

平成 21 年 5 月 12 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2006-2008

課題番号：18770130

研究課題名（和文） 励起生体分子の動的過程：電子理論からのアプローチ

研究課題名（英文） Excited states of bio-molecules and their dynamics:
Electronic-structure theoretical approach

研究代表者

長谷川 淳也 (HASEGAWA JUN-YA)

京都大学・大学院工学研究科・講師

研究者番号：30322168

研究成果の概要：電子励起した生体分子がどのような挙動を示すかを研究するために、励起状態のポテンシャルエネルギー面を計算する方法を整備した。巨大な蛋白質-色素複合体を計算するために、量子-古典ハイブリッド法である QM/MM 法のプログラムを開発した。その応用として、レチナール蛋白質、ホタルルシフェラーゼなどの励起状態を計算した。その結果、ヒト色覚で見られるレチナールのスペクトル制御メカニズムやホタルの黄緑色発光の起源などを明らかにし、人工的な発光色チューニングの提案などを行った。また、ヘムにおける酸素分子吸着過程を明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	700,000	0	700,000
2007 年度	2,200,000	0	2,200,000
2008 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	180,000	3,680,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：光生物学、励起状態理論

1. 研究開始当初の背景

植物の光合成系、視覚、生物発光などにおいて、生体分子の光反応過程が生命活動の本質において重要な役割を担っている例が多く知られている。近年、それらのタンパク質の結晶構造が得られて、分子論的メカニズムの理解が可能になりつつある。

また、色素-蛋白質複合体からなる生体分子は量子化学計算においては極めて巨大な系である。従って、生体分子を高速で計算で

きる方法論の発展が必要であった。具体的には巨大な蛋白質分子を取り扱うために、量子-古典論を組み合わせた計算手法を開発した。即ち、電子状態の記述を必要とする蛋白質活性中心には量子論を用い、活性中心を取り巻く蛋白質による構造、静電的な効果を古典理論組み合わせるものである。

他方で励起状態の電子理論の計算精度は向上し、分光学的実験結果を十分解析できる精度に至っている。我々が開発を進めている SAC-CI 法は励起状態理論としてシンプ

ル且つ正確で、理論上の制約が少なく、計算プログラムにおいても他の方法論と比較して、より大規模な計算が可能である。また、励起状態において原子核に働く力が計算でき、励起状態のポテンシャルエネルギー面を研究する基礎理論が準備されつつある。

2. 研究の目的

本研究では、上述した SAC-CI 法と QM/MM 法を用いて、生体分子の励起状態のポテンシャル面に関する研究を行った。具体的には、ホタルの発光色の制御メカニズム、色覚を実現しているレチナル蛋白質における光吸収スペクトルの制御メカニズムなどを明らかにすることである。

蛋白質において色素の励起エネルギーが変化する要因には、構造効果、蛋白質とのクーロン相互作用効果が考えられる。前者については、色素が蛋白質の内部における安定構造をとるので、気相中の構造と比較すると歪んだ構造になり、励起エネルギーが変化する。後者については古典的なクーロン相互作用と量子力学に由来する相互作用がある。色素の励起状態において電荷移動性があれば、クーロン相互作用が励起エネルギーに大きな影響を与える。

これらの解析を通して、励起エネルギーが変化するメカニズムを明らかにし、得られた原理を元に励起・発光エネルギーの制御法を提案することも本研究における目的の一つである。

3. 研究の方法

生体分子の分子構造を QM/MM 法により決定する。使用した QM 理論については、基底状態では DFT(B3LYP)、励起状態では CIS を用いた。基底関数では DZP クラスのものを用いた。

生体分子の構造を QM/MM 法で決定するにあたって、Protein Data Bank に登録されている構造を初期構造として用いた。ホタルルシフェラーゼに関しては、蛋白質-色素複合体の構造が未解決であったため、古典的な分子動力学法を用いて、安定な構造を幾つか計算したのち、QM/MM 法で構造を決定した。また、アミノ酸の荷電状態については、実験的に同定された結果や pKa の計算などを行って決定している。

励起状態の計算には SAC-CI 法を用いた。図 1 に幾つかの生体分子の光吸収・発光エネルギーについての SAC-CI 法による計算結果を示す。計算結果は実験値を平均誤差 0.1eV(2.3kcal/mol)程度で再現できている。基底関数は DZP クラスのものを用いた。SAC/SAC-CI 波動関数における励起演算子は摂動選択法により 2 次摂動エネルギーの

大きいものを選択した。閾値としては Gaussian03 プログラムにおける"LevelTwo"、即ち基底状態 5.0d-6 hartree、励起状態 6.0d-7 hartree で行った。

