膜貫通型光受容タンパク質の計算機シミュレーション

櫻井 実

東京工業大学バイオ研究基盤支援総合センター 〒226-8501 神奈川県横浜市緑区長津田町4259-B-62

Computer Simulation of Some Transmembrane Photoreceptors

Minoru Sakurai

Center for Biological Resources and Informatics, Tokyo Institute of Technology
B62-4259 Nagatsuda-cho, Midori-ku, Yokohama 226-8501, Japan

Here, we describe the results of computer simulations for some retinal proteins. In our simulations, the membrane environments surrounding the proteins were treated at three different levels of approximation : 1) neglect of the membrane (protein placed in vacuo), 2) low dielectric continuum, and 3) more realistic model that explicitly takes into account all the atoms of phospholipids and water molecules. Under approximation 1), we calculated the excitation energies of several retinal proteins using a QM/MM-CI theory recently developed by us. There was found a good correlation between the calculated and observed data. Under approximation 2), the binding affinity between phoborhodopsin and transducer protein (HtrII) was estimated using linear-scaling molecular orbital calculations. According to our calculations, the tendency of the observed binding affinity, including the effect of mutation at Tyr199, was successfully reproduced if the dielectric constant of the membrane region is assumed to be about 4. Finally, we discuss the outlook for molecular dynamic simulations based on approximation 3).

Key words : molecular orbital calculation / molecular dynamics simulation / rhodopsin / solvent effect / excitation energy / signal transduction

1. はじめに

生物における光受容の多くは、細胞膜中に埋め込まれた光受容タンパク質により行われる。たとえば、動物の視覚を司るロドプシンというタンパク質は、視細胞の桿体外節に存在するディスク膜

中に埋め込まれている。ロドプシンに代表されるレチナールを発色団に持つ一連のタンパク質は、動物の視細胞のみならず、古細菌にも存在し光駆動イオンポンプや光走性のセンサーとして働いている。近年、これら膜タンパク質の構造解析が精力的に行われ、やっと計算機シミュレーションに

基づく原子レベルでの機能発現機構の解明が可能になってきた。本稿では、特にレチナールタンパク質に焦点を絞り、膜タンパク質の計算機シミュレーションの一端を紹介する。

レチナールタンパク質は、いずれも α ヘリックスが7回膜を貫通した立体構造をもつ。このようなタンパク質の機能を正確に評価するためには、膜環境（リン脂質二重膜）をどのようにモデル化するかが鍵となるが、次の3つの粗視化レベルの異なるモデルが考えられる。すなわち、1) 基本的に膜環境を無視する（タンパク分子を真空中の孤立分子として扱う）、2) 膜環境を誘電体モデルで近似する、3) 膜およびその両側の水層を含めて、できるだけ実在の系に近い（すべての原子を明示的に扱う）モデルを構築する。

2. 孤立分子モデル

前述した 1) のモデルは、一見大胆すぎるように思われるが、タンパク質のほぼ中央内部に存在する活性部位の光吸収機構や電子状態を評価するには十分のようである。われわれは、独自に開発した Quantum Mechanics/Molecular Mechanics-Configuration Interaction (QM/MM-CI) 理論を用いて、数種のレチナールタンパク質の励起エネルギーを評価し、実験値の傾向をよく再現することを確かめた^{1,2)}。この理論では、一つのタンパク質全体は、QMで解く部分とMMで解く部分に分割される。前者には、実際に光の吸収を起こす発色団レチナールが含まれ、後者には残りのタンパク質部分が含まれる (Fig. 2左側の図の白い楕円がQM領域、黒い楕円がMM領域)。レチナールが光を吸収し、励起状態 (Franck-Condon状態) に上がると大きな電荷の再分布が起こる。アミノ酸残基の側鎖や主鎖の熱運動は、この電子遷移に追従できないが、アミノ酸残基の中の電子の運動はQM領域の静電的状态の変化を受け止められる。すなわち、QM領域からの静電場の変化に応じて分極する。最近、QM/MMタイプの理論はタンパク質の電子状態計算に盛んに使われている

Fig. 1 Three dimensional structure of rhodopsin (circle : water molecules).

