

## 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力学解析（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（宮川 他）

以下で、これらの研究・開発の概要と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) マルチカノニカル分子動力学法を使ったモデルタンパク質の折り畳み

タンパク質の構造や折り畳みの機構（秩序化過程：会合）は、未だ理解されているとは言えない。タンパク質の立体構造は、アミノ酸配列と溶媒条件を決めると一意的に決まると信じられている。溶媒中のタンパク質の挙動を分子レベルで理解するために、折り畳み過程で本質的な寄与する4つの相互作用（電荷、疎水、水素結合、分散力）の役割を明らかにすることが重要である。本研究では、タンパク質の詳細によらない普遍的な特徴を統計力学的観点より見出すことを目標とし、理論的な枠組みを構築する基本的な知見を得るため、自由度を縮約した単純なモデルを用い、相互作用の相対的強さを変えることにより実現される様々な溶媒条件の下でのタンパク質の変性状態と温度変性による転移の様子を自由エネルギー面による解析より明らかにした。

分子動力学的手法を用い研究を進める場合、現在の計算機的能力では全原子を含む構造の計算はせいぜい10ナノ秒程度が限界である。ところが、折れ畳みは最低でも1マイクロ秒以上の現象であるため、直接シミュレーションをすることは非常に困難な状況にある。このような状況下では、2つの方向性（戦略）が考えられる。一つは、拡張アンサンブルを使い、エネルギーの準安定状態に長時間留まるのを回避し、効率のよいサンプリングを行う戦略である。もう一つは、アミノ酸分解能で粗視化をし、必要な相互作用を正しく理解し必要かつ十分な詳細さ

を持つモデルを構築する戦略である。本研究では、これら2つの戦略の長所を取り入れ、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タンパク質系を用い、拡張アンサンブル法の一つであるマルチカノニカル分子動力学法を使い、タンパク質の温度変性による諸物理量の確率密度分布関数の変化の様子を系統的に調べた。

最初に、モデル Protein-G 系 (PDB id:2gb1, 56 残基) のシーケンスを用い、電荷相互作用と疎水相互作用の相対的大きさ (溶媒条件) を制御パラメーターとし、真空中と水の2つの極限系を設定してその間で値を動かし、どのように折り畳みの挙動が変化するかを調べた。その結果、疎水相互作用をべき型で導入した場合常温付近で転移が起こるが、指数関数型では転移は起こらないことがわかった。さらに、べき型疎水相互作用を強くすると、連続転移から不連続転移に変化し、この状態から電荷相互作用を弱めると連続転移に変化することがわかった。また、シーケンス特有の性質として C 末端に負電荷が存在するためこれが不連続転移に大きな影響力を及ぼしていることがわかった。

次に、様々な現実存在するタンパク質のシーケンスを使い、同様のシミュレーションを行い、何がシーケンスに共通の特徴で、何がシーケンスに固有の特徴であるかを系統的に調べた。マルチカノニカルシミュレーションで得られた結果を再重法を施すことより慣性半径—DME (Distance Matrix Error) 平面の各温度による確率密度分布を求めた。この解析結果より、各温度の自由エネルギー曲面を考察が可能となり、以下のことがわかった。溶媒条件が水に近いとき (疎水相互作用が強く、電荷相互作用が弱い場合)、高温で広がっていた確率密度分布は低温では局在する。これは、ポリマーが疎水相互作用のような引力項を持つとき、大域的な自由エネルギー面がファネル状になることを意味している。また、溶媒条件が真空中のとき (電荷相互作用が強く、疎水性相互作用が弱い状態)、エネルギー曲面が温度に極めて強く依存する。特に正負の電荷の存在によりエネルギーのフラストレーションが起こり、エネルギーランドスケープにローカルミニマムが発生しやすくなることがわかった。

