

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K05379

研究課題名(和文) バイオルミネッセンスの色決定機構における化学反応ダイナミクス

研究課題名(英文) Study on chemical reaction dynamics in the color determination mechanism 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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：従来法によりオキシルシフェリンの吸収・蛍光スペクトルにおける振電相互作用の解析を行い、ケト型のみの特異な水和の影響を見つけた。同時に、この影響は従来法では解析できず、理論計算における水和の扱いは非常に難しいことが明確になった。生物発光のタンパク質酵素は水溶液中で働くことから、まず水和の問題を解決する必要がある。水和問題に対応するため第一原理分子動力学計算を実施し、ケト型のみみられる特異な水和の影響はその疎水的な水和構造に起因することを突き止めた。この計算に基づく理論吸収スペクトルでは、実験とよく一致し、「化学種の疎水性の影響がスペクトル形状に現れる」という、新しい関係性を見つけた。

研究成果の概要(英文)：We elucidated the vibronic effect on the absorption and fluorescence spectra of the oxyluciferin and its conjugate bases. While the energies of the excited states were calculated with the time-dependent density functional theory, the solvent effect was incorporated using the polarized continuum model. Then, the effects of hydrogen bonding interactions were clarified through a theoretical study on the stability of the oxyluciferin anions with explicit water molecules using the first-principles molecular dynamics (FPMD) simulations. These simulations showed that enol type is more stable than keto type because of the unique features of the static and dynamical hydration structures. The absorption spectra of aqueous oxyluciferin anions were derived using the structures obtained from the FPMD simulations at room temperature for each isomeric form, in order to account for the effects of vibrations of oxyluciferin anions and dynamical fluctuations of their hydration structures.

研究分野：物理化学

キーワード：ホタル生物発光 オキシルシフェリン 水和 量子化学計算 分子動力学計算

1. 研究開始当初の背景

バイオルミネッセンスは、バクテリア、藻、キノコ、魚、イカ、エビ、昆虫等で観測されている。昆虫では、ホタル、鉄道虫、ヒカリコメツキムシなどがある。これらは光吸収や電子衝突等のようにあらわに外部からエネルギーが供給されることなく、化学反応により発光する興味深い現象である。この反応は、ルシフェラーゼタンパク質酵素中でアデノシン三リン酸(ATP)・ Mg^{2+} ・ルシフェリン・ O_2 からオキシルシフェリンが生成・発光する。その反応過程は図1に示すように中間体を經由しておき、「ルシフェリンールシフェラーゼ反応」と呼ばれる。タンパク質酵素の違いにより発光色が異なることから、反応経路はタンパク質酵素から影響をうけており、この点がホタル生物発光における発光色決定機構の本質であると考えられる。

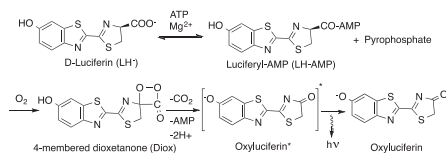


図1：ルシフェリンールシフェラーゼ反応

ルシフェリンールシフェラーゼ反応ダイナミクスを調べるためには、その基礎となるデータとして、反応物であるルシフェリンと発光体であるオキシルシフェリンの構造を知る必要がある。これまでルシフェリンの電子状態については理論・実験研究から明らかになった。

一方で、オキシルシフェリンにはケト型とエノール型が存在することから、生物発光に互変異性が何らかの影響を与える可能性があると考えられている。しかし、オキシルシフェリンは不安定な化合物であるため、水溶液中における吸収・蛍光実験スペクトルの研究は限られていた。

2. 研究の目的

これまでオキシルシフェリンの実験データが少なかったため、計算手法の妥当性を検討することができなかった。平成27年初頭に水溶液中のオキシルシフェリンとその共役酸・塩基に対する詳細な実験スペクトルが報告された[Ghose et al. J. Phys. Chem B, 2015]。これらの実験スペクトルと理論スペクトルを比べることで、オキシルシフェリン電子状態に対する水和の影響が明らかになると考えられる。

