

水表面の構造と変角振動スペクトルの分子動力学研究

(東北大院理¹, 富山大院理工², 京都大 ESICB³) ○田中翔悟¹・石山達也²・森田明弘^{1,3}

Molecular dynamics study of structure of the water surface and the water bending mode

(¹Graduate School of Science, Tohoku University, ²Graduate School of Science and Engineering, University of Toyama, ³ESICB, Kyoto University) ○Shogo Tanaka¹, Tatsuya Ishiyama², Akihiro Morita^{1,3}

【序】水表面の SFG スペクトルは、従来主に O-H 伸縮振動が研究されてきた。O-H 伸縮振動は水素結合を敏感に反映するが、分子内・分子間振動カップリングの影響が大きく、その配向解析は複雑になる問題がある。一方変角振動はそのような影響が比較的少なく、分子の配向構造に関して、O-H 伸縮とは違った情報を与えることが期待できる。また水の変角振動の倍音は O-H 伸縮振動の基音と重なるため、伸縮振動の緩和のチャンネルとしても重要な役割を持っている。

実験的に水の変角振動領域の SFG スペクトルの測定は困難であったが、2012年に水の変角振動領域の強度スペクトルが初めて報告された[1]。そこで我々は位相情報を含む $\chi^{(2)}$ の虚部 $\text{Im}\chi^{(2)}$ を含めて、そのスペクトルを解明することを目的とした。水の変角振動領域の $\text{Im}\chi^{(2)}$ は、分子動力学 (MD) シミュレーションの報告例があるが [2]、その結果は理研の田原グループによる実験結果とは定性的に異なるものであった。そこで今回、我々がこれまでに開発してきた水のモデルを用いて、界面での水の変角振動スペクトルを正しく再現し、その構造情報を明らかにした。

【計算方法】 MD シミュレーションでは振動かつ分極水モデル(CRK モデル)を用いた[3]。温度 298K で水分子 500 個を $30\text{\AA} \times 30\text{\AA} \times 150\text{\AA}$ のシミュレーションセルを準備し、中央に液膜を生成させる方法により界面を生成させた。また、Morita-Hynes の時間相関関数法によりスペクトルを計算した[4]。

計算によって得られたスペクトルを水素結合の数によって分解し、スペクトルの帰属を行った。以下では両方の水素が水素結合している水分子を 2DH、片方の水素のみ水素結合している水分子を 1DH、全く水素結合していない水分子を 0DH と呼ぶ。さらにスペクトルを生じる界面領域を同定するため、 $\chi^{(2)}$ の寄与を界面垂直の深さ方向に分解する解析も行った。また、界面の水の配向と $\text{Im}\chi^{(2)}$ の符号についての解析も行った。

【結果】 MD 計算の結果は、変角振動領域全体にわたって $\text{Im}\chi^{(2)}$ が正のバンドを与え (図 1 黒線)、これは近年の田原らの実験結果をよく再現した。図 1 の水素結合の数による分解によると、1DH や 0DH の負の寄与が 2DH の正の領域に打ち消されていることがわかる。この結果は全体のスペクトルは 2DH による寄与が大きいことを表している。2DH の $\text{Im}\chi^{(2)}$ が正のピークを持っていることから、水の変角振動領域におけるスペクトルは下向きの配向が支

配的であることがわかる。

得られた元のスペクトルを深さ方向に分解したグラフが図2である。グラフを見ると Gibbs 界面より1Å気相側から正のバンドが観測でき、深くなるにつれ高波数側にシフトしていく様子が見られる。このことから表面第一層の水は低波数側に寄与し、第二層第三層などの水は高波数側に寄与することがわかった。

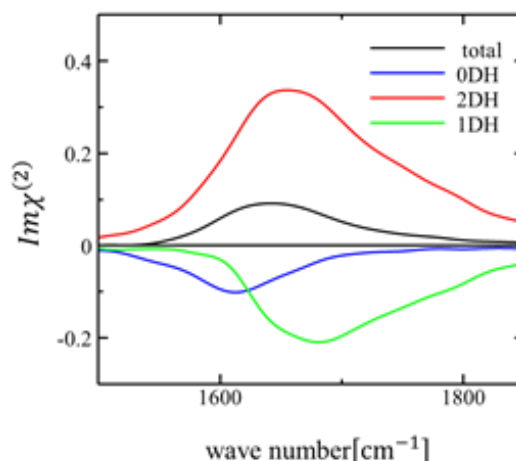


図1 変角領域で計算された ssp の $\text{Im}\chi^{(2)}$ スペクトル, および水素結合数により分解したスペクトル

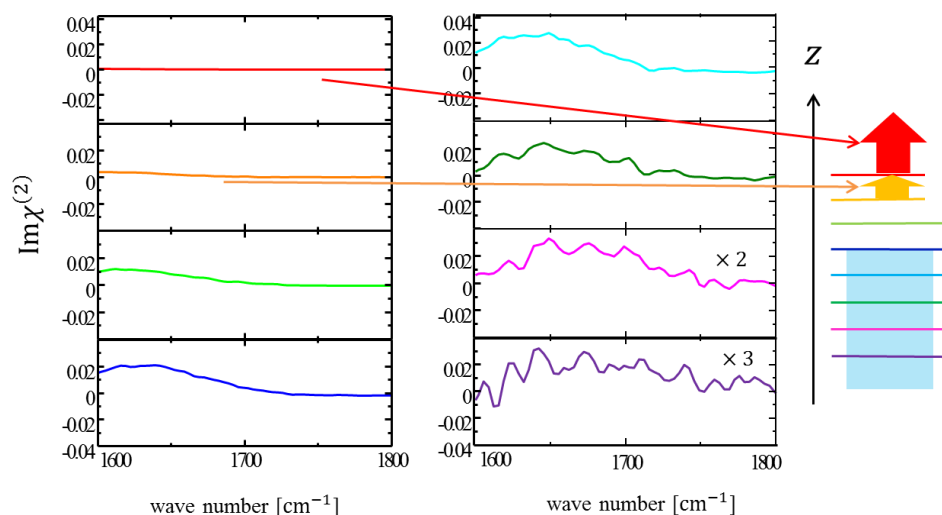


図2 変角領域の $\text{Im}\chi^{(2)}$ スペクトルを深さ方向に分解した結果. 各パネルは, Gibbs 面を $Z=0$ として, $Z > 3\text{\AA}$ (赤), $3\text{\AA} > Z > 2\text{\AA}$ (オレンジ), ..., $-3\text{\AA} > Z > -4\text{\AA}$ (紺) の各深さ領域からの寄与を示す.

【謝辞】

本研究にあたって, 理研の田原分子分光研究室との協力のもと行われた. その実験データと有益な議論に感謝する.

【参考文献】

- [1] M. Vinaykin and A. V. Benderkii, *J. Phys. Chem. Lett.* **2012**, *3*, 3348.
- [2] Y. Nagata et al. *J. Phys. Chem. Lett.* **2013**, *4*, 1872.
- [3] T. Ishiyama and A. Morita, *J. Chem. Phys.* **2009**, *131*, 244714.
- [4] A. Morita and J. T. Hynes, *J. Phys. Chem. B.* **2002**, *106*, 673

2P082

DFT 計算による色素増感太陽電池 Ru 色素の NCS 基を介した TiO₂ 表面吸着構造の安定性の比較

(NIMS MANA¹、JST-CREST²、京大 ESICB³、JST-PRESTO⁴)

○大谷優介^{1,2}、袖山慶太郎^{1,3}、韓礼元^{1,2}、館山佳尚^{1,2,3,4}

DFT study on stability of the adsorption structure of Ru dye on TiO₂ via NCS group for
dye-sensitized solar cell applications

(NIMS MANA¹、JST-CREST²、ESICB Kyoto Univ.³、JST-PRESTO⁴)

Yusuke Ootani^{1,2}、Keitaro Sodeyama^{1,3}、Liyuan Han^{1,2}、Yoshitaka Tateyama^{1,2,3,4}

【緒言】

色素増感太陽電池(Dye-sensitized Solar Cell : DSC)は半導体表面に塗布した色素が光を吸収し、励起した色素が電子を半導体へ注入することで発電する太陽電池である。従来のシリコン型太陽電池よりも安価に大量生産が可能であり、次世代の太陽電池としてその実用化が期待されている。これまで DSC のエネルギー変換効率向上に向けて様々な色素が開発されてきたが、中でも Ru 色素は高いエネルギー変換効率を発揮する色素として広く研究されてきた (図 1)。一般的に Ru 色素は COOH 基を介して吸着し、NCS 基は溶液やレドックスメディエータに接触しているとされている。電子を注入に関わる

