1E1515

Photoactive Yellow Protein 発色団の pKa シフトに関する量子化学的研究

○櫻井 実、依田 真樹、井上 義夫（東工大院生命理工）

PYP は Cys 残基にチオールエステル結合した p-クマル酸を発色団として持つが、その吸収波長や pKa は、光反応サイクル中大きな変化を示すことが知られている。われわれの研究目的は、これらの変化を consistent に説明する分子モデルを計算化学的に構築し、最終的に“光サイクルがなぜ回るのか”を解釈することにある。昨年度は、溶媒効果実験と連続体モデルを用いた分子軌道計算より、主として波長シフトの解析を試みたが、本年は pKa シフトの原因を探るべく、同じく連続体モデルに基づく計算と、全原子を考慮に入れた分子軌道計算を行った。連続体モデルの計算は、Gaussian98 プログラムを用いて Hartree-Fock または DFT レベルで行った。また、全原子計算は MOPAC2000 プログラムを用いて行った。pKa について興味ある実験事実は、基底状態 (PG) では、クマル酸のフェノール性 OH が解離し、その近傍の Glu46 がプロトン化しているが、PB 中間体では、プロトンがクマル酸側へ移動することである。特に、PG 状態における発色団の解離は、溶液中のクマル酸と Glu の pKa 値 (それぞれ、約 8 と 4) からは解釈できない。連続体モデルの結果によれば、用いた近似や溶媒モデルによらず、低誘電率側では、Glu の pKa がクマル酸のそれより大きいこと、また、これらの pKa 差は誘電率の増大に伴い 15 程度小さくなることが示された。これより、PG におけるプロトン化状態は、発色団およびその近傍が蛋白質内部 (誘電率 4 程度) に埋もれていると仮定することにより説明できる。このことは、X 線構造に基づいた全原子分子軌道計算からも支持された。講演では、水溶液および結晶状態における PB 中間体の pKa についても議論する。

M.Sakurai, M.Yoda, Y.Inoue : Quantum chemical study of pKa shifts of the chromophore of photoactive yellow protein

1E1600

バクテリオロドプシンの光異性化プロセスの励起状態ダイナミクスシミュレーション

○倭 剛久¹、山本 茂義²、垣谷 俊昭¹ (¹名大・院理・物理、²中京大・教養)

バクテリオロドプシンは光駆動プロトンポンプの機能をもつ膜蛋白質である。このプロトンポンプの分子機構は生命科学の重要な問題のひとつに挙げられる。我々はバクテリオロドプシンのフォトサイクルの初期段階である発色団レチナールの光異性化のプロセスを計算機実験で調べている。これまでの研究で、シッフ塩基プロトン近傍の水分子の光異性化反応に対する寄与、レチナール近傍の水素結合ネットワークの重要性などを指摘してきた。本研究ではレチナール骨格のボンド長の緩和に焦点をあて、バクテリオロドプシンのレチナール異性化反応の機構について研究した。我々は ab initio 分子軌道計算を用いてレチナールの励起状態のポテンシャル面を調べた。異性化の反応座標である C13=C14 ボンドのねじれに沿ってエネルギー面を解析した。レチナール骨格のボンド長を緩和させない場合、励起状態と基底状態間のエネルギーギャップは 1 eV 程度であった。さらに、計算機シミュレーションから得られる反応座標の時間変化の値を考慮すると、Landau-Zener の断熱パラメータを評価できる。この場合、断熱極限が妥当であるという結果になった。一方、レチナール骨格のボンド長を緩和させた場合にはエネルギーギャップが著しく減少した。この場合は異性化の反応がより非断熱的になった。ボンド長の緩和により変化するレチナール骨格のボンド長は高々 0.01 Å 程度であるため、その結果が構造的に異性化反応に寄与するとは考えがたい。ボンド長の緩和は、むしろ、励起状態から基底状態への量子力学的な遷移確率を増大させるために重要な役割を果たしていると考えられる。

T.Yamato, S.Yamamoto and T.Kakitani : Excited-state dynamics simulation of the photoisomerization process of bacteriorhodopsin

