

京都大学	博士 (工学)	氏名	中谷 直輝
論文題目	Theoretical Studies of Photoproteins and Non-Heme Iron Enzymes: Electronic Structures and Reaction Processes (発光タンパクおよび非ヘム鉄酵素の電子状態と反応過程に関する理論的研究)		
(論文内容の要旨)			
<p>本論文は、生命科学において重要な役割を担うタンパク質機能の分子論的メカニズムを解明することを目的として、タンパク質の活性中心の電子状態と反応過程を電子状態理論に基づいて研究したものであり、緒言と結言を含む七章から構成されている。タンパク質機能の分子論的メカニズムの解明は、化学または物理学の基礎的な興味から、また医療・創薬への応用の観点から、重要な課題となっている。その中でも励起状態が直接関わる発光タンパクの機能や複雑な電子状態が重要な役割を果たす非ヘム鉄酵素は、高精度電子状態理論に基づく検討が必要不可欠である。</p> <p>第一章では、タンパク質機能の分子論的メカニズムを解明することの意義および近年の実験分野における進展と残されている問題点、それらの研究において理論化学が果たしてきた役割と限界が電子状態の観点から述べられており、本論文の目的がまとめられている。</p> <p>第二章では、ホタルの生物発光を担うオキシルシフェリンの励起状態に関する理論研究が行われている。Keto型およびenol型のオキシルシフェリンについて、真空中、DMSO溶液中、ルシフェラーゼタンパク質中での発光エネルギーをSAC/SAC-CI(Symmetry-Adapted Cluster-Configuration Interaction)法を用いて検討した結果、化学発光および生物発光の発光色を初めて系統的に再現することに成功している。化学発光においては、keto型のオキシルシフェリンから赤色の発光が、enol型のそれからは黄緑色の発光が観測されるのに対し、生物発光ではルシフェラーゼタンパク質中の近傍アミノ酸残基との静電相互作用によってketo型のオキシルシフェリンの発光エネルギーが短波長シフトし、黄緑色の発光が観測されることが明らかにされている。同時に、ルシフェラーゼタンパク質中ではenol型のオキシルシフェリンはketo型よりもエネルギー的に不安定であることも示されている。さらに、オキシルシフェリンのC2-C2'結合の回転に関するポテンシャルエネルギー曲線から、過去に提案されていたTICT(Twisted Intramolecular-Charge Transfer)励起状態による発光色制御メカニズムが否定されることを明らかにしている。</p> <p>第三章では、第二章で得られた結果に基づいてホタルの生物発光の理論的な発光波長制御が議論されている。ルシフェラーゼは脳細胞中のATPの定量分析に用いられており、定量性を向上させるために強い赤色の発光を呈するルシフェラーゼが実験分野で求められており、本章では、オキシルシフェリンと周囲アミノ酸残基との静電相互作用を解析することによりオキシルシフェリンの発光色に重要な寄与を与えるアミノ酸残基を特定し、それらのアミノ酸を別のアミノ酸に置換することで赤色の発光を示すルシフェラーゼミュータントを理論的に提案している。</p> <p>第四章では、単核鉄ヒドロゲナーゼの活性中心の構造および電子状態に関する理論研究が行われている。DFT(Density Functional Theory)法を用いて候補となるいくつかのモデル錯体の構造が検討された結果、単核鉄ヒドロゲナーゼの活性中心は六配位の低スピンFe(II)錯体であることが明らかにされている。また、Feに配位している二つのCO配位子の伸縮振動数を計算し、実験値との比較が行われた結果、FeGP補酵素はアシルピリドン型であること、実験的に同定されなかった配位子は水であることが明らかにされている。</p> <p>第五章では、鉄(III)カテコールジオキシゲナーゼの酸素活性化反応に関する理論研究が行われている。DFT法とCASPT2(Complete-Active-Space 2nd-order Perturbation Theory)法を用いて検討が行われた結果、酸素分子は鉄(III)中心と直接反応することが明らかにされ、「酸素活性</p>			

氏名	中谷 直輝
----	-------

化機構」を支持する結果が述べられている。CASPT2 法による計算結果から、この反応において鉄中心は高スピン鉄(III)状態を維持しており、カテコレートから鉄(III)中心への電荷移動は全く起きていないという興味深い結果が報告されている。この点について、さらに詳細な検討が行われた結果、鉄中心は酸素分子と相互作用することによって酸素分子の π^* 軌道のエネルギーレベルを下げ、カテコールからの電子移動を誘起する役割を果たしていることが明らかにされている。また、DFT 法と CASPT2 法との比較が行われた結果、DFT 法では活性障壁や反応エネルギーに関しては実験結果と矛盾しない結果を与えるが、スピン状態間の相対エネルギーを正しく見積もることができず、反応に重要な六重項状態の安定性を著しく過小評価する結果が示されている。他方で、CASPT2 法は活性障壁を過大評価する傾向はあるものの、六重項状態が基底状態として計算され、なめらかなポテンシャル面を与えることが示されている。さらに、高スピン鉄(III)錯体としては、実験的にも理論的にも過去に報告のない η^2 -side-on 型の酸素錯体が安定な異性体として存在することが報告されている。

