

博士論文

論文題目

実験と計算両側面から考察した、黄色ブドウ球菌の
細胞壁上の高速ヘム輸送機構の解明

氏 名 森脇 由隆

目次

第 1 章	序論	7
1.1	研究背景	7
1.1.1	黄色ブドウ球菌	7
1.1.2	現在知られている黄色ブドウ球菌の鉄獲得機構	8
1.1.3	ヘム分子	9
1.1.4	ヘム獲得機構 Isd system	10
1.1.5	Isd-NEAT ドメイン (IsdH-NEAT1,2,3, IsdB-NEAT1,2, IsdA, IsdC)	13
1.1.6	IsdDEF、IsdG、IsdI の機能	16
1.1.7	Isd system 内の蛋白質間相互作用	17
1.2	研究目的	18
1.3	研究手法	18
1.4	論文の構成	19
1.5	特色と独創的な点、学術的な貢献	19
第 2 章	分子動力学法	20
2.1	分子動力学シミュレーションの原理	20
2.2	分子動力学法と運動方程式	20
2.3	初期条件と計算条件の設定	21
2.4	分子力場	22
2.4.1	分子内力場と分子間力場	23
2.4.2	AMBER 力場	24
2.5	運動方程式の解法	24
2.6	分子動力学法における温度と圧力	25
2.7	ブラウン運動と Langevin dynamics	26
2.8	熱浴制御	27
2.9	圧力制御	28
2.10	クーロン静電相互作用の計算	29
2.11	一般化ボルン(Generalized Born)モデル	31
2.12	原子間距離の拘束: SHAKE アルゴリズム・LINCS アルゴリズム	32
2.13	自由エネルギーの計算	33
2.14	エネルギー最小化	35
2.15	量子化学計算による分子のパラメータの設定	35
第 3 章	分子軌道法	37
3.1	シュレディンガー方程式	37
3.1.1	ハミルトニアン演算子	38

3.1.2	Born–Oppenheimer 近似	39
3.1.3	Hartree–Fock 法	40
3.1.4	Slater 行列式	40
3.1.5	Hartree–Fock 方程式	41
3.1.6	閉殻系・開殻系	43
3.1.7	Roothaan–Hall 方程式と自己無撞着場 (self-consistent field) 計算	44
3.1.8	<i>ab initio</i> 分子軌道法	45
3.2	基底関数系	46
3.2.1	最小基底系	47
3.2.2	2 倍基底関数系	47
3.2.3	分極基底関数系	48
3.3	密度汎関数法	48
3.3.1	Hohenberg–Kohn の定理	48
3.3.2	Kohn–Sham の定理	52
3.3.3	局所密度近似 (LDA)	55
3.3.4	局所スピン密度近似 (LSDA)	56
3.3.5	勾配補正汎関数と混成汎関数	57
3.3.6	密度汎関数法と分子軌道法の比較	58
第 4 章	<i>in vitro</i> 実験手法	60
4.1	RP523 株を使った大腸菌発現系	60
4.2	菌体培養法 (好気呼吸条件)	61
4.3	菌体培養法 (嫌気呼吸条件)	62
4.4	蛋白質の精製	63
4.5	使用した金属ポルフィリン	63
4.6	変異体作製	64
4.7	等温滴定型熱量測定 (ITC)	65
4.7.1	ITC の原理	65
4.7.2	測定の手順	66
4.8	Isd 蛋白質間の金属ポルフィリン輸送測定	67
第 5 章	計算機実験手法	68
5.1	分子動力学シミュレーションの概要	68
5.2	モデル構築	68
5.3	RESP 法を用いた部分電荷の設定	69
5.4	分子動力学シミュレーションの設定	69
5.5	MD トラジェクトリの変換	70
5.6	平均二乗偏差 (RMSD)	70

5.7	Root-mean-square fluctuation (RMSF)	71
5.8	主成分分析 (PCA)	71
5.9	Schlitter の振動エントロピー推定	72
5.10	MM-PB/SA 法と結合自由エネルギー変化の推定	76
5.11	エネルギー補正項の算出	81
第 6 章	異なる親和性を提示する、構造的に似た 3 種の Isd-NEAT ドメインの ヘム結合機構の解析	83
6.1	金属キレートアフィニティークロマトグラフィーによる蛋白質粗精製	83
6.2	サイズ排除クロマトグラフィー精製	84
6.2.1	IsdH-NEAT3	84
6.2.2	IsdA (full-length)	84
6.2.3	IsdC	85
6.3	ITC による結合自由エネルギー変化 (ΔG) の測定	86
6.4	IsdH-NEAT3 から IsdC への直接的な金属ポルフィリン輸送	88
6.5	力場・RESP 電荷パラメータ決定	91
6.5.1	ヘムの力場決定	91
6.5.2	チロシン-ヘムの RESP 電荷決定	91
6.6	振動エントロピーと構造変化の主成分の推定	93
6.7	分子動力学シミュレーションによる各 Isd-NEAT の ヘム結合エネルギー推定	93
6.8	IsdC 変異体の結合自由エネルギー・エンタルピー測定	98
6.9	IsdC の F130 の役割	99
6.10	Isd 変異体を用いた NEAT ドメイン間ヘム輸送の方向の逆転現象	104
6.11	他の病原菌に存在する NEAT ドメインの親和性の推定	104
6.12	第 6 章の結言	105
6.13	補足資料 (Supporting information)	106
第 7 章	Isd-NEAT ドメイン間のヘム輸送の中間体構造の推察	110
7.1	緒言	110
7.2	ONIOM 法	110
7.3	IsdH-NEAT3-heme-IsdA-NEAT 輸送中間体のモデル構築	111
7.4	IsdA-NEAT-heme-IsdC-NEAT 輸送中間体のモデル構築	112
7.5	ONIOM による各種構造変異体の最安定構造推定	114
7.5.1	研究背景	114
7.5.2	IsdH-NEAT3 と Ga-PPIX、ヘム複合体の構造最適化	115
7.5.3	ヘム結合チロシンのフェニルアラニン変異体	116
7.5.4	IsdA, IsdC とヘム複合体の構造最適化	117

7.5.5	2つのフェノールとポルフィリン複合体のエネルギー計算	119
7.6	結果と考察	120
7.6.1	2種の Isd-NEAT ドメインとヘムの複合体構造	120
7.6.2	β 8 ストランド上のもう1つのチロシンによる配位結合	122
7.6.3	Isd-NEAT 間の金属ポルフィリン輸送	125
7.6.4	第7章の結言	128
第8章	Isd system の鉄輸送阻害剤	131
8.1	緒言	131
8.2	研究手法	132
8.2.1	ヘム誘導体の合成	132
8.2.2	ITC 測定	132
8.2.3	UV 吸光度測定	133
8.2.4	IsdC-IsdE 間のヘム誘導体輸送実験	133
8.3	結果と考察	134
8.3.1	吸光度測定によるヘム誘導体の結合	134
8.3.2	ITC 測定によるヘム誘導体の結合	135
8.3.3	IsdC から IsdE へのヘム誘導体の輸送	136
8.4	第8章の結言	137
8.5	補足資料 (Supporting information)	138
第9章	結論	139
参考文献	142
付録	149

略語

Isd, Iron-regulated surface determinant; NEAT, near transporter;
 ITC, isothermal titration calorimetry (等温滴定型熱量測定);
 SEC, size-exclusion chromatography (サイズ排除クロマトグラフィー);
 PPIX, protoporphyrin IX (プロトポルフィリン IX) ; DMSO, dimethyl sulfoxide;
 DEAE, diethylaminoethyl (ジエチルアミノエチル) ; *in silico*, 計算機を用いて;
in vitro, 実験室の試験管内で; *in vivo*, 生体・細胞内で;

第1章 序論

1.1 研究背景

1.1.1 黄色ブドウ球菌

黄色ブドウ球菌は通性嫌気性のグラム陽性菌であり、人体の皮膚表面上、特に鼻腔内に存在することの多い常在菌である。常在菌のブドウ球菌の中では比較的毒性が高く、免疫力が低下した状態のヒトにおいて増殖し、肺炎や敗血症、骨髓炎などの重篤な病を引き起こすこともある^{1,2}。健康なヒトにおいてもその30%は黄色ブドウ球菌を保有していると言われ³、創傷部から体内に侵入した場合に黄色ブドウ球菌が体内で増殖し、発病することが多い。黄色ブドウ球菌は毒素として、特に黄色ブドウ球菌の食中毒の原因としてよく挙げられるエンテロトキシン群（20種類以上が確認されている）^{4,5}や血漿凝固作用を持つコアグララーゼ⁶、白血球の破壊作用を持つロイコシジン^{7,8,9}などがある。同様に黄色ブドウ球菌はヒトなど宿主動物の免疫機構を封じ込めるための機構も発展させており、代表的なものとしてほとんどの黄色ブドウ球菌の細胞壁上に発現している Protein A は、抗体（免疫グロブリン）の Fc 領域に結合することでその活性を抑制している¹⁰。この他様々な免疫回避機構を有している。

黄色ブドウ球菌の最も厄介な性質は抗生物質耐性の獲得の速さであり、1982 年から、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌の存在が相次いで報告されている^{11,12,13,14}。1997 年には黄色ブドウ球菌に対する「最終手段」と言われていた抗生物質バンコマイシンへの耐性を獲得した株も出現し¹⁵、黄色ブドウ球菌の単純な抗生物質による封じ込めは現状極めて困難となってしまった。

このため現在黄色ブドウ球菌に対する創薬は2つの方向性が存在する。1つはワクチンによって宿主体内に免疫を作成する方法であり、黄色ブドウ球菌への抗体が体内で作られることで薬剤耐性に関係なく死滅させる方法である。しかし、上記のように黄色ブドウ球菌は様々な構成蛋白質をゲノムレベルで短期間のうちに変化させる上、生育の段階において発現する蛋白質の構成が大きく変化するため、この方法は非常に困難である。もう1つの方法は新たな抗生物質を作り続けることである。リポペプチド系抗生物質ダプトマイシン（daptomycin）やグリシルサイクリン系抗生物質のチゲサイクリン（tigecycline）などが21世紀に入ってから新たに開発され、現時点では耐性株が出現していない。しかしこちらも時間経過による出現の可能性は否定できず、できるだけ多くの抗生物質を作り続ける必要があると考えられる。

抗生物質の多くはターゲット生物の生育に必要なコンポーネントの活性を阻害するものである。例としてメチシリンやバンコマイシンは細胞壁の構成を阻害するためのものであり、カナマイシンやテトラサイクリン系のものは真正細菌のリボソームの活動阻害剤として働く。一方で黄色ブドウ球菌は生育に鉄が必須であり、この機能を阻害するような物質は黄色ブドウ球菌に対する新たな抗生物質として働くことが期待される。

1.1.2 現在知られている黄色ブドウ球菌の鉄獲得機構

細菌の生育において鉄は必須の栄養素であり、様々な代謝機構に用いられている。3 価の鉄原子は DNA 合成やエネルギー産生において機能するばかりでなく、過酸化水素や 2 価の鉄原子から産生される有害なラジカルを無毒化するなどの機能がある。鉄原子は地球上広く存在する遷移金属原子であり、地中や水中にイオンや化合物の形で数多く存在し、その獲得は本来細菌や微生物にとって容易なものである。

一方で、ヒトは体内におよそ 4 g 程度鉄原子を保持しているが¹⁶、そのほぼすべて(99.9%)が小分子や蛋白質などの生体分子によってキレートされており、また 3 価鉄イオンの溶解度はとても低いため、細菌は通常これらの鉄を利用することは不可能である¹⁶。

そこで黄色ブドウ球菌は、これらキレートされている鉄を奪取するような様々な機構を発展させてきた。宿主動物が鉄をキレートしている蛋白質の代表例としてラクトフェリンやトランスフェリンが存在するが、これらの蛋白質から鉄を奪うための機構の 1 つとして siderophore と呼ばれる機構が存在する^{17,18,19}。siderophore 自体は古くから知られ、多くの細菌が産生する小分子化合物であり、様々なタイプが存在する。しかし、黄色ブドウ球菌はこれまで知られていた siderophore に加え、Staphyloferrin A, Staphyloferrin B という新種の siderophore を有していることが判明している (Figure 1.1)。この 2 つの黄色ブドウ球菌内の生合成および発現は ferric uptake regulator (*fur*) 遺伝子によって制御されており、また鉄欠乏環境下でのみ発現しやすいように調整されている^{20,21}。Staphyloferrin A は D-オルニチンから合成される分子量 479 の化合物であり^{22,23}、細胞膜に存在する HtsA によって輸送されることが判明している^{24,25}。ただし HtsBC は siderophore との相互作用は現時点では確認されていない。Staphyloferrin B は分子量 448 の化合物で、L-2,3-diaminopropionic acid などから合成される。この系での細胞膜への輸送は SirABC によって仲介されている。Staphyloferrin A, B とともに黄色ブドウ球菌固有の機構であり、感染においてもこれらの機構が有効に働いている可能性は高い。この調査は現在精力的に行われている段階である。

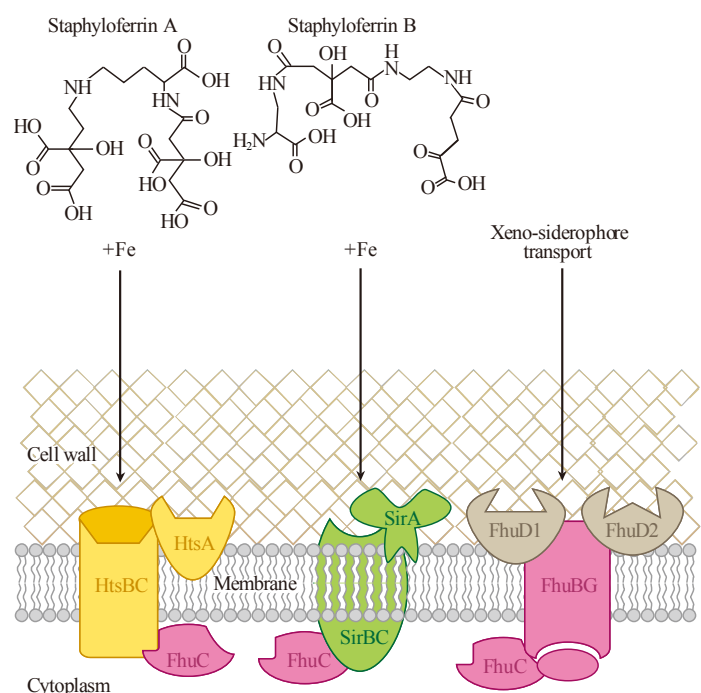


Figure 1.1 黄色ブドウ球菌に見られる siderophore を介した鉄獲得機構。Molecular mechanisms of *Staphylococcus aureus* iron acquisition. *Annual review of microbiology*, 65, 129-47 より引用。

しかし、人体において鉄はヘム (heme) 分子の中にキレートされ、さらにヘムが蛋白質によって補酵素として働いている場合も数多く存在する (**Figure 1.2**)。その代表例としてはヘモグロビン (hemoglobin)、ミオグロビンが存在し、それぞれ人体では 2.67 g、0.2 g ほど存在すると言われている¹⁶。特に血管内においてはヘモグロビンが主要な鉄保有蛋白質であるが、siderophore ではヘモグロビンから鉄を奪うことはほぼ不可能である。それにもかかわらず、黄色ブドウ球菌は血管中でも比較的生存しやすく全身に広がり敗血症を引き起こしやすいことがこれまで知られていた。つまり、黄色ブドウ球菌にはヘモグロビン・ヘムから鉄分を獲得する機構が存在することが強く示唆されてきた。

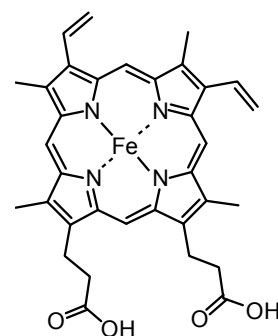


Figure 1.2 ヘムの構造式

1.1.3 ヘム分子

ヘムは、鉄原子とポルフィリンからなる錯体分子である。生体内ではポルフィリンは IX 型プロトポルフィリン (protoporphyrin-IX) からなるヘム b (**Figure 1.2**) が代表例である (他にはシトクロム c オキシダーゼ内で用いられるヘム a などが存在する)。本研究では特に断りがない限りヘムはこのヘム b を示す。ヘムの働きとして最も有名なものの 1 つには、ヘモグロビンと酸素運搬の役割がある。血液 (赤血球) 中に存在するヘモグロビンは 1 分子中に 4 分子のヘムを有し (ヘモグロビンは α , β がそれぞれ 2 ユニットからなる合計 4 量体

であり、それぞれのユニットに1分子のヘムを有する)²⁶、それぞれのヘムの鉄原子上に酸素分子が結合し、血管を通して全身に酸素を供給する重要な役割を果たす。

ヘム内の鉄原子の酸化状態はほとんどのヘム蛋白質の機能に大きな影響を与える。空気中では鉄は酸化されやすく、 Fe^{2+} よりは Fe^{3+} の価数をとる。しかし、例えば血液中のヘモグロビン内の鉄の価数は Fe^{2+} となるよう保たれており、 Fe^{3+} の状態 (methemoglobin) では酸素と結合することができないことが知られている。またヘモグロビンを含めほとんどのヘム蛋白質が反応を触媒するときには、反応サイクルにおいて鉄の価数が変わることで酸化・還元反応を促進することが多い。また、このような背景から、細菌を含む生体内でヘムは生合成されることが多い。

ヘムを含むポルフィリンは400~500 nmと500~700 nm付近に特徴的な吸収帯（それぞれ Soret 帯・Q 帯）を持つことが古くから知られている。これらは可視光領域であるため、人間の目には色が付いているように見える。また、この吸収帯は配位する金属種や周囲の残基の配位によって少しずつ変化し、それに応じて見える色も変化する。

1.1.4 ヘム獲得機構 Isd system

2002年、Mazmanian らによって同定された Iron-regulated surface determinant (Isd) system は、黄色ブドウ球菌がヒトなど宿主動物のヘモグロビンとヘムから鉄分を獲得するのを可能にする蛋白質群であることが判明した^{27,28}。この Isd system は鉄分不足の環境下で発現する、9つからなる蛋白質で構成されている²⁹。まず細胞壁の最外殻に存在するヘモグロビンおよびヘム結合蛋白質である ①IsdH、②IsdB、細胞壁の中部、内部に存在するヘム結合蛋白質 ③IsdA、④IsdC、細胞壁と細胞膜の境界に位置する⑤IsdE、細胞膜に存在し、ヘムを細胞膜内へ輸送する ABC トランスポーターである⑥IsdF、同じく細胞膜に位置する、現時点では機能不明の⑦IsdD、最後に、細胞膜内に存在してヘムを分解し、鉄分を獲得するヘムオキシゲナーゼ⑧IsdG と⑨IsdI である。

Isd system の機能はこの10年で、我々を含めた世界中の多くの研究者によって精力的に調査が行われ、解明が進んできた。まず Isd system の機能の第1段階は宿主動物のヘモグロビンを捕獲し、ヘムを奪うところから始まる。この機能を担うのが細胞表層に提示されている IsdH、IsdB の機能ドメインの一つである Near transporter (NEAT)ドメインである。IsdH-NEAT1、NEAT2 ドメインはハプトグロビン—ヘモグロビン (Haptoglobin—Hemoglobin) と相互作用し、蛋白質の構造を歪ませることによってヘモグロビン内のヘムとの親和性を低下させて解離しやすくさせる^{30,31,32,33}。IsdB-NEAT1 ドメインも同様の形式でメトヘモグロビン (3 価鉄の状態のヘモグロビン) と相互作用する²⁸。IsdH-NEAT3 および IsdB-NEAT2 は先のドメインの働きと共同して、ヘモグロビン中のヘムを獲得する。これらのドメイン上のヘムはその後迅速に IsdA、IsdC の NEAT ドメイン上を経由して、およそ30~100 nm ほどある細胞壁内を縦断して IsdE へと輸送される^{34,35} (**Figure 1.3**)。ここで黄色ブドウ球菌の NEAT ドメインには、① ヘモグロビンと親和性が高いが、ヘムに対する親和性は低いもの

(IsdH-NEAT1, 2 および IsdB-NEAT1) と、② ヘムとの親和性が高いが、ヘモグロビンとは直接相互作用しない (IsdH-NEAT3, IsdB-HEAT2, IsdA-NEAT および IsdC-NEAT) ものが存在することに留意していただきたい。

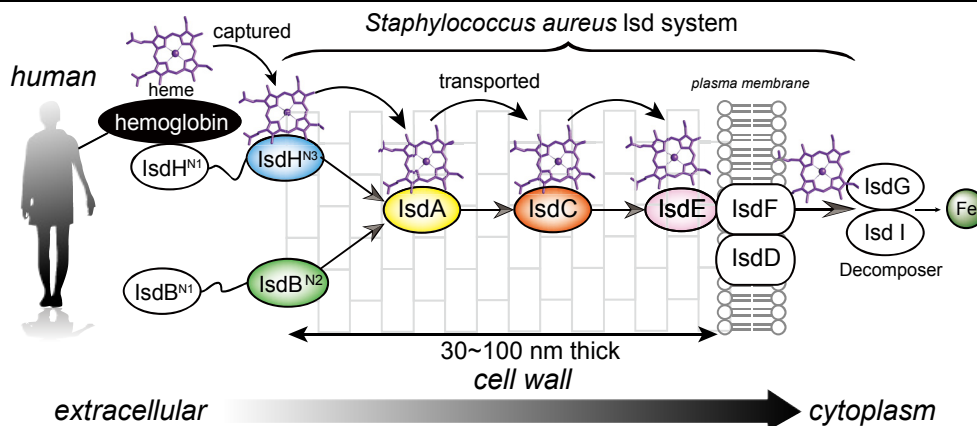


Figure 1.3 Isd system の模式図。ヒトの hemoglobin に存在する heme を細胞壁上で輸送する。IsdA, IsdB, IsdC と IsdH は細胞壁と共有結合している。IsdF は IsdE とともに働く ABC transporter である。IsdD の機能は未知である。IsdG/IsdI はヘムを分解し、鉄原子を取り出す。本研究論文で特に重要な蛋白質は色付きで示した。

IsdA, IsdB と IsdH は Sortase A (SrtA) のはたらきにより、細胞壁のペプチドグリカンにアンカリングされている³⁶。IsdA, IsdB と IsdH は C 末端に LPXTG 細胞壁アンカーモチーフを有しており、SrtA は LPXTG モチーフを認識してペプチドグリカンとの共有結合を形成させる。IsdC は末端に NPQTN モチーフを有しており、Sortase B (SrtB) の働きにより同様に細胞壁にアンカリングされている²⁷。isdC、isdD、isdE、isdF、srtB と isdG は同じ翻訳ユニット上に位置している (Figure 1.4)。

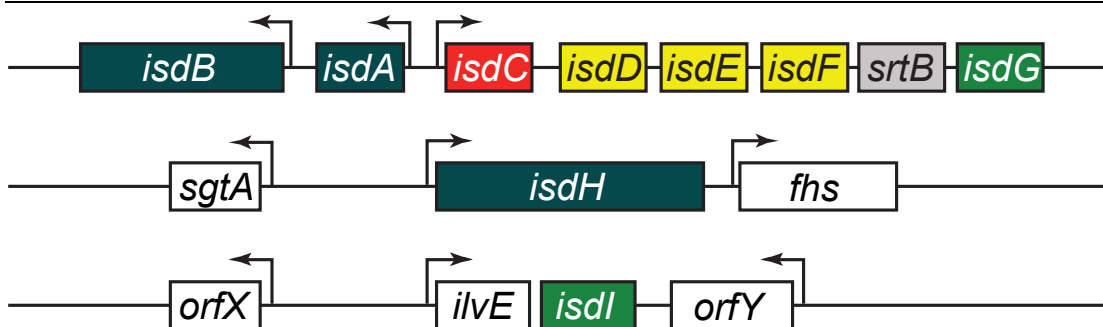


Figure 1.4 黄色ブドウ球菌で同定された *isd* 遺伝子群。Sortase A により細胞表層に提示される蛋白質の遺伝子は深緑、Sortase B により細胞表層に提示される蛋白質の遺伝子は赤、plasma membrane のヘム輸送機構システムを形成する蛋白質をコードする遺伝子は黄色、Sortase をコードする遺伝子は灰色、ヘム分解酵素をコードする遺伝子は緑で示した。また、機能が明らかになっていない遺伝子を白で示した。

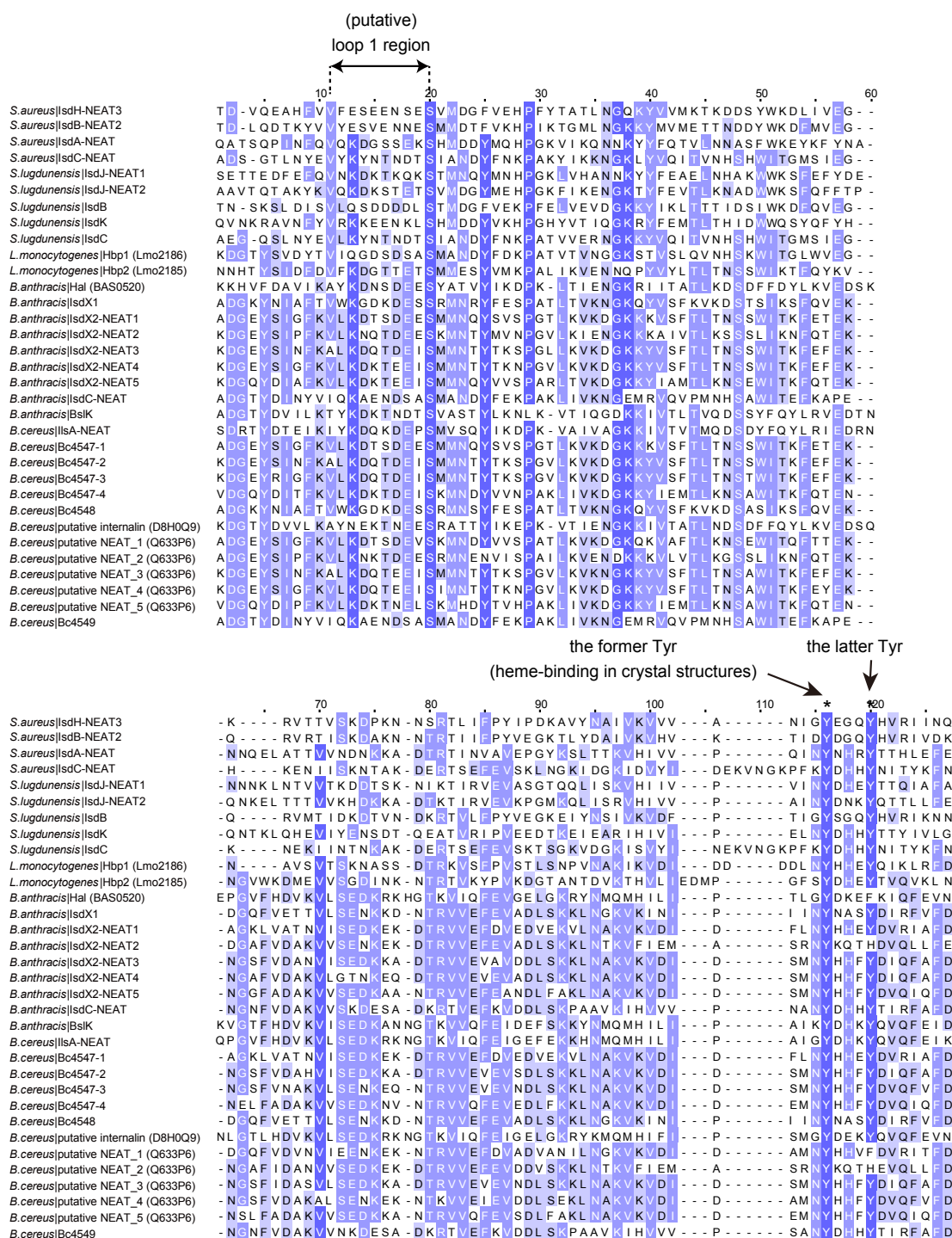


Figure 1.5 NEAT ドメインについてのシーケンスアラインメントの結果。残基はそれぞれ類似度 (similarity) によって段階的に色付けされている。NEAT ドメインの定義は Pfam データベースにおけるアノテーションを用いた。蛋白質の名称が決定されていない推定される NEAT ドメインについては primary accession ナンバーを付記している。アラインメントはソフトウェア JalView 2.8 を用いた。

1.1.5 Isd-NEAT ドメイン (IsdH-NEAT1,2,3, IsdB-NEAT1,2, IsdA, IsdC)

前項のように、Isd system のうち IsdH, IsdB, IsdA および IsdC にはそれぞれ 1～3 個の NEAT ドメインが存在する。また、IsdH-NEAT1, NEAT2 ドメインと IsdB-NEAT1 ドメインはヘモグロビンへの結合に特化しており、その他の NEAT ドメインはヘム結合に特化している。NEAT ドメインは 2002 年にはじめて同定され、グラム陽性菌に特有のものであることが判明している³⁷。各ドメインの配列相同性は 11%～64% と多様性に富んでいる (Table 1.1)。また、それぞれのドメインの模式図を Figure 1.6 に示した。各 Isd-NEAT ドメインの N 末端には分泌シグナルが、C 末端には Sortase による細胞壁上へのアンカリング用のアミノ酸配列が、それぞれ存在する。ここで、Sortase の一種 SrtA が IsdH, IsdB, IsdA に対して働き (LPXTG モチーフ)、SrtB が IsdC に対して働く (NPQTN モチーフ)。ここで使い分けられている Sortase の働きにより、細胞壁上でのこれらの Isd 蛋白質の発現箇所の制御を行っていると考えられている。

Table 1.1 NEAT ドメイン間の配列相同性

	IsdA ^N	IsdB ^{N1}	IsdB ^{N2}	IsdC ^N	IsdH ^{N1}	IsdH ^{N2}	IsdH ^{N3}
IsdA ^N	100%	18.5%	19.0%	19.8%	19.1%	17.6%	19.0%
IsdB ^{N1}	-	100%	11.9%	15.4%	42.3%	63.8%	11.1%
IsdB ^{N2}	-	-	100%	20.6%	13.5%	13.5%	57.1%
IsdC ^N	-	-	-	100%	10.6%	13.7%	15.1%
IsdH ^{N1}	-	-	-	-	100%	46.6%	13.5%
IsdH ^{N2}	-	-	-	-	-	100%	12.7%
IsdH ^{N3}	-	-	-	-	-	-	100%

ClustalW を用いた配列比較により、各 NEAT ドメイン間の配列相同性を示した。本研究では、同じ ORF 上に複数の NEAT ドメインが存在する IsdB, IsdH については N 末端側から順に NEAT1, NEAT2, NEAT3 と表記した。上付きの N1, N2, N3, N はそれぞれ NEAT1, NEAT2, NEAT3, NEAT ドメインを表している。

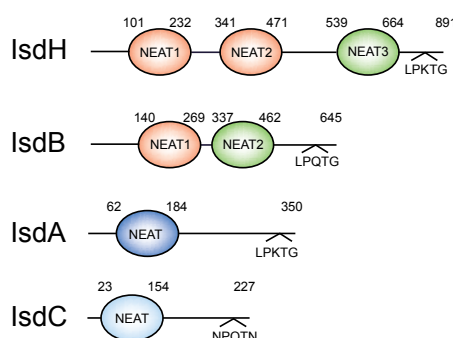


Figure 1.6 細胞壁に存在する Isd 蛋白質の模式図。分泌シグナルが N 末端に存在する (図中では示していない)。図中の番号は N 末端からのアミノ酸番号である。NEAT ドメイン以外の領域は線で示している。配列相同性が高いものは互いに同じ色で示してある。

それぞれの NEAT ドメインはおよそ 120 アミノ酸残基から構成され、精力的な NMR や結

晶構造解析の結果、現在ではすべての NEAT ドメイン構造が解明された。初めて構造が解かれたのは 2006 年の Pilpa らによる IsdH-NEAT1³²であった。これらのドメインはすべて共通して、8 本の β -strand からなる immunoglobulin 様の β -sandwich 構造であり、ヘモグロビン結合・ヘム結合 NEAT ドメイン間でさえ、互いによく類似している (**Figure 1.7**)。また、配列比較の結果から NEAT ドメインは炭疽菌 (*Bacillus anthracis*) をはじめ、*Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus lugdunensis* といった他のグラム陽性菌にも存在が確認された (**Figure 1.5**)。これらの他にも *Listeria innocua*, *Bacillus halodurans*, *Clostridium perfringens*, *Streptococcus pyogenes* において存在が示唆されている。これらのグラム陽性菌には病原菌として有名なものも多く、NEAT ドメインが病原性微生物に普遍的に存在する鉄取り込み機構なのではないかと考えられている。

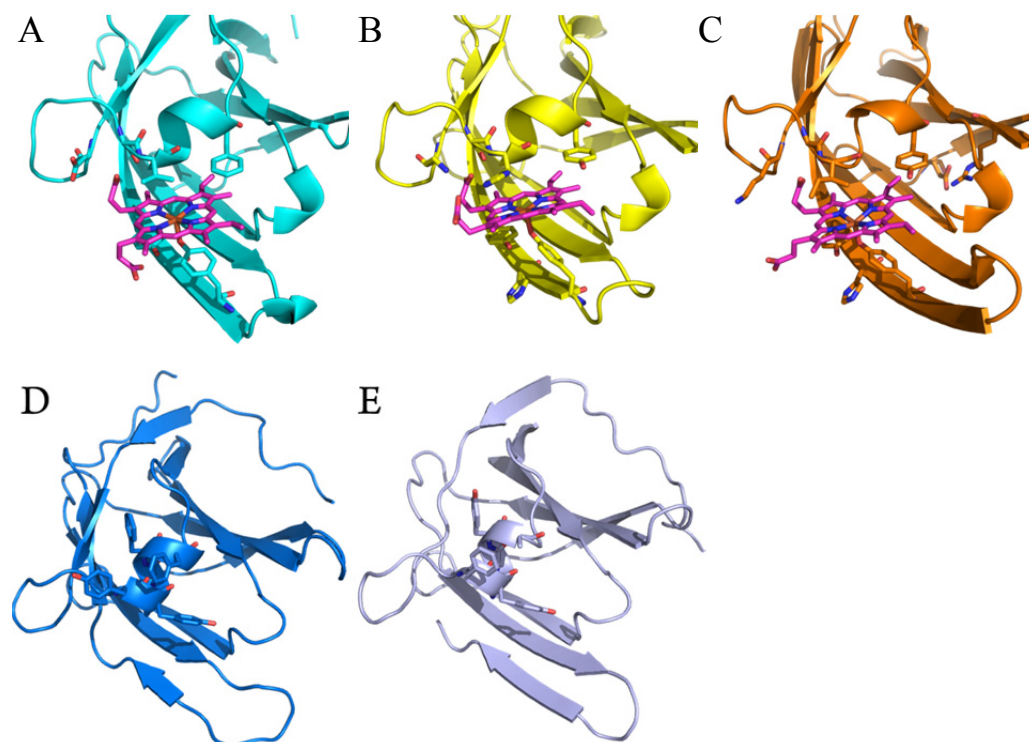


Figure 1.7 Isd-NEAT ドメインの蛋白質構造。(A) IsdH-NEAT3 (PDB entry: 2Z6F) (B) IsdA-NEAT (PDB entry: 2ITF) (C) IsdC-NEAT (PDB entry: 2O6P)。紫色の棒で示している分子はヘムである。(D) IsdH-NEAT1 ドメインの結晶構造 (PDB entry: 3SZK)。(E) IsdH-NEAT2 ドメインの結晶構造 (PDB: 4IJ2)。活性部位は棒で表示している。

ヘモグロビン結合型の NEAT ドメイン (IsdH-NEAT1, NEAT2) とヘモグロビンが相互作用し、ヘムをヘモグロビンから取り出す機構については 2013 年に Spirig らによって報告された³³。それによると、IsdH-NEAT2 と NEAT3 ドメインの間には 3 本の α -ヘリックスが存在し、このリンカー領域のおかげで NEAT2 と NEAT3 がヘモグロビンに対し適切な配置をとることが可能となり、NEAT2 がヘモグロビンを不安定化させつつ NEAT3 がヘムを奪取することを可能にしている。興味深いことに、NEAT2-linker-NEAT3 が一続きになっている場合

に限り、効率の良いヘム奪取が行われることが報告されている。さらに 2014 年 1 月、これらのヘモグロビンと結合した状態での結晶構造が Gell らによって報告された³⁸。これによると、IsdH-NEAT2 がヘモグロビンを構成するユニットの N 末端の $\alpha 1$ ヘリックスの相互作用した状態で、linker の働きにより NEAT3 ドメインがちょうどそのヘモグロビンユニットのヘム結合部位に接近できることが示された (**Figure 1.8**)。linker 部位は 3 つの α ヘリックスによって構成されており、剛直な構造であることが想定される。この働きにより NEAT3 ドメインはヘモグロビンのヘムに直接相互作用することが可能となり、これを奪っていく機構が提唱されている。

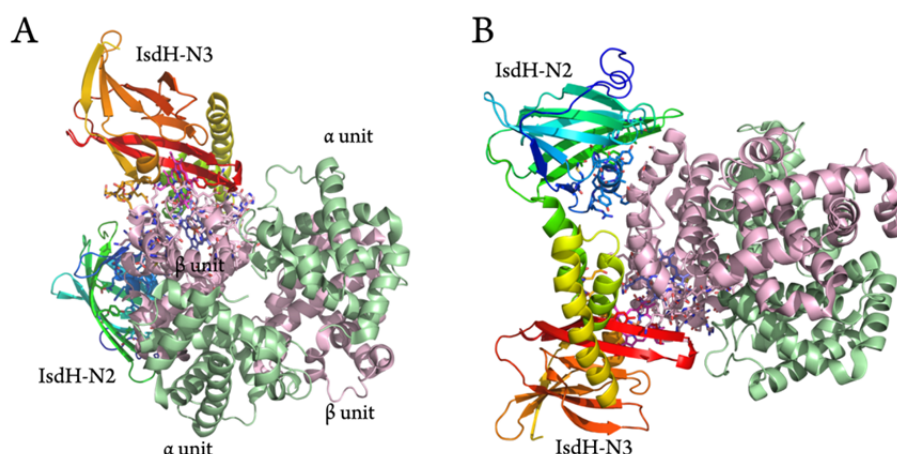


Figure 1.8 (A–B) ヘモグロビンと結合した IsdN2-linker-IsdH-N3 の結晶構造 (PDB entry: 4IJ2)³⁸。wild type の IsdH-NEAT2, NEAT3 ドメイン連結型がヘモグロビンの α 、 β ユニットからヘムを抜き取り、また α 、 β ユニットの解離を促進する。図では同様に α ユニットに結合した IsdH2-linker-IsdH-N3 は表示していない。

IsdH-NEAT3 (または IsdB-NEAT2) によってヘムが捕らえられた後は、細胞壁上の IsdA-NEAT、IsdC-NEAT によって細胞膜付近の IsdE まで輸送される。興味深いことに、ヘムとの配位形式はヘモグロビンなどでよく見られる 2 つのヒスチジンを使った 6 配位形式ではなく、チロシン 1 つによる 5 配位形式である^{39,40,41,42}。**Figure 1.9** に各 Isd-NEAT のヘム結合ポケットの周辺残基を示す。配列アラインメントの結果と合わせると、21 番目のセリンと 111 番、115 番の 2 つのチロシンがヘム結合ポケット周辺で共通している。これは他の種に存在する NEAT ドメインにおいても同じである (**Figure 1.5**)。

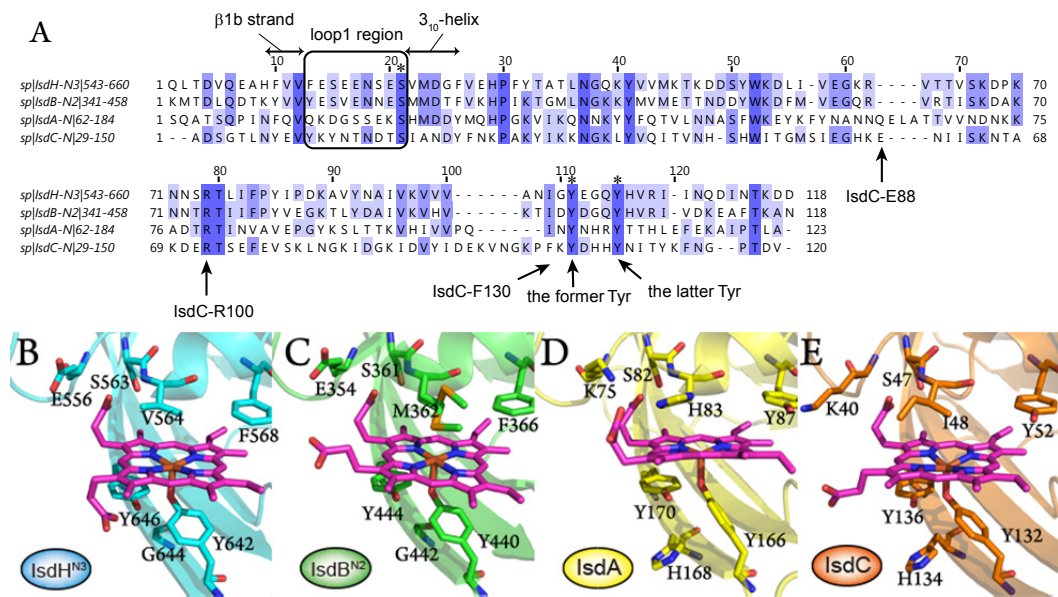


Figure 1.9 黄色ブドウ球菌のヘム結合 NEAT ドメインのヘム結合ポケットの周辺拡大図。(A) 黄色ブドウ球菌内のシーケンスアラインメントの結果 (B) IsdH-NEAT3 (C) IsdB-NEAT2 (D) IsdA-NEAT (E) IsdC-NEAT。

1.1.6 IsdDEF、IsdG、IsdI の機能

IsdC まで輸送されたヘムは細胞膜の IsdE へと輸送される。IsdE は IsdC までの NEAT ドメインと違い、メチオニンとヒスチジンを 1 つずつ用いる 6 配位形式でヘムと結合することが結晶構造解析により判明している⁴³。また、ヘムの 2 つのプロピオン酸基も蛋白質に内包される形で結合する。この後の詳しい機構は判明していないが、機能未知の IsdD と IsdF によって細胞膜内に輸送され IsdG/IsdI に輸送される。

IsdG/IsdI はヘムオキシゲナーゼ (HO) の 1 種であり、最終的にヘムを分解して鉄原子を取り出す役割を果たす。この 2 者はホモログであり、ほぼ同じ働きをすること考えられている^{44,45}。この IsdG/IsdI がヘムを分解する際の興味深い点として、結合時にヘムを歪ませるような構造を取ることで⁴⁴、これまで知られている HO と違い、分解時に biliverdin と一酸化炭素を排出していないことが知られており⁴⁶、新種の HO であることが想定されていた。2010 年に Reniere らによってこの産物は biliverdin ではなく新種の分解物 Staphylobilin と名付けられた⁴⁷。また 2013 年には副産物として一酸化炭素ではなくホルムアルデヒドを排出することが発見された⁴⁸。興味深い点として、鉄以外の他の金属が含まれるポルフィリンを用いた場合、IsdG/IsdI による分解反応は進行せずに結合したままになってしまう現象が確認されている⁴⁴。このため細胞膜内に金属置換ポルフィリンが混入した場合、IsdG/IsdI はそれを分解することができず、Isd system は機能不全に陥ってしまう可能性が示唆されている。

1.1.7 Isd system 内の蛋白質間相互作用

IsdH-NEAT3, IsdB-NEAT2 がヘモグロビンからヘムを取得する相互作用形式については前項で少し述べた。一方、メトヘモグロビンから IsdB への見かけの輸送速度 k_{obs} は 0.31 s^{-1} 、IsdB-NEAT2 から apo 体の IsdA と IsdC へはそれぞれ $82 \sim 114 \text{ s}^{-1}$, 15 s^{-1} である^{40,49}。また IsdA 上のヘムから apo 体の IsdC へは 54 s^{-1} である³⁴。これらの値はヘムが Isd-NEAT からの自然な遊離速度と比べ非常に速いため、Isd system におけるヘム輸送は蛋白質間相互作用を介して行われている可能性が高いことが示されている^{35,40,49}。また、Isd-NEAT のうち IsdA は IsdE へと効率的にヘムを輸送することができないことが示されている (0.0062 s^{-1})⁴⁹ (IsdH-NEAT2, IsdH-NEAT3 は直接 IsdE へヘムを受け渡すことが可能かもしれないとされている³⁵)。Figure 1.10 に輸送モデルを示す。

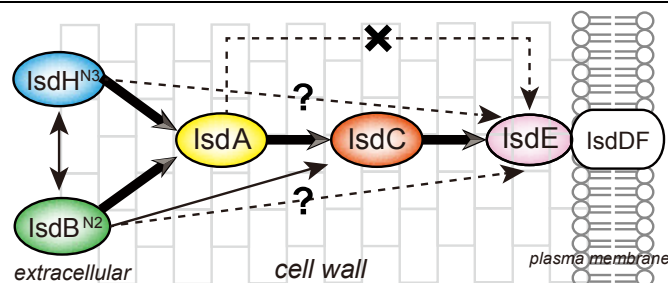


Figure 1.10 Isd system 内でのヘム輸送モデル。蛋白質間相互作用を介したヘム輸送が行われる可能性の高いものを矢印で示す。太い矢印は特に重要度の高い輸送経路を示す。細い矢印は *in vitro* での輸送は可能だが実際の黄色ブドウ球菌内で生じるかは不明である。IsdA から IsdE への直接のヘム輸送は *in vitro* であっても発生しない。IsdH-NEAT3, IsdB-NEAT2 から IsdE へ直接輸送されるかどうかについては意見が分かれている。

2012 年、東京大学医科学研究所（現：工学系研究科バイオエンジニアリング専攻）の津本浩平 教授と安部良太らによって IsdA から IsdE へ輸送が生じない理由が解明された⁵⁰。IsdC はその他の Isd-NEAT ドメインと異なり、特徴的な長い $\beta 7$ - $\beta 8$ ループが存在する。この長いループが存在することで IsdC は IsdE に蛋白質間相互作用することが可能となり、ヘムを直接 IsdE の結合ポケットに送り込むことが可能ではないかと示唆されている。その証拠として、ほぼ同じ蛋白質立体構造骨格を持つ IsdA の $\beta 7$ - $\beta 8$ ループ部分を IsdC の配列に入れ替えた IsdA の変異体は IsdE にヘムを効率的に輸送することが可能となった⁵⁰。これにより、IsdA と同様の短い $\beta 7$ - $\beta 8$ ループを持つ IsdH-NEAT3 と IsdB-NEAT2 も効率的な輸送は不可能であると考えられる。

現在細胞壁上で未解明のままとなっているヘム輸送機構は NEAT ドメイン—NEAT ドメインの蛋白質相互作用の部分だけとなっている。提案されている輸送機構の中で有力なものは、NEAT ドメイン同士が「握手」するような形で交差しながら複合体を形成する“handclasp”モデルである^{51,52} (Figure 1.11)。このモデルを支持する先行研究として、非常に弱い蛋白質間の相互作用を NMR によって検出したものが存在する⁵²。この論文では弱い複合体を形成する上でいくつかの重要な残基を特定できたものの、帰属が困難であった部分も多く、複合体構造を解明するにはまだ多くの不明な領域が残されている。

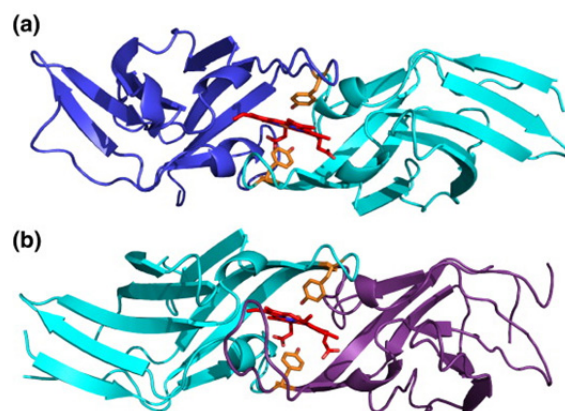


Figure 1.11 提唱されている Isd-NEAT ドメイン間のヘム輸送機構：handclasp モデル⁵¹。(a) IsdB-NEAT2 (暗青) - IsdA-NEAT (水色) 間のモデル。配位するチロシンとヘムはそれぞれオレンジ色と赤色で示している。(b) IsdA-NEAT (水色) と IsdC-NEAT (紫色) のモデル

1.2 研究目的

本研究の目的は大きく分けて以下の2つである。1つは Isd-NEAT ドメイン間(IsdH-NEAT3, IsdA-NEAT, IsdC-NEAT および IsdB-NEAT2) における構造類似性とヘム輸送の一方向性を解明すること、もう 1 つはヘム輸送中間体構造に関する知見を得ることである。これらの問題は黄色ブドウ球菌に限らず同様のヘム輸送機構を持つグラム陽性菌にも存在するものであるため、病原性微生物のヘム獲得機構について一般的な法則を見つけ出すことができれば、この機構を狙った生育阻害剤・ワクチンの開発に有益な知見が得られることが予想される。

1.3 研究手法

本研究は近年急速に発展しつつある *in silico* の計算機科学と、精製した蛋白質を用いた *in vitro* の実験科学を組み合わせることで進めてきた。計算機の性能向上は蛋白質のような巨大分子の時間変化をナノ秒 (10^{-9} 秒) からマイクロ秒 (10^{-6} 秒) スケールまで見積もることを可能にしている。また量子化学計算や分子動力学の理論の発展により精度および計算速度の向上は日進月歩であり、実験データとの連携をとる上での信頼性もそれに応じて増してきている。実験科学においては、熱力学を基盤とした蛋白質ーリガンド間相互作用を解析しまた、ヘム以外の非鉄金属ポルフィリンを利用して親和性の金属依存性を考察した。特に等温滴定型熱量測定 (ITC) による結合定数の算出精度はとて高く、今回のような類似した蛋白質、リガンド間の結合定数の比較を行う上では非常に有用なものである。理論的な側面からは、まずそれぞれの蛋白質およびヘムについて 300 K、1 気圧の条件下で 200 ナノ秒の MD シミュレーションを行なった。これらのトラジェクトリに基づいて、リガンド (ヘム) 結合に伴うエンタルピー変化と自由エネルギー変化を見積もることのできる MM-PB/SA 法を用いて、NEAT ドメインそれぞれについて各アミノ酸の親和性への寄与を計算

した。この結果親和性への寄与が大きいと推定された残基について、*in vitro* で変異体解析を行い、その影響を検証した。また、MD シミュレーションを用いて 2 種類の Isd-NEAT ドメインのドッキングを行ない、RMSD 値に基づいてその複合体構造の妥当性を評価した。

1.4 論文の構成

第 2 章から第 5 章までは計算機実験の理論的背景および実験手法について述べる。第 6 章で分子動力学法 (MD シミュレーション) と MM-PB/SA 法に基づいて、類似する構造を持つ NEAT ドメイン内で親和性の差を生み出す残基を特定し、さらに実験による検証によって判明した金属ポルフィリンとの結合様式について述べる。第 7 章では MD シミュレーションによる 2 種類の NEAT ドメインのドッキング構造を推定し、さらに量子化学計算による構造の最適化も用いてドメイン間のヘム輸送複合体構造の詳細に迫った。第 8 章では Isd-NEAT ドメインと IsdE の配位形式の違いに着目し、その性質を利用した輸送阻害剤の可能性について述べる。最後に第 9 章で本研究を総括する。

1.5 特色と独創的な点、学術的な貢献

筆者は現 東京大学大学院工学系研究科バイオエンジニアリング専攻 (※同研究科化学生命工学専攻および同大学医科学研究所 兼任) の津本浩平 教授の指導の下、学部の卒業研究と修士課程においてこの Isd-NEAT ドメインについて実験科学の見地から研究を行ってきた。博士課程では清水謙多郎 教授と寺田透 特任准教授の下での計算科学の研究から予測された知見を元に、津本教授の下で実験による検証を行い続けた。こうした実験と計算の知見の融合を一人で行い、Isd-NEAT ドメインと金属ポルフィリンの結合を一原子レベルで解明した。研究対象である Isd system については実験的な *in vitro* 手法やノックアウト株、アミノ酸の点変異株を用いた臨床的な *in vivo* 手法の研究は行われているが⁵³、計算によるアプローチとそれに基づいた生育阻害剤を探索する研究はこれまでになく、本研究が初の報告となる (第 8 章)。また、NEAT ドメイン間の輸送複合体の構造推定は 2011 年の NMR を用いた試みでは結局詳細を解明できないままであった⁵²。第 7 章にてこれに代わる有力な複合体構造を提案し、エネルギー的に構造の安定性を議論した。これまでの現象論的な考察に代わる本研究の定量的・化学的な考察は Isd system および類似のヘム取り込み機構を持つ病原菌をターゲットとした創薬に大きな知見を与えることが期待される。

第2章 分子動力学法

2.1 分子動力学シミュレーションの原理

分子が形態を変化させるとき、その分子の構造や動きには何らかの変化が生じている。その分子 1 つ 1 つの変化を追跡可能にするのが分子シミュレーションである。分子シミュレーションは計算機を利用した、分子系の運動状態に関する数値実験のことである。

分子シミュレーションには様々な方法があり、原子レベルで運動方程式を解く力学的手法や、統計力学を利用した統計的手法により、分子系の運動を解析するものなどがある。

分子力学 (Molecular Mechanics; MM) 法は力学的な手法で、分子系を構成する N 個の原子群に働くポテンシャルエネルギー関数によって分子の立体配座の安定性や配座間のエネルギー差を計算するものである。ここでポテンシャルエネルギー関数は① 分子内の結合の伸縮エネルギー、② 結合角の変角エネルギー、③ ねじれ角のねじれエネルギー、④ 非結合相互作用エネルギーという 4 つのエネルギー成分の和で構成されている。この分子力学法は 7.2 ONIOM 法においても用いられる。

このポテンシャルエネルギー関数を作る曲面上の一番低いところがその分子系の安定構造に相当するため、ポテンシャルエネルギーの最低値を求めることによってその分子の最安定な構造を算出することができる。これによって複雑な分子凝集系であっても同様に、どんな未知の構造や状態が存在可能なかを調べる事が可能になる。

このときに用いる 4 つのエネルギー成分を評価する関数を、その関数を規定するパラメータと合わせて分子力場 (Molecular Force Field) と呼ぶ。分子力場は適用対象によって異なり、用途に応じた経験的パラメータとして定義されている。

分子動力学 (Molecular Dynamics; MD) 法は運動方程式を基礎としている点が MM と異なる。物質系を構成する原子や分子の 1 つ 1 つに対する運動方程式を数値的に解き、位置や速度の時間変化やエネルギーなどの変化を追跡する。特に時間変化や非定常状態を知りたいときには、分子動力学法を用いる必要がある。本研究においては蛋白質の構造変化を観察するのでこれを用いる。

2.2 分子動力学法と運動方程式

N 個の粒子から構成される、互いに力を及ぼしながら運動している物質系の運動方程式は、

$$m_i \frac{d^2 \mathbf{r}_i(t)}{dt^2} = \mathbf{F}_i(t) \quad (i = 1, 2, \dots, N) \quad (2.1)$$

と表せる。ここで、 $\mathbf{r}_i(= (x_i, y_i, z_i))$ と m_i はそれぞれ粒子 i の位置ベクトルおよび質量で、 $\mathbf{F}_i(t)$ は粒子 i が他の粒子から受ける力である。式 (2.1) を時間について積分すれば、任意の時刻での各粒子の速度や位置を予測することが出来る。 $\mathbf{F}_i(t)$ が \mathbf{r}_i の複雑な関数の場合は解析解を求めることは困難なので、分子動力学法では数値解法を用いる。

位置 $\mathbf{r}_i(t)$ を時刻 t の近傍でテイラー展開すると、

$$\mathbf{r}_i(t + \Delta t) = \mathbf{r}_i(t) + \left(\frac{d\mathbf{r}_i(t)}{dt} \right) \Delta t + \frac{1}{2} \left(\frac{d^2\mathbf{r}_i(t)}{dt^2} \right) \Delta t^2 + \dots \quad (2.2)$$

式(2.2)で Δt^3 以降を無視して、速度 $\frac{d\mathbf{r}_i(t)}{dt}$ を $\mathbf{v}_i(t)$ と表し、式(2.1)から $\frac{d^2\mathbf{r}_i(t)}{dt^2} = \mathbf{F}_i(t)$ として代入すると、

$$\mathbf{r}_i(t + \Delta t) = \mathbf{r}_i(t) + \mathbf{v}_i(t) \Delta t + \frac{\mathbf{F}_i(t)}{2m} \Delta t^2 \quad (2.3)$$

となる。ここで時間刻み Δt は、物質系の持つ最も速い運動の時間周期よりも十分に短くとる必要がある。

また式(2.3)の力 $\mathbf{F}_i(t)$ は

$$\mathbf{F}_i = -\nabla V(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2, \dots, \mathbf{r}_N) = -\left(\frac{\partial V}{\partial x_i}, \frac{\partial V}{\partial y_i}, \frac{\partial V}{\partial z_i} \right) = (F_x, F_y, F_z) \quad (2.4)$$

により計算できる。ここで $V(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2, \dots, \mathbf{r}_N)$ はポテンシャルエネルギーを表す。

2.3 初期条件と計算条件の設定

運動方程式は数学的には時間に関する2階微分方程式である。そのための初期条件として時刻 $t = 0$ における位置 $\mathbf{r}_i(0)$ と速度 $\mathbf{v}_i(0)$ を与える必要がある。蛋白質の場合は初期位置の情報をProtein Data Bankの供給する結晶構造などから取得することが多い。初期速度 $\mathbf{v}_i(0)$ を与えるには温度 T と運動エネルギーの関係式

$$\frac{3}{2} N k_B T = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^N m_i |\mathbf{v}_i(0)|^2 \quad (2.5)$$

を利用し、設定したい温度 T でのマクスウェル分布

$$f(\mathbf{v}_1, \mathbf{v}_2, \dots, \mathbf{v}_N) = \prod_{i=1}^N \left(\frac{m_i}{2\pi k_B T} \right)^{\frac{3}{2}} \cdot \exp \left(-\frac{m_i \mathbf{v}_i^2}{2k_B T} \right) \quad (2.6)$$

に従うように乱数を使って各粒子に速度を割り振る。この時、物質系の全運動量が0、すなわち

$$\sum_{i=1}^N m_i \mathbf{v}_i = 0 \quad (2.7)$$

となるように選ぶと、物質系全体の並進運動をのぞいた、物質系そのものの性質をうまく表すことができる。

実際の実験系から得られる物理量は、シミュレーションの時間に比べるととても長い時間から得られる値である。例えばこのような物理量の1つを A で表すと、 A は $A(\mathbf{r}_1(t), \mathbf{r}_2(t), \dots, \mathbf{r}_N(t), \mathbf{v}_1(t), \mathbf{v}_2(t), \dots, \mathbf{v}_N(t))$ のように、全構成粒子の位置と速度の関数(力学量)となっている。実際の観測値あるいは測定値は、位置と速度を通して間接的に時間に依存する力学量 $A(t)$ を、ミクロには十分長い時間について時間平均した値

$$\langle A \rangle = \frac{1}{t_2 - t_1} \int_{t_1}^{t_2} A(t) dt \quad (2.8)$$

に対応する。すなわち分子動力学法においては十分大きな M に対する各ステップの値の単純平均より求められる。

$$\langle A \rangle = \frac{1}{M} \sum_{n=1}^M A(t_{n-1}) = \frac{1}{M} \sum_{n=1}^M A(t_0 + (n-1)\Delta t) \quad (2.9)$$

ここで、 M は全サンプル数、 t_0 はサンプリングの開始時刻である。

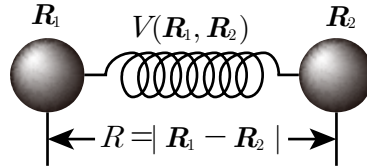
ただし、はじめに式(2.5)～(2.7)を通して準備した初期配置と初期速度は、通常、ある特殊な熱力学的状態に対応している。そのため、熱平衡状態の観測値を分子動力学計算から求めたいときは対象とする物質系が熱平衡状態になっていることを確認してから値を見積もる必要がある。

2.4 分子力場

分子は原子がバネでつながったモデルで説明されるが、分子力場 (Molecular Force Field) とはこの“バネ”に相当すると考える。原子やバネの種類に応じて、あらかじめ実験結果などから決められたポテンシャルエネルギーの関数 $V(\mathbf{R}^N)$ を用いて、位置 \mathbf{R}_i に存在する i 番目の原子に働く力 \mathbf{F}_i を

$$\mathbf{F}_i(\mathbf{R}^N) = -\frac{\partial V(\mathbf{R}^N)}{\partial \mathbf{R}_i} \quad (2.10)$$

として求める。この $V(\mathbf{R}^N)$ が分子力場である。



ここで \mathbf{R}^N は N 個の原子群の位置座標 $(\mathbf{R}_1, \mathbf{R}_2, \dots, \mathbf{R}_N)$ をまとめて表している。しかし、本来分子シミュレーションの対象となる分子中の電子は量子力学的に取り扱われるべきであって、より厳密に言えば力 \mathbf{F}_i は

$$\mathbf{F}_i(\mathbf{R}^N) = -\frac{\partial E_n V(\mathbf{R}^N)}{\partial \mathbf{R}_i} = -\frac{\partial \left(\int \psi_n^*(\mathbf{r}^M) H^{\text{elec}}(\mathbf{r}^M; \mathbf{R}^N) \psi_n(\mathbf{r}^M) d\mathbf{r}^M \right)}{\partial \mathbf{R}_i} \quad (2.11)$$

で与えられる。 \mathbf{r}^M は M 個の電子群の位置座標をまとめたものである。ここで E_n は、電子ハミルトニアン H^{elec} に対するシュレディンガー (Schrödinger) 方程式

$$H^{\text{elec}} \psi_n = E_n \psi_n \quad (2.12)$$

のエネルギー固有値を表し、 ψ_n は電子固有関数を表す。ここで n は、式(2.12)で許される離散的エネルギー固有値に対応する電子状態を区別するための自然数を表す。 E_1 が電子基底状態、 $E_n (\geq E_{n-1})$ ($n \geq 2$) は電子励起状態を表す。ただし、通常の熱反応などでは熱エ

エネルギーが $\Delta E = E_2 - E_1$ よりも小さいため、電子基底状態を扱えば十分である。このとき $V(\mathbf{R}^N) = E_1(\mathbf{R}^N)$ に対応する。

原子 i にかかる力 $\mathbf{F}_i(\mathbf{R}^N)$ は、まともに式(2.11)を解かずに、単に $V(\mathbf{R}^N)$ を原子座標で微分すれば求めることができる。全原子座標 \mathbf{R}^N の関数として表された分子力場 $V(\mathbf{R}^N)$ が手に入ると、シュレディンガー方程式を解く手間が省けることになる。

2.4.1 分子内力場と分子間力場

分子集合系に対する分子力場は、分子内力場 (Intramolecular Force Field) V^{intra} と分子間力場 (Intermolecular Force Field) V^{inter} との和

$$V = V^{\text{intra}} + V^{\text{inter}} = \sum_{I=1} V_I^{\text{intra}}(\mathbf{R}_I^N) + \sum_I \sum_{J < I} V_{IJ}^{\text{inter}}(\mathbf{R}_I^N, \mathbf{R}_J^N) \quad (2.13)$$

と表現できる。ここで V^{intra} は化学結合でつながった個々の分子内の力場を表し、 V^{inter} は化学結合していない分子間の力場 (分子間相互作用に相当する) を表す。また、 \mathbf{R}_I^N は I 番目の分子の分子内の原子位置を表すための位置変数 (分子内変数) をまとめて表す。簡単のため、同種分子からなる分子集合系を考え、 I と J はこの分子集合系に含まれている分子の総数だけ値が変化するとする。

MM 法では球と棒 (Ball and Stick) 分子モデルを念頭に考える。つまり、ある 1 つの分子に対して原子核を球で、化学結合を棒で表して、分子内変数として i) 結合長 R 、ii) 結合角 θ 、iii) ねじれ角 ϕ 、iv) 面外角 χ を採用する。

このとき分子集合系の中の分子群の分子内力場 $V_I^{\text{intra}}(\mathbf{R}_I^N)$ の全体は、

$$\begin{aligned} V^{\text{intra}} &= \sum_{I=1} V_I^{\text{intra}}(\mathbf{R}_I^N) \\ &= \sum_{I=1} \left(\sum_{\text{bonds}} V_I^R(R_I) + \sum_{\text{angles}} V_I^\theta(\theta_I) + \sum_{\text{dihedrals}} V_I^\phi(\phi_I) + \sum_{\text{out-of-planes}} V_I^\chi(\chi_I) \right. \\ &\quad + \sum_{\text{bonds angles}} V_I^{R\theta}(R_I, \theta_I) + \sum_{\text{bonds dihedrals}} V_I^{R\phi}(R_I, \phi_I) \\ &\quad \left. + \sum_{\text{bonds out-of-planes}} V_I^{R\chi}(R_I, \chi_I) + \sum_{\text{bonds dihedrals out-of-planes}} \sum_{\text{out-of-planes}} V_I^{\theta\phi\chi}(\theta_I, R_I, \chi_I) \right) \end{aligned} \quad (2.14)$$

