

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：12101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05072

研究課題名(和文)位置選択的天然物生合成反応メカニズムにおける酵素の役割に関する理論的研究

研究課題名(英文)Theoretical Studies on Role of Enzymes in Regioselective Biosyntheses of Natural Products

研究代表者

森 聖治 (Mori, Seiji)

茨城大学・理工学研究科(理学野)・教授

研究者番号：50332549

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、酸化還元反応や異性化反応を司る天然物生合成の位置選択的酵素反応機構を、計算化学的手法と情報科学的手法を用いて解明することを目的とする。

3-ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ(3-HSD)という酵素の一つは、還元型NADP存在下において、前立腺がんを引き起こす原因となる5-ジヒドロテストステロンを人体に無害な3-アンドロスタンジオールへとヒドリド還元する。我々は分子動力学シミュレーション及び結果のクラスタリング解析、ONIOM法を用いた還元反応経路のQM/MM計算を行い、学術誌論文として採択された。また、天然有機化合物(トリテルペン類)の絶対立体配置の決定に寄与した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で明らかになった反応機構や、酵素のアミノ酸残基と補因子の間に働く非共有結合性相互作用によって、酵素反応にかかわる酵素自身のアミノ酸残基を変異させ制御することによるタンパク質エンジニアリングや、酵素のモデル化合物を用いることによる人工酵素の設計、遷移状態アナログに基づく薬剤の開発にも役立つことが期待される。

研究成果の概要(英文)：In this research project, we employed computational chemistry methods to investigate regio- and stereo-selective enzymatic reaction mechanisms. 3-Hydroxysteroid dehydrogenase (3-HSD) is an enzyme, that is essential in the regulation of the concentration of 5-dihydrotestosterone (5-DHT) in the prostate. It catalyzes the hydride reduction of 5-DHT to 3-androstanediol, which activates androgen receptors. Molecular dynamic (MD) simulations and hybrid ONIOM-type quantum mechanics/molecular mechanics (QM/MM) calculations were performed, and a new important aspect of the non-covalent interactions between a cofactor NADPH, water molecules, and the enzyme were found in this study. This work is accepted in a scientific journal. In addition, the absolute stereochemistry configurations of several triterpenes (biological active natural products) were determined.

研究分野：理論・計算化学

キーワード：量子化学計算 QM/MM法 分子動力学シミュレーション 反応機構 酵素 非共有結合性相互作用

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

酵素反応の解析は非常に重要であり、抗インフルエンザの治療剤であるリレンザやエイズ治療薬としての HIV プロテアーゼ阻害剤の開発のように、遷移状態アナログになりうる酵素反応阻害剤や新しい機能性分子を創出する人工酵素を設計する際に有用である。反応機構の解明には、タンパク質の構造解析、酵素反応速度の解析と部位特異的突然変異導入法の併用が有力な手段であるが、その詳細については不明な点が多い。生体内でホルモンや神経伝達物質として働く天然有機化合物は、酵素を用いて、立体選択的および位置選択的に精巧に生合成されている。多くの酵素の結晶構造が X 線や中性子線結晶構造解析により報告されているが、これらの選択性の制御は、酵素がフレキシブルに揺らいでいることと、基質が酵素に取り込まれた複合体の状態が、反応の前駆体や遷移状態に至るとは限らない点も多いことから、いまだに謎が多い。多くの酵素のダイナミクスに関する分子動力学シミュレーションや酵素反応に関する QM/MM 計算などがいくつか報告されているが、水も含んだ大規模系を取りあつかうこともあり、いまだにチャレンジングな課題である。研究代表者は、金属触媒による有機合成反応機構だけでなくシトクロム P450 やプロスタグランジン類の生合成酵素のモデル反応のメカニズムを、計算科学的手法を用いて検討した実績を持つ。

