

毒性予測を目指した α, β 不飽和カルボニル化合物と 生体分子モデルの量子化学計算

(国立環境研究所) ○古濱彩子、青木康展、白石寛明

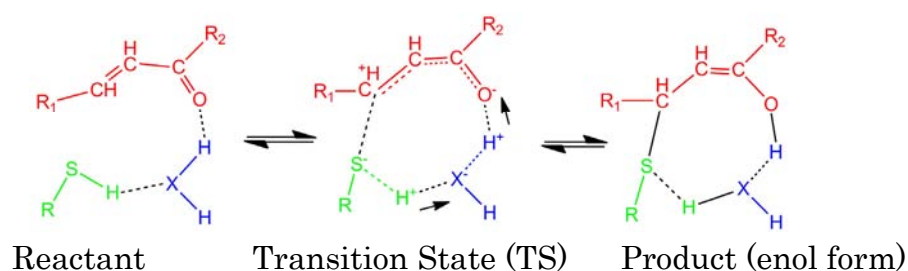
【序】魚類など環境中に棲息する生物への化学物質の影響評価には、生態毒性試験[1]の結果が用いられており、化学物質審査規制法における基準となっている。しかし、現実には化学物質は数万種類以上存在するため、すべての物質に対して試験を実施することは時間・コストの面で困難であり、毒性を構造から予測する定量的構造活性相関(QSAR)の開発がすすめられている[2]。QSARの実用化に向け予測性(predictivity)や頑健性(robustness)を改善するためには、化学物質と生体分子の間の反応機構に基づいた予測をすることが必要である。毒性予測の分野で量子化学計算の活用も進められてはいるが、反応経路や寄与する要因の解明は未発達な段階である。

近年、Shultzら[3]はシステインのチオール(SH)基を含む生体分子グルタチオン(GSH)と α, β 不飽和カルボニル基を含む化学物質の実験により、化学物質とGSHの反応速度と急性毒性の強さとの間に相関があることを示した。 α, β 不飽和カルボニル化合物は生体分子の求核部分とマイケル付加反応を起こし、毒性の発現に寄与すると考えられることから、GSHと化学物質の反応性による毒性予測法を提案した。また、Schwöbelら[4]は、QSARによるGSHと化学物質の反応速度の推算を、密度汎関数法で求めたCH₃SHと α, β 不飽和カルボニル化合物各1分子とのマイケル付加反応の活性化エネルギー等を記述子として提案した。

本研究では、反応で触媒の役割を果たす水分子に注目し、 α, β 不飽和カルボニル化合物と生体内の求核的な構造部分との反応過程に関する量子化学計算を行った。得られた活性化エネルギーや反応エネルギーと、生態毒性の指標である96時間魚類50%致死濃度(LC₅₀)の相関から、どのような反応機構が魚類への急性毒性の発現に寄与するのかを検討した。

【方法】Esterbauerらが示した生体内のSH基とアクロレインの反応経路[5]を基に、Scheme 1で示すような酸と塩基の役割をする物質(H₂X)を含む反応障壁の見積を行った。H₂Xは酸や塩基の役割をする分子であり、溶媒の水分子H₂Oやペプチド内のアミノ基などを想定した。また、求核剤RSHはタンパク質内のシステイン残基をモデル化しており、GSHやCH₃SHとして扱った。

Scheme 1 マイケル付加反応のモデル



GSHはX線構造 [6]を初期値としてエネルギー極小構造を求めた。図1で示した化学物質の三次元構造は、ソフトウェア CORINA で立ち上げた初期構造から量子化学計算によって決定した。Transition State (TS) 探索では、Scheme1で示した反応経路を仮定し、固有反応座標計算を基にエネルギー極小構造である反応物と生成物を

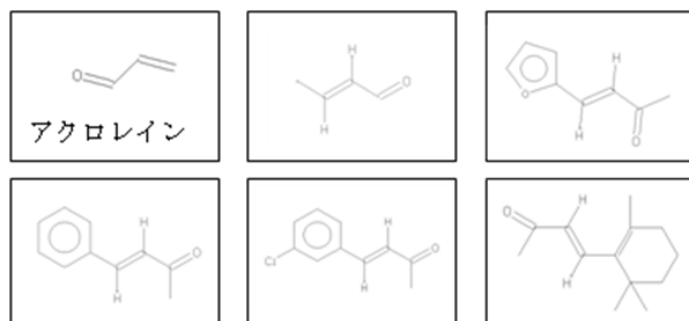


図1 計算対象とする α, β 不飽和カルボニル化合物

求めた。量子化学計算プログラム Gaussian03 および Gaussian09 によって、B3LYP/6-31G(d,p)法の計算を実施した。溶媒効果の見積もりには PCM 法を用いた。エネルギー値の評価の際には零点振動エネルギーの補正を行った。

【結果・考察】アクロレインと GSH の TS 検索を scheme 1 の H_2X 無しと H_2O (水分子) の場合の結果を比較した所、反応に水分子が関与すると反応障壁が低くなることが示された。次に図1の化合物と CH_3SH の TS 検索を水1分子が介した反応を仮定して計算を行った。図2で示すように、毒性値が高い(横軸の値が高い)ほど、遷移状態のエネルギー障壁や生成物の安定化エネルギーは低く、反応が進みやすいという関係があることがわかった。この結果は、毒性の高い分子ほど、反応が進みやすく、反応物が生成物よりも安定に存在することを示すものであり、GSHの反応速度と毒性の相関の実験結果 [3]の傾向と一致した。

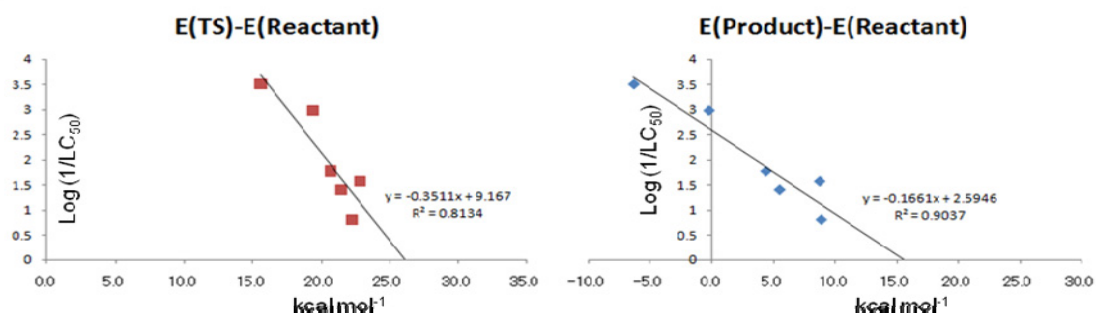


図2 魚類急性毒性値(96hr LC_{50})とエネルギー値の相関

昨年度の本討論会 [7]では、scheme 1 の H_2X が無い場合には毒性値が高いほど反応障壁が高くなる結果を報告した。以上から、実験で得られる反応速度を理論計算で予測するには、少なくとも露わな水1分子のプロトン移動反応を考慮に入れる生体分子モデルが必要である。

- [1] 化学物質の生態影響試験について <http://www.env.go.jp/chemi/sesaku/seitai.html> [2] OECD (Q)SAR project http://www.oecd.org/document/23/0,2340,en_2649_34373_33957015_1_1_1_1,00.html [3] T.W. Schultz, J.W. Yarbrough, E.L. Johnson, *SAR QSAR Environ. Res.*, **2005**, *16*, 313–322. [4] J.A.H. Schwöbel, S.J. Enoch, J. C. Madden, M.T.D. Cronin, *Workshop QSARs in Environ. Heal. Sci.*, **2010**, Montreal Canada (*SAR QSAR Environ. Res.* submitted.). [5] H. Esterbauer, R.J. Schaur, H. Zollner, *Free Rad. Bio. Med.*, **1991**, *11*, 81-128. [6] C.H. Gorbitz, *Chem. Biochem.*, **1987**, *41*, 362-366. [7]分子科学総合討論会 **2009**, 名古屋 **1P097**

衝突誘起解離における グリコシド結合の解裂機構 ：量子化学計算による解析

(地球快適化インスティテュート¹、三菱化学科学技術研究センター²、三菱化学生命科学研究所(MITILS)³)

○横島 智¹、Tatiana Romanova²、村上 明德²、大黒 周作³、蟹江 治³、中村 振一郎^{1,2}

The KAITEKI Institute, Inc.¹; Mitsubishi Chemical Group Science and Technology Research Center, INC.²; Mitsubishi Kagaku Institute of Life Sciences(MITILS)³

Satoshi Yokojima¹, Tatiana Romanova², Akinori Murakami², Shusaku Daikoku³, Osamu Kanie³, Shinichiro Nakamura^{1,2}

