

課題名 (タイトル) :

## 分子の非調和性と柔軟性を考慮した振動状態理論の開発と応用

利用者氏名 : ○八木 清\*, 大滝 大樹\*, 水上 渉\*, Thomsen Bo\*

所属 : \*杉田理論分子科学研究室

スフィンゴミエリン脂質二重膜のアミドバンド  
に対する理論的解析

(担当 : 八木)

## 1. 本課題の研究の背景、目的、関係するプロジェクトとの関係

生体膜には、機能を持った膜タンパク質や糖鎖などが集積した分子群が細胞内外の物質輸送に重要な役割を果たしており、脂質膜に浮かぶ筏という意味で「ラフト」と呼ばれている。しかし、ラフト構造は極めて動的であり、生体膜中にどのように存在しているのか、その描像を明らかにする計測手法は限られており、従って、その存在も含め、未だ多くの論争が続いている。スフィンゴミエリン (SM) はラフトを構成する主要な脂質分子の一つであり、図1のようにheadとtail groupをつなぐ中間部位に、スフィンゴシン由来のアミド骨格とOH基を持つ。これらの極性基が水素結合したSMクラスターがラフト生成に関わっていると考えられるが、生体膜におけるクラスターの動態は未だに明らかでない。

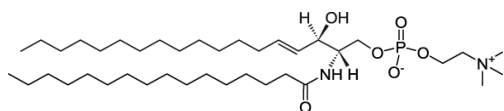


図 1. SM の化学式

最近、城田と小林は、ラマン分光法によりSMリポソームの振動スペクトルを取得し、SMのアミドI (C=O伸縮振動)と思われる強いピークを1645 cm<sup>-1</sup>に観測した。興味深いことに、この振動バンドはSM/DOPC混合膜にも観測されるが、SM/DPPC混合膜では消失する。SMはDOPCでは分散しないが、DPPCでは分散することが知られており、従って、この振動バンドはSMクラスターの生成を示すマーカバンドとなることが示唆された。しかし、過去の文献では、この領域に弱いバンドしか観測されておらず、その強度の弱さから水の変角振動と考えられていた。

本研究では、観測されたラマンバンドの帰属を明らかにするため、分子動力学法 (MD) と量子化学計算

によりSM二重膜のラマンバンドを計算した。

## 2. 具体的な利用内容、計算方法

SM用の古典力場を用いてSM二重膜に対するMD計算を実施した。ユニットセルに128個のSM分子と5012個の水分子を含む系を用意し、温度・圧力一定のMD計算を100 ns実行した。圧力は1 atm, 温度は23°Cと50°Cの2つで計算した。プログラムはNAMDを用いた。トラジェクトリーからSMクラスターを取り出し、量子化学計算により構造最適化とラマンスペクトルの計算を行った。4次の非調和性まで考慮したポテンシャルを生成し、VMP2法により振動数を求めた。得られた調和と非調和振動数の比により得られる非調和補正係数を用いて、SMクラスターの調和振動数を補正した。計算レベルにはB3LYP/6-31++G(d,p)、プログラムはGaussian09を用いた。得られたスペクトルをSMクラスターに対する重み平均を取ることで、全スペクトルを計算した。

## 3. 結果

図2にMD計算により得られたSM二重膜の構造を示す。SM二重膜は転移温度が38°C付近にあり、23°Cではゲル相、50°Cでは液晶相となる。図2から、50°Cの結果はtailグループが乱雑になっているのに対し、23°Cの結果はtailグループが綺麗に配列しており、相が異なっていることが明らかである。また、液晶相ではゲル相よりも膜内部に多くの水分子が入っていることが分かった。液晶相とゲル相では、1個のSM分子当たり平均して水分子は3.9個と2.1個だった。

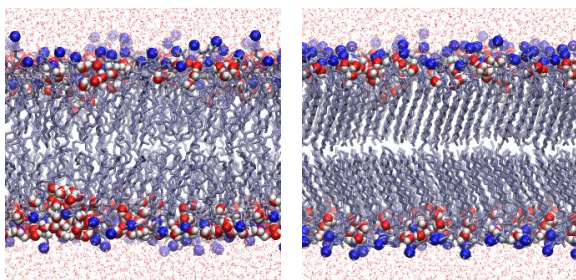


図 2. MD 計算で得られた SM 二重膜の構造。温度が 50°C (左) と 23°C (右) ではそれぞれ液晶相、ゲル相となる。コリンの窒素 (青) の平均位置より内側に入っている水分子がハイライトされている。

