

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 6 日現在

機関番号：32621

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05044

研究課題名(和文) 免疫測定に係る化学発光反応ダイナミクスと発光効率の革新的最適化

研究課題名(英文) Chemiluminescence reaction dynamics on immunoassays and innovative optimization for luminescence efficiency

研究代表者

南部 伸孝 (Nanbu, Shinkoh)

上智大学・理工学部・教授

研究者番号：00249955

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本課題では凝縮相における化学発光反応過程を取り上げ、四つの素過程である「電子移動・内部転換・項間交差・光発光過」に「溶媒効果」を加えることにより五つの素過程定が扱える理論および計算アルゴリズムの構築とその応用を目的とした。特に理論構築においては項間交差を定量的に扱うための計算アルゴリズムが検討された。比較的小さな分子による気相の光解離過程において実験では観測されているが、理論では再現されていない過程を新たに解明することに成功している。その一方、生物系への応用を踏まえ、三つの異なる計算モデル(ドッキング/古典MD/PME-ONIOM ab initio MD)による評価を実施することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ウェットケミストリーは、明らかに化学の中心である。ある分子を新たに開発する上で、利用する溶媒の種類によって大きく反応率が変化する議論は当然である。しかし、理論・計算化学の現状では、その議論はまだ未成熟であり、化学の世界に寄与しているとは言い難い。そこでQM/MMモデルにおいてPME法に基づき、溶媒効果を明示的に取り入れた方法(PME-QM/MM法)を開発し、生化学分野に応用する挑戦を行った。さらに、古典軌道ホップ法における項間交差の理論的な取り扱いが全く確立されていなく、本研究により新たに構築された。得られた成果は近年開発が進む蛍光過程の解明などに応用されると予想される。

研究成果の概要(英文)：In this research-project, the chemiluminescence reaction process in the condensed phase was taken up to newly construct the theory construction and computational algorithm which can treat all five elementary processes at the same time; those are solvent effect, electron transfer, internal conversion, intersystem crossing, and photoemission. In the theory construction, the algorithm for quantitatively handling the intersystem crossing was particularly examined; finally, we have succeeded in elucidating a new process that has been already found by experimental measurement in the photodissociation process of relatively small molecules, however it has not been reproduced in theory yet. On the other hand, based on the application to biological systems, we succeeded in conducting evaluations using three different types of models, docking, classical MD simulation, and ab initio MD simulation at PME-ONIOM hybrid-model.

研究分野：理論化学

キーワード：凝縮相の分子動力学 量子/古典ハイブリッドモデル エワルド総和法 PME-QM/MM 非断熱遷移 古典軌道ホップ法 細胞性粘菌 光合成

1. 研究開始当初の背景

凝縮相の理論計算において、無限遠まで広がるクーロン相互作用エネルギーを確実に取り入れることは不可欠であり、周期境界条件のもと粒子メッシュ・エwald総和(Particle Mesh Ewald, PME)法[1]が一般的な手法である。当然のごとく分子動力学(Molecular Dynamics)シミュレーションでは利用されており、MDシミュレーションと言えばPME法が利用され、凝縮相の実験結果が再現されてきている。これほど利用されている現代において、何故か量子/古典ハイブリッド(Quantum Mechanics/Molecular Mechanics, QM/MM)モデルを用いた計算には、溶媒効果を考慮しない傾向が強い。

一方、ウェットケミストリーは明らかに化学の中心である。ある分子を新たに開発する上で、利用する溶媒の種類によって大きく反応収率が変わる議論は当然である。しかし、理論・計算化学の現状では、その議論はまだ未成熟であり、化学の世界に寄与しているとは言い難い。そこで我々は、QM/MMモデルにおいてPME法に基づき、溶媒効果を明示的に取り入れた方法(PME-QM/MM法)を開発し、その効果を直接的に議論する挑戦を行っている。

2. 研究の目的

化学発光反応を理論的に扱う場合、電子移動・内部転換・項間交差・光発光過程からなる四つの素過程が想定される。しかし、この四つの素過程が順番に起こる保証はなく、むしろ二つ以上の過程が複雑に関連するとともに、溶媒の性質や構造により発光効率が大きく変化する。つまり、五つ目の素過程として溶媒効果も不可欠である。本研究では、非断熱遷移・自由エネルギー解析・アインシュタイン A 係数に基づく理論および溶媒効果を明示的に考慮した量子/古典ハイブリッドモデルを用い、五つの素過程を的確に捉えながら化学発光反応のメカニズムを解明する。さらに、反応物や溶媒の種類(極性や非極性など)を変え、電子状態が基底状態から励起状態へ非断熱遷移する過程(無輻射過程)において「高確率な非断熱遷移 = 高効率な発光」をもたらす要因を理論的に最適化する。得られる成果は、薬学における免疫測定において、生物発光を超える効率で発光する革新的物質を見出す初めの一步と期待される。

