4P061 NO の光解離を用いた糖結合タンパク質の 細胞凝集制御の試み (東北大院薬)〇佐藤一平・平松弘嗣・中林孝和

The attempt to control the ability of cell agglutination by the NO photodissociation in the carbohydrate-binding protein (Tohoku Univ.) I. Satoh, H. Hiramatsu, T. Nakabayashi

[序] 我々はタンパク質構造の光制御を行い,タンパク質および細胞の機能を制御することを目指している.本研究では,光解離過程の基本的な系である SNO 基からの NO の光解離を用いて,タンパク質内にある分子内ジスルフィド結合(S-S 結合)の光による制御・細胞凝集の光制御を目指す. S-S 結合はタンパク質の構造や機能に重要な役割を果たしており, S-S 結合形成の光制御は,多くのタンパク質に適用できると考えられる.光制御の過程を Fig. 1 に示す.タンパク質内にあるシステイン(Cys)側鎖のチオール基(S-H 基)を NO 基に置換させ,S-NO 結合を形成する.次に,NO が吸収する光を照射し,NO を光解離させる.生成した C-S ラジカルはすみやかに S-S 結合を形成し,光によって S-S 結合の生成を行うことができる^{1,2}.



Fig. 1. NOの光解離を用いた S-S 結合の生成機構

本研究では NO 基を修飾するタンパク質として,糖結合タンパク質であるヒトガレクチン 1(Wt-hGal-1)を用いる.Wt-hGal-1 は分子内に6つの Cys 側鎖を持ち,Cys 側鎖が還元状態の S-H 基のときには,Fig.2のように二量体を形成し,細胞を凝集させることができる.しかし 酸化状態となり,Cys 側鎖が分子内 S-S 結合を形成すると,Wt-hGal-1 は単量体となり,細胞 の凝集機能を失う³.このWt-hGal-1を用いて以下の実験を行うことを目指す.(i)Wt-hGal-1 の S-H 基を NO 基に置換し,S-NO 基を形成させる(以下,NO基で置換されたガレクチン 1 を,SNO-hGal-1と呼ぶ).(ii) NO 基のみが吸収する約 350 nm の光を照射し,NO の光解離が 生じることを確認する.(iii) SNO-hGal-1を用いて赤血球などの細胞試料を凝集させる.(iv)約 350 nm の光を照射し,凝集した細胞を光によって単量体へと変化させる.本研究によって, NO の光解離を用いたタンパク質および細胞の機能制御の基礎的知見を得ることができる.

[結果] Wt-hGal-1 は、大腸菌を用いて発現させ、 複数のカラムを用いて精製した⁴. 得られた Wt-hGal-1の細胞凝集能を調べた結果をFig.3に示 す. 2-メルカプトエタノール(2-ME)によって S-H 基に還元された Wt-hGal-1 について、希釈された ウサギ保存血液に加え、約1時間の培養を行った. 加える前は単量体(Fig.3上)であった赤血球が、大



Fig. 2. ヒトガレクチン1の二量体構造

きな凝集構造(Fig. 3 下)を示した. 調整した Wt-hGal-1 は細胞 凝集能があることがわかる. 還元状態の二量体 Wt-hGal-1 は, 細胞膜上にある β-ガラクトシドと結合することによって, 細 胞凝集させることができる.

S-H 基の置換反応による S-NO 基の生成は, NO 置換された アミノ酸システイン(Cys-NO)と Wt-hGal-1 の混合による置換 反応を用いた⁵. しかし, Wt-hGal-1 が分子内 S-S 結合を形成 すると, NO の置換を行うことができない. そこで反応前に, Wt-hGal-1 に還元剤を加え, Wt-hGal-1 の Cys 残基を S-H 基に 還元した. Fig. 4 に調製した SNO-hGal-1 の吸収スペクトルを 示す. ガレクチン内のトリプトファンに由来する約 280 nm の吸収の他に, NO に由来する約 335 nm の吸収も観測されて おり, SNO-hGal-1 が生成していることがわかる. また反応前 に用いる還元剤(2-ME とトリス(2-カルボキシエチル)ホスフ ィン(TCEP))を比べると, ガレクチンの吸収に対する NO の吸 収が TCEP の使用時において大きくなっている. TCEP の還



Fig. 3. 赤血球の凝集構造. 赤血 球 含 む 水 溶 液(上 図)に Wt-hGal-1 を加えると, 赤血球 が凝集するようになる(下図).

元力は強く, Wt-hGal-1 内の Cys の多くを S-H 基に還元したことが原因であると考えられる. タンパク質の Cys 濃度に対する NO の濃度は,β-ME は 37%、TCEP の場合は 102%と計算さ れた. TCEP によってほぼすべての Cys が S-H 基に還元され,NO 置換されたと考えられる.

Fig. 5 に S-NO hGal-1 に対して紫外光を照射した結果を示す.紫外光の照射によって,NO に由来する約 335 nm の吸収強度が減少することがわかる.この結果は,SNO-hGal-1 から NO が光解離していることを示している.さらに,エルマン試薬を用いて S-H 基の検出を行ったが,SNO-hGal-1 は紫外光の照射,非照射にかかわらず S-H 基は検出されなかった.

S-NO hGal-1 についても赤血球の凝集能を確認した.現在,光照射による赤血球の単量体への解離を検討している.







Fig. 5. 紫外光非照射時(青)と照射時(赤) SNO-hGal-の吸収スペクトル. Wt-hGal-1 の吸 収スペクトル(黒)も併せて示す.



連続2残基¹³C,¹⁸Oラベルによるヘリックス主鎖構造二面角解析 (東北大院薬)○平松弘嗣・岡部仁美・中林孝和

Analysis of dihedral angle of peptide main chain in helix

using the two-residue ¹³C,¹⁸O isotope labeling

(Grad. Sch. Pharm. Sci., Tohoku Univ.) Hirotsugu Hiramatsu, Hitomi Okabe, Takakazu Nakabayashi

序 原子座標などによって指定されるタンパク質の静的な構造の情報は、構造と機能 の関連性を議論する際の出発点となりうる。また、条件に応じて生じる構造変化を解 析することは、タンパク質の動的な性質を理解する上で本質的な重要性を持つ。赤外 吸収スペクトル測定は、タンパク質構造の変化を鋭敏に検出する実験手法の一つであ る。タンパク質の動的な性質を解明することを目的として、赤外スペクトルに現れる バンドのうち、ペプチド主鎖構造の情報をもたらすアミドバンド、および側鎖構造に 関する知見をもたらす種々のマーカーバンドが利用されてきた。

タンパク質において、末端を除く各アミノ酸残基はペプチド(O=C-N-H)結合で連結 してペプチド主鎖を形成する。ペプチド主鎖 C=O 伸縮振動バンドに相当するアミド I バンドは 1600-1700 cm⁻¹に現れる。アミド I 振動数と二次構造の関連性は、振動子間 の遷移双極子相互作用(TDC)を考慮して大方説明することが可能である。我々はこの 対応関係を利用して残基二面角を解析する新規実験手法「連続 2 残基 ¹³C=¹⁸O 同位体 ラベル法」を考案し、実験値と計算値の対応関係を示した[1]。すなわち赤外スペクト ルに現れる ¹³C=¹⁸O ダブレットの振動数差と強度比(ダブレット全体の強度に対する 高波数側バンドの強度)の実測値がラベル残基の二面角と対応関係を持つことを報告 した。¹³C=¹⁸O ダブレットが主鎖構造(二面角)マーカーとして利用可能かどうか、 さらに探ることを目的として、本研究では、用いるパラメータを改良することで実験 値と計算値の対応関係が改善するかどうか検討した。

実験 試料として 11 残基のペプチド[2FXZ]および 13 残基のペプチド[2DX2]を用いた(表1)。それぞれのペプチドは水溶液中でαヘリックスおよび 3₁₀ヘリックスを取っており二面角がよく定まっている。2FXZ の Ala6 および 2DX2 の Leu7 の二面角の解析を行うため、全て¹²C=¹⁶O からなる試料、1 残基のみ¹³C=¹⁸O ラベルを施した2 種類の試料、および連続2 残基ラベル体を合成した(表1、ラベルを施した2つの残基を下線で示す)。各試料は溶液中で一定の割合でランダム構造をとり、赤外スペクトルにランダム構造の寄与が現れる。この成分の寄与を除くため、D₂O/DMSO(2:8)溶媒中で測定したスペクトルを差し引いた。連続2 残基ラベル体の測定結果から、¹³C=¹⁸O ダブレットバンド形状(振動数差および強度比)を解析した。赤外吸収スペ

クトル測定は重水中で行った。

結果 実験結果を図1に、解析の結果を表1にそれぞれ示す。この実験結果と、注目する残基の二面角(文献値、表1)の関連性を説明するために、
GF 行列法を用いて振動数計算を行った。その際、
モデル化合物 Gly-Gly-Glyの二面角を任意の値に固定して得られる「2つのアミドI振動子の距離と配向」を考慮することで計算値を得た。

F 行列非対角項に関して TDC および補正項Δ(文 献値)を考慮した結果、振動数差の計算値が実測値 をよく再現した(表1)。

実際のペプチドにおいて、各残基の C=O 結合長 は一定ではない。これは各ペプチド結合の水素結合 構造の相違、あるいは静電的環境の相違に由来する。 その結果、F 行列の対角項の値(*f*_{ii})は一定とは限ら ない。そこで、1 残基ラベル体に関して、赤外吸収

スペクトルに現れる ¹³C=¹⁸O バンドの振 動数、および同位体ラベルにより消失し た ¹²C=¹⁶O バンドの位置を決定し、原子 質量由来の振動数シフト実測値から f_{ii} (および g_{ii})を決定した。 $\alpha \sim J ックス$ と $3_{10} \sim J ックス$ に関してこれらの実測 値を用いたところ、計算結果は大きく変 化しないことが分かった(表1)。

H₂O 中、アミドI 振動子の振動遷移モ ーメントは C=O 結合軸と約 20°をなす。 H₂O 中でのアミドI と D₂O 中とアミドI'



図1¹³C,¹⁸Oラベルにより生じた赤外吸収 変化を示す差スペクトル(ラベルなしの結 果との差分)。ラベル残基を図中に示す。

構造	α-helix		3 ₁₀ -helix	
PDB ID	2FXZ		2DX2	
配列*	KMVNE <mark>AL</mark> VRQGLA		INYW <mark>LA</mark> HAKAG	
$\{\phi,\psi\}$	$\{-97.9^{\circ}, -34.6^{\circ}\}$		$\{-80.6^{\circ}, -15.2^{\circ}\}$	
	Δω	強度比	$\Delta \omega$	強度比
実測値	$15.4 \pm 1.4 \ 0.38 \pm 0.04$		$10.4 \pm 1.3, 0.68 \pm 0.10$	
計算值 [†] A	24.9	0.82	22.5	0.67
В	16.1	0.82	13.8	0.67
С	16.2	0.82	14.6	0.66

*同位体ラベル残基を下線で示した。

†A: $g_{ii} = 1$, $g_{ij} = 0.91$, $f_{ii} = 1.605$, $f_{ij} = (TDC)$;

B: $g_{ii} = 1, g_{ij} = 0.91, f_{ii} = 1.605, f_{ij} = (TDC + \Delta);$

C: $g_{ii} = 1, g_{ij} = (実測値), f_{ii} = (実測値), f_{ij} = (TDC + \Delta)$

では振動形が異なることを念頭に、振動遷移モーメントと C=O 結合軸の間の角度を 10°-30°の範囲で変化させた。ダブレット強度比計算値は小さく変化したが、実測値と の合致は特に改善しなかった。

表 1

以上の解析から、用いるパラメータを適切に選ぶことにより実測値と計算値の対応 が改善することが示された。

参考文献[1] 岡部、平松、中林「(2P083) 連続2残基¹³C=¹⁸O ダブレット形状とペプチド主鎖構造の関 連」第8回分子科学討論会、東広島、2014.

