

Jh130045-NA22

生体酵素における特異的反応機構の理論的解明

庄司光男(筑波大学)

酵素における反応機構の解明は、生化学的重要性のみならず、化学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。本研究課題では生体内に存在する 2 つの複雑な反応機構を持つ酵素、トレオニン合成酵素(TS)と亜硝酸還元酵素(Nii3)に注目し、高精度な電子状態計算法(量子古典混合計算:QM/MM)による理論解明をおこなった。TS については反応制御に重要な反応過程(全反応サイクルの後半部分)の反応機構を完全に明らかにし、Nii3 については全反応過程におけるすべての反応中間体を決定した。本研究では FX10 等のスーパーコンピュータを利用し、大規模計算を行った事と、実験研究と密接に連携したことで、計算の妥当性の評価と実験結果のより詳細な解析を可能にし、酵素反応の解明を躍進させた。

1. 研究の目的と意義

生体内において酵素は生命現象に不可欠な化学反応を支えており、非常に効率的に物質変換とエネルギー変換を行っている。また、様々な調節機構により、情報伝達や反応制御を行っており、極めて洗練されたシステムを構築している。このような酵素反応機構の解明は化学だけではなく生物学、環境、合成、農業、医療などの多くの分野への応用が期待される。様々な酵素が存在するが、加水分解酵素など反応が比較的簡単な酵素については量子化学計算など理論的な解析が進み、電子レベルでの反応機構が議論されてきているが、より複雑な酵素反応においては多くの不確定要素が存在し、詳細な議論がなされていない。

申請者は数ある生体内酵素の中でもトレオニン合成酵素:Threonine Synthase (TS)と同化型亜硝酸還元酵素:Nitrite Reductase (Nii3)に注目した。これらは共にピリドキサーリン酸:Pyridoxal 5'-phosphate (PLP)およびシロヘムという補欠分子族を有し、多段階の位置特異的かつ立体選択的な反応過程を含み、非常に複雑な反応機構を持つと予想されている。これらはいずれも比較的最近(2011 年)極めて高精度な X 線結晶構造解析 (<2Å) が解けているが、未だ詳細な反応機構が確定できていない。

トレオニン生合成機構は植物や微生物が持っており、動物は持っていない。TS はそのトレオニン

生合成の最終ステップを担っており、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いる。TS の反応は PLP 酵素の中でも最も複雑であり、多くの中間体を経由するため、どのように効率的に反応を進行させているのかなど、極めて興味深い。X 線結晶構造解析と速度反応論による実験的解析がなされ(T. Murakawa, Y. Machida, H. Hayashi, J. Biol. Chem., 286, 2274(2011).)、反応機構の提唱と反応生成物のリン酸が反応制御に関わる事(Product Assisted Catalysis)等が明らかにされてきたが、反応機構の詳細(遷移状態構造など)については未だ明らかにされていない。

窒素同化作用は、植物や藻類、シアノバクテリアにおいて窒素源(NO_3^-)を吸収する基本的プロセスであり、植物の成長に著しく影響を与えている。亜硝酸還元酵素は窒素同化作用において NO_2^- を NH_4^+ に変換する反応を担っており、生成物の NH_4^+ はグルタミン合成やグルタミン酸合成経路によりアミノ酸の構成原子となるため、亜硝酸還元酵素は窒素同化作用における鍵となる酵素である。しかしながら亜硝酸還元酵素の反応は 6 つの電子移動と 8 つのプロトン移動が連動していることから分かるように、きわめて複雑な機構であり、反応機構の詳細については未だ明らかにされていない。

2. 当拠点公募型共同研究として実施した意義

このような生体内の複雑な仕組みを解明するには実験的手法のみならず、数値計算による解明が重要になってきている。酵素反応の解明は検証すべき問題が多く存在するため、非常に手間と時間がかかる。また、高精度電子状態計算は概して並列化効率が低いいため、スーパーコンピュータを使って科学的成果を挙げたという前例は多くない。

しかしながら、スーパーコンピュータで効率的な大規模並列計算を実行できるようになれば、リアリステックな計算機シミュレーション分野が拓かれ、より正確な解明と信頼性の高い予言を行う事が可能になると期待される。生命科学分野では分子レベルでの詳細まではなかなか明らかにされないことが多いため、計算科学的アプローチにより、本質的現象を理解することは今後益々重要になる。特に、ドラッグデザインや最先端材料開発にはなるべく早く、最適な材料を設計することが重要であり、計算科学的アプローチにより有望な指針を与えることは極めて重要となっている。このような応用分野への展開のためにも、スーパーコンピュータで効率的な大規模並列計算を実行できるようにすることは極めて重要である。また、TSの反応機構解明は抗菌剤を指向した阻害剤開発に、Nii3は窒素肥料に関する産業応用に直結している。さらに反応制御機構解明の応用は新たな酵素機能を付加できる可能性もある。