2. 研究の目的

本研究では、酸化還元反応や異性化反応を司る天然物生合成の位置選択的酵素反応機構を、計算化学的手法(量子化学計算、QM/MM 法、分子動力学(MD)シミュレーション)および情報科学的手法を組み合わせて解明し、いままで議論のあった位置選択的生合成反応における酵素の効果に関して知見を与える。

この研究で行った対象は以下の通りである。

(1) 医学的にも重要な酵素である 3 α -ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ(3 α -HSD)のダイナミクスと還元反応の検討。非共有結合性相互作用が、この酵素の反応性と選択性を制御するかどうかの検討。(2) 研究の途中段階で、酵素のモデル化合物である、金属サレン錯体における置換基との非共有結合性相互作用の影響の検討、(3) 薬のシーズとなりえる天然有機化合物の相対及び絶対立体配置の計算化学的決定にも携わった。

3. 研究の方法

量子化学計算や分子動力学シミュレーションでは Gaussian 09 Rev. E 01、Gaussian 16 Rev B.01 および AMBER 18 プログラムを用いた。さらに、非共有結合性(NCI)相互作用の表示には、NCI Plot Version 3.0 プログラムおよび VMD, Multiwfn 3.8 を用いた。

3 -ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼについては、ヒトからの X 線結晶構造解析の結果(PDB ID: 1J96)を用いて、ProPKa 3.1 モジュールを用いて、反応速度が決定された pH 7.0 におけるアミノ酸残基の pKa 値を計算し、それに基づいて、プロトン化状態を決めた。MD シミュレーションの解析には VMD を用いた。100 ns の MD シミュレーションのトラジェクトリで、アミノ酸残基の炭素に対して RMSD に基づき、DBSCAN 法を用いたクラスタリングを行ったほか、主成分分析を用いたデータの分類も行った。電子円二色性(ECD)スペクトルの計算には、TD-DFT 法を用いた。

4. 研究成果

(1) 3 -ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ(3 -HSD)のダイナミクスと還元反応の検討
当初は、プロスタグランジン D 合成酵素(PGDS) およびプロスタグランジン F 合成酵素(PGFS)の反応をターゲットにして検討を始めたが、プロスタグランジン D 合成酵素(PGDS)に関しては、基質アナログとの複合体構造が報告されていないこと、基質であるプロスタグランジン H₂の2つの側鎖のコンフォメーションの可能性が大変多く、補酵素であるグルタチオンの役割が明確になっていないことから、QM/MM 計算は始めたものの断念した。プロスタグランジン F 合成酵素(PGFS)の反応については、部位特異的突然変異体の反応で、どのアミノ酸残基が重要か明らかになっていないこともあり、PGFS と同種のアルド-ケト還元酵素スーパーファミリーに属し、部位特異的突然変異体の活性、pH 依存性および反応速度の検討が豊富な、3 -ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ(3 -HSD)触媒のダイナミクスと還元反応について、検討した。この酵素は、還元型 NADP 存在下において、5 -DHT を人体に無害な 3 -アンドロスタンジオールへとヒドリド還元する。この酵素は、臨床検査において胆汁酸の測定で用いられるほか、この酵素が欠損した場合、副腎不全及び外性器異常を起こすとされている。ヒト 3 -HSD3 型における比活性及び X 線結晶構造はすでに報告されている(引用文献)。しかし、触媒機構及び活性部位周辺環境の原子レベルでの詳細は未だ明らかになっていない。

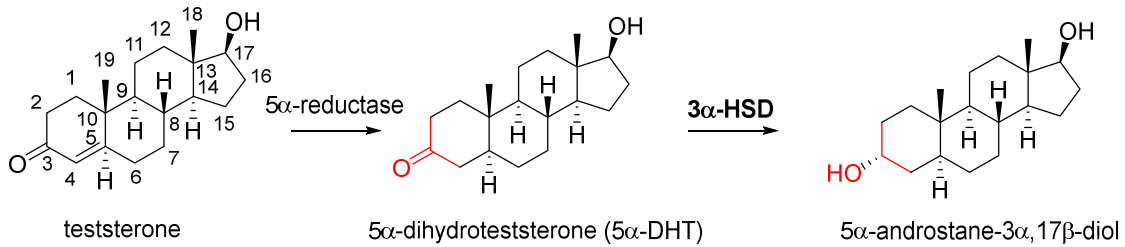


図1. テストステロンから、5α-androstane-3α,17β-diol を生成する 3-ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ触媒の還元反応経路