そこで、本研究では、まず十分な水分子の数を考慮した計算により実際の環境のモデル系を作成し、分子動力学計算および量子化学計算によりオキシルシフェリン電子状態に対する環境の影響を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究ではタンパク質の働く標準的な pH 7 を仮定した。これまでの研究から、pH 7 の水溶液中オキシルシフェリンの吸収・蛍光スペクトルには N 原子にプロトン付加した化学種は現れないことがわかっている[Hiyama et al. CPL 2013]。そこで、図2に示す6種類のオキシルシフェリンとその共役塩基に着目した。

スペクトルの強度を与える遷移双極子モ

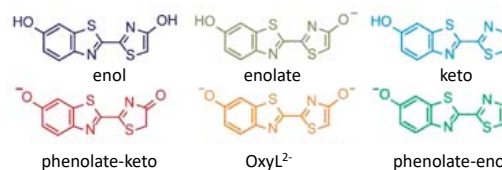


図2：オキシルシフェリンとその共役塩基

メントは、近似的に始状態と終状態間のフランク・コンドン因子(FCF)に比例する。オキシルシフェリンとその共役塩基の基底状態(S_0)と第一励起状態(S_1)の振動波数関数を得るため、密度汎関数法(CAM-B3LYP/AUG-cc-pVTZ)を用いて S_0 と S_1 状態それぞれの安定構造の振動解析を行った[主な発表論文等の雑誌論文 4]。溶媒効果は標準的な連続誘電体モデル(PCM)により取り入れた。

第一原理分子動力学(FPMD)計算では、水和モデルには、オキシルシフェリンアニオンと64個の水分子を取り入れた。この系に対して1ns(200日)を超えるFPMD計算を実行した[主な発表論文等の雑誌論文 3]。

水和構造はFPMD計算により得られるスナップショットに現れるため、スナップショットごとのオキシルシフェリンアニオンの励起状態を計算することで、水和構造を取り入れた吸収スペクトルを得ることができる。そこで、FPMD計算の結果から1000個のスナップショットを取り出し、スナップショットごとの水分子に対して、Natural Population Analysis(NPA)により各原子の電荷を求めた。周囲の水分子を得られた点電荷で近似し、オキシルシフェリンアニオンの励起エネルギーおよび振動子強度を、時間依存DFT計算cam-B3LYP/aug-cc-pVTZ計算により求めた。NPA計算および電子励起状態計算にはGaussian09を用いた。振動幅に影響を与えない程度に、振動子強度のラインに人為的な線幅をつけて、積算することにより、理論吸収スペクトルを得た[主な発表論文等の雑誌論文 1]。

4. 研究成果

本研究では、6種類のオキシルシフェリン

に対して、それらの基底状態と励起状態間の振動のFCFを見積もることにより、水溶液中におけるオキシシフェリンの振電相互作用を調べた。その結果、水溶液中におけるケト型とエノール型のオキシシフェリンおよびその共役塩基の吸収・蛍光スペクトルにおけるスペクトルの形状・幅・それらの起源を解明することができた。例えば図3に示す蛍光スペクトルでは、phenolate-ketoのみスペクトル幅が小さくなるという特徴が、Ghoseらによる実験結果(図3(a))と本研究の理論結果(図3(b))とで一致している。

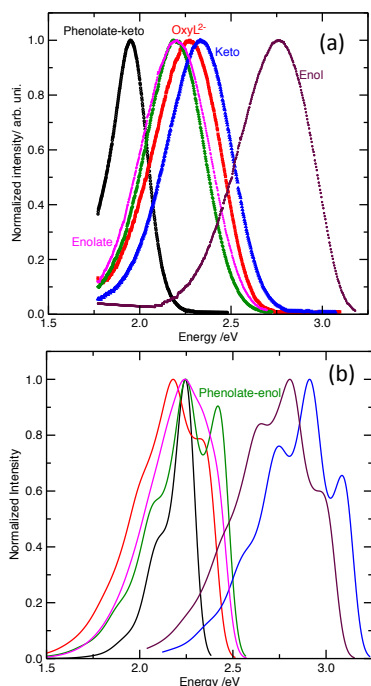


図3: 蛍光スペクトル(a)実験(b)理論
[主な発表論文等の雑誌論文4]

しかしながら、ケト型アニオンは0-0'バンドが強いので鋭いスペクトル形状になり、また、ケト型は吸収・蛍光エネルギーが他の化学種に比べて過大評価された。ここで用いた計算方法では、ケト型のみが実験結果と異なる結果となった。

