

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24750007

研究課題名(和文) 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

研究課題名(英文) Theoretical elucidations of the reactions and the reaction-control mechanisms in enzymes

研究代表者

庄司 光男 (SHOJI, Mitsuo)

筑波大学・数理物質系・助教

研究者番号：00593550

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円、(間接経費) 1,080,000円

研究成果の概要(和文)：酵素は生命現象に不可欠な化学反応を担っており、効率的に物質変換やエネルギー変換を行っている。単純な酵素反応は理論解析が進んでいるが、複雑な反応過程を持つ酵素反応機構は未だ解明がなされていない。非常に興味深い化学反応を触媒するトレオニン合成酵素(ThrS)、亜硝酸還元酵素(NiR)、一酸化窒素還元酵素(NOR)、DNAトポイソメラーゼ(Topo)に注目し、量子古典混合計算(QM/MM)法により反応機構解明を行った。スーパーコンピュータを用いた大規模並列計算により、プロトン化状態、水素結合ネットワーク、水の有無、反応経路についての網羅的検証を可能にした事で、複雑な反応機構を初めて明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Enzymes catalyze important chemical reactions in living systems. The enzyme reactions for material formations and energy conversions are highly efficient. Simple reactions are clarified by theoretical analyses, however, complicated reactions in many important enzymes are still unclear. Therefore, reactions of threonine synthase (ThrS), nitrite reductase (NiR), nitric oxide reductase (NOR) and DNA topoisomerase (Topo) are investigated by a mixed quantum mechanical and molecular mechanical (QM/MM) method. We utilized supercomputers and massive parallel simulations were performed. We elucidated the reaction mechanism by investigations for the protonation states, hydrogen-bonding network, existence of waters and possible reaction pathways.

研究分野：化学

科研費の分科・細目：物理化学

キーワード：QM/MM 酵素 反応機構 トレオニン合成酵素 亜硝酸還元酵素 反応制御 スーパーコンピュータ

## 1. 研究開始当初の背景

生体内酵素は生命現象に不可欠な化学反応を支えており、非常に効率的な物質変換とエネルギー変換を行っている。また、様々な調節機構により、情報伝達や反応制御を行っており、極めて洗練されたシステムを構築している。このような酵素反応機構の解明は化学だけではなく生物学、環境、合成、医療などの多くの分野から注目されている。このような酵素のうち、加水分解酵素など比較的簡単な酵素については量子化学計算など理論的な解析が進み、電子レベルでの反応機構が議論されるようになってきているが、より複雑な酵素反応においてはまだその水準に達していない。

申請者は数ある生体内酵素の中でもトレオニン合成酵素:Threonine Synthase (TS)、タバコ由来亜硝酸還元酵素:Nitrite Reductase (Nir3)に注目した。これらは共にピリドキサーリン酸:Pyridoxal 5'-phosphate (PLP)およびシロヘムという補欠分子族を有し、多段階の位置特異的かつ立体選択的なプロトン移動反応を含み、複雑な反応機構の中で反応制御がなされて目的とする生成物のみを生成している。いずれも最近(2011年)極めて高精度なX線結晶構造解析( $< 2\text{\AA}$ )が解けているが、未だ詳細な反応機構が確定できていなかった。

## 2. 研究の目的

複雑な酵素反応機構を解明し、反応過程における構造変化とエネルギーおよび酵素反応に特徴的な反応制御機構について明らかにする。実験結果( $\Delta G$ , UV/Vis)と計算結果を直接対応させ、精密に反応中間体の同定する。

## 3. 研究の方法

量子力学/古典分子動力(QM/MM)計算による高精度理論解析を行った。スーパーコンピュータを用いて大規模並列計算を可能にした事で、より高精度に(大きなQM領域を用いたリアリステックな計算モデルで)、未解明事項(プロトン化状態、水素結合ネットワーク、水の有無、多くの可能な反応経路)を網羅的に検証した。それにより複雑な反応過程を明らかにする。

## 4. 研究成果

- (1)トレオニン合成酵素の反応制御機構解明
- (2)亜硝酸還元酵素(Nir)の全反応機構解明
- (3)一酸化窒素還元酵素(NOR)の化学反応過程の解明

(4)DNAトポイソメラーゼのDNA切断過程における反応過程の解明

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計4件)

[1] 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, 136 (12), 4525-4533, 2014.