この酵素反応では、還元剤として働く補酵素である NADPH のそばに、Tyr216 は存在し、 π - π スタッキングで相互作用していることが示唆されているが、その役割もはっきりしていない。また、結晶水などの水の役割もはっきりしていなかった。本研究において、我々は活性部位周辺における各残基の役割を詳述するために MD シミュレーション及び ONIOM 法を用いた QM/MM 計算を行った。AMBER ff14SB/TIP3P 力場を用いた 100 ns MD シミュレーションを検討したところ、結晶構造の段階では、基質の 5α-DHT と、Tyr55 および His117 残基との間には相互作用がなく、基質は不活性である一方、シミュレーションの途中で、基質が回転、フリップし、これらの Tyr55 および His117 残基と 5α-DHT カルボニル酸素の間に水素結合が見られるようになった。念のためもう一度 MD シミュレーションを行ったが、基質の回転とフリップの現象は再び起こった。NADPH による還元反応はこれらの水素結合によって、基質のカルボニル酸素が活性化される後に起きることが示唆された。ONIOM 計算には、3 種類の QM 領域を変えたモデルを考えた。最も大きな領域を持つ QM 領域では、基質、NADPH および周囲の残基、基質のヒドロキシ基と相互作用する 5 つの水分子をはじめ、233 原子が含まれている (図 2)。

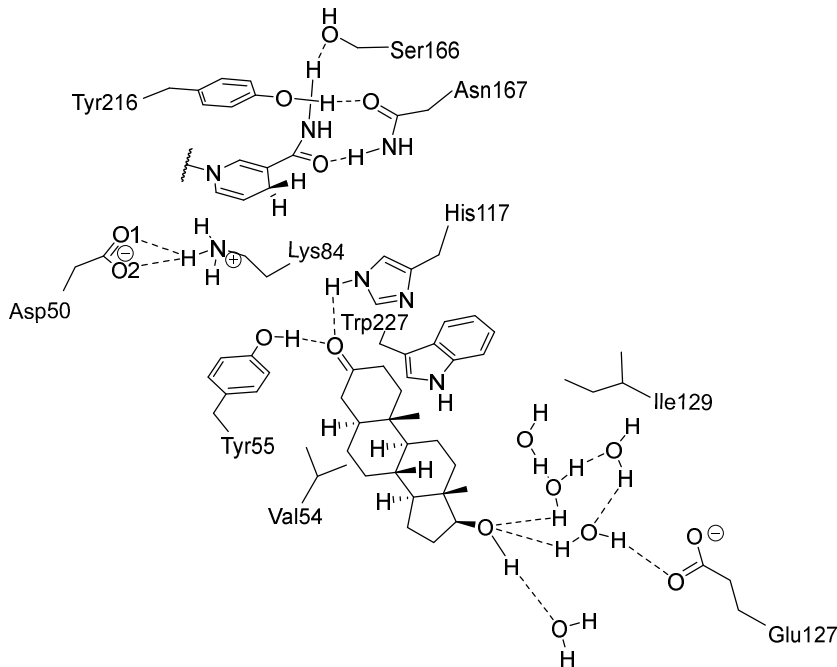


図2 最も大きな QM 領域に含まれる、3-ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ活性中心の構造

