

VIII 生命物理グループ

教授 重田育照

助教 庄司光男

研究員 原田隆平

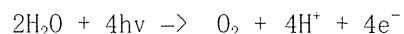
大学院生 3名 (数理物質科学研究科後期過程1名、前期課程2名)

卒研究生 1名

生命物理グループでは生体内で重要な働きをしている蛋白質と核酸等に注目し、その特異的機能を理論的に解明することを目的としている。平成25年度には、光合成酸素発生中心(PSII-OEC)、トレオニン合成酵素(TS)における特異的反応機構を生み出す分子メカニズムの解明を高精度計算手法(QM/MM)により行った。また、全原子分子動力学法(MD)により核内受容体の基質結合状態、ウリジンシチジンキナーゼの基質認識機構、トレオニン合成酵素のプロトン化状態の解明を行った。これらの研究には膨大な計算を高速に実行する必要がある為、スーパーコンピュータの効率的利用を改善したうえで、国内のスーパーコンピュータ(T2K-Tsukuba, HA-PACS, 東大 FX10)を利用した。宇宙生命分野においては宇宙理論分野と連携し、アミノ酸生成過程と系外惑星のバイオマーカーについての理論的研究を推進した。

【1】光合成酸素発生中心の電子状態についての理論的研究 (坂本浩隆、庄司光男)

光合成は光エネルギーを化学エネルギーに変換するシステムであり、生命にとって極めて重要なシステムの1つである。光合成は蛋白質複合体の集合体で構成されており、各複合体は光捕集、電子伝達、ATP生成と糖生成(酸素固定反応)の働きを担っている。電子伝達系では重要な化学反応として光合成システムIIにおける酸素発生中心(PSII-OEC)をもち、水の分解反応を行っている。



この反応では電子を水から引き抜いているが、本反応は極めて難しい化学反応である。原子分解能(1.9Å)のX線構造解析は2011年に沈教授(岡大)、神谷教授(大阪市大)によりなされ、初めて活性中心構造とその周りの水分子の位置が明らかになった。活性中心はCaMn4O5クラスターが歪んだ椅子型構造になっている。

我々はOECの反応機構を解明する為、大規模量子古典混合法(QM/MM)法を用いて検討を行った。初期の中間状態におけるOEC構造と電荷状態について理論解析を行った。プロトン化状態は実験からではなかなか確定できないため、すべての可能な電荷、スピン、プロトン化状態を検証し、PSII-OECの構造特性を明らかにした。

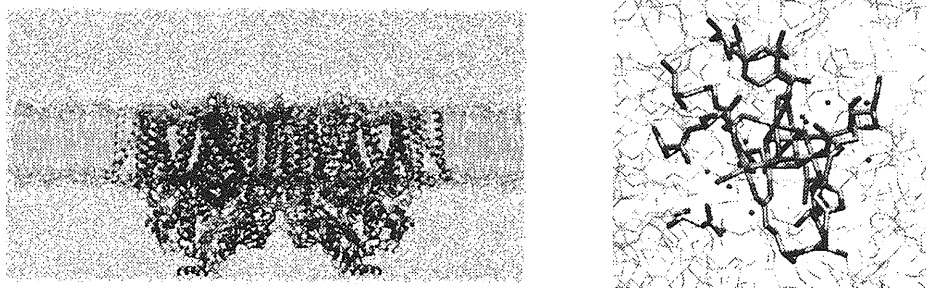


図 1. 光合成システム II(左図)と水分解サイト(右図)

【2】トレオニン合成酵素の特異的反応機構の理論的解明（庄司光男）

生体酵素における反応機構と反応制御機構（副反応の抑制機構）は、化学合成における究極のテーマといっても過言でないほど重要である。トレオニン合成酵素(TS)はトレオニン生合成の最終ステップである O-phospho-L-homoserine(OPHS)から L-トレオニンを生成する段階を触媒しており、いくつもの副生成物(α -ケトブチラート、ケトン)の生成を制御している。しかしながら未だTSの反応制御機構は明らかにされておらず、その本質の解明のためには基質・酵素複合体で各反応経路における構造変化とエネルギープロファイルを明らかにすることが不可欠である。

そこで、反応特異性に関わる反応過程に対して高精度理論解析(QM/MM計算)を行い、プロトン化状態と活性中心における水の存在の検証、可能な反応経路を網羅的に探索した。その結果、自由エネルギーが実験値と3kcal以内で一致し、中間体のUVスペクトル形状も完全に実験と一致した。これにより、反応制御因子を明らかにするとともに各中間体の構造特性も初めて明らかにした。研究成果は国際論文誌に掲載され、プレスリリースを行った。

