平成 29 年度　利用報告書

課題名：QM/MM 法に基づく非調和振動解析の開発と生体分子・高分子材料への応用

利用者氏名：

〇八木清(1)

Surblys Donatas(1)

大滝大樹(1,2)

秋永宜伸(3,4)

理研での所属研究室名：

(1)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研究チーム

(4)（株）ヴァイナス

報告内容

バクテリオロドプシンの内部水に対する理論的研究

（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

振動分光法は水素結合系をプローブする有力な解析法である．振動スペクトルは水素結合の強さを鋭敏であり，例えば，光駆動型プロトンポンプであるバクテリオロドプシン（bR）のプロトン移動経路を解明するうえで，重要な知見を与えた．bR には，Lys216 のプロトン化シッフ塩近傍に 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（図 1）．名工大の神取らは，光反応中間体の差スペクトルから，この部位の強い水素結合がプロトン輸送の機能発現に必須であることを明らかにした．しかし，観測される振動バンドの帰属は一般に容易ではない．神取らは，同位体置換やアミノ酸の変異体を導入するなど，多くの実験を経て，帰属を行った．従って，振動バンドの帰属を支援する，計算法の確立が求められている．

近年，量子化学（QM）計算の発展により，孤立分子のポテンシャルエネルギーを高精度に計算できるようになった．我々はポテンシャルの非調和性を考慮する独自の方法，振動擬縮退摂動（VQDPT2）法を開発した．VQDPT2 法により，プロトン化水クラスター4 量体，$H^+(H_2O)_4$ の振動スペクトルを計算し，実験と比較することでクラスター構造を決定した．また，局所性を利用

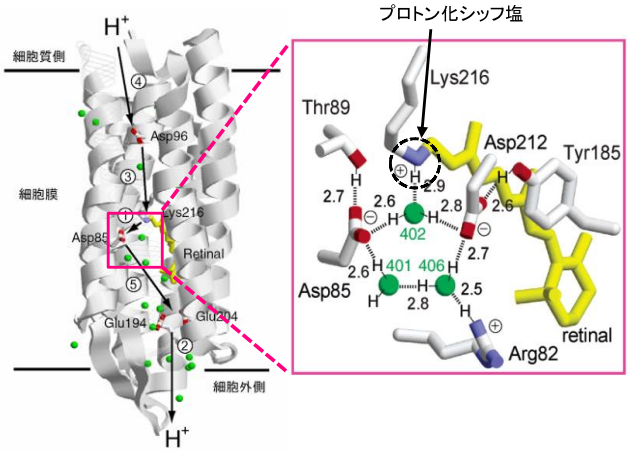

図 1. バクテリオロドプシンのプロトン化シッフ塩（青）とその周辺に存在する内部水による水素結合ネットワーク．Shibata and Kandori, Biochemistry **44**, 7406 (2005)より抜粋.

し，局在化した振動モードを用いることで VQDPT2 計算を大幅に効率化した．さらに，QM 計算と分子力場（MM）を組み合わせた QM/MM 法を杉田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 に実装している．QM/MM 法と VQDPT2 法により，生体環境中の分子に対する振動計算が可能になった．

本課題では，QM/MM ポテンシャルを用いた非調和振動計算により，bR 内部水の振動バンドを計算した．H28 年度一般利用課題（G16018）において，bR 内部水の差スペクトルを求めたが，定量性が不十分であった．本年度はこの原因を慎重に探った．QM/MM 計算の QM 領域のとり方，量子化学計算のレベル，初期構

造がスペクトルに与える影響を精査した．

2．　具体的な利用内容、計算方法

結晶構造（PDBID:1M0L）をもとに，脂質二重膜に bR を埋め込んだ分子モデルを構築した．これを平衡化した後，10 ns の MD 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から，*k*-means クラスタリング法により代表構造を選び，QM/MM 計算の初期構造を得た．

QM/MM 計算の QM 領域は，レチナール，R82, D85, D212, K216 の側鎖と 3 つの内部水を選んだもの（QM1），さらに D85 と D212 へ水素結合する T89, Y57, Y185 の側鎖と R82 に水素結合する内部水を加えたもの（QM2）とした．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 を用い，それ以外の原子は cc-pVDZ を用いた．QM2 の QM 原子数は 146 個，基底関数の総数は 1575 個となった．電子状態計算には B3LYP-D3 法を用いた．

