

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月28日現在

機関番号：32702

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21550017

研究課題名（和文） ONIOM 分子動力学法を用いた次世代化学反応理論の開発と酵素反応への応用

研究課題名（英文） Development of the chemical reaction theory and its application to the enzymatic reaction by the ONIOM molecular dynamics method

研究代表者

松原 世明 (MATSUBARA TOSHIAKI)

神奈川大学・理学部・教授

研究者番号：60239069

研究成果の概要（和文）：酵素の反応性を正確に評価するための熱振動の効果を新たに考慮した新規化学反応理論を構築することを目的とし、反応性と関係すると考えられる分子のエネルギーの揺らぎを解析した。その結果、自由度が同じでも環境が異なると環境の熱振動の効果によって反応部分のエネルギーが増幅することが分かった。

研究成果の概要（英文）：For the purpose of the development of the new chemical reaction theory that takes the effects of the thermal motion into account for the precise evaluation of the reactivity of the enzyme, we analyzed the energy fluctuations of the molecule that considered to be related to the reactivity. As a result, it turned out that the energy fluctuations of a reaction portion of the molecule is amplified by the effect of the thermal motion of the environment if the environment is different even though the number of degree of freedom is the same.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：基礎化学・物理化学

キーワード：酵素、化学反応、熱運動、環境の効果、化学反応理論、量子化学計算、分子動力学法

## 1. 研究開始当初の背景

申請者が共同開発した ONIOM 法は、量子化学計算が長年抱えてきた計算時間の制約という最大の問題を克服し、複雑な巨大分子の量子化学計算を実現した。これまでの QM/MM ハイブリッド法とは計算アルゴリズムが異なり、計算がシンプルでかつ精度が高い。現在では、世界で最もよく使われている量子化学計算プログラム

GAUSSIAN09 に組み込まれており、幅広い分野で用いられている。ONIOM 法は、北浦らのフラグメント分子軌道法や佐藤らの全電子密度汎関数法と並んで大規模複雑系電子状態計算法開発の一端を担っている。しかし、分子全体の熱揺らぎによる動きが機能と大きく関わっている酵素のような生体高分子には、原子の熱運動を考慮していない ONIOM 法をそのまま応用できない。一方、

これまで生体高分子等の大規模分子の計算で主流だった古典力学に基づいた分子動力学法では、原子の熱運動は考慮できるが、電子配置に変化があるような強い相互作用や反応のシミュレーションは不可能である。申請者が開発した ONIOM 法と分子動力学法を統合した ONIOM 分子動力学法は、このジレンマを見事に解決した。酵素のような大規模分子の中で起こる反応を原子核の熱運動の効果を考慮して量子論的に解析することができる。この ONIOM 分子動力学法を体内で抗癌剤活性化の鍵を握る酵素として知られるシチジンデアミナーゼ及び類似の抗癌剤活性作用を持つシトシンデアミナーゼに応用し、数万原子に及ぶ巨大実在酵素の水溶液内での反応の量子力学的分子動力学シミュレーションに初めて成功し、酵素触媒反応の様子を実際に視覚的に捉えることができた。

## 2. 研究の目的

酵素の触媒作用の効率を決定づけているのは活性サイトポケット内に配置されたアミノ酸残基である。通常、X 線解析によって決定された結晶構造から反応に直接関与するアミノ酸残基が特定され、その役割が推測される。基質が活性サイトポケット内で周囲のアミノ酸残基の環境の効果によって、反応し易い不安定な状態になることは容易にイメージできるため、ずいぶん以前から一般説として教科書にも書かれている。しかし、環境の効果の具体的なイメージは、明確にされていない。申請者は、ONIOM 分子動力学法によって、反応には直接関与しない周辺アミノ酸残基が熱運動を通して基質をエネルギー的に不安定な状態にしていることを実証するとともに、そのアミノ酸残基の特定に成功した。このアミノ酸残基の熱運動によって生じる環境の効果は、熱運動を考慮しない場合の立体効果とは異なり、「環境の動的効果」として理解できる。この「環境の動的効果」が基質のエネルギーの揺らぎに影響を与え、反応性を左右していることが示唆された。そこで、「環境の動的効果」を詳細に解析するために、 $H_2$  分子の還元的脱離反応を起こす簡単な分子  $cis-Pt(H)_2(PR_3)_2$  について ONIOM 分子動力学法により調べた。ここで、環境部分は、 $R=t-Bu$ ,  $Ph$ ,  $Me$  である。その結果、置換基が高くなるにつれて、反応部分のエネルギーの揺らぎは増幅されることが分かった。

