新学術領域：物質デザイン
平成22年度研究会

多自由度・大規模系における反応と構造空間探索

視物質ロドプシンの吸収波長制御メカニズム

倭　剛久
（名古屋大・大学院理学研究科/CREST, JST）

Univ. Tokyo, 3/5/2011

組織

- 研究代表者
  倭（やまと）　剛久（たかひさ）（名古屋大学・准教授）

- 研究分担者
  光武亜代理（みつたけ　あより）（慶応大学・助教）

- 連携研究者
  岡本祐幸（名古屋大学・教授）
  足立伸一（KEK・准教授）

- 研究協力者
  杉田有治（理化学研究所・准主任研究員）
  渡辺宙志（ひろし）（名古屋大学・学振DC2）

Colleagues

Graduates

T. Kawatsu

PosDoc (Kyoto Univ.)

H. Nishioka

PosDoc (Kyoto Univ.)

A.Yamada

Assist. Prof. (Nagoya Univ.)

(Univ. Texas, Austin)

T. Ishikura

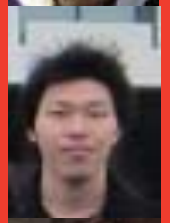
PosDoc (Gifu Univ.)

Y. Miyazawa

(TOYOTA)

Current students

T. Tsuduki (D1)



R. Sato (M1)

T. Hatano (B4)

K. Kawaguchi

(Assist. Prof. Kanazawa Univ.)

K. Koike

(Panasonic)

H. C. Watanabe

(JSPS Fellow, Nagoya Univ.)

(KIT, Germany)

A. Tomita

(TIT)

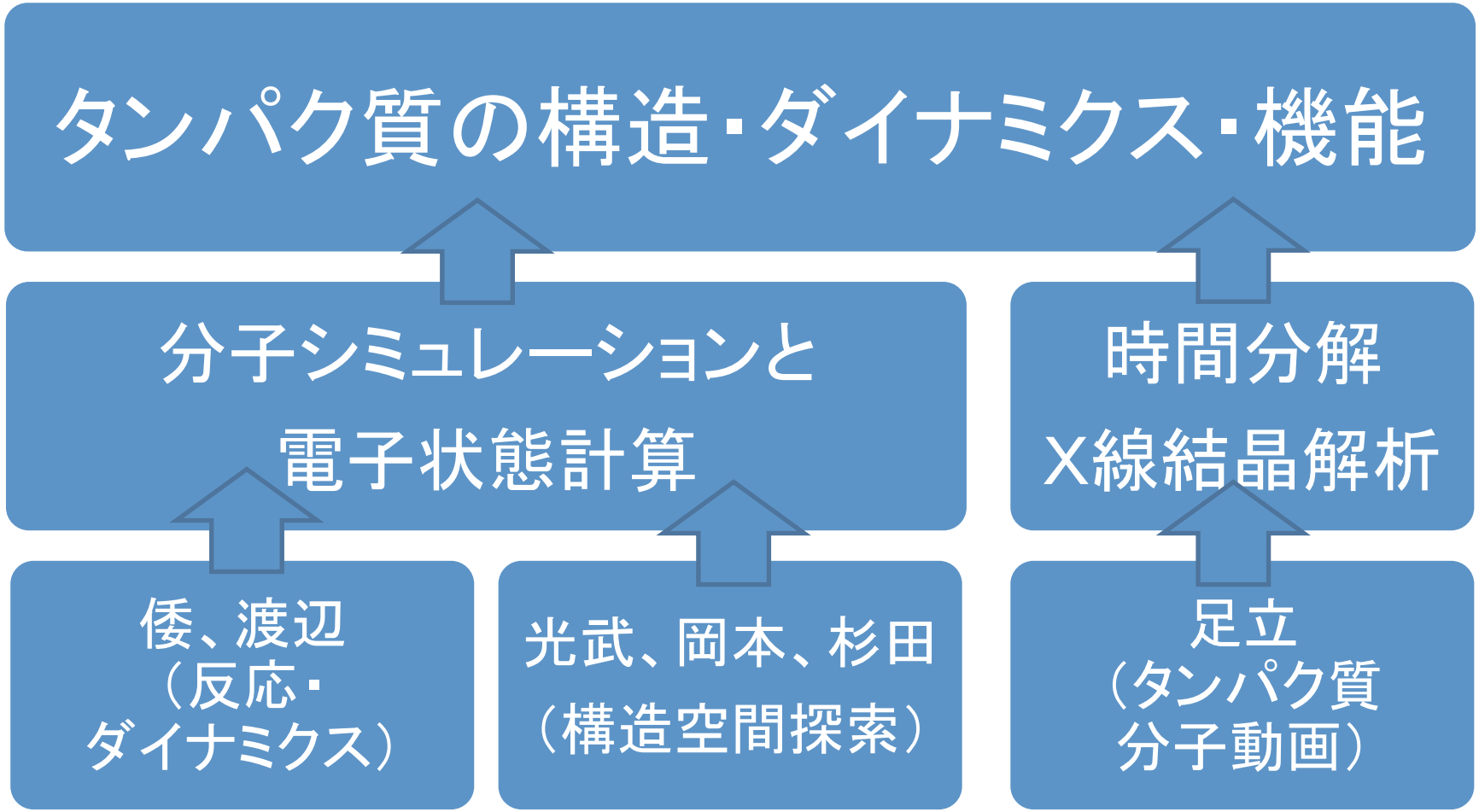
O. Lichtarge
(Baylor College of Medicine)

S. Yokoyama
(Emory Univ.)

K. YURA(Ochanomiz

Univ.)

研究分担と役割


タンパク質の構造・ダイナミクス・機能
分子シミュレーションと
電子状態計算
時間分解
X線結晶解析
倭、渡辺
（反応・
ダイナミクス）
光武、岡本、杉田
（構造空間探索）
足立
（タンパク質
分子動画）

研究概要

- 時間空間分解能の優れた実験手法と構造空間探索能の高い計算手法を併用して、多自由度・大規模系の構造形成・運動・および反応メカニズムにアプローチする。本課題では、**典型的な多自由度・大規模系である生体高分子系に焦点をあて**、分子シミュレーションと電子状態計算を活用して蛋白質の折りたたみ問題、複合体形成、および構造変化や機能発現機構を研究する。そして、時間分解X線結晶解析法による生体分子の動的情報とエネルギー計算を組み合わせ、**分子科学的視点から生体分子が働くメカニズムを深く理解**する。