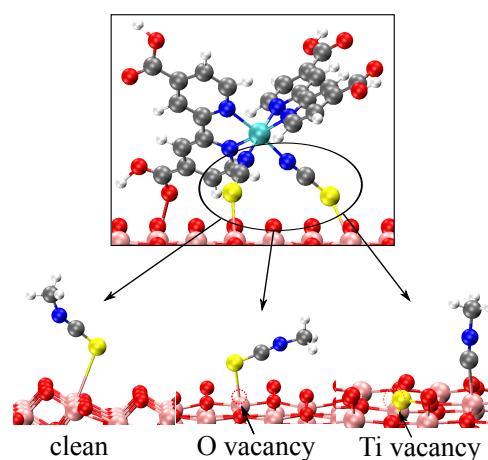


図 1. NCS 基を介して吸着する Ru 色素(N3)の模式図と NCS 基の吸着構造

LUMO は COOH 基を含むポリピリジル配位子に、レドックスメディエーターから電子を受け取る HOMO は NCS 基に広がっているため、この吸着構造はスムーズな電子移動過程にとって重要となる。多くの実験的、理論的研究において COOH 基が表面へ吸着するとしている一方で、一部の NCS 基が半導体である TiO₂ 表面に吸着しているという報告がある¹⁻³。これらの報告は主に X 線光電子分光スペクトル(XPS)の測定によるものであり、NCS 基の S 原子の内殻準位のシフトが観測されている。NCS 基の吸着は DSC のエネルギー変換効率を下げる要因となる。しかし、NCS 基の吸着は報告数が少ないことから実際に吸着しているのかは明確でなく、色素設計の際にも考慮されてこなかった。また、NCS 基の吸着サイトや吸着構造のなどの詳細な解析も報告されていない。

本研究では Ru 色素の NCS 基が TiO₂ 表面上へと吸着するかを調べるために、モデル分子(CH₃NCS)を用いて、DFT 計算で NCS 基の TiO₂ 表面吸着構造の探索を行った。また XPS の測定結果をアサインするために、吸着における S 原子の内殻電子束縛エネルギー(Core Electron Binding Energy : CEBE)の化学シフトの計算を行った。

【手法】

CH₃NCS のアナターゼ TiO₂(101)表面への吸着構造の計算は周期境界条件(Periodic boundary condition : PBC)の下で行った。NCS 基の吸着サイトとして表面 Ti、O サイト、O 欠損(V_O)、T(V_{Ti})欠損サイトを考慮した。また、NCS 基の吸着エネルギーと比較するために Ru 色素の COOH 基を模した Isonicotinic acid (PyCOOH)と DSC に用いられる溶媒、アセトニトリル(AN)の吸着エネルギーを計算した。これらの PBC 計算には CPMD を用いた。CEBE の化学シフトは(TiO₂)₃₈ クラスタモデルを用いて行った。CEBE は Kohn-Sham 軌道エネルギーで近似し、化学シフトは対象とする系と参照系との差 (= CEBE_{target} - CEBE_{reference})として計算した。CEBE の計算には Gaussian09 を用いた。

【結果と考察】

NCS 基は O サイトには吸着せず、Ti、V_O、V_{Ti} 欠損上へと吸着した。吸着構造を図 1 に示す。Ti 上へは 1.4 kcal/mol の吸着エネルギーで吸着した。V_O 上では隣の Ti 原子へと吸着し、V_{Ti} 上では S 原子が解離し、周囲の酸素原子と結合して、CH₃NC は Ti サイトへと吸着した。安定

表 1. S 原子の CEBE 化学シフトの計算値と実験値 (eV)

	Our results (CH ₃ NCS)			Exptl. (Ru 色素)
	Ti	V _O	V _{Ti}	
1s	0.43	1.17	6.98	8.8 ³
2p	0.48	1.22	6.23	0.7–0.6 ^{1,2}

構造が得られた 3 つの吸着様式に対して、S 原子の CEBE 化学シフトの計算を行った。表 1 に計算結果と対応する実験値を示す。2p レベルの結果を比較すると、Ti 上でのシフト値 0.48 eV が実験値と一致している。また、V_O 上では 1.22 eV と、実験値と同程度のシフトが得られた。Ti 上の吸着エネルギー(1.4 kcal/mol)が小さいことを考慮し、観測された 2p レベルの XPS シフトを Ti、V_O への吸着へアサインした。一方、1s レベルでは V_{Ti} 上のシフト 6.98 eV が実験値と同程度であることから 1s レベルの XPS シフトを V_{Ti} にアサインした。最後に、吸着エネルギーの比較を行った。COOH 基、AN の吸着エネルギーは 14.6、9.2 kcal/mol であり、NCS 基(1.4kcal/mol)よりも大きく NCS 基の吸着は少数であること確認された。

以上の結果から、真空中においては XPS 測定の実験が示すように NCS 基の吸着は少数存在し、溶媒中では AN の吸着と競合するため、ほぼ存在しないということがわかった⁴。

【参考文献】

- [1] E. M. J. Johansson *et al.*, *J. Phys. Chem. B* **2005**, 109, 22256.
- [2] L. C. Mayor *et al.*, *J. Chem. Phys.* **2008**, 129, 114701.
- [3] M. Honda *et al.*, *J. Phys. Chem. C* **2013**, 117, 17033.
- [4] Y. Ootani, K. Sodeyama, L. Han, Y. Tateyama, submitted.

2P083

連続2残基 $^{13}\text{C}=\text{O}$ ダブルット形状とペプチド主鎖構造の関連

(東北大院・薬) ○岡部 仁美, 平松 弘嗣, 中林 孝和

Relationship between infrared $^{13}\text{C}=\text{O}$ doublet band and residue-level conformation of peptide with isotope labels at consecutive two residues

(Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Tohoku Univ.)

○Hitomi Okabe, Hirotsugu Hiramatsu, Takakazu Nakabayashi

【序】

タンパク質が持つ固有の機能を理解するためには、構成するポリペプチドの高次構造の解明が必須である。本研究では、赤外吸収分光法を用いたペプチド主鎖構造の新規解析手法として連続2残基 $^{13}\text{C}=\text{O}$ 同位体ラベルペプチド主鎖構造解析法を考案した。さらに合成したモデルペプチドの赤外吸収スペクトルの実測結果と比較することにより、妥当性を検証した。

本研究では、ペプチド主鎖構造の情報を含む $\text{C}=\text{O}$ 伸縮振動バンドについて、残基ごとの解析を可能にするために、連続2残基 $^{13}\text{C}=\text{O}$ 同位体ラベルを行った。 $^{12}\text{C}=\text{O}$ を $^{13}\text{C}=\text{O}$ でラベルした残基の $\text{C}=\text{O}$ バンドは、同位体効果により低波数シフトする。さらに連続した2残基を $^{13}\text{C}=\text{O}$ ラベルすると、ラベル残基間で相互作用が起これり $^{13}\text{C}=\text{O}$ バンドはダブルットになる。これにより、従来よりも詳細な構造解析が可能になる。すなわちダブルットの強度比と分裂幅は2つの $^{13}\text{C}=\text{O}$ の二面角によって変化すると期待され、ダブルットの形状から二面角を特定できると考えられる。

【方法】

1. Gly-Gly-Gly の連続2残基 $^{13}\text{C}=\text{O}$ ダブルットのシミュレーション

Gaussian09 (RB3LYP/6-31+G**) を用い構造最適化したトリペプチド Gly-Gly-Gly に関し、二面角 (ϕ, ψ) のみを 10° ずつ変化させた構造ファイルを作成した。2つのアミド I 振動子間で遷移双極子相互作用のみが生じると仮定して F 行列を求めた。また、同位体効果を考慮して G 行列を求めた。GF 行列の固有値と固有ベクトルから振動スペクトルを計算し、ダブルットの分裂幅 (振動数差) と強度比 (ダブルット全体の強度に対する高波数側のバンドの強度) の値を計算した[1]。

2. モデルペプチドの赤外吸収スペクトル測定

6つのペプチド (Table 1 ①~⑥) の $^{13}\text{C}=\text{O}$ ラベル体と非ラベル体の赤外吸収スペクトルを重水溶媒中で測定した。側鎖などの吸収バンドの寄与を除き解析を容易にするため、 $^{13}\text{C}=\text{O}$ ラベル体と非ラベル体の差を求めた。④⑤に関してはランダム構造 (⑥) の寄与も差し引いた。得られた差スペクトルの 1575 cm^{-1} 付近に現れる $^{13}\text{C}=\text{O}$ ダブルットバンド形状の解析を行った。

Table 1 用いたモデルペプチド及び二次構造 (赤字はラベル化した残基、下線は PDB ID)

