

酵素反応機構の理解に向けた効率的にタンパク質の揺らぎを取り込む計算手法の開発

山田 健太

理化学研究所 杉田理論分子科学研究室

1. はじめに

生体内分子システムが長い時間を掛けて創り上げてきた、酵素タンパク質の触媒する反応機構を解明することは、近年のエネルギー問題や環境問題を解決する新規触媒の開発や、反応条件が緩やかで環境負荷の低い生体触媒の工業利用に直結する、人類にとって重要な課題である。このため、生物学だけでなく化学や工学分野でも注目され、実験と理論の両立場から、微生物や植物細胞が有するタンパク質を対象にした研究が盛んに行われている。

計算機を用いて理論化学の問題に取り組む分野である計算化学では、量子力学的手法 (QM 法) を、実験で得られた酵素の立体構造から取り出した活性中心に適用し、触媒反応の解析が行われてきた。この手法は、電子を露わに扱うため、化学結合の生成・開裂を記述することができる一方で、計算コストが高い。近年では、活性中心周囲のタンパク質を露わに扱うために、低計算コストの分子力場を用いた分子力学的手法 (MM 法) と組み合わせた QM/MM 混合法によって反応解析を行うのが主流となっている。しかし、この混合法に基づいたダイナミクスの計算によってタンパク質の揺らぎを記述することは依然現実的ではなく、また基礎とする立体構造が、酵素のある瞬間的な状態から求められたものである。このため、従来手法では生体内では起こり得ない反応機構を提案してしまう可能性がある。一方、生体内におけるタンパク質の揺らぎを調べるために、古典力学に基づいて分子力場における原子・分子系のダイナミクスを追跡できる分子動力学(MD)シミュレーションが用いられている。しかし、分子力場では化学結合の生成・開裂を記述することは困難である。そこで、生体内における酵素反応機構の理解を目指して、上記手法を組み合わせた新規計算手法の開発に取り組んだ。

2. 計算対象：一酸化窒素還元酵素の反応解析

地球上の窒素循環を維持するために不可欠な過程である脱窒は、自然界では主に細菌 (脱窒菌) によって営まれる。脱窒菌においては、4 種の金属酵素によって、硝酸塩(NO_3^-)や亜硝酸塩(NO_2^-)が窒素分子(N_2)まで還元される($\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$)と考えられている。亜硝酸還元酵素(Nitrite Reductase, NiR)によって作られる一酸化窒素(NO)は、一酸化窒素還元酵素(Nitric Oxide Reductase, NOR)により亜酸化窒素(N_2O)に変換される。不対電子を有し細胞毒である NO を N_2O へと無毒化する還元反応は、脱窒菌の生命維持に重要な機能であること、化学の本質である結合の生成と開裂が逐次的に生じること、 N_2O が強力な温室効果ガスであること、さらに嫌気呼吸から好気呼吸へという膜タンパク質の分子進化を理解する糸口となる可能性をもつことから、分子生物学をはじめとして、さまざまな分野から注目されている。

