

1B01

量子化学に基づいた二万原子規模の構造最適化と相互作用解析

(産総研) Omitri G. Fedorov

【序】

フラグメント分子軌道 (FMO) 法では、巨大系を残基等に分割し、フラグメントとその二量体の量子化学計算を行い、全系のエネルギー E とその勾配を得る [1, 2]。

$$E = \sum_{I=1}^N E_I + \sum_{I>J} \Delta E_{IJ}$$

$$\Delta E_{IJ} = E_{IJ} - E_I - E_J$$

ここで E_I と E_{IJ} はフラグメント I と二量体 IJ のエネルギーである。

$$H_X \Psi_X = E_X \Psi_X$$
$$H_X = H'_X + \sum_{L \neq I} V_L + \sum_{i=1}^{\text{bonds}} P_X^i, \quad V_L = -\sum_{\alpha \in L} \frac{Z_\alpha}{|r - R_\alpha|} + \int \frac{\rho_L(r')}{|r - r'|} dr'$$
$$P_X^i = B \sum_{b \in i(X)} |\varphi_b\rangle\langle\varphi_b|, \quad B = 10^{+6}$$

V_L は L フラグメントによる静電場、 P_X は切った結合の射影演算子 ($X=I, IJ$)。

FMO 法では、フラグメント電子状態を無撞着的に決めて (FMO1)、それに二体補正 (ΔE_{IJ}) を加える。FMO 法は多階層化され、階層毎に波動関数と基底関数を指定出来る。

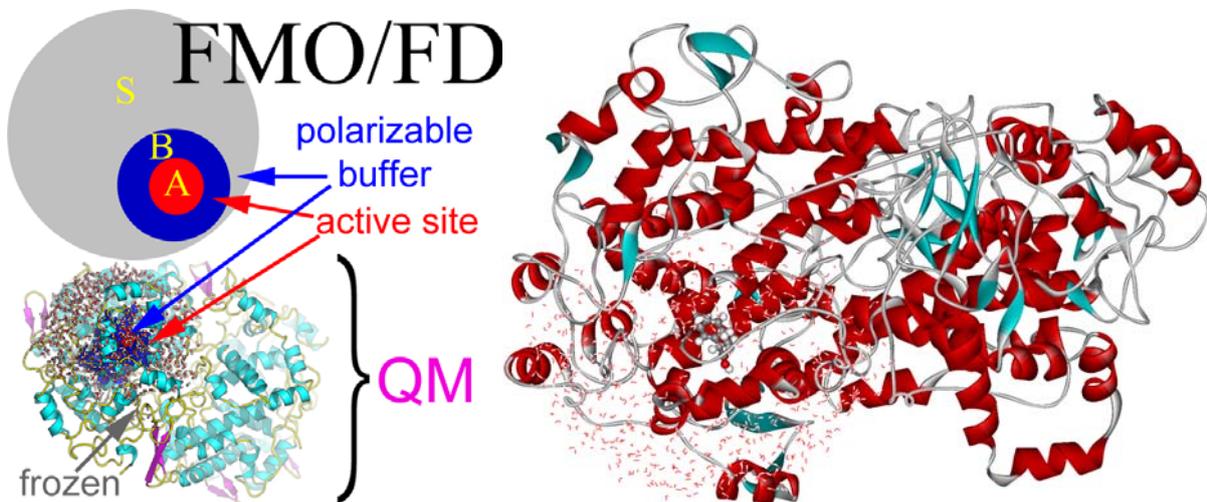
複合体等の為、二階層の FMO 法に基づいた高速構造最適化の FMO/FD 法を開発した [3]。

【方法】

FMO/FD 法では、全てのフラグメント (S , 全体) を三つの領域に分ける。

1. F (固定領域)
2. B (可分極領域)
3. A (活性領域)、 $A \subseteq B \subseteq S$ 、 $B \cup F = S$

F は第一階層と定義し、B は第二階層である。A は B の一部となる。

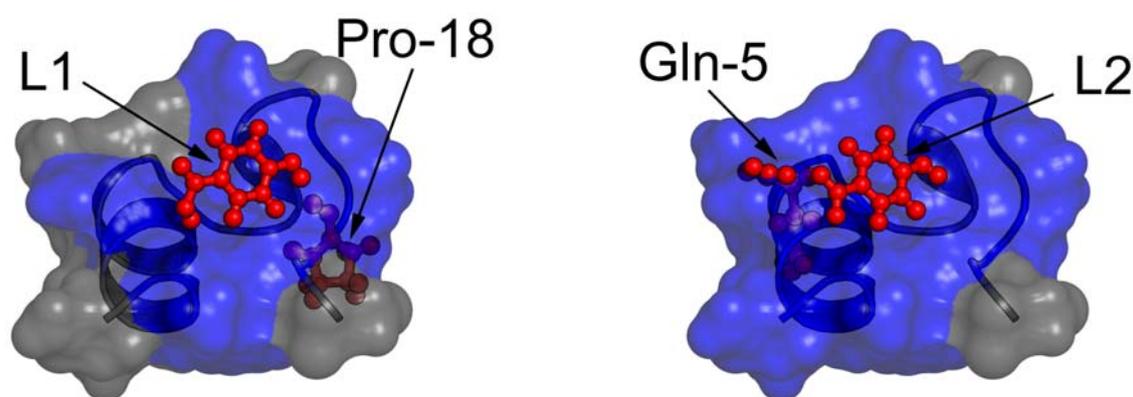


構造最適化中 A 領域の原子のみ動ける。計算を下記の様に行う。

1. 初期構造作成
2. 全体 (S) の計算を第一階層の FM01 で行う。即ち、多体分極効果を初期構造で取り込む。
3. B 領域の計算を第二階層の指定で行う。そこで、F からの静電場を入れ込む (2) で見積もった多体分極)。
4. 勾配を計算し、新しい構造を決める。収束していない場合、(3)に戻る。

【結果】

A, B 領域の大きさの影響を Trp 籠 (1L2Y) の蛋白質と基質 (L1=*o*-PhOHC00H, L2=*o*-PhOHC00⁻) の複合体で調べた。結果は、荷電基質の影響が長距離に及び、大きい B 領域 (青) を必要とする。1L2Y の基質認識について、解析を行った。



応用例として、19471 原子から成る prostaglandin H(2) synthase-1 と可逆競合阻害剤 ibuprofen の複合体 (PDB: 1EQG) の構造最適化を (B=B3LYP-D/6-31G*, F=RHF/STO-3G) で行った。D は Grimme による経験分散力計算法を示す。B 可分極領域には 532 原子があった。

基質の座標のみ最適化するには、6 台 2.83 GHz Xeon (合計 48 CPU core) の並列計算機で 32 時間掛かった。FM0/FD は GAMESS で無償公開されている。

【結論】

FM0/FD を以って巨大系の部分構造最適化が出来る様になった。力場を使わず、全部量子化学計算である為、一般性がある。将来に、FM0/FD を創薬等に活躍させたい。

参照

[1] <http://staff.aist.go.jp/d.g.fedorov/fmo/main.html>

[2] *The fragment molecular orbital method: practical applications to large molecular systems*, D. G. Fedorov, K. Kitaura, Eds., CRC Press, Boca Raton, FL, 2009, 288 pages.

[3] D. G. Fedorov, Y. Alexeev, K. Kitaura, *J. Phys. Chem. Lett.* 2 (2011) 282-288.

1B02

タンパク質内アミノ酸側鎖の酸解離定数の新規算出法と応用

(阪大院理¹, 阪大院基礎工², 兵庫県立大院生命理³, 筑波大院数物⁴)○松井 亨^{1,2}, 馬場 剛史³, 安田 奈都美¹, 神谷 克政⁴, 北河 康隆¹, 重田 育照², 奥村 光隆¹

【序】 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い。理論についても分子動力学法による計算では電子状態の変化する金属を含む酵素では定量的な議論ができず、また電荷等のパラメータに依存することが多い。量子化学計算を用いた酸解離定数の導出に関しては、現状ではコストの問題に加えてプロトンのエネルギーを計算手法(密度汎関数や基底関数、溶媒和モデルの種類)に依存せずに一定値とするために十分な精度が得られないために正確に求めるのは困難である。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、5 位置換したウラシルにおけるイミノプロトンのギブスエネルギーを計算手法に依存した形で導出することに成功した[1]。これらの計算手法をアミノ酸側鎖の pK_a に注目し、小さいタンパク質を構成するアミノ酸の側鎖に適用することを本発表の目的とする。

【理論・計算手法】 pK_a は通常水溶液中での酸解離反応 ($HA \rightarrow H^+ + A^-$) のギブスエネルギーの差 $\Delta G(aq) = G(A^-, aq) - G(HA, aq) + G_H$ で(1)のように書き下せる。

$$pK_a = \Delta G(aq) / 2.303RT \quad (1)$$

ここで、 R は gas constant, T は絶対温度である。本研究ではプロトンのエネルギーを最初から分からないものとして定数 G_H とおく。また水溶液中の化合物のギブスエネルギーは連続誘電体モデル(PCM)と振動計算により導出可能とし、ギブスエネルギーに誤差を補正するスケールリングファクター s をかけて、 $s/2.303RT$, $s \cdot G_H / 2.303RT$ をそれぞれ k , C_0 とおくと(1)式は

$$pK_a = k \{ G(A^-, aq) - G(HA, aq) \} + C_0 = k \Delta G_0 + C_0 \quad (2)$$

と近似できる。よって、 $\Delta G_0 = G(A^-, aq) - G(HA, aq)$ と pK_a は線形関係にあるので、計算した ΔG_0 と pK_a の実験値から k , C_0 をフィッティングすれば、他の化合物の ΔG_0 を計算で求めることで pK_a を算出可能となる。この方法をアミノ酸側鎖に適用するために、特定の官能基を持つ化合物の実験値を利用した。本研究では、特に断らない限り PCM を使い、B3LYP/6-31++G(d,p) レベルの計算を行っている。

