

## 生体分子の溶媒和理論

吉田 紀生

タンパク質やDNAといった生体分子は水の中でこそその構造を維持し、機能を発揮している。したがって、生体分子の計算科学において、水和を適切に扱うことは本質的な意味をもつ。水と生体分子の間の相互作用、たとえば、親水性相互作用や疎水性相互作用を適切に扱える理論が不可欠となる。

生体分子の水和（あるいは、より広義に溶媒和）において興味があるのは、溶媒が生体分子にどのような影響を与えるのか？ということと、生体分子の存在下で溶媒はどのように振る舞うのか？の2点であろう。

溶媒が生体分子に与える影響を知るためには、まず、溶媒分子の位置と向きが分からなければならない。そして、それぞれの溶媒がどのような相互作用を与えるか（たとえば、クーロン相互作用やvan der Waals力など）も必要となる。後者は、計算科学では点電荷や多重極子（双極子・四極子……）やLennard-Jonesポテンシャルなどでよくパラメータ化されている。では、溶媒分子の配置・向きはどのように扱えばよいのであろうか。図1aはグリシン分子の周りに水分子が分布している様子の“スナップショット”を示したものである。実際には、水分子は動き回るため、この一つのスナップショットだけで水分子からの影響を評価することは適当ではない。そこで、分子動力学（molecular dynamics (MD)）シミュレーションでは、水分子に働く力を計算し、ニュートン方程式にしたがって水分子の運動を追うことで、さまざまな水分子の配置（分布）を評価する。このとき、溶質の作る場も考慮されるため、第2の興味である、「生体分子の存在下で溶媒はどのように振る舞うのか」の解答も得ることができる。ここで問題となるのは、いくつの水分子を計算に含めるのか、どれくらいの時間の運動を追えば良いのか、である。計算機で扱う以上、アボガドロ数個の水分子を扱うことは不可能であるし、無限に計算を続けることもできないからである。（もちろん、実際はアボガドロ数個の水分子を扱う必要はない。ここで述べたいのは、望んだ計算結果を適切に得るための水分子の数が不明だ、ということである。）また、初期構造からの時間発展を追うというシミュレーションの性質上、計算結果は初期条件に依存することになる。たとえば、タ

ンパク質内部に取り込まれた水分子の扱いなどは最たるもので、初期条件として適切に配置しなければ、シミュレーションの間に適切な配置を得ることは非常に難しい（タンパク質の“壁”を水分子がすり抜けて行くことは、常識的に考えて“レア”なイベントだからである）。

より簡便に連続体モデルを用いる方法もある。図1bに示すように、連続体モデルでは溶媒を均質な誘電体と見なして、溶質に対する相互作用を計算する。このよう

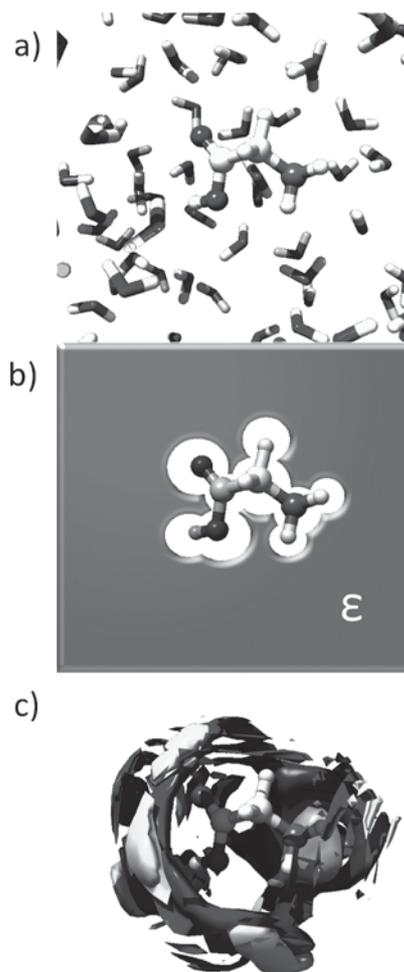


図1. 溶媒モデルの概念図. a) 分子シミュレーションでは溶媒分子（ここでは水）一つひとつを露わに扱うが、b) 連続体モデルでは誘電率( $\epsilon$ )をパラメータとする連続体として扱う。c) 3D-RISMは分子としての特徴をもった、溶媒分子の確率分布を扱う。

