

2P081

## 超臨界 *n*-ペンタン水溶液系における ゆらぎと部分モル体積および等温圧縮率の相関

(千葉大院・融合科学) ○澁田諭, 森田剛, 西川恵子

Correlation between structural fluctuation and thermodynamic quantities  
for the supercritical *n*-pentane aqueous solution system  
(Chiba Univ.)○Satoshi Shibuta, Takeshi Morita, Keiko Nishikawa

【序】常温常圧において、炭化水素は水にほとんど溶解しない。例えば、水 100 g に対して *n*-ペンタンは 0.04 g しか溶けない[1]。一方で超臨界状態において両者は任意の割合で混ざり合い、均一相を形成する。さらに *n*-ペンタンを添加することで超臨界水の物理化学的性質を一変させる。図 1 に高温高压における超臨界 *n*-ペンタン水溶液系の相図を示す[2]。

超臨界流体は、様々な相の状態において分子分布の最も乱れた系であるといえる。それは熱運動と分子間力の拮抗において分子が離散、集合を繰り返しているためである。このような状態を表現する際に、もっとも有力なものがゆらぎの概念である。ゆらぎは平均からの変動の大きさを表す物理量であり、超臨界流体のような分子分布に大きな乱れがある場合に対して、系の状態を表すのに最も適したパラメータである。特に成分の平均濃度からのズレを表す濃度ゆらぎ ( $S_{CC}$ ) は、二成分系において有力な情報となる[3]。

本実験では、ゆらぎを求めるために必要な 3 つのパラメータ（散乱角  $0^\circ$  における散乱強度、等温圧縮率、部分モル体積）のうち、等温圧縮率と部分モル体積を実験的に決定し、超臨界 *n*-ペンタン水溶液系におけるゆらぎと部分モル体積及び等温圧縮率との相関を調べることを目的とした。

【実験】等温圧縮率と部分モル体積は、水の臨界点 647 K で様々な圧力と濃度における密度を測定して決定した。常温常圧下において、電子天秤によって正確に質量が決定された水と *n*-ペンタンをサンプルホルダーに封入し、昇温した。圧力の調整はサンプルホルダー内の流体をリークさせて行った。各熱力学条件で X 線を照射し、入射光と透過光の比から Lambert-Beer の法則を用いて密度を実験的に求めた。高温高压用サンプルホルダーは自作のものを用いた。熱膨張率と耐食性を考慮し、材質はチタンが用いられている。さらに濃度を正確に見積もるため、dead volume を非常に小さくした。X 線が通過する窓は強度を考慮して直径 4.5 mm、厚さ 0.8mm のダイヤモンドを用いた。

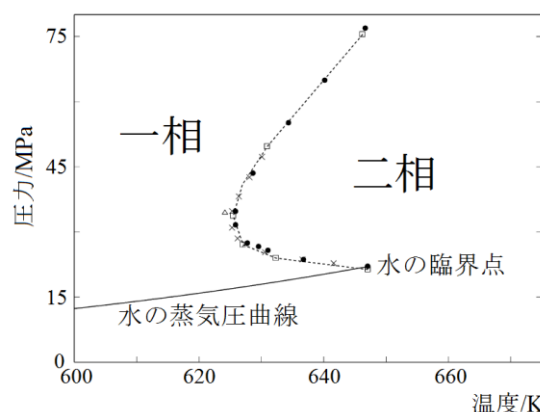


図 1 超臨界 *n*-ペンタン水溶液系の相図[2]

【結果と考察】図2に647 K、水に対する *n*-ペンタンのモル分率 0.0880 における密度の圧力依存性を示す。比較のため neat な水 [4]と *n*-ペンタン[5]のデータも示す。混合系のデータと neat な水を比較すると 22 MPa の低圧側と高圧側で挙動が大きく異なることが分かった。水の臨界圧力は 22 MPa であり、*n*-ペンタンの存在によって超臨界水の物性が大きく変化している。

上記のデータから求めた等温圧縮率 ( $\kappa_T$ ) を図3に示す。水は 22 MPa で  $\kappa_T$  の発散が生じているのに対し、超臨界 *n*-ペンタン水溶液系の  $\kappa_T$  は、高圧側へシフトし、さらに大きく減少している。

モル分率 0.0880 における  $\kappa_T$  と既報[6]の  $S_{CC}$  の相関を図4に示す。グラフにはそれぞれの極値の位置も示した。 $\kappa_T$  と  $S_{CC}$  は、ほぼ同じような変化を示している。しかしながら極値の位置を厳密に比較すると  $S_{CC}$  は  $\kappa_T$  と比べ、高圧側にずれることが分かった。これは  $\kappa_T$  が分子分布の不均一に伴うボイドの圧縮性の情報を主として持っているためである。当日は部分モル体積も含めて議論する。

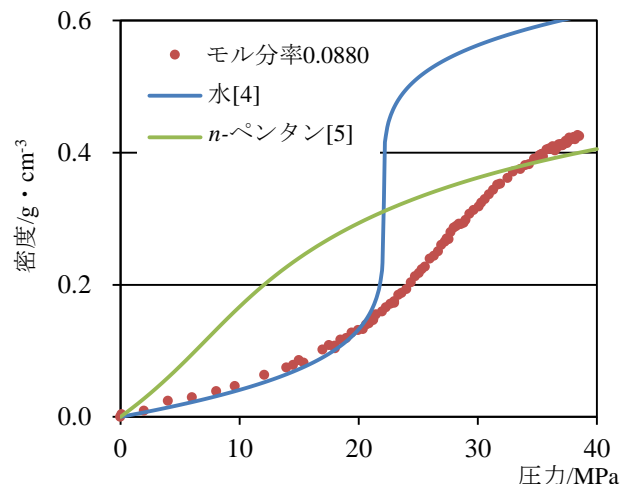


図2 密度の圧力依存性

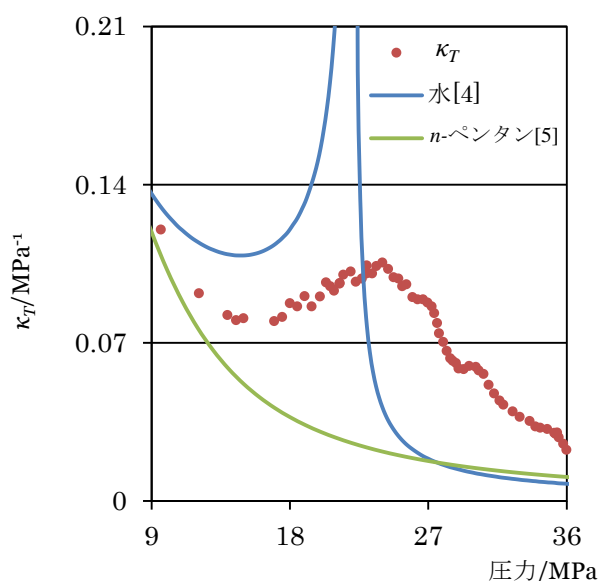


図3  $\kappa_T$  の圧力依存性

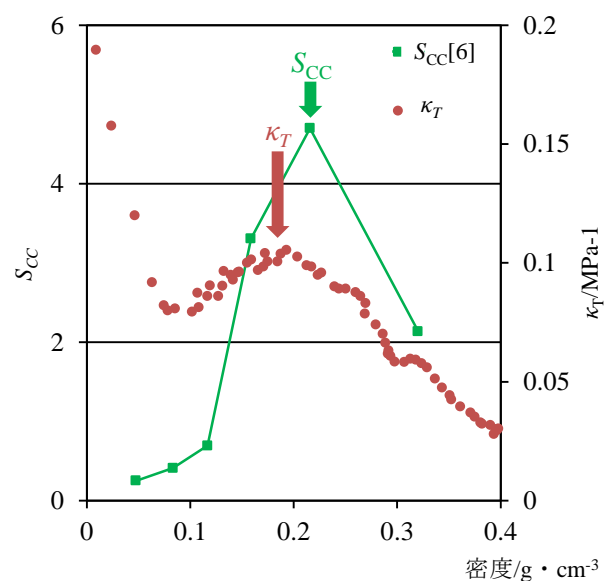


図4  $S_{CC}$  と  $\kappa_T$  の密度依存性

#### 参考文献

- [1]C.MeAuliffe: *J.Phys.Chem.*, **70**, 1267 (1966)
- [2]S.M.Rasulov, I.M.Abdulagatov: *J.Chem.Eng.Data.*, **55**, 3247 (2010)
- [3]西川恵子, 森田剛: *Mol.Sci.*, **6**, A0054 (2012)
- [4]W.Wagner, A.Pruss: *J.Phys.Chem.Ref.Data.*, **31**, 387 (2002)
- [5]K.E.Starling: *Fluid Thermodynamic Properties for Light Petroleum Systems*, Gulf Publishing Company (1973)
- [6]T.Morita, H.Murai, S.Kase, K.Nishikawa: *Chem.Phys.Lett.*, **543**, 68 (2012)

## 超臨界エタノール/ベンゼン 2 成分系における溶媒和 — ラマン分光法と量子化学計算 —

(学習院大・理) ○上山志帆, 仲山英之, 石井菊次郎

### Solvation in Supercritical Ethanol/Benzene Binary Systems Studied by Raman Spectroscopy and Quantum-Chemical Calculations

(Gakushuin Univ.) ○Shiho Kamiyama, Hideyuki Nakayama, Kikujiro Ishii

【序論】超臨界流体の特異的な性質の一つに高い溶解性があり、その仕組みに興味をもたれている。本研究では、超臨界流体中の溶媒和構造を理解する研究の一環として、水素結合を形成する超臨界流体中での溶媒和を分子レベルで理解するために、ラマン分光法を用いて超臨界エタノール (EtOH) 中での溶媒和の研究を行った。溶質としては、 $\pi$  電子を持つベンゼン (BZ) を用いた。さらに分子的レベルにおける溶媒和構造を調べるために、BZ/EtOH のクラスター形成に関する量子化学計算を行った。

【実験】本実験では、2つのポンプを用い、高圧用の光学セルに溶媒 (EtOH,  $T_c = 513.9$  K,  $p_c = 6.39$  MPa) と溶質 (BZ) を注入した (図 1)。溶液の濃度はベンゼンのモル分率  $x_{BZ} = 0.010$  とした。濃度の決定は濃度既知の溶液のラマンスペクトルにおける BZ バンド (約  $990$   $\text{cm}^{-1}$ ) と EtOH バンド (約  $1270$   $\text{cm}^{-1}$ ) の強度比の較正曲線を作成して行った。セル内を一定温度  $T_r (= T/T_c) = 1.02$  に保ったまま、圧力を  $14$  MPa から  $0.6$  MPa まで段階的に減少させて測定を行った。また BZ の蒸気のラマンスペクトル測定も温度を変化させて行った。励起光には  $\text{Ar}^+$  レーザー ( $514.5$  nm,  $100$  mW) を使用し、液体窒素で冷却した CCD を備えた分光器を用いてラマンスペクトルを観測した。また測定したラマンバンドの波数は、波数既知のネオン線のバンドにより補正し決定した。量子化学計算においては、Gaussian09 を用いて EtOH-BZ (2 量体) と  $\text{EtOH}_2\text{-BZ}$  (3 量体) のクラスター形成による安定化エネルギー  $-\Delta E$  と振動シフト  $\Delta \nu$  を計算した。計算レベルは MP2/6-311++G(d,p) で、counterpoise 法により BSSE に対する補正を行った。

【結果と考察】測定したラマンスペクトルを図 2(a, b) に示した。圧力減少に伴いスペクトル強度は段々と減少した。図 2(b) に見える OH 伸縮モードは高密度領域で非常にブロードな形を示した。このうち  $3500\sim 3600$   $\text{cm}^{-1}$  領域に広がるバンドは水素結合した OH 伸縮振動で、 $3600$   $\text{cm}^{-1}$  領域に少し突出したバンドは主に水素結合した鎖の末端にある OH のバンドである。低密度領域では  $3660$   $\text{cm}^{-1}$  領域のバンドの分裂が観測された。これらは単独の EtOH 分子のうちの *trans* 型と *gauche* 型分子の OH 伸縮モードである。図 2(a) のスペクトルの中において約  $990$   $\text{cm}^{-1}$  のバンドはベンゼンの全対称骨格振動によるものである。もし BZ の  $\pi$  電子

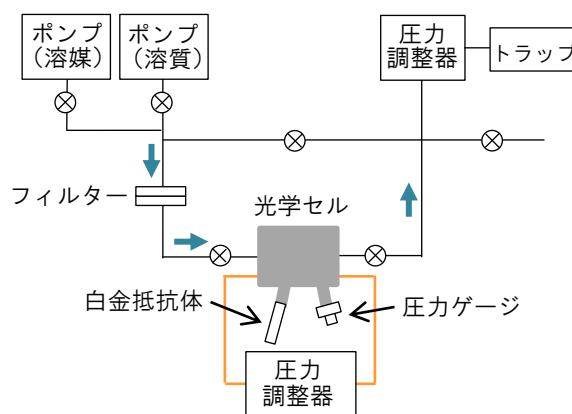


図 1. 超臨界 2 成分系の装置図

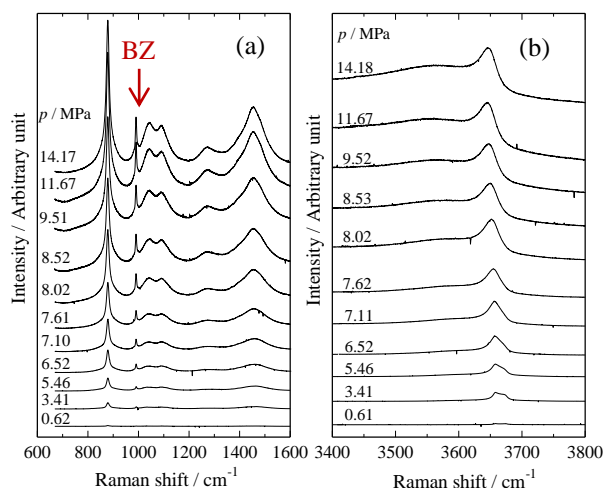


図 2.  $T_r = 1.02$  における EtOH/BZ 2 成分系のラマンスペクトル (a) 指紋領域, (b) EtOH の OH 伸縮振動バンド領域

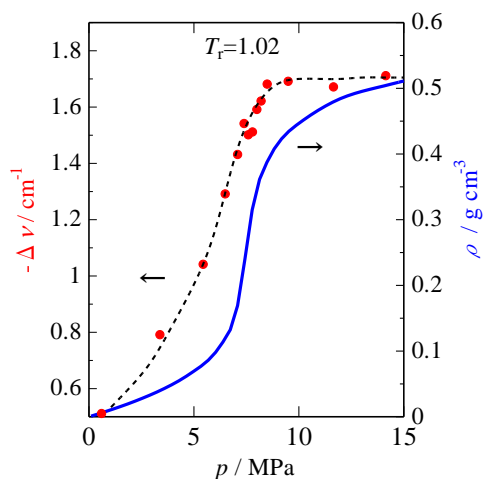


図 3. BZ 全対称骨格振動モードの波数シフト  $\Delta\nu$  と  $T_r = 1.02$  における EtOH 密度の圧力依存性

系が EtOH と水素結合を形成するならば、この振動の波数は低波数側にシフトすると期待される。図 3 に上記の BZ 振動モードの波数変化  $\Delta\nu$  と  $T_r = 1.02$  における EtOH 密度の圧力依存性を示した [1]。また  $\Delta\nu$  は多重反射セルを用いて測定した室温 300.64 K での BZ 蒸気のラマンスペクトルにおける波数を基準として求めた。

図 3 から、低密度領域の圧力増加に伴い、BZ の全対称骨格振動の波数  $\nu$  はエタノール密度の増加よりも急激に減少したことがわかる。これは BZ 分子周囲での局所的な EtOH 分子密度の増加によるものであると考えられる。また BZ バンドの  $\nu$  は EtOH/BZ 2 成分系の  $p = 0.62$  MPa での結果と室温での BZ 蒸気の測定の結果の間で  $0.5 \text{ cm}^{-1}$  の差が生じた。これを考慮すると、低密度領域において BZ は EtOH 分子の存在により完全に free な状態では存在しないことが考えられる。

計算によって得られたクラスター形成による安定化エネルギー  $\Delta E$  と BZ の全対称骨格モードの振動シフト  $\Delta\nu$  を表 1 に、各クラスターの最適化構造を図 4 に示した。EtOH の OH 基が BZ の  $\pi$  電子系に向かうように水素結合を形成すると、BZ の振動数は減少した。このことから低圧領域での  $\nu$  の急激な減少 (図 3) は、低密度領域においてクラスター形成により局所密度が増加することを示唆し、 $0.62$  MPa の実験で観測された BZ バンドの free な状態からの  $0.5 \text{ cm}^{-1}$  の差は、低密度な状態においても BZ 分子が周囲の EtOH 分子による影響を受けていることを示唆している。また表 1(c) は、実験から観測された高密度領域における  $\Delta\nu$  ( $1.7 \text{ cm}^{-1}$ ) は 3 量体を形成した時の  $\Delta\nu$  よりも小さいことを示している。このことから高密度領域においても、BZ と EtOH 間で多数の分子から成るクラスターが定常的には形成されていないことが考えられる。

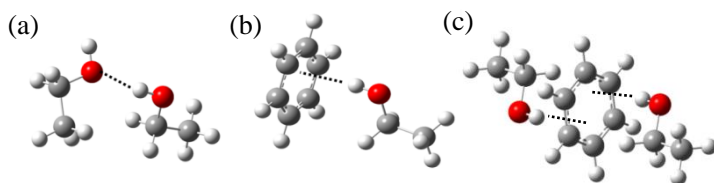


図 4. クラスターの最適化構造 (a) EtOH 2 量体, (b) BZ/EtOH 2 量体, (c) BZ/EtOH<sub>2</sub> 3 量体 (MP2/6-311++G(d,p))

表 1. 各クラスターの安定化エネルギー  $\Delta E$  と振動シフト  $\Delta\nu$

	$\Delta E / \text{kJ mol}^{-1}$	$\Delta\nu / \text{cm}^{-1}$
(a)	-22	
(b)	-15	-0.55
(c)	-47	-2.14

$$\Delta E = E(\text{cluster}) - E(\text{free EtOH}) - E(\text{free BZ})$$

$$\Delta\nu = \nu(\text{cluster}) - \nu(\text{free BZ})$$

[1]N. B. Vargaftik, *Tables on the thermophysical properties of liquids and gases*; John Wiley, New York (1975).