#### (b) 単一鎖ビーズポリマーの温度変化による構造と動力学的研究

単一鎖ビーズポリマーの温度変化による構造と動力学的研究を行った。近年、ポリマーの基礎的物質量や生物学的巨大分子に対しこのようなモデル化が施され、タンパク質の折り畳み問題を研究にも使われている。その理由は、タンパク質は原子レベルの研究するにはとても複雑な凝縮系であり、全原子モデルの小さなタンパク質では現在の計算機の能力では全く実行不可能であること、タンパク質の折り畳みの基本的特徴を理解するためには原子に関するすべての情報は必ずしも必要でなく、2種類のモノマーからなる格子タンパク質においても、最近のエネルギーランドスケープ理論との比較検証がなされているといったことが上げられる。こういった単純なモデルを使った研究は科学として大きな重要性を持っている。我々は、ビーズポリマーを使って以下の研究を行った。

まず、ビーズモデルタンパク質の長距離静電相互作用の役割に着目した。クーロン力はネイティブ構造の安定性と折り畳み過程そのものの両方に本質的な寄与を及ぼすことが知られている。タンパク質のシーケンスは自然界ではランダムではないので、タンパク質の構造に対する電荷モノマーの役割は何かという疑問が生じる。既知のタンパク質の電荷シーケンスで正しいネイティブ構造に折り畳むのか?それとも、少なくともポリマーがタンパク質のような特徴を示すのか?といった疑問に着目し、56残基の Protein-G 系の電荷シーケンスを使って検証した。特に低温での構造を研究するため、一連のカノニカルMD、マルチカノニカルMD、シミュレーションテッドアニーリング (SA) を行った。シミュレーション結果より、モデルは温度  $T_c$  で凝固し、不規則なコイル状態からコンパクトな複数の凝固状態の一つに転移する連続転移を起こすことがわかった。凝固状態は、鎖は電荷モノマー同士が集まったコアと中性のコロナからなる球状のグロビュール状態であった。構造間の平均二乗変位を計算することにより、このモデルのポテンシャルエネルギー面を見積もった結果、タンパク質としての基本的な特徴 (大局的最小状態の存在) が欠けていたため、ヘテロポリマーモデルに電荷のみを導入するだけではタンパク質様な特徴は保証できないと結論付けた。

次に、2ブロックポリアンフォライト (DPA) の構造に関して研究を行った。DPAとは、同じ長さで異符号の電荷を持ったそれぞれの2つのポリマー鎖を1つにつなげたものである。DPAの低温における構造に与える電荷相互作用の役割を研究するため、モノマー数 20, 30, 40 個の系でカノニカルMD、マルチカノニカルMDを広

い温度領域で実行した結果、定積モル比熱に2つの極大値を見出した。高温の極大値は慣性半径の変化の様子から、コイル-モルテングロビュール転移に対応し、低温の極大値はヘリシティの感受率を調べることにより、モルテングロビュールからダブルスタンダードヘリックス（基底状態）への転移であることがわかった。また、有限サイズ解析によりこの転移が1次であると結論づけた。

さらに単純化されたヘテロポリマーモデルにおける効率的な計算手法の開発を試みた。単一鎖ヘテロポリマーは、多くの準安定状態の存在により高いエネルギー障壁を越えられず運動が制限されてしまう。これは基底状態を探索する際、大きな問題になる。複雑凝縮系で基底状態探索のため開発された手法の中でも確率トンネル最小化法（STUN）は最も効率的で有望な方法の一つである。この方法は、ポテンシャルの局所的最小と大局的最小の相対的深さを変化させ大局的最小値の探索をやすくする。この手法を2つのモデルヘテロポリマー系に適用して、有用性を検証した。タンパク質モデル（Honeycutt-Thirumalai）ではSAに比べ、約5倍効率がよい結果が得られたが、ランダムヘテロポリマーでは、約2倍の効率性に留まった。これは、STUNがタンパク質様なポリマーに最も適していることを意味している。

