

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年 8月28日現在

機関番号：25403

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2014～2018

課題番号：26105012

研究課題名(和文) 分子シミュレーションによる生体活性サイトの構造・機能相関の解明とデザイン

研究課題名(英文) Elucidation of Structure-Function Relationship of Biological Active Sites and New Material Design by Molecular Simulation

研究代表者

鷹野 優 (Takano, Yu)

広島市立大学・情報科学研究科・教授

研究者番号：30403017

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 35,900,000円

研究成果の概要(和文)：金属タンパク質は、タンパク質が活性サイトを制御することで、高い触媒能、多機能性などの優れた特性を可能にする。本研究課題では、金属タンパク質として、特にヘムタンパク質における活性サイトの多機能性と光合成光化学系II(PSII)の優れた触媒特性に着目した。これらの解明・応用に向けて、【課題1】「3D活性サイトの分子構造・電子状態の精緻化」、【課題2】「金属タンパク質の機能発現要素の抽出」、【課題3】「抽出された機能発現要素を用いた物質デザイン」を掲げ研究を遂行した。課題に取り組む中で、分子シミュレーション法の開発、活性サイトの構造や機能発現機構の解明、活性サイト設計について進展させることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PSIIのMn4CaO5錯体における水分解・酸素発生反応機構の解明に関しては、機構を利用した人工光合成の開発に大きく寄与し、エネルギー問題の解決につながるものと考えられる。また、ヘムの構造歪みに関する理論計算および統計解析により得られた結果は、ヘムタンパク質の演繹的な設計を可能にし、これまで経験的・網羅的であったバイオ材料設計から演繹的バイオ材料設計へとつながるものであろう。さらには、新たに開発された分子シミュレーション技術は金属タンパク質の機能発現に重要な構造変化をとらえることができ、生体分子の機能発現機構要素の詳細な理解にいたると期待できる。

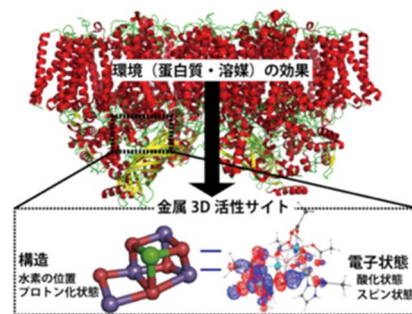
研究成果の概要(英文)：Active sites in biomolecules are regulated by the protein environment and achieve important functions, such as highly specific molecular recognition and efficient catalysis. To understand and apply biochemical functions of metalloproteins, heme proteins and photosystem II (PSII) in photosynthesis, we addressed three issues: (1) investigation of the molecular and electronic structures of the active sites, (2) elucidation of the mechanism of the biochemical functions of metalloproteins, and (3) design of novel functional molecules utilizing it. In (1), we investigated the molecular and electronic structure of Mn cluster in PSII. In (2), proton releases, dioxygen formation, and substrate water incorporation was demonstrated in response to Mn4CaO5 oxidation in the protein environment by using a QM/MM approach. In (3), we showed the relationship between distortion of heme porphyrin and redox potential of heme, providing guidelines of the design of heme proteins.

研究分野：生物物理学

キーワード：活性サイト 金属タンパク質 ヘムタンパク質 光合成光化学系II 分子シミュレーション

1. 研究開始当初の背景

金属タンパク質は高い触媒能、多機能性などの優れた特性をもち生命活動に深く関わっている(図1)。従って、その機能発現要素の抽出は生命の本質に迫るだけでなく、新規機能性物質の創製につながる。しかし、金属タンパク質の「3D活性サイト」は酸化状態・スピン状態・配位構造が協働する複雑な電子状態のため、最近、その機能発現機構の理論解明は着手されたところである。その機構の解明には、精緻な「3D活性サイト」の情報(分子構造・電子状態)が必須となる。現在頻繁に使われるX線回折法、NMRでは、結晶化が必要、常磁性金属の取り扱いが困難等の問題のため、反応の理解に重要な金属サイトの酸化状態すら決定できない状況にある。これまで金属と生体分子の相互作用を研究する中で『タンパク質の機能発現ではタンパク質環境が「3D活性サイト」の固有



