

## 4D01

### 光誘起赤外差分分光法によるチャネルロドプシンの分子機構研究

○稲熊あすみ<sup>1,2</sup>、塚本寿夫<sup>1</sup>、木村哲就<sup>1,3</sup>、石塚徹<sup>3,4</sup>、八尾寛<sup>3,4</sup>、古谷祐詞<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> 分子研、<sup>2</sup> JST PRESTO、<sup>3</sup> JST CREST、<sup>4</sup> 東北大院・生命科学

### Investigation of the molecular mechanism of Channelrhodopsin by light-induced difference FTIR spectroscopy.

○Asumi Inaguma<sup>1,2</sup>, Hisao Tsukamoto<sup>1</sup>, Tetsunari Kimura<sup>1,3</sup>, Toru Ishizuka<sup>3,4</sup>, Hiromu Yawo<sup>3,4</sup>, Yuji Furutani<sup>1,2</sup>

【背景】 チャネルロドプシンは、緑藻類のクラミドモナスの光受容器官 (eyespot) に存在する7回膜貫通型膜タンパク質である。発色団として全トランスレチナールを持ち、その光異性化によりタンパク質の構造を変化させて、ナトリウムイオンなどの陽イオンを細胞内へと透過する光開閉チャネルとして機能する。

クラミドモナスには、チャネルロドプシン-1 (ChR1) とチャネルロドプシン-2 (ChR2) の2種類が存在する。ChR2は、青色光を照射した数ピコ秒後にP<sub>1</sub><sup>500</sup>になり、P<sub>2</sub><sup>390</sup>を経て、陽イオンを透過するP<sub>3</sub><sup>520</sup>になった後、最も長寿命な中間体P<sub>4</sub><sup>480</sup>を経て、基底状態へと戻るフォトサイクルを示す。また、ChR1とChR2のキメラが特徴的な電気生理応答を示すことが報告され<sup>1)</sup>、2012年にはChR1とChR2から作製されたキメラチャネルロドプシンの暗状態の結晶構造が解かれた<sup>2)</sup>。さらに、ChR2に対する時間分解赤外分光計測は報告されているが、ChR1やキメラチャネルロドプシンの報告はない。本研究では、ChR1の配列を含むキメラチャネルロドプシンの光反応を解析することで、ChR1とChR2の違いや、キメラの光応答特性の分子機構を明らかにすることを目的とした。

【手法】 野生型 ChR2、キメラチャネルロドプシン ChR<sub>5/2</sub> (ChR1 の膜貫通領域 1~5 番目+ ChR2 の膜貫通領域 6~7 番目)、ChR<sub>2/5</sub> (ChR1 の膜貫通領域 1~2 番目+ ChR2 の膜貫通領域 3~7 番目) (図 1)、およびそれらの変異体のコンストラクトを作製し、哺乳培養細胞でタンパク質を発現させた。精製後、脂質に再構成したサンプルを、全反射フーリエ変換赤

外分光器で計測した。光を当てない基底状態と、460 nm の光を照射した光定常状態の赤外吸収スペクトルを測定し、そこから赤外差吸収スペクトルを得た。

【結果】 ChR2、ChR<sub>5/2</sub>、ChR<sub>2/5</sub> の差吸収スペクトルを比較したところ、キメラ同士のスペクトルは類似しているが、ChR2 とキメラにはスペクトルの形状に違いが見られた (図 2)。1760~1700 cm<sup>-1</sup> のカルボン酸の変化が現れる領域に 2 つのネガティブバンド (1738 および 1718 cm<sup>-1</sup> 付近) が確認されたが、そのバンドの強度は、各々のチャネルロドプシンにより異なっていた。

次に、ChR<sub>5/2</sub>、ChR<sub>2/5</sub> の変異体に対する解析を行った。2 番目のヘリックス上にあ

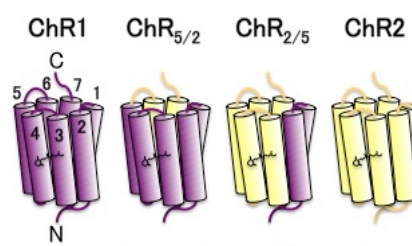


図1. 野生型チャネルロドプシン及びキメラチャネルロドプシンの模式図。

る 129 番目のグルタミン酸 (Glu129) をグルタミンにした変異体 (E129Q) では、 $1720\text{ cm}^{-1}$  のバンドが消失し、4 番目のヘリックス上の 195 番目のアスパラギン酸 (Asp195) をアスパラギンに置換した変異体 (D195N) では、 $1738\text{ cm}^{-1}$  付近のバンドが消失した。このことから  $1720\text{ cm}^{-1}$  のバンドは Glu129 に、 $1738\text{ cm}^{-1}$  付近のバンドは Asp195 に帰属される。

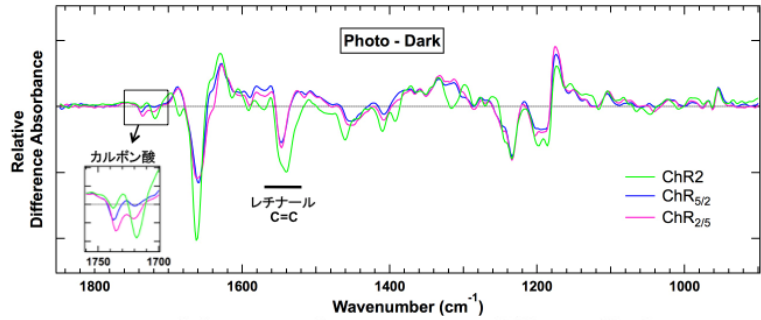


図2. チャネルロドプシン-2 及びキメラチャネルロドプシンの差吸収スペクトル。

【考察】 光定常状態の主な構成成分は  $P_4^{480}$  であり、実験で得られた差吸収スペクトルは基底状態と  $P_4^{480}$  の違いを表すと考えられる。ChR<sub>5/2</sub> と ChR<sub>2/5</sub> の差吸収スペクトルが類似し、ChR2 とは異なっていることから、1~2 番目の膜貫通領域が ChR1 型であることが、キメラの光応答特性に重要な役割を果たしていることが分かった。

Glu129 の脱プロトン化は  $1720\text{ cm}^{-1}$  にネガティブバンドとして現れ、そのシグナル強度は ChR2 > ChR<sub>2/5</sub> > ChR<sub>5/2</sub> と、ChR1 の膜貫通領域を多く含むキメラになるにつれて小さくなった。この結果は、電気生理の光電流計測で見られる脱感作の大きさと相関している<sup>1)</sup>。従って、Glu129 の脱プロトン化によって脱感作が引き起こされるが、ChR1 領域の割合が増すことで Glu129 の脱プロトン化は抑制されて脱感作が抑えられることが示唆された。

ChR2 の  $P_3^{520}$  の差吸収スペクトルでは、 $1554(-)/1542(+)$  にレチナールの C=C 伸縮振動に帰属されるバンドが特徴的に現れることが報告されている。4 番目のヘリックス上の Asp195 をアスパラギンに置換した変異体では、 $1550\text{ cm}^{-1}$  付近にネガティブとポジティブの対になったバンドが見られた。このことから、この変異体では、チャネル閉鎖に関わる残基が欠損しているため  $P_3^{520}$  が長寿命化し、光定常状態で  $P_3^{520}$  が主たる成分になっていると考えられる。ChR2 の Asp156 変異体 (本研究の Asp195 に相当) で  $P_3^{520}$  が長寿命化することは可視吸収変化の計測でも報告されており<sup>3)</sup>、今回の結果を裏付けている。キメラの差吸収スペクトルで、 $1738\text{ cm}^{-1}$  付近のネガティブバンドが Asp195 に帰属されることから、Asp195 の脱プロトン化によりチャネルが閉じると考えられる。

【結論】 本研究では、光誘起赤外差分分光法を用いて、野生型 ChR2、およびキメラチャネルロドプシン ChR<sub>5/2</sub>、ChR<sub>2/5</sub> の解析を行った。キメラでは、1~2 番目の膜貫通領域が ChR1 型であるために、その光定常状態の構造変化が ChR2 とは異なることが分かった。また、Glu129 の脱プロトン化が光電流の脱感作に、一方、Asp195 の脱プロトン化はチャネルの閉鎖に重要な役割を果たしていることが示唆された。

【参考文献】 1) Wang H. *et al.*, J. Biol. Chem. 284(9), 5685-96 (2009). 2) Kato H. E. *et al.*, Nature 482(7385), 369-74 (2012). 3) Bamann C. *et al.*, Biochemistry 49(2), 267-78 (2010).