コレステロールを添加した DPPC 二重膜中でのエネルギー移動の

ピコ秒時間分解ラマン分光法による観測

(学習院大学・理)〇北村 捷, 髙屋 智久, 岩田 耕一

Effect of cholesterol on energy transfer in DPPC lipid bilayers observed with picosecond time-resolved Raman spectroscopy

(Gakushuin University) OSyo Kitamura, Tomohisa Takaya, Koichi Iwata

【序】光合成などの多くの生化学反応は、生体膜中に存在する膜たんぱく質を触媒として進行する。膜たんぱく質は脂質二重膜に取り囲まれていることから、脂質二重膜は生化学反応の進行する場であるといえる。そのため、生化学反応について理解するためには、脂質二重膜の性質について知る必要がある。コレステロールは生体膜中に多く含まれている脂質であり、コレステロールの添加は脂質二重膜の特性を変化させることが知られている。脂質二重膜では相転移温度の前後で膜の構造が変化する。相転移温度以下では炭化水素鎖の秩序が高いゲル相をとり、相転移温度以上では秩序の低い液晶相をとる。コレステロールを添加した 脂質二重膜では、秩序液体相と呼ばれる脂質・コレステロール系に特徴的な相が観測される。 本研究ではピコ秒時間分解ラマン分光法を用いて、コレステロールを添加したリン脂質 (DPPC)のリポソームでのエネルギー移動過程を観測し、コレステロールの添加が脂質二重膜 中のエネルギー移動特性に与える影響を調べた。

【実験】DPPC とコレステロールのモル比 100:30 の混合物とコレステロールを添加してい ない DPPC のそれぞれから *trans*-スチルベン内封リポソームを薄膜法で作成した。得られた リポソームをエクストルーダーで処理することで直径を 100 nm に調整した。ピコ秒時間分 解ラマン分光計¹⁾を用いて、リポソーム脂質二重膜中の最低励起一重項(S₁)状態の *trans*-ス チルベンのラマンスペクトルの時間変化を測定した。ポンプ光とプローブ光の波長は、それ ぞれ 300 nm と 590 nm だった。

【結果と考察】DPPC に対してコレステロールを 30%添加した脂質二重膜中とコレステロールを添加していない DPPC 二重膜中でS₁*trans*スチルベンの時間分解ラマンスペクトルを測定した。コレステロールを 30%添加した脂質二重膜中での結果を図1に示す。1570 cm⁻¹の ラマンバンドは時間とともに高波数側にシフトする。このシフトは S₁*trans*スチルベンの冷却過程に対応しており、ピーク位置の時間変化は膜中での S₁*trans*スチルベンの冷却過程を示す。DPPC 二重膜中と DPPC に対しコレステロールを 30%添加した二重膜中での 1570

 cm^{-1} のラマンバンドの位置の時間変化を図 2 に示す。1570 cm⁻¹のラマンバンドの位置の変化から S₁ trans-スチルベンの冷却速度定数を求めた結果、コレステロールを 30 %添加した脂質二重膜中では 1.0 × 10¹¹ s⁻¹、コレステロールを添加していない DPPC 二重膜中では 9.1 × 10¹⁰ s⁻¹となった。

アルカンやアルコールなどの有機溶媒中では、S₁ trans-スチルベンの冷却速度定数と溶媒 の熱拡散定数の間に相関がある。²⁾この相関が脂質二重膜中でも成り立つと仮定すると、冷 却速度定数から膜中の熱拡散定数を見積もることができる。冷却速度定数から見積もったコ レステロールを 30%含む DPPC 脂質二重膜中の熱拡散定数は 8.6×10⁻⁸ m² s⁻¹となった。 得られた熱拡散定数はコレステロールを含まない DPPC 脂質二重膜(ゲル相)の熱拡散定数 8.3×10⁻⁸ m² s⁻¹よりも大きい。コレステロールの添加により、脂質二重膜のエネルギー 移動特性が変化する。この変化は、コレステロールの添加による秩序液体相の形成に対応す ると考えている。



図 1: DPPC に対してコレステロールを 30 %添加した脂質二重膜中での S₁ trans-スチルベンの時間分解ラマンスペクトル



図 2: S₁ trans スチルベンの 1570 cm⁻¹の バンドの位置の時間変化。DPPC 二重膜中 とコレステロールをモル比で 30 %添加し た DPPC 二重膜中での測定結果を示す。

[参考文献]

K. Yoshida, K. Iwata, Y. Nishiyama, Y. Kimura, and H. Hamaguchi, *J. Chem. Phys.*, **2012**, 136, 104504.
 K. Iwata and H. Hamaguchi, *J. Phys. Chem. A*, **1997**, 101, 632.

全反射赤外分光法で見るサル緑感受性視物質の陰イオン結合 (名工大院工¹,ケース・ウェスタン・リザーブ大²,京大霊長研³) ○ 中村 駿太¹,片山 耕大^{1,2},岩城 雅代¹,今井 啓雄³,神取 秀樹¹

ATR-FTIR study of anion binding to monkey green sensitive visual pigment (Graduate School of Engineering, Nagoya Institute of Technology¹, Case Western Reserve University², Primate Research Institute Kyoto University³)

○ Shunta Nakamura¹, Kota Katayama^{1,2}, Masayo Iwaki¹, Hiro Imai³, Hideki Kandori¹

【序】動物の網膜には、明暗を認識する桿 体視物質と、色覚を認識する錐体視物質が存 在する。これらは、7回膜貫通ヘリックス構 造のGタンパク質共役受容体のひとつであ り、発色団として 11-cis レチナールをもつ。 我々、ヒトを含む霊長類は3種類の錐体視物 質をもち、特に赤・緑感受性視物質はLグ ループ視物質に属する。Lグループ視物質 は、錐体視物質の中でも最も長波長に吸収極 大をもつグループであり、塩化物イオン (Cl-) がタンパク質内部に結合することで吸 収極大が長波長へシフトする。Clの結合に は、細胞外第2ループの His197 と Lys200 が 大きく関与していることが分かっているがし、 それ以外の構造情報についてはほとんど分かっ ていない。



図 1 ウシロドプシンにおける発色団レチ ナール周辺の X 線結晶構造

今回、我々はサル緑感受性視物質に対し、タンパク質の陰イオン選択的構造変化を捉え、 陰イオンが波長制御に及ぼす影響を検討することを目的とし、エバネッセント波を利用し て分子振動を捉えることが可能な全反射赤外分光測定を行った。CF、NO₃、N₃を含むバッ ファーと含まないバッファーを交互に流すことで赤外差スペクトルを測定した。

【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、1D4 抗体カラムによる精製の後、PC リポソームへと再構成した。0.1 mg の再 構成ペレットを、45 μ l のバッファー(2 mM phosphate, 10 mM NaCl, pH 7.25)で懸濁 後、そのうち5 μ l を ATR シリコンプリズム上に滴下し、窒素雰囲気下で乾燥させた。 各種アニオンを加えたバッファー(200 mM phosphate, pH 7.25)を用いて、バッファー 交換による赤外差スペクトルを測定した。CI⁻、NO₃⁻は、10 mM と0 mM の陰イオンが 含まれたバッファーを、N₃⁻は 20 mM と0 mM の陰イオンが含まれたバッファーを用い て測定した。

【結果と考察】各種アニオンのバッファー交換により誘起された赤外差スペクトルを 図2に示す。(a)はCIの結合により得られたスペクトルである。(b),(c)は、 NO₃⁻、N₃の結合によって得られたスペクトルであり、両者は類似しているのに対し、 CLの結合によって得られたスペ クトル (a) は (b),(c) とは異 なる結果となった。タンパク質 の二次構造を反映するアミドI 領域 (1690-1620 cm⁻¹)、アミド Ⅱ領域 (1590-1510 cm⁻¹) が大き く異なっており、これは、CIの 結合に伴うタンパク質内部の構 造変化が、NO3やN3の結合によ るものとは異なることを示唆す る。1500-1600 cm⁻¹領域には、 アミド以外にレチナールの C=C 伸縮振動のモードが現れる。低 温赤外分光測定の結果から、レチ ナールの C=C 伸縮振動のバンド が、Cl⁻結合型で1534 cm⁻¹に、



図 2 1800-1150 cm⁻¹領域におけるサル緑感受性視 物質の各種アニオンの結合による赤外差スペクトル (a)Cl⁻(b)NO₃⁻(c)N₃⁻

NO₃ 結合型で 1540 cm⁻¹に現れる ことが分かっている。今回の結果で、Cl の結合における 1532 cm⁻¹、NO₃ の結合にお ける 1538 cm⁻¹、N₃ 結合における 1534 cm⁻¹はレチナールの C=C 伸縮振動を反映して いると考えられる。1745 cm⁻¹にみられるバンドは、プロトン化カルボン酸による信号 が候補としてあげられ、Cl の結合に伴い、結合サイト付近のカルボン酸がプロトン化 していると考えられる。また、1200-1300 cm⁻¹領域においても、Cl の結合による特異的 なレチナールもしくはアミノ酸の変化が現れている。

図3は、光反応後のオプシンに対して、Cl、NO3の結合により誘起された赤外差ス

ペクトルを測定した結果である。 その結果、CI、NO3 ともにフラットな信号が得られた。また、光反応前後で、CI・の解離と思われる信号が得られた。これは、暗状態で保たれていたアニオン結合部位が、レチナールの異性化とともに構造変化を引き起こし、アニオンが結合できない状態となっていると考えられる。過去の研究で、光反応過程でCITが解離することが示唆されており²、今回の結果はこれと一致する。

本発表では、これらの Cl の結 合により特異的に引き起こされ た構造変化に着目し、Cl 結合部 位を形成しているアミノ酸につ いて議論し、長波長シフトの要 因と関連付けていきたい。

【引用参考文献】



図 3 1800-1150 cm⁻¹ 領域における光反応後のサル緑 感受性視物質のオプシンに対する各種アニオンの結合 による赤外差スペクトル (a)Cl⁻(b)NO₃⁻

1. Wang, Z., et al., *Biochemistry* 32, 2125-2130 (1993).

2. Tachibanaki, S., et al., Biochemistry 34, 13170-13175 (1995).

(6-4)光回復酵素の低温における DNA 修復中間体の赤外分光測定

(名工大院・工¹、阪大院・基礎工²、米国・スクリプス研³)
 ○山田大智¹、山元淳平²、張宇¹、岩田達也¹、人見研一³、
 E. D. Getzoff³、岩井成憲²、神取秀樹¹

Low-temperature FTIR study of the intermediates in (6-4) photolyase repair process by isotope labelling. (Nagoya Inst. Tech. Japan¹, Grad. Sch. Eng. Sci., Osaka Univ. Japan², The Scripps Res. Inst., USA³) •Daichi Yamada¹, Junpei Yamamoto², Yu Zhang¹, Tatsuya Iwata¹,

Kenichi Hitomi³, Shigenori Iwai², Elizabeth D. Getzoff³, Hideki Kandori¹

【序】生物は太陽光のエネルギーを巧みに利用するが、光エネルギーを特異な酵素反応に利用するのが DNA 光回復酵素である。興味深いことにこの酵素は、紫外線によって生じた DNA 損傷を、近紫外光あるいは青色光を使って修復することができる。光吸収を担うのは酵素内部に結合した FAD であり、酸化型(FAD^{ox})から光照射によりセミキノン型(FADH[•])を経て酵素活性をもった完全還元型(FADH⁻)を生成する。光回復酵素には、シクロブタン型ピリミジンダイマー(CPD)を修復する CPD 光回復酵素と(6-4)光産物(Figure 1、左)を修復する(6-4)光回復酵素(Figure 1、下)があるが、いずれも FADH⁻⁻が基質存在下で光を吸収することで修復が実現する。(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(Figure 1、中央)などが提案されてきた。しかし、修復における反応中間体の構造解析は皆無である[1]。

我々はフーリエ変換赤外(FTIR)分光法を用いた構造解析を試み、これまで FAD^{ox} から FADH-への光反応及び(6-4)光産物の修復における FTIR 差スペクトルを得ることに成功し、反応機構解 明に向けた端緒を開くことが出来た[2-4]。今回我々は、*Xenopus* (6-4)光回復酵素に対して低温 FTIR 分光法を用いた構造解析を試みたところ、(6-4)光産物の修復中間体に由来する信号を含ん でいると考えられる赤外差スペクトルを温度依存的に捉えることに成功した。さらに、¹³C 標識 (6-4)光回復酵素と¹⁸O 標識(6-4)光産物を用いた測定を行うことで、FTIR シグナルの帰属と中間 体の構造モデルを提案する。



Figure 1 (6-4)光産物形成と(6-4)光回復酵素による修復

【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[4]。¹³C 標識(6-4) 光回復酵素は、M9 培地(0.5 g/ 1L culture¹⁴NH₄Cl、4 g/ 1 L culture¹³C-Glucose を含む)を用いて 培養し精製した。二本鎖 DNA は 14 塩基対からなり、配列中に合成した(6-4)光産物を含む。塩基 配列を以下に示す[5]。

5'-CGCGAA<u>TT</u>GCGCCC-3'(TT:(6-4) 光産物) 3'-GCGCTTAACGCGGG-5'

また、¹⁸O標識(6-4)光産物は Figure 1 に示す通り標識した。

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[2]。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 (修復前後の差スペクトル)とは異 なるものであった(Figure 2)。77 K では、1800-1700 cm⁻¹の C=O 伸縮 振動は変化したものの Amide I の領 域(1700-1600 cm⁻¹)に変化が見ら れなかった。200 K 以上で Amide I 領域に変化が現れ、230 K では、さ らにリン酸 (PO²⁻)の非対称伸縮振 動領域(~1230 cm⁻¹)に変化が見ら れた。250 K を見ると 277 K と類似 したバンドが見られた。1720 (+) cm⁻ ¹のバンドは修復され新たに生じた チミンの $C_4=O$ (Figure 1、右) に由 来すると考えられているバンドであ る[2]。そのため、250 K でも修復反 応が起きていると考えられが、230 K 以下ではスペクトルの形が 277 K のものとは異なるため、これらの温 度では完全には修復がなされておら ず、修復中間体だと考えられる。以 上の事から、低温で得られたスペク トル (77,200,230 K) は少なくとも 3 つの修復中間体を捉えられている と考えられる。



Figure 2 低温FTIR分光法を用いた(6-4)光産物の 修復中間体の測定結果

また、同じ測定を¹³C 標識(6-4)光回復酵素についても行い、両者のスペクトルを比較することで、1800-1700 cm⁻¹のバンドが(6-4)光産物の C=O 伸縮振動、1700-1600 cm⁻¹のバンドが(6-4)光回 復酵素 の Amide I、低波数領域のバンドが DNA のリン酸骨格であると同定した。さらに、¹⁸O 標 識(6-4)光産物の結果も合わせて、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] Zhang, Y., Iwata, T., Yamamoto, J., Hitomi, K., Iwai, S., Todo, T., Getzoff, E. D., Kandori, H. *Biochemistry* **2011**, *50*, 3591-3598.