【結果】 この理論を用いることで、特定の官能基を持つ化合物に対して半定量的に pK_a を導出することができる。今回はその一例を示す。

1. サリチル酸を用いたテスト計算

サリチル酸において分子内の水素結合が pK_a に与える影響を考えるため、図 1 にあるような 2 つの構造を考えて COOH、フェノールのプロトンが順にとれる二段階の脱プロトン反応に

において、プロトンがある状態とない状態のギブスエネルギーの差から pK_a を見積もる。

計算の結果、分子内の水素結合の影響により **a** の方が 6 kcal/mol 程度安定である。**a** の構造では pK_a は 2.69 と 13.29, **b** の構造では pK_a は 4.10, 10.76 と算出された。実験値は 2.81 と 13.4 であることから、**a** の構造を支持している。**a** と **b** で大きく値が異なる理由は COOH が抜けることで COO⁻ となる際に、**a** では OH が COO⁻ と水素結合を強化しやすい形になり、脱プロトン化した状態も安定になる。この形になった場合フェノールのプロトンが脱離しにくくなり、第 2 段階目での pK_a が大幅に上昇する原因となる。一方で、**b** の構造では各々が独立しているために、安息香酸($pK_a=4.20$)とフェノール($pK_a=10.02$)と似た値になる。分子内の水素結合により、 pK_a 値が 2.5 程度変化しうることがこれらの結果からも示唆された。

2. アミノ酸側鎖の pK_a 値導出

右の表は今回提案した計算手法をアミノ酸側鎖に適用した結果である。Asp, Glu, Tyr においてはほぼ文献値を再現している。その一方で、Cys, His, Lys では文献値と 0.4-0.5 程度大きくなっている。Gly-Cys-Gly などのトリペプチドにおいては、Cys の pK_a が 8.44 に下がることから、アミノ酸 ($H_3N^+ - RH - COO^-$) の構造、すなわちアミノ酸単体が持つ電荷の影響も原因として考えられる。

3. シニョリンにおけるチロシンの pK_a 計算

この手法を最小タンパク質であるシニョリン (10 残基、構造を図 2 に示す) に適用した。シニョリンにはチロシンが 1 残基含まれている。そこで、B3LYP/6-31G(d)レベルの計算で最適化し、振動計算を行いチロシンの pK_a 値を導出したところ、10.02 となり単体のアミノ酸の側鎖と同様の結果となった。これはチロシンがタンパク質の外側を向いていて、タンパク質を構成する他の分子と水素結合を形成していないためである。

参考文献

[1] T. Matsui, A. Oshiyama, Y. Shigeta, Chem. Phys. Lett. 502 (2011), 248.

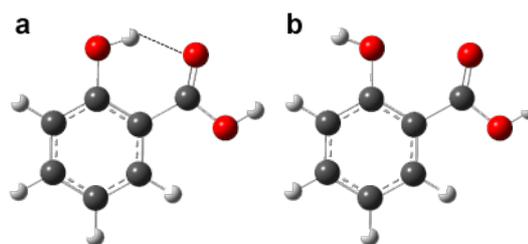


図 1: 今回検討するサリチル酸の配座 (灰、赤、白はそれぞれ C, O, H 原子) **a** では OH 基が COOH と水素結合した形を取る一方、**b** には水素結合は存在しない

表: アミノ酸側鎖における pK_a の計算値と文献値。官能基によってパラメータが異なるため、精度に違いが生じる。

	官能基	pK_a 計算値	pK_a 文献値
Asp	-COOH	3.78	3.86
Glu	-COOH	4.23	4.25
Cys	-SH	8.85	8.33
His	イミダゾール	6.49	6.04
Lys	$-NH_3^+$	10.92	10.53
Tyr	フェノール	10.07	10.07

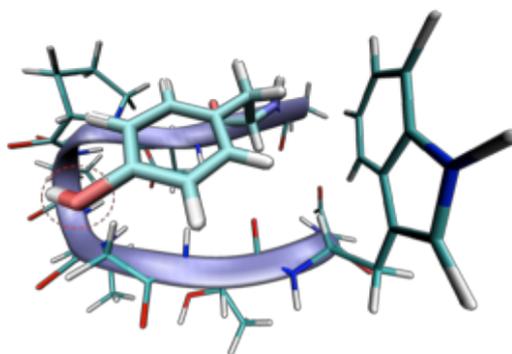


図 2: NMR によるシニョリンの構造 (PDBID: 1UAO) 点線部分が計算の対象となるチロシンのプロトンである。

分子動力学シミュレーションによるタンパク質の遅い運動の解析

(横浜市大院・生命ナノシステム) 成富 佑輔, ○ 淵上 壮太郎

【序】タンパク質のシミュレーション結果には動的構造情報が原子レベルの精度で含まれているが、複雑多様な揺らぎの実態、その動的機構、機能との相関を解明するためには、膨大なデータの中から有用な情報を抽出する必要がある。特に、タンパク質の遅い時間スケールの運動は機能と関連する可能性が高く、その運動を効率的に特定・解析する手法が求められている。そのような手法として、最近、我々は「時間構造に基づいた独立成分分析 (tICA)」を提案した^[1]。本研究では、リジン・アルギニン・オルニチン結合タンパク質 (LAO) を対象として 1 μ s の長時間シミュレーションを実行し、得られた時系列データに tICA を適用することによって LAO 主鎖の遅い運動を同定し、特徴づけることを試みた。

【分子動力学シミュレーション】基質が結合していない LAO の結晶構造 (PDB ID: 2LAO, 図 1) を用い、水を陽に含んだ全原子分子動力学シミュレーションを行った。系の総原子数は約 8 万である。シミュレーションの実行には Ikeguchi により開発された分子動力学シミュレーションソフトウェア MARBLE を使用し、力場は CHARMM22/CMAP を用いた。周期境界条件を課し、静電相互作用の計算には Particle Mesh Ewald 法を用いた。作成した初期構造をエネルギー最小化し、NPT アンサンブルを用いた平衡化を行った後、NVE アンサンブルで本計算を 1 μ s 実行した。

シミュレーションの結果を見てみると、LAO が大きく揺らいでいる様子が観察される (図 2 の黒線)。揺らぎの時間スケールに注目すると、100 ns オーダーの遅い時間スケールの揺らぎが含まれていることもわかる。各ドメインは安定であることから、LAO の揺らぎはドメイン運動が支配的であることが示唆される。

【tICA の概略】時系列データ $x(t)$ の tICA を実行するには、共分散行列 C と時間遅れ共分散行列

$$\bar{C} = \left\langle \left(x(t) - \langle x(t) \rangle \right) \left(x(t+t_0) - \langle x(t) \rangle \right) \right\rangle$$

を用いて、一般化固有値問題 $\bar{C}F = CFK$ を解く。ここで、 F は固有ベクトル行列、 K は固有値行列。また、本研究では、遅延時間パラメータ t_0 を 1 ns とした。tICA では、固有ベクトル f_i は非直交基底をなしており、対となるベクトル $g_i = C f_i$ が運動の方向を表わす独立成分となる。固有

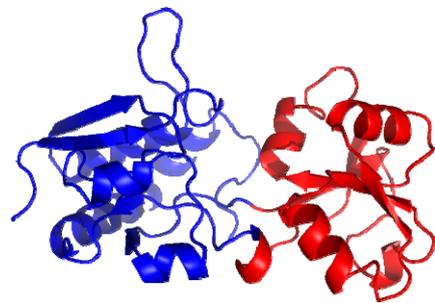


図 1 : リジン・アルギニン・オルニチン結合タンパク質。2つのドメイン(青, 赤)から成る。

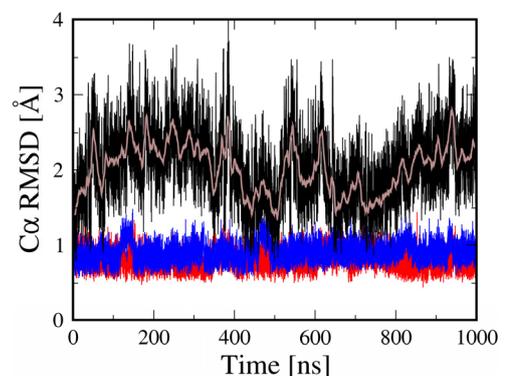


図 2 : 結晶構造との C_{α} RMSD の時間発展。全体:黒, 各ドメイン:青, 赤。

値は運動の時間スケールを特徴づけている。

【tICAによって特定された遅い運動】LAOの C_{α} 原子を対象とし、シミュレーション結果にtICAを適用して得られた独立成分を図3に示す。第一独立成分(IC1)によって表わされる最も遅い時間スケールの運動(図3上段)では、218番目から221番目の残基にかけての局所的な部分の変動が顕著であった。この部分の運動の詳細を調べたところ、ペプチド結合部分が1 μ s中で一度だけクランクシャフト運動を起こしていた。このような稀にしか起こらない運動ではその時間スケールが遅くなるので、tICAが目論見通りにうまく機能していることがわかる。

第三独立成分(IC3)においても、IC1と同様に、顕著な局所運動が14~16番目の残基、および、167番目の残基に見られる(図3下段)。前者周辺の運動を調べたところ、4本の水素結合が解離した後、しばらくして元の結合が再形成されるというイベントが2回起こっていた。167番目の残基はこのイベントが発生しているドメインとは別のドメイン上にあるが、ちょうど向かい側にあたっており、2つの運動にはなんらかの因果関係が想像される。しかし、ドメイン間に直接の相互作用は観察されなかったため、同じような時間スケールをもつ2つ運動が分離できず、1つの独立成分で記述されてしまったのではないかと推測される。

一方、第二独立成分(IC2)にはIC1のような顕著な局所運動は存在せず、2つドメインが反対方向に回転し、全体がねじれるような運動(ねじれ運動)を表わしていることがわかる(図3中段)。この運動は、図2に見られる遅い時間スケールの揺らぎの原因となっていることも確認できた。この結果は、ドメイン運動のみに限定してtICAを行った以前の解析結果^[1]とも一致している。

以上のように、tICAではタンパク質の遅い時間スケールの運動を、その運動が全体的であるか局所的であるかにかかわらず、うまく抽出することができ、その運動の詳細を明らかにすることができた。

