

平成 22 年 6 月 10 日現在

研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19750021
 研究課題名（和文） 複合的シミュレーション手法を用いた酵素機能の理論予測
 研究課題名（英文） Theoretical Analysis of Enzymatic Functions based on Hybrid-Computational Modeling
 研究代表者
 石田 豊和 (ISHIDA TOYOKAZU)
 独立行政法人産業技術総合研究所・計算科学研究部門・研究員
 研究者番号：70443166

研究成果の概要（和文）：

近年の計算機資源の飛躍的な性能向上と理論計算手法の新たな展開に伴って、タンパク質の立体構造を露に考慮した生体分子の理論計算は現実的な研究課題となった。中でも化学反応の究極のターゲットとして、酵素反応の理論計算は重要な研究課題となっている。本課題では、非経験的電子状態計算と経験的分子力場関数を組合せたQM/MM法を開発、応用する事で、酵素活性の触媒原理を原子レベルで明らかにする研究を実行した。

研究成果の概要（英文）：

Owing to the rapid progress of computational architecture and the advance of new chemical theories for treating large molecular systems, understanding complex chemical reactions in the condensed phase is becoming one of the important issues in modern theoretical chemistry. Before the mid 90's, mainly due to a lack of computational power, the major target of quantum chemistry was limited to simple chemical reactions in the gas phase. At present, however, various types of chemical reactions in the condensed phase (e.g. reactions in solutions, on surfaces, inside proteins, and so on) have become realistic targets for theoretical and computational studies.

In the field of biochemistry, understanding the nature of enzyme functions at atomistic level is one of the most important issues. Despite the intensive work over past decades, however, there is still no quantitative understanding of how enzymes work. Now, understanding the structure-function relationships of enzyme reactions is becoming a more and more important problem. In this research project, we developed a hybrid QM/MM modeling procedure combined with MD simulations and all-electron QM calculations for the entire protein matrix. By selecting typical protein systems, we then performed a systematic computational analyses based on QM/MM computations and discussed the major catalytic factors in typical enzyme reactions.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,700,000	0	2,700,000
2008年度	500,000	150,000	650,000
2009年度	500,000	150,000	650,000
年度			
総計	3,700,000	300,000	4,000,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：基礎化学・物理化学

キーワード：酵素反応、生体化学反応論、電子状態、分子動力学、QM/MM 計算

1. 研究開始当初の背景

近年の計算機資源の飛躍的な性能向上と理論計算手法の新たな展開に伴って、理論化学研究の対象とする現象は飛躍的に拡大し、実在系を対象とした複雑な化学現象の取り扱いも現実の課題となりつつある。特に2000年頃から、電子状態計算と分子力場計算を組合せたQuantum Mechanical / Molecular Mechanical (QM/MM)法が実用的な計算手法として広く普及し始めたため、現在では凝縮相で見られる現実的なスケールの反応（溶液内化学反応、固体表面の吸着・触媒反応、タンパク質内化学反応）も、理論計算により解析可能となりつつある。中でも特に、タンパク質の立体構造を露に考慮した生体分子の理論計算は近年最も進展の著しい研究領域であり、化学反応の究極のターゲットとして、酵素反応の理論計算は世界の多くのグループが挑戦している研究課題の一つである。

酵素反応を計算機シミュレーションで取り扱う場合の最大の困難は、酵素触媒過程の各ステップ（基質認識、化学反応、基質放出）が時間的・空間的にも異なった階層で進行するため、単一の計算手法（例えば非経験的電子状態計算や古典分子動力学計算）を用いて現象を一元的に解析する事が殆どの場合不可能である点である。そこで現実問題としては、量子化学計算や分子動力学計算など、既に確立した分子シミュレーション技法を組合せた複合的モデリング技術を開発する事が最重要だと考えられる。現時点においても計算時間などの制約から、多くのQM/MM計算では半経験

的計算（及び類似の手法）が用いられ、またポテンシャルエネルギーを計算する事で酵素反応が議論されるのが実状で、かつ生体分子系に対する自由エネルギー計算そのものが困難であることから、自由エネルギー面を基礎とした酵素反応の理論解析はまだ多くの技術的困難を抱えた研究課題である。この様な現状から、非経験的電子状態計算を基礎とした酵素反応の自由エネルギー計算、およびその反応機構の詳細な解析は、世界の多くのグループが挑戦している理論化学分野の最先端のテーマの一つとなっている。

