

## 生体分子の構造, 機能, 反応の理論研究の最近の進歩

平尾 一, 諸熊 奎治\*

Recent Progress in the Theoretical Studies of Structure, Function,  
and Reaction of Biological Molecules

Hajime HIRAO and Keiji MOROKUMA\*

*Fukui Institute for Fundamental Chemistry, Kyoto University, 34-4 Takano  
Nishihiraki-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8103, Japan*

(Received April 6, 2011)

Essential biomolecular functions often involve electron-related events such as chemical reactions and photoluminescence phenomena. Theoretical description of such electronic processes requires the use of quantum mechanics (QM), but the number of atoms that can be handled with QM is usually smaller than the number of atoms present in a single protein. A reasonable strategy is therefore to give priority to a few tens or hundreds of atoms in the system and deal with them quantum mechanically. Lower-priority atoms influence the event occurring in the higher-priority area; therefore, their effect should also be taken into account. Under these circumstances, a reasonable approach is to apply two or more different theoretical methods to differently prioritized subsystems. QM can be combined, for example, with less accurate yet much less demanding molecular mechanics (MM). Our own N-layered integrated molecular orbital and molecular mechanics (ONIOM) method allows for such hybrid calculations, and our group has been applying it to a wide range of biology-related problems. In this paper, we briefly explain the theoretical background and the procedure for the theoretical investigation of biological systems. Subsequently, we provide an overview of some of our recent studies of metalloenzymes and photobiology-related problems.

**Key words**—reaction mechanism; excited state; metalloenzyme; photobiology; our own N-layered integrated molecular orbital and molecular mechanics (ONIOM)

## 1. はじめに

化学反応やバイオルミネセンス等, 電子が絡む基礎過程によって制御されている生命現象はわれわれの身の周りに数多く存在する. それらの分子基盤の解明は, 研究対象として興味深く, 酵素阻害薬や蛍光プローブの合理的設計といった応用展開への可能性を秘めてもいる. 計算化学はこうした問題にアプローチするための有力な手法として, 近年大きな注目を集めている. 計算化学で分子の電子過程を記述するためには, 量子力学 (QM) の適用が不可欠である. しかしながら QM 法は一般に計算負荷が高く, 数千, あるいは数万個以上の原子を含む生体分子の全体を QM で扱うことは, 現時点で困難であ

る. むしろ, 系の中から重要度の高い原子群をまず選択し, それらにのみ QM 法を適用するのが現実的である. ただし, そこで選択されなかった原子も, 立体効果や静電効果などを通じて, 問題となる化学現象に大きな影響を及ぼすことがあることから, 無視しない方がよい. こうした条件の下で, 生体分子シミュレーションを現実的な精度と時間で行うためには, 分子系に関して比較的重要度の高い領域とそれ以外の領域を定義し, 系全体を階層的に記述するのが得策である. すなわち, 1種類だけの方法を使うのではなくて, 例えば精度の高い QM 法と計算コストの低い分子力学 (MM) を組み合わせるようにする. われわれのグループでは, この理念に沿った ONIOM 法を開発し, それを基軸とした階層的複合分子シミュレーションによって様々な生体分子の電子過程を研究している. 本稿では, 理論解析の方法・手順などを簡単に説明し, その後, われわれが最近行ったいくつかの応用研究の結

京都大学福井謙一記念研究センター (〒606-8103 京都市左京区高野西開町 34-4)

\*e-mail: morokuma@fukui.kyoto-u.ac.jp

本総説は, 日本薬学会第 130 年会シンポジウム SS03 で発表したものを中心に記述したものである.

果を概観する。

## 2. 解析手法

生体分子の解析を系統的に行うための基本的な手順を Fig. 1 にまとめる。生体分子の理論解析は Protein Data Bank (PDB) に登録された X 線結晶構造を出発点とすることが多い。結晶構造が入手できない場合には、類似タンパクの構造をベースにして構築したホモロジーモデルを使ってもよい。解析には、主要原子だけを切り出した「活性中心モデル」又は全系を扱う「全タンパクモデル」を用いる。酵素反応などの電子過程は、生体分子中の局所現象であることが多い。したがって、活性中心近傍の重要な原子のみを孤立系として切り出し、密度汎関数理論 (DFT) のような QM 法を適用するというアプローチにはそれなりの妥当性がある。活性中心モデルの計算にはタンパク環境の効果は考慮に入られていないが、現象の本質的側面を理解することは可能である。実際のタンパクの中では、活性中心は周辺アミノ酸残基にとり囲まれており、例えば化学反応の途中で、活性中心の構造が大きく変動することはあまりない。しかし周辺環境の効果を含まない活性中心モデルの構造を拘束なしに最適化すると、本来の構造から大きくずれてしまうことがある。この問題を避けるために、例えばアミノ酸残基の側鎖中のいくつかの原子を固定した方がよい場合もある。

一方、全タンパクモデルでは、活性中心モデルで考慮する原子に加え、周辺原子の寄与を計算に含める。諸熊らによって開発された ONIOM (our Own N-layered Integrated molecular Orbital and molecu-

lar Mechanics) 法は、このような計算を可能にするアプローチの 1 つとして知られ、複数の異なった計算手法を組み合わせることを特徴とする。<sup>1-7)</sup> ONIOM 法をタンパクに適用する際には、注目する系に関して、全原子からなる real 系とそれより小さい model 系を定義する [Fig. 2(a)]. 2 種類の計算手法を組み合わせる ONIOM (QM : MM) 法では、real 系を MM で、model 系を QM と MM の両方で記述する。Model 系は大きければ大きいほど計算の信頼性が高くなるが、QM で扱える原子の数はせいぜい数百個である (ただし数は計算レベルや計算機環境に依存する) ので、精度と計算にかかる時間とのバランスから、最適な大きさを定めるとよい。所望の物理量は real 系の QM エネルギー (ターゲットエネルギー) であるが、その計算は実質的に実行不可能であるので回避したい。ONIOM 法では、real 系と model 系に関して行う、より計算負荷の低い 3 種類の計算を実行し、得られるエネルギー値からの外挿で ONIOM (QM : MM) の全エネルギー ( $E^{\text{ONIOM}}$ ) を求め、これをターゲットエネルギーの近似値とする [Fig. 2(b)].  $E^{\text{ONIOM}}$  は Eq. 1 のように表現される。

$$E^{\text{ONIOM}} = E^{\text{real, MM}} + E^{\text{model, QM}} - E^{\text{model, MM}} \quad (1)$$

通常、計算は Eq. 1 の右辺の項の順序に従って逐次実行するが、

$$\begin{aligned} E^{\text{ONIOM}} &= E^{\text{model, QM}} + [E^{\text{real, MM}} - E^{\text{model, MM}}] \\ &= E^{\text{model, QM}} + \Delta E^{\text{real} \leftarrow \text{model, MM}} \end{aligned} \quad (2)$$

