

1F03

ハロロドプシン光反応中間体のレチナル発色団に対する水分子の役割 (阪大院理¹・名工大院工²)

○水野 操¹・神取 秀樹²・水谷 泰久¹

Role of a water molecule to a retinal chromophore of harorhodopsin photointermediate

(Osaka University¹, Nagoya Institute of Technology²)

Misao Mizuno¹, Hideki Kandori², and Yasuhisa Mizutani¹

はじめに 微生物型ロドプシンの代表的な機能のひとつは光駆動イオンポンプである。その一種であるハロロドプシンは、細胞膜の内側から外側へ塩化物イオンを輸送する。イオンの輸送経路には、レチナル発色団がタンパク質と形成するプロトン化シッフ塩基が存在する(図1)。シッフ塩基の周辺領域がイオン輸送経路に含まれていることから、ポン

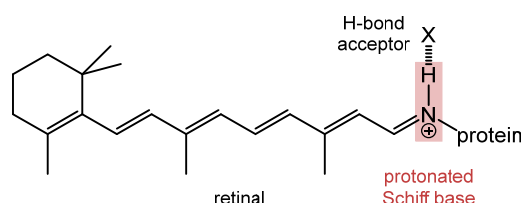


図1. レチナル発色団の構造。

プ機構の理解には発色団に起きる段階的な構造変化の解明がきわめて重要である。わたしたちは、古細菌 *Natorobacterium pharaonis* 由来ハロロドプシン (*pHR*) のイオン輸送機構を明らかにするために、時間分解可視共鳴ラマン分光法をもちいてレチナル発色団の構造の時間発展をナノ秒からミリ秒の幅広い時間スケールで調べている。本研究では、レチナル発色団のシッフ塩基の水素結合に対する構造マーカーバンドであるC=N伸縮振動の共鳴ラマンバンドの振動数およびバンド幅から、シッフ塩基の水素結合強度および水素結合のアクセプターを同定し、イオン輸送の鍵となるタンパク質の構造変化を明らかにした。

実験 *pHR* は大腸菌中で発現させ、カラムクロマトグラフィーにより精製した。界面活性剤をもちい、軽水および重水バッファー(pH 7.0およびpD 7.0)に可溶化した。測定では、試料をフローセル中で循環させた。ラマン散乱測定のプロブ光には、波長 475 nm (パルス幅 40 ns) の光をもちいた。反応初期の時間領域では、波長 532 nm (パルス幅 25 ns) のポンプ光パルスをもちいたポンプ・プロブ測定(時間分解能 50 ns)を行った。遅い時間領域では、波長 561 nm の cw 光で連続的に試料をポンプし、プロブ光との照射位置間隔で遅延時間を設定するデュアルビームフロー法(時間分解能 100 μ s)により時間分解計測を行った。

結果と考察 時間分解共鳴ラマンスペクトルには、3つの反応中間体(K、LおよびN)の寄与が観測された。特異値分解解析によりこれら中間体のスペクトルを得た。図2に未反応状態および反応中間体の共鳴ラマンスペクトルを 1580 cm^{-1} から 1700 cm^{-1} まで拡大して示す。軽水中でのC=N伸縮振動バンドは、未反応状態では 1634 cm^{-1} に観測され、K中間体では 1621 cm^{-1} に低波数シフトし、L中間

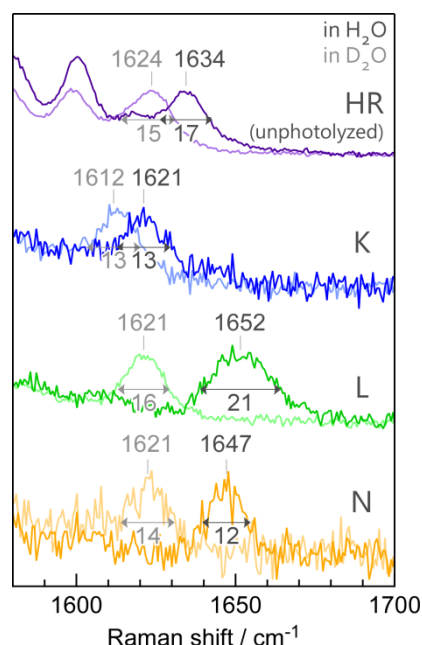


図2. *pHR*の未反応状態およびK、L、N中間体のC=N伸縮振動領域の共鳴ラマンスペクトル。バンド幅はローレンツ関数によるフィッティングにより決定した。

体では 1650 cm^{-1} に高波数シフトし、その後 N 中間体では 1647 cm^{-1} へ若干シフトした。重水中では、すべての状態において C=N 伸縮振動バンドが軽水中よりも低波数シフトを示した。そのシフトの大きさは、未反応状態および K 中間体では 10 cm^{-1} 程度と小さく、L および N 中間体ではそれぞれ 31 および 25 cm^{-1} と大きかった。また、L 中間体のみ軽水中でバンド幅の増加が観測された。

レチナール発色団のプロトン化シッフ塩基において、C=N 伸縮振動モードは N-H 変角振動モードとエネルギーが近接し強くカップルしている。そのため、スペクトルに観測されるバンドの振動数は、純粋な C=N 伸縮振動数よりも高くなる。重水中では、シッフ塩基のプロトンは重水素イオンに完全に置換される。この結果、N-D 伸縮モードの振動数は低下し、C=N 伸縮振動モードとのカップリングが解消する。これにより、重水中で観測される C=N 伸縮振動バンドは軽水中と比べ低波数側へシフトする。このシフトの大きさは、シッフ塩基の水素結合強度に依存する。すなわち、水素結合強度が強いと、N-H 変角振動数は高くなるため、スペクトルに観測される C=N 伸縮振動バンドは高波数側に現れ、また重水素化による低波数シフトは大きくなる[1]。本研究で観測されたスペクトル変化から、プロトン化シッフ塩基における水素結合強度は、未反応状態に比べ K 中間体で弱くなり、L 中間体の生成にともなって強くなるのがわかった。N 中間体でも、L 中間体ほどではないが強い水素結合が形成されていることがわかった。

次に C=N 伸縮振動のバンド幅について議論する。未反応状態のバクテリオロドプシン(BR)の共鳴ラマンスペクトルでは、重水中に比べ軽水中で C=N 伸縮振動バンド幅の増加がみられている[2]。BR はプロトン化シッフ塩基のすぐ近傍に水分子が存在する。軽水の HOH 変角振動数はおよそ 1640 cm^{-1} である。この振動数は、 1630 から 1650 cm^{-1} に観測されるプロトン化シッフ塩基の C=N 伸縮振動数と非常に接近している。したがって、プロトン化シッフ塩基と水分子が直接相互作用できるような近距離にある場合、C=N 伸縮振動モードと HOH 変角振動モード間で共鳴振動エネルギー移動が起こる。このとき、C=N 伸縮振動の位相緩和時間が短くなりバンド幅が増加すると考えられる。一方、重水では DOD 変角振動数は約 1200 cm^{-1} へ低下するため、共鳴振動エネルギー移動は起こらない。pHR では L 中間体において、C=N 伸縮振動バンドに軽水中でバンド幅の増加が観測された。これは、発色団のプロトン化シッフ塩基の水素結合のアクセプターが水分子に交換したことを強く示唆する。一方、N 中間体では強い水素結合を形成しているにもかかわらず、軽水中のバンド幅が重水中と変わらなかったことから、L→N の過程で水素結合のアクセプターが水分子から別の化学種に交換したことがわかる。

