

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24550190

研究課題名(和文)量子化学計算による酵素の触媒機構解明

研究課題名(英文)Quantum mechanical investigation of enzymatic reactions

研究代表者

蒲池 高志(Kamachi, Takashi)

九州大学・先導物質化学研究所・助教

研究者番号：40403951

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題ではQM/MM(Quantum Mechanical/Molecular Mechanical)法と呼ばれる量子化学計算の手法を用いることで、数万原子からなる生体分子などの巨大な系についてシミュレーションを行い、酵素の活性中心における反応活性種の反応性や電子状態を検討し、酵素による基質の活性化機構を明らかにした。成果としては、フルオロ酢酸デハロゲナーゼ、ヘムオキシゲナーゼ、ジオールデヒドラターゼなどの酵素反応について、QM/MM法による高精度なドッキングシミュレーションや変異体の反応性評価を行い、そのいくつかについて論文を発表した。

研究成果の概要(英文)：In this study, reactivity and electronic structure of active species in the active site of enzymes were investigated with the Quantum Mechanical/Molecular Mechanical (QM/MM) method. QM/MM studies on fluoroacetate dehalogenase, heme oxygenase, and diol dehydratase were published.

研究分野：計算化学

キーワード：酵素反応 密度汎関数法 遷移状態 QM/MM法

1. 研究開始当初の背景

酵素は精緻に組み合わされた多元素から成る化学反応系であり、呼吸などによるエネルギー獲得、電子移動、物質変換など、生命の根幹に関わる反応が行われている。このような酵素が行う反応系をそのまま工業的に応用できれば、低環境負荷な触媒が構築されることとなり、今世紀に期待される課題である。

2. 研究の目的

QM/MM (Quantum Mechanical/Molecular Mechanical) 法と呼ばれる量子化学計算の手法を用いることで、数万原子からなる生体分子などの巨大な系についても、十分な精度でシミュレーションを行うことが可能である。本研究はこの QM/MM 法を使うことで、酵素の活性中心における反応活性種の反応性や電子状態を検討し、酵素による基質の活性化機構を明らかにすることを目的とする。計画している研究項目としては、(1)QM/MM 法による高精度なドッキングシミュレーション(2)酵素全原子を含んだ計算による反応性評価(3)計算化学による高機能人工酵素の設計など、計算化学の立場から酵素化学に関連した幅広い研究を行う。

3. 研究の方法

本研究では量子力学的手法(QM法)と分子力場法(MM法)を組み合わせたQM/MM法を利用し、酵素の触媒機構の解析を行う。結合や電子状態の精密な記述が必要なQM領域(活性中心)に量子化学計算を、周辺領域の比較的記述が容易なMM領域(ほぼすべてのタンパク)に分子力学を使用し、それらを組み合わせる方法である。系の全エネルギー E はQM領域、MM領域の各エネルギー $E(\text{Inner, QM})$ 、 $E(\text{Outer, MM})$ に領域間の相互作用 $E(\text{Couple, QM/MM})$ を加えたものとなる。この方法を用いれば、現実的な時間内で全タンパクを含む系の計算が実行可能となる。

4. 研究成果

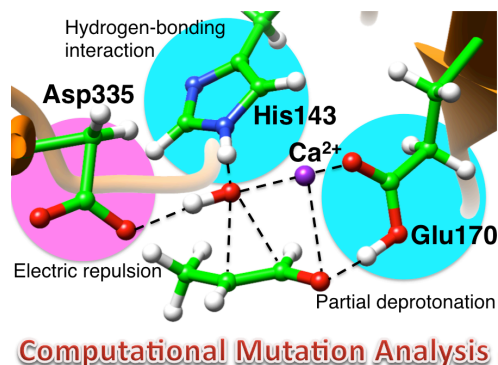
計算シミュレーションを用いた酵素反応の解析

ジオールデヒドラターゼ(DD)はアデノシルコバラミン由来の酵素であり、1,2-ジオールを相当するアルデヒドへと変換する反応を触媒する。最初にアデノシルラジカルにより1,2-propanediol(PDO)のC1の水素が引き抜かれ、1,2-diol radicalになる。次に2位の水酸基が1位に転移する水酸基転移反応が進行し、1,1-diol radicalが生じる。その後、水素の再結合が起こり、1,1-propanediolが生じる。その活性中心には金属イオンが存在し、基質の水酸基が金属イオンに直接配位している。虎谷らはこの金属イオンをKと推定した。近年、我々はQM/MM計算により中心金属の再同定を行い、中心金属をCaであると予見した[1]。その後、虎谷らは酵素の活性がCaに大きく依存していることを確認し、中心金属はCaと訂正された。また、虎谷らは