NOR の活性中心はヘム b_3 、非ヘム鉄とこれらを取り囲む側鎖によって構成される (図 1)。この部位において、NO 二分子が反応

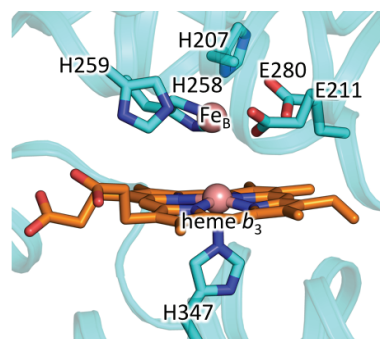


図 1: NOR (PDBID: 3o0r) の活性中心

FeB と $\text{heme } b_3$ の鉄原子は二価で、それぞれの配位数は 5 である。

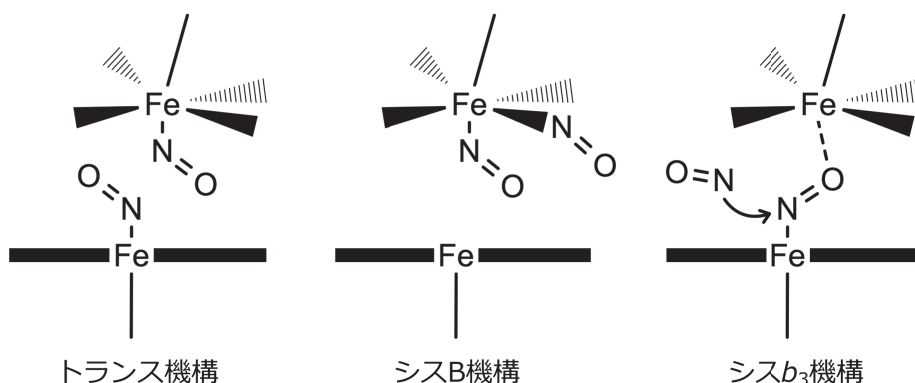


図2: NOR 活性中心における NO 還元反応機構モデル

NO 二分子が配位する鉄原子の違いと、生成すると考えられているハイポナイトライト($\text{N}_2\text{O}_2^{2-}$)がとる配座によって区別されて呼ばれている。

し、N-N 結合の生成と N-O 結合の開裂によって、 N_2O が生成される($2\text{NO} + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{N}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}$)。この還元反応について、さまざまな実験研究から 3 種類 (トランス機構、シス B 機構とシス b_3 機構) の反応機構がこれまでに提案されてきた (図 2)。トランス機構ではヘム b_3 の鉄原子と非ヘム鉄のそれぞれに NO が配位した構造、シス B 機構では非ヘム鉄に NO 二分子が配位した構造、そしてシス b_3 機構ではヘム b_3 の鉄原子に配位した NO に対する NO の攻撃を介して、反応が進行すると想定されている。

脱窒菌の一種である緑膿菌由来の NOR(PDBID: 3o0r)を用いた NO 還元反応解析に対して、実験ではトランス機構を示唆する急速冷凍電子スピン共鳴法の結果が報告されている[1]。理論計算では QM 法と QMMM 混合法を用いて既に行われており[2,3]、両手法の結果ともシス b_3 機構を提案している。また、この NOR 活性中心を変異によってミミックするように創成されたミオグロビン(EngMb)に対しても、QMMM 混合法による解析ではシス b_3 機構が有利だという結果が得られている[4]。しかしながら、振動分光実験により、EngMb では NO 二分子が異なる鉄原子に配位した構造の存在、つまり、トランス機構が強く示唆されている[5]。こういった理

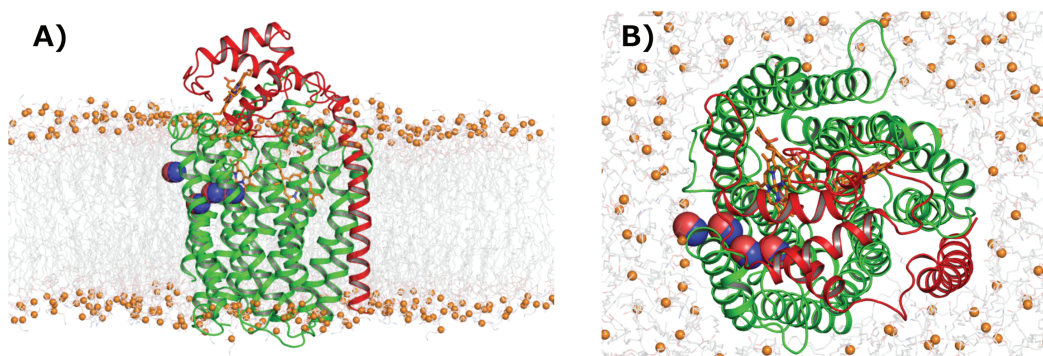


図3: NOR+4NO 系の初期構造 A) サイドビュー B) トップビュー

NOR 系の全原子 MD シミュレーションのスナップショットに対して、その NOR の疎水性チャネルに NO 4 分子を配置することによって、NOR+4NO 系の初期構造をセットアップした。また、橙色の球は脂質分子の P 原子を示している。

