

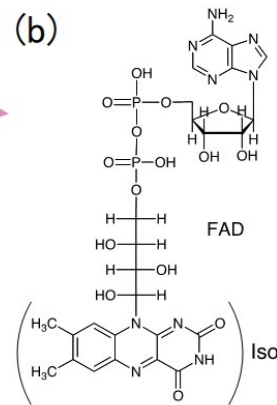
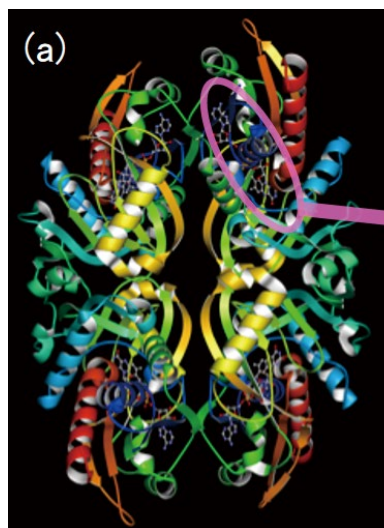
CONTENTS

レーザー計測によるヒト由来
D-アミノ酸化酵素の液相中構造の解析
光とレーザーの科学技術フェア2019にて
ILTオープンセミナーを開催!

LASER CROSS

ISSN 0914-9805

【表紙図】(a) ヒト由来D-アミノ酸化酵素(hDAAO)の結晶構造(4量体、PDB ID: 2E48)、(b) 補因子フラビンアデニンジヌクレオチド(FAD)の分子図



レーザー計測によるヒト由来 D-アミノ酸化酵素の液相中構造の解析

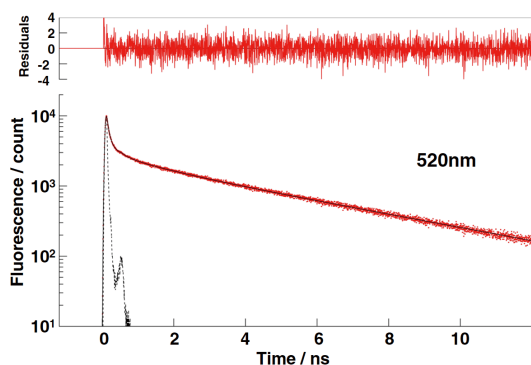
レーザーバイオ化学研究チーム 谷口誠治、ハイク コスロービアン

特別研究員 田中文夫

■はじめに

蛋白質や酵素が示す特異的な機能性には、それらを構成するアミノ酸鎖が形作る立体構造が深く関与している。機能メカニズムを明らかにし、創薬分野などへ応用するためには、それらの構造を明確にすることが重要である。このことから、近年X線結晶構造解析法を用いた蛋白質構造の観測が数多く行われてきたが、この手法には人為的に結晶化した試料を用いる必要があることから、X線結晶構造解析の結果は蛋白質が機能する液相(生体膜)中での構造とは必ずしも一致せず、その場合実際とは異なる構造情報を元に機能解析や薬剤開発などの応用が進められる恐れがある、という問題点が指摘されるようになった。これを解決するためには、他の手法により溶液中の蛋白質構造に関する情報を取得し、結晶構造との比較検討を行うことが重要である。

当研究所ではこれまで、生体内の電子輸送や酸化還元反応を制御する機能を持つ種々のフラビン蛋白質について、パルスレーザーを用いた時間分解蛍光計測法を用いてその液相(水溶液)中における光励起過程を観測してきた。その結果、フラビン蛋白質は補因子フラビンアデニンジヌクレオチド(FAD)またはフラビンモノヌクレオチド(FMN)が青色光を吸収し、その周囲に存在し電子供与性を持つアミノ酸残基(チロシン(Tyr)、トリプトファン(Trp))から電子を受け取る反応(光誘起電子移動反応)を示すことを見いだした¹⁾。また補因子-Tyr(Trp)間の距離や配向を考慮した電子移動速度の理論計算により、電子移動速度がTyrまたはTrpの配置、つまり蛋白質の構造に大きく依存することを明らかとした²⁾。これらの結果は、溶液中での蛍光(励起)寿命(実験値)と、結晶構造に基づいた電子移動速度の計算値を比較することで、液相中構造と結



