

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：12101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K05411

研究課題名(和文) プロスタグランジン合成酵素の機能と反応に関する計算科学的解明

研究課題名(英文) Computational Studies on Functions and Reactions of Prostaglandin Synthases

研究代表者

森 聖治 (MORI, Seiji)

茨城大学・理学部・教授

研究者番号：50332549

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、プロスタグランジン類の生合成を司る酵素の機能と反応について検討した。(1) プロスタグランジンH₂合成酵素(シクロオキシゲナーゼ)：本研究では、シクロオキシゲナーゼ2型の酵素(COX-2)によるアラキドン酸の水素引き抜きの段階では、活性化エネルギーが、基質の立体配座に依存することをQM/MM法で明らかにした。(2) リポカリン型プロスタグランジンD合成酵素：プロスタグランジンD合成酵素の反応について検討し、システイン残基のチオラートイオンがエンドペルオキシド酸素に攻撃する経路を見いだした。比較としてピリン還元酵素と基質複合体の結合状態を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The present studies are aimed for the functions and reaction mechanisms of prostaglandin synthases.

(1) Prostaglandin H₂ synthase (cyclooxygenase): We investigated COX-2 catalyzed reaction of arachidonic acid, and we found that the activation energies for the proton abstraction step depend on the conformations of the substrate.

(2) Lipocalin-type prostaglandin D synthase: This synthase catalyzed isomerization of prostaglandin H₂, and we found a pathway which involves nucleophilic attack of the thiolate ion of cysteine residue into an oxygen of endoperoxide. We also examined electronic and bonding states of bilin reductase-substrate complex.

研究分野：理論・計算化学、理論有機化学

キーワード：量子化学計算 QM/MM法 プロスタグランジン 酵素 反応機構

1. 研究開始当初の背景

生理活性脂質であるプロスタノイド類は、アラキドン酸から、シクロオキシゲナーゼ(COX, PGHS)触媒によりプロスタグランジン(PG) G₂ (PGG₂)を経由して生成したPGH₂を共通の基質とする。研究代表者らは、プロスタノイド合成酵素のうち、世界に先駆けてPGI₂, TXA₂, PGD₂/PGE₂の生合成の反応機構の理論的解明を行った(Chem. Asian. J. 3, 1900 (2008); Chem. Eur. J., 15, 4464(2009); Theo. Chem. Acc.128, 191 (2011))。COX-2は炎症によって誘導される酵素であり、非ステロイド性抗炎症薬のターゲット酵素として生化学的にも薬学的にも興味深い。COX-2とアラキドン酸との複合体の構造が近年報告された(Malkowski, et al. J. Biol. Chem. (2010))。COXによるPGH₂の生成は、アラキドン酸の、ヘムの関与によって酸化されたチロシルラジカルによるC-H不斉水素引き抜きで開始される。提唱されている反応機構図を図1に示す。

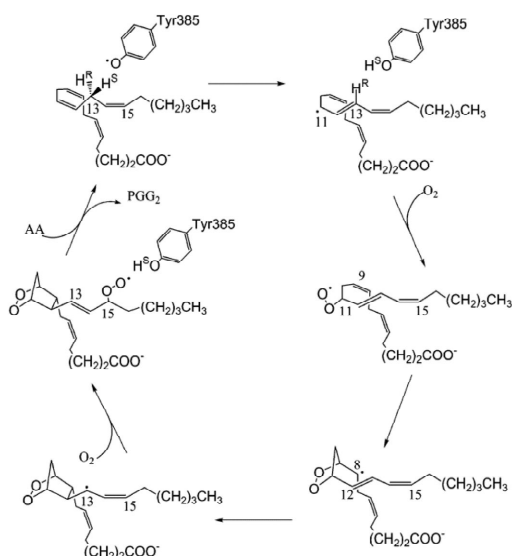


図1 COX 触媒によるプロスタグランジン G₂の生合成のメカニズム

酵素部分を切り取ったモデル系の反応機構に関する量子化学計算の報告例はある(J. Phys. Chem. 107,3297(2003))が、酵素の効果を含めて精密な反応機構に関する計算化学研究例はないため、酵素がどのように蛋白質に挿入する可などの情報はない。一方、類似のリポキシゲナーゼによるリノレン酸の酸化反応では、O₂の添加の段階に関して酵素も含めたQM/MM-MD計算が行われた(González-Lafont ら, J. Phys. Chem. B. 117, 3747 (2013))。しかし、QMレベルは半経験的分子軌道法(MNDO99)レベルで、反応経路全体の研究は行われていない。

2. 研究の目的

本研究では、COXによるアラキドン酸からプロスタグランジン類の生成およびプロスタ

グランジン H₂の異性化で生じるプロスタグランジン類の生合成反応機構における酵素の役割を解明した上で、リポカリン型プロスタグランジン D₂合成酵素(L-PGDS)をはじめとして、大規模系酵素反応経路を解明し、酵素の役割を明らかにするために、活性中心部分のQM計算とともにQM/MM計算を行い、副作用のない抗アレルギー剤の設計・開発につなげる。さらに比較のため、ピリベルジン IX α (BV)を還元する酵素(PcyA)についても検討した。

