

jh220006

タンパク質中での重水素結合ネットワークに関する 第一原理シミュレーション研究

立川 仁典 (横浜市立大学)

概要

医薬品や材料中に含まれている水素を重水素に置換することで、様々な機能向上が確認されており、例えば重水素置換医薬品の活用が進んでいる。しかしながら、重水素置換することにより、医薬品や材料の機能がなぜ向上するのかについて、その詳細なメカニズムについては明らかにされていない。重水素の機能向上のメカニズム解明を妨げている要因の 1 つは、水素・重水素の質量は軽く、それらの振る舞いを詳細に解析するには原子核の量子性を考慮する必要があるためである。一方、一般的に利用されている第一原理計算パッケージでは、水素の量子効果を取り扱うことはできない。そこで本研究では、材料および生体分子中での重水素の量子性を考慮するために、我々の研究室で開発されてきた多成密度汎関数法を用いた。特に本研究では、重水素化された高感度緑色蛍光タンパク質 (Enhanced Green Fluorescent Protein: EGFP) 中の発色団近傍には特異な(重)水構造や(重)水素結合ネットワークに注目し研究を実施した。結果、EGFP 中の Arg96 残基が発色団の重水素・水素結合の状態 (プロトン化状態) に強い影響を与えていることを見出した。

1. 共同研究に関する情報

(1) 共同利用・共同研究を実施している拠点名

九州大学 情報基盤研究開発センター

(2) 課題分野

大規模計算科学課題分野

(3) 共同研究分野

超大規模数値計算系応用分野

(4) 参加研究者の役割分担

全体統括:

立川仁典 (横浜市立大学)

多成分系密度汎関数プログラム開発とチュー

ニング: 北、桑畑、小林、高木、大野

計算実行と解析: 島崎、Iskandarov、Hanindriyo、

井尾、村田、坂上、大北、蓼沼、内藤、一瀬、

三枝、高桑、折小野、阿部

2. 研究の目的と意義

研究の目的

現在、医薬品や材料中に含まれている水素を重水素に置換した物質を活用することへの期待が非常に高まっている。医薬分野にみられるように重水素置換医薬品の実社会への活用も進んでいる。しかし、なぜ重水素置換することにより、医薬品や材料の機能が向上するのか、その詳細については未だ明らかにされていない。

水素・重水素の詳細な効果が明らかにされていない原因の 1 つは、水素・重水素の質量は軽く、それらの振る舞いを詳細に解析するには、原子核の量子性を考慮する必要があるためである。しかしながら、一般的に利用されている第一原理計算パッケージでは、水素の量子効果を直接取り扱うことはできない。そこで本研究では、材料および生体分子中での重水素の量子性を考慮するために、我々の

研究室で開発してきた多成分分子軌道法および第一原理経路積分法を用いて研究を行った。これら量子効果を扱える第一原理シミュレーション法を用いることにより、(重)水素の振る舞いを理論的に明らかにすることが可能となる。

特に本研究では、重水素化された EGFP 中の中性子回折で見られた特異な(重)水構造や(重)水素結合ネットワークの解析を行った。X線では観測することが困難なタンパク質中での(重)水素の構造が実験的に観測されているにも関わらず、現在、理論やシミュレーションによる解析が十分に行われていない。本研究では高感度緑色蛍光タンパク質(Enhanced Green Fluorescent Protein: EGFP) 中での特徴的な(重)水素の構造を解析することにより、生体分子中での水素、重水素の振る舞いへの理解を深めることを目的とした。

研究の意義

重水素の活用が様々な分野で進んでいる。例えば、電子デバイス等で使われている有機材料中の水素原子を重水素に置換することにより、材料の機能を向上することが報告されている。また、四角酸 ($H_2SQ: C_4H_2O_4$) 結晶では、常温時には強誘電体であるが、温度が上昇すると反強誘電体へと相転移する。興味深いことに、この四角酸に含まれている水素を重水素に置換することにより、この相転移温度が約 150K も上昇する。しかし、実験のみでは水素原子の振る舞いを直接観測することは難しく、この相転移温度が上昇する H/D 同位体効果の機構は不明である。