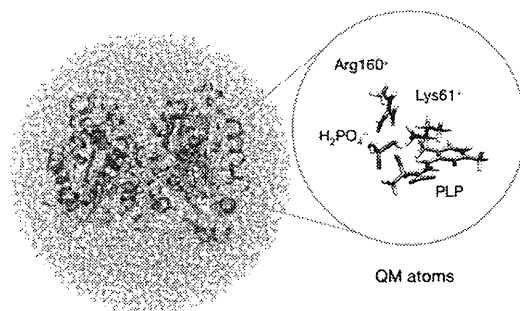


図 2. トレオニン合成酵素の QM/MM モデル: (左)全系, (右)QM 領域

【3】トレオニン合成酵素の基質結合状態解析（氏家謙）

トレオニン合成酵素における重要な反応中間体について、長時間 MD シミュレーションを行うことで、基質結合相互作用解析と基質のプロトン化状態を明らかにした。また、反応過程における活性中心への水分子の侵入についても理論解析を行った。今後は反応制御に関わる中間体における自由エネルギー評価を熱力学積分法により精密に算出することで、酵素反応特有の反応制御機構の解明を試みている。

【4】ビタミンD受容体の活性制御機構の解明（花岡恭平）

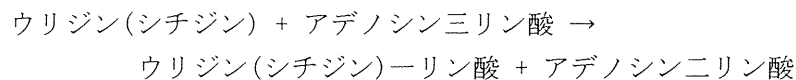
ビタミンD受容体(VDR)は核内受容体(NR)の一つである。NRは重要な創薬標的であり、NR標的薬はNRのヘリックス12を活性構造あるいは不活性構造にする事によってNRが関わる細胞応用を調節する。NRの構造はX線結晶解析に基づいて理解されて来た。溶液中でのコンフォメーションアンサンブル(可能な構造の集合)が受容体活性の制御に関係する事が実験から示唆されている。しかし、ヘリックス12のコンフォメーションアンサンブルの実態は明らかではない。一方で、NRは極めて重要な創薬標的であるため、薬によるNR活性調節機構について多くの計算科学的解析が行われて来たが、NRコンフォメーションアンサンブルの計算モデルは未だ提案されていない。これは全原子分子動力学計算で扱うタイムスケールと実際に蛋白質が構造変化するタイムスケールが大きく異なるためである。

そのため、天然作動薬(受容体を活性化する小分子)結合時のビタミンD受容体のコンフォメーションアンサンブルを明らかにするために、レプリカ交換分子動力学法による大規模構造探索を行った。レプリカ交換分子動力学法は蛋白質折りたたみ過程の自由エネルギープロファイルの計算などに使われる構造探索加速手法である。

計算によって得られた最安定構造は結晶構造と良く一致する活性構造であった。一方で僅かな自由エネルギー差でヘリックス12が大きく構造変化(不活性化)した複数の準安定構造を取りうる事が分かった。これらの準安定構造の一部は、糖質コルチコイド受容体の不活性構造と良く似た構造を取っていた。また、結晶とは異なる準安定な作動薬結合ポケットを発見し、作動薬結合様式とヘリックス12構造の関係を明らかにした。それにより、リガンド特異的なVDR活性制御機構を提案した。

【5】ウリジンシチジンキナーゼの基質特異性についての理論解明（田中弥）

ウリジンシチジンキナーゼ(uridine-cytidine kinase : UCK)は生体内でエネルギー源やDNA, RNAの材料となる物質をリサイクルする経路で作用し、以下のようにウリジンとシチジンのリン酸化を触媒する。



この反応は腫瘍細胞の成長を抑制する働きも有することからUCKは抗がん剤のターゲットとなっている。UCKでは初めにヒト由来のものの結晶構造が解かれたが、高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8 に由来するUCK(*Thermus thermophilus* UCK : ttCK)は基質が結合する部位に1つだけヒト由来UCKとは異なったアミノ酸残基を持ち、ウリジンには作用しないという基質特異性を持っている。この残基をヒト由来UCKが持つものと同じ残基に置換された変異体ttCKではウリジンにも作用することが置換実験により発見された。

