

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25330343

研究課題名(和文) 量子化学計算によるリボソームにおけるペプチド結合形成の反応機構の解明

研究課題名(英文) Quantum Chemical Calculations of Mechanism for Formation of Peptide Bond on the Ribosome

研究代表者

福島 和明 (Fukushima, Kazuaki)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号：00273730

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：細胞内では、リボソームでDNAの遺伝情報に基づいて、アミノ酸をつないでタンパク質が合成される。本研究では、量子化学計算を用いてリボソームにおけるペプチド結合形成の反応機構の探索を行った。その結果、リボソームにおけるペプチド結合の形成は、中間体を經由する段階的な機構で進行すること、活性中心にある水分子を經由して水素原子が移動することで反応がスムーズに進むこと、および、反応の遷移状態が活性中心内の立体的、静電的影響によって安定化されることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：In a living cell, protein synthesis is occurs in the ribosome based on the genetic information recorded in DNA. In this study, quantum chemical calculation on the mechanism of peptide bond formation in the ribosome was performed.

The calculation showed the three characteristics of the peptide bond formation in the ribosome. The first one is that the reaction proceeds in a stepwise mechanism through the reaction intermediate. The second one is that the reaction is facilitated by hydrogen transfer through hydrogen bonding with the water molecule in the active site. The last one is that the transition states of the reaction is stabilized by steric and electrostatic effects of the active site of the ribosome.

研究分野：計算化学

キーワード：リボソーム ペプチド結合 反応機構 量子化学計算 ONIOM法

1. 研究開始当初の背景

(1) セントラルドグマとして知られている遺伝情報の発現過程では、DNA に記録されている遺伝子の情報が mRNA に転写され、それがタンパク質のアミノ酸配列へと翻訳される。最終段階のタンパク質合成はリボソームで行われることが知られている。リボソームは RNA からなる大小二つのサブユニットと、いくつかのタンパク質からなる巨大な複合体であるが、ペプチド合成は大サブユニットで、ペプチジル tRNA と結合したペプチド鎖がアミノアシル tRNA と結合したアミノ酸に転移することによって行われる (図 1)。

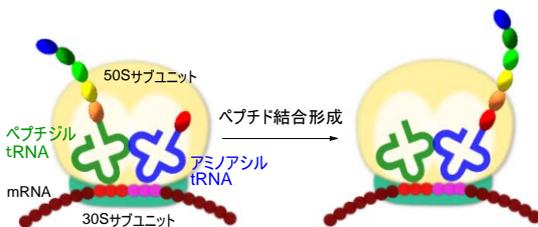


図 1. リボソームにおけるペプチド結合形成反応

(2) 2000 年に Steitz らは、*Haloarcula Marismortui* のリボソームで反応活性中心がある大サブユニット (50S サブユニット) の X 線結晶構造解析を達成した。この研究によって、反応中心における原子の空間的な配置が高い分解能 (2.4Å) で明らかにされた (N. Ban et al., *Science*, 2000, 289, 905)。

(3) (2) の成果に基づいて、ペプチド結合が形成される際にアミノ酸の N とペプチド鎖の C=O 基が結合する際の、基質の空間的な配置などが明らかになったが、アミノ基の H が反応の際にリボースの 3' 位に移動するメカニズムは依然として明らかではない (図 2)。

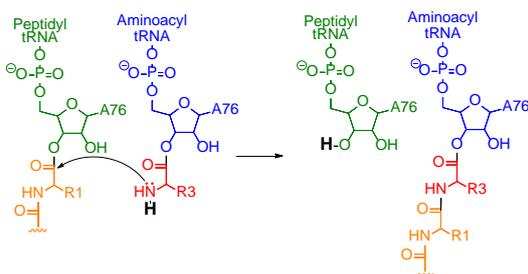


図 2. ペプチド結合形成時のアミノ酸の N とペプチド鎖の C=O 基の反応。

ペプチド結合形成時の H⁺ の移動経路が明らかでないことから、いくつかの反応経路が提案されてきた。正しい反応経路を明らかにするために、(4)、(5) に述べるような実験的、理論的研究が活発に行われている。

