

12-NA17

トレオニン合成酵素における反応制御機構の理論的解明

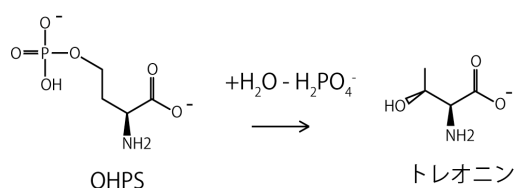
庄司 光男 (筑波大学)

概要 トレオニン合成酵素(TS)のような複雑な反応機構は未だ分子レベルでの解明がなされていないため、TS の反応機構解明は酵素反応の仕組みを解き明かす上で極めて重要な課題となっている。理論的検証には多くの可能な反応経路を正確に検討する必要があり、膨大な計算が必要である。我々は、FX10 の大規模並列計算機環境を活用することで、理論的に TS の反応機構解明を試みた。まず始めに、FX10 での実行環境の構築をおこない、NWChem プログラムパッケージを高並列化させて、高い並列実行性能を出せるようにした。次に、TS の後半部分の反応過程に対して高精度理論解析 (QM/MM 計算) を行った。網羅的な反応過程探索をおこなうことで、最も妥当な反応経路を求めた。その結果、自由エネルギーは実験と 3kcal 以内の誤差で一致し、中間体の UV スペクトルも完全に実験値と一致していた。さらに反応に重要な様々な未解決問題(プロトン化状態、中間体状態等)を明らかにした。このように本研究では FX10 を用いることで、TS の最も重要な反応過程における反応機構を初めて理論的に明らかにした。

1. 研究の目的と意義

生体酵素における反応機構と反応制御機構(副反応の抑制機構)は、化学合成における究極のテーマといっても過言でないほど重要である。トレオニン合成酵素(TS)はトレオニン生合成の最終ステップである *o*-phospho-L-homoserine (OPHS) から L-トレオニンを生成する段階を触媒しており(図 1)、いくつかの副生成物(α -ケトブチラート、ケトン)の生成を制御している。しかしながら未だ TS の反応制御機構は明らかにされておらず、その本質の解明のためには基質・酵素複合体で各反応経路における遷移状態構造、活性化エネルギー、酵素構造変化について明らかにすることが不可欠である。

本研究では生体内に存在する複雑な反応機構を持つ酵素(TS)について、これまで申請者が独自開発してきた電子状態解析法を活用して実験結果と対応させ、実験的には



トレオニン合成酵素 (TS) の反応

図 1. トレオニン合成酵素の反応

解明できなかった電子レベルの反応機構と反応制御機構について理論的に明らかにすることを目的とする。

特に、生体システムは特異的生体分子(タンパク質、核酸)によって制御されており、高効率、安定性、普遍性の観点において驚異的に優れている。そのため、生体分子の機能発現機構を解明することは生命現象の動作原理を解明することであるのみならず、化学合成や創薬、治療等の応用分野にとっても極めて重要である。現在、生物学的実験では X 線結晶構造や NMR による構造生物学的研究によって多くの立体構造が解明されてきているが、TS のような複雑な酵素における反応機構や反応制御機構については十分明らかにされていない。複雑な反応過程を制御できる TS は化学や生物学での学術的重要性のみならず、化学合成法の効率化や酵素阻害剤の開発、酵素機能変換などの産業利用、医薬品開発、農業への応用上極めて重要である。

TS はアスパラギンからトレオニンを生合成する最終過程に存在している。TS は植物や微生物のみが持っており、動物(人)は TS を持たない。そのため、動物は体内でトレオニンを作り出すことができず、トレオニ

ンは必須アミノ酸となっている。TS阻害は抗菌剤開発のターゲットとしても重要である。本研究では、実験研究グループと密に連帯しているため、理論解析と実験の両アプローチの融合による酵素学分野の革新的進展が期待される。

2. 当拠点公募型共同研究として実施した意義

本プロジェクトの計算遂行には東京大学 Fujitsu PRIMEHPC FX10 を使用した。NWChem はこれまで FX10 上での利用が報告されていないため、実行には高度な技術支援が必須である。そのため、東京大学・情報基盤センターの鴨志田良和氏に協力頂き、NWChem の高並列化チューニングを行った。FX10 はコンパイラ、共有メモリ設定等 Fujitsu 独自環境の設定が多くあるため、すべての設定について見直す必要があった。