【図1】hDAAOの時間分解蛍光データと4成分指数関数によるfitting曲線

晶構造の差異を検証することが可能であることを示している。本稿では、ヒトの脳に含まれるヒト由来D-アミノ酸酸化酵素(hDAAO)について、実験値と計算値を比較することでその液相中構造について検証した結果を報告する。

■ヒト由来DAAOの励起ダイナミクス

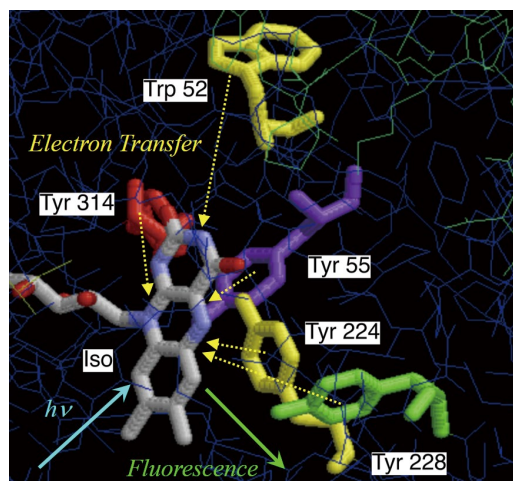
ヒト由来D-アミノ酸酸化酵素(hDAAO、表紙図(a))は、FAD(表紙図(b))を補因子に持つフラビン蛋白質の一種で、FADを触媒としてD-アミノ酸を分解(代謝)する機能を持つ。福井清教授(徳島大)らは、hDAAOの異常活性により統合失調症患者の脳内D-アミノ酸濃度が通常よりも低下することを示すとともに、機能抑制剤の投与が活性を抑制し、脳疾患の治療に有効であると報告した³⁾。その溶液中構造を明確にすることは、治療薬の開発という観点から重要な意義を持つと考えられる。水溶液中のhDAAOを計測した結果、蛍光は多成分指数関数で減衰し、47 ps、235 ps、1.17 ns、4.5 nsの4つの寿命成分が得られた(図1)⁴⁾。1.17 ns、4.5 nsの寿命については蛋白質から遊離したFAD(不純物)の可能性がありその由来は現在明確ではないが、47 ps、235 psの寿命成分については類似構造を持つブタ腎臓由来DAAO(pkDAAO)でも同様の蛍光寿命(40 ps、170 ps)が報告されている⁵⁾。この報告では、寿命成分比が濃度により変化することから水溶液中では2つのpkDAAOが会合した2量体と単量体が混在し、各寿命はそれぞれ2量体、単量体の電子移動反応に起因するものとしている。hDAAOも同様と考えられるが、結晶は4つのサブユニットで1つのユニット(4量体)を形成するため(表紙図(a))液相中でも4量体が存在する可能性があり、さらにこれらの蛋白構造と蛍光寿命(電子移動速度)との関係は明確ではない。

■電子移動理論による蛍光寿命解析

hDAAOではFAD内のイソアロキサジン環(表紙図(b)のIso部)が光により励起され(光励起状態をIso^{*}と表記)、Iso^{*}周囲のTyr、Trpとの電子移動反応が起こると考えられる。この反応の電子移動速度および蛍光寿命を電子移動理論を用いて算出した。基本的な電子移動理論は、Marcusにより理論化された⁶⁾が、条件の違いによりさまざまな修正が加えられている。本研究では、Kakitani, Matagaらにより構築された、電子ドナー-アクセプター間の距離依存性を表す電子移動速度式⁷⁾を用いた(式1)。

$$k_{KM} = \frac{\nu_0}{1 + \exp\{\beta(R_c - R_0)\}} \sqrt{\frac{k_B T}{4\pi\lambda}} \exp\left[-\frac{\{\Delta G^0 - e^2/\epsilon_0^{DA} R_c + \lambda + E_{Net}\}^2}{4\lambda k_B T}\right] \quad (1)$$