機能(優れた触媒特性・活性サイトの多機能性)

[目的] 機能発現要素の抽出
「タンパク場」の本質の理解

図1. 生体活性サイト

に持つ性質を強め、制御している』ことを明らかにした。これは「3D活性サイト」とタンパク質が役割分担をしていることを意味する。これは「3D活性サイト」とタンパク質が役割分担をしていることを意味する。これを作業仮説として、本計画研究では、ヘムタンパク質の多機能性とPSIIの優れた触媒特性に着目し、これらに対して、(1)3D活性サイトの分子構造・電子状態の精緻化、(2)金属タンパク質の機能発現要素の抽出、(3)抽出された機能発現要素を用いた物質デザインを目指す。

2. 研究の目的

金属タンパク質のもつ優れた触媒特性や活性サイトの多機能性の理解と応用を目指して同じ「3D活性サイト」を持ちながら異なる機能を示すヘムタンパク質と反応過程の分子構造・電子状態が完全に同定されていないPSIIのMnクラスターに着目し、それを利用した物質デザインを目指す。そのために、以下の課題を実施する。

【課題1】3D活性サイトの分子構造・電子状態の精緻化

分子シミュレーションを実施し、PSIIのMnクラスターなどの分子構造(水素原子位置、プロトン化状態)や電子状態(酸化状態)の精緻化を行う。

【課題2】金属タンパク質の機能発現要素の抽出

理論計算を用いてタンパク質による「3D活性サイト」の制御機構を解明し、機能発現に必要な要素を抽出する。さらに、無機・有機触媒と比較し、触媒科学での「タンパク場」の一般性・特異性を浮き彫りにする。

【課題3】抽出された機能発現要素を用いた物質デザイン

抽出された機能発現に必要な要素をもとに、タンパク質にこだわらず機能の本質を利用した機能性材料のデザインを行う。デザインした分子も分子シミュレーションで機能を調べ改良する。

3. 研究の方法

【課題1】では、タンパク質などの巨大分子系の3D活性サイトを取り扱うため、分子動力学法による構造変化探索の効率化・電子状態計算の高速化が必要となる。まずはQM/MM計算プログラムの開発、DFTB-D法の実装など新しい分子シミュレーション技術の開発を実施した。続いて、光合成光化学系II(PSII)のMnクラスターの分子構造・電子状態の精緻化をQM/MM法で、グラフェンへの金属錯体やクラスターの吸着構造の精緻化をDFTB-D法を用いて実施した。

【課題2】では、光合成光化学系II(PSII)のMnクラスターの機能発現機構の解明、一酸化窒素還元酵素P450_{nor}のタンパク質静電場環境下における量子化学計算(QM/MM計算)を実施した。

【課題3】では、ヘムの構造歪みの統計解析に関しては、Protein Data Bankに登録されている酸化還元酵素と酸素運搬蛋白質中のヘムの骨格構造を取り出し、Fisherの線形判別法により機能ごとの構造分布の違いを特徴付けるベクトル(特徴ベクトル)を抽出した。得られた特徴ベクトルに沿って機能に関する2種の物性値(Fe(II)の酸化エネルギー、および酸素吸着エネルギー)を量子化学計算により求め、物性値と特徴ベクトル方向の歪みとの相関を調べた。

4. 研究成果

【課題1-1】生体活性サイトの構造・機能解明に向けた新しいシミュレーション技術の開発
タンパク質などの生体高分子は、巨大かつヘテロな分子であり、また構造が時間とともに揺らぐ動的な系である。3D活性サイトの分子構造・電子状態の精緻化、金属タンパク質の機能発現に必要な構造変化は通常分子動力学法で追跡不可能なレアイベントである。そのため機能解明には、分子動力学法・電子状態計算の双方で新しい分子シミュレーション技術を必要とする。そ

