

令和元年5月15日現在

機関番号：24403

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K05664

研究課題名(和文)新しい自由エネルギー分割法を用いた分子内環境自己制御法の開発

研究課題名(英文) Development of intramolecular self-environment control technique based on the free energy contribution analysis

研究代表者

麻田 俊雄 (ASADA, TOSHIO)

大阪府立大学・理学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：10285314

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：我々の身の回りで生じる化学反応のほとんどは周囲の分子の構造揺らぎを受けながら生じている。これらの構造揺らぎを考慮した化学反応を理解するためには、エントロピー効果を含む自由エネルギーを詳細に解析しなければならない。本研究では計算機シミュレーションを行って、もっとも信頼性が高い反応経路を自由エネルギー面の上で最適化すること、および周囲の個々の分子からくる影響に分割することに成功したことが大きな成果である。これにより反応を促進または抑制するために必要な分子修飾の手法を確立することにも成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高い信頼性を維持しつつ、自由エネルギーの成分を原子間の寄与として明確化した点は大きな学術的意義をもつ。一般に、複雑な相互作用と熱揺らぎを含む結果として得られる自由エネルギーを、部分的な寄与に分割することは、温度や環境の影響を取り入れた反応制御の方法が確立するために、不可欠である。同時に、着目する生体反応を抑制するような薬品の開発にも生かすことができる点で、社会的意義も大きい。生体反応に深くかかわる酵素反応を周辺アミノ酸配置からの寄与として分割することで、自由エネルギーにもっとも深く影響を及ぼす分子を目的通り設計できる道筋がつけられたことから、強力な反応制御の新薬開発への発展が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Most of the chemical reaction occur in the molecular assembly, which is fluctuating at a given temperature. The free energy analysis is necessary to evaluate such chemical reactions considering the thermal fluctuations and the entropy effects. In this study, both the optimization method of the free energy minimum path, and then the free energy contribution analysis method were developed based on the computer simulation technique. The molecular modification technique were also established to enhance or reduce the focused reaction using the free energy contribution analysis.

研究分野：理論・計算化学

キーワード：自由エネルギー経路最適化 CDRK法 自由エネルギー寄与解析法 QM(CDRK)/MM法 セファロチン beta-lactamase 分子設計 自己環境制御

1. 研究開始当初の背景

(1) 自由エネルギー面上の酵素**反応経路最適化**に関する背景

巨大系で自由エネルギーについての信頼性が高い詳細な反応経路を得ることは、構造揺らぎの影響を考慮する必要があることから計算機の性能が発展しているにも関わらず依然として困難な問題である。研究開始当初、広く信頼性を下げた近似計算で反応を解析することが多かった。自由エネルギーの解析において自由エネルギー勾配 (FEG) 法が提案されていたものの、構造分布を得るためには膨大な繰り返し計算が必要であることから非経験的分子軌道 (MO) 法およびコストを抑えた Quantum Mechanical/Molecular Mechanical(QM/MM) 法を用いたとしても大きな系には適用できていなかった。そこで自由エネルギー面上の反応経路最適化について、高速かつ高い信頼性の手法の確立が重要な問題として認識されていた。

(2) **自由エネルギー解析と分子設計**に関する背景

環境分子からくる自由エネルギーへの寄与を解析するために、残基置換法や QM/MM 法と Poisson-Boltzman 法を組み合わせた手法が提案されていた。しかしながら、この手法は誘電連続モデルであるため信頼性に問題があった。さらに自由エネルギーを原子間の寄与に分割できる MO 計算レベルの高い信頼性をもった手法は存在していなかった。このため反応制御を目指すことは困難であり、分子の修飾が反応の自由エネルギープロファイルにどのように影響するかを知ることは不可能であった。

2. 研究の目的

(1) 自己環境制御法の確立

自由エネルギー制御を行うためには、高い信頼性を有し高速に計算できる理論計算手法を発展させる必要がある。本研究代表者が昨年提案した画期的な **FEG 計算に適した Charge and atom Dipole Response Kernel (CDRK) 法**は、MO 計算と同等の信頼性を保ちつつ FEG の計算を劇的に高速化(力場程度の計算コスト)することができる。さらに、MO 計算では分割が困難であった自由エネルギーの原子間への成分分割を可能にする。そこで、これを活用することで環境分子からくる自由エネルギーへの寄与を増大または減少させるために、**外場を制御する分子設計手法として自己環境制御法**を確立することを目的とした (図1)。