低温 FTIR の研究結果[3]から、 170 K で観測される L 中間体の生成とともに、プロトン化シッフ塩基の水素結合アクセプターが塩化物イオンから水分子へ置き換わると提案されている。その結果、塩化物イオン周辺の極性が低下し、シッフ塩基近傍における塩化物イオンの移動が起きると考えられている。本研究により得られた結果はこの考えを支持する。また、これまで明らかでなかった N 中間体の発色団構造を明らかにし、水分子との水素結合は L 中間体のみで見られることを示した。

本研究では、pHR のレチナール発色団の構造の時間発展を観測した結果、イオン輸送の鍵となる過程におけるプロトン化シッフ塩基と水分子との水素結合形成を直接結論づけた。

参考文献 [1] Baasov, et al., *Biochemistry* **26**, 3210 (1987). [2] Hildebrandt and Stockburger, *Biochemistry* **23**, 5539 (1984). [3] Shibata, et al., *Biochemistry* **44**, 12279 (2005).

1F04

光駆動塩化物イオンポンプとそのプロトンポンプへ機能転換した 変異体の光反応における発色団構造の違い

(阪大院理¹・名工大院工²) ○久保田 真司¹・水野 操¹・神取 秀樹²・水谷 泰久¹

Differences of the photointermediate chromophore structures between
a light-driven chloride ion pump and its functionally converted proton pump analog
(Osaka University¹, Nagoya Institute of Technology²)

Shinji Kubota¹, Misao Mizuno¹, Hideki Kandori² and Yasuhisa Mizutani¹

【序】*Fulvamarina* rhodopsin (FR) は光駆動塩化物イオン輸送タンパク質である。FR は全トランス形レチナールを発色団としてもち、その光異性化がイオン輸送のトリガーとなる。最近、FR のアミノ酸残基のうち3つを置換した変異体 (N110D、Q121E、S255F) がプロトン輸送活性を示すことが報告された[1]。野生型と変異体はほとんど同じ配列を持ちつつ機能だけが異なることから、輸送するイオンを決定する要所のみ違いがあると考えられる。その候補のひとつである発色団構造を比較することで塩化物イオン輸送とプロトン輸送の機能発現の仕組みが明らかになると期待できる。そこで我々は、これらのタンパク質の始状態、反応初期中間体における発色団構造を時間分解共鳴ラマン分光法によって調べ、両者の特徴を比較した。

【実験】大腸菌で発現させた FR の野生型と変異体を精製し、界面活性剤を含むバッファーに可溶化したものを試料として用いた。時間分解共鳴ラマン測定はフローセル中に氷冷した試料を流し、ナノ秒パルスを用いたポンププローブ法 (ポンプ光 532 nm、プローブ光 475 nm) により行った。中間体のスペクトルの測定は、野生型では遅延時間 50 μs において、変異体では 1 μs において行った。

【結果】図 1A に軽水中と重水中での野生型の時間分解共鳴ラマンスペクトル (1600 – 1660 cm^{-1} の領域) を示す。青・緑のカーブは軽水中のスペクトル、紫・黄緑のカーブは重水中のスペクトルを表す。この領域には発色団に含まれるプロトン化シッフ塩基 (PSB) の C=N 伸縮振動バンドが観測された。軽水中の野生型のスペクトルにおいて、始状態では 1629 cm^{-1} に、中間体では 1645 cm^{-1} にバンドが観測された。これらのバンドは重水中ではそれぞれ 13 cm^{-1} 、26 cm^{-1} の低波数シフトを示した。また、バンドの幅について解析したところ、始状態、中間体ともに軽水中 – 重水中間で有意な差はなかった。次に変異体の共鳴ラマンスペクトルを図 1B に示す。変異体の C=N 伸縮振動バンドは、始状態では

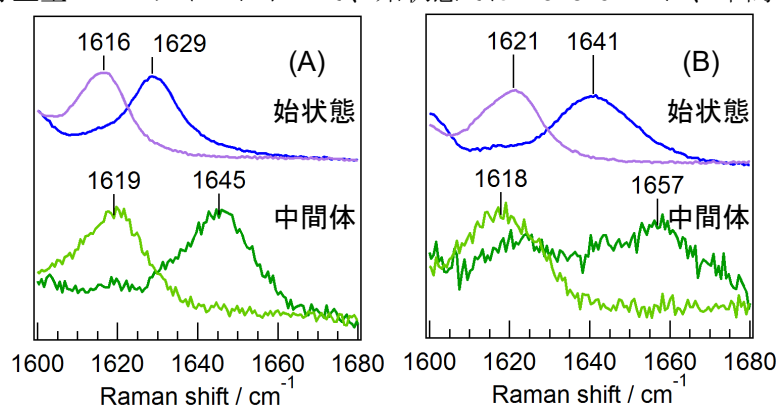


図 1. FR の野生型 (A) と変異体 (B) の共鳴ラマンスペクトル。カーブはそれぞれ軽水中の始状態 (青)、重水中の始状態 (紫)、軽水中の中間体 (緑)、重水中の中間体 (黄緑)。中間体のスペクトルは、野生型では 50 μs 、変異体では 1 μs の時間分解スペクトルである。

1641 cm^{-1} 、中間体では 1657 cm^{-1} にみられた。重水中でのバンドはそれぞれ 19 cm^{-1} 、39 cm^{-1} の低波数シフトを示した。野生型とは異なり、変異体では始状態におけるバンド幅が重水中よりも軽水中の方が広がった。一方、中間体ではほとんどバンド幅の違いはみられなかった。

【考察】はじめに始状態における野生型と変異体の PSB について議論する。PSB の C=N 伸縮振動バンドの重水中における低波数シフトの大きさは、PSB がつくる水素結合強度に依存することが知られている[2]。始状態ではこのシフトの大きさは、野生型の 13 cm^{-1} と比較して変異体では 19 cm^{-1} と大きかった。このことは、変異体の PSB が、野生型よりも強い水素結合を形成していることを示唆する。また、重水中と比べたときの軽水中での C=N 伸縮振動バンド幅の広がり、PSB が水分子と水素結合を形成していることを示すマーカーである[3]。野生型では軽水中と重水中の C=N 伸縮振動バンドの幅の違いはみられなかったが、変異体では軽水中の方が幅広がった。このことは、始状態において、野生型では PSB と水素結合している水分子が存在しないのに対し、変異体では PSB と水素結合する水分子が存在することを示唆する。