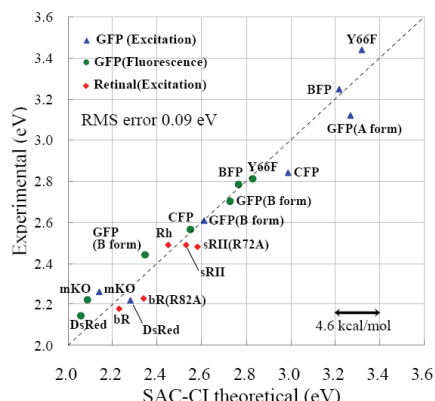


図 1. 定量性のある電子状態理論(SAC-CI 法)により行われた光機能性蛋白質の励起・発光エネルギーを実験値と比較したもの。

4. 研究成果

(1) オキシヘム類縁体と酸素分子の可逆的結合過程に関する理論的研究

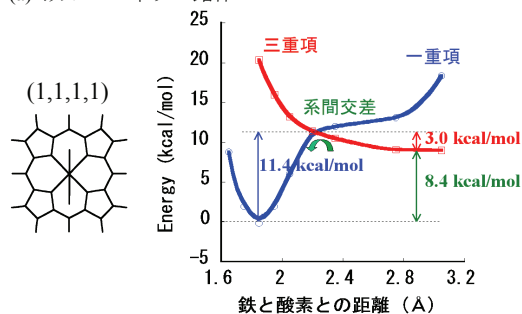
生体内での酸素運搬または貯蔵蛋白質であるヘモグロビンやミオグロビンにおいては、ヘム(鉄ポルフィリン錯体)が酸素分子を結合するアクティブサイトである。ヘムにおける酸素結合に関しては 2 つの重要な性質、(i) スピン状態の変化、(ii) 鉄の面外位置の変化、がある。本研究前半ではこれらの 2 つの点に着目してヘムにおける酸素結合を理論的に研究した。

また、実験研究から天然のミオグロビン中の鉄ポルフィリン錯体をポルフィリン類縁体(本研究では鉄ポルフィセン錯体、鉄コルフィセン錯体を扱った。)に置き換えることにより、再構成されたミオグロビンが天然ミオグロビンとは大きく異なる酸素親和性やその他の性質を示すことが明らかになった。そこで、本研究後半ではヘム(鉄ポルフィリン錯体)と比較しながらこれら類縁体錯体における酸素結合を理論的に研究した。我々は DFT 法を用い各スピン状態での構造と電子状態およびポテンシャル面を求めることにより酸素の結合メカニズムを調べた。

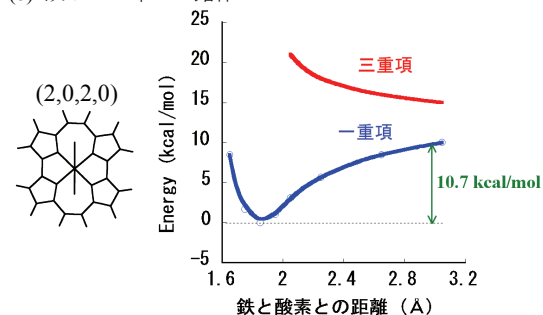
まずヘムにおける酸素結合について述べる。鉄-酸素間距離および鉄の面外位置という 2 つの反応座標により酸素結合に対するポテンシャル面を三重項状態および一重項状態で求め、反応経路に沿ったポテンシャルカーブを図 2 (a)に示した。三重項状態の面は

全体的に解離的で、一重項状態は吸着的な面を示すことが分かった。従って、酸素の結合過程は解離状態の三重項状態のままでは酸素は結合できないが、結合過程の途中で見られる系間交差の点で三重項状態から一重項状態に遷移することにより酸素が結合できるようになることが分かった。