3. 研究の方法

QM/MMモデルの一つである諸熊奎治(京大)らが開発したONIOMモデルに対し、分子環境の効果にとって重要な遠距離力がある溶質 - 溶媒(部分電荷を持つ溶媒)間のクーロン相互作用エネルギーをPME法により取り込んだPME-ONIOMモデル[2]を用い、薬学における免疫測定(イムノアッセイ)に関連する化学発光反応の設計指針に寄与することを最終目的とする。

化学発光過程は、我々がこれまで取り組んできた素過程のすべてを伴う。つまり、電子移動・内部転換・項間交差・光発光過程からなり、本研究課題の一つの特徴である五つ目の素過程として「溶媒効果」を加え、すべての過程を同時に記述できる理論に基づき、化学発光反応過程の解明を行う。ONIOM理論と同様に、PME-ONIOMエネルギーを式(1)より求める。また、その傾きも項別微分により得る。

$$E_{\text{PME-ONIOM}} = E_{\text{real}}^{\text{MM}} + E_{\text{model}}^{\text{QM}} - E_{\text{model}}^{\text{MM}} + E_{\text{image with real}}^{\text{PME}} - E_{\text{real}}^{\text{Coulombic int.}} \quad (1)$$

MDシミュレーションでは、約0.25フェムト秒ごとに式(1)の E^{QM} を量子化学計算により求める。特に電子励起状態の場合は、励起状態のエネルギーとその傾きを求め、ニュートン方程式を解き、座標と運動量を時間発展させる。時間発展法は、一般的な分子力学(Molecular Mechanics)によるMDシミュレーションと全く同じである。そして、二つの電子状態が近接すれば、無輻射過程(非断熱遷移)が予想されことからZhu-Nakamura公式[3]を適用し、電子状態間のHop/Stayを判断する。この理論手法は、先に述べた五つの素過程すべてを記述できると共に、無輻射過程の制御となる電子状態が基底状態から励起状態へ非断熱遷移する過程を探し出し、高確率な非断熱遷移 = 高効率な発光をもたらす要因を直接最適化することができる。つまり、非断熱遷移付近の分子構造を取り出し、溶媒・温度なども変更し、高確率な遷移となる要因を最適化する。まさに仮想実験がもたらす革新的な技術である。一方、光発光過程は、アインシュタイン A 係数に基づく理論により発光確率を評価する。ただし、同時に遷移双極子モーメントの評価も実施する。

4. 研究成果

(1) 分子動力学シミュレーションによるDIF-1レセプター活性化過程の解析[4]

基質と酵素はまさにカギとカギ穴の関係となるが、酵素となるタンパク質のカギ穴を探すと共にその特性を調べる経験が、我々のグループでは皆無であった。そこで、上智大学にて粘菌の研究をされている齊藤玉緒教授の指導の下、細胞性粘菌についてカギとカギ穴の関係を調べる最初の候補として取り上げた。

具体的には、細胞性粘菌 *Dictyostelium discoideum* が飢餓状態になると、細胞同士が集合して胞子と柄二種類の細胞からなる子実体と呼ばれる複合体を形成する過程に現れる酵素反応に着目することとした。

この *D. discoideum* には非常にユニークな構造を持つポリケタイド合成酵素 SteelyB が報告さ

れている。SteelyB の機能により、基質分子となる Differentiation-Inducing Factor-1 (DIF-1) と呼ばれる塩素化合物が合成される。DIF-1 は柄細胞分化を誘導する因子であると言われており、非常に重要な生理活性を持ちながら、そのレセプターを初めとした誘導経路は約 40 年間に渡って不明のままであった。一方、実験によるレセプターをはじめとする誘導経路の解明は非常に困難であると知られているためコンピュータを利用した *in silico* のアプローチのみが、解決の新たな糸口を見出す可能性が示唆された。

最初に、レセプター候補であるタンパク質 Dictyostelium Histidine Kinase M (DhkM) に対して構造予測を行い、さらに MD シミュレーションによる構造探索を行った。一方、基質分子である DIF-1 と DhkM のドッキングシミュレーションを繰り返し、得られたモデルを結合自由エネルギーによる評価を行った。