## 時間分解熱力学で見る蛋白質反応と構造揺らぎ

(京大院理<sup>1</sup>、大阪府立大院理<sup>2</sup>) 中曽根祐介<sup>1</sup>、直原一徳<sup>2</sup>、徳富哲<sup>2</sup>、寺嶋正秀<sup>1</sup>

## Time-resolved study of structural fluctuation in protein reactions

(Kyoto Univ.<sup>1</sup>, Osaka Prefecture Univ.<sup>2</sup>) Yusuke Nakasone<sup>1</sup>, Kazunori Zikihara<sup>2</sup>, SatoruTokutomi<sup>2</sup>, Masahide Terazima<sup>1</sup>

【序】現在、X線結晶解析やNMR測定により数多くの蛋白質構造が高い空間分解能で報告されている。構造情報を基に活性部位の特定や信号伝達経路が議論され、構造生物学が現在の生命科学を大幅に発展させたことは疑う余地がない。しかし、これら手法により報告される構造は時間平均された静的な構造である一方、実際の蛋白質分子は生体内や溶液中で熱的に絶えず揺らいでおり、この揺らぎが蛋白質機能に与える効果を忘れてはならない。例えば信号の入出力は揺らぎの為に確率的であるだろうし、揺らぎの変化自体が信号伝達を達成することがあるかもしれない。我々はこうした揺らぎの実測をテーマに研究に取り組んでいる。揺らぎは蛋白質の柔らかさと溶媒との相互作用に依存するため、両面からのアプローチが必要である。2P-084は蛋白質の柔らかさを実測しており、本研究は溶媒との相互作用を含めた全体像に関する研究である。

本研究で取り扱う phototropin は植物の光屈性を制御する青色光センサー蛋白質である。光受容を担う二つの LOV ドメインと活性化を示す kinase ドメイン、さらに LOV2 と kinase を結ぶ linker ドメインから構成される (図 1(a))。これまで我々は過渡回折格子法を用いて LOV2-linker 試料の反応検出を行い、機能に重要な反応を捉えることに成功してきた (図 2: linker に存在するヘリックスの解離・崩壊反応が光誘起される)<sup>1</sup>。しかし、LOV ドメイン自体の構造変化は発色団周りに限られており、何故 linker ヘリックスが解離するのかという点は不明瞭であった。MD シミュレーションを用いた先行研究によると、明状態で LOV2 内部の H $\beta$ -I $\beta$  ループの揺らぎが増大すると報告されている (図 2(b))<sup>2</sup>。興味深いことに、このループは linker ヘリックスと隣接しているため、この揺らぎの増大により linker ヘリックスの解離が引き起こされるのではないかと予想される。これを実験的に検証するため、揺らぎの時間変化を熱力学観点から捉える事を試みた。

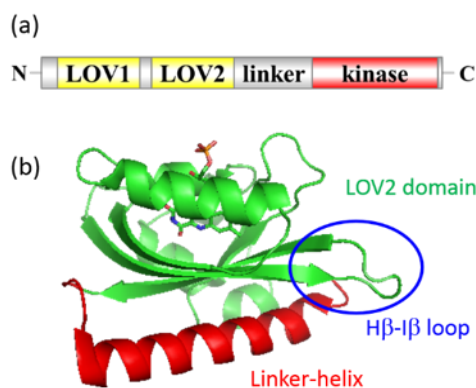


図1 (a) phototropinの一次構造  
(b) LOV2-linkerの結晶構造

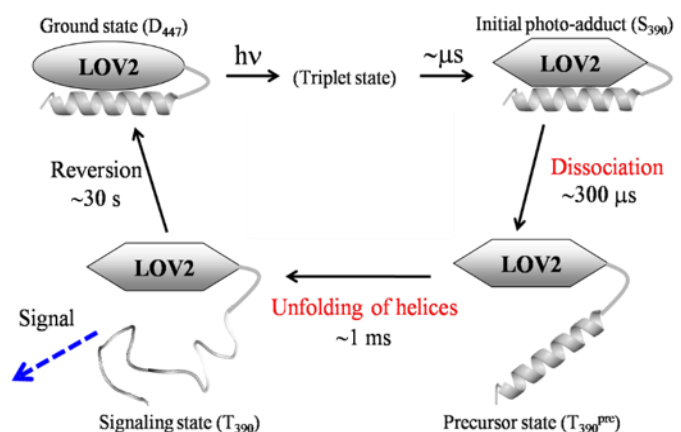


図2 LOV2-linkerの光反応

【実験】 熱力学量は様々な揺らぎを反映する有用な物理量である。アインシュタインの揺らぎの公式を出発点とし、いくつかの熱力学的公式を適用すると右

$$\begin{aligned} \langle (V - \langle V \rangle)^2 \rangle &= k_B T V \beta_T & \beta_T: \text{等温圧縮率} \\ \langle (S - \langle S \rangle)^2 \rangle &= k_B C_P & C_P: \text{定圧熱容量} \\ \langle (SV - \langle S \rangle \langle V \rangle) \rangle &= k_B T V \alpha_{th} & \alpha_{th}: \text{熱膨張係数} \end{aligned}$$

に示す3つの式が導かれる。これらの式が示すように圧縮率は体積揺らぎと関係づけられ、熱容量はエントロピーの揺らぎを表す。また熱膨張係数は体積揺らぎとエントロピー揺らぎの掛け合わせで表され、構造揺らぎの指標となる物理量である。したがってこうした熱力学量を反応中間体に対して測定することが出来れば、反応に伴う揺らぎの変化を捉えることにつながり、反応の駆動力や中間体の性質をより詳しく議論することが可能になる。我々はこれら熱力学量の変化を実時間で捉えるための手法として、過渡回折格子法と過渡レンズ法を併用した。

【結果】 各反応に伴うエンタルピー変化および体積変化の温度依存性を調べることにより、熱容量や熱膨張係数の変化を時間分解検出した(図3)。エントロピーの揺らぎは反応が進むにつれて増大する様子が観測されたが、これは初期反応(発色団の反応)およびヘリックスの構造変化によって内部に埋もれていた疎水性残基が露出したことを示している。表面に疎水性残基が露出すると疎水の水和が起こり、バルク水より弱い水素結合を形成し揺らぎが大きくなるためである。一方、構造揺らぎは初期過程において大きく増大し、最終過程においてはエントロピー揺らぎの増大から予想されるよりも小さい変化を示した。この初期過程における構造揺らぎの増大はシミュレーションによる先行研究を支持する結果であり、おそらくループ領域の揺らぎを捉えているのだろう。そしてこの揺らぎの増大が後に続く反応の駆動力となっていると考えられる。最終過程において構造揺らぎの変化が抑えられたことは、エントロピー揺らぎの増大を相殺するような負の体積揺らぎ変化が起こったことを示唆している。

さらに我々は熱量計を用いて定常状態における熱容量や熱膨張係数の測定を行った。その結果、絶対値に対してわずか5~10%程度の揺らぎの増大が光反応中に起こることがわかった。このような微小な揺らぎ変化を時間分解で検出し、反応の駆動力として評価したのは世界で初めてである。本討論会では以上の結果を基に揺らぎと機能のつながりを議論する。

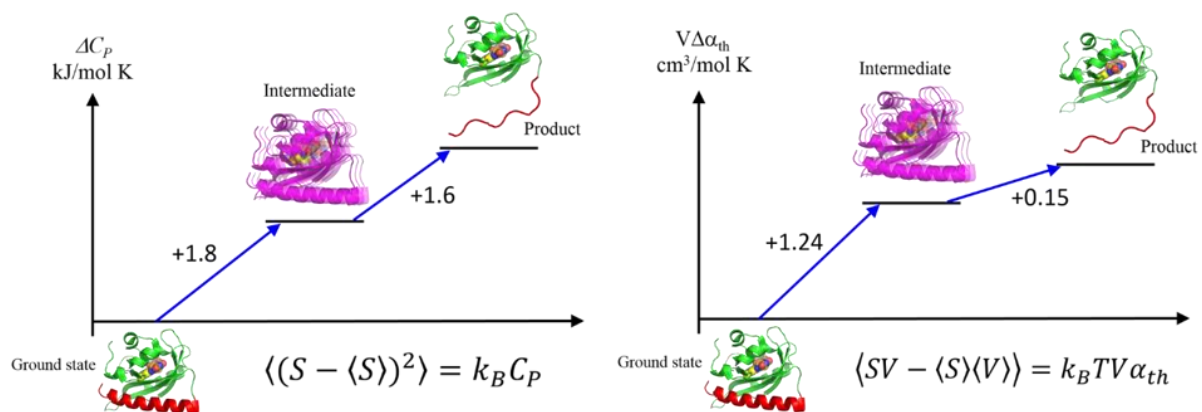


図3 LOV2-linkerの光反応に伴う(a)エントロピー揺らぎ、(b)構造揺らぎの変化

【参考文献】

[1] Nakasone et al. *J Mol Biol.* (2007) 367:432-42.  
 [2] Freddolino PL et al. *Biophys J.* (2006) 91:3630-9.

2P084

## フォトリロピン LOV2 ドメインの光反応短寿命中間体の揺らぎ

(京大院理<sup>1</sup>、マリンガ大<sup>2</sup>、大阪府立大院<sup>3</sup>) 黒井邦巧<sup>1</sup>・佐藤フランシエーレ<sup>2</sup>・中曾根祐介<sup>1</sup>・直原一徳<sup>3</sup>・徳富哲<sup>3</sup>・寺嶋正秀<sup>1</sup>

### Fluctuation of short-lived intermediates during the photoreaction of the LOV2 domain of photoropin

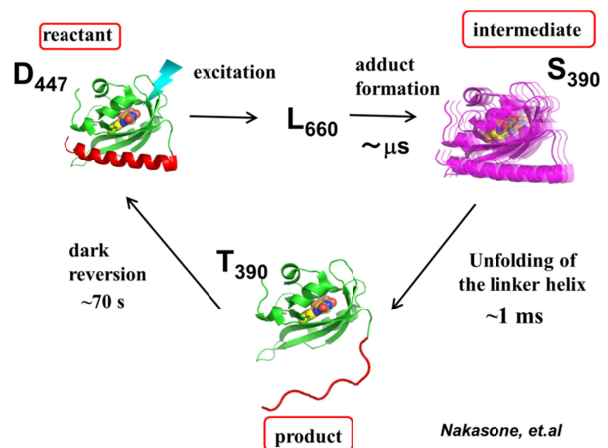
(Kyoto Univ.<sup>1</sup>, Univ. of Maringa<sup>2</sup>, Osaka Prefecture Univ.<sup>3</sup>) ○Kunisato Kuroi<sup>1</sup>, Francielle Sato<sup>2</sup>,

Yusuke Nakasone<sup>1</sup>, Kazunori Zikihara<sup>3</sup>, Satoru Tokutomi<sup>3</sup>, Masahide Terazima<sup>1</sup>

【序】タンパク質分子は一般に不完全なパッキングにより生じる多くのキャビティーを持つため、その構造は自由度の高い柔らかな構造と言えるだろう。このような構造の柔らかさはタンパク質に自発的な揺らぎを与え、タンパク質機能と密接な関係があると指摘されている。このようなタンパク質分子の柔らかさの実測は困難を伴うが、圧力摂動に対する応答を捉えることでその検出が可能である。実際に音速分散測定や高圧 NMR などによってこうした揺らぎの研究がなされているが、これらの研究は定常状態の測定に限られており、生体反応における短寿命中間体に対しては適用が不可能であった。そこで我々は高い時間分解能で揺らぎを捉えるべく、過渡回折格子法 (Transient Grating; 以下 TG 法) および過渡レンズ法 (Transient Lens; 以下 TrL 法) による測定を高圧条件下で行った。これらの手法 (TG 法、TrL 法) はタンパク質反応に伴う溶液の屈折率変化を検出するため、反応過程における体積変化量を算出することが可能である。さらにその圧力依存性から中間体の等温圧縮率変化を求めることができるが、この等温圧縮率は『体積揺らぎ』と直接結びつくパラメーターであるため、中間体におけるタンパク質分子の柔らかさを定量的に評価することが可能である。

本研究では植物由来の青色光センサータンパク質であるフォトリロピンの LOV2-J $\alpha$  ドメインの光反応に伴う圧縮率の変化を検出した。LOV2-J $\alpha$  ドメインは LOV2 ドメインと J $\alpha$  と呼ばれる C 末端ヘリックスから成り、図 1 のような光反応を起こすことが知られている。すなわち光励起後トリプレット L<sub>660</sub> を形成し、続いて発色団と LOV ドメイン内部のシステイン残基が共有結合を形成して S<sub>390</sub> 状態となり、最終的に J $\alpha$  がアンフォールディングを起こしてシグナリング状態 T<sub>390</sub> となる[1,2]。今回これら各中間体が持つ圧縮率を検出することに成功し、基底状態よりも大きく揺らいでいることが示唆されたので本討論会で報告する。

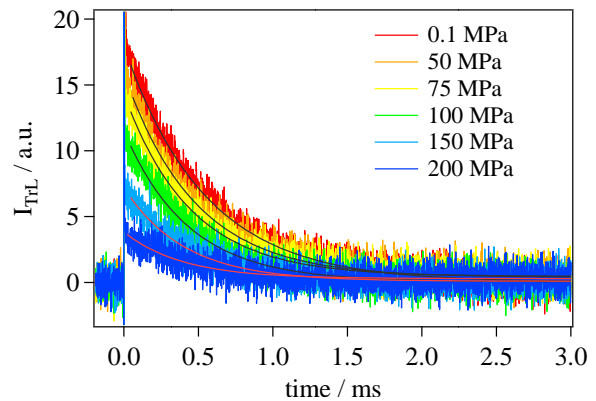
【実験】フォトリロピン試料溶液をシリコンチューブが付いたインナーセルに封入して高圧光学セル[3]内で TG 信号および TrL 信号を測定した。測定圧力範囲は 0.1 MPa から 200 MPa であり、



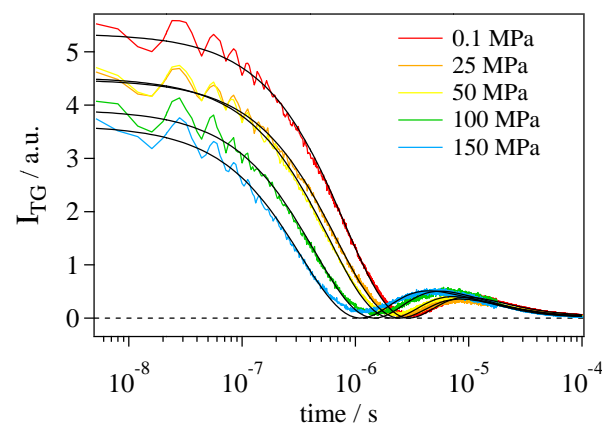
て緑で  
で示し

この圧力下ではタンパク質の変性が起こらないことを確認した。TG 信号の測定には励起パルス光に波長 460 nm の色素レーザーを用い、連続プローブ光として波長 840 nm のダイオードレーザーを用いた。TrL 信号の測定には連続プローブ光として波長 633 nm の He-Ne レーザーを用い、体積変化量の算出は同一条件下で測定した熱参照試料の信号強度との比較により行った。

