様式 C-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成２３年６月６日現在

機関番号：８２１１０
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2009～2010
課題番号：２１７７０１７８
研究課題名（和文） 中性子散乱とシミュレーションによる蛋白質動力学に対する水和とキャビティ効果の研究
研究課題名（英文） Effect of hydration and cavity on protein dynamics studied by neutron scattering and simulation

研究代表者
中川 洋（NAKAGAWA HIROSHI）
独立行政法人日本原子力研究開発機構・量子ビーム応用研究部門・研究員
研究者番号：２０３７９５９８

研究成果の概要（和文）：非干渉性中性子散乱実験と分子動力学シミュレーションにより、タンパク質構造の揺らぎは、タンパク質表面に存在する水和水のダイナミクスや構造内部に存在するキャビティ構造の揺らぎとカップルしていることを示した。食品の腐敗には水が関係するほか、高圧による食品加工など、これら成果は、生命科学研究のみならず、食品タンパク質の保存性の研究など食品科学研究への貢献も期待できる。

研究成果の概要（英文）：It was demonstrated that the protein internal dynamics is coupled with the dynamics of hydration water on protein surface and cavity in protein structure. This study will contribute not only bioscience but also food science because the decay of food is related with water and there is food processing by high pressure.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
２００９年度	2,900,000	870,000	3,770,000
２０１０年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
年度			
総　計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：生物物理学
科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学
キーワード：タンパク質、中性子、シミュレーション、ダイナミクス

１．研究開始当初の背景

タンパク質の構造揺らぎは、安定性や機能発現に関わる。タンパク質表面の水和構造は、タンパク質の揺らぎに著しい影響を与えることが知られている。またタンパク質の構造にはキャビティと呼ばれる空間的な隙間が存在して、分子パッキングの揺らぎの場となっている。タンパク質の揺らぎは多数の原子が協調的に動くため、水和水やキャビティの構造変化の影響はタンパク質全体に及ぶ。これまでの理論的な研究から、タンパク質と水和水との水素結合や分子パッキングの変化は、タンパク質の協調的な構造変化とカップルしていることが指摘されてきた。しかし、動力学の有効な測定手段が限られているため、実験研究はあまり進んでこなかった。中性子非弾性散乱測定は、タンパク質動力学を調べる有効な手段である。特に、理論的に重要性が指摘されている低エネルギーの運動の解明には、最も有力な手段である。また、シミュレーションは、原子レベルでの分子構造やダイナミクスを可視化できるほか、中性

子散乱データを定量的に計算できるという特徴を持つ。本研究では、中性子散乱実験データから効果的に情報を引き出すために、シミュレーションも行った。

２．研究の目的

本研究では、タンパク質を取り巻く水和構造や分子内部のキャビティ構造が、タンパク質の揺らぎをどのように制御しているかを調べることを目的とした。タンパク質と水界面の水素結合状態やキャビティによって決まる分子パッキングが、タンパク質の協調的な動力学とどのように関係しているかを明らかにするために、下記の３点について研究を行った。

(1) 水和したタンパク質の動力学の時間スケール依存性

(2) 水和水のパーコレーション転移

(3) 低エネルギー動力学への圧力効果

３．研究の方法

本研究では、動力学研究のモデルタンパク質であるスタフィロコッカルヌクレアーゼ(SNase)を用いた。研究手法には、非干渉性中性子散乱測定法と分子動力学シミュレーションを用いた。

(1)中性子散乱実験

タンパク質の構成原子組成の約半数は水素原子である。そのため、タンパク質からの中性子散乱は、水素原子からの非干渉性散乱の寄与が大きくなる。タンパク質中の水素原子は、立体構造中に均一に分布するため、水素原子を見ることでタンパク質の構造揺らぎを観測することができる。水和タンパク質を試料とする場合、水の散乱が大きくなるが、水和水として D_2O を用いることで、水分子からの散乱は無視できる。

非干渉性中性子散乱には、大きく分けて、非弾性散乱、準弾性散乱、弾性散乱がある。非弾性散乱では、数 100meV までの広いエネルギー領域において揺らぎの振動数分布が分かる。本研究では、数 meV 以下に見られるタンパク質の低振動ダイナミクスを測定した。準弾性散乱では構造緩和や拡散的な運動を解析することができる。また弾性散乱の散乱ベクトル q 依存性からは、揺らぎの平均自乗変位を求めることができる。

