

jh140034-NA19

同化型亜硝酸還元酵素の高次機能の理論的解明

庄司光男（筑波大学）

酵素は生体内において特定の化学反応の進行を制御することで、複雑な生体システムを機能させている。そのため、酵素反応メカニズムを分子レベルで解明することは生化学的に大きな意義を持っている。また化学的にも非常に興味深い。生体内現象は時間的・空間的に極めて広大であり、未だ多くが解明されていない。しかしながら、リアリストックな分子シミュレーションによって少しずつ理論解明が可能となってきた。本研究課題では多くの酵素の中でも理論解明が困難だった同化型亜硝酸還元酵素(aNiR)に注目し、全化学反応過程を明らかにすることを目的とする。理論解明には多くの不確定要素（水、プロトン化状態、還元状態）を検証することが必要となり、膨大な計算量が必要となるが、FX10 等のスーパーコンピュータを効率的に利用する事で、網羅的検証を行う。aNiR のような極めて複雑な酵素反応を解明できれば、本研究課題は極めて大きな躍進となる。

1. 共同研究に関する情報

(1) 共同研究を実施した拠点名

東京大学

(2) 共同研究分野

- 超大規模数値計算系応用分野
- 超大規模データ処理系応用分野
- 超大容量ネットワーク技術分野
- 超大規模情報システム関連研究分野

(3) 参加研究者の役割分担

研究代表者（庄司）は計算実行と計算結果の解析をおこなった。本プロジェクトでは東京大学 Fujitsu PRIMEHPC FX10 を一部利用した。FX10 上で NWChem プログラムパッケージを実行する為には、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實本英之氏と平成 24, 25 年度から協力して頂いてきた、鴨志田良和氏に並列化支援をしていただいた。

2. 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、酵素は様々な調節機構により、情報伝達や制御に関わっており、極めて洗練されたシステムを構築している。そのため、酵素における反応機構を解明することは化

学だけではなく生物学、環境、化学合成、医療などの多くの分野に応用が期待され、極めて重要な課題となっている。多くの酵素反応のうち、単純な反応機構解明については量子古典混合法(QM/MM)法などで解明が進んできているが、複雑な反応機構を持つ酵素については、未だ詳細な解明がなされていない。とくに高次機能である反応制御や調節機構と反応機構の関わりは学術的にも応用上も極めて重要であるが、いまだ十分な解明がなされていない。これは蛋白質が密接に関わり、長い時間スケールで大きな構造変化により発現する極めて複雑な現象であり、膨大な計算が必要となるためであり、正確に理論的に取り扱いは未だ多く課題が存在している。申請者は複雑な酵素反応機構とその高次機能を明らかにするため、実験的に高次機能が明らかになってきた同化型亜硝酸還元酵素(aNiR)の反応機構に注目し、(1)正確な電子状態解析とダイナミックスの解析、(2)実験との対応、(3)スーパーコンピュータ(スパコン)の効率的利用を本研究アプローチの特徴とした理論解明を行う。

同化型亜硝酸還元酵素(aNiR)は窒素同化作用における鍵となる酵素であり、生体内でグルタミン合成やグルタミン酸合成経路でアミノ酸の窒素源となる NH_4^+ を生成する。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る極めて重要な働きである。反応機構は 2 電子還元を 3 回繰り返す以下

$$\text{NO}_3^- \xrightarrow[-\text{H}_2\text{O}]{+2e^- + 2\text{H}^+} \text{NO}_2^- \xrightarrow[-\text{H}_2\text{O}]{+2e^- + 3\text{H}^+} \text{NH}_2\text{OH} \xrightarrow[-\text{H}_2\text{O}]{+2e^- + 3\text{H}^+} \text{NH}_4^+$$
 下の反応機構が提案されている。