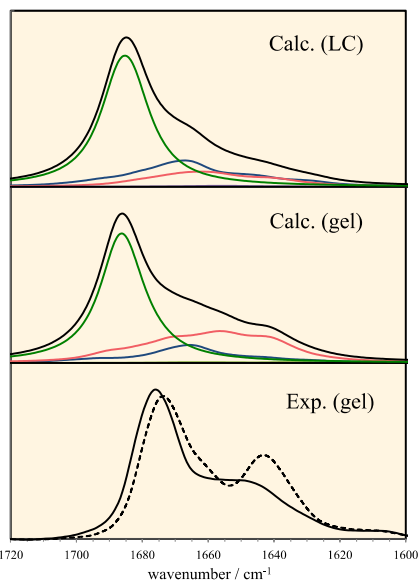


図 3. SM 二重膜のラマンスペクトル。計算による液晶相 (上) とゲル相 (中) のスペクトル。緑線は CC 伸縮振動、赤線と青線は、それぞれ、単量体と二量体のアミド I バンド。(下) 実験スペクトル。実線と点線は、それぞれ、リポソームを溶液から資料台へ取り出してから 1 時間と 48 時間後のスペクトル。

リポソームを溶液から取り出してから 1 時間後の実験結果 (実線) とよく一致する。実験では、このスペクトルは時間とともに変化し、48 時間後に定常化する。そのスペクトル (点線) には、 $1645\text{ cm}^{-1}$  に明瞭なピークがあり、 $1665\text{ cm}^{-1}$  付近に肩バンドがある。リポソームが試料台に置かれている間の変化は、リポソームが乾燥し、SM 二重膜から水分が失われた時の変化に相当する。従って、 $1645\text{ cm}^{-1}$  のピークは、水を失うことで、2 量体 (あるいはさらに大きい多量体) が生成したことを示唆している。一方、水素結合ネットワークから孤立した単量体は、水分量の変化に影響を受けずに残るため、 $1665\text{ cm}^{-1}$  のピークは相対的に突出してくると考えられる。

計算されたスペクトルを、実験結果とともに図 3 に示す。液晶相とゲル相の結果を比較すると、ゲル相の方がアミド基の 2 量体が増えることを反映し、赤線で示す 2 量体のアミド I バンドが低波数側に広がっているのが分かる。ゲル相の計算結果は、

#### 4. まとめ

本研究では、SM 二重膜に対する MD 計算と量子化学計算を実施し、アミドバンドのラマンスペクトルを計算した。計算結果は実験スペクトルを良好に再現し、帰属が不明確であった  $1645\text{ cm}^{-1}$  のピークはアミド I バンドであることを決定できた。

振動分光実験と理論計算を組み合わせることで、動的に複雑な構造を持つ分子系の解析技術を確認し、柔らかな構造を持つ分子系の動的構造を明らかにすることができた。

現在、上記の成果を論文にまとめ、投稿の準備を進めている。

#### 5. 今後の計画・展望

今後は、SM/DOPC や SM/DPPC 混合膜に対する計算を計画している。

#### 6. 利用がなかった場合の理由

該当しない。

レプリカ交換分子動力学法と非調和振動状態計算  
によるポリペプチドの構造解析  
(担当：大滝)

#### 1. 本課題の研究の背景、目的、関係するプロジェクトとの関係

近年、蛋白質の一部を切り取ったポリペプチドを非破壊的に蒸発させ、気相中で高分解能の振動スペクトルを取得することが可能になった。一方で、得られたスペクトルの解釈と分子の構造決定は非常に難しい。その理由は以下の通りである。

- ポリペプチドは非常に柔らかく膨大な数の準安定構造を取り得るため、構造探索が難しい。
- 振動スペクトルを精度よく計算するには量子化学計算が必要である。しかし、X-H 伸縮振動 (X=C,N,O) の伸縮振動は非調和性が強いいため、一般的に用いられる調和近似に基づく振動計算は信頼性が低い。

このような問題に対し、報告者らはレプリカ交換分子動力学法による構造サンプリングと非調和性を露わに取り込んだ振動状態理論を組み合わせた構造決定手法を考案した。効率的な構造サンプリングと正確な振動状態計算を組み合わせた手法により上記の問題を解決し、構造決定手法の確立を目指す。

