

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月24日現在

機関番号：34204

研究種目：基盤研究(C) (特設分野研究)

研究期間：2016～2018

課題番号：16KT0166

研究課題名(和文) 酵素の機能改良のための遷移状態解析法の開発

研究課題名(英文) Development of analysis method of transition state for improvement of enzymatic function

研究代表者

中村 卓 (Nakamura, Takashi)

長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部・准教授

研究者番号：80344050

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：実験研究者が計算化学を利用して簡単に精度よく酵素機能改良のためのデザインができる方法論を確立したいと考え、酵素反応に要するエネルギー(活性化エネルギー)を見積もるために必要な遷移状態構造の探索や、活性化エネルギーを量子化学計算により算出し、実験結果と比較した。その結果、計算結果と実験結果と対応させるためにはまず、反応座標が複雑な経路でも精度の高い計算方法で反応の遷移状態構造を決定する必要があることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果より、実験研究者でも簡便かつ精度よく機能改変酵素のデザインができる計算化学の手法を開発するには、まず実験結果と対応する酵素反応の経路を効率的かつ精度よく探索できる方法を見つける必要があることが明らかとなったが、それらの課題が解決されれば、医薬品、食品、化学製品などの製造において幅広く利用されている酵素の機能改良が進み、これら製品のさらなる生産性向上につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：We would like to develop a computational method by which experimental researchers can improve the function of a target enzyme easily and efficiently, and thus performed the search of transition structure that is necessary to estimate an activation energy of the enzymatic reaction and the calculation of the activation energy by quantum chemical calculation. We then compared the calculation results with the experimental results.
As a result, we found that to obtain comparable result between experiment and calculation, reaction path of the target enzyme should be calculated quite accurately even though the reaction coordinate is complex.

研究分野：酵素学 タンパク質工学 計算化学

キーワード：遷移状態エネルギー分割法 QM/MM計算 八口酸脱八口ゲン化酵素 計算精度 遷移状態構造 活性化エネルギー 実験結果と計算結果の対応

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

酵素は医薬品、食品、化学製品などの製造において、幅広く利用されている。また、既存の活性を高めたり、耐熱性を付加させたような機能改良酵素を作製するためにタンパク質工学の技術が活用されている。しかし、酵素の機能改良は容易ではなく、汎用的な方法はない。アミノ酸配列アライメントや立体構造情報を基に、活性部位付近のアミノ酸残基の変異導入やランダム変異導入などの実験がよく使用されるが、目的の活性の向上した変異体を得るのは難しい。反応速度論から考えると、目的の機能を酵素に付加させるには、目的の酵素反応の遷移状態 (TS) を安定化するような変異を導入するのが最も合理的であるが、TS 構造が実験でも計算でも容易に推定できないため、TS 制御による酵素の機能改良の例は少ない。

研究代表者は、これまでに環境汚染物質であるハロアルカンやハロ酸の脱ハロゲン化酵素などの機能改良を目指して、分解酵素発現系の構築、酵素精製、酵素活性測定などの実験と、分子動力学計算・量子化学計算による酵素反応機構解析や酵素と基質間の相互作用解析を行ってきた¹⁾。そして近年、研究分担者と共に、酵素反応の活性化エネルギーに、活性部位周辺のアミノ酸各残基がどのように寄与するのかを見積もる手法を開発し (TS の Decomposition Analysis、TS エネルギー分割解析法)、それを研究対象としているハロ酸脱ハロゲン化酵素 L-DEX YL の反応機構解析や立体選択性の反転に活用することができた^{2,3)}。この方法は、TS 構造が推定できれば非常に簡単に解析を行う事ができるものの、実験結果と対応しない結果もあり、まだ改善の余地がある。そこで、本研究では、我々が開発した TS エネルギー分割解析法を改良したり、新たに TS 構造の基質 - 酵素間の相互作用解析ができる方法を開発して、実験研究者が簡単に精度よく酵素機能改良のためのデザインができる方法論の確立を目指そうと考えた。