k_{KM} は電子移動速度、 R_c はドナー-アクセプター間距離(center-to-center)、 ν_0 、 β 、 R_0 はそれぞれ、断熱振動数、ET過程係数、断熱-非断熱の電子移動境界距離である。また、 ΔG^0 はET反応生成物と反応物の自由エネルギー差、 $-e^2/\epsilon_0^{DA} R_c$ はイオン対間の静電エネルギー、 λ は溶媒和エネルギー、 E_{Net} は反応生成物(Iso-TyrまたはIso-Trp間のイオン対)と蛋白質内に存在するグルタミン、リシン等のイオン性アミノ酸残基間の静電エネルギーである。電子ドナー-アクセプター間の距離および配向は、hDAAOの結晶構造(表紙図参照)を用いて決定した。図2に、FAD(Iso)周辺の結晶構造を示す。Isoの周囲には、Tyr224、Trp52など5つの芳香族アミノ酸残基が配置している。光誘起電子移動はIso^{*}と各芳香族アミノ酸残基間の電子移動が競争して起こるため、蛍光寿命はそれぞれのIso^{*}-アミノ酸残基間の電子移動速度の総和の逆数で



【図2】補因子FAD(Iso)周囲の芳香族アミノ酸残基の立体配置

表される。本研究では溶液中では2量体と単量体が存在すると仮定し、それぞれを以下のように定めた。hDAAO 2量体は4量体のうち隣接する2つのサブユニットを選択し、近接したサブユニット間でも電子移動が起こるものとした。単量体では1つのサブユニットのみを用いた。

表1に、式(1)により求めたhDAAO 2量体および単量体の電子移動速度および蛍光寿命を示す。 k_s はIso^{*}と各芳香族アミノ酸残基間の電子移動速度の総和で、 τ_{cal} は $1/k_s$ から求めた蛍光寿命の理論値である。2量体の蛍光寿命の理論値は47 ps、単量体では235 psと求めることができ、実験値と良く一致することがわかった。この結果は、hDAAOは液相中において2量体と単量体が混在しており、2量体の方が蛍光寿命は短くなることを示している。4量体は蛍光寿命がさらに短くなると予想されるが、実験で観測されておらず溶液中では存在しないものと考えられる。さらに重要な点は、結晶構造から得られるパラメータを用いて計算した理論値が実験値と一致した点にある。この結果はhDAAOの液相中構造が結晶構造と一致するかあるいは類似性が高いことを示しており、われわれの手法によりその液相中構造がより明確になったといえる。

本研究では、結晶構造を用いた蛍光寿命計算結果と実測値を比較することで、hDAAOでは液相中と結晶状態で蛋白構造は同様であることを明らかにした。一方、構造が異なる蛋白質の場合、この手法では計算値

【表1】電子移動速度および蛍光寿命の計算値

	k_s (ps ⁻¹)	τ_{cal} (ps)
2 量体	2.13×10^{-2}	47
単量体	4.26×10^{-3}	235

と実測値は一致しないため構造が異なること自体は判断可能であるものの、液相中構造に関する具体的な知見は得られない。この課題に対しわれわれは現在、分子動力学(MD)法を用いた液相中構造のシミュレーションを行っており、今後は予測した構造に基づく理論計算を進めていく予定である。

参考文献

- 1) N. Mataga et al., *J. Phys. Chem. B*, **106**, pp.8917-8920 (2002).
- 2) F. Tanaka et al., *Phys.Chem.Chem.Phys.*, **17**, pp.1681316825 (2015).
- 3) K. Fukui, H. K. Park, T. Kawazoe, K. Ono, S. Iwana, Y. Tomita, K. Yorita, T. Sakai and Y. H. Kong, *Flavins and Flavoproteins*, **2005**, pp.853-860 (2005).
- 4) 谷口誠治他、ILT2015年報、pp.44-49 (2015).
- 5) F. Tanaka, N. Tamai and I. Yamazaki, *Biochemistry*, **28**, pp.4259-4262 (1989).
- 6) R. A. Marcus, *Journal of Chemical Physics*, **24**, pp.966-978 (1956).
- 7) T. Kakitani, N. Mataga, *J. Phys. Chem.*, **89**, pp.8-10 (1985).