にすることで、溶媒分子一つひとつの位置情報は不要になるため、MDに比べずっと少ない計算量で溶媒の影響を扱うことができる。ただし、溶媒を連続体として扱うために、溶媒分子一つひとつの個性からくる特徴、たとえば水素結合、を考慮する事ができない。また、最初にあげた第2の興味「生体分子の存在下で溶媒がどのように振る舞うか」については情報を得ることはできない。

これらとは異なる手法に、統計力学に基づいて液体の構造を求める、液体の積分方程式理論を使った手法がある<sup>1)</sup>。液体の積分方程式理論にはいくつかの種類があるが<sup>2-6)</sup>、ここでは生体分子によく用いられており、近年、AmberやMOEといった市販ソフトウェア上でも利用が可能となった、three-dimensional reference interaction site model (3D-RISM) 理論を例に取る<sup>7,8)</sup>。3D-RISM理論では、溶質が作る場のもとで、溶媒分子の分布を統計力学に基づいて算出することができる。図1cにグリシンの周りの水分子の分布をプロットしたものを示す。ここで見られる雲のようなものは、水分子（の酸素（濃色）および水素（淡色））の分布確率がバルクのそれより3倍程度高い領域を示している。また、この図では分かりづらいが、溶質と溶媒（水）の間の水素結合に由来する分布も見ることができる。すなわち、3D-RISM理論では、溶媒分子一つひとつを露わに扱ってはいないが、溶媒分子の特徴を考慮した分布を得ることができるのである。

本稿では、3D-RISM理論の概略と、その応用について紹介する。

### 1. 3D-RISM理論

ここでは、3D-RISM理論について概念的な説明を行う。近年、AmberやMOEといった市販ソフトウェアでも3D-RISM計算は可能となっており、ソフトウェアマニュアルを片手に持てば何らかの計算は可能である。しかし、3D-RISM理論（に限ったことではなく計算科学手法一般）には仮定や近似が含まれており、それらを理解することなく運用することには危惧を覚える。本稿では詳細な解説は避けるが、3D-RISM理論に興味を持ち、実際の研究に用いられるならば、ぜひ、理論を詳細に学んでいただきたい<sup>1-8)</sup>。

3D-RISM理論は統計力学に基づいた、液体の積分方程式理論である。この理論は、つまるところ液体の構造、すなわち分布関数を求めるための理論である。3D-RISM理論で、生体分子の溶媒和を扱う際は、対象となる生体分子を“溶質”にとらえ、その周りに水やイオンと言った“溶媒”が分布している系を考える（イオンは溶媒で

はなく溶質だ、という意見があるだろうが、ここでは本理論上の便宜的な扱い方について述べており、“溶媒”としている）。3D-RISM理論では、溶質-溶媒間の2体相互作用ポテンシャル、溶媒の密度、温度をインプットとして与えることで、溶質の周りの“どこ”に“なに”が“どれくらい”分布しているのか（すなわち空間分布関数）をアウトプットとして得ることができる（図2）。

インプットとなる分子間相互作用ポテンシャルは、たとえば、クーロン相互作用やvan der Waals相互作用、そして近距離の斥力（交換斥力）などが考えられるが、3D-RISMでは一般的なMDなどと同様に、クーロン相互作用とLennard-Jonesポテンシャルの和を用いることが多い。

