

機関番号：15501  
 研究種目：基盤研究(C)  
 研究期間：2008～2010  
 課題番号：20500276  
 研究課題名(和文) 水溶液中における分子認識予測のための分子軌道計算モデルの確立と  
 応用  
 研究課題名(英文) Establishment and applications of a computational model  
 for prediction of molecular recognition in aqueous solution  
 by molecular orbital calculations

研究代表者  
 谷 誠治 (TANI SEIJI)  
 山口大学・大学院理工学研究科・助教  
 研究者番号：60197514

研究成果の概要(和文)：本研究では、分子軌道計算により水溶液中における分子認識の熱力学を評価するための計算モデルを確立した。この計算モデルの確立により、(i)生体分子の溶液構造と分子認識過程に対する熱力学的パラメータの評価、そして、(ii)生体分子-水クラスターの水和構造と電子構造の解析において大きな進歩があった。

研究成果の概要(英文)：In the present study, a computational model has been established for evaluating the thermodynamics of molecular recognition in aqueous solution by molecular orbital calculations. This computational model improves significantly the following issues: (i) the evaluation of the thermodynamic parameters of the solution structure of biomolecules and for molecular recognition processes and (ii) the analyses of the hydration structure in biomolecule-water clusters and their electronic structure.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	400,000	120,000	520,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
年度	0	0	0
年度	0	0	0
総計	2,100,000	630,000	2,730,000

研究分野：生物物理化学

科研費の分科・細目：情報学・生体生命情報学

キーワード：水和クラスター、分子軌道計算、ギブズエネルギー、水和構造、電荷移動、排除体積効果、蛍光プローブ、ミトコンドリア

#### 1. 研究開始当初の背景

近年のコンピュータの著しい高性能化とソフトウェア技術の進展にともなって、生体高分子の立体構造と機能を分子レベルで解析するために、計算化学的手法(分子動力学法やモンテカルロ法)が広く使われるようになった。分子力場を用いるこれらの計算では、数百～数千個の水分子を含んだ系を取扱うことができ、核酸やタンパク質などの生体高分子の立体構造のみならず、その周りに存在する水と水の挙動に関する知見も得られる。

しかしながら、系の正確なエントロピーの計算は膨大な計算時間を必要とし、非常に困難とされている。結果として、系の安定性は内部エネルギーにより評価される。

一方、分子軌道計算や密度汎関数理論計算では、原子数の少ない分子系の化学構造や電子構造をより精度高く求めることができ、さらに、取り扱える原子の種類も豊富である。また、溶媒を均一な連続体として扱う近似理論も精力的に開発されており、溶媒和ギブズエネルギーや分光学的性質などがよく再現

されることが知られている。しかし、この近似に基づいた計算では、溶質-溶媒間の特異的相互作用、特に水溶液中で重要となる溶質の立体構造や反応に関与する水和水との水素結合に関する知見は得られない。そこで、水溶液系モデルのひとつとして第一水殻を形成できる数の水分子を含んだクラスターモデルも考えられているが、水分子の配置に任意性が残ることや溶媒としての統計的（巨視的）性質が考慮されていない点が指摘されている。

以上の観点から、量子化学的手法により水溶液系における分子認識を予測するためには、多数の水分子を効率よく取り込み、かつ、水/脱水和に起因するエントロピー項を定量的に算出できる計算モデルの確立が求められている。

## 2. 研究の目的

本研究の第一の目的は、生体分子の水和、生体分子と水和水との特異的相互作用、および、水溶液系における生体分子反応の熱力学的パラメータを評価できる量子化学的計算モデルを確立することである。第二の目的は確立された計算モデルをより多くの原子を含んだ系に適用し、本手法の有用性を検証することである。

そこで以下の6点に絞ったプロジェクトを進め、水溶液系の分子認識予測に有用な量子化学計算モデルの確立・検証を実施した。

### (1) 小分子系の熱力学的に安定な水殻構造の探索

水溶液系として取り扱うための溶媒モデルの構築において、溶質分子の周りに配置する水分子の数は特に重要な因子である。そこで、配置する水分子の数およびその配置の任意性に関する問題を克服する計算手法を検討する。

### (2) 低分子系の水和熱力学の解析

真空中に置かれた溶質分子が水クラスター( $H_2O$ )<sub>n</sub>に入り込む際の水和ギブズエネルギーを算出する。また、溶質分子の水和過程に対するエンタルピー変化を詳細に解析する。

