

課題名 (タイトル) : 構造ゆらぎと非調和性を考慮した振動状態計算の開発と生体分子への応用

利用者氏名 :

○ 八木 清*

大滝 大樹*[#]

Surblys Donatas*

Thomsen Bo*

所属 :

* 杉田理論分子科学研究室

客員研究員、長崎大学 (本務)

報告内容

分子認識に関わる生体分子の水素結合構造の解明

(担当 : 大滝)

1. 本課題の研究の背景、目的、関係するプロジェクトとの関係

神経伝達物質とその受容体の分子認識は薬理学的重要性から広く研究されている。分子認識には水素結合が重要な役割を果たしていると考えられているが、詳細な構造は明らかでない。本研究は、振動分光実験と理論計算で共同し、両者の結合構造を明らかにすることを最終的な目的としている。

β 2-アドレナリン受容体では、アミノ酸配列における 204 番目および 207 番目のセリンがアドレナリンのカテコール OH 基と水素結合を形成することが予測されている。そこで、共同研究者である藤井グループ (東工大) では、まず受容体単体の構造を明らかにするため、上記 2 つのセリンを含む 5 残基ペプチド SIVSF (S=セリン(Ser), I=イソロイシン(Ile), V=バリン(Val), F=フェニルアラニン(Phe); 図 1) を合成し、レーザー蒸発超音速ジェット分光法によりペプチド単体の振動スペクトルの測定に成功した。この方法では、試料を非破壊的に蒸発させ、気相中で極低温に冷却することで、安定構造に“固まった”分子の振動スペクトルを構造選択的かつ高分解能で得ることができる。

従来、分子の構造決定は量子化学計算による構造最適化と調和振動数計算を行い、実験スペクトルと比較することで行われてきた。しかし、ペプチドは柔らかく膨大な数の準安定構造が存在するため、最安定構造の探索が難しく、そのまま適用することは困難である。さらに、分子内に多数存在する水素結合は非調和性が強く、調和近似に基づく計算は信頼性が低い。これらの問

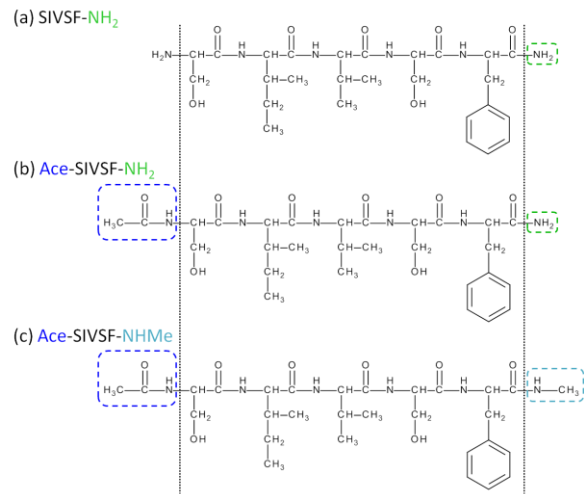


図 1: SIVSF の構造式。(a) 末端非修飾の SIVSF-NH₂, (b) N 末端のみを修飾した Ace-SIVSF-NH₂, (c) 両末端を修飾した Ace-SIVSF-NHMe。

題に対し、レプリカ交換分子動力学法による効率的な配座サンプリング、クラスタ解析を用いた類似構造のグループ化、振動の非調和性を露わに取り込んだ振動状態理論を組み合わせた構造決定手法を考案した。これまでに、考案手法を SIVSF-NH₂ (図 1a) および Ace-SIVSF-NH₂ (図 1b) に適用し、構造決定に成功した (一般利用・課題番号 : G14007, G15020)。しかし、実際のアドレナリン受容体には存在しない末端の NH₂ が不要な水素結合を作ってしまう可能性が示唆された。そこで、両末端を修飾して不活性にした Ace-SIVSF-NHMe (図 1c) についてもスペクトルを取得し、構造決定を行うことで末端修飾の影響を調べた。また、Ace-SIVSF-NHMe とアドレナリンのプロトン付加体 (以下 ALEH) との複合体についても並行して構造決定を行った。両者とも実験により 2 つの振動スペクトルが観測され、2 種類の構造を取ることが分かっている。