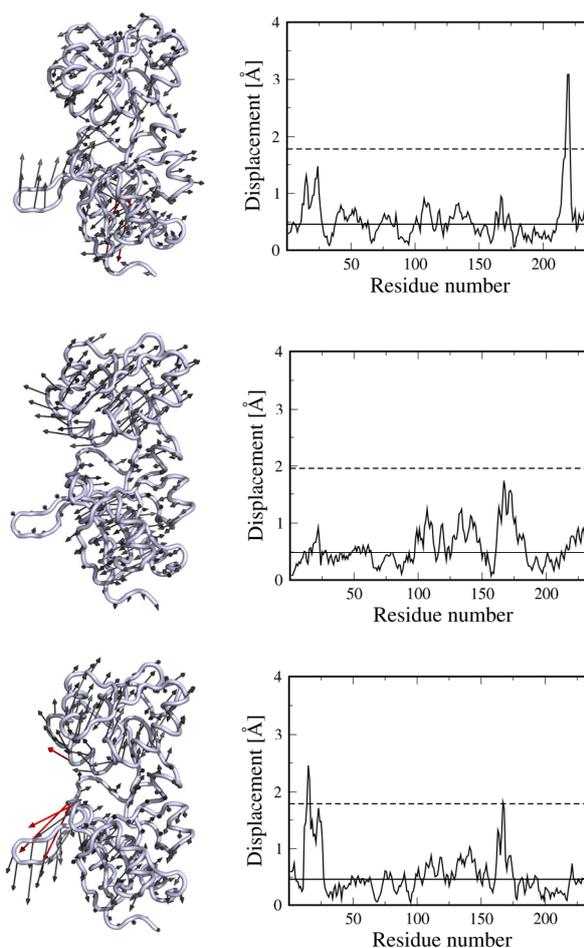


図3 : tICAによって特定されたLAOの遅い時間スケールの運動。上から順にIC1, IC2, IC3。左図では運動の方向を矢印で示した。右図は残基ごとの変位の大きさ。実線はメジアン、破線はその4倍。メジアンの4倍よりも大きな変位を示す残基は、左図の矢印を赤色にしてある。

[1] Y. Naritomi and S. Fuchigami, *J. Chem. Phys.* **134**, 065101 (2011).

高圧環境におけるタンパク質構造の理論的研究： 圧力に関する拡張アンサンブルシミュレーションを用いて

(名大・院・理¹, 名大・構造生物研²) ○森義治¹, 岡本祐幸^{1, 2}

【序】

いくつかのタンパク質（例えば BPTI やユビキチン）においては、高圧下においてその構造が変化することが知られている。これはタンパク質の圧力変性として知られている。

この分子論的な機構を理解することは重要である。そのような方法として例えば分子シミュレーションの方法を用いることができる。しかし、生体分子のような系に対する分子シミュレーションでは、多くの自由エネルギー極小状態にしばしばとらわれることがある。さらに高圧下のシミュレーションにおいてはタンパク質の構造が変化しにくくなり、解析を行うのに十分なデータを得ることができないこともある。

このような困難を克服するために、拡張焼き戻し法（generalized simulated tempering）という新しい拡張アンサンブル法が提案された [1,2]。さらにわれわれはその方法を温度と圧力に関して適用した手法、つまり、温度と圧力に関する焼き戻し方を提案した [3]。この方法の模式図を図 1 に示す。この方法においては温度と圧力がシミュレーション中において平衡状態を保つように様々な値に変化することを許す。このことによりシミュレーションにおいて効率的なサンプリングを実現し、さらに系の様々な温度と圧力における物理量を正確な量を計算することができる。

【方法】

扱うタンパク質として BPTI とユビキチンをそれぞれ選び、水中のそれらのタンパク質をモデルとして用いた。これらの系に対して全原子分子動力学シミュレーションを行った。分子動力学シミュレーションは【序】において述べた温度と圧力に関する焼き戻し法を用いて実行された。

本研究においては、圧力空間においてランダムウォークをするように設定し、温度に関しては室温（300 K）のみを設定した。圧力は大気圧（1 bar）から 10,000 bar まで設定した。

【結果】

本研究におけるユビキチンを例として、シミュレーションにおける圧力の時間発展を図 2 に示す。この図から、低圧（大気圧）から高圧（10,000 bar）におよぶ広い範囲を、タンパク質の系が圧力空間でランダムウォークしていることがわかる。このこ

とにより低圧から高圧にかけての系の状態を効率よくサンプリングすることができ、タンパク質の構造を広く探索することができた。このため、大気圧におけるタンパク質の状態と高圧に関するタンパク質の状態を正確に計算することが可能となった。

このようにして得られたデータを用い、低圧から高圧にかけてさまざまな圧力に対応するタンパク質の構造情報および水分子の分布、また相互作用エネルギーを計算した。これらは圧力により変化しており、圧力によるタンパク質の構造変化と水分子のふるまいの変化が関係していることを示唆している。

【まとめ】

温度・圧力に関する焼き戻し法を適用した分子動力学シミュレーションを水中のタンパク質に対して行った。その結果、圧力空間においてタンパク質系がランダムウォークすることをみることができた。このことにより比較的大きい系であっても、焼き戻し法は適用でき、正確な系の情報を計算することができるということがいえる。

これからの展望として、さらにシミュレーションを長く実行し、多くのデータをとる。その結果を用いて、より正確なタンパク質の構造やタンパク質付近に見られる水分子のふるまいの圧力依存性を解析する。さらに化学シフトなどの実験結果と比較することにより、高圧におけるタンパク質の詳細な構造変化を解明することを目指す。

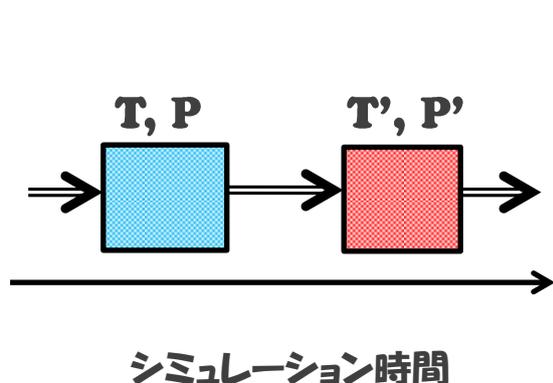


図1 温度・圧力に関する焼き戻し法の模式図

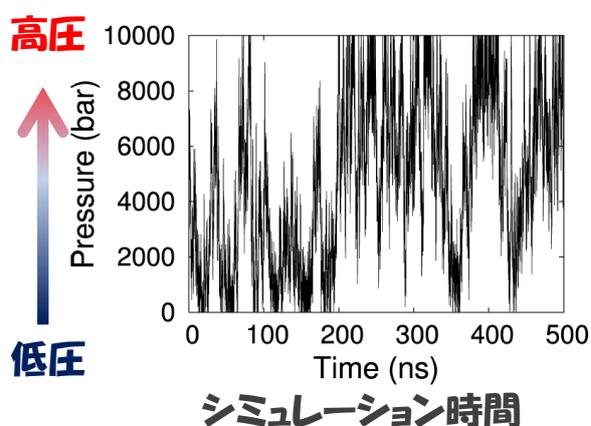


図2 焼き戻し法を用いた分子動力学シミュレーションにおける圧力の時間発展

【参考文献】

1. A. Mitsutake and Y. Okamoto, *Phys. Rev. E* **79** (2009) 047701.
2. A. Mitsutake and Y. Okamoto, *J. Chem. Phys.* **130** (2009) 214105.
3. Y. Mori and Y. Okamoto, *J. Phys. Soc. Jpn.* **79** (2010) 074003.

1B05

グラミシジン A を添加した脂質二重層膜の分子動力学シミュレーション

(金沢大院・自然)

○ 齋藤大明, アチェププルコン, 川口一朋, 長尾秀実

【序】 膜タンパク質は生体膜における物質の選択的透過, シグナル伝達, エネルギー変換等の生体機能に直接関わる重要な生体分子であり, これらの機能は膜タンパク質を介したイオン・分子透過と密接な関係がある. 例えば, 抗菌性ペプチドとして知られるグラミシジン A は, 膜内において二量体を形成することによりカチオンを選択的に透過させるイオンチャンネルを形成する事が知られている[1]. これら膜タンパク質のイオン・分子透過機構の解明は, 生体内における膜タンパク質の機能理解のみならず, 創薬や新規ナノデバイスの研究・開発における重要課題である. 生体膜は脂質分子の種類やその混合割合によって, 膜内流動性やパッキング特性が大きく変わり, これにより膜タンパク質の構造特性や膜内安定性, イオン透過性も大きく変化することが知られている[1]. すなわち, 膜タンパク質は最適な膜溶媒環境下においてその特性を最大化させる「膜溶媒選択性」を有している. このことから, 生体内における膜タンパク質の機能解明には, 膜タンパク質だけではなく, タンパク質を取り囲む脂質二重層膜も含めた原子レベルでの動的構造や分子間相互作用特性の理解が重要である[1]. しかしながら, タンパク質-脂質二重層膜のような混合複雑系における実験観測の難しさのために, これら構造特性は未だ明らかではなく, 分子シミュレーションによる詳細な解析が望まれている. そこで本研究では, 様々な脂質膜環境におけるグラミシジン A および脂質二重層膜の動的構造の解析, グラミシジンの膜内安定性の評価を分子動力学シミュレーション計算により評価する. 膜環境の変化に対するこれらの特性の系統的変化を定量的に評価し, 生体内における膜タンパク質の脂質膜選択性やイオン・分子透過機構を明らかにする.

