

高分子会合(秩序)・解離(無秩序)の分子論的研究

金沢大学理学部 樋渡保秋

Molecular-level study of association and dissociation of polymers.

Faculty of Science, Kanazawa University, Yasuaki HIWATARI

abstract

Understanding the microscopic mechanism of molecular association between same or different molecules is necessary to design these molecules. If we intend to design a medical molecule, for instance, an accurate estimation of free energy in associating with target molecules is demanded, for which we must calculate the thermal fluctuation (or the density of states) near the surface around associated molecules correctly. In this project, we will examine, by various molecular simulations, the association (ordering) and dissociation (disordering) process between such as a medical molecule and a target molecule, protein molecules, and functional material molecules.

はじめに

2つ以上の同種又は異種分子が互いに会合する際の分子論的メカニズムの解明は、これら分子を設計する為の必要条件となる。例えば、医薬分子の設計に際しては医薬分子が標的の分子と会合する際の自由エネルギーの算出が不可欠となる。この為、分子が会合する際の会合面近くでの熱的揺らぎ(状態密度)の計算を正しく行うことが必須である。本研究では、医薬分子と標的との会合・解離やタンパク質分子間の会合(複合化)・解離、機能材料分子の会合(秩序形成)と解離(無秩序化)について、分子シミュレーションを用いて分子論的に考察する。これを達成するため、以下の研究・開発を行った。

- (1) モデル分子系の分子シミュレーションの研究(樋渡 他)
- (2) 分子会合・解離の分子理論の研究(西川 他)
- (3) 画像処理技法の開発(田子 他)
- (4) タンパク質複合体の実験および分子動学的解析(山岸 他)
- (5) 医薬分子会合の分子動力学シミュレーション及び超高速専用システムの開発(北村 他)

以下で、これらの研究・開発の概要とこれまでに得られた成果の概要について述べる。

(1) モデル分子系の分子シミュレーションの研究

(a) モデルタンパク質の秩序化過程(分子会合)について

タンパク質の構造や折り畳みの機構(秩序化過程:会合)は、未解決の問題である。タンパク質の3次元構造を構築するために必要なすべての情報はそのアミノ酸配列にだけ含まれており、アミノ酸間の相互作用が与えられれば、配列に対応した唯一のネイティブ構造へ構造変化する。しかし、計算機を使った研究では、与えられたアミノ酸配列からタンパク質の構造を予測することは取り得るポリペプチド鎖のコンフォメーションが、残基数に伴い急激に増大するので困難である。これまでの研究は、格子モデルで代表される極端なモデル化や、水分子を直に考え全原子間の相互作用を考慮した連続空間の現実的計算も行われてきたが、このような極端な状況下では実際にどの相互作用が折り畳みに本質的に寄与しているのかがわかりにくくなっている。そこでタンパク質を連続空間上で単純なモデル化を施し、モノマー間の各々の相互作用の相対的強さを変えることによってタンパク質の折り畳みの変化を調べ、包括的な枠組みを構築するための基礎データを蓄積することが必要である。本研究では、連続空間上でアミノ酸残基を電荷、疎水、中性の球状モノマーに置き換えたモデルProtein-G系(PDB id:2gb1, 56残基)の折り畳み過程と構造に着目しカノニカル(CMD)、マルチカノニカル分子動力学法(MMD)を使って系統的にシミュレーションを行った。特に、溶媒の存在により生じるモノマー間の疎水相互作用がタンパク質の折り畳み過程に大きな影響を与えると考えられているため、電荷相互作用と疎水相互作用の相対的大きさによってモデ

ルタンパク質の折り畳みの挙動がどのように変化するかに着目した。電荷相互作用と疎水相互作用の相対的強さを変えることは、溶媒の種類を変えることに対応する。CMDにおいて、三角マップや慣性半径、Distance Matrix Error(DME)を使ってエネルギー最低構造の解析をしたところ、電荷相互作用が疎水相互作用より相対的に大きいとき、エネルギー最低構造はN末端が伸び慣性半径が大きな状態となる。疎水相互作用が電荷相互作用に比べて大きいときは、疎水モノマー同士がコアを形成してコンパクトな構造となることがわかった。また、疎水相互作用のポテンシャル関数のタイプにより各温度における自由エネルギー曲面の準安定状態が変化することが、MMDで慣性半径、DMEという2つのオーダーパラメータをReweighting法で調べることにより明確に理解される。また、転移の傾向と経路はポテンシャル関数のパラメータ並びに形にも影響されることなどもわかった。