[2] K. Hanaoka, M. Shoji, D. Kondo, A. Sato, M. Y. Yang, K. Kamiya, 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.

[3] 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).

[4] 梅田 宏明, 塙 敏博, 庄司 光男, 朴 泰祐, 稲富 雄一, "フラグメント分子軌道法におけるFock行列計算のGPGPU化", 情報処理学会論文誌コンピューティングシステム(ACS), 6, 4, 26-37 (2013).

[学会発表](計59件)

[1] 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.

[2] 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.

[3] 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.

[4] 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).

- [5] 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。
- [6] 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).
- [7] M. Kayanuma, K.Hanaoka, M. 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).
- [8] M. Shoji, K.Hanaoka, Y.Ujiie, W.Tanaka, M.Kayanuma, H.Umeda, Y.Machida, T.Murakawa, H.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).
- [9] 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。
- [10] 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)。
- [11] 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)。
- [12] 庄司光男, 氏家謙, 田中弥, 花岡恭平, 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)。
- [13] 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)。
- [14] 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.
- [15] W. Tanaka, Y. Ujiie, K. Hanaoka, M. Shoji, M. Kayanuma, K. Kamiya, T. Ishida, F. Tomoike, S. Kuramitsu, K. Shiraishi, Theoretical Investigation on the Substrate Specificity of Uridine-cytidine Kinase, ISTCP-8, Budapest, Hungary, 2013/8/25, Poster.
- [16] 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.
- [17] 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.
- [18] 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).
- [19] 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 Awaji International Workshop on "Electron Spin Science & Technology: Biological and Materials Science Oriented Applications" (1st AWEST2013), 2013/6/16, Poster.
- [20] 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、蛋白質科学会年会@鳥取、2013/6/13, ポスター。
- [21] 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、蛋白質科学会年会@鳥取、2013/6/13, ポスター。

[22] 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、蛋白質科学会年会、鳥取、2013/6/13, ポスター。

[23] 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、蛋白質科学会年会@鳥取、2013/6/13, 口頭(若手奨励賞候補)+ポスター。

[24] 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。

[25] 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。

[26] 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)。

[27] 庄司光男、花岡恭平、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におけるリン酸脱離以降の反応経路についての理論的検証、日本農芸化学会、東北大学、2013/03/26, 口頭。

[28] 田口真彦、小松勇、佐藤皓允、蘇垠成、庄司光男、栢沼愛、神谷克政、梅村雅之、矢花一浩、白石賢二、光化学系IIアンテナ部の光捕集機構についての量子化学的研究、第93回日本化学会春季年会、立命館大学、2013/3/22, 口頭。

[29] 栢沼愛、花岡恭平、近藤大生、田口真彦、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、第93回日本化学会春季年会、立命館大学、2013/3/22, ポスター。

[30] 庄司光男、磯部寛、山中秀介、山口兆、沈建仁、QM/MM法による光合成酸素発生中心のS2中間体の電子状態についての理論的研究、第93回日本化学会春季年会、立命館大学、2013/3/22, ポスター。

[31] 田口真彦、小松勇、佐藤皓允、蘇垠成、庄司光男、栢沼愛、神谷克政、梅村雅之、矢

花一浩、白石賢二、生命指標となりうる光合成の光吸収スペクトル帰属についての理論的研究、2013年日本天文学会春季年会、埼玉大学、2013/3/20, ポスター。

[32] 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、蘇垠成、系外惑星バイオマーカー検出を目指した光合成機構のエネルギー移動計算、2013年日本天文学会春季年会、埼玉大学、2013/3/20, 口頭。

[33] M. Shoji, H. Isobe, S. Yamanaka, N. Kamiya, J.-R. Shen, K. Yamaguchi, A QM/MM study on the S2 spin state of the oxygen-evolving complex, 第5回 OCARINA シンポジウム、大阪市立大学 2013/3/5, oral(invited)。

[34] M. Shoji, K. Hanaoka, D. Kondo, H. Umeda, K. Kamiya, K. Shiraishi, A QM/MM study of nitric oxide reductase-catalyzed N2O formation, Sanibel Symposium, Florida, 2013/2/17-22, poster。

