



QM/MMシミュレーションによる タンパク質機能解析

広島市立大学大学院情報科学研究科





ytakano@hiroshima-cu.ac.jp

概要

- I. 序論
- II. QM/MMの理論
- III. 金属蛋白質中の補欠分子の電子構造
 - Ⅲ-1. 光合成反応中心のスペシャルペア
 - Ⅲ-2. シトクロム*c*酸化酵素のヘム*a*の 酸化還元状態における電子構造
- IV. Photoactive Yellow Proteinに現れるH/D同位体効果の 理論的解析
- **V. 生体高分子生化学的機能解析のための分子計算技術の開発** 超並列QM/MM-MD連成計算プログラムPlatypus
- VI. まとめ

タンパク質は活性中心固有の性質を強める







分子構造・電子構造は機能発現を どのように制御しているか?

タンパク質の電子構造 1) タンパク質は巨大で、ヘテロで、ダイナミックな系 2) タンパク質の機能の発揮は局所部位の電子状態に依存する 計算サイズ 活性中心そのもの 1活性中心をとりかこむタンパク質 溶質分子をとりかこむ溶媒分子 アンサンブル ダイナミクス 大

資源(計算機・人間の能力)には限りがある

「どのようにしてモデル化するか?」





1) タンパク質は巨大で、ヘテロで、ダイナミックな系
 2) タンパク質の機能の発揮は局所部位の電子状態に依存する



QM/MM法の適用



II.QM/MMの理論

QM/MM法

- ・多階層連結計算法の一つ
- ・電子構造が重要な部分(化学反応)は量子力学(QM)を それ以外は分子力場(MM)を用いる
- ・1976年にWarshelとLevittが提案
- ・2013年ノーベル賞(Warshel, Levitt, Karplus)



http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2013/popular-chemistryprize2013.pdf

QM/MM法

- ・全系(System)をQM領域(Inner)とMM領域(Outer)に分割
- ・QMとMMの境界に共有結合が含まれる場合は 特別な取り扱いが必要



System = Inner + Outer + (Link) 共有結合

QM/MM法に使う計算手法

- ・基本的に制限はない
- QM: 密度汎関数法(DFT) Hartree-Fock法(HF) post-HF法(MP2, CASSCFなど) 半経験的分子軌道法(AM1, PM6法など)

MM: AMBER CHARMM GROMOS OPLS-AA

QM/MM法の種類

全系のエネルギーの表現法に関して大きく二種類ある

減法表現(ONIOM法)

 $E_{\text{QM/MM}}^{\text{sub}}(\text{System}) = E_{\text{MM}}(\text{System}) + E_{\text{QM}}(\text{Inner+Link}) - E_{\text{MM}}(\text{Inner+Link})$



加法表現(QM/MM法)

 $E_{\text{QM/MM}}^{\text{add}}(\text{System}) = E_{\text{MM}}(\text{Outer}) + E_{\text{QM}}(\text{Inner+Link}) + E_{\text{QM/MM}}(\text{Inner,Outer})$



タンパク場の効果

mechanical embedding

QMの電子密度はMMと相互作用しない Steric effectのみ考慮

electrostatic embedding

QMのハミルトニアンにMMとの静電相互作用をとりこむ Electrostatic effectとSteric effectを考慮 MMの電荷がQM領域に近いときには過分極を起こす

→・電荷スケーリング法

QM境界付近のMM電荷の大きさを調整

・電荷シフト法

QM境界付近のMM電荷をより外の原子にシフトする

・ガウス型電荷分布

QM/MM境界問題

QM/MM境界に化学結合が存在する場合

QM空間の切断->不対電子対の発生->QM(分子軌道)の歪み

正しいエネルギー及び力が得られない

1. どのように切るか? 2. どこを切るか?

QM/MM境界問題

1. どのように切るか?