(b)機能有機材料分子系の秩序化過程(分子会合)について

CRフィルムは再利用できる感熱紙であり、実用化されればオフィスでの紙の消費量を飛躍的に押さえることが期待されている。現在CRフィルムは実用化に近づきつつあり、既に室温における発色の安定性と消色性が可能となっている。しかし高性能化に関しては困難を伴い、実験で試行錯誤することは非常に開発時間がかかることが問題となっている。そこで本研究の目的はシミュレーションを行うことによって、実験の方向性付けをすることにある。シミュレーションは、分子動力学法・モンテカルロ法の2つの手法を用い、それぞれの長所を生かして顕色剤が作る構造(会合・秩序化)が温度によりどのように変化するかを調べた。分子動力学法では特に構造の緩和過程の動的変化を、モンテカルロ法では安定構造を調べ、これらを併用することにより多角的にCRフィルムの特徴をつかむことができる。実験において、CRフィルムの消色状態、発色状態で相構造が存在していることが確認されており、消色、発色に相構造の形成が大きくかかわっていることもわかっている。分子動力学シミュレーションでは、顕色剤(ポリマー)の引力の違いが相構造の形成に大きな影響を与えることがわかった。ポリマーの先頭どうしに働く引力の大きさを温度400Kにおいて変化させたところ、相構造を形成する引力の大きさに条件があることが判明した。また、モンテカルロシミュレーションにおいては温度変化に伴うエネルギーの急激な変化から、282K付近で転移を起こすことがわかり、転移温度付近では圧力変化に対し構造が急激に変化する傾向があることが確認された。

(2) 分子会合・解離の分子理論の研究

分子の会合・解離について量子力学的に調べる目的で以下の様な研究を行った。

(a)分子の会合・解離の際に電荷移動が起こることにより、電子状態が変化し分子内ポテンシャルや構造が変化することが考えられる。この様な電荷移動(Charge Transfer;CT)の効果は古典的な取り扱いでは取り込まれず、量子化学的に調べることは意義があると思われる。そこで簡単なモデル系について量子化学計算を行い、電荷移動のないvan der Waals(vdW)型の相互作用を行う系と、電荷移動(Charge Transfer;CT)型の相互作用を行う系の分子間ポテンシャルを比較した。それぞれのモデルとして $H_2 \cdots H_2$ と $H \cdots H_3$ を考え、分子間ポテンシャルと電荷移動量の計算を行った。CTの方では最大で0.2eの電荷の移動があり、平衡距離が短く、強い結合であること等の結果が得られた。

(b)密度汎関数法による分子の励起状態の計算

高分子の分子間相互作用をある程度現実的なモデルを用いて記述するためには原子数の多い系を扱うが必要になる。近年、密度汎関数法(Density Functional Theory;DFT)は従来の電子相関を考慮する方法と比較して、その計算量の少なさから原子、分子、固体の計算に広く用いられている。一方、DFTの励起状態への拡張は幾つか行われてきたが、その中で最近Levy,Nagyによって提案された励起状態に対する定式化に基づき、簡単な分子(H_2, H_2O, C_2H_4)について計算を行った。励起状態にも適用可能な相関エネルギー汎関数およびポテンシャルがまだ開発されていないので今回の計算では交換エネルギー汎関数、ポテンシャルのみを用いた。そのため計算結果はHartree-Fock法とほぼ同じになった。

(3) 画像処理技法の開発

(a) 分子シミュレーション研究統合化プロトタイプシステムの構築

Web, Java, XMLの最新ネットワーク技術を用いることにより、シミュレーション・プログラムや可視化アプリケーション等、ネットワーク上の異なるアプリケーションを統合的・組織的に扱うことができる。研究支援統合システムのサブシステムとして (i)文献データベースの検索、論文作成支援システム (ii)シミュレーション・プログラム実行支援システム (iii)シミュレーション結果の評価機能としての可視化支援システムがある。現在、金沢大学内のイントラネット内でこれらのシステムを統合したプロトタイプシステムを構築中であり、本システムを金沢大 大正製薬 東京薬科大学を結んだネットワークに拡大する予定である。