次に、光反応後数マイクロ秒で生成する中間体の PSB について議論する。この中間体は、過渡吸収の結果から、光駆動イオン輸送タンパク質のイオン輸送過程で一般的にみられる L 中間体に帰属できる。今回観測された L 中間体の C=N 伸縮振動バンドでは、重水中での低波数シフトの大きさは、野生型では 26 cm^{-1} 、変異体では 39 cm^{-1} であった。この結果は、PSB の形成する水素結合は L 中間体においても野生型より変異体の方が強いことを示唆する。一方でそれぞれの始状態と比較すると、野生型、変異体ともに L 中間体の方がシフトの大きさが大きかった。これは、野生型と変異体の両方で、始状態よりも L 中間体の方が強い水素結合を形成していることを示唆する。また、C=N 伸縮振動バンド幅の軽水中－重水中の違いが野生型、変異体ともにみられなかったことから、L 中間体における PSB は水分子との水素結合を形成していないと考えられる。

以上の議論から、野生型の PSB は弱い水素結合を水以外の化学種（先行研究では塩化物イオンが示唆されている[4]）と形成しているのに対し、変異体の PSB は水分子と強い水素結合を形成していると考えられる。バクテリオロドプシンの PSB は、始状態で強い水素結合を形成しており[3]、水分子と相互作用していることが報告されている[5]。この特徴は FR の変異体にも観測された。共通した特徴が見られることは、水分子と強い水素結合を形成することがプロトンの輸送を実現する必要条件であることを示唆する。また、野生型、変異体の L 中間体において PSB の水素結合アクセプターが水分子ではないことが示唆された。この結果は、別の塩化物イオン輸送タンパク質であるハロロドプシンの L 中間体で PSB が水分子と水素結合しているという結果と異なっている[6]。この水素結合の違いとイオン輸送タンパク質の機能転換の可能性について議論する。

【参考文献】

[1] K. Inoue et al., *J. Biol. Chem.* **2016**, 291, 9883. [2] T. Baasov et al., *Biochemistry* **1987**, 26, 3210. [3] P. Hilderbrandt and M. Stockburger, *Biochemistry* **1984**, 23, 5539. [4] K. Inoue et al., *J. Phys. Chem. B* **2014**, 118, 11190. [5] H. Luecke et al., *J. Mol. Biol.* **1999**, 291, 899. [6] 水野ら, 第 10 回分子科学討論会 **2016**, 1F03

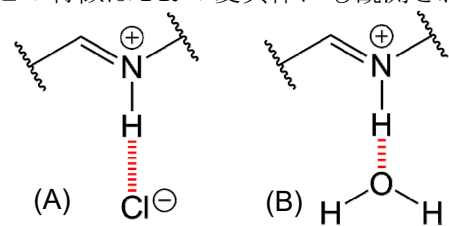


図 2. FR 野生型 (A) と変異体 (B) の始状態における PSB の水素結合構造モデル。図の向かって右側にタンパク質が結合している。向かって左側へレチナールのポリエーテル鎖が延びている。

1F05

グリシンアミドリボヌクレオチド合成酵素の反応機構: 自由エネルギー解析
(千葉工大¹, 電通大²) ○山本 典史¹, 河合 剛太¹, 三瓶 徹一²

Reaction mechanism of glycinamide ribonucleotide synthetase: Free energy analysis
(Chiba Institute of Technology¹, The University of Electro-Communications²)
○Norifumi Yamamoto¹, Gota Kawai¹, Gen-ichi Sampei²

■ 序論

プリンヌクレオチド新生合成系は、ホスホリボシルニリン酸を出発物質として14段階の反応過程を経てアデノシンーリン酸およびグアノシンーリン酸を生成する経路であり、ほとんど全ての生物に共通する。この生合成経路に関わる酵素のいくつかは構造的・機能的にきわめて類似しており、共通する祖先タンパク質から派生したと推測される。そこで我々は、プリンヌクレオチド生合成系を構成する酵素の分子機構を多角的に解析することで、この代謝システムが形成されるに至った進化的な過程の全体像を明らかにすることを目指している。

この代謝システムの第2段階は、グリシンアミドリボヌクレオチド合成過程である。この反応過程を触媒する酵素 PurD は、他のいくつかのプリンヌクレオチド生合成酵素 (PurKやPurT) とスーパーファミリーを構成しており、代謝システムの形成過程を解明する上で基軸的役割を果たす。本研究では量子化学計算に基づき、PurD 酵素の反応機構の理論的解析に取り組んだ。

■ 方法

PurDについて、QM/MM-ONIOM 法に基づき、基質部分をQM、酵素部分をMMとする基質・酵素複合体モデル (図1) を構築した。QM部分は B3LYP/6-31(d,p) 精度、MM部分は Amber 力場で記述した。ストリング法 [1] を用いることで、反応過程の最小エネルギー経路を決定した。最小エネルギー経路に沿った自由エネルギー変化を QM/MM自由エネルギー摂動法 [2] を用いて解析した。

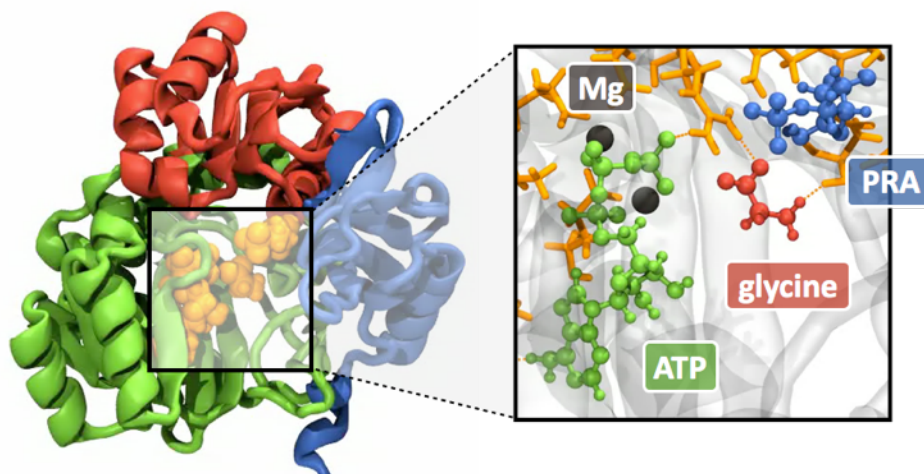


図1. PurD酵素および基質化合物の複合体モデル

■ 結果

PurD中で進行するグリシルリン酸の形成過程について、最小エネルギー経路に沿った自由エネルギー変化を解析した。その結果、図2に示すように、ATPによるグリシンのリン酸化過程は 30 kcal mol^{-1} 程度の活性化エネルギーを伴って進行し、終状態に至るエネルギー変化は -9 kcal mol^{-1} であることが明らかとなった。