と表すことができる。式(2.14)の中の bonds, angles, dihedrals, out-of-planes はそれぞれ分子 I 内に存在しているすべての化学結合長、結合角、ねじれ角、面外角について和をとることを簡略的に示している。

分子間力場 $V_{IJ}^{\text{inter}}(\mathbf{R}_I^N, \mathbf{R}_J^N)$ を表すための分子間変数としては、i) 原子核間距離と、ii) 点電荷間距離を用いる。通常

$$V^{\text{inter}} = \sum_{I=1} \sum_{J < I} V_{IJ}^{\text{inter}}(\mathbf{R}_I^N, \mathbf{R}_J^N) = \sum_{I=1} \sum_{J < I} \left(\sum_{i \in I} \sum_{j \in J} V_{ij}^{\text{vdw}}(R_{ij}) + \sum_{i \in I} \sum_{j \in J} V_{ij}^{\text{est}}(R_{ij}) \right) \quad (2.15)$$

と表せる。最右辺の大きなカッコ内の第 1 項は、 I 番目と J 番目の分子間のファンデルワールス相互作用 (分散力などによる引力相互作用と近距離での電子間反発力による斥力相

相互作用)を表し、第2項は静電相互作用を表す。

多くの場合、力の作用点は原子核位置にとるが、有効点電荷位置については分子全体の極性を考慮して、原子核とは別の位置に仮定される場合がある。例えば水分子について剛体モデルを仮定した TIP4P 分子力場が知られているが、これは $\angle\text{HOH}$ の二等分線上に負電荷が配置されている。一方、正電荷は水素原子上の位置に配置されていて、水分子全体では中性となっている。

2.4.2 AMBER 力場

AMBER シリーズは、生体分子のシミュレーションを念頭に置いて開発されてきた分子シミュレーションパッケージである⁵⁴。このため、AMBER に含まれているモジュール中の力場、特に SANDER モジュールが直接提供している力場は、生化学分野に特化したものである。これは次のような比較的簡単な関数系を仮定した上で、高分子の配向や非結合エネルギーの精度を高めたパラメータ設定になっている。

$$V = \sum_{\text{bonds}} K_{ij}^R (R_{ij} - R_{ij}^{\text{eq}})^2 + \sum_{\text{angles}} K_{ijk}^{\theta} (\theta_{ijk} - \theta_{ijk}^{\text{eq}})^2 + \sum_{\text{dihedrals}} \frac{V_{ijkl}^n}{2} [1 + \cos(n\phi_{ijkl} - \gamma_{ijkl})] + \sum_{j=1}^{\text{atoms}} \sum_{i>j}^{\text{atoms}} \left[\frac{A_{ij}}{R_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{R_{ij}^6} + \frac{q_i q_j}{\epsilon R_{ij}} \right] \quad (2.16)$$

式(2.16)で R_{ij} は原子 i と j の間の原子間距離、 K_{ij}^R は伸縮振動のバネ定数、 R_{ij}^{eq} は平衡距離、 θ_{ijk} は2つの化学結合で繋がった3つの原子 ijk の間の角度、 K_{ijk}^{θ} は変角振動のバネ定数、 θ_{ijk}^{eq} は平衡結合角を表す。また ϕ_{ijkl} は4つの原子 $ijkl$ が結合している時に3原子 ijk が作る面と別の3原子 jkl が作る面がなす二面角(ねじれ角)、 V_{ijkl}^n は二面角振動のバネ定数、 γ_{ijkl} は平衡二面角を表す。 A_{ij} と B_{ij} はファンデルワールス相互作用を表すパラメータ、 q_i は原子 i の有効点電荷、 ϵ は比誘電率を表す。

MM2/MM3 などの複雑なポテンシャルエネルギー関数は AMBER 力場には採用されていないため、電子状態の変化、例えば励起状態、結合の開裂や生成などはそのままでは表せない。

AMBER の力場は常に改良が続けられており、最近の AMBER 12 + AmberTools 13 パッケージでは ff12SB や ff10, ff99SB force field などが利用可能である。これらは主に蛋白質に用いられる20種類のアミノ酸の力場だけでなく、RNA や DNA のパラメータも含んでいる。

2.5 運動方程式の解法

分子動力学計算では運動方程式を差分近似して解くが、式(2.3)では、式(2.2)の Δt^3 以降を無視したことによる打ち切り誤差が含まれ、 Δt の値が大きすぎると誤差が大きくなる。しかし Δt が小さすぎても新たな誤差が生まれる。 Δt を小さくすると、必要な演算回数が増えるため、計算機が計算する際の端数の丸め誤差の影響が大きくなるためである。したがって、 Δt は計算対象とする系に合わせて適切な値を設定する必要がある。

Leap-frog 法（蛙跳び法）では、時間刻みの間の平均加速度を、その時間刻みの中点の時刻における値に等しくおく方法である。この手法では時刻 $t + \Delta t / 2$ での速度は

$$\mathbf{V}_i\left(t + \frac{\Delta t}{2}\right) = \mathbf{V}_i\left(t - \frac{\Delta t}{2}\right) + \Delta t \frac{\mathbf{F}_i(t)}{m_i} \quad (2.17)$$

となる。同様に、 Δt の間の平均速度がその中点の時刻での速度に等しいとすると、時刻 $t + \Delta t$ での位置は $\mathbf{V}_i(t + \Delta t / 2)$ を用いて、

$$\mathbf{R}_i(t + \Delta t) = \mathbf{R}_i(t) + \mathbf{V}_i\left(t + \frac{\Delta t}{2}\right) \Delta t \quad (2.18)$$

となる。分子動力学ソフトウェア GROMACS ではこちらの Integrator が推奨されている。

2.6 分子動力学法における温度と圧力

分子動力学計算では運動方程式に基づいているので、基本的に系の全エネルギーは保存される。今、体積 V の容器に、 N 個の単原子分子が入っている系を考える。運動方程式を解くために初期条件（位置 $\mathbf{r}_i(0)$ と運動量 $\mathbf{p}_i(0)$ ($i = 1 \sim N$)）を設定する。このとき時刻 0 における系の全エネルギーは

$$E = \sum_{i=1}^N \frac{\mathbf{p}_i(0)^2}{2m_i} + V(\mathbf{r}_1(0), \mathbf{r}_2(0), \dots, \mathbf{r}_N(0)) \quad (2.19)$$

と表されるが、この値 E がシミュレーション実行中、数値計算精度の範囲で一定値をとるわけである。ただし、 E が保存しない分子シミュレーションも存在する。

さらに十分長い時間をかけて計算すれば、対象系は熱平衡状態に到達するので、熱力学変数である温度 T 、圧力 P 、体積 V 、粒子数 N などで指定できる、ある熱力学的状態に落ち着く。粒子数 N と体積 V を最初から指定している今の場合、温度 T と圧力 P はそれぞれ

$$T = \langle T(t) \rangle_t = \frac{2}{3Nk_B} \left\langle \sum_{i=1}^N \frac{\mathbf{p}_i(t)^2}{2m_i} \right\rangle_t \quad (2.20)$$

$$\begin{aligned} P &= \langle P(t) \rangle_t = \frac{2}{3V} \left\langle \sum_{i=1}^N \frac{\mathbf{p}_i(t)^2}{2m_i} \right\rangle_t - \frac{1}{3V} \left\langle \sum_{i=1}^N \mathbf{r}_i \cdot \nabla_i V(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2, \dots, \mathbf{r}_N) \right\rangle_t \\ &= \frac{Nk_B \langle T \rangle_t}{3V} + \frac{1}{3V} \left\langle \sum_{j \neq i} \sum_{i=1}^N \mathbf{r}_{ij} \cdot \mathbf{F}_{ij} \right\rangle_t \end{aligned} \quad (2.21)$$

と表現できる。（ここで $\langle \dots \rangle_t$ は時間平均）。ここで $T(t)$ と $P(t)$ はそれぞれ瞬間温度と瞬間圧力と呼ばれ、シミュレーション実行中の各時刻で計算できる力学量である。式(2.20)と式(2.21)の T と P をそれぞれ運動学的温度、運動学的圧力と呼ぶ。

ここで考えた対象系全体の力学的エネルギー E の時間平均は、熱力学的には内部エネルギー U に相当し、熱平衡状態では

$$U = \langle E \rangle_t = \langle K \rangle_t + \langle V \rangle_t \quad (2.22)$$

$$= \left\langle \sum_{i=1}^N \frac{\mathbf{p}_i(t)^2}{2m_i} \right\rangle_t + \left\langle V(\mathbf{r}_1(t), \mathbf{r}_2(t), \dots, \mathbf{r}_N(t)) \right\rangle_t \quad (2.23)$$

$$= \frac{3}{2} N k_B \langle T(t) \rangle_t + \langle V(\mathbf{r}_1(t), \mathbf{r}_2(t), \dots, \mathbf{r}_N(t)) \rangle_t \quad (2.24)$$

と表される。式の右辺第 1 項は理想気体の内部エネルギーに対応し、右辺第 2 項は実在気体に存在する分子間相互作用エネルギーからの寄与に対応する。このように分子動力学計算を実行すると、温度や圧力に限らず、内部エネルギーなどの熱力学量なども、個々の原子に関わる位置 \mathbf{r}_i と運動量 \mathbf{p}_i で表現されるミクロな力学量の統計的平均値として求めることができる。

理想気体の場合、全運動エネルギーが全エネルギー E そのものなので分子動力学計算をするまでもなく運動学的温度を望みの値 T に設定することが可能である。マクスウェル速度分布(式(2.6))を仮定して、全(運動)エネルギー E かつ全運動量 0 の下で、初期速度をランダムに決めれば、十分長い時間が経過したあとに熱平衡状態を実現できる。このとき、 $\langle T(t) \rangle_t = T$ かつ $\langle P(t) \rangle_t = P$ となる。

しかし実在系の場合にははじめに設定した全エネルギー E が運動エネルギー K だけではなくポテンシャルエネルギー V へもまた振り分けられるため、前もって運動学的温度や運動学的圧力を指定することができない。 $\langle T(t) \rangle_t = T$ や $\langle P(t) \rangle_t = P$ が常に成り立つわけではない。これに対処する方法として後述の熱浴制御の方法が用いられる。これは「温度や圧力などのマクロな熱力学状態を指定した上で、ミクロな原子レベルの運動にある制限を加える事で実在系を扱えるようにする方法」である。

2.7 ブラウン運動と Langevin dynamics

アインシュタインらによって 1905 年に理論的に提唱されたブラウン運動によると、熱運動する溶媒(水など)中に存在する微粒子は溶媒との衝突を繰り返すことにより不規則な動きをされると言われている。質量 m のブラウン運動をする粒子にかかる力が外力 $\mathbf{F}(t)$ と摩擦力 $-\zeta \mathbf{v}(t)$ だけだとすると、

$$m \frac{d^2 \mathbf{r}(t)}{dt^2} = \mathbf{F}(t) - \zeta \frac{d\mathbf{r}(t)}{dt} (= \mathbf{F}(t) - \zeta \mathbf{v}(t)) \quad (2.25)$$

と書ける。ここに統計力学の考えを持ち込むと、温度 T での熱平衡状態にある理想気体においてある速度 \mathbf{v} を持った粒子はその \mathbf{v} が従う統計平均において

$$\frac{1}{2} m \langle \mathbf{v}^2 \rangle = \frac{1}{2} k_B T \quad (2.26)$$

というエネルギー等分配則を持つ。統計力学には十分時間がたった系は熱平衡状態になるという仮定があるので、このエネルギー等分配則式を式(2.25)は t が十分大きくなったときに再現するはずである。しかし、外力が 0 であっても実際の粒子の速度 \mathbf{v} は 0 にならないのに対し、式(2.25)は $\mathbf{v}(t \rightarrow \infty) = 0$ なので、摩擦力だけでは再現できていない。そこで、溶媒分子(水)からランダムな力を受けていると考え、その力を $\mathbf{R}(t)$ とすると

$$m \frac{d\mathbf{v}(t)}{dt} = \mathbf{F}(t) - \zeta \mathbf{v}(t) + \mathbf{R}(t) \quad (2.27)$$

と書ける。この型の方程式を Langevin 方程式と呼ぶ。

粒子 i についての Langevin 方程式は式(2.27)をさらに変形して

$$m_i \frac{d\mathbf{v}_i(t)}{dt} = \mathbf{F}_i(t) - m_i \gamma_i \mathbf{v}_i(t) + \mathbf{R}_i(t) \quad (2.28)$$

とする。ここで、 γ_i は friction constant [ps^{-1}]であり、 $\gamma_i = \zeta_i / m_i$ である。

ランダムな力 $\mathbf{R}(t)$ は、揺動散逸定理 (Fluctuation-dissipation theorem) から以下の2つを満たさなければならない。

$$\langle \mathbf{R}_i(t) \rangle = 0 \quad (2.29)$$

$$\langle \mathbf{R}_i(t) \mathbf{R}_j(t + \tau) \rangle = 2m_i \gamma_i T_0 k_B \delta_{ij} \delta(\tau) \quad (2.30)$$

つまり、ランダムな力の時間平均は0であり、異なる時間の力の間に相関はないとする。ここで δ はディラックのデルタ、 T_0 は熱浴の温度である。これによりランダムな力 $\mathbf{R}(t)$ の性質として熱浴の温度 T_0 を導入することができる。

2.8 熱浴制御

in vitro での実験の多くは温度や圧力が一定の条件下で行われるため、MD でもこのような条件を設定したい場合がある。ただし、孤立分子系の運動方程式の解では対象系のエネルギーは保存するが、温度や圧力は一定にならないため、運動方程式に工夫を加える必要がある。それが熱浴制御の方法である。統計力学では、温度をはじめとする熱力学量は統計集団（以後**アンサンブル**と呼ぶ）を通して定義されているので、熱力学的観測量としての温度（マクロな温度）とは、アンサンブル平均 $\langle \dots \rangle$ を通して

$$\frac{N_f}{2} k_B T_0 = \left\langle \sum_{i=1}^N \frac{1}{2} m_i \mathbf{v}_i^2 \right\rangle \quad (2.31)$$

で決まる温度 T_0 であって、

$$\frac{N_f}{2} k_B T(t) = \sum_{i=1}^N \frac{1}{2} m_i \mathbf{v}_i(t)^2 \quad (2.32)$$

で定義される瞬間的な“温度” $T(t)$ とは意味が異なる。ここで N_f は自由度の数を表す。剛体モデルなどの拘束系でなければ $N_f = 3N$ (N は全原子数) となる。AMBER や GROMACS のアウトプットにそれぞれ記録される温度はこの瞬間的な温度である。

対象系のダイナミクスを Langevin 方程式に基づいた Langevin dynamics として捉えると、ランダムな力 $\mathbf{R}_i(t)$ の性質として熱浴の温度 T_0 を導入することができる。このとき対象系と温浴（温度一定の熱浴）との結合は摩擦力 $-m_i \gamma_i \mathbf{v}_i$ として取り込まれている。したがって、ランダム力のない対象系と温浴との結合だけの仮想系において温度を一定に保つためには、

速度を v_i から λv_i へスケーリングすることによって、摩擦力を補正すればよいと考えることができる。Berendsen の weak coupling 法（後述の Berendsen thermostat アルゴリズム）は瞬間温度 $T(t)$ が温浴の温度 T_0 に近づくように

$$\frac{dT}{dt} = \frac{T_0 - T(t)}{\tau} \quad (2.33)$$

と設定する。これは温度の外れを時定数 (time constant) τ を用いて指数関数的に弱めることを意味する。平衡化が目的の場合には $\tau = 0.1$ ps 程度である。

系に出入りする熱の流れは各ステップもしくは各 n_{TC} ステップ数で時間に依存するパラメータ λ を用いて、各粒子の速度はスケーリングの影響を受けることにする ($v \rightarrow \lambda v$)。

$$\lambda = \left[1 + \frac{n_{TC}\Delta t}{\tau_T} \left\{ \frac{T_0}{T(t - \frac{1}{2}\Delta t)} - 1 \right\} \right]^{1/2} \quad (2.34)$$

パラメータ τ_T は時定数 τ に近いものの完全には等しい値には設定しない。

$$\tau = 2C_V\tau_T / N_f k_B \quad (2.35)$$

完全に一致させない理由は、速度 v のスケーリングによって引き起こされる運動エネルギーの変化が部分的に運動エネルギーとポテンシャルエネルギーに再分配され、温度変化がスケーリングのエネルギーより小さくなってしまうためである。

Berendsen thermostat アルゴリズムは運動エネルギーを弱めてしまうため、厳密には適切なカノニカルアンサンブルを得ることができず、サンプリングが不正確になってしまう。ゆらぎに起因する特徴、例えば熱容量 C_V などのパラメータも影響を受ける。しかし 2007 年の改良法によって正しいアンサンブルを得ることが可能になった。上記の Berendsen thermostat に以下の様な確率論的 (stochastic) な項を加え、正しい運動エネルギー分布が得られるようにしたのが V-rescale 法^{55,56,57}である。

$$dK = (K_0 - K) \frac{dt}{\tau_T} + 2\sqrt{\frac{KK_0}{N_f}} \frac{dW}{\sqrt{\tau_T}} \quad (2.36)$$

ここで K は運動エネルギー、 dW は Wiener process である。これにはランダムシード (乱数) のみ与える必要がある。

2.9 圧力制御

圧力の weak coupling 法については現在 Berendsen⁵⁸ の方法の他に、Parrinello–Rahman の方法^{59,60}がある。Berendsen と Parrinello–Rahman 法は温度制御のカップリング法いずれとも併用可能である。

Berendsen の方法では温度制御と同様、座標やシミュレーションボックス（基本セル）の大きさについて、各ステップまたは n_{PC} ステップごとに、行列 μ を用いて設定圧力 P_0 に向かうよう再スケーリングを施す。

$$\frac{d\mathbf{P}}{dt} = \frac{\mathbf{P}_0 - \mathbf{P}}{\tau_p} \quad (2.37)$$

スケーリング行列 $\boldsymbol{\mu}$ は次のように与えられる。

$$\mu_{ij} = \delta_{ij} - \frac{n_{\text{PC}} \Delta t}{3\tau_p} \beta_{ij} \{P_{0ij} - P_{ij}(t)\} \quad (2.38)$$

ここで β は系の等温圧縮率 $\beta_T = -\frac{1}{V} \left(\frac{\partial V(T, p)}{\partial p} \right)_T$ である。1 気圧、300 K の水については

$\beta = 4.6 \times 10^{-10} \text{ Pa}^{-1} = 4.6 \times 10^{-5} \text{ bar}^{-1}$ である。ほとんどの場合においてこれは対角行列

(対角成分以外が 0) であり、対角成分も同じ値を持つ (ただし値は一般には未知である)。

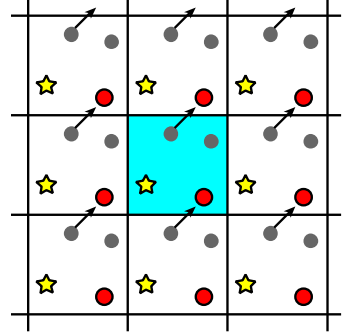
\mathbf{P} は圧力テンソルで

$$\mathbf{P} = \frac{1}{V} \left\{ \sum_i m_i \mathbf{v}_i \mathbf{v}_i^T + \sum_{j < i} \sum_i \mathbf{r}_{ij} \mathbf{F}_{ij}^T \right\} \quad (2.39)$$

で定義され、 \mathbf{P}_0 は $\mathbf{P}_0 = P_0 \mathbf{1}$ で定義される。これらを用いて座標とシミュレーションの大きさは $\mathbf{r}_i \rightarrow \boldsymbol{\mu} \mathbf{r}_i$, $V \rightarrow (\det \boldsymbol{\mu}) V$ のようにスケーリングがなされる。

2.10 クーロン静電相互作用の計算

分子シミュレーションにおいて最も計算時間を要する部分は、クーロン静電相互作用の計算である。水中の蛋白質のような大きな対象系の計算を、周期境界条件下で行う場合、演算量を軽減するために、クーロン相互作用の及ぶ範囲を適当な距離で打ち切るカットオフ法が昔はよく使われていた。しかし、この方法では信頼性の高い結果を得ることができなかったため、現在では Ewald 法がよく用いられている。Particle Mesh Ewald (PME) 法^{61,62}はその高速化版であり、こちらが現在最もよく使われている。



一辺の長さが L_x, L_y, L_z の直方体セルを、周期境界条件の基本セルとして考える。イメージセル内の原子 j の位置 \mathbf{r}_j' は、基本セル中の原子 j の位置 \mathbf{r}_j を用いて、

$$\mathbf{r}_j' = \mathbf{r}_j + \mathbf{L}\mathbf{n}, \quad \mathbf{L} = \begin{pmatrix} L_x & 0 & 0 \\ 0 & L_y & 0 \\ 0 & 0 & L_z \end{pmatrix} \quad (2.40)$$

と表され、基本セルと無限遠まで含めたすべてのイメージセル中の粒子との、クーロン相互作用ポテンシャル $E(\mathbf{r}^N)$ の総和は、式(2.41)で与えられる。ここで、 \mathbf{n} は整数で作られる 3 次元ベクトルで、 $(1,0,2)^t$ や $(-1,2,-3)^t$ などである。

$$E(\mathbf{r}^N) = \frac{1}{2} \sum_{\mathbf{n}} \sum_i q_i \sum_j' \frac{q_j}{4\pi\epsilon_0} \phi(|\mathbf{r}_i - \mathbf{r}_j - \mathbf{L}\mathbf{n}|) \quad (2.41)$$

ここで \sum' は、 $\mathbf{n} = (0,0,0)$ の場合に $i = j$ の項は計算しないことを表す。関数 $\phi(r) = 1/r$ は原子間の距離に反比例する、0 への収束が遅い関数であるので、近距離で計算をうち切ってしまうと正しい結果を与えない。この問題を解決するために、Ewald 法では $\phi(r)$ と同様に、収束の遅い関数（通常、ガウスの誤差関数 $\text{erf}(x) = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_0^x e^{-t^2} dt$ を用いる）を差し引くことによって、実空間で速く収束するようにする（ E_{dir} ）。差し引いた分についても、フーリエ変換によって、逆格子空間における和に置き換えることで収束を速める（ E_{rec} ）。さらに、原子の自己エネルギーに由来する定数項（ E_{self} ）を加える。すなわち、 E_{rec} において、 $\mathbf{n} = (0,0,0)$ 、 $i = j$ の項を除かずに計算しているので、その分を E_{self} として差し引く。

$$E(\mathbf{r}^N) = E_{\text{dir}} + E_{\text{rec}} + E_{\text{self}} \quad (2.42)$$

各項の計算式は以下のようになる。

$$E_{\text{dir}} = \frac{1}{2} \sum_{\mathbf{n}} \sum_i \sum_j \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0} \frac{\text{erfc}(\alpha |\mathbf{r}_i - \mathbf{r}_j - \mathbf{L}\mathbf{n}|)}{|\mathbf{r}_i - \mathbf{r}_j - \mathbf{L}\mathbf{n}|} \quad (2.43)$$

$$E_{\text{rec}} = \frac{2\pi}{L_x L_y L_z} \sum_{\mathbf{G} \neq 0} \frac{\exp(-|\mathbf{G}|^2 / 4\alpha^2)}{|\mathbf{G}|^2} \sum_i \sum_j \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0} \cos\{\mathbf{G} \cdot (\mathbf{r}_i - \mathbf{r}_j)\} \quad (2.44)$$

$$E_{\text{self}} = -\sum_i \frac{q_i^2}{4\pi\epsilon_0} \frac{\alpha}{\sqrt{\pi}} \quad (2.45)$$

ここで $\text{erfc}(x)$ は補誤差関数とよばれ、誤差関数とは次のような関係にある。

$$\text{erfc}(x) = 1 - \text{erf}(x) = 1 - \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_0^x e^{-t^2} dt \quad (2.46)$$

これは0 への収束が速い関数である。式(2.44)の \mathbf{G} は、整数ベクトル $(h_x, h_y, h_z)^t$ を用いた逆格子ベクトルで、次のようになる。

$$\mathbf{G} = 2\pi \begin{pmatrix} h_x / L_x \\ h_y / L_y \\ h_z / L_z \end{pmatrix} \quad (2.47)$$

Ewald 法では、 \mathbf{n} に関する和をどこまでとるかに対応する値として、実空間におけるカットオフ距離 r_{cut} 、 \mathbf{G} に関する和をどこまでとるかに対応する値として、逆空間における整数ベクトルの絶対値の最大値 $|h_{\text{max}}|$ 、誤差関数で表される電荷の広がりを決定する係数 α が、指定すべきパラメータとなる。

Ewald 法は、現実的な計算時間で無限遠までのクーロン相互作用を計算できるが、計算時間は系の粒子数を N とすると、およそ $N^{2/3}$ に比例するので、水中の蛋白質のような大規模な系に対しての適用は、あまり適当ではない。その高速化を目的に、Ewald 法を基本とした様々な改良法が開発されている。特に Particle Mesh Ewald 法は計算の精度と速度において、最も優れた方法の1つである。基本的な計算理念は Ewald 法と同じであり、実空間部分の

和は通常の Ewald 法と同様にカットオフを用いて計算する。一方で、PME 法では電荷分布を B-spline 補間などを用いてグリッド（格子点）に内挿し、それらの畳み込み積分によって逆空間部分の和を評価する。畳み込み積分の計算には、高速フーリエ変換（Fast Fourier Transform, FFT）を用いることで、高速化を実現している。PME 法を用いた場合、計算時間はおよそ $N \log N$ に比例する。PME 法では、Ewald 法における r_{cut} と α に加え、補間式の次数およびグリッドサイズが、指定すべきパラメータとなる。

Ewald 法や PME 法でクーロン相互作用を計算する場合は、系の電荷を中和（つまり全電荷の合計を 0 にする）必要がある。そうでなければ、式(2.44)において $\mathbf{G} = (0,0,0)^T$ の場合にエネルギーが発散してしまうからである。そのため、通常は中和させるためにカウンターイオンを対象系に配置する。

2.11 一般化ボルン(Generalized Born)モデル

多くの分子動力学シミュレーションにおいて、最も重要な量は溶媒中における分子のエネルギーである。そのエネルギーは分子構造の関数であり、その構造に関する勾配は力を決定する。溶媒和分子の全エネルギーは

$$E_{\text{total}} = E_{\text{vac}} + \Delta G_{\text{solv}} \quad (2.48)$$

で表すことができる。ここで E_{vac} は分子の真空中（気相）でのエネルギー、 ΔG_{solv} は分子を真空中から溶媒中に移すのに必要な自由エネルギー（溶媒和自由エネルギー）で、

$$\Delta G_{\text{solv}} = \Delta G_{\text{pol}} + \Delta G_{\text{nonpol}} \quad (2.49)$$

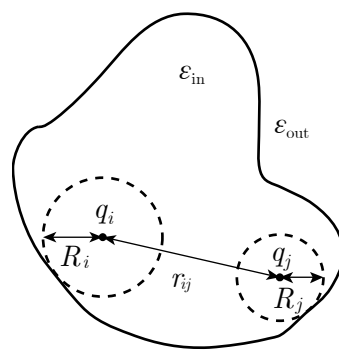
のように、静電項と非静電項に分けられる。さらに非静電項は伝統的に

$$\Delta G_{\text{nonpol}} = \Delta G_{\text{cav}} + \Delta G_{\text{vdw}} \quad (2.50)$$

のように cavity 項（溶媒間） ΔG_{cav} とファンデルワールス相互作用（溶質溶媒間） ΔG_{vdw} との和で与えられる。

一般化ボルン（Generalized Born, GB）モデル⁶³は、式(2.49)の ΔG_{pol} を求めるモデルの 1 つである。分子動力学シミュレーションを用いて静電自由エネルギーを求めるとき、溶質にかぎらず溶媒についてもすべての分子間の長距離静電相互作用を Particle Mesh Ewald 法を用いて取り入れるのが自然である。しかし、生体高分子水溶液の全原子シミュレーションを望みのままに実行するのはかなりの労力を要する。こうした現状の中で、連続溶媒モデルの 1 つである GB モデルは、個々の溶媒分子を陽に取り扱うのが不可能な場合に、より現実的なシミュレーションを実現するのに用いられている。

溶媒和自由エネルギーへの静電的寄与 ΔG_{pol} を、手頃でかつ計算上も有効に見積もることができる方法が解析的 GB 法である。図のようにある分子の各々の原子はその中心に電荷 q_i を持つ半径 R_i の球として表現される。球の内部は誘電率 1 の誘電体で一様に満たされている



るとし、分子全体は誘電率の溶媒（300 K の水の場合 $\varepsilon_w = 78.5$ ）で囲まれているとする。このとき、 ΔG_{pol} は

$$\Delta G_{\text{pol}} \approx \Delta G_{\text{GB}} = -\frac{1}{2} \sum_{ij} \frac{q_i q_j}{f^{\text{GB}}(r_{ij}, R_i, R_j)} \left(1 - \frac{\exp(-\kappa f^{\text{GB}}(r_{ij}, R_i, R_j))}{\varepsilon} \right) \quad (2.51)$$

のように近似される。ここでは原子 i と j との距離、 R_i は原子のいわゆる有効ボルン半径を表す。また κ は Debye-Huckel の遮蔽パラメータである。 f^{GB} は変数 r_{ij}, R_i, R_j に関する滑らかな関数を表し、その関数系としては

$$f^{\text{GB}}(r_{ij}, R_i, R_j) = \sqrt{r_{ij}^2 + R_i R_j \exp(-r_{ij}^2 / 4R_i R_j)} \quad (2.52)$$

がよく用いられる。有効ボルン半径 R_i はその原子 i が分子内でどの程度埋まっているのかを反映する。例えば孤立イオンの場合、 R_i はファンデルワールス半径 ρ_i と等価になるので、式(2.51)は

$$\Delta G_{\text{pol}} \approx -\frac{1}{2} \left(1 - \frac{1}{\varepsilon_w} \right) \frac{q^2}{\rho_i} \quad (2.53)$$

となる。

2.12 原子間距離の拘束：SHAKE アルゴリズム・LINCS アルゴリズム

結合伸縮のタイムスパンは水素原子が関連している場合に短くなる。この場合、正確に運動方程式を解くためにはタイムステップ dt を小さくする必要がある。しかし、このような結合伸縮は全体の運動から見た場合にはさほど重要とはならない。そこで、共有結合の長さを固定するためのアルゴリズムを導入することで dt をより長くすることが可能となり、CPU 時間を節約することができる。実際のシミュレーションではすべてのタイプの共有結合に対して拘束をかけることや、水素原子を含む結合だけを理想的な長さに拘束するという使い分けが可能である。

SHAKE アルゴリズム⁶⁴は Lagrange の未定乗数法がこの手法の基礎となっており、蛋白質のような原子数の大きな対象系でも、計算時間がそれほどかからないように工夫されている。2 点間 i, j の結合距離を拘束するための拘束力は

$$f_{\text{const}} = \frac{\mu_{ij}}{2\Delta t^2} \frac{(d^2 - d'^2)}{d' - d} d \quad (2.54)$$

となっている。ここで d は最初のステップでの拘束された結合ベクトル、 d' は拘束されていない積算ステップでの結合ベクトル、 μ_{ij} は 2 点の換算質量 ($\mu_{ij} = \frac{m_i m_j}{m_i + m_j}$) である。

SHAKE アルゴリズムにおける拘束力の計算手順は

① 系の中のすべての原子について、固い結合（拘束力）がないものとして Verlet アルゴリズムを使用して運動させる。

② それぞれの結合距離における偏差を使用して、結合距離を「回顧的に修正する」拘束力を式(2.54)によって計算する。

③ 式(2.54)による修正がすべての結合に適用されたあと、すべての結合距離をチェックする。この中で最も大きい偏差が必要な許容値を超えるのであれば、修正計算を繰り返す。

④ すべての結合が集合評価基準を満たすまで、②と③を繰り返す。

LINCS アルゴリズム⁶⁵は拘束をかけない更新後に結合をそれらの正しい長さにリセットするアルゴリズムである。この計算法は繰り返しではなく、常に 2 ステップのみで行われる。LINCS は行列を用いているが、行列同士の掛け算は含まれていない。そのため SHAKE と比較すると安定で 3~4 倍ほど速い演算を行えるが、距離のみの拘束であり、角度の拘束には使えない点に留意すべきである。処理を並列化した P-LINCS アルゴリズム⁶⁶も同様である。

LINCS の処理の中では、ヤコビ行列 A_n の逆数に近似する以下の様な展開を行っている。

$$(I - A_n)^{-1} = I + A_n + A_n^2 + A_n^3 + \dots \quad (2.55)$$

この近似は A_n の固有値が 1 より小さいものの行列に対してのみ行われる。このため LINCS は結合の数が少ない分子に対して適切に働く。大抵の場合において、分子が環構造を持っていても問題が発生しないが、角度の拘束を導入すると結合の数は大きくなるため、LINCS が使用不能になる。このアルゴリズムを使用する場合、式(2.55)で展開する次数が精度に関わってくる。通常のシミュレーションの場合、4 次の展開で十分な精度が得られるが、大きなタイムステップでブラウン運動シミュレーションをする系の場合には、8 次の展開が必要となる場合がある。

2.13 自由エネルギーの計算

熱力学的状態の熱力学的安定性は自由エネルギーを用いて議論される。特に独立変数として温度 T と体積 V をとると、ヘルムホルツ自由エネルギー A

$$A = U - TS \quad (2.56)$$

が便利である。一方、温度 T と圧力 P をとると、ギブズ自由エネルギー G

$$G = H - TS \quad (2.57)$$

が便利である。ここで S はエントロピー、 U と H はそれぞれ系の内部エネルギーとエンタルピーであり、 $H = U + PV$ である。ふつうこれらはその熱力学的対象の熱力学的状態を指定する巨視的な変数、すなわち状態変数（温度や圧力など）の関数と考える。事実、相転移や溶媒和などにおける状態変化の自由エネルギー変化は分子シミュレーションによってよく見積もられる計算量である。

対象系の平衡状態を考える時、エネルギーが一定に保たれている孤立系ではエントロピーが最大の状態が平衡状態になるが、例えば多数の分子群が関係する凝縮系では、自由エネルギーが最小になる状態が平衡状態として実現する。また、自由エネルギーを小さくす

るには、内部エネルギー（またはエンタルピー）を小さくするか、もしくはエントロピーを大きくすれば良いことがわかる。しかし、内部エネルギー（エンタルピー）変化とエントロピー変化の間には相関があるため、内部エネルギー（エンタルピー）を小さくすればするほど、エントロピーも小さくなる。すなわち、外部の熱浴と接している対象系の平衡状態は、対象系の温度に応じて、内部エネルギー（エンタルピー）変化とエントロピー変化とが互いに競合することによって自由エネルギーを最小にする状態といえる。

ある対象系において、状態 i から状態 j へ変化するときの自由エネルギー変化 $\Delta A_{ij} = A_j - A_i$ は、自由エネルギー A を“状態”を表す変数（あるいはパラメータ） λ の関数 $A(\lambda)$ として表現する場合、一般に次のように記述される。

$$\Delta A_{ij} = \int_{\lambda_i}^{\lambda_j} \frac{dA(\lambda)}{d\lambda} d\lambda \quad (2.58)$$

さらに状態 i の自由エネルギー A が、分配関数 Q_N を使って

$$A(\lambda_i) = -k_B T \ln Q_N(\lambda_i) \quad (2.59)$$

と表現される場合を考える。ここで、状態 i を指定するパラメータに依存する対象系のハミルトニアン $H(\mathbf{r}^N, \mathbf{p}^N; \lambda_i)$ を用いると、

$$Q_N(\lambda_i) = \frac{1}{N!} \frac{1}{h^{3N}} \int \exp(-H(\mathbf{r}^N, \mathbf{p}^N; \lambda_i) / k_B T) d\mathbf{r}^N d\mathbf{p}^N \quad (2.60)$$

と表される。このとき、状態 i を指定するパラメータ λ_i は、熱力学的状態変数に限らない。この式(2.59)を式(2.58)に代入すると、以下のように式変形できる。

$$\begin{aligned} \Delta A_{ij} &= - \int_{\lambda_i}^{\lambda_j} \frac{k_B T}{Q_N} \frac{\partial Q_N}{\partial \lambda} d\lambda \\ &= \int_{\lambda_i}^{\lambda_j} \frac{1}{Q_N} \int \frac{\partial H(\lambda)}{\partial \lambda} \exp\left(-\frac{H(\lambda)}{k_B T}\right) d\mathbf{r}^N d\mathbf{p}^N d\lambda \\ &= \int_{\lambda_i}^{\lambda_j} \left\langle \frac{\partial H(\lambda)}{\partial \lambda} \right\rangle_\lambda d\lambda \end{aligned} \quad (2.61)$$

ここで、 $\langle \dots \rangle_\lambda$ はハミルトニアン $H(\mathbf{r}^N, \mathbf{p}^N; \lambda)$ に関するアンサンブル平均を表す。この式によって自由エネルギーを計算する方法を熱力学的積分法（Thermodynamic Integration）と呼ぶ。

$\Delta A_{ij} = A_j - A_i$ に式(2.59)を直接代入すると、自由エネルギー差は次のように表現される。

$$\Delta A_{ij} = -k_B T \ln \frac{Q_N(\lambda_j)}{Q_N(\lambda_i)} = -k_B T \ln \frac{Z_N(\lambda_j)}{Z_N(\lambda_i)} \quad (2.62)$$

ここで $Q_N(\lambda_i)$ と $Q_N(\lambda_j)$ はそれぞれ状態 i と j の分配関数を、 $Z_N(\lambda_i)$ と $Z_N(\lambda_j)$ はそれぞれ配置積分

$$Z_N(\lambda) = \int \exp\left(-\frac{V(\mathbf{r}^N; \lambda)}{k_B T}\right) d\mathbf{r}^N \quad (\lambda = \lambda_i \text{ or } \lambda_j) \quad (2.63)$$

を表す。また、 $V(\mathbf{r}^N; \lambda)$ （以下では簡単のため $V(\lambda)$ ）はパラメータ λ におけるポテンシ

ヤルを表す。この式(2.63)を式(2.62)に代入すると次の式を得る。

$$\Delta A_{ij} = -k_B T \ln \frac{\int \exp\left(-\frac{V(\lambda_j)}{k_B T}\right) d\mathbf{r}^N}{\int \exp\left(-\frac{V(\lambda_i)}{k_B T}\right) d\mathbf{r}^N} = -k_B T \ln \exp\left\langle \left(-\frac{V(\lambda_j) - V(\lambda_i)}{k_B T} \right) \right\rangle_{\lambda_i} \quad (2.64)$$

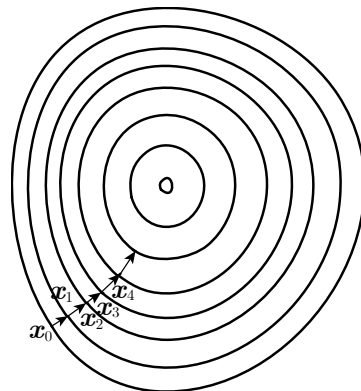
つまり着目する状態 i と参照状態 j のポテンシャルエネルギー差の指数平均を状態 i でのアンサンブル平均として計算することを意味する。この式(2.64)によって自由エネルギーを計算する方法は、自由エネルギー摂動法 (Free energy perturbation, FEP) と呼ばれる。

2.14 エネルギー最小化

系のエネルギーを最小化する方法 (Energy minimization) で代表的なものに最急降下法 (steepest descent) 法がある。この方法は最小化した構造を探索する方法としては必ずしも最も優れているわけではないが、汎用性が高く実装も簡単なのでほとんどのソフトウェアに搭載されている。

最急降下法は、 n 次のベクトル $\mathbf{x} = (x_1, x_1, \dots, x_n)$ を引数とする関数を $f(\mathbf{x})$ として、この関数の最小値を求める方法である。 k 回目の反復時に解が \mathbf{x}_k の位置にあるとき、以下の手順に従って値を更新する。

- ① \mathbf{x}_0 の初期値を決めて $k = 0$ とする。
- ② $\nabla f(\mathbf{x}_k)$ が十分小さな値であれば終了する。
- ③ ステップ幅 α_k を小さな値に設定し、 $\mathbf{x}_{k+1} = \mathbf{x}_k - \alpha_k (\nabla f(\mathbf{x}_k))^T$ によって \mathbf{x}_{k+1} を決定する。
- ④ $k = k + 1$ とする。



勾配法のため、局所的な最小値にハマり易く、大域的な最小値を求めるのは困難であることが欠点である。それを回避するために、複数の初期値から探索を行うなどの対策が必要である。しかしながら、分子動力学シミュレーションを開始するときにはある程度エネルギーが小さくなっていけばよく、エネルギーの最小値を求める必要はない。

2.15 量子化学計算による分子のパラメータの設定

酵素など蛋白質の機能発現部位 (活性部位) に結合し、分解される基質や、酵素としての機能を阻害する低分子などを一般的にリガンド (ligand) とよび、それを受け入れる蛋白質などの生体高分子を、受容体 (receptor) と呼ぶ。分子動力学シミュレーションソフトウェアにデフォルトで搭載されている力場は、いずれも蛋白質、DNA、RNA、脂質や糖といった汎用的な分子のパラメータは保存されているものの、実際にユーザーの使いたい系にそれ以外の分子が含まれる場合は自身でパラメータを用意する必要がある。特に蛋白質の

リガンド分子は様々なものが存在する上、周囲の残基の影響を受けて電荷の分布が変化する場合も多々ある。このようなユーザーの希望する力場や電荷パラメータを決定する方法の 1 つとして、量子化学計算ソフトウェアを用いてそれぞれの原子間の標準振動や原子上の電荷を計算し、分子動力学計算用にパラメータを変換する方法がある。

Kollman ら AMBER を開発したグループでは、これらのポテンシャル関数の改良にも力を注いだ。特に点電荷の算出に静電ポテンシャル最適化法 (ESP 法) を取り入れたことは、相互作用エネルギーの改良において重要な役割を持つ⁶⁷。それまでは点電荷はしばしば分子軌道計算 (MO 計算) から得られる Mulliken charge を用いることが多かった。しかし Mulliken の population 解析には明らかな論理欠陥があり、実用上は難点が存在した。ESP 法は一方で、MO 計算から得られた軌道を用い、分子表面において静電ポテンシャルを計算していく。その参照のポテンシャルを表現するように最適化によって原子上の点電荷を決定する手法である。この点電荷は分子の電荷密度分布をよく再現し、静電エネルギーの計算に用いることができる。後に、ESP 法をさらに改良した RESP 法が提案された⁶⁸。現在 AMBER に搭載されている ANTECHAMBER モジュールはこの RESP 法を利用している。

第3章 分子軌道法

3.1 シュレディンガー方程式

電子、原子などの微視的粒子が従うべき方程式の導出を行う。まず振幅を $\psi(\mathbf{r})$ とする定常波

$$\Psi = \psi(\mathbf{r})e^{-i\omega t} = \psi(\mathbf{r})(\cos\omega t - i\sin\omega t) \quad (3.1)$$

を、速さ u の波動が満足するべき波動方程式

$$\frac{\partial^2 \Psi}{\partial t^2} = u^2 \nabla^2 \Psi, \quad \left(\nabla^2 = \frac{\partial^2}{\partial x^2} + \frac{\partial^2}{\partial y^2} + \frac{\partial^2}{\partial z^2} \right) \quad (3.2)$$

に代入すると、

$$\begin{aligned} (-i\omega)^2 \psi(\mathbf{r})e^{-i\omega t} &= u^2 \{ \nabla^2 \psi(\mathbf{r}) \} e^{-i\omega t} \\ u^2 \nabla^2 \psi + \omega^2 \psi &= 0 \end{aligned} \quad (3.3)$$

ここで両辺を u^2 で割って、波数 k と周波数 ω の関係から $\omega = ku$ なので

$$\nabla^2 \psi(\mathbf{r}) + k^2 \psi(\mathbf{r}) = 0 \quad (3.4)$$

が得られる。この古典的な波動の式に粒子性を加味する。波数 k と運動量 p の間には de Broglie の関係式があり、これらはともにベクトルであることに注意すると

$$\mathbf{p} = \hbar \mathbf{k}, \quad \hbar = h / 2\pi \quad (3.5)$$

ここで h はプランク定数(Planck constant)である。これを用いると

$$\nabla^2 \Psi + \frac{\mathbf{p}^2}{\hbar^2} \Psi = 0 \quad (3.6)$$

さらに x, y, z を用いて書き直すと

$$[p_x^2 + p_y^2 + p_z^2] \psi = \left[\left(\frac{\hbar}{i} \frac{\partial}{\partial x} \right)^2 + \left(\frac{\hbar}{i} \frac{\partial}{\partial y} \right)^2 + \left(\frac{\hbar}{i} \frac{\partial}{\partial z} \right)^2 \right] \psi \quad (3.7)$$

となり、粒子に関連した運動量の各成分が

$$p_x \rightarrow \frac{\hbar}{i} \frac{\partial}{\partial x}, \quad p_y \rightarrow \frac{\hbar}{i} \frac{\partial}{\partial y}, \quad p_z \rightarrow \frac{\hbar}{i} \frac{\partial}{\partial z} \quad (3.8)$$

のように対応することが示されている。

これを用いて1粒子の全エネルギー E を表すと、運動エネルギーとポテンシャルエネルギー $-V(\mathbf{r})$ から

$$\frac{\mathbf{p}^2}{2m} + V(\mathbf{r}) = E, \quad \Longleftrightarrow \quad -\frac{\hbar^2}{2m} \nabla^2 + V(\mathbf{r}) = E \quad (3.9)$$

が得られる。上の式の左辺は微分演算子を含んでいるから、このままでは方程式にならないので、両辺が $\psi(\mathbf{r})$ に作用すると考えて

$$\left[-\frac{\hbar^2}{2m} \nabla^2 + V(\mathbf{r}) \right] \psi(\mathbf{r}) = E\psi(\mathbf{r}) \quad (3.10)$$

を得る。この式には t は含まれていない。この式を時間に依存しないシュレディンガーの方程式 (time-independent Schrödinger equation) と呼ぶ。

解析力学または古典力学において、運動エネルギーとポテンシャルエネルギーの和はハミルトン関数 $H(\mathbf{p}, \mathbf{r})$ と呼ばれ

$$H(\mathbf{p}, \mathbf{r}) = \frac{\mathbf{p}^2}{2m} + V(\mathbf{r}) \quad (3.11)$$

となる。この式を式(3.8)で変換すると

$$H\left(\frac{\hbar}{i}\nabla, \mathbf{r}\right) = -\frac{\hbar^2}{2m} \nabla^2 + V(\mathbf{r}) \quad (3.12)$$

を得る。この式の左辺はハミルトン関数に含まれる \mathbf{p} を $(\hbar/i)\nabla$ に置き換えたもので、ハミルトン演算子またはハミルトニアンと呼ぶ。以後

$$H\left(\frac{\hbar}{i}\nabla, \mathbf{r}\right) \equiv \hat{H} \quad (3.13)$$

と記す。これにより、式(3.10)は

$$\hat{H}\psi = E\psi \quad (3.14)$$

と書くことができる。ここでエネルギー E と $\psi(\mathbf{r})$ をそれぞれ固有値 (あるいはエネルギー準位)、固有関数と呼ぶ。これらの導出は論理的に導かれたものではない箇所がいくつか存在するが、その妥当性はこの式の解と種々の観測結果とを比較することによって確かめられた。

時間に依存するシュレディンガーの方程式 (time-dependent Schrödinger equation) は

$$\left[-\frac{\hbar^2}{2m} \nabla^2 + V \right] \Psi = i\hbar \frac{\partial \Psi}{\partial t} \quad (3.15)$$

または

$$\hat{H}\Psi = i\hbar \frac{\partial \Psi}{\partial t} \quad (3.16)$$

と書ける。この時間に依存するシュレディンガーの方程式は $\Psi(\mathbf{r}, t)$ が定常波の形、つまり Ψ が $\psi(\mathbf{r}) \cdot e^{-i\omega t}$ のように \mathbf{r} の関数と t の関数に分離されるときに限り、 $E = \hbar\omega$ を用いると時間に依存しないシュレディンガーの方程式(3.10)を導くことが可能である。

3.1.1 ハミルトニアン演算子

系に含まれる n 個の電子の番号を $i = 1, 2, \dots, n$ 、 N 個の原子核の番号を $A = 1, 2, \dots, N$ とする。また、 A 番目の原子核の電荷と質量を原子単位で Z_A, M_A とすると、ハミルトン演算子は次のようになる。

$$\hat{H} = -\sum_{i=1}^n \frac{1}{2} \nabla_i^2 - \sum_{A=1}^N \frac{1}{2M_A} \nabla_A^2 - \sum_{i,A=1}^{n,N} \frac{Z_A}{r_{iA}} + \sum_{i>j}^n \frac{1}{r_{ij}} + \sum_{A>B}^N \frac{Z_A Z_B}{R_{AB}} \quad (3.17)$$

ただし、 n 個の電子の座標を $\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2, \dots, \mathbf{r}_n$ 、 N 個の原子核の座標を $\mathbf{R}_1, \mathbf{R}_2, \dots, \mathbf{R}_N$ として、 $r_{ij} \equiv |\mathbf{r}_i - \mathbf{r}_j|$ は電子 i と j の距離、 $R_{AB} \equiv |\mathbf{R}_A - \mathbf{R}_B|$ は核 A と B の距離、 $r_{iA} \equiv |\mathbf{r}_i - \mathbf{R}_A|$ は電子 i と核 A の距離である。なお、原子の場合は $N = 1$ であるから、上式の右辺の最後の項は存在しない。シュレディンガーの方程式 $\hat{H}\Psi = E\Psi$ を解いて得られる波動関数 Ψ には、電子の座標 $\tau_1, \tau_2, \dots, \tau_n$ (スピン座標を σ_i として、 $\tau_i = (\mathbf{r}_i, \sigma_i)$) と核の座標 $\mathbf{R}_1, \mathbf{R}_2, \dots, \mathbf{R}_N$ とが含まれているはずである。これらの座標をまとめて、それぞれ τ および \mathbf{R} と表すことにする。すなわち

$$\Psi(\tau_1, \tau_2, \dots, \tau_n; \mathbf{R}_1, \mathbf{R}_2, \dots, \mathbf{R}_N) \equiv \Psi(\tau; \mathbf{R}) \quad (3.18)$$

である。

3.1.2 Born–Oppenheimer 近似

原子核は電子に比べてはるかに重いので、電子に比べてゆっくり運動するはずである。そこで、電子は固定された核の場の中で運動していると考えると、式(3.18)は

$$\Psi(\tau; \mathbf{R}) = \Psi_{\text{el}}(\tau; \mathbf{R}) \Psi_{\text{nucl}}(\mathbf{R}) \quad (3.19)$$

の形に分離できるであろう。ただし、 $\Psi_{\text{el}}(\tau; \mathbf{R})$ は核の座標 \mathbf{R} をパラメータとして含む電子の波動関数、 $\Psi_{\text{nucl}}(\mathbf{R})$ は核の波動関数である。式(3.19)の近似を **Born–Oppenheimer 近似** という。式(3.17)で ∇_i^2 は \mathbf{r} だけに、 ∇_A^2 は \mathbf{R} だけに作用する。また、 Ψ_{el} に \mathbf{R} はパラメータとして含まれており、 \mathbf{R} にあまり依存せず、特に核の平衡位置の近傍では \mathbf{R} にほとんどよらないので、 $\nabla_A^2 \Psi_{\text{el}}(\tau; \mathbf{R}) = 0$ としてよい。これらのことを考慮すると式(3.17)と式(3.19)から、

$$\begin{aligned} & \Psi_{\text{nucl}}(\mathbf{R}) \left(-\sum_{i=1}^n \frac{1}{2} \nabla_i^2 - \sum_{i,A=1}^{n,N} \frac{Z_A}{r_{iA}} + \sum_{i>j}^n \frac{1}{r_{ij}} + \sum_{A>B}^N \frac{Z_A Z_B}{R_{AB}} \right) \Psi_{\text{el}}(\tau; \mathbf{R}) \\ & + \Psi_{\text{el}}(\tau; \mathbf{R}) \left(-\sum_{A=1}^N \frac{1}{2M_A} \nabla_A^2 \right) \Psi_{\text{nucl}}(\mathbf{R}) = E \Psi_{\text{el}}(\tau; \mathbf{R}) \Psi_{\text{nucl}}(\mathbf{R}) \end{aligned} \quad (3.20)$$

この式を $\Psi_{\text{el}}(\tau; \mathbf{R}) \Psi_{\text{nucl}}(\mathbf{R})$ で割って変形すると

$$\begin{aligned} & \frac{\left(-\sum_{i=1}^n \frac{1}{2} \nabla_i^2 - \sum_{i,A=1}^{n,N} \frac{Z_A}{r_{iA}} + \sum_{i>j}^n \frac{1}{r_{ij}} + \sum_{A>B}^N \frac{Z_A Z_B}{R_{AB}} \right) \Psi_{\text{el}}(\tau; \mathbf{R})}{\Psi_{\text{el}}(\tau; \mathbf{R})} \\ & = E - \frac{\left(-\sum_{A=1}^N \frac{1}{2M_A} \nabla_A^2 \right) \Psi_{\text{nucl}}(\mathbf{R})}{\Psi_{\text{nucl}}(\mathbf{R})} \end{aligned} \quad (3.21)$$

となる。この式の左辺は τ と \mathbf{R} の関数、右辺は \mathbf{R} だけの関数であるから、この式が τ によらず恒等的に成立するためには両辺が \mathbf{R} だけの関数でなければならない (変数分離)。そこで、上式の両辺を $E_{\text{el}}(\mathbf{R})$ とおくと、次の二つの式が得られる。

$$\left(-\sum_{i=1}^n \frac{1}{2} \nabla_i^2 - \sum_{i,A=1}^{n,N} \frac{Z_A}{r_{iA}} + \sum_{i>j}^n \frac{1}{r_{ij}} + \sum_{A>B}^N \frac{Z_A Z_B}{R_{AB}} \right) \Psi_{\text{el}}(\tau; \mathbf{R}) = E_{\text{el}}(\tau; \mathbf{R}) \Psi_{\text{el}}(\tau; \mathbf{R}) \quad (3.22)$$

$$\left(-\sum_{A=1}^N \frac{1}{2M_A} \nabla_A^2 + E_{\text{el}}(\mathbf{R}) \right) \Psi_{\text{nuc}}(\mathbf{R}) = E \Psi_{\text{nuc}}(\mathbf{R}) \quad (3.23)$$

式(3.22)は原子核の位置をパラメータとして(原子核を適当に配置して)電子の状態を求める式である。式(3.23)は原子核の運動を定める式で、そのポテンシャルは $E_{\text{el}}(\mathbf{R})$ である。

式(3.22)において、核間反発(repulsion)の項は一定値になるので

$$E_{\text{rep}} = \sum_{A>B}^N \frac{Z_A Z_B}{R_{AB}} \quad (3.24)$$

とおくと、式(3.22)は

$$\left(-\sum_{i=1}^n \frac{1}{2} \nabla_i^2 - \sum_{i,A=1}^{n,N} \frac{Z_A}{r_{iA}} + \sum_{i>j}^n \frac{1}{r_{ij}} \right) \Psi_{\text{el}}(\tau; \mathbf{R}) = E_{\text{e}}(\tau; \mathbf{R}) \Psi_{\text{el}}(\tau; \mathbf{R}) \quad (3.25)$$

のように変形できる。ただし、

$$E_{\text{e}}(\mathbf{R}) \equiv E_{\text{el}}(\mathbf{R}) - E_{\text{rep}} \quad (3.26)$$

は $E_{\text{el}}(\mathbf{R})$ から核間の反発エネルギーを差し引いたもので、核の座標を \mathbf{R} に固定した時の、電子の運動エネルギーならびに電子と核の間および電子間のポテンシャルエネルギーに相当する。Born–Oppenheimer 近似では、核間反発を含まないハミルトニアンと含むハミルトニアンは、同じ固有関数 $\Psi_{\text{el}}(\tau; \mathbf{R})$ をもち、前者の固有値 $E_{\text{e}}(\mathbf{R})$ に核間反発の項 E_{rep} を加えれば、後者の固有値 $E_{\text{el}}(\mathbf{R})$ が得られることがわかる。

3.1.3 Hartree–Fock 法

1928 年、Hartree は物理的な意味を持つある近似を導入することで、それなりの精度で波動関数を発見することができる方法を発見した。この近似により、他電子系のシュレディンガーの方程式を解くことができる。

この Hartree による近似は、電子間反発を平均化するものである。全電子数 n の系において、この近似で各々の電子は核の作る場と自分以外の他の $n-1$ 個の電子の作る平均場の中を移動することになる。この近似により、他電子波動関数は 1 電子波動関数の積によって表現することができる。

$$\psi(\mathbf{r}) = \psi_1(\mathbf{r}_1) \psi_2(\mathbf{r}_2) \cdots \psi_n(\mathbf{r}_n) \quad (3.27)$$

ここで、 $\psi_i(\mathbf{r}_i)$ は位置ベクトル \mathbf{r} の関数からなる空間軌道であり、位置 \mathbf{r} から位置 $\mathbf{r} + d\mathbf{r}$ の間に電子を発見する確率は、 $|\psi_i(\mathbf{r})|^2 d\mathbf{r}$ である。すべての波動関数は全電子の位置情報と核の位置に依存している。よって、核の配置が異なっていれば得られる解も異なるものになる。

3.1.4 Slater 行列式

式(3.22)のうち、左辺の () の中について、第 4 項は一定値なので、

$$\left(\sum_{i=1}^n \hat{H}_c(i) + \sum_{i>j}^n \frac{1}{r_{ij}} \right) \Psi_{\text{el}}(\tau; \mathbf{R}) = E_e(\mathbf{R}) \Psi_{\text{el}}(\tau; \mathbf{R}) \quad (3.28)$$

と書き直せる。ただし、ここで

$$\hat{H}_c(i) = -\frac{1}{2} \nabla_i^2 - \sum_{A=1}^N \frac{Z_A}{r_{iA}} \quad (3.29)$$

$$E_{\text{el}}(\mathbf{R}) = E_e(\mathbf{R}) + \sum_{A>B}^N \frac{Z_A Z_B}{R_{AB}} \quad (3.30)$$

とした。原子の場合は $N = 1$ 、 $E_{\text{el}}(\mathbf{R}) = E_e(\mathbf{R})$ とする。また、 $\Psi_{\text{el}}(\tau; \mathbf{R}) = \Psi(\tau_1, \tau_2, \dots, \tau_n)$ とおく。

n 電子系の Slater 行列式

$$\Psi(\tau_1, \tau_2, \dots, \tau_n) = \frac{1}{\sqrt{n!}} \begin{vmatrix} \psi_1(\tau_1) & \psi_2(\tau_1) & \cdots & \psi_n(\tau_1) \\ \psi_1(\tau_2) & \psi_2(\tau_2) & \cdots & \psi_n(\tau_2) \\ \vdots & & \ddots & \\ \psi_1(\tau_n) & \psi_2(\tau_n) & \cdots & \psi_n(\tau_n) \end{vmatrix} \quad (3.31)$$

において、 $\{\psi_i\} = \{\psi_1, \psi_2, \dots, \psi_n\}$ は n 個の電子が占めている 1 電子軌道で規格直交系をなすものとする。すなわち、

$$\int \psi_i^*(\tau_1) \psi_j(\tau_1) d\tau_1 = \delta_{ij} \quad (3.32)$$

である。

3.1.5 Hartree–Fock 方程式

Hartree–Fock の方法では n 電子系のシュレディンガーの方程式

$$\hat{H}\Psi = E_e\Psi, \quad \hat{H} = \sum_{i=1}^n \hat{H}_c(i) + \sum_{i>j}^n \frac{1}{r_{ij}} \quad (3.33)$$

の基底状態の解を Slater 行列式で表し、変分法を用いて最適の 1 電子軌道の組を選ぶ。

そのためには、この付帯条件のもと、 ψ_i と ψ_i^* を変えて、基底状態のエネルギー期待値

$$E_e = \int \Psi^* \hat{H} \Psi d\tau = \langle \Psi | \hat{H} | \Psi \rangle \quad (3.34)$$

の極値を求めればよい。この式のハミルトニアンは

$$E_e = \left\langle \Psi \left| \sum_{i=1}^n \hat{H}_c(i) + \sum_{i>j}^n \frac{1}{r_{ij}} \right| \Psi \right\rangle = \sum_{i=1}^n H_i + \frac{1}{2} \sum_{i,j=1}^n (J_{ij} - K_{ij}) \quad (3.35)$$

のように変形できる。ただし、

$$H_i \equiv \int \psi_i^*(1) \hat{H}_c(1) \psi_i(1) d\tau_1 \quad (3.36)$$

$$J_{ij} \equiv \int \psi_i^*(\tau_1) \psi_j^*(\tau_2) \frac{1}{r_{12}} \psi_i(\tau_1) \psi_j(\tau_2) d\tau_1 d\tau_2 \quad (3.37)$$

$$K_{ij} \equiv \int \psi_i^*(\tau_1) \psi_j^*(\tau_2) \frac{1}{r_{12}} \psi_i(\tau_2) \psi_j(\tau_1) d\tau_1 d\tau_2 \quad (3.38)$$

とした。 J_{ij} , K_{ij} はそれぞれクーロン積分、交換積分と呼ばれる。

Lagrange の未定係数法により、未定係数を ε_{ji} として

$$\begin{aligned} & A(\psi_1, \psi_2, \dots, \psi_n; \psi_1^*, \psi_2^*, \dots, \psi_n^*) \\ &= \sum_{i=1}^n \int \psi_i^*(1) \hat{H}_c(1) \psi_i(1) d\tau_1 + \frac{1}{2} \sum_{i,j=1}^n \int \psi_i^*(1) \psi_j^*(2) \frac{1}{r_{12}} \psi_i(1) \psi_j(2) d\tau_1 d\tau_2 \\ & \quad - \frac{1}{2} \sum_{i,j=1}^n \int \psi_i^*(1) \psi_j^*(2) \frac{1}{r_{12}} \psi_i(2) \psi_j(1) d\tau_1 d\tau_2 - \sum_{i,j=1}^n \varepsilon_{ij} \left(\int \psi_i^*(1) \psi_j(1) d\tau_1 - \delta_{ij} \right) \end{aligned} \quad (3.39)$$

の ψ_i と ψ_i^* についての変分 δA をとり、 ψ_i と ψ_i^* の独立な変化に対して、 $\delta A = 0$ にすることにする。計算して整理していくと $\delta A = 0$ であるためには、

$$\begin{aligned} & H_c(1) \psi_i(1) + \sum_{j=1}^n \left(\int \frac{\psi_j^*(2) \psi_j(2)}{r_{12}} d\tau_2 \cdot \psi_i(1) - \int \frac{\psi_j^*(2) \psi_i(2)}{r_{12}} d\tau_2 \cdot \psi_j(1) \right) \\ &= \sum_{j=1}^n \varepsilon_{ji} \psi_j(1) \end{aligned} \quad (3.40)$$

$$\begin{aligned} & H_c(1) \psi_i^*(1) + \sum_{j=1}^n \left(\int \frac{\psi_j(2) \psi_j^*(2)}{r_{12}} d\tau_2 \cdot \psi_i^*(1) - \int \frac{\psi_j(2) \psi_i^*(2)}{r_{12}} d\tau_2 \cdot \psi_j^*(1) \right) \\ &= \sum_{j=1}^n \varepsilon_{ij} \psi_j^*(1) \end{aligned} \quad (3.41)$$

であるから、2つの式は

$$\left[\hat{H}_c + \sum_{j=1}^n (\hat{J}_j - \hat{K}_j) \right] \psi_i = \sum_{j=1}^n \varepsilon_{ji} \psi_j \quad (3.42)$$

$$\left[\hat{H}_c^* + \sum_{j=1}^n (\hat{J}_j^* - \hat{K}_j^*) \right] \psi_i^* = \sum_{j=1}^n \varepsilon_{ji} \psi_j^* \quad (3.43)$$

となる。ただし、 $\hat{H}_c^*(1) = \hat{H}_c(1)$ を用いた。ここで

$$\hat{F} \equiv \hat{H}_c + \sum_{j=1}^n (\hat{J}_j - \hat{K}_j) \quad (3.44)$$

とおくと、式(3.42)は次のようになる。

$$\hat{F} \psi_i = \sum_{j=1}^n \varepsilon_{ji} \psi_j \quad i, j = 1, 2, \dots, n \quad (3.45)$$

この式に左から ψ_k^* をかけて積分を行うと、規格直交系であることを利用して

$$F_{ki} \equiv \int \psi_k^*(1) \hat{F}(1) \psi_i(1) d\tau_1 = \sum_{j=1}^n \varepsilon_{ji} \delta_{ki} = \varepsilon_{ki} \quad (3.46)$$

となる。ここで (F_{ki}) はエルミート行列なので、複素共役 $\varepsilon_{ki}^* = \varepsilon_{ik}$ も成立する。

したがって、

$$\varepsilon_{ij} = \varepsilon_{ji}^* \quad (3.47)$$

が成立するため、式(3.42)と式(3.43)は等価であることがわかり、どちらか一方が成立すれば良い。この式(3.44)を Hartree-Fock の方程式という。