本のご紹介

生命科学専門書

タンパクシツノリッタイコウゾウニュウモン

タンパク質の立体構造入門

基礎から構造バイオインフォマティクスへ

編者： 藤博幸

発行年月日：2010/12/01
サイズ：B５判
ページ数：190
ISBN：978-4-06-153881-8

定価（税込）：3,675円

購入する

内容紹介

まったくの初学者にもよくわかる入門書。タンパク質の構造の基礎から説き起こし、構造決定法や構造バイオインフォマティクスまでを丁寧に解説する。タンパク質の機能の理解には、立体構造が欠かせない。

目次

第1章　タンパク質構造の基礎
第2章　タンパク質構造の物理化学
第3章　タンパク質の立体構造の特徴抽出と構造比較
第4章　タンパク質の配列・構造・機能の関係
第5章　アミノ酸配列からの構造予測とデザイン
第6章　分子シミュレーション的な技法
第7章　立体構造決定法

視物質ロドプシンの吸収波長制御メカニズム

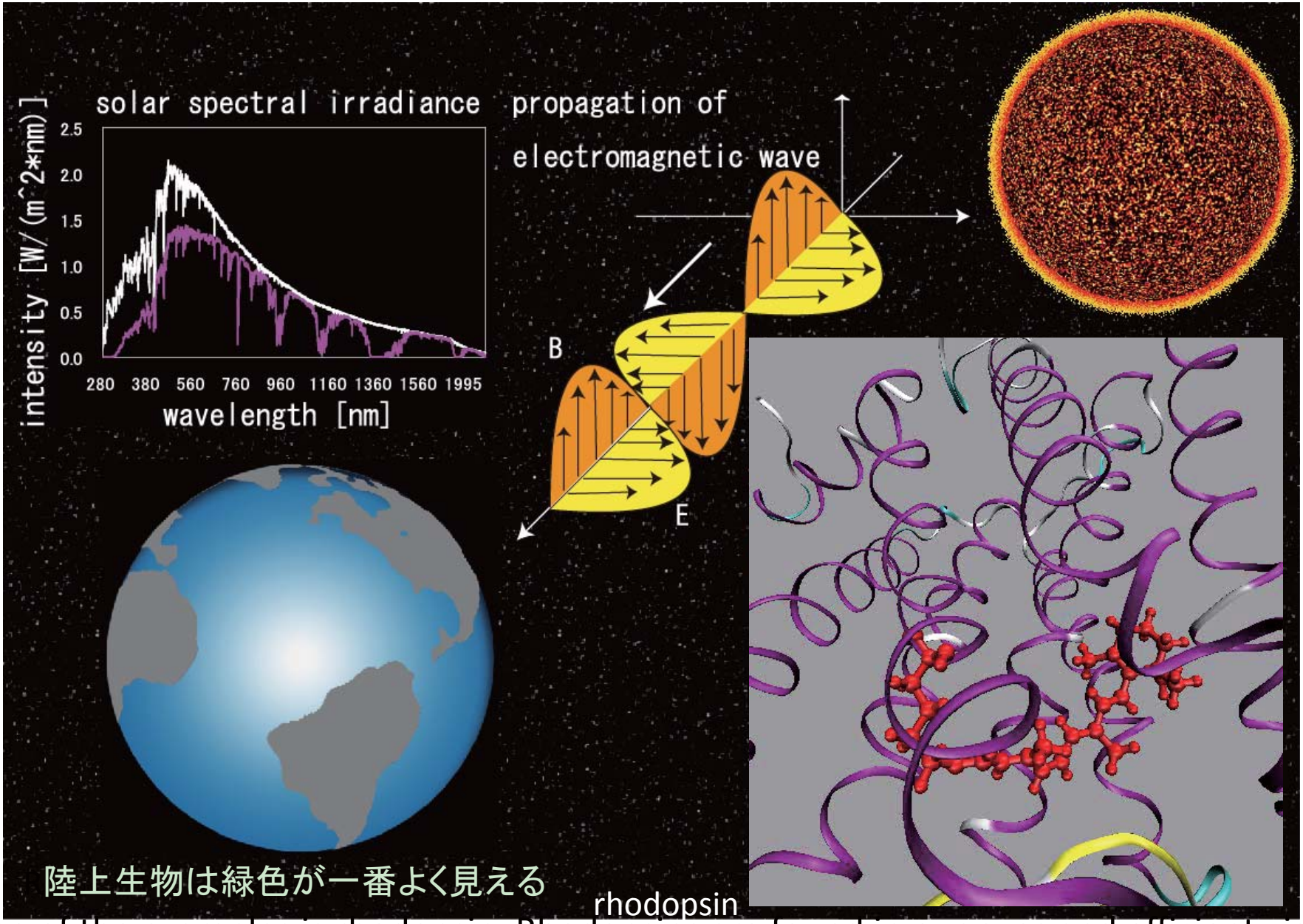
Biophysics, 6: 67-78, (2010)

H. C. Watanabe

(JSPS Fellow, Nagoya Univ.)

(KIT, Germany)

S. Yokoyama
(Emory Univ.)



One of the examples is rhodopsin. Rhodopsins are found in our eyes and efficient visual sensor. It maximally absorbs light at 500nm and undergoes isomerization of retinal chromophore. Then, this reaction induces structure change of the molecule and send signal to the cell.

Renewable Energy Vol. 1, No. 1, pp. 31–35, 1991
Printed in Great Britain.