ここで図 2 に示すような、分子シミュレーション技術の開発を手がけ、分子動力学法によるタンパク質の機能発現に関わる効率的な構造変化探索法の開発(雑誌論文)、長時間の古典力学分子シミュレーションに耐える分子力場の開発(雑誌論文)、電子状態計算の計算コスト削減のための分割統治法による初期密度生成法の開発(雑誌論文)、タンパク質の機能解析のための QM/MM シミュレーションプログラムの開発(雑誌論文)、金属タンパク質活性サイトの高速電子状態計算手法 rPM6 の開発(雑誌論文)を進め、その有効性を確認した。

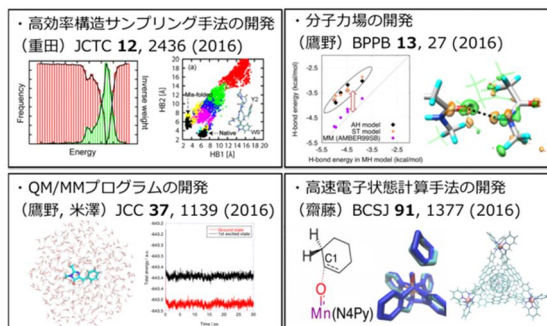


図 2. 生体活性サイトの機能解明に向けて開発した分子シミュレーション法

【課題 1 - 2】光合成光化学系 II(PSII)の Mn クラスターの分子構造・電子状態の精緻化
 光合成は光エネルギーを化学エネルギーに変換するシステムであり、光合成光化学系 II (PSII)では水を分解し酸素発生を発生する反応 (Kok サイクル) を行っている。2011 年に原子分解能(1.9 Å)の X 線構造解析 (Umena et al., *Nature*, **473**, 55 (2011)) がなされ、初めて活性中心構造とその周りの水分子の立体的配置が明らかとなった。OEC の活性中心は CaMn_4O_5 クラスターが歪んだ椅子型構造になっている。しかしながら、反応中間体の一つ (S_1 状態) であり、他の中間体 (S_0 , S_2 - S_4 状態) は明らかにされていない。さらに S_1 状態もその電子状態 (プロトン化、酸化・スピン状態) に関しては同定されていない。そこで QM/MM 計算により構造最適化を行い、タンパク質の静電相互作用を考慮に入れた中間体の構造同定および Mn の酸化状態などの電子状態を決定し、「3D 活性サイト」の分子構造・電子状態の精緻化を行った。現在、Mn クラスターの構造、プロトン化状態および酸化数の解析を進めている。QM 領域として、Mn クラスターまわり 382 原子を量子力学で、PSII の他の部分を古典力学で取り扱った QM/MM 計算により、 S_0 状態、 S_1 状態、 S_2 状態の安定構造、最適のプロトン化状態および最安定の酸化状態 (S_0 状態: Mn^{III} , Mn^{IV} , Mn^{III} , Mn^{III} , S_1 状態: Mn^{III} , Mn^{IV} , Mn^{IV} , Mn^{III} , S_2 状態: Mn^{III} , Mn^{IV} , Mn^{IV} , Mn^{IV}) が決定された (学会発表)。これらは 2011 年の X 線結晶構造解析のデータをもとにしているため放射線ダメージの影響が問題となっていたが、ごく最近 XFEL を用いたダメージレスの構造 (Suga et al., *Nature*, **517**, 99 (2015)) から、その酸化数が S_1 状態で Mn^{III} , Mn^{IV} , Mn^{IV} , Mn^{III} と報告され、理論計算と一致する結果となった。

【課題 1 - 3】グラフェン吸着の理論解析

(1) グラフェン表面には、従来、金属原子や酸素などの小さな分子の吸着が知られていたが、近年、比較的大きな金属錯体も吸着することが明らかになった。「タンパク場」の本質の理解を目指し、生体活性サイトと他の活性サイトとの構造の類似点・相違点の解明のため、A01 試料班の山田 G、A02 手法班の郷原 G と共同で、電子状態計算によってグラフェンに対するヘムの類似錯体 Pd-porphycene の吸着構造を解析した。原子吸着の理論解析に対しては密度汎関数法が用いられてきたが、計算コストのため、大きな金属錯体への吸着に対する適用は困難である。我々はより計算コストの低い密度汎関数強束縛法に分散力補正を加えた DFTB-D 法を実装し、金属錯体のグラフェン吸着構造の探索への応用可能性を検証し、その有効性を実証した。(雑誌論文)