(4) これまでにいくつかのグループによって報告された反応速度論的な実験より、反応機構に関して以下の重要な事実が明らかにさ

れてきた。

① 2004 年に Sievers らは、リボソームによって触媒されるアミノアシル tRNA とペプチジル tRNA とによるペプチド結合形成反応の、反応速度解析を行った。この研究により、リボソームの反応活性中心には、反応基質であるアミノアシル tRNA とペプチジル tRNA とを適した位置に配置させる役割があり、リボソームによって触媒される反応はエントロピー的に有利であることが明らかにされた (A. Sievers et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2004, 101, 7897)。

② 2011 年に Kuhlenkoetter らは、一定の割合で重水 (D₂O) を含む水を溶媒として、リボソームによるペプチド結合形成反応の反応速度における同位体効果を測定した。この研究によってリボソームにおける反応の遷移状態は、3 個の H⁺ の移動を伴って進行することが明らかになった (S. Kuhlenkoetter et al., *Nature*, 2011, 476, 351)。

③ 2011 年に Hiller らは、反応基質であるペプチジル tRNA とアミノアシル tRNA の複数の炭素、窒素、酸素原子を同位体で置換して、リボソームによる反応速度の同位体効果を測定した。この研究の結果から、反応は段階的な機構で進行することが明らかになった (D. A. Hiller et al., *Nature*, 2011, 476, 236)。

(5) 理論計算に関しては、活性中心のみを対象としたモデル計算が主に行われていた。活性中心の周辺の影響を考慮した ONIOM 法や QM/MM 法を用いた計算は、下に示した 3 例と我々による先行研究 ((6) で述べる) のみであった。

① S. Trobro et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, 2005, 102, 12395.

② J. Kästner et al., *Mol. Phys.*, 2010, 108, 293.

③ J. Xu et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 2012, 134, 16424.

これらの研究は、いずれも特定の反応機構に関してのみ計算が行われており、網羅的にいくつかの反応機構を比較する研究はなされていなかった。

また、これらの内②と③は 1 段階で進む協奏的機構について計算されたものであり、(4) - ③ の反応速度論的な実験で示された段階的機構を説明できるものではなかった。

(6) 申請者らは (4) で述べた反応速度論的な実験事実を説明することができる段階的な反応機構として、アミノ酸のアミノ基がペプチジル基と反応してペプチド結合ができる際に、リボースの 2'-OH 基がプロトンの受け渡しの触媒となる、段階的なプロトンシャトル機構を考え、ONIOM 法を用いた計算によって反応の遷移状態や中間体の最適化構造とエネルギーを求めた (K. Fukushima et al., *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 2012, 85, 1093)。

2. 研究の目的

申請者らが先行研究で計算したプロトンシャトル機構には2つの遷移状態がある。第1段階目の遷移状態のエネルギーは、 $24.3 \text{ kcal mol}^{-1}$ であり、生体内でスムーズに反応が進行する高さであったが、第2段階目の遷移状態のエネルギーは $51.9 \text{ kcal mol}^{-1}$ であり、これは酵素反応としては高すぎる値であった。この原因としては、以下の2つが考えられる。

①ONIOM 法で量子化学計算を適用する領域が小さかったために、活性中心に隣接する官能基の電子的な影響が十分に考慮できていなかった。

②申請者らが先行研究で計算したプロトンシャトル機構とは異なる機構で、反応が進行する。または、高いエネルギー障壁をもつ第2段階についてのみ、エネルギー障壁が低い異なる反応経路が存在する。

そこで本研究では、先行研究における2つの欠点を克服し、リボソームの活性中心で進行するペプチド結合形成反応の反応機構を明らかにするために、以下の点を目標として計算を行った。