DhkM は DIF-1 のレセプターである可能性が非常に高く、そして DIF-1@DhkM の結合過程において、基質分子認識過程は非常に重要な役割を果たしていることがわかった。特に、活性中心付近の残基による親水性・親油性総合作用及び立体構造変化は分子認識のファクターとして機能していたことを確認した。さらに、DIF-1 分子の誘導体を作成し、実験にて判明している結果の再現に成功した。(2019 年日本化学会論文賞を受賞)

(2) 自由エネルギー解析を用いた RuBisCO 炭素固定反応の同位体効果の研究[5]

(1) の成果を進展させ、QM/MM モデルへの拡張を試みた。応用する系は、光合成に係わる RuBisCO タンパク質である。RuBisCO はカルビン回路の炭素固定反応において唯一係わる酵素として機能し、空気中の CO₂ を固定してエネルギーリッチな生体分子を合成する。そして炭素固定反応において同位体効果が存在することが知られており、¹²C と ¹³C の質量による同位体分別が生じている。この同位体効果は多数の分野で活用されており、理論研究も積極的に行われてきた。しかし、従来のクラスターモデル等では同位体効果を正確に理解するには不十分だと考えられている。本研究テーマでは新たな QM/MM モデルを提案し、非経験的分子動力学(*ab initio* MD)シミュレーションを実施した。

まず、RuBisCO の構造解析を行うことにより、活性中心付近にトンネル状の経路を 1 つ見出した。そこで CO₂ 固定反応は、2 段階で起こると予測した。具体的には、「Phase 1: トンネル状経路内における CO₂ の拡散過程」と「Phase 2: これまで議論されている Mg イオン付近の錯体反応過程」の二つと仮定した。(図 1 を参照)

Phase 1 では古典的な MD シミュレーションを行い、拡散係数の見積もりを行った。結果は、ほぼ実験値を再現する同位体分別係数が得られた。さらに、Phase 2 では QM/MM モデルに基づく *ab initio* MD シミュレーションを行い、速度相関法に基づく自由エネルギー解析を行った。結果は、活性中心である Mg イオン付近まで自由エネルギー曲線が引力型となり、従来のクラスターモデルで得られる遷移状態が存在するポテンシャルエネルギー曲線の形状とは全く異なる結果となった。

従って、恐らく同位体分別過程は CO₂ の拡散過程にて生じており、固定反応の律速段階は本論文で定義した Phase 1 であることを新たに見出した。

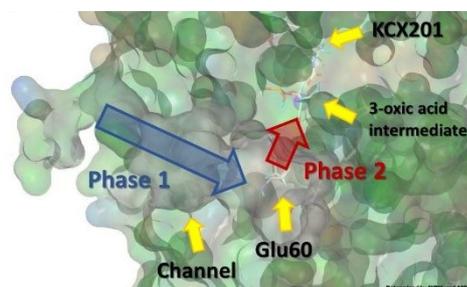


図 1 Phase1 および Phase2 の二つの過程からなる CO₂ 固定反応モデル

(3) アクリジニウムエステル化学発光機構に現れる項間交差過程における溶媒効果

標記にある分子について我々はこれまで量子化学計算による反応経路探索を行い、反応のメカニズムを解明して来た。しかし、反応は明らかに溶液の中で起こっており、電子状態間遷移を伴い発光に至る。さらに、電子状態間遷移に着目すると一重項・三重項間の遷移である項間交差過程がすべてを決定していると思われる。そこで、まず上記の(2)の成果を用い、非断熱過程を考慮しない溶媒を考慮した PME-ONIOM モデルに基づく *ab initio* MD シミュレーションを実施した。その結果、自由エネルギーが見積もられ、明らかに過酸化水素イオンとアクリジニウムエステル誘導体が錯体を形成する経路において約 3 eV 程度の自由エネルギーの低下が見出された。次に錯体が形成される付近に置いて溶液を除いた気相反応となるが、項間交差のみを考慮した *ab initio* MD シミュレーションを実施した。見積もられる項間交差における遷移確率は約 80 % あり、かなり大きな値となつて示された。

現在、PME-ONIOM モデルに基づく *ab initio* MD シミュレーションプログラムに項間交差における非断熱遷移を考慮したプログラムの開発を進めている。残念ながら 2020 年春に発生した新型コロナウイルスの蔓延に伴い開発の進捗が遅れている。その一方、開発は確実に進んでいることから、一年遅れとなるが 2021 年度には論文発表へ迎り着く予定である。

(4) PME-ONIOM モデルに基づく非断熱 *ab initio* MD シミュレーションプログラムの開発

我々が開発している PME-ONIOM モデルに基づく非断熱 *ab initio* MD シミュレーションプログラムの構造を図 2 に示す。図の中ではシクロヘキサン/ヘキサトリエンの光異性化反応を様々な溶媒にて化学反応動力学計算を実施することが可能となっている。