実験のための試料は、タンパク質を凍結乾燥後、適当な飽和塩溶液を用いた蒸気圧平衡によって作成した水和タンパク質を用いた。

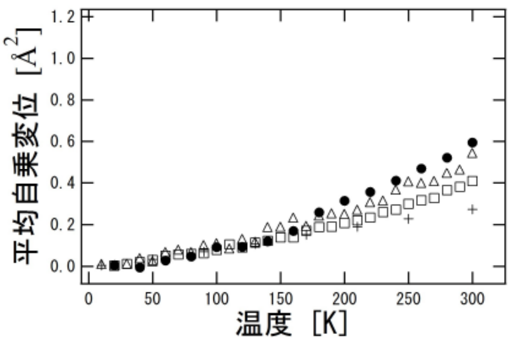
(2)分子動力学シミュレーション

タンパク質の分子動力学計算には、AMBER8 を用いた。SNase の結晶状態を計算機で再現し、周期的境界条件を設定して合計４つのタンパク質で計算を行った。系に入れる水の数を決めることで、適当な水和量の状態を作った。

４．研究成果

(1)水和したタンパク質の動力学の時間スケール依存性

非干渉性弾性散乱強度の q 依存性からは、ガウス近似により原子の平均自乗変位を求めることができる。タンパク質の平均自乗変位の温度依存性を調べると、約 240K で揺らぎの増大が見られる。これは動力学転移と呼ばれ、多くの高分子に見られるガラス転移と現象的に似ていることから、タンパク質のガラス転移と呼ばれることもある.興味深いことに、タンパク質の場合には水和することで動力学転移が現れることが分かっている。本研究では、動力学転移はどの時間スケールで生じている構造揺らぎなのかを調べるため、様々な時間スケールでの動力学転移を観測した。観測する揺らぎの時間スケールは、実験装置のエネルギー分解能によって変える ことができる。これはエネルギー分解能の高い方が、より遅い運動を検出できることによる。



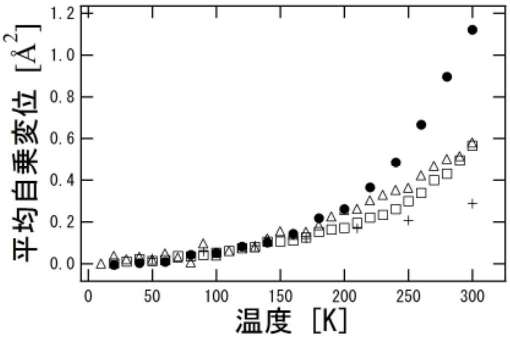


図 1. 乾燥タンパク質と水和タンパク質の動力学転移の時間スケール依存性。～4ps(+)、～40ps(□)、～400ps(▲) and ～4ns(●)。

図１は、４つの中性子散乱装置を用いて、ps～ns までの異なる時間スケールで測定した、脱水和タンパク質と水和タンパク質の動力学転移である。150K 付近に水和に関わらず転移が見られた。これはメチル基の回転に由来することがこれまでの研究で分かっている。240K 付近に水和によって生じる動力学転

移が観測された。また観測する動力学転移は、時間スケールによって大きく変わることが分かった。数ピコ秒の時間スケールでは転移はほとんど観測されず、数 10 ピコ秒より遅い運動が動力学転移に寄与していることが分かった。またナノ秒スケールでは振幅がさらに大きくなるが、水和によって生じる動力学転移は特に遅いダイナミクスが関わることが分かった。このように水和水とカップルしているタンパク質ダイナミクスは、広い時間領域で変化を見せるが、この揺らぎの詳細を明らかにするために、今後は高エネルギー分解能を有する中性子非弾性散乱装置を用い、中性子準弾性散乱測定による詳細な解析が必要である。

(2)水和水のパーコレーション転移

上記に示したように、動力学転移は、水和することで生じる。SNase を用いて、様々な水和量のタンパク質の非干渉性中性子弾性散乱実験を行った。その結果、240Kの動力学転移の存在には水和量の閾値が存在し、転移は水和量が h=0.37 以上で起きることが分かった。