もし、系が生体分子一つと水分子一つの二つの分子しか含まないなら、その分布関数は2体の相互作用ポテンシャルを用いて単純なボルツマン分布の形で表される。しかしながら、実際の系は無数の水分子を含むため、それらの影響（多体相互作用）を含んだ形で分布は表されなければならない。MDなどでは、2体の相互作用ポテンシャルのもとで、分子運動の時間発展を計算し、さまざまな分子配置（分子分布）をサンプリングし平均化することで多体相互作用を考慮した分布を求めている。3D-RISM理論では、3D-RISM方程式を解くことで、言

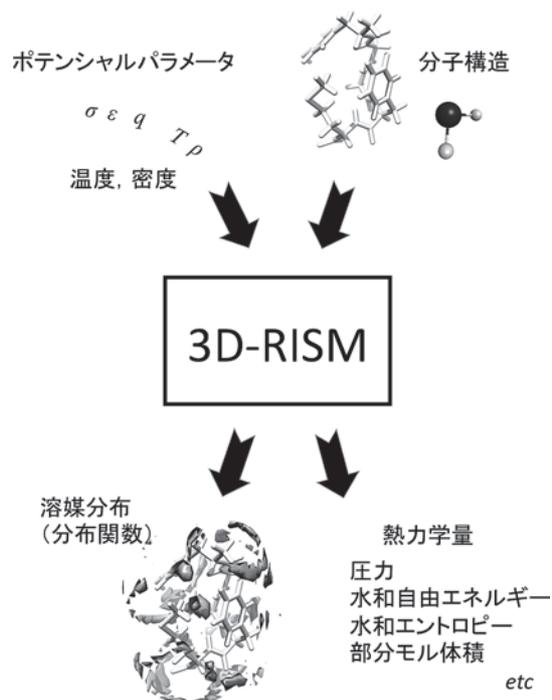


図2. 3D-RISM計算の概念図。溶質および溶媒分子の分子構造と、ポテンシャルパラメータをインプットとして、溶質まわりの溶媒の分布、および溶媒和に伴う種々の熱力学量を算出できる。

わば“サンプリングを解析的に行って”分布関数を算出することができる。このため、3D-RISM理論で得られる分布関数は(いくつかの近似の影響を除けば)、無限個の溶媒分子を含み、無限回のサンプリングにより得られるものに相当する。したがって、MDではサンプリングの難しいケース、いわゆるレアイベントの取扱いに威力を発揮する(図3)。たとえば、狭隘なチャネルへのイオンの侵入はレアイベントの代表例と言える。通常のMDの時間スケールではサンプリングが難しいため、反応座標(イオンの通り道)を限定してサンプリングを行ったり、強い外場(たとえば電場)をかけて加速するといった工夫がなされる。一方、3D-RISM理論ではすべてのサンプリングが解析的に行われるためこのような人為的な操作は一切不要である。

次節からは、3D-RISM理論を使った生体分子への応用例を紹介する。

## 2. 生体分子の分子認識

生体分子の分子認識は、もっとも重要な生命の素過程の一つである。分子認識とは受容体(タンパク質など)が特定の部位(認識部位)に特定のリガンドを結合(認識)することである。言い換えれば、受容体の認識部位におけるリガンドの存在確率はバルクに比べて高くなるはずである。リガンドを溶媒として見なして、3D-RISM理論を適用し、求められる分布関数は、リガンドの存在確率の分布に他ならないため、認識部位において分布関数は高いピークをもつことになる。一方、受容体がリガンドを認識しないならば、そのリガンドの分布関数はピークを示さない。