構造最適化の後，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 計算を繰り返す必要があり，これに bwmpc を用いた．調和計算と非調和計算にはそれぞれ 139 回と 2,161 回の計算が必要であり，これを並列実行した．

3．　結果

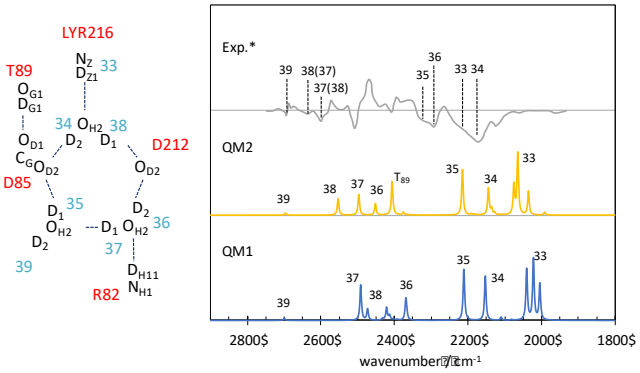

図 2．重水置換した bR 内部水の振動スペクトル．QM/MM ポテンシャルの QM 領域として QM1（下）と QM2（中）を用いた時，VQDPT2 計算で得られる振動スペクトルと実験（上）の比較．

図 2 に QM 領域を QM1、QM2 とした時の VQDPT2 計算の結果を示す．初期構造は結晶構造である．QM1, QM2 ともに水素結合していない OD 伸縮振動（39）を精度良く再現した．一方，他の水素結合している OD 伸縮振動は QM1 では実験より全体的に低波数に計算されている．QM2 へ QM 領域を拡大することで，特に 36, 37, 38 は改善が見られるが，33, 34, 35 はあまり変化がない．

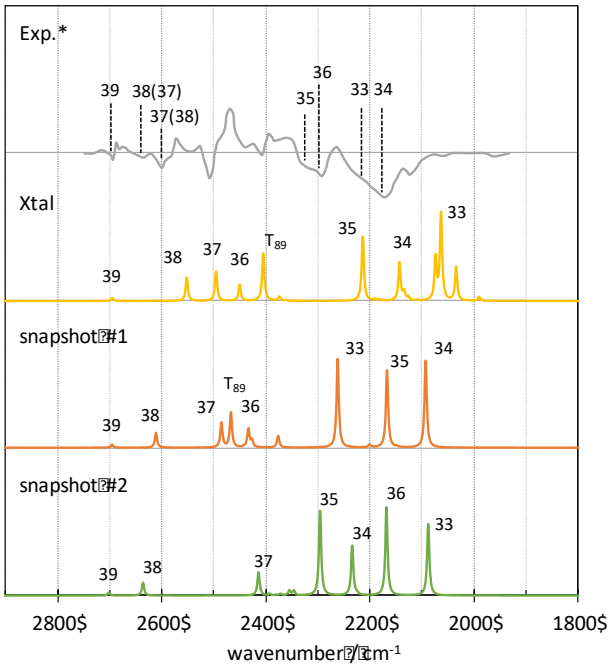

図 3．重水置換した bR 内部水の振動スペクトル．初期構造として結晶構造（Xtal）と MD トラジェクトリーのスナップショット（snapshot #1 #2）を用いた結果と実験（上）の比較．QM 領域は QM2．Xtal は図 2 の QM2 と同じ．

そこで，QM/MM 計算の初期構造として，MD トラジェクトリーのスナップショットを用いて，同様の計算を行った．結果を図 3 に示す．MD のスナップショットを用いることで，さらに高波数側へシフトし，全体的に実験との一致は良くなった．特に，#2 では 36 が強い水素結合の領域まで下がり，実験の解釈と一致する．

4．　まとめ

bR に対する MD 計算を実施し，得られた構造を用いて QM/MM 計算に基づく振動解析を行った．振動スペクトルを計算する上で，QM 領域と初期構造の選び方を検討した．QM2 のように水素結合で繋がっている分子を広く QM 領域として採用し，MD 計算により生体環境を考慮した初期構造を用いることで，計算結果は改善されてきた．