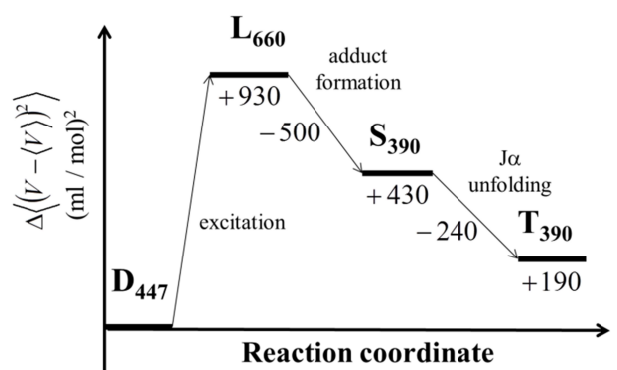
【結果と考察】図 2 に圧力を 0.1 MPa から 200 MPa まで変えて測定した TrL 信号を示す。この減衰曲線は約 1 ms の時定数で起こる J $\alpha$ ヘリックスのアンフォールディングに伴う体積変化に起因し、その信号強度は体積変化量に比例する。したがってその圧力依存性を解析することにより、圧縮率（体積揺らぎ）の変化を求めることができる。その結果、ヘリックス崩壊過程における体積揺らぎの変化は  $-240 \text{ (ml/mol)}^2$  であると求められた。さらに遅い時間スケールの信号強度に対して同様の解析を行った結果、T<sub>390</sub> 状態（シグナリング状態）と基底状態の体積揺らぎの差が求められ、 $+190 \text{ (ml/mol)}^2$  であった。すなわち T<sub>390</sub> 状態は基底状態よりも大きく揺らいでいることが分かった。



次に図 3 に 0.1 MPa から 150 MPa までの圧力範囲で測定した TG 信号を示す。この信号は LOV ドメインと発色団の間の共有結合形成過程を捉えており、信号の圧力依存性から L<sub>660</sub> 状態から S<sub>390</sub> 状態に移る過程において体積揺らぎが  $-500 \text{ (ml/mol)}^2$  という大きな変化を起こすことが分かった。



以上の結果から図 4 のように各中間体における体積揺らぎを基底状態からの差として得ることができた。初期過程において大きく増幅し、その後徐々に減少する様子が観測されたが、これは分子内のキャビティー量の変化や、溶媒分子との水和状態が反応に伴い変化した結果であると考えられる。X 線結晶解析では LOV ドメイン自身は光励起で大きな構造変化を起こさないことが知られているが、今回の結果から平均構造が変わらなくとも励起状態においてより柔らかな構造となっていることが示唆され、それがフォトトロピンの大きな構造変化を引き起こすトリガーになっているのではないかと推測される。



【参考文献】

[1]Harper et al. *Science*. (2003) 301:1541-4.  
 [2]Nakasone et al. *J Mol Biol*. (2007) 367:432-42  
 [3]Hoshihara et al. *Rev Sci Instrum*. (2008) 79

## Structural Dynamics of Hairpin RNA Measured by 2D Fluorescence Lifetime Correlation Spectroscopy

(Molecular Spectroscopy Laboratory, RIKEN)

○Chao-Han Cheng, Kunihiko Ishii, Tahei Tahara

### Introduction

RNA folding kinetics has attracted much interest because it provides information about the complex energy landscape on which multiple misfolding structures appear in competition with the most stable native structure. However, the study of structural dynamics of RNA is still difficult, especially for the secondary structure formation. In this work, we investigated a FRET-labeled hairpin RNA and compared it with the DNA analogue to understand the formation dynamics of a hairpin structure of RNA. Furthermore, we applied the 2D fluorescence lifetime correlation spectroscopy (2D FLCS)<sup>1-3</sup> to clarify the origins of this difference and tried to observe specific lifetime components and their interconversion.

### Experiment

The hairpin RNA that we used is a single-stranded RNA labeled with 6-FAM and TAMRA (6-FAM-5'-UUUAACC(U)<sub>18</sub>GGUU-3'-TAMRA). The DNA analogue has the same labeled dye molecules and bases as RNA but uracil is replaced by thymine. They were prepared in buffer solutions (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, BSA 0.01 %, pH 8.0) with various concentration of NaCl. 2D FLCS was measured by a home-built system.<sup>1-3</sup> Each photon was collected with absolute arrival time determined from the start of experiment ( $T$ ) and the relative arrival time determined from the excitation laser pulse ( $t$ ). The 2D emission-delay correlation map  $M(\Delta T; t', t'')$  was generated at a characteristic time interval  $\Delta T$  between two photons emitted at  $t'$  and  $t''$ . The maximum entropy method (MEM) was utilized to convert 2D emission-delay correlation maps to 2D lifetime correlation maps so as to obtain the correlation of isolated species.

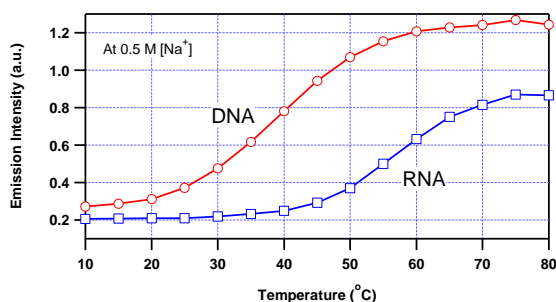


Fig. 1. Melting profiles of RNA and DNA. The emission intensity at 520 nm is plotted against temperature.

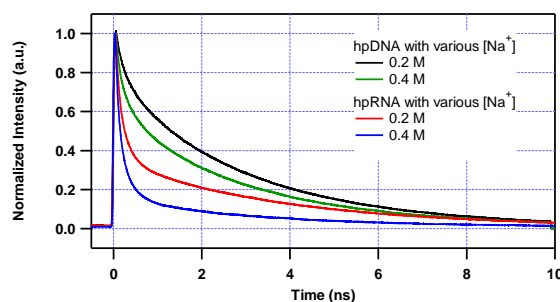


Fig. 2. Fluorescence lifetimes of RNA and DNA at various  $[\text{Na}^+]$ .



## Results and Discussion

Fig. 1 shows the melting profiles described by the emission intensity at 520 nm for RNA and DNA at 0.5 M  $[\text{Na}^+]$  plotted against temperature, reflecting the quenched fluorescence of donor due to FRET. The curves present the difference melting temperature of RNA and DNA. For RNA, it is 15 °C higher than DNA even with same  $[\text{Na}^+]$ , suggesting that there is a substantial difference in their structural change. The difference also emerged in lifetime measurements shown in Fig. 2, where the lifetime of RNA is much shorter than DNA at same  $[\text{Na}^+]$ , indicative of the different response to  $\text{Na}^+$  between them.

Fig. 3(a) shows the lifetime distribution of RNA with 0.4 M  $[\text{Na}^+]$ . Three isolated species (**S1**, **S2**, and **S3**) were observed. They correspond to the diagonal peaks in 2D lifetime correlation maps at  $\Delta T=20\text{-}30\ \mu\text{s}$  shown in Fig. 3(b). Because **S3** was also observed in donor-labeled RNA, it is assigned to acceptor-missing RNA. **S1** shows short-lifetime components and is assigned to the folded (F) form; moreover, the fast reaction among its components is observed, which suggests the formation and dissociation of the stem of RNA. **S2** is assigned to the unfolded (U) form. This is because the lifetimes of components are strongly affected by  $\text{Na}^+$ , implying a flexible structure such as a random coil. In the range of measurable delay time, the off-diagonal peaks between **S1** and **S2** were not observed, indicating that the transition time between U and F forms of RNA is longer than ms, possibly due to the rigid backbone which restricts the structural change.<sup>4</sup> DNA, by contrast, shows a shorter transition time around 100  $\mu\text{s}$  between U and F forms.<sup>3</sup>

In summary, the investigation of hairpin RNA shows the response to  $\text{Na}^+$  for the dynamics of RNA is different from DNA. Furthermore, the results of 2D FLCS show that the transition time between F and U forms for RNA is much longer than DNA, contributed from the difference in geometry.

## Reference

1. K. Ishii and T. Tahara *J. Phys. Chem. B* **2010**, 114, 12383.
2. K. Ishii and T. Tahara *Chem. Phys. Lett* **2012**, 519-20, 130.
3. K. Ishii and T. Tahara *Annual Meeting of Japan Society for Molecular Science* **2011**; K. Ishii and T. Tahara, submitted for publication.
4. H. Chen, S. Meisburger, S. Pabit, J. Sutton, W. Webb, and L. Pollack *PNAS* **2012**, 109, 799.

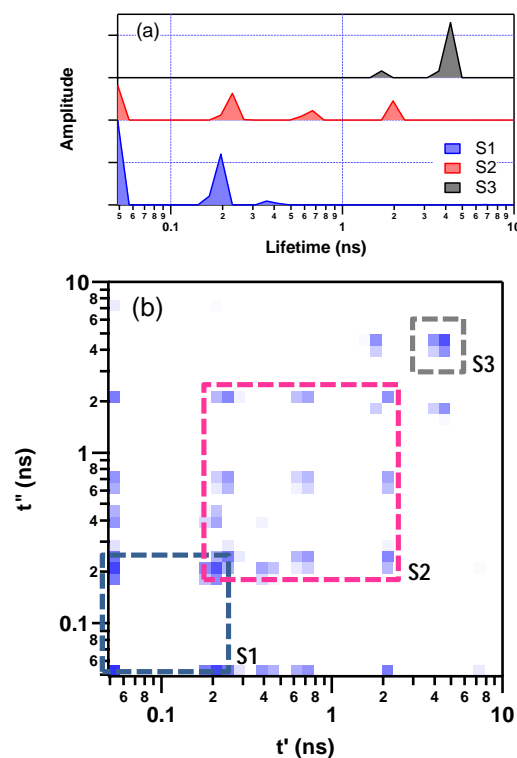


Fig. 3. 2D FLCS measurement of RNA with 0.4 M  $[\text{Na}^+]$ . The fluorescence lifetime distributions (a) and 2D lifetime correlation map (b) were evaluated at  $\Delta T=20\text{-}30\ \mu\text{s}$ . Dashed squares corresponded to the isolated species **S1**, **S2**, and **S3**.

2P086

**Excitation energy transfer of *Arthrospira platensis* cells grown in seawater medium  
probed by time-resolved fluorescence spectroscopy**

(Graduate School of Science, Kobe Univ.<sup>1</sup>, Graduate School of Engineering, Kobe Univ.<sup>2</sup>,  
JST CREST<sup>3</sup>, Molecular Photoscience Research Center, Kobe Univ.<sup>4</sup>)

○Muhammad Arba<sup>1</sup>, Shimpei Aikawa<sup>2,3</sup>, Kenta Niki<sup>1</sup>, Makio Yokono<sup>3,4</sup>,

Akihiko Kondo<sup>2,3</sup>, Seiji Akimoto<sup>1,3,4</sup>

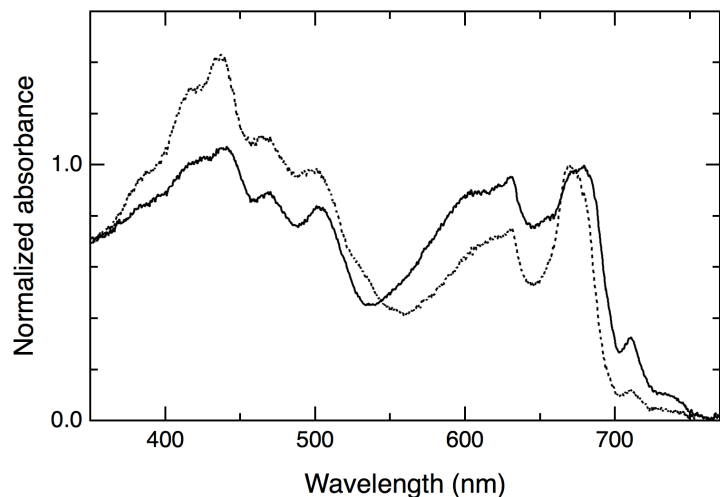
[Introduction] Large-scale cultivation of *Arthrospira (Spirulina) platensis* is now intensively researched worldwide due to its high potentials in pharmaceuticals, cosmetics, energy, and nutritious food source. Cultivation of *A. platensis* in seawater has been regarded as an attractive option, owing to the low cost of seawater and the limited freshwater available for large-scale farming. The excitation energy transfer between pigments in photosynthetic machinery largely governs the growth of oxygen-evolving organisms. However, changes in environmental conditions such as cultivation medium may induce changes in excitation energy transfer within the photosynthetic system, resulting in abnormal pigment production. In the present work, in vivo excitation energy transfer processes in *A. platensis* cells grown in both f/2 medium and SOT medium as a control were studied. The SOT medium is well known as one of the optimal media for *A. platensis*, while the use of f/2 medium was intended to imitate seawater.

[Experiment] The cyanobacterium *Arthrospira platensis* NIES-39 were grown under a fluorescent lamp of light intensity  $50 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  for 7-8 days in SOT medium or modified f/2 medium at 303 K ( $\sim 30^\circ \text{C}$ ) with agitation at 100 rpm. Steady-state absorption and fluorescence spectra were measured with a spectrometer (JASCO V-650/ISV-722) and a

spectrofluorometer (JASCO FP-6600/PMU-183), respectively, at low temperature (77 K). Time-resolved fluorescence spectra were measured by a time-correlated single-photon counting system at 77 K, with excitation wavelength 400 nm. Fluorescence rise and decay curves were analyzed by global analysis to obtain fluorescence decay-associated spectra (FDAS). Photosynthetic oxygen evolution and dark respiration were determined with a Clark-type oxygen electrode controlled by a computerized oxygen monitoring system.

[Results and Discussion] Growth in f/2 medium induced changes in absorption and fluorescence spectra as well as in the energy transfer pathways. Relative amount of Photosystem (PS) I red chlorophylls and phycobilisome (PBS) markedly decreased (Fig. 1),

fraction of PBS not incorporated into energy transfer processes increased, and energy transfer between PC and APC was slowed in the f/2 medium. The energy transfer from PSII to PSI is highly inhibited in the f/2 medium, which might be result from the modification of proteins



**Fig. 1** Absorption spectra of *A. platensis* cells grown in SOT medium (solid line) and f/2 medium (dotted line).

under salt stress. The PBS-to-PSI in parallel to PBS-to-PSII energy transfer pathways were observed in the two medium, however excitation energy captured by PBS was transferred directly to PS I in f/2 medium, instead of being first transferred to an intermediate (PBS→PSII→PSI), as observed in SOT medium. It was also found in f/2 medium that respiration rate increased, photosynthetic rate reduced, and the delayed fluorescence (DF) lifetime was a half from that in SOT medium, which is probably result from inhibition of electron transfer in PSII and/or the decrease in antenna efficiency.

## 2P087 芳香族炭化水素受容体と外来性及び内在性リガンド間の特異的相互作用： 分子シミュレーション及び生化学実験の比較

(豊橋技術科学大学大学院<sup>1</sup>、理化学研究所計算科学機構<sup>2</sup>、東芝研究開発センター<sup>3</sup>)

○宮城慧<sup>1</sup>、村田享士郎<sup>1</sup>、佐篠和哉<sup>1</sup>、澤村聡視<sup>1</sup>、伊藤聡<sup>2</sup>、石原-菅野美津子<sup>3</sup>、栗田典之<sup>1,\*</sup>

### Ab initio molecular simulations and biochemical assay on specific interactions between aryl hydrocarbon receptor and exogenous/endogenous ligands

(Toyohashi University of Technology<sup>1</sup>, AICS RIKEN<sup>2</sup>, R&D Center Toshiba Corporation<sup>3</sup>)

○Satoshi Miyagi<sup>1</sup>, Kyoshiro Murata<sup>1</sup>, Kazuya Sashino<sup>1</sup>, Satoshi Sawamura<sup>1</sup>, Satoshi Itoh<sup>2</sup>,  
Mitsuko Ishihara-Sugano<sup>3</sup> and Noriyuki Kurita<sup>1,\*</sup>

#### 【はじめに】

芳香族炭化水素受容体 (AhR: Aryl hydrocarbon receptor)は、外来異物が生体内に取り込まれた際に、それらを特異的に結合し、高い親和性で認識し、その情報を核に伝え、代謝酵素の発現を誘導するタンパク質である。さらに、近年の細胞実験[1-2]により、AhR が細胞分化にも重要な役割を担っていることが明らかになった。例えば、ナイーブ T 細胞が Th17 細胞と制御性 T 細胞へ分化をする際、AhR による転写調節が関わっていることが報告された[1]。その結果、AhR が自己免疫疾患やアレルギーといった細胞内外の環境によって調節される免疫系の制御機構にも関与することが初めて示された。ナイーブ T 細胞の分化の方向性は、2 種類の AhR リガンドによって変化する[2]。その 1 つは外来性リガンド TCDD (2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin)であり、もう一方は内在性リガンド FICZ (6-formylindolo [3,2-b]carbazole) である。現状では、AhR に結合するリガンドの違いにより、AhR がどのように T 細胞の分化を分岐させるかは、原子レベルでは未解明である。また、AhR とリガンド間の相互作用解析の際に必須である AhR の立体構造も未解明である。

我々は、これまでに、マウス AhR の LBD (Ligand binding domain)の構造、及び LBD に TCDD が結合した複合体の水中での安定構造を、分子モデリングと古典分子力学(MM)法を用いて求めた[3]。また、Motto ら[4]は、分子モデリングを用い、ラット AhR の LBD に様々なダイオキシン類を結合した複合体の構造を水中で最適化し、細胞実験の結果を説明できる構造を得ている。しかし、外来性及び内在性リガンドと AhR 間の特異的相互作用の違いは、原子・電子レベルでは明らかになっていない。本研究では、AhR と外来性リガンド(TCDD、 $\beta$ -NF)、及び AhR と内在性リガンド(FICZ、ITE)の複合体の水中での安定構造を、分子モデリングと MM 法によって作成し、リガンドの違いによる特異的相互作用の変化をフラグメント分子軌道(FMO)計算により解析した。更に、その結果を細胞実験の結果と比較し、リガンドの違いによる特異的相互作用の変化を解析した。