また、特徴的なのは PME および GAFF & RESP の部分を独立に扱っているため、そこだけ Gaussian Inc. がリリースする G16 パッケージの外部関数として利用可能である。[5]つまり、構造最適化も可能である。ただし、分子

の自由度を考えながら実施すること。今後はレプリカ交換法を組み込み、最安定構造に近い構造探索を *ab initio* MD シミュレーションにて実施したいと考えている。

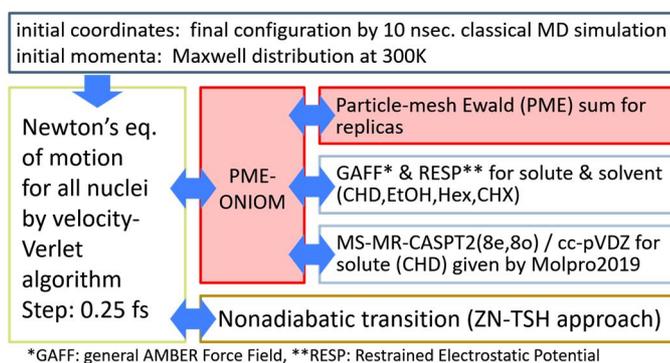


図 2 PME-ONIOM モデルに基づく非断熱 *ab initio* MD シミュレーションプログラム

< 引用文献 >

- [1] Essmann *et al.*, *J. Chem. Phys.* **103**, 8577 (1995); [2] Kobayashi, Nanbu, *Chem. Phys.* **461**, 47 (2015); [3] Ishida, Nanbu, Nakamura, *Int. Rev. in Phys. Chem.* **36**, 229 (2017); [4] Jang *et al.*, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **92**, 1436 (2019); [5] GitHub にて外部関数を公開 (<https://github.com/kobaya-sh/extsolv.git>) .

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Jiang Tianlong, Moriwaki Kenta, Kobayashi Osamu, Ishimura Kazuya, Danielache Sebastian O., Nanbu Shinkoh	4. 巻 41
2. 論文標題 Theoretical analysis of the kinetic isotope effect on carboxylation in RubisCO	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Computational Chemistry	6. 最初と最後の頁 1116-1123
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jcc.26156	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Jiang Tianlong, Saito Tamao, Nanbu Shinkoh	4. 巻 92
2. 論文標題 Theoretical Molecular Dynamics Simulation of the DIF-1 Receptor Activation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bulletin of the Chemical Society of Japan	6. 最初と最後の頁 1436-1443
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1246/bcsj.20190071	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 Nakazono Manabu, Nanbu Shinkoh, Akita Takeyuki, Hamase Kenji	4. 巻 170
2. 論文標題 Synthesis, chemiluminescence, and application of 2,4-disubstituted phenyl 10-methyl-10 4-acridine-9-carboxylates	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Dyes and Pigments	6. 最初と最後の頁 107628-107628
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.dyepig.2019.107628	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Sarka Karolis, Nanbu Shinkoh	4. 巻 123
2. 論文標題 Total Absorption Cross Section for UV Excitation of Sulfur Monoxide	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Physical Chemistry A	6. 最初と最後の頁 3697-3702
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jpca.9b01921	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sarka Karolis、Danielache Sebastian O.、Kondorskiy Alexey、Nanbu Shinkoh	4. 巻 516
2. 論文標題 Theoretical study of electronic properties and isotope effects in the UV absorption spectrum of disulfur	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Chemical Physics	6. 最初と最後の頁 108-115
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.chemphys.2018.08.045	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Manabu Nakazono and Shinkoh Nanbu	4. 巻 33
2. 論文標題 Enhancement effect on the chemiluminescence of acridinium esters under neutral conditions	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Luminescence	6. 最初と最後の頁 345-348
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ bio.3419	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Manabu Nakazono, Shinkoh Nanbu, Takeyuki Akita, Kenji Hamase	4. 巻 403
2. 論文標題 Chemiluminescence of methoxycarbonylphenyl 10-methyl-10 4 -2,7-disubstituted acridine-9-carboxylate derivatives	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry	6. 最初と最後の頁 112851(10pages)
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jphotochem. 2020.112851	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計17件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 12件)