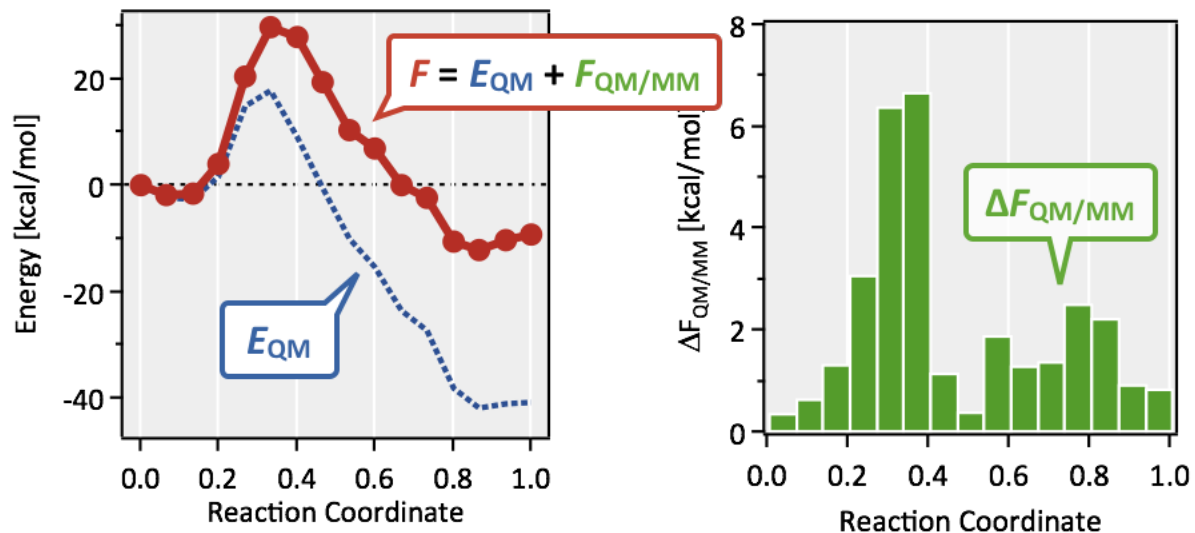


図2. 最小エネルギー経路に沿った自由エネルギー変化

反応過程における基質・酵素間の相互作用のはたらきを明らかにするために、自由エネルギーを各アミノ酸毎に分割して解析を行った。その結果、図3に示すように、基質に隣接する5つのアミノ酸残基が自由エネルギー変化に対して顕著な寄与をもち、それぞれが協調的にはたらくことで反応を触媒する機構が明らかになった。

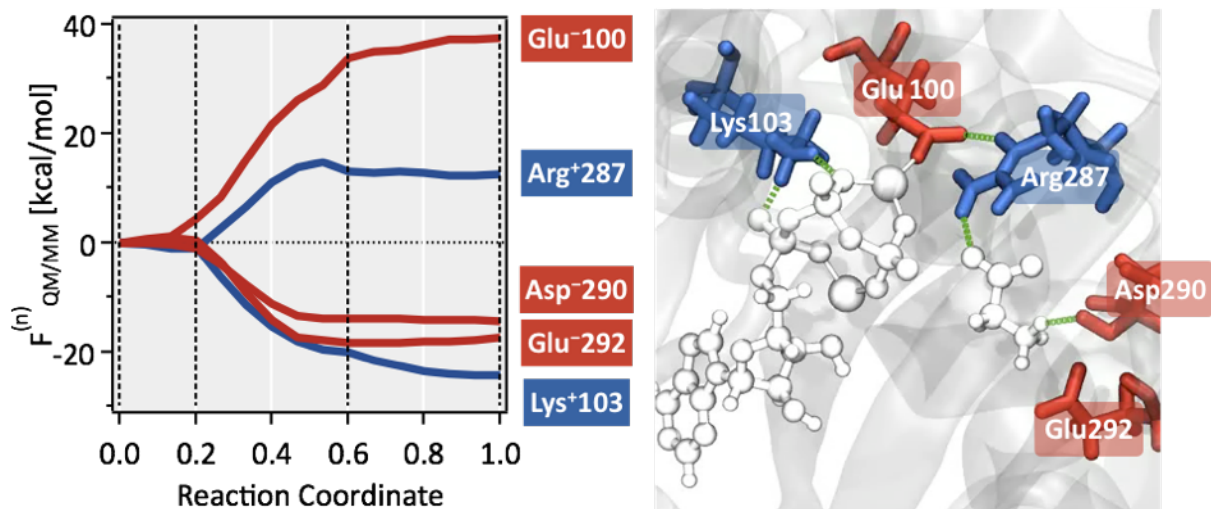


図3. アミノ酸残基毎に分割した自由エネルギー成分の変化

[1] E, W., et al., Phys Rev. B, 66, 052301 (2002)

[2] Zhang, Y., et al., J. Chem. Phys., 112, 3483 (2000)

柔らかいタンパク質の分子機能の理解と設計

(京大院理) 林 重彦

Understanding and Design of Molecular Functions of Flexible Proteins

(Graduate School of Science, Kyoto University) Shigehiko Hayashi

タンパク質分子の機能においては、タンパク質分子の作る触媒場の中で活性化される化学反応、すなわち酵素化学反応が重要な役割を果たす。酵素の触媒活性は一般的に非常に高く、その触媒活性の制御を用いて様々な分子機能が発現する。最近、タンパク質分子に特徴的な遅く大きな構造熱揺らぎが、酵素の高い触媒活性重要であることが実験的に示唆されているが、直接的な証拠がなく大きな論争となっている。

そのような酵素活性の分子機構を分子シミュレーションにより探るために、近年、広く用いられ成功を収めている手法が、quantum mechanical/molecular mechanical (QM/MM) 法である。この方法は、分子軌道法や密度汎関数法などの量子化学的 (QM) 手法と、生体分子の分子シミュレーションで通常用いられている分子力場に基づく分子力学的 (MM) 手法をハイブリッドするものであり、化学反応に関わる領域を QM 法で取り扱う際に、そのまわりのタンパク質環境の影響を MM 法に基づき記述することにより、酵素反応活性に関わる触媒場を非常に効率良く考慮することを可能にする。我々は、QM/MM 法を用いて様々な機能に関わる酵素活性の分子機構を探ってきた [1]。

しかしながら、そのような QM/MM 法の成功の一方で、限界も明らかになってきた。最も大きな困難は、タンパク質分子に特徴的な遅く大きな構造熱揺らぎを考慮するための十分な統計サンプルが取れないことである。この問題を解決するために、我々は、新規な QM/MM 自由エネルギー法 (QM/MM RWFE-SCF 法) を開発した [2,3]。この手法では、分子動力学 (MD) シミュレーションよりサンプルされた MM 部分の構造分布により定義される自由エネルギー曲面上で、QM 法によって取り扱われる活性部位分子の最適自由エネルギー構造が決定される。我々の手法は、平均場近似と reweighting 法を組み合わせることにより、非常に高効率な計算を達成しており、量子化学で取り扱われる酵素反応過程におけるマイクロ秒に渡る時間スケールのタンパク質の遅く大きな構造変化を取り入れることを可能にしている。また、QM/MM RWFE-SCF 法は、新規機能を有する変異体タンパク質の設計に力を発揮する。変異体の設計・解析においては、変異導入によるタンパク質の構造変化を十分考慮する必要があるが、タンパク質の構造熱揺らぎによる緩和を十分考慮することが可能な本手法を用いることにより、より正確な変異体のモデリングが可能となる。本講演では、QM/MM RWFE-SCF 法の簡単な解説と共に、Ras-GAP G タンパク質の酵素反応解析への適用を通して見えてきたタンパク質の高い酵素活性における構造熱揺らぎの役割の解明、及び光操作で用いられるレチナール結合タンパク質の色変異体の設計についての最近の研究を紹介する。

