

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 7 月 3 日現在

機関番号：57102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K14496

研究課題名(和文) 実験・理論の融合による溶液中における分子集合体の高次構造解析手法の確立

研究課題名(英文) Structural analysis for molecular assembly in aqueous solution by experimental and theoretical methods

研究代表者

大河平 紀司 (OKOBIRA, Tadashi)

有明工業高等専門学校・創造工学科・教授

研究者番号：60629210

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：ミセルは、ドラッグデリバリーシステム、重合反応場、洗浄剤など、さまざまな機能材料として利用されている。したがって、新しい機能性材料の開発、また機能性評価を行うためには、水溶液中のミセルの3D構造を理解する必要がある。小角X線散乱(SAXS)は、分散粒子のサイズと形状に関するナノスケールの情報を得ることができる。しかし、SAXSのみでミセルの3D配置の詳細を理解することは困難である。本研究課題では、ミセルの3D配置を計算化学法とSAXSの組み合わせによって可視化するという新しい手法を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新しい機能性分子や機能性材料を創製する際、その立体構造に関する情報は非常に重要であり、時限的または各種条件にて生じる構造変化に伴う相互作用の理解は、医療や工学など、様々な分野において重要である。本研究課題で提案する手法は、ミセルの三次元構造を可視化することができ、さらに安定性や動的挙動を知ることができる。また、計算化学では初期構造モデルがその計算時間に大きく影響することはよく知られているが、実験的手法により得られる情報を基に初期構造および計算条件等を構築することができれば、計算時間の大幅な短縮に繋がる。

研究成果の概要(英文)：Micelles are used as various functional materials such as drug delivery system, reaction site for polymerization and detergent. Therefore, we have to understand the 3D structure of micelles in aqueous solution, and their information play important role to create a novel functional material. Small-angle X-ray scattering (SAXS) provides nanoscale information about size and shape for disperse particle. However, it is difficult to understand a detail of the 3D configuration of the aggregate of the molecule forming the micelles with only SAXS. In this study, the 3D configuration of micelles was evaluated by combination of the computational chemistry method and SAXS.

研究分野：計算化学、超分子、

キーワード：ミセル 計算化学 分子動力学シミュレーション 小角X線散乱

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

能性分子は、ゼオライトや多孔性材料のような剛直な構造によりその機能を発現するハードな材料、タンパク質やミセルのような柔軟な構造により機能を発現するソフトな材料に分類される。前者は固体状のものが多く、X線構造解析や電子顕微鏡などでその構造や形状を観察することが可能である。一方、後者は水溶液中で機能を発現するものが多く、常に熱揺らぎや圧力の影響によって構造が大きく変化する。それ故、光学系の分析機器で得られる情報は平均的なものであり、ダイナミクスが及ぼす影響により、溶液中にて分子が形成する高次構造の変化を追跡することは極めて困難である。しかし、溶液中における分子の高次構造を理解することは、機能性分子の機能発現メカニズムの解明や、その機能を他の分子や新しい材料へ展開する際の分子設計において非常に重要である。特に、多くの機能性分子は水溶液中でその機能を発現するため、水溶液中における立体構造や相互作用の理解は、科学者にとって非常に有意義な情報となる。一方、それらの解析手法は確立されておらず、未だ局所的および限定的な理解に留まっているのが現状である。

2. 研究の目的

計算化学的手法では初期構造モデルが計算時間に大きく影響することはよく知られている。したがって、実験系より得られる情報を基に初期構造モデルおよび種々の計算条件等を構築することができれば、計算時間の大幅な短縮に繋がる。本研究課題では、分子集合体をはじめとする機能性分子の水溶液中における構造およびダイナミクスを、小角 X 線散乱 (SAXS) 等の実験的手法と理論的な手法である計算化学的手法の融合によって解析する手法の確立を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 検討対象

