

NO センサーの分子設計における必要条件の検討

(材料設計) 阿部 光将

1. 緒言

一酸化窒素 (NO) は重要な生理活性物質であり、循環系では内皮由来血管弛緩因子として血圧を調整し、神経系では神経伝達物質として情報伝達し、免疫系ではマクロファージの細胞毒として生体防御している。NO の動態や異常の評価は、NO が関与する病態 (生活習慣病や動脈硬化、狭心症など) の発生や進行の解明と、その病態の診断・予防・治療に貢献できる。NO 濃度を計測するセンサーに求められることは、NO に対する選択性や感度、NO との結合の寿命、計測における簡易性など多岐にわたる。現在、ヘムを含むヘモグロビン (Hb) が NO センサー開発研究に頻繁に用いられている。しかし、Hb のタンパク質部分であるポリペプチド鎖は熱や光、物理的刺激などにより変性され、NO センサーとしての機能を失うなど、問題点を抱えている。

そこで、本研究では Hb を模倣した鉄ポルフィリンを中心とする NO センサーの分子設計を目標とし、NO センシングにおけるタンパク質の役割を解明する。

2. 計算方法およびモデル

Hb は同一アミノ酸配列から成る 2 本のポリペプチド鎖 (α 鎖) ともう 2 本の同一ポリペプチド鎖 (β 鎖)、各鎖に含まれるヘム 4 分子から構成されている。ヘムの第 5 配位部位にはタンパク質のヒスチジン残基 (His) のイミダゾール (Im) が占めている。本研究では、計算方法として QM/MM 法を用い、NO 結合に重要であるヘムや Im、His を含む 3 つのモデルを QM 領域として用いた。これらのモデルを Fig. 1 (a)~(c) にそれぞれ示す。また、ポルフィリンのピロール環 β 位における置換基の影響を比較するために Fig. 1 (d) に示したオクタメチルポルフィリン (OMP) も比較検討した。MM 領域は amber99 のパラメータを適用し、点電荷で近似した。QM/MM 領域の境界は Link Atom として水素原子を挿入した。また、これらのモデルは X 線結

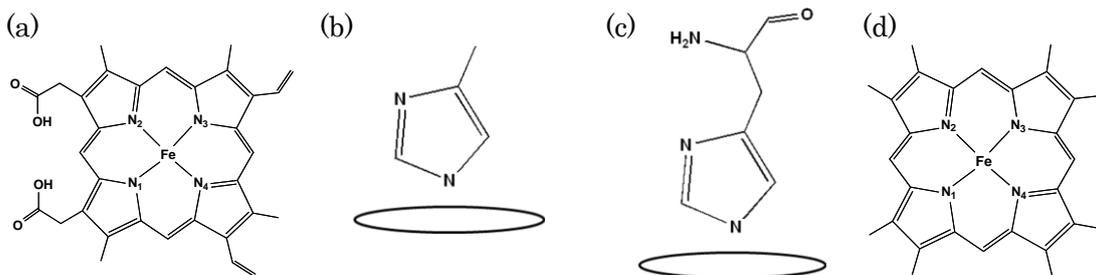


Figure 1. QM models from the Human Hemoglobin

(a) Heme, (b) Heme+Im, (c) Heme+His, (d) octamethylporphyrin (OMP)

晶構造解析によって得られた Human Hemoglobin の構造 (human_hemoglobin.pdb) を用いた。

QM 領域の計算には B3LYP (DFT) を用い、基底関数は Fe に LANL2DZ、Fe 以外の原子に 6-31G(d) を適用した。また、吸収スペクトル計算には TD-DFT 計算を用いた。

3. 結果と考察

まず、Heme+His を用いた QM 計算で、 α 鎖と β 鎖中のヘムの構造と電子状態の比較を行った結果、ほとんど同じ構造、電子状態であることがわかった。よって、以下の計算では β_1 鎖およびヘムの幾何学構造をすべてのモデルに適用する。次に Fe の電子スピン状態を確かめるため

に、Heme、Heme+His をそれぞれ singlet、triplet、quintet のスピン状態で QM 計算した。両方とも、triplet が最安定であったが、singlet との安定度の差は小さかった。この結果より、今回の QM 計算は singlet のスピン状態で行った。