3.1.6 閉殻系・開殻系

Hartree-Fock の式は n 個の電子が 1 電子軌道 $\psi_i(\tau) = \psi_i(\mathbf{r}, \sigma)$ ($i = 1, 2, \dots, n$) を占めている場合に、最良の $\psi_i(\mathbf{r}, \sigma)$ を定めるための方程式である。ここで、空間軌道による表現を用いると、1 電子スピン-空間軌道、つまり $\psi_i(\mathbf{r}, \sigma)$ が空間軌道関数とスピン軌道関数の積、 $\phi_i^\alpha(\mathbf{r})\alpha(\sigma)$ または $\phi_i^\beta(\mathbf{r})\beta(\sigma)$ で表される場合に、 $\phi(\mathbf{r})$ が満たすべき方程式を求めることにする。 n 個の電子のうち p 個が α スピンを、 q 個が β スピンをもつとすると、

$$\psi_i(\mathbf{r}, \sigma) = \phi_i^\alpha(\mathbf{r})\alpha(\sigma) \quad (i = 1, 2, \dots, p) \quad (3.48)$$

$$\psi_i(\mathbf{r}, \sigma) = \phi_i^\beta(\mathbf{r})\beta(\sigma) \quad (i = 1, 2, \dots, q) \quad (3.49)$$

ただし、 $p + q = n$ である。通常このときの空間関数 $\phi_i(\mathbf{r})$ を分子軌道と呼んでいる。

スピン軌道関数は規格直交化されており、

$$\int \alpha^*(\sigma)\alpha(\sigma)d\sigma = \int \beta^*(\sigma)\beta(\sigma)d\sigma = 1 \quad (3.50)$$

$$\int \alpha^*(\sigma)\beta(\sigma)d\sigma = \int \beta^*(\sigma)\alpha(\sigma)d\sigma = 0 \quad (3.51)$$

である。また分子軌道関数も規格直交化されている。

$$\int \phi_i^*(\mathbf{r})\phi_j(\mathbf{r})d\mathbf{r} = \delta_{ij} \quad (3.52)$$

このことを用いて、式(3.48)と式(3.49)をそれぞれ Hartree-Fock の式に代入すると、

$$\hat{F}^\alpha \phi_i^\alpha = \varepsilon_i^\alpha \phi_i^\alpha \quad i = 1, 2, \dots, p \quad (3.53)$$

$$\hat{F}^\beta \phi_i^\beta = \varepsilon_i^\beta \phi_i^\beta \quad i = 1, 2, \dots, q \quad (3.54)$$

と表すことができる。これらの式が空間軌道 $\phi_i^\alpha(\mathbf{r})$ と $\phi_i^\beta(\mathbf{r})$ を求めるための Hartree-Fock の式である。これらの式では $\phi_i^\alpha(\mathbf{r})$ と $\phi_i^\beta(\mathbf{r})$ の形にあらかじめ制限が加えられていないので、非制限 Hartree-Fock の式 (unrestricted Hartree-Fock, UHF) という。

スピン座標を含まないハミルトニアン \hat{H} はスピン角運動量の 2 乗 \hat{S}^2 および全スピン角運動量の z 成分の演算子 \hat{S}_z と交換可能なので、波動関数 Ψ は \hat{S}^2 および \hat{S}_z の固有関数となるべきである。しかし UHF の場合は、 Ψ は \hat{S}_z の固有関数であるが、一般に \hat{S}^2 の固有関数ではなく、スピン関数がすべて同じ ($p = n$ or 0) の場合だけである。

閉殻系とは副殻が完全に電子で満たされている状態の系のことであり、当然偶数個の電子 (電子数 n) が 2 個ずつ、 α スピンと β スピンを持ち、順にエネルギーの低い $n/2$ 個の軌道を占めることができる。このときの波動関数は

$$\Psi = \frac{1}{\sqrt{n!}} \begin{vmatrix} \phi_1(\mathbf{r}_1)\alpha(\sigma_1) & \phi_1(\mathbf{r}_1)\beta(\sigma_1) & \phi_2(\mathbf{r}_1)\alpha(\sigma_1) & \cdots & \phi_{n/2}(\mathbf{r}_1)\beta(\sigma_1) \\ \phi_1(\mathbf{r}_2)\alpha(\sigma_2) & \phi_1(\mathbf{r}_2)\beta(\sigma_2) & \phi_2(\mathbf{r}_2)\alpha(\sigma_2) & \cdots & \phi_{n/2}(\mathbf{r}_2)\beta(\sigma_2) \\ \vdots & & \ddots & \cdots & \vdots \\ \phi_1(\mathbf{r}_n)\alpha(\sigma_n) & \phi_1(\mathbf{r}_n)\beta(\sigma_n) & \phi_2(\mathbf{r}_n)\alpha(\sigma_n) & \cdots & \phi_{n/2}(\mathbf{r}_n)\beta(\sigma_n) \end{vmatrix} \quad (3.55)$$

である。これは $\phi_i^\alpha(\mathbf{r}) = \phi_i^\beta(\mathbf{r}) = \phi_i(\mathbf{r})$ 、 $p = q = n/2$ 、 $i = 1, 2, \dots, n/2$ の場合に相当する。つまり制限付き Hartree–Fock (restricted Hartree–Fock, RHF) の式は

$$\hat{F}\phi_i = \varepsilon_i \phi_i \quad i = 1, 2, \dots, n/2 \quad (3.56)$$

となる。

開殻系分子のスピンの計算では α スピンと β スピンの軌道を別々に考える UHF が有効である。これは NMR や電子スピン共鳴 (ESR) のようなスピンが直接関与する現象の説明に向いている (Figure 3.1)。

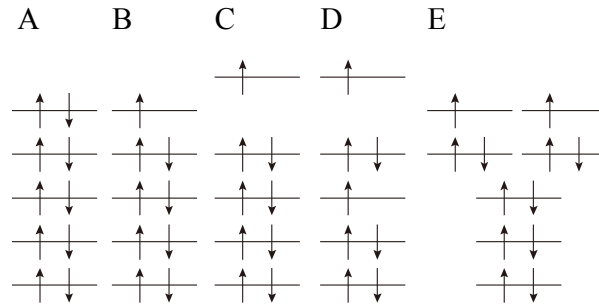


Figure 3.1 閉殻系と開殻系の例。(A) 閉殻系。(B–E) 開殻系。(B) ラジカル (C) 陰イオン (D) 励起状態 (E) 特殊な系 (O_2 など)

3.1.7 Roothaan–Hall 方程式と自己無撞着場 (self-consistent field) 計算

空間軌道関数 $\phi_i(\mathbf{r})$ が基底関数系 $\chi_\mu(\mathbf{r})$ ($\mu = 1, 2, \dots, m$) の一次結合、

$$\phi_i(\mathbf{r}) = \sum_{\mu=1}^m c_{\mu i} \chi_\mu(\mathbf{r}) \quad (3.57)$$

のように、自由に選ぶのではなく一次結合に限定して変分法を用いて最適の解の組 $\{c_{\mu i}\}$ を決めるとする。閉殻(RHF)の場合、この式の μ を ν に変えて式(3.56)に代入すると

$$\sum_{\nu=1}^m c_{\nu i} \hat{F} \chi_\nu = \varepsilon_i \sum_{\nu=1}^m c_{\nu i} \chi_\nu \quad (3.58)$$

この式に左から χ_μ^* をかけて空間全体で積分すると

$$\sum_{\nu=1}^m c_{\nu i} F_{\mu\nu} = \varepsilon_i \sum_{\nu=1}^m c_{\nu i} S_{\mu\nu} \quad (3.59)$$

ただし、

$$F_{\mu\nu} \equiv \int \chi_{\mu}^*(\mathbf{r}_1) \hat{F}(1) \chi_{\nu}(\mathbf{r}_1) d\mathbf{r}_1 \quad (3.60)$$

$$S_{\mu\nu} \equiv \int \chi_{\mu}^*(\mathbf{r}_1) \chi_{\nu}(\mathbf{r}_1) d\mathbf{r}_1 \quad (\text{重なり積分}) \quad (3.61)$$

とした。これを変形すると

$$\sum_{\nu=1}^m (F_{\mu\nu} - \varepsilon_i S_{\mu\nu}) c_{\nu i} = 0 \quad \mu = 1, 2, \dots, m \quad i = 1, 2, \dots, m \quad (3.62)$$

これは Roothaan⁶⁹ と Hall⁷⁰ がそれぞれ独立に求めたもので、Roothaan–Hall の式と呼ばれる。電子軌道関数 ϕ_i を基底関数 χ_{μ} の一次結合で表現した時の係数はこの式を解くことによって決定される。この式が $c_{\nu i} = 0$ ($\nu = 1, 2, \dots, m$) 以外の解をもつためには、係数で作られる行列式

$$|F_{\mu\nu} - \varepsilon_i S_{\mu\nu}| = 0 \quad (3.63)$$

でなければならない。この式を解くと m 個の ε_i が決定され、これに対応して m 組の $c_{\mu i}$ ($\mu = 1, 2, \dots, m$)、つまり m 個の ϕ_i が決まる。 n 個の電子は m 個の軌道を下から順に、2 個ずつ $n/2$ 番目の軌道まで占めることになる。しかし、この解を求めるとき、 $F_{\mu\nu}$ には $c_{\mu i}$ が含まれているため、適当な $c_{\mu i}$ ($\mu = 1, 2, \dots, m$) の初期値から出発して自己無撞着場 (self-consistent field; SCF) 計算による解法を試みる必要がある。

3.1.8 *ab initio* 分子軌道法

ab initio 分子軌道法では原則として実験値を使わないで分子の電子状態を計算する。その際、通常、まず基底状態における 1 電子軌道 $\phi_i(\mathbf{r})$ を適当な基底関数系の一次結合で表し、Hartree–fock 法を用いて 1 電子近似の範囲で最良の $\phi_i(\mathbf{r})$ を求める。

分子の性質を計算する主な方法として、*ab initio* 法、密度汎関数法、半経験的方法および分子力学法がある。まずこれらについて簡単に触れると、

1. 半経験的方法

半経験的方法では、ハミルトニアンを簡単化して量子力学的計算を行う。その際、実験値に合うように調節されたパラメータを用いる。半経験的と呼ばれるのはこのためである。Hückel の分子軌道法は半経験的方法の最も単純な例である。

2. *ab initio* 法

ab initio とはラテン語で from the beginning という意味である。この方法では半経験的方法とは異なり、正しいハミルトニアンを用いる。また、原則として基本物理定数以外は実験値を使わないで計算を進めるので、非経験的方法または第一原理法とも呼ばれる。

3. 密度汎関数(Density-functional method)法

この方法では波動関数を求めない。その代わりに基底状態の電子密度 $\rho_0(\mathbf{r})$ を (基底状態のエネルギーを最低にするという条件から) 変分原理により決定する。エネルギーその他の量は $\rho_0(\mathbf{r})$ の汎関数で与えられる。例えば、 $E = E[\rho_0(\mathbf{r})]$ である。汎関数とは、ある関数

の他の関数空間への写像をいう。例えば、積分値 $F = \int \psi^*(\mathbf{r}) \hat{f}(\mathbf{r}) \psi(\mathbf{r}) d\mathbf{r}$ は関数 $\psi(\mathbf{r})$ を指定すると写像として得られる。この関係を、[] を使って $F = F[\psi(\mathbf{r})]$ で表し、 F を $\psi(\mathbf{r})$ の汎関数という。

ab initio 法ではじめに必要なことは基底関数系の選択である。基底関数の数は無限にとるわけではなく、また電子相関を 100% 考慮することも不可能である。その意味で、*ab initio* 法は精度が高い方法ではあるが、近似を含んでいる。

3.2 基底関数系

基底関数系(basis-set)としては、関数の数になるべく少なく、よい結果が得られるものが良いが、積分などの計算に時間がかからないことも踏まえて選択する必要がある。通常使われる基底関数系は Slater 型軌道(Slater-type orbital, STO)と Gauss 型軌道(Gauss-type orbital, GTO)である。

規格化の定数を N とすると、STO は次の通りである。

$$\chi_{nlm}^{\text{STO}} = N r^{n^*-1} e^{-\zeta r} Y_{lm}(\theta, \varphi) \quad (3.64)$$

この式で $Y_{lm} \pm Y_{l,-m}$ を用いて実関数にし、また、 $n^* = 1, 2, 3, \dots$ とすると、

$$\begin{aligned} 1s & e^{-\zeta r} \\ 2s & r e^{-\zeta r} \\ 2p & (x, y, z) e^{-\zeta r} \\ 3d & (xy, yz, zx, x^2 - y^2, 2z^2 - x^2 - y^2) e^{-\zeta r} \end{aligned} \quad (3.65)$$

となる。ただし、ここでは規格化の定数は省略してある。一方で、GTO は

$$\chi_{ijk}^{\text{GTO}} = N x^i y^j z^k e^{-\alpha r^2} \quad i, j, k = 0, 1, 2, \dots \quad (3.66)$$

である。 N の一般式は次の通りである。

$$N = \left\{ \frac{2^{2(i+j+k)+3/2} \alpha^{i+j+k+3/2}}{(2i-1)!!(2j-1)!!(2k-1)!!\pi^{3/2}} \right\}^{1/2} \quad (3.67)$$

GTO では主量子数は用いず、主量子数の違いは α の値を調節することで表現される。s, p, d 関数はそれぞれ

$$\begin{aligned} s & e^{-\alpha r^2} \\ p & (x, y, z) e^{-\alpha r^2} \\ d & (xy, yz, zx, x^2, y^2, z^2) e^{-\alpha r^2} \end{aligned} \quad (3.68)$$

である。

STO の方が原子・分子の基底関数としては適切で、少ない項数でよい結果が得られやすいが、計算時間においては項数が増えても GTO の方がはるかに短いことが多く、現状とし

では GTO を用いて計算されることが多い (Figure 3.2)。次に、*ab initio* 計算で通常用いられる基底関数系の例を挙げる。

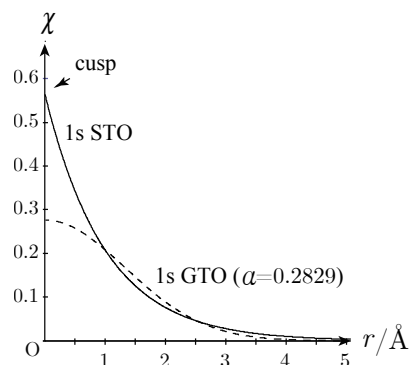


Figure 3.2 1s STO と 1s GTO の比較。1s STO の先端を cusp といい、尖っているのに対し、1s GTO では勾配が 0 である。GTO の基底関数の数を増やせば (6 程度) 解決される。

3.2.1 最小基底系

各原子の内殻と価電子殻にそれぞれ 1 個の STO を置く基底系である。例えば、 H_2O では O 原子に 1s, 2s, $2p_x$, $2p_y$, $2p_z$ の 5 個の STO を、各 H 原子に 1s STO を使う。各 STO は計算を簡単にするため、GTO の 1 次結合

$$\chi^{\text{STO}}(\zeta) = \sum_{u=1}^N d_u \chi^{\text{GTO}}(\alpha_u) \quad (3.69)$$

で表される。この際、 d_u と α_u を調節して、最もよく STO を再現するように用いられる。STO が N 個の GTO で表される時、STO-NG と呼ばれる。通常の STO-3G が使われる。最小基底系は精度はよくないが、大きな系にも適用可能で、系の化学結合の基本的な性格を調べるのには都合が良い。

一定の d_u と α_u を持つ GTO の一次結合で、計算の途中で変化させないような、固定した d_u と α_u からなる GTO の一次結合による規格化された軌道を縮約ガウス型軌道(contractd GTO, CGTO)と呼ぶ。また、CGTO を構成する各 GTO を原子 GTO と呼ぶ。CGTO を用いても積分の数は変わらないが、計算時間が大幅に節約される。

3.2.2 2 倍基底関数系

最小基底系を改良して各原子殻に対して 2 個の基底関数系を割り当てた系が 2 倍基底関数系である。2 個の基底関数の一方を、最小基底関数よりやや縮んだものに、他方をやや広がったものにして、両者の線形結合をとり係数を調節すると、電子の運動の自由度を高めることができる。ただし、内殻は化学的性質にあまり影響を与えないので、内殻の基底関数系は 1 個のままにし、原子価殻の基底関数を 2 倍にすることも行われる。このタイプの原子価殻 2 倍基底関数系(valence double zeta basis set)が、3-21G、4-31G、6-31G などである。数字は CGTO を構成する原子 GTO の数を表す。例えば、6-31G では内殻に 6 個の GTO が

らなる CGTO を、原子価殻に 3 個の GTO よりなる CGTO と 1 個の GTO を割り当てる。

3.2.3 分極基底関数系

計算精度を高めるため、原子価殻の基底関数を 2 倍から 3 倍に変えることも行われるが (6-311G など)、このような方法では軌道の基本的な形を変えることができない。そこで、H 原子に p 型関数を、Li~F 原子に d 型関数を、遷移元素に f 型関数を加える基底系が考えられた。この基底系を分極基底関数系という。例えば、水素原子の 1s 軌道は球対称であるが、他の原子と結合を作ると結合方向に電子分布が偏り、原子が分極する。この分極効果は s 軌道に結合方向の p 軌道を混ぜれば考慮される。同様に Li~F 原子には d 型関数が分極効果を与える。

分極基底関数系には 3-21G(d) (または 3-21G*)、6-31G(d)、6-31G(d,p) などがある。3-21G(d)、6-31G(d) では重原子 (H 以外の原子) に 6 個の d 型 GTO ($d_{xy}, d_{yz}, d_{zx}, d_{x^2}, d_{y^2}, d_{z^2}$) を、6-31G(d,p) では H 原子にさらに p 型 GTO を加える。現在では 6-31G(d) 基底関数系が中程度の大きさの分子に標準的に使われるようになった。結合エネルギーなど水素原子の寄与が大きい計算では 6-31G(d, p) も使われる。

3.3 密度汎関数法

密度汎関数法では、波動関数の代わりに基底状態の電子の確率密度 $\rho_0(\mathbf{r})$ を求め、エネルギーその他の物理量を $\rho_0(\mathbf{r})$ の汎関数として計算する。ただし、 $\rho_0(\mathbf{r})$ は通常の変分法と同様に基底状態のエネルギーを最低にするという条件から求められる。このような手続きの正当性は Hohenberg-Kohn の定理により保証される。密度汎関数法は 1951 年に Slater が提唱した X α 法に端を発する。

3.3.1 Hohenberg-Kohn の定理

ab initio 法では n 個の電子を含む原子や分子の系の計算において、波動関数 $\Psi(\tau_1, \tau_2, \dots, \tau_n)$ を用いた。例えば、系のエネルギーは $E = \int \Psi^* \hat{H} \Psi d\tau$ から得られる。また、一般的に古典的物理量 F の期待値は Ψ を通して $\langle F \rangle = \int \Psi^* \hat{F} \Psi d\tau$ から求められた。波動関数は $4n$ 個の変数 $\tau_i = x_i, y_i, z_i, \sigma_i$ ($i = 1, 2, \dots, n$) を持つので系が大きい場合には計算が非常に多くなってしまう。しかし、例えば電気双極子モーメントの期待値は

$$\langle \mu \rangle = -e \int \mathbf{r} \rho(\mathbf{r}) d\mathbf{v} + \sum_{A=1}^N Z_A e \mathbf{R}_A \quad (3.70)$$

で表されるが、この計算式に含まれている変数は $\mathbf{r}(x, y, z)$ の 3 つのみである (\mathbf{R}_A は核の配置を与えるパラメータであるから、変数ではない)。すなわち、 Ψ の代わりに ρ を用いれば、変数は $4n$ から 3 に減少する。上式で $\langle \mu \rangle$ は $\rho(\mathbf{r})$ をもとにして計算される。このような関係があるとき、 $\langle \mu \rangle$ は $\rho(\mathbf{r})$ の汎関数であるといい、 $\langle \mu \rangle = \langle \mu \rangle[\rho(\mathbf{r})]$ で表す。

n 電子系のハミルトニアンは、

$$\hat{H}_{\text{el}} = -\frac{1}{2} \sum_{i=1}^n \Delta_i - \sum_{i=1}^n v(\mathbf{r}_i) + \sum_{i>j}^n \frac{1}{r_{ij}} \quad (3.71)$$

である。ただし、

$$v(\mathbf{r}_i) = -\sum_{A=1}^N \frac{Z_A}{r_{iA}} \quad (3.72)$$

は電子 i に働く原子核からのポテンシャルである。このように電子にはたらく外部からのポテンシャルを密度汎関数理論では外部ポテンシャル(external potential)と呼ぶ。式(3.71)より、外部ポテンシャルと電子数がわかれば、 \hat{H}_{el} が決定する。そしてシュレディンガーの方程式 $\hat{H}_{\text{el}} \Psi_{\text{el}} = E_{\text{el}} \Psi_{\text{el}}$ を解けば、固有関数 Ψ_{el} と固有値 E_{el} が得られる。その結果、基底状態のエネルギーが決まる。後述の Hohenberg–Kohn の第一定理は、 $v(\mathbf{r}_i)$ と n の代わりに電子密度を基本的変数として、系の状態のエネルギーが決まることを述べている。

(a) Hohenberg–Kohn の第一定理

【定理】

縮重していない基底状態を持つ分子では、基底状態におけるエネルギー、波動関数、その他の電子的性質は基底状態の電子の確率密度 $\rho_0(\mathbf{r})$ が決まれば求められる。ただし、エネルギーについては、定数部分の差の任意性は存在する。

【証明】

$\rho_0(\mathbf{r})$ が決まれば、電子数 n と外部ポテンシャル $v(\mathbf{r}_i)$ が決まることを示せばよい。このとき、ハミルトニアン \hat{H}_{el} が決定され、固有関数と固有値が得られ、系のすべての電子的性質が求められるからである。

(1) 電子の確率密度について、 n 電子系の波動関数を $\Psi(\tau_1, \tau_2, \dots, \tau_n)$ とすると、電子 1 を $\tau_1 \sim \tau_1 + d\tau_1$ 、電子 2 を $\tau_2 \sim \tau_2 + d\tau_2$ 、電子 n を $\tau_n \sim \tau_n + d\tau_n$ に見出す確率は、

$$|\Psi(\tau_1, \tau_2, \dots, \tau_n)|^2 d\tau_1 d\tau_2 \cdots d\tau_n \quad (3.73)$$

である。今、電子 1 を $\tau \sim \tau + d\tau$ に見出す(他の電子はどこにあっても良い)確率を $p(\tau)d\tau$ とすれば

$$p(\tau) = \int |\Psi(\tau, \tau_2, \dots, \tau_n)|^2 d\tau_2 \cdots d\tau_n \quad (3.74)$$

となる。 n 個の電子は原理的に区別できないため、他の電子についてもその値は同じである。したがって、電子 1 $\sim n$ のどれかを $\tau \sim \tau + d\tau$ に見出す確率を $\rho(\tau)d\tau$ とすれば、

$$\rho(\tau) = np(\tau) = n \int |\Psi(\tau, \tau_2, \dots, \tau_n)|^2 d\tau_2 \cdots d\tau_n \quad (3.75)$$

となる。さらに、電子 1 $\sim n$ のどれかを $\mathbf{r} \sim \mathbf{r} + d\mathbf{r}$ に見出す確率 ($\mathbf{r} \sim \mathbf{r} + d\mathbf{r}$ における電子の確率密度) を $\rho(\mathbf{r})d\mathbf{r}$ とすれば、 $\rho(\tau) = \rho(\mathbf{r}, \sigma)$ を σ について積分して

$$\rho(\mathbf{r}) = \int \rho(\tau) d\sigma = n \int |\Psi(\mathbf{r}, \sigma, \tau_2, \dots, \tau_n)|^2 d\sigma d\tau_2 \cdots d\tau_n \quad (3.76)$$

$\rho(\mathbf{r})$ を \mathbf{r} について積分すれば、電子1～ n のすべてを全空間で見出す確率になるので、その値は当然 n になる。

$$\int \rho(\mathbf{r}) dv = n \int |\Psi(\mathbf{r}, \sigma, \tau_2, \dots, \tau_n)|^2 dv d\sigma d\tau_2 \dots d\tau_n = n \quad (3.77)$$

つまり、基底状態の電子密度 $\rho_0(\mathbf{r})$ から電子数 n が決まることがわかる。

(2) 次に、 $\rho_0(\mathbf{r})$ から外部ポテンシャル $v(\mathbf{r}_i)$ が決まることを示すために、背理法を用いる。まず、1つの $\rho_0(\mathbf{r})$ から2つの外部ポテンシャル $v_a(\mathbf{r}_i)$ と $v_b(\mathbf{r}_i)$ が得られ、それらが異なる（ただし定数部分の差は除く）と仮定する。

今、 $v_a(\mathbf{r}_i)$ から得られるハミルトニアンを \hat{H}_a 、その基底状態の固有関数と固有値を Ψ_{0a}, E_{0a} とする。同様に、 $v_b(\mathbf{r}_i)$ から得られるものを $\hat{H}_b, \Psi_{0b}, E_{0b}$ とする。シュレディンガーの方程式 $\hat{H}_a \Psi_a = E_a \Psi_a$ において、基底状態は縮重していないから、変分原理より次の式が成り立つ。

$$E_{0a} < \langle \Psi_{0b} | \hat{H}_a | \Psi_{0b} \rangle \quad (3.78)$$

なぜなら、 Ψ_{0b} は真の固有関数 Ψ_{0a} と異なる変分法の試行関数と考えられるからである。この式の右辺は

$$\begin{aligned} \langle \Psi_{0b} | \hat{H}_a | \Psi_{0b} \rangle &= \langle \Psi_{0b} | \hat{H}_a - \hat{H}_b | \Psi_{0b} \rangle + \langle \Psi_{0b} | \hat{H}_b | \Psi_{0b} \rangle \\ &= \left\langle \Psi_{0b} \left| \sum_{i=1}^n v_a(\mathbf{r}_i) - \sum_{i=1}^n v_b(\mathbf{r}_i) \right| \Psi_{0b} \right\rangle + E_{0b} \\ &= \int \rho_{0b}(\mathbf{r}) \{v_a(\mathbf{r}) - v_b(\mathbf{r})\} dv + E_{0b} \\ \therefore E_{0a} &< \int \rho_{0b}(\mathbf{r}) \{v_a(\mathbf{r}) - v_b(\mathbf{r})\} dv + E_{0b} \end{aligned} \quad (3.79)$$

同様に、次の式も得られる。

$$E_{0b} < \int \rho_{0a}(\mathbf{r}) \{v_b(\mathbf{r}) - v_a(\mathbf{r})\} dv + E_{0a} \quad (3.80)$$

仮定により $\rho_{0a}(\mathbf{r}) = \rho_{0b}(\mathbf{r})$ であるから ($\rho_0(\mathbf{r})$ は一つしかない)、上の二つの式を加えると、

$$E_{0a} + E_{0b} < E_{0b} + E_{0a} \quad (3.81)$$

となる。これは矛盾しているなので、はじめの仮定は否定される。したがって、

$$v_a(\mathbf{r}_i) = v_b(\mathbf{r}_i) \quad (3.82)$$

であり、 $\rho_0(\mathbf{r})$ から外部ポテンシャル $v(\mathbf{r}_i)$ が決定できることが示された。

上の定理から、基底状態 E_0 のエネルギーは、基底状態の確率密度 ρ_0 が決まれば求まるから、

$$E_0 = E_v[\rho_0(\mathbf{r})] \quad (3.83)$$

のように、汎関数を用いて表される。ただし、 E の添字 v は汎関数の形が外部ポテンシャル $v(\mathbf{r}_i)$ (分子が異なれば異なる) に依存していることを意味する。

式(3.71)の右辺の3つの項をそれぞれ、電子の運動エネルギー \hat{T} 、核と電子の相互作用(外部ポテンシャル) \hat{V}_{ne} 、電子間の相互作用 \hat{V}_{ee} とし、 $\hat{H}_{el} = \hat{T} + \hat{V}_{ne} + \hat{V}_{ee}$ とする。この式の両辺の Ψ_0 における期待値をとると、

$$E_0 = \bar{T} + \bar{V}_{ne} + \bar{V}_{ee} \quad (3.84)$$

ただし、 $\langle \Psi_0 | \hat{H} | \Psi_0 \rangle = E_0$, $\langle \Psi_0 | \hat{T} | \Psi_0 \rangle \equiv \bar{T}$ などである。上式の各項は Ψ_0 が決まると決まるので、 ρ_0 の汎関数だと考えられる。よって、

$$E_0 = E_v[\rho_0(\mathbf{r})] = \bar{T}[\rho_0] + \bar{V}_{ne}[\rho_0] + \bar{V}_{ee}[\rho_0] \quad (3.85)$$

ここで、

$$V_{ne} = \langle \Psi_0 | \hat{V}_{ne} | \Psi_0 \rangle = \left\langle \Psi_0 \left| \sum_{i=1}^n v(\mathbf{r}_i) \right| \Psi_0 \right\rangle = \int \rho_0(\mathbf{r}) v(\mathbf{r}) d\mathbf{r} \quad (3.86)$$

であるから、式(3.85)は、

$$E_0 = E_v[\rho_0] = \int \rho_0(\mathbf{r}) v(\mathbf{r}) d\mathbf{r} + F[\rho_0] \quad (3.87)$$

となる。ただし、

$$F[\rho_0] \equiv \bar{T}[\rho_0] + \bar{V}_{ee}[\rho_0] \quad (3.88)$$

とした。 $F[\rho_0]$ は外部ポテンシャルによらない。この式において、 $F[\rho_0]$ はわかっていないので、この式から E_0 を求めることはできない。 $F[\rho_0]$ を計算するには以下のHohenberg-Kohnの第二定理と(近似)汎関数の定義が必要である。実際的な分子の計算にはさらに後述のKohn-Shamの近似法が必要になる。

(b) Hohenberg-Kohnの第二定理

【定理】すべての \mathbf{r} において $\rho_{tr}(\mathbf{r}) \geq 0$ で、 $\int \rho_{tr}(\mathbf{r}) d\mathbf{r} = n$ になるような試行確率密度 $\rho_{tr}(\mathbf{r})$ に対して、

$$E_0 \leq E_v[\rho_{tr}] \quad (3.89)$$

が成立する。ただし、等号成立条件は $\rho_{tr} = \rho_0$ の場合である。

これは、波動関数における変分原理では、試行関数 Ψ_{tr} から求められるエネルギー $E_{tr} = \langle \Psi_{tr} | \hat{H} | \Psi_{tr} \rangle$ と真の基底状態のエネルギー E_0 の間に、 $E_0 \leq E_{tr}$ の関係が成立する。この第二定理によると、これと同様な関係が試行電子密度の汎関数として得られるエネルギー $E_v[\rho_{tr}]$ と真のエネルギー $E_0 = E_v[\rho_0]$ の間にも成立するということである。したがって、波動関数に関する変分法の場合と同様に、基底状態の近似を高めるためには、 $E_v[\rho_{tr}]$ をなるべく小さくするような ρ_{tr} を探せば良いことになる。

【証明】

Hohenberg-Kohnの第一定理より、この Ψ_{tr} をハミルトニアン \hat{H}_{el} の基底状態に対する試行関数として使うと、変分原理から、

$$\langle \Psi_{tr} | \hat{H}_{el} | \Psi_{tr} \rangle = \left\langle \Psi_{tr} \left| \hat{T} + \hat{V}_{ee} + \sum_{i=1}^n v(\mathbf{r}_i) \right| \Psi_{tr} \right\rangle \geq E_0 = E_v[\rho_0] \quad (3.90)$$

式(3.85)と式(3.86)を用いてこの式を書き直すと

$$\bar{T}[\rho_{\text{tr}}] + \bar{V}_{\text{ee}}[\rho_{\text{tr}}] + \int \rho_{\text{tr}}(\mathbf{r})v(\mathbf{r})dv \geq E_v[\rho_0] \quad (3.91)$$

左辺は $E_v[\rho_{\text{tr}}]$ に等しいので、

$$E_v[\rho_{\text{tr}}] \geq E_v[\rho_0] = E_0 \quad (3.92)$$

が成立する。よって示された。

なお、Hohenberg–Kohn の定理は縮重していない基底状態について証明されたが、縮重している場合にも成立することが示されている。

3.3.2 Kohn–Sham の定理

Hohenberg–Kohn の第一定理から、基底状態の電子の確率密度 ρ_0 からエネルギー E_0 その他の量が得られること、第二定理によって ρ_0 を求めるための基本原理（変分原理）が明らかになった。それによれば、

$$E = E_v[\rho] = \int \rho(\mathbf{r})v(\mathbf{r})dv + F[\rho], \quad n = \int \rho(\mathbf{r})dv \quad (3.93)$$

を最小にするような ρ が求める ρ_0 である。Lagrange の未定係数法によると、そのためには λ を未定係数として、 ρ を変えたとき $f = E - \lambda \left(\int \rho(\mathbf{r})dv - n \right)$ が極値をとることが必要である。つまり、

$$\frac{\delta f}{\delta \rho} = \frac{\delta E}{\delta \rho} - \lambda \frac{\delta}{\delta \rho} \int \rho(\mathbf{r})dv = 0 \quad (3.94)$$

ただし、 $\delta f / \delta \rho$, $\delta E / \delta \rho$ などは汎関数微分を表す。この式に式(3.93)を代入して変形すると次の式が得られる。

$$\lambda = v(\mathbf{r}) + \frac{\delta F[\rho]}{\delta \rho(\mathbf{r})} \quad (3.95)$$

ただし、 $\frac{\delta}{\delta \rho} \int \rho(\mathbf{r})dv = 1$ 、 $\frac{\delta}{\delta \rho} \int \rho(\mathbf{r})v(\mathbf{r})dv = v(\mathbf{r})$ を用いた。しかしこの式で $F[\rho]$ の具体的な形がわかればよいが、 $F[\rho] = \bar{T}[\rho] + \bar{V}_{\text{ee}}[\rho]$ の関係における $\bar{T}[\rho]$, $\bar{V}_{\text{ee}}[\rho]$ の形も合わせて明らかではない。

そこで、Kohn と Sham は対象とする系のモデルとして、外部ポテンシャル $\sum_{i=1}^n v_s(\mathbf{r}_i)$ の下に
ある n 個の相互作用がない仮想電子系 s を導入した。ただし、 $v_s(\mathbf{r}_i)$ は真の基底状態の電子密度 $\rho_0(\mathbf{r})$ と等しい電子密度 $\rho_s(\mathbf{r})$ を与えるものとする。すると仮想モデル系のハミルトニアンは

$$\hat{H}_s = \sum_{i=1}^n \left\{ -\frac{1}{2} \nabla_i^2 + v_s(\mathbf{r}_i) \right\} \equiv \sum_{i=1}^n \hat{h}^{\text{KS}}(i) \quad (3.96)$$

ただし、

$$\hat{h}^{\text{KS}}(i) \equiv -\frac{1}{2} \nabla_i^2 + v_s(\mathbf{r}_i) \quad (3.97)$$

は Kohn-Sham の 1 電子ハミルトニアンである。 \hat{h}^{KS} の固有関数と固有値をそれぞれ $\varphi_i^{\text{KS}}, \varepsilon_i^{\text{KS}}$ とすると、

$$\hat{h}^{\text{KS}} \varphi_i^{\text{KS}} = \varepsilon_i^{\text{KS}} \varphi_i^{\text{KS}} \quad (3.98)$$

また、式(3.96)は相互作用のない系のハミルトニアンであるから、その固有関数は Slater 行列式を用いて

$$\Psi_s = |u_1 u_2 \cdots u_n| \quad u_i(\tau_i) \equiv \varphi_i^{\text{KS}}(\mathbf{r}_i) \alpha(\sigma_i) \text{ または } \varphi_i^{\text{KS}}(\mathbf{r}_i) \beta(\sigma_i) \quad (3.99)$$

となる。ただし、 α, β はスピン関数である。基底状態では電子は α, β の対となって Kohn-Sham の軌道を下から 2 個ずつ占める (RHF の場合と同様)。なお、 \hat{h}^{KS} や $v_s(\mathbf{r}_i)$ の具体的な形は後に求められる。

このモデル系の電子密度は、

$$\rho = \sum_{i=1}^n \int |u_i(\tau)|^2 d\sigma = \sum_{i=1}^n |\varphi_i^{\text{KS}}(\mathbf{r})|^2 \quad (3.100)$$

また、運動エネルギーの期待値は

$$\bar{T}_s[\rho] = \left\langle \Psi_s \left| -\frac{1}{2} \sum_{i=1}^n \nabla_i^2 \right| \Psi_s \right\rangle = -\frac{1}{2} \sum_{i=1}^n \langle \varphi_i^{\text{KS}}(\mathbf{r}_i) | \nabla_i^2 | \varphi_i^{\text{KS}}(\mathbf{r}_i) \rangle \quad (3.101)$$

ただし、上式の変形において $\{\varphi_i^{\text{KS}}(\mathbf{r}_i)\}$ が規格直交系をなすので、

$$\int \varphi_i^{\text{KS}*}(\mathbf{r}_i) \varphi_j^{\text{KS}}(\mathbf{r}_i) dv_i = \delta_{ij} \quad (3.102)$$

を利用して式(3.101)を導いた。

このモデル系で電子密度を求めるための式は、 $v(\mathbf{r}) = v_s(\mathbf{r})$ 、 $F[\rho] = \bar{T}[\rho] = \bar{T}_s[\rho]$ ($\because \bar{V}_{\text{ee}}[\rho] = 0$) より、式(3.95)を利用して

$$\lambda = v_s(\mathbf{r}) + \frac{\delta \bar{T}_s[\rho]}{\delta \rho(\mathbf{r})} \quad (3.103)$$

である。一方、現実の系における式(3.88)の $F[\rho]$ は次のように書き換えられる。

$$F[\rho] = T_s[\rho] + J[\rho] + E_{\text{xc}}[\rho] \quad (3.104)$$

ただし、

$$E_{\text{xc}}[\rho] \equiv \bar{T}[\rho] - \bar{T}_s[\rho] + \bar{V}_{\text{ee}}[\rho] - J[\rho] \quad (3.105)$$

$$J[\rho] \equiv \frac{1}{2} \int \frac{\rho(\mathbf{r})\rho(\mathbf{r}')}{|\mathbf{r} - \mathbf{r}'|} dv dv' \quad (3.106)$$

$J[\rho]$ は dv に分布した電荷 $\rho(\mathbf{r})dv$ と dv' に分布した電荷 $\rho(\mathbf{r}')dv'$ の間の反発を全空間にわ

たって積分したもので、電子間の古典的なクーロン相互作用である。 E_{xc} は交換相関エネルギー（exchange-correction energy）と呼ばれ、十分小さい $\bar{T}[\rho]$ と $\bar{T}_s[\rho]$ の差、および $\bar{V}_{ee}[\rho]$ の非古典的な部分（古典的な部分がクーロン項 $J[\rho]$ ）からなる。式(3.104)を式(3.103)に代入すると、現実の系の式として次の式が得られる。

$$\lambda = v_{\text{eff}}(\mathbf{r}) + \frac{\delta \bar{T}_s[\rho]}{\delta \rho(\mathbf{r})} \quad (3.107)$$

ただし、

$$v_{\text{eff}}(\mathbf{r}) = v(\mathbf{r}) + \frac{\delta J[\rho]}{\delta \rho(\mathbf{r})} + \frac{\delta E_{xc}[\rho]}{\delta \rho(\mathbf{r})} = v(\mathbf{r}) + \int \frac{\rho(\mathbf{r}')}{|\mathbf{r} - \mathbf{r}'|} dv' + v_{xc}(\mathbf{r}) \quad (3.108)$$

ここで、

$$v_{xc}(\mathbf{r}) \equiv \frac{\delta E_{xc}[\rho]}{\delta \rho(\mathbf{r})} \quad (3.109)$$

は交換相関ポテンシャルである。

モデル系と現実の系が同じ電子密度を与えるためには、それらの系で電子密度を決める式とが同一でなければならない。そのためには $v_s(\mathbf{r}) = v_{\text{eff}}(\mathbf{r})$ が成立する必要がある。つまり、

$$v_s(\mathbf{r}) = v(\mathbf{r}) + \int \frac{\rho(\mathbf{r}')}{|\mathbf{r} - \mathbf{r}'|} dv' + v_{xc}(\mathbf{r}) \quad (3.110)$$

この結果を式(3.97)に代入すると、Kohn-Sham の方程式

$$\begin{aligned} \hat{h}^{\text{KS}} \varphi_i^{\text{KS}} &= \varepsilon_i^{\text{KS}} \varphi_i^{\text{KS}} \\ \hat{h}^{\text{KS}}(\mathbf{r}_1) &= -\frac{1}{2} \nabla_1^2 - \sum_{A=1}^N \frac{Z_A}{r_{1A}} + \int \frac{\rho(\mathbf{r}_2)}{r_{12}} dv_2 + v_{xc}(\mathbf{r}_1) \end{aligned} \quad (3.111)$$

ただし、 $\mathbf{r} = \mathbf{r}_1$, $\mathbf{r}' = \mathbf{r}_2$

$$v(\mathbf{r}_1) = -\sum_{A=1}^N \frac{Z_A}{r_{1A}} \quad (3.112)$$

とした。基底状態のエネルギーは

$$E_v[\rho] = \int \rho(\mathbf{r}) v(\mathbf{r}) dv + \bar{T}_s[\rho] + J[\rho] + E_{xc}[\rho] \quad (3.113)$$

この式に式(3.101)、式(3.106)、式(3.112)を代入すると

$$\begin{aligned} E_0 &= -\sum_{A=1}^N Z_A \frac{\rho(\mathbf{r}_1)}{r_{1A}} dv_1 - \frac{1}{2} \sum_{i=1}^n \langle \varphi_i^{\text{KS}}(\mathbf{r}_1) | \nabla_1^2 | \varphi_i^{\text{KS}}(\mathbf{r}_1) \rangle \\ &\quad + \frac{1}{2} \int \frac{\rho(\mathbf{r}_1) \rho(\mathbf{r}_2)}{r_{12}} dv_1 dv_2 + E_{xc}[\rho] \end{aligned} \quad (3.114)$$

となる。第1項と第3項はそれぞれ電子と外部ポテンシャルおよび電子同士の古典的なクーロン相互作用のエネルギー、第2項はKS軌道にある電子の運動エネルギーである。また、第4項はそれ以外のエネルギーで、電子間の交換相関エネルギー（交換相互作用によ

るエネルギーと相関エネルギーの和) である。

このようにして $E_{xc}[\rho]$ を与えれば、 $v_{xc}[\rho] = \delta E_{xc}[\rho] / \delta \rho(\mathbf{r})$ を Kohn–Sham の方程式に代入して、KS 軌道 $\phi_i^{KS}(\mathbf{r})$ を求めることができる。ただし、方程式の中に電子密度 $\rho(\mathbf{r})$ を含んでいるので、適当な電子密度の初期値 $\rho^{(0)}(\mathbf{r})$ を代入して $\phi_i^{KS}(\mathbf{r})$ を求め、式 (3.100) を用いて $\rho^{(0)}(\mathbf{r})$ を更新する。このような更新操作を繰り返し、 $\rho(\mathbf{r})$ をつじつまの合う方法で求めなければならない。そして、 $\rho(\mathbf{r})$ と $\phi_i^{KS}(\mathbf{r})$ が確定すれば、式 (3.114) から基底状態のエネルギーが求まる。この式には近似が含まれていない。Kohn–Sham の方程式 (3.111) を用いて得られる Kohn–Sham の軌道は仮想的なものであるが、この軌道をもとにして計算される基底状態のエネルギー E_0 は交換相関エネルギー汎関数 E_{xc} が正確であればあるほど、正確な値に近づく。一方、Hartree–Fock 方程式は HF 近似という、相関項が考慮されていない近似法に対する正確な解を与えてくれると考えられる。 E_{xc} の算出法が次の主題である。

3.3.3 局所密度近似 (LDA)

前節の Kohn–Sham の方程式を解くには、 $v_{xc}(\mathbf{r})$ (または $E_{xc}[\rho(\mathbf{r})]$) の具体的な式が必要である。**局所密度近似法**では $E_{xc}[\rho(\mathbf{r})]$ を次の式で表す。

$$E_{xc}^{LDA}[\rho] = \int \rho(\mathbf{r}) \varepsilon_{xc}(\rho(\mathbf{r})) d\mathbf{r} \quad (3.115)$$

上式で、 $\varepsilon_{xc}(\rho(\mathbf{r}))$ は 1 電子当たりの (交換+相関) エネルギーに相当している。LDA では $\varepsilon_{xc}(\rho(\mathbf{r}))$ に均一電子気体 (homogeneous electron gas) の式を使う。これは、連続的に均一に分布する正電荷を持つ無限容積の空間内で運動する無限個の電子からなる電氣的に中性の系を意味する。これを導入すれば、

$$v_{xc}^{LDA} = \frac{\delta E_{xc}^{LDA}}{\delta \rho} = \frac{\partial \{\rho(\mathbf{r}) \varepsilon_{xc}(\rho(\mathbf{r}))\}}{\partial \rho} = \varepsilon_{xc}(\rho(\mathbf{r})) + \rho(\mathbf{r}) \frac{\partial \varepsilon_{xc}(\rho(\mathbf{r}))}{\partial \rho} \quad (3.116)$$

と書ける。LDA では式 (3.115) と式 (3.116) を Kohn–Sham の方程式に用いて E_0 を求めることになる。

一方で、 E_{xc} は交換エネルギーと相関エネルギーの和なので、それぞれ E_x と E_c とすれば

$$E_{xc} = E_x + E_c \quad (3.117)$$

となる。

局所密度近似は原子や分子の一樣でない電子分布を $\rho(\mathbf{r})d\mathbf{r}$ 個の電子をもつ微小な部分に分け、この部分に一樣な電子気体の結果を用いる。この微小部分の寄与を全空間にわたって加え合わせることで一樣でない系の交換相関エネルギーを求める。このため、LDA は場所によって電子密度がゆるやかに変化する系には適用できるが、一樣性から著しく外れる系には適用が困難となる。原子や分子では cusp のような場所があるので、LDA はよい近似とはいえない。そのため、後に勾配補正近似が考えられた。

KS 方程式を実際に解くとき、分子の場合、それを構成する電子密度 $\rho^{(0)}$ を加えあわせて最初の分子密度とする。また LDA の場合、 v_{xc} は Vosko, Wilk, Nusair らによる関数を用いて

から計算される。次に φ_i^{KS} は

$$\varphi_i^{\text{KS}} = \sum_{\mu=1}^m c_{\mu i} \chi_{\mu} \quad (3.118)$$

のように基底関数の一次結合によって表される。 χ_{μ} には GTO がよく使われる。このような一次結合を使う場合、HF 方程式の代わりに Roothaan–Hall の式が適用されたように、

$$\sum_{\nu=1}^m (h_{\mu\nu}^{\text{KS}} - \varepsilon_i^{\text{KS}} S_{\mu\nu}) c_{\nu i} = 0 \quad \mu = 1, 2, \dots, m \quad (3.119)$$

$$h_{\mu\nu}^{\text{KS}} = \langle \chi_{\mu} | \hat{h}^{\text{KS}} | \chi_{\nu} \rangle \quad (3.120)$$

を解くことになり、この解から φ_i^{KS} が決定されると、式(3.100)に代入して新しい電子密度 $\rho^{(1)}$ が決定される。これを用いて繰り返し $\rho^{(2)}, \rho^{(3)}$ と値を更新していき、self-consistent になるまで続ける ($\rho^{(n)}$ と $\rho^{(n+1)}$ の差が一定値以下になるまで)。なお、一般には v_{xc} は ρ の複雑な関数になるため、解析的に $\langle \chi_{\mu} | v_{\text{xc}} | \chi_{\nu} \rangle$ を計算するのは難しい。その場合は、空間を微小な講師に分割して、各格子点の値を用いて数値的に積分することも多い。また、数値積分が避けられない以上、結局 $\langle \chi_{\mu} | v_{\text{xc}} | \chi_{\nu} \rangle$ 以外の他の全ての関数も数値軌道関数（数値基底）を用いて数値積分することもある。

3.3.4 局所スピン密度近似 (LSDA)

開殻構造や、閉殻分子でも解離限界の付近では RHF の代わりに UHF がよい近似になる。これと同様に、そのような場合には LDA よりも局所スピン密度近似 (local spin density approximation; LSDA) が良い結果を与える。LDA では逆スピンの電子は対になって同じ KS 軌道を占めるのに対し、LSDA ではこれらの電子は異なった KS 軌道 $\varphi_{i\alpha}^{\text{KS}}$ と $\varphi_{i\beta}^{\text{KS}}$ を占めるとする。

LSDA では通常の汎関数理論を拡張した、スピン密度汎関数理論によって導入される。それによると交換相関エネルギー E_{xc} は α スピンと β スピンの密度の汎関数として

$$E_{\text{xc}}^{\text{LSDA}} = E_{\text{xc}}[\rho^{\alpha}, \rho^{\beta}] \quad (3.121)$$

で表される。つまり、 v_{xc} や他の項も異なるものとなる。平衡位置の近傍にある閉殻の分子では LSDA は LDA に還元される。しかし、UHF の場合と同様に、LSDA でも、式(3.99)の Ψ_s において、 α スピンと β スピンの電子が異なった軌道を占めるので、 Ψ_s が \hat{S}^2 の固有関数にならないという、スピン汚染 (spin contamination) の問題が生じる。

LSDA は分子の平衡位置、分子振動数、電気双極子モーメントなどで実験値をよく再現する。しかし、原子価エネルギーでは実験値と合わない。この値の再現のためには勾配補正密度近似が必要となる。

3.3.5 勾配補正汎関数と混成汎関数

LDA や LSDA では電子密度 $\rho(\mathbf{r})$ が \mathbf{r} とともにゆるやかに変化する系では良い結果を与えるが、一般には満足されない。電子密度の場所の急激な変化に対応するため、 ρ^α と ρ^β の勾配 (gradient) を汎関数に組み込んだのが、勾配補正密度汎関数 (gradient-corrected density approximation, GCDA) である。GCDA は一般化勾配近似 (generalized-gradient approximation, GGA) とも呼ばれる。この近似では、交換相関エネルギーは次の式で表される。

$$E_{xc}^{GGA}[\rho^\alpha, \rho^\beta] = \int G(\rho^\alpha(\mathbf{r}), \rho^\beta(\mathbf{r}), \nabla\rho^\alpha(\mathbf{r}), \nabla\rho^\beta(\mathbf{r})) dv \quad (3.122)$$

LDA の場合と同様に、

$$E_{xc}^{GGA} = E_x^{GGA} + E_c^{GGA} \quad (3.123)$$

として、 E_x^{GGA} と E_c^{GGA} のそれぞれについて、理論的及び実験的な考察からいろいろな式が考案されている。

E_x^{GGA} として現在広く用いられているのは 1988 年の Becke による式である。

$$E_x^{B88} = E_x^{LDA} - b \sum_{\sigma=\alpha,\beta} \frac{(\rho^\sigma)^{4/3} \chi_\sigma^2}{1 + 6b\chi_\sigma \sinh^{-1} \chi_\sigma} dv \quad \chi_\sigma \equiv |\nabla\rho^\sigma| / (\rho^\sigma)^{4/3} \quad (3.124)$$

ただし、 $\sinh^{-1} x = \ln[x + (x^2 + 1)^{1/2}]$ 、 $b = 0.0042$ a.u. である。 b の値は希ガス原子の交換エネルギーの正確な値に合うように決められた。

相関汎関数 E_c^{GGA} としてよく使われるのは Lee, Yang, Parr (1988) によるものである⁷¹。

$$E_c^{LYP} = -a \int \frac{\gamma(\mathbf{r})}{1 + d\rho^{-1/3}} [\rho + 2b\rho^{-5/3} \{2^{2/3} C_F (\rho^\alpha)^{8/3} + 2^{2/3} (\rho^\beta)^{8/3} - \rho t_w \\ + \frac{1}{9} (\rho^\alpha t_w^\alpha + \rho^\beta t_w^\beta) + \frac{1}{18} (\rho^\alpha \nabla^2 \rho^\alpha + \rho^\beta \nabla^2 \rho^\beta)\} e^{-c\rho^{-1/3}}] dv \quad (3.125)$$

ただし

$$\gamma(\mathbf{r}) = 2 \left[1 - \frac{(\rho^\alpha(\mathbf{r}))^2 + (\rho^\beta(\mathbf{r}))^2}{\rho^2(\mathbf{r})} \right] \quad t_w(\mathbf{r}) = \frac{1}{8} \frac{|\nabla\rho(\mathbf{r})|^2}{\rho(\mathbf{r})} - \frac{1}{8} \nabla^2 \rho$$

$$C_F = \frac{3}{10} (3\pi^2)^{2/3}$$

$a = 0.04918$ 、 $b = 0.132$ 、 $c = 0.2533$ 、 $d = 0.349$ である。この他には Perdew (P86)⁷² や Perdew と Wang (1991) (PW91 または PWc91) および Becke (1995) (Bc95)⁷³ によるものなどがある。上述の交換汎関数と相関汎関数は別物なので適当に組み合わせられる。例えば BLYP/6-31G(d) は Becke 1988⁷⁴ の交換汎関数と上記の相関汎関数を組み合わせて、6-31G(d) 基底で展開した KS 軌道による計算である。

式 (3.96) で定義されるような仮想電子系では正しい電子密度は与えるであろうが、電子間の相互作用 (クーロン相互作用) は考えていないので、相関エネルギーは 0 となるはずである。したがって、この系の軌道 ϕ_i^{KS} を用いて求められる HF タイプの交換エネルギー

$$E_x^{\text{HF}} = -\frac{1}{4} \sum_{i,j=1}^n \langle \varphi_i^{\text{KS}}(1) \varphi_j^{\text{KS}}(2) | 1/r_{12} | \varphi_j^{\text{KS}}(1) \varphi_i^{\text{KS}}(2) \rangle \quad (3.126)$$

は、この仮想電子系では、 E_{xc} の正確な値を与えられと考えられる。Becke はここで仮想電子系から実在の系に移行するに際して、この E_x^{HF} に $E_{\text{xc}}^{\text{LSDA}}$ を加味することを提案した。これを混成汎関数 (hybrid functional) という。最もよく使用されている混成汎関数は B3LYP であり、3 はパラメータを 3 個含むことを意味する。

$$E_{\text{xc}}^{\text{B3LYP}} = (1 - a_0) E_x^{\text{LSDA}} + a_0 E_x^{\text{HF}} + a_x (E_x^{\text{B88}} - E_x^{\text{LDA}}) + a_c E_c^{\text{LYP}} + (1 - a_c) E_c^{\text{VWN3}} \quad (3.127)$$

この式において E_c^{VWN3} は Vosko, Wilk, Nusair による E_c^{LSDA} である。この式の第 1 項と第 2 項は E_x^{LSDA} と E_x^{HF} の混成部分、第 3 項は E_x の勾配に依存する部分、第 4 項と第 5 項は E_c^{LYP} と E_c^{VWN3} の混成部分である。なお、 $a_0 = 0.20$ 、 $a_x = 0.72$ 、 $a_c = 0.81$ である。これらの値は最小二乗法を用いて、第 2 周期原子の原子化エネルギー、イオン化エネルギーなどを再現するように決められた。

GGA や混成汎関数は分子の平衡位置、分子振動数、電気双極子モーメントばかりでなく、原子化エネルギーについても、実験値をよく再現する。一般に混成汎関数の方が計算値と実験値の一致精度が良い。

3.3.6 密度汎関数法と分子軌道法の比較

密度汎関数法では電子相関を考慮した汎関数を利用できる上、HF 法に比べて電子数からの影響が比較的小さいため、少ない計算時間で電子相関まで取り入れた計算ができる。Kohn–Sham 汎関数理論 (KSDF) による計算時間は HF による分子軌道計算とほぼ同等である。その精度は QCISD(T) や CCSD(T) ほどではないにしろ、これらの方法では不可能な大きい分子にも適用できる。また、開殻系に適用した場合、スピン汚染の影響が少ない点でも分子軌道法より有利である。しかし次のような欠点がある。

(1) 分子軌道法では正確な結果を得る道筋がはっきりしている。より大きい基底関数系を用いてより高次の相関を考慮すればよい。これに対して KSDF では、それに用いる E_{xc} 汎関数の正確さを決める判断基準がなく、個々の E_{xc} の計算結果を実験結果と比較する以外に方法がない。したがって、密度汎関数法は純理論的な方法というより、半経験的方法に属するとも言える。

(2) 物理量の計算は、分子軌道法では波動関数 Ψ を用いて容易に行われるが、汎関数法では電子密度 ρ を用いるので困難な場合がある。例えば、電子間の反発エネルギー $E_{\text{rep}}(\text{el})$ は $\sum_{i,j=1}^n 1/r_{ij}$ の期待値として、 Ψ から次のように容易に求められる。

$$E_{\text{rep}}(\text{el}) = \left\langle \Psi \left| \sum_{i>j}^n \frac{1}{r_{ij}} \right| \Psi \right\rangle \quad (3.128)$$

しかし、 ρ からの E_{rep} の計算は困難である。

(3) Hohenberg, Kohn, Sham などによる汎関数法はもともと基底状態についての理論である。一応励起状態についても適応できる方法が開発されているが、その成果は十分とはいえない。また、エネルギーの計算では、一般に活性化エネルギーが低くなる傾向がある。

(4) 分子軌道法の配置間相互作用 (CI) 法の場合と異なり、汎関数法では真の汎関数がわかっておらず、近似汎関数を用いなければならないため、基底状態のエネルギーの判定に変分原理が使えないので、エネルギーの計算値が真のエネルギーよりも低くなることもある。

(5) 現状では、van der Waals 相互作用のような弱い相互作用を記述するのが困難である。

第4章 *in vitro* 実験手法

4.1 RP523 株を使った大腸菌発現系

1950 年代からの分子生物学の発展から、研究対象とする生理活性を持つと思われる蛋白質を同定することが容易になってきている。蛋白質の一部でも明らかになれば、遺伝子のデータベースで検索し、その DNA を組み込んだ発現ベクターを構築して、それを培養細胞などに導入して強制的に蛋白質を発現させ、生理活性を調べることが可能となった。現在では、強制的に過剰発現させた細胞から目的の蛋白質を精製して、種々の研究を進めることが可能となっている。

大腸菌を使った発現系の利点は、培養が容易かつ安価であり、発現に必要な時間が短く、かつ大量に目的とする蛋白質が獲得できる点である。一方、発現蛋白質に対する糖鎖修飾は大腸菌発現系では行われないため、この目的の場合には適当ではない。

本実験で用いる黄色ブドウ球菌の蛋白質 IsdH-NEAT3, IsdA および IsdC のアミノ酸配列情報は UniProt データベースに登録されている *S.aureus* strain Mu50¹⁴ のものを用いて大腸菌発現系に導入した。IsdH, IsdA および IsdC の UniProt での Entry code はそれぞれ Q931P4、Q99UX4、Q99UX3 である。このうち、IsdH-NEAT3 は Gly-534 から Gln-664 を、N 末端と C 末端のシグナル配列を除いた IsdA 全長は Ala-47 から Thr-316 を、同様に両末端を除いた IsdC 全長は Ala-28 から Thr-192 を、それぞれ使用した。また、IsdA-NEAT ドメインのみの配列には、Ser-62 から Ala-184 を使用した。

大腸菌発現系では、宿主の大腸菌にプラスミド DNA を導入し、過剰発現させた後に破碎して可溶性画分に抽出する。しかし、これら Isd 蛋白質は先述の通り、ヘム結合蛋白質であるが、ヘム分子は大腸菌で生育のために使用されている分子である。したがって大腸菌発現系でヘム結合蛋白質を過剰発現させた場合、その蛋白質は精製段階でヘムと結合した状態で回収されてしまう。本研究では、Isd 蛋白質のヘムに対する親和性を測定する目的および、その他の金属置換ポルフィリンを用いることを想定しているため、ヘムの結合していない状態 (apo 体) の蛋白質を精製することが重要であった。そこで、大腸菌のヘム合成酵素 *hemB* をノックアウトした株 *Escherichia coli* RP523 strain⁷⁵ を用いた大腸菌発現系を構築した。この株を用いた場合、大腸菌はヘムを触媒にした酸素を使った好気呼吸が不可能になる。しかし大腸菌は通性嫌気性菌であり、酸素がなくとも発酵により ATP を合成することが可能であるため、本研究におけるこの RP523 株の培養は、嫌気条件 (酸素濃度が薄い条件) で行った。

この大腸菌 RP523 に導入するベクターは Figure 4.1 の pTAC-MAT-Tag[®]-2 Expression Vector (Sigma-Aldrich) を用いた。この発現ベクターでは *trp* プロモーターと *lac* プロモーターの 2 つの大腸菌由来プロモーターをかけ合わせた *tac* プロモーターを利用しており、コリネ型細菌では最も強力なプロモーターであることが報告されている⁷⁶。このベクターに各蛋白質コード領域を挿入し、TEE、His₆-tag のアミノ酸配列を追加して発現ベクターを完成させた。

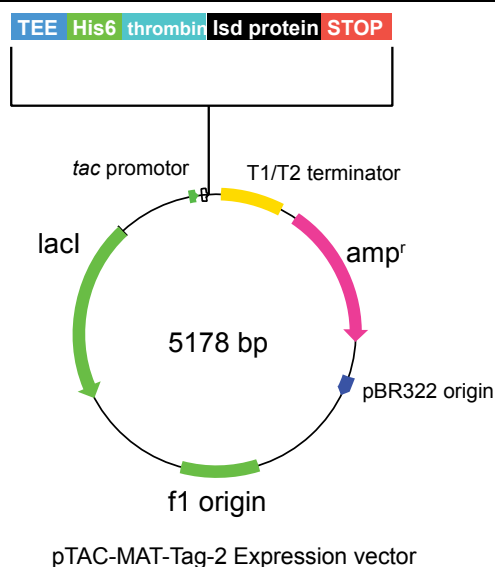


Figure 4.1 大腸菌 RP523 発現系にて使用したベクター設計図

4.2 菌体培養法（好気呼吸条件）

IsdH-NEAT3 の蛋白質発現に限り、経験的に後述の M9 培地を使って発現することにより、ヘムを含まない蛋白質を発現することが可能であった。また、ヘムと結合した蛋白質(holo 体)を多少含んでいても、陰イオン交換樹脂を使用した精製により apo 体と holo 体を分離することが可能であった。なお、IsdA, IsdC およびその変異体ではその分離が不可能であったため、嫌気呼吸条件で培養を行った。

作製した IsdH-NEAT3 発現ベクターをヒートショック法により大腸菌 Rosetta2 (DE3)株に導入した。kanamycin (Km)を終濃度 50 mg/L, chloramphenicol (Cp)を終濃度 34 mg/L 添加した LB 寒天培地上に 37°C で 12 時間ほど培養した後、100ml の LB 培地に植菌し 8 時間ほど 135 rpm で振盪培養した。この菌体を 5000g, 20°C, 10 分の条件で遠心分離し、LB 培地をきれいに取り除いた後、1L の M9 培地に植え継ぎ、37°C、135rpm ほど振盪培養した後、O.D.600 = 0.6 の時点で終濃度 0.5 mM となるように IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside)を添加して発現を誘導した。なお、それぞれの培地には Km, Cp をそれぞれ終濃度 50 mg/L, 34 mg/L となるように添加し、コンタミネーションが発生しないようにした。発現誘導後一晩振盪培養し、7000 g, 4 °C, 10 分ほど遠心分離によって集菌した後、菌体を超音波破碎し、40,000 g, 4 °C, 30 分の遠心分離によって完全に沈殿を除去することにより、可溶性画分に存在する目的蛋白質を回収した。蛋白質発現に使用したそれぞれの培地の成分を以下の **Table 4.1** と **Table 4.2** に記す。

Table 4.1 LB 培地の調製法

Trypton	10 g/L
Yeast Extract	5.0 g/L
NaCl	10 g/L
Agar (寒天培地のみ)	15 g/L

Table 4.2 M9 培地の調製法

Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	17.0 g
KH ₂ PO ₄	3.0 g
NaCl	5.0 g
NH ₄ Cl	1.0 g
Amino Acid 20 種	各 40 mg
Adenine	0.5 g
Thymine	0.16 g
Guanosine	0.66 g
Uracil	0.5 g
H ₂ O	Up to 1000 ml
オートクレーブ後に以下の試薬を加える	
40% Glucose	10 ml
1 M MgSO ₄	2.0 ml
1 M CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.1 ml
抗生物質	適量

4.3 菌体培養法（嫌気呼吸条件）

大腸菌は好気条件下の方が効率よく増殖できるものの、嫌気条件でも増殖することが可能である。さらにこの嫌気条件下ではヘムを生育に必要としないことが判明しており、ヘムの生合成に必要な酵素 *hemB* をノックアウトした株である大腸菌株 RP523 でも嫌気条件ならば増殖することが確認されている。このことから、作製した発現ベクターをヒートショック法により大腸菌 RP523 株に導入し、LB 寒天培地上で 37 °C, 12 時間ほど培養した後、密封ガラスびん中に 150 mL の TB 培地（Table 4.3）とスターラーを入れたものに植菌し、蓋をきつく締めて酸素が入らないようにした。この状態でガラスびんを 37°C で保温しつつ 100 rpm で 12 時間攪拌した。その後 2.5 L の TB 培地 + 0.4 % D-glucose に植え継ぎ、28 °C で保温した状態で攪拌し続け、O.D.₆₀₀ = 0.3 となったところで 1.0 mM IPTG を添加して発現を誘導させ、28 °C で 20 時間程度培養した。それぞれの培地にはコンタミネーションを防ぐために Ampicillin を終濃度 50 mg/mL となるように添加した。以降の大腸菌破碎方法および可溶性画分回収方法は IsdH-NEAT3 の場合と同様である。

Table 4.3 TB 培地の調製法

Tripton	12.0 g/L
Yeast Extract	24.0 g/L
K ₂ HPO ₄	9.4 g/L
KH ₂ PO ₄	2.2 g/L
Glycerol	4 mL/L 培地
H ₂ O	適量