【方法】 本研究では, グラミシジン A の脂質二重層膜への添加効果の評価のために, 膜タンパク質-脂質二重層膜系の分子動力学シミュレーションを実行する. 具体的には, 膜溶媒である脂質分子のアシル鎖の長さを変え, グラミシジン A と脂質分子との疎水性相互作用マッチングを系統的に変化させた場合の分子動力学シミュレーションを実行させる. 本研究では4種類の長さの違う脂質分子 (DLPC; diC12:0-PC, DMPC; diC14:0-PC, DPPC; diC16:0-PC, DSPC; diC18:0-PC) を用い, これら脂質分子で構成される脂質二重層膜へグラミシジン A を添加させ, MD シミュレーションを実行する. MD 計算は等温・等圧条件下で行い, 分子力場は脂質/ペプチド系には CHARMM36 を, 水モデルには TIP3P を用いた. いずれの系の計算も 25ns までに構造が十分に平衡化している様子が示され, 15ns 以降のデータを構造や相互作用解析に用いた. 解析には脂質二重層膜の膜面積(A_{lipid})や膜厚(d_{p-p})および疎水鎖領域の厚さ(d_{co-co}), 脂質分子のオーダーパラメータ($-S_{CD}$)やアシル鎖のゴーシュ構造比(F_{gauche})を行った. また, グラミシジンのトリプトファン残基は周辺の脂質分子と水素結合することから, これら水素結合特性を動径分布関数の解析により評価する.

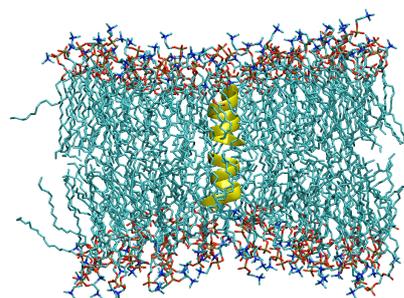
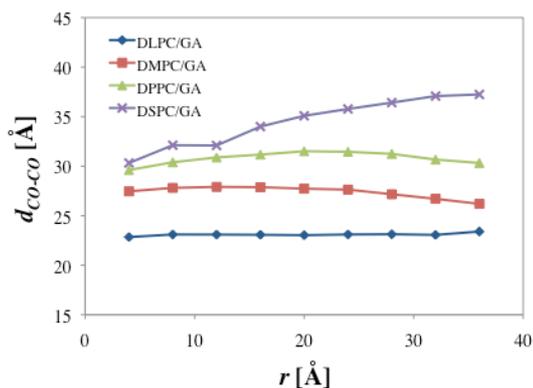


図 1. グラミシジンからの距離に対する疎水鎖厚の変化 図 2. DSPC/GA 膜のスナップショット

【結果と考察】 表 1 に各々の系における脂質膜の構造パラメータ(膜面積, 膜厚, 疎水鎖領域の厚さ, オーダーパラメータ, ゴーシュ構造比)を示す. グラミシジン添加効果の比較の為に, 表の括弧内にグラミシジン無しの系の値も示した. 解析の結果, 全ての系においてグラミシジン添加により膜面積は減少し, 膜厚と疎水鎖領域の厚さは増加する結果が示された. これは脂質分子のオーダーパラメータ増加やゴーシュ構造の減少による, アシル鎖の膜厚方向性の増加が原因と考えられ, 実験結果との良い一致が示されている[2]. グラミシジンとの距離に対する脂質の疎水鎖領域の膜厚の変化の様子を図 1 に示す. 図から明らかな様に, グラミシジンに近いほど膜厚の変化が大きい結果が示された. これはグラミシジンと周辺の疎水鎖領域の厚さの大きさのミスマッチングにより生じるものであり, 実際, DSPC/GA 膜の平衡状態におけるスナップショット構造(図 2) では DSPC 膜の膜厚はグラミシジン A の疎水鎖領域の厚さよりも十分大きいため, グラミシジン A 周辺の膜厚に大きなゆがみが生じていることが示された. 逆に DMPC 膜ではグラミシジンの疎水性コア領域とのマッチングが良く, グラミシジン添加による膜厚のゆがみはほとんど生じない結果が示された. これらの事から, グラミシジンは DMPC 膜において十分な安定が得られていると考えられる. 詳細は当日報告する.

【参考文献】

[1] Kelkar, D. A.; Chattopadhyay, A. BBA-Biomembranes 2007, 1768, 2011-2025.

[2] de Planque, M. R. R.; Greathouse, D. V.; Koeppe, R. E.; Schafer, H.; Marsh, D.; Killian, J. A. Biochemistry 1998, 37, 9333-9345.

	DLPC	DMPC	DPPC	DSPC
A_{lipid} [Å ²]	59.9 (62.6)	58.9 (62.9)	60.8 (62.7)	61.5 (63.8)
d_{p-p} [Å]	32.1 (31.3)	36.3 (35.1)	39.5 (39.2)	42.9 (42.6)
d_{CO-CO} [Å]	23.1 (22.6)	27.8 (26.4)	31.0 (30.5)	34.6 (34.0)
$-S_{CD}$	0.18 (0.17)	0.18 (0.17)	0.18 (0.17)	0.18 (0.17)
F_{gauche} [%]	28.4 (29.2)	29.5 (29.9)	30.2 (30.7)	30.9 (31.3)

表 1. 膜構造パラメータ. 括弧内はグラミシジン無しの系の値

[序]

ペプチド基には幾つかの特徴的な振動モードが存在し、その振動数位置（および振動数シフトに伴うバンド形状変化）がペプチド鎖の構造に関する情報を与えることは、よく知られている。しかし、その特徴的な振動モードそれぞれの、ペプチド基 1 つあたりの赤外強度のペプチド鎖構造への依存性については、全く考慮されないか、考慮しようとしても定量的根拠が存在しないので無視できる程度と仮定されるか、というのが現状である。

主として C=O 伸縮に由来するアミド I モードについては、水分子などとの水素結合形成によって赤外強度が増大し、その増大の程度は、例えば水 3 分子との水素結合形成で約 1.7 倍 (*N*-methylacetamide-*d*₁ の場合で 314.7 → 527.8 km mol⁻¹) であることは、以前に示した [1]。最近、主として NH 変角に由来するアミド II モードの赤外強度がペプチド鎖の 2 次構造に依存することが、理論計算の結果から現象論的に示唆されている [2]。本研究では、そのメカニズムについて、水の OH 伸縮等の場合 [3,4] と同様の電子密度微分の解析により、検討する。

[計算方法]

計算は、alanine dipeptide (CH₃-CONH-CHCH₃-CONH-CH₃) を対象に、B3LYP/6-31+G(2df,p) レベルで行った。孤立系として最安定である C₇ 構造 [(Φ, Ψ) = (-83.7, 75.0)°] のほか、2 面角を固定した構造最適化によって C₅ 構造 (伸び切り鎖) [(Φ, Ψ) = (-180, 180)°] とその近傍 (Φ = -210° to -120°, Ψ = 120° to 210°, 30° 間隔), pII 構造 [(Φ, Ψ) = (-75, 145)°], α -helix 構造 [(Φ, Ψ) = (-57, -47)°] を検討対象とした。通常の振動モードの計算から得られる力の定数行列と双極子微分から、平均部分ベクトル (average partial vector, APV) 法 [5] によって、各ペプチド基のアミド II モードの赤外強度を求めた。以下、アセチル基側からペプチド基 1, ペプチド基 2 と番号付けする。

赤外強度変化の電子構造的要因を解析するため、C₅ 構造と C₇ 構造を対象に、振動に由来する電子密度の変化 (電子密度微分 $\partial\rho^{(el)}(\mathbf{r})/\partial Q_{AII}$) を計算した (Q_{AII} はアミド II 振動座標)。この量は、双極子微分に対する電子の寄与 $\partial\boldsymbol{\mu}^{(el)}/\partial Q_{AII}$ と

$$\partial\boldsymbol{\mu}^{(el)}/\partial Q_{AII} = -e \int d\mathbf{r} \mathbf{r} (\partial\rho^{(el)}(\mathbf{r})/\partial Q_{AII}) \quad (1)$$

という関係にある。振動する核に単純に追従する電子の寄与を除くため、 α 炭素の先の隣接ペプチド基を水素原子で置換した系における電子密度微分を差し引いた $\delta(\partial\rho^{(el)}(\mathbf{r})/\partial Q_{AII}) [\equiv (\partial\rho^{(el)}(\mathbf{r})/\partial Q_{AII})_{dipeptide} - (\partial\rho^{(el)}(\mathbf{r})/\partial Q_{AII})_{isolated}]$ を計算した。これにより、隣接ペプチド基との相互作用に由来する電子密度微分の変化を見ることができる。

[結果と考察]

N-methylacetamide 孤立分子のアミド II モードと比較すると、C₅ 構造のペプチド基 1 について、特に大きい赤外強度増大 (199.9 → 458.2 km mol⁻¹) が計算された。2 面角の値が 180° から離れると、増大の程度は小さくなり、例えば (Φ, Ψ) = (-120, 120)° での強度の計算値は 323.8 km mol⁻¹ で

あった。C₇構造、pII構造、α-helix構造のペプチド基1, および本研究で検討対象とした全ての構造のペプチド基2については、強度の計算値は194.9–291.4 km mol⁻¹の範囲にあり、赤外強度増大は見られないか、見られてもその程度が上記に比べてかなり小さかった。なお、APV法で求めた上記赤外強度は、ペプチド基1と2の和をとると dipeptide 全体のアミド II 基準振動の強度和とほぼ等しく（差は最大で17.7 km mol⁻¹）、APV法がこのケースで十分に適用可能であることがわかる。

