

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：32714

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K21459

研究課題名(和文) ナノ・バイオ物質の反応場の量子論的解析

研究課題名(英文) First-Principles Analysis of Reaction Fields in Nano-Bio Materials

研究代表者

神谷 克政 (Katsumasa, Kamiya)

神奈川工科大学・基礎・教養教育センター・准教授

研究者番号：60436243

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：酵素の反応場は優れた触媒特異性を持ち、より一層の活用には反応場の制御が重要となる。本研究では、タンパク質とナノ物質の反応場が駆動する反応機構を量子論的シミュレーションにより解析し、反応場の構造と機能の相関関係を電子論的観点から原子レベルで解明することを目指した。その結果、タンパク質の反応場では生理的な立体構造と電子状態の協調が重要であること、ナノ物質の反応場では電荷注入と熱供給により機能発現を制御でき得ることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Reaction field, or active site, of enzyme has specific properties for its catalyzed reaction. To utilize the enzyme reaction field, the elucidation of reaction mechanisms is inevitable. In this work, we analyzed reactions both in bio-materials and nano-materials by using first-principles calculations. We found that catalytic reaction in enzymes could be driven by interactions between physiological structure and electron motions. We also found that function in nanomaterials could be controlled by charge injection and thermal fluctuation.

研究分野：計算物性物理学、生物物理学

キーワード：タンパク質の反応場 ナノ物質の反応場

1. 研究開始当初の背景

酵素に代表される触媒機能を有する生体物質は、従来の発酵・醸造分野での利用に加え、様々な産業・製薬分野で活用されている。このような酵素の高い有用性は、酵素タンパク質がもつ反応場が、一般の有機合成反応より温和な条件下で省エネルギー的な化学反応を引き起こす場であることに加え、特定の物質だけに作用する基質特異性や、特定の反応だけを触媒する反応特異性など、極めて高い触媒特異性をもつためである。この結果、生産プロセスなどを、低エネルギー、低公害で安全なものに変えることが可能となる。今後のより一層の活用には、使用目的に応じたタンパク質の反応場の制御が重要な課題である。

元来、タンパク質の反応場は進化の過程で環境に適応するように生物が獲得したものである。実際、反応場をより高次に制御させ人工化合物に対する分解能を獲得したバクテリアがいる。例えば、ナイロン合成に関する副生成物を分解できるバクテリアは、ナイロン繊維合成工場近くの土壤中で発見され、ナイロン繊維合成の際に生じる副生成物(ナイロン副生成物)を分解して栄養源の炭素や窒素を得る。ナイロン副生成物のような人工化合物は、天然に存在する化合物とは異なった化学構造を持っているため、生物にとっては元来分解しにくい物質である。これを可能としたのは、このバクテリアがもつ分解酵素(ナイロン副生成物分解酵素)の反応場に、触媒3残基に加えてチロシンというもう1つのアミノ酸が存在するためと予想されていたが、その詳細は明らかになっていなかった。

2014年に申請者は、量子論的シミュレーションの手法により、当該酵素の反応場の制御は、反応場を直接駆動するアミノ酸群(触媒3残基)が新たに付加されたアミノ酸と電子レベルで協調することが重要であることを明らかにしつつあった。タンパク質の反応場の制御法の解明には、反応場の構造と機能を電子論的観点から原子レベルで解明するアプローチが有効である。そのさらなる学問的な有効性は、得られる知見が生体分子以外のナノ物質における反応場にも拡張可能である点にもある。実際、申請者はこれまで、生体分子系に加え、有機合成反応系や次世代ナノ材料系に対しても、電子論に基づく構造・機能相関を原子レベルで解明することで、複雑な反応機構の共通項を研究してきた。

2. 研究の目的

本研究では、タンパク質の反応場が駆動する反応機構を量子論的シミュレーションにより解析し、反応場の構造と機能の相関関係を電子論的観点から原子レベルで解明する。さらに、酵素タンパク質以外のナノ物質に対して同アプローチで研究することで、タンパク質がつくる反応場の特異性を明らかにす

ると同時に、ナノ・バイオ物質群がつくるナノ反応場を統一的に理解するためのフレームワークを提唱することである。

3. 研究の方法

(1)タンパク質がつくる反応場として、環境分野で重要なナイロン副生成物分解酵素の加水分解反応、サルベージ経路で重要なウリジン-シチジンキナーゼの基質認識反応を取り上げた。およびそれぞれの反応場に対し、量子論的または古典論的な分子動力学シミュレーションにより、分子レベルの反応機構を検討し、反応場の特徴を検討した。

(2)ナノ物質がつくる反応場として、次世代パワーデバイスの候補の1つであるSiC-SiO₂および長寿命で保存可能なメモリデバイスの候補の1つであるMetal-Oxide-Nitride-Oxide-Semiconductor (MONOS)メモリを取り上げた。それぞれのナノ物質を反応場として生じる水素イオン移動反応や格子欠陥の構造変化に対して、量子論的シミュレーションを用いて、その特徴を検討した。