アミロイド β (25-35)	<u>2LMN</u> *	
① $^{25}\text{GSNKGA}$ AI IGLA 35	(-137.2°, 150.5°)	平行 β シート**
② $^{25}\text{GSNKGA}$ AI IGLA 35	(-108.8°, 124.0°)	(線維状態[2])
③ $^{25}\text{GSNKGA}$ II IGLA 35	(-147.4°, 114.5°)	
α -lactalbumin (101-111) 変異体	<u>2DX2</u>	
④ $^{101}\text{INYW}$ LA HAKAG 111	(-80.6°, -15.2°)	3^{10} ヘリックス
⑥ $^{101}\text{INYW}$ LA HAKAG 111		ランダム
Staphylococcal nuclease (97-109)	<u>2FX2</u>	
⑤ ^{97}KMN EA LRQGLA 109	(-97.9°, -34.6°)	α ヘリックス

*A β (1-40) の二面角の値を参考に行っている

**ラベル体と非ラベル体をモル比 1:5 に混合して作成

【結果・考察】

Gly-Gly-Gly に関して、計算により得た分裂幅及び強度比の (ϕ, ψ) プロットを Fig. 1A, B に示す。通常のペプチドがとりうる二面角の許容領域 $\{\phi < -100^\circ, \psi > -50^\circ\}$ において、分裂幅プロットでは ψ 依存性が見られた (ψ が大きいほど分裂幅が小さく、 ψ が小さいほど分裂幅が大き)。よって、分裂幅より ψ の値を決定することができる。強度比プロットでは、全ての象限に同心円状の等値線が見られた。これはある ψ の値に対して、許容領域において ϕ の値を等値線上で 1 つに限定できることを示す。以上により、ダブルット形状に基づく二面角決定が可能であると考えられる。

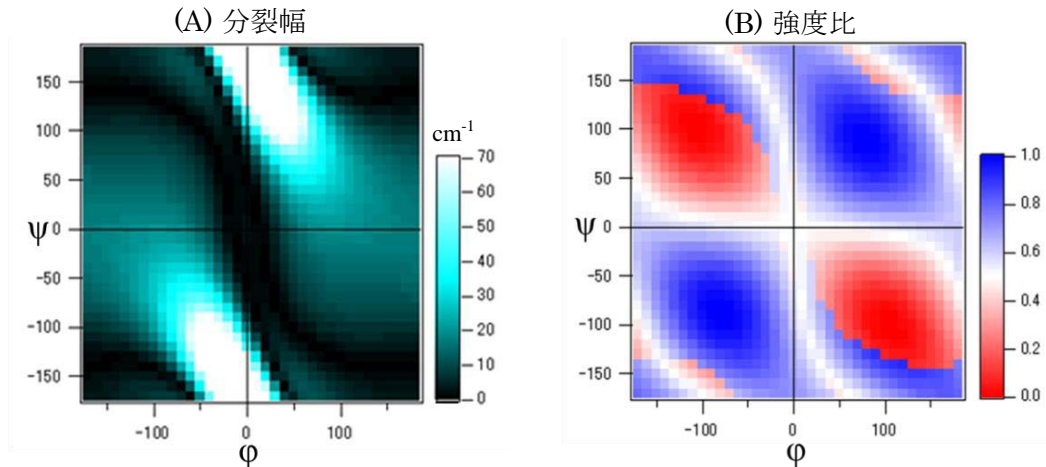


Fig. 1 Gly-Gly-Gly の分裂幅プロット (A) と強度比プロット (B)、値のスケールバーを各々右に示す

実測した赤外吸収の差スペクトル (Fig. 2 黒の実線) において、gauss 関数を用いてフィッティングを行った (Fig. 2 赤色の点線)。1550~1600 cm^{-1} の正の吸収について、①④⑤では 2 本、②③では 1 本のバンドで実測スペクトルを再現した。 β シート構造のうち②③では、第 2 のバンドが検出されなかった。二面角から計算される分裂幅は 5 cm^{-1} 程度 (Fig. 1 A)、強度比は 0.1 以下 (Fig. 1 B) と小さい。上記の結果から予想されるように、検出下限を超えている可能性がある。一方、①は β シートでありながら②③と異なる挙動を示した。この結果は、①の二面角 $(\phi, \psi) = (-137.2^\circ, 150.5^\circ)$ (Table 1) において、強度比が大きく変化するという計算値 (Fig. 1 B) と一致する。ランダム構造 (⑥) では幅の広いバンドが検出された。この特徴は二面角が不定であるためにダブルット形状が定まらなかったことに由来する。⑤のダブルット形状は計算値と異なり、2 本のバンドの中で高波数のバンドの相対強度が減少した。これはラベルした残基に隣接する残基の影響などを考慮することにより、計算値を改善できる可能性がある。

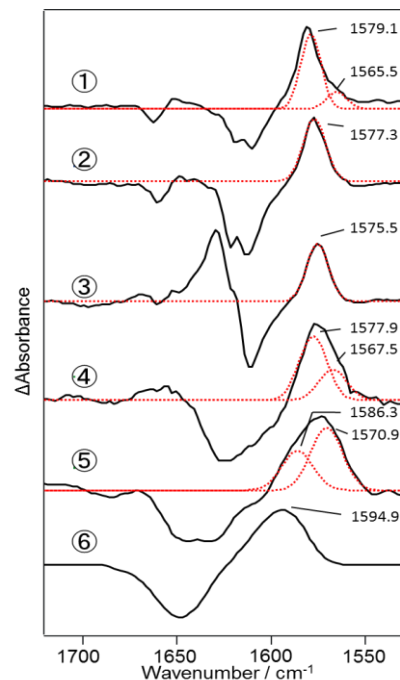


Fig. 2 スペクトル解析結果、黒実線：実測値
赤点線：フィッティングに用いたバンド

2P084

分子動力学法による Ferredoxin - NADP⁺- Reductase の構造解析
(金沢大院・自然) ○菅野 龍馬, 井田 朋智, 瀬尾 悌介, 水野 元博

Structural Analysis of in Ferredoxin -NADP⁺- Reductase by Molecular Dynamics Simulation

(Graduate School of Natural Science and Technology, Kanazawa University)

○Ryoma Kanno, Tomonori Ida, Daisuke Seo, Motohiro Mizuno

【序論】

フラビン-ニコチンアミドの電子伝達機構を有するフラビンタンパク質はヒトの体内やシアノバクテリア、植物などに存在し、自然界に広く分布する多様な生物の酸化還元代謝に関与する酵素である。NADP 酸化還元酵素である Ferredoxin-NADP⁺-Reductase(EC.1.18.1.2, FNR)は、植物やシアノバクテリアに関する非循環型光合成反応における電子伝達機構を担う事から、FNR に対する知見が様々な分野において報告されている。FNR の機能と構造に関して、X 線構造解析により、FNR の種の間で共通する構造が解明されており、共通構造に対する変異導入実験により、その重要性などが示唆されている。これらの実験から、共通構造の中で、FNR の補酵素である Flavin Adenine Dinucleotide(FAD)のイソアロキサジン環の *si* 面と *re* 面、双方に位置する Tyrosine(TYR)が種に関係なく共通する構造であり、2つの TYR が FAD のドメインとなることが報告されている [1]。特に、*si* 面の TYR と FAD のイソアロキサジン環の距離や環の傾きが、特異的な配置を取るにも関わらず、異なる起源でも共通して見られる構造であることから、FNR において重要な因子であると考えられており、残基の芳香属性が酵素活性への影響を与えるとも考えられている[1,2]。一方、*re* 面の TYR に関しては、SER 変異体に関し、FAD の還元速度は減少するものの、NADP の還元速度は上昇することが報告されている。その理由として、野生型において、*re* 面側の TYR308 が FAD-NADP 結合部位に stack し、NADP の結合を阻害するが、SER308 では stack を形成せず、NADP が優位に結合できるためと言われている[3]。しかし、この双方の TYR の構造と酵素活性の関係性については明確となっていない。そこで本研究では分子動力学法を用い、*in vitro* 条件下における野生型および変異型の FNR の構造を明確にするとともに、NADP 結合前—結合後及び野生型—変異型間の構造の差から、野生型の酵素活性の機構及び、変異型の酵素活性の変化に対する知見を得る。

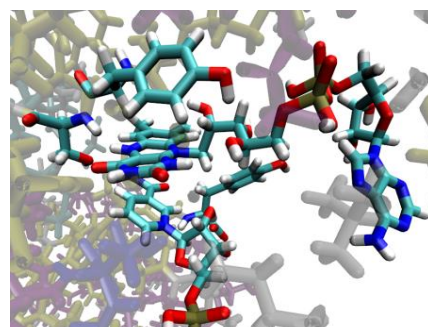


Fig.1 FAD 周辺の構造

【計算方法】

MD 計算の初期構造として Wild Type pea-FNR 1 ユニットの X 線構造解析結果を用い、溶媒に TIP3P 水分子を用いた。変異体 FNR の初期構造は、Wild Type の X 線構造より Amber tool を用いて作成した。基質である FAD の電荷計算には Hartree-Fock/6-31*を選択し、Gaussian 09 にて行った。また、MD 計算には Amber 12 を用い、力場は learprc.ff12SB 及び learprc.gaff とし