C₅構造のペプチド基1のアミド II モードの赤外強度が著しく増大するのは、ペプチド基2のC=Oとの水素結合的な相互作用に関係していると、比較的容易に想像できる。しかし、C₇構造のペプチド基2のNHもペプチド基1のC=Oと水素結合を形成しているので、水素結合の有無のみで赤外強度を論ずることはできない。この双方のケースについて、電子密度微分 $\alpha\partial\rho^{(el)}(\mathbf{r})/\partial Q_{\text{AmI}}$ を計算した結果を、図1に示す。C₅構造のペプチド基1のアミド II モードによって、ペプチド基間に大きな電荷フラックスが引き起こされていることがわかる(図1 a)。その大きさ ($3.53 \times 10^{-4} a_0^{-1} m_e^{-1/2}$, or $2.99 \times 10^{-2} e \text{ \AA}^{-1} \text{ amu}^{-1/2}$) は水のOH伸縮の場合 [3] の1/6程度であるが、これによる双極子微分の変化はこのモードの元々の双極子微分とほぼ平行であり、450 km mol⁻¹程度までに赤外強度が増大することをよく説明する。ペプチド基間の電荷フラックスは、C₇構造のペプチド基2のアミド II モードでも誘起され(図1 b)、その大きさ ($1.65 \times 10^{-4} a_0^{-1} m_e^{-1/2}$, or $1.40 \times 10^{-2} e \text{ \AA}^{-1} \text{ amu}^{-1/2}$) は、上記の半分程度もあるが、(図からはわかりにくい) これによる双極子微分の変化はこのモードの元々の双極子微分とほぼ垂直となっており、赤外強度増大を引き起こさないことをよく説明する。

したがって、アミド II モードの赤外強度の2次構造依存性が、鎖内のペプチド基どうしの相対配置と相互作用によって生ずることがわかる。

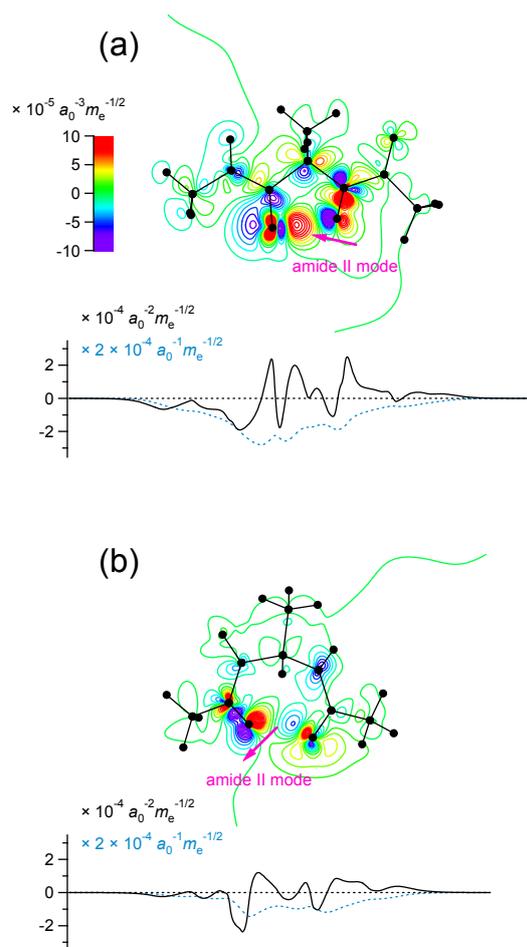


図1 : (a) C₅構造をとる alanine dipeptide のペプチド基1, および (b) C₇構造をとる alanine dipeptide のペプチド基2のアミド II モードに由来する電子密度微分 $\alpha\partial\rho^{(el)}(\mathbf{r})/\partial Q_{\text{AmI}}$ の2次元マップ（等高線図）および1次元プロット（黒実線）。青点線は1次元プロットの累積積分。

[1] H. Torii, *J. Chem. Phys.* **133**, 034504 (2010). [2] H. Maekawa, G. Ballano, C. Toniolo, and N. H. Ge, *J. Phys. Chem. B* **115**, 5168 (2011). [3] H. Torii, *J. Phys. Chem. B* **114**, 13403 (2010). [4] H. Torii, *J. Phys. Chem. B* **115**, 6636 (2011). [5] H. Torii, *J. Phys. Chem. A* **108**, 7272 (2004).

フーリエ変換型微弱発光分光分析装置による ポリリシンの熱ルミネッセンススペクトル

(農工大院 BASE¹、(株)日本アプライドテクノロジー²) 山田太志¹、唐木沢威人¹、
関根正彦¹、石井浩²、佐藤親弘²、○中田宗隆¹

【序】これまでに、我々はフーリエ変換型発光分光分析装置によって 20 種類のアミノ酸の熱ルミネッセンススペクトルの測定を試み、リシンが酸素中の高温下で側鎖のフリーのアミノ基と酸素と相互作用して、600 nm 付近に微弱熱発光を生じることを見出した[1]。本研究では、まずリシンの多量体である ϵ -ポリリシンの熱発光スペクトルを測定し、リシン単量体の熱発光スペクトルとの比較を行った。また、 ϵ -ポリリシンのペプチド結合が熱発光に関与していると推測し、側鎖にフリーのアミノ基をもたないナイロン-6 についても同様の実験を行い、 ϵ -ポリリシンの熱発光機構についての考察を行った。

【実験】 ϵ -ポリリシンの固体試料は JNC(株)から提供された 25% ϵ -ポリリシン水溶液から水を除去して乾燥することによって得た。ナイロン-6 は Sigma Aldrich より購入した。固体試料 (約 1 g) を 20 ϕ のアルミニウム製の皿に入れ、酸素または窒素下の試料室内で、室温から 453 K に温度を徐々に上げながら、日本アプライドテクノロジー社製の FT-CL-8310 で熱発光スペクトルを測定した。積算時間は約 1 分である。

【結果と考察】リシン単量体は 420 K で熱発光を始め、温度上昇とともに強度が増加し、温度を 453 K で一定にしたときには、強度の減少も波長のシフトも起こさないことがわかっている[1]。今回、横軸を波数に変換した後に、ガウス分布をあてはめると、リシンの最大発光の波長が 602 nm であることがわかった (図 1)。一方、 ϵ -ポリリシンの熱発光スペクトルを測定すると、リシン単量体と同様に窒素中では発光せず、酸素中で発光した。しかし、発光の開始温度は約 400 K でリシン単量体よりも低く、最大発光の波長は約 550 nm (図 2 左) で短かった。また、453 K に到達後に温度を一定に保つと、強度が減少を始め、波長は長波長側へシフトし、最終的には約 600 nm になっ

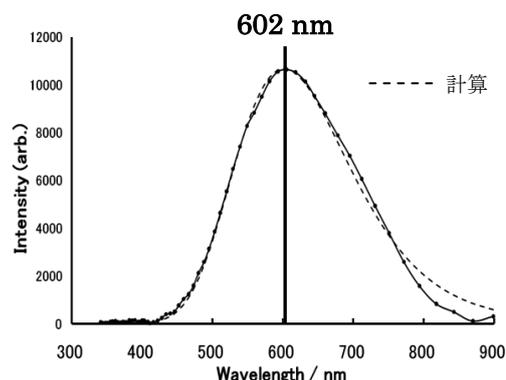


図 1 リシンの熱発光スペクトル

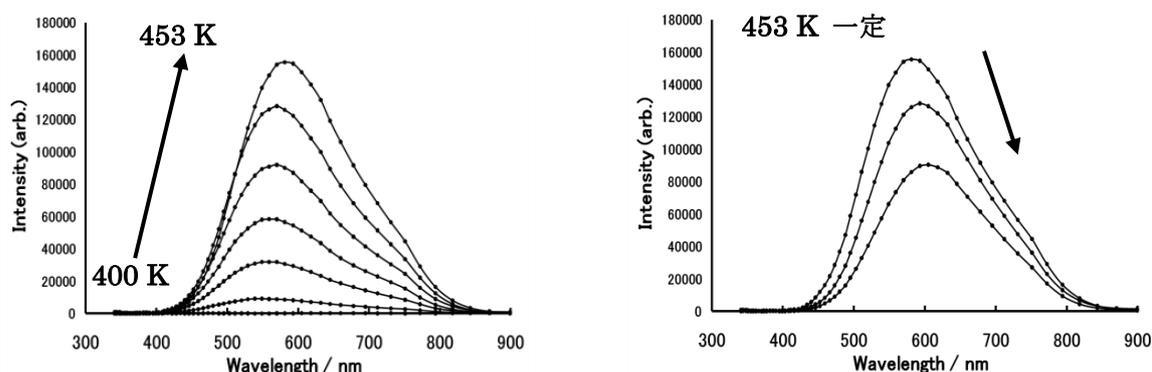


図 2 ϵ -ポリリシンの熱発光スペクトル

た(図2右)。以上のように ϵ -ポリリシンの発光スペクトルの挙動はリシン単量体と大きく異なり、その発光機構には側鎖のフリーのアミノ基以外の官能基も関与している可能性がある。そこで、単量体のときと同様に、453 Kに到達したときのスペクトルにガウス分布を当てはめた結果、三つのバンドに分離できた(図3)。最も短波長の542 nmのバンドは発光の初期には最も強いが、温度を453 Kで一定に保つと減少を始めた。加熱前後で赤外吸収スペクトルを測定して比較すると、アミド結合の吸収バンドが減少していたので、542 nmのバンドをアミド結合と酸素との相互作用による発光であると帰属した。つまり、アミド結合が熱反応によって壊れ、徐々に発光を示さなくなったと考えられる。アミド基による発光は他のポリアミドでも確認されている[2]。一方、602 nmのバンドはリシン単量体の発光と一致するので、側鎖のフリーのアミノ基と酸素との相互作用による発光に帰属した。また、アミノ酸のジシクロヘキシルアミン塩の発光[1]との類似から、668 nmのバンドは ϵ -ポリリシン主鎖の末端のアミノ基と酸素との相互作用による発光と仮定した。

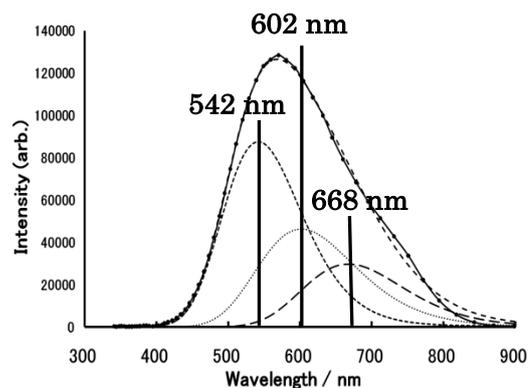
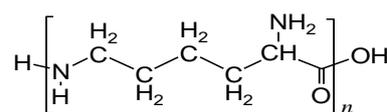
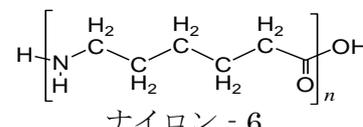