「環境の動的効果」によって反応部分

のエネルギーの揺らぎは大きくなることによって、何らかの形で反応を容易にしていると考えられる。このような効果は、反応に関与しない環境部分が大きくなる大規模分子ほど重要であると考えられ、大規模分子の反応性評価のための化学反応理論を確立するためには既成概念を改革する必要がある。申請者は、既に、エネルギーの揺らぎの化学反応理論への導入を、2 状態理論において行っているが、これを更に発展させるとともに、その他の化学反応理論にも導入し発展させていく。本研究の研究成果は、化学反応の予測・設計指針の改善につながるとともに、新たな化学反応理論の展開と発展に大きな期待を与えるものである。また、本研究により生命活動の根源である酵素の反応性が定量的に評価できるようになれば、生命科学、生命工学、薬学、医科学などの最先端分野に多大な貢献を与えることは自明である。酵素がどのように生体内の反応を容易にしているのか、作用機構の理解を深めその本質に迫ることができる。

本研究では、まず、簡単なモデル分子について、環境部分の熱運動が反応部分のエネルギーの揺らぎを増加させる原因およびエネルギーの揺らぎの増大と反応性との関係を明らかにし、最終的にはエネルギーの揺らぎの因子を化学反応理論へ導入し、酵素などの大規模分子系における反応性により正確な評価法を確立することを目的とする。

## 3. 研究の方法

自由度が同じで環境が異なるモデル分子を用い (図 1、2)、ONIOM 分子動力学シミュレーションを行い、エネルギーの揺らぎを解析した。ONIOM 分子動力学シミュレーションは、ONIOM(HF:MM3)レベルでエネルギーを計算し、温度一定(300 K)で、1 ステップを 1 fs とし、100 ps 行った。

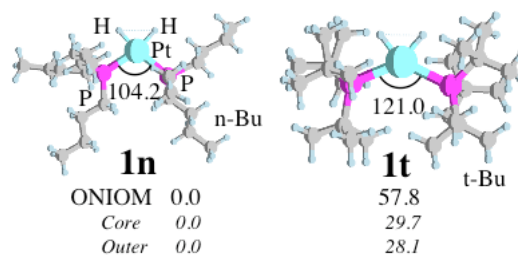


図 1. ONIOM 法による  $cis-Pt(H)_2(PR_3)_2$  ( $R=n-Bu$ ,  $t-Bu$ )の最適化構造(degree)および相対エネルギー(kcal/mol)

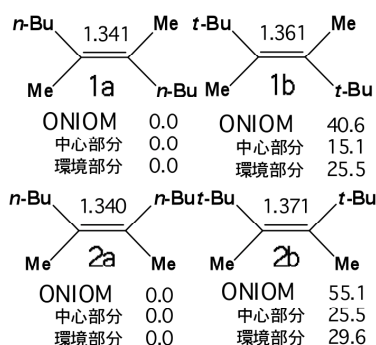


図 2. ONIOM 法によるモデル分子、1, 2 の最適化構造(Å)とそれぞれの相対エネルギー(kcal/mol)

#### 4. 研究成果

Cis-Pt(H)<sub>2</sub>(PR<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(R=H, Me, Ph, t-Bu)錯体の H<sub>2</sub> 分子の酸化的付加反応の逆反応である還元的脱離反応は、R= t-Bu の場合還元的脱離反応が起こるが、R=Ph, Me の場合は還元的脱離反応は起こらない。ONIOM 分子動力学法による解析の結果、t-Bu 基のような嵩高い置換基の場合、従来の立体効果(静的効果)は反応部分のエネルギー障壁を低くし、熱運動の効果(動的効果)は反応部分のエネルギーの揺らぎを大きくすることが分かった。しかしながら、関係式によって実証されているように、分子全体の自由度が異なるとエネルギーの揺らぎも異なるため、t-Bu 基のように原子数が増加すると、理論的にエネルギーの揺らぎも増加することになる。したがって、反応部分のエネルギーの揺らぎの増加が、環境部分の熱運動によるものなのかどうかという意見が学会発表などを通してあった。そこで、このような疑問を取り除くために、自由度が同じで嵩高さの異なる置換基、n-Bu と t-Bu を採用し、反応部分のエネルギーの揺らぎへの置換基の熱運動の効果を正確に調べた。

