

2B11

レチナールタンパク質と蛍ルシフェラーゼに対する励起状態解析

○田口 尚貴¹, 林 智彦², 櫻井 実², 加藤 太一郎³, 田中 成典⁴, 望月 祐志^{1,5}

1. 立教大理、2. 東工大バイオセンター、3. 兵衛大院工、4. 神戸大院シス情、5. 東大生研

1. 序 近年、QM/MM 法、Divide and Conquer 法、Elongation 法、そして MTA 法など様々な大規模分子系に対する電子状態計算手法の改良や実問題への応用計算が積極的になされている。この様な中、生体分子の第一原理計算として現在までに多くの成果が報告されている方法に、フラグメント分子軌道 (FMO) 法がある[1]。FMO 計算によって知る事の出来る物理量は様々であるが、光応答タンパク質などに関する励起状態のエネルギーは CIS (Configuration Interaction Singles), ならびに電子相関を含めた CIS(D) (CIS with perturbed doubles) 系の方法で可能となっている[2,3]。本発表は、これらの枠組みを使ってレチナールタンパク質と蛍ルシフェラーゼに対する理論計算を行い、電子遷移エネルギーの評価や励起状態となる部位の詳細な解析を試みた結果について報告するものである。

2. Duo 補正 FMO スキームに基づく励起状態の計算は、分子全体 (Layer 1) を Hartree-Fock レベルでまず解き、次に光応答を担う部分と周辺部分からなる活性領域 (Layer 2) に対して、CIS(D)などの励起状態計算を適用する多層型 (Multilayer FMO; MFMO) で行われる[4]。本方法の下、我々はこれまでに赤色系蛍光タンパク質や蛍ルシフェラーゼに対し、CIS(D)から MP2 相関によって誘導される余剰緩和エネルギーの導入 (extra singles; -s) や相関振幅の部分再規格化 (Partially Renormalized; PR)を併用した PR-CIS(Ds)/6-31G*レベル[5]の励起状態計算理論を採用した解析を行って実験値との対応をとった[6,7]。本研究では、電子遷移エネルギーに対する対補正の考え方[8,9]をフラグメント分子軌道の文脈に対し直截に導入することで、計算時間の短縮と共にタンパク質中の各アミノ酸残基からもたらされる分極効果の影響を取り入れた励起エネルギーの算出を試みた (二体 (Duo) 補正の式 (ω は電子遷移エネルギー、C は活性中心フラグメントを表す); $\omega = \omega_c + \sum (\omega_{CI} - \omega_c)$)。またこれに対して、PR-CIS(D)の摂動表式のエネルギー分母中にある占有軌道エネルギーについて Green 関数による二次の自己エネルギーの繰り込み補正を行った PR-CIS(D)_{ss(2)} (-ss(2); 2nd-order Self-energy Shift, [10]) などの手法も援用した (同一理論を用いた応用計算は 4P100 でポスター講演予定)。なお実装は、私たちが自主開発している ABINIT-MPX に対して行っている。

3. レチナールタンパク質 バクテリオロドプシン (bR, PDB; 1C3W) やフォボロドプシン (ppR, PDB; 1JGJ) の発色団であるレチナールは、リシン塩基とプロトン化レチナールシッフ塩基 (Protonated Retinal Schiff base; PRSB) が共有結合したものであり、光異性化されたクロモフォアは all-*trans*-retinal と呼ばれている (図 1)。発色領域の励起は π - π^* 遷移であり、bR と ppR の吸収極大波長はそれぞれ 568nm と 498nm に相当しこの差はおよそ 70nm である[11,12]。これら二つのタンパク質間の構造は高い相同性をもっているにも関わらず、この様な違い (オプシシフト) が現れるという点について様々なモデルが提唱されているが、シフトの要因が具体的にどの程度の寄与でレチナールタンパク質の吸収波長制御に関与しているかは明らかになっていない。そこでこの問題に対する一つのモデル化学としてのアプローチとして、私たちは FMO スキーム

に基づいた励起エネルギーに対する Duo 補正計算を行い、タンパク質中のどの残基がどれだけ発色団の吸収波長に対して寄与しているのかを評価した。解析に使用した構造は、Gaussian プログラムを用いて QM/MM による構造最適化により作成した。なお、最適化計算レベルは B3LYP/6-31G** と Amber 力場である。この手順によって得られた構造を用いて MFMO に基づいた計算を行った結果、bR と ppR との間の吸収極大波長の差は実験値とほぼ対応がとれた。Duo 補正を用いた解析結果の詳細については当日詳しく報告したい。