(1)Link atom method

QM領域とMM領域の境界にある 化学結合の末端を水素原子などで 置き換える



(2)局在化軌道法

QM領域とMM領域の境界にある 化学結合を局在化軌道(SLBOs)を 用いて表現する。



Lin and Truhlar, *Theor. Chem. Acc.* **117**, 185–199 (2007)

QM/MM境界問題

2. どこを切るか?

(1) 経験的、化学的洞察

活性中心から遠方の領域を選択 sp³炭素で切る

(2) 線形応答関数解析

QM/MMモデル化に起因する QM領域の電子構造の誤差の最小化

$$\delta\rho(\mathbf{r}) = \int \frac{\delta\rho(\mathbf{r})}{\delta v(\mathbf{r}')} \delta v(\mathbf{r}') d\mathbf{r}'$$

線形応答関数解析

従来:QM/MMモデルによる誤差 $\delta v(\mathbf{r}')$ の最小化

QM/MMモデル由来のQM領域の誤差 $\delta ho(\mathbf{r})$ の最小化 [ガイドライン]

- (i) 共有結合では電子トランスファーが大きい平衡核間距離では 結合不安定が起こる(結合が切れかけた)状態で最大となる。
- (ii) トランスファーブロックがない状況ではサイト数が多くなる
 につれフリーデル振動型の振動・減衰となる。
- (iii) アラニンジペプチド, グルタチオン, アラニントリペプチド系。
 ではsp³接合点が伝播をブロックする。水素結合経由の伝播 は約0.001(ex. 0.1 Hartreeの δv(r')に対し0.0001の誤差伝播)。
 αヘリックス系では明白に誤差伝播が構造化される(右図)。

従来のsp³接合点での切断が有効

QM/MM境界問題の定量化が可能に!

Ueda et al. Int. J. Quantum Chem. 113, 336-341 (2013).

 $\delta \rho_{iatom} / \delta v_{jatom} = 1$

 $\delta \rho_{iatom} / \delta v_{jatom} = -1$

 $\delta \rho_{iatom} / \delta v_{jatom} = 0.0$

RGB=(1-LRF, LRF, 0.5)/max LRF

QM/MM法による構造最適化 計算コスト

QM > QM/MM >> MM



microiterative scheme

QM部分とMM部分の構造最適化に異なるアルゴリズムや 座標系を使う

QM: macroiteration(内部座標+擬ニュートンアルゴリズム) MM: microiteration(カーテシアン座標+共役勾配法)

構造最適化の手続き

(1)断熱アプローチ
 QMのmacroステップではMM環境は完全に
 構造最適化される
 (2)交互スキーム
 QMとMMの構造最適化は交互に行われる

III. 金属タンパク質中の補欠分子

生物と金属

バランスを保つことで生物の生命維持に必須のはたらきをする

多量	微量	超微量
Na	Fe	Ni
Κ	Zn	Cr
Mg	Cu	Со
Ca	Mn	Мо
	V	W
呼吸·	光合成	・窒素固定

どのように金属と生体分子が相互作用(制御)しているか?

金属をもつ生体分子の特徴 (環境にやさしい触媒)

例:窒素(反応しにくい安定な気体)からアンモニアを生成 $N_2 + 3H_2 \rightarrow 2NH_3$

・ハーバーボッシュ法







蛋白質の生物活性において重要な、蛋白質に結合する非蛋白質

活性中心として機能を発現する



スペシャルペア (Mg)



酸素発生複合体(Mn)







III-1. 光合成反応中心スペシャルペア

Yamasaki, H.; Nakamura, H.; Takano, Y. *Chem. Phys. Lett.* **2007**, *447*, 324–329 Yamasaki, H.; Takano, Y.; Nakamura, H. *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 13923–13933

光合成

植物などの光合成色素をもつ生物がおこなう、 光エネルギーを化学エネルギーに変換する生化学反応





光合成電子伝達反応(明反応)



数々のタンパク質複合体により構成されている

Essential細胞生物学

光化学系



光合成反応中心

光エネルギーを電子エネルギーに変換 (量子収率 > 0.8)



chromophores



スペシャルペアカチオンラジカルの スピン密度



 $100\% \ 90\% \ 80\% \ 70\% \ 60\% \ 50\% \ 40\% \ 30\% \ 20\% \ 10\% \ 0\%$

スペシャルペアカチオンラジカルのスピン密度は非対称

Lubitz et al., Acc. Chem. Res. 2002, 35, 313



スペシャルカチオンラジカルの スピン密度の非対称性の原因は何か?

