

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009年度～2010年度

課題番号：21750019

研究課題名(和文) ヒトの色覚に潜む量子過程の解明と医学・工学的応用

研究課題名(英文) The elucidation of color-tuning mechanism in Human red, green, and blue visual pigments and its application to medicine and engineering

研究代表者

藤本 和宏 (FUJIMOTO KAZUHIRO)

京都大学・大学院理学研究科・研究員

研究者番号：00511255

研究成果の概要(和文)：(1) ヒトの色覚を司る赤・緑・青色錐体視物質に対し、吸収波長調節の機構をアミノ酸レベルで解明することに成功した。赤色と緑色錐体視物質の吸収波長の差が3アミノ酸残基の違いで説明できることを示した。(2) バクテリオロドプシンのM状態やキサントロドプシンの励起エネルギー移動の研究を行い、ヒトの錐体視物質とは異なるタイプの吸収波長調節機構を明らかにした。(3) これらの研究を行うために必要な方法を開発した。

研究成果の概要(英文)：1. Color-tuning mechanism in Human red (HR), green (HG), and blue (HB) visual pigments was theoretically clarified in amino-acid level. The difference in absorption spectra between HR and HG could be explained in terms of direction of three hydroxyl residues in HR. 2. Mechanisms of color tuning in the M state of bacteriorhodopsin and in xanthorhodopsin were also investigated, which were compared with those in human visual pigments. 3. To analyze the mechanisms, new theoretical methods were developed.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：基礎化学・物理化学

キーワード：生物物理、量子化学、生物・生体工学、励起状態

1. 研究開始当初の背景

「色覚(視覚)」は人間にとって非常に馴染み深いものである。しかしながら、色覚の機能発現における初期過程を分子レベルで理解をすることは困難とされてきた。その原因として、次の2つが挙げられる。一つは、色覚の機能発現には、視物質に含まれるレチナールの光励起という量子過程が関与すること。もう一つは、赤・緑・青の色覚を担う3錐体視物質の分子構造が未解明であることである。

申請者は、高精度の量子化学計算とホモロジーモデル(タンパク質の既知構造とアミノ酸配列の類似性を利用した立体構造のモデリング手法)を利用することで上記の2つの問題を克服し、ヒトの色覚を担う錐体視物質の吸収波長(赤・緑・青色)を理論計算で再現することに世界で初めて成功した。これらの結果に基づいて、3錐体視物質の吸収波長の違いを生み出す物理的起源を探ったところ、各錐体視物質のタンパク質場がレチナールへ形成する静電ポテンシャルの大きさ

の違いが吸収波長の差を生み出していることを突き止めた。

2. 研究の目的

これまでに申請者が行ってきた研究を更に発展させることを本研究の目的とした。具体的には次の三つである。

- (1) 錐体視物質の吸収波長の調節に大きく寄与するアミノ酸を見つける。
- (2) 色覚障害の原因となる分子機構の理解や紫外線を吸収する視物質のデザインといった医学・工学の分野へ応用する。
- (3) 上記の研究を遂行するための方法論を開発する。

3. 研究の方法

本研究は、SAC-CI法(高精度電子状態)やQM/MM法(タンパク質場を記述する方法)といった計算科学の手法を用いて遂行された。

- (1) 静電エネルギー分割法を作成し、錐体視物質を形成する各アミノ酸が静電相互作用にどのくらい寄与するかを解析し、3つ錐体視物質の静電ポテンシャルの差を生み出すアミノ酸を同定することを試みた。
- (2) アミノ酸の理論変異体を使って、赤色と緑色錐体視物質との間で吸収波長の違いが生じる分子機構の解明を試みた。
- (3) UV光を吸収する視物質を作成する上で重要となる脱プロトン化状態のレチナル色素の吸収波長調節の機構を研究した。ここでは、バクテリオロドプシンのM状態を取り扱った。
- (4) 励起エネルギー移動を利用した吸収波長調節の機構を解明するため、キサントロドプシンの吸収波長調節機構を研究した。

4. 研究成果

- (1) ヒト色覚を担う赤・緑・青色錐体視物質に対し、アミノ酸レベルで吸収波長調節の機構の解明を試みた。静電エネルギー分割法を開発し各錐体視物質に適用した結果、吸収波長調節に大きく寄与する11アミノ酸残基を見つけることに成功した。さらに、これらの11アミノ酸残基の寄与は、水素結合ネットワーク、アニオン結合部位、OH双極子の配向という3つの観点でグループ分けができることを見つけた。