た。まず、NPT アンサンブル条件下において、時間刻み 2fs で 5,000,000 Steps アニメーションを行った後、NVT アンサンブルにて構造データをサンプリングした。

【結果】

NADP 結合前後での構造解析の結果、NADP 結合後にヘリックスの N 末端の正電荷が NADP に結合するため、270-285 残基で構成されるヘリックスの挙動が変化し、また、NADP 結合残基が隣接する 168-180 ヘリックスにおいても挙動の違いが確認された。このことから、ヘリックスの構造変化は FNR の酵素活性に影響を与えるのではないかと予測される。

野生型-Y308S 変異型間の酵素活性の変動において、すでに報告されている stack した TYR308 残基の NADP 結合阻害は、その配置と Y308S 変異体との 308 残基の揺らぎの差から確認することができた。また、2つのタイプ間での挙動の違いを確認する為、各残基の主鎖 (CA,C,N 原子) の RMSF(Root mean square fluctuation)を測定した(Fig.2)。野生型では、NADP 結合に参与する 2つのヘリックス(168-180,270-285)の揺らぎに関し、N 末端側の RMSF は小さく、C 末端側の RMSF は大きくなることがわかった。このことから、NADP が結合する N 末端は、NADP 結合前から束縛を受けていると考えられる。

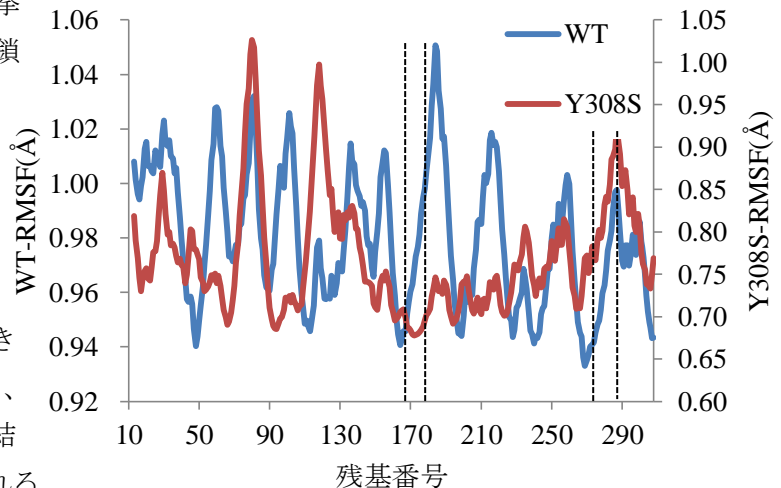


Fig.2 全残基の RMSF

Y308S においては、末端ではなく、ヘリックス内に RMSF の小さな残基を含む場合や、RMSF が極小値を取る残基がヘリックスから離れているなど異なる挙動を示した。

また、局所構造での変化を確認するため、野生型及び Y308S 変異体において、FAD-308 残基の重心原子間の距離と FAD-ligand 残基間の水素結合距離を測定したところ(Table1)、Y308S において SER308 は stack 結合を形成できないため、FAD との距離が大きく開き、ligand としての機能を失うが、それ以外の FAD の ligand となる残基との結合距離に大きな変化は見られず、FAD 周辺での構造変化は小さいと予測される。

Table 1 100ns 区間における FAD-308 残基の重心平均距離及び FAD-ligand 残基との水素結合平均距離。括弧内はその標準偏差を示す。

308 残基	LEU88O(Å)	TYR89OH (Å)	SER90N(Å)	CYS108O(Å)	LYS110N(Å)	
Wild	6.42(0.53)	2.91(0.13)	2.72(0.16)	3.64(0.15)	2.94(0.13)	3.48(0.32)
Y308S	8.53(1.07)	2.75(0.12)	2.66(0.13)	3.05(0.16)	3.21(0.16)	3.59(0.29)

【参考文献】

[1] Arakaki, A.K., Ceccarelli, E.A., and Carrillo, N.(1997) *FADEB J.* 11, 133-140
 [2] Arakaki, A.K., Orellano, E.G., Calcaterra, N.B., (2001) *J. Biol. Chem* 276, 44419-44426
 [3] Nora, B.C., Guillermo, A.P., Elena, G.O., Eduardo, A.C.,(1995) *Biochemistry* 34, 12842-12848

2P085

高酸素分圧下におけるヒトヘモグロビンに対する 酸素分子の非部位特異的アロステリック効果

(名大院情報科学^{*}、CREST-JST^{**}) ○高柳 昌芳^{*,**}, 栗崎 以久男^{*}, 長岡 正隆^{*,**}

Non-site-specific allosteric effect of oxygen on human hemoglobin under high oxygen partial pressure

(Graduate School of Information Science, Nagoya University^{*}, CREST-JST^{**})

○Masayoshi Takayanagi^{*,**}, Ikuo Kurisaki^{*}, Masataka Nagaoka^{*,**}

【背景】 タンパク質アロステリーは生命活動にとって不可欠である。酸素分子 (O₂) を運搬するタンパク質であるヒトヘモグロビン (HbA) は4つのサブユニットで構成されており、2つの四次構造状態 (O₂ 親和性が高い R 状態、O₂ 親和性が低い T 状態) によるアロステリック制御を示し、タンパク質のアロステリック構造制御のパラダイムとなっている。特に、基質分子である O₂ が「部位特異的な」ホモトロピックエフェクターとして振る舞う、つまり各サブユニットのヘム鉄に O₂ が逐次的に結合することで、O₂ を結合しやすい R 構造をますますとりやすくなる、とする考え方が長い間広く受け入れられている。この部位特異的制御は、ヘムの構造が O₂ 結合によりドーム型から平面型に変化し、この変形がサブユニット全体に伝わることで三次構造変化を起こし、最終的に T 構造を安定化させるサブユニット間結合 (水素結合、塩橋) を切断することで四次構造変化に繋がるものと考えられている。しかしながら我々は、高 O₂ 分圧環境における HbA の MD 計算結果から、部位特異的なアロステリック効果が必ずしも唯一のメカニズムではなく、「非部位特異的な」アロステリック効果が存在する可能性を示した。[1]

【計算手順】 水分子 (TIP3P) 約 12,000 分子の周期境界溶媒ボックス内に T 構造四量体 HbA (O₂ 未結合の HbA、PDB ID: 2DN2) と 120 分子の O₂ を配置し初期構造を生成した。HbA 構造を拘束したまま高温条件 (750 K、NVT 一定) で 300 ps の MD 計算を実行することでランダムな O₂ 分布を生成し、次いで生体内と同様の条件 (310 K、1 atm、NPT 一定) で 100 ps の MD 計算による溶媒平衡化を行った。そして HbA の拘束を解除して 310 K、1 atm、NPT 一定条件で 8 ns の MD 計算を実行した。以上の平衡化を含む MD 計算を異なる初期速度から 128 本実行し、8 ns × 128 MD の MD トラジェクトリデータを得た。なおヘム鉄への O₂ 結合は人工的に無視しており、ヘムの構造は常に 5 配位ドーム型構造を保っている。また対照計算として O₂ を含まない水溶媒中での MD 計算 8 ns 128 本も同様の手順により実行した。

【結果】 まず T-R 間四次構造変化を定量化する指標として、四量体 HbA のサブユニット重心 4 点 (α_1 、 $\alpha_1\beta_1$ 、 $\alpha_2\beta_2$ 、 α_2 の重心) により定義される二面角 χ (図 1) を利用できることを確認した。結晶構造における χ は初期構造である O₂ 非結合時の T 構造では -99.5°、O₂ 結合時の R 構造では -89.0° の値をとる。T から R への四次構造変化を示した MD トラジェクトリにおける χ の変化は、switch region における β_2 His97 側鎖の α_1 Thr41- α_1 Pro44 間から α_1 Thr38- α_1 Thr41 間への移動および、 α_1 Tyr42- β_2 Asp99 等のサブユニット間塩橋の切断と連動しており、 χ が四次構造の指標であることを確認した。

