立命館大学生命科学部生命情報学科

2016年度　卒業論文

分子動力学(MD)シミュレーションによる

アスパラギン酸カルボキシル基syn/anti配座に関する検討

計算構造生物学研究室

担当教員 高橋卓也 笠原浩太

生命科学部 生命情報学科

学籍番号 2713130052-8

宮脇 聖大

目次

**[ⅰ[序論]](#_Toc473629590)** [3](#_Toc473629590)

**[ⅱ[方法]](#_Toc473629591)** [5](#_Toc473629591)

**[本実験において使用したモデルと条件](#_Toc473629592)** [5](#_Toc473629592)

**[レプリカ交換分子動力学(REMD)シミュレーション](#_Toc473629593)** [6](#_Toc473629593)

**[カルボキシル基syn, anti配座の規定](#_Toc473629594)** [7](#_Toc473629594)

**[アスパラギン酸カルボキシル基のエネルギー曲線](#_Toc473629595)** [8](#_Toc473629595)

**[シミュレーションにおけるDIHEDパラメータV1及びV2値の改変](#_Toc473629596)** [9](#_Toc473629596)

**[ⅲ[結果]](#_Toc473629597)** [11](#_Toc473629597)

**[レプリカ交換分子動力学(REMD)シミュレーション結果](#_Toc473629598)** [11](#_Toc473629598)

**[アスパラギン酸カルボキシル基のエネルギー曲線結果](#_Toc473629599)** [16](#_Toc473629599)

**[ⅳ[考察]](#_Toc473629600)** [30](#_Toc473629600)

**[[謝辞]](#_Toc473629601)** [31](#_Toc473629601)

**[[参考文献]](#_Toc473629602)** [31](#_Toc473629602)

**ⅰ[序論]**

　タンパク質やDNAをはじめとする生体高分子の動的な構造変化が、生命現象に密接に関連している。例えば、胃液中で作用する消化酵素ペプシンに関して、ペプシンの触媒中心で見られるセリン及びスレオニン残基は、アスパラギン酸側鎖への水素結合により、化学反応に寄与するという事例が挙げられる。[1]本実験で扱ったアスパラギン酸中には、カルボキシル基が存在し、上述したような化学反応において重要な役割を果たす。カルボキシル基における構造の特徴の一つとして、図１のようにカルボキシル基は水素の結合角度により規定される二面角(O=C-O-H)の違いにより、配座はsynとantiに分けられる。カルボキシル基では、各酸素原子に存在する２つの非共有電子対間で電子反発力が生じる。この電子反発力は水素イオンと結合することによって大いに緩和されるが、カルボキシル基syn型電子対はanti型電子対に比べ非常に水素イオンと結合しやすい構造をとっている。これにより、カルボキシル基ではsyn型の構造の方が安定となる。

　しかし、分子動力学 (Molecular Dynamics: MD) シミュレーションにおける代表的なソフトウェアの一つであるAmberにて用いられる、使用頻度の高い力場(ff99SB, ff14SB, ff03)において算出されるカルボキシル基のsyn / anti配座の割合は、antiの割合を大きく算出する。先行研究では、ポリグルタミン酸のレプリカ交換分子動力学(Replica Exchange Molecular Dynamics: REMD)シミュレーションをff14SBの力場を使用して行うと、側鎖に存在するカルボキシル基は9割以上の存在比率でantiの配座を取る事が観察できた。本来であれば、カルボキシル基はsyn型で安定な構造をとるため、synの割合を大きく算出しなければならない。先述したような酵素の反応過程を再現するにあたり、正しい力場を用いてシミュレーションを行うことは重要であり、Amber上でアミノ酸等の生体分子の挙動を正確に再現できていないことは問題視されるべき点である。そこで、Amberを使用して正確なシミュレーションを行えるように、Amberの力場を設定しているパラメータを変更し、最適化することを本研究の目的とした。

そこで、本研究では1残基のアスパラギン酸を使用して、Amberにおける二面角を規定しているパラメータに改変を施し、REMDシミュレーションを行って存在比の観察を行った。また、カルボキシル基二面角を-180°～180°の範囲で1°刻みで変えた360構造の一残基アスパラギン酸を用いて、算出したエネルギー曲線を精察し、より正確なMDシミュレーション結果を得るための探索とその妥当性を検討した。

