

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K05052

研究課題名(和文) 複合シミュレーション技術によるバイオマス分解酵素の反応機構解明と機能改変

研究課題名(英文) Computational modeling and analysis of glycosyl hydrolases : reaction mechanism and catalytic design

研究代表者

石田 豊和 (Toyokazu, ISHIDA)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・材料・化学領域・主任研究員

研究者番号：70443166

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本課題では、非経験的量子計算と経験的分子力場を融合したQM/MM計算を基とする複合シミュレーション技術の開発/拡張を行うと同時に、典型的なバイオマス分解酵素の一つであるキシラナーゼのグリコシド結合分解過程の詳細を解明した。中性子構造を用いて酵素基質複合体の精密な分子モデリングを実行し、グリコシド結合分解過程のエネルギー変化を自由エネルギーレベルにて計算したところ、反応の律速段階は通説であるプロトン移動ではなくグリコシド結合の切断段階であり、この過程においてごく短時間ながら反応中間体が生成しうることを理論計算の視点から初めて明快に示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体内で起こる各種化学反応を触媒するのが酵素であるが、多数の実験構造が解明された現在においてすらその反応機構が完全解明された酵素はなく、酵素の機能改変や新規酵素の分子設計など現代化学が解決すべく問題に対して、分子スケールでの酵素反応機構解明は理論計算化学分野に課された重要課題の一つとなっている。

自然界に普遍的に存在する酵素の触媒メカニズムを完全に理解し、酵素触媒反応を制御するための化学的知見を提供することは、基礎科学研究において、そして各種化学産業への応用展開も含めて非常に重要な意義を持つ。

研究成果の概要(英文)：In this research project we have investigated the reaction mechanism of GH11 xylanase, a typical biomass-decomposing enzyme which catalyzes the hydrolysis of lignocellulosic hemicellulose (xylan), based on the ab initio QM/MM combined with molecular dynamics simulation technique.

For modeling a realistic enzymatic structure, we have employed the recent neutron crystal structure that revealed the protonation states of relevant residues, and we have determined the substrate binding pattern onto the enzymatic active site by using our original QM/MM program. On the basis of the QM/MM free energy profile of glycosylation step, we have identified that the rate-determining step of the glycosylation is a scission of the glycosidic bond after proton transfer from the acidic Glu residue. And also, our QM/MM calculations (free energy barrier as well as secondary kinetic isotope effect) suggest that a reaction intermediate can be transiently formed with short lifetime along the reaction pathway.

研究分野：理論計算化学(生体内化学反応論)

キーワード：理論計算化学 QM/MM計算 分子動力学計算 自由エネルギー計算 酵素反応機構 バイオマス分解酵素
Glycoside hydrolase (GH) キシラナーゼ(Xylanase)

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、研究者個人に帰属します。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 理論計算化学分野の著しい進展と近年の計算機環境の大規模化に伴い、タンパク質の立体構造を露わに考慮した理論計算は大きく進展している。中でも実在系の酵素反応を対象とする分子モデリングと定量的な反応エネルギー解析は、世界中の研究者が挑戦している理論計算化学研究の最先端課題の一つである。

しかし現時点ですら、典型的には溶液中の酵素反応を対象とする場合、依然として定量的な自由エネルギー面を基礎とした酵素反応解析には多くの技術的な困難を伴い、反応機構が完全に解明されたとはい切れる酵素は存在しない状況にある。こういった状況を考慮し、確かな計算化学手法に基づいた酵素反応機構の分子スケールでの解明、および理論計算から得られた微視的情報を基礎とした酵素機能の改変とその応用技術の展開に関しては、現在進行形の重要研究課題である。

(2) 木質系バイオマスと総称される木材資源の主成分はリグノセルロースと呼ばれ、セルロース、ヘミセルロース、リグニンの3種が主要な構成要素である。中でも全2者は単糖から構成される多糖高分子であり、バイオマス資源の有効活用には、これら多糖を加水分解して構成要素である単糖まで効率よく分解することが重要となる。セルロース、ヘミセルロースはそれぞれ構成要素が異なるものの、単糖が脱水縮合してグリコシド結合を形成し、その結果として非常に強固な高分子鎖を形成する点では共通であり、これらグリコシド結合を加水分解する酵素は一般に Glycoside Hydrolase (GH) と総称される。

