

令和元年5月31日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (特設分野研究)

研究期間：2016～2018

課題番号：16KT0053

研究課題名(和文) pH依存活性錯体の計算化学-マイクロ定pH法の開発から遷移状態制御へ-

研究課題名(英文) Computational Chemistry of pH-dependent Activated Complex -From Development of Micro-constant pH Method to Transition State Control-

研究代表者

長岡 正隆 (Nagaoka, Masataka)

名古屋大学・情報学研究科・教授

研究者番号：50201679

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、溶液中や生体内の込み合った環境下における水素イオン指数(pH)変化を有効的に取り込んだ新規分子シミュレーション手法(マイクロ定pH-MS法)を確立することである。離散的なプロトン化状態遷移モデルに基づいたマイクロ定pH-MS法の開発を行った。さらに、この方法に量子化学計算を導入する改良を行った。この手法を適用することで、有機分子やタンパク質のみならず、金属錯体のような無機化合物における安定構造や活性錯体などの構造情報、およびそれらの運動状態や化学的特性におけるpHに依存した特異的な変化を微視的視点から明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来の定pH法では考慮が難しかった微視的な溶媒和構造について、本手法では、溶媒として全原子モデルを使用することが可能であり、溶媒の配向性やエンタルピー変化などの微視的な溶媒効果を考慮することが可能となった。また、溶質分子を量子化学計算的に記述することで、金属錯体系や複数の滴定可能サイトを含む複合的な系に適用可能となり、今後の将来的な応用研究において極めて重要な成果が得られた。

研究成果の概要(英文)：A purpose of our study is to establish new molecular simulation method (the micro constant pH-MS method) that able to effectively take account of a pH (an index of the hydrogen ion concentration) change under solution and in vivo crowded environment. We have developed the micro constant pH-MS method based on discrete protonation state transition model. Furthermore, we improved it by an introduction of quantum mechanics method into this method. As well as organic molecules and protein, pH dependent chemical characteristic and their motions in the inorganic compound such as the metal complex were clarified from a microscopic viewpoint by applying our technique.

研究分野：遷移状態制御

キーワード：pH依存活性錯体 ミクロ定pH-MS法

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

- (1) 今日、安定状態にある分子の平衡構造を決定することは実験的にも理論的にも比較的容易になりました。他方、「遷移状態」にある活性錯合体の分子構造を特定することは、実際の要求度が高いものの、その予測構造の検証は、単離可能な安定分子に比べると格段に困難になります。さらに、実験・理論的興味からよく研究対象となる水溶液中の分子では、その溶媒環境による分子構造への影響を与えます。しかしながら、純水では pH7 の水素イオン濃度指数を示すことが知られていますが、この状態はオキソニウムイオン (H_3O^+) が水分子 100 億個 ($\sim 10^{10}$ 個) に 18 個程度しか含まれていないことに対応しているということを考えると、従来の分子シミュレーション手法では、このような水素イオン濃度を直接的に反映させることはできません。
- (2) ところが、一般の有機・無機反応を初めとして、生体内における酵素反応は、水素イオン濃度や塩イオン濃度に依存して劇的に変化することが知られております。たとえば、J. L. Kurz らは、ある pH 条件下で起こる化学反応の活性錯合体の予測構造を検証するために、安定分子についての構造-酸度相関に関する知見を利用して、活性錯合体の酸解離指数 (Acid dissociation constant, pK_a) を、簡単な速度定数比として算出し、議論しました (参考文献①)。また、アルツハイマー病や狂牛病などの変性タンパク質が関与する疾患では、生体内の水素イオン濃度変化によって、正常なタンパク質の配座変化に著しく影響を与えることが示唆されています (参考文献②)。さらに、ホスホリル転移反応の遷移状態アナログ (フッ化アルミニウム (AlFx)) におけるフッ化物イオン配位数が pH に依存して変わることが報告されています (参考文献③)。
- (3) 他方、理論化学的な手法を用いた研究から、これまで分子凝集系における自由エネルギー計算の標準化するための理論開発が精力的に進められています。なかでも、自由エネルギー勾配法は、熱力学的条件下の分子凝集環境における分子の自由エネルギーを求める手法として確立され、環境効果を取り入れた平衡分子構造を最適化して求めることが可能となってきました (参考文献④)。計算化学的な負荷は高いものの、その際の構造変化には、環境溶媒分子群の溶媒和構造、酵素のクロモフォア立体構造、及びそれらのアトミスティックダイナミクスの微視的影響が反映することが可能となっています。他方、タンパク質の構造とダイナミクスに対する水素イオン指数 (pH) 依存性を取り扱う、Tanford-Kirkwood 理論に基づいた定 (constant) pH 法が提案されています (参考文献⑤)。この方法では、溶質 (タンパク質) のプロトン化状態を設定した pH を考慮して確率的に決定します。ところが、これまで提案されている多くの手法では、その遷移確率を決めるために必要なエネルギー変化を評価する際に、連続誘電体モデルや一般化ボルン法などの連続体モデルを用いていることが多く見られます。しかし、これらの連続体モデルは微視的な溶質-溶媒相互作用や微視的エントロピー効果を十分に考慮できないという問題点があることが判っていました (参考文献⑥、⑦)。