生体中に存在する糖鎖の中でも、たんぱく質を修飾している糖鎖は微量しか含まれていないことが多く、その構造決定は難しい。しかしながら、このような糖鎖は生体中において重要な役割をはたしており、その構造を決定出来るようになることが望まれている。他の構造決定手法に比べ、質量分析を用いた解析法は高い感度をもつことから、微量しか存在しない糖鎖の解析にむいている手法である。なかでも、衝突誘起解離を用いると、もとの構造を反映して分子の壊れかたが異なることから、糖鎖の構造決定に利用できると考えられる。実際、このことを確認する実験がおこなわれ、糖鎖の異なるアノマーに対して、異なる解離パターンが得られることが確認された[1]。したがって、質量分析を用いた衝突誘起解離による実験手法は、今後、糖鎖解析において非常に重要な方法になると考えられる。こうした実験に対応した理論的な理解も必要になってくる。

我々は、これらの実験の中でも図1に示したような Fuc- α (1-2')-Gal- β (1'-1)Oct (α -precursor) と Fuc- β (1-2')-Gal- β (1'-1)Oct (β -precursor) のパターンの違いに焦点をあて、四重極イオントラップ質量分析装置の中での衝突誘起解離において起きる現象について理論的に解析した。

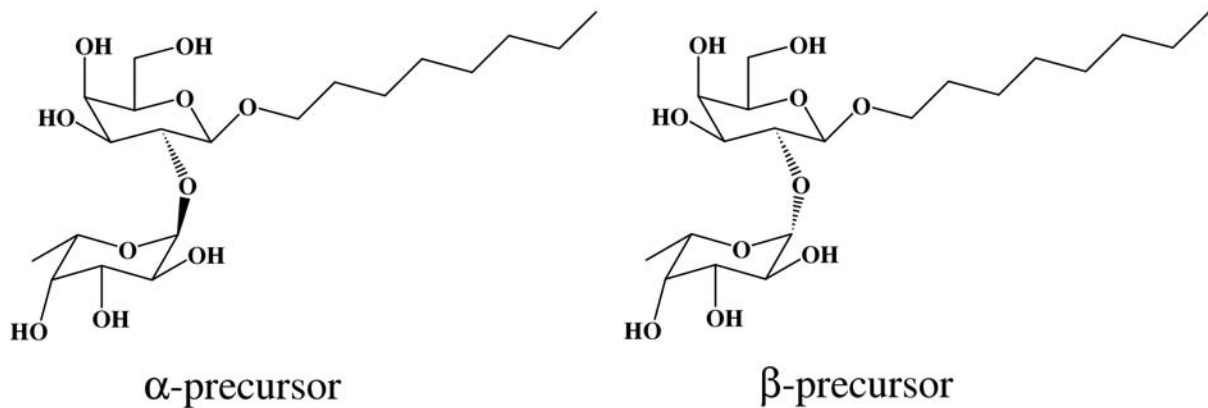


図 1: α -precursor と β -precursor の構造

実験では衝突誘起解離の際に α -precursor と β -precursor において2つの特徴的な違いが見られた。(1) α -precursor のほうが β -precursor に比べ、壊れるために必要なエネルギーが小さく、(2) β -precursor にしかあらわれない生成物が存在している。

本発表では、遷移状態に焦点を当てながら、こうした違いを量子化学計算を使った解析により説明していく。

参考文献

[1] S. Daikoku, T. Ako, R. Kato, I. Ohtsuka, and O. Kanie, *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* **18** (2007) 1873.

アミノ酸が赤く光る，光らせる

((株)日本アプライドテクノロジー¹, 東農工大院BASE²) 石井 浩¹, 佐藤 親弘¹,

山田 太志², 関根 正彦², ○中田 宗隆²

【序】 これまでに，われわれは微弱な化学発光を強度ではなく，スペクトルとして観測するフーリエ変換型発光分光分析装置を開発し，過酸化水素の分解によって生じる一重項酸素が関与する発光メカニズムの解明などに応用してきた[1]．本研究では，20種類のアミノ酸の熱ルミネッセンスを測定し，酸素中のリシン (Lys) から約 600 nm の赤い発光が最も強く観測されることを見出した．そこで，アミノ基と酸素との相互作用に着目し，Lys の塩酸塩やジシクロヘキシルアミン塩などについて同様の実験を行い，その発光メカニズムについて考察したので報告する[2]．

【実験】 固体のアミノ酸を直径 20 mm のアルミ製の皿に入れ，窒素あるいは酸素雰囲気下で 180℃ に加熱した．熱ルミネッセンススペクトルは日本アプライドテクノロジー社製の FT-CL-8310 で測定した[3]．積算時間は約 1 分である．アミノ酸のジシクロヘキシルアミン (DCHA) 塩は DCHA のアセトン溶液とアミノ酸水溶液を混合した後に溶媒を溜去し，乾燥させて得た．

【結果と考察】 固体の Lys を試料として，窒素中で 180℃ に加熱したときには，熱ルミネッセンスはまったく観測されなかった (図 1 (a))．そこで，窒素を酸素に変えたところ，約 600 nm を最大強度とする熱ルミネッセンススペクトルが観測された (図 1 (b))．この結果より，リシンの発光には酸素が関与していることを確認できた．しかし，Lys 以外のアミノ酸では，アスパラギン (Asn) とアルギニン (Arg) がわずかに発光を示すだけで (強度は Lys の 30 分の 1 以下)，そのほかのアミノ酸はまったく発光を示さなかったことから，Lys の側鎖 (アミノ基) が発光に関与すると考えられた．そこで，Lys の塩酸塩について同様の実験を行ったところ，窒素中でも酸素中でも発光を示さないことがわかった．したがって，Lys の発光には酸素のほかに側鎖のフリーの NH₂ 基が関与していることを確認できた．

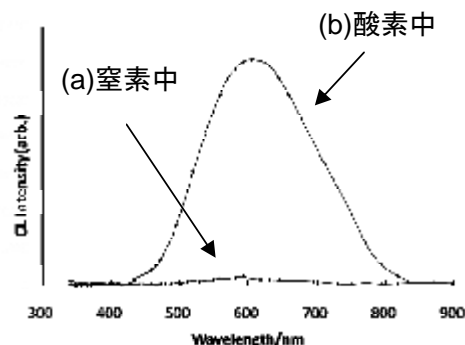
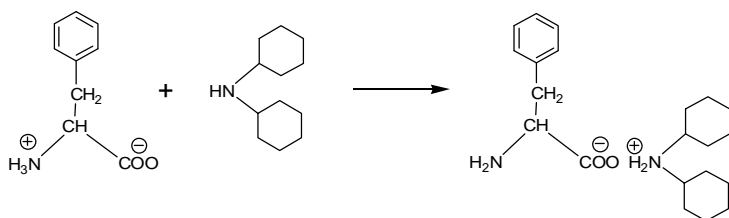


図 1 Lys の熱ルミネッセンススペクトル

以上の推論が正しければ，酸素とフリーのアミノ基があれば Lys と同様の発光を示す可能性がある．そこで，窒素中でも酸素中でも発光を示さなかったフェニルアラニン (Phe) について，以下のような考察と実験を行った．Phe は NH₂ 基と COOH 基を持っているが，固体試料中では両性イオンとなって分子間イオン結合をしているために，フリーの NH₂ 基を持っていない．そこで，Scheme 1 にしたがって，Phe の DCHA 塩を合成して熱ルミネッセンスの測定を行った．



Scheme 1

第 2 級アミンの DCHA は第 1 級アミンの Phe よりも塩基性が強いので、プロトンを奪ってイオンとなり、Phe の COO^- 基とイオン結合をするために、Phe にはフリーの NH_2 基が生成する。実際に、Phe の DCHA 塩の熱ルミネッセンスを測定したところ、図 2 (a) のようなスペクトルを測定することができた。なお、発光の最大強度波長は Lys の場合と異なり、約 660 nm であった。

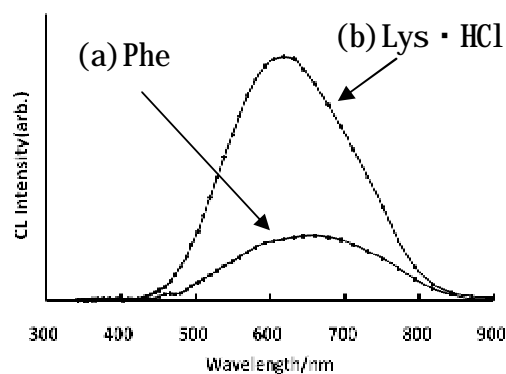
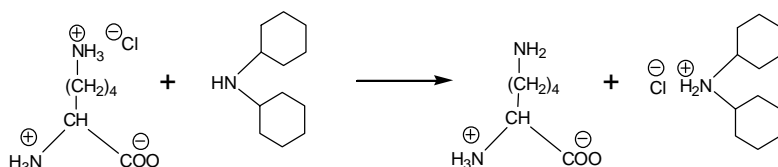