[3] Zhang, Y., Yamamoto, J., Yamada, D., Iwata, T., Hitomi, K., Iwai, S., Todo, T., Getzoff, E. D., Kandori, H. J. Phys. Chem. Lett. **2011**, *2*, 2774-2777.

[4] Yamada, D., Zhang, Y., Iwata, T., Hitomi, K., Getzoff, E. D. and Kandori H. *Biochemistry* **2012**, *51*, 5774-5783.

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

時間分解赤外分光計測による好熱性ロドプシン TR の光反応解析

(分子科学研究所¹、岡山大院·医歯薬総合²) 黒井邦巧¹、塚本卓²、本田尚也²、 須藤雄気²、古谷祐詞¹

Time-resolved infrared study on the photoreaction of Thermophilic rhodopsin (TR)

(Institute for Molecular Science¹, Okayama Univ.²)

【序】光受容タンパク質であるロドプシンは、最も精力的に研究されているタンパク 質の1つであり、光で生理機能を制御するオプトジェネティクスへ応用されているこ とから、最近では生命科学分野でも注目されているタンパク質である。多様な種類が

存在するロドプシンの中でも、最近発見された好熱菌由来の ロドプシン Thermophilic rhodopsin (TR) (図1) は、初めての 耐熱性ロドプシンであり光駆動プロトンポンプとして機能 する[1]。TR は生理的環境下では 75℃の高温環境にあり、高 い熱安定性を持ったTRの光反応がどのように高温環境に最 適化されているのかを知ることは物理化学の見地から興味 深い。また、TR は高温下における安定な光機能分子素子と して期待されているので、その光反応機構を明らかにするこ とは重要な研究基盤となる。これまで塚本らが過渡吸収分光 によって TR の光反応を調べているが[2]、タンパク質の構造 変化などのダイナミクスの詳細はよく分かっていない。今回、Xanthorhodopsinのものであ 我々は時間分解赤外分光法をTR に適用してその光反応誘起



ロドプシンの構造図。 構造は TR と類縁の る (PDB:3DDL)。

の構造変化を明らかにすることを試みた。さらに70℃までの様々な温度条件で測定を 行うことで、TRの光反応がどのように高温環境に最適化されているのかを検討した。

【実験】TR は文献[1]に従い、大腸菌で発現させ、界面活性剤で可溶化した後、カラ ムクロマトグラフィーにより精製した。卵黄由来フォスファチジルコリンをモル比 1:20 で混合し、界面活性剤を除去することで脂質膜に再構成した。これを緩衝液に懸 濁し、超音波処理した後、CaF2板の上に滴下、乾燥させた。近傍に 20% グリセロール 溶液の液滴を置き、密封することによって水和した。時間分解赤外分光測定には Bruker Optics 社製の Vertex 80 をステップスキャンモードで用いた(時間分解能 12.5 µs)。 試料の光励起には、ナノ秒パルス Nd-YAG レーザー(3 倍波)と OPO レーザーによ り、波長約 530 nm に変換したものを用いた。試料セルの温度は、恒温槽により温度 コントロールされた水を循環させることによって、30℃から 70℃まで 10℃刻みで制 御した。得られたスペクトルの時間変化のデータについて Matlab 数値解析ソフトで 特異値分解 (SVD) 解析、および Global Exponential Fitting(GEF)解析を行った。

【結果と考察】図 2(a)に好熱菌の生息温度付近である 70℃において得られた TR の 光誘起赤外差スペクトルの時間変化を示す。これらのうち2つの吸収ピーク1753 cm⁻¹ と 1628 cm⁻¹に着目した。1753 cm⁻¹はカルボン酸由来の吸収波数であり、この立ち上

がりは光反応に伴うアスパラギン酸 (a) 残基やグルタミン酸残基のプロトン 化を意味する。またアミド I 領域の 1628 cm⁻¹の正のバンドは、同じくア ミド I 領域のα-helix 由来と思われる 1649 cm⁻¹の負のバンドの変化と相関 していることから、TR のタンパク質 骨格の構造変化を表していると考え られる。図 2(b)に 70℃と 40℃におけ る 1628 cm⁻¹および 1753 cm⁻¹におけ る吸収の時間変化を示す。70℃では カルボン酸のプロトン化が骨格構造 変化よりも速い時間で起こるが(図 内赤矢印)、40℃では速い立ち上がり が見られずプロトン移動速度が遅く なっている。



図2 (a)70℃における TR の光誘起赤外差スペクトルの 時間変化。波数 1753 cm⁻¹ の吸収変化はカルボン酸の吸 収に 1649 cm⁻¹ と 1628 cm⁻¹ の吸収変化は TR の骨格構造 の変化に由来すると考えられる。(b)1628 cm⁻¹ および 1753 cm⁻¹における吸収の時間発展。太実線はフィット曲 線、破線は実験値である。

次に、TR の各中間体遷移の反 応速度の温度依存性を検討した。 SVD 解析を行った結果、すべての 温度で4つの主成分が抽出され、 GEF 解析により図3の表に示す時 定数が得られた。主成分数は塚本 らの報告[2]と一致していた。アレ ニウスプロットにより得られた各 活性化エネルギーEa (kcal mol⁻¹)は、ットより得た活性化エネルギーである。 遅い成分ほど大きな値であった。 このことは低温側で著しく光反応



サイクルが遅くなることと関連している。プロトン移動反応など、分子機構の詳細に ついては現在変異体を用いて検討中である。

【参考文献】

[1]T. Tsukamoto et al, J. Biol. Chem. (2013)

[2]T. Tsukamoto et al, J. Phys. Chem. B. (2014)

赤外超解像顕微鏡法による羽毛β-ケラチンの分子配向イメージング (東京工業大学 資源化学研究所)○渡瀬五常、牛尾公平、藤井正明、酒井誠

Orientation-sensitive imaging of feather β-keratins by VSFG-detected IR super-resolution microscopy (Tokyo Institute of Technology, Chemical Resources Laboratory) Yukihisa Watase, Kohei Ushio, Masaaki Fujii, Makoto Sakai

【序】羽毛は、羽軸を中心に羽枝そして小羽枝へと 分岐した形状を持ち(図1)、それぞれの直径は~200 μm、~100 μm 及び~5 μm と明瞭な違いがある[1]。 各部位では、共通の主成分であるβ-シート構造を有 するケラチンタンパク質 (β-ケラチン) が階層的に 収束し、繊維状構造を形成している。図2に羽軸の 赤外吸収スペクトルを示す[2]。主成分のβ-ケラチ ンの Amide I バンド (CO 伸縮振動) に対応する吸 収が 1630 cm⁻¹ 付近で非常に強く見られ、さらにそ の 1650 cm⁻¹ 付近にショルダーが観測されている。 この吸収は振動数からα-ヘリックス構造を有する タンパク質の Amide I によるものだと考えるのが妥 当だが、X線回折の結果から、ねじれているβ-シー ト構造をもつケラチンタンパク質(Twisted β-ケラ チン)の Amide I に由来すると現在考えられている。 つまり、羽毛は主にβ-ケラチンと Twisted β-ケラチ ンの二つの成分で構成されていると言われている。



図 1:(a) 羽毛の全体像(破線:切断方向)、 (b) 拡大像(スケールバー:100 µm)



さらに、 β -ケラチンと Twisted β -ケラチンが羽軸、羽枝また小羽枝では異なった比で存在していると報告されている[3]。しかし、 β -ケラチンの組成が異なるこれらの二成分が、各部位でどのように分布し、配向しているかは、一般的な赤外顕微鏡の空間分解能が低い(~10 μ m)ために分光学的に解明されていない。

そこで、赤外光と可視光による二次の非線形光学過程である振動和周波発生(VSFG)法を顕微 技術に応用し、空間分解能を~1.0 μm まで向上した VSFG 検出赤外超解像顕微鏡を用いて、羽毛 β-ケラチンの分布の解明を試みた。また VSFG 信号強度は VSFG、可視光そして赤外光の偏光に 影響し、分子配向によってその応答が変化することから、β-ケラチンの分子配向の観察が期待さ れる。本研究では、まず比較的観察しやすいサイズの羽軸におけるβ-ケラチンの分布に加え分子 配向を解明することを目的としている。

【実験】励起光源の可視光と赤外光を発生するために、ピコ秒レーザーシステム(パルス幅:2ps) を採用した。赤外光は 5500~9000 nm まで波長を可変できるようにし、可視光は 613 nm に固定し て使用した。同軸に合わせた赤外光と可視光は、羽毛試料に対して下から垂直に照射し、発生した VSFG のみを照射方向の反対側の対物レンズで集光し、ICCD カメラに結像した。

羽毛試料の調製には、生体試料を薄片化する技術として一般的なミクロトーム法を採用した。 ガチョウの胸部の羽毛をエポキシ樹脂で包埋し、β-ケラチンの熱変性が起きないように 65 ℃で 約18時間熱重合させてサンプルチップを作製した。ミクロトームを用いて、このチップを切断方 向が図1-a上に示した破線の通り羽軸の長軸方向に対して垂直に厚さ3 µm に薄切した。切り出 した羽軸横断面はカバーガラス上に吸着させ、半固定したものを測定に用いた。

【結果・考察】図 3-a 中の羽毛横断面の実線で囲った羽軸の領域を拡大して、 β -ケラチンの Amide I バンド (CO str., 1630 cm⁻¹) と Twisted β -ケラチンの Amide I (1650 cm⁻¹) に対して VSFG イメー ジングを行った (図 3-c, d)。図 3-c より羽軸の大部分に β -ケラチンが分布していることの可視化 に成功した。一方、図 3-d (Twisted β -ケラチン) では、 β -ケラチンより強度が明瞭に落ちている ものの分布に差がある様には見られない。羽軸の内側(画面上の上部)と外側(画面上の下部) で代表点を取り、強度比で比較したところ、内側の方が外側より β -ケラチンが Twisted β -ケラチ ンより約 10%多く存在している結果が得られた。この差が分布の差を示唆する有意な値であるの か精査するために、分子配向の違いつまり VSFG 信号強度の偏光依存性を測定した。



図 3: (a) 羽毛横断面の透過像 (スケールバー: 100 μm)、 (b) 羽軸横断面の透過像 (スケール バー: 20 μm)、 (c) β - ケラチン (1630 cm⁻¹) に対する VSFG 像、 (d) Twisted β - ケラチン (1650 cm⁻¹) に対する VSFG 像

VSFG、可視光及び赤外光を電場がそれぞれ画面上で縦方向と横方向になるように偏光させ、全 8 通りの偏光の組合せで β -ケラチンと Twisted β -ケラチンの Amide I に対する VSFG イメージン グを行った。二成分の結果を比較したところ、Twisted β -ケラチンの Amide I 振動によるイメージ ングでは信号強度が著しく低下しただけで、 β -ケラチンと同じ偏光依存性を示した。従って、我々 は β -ケラチンを選択的に観測していると考え、図 3-c, d では二成分の分布ではなく β -ケラチンが 羽軸の大部分を占めていると結論付けた。さらに偏光の組合せを変えると、 β -ケラチンの分布に 偏りが見られた。発表では、この偏光依存性に対するより詳細な議論をする予定である。

【参考文献】

- [1] Dincer Yildiz et al., Journal of Animal and Veterinary Advances, 12, 8 (2009).
- [2] R. D. B. Fraser and E. Suzuki, Spectrochimica Acta, 423-426, 26A (1969).
- [3] K. Takahashi et al., Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 1875-1881, 68 (9), (2004).