光合成反応中心の非対称な電子移動

タンパク場の効果



- ●スピン密度の偏りが再現された
- ●スペシャルペア単体でもスピン密度に偏りが生じている
- ●タンパク質の静電相互作用がスピン密度の非対称性が強める

Yamasaki, H.; Nakamura, H.; Takano, Y. Chem. Phys. Lett. 2007, 447, 324-329

[QM]方法:UB3LYP 基底関数6-31G(d)(0.25) [MM] AMBER96

Mes基とPhyt基の配向の違いにより スペシャルペアの電子構造の非対称性が生じた



側鎖の影響

側鎖の影響



Mes基とPhyt基の配向が異なる


配向の違いは保存されている



蛋白質環境が配向の違いを与える



4つの結晶構造の重ね合わせでは、 Mes基とPhyt基のまわりはよく重なっている

配向の違いを与えるアミノ酸残基は 保存されている

Phe/Val **Phe/Phe** lle/lle Leu/Val ~ 230 ~ 180 200 250 310 24 320 YNPAHMIAISEFF FNALALALHGAL' YNPAHMIAISEFF FNCLALSMHGSL **TAFAFAILAYLTLVLFRPVMMGA** LLSLSAVF-L-R. sphaeroides **TAFSFAIGAYLVLVFVRPLLMGA** L-T.tepidum FLALSAAF---WSA-V LAFCVPIFMFCVLQVFRPLLLGS YNPGHMSSVSELFVNAMALGLHGGL L-R.viridis FLASNIFL---YNPAHMLAVTIFFTTTLALALHGGL **CGFAAAIIAYMTLVIFRPLLMGA** L-R.denitrificans LLAINAGL---**TAFAFAIGAYLVLVVVRPILMGA** YNPAHMLAITEFF INCLALSMHGSL FLALSAVE---L-C.vinosum **LAFSFAILAYVTLVVIRPILMGA** YNPAHMLAITEFFTTTLAMSMHGGL L-R.gelatinosus FLALSAAF---WSA-VOIVI: **LAFGVAFSAWLVLOVIRPIALGM** YNPFHAIGITGLFASTWLLACHGSL: -ISADLC L-C.aurantiacus IFAIGGIL---[AFGAVVSSWITLQWLRPIAMGA YNPFHAIGITILFASTLFLHMHGSA' WTGAASVL---FS-NLCIFL: L-R.castenholzii /AYSAPLAATYSVFLIYPLGOGS MHPFHMFGVAGVLGGSLFAAMHGSL' FLGAWPVVCIWUTA-MGIBTI D1-A.marina /AYSAPVSAATAVFLIYPIGOGS MHPFHMLGVAGVFGGSLFSAMHGSL' FLGAWPVIGIWETA-MGVBTI D1-Synechocystis sp. D1-Nostoc-7120 /AYSAPLASATAVFLIYPIGQGS MHPFHMLGVAGVEGGSLFSAMHGSL' FLAAWPVIGIWETA-LOVBTI D1-P.patens /AYSAPVAAATAVFLIYPIGOGS MHPFHML SVAGVEGGSLESAMHGSL FLAAWPVVGIWETA-LGIBTI D1-A.thaliana /AYSAPVAAATAVFLIYPIGQGS MHPFHML SVAGVEGGSLESAMHGSL' FLAAWPVVGIWETA-LG FLAAWPVVGIWETA-LGIBTI D1-C.vulgaris /AYSAPVAAATAVFIIYPIGOGS MHPFHML GVAGVFGGSLFSAMHGSL' /AFSAPVAAATAVFLIYPIGOGS MHPFHMAGVAGVFGGALFSAMHGSL FLGLWPVVGIWUT5-IG D1-C.caldarium GVACVEGGSLESAMHGSL' GVACMEGGSLESAMHGSL' D1-G.violaceus-7421 LAYSAPVAAAAAVFLIYPIGQGS NHPFHML FLAAWPVIGIWETA-LGIBVI D1-P.marinus-9313 /AYSAPLSAAFAVFLIYPVGQGS MHPFHMI FLAAWPVICIWITS-LOIBTI /AYSAPLASAFAVFLIYPIGQGS MHPFHOLGVAGVFGGALFCAMHGSL' FLAAWPVVGVWETA-LGIBTI D1-T.elongatus 121314

