

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23657103

研究課題名(和文)蛋白質の分子動力学計算のための高次構造に依存する新規力場関数の開発と検証

研究課題名(英文)Development and validation of a new force field depending on protein structures for molecular dynamics simulations

研究代表者

中村 春木(NAKAMURA, Haruki)

大阪大学・たんぱく質研究所・教授

研究者番号：80134485

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：古典力学による分子動力学計算で利用する蛋白質高次構造に依存する力場関数の開発を目的とし、蛋白質中の代表的な二次構造である α -ヘリックスと平行および逆平行の β -構造としてエネルギー的に安定な構造を作り、それらの構造に対して厳密な量子化学計算を実施して高精度の構造エネルギーを算出した。その結果、代表的な古典力場である AMBER99-SB による構造エネルギーは、平行および逆平行 β -構造に対しては量子化学計算結果をほぼ再現したものの、 α -ヘリックス構造に対してはペプチド鎖長に依存して大きくエネルギー値が低下した。高次構造に依存する力場エネルギーの補正を行った所、量子化学計算結果を良く再現できた。

研究成果の概要(英文)：In order to develop a new force field depending on the tertiary structures of proteins, which can be used in classical molecular dynamics simulations, we performed highly accurate quantum chemical computations for typical and stable secondary structures, α -helices and β -sheets (both parallel and anti-parallel conformations). Then, the conformation energies of a variety of the peptide structures were compared with those calculated with AMBER99-SB classical force field. Consequently, for parallel and anti-parallel β -sheets, the energies given by the classical force field almost agreed with those by quantum chemical calculations. On the contrary, the former energies were much lower than the latter energies for α -helices, and α -helices were more stabilized as the peptide becomes longer with the classical force field. These deviations in the conformation energies calculated with the classical force field were well compensated depending on the tertiary structures.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：蛋白質 生物物理 分子シミュレーション 構造エネルギー 構造予測

1. 研究開始当初の背景

1977年にM. Karplusらによって開始された蛋白質の分子動力学 (MD: Molecular Dynamics) シミュレーションは成熟しつつあり、分子動力学の高速計算手法や Anton 等の専用計算チップの開発も進み、水溶液中蛋白質のミリ秒の長時間 MD 計算も既に実施されるようになった。しかし、これらの古典力学 MD で使わざるを得ない力場として高精度のものがない、という問題点がクローズアップされてきていた。実際、AMBER 力場を改良して拡張アンサンブル法によって求めた 40 残基のペプチド構造の自由エネルギー地形の解析では、天然構造に近い構造が得られたもののそれが最安定状態とはならなかった。また高精度の量子化学計算結果にフィットする力場パラメータが種々に求められていたが、天然の蛋白質構造が最安定となる解は得られていなかった。

一方、分光実験とアミノ酸変異を組み合わせた Gao らの研究(2009)でも、蛋白質中の水素結合の強さが局所的な極性に依存する context dependent であることを示している。すなわち、通常利用される力場の表式そのものに欠陥があり、そこで使われるパラメータをいくら精密化しても、信頼性が高い蛋白質の分子 MD シミュレーションには適用できないことを示唆していた。すなわち、主鎖の構造エネルギーには高次構造依存性があり、特に主鎖の水素結合エネルギーを高次構造に依存したものと捉え直し、高次構造に依存するような軌道相互作用を取り込むことで、信頼性が高い全く新たな力場の開発が可能であるという仮説を立て、この研究を着想して実施した。

2. 研究の目的

本挑戦的萌芽研究では、高精度の古典力学分子シミュレーションを行うため、蛋白質高次構造に依存する新規な力場関数とそのパラメータを開発し、第一原理計算による立体構造形成機序の解明を目的とする。現在の力場の表式そのものが基本的に持つ欠陥を検証した結果、主鎖の構造エネルギーには高次構造依存性があり、特に主鎖の水素結合エネルギーを高次構造に依存したものと捉え直し、高次構造に依存するように相互作用を取り込むことで、信頼性が高い新規な力場関数の開発を行う。