しかしながらttCKの残基認識がどのようになされているかの分子レベルでの機構が不明であり、1残基の変化だけで基質認識が大きく変わる理由は結晶構造からでは明らかでない。そこで、MD法により実際にttCKと基質の複合体をシミュレーションすることで、正確な相互作用のエネルギーを算出した。野生型および変異体のttCKと基質であるウリジン、シチジンとの複合体のMD計算を行った。

酵素基質複合体の安定な結合状態を計算したことにより、野生型ttCKウリジン複合体は

シチジン複合体に比べ Arg152 との水素結合がなく、結合の安定性が下がることが分かった。変異体 (ttCKY98H) シチジン複合体では Tyr88, His93, Arg152 の 3 種類の残基がシチジンと水素結合を形成していた。これらの結果は、実験により提唱されたヒト由来 UCK とシチジンとの結合様式と完全に一致していた。一方 Y93H 変異体ウリジン複合体では Tyr88 から His93 にウリジンと水素結合する残基が組み替わっていた。結合自由エネルギー計算からは、ウリジンはシチジンと比べ野生型、変異体ともに ttCK との結合自由エネルギーが小さい結果となった。この結果は、変異体とウリジンの結合は単純な MD 法では記述できない可能性を示唆しており、現在より高精度な方法で理論解析を検討している。

【6】宇宙生命 (小松勇*, 木立佳理*, * 宇宙物理理論研究室)

近年、系外惑星の発見が多く報告されてきている。ハビタブルゾーン内に入る惑星の観測が成功し、地球に類似した惑星の発見もなされている。それに伴い、惑星のスペクトルから生命の痕跡 (バイオマーカー) をいかに検出するかも非常に注目がなされている。バイオマーカーには様々な指標が提案されているが、red edge は、植物の反射スペクトル由来の近赤外領域 (700-750nm) に見られる特徴的な急勾配である。この勾配の由来は様々なスケールでの要因が関わっているが、主要な要因としては光合成色素の 1 つであるクロロフィルの吸収スペクトルである。

系外惑星における生命指標の可変性を明らかにするためには、地球における red edge 相当のスペクトルの環境依存性を明らかにすることが極めて重要と考えられる。まず始めに、主要な光合成色素の励起スペクトル計算を行い、系外惑星における植物の光吸収効率について考察をおこなった。また、光捕集システムの仕組み解明とその可変性について、光合成システムモデルを構築し、量子動力学計算により理論的検討をおこなった。

また、宇宙でのアミノ酸生成過程については様々な反応経路が考えられる。そこで、一般的な生成過程に対して反応物及び中間体の生成エネルギーの安定性を評価することで、宇宙におけるアミノ酸生成の仕組みの解明を試みた。ヒダントインやアミノニトリルを経由する、グリシン及びアラニンの生成過程について、高精度第一原理計算 (密度汎関数法) により検討した。また、水溶液中での反応経路の解析には、Polarizable Continuum Model (PCM) により溶媒効果を考慮した計算を行った。

その結果、真空中では、計算したすべての反応過程の中でグリシンが最も安定であり、過剰に安定な中間体は存在しなかった。アラニン生成についても同様の傾向が見られた。水溶液中でもグリシンが最も安定であったが、ヒダントイン形成は起こりにくい可能性があることが分かった。以上より、構成要素なる反応物があればグリシン、アラニンは容易に起こりうるということが明らかになった。

<論文>

- 1a. M. Shoji, K. Hanaoka, Y. Ujiie, W. Tanaka, D. Kondo, H. Umeda, Y. Kamoshida, M. Kayanuma, K. Kamiya, K. Shiraishi, Y. Machida, T. Murakawa, H. Hayashi, "A QM/MM Study of the L-Threonine Formation Reaction of Threonine Synthase: Implications into the Mechanism of the Reaction Specificity", *Journal of the American Chemical Society*, DOI: 10.1021/ja408780c, 2014.

