



Title	局所非調和振動計算によるロドプシンのアミドバンド予測
Author(s)	松山, 奈央
Citation	サイバーメディアHPCジャーナル. 2026, 16, p. 130-133
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/106254
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

局所非調和振動計算によるロドプシンのアミドバンド予測

松山 奈央

筑波大学 大学院理工情報生命学術院 数理物質科学研究群

1. はじめに

G 蛋白質共役受容体 (以降 GPCR) は、ループで繋がれた 7 本の α ヘリックスが細胞膜を貫通する構造をもつ膜蛋白質である。細胞外側への低分子リガンドの結合により膜貫通ヘリックスの立体構造変化が引き起こされ、その変化が細胞内へ伝わることで、共役する G 蛋白質を介したシグナル伝達が行われる。GPCR は生理活性物質のシグナル伝達を担っており、薬理学的な重要性から医薬品開発の標的である。

近年、GPCR の 1 つであるムスカリン性アセチルコリン受容体に対する、赤外 (以降 IR) 分光法を用いたリガンド結合誘起差スペクトル測定が行われた[1]。そのアミド I バンドを解析した結果、リガンド結合に伴う差スペクトルのバンド強度比が、細胞を用いた G 蛋白質活性化度合いと相関をもつことが示された。このことは、蛋白質の構造や水素結合状態を反映するアミド I バンドの変化が、薬効分類のプローブとなることを示しており、薬理作用のさらなる解析が期待される。一方で、蛋白質は複雑な構造をもつため、変化の見られたアミド I バンドの起源となる構造変化はまだ明らかとなっていない。そのため、理論計算によるバンドの帰属や解釈が求められている。

当研究室ではこれまでに、量子化学 (QM) / 分子力場 (MM) 法に基づく非調和振動計算法として、系の注目する部分 (QM 領域) を振動計算する方法[2]、QM 領域の一部をグループ局所化して振動計算する方法[3]が開発されており、蛋白質内部水の振動スペクトルが計算された。現在はペプチドに対して、これまでの方法を拡張させた、各アミド基の局所的な振動計算から蛋白質全体の振動スペクトルを構築する、局所化振動計算法の開発が行われている。本研究では、この新たに

開発された方法を GPCR の 1 つであり視覚の光受容蛋白質であるウシロドプシンに応用し、アミドバンドを予測した。

2. 方法[4]

結晶構造をもとに、ロドプシンの活性状態と不活性状態の構造に対する分子動力学 (以降 MD) 計算を実行し、得られた構造の振動解析から、それぞれの状態の IR スペクトルを求めた。MD 計算と振動解析の詳細は、2.1 節と 2.2 節に記載する。その後、活性状態と不活性状態のスペクトルの差をとり得られた差スペクトルと、IR 分光実験で観測された差スペクトルのアミドバンドの比較・解析を実施した。

2.1 MD 計算

活性状態 (PDB ID 3PXO) と不活性状態 (PDB ID 1U19) の結晶構造を取得し、CHARMM-GUI[5]を用いて、ロドプシン・POPC 二重膜・0.15M KCl 水溶液の膜蛋白質環境を全原子系で構築した。GENESIS[6]を用いた MD 計算により、系を平衡化した後、100 ns のトラジェクトリーを得た。MM パラメータは、水分子に対して TIP3P、それ以外に対して CHARMM36m を用いた。

2.2 振動解析

トラジェクトリーの最終スナップショットを、振動解析の初期構造に選択した。初期構造の各アミド基に対して水素結合解析を行った後、GENESIS と QSimulate-QM[7]を用いて QM/MM 計算を実行した。

各アミド基ごとに、図 1 に示す QM 領域と最適化領域で構造最適化を行い、それ以外の原子は MM 領域として扱い固定した。得られた各アミド

基の最適化構造を繋いでロドプシン全体の最適化構造とし、この最適化構造を初期構造として再度構造最適化を行うという方法を4回繰り返して、最終的に得られた最適化構造の振動状態を求めた。