(3)電荷注入をトリガーとする反応場の動的変化の例として、質量分析技術で重要なペプチドの分解反応を取り上げた。

4. 研究成果

(1)タンパク質の反応場について

ナイロン副生成物分解酵素は、進化の過程で獲得した人工化合物を分解可能とする極めて特異な反応場を有する。さらに最近、反応条件を変えることで人工化合物の合成も可能な場であることが示され、構造変化により反応場の親水性/疎水性のスイッチングが起こることも示唆されている。そこで本研究では、ナイロン副生成物分解酵素が駆動する触媒反応時の構造変化が分解/合成反応場に与える影響を、量子論的シミュレーションに基づいて検討した。

その結果、本酵素のアミド合成能が反応場の周囲にあるアミノ酸残基をいくつか置換することで大きく変化するという実験事実を分子レベルで説明する理論を提案することができた。本酵素に基質が結合するとAsn167からVal177までのループ領域の大きな構造変化とTyr170のflip-flopを引き起こす。この誘導適合により、本酵素の反応場は開放された形から閉じた形になる。本酵素の閉じた形での反応場は、Ser112、Lys115、Tyr215、およびTyr170からなる。このうち、前者3つのアミノ酸は触媒3残基を形成している。さらに、反応場のアミノ酸を遺伝子改変すると、構造変化するループ領域のゆらぎが変調され、溶媒由来の水分子が反応場に近づけるようになる。

第一原理分子動力学計算より、本酵素のアシル化反応では、Ser112は求核基、Lys115は一般塩基、Tyr215は一般酸としてはたらく

ことがわかった。一方、Tyr170はこの触媒3残基と機能的に相互作用することで、四面体様反応中間体の効率的な分解や、一般酸からのプロトンの供給を促進することがわかった。アシル化反応の律速段階は四面体様中間体が形成される段階であり、自由エネルギー障壁が約88 kJ/molと見積もられた。得られた自由エネルギープロファイルに基づき、反応が進む向き(分解反応)と逆向き(合成反応)に対する自由エネルギー障壁の差を各変異体に対して見積もったところ、変異体間での差は、反応が進む向き(分解反応)に対して1.9~4.3 kJ/mol、逆向き(合成反応)に対しては0.6~3.5 kJ/molであることがわかった。しかし、合成反応に対して実験的に得られた収率から見積もられる変異体間での自由エネルギーの差は約13 kJ/molであり、先のエネルギー障壁の差より有為に大きい値であることがわかった。一方、古典分子動力学法より、変異体間で反応場に到達する水分子の個数が大きく変化することが示唆された。これらの結果から、変異体間でアミド合成反応の収率が異なる理由は、反応場に存在する有効的な水分子の個数(濃度)の違いに起因するモデルを提案した。

本研究ではまた、タンパク質反応場の例として、ウリジン-シチジンキナーゼも取り上げた。ウリジン-シチジンキナーゼは、ウリジンとシチジンのリン酸化を触媒し、核酸の分解によって生じた塩基などがヌクレオチド合成に再利用されるサルベージ経路において重要な酵素である。注目したのは好熱菌由来の酵素である。この酵素はウリジンに対する活性を持たず、その反応場にはチロシン残基が存在している。この反応場を古典論的分子シミュレーションの手法により解析した。その結果、本酵素の反応場では、当該チロシン残基を含めた3つのアミノ酸残基が基質に対して特異的な水素結合を形成していることがわかった。この計算結果は、チロシン残基をヒスチジン残基やグルタミン残基に置換するとウリジン活性が出るという実験結果と良く整合することが明らかになった。

(2) ナノ物質の反応場について

SiC/SiO₂系において、水素アニーリングは欠陥を抑制する効果がある。しかし、水素アニーリングによりデバイス特性を悪化させる何らかの可動性の陽イオンが生じる欠点があった。一方、SiC/SiO₂系の界面付近には、CO₃様の欠陥が生じていることが我々の過去の量子論的シミュレーションの研究から予想されていた。タンパク質の反応場と比較すると、CO₃は周囲の環境に応じて水素イオンの授受を行なう可能性がある。そこで、SiC/SiO₂系の可動性イオンが水素イオンであるかどうかを、量子論的シミュレーションの手法により解析した。

計算の結果、水素アニーリングの条件下では、CO₃様の欠陥がCO₃-Hの欠陥になり、さらに水素イオンがCO₃-Hから解離してSiO₂中をプロトンとして拡散することがわかった。プロトンの拡散に対する反応障壁は約1.8 eVと見積もられ、温度上昇に伴いCO₃-Hからのプロトンの解離反応が促進されることが示唆された。これらの結果から、SiC/SiO₂中における可動性イオンは水素イオンであり、電圧を加えることで、CO₃様の欠陥からSiO₂中のバルク中へ水素イオンが移動してデバイス劣化を引き起こすことがわかった。

