

# Winmostar - Gromacs Tutorial 3

溶媒和自由エネルギー編

V6.018

株式会社クロスアビリティ

[question@winmostar.com](mailto:question@winmostar.com)

2016/7/11

# 修正履歴

2015/10/19版

- Version 6対応版

2015/11/25版

- 溶媒系、溶液系の分子数の制限に関する記述を追加

2016/1/15版

- 溶質の計算を剛体近似して省略するよう変更
- 高圧での平衡化を省略
- 細かい文章表現を調整

2016/6/30版

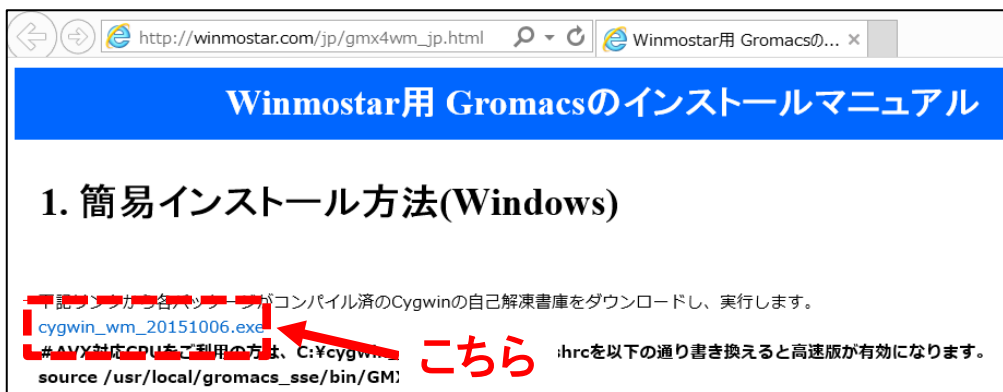
- V6.016対応

2016/7/11版

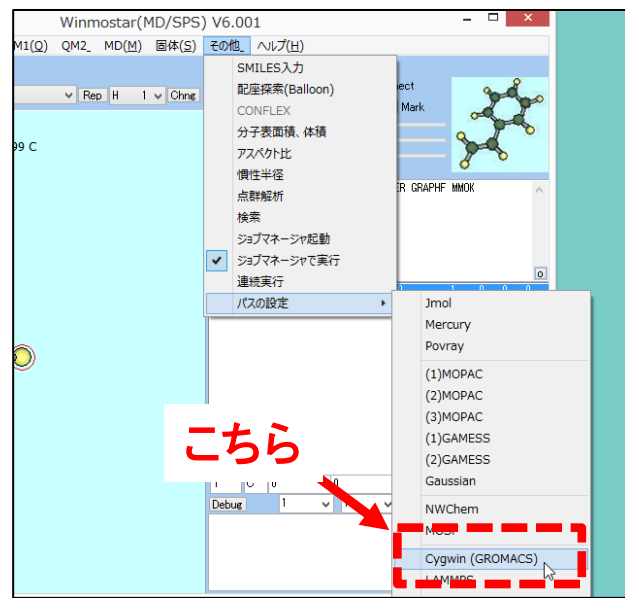
- V6.018対応

**Gromacsおよび関連ツールを使うためには、Cygwinのセットアップが必要です。**

- [http://winmostar.com/jp/gmx4wm\\_jp.html](http://winmostar.com/jp/gmx4wm_jp.html)の「1. 簡易インストール方法 (Windows)」から、自己解凍書庫 (exe) を入手し実行してください。



- デフォルトではC:¥直下にcygwin\_wmがインストールされますが、C:¥直下以外に置く場合はWinmostarの「その他」>「パスの設定」>「Cygwin (GROMACS)」にてcygwin\_wmの場所を指定して下さい。



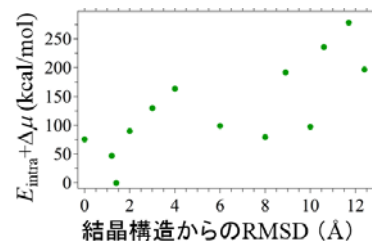
# MD計算による溶媒和自由エネルギーの予測

- 溶媒和自由エネルギーにより、相溶性や分子構造の安定性などを定量的に評価できる。

例) ◆ 分配係数(平衡定数)と1対1で対応 → 添加物の分散性や不純物の透過性などの解析に有用

$$\log P_{AB} = (\Delta\mu_A - \Delta\mu_B)/2.303RT$$

- ◆ タンパク質の構造の安定性も評価可能[1]



[1] K. Takemura *et al.*, *J. Chem. Phys.*, 137, 215105 (2012).

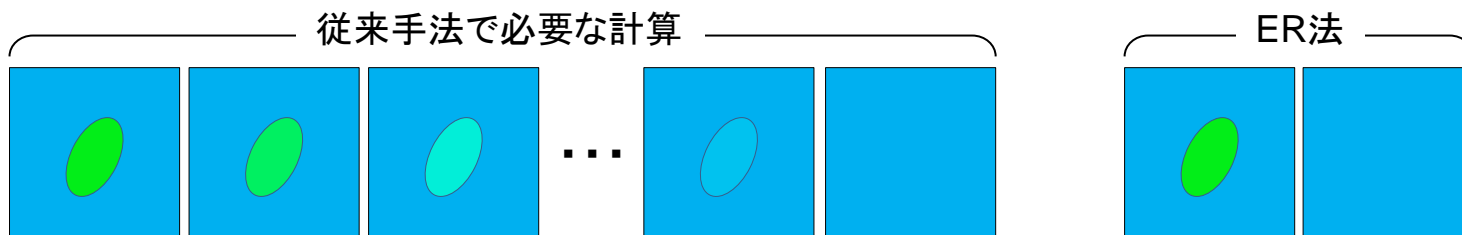
- MD計算は、他の予測手法と比べて精度と計算時間の面で優れる。

予測手法	実験値からの平均的な偏差 / kcal・mol <sup>-1</sup>
量子化学計算＋ 連続体近似の溶媒	± 1.08 (SMD/IEF-PCM/B3LYP)[2] ± 1.16 (SMD/IEF-PCM/HF)[2]
積分方程式 (RISM)	± 24.2 (HNC), ± 2.3 (GF)[3]
MD計算	± 0.7 (OPLS)[3]

[2] A. V. Marenich *et al.*, *J. Phys. Chem. B*, 113, 6378-6396 (2009). [3] Y. Karino *et al.*, *Chem. Phys. Lett.*, 496, 351-355 (2010).