3. 研究の方法

蛋白質中の代表的な二次構造である α -ヘリックスと平行および逆平行 β 構造に対してエネルギー的に安定な構造を作り、それらの構造に対してポスト・ハートレーフォック法およびそれを良く再現する密度汎関数法による量子化学計算を実施して、高精度のエネルギーを得た。特に、水素結合のドナーとアクセプターの相対的な配置については、種々の場合を考慮し、後で古典的な力場パラメー

タとするための基礎データとした。全ての計算は研究室の既設の PC クラスタを利用し、量子化学計算は Gaussian を用いて実施した。

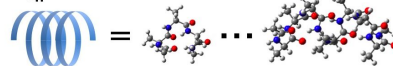
4. 研究成果

(1) 安定な二次構造モデルの生成

本研究を行うに際し、まず種々の典型的な二次構造を構築した。 α -ヘリックスとして $(\phi, \psi) = (-57^\circ, -47^\circ)$ 平行構造として $(\phi, \psi) = (-119^\circ, 113^\circ)$ 逆平行構造 $(\phi, \psi) = (-139^\circ, 135^\circ)$ の主鎖骨格構造を持つアラニン・オリゴマーを初期構造として構築し、その後 B97D/6-31+G(d)レベルの基底による密度汎関数法によって構造最適化を行った。

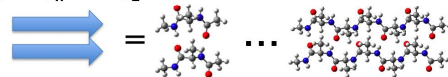
α -helix

ACE-(ALA)_n-NME: n = 3-8



parallel β -sheet

(ACE-(ALA)_n-NME)₂: n = 1-5



antiparallel β -sheet

(ACE-(ALA)_n-NME)₂: n = 1-5

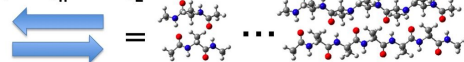


図1: 構築した種々の典型的二次構造

図1に示すように、 α -ヘリックスに対しては3残基から8残基までの長さのアラニンからなるペプチドを構築し、平行および逆平行 β 構造としては1残基から5残基のアラニンのペプチド鎖をそれぞれ2本用意して、 β シートのモデルを構築した。

(2) エネルギー関数と基底の選択

可能な限り高い精度の量子化学計算を実施するため、まず信頼性が高いポスト・ハートレーフォック法である MP2 により、図1の平行および逆平行 β 構造 (n=1~3) に対して β シート生成に関わる相互作用エネルギー (ΔE^{INT}) を算出した。ここで、

$$\Delta E^{INT} = E_{\beta\text{-sheet}} - E_{\text{strand-1}} - E_{\text{strand-2}} \dots [1]$$

と定義する。

これらの系に対して密度汎関数法として BLYP, B3LYP, PBE1PBE, M06-2X, CAM-B3LYP, B97D, B98, M06, LC- ω PBE の関数を用い、基底関数としては 6-31+G(d) を用いて ΔE^{INT} を計算した。その結果、平行および逆平行 β 構造の両者において、B97D の関数が常に最も MP2 の結果を良く再現した。基底関数として、より精度の高い 6-31+G(d, p) を用いた計算も実施したが、6-31+G(d) を用いた結果とほぼ同一だったため、以下の全ての計算では 6-31+G(d) を基底関数とした。

(3) 平行および逆平行 β 構造のエネルギー式 [1] で得られる相互作用エネルギー ΔE^{INT}

は、2本のペプチド鎖の主鎖間の水素結合エネルギーに直接対応する。これらの系に対して、B97D および古典力場である AMBER99-SB のパラメータでエネルギーを算出し、式[1]に従って相互作用エネルギーを算出した結果を図2に示す。

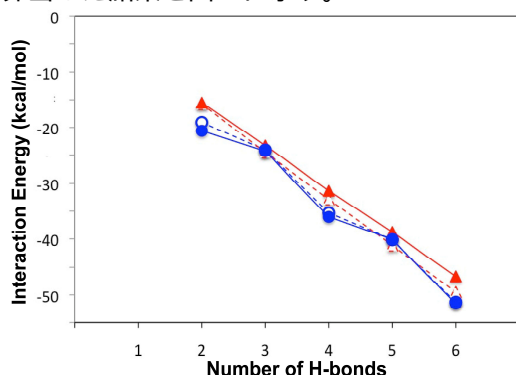


図2: アラニンペプチドによる、平行(赤)および逆平行(青)βシート構造の相互作用エネルギー ΔE^{INT} 。実線と塗りつぶしはB97Dによる量子化学計算結果であり、点線と白ヌキはAMBER99-SB古典力場による計算結果。