- 2a. K. Hanaoka, M. Shoji, D. Kondo, A. Sato, M. Y. Yang, K. Kamiya, and K. Shiraishi, "Substrate mediated proton relay mechanism for the religation reaction in topoisomerase II", *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics*, DOI:10.1080/07391102.2013.834848, 2013.
- 3a. M. Shoji, K. Hanaoka, D. Kondo, A. Sato, H. Umeda, K. Kamiya, K. Shiraishi, "A QM/MM study of nitric oxide reductase-catalyzed N₂O formation", *Molecular Physics*, 112, 3-4, 393-397 (2013).
- 4a. M. Shoji, K. Hanaoka, A. Sato, D. Kondo, M. Yang, K. Kamiya, K. Shiraishi, "Calculation of the Electron Transfer Coupling Matrix Element in Diabatic Reactions", *International Journal of Quantum Chemistry*, 113, 342-347, 2013.
- 5a. K. Yamaguchi, M. Shoji, H. Isobe, Y. Kitagawa, S. Yamada, T. Kawakami, S. Yamanaka, M. Okumura, Theory of chemical bonds in metalloenzymes XVI. Oxygen activation by high-valent transition metal ions in native and artificial systems, *Polyhedron*, 66, 228-244, 2013.
- 6a. M. Shoji, H. Isobe, S. Yamanaka, Y. Umena, K. Kawakami, N. Kamiya, J.-R. Shen and K. Yamaguchi, Theoretical insight in to hydrogen-bonding networks and proton wire for the CaMn₄O₅ cluster of photosystem II. Elongation of Mn-Mn distances with hydrogen bonds, *Catal. Sci. Technol.*, 3, 1831-1848, 2013.
- 7a. K. Yamaguchi, Y. Kitagawa, H. Isobe, M. Shoji, S. Yamanaka, M. Okumura, Theory of chemical bonds in metalloenzymes XVIII. Importance of mixed-valence configurations for Mn₅O₅, CaMn₄O₅ and Ca₂Mn₃O₅ clusters revealed by UB3LYP computations. A bio-inspired strategy for artificial photosynthesis, *Polyhedron*, 57, 138-149, 2013.
- 8a. K. Yamaguchi, S. Yamanaka, H. Isobe, T. Saito, K. Kanda, Y. Umena, K. Kawakami, J.-R. Shen, N. Kamiya, M. Okumura, H. Nakamura, M. Shoji and Y. Yoshioka, The nature of chemical bonds of the CaMn₄O₅ cluster in oxygen evolving complex of photosystem II: Jahn-Teller distortion and its suppression by Ca doping in cubane structures, *Int. J. Quatum. Chem.*, 113, 453-473, 2013.

< 学位論文 >

- 1b. 花岡恭平、Theoretical elucidations on the activity modulation mechanism of vitamin D receptor and the DNA relegation mechanism of DNA topoisomerase II (ビタミンD受容体の活性制御機構とII型DNAトポイソメラーゼのDNA再結合反応機構に対する計算科学的解明)、博士論文(理学)。

< 卒研発表 >

- 1c. 坂本浩隆、葉緑体チラコイド膜の構築

< 講演 >

- 1d. ○庄司光男, 磯辺寛, 山中秀介, 沈建仁, 山口兆, 大規模QM/MM法による光合成酸素発生中心の電子状態, 日本化学会春年会 2014, 名古屋大学, 2014/3/27-30, 口頭.
- 2d. ○庄司光男, 氏家謙, 田中弥, 栢沼愛, 梅田宏明, 町田康博, 村川武志, 林秀行, トレオニン合成酵素の反応機構についての理論的研究: 反応特異性決定過程の解明, 日本化学会春年会 2014, 名古屋大学, 2014/3/27-30, 口頭.
- 3d. ○栢沼愛, 花岡恭平, 庄司光男, ニトリルヒドラーゼの触媒機構に関する理論的研究, 日本