## 青色受容型アーキロドプシン3変異体の イオン輸送特性と光化学反応

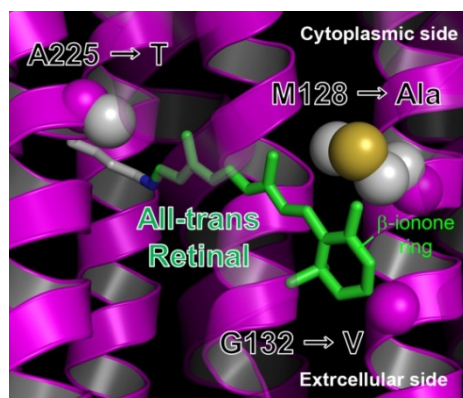
(名古屋工業大学<sup>1</sup>, JST さきがけ<sup>2</sup>, 名古屋大学<sup>3</sup>, 東邦大学<sup>4</sup>, 京都大学<sup>5</sup>, JST CREST<sup>6</sup>, 分子科学研究所<sup>7</sup>) ○井上圭一<sup>1,2</sup>, 谷ヶ崎仁<sup>3</sup>, 下野和実<sup>4</sup>, 宮内正二<sup>4</sup>, 林重彦<sup>5</sup>, 神取秀樹<sup>1</sup>, 須藤雄気<sup>3,6,7</sup>

### Ion Transport Function and Photochemical Reaction of Blue-Absorbing Archearhodopsin 3

(Nagoya Institute of Technology<sup>1</sup>, JST PREST<sup>2</sup>, Nagoya Univ.<sup>3</sup>, Toho Univ.<sup>4</sup>, Kyoto Univ.<sup>5</sup>, JST CREST<sup>6</sup>, Institute for Molecular Science<sup>7</sup>) ○Keiichi Inoue<sup>1,2</sup>, Jin Yagasaki<sup>3</sup>, Kazumi Shimono<sup>4</sup>, Seiji Miyauchi<sup>4</sup>, Shigehiko Hayashi<sup>5</sup>, Hideki Kandori<sup>1</sup>, Yuki Sudo<sup>3,6,7</sup>

**【序】**アーキロドプシン3 (AR3) は古細菌 *Halorubrum sodomense* の持つ、光駆動型外向きプロトン (H<sup>+</sup>) ポンプであり、光による H<sup>+</sup>濃度勾配は膜電位の産生や ATP の合成に利用される。AR3 は7回膜貫通型の構造を持ち、その中央に発色団として all-trans 型レチナールを結合する。この光でイオンの濃度勾配を作るメカニズムは古くから分子科学的な研究対象となってきた。最近では、AR3 やチャネルロドプシンなどの微生物型ロドプシンを動物細胞に異種発現させ、光による細胞の過分極・脱分極を介して、神経活動 (行動) を制御する光操作ツールとしての利用が盛んである。この分野はオプトジェネティクスと呼ばれ、AR3 は緑色光による神経抑制分子として、広く利用されている。

このような利用の際には、幅広い励起波長でのタンパク質の活性化が求められており、AR3 においても吸収波長の制御が必要となっている。そしてこれまでに、我々は分子科学的な知見を拠り所に、吸収波長を 50 nm 短波長シフトさせた変異体を作製し、青色光での神経抑制を可能とした<sup>1</sup>。このとき量子化学計算により、発色団レチナールのβ-イオン環と周辺残基との立体反発により、6-s 結合が回転し、π電子の共役系が短くなることから、Blue-shift の最も大きな要因であることが明らかとなった。その後さらなる量子化学計算により、4本目のヘリックス (ヘリックス D) に存在する Gly 132 を変異することで、より大きな 6-s 結合の回転とそれに伴う短波長シフトが予想された (図1) ことから、今回実際に変異体を作製し、その性質を研究した。

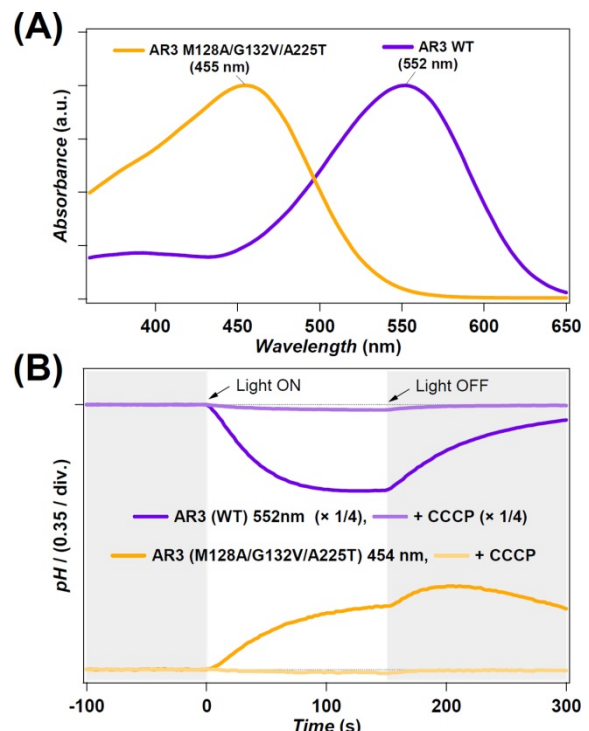


**図 1.** 今回変異を導入したレチナール周辺のアミノ酸残基 (構造はアーキロドプシン2のもの (PDB code: 2EI4) を使用)

**【実験】**AR3 の野生型および変異体は全て大腸菌を用いて発現した。精製のため C 末に His タグを導入し、必要に応じて Ni-NTA カラムで精製した。AR3 の野生型および変異体のプロトン輸送活性は pH メーターを用いて、光照射に伴う pH の変化をみることで評価した。また光反応フォトサイクルは Linear Detector Array を用いた過渡吸収測定により決定し、励起光にはナノ秒 Nd<sup>3+</sup>:YAG レーザーの三倍波を OPO を通して可視光に波長変換したものをを用いた。



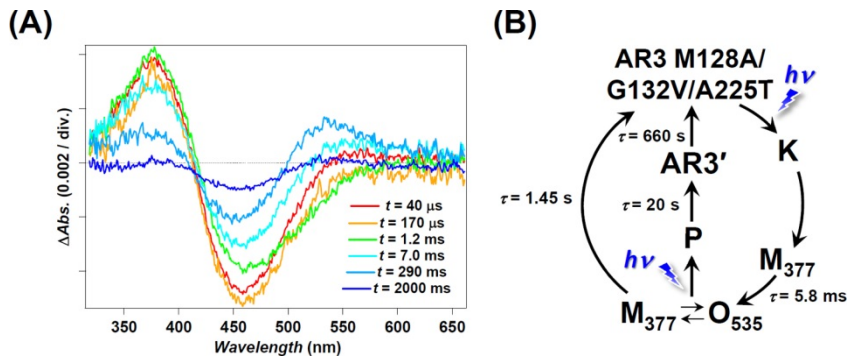
**【結果と考察】** 図 2(A)に AR3 の野生型と最も短波長シフトした変異体 (M128A/G132V/A225T) の吸収スペクトルを示す。これを見ると野生型のものと比べ M128A/G132V/A225T の極大吸収波長は 100 nm 近く短波長シフトしており、予想通り、これまでのもの<sup>1</sup>よりも 50 nm 近く吸収を短波長化することに成功した。これにより天然にも人工的にもない、最短波長に吸収を持つ微生物型ロドプシンの作成に成功したことになる。次に H<sup>+</sup>輸送活性を調べた (図 2(B))。野生型 AR3 については光照射に伴い、外液の pH の減少が観測され、外向き H<sup>+</sup>ポンプ活性が確認された。一方、興味深いことに M128A/G132V/A225T 変異体 (以下三重変異体) は、光照射により、野生型とは逆に pH の上昇が見られ、さらに光照射を止めると更なる pH の上昇が約 1 分間にわたってみられた。この結果は三重変異体については吸収変化と共にその機能が野生型と大きく変わっていることを示している。ここに H<sup>+</sup>の膜透過性を上昇させる carbonylcyanide-*m*-chlorophenylhydrazone (CCCP) を加えたところ、外液の pH 変化が完全に消失したことから、この三重変異体は内向き H<sup>+</sup>透過活性を持つものと考えられる。この pH 変化は細胞外が細胞内に比べて酸性条件での測定であり、輸送が能動的か受動的かを確定させることが出来ない。そこで、さらに三重変異体について電気生理学的な実験を行った。その結果、アフリカツメガエルの卵母細胞に発現させた三重変異体は、輸送方向が逆転するリバースポテンシャルがほぼゼロであることがわかった。つまり、これらの結果から、三重変異体は光ゲート型のチャネルとして働いていることが示唆された。



**図 2.** (A) 野生型 AR3 と M128A/G132V/A225T 変異体の吸収スペクトルおよび (B) H<sup>+</sup>輸送活性

この結果は三重変異体については吸収変化と共にその機能が野生型と大きく変わっていることを示している。ここに H<sup>+</sup>の膜透過性を上昇させる carbonylcyanide-*m*-chlorophenylhydrazone (CCCP) を加えたところ、外液の pH 変化が完全に消失したことから、この三重変異体は内向き H<sup>+</sup>透過活性を持つものと考えられる。この pH 変化は細胞外が細胞内に比べて酸性条件での測定であり、輸送が能動的か受動的かを確定させることが出来ない。そこで、さらに三重変異体について電気生理学的な実験を行った。その結果、アフリカツメガエルの卵母細胞に発現させた三重変異体は、輸送方向が逆転するリバースポテンシャルがほぼゼロであることがわかった。つまり、これらの結果から、三重変異体は光ゲート型のチャネルとして働いていることが示唆された。

