

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 28 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2010～2013

課題番号：22685003

研究課題名(和文)タンパク内で起こる協同的プロトン・電子移動反応の量子論的解析

研究課題名(英文)Quantum chemical studies on a cooperative proton and electron transfer reaction in protein

研究代表者

重田 育照 (Shigeta, Yasuteru)

大阪大学・基礎工学研究科・准教授

研究者番号：80376483

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,800,000円、(間接経費) 4,740,000円

研究成果の概要(和文)：生体内エネルギー変換を司るタンパク質であるチトクロム酸化酵素に関して量子論に基づく解析を行った。特にD経路とよばれるプロトン輸送経路の入り口付近のエナジェティクスとダイナミクスを解析し、(1)タンパク質環境がプロトン輸送のポテンシャルを平坦化しているため少ないエネルギーで輸送可能なこと、(2)His側鎖の回転によってポテンシャルのバランスがD経路内側に水素を運ぶ方向に傾くことでプロトン輸送を不可逆にすることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In this project, we have investigated a proton pumping mechanism of a cytochrom c oxidase, which is a fundamental enzyme for the biological energy transduction, on the basis of quantum mechanics. In particular, we have analyzed the energetics and dynamics of protons in D-pathway, which is one of proton pumping pathways, and found that (1) energy barrier for the pumped proton becomes less due to protein environment in comparison with gas phase environment (2) a rotation of His residue at the D-pathway prevent the backward flow of the proton.

研究分野：理論化学

科研費の分科・細目：基礎化学・物理化学

キーワード：量子力学 電子移動 水素移動 集団運動 PCET

1. 研究開始当初の背景

タンパク質内では、合成反応・分解反応・酸化還元反応等々、様々な化学反応が温和な条件下で起こり、その精緻な組み合わせにより生命の活動が維持されている。つまり、生命現象の本質はタンパク質が駆動する一連の化学反応であると言える。その反応機構の原子レベルで解明するためには、タンパク質の立体構造、特に、活性中心を構成するアミノ酸残基や水分子、補因子の役割を理論的に明らかにすることが必要である。その上で、従来の生化学的・分子生物学的方法による機能研究の知見と照らし合わせることにより、タンパク質のもつ固有の機能が解明される。

プロトン結合電子移動は、生体内のエネルギー変換機構として非常に重要な現象である。シトクロム *c* 酸化酵素の活性中心への電子供給は、プロトン濃度の低いネガティブサイドからのプロトン輸送と協役して起こる。さらにこの酵素では、酸化還元反応の余剰エネルギーを利用するプロトンポンプや、活性中心の酵素反応なども、何らかの形で電子状態変化とプロトン移動が関与しており、物理化学の手法でもってこの酵素の機能を理解することは、生物学的に見ても化学的に見ても、極めて重要な課題であった。

2. 研究の目的

本研究課題の目的は、量子論に基づくタンパク質内プロトン結合電子移動反応機構の解析である。ターゲットは、生体内エネルギー変換を司る巨大膜タンパクであるチトクロム酸化酵素である。このタンパクには3つのプロトン輸送経路(D, H, K 経路)があり、どの経路がプロトンポンプを担うのか? は実験的にもまだ論争中であり、定量的で信頼できる理論解析が望まれている。本研究課題では、プロトン・電子輸送を伴うチトクロム酸化酵素をターゲットとし、近年我々が提唱している準量子キミュラント動力学理論(QCD)および、Car-Parrinello分子動力学法(CPMD)法に基づく反応解析を行うことを目的としている。また、タンパク質のプロトン化状態や荷電状態は、タンパク質環境によって孤立した変化をすることから、実験でしばしば測定される pK_a や標準水素電極電位を高精度に計算する手法の開発も併せて行う。

3. 研究の方法

局所的なアミノ酸残基配置とプロトンポンプ機能の関係を明らかにすることを目的として、完全酸化(Oxidized)・還元(Reduced)状態の各々の構造に対し、D経路入り口付近のプロトン移動経路とそのエナジェティクスを解析し、機能との相関を、密度汎関数理論に基づくCar-Parrinello分子動力学法(CPMD)

QCD理論に基づく量子ダイナミクスにより明らかにする。

また、この系では複数のプロトン移動サイトや電子移動サイトである $\text{H}_{\text{M}a}$ や反応サイトである $\text{H}_{\text{M}a3}\text{-Cu}_B$ などが存在する。しかしながら、量子化学計算において、個々の pK_a や酸化還元電位を計算する事は困難であった。本研究課題においてプロトン移動や酸化還元反応解析をする手法として、 pK_a や標準水素電極電位の効率的計算法の開発を行う。