2. 研究の目的

上記の様な研究背景を踏まえた上で、本研究採択課題では、大規模かつ高精度な非経験的量子化学計算と分子動力学計算を組合せた複合シミュレーション技術を基礎として、タンパク質核酸など生体高分子の構造機能相関を理論計算により明らかにする事を目的とした研究を実行する。中でも特に触媒機能を持つ酵素反応の分子モデリング技術の開発に力点を置き、現実的な水和タンパク質環境を考慮した分子モデルを基に、酵素の作用機構を原子レベルで明確にする事を本研究課題の目標としている。

酵素反応の触媒因子として考えられる要素は幾つかあるが、本研究では特に（1）タンパク質の極性環境に由来する静電相互作用の重要性、（2）反応にともなったタンパク質の構造変化の効果、の2点に注目して、必要な理論計算手法の開発とプログラムへの実装、そして具体系への適用計算を平行して実行す

る事で、酵素機能とタンパク質立体構造の相関を明らかにする研究を行う。

3. 研究の方法

過去の多くの研究成果から、酵素反応の重要な触媒因子として、「タンパク質の極性環境が作り出す静電相互作用による、遷移状態の相対的安定化が重要」と主張される。そこで本研究課題では、この反応機構の典型例とされ、簡単な反応機構で触媒作用を示す酵素、Chorismate Mutase (CM)をモデル酵素に選び、以下に述べる計算手法を用いて、量子化学計算をベースとした一連の大規模計算を実行した。

計算手法に関して、これまで開発を続けて来た(タンパク質場の静電的環境を考慮した electrostatic embedding schemeに基づく)独自のQM/MM計算プログラムの機能拡張を行なう事で、ベースとなる計算手法の準備を行なった。これと平行して、具体的な酵素システムの反応解析を実行した。酵素反応プロファイルの計算は自由エネルギー計算が基礎となるが、現時点での現実的な計算環境を考えて、適切な反応経路に沿って近似的に自由エネルギー変化を見積もる手段をとり、QM/MM計算と分子動力学計算を組み合わせる事で、反応自由エネルギー変化を効率よく計算できる手法を整備した。またタンパク質静電場の効果の取扱いであるが、標準的なQM/MM計算では古典的な分子力場で近似する為、分子力場関数の精度に大きく左右され、多体分極の効果は通常無視される。この影響を見積もる為に、北浦和夫らにより提案されたフラグメント分子軌道法(FMO)を部分的に併用し、酵素全体の電子状態計算から電子分極の効果を評価する事も行ない、現時点でのQM/MMモデリング技術の妥当性の評価を行なった。

4. 研究成果

(1) QM/MMプログラムの整備拡張:

これまで作成して来たプログラムをもとに機能拡張を続け、QM領域が百原子程度、MM領域が5万原子弱程度のシステムに関しては、RHF/6-31G*レベルの計算でエネルギー計算、構造最適化、(伝統的な反応経路モデルの範疇での)反応経路計算が安定に実行できるよう整備した。現時点で数万原子系のナノ秒オーダーのQM/MM MDの実行は現実的ではないので、代わりに反応経路に沿ってシミュレーションを実行し、サンプルされた構造に対して数千程度のQM/MM計算を実行して物性やエネルギー成分の統計解析が可能となる様に拡張した。

(2) Chorismate Mutaseの反応機構:

Bacillus subtilis Chorismate Mutase の天然型酵素の結晶データを初期構造としてリアルな分子モデルを構築し、QM/MM計算による反応経路のモデリングとFMO法を組合せた系統的な解析手段を提案し、酵素反応過程におけるタンパク質環境の静電場効果を特に詳細に検討した。

複数の初期構造を用いて得られた反応経路モデルに対して、QM/MM、FMOの両手法でHF/MP2/B3LYPレベルのエネルギープロファイルを詳細に計算し、両者を比較する事でQM/MM計算で無視されているMM領域(タンパク質の大部分)の電子分極の寄与を見積もった。一連の系統的計算の結果、反応基質の電子状態変化にตอบสนองして分極するタンパク質の領域も、(Chorismate Mutaseの場合には)活性中心近傍のアミノ酸残基に限られ、これらアミノ酸残基をQM領域に加える事でQM領域を広く定義した反応経路モデルでは、QM/MM、FMO法ともにほぼ同様のエネルギープロファイルが再現される事が分かった。これらの結果は、タン

パク質本体の多体分極効果を無視したQM/MM法でも反応の本質がほぼ記述できている事を示している。また ab initio QM/MMレベルでの、反応経路に沿った直接のサンプリング計算を実行して、構造と電場の揺らぎの程度を見積もり、タンパク質内での静電相互作用の強さや分極の程度を統計平均をもとに評価した。この反応系においては遷移状態の静電相互作用による安定化の寄与が大きい事を改めて定量的に示した結果が得られた。

