

課題名(タイトル):

## QM/MM 計算に基づく生体分子の振動解析と反応機構解析

Vibrational analysis and reaction mechanism of biomolecules based on QM/MM calculations

利用者氏名:

○八木清(1)、山田健太(1)、大滝大樹(1,2)、秋永宜伸(3, 4)

理研における所属研究室名:

(1)開拓研究本部 杉田理論分子科学研究室

(2)長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 分子標的医学研究センター

(3)計算科学研究機構量子系分子科学チーム

(4) (株) ヴァイナス

## 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。

$\beta$ 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、受容体単体および受容体-アドレナリン複合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およびペプチド-アドレナリン複合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、安定構造にある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

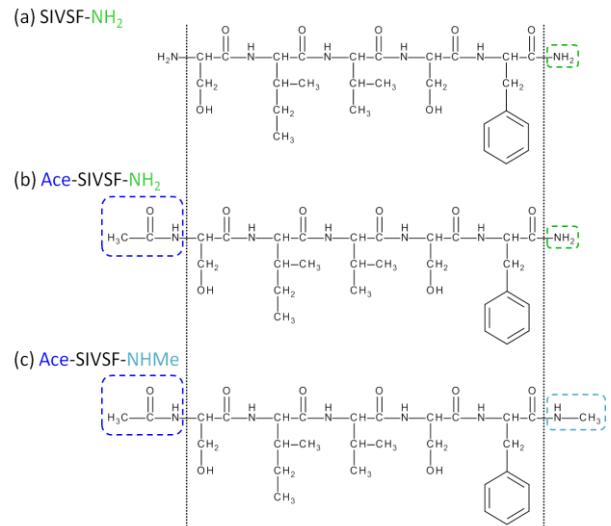


図 1: SIVSF の構造式。(a) 末端非修飾の SIVSF-NH<sub>2</sub>, (b) N 末端のみを修飾した Ace-SIVSF-NH<sub>2</sub>, (c) 両末端を修飾した Ace-SIVSF-NHMe。

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。これらの問題に対し、報告者は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 (oc-VQDPT 法) を組み合わせた構造決定手法を考案した。これまでに、考案手法を末端の状態が異なる SIVSF (図 1) に適用し、SIVSF-NH<sub>2</sub> (図 1a) および Ace-SIVSF-NH<sub>2</sub> (図 1b) の構造決定に成功した (一般利用・課題番号: G14007, G15020)。一方、両末端を修飾した Ace-SIVSF-NHMe (図 1c) は実験により 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が、これま

での計算では一方の構造しか明らかになっていない (一般利用・課題番号: G16018, G17024)。本課題では, Ace-SIVSF-NHMe のもう一方の構造を決定するための計算を行った。

## 2. 具体的な利用内容、計算方法

これまでは配座サンプリングで得た 30,000 点のスナップショットについてクラスタ解析を行い, 約 150 個のグループに分類した中から候補構造を探していた。本年度は, より厳密なグループ化を行うために水素結合解析や RMSD 計算などを利用したグループ化手法を開発し, 約 700 個のグループに分類した。その後, 各グループの代表構造について Gaussian を用いて調和振動計算を行い, エネルギーが低いものや調和スペクトルが実験スペクトルに近いものを候補として選出した。非調和振動計算には Gaussian を用いた Hessian 計算およびエネルギー一点計算を行い, 精確な非調和ポテンシャルを構築した。密度汎関数は B3LYP を使用し, 基底関数は 6-31(++)G\*\* (diffuse 関数は N, O とそれらに結合している H に使用) とした。得られた非調和ポテンシャルを用いて, oc-VQDPT 法を用いて振動数計算を行った。計算された振動数と強度の寄与を半値幅  $5 \text{ cm}^{-1}$  の Lorentz 関数として足し合わせてスペクトル計算を行った。

## 3. 結果

候補構造 6 点に対して非調和振動計算を行った。実験スペクトルとの比較を図 2 に示す。計算した中では ID359 が実験スペクトルと形状に近いが,  $3200 \text{ cm}^{-1}$  あたりの広いピークを再現できていない。