Ala/Gly

Ser/Thr

配向の違いを与えるアミノ酸残基は 保存されている



Mes基とPhyt基の配向を決めるアミノ酸残基は よく保存されている

NMRによる検証





Symmetry Break of Special Pair: Photochemically Induced Dynamic Nuclear Polarization NMR Confirms Control by Nonaromatic Substituents

Karthick Babu Sai Sankar Gupta,[†] A. Alia,^{†,§} Huub J.M. de Groot,[†] and Jörg Matysik^{*,†,‡}

[†]Institute of Chemistry, Leiden University, P.O. Box 9502, 2300 RA Leiden, The Netherlands [‡]Institut für Analytische Chemie, Universität Leipzig, Linnèstr. 3, 04104 Leipzig, Germany [§]Institut für Medizinische Physik und Biophysik, Universität Leipzig, Härtelstraße 16-18, 04107 Leipzig, Germany

Supporting Information

ABSTRACT: Despite the high structural symmetry of cofactor arrangement and protein environment, light-induced electron transfer in photosynthetic reaction centers (RCs) of the purple bacterium *Rhodobacter sphaeroides* runs selectively over one of the two branches of cofactors. The origin of this functional symmetry break has been debated for several decades. Recently, a crucial role of the substituents has been proposed by theoretical studies [Yamasaki, H.; Takano, Y.; Nakamura, H. J. Phys. Chem. B 2008, 112, 13923–13933]. Photo-CIDNP (photochemically induced dynamic nuclear polarization) MAS (magic angle



spinning) NMR demonstrates that indeed the peripheral atoms show opposite electronic effects on both sides of the special pair. While the aromatic system of P_L receives electron density from its periphery, the electron density of the aromatic ring of P_M is decreased.

Gupta, K. B. S. S. et al. J. Am. Chem. Soc. 2013, 135, 10382–10387

まとめ

- 1. Mes基とPhyt基の配向の違いがスペシャルペアの 電子構造の非対称性を引き起こした
- 2. 蛋白質の静電相互作用がスピン密度の非対称性が強めた
- 3. Mes基とPhyt基の配向を決める配列は保存されていた

III-2. シトクロムc酸化酵素のヘムaの 酸化還元状態における電子構造

Takano, Y.; Nakamura, H. J. Comput. Chem. 2010, 31, 954–962



酸素から水への四電子還元 → プロトン輸送

H pathway



Tsukihara et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2003**, *100*, 15304–15309 Shimokata et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2007**, *100*, 4200–4205

heme a



heme aの酸化還元の理解が必須!

Tsukihara et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2003**, *100*, 15304–15309 Shimokata et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2007**, *100*, 4200–4205



heme aの酸化還元における電子状態変化の理解 電荷密度変化 差分電荷密度分布

Quantum mechanical methods (B3LYP)

モデル



差分電荷密度(還元型→酸化型) [without protein (QM)]



$\Delta \mathbf{q}$	Fe	His61	His378	Porphyrin
	0.51	0.09	0.06	0.34

d_{zv}軌道の正電荷が増加

鉄イオンの酸化還元がポルフィリン環を介してformyl基の電荷に影響

[QM]方法:UB3LYP 基底関数: Fe:MIDI+d, others:6-31G(d

propionate基への伝播機構



ポルフィリン環のπ共役とpropionate基のσ*軌道を介した Feのd軌道とpropionate基のp軌道との軌道相互作用。

With protein (QM/MM)