カリックス[4]アレーンの lower rim に疎水鎖 (アルキル鎖) を、upper rim に高い親水性の官能基を導入すると、pH の異なる溶液中で様々な会合数を示すことが報告されている¹⁾。その会合数の違いや、SAXS から得られたデータより、溶液中では会合数の異なるミセルや棒状の集合体を形成していることが示唆されている。本研究では、Fig. 1 に示すように lower rim に C3 アルキル鎖 (Fig. 1 中の青部分) を、upper rim にトリアゾール環を導入し、親水部位として末端にアミノ (Fig. 1 中の赤部分) を有したカリックス[4]アレーン (PACaL4) を対象とした。この PACaL3 は、低濃度・低 pH 条件下にて会合数 6 でミセルを形成する。さらに、SAXS の散乱プロファイルを解析した結果、溶液中で正六面体構造をとることが示唆されている。

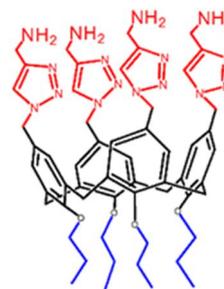


Fig. 1 研究対象としたカリックス[4]アレーン分子

(2) ミセル構造モデルの作成

タンパク質形状決定ソフトである DAMMIN にて PACaL3 の SAXS データを読み取り、PACaL3 が水溶液中で形成するミセルの大まかな構造を予測した。今回用いた DAMMIN は、Svergun 博士らが開発したプログラムで、SAXS により求めた粒子の最大長 D_{max} を直径とする球体にビーズを充填したものを初期構造とし、そこからビーズの削除あるいは付加によるモデル構造の修正を繰り返して、実測の散乱強度を満足できる構造を作製することが可能である²⁾。つまり、実験的に得られた散乱カーブに最も近い静的なモデル (ミセルの初期構造モデル) を得ることができる。DAMMIN の結果、得られたミセルの初期構造モデルは、SAXS の結果から予想されていた正 6 面体構造に近いものであった。

計算化学ソフトウェアである SCIGRESS ver. 2.4 (Fujitsu co. Ltd) にて PACaL3 単分子モデルを作成し、半経験的分子軌道法 (MO 法) にてプレ構造最適化を行った後、および Gaussian09W にて HF/6-311G(d,p) レベルにて構造最適化を行い、PACaL3 単分子モデルを作成した。DAMMIN にて予測されたミセル構造に、PACaL3 単分子モデル 6 つをあてはめてミセルの初期構造を得た。また、原子荷電については RESP ESP charge Derive (R.E.D.) tools III.4³⁾ にて計算した。

(3) 分子動力学シミュレーション

作成したミセル構造モデルを用いて分子動力学 (MD) シミュレーションのソフトウェアである Amber 11 にて MD 計算を行った。MD 計算の条件を、計算刻み幅 1 fs、general AMBER force field (GAFF) 力場、水分子 (TIP3P) をミセル構造モデルの周りに配置し、粒子数・温度・体積が一定 (NTV アンサンブル) の周期境界条件にて計算を実行した。温度に関しては、0 K から開始し、20 ps かけて 300 K まで昇温することで構造の緩和を行った。その後、定圧の周期境界条件にて、総計算時間が 10 ns となるように計算を行った。

(4) 解析方法

MD 計算終了後のミセルの構造モデルのデータを、分子可視化ソフトウェア (Visual Molecular Dynamics : VMD) を用いて可視化し、経過時間ごとにソートされたミセルの構造を PDB ファイル形式にて保存した。続いて、得られた全構造モデルに対して Crysol ver. 2.7 を用いて理論的な

散乱プロファイルを出し、SAXS の散乱プロファイルと、MD 計算によって得られたモデルの散乱プロファイルのフィッティングを行った。その際、どの程度 SAXS のデータと一致しているかを評価するため、類似度である Jaccard 係数を指標として解析した。Jaccard 係数の数値が 1 に近いほど SAXS と CRYSOLE の結果が一致していることを表す。この Jaccard 係数を、MD 計算の経過時間についてプロットし、ミセルの動的挙動について検討した。