4. 研究成果

本研究課題では、量子論に基づくタンパク内プロトン結合電子移動反応機構の解析のため、以下の4つの研究を行った。その成果は、論文30報、招待講演16件、著作2件として報告している。以下に、本科学研究費補助金の支援の元に行われた、個別の研究成果に関して説明する。

1. チトクロム*c*酸化酵素のプロトンポンプ機構の解析

チトクロム酸化酵素は呼吸鎖の末端に位置する巨大な膜タンパク質であり、その役割は、酸素を還元し、水へと変換する。その際、チトクロム *c* から4電子を受け取る反応と同時に、プロトン濃度の低いネガティブサイドから濃度の高いポジティブサイドへと、プロトン濃度勾配に逆らって4つのプロトンをくみ上げる。酸化還元反応に伴って、D経路の入り口のヒスチジン(His)残基が回転することが実験により明らかとなっており、この運動がプロトンポンプに関わっていることが予測される。この His はアスパラギン酸(Asp)残基と共に His-Asp ダイアドを形成しているが、その間には水分子が挿入されており、これらがどの様にプロトンポンプ機能と結びついているのかは明らかにされていなかった。本研究では、密度汎関数法(HCTH汎関数、擬ポテンシャル、平面波基底法)に基づく安定構造解析、および、CPMD法を用いた反応経路解析により、D経路入り口付近のプロトン移動経路とそのエナジェティクスを解析し、(1)タンパク質環境がプロトン輸送のポテンシャルを平坦化しているため少ないエネルギーで輸送可能なこと(Energy compensation mechanism)(2)回転によってポテンシャルのバランスがD経路内側に水素を運ぶ方向に傾くことでプロトン輸送を不可逆にすること(Redox reaction-induced pump)を明らかにした。

2. QCD法の開発

原子核は電子に比べて非常に重いため量子性が比較的弱く、ほとんどの場合、古典的な

運動方程式でその運動が記述される。しかし、プロトンはしばしば量子性が無視できないことから、プロトンに対する量子効果を取り込む理論が必要となる。本研究では、Heisenbergの運動方程式から導かれる、古典力学を1次近似とする一般的な階層方程式を導出し、その2次近似をプロトン移動反応に適用した。また、本手法を統計力学理論へ展開し、熱ゆらぎに対する同様の方程式を導出し、モデル系へと適用した。

3. pKaの高精度計算法

プロトンはDNAやタンパク質等の生体分子内での化学反応において重要な役割を果たしている。そのプロトンの存在を決める一つの要素が酸解離定数(pK_a)であり、その大小でアミノ酸がプロトンを持つか否かを決定している。一方、タンパク質等の生体分子内部のアミノ酸に関して酸解離定数を実験的に求めることは難しく、理論についても現状ではコストの問題に加えて、計算手法が十分ではなく精度が得られていない。我々はそれに対して、溶媒和モデルを用いることで、特定の官能基に関して pK_a 値の変化とギブスエネルギーの変化に線形関係があることを示した。本計算手法を用いて、小さなタンパク質のアミノ酸の側鎖の pK_a を高精度に算出する方法を確率した。

4. 標準水素電極電位の高精度計算法

遷移金属イオンを含む電子伝達タンパク質は構造や周りの環境に応じて電子伝達の性質、すなわち酸化還元電位を変化させることができる。そのような効果を検証する一つの手法として、量子化学計算に基づいた正確な電位の計算手法の確立が求められている。しかしながら、密度汎関数法を用いた金属錯体の電位計算においては(1)電位の零点となる標準水素電極(SHE)ポテンシャルの扱い、(2)溶媒和モデルによる大きい価数を持つ錯体の溶媒和エネルギーの算出が難しい、などの困難を伴うことから、これまでに正確な計算は多く報告されてこなかった。そこで本研究では、特に(2)の問題に対してカウンターイオンを擬似的に置き、その溶媒和エネルギーを補正する手法を提案した。本研究においては、Generalized-Born法に基づく補正式を提案し、 $M_1(\text{bpy})_3$ ($M_1=\text{Fe, Ru, Os}$) や $M_2(\text{mnt})_2$ ($M_2=\text{Ni, Pd, Pt}$)などの重金属を含む錯体の酸化還元電位も実験値と0.2 V以下の誤差で算出することに成功し、タンパク質内の補酵素などにも適用した。