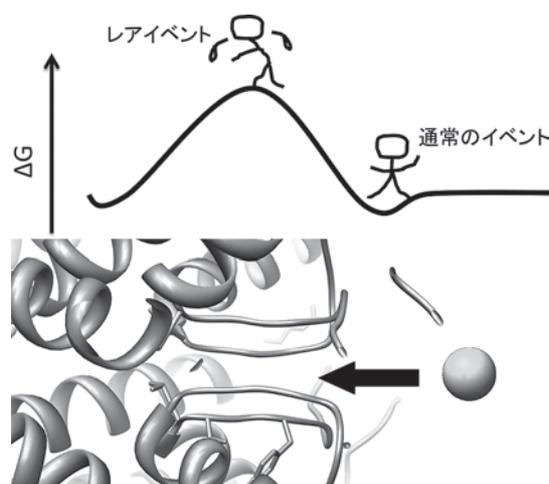


図3. レアイベント(出現頻度の低い状態、すなわち自由エネルギーの高い状態)のサンプリングも3D-RISM理論であれば取り込むことができる。

また、分子認識過程において、溶媒(水)が本質的な役割を果たす。リガンド分子は受容体タンパク質に認識される際に、それまで纏っていた“水分子を脱ぐ”(脱水和する)必要があり、このための自由エネルギー変化が大きな役割を果たすのである。この脱水和自由エネルギーを評価するには受容体とリガンド、そして溶媒分子との多体相互作用を考慮する必要がある。3D-RISMで得られるリガンドの分布関数は、この効果をきちんと取り入れて評価されている。

図4にヒトリゾチームの変異体のイオン認識の様子を示す<sup>9)</sup>。Kuroki-Yutaniらによって、異なるイオン認識能をもつ、ヒトリゾチームの変異体構造が報告されている<sup>10)</sup>。我々はこれらの構造をもとに、3D-RISM理論によりイオン分布の計算を行い、選択的イオン結合を再現することに成功した。得られた結果はKuroki-Yutaniの実験結果とよく一致しており、3D-RISM理論がタンパク質による選択的イオン結合を予測する能力を有していることを示した。

このように3D-RISM理論では、生体分子内部のような異方性のきわめて高い環境においても、イオンの分布をかなりの精度で予測することが可能である。この予測性を活かして行った、KcsAチャネルのイオン透過に関する研究を紹介する<sup>11,12)</sup>。

KcsAチャネルはバクテリア由来のチャネルタンパク質で、細胞膜内外のカリウムイオン濃度を調整する役割を担っている<sup>13)</sup>。KcsAは優れた選択性を有し、細胞内外でナトリウムイオン( $\text{Na}^+$ )の濃度差がきわめて大きい場合でもカリウムイオン( $\text{K}^+$ )のみを選択的に透過させる。この選択性は選択フィルタと呼ばれる部位によって作られていると考えられている。このため、選択フィルタ内に $\text{Na}^+$ は存在しないと考えられてきた。

我々は3D-RISM理論を用いてKcsAチャネルのイオン選択性を解明できると考え、KcsAを溶質、 $\text{Li}^+$ 、 $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ と言ったイオンおよび水分子を溶媒として計算を行った。我々の予想に反して $\text{K}^+$ 以外の分布もチャネ

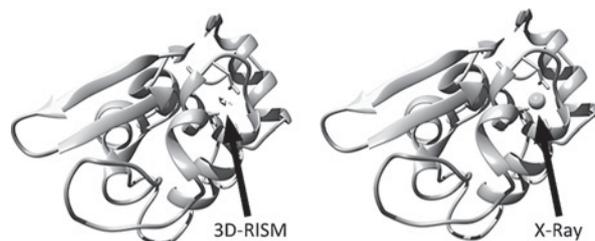


図4. ヒトリゾチーム変異体のカルシウムイオン結合の様子。3D-RISM理論で求めたイオン結合位置(左)は実験結果(右)を完全に再現している。

ル内にくっきりと出てきたのである。このパズリングな結果に長い間苦闘していたのであるが、2009年に、実験によってその存在が示されたのである<sup>14)</sup>。奇しくも、これは3D-RISM理論が高い予測性を持つことを顕著に物語っている。その後、実験を基にシミュレーションによる追試が行われ、 $\text{Na}^+$ と $\text{K}^+$ ではチャネル内でのイオンの結合様式(結合モード)が異なることが示唆された。