図 2 DCHA 処理後の熱ルミネッセンススペクトル

次に、窒素中でも酸素中でも発光を示さない Lys 塩酸塩の DCHA 塩の調製を試みた。Lys 塩酸塩の場合には、Phe と異なり、2 種類の NH_3^+ 基がある。

しかし、HCl が強酸であり、DCHA の塩基性が Lys よりも強いので、DCHA の塩酸塩が生成する (Scheme 2)。すなわち、Lys の側鎖にフリーの NH_2 基が生成すると考えられる。



Scheme 2

実際に、DCHA で処理したあとの Lys 塩酸塩の熱ルミネッセンスを測定すると、図 2 (b) のスペクトルが得られた。このスペクトルは 600 nm に最大強度波長をもち、Lys そのもののスペクトル (図 1 (a)) とほぼ一致した。したがって、Phe と異なり、Lys では DCHA 処理によって側鎖の NH_2 基がフリーになったと考えられる。

側鎖に NH_2 基を持つアミノ酸としては Asn, Arg, グルタミン (Gln) がある。上記の考察から、これらのアミノ酸も Lys と同様に酸素中で熱ルミネッセンスを示す可能性がある。実際に Asn と Arg は Lys よりも弱いけれども発光を示した。発光強度が弱くなった理由として、Asn は NH_2 基の隣に $\text{C}=\text{O}$ 基があり、また、Arg は NH_2 基の隣に $\text{C}=\text{NH}$ 基があり、フリーの NH_2 基の孤立電子対との間でいくらかの共役系をつくり、酸素との相互作用が弱くなったためであると考えられる。また、Gln は 180°C で熱分解したために、熱ルミネッセンススペクトルを観測することができなかった。以上のように、アミノ酸を DCHA で処理すると熱ルミネッセンスが観測され、そのスペクトルが異なることがわかり、新たなアミノ酸分析法としての応用が期待できる。

[1] H. Ishii et al., *Chem. Phys. Lett.*, **474**, 285 (2009); [2] H. Ishii et al., *Chem. Phys. Lett.*, in press (2010); [3] K. Tsukino et al., *Chem. Phys. Lett.*, **457**, 444 (2008).

光化学反応をトリガとするタンパク質の結晶化の機構

(群馬大院工¹・さががけ²) ○奥津哲夫^{1,2}, 田口徹¹, 高瀬裕太¹, 堀内宏明¹, 平塚浩士¹

【序】我々はタンパク質溶液に光を当てると、タンパク質の結晶が出現しやすくなるという現象を見だし、その機構を明らかにしてきた。¹⁾本討論会では、アミノ酸残基レベルでタンパク質の反応を明らかにし、結晶化促進の機構を考察した。

Fig. 1 に結晶成長の初期過程を示す。溶液が過飽和状態であっても臨界核以下の大きさのクラスターは表面自由エネルギー不利のため不安定である。もっとも不安定なのは $n=2$ の二量体である。光化学反応でタンパク質の共有結合性ダイマーが生成する。このダイマーは安定であるので、これが臨界核に成長し結晶化が促進されると考えている。モノマーから出発する場合と、ダイマーから出発する場合では、臨界核形成頻度が 10^7 倍大きくなることがわかっている。

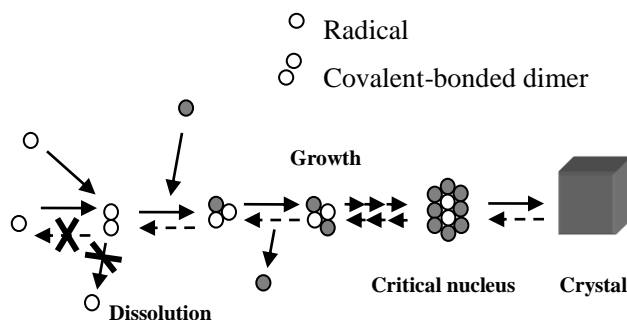


Fig. 1 Light-induced nucleation mechanism of protein. Photochemical product, protein dimer, behaves as smallest cluster. The photochemical dimer is stable and the nucleation is accelerated.

一方、反応で生成したダイマーが結晶中の隣り合う二つの分子と似た構造をとるならば、結晶へと成長できると考えられるが、反応でどのようなダイマーが生成するのか今までわからなかった。反応で生成したダイマーのうち結晶に成長できるダイマーを良いダイマー、成長できないダイマーをダメダイマーと呼んできたが、本研究では良い/ダメダイマーの構造をアミノ酸の反応性で調べることにした。

タンパク質として、ニワトリ卵白リゾチームを用い、反応中間体として生じたアミノ酸のラジカルが、他のどのアミノ酸と反応するのか過渡吸収法を用いて調べた。その結果、リゾチームの場合、53番の Tyr 残基同士が結合したダイマーが結晶中の隣り合う二つの分子とよく似た構造をとるために結晶化が促進されることが明らかとなった。この考察から、反応で生じたダイマーの構造が結晶中の構造と似たのは偶然であることがわかった。このため、偶然に頼ることなく結晶化を促進させるダイマーを積極的に作り出す検討も始めた。

【実験】過渡吸収法はナノ秒過渡吸収法を用いた。タンパク質としてニワトリ卵白リゾチーム（生化学工業6回再結晶品）を用いた。最初にタンパク質の光化学反応中間体として生成する Trp および Tyr のラジカルを生成させ、20種類のアミノ酸のうちどれがスカベンジャーとなり得るか調べた。次に、リゾチームの反応中間体を生成させスカベンジャーとなるアミノ酸を加えてラジカルの寿命を調べた。これらの結果から、タンパクの光化学反応中間体が他のタンパクのどの部分と結合するのか、その結果得

られるダイマーの構造はどのような形か検討した。

【結果と考察】Trp 溶液にアミノ酸を加え Trp ラジカルの減衰を観測したところ、Trp ラジカルは Trp および Tyr のみと反応することが明らかとなった。Trp 残基同士が結合してダイマーが形成される時は結晶核になり得ないことがわかっている。Trp 残基のラジカルは Trp と反応して Tyr のラジカルを生じることが判明した。次に Tyr のラジカルを生成させ、20 種類のアミノ酸を加えていった。その結果、Tyr のラジカルは Tyr ともっともよく反応することが明らかとなった。つまり、タンパク質は光励起されて Tyr 残基同士が結合して二量体を作る可能性が高いことがわかってきた。リゾチームは、放射線化学反応で Tyr 残基同士が結合したダイマーを形成することが報告されている。²⁾ リゾチームでは表面に存在する Tyr 残基は 20, 23, 53 番目にある。これらが結合してできるダイマーの構造は 6 通りである。Fig. 2 に構造を示した。このうち、Tyr⁵³-Tyr⁵³ 同士でダイマーを形成したときの構造が結晶中の隣り合う二つの分子と同じ構造をとることが判明した。この構造が良いダイマーであり、他のものはダメダイマーである。本研究ではリゾチームをもちいて構造を検討したが、アミノ酸レベルの反応様式はタンパク質に共通であり、Tyr 残基同士が反応してダイマーを形成すると思われる。このとき生じたダイマーが結晶中で隣り合う二つの分子と同じ配置をとったことはリゾチームの場合偶然の出来事である。他の分子でも同じことが起こるとは限らない。また、Tyr 残基が表面に出ていないタンパクではダイマーを生成しないこともある。多様な構造のダイマーを生成させる方法を現在検討中である。