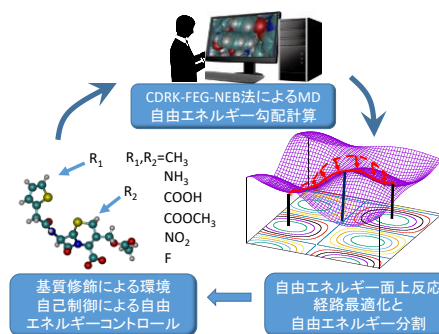


図1. 分子内環境自己制御法の確立

(2) **β -ラクタマーゼ**を対象とした新規抗生剤の設計指針の確立

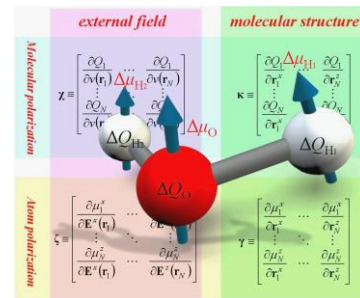
人類は病原菌の感染に打ち勝つために、いくつもの抗生剤を開発してきた。しかしながら近年は抗生物質を無効化する耐性菌が次々に出現し、人類の脅威になっている。これらの中には一部の耐性菌が産生する β -ラクタマーゼと呼ばれる抗生物質の β -ラクタム環を分解する酵素が存在する。そこで基質の分子修飾によって環境を自己制御し、**高信頼度な創薬分子設計技術に発展**

させることを本研究課題の目的とした。

3. 研究の方法

(1) CDRK 法を用いた FEG 計算と、NEB 法を活用した反応経路最適化

CDRK 法は図2に示すように分子内にわたる誘起分極と局所的な原子誘起双極子を MO 計算の信頼性で 1000 倍以上高速に再現することができる。これにより、信頼性のある FEG を得ることが可能となった。そこで、反応経路を最適化する手法である **Nudged Elastic Band (NEB)** 法と組み合わせることで自由エネルギー面上の反応経路最適化を高い信頼性で高速に求めることができる。この手法を、 β -ラクタム環を開環する酵素に適用し分解反応のメカニズムを解析する。



$$\Delta Q_a = \sum_{b \in \text{QM}} \chi_{a,b} \Delta v(\mathbf{r}_b^{\text{ref}}) + \sum_{b \in \text{QM}} \sum_{s \in x,y,z} \kappa_{a,ab} \Delta \mathbf{r}_b^s$$

$$\Delta \mu_a^i = \sum_{b \in \text{QM}} \sum_{s \in x,y,z} \zeta_{ia,ab} \Delta \mathbf{E}^s(\mathbf{r}_b^{\text{ref}}) + \sum_{b \in \text{QM}} \sum_{s \in x,y,z} \gamma_{ia,ab} \Delta \mathbf{r}_b^s$$

図2. MO 計算精度の分極高速計算応答核(CDRK)法

(2) 環境に応じた反応制御のための基質の分子内環境自己制御法

抗生剤のひとつであるセファロチンに着目し、自由エネルギー変化にもっとも大きな影響を受ける基質内の原子に対し分子修飾を行うことで、基質内の自己静電ポテンシャル場を生成し、自身のつくる場によって環境を制御する分子設計法へ展開する。これにより、環境に応じた反応制御法を確立することが見込める。提案した反応制御部位に対する基質内環境自己制御を新規分子設計指針に利用する。

4. 研究成果

(1) 最適化した自由エネルギー面上の反応経路

抗生剤のひとつであるセファロチンの β -ラクタム環の開環反応(図3)について、自由エネルギー面上で反応経路最適化を行った。その結果、活性化自由エネルギーが 26.0 kcal/mol で耐性菌により室温でも分解されうる結果が得られた(図4)。耐性菌が産生する酵素自体は分子修飾することができないため、分解されにくい抗生剤を設計するためには活性化障壁を高くするこ

