

令和 6 年 4 月 4 日現在

機関番号：25403

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K04985

研究課題名（和文）金属酵素の酵素反応機構およびリガンド相互作用の定量的解明

研究課題名（英文）Quantitative prediction of reaction mechanisms catalyzed by metalloproteins and of protein-ligand interactions

研究代表者

齋藤 徹 (Saito, Toru)

広島市立大学・情報科学研究科・准教授

研究者番号：80747494

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：疾患の原因となる金属酵素のはたらきを阻害する医薬品設計に貢献すべく、酵素反応過程や阻害過程をコンピュータ上で追跡できる分子シミュレーション基盤技術を構築した。得られた結合自由エネルギーに基づき、結合の仕方や結合の強さが基質と阻害剤とでどのように異なるのかを定量的に示すことができた。半経験的量子化学（SQM）計算と機械学習（ML）を併用したSQM/MLモデルを開発し、予測が困難な薬物代謝部位や反応速度定数を高速かつ高精度に予測できるようにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

金属酵素のはたらきを理解するためには、タンパク質全体の構造情報に加えて反応速度や結合親和性などの定量的な情報が重要となる。金属酵素活性部位の電子状態は複雑なため、既存のアプローチでは十分な追跡が行えない状況にあった。本研究により、金属酵素の高次構造と活性部位の化学反応過程を同時にかつ定量的に解析できるようになったことは大変意義深く、国内外を問わず当該研究分野の先導的役割を果たすと考える。本アプローチは、がん細胞のDNAとシスプラチンなどの金属含有薬剤との相互作用解析や人工酵素の設計にも展開でき、医薬品設計、材料設計など各方面への波及効果が期待される。

研究成果の概要（英文）：To contribute to the design of drugs that inhibit enzymatic activity of metalloproteins responsible for diseases, we made it possible to track enzymatic conversion processes and inhibitory processes by means of molecular simulation techniques. Computed binding free energies quantitatively evaluate the differences between substrates and inhibitors in binding affinities. We constructed a fast, accurate, and fully-automated tool that combines semi-empirical quantum mechanical (SQM) calculations and machine-learning (ML) approach to predict sites of metabolism and reaction rate constants.

研究分野：計算化学

キーワード：金属酵素 擬縮退電子系 量子/古典混合分子動力学 機械学習 競合的阻害剤

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

金属酵素は、タンパク質立体構造と活性部位の配位構造・電子状態が協同的かつ柔軟に変化することで、多様な機能が発現される。疾患の原因となる金属酵素に対しては、中心金属と配位結合して活性を低下させる競合的阻害剤の開発が行われており、その設計にはタンパク質全体の構造情報に加えて反応速度や結合親和性などの定量的な情報が重要となる。定量的な情報は、量子化学(QM)計算を用いて化学反応過程のエネルギー、構造、電子状態の時間変化を追跡すれば得られる。反応中心をQM、残りを古典力学(MM)で扱う量子/古典混合近似分子動力学(QM/MM-MD)法が有効な解決法として提案されているが、金属酵素への適用は未だ困難である。QM領域の原子数の多さと擬縮退電子状態の複雑さが相まって、精度を確保するために必要なQM計算の時間が膨大となり、MD計算による十分な追跡が行えないためである。したがって、金属酵素の機能解明および阻害剤の合理的設計の効率化に有用な定量的な情報を得るための方法が求められている。

### 2. 研究の目的

競合的阻害剤の設計指針を見いだすために、金属酵素の化学反応過程を追跡できる分子シミュレーション基盤技術を構築し、定量的な情報から酵素反応機構およびリガンドの結合機序を解明することが本研究の目的である。擬縮退電子系を対象としたQM計算の精度・コストの両問題の改善に取り組んできた経験を生かし、金属酵素の活性部位を高速に、かつ十分高精度な計算データの取得を目指す。構築した基盤技術を用いて、金属酵素ウレアーゼによる基質尿素の加水分解の反応機構を自由エネルギー曲面から定量的に解析するとともに、ウレアーゼ競合阻害剤の結合様式ならびに阻害機構を解明する。実験による各阻害剤の50%阻害濃度(IC50)と得られた計算データを比較することにより、阻害剤設計の指針となりうる定量的な情報を明らかにする。