# エネルギー表示法について

- 本チュートリアルでは、MDの結果からエネルギー表示法(ER法)を用いてエタノールの水和(溶媒和)自由エネルギーを算出
- ER法[4]は他の近似手法より高い精度で溶媒和自由エネルギーを予測
  - 従来手法である熱力学的積分法、自由エネルギー摂動法では20~30本のMD計算が必要であったが、ER法では2-3本のMD計算のみ必要



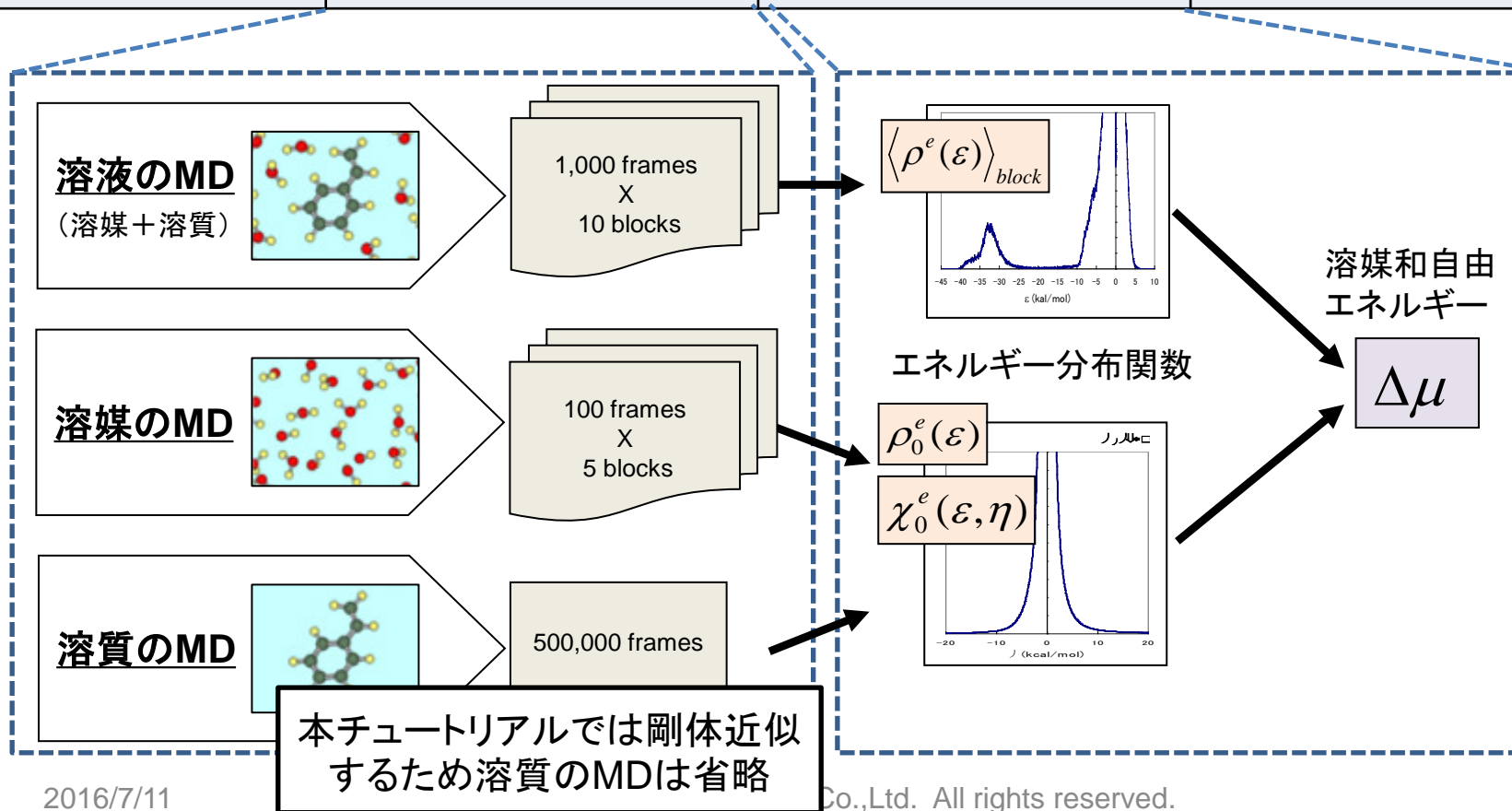
- エネルギー分布関数の汎関数として自由エネルギーを記述し(ここまでは厳密)、実用的な精度が出る項までの計算を実施することで精度を確保
- Winmostarは松林・櫻庭らによるER法の実装であるERmodのGUIを提供
  - ERmodは2012年の公開以来、35か国から計1600回以上ダウンロードされており、世界的に実績がある (<http://sourceforge.net/projects/ermod/>)。

[4] N. Matubayasi and M. Nakahara, *J. Chem. Phys.*, 113, 6070 (2000).

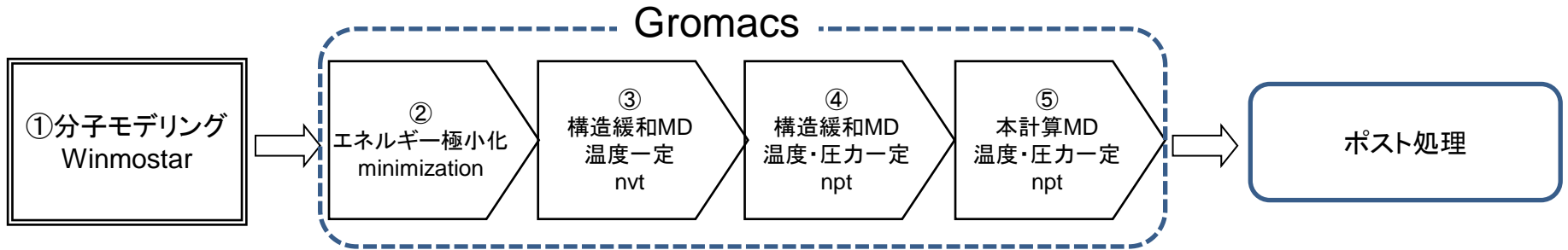
[5] H. Saito *et al.*, *Chem. Phys. Lett.*, 497, 218-222 (2010).

# 処理フロー

	I. MD計算	II. 自由エネルギー計算	III. 結果の表示
操作手順 (「MD」>「Gromacs」)	「キーワード設定」 「Gromacs実行」	「ER法設定」	「溶媒和自由エネルギー (ER法)」
内容	MD計算を実行して、分子の時々刻々の位置・速度(スナップショット)を取得	スナップショットから溶媒和自由エネルギーを計算	計算した溶媒和自由エネルギーを表示



# 各MD計算の手順



- ① 溶質分子のモデリング  
Winmostarを使って、 $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ を作成する。
- ② エネルギー極小化(最急降下法)計算  
⇒ 系のポテンシャルエネルギー変化や計算系を確認する。
- ③ 構造緩和MD(温度一定: nvt)  
⇒ 系の温度、エネルギー変化を確認する。
- ④ 構造緩和MD(温度・圧力一定: npt)  
⇒ 系の温度、体積変化などを確認する。
- ⑤ 本計算MD(温度・圧力一定: npt)  
⇒ 系の温度、体積変化などを確認する。