図2からわかるように、平行シート構造(赤)における相互作用エネルギーは、水素結合1つあたりにして -0.37 ± 0.14 kcal/molほど、古典力場である AMBER99-SB がB97Dによる高精度の量子化学計算よりも過大に算出されていた。一方、逆平行βシート構造(青)における相互作用エネルギーは、AMBER99-SBとB97Dの結果は良く一致していた。

また、図2の平行βシート構造(赤)は水素結合の数に比例して安定性が高くなっているのに対し、逆平行βシート構造(青)の場合には、水素結合が偶数ヶの場合に比べて、奇数ヶの場合にそのエネルギーの安定性が下がる現象が見られた。この現象は以前にも協同性現象として見出されていたが、古典力場による計算においても観測されることから、主鎖カルボニル酸素同士およびアミド水素同士が近接することによる静電的な反発により、容易に説明がなされる。

以上のことから、平行シート構造の場合には若干のエネルギー差があるものの、βシート構造に関しては力場パラメータによるエネルギーのズレは小さいと結論できた。

(4) α-ヘリックス構造のエネルギー

図1に示す $n=3\sim 8$ 残基のアラニンからなるα-ヘリックス構造に対して、式[2]で定義される ΔE^{REL} を、B97DとAMBER99-SBによって算出した結果を図3に示す。

$$\Delta E^{REL} = E_{\alpha\text{-helix}} - E_{\text{extended}} \quad \dots [2]$$

ここで E_{extended} は、同じ長さのペプチドが伸び切った伸展構造でのエネルギーを示す。

β構造の場合と異なり、 ΔE^{REL} は直接水素結合エネルギーとは対応しないが、 E_{extended} には分子内水素結合の寄与がないため、水素

結合による寄与を評価できる。

図3に示されるB97DおよびAMBER99-SBによる結果(黒丸と白丸)は、どちらも水素結合の数に比例せず、水素結合が多くなるほど(α-ヘリックスが長くなるほど)よりエネルギーが安定化している。共有結合によるエネルギー変化は残基数に比例するため、この効果は主に水素結合に起因するものと考えられる。

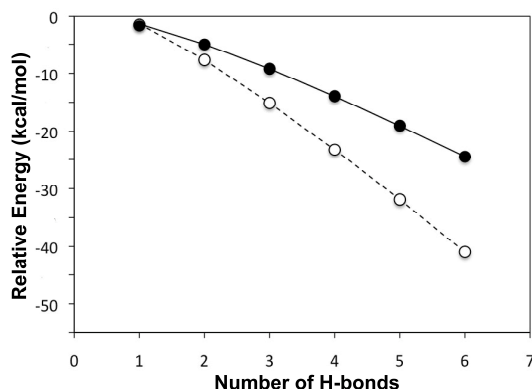


図3: アラニン3~8残基のペプチドによるαヘリックス構造の伸展構造からのエネルギー差 ΔE^{REL} 。B97Dによる量子化学計算結果(黒丸)と、AMBER99-SB古典力場による計算結果(白丸と点線)とを示す。実線はAMBER99-SBの結果に式[3]を用いてB97Dの結果にフィットさせた時の ΔE^{REL} を示す。

明らかに、AMBER99-SB古典力場によるエネルギーは、α-ヘリックスが長くなるほどより構造を安定化する方向にB97Dから大きくずれており、特に8残基のα-ヘリックスの場合には15 kcal/molほども安定化してしまっている。拡張アンサンブル計算によるペプチドの自由エネルギー地形からは、用いられる力場の特徴が顕著に現れるが、確かにAMBER99-SBはα-ヘリックスが好まれるという特徴が観測されており、図3の結果はつじつまが合っている。

図2で示されるようにβ構造では古典力場によるエネルギーは量子化学計算の結果を良く再現しているため、単独の水素結合に対する古典力場のパラメータが悪いとは考えられず、やはり初期に推測したように、主鎖の構造エネルギーには高次構造依存性があると考えられる。実際、α-ヘリックス自身が作るマクロスコピックな電場を考慮すると、N末側が正にC末側が負に帯電するため、この外場中にあるα-ヘリックス中の主鎖間の水素結合は、外場がない場合よりも原理的に弱くなるはずである。また隣り合う局所双曲子間にも電気的反発が起きていると考えられる。これらは定性的に図3の特徴をよく表している。

