

1B10

反応分子動力学計算を用いたタンパク質のプロトン ポンプ機構解析

(東京大学¹, シカゴ大学²) 山下雄史¹、Voth, Gregory A.²

A reactive molecular dynamics study of proton pumping function of a protein

(Univ. Tokyo¹, Univ. of Chicago²)

Takefumi Yamashita, Gregory A. Voth.

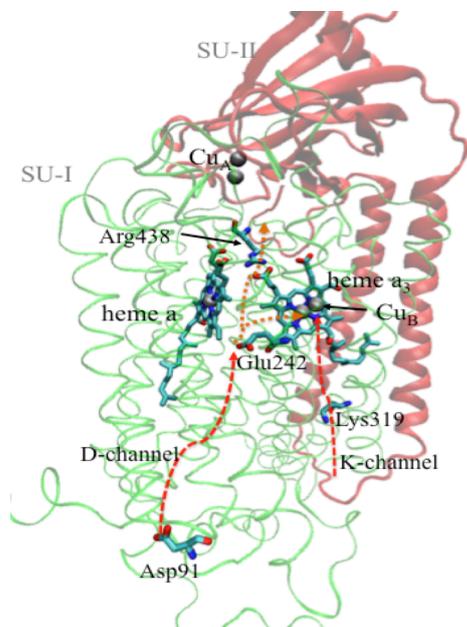
プロトンポンプ機能を持つタンパク質のは、生命活動にとって重要な役割を担っている。例えば、シトクローム c 酸化酵素(cytochrome c oxidase, CcO)は細胞呼吸プロセスにおいて、ATP合成に必要なエネルギーをプロトンの濃度勾配という形で作り出している。CcOはシトクローム c から受け取った電子で二核中心に捕捉した酸素分子を水分子へと還元する。この電子移動によってプロトン輸送が誘起されるのであるが、詳細な原子レベルでのメカニズムは明らかになっていない。本研究では、まず、電子移動によってプロトン輸送の自由エネルギープロファイルがどのように変化するのかを調べる。

CoOの重要な構造をFigure 1に示す。CcOにより能動的に汲み上げられるプロトンはDチャンネルを通っていることが実験によって明らかにされているが、チャンネルの終点であるGlu242のすぐ上には酸化還元中心である2つのhemeに囲まれたNon-polar cavityが存在する。このような構造的特徴を見ても、Non-polar cavityにおけるプロトンの振る舞いがどのように付近の酸化還元状態に影響を受けるかで、プロトン輸送経路の開閉が制御されているのではないかと容易に想像される。しかし、Non-polar cavityでのプロトンの振る舞いを実験的に直接観測するのは非常に困難である。有効な解決策の1つとして、分子動力学シミュレーションが期待されている。

方法論的観点からも、CcOによるプロトンポンプをシミュレーションすることは挑戦的なテーマである。特に、プロトンは水分子の存在下で化学結合の形成・開裂を伴う運動

□

Figure 1: Proton pathways in CcO



を頻繁に行っているため、標準の古典的経験力場を用いることはできない。本研究では multistate empirical valence bond 法 (MS-EVB 法, 多状態原子価結合法) [1]を採用して、プロトンを含む系の分子動力学シミュレーションを可能にしている。MS-EVB 法は化学者の直感に合致するもので、ab initio MD 法に比べ計算コストを大幅に削減できるのが利点である。さらに、ここでは MS-EVB モデルを拡張し heme a₃ の D-propionate (PRDa3) がプロトン化されることを可能にしている。この拡張は非常に本質的であり、もし PRDa3 がプロトン化できないモデルのまま分子動力学計算を実行すれば Non-polar cavity 内の水素結合ネットワークが影響

を受け、結果として自由エネルギープロファイルが正しく計算できなくなる。

本研究の計算結果より、heme aに電子が移動したときに Non-polar cavity でプロトン輸送の自由エネルギー障壁が大きく下がることが分かった。これは Kaila 等[2]によって提案されているメカニズムと良く一致するものである。heme a に電子が移動すると特徴的な水素結合ネットワークの変化が現れるが、このことが自由エネルギー障壁を低下させる本質的な役割を果たしていると考えられる。また、本研究では、MS-EVB 法で CcO のプロトン輸送を研究できることを示したが、方法論に改良を加え、さらに大きな系に組み込まれている化学反応を調べることができる[4]。本発表では、こうした最近の方法論的改良についても議論する予定である。

References:

- [1] G. A. Voth, *Acc. Chem. Res.* **39** 143 (2006), and more references therein
- [2] V. R. I. Kaila *et al*, *Biochim. Biophys. Acta-Bioenerg.* **1787** 1205 (2009)
- [3] T. Yamashita and G. A. Voth, *J. Am. Chem. Soc.* **134** 1147 (2012)
- [4] T. Yamashita, Y. Peng, C. Knight, G. A. Voth (in preparation)

光-分子強結合場を用いたタンパク質の光誘起結晶化

(群馬大院工, さきがけ) 奥津哲夫, 治田 将, 山下 卓勇, 今井 央華, 戸丸 卓真, 堀内 宏明

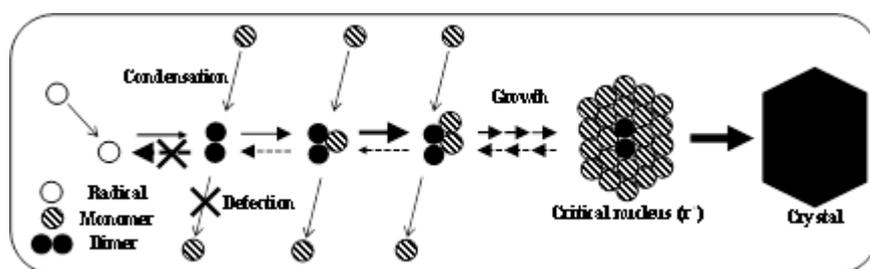
Photoinduced crystallization of protein with strong photon coupling field

(Gunma University, PRESTO JST) T. Okutsu, S. Haruta, T. Yamashita, H. Imai, T. Tomaru, H. Horiuchi

タンパク質の光化学反応をきっかけとして結晶成長が誘起される現象を見出し、機構の解明を進めてきた。今までに、この現象が本当であるか、再現性良く実験を進めるための実験方法の工夫を経て、①タンパク質の光化学反応の機構の解明、②光化学反応と結晶核形成の関連を合理的に説明する機構の提案と実証実験、③この現象をより多くのタンパク質の結晶化に適用する試みを進めてきた。光誘起結晶化の機構は次のように説明できる。

タンパクの Trp, Tyr, Phe 残基が光吸収し、Tyr のラジカルが反応中間体として生成し、ラジカル化したタンパクが基底状態のタンパクと反応して、共有結合性のダイマーを生成し、このダイマーが成長して結晶になる。一般に結晶成長の初期過程では、分子が集合してクラスターを形成してゆくが、最初にできる二量体が最も不安定であり、三量体に成長する前に分解してしまう。光化学反応で生成したダイマーは共有結合性のため分解しないため結晶化が促進されると考えた。共有結合性ダイマーから出発した場合は、モノマーが分子間力で二量体を作るのに比べ結晶になるまでの待ち時間が短縮される。

本研究では、光-分子強結合場を用い、タンパクをタンパクの吸収のない可視光の多光子過程により励起し反応させ、光誘起結晶化に導くことを検討した。



【実験】タンパクにはニワトリ卵白リゾチームを用い、塩化ナトリウムを沈殿剤として結晶化実験を行った。最初にタンパクの二光子励起により反応が進行し、結晶化が促進されるかレーザーを用いた方法で確認し、次に光-分子強結合場として金ナノ粒子および金ナノ構造を用い、可視の定常光励起により反応することを確認、結晶化実験を行った。タンパクの光吸収は 300nm よりも短波長にあり、本実験ではタンパ

クが吸収を持たない可視光を励起光源として用いた。

【結果】 1. YAG レーザーの 532nm をタンパクの過飽和溶液に集光すると、ダイマーが生成した。酵素活性はレーザーを集光した場合にのみ低下し、励起光強度依存性が2次であった。また、集光した溶液にはより多くの結晶が出現した。 2. 金ナノ構造上にタンパク溶液を滴下し、結晶化実験を行った。キセノンランプの 400nm 以下をカットした光を当てた。結果を右図に示す。コントロール（光照射－、金ナノ構造－）では結晶が出現しない条件で、（金ナノ構造＋光＋）では多くの結晶が出現した。このことから、金ナノ構造が光化学反応を誘起し、タンパクの光結晶化を促進させることがわかった。

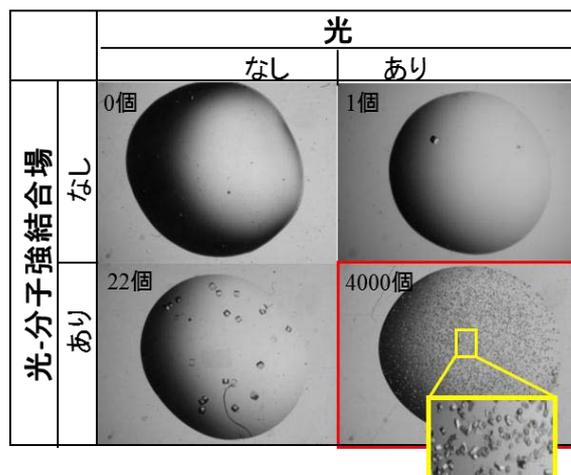
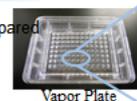


図1 光-分子強結合場を構築した基板上的での結晶化実験結果。溶液はニワトリ卵白リゾチームの過飽和でありながら結晶化が自発的に起こりにくい条件(準安定状態)とした。金ナノ構造+光+で著しく結晶化が促進された。

次に、タンパクの結晶化に用いられているプレートに金蒸着を行い、実用に向けた検討を行った。プレートの半分にウェルに金を蒸着し、その上に準安定状態のタンパク溶液を滴下し、金を蒸着していない部分と比較した。金蒸着膜でもダイマーの形成が確認された。結晶化実験の結果を図2に示す。金を蒸着した領域で光照射を5分行った場合に結晶化が促進された。本実験は光源にXeランプを用いているが、白色の蛍光灯でも効果が確認された。蛍光灯の光はXeランプに比べて弱いですが、特別の装置を用いずに結晶化を促進させることが可能なことを示した。

Examination for practical use

Au nano structure was prepared By Au spatter technique



Crystallization experiment

min	0	5	10	30	
Au	+	○ ○	○ ○ ○	○ ○ ○ ○	○ ○ ○ ○ ○
	+	○	○ ○ ○	○ ○ ○ ○	○ ○ ○ ○ ○
	+	○	○ ○ ○ ○	○ ○ ○ ○ ○	○ ○ ○ ○ ○ ○
	+	○ ○ ○	○ ○ ○ ○ ○	○ ○ ○ ○ ○ ○	○ ○ ○ ○ ○ ○ ○
-	-				
	-	○			

Crystallization is enhanced on commercial plate with Au thin film

図2 実用プレートに金蒸着し光を当てた実験結果。金+光で結晶化が促進された。

1. S. Haruta, H. Misawa, K. Ueno, Y. Yokota, H. Uehara, H. Hiratsuka, H. Horiuchi and T. Okutsu, Protein Crystallization Induced by Strong Photons-molecules Coupling Fields Photochemical Reaction, *J. Photochem. Photobiol. A: Chemistry*, 221, 268-272(2011).
2. K. Tawa, S. Haruta, T. Okutsu, J. Nishii, Photochemically induced crystallization of proteins promoted on the plasmonic chip, *Japanese Journal of Applied Physics (JJAP)*, in press.