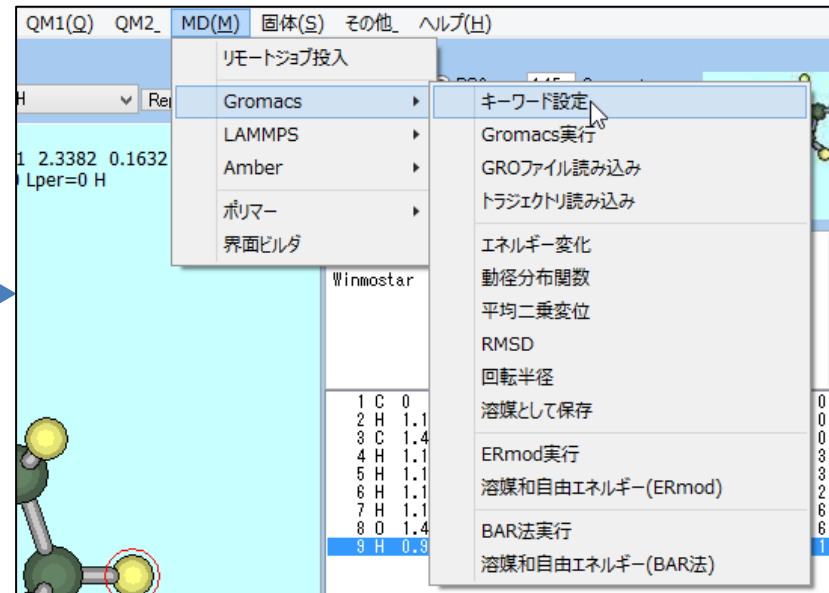
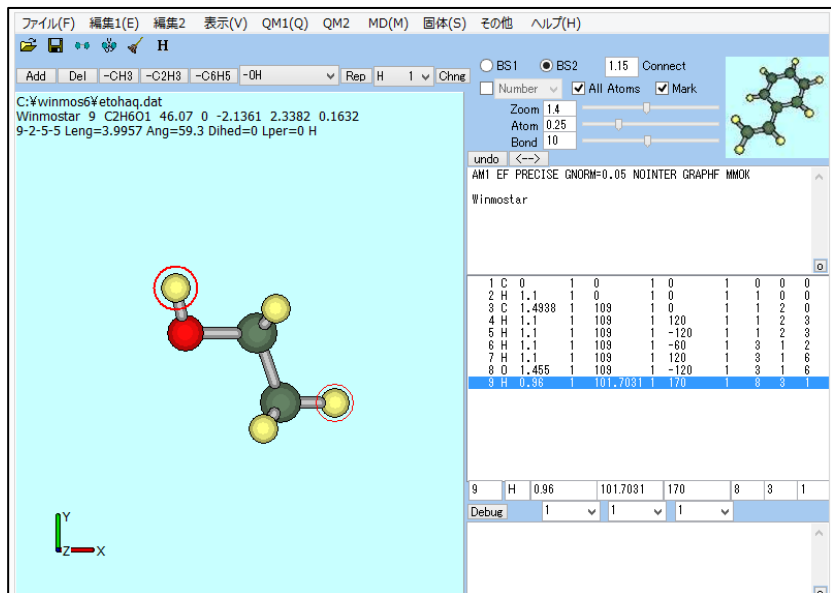
# I. MD計算

## 【①溶液系】モデリング

まず、エタノール1分子(溶質)と水1000分子(溶媒)から構成される、溶液系(液相)のMD計算を実施する。

Winmostarメイン画面にてエタノール分子をモデリングし、「ファイル」>「名前を付けて保存」にてC:¥winmos6¥etohaq.datで保存

「MD」>「Gromacs」>「キーワード設定」を選択





# I. MD計算

## 【①溶液系】 エネルギー極小化の設定

以下の項目を設定し(他はデフォルト値)「Gromacs実行」する。

一旦、ウインドウ右下の[Reset]ボタンを押しデフォルト値に戻す。

- ① 力場は「OPLS-AA/L」
- ② 溶媒(solvent) に「WATER」を指定し、最大溶媒挿入数(maxsol/nmol)を1000に

Gromacs Setup

Preprocess Parameters (1) Parameters (2) Options Preprocessタブ

pdb2gmx

Use acpype

Method

AM1-BCC

Gasteiger

User

Net Charge 0

Use pdb2gmx

Ignore H atom

No Solute

Force Field

① OPLS-AA/L

editconf

Box Type cubic

Distance [nm] 1.5

Box Size [nm] 2.5 2.5 2.5

Angles 90.0 90.0 90.0

Import

solvent / insert-molecules

② Solvent WATER

maxsol/nmol 1000

genion

# I. MD計算

## 【①溶液系】 構造緩和(温度一定)の設定・実行

同様に「キーワード設定」から以下のように設定し、「Gromacs実行」する。

直前の設定からの変更点:

- ① Extending Simulationをチェック
- ② integratorはmd(分子動力学)
- ③ ステップ数(nstep)は 25000
- ④ 全ての結合長を拘束(constraint: all-bonds)
- ⑤ 座標出力間隔(nstxout)は100 steps
- ⑥ 必要に応じて、「Options」タブで並列数を指定し計算を高速化

**Gromacs Setup**  
Parameters (1) タブ

Parameters for mdp File

- ①  Extending Simulation
- Velocity Generation: gen-vel: yes
- Run Control: integrator: md (②)
- Simulation Time: dt [ps]: 0.002; nsteps: 25000 (③)
- Energy Minimization: emtol [KJ/mol/nm]: 100.0; emstep [nm]: 0.01
- Electrostatic: coulombtype: PME; rcoulomb [nm]: 1.2
- VdW: vdwttype: Cut-off; rvdw-switch [nm]: 1.0; rvdw [nm]: 1.2
- Temperature Coupling: tcoupl: berendsen; tc-grps: System
- Pressure Coupling: pcoupl: no; tau-p [ps]: 1.0; compressibility [/bar]: 4.5e-5; ref-p [bar]: 1.0
- Constraints: constraints: all-bonds (④); constraint-algorithm: LINCS
- Output Control: nstxout: 100 (⑤)

**Gromacs Setup**  
Options タブ

mdrun

- # of MPI Procs (for Remote Job): 1
- ⑥ # of Threads (for Local Job): 1
- Verbose Output
- maxwarn: 10
- Backup Working Directory

# I. MD計算

## 【①溶液系】 構造緩和(温度圧力一定)の設定・実行

「キーワード設定」から以下のように設定し、「Gromacs実行」する

直前の設定からの変更点:

- ① 初速度を前の計算から引き継ぐ (gen-vel=no)
- ② ステップ数(nstep)は 25000
- ③ 圧力制御(pcoupl)にはparrinello-rahmanを使用

Gromacs Setup

Preprocess Parameters (1) Parameters (2) Options Parameters (1)タブ

Parameters for mdp File

Extending Simulation

**Velocity Generation**

① gen-vel no

**Run Control**

integrator md

**Simulation Time**

dt [ps] 0.002

② nsteps 25000

**Electrostatic**

coulombtype PME

rccoulomb [nm] 1.2

**VdW**

vdwtype Cut-off

rvdw-switch [nm] 1.0

rvdw [nm] 1.2

**Pressure Coupling**

③ pcoupl parrinello-Rahman

tau-p [ps] 1.0

compressibility [/bar] 4.5e-5

ref-p [bar] 1

refcoord-scaling no

**Constraints**

constraints all-bonds

# I. MD計算

## 【①溶液系】本計算の設定・実行

「キーワード設定」から以下のように設定し、「Gromacs実行」する。

直前の設定からの変更点:

- ① ステップ数(nstep)は 50000
- ② 圧縮フォーマット(xtc)での座標出力間隔(nstxout-compressed)は5 steps

Gromacs Setup

Parameters (1) タブ

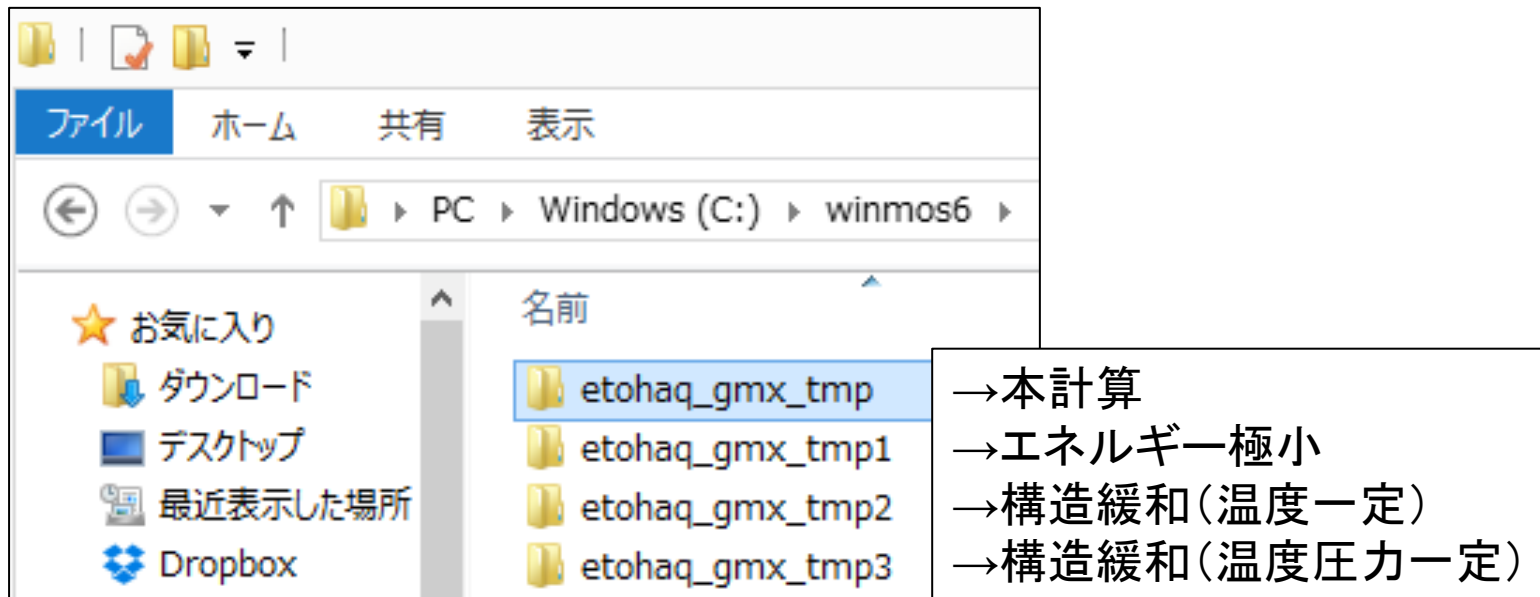
Parameters for mdp File

Category	Parameter	Value
Velocity Generation	gen-vel	no
	integrator	md
Simulation Time	dt [ps]	0.002
	nsteps	50000
Energy Minimization	emtol [KJ/mol/nm]	100.0
	emstep [nm]	0.01
Boundary Condition	pcpl	parrinello-Rahman
	pcoupl	tau-p [ps]
Electrostatic	coulombtype	PME
	rcoulomb [nm]	1.2
VdW	vdwtype	Cut-off
	rvdw-switch [nm]	1.0
Temperature Coupling	tcoupl	berendsen
	tau-t [ps]	1.0
Pressure Coupling	compressibility [/bar]	4.5e-5
	ref-p [bar]	1
Constraints	constraints	all-bonds
	constraint-algorithm	LINCS
Output Control	nstxout	100
	nstxout-compressed	5

# I. MD計算

## 【①溶液系】 計算データ保存先の確認

C:\¥winmos6の下に、以下のようにetohaq\_gmx\_tmp～etohaq\_gmx\_tmp3までのフォルダが生成されていることを確認



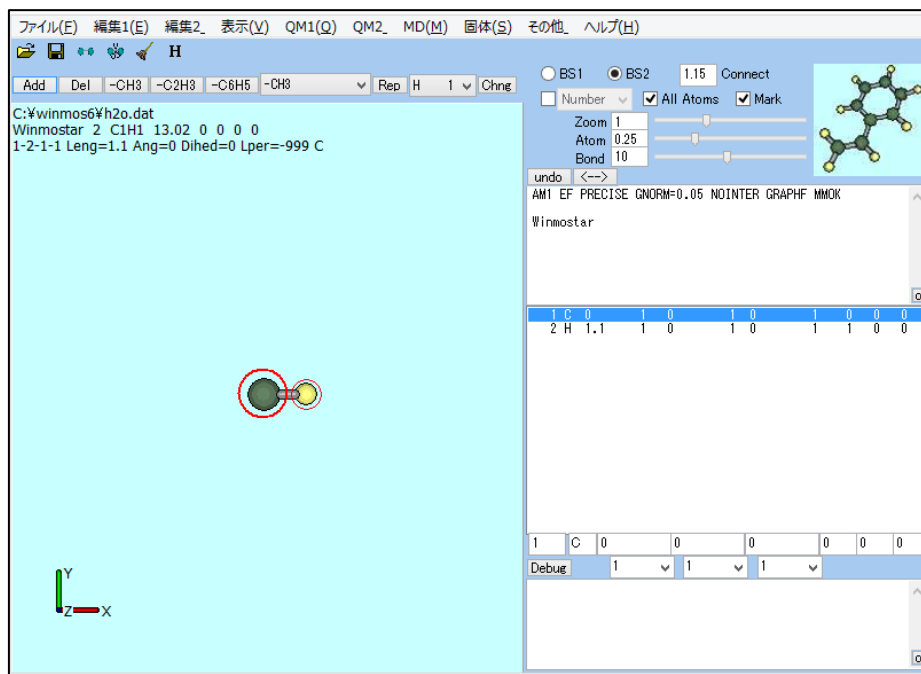
etohaq\_gmx\_tmp(本計算のデータ)は後の自由エネルギー計算で利用

# I. MD計算

## 【②溶媒系】モデリング

次に、水1000分子から構成される、溶媒系(液相)のMD計算を実施する。

「ファイル」>「新規」で新規モデリング画面表示後、  
モデリングを行わず、「ファイル」>「名前を付けて  
保存」にてC:\winmos6\h2o.datで保存



# I. MD計算

## 【②溶媒系】エネルギー極小化の設定

Gromacsメニューの「キーワード設定」から以下のように設定し、「Gromacs実行」する。

一旦、ウインドウ右下の[Reset]ボタンを押しデフォルト値に戻す。

- ① 「No Solute」を選択
- ② Box Sizeは3.3 nm
- ③ 溶媒(solvent) に「WATER」を指定し、最大溶媒挿入数(maxsol/nmol)を1000に

Gromacs Setup

Preprocess Parameters (1) Parameters (2) Options **Preprocessタブ**

**①**  No Solute

Force Field

editconf

Box Type cubic

Distance [nm] 1.5

**②** Box Size [nm] 3.3 3.3 3.3

Angles 90.0 90.0 90.0

Import

solvate / insert-molecules

**③** Solvent WATER

maxsol/nmol 1000

# I. MD計算

## 【②溶媒系】構造緩和(温度一定)の設定・実行

同様に「キーワード設定」から以下のように設定し、「Gromacs実行」する。

直前の設定からの変更点:

- ① Extending Simulationをチェック
- ② integratorはmd(分子動力学)
- ③ ステップ数(nstep)は 25000
- ④ 座標出力間隔(nstxout)は100 steps
- ⑤ 必要に応じて、「Options」タブで並列数を指定し計算を高速化

**Gromacs Setup**  
Parameters (1) タブ

Parameters for mdp File

- ①  Extending Simulation
- Velocity Generation: gen-vel: yes
- Run Control: integrator: md (②)
- Simulation Time: dt [ps]: 0.002; nsteps: 25000 (③)
- Energy Minimization: emtol [KJ/mol/nm]: 100.0; emstep [nm]: 0.01
- Electrostatic: coulombtype: PME; rcoulomb [nm]: 1.2
- VdW: vdwttype: Cut-off; rvdw-switch [nm]: 1.0; rvdw [nm]: 1.2
- Temperature Coupling: tcoupl: berendsen; tc-grps: System
- Pressure Coupling: pcoupl: no; tau-p [ps]: 1.0; compressibility [/bar]: 4.5e-5; ref-p [bar]: 1.0
- Constraints: constraints: all-bonds; constraint-algorithm: LINCS
- Output Control: nstxout: 100 (④)

**Gromacs Setup**  
Options タブ

mdrun

- # of MPI Procs (for Remote Job): 1
- ⑤ # of Threads (for Local Job): 1
- Verbose Output
- maxwarn: 10
- Backup Working Directory



# I. MD計算

## 【②溶媒系】構造緩和(温度圧力一定)の設定・実行

「キーワード設定」から以下のように設定し、「Gromacs実行」する。

直前の設定からの変更点:

- ① 初速度を前の計算から引き継ぐ (gen-vel=no)
- ② ステップ数 (nstep) は 25000
- ③ 圧力制御 (pcoupl) には parrinello-rahman を使用

Gromacs Setup

Preprocess Parameters (1) Parameters (2) Options Parameters (1)タブ

Parameters for mdp File

Extending Simulation

**Velocity Generation**

① gen-vel no

**Run Control**

integrator md

**Simulation Time**

dt [ps] 0.002

② nsteps 25000

**Electrostatic**

coulombtype PME

rcoulomb [nm] 1.2

**VdW**

vdwtype Cut-off

rvdw-switch [nm] 1.0

rvdw [nm] 1.2

**Pressure Coupling**

③ pcoupl parrinello-Rahman

tau-p [ps] 1.0

compressibility [/bar] 4.5e-5

ref-p [bar] 1

refcoord-scaling no

**Constraints**

constraints all-bonds

# I. MD計算

## 【②溶媒系】本計算の設定・実行

「キーワード設定」から以下のように設定し、「Gromacs実行」する。

直前の設定からの変更点:

- ① 圧縮フォーマット(xtc)での座標出力間隔(nstxout-compressed)は50 steps

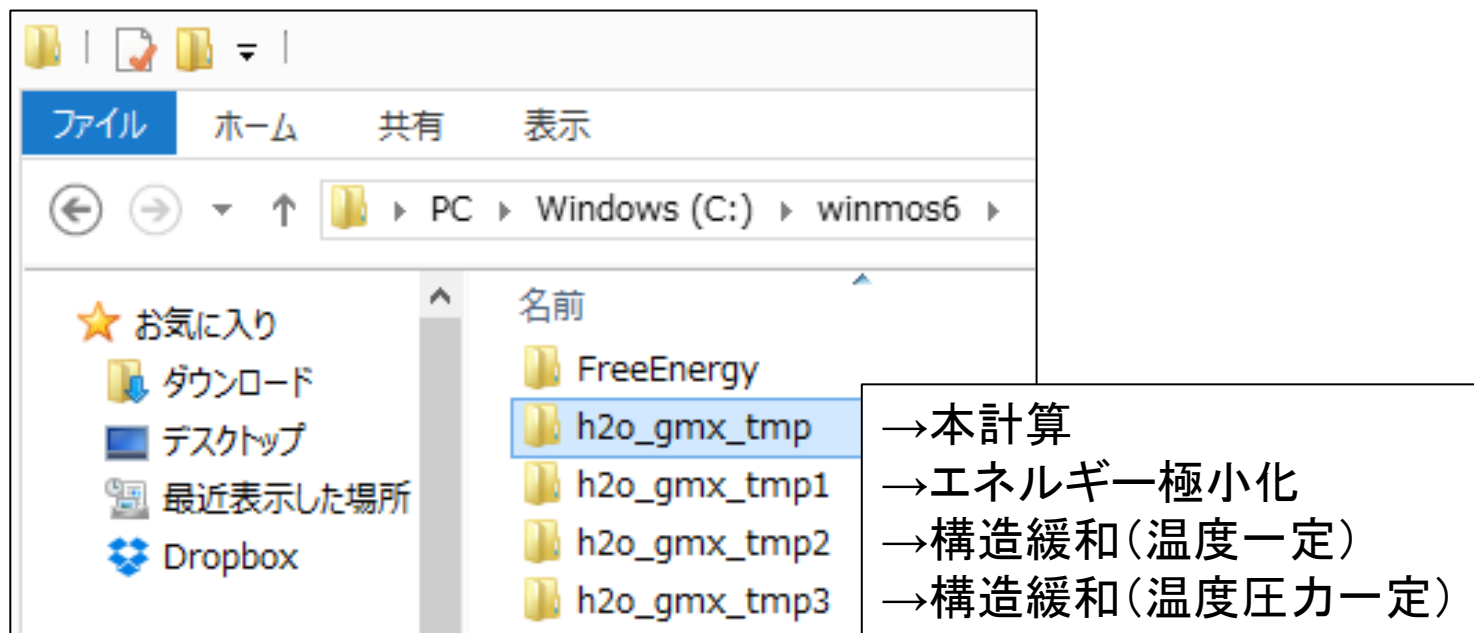
The screenshot shows the 'Gromacs Setup' window with the 'Parameters (1)' tab selected. The window is divided into several sections for configuring simulation parameters:

- Extending Simulation:** Checked.
- Velocity Generation:** gen-vel is set to 'no'.
- Run Control:** integrator is set to 'md'.
- Simulation Time:** dt [ps] is 0.002, nsteps is 25000.
- Energy Minimization:** emtol [KJ/mol/nm] is 100.0, emstep [nm] is 0.01.
- Boundary Condition:** pbc is set to 'xyz'.
- Electrostatic:** coulombtype is 'PME', rculomb [nm] is 1.2.
- VdW:** vdwtype is 'Cut-off', rvdw-switch [nm] is 1.0, rvdw [nm] is 1.2.
- Temperature Coupling:** tcoupl is 'berendsen', tc-grps is 'System', tau-t [ps] is 1.0, ref-t [K] is 300.0.
- Pressure Coupling:** pcoupl is 'parrinello-Rahman', tau-p [ps] is 1.0, compressibility [/bar] is 4.5e-5, ref-p [bar] is 1, refcoord-scaling is 'no'.
- Constraints:** constraints is 'all-bonds', constraint-algorithm is 'LINCS'.
- Output Control:** nstxout is 100, nstvout is 100, nstenergy is 100. The **nstxout-compressed** field is highlighted with a red box and a circled 1, with a value of 50.