### (3) 分子間相互作用における排除体積効果の解析

単純な分子間相互作用モデルとして、核酸塩基対の形成と2つの塩基対の $\pi$ - $\pi$ スタッキングの形成に着目し、それぞれの排除体積効果に寄与するエントロピー変化を解析する。

### (4) オリゴペプチドの二次構造

水溶液中におけるタンパク質の立体構造の熱力学的安定性に関しては、周囲に存在する水分子との相互作用からの寄与が非常に大きいとされている。また、 $\alpha$ ヘリックスや $\beta$ シートなどの二次構造はアミノ酸配列に強く依存するが、二次構造形成に対してアミ

ノ酸残基は異なった傾向を示すことが知られている。例えば、アラニン、グルタミン酸、ロイシンそしてメチオニンは特に $\alpha$ ヘリックスを作る傾向が強く、グリシンはその傾向が非常に弱いとされている。我々が提案する計算モデルによりこのヘリックス形成傾向を検証する。

### (5) 核酸塩基-アミノ酸相互作用

多くのタンパク質-核酸複合体の立体構造解析から、核酸塩基とアミノ酸との間に特異的相互作用、例えば、二本の水素結合を介したアデニン-アスパラギン/グルタミン相互作用等が存在することが見出されている。そこで、核酸塩基とアミノ酸との分子認識における熱力学的パラメータを解析する。

### (6) 核酸-薬物相互作用

低分子量の薬物と二重鎖核酸との非共有結合性相互作用として、a) 核酸塩基対間に挿入する（古典的インターカレーション）、b) 核酸の溝に結合する（グループ結合）、c) 構造の一部はインターカレーション機構で結合し、他の部分は溝に結合する、およびd) 核酸塩基対間を貫通し、かつ溝にも結合（縫込み型インターカレーション）が知られている。本プロジェクトでは、これらの結合様式に関する熱力学を解析する。

なお、研究実施期間内に平行して行ってきた蛍光プローブの耐光性と細胞内ミトコンドリア染色に関する予備実験に大きな進展があった。そこで、蛍光プローブの開発が急務であると判断し、当初予定していた(6)の一部と応用研究（特定の核酸塩基配列やアミノ酸配列を認識・結合する新規なプローブ分子の設計への応用的研究）を取りやめ、下記プロジェクト(7)を実施した。

### (7) バイオイメージング用蛍光プローブの開発

蛍光性色素によるバイオイメージングにおいては、蛍光プローブ自身の光退色性が問題となる。有機色素を粘土鉱物に吸着させることにより耐光性の向上が期待できると考えられている点を考慮し、粘土鉱物共存下における蛍光色素の耐光性を調べる。また、二光子吸収特性の高い蛍光性色素がバイオイメージング用蛍光プローブとして利用できるかどうかについて調べる。

## 3. 研究の方法

本研究では、溶質-溶媒間の特異的相互作用に関する情報を得るために、溶媒となる水分子をあらわに含む溶媒モデルの一つである生体分子の水和クラスターモデルを採用した。

水和水の配置方法と溶媒としての統計的性質に関する問題を克服するために、溶質分子の周りに水分子を発生（配置）させた後、

溶質分子の構造を固定したまま水和水のみの分子力学・分子動力学 (Molecular Dynamics: MD) 計算により系を平衡化させた。引き続き MD 計算を行い、一定時間経過ごとに水和クラスター構造をサンプリングした。サンプリングした水和構造は分子力学計算によりエネルギーの最小化を行った。さらに、得られた構造を初期構造として半経験的分子軌道計算により溶質分子を含む水和クラスター全体の構造を最適化し、振動解析よりそれぞれの水和クラスターのギブズエネルギーを算出した。最後にボルツマン分布を仮定して、各系の熱力学的パラメータを算出した。

#### (1) 小分子系の熱力学的に安定な水和構造の探索

水分子数個から 50 個程度までを含む核酸塩基 (A, T, C, G) の水和クラスター構造について、上述の計算プロトコールにより、いくつかの安定な水和クラスター構造を求め、それぞれの熱力学的パラメータを算出した。また、溶質分子の第一水和殻形成に必要な水分子数を決定した。

#### (2) 低分子系の水和熱力学の解析

真空中に置かれた溶質分子が水クラスター ( $(\text{H}_2\text{O})_n$ ) に入り込む際の過程は図 1 のように 3 段階に分けて考えることができる。