と並べ替えて考えると、model 系に関する QM エネルギーを起点としてターゲットエネルギーを得るという理想過程 [Fig. 2(b)の白矢印] を、MM レベルで記述された、model と real 系のエネルギー差 [Fig. 2(b)の黒矢印] によって近似している

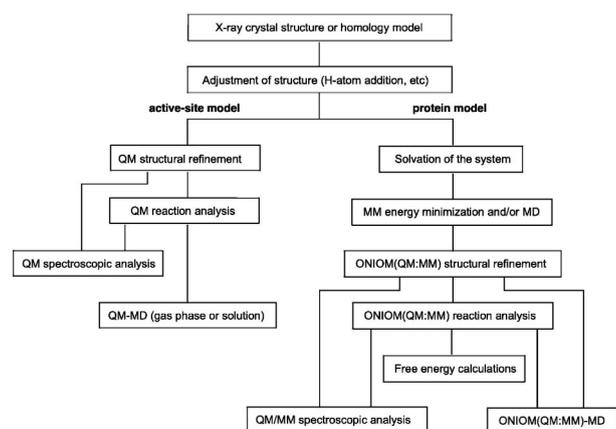


Fig. 1. Typical Flowchart for the Computational Analysis of Biomacromolecules

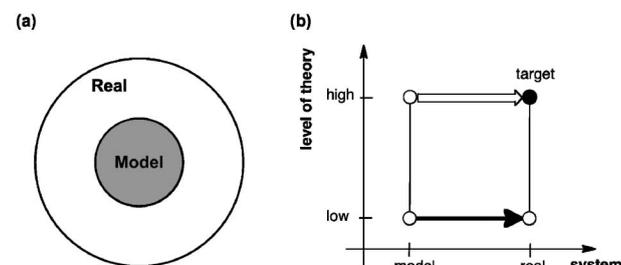


Fig. 2. Schematic Illustration of the Two-layer ONIOM Method

(a) real and model systems, (b) strategy to calculate the total energy.

みることもできる。ONIOM エネルギーの原子位置に関する解析的エネルギー微分も整備されており、安定構造や遷移状態構造の最適化など、様々な解析を行うことができる。先に活性中心モデルに関して行った解析の結果を、全タンパクモデルの解析結果と比較することで、タンパク環境が model 系に対してどの程度の影響を及ぼしているのかを知ることができる。

さて、ONIOM (QM : MM) 法には mechanical embedding (ME) と electronic-embedding (EE) という2つのスキームがある。ONIOM (QM : MM)-ME 法では、model 系と周辺環境の静電的相互作用を、点電荷同士の古典的 Coulomb 相互作用として評価する。したがって静電的相互作用は、model 系の原子に割り当てられた点電荷に大きく依存することになる。ME 法で静電効果を適切に見積もるためにも、汎用力場であらかじめ定義されている点電荷を model 系に対してそのまま割り当てるのではなく、分子の静電ポテンシャルを再現するような点電荷決定法 (ESP 法, RESP 法など) や Mulliken 法によって、固有の点電荷を決め、使用することが推奨される。また model 系の電荷分布は、例えば反応の進行に伴って変化するため、中間体ごとに固有の電荷セットを決定し、使用してもよい。ME 法の主な特徴は、model 系の波動関数、すなわち Eq. 1 の第二項の計算で扱う波動関数が、周辺環境の影響で「分極」しないことである。したがって、ME 法で取り込まれる主なタンパク環境効果は、古典的静電効果と van der Waals 効果である。

一方 EE 法では、model 系の波動関数が、周辺環境の各原子が持つ点電荷によって分極するように改良されている。<sup>7)</sup> 具体的には、第二項の計算の際、model 系の周りに周辺原子の持つ点電荷を置き、その効果を QM 計算のコアハミルトニアンに取り込む。第一項でも周辺原子の点電荷の model 系への影響が古典的に計算されており、そのままでは同種の効果の二重カウントになってしまう。そこで、第三項の計算の際にも QM 計算の際と同様の点電荷を置き、第一項と第三項で古典的な静電効果を相殺させる。EE 法によって波動関数の分極効果が入り、分子系のより現実的な記述が可能になる。ただし、周辺環境中の原子が持つ点電荷は凍結されており、model 領域の電荷分布に応答して分極すること

はない。そのため、model 系の波動関数の分極効果が過大に見積もられてしまう危険性があるので注意が必要である。

過大分極の問題を回避するためには周辺領域の分極を許す必要がある。これを効率的に行う方法の1つに、三層型 ONIOM 法がある。<sup>8-10)</sup> この手法では、全系に関して大きい方から順に real, intermediate, model とサイズの異なる三系を定義する [Fig. 3(a)]. real 系と model 系は、ONIOM (QM : MM) と同様に記述し、intermediate 系には、例えば DFTB 法のような安価な QM (QM') 法を適用する。Figure 3(b) に、この ONIOM (QM : QM' : MM) におけるエネルギーの計算手順を模式的に示している。左上の白丸に相当する model 系の QM エネルギーを起点として、環境効果を取り入れてターゲットエネルギーに近づけていく作業 [Fig. 3(b) の白矢印] を、ここでは2段階で行っている [Fig. 3(b) の黒矢印]。図が示すように、QM' のような medium レベルの計算は、model 系と intermediate 系に対して行う。この2種類のエネルギーの差 [Fig. 3(b) の左側の黒矢印] の中に、model 系の外側の領域の分極効果が含まれている。

全タンパクモデルの計算には DFT と MM を組み合わせた ONIOM (DFT : MM) 法を使うことが多い。三層型の ONIOM (DFT : DFTB : MM) 法を用いてもよい。励起状態の性質を調べる際には QM 法として TDDFT、あるいは Hartree-Fock 波動関数を参照関数とする単参照 CI 法、CASSCF 波動関数を参照関数とする多参照 CI 法や多参照摂動法、といった手法が有効である。なお、励起エネルギーを計算する際には基底状態と励起状態のエネルギー

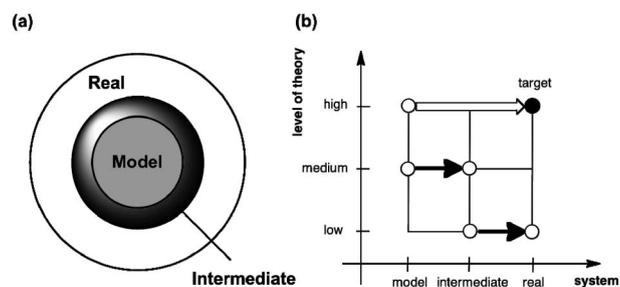


Fig. 3. Schematic Illustration of the Three-layer ONIOM Method

(a) real, intermediate, and model systems, (b) strategy to calculate the total energy.