A sub-micron step closer to spatially resolving the magnetosensitivity of photochemically induced electron transfer reactions of flavins

(The University of Tokyo) ANTILL, Lewis; BEARDMORE, Joshua; WOODWARD, Jonathan

[Introduction] Phenomena arising as a result of the radical pair mechanism (RPM) have been extensively studied over the last 40 years. In recent times the RPM has seen renewed interest after being proposed as being a prime candidate as the physical interaction mechanism at the heart of animal magnetoreception.¹ Blue-light receptor proteins called cryptochromes and in particular the photochemistry of the flavin adenine dinucleotide (FAD) and the tryptophan triad components of cryptochromes have gained much interest in research in uncovering this mystery.² Moreover, the photochemistry involved takes place in a cellular environment and therefore one would like to examine the mechanisms taking place in a spatially resolved approach.

Here we present the newly developed transient optical absorption detection (TOAD) imaging microscope with high sensitivity and sub-micrometre spatial resolution, which allows direct imaging of photochemically generated radicals. We also demonstrate, the magnetic intensity modulation (MIM) imaging microscope that allows direct spatial imaging of magnetic field effects (MFEs), which can selectively image regions containing magnetically sensitive radical pairs (RPs). Both techniques have the potential of directly measuring flavin photochemistry and magnetosensitivity in cells and tissues, such as cryptochromes.

We display the capability of the TOAD/MIM microscope by imaging the short-lived radicals generated in the photoexcitation of flavin adenine dinucleotide (FAD) and tryptophan (Trp) in aqueous solution at low pH, demonstrating the ability to study the magnetosensitivity of FAD + Trp derived RPs in volumes of less than 4 femtolitres and with sufficient sensitivity to observe magnetic field effects of less than 1 %.

[Experimental] Measurements were conducted on the TOAD/MIM microscope. Technical details are described elsewhere.³ FAD (200 μ M) and Trp (1.5 mM) were prepared in a pH 2.3 buffer solution. For thin sample preparation, polymer beads (2.5 – 2.9 μ m) were added to the sample solution and 1 μ L of this solution was sandwiched between glass cover slips. For thicker samples, the polymer beads were replaced with 100 μ m glass beads and the volume of solution increased to 5 μ L.

[Results and Discussion] The electron transfer from Trp to the photoexcited triplet state of FAD creates a separated biradical. The FADH[•] + Trp^{•+} radical pair was monitored at 532 nm (with a 450 nm pump) where both species absorb comparable extinction coefficients and lifetimes of a few microseconds under the conditions of the experiment. Figure 1 shows a MARY (magnetically affected reaction yield) curve recorded at a single point of the FAD (200 μ m) + Trp (1.5 mM) sample. Only 4 min was required to record a MARY spectrum at this signal-to-noise level. The vertical scale of the MARY curve is a percentage change in the output of the lock-in signal as the field is probed.

Figure 2 shows an image of a $\sim 2.5 \ \mu m$ bead surrounded by FAD (200 μm) + Trp (1.5 mM) in pH 2.3 buffer under flash photolysis mode (300 ns pulse width of pump light (450 nm)). The sample thickness is bead controlled (i.e. <3 μm) and the lasers irradiate a sample volume of <4 fL with a beam waist of $\sim 240 \ nm$. The imaging signal is a direct measure of RP concentration and is reduced to zero in the area of the bead as no photochemistry can occur in this area.



Figure 1: MARY curve for FAD (200 μ M) + Trp (1.5 mM) solution at pH 2.3 with 300 ns 450 nm laser pulse, 5 μ L solution, 100 μ m sample thickness.



Figure 2: TOAD image of a 2.5 – 3.0 μ m polymer bead surrounded by FAD (200 μ M) + Trp (1.5 mM) solution at pH 2.3, 1 μ L solution, 2.5 – 3.0 μ m sample thickness.

As cryptochrome magnetosensitive photochemistry involves the same species (in a protein environment), this microbead image displays the potential of the TOAD/MIM microscope to be used to image magnetically sensitive areas as photoreactions are occurring in cellular environments. The aim of unraveling the mechanisms of RPs both in vitro and in will hopefully develop vivo kev connections between the fields of spin chemistry and behavioral biology.

- [1] T. Ritz, S. Adem, K. Schulten, *Biophys. J.* **2000**, *78(2)*, 707 718.
- [2] H. Mouritsen, P. J. Hore, *Curr. Opin. Neurobiol.* **2012**, *22*, 343 352.
- [3] J. P. Beardmore, L. M. Antill, J. R. Woodward, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 8494-8497.

チオグアノシン及びジチオグアノシンの励起状態

(青学大理工) 〇宮田 翔馬・磯崎 輔・鈴木 正

Excited states of thioguanosine and dithioguanosine

(Aoyama Gakuin Univ.) Shoma Miyata, Tasuku Isozaki, Tadashi Suzuki

【序】 核酸塩基は 300 nm よりも短 波長の紫外域に吸収帯を持ち、励起一 重項状態からの緩和過程は基底状態 への内部変換である。しかし、核酸塩 基のカルボニル酸素を硫黄原子に置 換した修飾核酸塩基(チオ核酸塩基) は UVA 領域に強い吸収帯をもち、励 起三重項状態への項間交差が主な緩 和過程であることが明らかとなって きた [1-3]。また、酸素分子へのエネル



Fig.1 チオグアノシン誘導体の構造.

ギー移動反応を起こし、高い収率で一重項酸素分子を生成する。このことから、チオ核酸塩基を 用いた光線力学療法への応用が検討されている。本研究では、一置換及び二置換チオグアノシン 誘導体を新規に合成し(Fig.1)、その励起状態について調べた。

【実験】 Guanosine (G)、8-Oxoguanosine (8-OG)、8-Thioguanosine (8-TG)、6-Thioguanosine (6-TG)、 6,8-Dithioguanosine (6,8-diTG) を新たに合成した。一般に核酸塩基は溶媒に難溶性であるため、チ

オグアノシン誘導体ではリボース部 分のヒドロキシル基をアセチル化す ることにより溶媒への溶解性を高め た。吸収スペクトルはアセトニトリ ルを溶媒として用い、測定を行った。 過渡吸収スペクトルの測定では励起 光源として XeCl エキシマレーザー (308 nm)、検出光として Xe ランプを 用いた。測定は全て室温で行った。

【結果と考察】 G、8-OG、8-TG、6-TG、6,8-diTG(濃度 2.5×10⁻⁵ M)の アセトニトリル中における吸収スペ クトルをFig. 2 に示す。8-OGの吸収



Fig.2 アセトニトリル中におけるチオグアノシン誘導体 の吸収スペクトル.



Fig. 3 アセトニトリル中における 6,8-diTG の 吸収スペクトルの濃度依存性.

帯は G よりも長波長側に観測された。8-TG の 吸収帯は 8-OG よりもやや長波長側にあらわ れると共に、モル吸光係数 ε が著しく増大する ことがわかった。6-TG の吸収帯は 8-TG より もさらに長波長側にあらわれたことから、8 位 より 6 位のカルボニル酸素をチオカルボニル化 した誘導体の方が、より長波長側に吸収帯をも つことが明らかとなった。6,8-diTG は置換グア ノシン誘導体の中で最も長波長側に吸収帯を もち、G と比較すると 120 nm も長波長側にあ らわれることが明らかとなった。

様々な濃度の 6,8-diTG の吸収スペクトルを

測定したところ、スペクトルの形状が濃度によって大きく変化することがわかった。6-TG につい ても同様の結果が得られた。このスペクトル変化は二量体形成に起因するものと考えられる。そ こで、各濃度における吸収スペクトルを global fitting を用いて解析し、6,8-diTG の単量体および 二量体の吸収スペクトルと二量体形成平衡定数 *K* を得ることに成功した。6,8-diTG および 6-TG の*K* はそれぞれ (1.1±0.1)×10⁵ M⁻¹、(1.4±0.1)×10⁵ M⁻¹ と求められ、二量体は単量体よりも長波 長側に吸収帯をもつことがわかった。また、量子化学計算を行い、二量体の最適化構造、分子軌 道、垂直遷移エネルギー及び振動子強度を求めた。これらの結果から、グアノシンの 6 位をチオ

カルボニル化した誘導体は二量体を形成しやすいことが初めて明らかとなり、6,8-diTG 二量体はこれまでに知られているチオ置換核酸塩基の中で最も長波長側に吸収帯をもつことがわかった。

Ar 飽和下における 8-TG の過渡吸収 スペクトルを Fig. 4 に示す。スペクト ルの時間変化を単一指数関数で解析し たところ、過渡種の寿命は $\tau = 1.4 \pm$ 0.1 µs であった。今後、過渡種の同定 と反応機構について検討する予定であ る。



Fig. 4 8-TG の過渡吸収スペクトル.

【謝辞】チオ置換核酸塩基の合成では、青山学院大学の杉村秀幸教授および山田剛史助教(現阪 大産研)の両先生にご協力いただきました。ここに感謝の意を表します。

[1] H. Kuramochi et al., J. Phys. Chem. B 2010, 114, 8782.

- [2] Y. Harada et al., J. Phys. Chem. B 2007, 111, 5518.
- [3] 鈴木 正, 光化学, 2008, 39, 66.

超高感度バイオセンシングを目指した単一微小液滴顕微分光装置の開発 (九大院理)〇迫田憲治,関谷博

A single microdroplet levitation apparatus combined with microscope for ultimate biosensing (Kyushu Univ.) <u>Kenji Sakota</u>, Hiroshi Sekiya

【はじめに】

直径が数~数十µmの微小液滴の気液界面において,光の全反射条件が満たされると,微小液滴内で 発生した蛍光やラマン散乱光の一部は液滴内部に閉じ込められる.このとき,液滴の外周の長さが光 の波長の整数倍に一致すると,液滴内に定在波が形成される.このように,微小液滴は極めて小さな 光共振器としての機能をもっており,その性質が詳しく調べられてきた.微小光共振器中では,自由 空間と比べて電磁場モードの状態密度分布が変化するため,光と分子の相互作用が大きく変化する場 合がある.なかでも興味深いのは,分子(原子)の励起状態準位と真空場との相互作用である自然放 出の速度が,微小共振器中では増強されたり抑制されたりする点(Purcell 効果)である.

また,空間中に捕捉された単一微小液滴は,表面張力の働きによってほぼ完全な球体を形成する ため,共振器の光閉じ込め能力を表わす Quality factor (Q値) が極めて高くなる.よって,微小液滴 内に溶存する分子を光ポンピングすると,極めて低いしきい値でレーザー発振に至る.これまで,ロ ーダミンのような色素分子に加えて,普通はレーザー媒質とは見なされていない生体分子 (ビタミン 類や核酸類似分子など)からのレーザー発振も確認されている.よって,微小液滴からの超低しきい 値レーザー発振や上述の Purcell 効果を上手く利用することによって,これまでにない感度で生体分子 を検出できる可能性がある.我々は最近,超高感度バイオセンシングを目指した単一微小液滴顕微分 光装置を開発している.本発表では,実験装置の概要を紹介するとともに,テスト計測として行った 単純な色素分子間のフェルスター励起エネルギー移動 (FRET) に関する実験結果について報告する.

【実験装置の概要】

エレクトロスプレー法によって生成した微小液滴(直径 2~10µm 程度)は、平行平板型イオントラ ップによって空間捕捉される.このとき、微小液滴同士の静電反発によって単一の微小液滴のみがト ラップ内に捕捉される.平行平板型イオントラップの内側 2 枚の電極には液滴をトラップするための 方形波(1.2~3.0 kV_{pp}, 150~1000Hz)を印加し、最下部の電極には重力による落下を補正するための DC 電圧を印加する.最上部の電極は通常、地絡させている.長作動距離の無限遠補正対物レンズを通 して微小液滴にレーザーを照射し、液滴からの蛍光やラマン散乱を同じ対物レンズを用いて捕集する. これらはビームスプリッターによって 2 つに分けられる.一方の光は液滴の顕微画像を得るために CMOS カメラに結像され、もう一方の光はスペクトルを計測するために分光器へと送られる.

FRET の実験では、ドナー分子としてローダミン 6G (R6G), アクセプター分子としてローダミン 700 (R700) を用いた. 溶媒はメタノールとグリセロールの混合溶媒 (50 vol%) を用いた.

【結果・考察】

図1に通常のセルを用いて測定した R6G(ドナー)および R700(アクセプター)の混合溶液の蛍光スペクトルを示す.図1から明らかなように、アクセプター分子の濃度が高くなるにしたがって、560nm

付近に観測されているドナー分子からの蛍光が弱くなっている.これは、電子励起状態において、ドナー分子からアクセプター分子に FRET が生じたため、ドナー分子からの蛍光が消光しているからである.