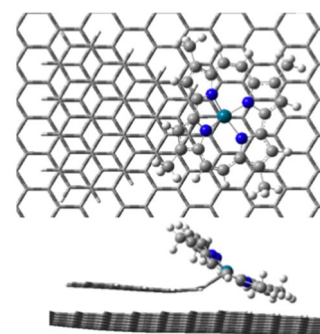


図 3. グラフェンのステップエッジに吸着した Pd-porphycene

次にグラフェンの構造として、欠陥のないものに加え、2 種の欠陥 ($[\text{I}_2(7557)]$, $[\text{V}_2(5-9)]$) を持つグラフェン、ナノサイズのグラフェンを積層したモデルをそれぞれ検討した。吸着エネルギーの計算より、Pd-porphycene がグラフェン上に吸着する際には、積層したナノグラフェン周りのステップエッジが主要な吸着部位と期待されることが明らかとなった (図 3) (論文準備中)。

(2) SiO_x ナノクラスターがナノグラフェン周りに平面的に集積することも明らかにされたが、分解能の制約によりその具体的構造を同定するには至っていない。そこで我々は、DFTB-D 法を用いて、実験で得られた SiO_x ナノクラスターの構造の精緻化を目的とし、構造探索を行った。構造探索の前に、先行研究で提唱された単層、および 2 層の平面構造が DFTB-D 法によって概ね再現できることを実証し、本系に対して DFTB-D 法が有効であることを確認した。さらに、ナノグラフェン上への積層構造を探索したところ、ナノグラフェン末端からナノグラフェン上部への折り返し構造とナノグラフェンに平行な平面環状構造からなるケージ状構造が安定であることが見出された。この構造は、Si は二層以上に積層しないという実験からの示唆と矛盾しないことから、実験で得られた構造はこのケージ状構造を最小ユニットとし、環状構造によってナノサイズまで延伸した構造を取っていることが示唆された (論文準備中)。

【課題 2 - 1】光合成光化学系 II(PSII)の機能発現機構解明

光合成光化学系 II (PSII)の Mn_4CaO_5 錯体における水分解・酸素発生反応は、2つの基質水分子から H^+ と電子を奪うことで進む。活性部位は $S_0 \rightarrow S_1 \rightarrow S_2 \rightarrow S_3 \rightarrow S_4$ と酸化され、酸素発生後、再び S_0 状態へと戻る。最も低酸化状態からの酸化 $S_0 \rightarrow S_1$ 遷移における H^+ 放出源は、基質水分子である可能性が高く、その同定が急務であった。私たちは、蛋白質静電場環境下における量子化学計算 (QM/MM 計算) により、 Mn_4CaO_5 錯体中の O4 部位が S_0 状態で OH^- 、 S_1 状態で O^{2-} となることで H^+ が放出、さらに近傍の水分子鎖がその H^+ 移動経路として機能することを明らかにした(雑誌論文)。この結果は、後ほど実験研究(時間分解赤外分光)により実証された(Shimizu et al., *J. Phys. Chem. B* **122**, 9460 (2018))。さらに私たちは、その先の $S_2 \rightarrow S_3$ 遷移、 $S_3 \rightarrow S_0$ 遷移では、Mn4 部位の酸化に伴って配位水 W1 より、水素結合アクセプターD1-Asp61 を介した H^+ 共役電子移動が起こることを QM/MM 計算で示した(図 4)(雑誌論文)。 H^+ 放出なくして水分解・酸素発生はあり得ないため、2つの水分子からの H^+ 放出機構を明らかにした本研究は、いずれ水分解反応機構を H^+ 放出の面からも矛盾なく示した独創的な研究として認められるだろう。