図3 スペクトルのバンド分離

以上の帰属を確認するために、主鎖の構造は ϵ -ポリリシンと同じで、側鎖にフリーのアミノ基をもたないナイロン-6の発光スペクトルを測定した。453 Kで測定したスペクトルにガウス分布を当てはめると、 ϵ -ポリリシンと同じ542 nmと668 nmのバンドが現れたが、側鎖のアミノ基が関与する602 nmのバンドは現れなかった(図4左)。なお、ナイロン-6は、温度の上昇と共に強度が増加するが、 ϵ -ポリリシンのような波長シフトも強度の減少も見られなかった(図4右)。この結果は、ナイロン-6では ϵ -ポリリシンのような熱反応が起こらないことを意味している。実際、加熱前後の赤外吸収スペクトルには変化が見られなかった。したがって、 ϵ -ポリリシンの熱反応には、ナイロン-6にはない側鎖のアミノ基が関与している可能性が高いと思われる。



ϵ -ポリリシン



ナイロン-6

図4 ポリアミドの構造式

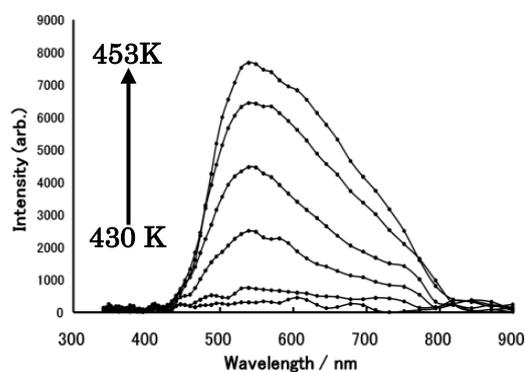
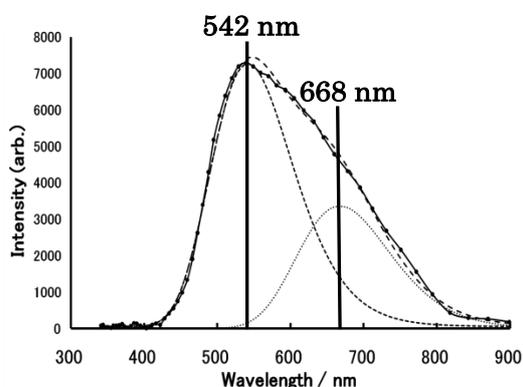


図4 ナイロン-6の熱発光スペクトル

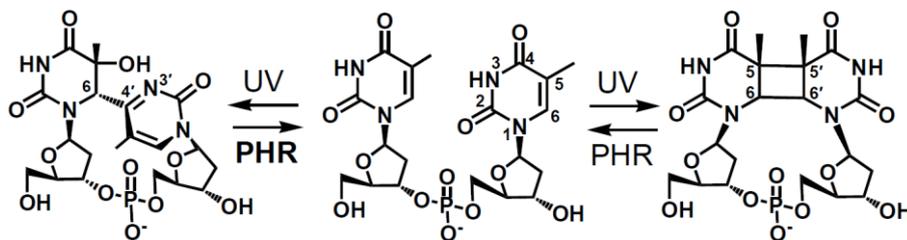
[1] H. Ishii et al., *Chem. Phys. Lett.*, **496**, 330-334 (2010).

[2] 山田太志ら、本討論会要旨、2P086.

¹⁵N ラベルした(6-4)光産物修復の赤外分光観測

(1 名工大院工、2 阪大院理、3 スクリプス研、4 阪大院医) ○張宇¹、山田大智¹、
岩田達也¹、山元淳平²、人見研一^{2,3}、岩井成憲²、藤堂剛⁴、E. D. Getzoff³、神取秀樹¹

【序】DNA が紫外線を吸収すると、励起状態からの緩和の過程でしばしば異なった化学構造を取る場合がある。代表的な光産物



図、1 チミン(中央)、CPD(右)、(6-4)光産物(左)の構造。

として、隣り合ったチミン同士が共有結合を形成した CPD(図 1、右)または(6-4)光産物(図 1、左)を挙げることができる。これらの DNA 損傷は細胞のガン化など生命に危険な状態をもたらすため、損傷を修復する種々の酵素を生物は有している。このうち、光回復酵素は青色光を用いて DNA の修復を行う酵素であり、いずれも FAD を発色団としている。植物の光センサーや動物の概日時計の構成要素として働くクリプトクロムとの構造の類似性が報告されている光回復酵素であるが、(6-4)光回復酵素は CPD 光回復酵素よりも発見が遅く、反応機構の理解も遅れている。CPD より複雑な構造を有する(6-4)光産物の修復においては酸素の転位が必須であり、修復過程におけるオキセタン中間体などが提案されてきた。最近、(6-4)光回復酵素の結晶構造が報告され、構造をもとにした新しい研究の時代に入ったが、反応中間体の捕捉を含めた詳細な構造解析は皆無である[1]。

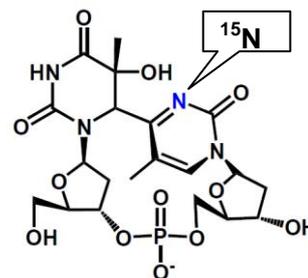
これまでに我々は、*Xenopus* 由来の(6-4)光回復酵素[2]に対してフーリエ変換赤外 (FTIR)分光法を用いて光修復過程における構造変化の解析を試みた。再溶解試料での測定条件の構築を行い、(6-4)光回復酵素の光誘起差スペクトルを測定することに成功した。さらに光照射波長を最適化することで(6-4)光産物の光修復に伴う光誘起差スペクトルも得ることができた[3]。本発表では、77-277 K の温度範囲で光産物修復の中間体の検出と ¹⁵N 標識した(6-4)光産物の測定を行い、FTIR シグナルの帰属と中間体の構造モデルを提案する。

【実験】*Xenopus* 由来の(6-4)光回復酵素の調製は以前に報告した方法を用いた[3]。二本鎖 DNA は 14 塩基対からなり、配列中に一箇所の(6-4)光産物を含む。塩基配列を以下に示す[4]。また、(6-4)光産物は N3' が ¹⁵N 標識された試料を用いた。

5'-CGCGAATTGCGCCC-3' (TT:(6-4) 光産物)

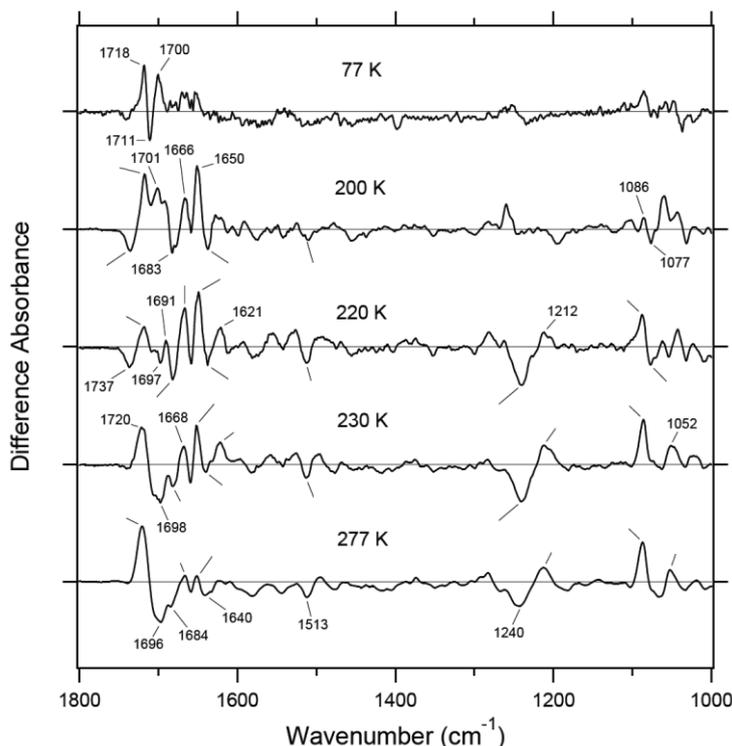
3'-GCGCTTAACGCGGG-5'

FTIR 測定は、(6-4)光産物存在下で、*Xenopus* (6-4) 光回復酵素の再溶解試料を作製し、277 K で >450 nm の光照射により還元型を蓄積させた[3]。その後 77-277 K で目的の温度にセットし、温度が安定するのを待って >390 nm 以上の光を照射し、光照射前後の差スペクトルを得た。



【結果と考察】

低温で測定した光照射前後の差スペクトルは、277 K (DNA の完全な修復の差スペクトル)とは異なるものであった(図 2)。230 K と 277 K はスペクトルの形がよく似ているが 1700-1600 cm^{-1} 領域で違いが観測される。230 K では DNA は修復されているがタンパク質から解離していない状態だと考えられ、1666 cm^{-1} 、1650 cm^{-1} のバンドは摂動を受けたタンパク質骨格(アミド I)に由来するかもしれない。また、1086 cm^{-1} 、1052 cm^{-1} のバンドは DNA のリン酸基に由来すると考えられる。



図、2 *Xenopus* (6-4) 光回復酵素の光活性化後に、各温度得られたスペクトルである。

220 K 以下ではスペクトルの形が 277 K のものとは異なることから、これらの温度では完全には修復がなされておらず、中間状態だと考えられる。同じ測定を ^{15}N (6-4) 光産物についても行い、両者のスペクトルを比較することで、C4'=N3'伸縮振動、C2'-N3'伸縮振動を同定した。これらの結果から、各温度における中間状態の構造モデルを提案する。

[1] Sancar, A. *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 2203-2237.

[2] Hitomi, K.; Kim, S. T.; Iwai, S.; Harima, N.; Otsoshi, E.; Ikenaga, M.; Todo, T. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 32591-32598.