4.4 蛋白質の精製

大量培養で回収した可溶性画分から、目的蛋白質だけを高い純度で獲得するため、金属キレートアフィニティークロマトグラフィー(IMAC)とサイズ排除クロマトグラフィー(SEC)を行った。まず IMAC では各目的蛋白質の N 末端についている His⁶-tag を利用し、Ni²⁺ イオンを配位させたカラム担体との親和性の違いを利用して粗精製を行った。オープンカラムに His・Bind Regin (Novagen)のカラム担体を 1 mL 充填させ、その後 NiCl₂ 溶液を使用してカラム担体に Ni²⁺イオンを配位させた。このカラムに各蛋白質上清画分を通し、目的蛋白質をカラムに吸着させた。この吸着させた蛋白質はいずれも 200 mM imidazole 入りの溶出バッファー (20 mM Tris-HCl pH 7.9, 500 mM NaCl, 200 mM imidazole) 5 mL を用いて溶出させた。この画分に目的蛋白質が含まれていることは、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)を用いて確認した。

続いて、それぞれの蛋白質の N 末端 His⁶-tag と目的蛋白質の間に存在する thrombin 認識配列 LVPRGS を利用し、Sigma-Aldrich から購入した thrombin 溶液を用いて両者を分断した。1 Unit/μL に調製し、-20 °C で保存してある thrombin 溶液を、IsdH-NEAT3 に対して 0.5 Unit/mg 蛋白質、IsdA、IsdC に対しては 1.5 Unit/mg 蛋白質となるよう添加し、37 °C で 12 時間 incubate することで切断した。切断は SDS-PAGE を用いて確認した。

以上の粗精製を行った後、最終精製として HiLoad 16/60 Superdex 200 prep grade(GE Healthcare Bio-Sciences Corp.)を用いたサイズ排除クロマトグラフィーを行った。緩衝液は用途に応じて 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 200 mM NaCl と、50 mM Tris-HCl pH 8.0 を使用した。

4.5 使用した金属ポルフィリン

実験で使用した各金属ポルフィリンは以下の通りである。Hemin (Fe³⁺-Cl⁻-PPIX; chlorohemin ; heme)は東京化成工業株式会社(Tokyo Chemical Industry Co. Ltd.)から、Mn³⁺-Cl⁻-protoporphyrin IX (以降 MnPPIX), Co³⁺-Cl⁻PPIX, Zn²⁺PPIX, Cu²⁺PPIX, Mg²⁺PPIX は Frontier Scientific Inc.から、それぞれ購入した。Ga(III) Protoporphyrin IX hydroxide (Ga³⁺PPIX) は以前報告されている論文に従い合成し⁷⁷、FPLC によって精製した。精製物の評価は ESI-MS, FTIR, UV-Vis によって行った。

4.6 変異体作製

後述する分子動力学シミュレーションの結果とあわせて、Isd-NEAT ドメインの共通する β 1b strand と 3_{10} -helix 二次構造の間に存在する“loop 1 領域”と名付けた領域のアミノ酸 (Figure 1.9A) を、それぞれ別の NEAT ドメインのアミノ酸配列に置換した変異体を作製した (Table 4.4)。すなわち、IsdC の loop 1 領域 (Tyr-39 から Thr-46) を IsdH-NEAT3 の対応する領域の配列 (Phe-555 から Glu-562) に置換したものを IsdC-(N-)loop 1H として作製した。また同様に IsdH-NEAT3 の loop 1 領域を IsdC 型に置換したものを IsdH-N3-loop1C として作製した。さらに、アラニン変異体として IsdC-E88A, IsdC-F130A を作製した。これらを作製するときに使用したプライマーセットは Table 4.5 に示した。

Table 4.4 Isd-loop キメラ変異体のアミノ酸配列^a

キメラ名	アミノ酸配列
IsdC-(N-)loop1H	30- DSGTLN YEV <u>FESEENSE</u> SIANDYF -53
IsdH-N3-loop1C	546- DVQEAHFV VYKY <u>NTND</u> TSVMDGFV -569

^a 下線部が置換したアミノ酸残基である。IsdC-N-loop1H は分子動力学シミュレーションに使用し、IsdC-loop1H と IsdH-N3-loop1C は *in vitro* の ITC 測定とヘム輸送解析に用いた。

Table 4.5 クローニングと変異体作製に用いたオリゴヌクレオチドのセット

		Sequence
IsdC-E88A	Forward	GCCAATATTATTAGTAAAAACACTGCCAAAGATGAACGCAC
	Reverse	TTTATGTCCTTCGATACTCATTCCAGTAATCC
IsdC-loop1H	Forward	TCAATTGCTAATGACTATTTTAATAAACCGGCAAAGTACATTA AG
	Reverse	CTCACTATTTTCTTCACTTTCAAAAACCTCATAATTCAAAGT ACCGCTATCTGCG
IsdC-F130A	Forward	GCCAAATATGACCATCATTACAACATTACATATAAATTTAATG GACC
	Reverse	TGGCTTTCCATTTACTTTTTCATCGATATAAACGTC
IsdH-N3-loop1C	Forward	TACAAATACAATACCAATGACACGTCAGTTATGGACGGCTTT GTTGAACATCCATTC
	Reverse	AACAACAAAATGCGCTTCTTGTAATCTGTTAATTG

^aE88A 変異体と全長 IsdC-loop1H キメラの組み合わせ体 (IsdC-E88A-loop 1H) は、IsdC-E88A と IsdC-loop1H を作製するときのプライマーセットを組み合わせで作製した。

4.7 等温滴定型熱量測定 (ITC)

4.7.1 ITC の原理

等温滴定型熱量測定 (Isothermal titration calorimetry ; ITC) は結合成分を標的分子に滴下した際に起こる化学反応もしくは結合反応を観測する熱力学的技法である。物質同士が結合する時には熱の発生もしくは吸収がおこるため、この熱量を測定することにより相互作用の結合定数 (K_a)、反応の結合比(n)、エンタルピー変化(ΔH)、およびエントロピー変化(ΔS)が精度良く得られる。試料への化学修飾や物理的固定化等を必要とせず、自然状態に近い環境下で測定することが可能である。また、1 回の実験で分子間相互作用の完全な熱力学的プロファイルを把握できることも特長の一つである。

ITC の装置内部には試料セルと参照セルが備わっており、任意の一定温度に保たれた試料セル中の標的分子溶液に対して、滴定シリンジ中のリガンド溶液を数マイクロリットルずつ逐次滴定する。リガンドが試料セル内へ滴定されて両物質が相互作用すると、結合量に正比例した熱の発生または吸収が起こる。リガンド滴定の進行に沿って試料セル中の標的分子の結合サイトが飽和され、熱シグナルは減少して最終的にリガンドの希釈熱のみが観測されるようになる(**Figure 4.2**)。Figure 4.3 はリガンド溶液を試料セル中の標的分子溶液へ合計 18 回にわたって滴下した時のデータを示しており、各滴定ピークの面積はその滴定によって発生した熱量に等しい。また、各滴定の発生熱量をセル中におけるリガンドと標的分子のモル比に対してプロットすることにより右図のような相互作用の結合等温線が得られる。この例の場合、カーブフィッティングには One-Set-of-Sites モデルを使用し、得られたベストフィットカーブを赤線で示した。各フィッティングパラメータから、結合定数、結合比、エンタルピー変化を求めることができる。詳細は以下に示す。

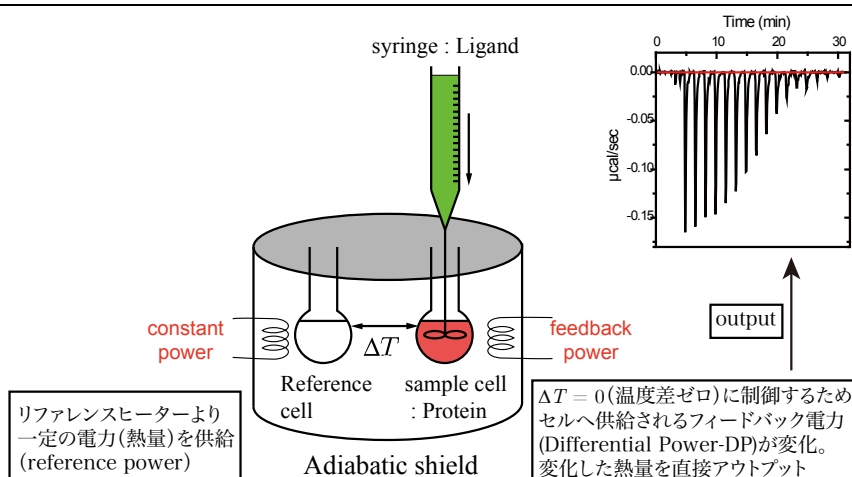


Figure 4.2 等温滴定型熱量測定装置と得られる ITC データ

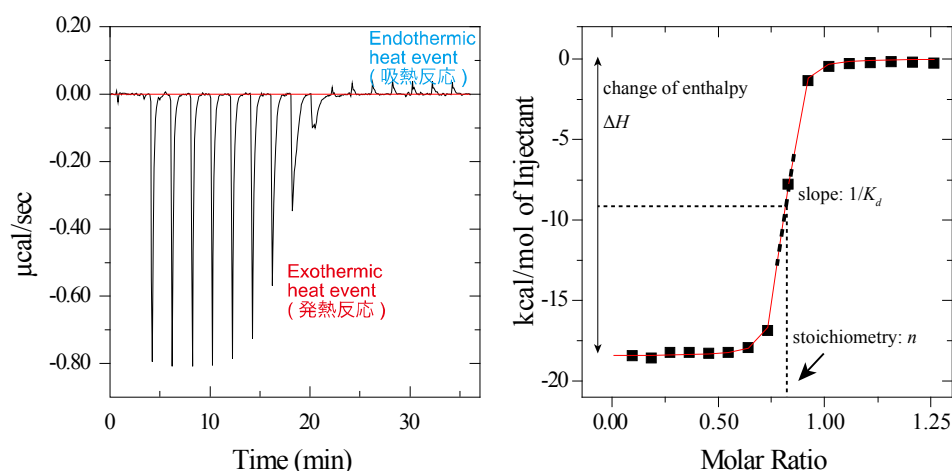


Figure 4.3 典型的な ITC データと結合等温線

滴定のデータから結合定数 K_a が以下の式より求められる⁷⁸。化学量論的に 1:1 の反応に対して、 $M + X = MX$ の結合平衡は次式で記述される。

$$K_a = \frac{[MX]}{[M][X]} \quad (4.1)$$

$$[X]_{tot} = [X] + [MX] \quad (4.2)$$

$$[M]_{tot} = [MX] + [M] = [MX] + \frac{[MX]}{K_a[X]} \quad (4.3)$$

ここで K_a は結合定数であり、 $[X]$ は X の濃度を表す。

MX 濃度の変化は、熱変化として次式と関連付けられる。

$$dQ = d([MX]) \cdot \Delta H^\circ \cdot V_0 \quad (4.4)$$

ここで ΔH° は結合のモルエンタルピー、 V_0 はセル容積、 Q は吸収または発生した熱量である。

以上 4 式より次式が導かれる。

$$\frac{d([MX])}{d[X]_{tot}} = \frac{1}{2} + \frac{1 - (1+r)/2 - X_r/2}{\sqrt{X_r^2 - 2X_r(1-r) + (1+r)^2}} \quad (4.5)$$

ここで、 $r = \frac{1}{K_a[M]_{tot}}$ 、 $X_r = \frac{[X]_{tot}}{[M]_{tot}}$ である。

滴定型カロリメータで測定される実験的パラメータは示差熱 $\frac{dQ}{d[X]_{tot}}$ (実際には $\frac{\Delta Q}{[X]_{tot}}$)

である。これらの値から化学量論比 n 、 ΔH° と K_a が測定後の解析 (deconvolution) によって求まる。また ΔH° と K_a が求められれば、次式よりギブスエネルギー ΔG° とエントロピー $-\Delta S^\circ$ が算出される。

$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ = -RT \ln K_a \quad (4.6)$$

4.7.2 測定の手順

各 Isd-NEAT ドメインと各金属ポルフィリン (heme, Mn-PPIX, Ga-PPIX) 間の熱力学的パ

ラメータを 25 °C の条件下で iTC 200 (GE Healthcare)を用いて決定した。apo 体の IsdH-NEAT3, IsdA-NEAT, 全長 IsdC, および全長 IsdC の変異体はすべて緩衝液(0.2 M NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0)で平衡化した。これらの蛋白質は大腸菌 RP523 の発現系を用いて、ヘムと結合していない状態で発現している。蛋白質はそれぞれ 5 v/v% のジメチルスルホキシド (DMSO) を含む状態で、濃度が 20 μ M となるよう、ITC 装置のセルにセットした。各金属ポルフィリンも同様に 5 v/v%の DMSO とともに 375 μ M になるよう、粉末から測定時に用時調製して測定装置のシリンジ側にセットした。また、IsdH-NEAT3 に関しては温度依存性を確認すべく 15 °C, 20 °C と 30 °C の条件でも測定を行った。結合の等温線はプログラム ORIGIN 7.0 を用いた one-site fitting でフィッティングを行ない、パラメータを決定した。

4.8 Isd 蛋白質間の金属ポルフィリン輸送測定

金属ポルフィリンの輸送は Liu らの手法に基づいて行った³⁴。金属ポルフィリンの結合した holo 体 IsdH-NEAT3 (14 μ M) と結合していない apo 体 IsdC (16 μ M) を 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.3) 1 mL で 1 または 2 分間混合したのち、ジエチルアミノエチルセファロース (DEAE Sepharose) カラムを用いてすぐに分離した。このとき IsdH-NEAT3 はカラムに吸着し、IsdC は溶出液に含まれた。IsdH-NEAT3 は 500 mM の NaCl 溶液によって別に回収した。金属ポルフィリンの輸送を確かめるべく、Jasco (Tokyo, Japan)の spectrophotometer を用いてそれぞれのソーレー帯の強度を測定した (ヘムは 403 nm; Ga(III)-PPIX は 413 nm; Mn(III)-PPIX は 375 nm⁷⁹)。

IsdC の変異体と IsdA 間のヘム輸送は、両蛋白質の等電点が近く、DEAE カラムによる分離が不可能であったため、サイズ排除クロマトグラフィーを用いて分離した。このとき、IsdA が実際の分子量と異なり、100.3 kDa の体積に溶出される性質を利用した⁸⁰。ヘムと結合している IsdC の変異体: IsdC-F130A と IsdC-E88A-loop 1H (16 μ M) を apo の全長 IsdA (16 μ M) と混合し、3.5 mL に調製したのち、50 mM Tris-HCl + 200 mM NaCl (pH 8.0) で平衡化されたカラム HiLoad 16/60 Superdex 200 (GE Healthcare)に投入して分離した。以降金属ポルフィリンの輸送は上記の様に UV-Vis を用いて行った。

第5章 計算機実験手法

5.1 分子動力学シミュレーションの概要

第2章で述べたように、統計力学の理論と計算機の計算速度の発展により、現在までの所ナノ秒～マイクロ秒スケールで蛋白質および水分子の時間変化をシミュレートすることが可能となっている。蛋白質の構造は各蛋白質に固有であり、現在のところ主に結晶構造解析と NMR によって構造決定されたデータが、Protein Data Bank (PDB) と呼ばれる国際的な公共データベースに保存されている。これらの構造データは蛋白質の最も安定的な構造を示していることが多く、分子動力学シミュレーションではこのデータをもとに初期構造を作成して利用する事が多い。

分子動力学シミュレーションを始める上で必要不可欠な情報はこの初期構造の他に力場・電荷のパラメータである。このうち 20 種類のアミノ酸または一部の脂質やイオンについては統一された力場および電荷パラメータが無償で提供されているため、簡単に利用可能である。しかし、リガンド分子は普遍的なパラメータ（特に電荷）がほとんど存在していないため、研究対象に合わせてそれぞれ用意する必要がある。電荷のパラメータ決定に現在よく用いられているのは 2.15 で述べた RESP 法である。これによってリガンドのパラメータを決定し、蛋白質とリガンドの初期情報を与えることが可能となる。

分子動力学シミュレーションにおいて、蛋白質ーリガンドの時間変化計算には GROMACS を、解析には AmberTools 13 を使用した。

5.2 モデル構築

IsdH-NEAT3³⁹, IsdB-NEAT2⁴⁰, IsdA-NEAT⁴¹, IsdC-NEAT⁴² のヘム結合状態 (holo 体) はすでに結晶構造が報告されている (それぞれ PDB accession code : 2Z6F, 3RTL, 2ITF, 2O6P)。ヘムの結合していない状態 (apo 体) は、IsdH-NEAT3 (PDB accession code : 2E7D), IsdA-NEAT (PDB accession code : 2ITE) の 2 つが報告されている。これらの構造情報を PDB からダウンロードし、holo 体の初期構造として用いた。apo 体のうち構造が報告されていない IsdB-NEAT2, IsdC-NEAT については holo 体構造のヘムを削除することで apo 体の初期構造とした。

IsdC-E88A, IsdC-F130A 変異体はソフトウェア PyMOL⁸¹ に実装されている “mutagenesis” 機能を用いて作製した。IsdC-loop1H キメラ体の作製は、はじめに PDB の IsdC-NEAT と IsdH-NEAT3 構造を PyMOL 上でそれぞれの Ca 原子を重ねあわせた上で、loop 1 領域に相当する部分の座標を入れ替えることによって達成した。

変異体を含むすべての蛋白質モデルの N 末端と C 末端はそれぞれアセチル基 (-COCH₃) と N-メチル基 (-NHCH₃) によってキャッピングを施した。ヒスチジン残基のイミダゾール基における水素は δ 位と ε 位の 2 つが存在するが、それぞれ結晶構造中の近接する原子間の距離をもとにどちらに存在するかを決定し、ともに水素が存在するかどうか (δ 位と ε 位) は PROPKA 3 を用いて決定した⁸²。

結晶構造中でヘムの鉄原子と配位結合しているチロシン残基 (IsdH-Y642, IsdB-Y440,

IsdA-Y166, IsdC-Y132) のフェノール基が水素を保持している状態では、テスト時に 2 つのチロシン(i.e. IsdH-Y642 と Y646)間の水素結合の維持を再現できなかったため、脱水素されたフェノール基を用いて holo 体、apo 体のシミュレーションを行った。水分子と電荷を中和するためのイオンは、各蛋白質モデルの周りにプログラム Solvate 1.0⁸³ を用いて配置した。その後、AmberTools の LEaP モジュールを用いて周囲 5 Å に水分子で満たされた溶媒ボックスを作成した。蛋白質には AMBER の ff99SB 力場⁸⁴ を、水分子には TIP3P モデル⁸⁵ を用いた。

5.3 RESP 法を用いた部分電荷の設定

上述の脱プロトンしているチロシン残基とヘムの部分電荷 (Cl⁻イオン結合状態を含む) は以下のようにして決定した。まず 4-メチルフェノキシド、ヘム-4-メチルフェノキシドおよびヘム-Cl⁻イオンの構造を Gaussian 09⁸⁶ を用いた密度汎関数法の B3LYP/6-31G(d)^{71,87} 理論レベルで最適化した (Figure 5.1)。このとき、いずれの Isd-NEAT ドメインにおいても結合時のヘムの鉄原子のスピンの状態は高スピン、すなわち multiplicity が 6 であるとして計算を行った^{35, 42, 80, 88}。続いてその分子周りの静電ポテンシャルを計算し、AmberTools に実装されている ANTECHAMBER モジュールの Restrained electrostatic potencial (RESP)⁶⁸ 法を用いて部分電荷を決定した。すなわち、apo 体と holo 体で、ヘムおよび脱プロトンしたチロシン残基にそれぞれ別の部分電荷を用いた。ヘムとそのチロシンの間の相互作用を記述する結合長、角度、二面角パラメータは、構造変化に伴うエネルギー変化から決定した。

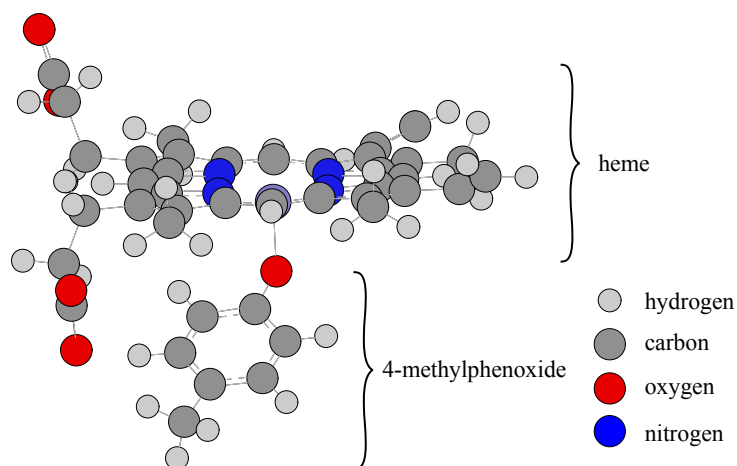


Figure 5.1 Gaussian 09 を用いて構造最適化をするヘム-4-メチルフェノキシド

5.4 分子動力学シミュレーションの設定

各分子動力学シミュレーションは以下のようにして行った。まず 5.2 で作製した溶媒ボックス内のうち、水分子とカウンターイオンの位置のみを 200 ステップの最急降下法 (2.14) によるエネルギー最小化で最適化した。次に系全体に 200 ステップのエネルギー最小化を

行なった。その後、系全体の重原子に調和的な位置拘束 ($10 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$) をかけながら温度・体積一定 (*NVT*) 条件で、200 ps のシミュレーション時間中で徐々に 10 K から 300 K へと温度を上げていった。続いて温度・圧力一定 (*NPT*) 条件での 800 ps のシミュレーション中に位置拘束を段階的に弱めていき、最終的に 300 K, $1.0 \times 10^5 \text{ Pa}$ の条件下で平衡化を行った。この間、SHAKE アルゴリズムによって水素原子が関わる結合長に拘束をかけ、2 fs のタイムステップをとることを可能にした。静電相互作用はカットオフ半径を 8 Å とした Particle Mesh Ewald (PME) 法によって計算し、温度は衝突頻度 (collision frequency) を 2.0 ps^{-1} とする Langevin dynamics によって制御を行った。また圧力は Berendsen の weak coupling 法⁵⁸を用いた。エネルギー最小化と平衡化は AMBER 11 の SANDER と PMEMD モジュールを用いてそれぞれ行った⁵⁴。

これら前準備の操作の後、ソフトウェア GROMACS 4.5.5⁸⁹を用いて温度 300 K、圧力 $1.0 \times 10^5 \text{ Pa}$ の条件下で各 NEAT ドメインの apo, holo 体に対し Production run を 200 ns ずつ行った。AMBER のトポロジーファイルから GROMACS 用のトポロジーファイルへの変換は ffAmber スクリプト⁹⁰を用いて行った。Production run の間、水素原子が関わる結合の拘束には P-LINCS アルゴリズムを、温度制御には Berendsen の方法を改良した V-rescale 法⁵⁶を用いた。

5.5 MD トラジェクトリの変換

Production Run 中における各原子の各タイムステップにおける位置情報・速度情報はトラジェクトリとしてファイルに出力されている。トラジェクトリのファイル形式は AMBER・GROMACS およびその他のソフトウェアにおいてそれぞれ独自のバイナリフォーマットを採用しているが、内包する情報は同じである。一方で、AmberTools には GROMACS と比較して様々な解析ツールが豊富に揃っているため、GROMACS のトラジェクトリのファイル形式から AMBER のファイル形式に変換することで AmberTools を利用することが可能になり、トラジェクトリの解析を行うことが容易となる (主に MM-PBSA)。

変換は次のようにして行われる。まず GROMACS のバイナリ形式のトラジェクトリファイル (.xtc) と初期構造ファイル (.gro) をソフトウェア VMD にロードする。VMD は様々なトラジェクトリファイルを読み込めるよう対応しているソフトウェアである。これを用いてアスキー形式に出力した後、再び AmberTools の (cp)ptraj モジュールを用いて再結合し、出力形式を AMBER のバイナリ形式である netcdf 形式にすることで達成する。ただし、変換途中で溶媒ボックスの周期境界条件 (PBC) を考慮する必要がある。この変換スクリプトは巻末の付録 (Appendix 1) に示した。

5.6 平均二乗偏差 (RMSD)

蛋白質構造は分子動力学シミュレーション中で溶媒分子や温度、圧力の影響から時間とともに変化する場合がある。このずれを数値で評価する指標として平均二乗偏差

(Root-mean-square deviation) が用いられることが多い。RMSD は 2 つの分子構造を最適に重ね合わせて、対応する各原子のずれの二乗を平均したものの平方根で定義される。すなわち、

$$\text{RMSD} = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (\mathbf{r}_i(t_1) - \mathbf{r}_i(t_2))^2} \quad (5.1)$$

ここで $\mathbf{r}_i(t_1)$ と $\mathbf{r}_i(t_2)$ はそれぞれ時間 t_1 と t_2 における粒子 i の座標である。 N は全粒子数である。 $\mathbf{r}_i(t_2)$ には初期構造 ($t_2 = 0$) を入れることが多い。

式(5.1)の RMSD は動きやすい水素原子の挙動も他の重原子の挙動も同じように評価する。これと比較して、質量の重みをつけた RMSD も存在する。

$$\text{RMSD} = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N m_i (\mathbf{r}_i(t_1) - \mathbf{r}_i(t_2))^2} \quad (5.2)$$

これは粒子 i の質量をつけることで、動きやすい水素原子のゆらぎの影響を小さくしたものであり、こちらの RMSD もよく使われる。AmberTools では前者が、GROMACS の解析ツールでは後者が標準となっている。

5.7 Root-mean-square fluctuation (RMSF)

RMSD に対し、ある粒子 i の座標 $\mathbf{r}_i(t_j)$ とリファレンス座標 $\bar{\mathbf{r}}_i$ 間の分散を表す指標として Root-mean-square fluctuation (RMSF) が存在する。

$$\text{RMSF} = \sqrt{\frac{1}{T} \sum_{t_j=1}^T (\mathbf{r}_i(t_j) - \bar{\mathbf{r}}_i)^2} \quad (5.3)$$

ここで T はサンプリング時間であり、リファレンス座標 $\bar{\mathbf{r}}_i$ にはサンプリング時間中の平均座標を用いることが多い。すなわち、RMSD はあるタイムステップにおけるリファレンス構造からの全原子のずれの平均値を、RMSF はある粒子におけるリファレンス構造からの全サンプリング時間内の分散の値を、それぞれ与えることになる。

5.8 主成分分析 (PCA)

主成分分析 (Principal component analysis; PCA) は、次元削減や非可逆データ圧縮、特徴抽出などに広く使われている統計学的手法である。主成分分析は、主部分空間 (principal subspace) と呼ばれる低次元の線形空間の上への、データ点の直交射影として定義できる⁹¹。この直交射影は、射影されたデータの分散が最大化されるように定める。結果は等価であるが、主成分分析はまた、もともとのデータ点と射影した点の間の 2 乗距離の平均値で定義される射影のコスト関数の期待値を最小化するような線形射影としても定義できる⁹²。

この統計的手法を蛋白質の分子動力学シミュレーションに応用する方法が 1990 年代から北尾らによって始められた⁹³。構造生物学では、分子動力学シミュレーションによるトラジェクトリから生体分子の特徴的な動きを抽出するのに PCA が活用できるということである。この手法は 1984 年に Levy による quasi-harmonic 近似法に基本的に則っている^{94,95}。

まず対象分子の MD トラジェクトリ内の動きの並進運動・回転運動を重ねあわせによって取り除くと、各分子の基準位置からの分散は「ゆらぎ (fluctuation)」として表れるようになり、分散共分散行列 (variance-covariance matrix) によって数値的に表現できる。もしポテンシャル曲面 (potential surface) が厳密に調和的であれば、分布は正規分布になり、通常の座標空間に対し非対角成分を持つことはないはずである。しかし現実にはそうではないので、分散共分散行列を対角化することで主成分を定義する。蛋白質の動きを支配する大きなスケールのゆらぎは、分散が大きな主成分に相当する。すなわち、分散共分散行列から得られる第 1 主成分、第 2 主成分……がそれぞれ蛋白質の動きを最もよく表すベクトルとなる。

N 原子からなる蛋白質に対して PCA を行うとき、 K フレーム存在する MD トラジェクトリは $(3N-6)$ 次元空間内の K データ点として扱われる。6 は並進・回転の自由度を除くためである。ここで D を $3N \times K$ の行列で、成分 D_{ia} を時刻 t_a における質量重み付き座標 $\mathbf{X}_i(t_a)$ の時間平均座標 $\langle \mathbf{X}_i \rangle$ からの分散値であるとする。すなわち

$$\mathbf{X}_i(t) = \sqrt{m_i} \mathbf{r}_i(t), \quad D_{ia} = \mathbf{X}_i(t_a) - \langle \mathbf{X}_i \rangle \quad (5.4)$$

ここで m_i は粒子 i の質量、 $\mathbf{r}_i(t)$ は時刻 t における粒子 i の座標である。次に $3N \times 3N$ の分散共分散行列 C は次のように定義される。

$$C = \frac{1}{K} DD^T \quad (5.5)$$

PCA を行う上で、まずこの C を対角化する。対角化とは、行列 C の複数の主成分ベクトルを列とする行列 U (j 番目の列ベクトル \mathbf{u}_j は j 番目の主成分である) を用いて、

$$\Sigma = U^T C U = \begin{pmatrix} \lambda_1 & & & 0 \\ & \lambda_2 & & \\ & & \ddots & \\ 0 & & & \lambda_{3N} \end{pmatrix} \quad (5.6)$$

とすることである。ここで、 λ_j は j 番目の固有ベクトル \mathbf{u}_j に対する固有値である。この操作は計算機による「特異値分解」や「スペクトル分解」のアルゴリズムを利用することが多い。

主成分ベクトル \mathbf{u}_j は正規直交基底なので

$$UU^T = I \quad (5.7)$$

であるから、式(5.6)と式(5.7)から

$$CU = U\Sigma \quad (5.8)$$

となる。固有値 λ_j は j 番目の主成分に対する分散を表すので、言い換えればその方向への平均二乗ゆらぎ (mean-square fluctuation) である。

5.9 Schlitter の振動エントロピー推定

1993 年に、Schlitter は分子動力学シミュレーション内の分子の振動エントロピーを、統計

力学の原理と分散共分散行列を用いて見積もる方法を提唱した⁹⁶。これによれば、まず量子力学系ではエネルギー E_n は離散的な値しか許されず、温度 T におけるカノニカル分配関数は以下のように表される。

$$Z = \sum_n \exp\left(-\frac{E_n}{k_B T}\right) = \sum_n e^{-\beta E_n} \quad (5.9)$$

ここで E_n は量子力学で対応する n 番目のエネルギー固有値である。このとき、統計力学的にはエントロピーは確率 $p_n = \exp(-\beta E_n) / Z$ ($\beta = 1 / k_B T$) を用いて

$$S = -k_B \sum_n p_n \ln p_n \quad (5.10)$$

と表される。次に、簡単のため、1次元座標上に存在する質量 m の点を仮定し、平均座標は 0 ($\langle x \rangle = 0$)、分散は $\langle x^2 \rangle$ で表される系を考える。これは

$$\langle x^2 \rangle = \sum_n p_n x_n^2 \quad (5.11)$$

である。ここで、 $\langle x^2 \rangle$ が与えられていると仮定し、 p_n を変えることでエントロピー S の上限値を見積もることを考える。これは $\sum_n p_n x_n^2 = \langle x^2 \rangle$ 、 $\sum p_n = 1$ の拘束条件下での Lagrange の未定乗数法を用いると、

$$\begin{cases} f(p_1, p_2, \dots, p_n) = -k_B \sum_{k=1}^n p_k \ln p_k (= S) \\ g(p_1, p_2, \dots, p_n) = \sum_{k=1}^n p_k x_k^2 - \langle x^2 \rangle = 0 \\ h(p_1, p_2, \dots, p_n) = \sum_{k=1}^n p_k - 1 = 0 \end{cases} \quad (5.12)$$

$$\therefore \frac{\partial}{\partial p_i} (f + \lambda g + \mu h) = 0 \iff (\ln p_n + 1) + \lambda x_n^2 + \mu = 0$$

の式が得られ、これを確率とエネルギーの式 $p_n = \exp(-\beta E_n) / Z$ ($\beta = 1 / k_B T$) を用いて書き換えると、

$$\beta E_n - \lambda x_n^2 = \mu - \ln Z + 1 \quad (5.13)$$

となる。この式はエントロピー S が極値をとるのは、式(5.13)で右辺全体の定数項を考慮しなければ、各状態 n におけるエネルギー E_n と分散 x_n^2 が比例関係（比例定数 λ / β ）にあるときであることを示している。これは角振動数 ω の調和振動子 (harmonic oscilation) のハミルトニアンを導入し、

$$H = \frac{1}{2} \left(\frac{p^2}{m} + m\omega^2 x^2 \right) \quad (5.14)$$

とすれば（この p は運動量である）、エネルギーは

$$E_n = m\omega^2 x_n^2 = \hbar\omega \left(n + \frac{1}{2} \right) \quad (5.15)$$

で表される。ところで、1つの調和振動子のエントロピー S_{ho} は、まず式(5.10)から

$$\begin{aligned}
S_{\text{ho}} &= -k_{\text{B}} \sum_n p_n \ln p_n = -k_{\text{B}} \left(\beta \sum_n p_n E_n - \sum_n p_n \ln Z \right) \\
&= k_{\text{B}} \beta \{U - U(0)\} + k_{\text{B}} \ln Z
\end{aligned} \tag{5.16}$$

である。ここで U は内部エネルギーである。

これについては、

$$\begin{aligned}
U - U(0) &= \sum_i E_i = \frac{1}{Z} \sum_i E_i e^{-\beta E_i} = -\frac{1}{Z} \sum_i \frac{d}{d\beta} e^{-\beta E_i} \\
&= -\frac{1}{Z} \frac{d}{d\beta} \sum_n e^{-\beta E_n} = -\frac{1}{Z} \left(\frac{\partial Z}{\partial \beta} \right)_V
\end{aligned} \tag{5.17}$$

が導けるので、調和振動子の分配関数 $Z = \frac{1}{1 - e^{-\beta E_n}}$ を用いると、

$$\begin{aligned}
S_{\text{ho}} &= -k_{\text{B}} \beta \frac{E_n e^{-\beta E_n}}{1 - e^{-\beta E_n}} - k_{\text{B}} \ln(1 - e^{-\beta E_n}) \\
&= k_{\text{B}} \left[\frac{\alpha}{e^\alpha - 1} - \ln(1 - e^{-\alpha}) \right]
\end{aligned} \tag{5.18}$$

となる。この式は広く知られている。ここで \hbar はプランク定数 h を 2π で割ったもの、 $\alpha = \hbar\omega / k_{\text{B}}T = \beta E_n$ である。

さて、実際の振動数 ω は量子力学の $\langle x^2 \rangle$ と関連しているが、分子動力学シミュレーション中では古典的な分散 $\langle x^2 \rangle_c$ しか利用できないため、この物理量から振動数 ω を見積もる近似を導入する必要がある。つまり、

$$m\omega^2 \langle x^2 \rangle_c = k_{\text{B}}T \tag{5.19}$$

という関係式を導入する。これは $\hbar\omega \ll k_{\text{B}}T$ ($\alpha \ll 1$) という古典極限のもとに行われているが、ほとんどの場合においてよい近似となる。

多粒子系における問題に応用するため、*ad hoc* な近似をさらに導入する。

$$S \leq S_{\text{ho}} < S' = \frac{k_{\text{B}}}{2} \ln \left(1 + \frac{e^2}{\alpha^2} \right) \tag{5.20}$$

ここで e は $\exp(1)$ である。この式は、 $\alpha \rightarrow \infty$ のときに $S' \rightarrow 0$ を満たし、かつ $\alpha \rightarrow 0$ の極限において

$$\begin{aligned}
&\lim_{\alpha \rightarrow 0} S' \rightarrow k_{\text{B}}(1 - \ln \alpha) \\
&\left(\because \lim_{\alpha \rightarrow 0} \ln \left(1 + \frac{e^2}{\alpha^2} \right) = \lim_{\alpha \rightarrow 0} (\ln(\alpha^2 + e^2) - 2\ln \alpha) = 2(1 - \ln \alpha) \right)
\end{aligned} \tag{5.21}$$

となる。これは式(5.18)において

$$\lim_{\alpha \rightarrow 0} S_{\text{ho}} \rightarrow k_B(1 - \ln \alpha)$$

$$\left(\because \lim_{\alpha \rightarrow 0} \frac{\alpha}{e^\alpha - 1} = 1, \quad \frac{1 - e^{-\alpha}}{\alpha} > 0, \quad \lim_{\alpha \rightarrow 0} (\ln(1 - e^\alpha) - \ln \alpha) = 0 \right) \quad (5.22)$$

となるので、それぞれの極限が一致するよう「適当に」設定されたものである。

さて式(5.20)を

$$\frac{1}{\alpha^2} = \frac{k_B^2 T^2}{\hbar^2 \omega^2} = \frac{mk_B T}{\hbar^2} \cdot \frac{k_B T}{m\omega^2} = \frac{mk_B T}{\hbar^2} \langle x^2 \rangle_c \quad (5.23)$$

という式変形を用いて書き換えると

$$S' = \frac{k_B}{2} \ln \left(1 + \frac{e^2}{\alpha^2} \right) = \frac{k_B}{2} \ln \left(1 + \frac{k_B T e^2}{\hbar^2} m \langle x^2 \rangle_c \right) \quad (5.24)$$

となる。

多粒子系のエントロピーを求める際はこの分散の部分に **5.8** 主成分分析 (PCA) で用いた (質量重み付き) 分散共分散行列を用いればよい。先述の通り、対角化した分散共分散行列 Σ の固有値は λ_j は j 番目の主成分に対する分散なので、

$$S' = \frac{k_B}{2} \sum_{j=1}^n \ln \left(1 + \frac{k_B T e^2}{\hbar^2} m \lambda_j \right)$$

$$= \frac{k_B}{2} \ln \left(\prod_{j=1}^n \left(1 + \frac{k_B T e^2}{\hbar^2} m \lambda_j \right) \right) \quad (5.25)$$

となる。この式は対角化した行列の対角成分の積を利用しているが、これは質量重み付き分散共分散行列 C の行列式 determinant と固有値との関係を使えば

$$S < S' = \frac{k_B}{2} \ln \det \left[\mathbf{I} + \frac{k_B T e^2}{\hbar^2} \mathbf{C} \right] \quad (5.26)$$

と等価である。(質量重み付きでない) 分散共分散行列 σ_{ij} と質量行列 \mathbf{M} を用いる場合は

$$\sigma_{ij} = \langle (x_i - \langle x_i \rangle) (x_j - \langle x_j \rangle) \rangle \quad (5.27)$$

の上で、

$$S < S' = \frac{k_B}{2} \ln \det \left[\mathbf{I} + \frac{k_B T e^2}{\hbar^2} \mathbf{M} \sigma \right] \quad (5.28)$$

となる。

なお、導出過程で見た通り、式(5.20)は Schlitter が「適当」に定めたものなので、さらによい近似が存在する。2001 年には Andricioaei と Karplus らにより、さらに良い精度の近似式が発表されている⁹⁷。

$$S < S'' = k_B + \frac{k_B}{2} \ln \det \left[\frac{1}{12} \mathbf{I} + \frac{k_B T}{\hbar^2} \mathbf{M} \sigma \right] \quad (5.29)$$

また、標準振動解析との違いは以下の **Figure 5.2** のように示される。

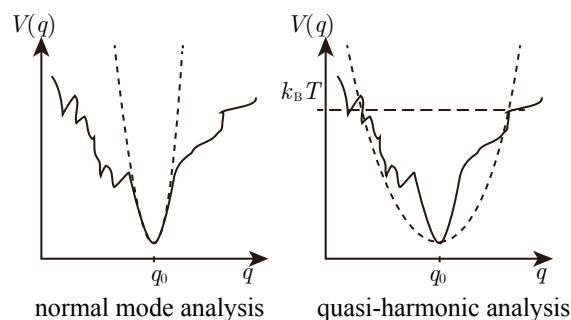


Figure 5.2 標準振動解析（左）と quasi-harmonic（右）解析の図解。標準振動解析ではある 1 点 q_0 （通常停留点）周辺で、ポテンシャルエネルギー面 $V(q)$ の曲率に基づいてローカルな配置空間 (configurational space) q の探索を行う。Quasi-harmonic 解析は与えられた温度 $k_B T$ での分子系に到達可能な配置空間をグローバルに探索し、調和的（2 次関数的）に近似する。

並進エントロピー S_{trans} ・回転エントロピー S_{rot} は上述の振動エントロピー S_{vib} とともに、エントロピーの構成要素である。電子状態の寄与 S_{elec} は分子動力学シミュレーションでは考慮しない。

理想気体のそれぞれのエントロピーの計算は 1912 年の Sackur-Tetrode の式から、

$$S_{\text{trans}} = R \left[\frac{5}{2} + \ln \left\{ \left(\frac{2\pi m k_B T}{h^2} \right)^{3/2} \frac{V}{N_A} \right\} \right] \quad (5.30)$$

$$= R \left(\frac{3}{2} \ln M + \frac{5}{2} \ln T - \ln P + 10.36122 \right)$$

$$S_{\text{rot}} = R \left[\frac{3}{2} + \ln \left(\frac{8\pi^2 k_B T}{h^2} \right)^{3/2} \frac{(\pi I_A I_B I_C)^{1/2}}{\sigma} \right] \quad (5.31)$$

ここで R は気体定数、 M は分子量 [g mol^{-1}]、 P は圧力 [Pa]、 h はプランク定数、 σ は分子の対称数、 I_A, I_B, I_C はそれぞれ互いに直交する分子の各主軸の慣性モーメントである。

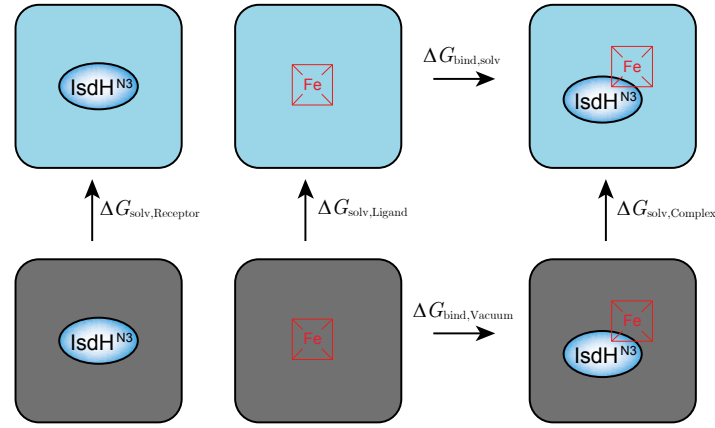
5.10 MM-PB/SA 法と結合自由エネルギー変化の推定

リガンドと受容体がどれほど結合しやすいかを定量（熱力学）的に見積もることは、新規薬剤の開発や、既存の薬剤分子の高機能化を戦略的に進める上で、非常に重要となる。ここではリガンドと受容体がどのような形で結合するのかがおおよそ既知である場合の結合自由エネルギー変化の推定について述べる。

まず結合自由エネルギー (ΔG_{bind}) はリガンドと受容体が結合している複合体 (complex) の自由エネルギーから、リガンド・受容体がそれぞれ独立に存在しているときの自由エネルギーの合計を差し引くことで求まる。そして溶媒中の状態 X (complex, ligand, receptor) の自由エネルギー ΔG_{tot}^X は、一般に

$$\Delta G_{\text{tot}}^X = E_{\text{vac}}^X + \Delta G_{\text{solv}}^X - T \Delta S_{\text{MM}}^X \quad (5.32)$$

という形で表すことができる。ここで $E_{\text{vac}}^{\text{X}}$ は溶質分子の真空中(気相中)のエネルギーで、 $\Delta G_{\text{solv}}^{\text{X}}$ は溶媒和自由エネルギーである。 $T\Delta S_{\text{MM}}^{\text{X}}$ はエントロピー変化であり、前項までのエントロピー推定の方法で求める。



$$\Delta G_{\text{bind,solv}} = \Delta G_{\text{bind,Vacuum}} + \Delta G_{\text{solv,Complex}} - \Delta G_{\text{solv,Ligand}} - \Delta G_{\text{solv,Receptor}}$$

Figure 5.3 MM-PB(GB)/SA 法の図解。溶液中での $\Delta G_{\text{bind,solv}}$ を、Receptor,Ligand, Complex それぞれの溶媒和自由エネルギーを用いて間接的に求める。溶媒和自由エネルギーの計算に PB/SA 法や GB/SA 法を用いる。

Molecular Mechanics–Poisson–Boltzmann/surface area (MM–PB/SA)または Generalized Born/surface area⁶³ 法は、この溶媒和自由エネルギーを計算するための方法である。**2.11** で GB モデルに関する説明を行った。PB/SA 法は式(2.49)で見たように静電的寄与 ΔG_{pol} と非静電的寄与 ΔG_{nonpol} に分けて計算する点は同じであるが、 ΔG_{pol} を Poisson–Boltzmann 方程式の解法を一般化し、解析的に計算する。

Poisson–Boltzmann 式の導出を行う。まず、クーロンの法則から、真空中の粒子 i と粒子 j の間に働く静電エネルギーは

$$G_{ij} = \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \frac{q_i q_j}{r_{ij}} \quad (5.33)$$

である。続いて、粒子 j の影響による粒子 i の位置の静電ポテンシャル（電位）は

$$\phi_i = \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \frac{q_j}{r_{ij}} \quad (5.34)$$

ここで、 q_j は粒子 j の電荷、 ϵ_0 は真空での誘電率、 r_{ij} は粒子 i と j の間の距離である。以降、物体の誘電率を ϵ とする。

さて、蛋白質のような分子は外部の静電場によって再配向することが難しく、水素結合ネットワークなどによって双極子の化学基が固定されているため、低い誘電率を持つ（およそ 2~4 程度）。一方で、水分子はとても高い誘電率を持つ（80）。これは双極子が自由に再配向できるためである。したがって、水溶液中の分子は 2 つの異なる誘電率媒体を持った系を与えることになる。この違いによる大きな影響は無視できるものではないため、静電モデルを用いて記述されることになる。Poisson–Boltzmann 方程式はそのような水溶液中

の分子のふるまいを記述するのに良いモデルとされている。

座標 \mathbf{r} の関数としての電場 $E(\mathbf{r})$ と電束密度 (電気変位) $D(\mathbf{r})$ は次のように定義される。

$$E(\mathbf{r}) = -\nabla \cdot \phi(\mathbf{r}) \quad (5.35)$$

$$D(\mathbf{r}) = \varepsilon(\mathbf{r}) \cdot E(\mathbf{r}) = -\varepsilon(\mathbf{r}) \cdot \nabla \cdot \phi(\mathbf{r}) \quad (5.36)$$

ここで $\phi(\mathbf{r})$ は静電ポテンシャル (いわゆる電位)、 $\varepsilon(\mathbf{r})$ は座標に依存する誘電率の関数である。

電荷および不均一な誘電体が存在する系において、Poisson の式は電荷密度 $\rho(\mathbf{r})$ を用いて

$$\nabla \cdot D(\mathbf{r}) = 4\pi\rho(\mathbf{r}) \quad (5.37)$$

と表せる。ここで式(5.36)を用いれば

$$\nabla \cdot [\varepsilon(\mathbf{r}) \cdot \nabla \cdot \phi(\mathbf{r})] = -4\pi\rho(\mathbf{r}) \quad (5.38)$$

と書き直すことができる。

電荷密度 $\rho(\mathbf{r})$ は2つの項に分解できて、

$$\rho = \rho_{\text{int}} + \rho_{\text{ext}} \quad (5.39)$$

ここで、 ρ_{int} は分子内の固定された全電荷の位置の内部電荷分布である。 ρ_{ext} は外部の電荷分布であり、これによって溶液内の電気ポテンシャルに対応する溶液内イオンの再配置を説明できる。

この外部電荷の密度 ρ_{ext} は Boltzmann 分布を用いてモデル化されることが可能である。これはいくつかのリーズナブルな仮定の上になりたっている。相互作用する粒子で構成される複雑系において、ある任意の粒子の電荷密度 $\rho(\mathbf{r})$ は、系中の他の粒子たちによる相互作用がないとした状態でのその粒子の電荷密度 $\rho_0(\mathbf{r})$ についての比で表されるとするものである。すなわち、

$$\rho(\mathbf{r}) = g(\mathbf{r})\rho_0(\mathbf{r}) \quad (5.40)$$

実際の電荷密度とその粒子の平均密度との比である $g(\mathbf{r})$ は粒子の分布関数である。この分布関数からもたらされる有用な知見として、次の式から定義される、粒子についての potential of mean force $w(\mathbf{r})$ がある。Potential of mean force とは、自由エネルギーを反応座標に沿ってプロットしたもののことである。

$$g(\mathbf{r}) = e^{-\frac{w(\mathbf{r})}{k_b T}} \quad (5.41)$$

イオン性の系において、イオンは正、負に応じてそれぞれ平均のポテンシャルが高いまたは低い箇所に存在しようとする。この文章にはいくつかの注意点があり、イオンの存在する系においては、静電相互作用は遮蔽され、溶質に起因する静電効果は 10~20 Å に制限されてしまう。したがってイオンにとっては該当分布のゆらぎがないような大きな空間が存在することにある (溶質の濃度に依存する)。言い換えれば、ポテンシャルエネルギーの低い領域に向かう傾向は、エントロピーによって効率よくバランスが保たれている。

ポテンシャルについての等式を得るためになさなくてはならない重要で合理的な仮定が存在する。イオンの potential of mean force はイオン電荷によって乗算された平均静電ポテン

シャルと等しいはずであるということである。つまり、

$$w(\mathbf{r}) = qz\phi(\mathbf{r}) \quad (5.42)$$

この仮定を不均一な媒体での Poisson 式について定式化することで、非線形微分方程式である Poisson–Boltzmann 式を得ることになる。

$$\nabla \cdot [\varepsilon(\mathbf{r}) \cdot \nabla \cdot \phi(\mathbf{r})] = -4\pi\rho_{\text{int}}(\mathbf{r}) - 4\pi\lambda(\mathbf{r}) \sum_i c_{0i} qz_i \cdot e^{-\frac{qz_i\phi(\mathbf{r})}{k_B T}} \quad (5.43)$$

ここで $\rho_{\text{int}}(\mathbf{r})$ は溶質の電荷分布、 c_{0i} は溶質から無限遠におけるイオン i の濃度、 qz_i はイオン i の正負記号付きの電荷を表す (z_i が価数を表す)。 $\lambda(\mathbf{r})$ は Stern layer masking function と呼ばれる、座標 \mathbf{r} におけるイオンへのアクセシビリティを表す関数である (後述)。対称型電解質 (NaCl など、イオンの価数と数のペアが等しい) の場合、 ρ_{ext} の項は次のように書き直せる。

$$\begin{aligned} \rho_{\text{ext}} &= qz_i(c_+ - c_-) = cqz_i \left\{ e^{-\frac{qz\phi(\mathbf{r})}{k_B T}} - e^{-\frac{(-qz)\phi(\mathbf{r})}{k_B T}} \right\} \\ &= -2cqz \sinh\left(\frac{qz}{k_B T} \phi(\mathbf{r})\right) \end{aligned} \quad (5.44)$$

ここで、 c_+ 、 c_- はそれぞれ拡散層での正・負のイオンの濃度であり、無限遠でのイオンの

濃度 c_0 を用いて $c_+ = c_{0+} \cdot e^{-\frac{qz\phi(\mathbf{r})}{k_B T}}$ 、 $c_- = c_{0-} \cdot e^{-\frac{(-qz)\phi(\mathbf{r})}{k_B T}}$ となる。これを式 (5.43) に当てはめて

$$\nabla \cdot [\varepsilon(\mathbf{r}) \cdot \nabla \cdot \phi(\mathbf{r})] = -4\pi\rho_{\text{int}}(\mathbf{r}) + 4\pi\frac{\kappa^2}{C}\lambda(\mathbf{r})\sinh(C\phi(\mathbf{r})) \quad (5.45)$$

が得られる。ここで、 $\kappa^2 = \frac{2(qz)^2 c_0}{k_B T}$ 、 $C = \frac{qz}{k_B T}$ である。特に、

$$\frac{1}{l_D^2} = \frac{4\pi}{\varepsilon(\mathbf{r})} \kappa^2 = \frac{8\pi q^2 z^2 c_0}{k_B T \varepsilon(\mathbf{r})} \quad \therefore l_D = \sqrt{\frac{k_B T \varepsilon(\mathbf{r})}{8\pi q^2 z^2 c_0}} \quad (5.46)$$

で定義される l_D は Debye の遮蔽距離と呼ばれる。前述のように水中の場合は $\varepsilon(\mathbf{r}) = 80$ 程度である。

シュテルンの電気二重層モデルでは、溶質の物体表面から一定距離 b 以内をシュテルン層 (Stern layer) と呼び、この中では電位は直線的に変化する。拡散層 ($|\mathbf{r}| > b$) では先の式に従うとする (Figure 5.4)。すなわち $\lambda(\mathbf{r})$ は、

$$\lambda(\mathbf{r}) = \begin{cases} 0 & (0 < |\mathbf{r}| \leq b) \\ 1 & (|\mathbf{r}| > b) \end{cases} \quad (5.47)$$

である。なお、 b の値は AmberTools のインプット値 `iprob` で決定される (デフォルト値は 2.0 Å)。

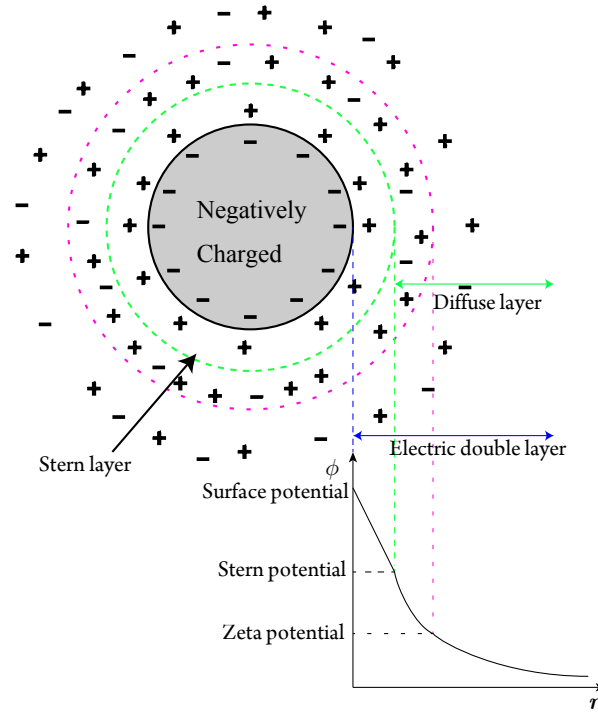


Figure 5.4 Stern の電気二重層モデル。イオンの存在する水中に分散するコロイド粒子の表面付近に、反対のイオンが特異吸着するイオン層（Stern layer）がある。Stern 層の間では電位は直線的に変化する。Stern 層と拡散層の間の電位はゼータ電位と呼ばれる。

さて、仮定として拡散層における電荷密度とイオン濃度 c_0 が低い場合、次のように線形化することで計算を簡単にすることができる。

$$\nabla \cdot [\varepsilon(\mathbf{r}) \cdot \nabla \cdot \phi(\mathbf{r})] = -4\pi\rho_{\text{int}}(\mathbf{r}) + \kappa^2\phi(\mathbf{r}) \quad (5.48)$$

非線形の Poisson–Boltzmann 式における静電的な自由エネルギーは次のように書ける。

$$G = \int \rho_{\text{int}}\phi(\mathbf{r}) - \frac{\varepsilon(\mathbf{r})}{2}(\nabla \cdot \phi(\mathbf{r}))^2 - \kappa^2(\cosh \phi(\mathbf{r}) - 1)\lambda(\mathbf{r})dV \quad (5.49)$$

$\phi(\mathbf{r})$ が十分に小さい場合、 $\cosh \phi(\mathbf{r}) \rightarrow 1$ なので右辺の第 3 項は 0 となる。また第 2 項はガウスの法則から

$$-\int \frac{\varepsilon(\mathbf{r})}{2}(\nabla \cdot \phi(\mathbf{r}))^2 = \int \frac{\phi(\mathbf{r})}{2} \nabla \cdot [\varepsilon(\mathbf{r}) \cdot \nabla \cdot \phi(\mathbf{r})] \quad (5.50)$$

であるため、最終的によく知られた線形的な Poisson–Boltzmann 式

$$G = \frac{1}{2} \int \rho_{\text{int}}(\mathbf{r})\phi(\mathbf{r})dV \quad (5.51)$$

が得られる。よって真空中との Poisson–Boltzmann 式による差分は

$$\Delta G_{\text{pol}} = \frac{1}{2} \int [\phi(\mathbf{r}) - \phi_{\text{vac}}(\mathbf{r})]\rho_{\text{int}}(\mathbf{r})dV \quad (5.52)$$

となる。

ε_{int} と ε_{ext} は本研究ではそれぞれ 1.0, 80.0 とした。また溶媒分子のプローブ半径は 1.4 Å、鉄原子の静電半径は 1.4 Å とした。

非静電的寄与 ΔG_{nonpol} の計算には以下の式を用いた。

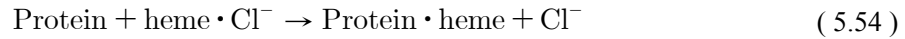
$$\Delta G_{\text{nonpol}} = \gamma \text{SASA} + b \quad (5.53)$$

ここで γ と b はそれぞれ 0.00378, -0.5692 とした (AmberTools 13 のデフォルト値)。

以上の式を用いて、それぞれ MD トrajジェクトリの各フレームに対し計算を行うことで分子動力学シミュレーション中の構造変化にも対応しつつ各エネルギーを算出した。それぞれ 200,000 ps のうちはじめの 10,000 ps を除いて 10 ps ごとにフレームを取得し、計 19,000 フレームについて計算を行った。

5.11 エネルギー補正項の算出

分子動力学シミュレーションは本来化学結合の生成および開裂は考慮しない。これに則る MM-PB/SA 法も原則として化学結合の生成及び開裂の際に生じるエネルギーは計算できない。しかし本研究の蛋白質は 1 つのチロシンとヘムの鉄の間に配位結合が生じている。また、ヘムは溶液中では Cl^- イオンと結合している。すなわち反応式は



となり、MM-PB/SA もこれにしたがってエネルギーを算出しなければならない。

これに対応すべく、まず holo 体の分子動力学シミュレーションに備えて、チロシンとヘムの間の配位結合を調和的に近似した。**5.3** で行った Gaussian 09 でのエネルギー算出に加え、チロシンとヘムの間の距離を少しずつ変えながらエネルギーを算出することで、停留点周りの標準振動解析を行い、振動子の力の定数を決定した。

力のパラメータをチロシンーヘム間の結合に適用して holo 体の分子動力学シミュレーションを行うが、MM-PB/SA のときにはチロシンーヘム間の配位結合は仕様上、古典力学(MM)的に考慮されてしまう。このため、結合生成を含めた正しい ΔG_{bind} の計算式は以下のようになる。

$$\begin{aligned} \Delta G_{\text{bind}} = & E_{\text{MM}}(\text{Protein-heme}) - TS(\text{Protein-heme}) \\ & + \Delta G_{\text{solv}}(\text{Protein-heme}) + E_{\text{MM}}(\text{Cl}^-) - TS(\text{Cl}^-) \\ & + \Delta G_{\text{solv}}(\text{Cl}^-) - \{E_{\text{MM}}(\text{Protein}) - TS(\text{Protein})\} \\ & + \Delta G_{\text{solv}}(\text{Protein}) + E_{\text{MM}}(\text{heme-Cl}) - TS(\text{heme-Cl}) \\ & + \Delta G_{\text{solv}}(\text{heme-Cl})\} + \Delta E_{\text{corr}} \end{aligned} \quad (5.55)$$

ここで $E_{\text{MM}}(X)$ と $S(X)$ はそれぞれ気相中で計算される MM に基づくエネルギーとエントロピーである。 $\Delta G_{\text{solv}}(X)$ は溶媒和自由エネルギー、 ΔE_{corr} は QM-MM 間の補正項である。 $E_{\text{MM}}(X)$ は結合長、角度、ねじれ角、ファンデルワールス力、静電相互作用のエネルギーの合計値である。 $S(X)$ は **5.9** の quasi-harmonic なエントロピー推定法に基づいて計算した。 $\Delta G_{\text{solv}}(X)$ は **5.10** の方法に基づいた。 $\Delta G_{\text{solv}}(\text{Cl}^-)$ は実験値の -74.7 kcal/mol⁹⁸ を使用した。

QM-MM 間の補正項 ΔE_{corr} は次の式で表される。

$$\begin{aligned} \Delta E_{\text{corr}} = & E_{\text{QM}}(4\text{MP-heme}) + E_{\text{QM}}(\text{Cl}^-) - \{E_{\text{QM}}(4\text{MP}^-) + E_{\text{QM}}(\text{heme-Cl}^-)\} \\ & - [E_{\text{MM}}(4\text{MP-heme}) + E_{\text{MM}}(\text{Cl}^-) - \{E_{\text{MM}}(4\text{MP}^-) + E_{\text{MM}}(\text{heme-Cl}^-)\}] \end{aligned} \quad (5.56)$$

ここで $E_{\text{QM}}(\text{X})$ は Gaussian 09 の B3LYP/6-31G(d) レベルで計算した量子力学 (QM) 的なエネルギーであり、4MP は 4-メチルフェノキシドを表す。

第6章 異なる親和性を提示する、構造的に似た 3 種の Isd-NEAT ドメインのヘム結合機構の解析

in silico の計算結果と *in vitro* の実験結果とを相互に参照しながら結果と考察を述べる。**6.1** と **6.2** では *in vitro* 実験に用いた蛋白質の精製結果を示す。これらを用いて **6.3** と **6.4** でまず各 Isd-NEAT ドメインと金属ポルフィリンの結合および輸送の実験結果を示す。**6.5** から **6.9** までは分子動力学シミュレーションを用いて各ドメインの残基レベルでのエネルギー寄与を計算し、実験データと比較検証する。最後に **6.10** で、シミュレーションで推定された重要な残基を実験で実証する。

6.1 金属キレートアフィニティークロマトグラフィーによる蛋白質粗精製

はじめに Isd-NEAT 蛋白質の発現と精製について述べる。

各 NEAT ドメインを発現するときに使用する大腸菌は、Rosetta2 (DE3)・RP523 株いずれも同じリコンビナント蛋白質を発現することが可能であった。N 末端につけている His₆-tag を利用して、超音波による大腸菌の破碎後に上清画分を Ni²⁺イオンを配位させた His・bind Resin カラムに通すことで、目的蛋白質のみをこのカラムに吸着させた。続いて 200 mM の imidazole を含む緩衝溶液で溶出させる粗精製を行った。

次に thrombin (Sigma-Aldrich) を用いて N 末端の His₆-tag を切断した。**Figure 6.1** に SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) による粗精製の様子を示す。

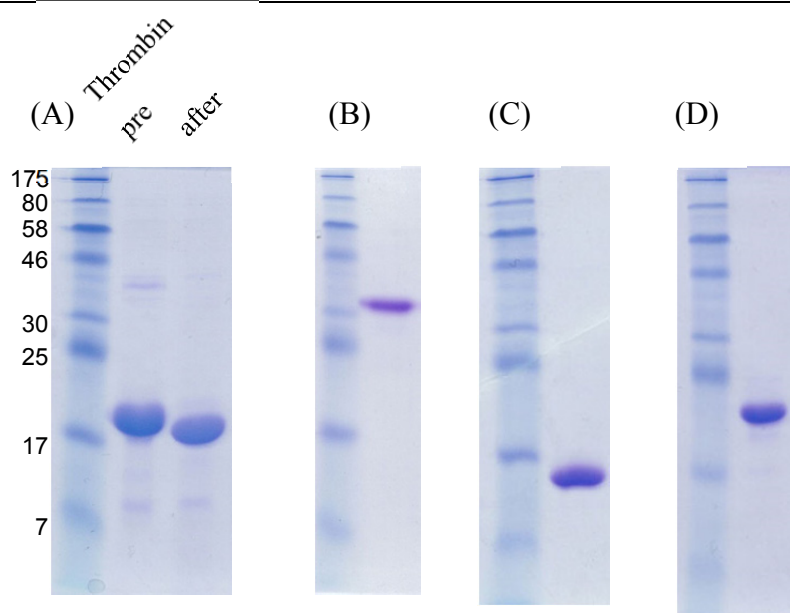


Figure 6.1 (A) IsdH^{N3} の thrombin 処理前後 (B) IsdA (C) IsdA^N (D) IsdC. (B)~(D)は thrombin 処理済である。

6.2 サイズ排除クロマトグラフィー精製

6.2.1 IsdH-NEAT3

IsdH-NEAT3 は大腸菌 Rosetta2 (DE3) と M9 培地を利用して発現させているが、わずかながら生合成されたヘムを含んでいるため、apo 体のみを精製するためにイオン交換クロマトグラフィーを用いた。Resource Q 1mL カラムに 50 mM Tris-HCl pH8.0 に対する透析により脱塩させた蛋白質溶液を通し、カラム樹脂に目的蛋白質を吸着させた後、2 M NaCl を含む緩衝液で段階的に溶出させることで、塩濃度の低い側に apo 体が、やや遅れて塩濃度の高い側に holo 体が分離されたことが 400 nm の吸光度の有無により判別できた (**Figure 6.2 左**)。続いてこのうち 400 nm の吸光度が確認されなかった蛋白質分画を、50 mM Tris-HCl pH 8.0, 200 mM NaCl 緩衝液中におけるサイズ排除クロマトグラフィーにかけ、これを最終精製とした (**Figure 6.2 右**)。収量は非常に高く、holo 体を除く apo 体だけで 50 mg/L 程度であった。