論と実験が導く結論の不一致をもたらす原因の1つとして、タンパク質が本来有する揺らぎを理論計算では考慮していないことが挙げられる。

3. 研究目的と方法

活性中心に NO 分子が存在するときのスナップショットに基づいて、タンパク質の揺らぎによる活性中心への影響を考慮できる場をつくり、その場の存在下において反応機構を QM 法によって決定するという一連の手法を開発することが本研究の目的である。このために、まず、膜タンパク質である NOR を脂質二重膜に埋め込み、周囲に十分な水分子、および、150mM になるようにイオンを配置することによってモデル系をセットアップした。次に、この系の平衡化、および、100 ns の全原子 MD シミュレーションを実施した。NOR の構造が結晶構造と似ているスナップショットに対して、NO 4 分子を NOR の疎水性チャネルとそれと膜との境界付近に適宜配置した(NOR+4NO)系を作成した

(図3)。そして、この系のシミュレーションを行い、100ns のトラジェクトリを2本得た。また、同様の手続きによって、緑膿菌のもつ生体環境をモデリングした NiR と NOR の酵素複合体 (NiR:NOR 複合体, 図4) 系の全原子 MD シミュレーションを用いて、この複合体の構造安定性に関する調査を併せて実施した。

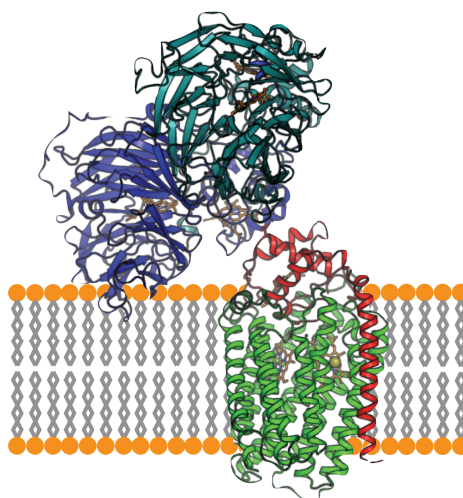


図4: 緑膿菌で発見された NiR:NOR 複合体 [6]
青色と青緑色で表したホモダイマーが NiR で、黄緑色と赤色で表したヘテロダイマーが NOR である。また、脂質二重膜は模式的に描いたものである。