MD計算のためには、AMBER99-SBの力場を何らかの形で補正する必要があり、図3のAMBER99-SBとB97Dの値の差を水素結合の数 N_{HB} による関数で最小二乗フィット

したところ、次の関係式

$$\begin{aligned} (E^{REL}) &= E^{REL(B97D)} - E^{REL(AMBER99-SB)} \\ &= 2.7 \times (N_{HB} - 1)^{1.126} \text{ (kcal/mol)} \dots [3] \end{aligned}$$

が得られた。

式[3]の結果を用いて $\Delta E^{REL(AMBER99-SB)} + 2.7 \times (N_{HB} - 1)^{1.126}$ を算出した結果は図3中の実線で示されており、多体問題として種々の効果を含む量子化学計算 (B97D) の結果が良く再現された。高次構造依存性を MD 計算に取り込むためには、高次構造の形成を MD 計算の各ステップで確認し滑らかな解析関数によるスイッチング関数を用いることで可能である。今後、式[3]を組み込んだ拡張アンサンブル計算 (マルチカノニカル MD) を行って、その自由エネルギー地形を評価し、本研究の成果を発展させていきたい。

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12件)

1) Yamasaki H, Nakamura H, Electron density based interaction energy estimation of the special pair in the photosynthetic reaction center. Chem. Phys. Lett. 査読有, 536, 129-135 (2012) DOI: 10.1016/j.cplett.2012.03.087

2) Kita M, Nakamura H, Takano Y, Density functional study of the phosphodiester hydrolysis of RNA in RNA/DNA hybrid by RNase H. Mol. Phys. 査読有, 112, 355-364 (2014) DOI: 10.1080/00268976.2013.820854

[学会発表](計18件)

1) 山崎 秀樹, 中村 春木 「Atoms in molecules 法によるタンパク質 α ヘリックス、 β シートの水素結合相互作用の理論解析」第50回日本生物物理学会年会, 2012年9月22日~2012年9月24日, 名古屋大学東山キャンパス(名古屋市)

2) 鷹野 優, 中村 春木 「Quantum chemical study of intra- and inter- molecular interactions in secondary structures」第51回日本生物物理学会年会, 2013年10月28日, 京都国際会議場(京都市)

3) Nakamura H 「Towards quantitative analysis and prediction of protein-protein interactions」5th JCS (Japan, Czech, Slovakia) International Symposium on Theoretical Chemistry, 2013年12月3日, 東大寺総合文化センター(奈良市)(招待講演)

4) Takano Y, Nakamura H 「Theoretical study of local- and nonlocal- molecular interactions in secondary structures」5th JCS (Japan, Czech, Slovakia) International Symposium on Theoretical Chemistry,

2013年12月3-4日, 東大寺総合文化センター(奈良市)(招待発表)

5) 鷹野 優, 中村 春木 「二次構造形成に関する局所および非局所相互作用に関する計算化学的研究」スーパーコンピュータ・ワークショップ2013, 2014年1月21日, 自然科学研究機構・岡崎コンファレンスセンター(岡崎市)

6) Takano Y, Nakamura H 「Density functional study of local and nonlocal molecular interactions in secondary structure」54th Sanibel Symposium, 2014年2月18日, The King and Prince Golf & Beach Resort, Georgia, USA

7) Takano Y, Nakamura H 「Density functional study of molecular interactions in secondary structures of proteins」The 4th Asia Pacific Protein Association (APPA) Conference, 2014年5月17-20日, ICC Jeju, Korea

[図書](計0件)

[産業財産権]
出願状況(計0件)

[その他]
ホームページ等
http://www.protein.osaka-u.ac.jp/rcsfp/pi/index_pi.html

6. 研究組織

(1)研究代表者

中村 春木 (NAKAMURA, Haruki)
大阪大学・たんぱく質研究所・教授
研究者番号: 80134485

(2)研究分担者

鷹野 優 (TAKANO, Yu)
大阪大学・たんぱく質研究所・助教
研究者番号: 30403017