が、MM領域の電子分極を明示的に考慮した理論は未だ発展途上である。われわれは、2001年に代表的なレチナールタンパク質の一つであるバクテリオロドプシンの吸収波長を研究するため、MM領域の電子分極を考慮した新たなQM/MM理論を提出した¹⁾。

この理論では、タンパク質の共有結合はすべて円筒形状の誘電体で近似された。Fig. 2の右側の図にTrp側鎖の例が示されている。タンパク質中の各原子の電荷は、基底状態 (光吸収前) では Q^0 という値を持つが、光吸収に伴うQM領域からの静電場変化に応じて各円筒誘電体が分極するため、原子電荷は誘起電荷 q^0 だけ変化する。これが前述した電子分極に相当する。われわれの理論では、各円筒誘電体の分極率は対応する共有結合の分極率の実験値に基づいて決められている。なお、以下で述べる計算ではQM領域にはINDO/S法という分子軌道計算を用いている。

以上の理論を用いて、これまでX線構造の提出されているロドプシン (Rh)、バクテリオロドプシン (bR)、ハロロドプシン (hR)、ファラオニスフォボロドプシン (ppR) およびbRのMと呼ばれる光反応中間体 (bR_M) の吸収波長 (励起エネルギー) を計算し、どの程度実験値を再現するか

Fig. 2 QM/MM theory that allows for the electronic polarization of the MM region.

調べた。結果は、Fig. 3に示す通りで、絶対値では2000 cm^{-1} 程度の誤差があるとはいうものの、相対値は相関係数0.99という見事な一致を示した。この研究は、膜内在タンパク質といえども、その性質を決定付けているのは、タンパク部位の構造であることを示している。

吸収波長の他、活性部位残基のpKaなども膜部位の明示的な取り扱い無しに、ある程度再現できる。その例については文献3)を参照されたい。

3. 膜を誘電体で近似するモデル

古細菌*Natrobacterium pharaonis*の光センサーであるppRは、光吸収前、トランスデューシンHtrIIと複合体を形成しているが、光を吸収するとppRに構造変化が誘起され、結果としてこの複合体は2分子に分離する。これが信号伝達の引き金となる。このような現象をシミュレートするには、もちろん、膜を何らかの形で取り込む必要がある。われわれは、膜の最も粗視化したモデルの一つとして誘電体近似を採用し、ppRとHtrIIの結合アフィニティーについて検討した。

実験によると、sRIIのTyr199がこの複合体の安定化に重要な寄与をしている。この残基を疎水性残基に置換すると、結合アフィニティーは大きく低下する。言い換えると、膜中におけるppRとHtrIIの結合アフィニティーは、ppR側のTyr199とHtrII側にあつてこれと水素結合するパートナー

Fig. 3 Correlation between the calculated and observed excitation energies of retinal proteins.

残基の相互作用によってほぼ決まっていることになる。真空中では、2つのタンパク質の結合エネルギーは約100 kJ mol^{-1} もあるが、膜中では劇的に減少して、水素結合1個分程度になる。われわれは、膜を誘電体として近似するモデルの下で、誘電率をどの程度に仮定したとき、以上の事実関係が再現できるかどうか調べた。この計算では、両タンパク質をMOZYME法というlinear-scaling分子軌道計算で扱い、膜環境をCOSMO法という溶媒効果計算手法により扱った。

その結果をFig. 4に示す。縦軸は結合エネルギー、横軸は誘電率 ϵ の関数 $(\epsilon - 1) / (\epsilon + 1)$ である。実線はwild typeのppR、破線はppRのY199F変異体に対するデータである。これを見ると、横

Fig. 4 Dependence of the binding affinity between ppR and HtrII solid line: wild type, dashed line: ppR is replaced by Y199F mutant.

軸およそ0.6付近 ($\epsilon \approx 4$) でアフィニティーが0に近くなり、しかもTyr199 1個の変異により、その値が正に転じることがわかる。すなわち、膜の誘電率を4程度とみなすと、前述した実験結果が定性的に再現されることが判明した。誘電体近似は、粗いモデルであるが、現象を理解するための見通しを立てるためには十分役に立つと思われる。

4. おわりに

細胞膜のリン脂質分子や水分子を明示的に扱うシミュレーションは、本ミニシンポジウムの講演者の一人でもあった（独）産業技術総合研究所の

篠田渉氏の協力を得て、現在進行中である。目下の目標は、i) ロドプシンの分子運動が、光吸収後どのように変化し、それがどのようにしてGタンパク質との相互作用に結びつくのか、ii) ハロロドプシンはどのようにして光エネルギーを利用してイオンを能動輸送するのか、などについて解くことである。これらについては、もう少し研究の進んだ後、別の機会に発表させていただきたい。

文 献

- 1) Houjou H, Inoue Y and Sakurai M : *J. Phys. Chem. B*, **105** 867-879 (2001)
- 2) Sakurai M, Sakata K, Saito S, Nakajima S and Inoue Y : *J. Am. Chem. Soc.*, **125** 3108-3112 (2003)
- 3) Nakajima S, Ohno K, Inoue Y and Sakurai M : *J. Phys. Chem. B*, **107** 2867-2874 (2003)

(受付2004年10月6日 掲載決定10月8日)

著者略歴

櫻井 実 (さくらい みのる)

1983年 東京工業大学大学院博士
課程満期退学

同年4月より東京工業大学助手

1990年 東京工業大学助教授

2003年 東京工業大学教授

現在に至る