(1) 先行研究よりも広い範囲に量子化学計算を適用して、活性中心における周囲の立体的な影響だけでなく、電子的な影響も考慮しながら ONIOM 計算を行い、反応の活性化エネルギーを求める。

(2) 先行研究では、プロトンシャトル機構のみを計算の対象としたが、それ以外にも、協奏的な機構や、活性化エネルギーが高かった2段階目に異なる経路で反応が起こる機構についても計算を行い、それぞれの反応機構における活性化エネルギーを比較する。

これら、(1)、(2)を目標としながら、先行研究の結果を改良し、リボソームの活性中心におけるペプチド結合形成反応の機構を明らかにすることが、本研究の目的である。

3. 研究の方法

(1) 入力構造の作成

計算に用いた構造は、プロテインデータバンクから取得した *Haroarcu* *Marismortui* のリボソームの50Sサブユニットの構造データ (pdbid:1vqp) を用いて作成した (T. M. Schmeing et al., *Mol. Cell*, 2005, 20, 437)。

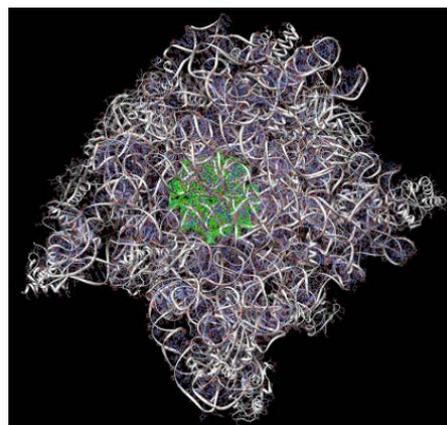


図3. *Haroarcu Marismortui* のリボソームの50SサブユニットのX線構造(PDBID: 1vqp)。反応活性中心から半径20Åの以内の領域を緑色で表示してある。

初めに50Sサブユニットの構造で、反応活性中心から20Å以内の領域を取り出した(図3)。周辺部分に位置するリン酸基はヒドロキシ基と置き換えた。また、X線の構造データには水素原子が存在しないので、すべての炭素、窒素、酸素原子に、原子価を満たすように水素原子を付けた。この構造には、2個の Mg^{2+} 、2個の K^+ 、4個の Na^+ 、5個の Sr^{2+} 、46個の R_2PO_4^- が含まれている。5個の Sr^{2+} は10個の Na^+ で置き換え、さらに負電荷を中和するために26個の Na^+ を新たに付け加えた。これらの操作で付け加えた水素原子と36個の Na^+ の位置は Amber 法を用いた分子力場計算を行うことによって最適化した。

元のX線構造(PDBID: 1vqp)では、活性中心に基質の遷移状態アナログを用いて結晶の作成から構造の解析を行っていたので、以下の手順でこれらの部分を変更した(図4)。

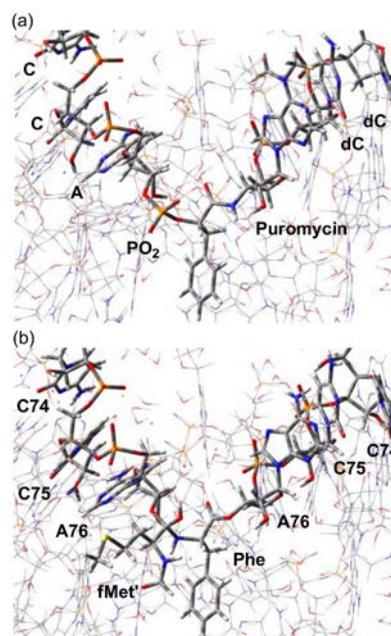


図4. 活性中心における基質の変更。(a) 変更前、(b) 変更後。

- ①変更前: ペプチジル tRNA の末端 CCA-PO₂、
アミノアシル tRNA の末端 dCdC-ピューロ
マイシン、
- ②変更後: ペプチジル tRNA の末端 CCA-N-
ホルミルメチオニン (fMet)、
アミノアシル tRNA の末端 CCA-フェニル
アラニン (Phe)

