The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	ヘムの構造歪みと機能に関する計算科学的研究
Author(s)	今田, 康博
Citation	大阪大学, 2018, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/69340
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

ヘムの構造歪みと機能に関する計算科学的研究

今田康博

大阪大学大学院　理学研究科　化学専攻

2018年3月

目次

第１章　序論 6

1.1研究背景 6

1.1.1 ヘム分子 6

1.1.2 ヘムタンパク質 7

1.1.3 ヘムの構造歪み 9

1.1.4 タンパク質の機能とヘムの構造歪み 11

1.2 研究目的 13

1.3 研究手法 13

第２章　量子化学計算 14

2.1 シュレディンガー方程式 14

2.3 スレーター行列式 17

2.4 ハートリー・フォック方程式 18

2.5 密度汎関数法 19

2.6 交換相関汎関数 21

2.7 基底関数.....22

2.8 振動解析.....25

2.9 振動モードと基準座標.....27

2.10 分子の対称性.....29

2.11 酸化還元電位.....30

３章 統計解析.....32

3.1 主成分分析.....32

第４章 ヘム分子の構造歪みの解析手法.....34

4.1 ヘムの構造歪みの定義.....34

4.2 Normal-coordinate Structural Decomposition (NSD).....34

第５章 Protein Data Bankの統計解析.....39

5.1 PDBのヘムタンパク質の主成分解析.....39

5.2 主成分軸と振動モードの関係.....41

5.3 軸配位子の統計.....42

第６章 ヘムの構造歪みと機能に関する解析 45

6.1 D_{4h}対称のヘムの量子化学計算 45

6.2 モデルの作成 47

6.3 ヘムの軸配位子の配位長を変化させた計算 49

6.4 酸化還元電位と電子構造に対するruffling の効果 51

6.4.1 Hisが平行に配位している場合 51

6.4.2 Hisが垂直に配位している場合 65

6.5 酸化還元電位と電子構造に対するsaddling の効果 70

6.6 酸化還元電位と電子構造に対する組み合わせた歪みの効果 74

第7章 結論 77

付録 79

参考文献 86

謝辞 91

第１章序論

1.1研究背景

1.1.1 ヘム分子

ヘム分子とは、一般に鉄ポルフィリン錯体のことをいう。鉄イオンは単体では、生物が利用することができないだけではなく、活性酸素を生成することもあり、非常に有害な金属イオンである。しかしながら、生体内で存在する金属の中では鉄が最も多く、一般的な成人男性で4 g程度含まれている[1]。その鉄イオンのほとんどがヘム分子として存在しており、多くの場合、タンパク質の中で補欠分子族として存在し、生体内で様々な機能を担っている。

ヘム分子(図 1.1.1-1)[2]は側鎖やタンパク質との結合の様式によってヘムa、ヘムb、ヘムc、シロヘムなどの様々な種類に分類されている。ヘムaとヘムbは、タンパク質分子と共有結合を形成しておらず、タンパク質を変性させると、容易に取り出すことができる。一方ヘムcはタンパク質のシステイン残基と2箇所でチオエーテル結合を形成しており、強力な還元剤のもとで、タンパク質を処理しなければ単離することができない。なおヘムcには1箇所でしかシステイン残基と共有結合を形成していない変形ヘムcと呼ばれるヘムが存在している[3]。これらのヘムは単体では紫外領域に吸収があるために無色だが、タンパク質の中では、その吸収極大波長が赤方偏移することで可視領域に吸収極大が現れる。それぞれのヘムは種類ごとに異なる吸収極大波長を持ち、吸収スペクトルからヘムの種類を判別することも可能である[4]。

ヘム分子は単体では、完全な平面構造をしていると考えられる[5]。

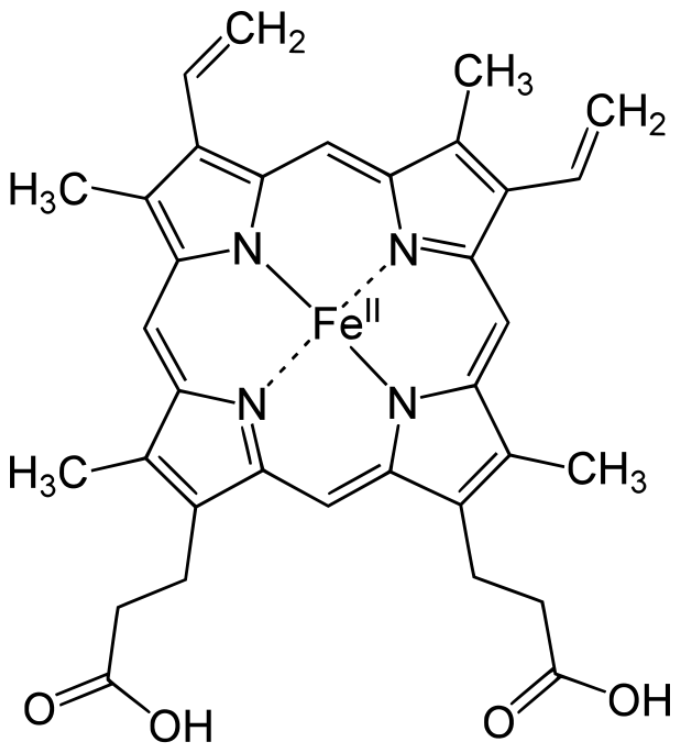

図 1.1.1-1 ヘムの構造式(ヘムb) 。プロトポルフィリンIXの中心に鉄が配位した構造をしている。

1.1.2 ヘムタンパク質

ヘムを補欠分子として持つタンパク質をヘムタンパク質という。ヘムタンパク質には様々な種類が存在しており、Protein Data Bank (PDB)[6,7]には2017年11月10日の時点で4445個のX線結晶構造解析でとられたヘムタンパク質構造データが登録されている。初めてPDBに登録されたヘムタンパク質は、1969年に構造が解かれた鯨由来のmyoglobinの構造で、その分解能は2.0 Åであった[8](登録は1973年に行われている)。それ以降、多くのヘムタンパク質の構造が解かれ、ヘムタンパク質の登録数は年々増加している。

ヘムタンパク質の機能は多種多様である。cytochrome *c* (図 1.1.2-1)は分子中にヘムcを持ち、ミトコンドリア呼吸鎖(電子伝達系)で電子をcytochrome *c* oxidaseに渡す電子伝達の機能を持つ[9]。血液中に存在するhemoglobin(図1.1.2-1)は1分子中に4つのヘムbを持ち、一度に4分子の酸素を体中の組織に運ぶことができる。hemoglobin分子は組織の酸素分圧により酸素の結合と解離を行い、ヘムは酸素分子の有無でその構造が大きく異なる。このヘムの構造の違いが、hemoglobin全体の4次構造を変化させ、hemoglobinと酸素分子との親和性が変化する[10]。cytochrome P450(図 1.1.2-2)はヘムbを持ち、様々な分子の酸化を触媒するタンパク質である。このタンパク質は、薬剤代謝やコレステロールの生合成などに関わる。cytochrome *c* oxidase (図1.1.2-2)はヘムaとヘムa_3を持つ巨大な膜タンパク質複合体で、ヘムa_3ではcytochrome *c*から電子を受け取り、分子状酸素を4電子還元し水を生成する反応を触媒する。ヘムaではその反応と共役してプロトンをミトコンドリアのマトリクス側から膜間腔へと輸送する[11]。この輸送により、膜を隔てたプロトン濃度勾配が生じる。この濃度勾配はATP合成酵素により利用される[4]。

これらの例からもわかるようにヘムはタンパク質と複合体を形成することで、多岐にわたる機能を発現する。タンパク質ごとに機能に関する詳細な研究は数多く存在するが、そもそも、なぜヘムがこれほど多様な機能を持つのか、どういったタンパク質との相互作用が機能を規定するのか、わからないことも多い。もし、ヘムの機能の原理が明らかになれば、新たな機能を持つヘムタンパク質を人工的に設計することが可能になるかもしれない。

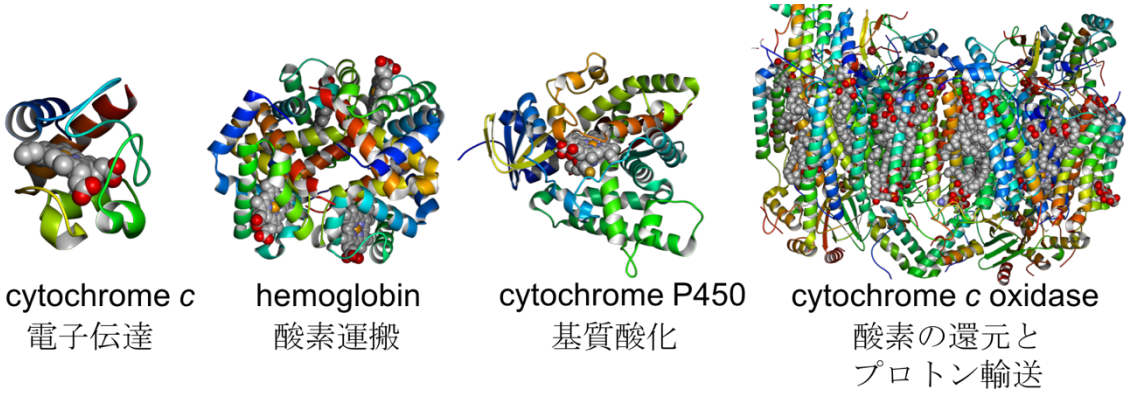

図 1.1.2-2 代表的なヘムタンパク質の例。左からミトコンドリア呼吸鎖で電子伝達タンパク質として働くcytochrome *c*、 血液中で酸素を運搬するhemoglobin、基質に酸素分子を添加するcytochrome P450、 ミトコンドリア呼吸鎖でATP合成に重要な働きをするcytochrome *c* oxidase

1.1.3 ヘムの構造歪み

構造生物学の黎明期である1970年頃までは、ヘム分子はタンパク質の中で平面構造を維持していると考えて原子モデルが作られていた。しかし、高分解能な結晶構造が多く報告され、精密化の手法が進歩するに伴い、現在では、一般にタンパク質の中でヘムの構造が、平面からずれて歪んでいると考えられるようになった。さらに、ヘムの構造の歪みが、ヘムタンパク質の機能や鉄ポルフィリン錯体の物性に関係しているという研究が発表され、多くの研究者が様々なヘムタンパク質について、その機能をヘムの構造の歪みの点から議論するようになった。

ヘムの構造歪みには面外の歪みと面内の歪みに大別することができる。面外の構造歪みとは、デカルト座標系で、ヘムの鉄ポルフィリン平面に直交する方向への原子のずれのことで、面内の構造歪みとはポルフィリン平面内での構造のずれのことである。広く知られていたのは面外の構造歪みであり、面内の構造歪みは一見わからない

ため注目されることは少なかった。しかしながら、面内の歪みも面外の構造歪みと同様に、ヘムタンパク質の機能に重要であると考えられてきている[5]。

ヘムがタンパク質の中で歪む原因はいくつかある。まず、ヘム近傍のアミノ酸残基による立体障害による歪みが挙げられる[12–15]。この種のヘムの構造歪みは、障害となるアミノ酸残基を変異させることで、容易に構造の歪みを変えることができる。そのため、それを利用してヘムの構造歪みとヘムタンパク質の機能との関係を調べた研究もいくつ報告されている[12–14]。次に、軸配位子のねじれによる歪みがある[16,17]。例えばヘムに配位しているヒスチジンがねじれる事による立体障害の影響でヘムがフリル状に歪むことがある。cytochrome c_3のヘムではこのねじれによるヘムの構造歪みが多くの生物種で保存されている。また、hemoglobinの例でよく知られるヘムのスピン状態による構造歪みがある。一般に5配位高スピンのヘムは中心金属の鉄イオンが軸配位子の方へ引かれることによってヘムがドーム状に歪む。一方、6配位のヘムは鉄イオンがポルフィリンの面内に引き戻される。hemoglobinではこの酸素の結合解離によって引き起こされるヘムの構造歪みの大きな変化が、ヘム近くのヘリックスとの相互作用を起こし、hemoglobin全体の構造変化を誘起し、hemoglobinと酸素分子との親和性を変化させている。また、catalaseではヘムのプロピオン酸の近くに多数の塩基性アミノ酸が塩橋を形成している。これによりわずかにヘムのプロピオン酸の根元付近のポルフィリン面が歪んでいることもある。以上、説明した例は、ヘム周囲の環境によるヘムの構造歪みの例だが、ヘム分子自体に修飾を加えて歪みを生じさせた例も報告されている。こうした分子修飾によって作り出された構造歪みの異なる鉄ポルフィリン錯体を用いた実験や理論研究から、構造の歪みと鉄ポルフィリン錯体の機能との関

係が調べられており、その知見がヘムタンパク質研究にも生かされている。

1.1.4 タンパク質の機能とヘムの構造歪み

ヘムの構造歪みがタンパク質の機能に影響を及ぼす例がいくつか報告されている。 1つ目の例は、H-NOXドメインを持つヘムタンパク質で、酸素や一酸化窒素を認識するガスセンサーの役割を担っている。ガス分子がヘムに結合すると、ヘムの大きな構造変化が起き、別のドメインのcAMPの合成反応を活性化する[18]。このヘムタンパク質のヘムの構造は大きく歪んでおり、この構造歪みにはヘム近傍のProが重要であると考えられている[12,19]。そこで、ProをAlaに置換すると、ヘムの構造歪みは解消され、さらに、変異体では野生型に比べて酸化還元電位が約150 mV低くなることが明らかになった。この実験は、ヘムの構造歪みが機能に重要であることを示唆するだけではなく、タンパク質に変異を与えることで、ヘムの構造歪みを変化させ、それによって機能を調節できる可能性を示している点で非常に興味深い研究である[12]。

2つ目の例は、isd systemというヘムから鉄を獲得するためのタンパク質群の末端酵素であるIsdIというヘム分解酵素である[13–15]。この酵素はヘムの構造歪みを利用してヘムを分解すると考えられている。この酵素にヘムが取り込まれると、ヘムポケットにあるTrpによってヘムが大きく歪む。ヘムが大きく歪むことで、ヘムの電子構造が変化し、それがきっかけとなり、ヘムのα位のメチン基が開裂することで、ヘムの分解が起こる。このTrpをTyrに置換するとヘムの構造歪みが減少することがX線結晶構造解析から確かめられ、さらにヘムの分解活性が減少することが吸収スペクトル測定から明らかになっている。

最後は、酸素を身体中の組織へと運搬するhemoglobinの例である。hemoglobinは4つのサブユニットの会合体であり、それらの協働性が酸素の親和性の調節に重要であることはよく知られている。hemoglobinは、酸素分圧に応じて酸素との親和性を変化させる。この関係をプロットすればシグモイド状の曲線を得ることができる。シグモイド状になる理由としてhemoglobinにはT状態とR状態と呼ばれる2つの状態があることによる。T状態のhemoglobinのヘムの1つに酸素分子が結合することで、サブユニット全体の大きな構造変化が起こる。この構造変化には、リガンドの着脱によるヘムの構造歪みの変化が重要である。ヘムに酸素分子などが結合するとドーム状に歪んだヘムの構造が平面に近づく。それによりhemoglobinのサブユニット間の相互作用が変化し、T状態からR状態へのコンフォメーション変化が起き、他のヘム分子にも酸素分子が吸着しやすくなる[10]。

これらの例から、ヘムの構造歪みはヘムタンパク質やヘムを基質とする酵素の機能にとって重要であると言える。

1.1.5 立体構造データベース

1971年にPDB(Protein Data Bank)[6]というタンパク質など生体高分子の立体構造データベースが誕生し、現在までに多くの構造が登録されている。2017年12月の時点で135787件のタンパク質・核酸・糖の立体構造を利用することができる。登録件数のうち12〜13 %の構造が日本から登録された構造である。また、登録されているデータの80 %がX線結晶構造解析によって解かれた構造である。登録されたデータにはデカルト座標(Å単位)でのタンパク質の原子の位置が記述されており、これを利用して統計解析や分子シミュレーションを行うことができる。またアミノ酸配列のデータも同時に利用可能であり、相同性によるタンパク質の分類や、立体構造や配列情報もしくは

その両方を用いた立体構造分類など様々な用途に利用されている。

タンパク質の構造データベースの他にもケンブリッジ結晶構造データベース[20]がある。このデータベースでは、低分子の結晶構造データを登録もしくは利用することができる。創薬初期段階での標的化合物のスクリーニングのデータセットにも利用される[21]。

1.2 研究目的

本研究の目的は2つある。ヘムの構造の歪み・軸配位子の配向や結合長が、機能と関わりの深い酸化還元電位と電子構造に与える影響を明らかにする事である。そして、ヘムタンパク質の機能はどこから生じるのかをヘムの構造の観点から知見を得る事である。これらの知見は、ヘムという共通の分子が様々な機能を発現するための一般的な法則を見つけるための基盤となる可能性がある。さらに、ヘムタンパク質の機能をデザインする上でも有用な知見になると考えられる。

1.3 研究手法

本研究は構造データベースの統計調査と量子化学計算を用いてヘムの歪みと機能の関係の解明を行なった。構造データベースの統計解析では、主成分解析[22–25]を用いた。主成分解析により、ヘムの構造歪みを特徴付ける軸を抽出した。さらに、ヘムの軸配位子の統計を行なった。これらの統計解析に基づいてモデルを作成し、量子化学計算を行うことで、構造歪みが酸化還元電位や電子構造、酸素親和性との関係性を調べた。

第２章 量子化学計算

この章では、量子化学計算の基礎と振動解析の基礎についての概要を述べた。

2.1 シュレディンガー方程式

シュレディンガー方程式は、原子や分子のような極微の世界における基礎方程式である。この方程式を定量的に正確に解くのは現実的には不可能である。このシュレディンガー方程式は以下のように表されることが多い。

$$\boldsymbol{\mathcal{H}}|\boldsymbol{\phi}\rangle = \boldsymbol{\mathcal{E}}|\boldsymbol{\phi}\rangle \quad (1)$$

ここで$\mathcal{H}$は核と電子からなる系のハミルトニアン演算子である。ハミルトニアンを詳しく書くと、

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

となる。ここでは、原子単位で書かれている。この単位系では、電子の電荷の絶対値(e) = 1、電子の質量(m) = 1、$\hbar = \frac{h}{2\pi} = 1$(hはプランク定数)になっている。ハミルトニアンの第１項と第2項はそれぞれ、電子の運動エネルギーと核の運動エネルギーに対応する演算子である。第３項以降はポテンシャル項で、第3項は核と電子の間のクーロン引力、第4と第5項はそれぞれ、電子間、核間の斥力を表している。M_Aは核の質量と電子の質量の比であり、Z_Aは核Aの原子番号である。∇_i^2と∇_A^2はそれぞれ、電子の位置と核の位置に関する微分演算子で

ある。また、i番目の電子とA番目の核との距離は$r_{iA} = |\boldsymbol{r}_{iA}| = |\boldsymbol{r}_i - \boldsymbol{R}_A|$で与えられ、$i$番目の電子と$j$番目の電子の距離と、A番目の核とB番目の核の距離もそれぞれ、$r_{ij} = |\boldsymbol{r}_{ij}| = |\boldsymbol{r}_i - \boldsymbol{r}_j|$と$R_{AB} = |\boldsymbol{R}_{AB}| = |\boldsymbol{R}_A - \boldsymbol{R}_B|$である。

2.2 ボルン・オッペンハイマー近似

2.1式を解くための基本的な近似はBorn-Oppenheimer近似と呼ばれており、以下に説明する手順を取ることで、核の運動と電子の運動を完全に切り離して考えることで、方程式の厳密解を求めようという考えである。

原子核の質量は電子の質量に比べてはるかに大きいので、分子中の電子は固定された核の場の中を運動していると考える。そこで、次のような電子ハミルトニアンを考える。

$$\mathcal{H}_{elec} = -\sum_{i=1}^{N}\frac{1}{2}\nabla_i^2 - \sum_{i=1}^{M}\frac{Z_A}{r_{iA}} + \sum_{i=1}^{N}\sum_{j>i}^{N}\frac{1}{r_{ij}} \quad (3)$$

電子ハミルトニアンに対するシュレディンガー方程式

$$\boldsymbol{\mathcal{H}}_{elec}\boldsymbol{\Phi}_{elec} = \mathcal{E}_{elec}\boldsymbol{\Phi}_{elec} \quad (4)$$

の解は、電子波動関数と電子エネルギーを与える。

$$\Phi_{elec} = \Phi_{elec}(\{\boldsymbol{r}_i\};\{\boldsymbol{R}_A\}) \quad (5)$$

$$\mathcal{E}_{elec} = \mathcal{E}_{elec}(\{\boldsymbol{R}_A\}) \quad (6)$$

電子波動関数は、電子の位置に依存し、核の位置をパラメータとして含んでいる。また電子エネルギーも核の位置をパラメータとして含んでいる。つまり、固定した核の位置を与える1組の$\{R_1, R_2 \cdots R_M\}$に対して、1組の$\{\Phi_{elec}, \mathcal{E}_{elec}\}$が決まる。全エネルギーは定数である核

間反発エネルギーを$\mathcal{E}_{elec}$に加えることで得られるので、

$$\mathcal{E}_{total} = \mathcal{E}_{elec} + \sum_{A=1}^{M}\sum_{B>A}^{M}\frac{Z_A Z_B}{R_{AB}} \qquad (7)$$

となる。

次に、電子は核に比べてずっと速く動くので、2.1-1式に示した電子の座標を電子波動関数で平均した平均値で置き換えるという近似を導入する。それにより、電子による平均場の中で核が運動していると考えることができる。この場合、核の運動に対するハミルトニアンは、

$$\mathcal{H}_{nucl} = -\sum_{A=1}^{M}\frac{1}{2M_A}\nabla_A^2 + \langle -\sum_{i=1}^{N}\frac{1}{2}\nabla_i^2 - \sum_{i=1}^{M}\frac{Z_A}{r_{iA}} + \sum_{i=1}^{N}\sum_{j>i}^{N}\frac{1}{r_{ij}}\rangle + \sum_{A=1}^{M}\sum_{B>A}^{M}\frac{Z_A Z_B}{R_{AB}}$$

$$= -\sum_{A=1}^{M}\frac{1}{2M_A}\nabla_A^2 + \mathcal{E}_{elec}(\{\boldsymbol{R}_A\}) + \sum_{A=1}^{M}\sum_{B>A}^{M}\frac{Z_A Z_B}{R_{AB}}$$

$$= -\sum_{A=1}^{M}\frac{1}{2M_A}\nabla_A^2 + \mathcal{E}_{total}(\{\boldsymbol{R}_A\}) \qquad (8)$$