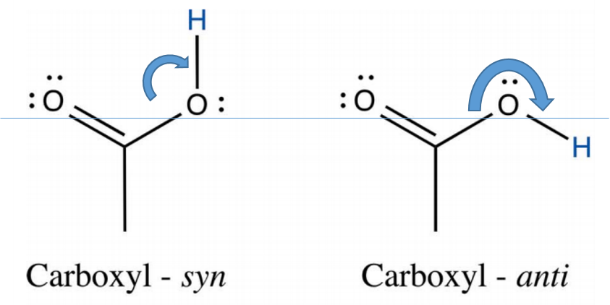


図 1 : カルボキシル基の水素結合におけるsyn, antiの配座

**ⅱ[方法]**

**本実験において使用したモデルと条件**

ACE(アセチル基末端)及びNME(N-メチルアミン末端)でキャップした1残基のASH(水素化されたアスパラギン酸)を対象に、REMDシミュレーションを行った。アスパラギン酸の初期構造はいずれもsynで、レプリカ数は6、交換ステップ数は10、各系の温度は300-900Kである。総ステップ数については、ff99SBの力場においてのみ総ステップ数108のREMDシミュレーションも行った。また、以下の表1にREMDシミュレーションの計算条件の詳細をまとめた。

表1：REMDシミュレーションの計算条件

|  |  |
| --- | --- |
| レプリカ数 | 6個 |
| 温度(K) | 300, 373, 465, 579, 722, 900 |
| 力場 | ff99SB, ff03, ff14SB |
| サンプリング頻度 | 1fs（dt=0.001） |
| 熱浴種類 | Langevin dynamics |
| 陰溶媒 | GB-OBC(Ⅱ) |
| 交換ステップ数 | 10 |
| 総ステップ数 | 107, 108(ff99SBのみ) |

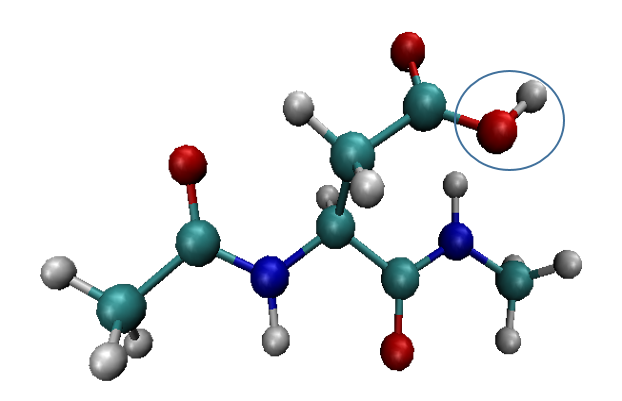


図 2 : 本研究で用いた一残基アスパラギン酸

青い丸で示した部分はカルボキシル基における水素結合部分である。

**レプリカ交換分子動力学(REMD)シミュレーション**

REMDシミュレーションとは、N個の異なる温度Tn(n = 1, … , N)をもち、相互作用しないN個の独立したコピー(レプリカ)を、それぞれ独立且つ同時にMDシミュレーションを走らせ、これをメトロポリス法による判定にて、レプリカ対の交換の遷移確率ρを得るものである。[2]従来のMDシミュレーションでは、構造がエネルギー障壁のために最安定構造にたどり着けないという問題点があった。しかし、REMDシミュレーションでは温度交換を行うことでエネルギー障壁を越えることができ、高温と低温の両者とも幅広くサンプリングすることが可能になる。

また、レプリカ交換法の詳細について、レプリカiとレプリカjで交換を行うとすると遷移確率ρは以下のようになる。

ρ = min [1, exp (ΔβΔΕ)]

ここで、Δβ = 1/(kBTl)‐1/(kBTm)、ΔΕ = Ei‐Ejで、 kBはボルツマン定数、Eはレプリカi、jにおける交換を行う前のポテンシャルエネルギーに対応している。系の温度Tlはレプリカiの温度に、Tmはレプリカjの温度に対応している。[3]

**カルボキシル基syn, anti配座の規定**

カルボキシル基(O=C-O-H)は水素の結合角度により規定される二面角によって、

syn / antiに配座が分けられる。本研究では以下の表２のように、-90°～90°の時はsyn, -180°～-90°, 90°～180°の時はantiと配座を規定した。