Ras-GAP G タンパク質複合体の酵素活性 Ras-GAP 複合体は、顕著な GTPase 活性を有する G タンパク質である。その酵素反応は、細胞増殖等の信号伝達経路におけるスイッチとして働き、酵

素活性が低下した変異体は腫瘍形成をもたらすことが知られており、酵素活性が生体機能に重要な役割を果たしている。最近の時間分解赤外分光実験で、この酵素反応の反応自由エネルギー障壁に対する非常に大きなエン트로ピーによる安定化の寄与が見出され、酵素反応に大きなタンパク質の構造変化が関与していることが示唆される。そこで、QM/MM RWFE-SCF 法を用いて、反応の始・終状態及び遷移状態の自由エネルギー最適化構造を求めた。その結果、反応の遷移状態生成に、複合体間が大きくずれる構造変化が相関していることを見出した。この大きな複合体間の構造変化は、反応活性中心における基質の反応遷移状態構造の安定化をもたらす水素結合形成と相関しており、酵素活性に大きな寄与を与えていることを示唆している。また、腫瘍形成に関わる変異体に対しても酵素反応性の解析を行い、その分子論的機構を明らかにした。

レチナール結合タンパク質の色変異体設計 光感受性イオン輸送体である微生物型ロドプシンは、神経科学における光操作のツールとして用いられている。光操作実験では、神経細胞にこの異種由来の微生物型ロドプシンを発現することにより、光照射を用いた詳細な神経細胞活動の制御が可能になる。微生物型ロドプシンは、レチナールシッフ塩基分子を発色団として有し、異なるタンパク質における発色団とタンパク質の相互作用の違いにより、吸収波長が大きく変化する。そのような吸収波長の可変性は、光操作実験において、二つの異なる吸収波長を有する光受容体を用いた同時操作／観測実験を可能にする。本研究では、ツールとして実際に用いられているいくつかの微生物の色変異体を理論的に設計し、大幅な吸収波長シフトを有する変異体の作成に成功した [4]。まず、少数の変異導入による大きな吸収波長シフトを達成するべく、これまで考慮されていなかった発色団の構造変化を引き起こす二～三箇所の変異を設計し、上記手法により変異モデル構造の精密化を行った。また、静電相互作用的に波長シフトを引き起こす既知の一箇所の変異を加え、三～四重変異体を設計した。神経細胞の不活性化に用いられる AR3、及び活性化に用いられる C1C2 に対して、それぞれ実験的検証を行ったところ、理論的設計を基本として、最大 100 nm の短波長シフトを有する色変異体を得た。これまでに実験で得られた点変異による色変異体の最大の吸収波長シフトは 50 nm であり、本研究ではこれまでの倍以上のシフトを有する変異体の設計に成功したことになる。更に、C1C2 の色変異体に対して X 線結晶構造解析を行ったところ、理論設計による構造モデルと同様な発色団分子の構造変化を観測した。また、C1C2 の色変異体は、マウスの脳スライス中で、より短波長の光を用いて活動電位を惹起出来ることが神経化学的実験により確認された。

また、水溶性タンパク質であるヒト細胞 II 型レチナール結合タンパク質 (hCRBP II) の色変異体の吸収スペクトルの波長シフトの分子機構に関する理論的研究を行った [5]。hCRBP II は、最大 10 箇所の点変異導入で 200 nm にも渡る吸収波長極大のシフトが引き起こされる。この分子機構を明らかにするために、代表的な色変異体のタンパク質構造を QM/MM RWFE-SCF 法による自由エネルギー構造最適化を用いてモデリングし、吸収波長の計算を行った。その結果、200 nm の吸収波長シフトを再現し、その分子起源を原子論的に明らかにすることに成功した。特に、非常に長波長シフトする色変異体においては、タンパク質構造の柔軟性により、活性部位から遠く離れた変異導入による疎水性相互作用の変調がレチナール結合ポケットの形が変形を引き起こし、発色団のシッフ塩基周辺ポケットに存在する水分子を排除することにより、吸収波長極大を決定する静電環境に大きな変化が現れることを明らかにした。

Reference: [1] 林, CSJ カレントレビュー, 08, 第 17 章, 166 (2012). [2] Kosugi and Hayashi, *J. Chem. Theory Comput.* **8**, 322 (2012). [3] Kosugi and Hayashi, *J. Am. Chem. Soc.*, **134**, 7045 (2012). [4] Kato et al., *Nat. Commun.*, **6**, 7177 (2015). [5] Cheng et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **137**, 13362 (2015).

スレオニル tRNA 合成酵素のアミノ酸選択機構に関する理論的研究

(1 分子研, 2 総研大) ○森義治¹, 奥村久士^{1,2}

Theoretical study on the selection mechanism of the correct amino acid in threonyl-tRNA synthetase

(1IMS, 2SOKENDAI) ○Yoshiharu Mori¹ and Hisashi Okumura^{1,2}

【序】

本研究では、リボソームにおけるタンパク質の翻訳前に起こる、tRNA にアミノ酸を付与する酵素の構造と関連する反応過程を理論的方法により調べた。この反応を触媒する酵素はアミノアシル tRNA 合成酵素とよばれている。本研究で扱うのはスレオニン (Thr) に対する酵素である。

本研究では大腸菌由来のスレオニル tRNA 合成酵素 (ThrRS) の研究を行った (三次元構造については図 1 参照)。この酵素の主な機能は tRNA に対するスレオニン付加反応を触媒することである。この反応の際にはスレオニンを選択的に酵素内に取り込む必要がある。スレオニンに類似したアミノ酸であるセリンやバリンは本質的に取り込まれる可能性があるが、このようなアミノ酸が酵素に取り込まれにくい分子機構を解明することを目的とする。

【方法】

本研究では以上のようなアミノ酸がスレオニル tRNA 合成酵素に取り込まれる過程で選択的にスレオニンを取り込む分子機構を理論的に解析した。大腸菌由来のスレオニル tRNA 合成酵素の X 線結晶構造を用いて計算を行った (図 2 参照)。図に示されているようにこの分子は二量体をとっている。この構造は分子の本来の N 末端が除かれているものであるが、アミノ酸の取り込みやその後の酵素反応も野生型と同程度の効率で起こることが示されている。二量体の一方においては、アミノ酸結合部位にスレオニンが結合していないが (ThrRS1 とよぶ)、一方にはスレオニンが結合している (ThrRS2)。重