本反応過程では電子移動と関連して、8 回のプロトン移動と水 2 分子の生成がなされる。 aNiR の活性中心はシロヘムと $[\text{4Fe-4S}]$ クラスターの補欠分子で構成される特徴的な構造となっている。 $[\text{4Fe-4S}]$ クラスターは電子伝達体として働いている。シロヘム近傍には多くの塩基性アミノ酸残基(Arg, Lys)が存在し、正電荷のチャネルが形成されている。これらが負電荷を持つ基質 (NO_2^-) と 6 電子移動に重要な働きを持っていると考えられる。このような多電子反応を担うことができる酵素は生体酵素でも非常に限られており、効率的反応促進のために多くの仕組みが存在している。そのため、本研究では同化型亜硝酸還元酵素(aNiR)の高次機能を解明する。

aNiR は弱い亜硫酸還元能力を持っている。 aNiR は亜硝酸還元酵素 SiR と蛋白質構造が非常に良く類似している。そのため、活性中心の僅かな変異(N226K 等)で、機能改変を行う事が可能となっている。機能改変は酵素の産業利用上、極めて重要な課題である。酵素を診断薬や化学合成で利用すると、極めて簡便で低コストかつ迅速にすることができる。そのためには酵素の熱的安定性、pH 耐性、反応特異性をコントロールすることが重要であり、機構改変について計算により予測することは極めて重要である。また、炭酸イオンを還元するなどの新たな機能改変についても検討が可能になる。本研究では aNiR の高次機能と機能改変について注目し、変異予測できる解析手法の構築を目指す。それにより、*in silico* 解析の有用性を躍進させる。

3. 当拠点公募型共同研究として実施した意義

酵素反応機構の解明は実験的手法のみならず、数値計算による解明が極めて重要になっている。数値計算では実験では検証が極めて難しい反応中間体や遷移状態を明らかにする事ができるため、最先端の分子生物学分野では実験と計算の両方のアプローチを補い合う事が、極めて重要になってきている。現在の数値計算では大幅なモデル化により計算コストを下げているが、そのために信頼性も激減してしまっているのが現状である。また、スパコンを活用した正確な計算の報告例は多くない。そのため、今後、スパコン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、正確な解明と予言を行う事が可能となる。スパコンを用いた計算科学的アプローチは生命科学分野にとって今後益々重要になると考えられる。特に、ドラッグデザインや最先端材料開発において短期間で膨大な組み合わせについて高精度に予測することは極めてメリットが大きい。このような応用分野への展開のためにも、スパコンで効率的な大規模並列計算を実行できるようにノウハウをためることは極めて重要である。 aNiR における反応機構解明は窒素質肥料に関する産業応用に直結する。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があり、該当領域の革新的進展が期待できる。

4. 前年度までに得られた研究成果の概要

前年度の JHPCN 課題”生体酵素における特異的反応機構の理論的解明”ではトレオニン合成酵素の特異的反応過程について、QM/MM 法(NWChem)により理論解析した。その結果、最も妥当な反応経路では実験の自由エネルギーと 3kcalmol^{-1} 以下で一致し、反応中間体の UV スペクトル形状も良く一致した。これまで水分子付加過程はリン酸イオンが塩基として働いていると考えられたが、Lys 残基がその役割を担っている事を明らかにした。こ

のように、FX10 を利用することで、大規模計算が可能となり、トレオニン合成酵素という非常に複雑な反応を明らかにする事ができたのは大きな研究成果である。本研究は国際誌に出版された[1]。JHPCN 課題では平成 24、25 年度から FX10 等のスパコン利用に取り組み、NWChem をチューニングする事で、酵素反応機構の解明に取り組んできた[1-3]。今後も並列化対応と計算アルゴリズムを改善することにより、スパコンをより効率的に利用し、リアリスティックな計算機シミュレーションを推進させていきたい。

[1] 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*, 136(12), 4525-4533.

[2] 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*, 19, 32(11), 1759-1765(2014).

[3] 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).