2. 研究の目的

- (1) こういった背景から、我々は、これまで混合 MC/MD 反応法 (Red Moon 法) の開発と複合化学反応系への適用し、手法の妥当性の検討と複合化学反応系における様々な物性や化学特性を明らかにしてきました (参考文献⑧-⑩)。本研究の目的は、この Red Moon 法と分子凝集環境の pH 効果に関するマイクロ定 pH 法を組み合わせることで、さらなる高度な分子シミュレーション手法として展開することにあります。
- (2) さらに、定 pH 法の古典的研究において、Tanford らは、静電相互作用のみを考慮するアプローチでは、正確な pH 依存性を予測することには不十分であると指摘しています (参考文献⑪)。そこで、Red Moon 法に基づくマイクロ定 pH 法にマルチスケールアプローチの一つである QM/MM 法と組み合わせることで、非静電相互作用や微視的エントロピー効果を適切に取り入れる新規手法を

開発することを目指します。

- (3) 以上の2つの理論開発を通じて、“分子凝集環境”で起こる化学反応に対する、水素イオン指数 (Potential hydrogen, pH)依存性を取り扱える計算化学的手法・技術の確立を目指します。これを、無機・有機物反応系に対して適用して、pH に依存した溶質分子の安定構造や運動状態の特異的な変化を微視的に明らかにします。

3. 研究の方法

- (1) まずは、離散的なプロトン化状態遷移モデルに基づいた分子力学(MM)マイクロ定 pH-MS 法の開発を行いました。酸である溶質分子 SH 中の HA 類似官能基のプロトン化状態(SH₂⁺)あるいは脱プロトン化状態(S⁻)によるエネルギー変化

$$\Delta E = \log(10) \cdot k_B T (\text{pH} - \text{p}K_a) + \Delta E_{\text{shift}} \quad (1)$$

を何らかの方法で評価し、メトロポリス法に従って遷移確率

$$P(\Delta E) = \min[1, \exp\{-\beta\Delta E\}] \quad (2)$$

に応じて、イオン化状態の切り替えを判定します。ここで ΔE_{shift} は、プロトン化あるいは脱プロトン化 (SH+H⁺ ↔ SH₂⁺) に伴う溶媒和エネルギー差を意味します。本手法では、状態切り替えたのちに実行する平衡シミュレーションによる試行点探索において、系の熱揺らぎによる影響を制御するためにガウシアン型確率分布関数による配置選別スキームを導入しました。これを、配置選択 CpH 法と呼びます。

- (2) つぎに、(1)で開発した MM ミクロ定 pH-MS 法を拡張して、溶質溶媒間相互作用を QM/MM 法で取り扱えるような改良した QM/MM ミクロ定 pH-MS 法を開発しました。この方法を、まず酸塩基指示薬である p-ニトロフェノールに適用して、pH に依存した電子スペクトル変化の再現性について調査しました。
- (3) 水溶液中アルミニウム錯体系に適用し、多段階 pK_a の予測性やそれに伴う水和数変化について調査しました。また、酢酸および酢酸フルオロ誘導体のフッ化物官能基による振動シフトの定量性について、量子化学計算手法による依存性を調査したのちに、高精度量子化学計算手法によるエネルギー補償手続き法を提案し、その有効性について調査しました。