4. 研究成果

(1) ミセル構造モデル (静的構造モデル)

DAMMIN にてミセルの大きな形状を決定し、その中に PACaL3 単分子モデルをあてはめたものを Fig. 2 に示す。実験結果より、PACaL3 は会合数 6 でミセルを形成することが明らかとなっているため、PACaL3 単分子モデル 6 つをあてはめたところ、得られたミセル構造モデルは正六面体構造に近いものであった。また、作成したミセル構造について、SAXS の散乱プロファイルとフィッティングを行った結果を Fig. 3 に示す。

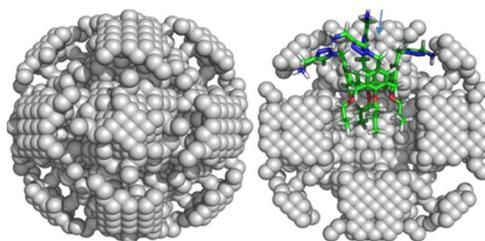


Fig. 2 DAMMIN によって得られた PACaL3 のミセル構造

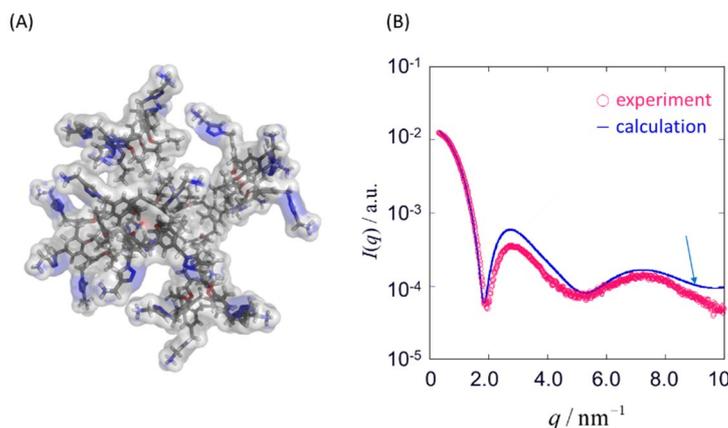


Fig. 3 (A)作成したミセル構造モデル、(B)SAXS の散乱プロファイル (図中赤丸) と作成したミセル構造から CRYSOLE にて得られた散乱プロファイル (図中青線)

(2) 分子動力学シミュレーション

作成したミセル構造モデルを用いて MD 計算を実行し、MD 計算から得られる構造データから理論的な散乱プロファイルを計算できる CRYSOLE にて、実験的に得られている SAXS の散乱データとフィッティングを行う事で、動的挙動の解析を行った。ソフトな構造であるミセルは、溶液中では熱運動による構造変化が生じる。この熱揺らぎによる構造変化について、どの程度 SAXS のデータと一致しているかを評価するため、類似度の 1 つで下式より算出可能な Jaccard 係数 ($J_{ind.}$) を指標として解析を行った

$$J_{ind.} = \frac{\sum_{i=0}^N [\log I(q_i) \times \log I_c(q_i)]}{\sum_{i=0}^N [\log I(q_i)]^2 + \sum_{i=0}^N [\log I_c(q_i)]^2 - \sum_{i=0}^N [\log I(q_i) \times \log I_c(q_i)]}$$

ここで、 $I(q_i)$ は SAXS の散乱強度、 $I_c(q_i)$ は CRYSOLE にて理論的に求めた散乱強度である。この Jaccard 係数を、MD 計算の経過時間についてプロットしたところ、熱揺らぎによりミセルの構造、つまり正六面体構造の崩壊と回復が起きていること示差された (Fig. 4)。