ONIOM-ME(M06-2X/def-2SVP:Amber)での計算結果から、触媒機構は還元型 NADP による基質への直接的なヒドリド還元であり、基質へのプロトンの受け渡しは、基質の近傍にある Tyr55 によって行われることが明らかとなった (図 3)。最も大きな QM 領域を用いた場合の活性化エネルギーは、18.7 kcal/mol であり、体温で起きる反応としては十分に進行する。生成物と酵素、NADP⁺ 複合体のエネルギーは、反応前駆体に比べて 9.4 kcal/mol 低いことがわかった。非共有結合性相互作用(NCI)及び Quantum Theory of Atoms in Molecules (QTAIM)解析により、還元型及び酸化型 NADP のニコチンアミド環と Tyr216 の側鎖間に π/π 相互作用が確認された。Tyr216 は反応の進行を助け、生成物の安定化に寄与するという重要な役割を持つと示唆された。また、Glu127 と基質及びその間に存在する水分子は互いに水素結合ネットワークを形成することで、基質の活性部位への配置を助ける働きがあるということが示唆された。

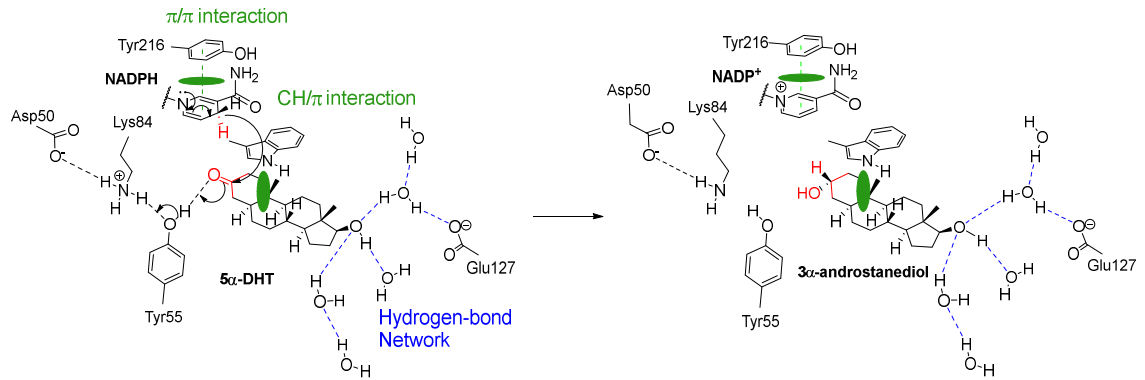


図3 QM/MM 計算結果から予言される還元反応経路

(2) インドール置換の金属サレン錯体における非共有結合性相互作用

ガラクトースオキシダーゼ(銅含有酵素)のモデル金属錯体であるインドール置換のジメトキシ金属サレン錯体およびメチル置換のジメトキシサレン Cu(II)錯体の1電子酸化体に対してインドールとサレン配位子との π/π 相互作用の電子状態に対する重要性を、XANES, X線結晶解析、UV-vis-NIR, ECD スペクトル、EPR スペクトルおよび量子化学計算を組み合わせることで明らかにした。金属は、Cu(II)、Ni(II)である。インドール置換基をもつサレンの配位した Ni(II)錯体の1電子酸化体について、非共有結合性相互作用(NCI)解析と QTAIM(Quantum Theory of Atoms in