4. 研究成果

- (1) 配置選択 CpH 法の妥当性を検証するために、MMマイクロ定 pH-MS 法を用いて、グルタミン酸分子を含む水溶液系について本手法を適用しました。複数の pH 条件によるシミュレーション結果から、pH 曲線を作成したところ、実験の酸解離定数 pK_aを再現できました。これらの成果は、第10回分子科学討論会にて研究報告を行いました[学会発表⑨]。
- (2) つぎに、グルタミン酸分子を複数含む水溶液系における拡散係数および振動パワースペクトルについて解析を行い、グルタミン酸分子の濃度依存性を検証しました。高濃度条件では、溶質分子の拡散係数は低下し、エンタルピー的に不安定化することが示唆されました。これらの解析から、酸解離定数指数(pK_a)の濃度依存性を説明できました。これらの成果は、第 32 回分子シミュレーション討論会にて研究報告を行いました[学会発表②]。
- (3) QM/MM ミクロ定 pH-MS 法を、酸塩基指示薬である p-ニトロフェノール (pK_a=7.08) に適用して、酸性型・塩基型の pH による存在比を予測しました。同時に、QM/MM ミクロ定 pH-MS 法が安定して動作することを確認しました。多数の pH に変化させた条件で分子シミュレーションすることで、p-ニトロフェノールの酸性型・塩基型の存在比の違いから吸収スペクトル変化を再現し、実験で測定されている当量点を定量的に再現することができました。さらに、発色機構を構造変化から検証したところ、p-ニトロフェノールの溶媒による色調変化は、水分子の相互作用に伴うニトロ基の構造変

化によって説明できるのに対して、パラニトロフェノラートはそうではないことが判りました。これらの成果は JFS 国際シンポジウムにて研究報告および英文学術誌にて発表を行いました[学会発表⑥および雑誌論文①]。

- (4) 両性元素であるアルミニウム系は、pH 変化に伴って水酸化物イオンを配位子とする錯イオンを形成することが分かっており、QM/MM ミクロ定 pH-MS 法を用いて水溶液中アルミニウム錯体系の系が安定に動作するかを調査しました。量子化学計算の手法、溶媒モデルを変えた条件で分子シミュレーションを行い、異なるプロトン化状態でのアルミニウム錯体での水和数変化を定性的に再現できることを確かめました。これらの成果は、第 12 回分子科学討論会および第 22 回理論化学討論会にて研究報告を行いました[学会発表③および①]。
- (5) QM/MM ミクロ定 pH-MS 法を用いて、酢酸フルオロ誘導体の滴定曲線を作成しました。本手法では、半経験的量子化学計算を用いるミクロ定 pH-MS を実行し、振動シフトを見積もりました。その結果、半経験的量子化学計算の不正確性のために、フッ化物置換基による振動シフトを過大評価することが判明しました。この理論的限界に起因する数値誤差を避けるために、より高精度な予測可能性を有すると考えられる第一原理計算法を用いたエネルギー補償手続き手法を検証しました。この方法では、モデル系である酢酸分子と対象系のフルオロ酢酸から化学反応サイクルに基づいたエネルギー補正項を評価し、それに基づいて pK_a シフトを見積もりました。その結果、MP2 法、CCSD 法などの高精度第一原理計算法を用いることで実験結果を再現できることが示されました。
- (6) 従来の定 pH 法では、溶媒環境を誘電体モデルに近似することが行われてきたが、このような取り扱いでは、微視的な溶媒和構造を無視してしまうという問題がありました。本手法は、溶媒として全原子モデルを使用することが可能であり、溶媒の配向性やエンタルピー変化などの微視的な溶媒効果を考慮することが可能となりました。
- (7) また、溶質分子の濃度依存性については、従来の定 pH 法を用いた研究では十分に調査されておらず、本研究事業から得られた業績は理論化学において意義深い。また、これまでは古典的な分子力場が用いられていたが、アルミニウム錯体のような金属錯体の系では、典型的な化学結合によるものとは異なり、それらを適切に記述することは難しい。本年度に開発を行った量子化学計算手法を導入することによって、pH 変化に伴う水和数変化という化学的特徴を定性的に再現できた。同時に、溶質分子の構造変化や微視的な溶媒和に対応する分極効果も取り込むことが可能となっており、今後のさらなる複雑なシステムへの応用するうえで極めて重要であると考えられる。
- (8) 量子化学計算を用いた分子動力学シミュレーションは、計算コストの観点から半経験的量子化学計算を使用することが望まれるが、実験値を再現する上では不十分であることも多いと考えられます。今回、提案されたエネルギー補正手続きを用いることで、実験の pH 依存特性を低コストで調査することが可能であることを期待できる示唆が得られました。これは、今後の金属錯体系や複数の滴定可能サイトを含む複合的な系に対する将来的な応用において極めて重要な成果であるといえます。

<引用文献>

- ① J. L. Kurz, *Acc. Chem. Res.*, **5** (1972) 1.
- ② J. Khandogin, et al., *PNAS*, **104** (2007) 16880.
- ③ I. Schlichting et al., *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **6** (1999) 721.
- ④ M. Nagaoka, et al., in “*Quantum Modeling of Complex Molecular Systems*” (Eds. J.-L. Rivail, et al.), (Springer, 2015).
- ⑤ C. N. Schutz, et al., *Proteins*, **44** (2001) 400.