## 4. まとめ

両末端を修飾した 5 残基ペプチド Ace-SIVSF-NHMe の構造を決定するために, 候補構造の絞り込みと非調和振動計算を行った。非調和計算には量子化学計算を用いてポテンシャルを構築した。非調和振動計算の結果, 実験スペクトルとよく似ているものもあったが, 完全に一致しているとは言えず構造決定には至っていない。しかし, グループ化の基準を厳格化することでこれまで得られなかった候補構造を多く得ることができた。

## 5. 今後の計画・展望

本課題では, 計算コストを抑えるためにモード結合強度を用いて取り扱う振動モードの数を全体の 261 から 80 に削減している。ID359 については取り扱う振動モードの数を増やして計算し, 振動モードを削減する際に  $3200 \text{ cm}^{-1}$  あたりに相当する振動の情報を落としていないか精査する。並行して他の候補について非調和振動計算を行い, 実験スペクトルを再現する構造を探索する。実験研究者ともコミ

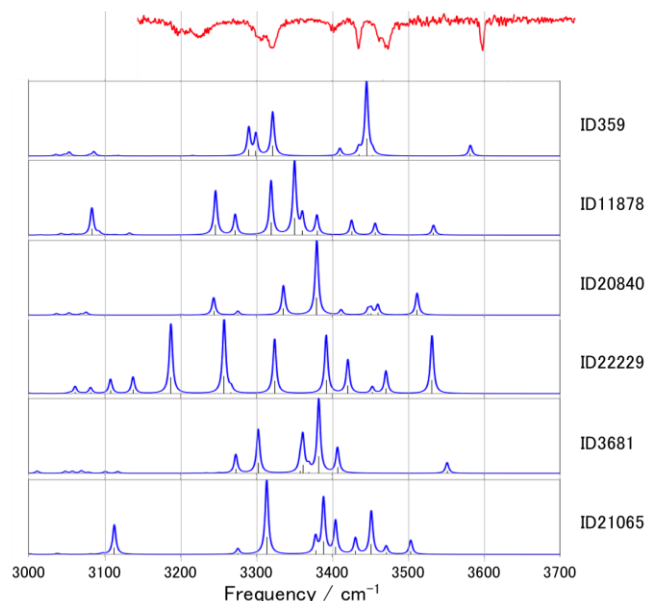


図 2: Ace-SIVSF-NHMe の実験スペクトル (赤) と非調和振動計算により計算されたスペクトル (青) の比較。

ュニケーションを取り, 実験結果から得られる知見と照らし合わせながらペプチドの構造決定を行う。

## 分光測定を活用した一酸化窒素還元酵素における触媒反応機構の理論解析 (担当: 山田、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

チトクロム c 依存一酸化窒素還元酵素(cNOR)は, 細胞毒である一酸化窒素(NO)を無毒な亜酸化窒素( $\text{N}_2\text{O}$ )に還元する反応( $2\text{NO}+2\text{e}^-+2\text{H}^+\rightarrow\text{N}_2\text{O}+\text{H}_2\text{O}$ )を触媒する膜タンパク質である(図 3). その反応機構として, これまでに 3 通りの機構(trans, cis-Fe<sub>B</sub>, cis-heme b<sub>3</sub>)が提案されてきた。しかし, cNOR が膜タンパク質であることに加え, この反応が非常に速く進行すること, プロトン供給源が補酵素ではなく水分子であることから, 実験的に反応機構の解明す

るのは困難であった。

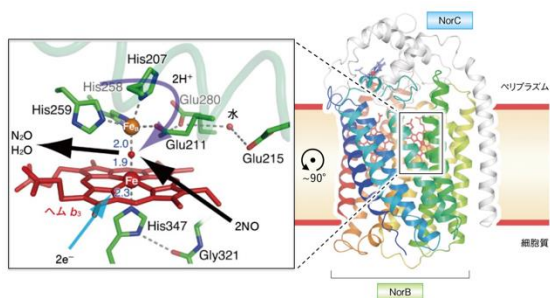


図 3. 一酸化窒素還元酵素とその活性中心の立体構造。  
日野智也・城宜嗣, ライフサイエンス新着論文レビュー  
「生体で亜酸化窒素を生成する一酸化窒素還元酵素の  
立体構造」(2010)より。