Molecules) 解析

を行った。結果

を図4に示す。

なお、QTAIM 解析

によって、Ni-N

結合に関しては、窒素の孤立

電子対がニッケルと相互作用する

配位結合であり、Ni-O 結合に

関しては、フェ

ノラートアニオンと2価のニッケルとの相互作用であることからイオン性の結合であると理解できることがわかった。

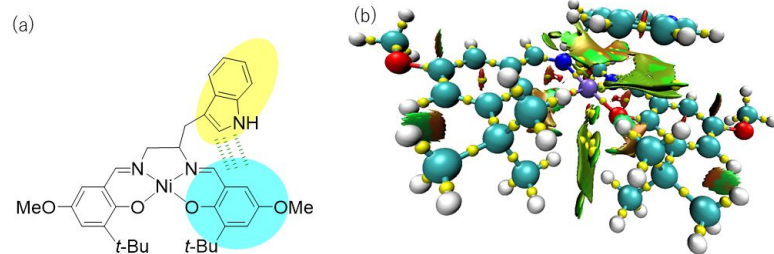


図4 インドール置換 Ni(II) salen 錯体の1電子酸化体の(a)概略図および(b)NCI解析

(3) 天然有機化合物の相対及び絶対立体配置決定

(3-1) 昆虫病原糸状菌から単離された orbiochromone A の電子円二色性スペクトル

昆虫病原糸状菌 *Orbiocrella patchii* から単離された二次代謝物である orbiochromone A の電子円二色性(ECD)スペクトルと、TD-DFT 計算(TD-B3LYP-D3BJ/6-311+G(d,p)//B3LYP-D3BJ(SMD)/6-31G(d))の結果と比較して、その絶対立体配置を決めることができた(図5)。相対立体配置についてはNMR スペクトル解析で決めた。

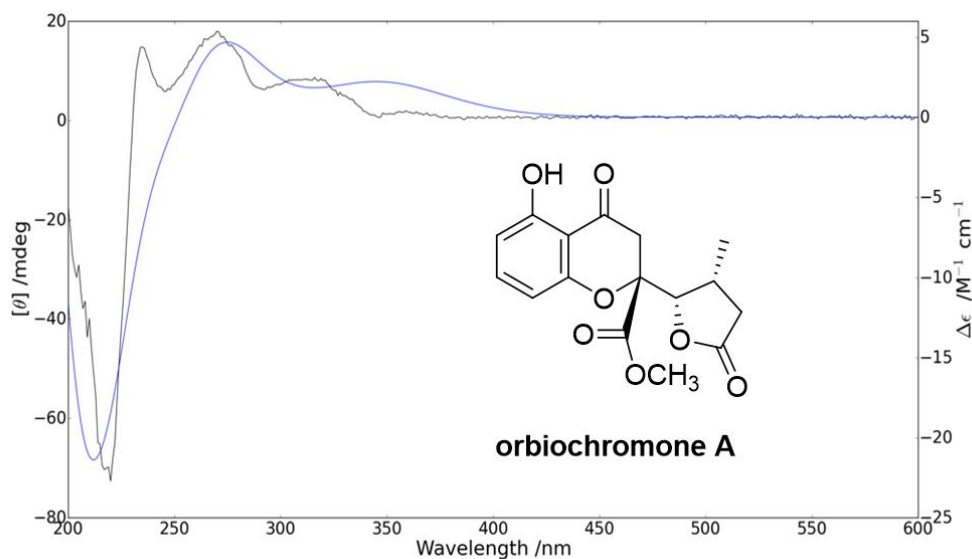


図5 (+)-orbiochromone A の理論 ECD スペクトル (青) と実験 ECD スペクトル (黒)

(3-2) 木材腐朽担子菌から単離された天然物 ganocolossusin A および D の電子円二色性スペクトル

木材腐朽担子菌 *Ganoderma* から単離された天然物の多くは、ラノスタントリペプチドに属し、生理活性が検討されている。タイ王国南部クラビ県木材腐朽担子菌 *Ganoderma colossus* から天然物であるラノスタントリペプチドが抽出され、13種類が新しい化合物であった。その中で、ganocolossusin A および D (構造式を図6に示す) が単離された。ganocolossusin D は、強力な抗マラリア活性を持つことが明らかになっている。これらの分子式はそれぞれ $C_{32}C_{44}O_6$ および $C_{30}C_{42}O_5$ であり、相対立体配置については 1D および 2D NMR スペクトル解析で決めた。絶対立体配置については、明らかになっていない。そこで、これらの化合物の MeCN 溶液の電子円二色性(ECD)スペクトルと、TD-DFT 計算(B3LYP-D3BJ/6-311+G(d,p))の結果と比較して、その絶対立体配置を決めた。