差が問題となるが、異なる電子状態間で共通の分子力場パラメータを用いた場合には、分子力場の寄与はキャンセルする。したがって、ME法で電子励起に対するタンパク環境の静電効果を取り込むためには、基底状態と励起状態の電子密度分布の違いに応じて、model系の点電荷を変えた方がよい。ONIOM-EE法の場合には、電子励起に対する周辺環境の静電効果は、波動関数への点電荷効果の導入という形で取り込まれる。

系の動的な性質を調べたい場合には、核配置に関するONIOMエネルギーの微分を求め、その情報を使って古典的運動方程式を数値積分すればよい(ONIOM-MD)。その際、QM手法としてCASSCF法などを用い、励起状態のエネルギー微分を求めようすれば、励起状態のダイナミクスの解析も可能になる。<sup>11)</sup> また生体分子の反応経路を求めることは、大自由度分子系がとり得る様々な核配置のうちただ1つだけを見ておくことに相当する。MDなどのシミュレーションによって、位相空間内で系がとり得る様々な状態をサンプルし、ONIOMのエネルギー表式に基づいた自由エネルギー摂動法の計算等を行うことによって、反応の自由エネルギー変化を求めることも可能である。<sup>12)</sup>

### 3. 金属酵素の化学反応

金属酵素の活性中心に含まれる金属原子は、酵素触媒活性の鍵を握っている。特に、金属を中心に形成された反応活性種は、触媒反応で中心的役割を担うため、その詳細な理解はとりわけ重要な意味を持つ。例えば鉄酵素シトクロム P450cam の場合には、Fig. 4(a)に示した中間体候補のうち、compound I (Cpd I)、すなわち  $\pi$ カチオンラジカル型のポルフィリンがオキシ鉄(IV)に配位した中間体が反応活性種として働くと考えられている。Cpd I状態では、P450camの活性中心はFig. 4(b)のような原子配置をとる。このとき、P450camの基質である樟脳(camphor)の5位の炭素上の水素は、オキシリガンドの近傍に位置することができ、水素引き抜きに都合がよい[Fig. 4(b)]。実際、P450camによる樟脳の水酸化反応は、この水素に対して選択的に起こることが知られている。P450のCpd Iは実験的に捕捉することが難しく、反応機構の解析がかならずしも容易でない。計算化学の特長の1つは様々な状態を安定性によらず調べられることであり、Cpd

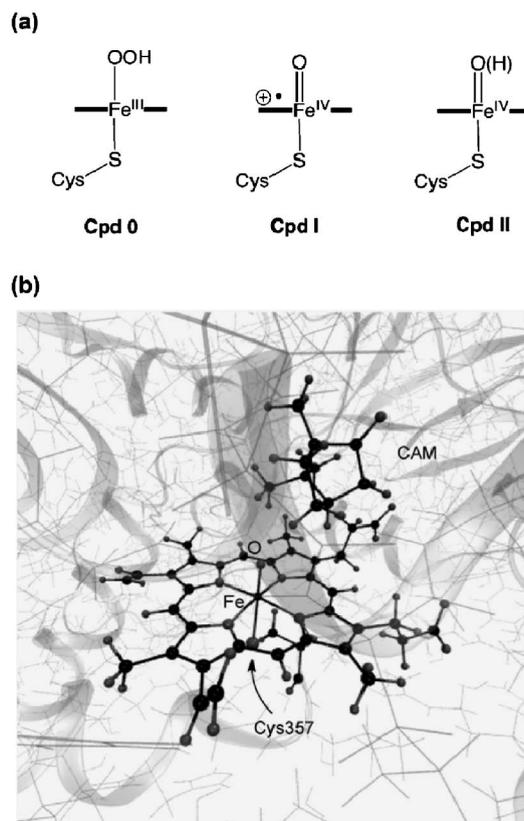


Fig. 4. Intermediates of Cytochrome P450  
(a) possible reactive species of P450cam, (b) P450cam Cpd I.

I に関しても近年、理論的理解が大きく進んだ。<sup>13)</sup>

P450のように遷移金属を含む酵素では、エネルギー的に安定なスピン状態が複数存在する。スピン状態によって反応エネルギープロファイルが微妙に異なることもあり、それが異なる反応生成物をもたらすかもしれない。したがって、遷移金属を含む金属酵素の反応機構を正確に理解するためには、各スピン状態の多様な振舞いを計算化学で正確に捉えることが必要である。一方、活性中心を取り囲むアミノ酸残基も触媒反応に大きな影響を及ぼすことがある。例えば、P450camの場合、タンパク環境によって、特定の反応が有利になるように樟脳の配向が調節されている。このようなタンパク環境効果を、ONIOM(QM:MM)で計算に取り入れるとシミュレーションがよりリアルになる。

P450は、とりわけ代謝との関係が深い酵素であるが、生理学的に重要な過程で中核的役割を担う金属酵素はほかにも多数存在する。したがって、金属酵素の反応メカニズムの理論解析は、生理現象の分子の詳細な理解あるいは酵素阻害薬の合理的な設計

にもつながり得る。さらに、金属酵素の高度な触媒メカニズムは、合成遷移金属触媒の設計にも応用できるかもしれない。P450 Cpd I の場合には、強固な C-H 結合を容易に変換する能力を持っており、鉄触媒のモデルになっている。例えば P450 Cpd I 同様、高原子価オキソ鉄 (IV) ユニットを有する合成非ヘム錯体が Que らによって開発され、大きな注目を集めている。<sup>14,15)</sup> 以下、他の酵素に関してわれわれが行った研究を簡単に紹介する。

**3-1. myo-Inositol oxygenase (MIOX) の反応機構** イノシトールは、イノシトールリン脂質 (PtdIns) シグナル伝達経路で中心的役割を演じる、様々なセカンドメッセンジャー分子の基本構造である。そのためイノシトールは、同経路の異常に由来する数多くの疾患と密接な係わりを持っている。MIOX は *myo*-inositol を D-glucuronate に変換する酵素である [Fig. 5 (a)]. MIOX の存在自体は 50 年以上前から知られていたが、この酵素がどのような活性中心を持っているのか、反応がどのような機構で進行しているのか、といった詳細については、長らく不明のままであった。しかし Xing らは最近、分光学的解析や速度論的解析を実行し、MIOX が二核の鉄酵素であること、(superoxo) Fe(III) Fe(III) 種が反応活性種として働き、反応の第一ステップで基質の *myo*-inositol から水素を引き抜くことなどを明らかにした。<sup>16-18)</sup> さらに Brown らは、マウス MIOX の X 線結晶構造を解き、*myo*-inositol が ferric superoxide を形成する方の鉄ではなく、もう一方の鉄のみに結合していることを示した。<sup>19)</sup> これらの先駆的発見により、MIOX が生物無機化学的にもユニークな特徴を持つ酵素であることがわかってきた。