Site-Directed Mutagenesisにより変異型酵素を作成し、それらの活性を測定した。変異型では水酸基転移反応の活性化エネルギーの低下に寄与するHis143とGlu170を置換したHis143Ala、Glu170Gln、Glu170Alaの活性を求めた。His143AlaとGlu170Gln変異型の活性はそれぞれ野生型の5.1%と0.02%となり、Glu170Ala変異型では活性はほとんどなかった(<0.01%)。今回、計算シミュレーションを用いてアミノ酸残基の役割および活性に与える影響について検討した。

酵素の全原子計算を行うためにQM/MM法を用いた。QM/MM法は高精度で計算負荷が大きい量子化学(QM)計算と安価で高速な分子力場(MM)計算を組み合わせた方法である。QM領域の原子は反応に重要な7個のアミノ酸残基、金属イオン(Ca²⁺)、基質(PDO)、アデノシルラジカルのリボース部位とした。変異型ではHis143をアラニンにGlu170をグルタミンとアラニンに置換した。QM領域ではTURBOMOLEプログラムを用いてB3LYP法で計算を行い、基底関数はSV(P)を適用した。それ以外の領域をMM領域として力場にCHARMmを適用し、計算をDL_POLYプログラムで行った。計算のインターフェイスとしてChemShellプログラムを用いた。

変異導入により水酸基転移反応の活性化エネルギーが大きく上昇していることが判明した。野生型では水酸基転移反応においてC2-O2結合がヘテロリティックに切れることにより電子の非局在化がおき、遷移状態が安定化することが知られている。一方、His143Ala変異型ではこの結合がホモリティックに開裂し、ラジカルが転移する水酸基に局在することが判った。また、Glu170Gln、Glu170Ala変異型では水素を引き抜く残基が存在せず、共鳴安定化が確認されなかった。これらの結果から、His143はとGlu170による相乗効果により遷移状態が安定化することが明らかになった。また、律速段階の活性化エネルギーから計算された酵素の相対活性は実験により得られた相対活性をよく再現しており、酵素反応の解析だけでなく、設計に応用することも期待させる結果となった。



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 12 件)

- 1, "Naphthalene and Anthracene Complexes Sandwiched by Two Cp*Fe^I Fragments: Strong Electronic Coupling Between the Fe^I Centers" T. Hatanaka, Y. Ohki, T. Kamachi, T. Nakayama, K. Yoshizawa, M. Katada, and K. Tatsumi, *Chemistry-An Asian Journal*, **7**, 1231-1242 (2012). Selected as "Journal Cover" in the special issue: 150 years of German-Japanese relations
2. "Substrate Specificity of Fluoroacetate Dehalogenase: An Insight from Crystallographic Analysis, Fluorescence Spectroscopy, and Theoretical Computations" T. Nakayama, T. Kamachi, K. Jitsumori, R. Omi, K. Hirotsu, N. Esaki, T. Kurihara, K. Yoshizawa, *Chemistry – A European Journal*, **18**, 8392-8402, (2012).
3. "Reductive elimination pathway for homocysteine to methionine conversion in cobalamin-dependent methionine synthase" P. M. Kozlowski, T. Kamachi, M. Kumar, K. Yoshizawa, *Journal of Biological Inorganic Chemistry* **17**, 611-619, (2012).
4. "A new understanding on how heme metabolism occurs in heme oxygenase: water-assisted oxo mechanism" T. Kamachi, T. Nishimi, K. Yoshizawa, *Dalton Transactions* **41**, 11642-11650, (2012).
5. "Surface Oxygen Atom as a Cooperative Ligand in Pd Nanoparticle Catalysis for Selective Hydration of Nitriles to Amides in Water: Experimental and Theoretical Studies" K. Shimizu, T. Kubo, A. Satsuma, T. Kamachi, K. Yoshizawa, *ACS Catalysis* **2**, 2467-2474, (2012).
6. "Inactivation Mechanism of Glycerol Dehydration by Diol Dehydratase from Combined Quantum Mechanical/Molecular Mechanical Calculations" K. Doitomi, T. Kamachi, T. Toraya, K. Yoshizawa, *Biochemistry* **51**, 9202-9210, (2012).
7. "Hydrolytic Enantioselective Production of Cyclic Dienyl Esters and a β -Diketone with Chiral Phase-Transfer Catalysts" E. Yamamoto, D. Gokuden, A. Nagai, T. Kamachi, K. Yoshizawa, A. Hamasaki, T. Ishida, M. Tokunaga, *Organic Letters* **14**, 6178-6181, (2012).
8. "Oxidation of Silanes to Silanols on Pd Nanoparticles: H₂ Desorption Accelerated by Surface Oxygen Atom" T. Kamachi, K. Shimizu, D. Yoshihiro, K. Igawa, K. Tomooka, K. Yoshizawa, *The Journal of Physical Chemistry C* **117**, 22967–22973, (2013).
9. "Enantioselective Alkylation by Binaphthyl Chiral Phase-Transfer Catalysts: A DFT-Based Conformational Analysis" T. Kamachi, K. Yoshizawa, *Organic Letters* **16**, 472-475, (2014).
10. "Computational Mutation Design of Diol Dehydratase: Catalytic Ability toward Glycerol beyond the Wild-Type Enzyme" K. Doitomi, H. Tanaka, T. Kamachi, T. Toraya, K. Yoshizawa, *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, **87**, 950-959, (2014). (Selected papers)
11. "Molecular Motor-Driven Abrupt Anisotropic Shape Change in a Single Crystal of a Ni Complex" Z.-S. Yao, M. Mito, T. Kamachi, Y. Shiota, K. Yoshizawa, N. Azuma, Y. Miyazaki, K. Takahashi, K. Zhang, T. Nakanishi, S. Kang, S. Kanegawa, O. Sato, *Nature Chemistry*, **6**,