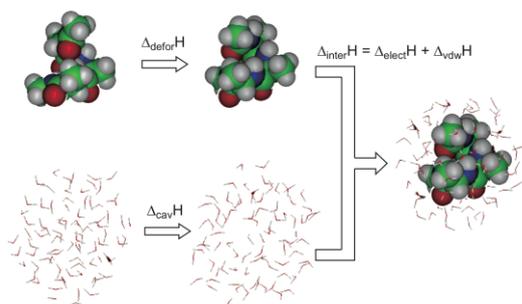


図 1 溶質分子の水和過程

真空中に置かれた溶質分子の立体構造は水に適した構造に変化する ( $\Delta_{\text{defor}}H > 0$ )。一方、水クラスターはこの構造変化した溶質を収容するための空洞を形成する ( $\Delta_{\text{cav}}H > 0$ )。この空洞内部は真空である。最後に、構造変化した溶質分子が空洞中に挿入され、溶質分子と水クラスターとの間に相互作用が生じる。半経験的分子軌道計算で算出されるエンタルピーには、静電的相互作用のほか、van der Waals 相互作用からの寄与も含まれているとされている。これらのエンタルピー変化の総和が水和エンタルピー変化として算出される。また、真空中の安定な溶質分子、水クラスターおよび溶質分子-水クラスター系のギブズエネルギーより水和ギブズエネルギー変化 ( $\Delta_{\text{hyd}}G$ ) を求めることができる。ただし、本計算方法では構造変

化した溶質分子と空洞のある水クラスターは真空中では安定構造ではないため、これらのエンタルピーは算出できない。したがって、各段階のエンタルピー変化のみを求めることができる。

そこで、溶質分子が水クラスター ( $(\text{H}_2\text{O})_n$ ) に入り込む際のギブズエネルギーのほか、溶質分子の水和、水クラスター中の空洞形成、および、溶質分子-水クラスター相互作用の各エンタルピー変化について解析した。

#### (3) 分子間相互作用における排除体積効果の解析

一塩基対 (AT, GC) と  $\pi$ - $\pi$  スタッキングした二塩基対の安定な水和クラスター構造を求め、第一水和殻を形成するために必要な水分子の数を決定した。さらに、塩基対および  $\pi$ - $\pi$  スタッキング形成にともなう第 1 水和殻中の水和水の数の変化を調べた。続いて、塩基対形成と核酸塩基対の  $\pi$ - $\pi$  スタッキング形成におけるギブズエネルギー解析を行い、排除容積効果に寄与するエンタルピー変化を評価した。

#### (4) オリゴペプチドの二次構造

$\alpha$  ヘリックスの形成には少なくとも 4 残基以上のアミノ酸が必要である。ヘリックスを作る傾向が最も強いとされるアラニンのみを含むオリゴペプチドの  $\alpha$  ヘリックス構造と伸長構造の熱力学的安定性に及ぼす水和の影響を調べた。また、グリシン (ヘリックスを作る傾向が最も弱いとされる) のみを含むペプチド、およびアラニンとグリシンの両アミノ酸を含むペプチドの熱力学的安定性、電子構造およびペプチドの周りに存在する水分子の配向 (水和構造) について検討した。

#### (5) 核酸塩基-アミノ酸相互作用

アデニン-アスパラギン/グルタミン、および、グアニン-アルギニン相互作用における熱力学的パラメータを解析した。

#### (6) 核酸-薬物相互作用

結晶構造解析が行われているエチジウムとミニヘリックス  $r(\text{CpG})_2$  の系を例として、色素の平面構造部分が核酸塩基対間に挿入 (インターカレーション) する非共有結合型反応の熱力学的パラメータを解析した。

#### (7) バイオイメージング用蛍光プローブの開発

イオン交換反応により粘土鉱物 (合成サボナイト) 表面に吸着したカチオン性有機色素の耐光性を調べた。また、水溶液中におけるフルオレン誘導体の二光子吸収特性と生細胞中ミトコンドリアに対する吸着挙動を調べた。

### 4. 研究成果

#### (1) 小分子系の熱力学的に安定な水和構造の探索

核酸塩基 A, T および C の周りに第一水和殻

を形成するために必要な水分子の数は少なくとも約 35 個、一方、G では約 40 個であった。またすべての塩基-水クラスター系のエンタルピー、エントロピーおよびギブズエネルギーはあらわに考慮する水分子数の増加とともに、線形的に減少または増加した。すなわち、得られた計算結果を用いれば、少なくとも 50 個程度までの任意の数の水分子を含む塩基の水和クラスター構造に対する熱力学的パラメータを高い精度で簡単に算出できることが示された。