3. 研究成果の詳細と当初計画の達成状況

(1) 研究成果の詳細について

3. 1 NWChem の効率的実行環境の構築

FX10 では NWChem の動作実績がなかったため、実行環境の構築を行った。環境構築のためには、主に、(1)コンパイルの高速化、(2)アーキテクチャ依存コードの追加、(3)MPI-SPAWN の実装、(4)通信の最適化、の 4 つの作業を行った。以下それぞれの詳細を述べる。

(1)コンパイルの高速化

NWChem の実行環境構築のためには、様々なコンパイル時オプションを検討する必要があり、コンパイル時間の短縮は作業効率に大きな影響を及ぼす。NWChem のソースコードは多数のサブディレクトリに分かれており、各サブディレクトリは、それぞれの間に依存関係がない場合でも逐次的にコンパイルされるようになっていた。Makefile を以下のように書き換えることでサブディレクトリを並列にコンパイルできるようにし、並列コンパイルを高速化した。

```
libraries:
```

```
@for dir in $(SUBDIRS); do ¥
```

```
echo Making $@ in $$dir; ¥
$(MAKE) -C $$dir || exit 1 ; ¥
done
```

↓ 書き換え

```
SUB_TARGETS = $(SUBDIRS:%=_lib_%)
_lib_%:
@dir=`echo $@|perl -pe s/_lib_/^/`; ¥
echo Making in $$dir; ¥
$(MAKE) -C $$dir
libraries: $(SUB_TARGETS)
```

サブディレクトリのコンパイルの最適化

(2)アーキテクチャ依存コードの追加

FX10 では SPARC64 IXfx アーキテクチャを採用しており、NWChem で排他制御のために使用されているアセンブリコードの中にはこのアーキテクチャに対応するものがなかったため、対応するアセンブリコード(cas 命令および ldstub 命令)を追加した。

(3)MPI-SPAWN の実装

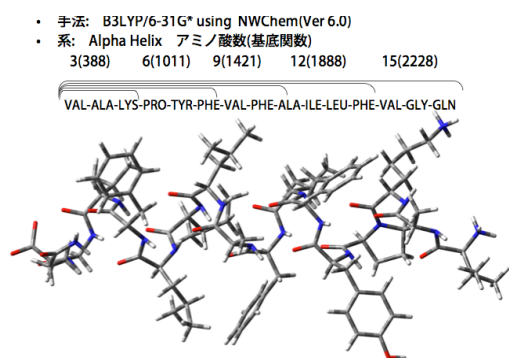
NWChem では複数ノードで計算をする場合、まず各ノードで(CPU コア数-1)個の計算用プロセスを起動した後、動的にプロセスを生成するための MPI_Comm_spawn という API を使用し、各ノードに 1 つずつの通信補助用プロセスを起動して計算を開始する。しかし、FX10 に提供されている富士通 MPI の MPI_Comm_spawn では、動的に生成されるプロセスを配置できるのは、MPI プロセスがまだ存在しないノードに限られる。この制約のため、同じノードに生成されたプロセスを混在させる必要がある NWChem は、このままでは FX10 上で動作させることができない。このため、生成するプロセスが実行するプログラムを静的に決定する代わりに、プロセス配置の制限をなくした MPI_Comm_spawn を新たに実装して差し替えることで、NWChem の実行を可能とした。

(4)通信の最適化

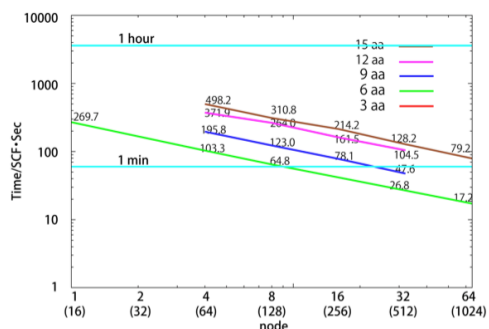
24 ノード以上を使用した場合に、計算中にメッセージキューあふれを示すエラー (Tofu interconnect detected MRQ overflow.)が出力された。これは、特定のプロセスに対して短時間に多数の

メッセージが送信されている処理が存在することが原因であることが判明した。そこで、問題の通信の付近で、宛先が同一の複数のメッセージを 10KB ごとにまとめて送信することで、メッセージ数を 100 分の 1 程度に削減し、メッセージキューあふれを抑制することが可能となった。