一方、医薬品分野に目を向けると、図 1 に示すような水素原子を重水素置換したデューテトラベナジンは、新規医薬品として 2017 年にアメリカ食品医薬品局 (FDA) より承認されている。このように、医薬品分野では重水素の活用は研究段階を超え、実用上重要な位置を占めるまでになっている。

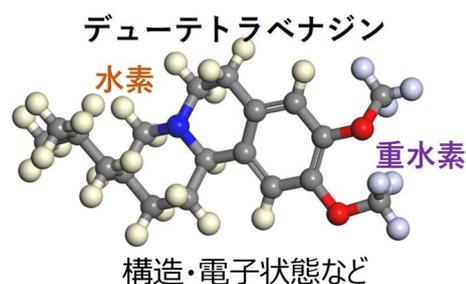


図 1. 重水素創薬の例。重水素化されたデューテトラベナジンは 2017 年 FDA にて承認された

重水素は生体分子を調べるためにも広く活用されている。例えば、タンパク質中の水素分子を重水素に置換した重水素タンパク質と中性子線回折を用いることにより、X線回折では難しい水素原子の挙動を解析することができる。例えば、2020 年には重水素化された Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP) に対して中性子回折実験が行われ、図 2 に示したように、EGFP タンパク質中の色素中心に特異的な(重)水構造や(重)水素結合ネットワークが存在していることが観測されている (C. Shibazaki, et al., J. Phys. Chem. Lett., 11, 492-496, 2020)。

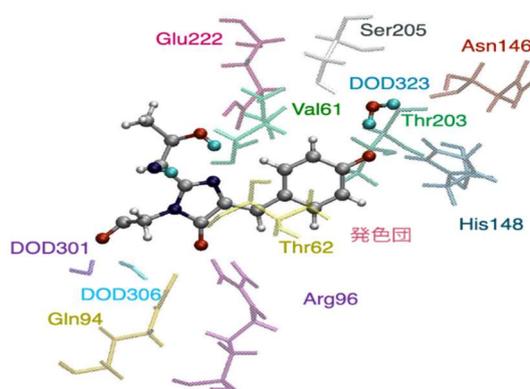


図 2. 中性子線回折によって得られた Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP) の発色団近傍の構造。特異的な(重)水の構造が観察されている

このように、重水素の活用はエンジニアリングおよびサイエンス分野で重要な役割を果たすようになってきている。しかし、重水素の活用は進んでいるものの、材料および生体分子中で重水素がどのように振る舞っているかについては、十分に理解されていない。すなわち現状では、重水素の役割についての理解が充分にないまま、重水素の活用や応用が進んでいる状況である。このような重水素に関与する現象への理解がない状況では、将来的にさらなる重水素の活用時への障害や、体系的な開発への障害となり得る。そこで、本研究では、重水素の効果について、特に量子性に着目して第一原理シミュレーションを実施し、重水素の振る舞いを明らかにすることを旨として研究を行った。よって、本研究は重水素の特に量子効果に注目した振る舞い、そして、基本メカニズムを理解することにより、さらなる重水素の活用・応用に対して重要な意義を持つものと考えている。

3. 当拠点公募型研究として実施した意義

これまで我々は、九州大学の計算機システム、ITO A において水素の量子効果を扱える第一原理量子化学計算（多成分分子軌道法や経路積分法）を用い、大規模計算を実行した多数の経験をもつ。また、より高効率・大規模計算を実現するために、コンパイル時の最適化など計算機環境に最も適した条件での実行環境を整えてきた。よって、九州大学の大型計算機センターを利用することにより、速やかにテスト計算および応用計算に取り組むことができた。このような理由により、九州大学の計算機環境を活用することが不可欠であった。

4. 前年度までに得られた研究成果の概要

EGFP タンパク質の解析モデルとし、発色団、DOD323 と水素結合している残基と重水素を取り込んだモデル (Arg96 有モデル)、およ

び Arg96 のみ除いたモデル (Arg96 無モデル) の 2 種類を使用した。様々な残基が水素結合ネットワークに与える影響を荒く調べたところ、Arg96 が大きな影響を与えるという示唆が得られた。本年度では、前年度に得られた示唆に基づき、より詳細な解析を行った。