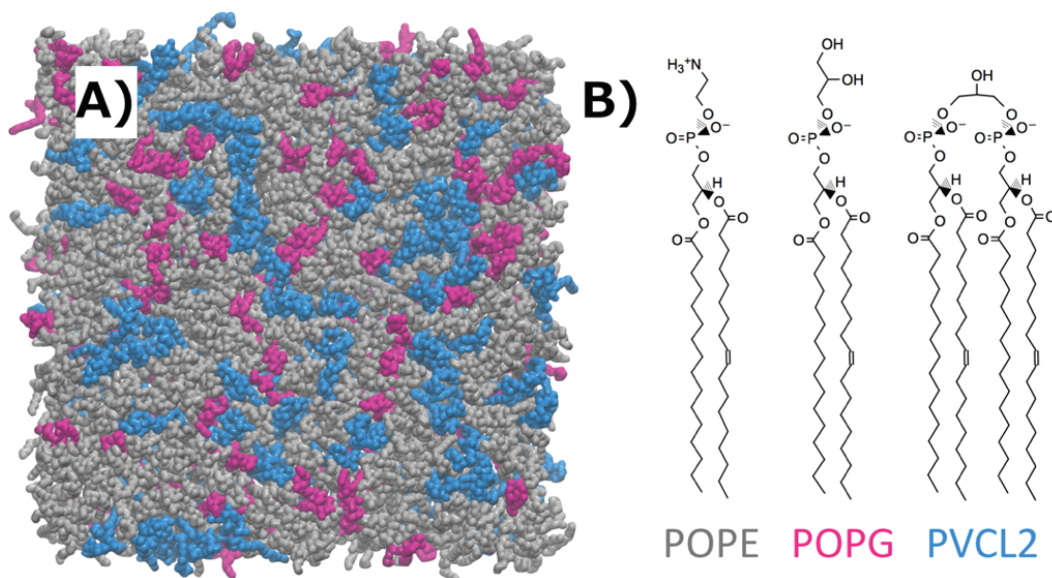


図5: A)作成した混合脂質二重膜と B)その構成分子

生体環境における NiR:NOR 複合体の構造安定性を調べるために使用した3種の分子で構成される脂質二重膜。

NOR 系で使用する POPE 分子から構成される脂質二重膜と, NiR:NOR 複合体系で使用する POPE 分子, POPG 分子と PVCL2 分子から成る脂質二重膜は CHARMM-GUI[7]によって作成した(図5)。NiR:NOR 複合体系で混合膜を採用した理由は, 緑膿菌の形質膜がもつ脂質組成に似せることによって, 重要だと考えられる膜表面と NiR の相互作用を適切に考慮するためである。また, この相互作用を議論するために, 脂質二重膜の代わりに直径が約 86 Å と小さいナノディスクを用いた複合体系も作成した。力場パラメータは CHARMM C36 を一部改変したものを使用した[8]。静電相互作用の計算は PME 法によって行い, 温度と圧力の制御には Bussi 法を使った。MD ソフトウェアは理化学研究所の杉田グループで開発しているプログラムである GENESIS を用いた[9]。

4. 結果と考察

A. NOR+4NO 系

今回得られた 2 本の 100 ns のシミュレーションでは, NO 分子は活性中心に到達せず, 本研究の方法開発に必要な, 活性中心に NO 分子が存在するスナップショットを得ることができなかった。NO 分子の動きを吟味すると, 活性中心の傍に存在する残基 5 つ(Phe136, Val206, Trp209, Val210, Phe352)でつくられている「ポケット」に停留することが分かった(図6)。シミュレーション時間を延ばす, または, ラジカル分子である NO 分子の力場を再検討することによって, この分子が活性中心に行き着くのではないかと期待される。

B. NiR:NOR 複合体系

3 本の 300 ns のシミュレーションを実施した結果, NiR の解離は起こらず, 複合体構造は壊れなかった。得られたトラジェクトリを解析したところ, NiR-NOR 間の結合部位では, 結晶構造で見出された Glu119-Arg71 間の塩橋はシミュレーション時間にわたってよく維持されること, NiR の Lys61 や NOR の Lys100 をはじめとした塩橋周囲の残基と heme c によって, NiR-NOR 間だけではなく NiR 内・NOR 内の水素結合が頻繁に生成されることが分かった(図7)。塩橋を含めた, これらの水素結合ネットワークが, NiR:NOR 複合体の維持に寄与していると示唆された。

一方, NiR と膜のコンタクト部位では, 脂質二重膜から構成される脂質分子と NiR の残基が水素結合を生成することが分かった(図8)。平均して NiR-膜間で生じる水素結合ペアの数は約 10.1 であり, この部位が膜に対して船のアンカーのように働くことによって, NiR の動きを抑制し, NOR からの解離が困難になっていると

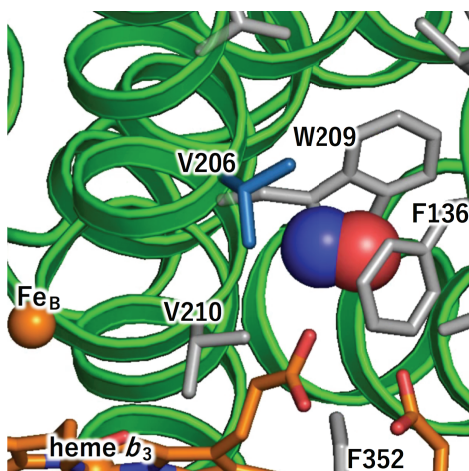


図6: NO 分子が停留するポケット

Phe136, Val206, Trp209, Val210, Phe352 で構成されているポケットで NO 分子(青と赤色の球)はスタックしてしまい, 活性中心には到達しなかった。

