

氏 名 望月 建爾

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第 1653 号

学位授与の日付 平成26年3月20日

学位授与の要件 物理科学研究科 機能分子科学専攻  
学位規則第6条第1項該当

学位論文題目 A Theoretical Study on the Molecular Mechanism of Ice  
Melting and the Local Structure of Aqueous Solutions

論文審査委員 主 査 教授 齊藤 真司  
教授 小杉 信博  
准教授 奥村 久士  
准教授 繁政 英治  
教授 岡崎 進 名古屋大学

論文内容の要旨  
Summary of thesis contents

水は、地球上のあらゆる化学反応や生命維持活動に必要な不可欠な物質として、我々の身近に多量に存在している。日常的に目にする物質でありながら、融点・沸点が同族の化合物に比べ高い事や、固相が 16 種類あることなど、非常に特殊な性質を持っている。また、多くの物質を溶解し多様な反応場を与える、生体高分子の反応や構造維持を助けるなど、水にしかできない溶媒としての役割がある。そのような水の特殊な性質は、三次元的に形成された水素結合ネットワークに起因する事が知られているが、水の物理化学的現象の分子レベルの理解は、未だ不十分である。本博士論文では、水素結合ネットワークの観点から、コンピュータシミュレーションを活用して、氷の融解ダイナミクス、メタノール水溶液の局所構造を明らかにした。さらに、創薬の *in silico* スクリーニングに必要な、タンパク質のリガンド結合の自由エネルギー計算の簡便方法の開発を行った。

氷の融解ダイナミクスの解明 (第 2 章)

氷は通常、融点(1 気圧では 0°C)で容器の壁や表面から融け始める (不均一融解)。これに対し、界面が存在しない理想的な環境では、熱揺らぎのみにより、自発的に結晶構造に乱れが生じ融解する (均一融解)。氷の結晶は、それぞれの水分子が隣接する 4 つの水分子と強い方向性を持つ水素結合を作っており、規則正しく秩序を保った非常に安定な水素結合ネットワークを形成している。従って、氷の中に乱れが生じると、エネルギーが大きく不安定化するが、乱れが生じて水分子同士の水素結合の強い方向性のためにエントロピーを稼ぐのが難しく、均一融解のポテンシャルエネルギー面は勾配のきつい漏斗型となり、融解は進行し得ない。実際、氷がそのようなシャープなポテンシャルエネルギーの井戸から如何に抜け出し、乱れを拡大していくのだろうか。すなわち、局所的な欠陥の生成と消滅を繰り返す長い待ち時間から、どのような乱れがきっかけとなり、それが成長し、融解に至るか、その分子論的メカニズムは謎であった。

本研究は、分子動力学シミュレーションを用いて、氷の均一融解過程を再現した。これまでは、系の融解の程度を表す尺度として、乱れた構造と氷構造の二状態の単純な差である、結晶点から外れた分子数 (defect 数) が広く使われてきた。しかし、本研究では、二状態の道のりを表す、乱れた構造が結晶構造に修復するのに必要な水素結合の組み替え総数 (edit distance) を、乱れを表す尺度として新しく定義した。これら二つの尺度 (defect 数と edit distance) を用いて、自由エネルギー計算、素過程のエネルギーバリア計算、水素結合のネットワーク解析などを行った。そして、氷の融解過程が、これまで考えられていた、微小な液滴の形成→液滴の成長→大規模な融解という単純な経路ではなく、ある種の格子欠陥対の形成と分離といった複雑な過程を経ないと、進まない事を明らかにした。この欠陥対は“消えない欠陥”として結晶中に存在し続ける。さらに、水素結合ネットワークの組み替えを活性化(容易に)する役割も同時に果たし、氷の強固な水素結合ネットワーク構造を崩壊に導く“きっかけ”であることを明らかにした。なぜなら、水分子同士の水素結合のエネルギーは非常に強いいため、温度による構造の揺らぎに誘発されていくつかの欠陥が出来ても、ほとんどの場合すぐに安定な氷構造へ戻ってしまう。しかし、一旦格

(別紙様式 2)  
(Separate Form 2)