第六章では、鉄(III)カテコールジオキシゲナーゼの活性中心に含まれる鉄(III)カテコール錯体の LMCT 吸収に関する研究が行われている。Multi-State-CASPT2 法を用いて、鉄(III)カテコールジオキシゲナーゼおよび種々の機能モデル錯体の励起スペクトルが検討された結果、実験スペクトルを極めて高い精度で再現することに成功し、可視から近赤外領域に見られる吸収帯が LMCT 励起に由来することが理論的に証明されている。また、基底状態は主として鉄(III)カテコレート状態であるが、カテコレートから鉄(III)への電荷移動により生成する鉄(II)セミキノナート状態の寄与が最大 25%程度存在し、基底状態における鉄(III)カテコレート状態の寄与と LMCT 励起エネルギーとの間には密接な相関関係が存在することが明らかにされている。真空中での励起エネルギーおよび電子状態についても検討が行われた結果、真空中では鉄(II)セミキノナート状態が基底状態であることが明らかにされ、タンパク質や溶媒などの環境の効果が基底状態の電子状態に大きく影響することが示されている。また、LMCT 励起エネルギーと酸素分子との反応性はカテコールの π 軌道のエネルギーレベルと相関することが示されている。

第七章では、本論文の成果が各章で取り上げた研究結果に基づいてまとめられていると共に、生命科学の諸分野、特に、光生物系や金属酵素の電子状態や反応過程の理論的研究において高精度量子化学計算が果たす役割とその必要性、今後の展望が述べられている。

本論文では、電子状態が深く関わる発光タンパク質の機能と非ヘム鉄酵素の反応を取り上げ、高精度量子化学計算に基づいて、これらのタンパク質機能の電子的過程が明らかにされ、それによって得られた様々な知見が述べられている。これらの知見は、実験事実分子論的な解釈を与えるのみにとどまらず、タンパク質ミュータントの理論的設計や酵素を模倣した触媒設計などに有用とされる興味深い知見を含んでいる。また、これらのタンパク質機能の電子的過程を解明するためには DFT 法による検討のみでは不十分であり、高精度量子化学計算による検討が必要不可欠であることが述べられている。以上より、本論文で取り扱われている高精度量子化学計算による研究手法がタンパク質機能の分子論的メカニズムの解明に一層必要となることを確信させるものである。

(論文審査の結果の要旨)

タンパク質は多くの生命現象の根幹を担う重要な生体分子であり、タンパク質機能の分子論的メカニズムの解明は、化学および物理学の興味から、また医療・創薬への応用の観点から重要な課題となっている。その中でも、励起状態が活性中心の構造や電子状態に深く関わる発光タンパクの機能や、複雑な電子状態が重要な役割を果たす非ヘム鉄酵素の反応の分子論的メカニズムを解明するためには、高精度電子状態理論に基づく研究が必要不可欠である。申請者 中谷直輝君は、発光タンパク質の機能および非ヘム鉄酵素の反応について高精度電子状態理論に基づく理論的研究を行い、発光タンパク質や非ヘム鉄酵素の活性中心の構造および電子状態、周囲アミノ酸残基との相互作用などを詳細に検討し、これらのタンパク質機能の分子論的メカニズムを解明している。

発光タンパクとして、ホタルルシフェラーゼを取り上げ、理論的研究が行われている。ホタルの黄緑色の生物発光は、長い間 enol 型のオキシルシフェリンからの発光であると信じられてきたが、オキシルシフェリンの励起状態について高精度電子状態理論に基づいた検討が行われ、化学発光においては keto 型のオキシルシフェリンから赤色の発光が、enol 型のそれからは黄緑色の発光が観測されるが、生物発光においては、オキシルシフェリンとタンパク質との静電相互作用によって keto 型のオキシルシフェリンの発光波長が短波長シフトし、黄緑色の発光が観測されることを明らかにしている。また、オキシルシフェリンの発光波長制御に重要な寄与をするいくつかのアミノ酸を特定し、それらを別のアミノ酸に置換することにより、実験分野で求められている赤色の発光を示すルシフェラーゼミュータントを理論的に提案している。

非ヘム鉄酵素として、最近報告された単核鉄ヒドロゲナーゼが取り上げられ、活性中心の構造と電子状態に関して、候補となるいくつかのモデル錯体の構造と振動スペクトルを理論的に計算し、実験の情報と照らし合わせることで単核鉄ヒドロゲナーゼの活性中心を理論的に同定している。

さらに、鉄(III)カテコールジオキシゲナーゼの理論的検討が行われている。この酵素の酸素活性化反応は、鉄(III)中心と酸素分子との相互作用により活性中心の電子状態が複雑なため、これまで議論されてこなかった。波動関数の多配置性をあらわに考慮した電子状態理論に基づいた検討が行われ、反応が「酸素活性化機構」で進行すること、鉄中心は高スピン鉄(III)状態を維持し、カテコレートから鉄(III)への電荷移動は直接寄与しないこと、鉄中心は酸素分子と相互作用することで酸素分子の π^* 軌道のエネルギーレベルを安定化させ、カテコールからの電荷移動を誘起する役割を担っていることなどが明らかにされている。また、鉄(III)カテコールジオキシゲナーゼおよびその機能モデル錯体の LMCT 吸収についても検討が行われ、実験の吸収スペクトルを理論的に帰属するとともに、LMCT 励起エネルギーが基底状態の電子状態、酸素分子への反応性と密接な相関があることなどが明らかにされている。

以上、要するに本論文は、発光タンパク質および非ヘム鉄酵素の電子状態計算を通じて、その機能および反応の電子的過程の詳細を明らかにし、実験結果を分子論的に説明するとともに、実験分野に対して新たな知見と興味深い提案を与えたものである。本研究で得られた知見や提案は、これらのタンパク質の機能や酵素反応の分子論的メカニズムを解明する上で必要不可欠であり、学術上、実際上寄与するところが少なくない。よって、本論文は博士(工学)の学位論文として価値あるものと認める。また、平成22年2月25日、論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。