2. 具体的な利用内容、計算方法

Ace-SIVSF-NHMe

まず、レプリカ交換分子動力学法により構造サンプリングを行い、30,000 点のスナップショットを取得した。プログラムは NAMD, 力場は CHARMM36 with CMAP を用いた。次に、クラスタ解析を用いて類似構造のグループ化を行い、約 300 個のグループを得た。その後、各グループにおける平均構造に最も近い構造を代表構造として抽出した。このようにして得た約 300 個の構造に対し Gaussian09 を用いて構造最適化を行い、エネルギーの低いものを候補構造とした。候補構造について Gaussian09 を用いた Hessian 計算およびエネルギー一点計算を行い、正確な非調和ポテンシャルを構築した。量子化学計算には B3LYP, CAM-B3LYP, ωB97X などの密度汎関数を使用し、基底関数は 6-31(++)G(d,p)とした。得られた非調和ポテンシャルを用いて、近年報告者らにより開発された oc-VQDPT 法を用いて振動数計算を行った。

Ace-SIVSF-NHMe-ALEH 複合体

レプリカ交換分子動力学法により 300,000 点の構造を取得した後、水素結合構造で分類し、グループ化を行った。各グループから代表構造を選び出し、主成分解析および階層クラスタリングにより類似構造をグループ化した。このようにして絞り込んだ構造に対し Gaussian09 を用いて構造最適化計算を行った。

3. 結果

Ace-SIVSF-NHMe

実験で測定された Ace-SIVSF-NHMe のスペクトルと、計算によって得られたスペクトルとの比較を図 2 に示す。実験と計算のスペクトルは概ね一致しており、この構造が実験で観測された Ace-SIVSF-NHMe のスペクトルの一方に対応する構造と結論付けられる。この構造は計算で得られた構造の中で最安定であり、エネルギー的にも矛盾しない。

図 2 には、観測された構造の水素結合パターンとスペクトルのピークの帰属も示してある。Ace-SIVSF-NHMe の水素結合パターンは SIVSF-NH₂ や Ace-SIVSF-NH₂ の水素結合パターンと大きく異なることが分かった。前年度までの結果から、N 末端側の修飾が SIVSF の構造に及ぼす影響が小さいことが分かっている。一方、今回の計算結果から、C 末端側の修飾はペプ

チドの構造に大きく影響すると考えられる。

Ace-SIVSF-NHMe-ALEH 複合体

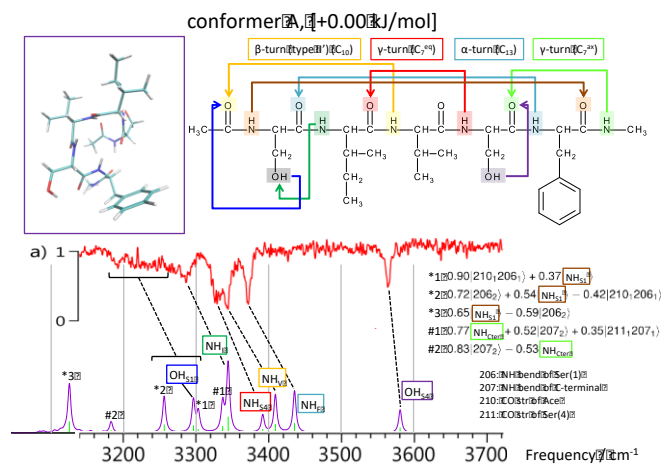


図 2: (上段) 計算によって得られた最安定構造と水素結合ネットワーク。(下段) 計算結果 (紫) と実験スペクトル (赤) との比較。非調和ポテンシャル計算は CAM-B3LYP/6-31(++)G(d,p)レベルで行った。

サンプリングした 300,000 構造を水素結合パターンで分類し、約 16,000 グループを得た。各グループの代表構造に対し、主成分解析および階層クラスタリングを用いて類似構造のグループ化を行い、約 1,000 個のグループを得た。図 3 に、同一グループに属する構造群の一例を示す。よく重なっており、適切に分類できたことが分かる。現在、約 1,000 のグループから代表構造を取り出し、量子化学計算による構造最適化を行っている。