5. 今年度の研究成果の詳細 EGFP タンパク質の解析

水素結合構造を詳細に解析するために、H/D の区別可能な多成分密度汎関数理論を実装した Gaussian16 を用い、汎関数には B3LYP, 基底関数には 6-31++G(d,p) を使用した。そしてタンパク質内部における残基間の相対方位を保持するため、発色団、DOD323 以外の重原子に拘束条件を課し、構造最適化計算を実施した。

Arg96 有モデル、Arg96 無モデルの結果、実験で観測された発色団と His148 の構造を図 3 に示す。Arg96 の存在により His148 の重水素の位置が大きく変化したことで発色団のプロトン化状態が変化することが判明した。Arg96 有モデルでは His148 の重水素が His148 に近づくことにより、発色団は脱プロトン化状態、Arg96 無モデルでは His148 の重水素が発色団に近づくことにより、発色団は中性型となることが分かった。実験で観測された発色団は中性型であるので、Arg96 を入れたモデルが実験と定性的に正しい結果を示すことがシミュレーション結果より示唆された。よって Arg96 の存在により発色団の脱プロトン化状態が安定化されていると考えられる。

次に実験でも注目されていた 323 番の重水の結合長に注目する。Arg96 無モデル、Arg96 有モデルで得られた DOD323 の結合長 ROD1、ROD2、および対応する実験値と気相中の重水の結合長の値を表 1 に示す。まず DOD323 の結合長は Arg96 の有無に関わらず、気相中より大きいという結果が得られた。従来の量

子化学計算を用いても実験と同様に DOD323 の結合長が大きくなることが示された。また結合長の差に着目すると、Arg96 有モデルは Arg96 無モデルより実験値に近い。よって Arg96 は DOD323 の結合長の非対称化に大きく影響していることが明らかになった。