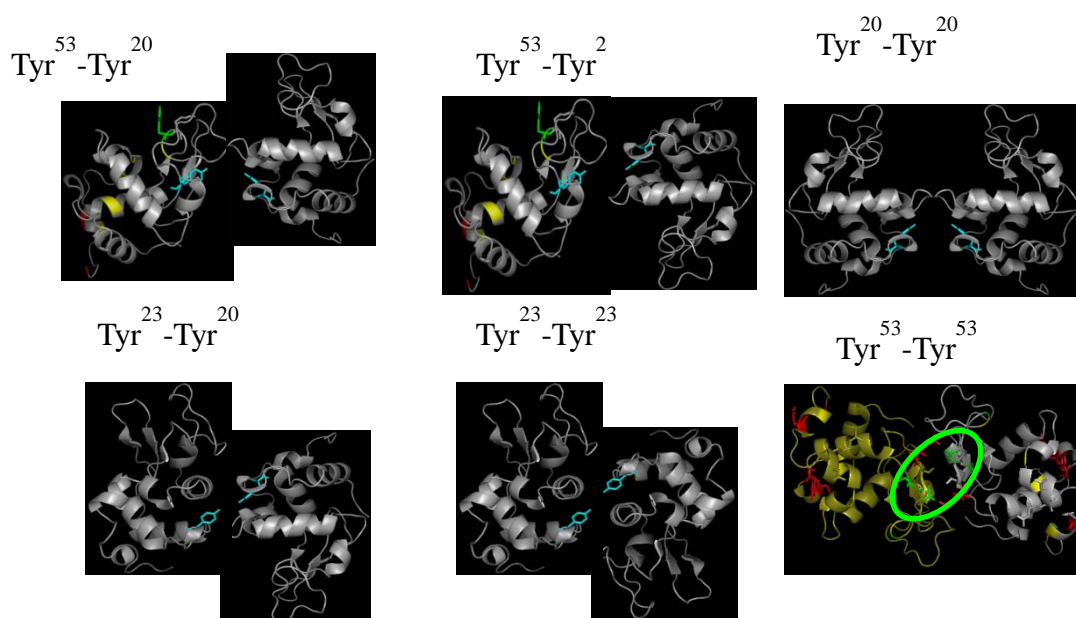


Fig. 2 Conformations of lysozyme dimers which are expected to be produced by photochemical reaction. The dimer bound at Tyr⁵³-Tyr⁵³ residues has an identical configuration to the neighbor two molecules in crystal.

- 1) T. Okutsu *J. Photochem. Photobiol. C: Photochemistry Reviews*, **8**, 143-155 (2008).
- 2) S. Hashimoto, *INT. J. RADIAT. BIOL.*, **41**, 303 (1982).

呼吸鎖複合体 I における電子トンネル移動

(University of California, Davis) ○林 友將, Alexei Stuchebrukhov

【序】呼吸鎖複合体 I (NADH:quinone oxidoreductase) は、ミトコンドリア内膜上で電子伝達系の入り口を構成し、電子を NADH から補酵素 Q へ 90Å にわたり転移させると同時に、その余剰エネルギーを用いることで ATP 合成に必要な膜内外のプロトン濃度勾配を発生させる。近年 Sazanov らにより結晶構造が報告されたが¹、電子移動の原子レベルでのメカニズムは未だ明らかではない。本研究では、FMN および 7 つの鉄硫黄クラスター (N3, N1b, N4, N5, N6a, N6b, N2) に沿った電子トンネル移動経路、電子移動速度定数を計算により求め、関与するタンパク質残基、タンパク質内部の水の役割について検討した。

【計算】計算は、鉄硫黄クラスター間の電子トンネル移動各ステップについて、始状態、終状態に対応する Broken-Symmetry 状態を非制限 ZINDO レベルで取り扱い、双直交化された多電子波動関数を用いてトンネル電子およびその他電子の分極効果を考慮した。トンネル電流密度は

$$\vec{J}(r) = -i \langle A | \hat{j}(r) | D \rangle$$

により得られ、電子トンネル行列要素は、ドナー、アクセプターを区切る平面を横切る全電流に等しい²。

$$T_{DA} = -\hbar \int (d\vec{s} \cdot \vec{J})$$

速度定数は Marcus 理論により求めた。

【結果と考察】FMN から N2 までの電子トンネル移動経路の計算結果を図1に示す。赤の色強度はトンネル電子がその原子を通過する相対的確率を表す。個々の鉄硫黄クラスターペア間の電子トンネル移動には、2つのシステイン配位子および1つの Mediator 残基を含む最大3つのタンパク質残基 (Key Residues) が寄与することがわかった (表1)。多くの鉄硫黄クラスターペアにおいて、2つのシステイン配位子

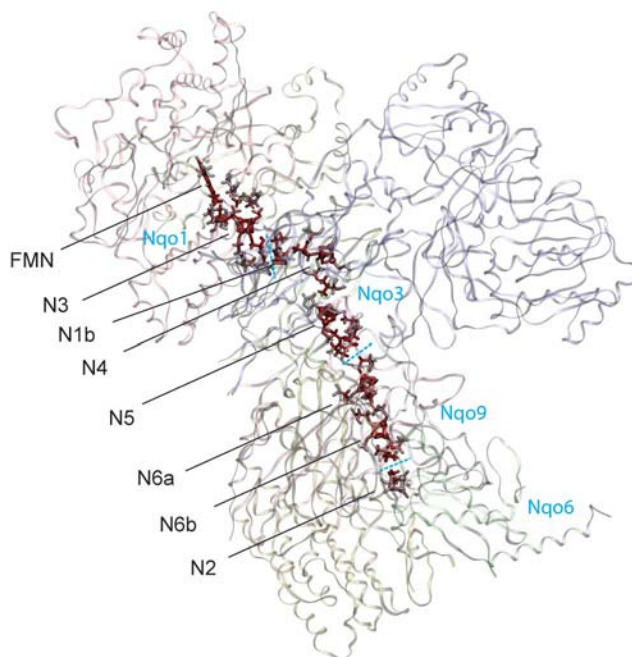


図 1 複合体 I 中の電子トンネル経路の計算結果

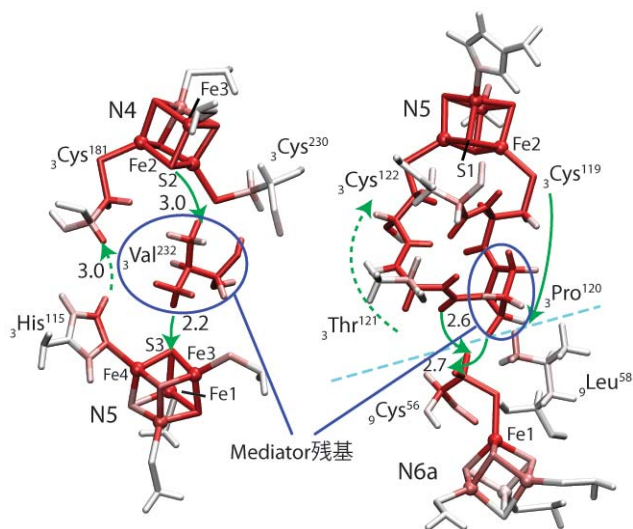


図 2 N4→N5(左)および N5→N6a(右)の電子トンネル経路と Mediator 残基

は互いに向きあうように配向することで電子移動に最適な配置になっている。タンパク質サブユニット間(Nqo3/Nqo9 など)には明確な空間的ギャップが存在し(図1シアン破線), 生体中では結合水で満たされていると考えられる。N4→N5においては Mediator 残基₃Val²³²のY型イソプロピル基の2つのδ-メチル基がドナー, アクセプター方向に位置することで, 効率的な電子移動が達成されることがわかる(図2左)。N5→N6a では, トンネル電子の量子性に由来する干渉が見られる。電子波束はN5→₃Cys¹¹⁹→₃Pro¹²⁰→₃Thr¹²¹→₃Cys¹²²→N5 から構成されるバックボーンループ上をN5→₃Cys¹¹⁹→₃Pro¹²⁰と移動し, 一部は₉Cys⁵⁶へ透過してN6へ, 残りは₃Thr¹²¹を経てN5へ向かう(図2右)。N4→N5およびN5→N6aの Mediator 残基は, 原核生物, 真菌, 無脊椎動物, ほ乳類など異なる生物種の複合体I一次配列においてよく保存され, またこれらをグリシンに置換した変異体の計算では速度定数が著しく減少した(表1:(N4→N5)*, (N5→N6a)*)。このことは, Mediator 残基が生体中での電子移動に不可欠な役割をはたしていることを支持する。計算された電子移動速度定数は, サブユニット間に存在する水を考慮しない場合(表1:Dry), 律速段階である最遠距離ペアN5→N6aにおいて9 s⁻¹となり, 実験で観測された全体の速度定数(170~10⁴ s⁻¹)を再現できない。一方サブユニット間の電子トンネル経路上に水分子を配置した計算(表1:Wet)では, 速度定数が劇的(10²~10³倍)に増加し, 実験値を再現した。タンパク質内部の水を含んだ電子移動速度の対数(log₁₀)はトンネル距離に対して, 経験的に知られた³勾配-0.6の直線関係とよい一致を示した。

以上の計算により, 呼吸鎖複合体Iにおける電子トンネル移動経路が初めて原子レベルで明らかになり, サブユニット間の水が, 生体中での効率的な電子移動に必須の役割を果たしていることがわかった。