最後にこの変異体のフォトサイクルを調べるため、大腸菌膜中での過渡吸収測定を行ったところ図 3(A)の様な過渡吸収スペクトルが得られた。これを見ると変異体は野生型 ( $\tau = 46$  ms) よりもかなり遅い反応サイクル ( $\tau = 1.45$  s) を示した。また強い連続光を照射した実験では、二段階の光励起過程による



**図 3.** (A) AR3 M128A/G132V/A225T 変異体の過渡吸収スペクトルと (B) 光反応サイクル

と思われる、さらなる長寿命中間体が生成し、この過程が光 OFF 時のゆっくりとした pH の上昇と関与していると思われる。講演ではさらに Single および Double 変異体の結果とも合わせて、青色受容型 AR3 のイオン輸送機構について詳細な議論を行う。

**【参考文献】** 1. Sudo Y, et al. (2013) *J Biol Chem.* **288**, 20624-20632.

## 全反射赤外分光法によるサル緑感受性視物質の クロライドイオン結合機構解析

(名工大院工<sup>1</sup>, 分子研生命錯体<sup>2</sup>, 京大霊長研<sup>3</sup>) ○片山 耕大<sup>1</sup>, 古谷 祐詞<sup>1,2</sup>,  
今井 啓雄<sup>3</sup>, 岩城 雅代<sup>1</sup>, 神取 秀樹<sup>1</sup>

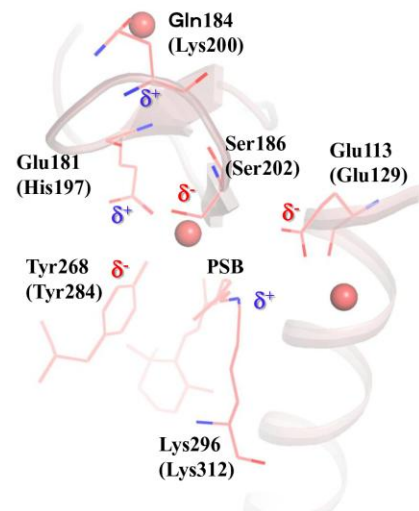
### ATR-FTIR study for chloride binding mechanism of monkey green-sensitive visual pigment

(Department of Frontier Materials, Nagoya Institute of Technology<sup>1</sup>, Department of Life and Coordination-Complex Molecular Science, Institute for Molecular Science<sup>2</sup>, Primate Research Institute, Kyoto University<sup>3</sup>) ○Kota Katayama<sup>1</sup>, Yuji Furutani<sup>1,2</sup>, Hiroo Imai<sup>3</sup>,  
Masayo Iwaki<sup>1</sup>, Hideki Kandori<sup>1</sup>

【序】我々が様々な色を識別できるのは、吸収極大波長の異なる3種類の色覚視物質が網膜に存在するからである。これらは全て同一の発色団分子 11-*cis* 型レチナールをもつが、オプシンと呼ばれるタンパク質部分がレチナールの電子状態を制御する結果、色の識別が可能になる。それに加えて色覚視物質の中には、塩化物イオン (Cl<sup>-</sup>) が結合すると吸収波長が長波長シフトするグループ (グループ L) があり、その波長シフトの分子機構が注目されている。特にヒトやサルの緑・赤感受性視物質はともにグループ L に属し、遺伝子重複によって発現した視物質である。従って、サル緑・赤感受性視物質の Cl<sup>-</sup> 結合部位の構造解析を行い、両視物質間における Cl<sup>-</sup> 結合機構が同じなのか、異なるのか、構造基盤に立って解析することは興味深い。これまで我々は、培養細胞により発現させたサルの緑・赤感受性視物質に対し低温赤外分光法を適用させることで、霊長類色覚視物質の構造解析を初めて実現し<sup>1</sup>、内部結合水の同定にも成功<sup>2</sup>、最近では部位特異的な変異タンパク質に対する精度の高い計測も達成している。

今回我々は、サル緑感受性視物質に対し、エバネッセント波を利用して水溶液中でのスペクトル測定が可能な全反射赤外分光法を活用し、塩 (Cl<sup>-</sup>) 存在下/非存在下での赤外差スペクトルを測定し、Cl<sup>-</sup> 結合部位の構造情報を直接得ることに成功したので報告する。さらに、同様にしてタンパク質内部に Cl<sup>-</sup> を結合させる微生物型ロドプシン (ハロロドプシン) とのスペクトル比較、及び各種異なるイオン間 (Br<sup>-</sup>, I<sup>-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) での交換差スペクトル計測により、色覚視物質における詳細な Cl<sup>-</sup> 結合機構の解明を目指した。

【実験】HEK293T 細胞株により、サル緑感受性視物質を発現し、界面活性剤による可溶化、抗体カラムによる精製の後、PC リポソームへ再構成した。0.1 mg のタンパク質を 10 μL 全



サル緑・赤感受性視物質における Cl<sup>-</sup> 結合に重要な領域を示す。His 197 及び Lys 200 が結合サイトの一端を担う<sup>3</sup>。また表示されたアミノ酸はロドプシンに対応しており、括弧内は色覚視物質に対応する。

反射赤外分光装置のダイヤモンドプリズム上に滴下し、窒素雰囲気下で乾燥させた後に、緩衝液 (200 mM phosphate [pH 7.25], 10 mM NaCl) を環流させた。その後、塩あり/なしにおける赤外差スペクトルを計測した。イオン交換スペクトル計測では 10 mM phosphate [pH 7.25] に 10 mM の NaCl もしくは NaBr, NaNO<sub>3</sub>, NaI を混合した緩衝液間での差を計測した。また、NaNO<sub>3</sub> のタンパク質内部への結合シグナルを同定する為に、硝酸の安定同位体標識試料 Na<sup>15</sup>NO<sub>3</sub> に対する NaCl とのイオン交換赤外差スペクトルも計測した。

【結果と考察】 図 2 は、サル緑感受性視物質に対し、Cl<sup>-</sup>の結合解離により誘起された赤外差スペクトルを表わしている。得られたスペクトルにおいて、1637 (-)/1620 (+) cm<sup>-1</sup> 対バンドは、典型的なβ-シートの amide-I バンドに対応する振動数である。過去の部位特異的な変異タンパク質に対する実験により、タンパク質の細胞外側に存在する領域が Cl<sup>-</sup>結合サイトの一端を担うと報告されており<sup>3</sup>、この領域がβ-シートを形成すると考えられる。また興味深いことに、観測された対バンドにおいて、ポジティブ側 (Cl<sup>-</sup>結合型) でのバンド強度が大きく現れている。この結果は Cl<sup>-</sup>のタンパク質内部への結合が、積極的にβ-シートの構造安定化に寄与していることを示唆している。一方で、ポジティブ側に観測される 1745 (+) cm<sup>-1</sup> バンドは、プロトン化カルボン酸の C=O 伸縮振動バンドであると考えられる。この結果は、Cl<sup>-</sup>非結合型ではバンドが確認されないことから、Cl<sup>-</sup>の結合に伴いプロトン化するカルボン酸が存在することを示している。このように今回得られた赤外差スペクトルは、X 線結晶構造が未だに解かれていない色覚視物質に対し、Cl<sup>-</sup>のタンパク質内部への結合に伴う構造変化を捉えるに至った。

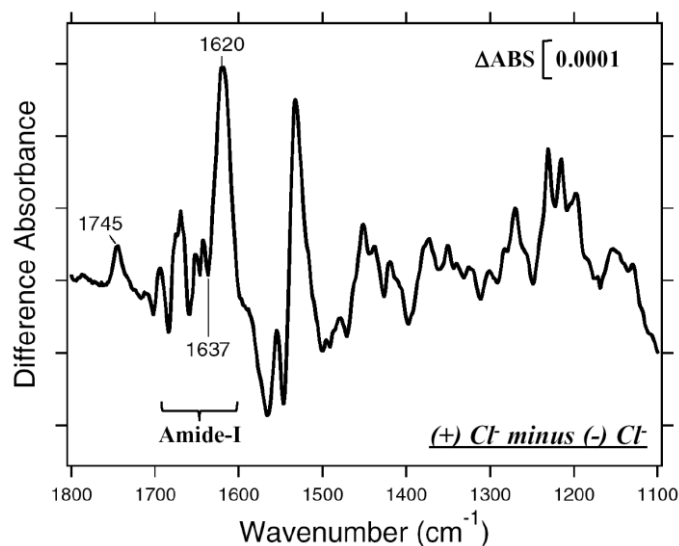


図 2 293 K で測定した 1800-1100 cm<sup>-1</sup> 領域におけるサル緑感受性視物質に対する Cl<sup>-</sup>の結合解離に伴う構造変化 塩 (Cl<sup>-</sup>) 存在下/非存在下における差スペクトルを計測しているため、ポジティブ側、ネガティブ側はそれぞれ Cl<sup>-</sup>結合型、解離型に対応する。

本発表では他の振動バンドの由来についても議論したい。また Cl<sup>-</sup>結合部位をもつ微生物型ロドプシン (ハロロドプシン) の結果と比較することで、Cl<sup>-</sup>結合機構について考察し長波長シフトをもたらす分子メカニズムについて議論したい。

- 【引用文献】 1. Katayama, K., Furutani, Y., Imai, H., and Kandori, H., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **49**, 891-894 (2010).  
 2. Katayama, K., Furutani, Y., Imai, H., and Kandori, H., *Biochemistry* **51**, 1126-1133 (2012).  
 3. Wang, Z., Asenjo, A. B., and Oprian, D. D., *Biochemistry* **32**, 2125-2130 (1993).