# I. MD計算

## 【②溶媒系】 計算データ保存先の確認

C:¥winmos6の下に、以下のようにh2o\_gmx\_tmp~h2o\_gmx\_tmp3までのフォルダが生成されていることを確認

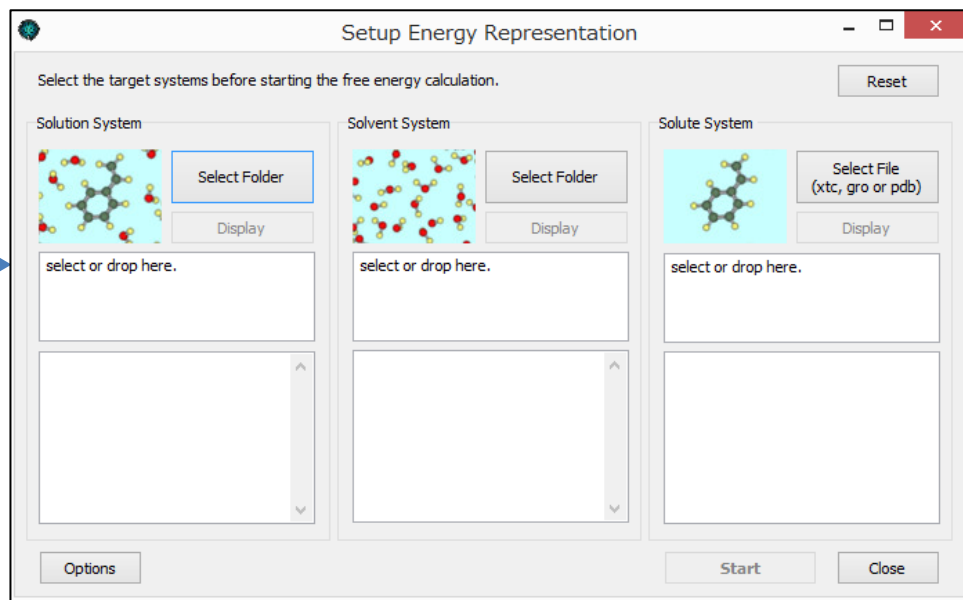
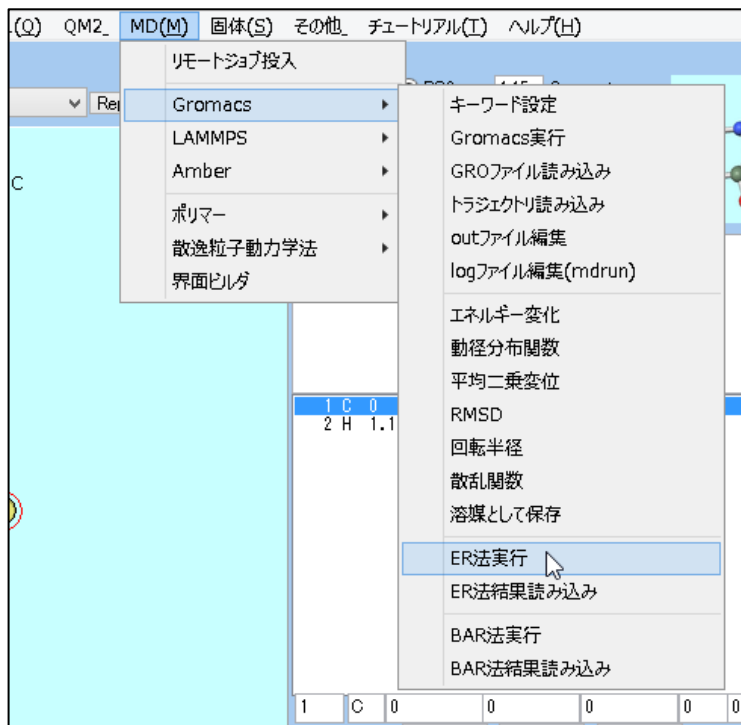


h2o\_gmx\_tmp(本計算のデータ)は後の自由エネルギー計算で利用

# II. 自由エネルギー計算

## ER法の設定

「MD」>「Gromacs」>「ER法実行」を選択する。以下のような設定画面が開く。



# II. 自由エネルギー計算

## 「I. MD計算」で取得したデータの指定(1)

まず、溶液系のデータを指定する。

表示

Windows (C:) > winmos6

名前

- etoh\_gmx\_tmp
- etoh\_gmx\_tmp1
- etoh\_gmx\_tmp2
- etohaq\_gmx\_tmp**
- etohaq\_gmx\_tmp1
- etohaq\_gmx\_tmp5
- etohaq\_gmx\_tmp6
- etohaq\_gmx\_tmp7
- FreeEnergy
- h2o\_gmx\_tmp

Setup Energy Repre

Select the target systems before starting the free energy calculation.

Solution System

number of species : 2  
molecule name : gmx\_tmp SOL  
number of molecules : 1 1000  
ensemble : NPT  
temperature : 300.0 K  
pressure : 1 bar  
simulation time : 100 ps  
number of steps : 50000  
number of snapshots : 10000

Options

[Display]で座標をWinmostarメイン画面に標示可能

C:\winmos6\etohaq\_gmx\_tmp  
を赤枠内にドラッグアンドドロップ

C:\winmos6\etohaq\_gmx\_tmp  
の計算条件等が表示される

※[Select Folder]でも同様にフォルダを指定可能

# II. 自由エネルギー計算

## 「I. MD計算」で取得したデータの指定(2)

次に、溶媒系のデータを指定する。

溶液系のデータに含まれる溶媒分子数と異なるとエラーが表示される。

表示

Windows (C:) > winmos6

名前

- FreeEnergy
- h2o\_gmx\_tmp**
- h2o\_gmx\_tmp1
- InterfaceBuilder
- polymer
- wm\_stack\_1
- wm\_stack\_2
- #etohaq.out.1#
- #etohaq.out.2#
- 1-adapass

Setup Energy Representation

Select the target systems before starting the free energy calculation.

**Solution System**

number of species : 2  
molecule name : gmx\_tmp SOL  
number of molecules : 1 1000  
ensemble : NPT  
temperature : 300.0 K  
pressure : 1 bar  
simulation time : 100 ps  
number of steps : 50000  
number of snapshots : 10000

**Solvent System**

number of species : 1  
molecule name : SOL  
number of molecules : 1000  
ensemble : NPT  
temperature : 300.0 K  
pressure : 1 bar  
simulation time : 50 ps  
number of steps : 25000  
number of snapshots : 500

C:\winmos6\h2o\_gmx\_tmp

C:\winmos6\h2o\_gmx\_tmpを赤枠内にドラッグアンドドロップ

C:\winmos6\h2o\_gmx\_tmpの計算条件等が表示される

※[Select Folder]でも同様にフォルダを指定可能

# II. 自由エネルギー計算

## 「I. MD計算」で取得したデータの指定(3)

最後に、溶質系のデータを指定する。

C:\Windows (C:) > winmos6 > etohaq\_gmx\_tmp

名前	更新日時	種類
gmx_tmp.acpype	2016/01/15 18:36	ファイル フォルダー
#gmx_tmp.top.1#	2016/01/15 18:36	1# ファイル
#trajout.xtc.1#	2016/01/15 18:10	1# ファイル
energy.log	2016/01/15 18:22	テキストドキュメント
energy.png	2016/01/15 18:22	PNG イメージ
energy.xvq	2016/01/15 18:22	XVG ファイル
<b>gmx_tmp.gro</b>	2016/01/15 18:36	GRO ファイル
	2016/01/15 18:36	ITP ファイル