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 30 件)

1. T. Baba, R. Harada, M. Nakano, Y. Shigeta, "On the induced-fit mechanism of substrate-enzyme binding structures of nylon-oligomer hydrolase", *J. Comp. Chem.* **35**, 1240-1247 (2014).
2. R. Harada, Y. Takano, Y. Shigeta, "Fluctuation Flooding Method (FFM) for accelerating conformational transitions of proteins", *J. Chem. Phys.* **140**, 125103 (2014).
3. K. Kamiya, T. Baba, M. Boero, T. Matsui, S. Negoro, Y. Shigeta, "A Nylon-oligomer Hydrolase Promoting Cleavage Reactions in Unnatural Amide Compounds", *J. Phys. Chem. Lett.* **5**, 1210-1216 (2014).
4. 馬場剛史、安東寛之、重田 育照、"第一原理 Meta-Dynamics 法、Blue Moon Ensemble法を用いた反応経路解析 (特集 反応経路探索)、アンサンブル：分子シミュレーション研究会会誌 16, Vol. 1, 36-41 (2014).
5. Y. Shigeta, "Cumulant mechanics : An explicit treatment for fluctuation on dynamics", 分子科学会アーカイブス (Review), *Mol. Sci.* **7**, Vol. 1, A0057 (2013).
6. 重田育照 "第一原理計算による生体内酵素反応の理論解析" 豊田研究報告, **66**, 103-104 (2013).
7. Y. Kitagawa, T. Matsui, Y. Nakanishi, Y. Shigeta, T. Kawakami, M. Okumura, K. Yamaguchi, "Theoretical studies of electronic structures, magnetic properties and electron conductivities of one-dimensional Ni_n ($n = 3, 5, 7$) complexes", *Dalton Trans.* **42**, 16200-16208 (2013).
8. K. Koyanagi, Y. Kita, Y. Shigeta, M. Tachikawa, "Binding of a positron to nucleic-acid base molecules and their pairs", *ChemPhysChem.* **14**, 3458-3462 (2013).
9. T. Inui, Y. Shigeta, K. Okuno, T. Baba, R. Kishi, M. Nakano, "Finite-Field Method with Unbiased Polarizable Continuum Model for Evaluation of the Second Hyperpolarizability of an Open-Shell Singlet Molecule in Solvents", *J. Comp. Chem.* **34**, 2345-2352 (2013).
10. K. Okuno, Y. Shigeta, R. Kishi, M. Nakano, "Non-empirical tuning of CAM-B3LYP functional in time-dependent density functional theory for excitation energies of diarylethene derivatives", *Chem. Phys. Lett.* **585**, 201-206 (2013).