(1) 共同研究を実施した拠点名および役割分担

本プロジェクトの計算遂行には東京大学 Fujitsu PRIMEHPC FX10 を一部使用した。FX10 上で NWChem を実行するためには、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金子勇氏と平成 24 年度利用において協力いただいた鴨志田良和氏に高並列化チューニング支援をしていただいた。

(2) 共同研究分野

本研究では①理論解析分野(庄司光男(研究代表)、花岡恭平(筑波大D3))、②計算科学分野(金

子勇(東大)、鴨志田良和)の密接な連帯を通じて、該当領域の革新的進展をおこなう。

また、実験研究分野(林秀行先生(大阪医大)、片柳克夫先生(広島大))と情報交換を密に行うことで、実験結果と対応する精密な理論解析研究を行う。

(3) 当公募型共同研究ならではの事項など

3. 研究成果の詳細

3.1 トレオニン合成酵素(TS)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8つの中間体が存在すると提案されている。これらはリン酸イオンが脱離する前半過程と脱離後の後半反応過程に分けられる。後半過程は自由エネルギープロファイルと中間状態でのUVスペクトルが明らかにされている。また、副生成物生成がリン酸イオンにより抑制される機構存在するなど、反応制御機構の観点からも後半過程は興味深い。NWChemによる量子古典混合計算(QM/MM)法を用いた。QM領域には活性中心近傍の100原子を選択し、総軌道数は1000程度となった。この系の大きさは反応機構を解析する系としては極めて大きい。計算レベルにはQM=B3LYP/6-31G*, MM=AMBER99を用いた。初期構造はX線構造(PDBID=3AEX)を用い、TSダイマーを9nmの水球で多い、MMで水素原子を構造最適化した。

本研究では6つの異なるプロトン化状態での反応機構と6つの反応素過程に対する活性障壁を求め、最も妥当な反応経路を探索した。反応経路探索では化学的直感はなかなか通用しなかったため、網羅的に反応経路探索をしないと解明できないことが判明した。網羅探索の結果、反応自由エネルギーは実験値と 3 kcalmol^{-1} 以下で一致し、中間体のUVスペクトル形状も非常に良く実験値を再現した。これまで水付加過程ではリン酸イオンが塩基として働くと考えられていたが、Lysが塩基と

して働くことを明らかにした。また、アミノ酸転移過程ではジェミナルジアミン中間体ができる 2 ステップ過程からなることが分かった。さらに反応制御にかかわるリン酸イオンの役目についても明らかにする事が出来た。このように非常に明確に理論解明する事に成功し、これらの成果は国際論文に採択された(1.3)。また、論文出版時には成果報告をプレス発表した。

3.2 同化型亜硝酸還元酵素(Nii3)の反応機構の解明

Nii3の反応機構には多段階の電子移動とプロトン移動が含まれる。そのため、これらの過程の順序が明らかでない。一方、反応は2電子還元毎に特徴的の中間体となるため、初状態AからB, C, D, Eまで名前付けされている。E以外の4状態についてはX線構造が高分解能で報告されている。

反応機構解明ではQM/MM法を用いた。QM領域には活性中心近傍の120原子を選択し、総軌道数は1100程度であった。まず初めにプロトン化と一電子還元を順序を解明するため、すべての取り得る中間状態を計算し、プロトン化と還元過程の順番をエネルギー的に決定した。その結果、これまで実験的に提案されていた順番とは異なる新たな結果が得られた。また、中間体の構造はX線構造と非常に一致する事が判明した。不思議なことに活性中心にはArg側鎖がシロヘムの上に覆い被さっているが、塩基としては働いておらず、基質を保持するのにのみ利用されていることを明らかにした。これら結果の詳細は現在まとめている段階である。

4. これまでの進捗状況と今後の展望

平成25年度ではTSにおける研究結果を論文としてまとめることに全力を注いだ。Nii3については反応機構の解明に取り組み、重要な解明を行う事ができた。

今後の課題としてはTSについてはまだ論文化できていない反応特異性に関する計算結果をまとめる事と、Nii3に関しては論文としてまとめる事

に取り組む。それにより学際大規模情報基盤共同利用・共同研究拠点による研究成果を公開し、関連分野への発展につなげる。

5. 研究成果リスト

(1) 学術論文

(1.1) K. Hanaoka, M. Shoji, D. Kondo, A. Sato, M. Y. Yang, K. Kamiya, and K. Shiraishi, Substrate mediated proton relay mechanism for the religation reaction in topoisomerase II, *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics*, accepted 2013.