図 2 に R6G と R700 を含む単一微小液滴 (~10um) の 発光スペクトルを示す. 図 2(a)は、ドナー分子のみを含 む微小液滴からの発光スペクトルであり,600nm 付近に 観測されているシャープで強い発光はドナー分子からの レーザー発光である.図2(b)は、ドナー分子とアクセプタ ー分子を含む微小液滴からの発光スペクトルである.図 2(b)では, 550nm から 650nm 付近にかけて, ドナー分子 からのブロードな蛍光が観測されているが,図 2(a)で 600nm 付近に観測されていたドナー分子からのレーザー 発光は完全に消失している.一方,760nm 付近にシャー プな発光が観測されており,これはアクセプター分子か らのレーザー発光に帰属できる. 図 2(c)および(d)は, ア クセプター分子の濃度を増加させたときの発光スペクト ルである.図 2(b)と同様にドナー分子からのブロードな 蛍光は観測されているが、レーザー発光は完全に消失し ている.一方,760nm 付近に観測されるアクセプター分 子からのレーザー発光は,アクセプター分子の濃度が増 加するにしたがって強くなっていることがわかる.

図3は、ドナー分子からの蛍光およびレーザー発光強度 をアクセプター分子の濃度に対してプロットした図であ る.赤のプロットは通常の溶液におけるドナー分子から の蛍光強度を示しており、アクセプター分子の濃度が増 加するにしたがって、徐々にドナー分子からの蛍光が消 光されていることがわかる.一方、青のプロットで示し た微小液滴の場合、通常の溶液からの蛍光に比べて、ド ナー分子からのレーザー発光が急激に消光されているこ とがわかる.これは定性的には次のように説明できる. 通常、色素分子からのレーザー発光は4準位系を用いて 説明できるが、その場合、3番目と4番目の準位の間で 反転分布が形成されてレーザー発振がおこる.ここで、 レーザー発振をしているドナー分子の3番目(あるいは



図 1. 532nm の励起波長を用いたときの R6G / R700 混合溶液の蛍光スペクトル.



図 2. 微小液滴に溶存した R6G および R700 からの発光スペクトル.



図 3. ドナー分子からの発光強度のアクセプタ 一分子濃度依存性.

2番目)の準位とアクセプター分子との間で FRET が生じると,反転分布を維持することが難しくなり, レーザー発光が消光される.以上の結果は,微小液滴中におけるレーザー発光を用いることで FRET を高感度に検出できることを示している.

ミオグロビンの2状態転移に対する

ポリエチレングリコールの分子量特異的吸着とその効果

(九大院理) 〇安冨 翔太, 迫田 憲治, 関谷 博

The effect of molecular-weight dependent adsorption of polyethylene glycol on two-state transition of myoglobin

(Kyushu Univ.) OShota Yasutomi, Kenji Sakota, Hiroshi Sekiya

【諸言】

ミオグロビン(Mb)は、初めて立体構造が解明されたタンパク質として有名である. Mb 中に存在するヘムはポルフィリンの鉄錯体であり、酸素分子はヘム中の鉄に結合 することができる.これまで、ヘムに対する酸素分子の結合やそれが引き起こすタン パク質の構造変化などが詳しく調べられてきた.

タンパク質の X 線立体構造解析を行うには、タンパク質の結晶が必要となる. ポリエチレ ングリコール (PEG) はタンパク質の結晶を得るための沈殿剤としてよく利用されてい る.また、工業的にタンパク質を大量に発現させた場合、しばしば不活性の凝集体が 混入する. PEG は変性したタンパク質を天然構造に再生させるためのリフォールディ ング剤としても利用されている.このように PEG はタンパク質に対する添加剤とし て様々な用途で用いられてきたが、実際に PEG を添加剤として使用する際には、適 切な分子量の選択などに多くの時間を要し、期待通りの効果が得られないことも多い. PEG を添加剤として効果的に利用するには、PEG がタンパク質の立体構造安定性に与 える効果と分子量の関係性を理解することが必要不可欠である.そこで本研究では、 Mb の天然状態と変性状態間の2 状態転移に対する PEG の添加効果とその分子量依存 性に関して研究を行った.

【実験手法】

Mb 2.0 mg/ml, PEG 0~16.0 mg/ml の9種類の溶液を調整し, Mb の 409.4 nm におけ る吸光度の温度変化を測定することで各溶液における Mb の転移温度曲線を測定した. PEG の分子量には, 6000, 10000, 20000, 35000 の4種類を用いた.

【結果及び考察】

各溶液における Mb の転移温度曲線を測定すると, Mb 溶液は 81℃付近で1 段階の転移を示すのに対して,分子量 6000 もしくは 10000 の PEG を添加した溶液では 2 段階の転移が見られた(図 1).一方で,分子量 20000 もしくは 35000 の PEG を添加した溶液における転移温度曲線は, Mb 溶液のものと非常に類似しており,81℃付近で 1 段階の転移を示した(図 2).図1の実験データに対して天然状態と変性状態の間の 2 状態転移を仮定して解析を行うと,高温側に観測される 2 段階目の転移温度 T_{m2} は,

Mb 溶液での転移温度とほぼ一致すること がわかった(図 3). よって, T_{m2} はフリーの Mb (PEG が吸着していない Mb)の構造転 移に対応すると考えられる.一方,1 段階 目の転移温度 T_{m1} は, PEG の濃度に依存し て変化することが分かった.図4に示され るように, T_{m1} を PEG の濃度に対してプロ ットすると以下の式で再現できることが 分かった.

 $T_{m1} = T_m + B_{max} K_A [PEG]/(1 + K_A [PEG])$ (1) ここで, K_A は Mb と PEG の結合定数, B_{max} は PEG の吸着率を転移温度変化に変換す る係数, [PEG]は PEG の濃度である.式(1) の右辺第2項はラングミュア型の吸着式と 同じ形をしている.図4の実験データがラ ングミュア型の吸着式によって上手く説 明できることから,1 段階目の転移は, PEG が Mb に吸着することによって引き起 こされると考えられる.

PEG 6000, 10000 を添加したときには Mb が2段階で構造転移したこと、および T_{m1} , T_{m2} はそれぞれ PEG が吸着した Mb, フリーの Mb の変性温度を表していること から, Mb と PEG の挙動は次のように考え られる. まず, T_{m1} 以下の温度においては Mb の変性はまだ起こらず, 天然状態の Mb が PEG と吸脱着の平衡にある.一方 Tm2以上の温度では変性状態の Mb が PEG と吸着平衡にある. T_{m1} < T < T_{m2}の温度範 囲では, PEG が Mb に吸着すると Mb は変 性するが, PEG が脱着すると再び適切な立 体構造に自発的に折り畳まれると考えら れる.よって, Mb に対する PEG の吸脱着 と Mb の構造転移は相互に相関しており, 動的な平衡状態にあることがわかった.



図 4. Mb+PEG 6000 溶液の転移温度 T_{m1}

1-および 3-メチルヒスチジン水和物結晶の疑似多形

(北里大・理) 〇笠原康利、遠藤ひかる、山村滋典、菅原洋子、石川春樹

Psuedopolymorphism of 1- and 3- methylhistidine hydrate crystals

(Kitasato University) OYasutoshi Kasahara, Hikaru Endo, Shigefumi Yamamura, Yoko Sugawara, Haruki Ishikawa

【序】

結晶中のアミノ酸は、図1左のヒスチジン(His)のように中性状態では双極性イオンとして存 在し、多様な分子内および分子間水素結合ネットワークを形成する。中性、+1、+2 価の His は、 電荷状態の違いによって His 分子のコンフォメーションが大きく変化し、分子内および分子間水 素結合に大きな影響を与えることを昨年の本討論会で報告した[1]。

また結晶溶媒の違いによっても結晶中のアミノ酸の水素結合様式の変化やコンフォメーション が変化するため、アミノ酸は結晶多形や疑似多形が多く存在する。



図 1 His および 1-、3-MeHis の分子構造図

His のイミダゾール環(Imd)の N 原子がメチル化された 1-MeHis (図 1 中) および 3-MeHis (図 1 右) は、骨格筋中のアクチンやミオシン中の His がメチル化されて形成される。人の体内で生成される 1-MeHis は、尿中に排泄されるので筋肉タンパク質の分解率を見積もるために使用されている。一方で 3-MeHis は、人以外の動物において形成されることが報告されている[2]。1-および 3-MeHis は、Me 基の導入により His と比べて分子内および分子間水素結合が大きく変化すると予想される。今回、単結晶 X 線構造解析により 1-MeHis は二水和物結晶、3-MeHis は一水和物結晶であることを明らかにした。これらの結晶および粉末のラマンスペクトル測定を行い分子の振動状態への影響について検討した。さらに MeHis について試料周りの湿度や温度を変化させた粉末 X 線回折測定 (PXRD) を行い、湿度および温度に依存した構造変化が見られた。本講演では、MeHis の疑似多形の水和数と構造の違いについて議論する。

【実験】

市販品(粉末)の1-MeHis および3-MeHis を、それぞれ水ーエタノールおよび水から再結晶して得られた単結晶を用いて X線構造解析を行った。1-MeHis、3-MeHis について湿度および温度

を変化させて、PXRD 測定を行なうとともに、DSC および TG 測定を行った。Me 基の導入位置の 違いによる各 His の振動状態への影響を調べるために、単結晶および粉末試料のラマンスペクト ル測定を行った。Gaussian09 による密度汎関数法(B3LYP/6-31++G**)を用いた構造最適化およ び基準振動解析を行った。

【結果および考察】

結晶構造解析の結果、1-MeHis は、二水和 物、3-MeHis は一水和物であった。

His、1-MeHis および 3-MeHis の結晶および 粉末(市販品)のラマンスペクトルを図2に 示す。His および 3-MeHis の結晶および粉末 状態のラマンスペクトルは、それぞれ一致し ていた。しかし図2の1-MeHis の結晶および 粉末のラマンスペクトルは異なっていた。

1-MeHis の違いについて、より詳細に検討 するために、試料周りの湿度や温度を変化さ せて PXRD と TG 測定を行った。24℃条件下 で、相対湿度(RH)を45%RHから76%RHへ 変化させたところ回折図形に変化が生じた (図 3)。1-MeHis 二水和物の結晶構造にもと づき計算した粉末回折図形を図 3 にあわせて 示す。76%RHの実測回折図形とのよい一致が みられ、加湿により二水和物への構造変化が 起きたと考えられる。一方、1-MeHisの45%RH の粉末試料は、TG 測定により重量変化がみら れ、PXRD により構造変化することがわかっ た。

また 3-MeHis についても PXRD、DSC、TG により水和数変化と構造の違いについて解析 を進めている。







講演では、His、1-MeHis、3-MeHisのMe基導入による結晶構造の変化と分子振動への影響について議論する。

【文献】

[1]笠原康利、近藤誠、石川春樹、第8回分子科学討論会、2P052.

[2] H. Wang, P. Hu, J. Jiang, Clinica Chimica Acta, 413, 131, (2012).

膜結合型メタンモノオキシゲナーゼのペルオキソ状態に関する理論的考察

(九大先導研) 〇糸山修平・土井富一城・蒲池高志・塩田淑仁・吉澤一成

A theoretical study of peroxo state of particulate methane monooxygenase

(IMCE, Kyushu Univ.) OITOYAMA, Shuhei; DOITOMI, Kazuki; KAMACHI, Takashi; SHIOTA, Yoshihito; YOSHIZAWA, Kazunari

【序】 メタンモノオキシゲナーゼ(MMO)は不活性なメタンをメタノールに転換する酵素 であり、可溶型の sMMO と膜結合型の pMMO の2つの型が知られている。sMMO の構造は X 線結晶構造から鉄二核の活性中心を持つことが明らかになっており、その反応性について も多くの研究がなされている。いっぽうで、pMMO は sMMO にくらべて研究例が少なく、 その詳細な反応性は明らかとなっていない。

近年、pMMOのX線結晶構造解析と分光学的手法及び理論的手法によりpMMOの活性中 心は銅二核サイトであることが明らかとなり、酸素が銅二核サイトに配位したことを示す UV-Vis スペクトル¹も得られている。しかしながら、pMMOの銅二核サイトに酸素が配位 した peroxo 状態のX線結晶構造はいまだに得られておらず、その詳細な構造は明らかとなっ ていない。

本研究では、QM/MM 法を用いて pMMO の resting 状態について計算を行った後、その構造をもとにして peroxo 状態の計算を行い、pMMO の peroxo 状態について予測した。本発表では計算で得られた peroxo 状態の構造と他の μ - η^2 : η^2 -peroxo-Cu^{II}₂種のX線結晶構造と比較し、pMMO の peroxo 構造について議論する。

【計算方法】 pMMO の X 線結晶構造(1YEW)をもとに Discovery Studio を用いて QM/MM 計算の初期構造を作成した。QM/MM 計算のインターフェイスとして Chemshell を用い、QM 領域に TURBOMOLE、MM 領域に DL-POLY をそれぞれ用いた。QM 領域の計算において、 汎関数に B3LYP-D、BP86-D、B97-D、M06-D を用い、基底関数に TZVP を用いた。MM 領 域の計算において CHARMm 力場を用いた。QM 領域には二核の銅および His33, Glu35, His137, His139, Tyr374 を含めた。最適化する領域には二核の銅原子から半径 10 Å 以内の残基を含め た。