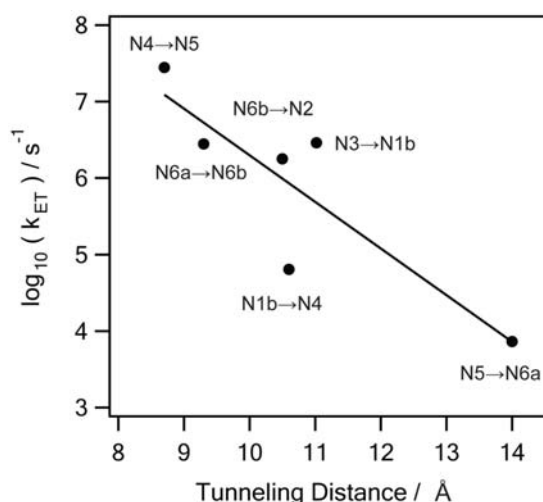


図3 電子移動速度のトンネル距離依存性

表1 トンネル距離, 電子トンネル移動に寄与するタンパク質残基, および電子移動速度定数

Pair	Distance [Å]	Key Residues			k_{ET} [s ⁻¹]	
		Exit	Entrance	Mediator	Dry	Wet
N3→N1b	11.0	₁ Cys ⁵⁶	₃ Cys ⁶⁴	₃ Ala ⁶³	1.3×10^3	2.9×10^6
N1b→N4	10.6	₃ Cys ³⁴	₃ Cys ¹⁸⁴	-	6.4×10^4	-
N4→N5	8.7	-	-	₃ Val ²³²	2.8×10^7	-
N5→N6a	14.0	₃ Cys ¹¹⁹	₉ Cys ⁵⁶	₃ Pro ¹²⁰	9.1	7.3×10^3
N6a→N6b	9.3	₉ Cys ⁵⁹	₉ Cys ¹⁰⁴	-	2.8×10^6	-
N6b→N2	10.5	-	₆ Cys ¹⁴⁰	₉ Ile ⁹⁹	1.9×10^4	1.8×10^6
(N4→N5)*	8.7	-	-	Gly	2.3×10^4	-
(N5→N6a)*	14.0	₃ Cys ¹¹⁹	₉ Cys ⁵⁶	Gly	1.2	0.3×10^2

¹ L. A. Sazanov and P. Hinchliffe, *Science* **311** (5766), 1430 (2006).

² A. A. Stuchebrukhov, *Theor. Chem. Acc.* **110** (5), 291 (2003).

³ C. C. Moser, C. C. Page, and P. L. Dutton, *Philos. T. R. Soc. B* **361** (1472), 1295 (2006).

1B07

全原子モデルによるアズリン-シトクロム複合体の結合自由エネルギー評価

(金沢大院・自然)

○齋藤大明, 西川清, 長尾秀実

【序】

生体内におけるタンパク質の機能理解にはタンパク質の自由エネルギー変化が最も重要な物理量である。たとえばタンパク質-リガンドの分子会合過程では、分子会合により分子構造や水和構造は大きく変化し、これに伴い溶質の水和エネルギーも大きく変化する[1]。この自由エネルギー変化は複合体形成のための結合エネルギーと等価であり、複合体間の分子親和性や熱的安定性の評価にも有用である。このような結合エネルギーの評価を高精度に行うことができれば、コンピュータによるタンパク質複合体の構造予測にブレークスルーがもたらされると期待される。しかしながら、これら水和自由エネルギーの精確な評価は実験・理論共に困難な現状にある。

アズリン(Az)-シトクロム(Cyt)複合体は生体内において酸化還元反応を起こし、タンパク質間での電子伝達が起こることが知られている。このような複合体形成過程の理解のためには、結合前後における構造及び自由エネルギー変化の詳細な解析が重要である。本研究では、会合前後の状態である酸化型アズリン(Az_{ox})、還元型シトクロム(Cyt_{red})、Az_{ox}-Cyt_{red}複合体の溶媒中における溶媒和自由エネルギー、構造エネルギー、エントロピーを評価し、これらのエネルギー差からタンパク質の分子会合における結合自由エネルギーの評価を行う。

【方法】

本研究に用いるアズリンとシトクロムは、いずれも実験・理論等に多くの検証がされている代表的なタンパク質である。計算に用いる Az_{ox}-Cyt_{red}複合体の構造は ZDOCK を用いて作成した(図 1 参照) [2]。複合体構造の作成の際、モデル A は静電相互作用、モデル B は疎水性相互作用が大きくなるように作成した。本研究では 2 つのモデル複合体構造における結合特性を比較評価する。これらのタンパク質構造を用いて始めに NVT-MD 計算($T = 300\text{K}$)を実行し、各々のタンパク質の溶媒和された平衡構造を作成する。MD と自由エネルギー計算に用いた分子力場は Amber03 を用い、水分子のモデルは TIP4P を用いた。図 1 に各々のタンパク質の初期構造からの根平均二乗変位(RMSD)の時間推移の様子を示す。いずれのタンパク質も 10ns までに構造が十分に平衡化している様子が示されている。自由エネルギー計算は系が平衡化した 10ns 以降のデータを用いて行った。

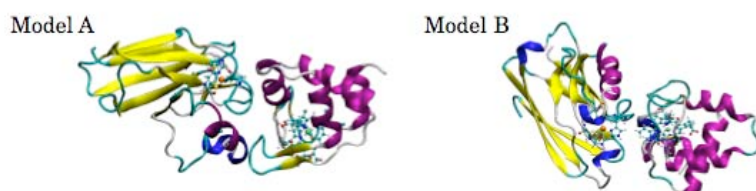


図 1 Az-Cyt 複合体モデル

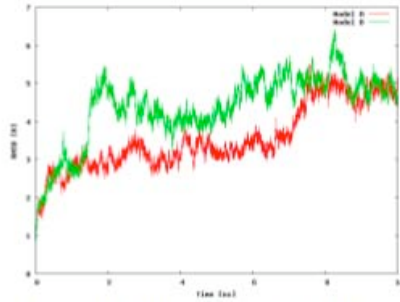


図 2. タンパク質の根平均二乗変位推移

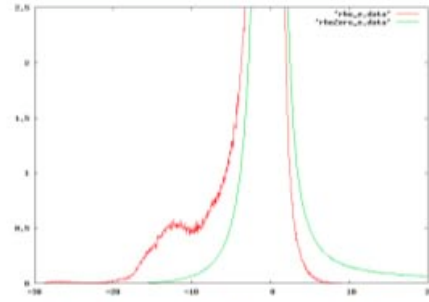


図 3. Az のエネルギー分布関数, $\rho(\epsilon)$:緑線, $\rho_0(\epsilon)$:赤線

タンパク質の水和特性評価には松林等が開発したエネルギー表示法を用いて評価を行う[2-4]。エネルギー表示法は、溶質の溶媒和自由エネルギーを高速に評価する手法であり、タンパク質のような大きな分子への適用も可能な手法として注目を集めている。具体的な計算方法については文献を参考にされたい[3-5]。相互作用計算のための実空間のカットオフ長は 8Åとし、クーロン相互作用にはエワルド法を用いた。

【結果と考察】

図 3 にアズリンと水のエネルギー分布関数 $\rho(\epsilon)$ と $\rho_0(\epsilon)$ の計算結果を示す。いずれのタンパク質でも、 $\rho(\epsilon)$ のエネルギー分布はおよそ-30 ~ 20 kcal/mol に分布する結果が示された。これらの分布関数を用いて各々のタンパク質の $\Delta\mu$ を計算した。表 1 に各タンパク質の溶媒和自由エネルギー ($\Delta\mu$)、構造エネルギー(E_{conf})、エントロピー(- TS)を示す。また、これらのエネルギー差からタンパク質の分子会合による結合自由エネルギーの評価を行った。これにより Model A, ModelB の結合エネルギーは各々-50 kcal/mol, 38 kcal/mol となる結果を得た。表の結果に示すように、モデル構造の違いによる溶媒和自由エネルギーがこれら結合エネルギーの差に大きく寄与していることが示された。詳細については当日報告する。

	Model A				Model B			
	Az ⁽¹⁾	Cyt ⁽²⁾	Complex ⁽³⁾	(3)-(1)-(2)	Az ⁽¹⁾	Cyt ⁽²⁾	Complex ⁽³⁾	(3)-(1)-(2)
$\Delta\mu$	-470	-355	-859	-34	-507	-379	-843	43
E_{conf}	-422	-293	-458	-47	-494	-259	-806	-52
- TS	-1422	-939	-2233	31	-1429	-954	-2336	47

表 1. 溶媒和自由エネルギー $\Delta\mu$, 構造エネルギー E_{conf} , エントロピー- TS [kcal/mol]

【参考文献】

- [1] Massova, I., Kollman, P.A., *J.Am.Chem.Soc.*, **121**, (1999) 8133-8143.
- [2] Chen R, Li L, Weng Z (2003) ZDOCK: An Initial-stage Protein-Docking Algorithm. *Proteins* 52, 80-87
- [3] N.Matsubayasi, and M.Nakahara, *J.Chem.Physics*, **113**, (2000) 6070-6081.
- [4] N.Matsubayasi, and M.Nakahara, *J.Chem.Physics*, **117**, (2002) 3605-3616.
- [5] N.Matsubayasi, and M.Nakahara, *J.Chem.Physics*, **119**, (2003) 9689-9702.