深海には赤色光が届かない

SOLAR SPECTRUM AT DEPTH IN WATER

J. A. MUADDI and M. A. JAMAL

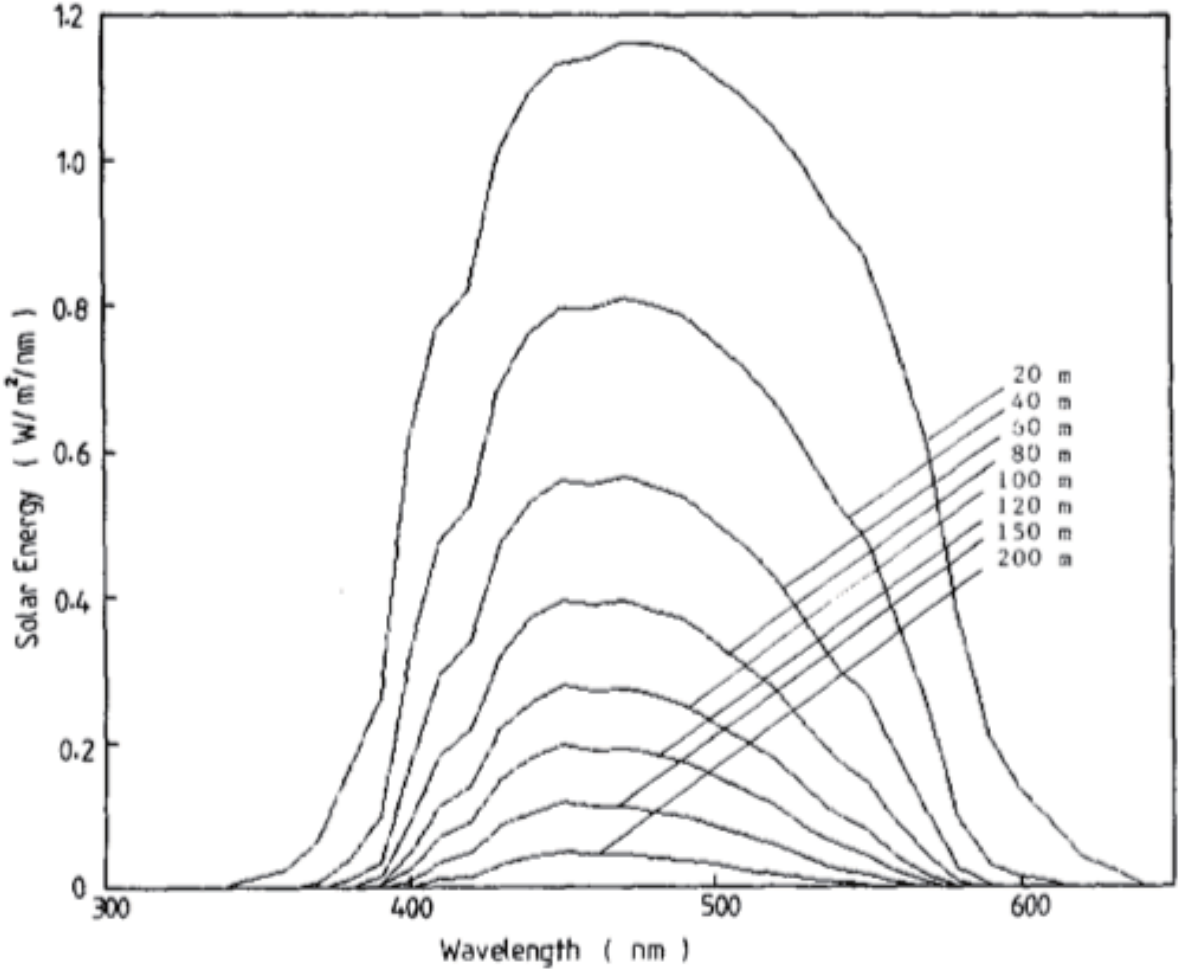


Fig. 6. Solar spectrum at various depths in pure water from 20 to 200 m.

環境への適応

- 浅い海にすむ魚の光センサータンパク質と深い海にすむ魚のものでは、吸収極大波長が違うだろう。
- （深い海にすむ魚は赤色光が見えても意味がない。）

Study tracks the changes in a vision protein as fish evolved

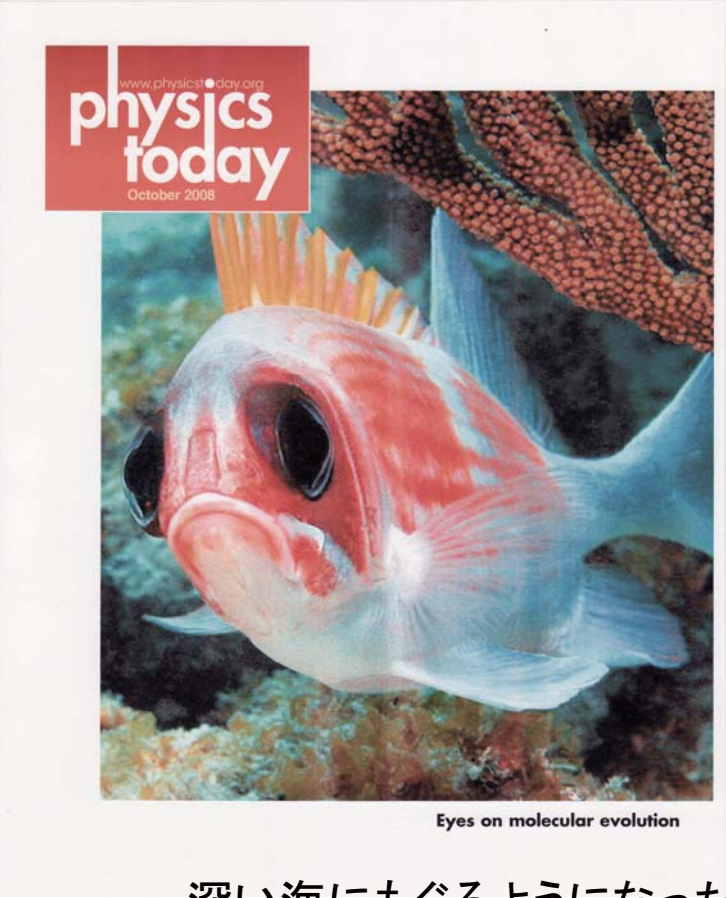
Genetic engineering, statistics, and spectroscopy are combined to address a fundamental question in biology.

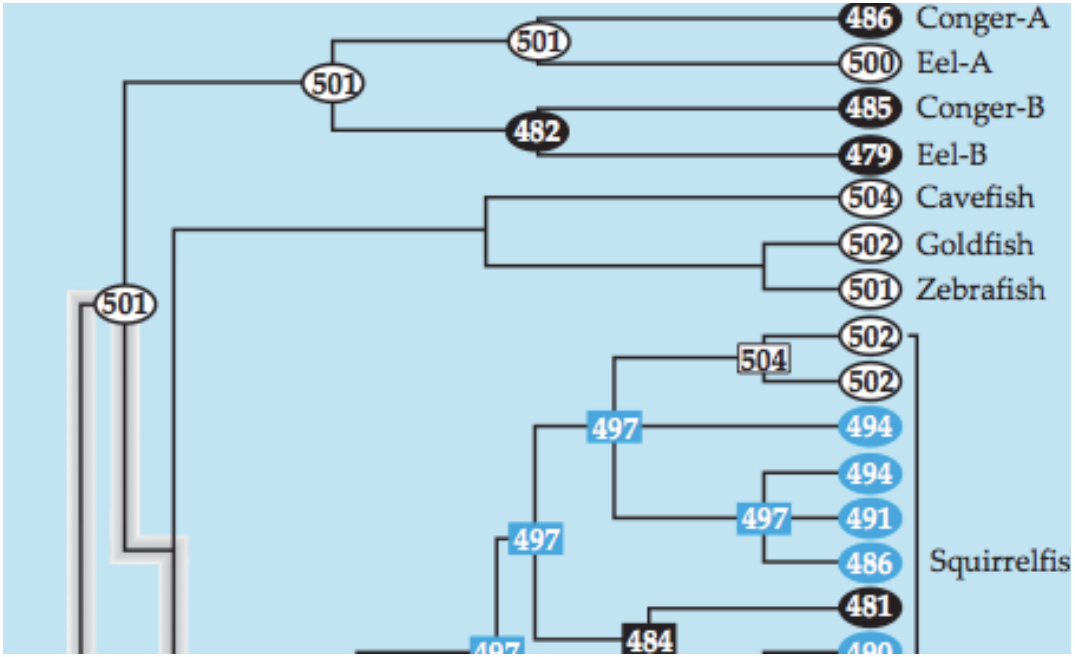
How does Darwinian evolution work on the molecular scale? That is,

water, the spectrum shifts redward.

