

2B01

巨大分子の水和電子状態に於ける構造最適化と相互作用解析

(産総研) Dmitri G. Fedorov

Geometry optimization and interaction analysis for solvated large molecules

(AIST) Dmitri 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]。

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

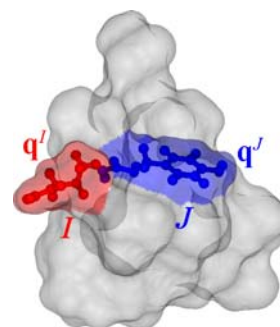
$$\Delta E_{IJ} = E_{IJ} - E_I - E_J$$

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。

本研究では、水の中巨大分子構造を最適化する為、

FMO-MP2/PCM 法の解析微分を開発した [3]。

又は、水の中相互作用解析を開発した [4]。



フラグメント I, J と、溶媒表面電荷 q^I, q^J

【方法】

1. 溶媒効果を考慮する為、可分極連続体手法 (PCM) を用いた。溶媒表面に誘電された電荷 \mathbf{q} を

$\mathbf{Cq} = -\frac{\epsilon-1}{\epsilon} \mathbf{V}$ から計算する。ここで溶質によって溶媒表面に掛かる静電場 \mathbf{V} を

$$\mathbf{V} = \sum_I^N \mathbf{V}^I + \sum_{I>J}^N (\mathbf{V}^{IJ} - \mathbf{V}^I - \mathbf{V}^J)$$
 の FMO 展開で計算する。 $\mathbf{q}(N_{\text{TS}} \times 1)$ と $\mathbf{V}(N_{\text{TS}} \times 1)$ と $\mathbf{C}(N_{\text{TS}} \times N_{\text{TS}})$ の規模

は溶媒を表わす空孔表面の要素数 N_{TS} である。溶媒の誘電電荷 \mathbf{q} を量子化学の計算に導入し、溶媒による溶質の分極を取り込む。 \mathbf{q} と電子状態を無撞着的に解く。

この様に、FMO 法に溶媒効果を入れて、FMO-MP2/PCM のエネルギー解析微分を開発した。

2. フラグメント間の相互作用解析を行う為に、北浦一諸熊の解析に因んだ Pair Interaction Energy Decomposition Analysis (PIEDA)/PCM 法を開発した。

$$E_{\text{FMO/PCM}} = \sum_I E_I'' + \sum_I \Delta E_I^{\text{solv}} + \sum_{I>J} \Delta E_{IJ}^{\text{PCM}}$$

ここで、 E_I'' は溶媒に分極されたフラグメント内部溶質エネルギーで、フラグメントの水和エネルギーは $\Delta E_I^{\text{solv}} = \Delta E_I^{\text{cav}} + \Delta E_{I(I)}^{\text{es}} + \Delta E_{I(I)}^{\text{disp}} + \Delta E_{I(I)}^{\text{rep}}$ となる。

フラグメント間相互作用エネルギー $\Delta E_{IJ}^{\text{PCM}} = \Delta E_{IJ}^{\text{ES}} + \Delta E_{IJ}^{\text{EX}} + \Delta E_{IJ}^{\text{CT+mix}} + \Delta E_{IJ}^{\text{DI}} + \Delta E_{IJ}^{\text{SOLV}}$ の成分は静電 (ES)、交換反発 (EX)、電荷移動と多体効果 (CT+mix)、分散力 (DI) と溶媒遮蔽 (SOLV) がある。後者は $\Delta E_{IJ}^{\text{SOLV}} = \Delta E_{IJ}^{\text{es2}} + \Delta E_{IJ}^{\text{es3}} + \Delta E_{IJ}^{\text{disp}} + \Delta E_{IJ}^{\text{rep}}$ で計算される。

$\Delta E_{IJ}^{\text{es2}} = \Delta E_{I(J)}^{\text{es}} + \Delta E_{J(I)}^{\text{es}}$ は直接溶媒静電遮蔽であり、 I フラグメントの電子状態と J フラグメント表面の誘電電荷 q^J の相互作用 $\Delta E_{I(J)}^{\text{es}}$ と、 J 電子状態と I の誘電電荷 q^I の相互作用 $\Delta E_{J(I)}^{\text{es}}$ に分かれる。

$\Delta E_{I(J)}^{es} = \frac{1}{2} [Tr(\mathbf{D}^I \mathbf{W}_e^J) + \mathbf{W}_N^I \cdot \mathbf{q}^J]$ は溶媒電荷 \mathbf{q} と溶質の電子と核の相互作用である。

$$\text{電子分布成分 } (\mathbf{W}_e^J)_{\mu\nu} = -\sum_{i=1}^{N_I} \langle \mu | \frac{q_i^J}{|\mathbf{r} - \mathbf{R}_i|} | \nu \rangle, \mu\nu \in I \quad \text{原子核成分 } (\mathbf{W}_N^I)_i = \sum_{\alpha \in I} \frac{Z_\alpha}{|\mathbf{R}_i - \mathbf{R}_\alpha|}$$

ΔE_{IJ}^{es3} は溶媒静電場中フラグメント I と J の間の電荷移動のエネルギーである。

水と中溶質内相互作用はどの程度で弱まったか計算し、誘電率 ϵ を局所的に第一原理から定義した。

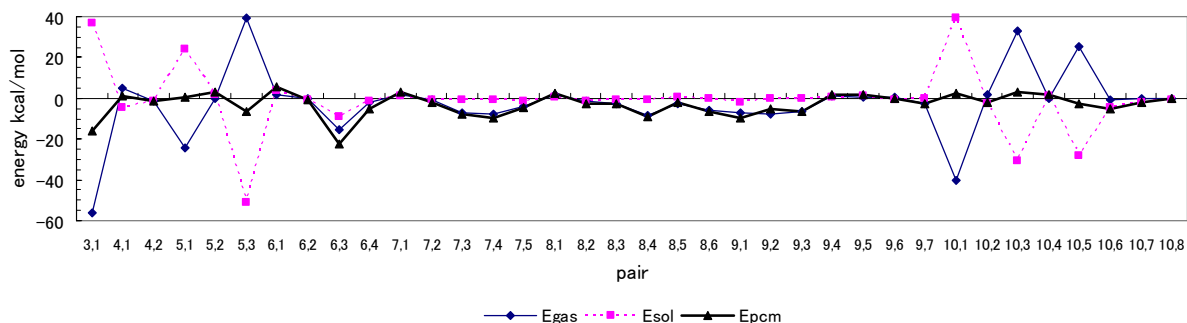
非静電溶媒遮蔽成分 ΔE_{IJ}^{disp} と ΔE_{IJ}^{rep} は I フラグメントの溶質原子と J フラグメント溶媒表面の溶媒原子の分散力(disp)と交換反発(rep)から成る。

【結果】

1. 304 原子から成る Trp 籠蛋白質(PDB:1L2Y)の構造を FMO-MP2/PCM/6-31G*で最適化した。NMR 実験構造との RMSD は 0.426 Å であった。又は、MP2 の代わりに、Grimme の分散力手法を用いて、MP2 によく似た極小を得られた (RMSD は 0.068 Å)。

2. 別な応用として、イオン間距離を変えながら、 $\text{Na}_{aq}^+ + \text{Cl}_{aq}^- \rightarrow (\text{Na}^+ \dots \text{Cl}^-)_{aq}$ の水和過程を解明した。それで、遮蔽効果とイオンが溶媒にされる分極を明らかにした。

3. FMO-MP2/PCM/6-31G*を水と中 Chignolin(PDB: 1UAO)に適用し、PIEDA で電子状態を解析した。



真空中フラグメント (残基) 間相互作用(E_{gas})は溶媒遮蔽(E_{sol})で弱まり、 E_{PCM} の値になる。

【結論】

溶媒は溶質の構造へ影響を与え、溶質内相互作用を遮蔽する。その両方の効果を第一原理に基づいた計算に取り込んだ。蛋白質の構造最適化には分散力が重要であると示した。蛋白質等で溶質内荷電の残基や官能基間の相互作用を弱める遮蔽効果が水と中相互作用解析に不可欠である。

参照

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

[2] D. G. Fedorov, T. Nagata, K. Kitaura, Phys. Chem. Chem. Phys. 14 (2012) 7562.