興味深いことに、IsdH-NEAT3 のサイズ排除クロマトグラフィーの結果は、ピークが非対称になっており、低体積側のピークが鋭くなっていることが特徴的であった。

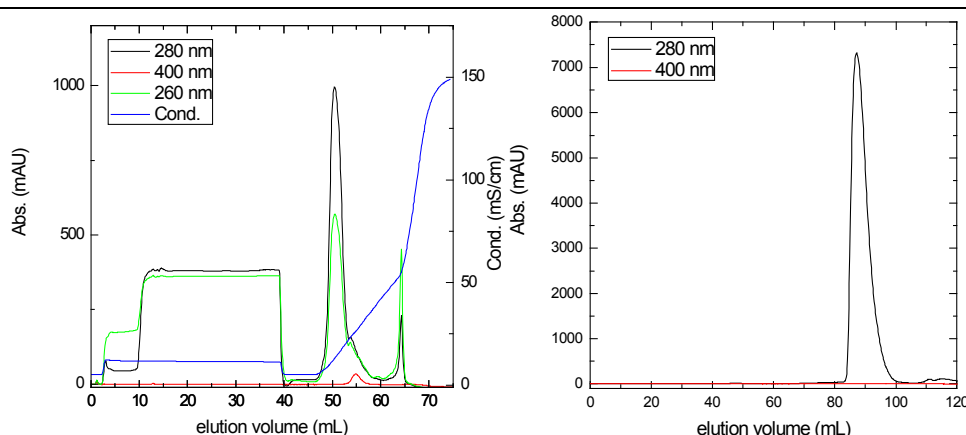


Figure 6.2 (左) IsdH-N3 の Resource Q 1mL による陰イオン交換クロマトグラフィー結果、cond. は伝導率(塩濃度)を表している。(右) IsdH-N3 のサイズ排除クロマトグラフィー結果。カラムは HiLoad 16/60 Superdex 200 (GE Healthcare)を使用した。

6.2.2 IsdA (full-length)

IsdA の全長はおよそ 29 kDa であるが、C 末端側に存在する大きな天然変性領域のために慣性半径が球状の蛋白質に比べて大きくなり、サイズ排除クロマトグラフィーでも溶出体積は 100 kDa の球状蛋白質のそれとほぼ同等となることが知られていた⁸⁰。結果を **Figure 6.3** に示す。IsdH-NEAT3 の溶出体積と比べると、10 mL 程度低体積側にシフトしていることがわかる。

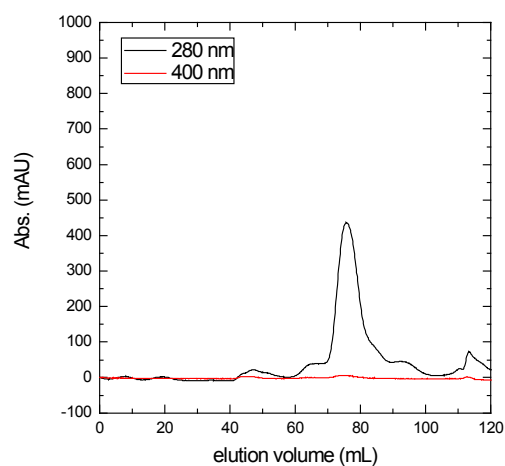


Figure 6.3 IsdA のサイズ排除クロマトグラフィー結果。カラムは HiLoad 16/60 Superdex 200 (GE Healthcare) を使用した。

6.2.3 IsdC

IsdC は IsdA に比べると全長においても天然変性領域が少なく、構成アミノ酸のほとんどが NEAT ドメインとなっている。サイズ排除クロマトグラフィーでの溶出体積は IsdH-NEAT3 に比べて少し高体積側にシフトしていた (**Figure 6.4**)。

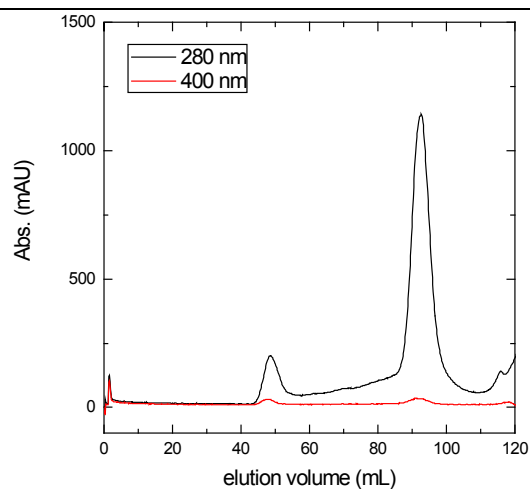


Figure 6.4 IsdC のサイズ排除クロマトグラフィー結果。カラムは HiLoad 16/60 Superdex 200 (GE Healthcare) を使用した。

6.3 ITC による結合自由エネルギー変化 (ΔG) の測定

ヘムと各種金属ポルフィリンがそれぞれ IsdH-NEAT3, IsdA-N, IsdC に結合した時の熱力学的パラメータを ITC によって決定した。各種 NEAT ドメインを含む緩衝溶液にヘムを注入すると大きな発熱が観測された。Table 6.1 に示すように、発熱の大きさは IsdH-NEAT3 ($\Delta H^\circ = -10.6 \pm 0.1 \text{ kcal mol}^{-1}$)、IsdA-N ($\Delta H^\circ = -11.0 \pm 0.1 \text{ kcal mol}^{-1}$)、そして IsdC ($\Delta H^\circ = -14.6 \pm 0.1 \text{ kcal mol}^{-1}$) の順であった。同様に IsdC の解離定数は最も小さく ($K_d = 6.5 \pm 1.4 \text{ nM}$)、ヘムに対する親和性が最も高いことを表していた。IsdA-N の解離定数は 3 種の NEAT ドメイン間で中間の値であり ($14 \pm 4 \text{ nM}$)、IsdH-NEAT3 のものは最も大きな値 ($34 \pm 8 \text{ nM}$) を示した。この親和性の順序はヘムが NEAT ドメインを介して細胞壁上を縦断して輸送される時に通過するであろう生物学的な順序 (外界→IsdH-NEAT3→IsdA→IsdC→……) と一致していた。

Table 6.1 3 種の Isd 蛋白質と金属ポルフィリン間の ITC の結果 ^a

Metalloporphyrins	Proteins	ΔH° [kcal/mol]	$-T\Delta S^\circ$ [kcal/mol]	ΔG° [kcal/mol]	K_d [nM]
Heme	IsdH-N3	-10.6 ± 0.1	0.39	-10.2 ± 0.1	34 ± 8
	IsdA-N	-11.0 ± 0.1	0.30	-10.8 ± 0.1	14 ± 4
	IsdC	-14.6 ± 0.1	3.4	-11.2 ± 0.1	6.5 ± 1.4
Mn-PPIX	IsdH-N3	-5.77 ± 0.1	-2.84	-8.61 ± 0.1	490 ± 60
	IsdA-N	-9.5 ± 0.1	-1.8	-11.3 ± 0.2	5.7 ± 2.1
	IsdC	-14.6 ± 0.1	3.25	-11.4 ± 0.1	4.5 ± 1.0
Ga-PPIX	IsdH-N3	-7.67 ± 0.1	-1.97	-9.62 ± 0.1	91 ± 21
	IsdA-N	-8.0 ± 0.1	-3.0	-11.0 ± 0.2	34 ± 8
	IsdC	-13.2 ± 0.1	0.95	-12.2 ± 0.2	14 ± 4

^a 測定温度は 25°C (298.15 K) である。Proteins の列の N は NEAT ドメインを表す。

興味深いことに IsdA-NEAT と IsdC の ΔH° の差は $3.6 \text{ kcal mol}^{-1}$ であったが、 ΔG° の差はわずかに $0.4 \text{ kcal mol}^{-1}$ であり、IsdC への結合時により大きなエントロピーの損失が発生していることが示唆された。この現象は、apo 体 IsdC-N の結合ポケットが柔軟で、ヘムと結合すると構造が堅固になるという過去の報告とも一致する⁹⁹。ITC によって決定された IsdA と IsdC 間のヘムの相対的な親和性の違いはおよそ 2~3 倍であり、過去の報告 (5~15 倍)³⁴ と比較すると少し小さな値であった。この違いはおそらくいくつかの実験的な条件の違い (蛋白質濃度や手法) に基づくものであろうと考えられる。しかし、親和性の傾向は過去の報告とも一致する結果であった。

次に Mn-PPIX, Ga-PPIX について同様に K_d 値を測定した。これらはヘム鉄ととても関連性の深いアナログである^{100,101}。ITC の結果はこの 2 つの金属ポルフィリンについても同様に 3 種の NEAT ドメインに対して同じような親和性で結合することが示された (Table 6.1)。

さらに、これらの親和性は下流の NEAT ドメインになるにしたがって K_d 値が小さくなっていく様子が観測された。しかしながら金属イオンが異なることに伴う ΔG° と ΔH° の変化量はそれぞれの NEAT ドメインで一定ではなかった。特に、IsdH-NEAT3 の Mn-PPX と Ga-PPIX に対する親和性がともにヘムのそれよりも低かったのに対し、IsdA-NEAT と IsdC ではともに高くなっていた。

これらのデータについて、測定温度は 25°C であったが、この親和性の順序は 37°C においても変化しないであろうと考える。親和性の温度依存性をチェックするため、IsdH-NEAT3 の親和性を 15 °C から 30 °C の範囲でいくつか測定を行った。その結果、37°C での測定はベースラインが不安定であったために測定できなかったが、親和性はその範囲で測定誤差に含まれる程度に一定であった (Table 6.2)。

Table 6.2 各温度で測定した IsdH-NEAT3 とヘム間の熱力学的パラメータ

	Temp.	ΔH° [kcal/mol]	$-T\Delta S^\circ$ [kcal/mol]	ΔG° [kcal/mol]	K_d [nM]
IsdH-NEAT3	15 °C	-7.52 ± 0.1	-2.3	-9.80 ± 0.2	37.2 ± 7.4
	20 °C	-9.82 ± 0.1	-0.30	-10.1 ± 0.1	30.4 ± 6.5
	25 °C	-10.6 ± 0.1	0.39	-10.2 ± 0.2	37.0 ± 10.2
	30 °C	-11.8 ± 0.1	1.3	-10.5 ± 0.2	26.0 ± 7.6

ヘムの結合量論比について、いずれの NEAT ドメインに対してもヘムは 2 当量結合していることが ITC によって示された (Figure 6.5)。この当量は他の非鉄金属ポルフィリンにおいても観測された。この現象について、ヘムは ITC 実験に用いるような高濃度溶液中では二量体を形成するため、非鉄金属ポルフィリンも含め、NEAT ドメインに対して二量体の形で結合すると考えられる (Figure 6.6)。しかしながら、ITC 実験によって得られる熱力学的パラメータに対する余分なヘム分子が結合することの影響は小さいものであると考えられる。なぜなら 2 つめのヘム分子はヘム-NEAT ドメイン複合体に対してとても弱く結合するからである。

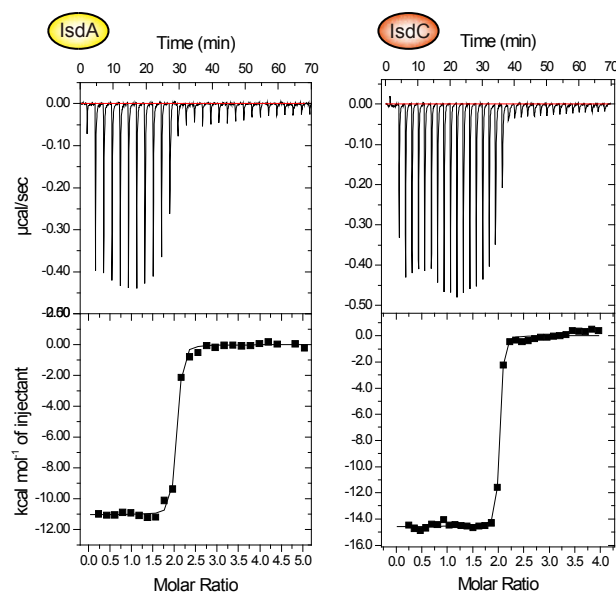


Figure 6.5 ITCによる結合等温線。(左) wild type IsdA と (右) wild type IsdC とヘムとの結合等温線である。蛋白質濃度は 20 μM とした。

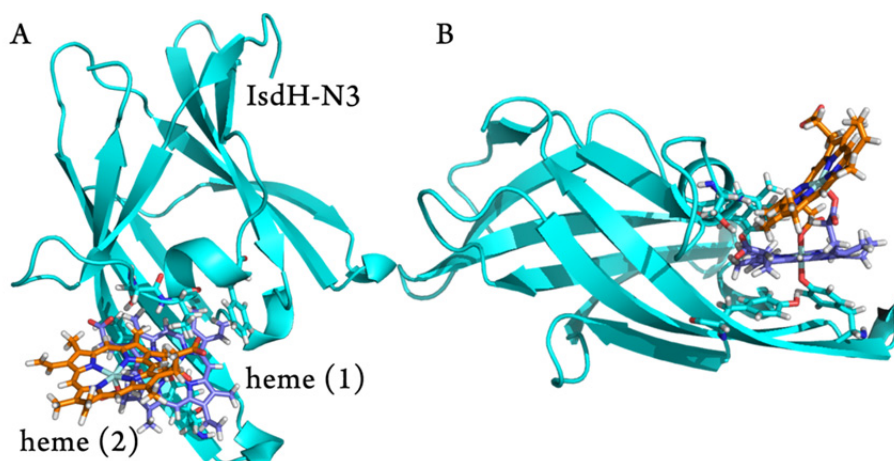


Figure 6.6 IsdH-NEAT3 と 2 分子のヘムの結合モデル。このモデルは分子動力学シミュレーションによって作製した。(A) IsdH-NEAT3 (light blue) とヘム 2 分子 (cyan and orange)。(B) 側面図。

6.4 IsdH-NEAT3 から IsdC への直接的な金属ポルフィリン輸送

2012 年にエレクトロスプレーイオン化質量分析法 (ESI-MS) による IsdH-NEAT3 から IsdC への直接的なヘム輸送が報告されている¹⁰¹。本研究では、UV スペクトル変化による IsdH-NEAT3 から IsdC への直接的な金属ポルフィリンの輸送を観測した。holo 体の IsdH-NEAT3 と apo 体の IsdC を混合して静置した後、2 分後に DEAE イオン交換カラムを用いて両者を分離する操作を行った。DEAE カラムに結合され、500 mM の NaCl 溶液で溶出される IsdH-NEAT3 側の Soret バンドは混合前後で大きく低下していることが判明した。他方、IsdC は混合後に Soret バンドが大きく上昇していることが判明した (**Figure 6.7**)。この

輸送はヘムに限らず他の金属ポルフィリンにおいても同様に確認された (**Figure 6.8**)。このスペクトル変化はこれまで確認されてきた IsdH-NEAT3 から全長 IsdA への輸送および IsdA から IsdC への輸送時に観測された変化と酷似している^{34,100}。このことは本来中間となる IsdA-NEAT が存在しない状況でも金属ポルフィリンの輸送は効率良く行われることを表していると考えられる。同時に、この高速なヘム輸送は以前示されている IsdA/IsdC の中間複合体⁵²が、IsdH-NEAT3 と IsdC の間でも形成することが可能であることを強く指し示している。一方、holo 体の IsdC から apo 体の IsdH-NEAT3 への逆輸送は 20 分経過してもほとんど発生せず、金属ポルフィリンの輸送は熱力学的平衡則に則って行われるものであると考えられた。

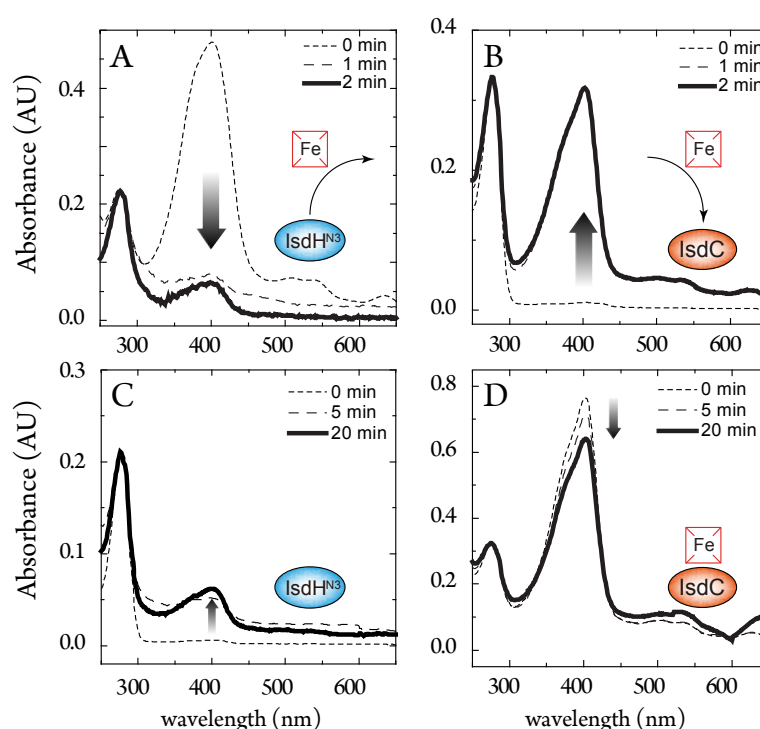


Figure 6.7 IsdH-NEAT3 から IsdC へのヘムの輸送。左側のパネルは DEAE カラムから溶出された IsdH-NEAT3 のスペクトルを表す(A と C)。右側のパネルは IsdC のスペクトルを表す(B と D)。IsdH-NEAT3 に結合したヘムは効率よく apo 体の IsdC へと輸送されている (A と B) のに対して、IsdC に結合しているヘムは apo 体の IsdH-NEAT3 にはほとんど輸送されなかった (C と D)。Mn-PPIX と Ga-PPX の輸送については **Figure 6.8** に示している。

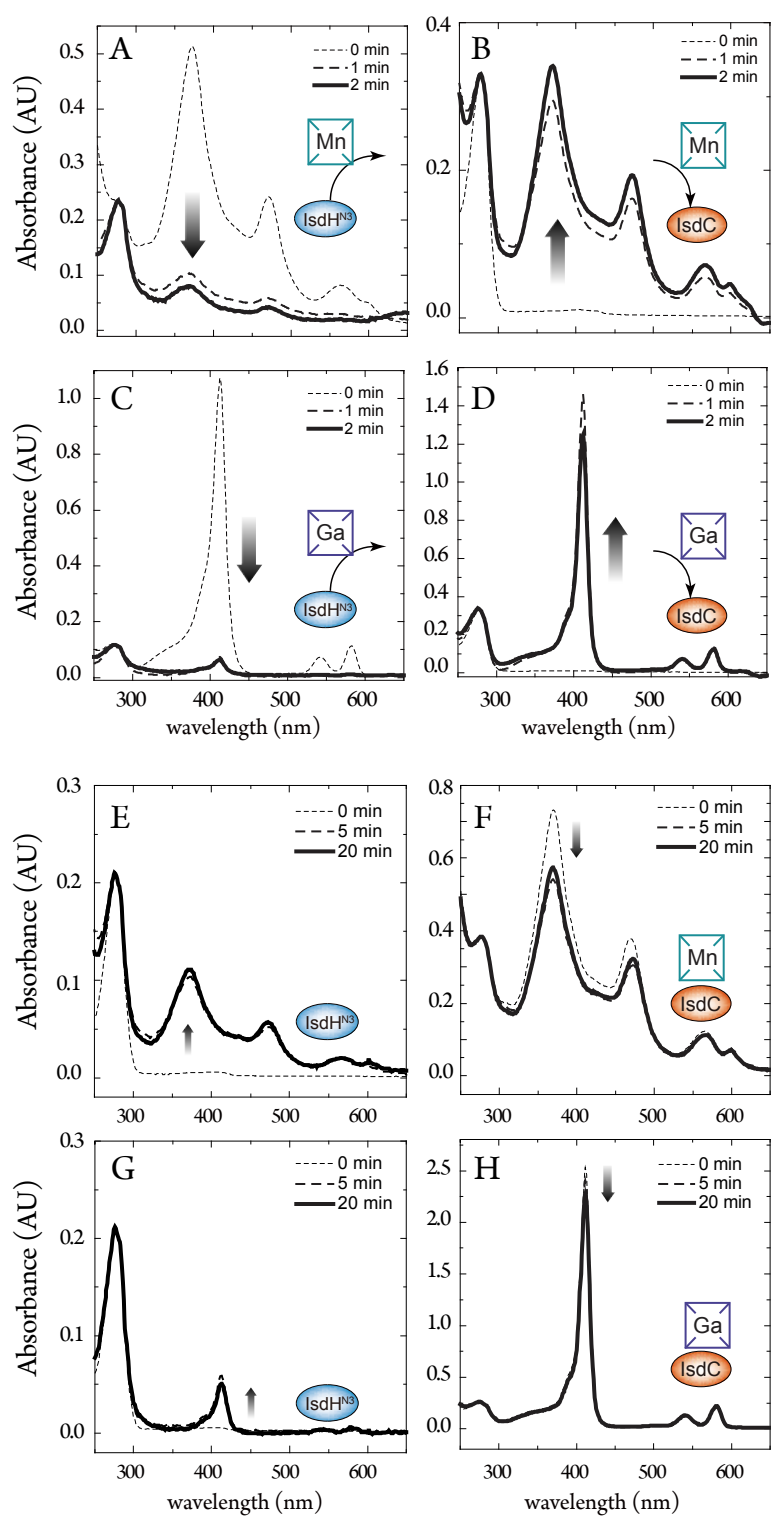


Figure 6.8 IsdH-NEAT3 と IsdC 間の金属ポルフィリン輸送。左側のパネルは IsdH-NEAT3 を、右側のパネルは IsdC の UV スペクトルを示す。A・B と E・F は Mn-PPIX、C・D と G・H は Ga-PPIX の輸送を示す。

以降 **6.6** から **6.9** までは分子動力学シミュレーションによって NEAT ドメインーヘム間の相互作用を解析した結果を示す。**6.5** ではそれに先立ってシミュレーションに用いるためのヘムのパラメータを示した。

6.5 カ場・RESP 電荷パラメータ決定

6.5.1 ヘムの力場決定

ヘムの AMBER 用のパラメータは Web 上でいくつか公開されており、これをひな形として利用した (<http://personalpages.manchester.ac.uk/staff/Richard.Bryce/amber/cof/frcmod.hemall>)。本研究ではこれに加え、チロシンーヘム間の結合長・角度の力の定数を決定する。

5.3 の構造最適化後、平衡位置から構造をずらした時のエネルギー変化を求めた。構造変化は 2 原子間の距離、3 原子間の角度についてそれぞれ行った。この後、AMBER の追加力場ファイルを作成し、エネルギー変化がほぼ一致するように式 (2.16) の値をそれぞれ決定した。その後 AMBER によって系のエネルギーを算出し、比較を行った。その一例を **Figure 6.9** に示す。

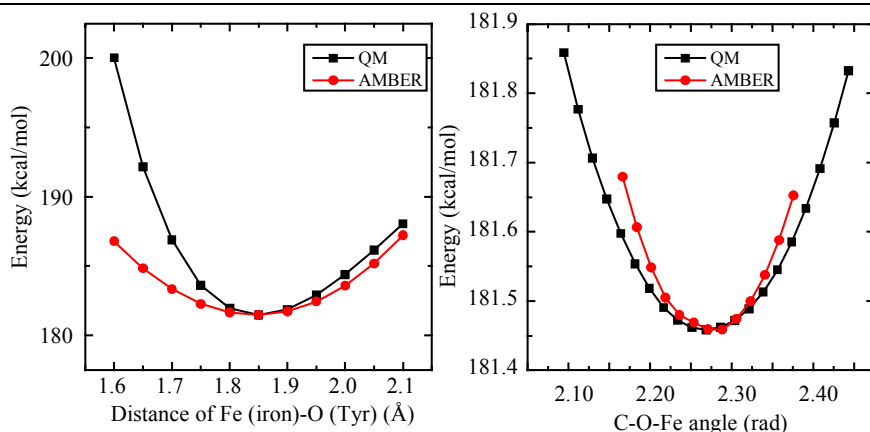


Figure 6.9 AMBER 用のヘムのパラメータ決定。QM は Gaussian 09 の B3LYP/6-31G(d) レベルでのエネルギーを、AMBER は AMBER の MM 的な取り扱いでのエネルギー計算値を示す。左は脱水素されたチロシンとヘムの鉄原子間のエネルギー変化、右はチロシンのベンゼン環の炭素、フェノール基の酸素、ヘムの鉄原子間の角度を示す。

完全なパラメータ表は巻末の付録 (**Appendix 2**) に示した。

6.5.2 チロシンーヘムの RESP 電荷決定

RESP 電荷は Gaussian 09 の構造最適化後、続けて Mulliken charge の計算により求めた。SCF=Tight Pop=(MK,ReadRadii) IOp(6/33=2,6/41=10,6/42=17) オプションを付け加えた。鉄のイオン半径は 1.40 とした。その後計算結果のファイルをもとに AmberTools の ANTECHAMBER モジュールを利用し、RESP 電荷を決定した。各原子の電荷を **Figure 6.10** に示した。

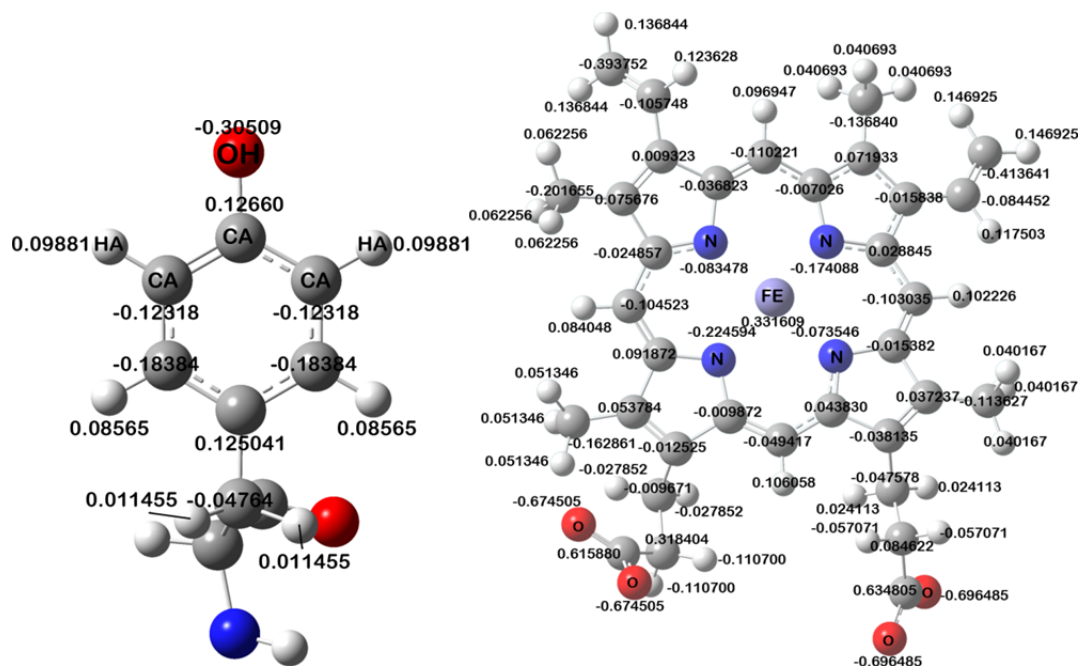


Figure 6.10 分子動力学シミュレーションの各電荷に使用した脱水素のチロシン（左側）とヘム（右側）の電荷。

また、それぞれの単体の構造最適化後の電荷は以下ようになった（**Figure 6.11** と **Figure 6.12**）。これらの残基のトポロジーと電荷パラメータを蛋白質の apo 体のシミュレーションに用いた。

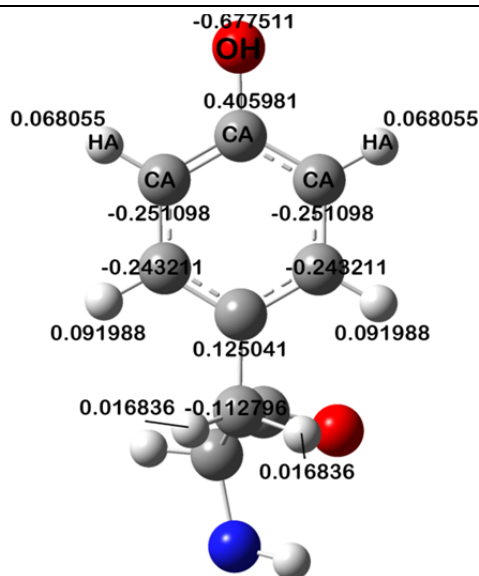


Figure 6.11 分子動力学シミュレーションの各電荷に使用した脱水素のチロシンの電荷。apo 体の蛋白質のシミュレーションの時に使用した。

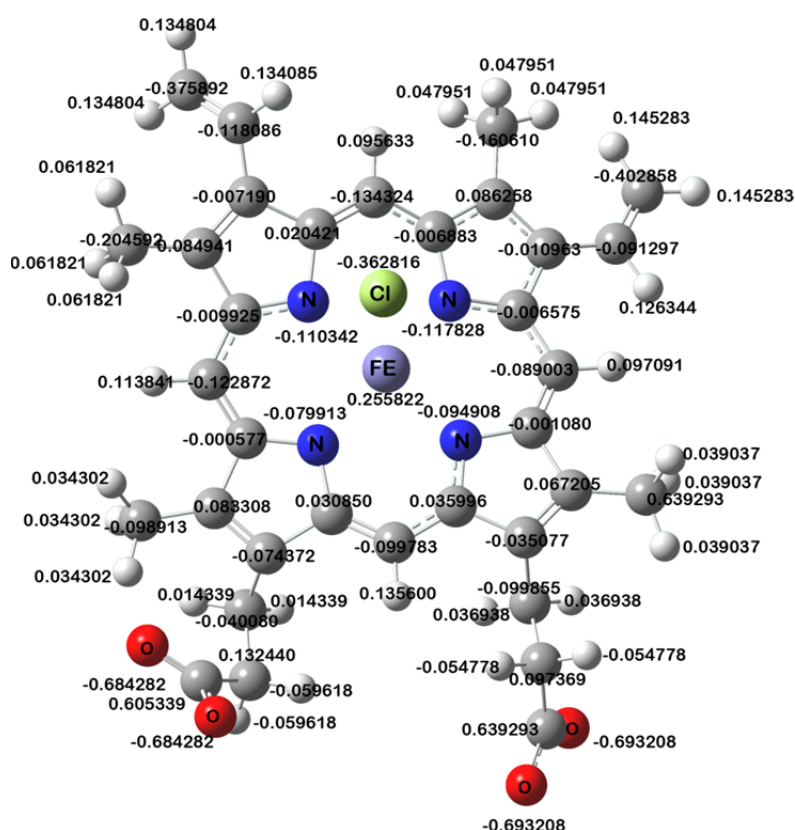


Figure 6.12 分子動力学シミュレーションのヘム-Cl⁻イオン（右側）の電荷。MM-PB/SA のヘム-Cl⁻イオンのエネルギー計算の時に使用した。

6.6 振動エントロピーと構造変化の主成分の推定

5.9 「Schlitter の振動エントロピー推定」で述べた手法に基づき、quasi-harmonic な振動エントロピーの推定を行った。まず各 NEAT ドメインの apo 体と holo 体の 10 から 200 ナノ秒までのトラジェクトリについて、重心を固定し、回転の影響を除去した状態で蛋白質の平均構造を算出した。次に各アミノ酸の C α 原子の平均構造からのずれを計算し、RMSF 値が 1.5 Å 未満の残基を抽出した。ここでもう 1 度蛋白質の平均構造を算出するときにこれらのアミノ酸番号の残基に限定して平均構造を抽出し、RMSF 値の計算を行った。この操作を RMSF 値が 1.5 Å 未満となる残基が変化しなくなるまで繰り返した。こうして求めた平均構造からトラジェクトリに対しての分散値を計算し、振動エントロピーを推定した。計算は蛋白質の apo 体、holo 体とヘムについて行ない、それぞれの差分を算出した。結果を **Table 6.3** の $-T\Delta S_{\text{solute}}$ に示す。温度 T は 300 K とした。

6.7 分子動力学シミュレーションによる各 Isd-NEAT のヘム結合エネルギー推定

分子動力学シミュレーションによる MM-PB/SA 法に基づき、IsdH-NEAT3, IsdA-N, IsdC-N とのヘムとの結合自由エネルギー変化を推定した。

なお、apo 体と holo 体の間でヘムの結合エネルギーを見積もる上で、チロシンとヘムの鉄原子間の化学結合を分子動力学シミュレーションで表現することは不可能である。このエ

エネルギー補正項は $-104.5 \pm 2.0 \text{ kcal mol}^{-1}$ であると決定された。これにより計算された結合自由エネルギー変化 ΔG_{bind} とそれらの構成要素を **Table 6.3** に示した。それぞれのコンフォメーションサンプリングが十分であることは、各 apo 体と holo 体の最も遅い分散のモードである第 1 主成分の時間変化（手法は **5.8**「主成分分析 (PCA)」を参照）を追うことによって評価した (**Figure 6.13**)。200 ns の MD シミュレーションの結果、150 ナノ秒からコンフォメーション変化が観測された Isd-NEAT3 の apo 体を除いては、いずれのモデルでも十分に収束した結果が得られていると判断した。 ΔG_{bind} の値は、ITC に比べると大きくずれて評価しているところが多かったものの、順序は ITC のそれと完全に一致しており、IsdC-N で最も小さく、IsdH-NEAT3 で最も大きな値が得られた。

Table 6.3 MM-PB/SA によって計算された ΔG_{bind} とその構成要素 (kcal/mol)

contribution	IsdH-NEAT3	IsdA-N	IsdC-N	IsdC-N -loop 1H
ΔE_{EEL}	172.08	-219.64	-133.83	26.95
ΔE_{vdw}	-37.72	-23.19	-43.51	-39.84
$\Delta E_{\text{internal}}^{\text{a}}$	-2.53	-2.82	-7.05	1.90
ΔG_{PB}	-85.37	267.90	197.49	40.04
ΔG_{SA}	-3.64	-4.41	-3.94	-3.99
$\Delta G_{\text{MMPBSA}}^{\text{b}}$	42.82	17.84	9.16	25.06
$-T\Delta S_{\text{solute}}$	39.41	39.46	41.69	32.73
$\Delta E_{\text{corr}}^{\text{c}}$	-104.5	-104.5	-104.5	-104.5
ΔG	-22.3	-47.2	-53.6	-46.7

データはいずれも 200 ns の Production run のうち、はじめの 10 ns を除いた 9500 フレームから計算した。

^a $\Delta E_{\text{internal}}$ の項は ΔE_{bond} , ΔE_{angle} と $\Delta E_{\text{torsion}}$ の合計値、^b ΔG_{MMPBSA} 項は ΔE_{EEL} , ΔE_{vdw} , $\Delta E_{\text{internal}}$, ΔG_{PB} と ΔG_{SA} の合計値である。^c ΔE_{corr} の項はヘム結合のチロシンとヘムの鉄原子間の MM-QM 間の補正項である。

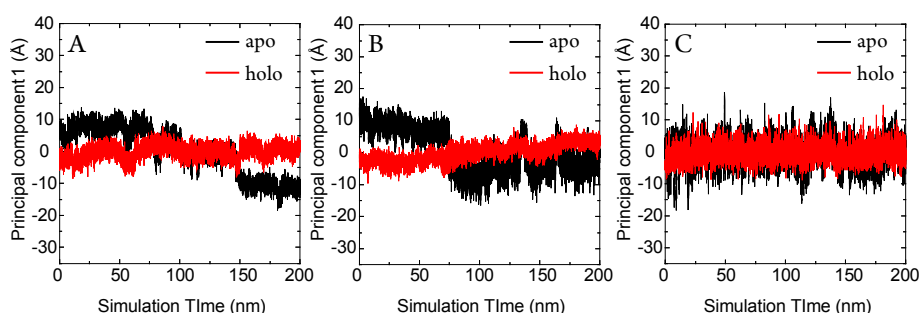
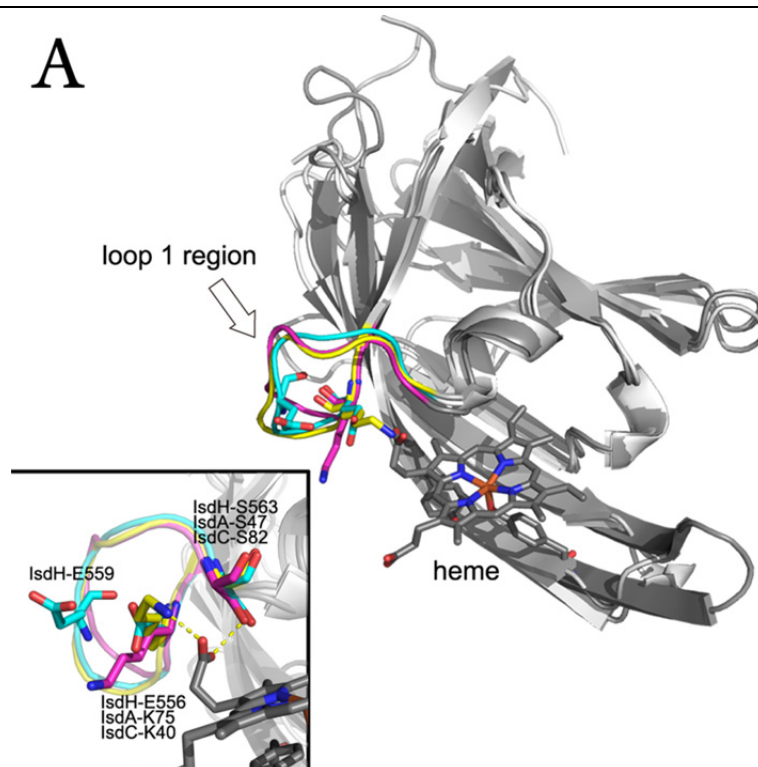


Figure 6.13 第 1 主成分の時間変化。(A) IsdH-NEAT3, (B) IsdA-N, (C) IsdC-N。黒線は apo 体を、赤線は holo 体をそれぞれ表す。

自由エネルギーの構成要素をそれぞれ比較することで、NEAT ドメイン間におけるヘムとの相互作用の中で異なる特徴が存在することが明らかとなった。IsdH-NEAT3 の場合、静電

相互作用のエネルギー変化が大きく正であり($\Delta E_{\text{EEL}} = +172.08 \text{ kcal mol}^{-1}$)、結合としては不利であることが判明した一方で、IsdA-N と IsdC-N では負の値を示していた (それぞれ $-219.64 \text{ kcal mol}^{-1}$ and $-133.83 \text{ kcal mol}^{-1}$)。その一方で、溶媒和自由エネルギーの極性項を表す ΔG_{pol} では、IsdH-NEAT3 において $-85.37 \text{ kcal mol}^{-1}$ という負の値を示す一方で、IsdA-N と IsdC-N では $267.90 \text{ kcal mol}^{-1}$ と $197.49 \text{ kcal mol}^{-1}$ という正の値を示した。これらの結果は結合に好ましい静電相互作用が IsdA-N/IsdC-N とヘムの間に形成され、それによってもって結合界面周辺の残基から脱溶媒和が発生していることを意味していると考えられる。しかし IsdH-NEAT3 ではヘムとの静電相互作用的な結合は好ましくないものであると考えられる。続いて、ヘム結合における重要な残基を特定するため、 ΔG_{bind} の 1 残基レベルでのエネルギー分解を行った。各残基の主鎖と側鎖からの寄与を **Figure 6.14** に示す。また N 末端からの累積値に基づき、各 NEAT ドメイン間で ΔG_{bind} の差に大きく貢献している興味深い 2 つの領域について解析をさらに進めることにした。



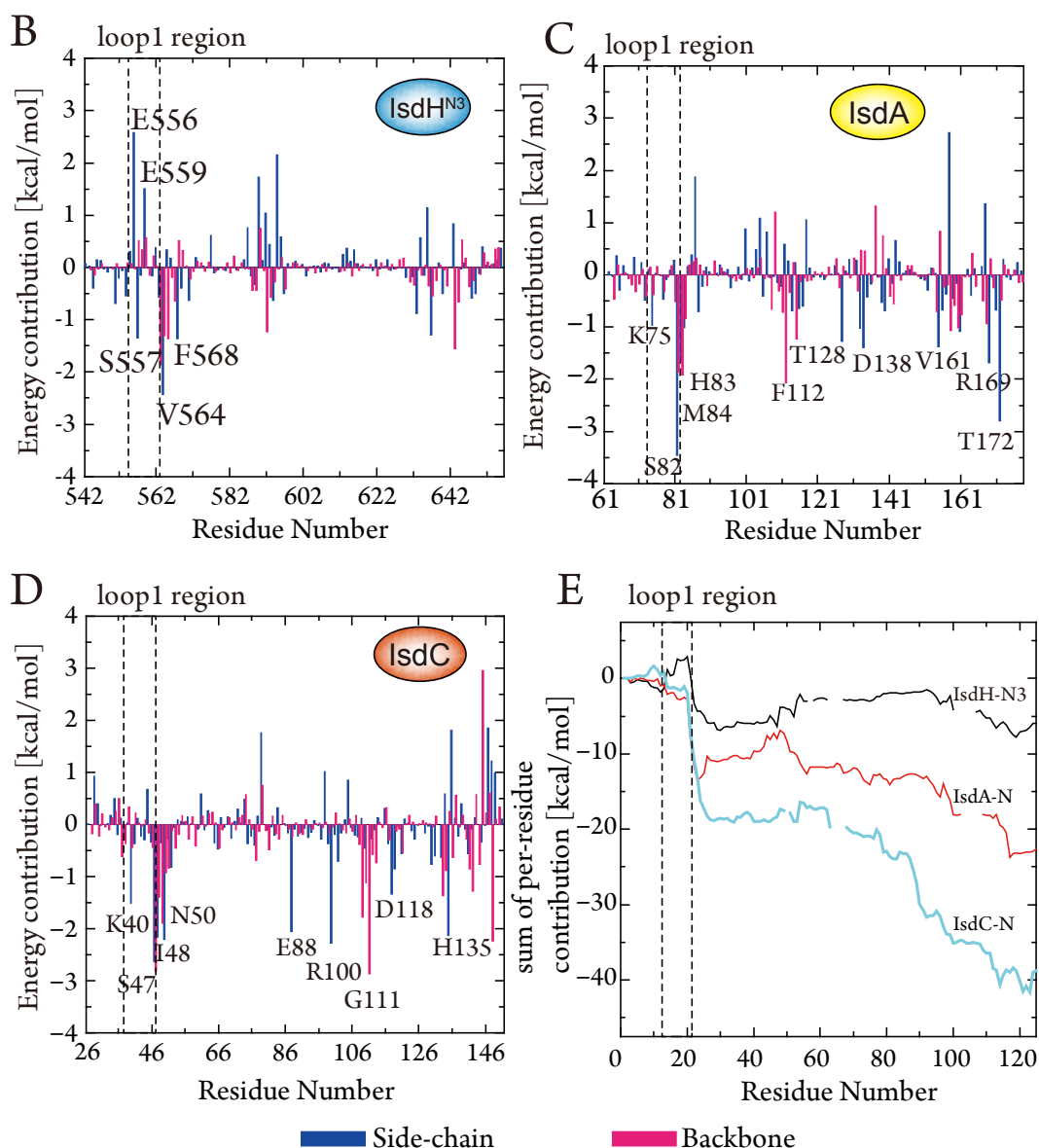


Figure 6.14 結合自由エネルギー寄与の1残基分解。MM-GB/SA法を用いた。(A) IsdH-NEAT3 (青), IsdA-N (黄)と IsdC-N (赤)の構造の重ねあわせ。loop 1 領域のみ色をつけている。(B–D) IsdH-NEAT3, IsdA-N, IsdC-N のヘム結合に対する1残基あたりのエネルギー寄与。青色は側鎖の、赤色は主鎖からの影響を表す。(E) N 末端からの各残基の累積結合エネルギー値。それぞれの図において loop 1 領域は点線で囲んでいる。

1 つ目の領域は各蛋白質構造に共通するストランド $\beta 1b$ と 3_{10} ヘリックスの間に存在する “loop 1” 付近である (Figure 6.14A)。この領域において、IsdH-NEAT3 の計算ではヘム結合に好ましくない寄与 (正の値) を与えるいくつかの残基、特に Glu556 と Glu559 が示された (Figure 6.14B)。その一方で、IsdA-N と IsdC-N ではこの領域で好ましくない影響を与える残基は少なくなっていた (Figure 6.14C, D)。結果として IsdH-NEAT3 の loop 1 領域は IsdA と IsdC と比べると結合に対して不適なものであることが示された。シーケンスアラインメントの結果と合わせると、これら NEAT ドメインのこの領域のアミノ酸配列はそれぞれ異

なっているが、領域の最後に存在するセリン残基はよく保存されているのがわかる (Figure 1.5)。このセリン残基はすべての Isd-NEAT ドメインにおいてヘムの 1 つのプロピオン酸基と水素結合を形成している。しかしながら、MD シミュレーションの結果はこの水素結合の安定度が蛋白質の種類によって異なることを示していた。この水素結合の距離の時間進行におけるプロットにより、200 ナノ秒のシミュレーション中において IsdH-NEAT3 のそれは IsdA-N と IsdC-N に比べると不安定であることが判明した (Figure 6.15)。特筆すべき点として、loop 1 領域を構成する IsdC の残基 (residues 39–46) を IsdH-NEAT3 内の残基 (residues 555–562) で置換した (the IsdC-N-loop 1H キメラ体) ところ、その水素結合の安定性は大きく低下し、wild type の IsdH-NEAT3 と同等のものとなった (Figure 6.15)。MM-PB/SA 計算によってもそのキメラ体のヘムに対する親和性は大きく低下していた (Table 6.3)。加えて、 ΔE_{elec} と ΔG_{pol} はそれぞれ上昇、低下しており、wild type の IsdH-NEAT3 に近い値となっていた。

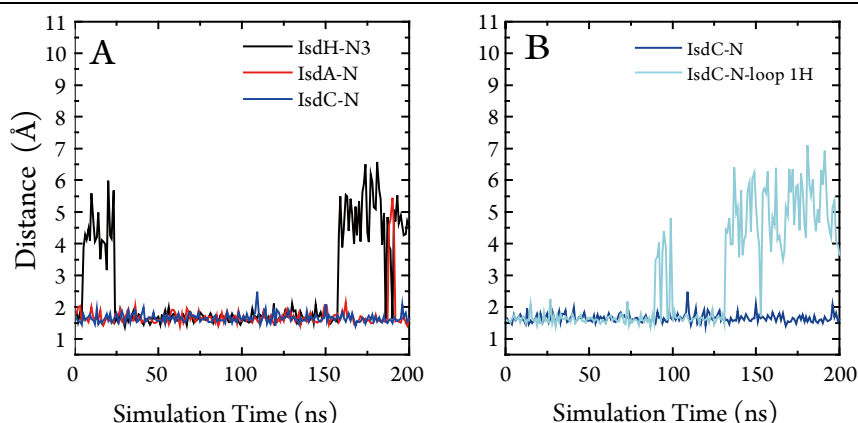


Figure 6.15 200 ナノ秒中の MD トrajекトリのヘムと結合するセリン残基とヘムの近位のプロピオン酸基との結合距離のプロット。(A) wild type の Isd-NEAT ドメインの比較。黒線、赤線、青線はそれぞれ IsdH-NEAT3, IsdA-N, IsdC-N を表す。特に IsdC-N の水素結合はシミュレーション中完全に 1 度も切れることはなかった。(B) loop 1 領域を IsdH-NEAT3 型に置換した IsdC-N-loop 1H 変異体の結果 (light blue)。水素結合がやや壊れやすくなっている。

以上より、loop 1 領域は IsdA-N/IsdC-N と IsdH-NEAT3 の親和性の差を調節するために重要な役割を果たしているのではないかと推察される。一連の計算機実験により、loop 1 領域に多く存在する IsdH-NEAT3 上の多くの負電荷のアミノ酸 (4 つのグルタミン酸 E) は結合の上で悪影響を及ぼすものであることが予想される。すなわち、このグルタミン酸とヘムのプロピオン酸基間の反発相互作用が水素結合を不安定化させ、 ΔE_{elec} を好ましくない正の値に向かわせると思われる。

興味深い 2 つ目の領域は、Figure 6.14E で結合に好ましい寄与を与えていると算出された IsdC 内に存在する Glu88/Arg100 のペアである。これらの残基は holo 体の MD シミュレーションにおいて安定な塩橋を形成していた。反対に、apo 体のシミュレーションでは、このペアとヘム結合ポケットの位置は遠く離れているのにも関わらずこの塩橋は不安定となって

いた (Figure 6.16)。シーケンスアラインメントによるとこの Glu88 は IsdC-N に特有のものであるのに対し、Arg100 はすべての NEAT ドメインにおいてよく保存されている (Figure 1.5)。このことから、Glu88-Arg100 ペアは IsdA-N に比べて IsdC-N の親和性を上昇させる上で重要な役割を果たしていると予想される。

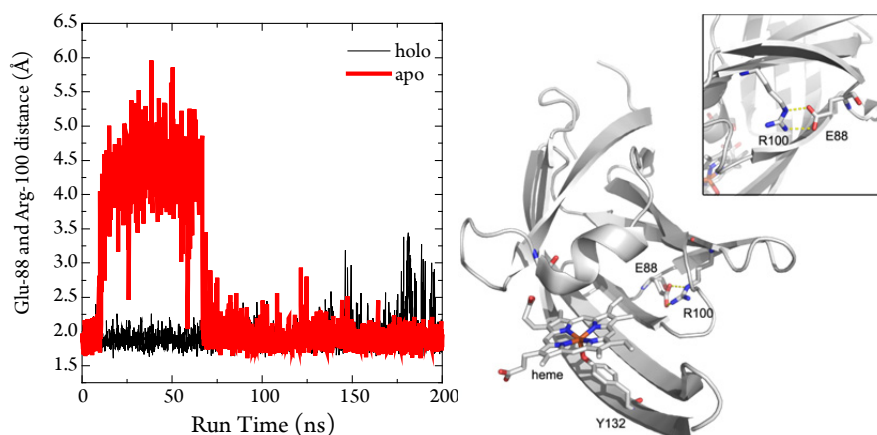


Figure 6.16 IsdC における Glu88 と Arg100 の結合距離の時間変化。黒線と赤線はそれぞれ holo 体、apo 体を表す。

6.8 IsdC 変異体の結合自由エネルギー・エンタルピー測定

MD シミュレーションによる推定を検証すべく、ITC を用いて IsdC のキメラ体: IsdC-loop 1 H (IsdC の loop 1 領域を IsdH-NEAT3 の配列に置換したキメラ体) の ΔH° と ΔG° を決定した。このキメラ体の ΔH° は wild type のそれに比べて $1.9 \text{ kcal mol}^{-1}$ 上昇していた (Table 6.4)。これは MD シミュレーションによる推定と一致する結果であった。親和性を表す ΔG° も同様に低下していた ($\Delta\Delta G^\circ = 0.7 \text{ kcal mol}^{-1}$)。続いて IsdC-E88A 変異体と、IsdC-loop 1H キメラ体における E88A 変異体の効果を同様に検証した。結果は MD シミュレーションによる予想と一致し、まず wild type においては ΔH° が $3.4 \text{ kcal mol}^{-1}$ ほど上昇し ($-14.6 \text{ kcal mol}^{-1}$ から $-11.2 \text{ kcal mol}^{-1}$)、IsdC-loop 1H 体においては $3.6 \text{ kcal mol}^{-1}$ ほど上昇した ($-12.7 \text{ kcal mol}^{-1}$ から $-9.1 \text{ kcal mol}^{-1}$)。この結果は、loop 1 領域におけるアミノ酸置換の影響と、E88 の変異体のエンタルピーの影響が加算的であることを示している。しかしながら、結合自由エネルギー変化における変化はすべてのキメラ体、変異体において小さいものであった ($\Delta\Delta G^\circ = +0.7\text{--}0.9 \text{ kcal mol}^{-1}$)。このことは、「エンタルピー—エントロピー補償則」によるものであると考えられる^{102,103}。変異や置換によって相互作用がより好ましくないものへと変化した場合、結合界面にあるリガンドとアミノ酸や官能基との相互作用はより強固でなくなることになるため、結合によるエントロピーロスの規模が減少してしまうためであると考えられる。

Table 6.4 変異体・キメラ体を含む Isd 蛋白質とヘム間での ITC 測定の結果^a

Proteins	ΔH° [kcal/mol]	$-T\Delta S^\circ$ [kcal/mol]	ΔG° [kcal/mol]	K_d [nM]
IsdC-WT	-14.6 ± 0.1	3.4	-11.2 ± 0.1	6.5 ± 1.4
IsdC- loop 1H	-12.7 ± 0.1	2.2	-10.5 ± 0.2	21 ± 7
IsdC-E88A	-11.2 ± 0.1	0.70	-10.5 ± 0.2	23 ± 9
IsdC-E88A, loop 1H	-9.1 ± 0.1	-1.3	-10.4 ± 0.1	23 ± 4
IsdC-F130A	-14.4 ± 0.1	4.2	-10.2 ± 0.1	32 ± 6
IsdH-N3	-10.6 ± 0.1	0.39	-10.2 ± 0.1	34 ± 8
IsdH-N3-loop 1C	-11.3 ± 0.1	-0.11	-11.3 ± 0.1	5.4 ± 2.2

^a測定温度は 25°Cである。

この loop 1 領域の影響が可逆的であるかどうかを確かめるべく、今度は IsdH-NEAT3 の loop 1 領域を IsdC のアミノ酸配列に変更して同様の測定を行った。 ΔH° と ΔG° の値はそれぞれ $-0.7 \text{ kcal mol}^{-1}$ と $-1.1 \text{ kcal mol}^{-1}$ ずつ wild type IsdH-NEAT3 から変化した (Table 6.4)。これらの結果は loop 1 領域の影響が明確に Isd-NEAT ドメインのヘム (と他の金属ポルフィリン) に対する親和性に影響を与えていることを示している。

6.9 IsdC の F130 の役割

IsdC のフェニルアラニン F130 はヘムと結合するチロシン残基 Y132 の近位に存在する。シーケンスアラインメントによれば IsdC のこの F130 は他の Isd-NEAT に存在しない特有の残基であり、他の NEAT ドメインでは代わりにイソロイシン残基が存在している (Figure 1.9)。この残基のヘム結合における意義を調べるべく、まず *in silico* で IsdC-N の F130I 変異体を構築し、MD シミュレーションを行った。

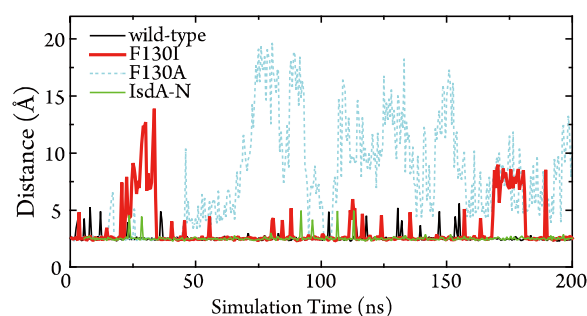


Figure 6.17 200 ナノ秒の MD シミュレーションにおける IsdC-Y132 と Y136 の酸素原子間の距離プロット。黒、赤 (太)、薄青 (点線)、緑線はそれぞれ wild type の IsdC-N、IsdC-N-F130I、IsdC-N-F130A、IsdA-N を示す。Wild type の IsdC-N と IsdA-N は水素結合が壊れなかった。

Wild type と IsdC-N 変異体の MD トラジェクトリを比較すると、apo 体の F130I 変異体は Y132 と Y136 の O η 原子間の水素結合が不安定化されていることがわかる (**Figure 6.17**)。wild type IsdC-N のこの 2 原子間の距離は、MD シミュレーションの 96%の時間において 3.5 Å 以内であり、水素結合が保持されていた。また IsdA-N においてはこれに対応する残基は IsdA-Y166 と Y170 であるが、99%保持されていた。しかしながら IsdC-N-F130I の apo 体のシミュレーション中では 82%程度の保持率に低下していた。これについて、IsdC の F130、Y132 および Y136 と、IsdA の I164、Y166、Y170 は β 7 とともに β ヘアピン構造を形成する β 8 ストランド上に存在している (**Figure 6.18**)。以降これを β 7- β 8 ヘアピンと呼ぶ。IsdC-N の F130 は β 7 上の I121 と疎水性相互作用を形成している。同様に IsdA-N の I164 も V161 と疎水性相互作用を形成している。この β 7- β 8 ヘアピンは NEAT ドメインの中で特に構造が変化しやすいことが PCA 解析により判明した (**Figure 6.19A, C**)。IsdC-N-F130I は wild type に比べてやや大きなゆらぎを見せており、このため β 7- β 8 ヘアピンの動きやすさが増大し、Y132-Y136 間の水素結合の安定性が低下することにつながっているのではないかと考えられる。IsdC の β 7- β 8 ヘアピンは IsdA に比べて 8 Å ほど長く、そのためイソロイシンよりも長いフェニルアラニン残基がこのヘアピンの動きやすさを抑制するのに必要だと考えられる。

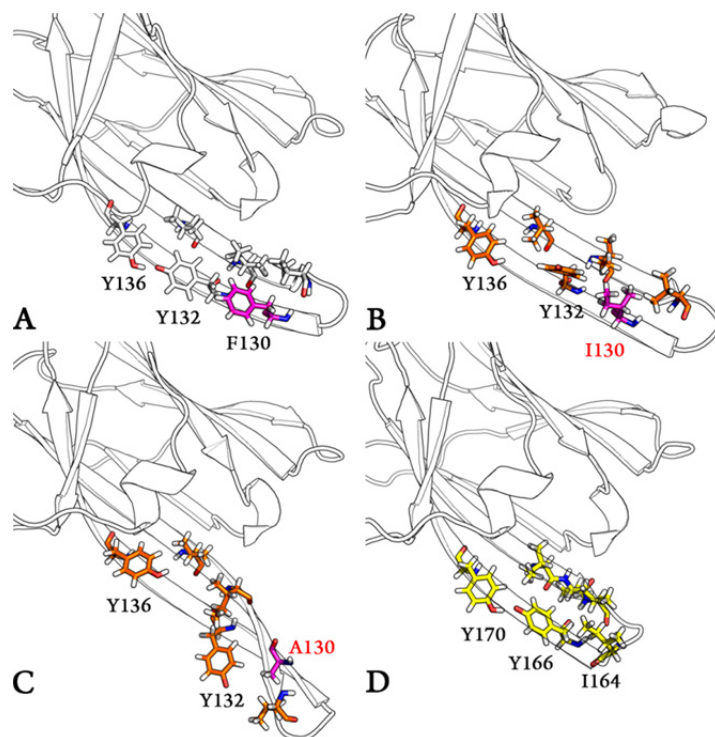


Figure 6.18 wild type IsdC-N (A)、IsdC-N-F130I (B)、IsdC-N-F130A (C)、IsdA-N (D)の、MD シミュレーション中に現れたヘム結合ポケット周辺の残基配置の比較。 β 7- β 8 ヘアピン中のバリン、イソロイシン、チロシンと置換した残基はスティックで表している。

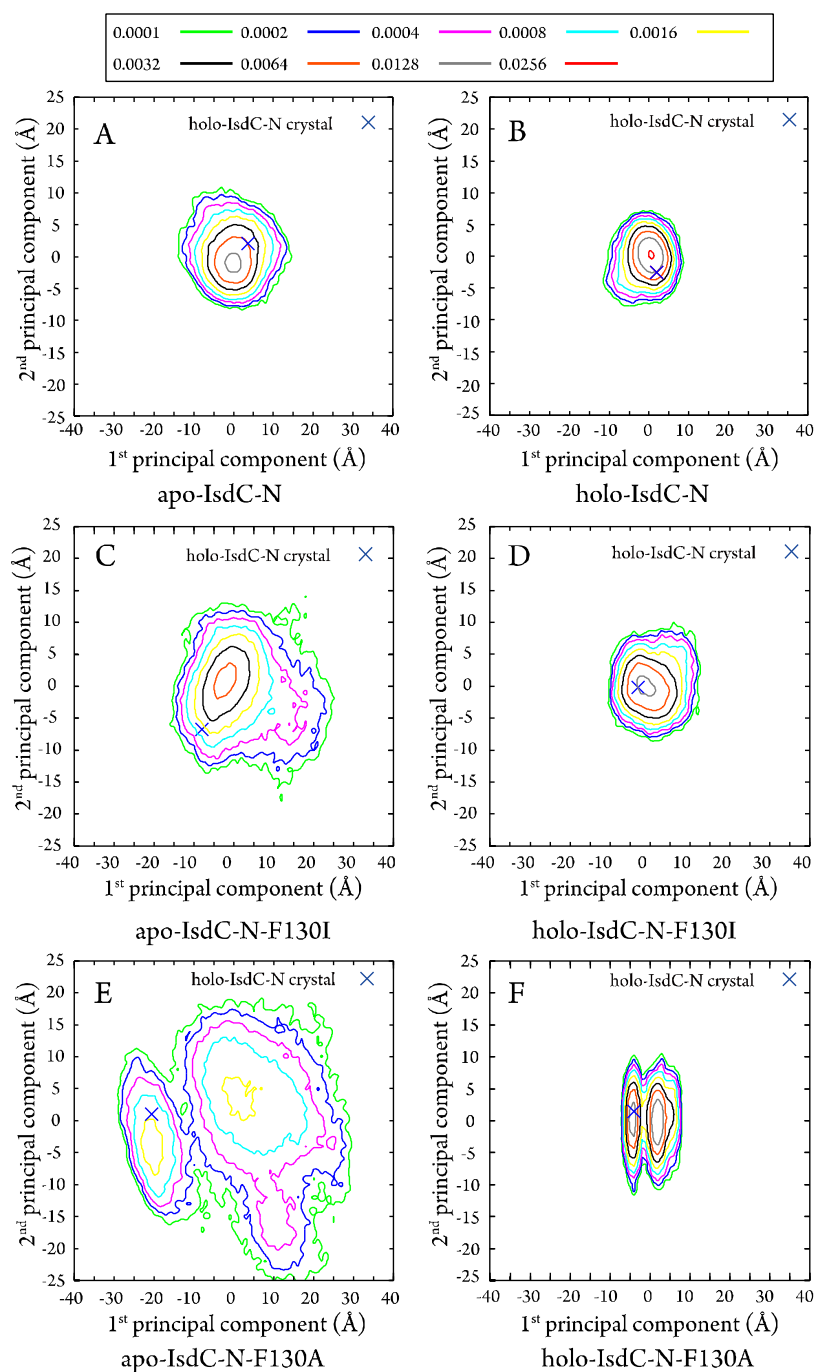


Figure 6.19 $\beta 7$ - $\beta 8$ ヘアピン構造のアンサンブルをそれぞれ MD シミュレーションの apo, holo 体から得た第 1 主成分、第 2 主成分で作る 2 次元平面に投影した図。IsdC-N の apo (A) と holo (B)、IsdC-N-F130I の apo (C) と holo (D)、そして IsdC-N-F130A の apo (E) と holo (F) である。横軸と縦軸の値はそれぞれ第 1、第 2 主成分の単位を Å とした平均構造からの分散を表す。IsdC の holo 体結晶構造 (PDB entry: 2O6P) の位置を青色の × で示している。

この仮説を検証するため、新たに IsdC-N-F130A 変異体のモデルを構築し、MD シミュレーションを行った。予想通り、Y132 と Y136 間の水素結合の保持率は 23% まで低下してお

り (Figure 6.17)、 $\beta 7$ - $\beta 8$ ヘアピンの可動性はさらに高まっていた (Figure 6.19A, C, E)。対照的に holo 体の IsdC-N-F130A では2つのチロシンの間の水素結合は F130I と wild type と同様にシミュレーション全体で保持されていた。holo 体 IsdC-N-F130A の $\beta 7$ - $\beta 8$ ヘアピンの変動はこれも wild type と F130I と同様に小さいものであった (Figure 6.19B, D, F)。したがってこれらの結果から IsdC-N-F130A のヘムへの親和性は、結合時のエントロピー低下が大きくなっていることがから wild type に比べて弱くなっていると考えられた。

次に ITC を用いて IsdC-N-F130A についての予想を実験的に検証した (Table 6.4)。 $-T\Delta S^\circ$ 項は wild type に比べて $0.8 \text{ kcal mol}^{-1}$ ほど上昇しており ($3.4 \rightarrow 4.2 \text{ kcal mol}^{-1}$)、IsdC-F130A における結合時のエントロピー損失を反映していると考えられた。興味深いことに ΔH° 項も同時に $0.2 \text{ kcal mol}^{-1}$ ほど増加し ($-14.6 \rightarrow -14.4 \text{ kcal mol}^{-1}$)、総合的に結合親和性のさらなる低下につながった ($\Delta\Delta G^\circ = +1.0 \text{ kcal mol}^{-1}$)。この ΔH° の増加は wild type の IsdC の F130 の 1 残基の寄与によるものであると考えられる ($+0.5 \text{ kcal mol}^{-1}$; Figure 6.14D)。また、wild type とは違い、Y132-Y136 間の水素結合が切断されてしまっているため、IsdC-N-F130 変異体の Y132 は apo 体では水素がついている可能性があり、 ΔH° の上昇を招くことにつながった可能性もある。

