表標題 Study on the possible meteorological factors of Japan's firefly bioluminescence occurrences
3. 学会等名 20th International Symposium on Bioluminescence and Chemiluminescence 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 樋山みやび
2. 発表標題 実験と理論計算からのホタル生物発光機構へのアプローチ
3. 学会等名 化学反応経路探索のニューフロンティア2018 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 樋山みやび
2. 発表標題 紅色光合成細菌の反応中心における電子移動に対するポルフィリン環側鎖の電子的効果の理論的研究
3. 学会等名 NTChemWorkshop2019 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Miyabi Hiyama, Hidefumi Akiyama, Nobuaki Koga
2. 発表標題 pH dependence of oxidation reaction pathway of firefly luciferin
3. 学会等名 The 55th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 薄倉淳子、樋山みやび、倉田麻貴、挟間優治、Xingping Qiu、Francoise Winnik、古賀伸明、秋山英文
2. 発表標題 クマリン・ケージドルシフェリンの電子励起状態の理論的研究
3. 学会等名 第11回分子科学討論会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 樋山みやび、野口良史、志賀基之、杉野修、秋山英文、古賀伸明
2. 発表標題 ホタルオキシルシフェリン吸収スペクトルにおける水分子鎖の構造ゆらぎの影響
3. 学会等名 第11回分子科学討論会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 薄倉淳子、樋山みやび、倉田麻貴、挟間優治、Xingping Qiu、Francoise Winnik、古賀伸明、秋山英文
2. 発表標題 GRRM 法による水溶液中ケージドルシフェリンの構造探索
3. 学会等名 シンポジウム「化学反応経路探索のニューフロンティア」
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Miyabi Hiyama, Yoshifumi Noguchi, Motoyuki Shiga, Osamu Sugino, Hidefumi Akiyama, Nobuaki Koga
2. 発表標題 Instantaneous absorption spectra of firefly oxyluciferin using the first principle molecular dynamics simulations
3. 学会等名 11th Triennial Congress of the World Association of Theoretical and Computational Chemists (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Nobuaki Koga, Miyabi Hiyama, Yoshifumi Noguchi, Motoyuki Shiga, Osamu Sugino, Hidefumi Akiyama
2. 発表標題 Effects of water solvation on absorption spectra of firefly oxyluciferin
3. 学会等名 The 28th International Conference on Photochemistry (ICP 2017) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Miyabi Hiyama, Yoshifumi Noguchi, Motoyuki Shiga, Osamu Sugino, Hidefumi Akiyama, Nobuaki Koga,
2. 発表標題 Theoretical study for firefly bioluminescence related molecules in aqueous solutions with first principle molecular dynamics simulations
3. 学会等名 The 6th Quantum Science symposium, The Main Symposium of 16th International Conference of Computational Methods in Science and Engineering (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 野口良史、樋山みやび、志賀基之、秋山英文、杉野修
2. 発表標題 水溶液中のホタルオキシルシフェリンの基底状態および励起状態の第一原理MD
3. 学会等名 第33回分子シミュレーション討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 薄倉 淳子, 倉田 麻貴, 樋山 みやひ, 成松 拓馬, 挟間 優治, 伊藤 隆, 早水 裕平, Xingping Qiu, Francoise M. Winnik, 古賀 伸明, 秋山 英文
2. 発表標題 クマリンケージドルシフェリンの合成と量的特性評価
3. 学会等名 第13回分子科学討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 樋山みやび、野口良史、志賀基之、秋山英文、杉野修、古賀伸明
2. 発表標題 ゲンジボタルルシフェラーゼにおける発光スペクトルのQM/MM法による解析
3. 学会等名 13回分子科学討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 野口良史、樋山みやび、志賀基之、秋山英文、杉野修
2. 発表標題 Full QM法とQM/MM法による水溶液中のオキシルシフェリン分子の光吸収スペクトル計算
3. 学会等名 日本物理学会2019年秋季大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 野口良史、樋山みやび、志賀基之、秋山英文、杉野修
2. 発表標題 第一原理による水溶液中のホタルオキシルシフェリン分子の安定性と光吸収スペクトル
3. 学会等名 第13回分子科学討論会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考