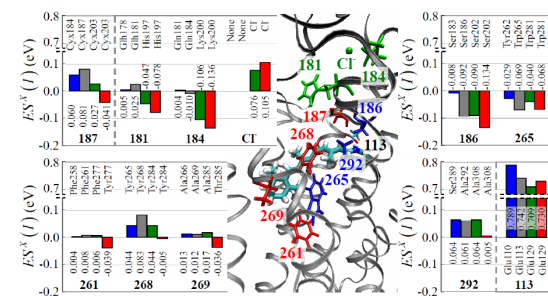


図1 静電エネルギーの分割から得られた

結果。赤・緑・青色錐体視物質とロドプシンの励起エネルギーに大きく寄与するアミノ酸残基。

- (2) 色弱の中で、特に多く存在するのが赤緑色弱である。(1)の結果から、赤色・緑色錐体視物質における吸収波長の差異を生じさせる3つのアミノ酸が絞り込まれたので、緑色錐体視物質中に存在するこれら3つのアミノ酸を赤色錐体視物質中のものに置き換えて理論変異体を作成し、励起状態計算を行った。その結果、この変異体は赤色錐体視物質と同様の吸収波長を有することを示せた。そこで、この3つのアミノ酸が赤色・緑色錐体視物質の吸収波長の差異を生み出す機構を探った。赤色錐体視物質中でこれら3つのアミノ酸はどれもOH基を有するが、レチナル色素との静電相互作用によってOH基の向きがレチナル色素のβイオン環を向くことが赤色錐体視物質の長波長シフトの原因であることを突き止めた。

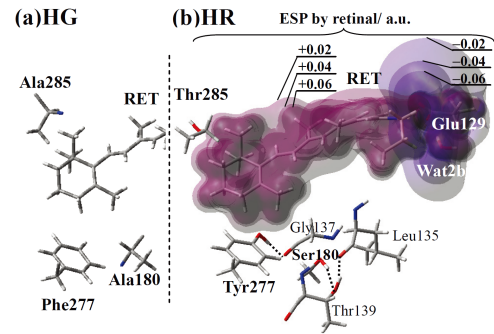


図2 レチナルが生成する静電ポテンシャルに応答するために、赤色錐体視物質の3つのアミノ酸(Ser180, Tyr277, Thr285)のOH基の酸素がβイオン環を向いている。

- (3) 鳥類をはじめ多くの生物の中に紫外光(UV)を感知するレチナルタンパク質が存在する。ここではバクテリオロドプシン(bR)のM中間体に焦点を当て、レチナルタンパク質がUV光をセンシングする機構(カラー・チューニング)の解明に取り組んだ。SAC-CI法とQM/MM法を用いた電子状態計算によって、実験の吸収スペクトルの定量的な再現に成功した。この結果に基づいて励起エネルギーの分割を試みたところ、bRのM中間体ではレチナル色素の構造の振れの効果がカラー・チューニングに最も大きな寄与をすることが分かった。(この結果はヒトの錐体視物質での機構とは異なる。)更なる解析の結果、レチナル色素の振れの効果の内、C6位の振れの影響が最も大きく、C13位の振れは2番目に大きな寄与であることを突き止めた。今回提案した機

構は以前別の研究者によって提案されたもの(水素結合の影響)と大きく異なるが、その理由についても詳しく言及した。

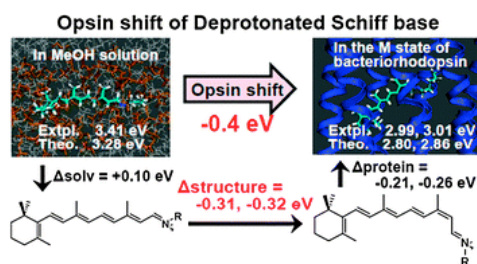


図3 バクテリオロドプシンのM状態(脱プロトン化状態のレチナール)における励起エネルギーの変化の様子。タンパク質の静電効果よりも、レチナールの構造の振れの方が励起エネルギーの大きさに主に効いている。この機構はヒト錐体視物質における機構と異なる。

(4) 励起エネルギー移動(EET)の電子・電子相互作用項(PCI)を正確に計算するための手法(TDFI法)を考案し、キサントロドプシン中の2つの色素間(カロテノイド-レチナール)で観測されるEETに適用した。これまでの計算手法では再現不可能であったPCIの実験値をTDFI法は高精度で再現することに成功した。次に、タンパク質表面へのカロテノイド結合様式とEET効率との相関を探った。その結果、2つの色素の配置がEET効率に最も大きく寄与すること、2つの色素間距離は副次的な因子であることを突き止めた。これらの結果は、レチナールタンパク質の吸収波長をカロテノイド結合の観点から人工的にデザインするという新たな可能性を示した。

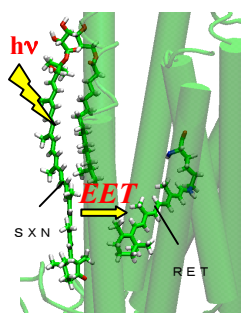


図4 キサントロドプシンで起こるサリニキササンチン(SxN)からレチナール(RET)への励起エネルギー移動(EET)。SxNとRETの距離がそれぞれの分子サイズと比べて近いと、双極子-双極子近似は適用できない。この問題を解決するためにTDFI法が開発された。