蛋白質移相自由エネルギーの空間分布に与える溶質表面特性の影響：
オスモライトによる分子クラウディング環境下の場合

(青山学院化学・生命¹, 名大院情報科学², JST-CREST³)

優 乙石^{1,3}, 中田 恭子¹, 長岡 正隆^{2,3}

Influence of Solute Surface Property on the Spatial Distribution of Protein Transfer
Free Energy: A Case of the Molecular Crowding Condition with Osmolyte

(Aoyama Gakuin University¹, Nagoya University², JST-CREST³)

Isseki Yu^{1,3}, Kyoko Nakada¹, and Masataka Nagaoka^{2,3}

【概要】 細胞内は水以外の分子が体積の 3 割ほどを占める分子クラウディング環境である。特に極限環境生物は、オスモライトと呼ばれる有機低分子を高濃度蓄積している。アポミオグロビンの純水からオスモライト水溶液への移相自由エネルギー (Transfer Free Energy TFE : 溶質をある溶媒から別の溶媒に移相した時に変化する溶質の自由エネルギー) を、分子動力学法とカークウッド-バフ積分法によって調査した。オスモライトは深海魚細胞中に高濃度で存在する TMAO (トリメチルアミン *N*-オキシド) を用いた。TFE の理論値とその空間分布を明らかにするとともに、溶質の表面特性 (疎水性や幾何学的形状など) が TFE 発現量に与える影響を解析した。

【方法】 カークウッド-バフ (KB) 積分 $G_{\alpha s}$ は、溶質 α 周囲における溶媒原子 s の (1 に規格化された) 数密度 $g_{\alpha s}(\mathbf{r})$ の揺らぎ ($g_{\alpha s}(\mathbf{r})-1$) を、全空間で積分したものである (式 1)。

$$G_{\alpha s} = \int [g_{\alpha s}(\mathbf{r}) - 1] d\mathbf{r}. \quad (1)$$

TFE ($\Delta \mathcal{F}_a^{\text{tr}}$) は各成分の数密度 ρ 、および MD 法で得られた上記 $G_{\alpha s}$ を用いて式 2 で計算できる [1]。(添え字 a、t、w はそれぞれ蛋白質 (アポミオグロビン)、TMAO、水を表している。 k はボルツマン定数、 T は温度である。)

$$\Delta \mathcal{F}_a^{\text{tr}} = kT \frac{2V_w(\rho_t + \rho_w) - 1}{\rho_t(G_{tw} - G_{tt}) - 1} \rho_t (G_{at} - G_{aw}) \quad (2)$$

ここで、 V_w は水分子一個の部分モル体積であり、次の式 3 から得られる。

$$V_w = \frac{1 + \rho_t (G_{tt} - G_{tw})}{\rho_w + \rho_t + \rho \left(\frac{G_{tw} - G_{tt}}{G_{tw} - G_{tt}} - \frac{G_{tw} - G_{tt}}{G_{tw} - G_{tt}} \right)} \quad (3)$$

本研究では G_{at} 、 G_{aw} を空間分解することで、TFE の三次元分布 $\Delta \mathcal{F}_a^{\text{tr}}(\mathbf{r})$ を得た (式 4)。

$$\Delta \mathcal{F}_a^{\text{tr}}(\mathbf{r}) = \left\langle \Delta \mathcal{F}_a^{\text{tr}}(\mathbf{r}, t) \right\rangle_T = kT \xi \rho_t \left\langle G_{at}(\mathbf{r}, t) - G_{aw}(\mathbf{r}, t) \right\rangle_T. \quad (4)$$

ここで ξ は式 2 中の、 $\{2V_w(\rho_t + \rho_w) - 1\} / \{\rho_t(G_{tw} - G_{tt}) - 1\}$ をまとめたものである。

$G_{at}(\mathbf{r}, t)$ および $G_{aw}(\mathbf{r}, t)$ は MD シミュレーションから得られた、溶媒成分の微小領域における瞬間的な KB 積分である (式 5)。

$$G_{\alpha s}(\mathbf{r}, t) = \int_x^{x+\Delta x} \int_y^{y+\Delta y} \int_z^{z+\Delta z} \left\{ \frac{\rho_s(x, y, z, t)}{\rho_s} - 1 \right\} dx dy dz, \quad (5)$$

【結果 1: TFE の三次元分布】 TFE の理論値は+10.1 (kcal/mol)を示し、対応する実験値を定量的に再現した[1]。さらに、式 4, 5 に基づき TFE を $1.0 \text{ (\AA}^3\text{)}$ の解像度で計算し、その 3 次元的な分布を映像化した (図 1)。その結果、TFE は蛋白質周囲で均一に発生するのではなく、蛋白質表面を塗りつぶすように発生する正の TFE 領域(a)と、球状に点在する負の TFE 領域(b)が混在している様子が明らかになった[1]。

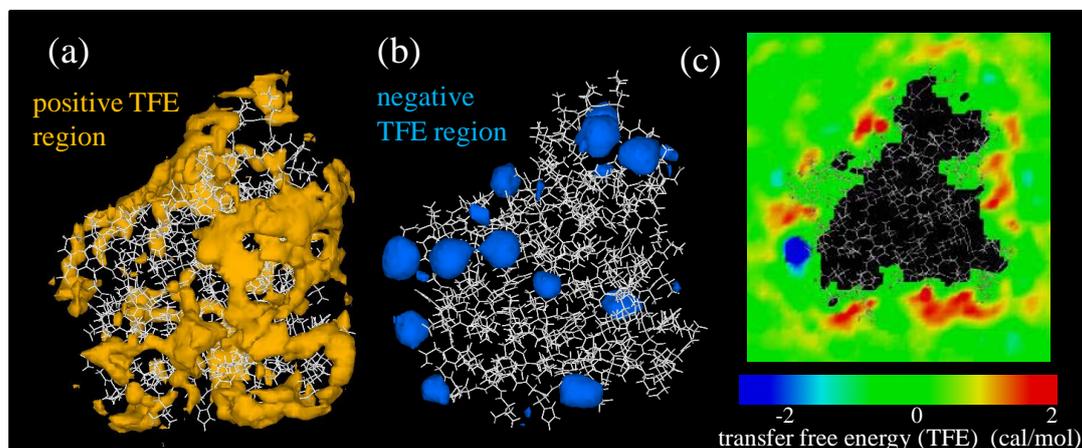


図 1. アポミオグロビンの(純水から TMAO 水溶液中 (濃度 2.2 M) への) TFE 三次元分布。(a) 正の TFE 領域 (TFE が 1.2 cal/mol 以上)。(b) 負の TFE 領域 (TFE が -2.0 cal/mol 以下)。(c) TFE の断面図。MD 計算から得られた 3000 個のスナップショットを用いて可視化した。

【結果 2: TFE の残基依存性】 式 4 で得られた TFE の空間分布のうち、溶質表面から 8.0 \AA 以内のものを、最近接溶質原子にマッピングした後にアミノ酸毎に集計し、どのようなアミノ酸周囲で TFE が発現しているかを解析した。一例として、アミノ酸の疎水性指標 (hydropathy index) のプロファイルと重ね合わせた結果を図 2 に示した。正の TFE が強く発現する領域は、hydropathy index の低い、すなわち極性の高いアミノ酸が形成する蛋白質表面であることが示唆された。TFE 発現量と、その他の蛋白質表面特性 (幾何学的特性や表面電荷など) との相関は当日発表する。

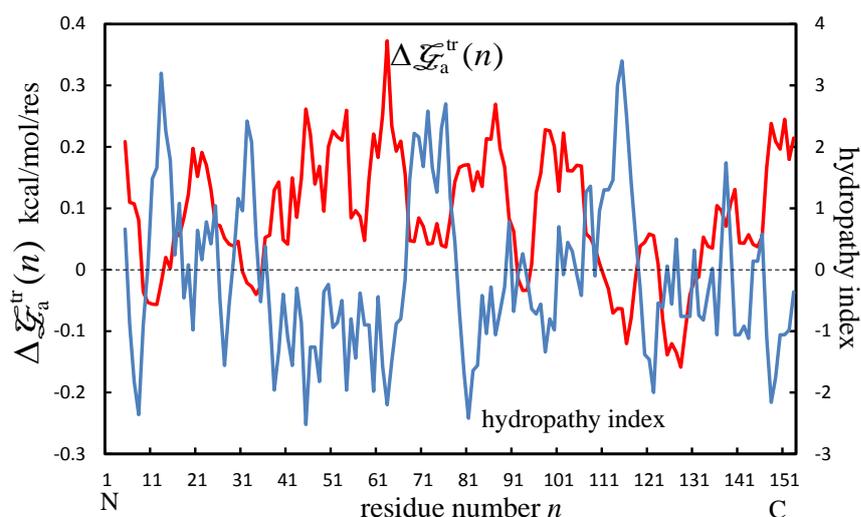


図 2. TFE 発現量のアミノ酸残基依存性 $\Delta \mathcal{G}_a^{\text{tr}}(n)$ (赤) と疎水性指標 (hydropathy index) (青)。各プロファイルは連続する 5 残基ごとの移動平均値によってスムージングした。MD シミュレーションによって得られた 3ns トラジェクトリから 300 個のスナップショットを 10 ピコ秒ごとに抽出し時間平均量の算出に用いた。

【参考文献】

[1] Yu, I; Nakada, K.; Nagaoka, M. *J. Phys. Chem. B* **2012**, *116*, 4080-4088.

