

令和元年6月11日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H02217

研究課題名(和文) ソフトマシンとしてのタンパク質の機能制御

研究課題名(英文) Functional regulation of protein soft machines

研究代表者

笹井 理生 (Sasai, Masaki)

名古屋大学・工学研究科・教授

研究者番号：30178628

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 33,900,000円

研究成果の概要(和文)：理論と実験の協力により、タンパク質の動的ランドスケープの原理について研究を行った。タンパク質の粗視化計算モデルを開発し、タンパク質の構造転移を合理的に説明する動的ランドスケープの計算を行った。さらに、統計力学モデルによってフォールディング、タンパク質系の振動を理論的に解析した。また、マルチタイムスケールのNMR緩和測定を行い、複数の酵素や天然変性タンパク質の特性を解析した。さらに網羅的なアミノ酸置換によってアルカン合成酵素をはじめとするタンパク質を解析した。こうした成果に基づき、タンパク質機能の工学的変換の原理を解析した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新しい粗視化計算モデル、統計力学モデルを開発するとともに、マルチスケールNMR緩和測定法により、ピコ秒からミリ秒に及ぶ構造変化ダイナミクスを解析するための学術的方法論を整備することができた。また、網羅的なアミノ酸置換により、バイオ燃料を生産できるアルカン合成酵素の可溶性と酵素活性の向上のための変換、リン資源の枯渇を防ぐ上で有用な酵素の機能向上のための変換など、タンパク質工学の基礎技術を発展させ、タンパク質の基礎知識と概念の社会的問題への適用可能性を示すことができた。

研究成果の概要(英文)：We have carried out the cooperative research of theory and experiment to reveal the principles of dynamical energy landscape of protein functions. We developed a new coarse-grained computational model of protein structure transitions, the chameleon model, and showed that the model explains allosteric transitions of model proteins in a consistent way. We further developed a statistical mechanical model of protein folding. Synchronization and desynchronization of the oscillatory protein system, the KaiABC system, were analyzed with a coarse-grained description of protein structural transitions and reactions. The multi-time scale NMR relaxation method was applied to the analyses of features of enzymes and intrinsically disordered proteins. Furthermore, comprehensive amino acid replacements were carried out on enzymes including alkane synthetase. On the basis of these theoretical and experimental development, a new possibility of protein engineering has been explored.

研究分野：生物物理学

キーワード：動的ランドスケープ 粗視化動力学モデル マルチスケールNMR測定 網羅的変異解析

## 1. 研究開始当初の背景

タンパク質はどのようにして、高効率で特異的な機能を示すのだろうか？エネルギー変換、情報処理、物質輸送など、タンパク質の機能の多くは構造変化に基づいているが、従来の理解では「タンパク質は、結晶解析で精密に決まった構造間を、決まった経路を経て順番に遷移する」という仮定に基づくことが多かった。しかし、近年の1分子計測やNMRのデータは、大きくダイナミックに揺らぐ蛋白質の姿を明らかにしており、一意的な経路に従わずに確率的に柔らかく動く、**ソフトマシン**としての蛋白質を理解する必要に迫られている（図1）。多様な構造変化がいかに収斂して特異的結合を実現させるか？構造揺らぎはどのように触媒反応を制御するか？こうした問題を理解してタンパク質の機能を制御するためには、広範な構造変化経路とそれに伴う自由エネルギー変化、すなわち、構造変化の自由エネルギーランドスケープを定量的に理解することが必要である。とりわけ、リガンド結合や化学反応など、状況に応じてランドスケープ自体が動的に変化する過程を扱う動的ランドスケープ描像の重要性が認識され始めており、これをテーマとして特集する論文誌や国際会議が登場して、生物物理学におけるパラダイムシフトが進みつつある。

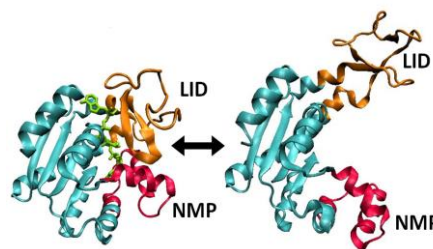


図1 アデニル酸キナーゼは、**closed** 構造（左）と **open** 構造（右）の間をミリ秒程度の時間で揺らぐタンパク質であるが、このソフトな構造揺らぎを巡って、多くの未解決問題がある。