これらの結果から、理論計算における水和の扱いは非常に難しいことが明確になった。生物発光でのタンパク質酵素は水溶液中で働くことから、まず水和の問題を解決する必要がある。

水和の問題に対応するため、さらに高精度な計算方法を検討した。上記の原因は、ケト型アニオンの場合は他の化学種に比べて特異な溶媒効果があり、溶媒環境の記述が従来の連続誘電体モデルでは不十分であるためと考えられる。水分子をあらわに扱う分子動力学計算が必要であるが、これまで想定していた古典分子動力学計算では計算精度が不明である。そこで、第一原理分子動力学計算を実施すれば、これまでよりも水素結合相互作用を高精度に取り入れることができると

考えた。

本研究ではオキシシフェリンアニオンと64個の水分子の系に対するFPMD計算を実施した。図4に、FPMD計算から得られるオキシシフェリンアニオンの周囲に生成した水分子鎖のスナップショットを示す。図4に示すように、オキシシフェリンアニオンのエノール(enol)型やエノレート(enolate)型は、周囲の水分子によりベンズチアゾール環とチアゾリン環からなる面の左右に水分子鎖が生成する。この水分子鎖の影響により、エノール型やエノレート型は水溶液中でエネルギー的に安定化することがわかった。

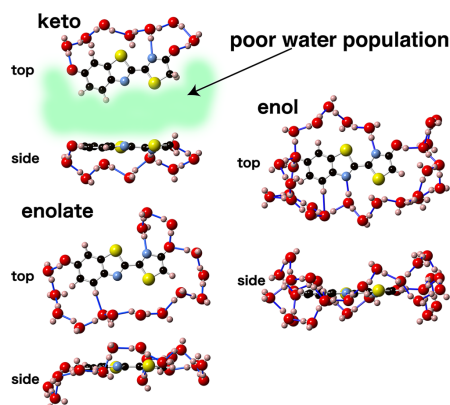


図4 オキシシフェリンアニオンの水溶液中におけるスナップショット
[主な発表論文等の雑誌論文3]

一方、図4に示すようにオキシシフェリンアニオンのケト(keto)型の場合は、一部にしか水分子鎖が生成されないという疎水的な水和構造になるため、水溶液中ではエネルギー的に不安定化することがわかった。すなわち、「水和によりケト型がエノール型に比べて不安定化する原因は、ケト型アニオンの疎水的な水和構造にある」と言える。

このような特殊な水和構造は、吸収スペクトルに反映されていると考えられる。そこで、水分子をあらわに含むケト型とエノール型のオキシシフェリンの分子動力学計算から得られる構造データから吸収スペクトルの形状を見積もることで、溶媒効果を調べた。

図5にGhoseらによる実験スペクトル(図5(a))・平成27年度に行ったFCF計算による吸収スペクトル(図5(b))・今回の理論吸収スペクトル(図5(c))を示す。図5から明らかのように、水分子をあらわに取り入れた今回の理論吸収スペクトルでは、エノール型とエノレート型だけでなく、ケト型の吸収スペクトルの幅も実験値と理論でよく一致した。連続誘電体モデルによるFCF計算の結果では、エノール型とエノレート型の吸収スペクトルの幅は実験値に近い値になるが、ケト型の場合は明らかに実験値よりも小さくなった。このことを考慮すると、今回水分子をあらわに取り入れた構造を用いることで、ケト型の水和構造が再現されたため、このような一致

が得られたと考えられる。これらの結果からスペクトル形状の元となる要因について分解して考えることができる。スペクトルのピークシフトには「疎水性が互変異性体で異なること」が反映されており、スペクトル幅には「水和の動的揺らぎは互変異性体で差があること」がわかった。

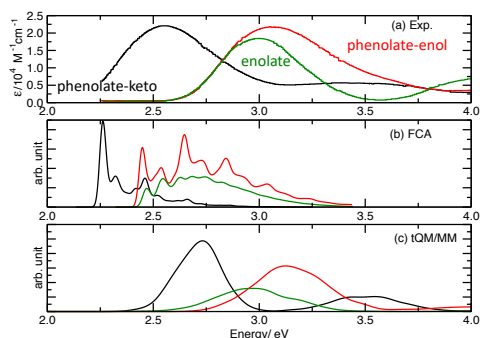


図5: 吸収スペクトル (a) 実験 (b) FCA 近似による理論吸収スペクトル (c) FPMD 計算結果を用いた理論吸収スペクトル [主な発表論文等の雑誌論文 1]