### 3. 研究の方法

QM領域の階層を2つに分割し、中心金属および中心金属に配位結合している原子付近には高精度な近似スピン射影密度汎関数理論、その他には高速な半経験的手法であるrPM6、GFN2-xTBなどのSQMを割り当てた、QM(AP-UDFT:SQM)/MM-MDシミュレーションを実施可能とする。提案手法を用いて金属酵素ウレアーゼによる尿素加水分解の反応機構解明に取り組む。活性部位における架橋および配位水分子のプロトン化状態(OHもしくはH<sub>2</sub>O)および尿素が最初に中心金属のNi(II)に配位する様式が不明瞭(単座もしくは二座配位)であるため、まずは配位様式と活性部位のプロトン化状態を決定することからはじめた。次いで、架橋化学種が尿素のカルボニル炭素に求核攻撃し四面体中間体を生成する過程、ならびにアンモニアとカルバミン酸に分解する過程の自由エネルギー曲面を求めた。得られた活性化自由エネルギー、遷移状態構造、電荷分布、軌道相互作用などを複合的に解析し、最適な反応機構を決定した。また、結合自由エネルギーに基づいて基質と既存の阻害剤であるヒドロキシ尿素、AHA、NBPTOとの結合様式や結合親和性の相違点を調べた。

### 4. 研究成果

#### (1) QM(AP-UDFT:SQM)/MM-MDシミュレーションの開発

QM(AP-UDFT:SQM)の分割にはONIOM法を用い、スピン密度の大きさに応じて領域を自動分割するコードを作成した。これを開発してきたコードに追加し、NAMD QM-MMインターフェイスに実装することで、MM-MD計算コードへのQM(AP-UDFT:SQM)のデータの受け渡しをはじめ、開発コードを介したQM(AP-UDFT:SQM)/MM-MD計算を実施可能とした(図1)。複核金属中心を有するウレアーゼに適用し、問題なく動作することを確認した。

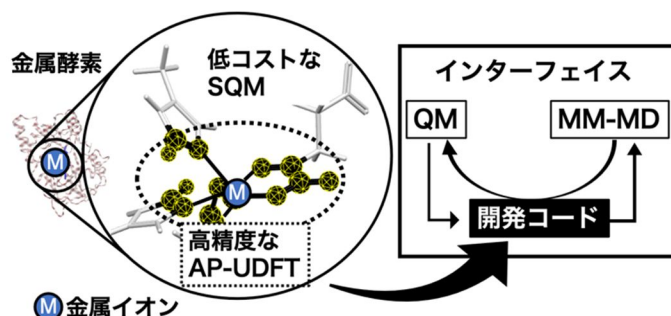


図1: 金属酵素に適用可能なQM(AP-UDFT:SQM)/MM-MDシミュレーション

## (2) ウレアーゼによる尿素加水分解の反応機構とウレアーゼ阻害剤の結合様式ならびに阻害機構の解明

AP-UDFT を適用する原子数を最小限に抑えたとしても一回の計算に数分要してしまうため、メタダイナミクスシミュレーションを用いたとしても自由エネルギー曲面の算出は難しいことが判明した。ウレアーゼの活性部位に関しては SQM の GFN2-xTB でも比較的高精度に分子構造が得られることから、GFN2-xTB/MM メタダイナミクスシミュレーションを代わりに用いた。その結果、尿素が単座配位ではなく二座配位で結合し(図 2)、求核攻撃と次いで起こる Asp363 を介したプロトン移動により加水分解反応が進行しうることを示した。単座モデルと比べて二座モデルの方が圧倒的に有利(23.1 kcal/mol vs. 4.0 kcal/mol)であることを見出し、議論に決着をつけることができたと言える。

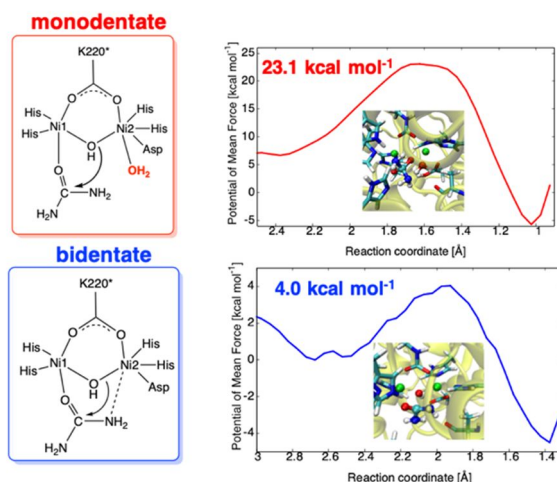


図 2: 尿素が単座もしくは二座配位した活性部位と求核攻撃過程における自由エネルギープロファイル

次に、種々のウレアーゼ競合阻害剤(ヒドロキシ尿素、AHA、NBPTO)の結合様式ならびに阻害機構を調べた。GFN2-xTB/MM メタダイナミクスシミュレーションから各阻害機構における活性化自由エネルギーおよび反応自由エネルギーを算出し、NBPTO > AHA > ヒドロキシ尿素の順に酵素-阻害剤複合体を形成しやすい(結合親和性が高い)ことを示した。また、これらの結果と IC50 値との間に強い相関関係が見られた(表 1)。

