

jh130045-NA22

庄司光男 (筑波大学)

生体酵素における特異的反応機構の理論的解明

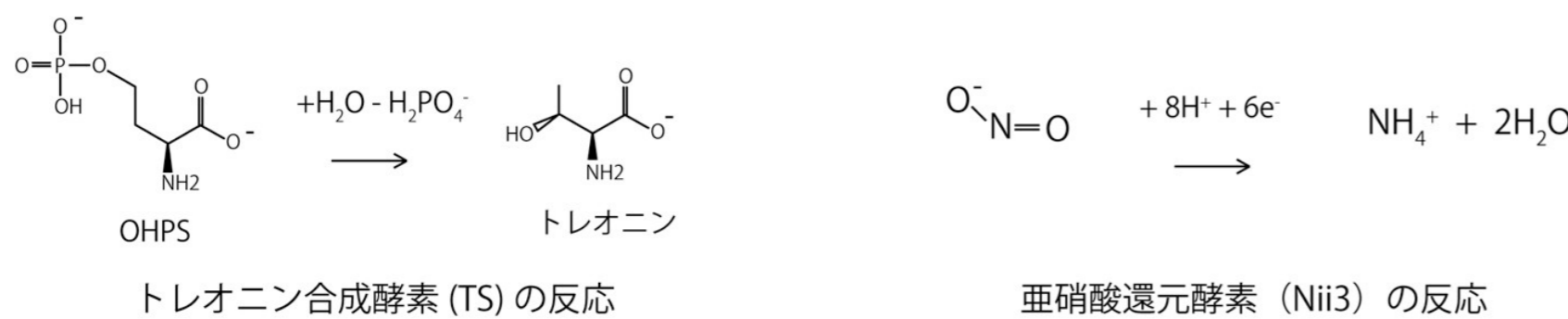


協同研究体制

代表 庄司 光男 筑波大学・計算科学研究センター 計算実行、データ解析
 副代表 金子 勇 東京大学・情報基盤センター プログラムのチューニング
 共同研究者 花岡 恭平 筑波大学・数理物質系 計算実行、データ解析

研究目的

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)の解明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。本研究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)を対象に、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ながら、実験的には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、スーパーコンピュータを使うことで劇的に理論解明を進展させる。



計算機利用の必要性

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極めて重要になっている。本課題は多自由度複雑系であり、その理論的解析には膨大な計算量が必要となる。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することができれば、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になる。スーパーコンピュータ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である。特に、ドラッグデザインや最先端材料開発には短期間で膨大な系を高精度に予測する必要がある。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は窒素質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。本研究では①計算科学分野、②実験研究分野、③理論解析研究の密な連帯を通じて、相互に発展させることで、該当領域の革新的進展をおこなう。

研究内容

生体内酵素は生命現象に不可欠な化学反応を支えており、非常に効率的な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から注目されている。このような酵素のうち、加水分解酵素など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るようになってきているが、より複雑な酵素反応においてはまだその水準に達していない。