- 化学会春年会 2014, 名古屋大学, 2014/3/27-30, ポスター.
- 4d. ○庄司光男、QM/MM 法による光合成酸素発生中心の電子状態と構造, 異分野融合による新材料開発のための計算科学, RIKEN AICS, 2014/3/8 (Invited).
- 5d. ○花岡恭平、庄司光男、栢沼愛、白石賢二、ビタミンD受容体におけるコンフォメーションアンサンブル: 分子動力学法による解明、第36回日本分子生物学会年会、神戸、2013/12/3-6, ポスター.
- 6d. ○M. Shoji, QM/MM study on the photosystem II oxygen evolving complex at the S1 state, 第51回日本生物物理学会年会, 京都, 2013/10/28-30, Oral, invited.
- 7d. ○Megumi Kayanuma, Kyohei Hanaoka, Mitsuo Shoji, Theoretical Study on Catalytic Mechanism of Nitrile Hydratase, 第51回日本生物物理学会年会, 京都, 2013/10/28-30, Poster.
- 8d. ○Mitsuo Shoji, Kyohei Hanaoka, Yuzuru Ujiie, Wataru Tanaka, Megumi Kayanuma, Hiroaki Umeda, Yasuhiro Machida, Takeshi Murakawa, Hideyuki Hayashi, Theoretical elucidation on the reaction control mechanism in Threonine Synthase, 第51回日本生物物理学会年会, 京都, 2013/10/28-30, Poster.
- 9d. ○庄司光男, QM/MM 法による光合成酸素発生中心 S1 状態の電子状態解析、第2回公開シンポジウム人工光合成特別セッション, 立命館大学, 2013/10/28, 口頭、招待講演.
- 10d. ○花岡 恭平, 庄司 光男, 栢沼 愛, 神谷 克政, 白石 賢二、ビタミンD受容体のコンフォメーションアンサンブルと細胞応答, 第86回日本生化学会大会, 横浜, 2013/9/11-12, 口頭+ポスター.
- 11d. ○氏家 謙, 田中 弥, 花岡 恭平, 庄司 光男, 栢沼 愛, 神谷 克政, 白石 賢二, 町田 康博, 村川 武志, 林 秀行、分子動力学法によるトレオニン合成酵素の反応特異性についての理論的解明, 第86回日本生化学会大会, 横浜, 2013/9/11-12, ポスター.
- 12d. ○庄司 光男, 氏家 謙, 田中 弥, 花岡 恭平, 梅田 梅田, 栢沼 愛, 神谷 克政, 白石 賢二, 町田 康博, 村川 武志, 林 秀行、トレオニン合成酵素における反応特異性についての理論的解明, 第86回日本生化学会大会, 横浜, 2013/9/11-12, 口頭+ポスター.
- 13d. ○田中 弥, 氏家 謙, 花岡 恭平, 庄司 光男, 栢沼 愛, 神谷 克政, 友池 史明, 倉光 成紀, 白石 賢二、ウリジンシチジンキナーゼ(ttCK)の基質認識機構についての分子動力学解析, 第86回日本生化学会大会, 横浜, 2013/9/11-12, ポスター.
- 14d. M. Taguchi, Y. Komatsu, A. Sato, ○M. Shoji, M. Kayanuma, K. Kamiya, K. Shiraishi, K. Yabana, and M. Umemura, Theoretical investigation on the absorption spectrum of photosystem as a biomarker of extrasolar plants, ISTCP-8@Budapest, Hungary, 2013/8/25, poster.
- 15d. ○W. Tanaka, Y. Ujiie, K. Hanaoka, M. Shoji, M. Kayanuma, K. Kamiya, T. Ishida, F. Tomoiike, S. Kuramitsu, K. Shiraishi, Theoretical Investigation on the Substrate Specificity of Uridine-cytidine Kinase, ISTCP-8@Budapest, Hungary, 2013/8/25, Poster.
- 16d. ○Y. Ujiie, W. Tanaka, K. Hanaoka, M. Shoji, M. Kayanuma, K. Kamiya, T. Ishida, K. Shiraishi, Y. Machida, T. Murakawa, H. Hayashi, Molecular dynamics study on the substrate binding free energy of Threonine Synthase, ISTCP-8@Budapest, Hungary, 2013/8/25, Poster