この天然型酵素の詳細な反応機構解析に続いて、自由エネルギー計算、QM/MMサンプリング計算、FMO計算を組合せた階層的モデル化手段を用いて、変異型酵素の反応性低下の詳細な解析に取り組んだ。この酵素に関してはこれまでの一連の研究結果から、ドメイン2上のArg7, Glu78, Arg90が触媒活性に必須のアミノ酸残基と判明している。そこでこの残基を系統的に変化させた変異型酵素の反応解析を通して、特にアミノ酸変異導入の効果を、1)電子状態の変化が反応に及ぼす影響と2)タンパク質ダイナミクスが反応に及ぼす影響の2点から考察する事を試みた。前者について、変異導入に伴う電子状態の影響はアミノ酸置換の局所的な部位に限定され、タンパク質全体に及ぶ分極効果は特に見られない。これは化学反応そのものは活性中心近傍のみで制御され、天然型酵素の反応中心の静電環境が最適にデザインされている事(言い換えると、変異の導入による電子状態変化に対しタンパク質環境はロバストである事)を示唆している。これとは対照的に、アミノ酸残基ペアの相関運動から反応過程におけるタンパク質全体の構造変化を解析すると、変異導入に伴うタンパク質ダイナミクスの影響は活性中心遠方まで及び、変異の影響はタンパク質ダ

イナミクスを介して適時調節されうる事が示唆された。

(3)糖タンパク質の糖鎖認識機構の分子モデリング:

糖鎖を特異的に認識して結合するタンパク質(レクチンと呼ぶ)は、その生理的に重要な役割に反して、これまであまり理論計算の対象とされてこなかった。大きな理由としては、(1)高分解能の結晶構造に基づいたタンパク質-糖鎖複合体の情報の不足、(2)信頼性のある糖鎖の分子力場の開発が(タンパク質/核酸と比べて)遅れている、事等が挙げられる。そこで我々は、レクチンの代表としてヒトセレクチンを対象に選択し、糖鎖とタンパク質の糖鎖認識を解析する為の方法論の開発を目指すとともに、具体的な実証計算を通じて、糖鎖認識機構の分子レベルの情報を引出す事を目標とした計算を実行した。

これまでの研究結果から、構造比較ベースの解析では糖鎖の様な弱い高次複合体の解析は困難な事が明らかとなったので、別途解析手法の開発を試みた。問題設定として、「溶液中でタンパク質が基質である糖鎖を結合した状態を自由エネルギー空間上での安定構造間の状態遷移」だととらえ、自由エネルギー空間上での糖鎖の安定構造集団を抽出する事を試みた。この場合の自由エネルギー面は、(1)糖鎖の溶媒和自由エネルギーと(2)糖鎖の配座の内部エネルギーの2つの情報を反応座標に選択した2次元エネルギー面である。この様な糖鎖結合状態を定義する自由エネルギー面の定義の下で、分子動力学計算とab initio QM/MM計算を組合せた大規模計算を実行する事で、実際にEセレクチン・シアリルルイスX複合体を対象としたQM/MMレベルの2次元自由エネルギー面の計算を実行した。そしてモデリング手法の妥当性を評価する為に、

実験結果と対応し、かつ自由エネルギー空間内で糖鎖結合を特徴づける2つのパラメータ、(1) Bioactive conformationと(2) Binding Epitopeを抽出する事に成功した。また実験結果との整合性をとるため、QM/MMレベルで糖鎖の化学シフト計算を実際に評価して、実験結果との比較を通してモデリング手法の妥当性を確かめた。

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)

Toyokazu Ishida, “ Effects of Point Mutation on Enzymatic Activity: Correlation between Protein Electronic Structure and Motion in Chorismate Mutase Reaction”, *Journal of the American Chemical Society*, 査読有, vol.132, no.20, 2010年, p.7104-7118,

Toyokazu Ishida, “ Computational Modeling of Carbohydrate Recognition Process in E Selectin Complex: Structural Mapping of Sialyl Lewis X onto Ab Initio QM/MM Free Energy Surface “, *The Journal of Physical Chemistry B*, 査読有, vol.114, no.11, 2010年, p.3950-3964,

Toyokazu Ishida, “ Probing Protein Environment in an Enzymatic Process: All-Electron Quantum Chemical Analysis combined with ab initio Quantum Mechanical / Molecular Mechanical Modeling of Chorismate Mutase “, *Journal of Chemical Physics*, 査読有, vol.129, no.12, 2008年, 125105 (14 pages),

