

令和 6 年 5 月 28 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K18602

研究課題名（和文）深海模倣系構築による高圧下の蛋白質構造の実測法の開発

研究課題名（英文）Development of a method to measure protein structure under high pressure by constructing a deep-sea mimetic system

研究代表者

杉山 正明（Sugiyama, Masaaki）

京都大学・複合原子力科学研究所・教授

研究者番号：10253395

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：常温・常圧下におけるGSJ溶液の構造解析をX線小角散乱法と全原子分子動力学シミュレーションを用いて行った。その結果、常圧下のGSJ溶液中では開閉運動が支配的であり、マルチドメインタンパク質と比較して比較的単純な内部運動を有することが明らかになった。さらに、高圧下（100 MPa）におけるGSJ溶液の構造解析を中性子小角散乱法と全原子分子動力学シミュレーションで行った結果、TMAO非添加系と比較して、TMAOの濃度上昇に伴いFSS内の水素結合の形成が促進され、水素結合を形成しない水の割合が減少することが示唆された。これにより、TMAOがタンパク質内部への水の侵入を阻害していることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、常温でのGSJの溶液ダイナミクスを実験・計算の両面から解析し、その運動の特徴を明確にし、更に高圧下での構造の実測・MD計算による解析まで行っている。このようにタンパク質の構造・ダイナミクスを常温のみならず高圧まで行っている例は世界的に珍しく、本研究で行った手法は今後のタンパク質の構造・ダイナミクス研究において参考となる重要なものである。

研究成果の概要（英文）：The solution structure analysis of GSJ under normal temperature and pressure was conducted using X-ray small-angle scattering and all-atom molecular dynamics simulations. The results revealed that under normal pressure, the movement of GSJ in solution is predominantly an open-close motion. Compared to multi-domain proteins that exhibit diverse movements, GSJ was found to have relatively simple internal movements. Furthermore, the solution structure analysis of GSJ under high pressure (100 MPa) was performed using neutron small-angle scattering and all-atom molecular dynamics simulations. The results, particularly from MD calculations, indicated that as the concentration of TMAO increased, it promoted the formation of hydrogen bonds within the FSS, contributing to a decrease in the fraction of water that does not form hydrogen bonds. This suggests that TMAO inhibits the intrusion of water into the protein interior.

研究分野：ナノ構造物理学

キーワード：中性子散乱 生体高分子ダイナミクス 重水素化 分子動力学シミュレーション

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。

1. 研究開始当初の背景

深海は我々が暮らす表層とは環境が大きく異なり、高圧・低温といった非常に過酷な極限環境である。一方、生命機能維持には蛋白質が正常な立体構造を持つことが必須であるが、常温・常圧の生理条件下から逸脱すると蛋白質は正しく折り畳まれた (fold 状態) から折り畳み構造を維持できない (unfold 状態) へと転移し、正常な立体構造を失い必然的に機能も喪失する。計算機シミュレーションによると高圧環境下の蛋白質ではその内部に水分子が侵入し、unfold 状態へと転移し正常な立体構造を維持できなくなることが予測されている。しかしながら、現在では、深度 8400 m (圧力に換算して 凡そ 84 MPa) までも多種多様な生物の存在が報告されている。では「深海生物はどのようにして高圧環境下においても蛋白質の構造を維持しているのか?」この謎を解く手がかりは「オスモライト(浸透圧調整剤)」と呼ばれる一群の分子であり、その代表が海洋生物の体内に普遍的に含まれている「トリメチルアミンオキシド (TMAO)」である。しかしながら、高圧下においてこの TMAO が具体的にどのような役割を果たしているか未だ解明されていない。

2. 研究の目的

本研究課題では、特に深海生物由来の α -グリシコダーゼ (GSJ) をサンプルとして注目し、本サンプルを用いて高圧下における溶液構造、更に TMAO の有無における溶液構造の変化を実験及び計算機手法の組み合わせにより調べた。

