

平成 22 年 5 月 1 日現在

研究種目： 特定領域研究
 研究期間： 2006 ～ 2009
 課題番号： 18066005
 研究課題名（和文） 生体分子の柔らかいダイナミクスと反応
 研究課題名（英文） Flexible dynamics and reactions in biomolecules

研究代表者
 笹井 理生 (SASAI MASAKI)
 名古屋大学・大学院工学研究科・教授
 研究者番号： 30178628

研究成果の概要（和文）：

酵素による反応、及びそれを引き金として生じる情報伝達、エネルギー変換を理解するためには、蛋白質および周囲の水分子の動きを的確に捉え、動力学の概念と理論的方法を見出すことが必須である。この研究では、蛋白質フォールディングの研究で開発されたエネルギーランドスケープ理論を蛋白質の情報伝達、エネルギー変換反応に適用し、大規模構造変化に伴う柔らかいダイナミクスを解明して新しい分子理論を展開するための研究を遂行した。さらに、高次の分子系における柔らかいダイナミクスの反応過程として、蛋白質相互作用によって引き起こされる反応の確率的揺らぎの研究を行った。

研究成果の概要（英文）：

Flexible dynamics of the large scale conformational change of proteins is essential in many biochemical reactions. In order to solve the principles of flexible dynamics and to bridge between quantum chemical understanding of reactions and the observed physiological phenomena, we studied the energy landscape models of protein conformation change. Also important is the flexible stochastic kinetics of reactions among biomolecules which are confined in a meso-scope *i.e.* cellular size space. We studied the stochastic processes in such meso-scope systems by developing models of biochemical reactions.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	4,100,000	0	4,100,000
2007 年度	5,500,000	0	5,500,000
2008 年度	5,500,000	0	5,500,000
2009 年度	3,200,000	0	3,200,000
年度	0	0	0
総計	18,300,000	0	18,300,000

研究分野：理論生物物理学

科研費の分科・細目：特定領域研究 領域番号 461 実在系の分子理論 研究項目 A04

キーワード：①生物物理 ②化学物理 ③自己組織化 ④生体分子 ⑤蛋白質

1. 研究開始当初の背景

蛋白質は多くの場合、化学反応を引き金とし

て大きな構造変化を引き起こし、ミリ秒から秒の時間スケールで機能を発揮すると考え

られているが、通常分子動力学計算ではこの時間スケールの構造変化を追跡することができない。そこで、統計物理学的モデルに基礎を置く粗視化されたモデルによって、長時間・大規模変形を追跡するシミュレーションを行い、蛋白質における化学反応とその生理的作用についての分子理論を展開する必要がある。この研究では、蛋白質フォールディングの研究で開発された、エネルギーランドスケープ理論、およびフラグメントアセンブリ法を機能発現の問題に積極的に展開する。この方法論の適用の結果、ナノ秒以下の化学反応とミリ秒以上の大規模構造変化という異なった階層の現象を結びつける分子理論を発展させることができると予想される。

2. 研究の目的

蛋白質による高効率化学反応制御に関する基本原理の解明を目指す。複合電子系としての酵素による反応、および、それを引き金として生じる蛋白質の大規模構造変化による情報伝達、エネルギー変換を理解するためには、蛋白質および蛋白質の周囲の水分子の動きを的確に捉え、電子論的な分析と実験との橋渡しをする動力学の概念と理論的方法を見出すことが必須である。この研究では、蛋白質フォールディングの研究で開発されたエネルギーランドスケープ理論、および蛋白質立体構造予測のために開発されたフラグメントアセンブリ法を蛋白質の情報伝達、エネルギー変換反応に適用し、蛋白質の大規模構造変化に伴う柔らかいダイナミクスを解明することによって、新しい分子理論を展開する。とりわけ、アクトミオシンなどの分子モーターの動作機構、アロステリック協同性を分析して蛋白質の大きな構造変化が化学反応を制御する機構を理解する。また、エネルギーランドスケープ理論、およびフラグメントアセンブリ法をもとに、蛋白質のフォールディング過程の考察に基づく新規の立体構造予測法を開発する。

