

研究終了報告書

「生体内量子多体系における特異的化学反应の機構解明」

研究期間：2019年10月～2023年3月

研究者：庄司光男

1. 研究のねらい

生体を用いている酵素反応はコスト、速度、安定性(耐性)のいずれの観点においても驚異的に優れており、その仕組みは生化学や化学における究極的探求課題となっている。現代社会において、エネルギー問題や食糧生産、環境汚染などを根本的に解決するには、自然系の究極的に優れた仕組みを学び、活用することが、1つの解決策となる。例えば、光合成の水分解反応や土壌細菌の窒素固定反応は無尽蔵の太陽エネルギー利用と現在環境負荷が高い肥料合成を可能にする。そのため、自然系の酵素が既に獲得している効率的な化学反応機構を解明することは極めて重要である。

本研究では、重要な生体内化学反応に注目し、反応機構の解明を電子量子状態から正確に決定する。

2. 研究成果

(1) 概要

酵素反応の反応機構は、結晶構造解析、分光学、反応速度解析、理論解析により解明がなされる。結晶構造解析では原子分解能で立体構造を解くことができるが、プロトン位置や電子状態については未だ難しい。分光学手法は極めて精密であるが、明確な帰属は困難であり、詳細な反応機構解明を行うことは難しい。

本研究では電子状態計算に基づいた理論解析により、生体内の重要な化学反応を解明する。特に量子状態を正確に決定することで、特異的な酵素反応を特定する。そのため、酵素活性中心の量子電子状態の解析法及び反応経路探索法を考案し、適用及び改善する。

(2) 詳細

研究テーマA「光合成光化学系II 酸素発生中心(PSII-OEC)」

PSII-OECは S_2 状態で基底状態 $S=1/2$ となり、PELDOR実験との対応ができるため、量子状態解析に適している。時分割シリアルフェムト秒結晶構造解析(TR-SFX)では S_2 状態は、 S_1 状態に比べ、Mnクラスター周辺の水分子とアミノ酸側鎖が再配置することが報告されている。そのため、 S_1 及び S_2 状態の量子分子動力学計算(QM/MM-MD、図1A)を実施し、熱力学的に安定な構造を探索した。しかしながら、限られた時間発展の理論計算では、 S_1 、 S_2 状態間で大きな差を得ることはできなかった。計算時間を5psから10psに増加させたが、依然としてエネルギー差が収束しなかった。 S_2 状態ではMnクラスターが量子状態変化に合わせて構造変化(R-openとL-open)する可能性がある。R-openでのQM/MM-MD計算は安定であるが、L-openの状態は不安定になり、基質水分子がMnクラスターに結合してしまう構造変化が現れ、これまでの反応サイクルと矛盾する結果が得られた。この理論計算結果の評価が難しく、現在慎重に研究を行

なっている段階である。PSII-OEC の反応解析は難しく、研究時間がかかるため、もう少し単純な酵素系についての量子状態解析を進めることにした。

人工光合成としての理論モデルとして、二核金属クラスターモデル(図1B)を提案し、酸素生成機構を金属中心を Fe/Mn/Co に変更して比較した。自然は何故 Mn 原子を反応中心に選んだかについて、理論研究を進めた。Mn < Fe < Co の順に反応性が向上し、反応選択性(副反応の抑制)は逆順となることを示すことができた。この Mn 原子の反応特異性が重要であると考え、現在、補強計算を実施し、論文としてまとめている段階である。