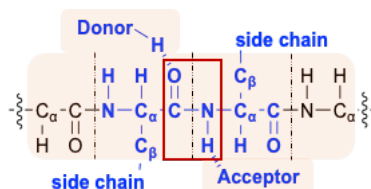


図1：構造最適化のQM領域（橙色ハイライト）と最適化領域（青色原子）

振動計算は、図2に示すQM領域と計算領域で、各アミド基に対して実行した。調和振動計算で得た平衡構造の振動座標と基準振動モードを用いて、4次テイラー展開ポテンシャル(以降QFF)計算と1次のグリッド計算を行い、非調和ポテンシャルエネルギー曲面(以降PES)を生成した。QM領域は、汎関数がB3LYP-D3、基底関数がcc-pVDZあるいはaug-cc-pVDZで扱った。SINDO[8]による、Vibrational Self-Consistent Field計算と2次の振動擬縮退摂動法計算(以降VQDPT2)により振動状態を求め、IRスペクトルを得た。各アミド基のIRスペクトルを全て足し合わせることで、ロドプシンのIRスペクトルを求めた。

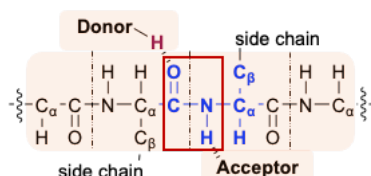


図2：振動計算のQM領域（橙色ハイライト）と計算領域（青色原子）

3. SQUIDでの計算時間

SQUIDにおけるロドプシンの計算には、1ノードあたりに換算して、表1に示す実行時間を要した。QFFを求める過程で最も計算時間を要するが、今回の方法は構造最適化と振動計算を各アミド基ごとに実行できるため、並列計算が可能であり、大規模計算機を有効に活用できる方法である。

表1：各過程での1ノード当たりの計算実行時間

	不活性状態 (hour)	活性状態 (hour)
MD 平衡化	12.7	12.6
MD production	128.4	126.6
構造最適化	404.2	392.6
調和振動計算	102.7	103.7
3体項-QFF	3369.6	3373.8
1体項-grid	638.0	634.4
VQDPT2	0.1	0.1
合計	4655.7	4643.8

4. 結果と考察[4]

4.1 計算と実験の差スペクトルの比較

図3に、調和振動計算（上）、非調和振動計算（中）、IR分光実験[9]（下）より得られた、1220-1750 cm^{-1} 領域のIR差スペクトルを示す。調和振動計算では、不活性状態の1701 cm^{-1} (-) から活性状態の1696 cm^{-1} (+) への低波数シフトが、構造変化に伴う最も大きな強度変化として示された。実験では、1655 cm^{-1} (-) から1642 cm^{-1} (+)への低波数シフトが、最も大きな強度変化を示すアミドIバンドシフトとして観測されている[9]。計算で示された低波数シフトは、このアミドIバンドシフトに相当すると考えられるが、実験結果より

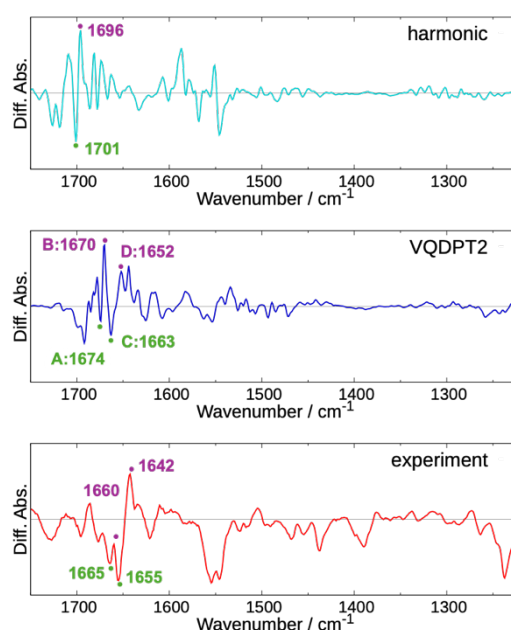


図3：1220-1750 cm^{-1} 領域のIR差スペクトル

も約 50 cm^{-1} 高波数に示された。非調和振動計算では、 1663 cm^{-1} (-) から 1652 cm^{-1} (+) への低波数シフトがアミド I バンドシフトに相当すると考えられ、実験結果との差は約 10 cm^{-1} に減少し、よい一致を示した。