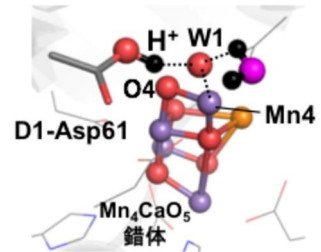


図 4. Mn4 に配位した水分子 W1 のプロトンは D1-Asp61 を経由して排出される。

【課題 2 - 2】ヘムタンパク質の機能発現機構解明

地球上の窒素循環において有毒な NO を無毒な N_2O に変換する酵素が一酸化窒素還元酵素 (NOR) である。この酵素は、好気呼吸で酸素を水に還元する酵素であるシトクロム c 酸化酵素 (CcO) と同じ祖先から進化したため、嫌気呼吸から好気呼吸への進化過程を明らかにする鍵となる。

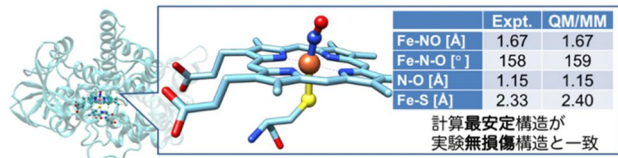


図 5. P450nor の構造と P450nor 中のヘムの構造

またその構造も CcO に似ている。カビ由来の NOR の一種である P450nor に関して、NO 結合状態である Fe(heme)-NO 構造を公募班久保 G が自由電子レーザー-SACLA を用いて明らかにした(図 5)。我々はその NO 結合状態に関して、QM/MM 計算を実施し、Fe-N 距離と Fe-N-O 角が反相関係にあること、タンパク質環境により NO がより折れ曲がった形で配位していることを示し、これが NADH からのヒドリドの付加に有利となりうることを示唆した(雑誌論文)。

【課題 3 - 1】ヘムタンパク質中のヘムの構造歪みの電子状態解析と統計解析

(1) ヘムの多機能性の起源を明らかにするため、量子化学計算を用いてヘム単体の構造-機能相関を調べた。本研究では、ヘムの構造としてヘムの歪みを、機能として電子伝達や酸化還元反応に関わる酸化還元電位に着目した。まず歪みを定量的に表すため Normal-coordinate structural decomposition (NSD)法をヘムに適用した。NSD はヘムの歪みを振動モードごとに分解し歪みの成分を調べる手法である。振動解析により得られた振動モードに従って系統的にヘムの歪みを作り、それぞれの構造に対して量子化学計算を行い、歪みと酸化還元電位との関係を調べた。その結果、各振動モードと酸化還元電位間に相関があることを明らかにした(図 6)(雑誌論文)。この結果は振動モード方向の歪みを大きくすることで酸化還元電位の制御が可能であることを示唆している。

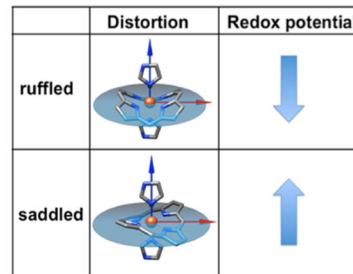


図 6.ヘムの構造歪みと酸化還元電位の関係

(2) ヘムタンパク質の多様性は、それぞれのタンパク質の持つ固有の化学的、静電的環境によってヘムの活性が用途に応じて調整されることで実現していると考えられる。本研究ではタンパク質中のヘムポルフィリン環の構造歪みに着目し、ヘムの構造と機能の相関性を解明することを目的として、ヘムの構造の統計分布解析を行った。酸化還元酵素と酸素の輸送・貯蔵に関与するタンパク質のヘム骨格構造に対して、Fisher の線形判別解析により得られた特徴ベクトル方向の歪みに伴う酸化エネルギーと酸素吸着エネルギーの変化を調べた結果(図 7) 酸化還元酵素では歪みにより吸着エネルギーが大きく酸化エネルギーが小さくなることで、酸素と強く結合し酸化が起こりやすくなることと関連付けることができた。本解析によって機能活性化