今回の結果は、ホタル生物発光の発光体であるオキシルシフェリンアニオン異性体という特定の化学種の水和問題に着目した結果となっている。しかし、このオキシルシフェリンアニオン異性体がベンゼン環・ヒドロキシ基・ケト基など、有機分子の典型的な置換基を持つ化学種であることを考慮すれば、本研究で用いた計算方法と分析方法は他の有機分子に対してもその水和効果の解析に有効であると言える。

今回の研究では、特に「化学種の疎水性の影響がスペクトル形状に現れる」という、これまで着目されていなかった新しい関係が明らかになった。これらの研究成果について投稿論文 6 件、図書 1 件、招待講演 5 件を含む 21 件の学会発表を行うことができた。

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 6 件)

- ① Miyabi Hiyama, Motoyuki Shiga, Nobuaki Koga, Osamu Sugino, Hidefumi Akiyama, Yoshifumi Noguchi, The effect of dynamical fluctuations of hydration structures on the absorption spectra of oxyluciferin anions in an aqueous solution. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 査読有, Vol.19, Issue 15, 2017, 10028-10035, DOI: 10.1039/c7cp01067b.
- ② Miyabi Hiyama, Hidefumi Akiyama, Nobuaki Koga, Theoretical insights

into the effect of pH values on oxidation processes in the emission of firefly luciferin in aqueous solution. *Luminescence: The Journal of Biological and Chemical Luminescence*, 査読有, Vol.32, Issue 6, 2017, 1100-1108, DOI: 10.1002/bio.3308.

- ③ Yoshifumi Noguchi, Miyabi Hiyama, Motoyuki Shiga, Osamu Sugino, Hidefumi Akiyama, Reverse Stability of Oxyluciferin Isomers in Aqueous Solutions. *J. Phys. Chem. B*, 査読有, Vol.120, Issue 34, 2016, 8776-8783, DOI: 10.1021/acs.jpcc.6B04963.
- ④ Miyabi Hiyama, Yoshifumi Noguchi, Hidefumi Akiyama, Kenta Yamada, Nobuaki Koga, Vibronic structures in absorption and fluorescence spectra of firefly oxyluciferin in aqueous solutions, *Photochem. Photobiol.* 査読有, Vol.91, issue 4, 2015, 819-827, DOI: 10.1111/php.12463.
- ⑤ Miyabi Hiyama, Hidefumi Akiyama, Toshimitsu Mochizuki, Nobuaki Koga, Analysis of Oxyluciferin Photoluminescence Pathways in Aqueous Solutions. *Photochem. Photobiol.*, 査読有, Vol.91, Issue 1, 2015, 74-83, DOI: doi.org/10.1111/php.12370
- ⑥ Yoshifumi Noguchi, Miyabi Hiyama, Hidefumi Akiyama, Yoshihisa Harada, and Nobuaki Koga, First-Principles Investigation of Strong Excitation Effects in Oxygen 1s X-Ray Absorption Spectra, *J. Chem.Theo.Comp.*, 査読有, Vol.11, No. 4, 2015, 1668-1673, DOI: 10.1021/acs.jctc.5b00082.

[学会発表] (計 21 件)

- ① Miyabi Hiyama, Hidefumi Akiyama, Nobuaki Koga, pH dependence of oxidation reaction pathway of firefly luciferin., The 55th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, 2017.
- ② 薄倉淳子, 樋山みやび, 倉田麻貴, 挾間優治, Xingping Qiu, Francoise Winnik, 古賀伸明, 秋山英文, 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. 第 11 回分子科学討論会, 2017.
- ③ 樋山みやび, 野口良史, 志賀基之, 杉野修, 秋山英文, 古賀伸明, 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. 第 11 回