11. K. Okuno, Y. Shigeta, R. Kishi, M. Nakano, "Photochromic Switching of Diradical Character: Design of Efficient Nonlinear Optical Switches", *J. Phys. Chem. Lett.* **4**, 2418-2422 (2013).
12. T. Matsui, Y. Kitagawa, Y. Shigeta, M. Okumura, "A Density Functional Theory Based Protocol to Compute the Redox Potential of Transition Metal Complex with the Correction of Pseudo-Counterion: General Theory and Applications", *J. Chem. Theor. Comp.* **9**, 2974-2980 (2013).
13. Y. Shigeta, T. Inui, T. Baba, K. Okuno, H. Kuwabara, R. Kishi, M. Nakano, "Qantal Cumulant Mechanics and Dynamics for Multi-Dimensional Quantum Many-Body Clusters", *International Journal of Quantum Chemistry*, **113**, 348-355 (2013).
14. T. Matsui, Y. Kitagawa, M. Okumura, Y. Shigeta, S. Sakaki, "Consistent Scheme for Computing Standard Hydrogen Electrode and Redox Potentials", *J. Comp. Chem.* **34**, 21-26 (2013).
15. Y. Takano, O. Okuyama, Y. Shigeta, H. Nakamura, "Density Functional Studies of the Structural Variety of the Cu₂S₂ Core of the Cu_A Site", *Int. J. Quantum Chem.* **112**, 3756-3762 (2012).
16. M. Kubo, O. Okuyama, T. Kitagawa, Y. Shigeta, "DFT Analysis of Low-Frequency Heme Vibrations in Soluble Guanylate Cyclase: Raman Mode Enhancement by Propionate-Protein Interactions", *Chem. Lett.* **41**, 860-862 (2012).
17. K. Okuno, Y. Shigeta, R. Kishi, H. Miyasaka, M. Nakano, "Tuned CAM-B3LYP Functional in the Time-Dependent Density Functional Theory Scheme for Excitation Energies and Properties of Diarylethene Derivatives", *J. Photochem. Photobio. A* **235**, 29-34 (2012).
18. K. Koizumi, Y. Shigeta, O. Okuyama, H. Nakamura, Y. Takano, "Coordination Effects on the Electronic Structure of the Cu_A Site of Cytochrome *c* Oxidase", *Chem. Phys. Lett.* **531**, 197-201 (2012).
19. K. Kamiya, T. Matsui, T. Sugimura, Y. Shigeta, "Theoretical Insight into Stereoselective Reaction Mechanisms of 2,4-Pentanediol-Tethered Ketene-Olefin [2+2] Cycloaddition", *J Phys. Chem. A* **116**, 1168-1175 (2012).
20. Y. Takano, Y. Shigeta, K. Koizumi, H. Nakamura, "Electronic Structures of the Cu₂S₂ Core of the Cu_A Site in Cytochrome *c* Oxidase and Nitronous Oxide Reductase", *Int. J. Quantum Chem.* **112**, 208-218 (2012).
21. T. Saito, S. Yamanaka, K. Kanda, H. Isobe, Y. Takano, Y. Shigeta, Y. Umena, K. Kawakami, J.-R. Shen, N. Kamiya, M. Okumura, M. Shoji, Y. Yoshioka, K. Yamaguchi, "Possible Mechanisms of Water Splitting Reaction Based on Proton and Electron Release Pathways Revealed for CaMn₄O₅ Cluster of PSII Refined to 1.9 Å X-Ray Resolution", *Int. J. Quantum Chem.* **112**, 253-276 (2012).
22. T. Matsui, T. Baba, K. Kamiya, Y. Shigeta, "An Accurate Density Functional Theory Based Estimation of pKa Values of Polar Residues Combined with Experimental Data: From Amino Acids to Minimal Proteins", *Phys. Chem. Chem. Phys.* **14**, 4181-4187 (2012).
23. K. Kamiya, Y. Shigeta, "First-principles Molecular Dynamics Studies on the Atomistic Behavior of His503 in Bovine Cytochrome *c* Oxidase", *Biochim. Biophys. Acta* **1807**, 1328-1335 (2011).
24. T. Matsui, H. Miyachi, T. Baba, Y. Shigeta, "A Theoretical Study on Reaction Scheme of Silver (I) Containing 5-Substituted Uracils Bridge Formation", *J Phys. Chem. A* **115**, 8504-10 (2011).
25. Y. Nakanishi, T. Matsui, Y. Kitagawa, Y. Shigeta, T. Saito, Y. Kataoka, T. Kawakami, M. Okumura, K. Yamaguchi, "Electron Conductivity in Modified Models of Artificial Meta-DNA Using Green's Function-Based Elastic Scattering Theory", *Bull. Chem. Soc. Jpn. (Selected Article)*, **84**, 366-375 (2011).
26. T. Baba, K. Kamiya, T. Matsui, N. Shibata, Y. Higuchi, T. Kobayashi, S. Negoro, Y. Shigeta, "Molecular Dynamics Studies on the Mutational Structures of a Nylon-6 Byproduct-Degrading Enzyme", *Chem. Phys. Lett.* **507**, 157-161 (2011).
27. T. Matsui, A. Oshiyama, Y. Shigeta, "A Simple Scheme for Estimating the pKa Values of 5-Substituted Uracils", *Chem. Phys. Lett.* **502**, 4-6, 248-252 (2011).
28. Y. Nakanishi, T. Matsui, Y. Shigeta, Y. Kitagawa, T. Saito, Y. Kataoka, T. Kawakami, M. Okumura, K. Yamaguchi, "Sequence-Dependent Proton-Transfer Reaction in Stacked GC Pair III: The Influence of Proton Transfer to Conductivity", *Int. J. Quantum Chem.* **110**, 2221-2230 (2010).
29. K. Kamiya, M. Boero, K. Shiraishi, A. Oshiyama, Y. Shigeta, "Energy Compensation Mechanism for Charge-Separated Protonation States in Aspartate-Histidine Amino Acid Residue Pairs", *J Phys. Chem. B* **114**, 6567-6578 (2010).
30. H. Miyachi, T. Matsui, Y. Shigeta, K. Hirao, "Effects of Mercury (II) on Structural Properties, Electronic Structure and UV Absorption Spectra of Thymine-Mercury(II)-Thymine Nucleobase Pair Containing Duplex", *Phys. Chem. Chem. Phys.* **12**, 909-917, (2010).