この式から分かるように、$\mathcal{E}_{total}(\{\boldsymbol{R}_A\})$は、核の運動に対するポテンシャルになっている。したがって、ボルン-オッペンハイマー近似のもとでは、核は電子の問題を解いて得られたポテンシャルエネルギー曲面の上を運動する。核のシュレディンガー方程式

$$\boldsymbol{\mathcal{H}}_{nucl}\boldsymbol{\Phi}_{nucl} = \mathcal{E}\boldsymbol{\Phi}_{nucl} \qquad (9)$$

に対する解は、分子の振動、回転、並進を記述する。

ここからは、振動と回転の問題を考えずに、電子ハミルトニアンと電子波動関数についてだけを考える。なので、今後は “elec”の添え字

を省略する。

電子には上向きと下向きのスピンがある。この2つに対応するスピン関数$\alpha(\omega)$と$\beta(\omega)$を導入する。これらのスピン関数は完全系をつくり、規格直交系である。

したがって、1つの電子は空間座標$\boldsymbol{r}$と1つのスピン座標によって記述される。これをひとまとめにして

$$\mathbf{x} = \{\boldsymbol{r}, \omega\} \qquad (10)$$

と書く。するとN電子波動関数は$\boldsymbol{x}_1, \boldsymbol{x}_2, \dots, \boldsymbol{x}_N$の関数となり、これを$\boldsymbol{\Phi}(\boldsymbol{x}_1, \boldsymbol{x}_2, \dots, \boldsymbol{x}_N)$と書く。

シュレディンガー方程式の解である多電子波動関数には、任意の2つの電子の座標の交換に対して反対称でなければならないという厳格な制約が課せられている。

$$\boldsymbol{\Phi}\left(\boldsymbol{x}_1, \boldsymbol{x}_2, \dots, \boldsymbol{x}_i, \dots, \boldsymbol{x}_j, \dots \boldsymbol{x}_N\right)$$

$$= -\boldsymbol{\Phi}\left(\boldsymbol{x}_1, \boldsymbol{x}_2, \dots, \boldsymbol{x}_j, \dots, \boldsymbol{x}_i, \dots \boldsymbol{x}_N\right) \qquad (11)$$

これを反対称性原理と呼ぶ。

2.3 スレーター行列式

反対称性原理からくる要請はスレーター行列式を使うことで容易に満たすことができる。その準備のために、1電子の波動関数について考える。1電子の波動関数は、規格直交系をなす空間軌道$\psi(\boldsymbol{r})$とスピン関数の組合せで表されるスピン軌道$\chi(\boldsymbol{x})$である。

$$\chi(\boldsymbol{x}) = \begin{cases} \psi(\boldsymbol{r})\omega(\alpha) \\ \psi(\boldsymbol{r})\omega(\beta) \end{cases} \qquad (12)$$

スピン軌道も空間軌道と同じく、規格直交である。

スピン軌道を用いれば、N電子波動関数は

$$\Psi(\boldsymbol{x}_1, \boldsymbol{x}_2, \dots, \boldsymbol{x}_N) = (N!)^{-\frac{1}{2}} \begin{vmatrix} \chi_i(\boldsymbol{x}_1) & \chi_j(\boldsymbol{x}_1) & \cdots & \chi_k(\boldsymbol{x}_1) \\ \chi_i(\boldsymbol{x}_2) & \chi_j(\boldsymbol{x}_2) & \cdots & \chi_k(\boldsymbol{x}_2) \\ \vdots & \vdots & & \vdots \\ \chi_i(\boldsymbol{x}_N) & \chi_j(\boldsymbol{x}_N) & \cdots & \chi_k(\boldsymbol{x}_N) \end{vmatrix} \tag{13}$$

と書くことができる。

1つのスレーター行列式は、N電子の基底状態を記述する最も単純な反対称波動関数である。また、次の節で説明するハートリー・フォック方程式から得られるそれぞれの分子軌道は、1つのスレーター行列式で表される。

2.4 ハートリー・フォック方程式

シュレディンガー方程式を厳密に解くことは、非常に困難である。その原因は、電子間にクーロン相互作用が働き、ある電子が別の電子の状態に影響を与えるからである。これを電子相関と呼ぶ。そこで、N電子系のシュレディンガー方程式を解くために近似を導入する。個々の電子は、他の電子が作る平均的な静電ポテンシャルのもとで運動していると仮定した平均場近似である。これをハートリー・フォック(HF)近似という。そのため、HF法では電子相関を取り込むことができない。

HF近似のもとでは、全電子ハミルトニアンを、1電子ハミルトニアンに他の電子の作る平均的な静電ポテンシャルを取り込んだ1電子演算子の和で表すことができる。

$$\mathcal{H} = \sum_{i=1}^{N}\left\{-\frac{1}{2}\nabla_i^2 - \sum_{A=1}^{M}\frac{Z_A}{r_{iA}} + \nu^{HF}(i)\right\} \qquad (14)$$

$\nu^{HF}(i)$が電子iが感じる、他の電子の作る静電ポテンシャルである。この式の右辺の和の中身

$$\mathrm{f}(i) = -\frac{1}{2}\nabla_i^2 - \sum_{A=1}^{M}\frac{Z_A}{r_{iA}} + \nu^{HF}(i) = h(i) + \nu^{HF}(i) \qquad (15)$$

をフォック演算子と呼んでいる。$\nu^{HF}(i)$はクーロン積分J_{ij}と交換積分K_{ij}と呼ばれる２電子積分を含んでいる。

このフォック演算子を用いて、ハートリー・フォック方程式は

$$\mathrm{f}(i)\chi(x_i) = \varepsilon\chi(x_i) \qquad (16)$$

と書き表される。

フォック演算子中のハートリー・フォックポテンシャル$\nu^{HF}(i)$は他の電子のスピン軌道に依存しており、自身の固有関数を含んでいる。それゆえに、ハートリー・フォック方程式は非線形で、繰り返し法によって解かなければならない。

最初に、適当なスピン軌道の組(分子軌道)を仮定してハートリー・フォック方程式を解き、分子軌道とハートリー・フォックポテンシャルが変化しなくなるまで解く(自己無撞着になるまで解く)。

2.5 密度汎関数法

密度汎関数法(DFT)は、基底状態のエネルギーが電子密度の汎関数として記述できることと、あらゆる電子密度について、常にエネルギ

一変分原理が成り立つ、というホーヘンベルグ・コーンの定理に基づいてシュレディンガー方程式を解くことである。この定理により、多電子系の電子状態計算を精度よく高速化することを目的としている。

ホーヘンベルグ・コーンの定理が提案された翌年の1965年、コーンとシャムが共同でコーン・シャム法を開発した。この方法では、電子密度の汎関数である電子間相互作用ポテンシャル(交換相関ポテンシャル)について、変分原理に従って最低エネルギーとそれに対応する分子軌道を求める方法であった。運動エネルギーには電子密度の汎関数を導入することをせず、ハートリー・フォック法と同様の定式を利用している。この単純な変更が密度汎関数法の急速な利用拡大につながった。

DFTではコーン・シャム方程式を用いる。この方程式もハートリー・フォック法と全く同じ手順で導かれているため、結果として、同じ形をした非線形方程式の演算子が現れる。

$$F = h(i) + 2\sum_j^n J_j + V_{XC} \quad (17)$$

ハートリー・フォック演算子との違いは第３項に交換積分に変わって、交換相関ポテンシャルが導入されていることだけである。これは、電子間相互作用を電子密度の汎関数で表していることに対応する。

従ってコーン・シャム方程式は

$$F\phi_i = \varepsilon\phi_i \qquad (18)$$

と書き表すことができる。ϕ_iをコーン・シャム軌道と呼び、ε_iは対応する軌道のエネルギーを表す。この方程式についてもハートリー・フォック法と同じように非線形方程式の解法で解く。

2.6 交換相関汎関数

コーン・シャム方程式の最大の特徴として、電子間相互作用を表すための普遍的な形の汎関数が存在していない。そのため、コーン・シャム方程式の信頼性は、交換相関汎関数に大きく依存する。この、交換相関汎関数には、以下のような種類がある。

- 局所密度近似(LDA)汎関数:電子密度のみで表された汎関数。
- 一般化勾配近似(GGA)汎関数：LDAを密度勾配で補正した汎関数。
- ハイブリッド汎関数：ハートリー・フォック交換積分を一定の割合で混合した汎関数。

交換相関汎関数の開発では、様々な分子の反応や物性を高精度に再現することが重要視されていた。また、パラメータを最小限に抑えた簡単な定式である汎関数であることも物理的意味づけが明確になり、汎関数の物理的解釈が容易になるため好まれて使われている。

LDAに基づく交換汎関数はスレーターにより利用された。スレーターはハートリー・フォック法でもっとも計算時間のかかる2電子積分である交換積分に対する近似としてこれを利用した。彼は、この近似による誤差を補正するために、反経験的パラメータであるαを交換ポテンシャルにかけるXα法を提案した。この方法では電子密度が空間的に一様として扱われていたため、後に電子密度の導関数による補正を施したGGAに基づく汎関数がより定量的な汎関数として登場した。このGGA交換汎関数は現在までに膨大な数が開発されてきた。代表的な交換汎関数として、ベッケ1988 (B88)交換汎関数やパーデュー・ワン1991 (PW91)交換汎関数、パーデュー・バーク・エルンザーホフ (PBE)交換汎関数などがある。B88交換汎関数は、量子化学計算で現在もっとも利用されているGGA交換汎関数である。この交換汎関数に含まれる半経験的パラメータは1つであり、さらに、交換

エネルギーの高い再現性のために非常によく使われる。後に登場するハイブリッド汎関数であるB3LYPにも使われている。

PW91交換汎関数はB88の欠点を補うように変形した汎関数である。それによりB88に比べて複雑な式となっている。

PBE交換汎関数はPW91を簡単にし、パラメータの数は2つである。

次にいくつかの相関汎関数についても簡単に紹介しておく。相関汎関数にはPBE相関汎関数やLYP相関汎関数などがある。これらはいずれも交換汎関数と組み合わせてよく使われる相関汎関数である。特にLYP相関汎関数は分子の物性計算において高精度な相関エネルギーを与えるため、最もよく利用される相関汎関数となっている。

ハイブリッド汎関数は1電子近似モデルに基づいているコーンシャム法を相互作用する場合のエネルギーに近づけるために、B88交換汎関数やLYP相関汎関数をもとに、ハートリー・フォック交換積分を混合した汎関数である。最もよく使われているハイブリッド汎関数はB3LYP汎関数である。この密度汎関数は数十種類の原子や小分子からなるベンチマークセットの物性値を再現するようにパラメータがフィッチングされている。そのためかはわからないが、ヘム分子のような大きな分子の系での物性値の計算には様々な問題が指摘されている。もう1つのよく使われるハイブリッド汎関数にPBE0がある。こちらもPBE交換相関汎関数をもとにハートリー・フォック交換積分を混合している。この汎関数はパラメータが少なく、また物性値の再現性の高さが特徴である。

2.7 基底関数

基底関数とは分子軌道を表現する際に、基底として用いられる関数のことで、基底関数のセットを基底系と呼ぶ。

量子化学計算で一般に使われる基底系は、原子関数の線型結合で表される。多電子原子の場合にはスレーター型の原子軌道(Slater type orbital : STO)が使われることがあるが、この軌道は分子軌道の計算には適していない。そのため実際の分子軌道の計算では、コストを軽減するために、ガウス型軌道が用いられる。ガウス型軌道(Gauss type orbital : GTO)は

$$\exp(-\alpha r^2) \qquad (19)$$

という形で表される。α はガウス関数の動径の広がりを決める。α の値が大きいと関数は広がりが小さくなる。このガウス関数を使う長所は、2個のガウス関数の積が1個のガウス関数で表すことができることである。

$$\exp(-\alpha_m r_m^2)\exp(-\alpha_n r_n^2) = \exp\left(\frac{\alpha_m \alpha_n}{\alpha_m+\alpha_n} r_{mn}^2\right)\exp(-\alpha r_c^2) \qquad (20)$$

ここで、r_{mn}^2は中心mとnの間の距離を表し、r_c は両者mとnの中心を結ぶ線上の点Cからの距離をあらわす。

ガウス関数は多電子からなる分子系で計算コストを低くできる長所があるが、いくつかの欠点がある。STOの方が、GTOに比べて、原子や分子の基底関数としては適切で、少ない項数で、良い結果が得られる。STOを1つのGTOで表すと、非常に大きな誤差を生むので、GTOの線型結合をとり、この欠点を克服し、精度と計算コストを実現している。

各原子に割り当てられる1つのSTOを3つのGTOの線型結合で1つの基底関数を表したSTO-3Gが最小基底系で最も有名である。

$$\varphi^{STO}(\boldsymbol{r}) = \sum_{i=1}^{3} c_i \exp(-\alpha_i r^2) \qquad (21)$$

複数のガウス型軌道の線型結合で基底を表現することを縮約といい、縮約に用いられるガウス型軌道を原子ガウス型軌道という。

しかしながら、最小基底では定量性はほとんど期待できない。そこで、各原子軌道に複数の関数を割り当てることで、拡張した基底系を用いる。1つの原子軌道に割り当てる関数の数によって、2つならばdouble zeta(DZ)基底、3つならばtriple zeta(TZ)基底、4つならばquadruple zeta(QZ)基底という。内殻の電子は化学反応や結合には寄与しないので、価電子の部分について拡張したsplit valence基底が使われる。VDZ(valence double zeta)基底として、3-21G基底や6-31G基底が有名である。VTZとしては、6-311G基底がよく使われる。例えば6-31G基底では、内殻に6個のGTOからなる縮約ガウス型軌道を、価電子部分には3つのGTOからなる縮約ガウス型軌道と1つのGTOを割り当てている。

計算精度を高めるために、VDZ基底をVTZ基底やQTZ基底に変えたとしても、十分な精度は得られない。なぜなら、分子中では電子の分布は球対称にはなっていないからである。GTOの数を増やすだけでは、軌道の基本的な形は変わらず、電子分布の偏りは表現できない。そこで、さらに、分極関数を加えることで、電荷分布の偏りを表現する。例えば、水素原子の1s軌道は球対称だが、他の原子との結合により、結合方向に電荷分布の偏りが生じる。その効果を再現するために、p軌道を混ぜて分極を表現する。一般にs軌道にはp軌道を足し、p軌道にはd軌道を足すことで、分極の効果を表現する。

VDZ基底である6-31G基底に分極関数を加えた基底は6-31G(d)で、非常によく使われる。これは、重原子にd型ガウス型関数を足した基底系である。

2.8 振動解析

一次元の調和振動子の運動方程式は、

$$m\frac{d^2x}{dt^2} = -kx \qquad (22)$$

とかける。mは質点の質量、$-kx$ (k<0)は原点からの距離に比例して、常に原点の向きに作用する力である。この式の両辺に$\frac{dx}{dt}$を掛ける。

$$m\frac{dx}{dt}\frac{d^2x}{dt^2} = -kx\frac{dx}{dt} \qquad (23)$$

すると両辺がtで積分できる形になる。

$$\frac{dx}{dt}\frac{d^2x}{dt^2} = \frac{1}{2}\frac{d}{dt}\left(\frac{dx}{dt}\right)^2 \qquad (24)$$

ここで、

$$x\frac{dx}{dt} = \frac{1}{2}\frac{d}{dt}x^2 \qquad (25)$$

という関係を用いると、

$$\frac{1}{2}m\left(\frac{dx}{dt}\right)^2 + \frac{1}{2}kx^2 = \text{定数} \quad (26)$$

この式の左辺は全て正の数だから、右辺の定数をa (a>0)を用いて$\frac{1}{2}ca^2$とおき、微分方程式を解くと、

$$x = a\cos\left(\sqrt{\frac{k}{m}}t + \alpha\right) \qquad (27)$$

が得られる。式中のaは振幅、αは位相定数である。

次にN個の原子からなる系の場合を考える。N個の原子の座標には、質量の重みをつけた以下のような$3N$個の一般化座標を用いる。

$$q_1 = \sqrt{m_1}x_1\,, q_2 = \sqrt{m_1}y_1, q_3 = \sqrt{m_1}z_1$$

$$q_4 = \sqrt{m_2}x_2\,, q_5 = \sqrt{m_2}y_2, q_6 = \sqrt{m_2}z_2$$

$$\vdots$$

$$q_{3N-2} = \sqrt{m_\mathrm{N}}x_\mathrm{N}\,, q_{3\mathrm{N}-1} = \sqrt{m_\mathrm{N}}y_\mathrm{N}, q_{3\mathrm{N}} = \sqrt{m_\mathrm{N}}z_\mathrm{N} \qquad (28)$$

この荷重質量座標を用いて、運動方程式をたて、一次元の場合からの知見を得て、この運動方程式の解が

$$q_i = a_i \cos(\omega t + \alpha) \qquad (29)$$

の形でかけるとする。つまりN個の質点が同じ振動数で振動する場合の解を求める問題に変換する。このq_iをN個の運動方程式に代入して解けば、振動モードを得ることができる。N=3程度なら、連立方程式を解けば簡単に求めることができるが、ヘム分子のような多数の原子からなる場合には、計算機を利用しなければ解くことは非常に困難である。

次の節でも触れるが、計算機を用いる場合には、エネルギー極小化した構造のポテンシャルエネルギーから得るヘシアン行列を対角化することで振動モードと振動数を得ることができる。

2.9 振動モードと基準座標

ポテンシャルVは$\{q_i\}$の関数だから、以下のようになる。

$$V := V(q_1, q_2, \cdots, q_{3n}) \qquad (30)$$

このVを平衡位置からのずれでテイラー展開すると、

$$V = V_0 + \sum_{i=1}^{3N} \left(\frac{\partial V}{\partial q_i}\right)_0 q_i + \frac{1}{2}\sum_{i,j=1}^{3N} \left(\frac{\partial^2 V}{\partial q_i \partial q_j}\right)_0 q_i q_j + \frac{1}{6}\sum_{i,j,k=1}^{3N} \left(\frac{\partial^3 V}{\partial q_i \partial q_j \partial q_k}\right)_0 q_i q_j q_k + \cdots \qquad (31)$$

ここで、V_0は分子の平衡位置でのポテンシャルである。ここでは

$$V_0 = 0 \ (32)$$

としておく。エネルギー極小化した位置はポテンシャルの極小点だから、

$$\left(\frac{\partial V}{\partial q_i}\right)_0 = 0 \qquad (33)$$

となるので、最初の２項は消える第4項以降は3次以上の微小量を含むので0とみなす。するとポテンシャルVは

$$V = \frac{1}{2}\sum_{i,j=1}^{3N} \left(\frac{\partial^2 V}{\partial q_i \partial q_j}\right)_0 q_i q_j \ (34)$$

となる。つまり、平衡位置からのずれが非常に小さい場合、ポテンシャルは調和振動子近似で表される。

$$(\boldsymbol{B})_{ij} = \left(\frac{\partial^2 V}{\partial q_i \partial q_j}\right)_0 = \left(\frac{\partial^2 V}{\partial q_j \partial \mathrm{q}_i}\right)_0 = (\boldsymbol{B})_{ji} \qquad (35)$$

とすれば、

$$\mathrm{V} = \frac{1}{2}\sum_{i,j=1}^{3N} q_i(\boldsymbol{B})_{ij}q_j \qquad (36)$$

のような、2次形式で表される。行列の形式で書けば、

$$\mathrm{V} = \frac{1}{2}\boldsymbol{q}^T\boldsymbol{B}\boldsymbol{q} \qquad (37)$$

となる。この$\boldsymbol{B}$は対称行列なので直交行列により対角化することができる。この固有値問題

$$\mathbf{B}\boldsymbol{u}_i = \lambda_i\boldsymbol{u}_i \qquad (38)$$

を解くことで、固有値$\{\lambda_i\}$と固有ベクトル$\{u_i\}$が求まれば、目的の直交行列$\boldsymbol{U}$が得られる。この$\boldsymbol{U}$を用いて、

$$\mathbf{Q} = \boldsymbol{U}^{-1}\boldsymbol{q} \qquad (39)$$

$\boldsymbol{q}$に作用させて新しい座標$\boldsymbol{Q}$に変換すると、これが基準座標$\{Q_i\}$である。この新しい座標$\boldsymbol{Q}$を用いて、ポテンシャルVを書き直せば、

$$\mathrm{V} = \frac{1}{2}\boldsymbol{Q}^T\boldsymbol{\Lambda}\boldsymbol{Q} = \frac{1}{2}\sum_{i=1}^{3N}\lambda_i\,(\boldsymbol{Q})_i^2 \qquad (40)$$

したがって、全系のポテンシャルが$3N$個の独立した結合のない振動子の集まりとして書くことができる。

この場合、$\boldsymbol{B}$は荷重座標系でのヘシアン行列になっており、その結果得られる固有値と、固有ベクトルはそれぞれ波数と各原子の振幅の比(振動モード)に対応している。このことから、振動モードから作られる直交行列$\boldsymbol{U}$を一般化座標$\{q_i\}$作用させて作った基準座標$\{Q_i\}$でポテンシャルVを書き直せば、連成振動が解けた振動子の集まりとし

て扱うことができる。ヘシアン行列の対角化には計算機を用いる。

2.10 分子の対称性

ある操作の前後で分子の様子が全く同じになるような操作のことを対称操作という。水分子には、2回回転軸があり、その軸周りに2度回転させると操作の前後で分子の様子は全く同じである。さらに2つの鏡面があり、この面に対して鏡映をとっても、空間的な配置は同一である。また、当然のことながら、何もしないという操作もあると考えれば、もちろん操作の前後での空間的な配置は変わらない。以上のことから、水分子には4つの対称操作が存在し、これをC_{2v}と表す。

ヘムの鉄ポルフィリン骨格も水分子同様、見た目から対称性があることは明らかであるが、その対称操作はかなり複雑である。鉄ポルフィリン骨格はD_{4h}対称のグループに属しており、16個の対称操作の集合(群)になっている。C_{2v}やD_{4h}などは対称操作がつくる群の名前で点群(point group)と呼ばれており、分子の対称性はこれらの点群で表すことが一般的である。