[3] T. Nagata, D. G. Fedorov, H. Li, K. Kitaura, J. Chem. Phys. 136 (2012) 204112.

[4] D. G. Fedorov, K. Kitaura, J. Phys. Chem. A 116 (2012) 704.

ピコ秒時間分解ラマン分光法を用いた

単一組成リポソーム脂質二重膜中のエネルギー移動の観測

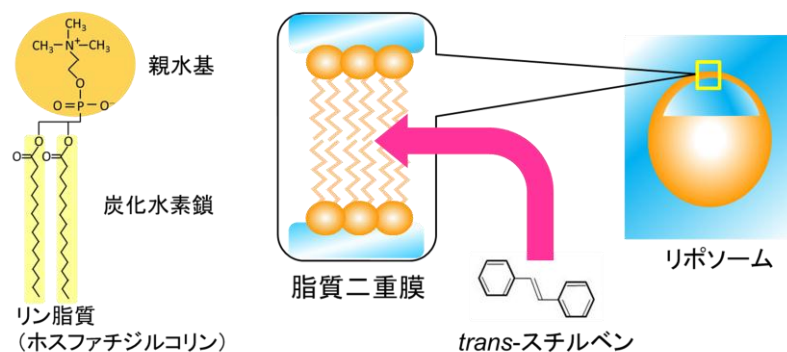
(学習院大学・理) 野嶋優妃, 高屋智久, 岩田耕一

Energy transfer inside lipid bilayer of single-component phosphatidylcholine liposome observed with picosecond time-resolved Raman spectroscopy

(Gakushuin University) Yuki Nojima, Tomohisa Takaya, Koichi Iwata

【序】細胞膜中で進行する生化学反応は多数ある。生化学反応は膜たんぱく質により触媒されるので、膜たんぱく質を取り囲んでいる脂質二重膜を生化学反応が進行する場とみなすことができる。化学反応の速度は膜中の粘度などの化学反応場の性質により決まる。そのため生化学反応を理解するには化学反応場としての脂質二重膜の性質を調べる必要がある。一般的に化学反応において、反応物は周囲の溶媒からエネルギーを受け取りエネルギー障壁を乗り越える。その後、余剰エネルギーを周囲に放出して生成物に変化する。したがってエネルギー移動特性も化学反応場を特徴づける性質の一つである。本研究では、ピコ秒時間分解ラマン分光法によりリポソーム脂質二重膜におけるエネルギー移動過程を観測し、そのエネルギー移動特性から化学反応場としての脂質二重膜の性質を評価した。

【実験】薄膜法を用いて、リン脂質より *trans*-スチルベン内封リポソーム水溶液を得た(図1)。得られたリポソームの径を100 nm に調整した。リン脂質として、炭化水素鎖の炭素数が異なる三種類の脂質(Egg-PC, DLPC,

図1: *trans*-スチルベン内封単一組成リポソームの概略

DPPC)を用いた。リポソーム脂質二重膜中の最低励起一重項(S_1)状態の *trans*-スチルベンのラマンスペクトルの時間変化をピコ秒時間分解ラマン分光計²⁾を用いて測定した。ピコ秒時間分解ラマン分光計は、モード同期チタンサファイアレーザー、再生増幅器、マルチパス増幅器、二台の光パラメトリック増幅器(OPA)、分光器、液体窒素冷却 CCD 検出器からなる。一方の OPA (800 nm 励起)からの出力を第四高調波発生により 300 nm に変換し、ポンプ光として使い、590 nm に変換されたもう一方の OPA (400 nm 励起)からの出力を一對の回折格子を用いたバンドパスフィルターで狭帯域化し、プローブ光として用いた。光学遅延回路を経た後、ポンプ光とプローブ光を試料に重ねて集光した。試料をギアポンプにより循環させて光励起による劣化を防いだ。試料から生じた散乱光を、けい光除去用の色ガラスフィルターを経て分光器のスリットに集光し、液体窒

素冷却 CCD 検出器により検出した。

【結果と考察】 *trans*-スチルベンを余剰エネルギーと共に光励起すると、 S_1 状態の *trans*-スチルベンが持つ 1570 cm^{-1} のラマンバンドの位置は時間が経つにつれ高波数側にシフトする。³⁾ このシフトの大きさは温度変化と比例しているため、バンド位置の時間変化から S_1 状態の *trans*-スチルベンの冷却過程を明らかにすることができる。DLPC 脂質二重膜中における 1570 cm^{-1} のラマンバンドの位置の時間変化を図 2 に示す。バンド位置の時間変化を単一指数関数により解析した結果、DLPC 脂質二重膜中での S_1 状態の *trans*-スチルベンの冷却速度は 0.11 ps^{-1} であった。

図 2 に示す。バンド位置の時間変化を単一指数関数により解析した結果、DLPC 脂質二重膜中での S_1 状態の *trans*-スチルベンの冷却速度は 0.11 ps^{-1} であった。

S_1 状態の *trans*-スチルベンの冷却速度と溶媒の熱拡散定数の間には相関がある。³⁾ 熱拡散定数 κ は $\kappa = \lambda / c\rho$ (λ : 熱伝導率, c : 比熱, ρ : 密度) で表される量である。図 3 にスチルベンの冷却速度と熱拡散定数の相関を示す。図 3 の相関が脂質二重膜中でも成り立つと仮定すると、得られた冷却速度から膜中の熱拡散定数を見積もることができる。見積もられた DLPC 脂質二重膜中の熱拡散定数は $9.0 \times 10^{-8}\text{ m}^2\text{ s}^{-1}$ であった。EggPC⁴⁾,

DLPC, DPPC 脂質二重膜について見積もられた値を図中に丸で示した。脂質二重膜は温度によって脂質の炭化水素鎖の状態が異なる液晶相とゲル相の二つの状態を示す。EggPC と DLPC から成る二重膜は室温で液晶相、DPPC 脂質二重膜はゲル相を示す。ゲル相の二重膜中について見積もられた熱拡散定数の値は、アルカン中の値と同程度となった。しかし、液晶相の膜中ではゲル相の膜中と比べて熱拡散定数の値が大きくなった。この理由として、膜を取り囲む水の影響が考えられる。より多くの種類の試料について測定を行って脂質二重膜の相の違いが膜中における熱拡散に与える影響について明らかにしたい。

【参考文献】 1. Y. Nojima and K. Iwata, *Chem. Asian J.*, **2011**, 6, 1817.