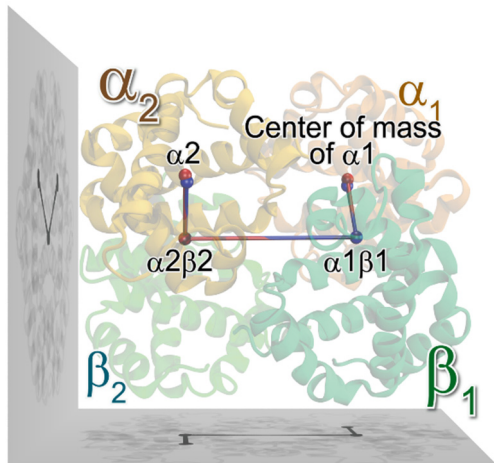


図1. 四次構造の指標となる HbA の二面角 χ をサブユニット重心により定義。青色は T 構造での $\chi = -99.5^\circ$ 、赤色は R 構造での $\chi = -87.8^\circ$ を示す。

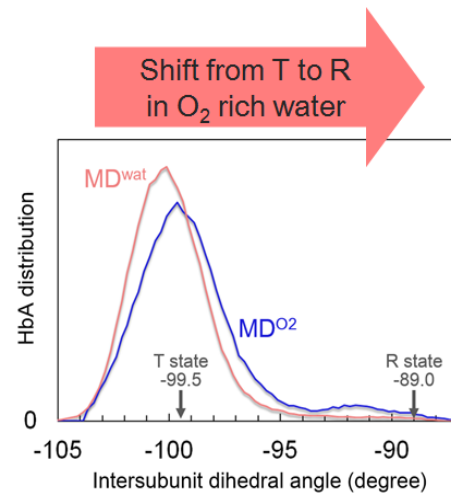


図2. 128 MD から算出された二面角 χ の分布。赤色は水溶媒中、青色は高 O_2 濃度溶媒中での分布。

水溶媒中 MD (MD^{wat}) および高濃度 O_2 溶媒中 MD (MD^{O_2}) の各 128 本の MD トラジェクトリに対し 7-8 ns の間における χ の分布を算出した(図2)。T 構造付近における MD^{O_2} の分布は MD^{wat} の分布よりも R 構造側に偏っている。また R 構造に変化したトラジェクトリ (7-8 ns での χ の平均値が -95° 以上と定義) は 128 本中 MD^{wat} で 4 本、 MD^{O_2} で 10 本であり、 MD^{O_2} で R 構造側に小さなピークが見られることと対応している。この結果は、高 O_2 濃度溶媒中では HbA の四次構造の平衡が R 構造側に偏ることを示している。

ヘムへの O_2 結合無しに R 構造への偏りがみられた結果は、非部位特異的なアロステリック制御の存在を示唆している。考えられる仮説としては内部効果と表面効果が考えられる。内部効果は、 O_2 侵入が HbA サブユニットの三次構造変形を引き起こし、これが四次構造変化に繋がるとするものである。実際に HbA への O_2 侵入経路解析で示したように 8 ns の間に多数の O_2 分子がヘムポケット等の内部空洞に侵入する[2]ことに加え、ミオグロビンにおいて空洞内リガンド移動が三次構造変化を引き起こすことが確認されている [3-7]。また表面効果は、サブユニット表面付近の水分子の挙動が変化することで、サブユニット間塩橋が切断されやすくなるとするものである。タンパク質表面に位置する水分子は低い拡散係数を有する等バルク層の水とは異なる性質を有しており[8]、また二量体ヘモグロビンにおいてサブユニット間に存在する水分子の数が四次構造変化と連動して変化する[9]ことから、四次構造変化と表面水分子の関連が示唆される。ゆえに、 O_2 の存在が HbA 表面近傍の水素結合ネットワークを乱すことで水分子の性質を変え、四次構造変化に繋がっている可能性が考えられる。今回得られた非部位特異的な効果は、従来から受け入れられている部位特異的な効果と相補的な役割を果たすはずであり、HbA のアロステリック制御を分子論的視点から包括的に理解するためのマイルストーンになると期待している。

【参考文献】 [1] Takayanagi M., Kurisaki I., Nagaoka M., *Scientific Reports*, 4, 4601 (2014). [2] Takayanagi M., Kurisaki I., Nagaoka M., *J. Phys. Chem. B*, 117, 6082 (2013). [3] Takayanagi M., Okumura H., Nagaoka M., *J. Phys. Chem. B* 111, 864 (2007). [4] Takayanagi M., Iwahashi C., Nagaoka M., *J. Phys. Chem. B* 114, 12340 (2010). [5] Takayanagi M., Nagaoka M., *Theor. Chem. Acc.* 130, 1115 (2011). [6] Nishihara Y., Kato S., Hayashi S., *Biophys. J.* 98, 1649 (2010). [7] Tsuduki T., Tomita A., Koshihara S., Adachi S., Yamato T., *J. Chem. Phys.* 136, 165101 (2012). [8] Yu I., Takayanagi M., Nagaoka M., *J. Phys. Chem. B* 113, 3543 (2009). [9] Kim K. et al., *J. Am. Chem. Soc.* 134, 7001 (2012).

アミロイド β の構造探索

(東京薬科大学薬学部) ○横島 智

Conformational search of amyloid beta peptide

(Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences, The School of Pharmacy) ○Satoshi Yokojima

アルツハイマー病は 記憶障害などの症状で知られている認知症であり、その原因としては アミロイド β と呼ばれるタンパク質が脳内で凝集し、それにより神経細胞死が引き起こされるため であると考えられている。神経細胞死の原因を探るには、その原因物質である アミロイド β がどのように神経細胞に影響を及ぼしているかを 知る必要があるが、そのためには、その第一歩として、凝集した時のアミロイド β がどのような構造をとっているのかを 知ることが重要になると考えられる。

しかしながら、天然変性タンパク質であるアミロイド β の凝集構造を 実験的に特定することは非常に難しい。その理由としては、環境の変化で凝集構造が変化するほど、凝集体は弱く結合しており、環境を変化させることなく、構造を決定する必要があるからである。近年、我々は蛍光相関分光法を用いてアミロイド β の凝集体の成長過程について調べ、その大きさを特定することに成功しているが[1] その具体的な構造の解明にはいたっていない。そこで、一つの方向性として計算によってその構造を 明らかにしていくことが期待される。

構造探索の手法としては分子動力学法、モンテカルロ法、遺伝的アルゴリズムなど様々なものが使われてきた。近年は構造

サンプリングの手法として 拡張アンサンブルに基づいた 優れたサンプリングの手法が 数多く提案されて、広範な探索空間を詳細に 調べられるようになってきている。しかしながら、40~42 残基からなるアミロイド β の凝集体のように大きな物質が取りうる様々な 構造を全て調べるのは容易ではない。

本発表では、アミロイド β の取りうる構造について調べたので、その結果を発表していく。

参考文献

- [1] S. Matsumura, K. Shinoda, M. Yamada, S. Yokojima, M. Inoue, T. Ohnishi, T. Shimada, K. Kikuchi, D. Masui, S. Hashimoto, M. Sato, A. Ito, M. Akioka, S. Takagi, Y. Nakamura, K. Nemoto, Y. Hasegawa, H. Takamoto, H. Inoue, S. Nakamura, Y.-I. Nabeshima, D. B. Teplow, M. Kinjo, and M. Hoshi
J. Biol. Chem. **286**, 11555-11562 (2011).

2P087

蛋白質の二次構造に関する相互作用の理論解析
(大阪大学蛋白質研究所) ○鷹野優、草鹿あゆみ、中村春木

Theoretical Analysis of Molecular Interactions of
Secondary Structures in Proteins

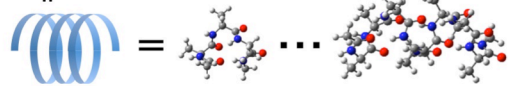
(Institute for Protein Research) ○Yu Takano, Ayumi Kusaka, Haruki Nakamura

【序】 蛋白質は、それぞれの特異な機能に適した三次元構造を形成している。 α ヘリックスや β シートなどの二次構造はそのような三次元構造を構成する重要な基本ブロックであり、その形成には水素結合などの相互作用が強く関わっている。このような相互作用を定量的に見積もることは蛋白質の三次元構造形成原理の理解を深めるのに加えて、蛋白質のふるまいを正確に記述する分子力場の開発にも役立つ。そこで、代表的な二次構造である α ヘリックスと平行 β シート、反平行 β シートの形成に関わる相互作用を密度汎関数法、分子力学法により調べた。