As you might expect, fish that swim

published, provide strong
tial evidence of molecul





深い海にもぐるようになったアナゴは、浅瀬にすんでいた祖先よりも
λmaxが短波長シフトした視物質（ロドプシン）を持つ。

Color tuningのシナリオ

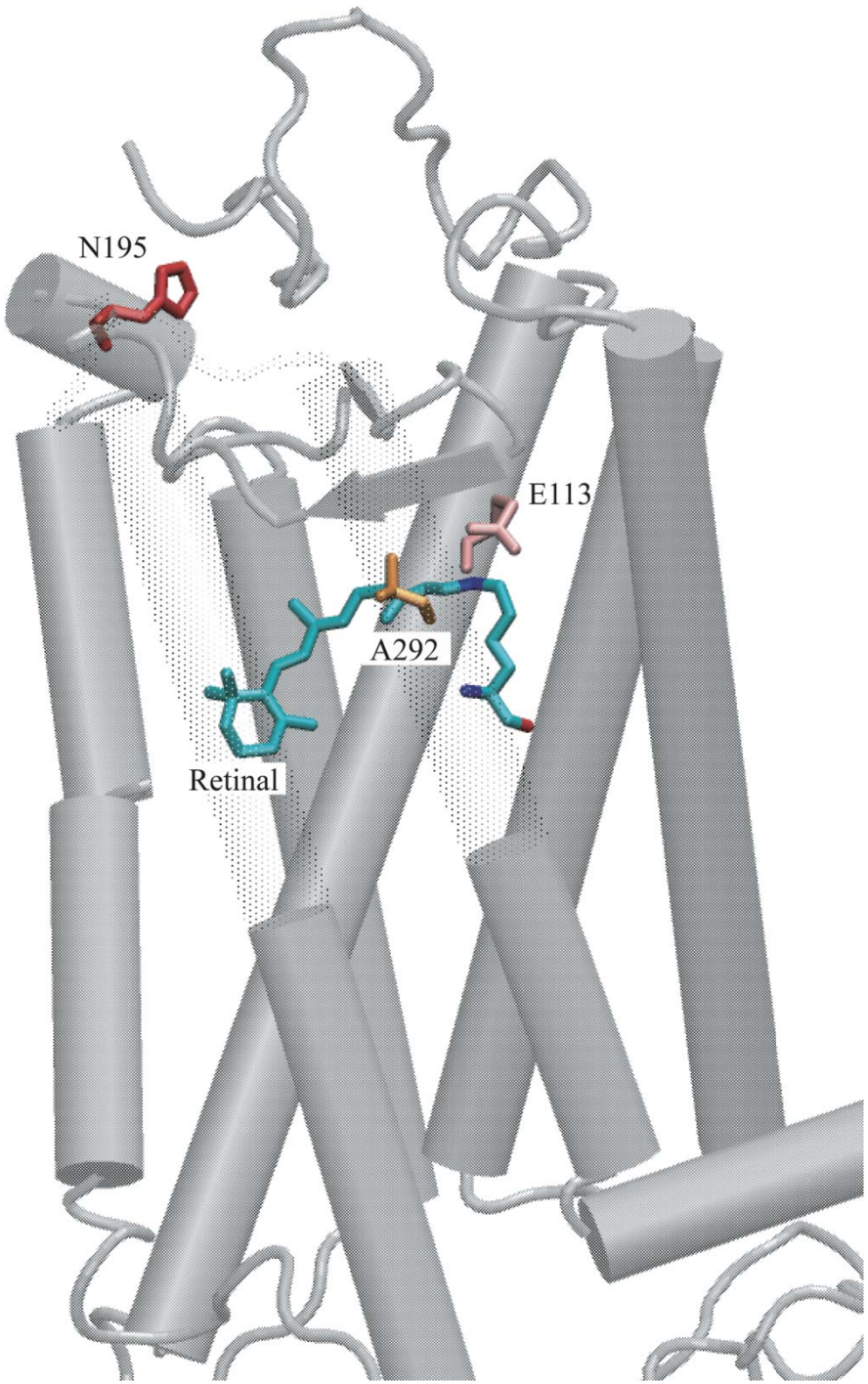
- アナゴとその祖先型のロドプシンはアミノ酸配列が異なる。
- アミノ酸配列が異なればロドプシンの立体構造が異なる。
- 立体構造が異なると、タンパク質とレチナール（可視光を吸収する補因子）との相互作用が異なる。
- 結果として、吸収極大波長がかわる。

どのアミノ酸がcolor tuning に関与しているのか？

Yokoyama et al.
PNAS **105**, 13480 (2008)

P501 :	501 nm
A292S:	502 nm
N195A/A292S:	488 nm

２つのサイトを同時に置換することで、吸収極大波長がブルーシフトする。



アミノ酸残基の分類

疎水性アミノ酸

芳香族アミノ酸：

- **チロシン** (tyrosine (Y))
- **フェニルアラニン** (phenylalanine (F))
- **トリプトファン** (tryptophan (W))

脂肪族アミノ酸：

- **グリシン**（glycine(G)）
- **アラニン** (alanine (A))
- **バリン** (valine (V))
- **ロイシン** (leucine(L))
- **イソロイシン** (isoleucine (I))

側鎖に硫黄原子を持つ脂肪族アミノ酸：

- **メチオニン** (methionine (M))
- **システイン** (cysteine (C))

親水性アミノ酸

ヒドロキシ基を側鎖にもつ脂肪族アミノ酸：

- **セリン** (serine (S))
- **トレオニン** (threonine (T))