QM 法と NMR 法を用いて炭酸脱水酵素活性部位の
水素結合ネットワークで起こるプロトン輸送を読み解く

(北陸先端大院・ナノ¹, 金城大・医療², 金沢大院・理³, 阪大院・薬⁴)

島原 秀登¹, 杉森 公一², Muhamad Koyimatu³, 長尾 秀実³, 大久保 忠恭⁴, 小林 祐次⁴

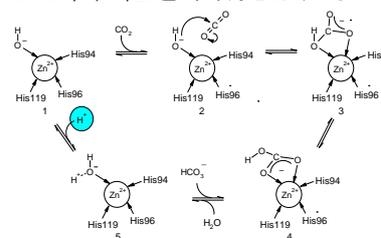
QM and NMR Approach to Proton Transfer in Hydrogen-bonding
Network of Active Site in Carbonic Anhydrase

(JAIST¹, Kinjo Univ.², Kanazawa Univ.³, Osaka Univ.⁴)

H. Shimahara¹, K. Sugimori², M. Koyimatu³, H. Nagao³, Ohkubo⁴, and Y. Kobayashi⁴

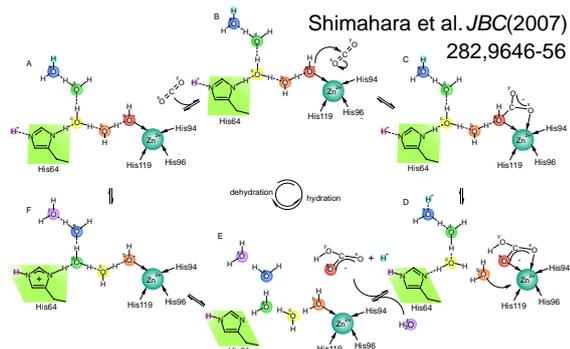
【緒言】幾つかの連なった分子の間を結ぶ水素結合の上をプロトンが次々と移動する様子は、水素結合リレーと呼ばれ、より速くプロトンを輸送する手段として広く見られる。生体系におけるこのような輸送は生物学的機能の発現に密接に関わっていることから生命の維持に極めて重要であると考えられ、その過程に多くの研究者が魅了されている。中でもヒスチジンは、側鎖イミダゾールの酸-塩基・互変異性平衡といった化学特性に加え、スウィングやフリップフロップのような回転(χ^1 , χ^2)といった多岐にわたる配向に起因するその多彩な能力から、蛋白質における効果的なプロトンドナーやアクセプターとして特徴付けられ、水素結合リレーに密接に関わる。炭酸脱水酵素(CA)は、このようなヒスチジン調節型水素結合リレーによって高度に制御されたプロトン輸送を理解するためのモデルとして半世紀近く研究される。

CAは、二酸化炭素の水和反応($\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$)を触媒することによって、生体内における CO_2 の排出や pH の調節、イオン輸送といった様々な生理学過程を調節する役割を担う。X線結晶構造解析によって、くぼみの底に位置する Zn^{2+} に3つのヒスチジンと水が配位子として配位することがわかり、その反応は、右のように、1) $\text{Zn}^{2+}\text{-OH}^-$ が基質 CO_2 の炭素を求核攻撃することで、2) $\text{Zn}^{2+}\text{-HCO}_3^-$ 複合中間体を形成させ、3) HCO_3^- がイソメライズ、4) そして HCO_3^- がもう一つの基質 H_2O と交換することで放出された後、5) そこに残る $\text{Zn}^{2+}\text{-H}_2\text{O}$ から H^+ (青丸印) が外部溶媒に放出され、始状態に戻るとの Zn-hydroxide 機構により説明される。これまで、その配位にみられる四面体構造と同様の配位構造を有する錯体化合物が触媒を模倣する複製モデルとして解析され、結合水の $\text{p}K_a$ が中性付近にあることでこの機構は成り立つとされてきた。しかし、2004年固体 ^{67}Zn -NMR 法により酵素の Zn^{2+} が直接観察された結果、pH5-8.5において $\text{Zn}^{2+}\text{-OH}^-$ 型と報告され、その機構について幾分の論争を残す。



Scheme

一方、5)の H^+ 放出は反応の律速段階であることが示され、最も触媒効率の高い酵素として数えられるヒトの II 型 (hCAII) の場合、くぼみの側面に位置する His64 によってその放出が助けられると考えられている。His64 は Zn^{2+} より近い "in" とより遠い "out" の2つの配向をもつ。その in 配向と Zn^{2+} の間に3つの水分子が観察されることから、 $\text{Zn}^{2+}\text{-H}_2\text{O}$ のイオン化に伴って生成された H^+ が水素結合リレーによって in 配向に移動することが広く受け入れられる。in 配向の χ^1 を回転させると out 配向と重なることから、それらの間にスウィング運動が生じ、out 配向の状態では H^+ が外部に放出されると、長年、予想されてきた。しかし、私たちは、 ^{15}N -NMR 法によって His64 の互変異性定数 (K_T) が 1.0 であることを決定し、 K_T と水素結合の間の

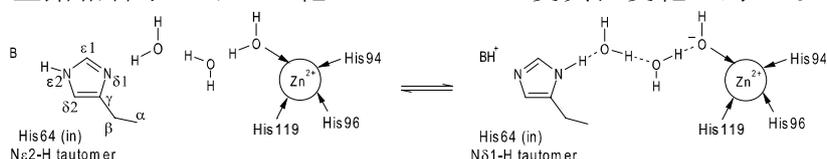


の相関解析から、左図のような互変異性モデルによって H^+ の放出を描画可能であることを報告した。そこでは、Zn-hydroxide 機構を基に His64 がスウィング運動を行うことなく H^+ が放出される。計算科学手法によって2つの配向が別々に H^+ 放出に関わることが可能なこと、活性のより高い Y7F 変異体の結晶構造において2つの配向が見られないことが相次いで報告され、現在、その運動は H^+ の放出に必要なのではと、界を二分する物議を醸す。

そこで、Zn-hydroxide 機構の検証と互変異性モデルの検証の 2 つを行うために、hCAII と部位特異的変異法によって得られた Y7F 及び H64A 変異体そしてそれらの酵素と阻害剤(アセタゾラミド)の複合体の ^{15}N - ^1H NMR 解析を行い、QM 法を用いて得られた構造情報の考察を行った。

【実験】 1) Bruker 500 MHz NMR 装置を用いて、a) イミダゾール ϵ 1 炭素の水素-重水素交換反応を観察することによって酵素の亜鉛に結合するその溶媒接触性に関する情報を取得すること、b) 酵素、変異体、酵素-阻害剤複合体のそれぞれの亜鉛に結合するイミダゾール窒素(^{15}N)のみかけの pK_a の決定することによって亜鉛に結合水の挙動に係る情報の抽出すること、c) Y7F 変異体 His64 の K_T を決定し、 K_T と水素結合の間の相関解析を基に、その K_T から His64 が関わる水素結合の様式を予想することを行った。次に 2) 野生型酵素と Y7F 変異体の X 線結晶構造(PDB: 2CBA, 2NXT)から抽出した活性部位(Zn $^{2+}$, Tyr7/Phe7, Asn62, Gly63, His64, Ala65, Asn67, His94, His96, Glu106, His119, Thr199, Thr200, 水分子(亜鉛結合水, w1a, w2, w3a, w3b, w4))に水素を付加し、Gaussian09 搭載 NEC SX-9 装置を用いてその水素の位置について構造最適化計算(B3LYP/6-31(d, p), SMD)を行った。得られた座標について振動数解析を行い、構造のエネルギーの値から、一つの水分子とその水分子を除いた構造の 2 つのエネルギーの値を差し引くことによって、水分子が活性部位と相互作用するエネルギー(ΔE s)を見積った。

【結果と考察】 イミダゾール ϵ 1 炭素位における重水素結合は、中性において OD^- のような溶媒によって ϵ 1 水素が引き抜かれることが必要であることが知られる。1-a)の結果、亜鉛結合イミダゾールの ϵ 1 炭素に結合する水素のシグナルは、9 ヶ月経ってもなお NMR スペクトル上観察され、表面にあるヒスチジンのシグナル強度の低下($\tau_{\text{ex}}=26\text{-}123$ days)と明らかに異なった。この重水素置換に対する抵抗性は、くぼみの底にわずかに露出するように見える亜鉛結合イミダゾールが溶媒と全く接しないか、さもなければ測定された pD8.3 において正電荷イミダゾリウムであることを示しており、いずれの場合においても、そのイミダゾールがその pD(pH7.9)より低い pK_a をもつという可能性が排除された。このことに基づいて、亜鉛に結合する第四の配位子の性質を特徴付けるために亜鉛結合窒素シグナルの観察(1-b)を行った。その結果、そのシグナルは、みかけの pK_a 7.4-7.6 で pH 依存的であり、酵素阻害剤複合体において pH 非依存的であった。pH7.9 以下を示す pK_a は亜鉛結合イミダゾールのそれでないことを示し、pH 依存性の変化は、結晶解析による亜鉛結合水が阻害剤の $-\text{SO}_2-\text{NH}_2$ 基によって置換される観察に相当する変化と考えられ、その pK_a は結合水のイオン化を示すと結論した。これは、固体 ^{67}Zn -NMR の結果と一致せず、代わりに Zn-hydroxide 機構を支持するものである。一方、 K_T と水素結合の間の相関解析によると、5.2 から 0.61 の範囲の K_T の低下は、 δ 1 窒素とある酸との間の水素結合が強く引き合う相互作用から部分的に引き合うものに変化することに相当する。実験の結果、Y7F 変異体 His64 の K_T は 0.67 であったので、Y7F 変異体 His64 の δ 1 窒素はある酸との間の相互作用が、野生型と比べてより部分的なものに変化したと考えられる。結晶構造によると、His64 と水素結合相互作用が可能な酸性基は、亜鉛結合水と Glu106 のカルボキシル基である (Zn-H $_2$ O-H $_2$ O(w1a)-H $_2$ O(w2)-His64 と Glu106-H $_2$ O(w4)-(Tyr7)-H $_2$ O(w3a)-His64, 但し Y7F 変異体は Tyr7 を除く)。2)を行った結果、野生型と Y7F 変異体それぞれの w1a と w2 の ΔE s は -7~-17 kcal/mol の範囲で差が見られなかった。これに対し w3a と w4 の ΔE s は、Y7F 変異体において -2 と -13 kcal/mol, 野生型において -10 と -24 kcal/mol とそれぞれの水の間に顕著な差が見られた。これは、2 つの酵素の Zn-His64 間の相互作用は類似していること、Glu106-His64 間の相互作用は Y7F 変異体において特に弱いことを示唆している。この結果に基づく、 K_T 0.67 は、Glu106-His64 相互作用がなくかつ Zn-His64 間に部分的に引き合う相互作用に因るものと考えられ、以下の式のように、Y7F 変異体において Zn-His64 間に部分的に引き合う相互作用がみられることを提案するに至った。式は、中性 pH において亜鉛結合水のイオン化が His64 の互変異性変化と対となる様子を表しており、これを