[3] Zhang, Y.; Iwata, T.; Yamamoto, J.; Hitomi, K.; Iwai, S.; Todo, T.; Getzoff, ED.; Kandori, H. *Biochemistry.* **2011**, *50*, 3591-3598.

[4] Iwai, S.; Shimizu, M.; Kamiya, H.; Ohtsuka, E. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 7642-7643.

生体高分子の揺らぎを観る新しい手法：二次元蛍光寿命相関分光法

(理研・田原分子分光) ○石井 邦彦, 田原 太平

【序】生体高分子に標識した蛍光色素の蛍光寿命は生体高分子の構造の優れたプローブとなる。例えば FRET (蛍光共鳴エネルギー移動) を利用すれば生体高分子の構造変化をドナー色素の蛍光寿命の変化として検出できる。我々は生体高分子の構造揺らぎを調べるための新しい手法として、蛍光寿命の変化を一分子レベルで追跡してその時間揺らぎを可視化する二次元蛍光寿命相関分光法を提案した[1]。本研究ではこのアイデアを実用化するため最大エントロピー法(MEM)に基づくフィッティング解析を導入する。この新手法を用いてヘアピン DNA の構造転移[2]を観測し、実際の生体高分子の構造揺らぎへの応用可能性を検証した。

【方法】本手法では蛍光相関分光計の光源としてフェムト秒パルスレーザー(76 MHz)を用い、蛍光検出器からの光子信号を時間相関光子計数回路で処理することにより図 1 のような蛍光光子の発光遅延時間の時系列データを得る。これに対して以下の手順で解析を行う。

1. 発光遅延時間二次元相関マップの作成 ある時間間隔 ΔT をもつ光子の対を集め、各対の2つの光子の発光遅延時間(t', t'')により分類して光子対のヒストグラム $M(\Delta T; t', t'')$ を作る。行列 $M(\Delta T; t', t'')$ の各要素は異なる発光遅延時間の間の相互相関を表す。

$$M(\Delta T; t', t'') = \langle I(T; t') I(T + \Delta T; t'') \rangle \quad (1)$$

2. 無相関成分の除去と一分子相関の抽出 こうして得られた $M(\Delta T; t', t'')$ にはバックグラウンド発光や異なる分子からの蛍光光子の対といった無相関成分が含まれている。これを除くため、相関が失われる $\Delta T \rightarrow \infty$ での値を差し引く。

$$M_{\text{corr}}(\Delta T; t', t'') = M(\Delta T; t', t'') - M(\infty; t', t'') \quad (2)$$

その結果、一分子で相関を計測したのと等価な $M_{\text{corr}}(\Delta T; t', t'')$ が得られる。

3. MEM によるフィッティング：逆ラプラス変換 構造揺らぎの情報を得るためには、発光遅延時間の相関 $M_{\text{corr}}(\Delta T; t', t'')$ から蛍光寿命の相関に変換する必要がある。一般に蛍光減衰曲線 $I(t)$ から蛍光寿命分布 $a(\tau)$ への変換 (形式的に逆ラプラス変換となる) は数値的に不安定であることが知られており、物理的に妥当な分布を推定するため情報エントロピー

$$S(a) = \int \left\{ a(\tau) - m(\tau) - a(\tau) \ln \frac{a(\tau)}{m(\tau)} \right\} d\tau \quad (3)$$

を指標とし、実験データを再現する解の中から過剰に複雑な構造を持たない最も自然な解 (最大エントロピー解) を求めることが行われてきた ($m(x)$ はエントロピーの基準となる初期分布) [3]。本研究ではこの逆ラプラス変換を二次元蛍光寿命分布に拡張し、MEM を用いて

$$M_{\text{corr}}(\Delta T; t', t'') = \iint \tilde{M}(\Delta T; \tau', \tau'') \exp(-t'/\tau') \exp(-t''/\tau'') d\tau' d\tau'' \quad (4)$$

と表される $\tilde{M}(\Delta T; \tau', \tau'')$ を求める。 $\tilde{M}(\Delta T; \tau', \tau'')$ は系内に存在する種 i ごとに

$$\tilde{M}(\Delta T; \tau', \tau'') = \sum_i a_i(\tau') a_i(\tau'') \quad (5)$$

と分解できる。そこで i の最大値を設定した上で $a_i(\tau)$ をフィッティングパラメータとし、(4),(5) を満たす解の中から(3)を用いて最大エントロピー解を求めた。

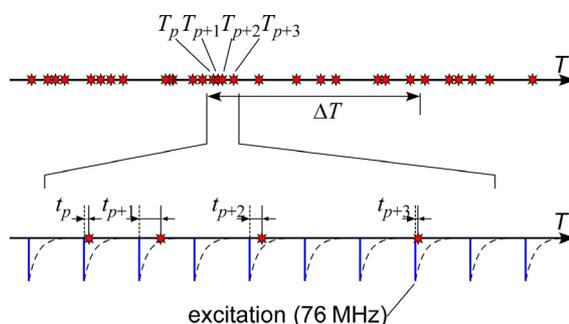


Fig. 1. 本実験で得られる蛍光光子の時系列データ。各光子の検出時刻について測定開始からの経過時間(T)と直近の励起パルスからの遅延時間(t)が記録される。

【結果】 1. 動的モンテカルロシミュレーション 図2は蛍光寿命の異なる二状態間の構造変化（単分子反応）を仮定して人工的に発生させた時系列データに対し本手法を適用して得られた $\tilde{M}(\Delta T; \tau', \tau'')$ である。各状態の平均滞在時間(200 μs)より十分短い時間スケールの ΔT を選

ぶと（図2a）2つの蛍光寿命成分の交差ピーク（ $\tilde{M}(\Delta T; \tau', \tau'')$ の非対角項）は現れない。（5）からこれはこれらの蛍光寿命成分が別の種に由来するためと解釈できる。一方 ΔT を大きくすると（図2b）、交差ピークが現れる。これは反応の進行に伴い2つの種の区別がつかなくなり、あたかも2つの蛍光寿命成分をもつ1つの状態であるかのように振舞うことを表している。この結果から、交差ピークに注目することで反応（構造変化）の時間スケールを知ることができるということが分かる。

2. ヘアピン DNA の構造転移 我々は以前に蛍光寿命相関分光法[4]を用いて両端に相補的な塩基配列をもつ一本鎖 DNA のヘアピン構造形成・解離過程を観測し、約 100 マイクロ秒で蛍光寿命を変化させるような構造揺らぎが存在することを見出した[2]。今回図3に示す一本鎖 DNA に対して本手法を適用し、ダイナミクスの帰属を試みた。図4は約 100 マイクロ秒の構造変化の前で蛍光寿命相関マップを比較したものである。これを見ると、構造変化とともに新たに現れた交差ピークが存在する一方（図4b中A）、0.3-1 ミリ秒後でも依然として交差ピークを伴わない蛍光寿命成分（同B）も同時に見られることが分かる。これらの特徴はマイクロ秒領域の構造変化が比較的蛍光寿命の短い（ドナー-アクセプター間距離が近い）構造の間で起こっており、蛍光寿命の長い成分はこの時間領域の変化に関与していないことを示している。このように、二次元蛍光寿命相関解析を行うことでマイクロ秒領域の構造揺らぎについて以前よりも詳細な情報を得ることが可能となった。

【結論】 本研究で示されたように、本手法は生体高分子のマイクロ秒領域での高速な構造揺らぎの観測に応用可能である。そのため、これまでの一分子 FRET 計測による揺らぎ観測[5]の限界を超える時間分解能をもつ新しい手法として活用されることが期待できる。

- [1] 石井邦彦・田原太平, 第3回分子科学討論会, 4P091 (2009); K. Ishii and T. Tahara, submitted for publication.
 [2] 石井邦彦・田原太平, 第4回分子科学討論会, 1B21 (2010).
 [3] J. -C. Brochon, *Methods Enzymol.* 240, 262 (1994).
 [4] K. Ishii and T. Tahara, *J. Phys. Chem. B* 114, 12383 (2010).
 [5] A. Hoffmann et al., *Phys. Chem. Chem. Phys.* 13, 1857 (2011)など.