本研究ではまた、長寿命で保存可能なコンピュータメモリの候補の1つであるMetal-Oxide-Nitride-Oxide-Semiconductor (MONOS)メモリも取り上げた。このメモリは1000年単位でデータを保存可能であることが提案されている。MONOSメモリは原子レベルの格子欠陥に電荷を注入することでデータを記憶する。この電荷注入は欠陥周囲の原子構造の変化を引き起こす。そこで、本研究では、MONOSメモリ中のSi₃N₄層に存在する酸素置換型欠陥に着目し、その電荷注入による構造変化を量子論的シミュレーションの手法で調べた。その結果、Si₃N₄中の酸素置換型欠陥では、電荷注入により不可逆的な構造変化を引き起こすことがわかった。この現象を応用することで、メモリの寿命を大きく向上させることを提案した。

(3) ペプチドの分解反応について

上記(1)と(2)の反応場における現象の本質は、「ナノ物質に電荷が注入されることで、電子状態の変化により断熱ポテンシャルが変化し、外部からの熱供給により構造変化が起こる」という現象である。これはナノ物質がつくる反応場とタンパク質がつくる反応場の共通項の可能性がある。すなわち、タンパク質反応場では、アミノ酸のプロトン化状態の変化(電子状態の変化)と立体構造の揺らぎの協調が反応場の動的変化を引き起こし、その結果として機能が発現する可能性がある。

そこで、プロトン化がタンパク質の動的変化を引き起こす現象として、本研究ではペプチドの分解反応に注目した。この反応は、最近水素原子を利用したタンデム質量分析技術で注目されている。この分析法では、タンパク質にプロトンと電子(水素原子)を付加することでペプチドをフラグメントに切断する。そこで本研究では、プロトンと電子をそれぞれ1つずつ付加したペプチドの分解反応を量子論的シミュレーションにより検討した。

その結果、N末端をアセチル化したArgとLysのアミノ酸のそれぞれにおいて、ペプチドのカルボニル酸素に水素原子付加をすることで、500K程度で1ps以内に分解反応が生じることがわかった。今後の展開としては、

ジペプチドに対する量子論的シミュレーションを行い、実験結果と比較することを予定している。

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)

Hiroki Shirakawa, Keita Yamaguchi, Masaaki Araidai, Katsumasa Kamiya, Kenji Shiraishi, "Possibility of Metal-Oxide-Nitride-Oxide-Semiconductor Memories for Long Lifespan Archive Memories"、IEICE Transactions on Electronics, Vol. 100, pp. 928-933, 2017

DOI: 10.1587/transele.E100.C.928

Seiji Negoro, Yasuyuki Kawashima, Naoki Shibata, Tatsuya Kobayashi, Takeshi Baba, Young-Ho Lee, Katsumasa Kamiya, Yasuteru Shigeta, Keisuke Nagai, Ikki Takehara, Dai-ichiro Kato, Masahiro Takeo, and Yoshiki Higuchi, "Mutations affecting the internal equilibrium of the reaction catalyzed by 6-aminohexanoate-dimer hydrolase"、FEBS Letters, 査読有り、Vol. 590, pp. 3133-3143、2016

DOI: 10.1002/1873-3468.12354

Wataru Tanaka, Mitsuo Shoji, Fumiaki Tomoike, Yuzuru Ujiie, Kyohei Hanaoka, Ryuhei Harada, Megumi Kayanuma, Katsumasa Kamiya, Toyokazu Ishida, Ryoji Masui, Seiki Kuramitsu, and Yasuteru Shigeta, "Molecular Mechanisms of Substrate Specificities of Uridine-Cytidine Kinase"、Biophysics and Physicobiology, Vol. 13, pp. 77-84, 2016

DOI: 10.2142/biophysico.13.0_77

Hiroki Shirakawa, Katsumasa Kamiya, Masaaki Araidai, Heiji Watanabe, and Kenji Shiraishi, "Origin of the unidentified positive mobile ions causing the bias temperature instability in SiC-MOSFETs and their diffusion process", Applied Physics Express, Vol. 9, 064301 (3 pages), 2016

DOI:

<http://doi.org/10.7567/APEX.9.064301>

1

[学会発表](計2件)

Daiki Asakawa, Hidenori Takahashi, Shinichi Iwamoto, Koichi Tanaka, Katsumasa Kamiya, "Fundamental Study of Hydrogen Attachment/Abstraction Dissociation (HAD) Tandem Mass

Spectrometry by Ab initio Calculation, ASMS Sanibel Conference, Florida (USA), 2018

神谷克政、第一原理分子動力学方による酵素反応中心の立体構造の解析、レア・イベントの計算科学、伊豆山研修センター(静岡県・熱海市)、2017年

[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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

神谷 克政(KAMIYA, Katsumasa)

神奈川工科大学・基礎・教養教育センター・准教授

研究者番号: 60436243

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号:

(4) 研究協力者