1B08 リゾチームの界面吸着現象のリアルタイム観測: pH および塩添加効果

(立命館 SLLS¹, JASRI SPring-8²) ○矢野陽子¹, 宇留賀朋哉², 谷田肇², 寺田靖子², 山田廣成¹

球状タンパク質リゾチームの気液界面吸着過程を X 線反射率/散漫散乱によって 3 次元解析した。その結果、高濃度 NaCl 水溶液中において、吸着は (1)脱水和による界面吸着、(2)Cl⁻イオンを介した島状凝集体形成の 2 段階で起こり、リゾチームの conformation は (1)と(2)では大きく変化することがわかった。この現象は、Net charge が大きくなる pH3 では促進するが等電点近傍では抑制されることから、結晶核生成の初期過程を観測していると思われる。

タンパク質の結晶化は、タンパク質溶液の溶解度を変化させ高過飽和状態にして核が形成することによってはじまる。その時、添加剤として中性塩や有機溶媒を加えることで、タンパク質の溶解度を下げる。中性塩を添加する場合は、塩析(salting-out)と呼ばれ、塩の水和によって、タンパク質表面の水が奪われ、タンパク質-溶媒間相互作用よりもタンパク質-タンパク質間の相互作用が打ち勝つために凝析する。この塩析効果は、塩添加による表面張力上昇度で説明できるという考え方がある[1, 2]。このことは、気液界面においてもタンパク質の塩析現象と同じことが起こっていることを意味する。そこで、我々は X 線反射率法を用いて、高濃度 NaCl 存在下におけるリゾチームの気液界面吸着過程を追跡した。

X 線反射率法は、X 線の全反射現象を利用した界面の構造解析手法である。界面深さ方向の電子密度分布をサブナノメートルオーダーの分解能で観測できることから、表面に吸着したタンパク質の 3 次構造に関する構造を得ることができ、2 次構造を観測する振動分光法とは相補的な実験手法である。これまで我々は pH7 のリン酸緩衝溶液中に球状タンパク質リゾチーム(LSZ)を注入し、注入 1 分後から 2 時間に渡る構造変化を追跡したところ、気液界面に吸着した LSZ は、ネイティブよりも薄くアンフォールドしており、その変性の原因が気相との

疎水性相互作用にあることを報告している[3]。

1 実験法

SPring-8/BL37XU の溶液界面反射率計[4, 5]を用いて、X 線反射率測定を行った。異なる pH、塩添加の有り (2M NaCl)、無しのリン酸緩衝溶液に注入後の濃度が 1mg/mL になるように調整した卵白 LSZ を注入し、気液界面に吸着する過程で生じる構造変化を追跡した。

2 結果と考察

図 1 は、pH7 のリン酸緩衝溶液の塩添加の無し(a)有り(b)の場合の電子密度の時間変化である。塩添加無しの場合、厚さ 20 Å 程度の表面単分子膜を形成した後、水相側に新たに LSZ が吸着し多層膜を形成する。この時、表面単分子膜の密度は変化しない。一方、2M NaCl 水溶液中では、表面単分子膜の密度が時間とともに減少し、厚さが増していることがわかった。

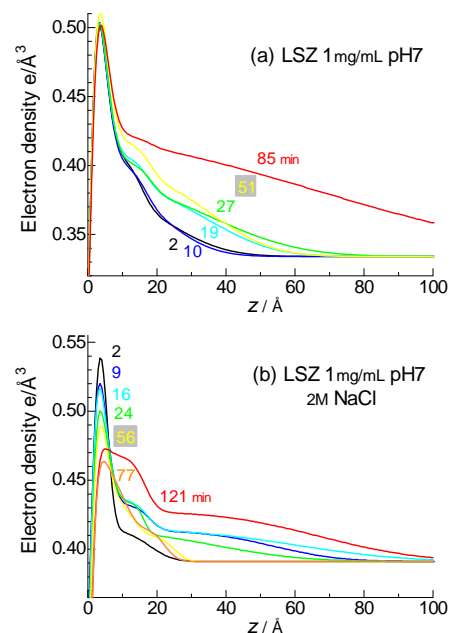


図 1 LSZ を pH7 の溶液に注入した後の電子密度の時間変化

図1を積分して、リゾチームの表面吸着量 Γ に換算したものを図2(b)に示す。塩添加無しでは、以前報告したものと同様[3]に、いったん単分子膜を形成した後に多層膜を形成するが、塩添加の場合は、単分子膜形成後に表面吸着量 Γ の減少が観測されていることから、単分子膜自体に変化が起きていると考えられる。

一方、散漫散乱から求めた界面平行方向の相関長を図2(a)に示す。表面吸着量が最小値の時に最大値をとり、その後減少している。このことは、表面に形成されたLSZの膜が不均一化していることを示唆している。すなわち、LSZは高濃度NaCl存在下において①単分子膜形成、②膜の不均一化、③凝集体形成の過程を経て吸着することがわかる。さらに興味深いことには、塩添加無では、一定だった表面単分子膜の厚さが増加していることである。このことは、界面吸着によってLSZが一旦アンフォールドしたのが、塩添加によってリフォールドしたようにも見える。

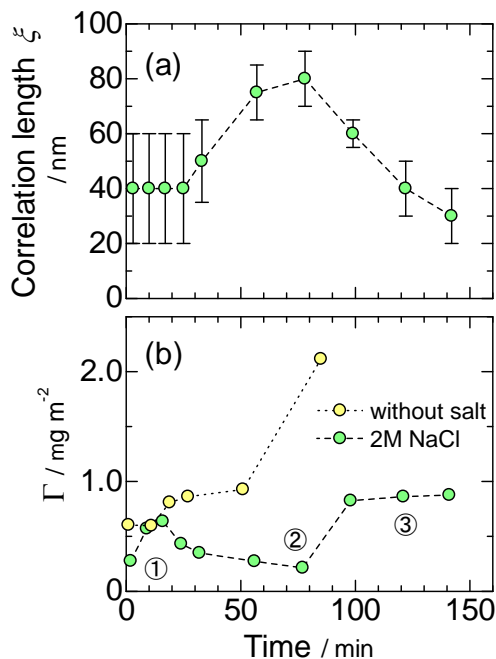


図2 LSZの表面相関長と吸着量の時間変化

同様の現象は、pH3の水溶液中では観測されたが、pH12では観測されなかったことから、この構造変化は、LSZが正に帯電している時に起こる現象であると考えられる。

以上のことを踏まえて、LSZの表面吸着

過程を模式化したのが図3である。②では、 Cl^- イオンがLSZの電荷を遮蔽することによって、凝集が開始する。このことは、LSZの結晶核生成と同じ現象を再現していると思われる。