3. 研究の方法

GSJ を既報の培養・精製条件 [1] に則り GSJ 溶液を調製した。GSJ 溶液構造は未だ報告されていないため、この得られた GSJ 溶液を用いて、最初に X 線小角溶液散乱 (SAXS) 測定及び全原子動力学 (all-atom MD) シミュレーションを行い常圧及び 298 K における GSJ の溶液構造解析を行った。次に、深海環境を模倣した高圧印加下における GSJ 溶液の溶液構造を調べるために、圧力印加セル(図 1 参照)を用いた高圧中性子小角散乱(SANS)測定を茨城県東海村の研究用原子炉 JRR-3 に設置されている中性子小角散乱装置 SANS-U を用いて行った。温度は 298 K で波長 6 Å, カメラ長 4 m と 1 m を組み合わせて行った。更に、高圧下における GSJ 溶液の構造を再現するために、圧力印加を模倣した all-atom MD シミュレーションを行った。加えて、TMAO 存在下或いは非存在下における高圧 all-atom MD シミュレーションを行い、高圧下における TMAO の役割を調べた。

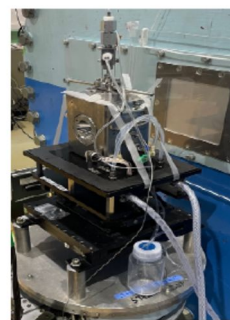


図 1 高圧 SANS 測定に使用した圧力セル。

4. 研究成果

常温・常圧下における GSJ 溶液の溶液構造解析

図 2 に SAXS 測定より得られた SAXS プロファイルを示す、回転半径(R_g)は 25.1 ± 0.2 Å と算出された。GSJ の溶液構造を再現するために、1 マイクロ秒の all-atom MD を行った。更に、all-atom MD から得られたトラジェクトリーから 10 ピコ秒毎にモデル構造を抽出し、合計で 10^5 のモデル構造を得た。このモデル構造から各々の対応する SAXS プロファイルを算出し、更にこの 10^5 個の SAXS プロファイルを平均化した集団平均散乱プロファイル (図 2 の赤線) を求めた。この集団平均散乱プロファイルと実測の SAXS プロファイルとの一致度を定量的に評価するために χ^2 を求めた。その結果、 χ^2 は 6.5 となり実測の SAXS プロファイルを再現できた。特に、1 マイクロ秒の時間スケールで SAXS プロファイルを再現できたことから、溶液中の GSJ の構造変化は比較的小さいことが示唆される。次に、この 1 マイクロ秒の all-atom MD のトラジェクトリーを用いて主成分分析 (PCA) を行うことで、常温・常圧下における GSJ の内部運動の同定を行った。図 3(a) は、PCA の各成分の寄与率をプロットした結果であり、横軸、左側の縦軸、右側の縦軸がそれぞれの主成分、固有値、累積比率に対応する。青色の棒グラフは各主成分の固有値を表している。なお、黒線は、第 1 主成分からの累積比率を表している。この結果から、GSJ の溶液中の動きは、第 1 主成分と第 2 主成分

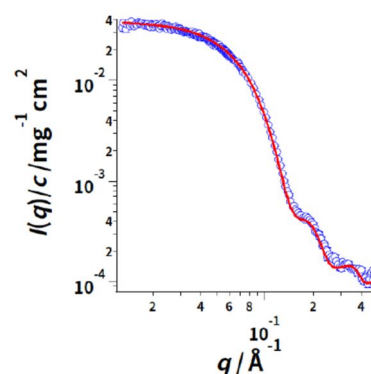


図 2 常温常圧測定から得られた GSJ の SAXS プロファイル (青丸) および all-atom MD から得られたモデル構造より算出された集団平均散乱プロファイル (赤線)。