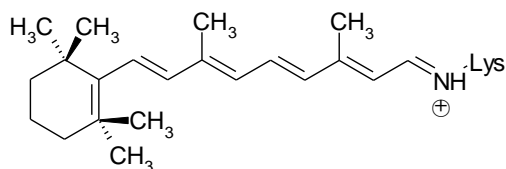


図 1. all-*trans*-retinal

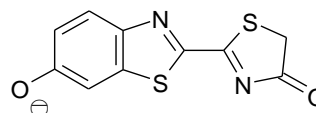


図 2. Oxyluciferin

4. 蛍ルシフェラーゼ ホタルの生物発光は分子生物学や生体内の分子イメージングで広く用いられている。蛍の発光反応の最大の謎は、発光色の制御のメカニズムである。我々は、アミノ酸置換によって様々に変化する発光波長をできるだけ正確に予測する為、実験的研究と相補的に理論計算を進行している。スタンスとしては、活性中心であるオキシルシフェリンについては図 2 で示した通りのままの構造とし、周辺残基に対して行う変異が発光エネルギーに対してどの様に寄与するかを検証するというものである。本研究では、既に先行研究[7]として報告済みである分子動力学 (MD) シミュレーションパッケージ Amber7 を使って構造サンプリングした野生型 (WT, PDB; 2D1S) と I288A 変異型の構造を用いて Duo 補正計算を行った (WT の結果: 表 1)。また、Oxyluciferin の構造については π - π^* 遷移した状態について CIS/6-31G レベルで最適化したモデルを使用した。現在、基底状態と励起状態との電子密度差を CIS レベルで算出し、FMO で直截に計算可能なフラグメント間相互作用エネルギー (IFIE; Inter-Fragment Interaction Energy) と連携して議論出来る様に調整しているところなので、これらの進捗と併せて当日講演したい。

表 1. Duo 補正計算の結果 (CIS(D)/6-31G)

r_{\min} (Å)		$W_{CI}-W_C$ (eV)	E_{exc} (eV)
	Oxyluciferin		2.30
2.147	AMP 546	-0.03	2.27
2.299	ARG 220	0.00	2.26
2.610	THR 253	0.00	2.26
2.733	GLY 318	-0.01	2.25
2.830	GLY 341	0.02	2.27
2.847	GLY 317	-0.01	2.26
2.867	LEU 344	0.00	2.26
2.878	WAT	-0.01	2.25
2.926	THR 345	0.00	2.25
2.939	PHE 249	-0.02	2.23
2.989	ALA 350	-0.01	2.22
	Expt. [13]		2.21

r_{\min} : Oxyluciferin と対象フラグメント間の最近接原子間距離

謝辞 本研究は、文部科学省科学技術研究費 (特別研究員奨励費) と立教大学学術推進特別重点資金 (立教 SFR; Rikkyo University Special Fund for Research) の支援を受け実施した。

参考文献 [1] K. Kitaura et al., *Chem. Phys. Lett.*, **313** (1999) 701. [2] M. Head-Gordon et al., *Chem. Phys. Lett.*, **219** (1994) 21. [3] Y. Mochizuki et al., *Theor. Chem. Acc.*, **117** (2007) 541. [4] D. G. Fedorov et al., *J. Phys. Chem. A*, **109** (2005) 2638. [5] Y. Mochizuki et al., *Chem. Phys. Lett.*, **443** (2007) 389. [6] N. Taguchi et al., *J. Phys. Chem. B*, **113** (2009) 1153. [7] A. Tagami et al., *Chem. Phys. Lett.*, **472** (2009) 118. [8] S. Hirata et al., *Mole. Phys.*, **103** (2005) 2255. [9] M. Chiba et al., *Chem. Phys. Lett.*, **444** (2007) 346. [10] Y. Mochizuki, *Chem. Phys. Lett.*, **472** (2009) 143. [11] R. R. Birge et al., *J. Chem. Phys.*, **92** (1990) 7178. [12] J. Hirayama et al., *Biochemistry*, **31** (1992) 2093. [13] T. Nakatsu et al., *Nature*, **440** (2006) 372.