3. 研究の方法

(1) アクトミオシンの機能発現に蛋白質の局所的な unfolding / refolding プロセスが重要である、という機能ファネル仮説を本研究の準備段階で提唱したが (PNAS, 99, 9202 (2002)), 本研究ではこの仮説の当否を検証するため、ミオシン II の立体構造トポロジーに基づいたモデルを構築した。粗視化された動力学による長時間シミュレーションを行って、アクトミオシンの運動を集中的に研究し、機能ファネルによる説明の当否を検討した。

(2) 粗視化された動力学法を用いたフォールディングを模したダイナミックな計算に

より、効果的に構造を検索する蛋白質立体構造予測法を開発した。100 残基を超える複雑なトポロジーを有する蛋白質について、新規に開発された立体構造予測法の能力を確かめた。

(3) 新しく開発した統計力学モデルと粗視化された動力学法を併用し、蛋白質のアロステリック変形の機構について理論的に分析した。

(4) 統計力学モデルにより、蛋白質フォールディング過程の自由エネルギー面を計算し、その多次元表現を実行して、フォールディング過程を理解する新しい方法を開発した。

(5) 蛋白質の化学反応を非断熱遷移・断熱遷移のアナロジーを用いて記述する確率的方法論を展開して具体的な蛋白質への応用を展開した。

4. 研究成果

(1) 蛋白質の大きな柔らかい構造変化が、分子モーターの動作にどのような効果をもたらすかを理論的に解析し、アクトミオシン系についてのシミュレーションを集中的に行った。その結果、電荷を変える突然変異やイオン濃度の変化によってミオシンの運動が大きく異なるなど、アクチンとミオシンの間の静電相互作用がミオシンの運動の一方向性を生み出すために、非常に重要であることを明らかにし、一方向に偏ったブラウン運動が筋肉の力発生に重要な役割を果たしている可能性を、原子的描像に基づいて具体的に示すことができた。この成果は、長年の論争が続いたアクトミオシンの動作機構の問題解決に向けて貢献すると期待される。

(2) アミノ酸配列の知識からその蛋白質の立体構造を予測する問題は、分子科学における基本的な問題として長年、多くの研究が行われてきた。理論的方法の進歩により、与えられた標的蛋白質に似た配列を持つ蛋白質の構造がすでに判明している場合には、それらの構造を参照しながらかなり正確な予測ができるようになってきたが、与えられた配列がすでに判明しているどの構造の配列とも似ていない、いわゆる de novo 予測の場合、確実な予測法は未だ発見されていない。我々は、局所的な配列フラグメントのとりやすい構造を整合的に集めて全体構造を予測するフラグメントアセンブリ法と、蛋白質鎖のフォールディングシミュレーションを実行して構造を予測する物理的方法を組み合わせ、新しい de novo 予測法を開発し、その予測能力を検証した。付加的に導入した評価関数を用いて、候補構造を絞り込むことにより、予測能力をさらに向上させることが可能であることを示した。さらに、韓国の Korea Institute for Advanced Study のグループと協力して、側鎖の原子パッキングが与える影

響を取り入れるように、この方法の改良を行った。

(3) 蛋白質にリガンドや他の生体高分子が結合して、その結合部位とは離れた別の部位の構造変化を引き起こすアロステリック転移は、生体内での情報処理やエネルギー変換の要となる過程である。しかし、その詳細は未だ十分理解されていない。アロステリック転移を表現する統計力学モデルを開発し、その分配関数を厳密に表現して転移の自由エネルギー面を計算する方法を展開した。NtrCと呼ばれるシグナル伝達を担う蛋白質は、リン酸化されていない状態（不活性化状態）とリン酸化された状態（活性化状態）の間の転移をするが、リン酸化されていない状態においても、揺らぎとして活性化構造が現れること、この大きな構造揺らぎが非常に多くの数の転移パスウェイの存在に伴うエントロピー効果に起因することを示すことに成功した。また、アロステリック転移の前後の2つの構造を参照する、新しい計算科学的モデルを開発し、アデニレートキナーゼと呼ばれる蛋白質に適用して、open 構造から closed 構造への転移をエントロピーとエネルギーのバランスの観点から合理的に説明することに成功した。これは、少ない構造をサンプルしていた従来までの計算では得られなかった、アロステリック転移の新しい視点を与える。