分で 30%以上の動きを捉えており、特に第 1 主成分の割合が顕著に高い。図 3(b)は、PCA の第 1 主成分と第 2 主成分を 2 次元ヒストグラムでプロットした結果である。第 1 主成分は、タンパク質の開閉運動を主に示していることから、常圧下の GSJ の溶液中の運動は、開閉運動が支配的であることが明らかとなった。

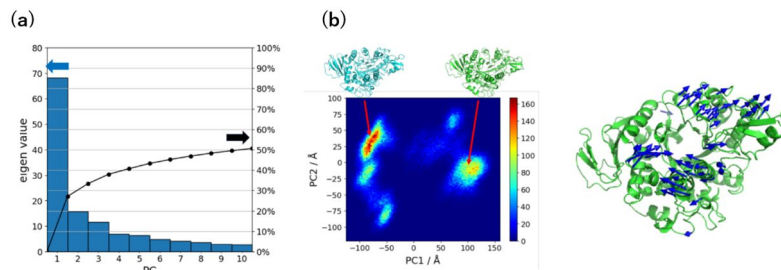


図 3 (a) PCA の各成分の寄与率、横軸、左側の縦軸、右側の縦軸がそれぞれの主成分、固有値、累積比率に対応。(b) PCA の第 1 主成分と第 2 主成分を 2 次元ヒストグラムでプロットした結果、右図は第 1 主成分の内部運動を可視化した模式図。

多様な運動を示すマルチドメインタンパク質と比較して、GSJ は比較的単純な内部運動を有することが明らかとなった。

高圧下における TMAO 無添加系の GSJ 溶液の溶液構造解析

図 4 は 0.1MPa(赤丸)及び 100MPa(青丸)印加下における SANS プロファイルを示す。0.1 MPa 印加下の R_g が $25.0 \pm 1.7 \text{ \AA}$ 、100 MPa 印加下の R_g が、 $53.6 \pm 13.1 \text{ \AA}$ となり、高圧印加下の R_g が常圧時と比較して 2 倍近く増加することが明らかとなった。即ち、TMAO 無添加系の GSJ 溶液においては圧力印加下では圧力変性が起きたことが明らかとなった。また、この圧力印加が可逆的か否かを確かめるため、100MPa から 0.1MPa に減圧後、更に 0.1MPa で SANS プロファイルを測定した(緑丸)。その条件下における R_g は $48.5 \pm 9.1 \text{ \AA}$ と算出された、つまり不可逆的な構造変化が確認された。TMAO を含まない GSJ 溶液に対して圧力を印加したため深海生物の生体環境下のタンパク質とは異なり、加圧による影響をより直接的に受け不可逆的な構造変化である圧力変性が生じたと考えられる。この実験的に観測された圧力変性を計算機上でも再現出来るかを確かめるために圧力印加を模倣した all-atom MD シミュレーションを行った。図 5(a)がそのシミュレーション中に観測されたスナップショットの一例を示すが常圧下の GSJ と比較して高次構造が大きく変化して様子が確認され、GSJ も計算機上で圧力変性が起きることが判明した。この結果は、2 次構造を多数持つ折り畳まれたタンパク質でも圧力変性が起こりうる可能性を示している。また、シミュレーション中の R_g の変化は図 5(b)に示した。 R_g が平衡値には到達していないため、今後より長いスケールでシミュレーションを行う必要があるが、高圧印加実験で得られた R_g の値近くまで GSJ が圧力変性する可能性を計算機上で初めて確認できた。

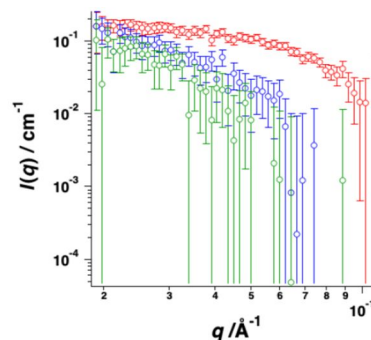


図 4 0.1 MPa(赤丸)及び 100 MPa(青丸)印加下における SANS プロファイル。緑丸は 100 MPa 印加後に 0.1MPa に戻し、0.1MPa 下で測定された SANS プロファイル。