そこで、我々は目的を変更し、3D-RISM理論を用いてKcsAチャネル内のイオン結合モードの違いを明らかにすることにした。3D-RISM理論で得られたチャネル内のイオン分布から、イオンの存在確率が高い部位にイオンの「陽溶媒モデル」を配置し、そのイオンの水和構造を3D-RISM理論で求めた。図5にこのようにして求めたチャネル内のイオンの水和状態を示す。図右側は、この分布から推測されるイオン水和構造の模式図である。

この結果から、 $\text{Li}^+$ イオンはカルボニル酸素4つが作る平面内で、上下に水を配位させた6配位構造で安定に存在し、 $\text{K}^+$ イオンは8つのカルボニル酸素がつくるカゴの中央にあり、水とは直接接していないことが分かった。

この結合モードは実験およびシミュレーションによって提唱されたものとよく一致しており、統計力学理論により別の角度から立証することができたと考えている。

この他にも、ミオグロビンの一酸化炭素脱離過程、アクアポリンのプロトン排斥機構、インフルエンザA M2チャネルのプロトン透過機構などさまざまな生体分子の分子認識への応用を行ってきた<sup>15-17)</sup>。

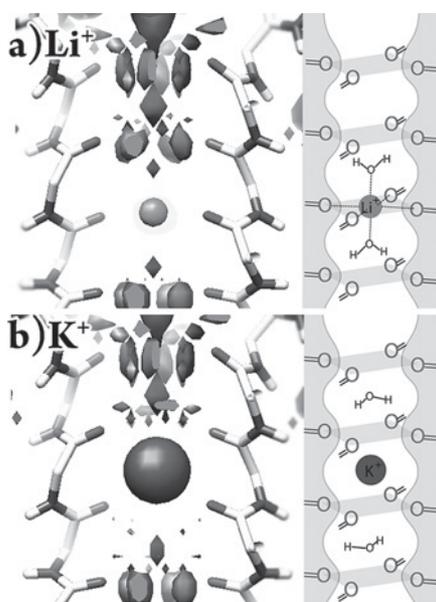


図5. KcsAチャネル・選択性フィルタ内のリチウムイオン (a) およびカリウムイオン (b) の水和構造。

また、水やイオンといった小分子の認識のみならず、アスピリンなどの薬剤分子の分子認識への応用も行っている<sup>18)</sup>。さらに、分子シミュレーションと3D-RISMを連携させて用いることで、タミフルのようにかなりの大きさを持つ分子の結合解析も行われつつある<sup>19)</sup>。

### 3. 溶液内化学反応

溶液内の化学反応を扱うには、反応物・生成物の電子状態とその周りの溶媒の影響を同時に考慮する必要がある。そこで、3D-RISMなどの液体の積分方程式理論で溶媒分布を記述し、電子状態理論で溶質(反応物・生成物)の電子状態を記述する連成手法が提案されている。液体の積分方程式理論と電子状態理論とを連成させる試みは、Ten-noらによるreference interaction site model self-consistent field (RISM-SCF) 法をはじめとして、さまざまな発展を遂げている<sup>20)</sup>。ここでSCFとは「つじつまの合った場」を意味し、溶媒分布と溶質の電子状態が与えられた相互作用のもとで矛盾なく解かれることを示している(図6)。本稿では生体分子系への応用という