Toyokazu Ishida, “ Toward Accurate Modeling of Enzymatic Reactions: All Electron Quantum Chemical Analysis combined with QM/MM Calculation of Chorismate Mutase “, *AIP Conference Proceedings: SELECTED PAPERS FROM ICNAAM 2007 AND ICCMSE 2007*, 査読有, vol.1046, 2008年, p.7-10,

[学会発表](計 17 件)

石田豊和, 「糖タンパク質の糖鎖認識機構の分子モデリング」, 第90回日本化学会第90春季年会, 2010年 3月 26日, 近畿大学,

石田豊和, 「複合モデリング計算によるタンパク質機能の理論解析: タンパク質分解酵素を例として」, 第82回日本生化学会大会, 2009年 10月 24日, 神戸ポートアイランド,

石田豊和, 「ODCaseの酵素触媒機構」, 第3回分子科学討論会, 2009年 9月 23日, 名古屋大学東山キャンパス,

石田豊和, 「糖タンパク質の糖鎖認識機構の分子モデリング」, 第12回理論化学討論会, 2009年 5月 29日, 東京大学本郷キャンパス,

石田豊和, 「階層的計算手法を用いたセレクチンの糖鎖認識機構の解析」, 第9回日本蛋白質科学年会, 2009年 5月 22日, 熊本全日空ホテル,

Toyokazu Ishida, “ Probing Protein Environment in Enzymatic Process based on Hybrid Computational Modeling: Case Study of Chorismate Mutase Catalysis “, BIT 's 2nd Annual Protein and Peptide Conference (PepCon 2009), 2009年 4月 3日, Seoul, South Korea,

Toyokazu Ishida, “ Computational Modeling of Carbohydrate Recognition Process in Selectins “, *Computational Sciences Workshop 2008 (CSW2008)*, 2008年 12月 10日, エポカルつくば,

石田豊和, 「糖タンパク質-糖鎖複合体の階層的分子モデリング」, 第22回分子シミュレーション討論会, 2008年 11月 18日, 岡山大学,

石田豊和, 「糖タンパク質セレクチンの糖鎖認識機構」, 第2回分子科学討論会(福岡), 2008年 9月 26日, 福岡国際会議場,

石田豊和, 「セレクチン-糖鎖複合体の構造解析: 複合シミュレーションによるアプローチ」, 日本化学会第2回関東支部大会(2008), 2008年 9月 19日, 群馬大学桐生キャンパス,

Toyokazu Ishida, “ Theoretical Modeling of Ligand Recognition Process in Selectin Complex “, *International Conference on*

Multi-scale Simulations of Biological and Soft Materials (MSBSM2008)、2008年6月19日、Akihabara Convention Hall 5B、

石田豊和、「複合的モデリングを用いた酵素反応におけるタンパク質環境の解析：chorismate mutase を例として」、第8回日本蛋白質科学会年会、2008年6月10日、タワーホール船堀、東京、

Toyokazu Ishida, “Hybrid Modeling Study of a Ligand Recognition Process in Selectin-Carbohydrate Complex ”、1st International Conference of The Grand Challenge to Next-Generation Integrated Nanoscience、2008年6月6日、東京国際交流館、日本科学未来館、

Toyokazu Ishida, “Theoretical Perspectives on the Reaction Mechanism of Serine Proteases ”、BIT's 1st Annual Protein and Peptide Conference (PepCon 2008)、2008年4月22日、Shenzhen, China

Toyokazu Ishida, “Toward Accurate Modeling of Enzymatic Reactions: All Electron Quantum Chemical Analysis combined with QM/MM Calculation of Chorismate Mutase ”、International Conference of Computational Methods in Sciences and Engineering 2007 (ICCMSE 2007)、2007年9月26日、Corfu, Greece、

石田豊和、「タンパク質・糖鎖認識機構の分子モデリング」、第1回分子科学討論会2007、2007年9月19日、東北大学川内北キャンパス、

石田豊和、「酵素反応の詳細な理解に向けて：QM/MM + 全電子計算によるタンパク質環境の解析」、第10回理論化学討論会、2007年5月16日、名古屋大学野依記念学術交流館、

〔図書〕(計 1 件)

Toyokazu Ishida, “Modeling Protein Environment in an Enzymatic Catalysis: A Case Study of the Chorismate Mutase Reaction ”、Book chapter in “*The Fragment Molecular Orbital Method: Practical Applications to Large Molecular Systems*”、Chapter 11、p.245-268、2009年、CRC press (Taylor & Francis group)、

6 . 研究組織

(1)研究代表者

石田 豊和 (ISHIDA TOYOKAZU)
独立行政法人産業技術総合研究所・計算科学研究部門・研究員
研究者番号：70443166