群の要素(元という)である対称操作にはそれぞれ対応する変換行列が存在する。従って、群を行列で表現することができる。

点群の性質は既約表現の指標で表されることがわかっている。既約表現とは、群の基底をなす互いに独立な変換行列の組み合わせのことである。指標とは、変換行列の対角要素の和(trace)のことである。ある対称群の既約表現と指標をまとめた表をを指標表と呼ぶ。

対称性を仮定して量子化学計算を行えば、得られる分子軌道や振動モードは、その分子の属する対称群のいずれかの既約表現に属している。

2.11 酸化還元電位

正確な酸化還元電位を計算科学的に求めることは、標準水素電極や溶媒効果、タンパク質環境のような電荷を持つ系の処理などの諸問題により非常に困難である[26,27]。

一般に、酸化還元電位E_{redox}はネルンストの法則から

$$E_{redox} = \frac{\Delta G_{redox}}{nF} - E_{SHE} \quad (41)$$

と計算することができる。ここで、Fはファラデー定数、nは酸化還元反応に関わる電子の数、ΔG_{redox}は酸化還元反応のギブスの自由エネルギー、E_{SHE} (= 4.43 eV)は標準水素電極電位を表す[28]。 ΔG_{redox}は、

$$\Delta G_{redox} = G_{solv}(ox) - G_{solv}(red)$$

$$= \{E_{solv}(ox) + \Delta G_{solv}(ox)\} - \{E_{solv}(red) + \Delta G_{solv}(red)\} \quad (42)$$

となる。ここで、

$$\Delta G_{solv}(ox) \approx \Delta G_{solv}(red) \quad (43)$$

という近似を導入すれば、

$$\Delta G_{redox} = E_{solv}(ox) - E_{solv}(red) = E_{IP} \quad (44)$$

E_{IP}は垂直イオン化ポテンシャルを表す。ファラデー定数($kcal \cdot mol^{-1} \cdot V^{-1}$)の値は23.06で、1 eV = 23.06 kcal mol^{-1}に等しいので、

$$E_{IP}\ (in\ kcal \cdot mol^{-1}) = FE_{IP}\ (E_{IP}\ in\ eV)\ (2.46)$$

と書き換える。すると、2.11-1式は、

$$E_{redox} = E_{IP} - E_{SHE} \ (E_{IP} \ in \ eV) \quad (45)$$

となる[26]。

本研究では、真空中での垂直イオン化ポテンシャルを用いて、酸化還元電位を計算した。PCM(連続分極体モデル)により溶媒効果を取り込んだテスト計算においても、真空中の計算と傾向は変わらないことを確かめた。

３章 統計解析

3.1 主成分分析

主成分分析とは教師無し学習に分類される。この手法は与えられたデータセットの次元を削減することで、データを扱いやすい形にすることが目的である。データセットに含まれる個々のデータはそれぞれ複数の特徴量(デカルト座標や、距離が使われることが多い)を持っており、多次元空間のある１点で表される。主成分解析ではこの多次元の空間にあるデータ点の分散が最大となる方向(第一主成分)を見つけ出し、その軸に射影する事で次元を削減する方法である。それ以降の主成分は、それまでの主成分と直交する方向で分散を最大化する方向となるつまり、第一主成分では説明しきれなかった部分の分散を説明することになる。多くの場合1～3個の主成分でデータセットの大半の情報を表すことができる。つまり、これらの軸はデータセットの分布の特徴をよく表す軸と言える。

主成分とは、分散共分散行列から計算されるベクトルである。

データセットがs個のデータからなり、それぞれのデータに含まれる特徴量がv個の場合データセットの持つ情報は$s \times v$次元を持つ行列$\boldsymbol{D}$で表される。この$\boldsymbol{D}$の成分は、特徴量qを成分とするベクトル$\boldsymbol{q}_i^T = (q_{i1}, q_{i2}, \cdots, q_{iv})\ (i = 1, \cdots, s)$を用いて、

$$\boldsymbol{D} = (\boldsymbol{q}_1, \boldsymbol{q}_2, \cdots, \boldsymbol{q}_s) \qquad (46)$$

で表される。ただし上付きのTは行列の転置を表す。ここで、データの特徴量は、既に平均値や参照値が引かれているとする。つまり、この$\boldsymbol{D}$は平均がゼロであるデータセットと考えて良いので、この$\boldsymbol{D}$を用いて、分散共分散行列$\boldsymbol{Z}$は次式で与えられる。

$$\boldsymbol{Z} = \boldsymbol{D}^T \boldsymbol{D} \qquad (47)$$

永年方程式$|\boldsymbol{Z} - \lambda \boldsymbol{I}| = \boldsymbol{0}$を解くか対角化することによって$\boldsymbol{Z}$の固有ベクトル$\boldsymbol{w}$を求めれば、それが主成分の係数となる。$\boldsymbol{Z}$は対称行列($\boldsymbol{Z}=\boldsymbol{Z}^{\mathrm{T}}$)なので得られる固有ベクトルは、互いに直交しており、第1主成分は最大固有値に、第2主成分は2番目に大きな固有値にそれぞれ対応する。この$\boldsymbol{w}$はデータセットと同じ空間上で新たな基底系を成している。このとき得られるi番目の主成分λ_iは、データの全分散のうち$\lambda_i / \sum \lambda$を説明する。これを寄与率と呼ぶ。また、第一主成分から第i番目までの寄与率の和を累積寄与率と呼ぶ。

主成分解析は多くのプログラミング言語でライブラリーの一部として提供されている。本研究ではpythonの機械学習ライブラリーであるscikit-learn[29]の主成分解析用のモジュールを用いた。

第４章 ヘム分子の構造歪みの解析手法

4.1 ヘムの構造歪みの定義

ヘムの構造の歪みは2種類に分けることができる。1つは平面からのずれ(z方向とする)で表される面外の歪みである。もう一方は、ポルフィリン面(xy平面とする)での参照構造からのずれで定義される面内の歪みである。本研究では参照構造には量子化学計算により構造最適化した鉄ポルフィリンのデカルト座標を用いている。これを$\boldsymbol{S}_{ref}$と定義する。また、結晶構造を$\boldsymbol{S}_{obs}$と定義する。これらの構造はあらかじめ、適当なプログラムを利用するなどして、重ね合わせを行なった座標を用いる。結晶構造でのヘムの構造歪みを$\boldsymbol{D}_{obs}$とすると、

$$\boldsymbol{D}_{obs} = \boldsymbol{S}_{obs} - \boldsymbol{S}_{ref} = \begin{pmatrix} \Delta x_1 \\ \Delta y_1 \\ \Delta z_1 \\ \vdots \\ \Delta z_N \end{pmatrix} \qquad (48)$$

で表される。Jentzenらによって、この$\boldsymbol{D}_{obs}$を基準座標の和で分解する手法が考案された[5]。その手法については、次の節で紹介する。

4.2 Normal-coordinate Structural Decomposition (NSD)

(48)式で定義されるヘムの構造歪みを基準座標の和で分解する手法である。ここでの基準座標とは、式(39)で表されるように、ある座標に表現行列の逆行列をかけて得られる座標になっている。この表現行列は、振動モードを用いて作ることによって、連成振動が解きほぐされたハミルトニアンを得ることが出来る。normal-coordinate structural decompositon法[5,30]では、振動モードではなく、変位ベクトルを基準座標に用いる。この変位ベクトルの組からなる行列$\boldsymbol{D}$は、次

の式で得られる。

$$\boldsymbol{D} = \boldsymbol{M}^{-1/2}\boldsymbol{Q} \qquad (49)$$

ここでの$\boldsymbol{Q}$は振動解析の固有ベクトルを成分とする行列である。この式の意味するところは、振動モードの各原子の振幅には原子の質量が考慮されているが、質量の逆平方根をかける事で、各原子の変位を重さでスケーリングし、純粋な変位として扱うためである。こうする事で、$\boldsymbol{D}_{obs}$を分解する際に、全ての原子を等しく扱うことが可能となる。$\boldsymbol{D}$は直交行列だから、$\boldsymbol{D}^{-1} = \boldsymbol{D}^{T}$となるので、一般化座標を基準座標に変換するときと同じく、以下の式を考えることで、各モードに沿った変位の大きさを成分とするベクトル$\boldsymbol{d}$が得られる。

$$\boldsymbol{d} = \boldsymbol{D}^{-1}\boldsymbol{D}_{obs} = \begin{pmatrix} q_1^1 & \cdots & q_{3N}^1 \\ q_1^2 & \ddots & q_{3N}^2 \\ \vdots & & \vdots \\ q_1^{3N-6} & \cdots & q_{3N}^{3N-6} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} \Delta x_1 \\ \Delta y_1 \\ \Delta z_1 \\ \vdots \\ \Delta z_N \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} d_1 \\ d_2 \\ d_3 \\ \vdots \\ d_{3N-6} \end{pmatrix} \qquad (50)$$

この式から得られる、$\boldsymbol{d}$を求めることができれば、ヘムの構造歪みを分解したことになる。ここで、q_m^nはn番目の固有値に対応する固有ベクトルのm番目の成分、$\boldsymbol{d}$はそれぞれの基準座標に分解した先の空間上であるモードに沿った変位に対応するベクトルでそれぞれの成分の単位はÅである。これらの成分dを分類するために、鉄ポルフィリンの属する対称性であるD_{4h}の既約表現を用いる。例えば、鉄ポルフィリンではB_{2u}に属するモードは4つあり、固有値の低い順に、$d_1^{B2u}, d_2^{B2u}, d_3^{B2u}, d_4^{B2u}$のように書く。このNormal-coordinate Structural Decomposition法では、それぞれの既約表現に属するモードのうち、固有値の1番低い振動モードでヘムの構造歪みを分解する。以下の図4.2-1にそれらを示す。

この表にあるモードの名前を用いて、先ほどのd_1^{B2u}は$d^{saddling}$と書く。他のモードに関しても同様に書くこととする。図 4.2-1からそれぞれの対称性に属するモードでもっとも振動数が低いモードは22番目までに存在することがわかる。これらのモードの特徴を図 4.2-1に示した。

本研究では、図 4.2-1に示したモードのうちruffling とsaddlingについてモデルを作成し量子化学計算を行った。この2つのモードに注目したのは、振動解析の結果、寄与率が高いモード、つまり、振幅が大きい低振動モードだからである。実際、Gaussianプログラムの振動解析の場合は、各原子の変位の大きさが1になるように規格化されているが、実際に観測される変位の2乗平均は、以下の式に示すように高温近似の下では振動数の2乗にほぼ逆比例する[31]。

$$\langle Q_k^2 \rangle = \frac{\hbar}{2\omega_k} \coth\left(\frac{\hbar\omega_k}{2k_B T}\right) \approx \frac{k_B T}{2\omega_k^2} \qquad (51)$$

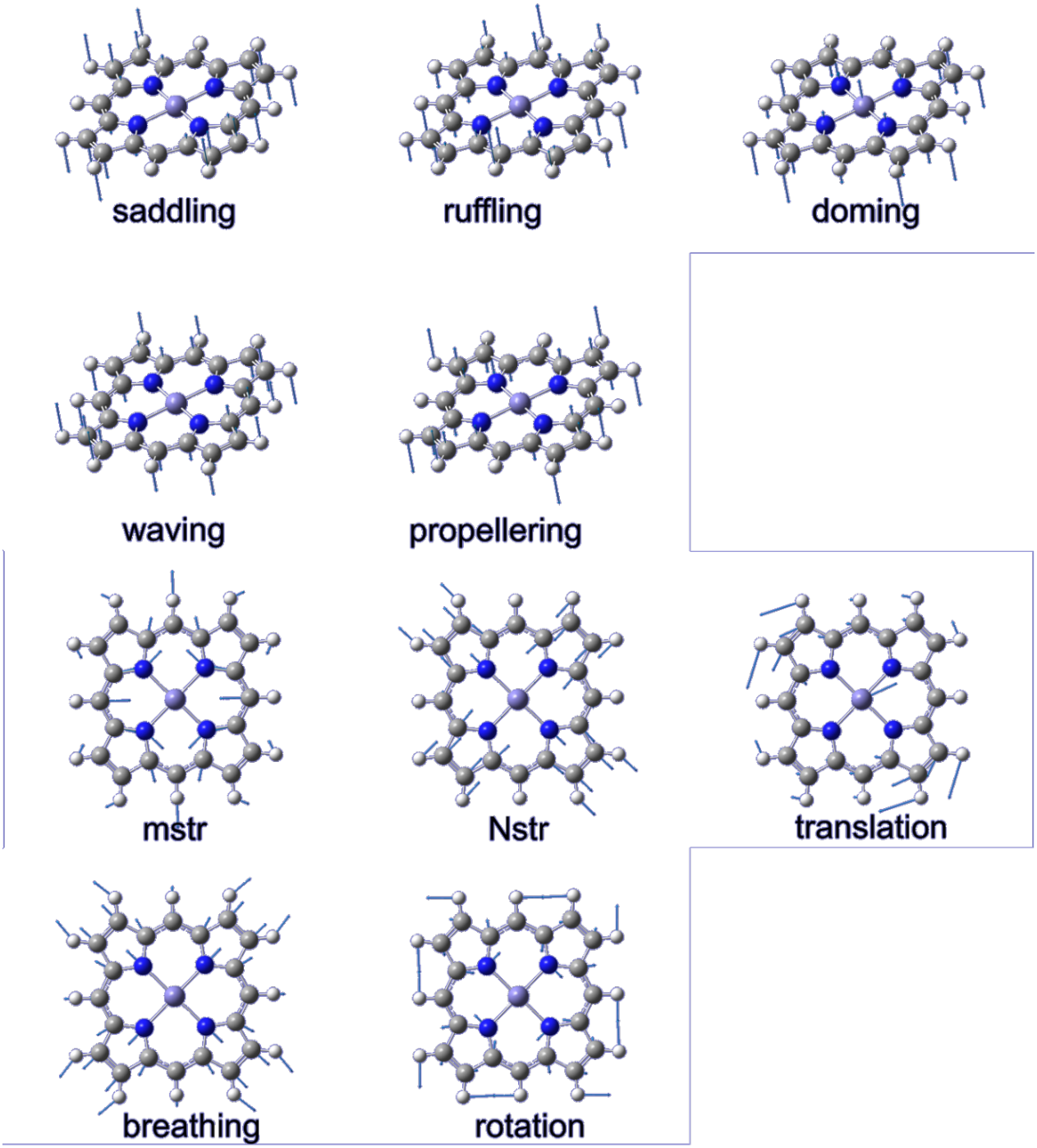

図 4.2-1 D_{4h}対称性を課した鉄ポルフィリンの量子化学計算から得られた代表的な振動モード。上側5個が面外のモード、下側6個が面内のモード。縮退しているモードであるwavingとtranslationは2つのうち1つ取り出してある。

表 4.2-1それぞれの対称性に属する最低振動数のモード

モード番号	モード (対称性)	固有値
1	Saddling (B_{2u})	46
2	Ruffling (B_{1u})	50
3	Doming (A_{2u})	101
4, 5	Waving x, Waving y(E_g)	150
6	m-str (B_{2g})	226
9	N-str (B_{1g})	242
12	Propelelling (A_{1u})	287
13, 14	Translation x, Translation y (E_u)	304
16	Breathing (A_{1g})	372
22	Rotation (A_{2g}))	434

第５章 Protein Data Bank(PDB)データの統計解析

5.1 PDB中のヘムタンパク質のヘム構造の主成分解析

ヘムの構造歪みと機能の関係を調べるために、PDBのヘムタンパク質に対して主成分解析を行った。解析の対象には、2017年11月10日までに登録された分解能が2.0 Å以下のヘムタンパク質中のヘムを用いた。そのデータ数は4971個で、ヘムタンパク質に含まれる全ヘムのうちの47 %に相当する。このヘムの鉄ポルフィリン骨格を構成する25個の原子の座標を用いた。その結果を図 5.1-1に示す。

それぞれの主成分軸の寄与率は、36.2 %と32.5 %であった。PC3の寄与率も計算した結果、10.5 %であった。つまり第2軸まででおよそ構造情報の68.7 %を表しており、第3軸まで含めると79.2 %にもなることから、ヘムの構造歪みはこの3つのモードでおおよそ表すことができると考えて良い

この2軸からなる空間の(0, 0)点はほぼ平面の構造に対応している。PC1とPC2にそれぞれ大きな成分を持つ構造を図 5.1-2に示した。これらは、それぞれの軸と特徴を知る上で目安となる構造である。

次にこの主成分空間上からいくつかの機能を持つタンパク質ファミリーをプロットした図を作成した(図 5.1-3)。この図から、ヘムタンパク質は機能ごとにある程度まとまって存在していることがわかった。これらのクラスター内には様々な生物種に由来するヘムタンパク質が含まれているが、ヘムの構造歪みはある程度保存されていることがわかった。

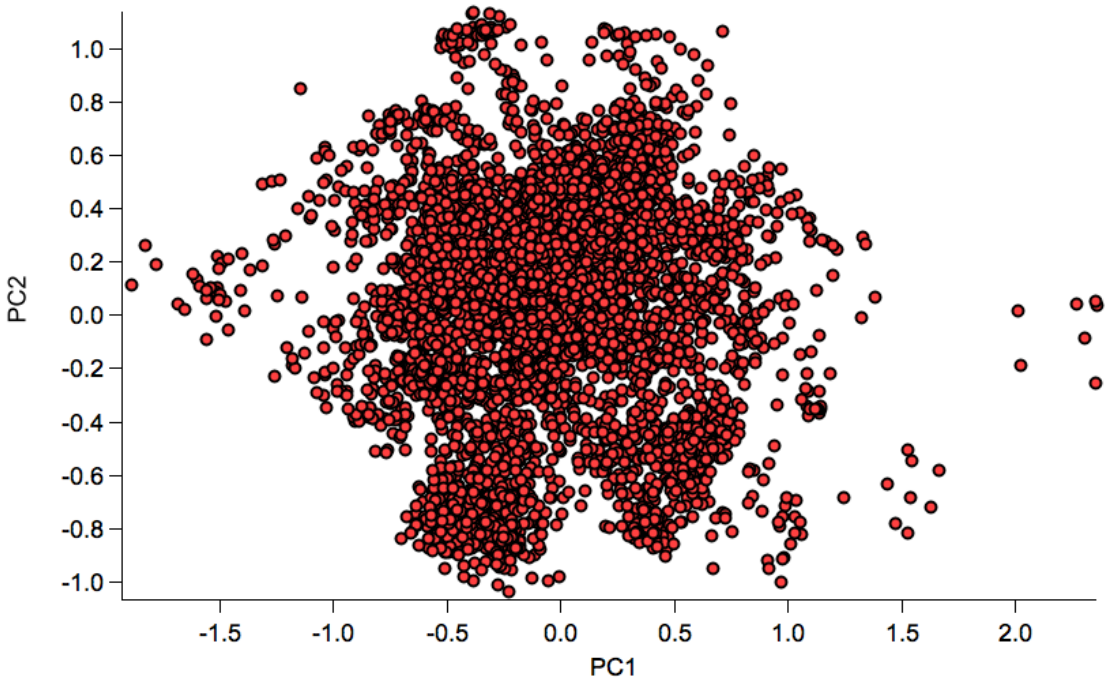

図 5.1-1 分解能2Å以下のヘムの構造を用いて主成分解析を行った結果。1つ1つの赤い点が、1つのヘムの構造に対応している。(PC1,PC2)=(0,0)の点の構造はほぼ平らな構造をしていた。

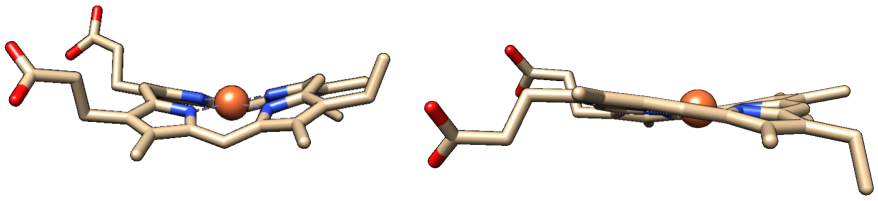

図 5.1-2 主成分空間上でほぼPC1軸上の点(PC1, PC2)=(2.36, 0.04)(左)と、ほぼPC2軸上の点の構造(PC1,PC2)=(0.19, 1.07)(右)。それぞれのPDBIDは3qgp(ヘムオキシゲナーゼIsdI)と2ewi (cytochrome c_3のヘム 4)。

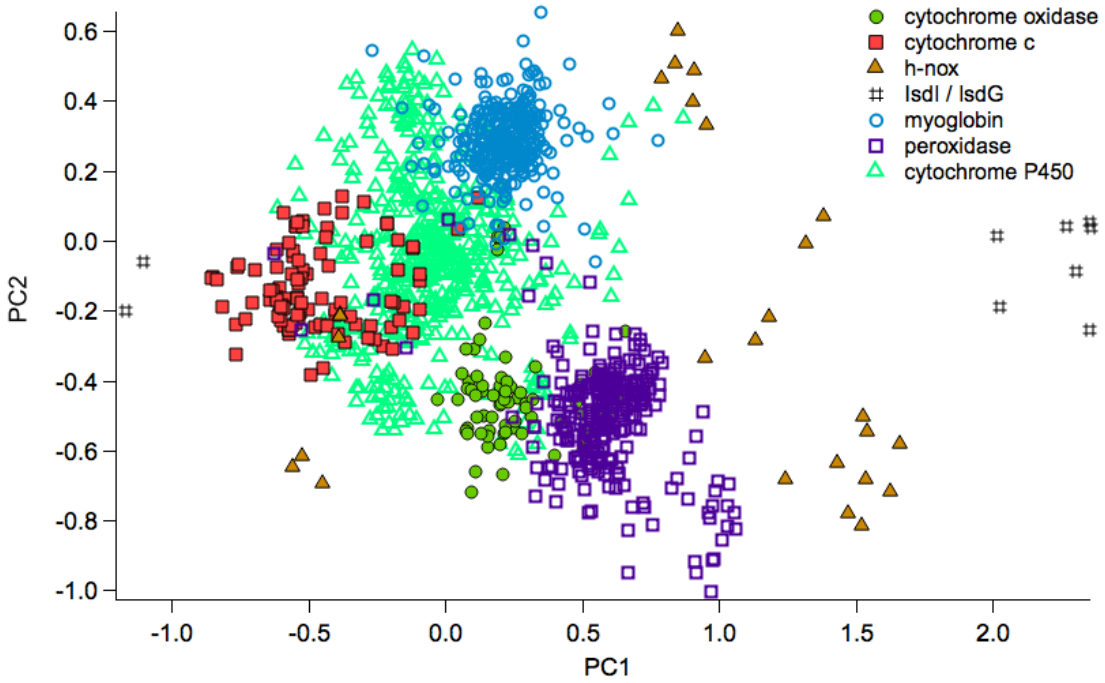

図 5.1-3 主成分解析の図から数種類のタンパク質ファミリーを取り出して表示している。緑丸が cytochrome *c* oxidase、赤四角がcytochrome *c*、茶色三角形はH-NOXドメイン 、井桁マークはIsdI/IsdG、紫四角はperoxidase、緑三角形はcytochrome P450を表す。タンパク質ファミリーごとにクラスターを形成している。

