

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23550035

研究課題名(和文) タンパク質機能の自由エネルギー解析と機能制御の分子基盤

研究課題名(英文) Mechanistic principle of protein functions: computational approach based on the free energy analyses

研究代表者

石田 豊和 (ISHIDA, Toyokazu)

独立行政法人産業技術総合研究所・ナノシステム研究部門・研究班長/主任研究員

研究者番号：70443166

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：酵素触媒の主要因として、遷移状態を安定化する静電相互作用の重要性は良く知られている。これとは別に、原理的には基底状態を不安定化することでも反応加速効果が得られるが、この作業仮説を巡っては多くの論争が繰り返されてきた。本作業仮説を検証するため、オロチジノーリン酸脱炭酸酵素を例にとり、QM/MM法を主とした複合モデリング計算を実行し、基質歪みが酵素活性に与える影響を詳細に解析した。一連の計算結果から、本酵素でも遷移状態/反応中間体を安定化する反応場の効果が確かめられたが、その一方、基質歪みの影響で活性化エネルギーが相対的に低下し、基底状態の不安定化が無視出来ない影響を持つ事も確認出来た。

研究成果の概要(英文)：Although the general catalytic principle, so-called the transition state stabilization (TST), was proposed over half a century ago, atomistic details of TST have not yet been clarified. Besides TST, other appealing hypotheses, such as the substrate distortion or ground state destabilization (GSD), are still actively debated issues in modern enzymology. One such example is orotidine monophosphate decarboxylase (ODCase), the enzyme that catalyzes the decarboxylation of orotidine monophosphate to uridine monophosphate. To answer the controversial issues, we performed systematic ab initio QM/MM modeling combined with all-electron QM calculation for the entire protein matrix. Our hybrid modeling analyses clearly showed that the reactive substrate has rather distorted geometry, and this distortion can contribute up to 4 kcal/mol energy reduction in the activation process. TST in this case is the key catalytic element, however, GSD can contribute to the catalytic mechanism in ODCase reaction.

研究分野：化学

科研費の分科・細目：基礎化学・物理化学

キーワード：酵素反応 オロチジノーリン酸脱炭酸酵素 QM/MM計算 自由エネルギー計算 遷移状態安定化 基底状態不安定化 相互作用エネルギー解析 生体分子シミュレーション

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 複雑な化学反応の典型例である酵素反応は、従来は理論/計算科学研究での扱いが困難な複雑系の代表例であった。しかし近年の理論/計算技術の進展と、特にQM/MM法に代表される複合シミュレーション技術の発展および計算プログラムの普及に伴い、大規模/高精度な分子計算を用いた酵素反応研究は、現在では現実的な研究課題となっている。そして実際2000年以降、酵素反応の理論/計算科学研究に関する論文は、世界中の複数の研究グループより多数発表され続けているのが現状である。

(2) これら最近の理論/計算科学研究における酵素反応研究の内容をみると、適用される計算手法の詳細には各研究グループの独自性が認められるものの、その研究の本質として、「酵素反応における遷移状態を安定化する触媒要因は何か」を議論する内容の論文が非常に多い。これは半世紀以上も昔に提案されたL. Paulingの有名な反応仮説「遷移状態と強く結合する事で酵素は反応を加速する」に由来すると考えられ、実際多くの計算科学論文の文脈では、「酵素であるタンパク質場の作る極性環境が、反応基質の遷移状態を安定化する事が重要である」と示唆する論文が多い事も事実である。しかしその一方で、「反応の基底状態(酵素基質複合体)を相対的に不安定化する事により、触媒反応の活性化障壁を低下させ得る」という作業仮説も存在するが、具体的な酵素反応系で本作業仮説が詳細に検討された例は極めて少ない。

(3) 後者の酵素反応仮説を巡る議論に関しては、古くはPhillips機構に遡る「基質の立体構造歪み」が主な要因だと考えられているが、現在においても構造解析の主たる実験手段であるX線結晶構造解析において、大きなタンパク質複合体中で小さな基質(アナログ分子)の微細な構造歪みを直接観測する事は多くの場合に困難である。そこで本作業仮説の検証においては、具体的な反応系を対象とした理論/計算科学研究により、定量的に酵素反応過程を調べる事が非常に重要な意味を持ち、実際に幾つかの研究グループではその試みも行われつつある。

## 2. 研究の目的

(1) 基底状態での基質歪みが酵素活性の主要因だと議論されている酵素は幾つかある

が、構造解析の実験研究においてこの仮説の真偽を検討されてきた酵素反応系の典型例とも言えるオロチジン-リン酸脱炭酸酵素(Orotidine 5'-Monophosphate Decarboxylase, ODCase)を対象として、独自に開発した計算プログラムのモデリング手法を適用する事で、基底状態の構造歪みが酵素活性に与える影響を定量的に議論する事を試みた。