これまでの研究で、タンパク質と水和水の動的挙動は強くカップルしていると考えられている。従って、上記の結果は、h=0.37 の閾値を境に、水和構造やその動的特性などが変化すると推察される。そこで次にこの閾値付近でタンパク質の水和構造がどのように変化するかを、分子動力学計算によって調べた。図２は SNase の分子構造と、様々な水分量における水和構造を示している。低い水分量の時は、多くの水和水はタンパク質表面に孤立した状態、あるいはタンパク質表面の１部分を覆う小さな水のクラスターとして存在する。しかし、h=0.37 の閾値を越えると、クラスター同士が接触し、一つの大きな水のネットワークがタンパク質表面全体を覆うようになる。タンパク質表面を覆う最大のクラスターのサイズを計算したところ、h=0.37 以上で水和水のネットワークがタンパク質表面全体を覆うようになることを見出した。これにより、タンパク質の動力学転移とタンパク質を覆う水和水のネットワーク形成に相関があることが分かった。ネットワークサイズの変化はパーコレーション確率の変化と対応していることから、水和水のパーコレーション転移が本質的であると結論した。

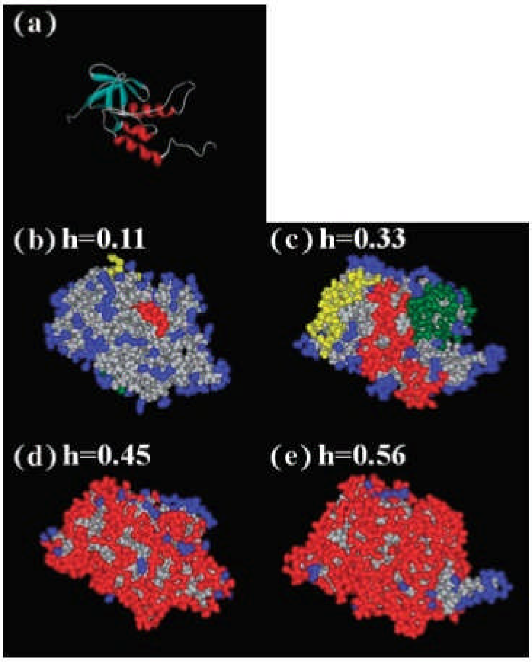


図２． シミュレーションによって得られた SNase の水和構造。(a)リボンモデルによる SNase の構造と水和構造 (b)h=0.11, (c)h=0.33, (d)h=0.45, (e)h=0.56。タンパク質の原子は灰色で示している。最も大きな水和水ネットワークを赤で、次いで大きい順に緑、黄で示している。青は孤立した水和水あるいは、小さな水のクラスターである。

次に、このようなネットワークを形成したときに、水分子の動的挙動がどのように変化するかを中性子散乱実験によって調べた。図３は、h=0.30 と 0.44 の水分量のときの、タンパク質と水和水の平均自乗変位の温度変化である。h=0.30 では、300K の室温までタンパク質と水和水の揺らぎの大きさはほとんど同じであった。これは、測定温度領域では、水和水はタンパク質表面に吸着していることを示唆する。一方、h=0.44 では、低温では両者はほとんど同じであるが、約 240K 以上の動力学転移温度で、水和水の揺らぎが急激に大きくなり、タンパク質に対してより大きく動いていることが分かる。これらの結果は、水和水のネットワークがタンパク質表面に形成される h=0.37 の水和量以上で、運動性の大きくなることを示している。