5.2 主成分軸と振動モードの関係

5.1で得られた主成分軸は、最初に与えるデータセットに大きく依存するため、今後のモデル化には不都合である。そこで、主成分軸は振動モードに対応しているのではないかと考え、それらの間の内積を計算することにした。その結果、PC1とruffling、PC2とsaddlingの内積はそれぞれ、0.96と0.87であった。

このことから、PC1はrufflingにPC2はsaddlingに対応していることが明らかとなった。また、PC3についても計算すると、domingとの内積が0.80であった。

主成分解析と振動モードの対応関係から、量子化学計算のためのヘムの構造歪みのモデル化にはruffling とsaddlingを用いることにする。

5.3 軸配位子の統計

ヘムは一般に、ポルフィリン面に対して上下、もしくは一方から軸配位子が配位している。ほとんどの場合、少なくとも一方からは、MetやHisのようなタンパク質部分由来のアミノ酸残基が配位することで、ヘムをタンパク質中に固定している。量子化学計算のためのモデル化のために、本研究では、PDBに存在するヘムタンパク質の軸配位子の統計を行った。その際に問題となるのは、PDBには多くのホモログが含まれており、軸配位子の統計をとるには冗長である。そこで、Blastp[32]というアミノ酸配列の相同性を調べるプログラムを用いて、PDB中のヘムタンパク質をアミノ酸配列の相同性でクラスタリングした。その結果4445 個のエントリーが307 個のクラスターに分類できた。その模式図を図 5.3-1に示した。各クラスター内で軸配位子の頻度を調べ、クラスターごとに規格化し、合計が1となるようにした。そして規格化された各クラスターでの結果を合算し(この時点での合計は307)、割合を計算することで、最終的な結果を得た(図 5.3-1)。図5.3-1からHis/His配位が最多であることが明らかになった。このことから、モデルはHis/His配位で作成した。

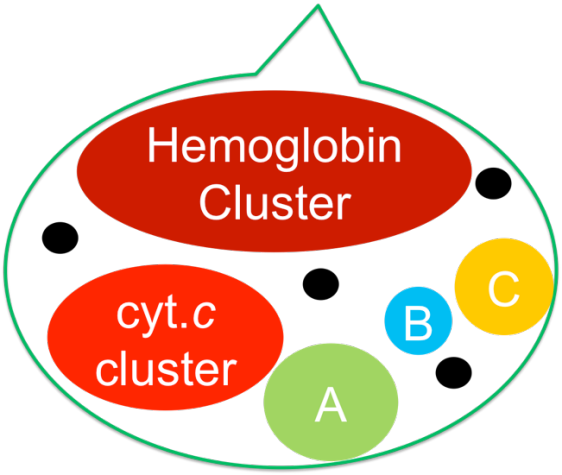

図 5.3-1 タンパク質ファミリーごとのクラスタリングの概念図。A,B,Cや黒い丸も、あるタンパク質のファミリーを表している。これらのクラスター内のタンパク質は、アミノ酸配列の相同性で40%以上一致している。

表 5.3-1 ヘムに配位する軸配位子の統計調査

軸配位子	比率(%)
His/His	23.035
His/*	19.802
His/Met	14.842
His/-	12.917
Cys/*	8.825
Cys/-	8.198
Tyr/-	5.474
Cys/His	1.456
His/Tyr	1.053
Others	4.398
Sum.	100

第６章 ヘムの構造歪みと機能に関する解析

6.1 D_{4h}対称のヘムの量子化学計算

モデルの作成に用いる振動モードを得るために、D_{4h}対称性を持つ鉄ポルフィリンの量子化学計算を行なった。モデルにはヘムの全ての側鎖を水素に置き換えた構造を用いた。密度汎関数にはPBE0[33]を用い、基底関数には、鉄にdef2-TZVPP[34,35]、それ以外の原子にはdef2-SVP[34,35]を用いた。この基底系を用いた場合の基底関数の数は460個だった。6-31G(d)の場合は394個である。鉄を含む系の電子状態計算では、鉄の電子の広がりを表現するため、def2TZVPP基底により、大きな基底系で鉄の原子軌道を展開した。また、その他の原子においても、同じ研究者によって開発されたdef2系の基底系を用いた。

そして、真空中で構造最適化を行なった後、振動解析を行った。なお、鉄ポルフィリンのモデルは低スピンの還元型で計算を行なった。

この計算で得られた振動モードのいくつかを図 4.1-2に示した。また、今後の議論で登場する鉄の3d軌道と相互作用する分子軌道については、図 6.1-1に示した。本来、ポルフィリン環のa_{1u}軌道やb_{2u}軌道は図 6.1-1に示すように鉄の3d軌道とは対称性が異なるため相互作用しない。しかし、振動モードに沿った核の変位により、それらの軌道の相互作用が可能となる。

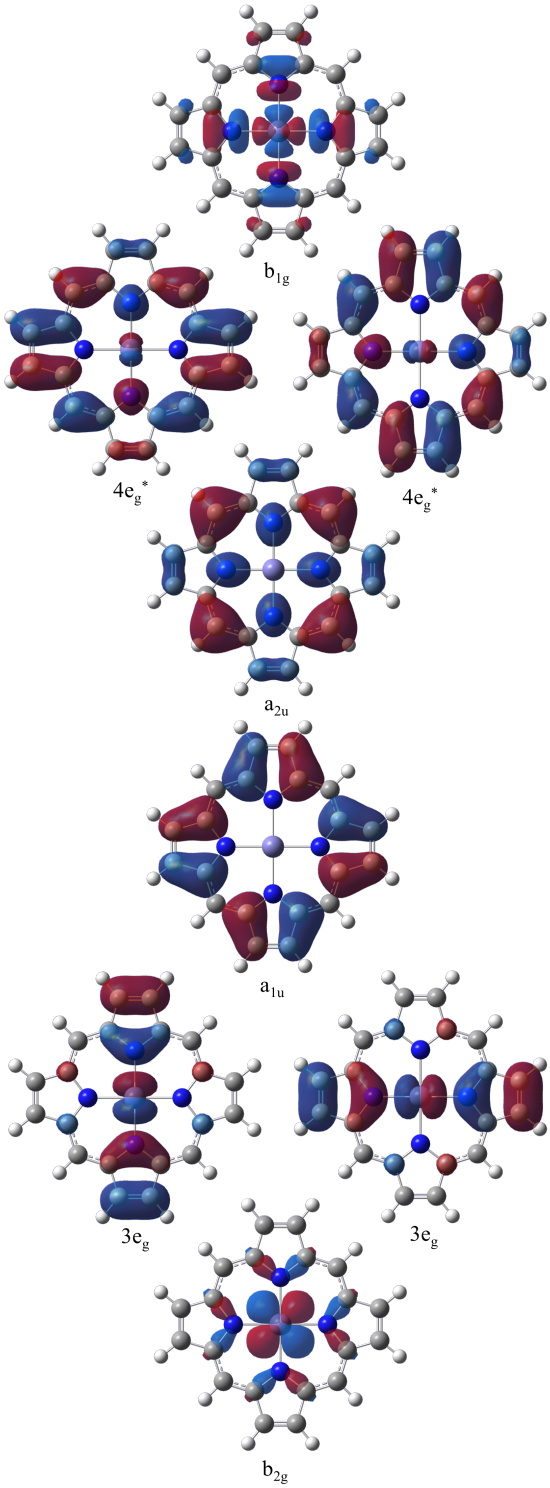

図 6.1-1 D_{4h}対称性を課した鉄ポルフィリンの計算から得られた分子軌道。これらの軌道は鉄の軌道と相互作用することで、ヘムの電子伝達に関わる。

6.2 モデルの作成

ポルフィリンの歪みによって引き起こされる酸化還元電位の変化を調べるために、以下の方法で構造歪みを持つヘムのモデルを作成した。図 6.2-1(A)に示すようにBis-Imidazole配位の鉄ポルフィリンを基本にしてruffling (図 6.2-1(B))とsaddling (図 6.2-1(C))の変位ベクトルを初期構造に足し合わせることよって構造歪みを持つモデルを作成し、歪みと酸化還元電位の関係を系統的に調べた。モデルはx軸とy軸をメソ炭素を横切る方向で定義し、鉄と軸配位子の窒素原子を結ぶ方向をz軸と定義した。

6.1節に示した手続きで計算を行い、得られたruffling(B_{1u})とsaddling(B_{2u})のモードは振動モードのうち最低振動数から2番目までのモードに対応していた。モデルの座標$\boldsymbol{r}$は、デカルト座標系での各原子の位置からなる$3N$次元のベクトルで、ruffling とsaddlingの変位ベクトル$\boldsymbol{D}^{\Gamma}$(Γ=ruffling, saddling)と任意の係数d^{Γ}、完全に平面な初期の座標$\boldsymbol{r}_0$を用いて、以下のように表される。

$$\boldsymbol{r} = \boldsymbol{r}_0 + d^{\Gamma}\boldsymbol{D}^{\Gamma} \quad (52)$$

d^{Γ}の値はruffling、saddlingはそれぞれ0 ~ 3.8 Å、0 ~ 4.1 Åの間で等間隔に変化させ、31個ずつのrufflingを持つ構造とsaddlingを持つ構造を得た。

さらにrufflingとsaddlingを組み合わせた複合歪みモデルの作成も行なった。それには以下の式を用いた。

$$\boldsymbol{r} = \boldsymbol{r}_0 + \sum_{\Gamma} d^{\Gamma}\boldsymbol{D}^{\Gamma} \qquad (53)$$

$d^{ruffling}$と$d^{saddling}$はそれぞれ、-2.8 ~ 2.8 Åと-1.6 ~ 1.6 Åの間で変化させた。rufflingの大きさはPDB、CSDに登録されている構造を共に網羅し

ているが、saddlingの大きさはPDBの構造は網羅しているが、CSDの構造は網羅しておらず、仮に-4.0～4.0 Åの範囲にすれば完全にCSDの構造を含めて網羅することができる。しかしながら、計算コストが跳ね上がるため行っていない。本研究では、247個の複合歪みモデルを作り、ruffling とsaddlingの組み合わせが酸化還元電位に与える影響を調べた。この複合モデルはPDBの100 %、CSDの88 %の構造を含んでいる(図 6.2-2)。

ここまでは、２つの軸配位子のイミダゾール環の作る面が平行の場合のモデル化だったが、ruffling に伴う軸配位子とポルフィリン環との立体障害を考慮して、その立体障害を緩和するために、ruffling の場合についてのみ、90度捻った垂直に配位子が配位している場合の計算も行なった(図 6.4.2-1)。

作成したモデルの水素の構造最適化は半経験的手法であるPM6[36]を用いて行った。

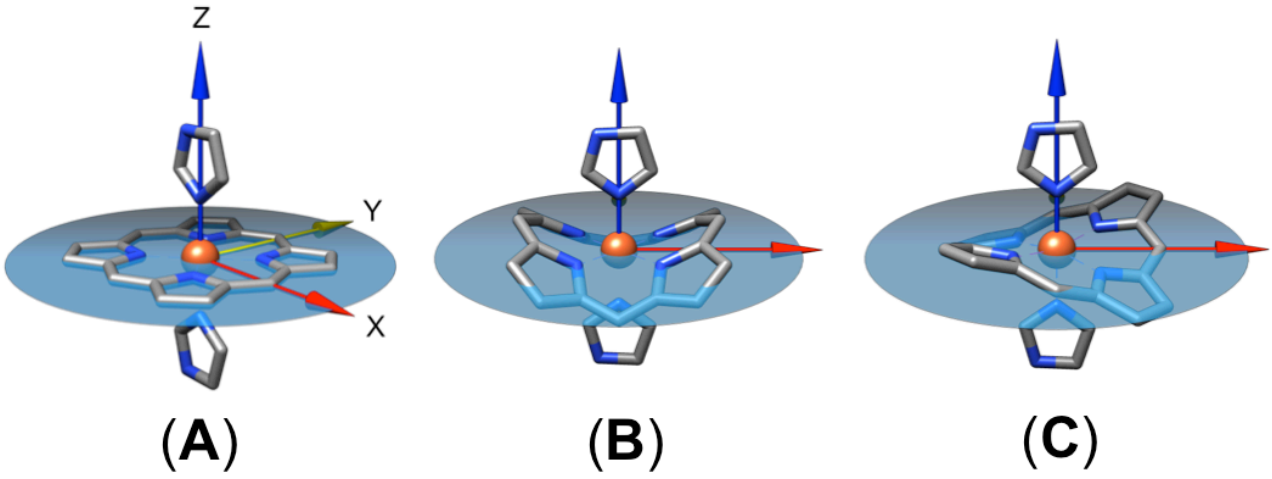

図 6.2-1 初期構造にした鉄ポルフィリンにイミダゾールが配位した構造(A)。ruffing した構造(B)とsaddling した構造(C)。水色の円盤は完全な平面であり、歪みがわかりやすくなるように追加した。赤色と黄色と青色の矢印は軸の方向を表しており、x軸とy軸はそれぞれ鉄と

メソ炭素を結ぶ方向で定義し、z軸は右ねじの進む向きとした。

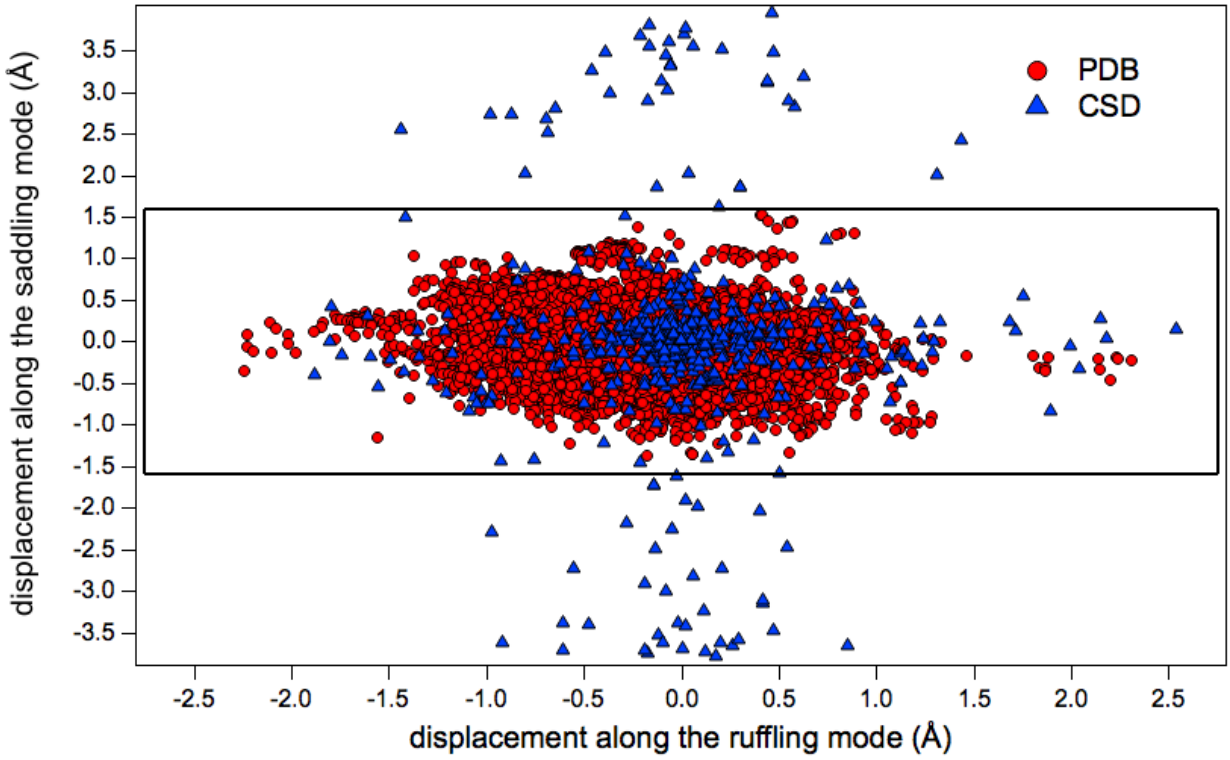

図 6.2-2 ruffling と saddling の displacement で定義される平面に PDB(赤色の丸)と CSD(青色の三角形)から取得した構造をプロットした。図中の黒い枠は本研究で作成したモデルが網羅している範囲を表しており、PDB の構造の 100%、CSD の構造の 88%をカバーしている。

6.3 ヘムの軸配位子の配位長を変化させた計算

ヘムの軸配位子はヘムに対して常に同じ向き、配位長で配位している訳ではない。そこで、本研究では、ヘムの軸配位子に関するパラメータを変えて、6.1.1 と同様に His/His 配位をもとに複数のモデルを作成した。

まず、配位長の長さを変えてモデルを作成を行った。配位長は 0.02 Åごとに 1.90 ~ 2.00 Åの間でそれぞれの軸配位子ごとに変化させ、36 点のモデルを作成した。そして、作成したモデルに対して量子化学計

算を行うことで、酸化還元電位を評価した。

図 6.3-1から、配位長が短ければ短いほど酸化還元電位は下がることがわかる。つまり、配位長が短くなると酸化型に比べて還元型がより不安定になるということである。配位長が酸化還元電位を変化させる原因は、電子の出入りする軌道である鉄のd_{yz}軌道の電子と、軸配位子のHisの非共有電子対との反発による効果で、酸化型と還元型で配位子の窒素の非共有電子対との相互作用が異なるからであると考えらえる。ヘムは一般にd_{yz}軌道(もしくはd_{xz}軌道)から電子が出入りすることで、パートナー分子との電子の受け渡しを行う。つまり酸化型のd_{yz}には電子が入っておらず、窒素の非共有電子対とは反発することはない。とはいえ、全く電子の存在確率がないわけではないので、多少は反発してこの軌道は不安定化する。一方、還元型の場合には、この軌道の電子の存在確率はほぼ1なので、配位子の窒素の非共有電子対のと反発はとても大きいはずである。この効果は配位長が短くなればなるほど顕著な差となる。cytochrome c_3において、ヘム 1は片側のHisの配位長が極端に短く、このことがこのヘムの酸化還元電位が低いことに関係しているかもしれない。

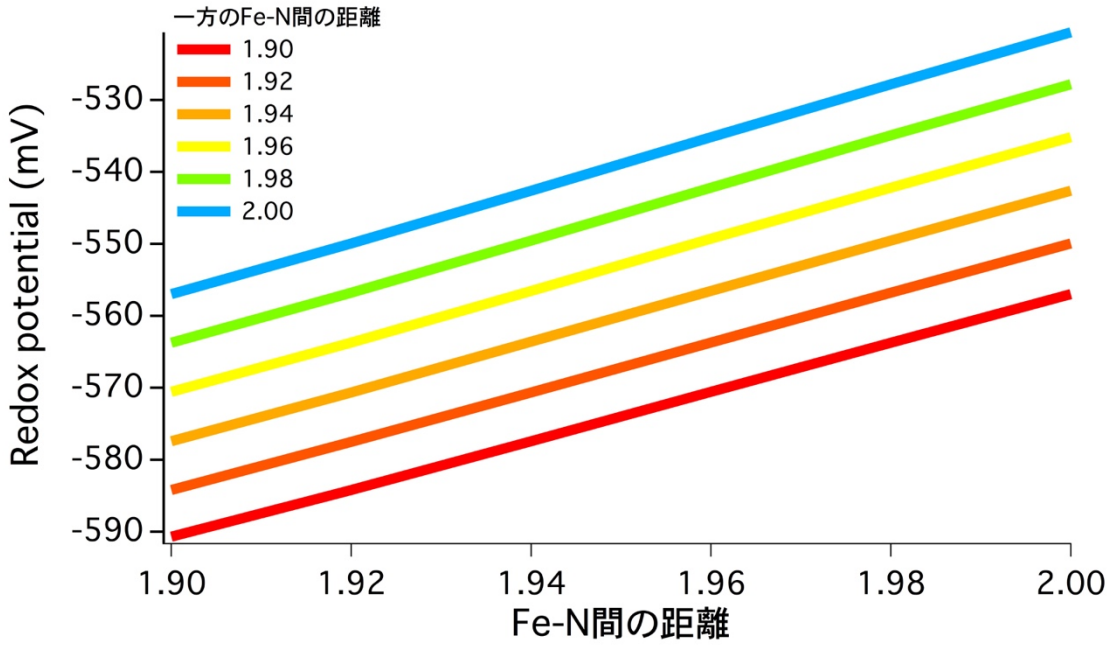

図 6.3-1 Hisの配位長を変えた場合の酸化還元電位。2つあるHisのうち、片側の配位長の違いを色の違いで表している。赤色が1.90で最も短く、青色が2.00で最も長い。また横軸はもう一方のHisの配位長を表している。縦軸はredox potentialを示す。

6.4 酸化還元電位と電子構造に対するruffling の効果

6.4.1 Hisが平行に配位している場合

Ruffling に沿って歪めたモデルの計算によって、ヘムの構造歪みが電子構造や酸化還元電位に与える影響について調べた。図 6.4.1-1からわかるようにruffling は酸化還元電位を433 mVから-63 mVまで減少させることがわかった。酸化還元電位が減少するということは、酸化型より還元型をより不安定にするということであり、平面の場合に比べてヘムが酸化されやすくなっていることを示している(図 6.4.1-2)。また図 6.4.1-1に示してある分子は、CSDに登録されている構造の中で、平面構造から最も大きくrufflingしている構造で、CSDIDで

AROLIDである[14]。saddling方向と、ruffling方向の歪みは0.14 Åと2.55 Åだった。

パートナー分子に移る電子が占める分子軌道と考えられる還元型のHOMOに注目した。HOMOは鉄のd_{yz}軌道とポルフィリン環の$3e_g$軌道との相互作用の結果できる軌道であった。このHOMOの軌道エネルギーが徐々に上がっていることが、軌道エネルギーのプロット（図6.4.1-3）わかった。