表 1: 計算データと実験データの比較 (単位: kcal/mol)

	活性化自由エネルギー	反応自由エネルギー	RT ln(IC <sub>50</sub> )
HU	5.1	-26.4	-5.5
AHA	4.7	-27.1	-6.0
NBPTO	0.0	-34.8	-11.9

## (3) SQM/ML に基づくアルデヒドオキシダーゼの代謝部位予測法の開発

cytochrome P450 に対する代謝耐性の高い含窒素複素環化合物は、別の代謝酵素アルデヒドオキシダーゼによる求核攻撃を受けやすいという欠点を有する。コンピュータを用いた代謝部位予測法として、ChemDraw で計算した <sup>13</sup>C-NMR 化学シフトに基づく SOM 予測が有用とされている。しかし、代謝部位数に関する予備知識が必要であることと、化合物の描画と化学シフトの出力を手動で行う必要があることから、自動予測という課題は達成できていない。そこで本研究では、半経験的量子化学計算(SQM)と機械学習(ML)を組み合わせた SQM/ML を用いて化学シフトの代替となるスコアと代謝部位予測ワークフローを提案し、この問題を解決した(図 3)。

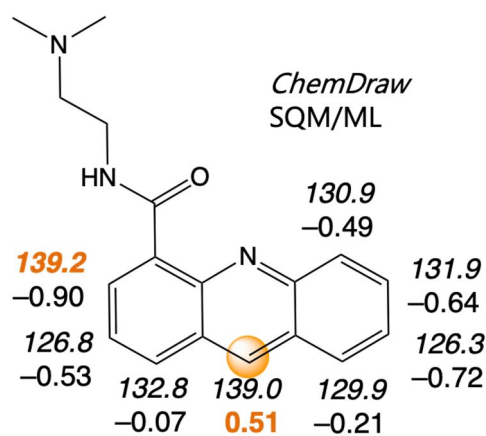


図 3: DACA の代謝部位予測 (SQM/ML のみ正解)

#### (4) SQM/ML に基づく C-H 結合解離エネルギー予測法の開発

BDE を高速かつ高精度に予測する方法として、DFT の計算データを再現するグラフニューラルネットワークモデルが既に提案されている。DFT による計算データはバラツキが大きいことは以前から指摘されているため、本研究ではより高精度な CBS-QB3 計算による BDE のデータセットである BSE49 を参照値とする AI 予測モデルを開発した。BSE49 のデータ数は 300 程度に限られているため、構造情報に加えて SQM から算出された物性パラメータを記述子とする SQM/ML モデルを構築した (図 4)。SQM/ML モデルによる予測は CBS-QB3 の計算結果を数 10 万倍の 1 の速さで非常に良く再現することを示した。

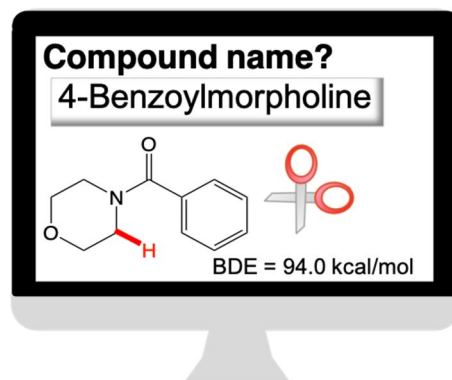


図 4: SQM/ML による BDE 予測

#### (5) 国際共同研究

ニューヨーク市立大学の Liu グループと実験と理論による国際共同研究を実施し、臭素を導入したグアニンカチオンラジカルカチオンへの一重項酸素による酸化反応、Watson-Crick 型塩基対におけるグアニンラジカルカチオン種と一重項酸素との反応に関する成果を学術論文誌に発表した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Moe May Myat, Saito Toru, Tsai Midas, Liu Jianbo	4. 巻 126
2. 論文標題 Singlet O <sub>2</sub> Oxidation of the Radical Cation versus the Dehydrogenated Neutral Radical of 9-Methylguanine in a Watson-Crick Base Pair. Consequences of Structural Context	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Physical Chemistry B	6. 最初と最後の頁 5458 ~ 5472
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jpcc.2c03748	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