## 2. 具体的な利用内容、計算方法

既に実験によりNH/OH伸縮領域の振動スペクトルが取得されている5残基ペプチドSIVSF (S=セリン(Ser), I=イソロイシン(Ile), V=バリン(Val), F=フェニルアラニン(Phe); 図1)を対象に計算を行った。まず、レプリカ交換分子動力学法により構造空間のサンプリングを行い、30,000点のスナップショットを取得した。力場にはCHARMM36 with CMAPを用いた。次に、k平均法によるクラスタ解析を用いて類似構造のグループ化を行い、30,000点の構造から約150個のグループを得た。その後、各グループにおける平均構造に最も近い構造を代表構造として抽出した。このようにして得た約150個の構造に対し、量子化学計算プログラムGaussian09を用いて構造最適化を行った。その中からエネルギーの低い5個を選び出し、Hessian計算およびエネルギー1点計算を行い、非調和ポテンシャルを構築した。量子化学計算のレベルはいずれもB3LYP/6-31++G(d,p)とした。得られた非調和ポテンシャルを用いて、最近報告書らにより開発されたoc-VQDPT法を用いて振動数計算を行った。

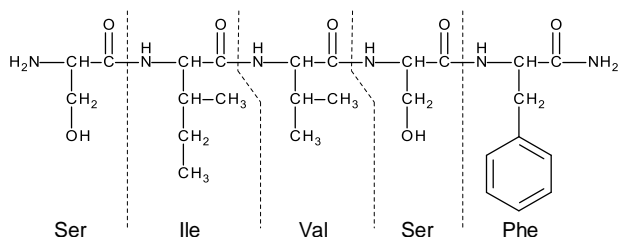


図 1. SIVSF

## 3. 結果

図2にSIVSFの $\alpha$ 炭素周りの二面角で描いた自由エネルギー面と、クラスタ解析により抽出した約150個の候補構造の二面角の分布を重ねたものを示す。候補構造は自由エネルギー面の極小部を全てカバーしており、本手法により重要な構造が漏れ無く選び出されていることが分かる。

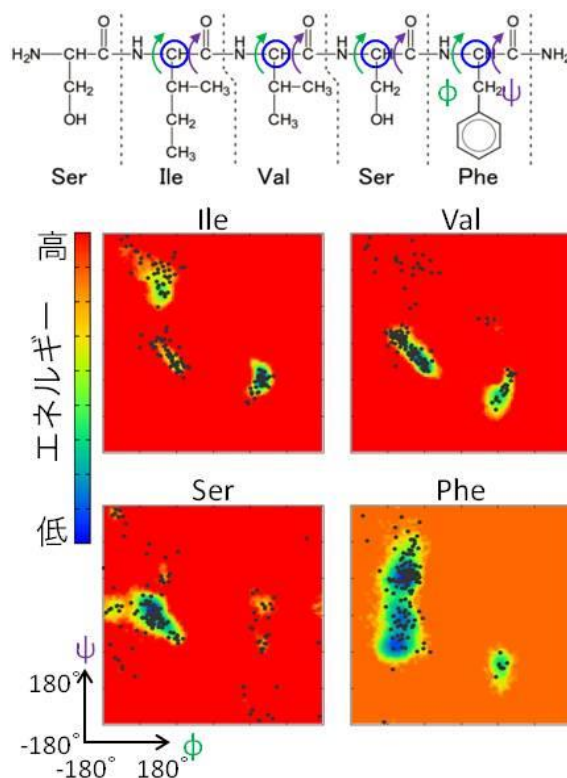


図 2: SIVSF の $\alpha$ 炭素(構造式中の青丸)周りの二面角 $\phi$ ,  $\psi$ をパラメータとして描いた自由エネルギー面と抽出した候補構造の二面角の分布(黒点)。

抽出した構造の中でエネルギーが最も低い構造に対する非調和振動状態計算の結果と実験スペクトルとの比較を図3に示す。両者はよく一致しており、この構造が実験で観測されたSIVSFの構造と結論付けられる。さらに、計算の結果からスペクトルの各ピークの帰属を行い、スペクトルの解釈にも成功した。