2. 研究の目的

我々が開発した TS エネルギー分割解析法を改良したり、新たに TS 構造の基質 - 酵素間の相互作用解析ができる方法を開発して、実験研究者が簡単に精度よく酵素機能改良のためのデザインができる方法論の確立を目指す。そのためにはまず、モデル酵素として研究対象としている *Pseudomonas* sp. YL 由来のハロ酸脱ハロゲン化酵素 L-DEX YL に対して、分解活性の向上した変異体酵素を計算で正しく予測できる手法を開発する。現時点では、妥当な変異を導入するためのノウハウがまだなく、立体構造を確認しながら手当たり次第に変異を導入して計算している状態であるが、活性化エネルギーを低下させる TS 構造の特徴を簡便に見出すことができれば、それを参考に効率よく変異導入箇所を推定できると思われる。

3. 研究の方法

本研究課題に使用するモデル酵素の反応として、L-DEX YL とその代表的な基質である L-2-クロロプロピオン酸 (L-2-CPA) と L-DEX YL がほとんど分解できない基質であるフルオロ酢酸 (MFA) の加水分解反応を選択した。

まず、分子設計支援ソフトウェアの一つである Molecular Operating Environment (MOE) によるドッキングシミュレーションで L-DEX YL の立体構造に基質を結合させ、酵素 - 基質複合体の初期構造を作成し、Amber というソフトウェアを用いた分子動力学計算で構造を緩和させて QM/MM 計算の初期構造を作成した。次に、基質と触媒水、そしてその周辺の残基を量子力学 (QM) 領域とし、残りの部分を分子力学 (MM) 領域と考えて量子化学計算を行う QM/MM 法により L-DEX YL と基質との反応における遷移状態 (TS) の候補構造を探索した。得られた TS 候補構造に対して、TS 構造最適化、振動数解析、反応経路追跡 (IRC) 計算を行って、TS 構造、反応前構造、反応後構造を決定し、活性化エネルギーを算出した。QM 領域は、基質、触媒水と実験結果から活性に重要であると思われる L-DEX YL のアミノ酸残基の側鎖部分からなり、少ない場合は、4 残基 59 原子の系、最大で 16 残基 180 原子の系で計算した。QM/MM 計算や他の量子化学計算については、Gaussian09 の Our own N-layered Integrated molecular Orbital and Molecular mechanics (ONIOM) 法により計算した。QM 領域の計算には半径的手法である PM3 法と、非経験的手法の一つである密度汎関数法のうち、主に B3LYP/6-31G(d) あるいは M06-2X/6-31G(d) を使用して計算した。MM 領域の計算には Amber 力場を使用した。特定の反応座標に注目して、その原子間距離を手操作で 0.1 Å ずつ縮め、各点で構造最適化計算を行った後の結果からエネルギープロフィールを描き、TS 構造を推測する SCAN 計算だけでなく、推定上の反応前、TS、反応後の構造から Nudged Elastic Band (NEB) 法により TS 構造や反応経路を自動探索するソフトウェア Reaction Plus Pro2 (HPC システムズ) も使用した。

4. 研究成果

本研究では、研究代表者と研究分担者で開発した遷移状態 (TS) エネルギー分割解析法の簡便性、精度の向上を目指す研究や、巨大分子を核酸やアミノ酸などの断片 (フラグメント) ごとに計算することで巨大分子の高精度計算を行なうことのできるフラグメント分子軌道 (FMO) 法による TS 構造の基質 - 酵素間相互作用の解析法の開発を行ない、実験研究者がこれらの手法を機能改良酵素創製の有効な手段として利用できるようにすることを最終目的としている。そのためにも、実験結果と対応する活性化エネルギー値を与える TS 構造の決定方法を確立する必要がある。

モデル酵素の反応として使用したハロ酸脱ハロゲン化酵素 L-DEX YL とその代表的な基質であ

る L-2-CPA との反応は、以下の 2 段階で進行すると考えられている (図 1)。すなわち、1 段階目の酵素内の Asp10 が基質の塩素のついた炭素に求核攻撃してハロゲン化物イオンとエステル中間体を形成する反応と、2 段階目のエステル中間体が触媒水によって加水分解を受けて酵素の再生と反応生成物である 2-ヒドロキシカルボン酸を生じる反応である。そのため、最低でも 2 つの TS 構造を決定する必要がある。そこで、まず、計算コスト重視の方法で計算を行なって実験結果と対応する結果が得られるか検討した。