(2) ONIOM 計算のための Layer の分割

本研究で計算の対象とした系は、リアル系
が 2354 原子、モデル系が 165 原子からなる
(図 5)。

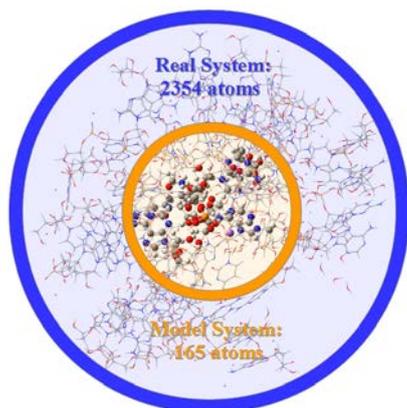


図 5. 本研究で計算に用いた系における、リ
アル系とモデル系の分割。

リアル系は系全体を含み、モデル系は反応
中心に存在する官能基と、それらと直接水素
結合などの相互作用をする官能基、周囲に存
在しており、立体的及び静電的な影響を強く
与える官能基を含んでいる。

(3) 計算手法

本研究における計算は Gaussian09 の ONIOM
法を用いて行った。ONIOM 法は、系全体をモ
デル系とリアル系に分割して計算する方法
である。モデル系は反応の活性中心付近を含
み、反応による結合の切断と形成による構造
とエネルギーの変化を高い精度で求める必要
がある。リアル系は系全体を含み、エネルギ
ーの精度は低くても高速で全体の構造を
計算する必要がある。そこで本研究では、モ
デル系には量子化学計算の手法の一つであ
る密度汎関数法の B3LYP/6-31G(d, p) 法を用
い、リアル系には生体高分子用の力場として
代表的な Amber96 力場を用いた分子力学法
を用いて計算を行った。

個々の反応経路について、まず初めに遷移
状態の構造を求め、振動解析によってその構
造が虚数の振動数を持つことと、その振動
の方向が反応経路に沿っていることを確認
した。次に遷移状態から順方向と逆方向に
それぞれ固有反応経路 (intrinsic reaction
coordinate, IRC) 計算を行い、最終的に得
られた低エネルギー構造について構造最適化
を行って、反応物と生成物の構造を得た。
構造最適化された反応物と生成物について
も振動解析を行い、これらが虚数の振

動数をもたないことを確認した。以上の
手順で (4) に示すすべての反応経路につい
ての計算を行い、遷移状態、反応物、生成物
の最適化構造とエネルギーを求めた。

(4) 反応経路

本研究では、2 段階で反応が進行する段階
的経路①、②と、1 段階で反応が進行する
協奏的経路③、④の合計 4 経路について
ONIOM 法による計算を行った (図 6)。