## ホタル生物発光関連分子の励起状態の理論的研究

(東大物性研<sup>1</sup>、名大院・情報科学<sup>2</sup>)○樋山みやび<sup>1</sup>、秋山英文<sup>1</sup>、古賀伸明<sup>2</sup>

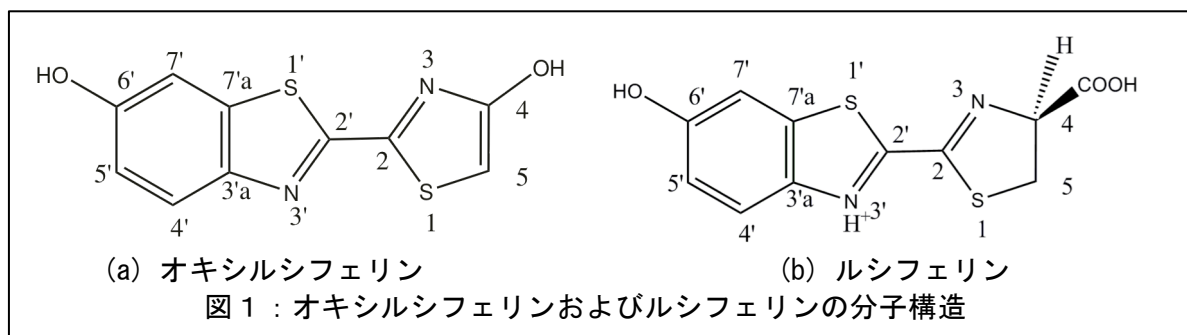
## Theoretical study for excited states of firefly-bioluminescence-related molecules

(1ISSP, Univ. Tokyo, 2Nagoya Univ.)

○Miyabi Hiyama<sup>1</sup>, Hidefumi Akiyama<sup>1</sup>, Nobuaki Koga<sup>2</sup>

【序論】ホタル生物発光では、ホタルルシフェリン（以下、ルシフェリンと呼ぶ）がタンパク質中で酸化され生成したオキシルシフェリンが発光を起こす。ホタル生物発光の理解のため、発光起源であるオキシルシフェリンの分光的性質にも古くから興味を持たれ研究されてきた[1]が、オキシルシフェリンは水溶液中で不安定であるため、吸収スペクトルの帰属はまだ十分に明らかにされていない。そこで本研究では、オキシルシフェリンの吸収スペクトルの帰属おこない、吸収過程を明らかにすることを目的とした。

【方法】図1に示すようにオキシルシフェリンとルシフェリンは一部の置換基を除いて同じ構造をもつため、ルシフェリンの吸収過程とオキシルシフェリンの吸収過程には類似性があると考えられている。ルシフェリンについては水溶液中で安定に存在するため、分光学的研究が盛んに行われている[2]。その吸収スペクトルに現れるピークは電子状態計算から得られるエネルギー準位から帰属されている。そこで、ルシフェリンの吸収スペクトルを解析し、その帰属を理解したうえで、オキシルシフェリンの吸収スペクトルの帰属を行った。



基底状態の  $pK_a$  を得るため、ルシフェリンおよびオキシルシフェリンとそれらの共役酸・塩基について密度汎関数法 (CAM-B3LYP/aug-cc-pVTZ/PCM(water)) を用いて得られた基底状態と励起状態 (TD-DFT) それぞれの安定構造における振動解析を行った。振動解析の計算から得ら

れる Gibbs の自由エネルギーを用いて、それぞれの化学種の基底状態における  $pK_a$  を見積った。さらに、実験値を利用することにより  $pK_a$  の補正を行い、溶媒の pH ごとにそれぞれの化学種の濃度を見積もった。励起エネルギー、振動子強度、および pH ごとの濃度を考慮することにより、理論吸収強度を評価した。

【結果】 pH に依存するルシフェリンの理論吸収強度を図 2 に示す。実験スペクトルと比べて長波長側へシフトしているものの、実験吸収スペクトルとこの理論吸収スペクトルの形状はよく一致している。さらに、スペクトル形状の再現だけではなく、各 pH においてルシフェリンとその共役酸・塩基のいずれが光吸収をおこなっているかを明らかにした。すなわち、実験吸収スペクトルに見られる 400 nm 付近のピークはジアニオンの吸収で、pH が小さくなるとアニオンのピークにシフトする状況を明確に示すことができた。また、pH の小さいところで、400nm 付近にアニオンの N 原子にプロトン付加した化学種の吸収によるピークが現れることも示すことができた。

ルシフェリンの吸収スペクトルの解析に成功したので、ルシフェリンの  $pK_a$  補正を参考に、同様の手続きによりオキシルシフェリンの吸収強度を計算した結果を図 3 に示す。ルシフェリンの場合と同様に、オキシルシフェリンの場合も pH の変化により、存在する化学種が変わり、吸収強度のピークが変化することが明らかになった。オキシルシフェリンの場合は、440nm 付近のピークには複数の化学種の吸収過程による影響が現れている。

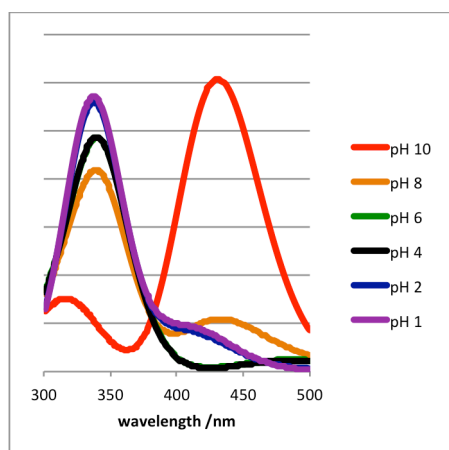


図 2 : ルシフェリンの理論吸収強度

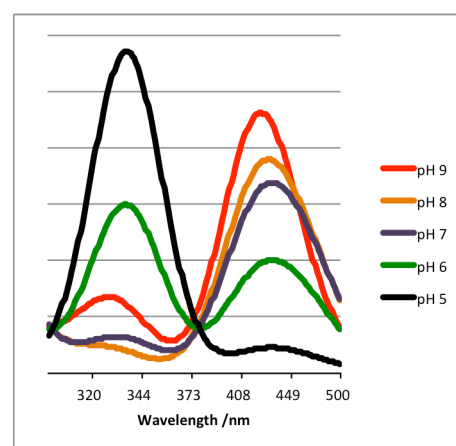


図 3 : オキシルシフェリンの理論吸収強度

#### 参考文献

- [1] Seliger et al. (1960) *Arch. Biochem. Biophys.* **88**, 136.
- [2] Seliger et al. (1961) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **47**, 1129, Morton et al. (1969) *Biochemistry* **8**, 1598, Gandelman et al. (1993) *J. Photochem. Photobiol.* **B19**, 187, Ando et al. (2010) *Jpn. J. Appl. Phys.* **49**, 117002, Hiyama et al. (2012) *Photochem. Photobiol.* **88**, 889



## T構造ヒトヘモグロビンにおける 複数酸素分子侵入経路の理論的解析

(名大・VBL<sup>1</sup>, 名大院・情報科学<sup>2</sup>, JST-CREST<sup>3</sup>, 京大・ESICB<sup>4</sup>)  
高柳 昌芳<sup>1,2,3</sup>、栗崎 以久男<sup>2,3</sup>、平尾 昌吾<sup>2</sup>、長岡 正隆<sup>2,3,4</sup>

### Theoretical study on multiple oxygen entry pathways in T-state human hemoglobin

(Venture Business Laboratory, Nagoya University<sup>1</sup>, Graduate School of Information Science,  
Nagoya University<sup>2</sup>, JST-CREST<sup>3</sup>, ESICB, Kyoto University<sup>4</sup>)

Masayoshi Takayanagi<sup>1,2,3</sup>, Ikuo Kurisaki<sup>2,3</sup>, Shogo Hirao<sup>2</sup>, Masataka Nagaoka<sup>2,3,4</sup>