表2：二面角に対応する配座の規定

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 二面角 | -90°～90° | -180°～ -90°, 90°～ 180° |
| 配座 | syn | anti |

**アスパラギン酸カルボキシル基のエネルギー曲線**

1残基のアスパラギン酸を対象に、側鎖のカルボキシル基の二面角(O=C-O-H)を

-180°～180°で1°刻みで変えた360構造に対して、MDシミュレーションを1ステップずつ行い、ポテンシャルエネルギー、二面角相互作用、静電相互作用などのエネルギー曲線を描写した。また、計算条件を以下の表3にまとめた。

表3：計算条件

|  |  |
| --- | --- |
| ツール | Amber |
| 温度(K) | 300 |
| 溶媒 | 真空中, GB-OBC(Ⅱ) |
| 力場 | ff99SB, ff03, ff14SB |

## **シミュレーションにおけるDIHEDパラメータV1及びV2値の改変**

Amberを用いてMDシミュレーションを行う際に必要な入力ファイルの一つであるprmtopファイルに関して、これは取り扱う分子のトポロジーや力場、原子や残基の情報などを入力するためのものである。図3は、prmtopファイル中の、カルボキシル基二面角を規定している部分を抜粋したものである。本研究では、この二面角を規定しているパラメータの初期値に改変を施し、一残基のアスパラギン酸に対してREMD及びエネルギー曲線を描写した。パラメータの改変を行うにあたり、同研究室の山上が量子計算により算出した表4のパラメータを参考にした。

Amberにおける力場ff99SB及びff03に関して、カルボキシル基の水素結合における二面角相互作用(DIHED)は、以下の式より与えられる。[4]

Vccoh = V2(1 + cos(2θ - 180)) ,

Vocoh = V1(1 + cosθ) + V2(1 + cos(2θ - 180))

このV1、V2に対応する数値について、図3におけるprmtopファイルの初期値1.9(V1)及び2.3(V2)が対応する。この該当箇所を、表4で載せた値を参照して、パラメータの改変を施し、REMDシミュレーション及びエネルギー曲線の算出を行った。

%FLAG DIHEDRAL\_FORCE\_CONSTANT (ff99SB, ff03)

%FORMAT(5E16.8)

2.00000000E+00 2.50000000E+00 0.00000000E+00 2.00000000E+00 4.00000000E-01

0.00000000E+00 0.00000000E+00 2.70000000E-01 4.20000000E-01 8.00000000E-01

8.00000000E-02 1.90000000E+00 2.30000000E+00 1.55555556E-01 2.00000000E-01

2.00000000E-01 4.50000000E-01 1.58000000E+00 5.50000000E-01 1.05000000E+01

1.10000000E+00

**図 3 : prmtopファイル中カルボキシル基二面角を規定している部分の抜粋**

表3：量子計算により算出したDIHEDの改変数値

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 1-4EEL | str | モデル化学 | 基底関数 | V1 | V2 |
| ff14SB | gaff | HF | 6-311G | -1.899 | 2.081 |
| ff14SB | gaff | AUG-cc-pVDZ | -0.734 | 2.112 |
| ff14SB | gaff | B3LYP | AUG-cc-pVDZ | -0.226 | 2.401 |
| ff14SB | gaff | CI | AUG-cc-pVDZ | -0.337 | 2.254 |
| ff14SB | gaff | CCSD(T) | AUG-cc-pVDZ | -0.099 | 2.319 |
| ff14SB | gaff | MP2 | AUG-cc-pVDZ | -0.111 | 2.410 |
| ff14SB | gaff | MP4 | AUG-cc-pVDZ | -0.044 | 2.379 |

**ⅲ[結果]**

**レプリカ交換分子動力学(REMD)シミュレーション結果**

　REMDシミュレーションにて算出したカルボキシル基syn, antiの存在比を算出した結果を以下の表に示した。表4は、ff99SB, ff03, ff14SBそれぞれの力場で、prmtopファイル中DIHEDを規定している数値を、初期値の状態でシミュレーションを行った結果である。また、表5は、手法で前述した量子計算結果を基にパラメータの改変を行って、ff99SBの力場にてシミュレーションを行った結果である。