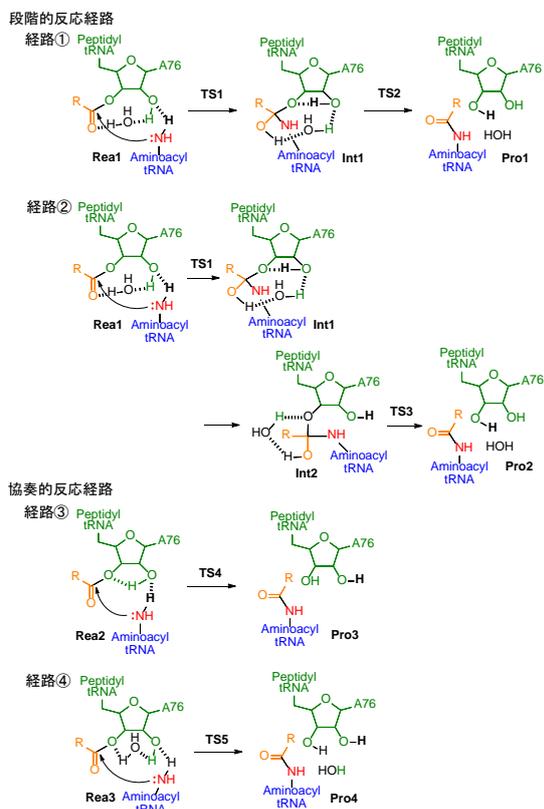


図 6. 段階的経路①、②と協奏的経路③、④。
Rea は反応物、TS は遷移状態、Int は中間
体、Pro は生成物を表す。

図 6 の経路①は 1-(6) で述べた我々の先行
研究で提案したプロトンシャトル機構と同
じ反応経路であるが、今回は量子化学計算
を適用するモデル系の範囲を拡大したため
、再び計算を行った。

経路②は、我々が行った先行研究で段階
的経路の二段階目のエネルギー障壁が高か
った点を改良するために、反応の後半に新
たな中間体と遷移状態の存在を仮定した反
応経路である。

経路③、④は、いずれも反応が一段階で
進む協奏的経路である。これらは 1-(5) で
述べた、他の研究者による先行研究で提
案されていた反応経路であり、我々が提
案していた経路①やその改良版である経路
②と比較するために、計算を行った。

4. 研究成果

(1) 段階的反応経路について

初めに段階的反応経路である経路①、経路②の遷移状態の最適化構造について述べる。

経路①には二つの遷移状態 TS1 と TS2 がある。これらの最適化構造を図 7 に示す。なお、図で原子の種類を区別するために用いられている色は、灰色が炭素原子、赤が酸素原子、青が窒素原子、白～明るい灰色が水素原子である。

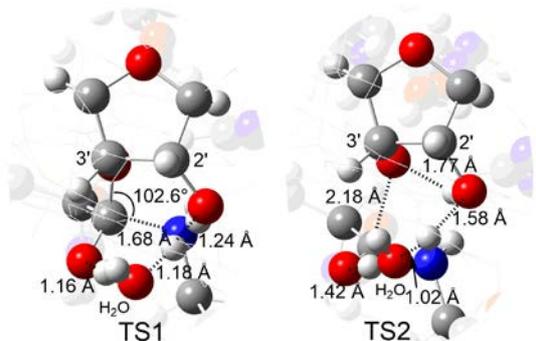


図 7. 経路①の遷移状態 TS1, TS2。

経路①の遷移状態 TS1 では、アミノ基の窒素原子がカルボニル基の炭素原子を求核攻撃すると同時に、水素原子がアミノ基から 2' 位のヒドロキシ基へと移動し、2' 位のヒドロキシ基から水分子を経由してカルボニル基の酸素原子へと、水素結合を経由して水素原子が移動する。TS2 では、カルボニル基に移動した水素原子が水分子へと移動し、さらに水分子から 2' 位のヒドロキシ基に水素原子が移るとともに 2' 位のヒドロキシ基から 3' 位の酸素原子に水素原子が移動する。この一連の水素原子の移動とともにカルボニル基の炭素と 3' 位の酸素との結合が切断される。経路全体として、TS1 と TS2 を経由して、3' 位のエステル結合がアミノ基とのアミド結合（ペプチド結合）に組み替わる。

我々が行った先行研究では、遷移状態 TS2 の 2' 位のヒドロキシ基から 3' 位の酸素原子への水素移動は、立体的な歪みによって遷移状態のエネルギーが高くなることが示されていた。そこで、本研究では二段階目の遷移状態で TS3 を経由する経路②を検討した。