次に、酸化型の電子を受け取る軌道を調べるために、スピン密度を調べた図6.4.1-4)。すると、スピン密度が分布する空間と還元型のHOMOの軌道がほぼ同じであることがわかった。そのため、スピン密度が分布する軌道が電子の入る軌道であると考えられる。そこで、酸化型の非占有軌道のβLUMO(β129)とβLUMO+2の軌道(図 6.4.1-5)を見ると、それぞれ、鉄のd_{yz}軌道が関係する分子軌道であった。さらに、これらの2つの分子軌道の和を計算して得られる軌道(図 6.4.1-6)は、スピン密度(図6.4.1-4)と還元型の分子軌道(図 6.4.1-7)と同じであった。このことから、酸化型ではLUMOとLUMO+2の両方の分子軌道が電子の受け取りに関与している軌道であることがわかった。酸化型の空軌道のエネルギーのプロット(図 6.4.1-8)からこの2つの軌道は徐々に安定化していくことがわかる。

さらに、ruffling に沿った歪みが1.7 Å付近で、LUMOの軌道のエネルギーが大きく上昇する点があることがわかった。この場合のLUMOの軌道を調べてみると鉄の軌道はd_{yz}から、d_{xz}に変化していた。スピン密度解析から、d_{xz}軌道は電子の受け取りに関与していないと考えられる。スピン密度解析ではスピン密度が分布する空間軌道は鉄のd_{xy}軌道であった。この軌道を探すと、エネルギー準位的にLUMOより上の軌道を見ると、LUMO+2(β131)がd_{xy}軌道であり、この軌道が電

子を受容する軌道であると考えられる(図 6.4.1-9)。そして、電子配置の変化前までβ129にあったd_{yz}軌道はβ120の占有軌道にあることがわかった。また、それまでβ120にあった占有軌道を確認すると、d_{xy}軌道だった。このことは、鉄の基底状態での電子配置が、$(d_{xz},d_{yz})^3(d_{xy})^2$から$(d_{xz},d_{yz})^4(d_{xy})^1$へと変化したことを示している。一般に酸化型低スピンの鉄の基底状態での電子配置は$(d_{xz},d_{yz})^3(d_{xy})^2$である。それ以降、酸化型で占有軌道と空軌道の間で軌道が入れ替わることはなかった。d_{xy}軌道が大きく不安定化する理由は、ポルフィリンのa_{2u}軌道と鉄のd_{xy}軌道(b_{2g})との相互作用が大きくなったからであると考えられる。異なる対称性に属する軌道で相互作用することがないはずだが、ヘムのruffling により、a_{2u}軌道とb_{2g}軌道である鉄のd_{xy}軌道が相互作用が可能となるからである。鉄のd_{xy}軌道を追跡した観察からも、ruffling が大きくなるにつれて、鉄のd_{xy}軌道にポルフィリンのa_{2u}軌道の成分が徐々に混ざっていくことが確認できた。この空軌道と占有軌道の入れ替わりはメソ炭素の軌道が大きく関係していることは、メソ炭素を窒素に置き換えたポルフィリンの研究から確かめられている。本計算でのスピン密度解析の結果(図 6.4.1-10)から、電子配置の変化以降メソ炭素上のスピン密度が徐々に増加していくことが分かった。このことは、a_{2u}とd_{xy}軌道の相互作用が強くなっていることを示している。また、メソ炭素でのスピン密度の上昇は、ヘムの反応性がメソ炭素で高まることを意味しており、ヘム分解酵素でのヘムのα位のメチン基の開裂に重要な働きをしていると考えられている[14]。このようなメソ炭素のスピン密度の上昇はEPR研究からも観察されている。さらに軸配位子が$(d_{xz},d_{yz})^4(d_{xy})^1$の状態を安定にしていることも明らかになっており、2つのイミダゾール環が配位している場合の実験においても、$(d_{xz},d_{yz})^4(d_{xy})^1$の状態を安定化していることが確かめられている。

これらの軌道に関する考察から、酸化還元電位の変化について考える。軌道の入れ替わりが起きる前の酸化還元電位の減少について考えるために、酸化型の電子を受け取る分子軌道(LUMO, LUMO+2)と還元型の電子を渡す分子軌道(HOMO)の軌道エネルギーのプロットを作成した (図 6.4.1-11)。この場合、酸化型の電位を受け取る軌道のエネルギーを足して2で割った平均軌道エネルギーの値をプロットし、平面でのエネルギーが0になるように合わせた。また、エネルギー変化度合いが分かりやすいように、酸化型のエネルギーを-1倍し、還元型のHOMOの軌道エネルギーと変化の方向を合わせた。このプロットから、電子の抜ける還元型のHOMOの軌道が不安定化し、電子が入る酸化型の軌道は安定化していることがわかった。電子が入る軌道が安定化すると酸化還元電位が上昇する方向に働くが、その安定化度合い以上に、電子が抜ける軌道の不安定化の度合いがより大きいので、結果的には、電子を出しやすくなると考えられる。このことは、定性的には酸化還元電位が減少することと一致する。

次に、酸化還元電位が跳ね上がるところについて考える。酸化還元電位が上昇するということは、電子の授受に関与する軌道のエネルギーが安定化していることが考えられる。酸化型では酸化還元電位の大きな上昇前後で電子を受け取る軌道が変化しており、上昇前は、LUMOとLUMO+2で電子を受け取っていたが、上昇後はLUMO+2が電子を受け取る軌道になっている。エネルギー順位図を見てみると、酸化還元電位の上昇前後で酸化型の電子を受け渡す軌道の安定化がおきている。上昇前のLUMOが上昇後のLUMO+2へと不安定化しており、これだけだと酸化還元電位は減少する方向だが、上昇の前後でLUMO+2は大きく安定化している。そのため、合計して考えると結果的に電子を受け渡す軌道は安定化しており、酸化還元電位は上昇すると考えられる。

それ以降の酸化還元電位の減少について考える。図 6.3.1-8から酸化型のβ131のd_{xy}は徐々に不安定化していることと、還元型のHOMOのd_{yz}軌道も不安定化していることがわかる。酸化型の電子が入る軌道が不安定化するということは、電子が入りにくくなる、また還元型のHOMOが不安定化しているので電子は出やすくなると考えられる。これらのことから、定性的に酸化還元電位が減少することが説明できる。さらに、変化の割合が増していることと酸化還元電位が大きく減少していくことも定性的に一致する。

他の密度汎関数(BP86[37,38], PBE[39], B3LYP[40])を用いて酸化還元電位を計算した場合にも同様の傾向が見られることを確認した(図 6.4.1-12)。B3LYPが最も小さい歪みで、電子配置の変化が起こり、BP86が最も大きな歪みで電子配置の変化が起こっていた。純粋なDFTに比べてハイブリッド DFTでは酸化還元電位が低く、その変化量も大きかった。

これまでの酸化還元電位は真空中での計算で得られた結果だが、連続分極体モデル(Polarizable Continuum Model: PCM) [41–44]で溶媒の効果を取り入れた計算についても行ない、同様の傾向が見られることを確かめた(図 6.4.1-13)。

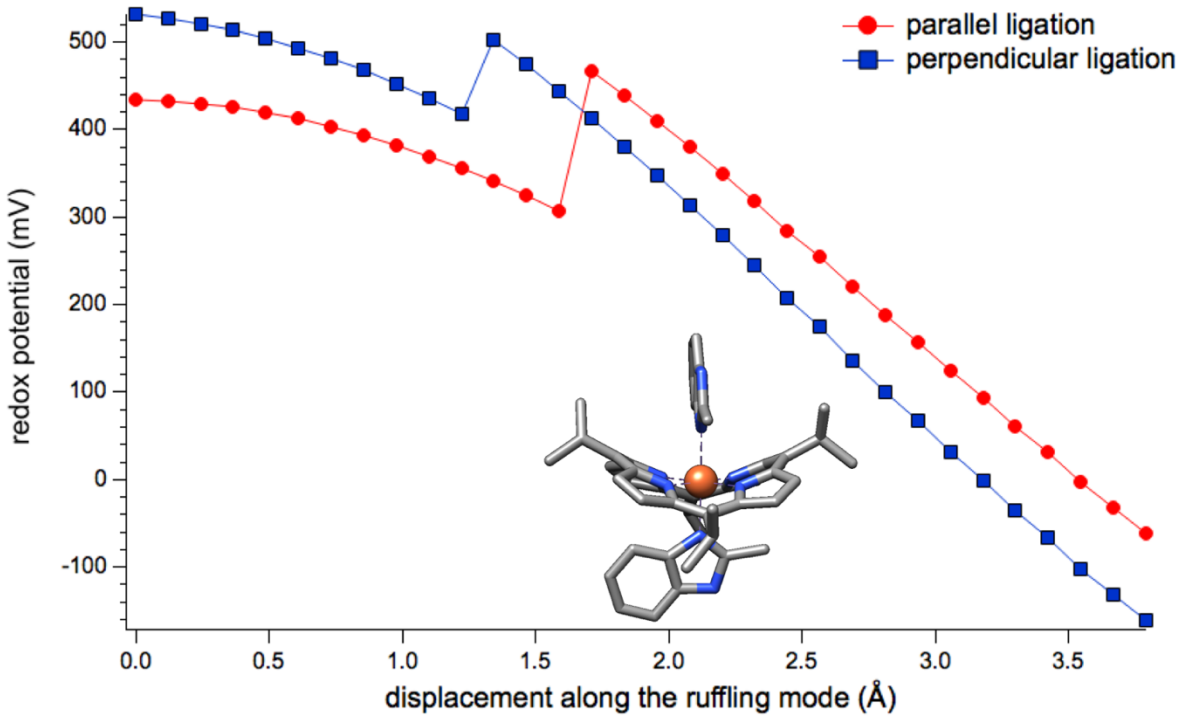

図 6.4.1-1 rufflingに沿った酸化還元電位の変化。赤色はHis/Hisが平行に配位している場合、青色はHis/Hisが垂直に捻れて配位している場合を示す。また、図中の構造はCSDに登録されている構造のうち、最もrufflingが大きい構造(CSDID: AROLID)

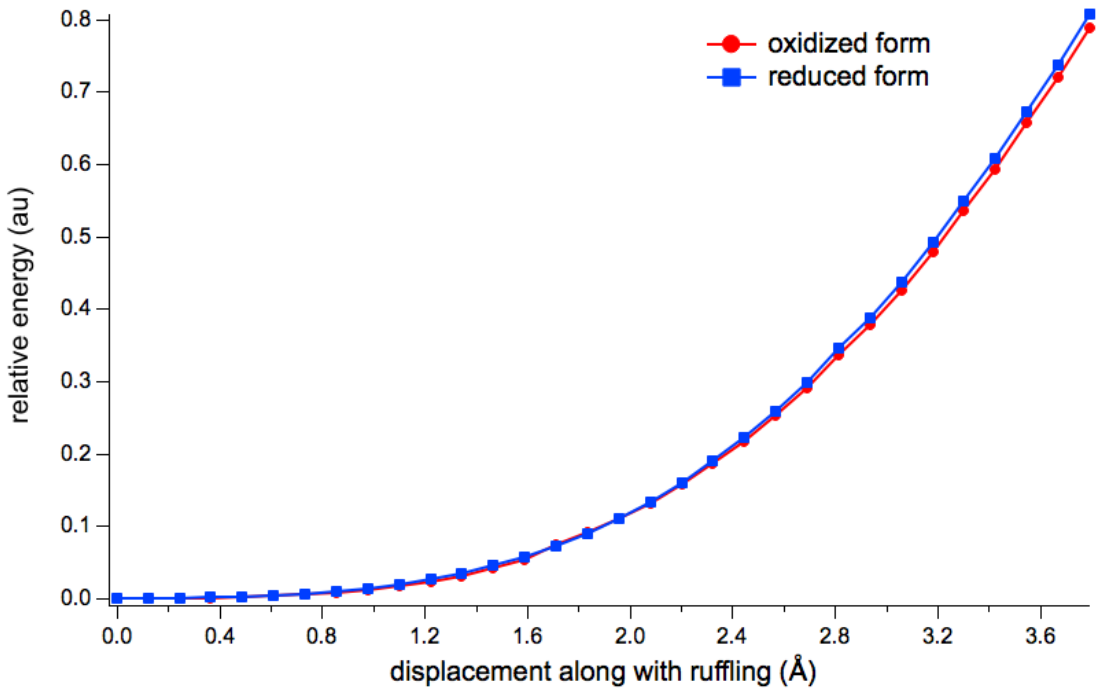

図 6.4.1-2 酸化型と還元型のエネルギーのプロット。赤色が酸化型、青色が還元型のエネルギーに対応している。酸化型還元型ともに完全に平面の場合のエネルギーを0としている。還元型の方が酸化型に比べてruffling によって、より不安定化している。

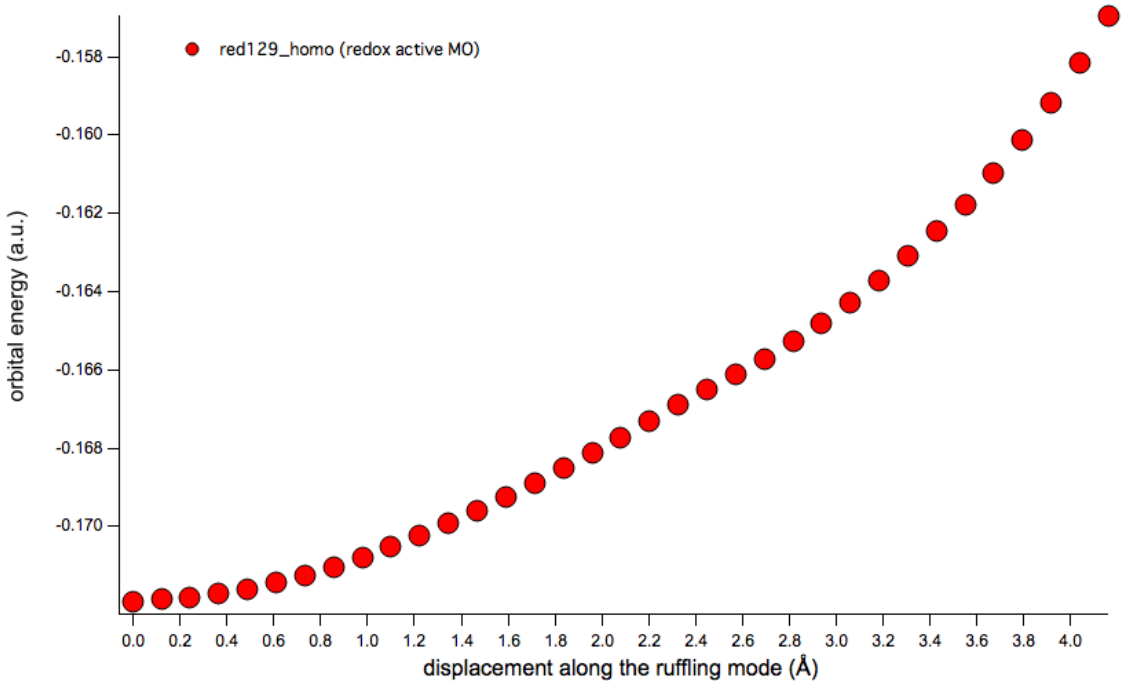

図 6.4.1-3 還元型のHOMOのエネルギー。

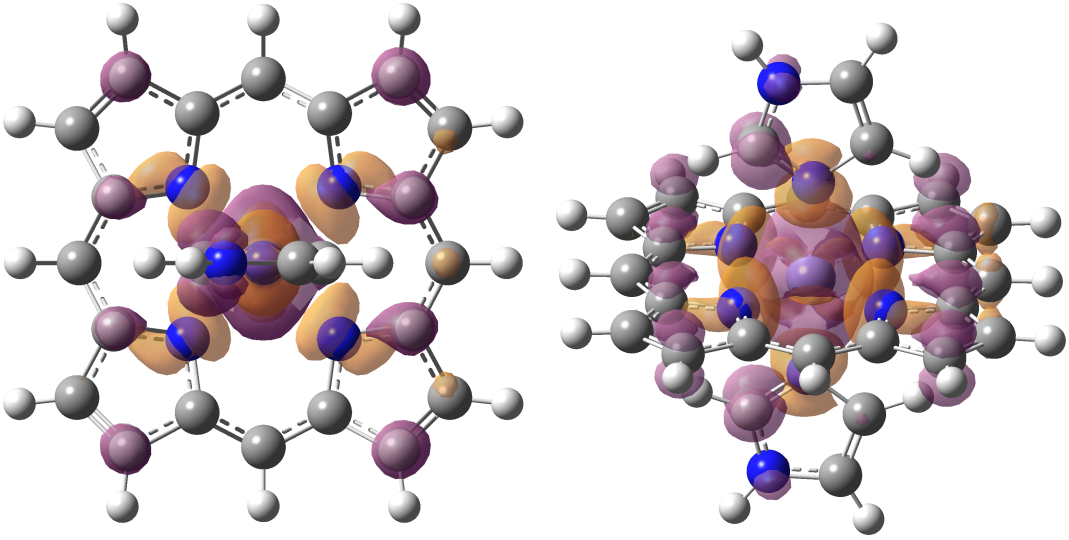

図6.4.1-4 酸化型のモデルのスピン密度。スピン密度はαスピンとβスピンの電子密度の差で定義される。スピン密度に寄与している空間軌道に電子が入ると考えられる。

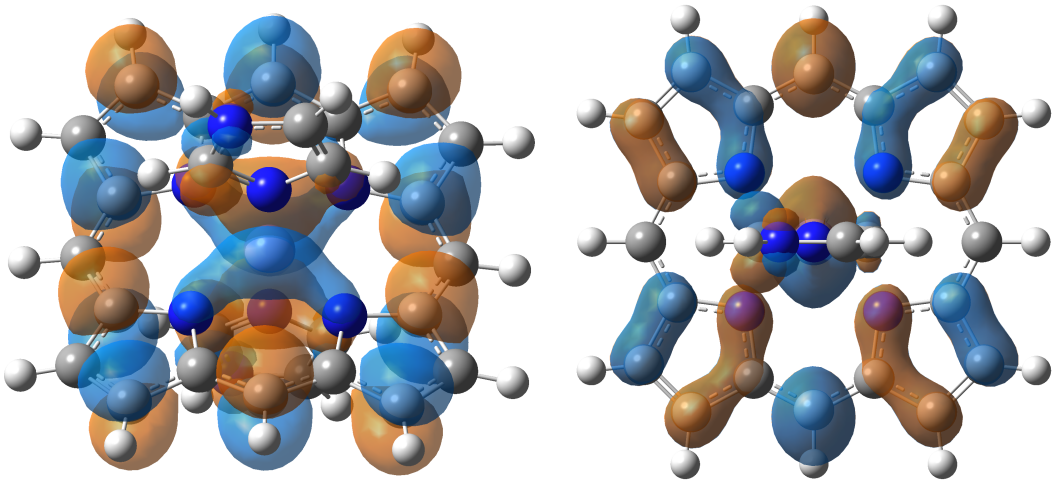

図6.4.1-5 酸化型のβLUMOとβLUMO+2(β131)。この2つの軌道が、電子配置の変化が起こる以前の場合に電子を受け取る軌道になっていると考えられる。

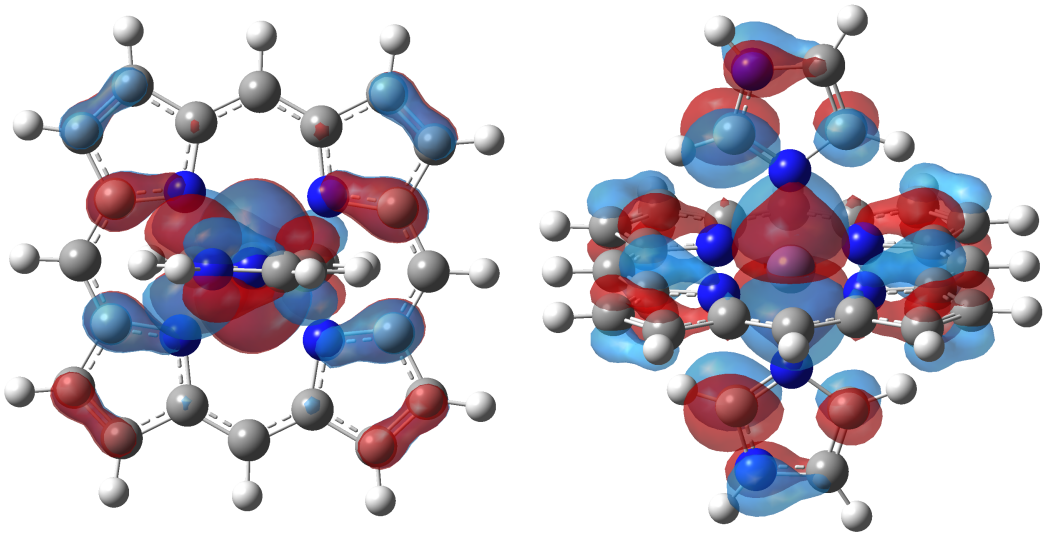

図6.4.1-6 酸化型のLUMOとLUMO+2の分子軌道を足し合わせた軌道。還元型のHOMOやスピン密度分布と似た軌道が得られた。このことから、LUMOとLUMO+2の２つの分子軌道が電子を受け取る軌道であると考えられる。