TOPICS

光とレーザーの科学技術フェア 2019 にて ILT オープンセミナーを開催！

■ILTオープンセミナー「レーザー技術の最先端」

2019年11月12日、東京北の丸公園の科学技術館において開催された「光とレーザーの科学技術フェア2019」にあわせて、ILTオープンセミナー「レーザー技術の最先端 ～レーザー加工からインフラ診断まで～」を開催いたしました。このオープンセミナーは、当研究所の設立以来、毎年継続して開催してきた東京での成果報告会を発展させたもので、当研究所が実施した前年度の主な研究成果の報告だけでなく、2～3のレーザー応用分野の現状や展望をも紹介するという形式に変えて3年目を迎えました。

今年度は、東北大学名誉教授伊藤弘昌先生による「テラヘルツ科学技術の最近の展開」と題する特別講演に



【写真1】展示会場(科学技術館)

加え、「レーザーアブレーションの基礎とシミュレーション」、「陸海空でのリモートセンシング」、「光学素子のレーザー損傷とその評価方法」を紹介いたしました。伊藤先生からは、ご自身がプログラムオフィサーを努めておられるJST産学共創基礎基盤研究プログラム「テラヘルツ波新時代を切り拓く革新的基盤技術の創造」から生まれてきた最新の成果や社会実装を目指す取り組みなどについてご講演いただきました。

また、ジェット水流方式kW級固体レーザー、UVプリンティング用に開発中の小型・高効率UVレーザー、ファイバレーザーを用いた表面加工技術、共鳴ラマン散乱を利用した大気中の微量成分分析、鉄道トンネルをはじめとするコンクリートインフラの健全性を高速で診断できるレーザー遠隔計測技術など、当研究所の最新の研究成果を報告いたしました。事前登録を含めて170名を越える皆様方がご参加くださり、多くのご質問、貴重なご意見をいただくことができました。

■レーザー科学技術フェア

「光とレーザーの科学技術フェア2019」はオプトロニクス社主催の展示会で、11月12日～14日の3日間にわたって開催されました。「レーザー・光技術フェア」に加えて「光学薄膜フェア」、「紫外線フェア」、「分光フェア」など6つの展示会が併催され、また、「光科学フォーラムサミット」、「空飛ぶクルマと未来ものづくり」、「レーザー駆動による量子ビーム加速器」などのセミナーや、出展各社によるセミナーなど多くのイベントが開催されました。当研究所は、上述のようにILTオープンセミナーを開催するとともに、レーザー科学技術



【写真2】ILTオープンセミナー

フェアへ出展し、当研究所の最新技術を紹介いたしました。

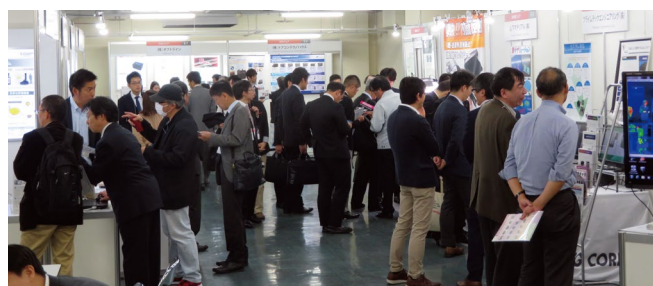
展示ブースでは、当研究所の技術紹介パネルや本誌レーザークロスバックナンバーの展示、コンクリート健全性評価の技術紹介ビデオの上映を行いました。期間中は多くの方々にご訪問いただきました。コンクリート健全性評価技術への関心が最も高く、検査システムの実用化についてのご質問も多くいただきました。



【写真3】伊藤昌弘氏による特別講演

が、レーザーを使ってどうやって計測を行うのかといった、計測原理の詳細について質問される方も多くいらっしゃいました。ついで光学素子損傷評価技術への関心が高く、具体的な評価条件に対するご質問や、損傷評価試験を依頼できないか、といったお問い合わせもありました。また、テラヘルツ波を用いた非破壊検査技術、海中ラマンライダーなどのリモートセンシング技術にも関心が高く、お問い合わせを多くいただきました。

次回の「光とレーザーの科学技術フェア2020」は11月12日～14日、東京都立産業貿易センター浜松町館にて開催される予定です。



【写真4】展示会の様子



【写真5】ILT展示ブース