これらの成果は、タンパク質の働きに必要な水和水の本質的な性質を明確に示した研究結果であり、食品工学等の他の分野への研究にも重要な結果である。

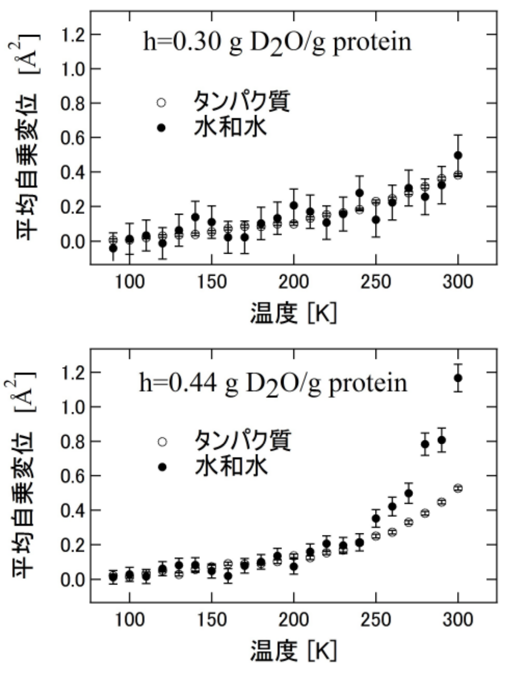


図３．タンパク質と水和水の平均自乗変位の温度依存性。(a)h=0.30, (b)h=0.40。

(3)低エネルギー動力学への圧力効果

低エネルギーダイナミクスへの圧力効果を調べるために、常圧と 900 気圧の高圧下での中性子非弾性、準弾性散乱測定を行った。高圧実験は、肉厚のアルミセルを用い、圧力媒体にはバックグラウンドが比較的小さいアルゴンガスを使用した。160K ではタンパク質の非弾性散乱スペクトルの数 meV のところにボソンピークといわれる励起スペクトルが観測される、脱水和タンパク質では圧力によってこのピーク位置が高エネルギー側へシフトすることを見出した。これは圧力によってエネルギー地形がハードニングを起こしたものと考えている。一方、水和タンパク質ではほとんどボソンピークに変化はなかった。これは、水和によって既にハードニングが起こっていることによると考えられる。低温では、水和と圧力は同じ効果がある。室温では、非調和な揺らぎに由来する準弾性散乱が見られる。脱水和、水和タンパク質共に、圧力によって準弾性散乱は抑制されることが分かった。これは、圧力によってタンパク質の揺らぎが抑制されることを示している。

次にキャビティに対する圧力効果を分子動力学シミュレーションによって調べた。常圧と 1000 気圧の高圧下で、SNase の分子動力学シミュレーションを行い、キャビティの体積変化を調べたところ、加圧によりキャビティ体積が減少することが分かった。また構造の至る所でキャビティはピコ秒の時間スケールで生成・消滅を繰り返していることが分かった。これは中性子非弾性散乱スペクトルが加圧により変化を示した時間領域と一致する。キャビティ構造の揺らぎがタンパク質構造全体の協調的な揺らぎとカップルしていることを示唆した。

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 6 件）

① H.Nakagawa, H.Kamikubo, M.Kataoka, Effect of conformational states on protein dynamical transition, Biochimica et Biophysca Acta, (2008)1804, 27-33.査読有

② H.Nakagawa, M.Kataoka, Percolation of Hydration Water as a Control of Protein Dynamics, Journal of Physical Society of Japan, (2010)79, 083801.査読有

〔学会発表〕（計 20 件）

① 中川洋 他、Hydration affects both harmonic and anharmonic nature of protein dynamics, 第 47 回日本生物物理学会年会、2009 年 10 月 30 日、徳島

② 中川洋 他、タンパク質ダイナミクスの調和運動と非調和運動に対する水和効果, 第９回日本中性子科学会年会、2009 年 12 月９日、東海

③ 中川洋 他、中性子非弾性散乱によるタンパク質の低エネルギーダイナミクスに対する水和効果, 日本物理学会第 65 回年次大会、2010 年３月 10 日、岡山

④ 中川洋、Dynamics of Biomolecules by Neutron Inelastic Scattering, 第 48 回日本生物物理学会年会、2010 年 9 月 20 日、仙台

⑤ 中川洋 他、中性子非弾性散乱と分子動力学によるタンパク質の揺らぎと水和水ダイナミクスの研究、日本物理学会 2010 年秋季大会、2010 年９月 23 日、大阪

⑥ 中川洋、 中性子非弾性散乱によるタンパク質の揺らぎと水和水ダイナミクスの研究、日本中性子科学会第 10 回年会、2010 年 12 月９日、仙台

⑦ 中川洋 他、Expectation to detect correlated dynamics in protein, nDDB Discussion Meeting, 2011 年１月 10 日グルノーブル(フランス)

⑧ 中川洋、 Dynamics and hydration of intrinsically disordered protein studied by inelastic neutron scattering. 第1回ISIDP国際シンポジウム、2011年1月27日、横浜

〔図書〕（計２件）
① Kataoka M., Nakagawa H., Water, The Forgotten Biological Molecule, Pan Stanford Publishing, 2011年,49-62.

② Kataoka M., Nakagawa H., Neutrons in Soft Matter, John Wiley, 2011年,517-538.

６．研究組織
(1)研究代表者
中川 洋 (NAKAGAWA HIROSHI)
独立行政法人日本原子力研究開発機構・量子ビーム応用研究部門・研究員
研究者番号：20379598