Zn-hydroxide 機構にパズルのようにはめ込むことで互変異性モデルを描くことが成立する。 **3P084** に関連報告

QM/MM 法と溶液論による ATP モデル分子の 加水分解反応の自由エネルギー解析

(東北大院理) 高橋 英明*, 近江 惇, 森田 明弘

Free energy analysis of ATP hydrolysis by QM/MM method
combined with a theory of solutions

(Graduate School of Science, Tohoku University) H. Takahashi, A. Omi, A. Morita

1. はじめに ATP(Adenosine Triphosphate)の加水分解の自由エネルギーを解析することは、ATPのエネルギーがタンパク質内でどのように力学エネルギーに変換されるかを知る上で重要である。ATP分子は、状況に応じて様々な電荷状態を取るにも関わらず、水溶液中で加水分解される際に放出される自由エネルギーは、その価数によらずほぼ一定であることが知られている[1]。

ATPの加水分解反応は、その重要性にも関わらず分子理論に基づく自由エネルギー解析は過去にほとんど行われていない。我々は、これまでに、ハイブリッド型の第一原理分子動力学シミュレーション(QM/MM法)とエネルギー分布関数を基本変数とする溶液論(エネルギー表示の理論)[2]を結合することによって、効率良く、且つ正確に溶液内の化学反応の自由エネルギー変化を計算する方法(QM/MM-ER法)を開発した[3]。本研究では、ATPのモデル分子である1価および3価のピロリン酸 ($\text{H}_3\text{P}_2\text{O}_7^-$, $\text{HP}_2\text{O}_7^{3-}$)について、それらの加水分解の自由エネルギー変化 ΔG_{hyd} をQM/MM-ER法によって解析する。

これらの反応においては、ピロリン酸やその解離生成物において余剰電子が水分子の運動にตอบสนองして著しく揺らぐと予想される。従って、溶媒和自由エネルギーの計算において、溶質—溶媒間の多体の相互作用(QM系の電子密度の揺らぎ)を考慮する必要がある。我々は、最近、QM系の電子密度が揺らぐことによる寄与 $\delta\mu$ をエネルギー表示の枠組みで厳密に計算する方法を開発したので[4]、この方法をピロリン酸の電子分極に関わる自由エネルギーの評価に対して適用する。

2. 方法論 QM/MM-ER法による自由エネルギー計算では、全溶媒和自由エネルギー $\Delta\mu$ を以下のように、2体的な相互作用による寄与 $\Delta\mu_{\text{tb}}$ と多体的な寄与 $\Delta\mu_{\text{mb}}$ に分解する。すなわち、

$$\Delta\mu = \Delta\mu_{\text{tb}} + \Delta\mu_{\text{mb}} \quad (1)$$

式(1)において、 $\Delta\mu_{\text{tb}}$ は電子密度がある分布 \bar{n} に固定されているQM系の溶質の溶媒和自由エネルギーであり、通常のエネギー表示の理論[2]が適用可能である。また、 $\Delta\mu_{\text{mb}}$ はQM系の溶質の電子密度が溶液中で \bar{n} の周りに揺らぐことによる自由エネルギー変化である。我々が最近、開発した方法[4]では、 $\Delta\mu_{\text{mb}}$ の計算において、エネルギー座標 η をQM-MM系全体の分極エネルギー

$$\eta = E_{\text{dist}} + \left[E_{\text{QM/MM}}(n, \mathbf{X}) - E_{\text{QM/MM}}(\bar{n}, \mathbf{X}) \right] \quad (2)$$

にとり、溶液系と参照系において η の分布関数 $Q(\eta)$ および $Q_0(\eta)$ をそれぞれ構築する。式(2)において n は \mathbf{X} に依存する溶質の電子密度であり、 E_{dist} は溶液中のQM系の溶質のエネルギーである。すると多体の寄与 $\Delta\mu_{\text{mb}}$ は、厳密に

$$\Delta\mu_{\text{mb}} = \int d\eta W(\eta) \left[k_B T \log \left(\frac{Q(\eta)}{Q_0(\eta)} \right) + \eta \right] \quad (3)$$

と計算されることが示される。式(3)において $W(\eta)$ は規格化された適当な重み関数である。

3. 計算の詳細 1価のピロリン酸の加水分解反応は、



であり、反応物および生成物の溶媒和自由エネルギーを上記のQM/MM-ER法によって計算した。QM系の電子状態は実空間グリッドを基底とするKohn-ShamのDFTにより決定した。ただし、交換相関エネルギーはBLYP汎関数を用いて評価した。立方体のQMの実空間セルにおいて、 $x, y,$ 及び z 軸方向にいずれも70個のグリッドを配置し、グリッド幅は0.152 Åとした。MM系として扱う水の溶媒はSPC/Eモデルの水分子で構成した。1価、および3価のピロリン酸について、それぞれ、494個、3994個の水分子を使用した。MDセルの外部に存在する水分子からのクーロン相互作用による自由エネルギーはBorn項によって計算した。溶媒配置のアンサンブルは分子動力学(MD)シミュレーションによって生成し、MDの時間ステップは1 fsとした。溶液の熱力学的条件は300 K, 1.0 g/cm³に設定した。

4. 結果と考察 1価のピロリン酸 $\text{H}_3\text{P}_2\text{O}_7^-$ の多体相互作用に起因する溶媒和自由エネルギー $\Delta\mu_{\text{mb}}$ について、式(2)のエネルギー座標 η の分布関数 $Q(\eta)$, $Q_0(\eta)$ 及び $W(\eta)$ を図1に示した。ただし、式(2)の固定された電子密度 \bar{n} は単に気相中の密度 n_0 とした。図1によれば参照系と溶液系の分布は乖離しているものの十分な重なりを持つ。式(3)の右辺の角括弧の中身は原理的には η の値によらない $\Delta\mu_{\text{mb}}$ の値を持つ関数であり、これを $R(\eta)$ として図1中にプロットした。図によれば、 $R(\eta)$ は $Q(\eta)$ と $Q_0(\eta)$ が有為な重なりを持つ範囲において良好に一定性を実現していることが分かる。結果として溶質の電子分極に伴う自由エネルギーは $\Delta\mu_{\text{mb}} = -13.1$ kcal/mol と計算される。また、通常の方法で計算される2体的な寄与 $\Delta\mu_{\text{tb}}$ は -54.9 kcal/mol である。こうして計算された各溶質の溶媒和自由エネルギーを表1にまとめた。式(5)の気相中の反応エネルギーは $+22.5$ kcal/mol であり、大きく吸熱的であるが、各溶質の溶媒和自由エネルギーについて2体相互作用の寄与のみを考慮すると、自由エネルギー変化 ΔG_{hyd} は -2.3 kcal/mol へと発熱に転ずる。これは、主として生成物においてイオン半径が減少したことによるイオン種の $\Delta\mu$ の減少と、 H_3PO_4 が H_2O に比べて $\Delta\mu$ が小さいことに起因する。さらに、多体相互作用の寄与を考慮すると、 ΔG_{hyd} は -6.7 kcal/mol まで減少する。実験値は -7.5 kcal/mol であり、本計算が高い精度で溶媒和自由エネルギーを計算できていることが示された。3価のピロリン酸の計算は現在実行中であり、結果は当日、発表する。

参考文献 [1] P. George, et al. *Biochim Biophys. Acta*, **223**, 1 (1970). [2] N. Matubayasi, et al. *J. Chem. Phys.* **113**, 6070 (2000). [3] H. Takahashi, N. Matubayasi et al. *J. Chem. Phys.* **121**, 3989 (2004). [4] H. Takahashi, et al. *J. Chem. Phys.* **136**, 214503 (2012).

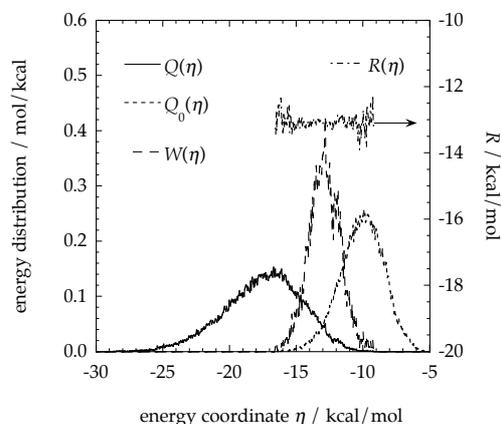


図1 1価のピロリン酸のエネルギー分布関数

表1 1価のピロリン酸の加水分解反応の反応物および生成物の溶媒和自由エネルギーとその分解項 (単位: kcal/mol)

Species	$\Delta\mu_{\text{tb}}$	$\Delta\mu_{\text{mb}}$	$\Delta\mu_{\text{Born}}$	$\Delta\mu$
$\text{H}_3\text{P}_2\text{O}_7^-$	-40.0	-13.1	-14.9	-68.0
H_2O	-4.0	-3.3	-	-7.3
H_2PO_4^-	-50.0	-11.3	-14.9	-76.2
H_3PO_4	-18.9	-9.4	-	-28.3

QM/MM 法を用いたジオールデヒドラターゼの
グリセロール脱水反応に関する研究

(九大先導研¹・岡山大工²) 土井富一城¹・蒲池高志¹・虎谷哲夫²・吉澤一成¹

Mechanism of Glycerol Dehydration by Dio Dehydratase
from Combined QM/MM Calculations

(IMCE Kyushu Univ.¹, Okayama Univ.²) Kazuki Doitomi¹, Takashi Kamachi¹,
Tetsuo Toraya², Kazunari Yoshizawa¹

【緒言】

ジオールデヒドラターゼ(DD)はアデノシルコバラミン依存の酵素であり, 1,2-ジオールを相当するアルデヒドへと変換する. この酵素による反応はアデノシルコバラミン(AdoCbl)中の Co-C 結合が均等に開裂することにより始まる. これにより生じたアデノシルラジカルが基質の 1 位の炭素から水素を引き抜き, 反応物ラジカルが生成する. 次に水酸基の転移が起き生成物ラジカルを経て 1,1-ジオールを生成する(図 1). この 1,1-ジオールから水分子が脱離することで, アルデヒドが得られる. この酵素はグリセロール(GOL)の脱水反応を触媒する際に不活性化されやすいことが知られている. Bachovchin は重水素化することで GOL の立体異性体を作成し, 反応性を調べた[1]. その結果, 不活性化への寄与が小さい構造(G_R)と寄与が大きい構造(G_S)というふたつの基質結合構造が提案された.