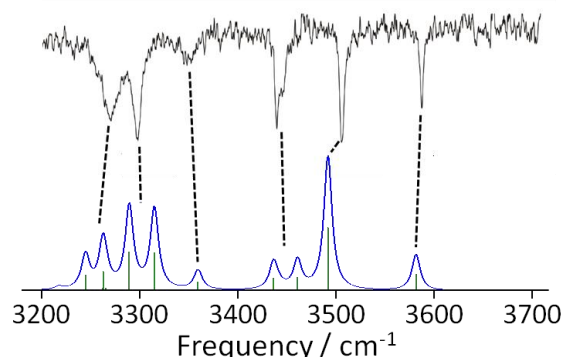


図 3. 実験で得られたスペクトル (上) と計算により得られたスペクトル (下)。

## 4. まとめ

本研究ではレプリカ交換分子動力学法による構造サンプリング、クラスタ解析、非調和振動状態計算を組み合わせた分子の構造決定手法を提案した。本手法を5

残基ペプチドSIVSFに適用し、SIVSFの構造決定およびスペクトルの解釈に成功した。これにより、ペプチドのように柔らかく膨大な数の準安定構造を有する分子に対して、本手法が極めて有効であることが示された。

## 5. 今後の計画・展望

本手法を他の系へ適用し、複雑な系の構造決定を行う。具体的には、より大きなポリペプチドや水和クラスタなどを考えている。

## 6. 利用がなかった場合の理由

該当しない。

### QM/MM による多剤排出トランスポーター MATE におけるプロトン移動反応の解析 (担当：水上)

#### 1. 本課題の研究の背景、目的、関係するプロジェクトとの関係

多様な薬剤分子を細胞外に排出するトランスポーターは、病原菌や癌細胞の多剤耐性発現の要因と見なされている。多剤排出トランスポーターには様々な種類が存在するが、なかでも MATE と呼称される膜タンパク質ファミリーは、様々な生物種に広く存在することが知られている。近年、X線解析によりプロトン駆動する MATE (PfMATE) の結晶構造が明らかになり、古典分子動力学計算を用いた解析が進められている。しかしながら、既存の力場を用いた動力学計算のみでは、機能発現に関わるプロトン化状態が変わりゆく過程を解析することが難しい。そこで本研究では、量子力学 (QM) と古典力学 (MM) の混合計算手法である QM/MM を用いて PfMATE のプロトン移動反応の理解を目指した。

#### 2. 具体的な利用内容、計算方法

結晶構造を基にして二つのアスパラギン酸 (D41 及び D184) 間のプロトン移動反応の反応エネルギープロファイルを計算した。この二つのアミノ酸残基を中心に約 40 原子程度を量子化学計算で取り扱い、残る領域は CHARMM 力場を用いて古典的に取り扱っ

た。まず Q-Chem/CHARMM を用い、量子化学計算部分に密度汎関数法(B3LYP/6-31+G\*)を適用することで反応経路を算出した。そして、得られた反応経路を用い、量子化学計算部分を高精度波動関数理論(DLPNO-CCSD(T)/aug-cc-pVTZ)に置き換えることでエネルギープロファイルを求めた。この計算には ORCA/ChemShell を使用した。

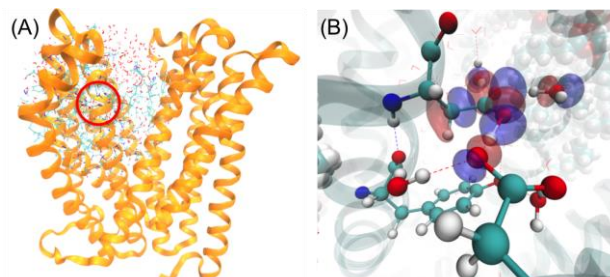


図 1. A) PfMATE と量子化学計算で取り扱う活性領域 (赤円) ; B) 活性領域の拡大図

#### 3. 結果

プロトン移動反応のエネルギープロファイルを図2に示す。相対的に左に行くほどプロトンが D41 に近く、右に行くほど D184 に接近している。この図から明らかなように結晶構造においては D41 にプロトンが付加した状態が安定なことが見て取れる。