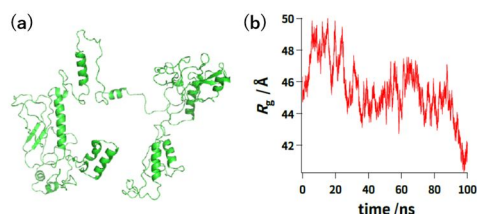


図 5 (a) 圧力印加を模倣した all-atom MD シミュレーションで観測された GSJ のスナップショット。(b) R_g の MD シミュレーション時間依存性。

高圧下における TMAO 添加系の GSJ 溶液の計算機シミュレーション

図 6 は TMAO を 4M 添加した GSJ 溶液における各圧力(1, 4000, 8000 bar)における水分子の酸素原子同士の動径分布関数を表す。TMAO 添加系においても圧力印加に伴い、水の分子の最近接の水素結合に変化が観測された。具体的

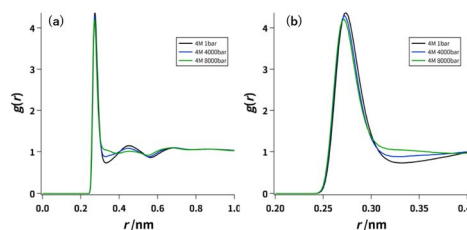


図 6 (a) TMAO を 4M 添加した GSJ 溶液における各圧力(1, 4000, 8000 bar)における水分子の酸素原子同士の動径分布関数。(b) r が短い距離での拡大図。

には、first peak の強度が低下し、そのピーク位置がより短距離側へとシフトする様子が確認され、この結果はタンパク質周りに存在する第一水和水内 (First solvation shell: FSS) で水素結合をしがたい水分子の比率が上昇していることを意味していると考えられる。TMAO 非添加系においてはこの水素結合を形成しない水がタンパク質内部へと侵入することで圧力変性が起きたと考えられる。更に、この挙動を詳細に調べるために FSS 以内の水分子間の全結合数と其中で水素結合をなしている結合数を確かめた。その結果を図 7 に示し、縦軸が FSS 内の水素結合数/FSS 内の全結合数、横軸が圧力である。TMAO 非添加系と比較して、TMAO の濃度上昇に伴い FSS 内の水素結合の形成を促しての傾向が確認された。この結果は、上述したように水素結合を形成しない水の分率の低下に貢献し、結果的にタンパク質内部への水の侵入の阻害している結果に対応すると考えられる。TMAO とタンパク質との直接的な相互作用に関しては、より長時間の all-atom MD シミュレーションが必要とされるため詳細な解析までには到達できなかった。

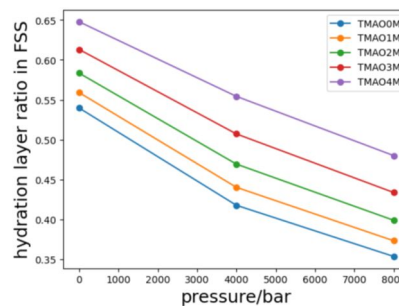


図 7 FSS 内の水分子間の水素結合の比率の圧力依存性。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 會澤直樹、清水将裕、横田幸紀、守島健、柚木康弘、奥田綾、佐藤信浩、井上倫太郎、裏出令子、大田ゆかり、杉山正明
2. 発表標題 X線小角散乱と全原子分子動力学シミュレーションによる α -glucosidaseの溶液構造研究
3. 学会等名 2022年度量子ビームサイエンスフェスタ
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究分担者	大田 ゆかり (Ota Yukari) (40399572)	群馬大学・食健康科学教育研究センター・講師 (12301)	
研究分担者	井上 倫太郎 (Inoue Rintaro) (80563840)	京都大学・複合原子力科学研究所・准教授 (14301)	

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
---------	---------