子欠陥対が分離すると、それらの欠陥対を消して、再び完全な氷構造へ戻すのは困難であり、糸がからまりなかなかに元に戻せないような現象、“水素結合ネットワークのからまり”が生じる。この欠陥対は“消えない欠陥”として結晶中に存在し続け、さらに、水素結合ネットワークの組み替えを活性化する（エネルギーバリアを下げる）役割も果たす事で、氷の強固な水素結合ネットワーク構造を崩壊に導く“きっかけ”になる事を見つけた。

メタノール水溶液の局所構造の解明（第3章）

水和や疎水相互作用は、多くの化学や生物過程において重要な働きをする。例えば、膜の形成やフォールディング過程において、疎水基を自ら隠すように自己組織化する事が知られている。メタノールは、親水基と疎水基を持つ最も小さな分子であり、メタノール水溶液の分子レベルの理解は、両親媒性分子の基本的な性質を解き明かし、生体機能の理解にも繋がる重要な研究である。

水とメタノールは、共に水素結合を形成する事ができ、任意の割合で混合できる。しかし、混合エントロピーの実測値は、ランダムに混ざった理想的な混合に比べ低く、分子レベルでは均一に混ざっていない事が知られている。これまで、実験や理論の両面から、メタノール水溶液の分子構造を調べる研究が行われてきたが、濃度による構造変化に着目した研究はあまり行われていない。本研究では、分子科学研究所の極端紫外光研究施設(UVSOR)で行った軟 X 線吸収分光(XAS)実験と、分子動力学シミュレーションを用いて、溶液の局所構造と大局的な水素結合ネットワーク構造の濃度変化を明らかにした。

炭素内殻励起の XAS スペクトルを測定したところ、メチル基周りの局所構造の影響を受ける 289eV 付近の強度が、メタノール濃度(x%)によって3つの状態に分かれる事が明らかになった：メタノールが多い領域 I ( $1.0 > x > 0.7$ )では、スペクトル強度は濃度にほとんど依存しない。 $x=0.7$  の濃度において、メチル基の分布を多く持つ励起状態に相当するピークがブルーシフトして、結果として 289 eV 領域のスペクトル強度が減少する。その後、領域 II ( $0.7 > x > 0.3$ )では、濃度に比例し強度が減少して、領域 III ( $0.3 > x$ )でその傾きが急になる。分子動力学計算を用いて、メタノールと水の混合状態を再現した。局所構造解析により、メチル基周りの分子配置を調べた所、領域 I ではメタノールの水酸基が多く、領域 II, III では水が多いことが分かった。また、領域 III ではメチル基周りの水の数が急激に増える事を明らかにした。さらに、水素結合ネットワークのパーコレーション解析により、 $x=0.3$  で水とメタノール混合のネットワーク、 $x=0.7$  で水だけのネットワークがそれぞれパーコレートしている事を明らかにした。

タンパク質のリガンド結合自由エネルギー計算方法の開発（第4章）

タンパク質と低分子化合物（リガンド）の結合による自由エネルギー変化を正確に計算することは、異なるリガンドを区別するメカニズム（分子認識）を理解する上で重要である。また、新薬開発においては、病気の原因となるタンパク質の働きを阻害するリガンド（薬）を低コスト・短時間で見つける為に、リガンド結合の自由エネルギー計算の簡易的な方法が求められている。

リガンド結合の自由エネルギーは、タンパク質とリガンドが結合した複合体の結合前後の自由エネルギー差から求められる。正確な自由エネルギー計算には、エネルギー面上の

(別紙様式 2)  
(Separate Form 2)

到達可能な全ての領域をサンプルする必要がある。しかし、数千～数万原子からなるタンパク質に対しては、サンプリングすべきエネルギー面が広大なだけでなく、特定の極小状態にトラップされやすく、必要な全ての構造のサンプリングは現実的に不可能である。

本研究では、数千～数万原子の巨大なタンパク質に数十原子のリガンドが結合した場合、結合部位から遠い領域には大きな構造変化が起こらず、タンパク質と複合体の自由エネルギーの“差”には、影響しないと仮定した。全原子の相互作用を残したまま、部分的に構造を固定化し、自由度を減らす **Rigid Body** 法と、効率的なエネルギー面サンプリングができる **Basin-Hopping parallel tempering** 法を組み合わせ、実験結果が豊富な複合体、**Human Aldose Reductase** に適用した。その結果、結合部位からある長さ以上離れた場所を固定化した場合に、リガンド結合の自由エネルギー値が一定になることが分かった。つまり、**Human Aldose Reductase** のようにリガンド結合によりタンパク質の構造が大きく変わらない場合は、リガンド結合周辺のサンプリングのみでリガンド結合の自由エネルギー計算を行えることを示した。

Summary of the results of the doctoral thesis screening

水は我々に最も身近な液体であるにも関わらず、その物理・化学的現象の分子レベルには未解決の問題が多く残されている。本論文では、水素結合ネットワーク系の分子シミュレーションに基づき、氷の融解過程、メタノール水溶液の局所構造の濃度依存性を明らかにするとともに、タンパク質の分子認識解析のための簡便な計算方法の開発をまとめている。論文の概要は以下の通りである。

第1章の序論に続き、第2章では6員環の水素結合ネットワークからなる氷の均一融解過程を纏めている。これまでの研究では、隣接する水2分子の変位により形成された隣接する5員環と7員環からなる5-7欠陥構造が増加することにより氷が融解すると推察されていた。本章では、まず、5-7欠陥構造が増加するだけでは氷は融解しないことを明らかにした。さらに、揺らぎによる5-7欠陥構造の生成消滅の結果、格子間分子と空孔による格子欠陥対が氷の融解を引き起こすことを明らかにした。また、融解により乱れた構造と結晶構造間の水素結合の組み換え数を秩序変数として融解過程を解析するとともに、融解過程に関する自由エネルギー面の解析等に基づき氷の均一融解過程の分子機構を明らかにした。

第3章では、3次元水素結合ネットワークを構成する水と1次元あるいは2次元水素結合ネットワークを構成するメタノールの混合によるネットワーク構造の解析を纏めている。水の濃度が70%程度までの水が多い濃度領域では水の3次元水素結合ネットワークの中にメタノール分子が散在しているパーコレートした構造をとること、メタノールが増え水の濃度が70-30%までの濃度領域ではメタノールと水の分子が混合しパーコレートした水素結合ネットワークを構成していること、さらにメタノールが増えると（水の濃度が30%以下）、メタノールが作る水素結合ネットワークが優勢となるとともに、メチル基の周りには水がほとんど存在しないことを明らかにした。これらの濃度変化による水素結合構造ネットワークの変化はメタノール水溶液の炭素内殻励起領域での軟X線吸収スペクトルの挙動とも一致している。これらの解析を通して、アルコール水溶液における局所的構造と大域的な水素結合ネットワークの濃度変化を明らかにした。

第4章では、タンパク質と低分子化合物（リガンド）の結合による自由エネルギー変化を簡便に見積もる方法論の開発を纏めている。タンパク質とリガンドの結合は分子認識に関する物理化学的観点に加え、創薬・医療の観点からも重要な問題である。しかし、サンプリング空間が広大であるとともに極小状態にトラップされやすいため、必要な全ての構造のサンプリングは現実的に不可能である。この問題を回避するため、リガンド結合により引き起こされる構造変化を露わに扱う領域と構造変化を無視できる領域の2つの領域に系を分割することにより、簡便に自由エネルギーを見積もる方法を開発した。さらに、リガンド結合によりタンパク質の構造が大きく変化しない場合には、リガンド結合周辺のサンプリングのみで効率的にリガンド結合の自由エネルギーを見積もれることを Human Aldose Reductase を例に実証し、この手法の有用性を示した。

(Separate Form 3)

以上の研究は、大域的に広がった規則正しいネットワーク構造の構造変化過程、異なるネットワーク構造を取る混合系の溶質近傍の局所的小よび大域的ネットワーク構造、また、溶質-溶媒系の自由エネルギーを簡便に見積もる手法の提案に関するものであり、高く評価できる。以上から、本論文は博士（理学）の学位の授与に値すると審査員全員一致で判断した。