(4) フォールディングの統計力学的理論の登場を契機として、フォールディング過程の進行度を表わすオーダーパラメータに沿った自由エネルギーのプロットが行われ、多くの蛋白質のフォールディング機構が解明されて、我々の蛋白質に関する理解が一変した。しかし、フォールディングは多数の原子が参加する非常に高い次元の空間内の運動であり、1次元のオーダーパラメータ空間に縮約することで失う情報も多い。我々は、2次元、3次元などの多次元空間による表現を分析し、これらの多次元表現がフォールディング過程についての多くの知見を与えることを示した。特に、遷移状態アンサンブルが、複数の異質な構造のグループを含むケース、複数のフォールディング経路が競合して、わずかな配列の変異で経路の変更が起こるケースについて、明瞭な分析が行えることを示した。この方法のうち2次元表現の方法をリボソーム蛋白質 S6、src-SH3 ドメイン、Im7、CheY、バルナーゼ、BBL ドメインなどの蛋白質に適用し、3次元表現をバルナーゼ、NtrC、アンキリンリピート蛋白に適用して、その有効性を示すことができた。

(5) 細胞内に含まれる DNA の個数は1個程度、DNA と結合して遺伝子発現を制御する蛋白質は1種類あたり100個程度と少数のため、大数の法則による平均化は期待できず、化学反応に伴う確率的な個数ゆらぎは、細胞にとつ

て本質的に重要であると考えられている。この個数ゆらぎを扱うために、ある遺伝子から合成された蛋白質が、その遺伝子のプロモータ領域に結合し、リプレッサーとして働く単純なフィードバック回路を形成する場合を例にとり、蛋白質個数の増減の確率過程を分析した。蛋白質合成と遺伝子制御に関わる複雑な化学反応過程を思い切って単純化した反応モデルをマスター方程式で表現し、それを経路積分の方法によって扱う平均場理論を構築して、マスター方程式を数値的にシミュレートするモンテカルロ法と比較した。その結果、遺伝子のオン、オフ（プロモータ部位と蛋白質の解離、結合）の頻度が蛋白質の個数の増減の頻度と同程度か、もしくはより小さい場合、個数分布の幅、およびその緩和時間に異常な増大が見られて、個数増減のゆらぎが顕著になる現象を予測した。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕(計15件)

- ① M. Takano, T. P. Terada, and M. Sasai, Unidirectional Brownian motion observed in an in silico single molecule experiment of an actomyosin motor, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 掲載決定 (2010) 査読有.
- ② K. Itoh and M. Sasai, Entropic mechanism of large fluctuation in allosteric transition, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 掲載決定 (2010) 査読有.
- ③ T. Nagai, T. P. Terada, and M. Sasai, Synchronization of circadian oscillation of phosphorylation level of KaiC in vitro, *Biophys. J.* 98, No.11 掲載決定 (2010) 査読有.
- ④ Juyong Lee, M. Sasai, C. Seok, Jooyoung Lee, de Novo Protein Structure Prediction using Fragment Based Potential and Conformational Space Annealing, *Biophys. J.* 98, Issue 3, Supp.1, 461a (2010) 査読無.
- ⑤ K. Itoh and M. Sasai, Multi-dimensional theory of protein folding, *J. Chem. Phys.* 130, No.14, 145104_1-21 (2009) 査読有.
- ⑥ Y. Okabe-Oho, H. Murakami, S. Oho, and M. Sasai, Stable, precise, and reproducible patterning of bicoid and hunchback molecules in the early *Drosophila* embryo, *PLoS Comp. Biol.* 5, No.8, e1000486_1-20 (2009) 査読有.
- ⑦ S. I. Nishimura, M. Ueda, and M. Sasai, Cortical factor feedback model of cellular locomotion and cytofission, *PLoS Comp. Biol.* 5, No.3, e1000310_1-11 (2009) 査読有.
- ⑧ K. Itoh and M. Sasai, Cooperativity, connectivity, and folding pathways of multidomain proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci.*

USA., 105, 13865–13870 (2008) 査読有.