これまで多数の GH に関して構造学的、生化学的な研究成果が報告されており、その現象論的な反応メカニズムと構造および機能的な情報に関しては CAZY データベースに集約されて公開されており、Web サイトを通して検索可能である。しかし現時点においても、基本的な触媒機能の詳細や GH ファミリー間での反応活性の差異および機能相関など、基礎科学的な視点から未解決の問題は多く残され、これが例えばバイオマス分解酵素としての機能改善等の産業応用に対しても大きな障害になっていることは事実であり、最新の理論計算化学技術を活用した反応機構解明が求められている。

2. 研究の目的

(1) 本研究においては、非経験的量子化学計算と分子力場計算を組み合わせたいわゆる QM/MM 計算を基礎として、これに分子動力学計算を組み合わせた複合シミュレーション技術の開発と拡張を理論計算研究の主目的として、さらに最新の構造解析実験により得られた詳細な酵素タンパク質構造を組み合わせることで、バイオマス分解酵素のグリコシド結合分解過程を詳細に解析する手法を開発し、実在の酵素反応系で大規模計算を実行することで、本酵素反応の律速段階を同定して反応機構の詳細を解明する。

(2) 本研究で取り上げるバイオマス分解酵素は、植物細胞壁主成分の一つであるヘミセルロースを分解するキシラナーゼ(Xylanase)と言う酵素である。GH ファミリーの典型的な酵素であるキシラナーゼは、ヘミセルロースを構成する主成分であるキシラン中のグリコシド結合を加水分解する化学反応を触媒する。この反応自体は有機化学反応機構で良く知られた酸塩基反応で進行すると考えられ、またすでに多くの結晶構造も解かれてタンパク質の立体構造も明らかになっている。しかしそれにも関わらず、基本的な反応機構に関しては未だ大きな謎が残されており、特に「反応経路上に生成するとされる Oxocarbenium ion が反応中間体なのか、それとも反応遷移状態であるか」が、未だに明らかにされていない。また関連して GH 酵素系では基質と反応する際に、酵素基質複合体において基質に構造歪みが導入され、これが反応基底状態を不安定化することが反応活性要因の一つであると仮定されているが、この作業仮説の分子論的実態も未解明のままである。これらは 1960 年代末に酵素リゾチームの立体構造が初めて解明された際に提案された反応仮説 (Phillips 機構) の検証にまで遡る根源的な問題を抱えた、酵素反応機構の研究上で非常に重要なターゲットである。本計算化学研究においては、現実的な分子構造モデルを用いて反応機構を詳細に解明することにより、種々の作業仮説を理論的視点で詳細に検討して、現時点で最も妥当な反応機構を提示することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 本研究では GH11 ファミリーに属し jelly-roll fold 構造を有する小型のキシラナーゼを対象として、これまで開発してきた QM/MM 計算技術をシステムティックに適用することで、グリコシド結合を加水分解する触媒過程の定量的な分子モデリングを実行する。

計算の出発点となる酵素構造に関しては、基質との結合モードが同定された高分解能の X 線結晶構造データと共に、今回は中性子線構造解析により構成アミノ酸の荷電状態が詳細に決定された結晶構造を併用して活用することで、現時点で最も妥当性のある酵素基質複合体の分子モデリングを実行した。そして我々がこれまで独自に開発を続けてきた QM/MM 計算手法で構造

精密化を行うことで、従来にない精度で酵素基質複合体の活性中心構造を決定し、ここを出発点としてグリコシド結合分解過程のポテンシャル面を ab initio QM/MM 計算から決定し、これをもとに妥当な反応経路を決定することで、反応経路に沿った自由エネルギー変化を QM/MM 計算と分子動力学計算を組み合わせた自由エネルギー摂動法から計算する手順をとった。