5. 今年度の研究成果の詳細

今年度課題では金属原子を含む酵素を取り扱っており、これまでの金属を含まない酵素に比べると、電子状態が非常に複雑（強相関電子系）になっている。取り扱う反応も多段階の電子移動とプロトン移動が含まれており、極めて複雑になっている。そのため、正しい電子状態を求める事がまず始めに重要である。

開殻分子系の電子状態を記述するにはスピン非制限 (Broken-symmetry: BS) 法の適用が有望であ

るが、正しい解を得る事が難しく、極めて煩雑な手続きが必要だった。我々は、開殻軌道を局在化自然軌道に変換することで効率的かつ自動的に望みの BS 解を作成できる新規方法(LNO 法)を考案した(7.1)。本方法により任意の BS 状態を作成することが可能である。本方法を H₂, カルベン、鉄硫黄クラスターに適用した結果、正しい結果を与えるのみならず、計算時間が約 3 倍短縮された。さらに、本方法で求められる局在化軌道は BS 状態の電子状態解析にとって非常に有益であることも判明した。また、本研究課題の aNiR においても上手く適用できることが判明した。aNiR のような大きな量子系では特に計算時間短縮効果が大きく、極めて役に立っている。

6. 今年度の進捗状況と今後の展望

今年度の研究課題では、aNiR の量子古典混合 (QM/MM) 計算モデルを構築し、反応機構の理論解明を進めてきている。化学反応的に重要である NO 結合乖離過程と水分子の生成箇所については実験結果と良い一致がみられている。しかしながら、エネルギープロファイルについては一致が悪い結果となっている。現在の QM/MM 計算では QM 領域中心から 10Å 以内の原子しか動かしていないため、MM 領域（蛋白質領域と水溶液環境）の構造変化を十分に起こす方法について検討している。酵素の高次機能との関わりを明らかにするにはこれらを解決する必要がある。特に電子移動過程は活性中心とその近傍のアミノ酸の電荷分布変化により大きく影響すると考えられ、また、プ

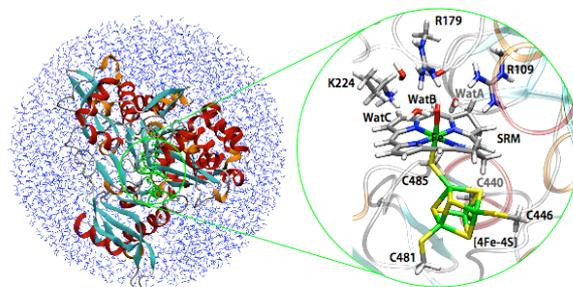


図 1. 研究課題で扱っている同化型亜硝酸還元酵素(aNiR)の QM/MM 系

ロトン伝達機能はチャネル内に存在する水分子の配向と近傍塩基性残基との水素結合によって大きく変わる。そのため、長時間(100ns 以上)の古典動力学計算と組み合わせ、十分に系を緩和させてから大規模 QM/MM 法(QM 領域千軌道、図 1 参照)する方法等を検討している。それにより反応機構との関わりを明らかにする。このように、蛋白質の影響を考慮することで、酵素の持つ高次機構の解明を行なう。

QM/MM 計算により、aNiR の全反応サイクルにおける反応中間体の構造を求めた。プロトン化と還元ステップの順序について検討する事で、aNiR の触媒サイクルを明らかにした。また、NO 結合乖離と水分子の生成過程については反応中間体を検出した X 線結晶構造と良い一致が見られた。活性中心のシロヘム近傍には多くの塩基性アミノ酸(Arg, Lys)残基が存在し、正電荷のチャネルを形成している。これらは負電荷を持つ基質と電子的に大きな影響を与えており、反応過程における活性中心での電荷を制御している。本研究結果は現在論文としてまとめている段階である。

また、研究を遂行する上で複雑な電子状態を自在に作成することが必要である事を痛感した。そのため、局在化変換を使った新規方法を提案した。本手法は aNiR だけでなく、光合成酸素発生中心の電子状態計算においても非常に有益である事が分かっている。

このように複雑な電子状態を持つ酵素反応系においても、スパコンを活用することで高精度計算が可能になってきた。今後もスパコンをより活用できるよう取り組む事で、生体システムの仕組みを一つずつ明らかにしていきたい。

7. 研究成果リスト

(1) 学術論文

- K. Hanaoka, W. Tanaka, M. Kayanuma, M. Shoji, "A QM/MM study of the 5'-AMP DNA hydrolysis of aprataxin", *Chem. Phys. Lett.*, **631-632**, 16-20 (2015).