(b) 可視化処理の問題解決環境システムの開発

(i) 可視化処理の問題解決環境プロトタイプシステム“統合化可視化システム”の開発

シミュレーション・プログラムと可視化パッケージ“AVS/Express Viz”や“Micro AVS”とのソフトウェア・インターフェイスを作成し、分子シミュレーションへ適用

(ii) XMLを用いた分子シミュレーション映像作成

統合化システムのシミュレーション結果評価サブシステムとして、分子シミュレーションの可視化・映像化に取り組んでいる。XMLのタグの機能を用いることにより、ネットワーク上の可視化アプリケーションを含めたアプリケーション間やデータベース間のデータ交換が容易になる。また、この機能を用いることにより、膨大なデータから特定の条件の下で行われた特定のデータのみを取り出して可視化・映像化することが可能である。現在は粒子シミュレーション特有のXMLタグ定義(粒子シミュレーションのためのDTD)の作成段階にあり、我々のグループで開発した統合化可視化システムをネットワーク上で使用できる環境を構築中である。

(c) スケジューリングによる動的負荷分散の研究

蛋白質を含む高分子のような大規模かつ複雑な分子シミュレーションでは、高性能計算機による並列計算が不可欠である。粒子シミュレーションでは領域分割法や粒子分割法等の並列化方法が用いられるが、不均一な負荷がかかる場合、並列効率が著しく低下し高速計算の阻害要因となる。この問題を解決する為に動的負荷分散の研究を行った。各プロセッサの負荷を常時監視しながらスケジューリングを行い、動的に負荷を分散するアルゴリズムを開発した。これを偏微分方程式シミュレーションのプログラムに適用した結果、高い並列効率を得ることが示された。

(4) タンパク質複合体の実験および分子動力的解析

生物学の分野において、様々な現象が蛋白質とリガンド(低分子)あるいは蛋白質と蛋白質の相互作用で説明される。蛋白質と蛋白質の相互作用の最小単位でありかつ最も単純な系である2量体蛋白質をモデルとして、実験により相互作用を決定している因子を調べる実験を行うこと、更に蛋白質と蛋白質相互作用を分子動力学計算から分析しようというのが本研究の目的である。

(a) 蛋白質複合体設計

蛋白質複合体の最も基本的な単位である2量体蛋白質、イソプロピルリンゴ酸脱水素酵素を材料として、遺伝子操作の手法をもちいて変異型の蛋白質を多数作製した。蛋白質と蛋白質の相互作用はその接触面の形状特性によっていと推定される。そこで2量体蛋白質の接触面の残基を系統的に残基の体積と疎水性を変化させた変異型蛋白質を作製した。これらの蛋白質を大腸菌内での大量発現の後に精製して、安定性の評価を耐熱性を指標として行った。2量体蛋白質の安定性は、予想に反して疎水性とはむしろ逆の相関を持ち、残基体積の減少と共に安定性が上昇することが観察された。この結果は、少なくとも今回検討を加えたアミノ酸の部位に関しては適切な残基体積があり、それ以上では安定性が低下することを示唆している。

また、ファージディスプレイを用いた接触面選択システムの作製を行っている。選択のためのカラム基材へのドメインの固定方法の開発をほぼ終了した。現在ファージコートタンパク中でのドメインの発現方法を検討している。

(b) 分子動力学シミュレーションを用いた分子動力学計算

MDエンジン（分子動力学専用並列型高性能計算機）を用いることにより、2量体タンパク質の原子数7万（蛋白質1万、水6万原子）の1500、40ピコ秒のシミュレーションを行った。計算により、2量体のタンパク質分子は大きく変性した。変性過程の解析から、2次構造、3次構造、4次構造の変性過程での挙動が明らかとなった。すなわち、耐熱性の高い好熱菌蛋白質では、4次構造（二量体相互作用）を残したまま2次構造3次構造が壊れていく事が分かった。今後、異なった安定性を持つタンパク質で同様な計算機実験を行い比較検討を行う事から、2量体接触面の性質と2量体蛋白質構造安定性との相関の評価を行う予定である。