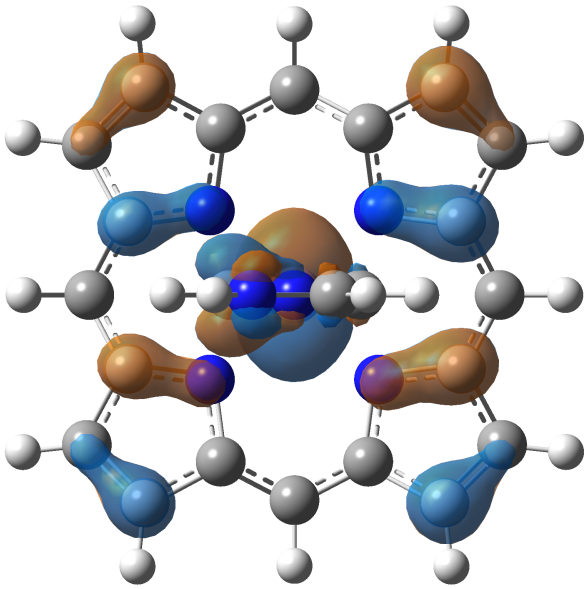

図6.4.1-7 還元型のHOMO。電子を出すと考えられる軌道。

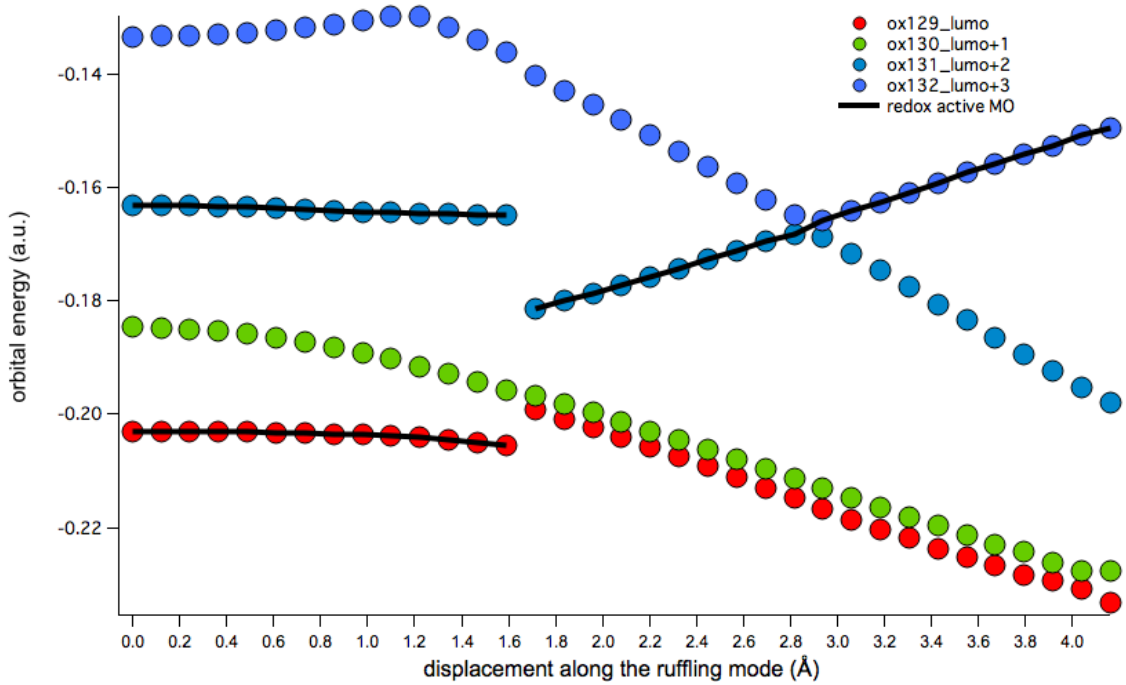

図6.4.1-8 酸化型の空軌道のエネルギー。1.7Åより歪みが小さい時は、LUMOとLUMO+2が酸化還元にする軌道(本研究ではredox active MOと呼ぶ)だったが、それ以降はLUMO+2がredox active MOになっている。さらに歪みが大きくなるとLUMO+3がredox active MOとなる。図中の黒の実戦はredox active MOを示す。

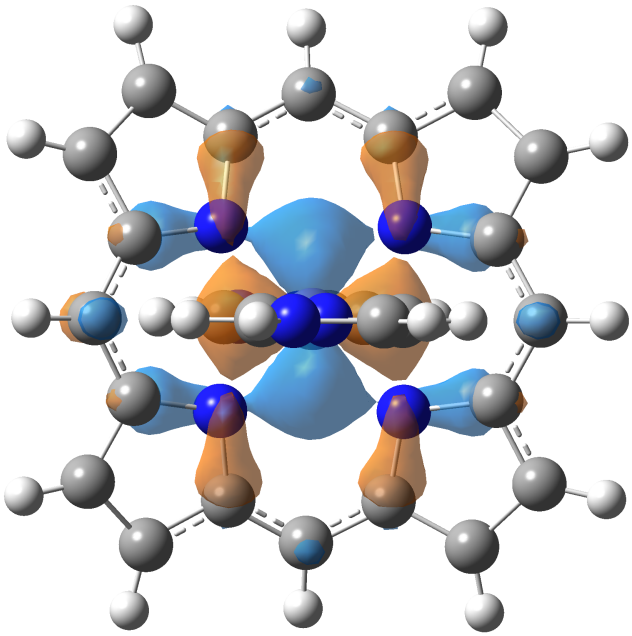

図 6.4.1-9 酸化型のβLUMO+2(β131)。酸化還元電位の大きな変化後は、こちらが電子を受け取る軌道になっている。

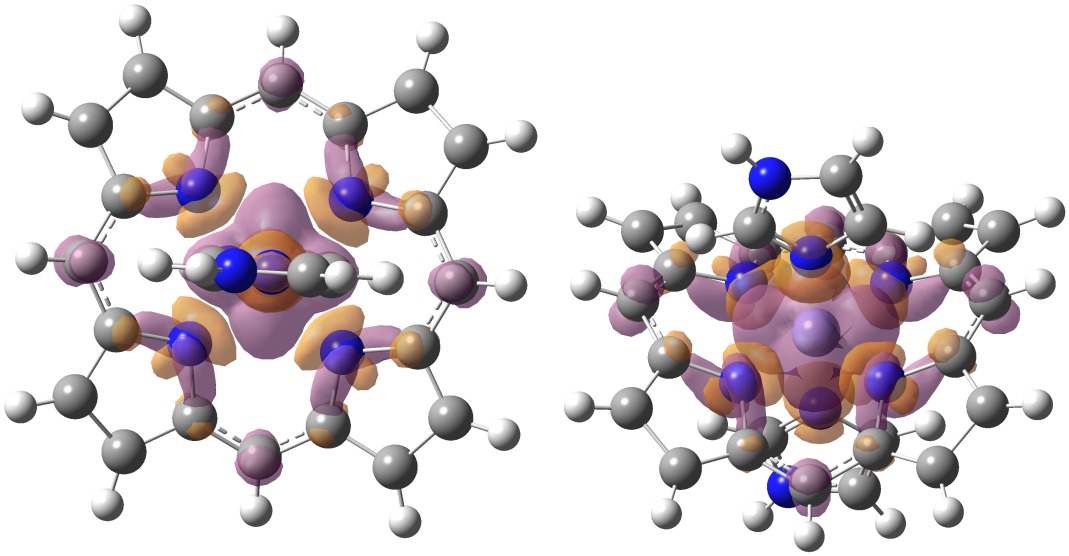

図6.4.1-10 電子配置変化後の酸化型のスピン密度。スピン密度が分布する空間は酸化型のLUMO+2の分子軌道に由来すると考えられる。そのため、LUMO+2の分子軌道が電子を受け取る軌道であると考えられる。

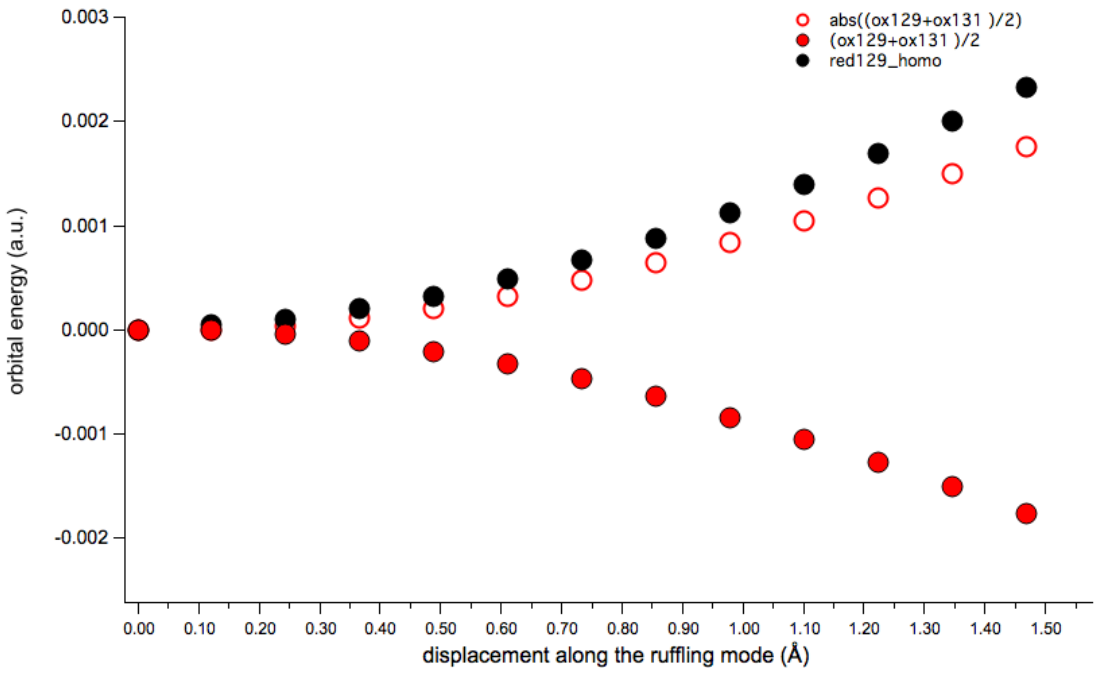

図 6.4.1-11 酸化型の電子を受け取る軌道の平均のエネルギー(赤色)と還元型のHOMOのエネルギー(青色)。比較しやすいように、平面の状態のエネルギーを0に合わせた。赤色の点線は、増加率を比較しやすいように電子を受け取る軌道のエネルギーの絶対値をとった。

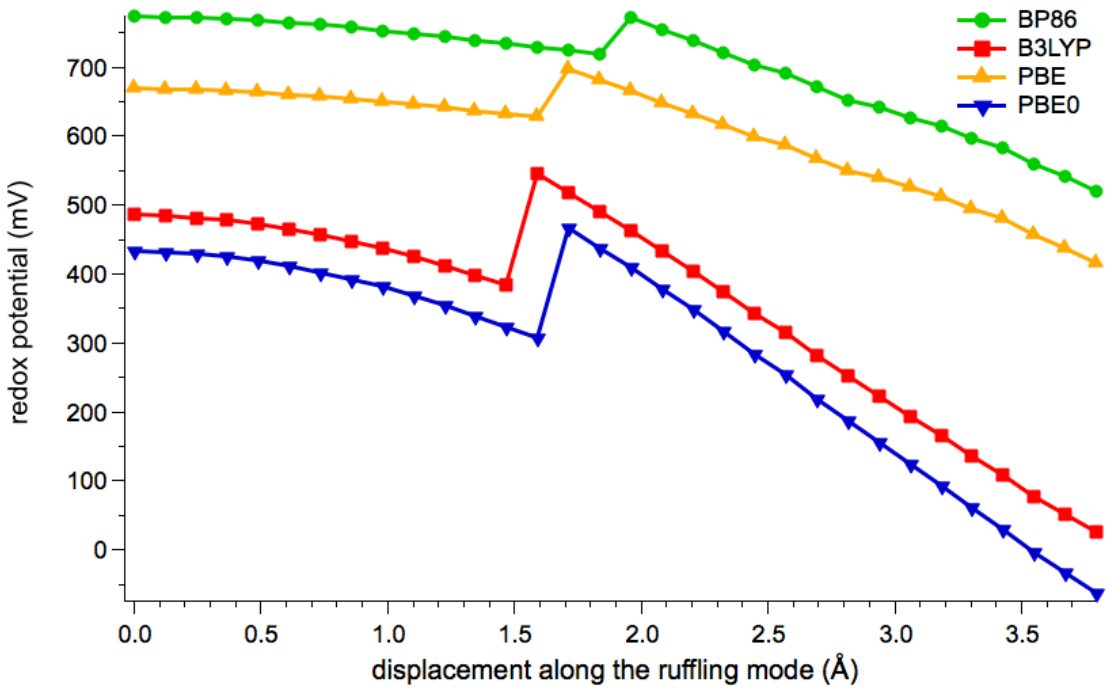

図 6.4.1-12 異なる密度汎関数を用いて計算した酸化還元電位。平面での酸化還元電位が高い順に、BP86(緑色丸)、PBE(黄色上三角)、B3LYP(赤色四角)、PBE0(青色下三角)での計算結果を示す。電子構造の大きな変化がどの密度汎関数法においても確認された。

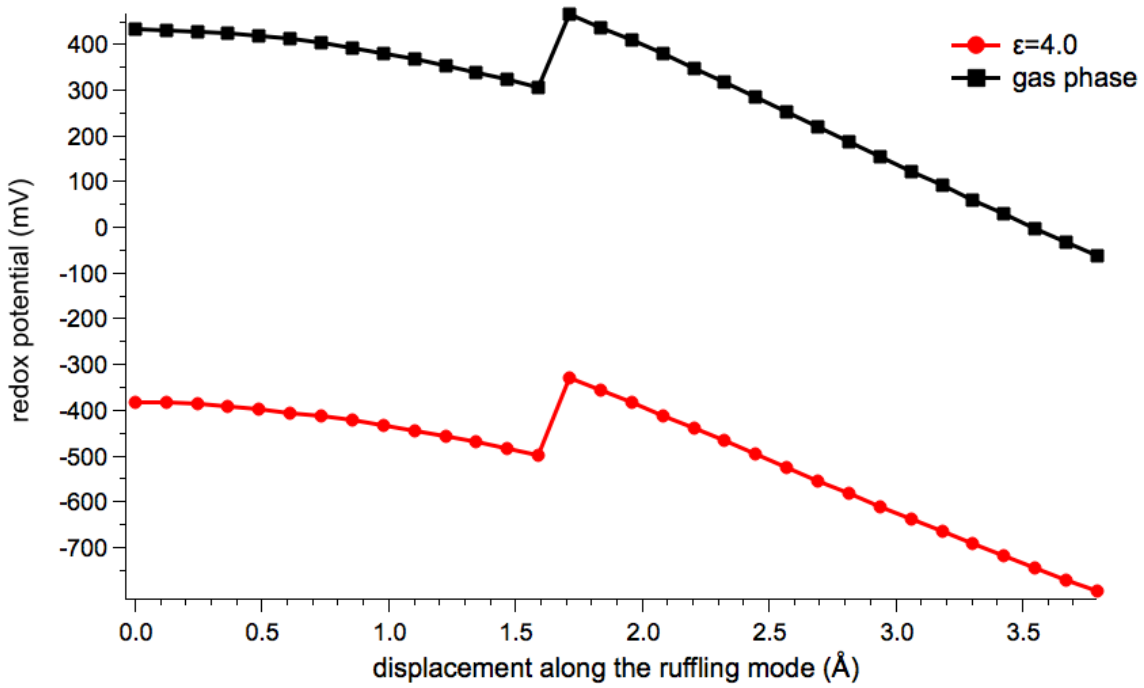

図 6.4.1-13 真空中と溶媒中の比較。溶媒モデルは連続分極体モデル(PCM)を用いて、その場合の誘電率にはタンパク質環境の近似としてよく用いられる ε = 4.0を用いた。

6.4.2 HISが垂直に配位している場合

一般にruffling によって軸配位子がHisのような嵩高い配位子の場合、配位子はポルフィリン面からの立体障害により、ねじれている方がエネルギー的に安定である。そこで、立体障害を避けるように上下のHisを捻ったモデル(図6.4.2-1)を作成し、同様に計算を行った。

その結果、大きな変化として、電子配置の大きな変化が早い段階で起こることが確かめられた(図 6.4.1-1)。平行な場合には1.7 Åで起こっていたが、ねじることによって1.3 Åで起きるようになることが確かめられた。このことはESRの研究からもねじれたHisの配向が通常不安定なd_{xy}軌道を安定化するという結果と一致している。軌道を調

べて見ると、酸化型のLUMOの軌道は軸配位子を捻っている場合には、d_{xz}とd_{yz}が混ざった軌道になっていることがわかった。軸配位子をねじることによって、d_{xz}軌道とd_{yz}軌道と軸配位子の窒素の電子雲との静電反発の結果、このようになったと考えられる。軸配位子をねじると、ヘムが平面の状態で酸化還元電位が100 mV程度高くなっていた。酸化型の軸配位子が平行な場合と垂直な場合のエネルギーを比較したところ、捻っている場合の方がLUMOの軌道エネルギーが低いことがわかった。つまり、電子が入る軌道が安定化していることを示しており、これは、酸化還元電位が上昇する方向である。また、酸化還元電位が垂直な場合と平行な場合で、その差が小さくなっていることは、両者のLUMOのエネルギーが近くなっていくことに対応していると考えられる。

酸化還元電位が突然上昇する理由は6.4.1で述べたことと同様の理由によると考えられる。

次に、なぜ軸配位子の配向が垂直な場合、より早く電子構造の大きな変化が起こるのかを軌道相互作用の観点から調べる。軸配位子が垂直に配向している場合、HOMOの分子軌道である、鉄のd_{xy}軌道とポルフィリン環のa_{2u}軌道との相互作用が平行に配位している場合に比べて、より大きくなっていることがわかった。Hisがねじれることによって、平行な場合にはx軸上にあるメソ炭素のみがHisと相互作用していたが(図6.4.2-2)、垂直に配向している場合、x軸上、y軸上に存在する4つ全てのメソ炭素がHisと相互作用するようになることがわかった(図6.4.2-3)。その結果、a_{2u}軌道のメソ炭素がより安定化し、さらに低いエネルギー準位(β120)に存在する、b_{2g}軌道(図6.4.2-4)と早い段階から混ざる(図6.4.2-5)ことが可能となり、それに伴ってd_{xy}軌道が半占有軌道になったのではないかと考えられる。

酸化還元電位の傾向は軸配位子が平行に配位していても垂直に配位していても、関係ないことから、6.4.1節と同様の理由で酸化還元電位が変化していると考えられる。

平面構造から最も大きくruffling している構造(CSDID:AROLID)において、軸配位子のねじれが生じており、この節でのモデルと同じく、その配位子の作る面はお互いに垂直になっている。

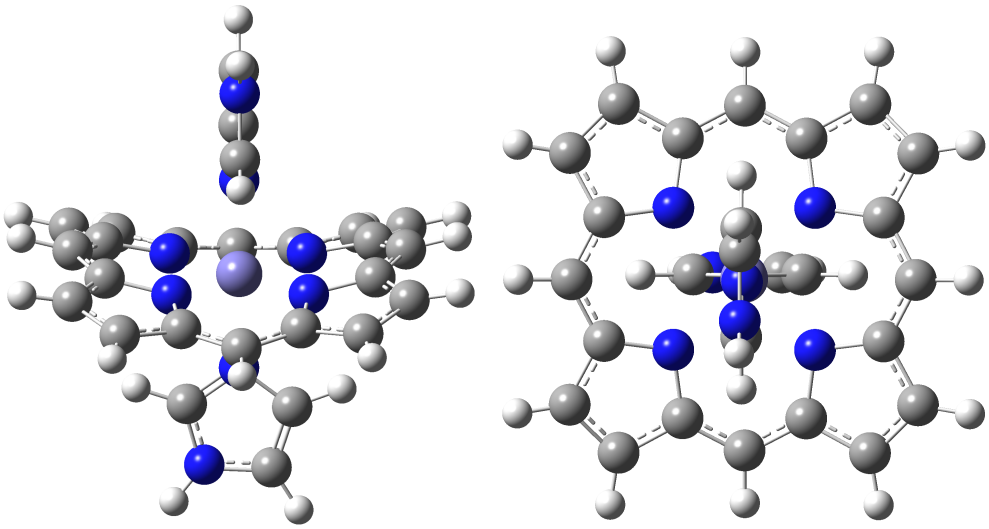

図 6.4.2-1 軸配位子とポルフィリン環の立体障害を考慮して、軸配位子を捻った場合のモデル。横から見たモデルと(左)、上から見たモデル(右)。上から見ると2つのイミダゾール環が垂直に交わっている。

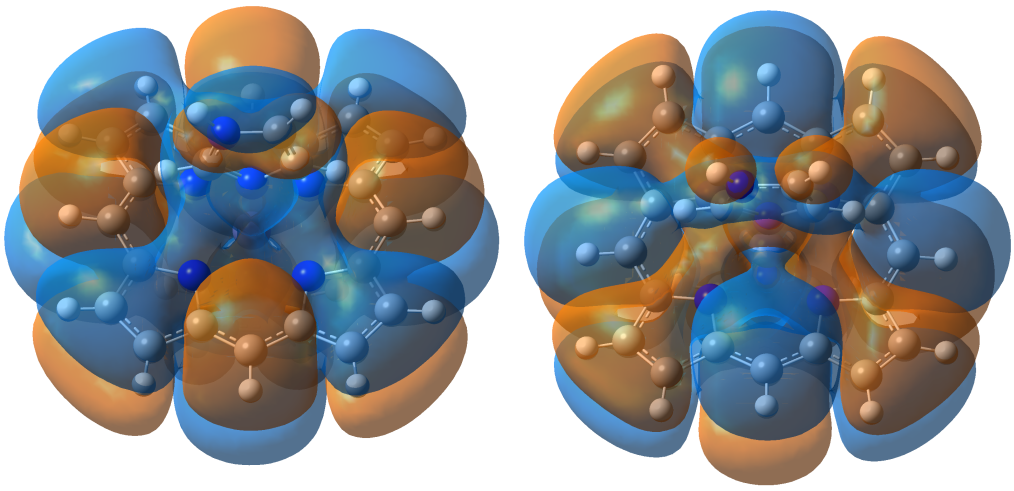

図 6.4.2-2 軸配位子が平行に配向している場合の還元型のβHOMO。片側のHisはメソ炭素と相互作用していないが(左側の図)、もう片側のHisはメソ炭素と相互作用している(右側の図)。MO係数が0.001の等値面を表示。

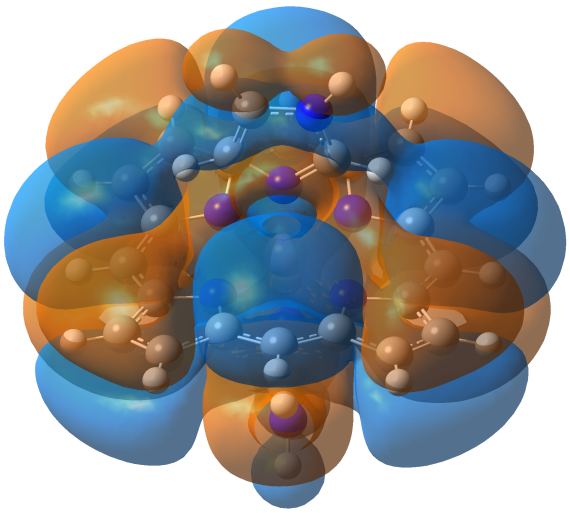

図 6.4.2-3 軸配位子が捻れて配向している場合の還元型のβHOMO。Hisとメソ炭素の軌道が相互作用している。裏側も同じように相互作用している。MO係数が0.001の等値面を表示。

