

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月14日現在

機関番号：32601  
 研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2010～2012  
 課題番号：22750015  
 研究課題名（和文） 生体分子機能を促進する分子クラウディング効果の微視的解明  
 研究課題名（英文） Microscopic breakthrough in the molecular crowding effects promote the functions of biomolecules  
 研究代表者  
 優 乙石 (YU ISSEKI)  
 青山学院大学・理工学部・助教  
 研究者番号：90402544

研究成果の概要（和文）：細胞質内の混み合った溶液環境（分子クラウディング）を、深海魚細胞中に存在する浸透圧調節物質 TMAO を用いてモデリングした。クラウディング溶液中の蛋白質熱力学量（部分モル体積や移相自由エネルギー）を、分子動力学シミュレーションから得られる溶媒原子配置情報とカークウッド-バフ（KB）積分法を組み合わせる手法を開発した。KB 積分を時空間分解することで、熱力学量の総量だけでなく、その時間依存性（ダイナミクス）や3次元的な分布を明らかにした。これにより、分子クラウディング効果の微視的描像が得られた。

研究成果の概要（英文）：Molecular crowding condition in the cytoplasm was modeled by osmolyte TMAO found in the cells of deep-sea fishes. Thermodynamic quantities (partial molar volume and transfer free energy) of the protein in crowding solution were calculated by Kirkwood-Buff (KB) theory using the atomic configurations of the solvent species generated by MD simulation. Furthermore, 3-dimensional distribution and dynamics of those quantities were revealed with uniquely developed space-time deconvolution techniques of the KB integrals. These data provided the microscopic picture of the molecular crowding effect.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：基礎化学・物理化学

キーワード：分子クラウディング・分子動力学・蛋白質・自由エネルギー・オスモライト

## 1. 研究開始当初の背景

現在まで、生体分子の *in vitro*（試験管内）実験や計算機シミュレーションの多くは、希薄な水溶液中で行われてきた。一方で、近年、細胞内の生体分子を直接観察する分光学的手法（*in-Cell* NMR 法など）の開発が進み、

蛋白質や核酸の立体構造、および反応効率などが、*in-vitro* 条件下とは大きく異なることが次々と判明している。また、細胞内環境を化学的に模倣することで、生体分子の機能を調節する試みも進んでいる。

細胞内環境と、*in vitro* 環境の最も大きな

違いは、分子の込み合いである。in vitro 環境では、媒質の殆どを水分子が占めるのに対して、細胞内は、全体積の 20%~40%を生体高分子や有機低分子が占めており、極めて濃厚な多成分溶液環境である。分子クラウディング (Molecular Crowding, 以下 MC と略記する。) とは、このような細胞内分子環境の化学的な呼称である。MC の効果をより深く理解し、生体分子の立体構造や反応を MC によって戦略的に制御する為には、クラウディング分子と生体分子の相互作用を微視的レベルで解明し、その効果を定量化および一般化する事が必要である。

## 2. 研究の目的

本研究は、分子クラウディング環境が、生体分子の立体構造や機能発現に及ぼす効果を、分子動力学シミュレーションを中心とした計算化学的手法によって、原子レベルで解明することを目的としている。すなわち、クラウディング剤の「何が、何処に、どれほど」作用しているかを微視的に明らかにすることである。

## 3. 研究の方法

本研究では、おもに分子動力学シミュレーション<sup>1)</sup>と液体論の一つである Kirkwood-Buff (カークウッド-バフ) 理論<sup>2)</sup>を組み合わせ用いる。前者は主に、分子のダイナミクスを再現するために、後者はそこで得られた各原子の位置情報を平均化し、クラウディング剤の 3 次元的な分布から、部分モル体積や、溶媒和自由エネルギーなどを計算するために用いる。

## 4. 研究成果

(1) 深海生物が細胞内に多く蓄積する有機低分子：TMAO (trimethylamin N-oxide) をクラウディング剤として用い、濃度 2.2M TMAO 水溶液中におけるアポミオグロビンの挙動 (25 ナノ秒) を、分子動力学法によってシミュレーションした。Kirkwood-Buff (KB) 積分法<sup>1)</sup>を改良し、シミュレーションによって得られた水分子および TMAO 分子の位置情報を用いて、タンパク質の純水から TMAO 水溶液中への移相自由エネルギー (Transfer Free Energy (TFE))<sup>3)</sup>を計算する手法を開発した。TFE の理論値は実験値と良い一致を示した。

(2) これに加え、KB 積分の時空間分解によって、TFE のダイナミクスや 3 次元的な分布を映像化する手法も開発した。TFE は、総量としては正の値を持つが、タンパク質周囲で均一に分布しているのではなく、溶質表面を塗りつぶすように発生する正の TFE 領域 (黄) と、球状に点在する負の TFE 領域 (青) が混在していることが明らかになった (図 1)。

本研究の解析手法によって、低分子クラウディング剤がタンパク質のどのような部位に作用し、それが熱力学的にいかなる影響を溶質に与えているかを、「定量的かつ視覚的に」理解することが可能となった。