1. 著者名 Suenaga Shunya, Takano Yu, Saito Toru	4. 巻 28
2. 論文標題 Unraveling Binding Mechanism and Stability of Urease Inhibitors: A QM/MM MD Study	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 2697 ~ 2697
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/molecules28062697	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 齋藤徹	4. 巻 25
2. 論文標題 開殻電子状態を有する生体高分子の分子シミュレーション	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 アンサンブル	6. 最初と最後の頁 13 ~ 18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

1. 著者名 Benny Jonathan, Saito Toru, Moe May Myat, Liu Jianbo	4. 巻 126
2. 論文標題 Singlet O <sub>2</sub> Reactions with Radical Cations of 8-Bromoguanine and 8-Bromoguanosine: Guided-Ion Beam Mass Spectrometric Measurements and Theoretical Treatments	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Physical Chemistry A	6. 最初と最後の頁 68 ~ 79
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jpca.1c09552	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

1. 著者名 Saito Toru, Takano Yu	4. 巻 126
2. 論文標題 QM/MM Molecular Dynamics Simulations Revealed Catalytic Mechanism of Urease	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Physical Chemistry B	6. 最初と最後の頁 2087 ~ 2097
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jpcc.1c10200	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Shiotake Yuto, Takano Yu, Saito Toru	4. 巻 833
2. 論文標題 Semi-empirical and machine learning-based prediction of site of metabolisms mediated by aldehyde oxidase	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Chemical Physics Letters	6. 最初と最後の頁 140942 ~ 140942
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cpllett.2023.140942	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kaneko Miki, Takano Yu, Saito Toru	4. 巻 53
2. 論文標題 C-H bond dissociation enthalpy prediction with machine learning reinforced semi-empirical quantum mechanical calculations	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 upae016
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/chemle/upae016	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計30件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Toru Saito
2. 発表標題 Evaluation of Free Energy Profiles for Reactions Catalyzed by Metalloproteins
3. 学会等名 第22回日本蛋白質科学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 J. Benny, T. Saito, M. M. Moe, J. Liu
2. 発表標題 Singlet O <sub>2</sub> oxidation dynamics of 8-Bromoguanine radical cations using guided-ion-beam tandem mass spectrometry
3. 学会等名 ACS fall (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Toru Saito
2. 発表標題 Computational Approach towards Binuclear Metal Centers in Proteins
3. 学会等名 錯体化学会第72回討論会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 齋藤徹, 藤原竜也, 鷹野優
2. 発表標題 ID01によるトリプトファン酸化反応の分子シミュレーション
3. 学会等名 第55回酸化反応討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 塩竹悠人, 藤谷姫菜, 齋藤徹, 鷹野優
2. 発表標題 簡便なCYP3A4代謝部位予測モデルの構築
3. 学会等名 2022年日本化学会中国四国支部大会広島大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 卜部孝幸, 齋藤徹, 鷹野優
2. 発表標題 QM/MM MD計算を用いた含フラビン酵素の研究
3. 学会等名 2022年日本化学会中国四国支部大会広島大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤原竜也, 齋藤徹, 鷹野優
2. 発表標題 ID01による一重項酸素生成とトリプトファンの選択的酸化の理論的研究
3. 学会等名 2022年日本化学会中国四国支部大会広島大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 末永隼也, 齋藤徹, 鷹野優
2. 発表標題 QM/MM MD計算を用いたヒドロキシ尿素のウレアーゼ阻害作用の解明
3. 学会等名 2022年日本化学会中国四国支部大会広島大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 森下美咲, 齋藤徹, 鷹野優
2. 発表標題 DNA-シスプラチン結合のQM/MM-MD計算
3. 学会等名 2022年日本化学会中国四国支部大会広島大会
4. 発表年 2022年



