

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 3 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2017～2020

課題番号：17H04854

研究課題名(和文) 生体分子の機能発揮機構における水和構造の役割の解明

研究課題名(英文) Elucidation of thermodynamic roles of hydration structure in protein functions

研究代表者

苮口 友隆 (Oroguchi, Tomotaka)

慶應義塾大学・理工学部(矢上)・講師

研究者番号：90589821

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 19,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、「蛋白質の構造変化過程における水和構造の役割の解明」である。この目的のためには、蛋白質の溶液中における構造アンサンブルを可視化し、そのアンサンブルの形成におけるすわい構造の自由エネルギー寄与を明らかにする必要がある。そのために、(1)実験とMDシミュレーションの統合的手法による蛋白質構造アンサンブル可視化法の開発を行い、さらに、(2)蛋白質構造変化に伴う溶媒和自由エネルギー変化の解析方法を開発した。これらの手法により、蛋白質の機能的構造変化の駆動メカニズムを説明するためには、水和構造によるエネルギー的寄与が必須であることが明らかになりつつある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生命の営みには『水』の存在が不可欠であるが、その大きな要因としては、生命活動の素過程を担うタンパク質や核酸といった生体分子が機能するためには、水環境が必須であることが挙げられる。では、なぜ生体分子は機能発現に水環境を必要とするのか？この疑問に答えるためには、生体分子近傍の水和構造を詳しく調べ、その構造を基に、生体分子の構造変化過程といった機能発揮過程において水が果たしている役割を熱力学的に明らかにする必要がある。本研究において開発された構造変化の解析方法は、このような熱力学的研究を可能にし、水和構造の役割を明らかにしつつある。

研究成果の概要(英文)：To reveal the role of water molecules in a protein functional motion in MD simulation, it is necessary to visualize a free-energy map (conformational ensemble) of protein motions and then investigate thermodynamic contribution of waters to the map. For these purposes, we have developed the two methods to analyse conformational ensembles of proteins; (i) the Bayesian optimization method of MD ensemble to obtain realistic ensemble that can reproduce experimental data, and (ii) the method to calculate solvation free energy changes along protein motions. By applying these methods to MD simulation and solution scattering experiments of proteins, we have begun to reveal that the mechanism of the protein conformational motions cannot be accounted without the thermodynamic contribution of waters surrounding the protein molecules.

研究分野：生物物理

キーワード：生体分子 機能的構造変化 水和構造 溶媒和自由エネルギー 分子動力学シミュレーション 溶液散乱実験 ベイズ統計

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生物細胞の体積の70%が水で占められていることから類推できるように、生命の営みには『水』の存在が不可欠である。生命が水を必要とする大きな要因としては、生命活動の素過程を担うタンパク質や核酸といった生体分子が構造形成し機能するためには、水環境が必須であることが挙げられる。では、なぜ生体分子は構造形成や機能発現に水環境を必要とするのか？この疑問に答えるためには、生体分子と水の界面における水分子の分布状態『水和構造』を原子レベルで詳しく調べ、その構造を基に、生体分子の構造変化過程や基質認識過程といった機能発揮過程において水が果たしている役割を熱力学的に明らかにする必要がある。

申請者はこれまで、X線回折散乱実験や分子動力学計算を組み合わせることで、溶液中における生体分子構造を、その水和構造も含めて可視化する解析方法を開発してきた。この手法により、生体分子周りの水は一様な媒質として近似する従来の考え方では説明できない、分子表面の性質に依存した特異的な水和構造の形が明らかになりつつある。このような特異的な水和構造が、構造変化や基質認識といった生体分子の機能発揮過程において果たす役割を明らかにする。

2. 研究の目的

本研究課題の目的は、「蛋白質の構造変化過程における水和構造の役割の解明」である。この目的のためには、蛋白質構造が溶液中においてどのような構造を取り得るか、すなわち、蛋白質の構造アンサンブル (= 自由エネルギー地形) を可視化し、そのアンサンブルの形成における溶媒の自由エネルギー寄与を明らかにする必要がある。そのために、本課題においては、(1) 実験と MD シミュレーションの統合的手法による蛋白質構造アンサンブル可視化法の開発、及び、(2) 蛋白質構造変化に伴う溶媒和自由エネルギー変化の解析方法の開発、の2つの研究項目を行った。