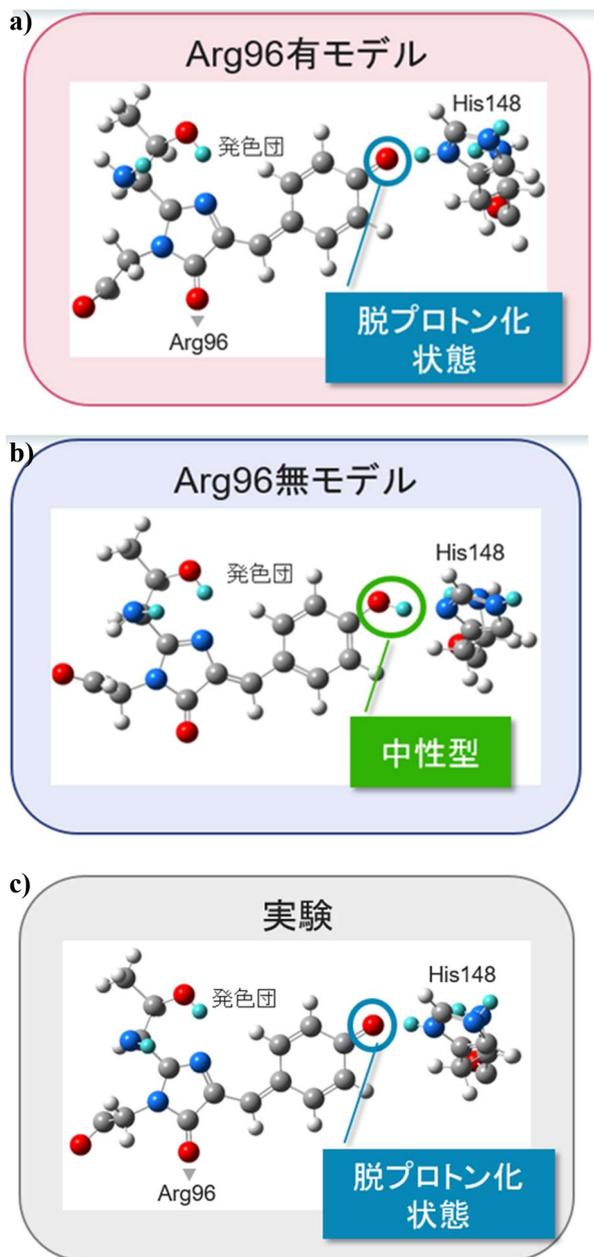


図 3. a) Arg96 有モデル、b) Arg96 無モデル、c) 実験から得られた EGFP 中の発色団付近の水素結合ネットワークの状態。

表 1. DOD323 の結合長 (Å)

	Arg96 有	Arg96 無	実験値
R_{OD1}	0.985	0.988	1.084
R_{OD2}	1.004	0.995	1.112
差	0.019	0.007	0.028

Arg96 有モデル、Arg96 無モデルにおける発色団と DOD323、および周辺残基の正味電荷を図 4 に示す。Arg96 有モデルの結果を赤、Arg96 無モデルの結果を青とし、それぞれの残基の NBO 電荷を示した。これより、Arg96 の存在により発色団から His148 への電子移動が抑制されたと考えられる。これは Arg96 により発色団のまわりの電子が増加し、His148 の周りの電子が減少したためと言い換えることができる。したがって Arg96 があることで His148 の電子が発色団に移動することから、発色団の電荷は His148 と Arg96 が大きく関係している。そして発色団の構造、His148 の重水素の位置、DOD323 の結合長の変化はこの電荷変化に起因すると考えられる。

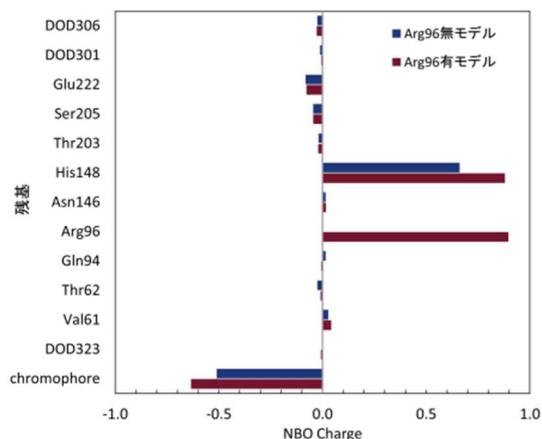


図 4. Arg96 有モデル、Arg96 無モデルのアミノ酸残基毎の電荷

発色団を 図 5 a) のように(a)~(e)の5つの部分に分割し、それぞれの NBO 電荷を Arg96 有モデルの結果を赤、Arg96 無モデルの結果を青とし、図 5 b) に示した。これより、(a)、(c)、(e) の部分に電荷の変化が見られた。Arg96 は(c)の部分と水素結合しているため、この有無により電荷が変化することは容易に考えられるが、His148 と水素結合している(e)や(a)の電荷も変化した。発色団の電荷の変化と構造変化を比較すると、構造変化も電荷変化と同じように(c)の5員環、(e)の6員環、(a)が変化した。以上より Arg96 は発色団と水素結合している部分だけでなく、発色団が His148 と水素結合を形成している部分等の離れた部分の電荷も変化させる。そして発色団の構造変化はこの電荷変化に起因すると考えられる。

