

令和 3 年 4 月 27 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05049

研究課題名(和文) 酵素反応の動的機構の理論的解明

研究課題名(英文) Theoretical study of enzymatic reaction dynamics

研究代表者

森 俊文 (Mori, Toshifumi)

九州大学・先導物質化学研究所・准教授

研究者番号：20732043

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、近年の実験で活性に重要であると示唆されている酵素の構造ダイナミクスが実際にどのように反応に寄与するかを明らかにすることを目指して、プロリン異性化酵素Pin1で起こる酵素反応を分子シミュレーションを用いて調べた。その結果、従来広く行われてきた自由エネルギー曲面の解析からは基質と構造の構造変化が同時に進行する反応過程が得られたのに対して、ダイナミクスの解析から、実際の反応では基質の構造変化は素早いため酵素の構造変化はその間起こらず、代わりに線維状対を安定化する酵素の構造変化が異性化反応の前にあらかじめ起こり「構造励起状態」として準備されているという反応の動的機構が明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

酵素反応の分子機構の理解には、統計平均の結果として得られる自由エネルギー面や反応速度に基づいた解析が従来広く行われてきた。これに対して、個々の酵素分子の運動の役割を理解するための手法が整備されておらず、ダイナミクスの理解は進んでいなかった。本研究により、酵素反応において「構造励起状態」として酵素の構造揺らぎが重要であることが明らかになり、さらにそれを特徴付けるための手法の道筋が得られたものと考えられる。これにより、従来の静的描像の枠組みを超え、ダイナミクスを考慮して酵素反応の分子機構を明らかにしていく重要性が示されたことで、そのような理解がより多くの酵素反応で進んでいくことが期待される。

研究成果の概要(英文)：The importance of proteins' conformational dynamics have been realized over the last decades, but the molecular mechanism remains unresolved. In this project, the reaction dynamics of an enzyme, Pin1, was studied using molecular dynamics simulations. We found that the conformational changes of the ligand (reaction center) and the enzyme (reaction environment) do not proceed concertedly; rather, enzyme changes its structure prior to the reaction event as an "conformational excited state", which mimics the conformation at about the transition state and catalyzes the isomerization step. This is in sharp contrast to the conventional free energy picture, which indicates that the ligand and enzyme changes their conformations concertedly along the reaction (isomerization) coordinate. Thus, our result highlights the fundamental importance of protein dynamics during enzyme catalysis, and indicates the need to study the dynamics, e.g. conformational excitations, in broader enzymes.

研究分野：理論化学

キーワード：酵素反応 反応ダイナミクス 分子シミュレーション 遷移経路 自由エネルギー Pin1

1. 研究開始当初の背景

生体分子の立体構造は、酵素反応や物質の輸送など生体分子の機能に本質的に重要である。そのため、これまで X 線結晶像解析や NMR 法などにより生体分子の立体構造を明らかにする研究が盛んに行われてきた。一方で近年、一分子計測などの実験や、分子動力学シミュレーションにより、生体分子の構造は実際には結晶構造で見られるような単一の形にとどまるのではなく、大きく揺らいだり、複数の状態をとったりしていることが明らかになってきた。さらに、このような生体分子の構造の「柔らかさ」は、機能の発現に不可欠であることが、実験から分かっていた。そのため、生体分子が機能を発現する分子機構を理解するには、生体分子の立体構造に加え、構造変化のダイナミクスを明らかにすることが重要である。ところが、これまでの酵素反応の研究では、反応の自由エネルギー面や反応速度など、平均化された静的描像の解明に主眼が置かれており、反応のダイナミクス、特に酵素のダイナミクスがどのように反応に寄与するか、に関する理解は進んでいなかった。

2. 研究の目的

本研究では、分子動力学シミュレーションを用いて酵素反応の反応ダイナミクスをはじめとした動的機構を明らかにすることを目指した。特に、酵素など生体分子で見られる協働的で遅い分子運動が、化学反応の局所的にかつ素早く進行するイベントとどのように相関することで酵素反応の高い反応性・選択性が実現しているか明らかにすること、またこれが自由エネルギー面など従来の静的描像とどのように異なっているかを解明することを目的とした。

具体的な酵素反応としては、酵素 Pin1 で起こる cis-trans 異性化反応を調べた。Pin1 は、タンパク質のフォールディングを助けるプロリン異性化酵素 (Peptidyl-prolyl isomerase (PPIase)) の一つであるが、その中でもリン酸化したセリンまたはスレオニンと、その次に位置するプロリンの間のペプチド結合の cis-trans 異性化を促進する。Pin1 はアルツハイマー病などのフォールディング病と関連しているため、創薬のターゲットとしても研究が行われ、反応の自由エネルギー障壁などが調べられてきたが、反応のダイナミクスは調べられていなかった。そこで、どのように反応が進行するかを分子動力学シミュレーションを用いて明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