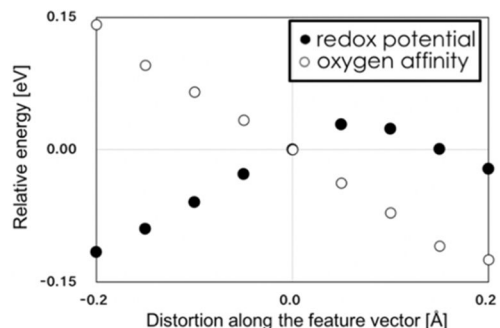


図 7. 特徴ベクトル歪みと酸化還元電位・酸素吸着エネルギーの関係

に寄与する構造的バイアス因子の抽出が可能であることが示唆された(雑誌論文、学会発表)

【課題3-2】酸化反応の触媒となる高スピン型複核Ni錯体の開発

酸化反応は工業プロセスの3割を占める重要な物質変換反応である。 sp^3 、 sp^2 炭素の酸化反応は、様々な化学種により達成されている。実験化学的、理論化学的な検討から、これらの活性中心の多くは二つの金属中心を有する複核構造を形成していることが明らかとなっている。一方で、複核構造を有する遷移金属錯体については、反応性と安定性を両立したものがなく、その関係性については未だ完全に解明されていない。さらに、複核錯体については精密計算に大きなコストがかかることから、理論的な研究も比較的進んでいない状況にあり、複核の遷移金属活性酸素錯体について研究することで、高効率な分子変換を可能とする触媒の開発についての指針が得られると期待される。そこで、酸化反応の活性種となる bis(μ -oxido)dinickel(III)が合成され、その電子状態・スピン状態が実験と計算の双方から調べられた(図8)。その結果、高い酸化数を持つ金属酸素二核錯体としては極めて珍しく、強磁性的に相互作用した錯体であることが明らかとなった(論文)。

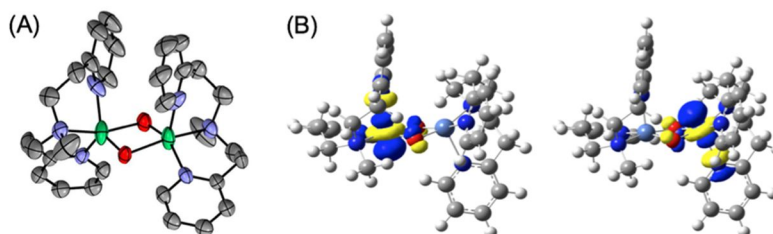


図8. 合成された bis(μ -oxido)dinickel(III)(A)と correspond molecular orbital 解析で示された強磁性的相互作用(B)

5. 主な発表論文等(研究代表者・研究分担者・研究協力者には下線)

[雑誌論文](計48件)すべて査読あり。

Y. Kanematsu, H. X. Kondo, Y. Imada, Y. Takano, "Statistical and quantum-chemical analysis of the effect of heme porphyrin distortion in heme proteins: Differences between oxidoreductases and oxygen carrier proteins", *Chem. Phys. Lett.* **710**, 108-112 (2018).

Y. Morimoto, Y. Takagi, T. Saito, T. Ohta, T. Ogura, N. Tohnai, M. Nakano, *S. Itoh, "A Bis(μ -oxido)dinickel(III) Complex with a Triplet Ground State", *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **57**, 7640-7643 (2018).

T. Saito, Y. Takano, "Transition State Search Using rPM6: Iron- and Manganese-Catalyzed Oxidation Reactions as a Test Case", *Bull. Chem. Jpn. Soc.* **91**, 1377-1389 (2018).

K. Kawashima, T. Takaoka, H. Kimura, K. Saito, H. Ishikita, "O₂ evolution and recovery of the water-oxidizing enzyme", *Nat. Commun.* **9**, 1247 (2018).

Y. Imada, H. Nakamura, Y. Takano, "Density functional study of porphyrin distortion effects on redox potential of heme", *J. Comput. Chem.* **39**, 139-142 (2018).