3. 研究の方法

(1) 溶液中における蛋白質の構造アンサンブルに関する情報を得る実験手法としては、溶液 X 線散乱 (SAXS) や NMR があるが、実験で得られる構造情報は、低分解能もしくは部分的といった特徴があり、その解析には原子分解能の MD シミュレーションが必要である。本項目においては、ベイズ統計を用いた実験と計算の統合手法を開発し、実験情報を再現できる構造アンサンブルを MD シミュレーションの結果から得られるか検証した。

(2) 蛋白質の構造変化機構を熱力学的に明らかにするためには、溶媒のエネルギー的寄与を明らかにすることが必須である。そのためには構造変化に伴う溶媒和自由エネルギーの変化を求める必要があるが、従来の溶媒和自由エネルギー計算法は揺らぎを持つ蛋白質構造には適用が困難であり、MD シミュレーションにおいて構造を拘束しておく必要があった。そこで、本研究項目においては、揺らぎを持つ蛋白質構造にも適用可能な溶媒和自由エネルギー計算法 rf-GIST 法を開発した。

4. 研究成果

本研究において成果が得られた、もしくは進行中の研究項目は主に3つある。以下にそれぞれについて説明する。

(1) 低温電子顕微鏡データを用いた MD 力場の信頼性評価

本研究項目においては、低温電子顕微鏡法 (cryoEM) によって得られた溶液中の生体分子構造を参照として、MD 力場セットの信頼性評価を行った。cryoEM の構造情報は局所構造・全体構造の情報を共に含んでおり、MD シミュレーションにおける分子構造の評価に有用だと思われるが、低解像度・分子量の大きさ等の問題により、これまで用いられたことはなかった。本研究では、高解像度で得られた cryoEM データを用いた力場セットの評価を世界で初めて行

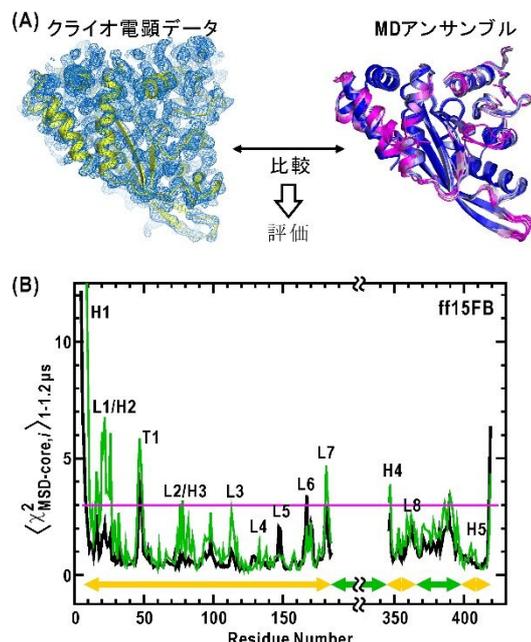


図1. クライオ電顕データとMDシミュレーションの比較によるMD力場の評価。

った(図 1)。その結果、AMBER ff15FB 力場が最も良く実験データを再現し、対して CHARMM 系の力場は再現性が低いことが明らかになった(*J. Phys. Chem. B* にて出版)。

(2) 蛋白質構造変化に伴う溶媒和自由エネルギー変化の解析方法の開発

溶液中における蛋白質の構造アンサンブルに関する情報を得る実験手法としては溶液散乱(SANXS)があるが、得られる構造情報は、低分解能もしくは部分的といった特徴があり、その解析には原子分解能の MD シミュレーションが必要である。本項目においては、ベイズ統計を用いた実験と計算の統合手法を開発し、実験情報を再現できる構造アンサンブルを MD シミュレーションの結果から得られることを示した(図 2)。本手法を SAXS と MD の連携に適用し、幾つかのモデル蛋白質の構造アンサンブルを可視化することに成功した。