(a) 鉄ポルフィリン錯体



(b) 鉄ポルフィセン錯体



(c) 鉄コルフィセン錯体

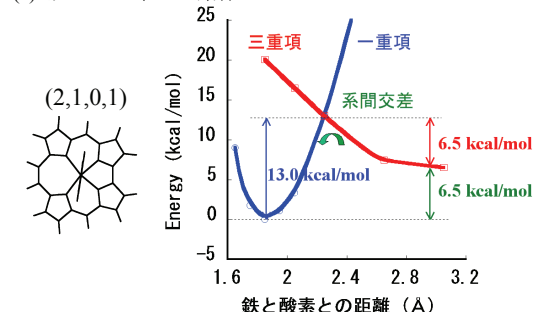


図2. (a)鉄ポルフィリン、(b)鉄ポルフィセン、(c)鉄コルフィセン錯体における酸素結合のポテンシャルカーブ。

次に、類縁体における酸素結合について述べる。図2(b,c)にそれぞれ、鉄ポルフィセン錯体および鉄コルフィセン錯体に関するポテンシャルカーブを(a)の鉄ポルフィリン錯体と同様に示した。酸素の解離状態で鉄が面外位置にあるとき、鉄ポルフィセン錯体は三重項状態が鉄ポルフィリン錯体に比べ不安定化し、鉄コルフィセン錯体は逆に安定化していることが分かる。この相違が結果的に酸素結合メカニズムと酸素親和性に最も大きな影響を与えていると考えられる。鉄ポルフィセン錯体の酸素結合メカニズムは鉄ポル

フィリン錯体や鉄コルフィセン錯体のように途中で系間交差を伴わないことが分かった。また、酸素親和性は、鉄ポルフィセン錯体>鉄ポルフィリン錯体>鉄コルフィセン錯体の順に大きく、これは実験結果と一致した。

(2) 蛍ルシフェラーゼにおける発光色制御メカニズムと理論ミュレーション

蛍の黄緑色発光は発色団である蛍ルシフェリンに由来する。しかし、蛍ルシフェリンは化学的な環境下では赤色発光する。本研究ではSAC-CI法を用いて、北アメリカホタルの蛋白質中において発光色が大きく青方シフトする原因について研究した。

まず、溶液中での keto 及び enol 型 oxyluciferin について、種々の幾何異性体とプロトン化状態を考慮して化学発光エネルギーを計算した。keto型の計算値は2.10eVであり、実験値(1.97eV)に約0.13eV(3.0kcal/mol)の誤差で良好に一致した。また、塩基性環境下での発光についても enolate型の発光エネルギーが2.17eVと計算され、実験値(2.20eV)を良く再現した。このように、化学発光におけるketo型の赤色発光と enolate型の黄緑色発光をSAC-CI計算により確認できた。

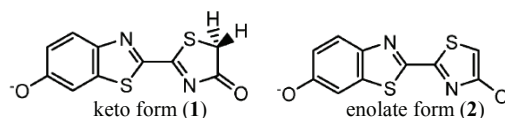


図3. 蛍ルシフェリンの化学構造式

次に蛋白質環境下での計算を行った。X線構造解析の結果と実験的仮説に基づいて、蛋白質中にketo型ルシフェリンを挿入し、分子動力学、分子力学、量子化学計算を行った。得られた構造を用いてSAC-CI計算を行ったところ、発光エネルギーは2.24 eVと算出され、実験値2.23eVにより一致を示した。つまり、keto型のoxyluciferinが化学的環境下で赤色発光し、ルシフェラーゼ蛋白質環境下においては約0.2eV青方シフトさせて黄緑色発光することが明らかになった。

より詳細なメカニズムを解析するために基底・励起状態の電子分布を解析した。図4の様に、ルシフェリンは励起に伴い分子末端の酸素原子の電荷分布が変化する。他方でルシフェリンは正に帯電したArg218と負に帯電したリン酸基に挟まれるように位置する。Argに水素結合する酸素原子の負電荷減少と、リン酸に最も近接する酸素原子の負電荷増加により、励起状態のエネルギー

が特異的に不安定化し、青方シフトの原因になっていることが明らかになった。

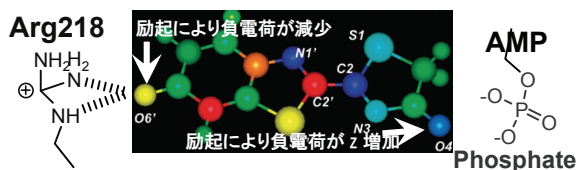


図4. 励起に伴うルシフェリンの電荷分布の変化と周辺の蛋白質環境。

また、従来説である蛋白質中のケト-エノール互変異性についても検討した。enol型およびenolate型はketo型に近い発光エネルギーを示すが、蛋白質中でのenol変換は約26 kcal/mol不安定化することが明らかになった。また、Arg218からのプロトン移動を原因とする説についても検証したが、発光エネルギーの計算値 (3.02eV) は実験結果から大きく逸脱しており、エネルギー的にも不利な過程であった。

更にこれらの結果を基に、ルシフェラーゼの分子設計を行った。アミノ酸残基を置換することにより活性中心の静電場を制御し、赤オレンジ色の発色を示すと期待されるミューテーション実験を提案した(図5)。