５．　今後の計画・展望

今回は bR の基底状態の振動スペクトルを計算した．観測されているのは，基底状態と光サイクル中間体である K 状態と差スペクトルである．従って，実験と比較するため，K 状態のスペクトルを計算し，差スペクトルを計算する．また，MD 計算で取り出す構造の数を増やし，振動スペクトルと水素結合構造の対応を詳細に解析する．

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。

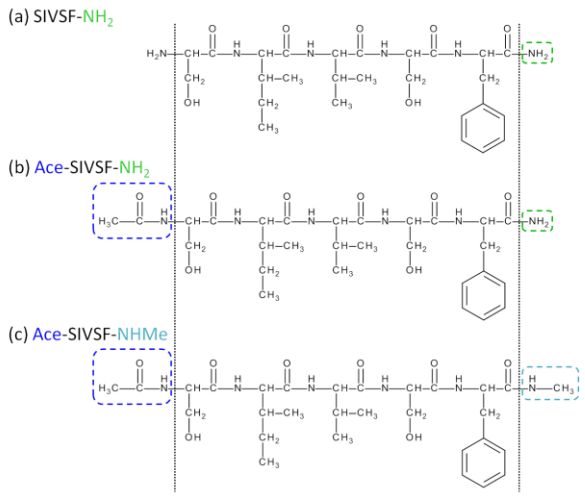

図 4：SIVSF の構造式。(a) 末端非修飾の SIVSF-NH_2, (b) N 末端のみを修飾した Ace-SIVSF-NH_2, (c) 両末端を修飾した Ace-SIVSF-NHMe。

β2-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，まず受容部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 4）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，クラスター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-NH_2（図 4a）および Ace-SIVSF-NH_2（図 4b）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 NH_2 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 4c）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。我々は前年度よりこれらの構造決定に着手しており，Ace-SIVSF-NHMe の一方について構造決定に成功している（一般利用・課題番号：G16018）。本研究では，残りの構造を決定するために計算を行った。

２．　具体的な利用内容、計算方法

<u>Ace-SIVSF-NHMe</u>

前年度までに，配座サンプリングや量子化学計算による構造最適化などから候補構造の絞り込みまで完了している。前年度に決定した構造はエネルギーが最も低い構造であった。本年度は主に 2 番目に低いエネルギーの候補構造について Gaussian09 を用いた Hessian 計算およびエネルギー一点計算を行い，精確

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**（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，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。計算された振動数と強度の寄与を半値幅 5 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。

Ace-SIVSF-NHMe–ALEH 複合体

複合体については，前年度にレプリカ交換分子動力学計算により 300,000 点のスナップショットを取得し，水素結合解析，クラスタ解析などから約 1000 個のグループに分類している。本年度は，各グループから代表構造を取り出し，Gaussian09 を用いた構造最適化を行い安定構造の探索を行った。計算レベルは B3LYP/6-31(++)G**とした。さらに，得られた最適化構造を用いて幾つかのレベルで量子化学計算を行い，エネルギーの相関について調べた。これらの結果からエネルギーの低い構造を選び，Ace-SIVSF-NHMe と同様の手法で非調和ポテンシャルを構築し，oc-VQDPT 法を用いて振動数計算を行った。

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 5 に示す。CAM-B3LYP で計算した場合（図 5 の最下），3600 cm^{-1} あたりのピークや 3400-3500 cm^{-1} あたりのピークは実験スペクトルと対応しているようにも見えるが，3200 cm^{-1} あたりのブロードなバンドを表現できていない。構造最適化時およびポテンシャル構築時の量子化学計算の計算レベルなどを幾つか組み合わせてスペクトル計算を行ったが，この構造では実験スペクトルを再現するには至らなかった。

Ace-SIVSF-NHMe–ALEH 複合体

まず，エネルギーの低い構造を探索するために，B3LYP/6-31(++)G**で最適化した構造を用いて幾つかの計算レベルでエネルギー一点計算を行った。RI-MP2/def2-TZVP(-df)レベルを reference として比較した場合の相対エネルギーの相関を図 6 に示す。B3LYP および CAM-B3LYP は比較的相関が悪い一方，分散力の効果を取り入れた B3LYP-D3 や ωB97X-D は RI-MP2 のエネルギーと良く相関していることが分かる。