IsdC-N の $\beta 7$ - $\beta 8$ ヘアピンは IsdH-NEAT3 や IsdA-N に比べると 6 残基ほど長くなっている。Abe らによってこの長い $\beta 7$ - $\beta 8$ ヘアピン構造は IsdE へとヘムを輸送するのに必要であることが示されている⁵⁰。しかし、これまで見たように $\beta 7$ - $\beta 8$ ヘアピンが長いことはヘム結合に際してエントロピー損失が増大してしまい、親和性を低下させてしまうという欠点にもつながる。このことは IsdC が IsdA よりも高い親和性を持つためには好ましくないものである。これを補うため、IsdC-N は先述の Glu88/Arg100 塩橋による ΔH° 項の上昇とともに、イソロイシン残基よりも好ましいフェニルアラニン残基を $\beta 8$ ストランド上に配置することで、apo 体において特徴的な長いヘアピン構造を剛直にしたと考えることができる。

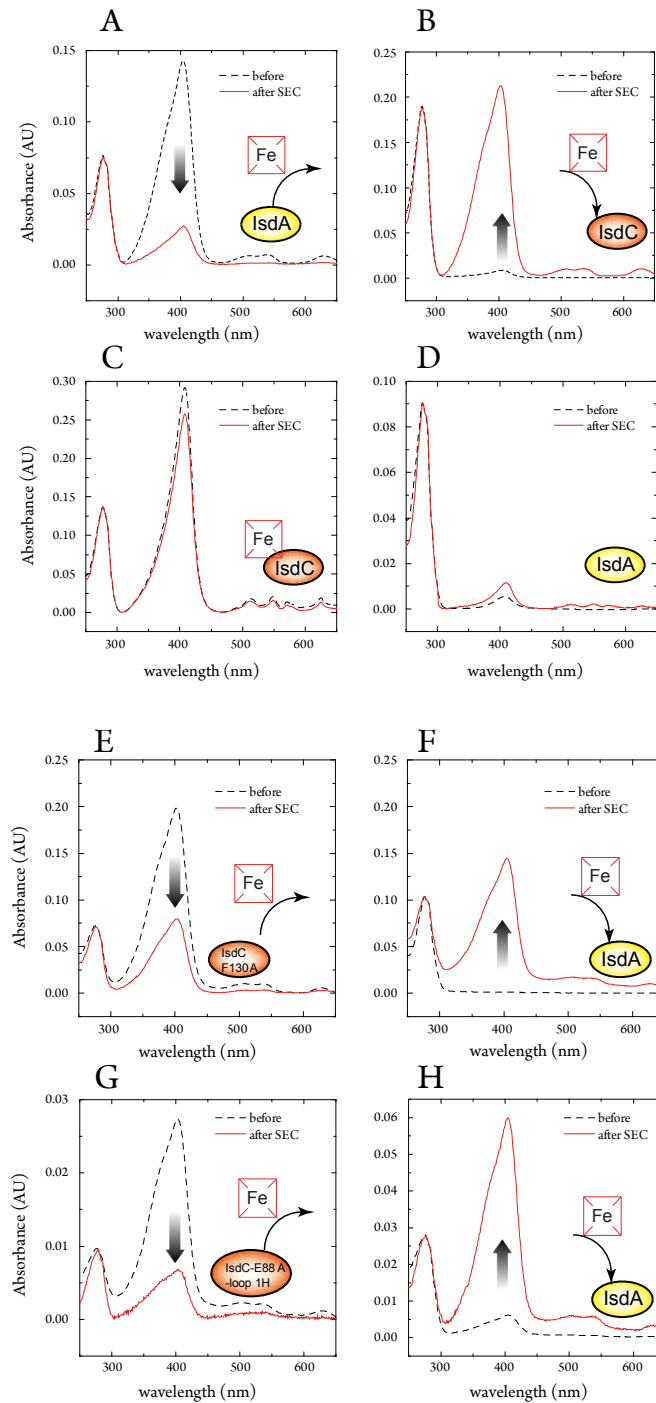


Figure 6.20 IsdA と IsdC およびその変異体間のヘム輸送。左側のパネル (A, C, E と G) は holo 体の Isd 蛋白質（ヘム供与体）の UV スペクトルを、右側のパネル (B, D, F と H) は apo 体（ヘム受容体）の UV スペクトルをそれぞれ表す。黒線と赤線はそれぞれサイズ排除クロマトグラフィーによる蛋白質の分離前後でのスペクトルを表す。(A, B) wild type の IsdA に存在したヘムは wild type の IsdC との混合後に IsdC 側へと受け渡された。(C, D) 反対に wild type の IsdC は wild type の IsdA には効率よく輸送されない。(E, F) IsdC-F130A から wild type の IsdA へとヘムが効率よく輸送された。(G, H) IsdC-E88A-loop 1H 変異体も同様に IsdA へとヘムを輸送した。

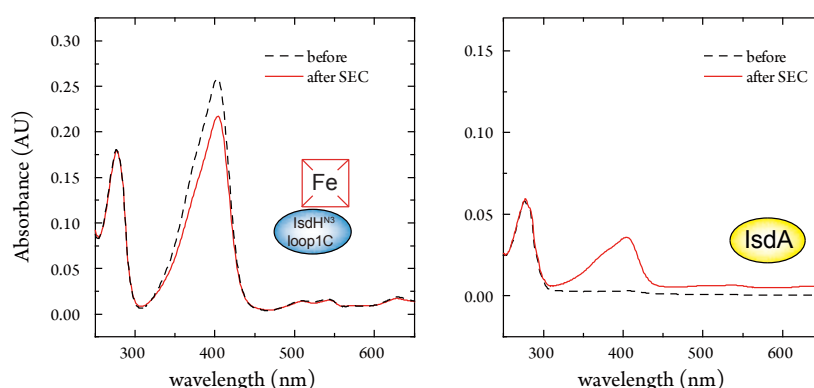


Figure 6.21 IsdH-N3-loop 1C と IsdA 間のヘム輸送。左側は holo 体の IsdH-N3-loop 1C の、右側は apo 体の IsdA の UV スペクトルの変化をそれぞれ表す。サイズ排除クロマトグラフィー後であっても IsdH-N3-loop 1C に存在するヘムは IsdA へとほとんど輸送されなかった。

6.10 Isd 変異体を用いた NEAT ドメイン間ヘム輸送の方向の逆転現象

ここまでで、ヘム輸送の下流に位置している Isd 蛋白質の NEAT ドメインが金属ポルフィリンに対して上流のものより高い親和性を有していることを示してきた。外部からのエネルギーを必要としないことから、このことは金属ポルフィリンの輸送が自由エネルギー勾配によって行われていることを示していると考えられる。この仮説が正しいことを完全に示すべく、NEAT ドメインのヘムに対する親和性を調節することでヘムを逆方向に輸送させることを試みた。先の **Table 6.4** に示したように IsdC-N の変異体群は wild type の IsdA よりヘムへの親和性が低下していた。これらのことから、これら IsdC の変異体から apo 体の IsdA-N へのヘム輸送が起きるかどうかを調査することにした。この実験結果は、明確に IsdC の変異体から apo 体 IsdA への輸送が効率よく発生していることを表していた (**Figure 6.20**)。一方で同様の実験条件下では wild type の IsdC は IsdA へとヘムを輸送しなかった (**Figure 6.20C, D**)。この実験結果はこれまで知られている限りで、NEAT ドメイン間のヘム輸送が逆流した初めてのケースである。また、wild type の IsdH-NEAT3 と IsdA では、IsdA へとヘムの輸送が発生しているが¹⁰⁰、IsdA よりもヘムに対する親和性が強くなった IsdH-N3-loop 1C 変異体 (**Table 6.4**) は IsdA へとヘムを輸送しなかった (**Figure 6.21**)。このことから、NEAT ドメインにおけるヘム輸送の方向は、それらの間の親和性の強弱と必要十分条件の関係にあることが示された。

6.11 他の病原菌に存在する NEAT ドメインの親和性の推定

近年、黄色ブドウ球菌以外の他の重要なグラム陽性菌、例えば *Listeria monocytogenes*^{104,105}, *Staphylococcus lugdunensis*¹⁰⁶, *Bacillus cereus* や *Bacillus anthracis* においても Isd に似たような蛋白質が次々に発見されている。*B. anthracis* では BslK¹⁰⁷, IsdX1, IsdX2, IsdC と Hal (BAS0520)¹⁰⁸ がこれまでにヘム結合もしくはヘム輸送蛋白質として現在同定されている¹⁰⁹。異種間のシーケンスアラインメント (**Figure 1.5**) と報告されている IsdX1¹¹⁰ と

IsdX2-NEAT5¹¹¹の結果によれば、他の NEAT ドメインもほぼ同様の立体構造を持つことが予想され、loop 1 領域に存在するアミノ酸配列がヘム結合のセリン残基の水素結合の安定性に影響していることが考えられる (Figure 6.22)。これまでに挙げた理論・実験からの結果によれば、これらの異種の NEAT ドメインに対しても、loop 1 領域に多くの負電荷のアミノ酸を含むものは低い親和性を持つことが予想できる。事実、その予想と合致するように、loop 1 領域に 3 つの負電荷アミノ酸を持つ *B. anthracis* の IsdX1 は、2 つの負電荷を持つ BslK や IsdC に比べると低い親和性を示すことが報告されている¹⁰⁷。これにより、loop 1 領域の負電荷アミノ酸の数をもとにまだ実験的に親和性が調べられていない NEAT ドメインの親和性の相対的な強さを推定できることが可能かもしれない。例えば、*B. anthracis* の Hal (Bas0520) はまだ相対的な親和性が決定されていないが、4 つの負電荷アミノ酸を持つので、親和性は他の NEAT ドメインよりも低いのではないかと、このような予想である。当然ながら *S. aureus* の IsdC-N で見られたように、loop 1 の外側にも親和性に影響を与える残基が存在する可能性はある。このような場合シーケンスデータのみから親和性を推定するのは難しくなるであろう。しかしながら、本研究で示した通り、もし正確な三次元構造が利用可能であるのならば、MD シミュレーションによって親和性を見積もり、結合に重要な残基を特定することが可能となるであろう。

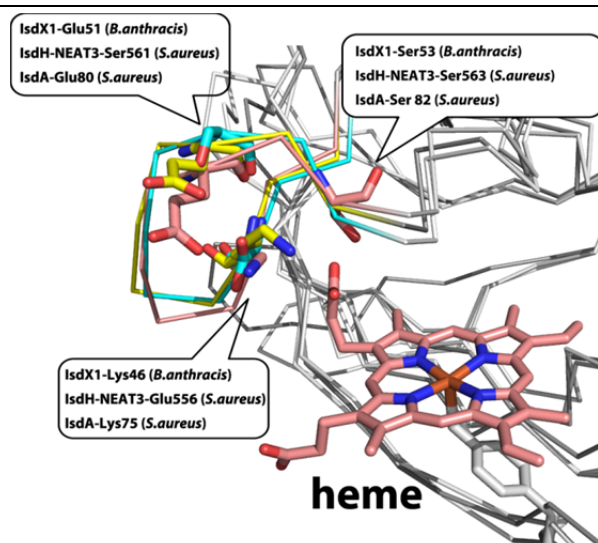


Figure 6.22 ヘム結合ポケット付近の残基。*B.anthraxis* の IsdX1 (PDB entry: 3SIK), IsdH-NEAT3 (PDB entry: 2Z6F) と IsdA (PDB entry: 2ITF) はそれぞれ薄桃色、薄青色、黄色で示している。IsdX1-Lys46, IsdH-NEAT3-Glu556 と IsdA-Lys75 はそれぞれ Figure 1.5 の位置 13 番に相当する。IsdX1-Glu51, IsdH-NEAT3-Ser561 と IsdA-Glu80 は位置 18 番に相当する。

6.12 第 6 章の結言

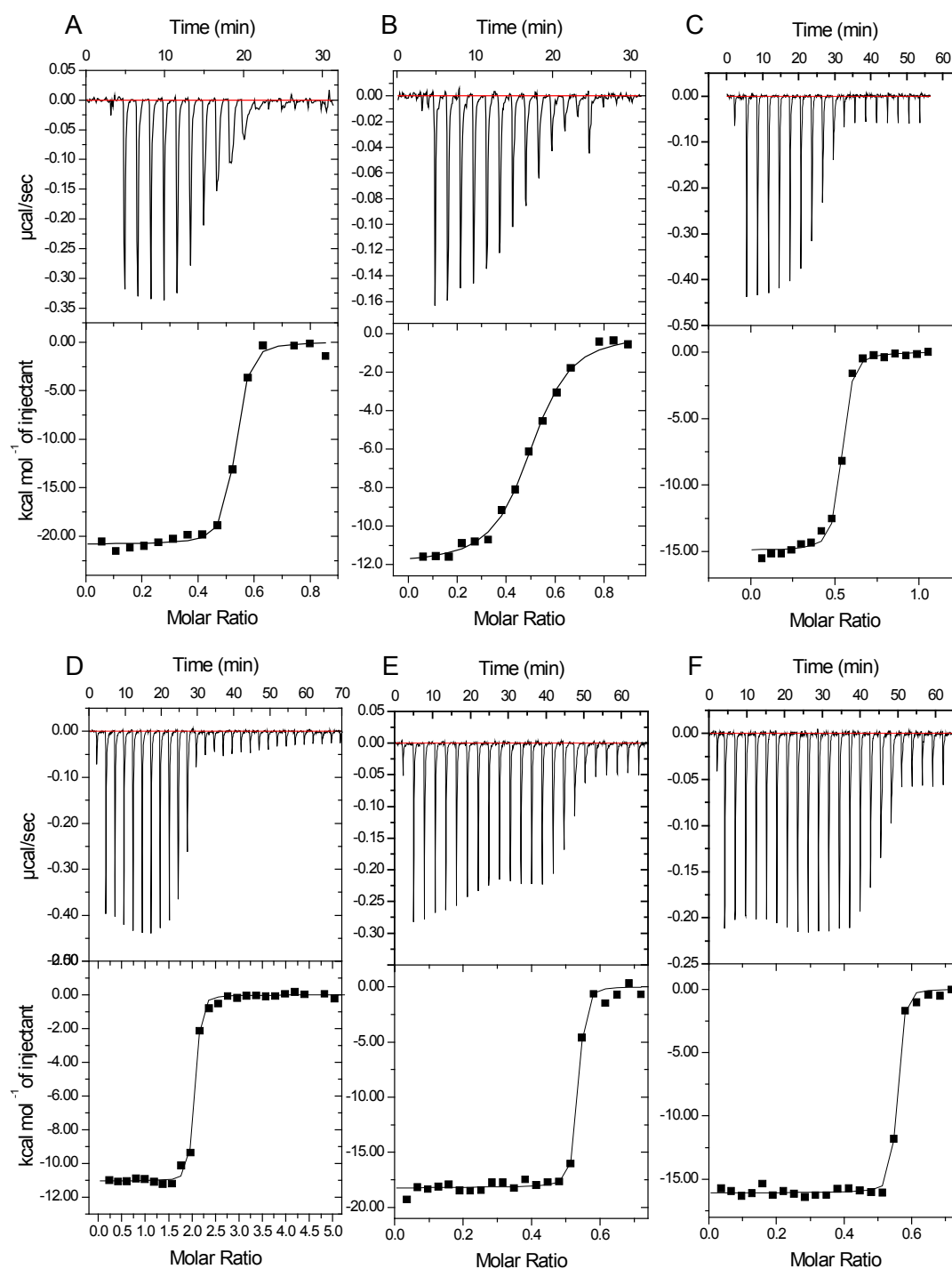
ITC を用いたヘムまたは金属ポルフィリンに対する親和性測定を用いて、親和性が IsdH-N3 < IsdA-N < IsdC の順に強くなることを証明した。この順番は以前に報告された in

vitro でヘムが輸送されていく順序と一致している。MD シミュレーションに基づいて、各 Isd 蛋白質の loop 1 領域と、IsdC に特有の Glu88-Arg100 塩橋が、NEAT ドメインの親和性を特徴付ける存在として重要であることが予想された。加えて、F130 は IsdC に特有であるが、apo 体で IsdC の長い β 7- β 8 ヘアピン構造を安定化させ、ヘム結合におけるエントロピーの損失を減らすことにつながっていることを示した。これらすべての予想は IsdC-loop 1H キメラ体、IsdC-E88A 変異体、それらのダブル変異体、そして IsdC-F130A 変異体を用いた熱量測定法によって検証され、各領域がエンタルピー的またはエントロピー的に大きく寄与していることが証明された。また IsdC-E88A-loop 1H キメラ体と IsdC-F130A 変異体は IsdA-N よりもヘムに対する親和性が低くなっていることから、IsdA へとヘムを逆に輸送するようになった。これらの変異された残基は金属ポルフィリンの金属原子の箇所に直接影響を及ぼしていないため、IsdH-NEAT3、IsdA-N、IsdC-N の親和性の順序は、金属原子の種類によらないであろうということに帰結される（マンガン・ガリウム入りポルフィリンにより部分的に示されている）。したがって NEAT ドメインに結合可能な非鉄金属ポルフィリンは Isd system 中で細胞壁上から細胞膜へと輸送されていくことが予想される。特にガリウムポルフィリンは NEAT ドメイン以下の Isd 蛋白質にも結合可能であり、さらに IsdG/IsdI での分解が不可能であることから、いわゆる“トロイの木馬”として Isd system の鉄獲得を阻害できる働きが予想される。

6.13 補足資料 (Supporting information)

本研究の第 6 章の内容は ACS Publications の *Biochemistry* 誌に採録された (DOI: 10.1021/bi4008325) ¹¹²。

本文中の ITC 測定の結合等温線を以下の **Figure 6.23** と **Figure 6.24** に掲載する。



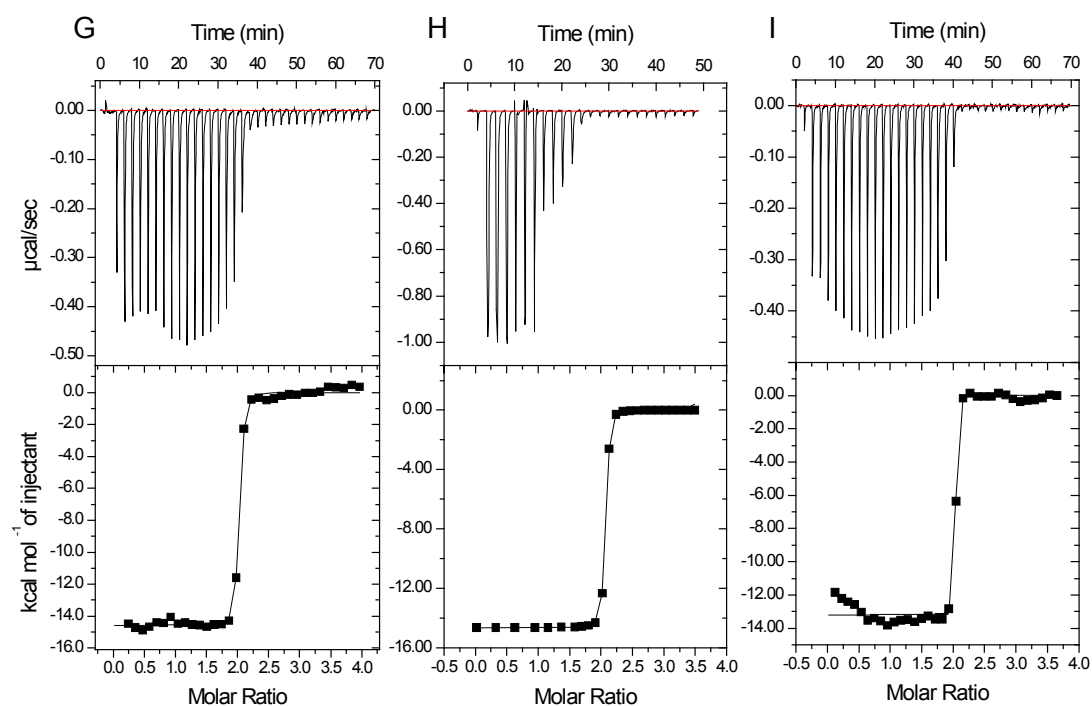


Figure 6.23 ITC の結合等温線。(A–C) IsdH-NEAT3 とそれぞれ順にヘム、MnPIX、GaPIX。(D–F) IsdA-NEAT とそれぞれ順にヘム、MnPIX、GaPIX。(G–I) IsdC とそれぞれ順にヘム、MnPIX、GaPIX。(A–C, E, F) はリガンドがセル側にセットされており、その他はシリンジ側にセットされているため、Molar Ratio が反転している（測定に影響はない）。

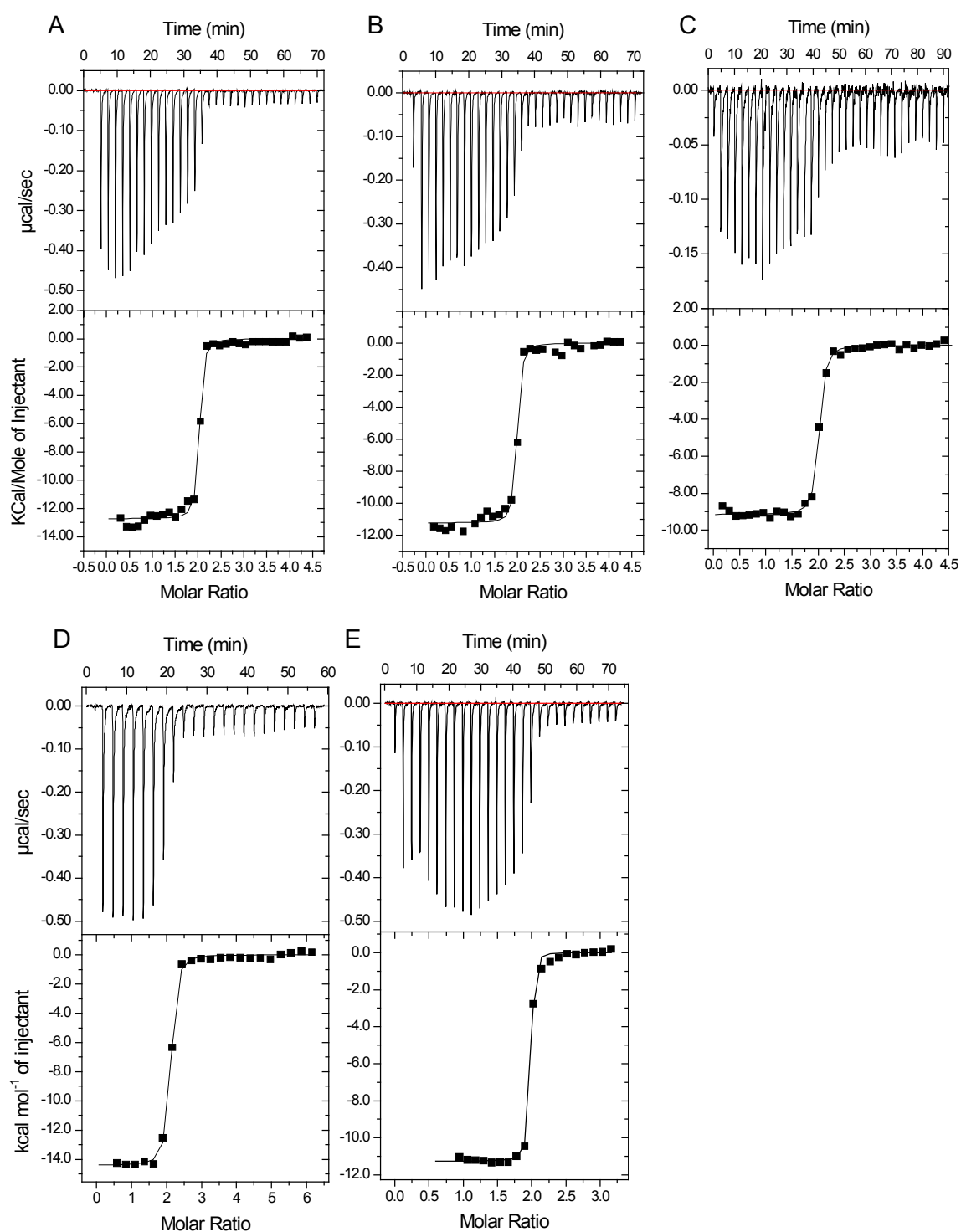


Figure 6.24 ITC の結合等温線 (Binding isotherm). (A) IsdC-loop 1H (B) IsdC-E88A (C) IsdC-E88A-loop 1H (D) IsdC-F130A (E) IsdH-loop 1C。

第7章 Isd-NEAT ドメイン間のヘム輸送の中間体構造の推察

7.1 緒言

第6章ではMDシミュレーションによる Isd-NEAT ドメインのヘムに対する親和性の違いが主として loop 1 領域と IsdC 内部の塩橋によることが示された。

ところで、これら Isd-NEAT ドメイン間のヘム輸送現象は、高いヘム親和性であるにも関わらず数分以内に完了することが本実験および他の研究者からも報告されている。この反応の1つの仮説として、**Figure 1.11** にも示されているようにヘムや金属ポルフィリンを受け渡す時にドメイン構造同士がちょうど握手をするような位置関係を取るのではないかと考えられている。しかしながら、この図はあくまで予想であり、報告されている結晶構造を用いて単純に再現しようとした際にはそれぞれの $\beta 7$ - $\beta 8$ ヘアピン部分がぶつかりあうため、信頼性に欠けると考えられる。

そこで本章では MD シミュレーションを用いてこのヘム輸送中間複合体がどのように形成されるのか、形成されるのであれば、エネルギーに基づいて最も信頼性の高い構造を推定することを目的とした実験とその結果を記す。この計算実験を行う上で、これまで使用した MM 法だけでなく、金属を含めたより厳密な最安定構造を得るため、諸熊らによって開発され現在 Gaussian 09 に実装されている QM とのハイブリッド計算法である ONIOM 法を用いた^{113,114}。

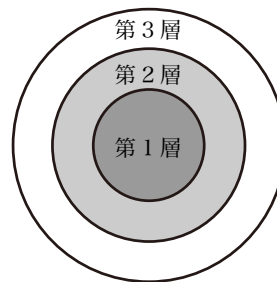
7.2 ONIOM 法

これまで述べたように QM 法では化学反応を考慮でき、金属との配位結合についても記述が可能であるが、大きな系の取り扱いが困難である。一方、MM 法では大きな系を取り扱いができる一方で、電子が関わる化学反応を記述することはできない。この両者の長所を活かして、大きい系の化学反応に適用可能にする1つの方法が ONIOM (Our own *N*-layered Integrated Orbital and Molecular mechanics)法である。ONIOM 法では分子全体を中心部分から外側に向かっていくつかの層に分割し、中心部分は QM で、外側の層では次第に低いレベルの QM または MM 法で計算する。これにより、計算精度を落とすことなく計算時間を短縮することが可能となる。

ONIOM 法ははじめに全系 (Real 系) を2層に分け、中心部分 (Model 系) を MO 法で、外側を含む全系を MM 法で計算する IMOMM (Integrated Molecular Orbitals plus Molecular Mechanics) 法¹¹⁵、および高いレベルの MO 法と低いレベルの MO 法を組み合わせた IMOMO (Integrated Molecular Orbital plus Molecular Orbital) 法¹¹⁶として開発された経緯がある。この方法では

$$E_{\text{IMOMO}} = E(\text{model, MO}) + \{E(\text{real, MM}) - E(\text{model, MM})\} \quad (7.1)$$

で近似される。ただし、 $E(\text{model}, \text{MO})$ と $E(\text{model}, \text{MM})$ は Model 系を MO と MM で計算した時のエネルギー、 $E(\text{real}, \text{MM})$ は Real 系を MM で計算した時のエネルギーである。この式の $\{ \}$ 内は $E(\text{real}, \text{MO}) - E(\text{model}, \text{MO})$ に近いと考えられるので、右辺が $E(\text{real}, \text{MO})$ の近似式に相当するのである。これを拡張したのが **Figure 7.1** の ONIOM 法であり、第 1 層の中心部分 (Model 系) に高レベル、第 1+2 層 (中間の Medium 系) レベル、第 1~3 層 (Real 系) に低レベルの計算方法を用いる。このとき全エネルギーは次のように近似できる。



層	系	計算レベル
1	Model	高
1+2	Middle	中
1+2+3	Real	低

Figure 7.1 3 層の ONIOM 計算の概念図

$$E_{\text{ONIOM}} = E(\text{model}, \text{high}) + \{E(\text{mid}, \text{med}) - E(\text{model}, \text{med})\} + \{E(\text{real}, \text{low}) - E(\text{mid}, \text{low})\} \quad (7.2)$$

なお、それぞれの層の境界の結合が切れた箇所にはキャップ原子 (水素原子) をつけて計算する。

ONIOM 法は Real 系・Model 系においてエネルギーを評価し、加算するという点で簡単であるが、内部の層の計算時に外部の層の電荷の影響がなされていない。これが QM/MM 法と異なる点であり、スペクトルの計算には向いていない。これを改善する方法が electron embedding 法であり、Gaussian 09 には指定することによって内部の層の計算時に外部層の電荷の効果が考慮されるようになる。

7.3 IsdH-NEAT3-heme-IsdA-NEAT 輸送中間体のモデル構築

第 5 章で説明した MD シミュレーションの手法とパラメータを用いる。IsdH-NEAT3-heme-IsdA-NEAT 輸送中間体のモデルの初期座標は以下のようにして作製した。

はじめに IsdH-NEAT3 と heme 複合体の結晶構造 (PDB: 2Z6F) に対して、IsdA-NEAT-heme (PDB: 2ITF) のヘムの窒素原子 4 点を用いて、それぞれの $\beta 7$ - $\beta 8$ ヘアピン構造がヘムを挟んで反対側になるように重ねあわせた。IsdA-NEAT から結合しているヘムを除いたのち、IsdA-NEAT の座標を IsdH-NEAT3 から x 軸方向に 20 Å、 y 軸方向に 10 Å 平行移動させた。このときヘムの鉄原子までの距離は IsdA の Y166 のフェノール基の酸素原子から 24.87 Å、Y170 の酸素原子からは 26.02 Å となった (**Figure 7.2**)。

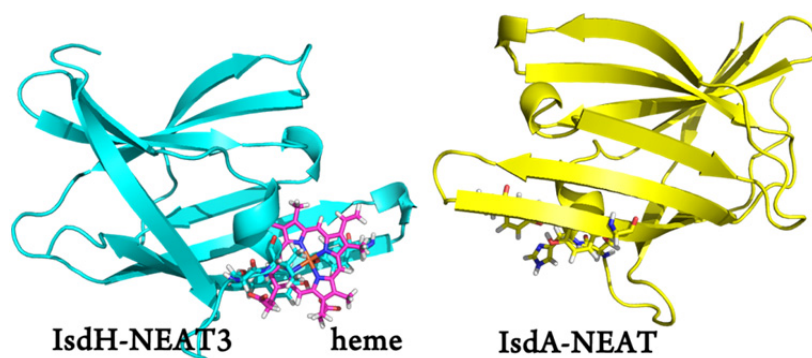


Figure 7.2 IsdH-NEAT3-heme-IsdA-NEAT 輸送中間体の MD シミュレーションの初期座標図。水分子は表示していない。

この座標系に対し、**5.2**「モデル構築」と **5.4**「分子動力学シミュレーションの設定」で示した方法と同様に TIP3P 水分子を配置し、系のエネルギーを最小化した後、徐々に系を平衡化させた。

1 ナノ秒の系の平衡化後、ソフトウェア AMBER 11 の sander モジュールの下、**Table 7.1** に示す距離拘束を適用した状態で 15 ナノ秒間の *NPT* シミュレーションを行った。

Table 7.1 IsdH-NEAT3-heme-IsdA-NEAT に適用した距離拘束^a

対象 1	対象 2	平衡距離 r (Å)	力の定数 k (kcal mol ⁻¹ Å ⁻²)
IsdH ^{N3} -Ser563-OG	Heme-O1D	2.8727	10.0
IsdH ^{N3} -Tyr646-OH	Heme-FE	4.0461	30.0
IsdA-Tyr166-OH	IsdA-Tyr170-OH	2.700	0.1
IsdA-Tyr166-OH	Heme-Fe	2.200	0.1
IsdA-Ser82-OG	Heme-O1A	2.8727	0.1
Heme-HVT2	IsdA-Trp113-CA	3.000	0.1

^a 対象名は ff99SB Amber force field の Atom type を用いた。それぞれの対象間にかかる力は、対象間の距離が R のとき、力の定数 k と平衡距離 r を用いて $k(R - r)^2$ である。

この操作により IsdH-NEAT3-heme-IsdA-NEAT がドッキングした。以降 50 ナノ秒間、距離拘束を適用せずに MD シミュレーションを続行した。

7.4 IsdA-NEAT-heme-IsdC-NEAT 輸送中間体のモデル構築

第 5 章で説明した MD シミュレーションの手法とパラメータを用いる。IsdA-NEAT-heme-IsdC-NEAT 輸送中間体のモデルの初期座標は以下のようにして作製した。

はじめに IsdA-NEAT とヘム複合体の結晶構造 (PDB: 2ITF) に対して、IsdC-NEAT・heme (PDB: 2O6P) のヘムの窒素原子 4 点を用いて、それぞれの $\beta 7$ - $\beta 8$ ヘアピン構造がヘムを挟んで反対側になるように重ねあわせた。IsdA-NEAT から結合しているヘムを除いたのち、

IsdC-NEAT の座標を IsdA から x 軸方向に 30 Å、 y 軸方向に 10 Å 平行移動させた。このときヘムの鉄原子までの距離は IsdC の Y132 のフェノール基の酸素原子から 32.92 Å、Y136 の酸素原子からは 35.00 Å となった (Figure 7.3)。

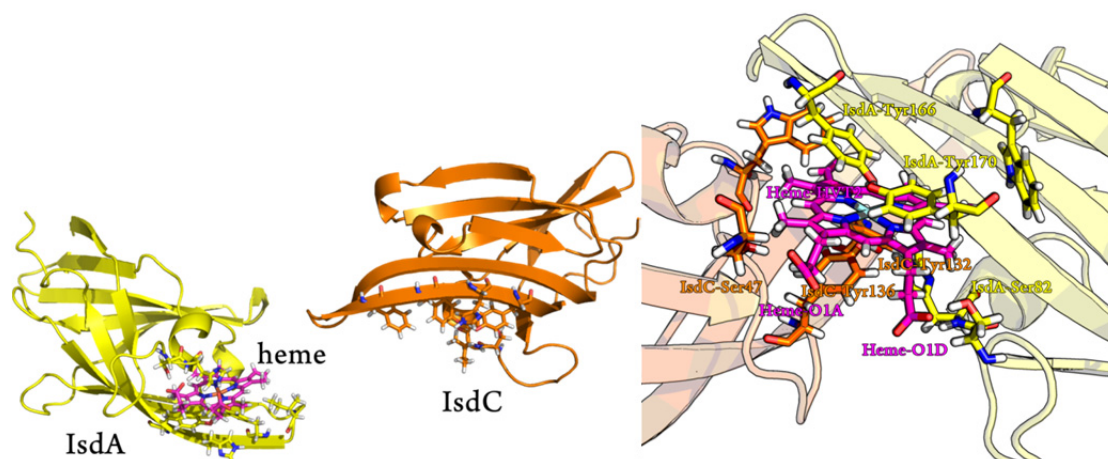


Figure 7.3 (左)IsdA-NEAT-heme-IsdC-NEAT 輸送中間体の MD シミュレーションの初期座標図。水分子は表示していない。(右) 距離拘束に用いた原子名と位置の対応

この座標系に対し、先と同様の方法によって TIP3P 水分子を配置し、系のエネルギーを最小化した後、徐々に系を平衡化させた。

1 ナノ秒の系の平衡化後、ソフトウェア AMBER 11 の sander モジュールの下、Table 7.2 に示す距離拘束を適用した状態で 15 ナノ秒間の *NPT* シミュレーションを行った。

Table 7.2 適用した距離拘束^a

対象 1	対象 2	平衡距離 r (Å)	力の定数 k (kcal mol ⁻¹ Å ⁻²)
IsdA-Ser82-OG	Heme-O1D	2.8727	10.0
IsdA-Tyr170-OH	Heme-Fe	4.0461	10.0
IsdC-Tyr132-OH	IsdC-Tyr136-OH	3.000	1.0
IsdC-Tyr132-OH	Heme-Fe	2.200	0.1
IsdC-Ser47-OG	Heme-O1A	2.8727	0.1
Heme-HVT2	IsdC-Trp77-CA	3.000	0.1

^a 対象名は ff99SB Amber force field の Atom type を用いた。それぞれの対象間にかかる力は、対象間の距離が R のとき、力の定数 k と平衡距離 r を用いて $k(R - r)^2$ である。

この操作により IsdA-NEAT-heme-IsdC-NEAT がドッキングした。以降 35 ナノ秒間、以下の Table 7.3 に示す距離拘束を適用した状態で MD シミュレーションを続行した。

Table 7.3 15～50 ナノ秒間に適用した距離拘束^a

対象 1	対象 2	平衡距離 r (Å)	力の定数 k (kcal mol ⁻¹ Å ⁻²)
IsdA-Ser82-OG	Heme-O1D	2.8727	1.0
IsdA-Tyr170-OH	Heme-FE	4.0461	1.0
IsdC-Tyr132-OH	IsdC-Tyr136-OH	2.507	0.1
IsdC-Ser47-OG	Heme-O1A	2.8727	0.05

^a 対象名は ff99SB Amber force field の Atom type を用いた。それぞれの対象間にかかる力は、対象間の距離が R のとき、力の定数 k と平衡距離 r を用いて $k(R - r)^2$ である。

7.5 ONIOM による各種構造変異体の最安定構造推定

7.5.1 研究背景

これまで見てきたように、Isd-NEAT ドメインによるヘム輸送蛋白質にはほぼ 100%、 $\beta 8$ ストランド上に 2 つのチロシンからなる“YXXXY”モチーフが存在している (Figure 1.5)。このモチーフはシーケンスアラインメントだけでなく変異体解析による実験結果によっても、特にヘム輸送速度に関して重要な残基であることが報告されている⁵¹。また、ヘム結合ポケットの上部に存在する loop 1 領域の C 末端にはヘムのプロピオン酸基と結合するためのセリン残基が共通して存在している。これらの残基は特にヘムの輸送および結合について大きな影響を及ぼしていると考えられる。一方で金属ポルフィリン中の金属との配位結合が大きく関わっているために、MD シミュレーションのみではこれらの反応を詳細に記述することはできない。また、ヘムに含まれる鉄原子は量子化学計算の発達しつつある現在でも未だ性質を詳細に記述することは難しく、特に 3d 軌道の電子スピン状態が大きく影響しうるため計算時間も長時間にわたってしまい、探索は現実的ではない。

そこで、鉄原子の代わりに第 6 章で示したガリウムポルフィリン (Ga-PPIX) をアナログとして使用し、反応座標を探索するという手法を採用した。これまでのところ、EPR によって Isd-NEAT 蛋白質に結合中のヘムの鉄原子は高スピンであることは確認されているが、それ以外のスピン状態を取りうることは報告されておらず、また反応中に電子が他の残基に移動するということも確認されていない。一方のガリウムポルフィリンは 4s と 4p 軌道にそれぞれ 2 つと 1 つずつ電子が配置されているが、通常イオン化すると Ga^{3+} 以外のイオン状態を取ることは極めて少ない。このことは電子状態と価数が反応中にめまぐるしく変化しやすい鉄原子とは対照的である。また、ガリウムポルフィリンが問題なく Isd-NEAT 間で輸送されるということは、電子状態の変化がほとんど存在しないかまたは影響しないものではないかと考えられる。さらに、量子化学計算中ではガリウムはイオン状態であっても 3d 軌道の電子が反応に影響することは少ないため、鉄原子に比べ極めて計算が行い易い。このことより、ヘムのアナログとしてのガリウムポルフィリンを用いることで、やや簡単な量子化学計算を行えることが予想される。また、 Ga^{3+} で構造最適化を行った後で、モデル

中でヘムの Fe^{3+} に置換すれば計算時間を減らせると考えられる。

7.5.2 IsdH-NEAT3 と Ga-PPIX、ヘム複合体の構造最適化

初期構造を PDB entry: 2Z6F (IsdH-NEAT3 in complex with heme) から取得し³⁹、アミノ酸番号 544-655 を使用した。A chain と周囲の結晶水を取り出して、AmberTools の LEaP モジュールを用いて溶媒ボックスを形成した。ヒスチジン残基の δ , ϵ 位の水素付加は目視による水素結合ネットワーク解析により決定した。

その後 AMBER 11 の SANDER モジュールを用いて水・イオンを固定したまま 200 ステップ、次いで系全体の 200 ステップのエネルギー最小化を行い、1 ナノ秒の間に徐々に位置拘束を弱めながら 300 K の溶媒中で平衡化する操作を行った。こののち、蛋白質とヘムの周り 5 Å に存在する水分子とともに構造を抜き出し、これを ONIOM 用の初期構造とした (蛋白質とヘムで 1884 原子、水を含めて 4722 原子)。

ONIOM は 2 層式 QM:MM で行った。QM 領域は B3LYP/6-31G(d) の理論レベルで、MM 領域は ff99SB AMBER force field を用いた。QM 領域と MM 領域の境界は水素原子でキャッピングを行った。QM のコア領域を Tyr-642, Tyr-646, ヘムと定義し、ここから 15 Å の範囲に存在する蛋白質残基を MM の構造最適化中で動けるよう設定した (範囲の外側は固定される)。これに QM 領域として Ser-563 を追加し、ヘム原子の鉄をガリウムに置き換えた。最終的な QM 領域は **Figure 7.4** に示すように 76 原子 (キャッピング原子の水素を入れて 86 原子) とした。MM 領域全体の電荷は -6、QM 領域の電荷は -1、スピン多重度はともに 1 として計算した。

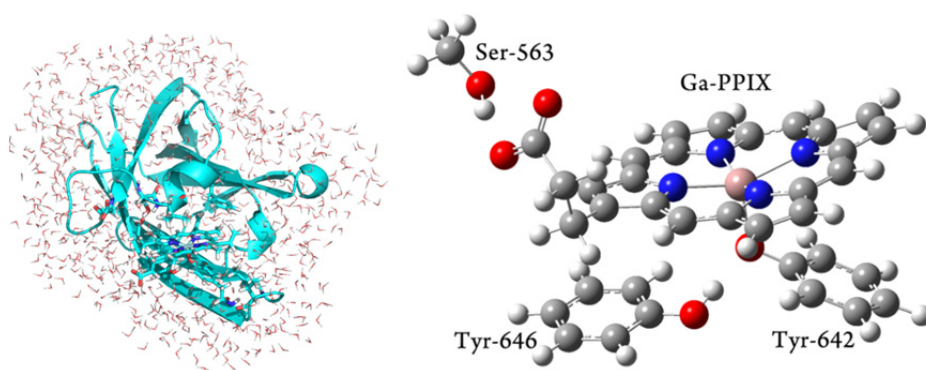


Figure 7.4 (左) IsdH-NEAT3 と Ga-PPIX の ONIOM 初期構造。蛋白質 (青色) の周囲に水分子を配置している。(右) QM 領域の拡大図。QM/MM 境界のキャッピングの水素原子を 10 個含む。

QM 領域に使用しているチロシンや Ga-PPIX の Real 系としての計算には RESP 電荷を用いているが、構造最適化前後においても部分電荷が変わらないことは計算精度の低下を招く可能性がある。そこで、Tao らの方法^{117, 118} に則り、以下の様な RESP 電荷更新の手続きを行った。

- (1) 初期の RESP 電荷セットと Mechanical embedding 法を用いた全体の構造最適化を行

った。

(2) 最適化後、QM 領域を取り出しキャッピング水素原子を付加した状態で真空中での RESP 電荷を求める手続きを行った。このとき QM 領域のキャッピング水素原子には電荷が 0 であるよう拘束をかけておく。RESP 電荷は同様に AmberTools の ANTECHAMBER モジュールを用いて求めた。

(3) この更新した RESP 電荷と Mechanical embedding 法を用いて再び構造最適化を行う。

(4) (2)と(3)の操作を、ONIOM 系のエネルギーの変化が 0.1 kcal/mol 以内に収まるまで繰り返す。

(5) 収束した構造について、シングルポイント計算を用いて B3LYP レベルで精密なエネルギーを計算した。このとき、鉄についての基底は SDD を、それ以外の元素については 6-311G(d)を用いた。

なお、これらの操作は Tao らが Web 上で公開している TAO Package により容易に行えるようになっている。

構造最適化後、Ga³⁺原子を Fe³⁺に置換して再び上記の操作を繰り返した。このときの鉄原子には LANL2DZ の基底を、その他の原子には 6-31G(d)基底を使用した。鉄のスピン多重度は 6 とした。

7.5.3 ヘム結合チロシンのフェニルアラニン変異体

IsdH-NEAT3 の Y642 は結晶構造中でヘム結合に関わる最も重要な残基であるが、先述の通り、NEAT ドメインは常にその 4 つ後にもう 1 つのチロシン残基を持つ。このチロシンによるヘム結合の可能性を調べるべく、Y642 をフェニルアラニンに置換した Y642F 変異体を構築した。また、IsdA においても Y166 を同様に置換したものを構築した。

それぞれのモデル構築は、PDB: 2Z6F (IsdH-NEAT3)、2ITF (IsdA-NEAT) と 2O6P (IsdC-NEAT)の結晶構造から、該当する配位チロシンのフェノール基の酸素原子を炭素原子にし、フェノール基の水素原子を除去することで、チロシンからフェニルアラニンに変化させた。IsdH-NEAT3-Y642F の QM 領域はこのフェニルアラニン、Y646、S563 およびヘムと定義した一方、IsdA においては、置換した F166、Y170、S82 とヘムだけでなく、ヘムの鉄原子に近い位置に存在するヒスチジン H83 も QM 領域に含めた (Figure 7.5)。

以降の手順は 7.5.2 と同様である。

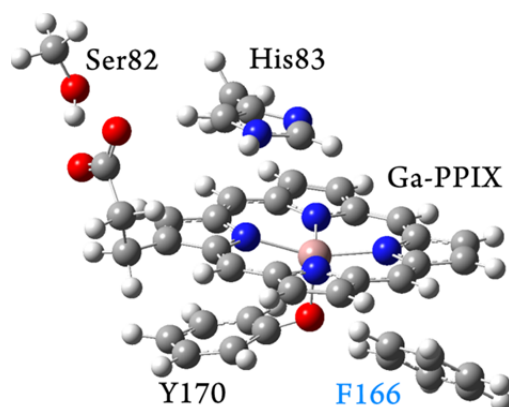


Figure 7.5 IsdA-Y166F における QM 領域の拡大図。QM/MM 境界のキャッピングの水素原子を 11 個含む。

7.5.4 IsdA, IsdC とヘム複合体の構造最適化

7.4 IsdA-NEAT-heme-IsdC-NEAT 輸送中間体のモデル構築において、IsdA-NEAT、ヘム、IsdC-NEAT の三者複合体が形成されたのち、IsdA-Y166, Y170 および IsdC-Y132, Y136 からの鉄原子までの距離が、**Table 7.4** (IsdC-Y132 とヘム鉄を接近させる目的) および **Table 7.5** (IsdC-Y136 とヘム鉄を接近させる目的) となるように拘束をかけて改めて 1 ナノ秒の Production Run を行ない、その後系のエネルギーを最小化した。この構造を Gaussian 09 での ONIOM の初期構造とした。

Table 7.4 適用した距離拘束 (IsdC-Y132 とヘム鉄が接近) ^a

対象 1	対象 2	平衡距離 r (Å)	力の定数 k (kcal mol ⁻¹ Å ⁻²)
IsdA-S82-OG	Heme-O1D	2.8727	8.0
IsdA-Y166-OH	IsdA-Y170-OH	2.3628	8.0
IsdA-Y166-OH	Heme-Fe	2.8364	8.0
IsdA-Y170-OH	Heme-Fe	3.2454	8.0
IsdC-S47-OG	Heme-O1A	2.7000	8.0
IsdC-Y132-OH	IsdC-Y136-OH	2.3628	8.0
IsdC-Y132-OH	Heme-Fe	2.6823	8.0
IsdC-Y136-OH	Heme-Fe	3.0935	8.0

^a 対象名は ff99SB Amber force field の Atom type を用いた。それぞれの対象間にかかる力は、対象間の距離が R のとき、力の定数 k と平衡距離 r を用いて $k(R - r)^2$ である。

Table 7.5 適用した距離拘束 (IsdC-Y136 とヘム鉄が接近) ^a

対象 1	対象 2	平衡距離 r (Å)	力の定数 k (kcal mol ⁻¹ Å ⁻²)
IsdA-S82-OG	Heme-O1D	2.8727	1.0
IsdC-S47-OG	Heme-O1A	2.8727	1.0
IsdA-Y166-OH	Heme-Fe	2.1000	1.0
IsdC-Y136-OH	Heme-Fe	2.1000	5.0
IsdC-Y132-OH	IsdC-Y136-OH	2.8727	1.0
IsdA-Y166-OH	IsdA-Y170-OH	2.8727	1.0

^a 対象名は ff99SB Amber force field の Atom type を用いた。それぞれの対象間にかかる力は、対象間の距離が R のとき、力の定数 k と平衡距離 r を用いて $k(R - r)^2$ である。

ONIOM において、まず全原子が動けるように設定した状態で IsdA-Y166, Y170, IsdC-Y132, Y136、金属ポルフィリン、IsdA-Ser82 と IsdC-Ser47 をそれぞれ ONIOM の Model 系に設定した (**Figure 7.6**)。はじめにヘムの鉄原子を Ga^{3+} に入れ替えて、Model 系の計算レベルを B3LYP/6-31G(d)を用い、Real 系の電荷を-3、スピン多重度を 1 とした。その後一度構造最適化した後に Ga を Fe 原子に改めて置換し、計算レベルを B3LYP/LANL2DZ¹¹⁹⁻¹²¹を用い、Real 系の電荷を-3、スピン多重度を 6 (高スピン) として構造最適化した。系全体の電荷は 1、スピン多重度を 6 と設定した。

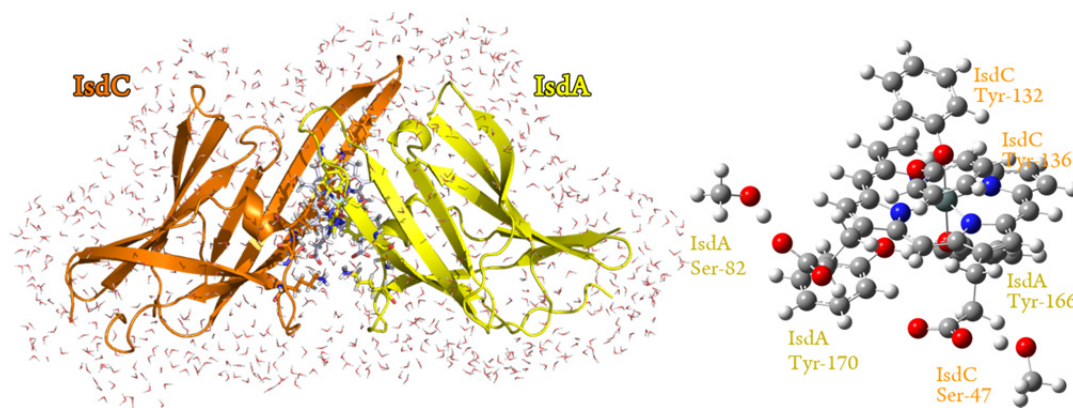


Figure 7.6 (左) IsdA-GaPPIX (heme)-IsdC と水分子の配置図。(右) QM 領域の図示

7.5.5 2つのフェノールとポルフィリン複合体のエネルギー計算

IsdA と IsdC それぞれに存在するチロシン残基とヘムの間のエネルギーを、2つのチロシン残基のフェノール基からの距離に対するエネルギーを計算した。簡単のためチロシン残基は単純なフェノールとし、ヘム (Fe-protoporphyrin IX) はポルフィリンとした (**Figure 7.7**)。それぞれのフェノールの酸素原子の距離を 4.06489 Å としてこれらの座標を固定した。続いて片側の酸素原子から鉄原子までの距離を 1.90000 Å になるよう設定し、0.02 Å ずつ距離を広げながらそれぞれの座標で最適化した構造のエネルギーを計算した。計算レベルは B3LYP を、基底は鉄原子以外に 6-31G(d)を用い、鉄原子には LANL2DZ を用いた。鉄のスピン多重度は高スピンの 6 とし、系全体の電荷は-1 とした。

なお、計算のエネルギーを表す単位 Hartree は、ボーア半径 a_0 、電子の静止質量 m_e 、プランク定数 h を用いて次のように表される。

$$E_h = \frac{\hbar^2}{m_e a_0^2} \quad (7.3)$$

1 Hartree は $4.35974434(19) \times 10^{-18}$ J であり、およそ $627.509 \text{ kcal mol}^{-1}$ である。

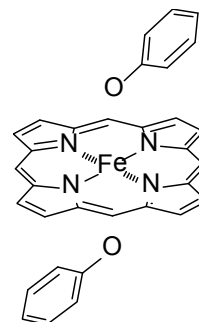


Figure 7.7 段階的エネルギー計算のモデル

7.6 結果と考察

7.6.1 2種の Isd-NEAT ドメインとヘムの複合体構造

IsdH-NEAT3 とヘムの複合体構造に対し、距離拘束を利用して IsdA-NEAT がこれに結合するまでの様子を観測した。MD シミュレーション中での IsdH-NEAT3・ヘム複合体と IsdA-NEAT の結合の様子を **Figure 7.8** に示す。はじめに 20 Å 以上離れていた両者が 2 ナノ秒間に接近し、互いの $\beta 7$ - $\beta 8$ ヘアピンがヘムの平面を挟んで上下に交差する構造をとった。この間のそれぞれのヘムのプロピオン酸基からの距離はおよそ 8 Å であった。15 ナノ秒経過したあたりで、IsdH-NEAT3 と IsdA-NEAT それぞれのヘムのプロピオン酸基が両者のセリン残基と水素結合される様子が観測された。以降両蛋白質に適用している距離拘束を除去しても 50 ナノ秒の間この水素結合はともに維持されていた (**Figure 7.8**)。この間、両蛋白質の結晶構造からのずれを表す RMSD は、両者とも最大 2 Å 程度であり、結晶構造からほとんど構造が変化せずに複合体構造を形成できることが判明した (**Figure 7.9**)。

この複合体を形成している間、ヘムのプロピオン酸基がある方向にはそれぞれの loop 1 領域が位置している。この 2 つの loop 1 で IsdH-NEAT3 の Glu556 と IsdA-NEAT の Lys75 といった長い残基によって溶媒への接触を防いでいるような形になっている。それぞれの Isd-NEAT とヘムの共結晶構造ではヘムの溶媒露出面積がとても大きいことがこれまでも指摘されていたが、この複合体構造ではヘムはほとんど溶媒に触れていない。また、IsdH-Glu556 と IsdA-Lys75 の間で安定的ではないにしろ一時的に塩橋が形成されることが確認された。以上より、これら MD シミュレーションによって得られた IsdH-NEAT3・ヘムと IsdA-NEAT は構造上無理なくドッキングが可能であることが強く示唆された。

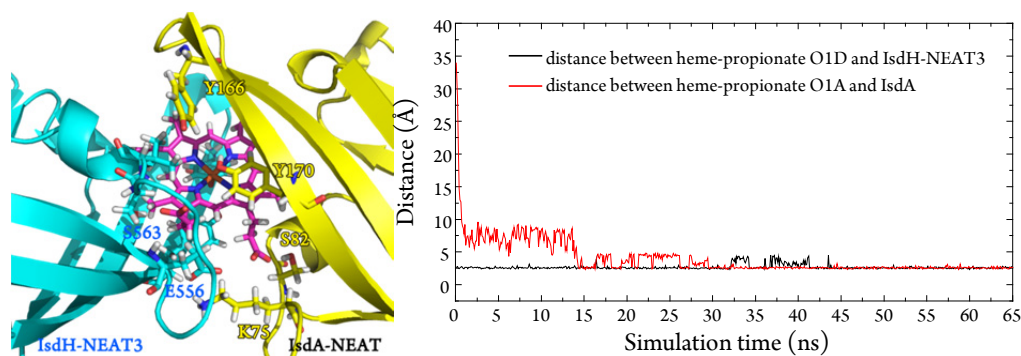


Figure 7.8 (左) IsdH-NEAT3, IsdA-NEAT とヘムの複合体構造。ヘムのそれぞれのプロピオン酸基部分に IsdA, IsdC のヘム結合の Ser 残基が水素結合を形成している。スナップショットは 15 ナノ秒時点のものを使用した。(右) 各 Isd 蛋白質から 2 つのプロピオン酸基までの距離のプロット。15 ナノ秒の時点で距離拘束を変更している。

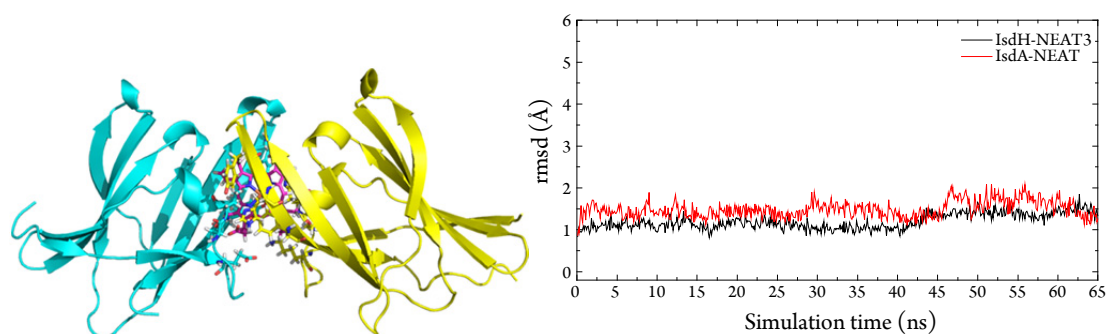


Figure 7.9 (左) 65 ナノ秒時点での IsdH-NEAT3, IsdA-NEAT とヘムの複合体構造 (全体)。(右) IsdH-NEAT3 と IsdA-NEAT のそれぞれの結晶構造 (PDB entry: 2Z6F, 2ITF) を基準とした RMSD 値の時間変化プロット。

同様に、IsdA-NEAT とヘムの複合体構造に対し、距離拘束を利用して IsdC-NEAT がこれに結合するまでの様子を観測した。MD シミュレーション中での IsdA-NEAT・ヘム複合体と IsdC-NEAT の結合の様子を **Figure 7.10** に示す。はじめに 35 Å 以上離れていた IsdC-NEAT と IsdA 上のヘムが 7 ナノ秒付近まで溶媒中を移動したのち、IsdA-NEAT, IsdC-NEAT のそれぞれの $\beta 7$ - $\beta 8$ ヘアピン構造が互いの 3_{10} ヘリックスにひっかかった。15 ナノ秒の時点で残基間にかかる一部の力の拘束を解除してもしばらくはこの構造を保っていた。33 ナノ秒の時点で、IsdA-NEAT の溶媒に露出している側のヘムのプロピオン酸基が IsdC-NEAT のヘム結合ポケットにうまくはまったことが確認され、その後 17 ナノ秒間結合したままであった。この間 IsdA-NEAT 側に結合しているヘムのプロピオン酸基も結合したままであった。またそれぞれの結晶構造からのずれを求めたところ、両方の蛋白質とも RMSD 値は 4 Å 以下であり、大きく構造が変化していないことが示された (**Figure 7.11**)。IsdH-NEAT3 や IsdA-NEAT に対して IsdC-NEAT の RMSD 値が大きいのは、これに特徴的な長い $\beta 7$ - $\beta 8$ ヘアピン構造が結晶構造に比べ、IsdA にかぶさるために引き伸ばされた構造をとるためであると考えられる。このヘアピン構造以外での構造変化はほとんど観測されなかった。この 2 つの結果から、IsdA-NEAT-ヘム複合体に対し、apo-IsdC-NEAT が構造的に無理なくドッキングすることが可能であることが示された。

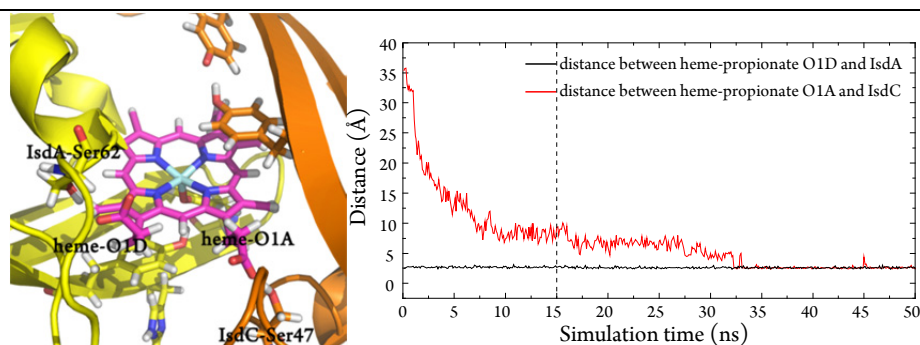


Figure 7.10 (左) IsdA-NEAT, IsdC-NEAT とヘムの複合体構造。ヘムのそれぞれのプロピオン酸基部分に IsdA-NEAT, IsdC-NEAT のヘム結合の Ser 残基が水素結合を形成している。スナップショットは 42 ナノ秒のものを使用した。(右) 各 Isd 蛋白質から 2 つのプロピオン酸基までの距離のプロット。15 ナノ秒の時点で距離拘束を変更している。

それぞれの複合体構造を、以前から提唱されている“handclasp”モデルと比較すると^{51,52} (Figure 7.11)、このモデルでは互いの β 7- β 8 ヘアピン部分が互いの 3_{10} ヘリックス部分に重なりあい、立体的に反発しあうことが指摘されていた。このモデルに似た構造がシミュレーション中の 15~30 ナノ秒の間に一時的に出現していたが、時間経過に伴い、“handclasp”モデルからこのヘアピン部分が X 字に交差する“crossover”モデルへと変化していき、ここで最終的に安定となる様子が確認された。

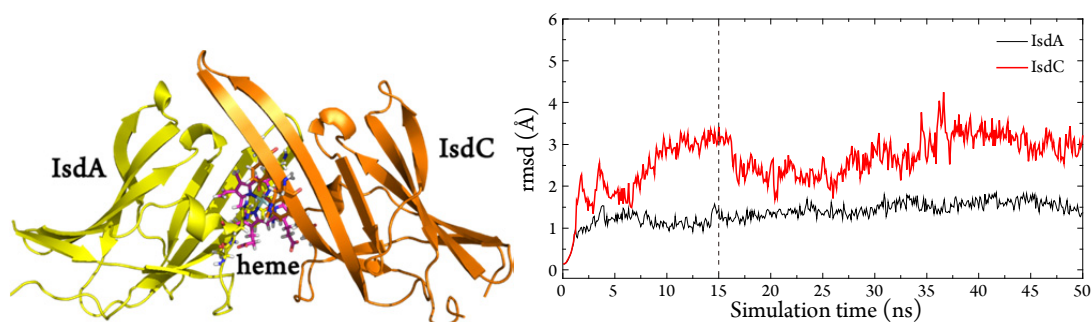


Figure 7.11 (左) 50 ナノ秒時点での IsdA, IsdC とヘムの crossover 複合体構造 (全体)。(右) IsdA と IsdC のそれぞれの結晶構造 (PDB entry: 2ITF, 2O6P) を基準とした RMSD 値の時間変化プロット。

7.6.2 β 8 ストランド上のもう 1 つのチロシンによる配位結合

これまでの MD シミュレーション中での IsdH-NEAT3 とヘムの複合体および IsdA-NEAT とヘム複合体はそれぞれ IsdH-Tyr642, IsdA-Tyr166 とヘムの鉄原子間の配位結合を調和振動子近似によって擬似的に再現していた。そのためこの結合はほとんど結合長が変化することなく、位置関係はほぼ固定されていた。一方、興味深いことに、それぞれのシミュレーションでヘムのアクセプターとなる IsdA-NEAT と IsdC-NEAT がドッキングした構造の時点では、結晶構造中でヘムと結合する IsdA-Tyr166/IsdC-Tyr132 よりも IsdA-Tyr 170/IsdC-Tyr 136 がヘムの鉄原子付近に常に近いことが示されていた (Figure 7.12)。

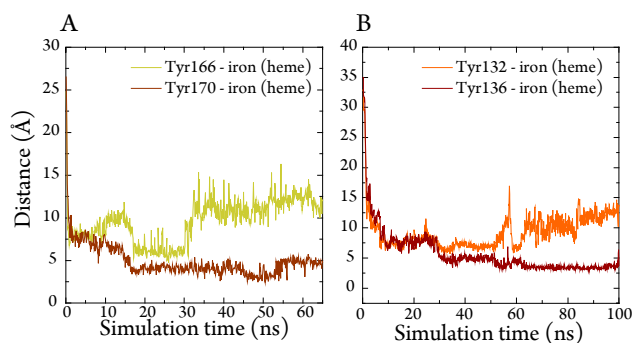


Figure 7.12 チロシンのフェノール基からヘムの鉄原子までの距離の時間変化プロット。(A) IsdA-Tyr166 および IsdA-Tyr170 からヘムの鉄原子までの距離。(B) IsdC の Tyr132 と Tyr136 から鉄原子までの距離。それぞれ IsdA-Tyr166, IsdC-Tyr132 が本来 IsdC-ヘムの共結晶構造で結合しているチロシンである。