本課題では、反応種である NO 分子の NO 伸縮振動の振動数( $\nu_{N-O}$ )をモニターすることで cNOR の反応機構を明らかにすることを目的とする。我々のグループで開発してきた QM/MM 計算に基づく非調和振動解析を用いて、NO 伸縮振動の振動数( $\nu_{N-O}$ )を計算する。実験値と計算値を比較し、NO 還元反応機構を解明する。また、MD トラジェクトリーからの構造の選び方、QM 領域の選び方などの影響を慎重に調査し、計算方法を確立する。本年度は waiting 状態のヘム鉄( $Fe_{b3}$ )および non-ヘム鉄( $Fe_B$ )の安定な電子状態を求め、そこへ 1 つ目の NO 分子が結合する過程を計算した。プログラムには開発版の GENESIS を、計算機は BW-MPC を用いた。

## 2. 具体的な利用内容、計算方法

まず、cNOR の結晶構造(PDBID: 3WFB)を初期値とし、これを POPE 脂質二重膜に埋め込み、水溶液環境に配置したモデルを作成した。次に、10,000 ステップのエネルギー最小化の後、cNOR と POPE の構造に制限をかけた温度体積一定(NVT)および温度圧力一定(NPT)の MD 計算をそれぞれ 1.5 ns 実行し、さらに POPE の構造の制限を徐々に緩和する NPT 計算を合計 8 ns 実行した。得られたトラジェクトリーの最終構造を用いて QM/MM 計算を実行した。QM 領域は反応活性中心である  $Fe_{b3}$  とその配位子(ヘム, His347),  $Fe_B$  とその配位子(His207, Glu212, His258, His259)および NO 分子とした。QM 計算のレベルは密度汎関数法(B3LYP-D3)と基底関数には 6-31G(d)と鉄の ECP として LanL2DZ を用いた。力場には CHARMM36 を用いた。

## 3. 結果

NO 分子が配位していない状態で、 $Fe_{b3}$  と  $Fe_B$  が取りうるスピン状態(1 重項, 3 重項, 5 重項)における安定構造とエネルギーを網羅的に調べた結果、ともに 5 重項が安定であることが分かった。次に、NO 分子が  $Fe_{b3}$  あるいは  $Fe_B$  へ結合した構造を計算した。それぞれにおいて鉄が 1 重項と 5 重項の場合があり、合計 4 パターンに対し、安定構造を求め、NO 伸縮振動を計算した。

得られた構造の 1 つである  $Fe_B$  へ NO 分子が配位した構造を図 4 に示す。NO 分子は Trp203, Val206, Val210 の近傍から反応活性中心へ入ることが知られているが、図 4 から、NO 分子はこれらの残基とヘムの間に空いている空間を通り、 $Fe_B$  へ難なく配位できることが分かる。このとき、NO 伸縮振動数は  $1764.8 \text{ cm}^{-1}$  と得られた。

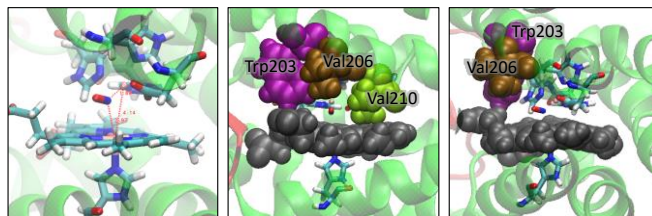


図 4. QM/MM 計算により得られた  $Fe_B$  へ NO 分子が配位した構造。

## 4. まとめ

QM/MM 計算により、cNOR の  $Fe_{b3}$  および  $Fe_B$  の電子状態を調べ、1 つ目の NO 分子がそれらに配位した構造と NO 伸縮振動数を計算した。

## 5. 今後の計画・展望

今回得られた NO 伸縮振動数は実験値と比較し、 $100 \text{ cm}^{-1}$  ほどずれている。その原因として、基底関数や汎関数の選択などを検討し、QM 計算のレベルを検証する。また、NO 分子が  $Fe_B$  と  $Fe_{b3}$  の間に架橋した構造など、まだ調べていない構造も調査する。