【計算方法】 二次構造のモデルとしては、ポリアラニンの N 末端をアセチル基で、C 末端を N-メチル基でキャップしたモデルペプチド(ACE-Ala_n-NME)を用いた。 α ヘリックスとしてはアラニン 3 量体~8 量体を、平行、反平行 β シートに関してはアラニン 1 量体~5 量体のダイマーを用いた (図 1)。これらはそれぞれ二次構造形成に重要である水素結合を、 α ヘリックス型モデルペプチドでは 1 個から 6 個、 β シート型モデルペプチドでは 2 個から 6 個形成する。これらのモデルに対して、まず密度汎関数法である B97D/6-31+G(d)法を用いて、 α ヘリックスと平行 β シート、反平行 β シート構造を保つように二面角を固定して構造最適化を行った (α ヘリックス： $\psi = -47^\circ, \phi = -57^\circ$ 、平行 β シート： $\psi = 113^\circ, \phi = -119^\circ$ 、反平行 β シート： $\psi = 135^\circ, \phi = -139^\circ$)。得られた最適化構造に対して、MP2 法、密度汎関数法 (B97D、BLYP、B3LYP、CAM-B3LYP、B98、PBE0、M06、M06-2X、LC- ω PBE)、分子力学法 (AMBERff99SB、AMBERff96、FUJI force-field) により相互作用を計算した。基底関数には 6-31+G(d)を用いた。より精度の高い 6-31++G(d,p)を用いたテスト計算も実施したが、ACE-Ala₁₆-NME の二量体からなる平行 β シートでは、相互作用エネルギーが B97D/6-31+G(d)法では 51.57 kcal/mol、B97D/6-31++G(d,p) 法では 52.34 kcal/mol とほぼ同じになることを

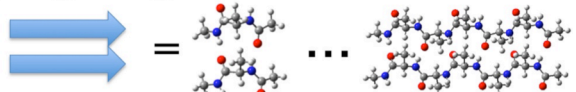
α -helix

ACE-(ALA)_n-NME: n = 3-8



parallel β -sheet

(ACE-(ALA)_n-NME)₂: n = 1-5



antiparallel β -sheet

(ACE-(ALA)_n-NME)₂: n = 1-5

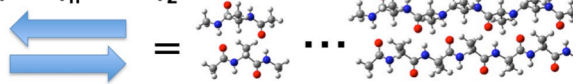


図 1. 二次構造のモデル

確認している。

相互作用の計算には、平行、反平行 β シート型モデルペプチドに関しては相互作用エネルギー(ΔE_{int})をモデルペプチドの二量体のエネルギーと構成する単量体のエネルギーの差として、

$$\Delta E_{\text{int}} = E_{\text{monomer1}} + E_{\text{monomer2}} - E_{\text{sheet}} \quad (1)$$

で計算した。その際、基底関数重なり誤差(Basis set superposition error)はBoysとBernardiのCounterpoise法により補正した。

また、 α ヘリックス型モデルペプチドの相互作用の計算には、延びきった構造(E_{extend})とヘリックス構造(E_{helix})のエネルギー差を相対エネルギー(ΔE_{rel})として

$$\Delta E_{\text{rel}} = E_{\text{extend}} - E_{\text{helix}} \quad (2)$$

で計算した。

【結果・考察】 まずは、二次構造の相互作用の計算に適した汎関数を決定するため、MP2法との比較をおこなった。dispersionや長距離補正をいれたB97D法やCAM-B3LYP法はMP2法に近い相互作用エネルギーを与えた。特にDFT-D法のひとつであるB97D法はMP2法とほぼ同じであった。このことから、これ以降はB97D法を用いて進めていくことにした。

次に、 α ヘリックス型ペプチドモデルと平行、反平行 β シート型ペプチドモデルの相互作用エネルギーに関して、分子力場(AMBERff99SB)と密度汎関数法(B97D法)の比較を行った(図2)。

平行、反平行 β シート型ペプチドモデルに関しては過大評価するもののそのずれは小さいものであった。しかしながら、 α ヘリックス型ペプチドモデルに関しては、分子力学法は密度汎関数法の結果に比べて大きく過大評価をしており、水素結合の数が増えるにつれて、ずれが大きくなっていくことが明らかとなった。このことは、現在の分子力場において蛋白質の折り畳みシミュレーションを実施した時に、 α ヘリックスが強く安定化される傾向があり、本来なら β シートをつくるものも α ヘリックスになってしまうということと合致している。以上から、分子力場の改良に関しては、 α ヘリックス形成に関わる相互作用(特に水素結合)の記述を改善する必要性を示唆している。

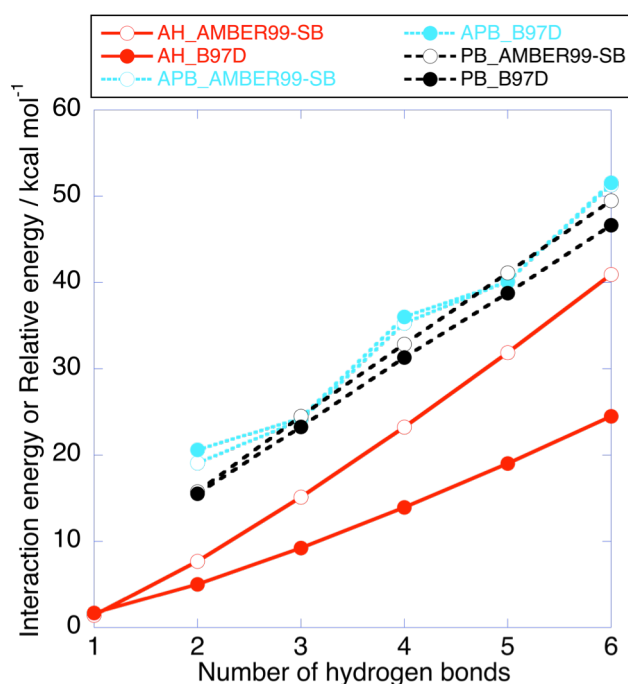


図2. α ヘリックス、平行、反平行 β シート型ペプチドモデルの水素結合の数と相互作用エネルギーとの関係

α ヘリックスを赤色、平行 β シートを黒色、反平行 β シートをシアンで示している。○は分子力学法、●は密度汎関数法による結果をあらわす。

2P088

RNA ポリメラーゼ C 末端領域構造の分子シミュレーション研究

(近畿大・先端研高圧蛋白センター) ○米澤康滋

Simulation study on the c-terminal domain of RNA polymerase

(Kinki University, ITL) ○Yasushige Yonezawa

(序) RNA ポリメラーゼ最大サブユニット Rpb1 の C 末端領域(CTD)は、転写開始、伸長、終結に関わる様々な mRNA プロセシング因子をリクルートして転写サイクルを精密に制御する重要な領域である。CTD はヒトにおいてはコンセンサス配列(YSPTSPS)と一部の残基が変異した非コンセンサス配列が混在して 52 回繰り返す、X 線結晶構造解析や NMR 構造解析では定まった構造を持たないことが示されている。CTD はリン酸化及び脱リン酸化によって構造を変化させてダイナミックにその機能を変えることが予想されているがその分子認識の詳細は殆ど明らかにされていない。またこれに加えてコンセンサス配列に含まれるプロリン残基のシス-トランス異性化も CTD のリクルート機能を変化させる役割を持つと予想され、プロリンのシス-トランス異性化酵素 Pin1 (Ess1) 等との関係が注目されている。

我々は、この CTD 領域の構造特性を分子原子レベルから高精度に明らかにするために分子動力学シミュレーションを用いた研究を展開している。これまでの研究成果として、1) リン酸化によってプロリンを中心とする特徴的なベータターンの構造分布確率が優位に増加し因子認識に寄与することを明らかにした。さらに 2) このベータターンの増加は、ベータターンに含まれるプロリンがシスに異性化することで強く抑制されることを明らかにした(Ref.1)。この結果は、プロリンのシス異性化が CTD のベータターンを抑制することを明確に示す知見であり Pin1 等プロリン異性化酵素との CTD 機能の関わりが重要であることも強く示唆するものである。現在、我々はさらなる CTD 機能の理解を目指して、a) コンセンサス配列が 2 回繰り返す長さの CTD ペプチドの構造空間探索、b) CTD に含まれる様々な非コンセンサス配列の構造空間探索、を目的とした一連の計算科学分子シミュレーションを展開しておりその結果を報告する。

(計算方法) 計算に用いた基本となる CTD ペプチド配列は、

Ace-Tyr-Ser-Pro-Thr-Ser-Pro-Ser-Tyr-Ser-Pro-Thr-Ser-Pro-Ser-NMe

1a 2a 3a 4a 5a 6a 7a 1b 2b 3b 4b 5b 6b 7b

である(2 行目はアミノ酸番号を示す)。ここで Ace と NMe はそれぞれ両末端の静電相互作用を抑制するための N 末端と C 末端のメチルキャップ残基を示す。シミュレーションに用いる系は、上記の CTD ペプチドを中心に置き、正方形の周期的境界条件下でペプチドの周りに顕な水のモデル(TIP3P)を配置し、さらに生理的イオン濃度(150mM)になるように Na⁺

