3P289

ホタルジオキセタノン分解過程による電子励起状態オキシルシフェリン生成の理論的研究

○酒井 博則¹、和田 直久¹、楠 正美² (¹東洋大生命、²明大理工)

ホタルの生物発光では発光基質ルシフェリンが ATP、Mg²⁺、酸素添加酵素ルシフェラーゼの存在下で、ルシフェラーゼによる酸素添加反応を経て4員環状過酸化物構造のジオキセタノンという不安定分子種を形成し、これが分解されることで CO₂ と励起状態オキシルシフェリン (Oxyl^{*}) を生成する。Oxyl^{*} は直ちに基底状態へと遷移し、可視光を極めて効率的に放出する。その発光収率は 88 % と評価されている。しかしながら、1) 酵素の活性部位、2) ジオキセタノン形成・分解過程におけるイオン化状態とコンフォメーション、3) 発光量子収率が極めて高い理由、4) 同一のルシフェリンを持つ異なるホタル種で発光波長が異なる理由といったことは、量子化学的にほとんど説明されていない。本研究では密度汎関数法・B3LYP により、ジオキセタノンのニュートラル、アニオン、それぞれの遷移状態、平衡状態構造について電子状態を計算し、活性化エネルギーを求めた。その結果、アニオンの活性化エネルギーが約 8kcal/mol、ニュートラルの活性化エネルギーが約 23kcal/mol であることから、ジオキセタノンが分解される際にはニュートラルよりもアニオンのほうが適していることが示唆された。また、ジオキセタノンは、ベンゾチアゾール環と、チアゾリン環との結合軸の周りの回転により、シス・トランス異性化構造を取りうるが、両者の間には目立った活性化エネルギーの差が認められなかった。ホタルの発光反応では他に脱プロトン化、脱水、酸素付加反応が起きるが、特に脱プロトン化について、基質ルシフェリンが酵素の疎水性領域に取り込まれると考え、酵素の活性中心に含まれると仮定したヒスチジンとルシフェリンまたはジオキセタノンとの水素結合状態の計算を行い、ヒスチジンによる脱プロトン化の妥当性を判定した。

H. Sakai, N. Wada and M. Kusunoki : Theoretical study of decomposition process of firefly dioxetanone to generate electronic excited oxyluciferin

3P291

DNA 依存性プロテインキナーゼが介在する可逆的な DNA 高次構造変換

○高萩 真彦¹、吉川 祐子² (¹放医研・安全研究、²名古屋文理短大・食栄)

DNA 依存性プロテインキナーゼ (DNA-PK) は、DNA の二本鎖切断損傷の修復過程を制御する動物細胞における DNA 修復因子である。DNA-PK は DNA 依存的なキナーゼ活性本体である DNA-PKcs と、その活性本体と DNA 末端で相互作用しキナーゼ活性化に寄与する Ku70/Ku86 heterodimer より構成される。我々は、溶液中における巨視的な分子動態の解析から、これらの蛋白質が DNA の高次構造を制御する因子であると考え、従来にはない視点から特徴付けを行った。

DNA-PK 構成蛋白質における DNA 高次構造への関与を評価するために、YOYO-1 蛍光試薬で標識した T4 phage DNA (166 kbp) を基質に用い、蛋白質が引き起こす DNA の分子形態変化を蛍光顕微鏡により観察した。DNA 末端と 1 対 1 で結合する条件より過剰に DNA-PKcs が存在すると、濃度依存的に T4 DNA はランダムコイルから密に凝縮したグロビュールな状態へと分子内相変化することが見出された。また、DNA-PKcs によって部分凝縮した構造は、Ku の添加によって凝縮度のより高い産物へと変化した。興味深いことにこれらの凝縮構造は、ATP と反応してランダムコイル状態へと容易に変換されることがわかった。一方、予め Ku と結合した DNA では、DNA-PKcs による DNA の凝縮化は認められなかった。以上の結果は、DNA-PK がキナーゼ活性とは独立に DNA 構造変換に関わる要件を示すとともに、この機能が自身のキナーゼ活性により可逆的に制御されることを示唆する。

M. Takahagi and Y. Yoshikawa : DNA-dependent protein kinase mediates the higher-order transition of DNA conformation

3P290

非弾性トンネル機構が引き起こす蛋白質中電子移動速度の異常なエネルギーギャップ依存性

○西岡 宏任¹、木村 明洋¹、倭 剛久¹、河津 励²、垣谷 俊昭³ (¹名大院・理・物理、²Duke U. 化学、³名城大・理工)