- M. Shoji, H. Isobe, S. Yamanaka, M. Suga, F. Akita, J.-R. Shen, K. Yamaguchi, "On the guiding principles for lucid understanding of the damage-free S1 structure of the CaMn₄O₅ cluster in the oxygen evolving complex of photosystem II", *Chem. Phys. Lett.* **627**(1), 44-52 (2015).
- M. Shoji, H. Isobe, S. Yamanaka, M. Suga, F. Akita, J.-R. Shen, K. Yamaguchi, "Theoretical studies of the damage-free S1 structure of the CaMn₄O₅ cluster in oxygen-evolving complex of photosystem II", *Chem. Phys. Lett.* **623**(2), 1-7 (2015).
- M. Kayanuma, K. Hanaoka, M. Shoji, Y. Shigeta, "A QM/MM Study of the Initial Steps of Catalytic Mechanism of Nitrile Hydratase", *Chem. Phys. Lett.* **623**(2), 8-13 (2015).
- M. Shoji, Y. Yoshioka, K. Yamaguchi, "An Efficient Initial Guess Formation of Broken-Symmetry Solutions by using Localized Natural Orbitals", *Chem. Phys. Lett.* **608**, 50-54 (2014).
- M. Nagai, C. Kobayashi, Y. Nagai, K. Imai, N. Mizusawa, H. Sakurai, S. Neya, M. Kayanuma, M. Shoji, S. Nagatomo, "Involvement of Propionate Side Chains of the Heme in Circular Dichroism of Myoglobin: Experimental and Theoretical Analyses", *J. Phys. Chem. B*, **119**, 1275-1287 (2015).
- Y. Komatsu, M. Kayanuma, M. Shoji, K. Yabana, K. Shiraishi, M. Umemura, Light absorption and excitation energy transfer calculations in primitive photosynthetic bacteria, *Molecular Physics*, accepted 2014.

(2) 国際会議プロシーディングス

- Y. Komatsu, M. Umemura, M. Shoji, M. Kayanuma, K. Yabana, K. Shiraishi, "Light absorption efficiencies of photosynthetic pigments: the dependence on spectral types of central stars", *International Journal of*

Astrobiology, accepted 2014.

(3) 国際会議発表

- M. Shoji, “A development of the computational biosciences with supercomputers”, AWEST2014, Awaji Island, oral (invited), 2014/6/17.
- M. Shoji, Y. Ujiie, W. Tanaka, M. Kayanuma, R. Harada, H. Umeda, Y. Shigeta, T. Murakawa, H. Hayashi, “QM/MM study of the L-threonine formation reaction of threonine synthase: mechanism of the product-assisted catalysis”, computational science workshop 2014, Tsukuba, oral (invited), 2014/8/22.

(4) 国内会議発表

- ○庄司光男、田中弥、氏家謙、栢沼愛、梅田宏明、重田育照、中野祥吾、片柳克夫，“同化型亜硝酸還元酵素における全化学反応の理論的解明”、第 8 回分子科学討論会、広島大、口頭発表，2014/9/23。
- ○庄司光男、田中弥、氏家謙、栢沼愛、梅田宏明、中野祥吾、片柳克夫，“同化型亜硝酸還元酵素の反応機構の理論的解明”、第14回蛋白質科学会、横浜、ポスター、2014/6/25-27。
- ○庄司光男，“M/MM 法による酵素反応機構の理論的解明”、CUTE Mini-Workshop、三重大学、口頭（招待），2014/5/21。

(5) その他（特許，プレス発表，著書等）

- 庄司光男（執筆分担，第 5 章 1-2 節），“金属錯体の量子・計算化学”、錯体化学会選書 10、山口兆、榊茂好、増田秀樹編著、三共出版、2014/9 出版。