〔学会発表〕(計 16 件)

1. “Theoretical Studies on Reaction Mechanism of An Enzyme Cleaving Unnatural Amide Compound”, *Symposium on Molecular Science and Synthesis of Functional Molecules for Next Generation*, Mar. 10th-11th, Hiroshima, Japan.
2. “Quantum chemical studies for estimation of pKa and redox potential”, *World Congress on Petrochemistry and Chemical Engineering*, Nov. 17th-19th, San Antonio USA.
3. “構造ゆらぎと化学反応に関する理論的研究”、分子科学会奨励賞受賞講演、Sep. 24th-27th 2013、京都。
4. “Free Energy Analyses on Cluster Deformations by Cumulant Mechanics”, *8th Congress of the International Society for Theoretical Chemical Physics*, Aug. 25th-31st 2013, Budapest, Hungary.
5. “第一原理計算に基づく反応解析”、“宇宙生命計算科学連携拠点」ワークショップ、June 28th-29th 2013、筑波大学。
6. “量子化学計算によるタンパク質の物性および機能評価”、“第 13 回蛋白質科学会、ワークショップ “蛋白質機能を化学的に理解するために”、Jun 12th-14th 2013、とりぎん文化会館（鳥取）。
7. “第一原理計算に基づく反応解析”、“第 4 回神戸大学協定講座シンポジウム「計算生物学と材料科学の融合」”、Dec 19th 2012、神戸大学。
8. “生体内化学反応解析の基礎: 化学反応理解の為の古典・統計・量子力学”、“分子研量子化学冬の学校”、Dec 16th-17th、分子科学研究所。
9. “Theoretical Studies on Current-Voltage (I-V) Characteristics of Metal Containing Artificial DNA and Ni Complex Based Molecular Devices”, *2012 Workshop on Innovative Nanoscale Devices and Systems (WINDS)*, Dec. 2nd-7th 2012, Hapuna Beach Hotel, Hawaii, USA.
10. “Design of Nylon Oligomer Hydrolase on the Basis of Simulations”, *BIT's 3rd Symposium on Enzymes & Biocatalysis 2012*, Apr. 25th-28th 2012, Xian, China.
11. “First-principles Analysis on Proton Transport Pathways of Cytochrome c Oxidase”, *Asian International Symposium on Theoretical Chemistry 2012*, Mar. 26th 2012, Tokyo, Japan.
12. “First-principle Analyses on Reaction Mechanisms of Enzymes and Related Topics”, *International Conference of Computational Methods in Sciences and Engineering 2011*, Oct. 2nd-7th 2011, Halkidiki, Greece.
13. “Classical and Quantal Cumulant Dynamics”, *16th International Workshop*

on Quantum Systems in Chemistry and Physics, Sep 11th-17th 2011, Ishikawa, Japan.

14. “Classical Cumulant Dynamics”, *7th Congress of the International Society for Theoretical Chemical Physics*, Sep 2nd-7th 2011, Tokyo, Japan.
15. “Theoretical Study on Artificial and Mismatch DNA Bases”, *Symposium #5 Pacificchem 2010*, Dec. 14th-20th 2010, Hawaii, USA.
16. “Analyses of Bio-Molecular Reactions Based on First-Principles Calculations”、“*Frontier in reaction path theory*”、Sep. 12th 2010、福井謙一記念研究センター・京都大学。

〔図書〕(計 2 件)

1. Y. Shigeta, “Quantal Cumulant Mechanics as Extended Ehrenfest Theorem”, *Quantum Mechanics*, Chap. 17, InTech open (ISBN 980-953-307-945-0), (2013).
2. T. Matsui, H. Miyachi, Y. Shigeta, “Theoretical Studies on Metal-Containing Artificial DNA Bases”, *Advances in the Theory of Atomic and Molecular Systems, Conceptual and Computational Advances in Quantum Chemistry*, Chap. 25, 433-460, InTech open, (2012).

〔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
重田育照 (平成 22 年度～平成 25 年度)

研究者番号：80376483

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者
()

研究者番号：