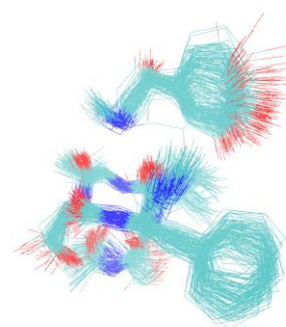


図 3: 同一のグループに属する複合体の構造群 (水素は非表示)。114 個の構造を重ねている。

4. まとめ

末端修飾により不活性化した 5 残基ペプチド Ace-SIVSF-NHMe に対し、分子動力学計算、量子化学計算などを実施し、振動分光実験により観測されたスペクトルの 1 つに対応する構造の決定に成功した。SIVSF-NH₂, Ace-SIVSF-NH₂ の結果との比較により、C 末端側の修飾がペプチドの構造に大きく影響を及ぼすことが分かった。

Ace-SIVSF-NHMe のもう 1 つの構造と ALEH との複合体については構造決定の途中である。また、SIVSF-

NH₂ の構造決定については論文発表を行った。

5. 今後の計画・展望

Ace-SIVSF-NHMe の残り 1 つの構造決定を行う。
Ace-SIVSF-NHMe-ALEH 複合体についても引き続き構造決定を行い、SIVSF と ALEH の水素結合ネットワークを調べる。また、Ace-SIVSF-NHMe 単体と複合体形成時における構造の差異についても解析を行う。

QM/MM 法に基づく生体分子に対する振動解析法の開発と応用 (担当：八木)

1. 本課題の研究の背景、目的、関係するプロジェクトとの関係

我々は、生体分子を対象として、高精度・高効率な振動解析法や反応解析法を新たに開発し、応用計算を展開することを目的として研究を進めている。昨年度は、当グループで開発している分子動力学 (MD) 計算プログラム GENESIS に QM/MM 法を実装した。QM/MM 法は、化学的に重要な領域を高精度な量子化学 (QM) 計算で扱い、それ以外の生体環境を力場関数 (MM) により扱うマルチスケールモデルである。また、L-BFGS-B アルゴリズムを実装することで効率よく安定構造を探索することが可能となり、さらに、安定構造近傍での 2 次微分行列 (Hessian) を求め、調和振動解析を実行することが可能になった。

一方、振動スペクトルを分光学的精度で計算するには、調和近似は精度が不十分であり、ポテンシャルの非調和性を考慮する必要がある。我々は非調和ポテンシャルを生成する multiresolution 法と振動 Schrödinger 方程式を解く振動擬縮退摂動 (VQDPT) 法を開発し、独自のプログラム SINDO に実装した。しかし、これまでの方法は孤立系に対する応用計算しか出来なかった。

本研究では、溶媒やタンパク質などの環境におかれた分子系に対する非調和振動解析法を開発した。QM/MM 法により環境の影響を考慮した非調和ポテンシャルを生成し、VQDPT 法により振動スペクトルを求める。テスト計算として、水中のリン酸イオンの振動スペクトルを計算した。

2. 具体的な利用内容、計算方法

本方法では、まず着目する分子系 (原子数 M) に対する Hessian 行列から基準座標を求める。

$$\begin{aligned} \mathbf{HL} &= \\ \omega^2 \mathbf{L}, \\ H_{ij} &= \\ &= \frac{\partial^2 V}{\partial X_i \partial X_j}, \end{aligned} \quad (2)$$

$$Q_i = \sum_{j=1}^{3M} L_{ji} X_j, \quad (3)$$

ここで、 X_i は荷重変位 Cartesian 座標、 ω_i と Q_i はそれぞれ調和振動数と基準座標である。得られた基準座標を用いて、振動 Schrödinger 方程式は次式のように表される。

$$\begin{aligned} \left[-\frac{1}{2} \sum_{i=1}^{3M} \frac{\partial^2}{\partial Q_i^2} + V(\mathbf{Q}; \mathbf{X}') \right] \Psi_n \\ = E_n \Psi_n. \end{aligned} \quad (4)$$

ここで、ポテンシャル $V(\mathbf{Q}; \mathbf{X}')$ は部分系の基準座標に対する関数であるが、環境原子を平衡構造 (\mathbf{X}') に固定しているため、 \mathbf{X}' にも陰に依存する関数である。すなわち、得られる振動波動関数とエネルギー準位も環境に依存する。