(2) 特に本酵素に関しては、構造解析の専門家から高分解能の結晶構造モデルの提供を受け(京都大学大学院理学研究科 藤橋雅宏博士)、最新の構造生物学/生化学的知見と自身がこれまでに独自開発した理論/計算手法を組み合わせる事で、酵素反応の定量的な自由エネルギー計算を行い、ODCaseの酵素活性において鍵となる分子論的要因を明らかにする。遷移状態の安定化および基底状態の不安定化と言う2つの代表的な背反する作業仮説を念頭に置き、これら酵素活性を支配する要因をアミノ酸残基単位の分解能で明らかにし、本酵素を巡る反応機構に関する議論に対して、理論計算の立場から回答を与える事を目標としている。

## 3. 研究の方法

(1) ODCaseは生体内でピリミジン環を新規合成する過程で必須の酵素であり、オロチジン-リン酸(Orotidine 5'-monophosphate, OMP)からカルボキシル基を引き抜いて、ウリジン-リン酸(Uridine 5'-monophosphate, UMP)を生成する反応を触媒する酵素として知られる。本酵素にはこれまでに多くの実験的/計算化学的研究が存在するが、種々の研究成果により、本酵素反応の律速過程は脱炭酸プロセスだと考えられている。そこで本研究ではこの脱炭酸過程の反応解析に注目し、これまで独自に開発を続けてきたQM/MM計算、およびMM計算/モデリング/分子動力学計算を可能とする一連のシミュレーションツールを用いる事で、酵素反応の自由エネルギー変化、および酵素反応の進行に伴ったタンパク質の動的構造変化を解析した。

(2) QM/MM計算におけるQM部分は、波動関数ベースの*ab initio*量子化学計算手法を基礎としており、主として分子構造の最適化および反応経路の決定にQM/MM計算を適用している。そして得られた反応経路に沿って、QM/MM計算と分子動力学計算を組み合わせる事で反応自由エネルギー変化の計算を実行し、経路に沿って分子動力学計算から得られたト

ラジエクトリーデータを基礎に、反応の進行に伴ったタンパク質のマクロな構造変化を解析する事も試みた。また理論計算で精密化された構造に基づきタンパク質場の影響をアミノ酸残基単位の分解能で解析するために、QM/MM 計算とフラグメント分子軌道法を組み合わせた大規模全系量子計算も実行して、基底状態 / 遷移状態 / 反応中間体を安定化するタンパク質場の電場効果、特に静電相互作用エネルギーの程度をより定量的に解析する事を試みた。

#### 4. 研究成果

(1) まず反応解析の第一ステップとして、酵素反応と参照系の反応自由エネルギー変化を、QM/MM 計算と分子動力学計算を組み合わせる事により評価した。参照系の反応としては、水溶液中での基質の自発的な脱炭酸反応を選択し、酵素と同条件の反応環境でシミュレーションを行った。得られた自由エネルギー変化を図1に示すが、実験から示唆される事実(参照系の反応と比較して酵素は  $10^{17}$  乗のオーダーで反応を加速し、活性化エネルギーの差に換算すると 20 数 kcal/mol も活性化障壁を低下させ得る)を定性的にも定量的にも良く再現している事が確かめられた。

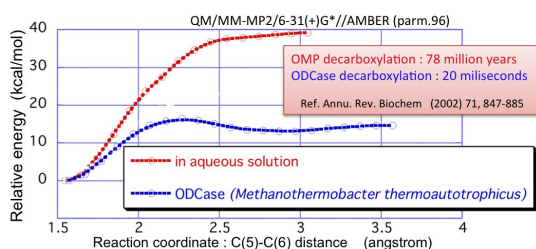


図1 反応の自由エネルギー変化(青線: 酵素反応、赤線: 水溶液中での参照反応)

次に理論 / 計算化学研究の利点を生かし、QM/MM 計算の定義に従って反応自由エネルギー変化を QM 領域、MM 領域(タンパク質場)、MM 領域(溶媒)の3成分に分割する事で、酵素活性における反応場の影響を大雑把に把握する事を行った。この結果から、QM 領域のエネルギーは単調に増加する一方(つまり、気相中では反応が起こりえない)、タンパク質場の効果で遷移状態 / 反応中間体が安定化されるために、酵素反応が常温下で進行する事が理解出来る。またこの場合には溶媒の効果は非常に小さく、活性中心のタンパク質場で基質との相互作用が主な触媒要因となり、酵素が脱炭酸反応を加速している事が明