(1.2) M. Shoji, K. Hanaoka, D. Kondo, A. Sato, H. Umeda, K. Kamiya, K. Shiraishi, A QM/MM study of nitric oxide reductase-catalyzed N2O formation, *Molecular Physics*, 112,3-4,393 (2013).

(1.3) M. Shoji, K. Hanaoka, Y. Ujiie, W. Tanaka, D. Kondo, H. Umeda, Y. Kamoshida, M. Kayanuma, K. Kamiya, K. Shiraishi, Y. Machida, T. Murakawa, H. Hayashi, A QM/MM Study of the l-Threonine Formation Reaction of Threonine Synthase: Implications into the Mechanism of the Reaction Specificity, *Journal of the American Chemical Society*, DOI: 10.1021/ja408780c, 2014.

(2) 国際会議プロシーディングス
無し

(3) 国際会議発表

(3.1) M. Shoji, K. Hanaoka, Y. Ujiie, W. Tanaka, M. Kayanuma, H. Umeda, Y. Machida, T. Murakawa, H. Hayashi, BIT's 4th Symposium on Enzymes and Biocatalysis 2013 (SEB-2013), Nanjing, 2013/4/26, China, oral(invited).

(3.2) M. Shoji, H. Isobe, S. Yamanaka, N. Kamiya, J.-R. Shen, K. Yamaguchi, Theoretical investigation on the electronic structures of photosystem II oxygen evolving complex at the S2 state, 1st AWEST2013, Awaji, 2013/6/16, oral(invited).

(3.3) M. Shoji, H. Isobe, S. Yamanaka, N. Kamiya, J.-R. Shen, and K. Yamaguchi, QM/MM study on the photosystem II oxygen evolving complex at the S1 state, The 16th International Congress on Photosynthesis Research @St.

Louis(MO), 2013/8/11, Poster.

(3.4) M. Shoji, QM/MM study on the photosystem II oxygen evolving complex at the S1 state, The 51st Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, kyoto, 2013/10/28, oral (invited).

(3.5) M. Shoji, K. Hanaoka, Y. Ujiie, W. Tanaka, M. Kayanuma, H. Umeda, Y. Machida, T. Murakawa, H. Hayashi, Theoretical elucidation on the reaction control mechanism in Threonine Synthase, The 51st Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, kyoto, 2013/10/28, Poster.

(4) 国内会議発表

(4.1) 庄司光男、花岡恭平、氏家謙、田中弥、梅田宏明、栢沼愛、神谷克政、白石賢二、町田康博、村川武志、林秀行、トレオニン合成酵素における反応特異性決定過程の理論的説明、蛋白質科学会年会@鳥取、2013/6/13, 口頭(招待)+ポスター.

(4.2) 庄司光男、氏家謙、田中弥、花岡恭平、梅田宏明、栢沼愛、神谷克政、白石賢二、町田康博、村川武志、林秀行、トレオニン合成酵素における反応特異性についての理論的説明、第86回日本生化学会大会、横浜、2013/9/11, 口頭+ポスター.

(4.3) 氏家謙、田中弥、花岡恭平、庄司光男、栢沼愛、神谷克政、白石賢二、町田康博、村川武志、林秀行、分子動力学法によるトレオニン合成酵素の反応特異性についての理論的説明、第 86 回日本生化学会大会、横浜、2013/9/11, ポスター.

(4.4) 庄司光男、QM/MM 法による光合成酸素発生中心 S 1 状態の電子状態解析、第 2 回公開シンポジウム人工光合成特別セッション、立命館大学、2013/10/28, 口頭(招待).

(4.5) 庄司光男、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の反応機構についての理論的研究：反応特異性決定過程の説明、口頭.

(5) その他 (特許, プレス発表, 著書等)

(5.1) 庄司光男、林秀行、必須アミノ酸”トレオニン”生合成の最終過程が明らかに—スーパーコンピュータで網羅的に反応経路を探索、プレス発表、筑波大学、大阪医科大学、2014/3/14.