#### 【計算手法】

本研究では、リガンドとして外来性の TCDD、 $\beta$ -NF と内在性の FICZ、ITE を採用し、ラット AhR の LBD とリガンドの複合体の水中での安定構造を決定し、AhR とリガンド間の特異的結合が、外来性、内在性でどのように異なるかを解析した。まず、AhR の LBD の立体構造を、タンパク質構造予測プログラム MODELLER、及び鋳型構造を用い作成した。次に、タンパク質リガンドドッキングプログラム Autodock を用い、AhR の様々な位置にリガンドをドッキングし、複合体の候補構造を多数作成し、幾つかの代表構造を、MM 計算プログラム AMBER9 を用い、水中で最適化した。最後に、各最適化構造のエネルギーを FMO 法[5]の MP2/6-31G 計算により求め、最安

定な複合体の構造を決定した。更に、FMO 計算の結果から、AhR の各アミノ酸残基とリガンド間の相互作用エネルギーを解析し、AhR とリガンド間の結合に重要なアミノ酸を特定し、リガンド種類による特異的結合特性の変化を解析し、細胞実験の結果と比較した。

また、AhR とリガンド間の相互作用には、van der Waals 相互作用が重要であると考えられるため、従来の MM 法による構造最適化では不十分な可能性がある。そこで、FMO 法の MP2/6-31G 計算を用いた部分構造最適化により、複合体のリガンド、及びその周囲のアミノ酸残基の構造を、電子相関を考慮し高精度に最適化した。

### 【結果と考察】

AMBER9 を用いて水中で最適化した複合体の最安定構造を Figure 1 に示す。4 種類のリガンドは全て同じ向きで AhR に結合するが、リガンドの大きさが異なるため、 $\beta$ -NF は AhR 上部の  $\alpha$ -helix に偏り、ITE と FICZ はポケットの上下に渡って広く結合する。これらの複合体に対する AhR の各アミノ酸とリガンド間の相互作用エネルギー(IE)を Table 1 に示す。内在性リガンドである FICZ と ITE は、外来性リガンドに比べて、AhR に強く相互作用する。また、全てのリガンドが AhR の Gln381 と強く引力相互作用し、更に、フェニルアラニンやチロシンなど、芳香環を持つアミノ酸と相互作用していることがわかる。計算結果の詳細、及び細胞実験との比較は、当日のポスターにて発表する。

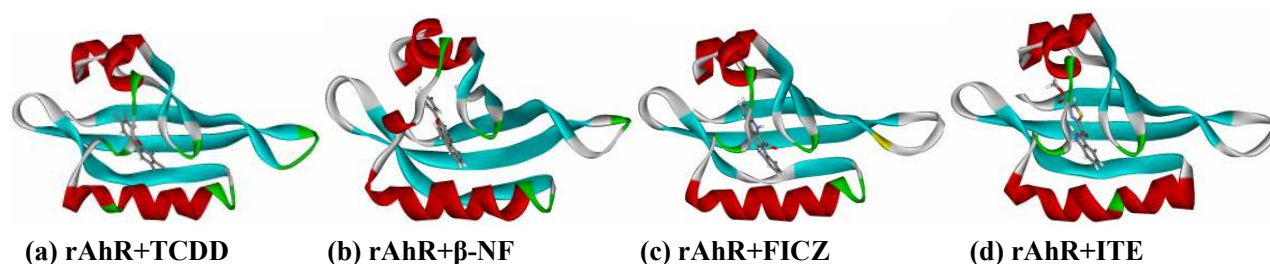


Figure 1 Structures of the rAhR+ligand complexes optimized in water by AMBER9-MM

Table 1 Interaction energies (I.E.) (kcal/mol) between ligand and each amino acid residue of rAhR

TCDD		$\beta$ -NF		FICZ		ITE	
Residues	I.E.	Residues	I.E.	Residues	I.E.	Residues	I.E.
Gln 381	-5.9	Ala 332	-6.6	Gln 381	-23.2	Tyr 320	-20.1
Tyr 320	-4.2	Gln 381	-6.2	Phe 293	-7.2	Gln 381	-8.9
Phe 293	-3.5	Phe 322	-5.6	Hid 289	-4.0	Phe 293	-5.4
Phe 349	-2.9	Gly 319	-4.5	Cys 331	-3.7	Ala 332	-4.7
Cys 331	-2.6	Hip 324	-3.9	Thr 294	-3.2	Phe 285	-4.3
Met 346	-2.5	Phe 293	-3.4	Ala 332	-3.1	Phe 349	-3.1
Gly 319	-2.2	Hid 289	-3.3	The 287	-2.3	Ser 363	-2.8
Hip 335	-2.0	Met 346	-3.1	Leu 351	-2.2	Cys 331	-2.6
Hid 289	-1.9	Ile 323	-2.9	Phe 322	-2.1	Hip 324	-2.4
Leu 351	-1.1	Thr 287	-2.8	Phe 349	-2.0	Hip 330	-2.1

[1] F. J. Quintana, *et al.*, *Nature*, 2008, 453, 65. [2] M. Veldhoen, *et al.*, *Nature*, 2008, 453, 106.

[3] S. Miyagi, *et al.*, *Int. J. Quantum Chem.*, 2012, 112, 289.

[4] I. Motto, *et al.*, *J.Chem.Inf.Model*, 2011, 51, 2868. [5] K. Kitaura, *et al.*, *Chem.Phys.Lett.*, 2001,336,163.



## 2P089

### 酵素活性における基質歪みの効果：ODCaseの酵素反応を例として

産業技術総合研究所 ナノシステム研究部門 ○石田豊和

京都大学 大学院理学研究科 化学教室 藤橋雅宏

Effects of Substrate Strain on Enzymatic Activity: Case Study of ODCase Catalysis  
*Nanosystem Research Institute (NRI), National Institute of Advanced Industrial Science and  
Technology (AIST)*, ○ Toyokazu Ishida

*Department of Chemistry, Graduate School of Science, Kyoto University, Masahiro Fujihashi*

#### はじめに

最近の理論/計算化学研究において、酵素反応のQM/MM（及びその類似）計算が数多く報告されるようになってきている。これら多くの計算研究を見ると、「反応遷移状態を安定化する構造論的要因」を議論する内容が殆どである。これは酵素反応における触媒要因としては「反応遷移状態における基質の相対的な安定化が鍵」という、L. Paulingの時代に遡る古くからの基本概念に由来していると言える。実際ここ数年の計算化学研究を眺める限り、「タンパク質の極性環境が静電相互作用を介し、反応遷移状態を相対的に安定化する事が酵素活性の主要因」とする報告が多い。しかしこれとは異なるアイデアとして「反応の始原系（酵素基質複合体、ES錯体）を不安定化する事により、相対的に反応障壁を低下させうる」と言う作業仮説も存在する。後者においては、古くはPhillips機構に遡る「基質の立体構造歪み」が主要因と考えられるが、現在においても主たる実験手段である結晶構造解析において、高分解能で基質歪みを検証する事が（多くの場合）困難であるため、本作業仮説の検証は理論/計算化学研究において、非常に重要な検討課題として残された問題と言える。これまで我々は、後者の典型例と考えられる酵素、オロチジナーリン酸脱炭酸酵素（Orotidine 5'-mono-phosphate decarboxylase、以下 ODCase）を題材に選び、構造生物学と理論/計算化学を組み合わせ、高分解能な結晶構造を基にしたQM/MM計算による分子モデリング、分子動力学計算による自由エネルギー計算、そしてフラグメント分子軌道法を用いた酵素全系の相互作用エネルギー解析を組み合わせる事で、本酵素の触媒活性の分子論的な起源を検討してきた。

ODCaseは生物体内でピリミジン環を新規合成する過程で必須の酵素であり、オロチジナーリン酸（Orotidine 5'-mono-phosphate、以下 OMP）からカルボキシル基を引き抜いて、ウリジナーリン酸（Uridine 5'-mono-phosphate、以下 UMP）を生成する反応を触媒する。本酵素にはこれまで多数の実験研究が存在するが、特に興味を引く点は、酵素非存在下の水溶液中での化学反応と比較して、その反応を $\sim 10^{17}$ ものオーダーで加速しようと言う事実である。常温下の化学反応において、これほどの反応活性を示す酵素はこれまで殆ど知られておらず、金属イオンや補酵素の副次的な作用がない中で、本酵素が示すタンパク質固有の反応場を理解する事は非常に興味深い。

#### 研究目的と計算手法

これまで我々は *Saccharomyces cerevisiae* 由来の構造データ、および *Methanobacterium thermoautotrophicum* 由来の構造データを用いて、反応の律速過程と考えられる脱炭酸過程に注目し、QM/MM 計算を基礎とした分子モデリングと反応解析を行ってきた。今回特に、Fujihashi らにより決定された一連の高分解能結晶構造を基にして、律速過程の反応プロファイルを再検討し、基質歪みをもたらすタンパク質場の影響を分子科学の視点で再考察した。計算/解析手順は以下の通りである：1) QM/MM 計算により反応経路を決定し、MD 計算を併用する事で自由エネルギー変化を評価し、実験結果と比較検討する事でモデリングの妥当性を確認、2) 次に反応経路上の代表点で、基質とタンパク質場との相互作用をフラグメント法ベースの全系量子計算から解析し、主要アミノ酸残基の触媒寄与を見積もる、3) そして反応経路上に沿って分子動力学計算を行う事で、反応に伴うタンパク質のダイナミクス変化を並行して解析し、基質歪みを及ぼす構造論的因子を解析・抽出する。QM/MM 計算などシミュレーションに必要なプログラムは、これまで独自に開発を行なって来たコードを利用しており、分子動力学計算におけるポテンシャル関数、および QM/MM 計算の MM 部分には AMBER(parm. 96) を採用している。

### 計算/解析結果

*Methanobacterium thermoautotrophicum* 由来の高分解能構造でモデリングした結果、酵素反応系と溶液系での活性化自由エネルギー差が実験結果を良く再現する事が確認されたので、以後は本構造モデルを基にした計算結果で議論する。今回特に「始原系における基質の構造歪み」が酵素活性に与える影響をより詳細に検討するため、QM/MM 計算による構造最適化から得られた基質構造を用いてエネルギー成分解析を実行する事で、基質の立体歪みが化学反応に及ぼす影響を定量的に解析した。計算機による仮想実験を行い、タンパク質の反応場が基質に与える立体場/静電場の影響を徐々に取り除く事で、脱炭酸過程の活性化エネルギーへ「基質歪み」が寄与する程度を解析した。この結果は、活性化障壁に相当するエネルギー量の約 2 割程度で、相対的に反応障壁を低下させる効果が認められ、「始原系の不安定化」が酵素活性に無視出来ない寄与を持つ事が明らかとなった。さらに、反応経路に沿ってフラグメント法レベルでアミノ酸残基単位の相互作用エネルギー解析を実行する事により、始原系 (ES 錯体)、遷移状態、反応中間体をそれぞれ安定化/不安定化する主要な構造要因をアミノ酸レベルで抽出した。始原系の安定化には主として Lys42, Asp75\* が、遷移状態のそれにおいては主として Asp70, Lys72 が主要な要因と確かめられた。過去の実験報告からも Asp70, Lys72 の重要性が示唆されているため、今回更にこれら同一ドメイン上に存在する 2 つのアミノ酸残基をアラニンに変異させた変異型酵素の分子モデルを作成し、同様の手順で自由エネルギー変化を解析する事で、酵素活性の低下を及ぼす分子論的な起源を詳細に検討した。これら結果の詳細は、当日にレポートする予定である。

### References

1. Fujihashi, et al. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 15048-15050., *J. Mol. Biol.* **2009**, *387*, 1199-1210., *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 9011-9016.
2. Fujihashi, Ishida, et al. *submitted*.

F<sub>1</sub>-ATPase の触媒活性機構の理論的解析及び新規触媒活性変異体の設計

(京大院・理) ○野口 志保、林 重彦

Theoretical studies on ATP hydrolysis in F<sub>1</sub>-ATPase and a rationally designed enzymatic reaction in its variants

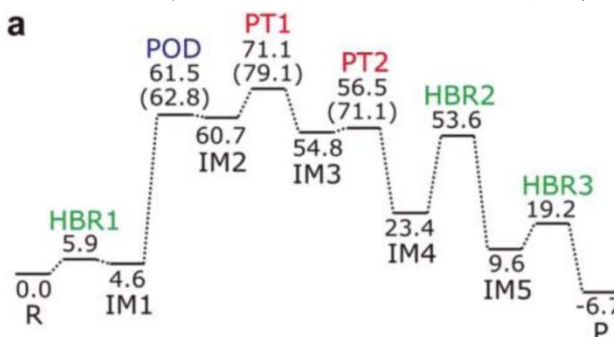
(Grad. Sch. Sci., Kyoto Univ.) ○Shiho Noguchi, Shigehiko Hayashi

## 【序】

F 型 ATPase はミトコンドリアで ATP 合成を行う酵素であり、その F<sub>1</sub> サブユニットである F<sub>1</sub>-ATPase は単独では ATP 加水分解反応を引き起こす。本研究では、F<sub>1</sub>-ATPase の触媒反応について、ハイブリッド QM/MM 法を用いて解析を行った。まず、ATP 加水分解の反応プロファイルについて QM/MM reweighting free energy SCF 法 (RWFE 法)<sup>[1]</sup> に基づき研究を行った。本手法では、化学反応過程におけるタンパク質の熱揺らぎの効果を効率的に取り入れることが可能である。これによって、活性におけるタンパク質の熱揺らぎの役割について議論する。次に、非天然反応である Kemp 脱離に対し触媒活性をもつ F<sub>1</sub>-ATPase の変異体のデザインを行った。Kemp 脱離反応の基質である 5-Nitrobenzisoxazole を ATP のアデニン環の代わりにリボースと結合させ、さらに ATP 結合サイトに変異を加えた。反応速度を上げる可能性のある変異体について、QM/MM 計算によって得られた反応プロファイルに基づき議論する。

## 【結果と考察】

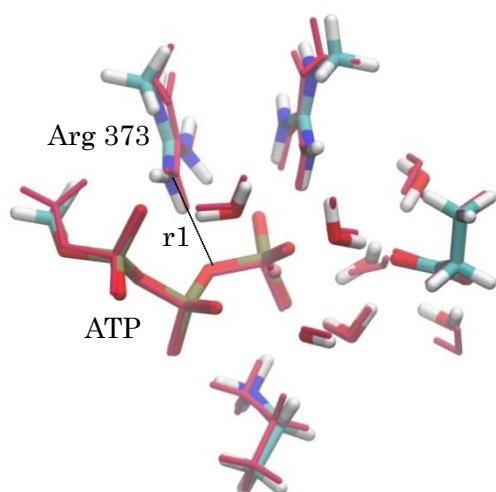
従来型の QM/MM 計算による ATP 加水分解反応プロファイルは、先行研究<sup>[2]</sup> によって明らかにされており (Fig. 1)、律速段階は ATP の P<sub>γ</sub>-O<sub>β</sub> 結合の開裂 (POD) 後のプロトン移動 (PT1) であることが示唆されている。そこで、今回 ATP 加水分解反応において、反応物 (R) と反応中間体 (IM2) について RWFE 法による解析を行った。その結果から、QM 領域の構造において、従来型の QM/MM 計算との比較を Fig. 2 に示した。反応物において、r1 は従来型の計算方法では 3.07 Å であるのに対し、RWFE 法では 3.02 Å と距離が短くなった。同様の傾向が IM2 でも観察されている。これらは、RWFE 法では、Arg373 の+電



**Fig. 1** Reaction profile determined by the QM/MM calculations. Energy diagram of the overall reaction path from Reactant (R) to product (P).<sup>[2]</sup>

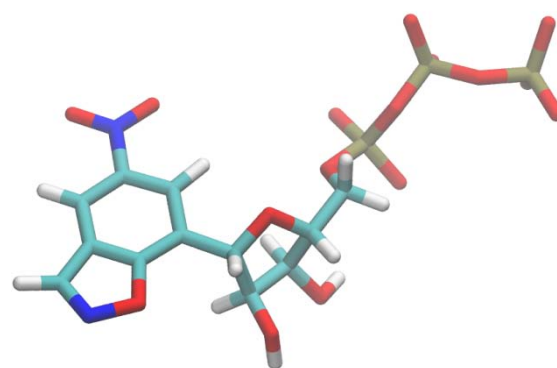
荷と ATP の  $O_{\gamma}$  の相互作用がより強くなったことを意味し、 $O_{\gamma}$  がより一電荷をもっている IM2 で安定化がより大きなものとなり、それに伴い POD のエネルギー障壁も減少すると考えられる。そして、IM2 は律速段階である PT1 のひとつ前の段階であり、PT1 と IM2 の構造は似通ったものであることから、反応の活性エネルギーも下がることが期待される。

また、Kemp 脱離に対し触媒活性をもつ  $F_1$ -ATPase の変異体のデザインについては、まず、上述した通り ATP のアデニン環の代わりに 5-Nitrobenzisoazole を結合させたもの (NTP) を作成し (Fig.3) 、 $F_1$ -ATPase の ATP 結合サイトに配置した。その NTP 結合サイトにある Thr を塩基としてはたらく Glu に変異させ、Glu が水を媒介して NTP のプロトンを引き抜き、Kemp 脱離を引き起こすモデルを考案した。現在、さらにエネルギー障壁を下げる変異について検討中である。詳細については当日発表する予定である。



**Fig. 2** reactant structure.

The optimized structure by RWFE method is depicted in a standard color code. The structure of the conventional QM/MM optimization drawn in pink is superimposed.