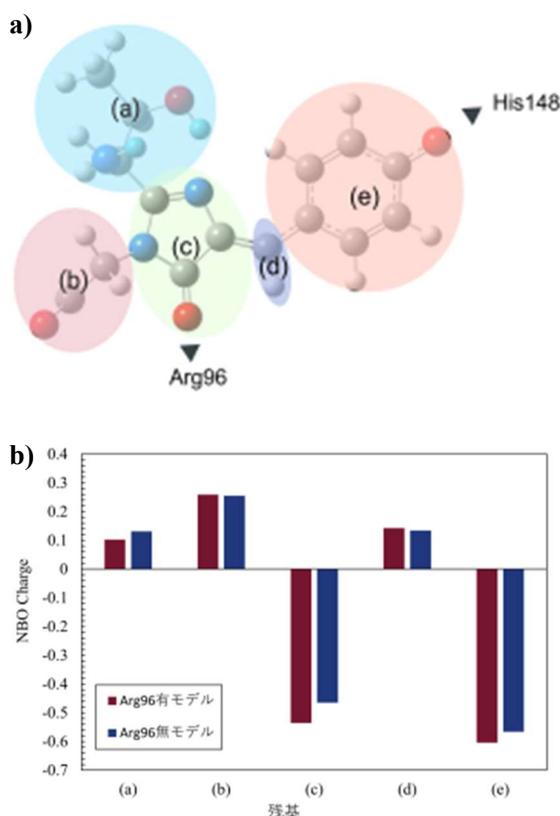


図 5. a) 発色団の部分構造の定義。b) Arg96 有モデル、Arg96 無モデルにおける発色団部分構造ごとの電荷。

6. 進捗状況の自己評価と今後の展望

今年度の研究進捗については、研究計画において記載した九州大学・情報基盤研究開発センターが所有するスパコン上で動作する並列プログラムを整備し、EGFP タンパク質の中心部分に対して、水素・重水素の量子効果を含むシミュレーションを実施することに成功した。

本研究では、実験で見られた構造の物理化学的起源の解明を目的とし、多成分密度汎関数法を用いて Arg96 の有無による発色団の水素結合構造の変化に注目して解析を行った。

発色団近傍の構造は、Arg96 と水素結合を形成している部分だけでなく、Arg96 と同様に正の電荷をもった His148 と水素結合している発色団の部分や His148 の重水素の位置が変化した。これより、Arg96 は発色団のプロトン化状態に関係していることが判明した。そして先行研究の中性子解析実験で述べられていた DOD323 の結合長は、気相中の重水の O-D 結合長よりも長いことが第一原理量子化学計算でも示された。そして Arg96 は DOD323 の非対称性に関係していることが分かった。以上の事柄は Arg96 の有無により、発色団や His148 の電荷が変化することに起因すると示唆された。

今後の展望として、量子力学と分子力場を組み合わせた QM-MM 法を用いて GFP の発色団と直接水素結合している残基を全て取り込む量子化学計算を予定している。タンパク質は内部の様々なアミノ酸によって複雑な水素結合を形成している。そのため、今回のモデル系をより精密にするためにはタンパク質全体の水素結合をさらに考慮する必要がある。その発色団の近傍を量子化学計算、そのほかの部分に古典的に扱う QM-MM 法を用いることにより、タンパク質全体の環境を取り込んで発色団近傍の構造の解析を行いたいと考えている。このようなシミュレーションを実施することにより EGFP 発色のよ

り詳細な理解が可能となり、新たな分子設計への貢献が期待できると考えている。

水素・重水素の量子効果を含む量子化学シミュレーションを多数実施することにより、タンパク質中での水素と重水素の異なる振る舞いをすることを明らかにすることができる。この違いをより詳細に解析することにより、謎の多いタンパク質中での水素・重水素の量子力学的同位体効果現象を明らかにできる。本研究を実施することによって、そのための手法を整備し、研究を遂行するための道筋を構築できたと考えている。

今回、九州大学・情報基盤研究開発センターが所有するスパコンを利用する機会が得られ、このような課題にトライすることができた。スパコン利用の申請が認められたことは、研究を遂行するために大きな助力となった。さらに研究を発展させるためには、引き続き大規模スパコンセンターによる支援が必要不可欠であると考えている。

7. 研究業績

(1) 学術論文（査読あり）

- [1] Sota Funaki, Tokuhisa Kawawaki, Tomoshige Okada, Kana Takemae, Sakiat Hossain, Yoshiki Niihori, Takumi Naitou, Makito Takagi, Tomomi Shimazaki, Soichi Kikkawa, Seiji Yamazoe, Masanori Tachikawa, Yuichi Negishi, "Improved activity for the oxygen evolution reaction using a tiara-like thiolate-protected nickel nanocluster", *Nanoscale*, *15*, 5201-5208 (2023). DOI: 10.1039/D2NR06952K
- [2] Miku Furushima, Makito Takagi, Daisuke Yoshida, Yukiumi Kita, Tomomi Shimazaki, and Masanori Tachikawa, "Theoretical investigations of positron affinities and their structure-dependent properties of carbon dioxide clusters (CO₂)_n (n = 1-5)", *Phys. Chem. Chem. Phys.*, *25*, 625-632 (2023). DOI: 10.1039/d2cp03788b