## 2. 研究の目的

本研究では理論と実験の協力により、動的ランドスケープの原理を明らかにしてタンパク質研究を進展させる。そのため、新しいタイプの粗視化動力学モデルを開発し、多階層時間をカバーするNMR緩和測定、網羅的変異解析など新技術を展開して、タンパク質の柔軟な構造変化を理論、実験の両面から捉える方法を構築する。さらに、動的ランドスケープの設計原理に基づき、反応を制御する新技術を開発する。

(1) タンパク質のアロステリック転移は多くの場合、ミリ秒以上の時間スケールを持つため、通常の原子レベル分子動力学の計算範囲を超えており、粗視化モデルの適用が不可欠である。しかし、未だアロステリック転移を記述する首尾一貫した粗視化モデルは開発されておらず、タンパク質科学に残された課題の1つとなっている。本研究では、アミノ酸残基の多体相関を取り入れた粗視化動力学モデルを開発し、アロステリック転移の動的ランドスケープを計算することにより、転移経路、構造変化の分子内伝達、アンフォールディング/フォールディングとアロステリック転移の協同と競合など、これまで計算できなかった重要な性質を解明し、柔軟な揺らぎの中で構造が選択される機構を明らかにする。

(2) 本研究では、とくに酵素反応に注目し、構造転移による反応の制御機構を解析する。酵素反応には、基質結合、触媒反応、生成物解離の素過程が存在するが、複数の緩和時間についての高精度NMR測定、分子動力学計算を組み合わせるマルチスケールの解析を行い、各ステップにおける自由エネルギーランドスケープを解析する。反応ステップの進行に伴うランドスケープの変化と、ランドスケープ上の運動として表される構造変化がカップルした動的な機構を明らかにする。さらに、動的ランドスケープの改変によって、タンパク質の動きと反応を制御できると期待される。分子動力学計算によって活性部位の周辺配列への変異導入による構造揺らぎの変化を予測し、触媒活性の変化を実験的に測定してその効果を検証する。

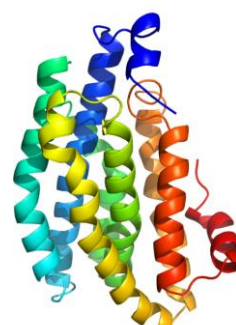


図2 構造インフォマティクスの方法で求められたADOの構造

(3) ラン藻由来のアルカン合成酵素であるアルデヒド脱ホルミル化オキシゲナーゼ（ADO, 図2）のアミノ酸置換変異体を網羅的に作製し、構造揺らぎの制御による酵素活性の改良を試みる。理論と実験の協力により、揺らぎ制御によるタンパク質工学の基礎をつくる。

### 3. 研究の方法

(1) ピコ秒からミリ秒に及ぶ構造変化ダイナミクスを解析するため、分子動力学、構造インフォマティクスの方法に加え、アロステリック構造転移を記述するカメレオンモデルを開発する。

(2) カメレオンモデルと統計力学モデルを用いて、フォールディングの自由エネルギーランドスケープを計算し、 $\phi$  値解析、マルチタイムスケールの NMR 緩和測定、詳細な熱力学的・速度論的測定により、高次元自由エネルギーランドスケープの可視化法を構築する。

(3) マイクロ秒からミリ秒をカバーする手法である NMR  $R_2$  緩和分散を用いた測定法を発展させる。

(4) こうして得られる方法、および網羅的なアミノ酸置換変異解析を用いて、酵素反応、リガンド結合、ランドスケープにガイドされる運動によってタンパク質の機能が制御される仕組みを明らかにする。

(5) 動的ランドスケープの概念と方法を用いて、触媒活性を制御する揺らぎ設計技術を開発する。

### 4. 研究成果

(1) カメレオンモデルの開発を行い、図 1 のアデニル酸キナーゼの構造転移を合理的に説明する動的ランドスケープの計算を行った。また、アクチン線維上を他のミオシンとは逆方向に進むミオシンである、ミオシン VI の動的ランドスケープを計算し、ミオシン VI の運動機構を説明する理論モデルを提案した。

(2) カメレオンモデルと WSME モデルを用いて、フォールディングの自由エネルギーランドスケープを計算し、 $\phi$  値解析をはじめとしたフォールディングに関するデータを合理的に説明する動的ランドスケープの導出に成功した。また、粗視化された統計力学的モデルを用いて、シアノバクテリアのタンパク質 KaiABC の反応と構造が KaiABC 系の振動における同調やノイズを制御する機構を説明した。