ここで、先に述べたように NEAT ドメイン構造の $\beta 8$ ストランド上には、結晶構造中でヘムと結合しているチロシンの 4 つ後にもう 1 つのチロシン残基が存在する。これまで報告されている結晶構造中ではすべて N 末端に近い側のチロシンでヘムと結合していたが、もう一方のチロシン残基とヘムの結合が可能なのかを、ONIOM 法を用いて計算することにした。

先に ONIOM の妥当性を検証するために、wild type の IsdH-NEAT3 におけるヘムとの共結晶構造 (PDB entry: 2Z6F) と、ONIOM で得られた最安定構造を比較した (Figure 7.13)。RMSD 値は 0.622 Å であり、ずれが大きい箇所は Pro572 と $\beta 7$ - $\beta 8$ ヘアピンの Ala638 から Ile640 であった。また、Tyr642 の次に存在する Gly643 において結晶構造と異なり逆平行の β シート構造が一部壊れていた。ヘムの位置は溶媒に露出している側がわずかに 3_{10} ヘリックス平面に接近するよう傾いているのが確認された。これは $\beta 7$ - $\beta 8$ ヘアピンが結晶構造に比べわずかに 3_{10} ヘリックス側に折りたたまれていることによるものであると思われる。このように細かな違いはいくつか見られたが、チロシンとヘムの配位結合は再現されていた。

これに基づいて IsdH-NEAT3 の Y642F 変異体の ONIOM による構造最適化を行ったところ、Y642F 変異体は Tyr642 の代わりに Tyr646 でのヘムとの配位結合が可能であることが示された (Figure 7.13)。変異された Phe642 はヘムと結合できず、Tyr646 との水素結合も形成できないために結合ポケットから遠ざかるように位置した。この構造を wild type の結晶構造および ONIOM 最適化構造と比較すると、ヘアピン構造の折りたたみが結晶構造と比べて開いている形になり、それにしただがってヘムの平面も溶媒に対して 10 度近く開く構造となった。一方でセリン残基でのヘムのプロピオン酸基との水素結合はどの構造においてもほとんど変化していなかった。以上より、IsdH-Y642F 変異体はヘムと結合可能であることが強く示唆された。

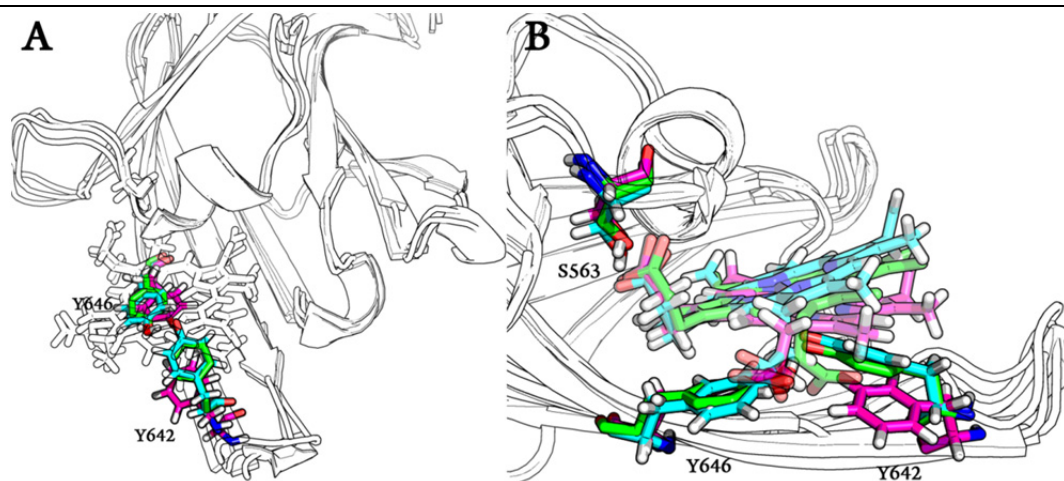


Figure 7.13 IsdH-NEAT3 とヘムの複合体の、ONIOM の最安定構造と結晶構造での比較。緑色が結晶構造、水色が wild type の Gaussian 09 の ONIOM で最適化した構造、紫色が Y642F 変異体の最適化構造である。水素原子は表示していない。(A) 全体構造 (B) 側面図

同様の結合様式は他の2つの IsdA-NEAT, IsdC-NEAT においても確認された。両者ともフェニルアラニン変異体においてそれぞれの β 7- β 8 ヘアピンが結晶構造に比べて開いた形をとっていた (Figure 7.14)。IsdH-NEAT3 の Y642F 変異体の場合と異なる点として、 β 8 ストランド上の2つのチロシンに挟まれた領域は完全に β シート構造を保っていた。これは IsdH-NEAT3 では構造の変化しやすいグリシンであり、IsdA, IsdC ではヒスチジンを有しているためであると考えられる。セリン残基での水素結合はこれらの蛋白質においても問題なく形成されていた。以上3つの NEAT ドメインの変異体モデル解析から、本来ヘムと結合しているチロシン残基をフェニルアラニンに変異させても、もう一方のチロシンが代わりに結合できることが強く示唆された。このことはそれぞれの wild type の場合において (2つのチロシンが存在する条件下で) ヘムとの結合可能な位置が結晶構造中に見られた1通りではなく、2通り存在することが示唆される。ただし、結晶構造で N 末端側のチロシンに結合したもののみが報告されていることから、そちらでヘムと結合する方がよりエネルギー的に安定な複合体構造であると考えられる。

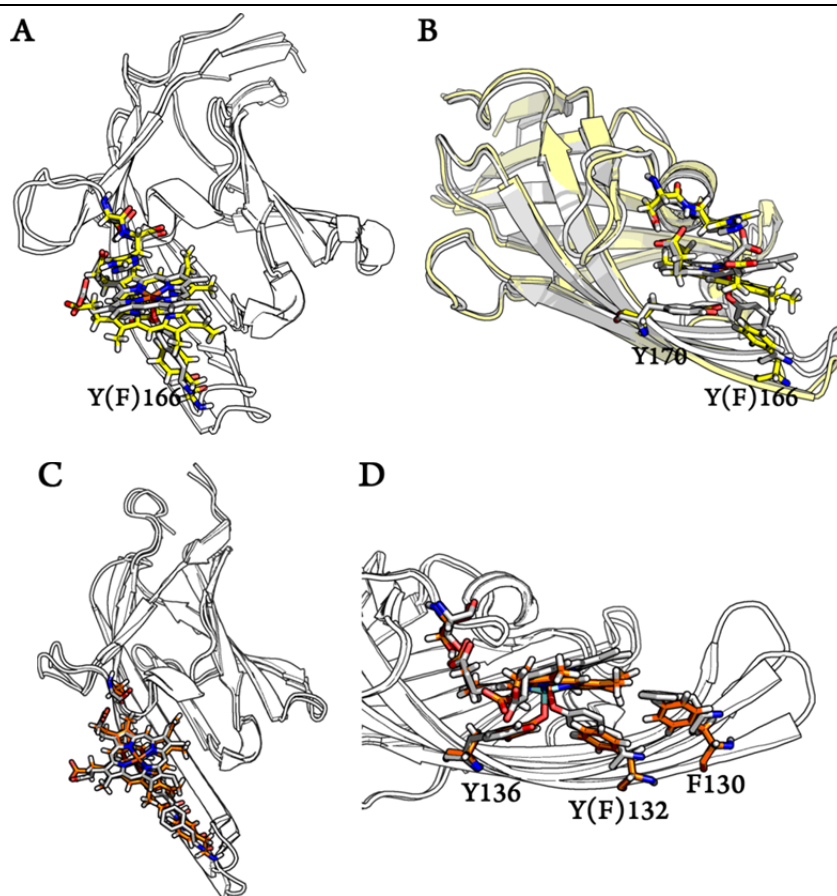


Figure 7.14 (A–B) IsdA-NEAT とヘムの複合体の、ONIOM の最安定構造と結晶構造での比較。灰色が結晶構造、黄色が Gaussian 09 の ONIOM で最適化した構造である。(C–D) IsdC-NEAT とヘムの複合体の、ONIOM の最安定構造と結晶構造での比較。灰色が結晶構造、橙色が ONIOM で最適化した構造である。

7.6.3 Isd-NEAT 間の金属ポルフィリン輸送

Figure 7.12 で示したように、アクセプターとなる NEAT ドメインがドッキングするとき、本来結晶構造中で見られる IsdA-Y166 や IsdC-Y132 よりもそれぞれ IsdA-Y170 と IsdC-Y136 がヘムの鉄原子に近位に来る頻度が極めて高かった。また Figure 7.13 と Figure 7.14 で示したように、これらのチロシン残基で金属ポルフィリンと結合することは可能であった。これらのモデルを使い、IsdA-NEAT・ヘムの複合体が IsdC にドッキングした状態での複合体構造を ONIOM 法を用いて最適化した。

はじめに IsdA-NEAT・ヘムと IsdC の複合体を Table 7.4 を用いて距離拘束をかけた状態を初期構造として最適化したところ、IsdA-Tyr166 と IsdC-Tyr132 が同時にヘムに配位する構造が得られた。このとき IsdA-Tyr166 から鉄原子までの結合長は 2.142 Å、IsdC-Tyr132 からの結合長は 2.125 Å であった (Figure 7.15)。これは ONIOM における IsdA-Y166F 変異体とヘムの複合体の構造最適化中で見られる結合距離 1.897 Å から明確に離れているものであり、どちらのチロシン残基からも最適結合長にない状態であると考えられる。それぞれの NEAT ドメイン内の水素結合は通常通り形成されており、ヘムのプロピオン酸基とそれぞれのセリン残基までの水素結合も保持されていた。また、両者の loop 1 領域のおかげでヘムの溶媒への接触は不可能であり、2 つの蛋白質内に閉じ込められている形になっていた。一方、それぞれの蛋白質構造は少し歪みが発生しており、IsdA の $\beta 8$ 部分では Ile164 から Tyr170 にかけて β ストランドのねじれが発生しており、IsdC の $\beta 8$ では His134 において β シートの部分的な切断が観測された。IsdC 特有の長い $\beta 7$ - $\beta 8$ ヘアピン構造はこの複合体中において IsdA の $\beta 5$ - $\beta 6$ 間のヘアピン構造 (IsdA の Asn134 から Asp138) と相互作用しており、特に IsdC の Lys128 と Asp138 は弱いながらも塩橋を形成している様子が見られた。

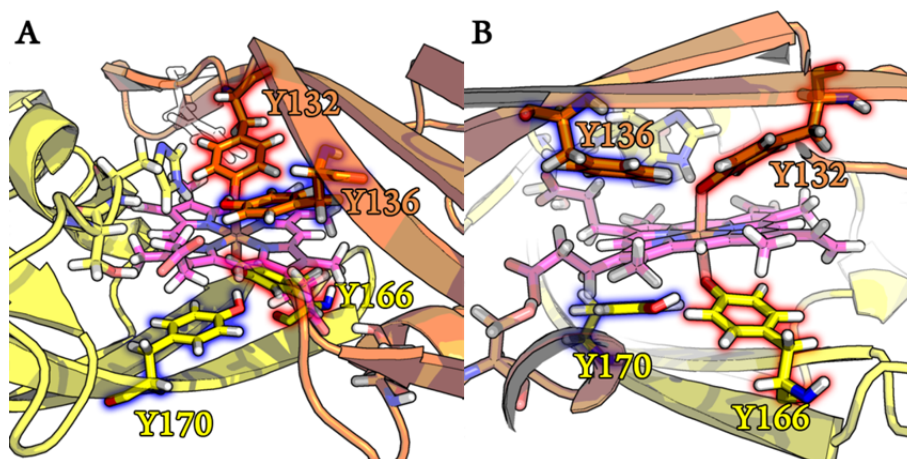


Figure 7.15 (A-B) IsdA-NEAT-ヘム-IsdC-NEAT の ONIOM 最適化構造その 1。IsdA-Tyr166 と IsdC-Tyr132 で鉄原子に配位結合している。

続いて、IsdA-NEAT・ヘムと IsdC の複合体を Table 7.5 を用いて距離拘束をかけた状態を初期構造として最適化したところ、今度は IsdC-Tyr132 の代わりに IsdC-Tyr136 で結合する

様子が観測された (**Figure 7.16**)。こちらでは IsdA-Tyr166 から鉄原子までの結合距離は 2.147 Å、IsdC-Tyr136 からは 2.048 Å となっており、IsdC 側の方が最適長 (1.897 Å) にやや近かった。こちらの構造においてもヘム分子が溶媒に触れることはなかった。先程の IsdC-Tyr132 で配位結合する構造と比べると、こちらの構造は IsdA, IsdC ともに $\beta 8$ ストランドにおける構造のゆがみやねじれが存在していなかった。興味深いことに、こちらの構造では IsdC-Tyr136 のフェノールの酸素原子のそばに、IsdA の 3_{10} ヘリックス上に位置するヒスチジン His83 の N ϵ 原子が 3.17 Å まで接近した。これは IsdC-Tyr132, Tyr136 のどちらかが鉄と配位結合するとき余る水素原子を受け取る可能性を示している。

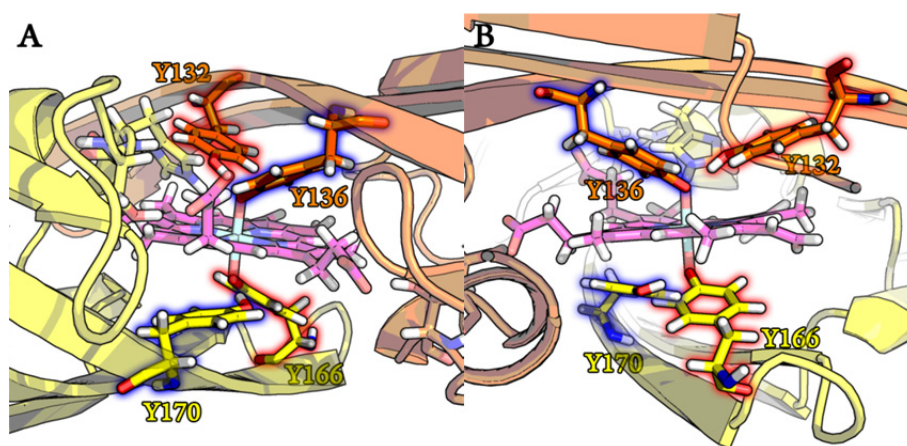


Figure 7.16 (A–B) IsdA-NEAT–ヘム–IsdC-NEAT の ONIOM 最適化構造その 2。IsdA-Y166 と IsdC-Y136 で鉄原子に配位結合している。

ここで見られた IsdC の構造を結晶構造や Y132F 変異体と比較すると、 $\beta 7$ - $\beta 8$ 構造部分が Y132F 変異体よりもさらに開かれていた (**Figure 7.17**)。しかし Tyr136 はいずれの構造においても常にほぼ同じ箇所に位置している。これは Tyr136 が $\beta 8$ ストランドの末端部分にあり、柔らかく構造が変化しやすい $\beta 7$ - $\beta 8$ 部分とは異なり、構造が固い部分に位置しているためであると考えられる。これより、IsdC が IsdA からヘムを受け取る時、Tyr136 の方が Tyr132 よりも結合しやすいのではないかと考えられる。以上の議論は他の Isd-NEAT ドメインにも適用できる可能性が極めて高い。しかし、IsdC が IsdA から受け取る場合には IsdA-His83 がチロシンの近くに存在しているが、このヒスチジンは他の NEAT ドメインでは保存されていないことが多い。この場合チロシンから余った水素原子を受け取る残基は他にも存在する可能性がある。

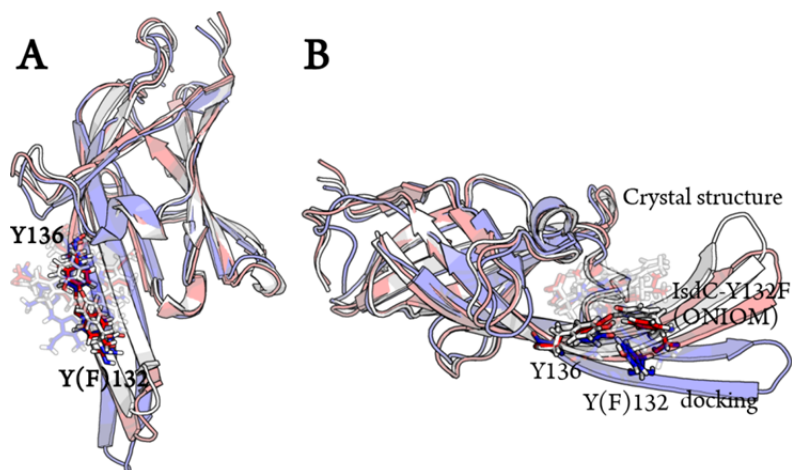


Figure 7.17 (A-B) IsdC-NEAT とヘム複合体の構造比較。白色、赤色、青色がそれぞれ結晶構造 (PDB entry: 2O6P)、ONIOM で最適化した Y132F 変異体、**Figure 7.16** の複合体構造中の IsdC である。構造は $\beta 7$ - $\beta 8$ 部分 (Asp118 から Asn137) を除く部分で重ねあわせた。

これら 2 つの配位形式をシングルポイント計算によってそれぞれのエネルギーを計算したところ、IsdC-Y132 で配位した方が Y136 での配位形式に比べて 19.73 kcal/mol ほど安定的であることが示された (**Table 7.6**)。これは本来 IsdC で結合している Y132 での配位が Y136 でのヘム配位よりもより熱力学的に安定であることを指し示していると考えられる。しかし、Y136 での配位の方が Model 系における安定性は高かった。これは主として鉄—チロシン結合距離が Y136 の方が好ましい配置をしていることに起因している。

Table 7.6 ONIOM のシングルポイントエネルギー計算結果 ^a

	Coordination	Total	Model high	Model low	Real low	Real-Model low
	IsdC-Y132	-3458.89	-3419.11	0.75	-39.03	-39.78
	IsdC-Y136	-3458.86	-3419.13	0.77	-38.97	-39.74
Subtract	IsdC-Y132	0	0	0	0	0
	IsdC-Y136	19.73	-9.56	7.73	37.02	29.29

^aModel high、Model low、Real low はそれぞれモデル系 (反応中心付近) における量子化学計算で得られたエネルギー、モデル系での古典力学計算で得られたエネルギー、Real 系 (全体) での力学的なエネルギーである。Real-Model low は古典力学計算レベルでの Real 系と Model 系の差分である。

また、2 つのフェノールと鉄入りポルフィリンを用いた、フェノール基から鉄原子までの距離に対するエネルギープロットは **Figure 7.18** のようになった。同様の計算で 1 つのフェノール基だった場合の最適結合長は 1.89 Å だったのに対し、両側からフェノール基が近づいた場合には 1.97 Å 付近で最も安定となっていた。ONIOM で最適化された構造 (**Figure 7.15**、**Figure 7.16**) でのそれぞれチロシンからの結合距離はこの値とほぼ合致しており、その値はエネルギーの極小点であると考えられる。また、1.89 Å から 1.97 Å まで結合長が変化する場合、フェノール基が 1 つの場合は +4.1 kcal mol⁻¹ ほどエネルギーが必要とされるのに対し

(Figure 6.9)、2つの場合は $-1.7 \text{ kcal mol}^{-1}$ であった。すなわち、2つの NEAT ドメインがドッキングしてヘムをチロシン残基で挟む構造においては、エネルギーの平衡点がずれて新たな安定点へと移動すると考えられる。これまで報告されているような NEAT ドメイン間のヘム輸送が極めて速い (holo-IsdA に対し、apo-IsdC の存在下では hemin の見かけの解離速度が 54.3 s^{-1} であるのに対し、存在しない場合は $2.6 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ である³⁴。)のは、この平衡点のずれの影響によるものであると考えられる。本実験では2つのフェノールの

酸素原子の位置を固定していたが、エネルギーの平衡点はほぼ中間に現れていた。このことに留意すれば、このドッキング構造中では2つのチロシンからヘムへの結合はほぼ等価になっており、どちらのドメインにも強く結合していないニュートラルな状態であると言えるだろう。

7.6.4 第7章の結言

NEAT ドメイン間のヘムの輸送はこれまで不明な点が多かったが、今回の ONIOM を使った最適化構造の探索により、いくつかの新たな知見が得られた。最も大きな発見は、NEAT ドメイン同士が互いの $\beta 7$ - $\beta 8$ 部分を交差させながら、金属ポルフィリンのそれぞれのプロピオン酸に対して同時に結合するドッキング構造の可能性である。このとき、リガンドとなる金属ポルフィリンの金属原子に対してそれぞれのドメインのチロシン残基が接近可能であった。特筆すべき点として、チロシン残基 IsdH-Y642, IsdA-Y166, IsdC-Y132 といった結晶構造中で配位している「前の」チロシン残基だけでなく、IsdH-Y646, IsdA-Y170, IsdC-Y136 といった「後の」チロシン残基によっても位置的に配位結合が可能であった。一方で、結晶構造では「前の」チロシンでの配位結合が常に見られているのは、こちらの方がよりエネルギー的に安定であるからと考えるのが自然である。そうであれば、NEAT ドメイン同士が複合体を形成してヘムを受け取る際に、まず輸送複合体の形成時に構造のゆらぎが少ない「後の」チロシンでヘムと配位結合し、ドメイン同士が解離した後に安定な「前の」チロシンに結合を組み替えるという可能性も十分考えられる (Scheme 7.1)。今回の ONIOM を用いた考察は IsdA-NEAT と IsdC-NEAT 間のみに行ったが、他の NEAT ドメインにもほぼ同様のことが言えると考えられる。シーケンスアラインメント (Figure 1.5) によれば、いくつかの NEAT ドメインにおいて「後の」チロシンがフェニルアラニンやヒスチジンであるものも存在する。このような場合においても「前の」チロシンは 100% 保存されているため、こちらで直接配位結合するのであろう (Scheme 7.2)。

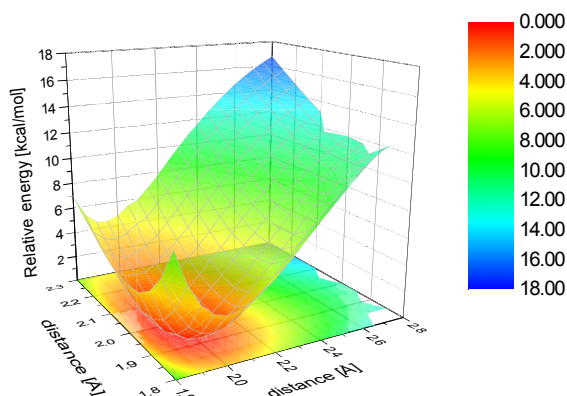
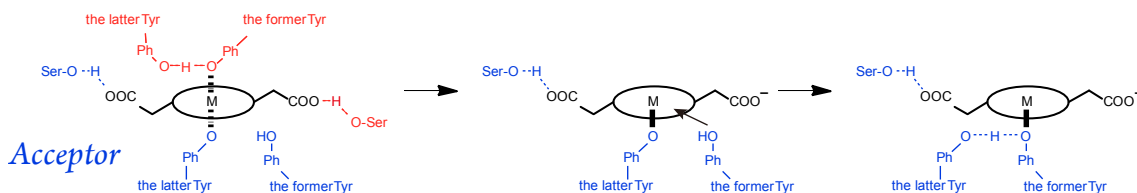


Figure 7.18 フェノールの酸素原子とポルフィリン鉄間の結合距離とエネルギーのプロット。Distance 1 と 2 はそれぞれ 2 つのフェノール基から鉄原子までの距離を表す。

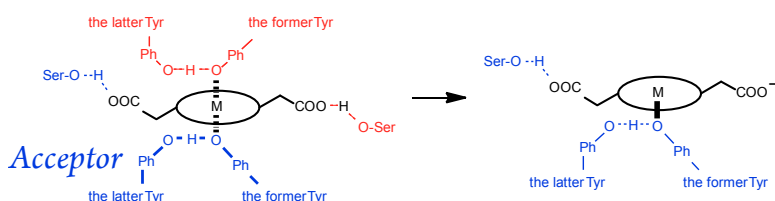
Scheme 7.1 ドナー側が「後の」チロシン残基で金属ポルフィリンを受け取った後、よりエネルギー的に安定な「前の」チロシン残基に結合を組み替える二段階反応^a

Donor



Scheme 7.2 ドナー側が「前の」チロシン残基で直接配位する一段階反応

Donor



^aM、Ph はそれぞれ金属原子、フェニル基 (C₆H₅) を表す。

今回 ONIOM を用いた量子計算を用いて高い理論レベルで構造を最適化することが可能であったが、性質上時間変化を追うことは MD と違って難しい。また、今回の複合体は MD で示したように 2 つの蛋白質の残基がそれぞれ動きやすく、複数の複合体構造の可能性が考えられるため、ONIOMでそのすべての自由度を探索して最適化構造を導き出すことは困難である。そのため、本論文で示した構造はあくまでその一例にしか過ぎない。しかし、結合に重要なチロシンについて、それぞれ 2 つの残基のどちらとも結合が可能であるという事実は間違いないだろう。

本論文の結果に基づき、Isd system の NEAT ドメインについて 1 つの重要な輸送形式をここで提唱する。NEAT ドメインとヘムの複合体は結晶構造中で溶媒に大きく露出していたことが特徴的であったが、これは他の NEAT ドメインによる輸送を待っているためである。そして、溶媒に露出しているセリン残基をアクセプターとなる NEAT が捉えて渡されるのであれば、それに応じてヘムの表裏が逆転して輸送することとなる (Figure 7.19)。これを支持する証拠として、IsdA-NEAT の結晶構造解析中に、ヘムの結合面が 2 通り存在するのが報告されている (Figure 7.20)⁴¹。この IsdA-NEAT の結晶構造の論文では特に触れられていなかったが、IsdA のみこの表裏面での結合が見られた一方で、IsdH-NEAT3 や IsdC ではそういった表裏面での結合は報告されていない。そのためこれら 2 つの NEAT で反転可能な結合が可能かどうかは不明であるが、IsdA-NEAT でこの結合様式が可能であるということは、提唱する「反転式ヘム輸送」は十分可能性があるものだと考えられる。

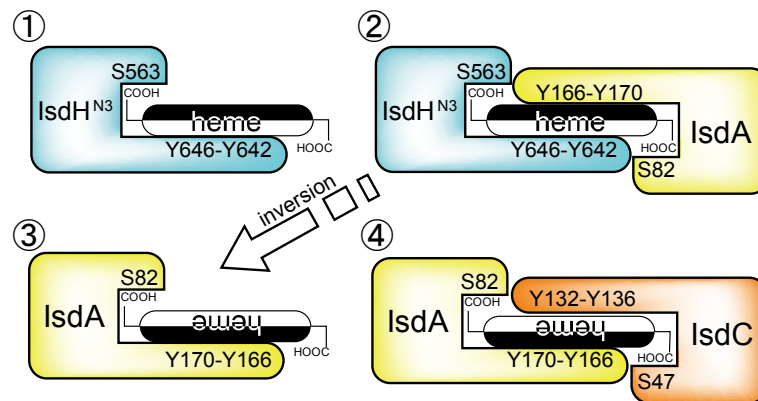


Figure 7.19 想定される NEAT ドメイン間のヘム輸送形式。ヘムの表裏面を白黒で表す。ヘムが IsdA, IsdC に輸送されるとき、ヘムは蛋白質から自然解離することなく、表裏を逆転させながら（結合するヘムのプロピオン酸基を入れ替えながら）輸送される。

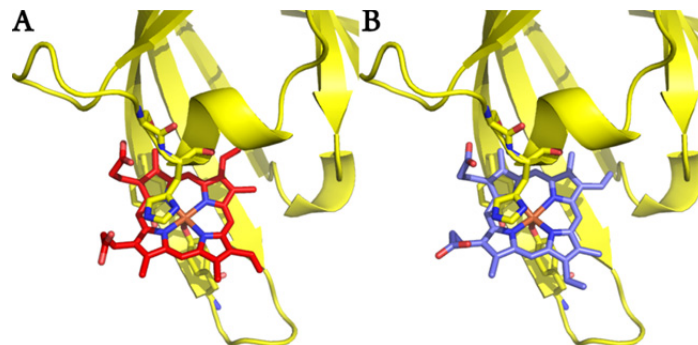


Figure 7.20 IsdA-ヘム複合体結晶構造 (PDB: 2ITF) に見られる 2 つのヘムの結合位置。(A) A chain の A position のヘム。(B) 同じく A chain の B position のヘム。

第8章 Isd system の鉄輸送阻害剤

8.1 緒言

第7章で Isd-NEAT ドメイン間におけるヘム輸送の仕組みを考察した。このような輸送形式が可能なのは、ヘムと蛋白質の結合様式が、1つのチロシンによる配位結合、1つのセリンによる水素結合という、珍しい形であったためである。ところで他の Isd system はどうか。細胞壁上に存在する Isd system は NEAT ドメインであるのに対し、細胞膜付近に存在する IsdC からヘムを受け取る IsdE という蛋白質は NEAT ドメイン構造を有していない。IsdE の結晶構造は Grigg と Murphy らによって 2007 年に報告されており⁴³、メチオニン 78 とヒスチジン 229 による鉄への配位結合をとっている。さらに、2つのプロピオン酸基はそれぞれセリン 60 とスレオニン 40 によって水素結合を形成している(厳密には Thr40 側とは HOH16 を介して水素結合を形成) (Figure 8.1)。この形状は明らかに NEAT ドメインとは異なる。

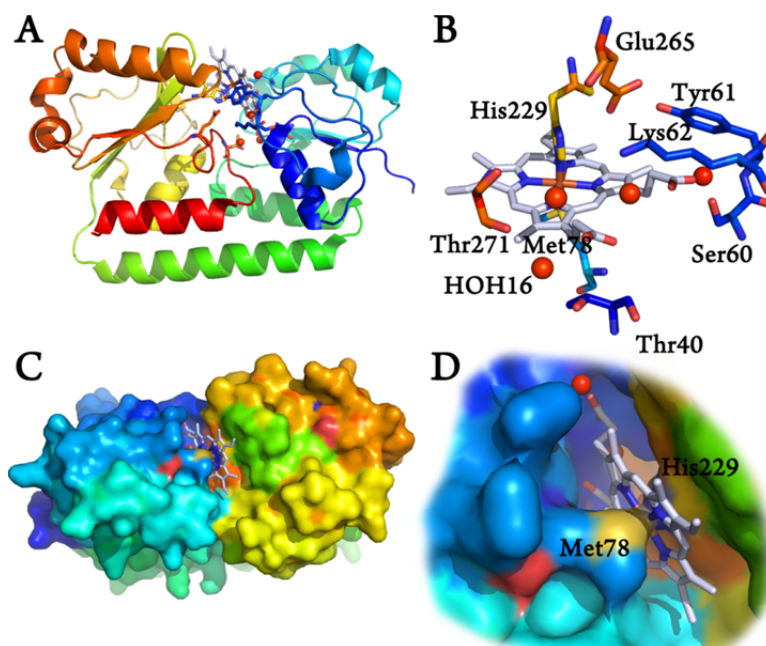


Figure 8.1 IsdE の結晶構造 (PDB entry: 2Q8Q)。 (A) 蛋白質の全体図、N 末端は濃青色、C 末端は赤色となるグラデーションで示している。 (B) ヘム結合ポケット周辺の残基配置。Met78 と His229 による 6 配位結合を形成している。 (C) 蛋白質の表面表示。 (D) 表面表示の拡大図。

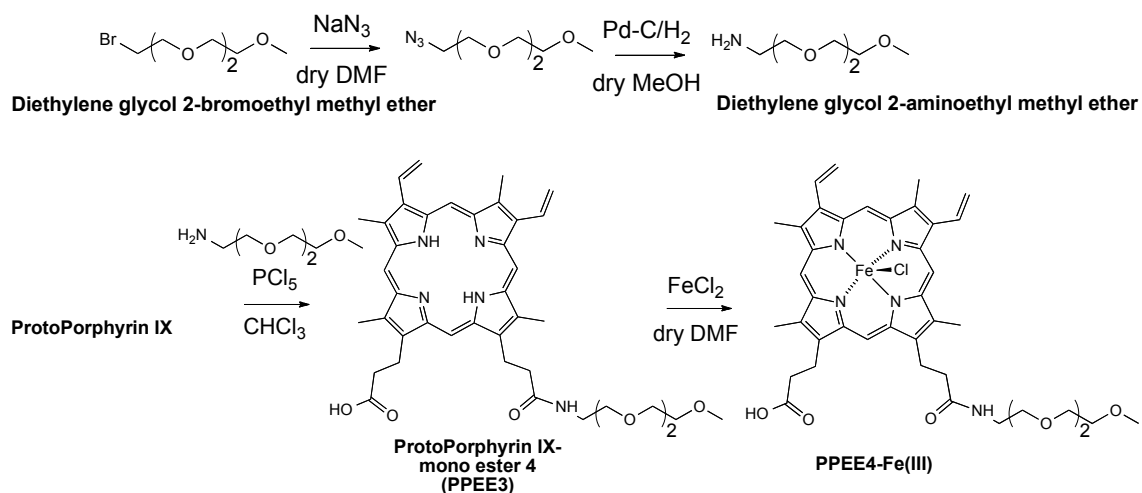
ここで NEAT ドメインと IsdE のそれぞれの結合様式には、片側のヘムのプロピオン酸基が完全に露出している/していないという違いが存在する。そこでヘムの片側のプロピオン酸基に嵩高い官能基をつければ、IsdC までは結合が可能であっても IsdE には結合できないのではないかと考えた。有機化学合成により、このような特性を持つヘムの誘導体を用意し、*in vitro* における蛋白質との結合実験に使用した。

8.2 研究手法

8.2.1 ヘム誘導体の合成

京都大学浜地格教授、高岡洋輔助教らのご好意により、以下の様な合成スキームでヘムの誘導体を用意した (Scheme 8.1)。

Scheme 8.1. ヘム誘導体 PPEE4-Fe(III)の合成



アミド結合を利用したのは、エステル結合では加水分解されやすいという欠点を回避するためである。オリゴエチレングリコールを合成したのは水溶液中での溶解度を上昇させるためである。メチルまたはエチル基をつけたものも合成することが可能であったが、DMSO 中においても溶解度が低く、測定や菌体培地中に溶解させることは不可能であった。また、以下の2つのヘム誘導体も同様に用意した。

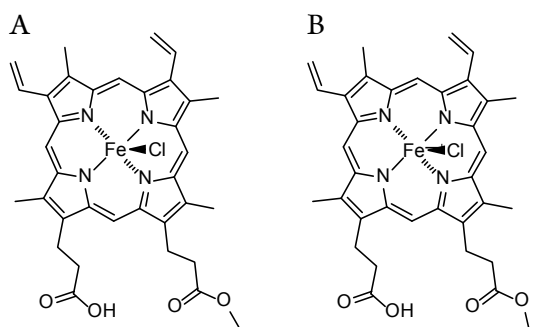


Figure 8.2 (A) ヘムモノメチルエステル誘導体 (heme-MME) (B) ヘムモノエチルエステル誘導体 (heme-MEE)

この2つの化合物の IR、GC-MS、UV スペクトルは章末に示した。

8.2.2 ITC 測定

IsdC と上記のヘム誘導体3種の間の熱力学的パラメータを 25 °C の条件下で iTC 200 (GE Healthcare)を用いて決定した。IsdC は緩衝液(0.2 M NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0)で平衡化し

た。蛋白質は大腸菌 RP523 の発現系を用いて、ヘムと結合していない状態で発現している。蛋白質はそれぞれ 5 v/v% のジメチルスルホキシド (DMSO) を含む状態で、濃度が 20 μM となるよう、ITC 装置のセルにセットした。各金属ポルフィリンも同様に 5 v/v% の DMSO とともに 375 μM になるよう、粉末から測定時に用時調製して測定装置のシリンジ側にセットした。

8.2.3 UV 吸光度測定

1.1.3 で述べたように、ヘム分子または金属入りポルフィリンは可視光領域に特徴的な鋭い吸収帯を持つ。また、これらの極大吸収波長 (maximum wavelength) は金属ポルフィリンや周囲の残基の配置に敏感に影響を受けるため、金属ポルフィリンの配位環境の変化を吸光度変化から定性的・定量的に調べることが可能である。3 価のヘム (Fe-PPIX) が IsdH-NEAT3, IsdA, IsdC に結合した時、403 nm 付近のピークが濃度に応じて上昇することが観測されている¹⁰⁰ (蛋白質に固有の値)。また、 Mn^{3+} -PPIX と Ga^{3+} -PPIX の場合にはそれぞれ 375 nm, 413 nm に極大吸収波長が現れる¹⁰⁰。ここで、蛋白質濃度が一定の時、リガンドとしてのポルフィリンの濃度[L]を変数として、観測される吸光度 A と蛋白質-金属ポルフィリンの結合定数 K_a の間には以下の式(8.1)が成り立つ。

$$A = A_f + (A_b - A_f) \frac{K_a [L]}{1 + K_a [L]} \quad (8.1)$$

ここで A_f はポルフィリンが存在しない状態 (蛋白質溶液のみ) の吸光度、 A_b は結合するポルフィリンの吸光度である。

吸光度測定は蛋白質の濃度を推定するのにも使用可能である。特に芳香族アミノ酸であるトリプトファン、チロシン、フェニルアラニンはそれぞれ 278 nm, 275 nm, 257 nm に極大吸収波長を持つ。したがってある蛋白質の中に含まれるこれら 3 つのアミノ酸の数と吸光係数の関係を決定しておけば蛋白質濃度を推定することが可能となる。

本研究の吸光度測定には Jasco spectrophotometer (Tokyo, Japan) を使用した。また、蛋白質のサイズ排除クロマトグラフィーによる精製時には、精製装置 ÄKTA に実装されている吸光度計を用いて蛋白質の濃度および存在画分を決定した。

8.2.4 IsdC-IsdE 間のヘム誘導体輸送実験

ヘムが蛋白質 IsdC と IsdE に結合した時、それぞれ 403 nm と 415 nm に鋭い極大吸収波長 (Soret 帯) が観測される。この違いはそれぞれの蛋白質のヘムに対する配位形式の違いであり、IsdC はチロシン 1 つによる配位結合であるのに対し、IsdE はメチオニンとヒスチジンによる 6 配位形式であるためである。これを利用し、IsdC と結合している状態のヘムまたはヘムの誘導体の溶液中に、IsdE を加えることでヘムが輸送されるか否かを測定した。なお、これと同様の実験条件下で IsdC から IsdE へと *in vitro* でヘムが輸送されることはすでに報告されている⁵⁰。

8.3 結果と考察

8.3.1 吸光度測定によるヘム誘導体の結合

IsdC、IsdE に対しそれぞれのヘム誘導体を加えた時に見られる極大吸収波長の変化により、ヘム誘導体の結合定数を算出した。まず IsdC とヘム誘導体 PPEE4-Fe (III)を混合し、蛋白質濃度に対する吸光度の変化を測定したところ、結合比が 1:1 となる付近で飽和に達したことが観測された (**Figure 8.3**)。この吸光度変化の特徴はこれまでに多くの研究者によって報告されている NEAT 蛋白質とヘムの結合の特徴と一致していた^{31,40,100,122}。また、IsdH-NEAT3 と heme-MEE 間でも同様の吸光度変化が観測された (**Figure 8.4**)。このことは、同じ NEAT ドメインを持つものは、片側のヘムのプロピオン酸基が変化した誘導体と問題なく結合できることを表している。一方で IsdE について同様の測定を行ったところ、こちらは蛋白質濃度の上昇に伴う吸光度の飽和が観測されなかった (**Figure 8.5**)。この飽和せず吸光度が上がり続ける様子は、蛋白質がヘムに対して特異的に結合しない場合に観測される様子とよく似ているため、IsdE はこれらのヘム誘導体に結合しないと考えられる。

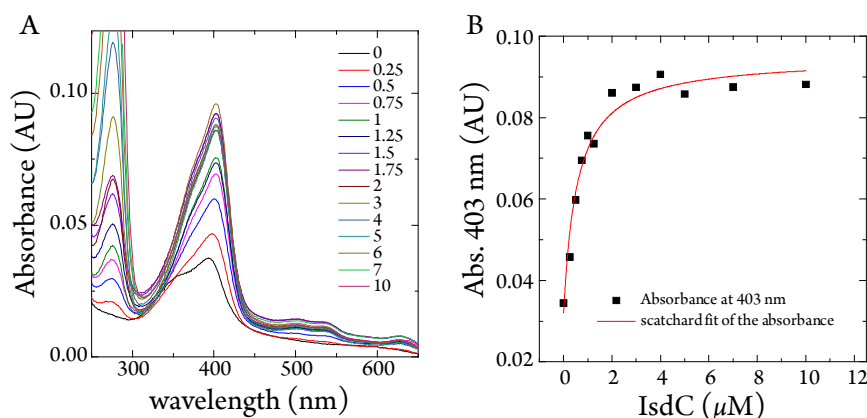


Figure 8.3 (A) IsdC の各濃度に対してヘム誘導体 PPEE4-Fe (III)を混合した時の UV-Vis スペクトル。PPEE4-Fe (III)の濃度は 2 μM である。 (B) 極大吸収波長 403 nm での吸光度のプロット。

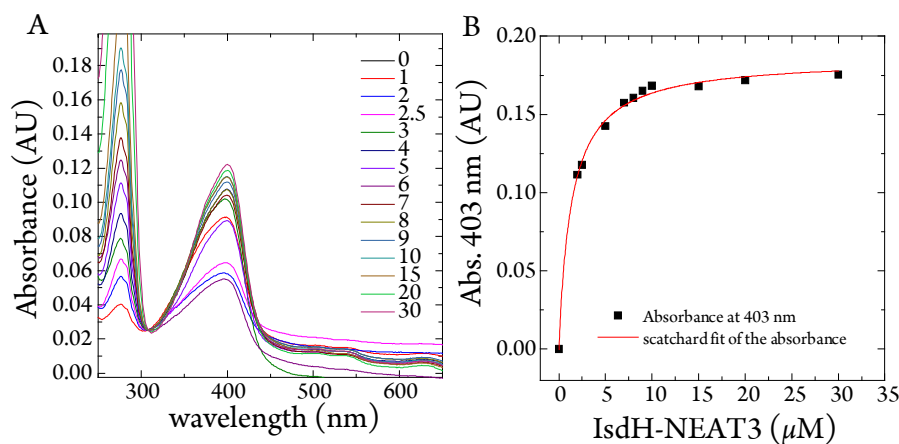


Figure 8.4 (A) IsdH-NEAT3 の各濃度に対してヘム誘導体 heme-MEE を混合した時の UV-Vis スペクトル。heme-MEE の濃度は 10 μM である。 (B) 極大吸収波長 403 nm での吸光度のプロット。

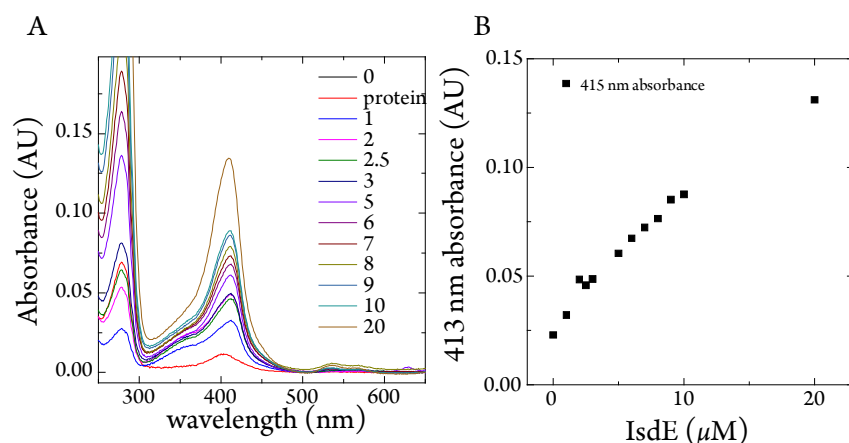


Figure 8.5 (A) IsdE に対してヘム誘導体 heme-MEE を混合した時の UV-Vis スペクトル。heme-MEE の濃度は 10 μM である。(B) 極大吸収波長 413 nm での吸光度のプロット。

結合が確認された IsdH-NEAT3 や IsdC に対し、PPEE4-Fe (III) に対する解離定数 K_d を数式 (8.1) を用いて算出した (結合定数 K_a は解離定数 K_d の逆数である)。IsdH-NEAT3、IsdC に対しての解離定数はそれぞれ 1.37 μM , 0.559 μM となり、いずれも通常のヘムへの親和性と同様の値であり、かつ IsdC の方が解離定数が小さい (親和性が高い) ことが示された。これは、ヘム誘導体の通常のプロピオン酸基部分と loop 1 領域との親和性によるものであると考えられる。まとめると、これらのヘム誘導体は NEAT ドメインに対してはヘムと同様に結合できるが、IsdE に対しては結合ができないことが示された。

8.3.2 ITC 測定によるヘム誘導体の結合

ITC を用いて、IsdC-NEAT とほぼ同じ結合様式である IsdH-NEAT3, IsdA-NEAT において結合定数の決定を試みたところ、ほとんど発熱しなかったために算出が不可能であることが確認された (**Figure 8.6**)。メチルエステル誘導体、エチルエステル誘導体ともに同様の結合等温線が得られた。ただし、IsdH-NEAT3 においては滴定中にほとんど発熱が認められなかったのに対し、IsdA-NEAT においては少しの発熱および発熱量が徐々に小さくなっていく様子が確認された。吸光度測定から蛋白質とリガンドが結合しているものであるとすれば、この現象については、「発熱がほとんど観測されない結合現象」ではないかと推察される。ITC は結合において観測される熱量の収支 (ΔH°) とその 1 回あたりに観測される熱量収支の変化によって決まるが、 ΔH° の絶対値が小さくても $-T\Delta S^\circ$ の項の影響で結合自由エネルギー変化 ΔG° (結合定数) が決まる場合もある。IsdH-NEAT3 と IsdA-NEAT の間で滴定曲線のカーブが違うのは、先に示した loop 1 領域とポルフィリンのプロピオン酸基の相性の差であると考えられる。

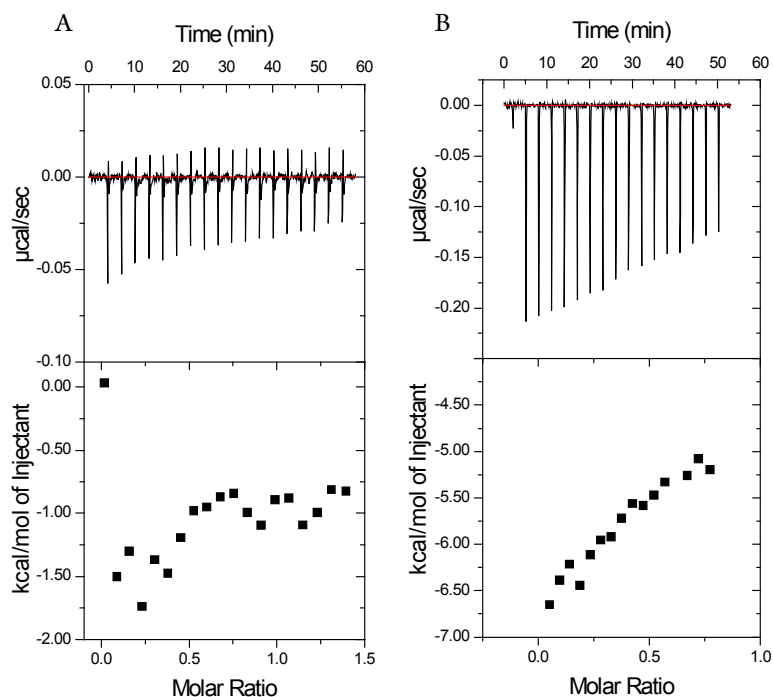


Figure 8.6 ITC の結合等温線。(A) IsdH-NEAT3 とヘムモノエチルエステル誘導体 (heme-MEE) (B) IsdA-NEAT とヘムモノメチルエステル誘導体 (heme-MME)

8.3.3 IsdC から IsdE へのヘム誘導体の輸送

IsdC から IsdE へと通常のヘムが輸送されることは多くの実験によって示されている。これは Isd-NEAT ドメイン間でのヘム輸送に比べると約 1000 倍遅い輸送速度であるが⁴⁹、IsdE へのヘムの輸送は細胞膜内へのヘム鉄の輸送を行う上で必ず通らなければならない関門である。

IsdC とヘムの複合体を用意し、同濃度の IsdE を混合して 1 分毎に吸光度を測定したところ、IsdE の結合様式である 6 配位に特徴的な 415~416 nm へと極大吸収波長がシフトしていく様子が観測された (**Figure 8.7A**)。11 分経過後にはピークシフトが終了していた。このことから、10 数分で IsdC に存在するヘムは IsdE へと移行したことが判明した。一方、同様の実験で PPEE4-Fe (III)を結合させた IsdC は、はじめ 403 nm 付近に観測される極大吸収波長は 10 数分経過してもまったく変化せず、1 日経過しても変化が観測されなかった (**Figure 8.7B**)。このことから PPEE4-Fe (III)は IsdE へと輸送されないことが示唆された。また、別のヘム誘導体の heme-MEE を用いても同様の結果が観測された (**Figure 8.8**)。以上から、IsdC →IsdE へのこれらのヘム誘導体の輸送は行われなかったことが示された。

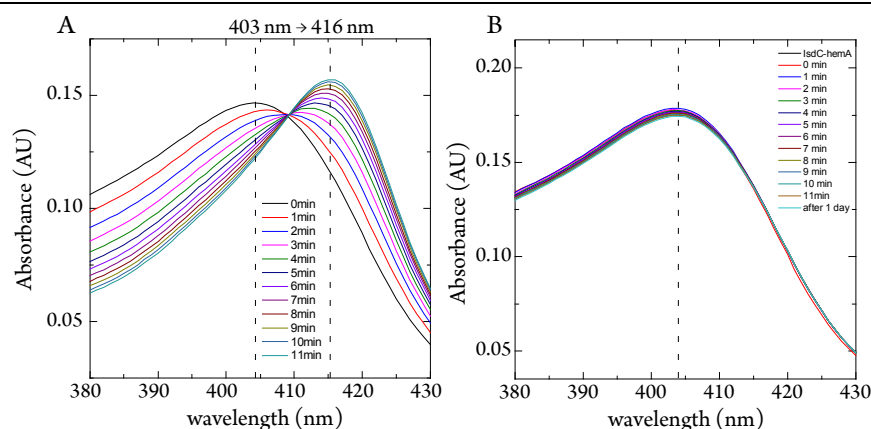


Figure 8.7 IsdC に存在するヘムまたはヘム誘導体からの IsdE への輸送。(A) ヘムは IsdE へと輸送された。(B) PPEE4-Fe (III)の場合は、IsdC に結合したまま IsdE へは輸送されなかった。

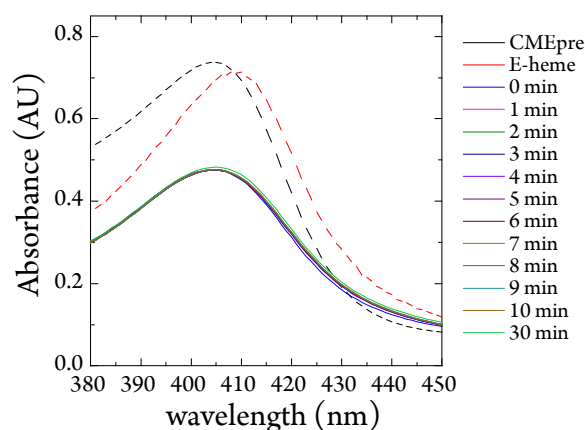


Figure 8.8 IsdC に heme-MEE を結合させた状態で IsdE を混合した場合。IsdE への輸送は 30 分経過してもまったく観測されなかった。

8.4 第 8 章の結言

新規に有機合成した各種ヘムの誘導体が IsdH-NEAT3、IsdC には通常のヘムと同様に結合可能である一方で、異なる結合様式である IsdE には輸送されないことを示した。輸送阻害剤としての実際の効力は *in vivo* での実験が待たれるところであるが、IsdH-NEAT3 が結合した後、IsdA、IsdC へと実際に輸送されていくかどうかはまだ定かではない。ヘムと同様に、これらの誘導体は下流の NEAT ドメインほど高い親和性を示すだろうということが結果から想定されるが、第 7 章で見た輸送形式を採るのであればうまく複合体を形成することができないため、輸送速度はヘム以下となるかもしれない。しかし、これらの誘導体は濃度次第で細胞壁上の Isd-NEAT ドメインをすべて専有できる上、非鉄金属を使っていないので毒性も低いと考えられる。今後の展望として、*in vivo* での生育阻害実験においてこの化合物を用いた最小発育阻止濃度 (MIC) や最小殺菌濃度 (MBC) を評価していきたい。

8.5 補足資料 (Supporting information)

本章中に示したヘムの誘導体の UV-Vis および ESI-HR-MS の結果は以下の通りである (Figure 8.9 および Figure 8.10)。

< Fe(III)-protoporphyrin IX monoethylester (1202, Takaoka) >

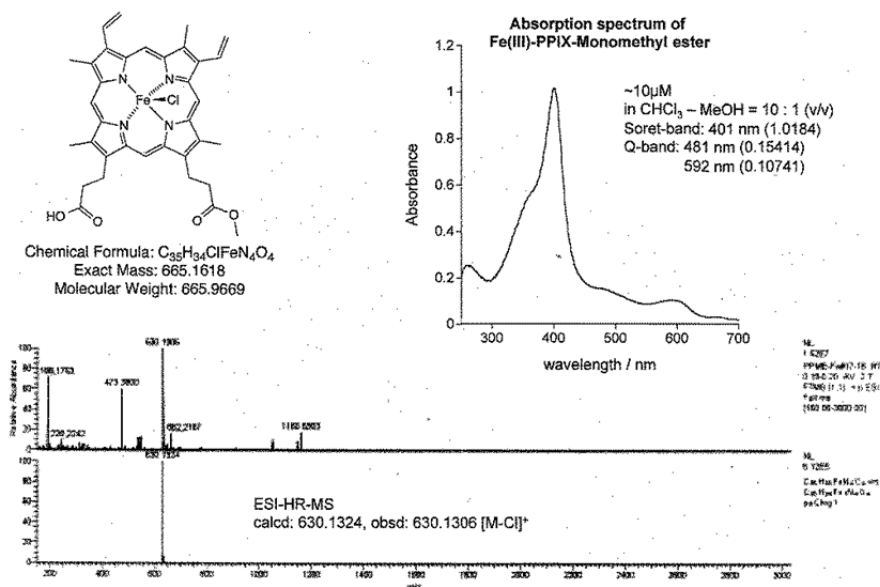


Figure 8.9 heme-monomethylester の構造式、UV-Vis および ESI-HR-MS。

< Fe(III)-protoporphyrin IX monoethylester (1202, Takaoka) >

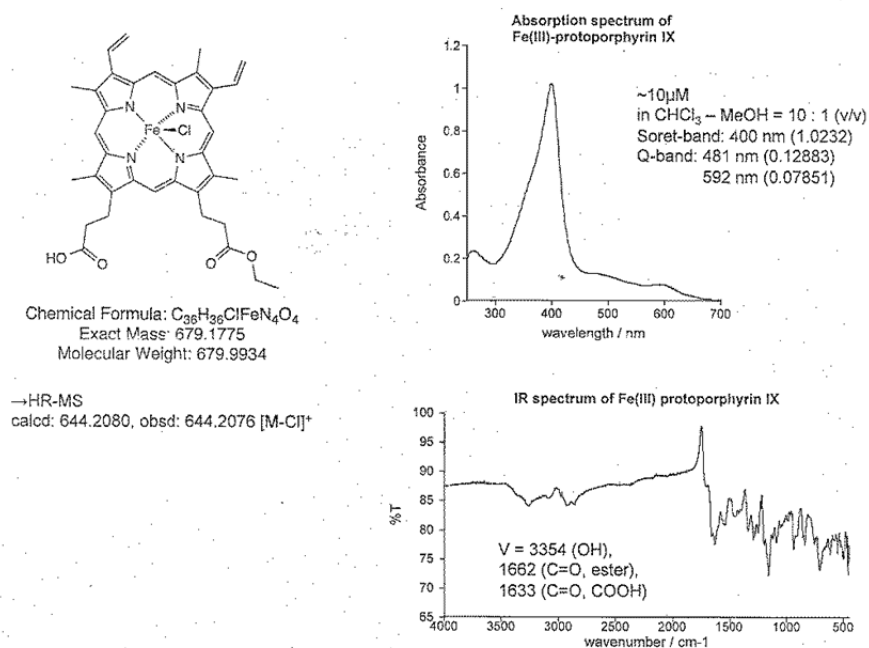


Figure 8.10 heme-monoethylester の構造式、UV-Vis および ESI-HR-MS。

第9章 結論

本研究は黄色ブドウ球菌において 2002 年に発見された新種のヘム輸送蛋白質群 Isd system の細胞壁上での輸送を担う NEAT ドメイン間のヘム輸送機構を原子レベルで解析することを目的とした。

第 6 章では、ほぼ同じ立体構造を有する IsdH-NEAT3, IsdA-NEAT, IsdC-NEAT のそれぞれについて、MD シミュレーションと *in vitro* 実験の両方の側面から金属ポルフィリンに対する異なる親和性を創出している要因を探索した。まず MD シミュレーションによりそれぞれの構造に共通する $\beta 1b$ ストランドから 3_{10} ヘリックスの間に存在する“loop 1”領域のアミノ酸組成、および IsdC の構造内部に存在する特有の塩橋 Glu-88/Arg-100 が親和性の差を生み出す要因であることが示唆された。これらは ITC を用いた *in vitro* 実験によってその正しさが検証され、また親和性の強弱に応じてヘム輸送の方向が変化することも示した。近年他のグラム陽性菌 (*B. anthracis*, *S. lugdunensis*) においても類似のアミノ酸配列および蛋白質立体構造を持つ (推定も含めた) NEAT ドメインが同定されつつある。本研究の知見により、これらの未知の NEAT ドメインに対しても、loop 1 領域に相当するアミノ酸配列からある程度の親和性の推定が可能になることが予想される。

第 7 章では計算化学によって一原子レベルでの NEAT ドメイン間のヘム輸送の機構についてさらに詳しく解析を行った。NEAT ドメインは 8 本の β ストランドからなる共通の構造を有しているが、ヘムを有する NEAT ドメインに対し、ヘムを持たない異種の NEAT ドメインがドッキングすることが可能であることが MD シミュレーションにより示された。このとき、アクセプターとなる NEAT ドメインは結晶構造中で見られる IsdH-Y642, IsdA-Y166, IsdC-Y132 といった「先の」チロシン残基よりも、IsdH-Y646, IsdA-Y170, IsdC-Y136 といった「後の」チロシン残基の方がヘムの鉄原子のそばに近づく確率が高かった。量子化学計算と分子力学を組み合わせた ONIOM 法により、ヘム平面の両側から鉄原子にチロシンが近づくと平衡となる結合距離が変化し、両方のチロシンの間でエネルギーの安定点が発生することを示した。これらの計算は主に IsdA-NEAT と IsdC-NEAT でのみ行ったが、チロシンのモチーフは他のすべてのヘム結合 NEAT ドメインに共通して存在しているため、黄色ブドウ球菌に限らず同じ NEAT ドメインを持つすべての蛋白質に対して通用する可能性が極めて高い。

さらに、第 6 章と第 7 章の内容をまとめると以下のことが推察される。第 7 章で見た 2 つの NEAT ドメインからなる輸送中間体 (例: IsdA-NEAT・ヘム・IsdC-NEAT) はエネルギー的に一時的に安定な構造を取ると考えられる。しかし、現実の溶液内では他にも同種の蛋白質を含むさまざまな分子が存在している。この複合体に対して他の蛋白質分子が衝突すると、この複合体構造が壊れてしまうと思われるが、その時ヘムはより親和性の強い NEAT ドメイン側が保持することになるのではないだろうか。結晶構造中でも見られたように、1 つの NEAT ドメインがヘムに対して直接結合する残基は $\beta 8$ ストランド上のチロシン

と loop 1 領域のセリンしか確認されていない。一方、第 7 章で示したようにそれぞれの NEAT ドメインのチロシン残基からの結合長はほぼ等距離となるため、この複合体中でのヘムに対する親和性の差は第 6 章で見た loop 1 領域と IsdC 内部の塩橋の差だけとなる。つまり、金属ポルフィリンの輸送において、どちら側の NEAT ドメインに輸送されるかを決定するのは、主にプロピオン酸基に対する loop 1 領域の親和性の差 (ΔG) および IsdC 内部の結合エンタルピーの差 (ΔH) となる。この輸送機構が正しいとすれば、第 6 章で見たような鉄以外の結合可能な金属ポルフィリン (Mn-PPIX や Ga-PPIX) などヘムと同様に輸送される理由も簡単に説明できる。

NEAT ドメインのヘム結合形式は非常に特殊であり、1 つのチロシンでのみ金属原子と配位し、6 番目の配位子が空であるという状態での結晶構造報告はとても珍しいものであった。これは第 7 章の結言で触れたヘムの反転輸送のためにわざと空けてあるものだと考えられる。逆に言えば、結合できる金属原子であれば鉄原子に限らず他の金属でも輸送が可能である。Isd system を通って細胞壁上を鉄以外の金属ポルフィリンが輸送されることは、親和性がヘム鉄よりやや高いことも加わって鉄獲得の阻害どころか毒性を持つことが予想される。唯一 Isd system 上で IsdE への結合はこれまで報告されていないが、配位子からして IsdE にも結合ができるものだと考えられる。そして IsdG/IsdI に鉄以外の金属ポルフィリンが到達した時、Mn-, Co-, Ga-PPIX は分解不能であることが報告されているので⁴⁴、毒性を持つ可能性が極めて高い。特にガリウムの細菌に対する毒性はこれまで多く研究・報告されてきた¹²³⁻¹²⁸。これよりガリウムポルフィリンの生育阻害剤としての期待は大きい。ガリウム塩である $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ はヒトの腫瘍細胞に対し、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 程度であれば無害であることが示されている一方 (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を超えると細胞が死滅する)¹²⁹、Ga-PPIX はメチシリン耐性黄色ブドウ球菌に対して 1.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 程度で最小発育阻止濃度 (MIC) となることが報告されている^{130, 131}。両報告においてガリウム原子は鉄原子のミミックではないかと推察されているが、本研究の輸送実験や量子化学計算はそれを支持すると考えられる。すなわち、金属置換ポルフィリンは Isd system を持つグラム陽性の病原菌に対して、まさに「トロイの木馬」としての働きが期待される。

第 8 章では新たに化学合成したヘムの誘導体を用いて、それらが IsdC までは結合できるが IsdE には輸送されないことを示した。この片側のプロピオン酸基を化学修飾した化合物は IsdH-NEAT3, IsdC-NEAT (おそらく IsdB-NEAT2 や IsdA-NEAT も) に通常のヘムと同様に結合できると考えられる。また、この誘導体は NEAT ドメインの特徴的な結合様式を逆手に取ったものであるため、これらに対しての結合可能な一方で、ヘモグロビンやミオグロビンなどほとんどの蛋白質には結合できないことが想定される。したがって、上記の非鉄金属ポルフィリンを使うよりは効力を発揮する濃度が高くなるかもしれないが、さらに安全な化合物となるかもしれない。これについては *in vivo* での研究が望まれる。

本研究では悪名高い病原菌の一種である黄色ブドウ球菌の生育阻害剤の開発につながるための低分子-蛋白質間相互作用について、*in vitro*, *in silico* の両方の見地から進めてきた。

特に *in vitro* で測定することの難しいエネルギーのプロファイルや中間体の構造について *in silico* の計算や理論に基づいた手法は大きな効力を発揮したといえる。残すところは *in vivo* からの検証である。黄色ブドウ球菌のヘム鉄輸送についてのさらなる理解や、ヘム誘導体の生育阻害剤としての評価のためにはこの見地からの検証も不可欠だろう (Figure 9.1)。

2013 年 4 月、かねてより黄色ブドウ球菌を様々な見地から研究している Skaar 博士らの研究室より、小分子 VU0038882 (慣用名: 2-[5-(2-Furanyl)-1H-pyrazole-3-yl]naphthalene-1-ol) が黄色ブドウ球菌のヘムセンサー蛋白質 HssRS に働きかけて菌体内の酵素 hemB によるヘム合成を強制的に誘導することが報告された¹³²。これは外界から直接ヘムを獲得する Isd system と対になる内発性のヘム生成機構である (ただし、Isd systemの方が優先度が高いようだ)。本研究の Isd system をターゲットとした阻害剤が有効であれば、この小分子と合わせることでさらなる生育阻害効果が期待される。

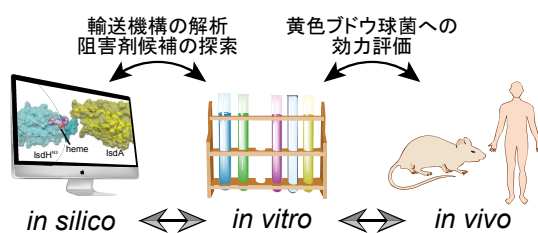


Figure 9.1 *in silico*, *in vitro*, *in vivo* の相互補完的な研究により展開されるであろう効率的な生育阻害剤探索法。

参考文献

1. Weems, J. J. (2001) The many faces of *Staphylococcus aureus* infection. Recognizing and managing its life-threatening manifestations, *Postgraduate Medicine* 110, 24–26 29–31, 35–36.
2. Lowy, F. D. (1998) Medical progress – *Staphylococcus aureus* infections, *New England Journal of Medicine* 339, 520–532.
3. Wertheim, H. F. L., Melles, D. C., Vos, M. C., van Leeuwen, W., van Belkum, A., Verbrugh, H. A., and Nouwen, J. L. (2005) The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections, *Lancet Infectious Diseases* 5, 751–762.
4. Marrack, P., and Kappler, J. (1990) The staphylococcal enterotoxins and their relatives, *Science* 248, 705–711.
5. Herman, A., Kappler, J. W., Marrack, P., and Pullen, A. M. (1991) Superantigens: mechanism of T-cell stimulation and role in immune responses, *Annual Review of Immunology* 9, 745–772.
6. Phonimdaeng, P., Oreilly, M., Nowlan, P., Bramley, A. J., and Foster, T. J. (1990) The coagulase of *Staphylococcus aureus* 8325-4. Sequence analysis and virulence of site-specific coagulase-deficient mutants, *Molecular Microbiology* 4, 393–404.
7. Woodin, A. M. (1959) Fractionation of a leucocidin from *Staphylococcus aureus*, *Biochemical Journal* 73, 225–237.
8. Prévost, G., Cribier, B., Couppie, P., Petiau, P., Supersac, G., Finckbarbancon, V., Monteil, H., and Piemont, Y. (1995) Pantone-Valentine leucocidin and gamma-hemolysin from *Staphylococcus aureus* ATCC 49775 are encoded by distinct genetic loci and have different biological activities, *Infection and Immunity* 63, 4121–4129.
9. Pédelacq, J. D., Maveyraud, L., Prevost, G., Baba-Moussa, L., Gonzalez, A., Courcelle, E., Shepard, W., Monteil, H., Samama, J. P., and Mourey, L. (1999) The structure of a *Staphylococcus aureus* leucocidin component (LukF-PV) reveals the fold of the water-soluble species of a family of transmembrane pore-forming toxins, *Structure with Folding & Design* 7, 277–287.
10. Patel, A. H., Nowlan, P., Weavers, E. D., and Foster, T. (1987) Virulence of protein A-deficient and alpha-toxin-deficient mutants of *Staphylococcus aureus* isolated by allele replacement, *Infection and Immunity* 55, 3103–3110.
11. Rybak, M. J., and Akins, R. L. (2001) Emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with intermediate glycopeptide resistance – Clinical significance and treatment options, *Drugs* 61, 1–7.
12. Iwamoto, M., Mu, Y., Lynfield, R., Bulens, S. N., Nadle, J., Aragon, D., Petit, S., Ray, S. M., Harrison, L. H., Dumyati, G., Townes, J. M., Schaffner, W., Gorwitz, R. J., and Lessa, F. C. (2013) Trends in Invasive Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infections, *Pediatrics* 132, E817–E824.
13. Hiramatsu, K., Cui, L., Kuroda, M., and Ito, T. (2001) The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Trends in Microbiology* 9, 486–493.
14. Kuroda, M., Ohta, T., Uchiyama, I., Baba, T., Yuzawa, H., Kobayashi, I., Cui, L. Z., Oguchi, A., Aoki, K., Nagai, Y., Lian, J. Q., Ito, T., Kanamori, M., Matsumaru, H., Maruyama, A., Murakami, H., Hosoyama, A., Mizutani-Ui, Y., Takahashi, N. K., Sawano, T., Inoue, R., Kaito, C., Sekimizu, K., Hirakawa, H., Kuhara, S., Goto, S., Yabuzaki, J., Kanehisa, M., Yamashita, A., Oshima, K., Furuya, K., Yoshino, C., Shiba, T., Hattori, M., Ogasawara, N., Hayashi, H., and Hiramatsu, K. (2001) Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Lancet* 357, 1225–1240.
15. Hiramatsu, K., Aritaka, N., Hanaki, H., Kawasaki, S., Hosoda, Y., Hori, S., Fukuchi, Y., and Kobayashi, I. (1997) Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin, *Lancet* 350, 1670–1673.
16. Stojiljkovic, I., and Perkins-Balding, D. (2002) Processing of heme and heme-containing proteins by bacteria, *DNA and Cell Biology* 21, 281–295.
17. Neilands, J. B. (1981) Iron absorption and transport in microorganisms, *Annual Review of Nutrition* 1, 27–46.
18. Neilands, J. B. (1981) Microbial iron compounds, *Annual Review of Biochemistry* 50, 715–731.
19. Crosa, J. H. (1984) The relationship of plasmid-mediated iron transport and bacterial virulence,

Annual Review of Microbiology 38, 69–89.