蛋白質中電子移動の反応速度 k_{DA} は、通常 Marcus の式 $k_{DA} = \frac{2\pi}{\hbar} |T_{DA}|^2 \frac{1}{\sqrt{4\pi\lambda k_B T}} \exp[-\frac{(-\Delta G - \lambda)^2}{4\lambda k_B T}]$ を用いて評価される。ここで、 T_{DA} は電子トンネル行列要素、 $-\Delta G$ は反応の自由エネルギーギャップ、 λ は再配置エネルギーである。この式では、 T_{DA} が核の運動に依存しないと仮定 (Condon 近似) されているが、計算機シミュレーションより観測される T_{DA} は、蛋白質構造の熱揺らぎにより数 10fs で激しく変動する。この Condon 近似の破れが、電子移動の反応速度にどのような影響を及ぼしているのかはまだ解決されていない。

そこで我々は、Condon 近似を用いない次の反応速度式を開発した。

$$k_{DA} = \frac{2\pi}{\hbar} \int_{-\infty}^{\infty} d\epsilon P(\epsilon) \frac{1}{\sqrt{4\pi\lambda k_B T}} \exp[-\frac{(-\Delta G - \lambda - \epsilon)^2}{4\lambda k_B T}]$$

$P(\epsilon)$ は、シミュレーションから得られた T_{DA} の自己相関関数をフーリエ積分し、それを量子補正することで得られる。この式には、電子が移動する際に見掛けのエネルギーギャップを $-\Delta G$ から $-\Delta G - \epsilon$ と変化させる、非弾性トンネル機構の寄与が含まれる。まず光合成バクテリア反応中心に対してシミュレーションを行い、Bacteriopheophytin (Bph) から primary quinone (Q_A) への電子移動系の $P(\epsilon)$ と k_{DA} の理論計算を実行した。 k_{DA} の $-\Delta G$ 依存性を調べると、 $|\Delta G|$ の大きな領域では非弾性トンネル機構が大きく働き、Marcus の式から予想されるよりも遥かに緩やかな減少になることが分かった。このような異常なエネルギーギャップ依存性は幾つかの実験で観測されており、これらに対して non-Condon 効果による解析を行った。

H.Nishioka, A.Kimura, T.Yamato, T.Kawatsu, and T.Kakitani : Anomalous Energy Gap Dependence of the Rate of Electron Transfer in Protein Environment Caused by Inelastic Tunneling Mechanism

3P292

過酸化水素の細胞毒性に対するコバルトの効果

○野村 保友¹、藤原 宏之²、佐藤 道比古³、高橋 英嗣⁴、馮 忠剛²、中村 孝夫¹ (¹山形大院・医学系・生命環境、²山形大・工・応用生命、³山形大・医・実験実習機器センター、⁴山形大・医・腫瘍分子)

活性酸素は虚血再灌流障害に重要な役割を果たしており、タンパクや脂質を攻撃するばかりでなく、核・ミトコンドリアゲノムを傷害し、アポトーシスやネクローシスを引き起こす。しかしあらかじめ短時間の虚血処理 (プレコンディショニング) すると細胞死が抑制されることが知られている。プレコンディショニングは低酸素誘導因子を活性化させる。低酸素誘導因子はコバルト処理によっても活性化され、赤血球産生、血管新生、解糖系酵素誘導に加えて、抗酸化作用を持つヘムオキシゲナーゼの発現を促進することが指摘されている。またコバルトが活性酸素を生成して細胞毒性を示すことも報告された。本研究ではプレコンディショニングによる細胞死抑制に対する低酸素誘導因子の役割を検討するために、過酸化水素の細胞毒性に対するコバルト処理の効果を調べた。293 細胞を H₂O₂ および CoCl₂ で処理し、細胞増殖、DNA の損傷、誘導が期待されるいくつかのタンパクの発現を比較し、H₂O₂ および CoCl₂ 処理の効果を詳細に検討した。0.4 mM H₂O₂ は細胞増殖を強く抑制し、核 DNA よりミトコンドリア DNA を強く損傷した。0.1 mM CoCl₂ では細胞増殖に影響がなく、低酸素誘導因子を活性化した。あらかじめ 0.1 mM CoCl₂ で処理すると、H₂O₂ によるストレス応答は一過性の分裂停止にとどまり、6 日目には細胞増殖を再開した。これらのデータはコバルトが酸化的ストレスをもたらすというよりはむしろ H₂O₂ による細胞毒性を軽減することを示唆した。

Y. Nomura, H. Fujiwara, M. Sato, E. Takahashi, Z. Feng, T. Nakamura : Alteration in oxidative stress responses by the pretreatment with CoCl₂