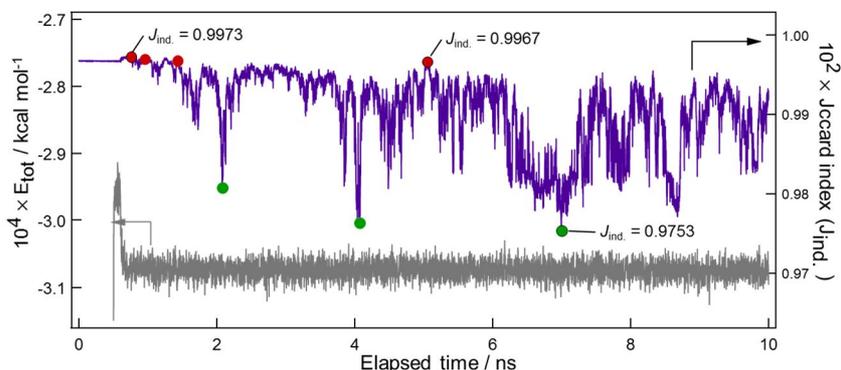


Fig. 4 MD 経過時間に対する Jaccard 係数の推移 (右軸)。図中の左軸は系のエネルギー (灰色線)

Jaccard 係数が高いモデルおよび低いモデルをそれぞれ抽出し、カリックス[4]アレーンの中心座標を求めて線で結んだところ、Fig. 5(A)で示す Jaccard 係数が高い赤線のモデルでは、Fig. 5(B)にて緑で示しているように中心座標も正多面体となり、Jaccard 係数が低いモデルでは、白で示しているように崩れていた。