最近, 虎谷らによって GOL が結合した DD の X 線結晶構造が明らかにされた[2]. 本研究では QM/MM 法を用いて G_R と G_S というふたつの構造における脱水反応と副反応の機構について検討を行い, G_S 構造で不活性化しやすい理由を明らかにした.

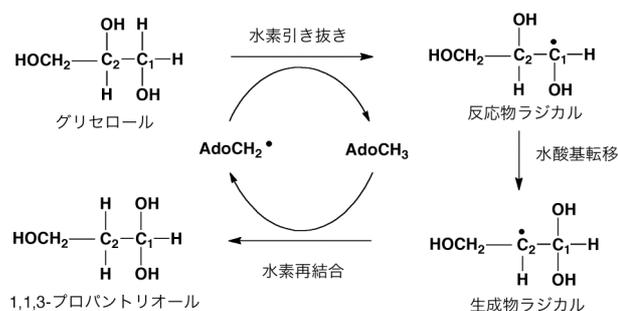


図 1. ジオールデヒドラターゼによる脱水反応機構

【計算方法】

酵素の全原子計算を行うために QM/MM 法を用いた. QM/MM 法は高精度で計算負荷が大きい量子化学計算(QM)と安価で高速な分子力場計算(MM)を組み合わせた方法である. QM 領域の原子は反応に重要な 10 個のアミノ酸残基, 金属イオン(Ca²⁺), GOL, アデノシルラジカルのリボース部位の全 109 原子とした. QM 領域では TURBOMOLE プログラムを用いて B3LYP 法で計算を行い, 基底関数は SV(P)を適

用した. それ以外の領域を MM 領域として力場に CHARMm を適用し, 計算を DL_POLY プログラムで行った. 計算のインターフェイスとして ChemShell プログラムを用いた.

【結果と考察】

図 1 に示す水素引き抜き, 水酸基転移, および水素再結合過程を解析し, 反応に伴うエネルギー変化を評価した. 図 2 に示すのは脱水反応のエネルギーダイアグラムである. 反応の律速段階はどちらの構造においても水素再結合であり, 水素再結合の活性化エネルギーは基質結合構造に依存しなかった. 一方, 水酸基転移の活性化エネルギーは G_S が 5.2 kcal/mol 高くなった. このエネルギー差の多くは反応物ラジカル(グリセロール)の安定性に起因する.

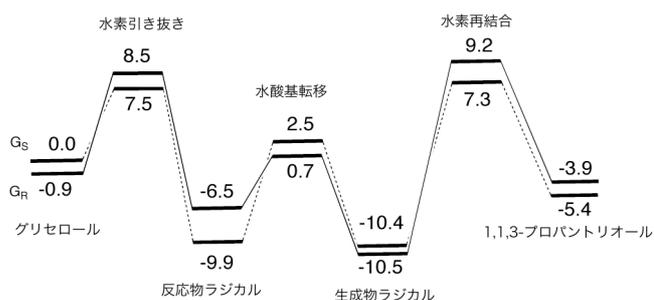


図 2. 脱水反応のエネルギーダイアグラム

我々は図 3 に示す不活性化に寄与する副反応を提案した. この反応の最初のステップである水素移動反応は水酸基転移反応と競争的に進行する. 水素移動反応では基質の 3 位の水酸基から C1 に水素が移動して, 酸素中心ラジカルが生成される. この反応の活性化エネルギーは G_S と G_R においてそれぞれ 23.6, 22.8 kcal/mol であり基質結合構造に依存しなかった. この酸素中心ラジカルは非常に不安定なのでグリコールラジカルとホルムアルデヒドに分解される. 可視紫外分光スペクトルはホルミル基と Co の相互作用の可能性を示しており[1], この副反応を支持する. 当日はこれまで得られた知見を基に不活性化と基質結合構造の関係性について議論する.

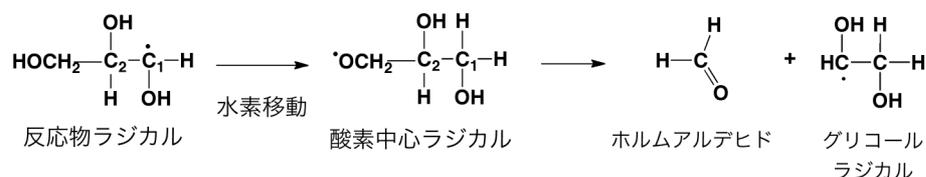


図 3. 本研究により提案された副反応の機構

- [1] Bachovchin, W. W.; Eagar, J. R. G.; Moore, K. W.; Richards, J. H. *Biochemistry* **1977**, *16*, 1082.
- [2] Yamanishi, M.; Kinoshita, K.; Fukuoka, M.; Saito, T.; Tanokuchi, A.; Ikeda, Y., Obayashi, H.; Mori, K.; Shibata, N.; Tobimatsu, T.; Toraya, T. *FEBS J.* **2012**, *279*, 793.
- [3] Doitomi, K.; Kamachi, T.; Toraya, T.; Yoshizawa, K. *Biochemistry*, submitted.

1B16

Elongation 法による DNA の高効率・高精度電子状態計算とその物性解析

(九大院・総理工¹, SCNU², JST-CREST³) 折本 裕一¹, Xie Peng¹, Liu Kai¹,
Gu Feng Long^{2,3}, 青木 百合子^{1,3}

High-efficient DNA electronic structure analysis by *ab initio* elongation method

(Kyushu Univ.¹, SCNU², JST-CREST³) Yuuichi Orimoto¹, Peng Xie¹, Kai Liu¹,
Feng Long Gu^{2,3}, Yuriko Aoki^{1,3}

【序】 DNA をはじめとする生体高分子の物性を理解するには、分子構造と電子状態の関係を正確に把握する必要がある。経験的パラメータを含まない量子化学計算をこの問題に適用できれば、定量的議論が可能となり、生命科学や生体材料分野へ大きな貢献が期待できる。しかし、従来の量子化学計算では系のサイズを N としたときに N^4 に比例する計算コストのため(サイズとともに爆発的に増大)、計算機技術の発達した現在においても生体高分子のような複雑・巨大系を気軽に計算できる段階にはなく、現実的には系の一部をモデルとして扱い、それ以外の部位の影響については目をつぶらざるを得ない。

当研究グループで開発している大規模系演算手法である 3D-Elongation(3D-ELG)法は、生体分子のような三次元ランダム高分子の電子状態を化学的精度を保持しつつ、オーダー N (N^1 に比例した計算コスト)の高効率で得ることができる。本研究では、Elongation 法の巨大生体高分子への有効性を調べるため、様々なタイプの DNA について電子状態の詳細を調べ、二重らせんのピッチ、塩基配列、カウンターイオン等の構造因子と物性の関係を調べる。

【方法】 Elongation 法^{1),2)} は高分子の重合反応を計算機上で実現したものであり、高分子の反応末端にモノマーを付加させながら、逐次的に電子状態を得る手法である。図1に、DNA 鎖を例とした Elongation 法による電子状態計算の手順を示した。まず、適当なサイズの出発クラスタについて電子状態計算を行い、正準分子軌道(CMO)を得る。次に、伸長方向の反応末端側に新しいモノマー M (ここでは塩基対ユニット)を付加させるが、従来法であればモノマーを含めた全系を解き直さなければならない。Elongation 法では、先に得た系全体に広がった出発クラスタの CMO をまず、ユニタリ変換によって反応末端側の Active 領域(B 領域)と、逆側の Frozen 領域(A 領域)に局在化させた領域局在化軌道(RLMO)を得る。この時、Frozen(A)領域の RLMO とモノマーは相互作用しないほど離れているので、計算に含めなくても良い。その結果、Active(B)領域の RLMO とモノマーの相互作用だけを解くことで(部分空間に対する Fock 行列の対角化)、モノマーが加わった系全体の電子状態が得られる。この局在化と部分 Fock の対角化を繰り返し、その都度必要のない Frozen 領域の RLMO を次々と計算から外す。解くべき部分空間のサイズは一定となり、計算精度を落とすことなく効率的に巨大系の電子状態が得られる。

しかし上記だけでは、局在化させる前の原子軌道(AO)基底 Fock 行列は系全体のものを常に扱うため、AO Fock 行列の作成と RLMO Fock 行列への変換が系のサイズとともに増大してしまう。そこで、必要のない(軌道の tailing の及ばなくなった)基底関数(AO)そのものを計算から外してしまう AO Cutoff 法によって、この問題を解決している。これにより、Fock 行列の作成・変換に係る時間も系の伸長過程で一定となる。

Fock 作成・変換の次元が一定、及び、モノマー付加後に対角化する部分 Fock 行列の次元が一定となり、Elongation 法では計算時間が N^1 に比例したオーダー N を達成できる。