(3)  $R_2$  緩和分散測定法などの NMR 法を用いて、ジヒドロ葉酸還元酵素 (DHFR) や ADO、天然変性タンパク質の構造や動態を分析し、動的ランドスケープの概念を発展させた。

(4) 上記の知見に基づいて DHFR と ADO の触媒活性を向上させる変異体を理論的に設計し実験で検証した結果、実際に活性を向上させることに成功した。

(5) HIV-1 の転写因子 Tat は天然変性部位を持つタンパク質であり、HIV-1 が人間の免疫機能を回避する仕組みにおいて重要な役割を果たす。CD, NMR, 小角 X 線散乱を用いて Tat タンパク質の構造を探り、pH7 で Zn を結合した Tat は大きく乱れた構造を持っていることを示した。この乱れは Zn 結合の有無、pH に依存していることを示す成果を得た。

(6) 肥料中のリンは植物が吸収しにくい形態 (フィチン酸) として存在するため、リンを有効活用してリン資源の枯渇を防ぐためには、フィチン酸分解酵素 AppA の利用が有効である。AppA の活性ループ内でアラニン/グリシンスキャン変異解析を行った結果、酵素機能の発現に重要な残基を同定できた。

(7) 10 種類のシアノバクテリアから得た ADO を大腸菌により合成して、その性質を調べた。とりわけ、10 種類のうち可溶性が高く、そのため取得量が多いが酵素活性の低い 7421ADO と、可溶性が低いが酵素活性の高い 7942ADO を比較し、網羅的なアミノ酸置換変異により、進化的に保存されていない場所の置換が酵素活性を大きく変えることを発見した。可溶性が高く酵素活性が高い ADO をデザインすることに成功した。

(8) ADO とともにアルカン合成に関与する酵素であるアシル ACP 還元酵素 (AAR) のアミノ酸配列を変えると、酵素活性と基質特異性の両方を制御可能であることを見出した。また AAR の構造揺らぎを制御するアミノ酸の同定や、酵素活性を向上させた変異体の構築に成功した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 18 件)