- [3] Moe Murata, Takuya Koide, Osamu Kobayashi, Shuichi Hiraoka, Tomomi Shimazaki, Masanori Tachikawa, "Molecular Dynamics Study on the Structure-Property Relationship of Self-Assembled Gear-Shaped Amphiphile Molecules with/without Methyl Groups", *J. Phys. Chem. B*, *127*, 328-334 (2023). DOI: 10.1021/acs.jpcc.2c07444
- [4] Takumi Naito, Yukiumi Kita, Tomomi Shimazaki, and Masanori Tachikawa, "Decomposition analysis on the excitation behaviors of thiazolothiazole (TTz)-based dyes via the time-dependent dielectric density functional theory approach", *RSC advances*, *12*, 34685-34693 (2022). DOI: 10.1039/d2ra06454e
- [5] Daisuke Yoshida, Yukiumi Kita, Tomomi Shimazaki, and Masanori Tachikawa, "A comprehensive theoretical study of positron binding and annihilation properties of hydrogen bonded binary molecular clusters", *Phys. Chem. Chem. Phys.*, *24*, 26898-26907 (2022). DOI: 10.1039/d2cp03813g
- [6] Tomomi Shimazaki and Masanori Tachikawa, "Theoretical study of the effect of nonlocal short-range exchange on calculations of molecular excitation energies in the dielectric screened-exchange method", *Chem. Phys. Lett.*, *802*, 139740 (2022). DOI: 10.1016/j.cplett.2022.13974
- [7] Taro Udagawa, Amane Kinoshita, Kazuaki Kuwahata, and Masanori Tachikawa, "A path integral molecular dynamics study on the NH₄⁺ rotation in NH₄⁺XH₂ (X = Be or Mg) dihydrogen bond systems", *Phys. Chem. Chem. Phys.*, *24*, 17295-17302 (2022). DOI: 10.1039/d2cp01999j
- [8] Takatsugu Wakahara, Kahori Nagaoka, Chika Hirata, Kun'ichi Miyazawa, Kazuko Fujii, Yoshitaka Matsushita, Osamu Ito, Makito Takagi, Tomomi Shimazaki, Masanori Tachikawa, Yoshiki Wada, Shinjiro Yagyu, Yubin Liu,

Yoshiyuki Nakajima, Kazuhito Tsukagoshi, "Fullerene C70/porphyrin hybrid nanoarchitectures: single-cocrystal nanoribbons with ambipolar charge transport properties", **RSC advances**, *12*, 19548-19553 (2022). DOI: 10.1039/d2ra02669d

[9] Taro Udagawa, Ikumi Hattori, Yusuke Kanematsu, Takayoshi Ishimoto, and Masanori Tachikawa, "Nuclear quantum effect and H/D isotope effect in excited state intramolecular proton transfer and electron-induced intramolecular proton transfer reactions in 8-hydroxyquinoline", **Int. J. Quant. Chem.**, *122*, e26962 (12 pages) (2022). DOI: 10.1002/qua.26962

[10] Hikaru Tanaka, Kazuaki Kuwahata, Masanori Tachikawa, and Taro Udagawa, "Low-Barrier Hydrogen Bond in Fujikurin A-D: A Computational Study", **ACS omega**, *7*, 14244-14251 (2022). DOI: 10.1021/acsomega.2c00857

[11] Tomomi Shimazaki and Masanori Tachikawa, "Collaborative Approach between Explainable Artificial Intelligence and Simplified Chemical Interactions to Explore Active Ligands for Cyclin-Dependent Kinase 2", **ACS omega**, *7*, 10372-10381 (2022). DOI: 10.1021/acsomega.1c06976