ロドプシンの内部水とプロトンポンプ機能に関する  
理論的研究  
(担当: 八木, 秋永)

## 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、光を吸収し、濃度勾配に逆らいプロトン細胞内から外へ輸送する、光駆動型プロトンポンプである(図 5). Lys216 のシッフ塩近傍には、3 つの内部水と極性残基による水素結合ネットワークが存在する. 名工大の神取らは、重水環境で光反応中間体のスペクトルを測定し、その差から OD 伸縮振動を帰属した(Shibata and Kandori, *Biochemistry* 2005). さらに、変異体のスペクトルを解析することで、プロトン移動経路が解明された(Garczarek and Gerwert *Nature* 2006).

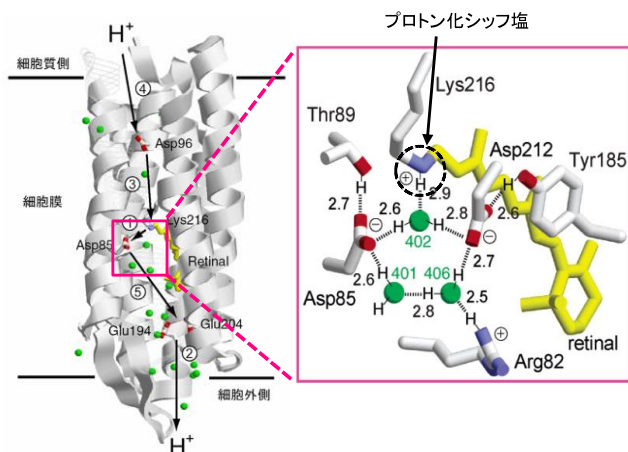


図 5. バクテリオロドプシンのプロトン化シッフ塩(青)とその周辺に存在する内部水による水素結合ネットワーク. Shibata and Kandori, *Biochemistry* 44, 7406 (2005)より抜粋.

興味深いことに、シッフ塩と内部水の水素結合の強さとプロトンポンプ機能には相関があることが見出されている. プロトンポンプ機能を持つ BR は水分子の OD 伸縮振動が低波数側に現れ、機能を持たない Cl<sup>-</sup>イオンポンプ(HR)やセンサーロドプシン(SR)ではそれが高波数側に現れる. しかし、このような振動バンドの変化が、分子構造にどのように関連付けられるか、また、プロトンポンプ機能の発現にどのように関わっているのかまだ分かっていない.

本課題では、新たに開発した QM/MM 計算と非調和振動状態計算を用いて、ロドプシン内部水の水素結合の振動バンドを計算した.

## 2. 具体的な利用内容、計算方法

BR の結晶構造(PDBID: 1M0L)を POPC 脂質二重膜へ埋め込み、水溶液環境に配置したモデルを作成した. 次に、5,000 ステップのエネルギー最小化の後、BR の構造に制限をかけたまま、温度体積一定(NVT)および温度圧力一定(NPT)の MD 計算をそれぞれ 50 ps, 325 ps 実行した. さらに、BR の構造を徐々に緩和しながら 7.75 ns の平

衡化を行った後、構造に制限を外した状態で 10ns のシミュレーションを実行した.

得られたトラジェクトリーを用いて QM/MM 計算を実行した. QM 領域は、最小モデルとして水素結合ネットワークを形成する Arg82, Asp85, Tyr185, Lys216,レチナールおよび3つの内部水とした(QM1). また、より大きな QM 領域として、Tyr57, Thr89, Tyr185 を含めたモデル(QM2)でも計算した. QM 計算のレベルは密度汎関数法(B3LYP-D3)と基底関数には水素結合に関与する酸素、窒素、水素は aug-cc-pVDZ, その他の原子には cc-pVDZ を用いた. 力場には CHARMM36 を用いた. 非調和振動計算は局所化させた振動モードを用いて実行した. 図 6 に示すように、シッフ塩近傍と 3 つの水分子をそれぞれ局所化のドメインとし、ドメイン内では非調和性を考慮するが、ドメイン間では調和ポテンシャルのみを考慮する. 非調和ポテンシャルには 2 モード結合項までは grid ポテンシャル, 3 モード結合項は QFF を用いた. 得られたポテンシャルのもとで、VQDPT2 法により振動数と赤外吸収強度を求めた.