**Fig. 3** NTP

#### 【参考文献】

- [1] Kosugi, T.; Hayashi, S. *J. Chem. Theory. Comput.* 2012, **8**, 322-334.
- [2] Hayashi, S. *et al. J. Am. Chem. Soc.* 2012, **134**, 8447-8454.

2P091

## リボヌクレアーゼ HI の RNA 加水分解反応機構に関する計算化学的研究

(阪大蛋白研)

鷹野優<sup>1</sup>・喜多真琴<sup>1</sup>・中村春木<sup>1</sup>

Computational study of RNA hydrolysis of DNA/RNA hybrid by RNase HI

(Institute for Protein Research, Osaka University)

Yu Takano<sup>1</sup>, Makoto Kita<sup>1</sup>, Haruki Nakamura<sup>1</sup>

### 【序論】

リボヌクレアーゼ(RNase)HI は $Mg^{2+}$ の存在下でDNA/RNAハイブリッド二重鎖中のRNA主鎖のリン酸ジエステル結合(P-O3'結合)を分解する酵素である。その性質からセントラルドグマ（複製・転写・翻訳）におけるさまざまな生化学反応（RNAプライマーの生成や分解除去、転写過程で生じるR-loopの分解除去、DNA複製時に誤って取り込まれたRNAの除去など）に深く関与している [1]。近年*Bacillus halodurans* (枯草菌) やヒト由来のRNase HI-DNA/RNAハイブリッド二重鎖複合体の高解像度結晶構造が決定され [2]、その構造を用いて種々の計算科学研究が行われてきた。しかし活性中心における $Mg^{2+}$ の数や活性に関与する残基数、各残基のプロトン化状態、プロトンの転移経路など、RNase HIの詳細な触媒機構については未だ様々な議論が行われている

[3-5]。

本研究では、活性中心の $Mg^{2+}$ の数に着目し、活性中心に一つまたは二つの $Mg^{2+}$ をもつ二種類のRNaseHI活性中心モデル錯体 (One-metal Model, Two-metal Model)を作成し、各モデルの水溶液条件における加水分解反応経路を探索した。両者の反応経路を比較することで、 $Mg^{2+}$ の数の違いが酵素反応に与える影響を調べた。

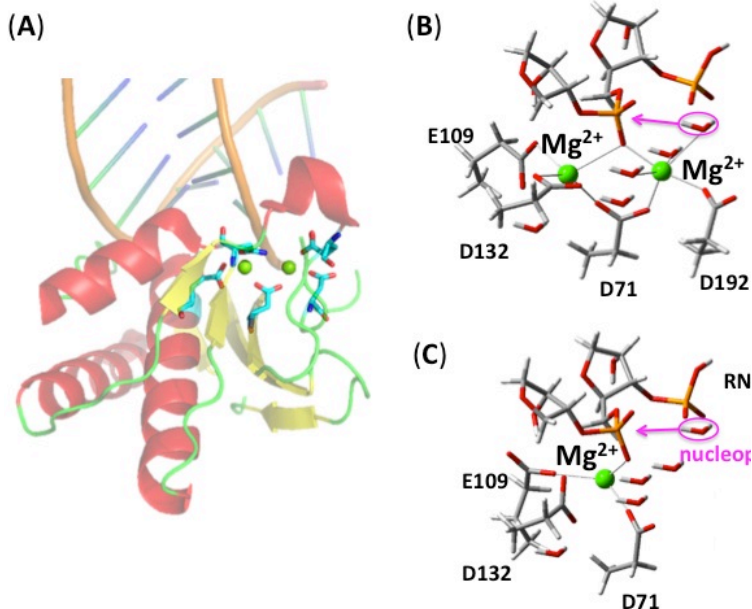


図 1. RNaseHI-DNA/RNA ハイブリッド複合体の結晶構造(A)、Two-metal モデル(B)、One-metal モデル(C)



## 【計算方法】

酵素反応に関与すると考えられる四つの残基(D71, E109, D132, D192)、活性中心に存在するMg<sup>2+</sup>、活性中心付近の基質RNA鎖と水分子のそれぞれを既知の結晶構造(PDBID: 1ZBL, 1RDD)から切り出すことで、図1(B), (C)のような二種類の錯体モデルを作成した。全ての残基は脱プロトン化していると仮定し、計算コストを考慮して基質RNA鎖中の塩基部分を除去した。計算にはB3LYP/6-31G(d)を使用し、各構造間の反応経路のつながりをIRC計算により確認した。溶媒モデルとしてIEF-PCMを採用し、誘電率の値には78.92、cavityにはUFFを使用した。

## 【結果・考察】

One-metal Model、Two-metal Modelとも二つの中間体を経る段階的な反応経路が観察された(図2)。Two-metal Modelの反応経路における反応物からの活性化ギブスエネルギーはOne-metal Modelのものと比較して10 kcal/mol程度低く、さらにOne-metal Modelの経路における生成物はエネルギーが高くなった。これは、One-metal ModelではMg<sup>2+</sup>による求核剤水分子の活性化や配向調整が行われないためであると考えられる。発表ではこれらモデル錯体の経路と、最も単純なリン酸ジエステル分子であるリン酸ジメチルアニオンの加水分解反応経路との比較結果についても報告する。

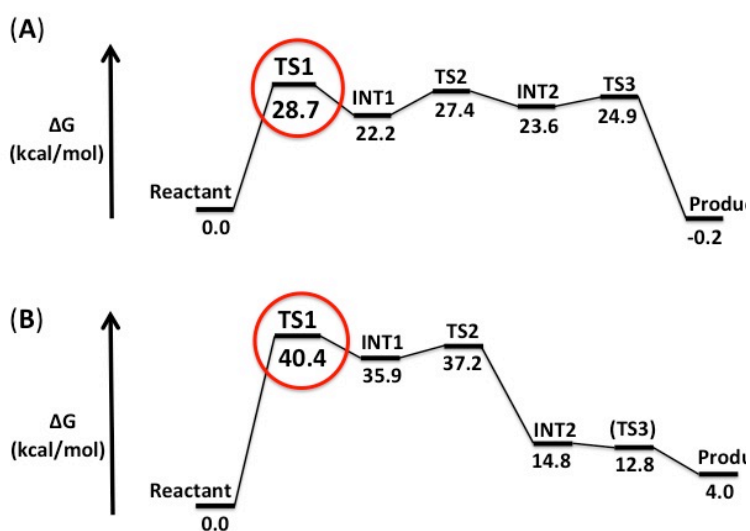


図 2. RNaseH のモデルに対するリン酸ジエステル結合の加水分解反応の Gibbs エネルギー: Two-metal モデル(A)、One-metal モデル(B)

## 【参考文献】

- [1] K. Katayanagi et al. *Proteins* 1993, 17, 337-346.
- [2] M. Nowotny et al. *Cell* 2005, 121, 1005-1016.
- [3] H. Nakamura et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1991, 88, 11535-11539.
- [4] M. D. Vivo et al. *J. Am. Chem. Soc.* 2008, 130, 10955-10962.
- [5] B. Elsassner et al. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2010, 12, 11081-11088.
- [6] M. Kita, Y. Takano, H. Nakamura *Mol. Phys.* in press.

## QM/MM-ER 法による ATP モデル分子の 加水分解自由エネルギーの計算

(東北大院・理) ○三木 雄詩、高橋 英明\*、森田 明弘

Free energy analyses for ATP hydrolysis using quantum mechanical  
/molecular mechanical simulations combined with a theory of solutions.

(Graduate School of Science, Tohoku University) ○Y. Miki, H. Takahashi\*, A. Morita

**【序】** ATP(Adenosine Triphosphate)の加水分解は生体内における最も重要な反応の1つであるが、その分子論は未だに確立されていない。ATP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は最大で4つの余剰電荷を持ち、水溶液中ではこれらの余剰電子が著しく揺らぐと考えられる。

本研究では、溶質分子を量子力学的に扱い、溶媒分子を分子動力的に扱うハイブリッド型のシミュレーション(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]を結合させたQM/MM-ER法[3]を用いることで、効率良く正確に自由エネルギー変化を計算する。最近、我々は、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[4]。本研究ではこの手法を用いて、ATPのモデル分子として0、-1、-2及び-3価のピロリン酸の加水分解自由エネルギー変化を計算する。

**【方法論】** 溶液における反応の自由エネルギー変化 $\Delta G$ は、反応物と生成物の溶媒和自由エネルギーの差で表される。

$$\Delta G = \Delta\mu_{\text{product}} - \Delta\mu_{\text{reactant}} \quad (1)$$

但し、ここでは溶媒和自由エネルギー $\Delta\mu$ の基準を原子、電子が独立に存在する状態に取る。QM/MM-ER法による自由エネルギー計算では $\Delta\mu$ を二体的な相互作用による寄与 $\Delta\bar{\mu}$ と多体的な相互作用による寄与 $\delta\mu$ に分解する。すなわち、

$$\Delta\mu = \Delta\bar{\mu} + \delta\mu \quad (2)$$

但し、式(2)において $\delta\mu$ は電子状態のエネルギーを含む。 $\Delta\bar{\mu}$ 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。一方、 $\delta\mu$ は固定された電子密度 $\bar{n}$ から電子密度が揺らぐことによる溶媒和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、 $\delta\mu$ の計算において、エネルギー座標 $\eta$ を溶質の電子密度が分極することによる系全体のエネルギー変化にとり、溶液系と参照系において $\eta$ の分布関数 $Q(\eta)$ および $Q_0(\eta)$ を構築することで、 $\delta\mu$ は厳密に

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

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

**【計算の詳細】** 反応物及び生成物の溶媒和自由エネルギーを上記のQM/MM-ER法により加水分解自由エネルギー変化 $\Delta G$ を計算した。QM系の電子状態計算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 を用いて計算した。立方体の QM の実空間セルにおいて、 $x$ 、 $y$  及び  $z$  軸方向いずれも 90 個のグリッドを配置し、グリッド幅は 0.152 Å とした。固定された電子密度  $\bar{n}$  として、0 価、-1 価のピロリン酸及び生成物のリン酸については気相中の電子密度を、-2 価及び-3 価のピロリン酸については溶液中における平均の電子密度を採用した。溶媒は SPC/E モデルの水分子で構成し、0 価及び-1 価では 494 個、-2 価及び-3 価では 3994 個の水分子を使用した。時間刻みは 1fs とし、溶液の熱力学的条件は 300K、1.0g/cm<sup>3</sup> とした。MM 系の力場として OPLS-AA を使用した。但し、-2 価及び-3 価のピロリン酸については原子のサイズパラメータを別途最適化した。

**【結果と考察】** 0 価のピロリン酸の電子の揺らぎによる寄与  $\delta\mu$  について、式(3)中の  $Q(\eta)$ 、 $Q_0(\eta)$  及び  $W(\eta)$  を図 1 に示した。式(3)における右辺の角括弧の中身は原理的には  $\eta$  の値によらない  $\delta\mu$  の値を持つ関数である。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。こうして得られたピロリン酸の加水分解自由エネルギーを表 1 にまとめた。反応の前後について、式(2)中の

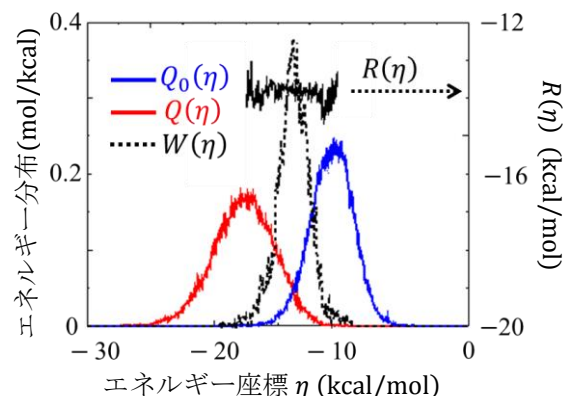


図 1. ピロリン酸(0 価)のエネルギー分布関数

の二体的な相互作用による寄与  $\Delta\bar{\mu}$  の差  $\Delta\Delta\bar{\mu}$  を計算すると、-2 価のピロリン酸の反応では+70.1 kcal/mol、-3 価のピロリン酸の反応では+124.7 kcal/mol と計算された。これは、固定された電子密度を持つ溶質の水和の自由エネルギー変化は反応の前後において大きく吸熱的であることを意味する。一方、反応の前後において多体的な相互作用による寄与  $\delta\mu$  の差  $\Delta\delta\mu$  を考慮すると、-2 価のピロリン酸の反応では-80.1 kcal/mol、-3 価のピロリン酸の反応では-130.8 kcal/mol と計算された。このように、大きな正の値を持つ水和の自由エネルギー変化と大きな負の値を持つ電子状態の自由エネルギー変化との間で相殺が起こり、結果として加水分解自由エネルギー変化  $\Delta G$  は、-2 価のピロリン酸については-11.6 kcal/mol、-3 価のピロリン酸の反応では-6.1 kcal/mol となった。それぞれの計算結果は以前に計算された-1 価のピロリン酸[4]と同様、実験値を再現することに成功しており、本手法が溶液系における自由エネルギーを計算するのに十分な精度を持つことが示された。

**【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, et al. *J. Chem. Phys.* **121**,39890 (2004). [4] H. Takahashi, et al. *J. Chem. Phys.* **136**, 214503 (2012).

Reaction	$\Delta G$	$\Delta G$ (expt) <sup>[1]</sup>
$\text{H}_4\text{P}_2\text{O}_7 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow 2\text{H}_3\text{PO}_4$	-10.1	-9.5
$\text{H}_3\text{P}_2\text{O}_7^- + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H}_3\text{PO}_4 + \text{H}_2\text{PO}_4^-$	-6.7[4]	-7.5
$\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7^{2-} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow 2\text{H}_2\text{PO}_4^-$	-11.6	-7.7
$\text{HP}_2\text{O}_7^{3-} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H}_2\text{PO}_4^- + \text{HPO}_4^{2-}$	-6.1	-7.1

表 1. ピロリン酸の加水分解反応とその反応前後の自由エネルギー変化(kcal/mol)

# ADP/ATP 透過担体の大規模構造変化に 関する理論的研究

(京大院理) ○田村 康一、林 重彦

A theoretical study on the large conformational change of ADP/ATP carrier  
(Grad. Sch. Sci., Kyoto Univ.) ○Koichi Tamura, Shigehiko Hayashi

## 【序】

**ADP/ATP 透過担体** (ADP/ATP carrier, **AAC**) は、ミトコンドリアの内膜に存在する膜タンパク質であり、ADP または ATP の 1:1 交換輸送を行うことが実験により明らかにされている。AAC は、それぞれ特定の基質に阻害される 2 種類の状態を持つ。すなわち、細胞質側に開いた状態 (c 状態) と、マトリクス側に開いた状態 (m 状態) である。これらの状態間の遷移過程を分子レベルで明らかにすることが、1:1 交換輸送メカニズムの理解に必要である。c 状態に関しては、X 線結晶構造が得られている<sup>[1]</sup>が、m 状態の構造は知られていない。

発表者らは、タンパク質の遅い構造変化を分子動力学法 (molecular dynamics, **MD**) によって再現する方法 (**LRPF 法**) を既に開発し、カルモジュリン N 末端ドメインの構造変化を再現することに成功している。この方法は、タンパク質が緩和しようとする方向に外力をかけることで、その構造変化を加速する。ここで外力は線型応答理論<sup>[2]</sup>に基づいて決める。こうして、タンパク質のある状態から出発して、次々に中間状態を発生させつつ、最終的に目的構造まで辿りつく。この方法の利点の 1 つは、構造変化を誘導するときに、目的構造の情報を必要としないという点である。つまり、予測能力が備わっているということであり、今回のように (m 状態に対応する) 目的構造が知られていない場合に最適な方法である。

## 【計算方法】

All atom 力場: CHARMM22/CMAP, CHARMM27, CHARMM36, TIP3P

二重膜: POPC, 100 \* 100 Å<sup>2</sup>

総原子数: 80,000 程度

外力: リガンド (ADP) から PX(D/E)XX(K/R)モチーフ内の(D/E)に向かうベクトルを、共分散行列で変換した線型応答ベクトル。

共分散行列のサンプリング: 10 ns

### 【結果】

Figure 1. に、リガンドから(D/E)に向かうベクトルと、それを変換した線型応答力を示す。AACは、リガンドからの摂動によって、開口部を閉じ、閉鎖部を広げる方向に緩和しようとしていることがわかった。この線型応答ベクトルを外力として、3つのLRPFシミュレーションを開始した。詳細は当日報告する。

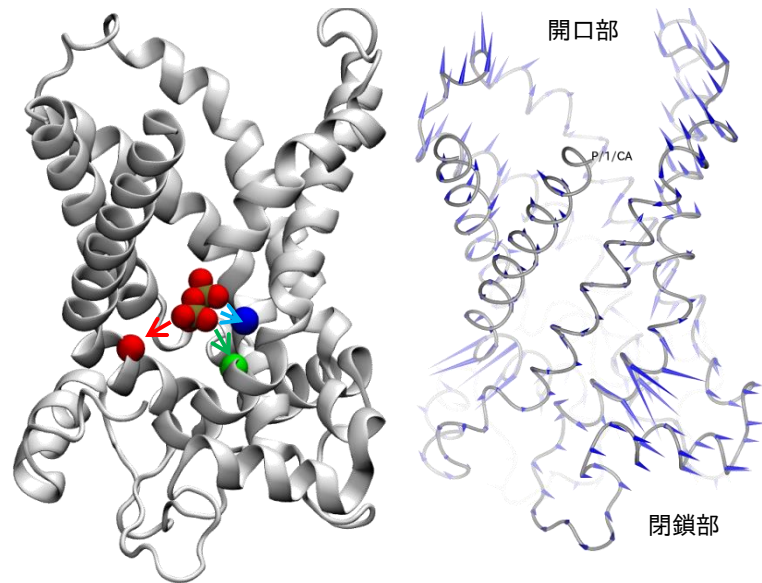


Figure 1. AACのX線結晶構造 (左) リガンドから (D/E) に向かうリガンド力。(右) 線型応答ベクトル。

### 【参考文献】

- [1] Pebay-Peyroula et al. 2003, *Nature*, **426**: 39-44.
- [2] Ikeguchi et al. 2005, *Phys. Rev. Lett.* **94**: 078102.