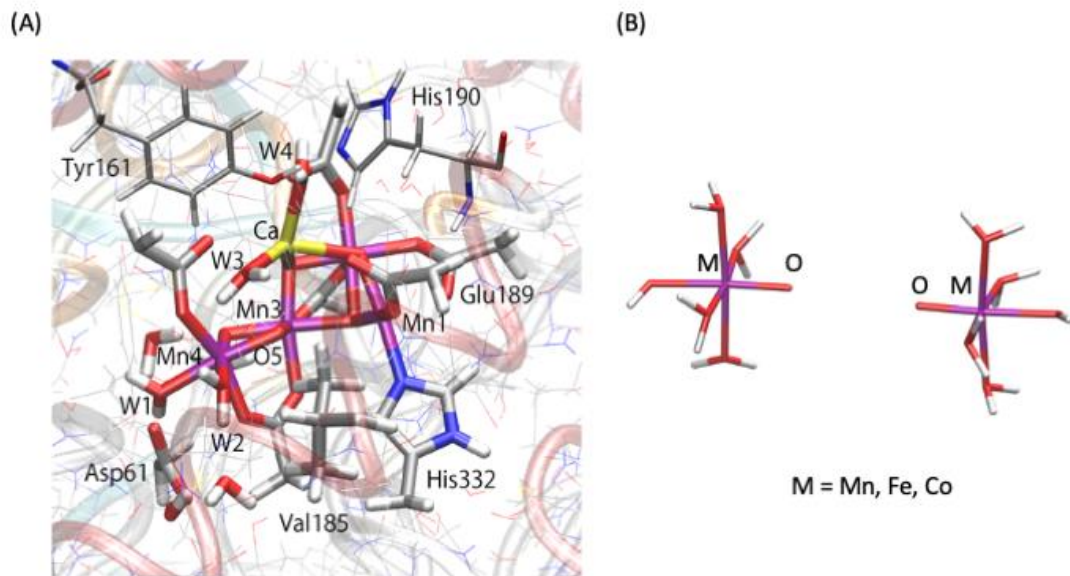


図 1. PSII-OEC の QM/MM-MD モデル(A)と最小二核モデル(B)

研究テーマ B「銅含有アミン酸化酵素(CAO)の反応機構の理論解明」

CAO は種々の生理活性アミン類の酸化的脱アミノ反応($\text{RCH}_2\text{NH}_3 + \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{RCHO} + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{NH}_3$)を触媒し、動植物や微生物に広く存在している。CAO は活性中心にトパキノン(TPQ)補酵素と銅イオンを保持し、特異的活性を発現している。還元的半反応の最終過程において TPQ から銅中心に一電子移動することにより、TPQ はセミキノラジカル(TPQsq)になる。TPQsq 生成で大きな構造変化を伴うことが結晶構造解析から示唆されていたが、その反応機構は不明であった。本反応は、古典的な酵素反応、鍵と鍵穴モデル、のような活性中心が固定されている系とは異なり、動的な描像を与える新しい酵素系である。この非古典的な酵素反応の仕組みについて量子古典混合(QM/MM)計算により、詳細な反応機構を解明し、分光測定及び変異体構造解析結果と良く対応する結果が得られた。論文は RSC Chem. Sci.誌に採択された。

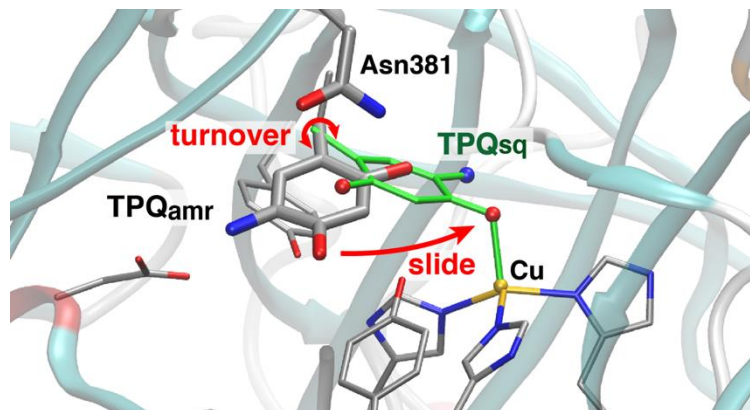


図2. CAO のセミキノンラジカル生成における大きな TPQsq の構造変化

研究テーマ C「サルコシンオキシダーゼ(MSOX)における酵素反応機構の理論解明」

サルコシンオキシダーゼ(MSOX)はサルコシン(N-methylglycine)やアミノ酸を酸化的に分解し、微生物の代謝作用を支えている。MSOX はアミン酸化酵素(AO)の中でも古くから知られており、産業応用もなされているが、反応機構については不明な点が多かった。これまで、代表的な3つのメカニズム、single electron transfer (SET), polar, hydride transfer (HT)が提唱されてきているが、基質によって全てあり得るとされていた。SET 機構は、シクロプロピルグリシン(CPG)において最も妥当とされてきたが、適用基質範囲は明確でなかった。そこで、QM/MM 法を用いて、MSOX の CPG 基質に対する反応機構を詳細に理論検証した。反応機構は最有力説とされていた SET 機構ではなく、polar 機構であることが明確になった。反応中間体は可視紫外吸収スペクトル計算で帰属を行なったところ、新規イミン種であることを明らかにした。サルコシン基質に対しては HACET 機構で反応が進行することを以前解明したが、今回の polar 機構と類似点があるため、MSOX のアミン酸化反応には普遍的な反応活性化機構があることについて報告し、Phys. Chem. Chem. Phys 誌に掲載された。