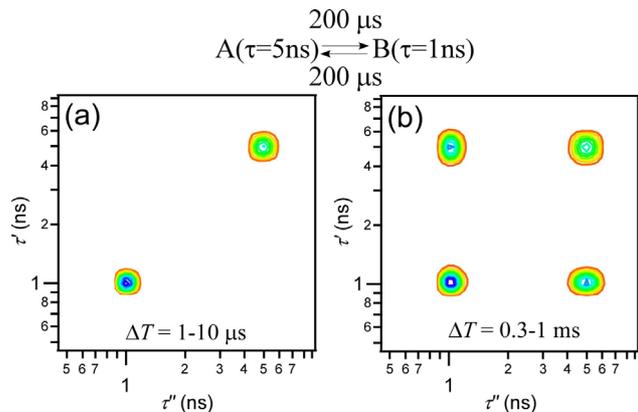


Fig. 2. 反応スキーム（上）に基づくシミュレーションデータの蛍光寿命相関マップ。

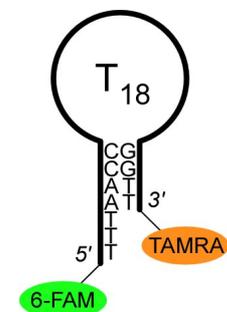


Fig. 3. 実験に用いた FRET ラベラー一本鎖 DNA。

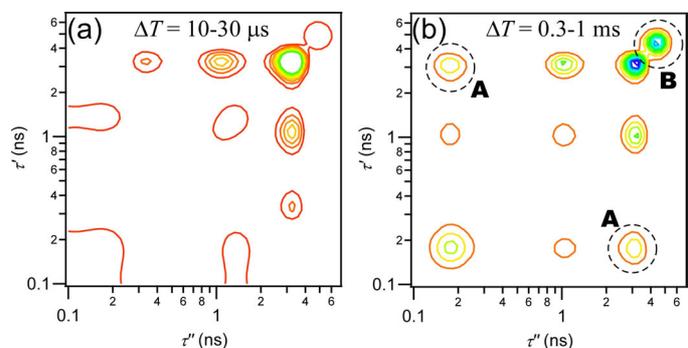


Fig. 4. ヘアピン DNA の蛍光寿命相関マップ。

二次元蛍光寿命相関分光で観る蛋白質自発ゆらぎ： シトクロム c のマイクロ秒構造転移ダイナミクス

(理研・田原分子分光) ○乙須拓洋、石井邦彦、田原太平

【序】生体高分子の自発ゆらぎに関する研究は構造-機能-ダイナミクスの相関を理解するうえで非常に重要である。生体高分子のような無限に近い自由度を有する分子の揺らぎ特性の理解には、従来の集合平均測定では不十分であり、個々の分子の実時間計測によるアプローチが必要であるとの観点から、一分子計測による研究が盛んに行われつつある。しかしながら従来の一分子計測では、時系列データの binning が必要なことから、構造機能相関の研究や、蛋白質折れ畳み機構の研究において注目されているマイクロ秒オーダーでのダイナミクスの検出が困難である。近年我々が独自に開発を行った蛍光寿命相関分光法は、一分子計測の利点と単一光子解析による高い時間分解能($\sim 100\text{ns}$)を兼ね備えた測定法であり、このような研究に最適である[1-3]。本研究ではこの新規分光法の蛋白質ダイナミクス研究への応用として、酸性変性条件下でのシトクロム c (cyt c) の構造揺らぎを取り上げた。折れ畳み研究のモデル蛋白質である cyt c は、これまでの研究により酸性変性条件下で特異的な変性中間体をとることが明らかになっている[4]。変性中間体の存在は蛋白質が効率的な折れ畳みを行ううえで重要とされているほか、生理機能との関連も報告されている[5]。そこで本研究では cyt c が変性中間体を取りうる pH3.5 条件下における、中間体を含む各構造間の構造転移ダイナミクスの測定、解析を行った。

【実験】本測定対象である cyt c (図 1) はヘムを内在していることから、C 端領域のシステイン残基(C102)に蛍光ドナーとなる Alexa546 を付与し、Alexa546-ヘム間の FRET による Alexa546 の蛍光強度、寿命の揺らぎを解析することで、cyt c の構造揺らぎを評価した。測定は自作の蛍光相関分光装置で行い、各蛍光光子の絶対到着時間 T と励起パルスからの相対遅延時間 t を記録した。得られた時系列データより、通常の蛍光強度相関関数 (G_I) と寿命の重み付けによる蛍光寿命相関関数 (G_L) の解析を行った。また、ある時間間隔 ΔT における異なる t 間の二次元相関マップ $M_{\text{corr}}(\Delta T, t', t'')$ を同データより求め、得られた $M_{\text{corr}}(\Delta T, t', t'')$ に対し最大エントロピー法(MEM)に基づく逆ラプラス変換を行うことで、異なる構造に由来する異なる寿命成分間の揺らぎを検出した[3]。

【結果と考察】図 2 には pH3.5 条件下での Alexa546_cyt c の蛍光強度相関、蛍光寿命相関および両相関の比を示しているが、計測された両相関データは明瞭な差異を示した。この差異については理論的な考察から系の不均一性を示していることが明らかとなっている[1]。よってこのデータより、酸性条件下において cyt c が異なる蛍光寿命を有するいくつかの構造をとっていることが明らかとなった。また相関比のデータは、マイクロ秒の遅延時間領域で値の大きな変化を示した。この結果はマイクロ秒の時定数で系の不均一性の変化が起こっている、つまり蛍光寿命

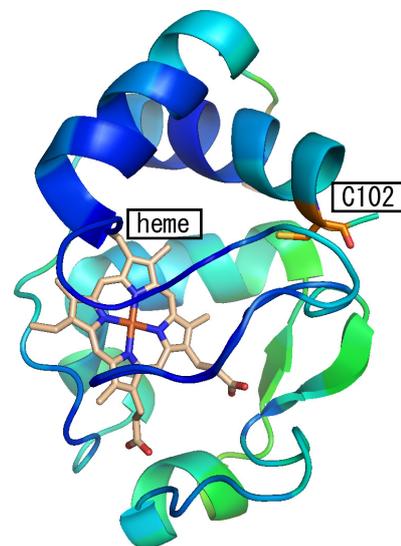
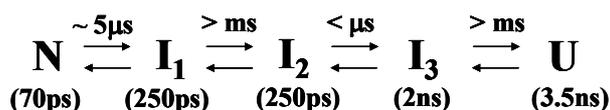


図 1. シトクロム c の立体構造
(PDB ID: 1YCC)

(Alexa546-ヘム間距離)の異なる構造間での揺らぎが起こっていることを明確に示している。この点について、どのような構造間での揺らぎが起こっているかを詳細に調べるため、相関比の値が変化する前後での t の二次元相関マップ ($M_{\text{corr}}(0.2\sim 4\mu\text{s}, t', t'')$) および $M_{\text{corr}}(50\sim 100\mu\text{s}, t', t'')$ を抽出し、MEM に基づく逆ラプラス変換を行った (図3)。得られたピークのうち、対角項のみの成分 (ΔT_1 における A, D) はその蛍光寿命を有する成分 (構造) が独立成分として検出されていることを示し、非対角項成分 (*) は、対応する2つの対角項成分 (ΔT_1 における B, C) が区別のつかない成分として検出されていることを示す [2,3]。つまり非対角項ピークの存在は、対応する対角項成分 (構造) 間の平衡が解析を行った遅延時間 (ΔT) よりも早い時定数を持つことを表している。相関比の変化前後でのデータ比較より以下の3つのことが明らかとなった。

1. マイクロ秒オーダーでの相関比の変化は $\sim 70\text{ps}$ 成分 (A) と $\sim 250\text{ps}$ 成分 (B) 間の平衡の時定数を表している。
2. $\sim 250\text{ps}$ 成分 (B) と $\sim 2\text{ns}$ 成分 (C) 間の揺らぎは $2\mu\text{s}$ 以下で起こっている。
3. $\sim 70\text{ps}$ 成分 (A) と $\sim 2\text{ns}$ 成分 (C) 間の揺らぎを表す非対角項成分が $\Delta T_2 = 50\sim 100\mu\text{s}$ の結果において確認されなかったことから、 $\sim 250\text{ps}$ の蛍光寿命を有する2つの異なる構造中間体が存在する。

以上の結果より酸性条件下での cyt c の構造転移ダイナミクスについて以下のようなモデルが考えられる。



N: native state, I: unfolded intermediate state, U: unfolded state

提案したモデルの妥当性については当日議論を行うが、本研究の結果はシトクロム c の構造転移ダイナミクスに関する新しい知見を示すとともに、蛋白質自発ゆらぎ研究における、蛍光寿命相関分光法ならびに二次元蛍光寿命相関解析の有用性を強く示唆するものである。

【参考文献】

1. K. ISHII and T. TAHARA, *J. Phys. Chem. B*, **114** (38), 12383-12391 (2010)
2. 乙須拓洋・石井邦彦・田原太平, 日本化学会第91春季年会, 2D1-13 (2011)
3. 石井邦彦・田原太平, 日本化学会第91春季年会, 2D1-11 (2011); 第5回分子科学討論会, 1B09 (2011)
4. J.H. Werner et al. *Proc. Natl. Acad. Soc.*, **103**, 1130-1135 (2006)
5. De Laureto PP et al. *FEBS J.*, **272** (9), 2176-2188 (2005)

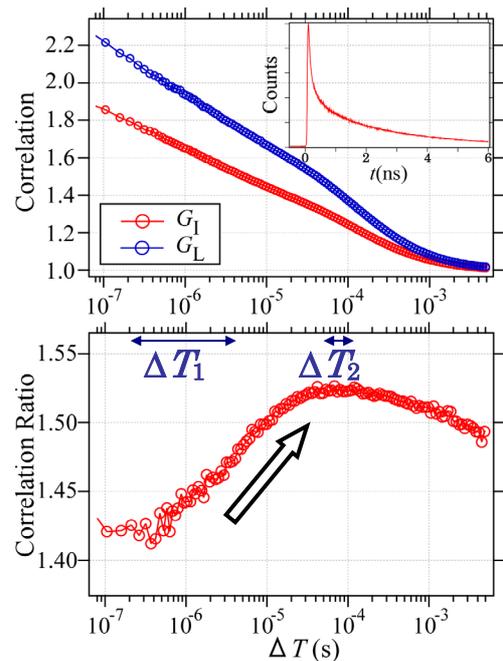


図2. (上) 蛍光強度相関と蛍光寿命相関 (下) 相関比

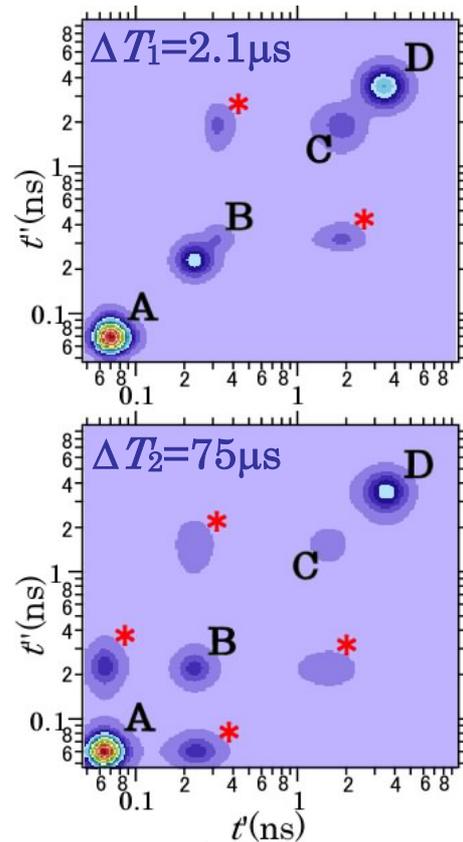


図3. 逆ラプラス変換による結果 (上) $\Delta T_1 = 0.2\sim 4\mu\text{s}$ (下) $\Delta T_2 = 50\sim 100\mu\text{s}$