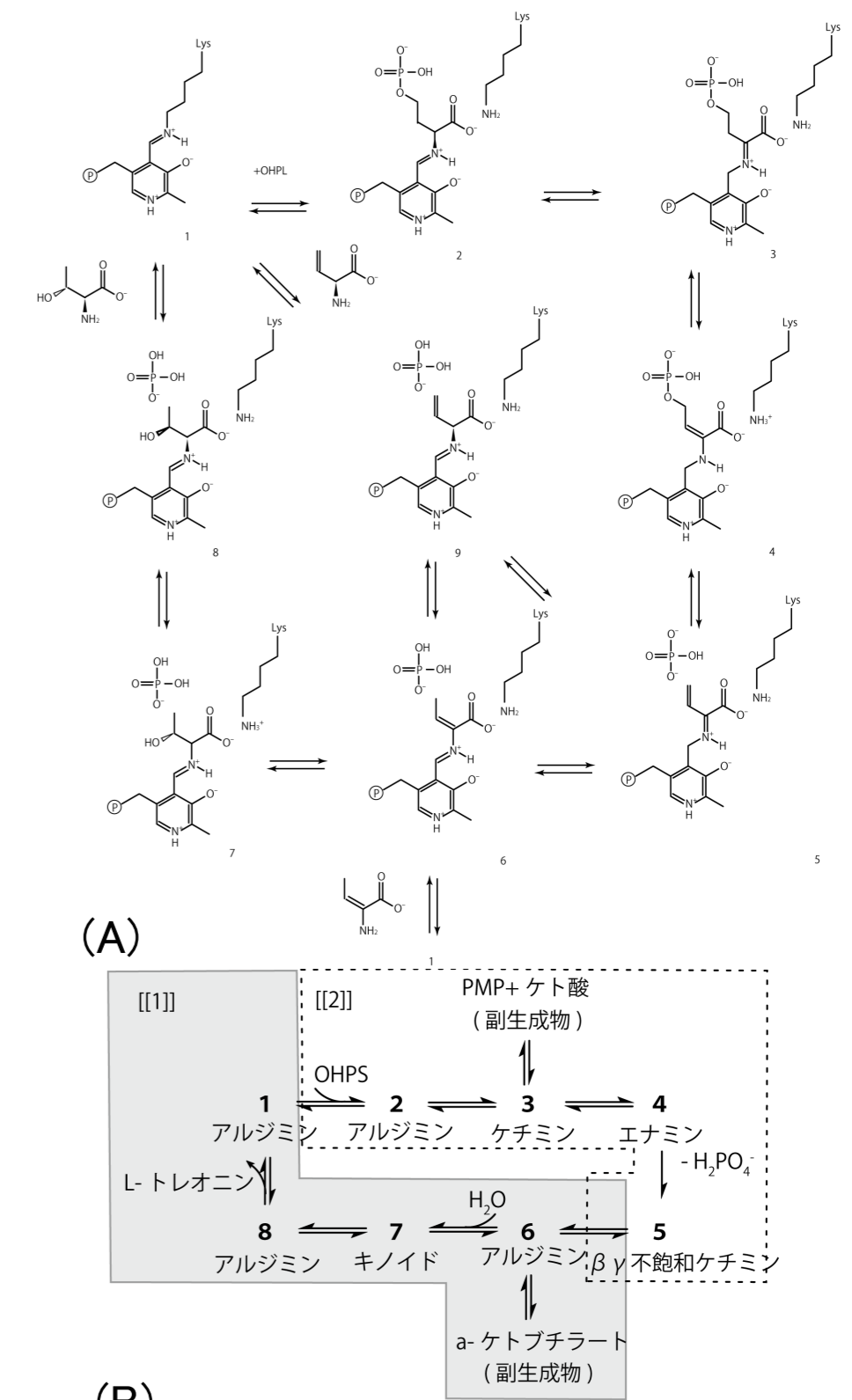
我々は、数ある生体内酵素の中でもトレオニン合成酵素:Threonine Synthase (TS)、タバコ由来亜硝酸還元酵素:Nitrite Reductase (Nii3)に注目した。これらは共にピリドキサル 5'-phosphate (PLP)およびシロヘムという補欠分子族を有し、多段階の位置特異的かつ立体選択的なプロトン移動反応を含み、複雑な反応機構の中で反応制御がなされて目的とする生成物のみを生成している。いずれも最近(2011年) 極めて高精度なX線結晶構造解析($< 2\text{\AA}$)が解けているが、未だ詳細な反応機構が確定できていない。

TSはトレオニン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いる。TSは動物は持っておらず、植物や微生物に存在している。TSの反応はいくつもの副生成物(α -ケトブチラート、ケトン)の生成の抑制がなされており、その制御機構は極めて興味深い。X線結晶構造解析と速度反応論による実験により、反応機構の提唱、反応生成物のリン酸が反応制御に関わること等が明らかにされたが、遷移状態の構造と活性化エネルギー、基質・酵素の各反応過程での構造変化については未だ明らかにされていない[1]。