**【背景】** 赤血球中に存在するヒトヘモグロビン (HbA) はサブユニット4つ ( $\alpha\cdot\beta$  鎖各2本) で構成される四量体ヘムタンパク質であり、各サブユニットは酸素分子 ( $O_2$ ) をヘムに結合することで  $O_2$  運搬機能を発揮している。 $O_2$  結合部位の空洞 (ヘムポケット) はサブユニット内部に埋没しており、 $O_2$  の侵入・離脱は熱ゆらぎによって一時的に形成される経路を通過している。ヘムポケット—溶媒間の  $O_2$  侵入・離脱経路を知ることは HbA の  $O_2$  運搬機能を原子レベルから理解する上で重要である。

$O_2$  移動経路には主に2つの説がある。1つは遠位ヒスチジン近傍を通過してヘムポケットから直接溶媒へとつながるヒスチジンゲート (His gate) 説。もう1つはサブユニット内の多数の疎水性空洞を経由する疎水的複数経路説である。多くの実験研究は His gate 説を支持しているが[1]、分子シミュレーションによる研究は疎水的複数経路説を支持している[2]。我々は、これまでにリガンド分子のダイナミクスがタンパク質構造に与える影響についての研究を行ってきており[3-5]、本研究では高濃度  $O_2$  溶液内 HbA のアンサンブル MD 計算を行うことで HbA への  $O_2$  侵入過程を解析し、 $O_2$  移動経路を特定することで上記の2つの説を検証した[6]。

**【計算手順】** 水溶媒 (TIP3P) ボックス内に T 構造四量体 HbA ( $O_2$  未結合の HbA、PDB ID: 2DN2) と 120 分子の  $O_2$  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  $O_2$  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 計算を実行した。最後に 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】** 外部からヘムポケットへの  $O_2$  侵入経路を特定するために、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つの時間ステップにおいて HbA 各サブユニット近傍 4.0 Å に位置する  $O_2$  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  $O_2$  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リガンド侵入経路の分類と各経路を経由した  $O_2$  侵入頻度の算出を行った (図1)。

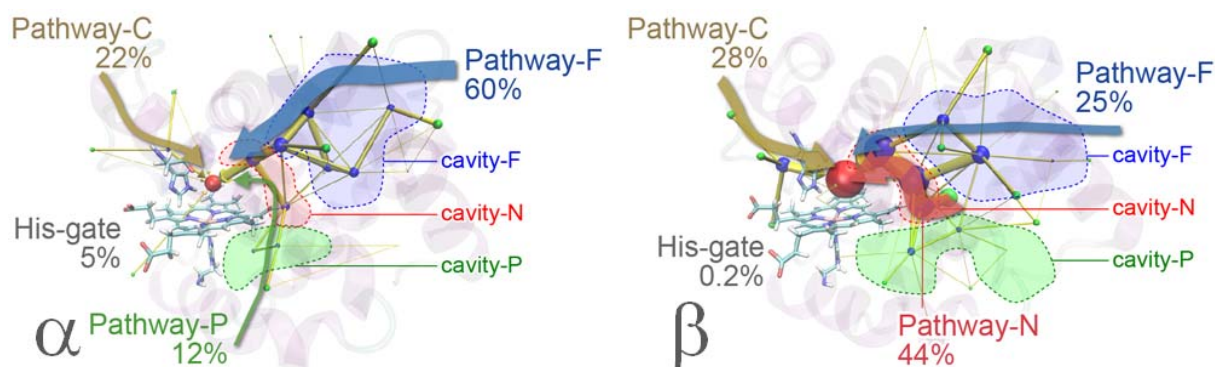


図1.  $O_2$  分布のクラスタリング解析により得られた HbA サブユニット内ヘムポケットへの  $O_2$  侵入経路。(左)  $\alpha$  鎖 (右)  $\beta$  鎖。赤色球はヘムポケットに対応するクラスタ重心、青色球はサブユニット内部のクラスタ重心、緑色球はサブユニット表面のクラスタ重心であり、ヘムポケットに到達した  $O_2$  が通過した頻度に対応して球の大きさを描画。同様にクラスタ間移動頻度に対応して黄色の円筒を描画。

内部空洞を  $O_2$  移動の挙動からヘムポケットから遠い cavity-F、ヘムポケット近傍の cavity-N、近位ヒスチジンに近い cavity-P に 3 分類した。 $\alpha$  鎖では cavity-F, cavity-N の順に經由する Pathway-F が 60%、次いで CD-corner 側から侵入する Pathway-C が 22% であった。 $\beta$  鎖では cavity-N を經由する Pathway-N が 44%、次いで Pathway-C が 28% であった。なお His-gate は  $\alpha$  鎖で 5.0%、 $\beta$  鎖で 0.2% であり、主要な経路ではない。

次に  $O_2$  侵入時定数  $k_{\text{entry}}^x$  ( $x = \alpha$  or  $\beta$  鎖) を算出し実験値との比較を行った (表 1)。 $O_2$  侵入速度が  $k_{\text{entry}}^x [O_2][Hb^x]$  と記述されると仮定し、128 MD 8 ns 時点のヘムポケット  $O_2$  侵入確率 ( $\alpha$  鎖 18%,  $\beta$  鎖 35%) より時定数を見積もった。実験値に関しては文献[7]の温度 293 K でのリガンド侵入時定数に対しアレニウスの式による温度補正を行った。得られた時定数は  $\beta$  鎖/ $\alpha$  鎖の比も含めて実験値とよく一致した。これは MD 計算による  $O_2$  侵入過程は正しく再現されていることを強く示唆しており、 $O_2$  侵入の主要な経路は His gate ではなく疎水的複数経路であると結論できる。得られた  $O_2$  分布、移動通路はアロステリック効果を含めた HbA の機能発現機構を原子レベルから解析、理解する上で重要な知見となり得るものである。

表 1. HbA サブユニットへの  $O_2$  侵入速度定数の比較

		HbA の状態	$\alpha$ 鎖 ( $\mu\text{mol/L})^{-1}\text{s}^{-1}$	$\beta$ 鎖 ( $\mu\text{mol/L})^{-1}\text{s}^{-1}$	$k^\beta/k^\alpha$ 比
本 MD 計算結果	$k_{\text{entry}}^x$	T 構造四量体	45	99	2.20
	$k_{\text{entry}}^x$	単量体	69	81	1.17
実験値[7]を 温度 310 K に補正	$k_{\text{NO}}^x$ *	単量体	60	131	2.18
	$k_{\text{NO}}^x$ *	R 構造四量体	48	127	2.65

\*一酸化窒素分子のヘムポケット侵入時定数

### 【参考文献】

- [1] Birukou I., Maillett D.H., Birukova A. Olson, J.S. *Biochemistry*, 50, 7361 (2011).
- [2] Shadrina, M.S., English, A.M., Peslherbe, G.H. *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 11177 (2012).
- [3] Takayanagi M., Okumura H., Nagaoka M. *J. Phys. Chem. B* 111, 864 (2007).
- [4] Takayanagi M., Iwahashi C., Nagaoka M. *J. Phys. Chem. B* 114, 12340 (2010).
- [5] Takayanagi M., Nagaoka M. *Theor. Chem. Acc.* 130, 1115 (2011).
- [6] Takayanagi M., Kurisaki I., Nagaoka M. *J. Phys. Chem. B*, 117, 6082 (2013).
- [7] Birukou I., Schweers R.L., Olson, J.S. *J. Biol. Chem.* 285, 8840 (2010).

## 4D07

### 糖鎖の化学シフト計算と立体構造予測への応用

(理化学研究所)

○李秀栄、二島渉、山口芳樹、杉田有治

#### Structure prediction of N-glycan in solution using the combined molecular dynamics simulation and NMR spectroscopy

(RIKEN) Suyong Re, Wataru Nishima, Yoshiki Yamaguchi, Yuji Sugita

##### 【序論】

細胞表面にある糖鎖は、種類や長さ、分岐構造の違いといった構造多様性に加え、コンフォメーションの多様性を利用した分子認識を行っていると考えられている。柔軟性の高い糖鎖は X 線結晶構造解析による構造決定が極めて困難である一方、NMR スペクトルを用いればグリコシド結合の立体配座やダイナミクスに関する情報が得られる。さらに、分子動力学計算から原子解像度の位置情報を得ることができ、NMR と分子動力学計算の組み合わせは糖鎖構造解析の有力な手段となっている。しかし、NMR から得られる情報は、一般的に、短い距離情報であり時間的に平均化されているため、大きな糖鎖の構造や多様なコンフォマーの識別は難しい。分子動力学計算で柔軟な糖鎖構造を隈なく探索するのも容易でなく、2～3糖からなる小さなモデル糖鎖を対象とした研究が大部分を占める。本研究では、大きな糖鎖の立体構造ダイナミクスを明らかにすることを目的として、広い構造空間を効率良く探索しうるレプリカ交換分子動力学計算を用いた糖鎖 NMR データの予測を行った。