塩基性アミノ酸：

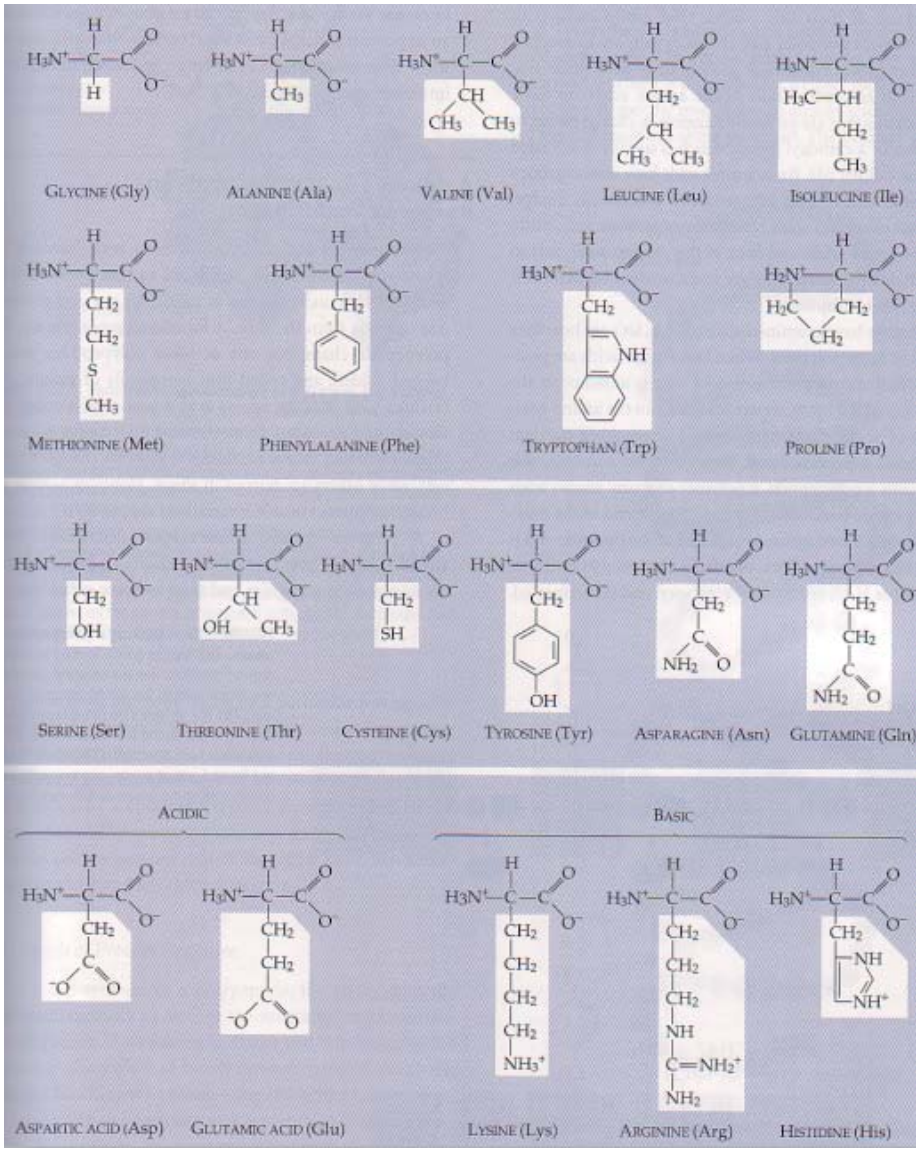
- **リジン** (lysine (K))
- **アルギニン** (arginine (R))
- **ヒスチジン** (histidine (H))

酸性または酸性基の誘導体：

- **アスパラギン酸** (aspartic acid (D))
- **グルタミン酸** (glutamic acid (E))
- **アスパラギン** (aspargine (N))
- **グルタミン** (glutamine (Q))

イミノ酸：

- **プロリン** (proline (P))



BIOPHYSICS

Vol. 6, pp. 67–78 (2010)
doi: 10.2142/biophysics.6.67

Molecular mechanism of long-range synergetic color tuning between multiple amino acid residues in conger rhodopsin

Hiroshi C. Watanabe[1,2], Yoshiharu Mori[1], Takashi Tada[3], Shozo Yokoyama[3] and Takahisa Yamato[1,4,5]

Table 1 Peak excitation energies (*eV*) of the spectra in Fig. 3 and estimated λ_{max} (*nm*)/full width at half-maximum (*eV*)

	In vacuo	Transparent E181	Deprotonated E181	Experiment
p501	2.96 (419)/0.12	2.91 (426)/0.12	2.96 (419)/0.14	2.47 (501)/(0.53)*
SM	2.94 (421)/0.14	2.90 (427)/0.15	3.00 (413)/0.21	2.47 (502)/ —
DM	3.03 (409)/0.05	2.96 (418)/0.11	2.97 (417)/0.31	2.54 (488)/ —

*) Experimental value of FWMH of p501 was taken from that of bovine rhodopsin for reference[60].

計算手順

- (1) Homology modeling (Sali & Blundell, 1993)
- (2) MD simulation (48ns), NAMD program with CHARMM force field for p501, SM and DM.
- (3) 2 stage optimization (MM + QM/MM) was applied to 100 snapshots for each of 3 species.

  (MM: CHARMM, QM: B3LYP/6-31G*)
- (4) Excitation energy (GAUSSIAN program). CASPT2 calculation based on the state averaged CASSCF (12e/12o) wavefunctions with ANO-L (3s2p1d/2s) basis set.