1E1530

全原子分子軌道計算によるバクテリオロドプシンの pKa シフトの解析

○神谷 成敏、大野 一樹、中島 佐和子、井上 義夫、櫻井 実（東工大・院生命理工）

バクテリオロドプシン (bR) は 1 回の光サイクルで膜の内側から外側に 1 個のプロトンポンプする。プロトンポンプのメカニズムを解明するためには、bR 及び各光反応中間体における解離性アミノ酸残基の pKa を求めることが重要である。レチナールシッフ塩基 (RSB) の pKa は均一溶媒中では 7.0 であるのに対し、bR 状態では > 13 である。この pKa シフトの原因としては、タンパク質の高次構造に由来する異方的静電場および電子分極の効果が重要であると考えられる。本研究では、これらを明示的に考慮に入れるため、X 線回折構造を基に全原子を含む分子軌道計算を実行し、bR および M 中間体における RSB の pKa を評価した。

bR, M 中間体それぞれについて、プロトン化型 RSB、脱プロトン化型 RSB を持つ 2 種類の発色団を作成し、全水素原子、全側鎖原子、全レチナール原子、全水分子の構造最適化を行った。bR では Arg 82, Asp 85, Asp 212 のプロトン化状態を荷電状態とし、他のアミノ酸側鎖の電荷は全て中性状態とした。M では上記の 3 アミノ酸残基に加えて Glu 194, Glu 204 のプロトン化状態を変化させ、最安定なプロトン化状態を求めた。全原子分子軌道計算には半経験的分子軌道計算プログラム MOPAC2000 を用い、ハミルトニアンを AM1、cutoff distance (cutoff 内では量子化学計算を行う) を 7 Å とした。レチナールまたはレチナールと周辺のアミノ酸モデル錯体について COSMO 法により溶媒効果計算を行い、全原子を考慮した結果と比較することで、タンパク質の有効誘電率やレチナールの pKa シフトを評価した。講演では、1) 全原子計算と溶媒効果計算によるタンパク質の有効誘電率、2) bR と M 状態に対する pKa シフト、3) M における種々のプロトン化状態の相対エネルギーとプロトン移動との関係、等について議論する。

N. Kamiya, K. Ohno, S. Nakajima, Y. Inoue and M. Sakurai : Theoretical analysis of pKa shifts of bacteriorhodopsin using a linear scale molecular orbital method

1E1615

複合時間軸吸収分光法によるバクテリオロドプシンの N 中間体の生成速度定数の直接測定

○和田 陽一郎、大谷 弘之 (東工大院・生命理工)

序論 バクテリオロドプシン (bR) は、レチナールの光異性化を起点とし、熱反応により 5 つの中間体を経て再び bR にもどる光サイクルと呼ばれる一連の反応を行う。反応開始後の過渡種の生成と崩壊の時定数を決定するのに、時間分解吸収分光は強力な手法であり、M や O の時定数が決定できる。しかし、この手法によって直接得られるのは bR との差スペクトルの変化であるから、重なった吸収スペクトルをもつ N は、どの波長で観測しても他の化学種よりもモル吸光係数の差が小さく、生成の時定数は決定できない。それゆえ今までは M から N ができることを仮定し、568 nm で見られる 2 成分の時定数のうちの約 3 ms を N の生成の時定数、約 8 ms の成分を O から bR が生成する時定数と帰属してきた。そこで我々は、複合時間軸吸収分光法 (反応開始後、任意の時刻に注目する化学種を励起、吸収スペクトルの大きくシフトした光生成物の量を吸収分光法により定量する。こうして、化学種の濃度の遅延時間依存性を得る。) を採用した。N の光生成物 Q と、bR の光生成物 M に注目し、N と bR についてこの手法を用い、生成と崩壊の時定数を直接的に求めた。

試料 塩濃度 0.1 M、Tris 緩衝液によって pH 6.9 ~ 7.2 にした紫膜懸濁液

結果 複合時間軸吸収分光法によって、N の生成の時定数 3.1 ± 0.5 ms、崩壊の時定数 10.2 ± 0.9 ms、bR の回復の時定数 8.1 ± 1.0 ms を得た。N の生成の時定数と M の崩壊の時定数の一致より、N から M ができることを証明できた。また、N の生成の時定数と bR の回復の時定数、568 nm の 2 成分の時定数の一致は予想が正しかったことを示唆している。

Y.Wada and H.Ohtani : Measurement of the formation rate constant of the N intermediate of bacteriorhodopsin by dual time-base absorption spectroscopy