2P094

ルテニウム(IV)-オキソ錯体を活性種とする  
メタノールの酸化反応に関する理論的研究

(九大先導研\*, 筑波大院\*\*) ○高橋 翔也\*, 塩田 淑仁\*, 小島 隆彦\*\*, 吉澤 一成\*

Theoretical Study of the Oxidation of Methanol to Formaldehyde  
by Ruthenium(IV)-Oxo Complex

(IMCE Kyushu Univ.\*, Univ. of Tsukuba\*\*) ○Shoya Takahashi\*, Yoshihito Shiota\*, Takahiko  
Kojima\*\*, and Kazunari Yoshizawa\*

【序】高原子価金属オキソ種は複数の酵素の活性部位に存在し、酸化触媒として優れた機能を発揮している[1]。そのため、人工的な応用を目指した新規金属オキソ錯体の開発と反応解析が盛んに行われている。しかし、今のところ触媒として使用できるもので生成物の選択性に関して望ましい結果の得られているものは少ない。

近年、小島らにより図 1 に示す Ru 錯体を触媒としたアルコールやオレフィン類の高効率かつ高選択的な酸化反応例が報告された[2,3,4]。反応活性種である Ru(IV)=O 錯体は Ru(II)(H<sub>2</sub>O)錯体からプロトン共役電子移動反応 (PCET) により水溶液中で生成する。

重水中での <sup>1</sup>H NMR 分光法の結果によると、錯体 1a は三重項状態をとるのに対し、1b と 1c は Ru(IV)には珍しい一重項状態をとる。また、基質濃度に対する反応速度の変化から、3つの錯体は全てアルコールなどの基質との間で水素結合を形成すると示唆されている。しかし、1b と 1c はもともと水素結合できる部分を持たないため、水溶液中では水分子の配位により 7 配位構造をとると同時に一重項状態を示すと推察されている。一方、反応効率や選択性、活性化エントロピーやエンタルピーに関する実験結果から、3つの錯体の反応性はほぼ同じであることが示された。

これまで様々な配位子を用いて Ru(IV)=O 錯体に関する研究が行われてきたが、小島らの報告した錯体の他にアクア配位子を有するものは無い。本研究では、1a とアクア配位子を持たない六配位構造の 1b、1c につい

て、密度汎関数法を用いてメタノールからホルムアルデヒドへの酸化反応機構を検討し、アクア配位子の有無と反応性の関係を考察する。

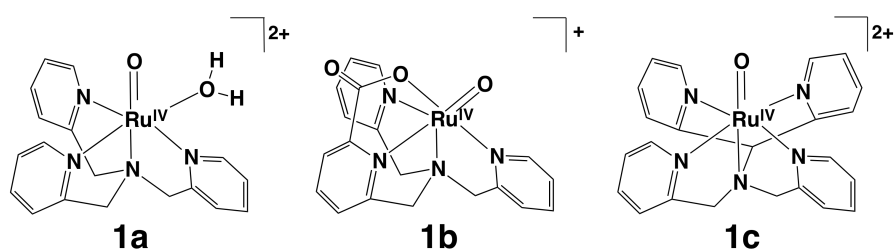


図 1. 本研究で取り扱う Ru(IV)=O 錯体

【計算方法】 B3LYP 法を用いて安定構造と遷移状態の構造最適化を行った。基底関数には Ru 原子に対して LANL2DZ 基底を、C,O,N,H 原子に対しては D95\*\*基底を用いて最適化構造を求め、その構造をもとに SDD 基底と 6-311+G\*\*基底を用いた一点計算によりエネルギーを算出した。ス

ピン多重度は一重項と三重項を考慮した。PCM 法により溶媒効果（水中）も考慮した。計算プログラムは Gaussian09 を用いた。

【結果と考察】錯体 **1a**、**1b**、**1c** を構造最適化した結果、一重項状態と三重項状態のエネルギー差はそれぞれ 18.4、14.9、23.4 kcal/mol で、全て三重項状態のほうがエネルギー的に安定となった。したがって、六配位構造の **1b** と **1c** は実験結果に反して三重項状態を基底状態にとる。

図 2 にメタノールの酸化反応経路を示す。

Ru(IV)=O 錯体はメタノールを酸化すると同時に Ru(II)(H<sub>2</sub>O) 錯体へ還元される。Ru(IV)=O 錯体の基底状態は三重項であるのに対して、Ru(II)(H<sub>2</sub>O) 錯体は一重項であるため、反応の途中でスピンの反転

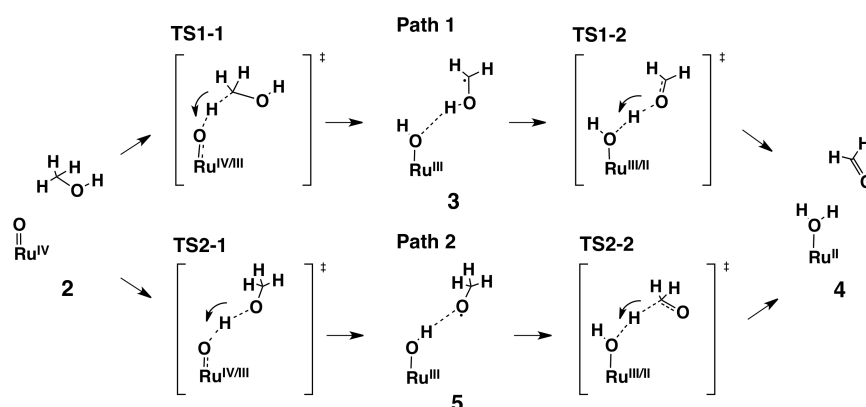


図 2. Ru(IV)=O 錯体によるメタノールの酸化反応経路

を必要とする。Path 1 では始めにメタノールのメチル基から水素原子が引き抜かれ、その後ラジカル中間体を経て OH 基から水素原子が引き抜かれる。反対に、Path 2 では始めに OH 基から水素原子が引き抜かれ、その後ラジカル中間体を経てメチル基から水素原子が引き抜かれる。

計算の結果、3つの錯体とも TS1-1 と TS2-2 がそれぞれ Path 1 と Path 2 の中で最もエネルギーの高い遷移状態であった。**1a**、**1b**、**1c** における反応物錯体 **2** を基準とした TS1-1 のエネルギーは、それぞれ 22.2、21.2、21.4 kcal/mol となりほとんど同じ値であった。したがって、Ru(IV)=O 錯体によるメタノールのメチル基からの水素原子引き抜きにおいてはアクア配位子の有無による活性化エネルギーへの影響はない。一方、TS2-2 については、それぞれ 27.1、19.7、25.9 kcal/mol となりばらつきが見られた。この影響により、**1a** と **1c** では Path 1 のほうがエネルギー的に優位であるのに対して、**1b** では Path 2 のほうがエネルギー的に優位となった。

#### 【参考文献】

- [1] Schlichting, I.; Berendzen, J.; Chu, K.; Stock, A. M.; Maves, S. A.; Benson, D. E.; Sweet, R. M.; Ringe, D.; Petsko, G. A.; Sligar, S. G. *Science* **2000**, *287*, 1615.
- [2] Hirai, Y.; Kojima, T.; Mizutani, Y.; Shiota, Y.; Yoshizawa, K.; Fukuzumi, S. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 5772.
- [3] Kojima, T.; Hirai, Y.; Ishizuka, T.; Shiota, Y.; Yoshizawa, K.; Ikemura, K.; Ogura, T.; Fukuzumi, S. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 8449.
- [4] Ohzu, S.; Ishizuka, T.; Hirai, Y.; Jiang, H.; Sakaguchi, M.; Ogura, T.; Fukuzumi, S.; Kojima, T. *Chem. Sci.* **2012**, *3*, 3421.

2P095

含ガリウムゼオライトによる  
フランの熱分解反応に関する理論的研究

(九大先導研) ○鈴木達也, 高橋翔也, 塩田淑仁, 吉澤一成

Theoretical study of pyrolysis of furan catalyzed by Ga-ZSM-5

(IMCE, Kyushu Univ.) ○Tatsuya Suzuki, Shoya Takahashi, Yoshihito Shiota,

Kazunari Yoshizawa

【序】環境問題やエネルギー問題に直面する中、バイオ燃料はクリーンで再生可能なエネルギーの1つとして期待されている。バイオマスの熱分解に由来するバイオ燃料は従来の燃料に比べて発熱量が小さく、改質反応が必須となっている。その原因の一つとして、バイオ燃料の酸素含有量の高さが挙げられる<sup>1</sup>。本研究では糖質由来のバイオ燃料のモデルとしてフランを取り上げ、その脱カルボニル反応について研究を行った。含ガリウムゼオライトの1つであるGa-ZSM-5は、フランが脱カルボニル化により一酸化炭素とアレンとに分解される反応を促進することが報告されている<sup>2</sup>。しかし、この触媒反応のメカニズムは明らかにされていない。そこで、Ga-ZSM-5によって促進されるフランの分解反応を量子化学計算により理論的に考察した。

【計算方法】QM(量子力学)計算とMM(分子力学)計算を組み合わせた ONIOM 法を用いて安定構造と遷移状態の構造最適化を行った。全ての中間体と遷移状態で振動解析を実行し、確認を行った。QM 領域では計算方法として DFT の B3LYP、基底関数には全原子に 6-311+G\*\*基底を用いた。MM 領域では力場パラメータとして UFF を用いた。計算プログラムには Gaussian09 を用いた。モデル触媒の活性部位として [GaO]<sup>+</sup>を採用し、ONIOM 計算では図 1 に示す SiO<sub>2</sub>ユニットを 768 個、全 2306 原子(GaO を含む)で構成され、縦 39.2 Å、横 21.9 Å、高さ 34.9 Å のモデルを用いた。

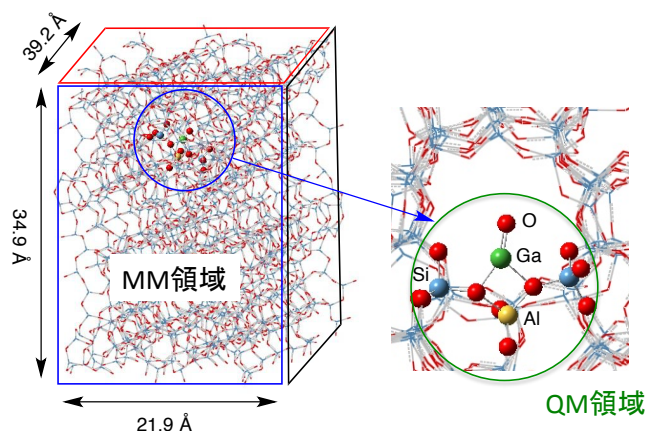


図 1. モデル触媒(QM 領域、MM 領域)

【結果と考察】図 2 に量子化学計算により予測された Ga-ZSM-5 によるフランの分解反応の機構を示す。この反応機構はフランの開環、一酸化炭素の脱離、アレンの生成の 3 つの過程から成り、反応は一重項状態で進行する。気相反応のフランの分解は C-O 結合開裂の開環ステップに一重項状態で 88.7 kcal/mol、三重項状態で 77.0 kcal/mol のエネルギーが必要で律速過程であることが理論計算により報告されている<sup>3</sup>が、触媒反応では一重項状態で 29.6 kcal/mol となり活性化エネルギーが大きく低下することがわかった。気相反応と比較して、ただ単純にフランの C-O 結合を開裂するのではなく GaO のオキソ配位子をフランに酸化的に挿入するという点が特徴的である。この酸素の挿入により、ラジカルの生成を抑え、かつ、フランの酸化の反応熱を利用することで、開環後の中間体のエネルギーを安定化させていると考えられる。また、反応経路全体として、気相反応と触媒反応のそれぞれのエネルギーダイアグラムを比べると、触媒反応では相対エネルギーが常に低く、安定な中間体を經由する。そのため、Ga-ZSM-5 によってフランの分解反応が促進されることが明らかとなった。

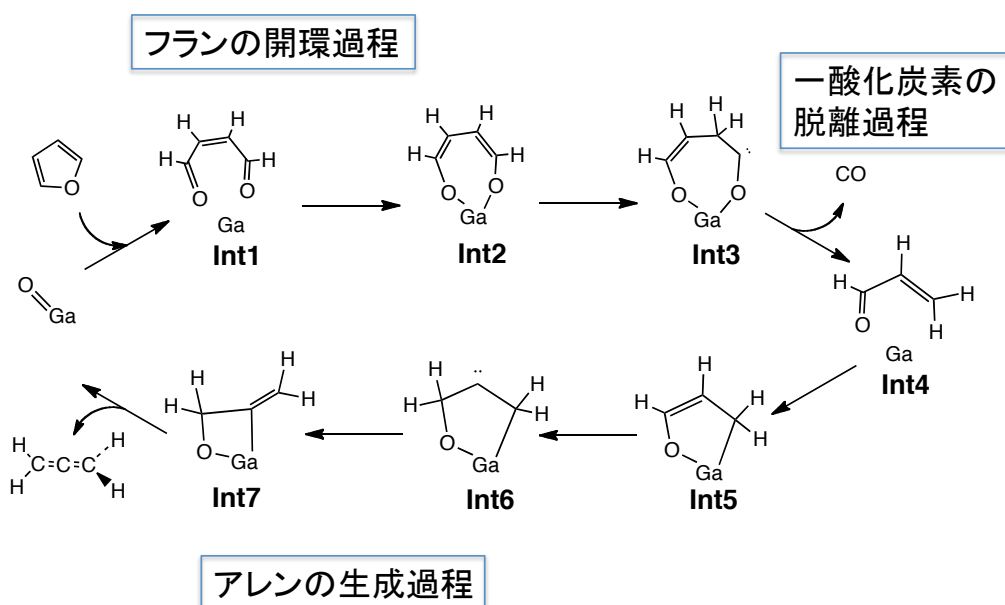


図 2. 理論計算により予測された触媒サイクル

【参考文献】

- [1] Czernik, S.; Bridgwater, A.V. *Energy Fuels*, **2004**, *18*, 590-598.
- [2] Cheng, Y.-T.; Jae, J.; Shi, J.; Fan, W.; Huber, G. W. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2012**, *51*, 1387-1390.
- [3] Sendt, K.; Bacskay, G. B.; Mackie, J. C. *J. Phys. Chem. A* **2000**, *104*, 1861-1875.