(5) 医薬分子会合の分子動力学シミュレーション及び超高速専用計算システムの開発

様々な生体分子の会合解離が生体内で常時行なわれることにより、生体活動は維持されている。しかし、生体高分子の会合解離の過程はまだまだ不明な点が多い。この問題を分子レベルから解明し、会合解離の過程のプロファイルを作り上げることが本研究の目標である。生体高分子の会合解離を解明するにはどのような相互作用が関わっているかを知ることが重要である。しかし、水中での相互作用は低分子間でさえあまりよくは分かっていない。水中では水という極性を持った分子を介しての相互作用となり、メタンのような無極性分子でさえ特殊な性質を示す。そもそも水は複雑な系とされ、今だ議論の堪えない絶えない物質である。この水による影響が溶質間の相互作用にどのように影響するかを自由エネルギー計算から考察することが最有用と考えられる。

そこで、低分子間の相互作用を分子動力学法(MD)を用いて調べた。無極性分子であるメタン、エタン、イソブタンや、極性分子のメタノール、更に、イオン(Na⁺, Cl⁻)の分子対をモデル水分子TIP3Pの水中に入れ、温度300Kで圧力1気圧のシミュレーションを5.0ns ~ 10.0nsほど行ないサンプルを得た。溶質間の長距離相関を解析するため一辺40ほどの大きな立方体の周期境界条件を適用した系で行なった。

計算量が非常に膨大であるためハードによる並列計算を行なうMD専用計算機を導入した。また、JSTの並列スーパーコンピュータも利用した。大きな系では溶質間距離の緩和時間が非常に長くサンプリング効率が悪いいため、一辺が25と30程の系についてもシミュレーションを行ない、それぞれ得られたデータを複合する解析方法を考案した。また、周期的境界条件の系では系の大きさによりクーロン力が変化することから、水分子を球状に分布させた境界条件で境界の表面の影響を少なくするアルゴリズムを開発し境界条件の影響も調べている。

得られた結果は、クーロン相互作用が強いイオン間に長距離の相互作用が見られ、無極性分子には会合を引き起こす程の長距離力はほぼ見られなかった。もちろん、溶質分子の大きさが変わることにより、長距離力が見られることは考えられる。この分子の大きさの効果、および、環状分子に関する相互作用について、現在、検討している。低分子間の水中での相互作用の研究は多くなされているが、本研究では溶質の違いによる中距離から長距離の相互作用の相違に注目し、はるかに大きなサイズの系のシミュレーションを行なっているという点で他の研究とは一線を画す。また、現実の蛋白質-阻害剤の会合シミュレーションも行っており、今後、これらをあわせて解析する。

ネットワーク活用について

本研究は、金沢大学3研究グループ（代表者：西川清、田子精男、樋渡保秋）東京薬科大学（代表者：山岸明彦）大正製薬（株）（代表者：北村一泰）の異なる研究機関のグループの共同で行われていることから、これらの5研究グループ間でネットワークの活用は必然のものとなっている。以下に、利用形態の主なものをあげる。

- (1) コンピュータ資源の共有（ワークステーション、高速専用並列コンピュータ（MDエンジン）等）
- (2) JSTにある並列スーパーコンピュータ"hissha"の使用。
- (3) 相手方にあるプログラムの起動
- (4) 分子シミュレーションデータの解析・画像化・映像化など
- (5) 日常の研究連絡

現在、構築中の分子シミュレーション統合化システムにより、ネットワーク活用が格段に向上することが期待される。

まとめ

本研究は、(1) モデル高分子分子系のシミュレーション及び理論的研究を中心に行うグループ(金沢大)(2) モデルシステムの実験による作成及びタンパク質複合体の分子シミュレーションによる研究を行うグループ(東京薬科大)(3) 超高速専用計算機システムの開発及び医療分子会合の分子シミュレーションによる研究を行うグループ(大正製薬(株))から構成され、3研究機関が相互に補いながら、高分子の会合(秩序)・解離(無秩序)の分子論的研究を行っている。

これまでに得られた発表論文数も多数にのぼり、着実に成果が上がっている。今後はこれらを継続発展して、成果が得られるよう一段と努力を行う所信である。

今後の予定

- (1) 溶媒効果を考慮したタンパク質分子の分子動力学計算(高次構造形成及び会合・解離)
- (2) 2量体タンパク分子系などの大規模分子シミュレーション実験/解析/画像処理。
- (3) タンパク質-阻害材の会合シミュレーション。
- (4) 分子シミュレーション研究統合化(可視化)システムの開発。
- (5) 高性能/高速分子シミュレーションシステムの開発

研究実施体制

