

1P90 複数のプロトン放出サイトを有する分子 の酸解離定数の推定に関する理論的研究

(阪大院基礎工¹、理研²、CREST³)○馬場剛史¹、松井亨²、中野雅由¹、重田育照^{1,3}

Theoretical study on the pK_a estimation of molecules with plural protonation sites

○Takeshi Baba¹, Toru Matsui², Masayoshi Nakano¹, Yasuteru Shigeta^{1,3}

生体内で物質の電荷が変化することは機能を発揮する上で重要な役割を果たしている。例えば、その機能はタンパク質の安定性や酵素と基質間、生体内物質同士間の相互作用等の制御に現れる。生体内で物質の電荷が変化する要因としては以下の2つが考えられる。一つは、物質による電子の受け取り、もう一つは、物質からのプロトンの放出もしくは受容である。両過程ともに実験による直接観測が難しい現象である。生体内では呼吸鎖のようにプロトンが官能基を介して、アミノ酸の側鎖を移動する事例やセリンプロテアーゼのような酵素反応など様々な場面でプロトンの授受が生じている。したがって、生命科学において物質の重要な役割、つまり機能を明らかにするためには、まず物質における特定部位のプロトンの有無を明らかにすることが1つの課題であるということが言える。この課題を解決するための指標となる値が酸解離定数(pK_a)である。

これまで、理論研究では、この pK_a の値を算出するために、複数の手法が開発されている。現在よく使用されている手法が PROPKA などのような経験的パラメータを利用した手法である[1]。このプログラムは MD シミュレーションにおいてアミノ酸の初期構造を決定するためによく使用される。しかし、この手法は X 線結晶構造解析で得られたタンパク質のアミノ酸側鎖の pK_a 算出することに特化したプログラムであり、ヒスタミンなどの生理活性物質の pK_a を計算することは難しい。我々のグループでは、これまでの研究において量子化学計算に基づく官能基を利用した pK_a を算出する方法を開発した[2]。特に、生体内でも多くの役割を担っているアミノ酸残基や DNA や RNA の骨格である塩基について、精度のよい pK_a の値の算出に成功した[2]。

本研究ではこの開発した手法を生理活性物質、薬剤など低分子の系に適用範囲を拡張することに取り組んだ。ヒスタミンやアセチルサリチル酸などはタンパク質に比べれば、とても小さな分子である。しかし、これらの物質は脳内で薬理作用や神経伝達に非常に重要な物質である。さらに、このような低分子はタンパク質に比べ、様々な環境に曝される可能性があるため、周囲の影響を受けやすい。特にヒスタミンのような複数のプロトン脱離が可能な箇所を有する系の場合、それぞれの pK_a の値がどのように変化するかを明らかにすることは特に重要である。本研究では、官能基を利用した pK_a の算出方法を利用することによって、生理活性のある低分子化合物の pK_a 値の算出可能性について検討した。

【理論と計算手法】

pK_a は通常水溶液中での酸解離反応 (HA→H⁺+A⁻) の Gibbs energy の差 $\Delta G(\text{aq}) = G(\text{A}^-, \text{aq}) - G(\text{HA}, \text{aq}) + G_{\text{H}}$ で(1)のように書き下せる。

$$pK_a = \Delta G(\text{aq})/2.303RT \quad (1)$$

ここで R は気体定数、 T は絶対温度である。本研究ではプロトンのエネルギーを最初から分からないものとして定数 G_{H} とおく。また、水溶液中の化合物の Gibbs energy は連続誘電体モデル (PCM) と振動計算により導出可能とし、Gibbs energy に誤差を補正するスケールリングファクター s をかけて、 $s/2.303RT$ 、 $sG_{\text{H}}/2.303RT$ をそれぞれ k 、 C_0 とおくと式 (1) は

$$pK_a = k \{ G(\text{A}^-, \text{aq}) - G(\text{HA}, \text{aq}) \} + C_0 = k \Delta G_0 + C_0 \quad (2)$$

と近似できる。よって、 $\Delta G_0 = G(\text{A}^-, \text{aq}) - G(\text{HA}, \text{aq})$ と pK_a は線形関係にあたるので、計算した ΔG_0 と pK_a の実験値から k 、 C_0 をフィッティングすれば、他の化合物の $\Delta G(\text{aq})$ を計算で求めることで pK_a の算出が可能となる。本研究では、薬剤であるサリチル酸と生理活性物質であるヒスタミンを対象として計算を行った。なおこれらすべての計算は Gaussian09 を用いて B3LYP/6-31++G(d,p) レベルで行った。溶媒効果には CPCM/UFF を適用した。