##### 【計算方法】

糖鎖の構造探索には、タンパク質の立体構造予測などで用いられてきたレプリカ交換分子動力学法 (REMD) を用いた。この手法では、温度の異なる複数のレプリカ (系のコピー) の分子動力学計算を並列・独立に実行し、ある頻度で隣接する温度を交換することで定温の分子動力学計算では実現できない幅広い構造探索を可能にする。本研究では水中 N 型複合型糖鎖に着目し、温度範囲を 300K～500K として 64 レプリカを用いた。糖鎖の力場には GLYCAM を用いた。各レプリカあたり 52ns の計算 (合計 3μs) から得られたトラジェクトリのクラスタリング解析を行い、代表構造と相対分布を抽出した。NOE と  $J$  スピン結合定数は、求めた相対分布の値を用いて、重み付き平均として計算した。

$${}^3J_{HH} = c_{gg} {}^3J_{HH}^{gg} + c_{g'j} {}^3J_{HH}^{g'j} + c_{tg} {}^3J_{HH}^{tg}$$
$$\frac{1}{r_{MD}^6} = \frac{c_a}{\langle r_a^6 \rangle} + \frac{c_b}{\langle r_b^6 \rangle} + \frac{c_c}{\langle r_c^6 \rangle} + \frac{c_{a'}}{\langle r_{a'}^6 \rangle} + \frac{c_{c'}}{\langle r_{c'}^6 \rangle}$$

## 【結果と考察】

Fig. 1A に、REMD 計算から求められた水中 N 型複合型糖鎖の代表構造を示す。これまで知られていた「Fold/Extend」構造を含め、5 つのコンフォメーションが得られた。さらに、5 つのコンフォメーションが、 $\alpha(1\rightarrow6)$ グリコシド結合の 2 つの二面角分布 ( $\Psi/\omega$ ) と非常に良く対応することも明らかになった。N 型糖鎖のコンフォメーションが本質的には  $\alpha(1\rightarrow6)$ グリコシド結合の局所的な配向によって決まることを示している。Fig. 1B に、 $\alpha(1\rightarrow6)$ グリコシド結合の  $\omega$  角回転異性体 (*gg, gt, tg*) に対して計算した NMR データ (NOE、*J* 結合定数) を示す。*J* 結合定数の値をみると、各異性体の値は実験値と異なるものの、重み付き平均をとった値は実験値と良い一致を示す。この結果は、分子動力学計算と NMR を組み合わせて、大きな糖鎖のコンフォマー予測が可能であることを示唆する。NOE や *J* 結合定数に加えて、周辺の相互作用変化を敏感に反映する化学シフトの計算も行えば、糖鎖の全体構造に関するより直接的な情報を得ることが出来る。当日は、化学シフト計算を含めた詳細を発表する。

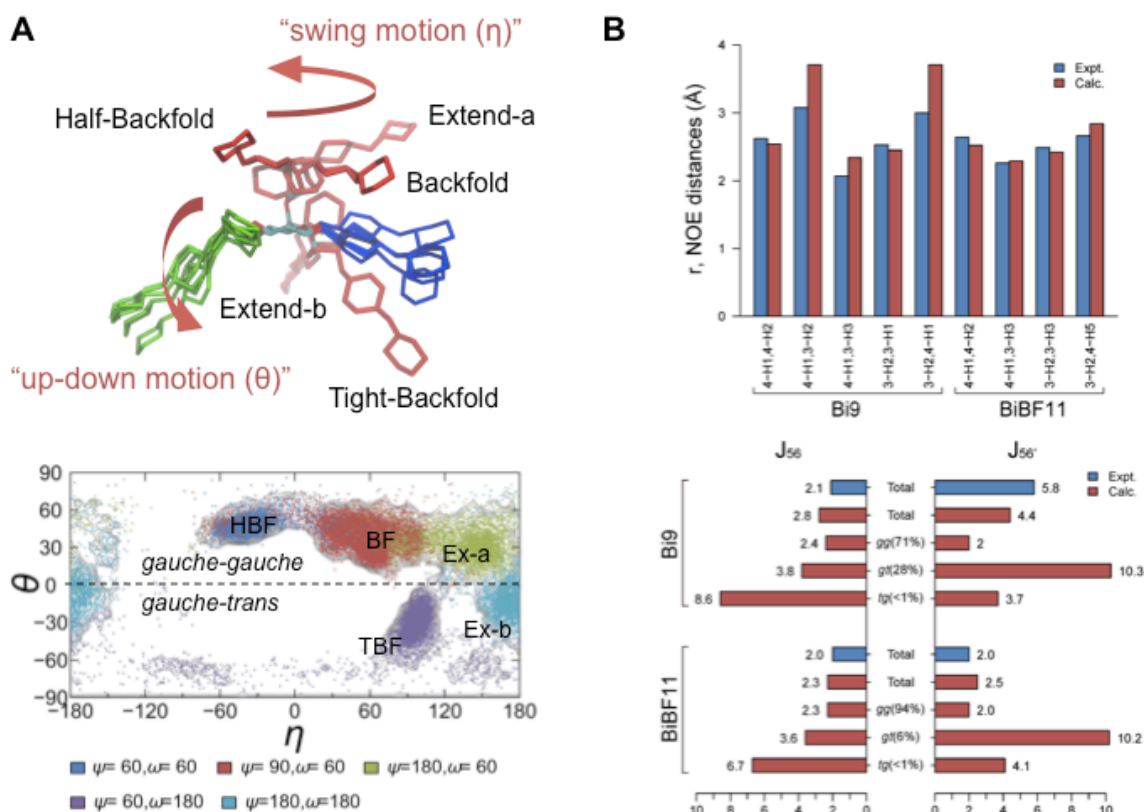


Figure 1. REMD 計算から得られた N 型複合型糖鎖のコンフォメーションと NMR データ。

(参考文献) [1] Sugita, Y., & Okamoto, Y. (1999) *Chem. Phys. Lett.*, 314:141–151. [2] Re, S. et al. (2011) *Biophys. J. (Letter)* 101:L44–L46. [3] Nishima, W. et al. (2012) *J. Phys. Chem. B* 116:8504–8512. [4] Re, S., et al. (2012). *Biophys. Rev.* 4:179–187.



Entangled quantum electronic wavefunctions of the  $\text{Mn}_4\text{CaO}_5$  cluster in photosystem II

(Inst. Mol. Sci.) ○Yuki Kurashige, Takeshi Yanai

【序】光合成系IIマンガンクラスターは光合成水分解反応の活性中心であり、酸素発生を伴う水の4電子酸化を触媒すると考えられている。今まで活性中心の分子構造が明確でなかった事から反応過程の解析が遅れていたが、一昨年、沈・神谷らの研究グループにより鮮明なX線結晶構造が明らかにされたことで、現在、反応過程の解明に向けて急速な進展をみせている。化学反応の理解には分子構造のみならず電子構造を詳細に知る事により初めて達成される。特に水分解反応は未だ人工的に再現するのが極めて難しい反応であり、マンガンクラスターがこの困難な反応をどのようにして進行させているのか、電子レベルで理解する事は人工触媒設計の糸口になると期待される。以上の背景から本研究では、新規多(電子)配置理論による光合成IIマンガンクラスターの電子状態計算を行った。また得られた電子波動関数から、マンガニオンの酸化状態やスピン状態の解析を行い、分光実験との比較により現在提案されているモデル構造の妥当性を議論する。

【方法】密度行列繰り込み群(DMRG)を基礎とする新規多配置理論を用いて Fig.1e に示す光合成水分解反応の活性中心モデルに対し電子状態計算を行った。多配置理論は多数の電子配置の量子的重ね合わせにより電子状態を記述する理論であり、金属錯体系、とりわけ多配置効果が重要となる様な共有結合性の強い配位結合を持つ錯体では、密度汎関数法、クラスター展開法など単参照理論にかわる高精度な計算法として用いられている。しかし、従来の多配置理論は、中心金属の数に対し計算量が指数関数的に増大するため適用範囲が単核や複核錯体に限られていた。本研究で対象となるマンガンの3d軌道とその架橋酸素の2p軌道の計35軌道からなる活性軌道空間の次元は $10^{18}$ を超え、従来の理論では扱う事が出来ない。この問題に対し広大なハミルトニアンをコンパクトな行列積表現(MPS)波動関数

$$|\Psi^{\text{MPS}}\rangle = A_{i_1}^{n_1} A_{i_1 i_2}^{n_2} \cdots A_{i_{k-2} i_{k-1}}^{n_{k-1}} A_{i_{k-1}}^{n_k} |\psi^{n_1} \psi^{n_2} \cdots \psi^{n_k}\rangle$$

( $n$ :各軌道の自由度,  $i$ :繰り込み状態の自由度)に情報圧縮を行うことにより、今回はじめてマンガン四核クラスターの高精度波動関数の算出を実現した。