2P096

## 水溶液中における ferrate(VI)による ビスフェノール A の分解に関する理論的研究

(九大先導研) ○森英一朗, 蒲池高志, 吉澤一成

The degradation of bisphenol A by ferrate(VI) in water solution  
(IMCE, Kyushu Univ.) ○Eiichirou Mori, Takashi Kamachi, Kazunari Yoshizawa

【序】ビスフェノール A はポリカーボネートやエポキシ樹脂などの製造に用いられている重要な化合物である。しかし、ビスフェノール A(BPA) (図 1) は内分泌かく乱物質 (EDCs) に分類されており、エストロゲン受容体に作用することで野生生物や人体に悪影響を与えてしまうことが懸念されている。[1] また、BPA は容易に除去することができないことが知られており、BPA は一般的に水質汚染物質として見なされている。このため、水中に含まれるビスフェノール A の分解を行い、水を浄化することは重要である。

従来、BPA を酸化分解する手段として、オゾンや塩素などが使われてきた。しかしこれらの物質は有害となる可能性を秘めていることや、環境に負荷を与えてしまうなどの問題点があった。例えばオゾンは臭素イオンと反応し、発がん性物質となる可能性があるため、臭素イオンを含んだ水中では使用することができない。[2]

ferrate(VI) ( $\text{FeO}_4^{2-}$ ) は四面体構造をとる鉄 6 価の化合物であり、強力な酸化剤として知られている

(図 2)。このフェレートは有毒な重金属を含まないため環境に優しい酸化剤として近年注目を集めている。また、フェレートは図 3 のようにその pH に応じて 3 つの構造をとることが知られており、以前の我々のグループの研究から、その酸化力の強さは  $\text{H}_2\text{FeO}_4 > \text{HFeO}_4^- > \text{FeO}_4^{2-}$  であることを見いだした。[3]

本研究では、クリーンで強力な酸化剤であるフェレートによる、水中における BPA の分解メカニズムおよび 3 種類のフェレートの酸化力の評価を、密度汎関数法を用いて研究を行った。

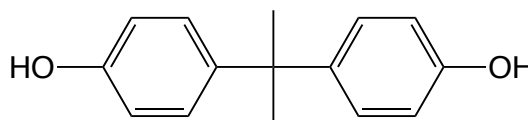


図 1. ビスフェノールAの構造

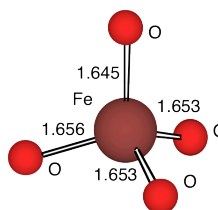


図 2. ferrate(VI)の構造

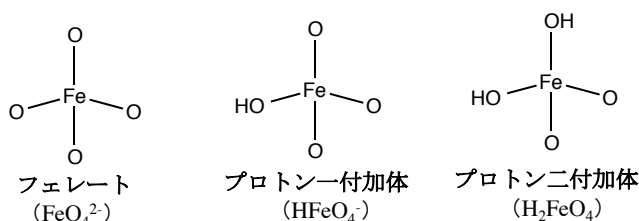


図 3. フェレートのプロトン付加体

【計算方法】本研究では密度汎関数法のひとつである B3LYP 法を用いて安定構造と遷移状態の構造最適化を行った。基底関数には全ての原子に対して 6-311++G(d,p)基底を用いた。スピン多重度は一重項と三重項を考慮した。計算プログラムは Gaussian09 を用いた。また水溶媒中の反応であるので、PCM 法を用いて溶媒効果を考慮した。

【結果】量子化学計算の結果、フェレートによって BPA を二酸化炭素と水へと分解する機構の反応中間体と遷移状態の最適化構造、反応熱を得ることができた。まず BPA の二種類の C-C 結合 A、B の切断 (図 4) から分解が始まるということが判明した。

これらの C-C 結合の切断後、フェノール誘導体 (ヒドロキノン等) が生成する。これをさらにフェレートが酸化しカテコールへと転換す

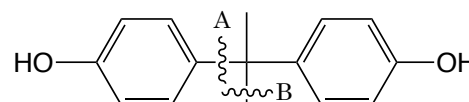


図 4. ビスフェノール A の切断部位

ることで、フェノール誘導体は容易に水と二酸化炭素まで分解される。活性化エネルギーはそれぞれ ( $\text{H}_2\text{FeO}_4$  を例にとると) A: 12.5 kcal/mol、B: 21.1 kcal/mol であった。この結果から、C-C 結合 A の切断がより起こりやすいことが予想された。また空気中と比べて、溶媒効果を含めるとほとんどの中間体が少しではあるが安定化し、活性化エネルギーが下がることが判明した。

また活性化エネルギーの値から、フェレートの酸化力の強さは予想されていた通りプロトン二付加体が最も強く、次いでプロトン一付加体、プロトン無付加体の順となることが分かった。図 5 に活性化エネルギーと平衡定数から得られた、各 pH における  $\text{H}_2\text{FeO}_4$ 、 $\text{HFeO}_4^-$ 、 $\text{FeO}_4^{2-}$  の水相における反

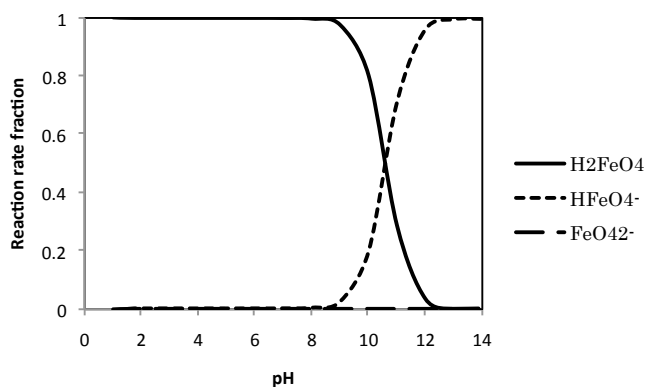


図 5. 水相における反応速度分布

応速度分布を示した。本実験は pH が 8~12 の範囲で行われているので、この条件下ではプロトン二付加体とプロトン一付加体が多く反応に寄与しているということが判明した。

#### 【参考文献】

- [1] Kuch H. M.; Ballschmiter K. *Environ. Sci. Technol.* **2001**, *35*, 3201-3206.
- [2] Condie L. W. *J. Am. Water Works Assoc.* **1986**, *78(6)*, 73-78.
- [3] Kamachi, T.; Kouno, T.; Yoshizawa, K. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 4380-4388.



2P097

## タンパク質内部の水分子位置決定に関する理論的研究

(九大先導研) ○緒方龍展, 蒲池高志, 吉澤一成

### An Efficient Procedure to Locate Buried Water Molecules in Proteins

(IMCE Kyushu University) ○Tatsunobu Ogata, Takashi Kamachi, Kazunari Yoshizawa

#### 【序】

近年のコンピュータの能力向上に伴い、酵素のような巨大分子に対しても QM/MM といった全原子計算が取り組まれている。特に水分子はタンパク質のフォールディング、構造安定性、機能などに重要な役割を果たすため、水分子の情報はタンパク質の計算モデルに不可欠である。しかし、タンパク質の構造決定法として用いられる X 線回折、中性子線回折、NMR では、タンパク質内部の水分子が解像度等の問題により正しい位置に観測されないことがある。Li らの報告によると<sup>1</sup>、タンパク質内部の水分子は周囲のタンパク質により 12 kcal/mol 以上安定化されている。この安定化エネルギーをタンパク質内部水分子の存在条件とすることは妥当であり、実験的に観測されたタンパク質内部の水分子が正しい位置に存在するのか計算により判定することが可能である。しかし、Li らが求めたエネルギーは分子力学計算に基づくため、信頼できるパラメータが存在しないリガンドを含むタンパク質に対して、安定化エネルギーによって水分子の存在を判定することはできない。この問題を解決するにはパラメータを必要としない量子化学計算を用いることが有効である。このエネルギー条件を量子化学計算において用いるためには、分子力学計算により求めた水分子の安定化エネルギーと量子化学計算により求めたエネルギーが同等である必要がある。そこで、我々はこれまでに適当な計算レベルの検討を行ってきた。

#### 【計算手法】

分子力学計算には CHARMM 力場を用いた。適当な汎関数の選択のために、B3LYP, CAM-B3LYP, LC-BLYP, B97D,  $\omega$ B97XD を検討した。基底関数は 6-31G(d), 6-311G(d) を検討した。また、基底関数重ね合わせ誤差を補正するために Counterpoise 法を用いた。これらの量子化学計算には Gaussian 09 を用いた。

#### 【結果と考察】

水分子の位置が良く定まっているタンパク質を用意し、水素を付加させ、水素のみ緩和した状態で分子動力学計算を行った。計算結果から、これらの水分子は周囲のタンパク質によって 12 kcal/mol 以上安定化されていることを確認した。それぞれの水分子について、酸素原子を中心として周囲 12 Å 以内の原子を計算モデルとして考慮し

た。計算コスト削減のため、3.4~12Å に存在する原子は点電荷とした。それぞれの水分子について各汎関数を用いて安定化エネルギーを計算した結果を表1に示す。B3LYPの計算結果は、CHARMMの値よりも安定化エネルギーを小さく見積もっていた。また、CHARMMにより得られた安定化エネルギーのファンデルワールス項と、CHARMMとB3LYPのエネルギー差をプロットすると図1のようになり、B3LYPの誤差は長距離補正項が不足しているためだと考えられる。長距離補正項を含む他の汎関数ではいずれもB3LYPと比較すると安定化エネルギーを大きく見積もった。このうち、LC-BLYPと $\omega$ B97XDは水分子の安定化エネルギーを過剰に見積もることが判明した。また、CAM-B3LYP, B97DはCHARMMのエネルギーの再現性が高く、タンパク質内部の水分子の存在判定に用いることが可能であるということが示唆された。

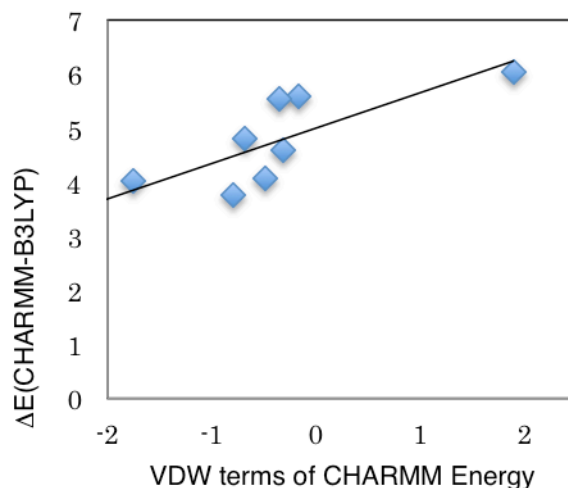


図1. CHARMMとB3LYPとの間のエネルギー差とファンデルワールス項(VDW)の関係

表1. CHARMMとDFTのエネルギー誤差(基底関数: 6-31G(d), Unit: kcal/mol)

Entry	CHARMM	B3LYP	CAM-3LYP	LC-BLYP	B97D	$\omega$ B97XD
1	-15.98	-11.90	-14.88	-18.84	-15.09	-16.27
2	-20.66	-17.14	-19.88	-23.71	-19.71	-21.15
3	-21.08	-15.05	-19.16	-24.54	-20.85	-23.07
4	-21.74	-17.72	-21.34	-26.31	-22.18	-24.59
5	-22.28	-16.70	-20.66	-25.85	-20.25	-23.08
6	-22.69	-18.09	-22.18	-27.70	-23.33	-25.86
7	-23.46	-19.69	-23.13	-27.90	-24.17	-25.88
8	-26.83	-22.03	-25.87	-30.98	-24.99	-28.13
RMSD	-	4.62	1.09	3.95	1.14	1.96

【参考文献】

- 1) Li, Z.; Jan, H. *PEOTEINS* **1996**, 24, 433.

## ジアリールエテンの整流作用に関する理論的研究

(九大先導研) 古賀 惇也, 辻 雄太, 吉澤 一成

## Asymmetric Diarylethene as a Dual-Functional Device Combining Switch and Diode

(IMCE Kyushu Univ.) Junya Koga, Yuta Tsuji, and Kazunari Yoshizawa

【序】単一分子デバイスは近年限界が指摘されつつあるシリコンベースの半導体デバイスにとって代わる次世代のデバイスとして注目を集めており、その実現のために単一分子レベルでの電子輸送物性を明らかにすることは非常に重要な研究課題となっている。整流機能を持つ単一分子デバイスの例として、単一分子ダイオードがあげられる[1]。これは、一つの分子の中にドナー性の部分とアクセプター性の部分とを作り出すことで、整流作用を持たせるという考えに基づいている。単一分子デバイスの研究の起源である分子ダイオードは、理論、実験の両面から盛んに研究が行われている。本研究では、非対称な構造を持つジアリールエテン[2,3]の単一分子レベルでの整流作用に焦点を当てる。フォトクロミック分子であるジアリールエテンの閉環体と開環体について単分子の電気伝導度には大きな差がある事がこれまでの研究により確認されている。本研究により、光スイッチ能を持つ単一分子ダイオードという新規の単一分子デバイスの提案を行う。

【計算方法】ジアリールエテン中の複素環のヘテロ原子の整流作用に与える影響を明らかにするために図 1 に示すモデル分子を用いて検討した。これらのモデル分子は実際に合成が報告されている分子を基にした。モデル分子には電極と接合する部位としてチオール基を導入した。これらの

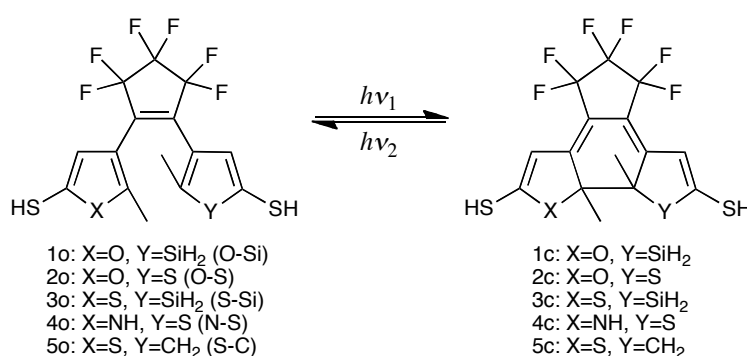


図 1. ジアリールエテンのモデル分子

分子を金電極に導入した系を用いて単一分子上の電気伝導特性について検討した。電気伝導の計算手法として、非平衡グリーン関数法(NEGF 法)と密度汎関数法(DFT)を組み合わせた第一原理的アプローチ(NEGF-DFT 法)を用いた。計算プログラムには二つの半無限の金電極間に挟まれた分子という系に対して NEGF-DFT 法による第一原理電気伝導計算が可能な ATK プログラムを用いた。交換相関汎関数として GGA-PBE を採用し、基底関数には Single- $\zeta$  Polarized (SZP) を金原子に、Double- $\zeta$  Polarized (DZP) をその他の原子に対して用いた。-1.0 V から 1.0 V 間の電流電圧曲線を算出し、整流作用が働く方向、作用の大きさを検討した。

## 【結果と考察】

スイッチとしての特性を検討するために開環体と閉環体との電流値を比較した。それぞれの分子について閉環体の方が 50~200 倍程度高い伝導性を示し、対称な構造を持つジアリールエテンと同様にスイッチとしての役割を持つことが確認された。今回検討したモデル分子の中では Si を含む分子が他の分子よりも高いスイッチ特性を示した。

単分子の整流作用を議論するために、算出した電圧に対する電流の値から整流比  $R = \{-I(V)/I(V)\}$  を得た(図 2)。整流比の値が 1 より大きいほど大きな整流作用を持つ。図 2 より、それぞれのモデル分子について整流作用が確認できた。また、ヘテロ原子の組み合わせにより整流作用の大きさが影響を受けることが示され、閉環体において最も大きな整流作用を示したのは、O-Si の組み合わせを持つ分子であった。整流作用の大きさは以下 S-O、S-Si、S-N、S-C の順に小さくなり、これは互いの電気陰性度の差の順番と一致するものであった。単分子上のヘテロ原子間の電気陰性度の差と最大整流比の関係は図 3 に示されるように、直接的な関係がある事が示された。ジアリールエテンの整流作用を考える上で、複素環のヘテロ原子の電気陰性度は重要な指標となりうることを明らかにした。ヘテロ原子がジアリールエテンの整流作用に対して大きく影響を与えることが明らかとなった。

本研究では、スイッチおよびダイオードの両方の機能を持ち合わせた新規の分子デバイス提案した[4]。Si を含む実際に合成された分子を用いてさらに現実的な系についても検討する予定である。

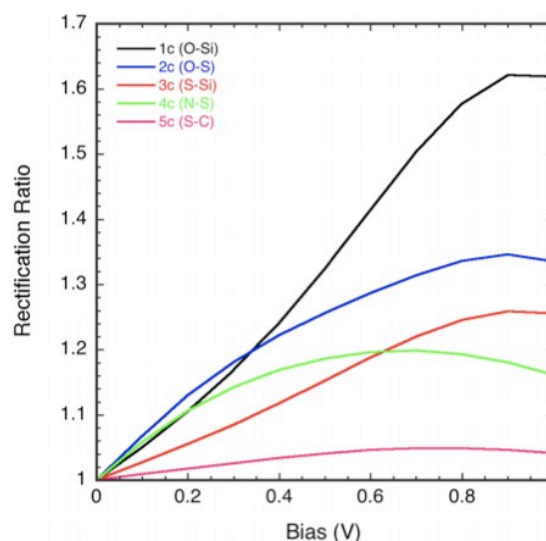


図 2. 電圧に対する整流比

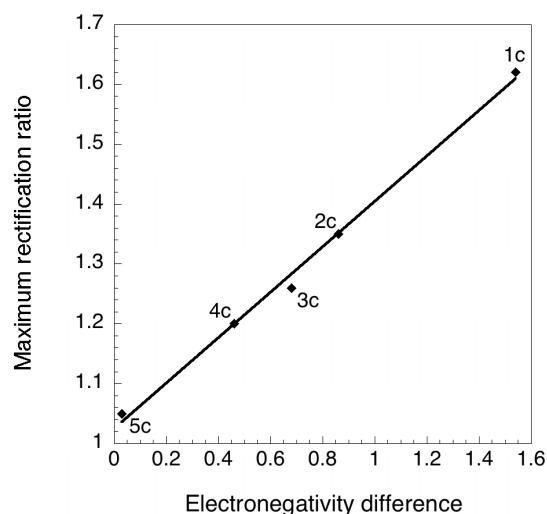


図 3. ヘテロ原子の電気陰性度の差と最大整流比の関係

[1] Aviram, A.; Ratner, M. *Chem. Phys. Lett.* **1974**, *29*, 277.