QM領域

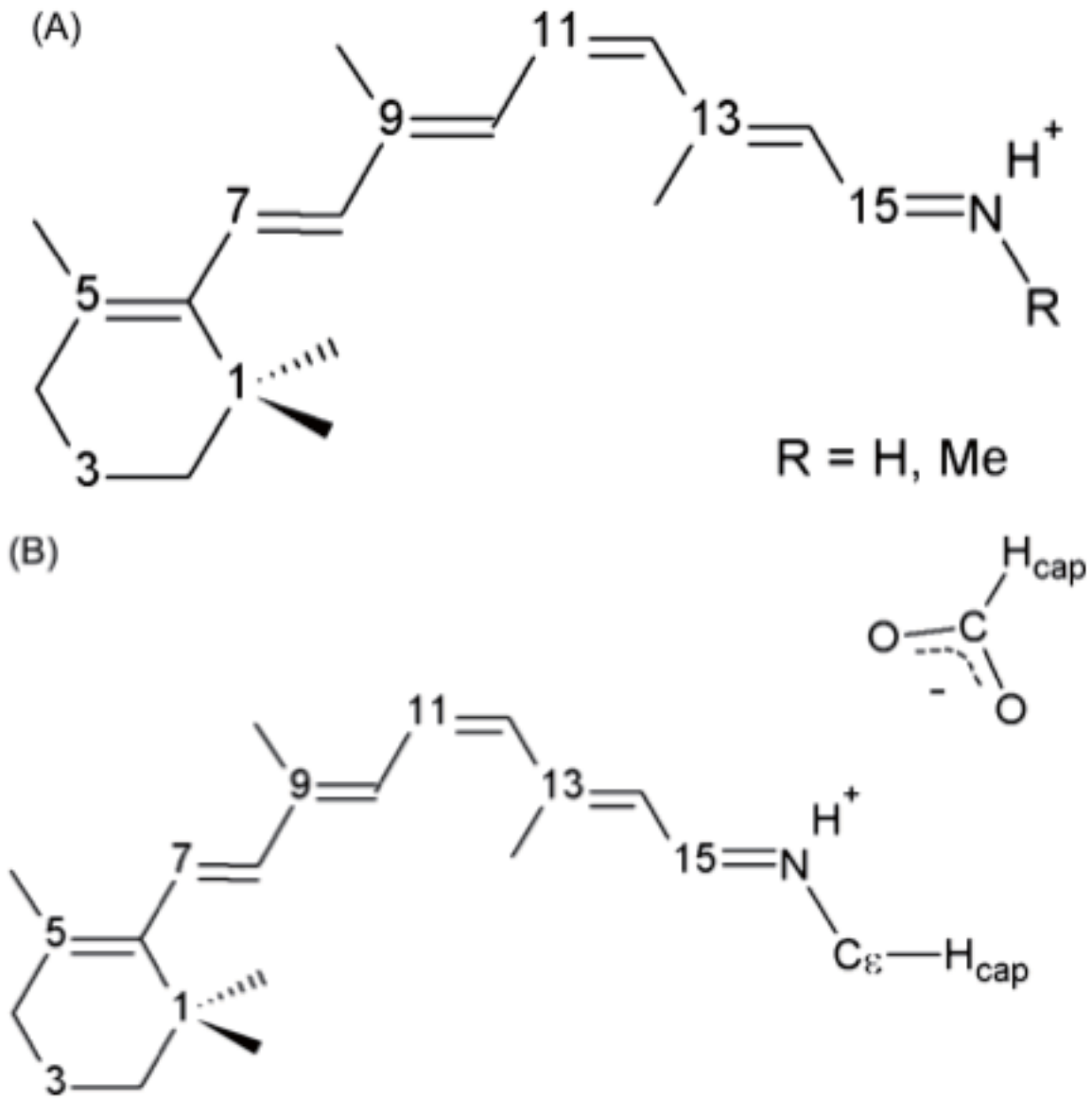
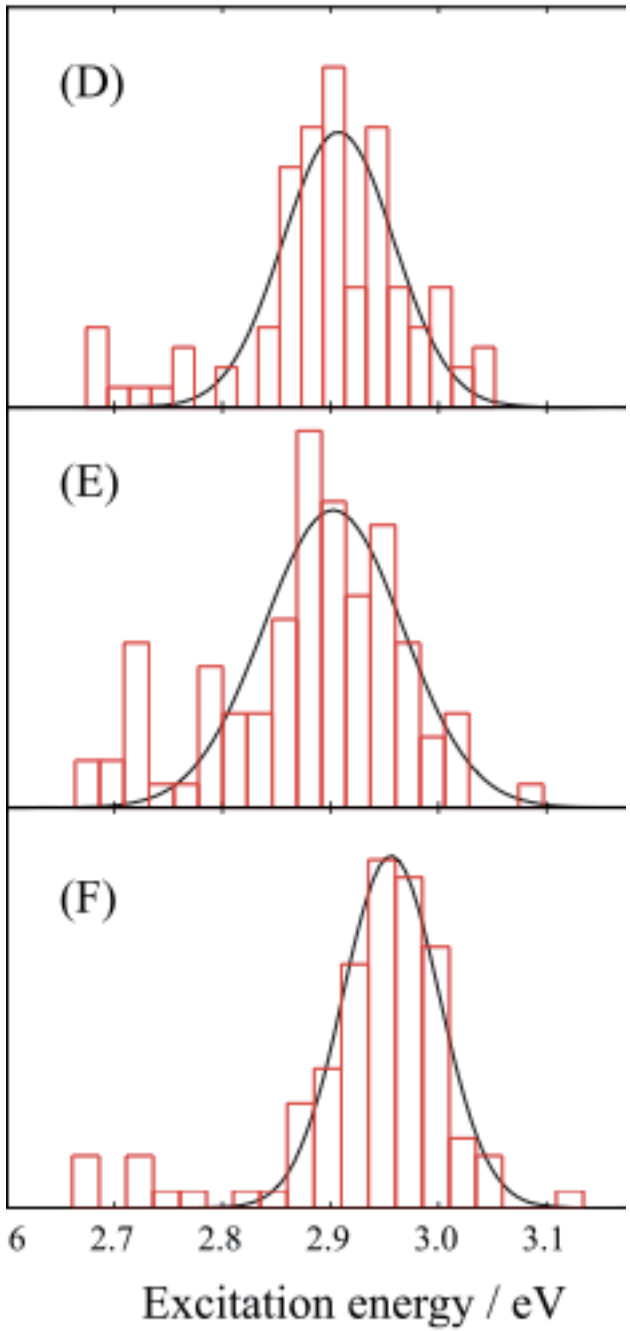


Figure 2 Protonated Schiff-base of retinal (PSBR). (A) QM egion of QM/MM optimization. (B) The model structure for excited tate calculations.