#### 4. まとめ

PfMATE のプロトン移動反応のエネルギープロファイルを QM/MM 計算により計算した。これにより結晶構造におけるプロトン化状態が確認された。

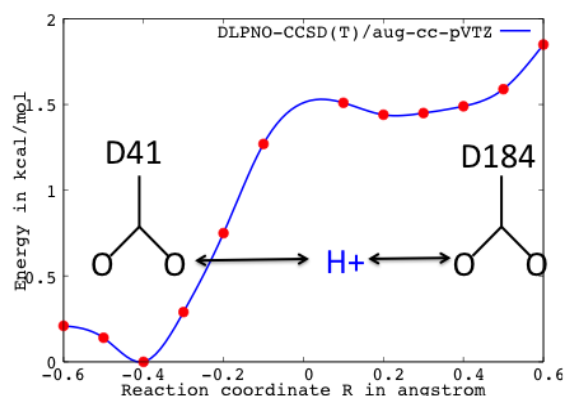


図 2. QM/MM 計算から得られた PfMATE のプロトン移動反応のエネルギープロファイル

#### 5. 今後の計画・展望

今後は結晶構造近傍だけでなく、生体内で重要となる環境の揺らぎも含めた自由エネルギー計算によりこの反応を解析していくことを考えている。また、プロ

トン移動反応では核の量子性も重要な役割を果たしうることから、振動状態理論を応用して反応速度定数などの見積もりも実施していきたい。

## 6. 利用がなかった場合の理由

該当しない。

### Calculating the infrared spectra of the Eigen ion using anharmonic vibrational theory

(担当 : Thomsen Bo)

#### 1. Background and purpose of the project

The Eigen ion motif ( $\text{H}_3\text{O}^+$ ) is, along with the Zundel ion motif ( $\text{H}_2\text{O}-\text{H}^+-\text{OH}_2$ ), is a model system for the free protons interacting with water in acidic solutions. The properties and motions of these ions micro solvated in water are therefore an important tool for modeling and predicting the properties of bulk acidic solutions.

Recently an accurate infrared (IR) spectrum has been reported for the  $(\text{H}_2\text{O})_{20}\text{H}_3\text{O}^+$  cluster[1]. Here the experimental spectrum of a smaller cluster,  $(\text{H}_2\text{O})_3\text{H}_3\text{O}^+$ , and anharmonic models for the cluster, based on the properties of the optimal structure only, were used for determining the assignment of the vibrations observed in experiment.

In this project, we calculate and assign the IR spectrum of the small Eigen ion cluster,  $(\text{H}_2\text{O})_3\text{H}_3\text{O}^+$ , using an accurate potential energy surface and a second-order vibrational quasi-degenerate perturbation theory (VQDPT2), thereby surpassing the accuracy found in the previous studies.

The investigated cluster has a pyramidal structure with strong hydrogen bonds connecting the hydrogen atoms of the Eigen ion with the oxygen of the surrounding waters. While being significantly smaller than the cluster considered in [1], it still offers many insights into the spectrum of the free proton in water, and provides a good model for determining important factors in accurate calculations of the IR spectrum of larger clusters

containing the Eigen ion motif.

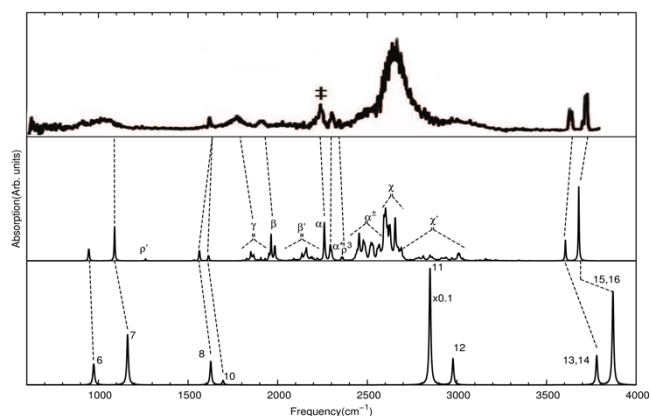


Fig. 1: The experimental (top) anharmonic, our calculation (middle) and harmonic (bottom) spectrum of the Eigen ion.

#### 2. Specific usage status of the system and calculation method

The initial calculations, i.e., the geometry optimization and the coordinate determination *et cetera*, were done using the resources in our group. However, calculating the anharmonic potential energy surface using multiple molecular conformations requires a large amount of computational resources. Nevertheless, the efficient use of super computational resources are straightforward in this case, since the problem is easily formulated as an embarrassingly parallel process by calculating each conformer energy or hessian as a separate job, thereby making it an ideal use of the RICC resources. In the current study, 2,179 points hessian and 143,041 points of energy were calculated using Gaussian09 with the B3LYP functionals and the aug-cc-pVTZ basis set. The combined cost of the calculations was around 200,000 core hours.