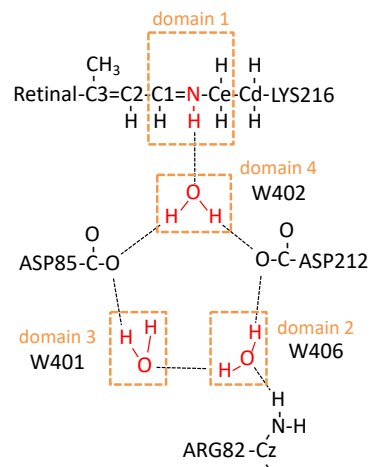


図 6.振動モードを局所化させたドメイン.

## 3. 結果

図 7 に BR の構造を結晶構造に制限し、得られた水分子の OH 伸縮およびシッフ塩の NH 伸縮振動に由来する赤外スペクトルを示す. この結果から、調和近似で得られるスペクトルと非調和のスペクトルは大きく異なっており、水素結合を形成する OH/NH 伸縮振動には非調和性が大きく寄与することが分かる. 一方、ドメイン間結合項の影響はそれほど大きくない. ドメイン間の調和項のみを考慮した結果は full の結果をよく再現する.

一方、実験と比較すると、計算されたスペクトルは全体的に低波数側へシフトしている. また、実験では 33 – 36 の振

動モードが低波数側にあり、すなわち、強い水素結合を持つことを示唆しているが、計算結果はこれを再現していない。従って、この結果ではまだ定性的にも不十分である。

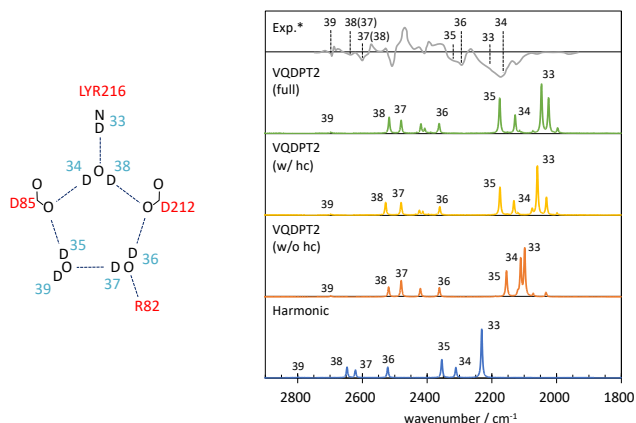


図 7. 水分子と Schiff 塩の OH/NH 伸縮振動の赤外スペクトル。上段から: 実験で得られた差スペクトル。非調和ポテンシャルを 3MR まで全て考慮した結果。ドメイン内ポテンシャルは 3MR, ドメイン間結合項は調和項のみ考慮した結果。ドメイン内ポテンシャルは 3MR, ドメイン間結合項を無視した結果。非調和項を全て無視した結果。QM 領域は QM1。

そこで、QM 領域を拡大し、3 つの水分子に直接水素結合している残基だけでなく、Asp85 と Asp212 へ水素結合する Tyr57, Thr89, Tyr185 を QM 領域に含め、同様の計算を実行したが、有用な改善は見られなかった。

次に、BR を結晶構造から緩和させた 10 ns のトラジェクトリーを解析し、水素結合に基づくクラスタリングにより主要な構造を取り出し、同様の手順で QM/MM 計算により振動スペクトルを求めた。結果を図 8 に示す。その結果、最もメジャーなタイプである #896(49.0) では Arg82 の水素結合パターンが変化し、33 - 36 の 4 つの振動モードが低波数側へ現れるパターンが得られた。

#### 4. まとめ

本課題では、BR のプロトンポンプ機能に強く関わっているレチナールの Schiff 塩近傍に形成される強い水素結合ネットワークに対する振動スペクトルを計算した。振動モードをドメインへ局所化し、ドメイン間の非調和結合項を無視する近似を導入することで、精度を落とすことなく、計算負荷を 4 倍下げることができた。MD 計算による緩和を考慮することで、