Pin1 の活性部位で起こる基質の cis-trans 異性化反応が、自由エネルギー曲面で表される静的 (統計平均的) 機構と実際の反応イベントで見られる動的機構でどのように違うかを、分子動力学シミュレーションを用いて明らかにすることを目指した。そのためにも、異性化反応の反応座標として広く用いられている二面角 ζ を反応座標として自由エネルギー曲線をレプリカ交換アンブレラサンプリング法 (replica exchange umbrella sampling (REUS)法) によって求め、反応の自由エネルギー障壁と遷移状態近傍での構造を調べた。

次に、反応のダイナミクスを調べるために、反応イベントのサンプリングと遷移経路の探索を行った。具体的には、自由エネルギー曲面での遷移状態近傍を出発点として多数のシミュレーションを実行することで、cis 状態と trans 状態をつなぐ反応トラジェクトリを複数準備した。次に、これらに対して、transition path sampling (TPT)法を改良したアプローチを適用し、反応イベントのサンプリングを行った。また、REUS および TPT によって得られたトラジェクトリを解析することで、自由エネルギー経路および遷移経路で基質と酵素にどのような構造変化が起こっているかを調べた。

次に、2つの反応経路の違いをより定量的に比較するために、遷移状態近傍の構造変化を表す反応座標を座標最適化によって調べた。そのためのアプローチとして、ある構造から生成物に到達する確率 (committor) が 0 (絶えず反応物側に戻る) から 1 (必ず生成物へ到達する) にスムーズに変化するような座標を求めるアプローチを、Kullback-Leibler divergence を出発点とした交差エントロピー最小化法として定式化した。次に、Pin1 の自由エネルギー経路および遷移経路に沿って committor を計算し、最適化によって反応座標を求めることで、2つの反応経路の違いを探った。

4. 研究成果

まず、基質の異性化を特徴付ける反応座標 ζ に関する自由エネルギー曲線を計算し、さらに経路に沿った構造変化を調べるために、REUS 法によるサンプリングで得られたトラジェクトリの解析を行った。すると、 ζ が変化するに従って基質分子内の構造変化が起こると同時に、基質-酵素間の水素結合の組み替えや、 3_{10} ヘリックスの形成も含めた酵素分子内での構造変化まで起こっているのが見られた。これは、自由エネルギー経路では基質と酵素の協働的な構造変化が ζ の変化に沿って起こっていることを示している。次に、TPT 法によって得られた反応イベントのトラジェクトリ (遷移トラジェクトリ) の解析を行ったところ、 ζ の変化は非常に素早く数 ps 以内に完了しているのが確認された。また、この間 Pin1 はほとんど変化しておらず、基質-酵素間や

酵素分子内の水素結合や構造もほとんどが反応前後で維持されたままであることが分かった。これは、自由エネルギー経路では酵素が ζ の変化に追従して随時最適な構造をとるように変化しているのに対して、遷移経路では酵素はほとんど動かない短時間の間に ζ の変化が完了していることを表している。さらに、遷移経路では反応直前および直後の酵素の構造が平衡状態で見られるものと異なっており、またそれが平衡状態へと緩和するまでに数百 ns 以上かかることも見積もられた。この結果は、酵素反応が起こるためには、酵素は平衡状態とは異なる「構造励起状態」にまず到達し、そこから反応イベント (ζ の変化) が起こる、という機構で Pin1 での cis-trans 異性化反応が進行していることを示している (図 1)。

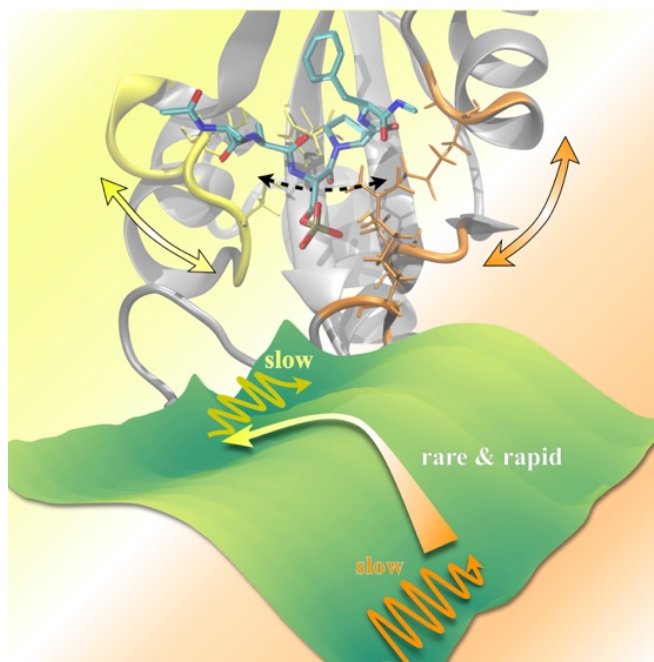


図 1. Pin1 に起こる異性化反応の動的機構

次に、この 2 つの反応経路がどのように異なるかをより定量的に評価することを目指した。その指標として特に、反応の成否に関わる遷移状態付近でそれぞれの経路がどのような座標で特徴付けられるかを調べた。具体的には、committor を反応経路に沿って計算し、交差エントロピー最小化法によって最適な反応座標の探索を行った。その結果、自由エネルギー経路では、 ζ 以外に基質の複数の二面角の協動的なねじれや基質-酵素間の相互作用の変化など、複数の座標が大きく寄与しているのが分かった。それに対して遷移経路では、 ζ 以外にはプロリン骨格のねじれのみが主な成分として見つかった。これらの結果は、自由エネルギー経路では遷移状態近傍でも酵素の構造がすぐに変化するために反応座標として酵素の相対位置が重要であるが、そのような変化は遷移経路では現れないため、遷移経路の解析のみからは自由エネルギー経路の線維状対を特徴づける反応座標を見つけるのは難しいことを示唆するものである (図 2)。