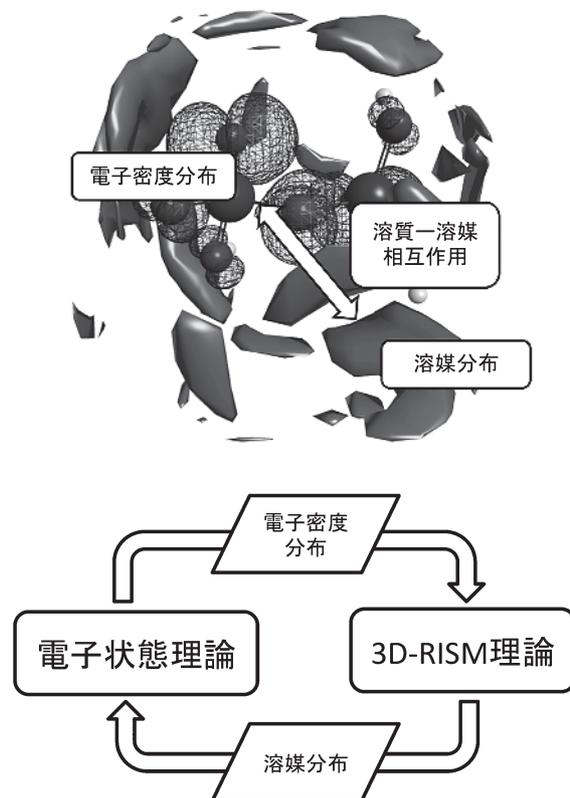


図6. 3D-RISM-SCF法の概念図。電子状態理論と3D-RISM理論を交互に解き、電子密度分布と溶媒分布を同時に決める。この際、電子状態は溶媒分布の、溶媒分布は電子密度分布の影響を互いに受けるため、繰り返し計算によって両者のつじつまが合うまで繰り返す。

観点から、3D-RISMと電子状態理論との連成手法である3D-RISM-SCF法に絞って解説する<sup>21)</sup>。3D-RISM-SCF法では、溶質を電子状態理論（分子軌道法（*ab initio* molecular (MO)）法）や密度汎関数理論（density functional theory (DFT)）で、その周りの溶媒分布を3D-RISM理論で扱う。

3D-RISM-SCFを用いた溶液内化学反応の応用例として、ピロリン酸の加水分解反応に関する研究を紹介する<sup>22)</sup>。ピロリン酸は加水分解により2つのリン酸を生じる。この反応を、アデノシン三リン酸（ATP）の加水分解反応のモデル系として考え、生体内エネルギー授受における溶媒の働きについて研究を行った。ピロリン酸の加水分解反応は、そのプロトン化状態によって4通りの反応が考えられる（図7）。

3D-RISM-SCFによる計算値は実験の傾向を非常によく再現している。溶媒効果を入れずに同様の計算を行った孤立系の結果と比べると、この反応において溶媒が本質的な役割を果たしていることがよく分かる。図中Aの反応では、反応前後で電荷の偏りに変化がないため、孤立系の反応熱は非常に小さい。しかし、溶液中では生成物と溶媒水との水素結合生成による安定化から、9 kcal mol<sup>-1</sup>程度の発熱反応となる。Bの反応では、反応により電荷の局在化がおこるため、孤立系では吸熱反応となるが、溶液中では局在化した電荷と水との静電相互作用による強い安定化により発熱反応となる。C、Dの反応では、分子内の電子反発により反応系が不安定になるため、大きな発熱反応となる。しかし、反応系は大きな正味電荷により溶媒水と強く結びつき安定化するため、溶液中ではやはり8 kcal mol<sup>-1</sup>程度の適度な発熱反応と

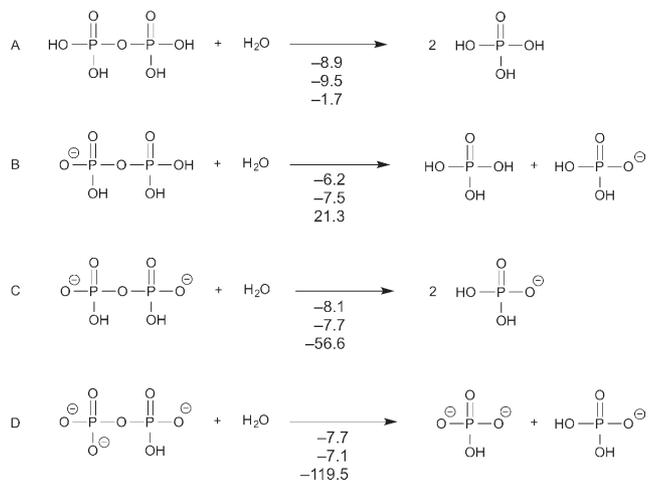


図7. ピロリン酸の加水分解反応。数値は反応の自由エネルギー変化で、上から3D-RISM-SCF、実験<sup>23)</sup>、および孤立系のDFT計算。単位はkcal mol<sup>-1</sup>。