特に、一連の実験で MIOX の反応の初期過程の理解が進んだ。反応では、まず Fe(II) Fe(III) の混合原子価状態から、(superoxo) Fe(III) Fe(III) 型の中間体が生成し、その superoxo 部位が基質から水素を引き抜き、以後の過程へと続く。反応の全貌を明らかにするために、われわれは MIOX の、DFT と ONIOM (DFT : MM) に基づく解析を実行した。<sup>20,21)</sup> まず X 線結晶構造に対応する Fe(III) Fe(III) 状態の構造を理論的に最適化したところ、ONIOM 法で得られた構造は結晶構造をよく再現し、タンパクの重原子間の RMSD 値は 0.89 Å と非

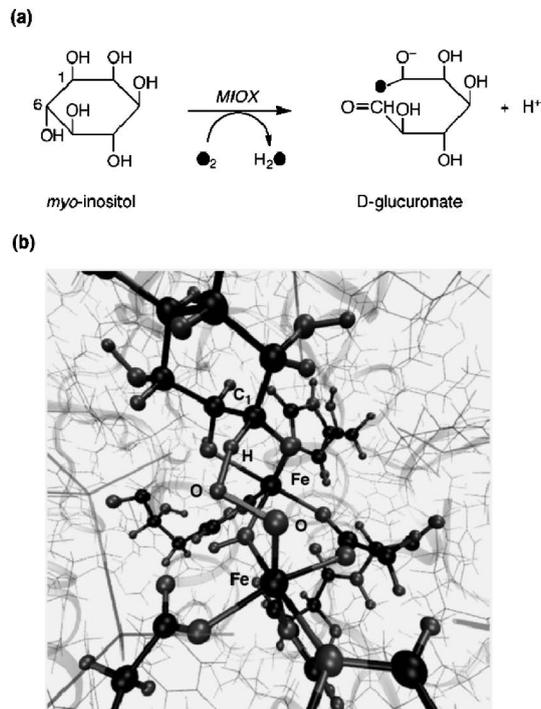


Fig. 5. MIOX Catalyzed Reaction

(a) reaction scheme, (b) ONIOM optimized transition state for H-abstraction.

常に小さいことがわかった。ここで RMSD とは、原子位置の平均二乗偏差のことで、タンパク間の構造類似性の指標となる。また活性中心の原子に関する RMSD 値は 0.25 Å 程度で、これもよい一致を示した。活性中心モデルを用いて最適化した構造の場合にも、RMSD 値は 0.40 Å と小さかった。ただ、構造最適化中にリガンドのいくつかの原子を結晶構造の座標に固定したにもかかわらず、RMSD は ONIOM の値よりも大きくなった。これは、活性中心モデルにおいて、*myo*-inositol の水酸基と水素結合する周辺アミノ酸残基の存在を無視しているために、基質部分が比較的自由に動けることによる。

さらにわれわれは、(superoxo) Fe(III) Fe(III) 種が引き起こす反応についても調べた。第一ステップの水素引き抜き [Fig. 5 (b)] では、環境効果による数 kcal/mol の反応障壁の引き下げがみられた。さらに速度論的同位体効果を理論的に求めたところ、8.8 と算出され、実験値 8-16 とよい一致を示すと同時に、水素引き抜き機構を支持した。その後 ferric-alkylperoxy 型中間体の生成を経由して、水素引き抜きよりも活性化障壁の高い O-O 結合のホモリティック解裂を伴う反応経路を見出した。実験で

は、水素引き抜き以降のなんらかのステップが律速になることが示されていたが、われわれは理論解析の結果から、この O-O 解裂が律速であることを提案した。先にも少し触れたように、基質は周辺残基と水素結合を形成しているが、活性中心モデルを用いて反応解析を行った場合には、その効果が欠如しているために、O-O 結合の解裂とともに、分子構造が大きく崩れてしまうことがわかった。すなわち、タンパクの水素結合は、基質位置の保持を通じて、特定の反応だけをを進めるのに一役買っている。また面白いことに、2つの鉄の間に位置するヒドロキシドリガンドは、単に2つの鉄を架橋しているだけではなく、一時的に基質から引き抜かれた水素をプロトンとして保有又は供与し、反応を積極的に支援していることもわかった。

### 3-2. Isopenicillin N synthase (IPNS) の反応機構

$\beta$ -ラクタムは抗生物質の代表的部分構造として非常によく知られている。IPNS はそのような化合

物の生合成を担う非ヘム型鉄酵素で、トリペプチド型の基質である  $\delta$ -(L- $\alpha$ -amino adipoyl)-L-cysteinyl-D-valine (ACV) から、二環式の isopenicillin N (IPN) を作り出す [Fig. 6(a)]. 反応ではまず Fe (II) 中心に酸素分子が結合し、反応活性種が生成する。しかしながら活性中心モデルに対する DFT 計算では、Fe(II) 中心への酸素の結合エネルギーが低く見積もられすぎてしまうという問題が指摘されていた。Lundberg らは IPNS の酸素結合過程を、ONIOM (DFT : MM) 法によって解析し、酸素の結合が、タンパク環境の寄与、特に van der Waals 相互作用の寄与によって促進されることを示した。<sup>22)</sup> Lundberg らはさらに、IPNS による IPN 生合成過程を活性中心モデルに関する DFT 計算、そして全タンパクモデルに対する ONIOM (DFT : MM) 計算を実行することによって解析し、ferric-superoxide 種による水素引き抜きに始まり ferryl 種を経由して生成物に至る反応経路を見い出し