【結果と考察】

1、サリチル酸

サリチル酸は COOH 基と OH 基の2種類を有していることから2段階のプロトン放出サイトがある(1段階目:COOH 基、2段階目:OH 基)。また、サリチル酸内における分子内水素結合を考慮すると、図1上段のように a (あり)、b (なし)の構造が想定される。今回、これらの構造に対して pK_a を見積もった。

計算の結果、分子内の水素結合の影響により a の方が 6 kcal/mol 程度安定であった。a の構造では

pK_a は 2.69 と 13.19、b の構造では pK_a は 4.10 と 10.76 と算出された。実験値は 2.97 と 13.4 であることから、a の構造を支持している。a と b で大きく値が異なる理由としては、水素結合の有無が挙げられる。a の構造では、OH 基とカルボキシル基の酸素の間に水素結合が存在し C=O が引っ張られることでカルボキシル基の OH の水素が抜け易くなり、 pK_a は、その他のカルボキシル基をもつ化合物（例えば酢酸の pK_a は 4.76）よりも著しく小さくなる。また、脱プロトン状態でも水素結合を形成している。このような形になった場合、OH 基のプロトンが脱離しにくくなり、第 2 段階目での pK_a が大幅に上昇する原因となった。一方で、b の構造では各々の官能基が独立に存在しているために、安息香酸($pK_a=4.20$)とフェノール($pK_a=10.02$)と似た値になった。これらの結果から分子内の水素結合の形成により pK_a の値が 2.5 程度変化しうることが示唆された。

2、ヒスタミン

ヒスタミンはイミダゾール基とアミノ基を有する生理活性物質であり、図 1 下段のようにプロトン放出部位の候補を 3 カ所有している。実験から明らかにされている値としては $pK_{a1}=6.04$ 、 $pK_{a2}=9.79$ 、 $pK_{a3}>15$ である。本研究ではこのようにプロトン放出候補の位置が離れた系について、開発した手法が適用可能かを調べた。ヒスタミンの場合、プロトン放出経路として 6 種類予測されるが、本研究では主要な放出経路 $\delta \rightarrow a \rightarrow \epsilon$ の順 (pK_a が低い順)にプロトンが放出されることが明らかとなった。しかし、構造最適化で得られた構造を参照して、推定された pK_a に関しては、5.54 と、1 段階目の pK_a 値を過小評価してしまった。これは一部、 ϵ 位から放出される経路($\epsilon \rightarrow a \rightarrow \delta$)が含まれている可能性があり、ボルツマン重みを考慮するとそれぞれ 5.67, 9.67 という値になる。また、ヒスタミンの場合、サリチル酸の構造のように、分子内の相互作用、構造の揺らぎの効果を現在の結果では考慮していない。特に 1 段階目の HA 構造（たとえば a と δ が近づいた構造など）について影響が予測される。これに関してはヒスタミンの各プロトン化状態の構造の配座解析を行い、ヒスタミン自身の構造アンサンブルの影響効果検討することで検討する。なお結果については当日報告する。

表 1 フィッティングパラメータの値

Fitting Parameter	k^a	C_0
COOH	0.2585	-68.8128
NH ₃	0.4350	-109.4141
Phenol-OH	0.2167	-53.5087
Imidazole-NH	0.4353	-112.6886

^a Unit of k is 1/kcal mol⁻¹

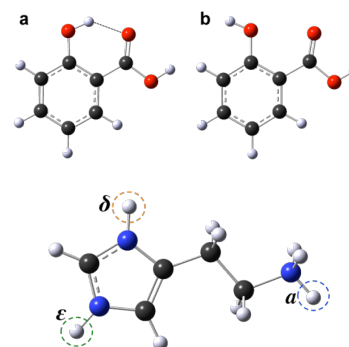


図 1 サリチル酸およびヒスタミンの構造

表 2 ヒスタミンの pK_a の推定

	1 st deprotonation		2 nd deprotonation		3 rd deprotonation	
	ΔG_0	pK_{a1}	ΔG_0	pK_{a2}	ΔG_0	pK_{a3}
δ	271.59	5.54	a	274.02 9.79	ϵ	298.95 17.45
δ	271.59	5.54	ϵ	295.01 15.73	a	277.96 11.50
ϵ	272.72	6.03	a	273.06 9.37	δ	298.78 17.37
ϵ	272.72	6.03	δ	293.88 15.24	a	277.96 11.50
a	269.93	8.01	δ	275.68 7.32	ϵ	298.95 17.45
a	269.93	8.01	ϵ	275.85 7.39	δ	298.78 17.37

【参考文献】

- [1] M.H.M. Olsson et al., J. Chem. Theoret. Comput., 7 (2011) 525.
- [2] T. Matsui, T. Baba, K. Kamiya and Y. Shigeta, Phys. Chem. Chem. Phys., 14 (2012) 4181.