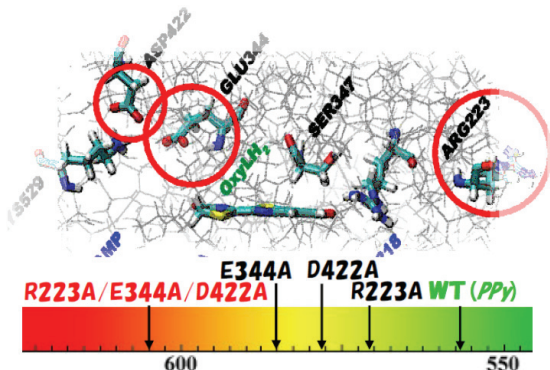


図5. 北アメリカ蛍のルシフェラーゼにおける理論ミューテーションの結果得られた黄～赤色発光が期待されるルシフェラーゼ・ミュータント。

(3) レチナル蛋白質におけるカラー・チューニングメカニズム

視物質ロドプシン(Rh)やプロトンポンプの機能を有するバクテリオロドプシン(bR)に代表されるレチナルタンパク質は、共通のレチナル色素分子を含みながら、周辺タンパク質(オプシン)の影響で吸収波長が大きく変化することが知られている。この機構を解明するために多くの研究が行なわれたが、これまで実験値を系統的に再現するには至っていない。本研究では、QM/MM 法およびSAC-CI 法によりロドプシン(Rh)、バクテリオロドプシン(bR)、センサーロドプシン II

(sRII)の励起状態を解析し、カラーチューニングメカニズムの起源を考察した。

まず計算方法とモデルに関する検討を行った。レチナル分子のような π 系の構造最適化にはよく CASSCF 法が用いられる。しかし、active space が不十分なために、得られた構造は HF 法と同様に結合長交替を過大評価し、 σ 電子の相関効果を含むことができない。結果として、CASSCF 構造を用いると励起エネルギーを 0.3 eV 程度過大評価する。B3LYP 構造は MP2 構造によく一致しており、算出される励起エネルギーも MP2 構造によるものとほぼ一致する。また、レチナルの Schiff base 部位のカウンターイオン(アミノ酸残基)の効果も励起エネルギーに大きな影響を与える。カウンターイオンを点電荷で近似すると、励起エネルギーを 0.3 eV 程度過少評価する。B3LYP functional を用いた TDDFT 計算を行うと、Rh と sRII では実験値とよい一致を示すが、bR においては 0.4 eV 程度過大評価しており、系統的な励起エネルギーの議論に用いることは困難と判断した。

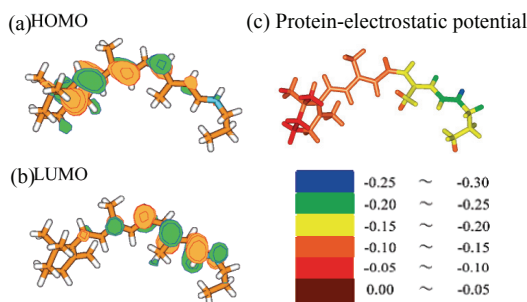


図6. レチナル分子の(a)HOMO と(b)LUMO。(c) Opsin による静電ポテンシャル。

次に、bR と比較して Rh と sRII の励起エネルギーが約 0.3 eV 大きい原因について研究した。種々の計算から励起エネルギーの分割解析をすると、蛋白質との静電的な相互作用が最も主要な効果であることが明らかになった。これらの励起状態は HOMO から LUMO への一電子励起が主配置であるが、HOMO は β -イオン環側、LUMO は Schiff base 側に偏った分布をしており、励起状態は分子内電荷移動の性質をもつ(図 6a,b)。他方で蛋白質(opsin)がレチナル分子上に形成する静電ポテンシャル(図 6c)は主にカウンター・アミノ酸により分極している。従って、電荷移動励起エネルギーは静電的に分極した環境に敏感であり、スペクトルシフトの起源になっている。

(4) ヒト色覚に関わるレチナル蛋白質のカラー・チューニングメカニズム

網膜中に存在する錐体視物質は光機能が高度に制御されたレチナル蛋白質として色覚に関与する。ヒトは網膜中に赤・緑・青色の三原色の光に対して応答する錐体視物質、human red(HR), human green(HG), human blue (HB)を有するが、光に応答して励起状態を形成するレチナル色素は3つの錐体視物質に共通する。つまり、色素を取り囲む蛋白質(オプシン)がレチナル色素の励起エネルギーを制御しているのである。この機構を解明するためにQM/MM法を用いてレチナル蛋白質の構造を最適化し、SAC-CI法を用いて基底・励起状態を計算し、スペクトル・チューニングのメカニズムについて解析した。