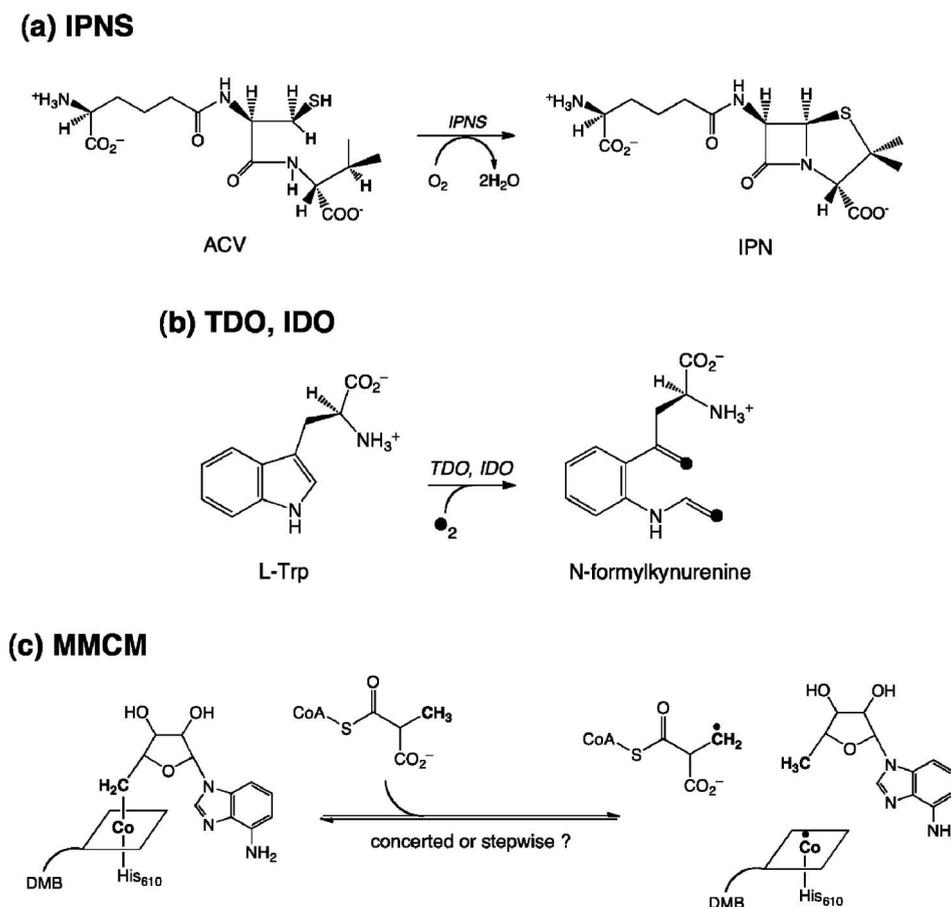


Fig. 6. Catalytic Reactions of Some Metalloenzymes That We Have Recently Studied

(a) conversion from  $\delta$ -(L- $\alpha$ -amino adipoyl)-L-cysteinyl-D-valine (ACV) to isopenicillin N (IPN) catalyzed by IPNS, (b) conversion from L-tryptophan to N-formylkynurenine catalyzed by TDO or IDO, (c) initial step for the MMCM catalyzed conversion from methylmalonyl-CoA to succinyl-CoA.

た.<sup>23,24)</sup> この酵素の場合には、律速段階である水素引き抜き過程の反応障壁が環境効果で 5 kcal/mol 程度押し下げられることも示された。

### 3-3. Tryptophan 2,3-Dioxygenase (TDO), Indoleamine 2,3-Dioxygenase (IDO) の反応機構

TDO 及び IDO は、酸素分子を使って必須アミノ酸の L-tryptophan を N-formylkynurenine に変換するヘム酵素である [Fig. 6(b)]. 最近、X 線結晶構造もいくつかのグループによって決定された.<sup>25-27)</sup> シトクロム P450 などのヘム酵素が Cpd I を反応活性種として使い、基質を活性化するのに対し (Fig. 4), これらのトリプトファン代謝酵素は、ferrous-dioxygen ないしは ferric-superoxide 種を反応活性種として使うというユニークな特徴を持つ。Chung らは活性中心モデルに対する DFT 計算,<sup>28)</sup> 及び全タンパクモデルに対する ONIOM (DFT : MM) 計算<sup>29)</sup> を実行し、IDO 又は TDO の酵素反応においては ferric-superoxide 種が最初の反応活性種として働き、インドール環を攻撃することを示した。また反応途中で Cpd II [Fig. 4(a)] が生成し、その後の反応を推し進めるための第二の反応活性種として働くことを示した。

### 3-4. B<sub>12</sub>-dependent methylmalonyl-CoA mutase (MMCM) の反応機構

MMCM はビタミン B<sub>12</sub> 依存型酵素で、methylmalonyl-CoA から succinyl-CoA への変換を触媒する [Fig. 6(c)]. この反応は、補酵素の adenosylcobalamin (AdoCbl) の Co-C 結合の、ホモリティック解裂によって開始される。その結果生じる 5'-deoxyadenosyl ラジカルが基質の methylmalonyl-CoA から水素を引き抜き、それに続いて基質内の 1,2-転移が起きる。Co-C ホモリティック解裂と水素引き抜きの 2 つが協奏的に起こるのか、それとも段階的に起こるのかが近年、議論の的になった。例えば Kozlowski らは、活性中心モデルを用いた理論解析を行い、段階的反應よりも協奏的反應の方が、障壁が 7 kcal/mol 低く有利であると結論した。<sup>30)</sup> 一方、Li らはこの問題に対して ONIOM (DFT : MM) 法のアプローチで取り組み、タンパク環境、特に静電、van der Waals, ねじれ相互作用の効果が Co-C 結合エネルギーを減少させていることを示した。<sup>31)</sup> さらに、タンパク中では、活性部位モデルの計算から提案されている協奏的反應よりも、5'-deoxyadenosyl ラジカルを経由

する段階的反應の方が有利になると結論した。

### 4. 金属酵素中間体のキャラクタリゼーション

金属酵素において、反応活性種が引き起こす化学反応は、触媒サイクルの中のごく一部である。すなわち金属酵素は、触媒サイクルの中で、ある場合にはプロトンや電子の供給を伴いながら、リガンドの配位状態、酸化状態などを次々に変えている (Fig. 7)。その過程で反応活性種が生成され、基質の反応が進行するが、X 線結晶構造で得られている状態は、実際の反応活性種とは異なる場合が多い。反応を直接担う反応活性種のキャラクタリゼーションは、反応機構を理解する上で鍵になり、理論研究が大いに貢献できる。加えて、触媒サイクル中にあらわれる反応活性種以外の各中間体の構造、電子状態、安定性などを 1 つ 1 つ理解していくことも、酵素の触媒機能を大域的に理解する上で重要である。

われわれはこうした問題意識に沿った研究の一環として、上述の MIOX の (superoxo) Fe (III) Fe (III) 型の反応活性種に関して、いくつかの異なる構造と電子状態の安定性を比較した。計算結果に基づき、鉄同士が反強磁性的にカップルし、鉄と superoxide が強磁性的にカップルした状態が安定であると予測した。また配位構造としては、end-on 構造よりも side-on 構造の方が安定であることを理論的に示した。