Nii3の窒素同化作用は、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に取り込まれるため、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[2]。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おり、きわめて複雑な機構であるために、この詳細な反応機構については未だ明らかにされていない。

そのため、高精度計算手法(QM/MM)を用いて、可能な中間状態の探索と検証、及び遷移状態の決定をおこない、特異的反応の仕組みを明らかにする。

- [1]T. Murakawa, Y. Machida, H. Hayashi, J. Biol. Chem., 286, 2274(2011).
 [2]S. Nakano, M. Takahashi, A. Sakamoto, H. Morikawa, K. Katayanagi, proteins, 80, 2035(2012).

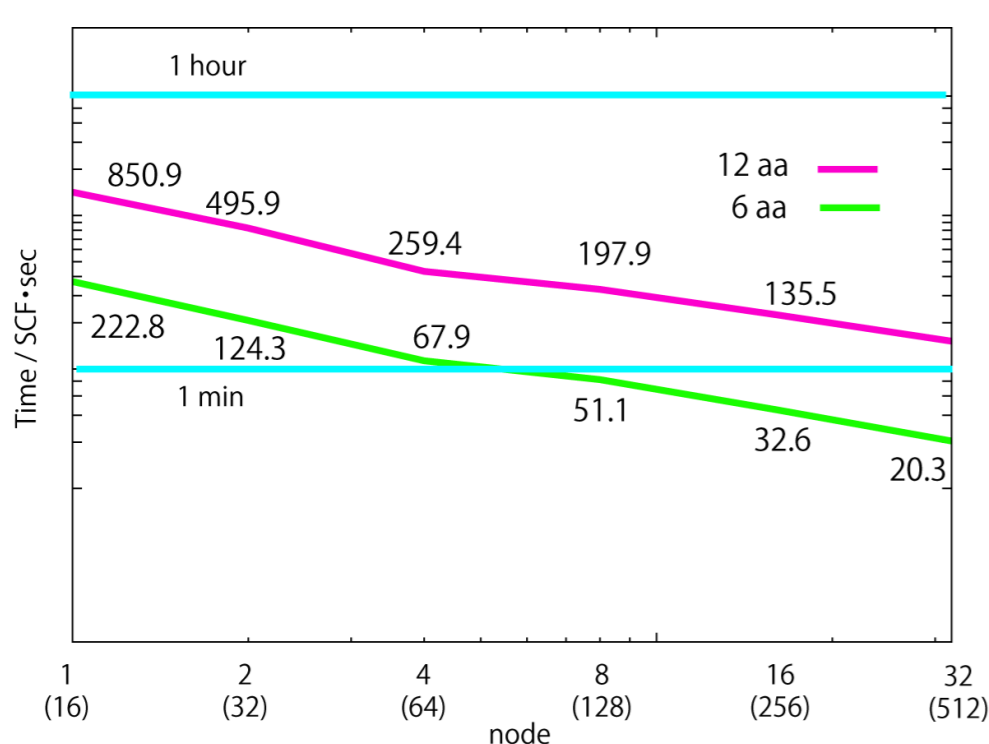


実験的に提唱されている反応機構[1,2]: (A)TS、(B)Nii3

研究状況

FX10でのベンチマーク測定結果

手法: B3LYP/6-31G* using NWChem(Ver 6.0)
 系: Alpha Helix アミノ酸数(基底関数)
 計算系: 3(388),6(1011),9(1421),12(1888),15(2228)