SAC-CI法により計算された励起エネルギーはHR, HG, HB及びrhodopsin (Rh)の実験結果を誤差約0.05 eV程度で再現できた。この結果を基に、励起エネルギーを制御する物理的因子について、色素の構造ひずみ、蛋白質との静電相互作用、カウンター残基の量子効果に分割した。その結果、スペクトル制御の起源は蛋白質との静電的な相互作用であった。

次に、スペクトル制御の生物学的な起源を調べるために、静電相互作用エネルギーをアミノ酸単位で分割して解析した(図7)。

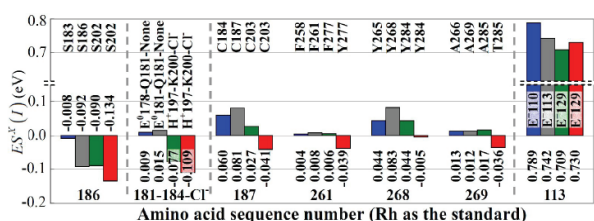


図7. 赤・緑・青色錐体視物質及びロドプシンにおいて、励起エネルギー制御を担うアミノ酸シーケンスとその寄与。赤、緑、青、灰色グラフはそれぞれ赤・緑・青色錐体視物質、ロドプシンに対応する。シーケンス番号はロドプシンを基準とした。

その結果、レチナル蛋白質におけるアミノ酸のシーケンスに特異的なカラー・チューニングが見出された。例えば、186位のアミノ酸はRh, HG, HRの励起エネルギーを低エネルギーシフトさせ、HBとの差別化がなされている。同様に181,184位からなるCl結合サイトは、HG, HRのみを低エネルギーシフトさせ、それ以外との差別

化されている。このようなシーケンスに特異的かつ、系統的なカラー・チューニングにおいて、レチナル蛋白質の分子進化との関連性を見出すことができた。また、ミュレーション実験の結果を理論的に再現することもでき、上記の結論を確認することができた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 11 件)

①"Origin of color tuning in human red, green, and blue cone visual pigments: SAC-CI and QM/MM study",

K. Fujimoto, J. Hasegawa, and H. Nakatsuji, Chem. Phys. Letters, 462 (4-6), 318-320 (2008).

②"Red Light in Chemiluminescence and Yellow-green Light in Bioluminescence: Color-tuning Mechanism of Firefly, *Photinus pyralis*, studied by the SAC-CI method",

N. Nakatani, J. Hasegawa, and H. Nakatsuji, J. Am. Chem. Soc. 129, 8756-8765 (2007).

③"Excited States of GFP Chromophore and Active Site Studied by the SAC-CI method: Effect of Protein-environment and Mutation",

J. Hasegawa, K. Fujimoto, B. Swerts, T. Miyahara, and H. Nakatsuji, J. Comp. Chem. 28, 2443-2452 (2007).

④"On the reversible O₂ binding of the Fe-porphyrin complex",

H. Nakashima, J. Hasegawa, and H. Nakatsuji, J. Comp. Chem., 27, 426-433 (2006).

[学会発表] (計 23 件)

①"SAC-CI study on the primary events in photobiological processes (Invited lecture)"

J. Hasegawa,

第88回日本化学会春季年会アジア国際シンポジウム、立教大学、2008年3月28日。

②"Exploring Photobiology with the SAC-CI method (Invited lecture)"

J. Hasegawa,

Molecular Response to Electronic Excitation, Bad Münstereifel, Germany, April 16-18, 2007.

③"SAC-CI applied to photobiology and biospectroscopy (Invited lecture)"

J. Hasegawa,

The XII-th International Congress of Quantum Chemistry, Satellite Symposium 「Reactions in

Solution and Biological Systems: Potential Energy Surface and Dynamics」、Fukui Institute for Fundamental Chemistry, 2006/5/27-29.

〔図書〕(計 4 件)

① ”Exploring Photo-Biology and Bio-Spectroscopy with the SAC-CI (Symmetry-Adapted Cluster-Configuration Interaction) Method”,
J. Hasegawa and H. Nakatsuji,
in Radiation Induced Molecular Phenomena in Nucleic Acid: A Comprehensive Theoretical and Experimental Analysis, Ed., by M. Shukla and J. Leszczynsk, pp. 93-123, (Springer, 2008).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長谷川 淳也 (HASEGAWA JUN-YA)
京都大学・大学院工学研究科・講師
研究者番号：30322168