表4：DIHEDパラメータ初期値状態でのシミュレーション結果

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | **ff99SB** | **ff14SB** | **ff03** |
| **syn** | **0.09** | **0.05** | **0.01** |
| **anti** | **0.90** | **0.94** | **0.85** |
| **error** | **0.033290** | **0.078663** | **0.023862** |

表5：DIHEDパラメータ改変後のシミュレーション結果

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **モデル** | **MP4** | **MP2** | **B3LYP** | **CI** | **HF** | **HF** | **CCSD(T)** |
| **基底関数** | **AUG-cc-pVDZ** | **AUG-cc-pVDZ** | **AUG-cc-pVDZ** | **AUG-cc-pVDZ** | **6-311G** | **AUG-cc-pVDZ** | **AUG-cc-pVDZ** |
| **syn** | **0.983800** | **0.986600** | **0.992100** | **0.994000** | **0.999900** | **0.997900** | **0.989800** |
| **anti** | **0.016200** | **0.013400** | **0.007900** | **0.006000** | **0.000100** | **0.002100** | **0.010200** |
| **error** | **0.012446** | **0.011843** | **0.007269** | **0.003613** | **0.000447** | **0.003463** | **0.006049** |

また、表5の条件下におけるシミュレーション結果より、カルボキシル基の水素結合角度-180°~ 180°区画におけるsynとantiの頻出度を以下の図4 中にヒストグラムを用いて各々示した。横軸はアスパラギン酸カルボキシル基水素結合角度、縦軸は水素結合角度に対する頻度を表している。

**図 4 : REMD結果によるsyn, anti頻出ヒストグラム**

　まず、表3におけるREMD結果からは、初期値のままAMBERを用いてMDシミュレーションを行った場合、カルボキシル基配座の割合はいずれの力場においてもantiを圧倒的に多く算出していることが確認できる。

　表4の結果では、量子計算条件(モデル化学、基底関数)全ての改変数値において、synの割合を多く算出している。本研究において使用した改変数値の中で、最も量子計算精度の高いMP4: AUG-cc-pVDZでは、syn: 0.983800、anti: 0.016200という割合を算出しているのに対して、最も量子計算精度の低いHF:6-311Gでは、syn:0.999900、anti:0.000100という割合を算出しており、antiをほぼ算出していないことが観察できた。

　また、図4のヒストグラムからはいずれの場合も、-50°~ 50°付近でsynが多く頻出しており、antiは180°及び-180°末梢付近で多く頻出している。それ以外の水素結合角度の区画におけるsyn及びantiの頻出は観察できなかった。

**アスパラギン酸カルボキシル基のエネルギー曲線結果**

　以下の図5では、各力場(ff99SB, ff14SB, ff03)に対し、真空中においてMDシミュレーションを行い、エネルギー曲線を描写したものである。また、図6では溶媒にGB-OBC(Ⅱ)を指定し、真空中の時と同様にしてエネルギー曲線を描写した。縦軸はエネルギーの値(Kcal/mol)、横軸はカルボキシル基の水素結合角度(二面角)である。図に示した曲線については、各々ポテンシャルエネルギー(EPtot)、二面角相互作用(DIHED)、カルボキシル基における静電相互作用(1-4EFL)、アスパラギン酸全体の静電相互作用(EELEC)で、陰溶媒中におけるシミュレーション結果の図6においてのみ、溶媒和の作用(EGB)を描写している。

**図 5 : ASH各力場におけるエネルギー変化(真空中)**

**図 6 : ASH各力場におけるエネルギー変化(GB-OBC(Ⅱ))**

図5の真空中におけるシミュレーションでは、いずれの力場でもsynにおけるポテンシャルエネルギー極小値(EPtot)は、antiのものよりも低い値をとっていた。これに対して、図6の陰溶媒中におけるシミュレーションでは、antiにおけるポテンシャルエネルギー極小値(EPtot)は、synのものよりも低い値をとっていた。また、図の5及び6いずれも、-90°付近でEPtotの曲線が最も大きな増加を示している。

次に、以下に示す図7a-gではff99SBの力場にてMDシミュレーションを行う際に、DIHRDのパラメータV1及びV2の値について、表3を参照に変更して陰溶媒中におけるエネルギー曲線の描写を行った。また、実際に行ったMDシミュレーションより算出したDIHEDの曲線と、ff99SBのDIHRDを規定している関数から描写した曲線とのフィッティングも行った。