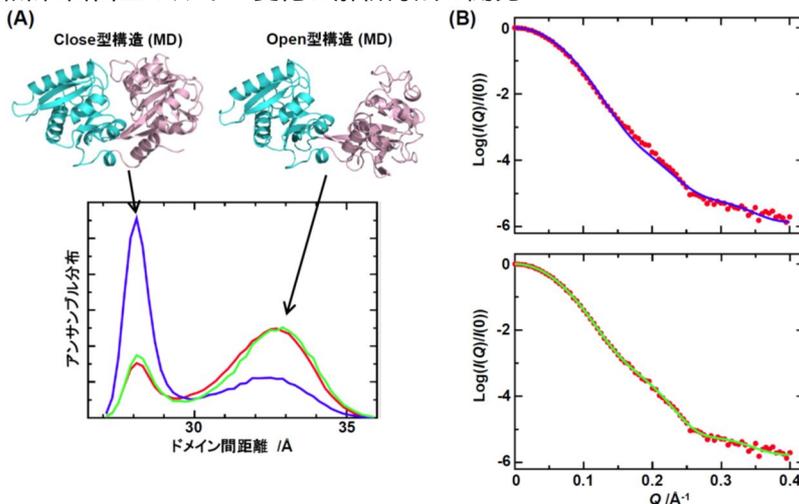


図 2. SANXS データとベイズ統計を用いた MD アンサンブルの最適化。(A) モデル蛋白質系 transferrin の構造変化(上パネル)。構造アンサンブルの分布(下パネル)； MD シミュレーションによって得られた構造アンサンブル(青線)、構造アンサンブルの正解(赤線)、実験データを用いて最適化した MD アンサンブル(緑線)。(B) SANXS データ。実験データ(赤マーク)、MD アンサンブルからの計算データ(青線)、最適化アンサンブルの計算データ(緑線)

(3) 正しく蛋白質構造を取り扱える MD 力場の検証及び開発

蛋白質の構造変化機構を熱力学的に明らかにするためには、溶媒のエネルギー的寄与を明らかにすることが必須である。そのためには構造変化に伴う溶媒和自由エネルギー変化を求めることが必要になるが、従来の溶媒和自由エネルギー計算法は揺らぎを持つ蛋白質構造には適用が困難であり、MD シミュレーションにおいて構造を拘束しておく必要があった。そこで、本研究項目においては、揺らぎを持つ蛋白質構造にも適用可能な溶媒和自由エネルギー計算法 rf-GIST 法を開発した。本手法により、(i) 大きな機能的構造変化を伴わない蛋白質の平均構造周りの平衡揺らぎ、(ii) ドメイン運動といった蛋白質の機能的構造変化、の 2 種類の蛋白質構造の運動における溶媒のエネルギー的寄与を明らかにした(図 3)。本手法により、溶媒によるエネルギー的寄与により、蛋白質の構造変化が制御されていることが明らかになった。