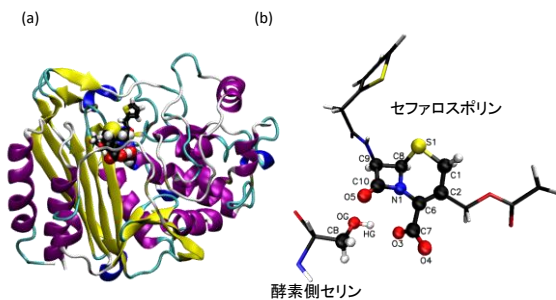


図3. (a) β -ラクタマーゼ (b)活性中心の構造 β -ラクタム環の C10-N1 結合が切断される。

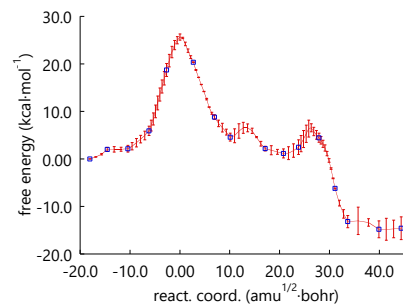


図4. β -ラクタム環の開環反応の自由エネルギープロファイル

とが必要である。最も自由エネルギーが高い活性化障壁は、活性中心に存在するセリンの水酸基のプロトン HG が基質のカルボキシラートイオンの原子 O3 に移動すると同時に、基質とセリンの HG-C10 間にアシル結合が生成する過程に存在することを明らかにした。それに続く、 β -ラクタム環の開環反応にともなう障壁は低くなっている。さらに本系においても、QM/MM法の計算結果と同等の信頼性を力場程度の計算時間で得られることを確認した。

(2) 自由エネルギーへの寄与分割の結果

上記 (1) の結果を利用して分子設計に展開するためには、現状の自由エネルギープロファイルがどのような外場からの寄与によって形成されているかを解明することが必要である。代表者が提案した CDRK 法は外場による影響を原子間の寄与にまで分割することが可能であるため、この手法を用いて自由エネルギー寄与分割法を確立し本系に適用した。得られた結果を図5に示す。本系の場合、自由エネルギー障壁の主成分は外場からの影響ではなく、抗生剤の構造からくることが示されている (QM energy)。外場の影響は、Lys, Arg, Glu の極性残基が遠距離相互作用として 5 kcal/mol 程度寄与することも明らかにした。そこで、遠距離力の原因となる残基からくる外部電場を制御することで、酵素によって分解されにくい抗生剤を設計し活性化障壁を調整することが可能になる結果を得た。

(3) 自己環境制御による新規分子設計

抗生剤が機能するためには、酵素によって分解されにくい分子設計が必要である。これは、自由エネルギーの活性化障壁を引き上げることで可能になる。自由エネルギーへの寄与分割の結果は、比較的少数のアミノ酸残基が活性中心への外部電場をとおして寄与し、大きな自由エネルギー低下をもたらしていることを明らかにした。そこで、この電場を打ち消す自己環境制御する分子を検討した。その結果、セファロチンに含まれる tiophene 基を 2-aminotiazole 基に置換することで実現する結果を得た。自由エネルギー寄与分割法を用いた結果、2-aminotiazole 基は tiophene 基における電荷分布と異なる分布を生じるため、活性中心への電場を変化させることで 1.8kcal/mol だけ遷移状態の障壁を引き上げる効果があることを明らかにした。以上の研究成

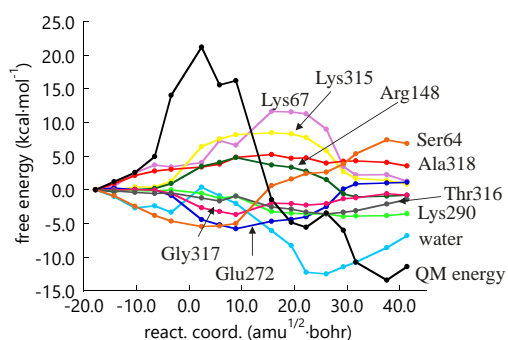


図5. 自由エネルギープロファイルの寄与分割の結果

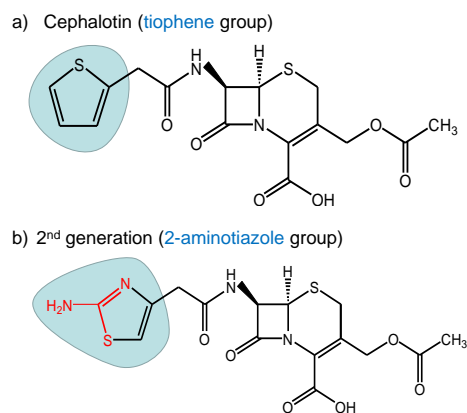


図6. 世代間による抗生剤の構造の違い
a) オリジナル b) 第二世代分子

果は、本設計による提案分子は、第二世代のセファロチン系抗生物質として利用されていたものの、本研究の当初の目的を達成し、自己環境制御法による分子設計指針が実用段階に入ったこと示している。同等の解析手法は、汎用であることから多様な分子設計手法として有効であることが確認できた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 10 件）