Solute System

Select File (xtc, gro or pdb)

Display

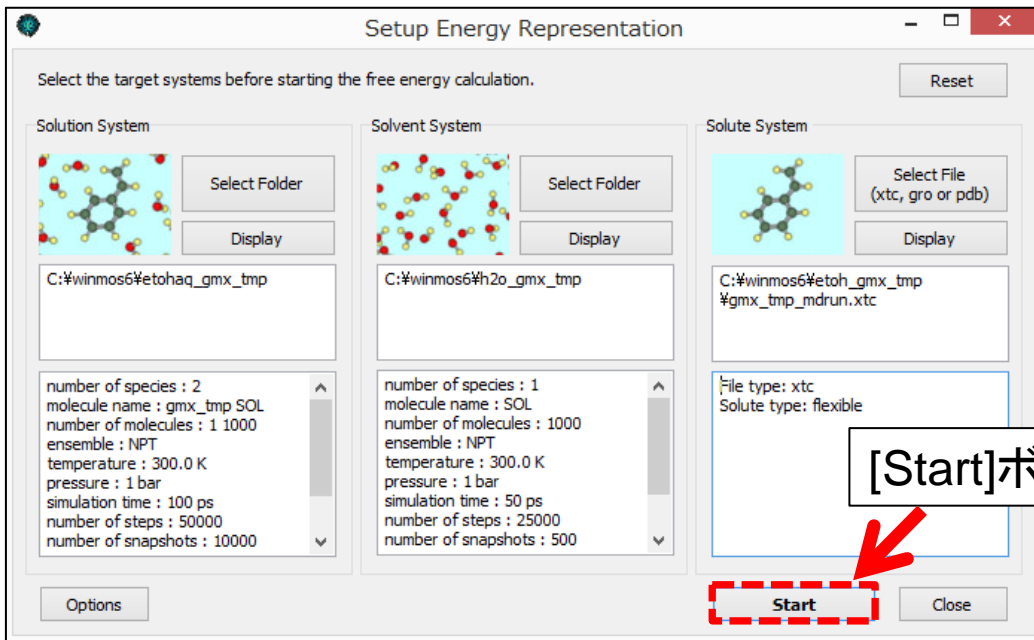
C:\winmos6\etohaq\_gmx\_tmp\gmx\_tmp.gro

C:\winmos6\etohaq\_gmx\_tmp\gmx\_tmp.groを赤枠内にドラッグアンドドロップ

※[Select File]でも同様に指定可能

# II. 自由エネルギー計算

## 自由エネルギー計算の開始



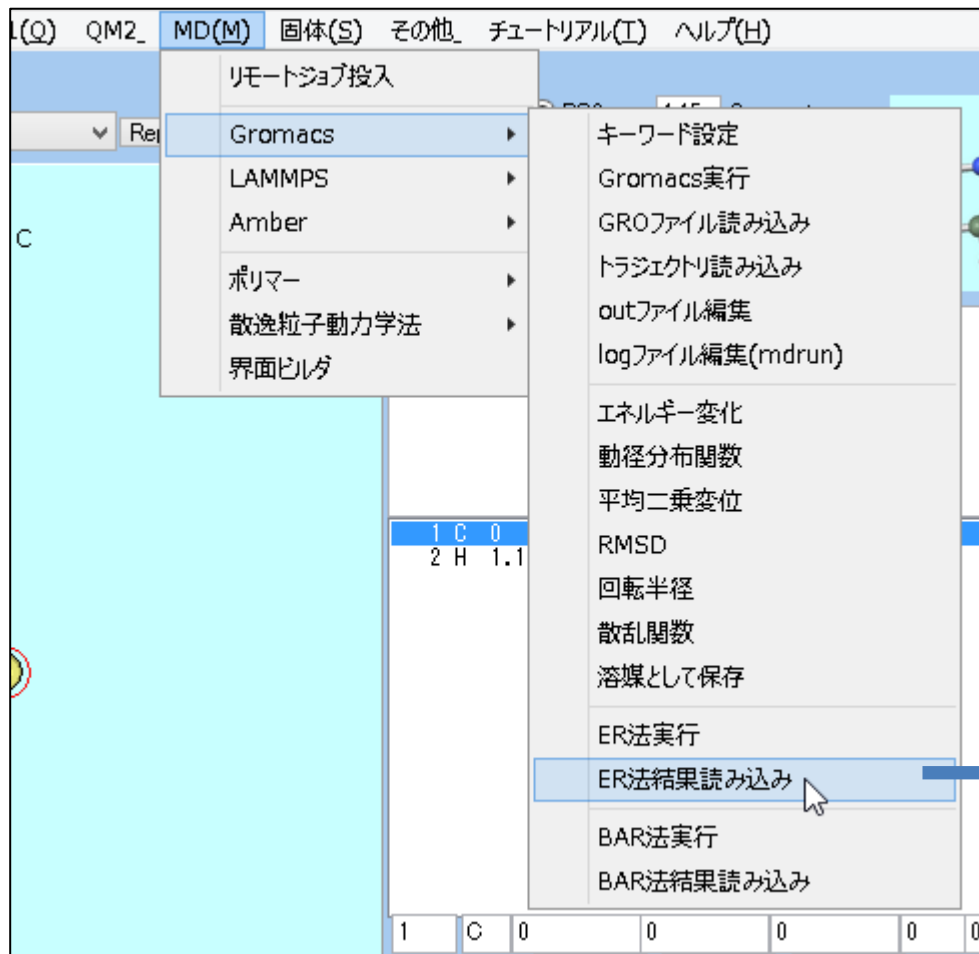
- 
- 自由エネルギー計算の結果の保存先を指定する。  
(ここではC:¥winmos6¥ermod\_etoHを新規作成し指定)すると、コンソールが開き計算が開始する。
  - 処理時間は数十分掛かるため、[Option]にて並列数を指定することで高速化が可能である。