1079-1083, (2014).

12. "Selective carbon dioxide adsorption of ϵ -Keggin-type zirconium-based purely inorganic 3D frameworks" Z. Zhang, M. Sadakane, S.-i. Noro, T. Murayama, T. Kamachi, K. Yoshizawa, W. Ueda, *Journal of Materials Chemistry A*, **3**, 746-755, (2015).

[学会発表] (計 件)

蒲池 高志

"フルオロ酢酸デハロゲナーゼの基質特異性に関する理論的研究"(招待講演)
第3回 統合物質シンポジウム 2012、福岡、2012年、6月

蒲池 高志、西見智徳、吉澤一成

"ヘムオキシゲナーゼによるヘムの代謝機構に関する理論的研究"
分子科学討論会 2012、東京、2012年、9月

蒲池 高志

"フルオロ酢酸デハロゲナーゼによる C-F 結合活性化機構に関する理論的研究"
第110回触媒討論会、福岡、2012年、9月

Takashi Kamachi, Tomonori Nishimi, Kazunari Yoshizawa

"Water-Assisted Oxo Mechanism for Heme Oxidation by Heme Oxygenase"
AsBIC-VI, Hong Kong November 2012.

蒲池 高志、西見智徳、吉澤一成

"ヘムオキシゲナーゼによるヘムの代謝機構に関する QM/MM 計算"
日本化学会第 93 春季年会、草津、2013年、3月

蒲池 高志、清水研一、久保 隆寛、薩摩 篤、吉澤 一成

"表面を酸素修飾した Pd/C によるシランの酸化反応に関する理論的研究"
第112回触媒討論会、秋田、2013年、9月

蒲池 高志、清水研一、井川和宣、友岡克彦、吉澤 一成

"DFT 計算による Pd 表面上の酸素原子の触媒機能解明"
分子科学討論会 2013、京都、2013年、9月

蒲池 高志、吉澤一成

"ビナフチル骨格をもつ Nスピロ型キラル相間移動触媒による不斉アルキル化反応に関する理論的解析"
日本化学会第 94 春季年会、名古屋、2014年、3月

蒲池高志

密度汎関数法による Pd 表面上の酸素原子の

触媒機能解明(招待講演)

アクセルリスジャパン、ユーザーフォーラム 2014

Takashi Kamachi, Kazunari Yoshizawa

"In silico design of fine-tuned phase transfer catalyst: DFT-based conformation search"
5th French-Japanese Workshop on Computational Methods in Chemistry, Strasbourg June 2014.

Takashi Kamachi, Kazunari Yoshizawa

"Toward Rational Design of Organocatalysts: DFT-Based Conformation Analysis" (invited)
ICOMC 2014 Pre-symposium in Kyoto, Kyoto, July 2014.

蒲池高志

Quantum Mechanical/Molecular Mechanical (QM/MM)法による酵素反応解析(招待講演)

徳島大学 特別講演会 創薬分野への若手理論計算化学研究者のチャレンジ
徳島 2014年、7月

蒲池 高志、吉澤 一成

"ビナフチル骨格をもつ Nスピロ型キラル相間移動触媒による不斉アルキル化反応に関する研究: 密度汎関数法に基づいた配座解析"
分子科学討論会 2014、東広島、2014年、9月

蒲池高志、緒方龍展、森英一郎、井浦克弘、奥田典和、長田昌輝、吉澤一成

"アントラキノンの水素化過程に関する理論的研究"
日本化学会第 95 春季年会、船橋、2015年、3月

[図書] (計 1件)

単行本「金属錯体の量子・計算化学」山口兆、榊茂好、増田秀樹編
3-4章 蒲池高志、三共出版 (2014)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：

番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

蒲池 高志 (KAMACHI TAKASHI)

九州大学・先導物質化学研究所・助教

研究者番号：40403951

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：