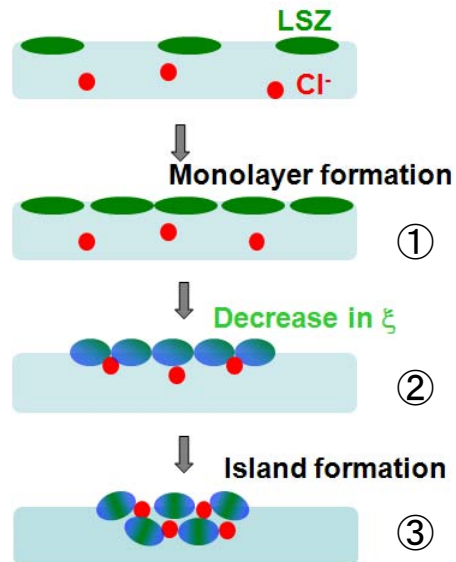


図3 高塩濃度下のLSZの表面吸着モデル

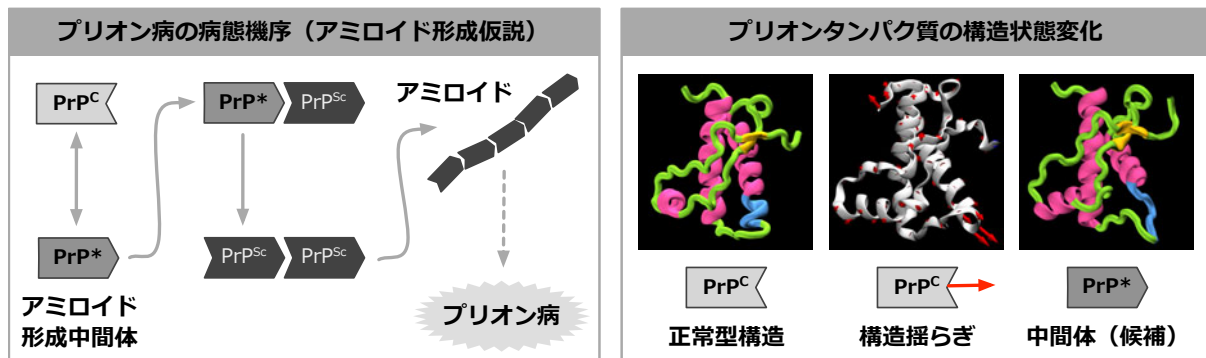
参考文献

- [1] R. L. Baldwin, *Biophys. J.* 71, 2056 (1996).
- [2] L. M. Pegram, M. T. Record Jr., *J. Phys. Chem. B* 111, 5411 (2007).
- [3] Y. F. Yano, T. Uruga, H. Tanida, H. Toyokawa, Y. Terada, M. Takagaki, and H. Yamada, *Langmuir*, 25, 32 (2009).
- [4] Y. F. Yano, T. Uruga, H. Tanida, H. Toyokawa, Y. Terada, and H. Yamada, *J. Synchrotron Rad.* 17, 511-516 (2010).
- [5] Y. F. Yano, T. Uruga, H. Tanida, H. Toyokawa, Y. Terada, M. Takagaki, and H. Yamada, *Eur. Phys. Special Topics*, 167, 101 (2009).

プリオンタンパク質変性状態の構造類比

(名大院・情報科学*, 岐阜大・人獣研**) ○山本 典史*, 桑田 一夫**

コンフォメーション病では、病因タンパク質の部分変性状態が、アミロイド繊維形成中間体としての重要な役割を果たす。本研究ではプリオンタンパク質変性状態の網羅的な収集・解析・分類に取り組み、アミロイド繊維形成中間体の構造及び産生機構を明らかにすることにより、コンフォメーション病の病態機序解明を目指した。



■ 背景：プリオン病を巡る研究動向

プリオン病は、脳の海綿状変性を特徴とする神経疾患であり、感染能を持つタンパク質性因子・プリオンを介して伝達する疾患である。プリオン病を含む幾つかの神経変性疾患群に共通する病態機序として、タンパク質の立体構造異常に基づいた機構が提唱されている。コンフォメーション病と総称されるこれらの疾患群では、タンパク質の構造異常化に伴うアミロイド繊維（不溶性凝集体）形成及び細胞組織への沈着が発症基盤と考えられる。近年、コンフォメーション病に対する新規治療薬候補として、病因タンパク質と特異的に結合することで立体構造変化（異常化）を効果的に制御する低分子化合物（ファーマコロジカル・シャペロン）が注目を集めている。しかし、プリオン病病態機序には不明な点が多く、真に有効な診断法・治療法は未だ確立していない。

近年桑田らは、プリオンタンパク質に結合することでプリオン病の病態進行を顕著に抑制する化合物GN8を発見している¹。我々はこれまで、GN8の抗プリオン作用の機序解明に取り組み、GN8がプリオンタンパク質に結合した場合、ヘリックス末端の構造揺らぎが抑制されることで部分構造変性（ヘリックス → ランダムコイル）が制御される機構を明らかにした²。以上の先行研究から我々は、プリオン病病態機序においては、プリオンタンパク質正常型（PrP^C）から病原性異常型（PrP^{Sc}）への構造変化を橋渡す過渡的中間状態（PrP^{*}）が存在し、病態初期の部分変性過程（PrP^C → PrP^{*}）を経て後、アミロイド繊維形成（PrP^{*} → PrP^{Sc}）に至ると推測している。

■ 目的：アミロイド繊維形成中間体の構造及び産生機構の解明

本研究では、プリオン病の病態機序で重要な役割を果たすアミロイド繊維形成中間体（PrP^{*}）の構造及び産生機構を明らかにすることを目指す。本討論会では、①：レプリカ交換分子動力学法を用いたタンパク質構造空間の網羅的探索、②：得られた膨大な構造情報のカーネル多変量解析を用いた構造類比解析について発表する。

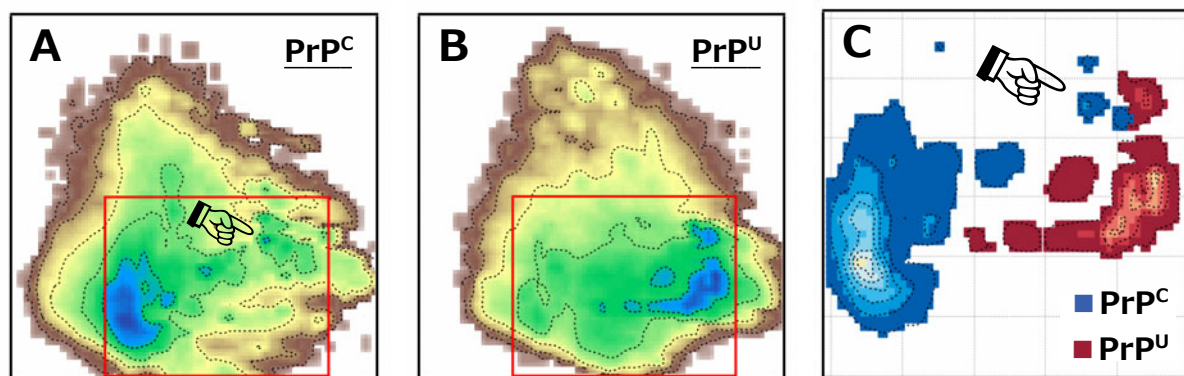
■ 方法：タンパク質構造空間の網羅的探索

本研究の第一段階は、正常型 (PrP^C) からアミロイド繊維形成中間体 (PrP^{*}) に至るタンパク質構造空間の網羅的探索である。これまでのところ、生体内で中間体 (PrP^{*}) が産生される具体的な条件は不明である。そこで本研究では、様々なタンパク質変性条件 (変性剤濃度, pH, 温度など) を走査し分子動力学計算を実行することで、タンパク質構造空間の網羅的探索に取り組んだ。さらに、異なる温度の拡張統計集団を逐次交換するレプリカ交換法を用いることで構造空間を効率的に探索した。

本研究の第二段階は、異常型 (PrP^{Sc}) への構造変化を仲介する中間体状態 (PrP^{*}) の特定である。本研究では、カーネル (=類似性を定義する関数) を用いた多変量解析の手法を用いて、タンパク質構造情報の類似解析に取り組み、「類似する構造状態は近く」「異なる構造状態は遠く」に配置することでタンパク質構造空間を地図化するコンフォメーション・マップを作成した。

■ 結果：タンパク質変性状態の構造類比解析

プリオンタンパク質のレプリカ交換分子動力学計算を実行し、構造情報に多変量解析を適用することで、二次元平面に射影した構造状態分布を得た。図Aの等高線図は、穏和な生理的条件における天然状態 (PrP^C) の自由エネルギー曲面を示す。図Bは、2 M 濃度尿素存在下の変性条件で部分的に変性した状態 (PrP^U) の自由エネルギー曲面を示す。



図Cの等高線図は、PrP^C および PrP^U の各状態分布の比較を示す。それぞれ、図A及び図Bで赤枠内に示す部分領域の状態分布に対応する。構造類比解析の結果、PrP^C 状態分布の一部が PrP^U 状態分布に近接する描像が得られた。この描像は、穏和な条件においても構造揺らぎのために、タンパク質の構造不安定な部位が過渡的に部分変性し得ることを示す。この場合、変性剤添加により誘起される PrP^U 状態の変性構造は、ヘリックス末端部位の疎水性残基 (=複合体を形成し易い) が一部分露出する構造であり、凝集体形成を仲介する中間体 PrP^{*} としての構造的特徴を有する。