3. 研究の方法

COX触媒のPGG₂生合成反応に関しては、初期構造に mus musculus COX-2: アラキドン酸複合体二量体の結晶構造(PDBID: 3HS5)を用い、反応活性な方のアラキドン酸を含む単量体を切り出した。結晶構造におけるCo³⁺をFe³⁺オキシ基に置き換えた構造を用いた。L-PGDS触媒のPGH₂の異性化反応に対して、初期構造には、マウス 1-24-C89A, C186A- L-PGDS/ U46619 複合体(PDBID: 2KTD)のNMRで同定された変異体とPGH₂の基質アナログの複合体の構造を用いた。続いて、いずれの検討においても水を加えて制限付きの分子力学計算及び、分子動力学計算を行った。本研究では、QM/MMの静電相互作用の見積もりを含めMM領域からの分極をQM領域に取り込むことのできるONIOM-EE(Electronic Embedding Scheme)法を構造最適化に用いた。

4. 研究成果

(1) シクロオキシゲナーゼ触媒の反応

シクロオキシゲナーゼによる、アラキドン酸からプロスタグランジン H₂生合成反応に関して、水分子を足して基質のアラキドン酸との複合体のMDシミュレーション(AMBER ff03力場を使用)を行った。引き抜かれる pro-S 水素の距離が pro-R 水素に比べて近いことから、チロシルラジカルによる水素引き抜き反応が立体選択的に起こることを示唆する結果を得た。基質のプロトン引き抜きにおける立体選択性(13位の pro-S 水素のみ引き抜く)およびアラキドン酸の鎖および鎖の配座の影響、プロトン引き抜き後のアラキドン酸の位置選択的酸素添加反応のQM/MM法計算を行った。アラキドン酸13位の水素引き抜きに関しては、ONIOM-EE(MO6-2X/def2SVP: AMBER)レベルで、5つのMDのスナップショットをもとに構造最適化したところ、活性化 Gibbs エネルギーは最も低いもので 17.4 kcal/molであった(図2)。この研究成果を投稿に向けて、現在準備中である。

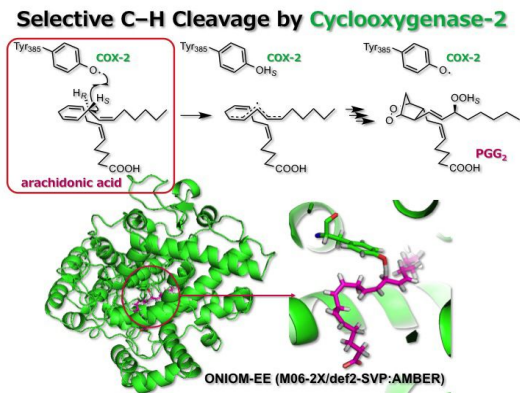


図2 アラキドン酸の13位水素引き抜きの段階

(2) リポカリン型プロスタグランジン D₂ 生合成反応

基質であるプロスタグランジン H₂ および酵素を含めた QM/MM 計算を現在も検討中である。いずれも、NMR スペクトルおよび X 線結晶構造解析に基づいた立体構造を用いた。図3に示したように、エンドペルオキシのプロトンを、Cys65 のチオラートイオンが引き抜き、エンドペルオキシが開環して PGD₂ になる経路(Path H)および、基質のエンドペルオキシ酸素にチオラートイオンが求核攻撃したのちに、S-O 結合が生成して、その後水素結合で活性化されたセリン残基がプロトンを引きぬく経路(path 0)の2種類の反応経路を主に検討した。Path 0 の第一段階の遷移状態(図4)など、いくつかの遷移状態が求まった。リポカリン型プロスタグランジン D₂ 合成酵素に関する QM/MM 計算に関して、QM 領域に、システインと水素結合するセリンなどのアミノ酸残基側鎖を取り入れることが必須であることが明らかになった。