要なこととしてスレオニン結合部位には亜鉛が存在し、いくつかのアミノ酸側鎖が配位して



図 1 スレオニル tRNA 合成酵素の三次元構造

タンパク質と tRNA から構成されている。



図 2 スレオニル tRNA 合成酵素の二量体

おり、またスレオニンも亜鉛に配位する。この結合部位に関して分子動力学シミュレーションを安定的に行うことができるかどうかを検証するため、まずいくつかの計算条件（亜鉛の複数の力場パラメータ）でシミュレーションを実行した。またこの計算で得られた構造が妥当であるかを確かめるために QM/MM 計算により亜鉛を含む系の安定構造を計算し、力場による記述が妥当であることを確かめた。そしてスレオニンが取り込まれる過程における結合自由エネルギーを計算するためにアンブレラサンプリングの手法を用いた分子動力学シミュレーションを行った。スレオニン非結合型の結合部位（ThrRS1）と結合型の結合部位（ThrRS2）での結合自由エネルギー評価を行い、比較を行った。また ThrRS1 と ThrRS2 に対するそれぞれの結合部位における分子構造の比較も行った。

【結果】

スレオニン結合部位における亜鉛への配位構造については、ひとつの力場についてシミュレーションを安定的に行うことができることが分かった。この条件を用いた計算結果より、結合自由エネルギーや結合部位における分子構造の解析を行った。スレオニンの結合自由エネルギーを計算した結果は図 3 のようになった。結合部位にスレオニンが結合していた構造（ThrRS2）においては、スレオニンの結合自由エネルギーは結合時に低くなり、また外部と遷移状態との自由エネルギー差も小さいことが分かった。ThrRS1 では外部にある状態と結合状態で自由エネルギー差はほとんどない。ThrRS1 と ThrRS2 とでこのような差が生じる理由を理解するために、スレオニンと結合部位近傍のアミノ酸との距離分布を計算した。図 4 はスレオニンと近傍のアスパラギン酸（Asp383）の距離の分布を示している。この図より、ThrRS1 は Asp383 から遠く、ThrRS2 は近い位置を占めていることが分かる。スレオニンとアスパラギン酸との静電相互作用が安定化に寄与していると思われる。

以上に加えてスレオニンと他の類似したアミノ酸（セリン・バリンなど）を区別している機構を理解するために、他のアミノ酸を結合した状態での分子動力学シミュレーションを実行し、結合部位における分子構造の解析を行った。この結果より、スレオニンの選択において結合部位近傍の非極性アミノ酸残基が重要な寄与をしていることが分かった。

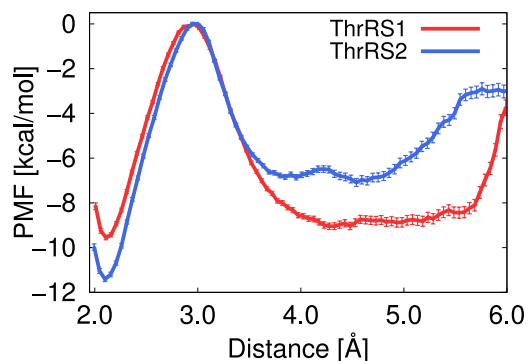


図 3 スレオニンの結合部位に対する自由エネルギープロフィール

スレオニンの N 原子と亜鉛間距離を反応座標にとっている。

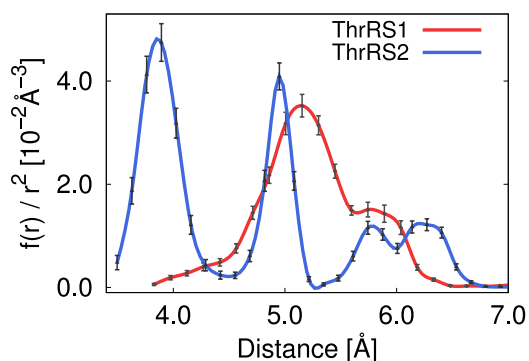


図 4 スレオニンと Asp383 との間の距離の分布

ThrRS1 と ThrRS2 のそれぞれにおけるスレオニンの重心と Asp383 側鎖の重心との距離に基づいて計算している。

光捕集複合体 FMO タンパク中の色素の励起状態に関する理論的研究

(琉大理¹, 分子研², 総研大³)○東 雅大¹, 齊藤 真司^{2,3}

Theoretical study on the excited states of pigments in the FMO protein

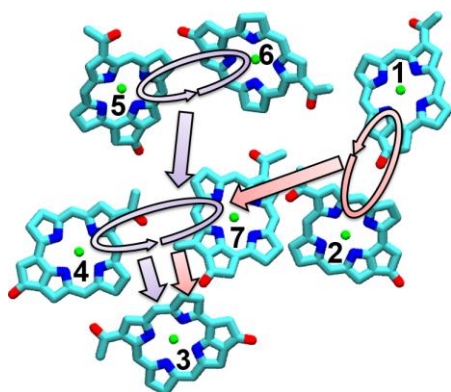
(University of the Ryukyus¹, Institute for Molecular Science², SOKENDAI³)Masahiro Higashi¹, Shinji Saito^{2,3}

図 1 : FMO タンパクにおける励起エネルギー移動

光合成系で吸収された光エネルギーは、光捕集複合体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。光捕集複合体の 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.* **2009**, *60*, 241)。FMO タンパクは内部に色素バクテリオクロロフィル *a* を 7 つ含む。この近接した 7 つの色素が相互作用することで、図 1 のように色素 1 や色素 6 で受け取ったエネルギーが励起エネルギー移動(EET)により色素 3

へ伝わると考えられている。一般的に EET の速度は色素の励起エネルギーの揺らぎが小さ過ぎても大き過ぎても低下するが、この EET の速度は数 ps 以下で量子効率ほぼ 100% と非常に高速・高効率であり、タンパク質は色素の励起エネルギーの揺らぎを最適化していると考えられている。しかし、このように複雑に相関している系について、タンパク質の微細な構造や揺らぎの役割を実験結果だけから理解することは難しい。一方、理論計算においても、タンパク質の構造や揺らぎの役割の解析には、従来の手法では非常に多くの構造で高コストな量子化学計算を行わなければならない、世界最高クラスの京コンピュータを用いてもほぼ不可能である。そこで本研究では、色素の励起エネルギーの大きさと揺らぎを効率的に解析可能な手法(Molecular Mechanics with Shepard Interpolation Correction, MMSIC 法)を開発し、その手法を用いて FMO タンパク中の異なる環境に置かれた色素の励起エネルギーの大きさと揺らぎを解析した。

MMSIC 法では、分子力場と修正 Shepard 内挿法を組み合わせることで、僅かな量子化学計算の結果から大域的なポテンシャル関数を高精度・低コストに生成する(M. Higashi & S. Saito, *J. Chem. Theory Comput.* **2016**, in press)。また、FMO タンパク中では色素の励起エネルギーが密集して揺らいでいるため、量子化学計算手法の精度が重要となる。そこで、我々が開発した様々な溶媒中におけるバクテリオクロロフィル *a* の吸収エネルギーや再配向エネルギーを正しく記述可能な量子化学計算手法(M. Higashi et al., *J. Phys. Chem. B* **2014**, *118*, 10906)を用いた。この 2 つの手法を組み合わせ分子動力学(MD)シミュレーションを効率的に行うことで、FMO タンパク中の 7 つの色素の励起エネルギーの大きさ並びに揺らぎを解析した。

6 ns の MD シミュレーションから得られた FMO タンパク中の7つの色素の励起エネルギーの分布は図 2 のようになった。色素の周囲の環境によって分布の幅が異なり、色素 2 と色素 5 の分布は他の色素の分布よりも幅広く、またガウス分布から大きく外れた。

次に、得られた分布のピーク値を実験スペクトルのフィッティングから見積もられた励起エネルギーと比較した(図 3)。過去のフィッティングの結果では、色素 3 が最小、色素 5 が最大となっていたが、これまでの分子シミュレーションを用いた理論計算では、この傾向を再現することができなかった。我々の計算では、実験スペクトルにフィッティングせずに、色素 3 と色素 5 だけでなく全ての色素について、ほぼ定量的に実験値を再現することに成功した。

さらに、励起エネルギーの揺らぎの大きさを表す Spectral Density を計算した(図 4)。Spectral Density は7つの色素のうち色素 3 だけ実験的に測定されているが、我々の計算は形状だけでなくピーク位置も含めてよく再現した。また、7つの色素の中で励起エネルギーの大きい色素 2 と色素 5 の揺らぎが他の 5 つと大きく異なることを明らかにした。この 2 つの色素の揺らぎの大きさが異なる要因を解析したところ、色素 5 については、色素周辺のタンパク質により色素のアセチル基が歪み、揺らぎが大きくなっているためと分かった。また色素 2 については、色素周囲の極性の高い環境により基底状態と励起状態の双極子モーメントの差が増幅されており、周囲の残基との相互作用が大きいためと明らかにした。これらの結果は、EET ダイナミクスに大きな影響を与えるものであり、本研究で初めて明らかになったものである。

現在、色素の励起エネルギーと同様に EET ダイナミクスに重要な色素の励起状態間のカップリングを効率的に計算可能な手法を開発し、FMO タンパク中の色素間のカップリングの大きさと揺らぎを解析中である。詳細は当日議論する予定である。

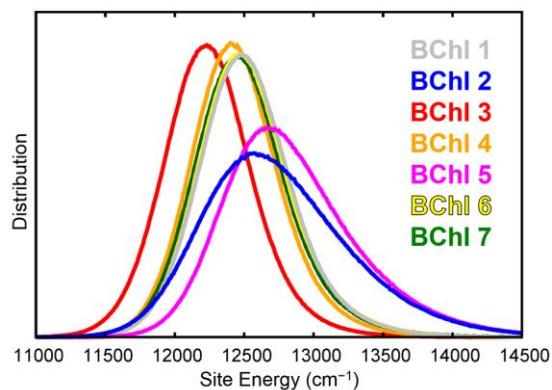


図 2 : 各色素の励起エネルギーの分布

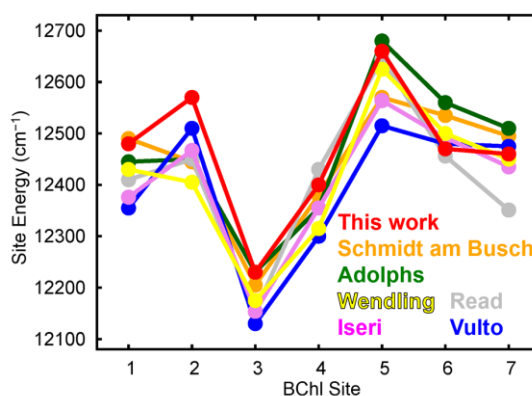


図 3 : 過去の研究との励起エネルギーの比較

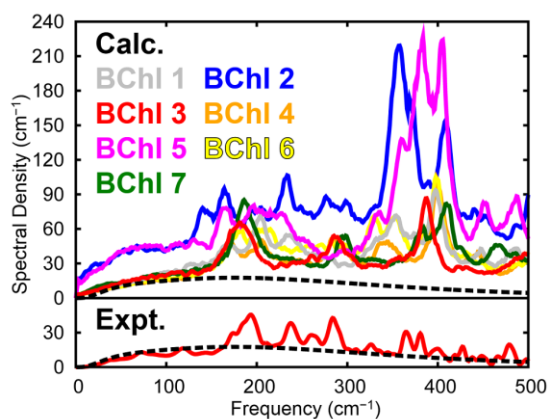


図 4 : 各色素の Spectral Density

1F10

フェムト秒からマイクロ秒領域における光合成光保護過程の観測

(熊本大・パルス研¹、関学大・理工²、大阪市大・理³)

小澄大輔¹、堀部智子²、杉崎満³、橋本秀樹²

Photosynthetic photo-protection processes in the time-region from femtosecond to microsecond

(¹Institute of Pulsed Power Science, Kumamoto Univ., ²Graduate School of Science and Technology, Kwansei Gakuin Univ., Graduate School of Science, ³Osaka City Univ.)

Daisuke Kosumi¹, Tomoko Horibe², Mitsuru Sugisaki³, Hideki Hashimoto²

【序論】 植物、藻類、細菌類の光合成ではアンテナ系が光を吸収し、そのエネルギーを反応中心で電気化学エネルギーに変換する。反応中心における機能・構造は、植物、藻類、細菌類等にかかわらずおおよそ保存しているのに対し、アンテナ系は生息環境に依存し多様性に富んでいる[1]。例えば紅色光合成細菌の周辺アンテナ LH2 では、光合成色素であるカロテノイド (Car) とバクテリオクロロフィル (BChl) 分子が周辺たんぱく質によりリング会合体を形成する (図 1(A))。アンテナ系は、効率的な光捕集・エネルギー伝達を行う一方で、過剰な光から生体系を保護する。光合成系では余剰エネルギーにより、酸素との反応性が高い三重項状態 BChl が発生する。三重項酸素と三重項 BChl 間のエネルギー伝達により、生体に有害な一重項酸素の生成されるため、三重項 BChl の除去あるいはその生成阻害により、一重項酸素の生成を阻害している。このような光合成系における光保護過程は、フェムト秒～サブミリ秒といった広範囲の時間領域で起こるため、その全容解明にはこのような広い時間領域を網羅可能な時間分解分光手法が必要となる。従来用いられていたポンプ・プローブ分光では、フェムト秒パルスを使用する場合、高い時間分解能は得られるものの測定範囲は数ナノ秒程度に限定されている。ナノ秒パルスを使用する場合には、ミリ秒以上の広範囲測定が可能であるものの、時間分解能は数十～百ナノ秒に制限される。そのため、数ナノ秒～百ナノ秒の時間領域が光合成過程におけるミッシングゾーンとなっている。本研究では、フェムト秒～マイクロ秒領域をカバー可能なポンプ・プローブ分光を用いて紅色細菌由来光合成アンテナ LH2 における光保護過程の解明を行った。

【実験】 時間分解分光測定において、フェムト秒～ピコ秒領域では従来のポンプ・プローブ分光手法を用いた[2]。サブナノ秒～サブミリ秒領域では、フェムト秒ポンプパルスとサブナノ秒プローブパルスの遅延時間を電氣的に制御し、プローブ光を高速ダイオードアレイで検出することで、高い時間分解能と高感度検出を実現している

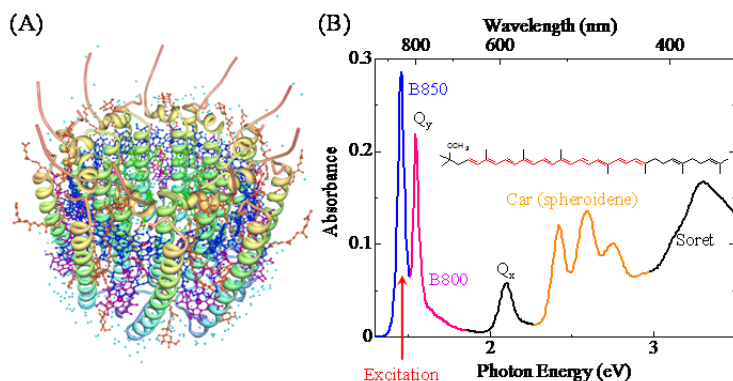


図 1 (A)紅色細菌由来光合成アンテナ LH2。(B) LH2 の定常吸収スペクトル。

[3,4]。LH2 は、紅色細菌 *Rhodospirillum rubrum* 2.4.1 から単離・精製を行った後、界面活性剤を混入した 20mM tris HCL バッファーに分散させた。図 1(B)は、単離された LH2 の定常吸収スペクトルを示す。500 nm 付近の吸収は Car (spheroidene) に由来する。800 nm 近辺の吸収は BChl の最低励起一重項状態 Q_y に帰属され、

LH2 中の 2 つのリング会合体 B800, B850 に由来する。時間分解分光測定では B850 帯を励起し、その後のダイナミクスを観測した。

【結果と考察】 図 2(A)に LH2 の B850 帯を励起後のサブナノ秒～マイクロ秒領域における光誘起吸収スペクトルの時間変化を示す。光励起直後に B850 に由来する褪色及び過渡吸収信号が 850 nm 付近に観測された。これらの信号は時間の経過とともに減少し、それに伴い 530 nm の過渡吸収及び Car の褪色信号が現れた。この 530 nm の信号は、Car の励起三重項状態 T_1 の過渡吸収信号であることが報告されており[5]、この結果は BChl から Car への三重項状態間エネルギー移動であることを示している。図 2(B)に BChl の褪色信号、Car の褪色及び T_1 過渡吸収信号の時間変化を示す。BChl の減衰には、2 つの指数関数成分が含まれ、それぞれ 1.2 ns (92%)と 16.7 ns (8%)であった。一方、Car 由来の信号は、16.7 ns で立ち上がり、5.5 μ s で減衰した。この結果から、B850 の Q_y 状態を光励起後 1.2 ns で BChl T_1 への項間交差が起こり、その後 16.7 ns で Car の T_1 への励起三重項状態間エネルギー移動が起こると考えられる。BChl の T_1 寿命は数十マイクロ秒以上であることから、LH2 における BChl-Car 間の三重項エネルギー移動効率は 100%に達している。一方、BChl の時間依存性に含まれる 2 つの指数関数の成分比から、BChl 分子の三重項生成率は 10%以下であり、これまで報告されている値 (30%)を大きく下回ることが示された。この違いについて検証するため、フェムト秒ポンプ・プローブ分光を用いて観測した B850 帯の褪色信号の時間依存性を図(3)に示す。時間依存性には、0.6 ps (56%)と 1.2 ns (44%)の二成分が含まれ、速い成分は B850 リング内に多励起状態が生成されたことによる対消滅過程であることが知られている[6]。この過程は励起光強度に依存することが知られているが、本研究の励起光条件 (20 nJ/pulse)では、B850 に生成された励起状態のうち 56%が対消滅過程により失活していることが示された。このように LH2 では様々な機構により、過剰な光から生体を保護していることが明らかになった。

参考文献

- [1] T. Polívka, H.A. Frank, *Acc. Chem. Res.* 43 (2010) 1125.
- [2] D. Kosumi, T. Kusumoto, R. Fujii, M. Sugisaki, Y. Inuma, N. Oka, Y. Takaesu, T. Taira, M. Iha, H.A. Frank, H. Hashimoto, *Chem. Phys. Lett.* 483 (2009) 95.
- [3] A. Ito, A. Shimizu, N. Kishida, Y. Kawanaka, D. Kosumi, H. Hashimoto, Y. Teki, *Angew. Chem., Int. Ed.* 53 (2014) 6715.
- [4] D. Kosumi, T. Horibe, M. Sugisaki, R.J. Cogdell, H. Hashimoto, *J. Phys. Chem. B* 120 (2016) 951.
- [5] T.G. Monger, R.J. Cogdell, W.W. Parson, *Biochim. Biophys. Acta* 449 (1976) 136.
- [6] G. Trinkunas, J. Herek, T. Polívka, V. Sundström, T. Pullerits, *Phys. Rev. Lett.* 86 (2001) 4167.

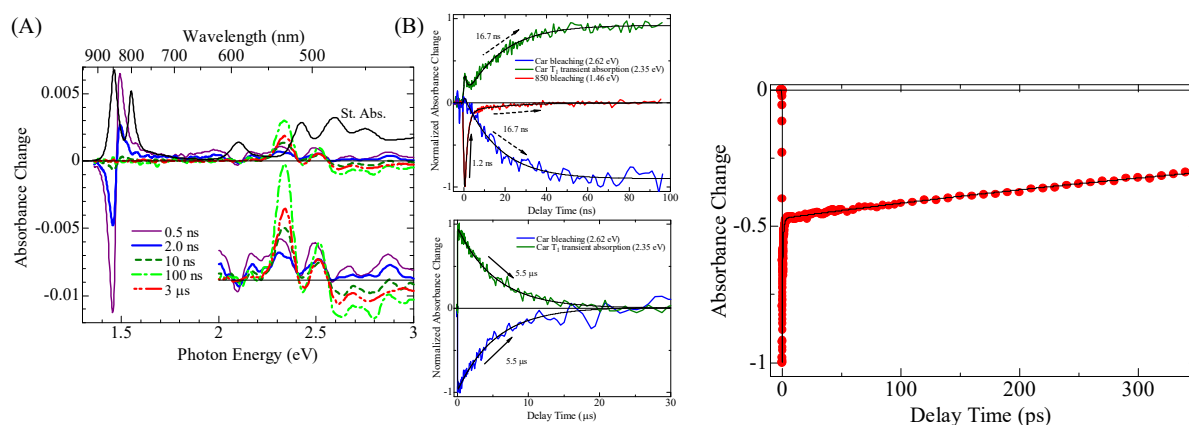


図 2 (A)サブナノ秒ポンプ・プローブ分光における B850 帯を励起後の光誘起吸収スペクトル及び、(B)その時間変化。図 3 フェムト秒ポンプ・プローブ分光で観測した B850 帯褪色信号の時間変化。