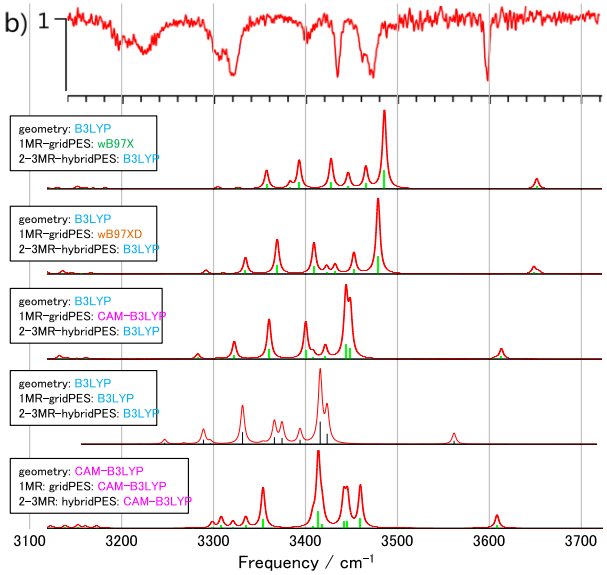

図 5：Ace-SIVSF-NHMe の実験スペクトル（最上）と非調和計算により計算されたスペクトルの比較。構造最適化やポテンシャル構築時の計算レベルを幾つか組み合わせて計算した。基底関数はいずれも 6-31(++)G**とした。

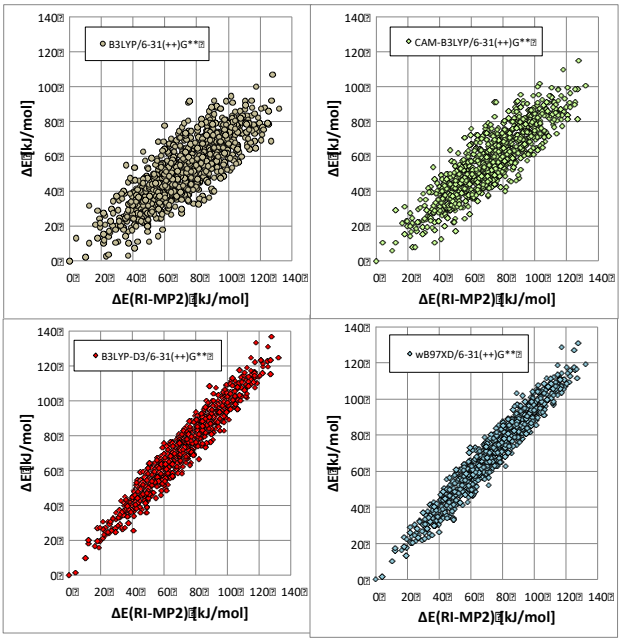

図 6：Ace-SIVSF-NHMe–ALEH 複合体における量子化学計算のエネルギー相関。B3LYP/6-31(++)G**で最適化した 1051 個の構造についてエネルギー一点計算を行った。Reference（横軸）は RI-MP2/def2-TZVP(-df)でのエネルギー。左上：B3LYP/6-31(++)G**，右上：CAM-B3LYP/6-31(++)G**，左下：B3LYP-D3/6-31(++)G**，右下：ωB97X-D/6-31(++)G**。

このように計算レベルによりエネルギー相関に大きく差が出ることが明らかになった。しかしながら，最もエネルギーの低い構造は今回用いた全ての計算レベルにおいて共通であったため，この構造について非調和振動解析を行った。

図 7 には最安定構造について非調和計算を行って得られたスペクトル 3 つと 2 つの実験スペクトルの比較を示す。実験スペクトル α, β における 3650-3700 cm^{-1} の領域のピークがそれぞれ 2 本，0 本であるのに対し，計算スペクトルのピークはいずれも 1 本であることを考えると，今回取り扱った構造は実験で観測したものに該当しないと考えられる。

本研究で取り扱う分子は大きいため，実験で観測している NH/OH 伸縮モードと，それらと強く結合している振動モードを全自由度（f = 342）から選び出して非調和ポテンシャルを構築している。80 モードの場合（緑）と 100 モードの場合（紫）を比較すると，スペクトルの形状は殆ど同じであることから，今後の計算は 80 モード取り出せば十分であると推察される。