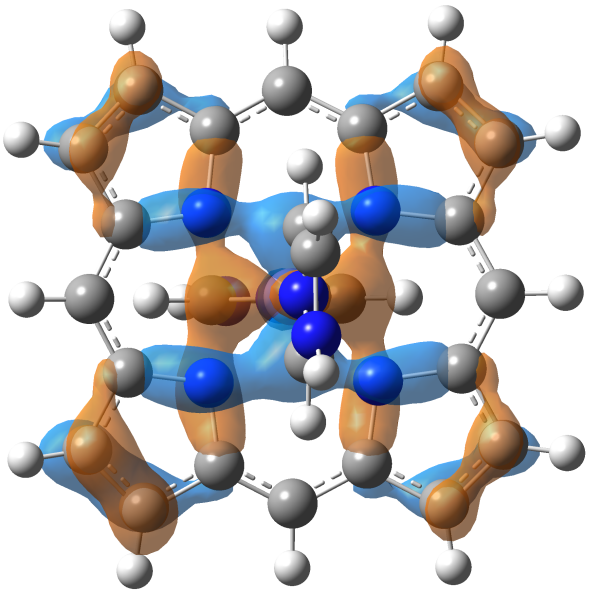

図 6.4.2-4 酸化型のβ119の分子軌道。d_{xy}軌道がメソ炭素の軌道と混ざる前の分子軌道。メソ炭素の軌道が混ざると、β119の軌道とβ129の軌道が入れ替わる。MO係数が0.02の等値面を表示。

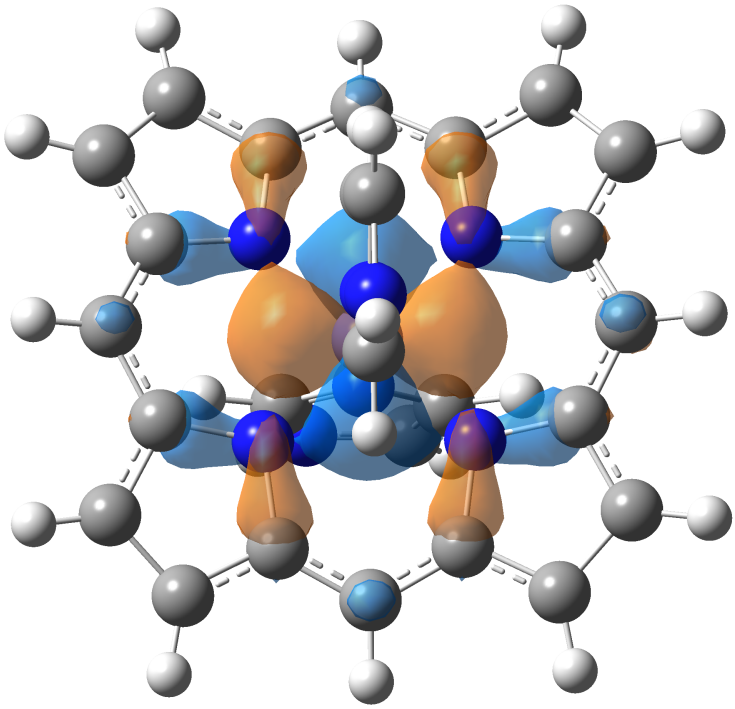

図 6.4.2-5 β LUMO+2の軌道。鉄のd_{xy}の軌道にポルフィリン環のメソ炭素の軌道が混ざっている。MO係数が0.02の等値面を表示

6.5 酸化還元電位と電子構造に対するsaddlingの効果

saddling modeが酸化還元電位や電子構造に与える影響を調べるために、saddling modeに沿って歪めたモデルの量子化学計算を行った。図 6.5-1から、433 mVから847 mVまで単調に酸化還元電位が上昇することがわかった。酸化還元電位が上昇するということは、還元型より酸化型を不安定にするということであり、平面の場合に比べてヘムが還元されやすくなっていることを示している(図 6.5-2)。

図 6.5-1に軌道エネルギーにオフセットをかけてある酸化型のLUMO(赤色)と還元型のHOMO, HOMO-1, HOMO-2を示した。図6.5-1から、saddlingが小さいときには、電子を受け渡す軌道は還元型

のHOMOの軌道であることがわかった。saddlingが大きくなるにつれて、HOMO-1, HOMO-2へと電子を渡す軌道が変化していくこと(図6.5-1中の緑の点線)が軌道を観察することでわかった。この軌道を追跡すると、鉄のd_{yz}軌道とポルフィリン環の$3e_g$軌道であることがわかった。不安定化していく軌道はa_{1u}軌道とa_{2u}軌道であり、これらの軌道は鉄の軌道とはほとんど相互作用しておらず、鉄での電子の存在確率はとても小さく、電子を渡す軌道ではなかった。ruffling の場合とは異なり、還元型では占有軌道の中で軌道のエネルギー準位の入れ替わりが起きていた。空軌道と占有軌道が入れ替わることは起きていなかった。

次に酸化型の電子を受け渡す軌道を調べた。酸化型では、電子を受け取る軌道は常にLUMOのd_{yz}軌道であることがわかった。また、ruffling の場合のような占有軌道と空軌道の入れ替わりはなく、酸化還元電位の急激な変化も見られなかった。酸化型の電子を受け取る軌道(図6.5-3の赤)と還元型の電子を渡す軌道(図6.5-3の緑の点線)を比較した場合、還元型の電子を受け渡す軌道がより安定化していることがわかる。このことは、酸化還元電位の上昇することに定性的に一致する。

また、ruffling の場合にはd_{xy}軌道はポルフィリン環のa_{2u}軌道と相互作用し、大きく不安定化したが、saddling の場合は、a_{2u}軌道が不安定化するので、d_{xy}軌道との重なりが小さくなり、その結果d_{xy}軌道は最終的にβ120からβ118まで安定化したと考えられる。

平面ポルフィリンからsaddlingモードに沿って4.0 Å歪んだ、鉄ポルフィリン錯体の歪みについて調べた(図 6.5-1中示した構造)。このように大きくsaddlingした構造は最大でも1.5 Åの構造までしかPDBには登録されていなかった。しかしながら、合成ポルフィリンである、

(2,3,7,8,12,13,17,18-octaethyl-5,10,15,20-tetraphenylporphyrinato)-perchlorato-Fe(III) (CSD ID: ACOTIV)は、嵩高いポルフィリン環の側鎖の影響によってsaddlingモードに沿って4.0A歪んだポルフィリン環を持っている[45]。ruffling モードおよびsaddlingモードに沿った変位は、それぞれ0.47 Åおよび3.94 Åであると計算された。 saddlingモードに沿った変位を持つ合成ヘムの導入により、ヘムタンパク質におけるヘムの酸化還元電位を約400 mV増加させることが期待できる。

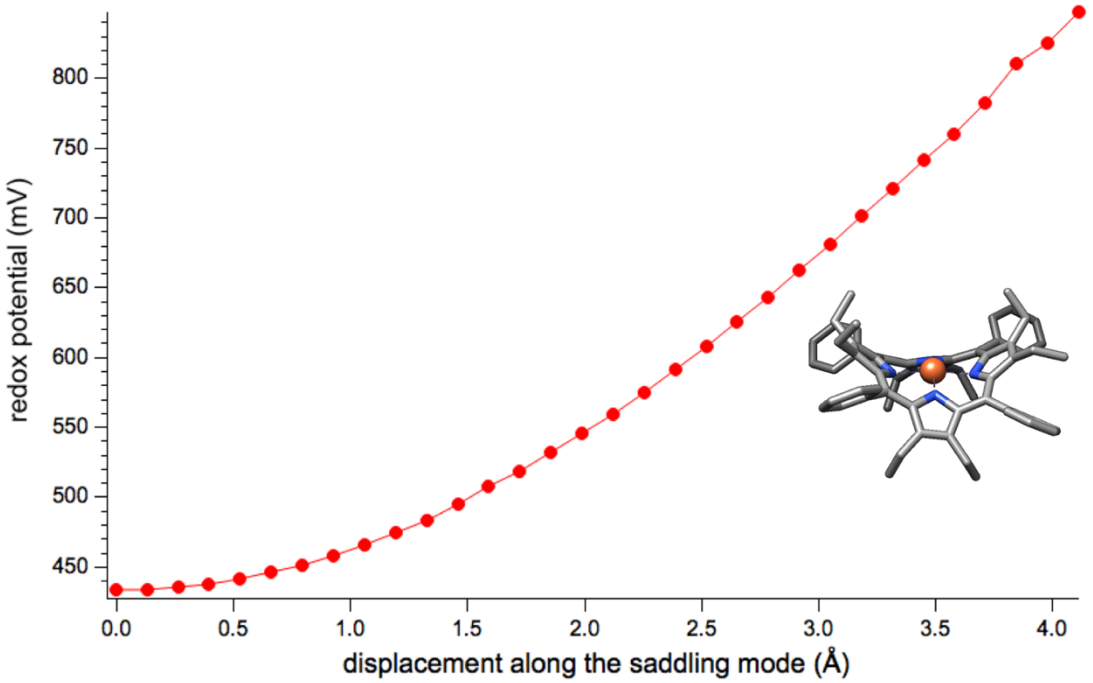

図 6.5-1 saddlingに沿った酸化還元電位の変化。縦軸はredox potential、横軸はsaddlingの変位の大きさ。図中の構造はCSD中で最もsaddlingの大きい構造(CSDID:ACOTIV)。saddlingに沿って単調に酸化還元電位が上昇している。

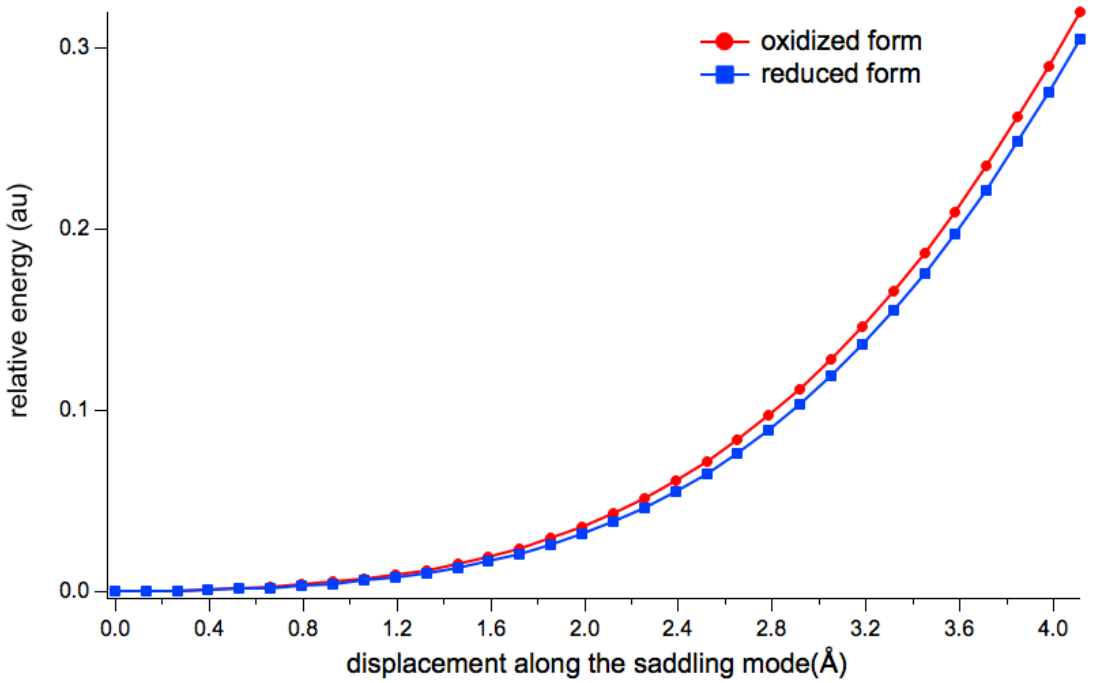

図 6.5-2 酸化型と還元型のエネルギーのプロット。赤色が酸化型、青色が還元型のエネルギーに対応している。酸化型が還元型に比べてよりsaddlingによって不安定化していく。

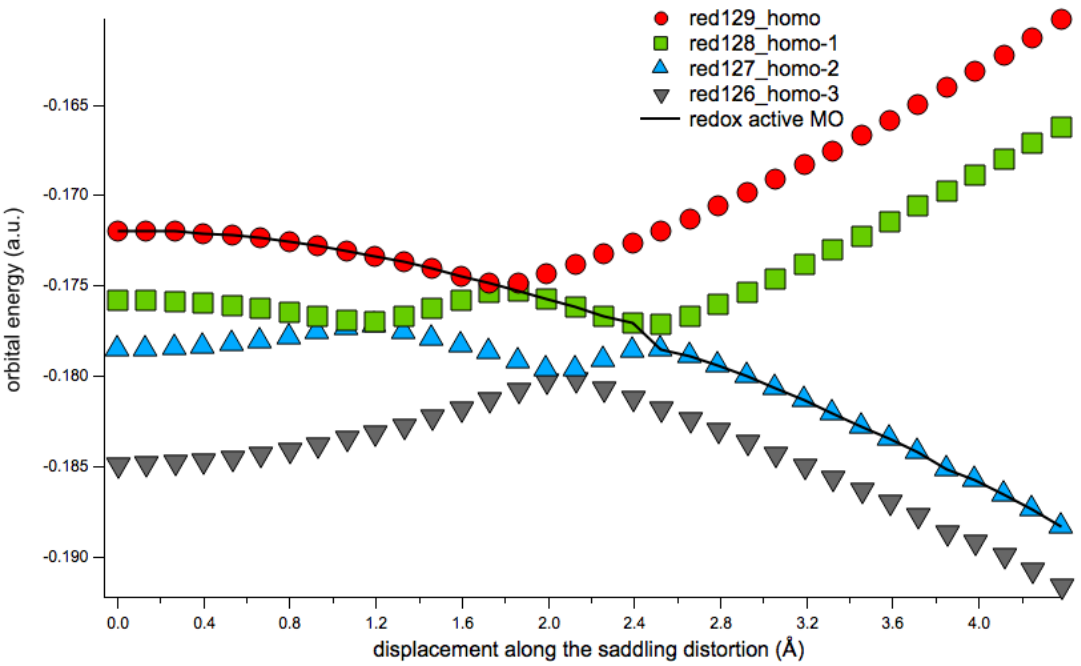

図6.5-3 還元型の軌道エネルギーのプロット。還元型のHOMOからHOMO-2までのエネルギーのプロットで平面でのHOMOのエネルギーを0に合わせている。また、図中の黒の実線は電子を渡す軌道(redox active MO)のエネルギーに対応しており、HOMOからHOMO-2へと移り変わっていくことがわかる。

6.6 酸化還元電位と電子構造に対する組み合わせた歪みの効果

ruffling とsaddlingの組み合わせが酸化還元電位と電子構造に与える影響を計算し、それらの組み合わせによる、ヘムモデルの計算から酸化還元電位地形を描写した。 本計算により、ruffling およびsaddlingが酸化還元電位に与える効果が、定性的にはrufflingおよびsaddlingの影響の合計になることを明らかにした。 これは、saddlingの効果がrufflingを固定した場合、またはその逆の場合に酸化還元電位に与える傾向が、単純なsaddlingまたはrufflingの効果と同等だったためである。また、図 6.6-1の地形からも2つのモードが混じり合うことによ

る複雑な効果は確認されなかった。

さらにcytochrome c_3の実験データと我々の結果を比較した。cytochrome c_3は単一のポリペプチドに4つのヘムを持ち、低い酸化還元電位を示す。 表6.6-1に示すように、実験的研究により、ヘム1およびヘム2は、ヘム3よりも低い酸化還元電位を示し、ヘム4は、ヘム3よりも高い酸化還元電位を示すことがわかっている。 NSDにより、野生型cytochrome c_3のヘムの構造を調べたところ、ヘム1とヘム2はポルフィリンがrufflingしており、ヘム3は平面構造を有し、ヘム4はsaddlingの構造を有することがわかった。 cytochrome c_3における酸化還元電位とヘムの歪みとの関係は、rufflingがヘムの酸化還元電位の低下をもたらし、saddlingが酸化還元電位の増加をもたらす。これらの実験的事実は、本研究の計算結果と定性的によく対応している[46]。表6.6.1に示した、計算値は図6.6-1から見積もった値で、実験で得たのヘムの酸化還元電位の順番とよくあっている。ヘム2は軸配位子がねじれているため、歪みの効果だけでは順番を説明できなかったと考えられる。

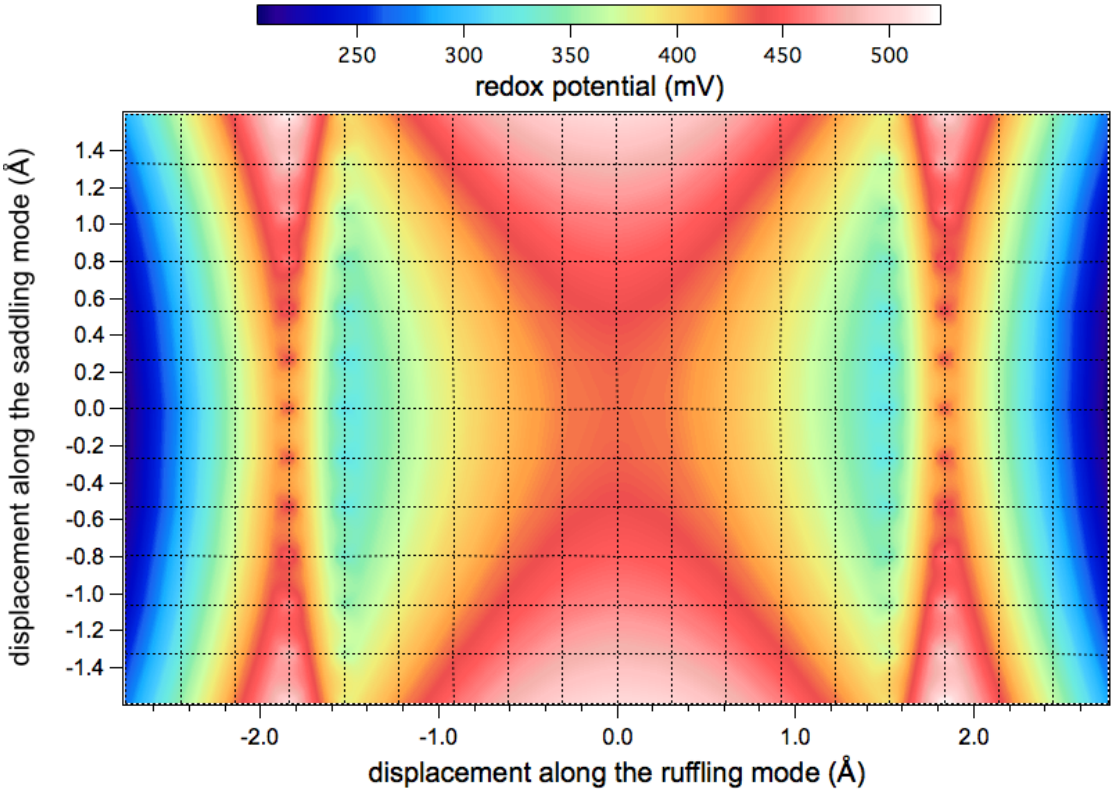

図 6.6-1 ruffling と saddling を組み合わせたモデルでの計算結果。横軸と縦軸はそれぞれ ruffling と saddling の変位の大きさを表す。

表 6.6-1 cytochrome c_3のruffling, saddlingの大きさとredox potential

ヘム	ruffling (Å)	saddling (Å)	redox potential (mV)	計算値(mV)
ヘム1	-0.775	-0.291	-309	401
ヘム2	-0.722	-0.202	-325	405
ヘム3	-0.268	-0.185	-285	429
ヘム4	0.279	1.072	-252	461

第7章 結論

ヘムタンパク質の機能をヘムの分子構造の観点から調べている研究は多く行われている。しかしながら、ヘムの分子構造と機能の関係は未だに明らかになっていない部分が多い。そこで、ruffling と saddlingの2つの歪みを用いモデル作成を行い、ヘムの構造歪みと酸化還元ポテンシャル・電子構造との関係を系統的に調べた。本研究では、PDBに登録されているヘムタンパク質の軸配位子の統計に従ってbis-His配位ヘムのモデルの歪みを用いた。ruffling と saddlingの歪みは、ヘムモデルの酸化還元電位を顕著に変化させた。軸配位子のHisがねじれていない配向の場合には、ruffling は酸化還元電位を433 mVから263 mVに減少させた。しかし、酸化還元電位は、電子配置の$(d_{xz},d_{yz})^3(d_{xy})^2$から$(d_{xz},d_{yz})^4(d_{xy})^1$の変化のために、ruffling の大きさが1.7

Åで跳ね上がった。saddlingでは、ruffling の場合とは対照的に、電子配置は$(d_{xz},d_{yz})^3(d_{xy})^2$を維持したまま、433 mVから847 mVまで単調に酸化還元電位が上昇した。ruffling とsaddlingに沿った歪みは酸化還元電位に対してそれぞれのモードの大きさに加算的に影響した。軸配位子が直交しているruffling しているポルフィリン環は、電子配置の転移の前までは、より高い酸化還元電位を示した。基底状態での電子配置の変化は軸配位子が直交している場合では平行な配向に比べて0.3 Å小さい変位で起きた。したがって、垂直に配位した軸配位子は$(d_{xz},d_{yz})^4(d_{xy})^1$を安定化した。我々の計算は定性的にヘムタンパク質のcytochrome c_3の実験と一致した。また鉄ポルフィリンのNMRやEPRの実験とも計算結果は定性的に一致していた。得られたヘムの歪みと酸化還元電位の関係は電子構造や化学的な機能の評価を容易にする。