1. 発表者名 塩竹悠人, 藤谷姫菜, 齋藤徹, 鷹野優
2. 発表標題 物理化学パラメータに基づく薬物代謝部位予測
3. 学会等名 第50回構造活性相関シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 末永隼也, 齋藤徹, 鷹野優
2. 発表標題 QM/MM MD計算を用いた阻害剤のウレアーゼへの結合機構の解明
3. 学会等名 第50回構造活性相関シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 末永隼也, 齋藤徹, 鷹野優
2. 発表標題 QM/MM MD 計算を用いた様々なウレアーゼ阻害剤の結合機構の解明
3. 学会等名 第45回ケモインフォマティクス討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 末永隼也, 鷹野優, 齋藤徹
2. 発表標題 QM/MM MDシミュレーションを用いたウレアーゼ阻害能の定量的評価
3. 学会等名 凝縮系の理論化学2023
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 塩竹悠人, 鷹野優, 齋藤徹
2. 発表標題 アルデヒドオキシダーゼの代謝部位予測
3. 学会等名 凝縮系の理論化学2023
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 藤原竜也, 齋藤徹, 鷹野優
2. 発表標題 ID01による一重項酸素生成とトリプトファンの選択的酸化の量子化学計算
3. 学会等名 日本化学会第103春季年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 末永隼也, 齋藤徹, 鷹野優
2. 発表標題 自由エネルギーに基づく様々な阻害剤のウレアーゼ結合親和性の比較
3. 学会等名 日本化学会第103春季年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 卜部孝幸, 齋藤徹, 鷹野優
2. 発表標題 Baeyer-Villiger酸化酵素の電子移動反応過程の分子シミュレーション
3. 学会等名 日本化学会第103春季年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 塩竹悠人, 鷹野優, 齋藤徹
2. 発表標題 基質の結合解離エネルギーと原子電荷に基づくアルデヒドオキシダーゼの代謝部位予測
3. 学会等名 日本化学会第103春季年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 齋藤徹, 鷹野優
2. 発表標題 インドールアミン-2,3-ジオキシゲナーゼによる一重項酸素生成機構の解明
3. 学会等名 日本コンピュータ化学会 2021年秋季年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 齋藤徹
2. 発表標題 阻害剤設計に向けた金属酵素反応の計算化学的研究
3. 学会等名 「高速分子動画」若手シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 塩竹悠人, 齋藤徹
2. 発表標題 機械学習を用いたアルデヒドオキシダーゼ代謝部位予測
3. 学会等名 第17回分子科学討論会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 塩竹悠人、齋藤徹
2. 発表標題 半経験的手法と機械学習を併用したアルデヒドオキシダーゼ代謝部位予測
3. 学会等名 日本化学会中国四国支部大会山口大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 藤原竜也、齋藤徹
2. 発表標題 ID01 阻害剤設計のためのケモインフォマティクス記述子の検討
3. 学会等名 日本化学会中国四国支部大会山口大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 金子未来、齋藤徹
2. 発表標題 機械学習による C-H 活性化反応の反応速度の予測
3. 学会等名 日本化学会中国四国支部大会山口大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 卜部孝幸、齋藤徹
2. 発表標題 QM/MM-MD計算によるDNA塩基対の二重プロトン移動の機構解明
3. 学会等名 日本化学会中国四国支部大会山口大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 塩竹悠人、齋藤徹
2. 発表標題 半経験的手法と機械学習を併用した薬物代謝部位予測
3. 学会等名 第51回構造活性相関シンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 塩竹悠人、齋藤徹
2. 発表標題 SQM-MLモデルによる結合解離自由エネルギーの予測
3. 学会等名 日本化学会第104春季年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 卜部孝幸、齋藤徹
2. 発表標題 QM計算とQM/MM-MD計算によるDNA塩基対の二重プロトン移動の機構解析
3. 学会等名 日本化学会第104春季年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 藤原竜也、齋藤徹
2. 発表標題 ケモインフォマティクスによるID01阻害剤の結合自由エネルギーの評価
3. 学会等名 日本化学会第104春季年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 金子未来、齋藤徹
2. 発表標題 SQM-MLモデルによる結合解離自由エネルギーの予測
3. 学会等名 日本化学会第104春季年会
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

所属学科のHPに掲載 <a href="https://bis.info.hiroshima-cu.ac.jp/category/%e3%81%8a%e7%9f%a5%e3%82%89%e3%81%9b/">https://bis.info.hiroshima-cu.ac.jp/category/%e3%81%8a%e7%9f%a5%e3%82%89%e3%81%9b/</a> 所属機関のHPに掲載 <a href="https://www.hiroshima-cu.ac.jp/news/c00034085/">https://www.hiroshima-cu.ac.jp/news/c00034085/</a> 所属学科のHPに掲載 <a href="https://bis.info.hiroshima-cu.ac.jp/postnews/page/2/">https://bis.info.hiroshima-cu.ac.jp/postnews/page/2/</a> 所属機関のHPに掲載 <a href="https://www.hiroshima-cu.ac.jp/news/c00032228/">https://www.hiroshima-cu.ac.jp/news/c00032228/</a>
--

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	ニューヨーク市立大学		