(D)
(E)
(F)
6
2.7
2.8
2.9
3.0
3.1
Excitation energy / eV

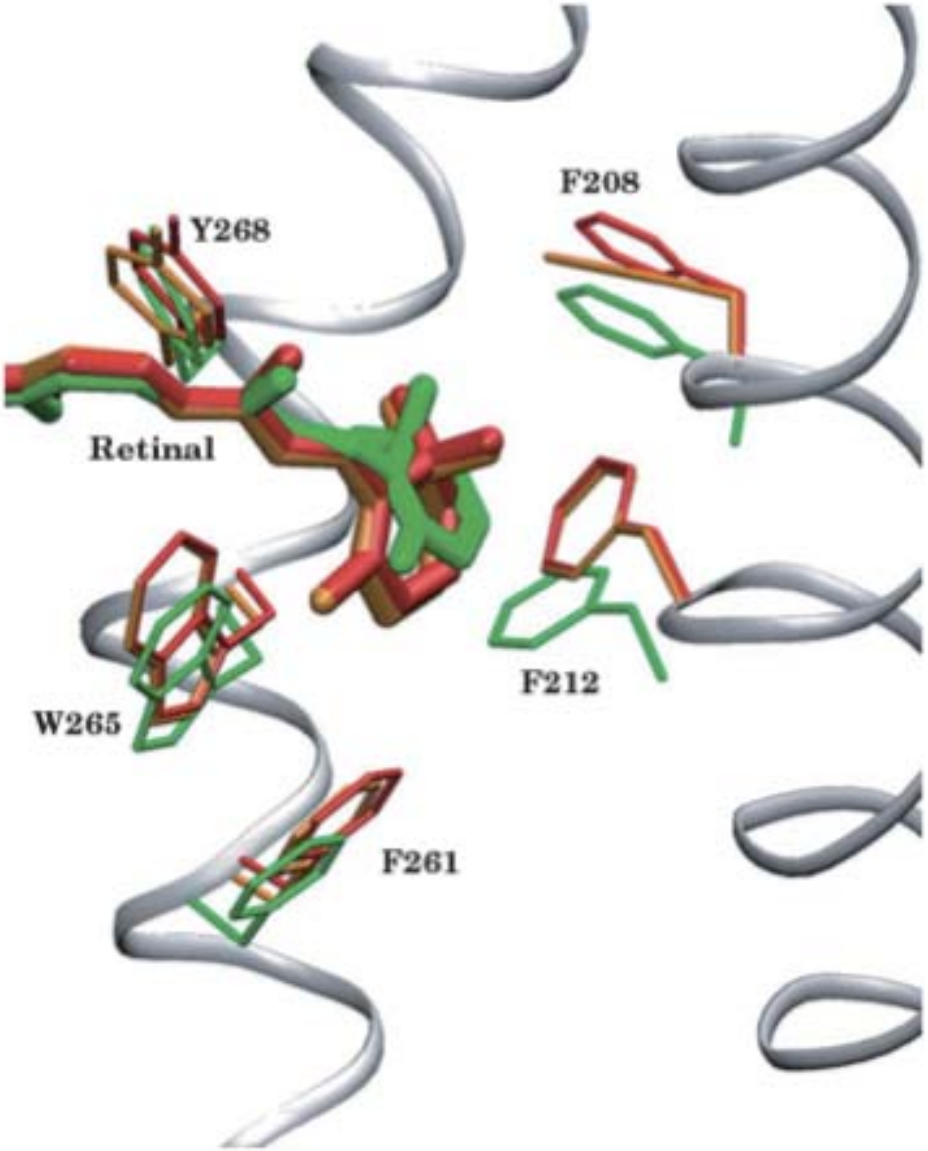


Figure 4 Average structures of the protonated Schiff-base of retinal and the surrounding amino acid residues are shown. The thermal average structure was obtained from MD simulations for p501 (*red*), SM(*orange*), and DM (*green*).

電子状態計算、第一原理計算を活用して、

タンパク質が働く仕組みを理解

機能にとって重要な部位を予測

することが可能だろう。

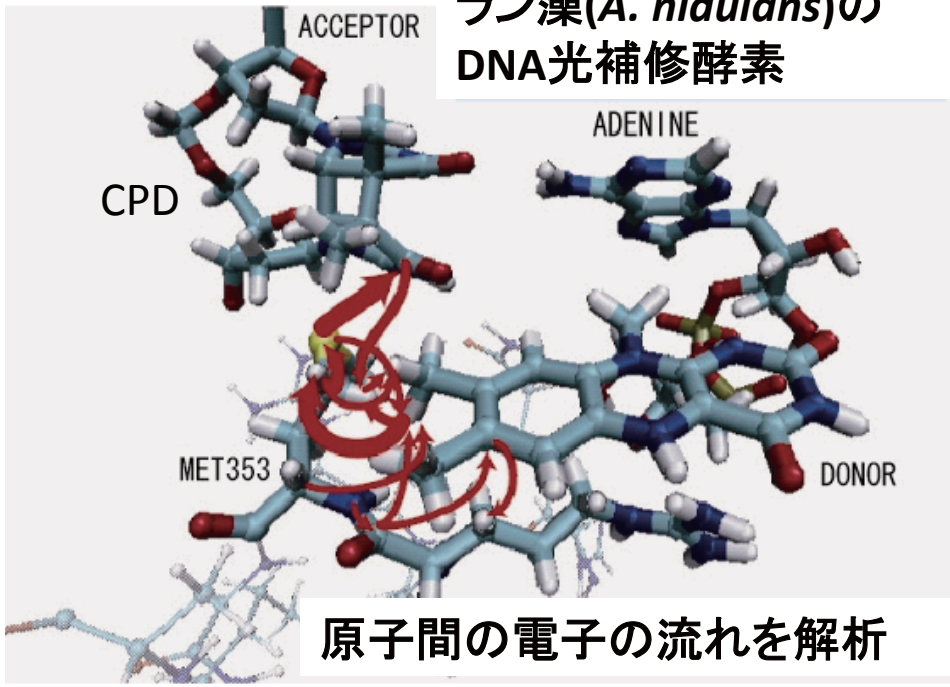
Met353 and CPD-photolyase function

TABLE 1 Experimentally verified function of protein coded by photolyase blue light photoreceptor family gene and amino acid residue at residue number 353

Sequence ID	Species	Verified function	aa at 353
Class I CPD photolyase subfamily:			
PHR_ECOLI (60)	*Escherichia coli*	Catalyze the light-dependent monomerization of CPD	Met
PHR_SALTY (61)	*Salmonella typhimurium*	Catalyze the light-dependent monomerization of CPD	Met
PHR_THET2 (62)	*Thermus thermophilus*	Catalyze the light-dependent monomerization of CPD	Met
PHR_THET8 (63)	*T. thermophilus*	Bind CPD	Met
PHR_VIBCH (64)	*Vibrio cholerae*	Bind CPD, involved in repair	Met
PHR_STRGR (65)	*Streptomyces griseus*	Complement phr-deficient *E. coli*	Met
PHR_HALSA (66)	*Halobacterium salinarium*	Complement phr-deficient *E. coli*	Met
PHR_SYNP6 (67)	*Anacystis nidulans*	Complement phr-deficient *E. coli*	Met
PHR_SYNY3 (55)	*Synechocystis* sp.	Complement phr-deficient *E. coli*, involved in repair of UV radiation-induced DNA damage	Met
PHR_YEAST (68)	*Saccharomyces cerevisiae*	Catalyze the light-dependent monomerization of CPD	Met
PHR_NEUCR (69)	*Neurospora crassa*	Complement phr-deficient *E. coli*	Met
CRY subfamily:			
CRY1_HUMAN (70)	*Homo sapiens*	Circadian clock component, negatively regulate *Per1* transcription independent of light	His
CRY2_HUMAN (70)	*H. sapiens*	Circadian clock component, negatively regulate *Per1* transcription independent of light	His
CRY1_MOUSE (71)	*Mus musculus*	Blue light-dependent regulator of the circadian feedback loop, no photolyase activity	His
CRY2_MOUSE (71)	*M. musculus*	Blue light-dependent regulator of the circadian feedback loop, no photolyase activity	His
CRY1_CHICK (72)	*Gallus gallus*	Blue light-dependent regulator of the circadian feedback loop, no photolyase activity	His
CRY2_CHICK (72)	*G. gallus*	Blue light-dependent regulator of the circadian feedback loop, no photolyase activity	His
CRY1_ARATH (73)	*Arabidopsis thaliana*	Mediate blue light-induced gene expression	Val
CRY2_VIBCH (64)	*V. cholerae*	No photolyase activity	Ala
PHR1_SINAL (57,58)	*S. alba*	No photolyase activity	Val
6-4 photolyase subfamiliy:			
DROCPD1 (74)	*Drosophila melanogaster*	Complement phr-deficient *E. coli*, 6-4 photolyase	His
AB042255(75)	*Xenopus laevis*	Complement phr-deficient *E. coli*, 6-4 photolyase	His
AB017331(76)	*A. thaliana*	Complement phr-deficient *E. coli*, 6-4 photolyase	His
CRY-DASH subfamiliy:			
CRYD_SYNY3 (54)	*Synechocystis* sp.	Bind DNA, repress transcription of eight genes	Gln
CRYD_VIBC (56,64)	*V. cholerae*	Bind RNA, photolyase activity on single-stranded DNA	Gln