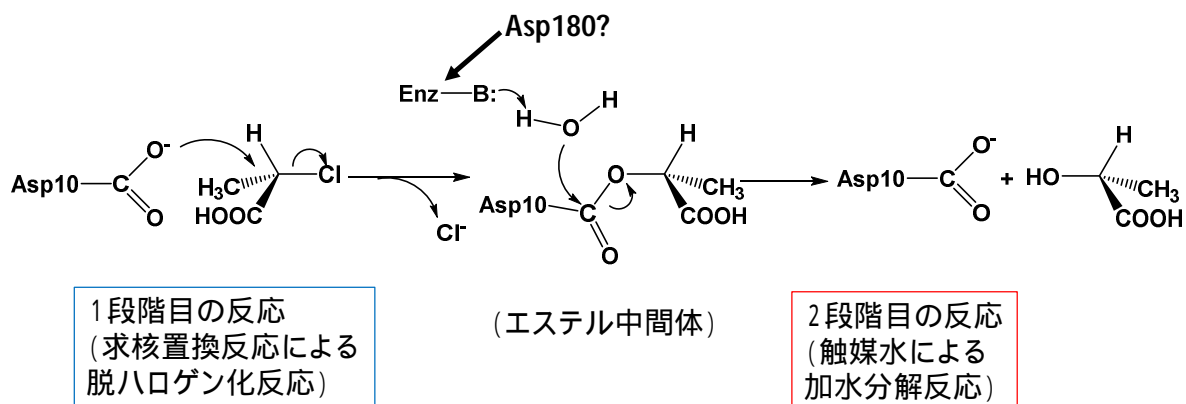


図 1. ハロ酸脱ハロゲン化酵素 L-DEX YL と L-2-クロロプロピオン酸の酵素反応

(1) 計算コスト重視の計算方法による、MFA 分解活性向上を目指した L-DEX YL 変異体酵素のデザインとその実験結果との対応関係の検証

まずは計算精度よりも計算時間を重視して妥当な反応経路が得られるかを確認するために、QM 領域を半経験的手法の 1 種である PM3 法で計算した。また、2 段階の反応のうち、1 段階目の脱ハロゲン化反応の方が活性化エネルギーの算出が容易であること、MFA は、強固な炭素-フッ素結合を有するとため、1 段階目の脱ハロゲン化反応が律速段階になると仮定して、野生型酵素と変異体酵素で 1 段階目の脱ハロゲン化反応の活性化エネルギーの値を比較して、活性が向上すると期待される変異体酵素を見つけることにした。その結果、野生型酵素の計算上の活性化エネルギーは 45 kcal/mol となり、室温で反応が起こり得ないような高い活性化エネルギーの値が得られた。しかし、野生型酵素と変異体酵素との相対的な活性化エネルギーの比較で議論できる可能性を考え、野生型酵素よりも活性化エネルギーが 6~8 kcal/mol 低下する変異体酵素 2 種類について実際に大腸菌で発現させて精製し、MFA に対する酵素活性を測定した。その結果、デザインされた酵素の活性は野生型より大幅に低下した。円偏光二色性スペクトル法で 2 次構造の温度依存性を調べたところ、これらの変異体酵素は野生型酵素よりも低温で変性する可能性が示唆されたため、計算を行なう際に、変異導入による酵素の立体構造への影響も考慮する必要があることがわかった。また、変異体酵素のデザインに関しては、2 段階目の加水分解反応を考慮した方が良いという可能性と、計算精度を上げて実験結果に対応する活性化エネルギーを算出できる反応経路を見つける必要があると考えられた。

(2) 計算精度の高い計算方法による L-DEX YL の酵素反応経路探索

(1)の結果より、計算時間はかかるものの分散力のような弱い相互作用を考慮した非経験的手法で計算した方が良く考えられたので、非経験的手法の 1 種である密度汎関数法の M06-2X/6-31G(d)を用いて、まずは L-DEX YL の第 1 段階の脱ハロゲン化反応について、活性化エネルギーを算出した。その結果、QM 領域が 180 原子の系で、本来の基質である L-2-CPA と、ほとんど反応しない MFA に対する活性化エネルギーがそれぞれ数日程度の計算時間でそれぞれ 4.91, 9.61 kcal/mol となり、実験的に反応が起こり得る活性化エネルギーの値となった。一方、2 段階目の加水分解反応については、反応座標が複数あって、その動かし方について非常に多くの組み合わせがあり、そのいくつかについて検討してみたものの、TS 構造探索中の構造最適化計算が収束しない、妥当な TS 構造が得られない、などの理由で反応経路を特定できなかった。