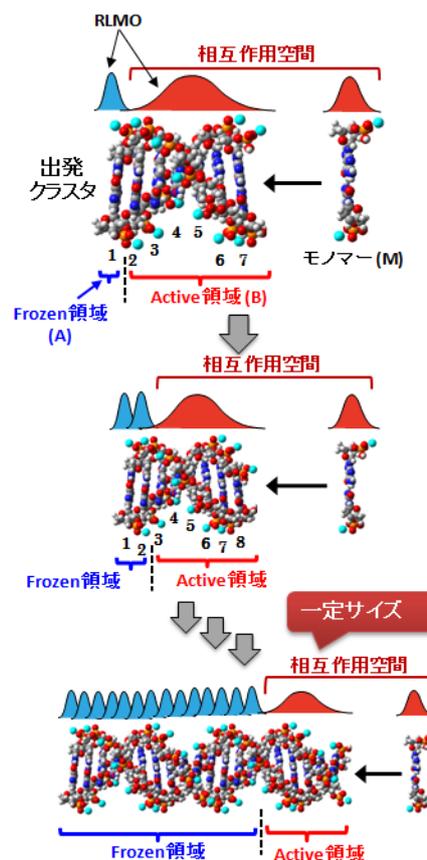


図1 Elongation 法による DNA の高精度・高効率電子状態計算

【結果と考察】 図2に、B-poly(dA)・poly(dT) DNA に対するベンチマークテストの結果を示す (HF/STO-3G)²⁾。まずは計算精度であるが、従来法(全系をダイレクトに解く場合)との全エネルギーの誤差(E(ELG)-E(CONV))は、塩基対ユニット数がn=20(原子数1,324)の時、わずかに 2.59×10^{-9} Hartree/atom(系全体で、0.002 kcal/molの誤差)であり、超高精度に電子状態が得られる。次に計算時間は、図に示すように各サイズごとのCPU時間が、従来法ではサイズとともに急激に増大するのに対し、Elongation法ではAO cutoffの開始とともに、各ステップにかかる時間がほぼ一定となる。

図2では塩基対(A...T)をスタックさせた場合を見てきたが、ここでさらに図3に示すように4種類の塩基対を様々な組み合わせで n_{whole} 個スタックさせることを考える。まず従来法では、塩基対 n_{whole} 個からなるDNAの全ての可能性(全組み合わせ数 $4^{n_{whole}}$ 通り)を計算するための時間 T_{CONV} は式(1)のように見込まれる。

$$T_{CONV} \sim (m \cdot n_{whole})^4 \cdot 4^{n_{whole}} \quad (1)$$

ここで、 m は塩基対ユニット当たりの基底関数の数であり、系のサイズに相当する $m \cdot n_{whole}$ の4乗に、組み合わせ数 $4^{n_{whole}}$ が掛け合わさった時間がかかる。

次にElongation法であるが、電子状態を逐次的に求めていくため、塩基対 n_{whole} 個の系を計算するためには $(n_{whole}-1)$ 個の結果が必要となり、さらに $(n_{whole}-1)$ 個のためには $(n_{whole}-2)$ 個の結果が必要というようにそれぞれ前段階の計算結果が必要となる。しかし一方で、途中段階の計算結果を全て保存しておけば、途中までの配列が同じ場合には、最初から計算する必要はなく、保存した結果を再利用して続きから計算を開始することができる。これらを考慮すると、Elongation法で塩基対 n_{whole} 個の全組み合わせ($4^{n_{whole}}$ 通り)を計算するための時間 T_{ELG} は式(2)のようになる。

$$T_{ELG} \sim (m \cdot n_{actv})^1 \cdot 4^1 + (m \cdot n_{actv})^1 \cdot 4^2 + \dots + (m \cdot n_{actv})^1 \cdot 4^{n_{whole}} = (m \cdot n_{actv})^1 \sum_{k=1}^{n_{whole}} 4^k$$

$$\sim \frac{4}{3} (m \cdot n_{actv})^1 \cdot 4^{n_{whole}} \quad (2)$$

ここで、 n_{actv} は図1の相互作用空間に含まれるユニット数であり、伸長過程で一定のサイズである。式展開の途中、等比数列の和の公式、および $4^{n_{whole}} \gg 1$ という条件を用いた。式(2)から分かるように、Elongation法の計算が目的サイズだけでなく、全てのスタックサイズそれぞれの全組み合わせの計算を含んでいるにもかかわらず、最終的には一定かつ小さな相互作用空間のサイズ $m \cdot n_{actv}$ の1乗に、目的サイズでの組み合わせ数 $4^{n_{whole}}$ が掛け合わさっただけの時間で済むことが分かる。具体的に $n_{whole}=100$ として計算時間の比を見積もると、DNAで想定される $m \sim 770$ (STO-3G), $n_{actv}=5$ を用いることで $T_{ELG}/T_{CONV} \sim 1/(6.8 \times 10^{15})$ となり、従来法とは比較にならないほど計算コストを削減できる。しかも、上述のように計算途中の各サイズの結果を既に全て獲得しており、鎖長依存性などの有用な情報をも抽出できる。

今後Elongation法によって、二重らせんのピッチ(A, B型など)、様々な塩基配列、カウンターイオン等が系の安定性や電子状態(状態密度など)とどのような関係を持っているか詳細に調べていく。

- 1) A. Imamura, Y. Aoki and K. Maekawa, *J. Chem. Phys.*, **95**, 5419 (1991).
- 2) Y. Aoki and F. L. Gu, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **14**, 7640 (2012).

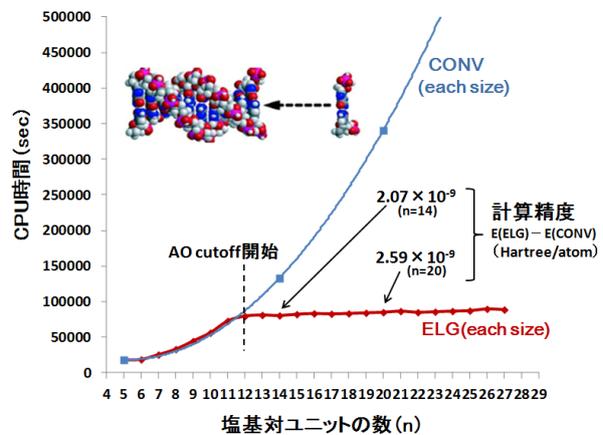


図2 DNAの計算時間の比較²⁾

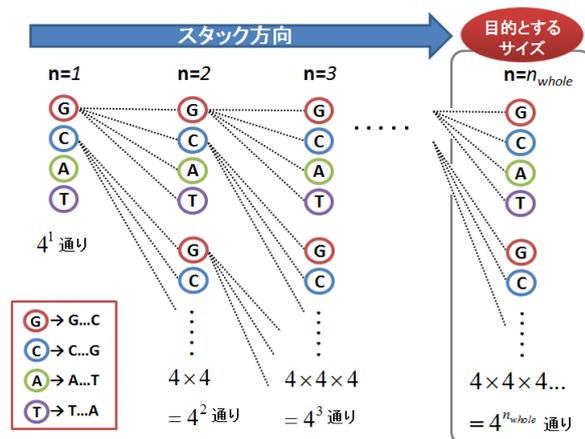


図3 塩基対ユニットを n_{whole} 個スタックさせる場合の全組み合わせ数

1B17

人工塩基対を含んだ DNA 系に対する塩基対間相互作用の評価と 超大規模計算に向けた試み

(理研 QBiC¹, 物材機構², ロンドン大学³) 大塚教雄¹, 有田通朗², David Bowler³, 宮崎剛²

Theoretical study on hydrated DNA systems with unnatural base pair by quantum chemical and linear-scaling DFT calculations

(RIKEN QBiC¹, NIMS², UCL³) Takao Otsuka¹, Michiaki Arita², David Bowler³, Tsuyoshi Miyazaki²

【序】 近年、有機合成化学の技術を駆使し、生命システムをボトムアップ的に理解し、人工的に創出するという合成生物学が急速に進展している。核酸化学の分野では、人工的に設計した塩基を DNA に導入し、いわゆる非天然型塩基を遺伝子情報の拡張コードとした複製・転写・翻訳システムの理解や再構成、それに伴う人工アミノ酸を含んだ機能性タンパク質の創製を目指した研究が行われている。最近、理研 SSBC の平尾等は、独自の設計指針から複製と転写で機能する人工塩基とその塩基対 (Ds-Pa, 7-(2-thienyl)-imidazo[4,5-b]pyridine (Ds)と pyrrole-2-carbaldehyde (Pa))の開発に成功している[1]。今後、効率よく、より洗練された人工塩基対を創製する分子設計指針が必要とされている。

本研究では、我々が開発してきたオーダーN (order-N または linear scaling) 法第一原理 DFT 計算プログラム CONQUEST[2]を用いて、計算シミュレーションによる分子設計や生体分子の機能理解といった観点から、この非天然型塩基対含有DNAの系に対し、構造安定性や環境効果(水和構造や塩基配列依存性)を電子状態から明らかにする事を目的としている。これまでに我々は、DNA系に対するオーダーN法第一原理DFT計算の数値検証から、我々のオーダーN計算手法が極めて高精度・安定であることを示してきた[3]。最近では、次世代スーパーコンピュータ「京」上での開発を行っており、超高並列計算機下でもオーダーN計算手法の堅牢さを実証している。

今回は、人工塩基対を含んだDNA系に対して、まず量子化学計算による人工塩基対間の相互作用の評価を行い、次いで超高並列計算機下での超大規模計算に向けたオーダーN法第一原理DFT計算の試みに関する報告を行う。

【理論的背景】 CONQUEST で用いられているオーダーN 計算手法は、密度汎関数法における一体の密度行列を最適化する手法である。密度行列の非対角項が局所的であることから、非対角項に対する cutoff 半径 R_L を導入する事でオーダーN法を実現している:

$$\rho(\mathbf{r}, \mathbf{r}') = \sum_{i\alpha, j\beta} \phi_{i\alpha}(\mathbf{r}) K_{i\alpha, j\beta} \phi_{j\beta}(\mathbf{r}'), \quad K = 3LSL - 2LSLSL, \quad L_{i\alpha, j\beta} = 0 \text{ for } |\mathbf{R}_i - \mathbf{R}_j| > R_L$$

ここで、行列 L は補助密度行列であり、電子数一定の条件下で全エネルギーを最小にする密度行列 L が求められる。また $\phi_{i\alpha}(\mathbf{r})$ は、support function と呼ばれる各原子に局在した関数である。今回も擬原子軌道 (PAO) を使った計算を行っている。系の全エネルギーは、cutoff 半径に対して変分的であるという利点を持つことから、オーダーN法を導入することによって生じる誤差を評価することが可能である。また、原子座標の自由度に対する最適化(構造最適化計算)も安定に行えるという特徴を持つ。

【計算と結果】 我々はまず人工塩基対 Ds-Pa 分子 (図 1) に関して、量子化学計算による塩基対間の分子間相互作用の評価を行った[4]。図 2 に Ds と Pa の分子間距離に関する相互作用エネルギー曲線を示す。また、天然型塩基対 (A-T、G-C) の PBE 汎関数による相互作用エネルギー曲線も示した。図 2 より、A-T、G-C 塩基対は水素結合によって十分安定化されているのに対し、Ds-Pa 間の相互作用は非常に小さい事が分かる。これより、DNA の 2 重鎖構造内の人工塩基対の安定性は、例えば、DNA 骨格上の空間的な形状、人工塩基対の前後配列にある隣接塩基対間との相互作用、溶媒との相互作用といった環境効果から大きく影響を受けている事が示唆される。

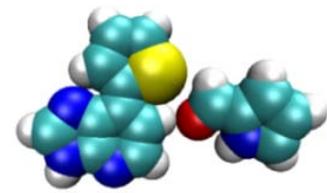


Figure1. unnatural base pair, Ds-Pa system.