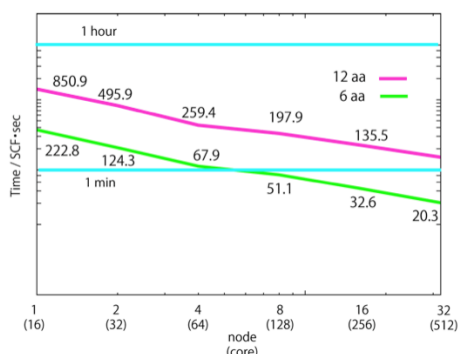
FX10 での NWChem の実行性能測定結果について記述する。 α ヘリックスにおけるアミノ酸 6 残基(1011 基底)、12 残基(1888 基底)において、B3LYP/6-31G*法で 1SCF 計算にかかる時間を、node に対してプロットした(図 2)。16node(256core) 利用でそれぞれ 32.6, 135.5 sec.であった。この結果は T2K-Tokyo(HA-8000)での 40sec., 161.5 sec と



(a)



(b)



(c)

図 2. スーパーコンピュータ上での実効性能比較, (a)ベンチマーク系, (b)T2K-Tokyo, (c)FX10

比べても早く、極めて高速な実行が可能となっていることが分かる[1]。

3. 2 トレオニン合成酵素の反応機構の解明

TSの反応機構[T. Murakawa, et al, J. Biol. Chem., 286, 2274(2011). H. Hayashi, J. Biochem. 118, 463(1995).]は図 3 のように 8つの中間状態が存在すると実験的に提案されている。この反応サイクルは 6 → 7 → 8 → 1 の反応物生成過程 ①と 1 → 2 → 3 → 4 → 5 → 6 のリン酸脱離以前の反応②に分けられる。

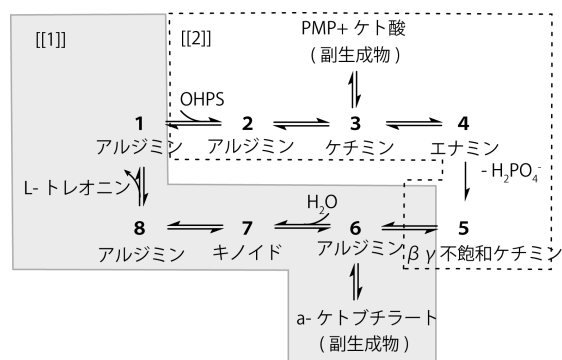


図 3. 実験的に提唱されている反応機構

①の反応過程ではリン酸脱離以降の主生成物が生成される段階であり、最も重要である。また、基質アナログでの実験的データが存在するため、本過程の反応制御機構を実験と対応させながら検討することが可能である。その為、これまで我々が行って来た電子状態計算法と解析方法が大いに活用できる。特に、各中間体の物性量 (CD スペクトル、反応速度定数) を求め、実験値と直接比較することで中間体 (プロトン化状態、基質コンフォメーション) を同定することは非常に重要であると考えられる。そこで、①の過程における反応機構を電子状態レベルで検討し、副反応を抑える反応制御機構について理論的な解明を行う事为目标とした[1]。

本研究では NWChem に実装されている、量子古典混合計算 (QM/MM: (B3LYP/6-31G*)/AMBER) 法を用いた。QM 領域には活性中心周りの 100 原子 (約 1000 基底関数) を、MM 領域にはそのほかの原

子を設定した。初期構造は、X線構造の TS ダイマーを 9nm の水球で覆い、MMの水素原子を構造最適化することで作成した(図 4)。反応機構解析時における構造最適化は QM 中心から 1.2nm の約 800 原子に対して行った。活性中心周りには多くの水素結合が形成されており、これらの水素結合によって、反応中間体は上手く安定化されていた。

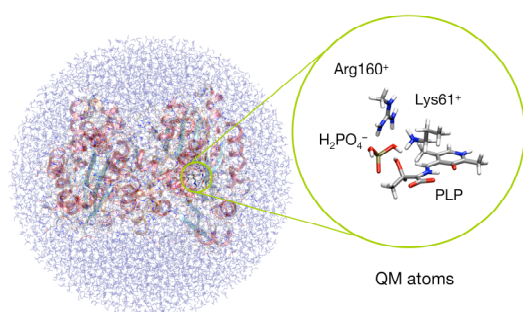


図 4. トレオニン合成酵素の QM/MM モデル: (左)全系, (右)QM 領域

本研究を複雑化させた主原因はプロトン化状態が不定であることである。我々は、可能な 3 つのプロトン化状態に対し、反応ポテンシャルと中間体の UV スペクトルを比較することで反応過程の検証を試みた。