周りのタンパク質の原子を点電荷で置き換える



Prop Aの部分にLUMOが大きく非局在化している。 Prop Aの電荷変化が $0.037 \rightarrow 0.102$ に増加。

タンパク質のつくる電場はProp Aへの電荷の伝播を強める。

[QM]方法:UB3LYP 基底関数: Fe:MIDI+d, others:6-31G(d) [MM] AMBER96

推定される反応機構



まとめ

- 鉄イオンの酸化還元変化はポルフィリン環のπ共役や propionate基のσ*軌道を介してformyl基やpropionate基 (Prop A, Prop D)の電荷に影響を与えた
- 2. 蛋白質の静電相互作用が電荷移動を強めた

IV. Photoactive Yellow Proteinに 現れる H/D同位体効果の理論的解析

H/D同位体効果(同位体シフト)

重水素置換によって分子の構造や分光スペクトルに生じる微小変化

Geometry

Absorption spectrum



原子核の量子揺らぎの違いを反映 電子状態の量子化学計算だけでは解析不能

J. Phys. Condens. Matter 24, 284126 (2012), MNRAS 439, 2370–2376 (2014)

H/D同位体効果の理論解析手法: Multi-Component Quantum Mechanics (MC_QM)



③ 拡張されたLCAO-SCF方程式 FC = SC ε 電子のFock演算子: $f_0^e = h^e + \sum_j 2J_j^e + V^{XC(e-e)} - \sum_k J_k^p$ 水素のFock演算子: $f_0^p = h^p + \sum_{l \neq k} J_l^p - \sum_j J_j^e$

✔ 電子と水素原子核の量子状態を同時に決定

H/D同位体効果の理論解析手法: Multi-Component Quantum Mechanics (MC_QM)



✔ MC_QMは効率的に構造と分光スペクトルに現れる
 H/D同位体効果を解析可能

Photoactive Yellow Protein (PYP)

好塩光合成細菌 H. halophilaの負の走光性を制御



J. Bacteriol. 175 3096 (1993)

Photoactive Yellow Protein (PYP)

▼結晶構造解析
 ① 低障壁水素結合(LBHB)が存在
 ② 近隣のArg52が脱プロトン化



Proc. Natl. Acad. Sci. 106, 440 (2009)

Photoactive Yellow Protein (PYP)

▼ 理論解析
 ① 一般的な水素結合が存在
 ② 近隣のArg52がプロトン化



Biochemistry, 51, 1171 (2012)

目的

MC_QM法を用いた解析により、H/D同位体効果 という観点からpCAとGlu46の間の水素結合と、 Arg52のプロトン化状態について検討する





計算条件



▼ 計算詳細

- high layer: MC_CAM-B3LYP/6-31+G(d,p)
- ₎₎ ・核基底関数系: 1s GTF

• low layer:

- ・middle layer: HF/3-21G ・溶媒効
- ・溶媒効果: CPCM ・ NMR計算:

Amber力場 (MM領域の構造は固定)

GIAO

• laye	ring	high	middle	e low	溶媒
	ONIOM	Y42,E46,R52,C69,pCA	A,(I31, T50)* -	残りの残基	-
	ONIOM/PCM	Y42,E46,pCA	I31,T50,R52,C69	残りの残基	PCM
-		I I I dede in I i			

* Only for protonated model ** main chains are assigned into middle layer



Proc. Natl. Acad. Sci. 106, 440 (2009)





✓ NMRの結果を最も良く再現したのは、
 プロトン化+溶媒効果のモデル(ONIOM/PCM-P)

溶媒環境の違いが水素結合様態に影響か?