[2] Irie, M. *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 1685.

[3] Pu, S.; Wang, R.; Liu, G.; Liu, W.; Cui, S.; Yan, P. *Dyes Pigm.* **2012**, *94*, 195.

[4] Tsuji, Y.; Koga, J.; Yoshizawa, K. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* ASAP.

2P099

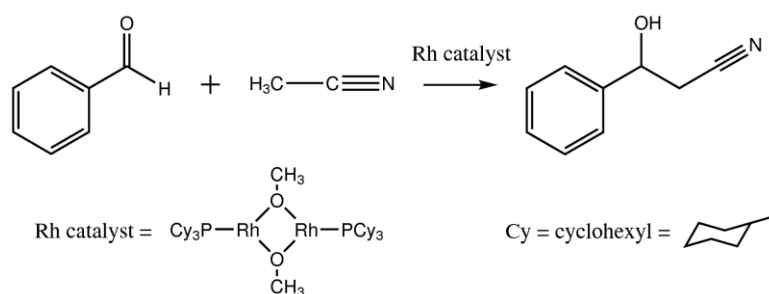
## Rh 錯体を用いたアルドール型反応に関する理論的研究

(名大院・理<sup>1</sup>, 名大・WPI-ITbM<sup>2</sup>) 西本佳央<sup>1,2</sup>, 牛丸理一郎<sup>1</sup>, 藤森嵩央<sup>1</sup>,  
横川大輔<sup>1,2</sup>, 中寛史<sup>1</sup>, 斎藤進<sup>1</sup>, Irle Stephan<sup>1,2</sup>

### Theoretical investigation of an aldol-type reaction with a Rh complex

(Graduate School of Science, Nagoya University<sup>1</sup>, WPI-ITbM, Nagoya University<sup>2</sup>) Yoshio Nishimoto<sup>1,2</sup>, Richiro Ushimaru<sup>1</sup>, Takahisa Fujimori<sup>1</sup>, Daisuke Yokogawa<sup>1,2</sup>, Hiroshi Naka<sup>1</sup>, Susumu Saito<sup>1</sup>, Stephan Irle<sup>1,2</sup>

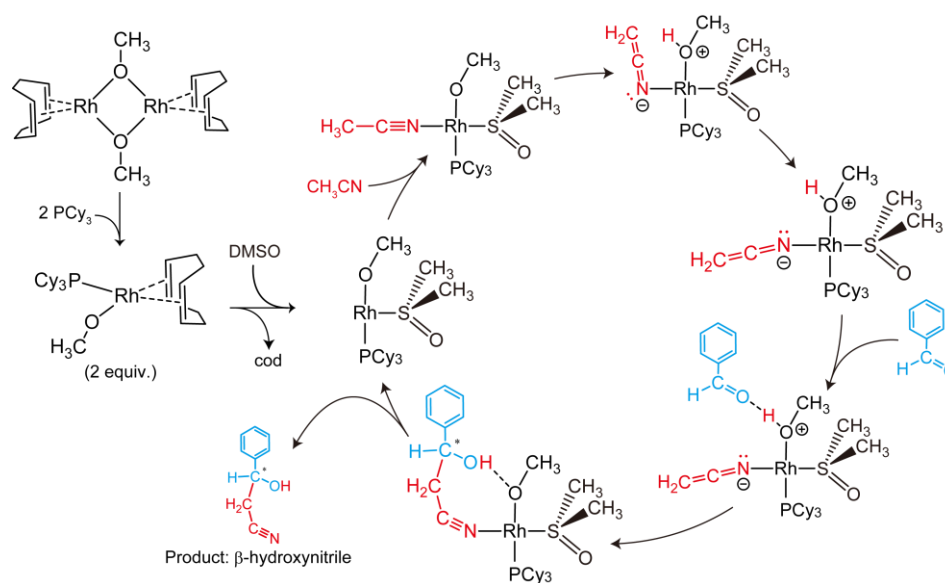
The chemical transformation of nitrile groups plays an important role in the field of organic synthesis. In particular, aldol-type reactions of organonitriles with aldehydes provide  $\beta$ -hydroxynitriles, which are potential precursors for pharmaceutically important functionality. We previously reported that Rh<sup>I</sup> complexes efficiently catalyzed aldol-type reactions of nitriles under mild conditions [1]. However, the mechanism for activation of nitrile group in this Rh catalysis was not clear. Because of the difficulty in functionalizing the nitrile group, it is of great importance to elucidate the mechanism of such an efficient catalytic reaction. Here, we conducted theoretical investigations to clarify the mechanism for the Rh catalysis (Scheme 1).



**Scheme 1** Target aldol-type reaction

In the theoretical investigations, all stationary points on the potential energy surfaces, including transition states, were optimized using the density functional theory (DFT) with the B3PW91 functional. The PCy<sub>3</sub> (Cy = cyclohexyl) ligand is explicitly treated. We chose a moderate basis set size (6-31G(d) for non-metal elements and LanL2DZ for Rh) for geometry

optimization, and the refined energies were computed using ONIOM(DF-LCCSD(T):DF-SCS-LMP2) with a larger basis set ((aug-)cc-pVTZ and ECP28MWB). To evaluate the solvent effect (dimethyl sulfoxide (DMSO)), we performed RISM-SCF-SEDD [2] calculations at RI-SCS-MP2/(aug)-cc-pVTZ+cc-pVDZ, and the energetic contribution due to the solvation was added to the ONIOM free energy. We investigated several reaction pathways with monomer and dimer catalysts, and proposed a plausible catalytic cycle as shown in Figure 1.



**Figure 1** Proposed catalytic cycle

Our calculations show that the barrier height of the proposed pathway is 22.48 kcal/mol, and is comparable to the experimental result (22.4 kcal/mol) of the reaction calorimetry.

## References

- [1] A. Goto, K. Endo, Y. Ukai, S. Irle, S. Saito, *Chem. Commun.* **2008**, 2212-2214.
- [2] D. Yokogawa, H. Sato, S. Sakaki, *J. Chem. Phys.* **2007**, 126, 244504.



## 2P100

異なった水素結合様式をもつ

OEC の  $S_2$  状態における分子構造と安定性に関する理論的研究

(三重大・院工<sup>1</sup>, 三重大・工<sup>2</sup>) ○市野智也<sup>1</sup>, 星山信幸<sup>2</sup>, 三谷昌輝<sup>1</sup>, 吉岡泰規<sup>1</sup>

Theoretical study on molecular structures and stability at the  $S_2$  state of OEC

with different hydrogen bonding patterns

(Grad. Sch. Eng. Mie. Univ.<sup>1</sup>, Eng. Mie. Univ.<sup>2</sup>)

○Tomoya Ichino<sup>1</sup>, Nobuyuki Hoshiyama<sup>2</sup>, Masaki Mitani<sup>1</sup>, Yasunori Yoshioka<sup>1</sup>

[序] 緑色植物や好熱性シアノバクテリアや藻類のもつ光化学系 II で行われる光駆動水分解反応 ( $2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{O}_2 + 4\text{H}^+ + 4\text{e}^-$ ) は  $\text{CaMn}_4\text{O}_5$  core をもつ酸素発生複合体 (OEC) により触媒される。触媒サイクルとして、OEC は 5 つの酸化状態 ( $S_0 \sim S_4$ ) を循環すると提案されている。暗所安定な  $S_1$  状態から酸化当量が 1 つ蓄積された  $S_2$  状態は EPR 測定で  $g = 2.0$  での多重線シグナルが観測されており、 $S = 1/2$  の基底電子状態に起因するシグナルであると解釈されている。4 つの Mn 原子は [1 Mn(III) + 3 Mn(IV)] の酸化状態であると推定されており、交換結合定数の測定からこれらの Mn は反強磁性的にスピнкаップリングしている。現在、キューバン様  $\text{CaMn}_3\text{O}_4$  core に架橋した 4 番目の Mn 原子 (Mn4) には  $\text{H}_2\text{O}$  と  $\text{OH}^-$  が配位しているとの見方が主流であるが、基質の結合サイトやプロトン化状態、さらに  $\text{CaMn}_4\text{O}_5$  core の周囲にある水分子との相互関係については未だ議論の余地がある。

我々は、密度汎関数計算を用いて、 $S_2$  状態の分子構造および酸化状態をすでに報告しており、上で述べた実験結果と一致している [1]。今回、Mn4 に直接配位している  $\text{H}_2\text{O}$  の水素結合様式が異なる  $S_2$  状態について検討した結果、以前の研究で得られたものよりエネルギーの低い構造が得られた。本発表では、これらの構造における分子構造と安定性について報告する。さらに、4 つの Mn に局在化した  $\alpha$ -spin および  $\beta$ -spin の配列パターンの違いによる相対安定性についても報告する。

[計算方法] モデル化は高解像度 X 線構造 (PDB ID: 3ARC) を基にした [2]。  $\text{CaMn}_4$  クラスタを架橋する 5 つの O 原子は全てオキシに、Asp170・Glu333・Asp342・Ala344・Glu354 はギ酸イオンに、Asp61・Glu189 は酢酸イオンに、His190・His332・His337 はイミダゾールに、Tyr161 はフェノール (PhOH) に、Gln165 はホルムアミドに、Arg357 はグアニジウムイオンに置き換えた。X 線構造解析で  $\text{H}_2\text{O}$  として割り当てられた  $\text{CaMn}_4\text{O}_5$  core 周囲の 9 つの O 原子を含めた。ただし、想定される  $S_2$  状態では Mn4 に直接配位する 1 つの O 原子を  $\text{OH}^-$  とした。系全体の電荷は 0、スピン多重度は二重項とした。計算は遷移金属を含む系に定評のある B3LYP 汎関数を用いた非制限法で実行した。さらに broken-symmetry 法を合わせ、4 つの Mn 原子にスピンが局在化した 3 つのスピン配列を検討した: (Mn1, Mn2, Mn3, Mn4) = ( $\alpha, \beta, \beta, \alpha$ ), ( $\beta, \alpha, \beta, \alpha$ ), ( $\alpha, \alpha, \beta, \beta$ )。Mn 原子には Wachters の DZ 基底を、H・C・N・O・Ca 原子には 6-31G\* 基底を使用した。構造最適化は  $\text{CaMn}_4\text{O}_5$  core、 $\text{OH}^-$ 、 $\text{H}_2\text{O}$ 、PhOH の H 原子に対して行い、残りの原子は X 線構造の位置で固定した。全ての計算は Gaussian09 で実行した。

[結果・考察] 今回の検討で得られた新しい  $S_2$  状態のモデルと文献 [1] で報告したモデルの結果を表 1 にまとめた。表中のモデル 7 が以前の  $S_2$  状態 (文献 [1] のモデル 9) に対応している。表 1 に示した 4

表 1. W1 の水素結合様式および 4 つの Mn のスピン配列の違いによるモデル **1-7** の相対安定性

水素結合様式	(Mn1, Mn2, Mn3, Mn4)		$E_{rel}$ (kcal/mol)	Mulliken のスピン密度 ( $e$ )			
	酸化状態	スピン配列		Mn1	Mn2	Mn3	Mn4
<b>1</b> [W6, Asp61]	(III, IV, IV, IV)	( $\alpha, \beta, \beta, \alpha$ )	0.0	3.888	-3.093	-3.042	3.024
<b>2</b> [W6, Asp61]	(III, IV, IV, IV)	( $\beta, \alpha, \beta, \alpha$ )	0.2	-3.899	3.072	-3.027	3.021
<b>3</b> [W6, Asp61]	(III, IV, IV, IV)	( $\alpha, \alpha, \beta, \beta$ )	2.3	3.901	3.145	-3.039	-3.072
<b>4</b> [W7, Asp61]	(III, IV, IV, IV)	( $\alpha, \beta, \beta, \alpha$ )	2.9	3.889	-3.095	-3.045	3.009
<b>5</b> [W7, Asp61]	(III, IV, IV, IV)	( $\beta, \alpha, \beta, \alpha$ )	3.1	-3.899	3.073	-3.029	3.006
<b>6</b> [W8, Asp61]	(III, IV, IV, IV)	( $\alpha, \beta, \beta, \alpha$ )	3.1	3.886	-3.091	-3.031	3.015
<b>7</b> [W8, Asp61]	(III, IV, IV, IV)	( $\beta, \alpha, \beta, \alpha$ )	3.3	-3.898	3.073	-3.014	3.010

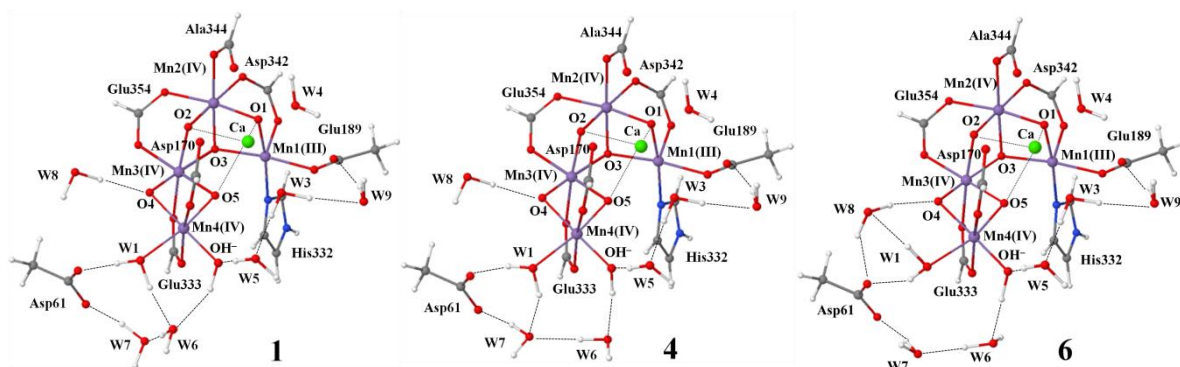


図 1. モデル **1, 4, 6** に見られる水素結合ネットワーク。W は水分子を表す。Mn・Ca・H・C・N・O 原子はそれぞれ紫・黄緑・白・灰・青・赤色の球で表現される。

つの Mn 原子の Mulliken のスピン密度値から個々の Mn の酸化状態を (Mn1, Mn2, Mn3, Mn4) = (III, IV, IV, IV) として明確に割り当てることができ、 $S_2$  状態の EPR 結果に一致する。

図 1 に  $\text{CaMn}_4\text{O}_5$  core とその周囲の水素結合ネットワークを示した。Mn4 原子には水分子 (W1) と  $\text{OH}^-$  が直接配位している。以前の  $S_2$  状態では W1 が [W8, Asp61] に水素結合していたが、新たに [W6, Asp61] および [W7, Asp61] と水素結合する構造が得られた。表 1 に示した相対エネルギー ( $E_{rel}$ ) から、[W6, Asp61] との水素結合様式をもつ構造 (**1, 2, 3**) が最も安定であり、順に [W7, Asp61] 様式をもつ構造 (**4, 5**) が 2.9–3.1 kcal/mol、報告した [W8, Asp61] 様式をもつ構造 (**6, 7**) が 3.1–3.3 kcal/mol ほどエネルギーが高くなる。我々は  $\text{OH}^- \rightarrow \text{W6} \rightarrow \text{W7} \rightarrow \text{Asp61}$  の水素結合ネットワークがプロトン移動・放出過程に関与しうると想定している [1]。W1 がその水素結合ネットワーク近傍に安定に配向することから、W1 もプロトン移動過程に関与しうると考えられる。

3 つの異なるスピン配列による相対安定性についても検討した。表 1 のモデル **1, 2, 3** の  $E_{rel}$  から、文献 [1] で報告した ( $\beta, \alpha, \beta, \alpha$ ) 配列より ( $\alpha, \beta, \beta, \alpha$ ) 配列の方が 0.2 kcal/mol だけ安定であり、( $\alpha, \alpha, \beta, \beta$ ) 配列が 2.3 kcal/mol ほど不利あることが判った。4 対 5 と 6 対 7 の比較からも ( $\beta, \alpha, \beta, \alpha$ ) 配列より ( $\alpha, \beta, \beta, \alpha$ ) 配列の方が 0.2 kcal/mol だけ安定であることが確認できる。

よって、( $\alpha, \beta, \beta, \alpha$ ) 配列をした W1  $\rightarrow$  [W6, Asp61] 水素結合様式をもつ構造が最適な  $S_2$  状態である。

## 参考文献

- [1] T. Ichino et al., *Bull.Chem.Soc.J.*, **2013**, 86, 479-491. [2] Y. Umena et al., *Nature*, **2011**, 473, 55-61.