ポテンシャル曲面 $V(\mathbf{Q}; \mathbf{X}')$ を QM/MM 法により生成するため、SINDO と GENESIS のインターフェースを作成した。具体的には、4 次テイラー展開関数やグリッドポテンシャルを生成するために必要な \mathbf{Q} のグリッド点を SINDO により生成し、グリッド点における QM/MM エネルギーと微分値を GENESIS により計算する。グリッド点の数は非常に多いため、これらを並列実行できる実装とした。

得られたポテンシャル曲面を用いて、式(4)を解くことで振動スペクトルが求められる。SINDO は、VSCF 法、VCI 法、VQDPT 法などの手法が実装されている。

開発した方法を水中のリン酸イオン (H_2PO_4^-) へ応用した。まず水中のリン酸イオンに対する MD 計算を 1 ns 実行した。得られたトラジェクトリーから、リン酸イオン周りの水分子の溶媒和構造を解析し、図 4(a) に示すように、リン酸イオンから 3.5 Å 以内に 13 個の水分子が存在する構造が主要な構造として得られた。

リン酸イオンと 13 個の水分子を QM 領域とする QM/MM 法を用いて、構造最適化、調和近似、および VQDPT2 法による非調和計算を実行し、振動スペクトルを求めた。QM 計算のプログラムには Gaussian09 を用いた。計算レベルは van der Waals 力を補正した密度汎関数法 B3LYP-D3 を用い、基底関数は cc-pVTZ を用いた。構造最適化と振動解析では、分子に掛かる力 (force) を繰り返し計算する必要がある、この過程が計算のボトルネックとなる。本研究の場合、構造最適化には 250 回、調和振動計算には 42 回、非調和ポテンシャルの生成には 925 回の Force 計算が必要であった。構造最適化はシリアルに 250 回の Force 計算が必要であるため、1 回の計算が速い GWACSG を利用した。調和、非調和計算の Force 計算は並列化できるため、主に RICC 用いて、多ノードを用いて実行した。

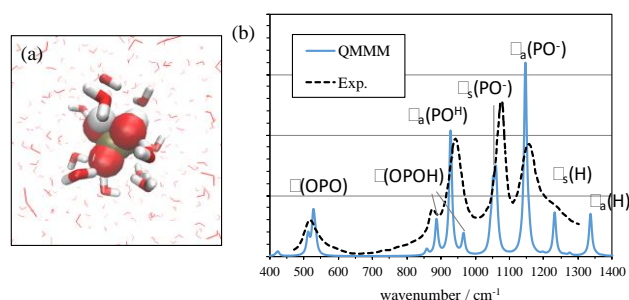


図 4. (a) QM/MM 計算のモデル。リン酸イオンと第 1 溶媒和圏の水分子を QM 領域とし、それ以外を MM 領域とした。(b) QM/MM 計算により得られた振動スペクトルと実験スペクトルの比較。

3. 結果

リン酸イオンの振動スペクトルは非常に強い溶媒効果を示すことで知られている。例えば、P-OH 変角振動は溶媒中で気相より約 200 cm^{-1} のブルーシフトを示し、一方、P=O 逆対称伸縮振動は逆に約 200 cm^{-1} のレッドシフトを示す。このような大きな溶媒効果は、連続誘電体モデル (PCM) では表せず、水分子とリン酸イオンの水素結合を露わに考慮する必要がある。図 4(b) と表 1 に結果を示す。表 1 から気相と溶媒中では大きな振動数シフトが起こることが分かる。また、先行研究の第 1 原理 MD (BOMD) と遜色ない結果が得られた。図 4(b) に示すように、計算は実験スペクトルの形もよく再現した。

4. まとめ

QM/MM 法を GENESIS へ実装し、これを非調和計算プログラム SINDO と接続した。この時、QM 計算によりポテンシャルエネルギー曲面を生成する過程がボトルネックとなるが、この過程を並列化することで、効率よく計算するスキームを考案した。開発した方法とプログラムを用いて、水中のリン酸イオンの振動スペクトルを計算し、良好に実験値を再現することが出来た。本研究により、凝縮相と生体系の分子振動状態を高い精度で計算することが可能となった。

表 1. 気相と水中におけるリン酸イオンの分子振動の振動数。

assign ^a	gas	QM/MM		BOMD ^b	Exp. ^b
		Harm	Harm VQDPT2		
$\delta_a(\text{H})$	1071	1366	1336 (265)	1330	
$\delta_s(\text{H})$	1056	1275	1232 (175)	1241	1213
$\nu_a(\text{PO})$	1327	1166	1146 (-180)	1153	1156
$\nu_s(\text{PO})$	1094	1072	1060 (-33)	1068	1077
$\nu_a(\text{PO}^{\text{H}})$	778	941	928 (150)	928	944
$\nu_s(\text{PO}^{\text{H}})$	750	869	859 (109)	870	879
$\delta(\text{OPO})$	492	530	528 (36)	512	521

a. δ , ν は変角振動と伸縮振動, s, a の添字は対称、逆対称、PO、

PO^H は水素のない、ある酸素との PO 結合を示す。

b. J. Phys. Chem. A **116**, 2466 (2012).

5. 今後の計画・展望

図 4(b) に示すように、今回の計算により、実験スペクトルを良好に再現することができた。しかし、よく見ると、 $\nu_s(\text{PO}^-)$ と $\nu_a(\text{PO}^-)$ の相対的な強度が逆になっていることや、実験では $1200\text{-}1400 \text{ cm}^{-1}$ 領域にブロードなバンドが観測されているのに対し、計算では $\delta_s(\text{H})$ と $\delta_a(\text{H})$ がシャープなバンドを与えている、など、まだ検討する余地が残っている。実験と計算の差を生む 1 つの原因は、構造サンプリングの問題が考えられる。現在の計算は、リン酸の周囲に水が 13 個ある構造だけを考えているが、実際にはより多くの構造がスペクトルに寄与していると考えられる。MD 計算のトラジェクトリーからは、水分子は 9 個から 16 個まで分布していることが分かっている。今後は、各水和構造に対するスペクトルを計算し、それらの重み平均を取ることで、全スペクトルを計算する。

バクテリオロドプシンの水素結合ネットワークに
対する振動解析とプロトン輸送機構の解明
(担当：八木)

1. 本課題の研究の背景、目的、関係するプロジェクト
との関係

バクテリオロドプシン (bR) は、光吸収から得られるエネルギーを利用することで、細胞膜の内側から外側 a へプロトンを能動輸送する機能を持つ膜タンパク質である。好塩古細菌は、bR により得られる膜電位を利用することで ATP を合成し、生命活動を維持している。また、bR は我々の視覚を司る光受容型 GPCR (G タンパク質共役受容体) の遺伝的な祖先に当たる。従って、bR のプロトン輸送機構は非常に興味を持たれてきた。

これまでに、結晶構造解析と分光研究から、光反応サイクルの中間状態が 5 つ知られており、初期状態 BR から始まり、K、L、M、N、O 状態と呼ばれている。最初の K 状態は、レチナールが光吸収し、all trans から 13-cis 体へ異性化した状態で、2 ps 程度の超高速過程である。K 状態が 1 μ s ほど緩和し L 状態を経て、60 μ s ほどで K216 のプロトン化シッフ塩 (PSB) から D85 へ最初のプロトン移動が起こる。この過程には、図 5 に示す、R82, D85, D212, K216 の側鎖と 3 つの水分子により形成される水素結合ネットワークが重要な役割を果たす。振動分光計測から、この部位の水分子の OH 伸縮振動数が大きくレッドシフトし、強い水素結合が形成していることが明らかになっている。様々な変異体や他のイオン透過ロドプシンの実験から、プロトン輸送能と強い水素結合には相関があることが分かっているが、その分子論的な起源は明らかになっていない。

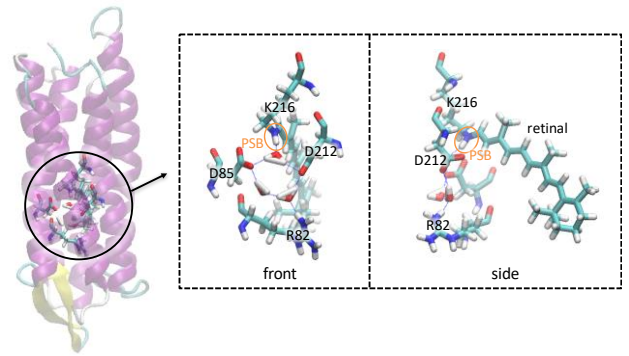


図 5. bR の結晶構造 (1C3W)。タンパク質の全体像 (左) と R82, D85, D212, K216 と 3 つに水分子により形成される水素結合ネットワークの拡大図 (右)。プロトン化シッフ塩 (PSB) を橙で示す。