⑨ T. N. Sasaki, H. Cetin, and M. Sasai, A coarse-grained Langevin molecular dynamics approach to de novo protein structure prediction, *Biochem. Biophys. Research Comm.* 369, 500-506 (2008) 査読有.

⑩ Y. Okabe, Y. Yagi, and M. Sasai, Effects of the DNA state fluctuation on single-cell dynamics of self-regulating gene, *J. Chem. Phys.* 127, 105107-1-8 (2007) 査読有.

⑪ M. Yoda, K. Eguchi, T. P. Terada, and M. Sasai, Monomer-shuffling and allosteric transition in circadian oscillation of KaiC phosphorylation, *PLoS ONE* 2, e408-1-8 (2007) 査読有.

⑫ T. Hotta, and M. Sasai, Fluctuating hydration structure around nanometer-size hydrophobic solutes II -Caging and drying around single-wall carbon nanotubes-, *J. Phys. Chem. C* 111, 2861-2871 (2007) 査読有.

⑬ M. Yoda, T. Ushikubo, W. Inoue, and M. Sasai, Roles of noise in single and coupled multiple genetic oscillators, *J. Chem. Phys.* 126, 115101-1-11 (2007) 査読有.

⑭ T. Ushikubo, W. Inoue, M. Yoda, and M. Sasai, Testing the transition state theory in stochastic dynamics of a genetic switch, *Chem. Phys. Lett.* 430, 139-143 (2006) 査読有.

⑮ K. Itoh and M. Sasai, Flexibly varying folding mechanism of a nearly symmetrical protein: B domain of protein A, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103, 7298-7303 (2006) 査読有.

[学会発表] (計 10 件)

① M. Sasai, Molecular Mechanism of A Protein-Based Circadian Clock, Fifty Years of Biophysics Research at Nagoya University, Nagoya University, Mar.12-14 (2010).

② K. Itoh and M. Sasai, Entropic mechanism of large fluctuation in allosteric transition, Gordon Research Conference on Protein Folding Dynamics, Ventura, California, Jan.10-16 (2010).

③ M. Sasai, Harnessing the thermal noise with molecular machines, International Symposium on Molecular Theory for Real Systems, Fukui Institute, Kyoto, Jan. 7-9 (2010).

④ M. Sasai, Harnessing the thermal noise with molecular machines, The 9th KIAS-SNU Conference on Protein Structure and Function, Seoul National University, Seoul, Korea, Oct.8-10 (2009).

⑤ M. Sasai, Unidirectional Brownian motion observed in an in silico single molecule experiment of an actomyosin motor, Single molecule experiments and theories, International Workshop on Single Molecule Dynamics and Spectroscopy, Chung-Ang University Seoul, Korea, Oct.7 (2009).

⑥ M. Sasai, Stochastic gene expression in developing embryos, International Symposium on Reaction Dynamics of Many-body Chemical Systems, Kyoto, June 22-24 (2009).

⑦ M. Sasai, Energy landscape theory of protein allostery, Korea-Japan seminars on biomolecular sciences - Experiments and simulations, Seoul, Korea, Feb.27- Mar.2 (2009).

⑧ M. Sasai, Consistency among local and global structures in protein folding and structure prediction, The 8th KIAS - Yonsei Conference on Protein Structure and Function, Yonsei University, Seoul, Korea, Oct.9-11 (2008).

⑨ M. Sasai, Noise and coherent dynamics in biomolecular networks, Noise in complex systems: From molecular dynamics to stochastic modeling WORKSHOP 2008, KAIST Daejeon, Korea, Oct. 6-9 (2008).

⑩ M. Sasai, Energy landscape perspective of protein functioning, The 3rd Asian Pacific Conference on Theoretical & Computational Chemistry, Beijing, Sep.22-26 (2007).

[図書] (計 1 件)

① 笹井理生, 蛋白質の柔らかなダイナミクス (培風館 2008) 192pages.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

笹井 理生 (SASAI MASAKI)
名古屋大学・大学院工学研究科・教授
研究者番号：30178628

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：