20. Lindsay, J. A., and Riley, T. V. (1994) Staphylococcal iron requirements, siderophore production, and iron-regulated protein expression, *Infection and Immunity* 62, 2309–2314.
21. Friedman, D. B., Stauff, D. L., Pishchany, G., Whitwell, C. W., Torres, V. J., and Skaar, E. P. (2006) *Staphylococcus aureus* redirects central metabolism to increase iron availability, *Plos Pathogens* 2, 777–789.
22. Cotton, J. L., Tao, J., and Balibar, C. J. (2009) Identification and characterization of the *Staphylococcus aureus* gene cluster coding for staphyloferrin A, *Biochemistry* 48, 1025–1035.
23. Konetschny, S., Jung, G., Meiwes, J., and Zahner, H. (1990) Staphyloferrin A: a structurally new siderophore from staphylococci, *European Journal of Biochemistry* 191, 65–74.
24. Beasley, F. C., Vines, E. D., Grigg, J. C., Zheng, Q., Liu, S., Lajoie, G. A., Murphy, M. E. P., and Heinrichs, D. E. (2009) Characterization of staphyloferrin A biosynthetic and transport mutants in *Staphylococcus aureus*, *Molecular Microbiology* 72, 947–963.
25. Grigg, J. C., Cooper, J. D., Cheung, J., Heinrichs, D. E., and Murphy, M. E. P. (2010) The *Staphylococcus aureus* siderophore receptor HtsA undergoes localized conformational changes to enclose staphyloferrin A in an arginine-rich binding pocket, *Journal of Biological Chemistry* 285, 11162–11171.
26. Perutz, M. F., Rossmann, M. G., Cullis, A. F., Muirhead, H., Will, G., and North, A. C. T. (1960) Structure of haemoglobin: a three-dimensional Fourier synthesis at 5.5 Å resolution, obtained by X-ray analysis, *Nature* 185, 416–422.
27. Mazmanian, S. K., Ton-That, H., Su, K., and Schneewind, O. (2002) An iron-regulated sortase anchors a class of surface protein during *Staphylococcus aureus* pathogenesis, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 2293–2298.
28. Mazmanian, S. K., Skaar, E. P., Gaspar, A. H., Humayun, M., Gornicki, P., Jelenska, J., Joachmiak, A., Missiakas, D. M., and Schneewind, O. (2003) Passage of heme-iron across the envelope of *Staphylococcus aureus*, *Science* 299, 906–909.
29. Dryla, A., Gelbmann, D., von Gabain, A., and Nagy, E. (2003) Identification of a novel iron regulated staphylococcal surface protein with haptoglobin-haemoglobin binding activity, *Molecular Microbiology* 49, 37–53.
30. Kumar, K. K., Jacques, D. A., Pishchany, G., Caradoc-Davies, T., Spirig, T., Malmirchegini, G. R., Langley, D. B., Dickson, C. F., Mackay, J. P., Clubb, R. T., Skaar, E. P., Guss, J. M., and Gell, D. A. (2011) Structural basis for hemoglobin capture by *Staphylococcus aureus* cell-surface protein, IsdH, *Journal of Biological Chemistry* 286, 38439–38447.
31. Pilpa, R. M., Robson, S. A., Villareal, V. A., Wong, M. L., Phillips, M., and Clubb, R. T. (2009) Functionally distinct NEAT (NEAr Transporter) domains within the *Staphylococcus aureus* IsdH/HarA protein extract heme from methemoglobin, *Journal of Biological Chemistry* 284, 1166–1176.
32. Pilpa, R. M., Fadeev, E. A., Villareal, V. A., Wong, M. L., Phillips, M., and Clubb, R. T. (2006) Solution structure of the NEAT (NEAr Transporter) domain from IsdH/HarA: The human hemoglobin receptor in *Staphylococcus aureus*, *Journal of Molecular Biology* 360, 435–447.
33. Spirig, T., Malmirchegini, G. R., Zhang, J., Robson, S. A., Sjodt, M., Liu, M., Kumar, K. K., Dickson, C. F., Gell, D. A., Lei, B., Loo, J. A., and Clubb, R. T. (2013) *Staphylococcus aureus* uses a novel multidomain receptor to break apart human hemoglobin and steal its heme, *Journal of Biological Chemistry* 288, 1065–1078.
34. Liu, M., Tanaka, W. N., Zhu, H., Xie, G., Dooley, D. M., and Lei, B. (2008) Direct heme transfer from IsdA to IsdC in the iron-regulated surface determinant (Isd) heme acquisition system of *Staphylococcus aureus*, *Journal of Biological Chemistry* 283, 6668–6676.
35. Murvoy, N., Tiedemann, M. T., Pluym, M., Cheung, J., Heinrichs, D. E., and Stillman, M. J. (2008) Demonstration of the iron-regulated surface determinant (Isd) heme transfer pathway in *Staphylococcus aureus*, *Journal of Biological Chemistry* 283, 28125–28136.
36. Mazmanian, S. K., Hung, I. T., and Schneewind, O. (2001) Sortase-catalysed anchoring of surface proteins to the cell wall of *Staphylococcus aureus*, *Molecular Microbiology* 40, 1049–1057.
37. Andrade, M. A., Ciccarelli, F. D., Perez-Iratxeta, C., and Bork, P. (2002) NEAT: a domain duplicated in genes near the components of a putative Fe³⁺ siderophore transporter from Gram-positive

- pathogenic bacteria, *Genome Biology* 3.
38. Dickson, C. F., Kumar, K. K., Jacques, D. A., Malmirchegini, G. R., Spirig, T., Mackay, J. P., Clubb, R. T., Guss, J. M., and Gell, D. A. (2014) Structure of the hemoglobin-IsdH complex reveals the molecular basis of iron capture by *Staphylococcus aureus*, *Journal of Biological Chemistry*, 10.1074/jbc.M1113.545566
 39. Watanabe, M., Tanaka, Y., Suenaga, A., Kuroda, M., Yao, M., Watanabe, N., Arisaka, F., Ohta, T., Tanaka, I., and Tsumoto, K. (2008) Structural basis for multimeric heme complexation through a specific protein-heme interaction – The case of the third neat domain of IsdH from *Staphylococcus aureus*, *Journal of Biological Chemistry* 283, 28649–28659.
 40. Gaudin, C. F. M., Grigg, J. C., Arrieta, A. L., and Murphy, M. E. P. (2011) Unique Heme-Iron Coordination by the Hemoglobin Receptor IsdB of *Staphylococcus aureus*, *Biochemistry* 50, 5443–5452.
 41. Grigg, J. C., Vermeiren, C. L., Heinrichs, D. E., and Murphy, M. E. P. (2007) Haem recognition by a *Staphylococcus aureus* NEAT domain, *Molecular Microbiology* 63, 139–149.
 42. Sharp, K. H., Schneider, S., Cockayne, A., and Paoli, M. (2007) Crystal structure of the heme-IsdC complex, the central conduit of the Isd iron/heme uptake system in *Staphylococcus aureus*, *Journal of Biological Chemistry* 282, 10625–10631.
 43. Grigg, J. C., Vermeiren, C. L., Heinrichs, D. E., and Murphy, M. E. P. (2007) Heme coordination by *Staphylococcus aureus* IsdE, *Journal of Biological Chemistry* 282, 28815–28822.
 44. Lee, W. C., Reniere, M. L., Skaar, E. P., and Murphy, M. E. P. (2008) Ruffling of Metalloporphyrins Bound to IsdG and IsdI, Two Heme-degrading Enzymes in *Staphylococcus aureus*, *Journal of Biological Chemistry* 283, 30957–30963.
 45. Skaar, E. P., Gaspar, A. H., and Schneewind, O. (2004) IsdG and IsdI, heme-degrading enzymes in the cytoplasm of *Staphylococcus aureus*, *Journal of Biological Chemistry* 279, 436–443.
 46. Haley, K. P., Janson, E. M., Heilbronner, S., Foster, T. J., and Skaar, E. P. (2011) *Staphylococcus lugdunensis* IsdG Liberates Iron from Host Heme, *Journal of Bacteriology* 193, 4749–4757.
 47. Reniere, M. L., Ukpabi, G. N., Harry, S. R., Stec, D. F., Krull, R., Wright, D. W., Bachmann, B. O., Murphy, M. E., and Skaar, E. P. (2010) The IsdG-family of haem oxygenases degrades haem to a novel chromophore, *Molecular Microbiology* 75, 1529–1538.
 48. Matsui, T., Nambu, S., Ono, Y., Goulding, C. W., Tsumoto, K., and Ikeda-Saito, M. (2013) Heme degradation by *Staphylococcus aureus* IsdG and IsdI liberates formaldehyde rather than carbon monoxide, *Biochemistry* 52, 3025–3027.
 49. Zhu, H., Xie, G., Liu, M., Olson, J. S., Fabian, M., Dooley, D. M., and Lei, B. (2008) Pathway for heme uptake from human methemoglobin by the iron-regulated surface determinants system of *Staphylococcus aureus*, *Journal of Biological Chemistry* 283, 18450–18460.
 50. Abe, R., Caaveiro, J. M. M., Kozuka-Hata, H., Oyama, M., and Tsumoto, K. (2012) Mapping ultra-weak protein–protein interactions between heme transporters of *Staphylococcus aureus*, *Journal of Biological Chemistry* 287, 16477–16487.
 51. Grigg, J. C., Mao, C. X., and Murphy, M. E. P. (2011) Iron-Coordinating Tyrosine Is a Key Determinant of NEAT Domain Heme Transfer, *Journal of Molecular Biology* 413, 684–698.
 52. Villareal, V. A., Spirig, T., Robson, S. A., Liu, M., Lei, B., and Clubb, R. T. (2011) Transient weak protein–protein complexes transfer heme across the cell wall of *Staphylococcus aureus*, *Journal of the American Chemical Society* 133, 14176–14179.
 53. Visai, L., Yanagisawa, N., Josefsson, E., Tarkowski, A., Pezzali, I., Rooijackers, S. H. M., Foster, T. J., and Speziale, P. (2009) Immune evasion by *Staphylococcus aureus* conferred by iron-regulated surface determinant protein IsdH, *Microbiology* 155, 667–679.
 54. D.A. Case, T. A. D., T.E. Cheatham, III, C.L. Simmerling, J. Wang, R.E. Duke, R. Luo, R.C. Walker, W. Zhang, K.M. Merz, B. Roberts, B. Wang, S. Hayik, A. Roitberg, G. Seabra, I. Kolossvai, K.F. Wong, F. Paesani, J. Vanicek, J. Liu, X. Wu, S.R. Brozell, T. Steinbrecher, H. Gohlke, Q. Cai, X. Ye, J. Wang, M.-J. Hsieh, G. Cui, D.R. Roe, D.H. Mathews, M.G. Seetin, C. Sagui, V. Babin, T. Luchko, S. Gusarov, A. Kovalenko, and P.A. Kollman. (2010) AMBER 11, University of California, San Francisco.
 55. Bussi, G., Donadio, D., and Parrinello, M. (2007) Canonical sampling through velocity rescaling, *Journal of Chemical Physics* 126.

56. Bussi, G., and Parrinello, M. (2008) Stochastic thermostats: comparison of local and global schemes, *Computer Physics Communications* 179, 26–29.
57. Bussi, G., Zykova-Timan, T., and Parrinello, M. (2009) Isothermal-isobaric molecular dynamics using stochastic velocity rescaling, *Journal of Chemical Physics* 130.
58. Berendsen, H. J. C., Postma, J. P. M., Vangunsteren, W. F., Dinola, A., and Haak, J. R. (1984) Molecular dynamics with coupling to an external bath, *Journal of Chemical Physics* 81, 3684–3690.
59. Parrinello, M., and Rahman, A. (1981) Polymorphic transitions in single crystals: A new molecular dynamics method, *Journal of Applied Physics* 52, 7182–7190.
60. Nose, S., and Klein, M. L. (1983) Constant pressure molecular dynamics for molecular systems, *Molecular Physics* 50, 1055–1076.
61. Darden, T., York, D., and Pedersen, L. (1993) Particle mesh Ewald: An $N\cdot\log(N)$ method for Ewald sums in large systems, *Journal of Chemical Physics* 98, 10089–10092.
62. Essmann, U., Perera, L., Berkowitz, M. L., Darden, T., Lee, H., and Pedersen, L. G. (1995) A smooth particle mesh Ewald method, *Journal of Chemical Physics* 103, 8577–8593.
63. Qiu, D., Shenkin, P. S., Hollinger, F. P., and Still, W. C. (1997) The GB/SA continuum model for solvation. A fast analytical method for the calculation of approximate Born radii, *Journal of Physical Chemistry A* 101, 3005–3014.
64. Ryckaert, J. P., Ciccotti, G., and Berendsen, H. J. C. (1977) Numerical integration of the cartesian equations of motion of a system with constraints: molecular dynamics of n-Alkanes, *Journal of Computational Physics* 23, 327–341.
65. Hess, B., Bekker, H., Berendsen, H. J. C., and Fraaije, J. (1997) LINCS: A linear constraint solver for molecular simulations, *Journal of Computational Chemistry* 18, 1463–1472.
66. Hess, B. (2008) P-LINCS: A parallel linear constraint solver for molecular simulation, *Journal of Chemical Theory and Computation* 4, 116–122.
67. Singh, U. C., and Kollman, P. A. (1984) An approach to computing electrostatic charges for molecules, *Journal of Computational Chemistry* 5, 129–145.
68. Bayly, C. I., Cieplak, P., Cornell, W. D., and Kollman, P. A. (1993) A well-behaved electrostatic potential based method using charge restraints for deriving atomic charges: the RESP model, *Journal of Physical Chemistry* 97, 10269–10280.
69. Roothaan, C. C. J. (1951) New Developments in Molecular Orbital Theory, *Reviews of Modern Physics* 23, 69–89.
70. Hall, G. G. (1951) The Molecular Orbital Theory of Chemical Valency. VIII. A Method of Calculating Ionization Potentials, *Proceedings of the Royal Society of London Series a-Mathematical and Physical Sciences* 205, 541–552.
71. Lee, C. T., Yang, W. T., and Parr, R. G. (1988) Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density, *Physical Review B* 37, 785–789.
72. Perdew, J. P. (1986) Density-functional approximation for the correlation energy of the inhomogeneous electron gas, *Physical Review B* 33, 8822–8824.
73. Becke, A. D. (1996) Density-functional thermochemistry. IV. A new dynamical correlation functional and implications for exact-exchange mixing, *Journal of Chemical Physics* 104, 1040–1046.
74. Becke, A. D. (1988) Density-functional exchange-energy approximation with correct asymptotic behavior, *Physical Review A* 38, 3098–3100.
75. Li, J. M., Umanoff, H., Proenca, R., Russell, C. S., and Cosloy, S. D. (1988) Cloning of the Escherichia coli K-12 hemB gene, *Journal of Bacteriology* 170, 1021–1025.
76. Deboer, H. A., Comstock, L. J., and Vasser, M. (1983) The tac promoter: a functional hybrid derived from the trp and lac promoters, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences* 80, 21–25.
77. Nakae, Y., Fukusaki, E. I., Kajiyama, S., Kobayashi, A., Nakajima, S., and Sakata, I. (2005) The convenient screening method using albumin for the tumor localizing property of Ga-porphyrin complexes, *Journal of Photochemistry and Photobiology a-Chemistry* 172, 55–61.
78. Wiseman, T., Williston, S., Brandts, J. F., and Lin, L. N. (1989) Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter, *Analytical Biochemistry* 179, 131–137.

79. Boucher, L. J. (1968) Manganese porphyrin complexes. 1. Synthesis and spectroscopy of Manganese (III) protoporphyrin IX dimethyl ester halides, *Journal of the American Chemical Society* 90, 6640–6645.
80. Vermeiren, C. L., Pluym, M., Mack, J., Heinrichs, D. E., and Stillman, M. J. (2006) Characterization of the heme binding properties of *Staphylococcus aureus* IsdA, *Biochemistry* 45, 12867–12875.
81. The PyMol Molecular Graphics System, V., Schrodinger, LLC. (2010) *The PyMol Molecular Graphics System, Version 1.5.0.3, Schrodinger, LLC*.
82. Olsson, M. H. M., Sondergaard, C. R., Rostkowski, M., and Jensen, J. H. (2011) PROPKA3: Consistent Treatment of Internal and Surface Residues in Empirical pK_a Predictions, *Journal of Chemical Theory and Computation* 7, 525–537.
83. Grubmueller, H. (1996) SOLVATE v. 1.0, Theoretical Biophysics Group, Institute for Medical Optics, Ludwig-Maximilians University, Munich.
84. Hornak, V., Abel, R., Okur, A., Strockbine, B., Roitberg, A., and Simmerling, C. (2006) Comparison of multiple amber force fields and development of improved protein backbone parameters, *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 65, 712–725.
85. Jorgensen, W. L., Chandrasekhar, J., Madura, J. D., Impey, R. W., and Klein, M. L. (1983) Comparison of simple potential functions for simulating liquid water, *Journal of Chemical Physics* 79, 926–935.
86. Frisch, M. J., Trucks, G. W., Schlegel, H. B., Scuseria, G. E., Robb, M. A., Cheeseman, J. R., Scalmani, G., Barone, V., Mennucci, B., Petersson, G. A., Nakatsuji, H., Caricato, M., Li, X., Hratchian, H. P., Izmaylov, A. F., Bloino, J., Zheng, G., Sonnenberg, J. L., Hada, M., Ehara, M., Toyota, K., Fukuda, R., Hasegawa, J., Ishida, M., Nakajima, T., Honda, Y., Kitao, O., Nakai, H., Vreven, T., Montgomery, J., J. A., Peralta, J. E., Ogliaro, F., Bearpark, M., Heyd, J. J., Brothers, E., Kudin, K. N., Staroverov, V. N., Kobayashi, R., Normand, J., Raghavachari, K., Rendell, A., Burant, J. C., Iyengar, S. S., Tomasi, J., Cossi, M., Rega, N., Millam, J. M., Klene, M., Knox, J. E., Cross, J. B., Bakken, V., Adamo, C., Jaramillo, J., Gomperts, R., Stratmann, R. E., Yazyev, O., Austin, A. J., Cammi, R., Pomelli, C., Ochterski, J. W., Martin, R. L., Morokuma, K., Zakrzewski, V. G., Voth, G. A., Salvador, P., Dannenberg, J. J., Dapprich, S., Daniels, A. D., Farkas, Ö., Foresman, J. B., Ortiz, J. V., Cioslowski, J., and Fox, D. J. (2009) Gaussian 09 Revision A.02, Gaussian, Inc., Wallingford CT.
87. Becke, A. D. (1993) Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange, *Journal of Chemical Physics* 98, 5648–5652.
88. Tiedemann, M. T., Muryoi, N., Heinrichs, D. E., and Stillman, M. J. (2009) Characterization of IsdH (NEAT domain 3) and IsdB (NEAT domain 2) in *Staphylococcus aureus* by magnetic circular dichroism spectroscopy and electrospray ionization mass spectrometry, *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines* 13, 1006–1016.
89. Hess, B., Kutzner, C., van der Spoel, D., and Lindahl, E. (2008) GROMACS 4: Algorithms for highly efficient, load-balanced, and scalable molecular simulation, *Journal of Chemical Theory and Computation* 4, 435–447.
90. Mobley, D. L., Chodera, J. D., and Dill, K. A. (2006) On the use of orientational restraints and symmetry corrections in alchemical free energy calculations, *Journal of Chemical Physics* 125, 084902.
91. Hotelling, H. (1933) Analysis of a complex of statistical variables into principal components, *Journal of Educational Psychology* 24, 417–441.
92. Pearson, K. (1901) On lines and planes of closest fit to systems of points in space, *Philosophical Magazine* 2, 559–572.
93. Kitao, A., Hirata, F., and Go, N. (1991) The effects of solvent on the conformation and the collective motions of protein: Normal mode analysis and molecular dynamics simulations of melittin in water and in vacuum, *Chemical Physics* 158, 447–472.
94. Levy, R. M., Srinivasan, A. R., Olson, W. K., and McCammon, J. A. (1984) Quasi-harmonic method for studying very low frequency modes in proteins, *Biopolymers* 23, 1099–1112.
95. Levy, R. M., Rojas, O. D., and Friesner, R. A. (1984) Quasi-harmonic method for calculating vibrational spectra from classical simulations on multi-dimensional anharmonic potential surfaces, *Journal of Physical Chemistry* 88, 4233–4238.
96. Schlitter, J. (1993) Estimation of absolute and relative entropies of macromolecules using the

- covariance matrix, *Chemical Physics Letters* 215, 617–621.
97. Andricioaei, I., and Karplus, M. (2001) On the calculation of entropy from covariance matrices of the atomic fluctuations, *Journal of Chemical Physics* 115, 6289–6292.
 98. Pliego, J. R., and Riveros, J. M. (2000) New values for the absolute solvation free energy of univalent ions in aqueous solution, *Chemical Physics Letters* 332, 597–602.
 99. Villareal, V. A., Pilpa, R. M., Robson, S. A., Fadeev, E. A., and Clubb, R. T. (2008) The IsdC protein from *Staphylococcus aureus* uses a flexible binding pocket to capture heme, *Journal of Biological Chemistry* 283, 31591–31600.
 100. Moriwaki, Y., Caaveiro, J. M. M., Tanaka, Y., Tsutsumi, H., Hamachi, I., and Tsumoto, K. (2011) Molecular basis of recognition of antibacterial porphyrins by heme-transporter IsdH-NEAT3 of *Staphylococcus aureus*, *Biochemistry* 50, 7311–7320.
 101. Tiedemann, M. T., Pinter, T. B. J., and Stillman, M. J. (2012) Insight into blocking heme transfer by exploiting molecular interactions in the core Isd heme transporters IsdA-NEAT, IsdC-NEAT, and IsdE of *Staphylococcus aureus*, *Metallomics* 4, 751–760.
 102. Baron, R., and McCammon, J. A. (2013) Molecular Recognition and Ligand Association, *Annual Review of Physical Chemistry* 64, 151–175.
 103. Boots, H. M. J., and Debokx, P. K. (1989) Theory of enthalpy–entropy compensation, *Journal of Physical Chemistry* 93, 8240–8243.
 104. Newton, S. M. C., Klebba, P. E., Raynaud, C., Shao, Y., Jiang, X. X., Dubail, I., Archer, C., Frehel, C., and Charbit, A. (2005) The *svpA-srtB* locus of *Listeria monocytogenes*: Fur-mediated iron regulation and effect on virulence, *Molecular Microbiology* 55, 927–940.
 105. Xiao, Q., Jiang, X., Moore, K. J., Shao, Y., Pi, H., Dubail, I., Charbit, A., Newton, S. M., and Klebba, P. E. (2011) Sortase independent and dependent systems for acquisition of haem and haemoglobin in *Listeria monocytogenes*, *Molecular Microbiology* 80, 1581–1597.
 106. Zapotoczna, M., Heilbronner, S., Speziale, P., and Foster, T. J. (2012) Iron-Regulated Surface Determinant (Isd) Proteins of *Staphylococcus lugdunensis*, *Journal of Bacteriology* 194, 6453–6467.
 107. Tarlovsky, Y., Fabian, M., Solomaha, E., Honsa, E., Olson, J. S., and Maresso, A. W. (2010) A *Bacillus anthracis* S-layer homology protein that binds heme and mediates heme delivery to IsdC, *Journal of Bacteriology* 192, 3503–3511.
 108. Balderas, M. A., Nobles, C. L., Honsa, E. S., Alicki, E. R., and Maresso, A. W. (2012) Hal is a *Bacillus anthracis* heme acquisition protein, *Journal of Bacteriology* 194, 5513–5521.
 109. Honsa, E. S., Fabian, M., Cardenas, A. M., Olson, J. S., and Maresso, A. W. (2011) The five near-iron transporter (NEAT) domain anthrax hemophore, IsdX2, scavenges heme from hemoglobin and transfers heme to the surface protein IsdC, *Journal of Biological Chemistry* 286, 33652–33660.
 110. Ekworomadu, M. T., Poor, C. B., Owens, C. P., Balderas, M. A., Fabian, M., Olson, J. S., Murphy, F., Balkabasi, E., Honsa, E. S., He, C., Goulding, C. W., and Maresso, A. W. (2012) Differential Function of Lip Residues in the Mechanism and Biology of an Anthrax Hemophore, *Plos Pathogens* 8, e1002559.
 111. Honsa, E. S., Owens, C. P., Goulding, C. W., and Maresso, A. W. (2013) The near-iron transporter (NEAT) domains of the anthrax hemophore IsdX2 require a critical glutamine to extract heme from methemoglobin, *Journal of Biological Chemistry* 288, 8479–8490.
 112. Moriwaki, Y., Terada, T., Caaveiro, J. M. M., Takaoka, Y., Hamachi, I., Tsumoto, K., and Shimizu, K. (2013) Heme binding mechanism of structurally similar iron-regulated surface determinant near transporter domains of *Staphylococcus aureus* exhibiting different affinities for heme, *Biochemistry* 52, 8866–8877.
 113. Svensson, M., Humbel, S., Froese, R. D. J., Matsubara, T., Sieber, S., and Morokuma, K. (1996) ONIOM: A multilayered integrated MO + MM Method for geometry optimizations and single point energy predictions. A test for Diels–Alder reactions and $\text{Pt}(\text{P}(t\text{-Bu})_3)_2 + \text{H}_2$ Oxidative Addition, *Journal of Physical Chemistry* 100, 19357–19363.
 114. Dapprich, S., Komaromi, I., Byun, K. S., Morokuma, K., and Frisch, M. J. (1999) A new ONIOM implementation in Gaussian98. Part I. The calculation of energies, gradients, vibrational frequencies and electric field derivatives, *Journal of Molecular Structure-Theochem* 461, 1–21.
 115. Maseras, F., and Morokuma, K. (1995) IMOMM: A new integrated *ab initio* + molecular mechanics geometry optimization scheme of equilibrium structures and transition states, *Journal of*

Computational Chemistry 16, 1170–1179.

116. Humbel, S., Sieber, S., and Morokuma, K. (1996) The IMOMO method: Integration of different levels of molecular orbital approximations for geometry optimization of large systems: Test for *n*-butane conformation and S_N2 reaction: RCl+Cl⁻, *Journal of Chemical Physics* 105, 1959–1967.
117. Tao, P., Fisher, J. F., Shi, Q., Vreven, T., Mobashery, S., and Schlegel, H. B. (2009) Matrix metalloproteinase 2 inhibition: combined quantum mechanics and molecular mechanics studies of the inhibition mechanism of (4-phenoxyphenylsulfonyl)methylthiirane and its oxirane analogue., *Biochemistry* 48, 9839–9847.
118. Zhou, J., Tao, P., Fisher, J. F., Shi, Q., Mobashery, S., and Schlegel, H. B. (2010) QM/MM studies of the matrix metalloproteinase 2 (MMP2) inhibition mechanism of (S)-SB-3CT and its oxirane analogue, *Journal of Chemical Theory and Computation* 6, 3580–3587.
119. Hay, P. J., and Wadt, W. R. (1985) *Ab initio* effective core potentials for molecular calculations. Potentials for K to Au including the outermost core orbitals, *Journal of Chemical Physics* 82, 299–310.
120. Wadt, W. R., and Hay, P. J. (1985) *Ab initio* effective core potentials for molecular calculations. Potentials for main group elements Na to Bi, *Journal of Chemical Physics* 82, 284–298.
121. Hay, P. J., and Wadt, W. R. (1985) *Ab initio* effective core potentials for molecular calculations. Potentials for the transition metal atoms Sc to Hg, *Journal of Chemical Physics* 82, 270–283.
122. Vu, N. T., Moriwaki, Y., Caaveiro, J. M. M., Terada, T., Tsutsumi, H., Hamachi, I., Shimizu, K., and Tsumoto, K. (2013) Selective binding of antimicrobial porphyrins to the heme-receptor IsdH-NEAT3 of *Staphylococcus aureus*, *Protein Science* 22, 942–953.
123. Tsan, M. F., Chen, W. Y., Scheffel, U., and Wagner, H. N. (1978) Studies on gallium accumulation in inflammatory lesions: 1. Gallium uptake by human polymorphonuclear leukocytes., *Journal of Nuclear Medicine* 19, 36–43.
124. Menon, S., Wagner, H. N., and Tsan, M. F. (1978) Studies on gallium accumulation in inflammatory Lesions: 2. Uptake by *Staphylococcus aureus*: concise communication, *Journal of Nuclear Medicine* 19, 44–47.
125. Tsan, M. F. (1978) Studies on gallium accumulation in inflammatory lesions: 3. roles of polymorphonuclear leukocytes and bacterial, *Journal of Nuclear Medicine* 19, 492–495.
126. Alaoukaty, A., Appanna, V. D., and Falter, H. (1992) Gallium toxicity and adaptation in *Pseudomonas fluorescens*, *FEMS Microbiology Letters* 92, 265–272.
127. Olakanmi, O., Britigan, B. E., and Schlesinger, L. S. (2000) Gallium disrupts iron metabolism of mycobacteria residing within human macrophages, *Infection and Immunity* 68, 5619–5627.
128. Chenier, D., Beriault, R., Mailloux, R., Baquie, M., Abramia, G., Lemire, J., and Appanna, V. (2008) Involvement of fumarase C and NADH oxidase in metabolic adaptation of *Pseudomonas fluorescens* cells evoked by aluminum and gallium toxicity, *Applied and Environmental Microbiology* 74, 3977–3984.
129. Rasey, J. S., Nelson, N. J., and Larson, S. M. (1982) Tumor cell toxicity of stable gallium nitrate: Enhancement by transferrin and protection by iron, *European Journal of Cancer & Clinical Oncology* 18, 661–668.
130. Stojiljkovic, I., Kumar, V., and Srinivasan, N. (1999) Non-iron metalloporphyrins: potent antibacterial compounds that exploit haem/Hb uptake systems of pathogenic bacteria, *Molecular Microbiology* 31, 429–442.
131. Stojiljkovic, I., and Perkins-Balding, D. (2002) Processing of heme and heme-containing proteins by bacteria, *DNA and Cell Biology* 21, 281–295.
132. Mike, L. A., Dutter, B. F., Stauff, D. L., Moore, J. L., Vitko, N. P., Aranmolate, O., Kehl-Fie, T. E., Sullivan, S., Reid, P. R., DuBois, J. L., Richardson, A. R., Caprioli, R. M., Sulikowski, G. A., and Skaar, E. P. (2013) Activation of heme biosynthesis by a small molecule that is toxic to fermenting *Staphylococcus aureus*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, 8206–8211.

付録

Appendix 1. GROMACS のトラジェクトリ (.xtc) ファイルから AMBER の netcdf 形式への変換法

GROMACS の xtc トラジェクトリファイルから AMBER の netcdf ファイル形式にするための操作の流れは次のようになる。

1. GROMACS の xtc トラジェクトリに対し、オプション“-pbc nojump”をつけて溶媒分子のみ溶媒ボックスの中でループしないようにする。
2. ソフトウェア VMD を用いて GROMACS 形式をロード、アスキーファイルの crd 形式に変換する。下記の xtc2crd.tcl を利用する。
3. AmberTools の ptraj または cpptraj で crd ファイルを netcdf 形式に結合、変換する。

xtc2crd.tcl の中身は以下の通り。

```
# xtc2crd.tcl
# values from mdp file
set dt "0.002"; # the value of time step in your trajectory file
set nstxtcout "500"; #output frequency of xtc file
set begns 1;
set endns 50; # generating crd file from $begns ns to $endns ns.
set grofile "./top/isdaa.gro"; # set your .gro coordinate file.
set xtcfile "./IsdAa40nsnj.xtc" # set your trajectory to load.
set crdprefix "IsdAa1_" # prefix of the converted output file.
set numfr [expr 1000 / ($dt * $nstxtcout)]; #number of frames during 1ns
set interval 50

# setting ends

mol new $grofile
animate delete all
set i $begns
while {$i <= $endns} {
    set firstframe [format "%.0f" [expr 1+($i-1) * $numfr]]
    set lastframe [format "%.0f" [expr (($i-1)+$interval) * $numfr]]
    append crdname "$crdprefix" [format "%03d" $i] "_" [format "%03d" [expr
($i +$interval - 1)]] ".crd"
    mol addfile $xtcfile type {xtc} first $firstframe last $lastframe
```

```
step 1 waitfor all
    animate write crdbox $crdname beg 0 end -1 skip 1
    animate delete all
    unset crdname
    set i [expr $i + $interval]
}
quit
```

このスクリプトを用いて

`$ /path/to/vmddirectory/bin/vmd -dispdev text -e xtc2crd.tcl`
と入力すれば2.の操作が実行される。

なお目的がMM-PB/SA や 3D-RISM (本研究では用いていない) の場合には溶媒のトラジェクトリは意味を為さないので、1. の操作時に溶媒やイオン分子を除くと処理時間が大幅に短縮される。また、溶質の並進・回転運動も本研究の解析の範疇では影響を与えないので、変換時に並進運動・回転運動の除去の操作を加えても問題ない。

Appendix 2. シミュレーションに用いたパラメータ

holo 体のシミュレーションに用いたヘム結合用チロシン (TYM.prep)

```

1      1      2
db94.dat
TYROSINE with negative charge from resp checked

TYM  INT      1
CORR OMIT DU   BEG
0.00000
1  DUMM  DU    M    0  -1  -2    0.000    0.000    0.000    0.00000
2  DUMM  DU    M    1   0  -1    1.449    0.000    0.000    0.00000
3  DUMM  DU    M    2   1   0    1.522   111.100    0.000    0.00000
4  N      N    M    3   2   1    1.335   116.600   180.000   -0.41376
5  H      H    E    4   3   2    1.010   119.800    0.000    0.27383
6  CA     CT    M    4   3   2    1.449   121.900   180.000   -0.00053
7  HA     H1    E    6   4   3    1.090   109.500   300.000    0.08953
8  CB     CT    3    6   4   3    1.525   111.100    60.000   -0.04764
9  HB2    HC    E    8   6   4    1.090   109.500   300.000    0.011455
10 HB3    HC    E    8   6   4    1.090   109.500    60.000    0.011455
11 CG     CA    S    8   6   4    1.510   109.470   180.000    0.125041
12 CD1    CA    B   11   8   6    1.400   120.000   180.000   -0.18384
13 HD1    HA    E   12  11   8    1.090   120.000    0.000    0.08565
14 CE1    CA    B   12  11   8    1.400   120.000   180.000   -0.12318
15 HE1    HA    E   14  12  11    1.090   120.000   180.000    0.09881
16 CZ     CA    B   14  12  11    1.400   120.000    0.000    0.12660
17 OH     OH    E   16  14  12    1.360   120.000   180.000   -0.30509
18 CE2    CA    B   16  14  12    1.400   120.000    0.000   -0.12318
19 HE2    HA    E   18  16  14    1.090   120.000   180.000    0.09881
20 CD2    CA    S   18  16  14    1.400   120.000    0.000   -0.18384
21 HD2    HA    E   20  18  16    1.090   120.000   180.000    0.08565
22 C      C     M    6   4   3    1.522   111.100   180.000    0.59923
23 O      O     E   22   6   4    1.229   120.500    0.000   -0.56597

LOOP
CG    CD2

IMPROPER
-M    CA    N    H
CA    +M    C    O
CG    CE2   CD2   HD2
CD2   CZ    CE2   HE2
CD1   CZ    CE1   HE1
CG    CE1   CD1   HD1
CD1   CD2   CG    CB
CE1   CE2   CZ    OH

```

DONE

holo 体のシミュレーションに用いたチロシンと結合したヘム (HEM.prep)

0 0 2

HEM

heme for TYROSINE RESIDUE bond

HEM INT 0

CORRECT OMIT DU BEG

0.0000

1	DUMM	DU	M	0	-1	-2	0.000	.0	.0	.00000
2	DUMM	DU	M	1	0	-1	1.449	.0	.0	.00000
3	DUMM	DU	M	2	1	0	1.522	111.1	.0	.00000
4	FE	Fe	M	3	2	1	1.850	130.104	-110.370	0.331609
5	NA	nc	M	4	3	2	2.079	103.186	-8.747	-0.224594
6	C1A	cc	M	5	4	3	1.375	125.550	-81.894	-0.009872
7	CHA	ce	M	6	5	4	1.395	124.356	-21.616	-0.049417
8	HGM	ha	E	7	6	5	1.084	116.588	-177.218	0.106058
9	C4D	cc	M	7	6	5	1.392	126.703	2.495	0.043830
10	C3D	cd	B	9	7	6	1.463	124.941	-177.705	-0.038135
11	C2D	cd	S	10	9	7	1.372	106.068	-179.555	0.037237
12	CMD	c3	3	11	10	9	1.500	127.990	-179.889	-0.113627
13	HM51	hc	E	12	11	10	1.098	111.169	134.159	0.040167
14	HM52	hc	E	12	11	10	1.101	111.243	-106.834	0.040167
15	HM53	hc	E	12	11	10	1.099	110.525	14.139	0.040167
16	CAD	c3	3	10	9	7	1.502	125.828	1.768	-0.047578
17	CBD	c3	3	16	10	9	1.551	114.915	94.616	0.084622
18	CGD	c	B	17	16	10	1.581	115.013	100.560	0.634805
19	O1D	o	E	18	17	16	1.264	116.888	4.631	-0.696485
20	O2D	o	E	18	17	16	1.250	113.950	-176.688	-0.696485
21	HP63	hc	E	17	16	10	1.097	111.578	-22.920	-0.057071
22	HP64	hc	E	17	16	10	1.099	109.602	-139.609	-0.057071
23	HP61	hc	E	16	10	9	1.098	108.908	-29.980	0.024113
24	HP62	hc	E	16	10	9	1.096	109.320	-147.347	0.024113
25	ND	nf	M	9	7	6	1.377	124.270	2.908	-0.073546
26	C1D	cc	M	25	9	7	1.377	105.635	179.294	-0.015382
27	CHD	ce	M	26	25	9	1.388	124.760	179.713	-0.103035
28	HBM	ha	E	27	26	25	1.084	115.929	179.913	0.102226
29	C4C	cc	M	27	26	25	1.398	126.858	-2.728	0.028845
30	C3C	cd	B	29	27	26	1.455	125.026	-176.478	-0.015838
31	C2C	cd	S	30	29	27	1.384	106.319	176.968	0.071933
32	CMC	c3	3	31	30	29	1.499	127.963	177.949	-0.136840
33	HM31	hc	E	32	31	30	1.100	112.458	86.460	0.040693
34	HM32	hc	E	32	31	30	1.096	111.562	-153.103	0.040693
35	HM33	hc	E	32	31	30	1.096	110.630	-33.129	0.040693
36	CAC	cf	B	30	29	27	1.456	124.145	-4.285	-0.084452
37	CBC	c2	B	36	30	29	1.344	128.042	157.966	-0.413641
38	HVC4	ha	E	37	36	30	1.086	122.878	-2.794	0.146925
39	HVT4	ha	E	37	36	30	1.086	120.588	178.986	0.146925
40	HV4	ha	E	36	30	29	1.090	115.099	-22.046	0.117503
41	NC	ne	M	29	27	26	1.368	124.771	0.176	-0.174088
42	C1C	cc	M	41	29	27	1.378	106.719	-176.509	-0.007026
43	CHC	ce	M	42	41	29	1.394	124.824	176.993	-0.110221
44	HAM	ha	E	43	42	41	1.085	116.385	-177.799	0.096947
45	C4B	cc	M	43	42	41	1.393	126.854	-0.004	-0.036823
46	C3B	cd	B	45	43	42	1.454	125.102	-177.941	0.009323
47	C2B	cd	S	46	45	43	1.386	106.276	-179.764	0.075676
48	CMB	c3	3	47	46	45	1.499	127.972	177.357	-0.201655
49	HM11	hc	E	48	47	46	1.101	112.377	88.867	0.062256
50	HM12	hc	E	48	47	46	1.095	111.511	-150.911	0.062256

51	HM13	hc	E	48	47	46	1.096	110.793	-30.840	0.062256
52	CAB	cf	B	46	45	43	1.456	124.254	-1.378	-0.105748
53	CBB	c2	B	52	46	45	1.345	128.055	156.746	-0.393752
54	HVC2	ha	E	53	52	46	1.085	122.688	-2.651	0.136844
55	HVT2	ha	E	53	52	46	1.087	120.721	178.784	0.136844
56	HV2	ha	E	52	46	45	1.091	115.141	-23.231	0.123628
57	NB	nd	M	45	43	42	1.371	124.834	1.069	-0.083478
58	C1B	cc	M	57	45	43	1.373	106.712	179.668	-0.024857
59	CHB	ce	M	58	57	45	1.401	124.825	-178.792	-0.104523
60	HDM	ha	E	59	58	57	1.083	116.857	178.094	0.084048
61	C4A	cc	M	59	58	57	1.386	126.935	-2.223	0.091872
62	C3A	cd	M	61	59	58	1.454	124.772	179.506	0.053784
63	CMA	c3	3	62	61	59	1.499	125.832	-1.849	-0.162861
64	HM81	hc	E	63	62	61	1.101	111.424	88.798	0.051346
65	HM82	hc	E	63	62	61	1.098	109.702	-150.343	0.051346
66	HM83	hc	E	63	62	61	1.096	111.270	-30.821	0.051346
67	C2A	cd	M	62	61	59	1.372	106.642	178.330	-0.012525
68	CAA	c3	M	67	62	61	1.504	128.269	177.839	-0.009671
69	HP71	hc	E	68	67	62	1.094	109.448	23.620	-0.027852
70	HP72	hc	E	68	67	62	1.099	109.061	141.112	-0.027852
71	CBA	c3	M	68	67	62	1.547	114.094	-95.271	0.318404
72	HP73	hc	E	71	68	67	1.101	107.920	-162.935	-0.110700
73	HP74	hc	E	71	68	67	1.096	111.215	-46.403	-0.110700
74	CGA	c	M	71	68	67	1.571	114.336	78.403	0.615880
75	O2A	o	E	74	71	68	1.259	115.265	-151.389	-0.674505
76	O1A	o	M	74	71	68	1.260	116.152	31.470	-0.674505

LOOP

ND	FE
NC	FE
NB	FE
C4A	NA
C2A	C1A
C1D	C2D
C1C	C2C
C1B	C2B

IMPROPER

FE	C1A	NA	C4A
C2A	CHA	C1A	NA
C1A	C4D	CHA	HGM
C3D	CHA	C4D	ND
CAD	C2D	C3D	C4D
CMD	C1D	C2D	C3D
CBD	O1D	CGD	O2D
FE	C1D	ND	C4D
C2D	CHD	C1D	ND
C1D	C4C	CHD	HBM
C3C	CHD	C4C	NC
C2C	C4C	C3C	CAC
CMC	C3C	C2C	C1C
CBC	C3C	CAC	HV4
CAC	HVC4	CBC	HVT4
FE	C4C	NC	C1C
C2C	CHC	C1C	NC
C4B	C1C	CHC	HAM
C3B	CHC	C4B	NB
C4B	C2B	C3B	CAB
CMB	C3B	C2B	C1B
CBB	C3B	CAB	HV2
CAB	HVC2	CBB	HVT2
FE	C4B	NB	C1B
C2B	CHB	C1B	NB
C4A	C1B	CHB	HDM
C3A	CHB	C4A	NA
CMA	C4A	C3A	C2A
CAA	C1A	C2A	C3A
CBA	O2A	CGA	O1A

DONE
STOP

apo 体のシミュレーションに用いた脱水素チロシン (TYO.prep)

1 1 2

db94.dat

TYROSINE with negative charge from resp checked

TYO INT 1

CORR OMIT DU BEG

0.00000

1	DUMM	DU	M	0	-1	-2	0.000	0.000	0.000	0.00000
2	DUMM	DU	M	1	0	-1	1.449	0.000	0.000	0.00000
3	DUMM	DU	M	2	1	0	1.522	111.100	0.000	0.00000
4	N	N	M	3	2	1	1.335	116.600	180.000	-0.48756
5	H	H	E	4	3	2	1.010	119.800	0.000	0.263521
6	CA	CT	M	4	3	2	1.449	121.900	180.000	0.009614
7	HA	H1	E	6	4	3	1.090	109.500	300.000	0.095501
8	CB	CT	3	6	4	3	1.525	111.100	60.000	-0.112796
9	HB2	HC	E	8	6	4	1.090	109.500	300.000	0.016836
10	HB3	HC	E	8	6	4	1.090	109.500	60.000	0.016836
11	CG	CA	S	8	6	4	1.510	109.470	180.000	0.042427
12	CD1	CA	B	11	8	6	1.400	120.000	180.000	-0.243211
13	HD1	HA	E	12	11	8	1.090	120.000	0.000	0.091988
14	CE1	CA	B	12	11	8	1.400	120.000	180.000	-0.251098
15	HE1	HA	E	14	12	11	1.090	120.000	180.000	0.068055
16	CZ	CA	B	14	12	11	1.400	120.000	0.000	0.405981
17	OH	OH	E	16	14	12	1.360	120.000	180.000	-0.677511
18	CE2	CA	B	16	14	12	1.400	120.000	0.000	-0.251098
19	HE2	HA	E	18	16	14	1.090	120.000	180.000	0.068055
20	CD2	CA	S	18	16	14	1.400	120.000	0.000	-0.243211
21	HD2	HA	E	20	18	16	1.090	120.000	180.000	0.091988
22	C	C	M	6	4	3	1.522	111.100	180.000	0.62229
23	O	O	E	22	6	4	1.229	120.500	0.000	-0.526607

LOOP

CG CD2

IMPROPER

-M	CA	N	H
CA	+M	C	O
CG	CE2	CD2	HD2
CD2	CZ	CE2	HE2
CD1	CZ	CE1	HE1
CG	CE1	CD1	HD1
CD1	CD2	CG	CB
CE1	CE2	CZ	OH

DONE

ヘムおよび塩化物イオン (hemecl.mol2)

@<TRIPOS>MOLECULE

HEC

74 81 1 0 0

SMALL

resp

@<TRIPOS>ATOM

1	CL	-0.9600	-0.4380	2.6770	Cl	1	HEC	-0.362816
2	FE	-0.8330	-0.1660	0.4370	Fe	1	HEC	0.255822
3	CHA	2.5560	0.3080	-0.0090	ce	1	HEC	-0.099783
4	CHB	-0.4180	-3.4720	-0.4970	ce	1	HEC	-0.122872
5	CHC	-4.2480	-0.5150	-0.2070	ce	1	HEC	-0.134324
6	CHD	-1.2560	3.2620	0.3160	ce	1	HEC	-0.089003
7	NA	0.7540	-1.3420	-0.1740	nc	1	HEC	-0.079913
8	C1A	2.0880	-0.9950	-0.1650	cc	1	HEC	0.030850
9	C2A	2.9330	-2.1660	-0.3760	cd	1	HEC	-0.074372
10	C3A	2.0760	-3.2320	-0.5080	cd	1	HEC	0.083308
11	C4A	0.7320	-2.7080	-0.3830	cc	1	HEC	-0.000577
12	CMA	2.4240	-4.6690	-0.7600	c3	1	HEC	-0.098913
13	CAA	4.4320	-2.1930	-0.4280	c3	1	HEC	-0.040080
14	CBA	5.1210	-2.7490	0.8500	c3	1	HEC	0.132440
15	CGA	5.8030	-4.1640	0.6660	c	1	HEC	0.605339
16	O2	5.6210	-4.7470	-0.4420	o	1	HEC	-0.684282
17	O3	6.4520	-4.5470	1.6630	o	1	HEC	-0.684282
18	NB	-2.1030	-1.6970	-0.2740	nd	1	HEC	-0.110342
19	C1B	-1.7370	-3.0110	-0.4570	cc	1	HEC	-0.009925
20	C2B	-2.9020	-3.8420	-0.6280	cd	1	HEC	0.084941
21	C3B	-3.9990	-3.0010	-0.5510	cd	1	HEC	-0.007190
22	C4B	-3.4750	-1.6660	-0.3220	cc	1	HEC	0.020421
23	CMB	-2.8870	-5.3300	-0.8050	c3	1	HEC	-0.204592
24	CAB	-5.4180	-3.3200	-0.6330	cf	1	HEC	-0.118086
25	CBB	-5.9950	-4.3680	-1.2470	c2	1	HEC	-0.375892
26	NC	-2.4510	1.1370	0.0670	ne	1	HEC	-0.117828
27	C1C	-3.7810	0.7850	-0.0310	cc	1	HEC	-0.006883
28	C2C	-4.6190	1.9550	0.0530	cd	1	HEC	0.086258
29	C3C	-3.7700	3.0380	0.1990	cd	1	HEC	-0.010963
30	C4C	-2.4200	2.4990	0.2120	cc	1	HEC	-0.006575
31	CMC	-6.1180	1.9550	0.0280	c3	1	HEC	-0.160610
32	CAC	-4.0870	4.4510	0.3550	cf	1	HEC	-0.091297
33	CBC	-5.1940	5.0970	-0.0510	c2	1	HEC	-0.402858
34	ND	0.4050	1.4650	0.1630	nf	1	HEC	-0.094908
35	C1D	0.0480	2.7930	0.2840	cc	1	HEC	-0.001080
36	C2D	1.2240	3.6400	0.3430	cd	1	HEC	0.067205
37	C3D	2.3150	2.8110	0.2520	cd	1	HEC	-0.035077
38	C4D	1.7830	1.4560	0.1340	cc	1	HEC	0.035996
39	CMD	1.2070	5.1330	0.4850	c3	1	HEC	-0.113511
40	CAD	3.7660	3.1930	0.2390	c3	1	HEC	-0.099855
41	CBD	4.3000	3.6780	-1.1360	c3	1	HEC	0.097369
42	CGD	4.4430	5.2450	-1.2790	c	1	HEC	0.639293
43	O4	4.1980	5.9380	-0.2510	o	1	HEC	-0.693208
44	O5	4.8130	5.6190	-2.4130	o	1	HEC	-0.693208
45	HAM	3.6310	0.4430	-0.0200	ha	1	HEC	0.135600
46	HBM	-0.2700	-4.5330	-0.6620	ha	1	HEC	0.113841
47	HCM	-5.3210	-0.6360	-0.2930	ha	1	HEC	0.095633
48	HDM	-1.3710	4.3370	0.4010	ha	1	HEC	0.097091
49	HM81	2.0640	-4.9970	-1.7470	hc	1	HEC	0.034302
50	HM82	3.5110	-4.8230	-0.7150	hc	1	HEC	0.034302
51	HM83	1.9540	-5.3260	-0.0150	hc	1	HEC	0.034302
52	HP71	4.7510	-2.8640	-1.2360	hc	1	HEC	0.014339

53	HP72	4.8080	-1.1900	-0.6630	hc	1	HEC	0.014339
54	HP73	5.8980	-2.0570	1.1970	hc	1	HEC	-0.059618
55	HP74	4.4080	-2.8330	1.6790	hc	1	HEC	-0.059618
56	HM11	-2.8830	-5.6250	-1.8640	hc	1	HEC	0.061821
57	HM12	-2.0040	-5.7810	-0.3410	hc	1	HEC	0.061821
58	HM13	-3.7750	-5.7830	-0.3480	hc	1	HEC	0.061821
59	HV2	-6.0820	-2.6160	-0.1300	ha	1	HEC	0.134085
60	HVC2	-5.4290	-5.1040	-1.8090	ha	1	HEC	0.134804
61	HVT2	-7.0730	-4.5040	-1.2170	ha	1	HEC	0.134804
62	HM31	-6.5200	2.1120	-0.9830	hc	1	HEC	0.047951
63	HM32	-6.5270	1.0080	0.3960	hc	1	HEC	0.047951
64	HM33	-6.5140	2.7580	0.6590	hc	1	HEC	0.047951
65	HV4	-3.3270	5.0440	0.8620	ha	1	HEC	0.126344
66	HVT4	-5.9890	4.6100	-0.6060	ha	1	HEC	0.145283
67	HVC4	-5.3170	6.1590	0.1420	ha	1	HEC	0.145283
68	HM51	0.5140	5.5910	-0.2340	hc	1	HEC	0.039037
69	HM52	0.8690	5.4300	1.4890	hc	1	HEC	0.039037
70	HM53	2.2070	5.5520	0.3080	hc	1	HEC	0.039037
71	HP61	4.3620	2.3500	0.6100	hc	1	HEC	0.036938
72	HP62	3.9240	4.0380	0.9200	hc	1	HEC	0.036938
73	HP63	3.6750	3.3170	-1.9610	hc	1	HEC	-0.054778
74	HP64	5.2980	3.2540	-1.3130	hc	1	HEC	-0.054778

@<TRIPOS>BOND

1	1	2	1
2	2	7	1
3	2	18	1
4	2	26	1
5	2	34	1
6	3	8	1
7	3	38	2
8	3	45	1
9	4	11	2
10	4	19	1
11	4	46	1
12	5	22	2
13	5	27	1
14	5	47	1
15	6	30	2
16	6	35	1
17	6	48	1
18	7	8	2
19	7	11	1
20	8	9	1
21	9	10	2
22	9	13	1
23	10	11	1
24	10	12	1
25	12	49	1
26	12	50	1
27	12	51	1
28	13	14	1
29	13	52	1
30	13	53	1
31	14	15	1
32	14	54	1
33	14	55	1
34	15	16	1
35	15	17	1
36	18	19	2
37	18	22	1
38	19	20	1
39	20	21	2
40	20	23	1
41	21	22	1
42	21	24	1
43	23	56	1
44	23	57	1
45	23	58	1

46	24	25	2
47	24	59	1
48	25	60	1
49	25	61	1
50	26	27	2
51	26	30	1
52	27	28	1
53	28	29	2
54	28	31	1
55	29	30	1
56	29	32	1
57	31	62	1
58	31	63	1
59	31	64	1
60	32	33	2
61	32	65	1
62	33	66	1
63	33	67	1
64	34	35	2
65	34	38	1
66	35	36	1
67	36	37	2
68	36	39	1
69	37	38	1
70	37	40	1
71	39	68	1
72	39	69	1
73	39	70	1
74	40	41	1
75	40	71	1
76	40	72	1
77	41	42	1
78	41	73	1
79	41	74	1
80	42	43	1
81	42	44	1

@<TRIPOS>SUBSTRUCTURE

1	HEC	1	TEMP	0	****	****	0	ROOT
---	-----	---	------	---	------	------	---	------

ヘムおよびチロシン間の力場 (frcmod)

```
remark goes here
MASS
OH 16.000    0.465    same as oh
Fe 55.850    0.000    ATTN, need revision

BOND
CA-OH  425.40  1.333    same as c2-oh
OH-Fe  355.51  1.849    scanned data OK
Fe-nc   50.00  2.079    from heme data
Fe-nd   50.00  2.079    from heme data
Fe-ne   50.00  2.079    from heme data
Fe-nf   50.00  2.079    from heme data

ANGLE
CA-CA-OH  71.640  122.070  same as c2-c2-oh
CA-OH-Fe  32.057  130.000  scanned data
OH-Fe-nc  60.000  103.203  from scanned data
OH-Fe-nd  60.000  101.600  from scanned data
OH-Fe-ne  60.000  103.664  from scanned data
OH-Fe-nf  60.000  107.481  from scanned data
Fe-nc-cc  50.000  126.500  from heme data
Fe-nf-cc  50.000  126.000  from heme data
Fe-ne-cc  50.000  126.000  from heme data
Fe-nd-cc  50.000  125.500  from heme data
ce-cc-nf  71.290  124.248  same as c2-c2-n2
ce-cc-ne  66.249  124.814  Calculated with empirical approach
nc-Fe-nd   9.981   86.857  from heme data
nc-Fe-ne   0.000  153.072  from heme data
nc-Fe-nf   9.981   86.822  from heme data
cc-ce-cc  65.550  126.840  same as c2-ce-cc
nd-Fe-ne   9.981   86.078  from heme data
nd-Fe-nf   0.000  150.917  ATTN, need revision
nd-cc-cd  67.220  110.441  same as ce-cc-nd
ne-Fe-nf   9.981   86.857  from heme data
ne-cc-cd  66.249  121.305  same as ce-cc-ne
cc-ne-cc  70.760  118.180  same as c2-n2-c2
nf-cc-cd  71.290  126.010  same as ce-cc-nf
cc-nf-cc  70.760  118.180  same as c2-n2-c2

DIHE
CA-CA-OH-Fe  1  8.000  317.260  2.000  from QM
CA-OH-Fe-nc  1  0.000   0.000  0.000  ATTN, need revision
CA-OH-Fe-nd  1  0.000   0.000  0.000  ATTN, need revision
CA-OH-Fe-ne  1  0.000   0.000  0.000  ATTN, need revision
CA-OH-Fe-nf  1  0.000   0.000  0.000  no restraint
OH-CA-CA-ha  1  6.650  180.000  2.000  same as X -c2-c2-X
OH-Fe-nc-cc  1  0.000   0.000  0.000  ATTN, need revision
OH-Fe-nd-cc  1  0.000   0.000  0.000  ATTN, need revision
OH-Fe-ne-cc  1  0.000   0.000  0.000  ATTN, need revision
OH-Fe-nf-cc  1  0.000   0.000  0.000  ATTN, need revision
ha-CA-CA-ha  1  6.650  180.000  2.000  same as X -c2-c2-X
X -nc-Fe-X   1  0.000  180.000  2.000
X -nd-Fe-X   1  0.000  180.000  2.000
X -ne-Fe-X   1  0.000  180.000  2.000
X -nf-Fe-X   1  0.000  180.000  2.000
X -nc-cc-X   4  5.700  180.000  2.000
X -nd-cc-X   4  5.700  180.000  2.000
X -ne-cc-X   4  5.700  180.000  2.000
X -nf-cc-X   4  5.700  180.000  2.000
X -cc-cd-X   4  3.150  180.000  2.000
X -cd-cd-X   4  21.500  180.000  2.000
X -ce-cc-X   4  7.900  180.000  2.000
X -cd-c3-X   1  0.000  180.000  2.000
X -cd-cf-X   4  0.000  180.000  2.000
X -cf-c2-X   4  30.000  180.000  2.000

IMPROPER
CA-CA-CA-c3  1.1  180.0  2.0  Using default value
CA-CA-CA-ha  1.1  180.0  2.0  Using default value
CA-CA-CA-OH  1.1  180.0  2.0  Using default value
cc-cc-ce-ha  1.1  180.0  2.0  Using default value
cd-ce-cc-nc  1.1  180.0  2.0  Using default value
c3-cc-cd-cd  1.1  180.0  2.0  Using default value
c3-o -c -o   1.1  180.0  2.0  General improper torsional angle (1 general atom type)
cd-ce-cc-nd  1.1  180.0  2.0  Using default value
cc-cd-cd-cf  1.1  180.0  2.0  Using default value
c2-cd-cf-ha  1.1  180.0  2.0  Using default value
cf-ha-c2-ha  1.1  180.0  2.0  Using default value
cd-ce-cc-ne  1.1  180.0  2.0  Using default value
cd-ce-cc-nf  1.1  180.0  2.0  Using default value

NONBON
OH  1.6000  0.2000  same as oh
Fe  1.2000  0.0500  ATTN, need revision
```

謝辞

本研究を進めるにあたり、3年間にわたって素晴らしい研究環境を提供してくださいました清水謙多郎 教授に心から感謝いたします。また、分子動力学や量子化学の基礎的な知識だけでなく、入ったばかりの時にはコマンドラインもともに扱えなかった私に丁寧に指導してくださいました寺田透 特任准教授に厚く御礼を申し上げます。そして、実験面においては私が学部4年生の頃からご指導を頂き、また適切なアドバイスを多く与えてくださいました、東京大学大学院工学系研究科バイオエンジニアリング専攻の津本浩平 教授および Jose Manuel Martinez Caaveiro 主幹研究員に心より感謝いたします。

また、ヘムの誘導体の合成について、失礼と迷惑をお掛けしながらも私の研究を支えてくださいました、京都大学大学院工学研究科合成・生物化学専攻の浜地格 教授および高岡洋輔 助教にお礼を申し上げます。量子化学計算の手法についてたびたび突然で不躰なメールを送り非常に失礼であったにも関わらず、丁寧な回答をしてくださった、工学部化学システム工学専攻の城野亮太 特任研究員に深く感謝いたします。

生物情報工学研究室の皆様との思い出は大きなものでした。昼食に誘って下さり、ともに最近の科学の話題や研究についてのディスカッションをしていただけた中村周吾 准教授並びに角越和也 助教に感謝いたします。同期でありながらも、生物学と情報科学の架け橋となるような研究に挑戦している込山悠介 博士との会話は、気の緩みがちな研究室生活の中でとてもよい刺激となっていました。また、生化学若い研究者の会や生物物理若手の会と言った、外にいる博士課程の学生との出会いは閉ざされがちな研究の目を外に向け続けてくれるよい機会であり、自身の励みとなりました。

結局私は3年間でプログラミングをほとんどすることがなかった一方、生物情報工学研究室で出会った先輩と後輩はプログラミングをしっかりとこなしていらっしゃったので、このままこの研究室を卒業して良いものだろうか、と思うこともありました。自身の発想や技術も未熟で、学ぶべきところがたくさん残っています。こうした自分を支えてくださり、道を示してくださった上記の方々、そしてここまで長らく迷惑をかけ続けた両親に深く感謝の意を表します。本当にありがとうございました。

平成26年（2014年）3月17日