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 および Ace-SIVSF-NHMe–ALEH 複合体に対し，量子化学計算を用いて構造間のエネルギー比較や非調和振動解析を行った。エネルギーの低い構造について計算を行ったが，どちらも実験スペクトルとは一致しなかった。実験では異なる構造を観測していると考えられる。

Ace-SIVSF-NHMe–ALEH 複合体で得られた約 1000 個の構造を用いて量子化学計算のエネルギー相関を調べた。分散力補正を取り入れた汎関数がエネルギーをよく記述できていることが確かめられた。また，ポテンシャル構築の際に選び出すモード数を変えて非調和計算を実行したところ，80 モードと 100 モードではスペクトルに大きな差は見られなかった。このことから，複合体の非調和振動解析では 80 モード選べば十分であることが分かった。

5．　今後の計画・展望

Ace-SIVSF-NHMe，Ace-SIVSF-NHMe–ALEH 複合体の他の候補構造について非調和振動解析を行い，実験スペクトルに対応する構造を決定する。決定された構造から 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。今年度に得られた知見を活かしながら効率的に計算を進める。

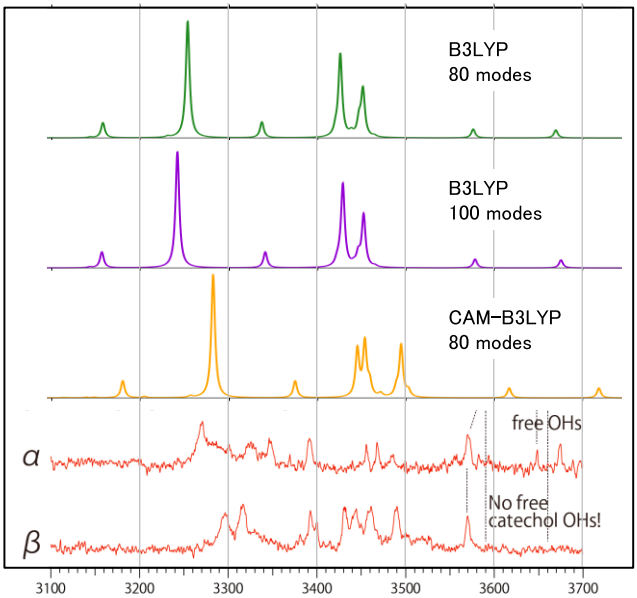

図 7 ：Ace-SIVSF-NHMe–ALEH 複合体の実験スペクトル（α,β）と非調和計算により算出したスペクトルの比較。緑：全振動モードから 80 モードを選択, B3LYP/6-31(++)G**でポテンシャル生成，紫：100 モードを選択，B3LYP/6-31(++)G**でポテンシャル生成，オレンジ：80 モードを選択，CAM-B3LYP/6-31(++)G**でポテンシャル生成。

芳香族ポリアミドを骨格とする逆浸透膜に対する振動解析

（担当：Surblys）

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

Reverse osmosis (RO) membranes are the most widely used technology in desalination plants to remove salt from sea and brackish water. Commercially, most RO membranes are those based on aromatic polyamides, with chemical structure as shown in Fig. 8 a), and while they exhibit excellent filtering capabilities, one of the main challenges that remains is fouling, i.e. impurities attaching to the membrane surface. As the mechanism and structure of the membranes themselves is poorly understood there has been

theoretical and experimental work to investigate them, but the multi-scale nature of the membrane structure and the large time scale of the filtration process makes it difficult to make a connection between computational and experimental results.