[35] 田口真彦、小松勇、佐藤皓允、蘇垠成、庄司光男、栢沼愛、神谷克政、梅村雅之、矢花一浩、白石賢二、時間依存密度汎関数法に基づく光合成アンテナ部の吸収スペクトルの研究とそれを用いた系外惑星における生命指標検出に向けての検討、Supercomputer workshop 2013, 分子科学研究所, 2013/1/22-23。

[36] 花岡恭平、庄司光男、近藤大生、田口真彦、神谷克政、白石賢二、QM/MM法を用いたII型DNAトポイソメラーゼによるDNA再結合反応の解明、Supercomputer workshop 2013, 分子科学研究所, 2013/1/22-23。

[37] 近藤大生、花岡恭平、田口真彦、神谷克政、庄司光男、河合(野間)繁子、田口英樹、白石賢二、GlnやAsnを多く含むミスフォールドしたタンパク質の構造安定化機構に関する理論的研究、Supercomputer workshop 2013, 分子科学研究所, 2013/1/22-23。

[38] 庄司光男、花岡恭平、近藤大生、梅田宏明、神谷克政、白石賢二、一酸化窒素還元酵素におけるN2O生成機構についての理論的研究、Supercomputer workshop 2013, 分子科学研究所, 2013/1/22-23。

[39] 田口真彦、小松勇、佐藤皓允、蘇垠成、庄司光男、栢沼愛、神谷克政、梅村雅之、矢花一浩、白石賢二、光合成光捕集複合体IIにおける光励起状態についての理論的研究、第85回日本生化学会大会、福岡国際会議場, 2012/12/16, ポスター。

[40] 花岡恭平, 庄司光男, 近藤大生, 田口真彦, 栢沼愛, 神谷克政, 白石賢二, アゴニスト結合型ビタミンD受容体の溶液中のダイナミクスと活性制御機構、第85回日本生化学会大会, 福岡国際会議場, 2012/12/16, ポスター。

[41] 近藤大生, 花岡恭平, 田口真彦, 神谷克政, 庄司光男, 河合(野間)繁子, 田口英樹, 白石賢二, Q/Nに富んだペプチドがつくるアミロイド線維の構造安定化機構の理論的解析、第85回日本生化学会大会, 福岡国際会議場, 2012/12/16, ポスター。

[42] 庄司光男, 花岡恭平, 近藤大生, 田口真彦, 栢沼愛, 梅田宏明, 鴨志田良和, 神谷克政, 白石賢二, 村川武志, 林秀行, トレオニン合成酵素におけるリン酸脱離以降の反応機構についての理論的解明、第85回日本生化学会大会@福岡国際会議場, 2012/12/16, ポスター。

[43] 花岡恭平, 庄司光男, 近藤大生, 田口真彦, 栢沼愛, 神谷克政, 白石賢二, アゴニスト結合型ビタミンD受容体のマイナーコンフォメーション、第35回日本分子生物学会年会, 福岡国際会議場, 2012/12/11, ポスター。

[44] 田口真彦, 小松勇, 佐藤皓允, 蘇垠成, 庄司光男, 栢沼愛, 神谷克政, 梅村雅之, 矢花一浩, 白石賢二, 光合成光化学系IIにおけるアンテナ部の光捕集機構についての理論的研究、第35回日本分子生物学会年会, 福岡国際会議場, 2012/12/11, ポスター。

[45] 庄司光男, 花岡恭平, 近藤大生, 梅田宏明, 神谷克政, 白石賢二, 一酸化窒素還元酵素におけるN<sub>2</sub>O生成機構についての理論的研究、第3回協定講座シンポジウム, 神戸大学統合研究拠点, 2012/11/29, ポスター。

[46] 花岡恭平, 庄司光男, 近藤大生, ヤンムンヨン, 神谷克政, 白石賢二, QM/MM法によるII型DNAトポイソメラーゼのDNA再結合反応の解明、第3回協定講座シンポジウム, 神戸大学統合研究拠点, 2012/11/29, ポスター。

[47] 近藤大生, 花岡恭平, 田口真彦, 神谷克政, 庄司光男, 河合-野間繁子, 田口英樹, 白石賢二, Q/Nに富んだペプチドがつくるアミロイド線維の構造安定化機構の計算科学的解析、第3回協定講座シンポジウム, 神戸大学統合研究拠点, 2012/11/29, ポスター。