The vibrational Hamiltonian included all intramolecular degrees of freedom and the highest frequency intermolecular modes for the cluster. The anharmonic vibrational theory calculations were done locally as these are much less cost intensive than the potential generation step.

#### 3. Result

It is found that the calculated spectrum matched

the experimental one very well as seen in Fig. 1. The peak positions compare favorably to the experimental results, furthermore we can recover the overtone and combination bands in spectral range from  $1800\text{cm}^{-1}$  to  $3200\text{cm}^{-1}$ . The peak positions and intensities indicate with high certainty that the experimental spectrum is indeed that of the Eigen ion cluster.

To facilitate the assignment of the individual vibrations, an analysis tool for converting the wave function amplitudes to molecular motion through the coordinates used to describe the potential energy surface was developed. This tool enables a detailed analysis of the movement and visualization of the vibrational states responsible for the absorption. Using this information the assignment of each vibrational band has been done as shown in Table 1, which match both with the previous results for the  $\alpha$  peak and the harmonic results for the surrounding water molecules.

The assignment of the peak around  $2600\text{cm}^{-1}$  does not agree with the harmonic result, which predicts that the peak is the fundamental of the O-H stretches of  $\text{H}_3\text{O}^+$ . Our calculation and data analysis reveal that, although there are still signs of this motion in the vibrational states in this region, the motion is strongly coupled to the intermolecular motions of the cluster. This is not, while different from the harmonic result, entirely unexpected, as the stretching of the O-H of  $\text{H}_3\text{O}^+$ , which eventually leads to a proton transfer process to one of the surrounding water molecules, would induce a rather radical reorganization of the intermolecular framework.

Label	VQDPT2	Exp	Assignment
7	1090.1	1088 <sup>a</sup>	Hydronium umbrella bend (A Symmetry)
$\rho'$	1262	-	Combination band of frustrated rotation of hydronium and oxygen-oxygen stretch
8	1562.9	1609 <sup>a</sup> , 1615 <sup>b</sup>	H-O-H(water) bend (E Symmetry)
10	1614.4	1609 <sup>a</sup> , 1751 <sup>b</sup>	H-O-H(hydronium) bend (E Symmetry)
$\gamma$	1800-1940	-	Combination band between H-O-H bends(hydronium and water) and oxygen-oxygen stretch
$\beta$	1904-2040	-	The combination band of the out of plane rotations and umbrella motion of the hydronium ion
$\beta'$	2040-2230	-	The combination bands of $\beta$ and the oxygen-oxygen stretches
$\alpha$	2260	2237 <sup>a</sup> , 2245 <sup>b</sup>	The combination band between hydronium bending and the in plane frustrates rotation of hydronium
$\alpha^*$	2294	2303 <sup>a</sup> , 2299 <sup>b</sup>	The combination band between H-O-H bending and the in plane frustrates rotation of hydronium
$\rho^3$	2364	2344 <sup>a</sup> , 2331 <sup>b</sup>	The third overtone <sup>c</sup> of the frustrated rotations
$\alpha^\pm$	2400-2580	-	The combination band between H-O-H bends (hydronium and water) and the out of plane frustrated rotation motions
$\chi$	2580-2730	-	The heavily correlated O-H stretches of the hydronium ion
$\chi'$	2730-3100	-	The combination bands of $\chi$ and the oxygen-oxygen stretches
13	3605.2	3637 <sup>a</sup> , 3645 <sup>b</sup>	Sym. O-H(water) stretch(E Symmetry)
14	3607.6	3637 <sup>a</sup> , 3645 <sup>b</sup>	Sym. O-H(water) stretch (A Symmetry)
15	3678.6	3730 <sup>a</sup> , 3731 <sup>b</sup>	Asym. O-H(water) stretch (E Symmetry)
16	3680.1	3730 <sup>a</sup> , 3731 <sup>b</sup>	Asym. O-H(water) stretch(A Symmetry)

#### 4. Conclusion

We have confirmed that our model potential generated an IR spectrum accounting for the peaks found in the experimental spectrum of Fournier *et al.* [1]. Furthermore we have assigned the molecular motions and uncover the nature and the shift of the band, around  $2600\text{cm}^{-1}$ , often associated with the O-H stretch of  $\text{H}_3\text{O}^+$ .

Calculation of the anharmonic potential energy surfaces for both the intra- and intermolecular degrees of freedom is shown to be of significant importance for obtaining the desired accuracy both in terms of spectral positions and assignments in the studied molecule. This is especially important for the motion of hydrogen involved in strong hydrogen bonds. We suggest that this finding also apply to the larger clusters. We will study this hypothesis in the future work on the larger systems.

