

機関番号：32714

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2013

課題番号：22740259

研究課題名(和文) 蛋白質環境下におけるアミノ酸のプロトン親和性変化の量子論的解析

研究課題名(英文) Quantum Mechanical Studies of Proton Affinity of Amino Acid Residues in Protein Environments

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) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：ナノメートルのスケールの生命現象では、プロトンの微視的な振る舞いが重要な役割を担う。本研究では、アミノ酸のプロトン親和性に対する環境の効果を量子論的手法により原子スケールで調べた。それにより、蛋白質の立体構造情報の量子論的解析法の確立と、その構造・機能相関を原子スケールで解明するためのフレームワークの提唱を目指した。(1)水溶液中のアミノ酸単体の環境、(2)プロトン輸送を担うアミノ酸の周りの蛋白質環境(チトクロム酸化酵素)、(3)分解反応を担うアミノ酸の周りの蛋白質環境(ナイロン分解酵素)に対し、各々の蛋白質環境の生理的な構造の意義を第一原理計算の手法を用いてプロトン親和性の観点から解明した。

研究成果の概要(英文)：Protons play crucial roles in biomolecules. We studied the effects of nanoscale environment on proton affinity of amino acid residues using computer simulations based on quantum mechanics. The purpose of this study is to develop quantum mechanical analysis of structural information of proteins

In this study, we focused on the three environments:(1)the environment around isolated amino acid residues in solution, (2) the environment around amino acid residues working for proton pumping activity in cytochrome c oxidase, (3) the environment around amino acid residues working for amide-bond cleavage reaction in nylon-oligomer hydrolase. The present computer simulations based on quantum mechanics highlight the importance of physiological protein structures in terms of proton affinity.

研究分野：数物系科学

科研費の分科・細目：物理学・数理物理・物性基礎

キーワード：ナノ・バイオ 蛋白質 計算物理学 アミノ酸 プロトン親和性 第一原理計算 構造・機能・電子状態 密度汎関数理論

1. 研究開始当初の背景

ナノメートルのスケールの生命現象では、プロトンの微視的な振る舞いが重要な役割を担う。蛋白質中のプロトンの挙動は、構成要素であるアミノ酸のプロトン親和性に支配される。このプロトン親和性は、アミノ酸とその周囲の環境との相互作用で決まる。蛋白質の立体構造解析によれば、反応の核となる部位（活性部位）にはプロトンの授受が可能なアミノ酸が頻繁に存在する。それらのアミノ酸の周りの環境は、水溶液環境とは著しく異なる異方性の極めて強い環境である。アミノ酸は、その特異な蛋白質環境との相互作用により、水溶液中の場合とは大きく異なるプロトン親和性を獲得する。このようなアミノ酸のプロトン親和性の変化は、活性部位でのプロトン移動反応を引き起こし、それが酵素触媒反応やプロトン輸送反応を促すトリガーとなる。

このような背景から、アミノ酸のプロトン親和性に関する近年の研究動向は、蛋白質環境とアミノ酸の間の相互作用様式や、蛋白質環境の変化によるアミノ酸のプロトン親和性の制御機構を明らかにし、蛋白質の構造と機能との間の相関関係を解明することである。

2. 研究の目的

本研究では、アミノ酸のプロトン親和性に着目し、その周囲の環境の効果を量子論的手法により原子スケールで解明する。水溶液環境から蛋白質環境へのシームレスな研究により、蛋白質環境の特異性を明らかにし、環境の変化によるアミノ酸のプロトン親和性の制御機構を解明する。それにより、蛋白質の立体構造の情報を量子論的に解析するための方法論を確立し、蛋白質の構造と機能との間の相関関係を原子スケールで解明するためのフレームワークを提唱することが、本研究の目的である。

3. 研究の方法

本研究では、アミノ酸の周りの環境として、(1) 水溶液環境、(2) プロトン輸送反応を担うアミノ酸の周りの蛋白質環境（チトクロム酸化酵素を例に）、(3) 基質分解反応を担うアミノ酸の周りの蛋白質環境（ナイロン分解酵素を例に）、の3つの環境を検討する。これらの環境下でのアミノ酸のプロトン受取/放出反応を、量子論に立脚したコンピューターシミュレーションの手法により解析し、活性化自由エネルギー障壁の算出と反応経路の同定を行う。それらの結果から、蛋白質環境の意義をプロトン親和性の観点から解明する。