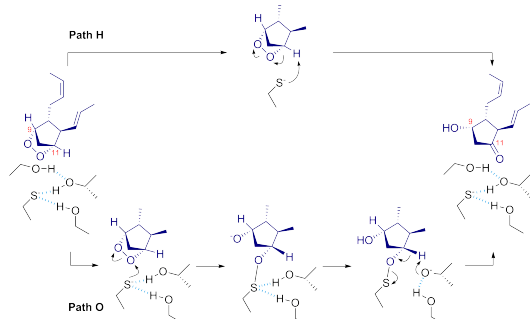


図3 検討した L-PGDS の触媒反応機構
酵素を構成するアミノ酸残基の静電的影響を取り入れた構造最適化計算を現在行っている。

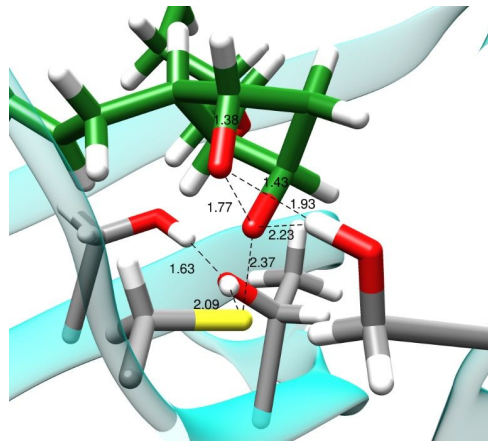


図4 ONIOM 計算で求めた L-PGDS 触媒による Cys65 のチオラートイオンの、PGH₂ のエンドペルオキシ酸素に対する求核攻撃の遷移状態構造

(3) ビリン還元酵素の構造に対する QM/MM 研究

シアノバクテリアなどの光合成生物は、細胞内に光合成色素であるビリンを持っている。その色素を分子内にもつタンパク質が、光合成において集光の役割を担う。ビリンの一つであるフィコシアノピリン(PCB)は、ヘム分解産物であるビリベルジン IX_a(BV)がフェレドキシソ依存性酵素 Phycocyanobilin:ferredoxin oxidoreductase (PcyA)によって還元され、生成する(図5)。2015年にシアノバクテリア由来の PcyA-BV 複合体の中性子結晶構造解析が行われ、BVのプロトン化状態を含む構造が明らかになった。しかしながら、この構造では、BVがプロトン化している構造と中性の2種類の構造の混在が示唆され、周囲残基のプロトン化状態の断定には更なる検討が必要であることが示唆された。

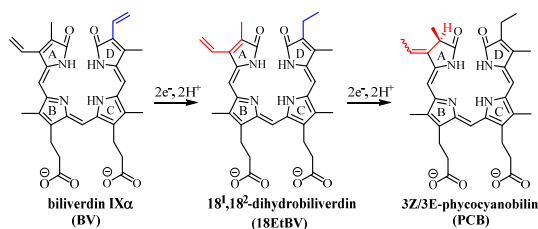


図5 ビリベルジン IX α の還元反応過程

ONIOM-EE(MO6-2X/6-311+G**):AMBER) レベルによるエネルギー一点計算の結果より、図5におけるC環が脱プロトン化している中性のBV構造(図6)が中性子結晶構造に最も適していることが示唆された。

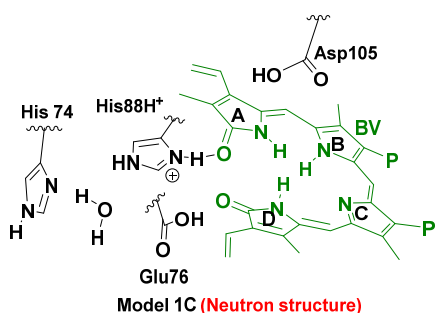


図6 PcyA-BV 複合体の中性子結晶構造に最も近いとされる BV まわりの構造

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 1件)

Eri Iijima, Matthew Paul Gleeson, Masaki Unno, Seiji Mori, QM/MM Investigation for Protonation States in a Bilin Reductase PcyA-Biliverdin IX α Complex, ChemPhysChem, 印刷中。

[学会発表](計 8件)

森 聖治、酵素反応機構解析における量子化学の役割-シトクロム P450 およびプロスタグランジン合成酵素を例に-、生物学・光源・物性研究者による量子生物学勉強会、2018年2月、水戸

飯島 愛璃, Gleeson Paul, 海野 昌喜, 森 聖治, QM/MM 法によるビリル還元酵素基質複合体の構造に関する研究、第11回分子科学討論会 2017 仙台、仙台、2017年

Seiji Mori, Computational Studies of Biosyntheses of Prostaglandins and Related Signaling Compounds, 6th Georgian Bay International Conference on Bioinorganic Chemistry, Parry Sound, Canada, 2017年5月23-27日

Takehiro Sato, Shigeru Shimamoto, Kousuke Aritake, Yoshihiro Urade, Seiji Mori, Theoretical Investigations of PGH₂ to PGD₂ Isomerization Reaction by Lipocalin-Type Prostaglandin D Synthase using Quantum Mechanics-Molecular Mechanics Method. 日本化学会第97春季年会、2017年3月16日-2017年3月19日、横浜
Seiji Mori, Theoretical Insights into Molecular Activation Reactions, Thai-Japan Symposium in Chemistry, Chiang Mai, 2016年11月15日、Thailand
Seiji Mori, Theoretical Studies of Molecular Activation Reactions-Mechanistic Insights and Rational Design of Catalysis, APCTCC 7, 2016年1月25日-28日、高雄、台湾
海野 昌喜、光合成色素合成酵素の中性子結晶構造解析、平成27年度第1回生物構造学研究会、2015年11月17日、東京
Seiji Mori, Computational Studies on Mechanistic Insights into Prostaglandin Synthases, ICoBio 2015, 2015年8月5日-8月7日、Bogor, Indonesia.

[図書](計 0件)

[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：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等
<http://smori.sci.ibaraki.ac.jp>

6. 研究組織

(1)研究代表者

森 聖治 (MORI, Seiji)
茨城大学・理学部・教授

研究者番号：50332549

(2)研究分担者

海野 昌喜 (UNNO, Masaki)

茨城大学・理工学研究科・教授

研究者番号：10359549