イオンと Cl⁻イオンを配置した。この i) コンセンサス配列が 2 回繰り返すペプチド以外に、i) をベースとして ii) 2a と 2b の Ser がリン酸化されたペプチド、iii) 5a と 5b の Ser がリン酸化されたペプチド、iv) 7a と 7b がリン酸化されたペプチド、v) 7a と 7b が Lys に変異した非コンセンサス配列ペプチド、の 5 種類のペプチドを作成して計算に用いた。周期的境界条件の大きさはおよそ 50x50x50Å となった。系をエネルギー最小化の後、温度体積一定のシミュレーションさらに圧力温度一定のシミュレーションで平衡化した。平衡化した系を初状態としてマルチカノニカル分子動力学法を実施した。マルチカノニカル温度は 100K で、1ps 毎に構造を保存して解析に用いた。

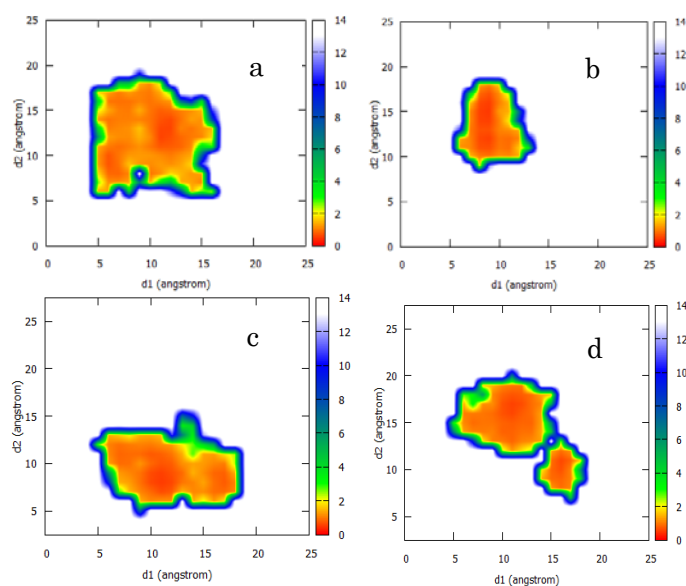


図 1
 a. リン酸化されていないコンセンサス配列 CTD ペプチドを d1 と d2 (本文参照) をベータターンの尺度座標として表した 2 次元構造分布、
 b. 2a と 2b の Ser がリン酸化された CTD ペプチドの構造分布
 c. 5a と 5b の Ser がリン酸化された CTD ペプチドの構造分布、
 d. 7a と 7b の Ser がリン酸化された CTD ペプチドの構造分布。

色付けされた構造分布の単位は、kcal/mol。結果は温度 310K に加重付けされている。

(結果と考察) 図 1 a から d に、OG-Ser(2a)~OG1-Thr(4a)間の距離と OG-Ser(2b)~OG1-Thr(4b)間の距離の和(d1)、及びOG-Ser(5a)~OG-Ser(7a)と OG-Ser(5b)~OG-Ser(7b)間の距離の和(d2)を、Pro 周りに形成されるベータターンの特徴的な尺度座標として、上記の様々なリン酸化パターン CTD ペプチドに対して得られた 2 次元構造分布プロットを示す。

これらの図から、2a と 2b 及び 5a, と 5b Ser のリン酸化は CTD ペプチドの構造分布をコンパクトに変化させている事が分かる。一方、7 番目の Ser がリン酸化された場合は Ser(7a) が Tyr (1b)を挟んだ Ser (2b) と水素結合を形成して全体的に伸長した構造を安定化する傾向が見られ CTD 機能との関わりからも大変興味深い。加えて Ser(7a,7b)のリン酸化により誘起される構造分布の変化は、他の Ser のリン酸化よりも複雑で現在さらなる解析を進めている。発表では様々なリン酸化が CTD 構造空間分布に与える影響と、非コンセンサス配列の構造特性についても詳細に報告する。

Prediction Solvation Free Energy of Organic Compounds: Molecular Dynamics Simulation and QSPR Model Approach

(Kanazawa University^{*}, Bandung Institute of Technology^{**}, Japan Advanced Institute of Science and Technology^{***})

○ Sri R. Natasia^{*,**}, Hiroaki Saito^{*}, Taku Mizukami^{***}, Kazutomo Kawaguchi^{*}, and Hidemi Nagao^{*}

[Introduction] In recent years, data mining approaches have been adopted widely in many fields outside computer science. For example in chemical physics area, this approach is used to predict some physical properties of a compound such as solvation free energy. One of predictive method and provide a promising result is QSPR model.

Our purpose is to find correlation between experimental and calculated data on chemical material by using clustering technique combined with QSPR model. The clustering technique will be applied in selecting molecular descriptors, which are features representation of chemical material.

In this work, solvation free energy values of 14 organic compounds containing diverse organic functions were calculated using energy representation (ER) method [1]. As calculation of solvation free energy using this method was obtained in combination with MD simulation [2], previously we conducted three MD simulations for each organic compound. These three MD simulations were solution, pure solvent, and isolated solute systems. The generated trajectories from the simulations were then sampled to construct a histogram of solute-solvent pair interaction energy.

The values of solvation free energy of these organic compounds will also be predicted using QSPR model. The further aim of this study is to provide a better QSPR model based on MD simulation results in predicting solvation free energy of organic compounds.

[Material and Method] We computed values of solvation free energy of 14 neutral and structurally different organic compounds in water solvent. The compounds containing diverse organic functions; alkanes, alkenes, alkynes, aromatics, alcohols, aldehydes, ketones, amines, ethers, and esters.

All MD simulations were performed in GROMACS 4.6.5 using GAFF parameter for organic molecules which assigned by Antechamber program in AMBER tools. AM1-BCC charge model was used to calculate atomic point. The coordinate file, in SYBYL mol2 format [3], formerly loaded to Antechamber program in order to set these parameters. After generating AMBER topology and coordinate files, these files were converted to GROMACS topology and coordinate files using acpype conversion script [4]. These organic molecules were then solvated using GROMACS utilities in a simulation box of 32 Å x 32 Å x 32 Å consisting of a fixed 1000 water molecules of TIP3P model. For solution and pure solvent systems, periodic boundary condition were applied. The configuration were generated through NPT ensemble at 300 K and 1 bar using Nose-Hoover thermostat and Parinello-Rahman barostat at time constant of 1 ps. The Lennard-Jones potential was also used for intermolecular interaction with cutoff of 13.5 Å. The Coulomb interaction was handled by PME method with the interpolation order of 6.

The simulation was performed for 100 ps and was sampled every 5 fs for solution system. Meanwhile for pure solvent and isolated solute systems, we conducted 10 ps and 10 ns simulations which were sampled every 100 fs, respectively. All trajectories of the systems were then loaded to ER program. Firstly, the pair interaction between the solute and the solvent in solution system was calculated. Next as the reference system, the configuration for the solute and the solvent systems were constructed independently by inserting the solute into a test particle.

The histogram of solute-solvent interaction energy was then constructed, for both solution and reference systems. The latter, these histograms and correlation matrix of reference system were used as the inputs of a functional for calculation of solvation free energy.

[Results] The calculated values of solvation free energy of 14 organic compounds and corresponding experimental data [3] are shown in Figure 1.

Although the trend is a bit over estimated and shows the similar tendency, the values were successfully calculated by the difference is only a few kcal/mol.

We calculated SASA from hydrophobic and hydrophilic parts of molecule. We discovered that almost of all molecules consist of more hydrophobic than hydrophilic atoms, yet it is still soluble since both of parts are accessible by water molecules. It is also found that if one of the parts not accessible, the molecules can not dissolve in water solvent thus the calculated value of solvation free energy is positive. The average of surface area of hydrophobic and hydrophilic parts of 14 organic compounds are listed in Table 1.

Table 1 The Average of SASA from hydrophobic and hydrophilic parts of molecules

Organic compound	Number of atom	Hydrophilic Area (\AA^2)	Hyrophobic Area (\AA^2)
pyridine	11	15.40	3.26
phenol	13	6.44	13.80
methyl acetate	11	5.06	13.24
methanol	6	3.77	8.01
ethylene	6	12.97	0.00
ethane	8	0.00	13.37
1-N,1-N-diethyl-2,6-dinitro-4-(trifluoromethyl)benzene-1,3-diamine	35	23.60	16.85
cyclopentanone	14	4.42	14.69
butanal	13	6.80	12.19
anisole	16	3.50	19.79
2-naphtylamine	20	3.77	22.60
2,2-dimethylbutane	20	0.00	22.08
1,3-dichlorobenzene	12	0.00	24.77
1,1-diphenylethene	26	4.52	28.17

We will also construct a QSPR model to predict the values of solvation free energy. This model is developed using molecular descriptors from the compounds that generated by a chemical program package. A clustering technique will be applied in order to get a useful and informative features from the molecular descriptor. Furthermore, the predicted values from this model will then be validated by the experimental and simulation results.