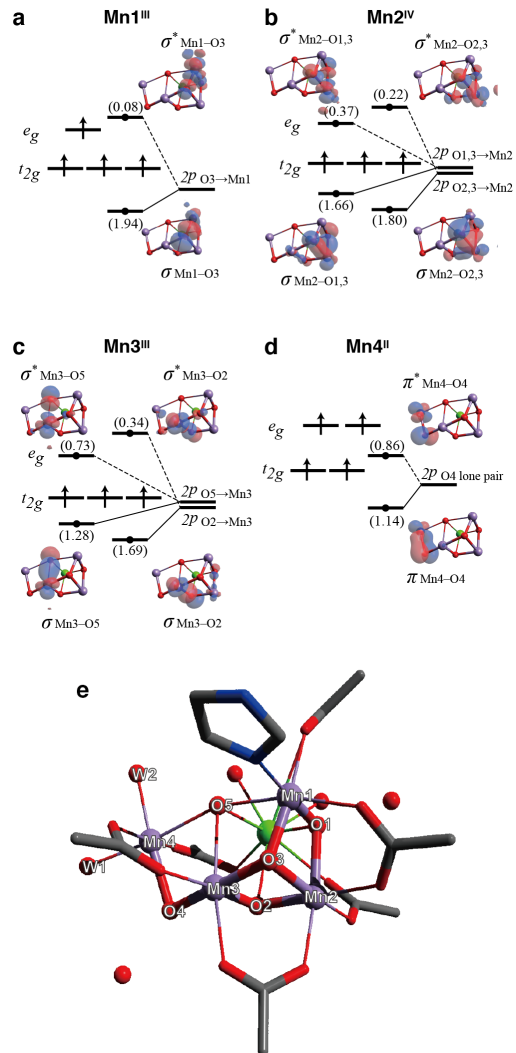


Fig1. 各 Mn の分子軌道ダイアグラム. 3d 軌道の分裂に寄与する酸素 2p 軌道を共に示した. 電子占有数は括弧内

**Table 1.** Spin projections for the Mn and O atoms of the DMRG-CASSCF wavefunctions.

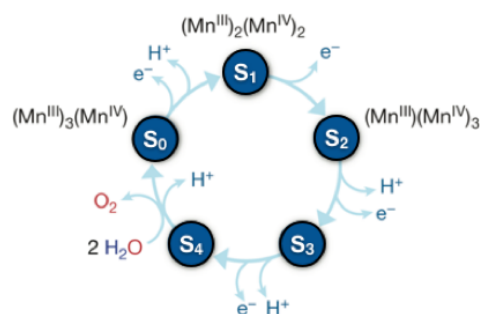
	Mn1	Mn2	Mn3	Mn4	O1	O2	O3	O4	O5
W1:H <sub>2</sub> O, W2:H <sub>2</sub> O									
DMRG	1.971	-1.021	-0.320	0.322	-0.012	0.024	0.020	0.002	0.002
Heisenberg <sup>1</sup>	1.354	-0.864	-0.992	1.502	—	—	—	—	—
W1:OH <sup>-</sup> , W2:H <sub>2</sub> O									
DMRG	2.007	-1.036	-0.190	0.189	-0.020	0.024	-0.002	0.002	0.000
Heisenberg <sup>1</sup>	1.936	-1.000	-0.728	0.792	—	—	—	—	—
W1:H <sub>2</sub> O, W2:OH <sup>-</sup>									
DMRG	1.977	-1.024	-0.314	0.320	-0.012	0.027	0.014	0.001	-0.001
Heisenberg <sup>1</sup>	1.646	-0.944	-0.970	1.270	—	—	—	—	—
W1: OH <sup>-</sup> , W2:OH <sup>-2</sup>									
DMRG	1.976	-1.017	-0.299	0.314	-0.012	0.027	0.006	-0.006	-0.002
Heisenberg <sup>1</sup>	2.000	-0.974	-0.310	0.286	—	—	—	—	—

<sup>1</sup>The exchange parameters (**J**) of the Heisenberg model were determined by the BS-DFT energies

<sup>2</sup>For the ‘W1: OH<sup>-</sup>, W2:OH<sup>-</sup>’ protonation state, the structure used for the Heisenberg model simulation is not available. Therefore, the DMRG calculation was done at a different structure. (See reference (b))

【結果】光合成系 II 酸素発生中心における水分解反応は Kok サイクル(Fig.2)と呼ばれる光照射に合わせた反応サイクル「S<sub>0</sub>→S<sub>1</sub>→S<sub>2</sub>→S<sub>3</sub>→S<sub>4</sub>(→S<sub>0</sub>)」に沿って起こるとされており、反応中心のマンガングラスタは各ステップで Mn 酸化数を変化させ、最終的に水分子から電子を引き抜くのに必要な電位を蓄えると考えられている。ゆえに Mn イオンの酸化状態の同定は反応機構を推測する上で重要な要素であり、分光実験や他の実験事実との相補的解析により様々な考察がなされてきた。本研究では DMRG-CASSCF 法より得られた波動関数からモデル構造における Mn 酸化状態を決定した。X 線回折により得られた構造 (XRD 構造) は EXAFS などから予測される構造とは結合長など大きく異なる部分があり、密度汎関数法から予測された構造 (QM/MM 構造) も EXAFS の結果を支持する事から、XRD 構造の妥当性が議論となっている。本研究では、分光実験により同定され現時点で広く正しいとされる S<sub>1</sub> 中間状態の酸化状態 {Mn<sup>III</sup><sub>2</sub> Mn<sup>IV</sup><sub>2</sub>} を再現するか否かを指標としたモデル構造の妥当性の検討を行った。解析の結果、QM/MM 構造における基底状態は妥当な酸化状態 (Mn<sup>2III</sup> Mn<sup>3IV</sup> Mn<sup>4IV</sup> Mn<sup>5III</sup>) を再現したのに対し、一昨年報告された XRD 構造においては O9,10 から Mn4,5 へ電荷移動した状態 (Mn<sup>2III</sup> Mn<sup>3IV</sup> Mn<sup>4III</sup> Mn<sup>5II</sup>) が基底状態となり (Fig1a–1d)他の分光実験と矛盾する結果になった。また、酸化状態により検出できるのは結合長にして高々 0.1 Å 程度の誤差であり、今回はより細かな結合長や結合角、二面角に対して鋭敏な EPR パラメータを波動関数から決定したので (Table1), それを指標としたモデル構造の妥当性と水素付加状態の差異による僅かな構造変化の検出の可否を議論する。

Fig. 2 水分解反応サイクル(Kok cycle)



### 【参考文献】

<sup>1</sup>Y.Kurashige, G.K.-L.Chan, T.Yanai “Entangled quantum electronic wavefunctions of the Mn<sub>4</sub>CaO<sub>5</sub> cluster in photosystem II” *Nature Chemistry* **5**, 660–666 (2013)

<sup>2</sup>Y.Kurashige, T.Yanai “High-performance *ab initio* density matrix renormalization group method” *J. Chem. Phys.* **130**, 234114 (2009).

光捕集アンテナにおける励起エネルギー移動の分子論的機構の解明を目指して

(琉大<sup>1</sup>, ワシントン大・生化<sup>2</sup>, 京大院理<sup>3</sup>, 分子研<sup>4</sup>)

○東 雅大<sup>1</sup>, 小杉 貴洋<sup>2</sup>, 林 重彦<sup>3</sup>, 斉藤 真司<sup>4</sup>

Toward Understanding of Molecular Mechanism of  
Excitation Energy Transfer in Light-Harvesting Antennas

(University of the Ryukyus<sup>1</sup>, University of Washington<sup>2</sup>,

Kyoto University<sup>3</sup>, Institute for Molecular Science<sup>4</sup>)

Masahiro Higashi<sup>1</sup>, Takahiro Kosugi<sup>2</sup>, Shigehiko Hayashi<sup>3</sup>, Shinji Saito<sup>4</sup>

光合成系で吸収された光エネルギーは、光捕集アンテナと呼ばれるタンパク質により高速・高効率で反応中心に伝達することが知られている。光捕集アンテナの 1 つである Fenna-Matthews-Olson (FMO)タンパクは、最も原始的で構造が単純であるため、古くから実験・理論の両面で広く研究されてきた(例えば Cheng and Fleming, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **60**, 241 (2009))。FMOタンパクは内部に色素バクテリオクロロフィル(BChl) *a* を 7 つ含む。近年、この BChl *a* の第一励起状態間の励起エネルギー移動において量子コヒーレンスが長時間保たれていることが二次元電子スペクトルの実験から示され(Engel et al., *Nature* **446**, 782, (2007))、注目を集めている。