Identifing key residue for DNA-photolyase function

Theoretical calculations



ラン藻(*A. nidulans*)の
DNA光補修酵素

原子間の電子の流れを解析

Electron tunneling pathway of DNA-phtolyase. Busy trafic of electron tunneling currents was observed at the Met-353 site.

*A. nidulans*のDNA光補修酵素とアミノ酸配列が類似の配列をデータベース検索。

371個のアミノ酸配列を検出（青色光受容体ファミリー）。

Met-353に該当するアミノ酸を比較。

CPDを光補修する遺伝子は該当のアミノ酸が100% **Met**であり、それ以外の機能をもつ遺伝子はすべて**Met以外**のアミノ酸であった！

Bioinformatics

Yura
(Ochanomizu Univ.)

Miyazawa
(Toyota)

Nishioka
(Kyoto Univ.)

The key residue (Met-353) is perfectly conserved for DNA-photolyase.

Y. Miyazawa, H. Nishioka, K. Yura & T.Y., Biophys. J. (2008), Science News , 03/28/2008.

Tunneling matrix element

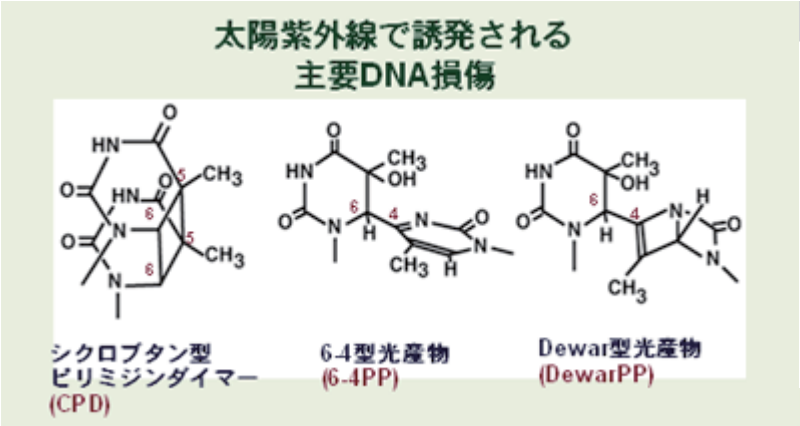
$$T_{DA} = \hbar \sum_{a \in \Omega_D^j, b \notin \Omega_D^j} J_{ab}$$

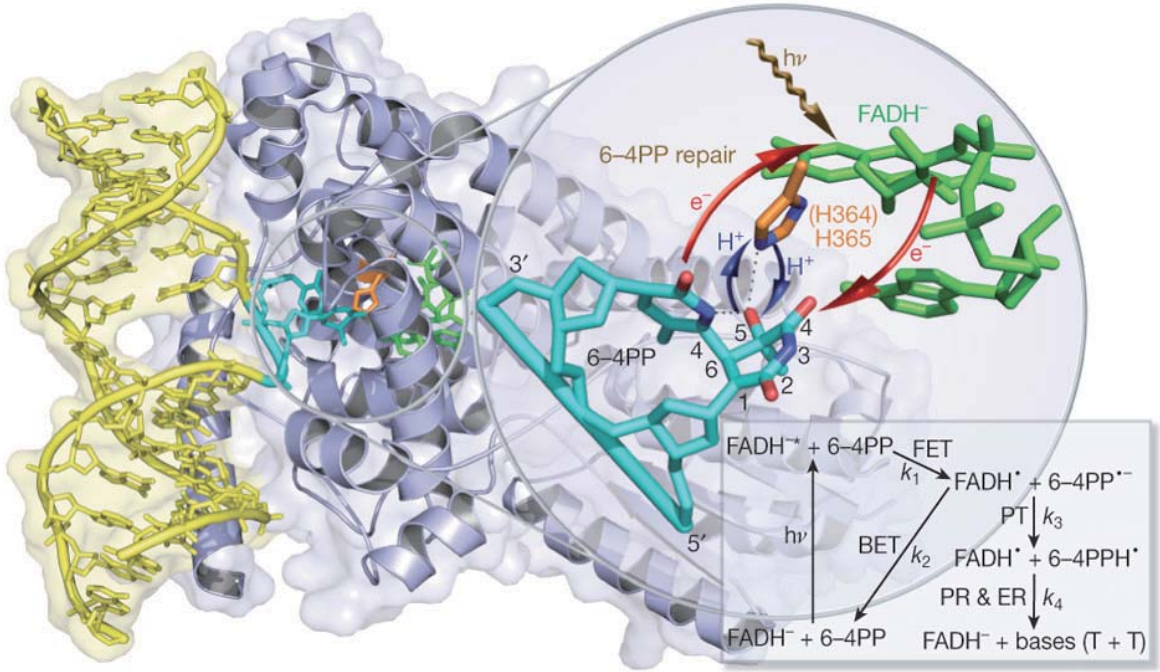
Interatomic tunneling current

$$J_{ab} = \sum_{\mu \in a, \nu \in b} J_{\mu\nu}, \; J_{\mu\nu} = \frac{1}{\hbar}(C_\mu^i C_\nu^f - C_\mu^f C_\nu^i)(H_{\mu\nu} - ES_{\mu\nu})$$

（参考）アミノ酸には全部で20種類ある。Met-353とは端から353番目のアミノ酸がメチオニンであるということ。

6-4 photolyase（CPD以外のDNA損傷を光補修する酵素）の場合



6-4 photolyaseの場合、A. nidulansのMet-353に該当するアミノ酸がHisに置換している。Hisの場合にはプロトン移動に関与すると考えられる。

Met-353の位置のアミノ酸がタンパク質の機能を制御する要になっていることが分かる。