[12] Kiriko Ishii, Tomomi Shimazaki, Masanori Tachikawa, and Yukiumi Kita, "Theoretical Study of the Isotope and Homologue Effects on Nuclear Magnetic Shielding in Water and Hydrogen Sulfide Molecules", **Chem. Lett.**, *51*, 342-344 (2022). DOI: 10.1246/cl.210760

[13] Taro Udagawa, Kazuaki Kuwahata, and Masanori Tachikawa, "Competitive nuclear quantum effect and H/D isotope effect on torsional motion of H₂O₂: An ab initio path integral molecular dynamics study", **Comp. Theor. Chem.**, *1208*, 113542 (2022). DOI: 10.1016/j.comptc.2021.113542

[14] Takuma Yamashita, Emiko Hiyama, Daisuke

Yoshida, and Masanori Tachikawa, "Spontaneous radiative dissociation of the second bound state of positronium hydride", **Phys. Rev. A**, *105*, 012814 (2022). DOI: 10.1103/PhysRevA.105.012814

[15] Kazuaki Kuwahata and Masanori Tachikawa, "Atomic mass dependence of the nuclear quantum effect in NH₄⁺(H₂O)", **Chem. Phys.**, *553*, 111381 (2022). DOI: 10.1016/j.chemphys.2021.111381

[16] Yuka Kimura, Yusuke Kanematsu, Hiroki Sakagami, David S Rivera Rocabado, Tomomi Shimazaki, Masanori Tachikawa, and Takayoshi Ishimoto, "Hydrogen/Deuterium Transfer from Anisole to Methoxy Radicals: A Theoretical Study of a Deuterium-Labeled Drug Model", **J. Phys. Chem. A**, *126*, 155-163 (2022). DOI: 10.1021/acs.jpca.1c08514

[17] Dorra Mahdaoui, Chika Hirata, Kahori Nagaoka, Kun'ichi Miyazawa, Kazuko Fujii, Toshihiro Ando, Manef Abderrabba, Osamu Ito, Makito Takagi, Takayoshi Ishimoto, Masanori Tachikawa, Shinjiro Yagyū, Yubin Liu, Yoshiyuki Nakajima, Yoshihiro Nemoto, Kazuhito Tsukagoshi, and Takatsugu Wakahara, "Ambipolar to unipolar irreversible switching in nanosheet transistors: the role of ferrocene in fullerene/ferrocene nanosheets", **J. Mater. Chem. C**, *10*, 3770-3774 (2022). DOI: 10.1039/D1TC05545C

[18] Kiriko Ishii, Tomomi Shimazaki, Masanori Tachikawa, and Yukiumi Kita, "Development of anharmonic vibrational structure theory using backflow transformation", **Chem. Phys. Lett.**, *787*, 139263 (2022). DOI: 10.1016/j.cplett.2021.139263

(2) 国際会議発表 (招待講演・査読なし)

[1] Masanori Tachikawa, "Path integral simulation for H/D isotope effect in protonated/deuterated aqueous solution", Asia Pacific Conference of Theoretical and Computational Chemistry

(APATCC-10), Quy Nhon, Vietnam (2023/2/19-23).

[2] Masanori Tachikawa, "Quantum Multi-Component Molecular Theory for H-Bonded System and its H/D Isotope Effect", J-PARC Workshop 2022, Deuterium Science to Entering a New Phase, Tokai-mura, Japan (2023/1/19-20).

[3] Masanori Tachikawa, "Muon and Positron Binding to Molecules", 7th International Symposium of Quantum Beam Science, Mito, Japan (2022/12/1-3).

[4] Masanori Tachikawa, "Positron Binding in Molecules", 75th Annual Gaseous Electronics Conference (GEC2022), Sendai, Japan (2022/10/3-7).

[5] Masanori Tachikawa, "Theoretical study on positron binding to atomic anion dimers ($[H^-; e^+; H^-]$, $[Li^-; e^+; Li^-]$): using first-principles Quantum Monte Carlo", 19th International Conference on Positron Annihilation (ICPA19), Helsinki, Finland (2022/8/22-26).