

1P107

イクオリン生物発光に対するセレンテラジンのイオン化状態の影響

(阪大院理) ○磯部寛, 奥村光隆, 倉光成紀, 山口兆

【序】イクオリンはオワンクラゲから分離された発光タンパク質で、カルシウムイオンとの結合により発光が誘起されるため、細胞内のカルシウムイオン濃度を測定するための指示薬として医学、生命科学の分野における応用が注目されている。イクオリンのX線結晶構造解析の結果からは、発色団であるセレンテラジン**1**と酸素分子から生じる2-ヒドロペルオキシド体**2**がアポタンパク質と複合体を形成していることが分かっている[1]。発光機構に関しては、カルシウムイオンが結合することで生じるタンパク質の構造変化によりペ

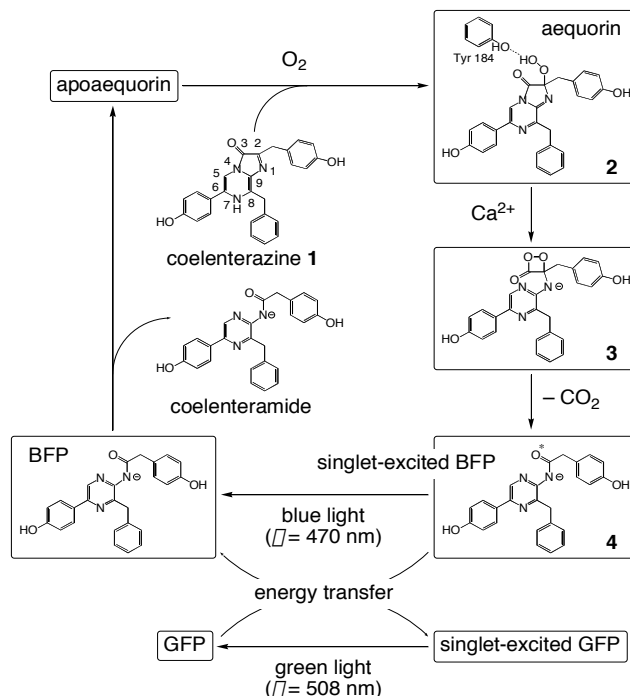


図1 オワンクラゲ生物発光における分子過程

ルオキシドを安定化させている Tyr184 との水素結合が切れ、図1に示す McCapra/Chang 機構[2,3]によりジオキセタン構造**3**を経て励起セレンテラミド**4**と二酸化炭素に分解すると推測されているが、詳細はまだよく分かっていない。本研究では、量子化学計算により McCapra/Chang 機構の検討を行った。

【計算方法】まず、セレンテラジンの可能なイオン化状態に対して、気相中におけるジオキセタン中間体の分解反応機構を密度汎関数法(B3LYP)により調べ、発光活性とイオン化状態との関連性の解明を試みた。次に有機溶媒中でのセレンテラジンとイミダゾールとの間のプロトン交換自由エネルギーを計算し、その溶媒依存性及びセレンテラジンの閉環に伴う pK_a 変化を調べた。溶媒和自由エネルギーは連続体モデル(PCM)を用いて計算した。最後に、図2に示すようなイクオリンのセレンテラジン結合部位のモデルに対して2-ヒドロペルオキシドとヒスチジン残基(イミダゾール)との間のプロトン交換エネルギーを計算し、基質結合部位周辺のアミノ酸、特に三つある Tyr-His-Trp トライアドによる pK_a 調節機構を調べた。構造パラメーターはX線構造解析から得られたデータ[1]を用いて、一部最適化した。

【結果・考察】気相中のジオキセタノンの分解反応は2つの類型に分類されることが分かった。中性状態やイミノ基がイオン化したモノアニオン状態の場合、O-O結合が均等に開裂するビラジカル反応になり、活性化エネルギーは大きくなる($E_a = 15\text{--}30 \text{ kcal mol}^{-1}$)。この場合、強いスピン-軌道相互作用により三重項セレンテラミドが優先的に生成するため、発光効率は低下すると考えられる。一方、これら以外のモノアニオン、ジアニオン、トリアニオン状態のときは電荷移動反応になり、比較的容易に分解して($E_a < 10 \text{ kcal}$

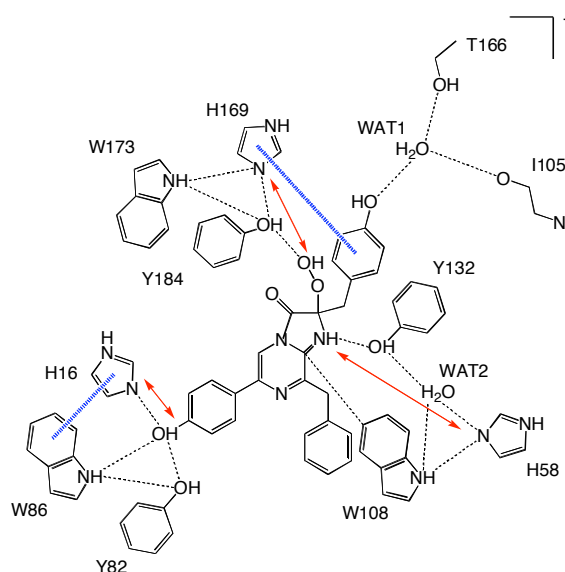


図2 セレンテラジン結合部位

mol^{-1})、一重項励起セレンテラミドを生成すると予想される[4]。すなわち、発光活性のためには二つあるフェノール性水酸基のうち少なくとも一つがプロトン解離している必要があると考えられる。ジアニオンの場合、二か所でのプロトン解離効果が協同的な場合と拮抗的な場合があることが分かった。前者は大きな共鳴安定化が関与しており、Whiteらによって提出されたジオキセタノン中間体を介さない電荷移動機構[5]と類似している。2-ヒドロペルオキシドの段階では、ベンゼンのような非極性溶媒中ではイミノ基のプロトン解離が特に促進されるが、アセトニトリルやDMSOのような極性溶媒では2位の水酸基も比較的イオン化し易くなることが分かった。一方、ヒドロペルオキシド基のイオン化とそれに伴う閉環反応において、イミノ基や2位の水酸基の $\text{p}K_a$ は大きく増加するが、6位の水酸基の $\text{p}K_a$ 変化は小さいことが分かった。図2に示すモデル複合体では、全体の電荷が0のとき水素結合ネットワークを介してHis58がセレンテラジンのイミノ基からプロトンを引き抜く傾向が特に強いが、カチオン状態になるとHis169・His16によるヒドロペルオキシド基・6位の水酸基のプロトン引き抜きが最も起こり易いことが分かった。His169とHis16のイミダゾール基は、図2に示すようにTrp86やセレンテラジン(2位のフェノール基)と積層しており、これらの間のカチオン- π 相互作用は非常に大きいことが分かった。トリプトファンや基質の芳香族的性質(ベンゼン環の四重極子)はセレンテラジンを活性なイオン化状態へと導く上で重要な役割を果たしていると考えられる。

【参考文献】 [1] J. Head et al. *Nature* **2000**, 405, 372. [2] F. McCapra and Y. C. Chang *Chem. Commun.* **1967**, 19, 1011. [3] E. S. Vysotski et al. *Acc. Chem. Res.* **2004**, 37, 405. [4] H. Isobe et al. *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, 127, 8667. [5] E. H. White et al. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, 109, 5189.