2. K. Yoshida, K. Iwata, Y. Nishiyama, Y. Kimura, and H. Hamaguchi, *J. Chem. Phys.*, **2012**, 136, 104504.

3. K. Iwata and H. Hamaguchi, *J. Phys. Chem. A*, **1997**, 101, 632.

4. Y. Nojima, K. Yoshida, H. Hamaguchi, K. Iwata, XXIII International conference on Raman spectroscopy, 2010, MP158.

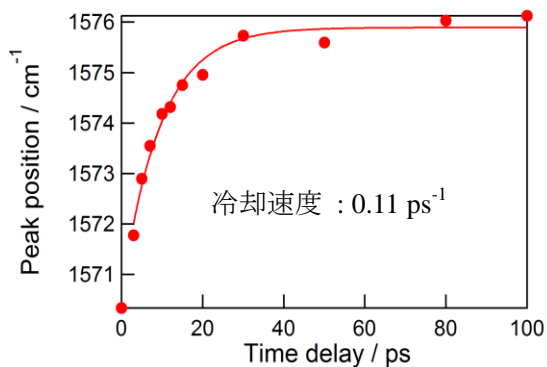


図 2 : DLPC 脂質二重膜中における S_1 *trans*-スチルベンの 1570 cm^{-1} のバンドの位置の時間変化

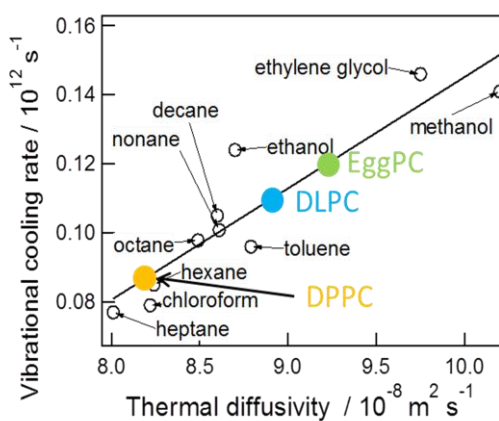


図 3 : S_1 *trans*-スチルベンの冷却速度と溶媒の熱拡散定数の相関。見積もられた熱拡散定数の値を図中に丸で示した。

2B03

脂質二重層膜におけるグラミシジン A の構造と圧力特性

(金沢大院・自然) 齋藤大明, 川口一朋, 長尾秀実

Structure and lateral pressure profile of lipid bilayer containing gramicidin A

(Institute of Science and Engineering, Kanazawa University) Hiroaki Saito, Kazutomo

Kawaguchi, Hidemi Nagao

【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。本研究では様々な脂質膜環境におけるグラミシジン A 分子動力学シミュレーションを行い, 脂質膜内におけるグラミシジンのチャンネル構造と圧力特性について解析した結果について報告する。

【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 2 種類の長さの違う脂質分子 (DMPC; diC14:0-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, 25ns 以降のデータを構造や圧力特性評価に用いた。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。分子動力学シミュレーションおよび圧力特性計算には NAMD2.7 を用いた。グラミシジンのチャンネル構造 (細孔半径) 解析には HOLE を使用した。

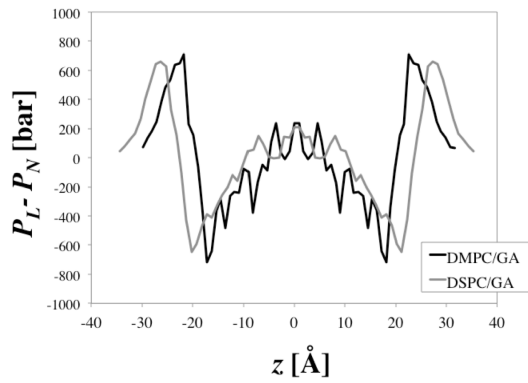


図 1. 膜厚方向に対する Lateral pressure profile.

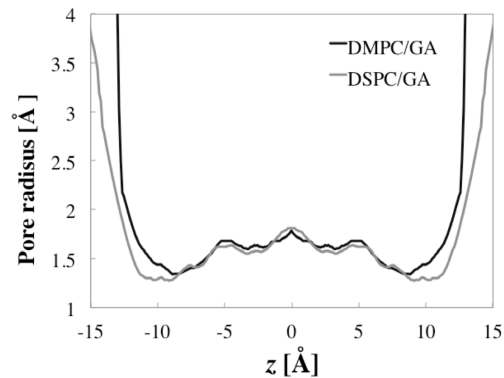


図 2. 膜厚方向に対する Pore radius profile.

【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, 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, 実験値との良い一致も示された[2].

図 1 に DMPC/GA, DSPC/GA 膜の膜圧方向 z に対する Lateral pressure profile の様子を示す. 原点は膜中心、 $|z| < 15 \text{ \AA}$ は膜の炭化水素鎖領域に対応する。 $z = |20| \text{ \AA}$ (極性基領域付近)に観測される負の圧力は膜を側面方向に収縮する圧力に対応し、膜の疎水差領域付近や水和領域に見られる正の圧力は膜を拡張する方向に働く。グラミシジンに対しては正の圧力はグラミシジンの側面へのプレッシャーとして働く。2つの系の圧力特性比較の結果、膜の中心付近($|z| < 8 \text{ \AA}$)では2つの系の圧力に大きな違いが見られないのに対し、それ以外の膜内領域では DSPC/GA 膜の方が大きな圧力特性を示した。すなわち、DSPC 膜の方がグラミシジンへの側面圧力が高いことが示された。図 2 にグラミシジンの z 方向に対する細孔半径の様子を示す。細孔半径は膜の中心付近では大きな違いが見られなかったが、チャンネルゲート付近($|z| > 10 \text{ \AA}$)では DSPC 膜内のグラミシジンの細孔半径の方が小さい値を示した。この違いは図 1 に示した DSPC、DMPC 膜における膜内圧力特性の違いから生じており、チャンネルゲート付近の細孔の縮小はイオン原子のゲートへのアクセシビリティの減少を示唆している。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.