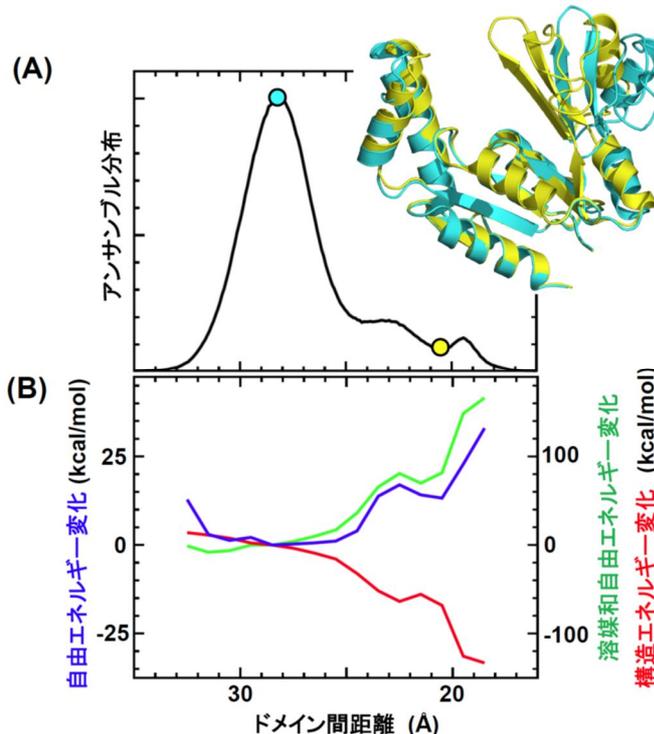


図 3. 蛋白質の機能的構造変化における溶媒のエネルギー的寄与の解析。(A) MD シミュレーションによって得られた、Maltose binding 蛋白質の自発的ドメイン運動。グラフは構造分布を示す。(B) 構造変化に伴う自由エネルギー変化(青線)。構造エネルギーの寄与(赤線)、溶媒和自由エネルギーの寄与(緑線)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計14件（うち査読付論文 14件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Amane Kobayashi, Yuki Takayama, Takeshi Hirakawa, Koji Okajima, Mao Oide, Tomotaka Oroguchi, Yayoi Inui, Masaki Yamamoto, Sachihito Matsunaga, Masayoshi Nakasako	4. 巻 11
2. 論文標題 Common architectures in cyanobacteria Prochlorococcus cells visualized by X-ray diffraction imaging using X-ray free electron laser	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific reports	6. 最初と最後の頁 3877
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-83401-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tomotaka Oroguchi, Mao Oide, Taiki Wakabayashi, Masayoshi Nakasako	4. 巻 124
2. 論文標題 Assessment of Force Field Accuracy Using Cryogenic Electron Microscopy Data of Hyper-thermostable Glutamate Dehydrogenase	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Physical Chemistry B	6. 最初と最後の頁 8479-8494
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jpcc.0c04464	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Asahi Fukuda, Tomotaka Oroguchi, Masayoshi Nakasako	4. 巻 1864
2. 論文標題 Dipole-dipole interactions between tryptophan side chains and hydration water molecules dominate the observed dynamic Stokes shift of lysozyme	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects	6. 最初と最後の頁 129406
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbagen.2019.07.015	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Mao Oide, Takayuki Kato, Tomotaka Oroguchi, Masayoshi Nakasako	4. 巻 287
2. 論文標題 Energy landscape of domain motion in glutamate dehydrogenase deduced from cryo-electron microscopy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 FEBS Journal	6. 最初と最後の頁 3472-3493
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/febs.15224	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Asahi Fukuda, Tomotaka Oroguchi, Masayoshi Nakasako	4. 巻 1864
2. 論文標題 Dipole-dipole interactions between tryptophan side chains and hydration water molecules dominate the observed dynamic Stokes shift of lysozyme	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects	6. 最初と最後の頁 129406
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbagen.2019.07.015	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mao Oide, Takaaki Hikima, Tomotaka Oroguchi, Takayuki Kato, Yuhki Yamaguchi, Shizue Yoshihara, Masaki Yamamoto, Masayoshi Nakasako, Koji Okajima.	4. 巻 287
2. 論文標題 Molecular shape under far-red light and red light-induced association of Arabidopsis phytochrome B	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 FEBS Journal	6. 最初と最後の頁 1612-1625
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/febs.15095	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mao Oide, Yuki Sekiguchi, Asahi Fukuda, Koji Okajima, Tomotaka Oroguchi, Masayoshi Nakasako	4. 巻 25
2. 論文標題 Classification of ab initio models of proteins restored from small-angle X-ray scattering	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Synchrotron Radiation	6. 最初と最後の頁 1379-1388
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1107/S1600577518010342	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tomotaka Oroguchi, Takashi Yoshidome, Takahiro Yamamoto, Masayoshi Nakasako	4. 巻 18
2. 論文標題 Growth of cuprous oxide particles in liquid-phase synthesis investigated by X-ray laser diffraction	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nano Letters	6. 最初と最後の頁 5192-5197
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.nanolett.8b02153	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Amane Kobayashi, Yuki Takayama, Koji Okajima, Mao Oide, Takahiro Yamamoto, Yuki Sekiguchi, Tomotaka Oroguchi, Masayoshi Nakasako, Yoshiaki Kohmura, Masaki Yamamoto, Takahiko Hoshi, Yasufumi Torizuka	4. 巻 25