- ① H Kudo, Y Hayashi, & M Arai (2019) Identification of non-conserved residues essential for improving the hydrocarbon-producing activity of cyanobacterial aldehyde-deformylating oxygenase. *Biotechnology for Biofuels*, 12: 89\_1-17. 査読有  
DOI: 10.1186/s13068-019-1409-8. 査読有
- ② M Wada, Y Hayashi, & M Arai (2019) Mutational analysis of a catalytically important loop containing active site and substrate binding site in *Escherichia coli* phytase AppA. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 83: 860-868. 査読有  
DOI: 10.1080/09168451.2019.1571897
- ③ R Nagashima, K Hibino, SS Ashwin, M Babokhov, S Fujishiro, R Imai, T Nozaki, S Tamura, T Tani, H Kimura, M Shribak, MT Kanemaki, M Sasai, & K Maeshima (2019) Single nucleosome imaging reveals loose genome chromatin networks via active RNA polymerase II. *Journal of Cell Biology*, 218: 1511-1530. 査読有  
DOI: 10.1083/jcb.201811090
- ④ T Kuniyama, Y Hayashi, & M Arai (2019) Conformational diversity in the intrinsically disordered HIV-1 Tat protein induced by zinc and pH. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 509: 564-569. 査読有  
DOI: 10.1016/j.bbrc.2018.12.126
- ⑤ M Sasai (2019) Effects of stochastic single-molecule reactions on coherent ensemble oscillations in the KaiABC circadian clock. *Journal of Physical Chemistry B* 123: 702-713. 査読有 DOI: 10.1021/acs.jpcc.8b10584
- ⑥ T Kenri, Y Kawakita, H Kudo, U Matsumoto, S Mori, Y Furukawa, YO Tahara, K Shibayama, Y Hayashi, M Arai, & M Miyata (2019) Production and characterization of recombinant P1 adhesin essential for adhesion, gliding, and antigenic variation in the human pathogenic bacterium, *Mycoplasma pneumoniae*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 508: 1050-1055. 査読有  
DOI: 10.1016/j.bbrc.2018.11.132
- ⑦ S Das, TP Terada, & M Sasai (2018) Single-molecular and ensemble-level oscillations of cyanobacterial circadian clock. *Biophysics and Physicobiology* 15: 136-150. 査読有  
DOI: 10.2142/biophysico.15.0\_136
- ⑧ J Kujirai, S Nanba, T Kadowaki, Y Oka, Y Nishiyama, Y Hayashi, M Arai, & Y Hihara (2018) Interaction of the GntR-family transcription factor Sll1961 with thioredoxin in the cyanobacterium *Synechocystis sp.* PCC 6803. *Scientific Reports* 8: 6666\_1-11. 査読有  
DOI: 10.1038/s41598-018-25077-5
- ⑨ M Arai (2018) Unified understanding of folding and binding mechanisms of globular and intrinsically disordered proteins. *Biophysical Reviews* 10: 163-181. 査読有  
DOI: 10.1007/s12551-017-0346-7
- ⑩ S Das, TP Terada, & M Sasai (2017) Role of ATP hydrolysis in cyanobacterial circadian oscillator. *Scientific Reports* 7: 17469\_1-10. 査読有  
DOI: 10.1038/s41598-017-17717-z
- ⑪ T Takenaka, T Nakamura, S Yanaka, M Yagi-Utsumi, MS Chandak, K Takahashi, S Paul, K Makabe, M Arai, K Kato, & K Kuwajima (2017) Formation of the chaperonin complex studied by 2D NMR spectroscopy. *PLoS ONE* 12: e0187022\_1-15. 査読有  
DOI: 10.1371/journal.pone.0187022
- ⑫ T Otsu, K Ishii, H Oikawa, M Arai, S Takahashi, & T Tahara (2017) Highly heterogeneous nature of the native and unfolded states of B domain of protein A revealed by two-dimensional fluorescence lifetime correlation spectroscopy. *Journal of Physical Chemistry B* 121: 5463-5473. 査読有  
DOI: 10.1021/acs.jpcc.7b00546
- ⑬ N Tokuda & M Sasai (2017) Heterogeneous spatial distribution of transcriptional activity in budding yeast nuclei. *Biophysical Journal* 112: 491-504. 査読有  
DOI: 10.1016/j.bpj.2016.11.3201
- ⑭ 新井 宗仁、林 勇樹、工藤 恒 (2017) ラン藻由来アルカン合成関連酵素の高活性化と軽油生産性の向上. 月刊ファインケミカル 46: 19-25. 査読無
- ⑮ 日原 由香子、朝山 宗彦、蘆田 弘樹、天尾 豊、新井 宗仁、粟井 光一郎、得平 茂樹、小山 内崇、鞆 達也、成川 礼、蓮沼 誠久、増川 一 (2017) 多彩な戦略で挑むシアノバクテリア由来の燃料生産 — 持続可能な第三世代バイオ燃料生産の最前線. 化学と生物 55: 88-97. 査読有
- ⑯ M Sasai, G Chikenji, & TP Terada (2016) Cooperativity and modularity in protein folding. *Biophysics and Physicobiology* 13: 281-293. 査読有  
DOI: 10.2142/biophysico.13.0\_281
- ⑰ H Kudo, R Nawa, Y Hayashi, & M Arai (2016) Comparison of aldehyde-producing activities

of cyanobacterial acyl-(acyl carrier protein) reductases. *Biotechnology for Biofuels* 9: 234\_1-15. 査読有

DOI: 10.1186/s13068-016-0644-5

- ⑱ T Okuno, K Kato, S Minami, TP Terada, M Sasai, & G Chikenji (2016) Importance of consensus region of multiple-ligand templates in a virtual screening method. *Biophysics and Physicobiology* 13: 149-156. 査読有  
DOI: 10.2142/biophysico.13.0\_149