### (2) 低分子系の水和熱力学の解析

一例として、 $\alpha$ ヘリックス構造と伸長構造をとるオリゴペプチド（アラニン7残基）が水クラスター  $(\text{H}_2\text{O})_n$  に水合する系の解析結果について要約する ( $n=139$ ,  $T=298\text{ K}$ )。オリゴペプチド鎖の両末端間に生じる静電的引力相互作用の効果が大きくならないように、N 末端と C 末端とをそれぞれアセチル基およびメチルアミノ基でブロックした。

真空中と水合クラスター中のヘリックス構造はほとんど変化していなかった。また、ヘリックス構造は伸長構造よりも小さい分子容積をもち、空洞形成に要するエネルギーは伸長構造のそれよりも小さかった。しかし、水クラスターとの相互作用エンタルピーはほとんど同じであり、エントロピー変化にも大きな違いはなかった。したがって、熱力学的に安定なヘリックス構造の水和はエンタルピー駆動型であることが示された。

以上、(1) と (2) の結果より、本研究課題で採用した計算モデルは、水分子の配置に関する任意性がある程度取り除くことができ、そして、溶媒である多数の水分子の統計的性質を取り込むことができるため、水溶液系の分子間相互作用の解析に有用であることが示された。

### (3) 分子間相互作用における排除体積効果の解析

核酸塩基対の水和構造の解析により、AT および GC 塩基対では第一水合殻を形成するために 60 個程度の水分子が必要であることが明らかとなった (図 2)。この結果は、塩基および塩基対の第一水合殻のみに着目すると、AT および GC 塩基対の形成に伴い塩基の第一水合殻より 10 個程度以上の水分子が放出されることを示唆している。

2つの塩基-水クラスターの会合により塩基対の水和クラスターが形成されるときのエントロピー変化は負となった。主に並進と回転の自由度の減少にともなうものであり、排除体積効果によるエントロピー増加はほとんど認められなかった。一方、2つの核酸塩基対が一層分の水分子を含む程度の距離

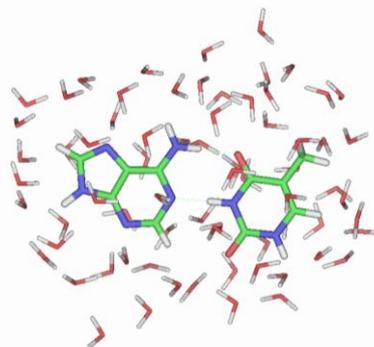


図 2 AT 塩基対- $(\text{H}_2\text{O})_{69}$  クラスター構造

から  $\pi$ - $\pi$ スタッキングを形成するエントロピー変化は正となり、系のギブズエネルギーが低下した。振動解析によると、低振動数を示す振動モードの振動数がより低下する傾向があり、水和水により形成されている水素結合ネットワークが塩基対のスタッキングにともなってより強くなっていることを示唆した。

本計算モデルにより、二分子会合に伴う排除体積効果に起因するエントロピー変化を定量的に解析できることが示された。

### (4) オリゴペプチドの二次構造

アラニンのみを含むオリゴペプチドでは、伸長構造に対してヘリックス構造が水和によって大きく安定化されることがわかった。一方、グリシンのみを含むオリゴペプチドでは伸長構造とヘリックス構造の相対的な熱力学的安定性に及ぼす水和の影響に大きな差はなく、同程度の安定化を受けていた。また、ヘリックス構造をとっているアラニンペプチドの周囲に存在する多くの水分子は、ペプチド自身の大きな双極子モーメントを相殺するように配向していることや、水素結合を通してペプチドと水分子との間で電荷移動がおこっていることが明らかとなった。

本研究により初めて、アラニンとグリシンのヘリックス形成傾向の違いを計算化学的に説明することができた。

### (5) 核酸塩基-アミノ酸相互作用

アスパラギンとグルタミン側鎖の末端部分 (カルボキシアミド基) が核酸塩基 A (アミノ基と  $N_7$ ) に、また、正電荷を有するアルギニン側鎖の末端部分 (グアニジル基) が核酸塩基 G ( $O_6$  と  $N_7$ ) に、2本の水素結合を形成する系に適用した。その結果、前者は水素結合を介して安定な複合体を形成する (エンタルピー駆動型) ことがわかった。一方、後者は正のギブズエネルギー変化を示した。これは正電荷を有するグアニジル基からの脱水和に大きなエネルギーを必要とするためであり、単独でのアルギニン-グアニン相互作用は起こりにくいことが示唆された。