	DMPC	DMPC/GA	DSPC	DSPC/GA
$A_{\text{lipid}} [\text{\AA}^2]$	62.9±1.1 (60.6)	58.9±1.1 (58.9)	63.8±1.3 (64.8)	61.5±1.6 (63.9)
$d_{P-P} [\text{\AA}]$	35.1±0.5 (35.3)	36.3±0.5	42.6±0.7 (41.5)	42.9±0.8
$d_{\text{CO-CO}} [\text{\AA}]$	26.4±0.4 (25.4)	27.8±0.5	34.0±0.6	34.6±0.7
$-S_{\text{CD}}$	0.17±0.01	0.18±0.01	0.17±0.02	0.18±0.01
$F_{\text{ gauche}} [\%]$	29.9±0.3	29.5±0.3	31.3±0.5	30.9±0.5
$A_{P-N} [\text{deg.}]$	60.8	60.9	62.3	61.6

表 1. 膜構造パラメータ. 括弧内は実験値

2B04

クーロンレプリカ交換法による Abeta(29-42)の構造探索

(分子科学研究所, 総合研究大学院大学) 伊藤暁, 奥村久士

Conformational samplings of Abeta(29-42) by the Coulomb replica-exchange method

(Institute for Molecular Science, The Graduate University for Advanced Studies)
Satoru G. Itoh, Hisashi Okumura

【序】

タンパク質の構造空間を効率的に探索する手法としてレプリカ交換法 [1,2] が挙げられる。しかし、この方法では水中のタンパク質系のような自由度が大きい系を扱う場合には多数のレプリカを用意する必要がある。レプリカ数の増大は計算コストの増大を意味するため、レプリカ交換法を水中のタンパク質のような自由度の大きな系に適用することは困難である。

この問題点を解決するために最近我々はクーロンレプリカ交換法を提案した。この方法ではレプリカ間で温度を交換する代わりに、原子の電荷を記述するパラメータの交換がおこなわれる。タンパク質中の各原子の電荷とタンパク質の構造とは密接に関わっており、電荷の値を変えることでタンパク質の様々な構造を得ることが可能となる。また、クーロンレプリカ交換法ではタンパク質内の相互作用に関わるパラメータのみ交換することで、水中のタンパク質系に対するレプリカの増大を抑えることが可能である。

【シミュレーション手法】

水中のタンパク質系に対し、タンパク質内のクーロンポテンシャルに対してのみ

$$V_{\lambda}(q) = \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \frac{(\lambda Q_i)(\lambda Q_j)}{r_{ij}}$$

となるように各原子の静電荷 Q にスケールリングパラメータ λ を設ける。ここで、 q はタンパク質内の原子の座標、 i, j はタンパク質内の原子、 r_{ij} は原子 i, j の間の距離、 ϵ_0 は真空の誘電率を表わす。

クーロンレプリカ交換法では、各レプリカに対して異なるスケールリングパラメータを割り当てる。レプリカ i がスケールリングパラメータ λ_m を持ち、レプリカ j がスケールリングパラメータ λ_n を持っているとき、この二つのレプリカ間のパラメータ交換は以下のメトロポリス判定によりおこなわれる。

$$W(\lambda_m \leftrightarrow \lambda_n) = \min(1, \exp(-\Delta))$$

$$\Delta \equiv \beta \left[(V_{\lambda_m}(q_j) - V_{\lambda_m}(q_i)) - (V_{\lambda_n}(q_j) - V_{\lambda_n}(q_i)) \right]$$

ここで、 $\beta = 1/k_B T$ で k_B はボルツマン定数、 T は系の温度、 q_i, q_j はそれぞれレプリカ i とレプリカ j のタンパク質内の原子の座標を表わす。

【結果】

クーロンレプリカ交換法を水中のアラニンジペプチに適用し、また、比較のためにファンデルワールスレプリカ交換法[3]、通常のレプリカ交換法、カノニカルシミュレーションもおこなった。図 1 にクーロンレプリカ交換法、ファンデルワールスレプリカ交換法、通常のレプリカ交換法から得られた二面角 ϕ, ψ に関する自由エネルギー地形を示す。また、数字は各自由エネルギー極小状態をそれぞれのシミュレーションが何回訪問したのかを表している。この図からクーロンレプリカ交換法がその他の手法と比較して効率的に二面角空間のサンプリングを実現していることが分かる。

さらに、より大きな系に対するクーロンレプリカ交換法の有効性を確かめるため、この方法を水中のアミロイドベータペプチド(A β)の C 末端フラグメント A β (29-42)に適用した。A β は水中で不溶性のアミロイド繊維を形成し、これが脳に沈着することでアルツハイマー病を引き起こすと考えられている。A β のアミロイド繊維形成において C 末端領域が重要な役割を果たすと考えられており、また A β (29-42)のみでもアミロイド繊維形成を起こすことが知られている[4]。しかしながら、A β (29-42)のアミロイド線維形成の過程のみならず、その水中での構造の詳細も未だに明らかにされていない。

本講演では、クーロンレプリカ交換法を水中の A β (29-42)に適用した結果を紹介する。

【参考文献】

- [1] K. Hukushima and K. Nemoto, *J. Phys. Soc. Jpn.* **65**, 1604 (1996).
- [2] Y. Sugita and Y. Okamoto, *Chem. Phys. Lett.* **314**, 141 (1999).
- [3] S. G. Itoh, H. Okumura, and Y. Okamoto, *J. Chem. Phys.* **132**, 134105 (2010).
- [4] C. Hilbich, B. K. Woike, J. Reed, C. L. Masters, and K. Beyreuther, *J. Mol. Biol.* **218**, 149 (1991).

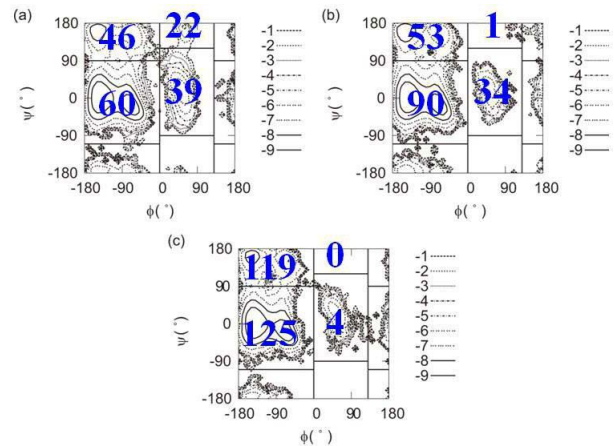


図 1 二面角 ϕ, ψ に関する自由エネルギー地形。(a) クーロンレプリカ交換法、(b) ファンデルワールスレプリカ交換法、(c) 通常のレプリカ交換法の結果。

2B05

ヒトヘモグロビン近傍および内部における 酸素分子挙動の解析

(名大院・情報科学¹, JST-CREST²)

高柳 昌芳^{1,2}、栗崎 以久男^{1,2}、長岡 正隆^{1,2}

Behavior of oxygen molecules inside and in the vicinity of human hemoglobin

(Graduate school of Information Science, Nagoya University¹, JST-CREST²)

Masayoshi Takayanagi^{1,2}, Ikuo Kurisaki^{1,2}, Masataka Nagaoka^{1,2}

【背景】ヒトヘモグロビン (HbA) は4つのサブユニット (α 鎖 β 鎖各2本) で構成される四量体ヘムタンパク質であり、酸素分子を各サブユニットのヘムに結合することで酸素分子を運搬する。ヘムに結合する酸素分子が存在する空洞 (ヘムポケット) はサブユニット内部に埋没しているため、HbA の酸素分子運搬機能を理解する上で、熱揺らぎによって HbA 外部とヘムポケットの間に一時的に形成される動的な酸素分子移動経路が重要な意味を持つ。本解析ではヘムポケットへの酸素分子侵入速度は β 鎖の方が α 鎖よりも早いという測定結果[1]の由来を原子レベルから解明することを目的として、分子動力学 (MD) シミュレーションにより複数の動的な酸素分子移動経路を特定した。なおHbAサブユニットと類似の構造であるミオグロビンにおいて、ヘムに結合した一酸化炭素が解離することで立体構造変化が生じる結果[2,3]からHbA 空洞内の酸素分子の存在は立体構造に影響を与えることが推定されるため、酸素分子をあらわに取り込んだ条件で解析を行った。

【計算手順】TIP3P 水溶媒ボックス内に T 構造四量体 HbA (酸素分子を結合していない HbA、PDB ID: 2DN2 [4]) と 120 分子の酸素分子を配置し初期構造を生成した。そして HbA 構造を拘束したまま高温条件 (750 K、NVE 一定) で 300 ps の MD 計算を実行することでランダムな酸素分子分布を生成し、次いで生体内と同様の条件 (310 K、1 atm、NPT 一定) で 100 ps の平衡化 MD 計算を実行し、最終的に HbA の拘束を解除して 310 K、1 atm、NPT 一定条件で 8 ns の MD 計算を実行した。以上の平衡化を含む MD 計算を異なる初期速度から 128 本実行し、8 ns \times 128 MD の MD トラジェクトリデータを得た。

【結果】8 ns の MD 計算 128 本から、外部からヘムポケットへの酸素分子侵入イベントが α 鎖では 141 回、 β 鎖では 425 回得られた。 β 鎖の方がヘムポケットへの侵入が速い結果は、実験的に報告されているリガンド侵入速度と整合性が取れている[1]。

HbA 各サブユニットにおける外部からヘムポケットへのリガンド侵入経路を特定するために、各 MD トラジェクトリから 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0 ns の 7 時間スレ

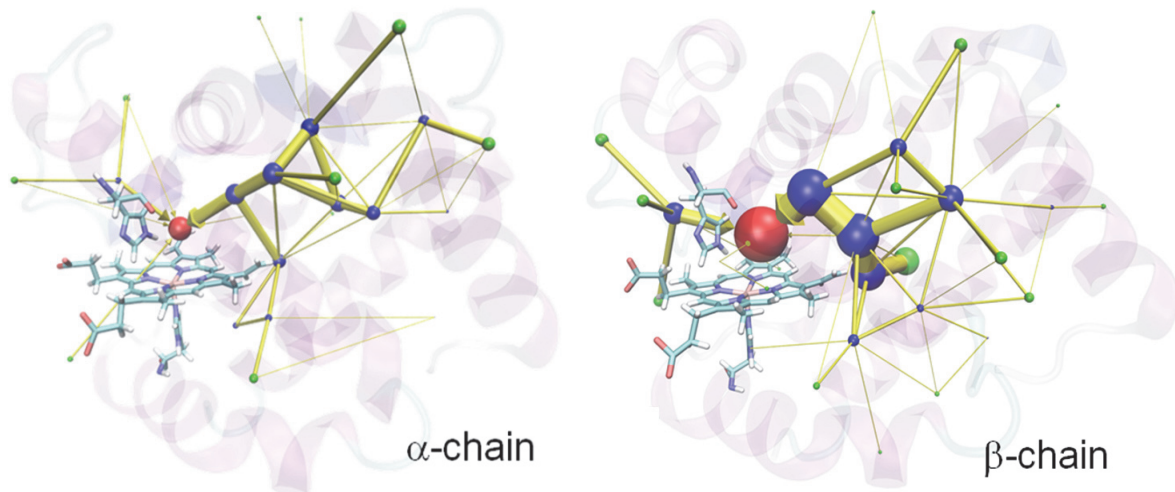


図1. MD計算で得られた酸素分子分布をクラスタリング解析することによって得られた各HbAサブユニット内ヘムポケットへの酸素分子移動経路。(左) α 鎖(右) β 鎖。赤色球はヘムポケットに対応するクラスタ重心、青色球はサブユニット内部のクラスタ重心、緑色球はサブユニット表面のクラスタ重心であり、ヘムポケットに到達した酸素分子が通過した頻度に対応して球の大きさを描画。同様にクラスタ間移動頻度に対応して黄色の円筒を描画。

ップにおいてHbA各サブユニット近傍4.0 Åに位置する酸素分子の重心座標を抽出しWard法による階層的クラスタリングを実行した。ヘムポケットに到達した酸素分子の各クラスタ通過頻度を球で、クラスタ間通過頻度を円筒で描画することでヘムポケットへのリガンド移動経路を可視化した(図1)。

両サブユニットに共通して、侵入する酸素分子の7割強は(α 鎖73.1%、 β 鎖72.2%)ヘムポケットに隣接する大きな空洞(図1のヘムポケットに対応する赤色球の右側)を経由してヘムポケットに侵入している。それに次いでCDコーナー付近から侵入する経路(図1のヘムポケット左側からの侵入)は2割強(α 鎖22.0%、 β 鎖27.5%)を占める。なお、遠位ヒスチジン近傍を通り外部溶媒から直接ヘムポケットへと侵入するHis-gateと呼ばれる経路は α 鎖5.0%、 β 鎖0.2%であり、主要な経路ではない。

α 鎖では主要な酸素分子侵入ポータル(出入り口)はヘムから離れたA, G, Hヘリックス付近に2箇所(侵入頻度23.4%, 19.9%)と、AEヘリックス間に1箇所(14.9%)存在する。それに対し β 鎖では主要な侵入ポータルはGHヘリックス間を通過するものが1箇所(43.1%)存在する。 α 鎖主要ポータルから侵入した酸素分子はヘムポケットに隣接する空洞に到達するまでに複数の空洞を経由する必要があるのに対し、 β 鎖の主要ポータル経路ではヘムポケットに隣接する空洞に直接侵入する。これが β 鎖の方が速いヘムポケットへの侵入が起こる[1]原因であると結論できる。

【参考文献】 [1] Birukou, I., Maillett, D. H., Birukova, A., & Olson, J. S. (2011) *Biochemistry*, 50, 7361. [2] Takayanagi, M., Iwahashi, C., & Nagaoka, M. (2010) *The journal of physical chemistry. B*, 114(38), 12340-8. [3] Takayanagi, M., & Nagaoka, M. (2011) *Theoretical Chemistry Accounts*, 130(4-6), 1115-1129. [4] Park, S.-Y., Yokoyama, T., Shibayama, N., Shiro, Y., & Tame, J. R. H. (2006) *Journal of molecular biology*, 360(3), 690.

2B06

ヘムオキシゲナーゼによるヘムの代謝機構に関する理論的研究

(九大先導研) 蒲池 高志、西見 智徳、吉澤 一成

Theoretical Study on Heme Metabolism by Heme Oxygenase

(Kyushu Univ. IMCE) Takashi Kamachi, Tomonori Nishimi, Kazunari Yoshizawa

【緒言】

ヘムオキシゲナーゼはヘムを分解し、鉄、ビリベルジン、一酸化炭素を生成する酵素である。この反応の中間生成物である α -メソヒドロキシヘムの生成機構として、図 1 に示す 3 つの経路が提案されている。ヒドロ

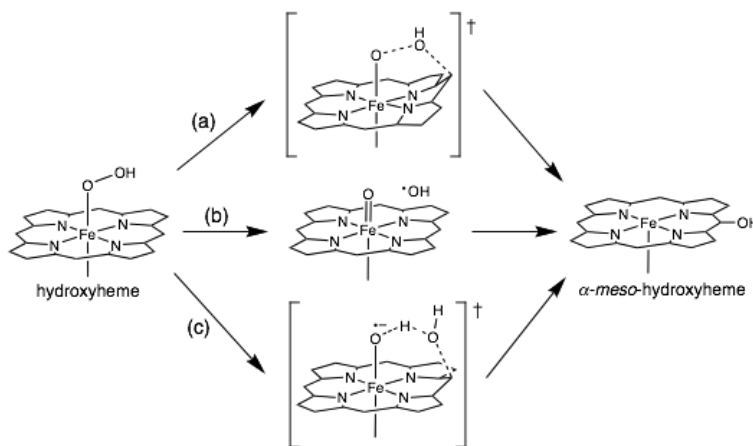


図 1. α -メソヒドロキシヘムの提案されている生成機構。

ペルオキシ配位子の遠位酸素が α 位の炭素を攻撃する協奏的反応である経路(a)は、多くの実験的研究に支持されているが、量子化学計算により、その活性化エネルギーは 47.4 kcal/mol と報告されているが、生理的条件下で進行するには高い[1]。ヒドロペルオキシ配位子の O-O 結合の開裂により生じる $\cdot\text{OH}$ が α 位の炭素を攻撃する経路(b)は、活性化エネルギーが 20.0 kcal/mol でありエネルギー的には生理的条件下で進行し得ると考えられるが[2]、反応性に富む $\cdot\text{OH}$ は生体に対する毒性が知られている。我々は以前、シトクロム P450 等の反応活性種として知られるオキシ種が水分子を攻撃し、この水分子の O-H 結合が開裂し、酸素と α 位の炭素間の結合が生成する反応経路(c)を提案した[1]。本研究ではこの経路について、酵素の全原子を考慮した QM/MM 計算により、さらなる理論的解析を行った。

【計算手法】

Sugishima らの X 線結晶解析[3]の結果に基づき、全原子数 10819 の初期構造を構築した。QM/MM 計算には Chemshell プログラムを使用した。QM 領域には、軸配位子であるヒスチジン、ポルフィリンの側鎖を取り除いたポルフィン、鉄オキシ錯体、鉄ヒドロペルオキシ種の遠位酸素にプロトンが付加することで生じる水分子 (W5)、X 線結晶解析由来の水素結合ネットワークを構築している水分子 4 つ (W1-W4) を含めた。この QM 領域について、計算プログラムは Turbomole を使用し、

B3LYP/SV(P)レベルで計算した。スピン多重度は二重項及び四重項状態を考慮し、電荷は+1とした。MM領域について、計算プログラムはDL_POLY、力場パラメータはCHARMmを使用した。

【結果】

QM/MM計算によって得られた反応物の最適化構造を図2に示す。O-O結合開裂により生じた水分子(W5)は、オキソ配位子の酸素原子及び水分子(W1, W2)との水素結合によってヘムの α 炭素上に固定されることが明らかになった。さらに、 α -ヘリックスの立体障害によって、W5によるヘムの β 位及び δ 位への攻撃が妨げられている。これらの効果により位置選択的に α 位が酸化されると考えられる。鉄原子、オキソ配位子、およびポルフィリンの二重項(四重項)状態における電子密度はそれぞれ、1.27(1.22)、0.84(0.85)、-1.05(0.91)であり、二重項状態が四重項状態より0.02 kcal/mol安定であった。これらのQM/MM計算で得られた結果は、以前報告したモデル計算の結果[1]とほぼ同等であった。反応経路(c)におけるC-O結合生成の活性化エネルギーは18 kcal/molとなり水分子が反応に関与することで有効にヘムが酸化されることが示された[4]。

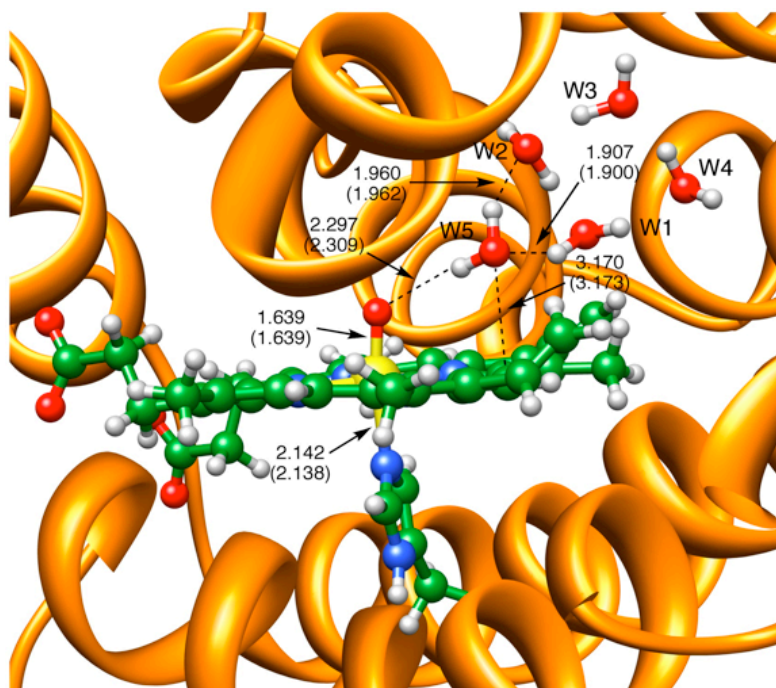


図2. QM/MM計算によって得られた反応物における活性点近傍の最適化構造。値は二重項(四重項)状態の結合長(Å)を表す。

【参考文献】

- [1] Kamachi, T.; Yoshizawa, K. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 10686.
- [2] Chen, H.; Moreau, Y.; Derat, E.; Shaik, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 1953.
- [3] Sugishima, M.; Sakamoto, H.; Higashimoto, Y.; Omata, Y.; Hayashi, S.; Noguchi, M.; Fukuyama, K. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 45086.
- [4] Kamachi, T.; Nishimi, T.; Yoshizawa, K. *Dalton Trans.* in press.

蛋白質活性部位における「低障壁水素結合」の化学

(京大・キャリアパス¹, JST さきがけ²) 石北 央^{1,2}, 齊藤圭亮¹

Chemistry of “low-barrier hydrogen bonds” in protein active sites

(Kyoto Univ.¹, JST PRESTO²) Hiroshi Ishikita^{1,2}, Keisuke Saito¹

【序】反応中間体の安定化には、特に水素結合による相互作用が重要な役割を果たす。水素結合のエネルギーは一般に 1~4 kcal/mol 程度であるが¹、「低障壁水素結合 (low barrier hydrogen bond, LBHB)」という特殊な水素結合のエネルギーは、20 kcal/mol にも及ぶと言われている^{2,3}。一方で、「LBHB」の概念や定義はしばしば曖昧であった^{1,4}。ここでは、LBHB の特徴を改めて整理してみたい。

【計算手法】光合成酸素発生蛋白質 photosystem II (PSII)⁵, 光受容体 photoactive yellow protein (PYP)^{6,7} の X 線・中性子結晶解析構造を利用した. 全蛋白質環境を考慮した QM/MM (quantum mechanical/ molecular mechanical)法を用いて, 構造最適化, 水素結合ポテンシャル, ¹H-NMR chemical shift の計算を行った。

【結果と考察】PSII の活性部位近傍に存在する TyrZ の水素結合. PSII の酸素発生部位 Mn_4CaO_5 上の水分子から電子を引きぬく D1-Tyr161 (TyrZ)は、D1-His190 と水素結合を形成している (proton “rocking” model)。PSII 結晶構造では驚くことに、水素結合距離 $O_{TyrZ}-N_{His190}$ は 2.46 Å である。この長さは、フェノール・イミダゾール化合物の最適化構造で見られる水素結合距離~2.8 Å と比べると、異常に短い。しかし、PSII 蛋白質環境下 QM/MM 構造最適化を行ったところ、 $O_{TyrZ}-N_{His190}$ は 2.47 Å となり、結晶構造の結合長を再現した。その水素結合ポテンシャルを解析したところ、左右対称な形を持つ single-well (ionic) H bond のものであった⁸。これは TyrZ と His が同じ強さで H を引く、すなわち両者の pK_a がほぼ一致するために起こる現象^{1,4}である。

PYP クロモフォアに存在する Glu46-*p*CA の水素結合. PYP のクロモフォアには Glu46 と *p*-coumaric acid (*p*CA)からなる水素結合が存在する。*p*CA はさらに Tyr42 のフェノール基からの水素結合を受け入れており、Glu46 のカルボキシル基-COOH が水素結合

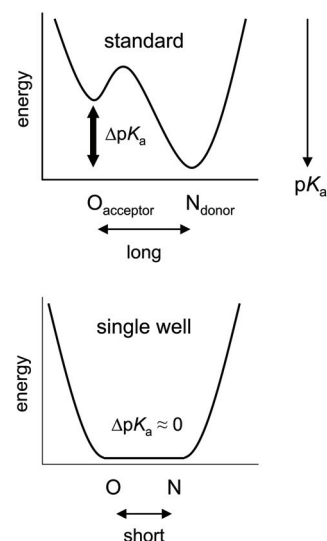


図 1. 典型的な水素結合のポテンシャル

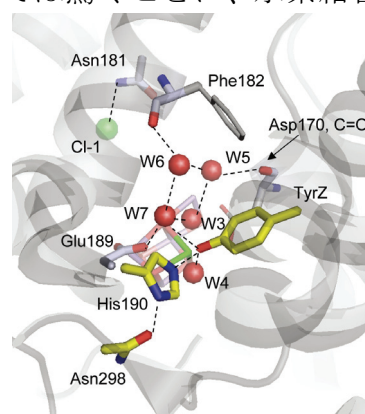


図 2. TyrZ と D1-His190 の環境

ドナー(PYP 中では $pK_a \approx 9$)、*pCA* のフェノール基-OH がアクセプター(PYP 中では $pK_a \approx 6$)となり、 $-\text{COOH} \dots \text{O}^-$ と水素結合を形成している⁹。フーリエ変換赤外分光 (FTIR) 測定の 1740 cm^{-1} 近傍の特徴的なピークから、Glu46 は protonation していることが以前より知られている¹⁰。一方、近年の中性子構造解析では、Glu46 と *pCA* 間の H 原子が結合の真ん中に近い位置に観測されたことから、低障壁水素結合 LBHB であると結論づけられた⁷。しかし、H 原子が結合中央付近に存在するためには (例えばマレイン酸分子内水素結合に見られるように) pK_a がほぼ一致しない限り化学としてありえず^{1,4}、既存の pK_a 、FTIR の測定結果¹⁰ と矛盾する。X 線結晶構造座標を用いて QM/MM 計算により構造最適化を行ったところ、 $\text{O}_{\text{Glu46}}-\text{O}_{\text{pCA}}$ の距離は正しく再現できた。しかし、その構造で水素結合ポテンシャルを描いたところ、水素原子が Glu46 に存在している非対称な形 (asymmetric double-well potential) であった¹¹。少なくとも結晶においては、 $\text{O}_{\text{Glu46}}-\text{O}_{\text{pCA}}$ は通常の水素結合であると考えるのが自然な解釈である。

【結論】多くの実験測定結果と今回の結果を考慮すると、PSII の $\text{O}_{\text{TyrZ}}-\text{N}_{\text{His190}}$ は single-well 水素結合、PYP の $\text{O}_{\text{Glu46}}-\text{O}_{\text{pCA}}$ は通常の水素結合である。

References:

1. Perrin, Nielson. B. *Annu Rev Phys Chem* **1997**, 48, 511-544.
2. Cleland, Kreevoy. *Science* **1994**, 264, 1887-1890.
3. Frey, Whitt, Tobin. *Science* **1994**, 264, 1927-30.
4. Schutz, Warshel. *Proteins* **2004**, 55, 711-723.
5. Umena, Kawakami, Shen, Kamiya. *Nature* **2011**, 473, 55-60.
6. Anderson, Crosson, Moffat. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **2004**, 60, 1008-1016.
7. Yamaguchi, Kamikubo, Kurihara, Kuroki, Niimura, Shimizu, Yamazaki, Kataoka. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2009**, 106, 440-444.
8. Saito, Shen, Ishida, Ishikita. *Biochemistry* **2011**, 50, 9836-9844.
9. Demchuk, Genick, Woo, Getzoff, Bashford. *Biochemistry* **2000**, 39, 1100-13.
10. Kandori, Iwata, Hendriks, Maeda, Hellingwerf. *Biochemistry* **2000**, 39, 7902-9.
11. Saito, Ishikita. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2012**, 109, 167-172.

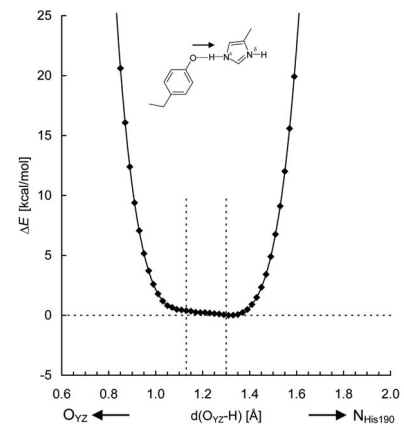


図 3. TyrZ · D1-His190 間の水素結合ポテンシャル

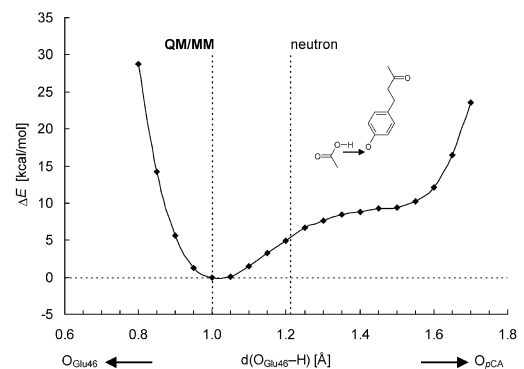


図 4. Glu46 · *pCA* 間の水素結合ポテンシャル

2B08

マウス内の 1 分子機能を計測する

(東京大学 理学系研究科) 樋口秀男

Measurement of single molecular function in mice

(Graduate School of Science, the University of Tokyo) Hideo Higuchi

細胞内分子機能の理解は、過去 15 年間の蛍光蛋白質観察と分子生物学の進展によって劇的に深まった。しかしながら、分子生物学や蛍光蛋白質は個々の分子を観察するのではないため、分子反応や機能を直接的に理解することはできない。一方、組換え蛍光蛋白質の登場とほぼ時を同じくして分子機能を直接的に観察する 1 分子イメージングと 1 分子ナノ精度計測が登場した (Svoboda et al Nature 1993, 船津ら Nature 1995)。この方法の登場によって、精製された実験系において DNA 及び RNA ポリメラーゼ・リボゾーム・モーター蛋白質などの 1 分子運動、ATP 加水分解反応、分子内構造変化、重合過程などが明らかにされた (Endow & 樋口 Nature 2001; 上村 et al Nature 2006; 茅 & 樋口 Science 2010)。さらに近年量子ドット (CdSe やダイヤモンド) の登場により、高輝度で長時間の蛍光観察が可能となり、細胞内の分子位置を 1nm の精度で測定できるようになった (渡邊 & 樋口 Biophys J. 2007)。さらに量子ドットを利用して、マウス内でも 1 分子の位置を追跡できるようになった (多田, 樋口ら Cancer Res 2007)。今回は、最近の研究であるマウス内の 1 分子あるいは少数分子のイメージングおよび機能計測に焦点を絞って話したい。

抗がん剤 1 分子のマウス内イメージング

量子ドットは、体内での単粒子のイメージングに用いるプローブとして最適である。我々は、細胞内ナノイメージングで用いたものと同様なテクノロジーを用いて、担癌マウスの生体腫瘍内で小胞に結合した単一量子ドットの追跡をすることに成功した。細胞での実験と同様に量子ドットに、転移性乳癌に対する抗癌剤である抗 HER2 モノクローナル抗体を約 1 分子結合させた。一方、マウスには HER2 発現乳癌を埋め込み腫瘍に成長させた、担癌マウスを製作した。この量子ドット-抗体を担癌マウスの尻尾の静脈に注射後、腫瘍内に集積した様子を背部の皮膚に固定した窓を通してイメージングした。単一量子ドット抗体の複合体は、まず、血管をすり抜けて血管とがん細胞の間の結合組織内に入った。結合組織内では数 μ m/sec の早い移動と停止を繰り返し、拡散をした。量子ドット抗体ががん細胞に出会うと、細胞に結合し、細胞膜に沿って、移動をした。がん細胞に結合した量子ドット・抗体のいくつかは細胞内にエンドサイトーシスし、細胞内を、輸送された。細胞内をモーター蛋白質に乗っているとされる小胞は 600nm/sec 程度の動きを行い、動いては止まり、動いては止まりを繰り返した。最終的に、量子ドットを含んだ小胞は、細胞核の付近での遅い小さな動きとなった。今後、この方法が効率的なドラッグデリバリーの発展のための強力な手法になりうることを示した。

がん細胞膜の流動性のイメージング

がん細胞が転移する際に移動先端部の細胞膜を伸張することで仮足を形成するため、転移には膜の高い流動性が重要でありこれは膜蛋白質の流動性とも関係があるので、流動性の研究はがん転

移と結びつく点で重要である。そこで、我々は、多くのがん細胞の転移を活性化する膜蛋白質PAR1 (Protease activated receptor 1)の動きの変化を調べた。マウス内がん細胞の観察は、がんの転移過程を踏まえ、がん組織内で血管の遠方に位置するがん細胞、血管近傍のがん細胞、血流中のがん細胞、血管壁に接着しているがん細胞の順に行った。がん細胞に結合したがん細胞は、細胞膜上をランダムに拡散した。しかし、その拡散速度は細胞がどこにいるかで大きく変化した。すなわち、血管遠方のがん細胞では、PAR1は非常に遅い拡散速度 ($72\text{nm}^2/\text{s}$)を示したが、血管内浸潤に向かって拡散速度は増加し、血流中のがん細胞では血管遠方の細胞に比べ1000倍以上の $82000\text{nm}^2/\text{s}$ にまで増加した(図3C-G)。このように膜蛋白質の拡散速度が増加すると細胞は活発に動くことができることから、転移が活性化されると考えられる。血流中のがん細胞は、その後血管壁に接着し、PAR1の拡散速度が血流中に比べ約1/20にまで減少した。以上の結果から、がん細胞は細胞内や組織内の場所に依りて巧みに膜蛋白質の拡散速度を変化させることで、増殖・転移を活性化して、がん転移を効果的に引き起こしていると考えられる。

非侵襲 *in vivo* がん細胞・白血球のイメージング

これまでの *in vivo* イメージングでは、腫瘍部を切開して、癌腫瘍表面近くを観察できた。しかしながら、切開をすると、出血や免疫細胞の活性化などが起こり、生きたままの姿を観察する事は困難である。そこで、非侵襲で観察できる装置システムの改良と観察法の工夫をおこなった。明るくするため、倍率を下げ、レーザーの集光度を上げた。血量が見えるように、青い光の透過像を得られるようにした。観察法として、約 $200\mu\text{m}$ の厚さしかない耳をえらび、蛍光を発する毛の脱毛をした。がん細胞をラベルするためにHerceptin-量子ドット複合体を尾静脈注射した。細胞膜に結合した量子ドットの観察に成功した。また、白血球の中でも運動能が高い好中球やマクロファージに結合した多粒子化量子ドットを結合することで、血管中の好中球をより鮮明に量子ドットを観察する事ができた。また、耳に刺激剤を塗りマクロファージを誘発したところ、貪食した量子ドットの詰まった小胞の運動を観察する事ができ、小胞の位置を 50nm 精度で追跡することができた(図)。また、細胞運動を観察でき、仮足が急速に伸びたのち、細胞体が仮足の方法に動き出した。好中球が生体内を動くメカニズムが解ってきた。

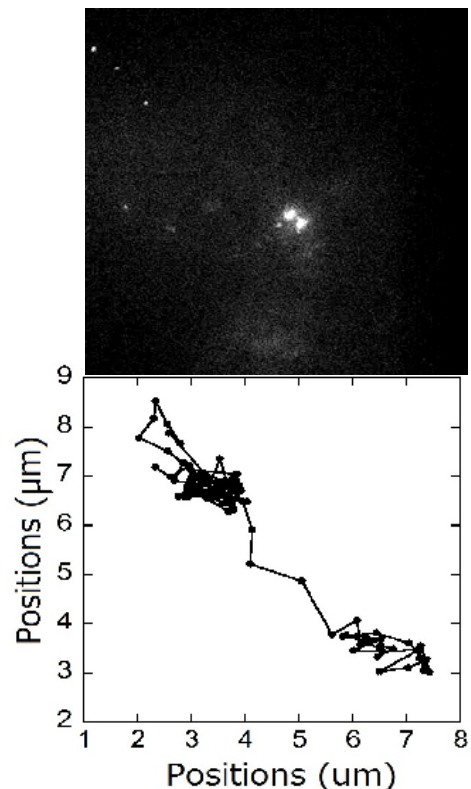


図: 非侵襲下で観察されたマクロファージ内に貪食された量子ドットの位置の解析結果