最後にマルチカノニカルアルゴリズムの修正に関する研究を行った。マルチカノニカル法の最も大きな困難は、マルチカノニカルの重み因子を繰り返し計算により決定する必要があるということである。これを解決するため、Hansmann&Okamoto（1997）は、エネルギー変形の解析的な形を提案している。彼らの手法をHoneycutt-Thirumalaiモデルに適用し検証を行った結果、望まれた範囲でうまくエネルギーをサンプルできないことがわかった。そこで、サンプルする領域を拡大するため変形されたエネルギー面ですらに何度か繰り返し計算を行うことを提案した。このやり方では、カノニカルMDを初期状態としたオリジナルなマルチカノニカル法に比べ2倍効率がよいことがわかった。

## 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い、その成果を得た。

分子の会合・解離機構の量子化学的研究

### 2.1 分子間相互作用の量子化学的計算

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 $H_2$ 、 $H_2$ と $H$ 、 $H_3$ 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。

### 2.2 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ことが必要になる。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。更に、GW法に基づき水素分子の準粒子エネルギーを計算し、初期波動関数としてHF近似よりDFT-LDAがより有効であることを示した。

### 2.3 分子の会合・解離の光制御に関する理論的研究

分子の会合・解離の過程においては、特に生体高分子では、分子内や分子間水素結合が分子の会合・解離過程やその高次構造の決定に重要な役割を演じている。本研究では、この解離・会合の分子

論的機構の解明だけでなく、さらに積極的にその過程のレーザー光による制御に関する理論的研究を行った。特に、プロトン移動（プロトントンネリング）の理論的シミュレーションを研究を行い、高効率でプロトン移動を誘起するレーザー光（パルス列）を以下のような系で、理論的に解明した。

(a) 誘導ラマン断熱通過法 (STIRAP) における状態遷移機構の解明とその拡張、3STIRAP法は別名、反直感的パルス列法とも呼ばれ、その状態遷移機構の物理的理解が得難い方法である。それ故量子化学で馴染み深いヒュッケルモデルによりその機構を分かりやすく解明した。更に、その考え方にに基づき、この方法を多順位系に応用した。

(b) 2原子分子の電子励起状態における高振動状態の選択的生成 OH ラジカル分子の基底状態から電子励起状態の高振動状態への選択的励起を誘起する、1個の可視及び幾つかの赤外レーザー列をシミュレーションにより見いだした。

(c) 1 メチルマロンアルデヒド（分子内水素結合）の分子内水素移動による異性化反応の制御この分子は水素結合の本質を解明するために、多くの実験的、理論的研究がなされてきた。我々はプロトンの運動を1次元非対称2重井戸ポテンシャルで記述し、STILAP法によりプロトン移動による異性化反応をシミュレーションした。更に、O-O対称伸縮振動モードを考慮した2次元シミュレーションを行い、プロトン以外の重原子の運動の効果を調べた。

(d) 2 メチルナフタザリンの2プロトントンネリングの制御この分子の2個のプロトンの運動を最適化制御法により取り扱い、2個のプロトンの同時移動を誘起する高効率のパルスを得た。

(e) 結晶中のベンジル酸2量体（分子間水素結合）のプロトントンネリングの制御（この分子の2個のプロトンの運動をSTILAP法により取り扱った。ここでは状態の時間発展は密度行列法で行い、励起状態の緩和の効果も取り込んだシミュレーションを行った。

### 3. 画像処理技法の開発

#### 3.1 分子シミュレーションソフトウェアの開発

##### (a) Web分子シミュレーションシステムの開発

統合化された分子シミュレーション研究環境の支援システムをネットワーク上に構築した。以下に示すネットワーク上の各サブシステムを最新IT技術を用いて有機的に結びつけることにより、効率的な分子シミュレーション研究が可能になった。

##### a 文献調査システム

- ・分子シミュレーション文献検索
- ・XMLを用いたキーワード検索

##### b リモートコンピューティングシステム

- ・CGI/Perl, Java Servletを用いた遠隔計算
- ・計算数値データのXML変換

##### c リモート可視化システム

- ・Java Servletを用いた会話型遠隔可視化

##### d 評価・考察システム

- ・論文や報告書作成システム

クライアントのWeb上からこれらのシステムが利用でき、研究者は複雑なIT技術を知らなくてもシミュレーション研究が手軽に行える。現在、このシステムをネットワーク上にある外部のコンピューティング資源へ接続可能とし、Gridコンピューティングシステムへ拡張中である。