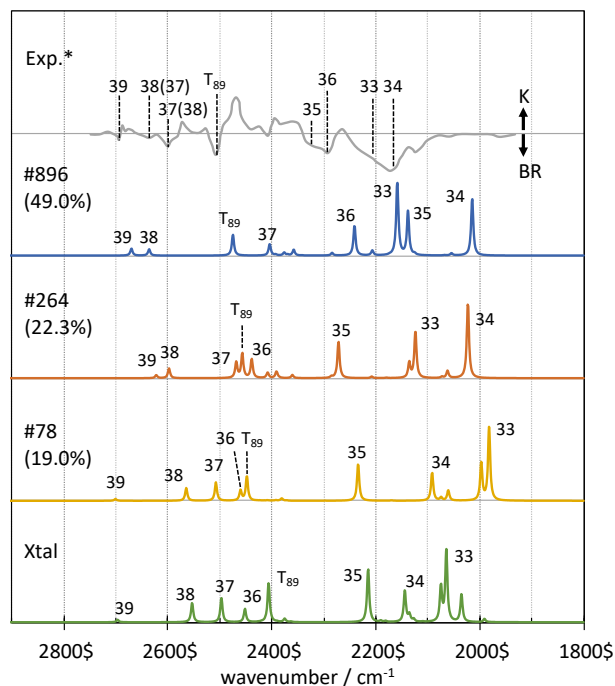


図 8. MD 計算で得られたスナップショットから得られた構造をもとに QM/MM 計算により得られた赤外振動スペクトル。

#### 5. 今後の計画・展望

本年度の計算により、実験値との一致は少なくとも定性的な一致が得られるようになり、格段に進歩したと言える。しかし、低波数側のスペクトルが実験と計算ではまだ 100 - 200 cm<sup>-1</sup> ほどずれており、定量的と言える精度にはまだ達していない。今後は、さらに QM 領域を大きく取り、また基底関数などの QM 計算の精度を上げることで、低波数側の一致が良くなるかどうかを検討する。

平成 30 年度 利用研究成果リスト

【雑誌に受理された論文】

- [1] Anharmonic Vibrational Analysis of Biomolecules and Solvated Molecules Using Hybrid QM/MM Computations, K. Yagi, K. Yamada, C. Kobayashi, and Y. Sugita, *J. Chem. Theory Comput.* in press.
- [2] Weight-Averaged Anharmonic Vibrational Calculations: Applications to Polypeptide, Lipid Bilayers, and Polymer Materials, K. Yagi, H. Otaki, P. -C. Li, B. Thomsen, and Y. Sugita, in “Molecular Spectroscopy. A Quantum Chemistry Approach” Edited by Ozaki and Wójcik, Wiley-VCH (2019).

【口頭発表】

- [1] QM/MM in GENESIS: Applications to anharmonic vibrational analysis of biomolecules, K. Yagi and Y. Sugita, ACS National Meeting, 2018 年 8 月, Boston, MA, USA.
- [2] QM/MM 法に基づく生体分子の非調和振動解析,  
八木清, 杉田有治, 第 12 回分子科学討論会, 2018 年 9 月, 福岡.
- [3] (招待講演)局所座標を用いた振動計算法の開発と生体分子への応用,  
八木清, 研究会「凝縮系の理論化学 2019」, 2019 年 3 月, 石垣島.
- [4] (招待講演) Domain Localized Vibrational Method for Studying Hydrogen-Bond Network in Biomolecules, K. Yagi, ACS National Meeting, 2019 年 3 月, Orlando, FL, USA.

【ポスター発表】

- [1] QM/MM 法の開発と生体分子の振動解析,  
八木清, 「細胞システムの動態と論理 X」, 2018 年 4 月, 和光.
- [2] QM/MM 法の開発と生体分子の非調和振動解析,  
八木清, 杉田有治, 「物質階層原理研究」&「ヘテロ界面研究」春合宿, 2018 年 5 月, 熱海.
- [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, 新学術領域研究「柔らかな分子系」成果公開シンポジウム, 2018 年 6 月, 和光.