### (6) 核酸-薬物相互作用

総原子数 900 個以上を含む系のため、半経験的分子軌道法による構造最適化に要する計算時間が長く、振動計算にも大量の計算資源を必要とするが、従来の実験的知見（典型的なエンタルピー駆動型反応）と一致する結果を得ることができた。

#### （7）バイオイメージング用蛍光プローブの開発

粘土鉱物による有機色素の耐光性向上の実験では、光分解が促進される色素と促進されない色素が存在することが明らかとなった。光分解が促進された有機色素の光分解反応機構を明らかにした。

蛍光プローブの開発では、水溶性フルオレン誘導体により HeLa 細胞とゾウリムシ内のミトコンドリアを選択的に染色でき、長時間観察が可能となった。さらに、水溶液中でも従来の蛍光プローブよりも二光子吸収効率が大きく、二光子励起蛍光プローブとしても優れた特性が期待できることが分かった。

#### 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 Seiji Tani, Kouta Nakagawa, Takuya Honda, Hiromasa Saito, Yasutaka Suzuki, Jun Kawamata, M Uchida, Akira Sasaki, and Masataka Kinjo, “Fluorescence Imaging of Mitochondria in Living Cells Using a Novel Fluorene Derivative with a Large Two-Photon Absorption Cross-Section,” *Curr. Pharm. Biotechnol.* in press. (2011) (査読有).
- ② Seiji Tani, Hiroshi Yamaki, Daisuke Nakayama, Yasutaka Suzuki, and Jun Kawamata, “Proton NMR Studies on Rhodamine B in an Aqueous Clay Suspension,” *Clay Science*, 14, 81-86 (2009). (査読有).

〔学会発表〕（計 8 件）

- ① Seiji Tani, “Computational chemical studies on the structure and stability of oligopeptides in water cluster,” 2010 International chemical congress of pacific basin societies (pacificchem 2010), 2010 年 12 月 19 日, Honolulu, Hawaii, USA.
- ② 谷誠治、鈴木康孝、川俣純、「ミトコンドリアの可視化のための二光子励起蛍光プローブ（招待講演）」、第 7 回バイオオプティクス研究会・理研シンポジウム「蛍

光相関分光と情報伝達（7）」合同シンポジウム、2010 年 12 月 4 日、東京農工大学（東京都）

- ③ 谷誠治、「量子化学計算による水和ペプチドの熱力学的安定性と電子構造の解析」、第 37 回生体分子科学討論会、2010 年 6 月 18 日、山口大学（山口市）
- ④ 谷誠治、「水和クラスターモデルを用いたオリゴペプチドの構造と安定性に関する分子軌道法による研究」、第 32 回情報化学討論会、2009 年 10 月 30 日、常磐工業会会館（宇部市）
- ⑤ 中山大輔、山木博史、谷誠治、川俣純、「粘土との複合化により光分解が促進される有機色素の構造上の特徴」、第 53 回粘土科学討論会、2009 年 9 月 11 日、岩手大学（盛岡市）
- ⑥ 谷誠治、山木博史、中山大輔、鈴木康孝、川俣純、「プロトン NMR による粘土水懸濁液中における有機色素の動的挙動と光分解」、第 53 回粘土科学討論会、2009 年 9 月 11 日、岩手大学（盛岡市）
- ⑦ 谷誠治、「水和クラスターモデル計算による分子間相互作用の自由エネルギー解析：核酸塩基対」、日本コンピュータ化学会 2008 秋季年会、2008 年 9 月 28 日、高知大学（高知市）
- ⑧ 山木博史、中山大輔、鈴木康孝、谷誠治、山崎鈴子、川俣純、「粘土を触媒とした有機色素の光分解」、第 52 回粘土科学討論会、2008 年 9 月 3 日、沖縄ポートホテル（那覇市）

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

- 出願状況（計 0 件）
- 取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.sci.yamaguchi-u.ac.jp/office/news/2010/index1020.html>

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

谷 誠治 (TANI SEIJI)

山口大学・大学院理工学研究科・助教  
研究者番号：60197514

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし