

1D03 水溶液中の糖のコンホメーション解析 ～NMR 結合定数の経験式の開発と *ab initio* 計算と分子動力学計算による予測～

○松原 正陽¹, 及川 雅人², 後藤 仁志¹

¹豊橋技術科学大学大学院工学研究科 (〒441-8580 豊橋市天伯町雲雀ヶ丘 1-1)

²横浜市立大学大学院生命ナノシステム科学研究科 (〒236-0027 横浜市金沢区瀬戸 22-2)

【緒言】 糖タンパク質や糖脂質として存在する糖鎖は、生体内において様々な役割を持つことが明らかにされてきている。特に糖鎖認識機構においては、単に各糖残基のアルドヘキソピラノース環の安定なコンホメーションだけで説明できるとは限らず、六員環上の水酸基の配向や分子内、水分子、グリコシド結合を介した糖鎖残基間の水素結合構造を明らかにし、糖残基を比較的簡単に解析できる手法の確立が望まれている。一方、NMR 解析から得られる結合定数のうち、 $^2J_{CH}$ は六員環上の8種の値によって糖残基の種類が同定可能なことが及川等によって示され[1]、隣接する水酸基の回転異性に強く依存することが理論計算から明らかにされている[2]。これらを用いることで、活性部位周辺で糖残基が関わる水素結合構造等を解明するための手掛かりとなることが期待できる。

そこで我々は、これらの結合定数を用いた水溶液中の糖のコンホメーション予測を目的として、これまで二つのアプローチで NMR 実験値の再現を試みてきた。すなわち、①糖の単分子モデルについて、溶媒効果を考慮した高精度 *ab initio* 法を用いて、立体配座、エネルギー、NMR 結合定数の理論計算による多配座混合を考慮した方法と、②実験測定条件を再現する糖水溶液アンサンプルの MD 計算と、新たに開発した NMR 結合定数の経験式を用いて、NMR 結合定数を決定する方法である。①では、糖の複数の配座異性体に対して様々な理論的手法や基底関数を適用することで、NMR 結合定数の構造や手法及び基底関数に対する依存性をそれぞれ詳しく調査するとともに、配座異性体のエネルギーを元にボルツマン分布則に基づく配座異性体ごとの存在確率によって重み付け平均した NMR 結合定数を実験値と比較した。溶媒効果も考慮する。これによって、糖のエネルギーと NMR 結合定数を求める適切な手法を検討した。②では、 $^2J_{CH}$ 値を隣接する水酸基の回転角によって記述する経験式を作成した。また、実験条件を再現した MD 構造に経験式を適用、NMR 結合定数を求め、その値を実験値と比較し経験式及び本手法を評価した。

本報告では、 α -D-ガラクトース (α -Gal) の解析結果を中心に紹介する。

【研究の概説】

ab initio 計算による糖のエネルギーおよび NMR 物性値の理論計算

α -Gal の配座空間探索と構造最適化

CONFLEX/MMFF94s[3]による配座探索から 150 個の α -Gal の配座異性体を創出した。これらを初期構造として、Gaussian09[4]の MP2 法および DFT 法 (B3LYP, B3PW91) の手法と基底関数 6-31+G(d,p) を用いて最適化を行った。PCM 法 (水溶媒モデル) を用いた場合も同様に行った。B3LYP/6-31+G(d,p) による構造最適化を行ったところ、いくつかは同じ配座に収束し、溶媒効果なしで 130 個、PCM 法を使った場合で 138 個のユニークな配座異性体を得られた。しかし、どちらも最安定配座からの配座エネルギー差が 1 kcal/mol 以内の配座異性体の $^2J_{CH}$ 計算値と実験値との差 (RMSD) は 1.4-1.7 Hz と大きく、全ての配座異性体の $^2J_{CH}$ 値をそれぞれの存在比で平均しても 1 Hz 以上であった (Table 1.)。

α -Gal の実測 $^2J_{CH}$ 値を再現する配座異性体

全ての配座異性体のうち、RMSD が 1 Hz 以下の配座異性体は 3 個であった。最も RMSD の小さい配座異性体を Fig. 2. に示す。これらの配座異性体は配座エネルギーにおいて優位ではなく、PCM 法を用いた B3LYP/6-31+G**計算で最安定配座から 2.5-2.9 kcal/mol, B3LYP/6-311+G(2d,p)で 2.3-2.6 kcal/mol も不安定であると予測された。これらの存在比は合わせても 1 % 程度に過ぎなかった。また、いくつか

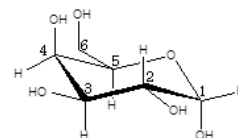


Fig 1. 4C_1 conformation of α -Gal

の基底関数や溶媒和モデルを組み合わせて MP2 と B3LYP による計算を行ったが、注目する3種類の配座異性体の存在比が大きくなるということが分かった。

Table 1. Comparison between observed and calculated $^2J_{CH}$ values of α -Gal

CONF.	$^2J_{CH}$								RMSD
	C1,H2	C2,H1	C2,H3	C3,H2	C3,H4	C4,H3	C4,H5	C5,H4	
Expl.	-0.4	-1.0	-5.4	-6.2	-4.6	1.2	5.6	1.5	-
average in vacuo	-0.5	-0.2	-3.6	-3.6	-4.0	1.2	3.3	3.0	1.50
average in water	-0.9	-1.0	-3.4	-4.3	-3.9	1.5	3.4	2.5	1.35
4C_1 rccc tg g	-1.2	-1.1	-4.1	-4.4	-4.5	0.9	5.8	2.5	0.93

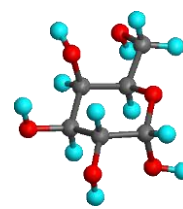


Fig 2. α -Gal conformation (4C_1 rccc tg g) in the best agreement with observed $^2J_{CH}$ values

$^2J_{CH}$ 経験式の開発

経験式の定式化とパラメータフィッティング

Klepach らの報告[2]の $^2J_{C_2,H_1}$, $^2J_{C_1,H_2}$ 式を基準に、我々は六員環上に存在する8種の $^2J_{CH}$ の経験式を展開し、下式のように定義した。

$$^2J_{CH} = \sum_{n=1}^3 A_n \cos(n\alpha + \sigma_{A_n}) + \sum_{n=1}^3 B_n \cos(n\beta + \sigma_{B_n}) + C$$

ここで、 α , β はそれぞれ C_x 上, C_a 上の置換基の回転角で、 C は定数, A_n , B_n はそれぞれ回転角の n (1~3) 倍角, σ は周期に対するパラメータである。パラメータは8種の $^2J_{CH}$ で個別の値とした。パラメータフィッティングに用いる参照データは、 α -Gal の 4C_1 構造について、各置換基 (4つの H-C-O-H 及び O5-C5-C6-O6) を 30° 刻みで回転させた構造に対し、B3LYP/6-311+G(2d,p)//B3LYP/6-31+G(d,p) と PCM 法 (水溶媒モデル) による NMR 計算で求めた $^2J_{CH}$ を採用。フィッティングの結果、 $^2J_{CH}$ の参照データとの差の RMS は $0.04 \sim 0.07$ Hz となり、十分に再現できていることが分かった。

実験測定条件を再現する糖水溶液アンサンブルの MD 計算

実験測定条件のモデル化と MD 計算

ガラクトース (Gal) 1 分子に対する水分子の数を NMR 実験測定条件[1]から算出し、糖水溶液 MD モデルを作成する。NMR 実験時 α - β -アノマーが混合状態だったため、存在比が 1 : 1 および 1 : 2 の二つの α - β -混合モデル (1a1b, 1a2b) を考慮する。Fig 3. にモデル

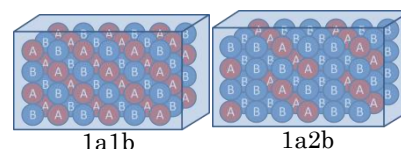


Fig 3. Configurations of α - β -monosaccharides in a unit cell

1a1b および 1a2b の α - β -混合の配置方法を示す。MD モデルの構築には、分子力学ソフト AMBER11[5] の LEaP を用い、分子力場として水分子 TIP3P, 糖分子 GLYCAM_06 を採用した。糖分子の初期構造は CONFLEX6/MMFF94s[3] で得られた最も安定なものを採用した。MD 計算には sandar.MPI を用いた。

MD 計算は、エネルギー最小化、NVT アンサンブルによる系の緩和、NPT アンサンブルによる実験環境の再現の手順で行う。今回は系全体のエネルギーと密度がある程度一定になった時点から実験環境が再現されたと見なし、NPT アンサンブルの後半の立体構造解析を行うこととする。

MD 計算と経験式による $^2J_{CH}$ 値の算出

スナップショット内のすべての糖の置換基の回転角から、作成した $^2J_{CH}$ 経験式を用いて8種の $^2J_{CH}$ を算出、平均値をスナップショット構造の $^2J_{CH}$ 値とする。さらに、各平均値を一定期間まで積算することで、時間平均値を算出した。その結果、1a1b と 1a2b の両モデルの時間平均値は、積算期間を長くすることによってともに一定の値に収束した。さらに、本手法による $^2J_{CH}$ の時間平均値と ab initio 計算による手法を比較したところ、本手法のほうが僅かではあるが実験値を再現することが分かった。(Fig 4.)

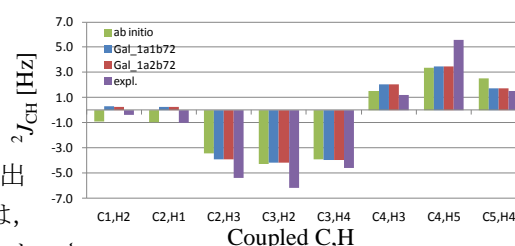


Fig 4. Comparison of $^2J_{CH}$ values calculated by ab initio and empirical equation methods

【参考文献】

- [1] M. Oikawa, S. Adachi, S. Kusumoto, *Org Lett.*, 2005, 7; 661-664.
- [2] Thomas E. Klepach, Ian Carmichael, and Anthony S. Serianni, *J. Am. Chem. Soc.* 2005, 127, 9781-9793
- [3] CONFLEX6, H. Goto, S. Obata, T. Kamakura, N. Nakayama, K. Ohta; Conflex Corp., Tokyo, 2006.
- [4] Gaussian 09, Revision A.02: M. J. Frisch, et. al., Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2009.
- [5] AMBER11, P.A. Kollman et. al., University of California, San Francisco, 2010.