Keyword: solvation free energy, organic compounds, molecular dynamic simulation, QSPR

References:

- [1] Matubayasi N, Nakahara M. *J. Chem. Phys.* 113: 6070, 2000.
- [2] Y Karino, MV Fedorov, N Matubayasi. *Chem. Phys. Letters* 496: 351-355, 2010.
- [3] DL Mobley, et. al. *J. Chem. Theory Comput.* 5(2): 350-358, 2009.
- [4] AW Sousa da Silva, WF Vranken. *BMC Research Notes* 5: 367, 2012.

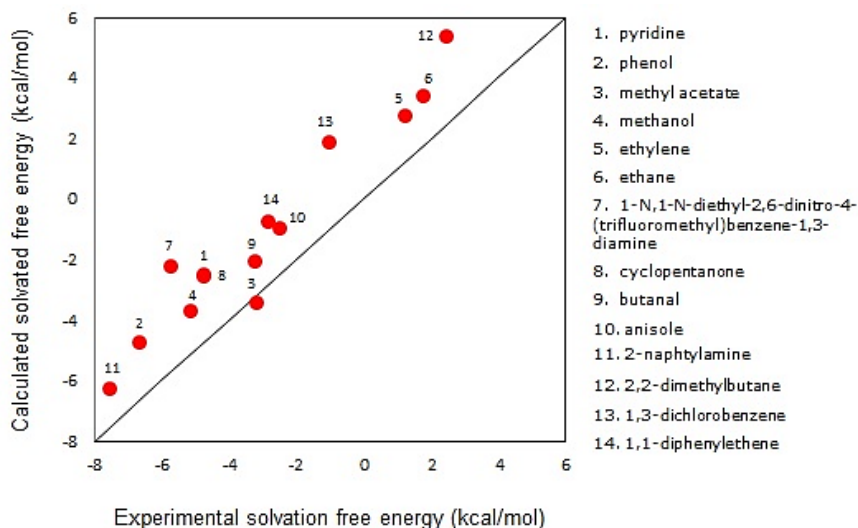


Figure1. Calculated solvation free energy versus experimental data

2P090

分子動力学法による多層ラメラ脂質二重層膜の安定性に関する研究

(金沢大院・自然) ○田中勇真, 齋藤 大明, 川口 一朋, 長尾 秀実

Molecular dynamics study of stability of multilamellar membranes

(Nat.Sci. Kanazawa Univ.) ○ Yuma Tanaka, Hiroaki Saito,

Kazutomo Kawaguchi, Hidemi Nagao

【序】生体膜の主要成分であるリン脂質は脂質二重層膜を構成し、それが多重に重なることでマルチラメラ構造の球状ベシクルを形成する。そして、細胞におけるエンドサイトーシスを介した物質輸送を行っている。このような多層の脂質膜には一般的に膜間ファンデルワールス力、水和力が働くことが知られており、マルチラメラ構造の安定性を決定する大きな要因となっている。また、球状ベシクルは細胞膜表面に接近すると、脂質膜間の相互作用により膜間の吸着・融合が生じる。それらの膜間相互作用は生体膜を構成する脂質分子と水分子の相互作用に由来することから、原子・分子レベルでの詳細な構造や相互作用特性の評価が重要となる。Lisらによって多層膜の膜厚、膜面積、膜間距離がX線解析により求められており、これらを用いて膜間の相互作用を評価された[1]。しかしながら実験における生体膜の様な複雑混合系の難しさのため、現在は分子シミュレーションによる詳細な解析が期待されており、脂質二重層膜をモデル化して再現し、膜タンパク質や他の脂質二重膜との相互作用を解析するためのシミュレーションが行われている。

本研究では膜間の相互作用特性を評価するために多層の脂質二重層膜に対する分子動力学(MD)シミュレーションを行い、脂質膜のZ軸方向の原子の分布・膜厚・膜面積・水和層厚を求める。また、脂質膜間との関係を明らかにするために複数の脂質二重層膜を重ねて膜間の水和量を変えたシミュレーションを行う。

本研究で脂質二重層膜として使用したジミリスチルホスファチジルコリン(DMPC)は代表的なリン脂質分子でありミセル、ベシクルなどの様々な生体膜モデルをもち、脂質二重膜や、相転移の実験に使われる。ホスファチジルコリン(PC)は一般に膜タンパク質を安定化させる働きのある脂質として知られ、数々のタンパク質の研究に使われている。

【計算】DMPCのマルチレイヤーをモデルとして三つの系を用いる。系1、系2は脂質二重層膜二枚、系3は三枚の脂質二重層膜を重ねたものであり、系2、系3はそれぞれの水和層によって水分子数が異なり、その値を表1に示す。またそれぞれの系の初期構造を図1~3として示す。

	系1	系2	系3
膜分子数	128×2	128×2	128×3
水和層1水分子数	3776	3776	3776
水和層2水分子数	3776	5664	5664
水和層3水分子数			7552
セルサイズ(z方向)初期値	133[Å]	163[Å]	275[Å]

表1.それぞれの系の膜分子数、水分子数、z軸方向のセルサイズ

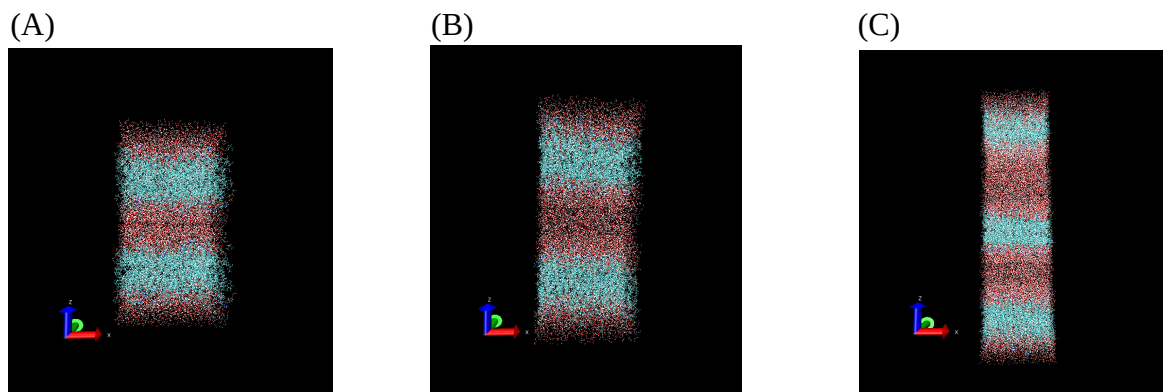


図 1.(A)系 1 の初期構造 (B)系 2 の初期構造 (C)系 3 の初期構造

A~Cにおいて、水色の分子が膜分子であり、赤色の分子が水分子であるが周期境界条件により水和層がセルの上下に別れた状態で配置されている。

MDは温度 300 K、圧力 1 atm、圧力制御はパリネロラーマン法、温度制御は能勢フーバーチェーン、アンサンブルは NPT を用いた。カットオフ距離は 12 Å とし、クーロン力の計算には PME 法を用いた。時間刻みは 2.0 fs、力場に charmm36 を使用している。MD 計算には汎用ソフト MODYLAS を用いた。

また、膜間の水の圧力を計算するためにファントホッフの式を用いた。理想溶液圧力 P , 水分子数 N , 温度 T , 体積 V , ボルツマン定数 k_B を用いて

$$PV = Nk_B T \quad (1)$$

と表される。

【結果・考察】

系 1, 2, 3 に対してそれぞれ 5.8 ns, 6.2ns, 2.6 ns MD を行った。膜厚、膜面積の平均の値と実験値を表 2 に示す。実験値は水中における DMPC の脂質二重層膜一枚の値である。

表 2. 膜厚、膜面積、膜間距離の実験値と計算結果

	膜厚 1[Å]	膜厚 2[Å]	膜厚 3[Å]	膜面積[Å ²]	膜間距離 1[Å]	膜間距離 2[Å]	膜間距離 3[Å]
実験値[2]	35.3			60.6			
系 1	38.22	38.23		55.81	32.40	32.72	
系 2	38.13	38.26		55.99	33.29	48.86	
系 3	41.10	41.70	41.79	50.49	36.58	54.50	72.33

表 2 より二重層膜の数が増えるほど膜厚は大きく、膜面積は小さくなっている。しかし MD が短く十分に平衡化していないと考えられる。そのため、平衡状態での膜厚、膜面積、膜間距離の計算結果は当日に発表予定である。発表当日は膜間の水和層の浸透圧をファントホッフの式から求め、多層膜の安定性について考察する。

【参考文献】

- [1] L. J. Lis, et al, *Biophys. J.* **37**, 657–665 (1982)
 [2] K. Norbert, *Biophys. J.* **88**, 2626–2637(2005)