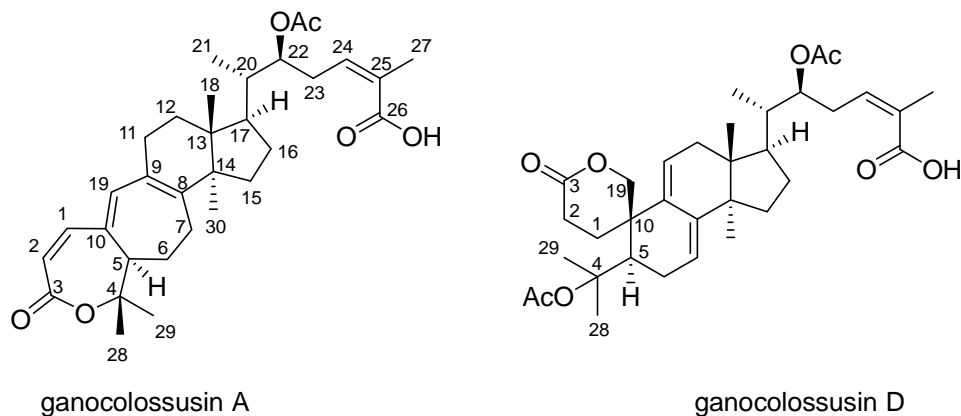


図6 ganocolossusin A および D の構造式

天然有機化合物 ganocolossusin A および D の絶対立体配置を決定するのに、電子円二色性スペクトルの実験と、DFT に基づく量子化学計算が大変役立つことを示した。

<引用文献>

V. Nahoum, et al. *J. Biol. Chem.* 276, 42091-42098 (2001).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Taborosi Attila, Yamaguchi Takahide, Mori Seiji, Kohzuma Takamitsu	4. 巻 25
2. 論文標題 Computational Modelling Study on the Pseudoazurin Type?1 Cu Site	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 JPS Conf. Proc.	6. 最初と最後の頁 11006
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7566/JPSCP.25.011006	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 Oshita Hiromi, Suzuki Takashi, Kawashima Kyohei, Abe Hitoshi, Tani Fumito, Mori Seiji, Yajima Tatsuo, Shimazaki Yuichi	4. 巻 48
2. 論文標題 The effect of - stacking interaction of the indole ring with the coordinated phenoxyl radical in a nickel(II)-salen type complex. Comparison with the corresponding Cu(II) complex	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Dalton Transactions	6. 最初と最後の頁 12060 ~ 12069
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/C9DT01887E	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 Oshita Hiromi, Suzuki Takashi, Kawashima Kyohei, Abe Hitoshi, Tani Fumito, Mori Seiji, Yajima Tatsuo, Shimazaki Yuichi	4. 巻 25
2. 論文標題 - Stacking Interaction in an Oxidized Cu II -Salen Complex with a Side Chain Indole Ring: An Approach to the Function of the Tryptophan in the Active Site of Galactose Oxidase	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Chemistry - A European Journal	6. 最初と最後の頁 7649 ~ 7658
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/chem.201900733	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 Isaka Masahiko, Palasarn Somporn, Choowong Wilunda, Kawashima Kyohei, Mori Seiji, Mongkolsamrit Suchada, Thanakitpipattana Donnaya	4. 巻 75
2. 論文標題 Benzophenone and chromone derivatives and their dimers from the scale-insect pathogenic fungus Orbicrella petchii BCC 51377	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Tetrahedron	6. 最初と最後の頁 130646 ~ 130646
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tet.2019.130646	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 該当する