次に、水溶液中の DNA モデル系のオーダー-N 計算の準備・予備計算段階ではあるが結果を示す。モデル系は、人工塩基対 Ds-Pa の 1 対分を含んだ DNA12 塩基対に AMBER で水分子を加える事で、全原子数 11,912

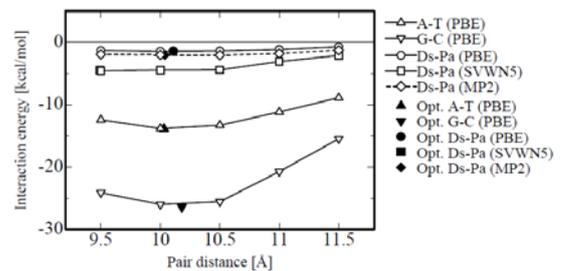


Figure2. Interaction energy of A-T, G-C, Ds-Pa base pair.

原子 (DNA: 763 原子、Na: 22 原子、H₂O: 3709 分子 = 11,127 原子) を作成し、分子動力学計算による平衡状態計算後のスナップショットの 1 構造を用いた (図 3)。AMBER 計算における Ds と Pa の力場パラメータは、Duan らの方法[5]を用いて作成した。図 4 に SCF による CONQUEST 計算から、この水溶液中の人工塩基対 DNA モデル系の Force を示す。この構造では、18 番目の Cytosine のリン酸部分の酸素が Force の最大値であった (桃色)。一方、薄緑色で示した部分は、人工塩基 Ds と Pa の Force 部分である。今後更に経験的な van der Waals 汎関数を導入した議論を進めていく予定である。

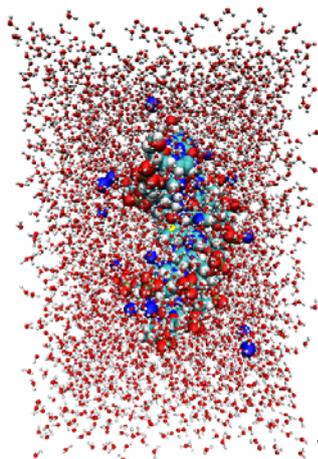


Figure3. DNA including one unnatural base pair system, which contains 11,912 atoms.

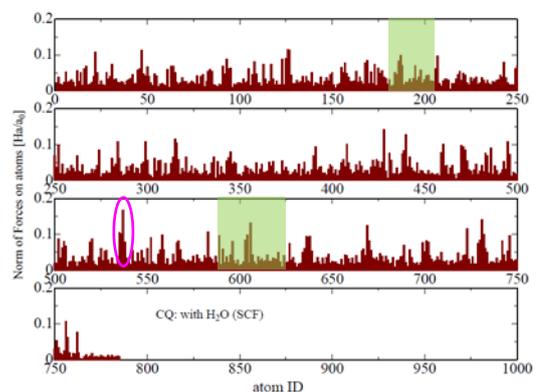


Figure4. Atomic forces of DNA including one unnatural base pair.

【参考文献】

[1] I. Hirao et al., Nature Methods., 3, 729-735 (2006). [2] D. R. Bowler, T. Miyazaki, Rep. Prog. Phys. 75, 036503 (2012). [3] T. Otsuka, et al., J. Phys. Condens. Matter, 20, 294201 (2008). [4] T. Otsuka, T. Miyazaki, Int. J. Quantum Chem. (2012), DOI:10.1002/qua.24094. [5] Y. Duan et al. J. Comp. Chem. 24, 1999-2012 (2003).

1B018 ナイロンオリゴマー分解酵素の反応機構に対する アミノ酸変異の効果

(阪大院・基礎工¹、筑波大院・数理物質²、阪大院・理³、ストラスブール大⁴、兵庫県立大院・工⁵) 馬場 剛史¹、神谷 克政²、松井 亨³、奥野 克樹¹、マウロ ボエロ⁴、根来 誠司⁵、中野 雅由¹、重田 育照¹

Mutational effect on the reaction mechanism of nylon oligomer hydrolase

(Eng. Sci. Osaka Univ.¹, Univ. of Tsukuba², Sci. Osaka Univ.³, Univ. of Strasbourg⁴, Univ. of Hyogo⁵)
Takeshi Baba, Katsumasa Kamiya, Toru Matsui, Katsuki Okuno, Mauro Boero, Seiji Negoro,
Masayoshi Nakano, Yasuteru Shigeta

【序】ナイロンオリゴマー分解酵素は、ナイロン工場廃水中に生息する微生物から単離された加水分解酵素である。一般的にナイロン6は、6アミノヘキサン酸(Ahx)が100ユニット以上重合した合成高分子であり、洋服など身近に使用されている。この酵素は、ナイロン合成過程で生じる副産物(Ahx-liner dimer や Ahx-cyclic dimer)を加水分解することができる。したがって、この酵素の反応機構の解明や酵素活性の改善は、「副産物を減らすことによる環境負荷の軽減」や「再利用するシステムの構築」に役立つ。

これまで複数のアミノ酸変異導入実験が報告されており、その中のいくつかについては酵素のみ、および、酵素-基質複合体の結晶構造が得られている。その結果、酵素活性に重要な役割を果たすアミノ酸残基として、Ser112、Lys115、Tyr170、Tyr215 が特定された。ナイロンオリゴマー分解酵素の反応機構は種々のプロテアーゼと類似しているが、反応機構や具体的な個々のアミノ酸の役割については不明な点が多い。例えば、プロテアーゼとナイロンオリゴマー分解酵素の大きな違いは、基質が結合する際に大きく移動するループ部位に Tyr170 が存在することである。この Tyr170 を Phe に置き換えるアミノ酸変異を導入した変異体 (Y170F) では大きく活性が低下することが明らかとなっているが[1]、基質結合能や酵素反応メカニズムにおける違いは十分に解明されていない。

そこで本研究では、本酵素の反応過程や重要アミノ酸残基の役割を解明するため、野生型と Y170F に関して (1)古典分子動力学法による酵素-基質複合体の構造解析、および、(2)QM/MM Car-Parrinello 分子動力学法とメタダイナミクス法によるアミド加水分解反応の解析を行った。特に(2)においては、加水分解の律速段階であるアシル化反応におけるアミノ酸残基の役割の特定および、アミド加水分解に対するアミノ酸変異の効果の解析を行った。

【計算の詳細】図1は(2)における QM 領域を示す。QM 領域と MM 領域の境界はプロトンキャップを採用し、密度汎関数計算における交換相関汎関数には HCTH、平面波のカ

ットオフは $E_{\text{cut}}=70$ Ry、時間刻みは $\Delta t = 0.097$ fs、電子の仮想質量は 400 a.u.、温度 300K で圧力 1 気圧の NPT アンサンブルでのシミュレーションを行った。また、ナイロンオリゴマー分解酵素の化学反応を記述するに当たって、メタダイナミクス反応座標として、基質のアミド結合のカルボニル炭素原子と、求核攻撃する Ser112 の側鎖の酸素原子間距離を採用した。

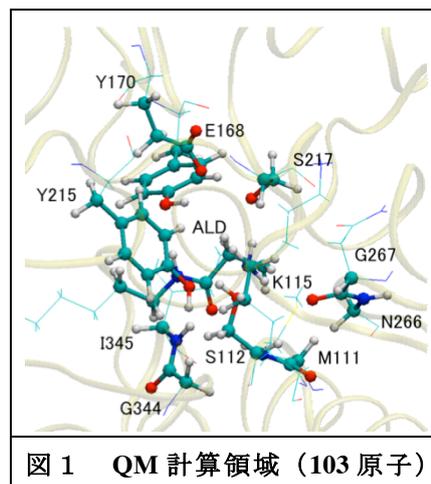


図1 QM 計算領域 (103 原子)

【結果と考察】 (1)では、Y170F の場合、酵素-基質複

合体形成時に構造が不安定化し、Tyr170 を含むループ部位が大きく揺ぐことが明らかとなった。この変化を野生型と比較すると、酵素-基質複合体の生成過程において、Tyr170 が基質と水素結合を形成することで構造を安定化させるという、従来この酵素が備える機能を喪失していることが確認された[2]。

野生型の反応機構の解析では Lys115 が塩基として働き、Tyr215 が四面中間体形成時にプロトンを供与するという役割をそれぞれ担っていることが判明した。また Y170F に関しては、四面中間体形成時に Tyr215 からのプロトン供与が困難になる配置を形成していることが判明した。野生型の場合、Tyr170 の水素結合により図 2 (a)のような配向をとり Tyr215 から自動的に水素原子を受容しやすい構造をしている。一方、Y170F の場合は図 2(b)のような構造をしているため、水素原子を受け取りにくい。また、メタダイナミクス法により算出した野生型との反応自由エネルギー差は約 11 kcal/mol の違いがあり、基質結合能および反応障壁の違いが酵素活性に影響を与えていることを明らかにした。

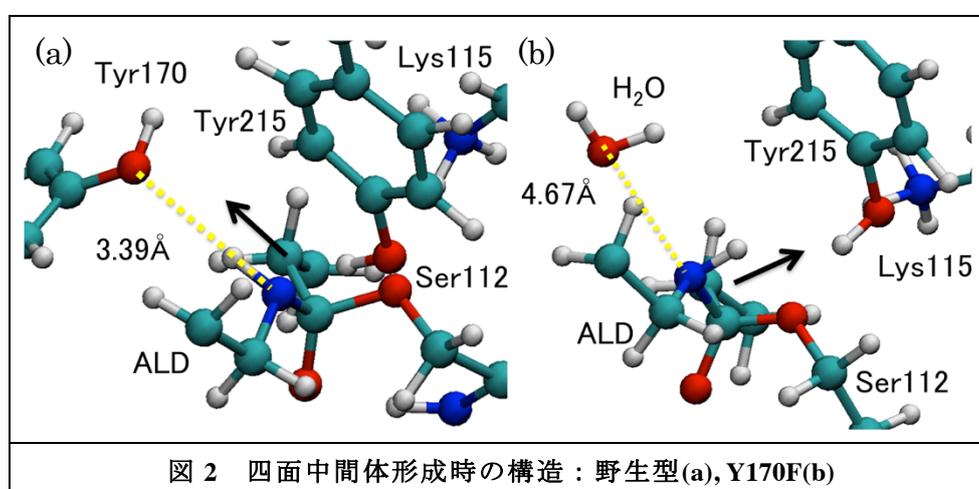


図2 四面中間体形成時の構造：野生型(a), Y170F(b)

Reference [1] S. Negoro *et al.*, *J. Mol. Biol.* **370**, 142–156 (2007). [2] T. Baba *et al.*, *Chem. Phys. Lett.* **507**, 157 (2011).