##### (b) 可視化処理の問題解決環境統合可視化システムの開発

可視化に不慣れな分子シミュレーション研究者が容易に可視化できる環境の整備を目指して、差分法ベースのシ

ミュレーションプログラムと可視化パッケージAVSシリーズ間のソフトウェアインターフェイスを開発し、分子シミュレーションへ適用した。

(c) 分子動力学プログラム自動生成システムの開発

プログラム作成を支援するためのプログラム自動作成システムを開発。

- ・ Java, XMLを用いた常微分方程式のプログラム自動生成
- ・ 任意ポテンシャルに対応した分子動力学プログラムの自動生成

(d) 分子動力学法の並列計算の研究

分子動力学計算の高速化にむけ、効率的な並列計算の研究開発を行った。

- ・ スケジューリングによる動的負荷分散の研究
- ・ 負荷分散のアルゴリズムを第一原理電子状態計算や差分法の並列プログラムに適用

#### 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-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項目の目的である。

(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ると推定される。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、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、蛋白質接触面に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た。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終了した。またファージコートタンパク中でのドメインの発現も成功した。ファージタンパク質の、カラム吸着に基づくスクリーニングにより新規蛋白質-蛋白質接触面が得られるはずである。

(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（2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。また変性の後半でも疎水性の相互作用を残しているという計算結果は、変性状態でも疎水性の相互作用が残っていること、そのことによって耐熱性を維持しているという実験結果と一致している。すなわち、耐熱性タンパク質の実験結果を支持する計算結果が得られた。

#### 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い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目標である。しかし、生体内（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。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。メタンやイオン（ $\text{Na}^+\text{Cl}^-$ の分子対をモデル水分子TIP3Pの水の中に入れ、温度300Kで圧力1atmのシミュレーションを50ns

行い溶質間の平均力ポテンシャルを得た。また、現実のタンパク質-阻害剤の会合シミュレーションも行った。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。

メタン分子間のいわゆる疎水性相互作用は、分子間距離が短い領域で、エントロピー的寄与は強い引力として働き、エネルギー的寄与は斥力として働くことがわかった。これは疎水性会合の伝統的描写と一致する。さらに、エネルギー的寄与をメタン分子間、メタン-水分子間、そして水分子間の各要素に分解した。その結果、メタン-水分子間相互作用の寄与を示すEswはメタン分子間距離が短くなるにつれ高くなることが分かった。これはメタンの周りの水分子の数が減少するためである。また、メタン分子の会合に対して水分子間相互作用はほとんど寄与しないことが明らかになった。これは水の構造を司る水素結合の数が変わらないことを示唆するものである。したがって、疎水性分子の会合過程では水が持つエネルギーは変化がなく、水素結合の組み替えによって水が持つ秩序は変わり、エントロピーが増大することにより会合する。これが疎水性相互作用の本質的特徴であると考察した。

また、高精度・高速化した専用計算システムによりタンパク質-阻害剤の会合過程をシミュレートする事に成功した。それを低分子の会合メカニズムの結果を基に解析した。阻害剤はタンパク表面から10 Å程度離れた位置に阻害剤-水分子間のエネルギー減少(安定化)と水分子間エントロピー減少(不安定化)のついで合いによって局所安定的に存在し、そこから、タンパク質-阻害剤間のエネルギー減少(安定化)と水分子間エントロピー増加(安定化)により阻害剤-水分子間のエネルギー増加(不安定化)に逆らって会合する事がわかった。

## 6. 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・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。

## 7. 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た。

これらにより得られた発表論文数も多数にのぼり、研究課題の当初の目標をはるかに越える大きな成果が得られた。今後共本研究を継続発展させ一段と努力を行う所信である。最後に、本プロジェクト研究の推行を可能にして頂いたJST(科学技術振興事業団)に深く感謝する次第である。

研究実施体制