ピロール環 β 位の置換基の影響について QM 計算で Heme および OMP について比較を行ったが、原子電荷分布はほぼ同じで、置換基の違いによる影響も少ないと考えられる。

第 5 配位部位の配位子結合による影響について、Heme、Heme+His、Heme+Im モデルを用いて QM 計算で比較を行った。3つのモデルの原子電荷分布を Table 1 に示す。Heme は他の 2つのモデルに比べて、電荷の分布が異なる。

Table 1. The net atomic charges of Heme, Heme+His, and Heme+Im models by B3LYP calculation

	Fe	N ₁	N ₂	N ₃	N ₄
Heme	0.613	-0.630	-0.620	-0.620	-0.620
Heme+His	0.511	-0.604	-0.595	-0.594	-0.601
Heme+Im	0.511	-0.604	-0.594	-0.595	-0.602

これは 4 配位から 5 配位結合への配位子場の変化によるものであると考える。Heme+His、Heme+Im の電荷分布

の偏りはほぼ等しいことから、配位子 His、Im の違いによる NO 結合への影響は変化しないと予想される。また、配位子の結合エネルギーは His、Im でそれぞれ -28.952, -32.067 kcal/mol であり、脱離することも考えられる。NO センサー設計時には考慮が必要である。

タンパク質がへむに与える影響を調べるために Heme を用いて QM/MM 計算をおこなった。この結果を Table 2 に示す。Heme (QM/MM) と Heme を比較すると、原子電荷の偏り方に違いがみられる。

Table 2. The net atomic charges of Heme model calculated by QM and QM/MM methods

	Fe	N ₁	N ₂	N ₃	N ₄
Heme (QM/MM)	0.520	-0.629	-0.593	-0.611	-0.600
Heme	0.613	-0.630	-0.620	-0.620	-0.620

これより、タンパク質の存在はへむの電荷分布に影響をもたらす、NO の吸着能に少なからず影響するというを表している。

同じように吸収スペクトルに関しても、ピロール環 β 位置換基の影響、配位子の影響、タンパク質の影響を調べた。ピロール環 β 位置換基、配位子ともに吸収スペクトルへの影響は観察されなかった。しかし、Fig. 2 に示すように Heme と Heme (QM/MM) の吸収スペクトルでは違いが表れた。これはタンパク質がへむに影響を及ぼし、軌道エネルギー準位を変化させていることに起因している。

NO が結合した系について同様の計算を行い、各要素の影響について解析を行う。また、へむ複合体生成や NO 結合に対するタンパク質の各々のアミノ酸残基ごとの寄与の解析を行う。

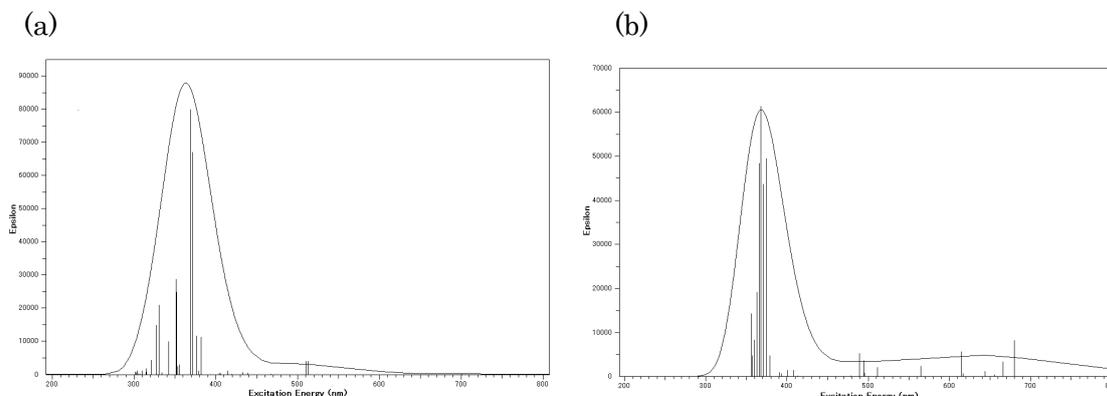


Figure 2. UV/vis absorption spectra of Heme model calculated by (a) QM and (b) QM/MM methods