(3) TS 構造探索方法の見直し

(1)と(2)の結果より、精度よく酵素機能改良のためのデザインができるようになるためには、目的とする酵素反応全ての反応経路を非経験的手法により高精度で計算する手法の確立が必要であると思われた。その際に、自分で反応座標を設定し、その座標系に従って計算を進める SCAN 計算では反応座標が複数になった場合に反応経路を特定することが困難になることが明らかとなった。そこで、L-DEX YL の本来の基質 (L-2-CPA) を用いた酵素反応に対して、推定上の反応前構造、TS 構造、反応後の構造からその数値的平均構造を複数作りだし、それらの構造全体を一つにつないだバンドを反応経路であるエネルギーポテンシャル曲面に最適化する NEB 法を利用した自動反応経路探索プログラムを使用して反応経路を探索することにした。さらに計算コ

ストを下げるため、QM 領域に含まれる原子数をできるだけ少なくして計算を行なったところ、QM 領域が 80 原子の系で、高精度の計算でもこれまでの探索方法よりも効率よく TS 候補構造を見出し、反応経路も推測できるようになった。さらに、(2)ではみつけれなかった高精度での TS 構造を得ることに成功した。しかし、得られた TS 構造から推定された活性化エネルギーは、40 kcal/mol 近い値となり、実験結果から推定される活性化エネルギー (5.1 kcal/mol) と大きな乖離を示した。

以上の結果より、本研究課題において精度よく酵素機能改良のためのデザインを行なうためには、実験結果と対応するような TS を経由する反応経路をいかに効率よく見出すことが出来るかという点がまず重要であることがわかった。本研究課題を遂行している間にも、密度汎関数法の結果と同程度の計算精度で計算できる半経験手法のためのパラメータ開発や、タンパク質の構造を分子動力学計算で緩和させながら量子化学計算を行なう QM/MD 法の開発、さらに機械学習を利用して、分子動力学計算で得られる膨大な酵素反応の途中構造から反応経路に沿うと思われる構造を自動的に抽出してその構造を基に QM/MM 計算を行なう試みなどが行われている。今後、これらの手法も取り入れながら、実験結果と対応するような TS を経由する反応経路を効率よく見出すことが出来る手法を開発して酵素の機能改良研究につなげられるように研究を進めていく予定である。

<引用文献>

- 1) Nakamura, T., Yamaguchi, A., Kondo, H., Watanabe, H., Kurihara, T., Esaki, N., Hirono, S., Tanaka, S. Roles of K151 and D180 in L-2-haloacid dehalogenase from *Pseudomonas* sp. YL: Analysis by molecular dynamics and *ab initio* fragment molecular orbital calculations. *J. Comput. Chem.* 2009, 30, 2625-2634.
- 2) Kondo, H., Nakamura, T., Tanaka, S. A significant role of Arg41 residue in the enzymatic reaction of haloacid dehalogenase L-DEX YL studied by QM/MM method. *J. Mol. Cat. B: Enzymatic.* 2014, 110, 23-31.
- 3) Kondo, H. Hujimoto, J. K., Tanaka, S., Deki, H., Nakamura, T. Theoretical prediction and experimental verification on enantioselectivity of haloacid dehalogenase L-DEX YL with chloropropionate. *Chem. Phys. Lett.* 2015, 623, 101-107.

5 . 主な発表論文等

[学会発表](計3件)

- (1) 田中 悠介、中村 卓、近藤 洋隆、渡邊 博文、田中 成典、ハロ酸デハロゲナーゼ L-DEX YL の触媒する脱ハロゲン化反応の量子化学計算による反応経路特定、2019 年 3 月、日本化学会第 99 春季年会、兵庫
- (2) 中村 卓、近藤 洋隆、渡邊 博文、田中 成典、QM/MM法によるハロ酸脱ハロゲン化酵素 L-DEX YLのフルオロ酢酸分解反応の機構解析、2018年9月、日本化学会 第12回バイオ関連化学シンポジウム、大阪
- (3) 福田 昌寛、岩崎 静斗、棚田 悠介、中村 卓、田中 成典、フルオロ酢酸分解活性の向上したハロ酸デハロゲナーゼL-DEX YL 変異体の量子化学計算によるデザインと 実験による検証 (2)、2017年3月、日本農芸化学会2017年度大会、京都

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：田中 成典

ローマ字氏名：Tanaka Shigenori

所属研究機関名：神戸大学

部局名：システム情報学研究科

職名：教授

研究者番号(8桁): 10379480

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。