[学会発表] (計 87 件) うち招待講演 14 件 / うち国際学会 14 件

- ① M Arai (2019) “Experimental and theoretical design of enzymes and binding proteins”, 分子研研究会 *New Frontier in Protein Design & Engineering* 招待講演.
- ② TP Terada, Q-M Nie, & M Sasai (2018) “Free energy landscape for the Brownian motion of the leading head of myosin VI during the stepping motion”, *The 2nd workshop on Advances in Theory and Computation of Complex Systems - Biological Systems* 招待講演 国際学会.
- ③ S Fujishiro & M Sasai (2018) “Heterogeneous repulsive interactions among local chromatin regions is responsible for the three-dimensional organization of human genome”, *Cold Spring Harbor Workshop, Nuclear Organization & Function* 国際学会.
- ④ M Arai (2018) “Current and future perspectives of protein design”, 第18回日本蛋白質科学会年会ワークショップ蛋白質工学の過去・現在・未来：1983年からの35周年を記念して招待講演.
- ⑤ SS Ashwin, T Nozaki, K Maeshima, & M Sasai (2018) “Inferring chromatin packing properties from the dynamical characterization of nucleosomes in live cells”, *Workshop on Chromatin Biophysics* 招待講演 国際学会.
- ⑥ S Fujishiro & M Sasai (2018) “Heterogeneous chromatin accessibility establishes human nuclear organization”, *Workshop on Chromatin Biophysics* 招待講演 国際学会.
- ⑦ SS Ashwin, T Nozaki, K Maeshima, & M Sasai (2018) “Inferring chromatin packing properties from the dynamical characterization of nucleosomes in live cells”, *International Conference on Advances in Physics of Emergent Orders in Fluctuation* 国際学会.
- ⑧ D Matsuike, YO Tahara, T Hamaguchi, M Arai, & M Miyata (2018) “Structural analyses of Gli123 protein, essential for *Mycoplasma mobile* gliding”, *22nd Congress of the International Organization for Mycoplasmaology* 国際学会.
- ⑨ 新井 宗仁 (2017) “分子動力学シミュレーションによるラン藻由来アルカン合成酵素の構造ダイナミクス解析”, ラン藻ゲノム交流会 2017 招待講演.
- ⑩ S Fujishiro & M Sasai (2017) “The phase-separation principle of human genome architecture”, 第55回日本生物物理学会年会 招待講演.
- ⑪ Y Hayashi, J Inatomi, Y Nomura, M Wada, H Kudo, H Kawai, Y Oka, Y Kawakita, M Yabe, T Hamaguchi, A Takamori, M Miyata, & M Arai (2017) “Structural analysis of the gliding protein Gli349 from *Mycoplasma mobile* by domain fragmentation”, *International Symposium on Harmonized supramolecular motility machinery and its diversity* 国際学会.
- ⑫ D Matsuike, YO Tahara, T Hamaguchi, M Arai, & M Miyata (2017) “Structural analyses of Gli123 protein, essential for *Mycoplasma mobile* gliding”, *International Symposium on Harmonized supramolecular motility machinery and its diversity* 国際学会.
- ⑬ S Fujishiro & M Sasai (2017) “The phase-separation principle of human genome folding”, *CSRC Workshop on DNA Chromosome Structure and Dynamics* 招待講演 国際学会
- ⑭ SS Ashwin & M Sasai (2017) “Role of dynamical DNA methylation in gene regulation”, *International Conference on Biological Physics 2017* 国際学会.
- ⑮ M Sasai (2017) “Genome folding: Analogy to protein folding problems”, *The Third Korean-Polish Conference on "Protein Folding: Theoretical and Experimental Approaches"* 招待講演 国際学会.
- ⑯ S Fujishiro & M Sasai (2017) “The 3D Genome Architecture and Transcriptional Regulation”, *Gordon Research Conference on Stochastic Physics in Biology* 招待講演 国際学会.
- ⑰ S Fujishiro & M Sasai (2016) “3D Genome Architecture Inferred from Epigenome”, *The 3rd International Conference on Computational Science and Engineering* 招待講演 国際学会.
- ⑱ M Sasai (2016) “Dynamical Energy Landscape Perspective of Protein Functioning”, *The 2nd Polish-Korean Conference on "Protein Folding: Theoretical and Experimental Approaches"* 招待講演 国際学会.

[図書] (計 2 件)

- ① M Arai, Y Hayashi, & H Kudo (2018) “Cyanobacterial enzymes for bioalkane production”, Chapter 6 in *Synthetic Biology of Cyanobacteria*, Springer Nature Singapore Pte Ltd. 36 ページ

- ② N Tokuda & M Sasai (2017) “Modeling of genomes”, Chapter 9 in *Coarse-Grained Modeling of Biomolecules*, CRC Press Taylor & Francis Group, 26 ページ

[その他]

ホームページ [http://www.tbp.cse.nagoya-u.ac.jp/HM\\_project.html](http://www.tbp.cse.nagoya-u.ac.jp/HM_project.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：新井 宗仁

ローマ字氏名： **Munehito Arai**

所属研究機関名：東京大学

部局名：大学院総合文化研究科

職名：教授

研究者番号 (8 桁)：90302801