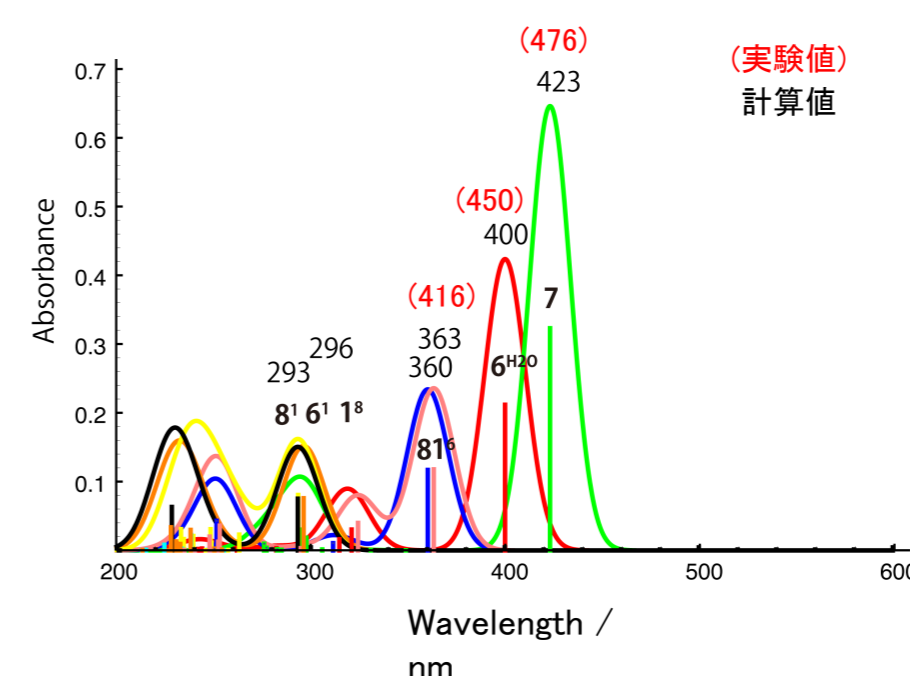
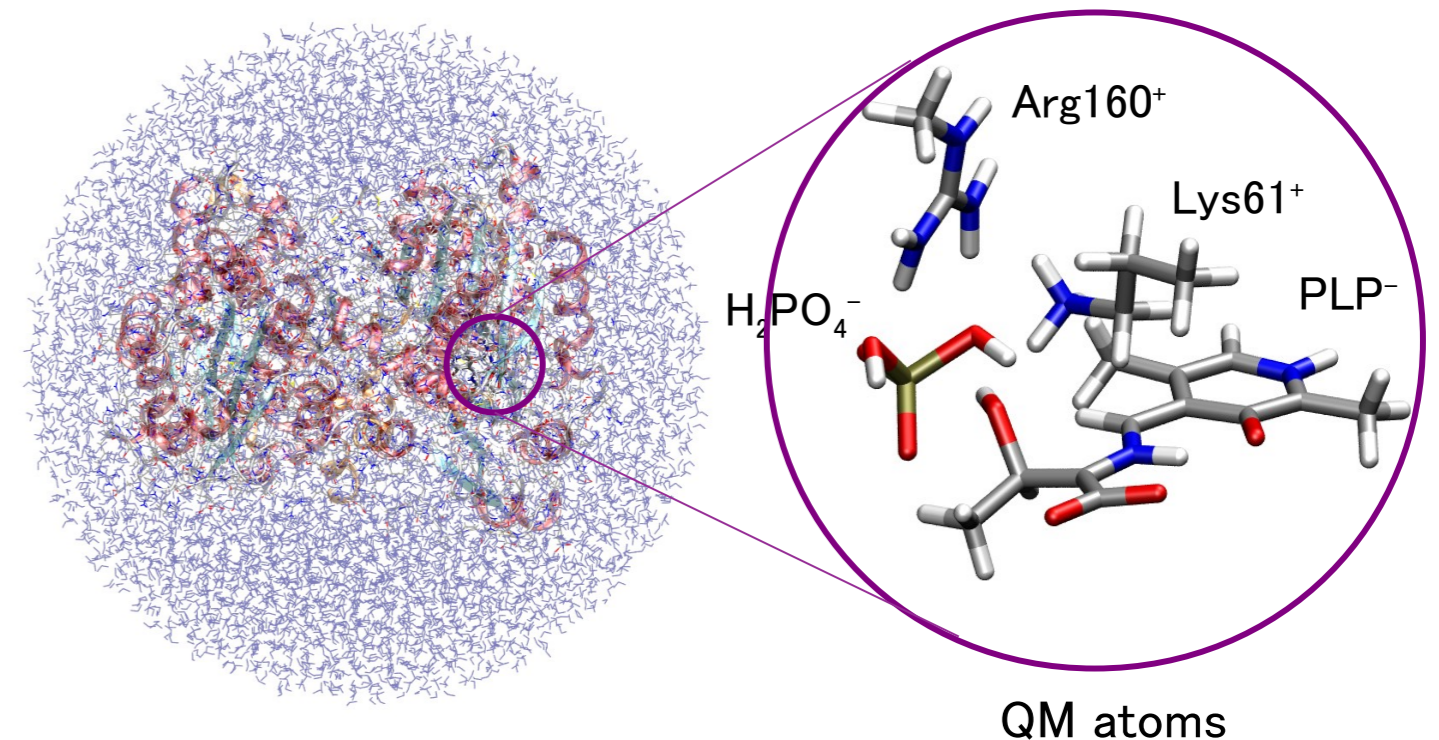
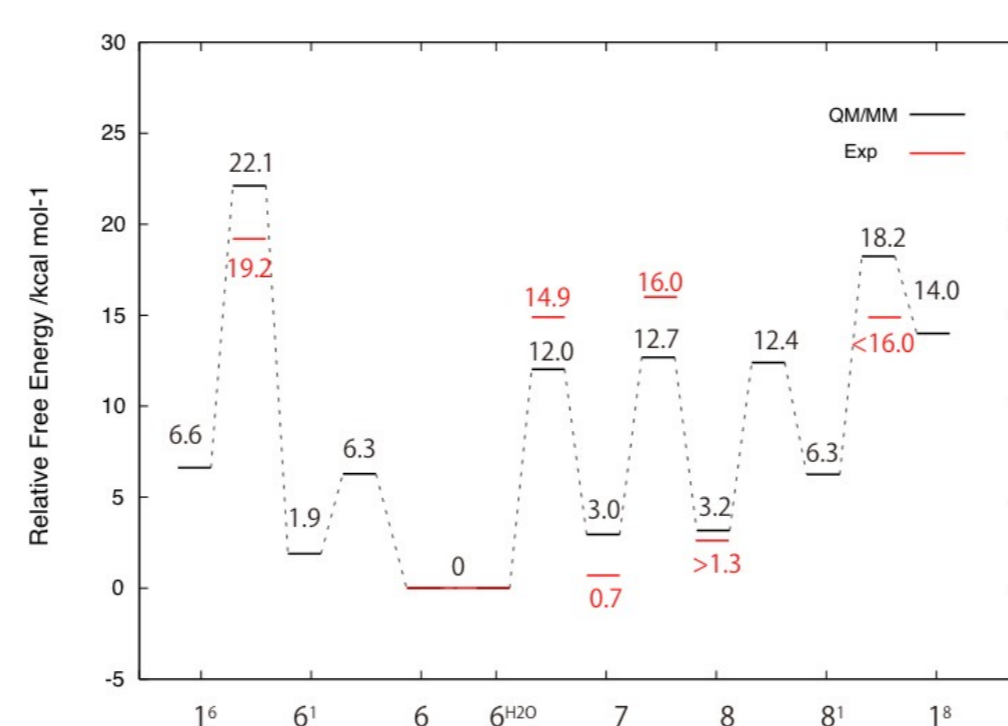


- CPU: SPARC64 IXfx 16 core /node
- Memory : 32GB /node, Infiniband

Method: QM/MM: UB3LYP/AMBER99 force field
 Basis: 6-31G* basis sets (700 basis sets)

#QM: ~ 70
 #MM(els, vdw) : ~ 2,000 (bq-zone radius 9Å)
 #Total : ~ 40,000 (PDB-ID: 3AEX)
 #Atoms in Opt. ~ 1,000

Normal mode analysis
 Automatic reaction path search by NEB



・エネルギー ±3kcalmol⁻¹
 ・UVスペクトル形状(-50nm shift)を完全に再現
 TSの反応機構を解明