付録

ここでは、Fisherの線形判別法[47–49]を用いた解析を行い、機能と構造歪みの関係を調べたので掲載する。

本文中では、ヘムの構造歪みへの寄与が大きい低振動モードであるruffling、saddlingについて、それらが電子構造や酸化還元電位に与える効果を系統的に調べた。ここでは、酸化還元酵素のグループと酸素運搬・貯蔵のグループのヘムタンパク質の2つのグループをFisherの線形判別法のための学習に用いて、機能を分ける特徴的なベクトルを抽出した。そしてこのベクトルに沿って構図歪みを作成し、量子化学計算を行うことで、2つのグループの機能と構造歪みの間にどのような関係があるかを調べた。

まず簡単にFisherの線形判別法について、説明する。

Fisherの線形判別法は主成分解析とは異なり、教師あり学習に分類されている。それは、データセットが2つのクラス(集団)に分かれることが与えられたとし、そのラベルを教師データとして、それらのクラスを分離する面（もしくは直線）を決定する手法だからである。

２クラスからなるN次元のデータセットを線形変換によって直線上に写すことを考える。このような変換に対応するベクトルを$\boldsymbol{w}$とすると、$\boldsymbol{w}$はN次元のベクトルである。この$\boldsymbol{w}$に2つの条件を課すことで、

満足のいく$\boldsymbol{w}$を得ることができる。1つは、2つのクラスのそれぞれの代表となる点(重心など)同士の距離ができるだけ大きくなるようにすること。そしてもう1つは、それぞれのクラス内での分散ができるだけ小さくなるようにすることである。なお、$\boldsymbol{w}$の大きさは1に規格化されているとする。この条件で決められた$\boldsymbol{w}$によりデータセットを直線上に移せば、射影された先で、同じクラスのデータが局在し、かつ、互いのクラス同士はあまり混ざり合わないよう分布を得ることができる。

2つのクラス、クラス1(C_1)とクラス2(C_2)の、それぞれの平均値を$\boldsymbol{a}_1$、$\boldsymbol{a}_2$とすれば、

$$\boldsymbol{a}_1 = \frac{1}{N_1}\sum_{m\in C_1}\boldsymbol{p}_m \quad (54)$$

$$\boldsymbol{a}_2 = \frac{1}{N_2}\sum_{n\in C_2}\boldsymbol{q}_n \quad (55)$$

となる。この$\boldsymbol{a}_1$と$\boldsymbol{a}_2$が射影された先で離れているためには、

$$\boldsymbol{w}^T\boldsymbol{a}_1 - \boldsymbol{w}^T\boldsymbol{a}_2 = \boldsymbol{w}^T(\boldsymbol{a}_1 - \boldsymbol{a}_2) \quad (56)$$

の2乗が最大となるように$\boldsymbol{w}$を決定すれば良い。得られたベクトル$\boldsymbol{w}$で線形変換をしても、同じクラスの点がまとまって射影されているとは限らない。そこで、各々のクラス内の分散の総和が最小となるような制約を付け加える事でクラス内の点の広がり小さくする。C_1とC_2

の射影先での分散はそれぞれ

$$s_1^2 = \sum_{m \in C_1} (\boldsymbol{w}^T \boldsymbol{p}_m - \boldsymbol{w}^{\mathrm{T}} \boldsymbol{a}_1)^2 \qquad (57)$$

$$s_2^2 = \sum_{n \in C_2} (\boldsymbol{w}^T \boldsymbol{q}_n - \boldsymbol{w}^{\mathrm{T}} \boldsymbol{a}_1)^2 \qquad (58)$$

と表される。これらの総和を小さくするような$\boldsymbol{w}$を見つければ、射影先でそれぞれのクラスはまとまって存在している。

以上のことから、評価関数$J(\boldsymbol{w})$を次の式で表す。

$$J(\boldsymbol{w}) = \frac{\boldsymbol{w}^T (\boldsymbol{a}_1 - \boldsymbol{a}_2)(\boldsymbol{a}_1 - \boldsymbol{a}_2)^T \boldsymbol{w}}{\boldsymbol{w}^T \{\sum_{m \in C_1} (\boldsymbol{w}^T \boldsymbol{p}_m - \boldsymbol{w}^{\mathrm{T}} \boldsymbol{a}_1)^2 + \sum_{n \in C_2} (\boldsymbol{w}^T \boldsymbol{q}_n - \boldsymbol{w}^{\mathrm{T}} \boldsymbol{a}_1)^2\} \boldsymbol{w}} \qquad (59)$$

(54)式の分母は総クラス内分散行列と言い、分子はそれに対応するようにクラスの平均を２乗した形にしており、これをクラス間分散という。評価関数$J(\boldsymbol{w})$を$\boldsymbol{w}$の大きさが最大となる場合の$\boldsymbol{w}$が求めたい直線の方向を表している。

次に実際の手順について記述する。特徴ベクトルの計算には、酸化還元酵素のグループと酸素運搬・貯蔵のグループのヘムタンパク質のうち分解能が2.0 Å未満のヘムの構造を用いた。この手法で必要となる、平均構造にはこれらのグループの構造全てを用いて作成した。

Fisherの線形判別法(LDA)により得られた特徴ベクトルに沿った面内歪みと面外歪み、それぞれ図A.1と図A.2に示した。また、特徴ベクトルと振動モードとの内積(図A.3)から、面外の歪みはsaddlingやruffling には対応していないことがわかる。

特徴ベクトルに沿って分布をプロットすることで、2つの機能グループを主成分解析の場合(図A.4)よりも、より良く分離することができた(図A.5)。

特徴ベクトルに沿って歪めたヘムのモデルを用意して、oxidation energyとoxygen adsorption energyを計算した。

oxidation energyは酸化型と還元型の電子エネルギーの差で定義した。oxygen adsorption energyはヘムに酸素が結合しているapoの状態とヘムに酸素が結合していないholoの状態のエネルギー差で定義した。計算結果を図A.6に示した。

計算結果から、特徴ベクトルと機能の間には相関があることが明らかとなった。特徴ベクトルが正の方向に向かうにつれて、oxygen adsorption energyが小さくなっていた。一方で、oxidation energyは大きくなっていた。このことは、酸素の運搬や貯蔵を容易にするとともに、酸化ストレスに強くなることで、hemoglobinやmyoglobinでヘムがメト化することを抑制している可能性が考えられる。また、基質の酸化還元を行うヘムタンパク質中のヘムの酸化状態を変化させるこ

とで、基質の酸化還元を行うので、oxidation energyが小さくなることは理にかなっている。この結果は、ヘムの構造歪みが、ヘムタンパク質の機能に関係していることを支持する結果である。

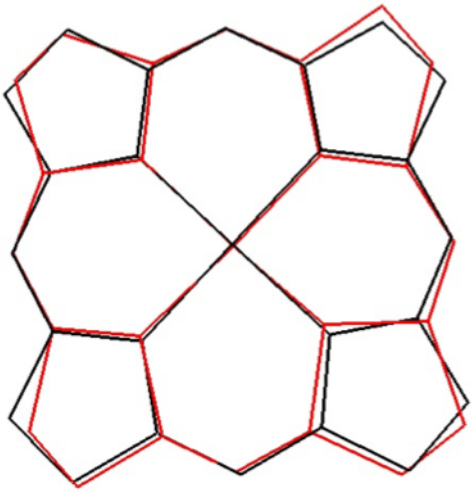

図 A.1 特徴ベクトルの面内成分(赤色)と参照構造(黒色)

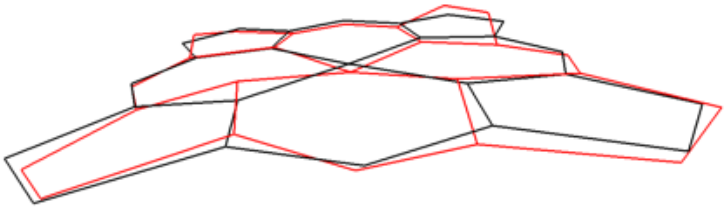

図 A.2特徴ベクトルの面外成分(赤色)と参照構造(黒色)

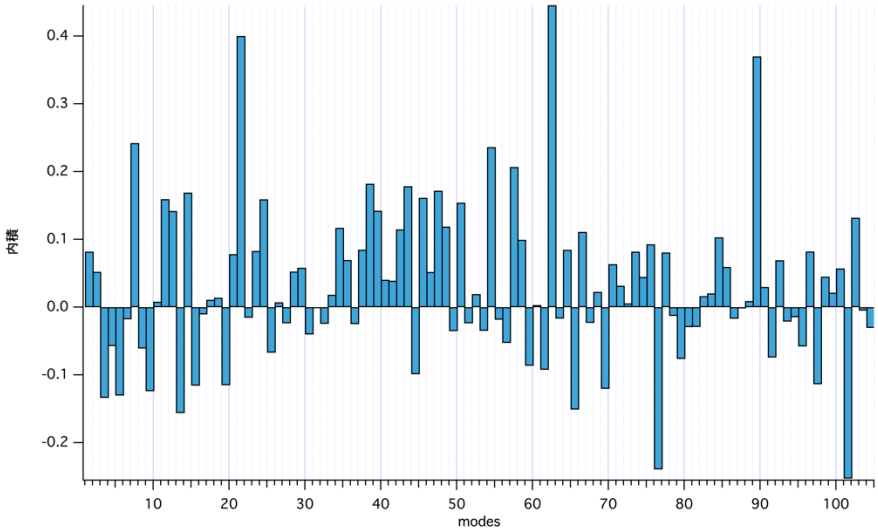

図 A.3 特徴ベクトルのNSD。

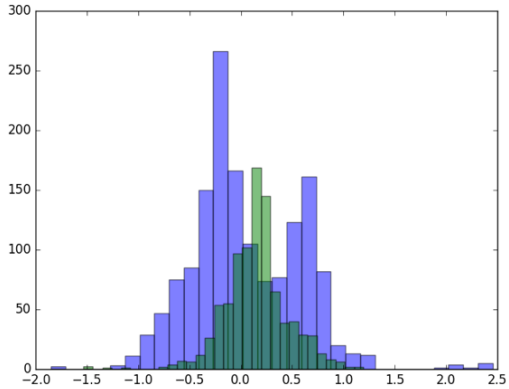

図 A.4 主成分軸上での2つの機能クラスの分布

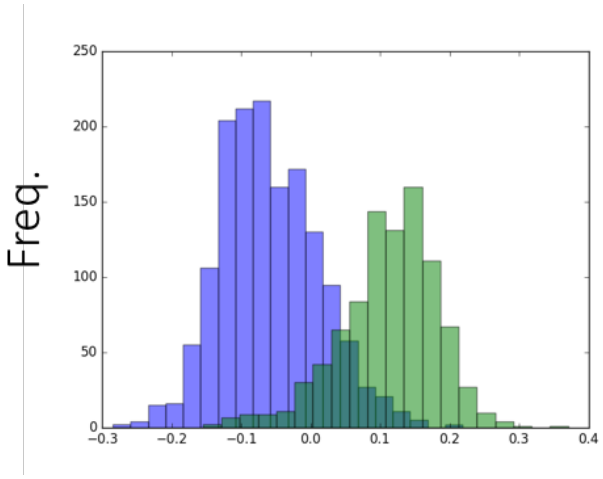

図 A.5 特徴ベクトルに沿った2つの機能クラスの分布。

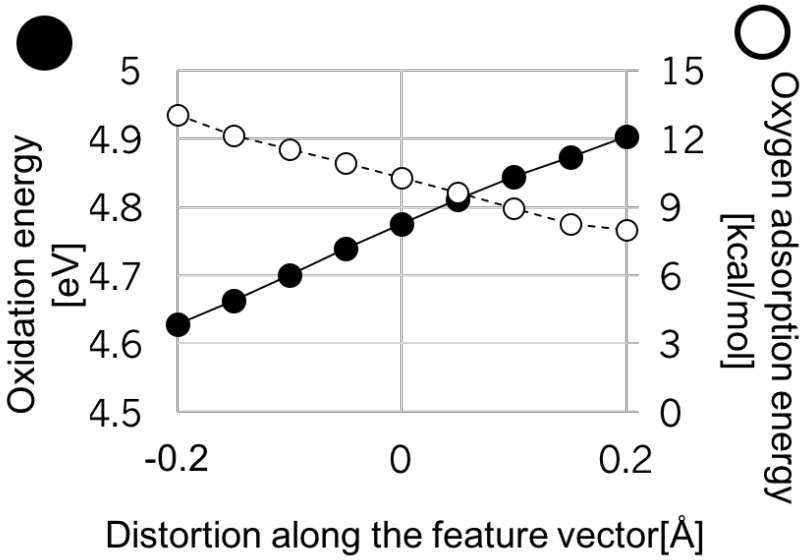

図 A.6 特徴ベクトルに沿った歪みと、機能に関する計算結果。黒丸はoxidation energy、白丸はoxygen adsorption energyを表す。横軸は特徴ベクトルの変位の大きさを示す。

参考文献

1. 山内 脩, 鈴木 晋一郎 & 櫻井 武. 生物無機化学. (朝倉書店, 2012).

2. ヘム. Available at: https://ja.wikipedia.org/wiki/ヘム.

3. 大塚 斉之助 & 山中 健生. 金属タンパク質の化学. (講談社, 1983).

4. Voet, D. *et al.* *ヴォート基礎生化学 第5版*. (東京化学同人, 2017).

5. Shelnutt, J. A., Song, X., Ma, J. & Jia, S. Nonplanar porphyrins and their significance in proteins. **27,** 31–41 (1998).

6. Available at Protein Data Bank Japan (PDBj). Available at: https://pdbj.org.

7. Berman, H., Henrick, K. & Nakamura, H. Announcing the worldwide Protein Data Bank. *Nature Structural Biology* **10,** 980 (2003).

8. Watson, H. C. The Stereochemistry of the Protein Myoglobin. *Prog. Stereochem* **4,** (1969).

9. *Handbook of Metalloproteins*. (John Wiley & Sons, Ltd, 2006). doi:10.1002/0470028637

10. Liljas, A. *Textbook of structural biology*. (World Scientific, 2009).

11. Yoshikawa, S. Cytochrome c oxidase. *Advances in Protein Chemistry* **60,** 341–395 (2002).

12. Olea, C., Kuriyan, J. & Marletta, M. A. Modulating heme redox potential through protein-induced porphyrin distortion. *J. Am. Chem. Soc.* **132,** 12794–12795 (2010).

13. Matsui, T. *et al.* Heme Degradation by *Staphylococcus aureus* IsdG and IsdI Liberates Formaldehyde Rather Than Carbon Monoxide. *Biochemistry* **52,** 3025–3027 (2013).

14. Takayama, S. J., Ukpabi, G., Murphy, M. E. P. & Mauk, A. G. Electronic properties of the highly ruffled heme bound to the heme degrading enzyme IsdI. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108,** 13071–6 (2011).

15. Reniere, M. L. *et al.* The IsdG-family of haem oxygenases degrades haem to a novel chromophore. *Mol. Microbiol.* **75,** 1529–1538 (2010).

16. Takayama, Y. *et al.* Strategic Roles of Axial Histidines in Structure Formation and Redox Regulation of Tetraheme Cytochrome c_3 †. *Biochemistry* **47,** 9405–9415 (2008).

17. Reddy, J., Shokhireva, T. K., Raffii, K., Simonis, U. & Walker, F. A. Rates of axial ligand rotation in diamagnetic d 6 C o (H I) and Fe (II) porphyrinates. **263,** (1997).

18. Ma, X., Sayed, N., Baskaran, P., Beuve, A. & van den Akker, F. PAS-mediated dimerization of soluble guanylyl cyclase revealed by signal transduction histidine kinase domain crystal structure. *J. Biol. Chem.* **283,** 1167–78 (2008).

19. Muralidharan, S. & Boon, E. M. Heme Flattening Is Sufficient for Signal Transduction in the H-NOX Family. (2012). doi:10.1021/JA211576B

20. Groom, C. R., Bruno, I. J., Lightfoot, M. P. & Ward, S. C. The Cambridge Structural Database. *Acta Crystallogr. Sect. B Struct. Sci. Cryst. Eng. Mater.* **72,** 171–179 (2016).

21. GOLD - The Cambridge Crystallographic Data Centre (CCDC). Available at: https://www.ccdc.cam.ac.uk/solutions/csd-discovery/components/gold/. (Accessed: 3rd January 2018)

22. Pearson, K. LIII. *On lines and planes of closest fit to systems of points in space. Philos. Mag. Ser. 6* **2,** 559–572 (1901).

23. Abdi, H. & Williams, L. J. Principal component analysis. *Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Stat.* **2,** 433–459 (2010).

24. Amadei, A., Linssen, A. B. M. & Berendsen, H. J. C. Essential dynamics of proteins. *Proteins Struct. Funct. Genet.* **17,** 412–425 (1993).

25. Kitao, A. & Go, N. Investigating protein dynamics in collective coordinate space. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **9,** 164–169 (1999).

26. Matsui, T., Kitagawa, Y., Shigeta, Y. & Okumura, M. A Density Functional Theory Based Protocol to Compute the Redox Potential of Transition Metal Complex with the Correction of Pseudo-Counterion: General Theory and Applications. *J. Chem. Theory Comput.* **9,** 2974–2980 (2013).

27. Matsui, T., Kitagawa, Y., Okumura, M., Shigeta, Y. & Sakaki, S. Consistent scheme for computing standard hydrogen electrode and redox potentials. *J. Comput. Chem.* **34,** 21–26 (2013).

28. Reiss, H. & Heller, A. The absolute potential of the standard hydrogen electrode: a new estimate. *J. Phys. Chem.* **89,** 4207–4213 (1985).

29. scikit-learn: machine learning in Python — scikit-learn 0.19.1 documentation. Available at: http://scikit-learn.org/stable/. (Accessed: 3rd January 2018)

30. Sun, Y. *et al.* Investigations of heme distortion, low-frequency vibrational excitations, and electron transfer in cytochrome c. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111,** 6570–5 (2014).

31. Levitt, M., Sander, C. & Stern, P. S. Protein normal-mode dynamics: Trypsin inhibitor, crambin, ribonuclease and lysozyme. *J. Mol. Biol.* **181,** 423–447 (1985).

32. BLAST: Basic Local Alignment Search Tool. Available at: https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi.

33. Adamo, C. & Barone, V. Toward reliable density functional methods without adjustable parameters: The PBE0 model. *http://oasc12039.247realmedia.com/RealMedia/ads/click_lx.ads/www.aip.org/pt/adcenter/pdfcover_test/L-37/56140772/x01/AIP-*

PT/JCP_ArticleDL_110117/AIP-3075_JCP_Perspective_Generic_1640x440.jpg/434f71374e315a556e61414141774c75?x (1999). doi:10.1063/1.478522

34. Weigend, F. & Ahlrichs, R. Balanced basis sets of split valence, triple zeta valence and quadruple zeta valence quality for H to Rn: Design and assessment of accuracy. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **7,** 3297 (2005).

35. Weigend, F. Accurate Coulomb-fitting basis sets for H to Rn. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **8,** 1057 (2006).

36. Stewart, J. J. P. Optimization of parameters for semiempirical methods V: Modification of NDDO approximations and application to 70 elements. *J. Mol. Model.* **13,** 1173–1213 (2007).

37. Becke, A. D. Density-functional exchange-energy approximation with correct asymptotic behavior. *Phys. Rev. A* **38,** 3098–3100 (1988).

38. Perdew, J. P. Density-functional approximation for the correlation energy of the inhomogeneous electron gas. *Phys. Rev. B* **33,** 8822–8824 (1986).

39. Perdew, J. P., Burke, K. & Ernzerhof, M. Generalized Gradient Approximation Made Simple. *Phys. Rev. Lett.* **77,** 3865–3868 (1996).

40. Becke, A. D. Density- functional thermochemistry. III. The role of exact exchange. *J. Chem. Phys.* **98,** 5648–5652 (1993).

41. Miertus, S., Scrocco, E. & Tomasi, J. ELECTROSTATIC INTER4CTION OF A SOLUTE WITH A CONTINUUIi . A DIRECT UTILIZATION OF A6 INITIO MOLECULAR P0TENTJAJ.S FOR THE PREVISION OF SOLVENT EFFECTS. *Chem. Phys.* **55,** 117–129 (1981).

42. Cossi, M., Barone, V., Cammi, R. & Tomasi, J. Ab initio study of solvated molecules: a new implementation of the polarizable continuum model. *Chem. Phys. Lett.* **255,** 327–335 (1996).

43. Cossi, M., Scalmani, G., Rega, N. & Barone, V. New developments in the polarizable continuum model for quantum mechanical and classical calculations on molecules in solution. *J. Chem. Phys.* **117,** 43–54 (2002).

44. Barone, V., Improta, R. & Rega, N. Computation of protein p K ?s values by an integrated density functional theory/Polarizable Continuum Model approach. *Theor. Chem. Accounts Theory, Comput. Model. (Theoretica Chim. Acta)* **111,** 237–245 (2004).

45. BARKIGIA, K. M., RENNER, M. W. & FAJER, J. Molecular structure of Fe(III) 2,3,7,8,12,13,17,18-octaethyl-5,10,15,20-tetraphenylporphyrin perchlorate: a saddle-shaped porphyrin with an intermediate S = 3/2 spin state. *J. Porphyrins Phthalocyanines* **5,** 415–418 (2001).

46. Takayama, Y. & Taketa-sato, M. Role o f Electron Systems in Stabilization of the Oxidized Tetraheme Architecture in Cytochrome c 3. **1101,** 1096–1101 (2011).

47. FISHER, R. A. THE USE OF MULTIPLE MEASUREMENTS IN TAXONOMIC PROBLEMS. *Ann. Eugen.* **7,** 179–188 (1936).

48. McLachlan, G. J. *Discriminant Analysis and Statistical Pattern Recognition*. (John Wiley & Sons, Inc., 1992). doi:10.1002/0471725293

49. Wetcher-Hendricks, D. *Analyzing quantitative data : an introduction for social researchers*.

投稿論文

Imada, Y., Nakamura, H. & Takano, Y. Density functional study of porphyrin distortion effects on redox potential of heme. *J. Comput. Chem.* 1–8 (2017). doi:10.1002/jcc.25058

謝辞

本研究を行うにあたり、その機会を与えていただき、親切なご指導、ご鞭撻を賜りました大阪大学蛋白質研究所 中村春木教授に深く感謝いたします。また、直接ご指導頂いた広島市立大学大学院情報科学研究科 鷹野優教授には、貴重なお時間を割いて頂き、日頃の研究における助言や研究成果を論文にするなど、大変お世話になりました。