T. Tosha, T. Nomura, T. Nishida, N. Saeki, K. Okubayashi, R. Yamagiwa, M. Sugahara, T. Nakane, K. Yamashita, K. Hirata, G. Ueno, T. Kimura, T. Hisano, K. Muramoto, H. Sawai, H. Takeda, E. Mizohata, A. Yamashita, Y. Kanematsu, Y. Takano, E. Nango, R. Tanaka, O. Nureki, O. Shoji, Y. Ikemoto, H. Murakami, S. Owada, K. Tono, M. Yabashi, M. Yamamoto, H. Ago, S. Iwata, H. Sugimoto, Y. Shiro, M. Kubo, "Capturing an initial intermediate during enzymatic reaction of P450nor using time-resolved XFEL crystallography and caged-substrate", *Nat. Commun.* **8**, 1585 (2017).

Y. Kanematsu, K. Gohara, H. Yamada, Y. Takano, "Applicability of density functional tight binding method with dispersion correction to investigate the adsorption of porphyrin/porphycene metal complexes on graphene", *Chem. Lett.* **46**, 51-52 (2017).

Y. Takano, K. Nakata, Y. Yonezawa, H. Nakamura, "Development of massive multi-level molecular dynamics simulation program, Platypus (PLATform for dYnamic Protein Unified Simulation), for the elucidation of protein functions", *J. Comput. Chem.* **37**, 1125-1132 (2016).

R. Harada, Y. Takano, Y. Shigeta, "TaBoo SeArch (TBSA) algorithm with a modified inverse histogram for reproducing biologically relevant rare-events of proteins", *J. Chem. Theory Comput.* **12**, 2436-2445 (2016).

Y. Takano, A. Kusaka, H. Nakamura, "Density functional study of molecular interactions in secondary structures of proteins", *Biophys. Physicobiol.* **13**, 27-35 (2016).

Y. Yonezawa, "A method for predicting protein conformational pathways by using molecular dynamics simulations guided by difference distance matrices", *J. Comput. Chem.* **37**, 1139-1146 (2016).

K. Saito, A. William Rutherford, H. Ishikita, "Energetics of proton release on the first oxidation step in the water oxidizing enzyme", *Nat. Commun.*, **6**, 8488 (2015).

[学会発表(招待講演のみ)](計73件:国際学会招待講演42件、国内学会招待講演31件)

Y. Takano, "Statistical and quantum-chemical analysis of the effect of heme porphyrin distortion in heme proteins: Differences between oxidoreductases and oxygen carrier proteins", ICPAC Langkawi 2018, Langkawi, Malaysia, 2018年10月31日

M. Shoji, "A development of the computational biosciences with supercomputers", AWEST2014, 兵庫, 2014年6月17日

〔図書〕(計5件)

鷹野 優(分担執筆)、「機能構造科学入門-3D 活性サイトと物質デザイン-」(丸善出版、大門 寛、佐々木裕次 監修、2016年)、5章・8章

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：石北 央

ローマ字氏名：(HISHIKITA, hiroshi)

所属研究機関名：東京大学

部局名：先端科学技術研究センター

職名：教授

研究者番号(8桁)：00508111

研究分担者氏名：米澤 康滋

ローマ字氏名：(YONEZAWA, yasushige)

所属研究機関名：近畿大学

部局名：先端技術総合研究所

職名：教授

研究者番号(8桁)：40248753

研究分担者氏名：齋藤 徹

ローマ字氏名：(SAITO, toru)

所属研究機関名：広島市立大学

部局名：大学院情報科学研究科

職名：助教

研究者番号(8桁)：80747494

研究分担者氏名：兼松 佑典

ローマ字氏名：(KANEMATSU, yusuke)

所属研究機関名：広島市立大学

部局名：大学院情報科学研究科

職名：研究員

研究者番号(8桁)：10765936

(2)研究協力者

研究協力者氏名：重田 育照

ローマ字氏名：(SHIGETA, yasuteru)

研究協力者氏名：神谷 克政

ローマ字氏名：(KAMIYA, katsumasa)

研究協力者氏名：庄司 光男

ローマ字氏名：(SHOJI, mitsuo)

研究協力者氏名：近藤 寛子

ローマ字氏名：(KONDO, hiroko x.)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。