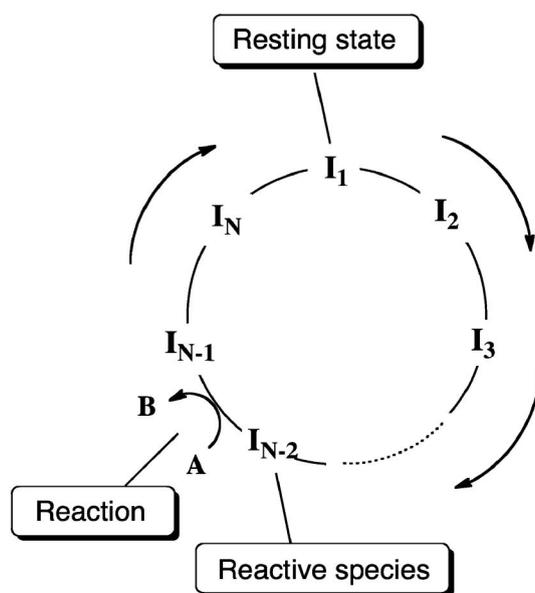


Fig. 7. Schematic Illustration of a Catalytic Cycle of a Metalloenzyme

またわれわれは, soybean lipoxygenase-1 (SLO-1) の ferrous 静止状態に関して理論解析を行った.<sup>32)</sup> この状態では, 5つの配位子を持つ Fe(II) 中心の上に, 単に水分子が1つ配位しているだけのはずだが, 奇妙なことに, Pavlosky らの CD スペクトル解析は, 異なる二状態の共存を示唆した.<sup>33)</sup> われわれの ONIOM (DFT:MM) 計算により, Fig. 8(a) に示す Conf-A と Conf-B の2つが, 別々の中間体として存在し得ることが見い出された. これらのコンフォメーションの違いは, 基本的には配位子の水の O-H 結合の向きだけである. しかしこの微妙な違いが, 配位構造の大きな変化をもたらすことがわかった. すなわち, Conf-A では鉄と Asn694 の酸素の距離 ( $r(\text{Fe-O}_{694})$ ) が  $2.39 \text{ \AA}$  と比較的短いのに対して, Conf-B では  $3.46 \text{ \AA}$  と顕著に長い [Fig. 8(a)]. Conf-B の  $r(\text{Fe-O}_{694})$  が長いのは, 水配位子が Asn694 の酸素と水素結合を形成し, それに有利な結合角を取るためである. 理論的に得られたこれらの二状態に関して, CD スペクトルを理論的に求めてみたところ [Fig. 8(b)], 実験的に得られた2種類のスペクトルと特徴が非常によく一致した. この結果からわれわれは, SLO-1 の二状態の正体は

この Conf-A と Conf-B に対応していると結論した. SLO-1 の ferrous 状態の X 線結晶構造は, CD スペクトルとは違って1つの状態の座標しか報告されておらず,<sup>34)</sup> その  $r(\text{Fe-O}_{694})$  値は  $2.87 \text{ \AA}$  である. この実験値は, Conf-A の値とも Conf-B の値ともあまり近くないが, それらの平均である  $2.93 \text{ \AA}$  とはよく一致する. したがって, われわれは結晶構造も二状態の共存を反映していると考えている.

### 5. 励起状態の関与する生化学過程

光生化学過程は電子状態間の遷移を伴うため, その理論的取り扱いにおいては, 基底状態に加えて励起状態の記述が必要になる. われわれの研究グループは, タンパク環境による電子遷移の制御機構の解明, 励起反応の主要チャンネルの同定, 電子遷移の経時変化の追跡, などの複雑な問題に果敢にチャレンジしている.

**5-1. ゲンジボタルの発光機構** ゲンジボタルは非常に高い量子効率で発光を実現している. この生物発光過程は, 酵素 Luciferase 中での, 発光基質のルシフェリンから発光体オキシルルシフェリンへの変換を伴う. Kato らのグループは, ルシフェリンの結合した Luciferase の X 線結晶構造を決定し

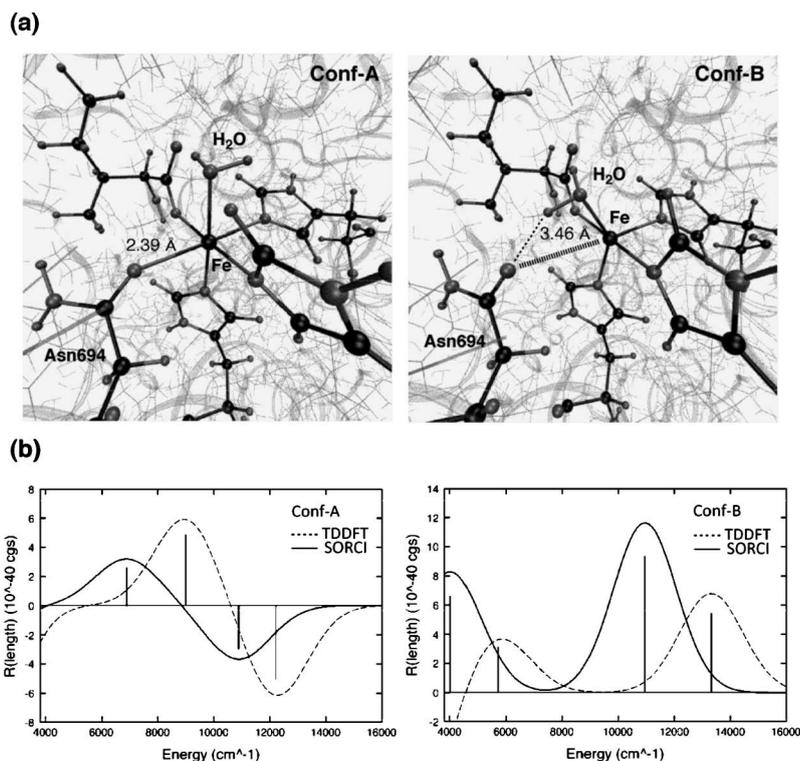


Fig. 8. SLO-1 Ferrous State

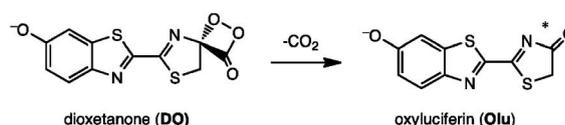
(a) two conformers for the SLO-1 ferrous state found in our study, (b) their theoretical CD spectra.

た.<sup>35)</sup> 反応途中, ジオキセタンオン状態から一重項励起状態のオキシルシフェリン生成物が生成するためには, O-O 結合の切断と C-C 結合の切断が必要である [Fig. 9(a)]. Chung らは Luciferase 中で起こるこの励起状態生成機構を理論的に調べた.<sup>36)</sup> 発色団のみを考慮したモデルに対する CASSCF, CASPT2 の計算による解析の結果, O-O 切断の基底状態における遷移状態を過ぎた後に起こる C-C 切断の過程で, 生成物が効率的に一重項励起状態をとれるような, 特徴的な傾斜型 (sloped) 最低エネルギー交差シームが存在することがわかった. 将来, ONIOM 計算によって発光過程のタンパク環境効果も明らかになるであろう.