#### 5. Future plans

Our future plans include working on larger clusters containing the Eigen ion motif. Furthermore we will use the experience gained and methods constructed in this project to benefit future projects involving the vibrational theory of molecular clusters.

[1] Fournier *et al*, Science **344**, 2014, p1009

[2] McCoy *et al*, Phys. Chem. Chem. Phys. **14**, 2012, p7205.

Table 1: The assignment of the spectrum in Fig. 1, the VQDPT2 label signifies our calculated peak positions. Experimental data are reported in a) Fournier et al [1] b) McCoy et al [2].

平成 26 年度 RICC 利用研究成果リスト

【国際会議、学会などでの口頭発表】

1. **Kiyoshi Yagi**, Vibrational correlation theories with optimized coordinates, The 18th East Asian Workshop on Chemical Dynamics, May 18-21, 2014, Pusan, Korea.
2. **Kiyoshi Yagi**, Theoretical Analyses on the Amide Vibrational Bands of Sphingomyelin Bilayers, Second International Conference on Weak Intermolecular Interaction, Mar. 5-6, 2015, Tokyo, Japan.
3. **大滝大樹**, 八木清, 杉田有治, 石内俊一, 藤井正明, レプリカ交換分子動力学法と非調和振動状態計算によるポリペプチドの構造解析, 第 8 回分子科学討論会 2014 東広島, 東広島, 2014 年 9 月.
4. **Hiroki Otaki**, Structure Determination of Polypeptide with Efficient Sampling, Clustering, and Anharmonic Vibrational Analysis, Japan-France Symposium on Biomolecular Structure and Function – Technical Fusion between Spectroscopy and Theory, CEA Saclay, France, 2014 年 10 月.
5. **大滝大樹**, 効率的な配座サンプリングと非調和振動状態計算による柔らかい分子の非経験的構造決定, 第 10 回若手研究者たちによる先端的レーザー分光シンポジウム, 横浜, 2014 年 12 月.
6. **大滝大樹**, 効率的な配座サンプリングと非調和振動状態計算による柔らかい分子の非経験的構造決定, 理研シンポジウム: 生体分子系量子化学計算の最前線, 和光, 2015 年 1 月.
7. **Hiroki Otaki**, Structure Determination of Polypeptide with Replica-Exchange Molecular Dynamics and Anharmonic Vibrational Structure Calculation, Korea-Japan Collaboration Workshop on Spectroscopic Study on Molecular Structure and Dynamics, Yokohama, 2015 年 1 月.

【その他】

○ポスター発表

1. **八木清**, 最適化振動座標に基づく分子振動理論の開発と応用, 第 8 回分子科学討論会, 2014 年 9 月 21-24 日, 広島.
2. **K. Yagi**, Pai-Chi Li, K. Shirota, T. Kobayashi, and Y. Sugita, Statistically Weight Averaged Vibrational Spectrum over Molecular Fragments for Studying the Amide I Vibration of Sphingomyelin Bilayer, ACS Meeting 2015, Mar. 22-26, 2015, Denver USA.
3. **大滝大樹**, 八木清, 杉田有治, 石内俊一, 藤井正明, レプリカ交換分子動力学法と非調和振動状態計算によるポリペプチドの構造決定, 第 17 回理論化学討論会, 名古屋, 2014 年 5 月.
4. **水上渉**, Analysis of Protein Dynamics via Computational Simulations of Vibrational Spectra with Considering Quantum and Anharmonic Effects, 平成 26 年度基礎科学特別研究員・国際特別研究員研究成果発表会, 和光, 2015 年 2 月.
5. **Bo Thomsen**, Kiyoshi Yagi, Yuji Sugita “Assigning the 1800-3500cm<sup>-1</sup> Region of the Eigen Ion Vibrational Infra-Red Spectrum.”, 5<sup>th</sup> Advanced Institute for Computational Science (AICS) International Symposium, Kobe, December 8<sup>th</sup> -9<sup>th</sup>
6. **Bo Thomsen**, Kiyoshi Yagi, Yuji Sugita, “Calculating the infrared spectra of the Eigen ion using anharmonic vibrational theory”, 249<sup>th</sup> American Chemical Society (ACS) national meeting, Denver, March 22<sup>nd</sup> – 26<sup>th</sup>