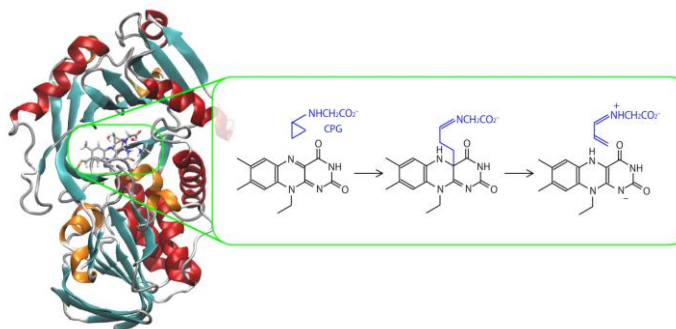


図3.理論計算で明らかにした CPG 基質における MSOX 反応機構

研究テーマ D「生命の起源」

生体を構成するキラルな生体分子であるアミノ酸は、非生物的に生成し、生命起源になった可能性が指摘されている。アミノ酸を星間空間で分子検出することは未だ難しいが、はやぶさ2のサンプルリターン計画では、小惑星に直接試料を採取しに行き、地上で精密分析することが可能になっている。近年では、リュウグウ粒子からはアミノ酸が同定されたと報告されている。アミノ酸はキラル分子であるため、ホモキラリティー起源に注目することで、アミノ酸起源を紐解くことが可能である。本研究では、量子分子物性の観点からアミノ酸のホモキラリティー問題を検討することを試みた。生命誕生の初期過程において円偏光による不斉分解の存在が提案されていたが、具体的な分子機構は未解明であった。アミノ酸の円偏光吸収特性(CDスペクトル)が重要な指標となるが、高いエネルギー領域(> 9eV)では十分に実験的測定がなされていなかった。そのため、高精度量子化学計算でCDスペクトルを求め、既存のCDスペクトルが十分に再現される計算条件を確認し、複数のアミノ酸でCDスペクトル計算を実施した。非天然アミノ酸であるイソバリンはCDスペクトルが他のアミノ酸(α -H)と反転していることから、アミノ酸化学種ではアミノ酸共通のホモキラリティーは説明できないことが示された。次に、非生物学的アミノ酸生成反応上に存在するキラルなアミノ酸前駆体についてCDスペクトル計算を行ったところ、アミノニトリル種のみが共通して10–11eV領域で同符号の異性体過剰を引き起こすことを見出した。10.2eVは銀河形成初期においてLy α 線として強く放射されるため、円偏光化されたLy α により、D体の光分解がより進み、L体が過剰になったシナリオ(図4)が導かれた。本研究成果を論文としてまとめ、論文採択時にプレスリリースを行った。

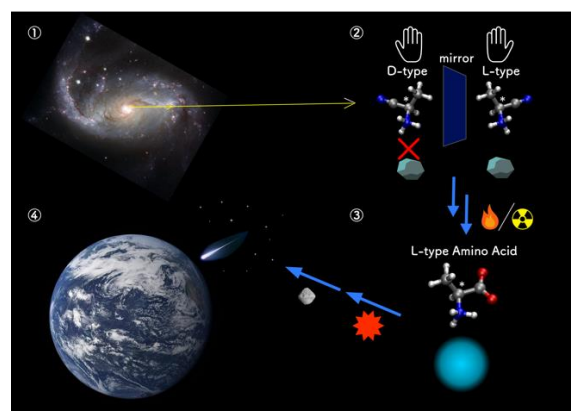


図4. アミノ酸の前生物的L体過剰生成機構概略図: ①銀河中心から円偏化されたライマンアルファ線が放射されることで、ダスト粒子上のアミノニトリル前駆体は選択的光分解反応を起こし、②L型のアミノニトリル前駆体が増加する(D体のアミノニトリル前駆体がより減少する)。③ダスト粒子が集積し、小惑星となり温度が上昇すると、アミノニトリル前駆体はキラリティーを保ったままアミノ酸に加水分解される。④小惑星間の衝突により、軌道が変わり、地球に落下した小天体(隕石)により、地上にアミノ酸のL型過剰がもたらされる。

3. 今後の展開

研究テーマ A は当初の目的を達成できておらず、今後も引き続き研究を実施し、正確に理論解析を実施していく。研究テーマ B は他の酵素反応過程について理論解析を進める。研究テーマ

マCは他のFAD酵素との関連性について研究発展することが可能となった。研究テーマDは引き続き、生命の起源について量子状態解析を深めていく。ニトロゲナーゼのFeMocoクラスターの解析はPSII-OECと共通点が多いため、今後研究を進める。現在、持続可能な社会の構築が求められている。自然系の光合成研究は太陽エネルギーを利用した人工光合成エネルギー変換技術に利用することが可能であり、5-10年後には本研究成果が社会実装に応用される様になると期待される。