4.2 アミド I バンドに寄与する領域

図 3 の非調和振動計算結果で示された、4 つのアミド I バンド (1674 cm^{-1} , 1670 cm^{-1} , 1663 cm^{-1} , 1652 cm^{-1} 、以降それぞれピーク A, B, C, D と表示) について、バンド形成に寄与するロドプシンの領域を解析した。全スペクトルを、ヘリックス領域とループ領域のスペクトルに分割し、各スペクトルにおいて、4 つのバンドに相当するピークトップの波数と強度を表 2 に示す。ピーク A では、ヘリックスからの -246 km mol^{-1} の寄与をループからの 94 km mol^{-1} の寄与が打ち消して、全スペクトルは負のピークを形成する。ピーク B は、ヘリックスからの 405 km mol^{-1} とループからの 155 km mol^{-1} の寄与により正のピークを形成しているが、ヘリックスからの寄与の割合が多い。ピーク C では、ヘリックスからの 121 km mol^{-1} の寄与によりループからの -304 km mol^{-1} の寄与が打ち消され、全スペクトルは負のピークを形成する。ピーク D は、ヘリックスからの 25 km mol^{-1} とループからの 274 km mol^{-1} の寄与により正のピークを形成しており、ループからの寄与の割合が多い。これらの結果は、ピーク A, B による高波数側のシフトは、主にヘリックスからの寄与により形成され、ピーク C, D による低波数側のシフトは、主にループからの寄与により形成されていることを示した。

4.3 アミド I バンドに寄与する残基

続いて、4 つのバンド形成に寄与するロドプシンの残基を解析した。ピーク A-D において、(1) ピークトップ $\pm 1\text{ cm}^{-1}$ の波数 (2) 不活性状態と活性状態の構造間の波数差が 10 cm^{-1} 以上の両条件を満たす残基を、図 4 でハイライトした。ピーク A : 赤、B : 青、C : 紫、D : 緑で残基を示し、ピーク A, C は不活性状態、ピーク B, D は活性状態の構造に表示した。ピーク A に 13 残基 (ヘリックス : 12、ループ : 1)、ピーク B に 12 残基 (ヘリックス : 9、ループ : 3)、ピーク C に 14 残基 (ヘリックス : 6、ループ : 8)、ピーク D に 8 残基 (ヘリックス : 2、ループ : 6) が該当した。ピーク A では、全てのヘリックスから寄与があった。ピーク A, B を形成する残基は主にヘリックスに分布し、ピーク C, D を形成する残基の分布はループに多くなっており、4.2 節で得られた結果と同様の傾向を示した。もう一つ重要な点は、不活性状態と活性状態の構造の重ね合わせでは、5 番目と 6 番目のヘリックスに大きな構造変化が見られたが、4 つのアミド I バンドに寄与する残基は全てのヘリックスに分布しており、構造変化の大きさだけがアミド I バンド変化に現れているわけではないことである。

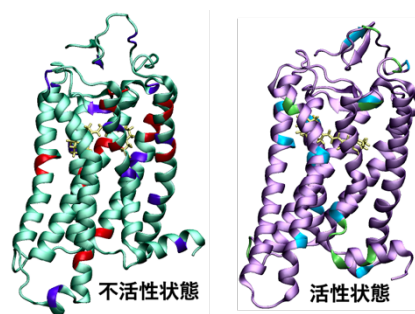


図 4 : ピーク A-D に寄与する残基のハイライト

表 2 : ヘリックス領域とループ領域のアミド I バンドの波数と強度

	残基数	ピーク A		ピーク B		ピーク C		ピーク D	
		波数	強度	波数	強度	波数	強度	波数	強度
ロドプシン全体	322	1674	-126	1670	527	1663	-251	1652	299
ヘリックス	209	1675	-246	1671	405	1661	121	1652	25
ループ	113	1673	94	1668	155	1662	-304	1652	274