4. 研究成果

(1) 水溶液中のアミノ酸単体の周りの環境
水溶液環境におけるアミノ酸のプロトン親和性を量子論的第一原理計算の手法を用

いて調べた。アミノ酸としては、その側鎖の官能基においてプロトンの授受が可能な7個のアミノ酸、すなわち、アスパラギン酸、グルタミン酸、システイン、ヒスチジン、リジン、セリン、およびチロシンを選んだ。プロトン親和性を表す指標であるpKa値を第一原理計算の手法を用いて現実的な計算時間で求める手法を共同研究により開発し、それを上記7つのアミノ酸単体（水溶液中）に対して応用した。その結果、計算で求めたpKa値は実験値と8%以内で一致することが分かった。次に、この手法を、最も単純な水溶性蛋白質であるchignolin (PDB ID: 1UA0) と Trp-cage (PDB ID: 1L2Y) に対して適用し、蛋白質環境中のアミノ酸のプロトン親和性の変化を調べた。その結果、蛋白質の内部にあり、分子内で水素結合をつくるアミノ酸のpKa値は大きく変化することがわかった。他方、蛋白質の表面にあるアミノ酸は、水溶液中で単体に存在するときのpKa値とほとんど変わらない値を示した。これらの結果は、アミノ酸のプロトン親和性には、局所的な水素結合環境が極めて重要であり、そのような環境がより複雑な蛋白質環境下における高次のレベルでのプロトン親和性の調節に関与する可能性を示唆した。

これらの結果をもとに、次の(2)と(3)の研究が行われた。なお、本研究成果に関係する主な発表論文は5. 主な発表論文等の文献②である。

(2) プロトン輸送を担うアミノ酸の周りの蛋白質環境

プロトン輸送蛋白質では、輸送反応を担うアミノ酸のプロトン親和性が環境の変化により調節され、プロトン移動が制御されている。その重要な例としてチトクロム酸化酵素をとりあげた。この酵素は、呼吸作用の最終段階を担うプロトン輸送蛋白質である。その生物機能としては、酸素分子の還元反応とそれに共役したプロトン輸送反応があるが、未だタンパク質内部のプロトンの移動機構は完全に解明されていなかった。プロトン輸送経路の入口では、プロトンは水相から蛋白質内部へと能動的に供給される。プロトンの取り込み過程における最初の受け手としてはこれまで、当該部分に存在するアスパラギン酸残基 (Asp91) のみが考えられていた。しかしながら最近のX線構造解析から、Asp91の近傍にはヒスチジン残基 (His503) が存在することがわかった。そこで、このプロトン輸送経路入口におけるHis503の機能的な役割を明らかにする目的で、Asp91-His503系の可能なプロトン化状態を密度汎関数理論に基づく第一原理計算の手法により探索した。

計算の結果、この系ではAsp91がプロトン化された状態（中性状態）とHis503がプロトン化された状態（電荷分離状態）の二種のプロトン化状態が存在し、それら2つの状態の全エネルギー差は5 kcal/mol であること

がわかった。このことから、プロトン輸送経路入口において Asp91 と His503 は同程度のプロトン親和性を有すること、従って Asp91 と同様に His503 もプロトンの取り込み過程に関与することが示唆された。さらに、当該残基の周りにある水素結合環境が元来 50 kcal/mol も高いエネルギーを持つ電荷分離状態を安定化すること、その結果二つのプロトン化状態の全エネルギー差が巧みに解消されることがわかった。

他方、His503 のアミノ酸は、酵素の酸化還元に伴って側鎖が回転することが、X 線構造解析より明らかになっていた。そこで、このアミノ酸の回転がプロトン親和性に与える影響を、第一原理分子動力学法により詳細に調べた。その結果、His503 の回転による周囲の水素結合環境の変調が、His503 と Asp91 のプロトン親和性を変化させることがわかった。これは、プロトン輸送を担うアミノ酸の回転による構造変化が、プロトンの蛋白質内部への取り込みを促すことを示唆しており、構成アミノ酸残基のプロトン親和性が周囲の水素結合環境により機能的に制御されることを意味する。この結果から、本酵素の生理的な構造と関連したプロトン輸送機構が示唆された。

これらの結果をもとに、次の (3) の研究が行われた。なお、本研究成果に関係する主な発表論文は 5. 主な発表論文等の文献③である。

(3) 分解反応を担うアミノ酸の周りの蛋白質環境

いくつかの分解酵素では、分解反応を担うアミノ酸残基同士が典型的なモチーフ (触媒 3 残基) を形成し、水溶液中とは異なるプロトン親和性を獲得して、基質分解反応を促進する。その例として、非天然合成化合物の生分解酵素であり、環境浄化の点で重要なナイロン分解酵素をとりあげた。本酵素は、6-ナイロン工業副産物 (ナイロンオリゴマー) を分解する機能を有し、これまで生化学的解析、分子生物学解析、および X 線結晶構造解析が精力的になされている。その結果、この酵素の興味深い特徴として、2 個のチロシン残基 (Tyr215 と Tyr170) がナイロンアミド結合に配位する事がわかった。Tyr215 は β ラクタマーゼ関連酵素に共通する触媒残基である。他方、Tyr170 はナイロンオリゴマー分解酵素にのみ存在する固有の残基である。これらのチロシン残基に加え、この酵素の活性部位には Ser112 と Lys115 があり、これらがナイロンオリゴマー分解反応に必須であることがわかっている。Ser112-Lys115-Tyr215 は、プロテアーゼ類で良く知られている触媒 3 残基と類似している。従って、本酵素は、「触媒 3 残基 + 固有の Tyr 残基」という極めて興味深い活性中心を持つ。しかしながら、これらのアミノ酸残基のナイロンオリゴマー分解過程における役割は、これまで全くわかっ