4. 自己評価

当初の研究目的は研究テーマAとニトロゲナーゼ系の反応機構解析を進める計画であり、新しい計算手法を準備して研究を始めたが、想定以上に難しく、まとめるには時間がかかることがわかった。また、計算機の故障があり、計算をフルに実施することができなかった。そのため、もう少し簡単な系で研究を進め、研究の広がり、応用することを試みた。その結果、発展課題領域で幾つかの重要な研究成果を得るに至った。それ故に、研究テーマに縛られることなく、広い視野で量子的な反応解析技術を発展させることで、当初予測できなかった研究展開が可能になった。研究費は数値計算実行に不可欠な専用計算機の構築に充てたことで、独自研究を推進させることができた。さきがけ領域内で新たに連携できるテーマを見つけることができた。今後共同研究を進め、新領域の創生、さらには社会や経済への波及効果をもたらせるよう尽力する。現在、研究連携に向け、少しずつ研究を進めている。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数:15件

1. M. Shoji*, K. Kitazawa, A. Sato, N. Watanabe, M. Boero, Y. Shigeta, M. Umemura, Enantiomeric Excesses of Aminonitrile Precursors Determine the Homochirality of Amino Acids, *The Journal of Physical Chemistry Letters*, 2023, 14(13), 3243-3248. open access, DOI:10.1021/acs.jpcllett.2c03862

アミノ酸の異性体過剰率はマーチソン隕石でも見つかっているが、その分子機構は不明であった。特にイソバリンにおいて円二色性吸収(CD)スペクトルが生体構成アミノ酸、 α -Hアミノ酸、に比べ反転している問題がある。本課題解決のため、高精度電子状態計算を実行し、アミノ酸合成に関わるストレッカー反応上のアミノ酸前駆体に対して理論検討を行った。その結果、アミノニトリル化学種のみが共通して異性体過剰に寄与することが示された。

2. M. Shoji*, T. Murakawa, S. Nakanishi, M. Boero, Y. Shigeta, H. Hayashi, T. Okajima, Molecular mechanism of a large conformational change of the quinone cofactor in the semiquinone intermediate of bacterial copper amine oxidase, *Chemical Science*, 2022, 13(36), 10923-10938.

銅含有アミン酸化酵素(CAO)は、セミキノラジカル生成時に、トパキノン(TPQ)補酵素の大きなコンフォメーション変化を起こす。しかしながらその過程と理由は未解明であった。QM/MM法を用いて理論解明を進め、可能な反応経路を探索した。その結果、TPQの回転と

スライドの順番で構造変化が可能であり、途中、脱プロトン化と電子移動を起こしていることを示した。

3. M. Shoji*, Y. Abe*, M. Boero, Y. Shigeta, Y. Nishiya, Reaction Mechanism of Monomeric Sarcosine Oxidase with *N*-Cyclopropylglycine, *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2020, 22, 16552-16561. DOI: 10.1039/D0CP01679A, selected as the outside back cover

単量体サルコシンオキシダーゼ(MSOX)はフラビン酵素の代表例であり、サルコシンや他の2級アミンの酸化を触媒する。提案されている反応機構は、一電子移動、ヒドリド移動など、基質や他のアミン酸化酵素との類似性から議論されてきているが、反応機構は不明であった。本研究では一電子移動機構の根拠となる *N*-シクロプロピルグリシン(CPG)基質において量子古典混合計算法で反応機構の解明を行った。その結果、polar 機構が最もエネルギー的に妥当であることを示した。反応中の不活性種は新規イミンであり、エナミンではない事を、エネルギー的かつ UV/Vis 吸収スペクトル帰属から示した。本反応解析では CPG の初期のコンフォメーション変化が重要であることも理論的に示した。

(2)特許出願

なし

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. 庄司光男、量子生命科学会第2回大会、優秀講演賞受賞、2020/12/23.
2. 庄司光男、量子生命科学会第3回大会、優秀講演賞受賞、2021/9/16.
3. 庄司光男、量子生命科学会第4回大会、優秀講演賞受賞、2022/5/26.
4. 庄司光男、プレスリリース: アミノ酸のホモキラリティ獲得の分子機構を解明～量子化学計算で生命の起源を探る～ (筑波大、CCS、日経新聞)、2023/3/30.
5. 庄司光男、量子生命科学会、研究奨励賞受賞、2023/5/19.