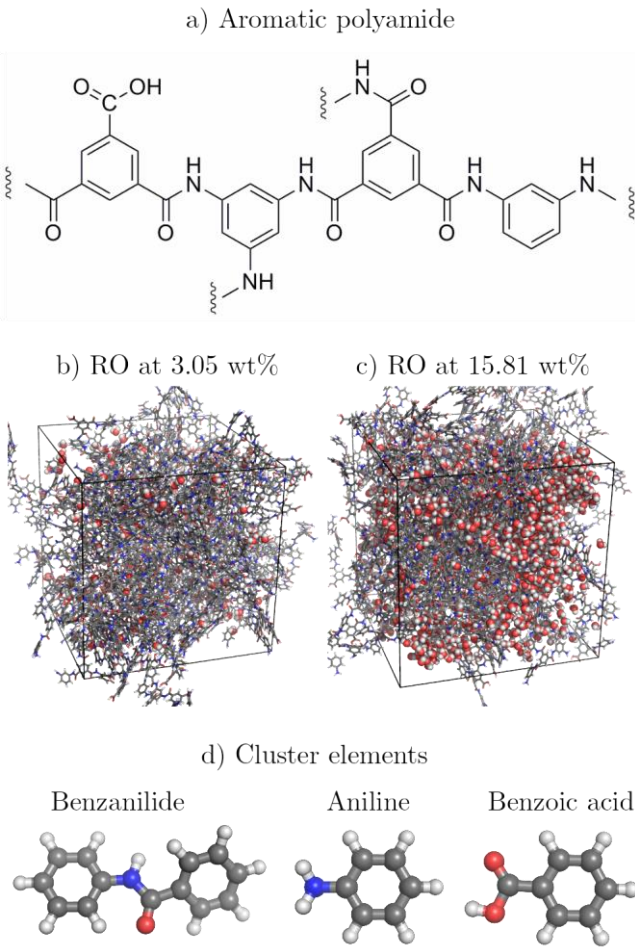

Fig. 8 a) Example of aromatic polyamide structure. b) and c) RO systems at two different water content values. d) Elements of polyamide membrane that are used for clustering and vibrational analysis.

The present study aims to connect macroscopic information readily obtained from IR spectrum measurements and microscopic properties observed through Molecular Dynamics (MD) simulation and Quantum Mechanics (QM) chemical computation. This is achieved through the "Weight Averaged Anharmonic Vibrational Analysis" method, which was previously successfully applied to sphingomyelin and Nylon systems, to calculate highly accurate IR spectra of RO aromatic membranes at a low computational cost. To observe membrane structure and water moisture effect on the IR spectrum, several sets of polyamide membranes at different water mass ratios were investigated and compared to actual experimental results.

２．　具体的な利用内容、計算方法

Initially, previously constructed dry membrane systems were populated with water molecules, where two snapshots for different conditions are shown in Fig. 8 b) and c). The water content was increased from 3.05 up to 15.81 wt%, resulting in 6 distinct hydration levels. For each hydration level, four systems were created, resulting in 24 unique systems. Each system was then sampled for 40 ns. All MD simulations were conducted with the LAMMPS package.

An in-house analysis program was then used to investigate the hydrogen bond network of the systems. The polyamide was divided into smaller elements, as shown in Fig 8 d) and the hydrogen bond connectivity between them and also water molecules was used to identify the 78 dominant clusters, where only the first hydration shell was considered for each central cluster element. Each of these clusters was extracted and geometrically optimized with Gaussian09. To conduct anharmonic vibrational analysis, SINDO program developed by this group was used to generate up to 641 grid points for each cluster, where the energies and gradients were computed via Gaussian09, taking advantage of the bulk job mode on GW-MPC to run a large number of independent computations in parallel. From these values, anharmonic IR spectrum for each cluster was calculated by the VQDPT2 method implemented in the SINDO package. Finally, the whole system spectrum was constructed by summing individual cluster spectra with cluster population used as weight. The density function theory was used with B3LYP for QM computations, where the basis sets were set to 6-31+G* for hydrogen atoms bound to

benzene rings and 6-31+G** for everything else.

３．　結果

The computed and experimental spectra in Fig. 9 show an excellent match. Several important revelations were obtained from this research. Firstly, regardless of the low amount of benzoic acid groups in both the model and the actual RO membrane, benzoic acid shows a significant contribution to the spectra, where the peak (c) and dip (d) in Fig. 9 clearly indicate the presence of protonated benzoic acid. On the other hand, no significant peaks or dips can be observed at (e) in Fig. 9, which would indicate the presence of deprotonated benzoic acid. This indicate that no noticeable change in protonated/deprotonated populations occur during change in humidity. This is an important discovery, as the deprotonation of benzoic acid negatively charges the membrane, which plays an important role in filtration and resistance to fouling. Another discovery, is the lack of a significant dip at (a) in Fig. 9 due to N-H stretching of the amide bonds, which was very prominent in Nylon systems that were previously investigated with this method. This indicates a relatively weaker inter-polymer interaction in RO membranes, which would result in greater water permittivity. As the difference in water permittivity is experimentally observed, this offers a means to gauge the water permittivity efficiency via spectrum measurement.