なる。

このように、3D-RISM-SCFは溶液内分子の電子状態が関与するさまざまな問題へ応用されてきたが、このままでは生体系への応用は難しい。3D-RISMの採用により溶媒和構造は求めることができるが、一方の電子状態計算を巨大な生体分子へ応用するのが難しいからである。この問題の解決のため、quantum mechanics/molecular mechanics (QM/MM) 法に3D-RISM-SCFを組み合わせた、溶液内生体分子の電子状態理論が筆者らによって提案されている (QM/MM/RISM理論<sup>24)</sup>)。

QM/MM/RISM理論では、生体分子の反応活性部位を量子力学 (QM) で、その他の反応不活性部位は古典力学 (MM) で、生体分子の周りの溶媒を3D-RISM理論で扱う (図8上)。この溶媒の取扱いが従来のQM/MM法とは異なる点である。(通常のQM/MMでは溶媒分子もMMで扱うか、polarizable continuum model (PCM) などの連続体モデルで記述する)。

また、もう一つの取組みとして生体分子の全電子状態計算を可能とするフラグメント分子軌道法 (fragment molecular orbital (FMO) 法) との連成計算手法 (FMO/3D-RISM理論) も提案されている<sup>25)</sup> (図8下)。FMO法で

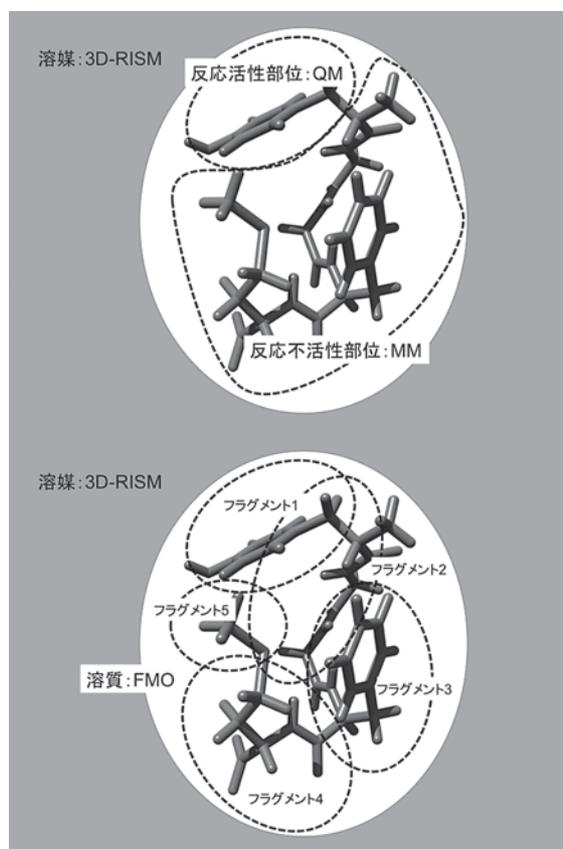


図8. QM/MM/RISM (上) およびFMO/3D-RISMの模式図

は対象分子をいくつかの断片（フラグメント）に分割して計算を行うことで、タンパク質のような巨大な分子の全電子状態計算を可能にしている。全電子状態を扱うことで生体分子内の長距離の電子移動などへの応用が期待できる。

#### 4. おわりに

本稿では、3D-RISM理論を用いて統計力学的に溶媒の分布および溶媒効果を扱う取組みを紹介した。3D-RISM理論を使うことで、分子シミュレーションや連続体モデルとは異なる確度からのアプローチが可能となる。ここでは、3D-RISM理論の紹介という観点から、優れた点に重点をおいて解説したが、もちろん他の手法が優れた点も多々あり、興味のある対象に適した、適材適所の運用・方法の選択が必要なのは言うまでもない。