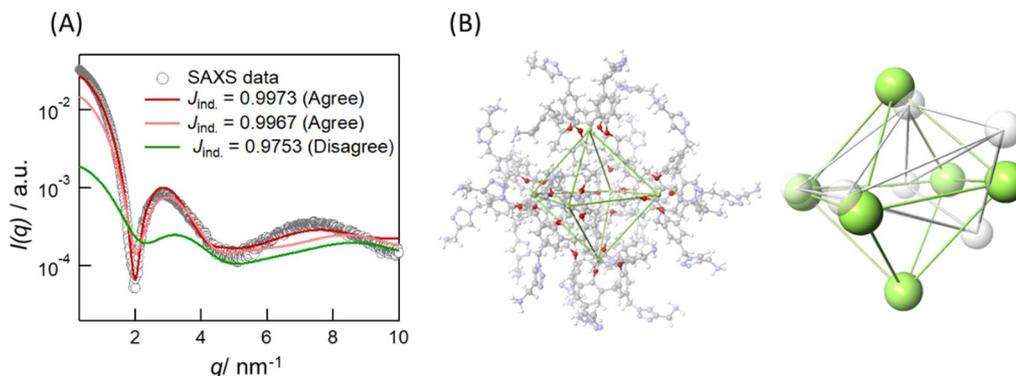


Fig. 5 (A)Jaccard 係数が離れたモデルの散乱プロファイル、(B)カリックス[4]アレーンの中心を線で繋げた描画

カリックス[4]アレーン環の lower rim の酸素と炭素および末端の窒素について、向かい合うペアの平均距離の分布を解析した結果を Fig. 6 に示す。

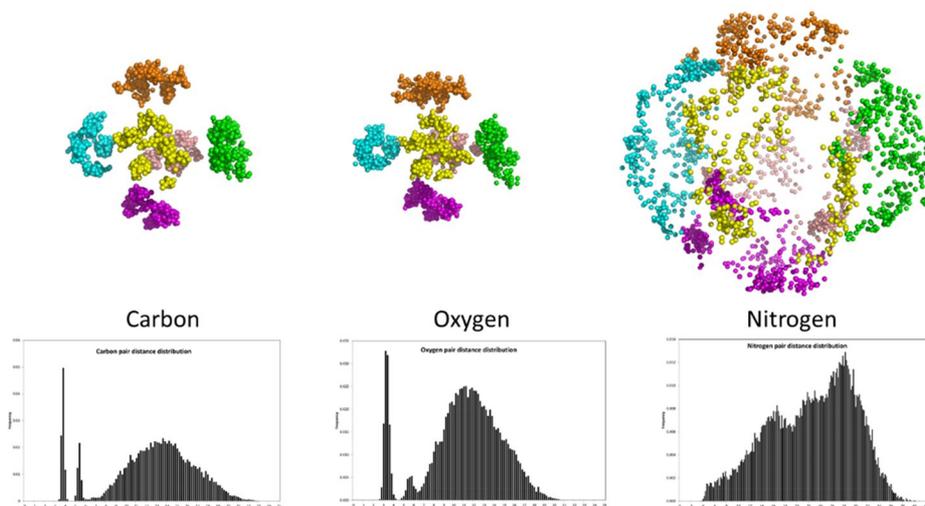


Fig. 6 (上)PACaL3 の炭素、酸素および窒素の軌跡図、(下)分布ヒストグラム

結果、各分子の炭素原子と酸素原子が小さな空間に配置されていることが明らかとなった。対照的に、高い可動性を有する窒素原子はミセルの表面全体に均一に分布していた。このことから、ミセルのコア部分の可動性はそれほど高くなく、密に凝集しており、正六面体構造を維持していることを裏付けるものである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Fujii Shota, Yamada Shimpei, Matsumoto Sakiko, Kubo Genki, Yoshida Kenta, Tabata Eri, Miyake Rika, Sanada Yusuke, Akiba Isamu, Okobira Tadashi, Yagi Naoto, Mylonas Efstratios, Ohta Noboru, Sekiguchi Hiroshi, Sakurai Kazuo	4. 巻 7
2. 論文標題 Platonic Micelles: Monodisperse Micelles with Discrete Aggregation Numbers Corresponding to Regular Polyhedra	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 44494
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/srep44494	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Mylonas Efstratios, Yagi Naoto, Fujii Shota, Ikesue Kodai, Ueda Tomoya, Moriyama Hideaki, Sanada Yusuke, Uezu Kazuya, Sakurai Kazuo, Okobira Tadashi	4. 巻 9
2. 論文標題 Structural analysis of a calix[4]arene-based Platonic Micelle	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1982
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-38280-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Tadashi Okobira, Ryo Takeuchi, Naoto Yagi, Shota Fujii, Kazuo Sakurai
2. 発表標題 Estimation of 3D structure of Platonic micelle by combination techniques of SAXS and Computational Chemistry
3. 学会等名 The 12th International Polymer Conference (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大河平紀司, 竹内良, 八木直人, 藤井翔太, 櫻井和朗
2. 発表標題 計算化学的手法を用いたプラトニックミセルの構造予測
3. 学会等名 第67回高分子討論会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 竹内良, 大河平紀司
2. 発表標題 実験と計算化学を駆使したプラトニックミセルの構造解析
3. 学会等名 第56回化学関連支部合同九州大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tadashi OKOBIRA, Efstratios MYLONAS, Naoto YAGI, Shota FUJII, Kazuo SAKURAI
2. 発表標題 Structural properties of Platonic Micelle constructed by calix[4]arene-based lipids
3. 学会等名 8th Asian Pacific Confederation of Chemical Engineering Congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大河平紀司
2. 発表標題 計算化学的手法によるプラトニックミセルの構造解析
3. 学会等名 第29回日本MRS年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 竹内良, 大河平紀司
2. 発表標題 実験と計算化学を駆使したプラトニックミセルの構造解析
3. 学会等名 第22回化学工学会学生発表会(岡山大会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 竹内 良, 藤井 翔太, 八木 直人, 櫻井 和朗, 大河平 紀司
2. 発表標題 計算法的手法によるプラトニックミセルの三次元構造予測
3. 学会等名 化学工学会第85年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

大河平研究室 http://www.ce.ariake-nct.ac.jp/lab/okobira/index.html

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考