この励起エネルギー移動の分子論的機構を解明するために、分子動力学シミュレーションと量子化学計算を組み合わせた計算が行われるようになってきたが(Olbrich et al., *J. Phys. Chem. B* **115**, 8609 (2011), Shim et al., *Biophys. J.* **102**, 649 (2012)など)、用いる量子化学計算手法により BChl *a* の励起エネルギーやその揺らぎが大きく異なり、励起エネルギー移動ダイナミクスの結果も大きく異なっている。したがって、励起エネルギー移動ダイナミクスを適切に計算するためには BChl *a* の励起状態を注意深く取り扱う必要がある。そこで本研究では、まず溶液中の BChl *a* の励起状態に注目する。BChl *a* の第一励起状態への吸収エネルギーは、様々な溶媒に対してほとんど変化しないが、アルコールに対して僅かに変化することが実験的に知られている。しかし、何故そうなるのかよく分かっていない。そこで、QM/MM-RWFE-SCF 法(Kosugi and Hayashi, *J. Chem. Theory Comput.* **8**, 322 (2012))を用いてトリエチルアミン、1-プロパノール、メタノールの 3 つの溶媒中で BChl *a* の吸収エネルギーの計算を行った。QM 領域の量子化学計算には時間依存密度汎関数法(TDDFT)を用いたが、既存の汎関数では実験の傾向を再現出来ないことが分かった。そのため、CAM-B3LYP のパラメータを調整し、実験の傾向を再現することに成功した。また、結果を解析したところ、吸収スペクトルの溶媒依存性が非常に小さいのは、双極子モーメントの減少による blue shift、BChl *a* のカルボニル基とアルコールとの水素結合による red shift などが打ち消しあっているためだと分かった。

このように溶液中で最適化した汎関数は、タンパク質中の BChl *a* にも適用できると期待される。しかし、タンパク質中の BChl *a* の励起状態ダイナミクスに TDDFT を直接適用するのは計算コストの観点から非常に困難である。そこで、凝縮相の化学反応のポテンシャル面を高精度・高効率に生成する EE-MCMM 法(Higashi and Truhlar, *J. Chem. Theory Comput.* **4**, 790 (2008))を応用し、

BChl *a* の励起エネルギーを高精度・高効率に計算可能な手法を開発した。この手法についても紹介する予定である。



## 4D10

### 京コンピュータを用いたウイルスの全原子シミュレーション: 4. カプシド内水相の負の圧力

(名大院工<sup>1</sup>, 名大院工・計算科学センター<sup>2</sup>, 立命館大薬<sup>3</sup>, 阪大蛋白研<sup>4</sup>, 微化研<sup>5</sup>)

○安藤 嘉倫<sup>1</sup>, 吉井 範行<sup>2</sup>, 山田 篤志<sup>1</sup>, 藤本 和士<sup>3</sup>, 小嶋 秀和<sup>1</sup>, 水谷 圭佑<sup>1</sup>,  
岡崎 進<sup>1</sup>, 中川 敦史<sup>4</sup>, 野本 明男<sup>5</sup>

#### Large-scale all-atom molecular dynamics calculation of viruses using the K-computer:

##### 4. Negative pressure inside the poliovirus empty capsid

(Graduate School of Engineering, Nagoya Univ.<sup>1</sup>, Graduate School of Engineering,  
Nagoya Univ.<sup>2</sup>, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Ritsumeikan Univ.<sup>3</sup>,  
Institute for Protein Research, Osaka Univ.<sup>4</sup>, Institute of Microbial Chemistry<sup>5</sup>)

○Yoshimichi Andoh<sup>1</sup>, Noriyuki Yoshii<sup>2</sup>, Atsushi Yamada<sup>1</sup>, Kazushi Fujimoto<sup>1</sup>, Hidekazu Kojima<sup>1</sup>,  
Keisuke Mizutani<sup>1</sup>, Susumu Okazaki<sup>1</sup>, Atsushi Nakagawa<sup>3</sup>, and Akio Nomoto<sup>4</sup>

#### 【はじめに】

京コンピュータを用いた水溶液中でのポリオウイルスの全原子シミュレーションの一連の講演 (1E04,1E06,3P091,4D10,3P092) において、本発表はウイルス殻 (カプシド) の内側と外側での圧力に注目したものである。

ウイルスはカプシドと呼ばれる数種のタンパク質から構成される外殻と、カプシドに取り囲まれた核酸、ときにエンベロープと呼ばれるカプシドをさらに取り囲む脂質二重層膜から構成される[1]。本研究で話題にするポリオウイルスはエンベロープを持たない、露出したカプシド内部に single-strand(ss)-RNA を含む球形のウイルスである。核酸を含まないウイルス (エンプティカプシド) は人工ワクチンや DDS キャリアーへの応用が期待されているものの一般に不安定であるとされる。本研究では、ポリオウイルスのエンプティカプシドを対象とした全原子分子動力学 (MD) 計算をもとに、温度・圧力一定条件下での熱平衡状態におけるエンプティカプシド内水相の圧力について考察した結果を報告する。

#### 【計算内容】

ポリオウイルスカプシドの初期座標には 0.22 nm の分解能の PDB ID : 1HXS [2] を用いた。一辺 40 nm の立方体基本セルの中央にカプシド殻を設置した。その上でカプシドの内外に水分子を配置し、カプシドの持つ正味の負電荷に対するカウンターイオン Na<sup>+</sup>を殻内外水相に設置した。さらにイオン強度がリン酸緩衝生理食塩水濃度となるよう Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>を設置した。総原子数は 6,480,326 個となった。タンパク質とイオンの力場には CHARMM22 with CMAP, 水分子には TIP3P を用いた。系の温度を 310.15 K に昇温させた後, Nosé-Andersen の *NPT* アン

サンプル ( $P = 0.1$  MPa) による計算を 200 ns 行った. 京コンピュータ上で, 当グループの開発した汎用ソフト MODYLAS[3]により分子動力学計算を行った.(その他計算内容の詳細は講演 3P901 を参照のこと)

### 【結果と考察】

図 1 には  $NPT$  アンサンブルに切り替えて以降のカプシド内水相および外水相バルクの水分子数密度  $\rho_{\text{wat}}$  の時間変化を示した. 初期値において外水相と同程度であった内水相の  $\rho_{\text{wat}}$  は, 最初の 30 ns ほどで目に見えて減少し, 100 ns 以降  $33.272 \text{ nm}^{-3}$  のまわりを揺らいだ. 一方, 外水相バルクについては 100 ns 以降  $33.332 \text{ nm}^{-3}$  のまわりを揺らいだ. 講演 3P092 にて報告したように, カプシドは水分子の透過を許しており (1 ns に 9 個), 100 ns かけて水分子が十分交換した結果カプシド内外の  $\rho_{\text{wat}}$  が平衡値に達したとみなせる. それでもなおカプシド内側の  $\rho_{\text{wat}}$  は外部にくらべ小さく, 本質的にエンptyカプシド内側での圧力がより低いことが示唆される. カプシド内外での  $P$  を定量的に確かめるために 2 つの方法, (1)  $\rho_{\text{wat}}-P$  検量線を用いた推定, および (2) ビリアル定理に基づく局所圧力計算による推定を行った. 表 1 にあるように, 2 つの方法ともにカプシド内側は外側にくらべ 3 MPa ほど低い負圧となった. 圧力への静電相互作用の寄与の解析により, この内部の負圧の起源はカプシドのもつ正味負の電荷によることがわかった. このエンptyカプシド内部の負の圧力によって系が不安定化されるために, 人工エンptyカプシドの自発的な形成が妨げられていると予想される.

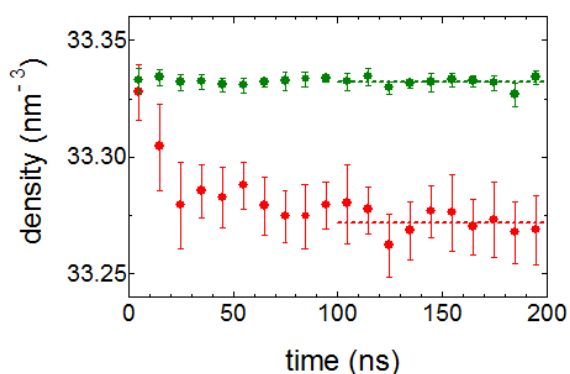


図 1 カプシド内外の水数密度の時間変化. 内側(赤), 外側(外). 点線は 100 ns 以降の平均値.

表 1 2 つの方法で推定した圧力 (MPa)

	$\rho_{\text{wat}}-P$ 検量線	局所圧力
内側	$-2.8 \pm 0.3$	$-3.4 \pm 0.5$
外側	$0.6 \pm 0.1$	$0.2 \pm 0.1$

### 【参考文献】

- [1] D.M. Knipe, and P.M. Howley (Ed.), Fields Virology 5<sup>th</sup> Ed., Lippincott Williams&Wilkins and Wolters Kluwer, Philadelphia (2007). [2] S.T. Miller, J.M. Hogle, and D.J. Filman, J. Mol. Biol. 307, 499 (2001). [3] Y. Andoh, N. Yoshii, K. Fujimoto, K. Mizutani, H. Kojima, A. Yamada, S. Okazaki, K. Kawaguchi, H. Nagao, K. Iwahashi, F. Mizutani, K. Minami, S. Ichikawa, H. Komatsu, S. Ishizuki, Y. Takeda, and M. Fukushima, J. Chem. Theory Comput., 9, 3201 (2013).