４．　まとめ

We were able to produce high precision IR computational spectrum via the “Weight Averaged Anharmonic Vibrational Analysis” method, with relatively small amount of computations and connect several features of the IR spectrum with the microscopic structure of RO membranes. This result paves the way for further studies of RO membranes to improve the interpretation and understanding of IR spectrum.

５．　今後の計画・展望

While an accurate QM spectrum has been produced and molecular details extracted, there still remain uncertainties about the finer details. One such detail is the protonation state of the benzoic acid cluster, as the IR spectrum indicated a substantial amount of protonated clusters, while the pKa value indicates that most of clusters should be deprotonated. As an attempt to shed more details to this subject, QM/MM computation of this region will be conducted.

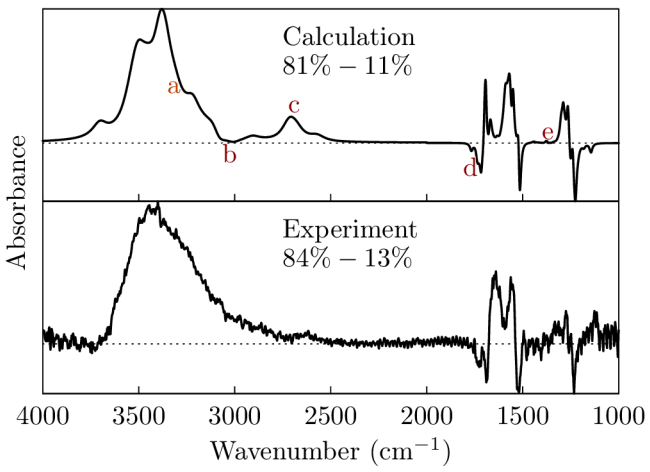

Fig. 9. Computational and experimental difference spectra. The percentages indicate humidity of used. Letters indicate the presence or lack of important bands.

平成 29 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. Weight Averaged Anharmonic Vibrational Analysis of Hydration Structures of Polyamide 6,
   B. Thomsen, T. Kawakami, I. Shigemoto, Y. Sugita, and K. Yagi,
   J. Phys. Chem. B **121**, 6050-6063 (2017).
2. Infrared Spectra of Protonated Water Clusters, $H^+(H_2O)_4$, in Eigen and Zundel Forms Studied by Vibrational Quasi-Degenerate Perturbation Theory,
   K. Yagi, and B. Thomsen,
   J. Phys. Chem. A **121**, 2386-2398 (2017).

【国際会議などの予稿集、proceeding】

なし

【国際会議、学会などでの口頭発表】

（口頭発表）

1. Development of anharmonic vibrational analysis methods for soft molecular systems,
   K. Yagi, IMS Seminar, 2017 年 5 月，岡崎.
2. 芳香族ポリアミド逆浸透膜の振動分光解析,
   D. Surblys，第 11 回分子科学討論会，2017 年 09 月，仙台.
3. 招待講演：GENESIS を用いた QM/MM 計算生体分子の振動解析と反応経路探索,
   八木清，北大理論化学研究会：実践理論化学の最前線, 2017 年 11 月，札幌.
4. Investigation of reverse osmosis membranes by weight-averaged anharmonic vibrational analysis,
   D. Surblys，255th ACS National Meeting, 2018 年 03 月, New Orleans, U.S.A.

【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 法に基づく反応経路探索法の開発と酵素反応への応用,
   八木清,「物質階層原理研究」第 1 回春合宿, 2017 年 5 月，御殿場.
2. Vibrational Analysis of Aromatic Polyamide Reverse Osmosis Membranes,
   D. Surblys,「物質階層原理研究」第 1 回春合宿，2017 年 5 月，御殿場
3. QM/MM 法に基づく非調和振動解析法の開発と生体分子への応用,
   八木清, 杉田有治, 第 17 回日本タンパク質科学会年会，2017 年 6 月，仙台.
4. Development of vibrational structure theory for biomolecules,
   K. Yagi, International Symposium on "Studying the Function of Soft Molecular Systems", 2017 年 6 月，仙台.
5. GENESIS への QM/MM 法の実装と酵素反応の反応経路探索,
   八木清，杉田有治，第 11 回分子科学討論会，2017 年 9 月，仙台.
6. 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」第 6 回全体合宿会議，2017 年 12 月，那覇.