まず、cis-Pt(H)<sub>2</sub>(PR<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(R=n-Bu, t-Bu)のポテンシャルエネルギーの平均値と揺らぎの理論値を計算し、ONIOM 分子動力学シミュレーションの結果が理論値と一致していることを確認した。ただし、その中で、問題としている中心部分(cis-Pt(H)<sub>2</sub>P<sub>2</sub>)のポテンシャルエネルギーの揺らぎについては、嵩高い t-Bu 基の場合に理論値の約 2 倍大きかった(図 3)。平均値の大きさには従来の立体効果、揺らぎの大きさにはこれまで考慮されていなかった熱運動の効果が反映されていると考えられる。

そこで、中心部分が環境部分から受ける力を解析し、n-Bu 基と t-Bu 基の場合の間に比較した。その結果、環境部分から受ける力の平均値と揺らぎは、嵩高い t-Bu 基の場合の方が明らかに大きかった(図 4)。一方、

中心部分の運動エネルギーについては明らかな違いは見られなかった。また、特定の構造パラメータや原子の座標の変化にも顕著な差が見出せなかった。エネルギーの揺らぎ同様の差が必ずしも運動エネルギーや原子の座標の変位に反映される必要はないと考えられる。今後、エネルギーの揺らぎと反応性との関係を明らかにしていく糸口として、エネルギーの揺らぎの増大と振動励起との関連を解析していく必要があると考えられる。

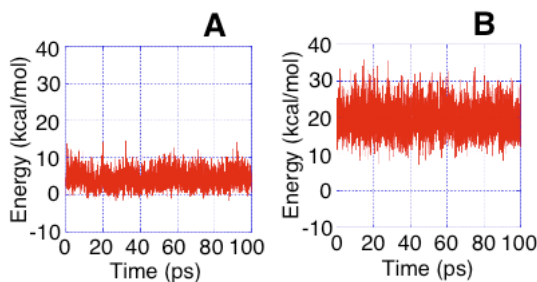


図 3. ONIOM 分子動力学法による cis-Pt(H)<sub>2</sub>(PR<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (R=n-Bu, t-Bu)の中心部分 cis-Pt(H)<sub>2</sub>P<sub>2</sub> のエネルギー変化. A: R=n-Bu, B: R=t-Bu.

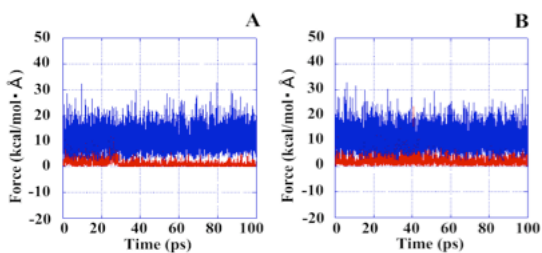


図 4. Cis-Pt(H)<sub>2</sub>(PR<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (R=n-Bu, t-Bu)の中心部分(cis-Pt(H)<sub>2</sub>P<sub>2</sub>)の 2 つの H(A, B)が環境部分から受ける力の経時変化. 赤: n-Bu, 青: t-Bu.

図 2 のモデル分子も同様に、C=C 部分のポテンシャルエネルギーの揺らぎについては、嵩高い t-Bu 基の場合に理論値より約 2 倍大きかった。それ以外のポテンシャルエネルギーの平均値と揺らぎについては理論値と一致した。また、MM 分子動力学シミュレーションを行った後 ONIOM 分子動力学シミュレーション同様の解析を行っても、ONIOM 分子動力学シミュレーション同様の結果を得た。このことから、中心部分のエネルギーの揺らぎの増加は、ONIOM 分子動力学法の人工的産物ではないことが確認できた。

さらに、どの領域でエネルギーの揺らぎの増加が生じるのか、中心部分の範囲を変えて調べた。その結果、図 5 に示すように、中心部分の領域を広げると t-Bu 基の場合の増大していたエネルギーの揺らぎ

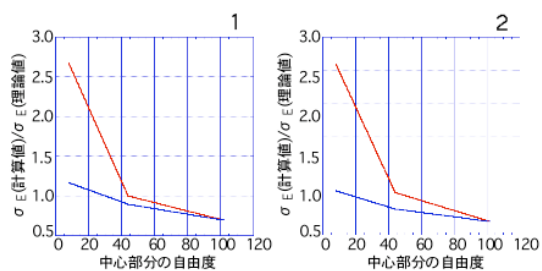


図 5. 1 および 2 の中心部分を広げた時のエネルギーの揺らぎの計算値と理論値の比の変化. 青:n-Bu, 赤:t-Bu.