①の各プロトン化状態において最安定中間体と中間状態間を結ぶ最安定経路を探索した。最安定中間体候補は幾つも出てくるため、すべての中間体の安定性を評価するのは非常に計算がかかる。さらに、中間体同士を結ぶ経路は幾つも考えられる。反応経路の多くは高すぎる活性化障壁(30kcal以上)を持つ経路である。20kcal 以下の反応進行可能な経路を探し出すのは化学的直感だけでは分からないため、網羅的探索が必須である。そのため、6→7→8 の経路を決定するだけでも 1 年近くかかってしまった。

しかしながら、網羅的探索の結果、最も妥当な反応経路を決定する事に成功した。しかも反応自由エネルギーは実験と 3kcal 以下で一致しており、中間体の UV スペクトルも非常に良く実験値と一致していた。これまで決定できなかったプロトン化状態や反応制御機構の本質についても明らかに

する事ができた。現在結果を論文にまとめている段階であり [1]、学会では成果発表をおこなった [2-6]。

(2) 当初計画の達成状況について

本研究では FX10 における NWChem の効率的実行環境の構築と TS の反応機構の解明を行った。FX10 での NWChem の実行は初めての試みであったため、応用計算を利用開始から直ぐに行う事ができず、早期に学術成果を出すことが難しかった。そのため、当初計画の半分しか達成できなかったが、非常に優れた学術的結果を得る事ができた。

4. 今後の展望

TS の反応機構の解明に関しては、②の前半プロセスが残っている。今後、本過程における脱リン酸過程、正常基質での解析とプロトン化状態について探求する。これらは実験的に決定することが難しく、実験との直接比較ができないが、①での結果をふまえ、TS の全反応サイクルにおける高度な反応制御機構を明らかにする。類縁酵素では副生成物生成経路があり、本過程での反応制御がなされている。このように、TS の各反応過程を電子状態レベルで解析していくことで、高度な酵素の仕組み：反応制御機構が明らかになり、人工系や酵素改変に応用する事が可能になると考えられる。

5. 研究成果リスト

(1) 学術論文

[1] M. Shoji, K. Hanaoka, Y. Ujiie, D. Kondo, W. Tanaka, H. Umeda, Y. Kamoshida, M. Kayanuma, K. Kamiya, K. Shiraishi, Y. Machida, T. Murakawa, H. Hayashi, A QM/MM study on the L-threonine formation reaction of threonine synthase (執筆中).

(2) 国際会議プロシーディングス

なし

(3) 国際会議発表

[2] M. Shoji, K. Hanaoka, Y. Ujiie, W. Tanaka, M. Kayanuma, Y. Machida, T. Murakawa, H. Hayashi, A

QM/MM Study on the Reaction Mechanism of Threonine Synthase, BIT's 4th Symposium on Enzymes and Biocatalysis 2013, Nanjing, 2013/4/27 (Invited).

(4) 国内会議発表

[3] 庄司光男、鴨志田良和、花岡恭平、トレオニン合成酵素における反応制御機構の理論的解明、第 4 回学際大規模情報基盤共同利用・共同研究拠点、2012/7/12(秋葉原)。

[4] 町田康博、村川武志、庄司光男、林秀行、トレオニン合成酵素の触媒性リン酸イオン結合基質の役割、第 85 回日本生化学会大会、2012/12/16(福岡)。

[5] 庄司光男、花岡恭平、近藤大生、田口真彦、栢沼愛、梅田宏明、鴨志田良和、神谷克政、白石賢二、村川武志、林秀行、トレオニン合成酵素におけるリン酸脱離以降の反応機構についての理論的解明、第 85 回日本生化学会大会、2012/12/16(福岡)

[6] ○庄司 光男、花岡 恭平、氏家 謙、田中 弥、栢沼 愛、梅田 宏明、町田 康博、村川 武志、林 秀行、トレオニン合成酵素におけるリン酸脱離以降の反応経路についての理論的検証、日本農芸化学会、2013/03/26, 東北大学、(口頭)。

(5) その他 (特許, プレス発表, 著書等)

なし