[48] 田口真彦, 小松勇, 佐藤皓允, 蘇垠成, 庄司光男, 栢沼愛, 神谷克政, 梅村雅之, 矢花一浩, 白石賢二, 光合成アンテナ部の光捕集機構についての理論的研究とそれをういた系外惑星における生命指標検出に向けての検討、

第3回協定講座シンポジウム@神戸大学統合研究拠点, 2012/11/29, ポスター。

[49] 田口真彦, 小松勇, 佐藤皓允, 蘇垠成, 庄司光男, 栢沼愛, 神谷克政, 梅村雅之, 矢花一浩, 白石賢二, 系外惑星における生命指標としての光合成色素についての理論的研究、第5回アストロバイオロジーワークショップ 2012/11/23, 24, 口頭。

[50] 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, 蘇垠成, 系外惑星のバイオマーカー検出に向けた光合成アンテナ機構の励起状態計算、第5回アストロバイオロジーワークショップ 2012/11/23, 24, 口頭。

[51] M. Shoji, H. Isobe, S. Yamanaka, K. Yamaguchi, J.-R. Shen, Ground spin state of the oxygen-evolving complex at the S<sub>2</sub> state, Structure and Dynamics of Photosynthetic Systems, Okayama, 2012/10/22, poster.

[52] K. Hanaoka, M. Shoji, D. Kondo, A. Sato, M.-Y. Yang, K. Kamiya, K. Shiraishi, QM/MM simulation revealed a substrate mediated proton relay mechanism in DNA religation reaction catalyzed by Type II DNA topoisomerase, CCP2012, Kobe, 2012/10/13, poster.

[53] M. Shoji, K. Hanaoka, D. Kondo, H. Umeda, M. Kayanuma, K. Kamiya, K. Shiraishi, S. Nakano, K. Katayanagi, QM/MM 法による同化型亜硝酸還元酵素の反応機構についての理論的研究、第50回日本生物物理学会年会, 名大, 2012/9/22。

[54] 花岡恭平, 近藤大生, 庄司光男, 梁文榮, 神谷克政, 白石賢二, II型DNAトポイソメラーゼによるDNA再結合反応に対する基質を介するプロトンリレー機構、第6回バイオ関連化学合同シンポジウム, 北大, 2012/9/6。

[55] 佐藤皓允, 田口真彦, 庄司光男, 第7回夏の学校 宇宙ライフサイエンス若手の会, 2012/8/25, ポスター発表。

[56] 花岡恭平, 近藤大生, 庄司光男, 梁文榮, 神谷克政, 白石賢二, 酵母DNAトポイソメラーゼIIにおけるDNA再結合反応の理論的解明、第12回日本蛋白質科学会年会, 名古屋国際会議場, 2012/6/20, ポスター。

[57] 庄司光男, 花岡恭平, 近藤大生, 梁文榮, 梅田宏明, 神谷克政, 白石賢二, 一酸化窒素還元酵素(NOR)におけるN<sub>2</sub>O生成酵素についての理論的研究、第12回日本蛋白質科学会年会, 名古屋国際会議場, 2012/6/20, ポスター。

[58] M.Shoji, K.Hanaoka, D.Kondo, H.Umeda, K.Kamiya, Y.Kitagawa, K.Shiraishi, QM/MM study on the catalytic mechanism of nitric oxide reductase, 2012 ICQC - International Congress of Quantum Chemistry, June 25 - 30, 2012, Boulder, Colorado, poster.

[59] 佐藤、庄司、神谷、梅村、矢花、白石、” Theoretical Investigation of a Mechanism of Chirality Induction for Amino Acids in the Early Solar System ”, 日本地球惑星科学連合大会, 2012/5/24, 口頭.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www2.ccs.tsukuba.ac.jp/people/mshoji/index.html>

プレスリリース

[https://www.ccs.tsukuba.ac.jp/pr/media/threonine\\_140314](https://www.ccs.tsukuba.ac.jp/pr/media/threonine_140314)

[http://www.ccs.tsukuba.ac.jp/wordpress/uploads/2014/03/press\\_140314.pdf](http://www.ccs.tsukuba.ac.jp/wordpress/uploads/2014/03/press_140314.pdf)

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

庄司光男 (SHOJI, Mitsuo)

筑波大学・数理物質系・助教

研究者番号：00593550