ここでは主に3D-RISM理論を取り上げたが、同じように液体の積分方程式理論で生体分子を扱おうという取組みは他にもあり、さまざまな展開がなされている<sup>26,27)</sup>。筆者らも溶媒分子の配向を扱うことのできる新しい理論を提案している<sup>28)</sup>。この手法はmolecular Ornstein-Zernike (MOZ)理論を基礎とし、生体分子へ対応させるために3D-RISMの要素を組み合わせたものである(拡張MOZ理論と呼んでいる)。溶媒分子の配向を扱うため、計算コストは増大するが、近年のコンピュータ技術の向上を鑑みるに、遠くない時期にタンパク質などへの応用も可能になると考えている。

#### 文 献

- 1) Hirata, F. ed., *Molecular Theory of Solvation*, Kluwer, Dordrecht (2003).
- 2) Blum, L. and Torruella, A. J.: *J. Chem. Phys.*, **56**, 303 (1972).
- 3) Blum, L.: *J. Chem. Phys.*, **57**, 1862 (1972).
- 4) Blum, L.: *J. Chem. Phys.*, **58**, 3295 (1973).
- 5) Chandler, D. and Andersen, H. C.: *J. Chem. Phys.*, **57**, 1930 (1972).
- 6) Hirata, F. and Rossky, P. J.: *Chem. Phys. Lett.*, **83**, 329 (1981).
- 7) Beglov, D. and Roux, B.: *J. Phys. Chem. B*, **101**, 7821 (1997).
- 8) Kovalenko, A. and Hirata, F.: *Chem. Phys. Lett.*, **290**, 237 (1998).
- 9) Yoshida, N. et al.: *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 12042 (2006).
- 10) Kuroki, R. and Yutani, K.: *J. Biol. Chem.*, **273**, 34310 (1998).
- 11) Phongphanphanee, S. and Yoshida, N. et al.: *Pure Appl. Chem.*, **86**, 97 (2014).
- 12) Phongphanphanee, S. and Yoshida, N. et al.: *J. Mol. Liq.*, **200**, 52 (2014).
- 13) Roux, B. and MacKinnon, R. T.: *Science*, **285**, 100 (1999).
- 14) Thompson, A. N. et al.: *Mol. Biol.*, **16**, 1317 (2009).
- 15) Kiyota, Y. et al.: *J. Am. Chem. Soc.*, **131**, 3852 (2009).
- 16) Phongphanphanee, S. et al.: *J. Am. Chem. Soc.*, **130**, 1540 (2008).
- 17) Phongphanphanee, S. et al.: *J. Am. Chem. Soc.*, **132**, 9782 (2010).
- 18) Kiyota, Y. et al.: *J. Chem. Theory Comput.*, **7**, 3803 (2011).
- 19) Phanich, J. et al.: *Protein Sci.*, in press.
- 20) Ten-no, S. et al.: *Chem. Phys. Lett.*, **214**, 391 (1993).
- 21) Sato, H. et al.: *J. Chem. Phys.*, **112**, 9463 (2000).
- 22) Hong, J. et al.: *J. Chem. Theory Comput.*, **8**, 2239 (2012).
- 23) George, P. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, **223**, 1 (1970).
- 24) Yoshida, N. et al.: *J. Mol. Liq.*, **159**, 83 (2011).
- 25) Yoshida, N.: *J. Chem. Phys.*, **140**, 214118 (2014).
- 26) Cortis, M. et al.: *J. Chem. Phys.*, **107**, 6400 (1997).
- 27) Yokogawa, D. et al.: *Chem. Phys. Lett.*, **432**, 595 (2006).
- 28) Ishizuka, R. and Yoshida, N.: *J. Chem. Phys.*, **139**, 084119 (2013).