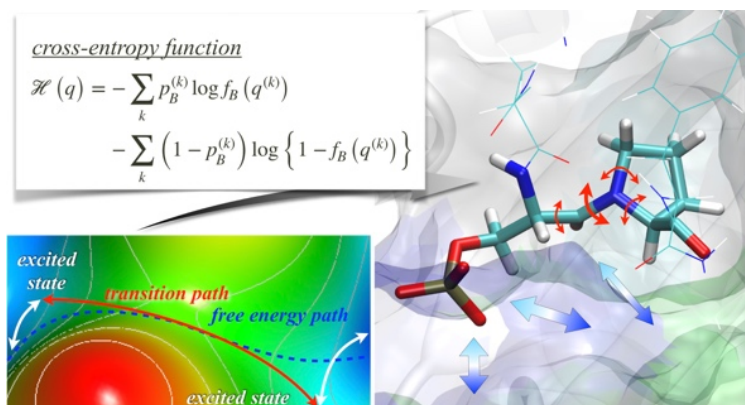


図 2. 交差エントロピー最小化による座標決定と自由エネルギー経路と遷移経路で重要となる反応座標

以上より、プロリン異性化酵素 Pin1 を用いた本研究により、従来の自由エネルギー曲面に基づく反応機構は、実際に反応ダイナミクスが進行する過程とは大きく異なっていることが明らかになった。この結果は、酵素反応の分子機構を理解するためには、ダイナミクスまで考慮した動的分子機構を調べていく必要があることを示唆している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Mori Toshifumi、Saito Shinji	4. 巻 16
2. 論文標題 Dissecting the Dynamics during Enzyme Catalysis: A Case Study of Pin1 Peptidyl-Prolyl Isomerase	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Chemical Theory and Computation	6. 最初と最後の頁 3396 ~ 3407
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jctc.9b01279	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Mori Yusuke、Okazaki Kei-ichi、Mori Toshifumi、Kim Kang、Matubayasi Nobuyuki	4. 巻 153
2. 論文標題 Learning reaction coordinates via cross-entropy minimization: Application to alanine dipeptide	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Chemical Physics	6. 最初と最後の頁 054115 ~ 054115
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1063/5.0009066	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Mori Toshifumi	4. 巻 13
2. 論文標題 Theoretical Study of Reaction Dynamics in Gas and Condensed Phases	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular Science	6. 最初と最後の頁 A0106 ~ A0106
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3175/molsci.13.A0106	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Mori Toshifumi、Saito Shinji	4. 巻 10
2. 論文標題 Conformational Excitation and Nonequilibrium Transition Facilitate Enzymatic Reactions: Application to Pin1 Peptidyl-Prolyl Isomerase	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Physical Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 474 ~ 480
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jpcllett.8b03607	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 MORI Toshifumi	4. 巻 59
2. 論文標題 酵素のダイナミクスは酵素反応の理解に重要か？	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 生物物理	6. 最初と最後の頁 271 ~ 272
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2142/biophys.59.271	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 森 俊文
2. 発表標題 生体分子の構造形成と機能発現の動的分子機構
3. 学会等名 第一回生体分子シミュレーション・モデリング研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森 俊文、斉藤 真司
2. 発表標題 プロリン異性化酵素の動的反応機構と構造励起状態の重要性
3. 学会等名 第22回理論化学討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Toshifumi Mori, Shinji Saito
2. 発表標題 Crucial role of conformational excitation and nonequilibrium transition in enzyme catalysis: Application to Pin1 peptidyl-prolyl isomerase
3. 学会等名 Joint 12th EBSA and 10th ICBP-IUPAB Biophysics Congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森 俊文
2. 発表標題 気相および凝縮系における反応ダイナミクスの理論的解明
3. 学会等名 第13回分子科学討論会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Toshifumi Mori, Shinji Saito
2. 発表標題 Crucial role of conformational excitation in enzyme catalysis of Pin1
3. 学会等名 第57回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Toshifumi Mori
2. 発表標題 Hierarchy and heterogeneity in protein folding and enzyme catalysis
3. 学会等名 2nd workshop on Advances in Theory and Computation of Complex Systems - Biological Systems（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 森 俊文
2. 発表標題 分子シミュレーションから見たタンパク質の構造ダイナミクスと機能発現の分子機構
3. 学会等名 ワークショップ「非共有結合系の分子科学：計測技術から探る生体分子科学の新展開」（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 協力 者	斉藤 真司 (SAITO Shinji)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------