ていない。そこで本研究では、当該酵素の反応機構を第一原理分子動力学法により解析し、当該反応の反応経路の同定と活性化自由エネルギー障壁の算出を行った。

計算の結果、野生型のナイロンオリゴマー分解酵素の活性中心の構造では、Ser112-Lys115-Tyr215 の触媒 3 残基が比較的強固な水素結合ネットワークを形成しており、ネットワーク内でプロトン移動が生じることがわかった。さらに、同手法で分解反応シミュレーションを様々な計算条件で行った結果、反応中心にある Ser112 の側鎖の O 原子と基質内カルボニル C 原子との間の距離と、基質内アミド CN 結合距離の 2 つの反応座標を用いることで、ナイロンオリゴマー分解酵素のアシル化過程である、Ser112 の求核攻撃、酵素-基質四面体中間体の形成、およびナイロンアミド結合の切断反応までをシミュレートできることがわかった。

これらの計算結果を詳細に解析し、本酵素の活性中心において分解反応を担うアミノ酸の周りの環境の特徴づけを行った。その結果、Lys115 は四面体中間体の安定化に寄与し、Tyr215 はアミド結合の切断に必要なプロトンの供与体であることがわかった。一方、本酵素に特徴的な残基である Tyr170 は、アミド分解時にアミド結合の NH 結合の方向を固定する事で、Tyr215 からアミド N へのプロトン移動を促進することがわかった。これにより、四面体中間体が効率的に分解され、反応効率が上昇することが予想された。実際、Y170F の変異型酵素では、Tyr215 からアミド N へのプロトン移動が起こりにくくなり、反応効率が減少する事がわかった。本計算で得られた反応機構は、触媒 3 残基と Tyr170 が協調的に働く事で発現するメカニズムであり、従来のペプチダーゼ系で見られる触媒 3 残基のみで行われる反応機構とは全く異なる機構であることが示唆された。これらの結果は、本酵素の生理的な構造により、特異なプロトン移動機構が実現され、非天然合成化合物の分解という非常に特異な現象が生じたものと考えられる。

なお、本研究成果に関係する主な発表論文は 5. 主な発表論文等の文献①である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 21 件)

① [Katsumasa Kamiya](#), Takeshi Baba, Mauro Boero, Toru Matsui, Seiji Negoro, and Yasuteru Shigeta, “Nylon-Oligomer Hydrolase Promoting Cleavage Reactions in Unnatural Amide Compounds”, *The Journal of Physical Chemistry Letters*, 5, 1210-1216 (2014), DOI: 10.1021/jz500323y, 査読あり

② Toru Matsui, Takeshi Baba, [Katsumasa Kamiya](#), and Yasuteru Shigeta, “An accurate density functional theory based

estimation of pKa values of polar residues combined with experimental data: from amino acids to minimal proteins”, Physical Chemistry Chemical Physics, 14, 4181-4187 (2012), DOI: 10.1039/c2cp23069k. 査読あり
③ Katsumasa Kamiya and Yasuteru Shigeta, “First-principles molecular dynamics study on the atomistic behavior of His503 in bovine cytochrome c oxidase”, Biochimica et Biophysica Acta, 1807, 1328-1335 (2011), DOI: 10.1016/j.bbabi.2011.03.015, 査読あり

〔学会発表〕 (計 28 件)

① Katsumasa Kamiya, “First-principles studies on Proton Transfer Mechanisms in Cytochrome c Oxidase”, 2012 International Conference on Small Sciences (招待講演), 2012.12.16-2012.12.19, Wald Disney World Swan and Dolphin, Orland, FL, USA.

② Yasuteru Shigeta, Katsumasa Kamiya, Takeshi Baba, Toru Matsui, Yoshiki Higuchi, and Seiji Negoro, “Design of Nylon Oligomer Hydrolase on the Basis of Simulations”, Symposium on Enzymes & Biocatalysis-2012(招待講演), 2012.4.25-2012.4.28, Xian Qujiang International Conference Center, Xian, China.

③ Katsumasa Kamiya, “First-principles studies of functional units in bovine cytochrome c oxidase”, Workshop on Allosteric cooperativity in soluble, membrane bound hemoproteins and related membrane systems (招待講演), 2010.5.29, Bari, Italy.

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ

http://www.gen.kanagawa-it.ac.jp/~katsumasa.kamiya/HP_japanese/index.html

アメリカ化学会 Web スライド集の掲載ページ

<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jz500323y>

日経バイオテク ONLINE に掲載された記事ページ

<https://bio.nikkeibp.co.jp/article/news/20140419/175556/>

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