	溶液 NMR	結晶 構造解析	発現菌の 生育環境		
Arg52	プロトン化	脱プロトン化	?		
LBHB形成	×	\bigcirc	?		
рH	7	9	10.5	強電解質	
塩濃度	40mM	1 M	saturating	(誘電率減)	

V. 生体高分子生化学的機能解析の ための分子計算技術の開発

 Inside-out アプローチ

 1.金属補欠分子固有の電子構造を調べる (QM)

 2.蛋白質中での電子構造を調べる (QM/MM)

 3.1と2を比較する

static effects (構造歪み、静電相互作用) dynamic effects (ゆらぎ)

超並列ab initio QM/MM-MD連成計算プログラム Platypusの開発

超並列*ab initio* QM/MM-MD連成計算プログラム Platypusの開発

(PLAT form for dYnamics Protein Unified Simulation)



ダウンロード先 (現在はPlatypus-QMのみ配布) http://www.islim.org/islim-dl_j.html

現在までの研究開発成果

- ・ RDF, UHF, R-DFT, U-DFT, CIS, CIS(D), CIS-DFT, MP2, CASSCF の実装
- ・ エネルギー・力計算における積分計算のハイブリッド並列化とSIMD化
- 2電子積分計算の**原子軌道基底から分子軌道基底への変換部分の高度化**
- ・ CASSCF計算におけるdirect CI 計算の高速化 (CAS(16,16)まで可能)

QM部分の高速化・超並列化

・ 粗結合 (chain-of-state法)を利用した超並列化

🗭 超並列化されたQM/MD計算による反応自由エネルギー

「京」での並列性能(QM)

並列化率 99.9888%



光合成反応中心 スペシャルペア (280原子) RHF/cc-pVDZ 総数32,768コア 並列化率 99.9888% 実行効率 7.27~2.24% (8192コア:4.26%)

CASCI(16,16)/6-31G** 総数16,384コア 並列化率 99.9728% 実行効率 15.43~6.80% (8192コア:7.85%)



「京」での並列性能(QM/MM-MD) 98,304コアのハイブリッド並列の実行 ^{実行交}

RHF/cc-pVDZ

Ace-ALA-NMe + 1,080 水分子

Strong scaling 総数2,048コア 並列化率: 99.7893% 実行効率 10.60~1.94%

Weak scaling (Chain of State) 総数98,304コア 128プロセス x 768レプリカ 実行効率 3.42~3.20% Weak scaling効率: 93.36%


励起状態QM/MDシミュレーション



SIFIUS 无巴回(1,374 原于) QMI 先巴回 SA-CASSCF(8,8)/MINI-4 MMI 水

Δ*t* = 0.25 fs 120,000ステップ

4.まとめ

Protein as amplifier





タンパク質環境の電気的・立体的摂動によって、補欠分子の 固有に持つ性質が強められ、制御されている

溶媒環境の違いが活性中心を制御				
ブ	[°] ロトン化の 制御	Arg52	^Н N-Н N- Х	溶媒環境
Tyr42 O. H. DCA				
	Glu46		BHB?	
	溶液 NMR	結晶 構造解析	発現菌の 生育環境	
Arg52	プロトン化	脱プロトン化	?	
LBHB形成	×	\bigcirc	?	
рН	7	9	10.5	強電解質
塩濃度	40mM	1 M	saturating	(誘電率減)





http://www.michiba-shunsara.jp/menu/sz044.html



光合成反応中心

- ・中村 春木 (大阪大)
- ・山崎 秀樹 (大阪大) PYP
- ・兼松佑典 (広市大)
- ・立川仁典 (横市大)

Platypus開発

- ・中村春木 (大阪大)
- ・中田一人
- ・米澤康滋 (近畿大)
- ・山中秀介
- 外部資金



新学術領域「コンピューティクス」 新学術領域「3D活性サイト科学」

JST-CREST

CREST

「ライフサイエンスの革新を目指した 構造生命科学と先端的基盤技術」



「次世代生命体統合シミュレーション ソフトウェアの研究開発」





(NEC)

(大阪大)