本研究では、QM/MM 法を用いて、特に水素結合ネットワークに着目し、bR の構造と赤外スペクトルを計算することで、プロトン輸送の機構解明に取り組むことを目的とする。

2. 具体的な利用内容、計算方法

BR および K 状態の結晶構造を初期値として、安定構造を QM/MM 計算により求めた。QM 領域は、初期検討の後、R82, D85, D212, K216 の側鎖と 3 つの水分子に、D85 と D212 へ水素結合する T89, Y57, Y185 の側鎖、R82 に水素結合する 2 個の結晶水とレチナールを加えた。基底関数には、水素結合のアクセプターとドナーには aug-cc-pVDZ を使い、それ以外の原子は cc-pVDZ を用いた。QM 領域の原子数は 106 個、基底関数の総数は 1258 個となった。電子状態計算には B3LYP 法を用いた。

構造最適化、調和振動計算と非調和振動計算を実行した。これらの計算には QM/MM 法による Force 計算を繰り返す必要がある。構造最適化は 250 回の Force 計算を serial に実行した。調和計算と非調和計算にはそれぞれ 636 回と 44,522 回の Force 計算を並列に実行した。前者は主に GWACSG, 後者には RICC を用いた。この計算を BR と K 状態のそれぞれに対して計算し、差スペクトルを計算した。

3. 結果

構造最適化の結果を図 6 に示す。BR 状態では PSB は水分子と強い水素結合を作っているが、K 状態ではレチナールが 13-cis 体へ異性化するのに伴い PSB もフリップするため、水分子との距離が離れ、水素結合が弱く

なる。

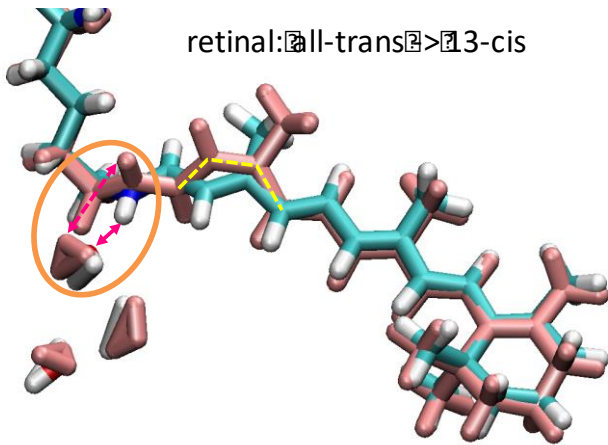


図 6. BR 状態（カラー）と K 状態（ピンク）のレチナル構造の比較。All-tran から 13-cis へ異性化することで、PSB がフリップし、水分子との水素結合が弱くなる。

BR と K の差スペクトルを図 7 に示す。実験スペクトルには、BR 状態では 2100 cm^{-1} 付近に PSB(ν_1)とそれに水素結合した水分子 (ν_3) の強いバンドが観測されている。一方、K 状態では ν_1 は 2500 cm^{-1} 付近までブルーシフトしている。これは、レチナルの異性化により、水素結合が弱くなったことに対応している。