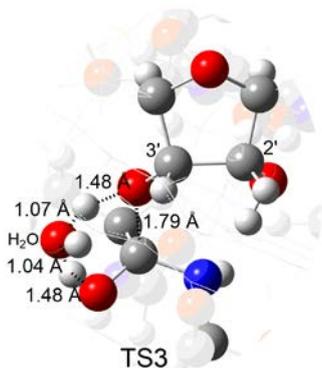


図 8. 経路②の遷移状態 TS3。

経路②の前半は経路①と同じ遷移状態 TS1 を経由して進行するが、後半は TS2 の代わりに TS3 を経由して反応が進行する。TS3 では、カルボニル基から 3' 位の酸素原子に水分子のみを経由して水素原子が移動する。これによって、大きな歪みが生じずに水素原子の移動とエステル基の切断とが同時に進行することができる。

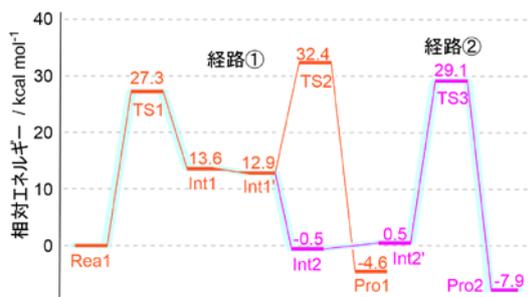


図 9. 経路①と経路②のエネルギー図。反応経路に沿って存在する、反応物、中間体、遷移状態、生成物におけるモデル系のエネルギーを図示した。

図 9 に経路①と経路②のエネルギー図を示した。経路①は TS1 と TS2 を経由して進行する。今回の研究で得られた遷移状態のエネルギーは TS1 では $27.3 \text{ kcal mol}^{-1}$ となり、先行研究の $24.3 \text{ kcal mol}^{-1}$ よりも $3.0 \text{ kcal mol}^{-1}$ だけ高くなった。一方 TS2 のエネルギーは、先行研究では $51.9 \text{ kcal mol}^{-1}$ であったが、今回の計算では $32.4 \text{ kcal mol}^{-1}$ と $19.5 \text{ kcal mol}^{-1}$ だけ低くなった。これは、高精度な量子化学計算を行うモデル系の範囲を広げたことにより、周囲の環境による立体的、電子的影響を精密に考慮することができるようになり、特に TS2 ではそのような安定化の効果が大きかったためであると考えられる。このように広い範囲を対象とした高精度な量子化学計算を行うことにより、経路①の TS2 のエネルギーは大幅に低下したが、それでもなお、TS1 よりも $5.1 \text{ kcal mol}^{-1}$ 不安定であった。

経路②は TS1 を経由して中間体が生じるまでは経路①と同じであるが、その後水分子がカルボニル基と 3' 位の酸素原子を橋渡しできる位置まで移動してから、TS3 を経由して生成物に至る経路である。計算で得られた TS3 のエネルギーは $29.1 \text{ kcal mol}^{-1}$ であり、TS1 よりも高いものの TS2 より $3.3 \text{ kcal mol}^{-1}$ だけ低かった。このことは段階的な反応機構がでは、中間体から生成物に至る 2 段階目に 2 種類の経路があり、TS3 を経由する経路②が TS2 を経由する経路①よりもエネルギー的に有利であるということを示している。

(2) 協奏的反応経路について

次に、1 段階で反応が進行する経路③と経路④についても ONIOM 法を用いた計算を行い、2 段階で進行する経路②の場合と比較した。

図 10 に遷移状態 TS4 と TS5 の最適化構造を示す。

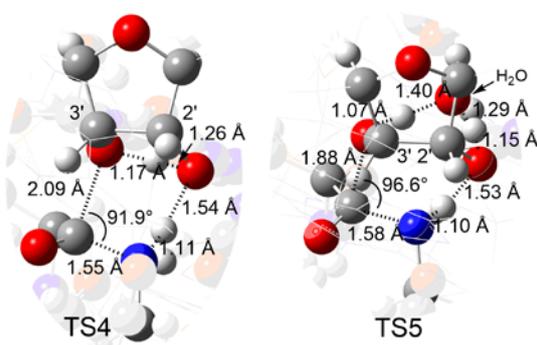


図 10. 経路③の TS4 と経路④の TS5。

経路③の遷移状態 TS4 では、アミノ基の窒素原子がカルボニル基の炭素原子を求核攻撃すると同時に、水素原子がアミノ基から 2' 位のヒドロキシ基へと移動し、2' 位のヒドロキシ基の水素原子が 3' の酸素原子に移動する。この一連の原子の移動によって、3' 位のエステル結合が切断されて、アミド結合（ペプチド結合）が 1 段階で生成する。