【結果】 pMMO の resting 状態について、本研究では Cu¹-Cu¹状態と Cu¹-Cu¹¹状態の 2 つ の状態を考慮した。各電子状態について 4 つの汎関数 B3LYP-D、BP86-D、B97-D、M06-D で計算し、その最適化構造を pMMO の X 線結晶構造と比較した。Table 1 に各汎関数におけ る Cu¹-Cu¹¹状態と Cu¹-Cu¹¹状態の Cu-Cu 間距離を示す。 pMMO の X 線結晶構造(1YEW)の銅

二核サイトの Cu-Cu 間距離は 2.59 Å である。Table 1 から Cu^I-Cu^I 状態と Cu^I-Cu^{II} 状態それぞれの Cu-Cu 間距離を比較すると Cu^I-Cu^{II} 状態より Cu^I-Cu^{II} 状態のほうが約 0.1 Å ずつ長い。また、 Cu^I-Cu^{II} 状態のほうが X 線結晶構造の値に近いこ とから、pMMO の Resting 状態は Cu^I-Cu^{II} 状態と 考えられる。これは pMMOの X 線結晶構造の EPR² の結果を支持している。

 Table 1. Optimized Cu–Cu distances in the resting state of the dicopper site of pMMO

resting state of the decopper site of points					
Functional	Cu ^I –Cu ^I	Cu ^I –Cu ^{II}			
B3LYP-D	2.50	2.62			
BP86–D	2.47	2.57			
B97–D	2.49	2.56			
M06–D	2.49	2.56			

Resting 状態で得られた構造に二つの酸素原子を加 えて pMMO の peroxo 状態を B3LYP-D/TZVP レベルで 計算した。Peroxo 状態の三重項状態と開核一重項状態 を計算したところ、三重項状態のほうが開核一重項状態 を計算したところ、三重項状態のほうが開核一重項状 態よりエネルギーが 3.7 kcal/mol 高く、pMMO の peroxo 状態は開核一重項状態で存在していることが明らかと なった。これは、pMMO が ESR 不活性であることを支 持している。計算によって得られた peroxo 状態の構造 を Figure 1 に示す。pMMO の peroxo 状態の構造 Cu-Cu 間距離が 3.63 Å、O-O 間距離が 1.46 Å、 Cu-O-O-Cu の 二 面 角 が 159.8° で あ り 、 他 の μ - η^2 : η^2 -peroxo-Cu^{II}2 種の値と非常に近い値を示してい る。また、この最適化された peroxo 状態の構造につい て TDDFT 計算を行ったところ、実験的に得られてい





state of pMMO

る UV-Vis スペクトルと非常に近いスペクトルが得られた。これらの結果から計算で得られた peroxo 状態の構造は真の pMMO の peroxo 状態であると提案する。

【参考文献】

1) Culpepper, M. A.; Cutsail, G. E.; Hoffmann, B. M.; Rosenzweig, A. C. J. Am. Chem. Soc. 2012, 134, 7640.

2) Smith, S. M.; Rawat, S.; Telser, J.; Hoffmann, B. M.; Stemmler, T. L.; Rosenzweig, A. C. *Biochemistry* **2011**, *50*, 10231.

トロンビン-基質会合反応におけるナトリウムイオン分布の役割

(名大院・情報科学¹, JST-CREST²) ○栗崎以久男^{1,2}, 高柳昌芳^{1,2}, Chantal Barberot^{1,2}, 長岡正隆^{1,2}

Roles of sodium ion's distribution in thrombin-substrate association reaction

(Gradate School of Information Science, Nagoya University¹, CREST-JST²) •Ikuo Kurisaki^{1,2}, Masayoshi Takayanagi^{1,2}, Chantal Barberot^{1,2}, Masataka Nagaoka^{1,2}

【序論】セリンプロテアーセの一種であるトロンビンは、Na⁺特異的な酵素活性を示す。こ れまで、Na⁺の部位特異的相互作用がトロンビンの酵素活性の原因であると考えられてきた[1]。 しかし、その後の研究から、トロンビンの基質認識ポケット、および活性部位の構造は Na⁺ 結合に影響を受けないこと[2]や(図 1)、K⁺結合能力を意図して設計したキメラトロンビンで、 天然型と比べて、酵素活性に著しく低下することが明らかになった[3]。これらの事実は、ト ロンビンの酵素活性のメカニズムは、部位特異的な相互作用では、十分に説明できないこと を意味する。一方、我々の行ってきた研究から、非部位特異的相互作用もタンパク質機能発 現に関係することが示唆されている[4]。そこで、本研究では、トロンビン-基質会合反応にお いて、非結合 Na⁺の持つ役割の検証を行った[5]。



図 1. トロンビン(青)とトロンビン-Na+(黄)の構造比較。トロンビンの全体構造(左)および触媒三残 基(右)。

【方法】140 mM XCl (X は Li、Na もしくは Cs)の水溶液中にトロンビン-X⁺複合体分子を配置し、イオンと水分子の配置の異なる初期構造を 100 個用意した。定温定圧条件下(300 K; 1 bar)で、20 ns の分子動力学計算を行った。トロンビン結晶構造を参照構造として、Cα原子についての自乗平均平方根(Root Mean Square: RMS)を計算した。RMS の値が収束する 15 ns 以

降を以下の解析に用いた。トロンビンの表面へのカチオンの配位数を計算し、カチオン数密 度の空間分布を可視化した。

【結果・考察】いずれの系でも、カチオン結合部位に安定に結合するカチオンに加え、トロンビンの基質認識ポケット(S1 ポケット)の周りにカチオンの分布が見られた(図 2)。さらに、イオン半径が大きいほど、トロンビンへのカチオンの配位数(Li⁺: 13.99 個、Na⁺: 5.48 個、Cs⁺: 1.70 個)や S1 ポケットから離れた部分での分布が減少することが分かった。トロンビンは基質分子内の正に荷電した残基、Arg や Lys を選択的に認識する。トロンビンに配位しやすいLi⁺は、基質分子がトロンビンと遭遇複合体を形成するのを妨げることが示唆される。Li⁺とは逆に、Cs⁺はトロンビンには配位しにくい。そのためトロンビン表面の負電荷が溶媒側に露出し、S1 ポケットから離れた部位でも、遭遇複合体を形成しやすくなると考えられる。すなわち、Li⁺も Cs⁺も、基質分子のS1 ポケット近傍への接近を阻害し、遭遇複合体形成を妨げる可能性がある。このことから、Na⁺は Li⁺と Cs⁺の中間的な分布を形成することで、S1 ポケット近傍でのトロンビン-基質の遭遇複合体アンサンブル形成を最適化し、会合反応速度を最大化すると考えられる。以上の結果は、非結合 Na⁺がトロンビン-基質会合反応に直接影響することを示唆している。さらに、これを踏まえ、トロンビン周囲の基質分子の分布に対して、カチオンが及ぼす影響を明らかにするため、基質分子を加えた計算を進めている。発表当日は、そちらの結果についても報告する予定である。



図2. トロンビン周囲のカチオン分布。赤枠はカチオン結合部位およびS1ポケットの周辺を示す。 メッシュと塗りつぶしは、それぞれ、カチオン数密度が5Å⁻³以上および50Å⁻³以上の箇所を表す。

【参考文献】

- Di Cera E., Page M. J., Bah A., Bush-Pelc L. A., Garvey L. C., *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2007, 9, 1292-1306.
- [2] Pineda A. O., Carrell C. J., Bush L. A., Prasad S., Caccia S., Chen ZW., Mathews F. S., Di Cera E., J. Biol. Chem., 2004, 279, 31842-31853.
- [3] Rana S., Pozzi N., Pelc L. A., Di Cera E., PNAS, 2011, 108, 5221-5225.
- [4] Tanakayagi M., Kurisaki I., Nagaoka M., Sci. Rep., 2014, 4, doi:10.1038/srep04601.
- [5] Kurisaki I., Takayanagi M., Nagaoka M., J. Phys. Chem. B, 2014, 119, 3635-3642.

独立成分分析 tICA によるヒストンテール主鎖二面角の遅い運動の解析

(横浜市大院·生命医科学) O 渕上 壮太郎

Slow dynamics of backbone dihedral angles in histone tails revealed by time-structure based independent component analysis

(Yokohama City University) OSotaro Fuchigami

【序】 ヒストンは真核生物において DNA をコンパクトに収納する役割を担っており, その末端部分であるヒストンテールは特定の構造をとらない天然変性領域である. DNA の転写は, ヒストンテールの翻訳後修飾によって誘起・制御されている. その実現にはヒストンテールの柔軟さが重要な役割を果たしていると考えられているが, その分子機構は十分に解明されていない. そこで, 本研究では, ヒストンテールの柔軟さが生み出す動的挙動とその分子基盤の解明を目指し, 分子動力学(MD)シミュレーションを実行した. 得られたシミュレーション結果からヒストンテールの柔軟な動きの実態を明らかにすべく, 遅い時間スケールの運動に着目し, 時間構造に基づいた独立成分分析(tICA)によってその特定を試みた.

【方法:分子動力学シミュレーション】4 種類のヒストンのいず れにもヒストンテールは存在するが、本研究では解析対象とし てヒストン H2A の N 末端テール(14 残基)を選択し、水を陽に 含んだ系(総原子数23,635、図1)の全原子 MDシミュレーショ ンを行った.シミュレーションの実行には MD 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.系に周期境界条件を課し、静電相互作用は Particle Mesh Ewald 法で計算した.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(圧力:1 atm, 温度: 300 K)で 平衡化を行った後、1 µs の本計算を3 回実行した.



図1:水溶液中のヒストン H2A のN末端テール.

【方法:tlCA の概略】時系列データ x(t) を tlCA で解析するには、まず共分散行列 $C = \langle (x(t) - \langle x(t) \rangle) t(x(t) - \langle x(t) \rangle) \rangle$ と時間遅れ共分散行列 $\overline{C} = \langle (x(t) - \langle x(t) \rangle) t(x(t + t_0) - \langle x(t) \rangle) \rangle$ を計算 し、続いて一般化固有値問題 $\overline{C}F = CFK$ を解く. ここで、F は固有ベクトル行列、K は固有値行列. 本 研究では、遅延時間パラメーター t_0 を 1 ns とした. tlCA 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 $g_i = Cf_i$ が独立成分の運動方向を表わすモードベクトルとなる. 固有値は独 立成分の運動の時間スケールを特徴づけている. 主鎖二面角の時系列データを解析する場合、座標の 周期性のため単純平均が意味をなさず、そのままでは上記の解析を適用することができない. そこで、 各二面角 θ_i を二次元の座標 ($\cos \theta_i$, $\sin \theta_i$) に変換し、その時系列データを解析の対象とした. 【結果】MD シミュレーションの結果を見てみると、3 回の 計算のいずれにおいても、ヒストンテールが特定の構造 で安定することなく、大きく揺らいでいる様子が観察され た(図 2).また、揺らぎの時間スケールに注目すると、サ ブマイクロ秒オーダーの遅い時間スケールの揺らぎが含 まれていることがわかった.

続いて、このヒストンテールの遅い運動の実態を調べる べく、主鎖二面角 ϕ 、 ψ の時系列データをtICA で解析した。 1 本目のトラジェクトリに tICA を適用して得られた上位 3 つの独立成分(IC1、IC2、IC3)の結果を図 3 に示す. もっ とも遅い時間スケールの運動を表す IC1 には、K9 ψ と



図2: 末端間距離の時間変化.上から順に 1回目,2回目,3回目の計算結果.

A10 ϕ が連動した運動と、R11 ψ と A12 ϕ が連動した運動とが主に含まれており、これらの運動によって ヒストンテールが3つの状態の間を遷移していることがわかった。この2つの連動運動は互いに独立な 運動と考えられるが、時間スケールが似通っていて、かつ、実際の運動が生じた回数が少なかったため、 うまく分離することができなかったと思われる。IC2 は一番大きな寄与を示している G8 ψ の独立な運動 を表していると考えられ、この運動によって IC1 で特定された3つの状態がより明瞭に区別されるように なっていた。IC3 は G4 ϕ と K5 ψ との連動運動を表しており、IC1 で特定された3つの状態のうちの1つ をさらに2つの状態へと分けることができることがわかった。また、tICA で特定されたこれらの遅い運動 が実際に起こっていることは、主鎖二面角の時間変化によって確認することができた。

残りの 2 本のトラジェクトリについても同様の解析を行ったところ, いずれにおいてもヒストンテールの 遅い運動を特定することができた. さらに, 3 本のトラジェクトリの tICA による解析結果を比較したところ, 共通する遅い運動はごくわずかで, ヒストンテールが示す遅い運動が多様であることが明らかとなった.