(2) 本酵素の触媒サイクルとしては、酵素基質複合体からグリコシル酵素中間体を形成するまでの反応前半過程 (Glycosylation) と、反応中間体が加水分解されて元の酵素に戻る後半過程 (Deglycosylation) からなるが、今回は Oxocarbenium ion 反応中間体が形成される前半過程 (Glycosylation) での化学反応のみに注目して一連の QM/MM 計算を実行した。初期構造モデルの精密化およびポテンシャル面での反応経路決定においては、対象系のサイズおよび現実的な計算時間を考慮し、すべて QM/MM-MP2/6-31+G**/AMBER レベルで実行し、基底関数の影響および DFT 計算との比較は別途実行/検証の上で以後の議論の参考とした。そして最終的には反応の半定量的なエネルギー収支を議論するため、CCSD(T) レベルの補正を加えた上で自由エネルギー計算により反応プロファイルを半定量的に理論計算から算出し、この結果をもとに反応機構の詳細、特に基底状態不安定化が酵素活性に及ぼす影響を議論した。

4. 研究成果

(1) 自由エネルギー計算を行う前段階として、QM/MM レベルで Glycosylation 過程のポテンシャル面を、X 線結晶構造に基づく構造と中性子構造に基づく構造とでそれぞれ計算して、両者の差異を詳細に比較した。X 線結晶構造を基に作成した酵素基質複合体の構造では基質を強く結合して、その結果としてグリコシド結合分解の活性化エネルギーを高く評価する傾向が確認できたので、本研究では中性子構造を基にした酵素基質複合体の分子モデルを用いる方針とし、反応のポテンシャル面を QM/MM-MP2/6-31+G**/AMBER レベルで決定して、この情報を基に反応の minimum energy reaction path を決定する手法をとった。反応座標の設定においては反応に必須となる 3 つの結合モード (Proton transfer coordinate, Scissile-bond coordinate, Nucleophile attack coordinate) を全て考慮して、大域的な QM/MM-MP2 ポテンシャル面を構築した上で妥当な反応経路の決定を行なった。計算手法による各種影響を調べるために、この反応経路に沿って MP2、B3LYP レベルで基底関数を系統的に変化させた (6-31+G**, 6-311+G**, aug-cc-pVDZ, aug-cc-pVTZ) 場合の計算結果を検討して、6-31+G** レベルの計算が妥当な結果を与えることを確認した。この結果から本反応系は QM 領域の電子状態計算において電子相関の影響が強く効くことが確認できたので、最終的には CCSD(T) レベルの補正を加えて活性中心の電子状態を計算する方針として、最後に分子動力学計算に基づく自由エネルギー摂動法による MM 領域の自由エネルギー成分を加えることで反応の自由エネルギー変化を計算した。

(2) 図 1 は minimum energy reaction path に沿った Glycosylation 過程の自由エネルギー変化であり、今回の計算結果により活性化障壁は 18kcal/mol 程度、およびグリコシル酵素中間体 (Glycosyl-enzyme, GE) の形成は僅かな発熱反応であることが確認でき、種々の実験事実から示唆される熱力学的な情報とも矛盾はなく、妥当な反応スキームが理論計算から再現された。