以上の結果、病理学的異常な摂動の下では、生体内においても PrP^C の内在的な構造不安定性のために PrP^C → PrP^U に沿う構造変化が起こり得ると推測される。このとき、ヘリックス末端部位の部分構造変性が中間体 PrP^{*} 形成の初期過程で基軸的役割を果たすと考えられる。抗プリオン化合物 GN8 は、変性剤不安定性を示すヘリックス末端部位近傍に架橋することでプリオンタンパク質と結合することが実験的に確認されている¹。したがって、PrP^C に GN8 が結合した場合、ヘリックス末端部位が安定化されることで、アミロイド繊維形成中間体 PrP^{*} の産生が抑制されると推測される²。本研究で提案するタンパク質変性状態の構造類比は、タンパク質構造状態を制御するファーマコロジカル・シャペロン (=コンフォメーション病治療薬) の合理的設計を可能とする鍵になると考えられる。

1. Kuwata, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 11921 (2007)
2. Yamamoto and Kuwata, *J. Phys. Chem. B*, **113**, 12853 (2009)

テラヘルツ時間領域分光によるポリグルタミン酸の低振動ダイナミクス

(神戸大・分子フォト¹、神戸大院・理²) 山本直樹¹、神原大¹、田村厚夫²、富永圭介^{1,2}

【序論】タンパク質は多数のアミノ酸が共有結合して連なり、各種分子間力を利用して特定の立体構造を形成することにより機能発現する。タンパク質分子内には 100cm^{-1} 以下の波数領域に原子の集団運動に由来する多数の低振動モードが存在することが知られており、機能発現にはそれらの振動モード間を遷移する、大きな構造変化を伴う非調和的な”動力学転移”が重要であることが示唆されている¹。従って動力学転移のメカニズムを理解することはタンパク質の機能発現機構を理解する上で重要である。これまで動力学転移はタンパク質の立体構造に関係なく水和量にのみ依存すると考えられてきたが、2次構造レベルで大きく構造変化させた際にその挙動が構造にどのように依存するかはわかっていない。そこで本研究では低振動領域におけるダイナミクスをモニターすることができるテラヘルツ分光法により、pH および温度条件によりランダムコイル、 α -helix および β -sheet の3種類の2次構造を形成することが知られているポリグルタミン酸の、低振動吸収スペクトルの水和依存性を調べた。

【実験】分子量約 8,000 および 64,000 のポリグルタミン酸を超純水に 3mg/ml となるよう溶解させ、濃塩酸溶液を添加することにより pH7 および 4 に調整し、ランダムコイルおよび α -helix 構造を得た。また 10mg/ml となるよう溶解させて pH4 に調整したのち 95°C で 2 日間インキュベートさせることにより β -sheet 構造を得た。各サンプルを凍結乾燥することにより粉末状態の試料を得た。THz 分光器はモードロック Ti:sapphire レーザーを用いた時間領域分光計 (Aispec) を用い、測定室の相対湿度はドライエアーを流入させることにより 8% 以下に保った。試料測定の際は、粉末試料を圧力 9MPa によりペレット状にしたものを用い、水和量の変化は乾燥ペレットを各種無機塩類の飽和溶液とともに制限空間に任意時間放置することで達成した。ATR FT-IR 測定により各サンプルがペレット状態でも水溶液中と同様の2次構造を保持していることを確認した。温度変化測定はペレットをセルホルダとともに液体窒素に直接漬けることにより温度を -194°C まで低下させたのち測定室にセットし、自然に室温に戻る間の任意温度において素早く時間領域スペクトルをスキャンすることにより行った。

【結果および考察】室温において各試料の乾燥状態での吸収スペクトルを測定したところ、分子量の大小および2次構造の種類に関わらず、振動数の増大に伴って単調増加的に吸光係数が増加するスペクトルを与えた(図 1)。いずれの振動数においても分子量の増大に伴う吸光係数の変化はほとんど見られなかった。2次構造間で比較すると、 α -helix と β -sheet の吸光係数はほぼ同じであった一方、ランダムコイルの値はそれらよりも大きくなった。従ってこの差異はランダムコイル状態ではグルタミン酸側鎖がマイナスに帯電していることによる双極子モーメントの増大に由来すると考えられる。また β -sheet 構造のスペクトルには、 α -helix には見られない 37cm^{-1} の比較的ブロードなピークが確認された。 β -sheet を形成することが知られているポリグリシンにおいても 45cm^{-1} にピークが観測されており²、また理論計算により β -sheet 構造ではポリペプチドの分子間振動モードに由来する吸収帯が 37cm^{-1} に観測されると予測されていることから³、今

回観測されたピークも同様の振動モードに由来するものであると考えられる。理論計算では α -helixにおいても低振動領域に吸収帯が存在すると予測されている一方で³、今回そのようなピークは観測されなかったことから、 β -sheet 構造は α -helix 構造よりも秩序だった構造を形成している、すなわち結晶性が高いと考えられ、 β -sheet 構造がしばしば数 100nm オーダーの線維構造体を形成することと矛盾しない。次にペレット試料を水和させて温度変化を行うと、いずれの試料においても水和量が増大するに従って 200–240K 以上の領域において吸光係数の増大に明らかな変曲点がみられ、またその変化の度合いは水和量の増大とともに増加した(図 2, MW 8,000 のものは掲載せず)。なお、水和量は h によって定義しており、タンパク質 1g 当たりの水和水の量 (g) を比率で表している。この急激な増大は温度上昇に伴い双極子モーメントが大きく変化するような振動が誘起されたことに由来すると考えられ、中性子散乱実験等により観測されている動力学転移に対応していると解釈することができる⁴。今回極端に異なる 3 種類の 2 次構造形成条件下においても水和により動力学転移が観測されたことは、タンパク質の動力学転移は構造に依存せず水和量のみ依存するという過去の観測例と矛盾せず⁵、動力学転移はタンパク質特有の立体構造に起因するのではなく水和水の運動により誘起されるものであるという考えを強く支持する結果である。

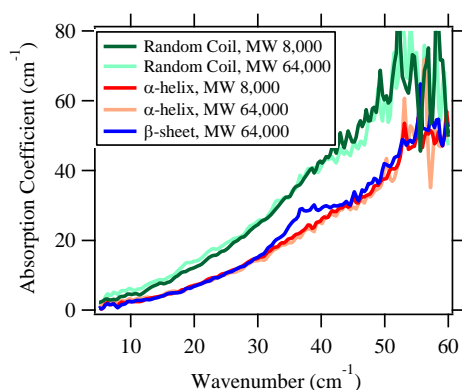


図 1. 各 2 次構造におけるポリグルタミン酸の低振動領域吸収スペクトル

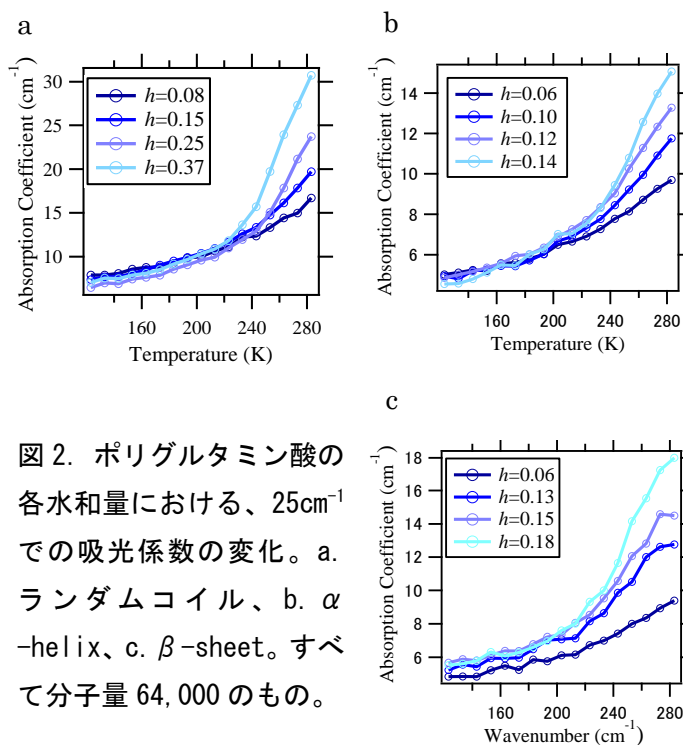


図 2. ポリグルタミン酸の各水和量における、 25cm^{-1} での吸光係数の変化。a. ランダムコイル、b. α -helix、c. β -sheet。すべて分子量 64,000 のもの。

1. Rasmussen et al., *Nature* **357** 423–424 (1992)
2. Yamamoto et al., *Biophys. J* (Letters) L22–L24 (2005)
3. Krimm, S. *Peptides and Proteins in Biological Applications of Raman Spectroscopy*. T. G. Spiro, editor. John Wiley & Sons, New York, NY. 1–45 (1987)
4. G. Zaccai, *Science* **288** 1604–1607 (2000)
5. Pei et al., *PRL* **101** 178103 (2008)