波数の単位は cm^{-1} 、強度の単位は km mol^{-1} で表示

4.4 レチナール周辺の分子の配置

最後に、アミド I バンド形成に寄与する残基の 1 つで、レチナール分子周辺に位置する Thr118 の構造変化とその波数変化の関係を解析した。図 5 (左) に示すように、QM/MM 計算で得られた不活性状態の最適化構造において、Thr118 側鎖の OH 基は、Gly114 主鎖の O 原子と水素結合距離、レチナールの C₉-メチル基と立体障害の位置にあり、結晶構造で見られた配置[10]と同様であった。活性状態の構造になると、図 5 (右) に示すように、Thr118 と Gly114 の間の水素結合が切断され、Thr118 側鎖の OH 基はレチナールに垂直な向きをとり、近くの水分子 (水色) と水素結合を形成する配置に変わった。さらに Thr118 主鎖の O 原子は、水分子と新たに水素結合を形成した。この水素結合の組み換えにより、Thr118 のアミド I は、 1674 cm^{-1} から 1615 cm^{-1} への 59 cm^{-1} の低波数シフトを示した。

ここで改めて図 5 を確認すると、Thr118 の周り $4.0\text{ \AA}$ 以内において、不活性状態では水分子が 1 つも示されないのに対し、活性状態では複数示された。これは図 6 に示すように、活性状態では膜貫通ヘリックス内部に圧倒的多数の水分子 (赤色) が存在する結果であり、活性化による 6 番目のヘリックスの動きで生じた、細胞質側と内部を繋ぐ空間にバルク水が流入することでもたらされる。

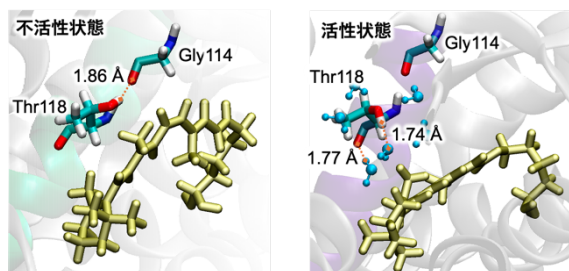


図 5 : Thr118 とレチナール周辺の最適化構造

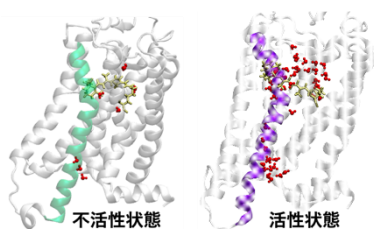


図 6 : 最適化構造での水分子の分布

5. おわりに

GPCR の 1 つであるロドプシンに対して、当研究室で開発された局所化振動計算法を応用してアミドバンドを予測し、その変化と構造変化の關係の解析から、アミド I バンドシフトに寄与する受容体の領域や残基を明らかにした。現在は、蛋白質構造ゆらぎの影響を検証するため、多スナップショットを初期構造とした振動解析を行っているところである。

今回の方法は、各アミド基の振動状態を足し合わせてロドプシン全体の振動状態を求めるため、アミド基間のカップリングは含まない。また計算資源の制約から、PES 生成は、QFF と 1 次のグリッド計算により行った。カップリングの取り込みや高次のグリッドポテンシャルでの PES 生成により、スペクトル予測の精度向上が期待できる。

本研究の遂行にあたり、筑波大学数理物質系の八木清教授、名古屋工業大学大学院工学研究科の片山耕大准教授よりご指導、お力添えをいただきました。深く感謝申し上げます。

参考文献

- (1) K. Katayama *et al. Commun. Biol.* **4**, 1321 (2021).
- (2) K. Yagi *et al. J. Chem. Theory Comput.* **15**, 1924 (2019).
- (3) K. Yagi, Y. Sugita, *J. Chem. Theory Comput.* **17**, 5007 (2021).
- (4) N. Matsuyama, K. Katayama, and K. Yagi, *J. Phys. Chem. B* DOI: 10.1021/acs.jpcb.6c01639.
- (5) S. Jo *et al. J. Comput. Chem.* **29**, 1859 (2008).
- (6) J. Jung *et al. J. Phys. Chem. B* **128**, 6028 (2024).
- (7) K. Yagi, S. Ito, and Y. Sugita, *J. Phys. Chem. B* **125**, 4701 (2021).
- (8) K. Yagi, アンサンブル **24**, 122-129 (2022).
- (9) K. Katayama *et al. J. Phys. Chem. Lett.* **10**, 7270 (2019).
- (10) V. A. Lórenz-Fonfría *et al. J. Am. Chem. Soc.* **132**, 5693-5703 (2010).