らかとなった。

さらにタンパク質場の効果をアミノ酸残基単位の分解能で検証するために、QM/MM 計算で決定した分子構造にフラグメント法ベースの全系量子計算を実行する事で、基質と各アミノ酸残基の相互作用エネルギー成分を解析し、基底状態(酵素基質複合体) / 遷移状態 / 反応中間体と相互作用する残基を同定した。一例として図2に、基底状態と反応中間体の相互作用エネルギー分割図を示すが、巨大なタンパク質の反応場の中で、ごく特定のアミノ酸残基のみが酵素活性をコントロールしうる事が理解出来る。本酵素の場合、全ての種に保存されているアミノ酸残基の並びとして、Lys42-Asp70-Lys72-Asp75\* (ODCase は2つのタンパク質ドメインから成る酵素であるが、\*は別ドメイン上のアミノ酸配列である事を示す)の配列が知られているが、反応中間体の安定化には Asp70 と Lys72 が、そして基底状態との相互作用では Lys42 と Asp75\* がそれぞれ重要な役割を果たす事が明らかとなった。これはつまり、基底状態の不安定化には Lys42/Asp75\* との相互作用が重要であり、遷移状態 / 中間体の安定化には Asp70/Lys72 との相互作用が鍵となる事を示唆している。

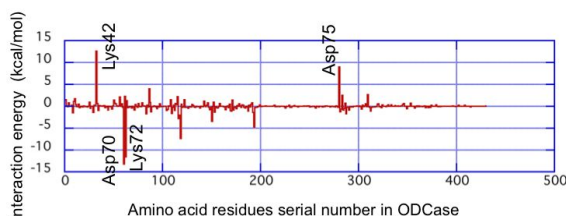


図2 基底状態と反応中間体との2状態間相互作用エネルギーの分割図

(2) 本酵素の重要な作業仮説である「基底状態の基質歪み」の効果を検証するために、仮想的な計算機実験を行って、構造歪みが酵素活性に及ぼすエネルギー変化を検証した。QM/MM 計算から決定された反応経路に沿った構造モデルにおいて、タンパク質場の作る立体場および静電場の影響を徐々に取り除く事でタンパク質環境の影響を取り除き、反応経路の各点においてどの程度のエネルギー歪みが基質に加わっているのかを電子状態計算から見積もった。タンパク質場の影響を取り除き、基質が構造緩和する際に得られるエネルギーを「基質歪みのエネルギー」と定義して、基底状態(酵素基質複合体)、遷移状態、反応中間体の3状態に対してエネルギー

一成分を計算すると、それぞれ 6.6 kcal/mol, 2.9 kcal/mol, 2.9 kcal/mol という値が得られた。この結果より、確かに基底状態において基質は 4 kcal/mol 程度の歪みエネルギーを受けて相対的に不安定化しており、参照系の反応と比較して活性化エネルギーの 2 割弱程度で、相対的に反応障壁を低下させている事が明らかにされた。そしてこの基質の不安定化に関しては、Lys42/Asp75<sup>-</sup> との静電的な相互作用が重要である事も確認された。

(3) 天然型酵素の反応を解析すると、ODCase の反応においては確かに基質歪みが酵素活性に影響を与える事が確認出来た。しかし図 2 の相互作用成分解析を見ると、反応遷移状態 / 中間体の安定化にもタンパク質環境が重要な寄与を果たしている事が確認出来たので、次に鍵となる 2 アミノ酸残基、Asp70, Lys72 をアラニンに置換した変異型酵素を計算機上でモデル化し、天然型酵素と同様に自由エネルギー変化およびエネルギー成分解析を実行する事で、これら 2 残基が酵素活性に及ぼす影響を更に検討した。計算による自由エネルギー変化からは、Asp70Ala および Lys72Ala 変異体は殆ど反応を触媒しない事が示唆され、これは実験事実とも矛盾しない結果である。この事実より、ODCase の酵素活性においても遷移状態の安定化は重要な触媒要素である事が確認でき、特に本酵素の場合、保存された特異的な 4 残基配列 (Lys42-Asp70-Lys72-Asp75<sup>-</sup>) がそれぞれ基底状態の不安定化 / 遷移状態の安定化に作用し、結果として大きな酵素活性に寄与している事が明らかとなった。また Asp70Ala 変異体では活性化障壁が殆ど現れない一方で、Asp70 と Lys72 の両者をアラニンに変異させた 2 重変異酵素では若干酵素活性が改善する事を計算結果から確認出来た。この事実は、保存された 4 つの特徴的なアミノ酸配列が基質の電子状態に何らかの影響を及ぼしていると考えられる。1 アミノ酸残基で酵素活性を調整する原理を追求するため、本変異体酵素の反応解析は継続して実行中であり、変異型酵素の反応解析を主とした投稿論文は準備中の状況にある。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 4 件)