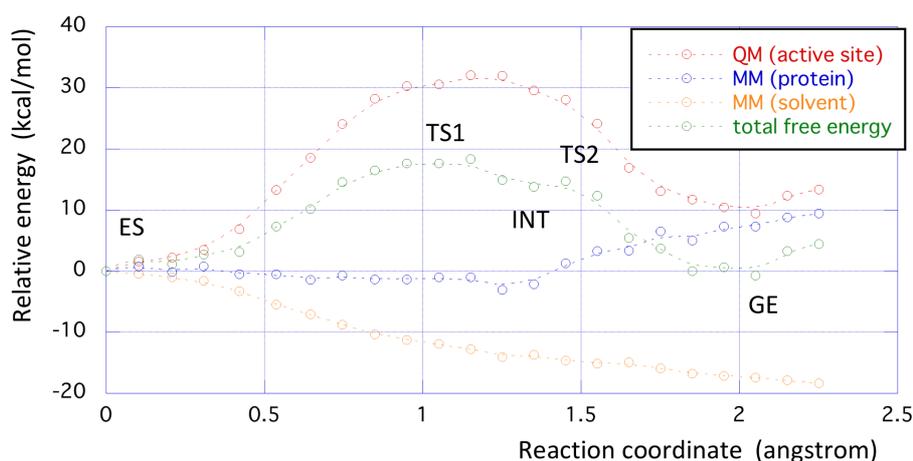


図 1 Glycosylation 過程での自由エネルギー変化

また図 2 には本反応過程での活性中心の構造変化を示しているが、Glycosylation 過程での律速過程は (従来から指摘されている、Catalytic-dyad を構成する Glu177 からの) 初期プロトン移動ではなく、グリコシド結合の切断過程であることが明らかになった。そして図 1 の自由エネルギープロファイルを基に反応素過程の詳細を調べることが可能となり、まず Glycosylation 過程での反応中間体である Glycosyl-enzyme (GE) 形成過程の間に、ごく短時間

ながら Oxocarbenium ion 中間体(INT)が確かに生成されることが理論計算の観点から明確になり、この反応中間体の寿命については高々数十 ps のオーダーであることが示唆された。また自由エネルギー計算に基づくデータ解析により、中間体形成に伴う反応部位の二次同位体効果を計算結果と実験事実を比較検証したところ両者の間で矛盾はなく、反応過程の途中で構造歪みを伴った Oxocarbenium ion が生成するのは理論的な視点から妥当であることが明らかとなった。

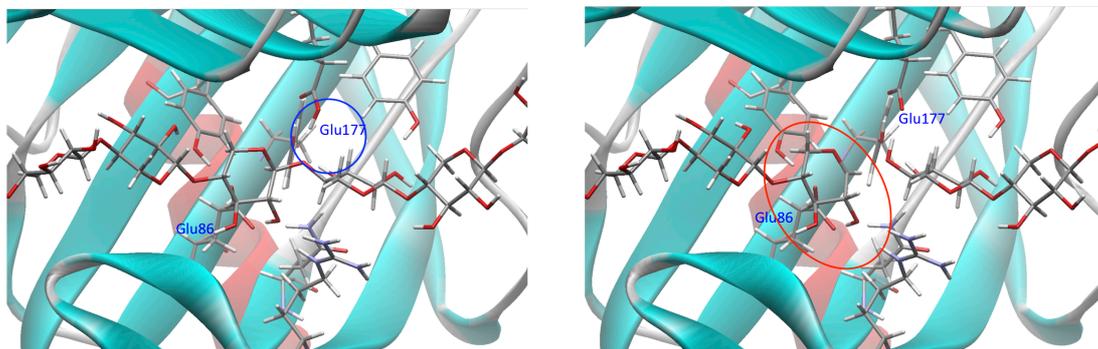


図2 反応中心 (QM 領域) の分子構造：(左) 酵素基質複合体 ES (右) 反応中間体 INT

(3) また基底状態での基質歪みが酵素反応を加速するという、いわゆる基底状態不安定化仮説を QM/MM 計算の結果から検証するために、QM/MM-MP2/6-31+G**レベルで構造最適化した活性中心の基質構造に注目して六員環構造を解析し、ここではいわゆる Cremer-Pople マップ上に反応の進行に伴って単糖構造がどのように変形していくのかを模式的に示した。図3に示す通り酵素基質複合体を形成する段階では理想的な椅子型構造から歪んではいるが、半椅子型や Skew 構造ほどには構造が歪んでおらず、Oxocarbenium ion 中間体を形成する段階で典型的な半椅子型の構造を取ることが確認できた。ただこの基質歪みが反応活性にどの程度優位に働くかは、参照系である溶液中での化学反応と詳細な比較検討が必要であり、現時点での解析は構造歪みによるエネルギー不安定化が高々5kcal/mol 程度と確認できたのみで、基底状態不安定化仮説に対しては、更なる研究が必要であることも明らかになった。