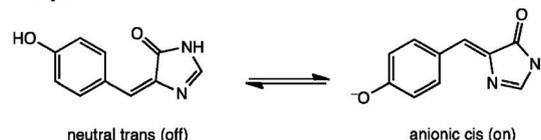
**5-2. 可逆的光スイッチ蛍光性タンパク Dronpa の発光機構** 生体分子をラベルして可視化する「蛍光イメージング技術」は生物に係わる様々な分野で大きな注目を集めている.<sup>37)</sup> Miyawaki らによって天然物からタンパク工学的に作られた緑色蛍光タンパク (GFP) 類似タンパク Dronpa には,<sup>38)</sup> Fig. 9(b) に示したような発色団がタンパクに共有結合を通じて組み込まれており, 光によって明状態と暗状態の間を可逆的に変換する. これにより, 生体分子の動きの変化を経時的に追うことや光ラベルを何回も繰り返して行うことが可能になっている. Li らは Dronpa の反応に係わる中間体の特徴を明らかにすることを目的として, 発色団のとり得る種々の可能な異性体の構造, そして吸収・発光エネルギーをシミュレーションや高精度 *ab initio* 計算を駆使することによって調べ, off 状態が中性のトランス状態, on 状態がイオン化したシス状態をとっていることなどを提案した [Fig. 9(b)].<sup>39)</sup>

**5-3. 生体色素ロドプシンのスペクトル調節機構** 動物の視覚に関与する光受容体ロドプシンは G タンパク質共役型受容体 (GPCR) の一種である. ロドプシンはタンパク質部分のオプシンと, それとリジン残基を介して共有結合したレチナールからなるが [Fig. 9(c)], 同一のレチナールが, 微妙に異なるオプシン環境の影響で, 350 から 630 nm の範囲で光の吸収極大波長 ( $\lambda_{\max}$ ) を変える. この光の吸収は, 一重項の基底状態 ( $S_0$ ) から一重項の第一励起状態 ( $S_1$ ) への電子遷移に対応している. われわれのグループでは, タンパク環境によるレチナールのスペクトル調整機構を明らかにすることを目的

### (a) Luciferase



### (b) Dronpa



### (c) Rhodopsin

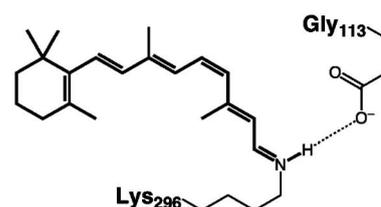


Fig. 9. Photobiology-Related Systems We Have Recently Studied

(a) a part of the process in the luciferase catalyzed reaction, (b) theoretically identified off- and on-states of the chromophore in the photoswitching of Dronpa, (c) retinal and key nearby residues in bovine rhodopsin.

として, ONIOM 計算, そして TDDFT, MRCI やその各種近似法などを用いて解析を行っている. Altun らはウシロドプシン及びその置換変異体について理論解析を実行し, 近傍の Glu113 がカウンターイオンとして最も重要な役割を担うこと, また Schiff 塩基の窒素部分がプロトン化しているか否かが吸収波長を決める最も重要な因子であることを明らかにした.<sup>40-42)</sup> Sekharan らはイカロドプシンに関する理論解析を行い, 活性中心における 2 つの水の存在が立体構造に大きく影響することを示した.<sup>43,44)</sup> このイカロドプシンの場合には, ウシの Glu113 [Fig. 9(c)] に相当するグルタミン酸残基が存在しない. Schiff 塩基窒素の近傍では, ウシの場合の Glu181 に相当する Glu180 が存在するのみで, これは Glu113 のような水素結合を形成できない. ただしイカロドプシンでは, この Glu180 がスペクトル調整において最も重要な役割を演じるカウンターイオンであることが示された. ロドプシンに関しては, 光吸収後のトランス体への異性化の動的過程も興味深い問題である.

## 6. おわりに

生体分子機能の本質をなす電子過程とその環境効果が、ONIOMなどの階層的複合分子シミュレーションによって解析できるようになり、実験的にアプローチし難い側面に関する様々な知見が得られるようになった。この流れは、計算化学の薬学に対する貢献の形を変えていくだろう。例えば従来の *in silico* 創薬では、X線結晶構造を出発点として、直ちに Structure Based Drug Design (SBDD) へと進むことが多かった。しかし将来は、阻害剤が抑えるべき基質反応の機構を量子化学で詳細に理解した上での、よりデリケートで合理的なドラッグデザインが可能になるだろう。また従来は、ドッキングシミュレーションや High-Throughput Virtual Screening の中で酵素-化合物間の相互作用を記述する際、精度の十分でない分子力場、あるいはスコアリング関数に頼るのが常であった。今後は、量子化学を中心に据えた階層的複合分子シミュレーションによって、分子間相互作用の記述の精密化が進むであろう。その結果、創薬における計算化学の信頼性・予測性はますます高くなる。このような将来型の *in silico* 創薬は、これまで以上に高負荷で大規模な計算を必要とする。計算機性能の制約上、これまではあきらめざるを得なかった計算も、次世代パソコンの登場で次々に可能になるであろう。この新しい潮流の中で、実験と理論の緊密な連携が極めて重要な意味を持つ。

**謝辞** 本稿に記述した研究を行うにあたり、科学技術振興機構のCREST（研究領域名：「マルチスケール・マルチフィジックス現象の統合シミュレーション」）、そして米国NIH（R01EY016400-04）の支援を受けました。ここに深く感謝いたします。平尾は福井謙一記念研究センターフェローシップ、京大若手研究者スタートアップ研究費、倉田奨励金、京大スーパーコンピュータ共同研究制度（若手奨励枠）の援助に心から感謝します。