藤橋雅宏、石田豊和、黒田新悟、Lakshmi P. Kotra, Emil F. Pai, 三木邦夫、  
“Substrate Distortion Contribute to the Catalysis of Orotidine 5'-Monophosphate Decarboxylase”, Journal of the American Chemical Society 査読あり (2013) 135 巻, p.17432-17443.  
DOI: 10.1021/ja408197k

石田豊和、「大規模量子計算を基礎とした酵素反応研究の現状と今後の展望」、生物物理、査読あり (2013) 53 巻、p.326-327.

石田豊和、「複合シミュレーション手法によるタンパク質機能の分子シミュレーション」、アンサンプル、査読あり (2012) 14 巻、p.32-39.

石田豊和、「タンパク質機能の分子シミュレーション：基質認識と酵素反応」、化学と工業、査読あり (2011) 64 巻、p.626-626.

[学会発表](計 13 件)

石田豊和、藤橋雅宏「酵素活性における基質歪みの効果：ODCase の酵素反応を例として」、日本化学会第 94 回春季年会、2014 年 3 月 27 日、名古屋大学東山キャンパス (愛知県)

石田豊和「タンパク質機能の分子シミュレーション」第 6 回産総研ナノシステム連携促進フォーラム、2014 年 2 月 27 日、秋葉原コンベンションホール (東京都)

石田豊和 “Computational modeling of protein functions: molecular recognition and enzymatic catalysis” 第 5 回 JCS 理論化学国際会議、2013 年 12 月 3 日、東大寺総合文化センター (奈良県)

石田豊和、藤橋雅宏「酵素活性における基質歪みの効果：ODCase の酵素反応を例として」、第 7 回分子科学討論会 2013 京都、2013 年 9 月 25 日、京都テルサ (京都府)

石田豊和、藤橋雅宏「複合シミュレーション手法で探るオロチジナーリン酸脱炭酸酵素の触媒機構」、第 13 回日本蛋白質科学会年会、2013 年 6 月 14 日、とりぎん文化会館 (鳥取県)

藤橋雅宏、石田豊和、黒田新悟、三登一八、Lakshmi P. Kotra, Emil F. Pai, 三木邦夫、  
「オロチジナーリン酸脱炭酸酵素の反応触媒機構の解析」、第 13 回日本蛋白質科学会年会、2013 年 6 月 13 日、とりぎん文化会館 (鳥取県)

石田豊和、藤橋雅宏「複合シミュレーションによる ODCase の反応機構解析」、日本化学会第 93 回春季年会、2013 年 3 月 22 日、立命館大学びわこくさつキャンパス（滋賀県）

(2) 研究分担者 ( )

研究者番号：

石田豊和、白土東子、成松久、久保田智巳、「高分解能結晶構造と計算科学の融合によるノロウイルス糖鎖認識機構の解析」、第 12 回産総研-産技連 LS-BT 合同研究発表会、2013 年 2 月 5 日、産総研つくばセンター共用講堂（茨城県）

(3) 連携研究者 ( )

研究者番号：

石田豊和 “Computer simulation of protein function: molecular recognition and enzymatic catalysis”, Nagoya Symposium: Frontiers in structural physiology, 2013 年 1 月 23 日、名古屋大学 豊田講堂（愛知県）

石田豊和、「若い世代の特別講演会 タンパク質機能の分子シミュレーション：基質認識と酵素反応」(招待講演) 日本化学会第 92 回春季年会、2012 年 3 月 27 日、慶応義塾大学 日吉キャンパス（神奈川県）

石田豊和 “Computational modeling of carbohydrate recognition in selectin complex”, 第 71 回岡崎コンファレンス「糖鎖分子科学の新たな展望」(招待講演) 2011 年 10 月 13 日、岡崎コンファレンスセンター（愛知県）

石田豊和、「タンパク質機能の分子シミュレーション：基質認識と酵素反応を例として」、第 5 回分子科学討論会 2011 札幌、2011 年 9 月 20 日、札幌コンベンションセンター（北海道）

石田豊和 “Computational modeling of carbohydrate recognition in selectin complex”, Ninth triennial congress of the World Association of Theoretical and Computational Chemists (WATOC 2011)、(招待講演) 2011 年 7 月 21 日、University of Santiago, Santiago De Compostela, スペイン

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

石田 豊和 ( ISHIDA, Toyokazu )  
独立行政法人 産業技術総合研究所・  
ナノシステム研究部門・  
研究班長 / 主任研究員

研究者番号：70443166