# III. 結果の表示

## 溶媒和自由エネルギーの表示

自由エネルギー計算終了後、  
「MD」>「Gromacs」>「ER法結果読み込み」を選択

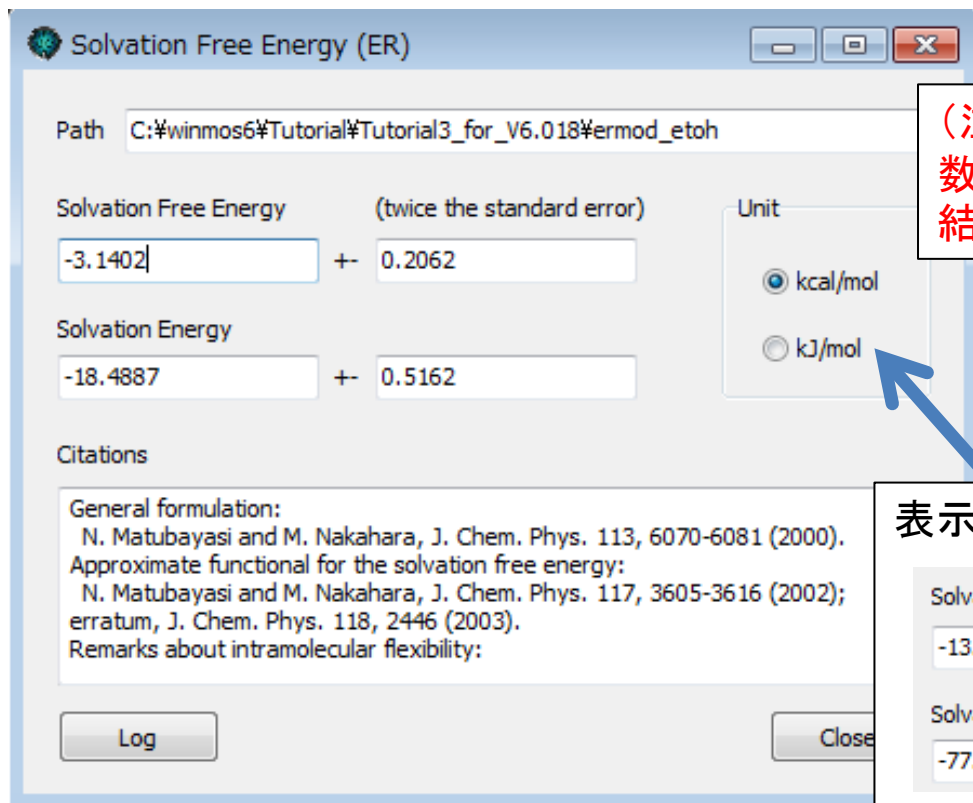


先ほど指定した結果の出力先  
(C:¥winmos6¥ermod\_etch)  
を指定

# III. 結果の表示

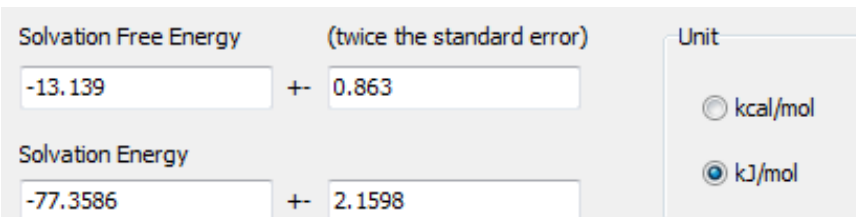
## 溶媒和自由エネルギーの表示

以下のウィンドウが立ち上がり、溶媒和自由エネルギー（上段のSolvation Free Energy）が表示される



(注)ER法の計算では、その時点の時刻を乱数の種とする乱数が用いられるため、計算結果は都度変化する。

表示する際のエネルギーの単位を切り替え可能



# 補足

# 補足

## 力場(電荷)の変更(1)

- 本チュートリアルは汎用性が高く簡便であるAM1-BCC電荷を利用した。
- より高精度な結果を得るためには、以下の方法が考えられる。
  - GAMESS, Gaussianなどを用いた非経験MO法の結果から、RESPなどの方法で電荷を決定し利用する。
  - OPLS-AA、CHARMM、Amber力場など、目的に合わせて設計された経験的パラメータとしての電荷をそのまま利用する。
- ここでは、文献[3]と同様にOPLS-AAの電荷を用いて計算する方法を示す。

[3] Y. Karino *et al.*, *Chem. Phys. Lett.*, 496, 351-355 (2010).

### 方法:

- (1) 溶液系、溶質系それぞれの計算において、エネルギー最小化後の\*\_gmx\_tmpフォルダのgmx\_tmp.itp をテキストエディターで開く。
- (2) 各原子の電荷の値を修正し保存(次頁)
- (3) 平衡化(1)以降の計算を実施

※ 溶媒系の計算は変更なし

# 補足

## 力場(電荷)の変更(2)

- gmx\_tmp.itpを修正する際には、編集する行を間違えないよう、分子モデリング画面で原子の番号を確認しながら作業する

```

; gmx_tmp_GMX.itp created by acpype (Rev: 7268) on Sun Oct 27 23:09

[ atomtypes ]
;name  bond_type  mass  charge  ptype  sigma  epsil
c3      c3        0.00000  0.00000  A      3.39967e-01  4.5773
hc      hc        0.00000  0.00000  A      2.64953e-01  6.5688
hl      hl        0.00000  0.00000  A      2.47135e-01  6.5688
ho      ho        0.00000  0.00000  A      0.00000e+00  0.0000
oh      oh        0.00000  0.00000  A      3.06647e-01  8.8031

[ molecule ]
;name
gmx_tmp

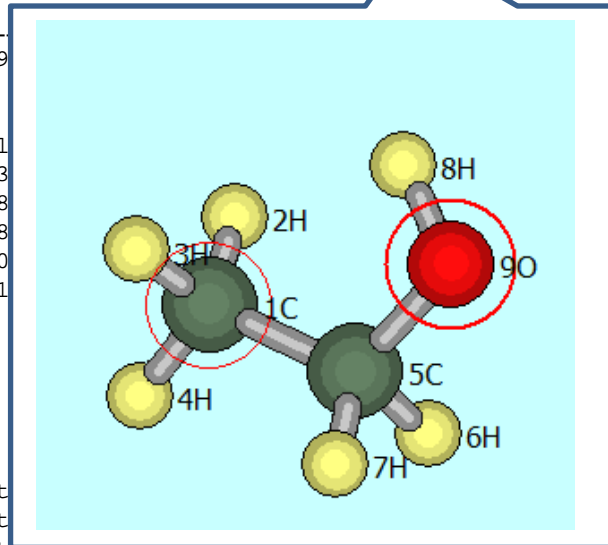
[ atoms ]
; nr  type  resi  res  atom  cgnr  charge  mass  ; qt
1  c3    1    UNK  C     1     -0.180000  12.01000 ; qtot
2  hc    1    UNK  H     2     0.060000  1.00800 ; qtot -0.023
3  hc    1    UNK  H1    3     0.060000  1.00800 ; qtot -0.023
4  hc    1    UNK  H2    4     0.060000  1.00800 ; qtot -0.017
5  c3    1    UNK  C1    5     0.145000  12.01000 ; qtot 0.202
6  hl    1    UNK  H3    6     0.060000  1.00800 ; qtot 0.202
7  hl    1    UNK  H4    7     0.060000  1.00800 ; qtot 0.201
8  ho    1    UNK  H5    8     0.418000  1.00800 ; qtot 0.584
9  oh    1    UNK  O     9     -0.683000  16.00000 ; qtot 0.000

[ bonds ]
; ai  aj  funct  r          k
1    2    1     1.0920e-01  2.8225e+05 ; C - H
:

```

モデリング画面上の  
番号に対応

この部分の値を修正



# 補足

## 力場(電荷)の変更(3)

- 参考までに、電荷を変更して得られた値を以下に示す

	計算方法	力場	溶媒和自由エネルギー / kcal・mol <sup>-1</sup>
<b>実験[8]</b>			<b>-4.9</b>
MD計算[3]	BAR法	OPLS-AA +OPLSオリジナル電荷	-4.2
MD計算[3]	ER法	OPLS-AA +OPLSオリジナル電荷	-4.8
MD計算 (Winmostar)	ER法	OPLS-AA/L +AM1-BCC電荷	-2.7
MD計算 (Winmostar)	ER法	OPLS-AA/L +OPLSオリジナル電荷	-4.8



[3] Y. Karino *et al.*, *Chem. Phys. Lett.*, 496, 351-355 (2010).

[8] R. Wolfenden *et al.*, *Biochemistry*, 20, 849 (1981).