2. 論文標題 Diffraction apparatus and procedure in tomography X-ray diffraction imaging for biological cells at cryogenic temperature using synchrotron X-ray radiation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Synchrotron Radiation	6. 最初と最後の頁 1803-1818
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1107/S1600577518012687	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 A. Kobayashi, Y. Sekiguchi, T. Oroguchi, M. Yamamoto and M. Nakasako	4. 巻 8
2. 論文標題 Shot-by-shot characterization of focused X-ray free electron laser pulses	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 831
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-19179-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 M. Oide, K. Okajima, H. Nakagami, T. Kato, Y. Sekiguchi, T. Oroguchi, T. Hikima, M. Yamamoto and M. Nakasako	4. 巻 293
2. 論文標題 Blue-light excited LOV1 and LOV2 domains cooperatively regulate the kinase activity of full-length phototropin2 from Arabidopsis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 963-972
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA117.000324	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 T. Oroguchi and M. Nakasako	4. 巻 7
2. 論文標題 Influences of lone-pair electrons on directionality of hydrogen bonds formed by hydrophilic amino acids side chains in molecular dynamics simulation	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 15859
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-017-16203-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Y. Sekiguchi, S. Hashimoto, A. Kobayashi, T. Oroguchi and M. Nakasako	4. 巻 24
2. 論文標題 A protocol for searching most probable phase-retrieved maps in coherent X-ray diffraction imaging by exploiting relationship between convergence of retrieved phase and success of calculation	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Synchrotron Radiation	6. 最初と最後の頁 1024-1038
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1107/S1600577517008396	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 28.H. Kameda, S. Usugi, M. K. Kobayashi, N. Fukui, S. Lee, K. Hongo, T. Mizobata, Y. Sekiguchi, Y. Masaki, A. Kobayashi, T. Oroguchi, M. Nakasako, Y. Takayama, M. Yamamoto and Y. Kawata	4. 巻 161
2. 論文標題 Common structural features of toxic intermediates from alpha-synuclein and GroES fibrillogenesis detected using cryogenic coherent X-ray diffraction imaging	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 55-65
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvw052	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 苅口友隆
2. 発表標題 蛋白質の機能的動きに沿った溶媒和自由エネルギー変化の評価法開発
3. 学会等名 第59回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 苅口友隆
2. 発表標題 MDシミュレーションと溶液散乱実験による蛋白質構造揺らぎの可視化: ベイズ学習の適用に向けて
3. 学会等名 CBI学会2021年大会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 荻口友隆、中迫雅由
2. 発表標題 Domain motion of Fv-fragment in antibody immunoglobulin G controls conformation of antigen-recognizing loop through hydration structure
3. 学会等名 第57回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 荻口友隆、中迫雅由
2. 発表標題 Domain motion of Fv-fragment in anti-dansyl immunoglobulin G controls conformation of its flexible antigen-binding region
3. 学会等名 第56回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tomotaka Oroguchi
2. 発表標題 Protein Structural Fluctuations Investigated by X-ray Solution Scattering and Molecular Dynamics Simulation
3. 学会等名 第55回日本生物物理学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Tomotaka Oroguchi
2. 発表標題 Protein conformational fluctuations and hydration structures investigated by the combination of MD simulations and X-ray experiments
3. 学会等名 TSRC Protein Dynamics Workshop (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 笠口友隆、大出真央、岡島公司、中迫雅由、引間孝明、山本雅貴
2. 発表標題 MDシミュレーションと溶液X線散乱で探る蛋白質の構造揺らぎ
3. 学会等名 第17回日本蛋白質科学会（招待講演）
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

蛋白質の構造形成や機能に重要な水素結合形成を、正しく取り扱える力場モデルを開発
<https://www.keio.ac.jp/ja/press-releases/2017/11/21/28-37390/>

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------