- ⑥ Y. Kitamura, et al., *Chem. Phys. Lett.*, **514** (2011) 261.
- ⑦ Y. Kitamura, et al., *J. Chem. Theory Comput.*, **10** (2014) 3369.
- ⑧ M. Nagaoka, et al., *Chem. Phys. Lett.*, **583** (2013) 80.
- ⑨ N. Takenaka, et al., *J. Phys. Chem. C*, **118** (2014) 10874.
- ⑩ Y. Suzuki, et al., *J. Phys. Chem. B*, **119** (2015) 6776.
- ⑪ C. Tanford, et al., *Biochemistry*, **11** (1972) 2192.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

- ① C. Bistafa, Y. Kitamura, M. Nagaoka, S. Canuto, “Microscopic Origin of Different Hydration Pattern of Paranitrophenol and Its Anion: A Study Combining Multiconfigurational Calculations and the Free Energy Gradient Method”, *The Journal of Physical Chemistry B*, Vol.122, 9202–9209 (2018).
- ② C. Bistafa, Y. Kitamura, M. T. C. Martins-Costa, M. Nagaoka, M. F. Ruiz-López, “A Cost-Effective Method for Free-Energy Minimization in Complex Systems with Elaborated Ab Initio Potentials”, *Journal of Chemical Theory and Computation*, Vol.14, 3262–3271 (2018).

[学会発表] (計 16 件)

- ① 北村 勇吉, 長岡 正隆, “水和アルミニウム錯体系での多段階プロトン化と水和数変化:量子力学法に基づいた定 pH 法の開発”, 第 22 回理論化学討論会 (北海道大学), (2019).
- ② 北村 勇吉, 長岡 正隆, “ゼロエネルギー差条件を満たす配置選択法に基づいた定 pH 法の理論的研究:グルタミン酸水溶液系への適用”, 第 32 回分子シミュレーション討論会 (産業技術総合研究所), (2018).
- ③ 吉田 正一, 北村 勇吉, 長岡 正隆, “アルミニウム水溶液における凝集過程の理論的解明 –その初期過程と pH 依存性–”, 第 12 回分子科学討論会 (福岡国際会議場), (2018).
- ④ C. Bistafa, Y. Kitamura, M. Nagaoka, S. Canuto, “How structural changes affect the paranitrophenol spectrum in aqueous solution: Insights from multiconfigurational calculations and the free energy gradient method”, 第 11 回分子科学討論会 (東北大学), (2017).
- ⑤ Y. Kitamura, N. Takenaka, M. Nagaoka, “Dual Approach to Vibrational Spectra in Solution: Microscopic Influence of Hydrogen Bonding to the State of Motion of Glycine in Water”, Japan-France-Spain Joint Symposium on Theoretical and Computational Science of Complex Systems (複雑・複合系の理論計算科学に関する 日・仏・スペイン合同シンポジウム)(京都大学福井謙一記念研究センター), (2016).
- ⑥ C. Bistafa, Y. Kitamura, M. Nagaoka, S. Canuto, “The Electronic Transitions of Paranitrophenol and Paranitrophenolate in Gas and Water: A Study Combining Ab Initio Multiconfigurational Calculations and the Free Energy Gradient Method”, Japan-France-Spain Joint Symposium on Theoretical and Computational Science of Complex Systems (複雑・複合系の理論計算科学に関する 日・仏・スペイン合同シンポジウム)(京都大学福井謙一記念研究センター), (2016).
- ⑦ C. Bistafa, “Combining Sequential-QM/MM and Free Energy Gradient Methods to Obtain Excited State Geometries in Solvent at Reasonable Computational Cost”, International Symposium on Multi-scale Simulation of Condensed-phase Reacting Systems (MSCRS2016)

(名古屋大学), (2016).

- ⑧ Y. Kitamura, “Dual Approach to Vibrational Spectra in Solution: Microscopic Influence of Hydrogen Bonding to the State of Motion of Glycine in Water”, International Symposium on Multi-scale Simulation of Condensed-phase Reacting Systems (MSCRS2016) (名古屋大学), (2016).
- ⑨ 北村 勇吉, 長岡正隆, “エネルギー揺らぎの制御スキームを導入した定 pH 分子シミュレーション法の開発”, 第 10 回分子科学討論会 (神戸ファッションマート), (2016).

6. 研究組織

(1) 研究分担者

(2) 研究協力者

研究協力者氏名: 北村 勇吉

ローマ字氏名: (Kitamura, Yukichi)