は小さくなり理論値に近くなることが分かった。一方、n-Bu の場合は、もともと理論値に近く、中心部分の領域を広げてもさほど変化はなかった。これによって、中心部分のある領域でエネルギーの揺らぎが明らかに増大していることが確認できた。同時に、中心部分（反応部分）の領域は、反応性の評価の精度を左右する重要な因子であると考えられる。

今後は、実在酵素で解析を行うとともに、化学反応理論へのエネルギーの揺らぎの具体的な導入を考えていく必要がある。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

① T. Matsubara, Dynamical Behavior of the H<sub>2</sub> Molecule of the PtH(H<sub>2</sub>)[P(t-Bu)<sub>3</sub>]<sub>2</sub><sup>+</sup> Complex. A Theory of Chemical Reactivity., J. Phys. Chem. A, 査読有、113 巻、2009、3227-3236

② Y. Sakae, T. Matsubara, M. Aida, H. Kondo, K. Masaki, and H. Iefuji, ONIOM Study on the Mechanism of the Enzymatic Hydrolysis of Biodegradable Plastics, Bull. Chem. Soc. Jpn., 査読有、82 巻、2009、338-346

[学会発表] (計 11 件)

① 松原世明、化学反応の量子化学計算—有機金属錯体から生体高分子まで—、22 回神奈川大学平塚シンポジウム—計算化学最前線—、2012 年 3 月、平塚

② 杉山香織、高橋亮平、松原世明、ONIOM 法によるウィルキンソン錯体のオレフィン水素化反応機構の再検討、第 5 回分子科学討論会、2P093、2011 年 9 月、札幌

③ 渡邊慶市、佐野晃平、松原世明、Si 原子上での求核置換反応に関する理論研究、第 5 回分子科学討論会、3P094、2011 年 9 月、札幌

④ 松原世明、高橋亮平、ONIOM 法によるウィルキンソン錯体触媒のオレフィン水素化反応における配位子の置換基効果に関する理論研究、日本化学会第 91 春季年会(2011)、

2PC-176、2011 年 3 月、横浜

⑤ 竹充、松原世明、ONIOM 法によるローヤルゼリーの薬理作用に関する理論研究、日本化学会第 91 春季年会(2011)、2PB-024、2011 年 3 月、横浜

⑥ T. Matsubara、ONIOM and ONIOM-molecular dynamics methods: principles and applications, The 6<sup>th</sup> Kanagawa University – National Taiwan University Symposium、2010 年 12 月、National Taiwan University, Taiwan

⑦ T. Matsubara、Development of a chemical reactivity theory of large-scale molecular system, The Fourth Asian Pacific Conference of Theoretical and Computational Chemistry (APCTCC-4)、PP25、2009 年 12 月、Port Dickson, Malaysia

⑧ 松原世明、ONIOM 法の概念と応用—有機金属錯体から生体高分子まで—、コンフレックス株式会社主催「Gaussian09 セミナー」、2009 年 10 月、大阪

⑨ 松原世明、大規模分子の反応性の理論的予測法の開発、第 3 回分子科学討論会、4E07、2009 年 9 月、名古屋

⑩ 松原世明、Application of the ONIOM-molecular dynamics method to the chemical reactions. A new theory of chemical reactivity, International Symposium on Theory of Molecular Structure, Function and Reactivity、2009 年 7 月、京都

⑪ 松原世明、酵素の高反応活性の起源に関する理論的考察、第 12 回理論化学討論会、3D2b、2009 年 5 月、東京

[図書] (計 1 件)

① T. Matsubara、Handbook of Computational Chemistry Research、Charles T. Collett and Christopher D. Robson 編、Nova Science Publishers, New York、2009、執筆分：ONIOM and ONIOM-Molecular Dynamics Methods: Principles and Applications、第 2 章、pp. 69-95

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

松原 世明 (MATSUBARA TOSHIAKI)

神奈川大学・理学部・教授

研究者番号：60239069

(2) 研究分担者

なし ( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし ( )

研究者番号：