図3: tICA によって特定されたヒストンテール主鎖二面角の遅い運動. 上段:独立成分 IC1, IC2, IC3 に おける各二面角の変位の大きさ(赤: ¢, 青: ψ). 下段:独立成分 IC1, IC2, IC3 の時間変化.

複数箇所で抗原を認識する抗体における 分子間相互作用に関する理論研究

(北里大学) 〇能登 香

A theoretical study of the antibody-antigen interaction with multiple binding sites

(Kitasato Univ.) oKaori Ueno-Noto

【序論】

ヒト免疫不全ウィルス(Human Immunodeficiency Virus Type-1 (HIV-1))の感染を予防するワクチン開発の基礎となる抗体の探索 が世界で進められている.HIV-1表面は糖タンパク質 gp120 に覆わ れており,gp120上の糖鎖を介して結合する複数のPGT 抗体が報告 された[1].その一つである PGT128 抗体は gp120上の二つの糖鎖と その主鎖にも結合し,計三箇所で gp120と結合している.抗体の認 識における糖鎖リガンドの役割の解明は新規抗体開発の基礎情報 となる.このPGT128 抗体と gp120 の複合体結晶構造(PDB ID:3TYG, Fig. 1,[2])を対象に古典動力学(MD)シミュレーション及び,各ス ナップショット構造について大規模量子化学計算を行い,これら 認識部位の抗体-抗原間相互作用や複合体ダイナミクスへの寄与 を比較解析した.



Fig.1 PGT128 抗体の Fab 領 域-HIV 表面膜タンパク質 gp120 複合体の結晶構造 (PDB: 3TYG) [2]

【計算方法】

糖鎖リガンドの有無が複合体構造のダイナミクスにどのように影響するのかを比較するために,gp120とPGT128抗体の複合体結晶構造(PGT128-org,Fig.1)及びgp120の二つの糖鎖リガンドを片方ずつ削除した構造2種(PGT128-7G,PGT128-10G)の計三種の複合体構造を対象にそれぞれ30nsのMDシミュレーションをPARM99,GLYCAM06eの力場を用いてプログラムAMBER14を使用して行った.また,PGT128抗体とgp120複合体の結晶構造及びMDスナップショット構造についてFM0-MP2/6-31G(d)レベルの量子化学計算を行い,糖鎖リガンド部分と抗体間の相互作用を比較解析した.

【結果と考察】

Fig. 2 に gp120 と PGT128 抗体の複合体結晶構造 (PGT128-org) の古典 MD 計算の結果得ら

れた部分構造の RMSD を示す. PGT128 抗体と相互作用する gp120 の部分構造(Asn85~Asn102) 及び7 糖の糖鎖から成る Ligand 1(N-glycan(7)) に比べ, 10 糖の糖鎖から成る Ligand2(N-glycan(10))の揺らぎが大きいことを示している. しかし, Ligand2のうちD1 arm 部分(Fig. 2)の揺らぎは比較的小さい事が明らかになった. Fig. 3 に糖鎖リガンド部分が 異なる3つのモデル (PGT128-org, PGT128-7G, PGT128-10G)の MD シミュレーションにおけ る gp120 及び PGT128 抗体の結合部位に存在するアミノ酸残基の平均構造からの揺らぎ値 (Atomic Position Fluctuation)を示す. Ligand2(N-glycan(7))のみを持つ PGT128-7G にお ける APF 値が, PGT128-org 及び PGT128-10G と異なることから, Ligand2(N-glycan(10))が無 い場合にタンパク質の構造安定性が低下することが明らかになった.

以上の結果から,Ligand2(N-glycan(10))のD1 arm 部分が gp120 と PGT128 抗体を橋渡しす るように結合して複合体の構造安定性に寄与していることが示唆された. 糖鎖リガンドと抗 体間の相互作用に関する詳細な解析は当日報告する.



Fig. 2 PGT128-gp120 複合体の部分構造における初期構造からの RMSD



【参考文献】

[2] R. Pejchal et al., (2011) Science 334, 1097-1103.

^[1] L. M. Walker et al. (2011) Nature 477, 466-470.

インフルエンザウイルス HA タンパク質の pH 依存性構造変化に関する 分子シミュレーション研究 (お茶大・生命情報学セ)〇三浦信明、(北大・人獣セ) 五十嵐学

Molecular simulation study on conformation changes depending on pH of influenza virus hemagglutinin

(Center for Informational Biology, Ochanomizu Univ.) ONobuaki MIURA, (Research Center for Zoonosis Control, Hokkaido Univ.) Manabu IGARASHI

【序】インフルエンザウイルスは、季節性インフルエンザとして、毎年ヒトの間で流行し、多数の患者・ 死者を出している。また、動物の間で流行・保持されているインフルエンザウイルスが、ヒトの間で 新型インフルエンザとしてパンデミック(世界的大流行)を起こすことも懸念される。このようにインフ ルエンザは公衆衛生上大きな問題であり、その予防・治療法の改良・発展は重要な課題である。本 研究では新規抗インフルエンザ剤の開発に資するための知見を得ることを目的としている。インフ ルエンザウイルスの粒子表面には 2 種類の糖タンパク質、ヘマグルチニン(HA)とノイラミニダーゼ (NA)が存在する。HA は感染初期過程において細胞に侵入する際の機能を司り、NA は複製したウ イルスが細胞から出芽する際の機能を司る。現在、最も治療に用いられているリレンザ、タミフルは NA の機能を阻害する薬剤であるが、耐性ウイルスの出現が問題になっている。一方、いまだ認可 されている HA 阻害剤は存在しない。HA はウイルス感染において、①宿主細胞表面にある糖鎖レ セプターと結合する、②宿主細胞のエンドソーム膜とウイルス膜を融合させる、という2つの機能を 持つ。したがって、これらの HA の機能を阻害する化合物があれば、抗インフルエンザ剤の候補とな る可能性がある。これまで、糖鎖レセプターと HA の結合を阻害する化合物(Cyanovirin-N、 trisphenol-sialyllactose)や膜融合を阻害する化合物(TBHQ, BMY-27709, CL-385319, N-carboxamide)が報告されている。しかしながら、これらの化合物はある特定のウイルス株にしか 効果がないため、臨床使用には適していない。そこで我々は次の標的として、インフルエンザウイル スが細胞内に取り込まれた後、エンドソーム内の pH の低下により HA が構造変化を起こす動的過 程に着目した。本研究では分子動力学(MD)シミュレーションにより、HA タンパク質の pH 依存性構 造変化の分子機構の詳細を明らかにし、新規抗インフルエンザ剤の開発に有用な知見を得る。

【計算】HA タンパク質の pH 依存性構造変化の分子メカニズムを解明するために、Protein Data Bank に収録されている A/Puerto Rico/8/1934(H1N1))株(PDB code: 1RU7)を用いて、以下 2 種類 の MD シミュレーションを行った。計算は全て、AMBER14を用いて行った。

(1) MD1

pdb2pqr を用いて pH=4.5 を想定したプロトネーションを行い、あらわに水を溶媒和させ、エネルギー 最小化を行った。その後 300K、1 気圧の条件で加温(50 ps)、平衡化(100 ps)を行った後、100 ns のプロダクトランを行った。数 ns ごとに構造をサンプリングし、それらの構造に対して再度 pH=4.5 で プロトネーションを行い、MD シミュレーションを行った。

(2) MD2

AMBER14 に implement されている constant pH molecular dynamics (CpHMD) を行った。CpHMD はグランドカノニカル分布に従い、プロトネーションの有無をダイナミクス中に変化させることができる。この方法では構造の変化に従ってイオン化状態が変化していく様子を逐次反映させる事ができる。ただし、あらわな溶媒は扱えないなどの制約がある。

【結果と考察】MD1 における 100 ns 後の構造と、初期構造(1RU7)を比較した(下図(左))。レセプター結合サイト側からの視点で描かれている。100 ns 後の構造(シアン)は初期構造(緑)に比べ、レ セプター結合サイトを含む HA タンパク質の頭部が外側に開いている事が観察できる。また APBS を 用いて、初期構造(pH=7.0と4.5)および 100 ns 後(pH=4.5)の構造に対して静電ポテンシャル計算を 行った(下図(右))。ただし、100 ns 後の構造は、MD 計算後の構造に対して、再度プロトネーション を行った構造である。初期構造の静電ポテンシャルでは、中性の状態に比べ低 pH における状態で はタンパク質の表層が正電荷を帯びている事が観察できる。これは電気的な反発を引き起こすこと で HA タンパク質の頭部領域が開くことを示唆している。また、100 ns の MD シミュレーション後、す なわち頭部がやや開いた状態ではさらに正電荷を帯びている部位が増加している様子が見て取れ る。

図:MD1の100nsにおける構造と1RU7の構造(シアン:MD1100ns, 緑:PDB1RU7)の静電ポテン シャルの pH 依存性



【謝辞】本研究は、北海道大学人獣共通感染症リサーチセンターー般共同研究の支援により実施した。

OEC による S_2 から S_3 への状態遷移における

Mn-O 形成の反応機構に関する理論的研究

(北海道大学*,三重大学**) 市野智也*,三谷昌輝**,〇吉岡泰規**

Theoretical study on reaction mechanism of Mn–O formation at the transition from S_2 to S_3 states by OEC

(Hokkaido Univ.*, Mie Univ.**) Tomoya Ichino*, Masaki Mitani**, OYasunori Yoshioka**

【序】 酸素発生複合体 (OEC) は光合成系の光化学系 II に存在し、水2分子を酸素分子へと4電 子酸化を促進する触媒である。反応は $S_0 \rightarrow S_1 \rightarrow S_2 \rightarrow S_3 \rightarrow S_4$ と5つの状態を経て進行されるとされて いる (Kok サイクル)。暗所で安定であるとされている S_1 状態に対する 1.9 Å の高解像度 X 線構造が近 年発表された[1]。反応中心は4つの Mn 原子を含む CaMn₄O₅ クラスターであり、図1に示すように CaMn₃O₄は立方体様の構造となっている。周囲に水分子 (W1~W4) と思われる4つの酸素原子が Ca と Mn4 原子に配位している。

現在、多くの分光学的実験と理論化学計算によって反応機構の研究がなされている。図1に示す S_2 状態の構造が[Mn4–OH]であるという提案には多くの研究者の合意が得られているが、反応機構の全容 解明には至っていない。特に、明らかになっていないのは S_3 状態の構造と電子状態、そして、分光学 実験で測定されていない S_4 状態の構造と $S_3 \rightarrow S_4 \rightarrow S_0$ の遷移過程である。

大きく分けて、S₃ 状態に対して2つの構造が提案されている。その一つはS₂ → S₃の遷移過程で反応サイトに挿入してきた新たな水分子が substrate として作用し、[Mn1–OH, Mn4–OH]の構造をとり Mn 原子の価数は Mn₄(IV, IV, IV, IV)となる。続いてS₃ → S₄の遷移過程では[Mn1–O, Mn4–OH]へと変化し、Mn1–O と O5 とのラジカルカップリングで O–O 結合が形成されるという提案である。もう一つはS₂ → S₃ の遷移過程では新たに挿入してきた水分子が substrate として作用するのではなく反応サイトと complex を形成し、Mn4–OH が酸化されて[Mn4–O]の構造となり Mn 原子が酸化されずに S₂ 状態の原子価と同じく Mn₄(III, IV, IV, IV)となる。続いて W6 が Mn4–O に親核攻撃して Mn4–OOH となり O–O 結合が形成されるという提案である。



図1. 反応サイトの概略図



図2.1電子酸化状態3の構造

我々は、[Mn4–OOH]が[Mn1–O, Mn4–OH]よりも 16.1 kcal/mol 安定であることから反応が後者の過程 を経て進行すると提案している[2]。しかしながら、 $S_2 \rightarrow S_3$ の遷移過程を明確に示しておらず、本研究 発表で無理なく[Mn4–OH] から[Mn4–O]が形成されることを示す。

【計算方法】 各状態の構造および電子状態の計算には Gaussian09 を使用した。電子状態計算は遷移金属を含む系に適した B3LYP 汎関数を用いた非制限法で実行した。Mn 原子には Wachters の DZ 基底を、H・C・N・O・Ca 原子には 6-31G*基底を使用した。CaMn₄O₅コアのd電子は強相関系であることから broken-symmetry 法により低スピン状態の電子状態を求め、Mulliken 法によってスピン密度を求めた。強相関系であることからスピン密度は Mn 上に局在しており、その値から Mn の原子価を決定した。

以前に発表した S₂ 状態(参考文献[3]に記載の 9) が本発表の起点になり、構造(状態)番号として 1 を当てる。対象とした反応モデルは以前のものと全く同じであり、図1に示すように W1~W9 の水 分子を含め CaMn₄O₅ コアと水分子を構造最適化した。検討する反応経路は、