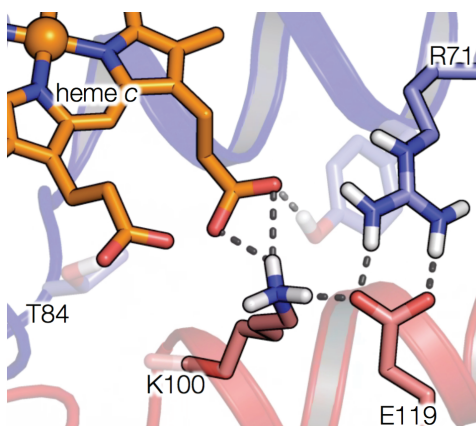


図7: NiR-NOR 結合部位のスナップショット

青色は NiR, 赤色は NOR, 点線は水素結合を表している。NiR の Lys61 は省略している。

考えられる。ナノディスク系ではこのペア数は約 1.4 となり、脂質二重膜系よりも水素結合の生成が非常に少なくなるという結果が得られた。しかし、今回実施したシミュレーション時間ではナノディスク系でも NiR:NOR 複合体が壊れることはなかった。したがって、生体環境における複合体の構造安定性に対する、NiR-膜間のコンタクト部位の親和的相互作用がもたらす寄与はあくまで副次的であり、NiR-NOR 間の結合部位における親和的相互作用の寄与が主要であると考えられる。

5. 結論

生体内における酵素反応機構の理解を目指して、

QM 法、QM/MM 混合法と MD シミュレーションを組み合わせた新規計算手法の開発に取り組んだ。計算対象として膜タンパク質 NOR の活性中心における NO 還元反応を採用した。脂質二重膜に NOR を埋め込み、その疎水性チャネルに 4NO 分子を配置した系のシミュレーションを実施したが、活性中心に NO 分子が存在するスナップショットは得られなかった。同時に、NiR:NOR 複合体系の MD シミュレーションも実施した。その生体環境における構造安定性に対して、NiR-NOR 結合部位と NiR-膜のコンタクト部位で生成される水素結合が寄与しており、特に前者における親和的相互作用が重要であることが示唆された。

参考文献

- [1] Kumita, H., Matsuura, K., Hino, T., Takahashi, S., *et al.*, *J. Biol. Chem.* **2004**, 279 55247.
- [2] Blomberg, M. R. A., Siegbahn, P. E. M., *Biochemistry* **2012**, 51, 5186.
- [3] Shoji, M., Hanaoka, K., Kondo, D., Sato, A., Umeda, H., Kamiya, K., Shiraishi, K., *Mol. Simul.* **2014**, 112, 393.
- [4] Attia, A. A. A., Silaghi-Dumitrescu, R., *J. Mol. Model.* **2015**, 21, 130.
- [5] Matsumura, H., Hayashi, T., Chakraborty, S., Lu, Y., Moënne-Loccoz, P., *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, 136, 2420.
- [6] Terasaka, E., Yamada, K., Wang, P.-H., *et al.*, *Prot. Nati. Acad. Sci. USA* **2017**, 114, 9888.
- [7] Lee, J., Cheng, X., Swails, J. M., *et al.*, *J. Chem. Theory, Comput.* **2016**, 12, 405.
- [8] Best, R. B., Zhu, X., Shim, J., *et al.*, *J. Chem. Theory, Comput.* **2012**, 8, 3257.
- [9] Jung, J., Mori, T., Kobayashi, C., *WIREs Comput. Mol. Sci.* **2015**, 5, 310.

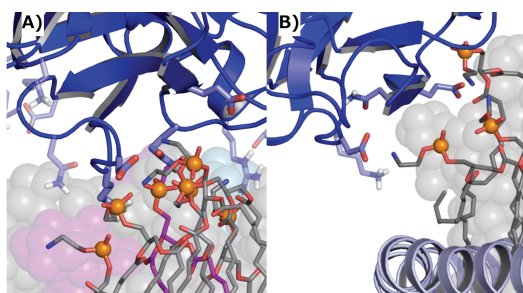


図 8: NiR-膜コンタクト部位のスナップショット

A) NiR:NOR 複合体+脂質二重膜系と B) NiR:NOR 複合体+ナノディスク系。残基と水素結合している脂質分子はスティックで、そうではない脂質分子は球で表している。