1. 著者名 Chen Chien-Tien, Chen Ya-Pei, Tsai Bang-You, Liao Yi-Ya, Su Yu-Cheng, Chen Tsung-Cheng, Lu Chia-Hao, Fujii Ryoma, Kawashima Kyohei, Mori Seiji	4. 巻 10
2. 論文標題 Vanadyl Species Catalyzed 1,2-Oxidative Trifluoromethylation of Unactivated Olefins	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ACS Catalysis	6. 最初と最後の頁 3676 ~ 3683
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acscatal.0c00370	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 Iijima Eri, Gleeson M. Paul, Unno Masaki, Mori Seiji	4. 巻 19
2. 論文標題 QM/MM Investigation for Protonation States in a Bilin Reductase PcyA-Biliverdin IX? Complex	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 ChemPhysChem	6. 最初と最後の頁 1809 ~ 1813
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cphc.201800031	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 該当する

1. 著者名 Taborosi Attila, Yamaguchi Takahide, Mori Seiji, Kohzuma Takamitsu	4. 巻 25
2. 論文標題 Computational Modelling Study on the Pseudoazurin Type?1 Cu Site	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 JPS Conf. Proc.	6. 最初と最後の頁 11006
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7566/JPSCP.25.011006	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 Isaka Masahiko, Chinthanom Panida, Choeyklin Rattaket, Thummarukcharoen Tuksaporn, Rachtawee Pranee, Sappan Malipan, Srichomthong Kitlada, Fujii Ryoma, Kawashima Kyohei, Mori Seiji	4. 巻 83
2. 論文標題 Highly Modified Lanostane Triterpenes from the Wood-Rot Basidiomycete Ganoderma colossus: Comparative Chemical Investigations of Natural and Artificially Cultivated Fruiting Bodies and Mycelial Cultures	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Natural Products	6. 最初と最後の頁 2066 ~ 2075
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jnatprod.9b00947	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 該当する

1. 著者名 Mitsuizumi Hiroaki、Mori Seiji	4. 巻 125
2. 論文標題 Combined MD and QM/MM Investigations of Hydride Reduction of 5 α -Dihydrotestosterone Catalyzed by Human 3 α -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 3: Importance of Noncovalent Interactions	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Physical Chemistry B	6. 最初と最後の頁 4998 ~ 5008
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jpcc.1c01751	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 -

〔学会発表〕 計6件(うち招待講演 4件/うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Seiji Mori
2. 発表標題 ridges between Experiment and Theory on Catalytic functions
3. 学会等名 International Annual Symposium on Computational Science and Engineering (ANSCSE23) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Seiji Mori
2. 発表標題 Bridges between experiment and theory on catalytic functions
3. 学会等名 31st IUPAP Conference on Computational Physics (CCP2019) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Seiji Mori
2. 発表標題 Computational Insights into Structures and Reactions of Homogeneous and Enzymatic Catalysts
3. 学会等名 The Organic & Biomolecular Chemistry conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 三ツ泉宏晃、森 聖治
2. 発表標題 3 -ジヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ-5 -ジヒドロテストステロン複合体構造に関する分子動力的研究
3. 学会等名 日本化学会 第100春季年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Seiji Mori
2. 発表標題 Bridges Between Experiment And Theory On Catalytic Functions
3. 学会等名 Computer Aided Drug Design (CADD) 2018 Seminar and Workshop (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 三ツ泉 宏晃・飯島 愛璃・海野 昌喜・M. Paul Gleeson・森 聖治
2. 発表標題 ピリン還元酵素PcyAが触媒するピリベルジンIX?の還元反応に関するONIOM法を用いた研究
3. 学会等名 日本化学会第99春季年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

物理有機化学研究室(森研究室)ホームページ
<http://smori.sci.ibaraki.ac.jp/>
 物理有機化学研究室ホームページ
<http://smori.sci.ibaraki.ac.jp>

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	伊坂 雅彦 (Isaka Masahiko)		
研究協力者	グリーソン マシュー ポール (Gleeson Matthew Paul)		

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