1B19 グリコシル化反応の溶媒効果に関する理論的研究:オキサカルベニウム-カウンターイオン中間体の立体配座による立体選択性の制御

(国立情報研¹, スイス連邦工科大学(ETH)², 理研・基幹研³)
佐藤寛子¹, ハンセン ハルバー², 眞鍋史乃³ ファン・グンステレン ウィルフレッド²,
ヒューネンベルガー フィリップ²

Theoretical Investigation of Solvent Effects on Glycosylation Reactions: Stereoselectivity Controlled by Preferential Conformations of the Intermediate Oxacarbenium-Counterion Complex

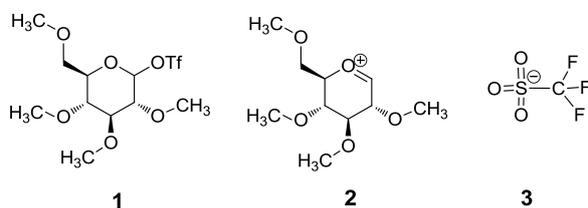
(National Institute of Informatics (NII)¹, Swiss Federal Institute of Technology (ETH)²,
RIKEN Advanced Science Institute³)
Hiroko Satoh¹, Halvor S. Hansen², Shino Manabe³, Wilfred F. van Gunsteren², Philippe H. Hünenberger²

【序】 グリコシル化反応は、糖鎖を生成する糖鎖合成の基本的な化学反応である。本反応はグリコシド結合を形成し、アノマー位の炭素に新たな立体中心を生成する。このため、グリコシル化反応の生成物は通常、2種類の立体異性体の混合物となる。本研究では、グリコシル化反応の反応性と立体選択性に関与すると考えられている種々の重要因子のうち、溶媒効果に着目し、GROMOSによる分子動力学(MD)シミュレーションと、GaussianによるDFT計算により解析を行った。その結果、従来の糖質化学分野で広く受け入れられてきた「溶媒配位仮説」とは異なる、「立体配座とカウンターイオンのカチオンに対する分布仮説」と呼ばれる新しい仮説を提案したので報告する。¹

【計算方法】 今回の計算の対象として、2,3,4,6-tetra-*O*-methyl-D-glucopyranosyl-triflate (**1**)をグリコシル供与体として選んだ。ここから脱離基 OTfが外れることで、グリコシル化反応の重要中間体とされるオキサカルベニウムカチオン(**2**)とトリフレートカウンターアニオン(**3**)が生成する。計算は(**2**)と(**3**)のイオンペアについて、それぞれ、アセトニトリル、ジエチルエーテル、トルエン、1,4-ジオキサン溶媒(300分子)中におけるMDシミュレーションをGROMOS(53A6力場)を用いて行った。シミュレーション時間は100 ns実施した。一方、イオンペア(**2, 3**)を含まない純粋溶媒について10 nsのシミュレーションを実施し、誘電率を計算し、実験値とほぼ一致することを確認した。MDシミュレーションの結果、アセトニトリル溶媒中とジオキサン溶媒中のイオンペアのうち、多く分布する立体配座について、Gaussian03を用いてDFT計算(6-31G(d,p)/B3LYP)による構造最適化を行った。アセトニトリル溶媒についてはGaussian03で定義されているパラメータを用いてIEF-PCMモデルによる最適化を行った。ジオキサン溶媒については、実験値と上記の計算値ともに誘電率が低い(それぞれ2.2, 1.1)ことから、真空中での計算により代替した。

【結果と新仮説】 溶媒の性質は、グリコシル化反応の立体選択性を決める重要な要因のひとつであることが知られている。例えば、グルコピラノシドの場合は、ジエチルエーテルやジオキサン中で、1,2-*cis* グルコシド(α 結合)が優位に生成する。これに対して、

アセトニトリル中では、1,2-*trans* グルコシド(β 結合)が主生成物として得られる。他のピラノシドについても、一般的に同様の傾向が見られる。すなわち、エーテルやジオキサン中では α -アノマー異性体が優位であり、アセトニトリル中では β -アノマー異性体が優位となる。この溶媒効果のメカニズムとしては、溶媒分子が、オキサカルベニウムイオンの環のどちらか一方に優位に結合する形でアノマー炭素と配位結合を形成し、求核剤のこの方向からの攻撃を防げるという仮説が広く受け入れられている(Figure 1-a)。この仮説によると、アセトニトリル中の β -生成物(1,2-*trans* グルコシド)の優位性は、アセトニトリル分子がオキサカルベニウムイオンの環に対して α 面からアノマー炭素に優位に配位することにより生じると説



明される。これと反対に、エーテルやジオキサン中の α -生成物 (1,2-*cis* グリコシド) の優位性は、溶媒分子がオキサカルベニウムイオンの環に対して β 面からアノマー炭素に優位に配位することにより生じると説明される。

これに対して、本研究のグリコシル化反応中間体の溶媒中のシミュレーションの結果は、この一般的な仮説を支持せず、別の異なる反応機構を提示した (Figure 1-b)。この新仮説では、立体選択性は、立体配座の分布とイオンペアの相対的な位置関係の両方の要素によって決まると説明される。すなわち、(1) オキサカルベニウムイオンのピラノース環の立体配座により、アノマー位置の α/β 面の立体的な混みあいすき具合が変化し、(2) オキサカルベニウムカチオンのアノマー位置のどちらか一方にカウンターアニオンが優位に配位することで、この方向からの求核剤 (グリコシル受容体) の攻撃をブロックすることによって、立体選択性が発現する、と説明される。たとえば、アセトニトリル中では、 $B_{2,5}$ 配座のピラノース環にカウンターアニオンが α 面から配位したものが優位に存在することが計算によって示された。実験で得られる β 選択性は、この両方の性質が、 β 面からの求核攻撃の優先性を導くものと説明される。一方、ジオキサン中では、 4H_3 配座のピラノース環にカウンターアニオンが β 面から配位したものが優位に存在することが計算によって示された。実験で得られる α 選択性は、この両方の性質が、 α 面からの求核攻撃の優先性を導くものと説明される。

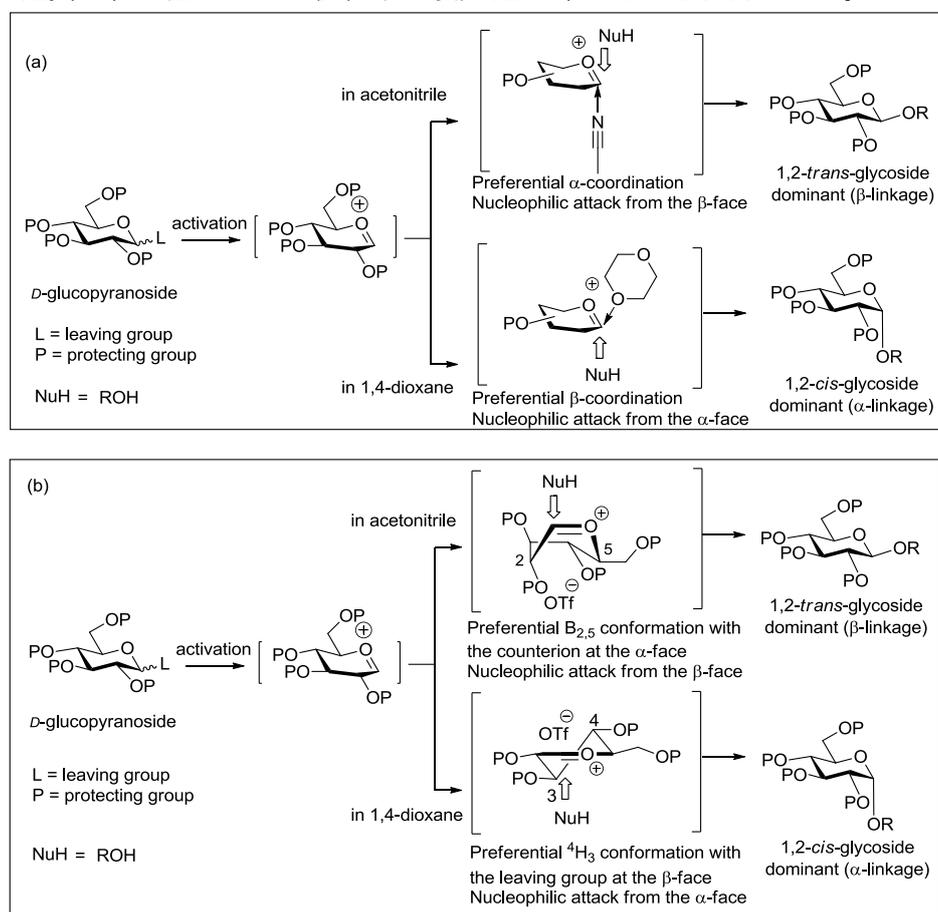


Figure 1. Two alternative hypotheses concerning solvent effects in glycosylation reactions: (a) Commonly formulated hypothesis, referred to here as the solvent coordination hypothesis; (b) alternative hypothesis formulated on the basis of the present study, referred to here as the conformer and counterion distribution hypothesis. A glucopyranoside donor in the solvents acetonitrile and 1,4-dioxane and in the presence of a triflate counterion are selected here to illustrate how the two hypotheses account for the experimentally observed stereoselectivity.

1. Satoh, H.; Hansen, H.; Manabe, S.; van Gunsteren, W.; Hünenberger, P. *J. Chem. Theory Comput.*, **6**, 1783-1797 (2010)