- 17d. ○M. Shoji, H. Isobe, S. Yamanaka, N Kamiya, J.-R. Shen, and K. Yamaguchi, QM/MM study on the photosystem II oxygen evolving complex at the S1 state, The 16th International Congress on Photosynthesis Research @St. Louis(MO), 2013/8/11, Poster.
- 18d. ○M. Shoji, H. Isobe, S. Yamanaka, N. Kamiya, J.-R. Shen, K. Yamaguchi, Theoretical investigation on the electronic structures of photosystem II oxygen evolving complex at the S2 state, 1st Awaji International Workshop on “Electron Spin Science & Technology: Biological and Materials Science Oriented Applications” (1st AWEST2013), 2013/6/16, oral (invited).
- 19d. ○Y. Komatsu, M. Umemura, M. Shoji, K. Yabana, K. Shiraishi, K. Kamiya, M. Kayanuma, A. Sato, The energy transfer simulation for detecting photosynthetic biosignatures on extrasolar planets, 1st AWEST2013, 2013/6/16, Poster.
- 20d. ○氏家 謙、田中 弥、花岡 恭平、庄司 光男、栢沼 愛、神谷 克政、白石 賢二、町田 康博、村川 武志、林 秀行、分子動力学法によるトレオニン合成酵素の基質結合自由エネルギー計算、蛋白質学会年会、鳥取、2013/6/13、ポスター。
- 21d. ○田中 弥、氏家 謙、花岡 恭平、友池 史明、庄司 光男、栢沼 愛、神谷 克政、倉光 成紀、白石 賢二ウリジンシチジンキナーゼの特異的基質認識機構の理論的解明、蛋白質学会年会、鳥取、2013/6/13、ポスター。
- 22d. ○花岡 恭平、庄司 光男、栢沼 愛、神谷 克政、白石 賢二 QM/MM 法による HIT スーパーファミリー酵素の触媒機構の解明、蛋白質学会年会、鳥取、2013/6/13、ポスター。
- 23d. ○庄司 光男、花岡 恭平、氏家 謙、田中 弥、梅田 宏明、栢沼 愛、神谷 克政、白石 賢二、町田 康博、村川 武志、林 秀行、トレオニン合成酵素における反応特異性決定過程の理論解明、蛋白質学会年会、鳥取、2013/6/13、口頭(招待)+ポスター。
- 24d. ○小松勇、梅村雅之、庄司光男、矢花一浩、白石賢二、神谷克政、栢沼愛、田口 真彦、佐藤 皓允、太陽系外惑星バイオマーカー検出に向けた光捕集機構のエネルギー転移計算、Japan Geoscience Union Meeting 2013, 5/19-24, 口頭。
- 25d. 田口 真彦、小松勇、佐藤皓允、○庄司 光男、栢沼愛、神谷克政、白石賢二、矢花一浩、梅村雅之、系外惑星のバイオマーカーのための光合成光吸収についての理論的研究、Japan Geoscience Union Meeting 2013, 5/19-24, 口頭。
- 26d. ○M. Shoji, K. Hanaoka, Y. Ujiie, W. Tanaka, M. Kayanuma, H. Umeda, Y. Machida, T. Murakawa, H. Hayashi, BIT's 4th Symposium on Enzymes and Biocatalysis 2013 (SEB-2013), Nanjing, 2013/4/26, China, oral(invited).

<その他(発表等)>

- 1f. ○M. Shoji, Methods and applications for biomolecular simulations, Computational Science Literacy, Mar.19,2014, CCS.
- 2f. 庄司、花岡、坂本、第3回つくば科学研究コンテスト、審査員、2014/3/16.
- 3f. 「筑波大 スパコンを用いてトレオニン生合成の最終過程を明らかに」、QLife Pro, 2014/3/26.
- 4f. 庄司光男、林秀行、必須アミノ酸”トレオニン”生合成の最終過程が明らかに—スーパーコンピュータで網羅的に反応経路を探索、プレスリリース、筑波大学、大阪医科大学, 2014/3/14.

- 5f. ○花岡恭平, レプリカ交換分子動力学法によるビタミン D 受容体のコンフォメーションアンサンブルの生成, つくばソフトマター研究会 2014, 2014/3/3.
- 6f. ○庄司光男, 酵素反応機構の理論的解明, つくばソフトマター研究会 2014, 2014/3/3.
- 7f. ○M. Shoji, Computational bioscience with supercomputers, Division of Life Sciences, External Review (Reviewer: Andrew Roger), 2014/2/19.
- 8f. ○庄司光男, 生体内化学反応の理論解明, 物理学セミナー, 2013/11/13.
- 9f. ○庄司光男, 生体システムにおける動作原理の理論的解明, 第 5 回「学際計算科学による新たな知の発展・統合・創出」シンポジウム, 2013/11/6.
- 10f. ○庄司光男, トレオニン合成酵素における反応制御機構の理論的解明, 5th JHPCN, 品川, 2013/7/11.
- 11f. ○M. Shoji, Computational Bioscience Utilizing Supercomputers: Performance and Applications, CCS-EPCC Workshop, CCS-Tsukuba, 2013/7/4-5.
- 12f. 田口真彦, 小松勇, 佐藤皓允, 木立佳里, ○庄司光男, 栢沼愛, 神谷克政, 梅村雅之, 矢花一浩, 白石賢二, L 型アミノ酸生成機構とバイオマーカーのための光合成光吸収機構についての理論的研究, 「宇宙生命計算科学連携拠点」ワークショップ, CCS-Tsukuba, 2013/6/28-29.

<外部資金>

1. 科研費、若手研究 B、生体酵素における反応機構と反応制御機構解明のための理論的研究、研究代表者: 庄司光男.

<受賞>

1. 花岡恭平、研究科長賞 (筑波大学数理物質科学研究科)。