- 分子科学討論, 2017
- ④ 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, GRRM 法による水溶液中ケージドルシフェリンの構造探索. シンポジウム「化学反応経路探索のニューフロンティア」2017.
- ⑤ Miyabi Hiyama, Yoshifumi Noguchi, Motoyuki Shiga, Osamu Sugino, Hidefumi Akiyama, Nobuaki Koga, Instantaneous absorption spectra of firefly oxyluciferin using the first principle molecular dynamics simulations. 11th Triennial Congress of the World Association of Theoretical and Computational Chemists, 2017.
- ⑥ Nobuaki Koga, Miyabi Hiyama, Yoshifumi Noguchi, Motoyuki Shiga, Osamu Sugino, Hidefumi Akiyama, Effects of water solvation on absorption spectra of firefly oxyluciferin, The 28th International Conference on Photochemistry, 2017.
- ⑦ 野口良史, 樋山みやび, 志賀基之, 杉野修, 秋山英文, 水溶液中のオキシルシフェリン異性体の安定性, 第 30 回分子シミュレーション討論会, 2016.
- ⑧ 樋山みやび, 秋山英文, 古賀伸明, ホタルルシフェリン酸化反応経路の理論的研究, 第 10 回分子科学討論会, 2016.
- ⑨ Miyabi Hiyama, Yoshifumi Noguchi, Hidefumi Akiyama Kenta Yamada, Nobuaki Koga, Hydration effects on absorption and fluorescence spectra of firefly oxyluciferin, The 54rd Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, 2016.
- ⑩ Yoshifumi Noguchi, Miyabi Hiyama, Motoyuki Shiga, Osamu Sugino, Hidefumi Akiyama, Stability of keto-, enol-, enolate-type oxyluciferin anions in aqueous solutions" 19th International Symposium on Bioluminescence and Chemiluminescence, 2016.
- ⑪ Miyabi Hiyama, Yoshifumi Noguchi, Kenta Yamada, Hidefumi Akiyama, Nobuaki Koga, Effects of vibronic transitions and water solvation on absorption and fluorescence spectra of firefly oxyluciferin, 19th International Symposium on Bioluminescence and Chemiluminescence 2016 (招待講演).
- ⑫ Miyabi Hiyama, Yoshifumi Noguchi, Toshimitsu Michizuki, Kenta Yamada, Hidefumi Akiyama, Nobuaki Koga, Theoretical study for photoluminescence of firefly-bioluminescence-related molecules, THE INTERNATIONAL CHEMICAL CONGRESS OF PACIFIC BASIN SOCIETIES, 2015, (招待講演).
- ⑬ Yoshifumi Noguchi, Miyabi Hiyama, Hidefumi Akiyama, Yoshihisa Harada, and Nobuaki Koga, All-electron first-principles X-ray adsorption spectra calculations for acetone and acetic acid. Physical, THE INTERNATIONAL CHEMICAL CONGRESS OF PACIFIC BASIN SOCIETIES, 2015.
- ⑭ 樋山みやび, ホタル生物発光の量子化学計算と反応機構」量子化学探索研究所講演会 2015, (招待講演).
- ⑮ 樋山みやび, 生物発光における量子化学計算」第 3 回津田沼 RBK フォーラム, 2015 (招待講演).
- ⑯ 樋山みやび「生物発光における分子科学」原子衝突学会第 40 回年会 2015, (招待講演).
- ⑰ 倉田麻貴, 樋山みやび, 挟間優治, 東暉舜, 吉田正裕, 望月敏光, 秋山英文, "生物発光の光制御に向けたケージド・ルシフェリンの分光評価" 第 9 回分子科学討論会, 2015.
- ⑱ 樋山みやび, 野口良史, 秋山英文, 山田健太, 古賀伸明, 水溶液中オキシルシフェリンの吸収・蛍光スペクトルにおける振電構造の解析, 第 9 回分子科学討論会, 2015.
- ⑲ 挟間優治, 東暉舜, 倉田麻貴, 樋山みやび, 吉田正裕, 久保田英博, 井上敏, 秋山英文, イクオリン生物発光の量子収率測定, 日本物理学会 2015 年秋季大会, 2015.
- ⑳ Miyabi Hiyama, Toshimitsu Mochizuki, Hidefumi Akiyama, Nobuaki Koga "Analysis of Photoluminescence Pathways of Firefly Oxyluciferin in Aqueous Solution" The 53rd Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, 2015.
- 21 樋山みやび, 野口良史, 望月敏光, 秋山英文, 古賀伸明, オキシルシフェリン光ルミネッセンスにおける発光反応経路と振動構造, 物性研究所短期研究会 機能物性融合科学研究会シリーズ (3)「反応と輸送」, 2015.

[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

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()