## REFERENCES

- 1) Maseras F., Morokuma K., *J. Comput. Chem.*, **16**, 1170–1179 (1995).
- 2) Humbel S., Sieber S., Morokuma K., *J. Chem. Phys.*, **105**, 1959–1967 (1996).
- 3) Matsubara T., Maseras F., Koga N., Morokuma K., *J. Phys. Chem.*, **100**, 2573–2580 (1996).
- 4) Vreven T., Morokuma K., Farkas, Ö., Schlegel H. B., Frisch M. J., *J. Comput. Chem.*, **24**, 760–769 (2003).
- 5) Svensson M., Humbel S., Morokuma K., *J. Chem. Phys.*, **105**, 3654–3661 (1996).
- 6) Svensson M., Humbel S., Froese R. D. J., Matsubara T., Sieber S., Morokuma K., *J. Phys. Chem.*, **100**, 19357–19363 (1996).
- 7) Vreven T., Byun K. S., Komaromi I., Dapprich S., Montgomery J. A., Morokuma K., Frisch M. J., *J. Chem. Theory Comput.*, **2**, 815–826 (2006).
- 8) Morokuma K., Wang Q., Vreven T., *J. Chem. Theory Comput.*, **2**, 1317–1324 (2006).
- 9) Zheng G., Lundberg M., Jakowski J., Vreven T., Frisch M. J., Morokuma K., *Int. J. Quantum Chem.*, **109**, 1841–1854 (2009).
- 10) Lundberg M., Sasakura Y., Zheng G., Morokuma K., *J. Chem. Theory Comput.*, **6**, 1413–1427 (2010).
- 11) Li X., Chung L. W., Mizuno H., Miyawaki A., Morokuma K., *J. Phys. Chem. Lett.*, **1**, 3328–3333 (2010).
- 12) Kawatsu T., Lundberg M., Morokuma K., *J. Chem. Theory. Comput.*, **7**, 390–401 (2011).
- 13) Shaik S., Kumar D., de Visser S. P., Altun A., Thiel W., *Chem. Rev.*, **105**, 2279–2328 (2005).
- 14) Rohde J. U., In J. H., Lim M. H., Brennessel W. W., Bukowski M. R., Stubna A., Münck E., Nam W., Que Jr. L., *Science*, **299**, 1037–1039 (2003).
- 15) Bukowski M. R., Koehntop K. D., Stubna A., Bominaar E. L., Halfen J. A., Münck E., Nam W., Que Jr. L., *Science*, **310**, 1000–1002 (2005).
- 16) Xing G., Hoffart L. M., Diao Y., Prabhu K. S., Arner R. J., Reddy C. C., Krebs C., Bollinger Jr. J. M., *Biochemistry*, **45**, 5393–5401 (2006).
- 17) Xing G., Barr E. W., Diao Y., Hoffart L. M., Prabhu K. S., Arner R. J., Reddy C. C., Krebs C., Bollinger Jr. J. M., *Biochemistry*, **45**, 5402–5412 (2006).
- 18) Xing G., Diao Y., Hoffart L. M., Barr E. W., Prabhu K. S., Arner R. J., Reddy C. C., Krebs

- C., Bollinger Jr. J. M., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 6130–6135 (2006).
- 19) Brown P. M., Caradoc-Davies T. T., Dickson J. M. J., Cooper G. J. S., Loomes K. M., Baker E. N., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 15032–15037 (2006).
- 20) Hirao H., Morokuma K., Abstracts of papers, 238th ACS National Meeting, Washington, DC, August 2009, COMP-020.
- 21) Hirao H., Morokuma K., *J. Am. Chem. Soc.*, **131**, 17206–17214 (2009).
- 22) Lundberg M., Morokuma K., *J. Phys. Chem. B*, **111**, 9380–9389 (2007).
- 23) Lundberg M., Siegbahn P. E. M., Morokuma K., *Biochemistry*, **47**, 1031–1042 (2008).
- 24) Lundberg M., Kawatsu T., Vreven T., Frisch M. J., Morokuma K., *J. Chem. Theory Comput.*, **5**, 222–234 (2009).
- 25) Sugimoto H., Oda S. I., Otsuki T., Hino T., Yoshida T., Shiro Y., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 2611–2616 (2006).
- 26) Forouhar F., Anderson J. L. R., Mowat C. G., Vorobiev S. M., Hussain A., Abashidze M., Bruckmann C., Thackray S. J., Seetharaman J., Tucker T., Xiao R., Ma L. C., Zhao L., Acton T. B., Montelione G. T., Chapman S. K., Tong L., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 473–478 (2007).
- 27) Zhang Y., Kang S. A., Mukherjee T., Bale S., Crane B. R., Begley T. P., Ealick S. E., *Biochemistry*, **46**, 145–155 (2007).
- 28) Chung L. W., Li X., Sugimoto H., Shiro Y., Morokuma K., *J. Am. Chem. Soc.*, **130**, 12299–12309 (2008).
- 29) Chung L. W., Li X., Sugimoto H., Shiro Y., Morokuma K., *J. Am. Chem. Soc.*, **132**, 11993–12005 (2010).
- 30) Kozlowski P. M., Kamachi T., Toraya T., Yoshizawa K., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **46**, 980–983 (2007).
- 31) Li X., Chung L. W., Paneth P., Morokuma K., *J. Am. Chem. Soc.*, **131**, 5115–5125 (2009).
- 32) Hirao H., Morokuma K., *J. Phys. Chem. Lett.*, **1**, 901–906 (2010).
- 33) Pavlosky M. A., Solomon E. I., *J. Am. Chem. Soc.*, **116**, 11610–11611 (1994).
- 34) Tomchick D. R., Phan P., Cymborowski M., Minor W., Holman T. R., *Biochemistry*, **40**, 7509–7517 (2001).
- 35) Nakatsu T., Ichiyama S., Hiratake J., Saldanha A., Kobashi N., Sakata K., Kato H., *Nature*, **440**, 372–376 (2006).
- 36) Chung L. W., Hayashi S., Lundberg M., Nakatsu T., Kato H., Morokuma K., *J. Am. Chem. Soc.*, **130**, 12880–12881 (2008).
- 37) Urano Y., Asanuma D., Hama Y., Koyama Y., Barrett T., Kamiya M., Nagano T., Watanabe T., Hasegawa A., Choyke P. L., Kobayashi H., *Nat. Med.*, **15**, 104–109 (2009).
- 38) Ando R., Mizuno H., Miyawaki A., *Science*, **306**, 1370–1373 (2004).
- 39) Li X., Chung L. W., Mizuno H., Miyawaki A., Morokuma K., *J. Phys. Chem. B*, **114**, 1114–1126 (2009).
- 40) Altun A., Yokoyama S., Morokuma K., *J. Phys. Chem. B*, **112**, 16883–16890 (2008).
- 41) Altun A., Yokoyama S., Morokuma K., *J. Phys. Chem. B*, **112**, 6814–6827 (2008).
- 42) Altun A., Yokoyama S., Morokuma K., *J. Phys. Chem. A*, **113**, 11685–11692 (2009).
- 43) Sekharan S., Altun A., Morokuma K., *Chem. Eur. J.*, **16**, 1744–1749 (2009).
- 44) Sekharan S., Morokuma K., *J. Phys. Chem. Lett.*, **1**, 668–672 (2010).