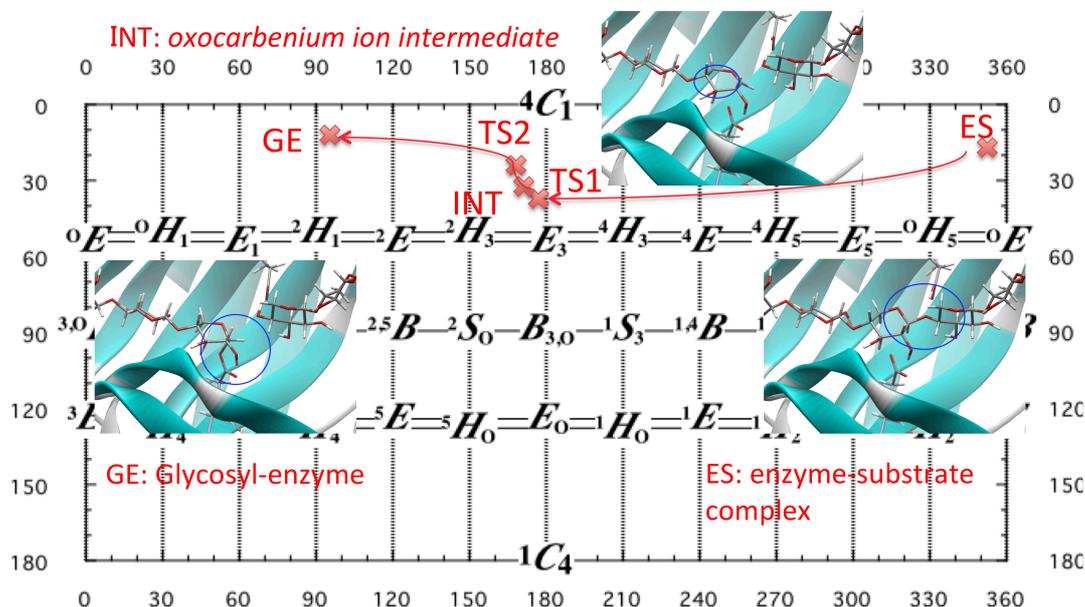


図3 反応の進行に伴った六員環構造の変化を示す Cremer-Pople ダイアグラム

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Toyokazu Ishida*, Jerry M. Parks, and Jeremy C. Smith*	4. 巻 142
2. 論文標題 Insight into the Catalytic Mechanism of GH11 Xylanase: Computational Analysis of Substrate Distortion Based on a Neutron Structure	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of the American Chemical Society	6. 最初と最後の頁 17966-17980
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/jacs.0c02148	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 2件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Toyokazu Ishida, Jerry M. Parks, Jeremy C. Smith
2. 発表標題 バイオマス分解酵素（Xylanase）の反応機構
3. 学会等名 第15回分子科学討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Toyokazu Ishida, Jerry M. Parks, Jeremy C. Smith
2. 発表標題 バイオマス分解酵素（Xylanase）の反応機構
3. 学会等名 第15回分子科学討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Toyokazu Ishida, Jerry M. Parks, Jeremy C. Smith
2. 発表標題 バイオマス分解酵素の反応機構
3. 学会等名 第33回分子シミュレーション討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Toyokazu Ishida, Jerry M. Parks, Jeremy C. Smith
2. 発表標題 バイオマス分解酵素の触媒機構
3. 学会等名 日本化学会第100 春季年会 (2020)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 石田 豊和
2. 発表標題 Computational Analysis of Carbohydrate Recognition based on ab initio QM/MM Modeling
3. 学会等名 ICPAC Langkawi 2018 (International Congress on Pure & Applied Chemistry Langkawi) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 石田 豊和
2. 発表標題 Computational analysis of carbohydrate recognition mechanism in proteins (計算科学によるタンパク質の糖鎖認識機構の解析)
3. 学会等名 The 9th NTChem WorkShop (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石田 豊和
2. 発表標題 Computational analysis of carbohydrate recognition based on hybrid QM/MM approach (複合分子モデリング技術による糖鎖認識機構の解析)
3. 学会等名 日本化学会 第99春季年会 (2019)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
米国	Oak Ridge National Laboratory (ORNL)		