である。

【結果・考察】 $S_2 \rightarrow S_3$ の遷移過程では、1電子(1e⁻)と1個のプロトン(1H⁺)が反応サイトから 取り除かれる。1e⁻は Tyr161を介して、1H⁺は Asp61を介して除去されると指摘されている。1H⁺の除 去が先に取り除かれるとすると、プロトンが[Mn4–OH]の OH から W6 と W7 を経て Asp61 に到り Asp61COOH が形成されると考えられる。Asp61COOH に相当する状態が2であるが、プロトン移動前 の1よりも 4.3 kcal/mol 高エネルギー状態であり、Asp61への1H⁺移動は考えられない。

 $1e^{-ti}$ Tyr161 を経て 1H⁺よりも先に除去された 1 電子酸化状態 3 を図 2 に示す。W7–Asp61COO⁻の距離が 2.693 (1) から 2.884 Å (3) へと 0.191 Å 長くなっている。 1 電子酸化状態にもかかわらず、四つの Mn 原子の価数は 1 と同じで CaMn₄O₅ コアが酸化されていない。しかし、Asp61COO のスピン密度が 0.481 e、His337 が 0.333 e とラジカルが非局在化した状態となっている。さらに、 $<S^2> = 8.2281$ であり、CaMn₄O₅ コアに 6 組の反平行のラジカル対 (8.2281 – 2.0 = 6.2281)があり Mn1 に一つのラジカルが 孤立している。

次に、 $1 \rightarrow 2$ への変化と同様に 1H⁺が W6、W7 を経て移動した Asp61COOH の構造を 4 とする。4 は 3 よりも 7.6 kcal/mol 低エネルギー状態である。この時[Mn4–O]が形成されるが、四つの Mn 原子の 酸化数は 3 から変化せず Mn₄(III, IV, IV)である。Mn4–O の O 原子のスピン密度は 0.892 e であり、 Mn(V)=O²⁻と Mn(IV)–O⁻⁻ の中間的な結合状態であると考えられる。この後、Asp61COOH から 1H⁺が 除去されると同時に新たに水分子(W10)が反応サイトに挿入される。5 の状態は先の研究[2]の構造 [1•H₂O]に相当している。

 $S_2 \rightarrow S_3$ の遷移過程では、まず $1e^{-in}$ 反応系外に除去され、 $1H^+in Asp61$ から除去されると結論される。

【参考文献】[1] Y. Umena et al., *Nature* 2011, 473, 55. [2] T. Ichino et al., *Chem. Phys. Lett.* 2014, 595-596, 237. [3] T. Ichino et al., *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 2013, 86, 479.

Goモデルを用いたプラストシアニン・シトクロム **f**における タンパク質間相互作用に関する理論的研究

(金沢大院・自然)○中川聖, 木下翔吾, 松井貴寛, 川口一朋, 齋藤大明, 長尾秀実

Theoretical study of protein-protein interactions in plastocyanin cytochrome f by using Go model

(Nat.Sci. Kanazawa Univ.) Satoshi Nakagawa, Shogo Kinoshita, Takahiro Matsui, Kazutomo Kawaguchi, Hiroaki Saito, Hidemi Nagao

【序】シトクロムfはシトクロムb₆f複合体のサブユニットであり、光合成においてシトクロムb₆f 複合体から光化学系Iに電子を伝達する際、プラストシアニンと複合体を形成する[1]。これらの タンパク質の複合体構造が解かれた現在、課題とされているのは、タンパク質複合体を形成する ためのタンパク質間相互作用の解明である。このタンパク質間相互作用を解明することで、電子 伝達反応に必要な二つのタンパク質の会合過程を観測することが可能になる。

一方、タンパク質のように巨大な自由度を持つ生体分子に対する計算科学的手法として、複数 の粒子をひとまとめにして取り扱う粗視化シミュレーションが挙げられる[2]。この粗視化シミュ レーションの手法を用いることで、タンパク質複合体のような大きな系に対しても、二つのタン パク質が会合し、複合体を形成するまでの長時間にわたるダイナミクスを観測することが可能と なっている。そして、粗視化モデルにおけるタンパク質間相互作用を適切に記述することで、複 合体を形成するまでのタンパク質の軌跡を得ることができる。

本研究では、粗視化シミュレーションにおけるタンパク質間相互作用関数をタンパク質複合体 での構造が最も安定となるように、レナード・ジョーンズ(LJ)型のポテンシャルを用いた。そし て、このタンパク質間相互作用関数の正当性を評価することを目的とする。

【方法】本研究では、一つのタンパク質の粗視化に対して Go モデルを用いた[3]。Go モデルとは、 タンパク質を構成する各アミノ酸を一つの球として取り扱い、その相互作用点を各アミノ酸残基 の*C_a*炭素に代表させている。タンパク質があるコンフォメーションΓの時の Go モデルの分子内ポ テンシャルを以下の(1)式とする。また、タンパク質間相互作用関数として、LJ 型ポテンシャル を(2)式とする。

$$U(\Gamma, \Gamma_{0}) = \sum_{bond} K_{r}(r_{i} - r_{0i})^{2} + \sum_{angle} K_{\theta}(\theta_{i} - \theta_{0i})^{2} + \sum_{dihedral} \left[K_{\phi}^{(1)} \{1 - \cos(\phi_{i} - \phi_{0i})\} + K_{\phi}^{(3)} \{1 - \cos(\phi_{i} - \phi_{0i})\} \right] + \sum_{i > j-3}^{nc} \varepsilon_{1} \left[\left(\frac{r_{0ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{r_{0ij}}{r_{ij}} \right)^{6} \right] + \sum_{i > j-3}^{nnc} \varepsilon_{2} \left(\frac{c}{r_{ij}} \right)^{12}$$
(1)
$$U_{LJ} = \varepsilon_{3} \left[\left(\frac{\sigma}{r_{\alpha i\beta j}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma}{r_{\alpha i\beta j}} \right)^{6} \right]$$
(2)

添え字のi, jはそれぞれ粒子番号を表しており、rは結合長、 θ は結合角、 ϕ は二面角、 r_{ij} はi番目 とj番目の粒子間距離を表している。また、添え字に0がついているものは天然構造においての

値を表している。そして(2)式のα,βはタンパク質の種類を 示している。ポテンシャルのパラメータであるσは、複合 体構造においてそれぞれのタンパク質の金属イオンに結 合しているアミノ酸残基の距離である 9.9[Å]としている。 この Go モデルを用いて粗視化した二つのタンパク質に 対して、ランジュバン方程式を解くことで軌跡を求めた。 相互作用関数の正当性を評価するために、各タンパク質

の重心間距離及び、分子配向を計算した。タンパク質の分 図1分子配向について 子配向は、シトクロムfのN末端からC末端へのベクトルをz軸、シトクロムfの重心からこのz軸に下した垂線をx軸とし、その外積をy軸とする。この座標軸に対し、プラストシアニンのN 末端からC末端へのベクトルと、z軸とのなす角を ψ 、xy平面に投影したものとx軸とのなす角を ω とした(図1)。

【結果と考察】タンパク質の重心間距離と二つの分子配 向の時間変化を図 2~4 に示す。各グラフの緑色の実線は 会合した時の複合体構造(PDB ID: 2PCF)におけるそれ ぞれの値である。グラフより、二つのタンパク質の重心 間距離は会合した複合体構造の値に近づいている。分子 配向のcosψ, cosωについては、100[ns]の計算では一定の 値を取るのではなく、様々な値を取ることが分かる。

このことより、タンパク質間相互作用に LJ 型ポテンシ ャルを用いると、タンパク質複合体における重心間距離が 会合時の複合体構造の重心間距離の値に近づいていく。こ の際、分子配向は重心間距離に依らず様々な値をとること が分かった。重心間距離が近づいていった後の分子配向の 値は、長時間シミュレーションを行うことで会合時の複合 体の値に近づいていく可能性がある。





図 3 cos ψの時間変化



【参考文献】

 M. Hervas, J. A. Navarro, and M. A. De la Rosa *Acc. Chem. Res.* **36** (2003) 798

[2] M. Levitt and A. Warshel *Nature* 253 (1975) 694-698
[3] N. Koga and S. Takada *J. Mol. Biol.* 313 (2001)
171-180

プラストシアニンとシトクロムfの会合-解離過程における 自由エネルギー地形に関する理論的研究

(金沢大院・自然) ○松井貴寛, 中川聖, 川口一朋, 齋藤大明, 長尾秀実 Theoretical study on the free energy landscape in the association-dissociation process of plastocyanin and cytochrome *f* (Nat.Sci. Kanazawa Univ.) ○ Takahiro Matsui, Satoshi Nakagawa, Kazutomo Kawaguchi, Hiroaki Saito, and Hidemi Nagao

【序】光合成系の中で、プラストシアニンはシトクロムb6/f 複合体のサブユニットであるシトクロムf から 電子を受け取り、光化学系 I へと輸送する機能を持つ[1]。プラストシアニンとシトクロムf 間で電子伝達 反応が起こるためには、シトクロムf とプラストシアニンが会合する必要があり、また電子を光化学系 I へ と輸送するためには解離する必要がある。つまり、シトクロムf-プラストシアニン間の会合-解離過程を解 析することは、電子輸送反応の解明に必要不可欠である。タンパク質間の会合-解離過程の解析には自由エ ネルギー地形による解析が有効である。我々はこれまで全原子モデルによる分子動力学(MD)シミュレーシ ョンを用いて、タンパク質-リガンド間の会合-解離過程における自由エネルギー地形を算出してきた[2]。 本研究では、この手法を用いてタンパク質間の会合-解離過程における自由エネルギー地形を算出し、結合 距離、結合親和性を求める。またシトクロムf とプラストシアニンの会合-解離過程において適用し、電子 伝達反応前後の構造において自由エネルギー地形を算出する。そして、反応前後の自由エネルギー差から構 造安定性の違いを評価し、その要因を追求する。

【方法】計算対象には X 線構造解析により得られた BPTI(5PTI)、プラストシアニン(酸化型(Ⅱ): 1PLC、 還元型(I): 5PCY)、シトクロム f(還元型(Ⅱ)、酸化型(Ⅲ): 1HCZ)を用いた。プラストシアニン、シトクロ ム fのそれぞれの構造を図 1、図 2 に示す。

計算条件は、温度 T = 300 K、時間刻み dt = 2.0 fs、カットオフ距離は 12Å、アンサンブルは NPT、圧 力制御はアンダーセンの方法、温度制御は Nose-Hoover chain、クーロン力計算は PME 法で行った。溶媒 水分子には TIP3P モデルを用い、タンパク質の力場は CHARMM27 を用いて計算を実行した。CHARMM27 に存在しない活性部位付近の力場は量子化学計算により求めたものを用いた。プラストシアニンに関しては 我々がこれまで求めてきたものを用いた。シトクロム f に関しての電荷分布は Gaussian 09 を用いて求めた。

基底関数 6-31G(d,p)を用いた DFT 構造 最適化計算を実行し、RESP 電荷を求め た。MD 計算には MODYLAS[3]を用い た。

自由エネルギー計算手法には熱力学 的積分法を用いた。シミュレーションに より求める平均力をFとし、自由エネル ギー変化 ΔG を求める。重心間距離をrとし、系のポテンシャルが距離rにし V(r)と書けるとすると、



図1.酸化型プラストシアニン(Ⅱ) 図2. 還元型シトクロム f(Ⅱ)

タンパク質間の会合・解離自由エネルギームG(r)は以下の式(1)、(2)により求められる。

$$\Delta G(r) = \int_{r_0}^r \left\langle \frac{\partial V(r')}{\partial r'} \right\rangle_{r'} dr' \tag{1}$$

$$= -\int_{r_0}^r \left\langle F(r') \right\rangle_{r'} dr' \tag{2}$$

ここで、r₀は自由エネルギーの基準点とする。

【結果と考察】まず溶媒中でタンパク質間の自由エネルギー計算手法を確立するために、小型の球状タンパ ク質であるBPTIに対して平均力、自由エネルギー地形を求めた。それぞれのグラフをそれぞれ図3、4に示 す。図4からBPTIの会合-解離過程においては、2つの極小点が存在し、会合状態と解離状態間の状態変化過 程が見られる。会合状態の方が解離状態よりも2.65kcal/molだけ安定であることがわかる。

またプラストシアニン-シトクロムf間の自由エネルギー計算を行うために酸化型、還元型プラストシア ニンそれぞれ単体で平衡化計算を行った結果を図5、6に示す。酸化型、還元型共に1.5nsあたりから値が収 束しており、平衡状態であるといえる。単体では電子伝達反応前後において、構造安定性に差はないことが わかる。この構造を用いてBPTIに対して自由エネルギー地形を求めた方法を適用し、プラストシアニン-シ トクロムf間の反応前後の自由エネルギー差を求めることができる。

[References]

[1]M. R. Redinbo et al. J. Bioenergetics & Biomembranes, 26, 49(1994).

[2] K. Kawaguchi et al. CPL 588, 226-230 (2013).

[3] Y. Andoh, et al., J. Chem. Theo. Comp., 9, 3201-3209 (2013).