経路④の遷移状態 TS5 は TS4 とよく似ているが、水素原子の移動に水分子が関与する点が異なる。アミノ基の窒素原子がカルボニル基の炭素原子を求核攻撃すると同時に、水素原子がアミノ基のから 2' 位のヒドロキシ基へと移動する。2' 位のヒドロキシ基の水素原子が 3' の酸素原子に移動する際に、水分子を経由して水素原子が受け渡される。この経路でも、一連の原子の移動によって、3' 位のエステル結合が切断されて、アミド結合（ペプチド結合）が 1 段階で生成する。

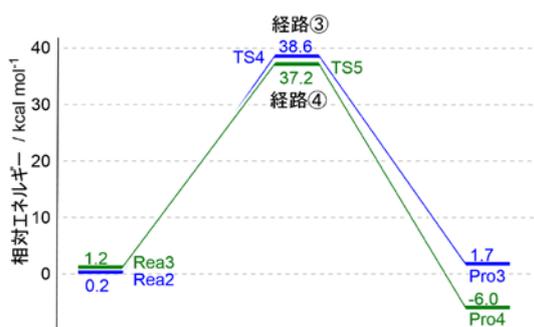


図 11. 経路③と経路④のエネルギー図。反応経路に沿って存在する、反応物、遷移状態、生成物におけるモデル系のエネルギーを図示した。エネルギーは経路①あるいは経路②の反応物 Rea1 を基準とした相対値である。

図 11 に経路③と経路④のエネルギー図を示した。いずれの経路も遷移状態のエネルギーは 35 kcal mol^{-1} 以上であり、これは図 9 で示した経路①、経路②のいずれの遷移状態よりも高いことが明らかになった。このことは、ペプチド結合の形成では、1 段階の反応経路よりも 2 段階の反応経路で反応が進む方

が有利であるということを示している。

(3)まとめ

本研究では、以下の成果が得られた。

①段階的経路では、高精度量子化学計算を適用するモデル系の範囲を広くとることにより、遷移状態のエネルギーが低下することが明らかになった。これは、ペプチド結合形成反応の遷移状態は、リボソームの活性中心内で周囲の環境による、立体的および静電的な安定化を受けていることを示している。

②段階的経路では、反応中間体から生成物に至る過程で、反応中間体の酸素原子から 3' 位の酸素原子に、水分子を介して水素原子が移動すると遷移状態のエネルギーが低くなることが明らかになった。これは、2' 位のヒドロキシ基を介して水素が移動する場合には、水素結合に大きな歪みが生じるためにエネルギーが高くなるためであると考えられる。

③反応速度の同位体効果に関する実験からは、反応が段階的経路で進行することが示唆されていたが、これまでに行われた理論計算の多くは、協奏的な 1 段階経路についてのものであった。本研究では、理論的にも 1 段階経路よりも 2 段階経路の方が有利であることを、多くの経路についての ONIOM 計算を行って遷移状態のエネルギーを比較することで明確に示した。

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)

[学会発表] (計 1 件)

(1) 福島和明、江寄啓祥、ONIOM Study of Stepwise and Concerted Mechanisms for Peptide Bond Formation in the Ribosome、日本化学会第 96 春季年会、平成 28 年 3 月 25 日、同志社大学 (京都府京田辺市)

[その他]

ホームページ等

<http://www.hyo-med.ac.jp/department/chem/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福島 和明 (FUKUSHIMA, Kazuaki)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号：00273730