(5) エキシトンCDスペクトルの高精度な計算

を可能とするTDFI-Matrix法を開発した。この計算手法を2量体形成したレチナール色素に適用した結果、実験で観測されるエキシトンCDスペクトルの高精度な再現に成功した。また、双極子-双極子(dd)近似やTrESP法による計算も行い、従来のCDスペクトルの計算で何が問題であったかを明確に示した(原点依存性やセルフコンシステンシーなど)。更に、溶媒効果や分子間相互作用による電子分極効果がCDスペクトルに与える影響についても定量的に評価した。その結果、溶媒効果はCDスペクトルの形状に大きな影響を及ぼすことが分かった。これらの結果から、タンパク質のような大規模系に対するCDスペクトル計算の可能性を示すことができた。

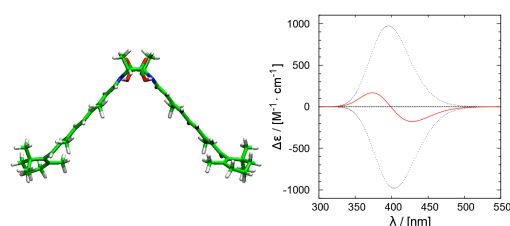


図5 (左) 2量体形成したレチナール色素と(右) TDFI-Matrix法で計算したレチナール2量体のCDスペクトル。TDFI-Matrix法は正と負のコットン効果を精度よく計算することができる。

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5件)

- 1) Kazuhiro J. Fujimoto, Kota Asai, and Jun-ya Hasegawa, "Theoretical study of the opsin shift of deprotonated retinal schiff base in the M state of bacteriorhodopsin", *Physical Chemistry Chemical Physics: PCCP* 査読有, vol. **12**, 2010, pp.13107-13116.
- 2) Kazuhiro J. Fujimoto, "Transition-density-fragment interaction approach for exciton-coupled circular dichroism spectra", *The Journal of Chemical Physics*, 査読有, vol. **133**, 2010, pp124101-1-9.
- 3) Jun-ya Hasegawa, Takehiko Ise, Kazuhiro J. Fujimoto, Akihiro Kikuchi, Eiko Fukumura, Atsushi Miyawaki, and Yoshitsugu Shiro, "Excited States of Fluorescent Proteins, mKO and DsRed: Chromophore-protein Electrostatic

Interaction Behind the Color Variations”, *Journal of Physical Chemistry B*, 査読有, vol.114, 2010, pp.2971-2979.

- 4) Kazuhiro J. Fujimoto, and Shigehiko Hayashi, “Electronic Coulombic Coupling of Excitation-Energy Transfer in Xanthorhodopsin”, *Journal of the American Chemical Society*, 査読有, vol. 131, 2009, pp.14152-14153
- 5) Kazuhiro Fujimoto, Jun-ya Hasegawa, Hiroshi Nakatsuji, “Color Tuning Mechanism of Human Red, Green, and Blue Cone Pigments: SAC-CI Theoretical Study”, *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 査読有, vol.82, 2009, pp.1140-1148.

[学会発表] (計6件)

- 1) 藤本和宏、「エキシトン CD スペクトルに関する計算手法の開発とレチナールタンパク質への応用」、第4回分子科学討論会、2010年9月15日、大阪大学
- 2) 藤本和宏、「レチナールタンパク質の吸収波長制御から何がわかるかタンパク質場やカロテノイド結合が何をもちますか」、分子研研究会「広がるロドプシンの仲間から“何がわかるか”“何をもちますか”」、2010年3月24日、分子科学研究所
- 3) 藤本和宏、「生物による光吸収の多様性に関する電子論的起源」、大阪大学蛋白質研究所セミナー「分子科学を基盤とした生命活動への理論的アプローチ」、2009年12月3日、大阪大学
- 4) Kazuhiro Fujimoto, Shigehiko Hayashi, 「Transition-Density-Fragment Interaction Approach for Excitation-Energy Transfer in Xanthorhodopsin」、第47回日本生物物理学会年会、2009年10月31日、徳島文理大学
- 5) 藤本和宏、林重彦、「キサントロドプシンの励起エネルギー移動：遷移電子密度を用いた擬クーロン相互作用の計算法の開発」、第3回分子科学討論会、2009年9月23日、名古屋大学
- 6) Kazuhiro Fujimoto, Shigehiko Hayashi, 「Transition-Density-Fragment Interaction Approach for Excitation-Energy Transfer in Xanthorhodopsin」、International Congress of Quantum Chemistry、2009年6月21日、ヘルシンキ大学

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

<http://repository.kulib.kyoto-u.ac.jp/dspace/handle/2433/131807>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤本 和宏 (FUJIMOTO KAZUHIRO)

京都大学・大学院理学研究科・研究員

研究者番号：00511255

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：