Model : MP4

BasisFunction : AUG-cc-pVDZ

1-4EFl : ff14SB

V1 = -0.044

V2 = 2.379

**図 7-a : MP4\_AUG-cc-pVDZにおけるASHエネルギー変化(GB-OBC(Ⅱ))**

Model : HF

BasisFunction : 6-311G

1-4EFl : ff14SB

V1 = -1.899

V2 = 2.081

**図 7-b : HF**\_**6-311GにおけるASHエネルギー変化(GB-OBC(Ⅱ))**

Model : HF

BasisFunction : AUG-cc-pVDZ

1-4EFl : ff14SB

V1 = -0.734

V2 = 2.112

**図 7-c : HF\_AUG-cc-pVDZにおけるASHエネルギー変化(GB-OBC(Ⅱ))**

Model : MP2

BasisFunction : AUG-cc-pVDZ

1-4EFl : ff14SB

V1 = -0.111

V2 = 2.410

**図 7-d : MP2\_AUG-cc-pVDZにおけるASHエネルギー変化(GB-OBC(Ⅱ))**

Model : B3LYP

BasisFunction : AUG-cc-pVDZ

1-4EFl : ff14SB

V1 = -0.226

V2 = 2.401

**図 7-e : B3LYP\_AUG-cc-pVDZにおけるASHエネルギー変化(GB-OBC(Ⅱ))**

Model : CI

BasisFunction : AUG-cc-pVDZ

1-4EFl : ff14SB

V1 = -0.337

V2 = 2.254

**図 7-f : CI\_AUG-cc-pVDZにおけるASHエネルギー変化(GB-OBC(Ⅱ))**

Model : CCSD(T)

BasisFunction : AUG-cc-pVDZ

1-4EFl : ff14SB

V1 = -0.099

V2 = 2.319

**図 7-g : CCSD(T)\_AUG-cc-pVDZにおけるASHエネルギー変化(GB-OBC(Ⅱ))**

図7a-gより、いずれの場合においてもsynにおけるEPtotの最小値は、antiにおける最小値より低い値を算出していた。また、DIHEDの曲線のフィッティングに関して、実際のMDシミュレーションより算出したDIHEDと、関数より描写したV\_DIHEDと完全に一致していた。また、以下の表4に各々のシミュレーションより算出したEPtotのsyn/antiでの極小値差、EPtotの最大値、DIHEDの最小値、最大値をまとめた。

表4：シミュレーション結果における各算出値(Kcal/mol)



表4より、syn及びantiにおけるポテンシャルエネルギー極小値差が最も低い値(3.054 Kcal/mol)を算出したのは、量子計算結果のモデル化学:MP4、基底関数:AUG-cc-pVDZの条件時であった。また、極小値差が最も大きい値(6.6279)を示したのが、モデル化学:HF、基底関数:6-311Gの条件時であった。

**ⅳ[考察]**

Amberでは真空中の構造に対して、パラメータを最適化しています。つまり、Amberでは、真空中においてのみ構造の再現が可能ではありますが、溶媒中においては正確なシミュレーションを行うことが現状では不可能です。

これは、Amberでは真空中の構造に対してパラメータを最適化しているため、溶媒中においては正確なシミュレーションを行うことが現状では不可能であることが理由として挙げられる。

**[謝辞]**

　本研究は、立命館大学 生命科学部 生命情報学科 計算構造生物学研究室にて行いました。本研究を行うにあたり、ご指導、ご鞭撻いただきました、高橋卓也教授、笠原浩太助教に厚く御礼を申し上げます。また、同研究室の皆様に感謝を申し上げます。

**[参考文献]**

[1] Dunn, *Chem Rev* , *102*, 4431, (2002)

[2] 勉強会の時の拡張アンサンブル.pdfの資料P163(教科書名不明)

[3] 大平智広, “8残基のポリアラニンを用いたレプリカ交換法の最適な計算条件の探索”, 05, (2015)

[4]Tetsuro Nagai, “Assesment and enhancement of empirical force fields regarding the conformational equilibrium of calboxyl droup in solution”, P2, (2016)