- ① T.Asada, B.Pradipta and S.Koseki, Computational approach for molecular design using free energy contribution analysis, *AIP Proc.*, 査読有, **2040**, 2018, 020016. DOI: 10.1063/1.5079058.
- ② T.Asada, N.Sawada, T.Nishikawa, and S.Koseki, An improved reaction path optimization method using a chain of conformations, *Chem.Phys.Lett.*, 査読有, **699**, 2018, 255-260. DOI: 10.1016/j.cplett.2018.03.058.
- ③ T.Asada and S.Koseki, Simulation study of hole mobility in the amorphous phase of organic molecules, *Org.Elec.*, 査読有, **53**, 2018, 141-150. DOI: 10.1016/j.orgel.2017.11.025.
- ④ R.Avijit, T.Yamaguchi, T.Asada, P.Bandyopadhyay, Understanding the structure and hydrogen bonding network of (H₂O)₃₂ and (H₂O)₃₃: an improved Monte Carlo Temperature Basin Paving (MCTBP) method and Quantum Theory of Atoms in Molecules (QTAIM) analysis, *RCS Advances*, 査読有, **7**, 2017, 18401-18417. DOI: 10.1039/C6RA28688G.
- ⑤ Numerical Estimation of the pseudo-Jahn-Teller effect using non-adiabatic coupling integrals in monocyclic and bicyclic conjugated molecules, S.Koseki, T.Azumao, T.Muramatsu, T.Asada, N.Matsunaga, *J.Phys.Chem.A*, 査読有, **120**, 2016, 10207-10215. DOI: 10.1021/acs.jpca.6b09632.
- ⑥ T.Asada, K.Ando, P.Bandyopadhyay, S.Koseki, Free Energy Contribution Analysis using Response Kernel Approximation: Insights into the Acylation Reaction for beta-lactamase, *J.Phys.Chem.B*, 査読有, **120**, 2016, 9338-9346. DOI: 10.1021/acs.jpcc.6b06104.
- ⑦ S.Koseki, S.Yagi, H.Yoshinaga, T.Asada, T.Matsushita, Spin-orbit coupling analyses of the phosphorescence: The effects of cyclometalated ligand replacement in Ir(ppy)₃ with various bpy ligands to blue phosphorescence, *RCS Advances*, 査読有, **6**, 2016, 65020-65030. DOI: 10.1039/C6RA07778A.

〔学会発表〕（計 27 件）

- ① Toshio Asada, Free energy contribution analysis of environmental effects on reaction free energy profiles, ICPAC LANGKAWI 2018 (2018) (招待).
- ② 澤田望実、麻田俊雄、小関史朗、クラス Cβ-ラクタマーゼとセファロチンとの複合体における脱アシル化反応の反応経路最適化に関する理論的研究、第 12 回分子科学討論会 2018 (2018).
- ③ 麻田俊雄、小関史朗、分子シミュレーションから得られるアモルファス構造における電荷移動度の新規計算手法、第 12 回分子科学討論会 2018 (2018).

- ④ Toshio Asada, Shiro Koseki, Free Energy Contribution Analysis using Charge and Atomic Dipole Response Kernels : Insights into Molecular Design, 16-th ICQC (2018).
- ⑤ Toshio Asada, Shiro Koseki, Computational approach to evaluate hole mobility in the amorphous phase of organic molecule, Photoinduced Processes in Embedded Systems 2018 (2018).
- ⑥ Toshio Asada, Computational Approach to Molecular Design using Free Energy Contribution Analysis, ICCMSE2018 (2018) (招待) .
- ⑦ 澤田望実、麻田俊雄、小関史朗、最小エネルギー探索手法である nudged elastic band 法における問題点とその改善に向けた研究、第 11 回分子科学討論会 2017 (2017).
- ⑧ 麻田俊雄、小関史朗、分子設計のための自由エネルギー成分分割法の適用、第 11 回分子科学討論会 2017 (2017).
- ⑨ Toshio Asada, Free Energy Contribution Analysis for Chemical Reaction by computer simulation, 4th TKU-OPU Conference (2016) (招待) .
- ⑩ Kotaroh Nonaka, Toshio Asada, Theoretical approach to analyze inhibition mechanism of enzymatic reaction, 4th TKU-OPU Conference (2016) (招待) .

[その他]

ホームページ等

<http://fock.c.s.osakafu-u.ac.jp/~asada/>