1. 発表者名 Shinkoh NANBU
2. 発表標題 Nonadiabatic ab initio Molecular Dynamics of Photoisomerization Reaction in Solution
3. 学会等名 International Conference on Theoretical and High-Performance Computational Chemistry (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tianlong JIANG, Kenta MORIWAKI, Osamu KOBAYASHI, Kazuya ISHIMURA, Sebastian O. DANIELACHE, Shinkoh NANBU
2. 発表標題 Theoretical Analysis of Carboxylation in RubisCO
3. 学会等名 International Conference on Theoretical and High Performance Computational Chemistry (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Koki ISHIHARA, Syuichi ISHIMOTO, Satoshi KUBOTA, Masahiro FUJITA, Shinkoh NANBU
2. 発表標題 Molecular dynamics for inner structure of anion mixed plastic crystal
3. 学会等名 International Conference on Theoretical and High Performance Computational Chemistry (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yurika Takaku, Shinkoh Nanbu
2. 発表標題 Nonadiabatic ab initio Molecular Dynamics on Ultra-violet Photodissociation of Methylamine
3. 学会等名 International Conference on Theoretical and High Performance Computational Chemistry (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Karolis Sarka, S. Nanbu
2. 発表標題 Calculation of quantum exact UV absorption cross-sections for interstellar and atmospheric chemistry
3. 学会等名 XV International workshop on quantum reactive scattering (QRS2019 Workshop) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shinkoh Nanbu
2. 発表標題 Nonadiabatic ab initio molecular dynamics simulations in solution
3. 学会等名 XV International workshop on quantum reactive scattering (QRS2019 Workshop) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yurika Takaku, Shinkoh Nanbu
2. 発表標題 Nonadiabatic ab initio molecular dynamics on ultraviolet photodissociation of methylamine
3. 学会等名 XV International workshop on quantum reactive scattering (QRS2019 Workshop) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yurika TAKAKU, Shinkoh NANBU
2. 発表標題 Non-adiabatic ab initio Molecular Dynamics on Ultra-violet Photodissociation of Methylamine
3. 学会等名 35th Symposium on Chemical Kinetics and Dynamics (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kenta MORIWAKI, Ayumi OHTA, Osamu KOBAYASHI, Shinkoh NANBU
2. 発表標題 Nonadiabatic ab initio Molecular Dynamics of Photoisomerization Reaction between 1,3-Cyclohexadiene and 1,3,5-cis-Hexatriene
3. 学会等名 35th Symposium on Chemical Kinetics and Dynamics (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yusuke IKUTA, Koki ISHIHARA, Syuichi ISHIMOTO, Satoshi KUBOTA, Masahiro FUJITA, Shinkoh NANBU
2. 発表標題 Inner structures and Molecular dynamics simulation of plastic crystal
3. 学会等名 35th Symposium on Chemical Kinetics and Dynamics (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高久 ゆりか, 南部 伸孝
2. 発表標題 メチルアミンの真空紫外光解離過程における非断熱非経験的分子ダイナミクス
3. 学会等名 第13回分子科学討論会2019名古屋
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 姜 天龍, 齊藤 玉緒, 南部 伸孝
2. 発表標題 分子動力学シミュレーションによるDIF-1レセプター活性化過程の解析
3. 学会等名 第13回分子科学討論会2019名古屋
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 生田 雄亮, 石原 剛輝, 石本 修一, 久保田 智志, 藤田 正博, 南部 伸孝
2. 発表標題 有機イオン性プラスチッククリスタルの物性に関する分子動力学シミュレーション
3. 学会等名 第13回分子科学討論会2019名古屋
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石原 剛輝, 石本 修一, 久保田 智志, 藤田 正博, 南部 伸孝
2. 発表標題 アニオン混合系プラスチック結晶の内部構造動力学
3. 学会等名 第13回分子科学討論会2019名古屋
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 姜 天龍, 齊藤 玉緒, 南部 伸孝
2. 発表標題 分子動力学シミュレーションによるDIF-1レセプター活性化過程の解析
3. 学会等名 第9回CSJ化学フェスタ2019 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Karolis SARKA and Shinkoh NANBU
2. 発表標題 Calculation of absorption cross-sections and isotopic effects in photochemistry of S2 and S3
3. 学会等名 22nd European Conference on the Dynamics of Molecular Systems (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Karolis SARKA and Shinkoh NANBU
2. 発表標題 Time-independent approach for fine-structure calculations in electronic spectra
3. 学会等名 Workshop on Interstellar Matter 2018 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

日本化学会学会誌BCSJ誌において、論文賞を受賞
http://pweb.sophia.ac.jp/nanbu_lab/index.html
理工学部 物質生命理工学科の南部伸孝教授が日本化学会 BCSJ Award 論文賞を受賞
https://www.sophia.ac.jp/jpn/news/PR/1018_award.html
BCSJ Award Article
https://twitter.com/CSJjournals_jp/status/1184272747976974336

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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------