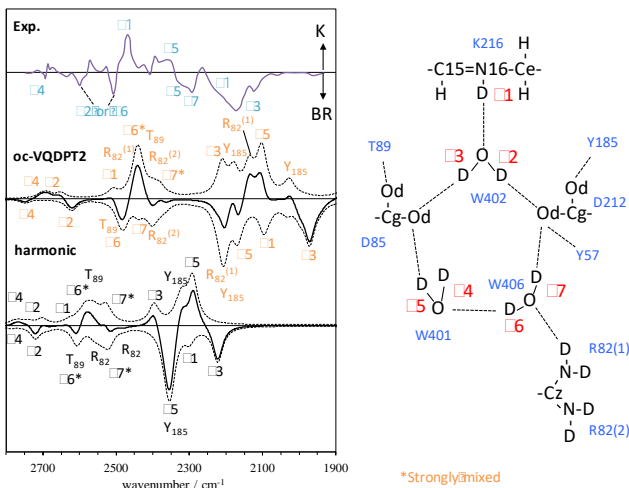


図 7. BR と K 状態の差スペクトル（左）と帰属（右）。

計算では、まず、調和計算と VQDPT2 の比較から、非調和性により振動バンドが大きく低波数側へシフトすることが分かる。これは水素結合系において、非調和性が極めて大きいことを示している。また、VQDPT2 で得られたスペクトルは、BR 状態では低波数側にある ν_1 と ν_3 が K 状態において大きくブルーシフトし、実験の傾向を再現した。

4. まとめ

本研究では、光受容プロトンポンプである bR に対する QM/MM 計算を実行し、基底状態 (BR) と光反応サイクルの初期中間体 (K 状態) の構造と赤外スペクトルを計算した。この計算には、QM/MM による Force 計算を述べ 9 万回を超える繰り返す必要があり、極めて大きな計算負荷が必要となる。これは、HOKUSAI と RICC を用いた並列処理することで、始めて計算可能となった。

5. 今後の計画・展望

今後は 2 つの方針がある。1 つは、図 7 から分かるように、現在の VQDPT2 計算結果は絶対値が実験とあまり合っていない。特に低波数側は $\sim 300\text{ cm}^{-1}$ の誤差があり、これまでの経験から考えるとかなり大きいものになっている。その原因を探る必要がある。2 つ目は、より近似的な理論モデルを構築することである。今回の計算は非調和ポテンシャルを生成するため、PSB 周辺の分子振動を全て考慮した計算となっている。しかし、実験と比較する、興味ある振動モードは遥かに少ない。そこで、振動モードの数を減らした計算を実行し、今回の結果と比較することで、重要な振動モードとそうでない振動モードを見分け、簡便かつ信頼性のあるモデルを構築する。

平成 28 年度 利用研究成果リスト

【論文、学会報告・雑誌などの論文発表】

1. Anharmonic Vibrational Analyses of Pentapeptide Conformations Explored with Enhanced Sampling Simulations, H. Otaki, K. Yagi, S. Ishiuchi, M. Fujii, and Y. Sugita, *J. Phys. Chem. B*, **120**, 10199-10213, (2016).
2. Detection of Sphingomyelin Clusters by Raman Spectroscopy, K. Shirota, K. Yagi, T. Inaba, P.-C. Li, M. Murata, Y. Sugita, and T. Kobayashi, *Biophys. J.* **111**, 999-1007, (2016).

【国際会議、学会などでの口頭発表】

(招待講演)

1. 非調和性を考慮した第 1 原理分子振動状態理論の開発と応用, 八木清, 第 10 回分子科学討論会, 2016 年 9 月, 神戸.
2. Anharmonic Vibrational Structure Calculations of Protonated Water Clusters, $H^+(H_2O)_4$, in Eigen and Zundel Forms, K. Yagi, WRHI International Workshop on Advanced Laser Spectroscopy for Soft Molecular Systems, 2016 年 9 月, 東京.
3. Hydrogen-bond structure of biological molecular recognition systems studied by gas-phase infrared spectroscopy and anharmonic vibrational calculations, K. Yagi and M. Fujii, 日本化学会春季年会, 2017 年 3 月, 東京.

(口頭講演)

1. A mixed quantum/classical approach for predicting amide vibrational bands of sphingomyelin bilayer, K. Yagi, Integrated Lipidology Workshop, 2017 年 3 月, Strasbourg, France.

【その他 (プレスリリース、学術会議以外の一般向けの講演など)】

○ポスター発表

1. QM/MM 法による生体分子の振動スペクトル計算法の開発と応用, 八木清, 「分子システム研究」第 5 回春合宿, 2016 年 5 月, 熱海.
2. レプリカ交換分子動力学計算と非調和振動状態計算によるポリペプチドの構造決定, 八木清・大滝大樹, HPCI 第 3 回成果報告会, 2016 年 10 月, 東京.
3. 生体分子系に対する振動状態理論の開発と応用, 八木清, 新学術領域「柔らかな分子系」第 4 回公開シンポジウム, 2016 年 10 月, 名古屋.