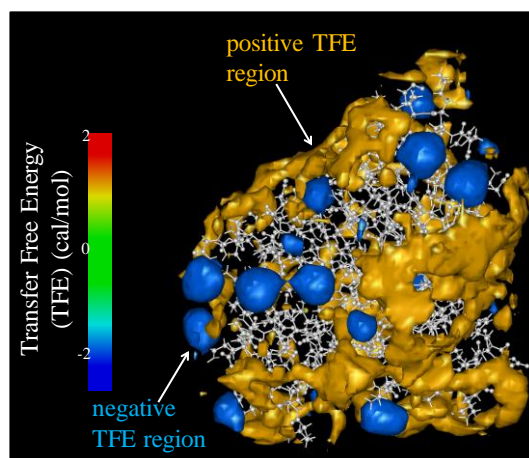


図 1 MD シミュレーションと Kirkwood-Buff 積分法で得られた移相自由エネルギーの 3 次元分布。黄色と青色の領域は、それぞれ TMAO 添加が蛋白質の自由エネルギーを増加、および減少させる領域。

(3) TMAO のようなクラウディング剤は、蛋白質を高静水圧による圧力変性から防御している可能性が示唆されている。高静水圧を付加した分子動力学シミュレーションを実行し、TMAO が蛋白質の部分モル体積 (溶質が系全体に及ぼす実質的な体積) とその圧力依存性に及ぼす影響を調査した。この研究を通じて、Kirkwood-Buff 理論を生体分子用に改良し、蛋白質の部分モル体積の時間変化 (ダイナミクス) および水和体積の 3 次元分布を溶媒分子の微視的配置情報のみから再構成する手法を開発した。これにより、従来、実験的には総量としてのみ観測可能であった体積量について、その微視的空間分布やダイナミクスを知ることが可能になった。

## 用語説明

1) 分子動力学 (MD) シミュレーション：原子間に働く力を計算し、運動方程式を繰り返し解く事によって、分子の動きをつぶさに追跡する方法。

2) Kirkwood-Buff 理論：液体分子の密度分布から、熱力学量を計算する理論。

3) 移相自由エネルギー (TFE)：溶質を、純水相から別の溶液相に移す際に変化する溶質の自由エネルギー。

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 2 件)

- ① Isseki Yu\*, Kyoko Nakada, Masataka Nagaoka

Spatio-Temporal Characteristics of Transfer Free Energy of Apomyoglobin into the Crowding Condition with Trimethylamine N-oxide: A Study with Three Types of the Kirkwood-Buff Integral

*Journal of Physical Chemistry B*, 116, 4080-4088, (2012) 査読有り

- ② Isseki Yu\*, Masayoshi Takayanagi, Masataka Nagaoka

Influence of Hydrostatic Pressure on Dynamics and Spatial Distribution of Protein Partial Molar Volume: Time-Resolved Surficial Kirkwood-Buff Approach

*Journal of Physical Chemistry B*, 114, 12392-12397, (2010) 査読あり

[学会発表] (計 9 件)

- ① 優乙石、中田恭子、長岡正隆

TMAO 添加による蛋白質溶媒和自由エネルギー変化の微視的解明: 3次元カークウッド-バフ積分法

によるマッピング解析

第26回分子シミュレーション討論会

2012年11月26日~2012

年11月28日

九州大学

- ② 優乙石、中田恭子、長岡正隆

Three-dimensional Imaging of the Protein Transfer Free Energy into the Molecular Crowding Condition with TMAO

第50回生物物理学会年会 名古屋市 名古屋大学

2012年09月22日~2012年09月24日

名古屋大学

- ③ 優乙石、中田恭子、長岡正隆

蛋白質移相自由エネルギーの空間分布に与える溶質表面特性の影響: オスマライトによる分子クラウ

ディング環境下の場合

第6回分子科学討論会 東京大学

2012年09月18日~2012年09月21日

東京大学

- ④ 優乙石、中田恭子、長岡正隆

カークウッド-バフ積分法による蛋白質移相自由エネルギーの計算と映像化: 分子クラウディング環境

の微視的理解に向けて

第15回理論化学討論会

2012年05月24日~2012年05月26日

仙台市福祉プラザ

- ⑤ 優乙石、中田恭子、長岡正隆

トリメチルアミン N-オキシドで模倣した細胞質環境へのアポミオグロビン移相自由エネルギー: カークウッド-バフ積分法による時空間解析

日本化学会第92春季年会

2012年3月27日

慶応大学

- ⑥ 優乙石、中田恭子、長岡正隆

高静水圧が及ぼすアポミオグロビンの遠位水和体積変化: 分子動力学法と連携するカークウッド-バフ積分法による考察

分子科学討論会 2011

2011年9月21日

札幌市 札幌コンベンションセンター

- ⑦ 優乙石、中田恭子、長岡正隆

High Pressure-Induced Hydration Volume Change around the Protein:

Kirkwood-Buff Approach combined with Molecular Dynamics Simulation

第49回生物物理学会年会

2011年9月17日

兵庫県立大学

- ⑧ 優乙石、中田恭子、長岡正隆

Molecular Dynamics Picture of Protein Partial Molar Volume Reduction under High Hydrostatic Pressure:

Time-Resolved Kirkwood-Buff Approach

生物物理学会48回年会

2010年9月21日

東北大学

- ⑨ 優乙石、中田恭子、長岡正隆

アポミオグロビン部分モル体積のダイナミクスおよび空間分布に及ぼす高静水圧の影響: 時間分解カークウッド-バフ積分法による考察

分子科学討論会 2010

2010年9月14日

大阪大学

[その他]

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

優 乙石 (YU ISSEKI)

青山学院大学・理工学部・助教

研究者番号：90402544

(2) 研究分担者

なし ( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし ( )

研究者番号：