

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25291034

研究課題名(和文) タンパク質機能発現の分子機構に関する理論的研究

研究課題名(英文) Theoretical study on molecular mechanisms of protein functions

研究代表者

林 重彦 (Hayashi, Shigehiko)

京都大学・理学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：70402758

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：タンパク質の分子機能は、局所的な酵素反応からタンパク質の大域的構造変化に至る様々な空間的・時間的スケールを持った現象が相関することにより達成される。本研究では、最近、我々により開発された、異なるスケールの現象の相関の記述を可能にする新規な分子シミュレーションの手法である QM/MM RWFE SCF 法を用いて、Ras-GAP GTPase タンパク質複合体の変異体の反応性、視物質ロドプシンの光活性化過程、F1-ATPase の分子モーター機能における化学 - 力学変換に関する新規の知見を得ることに成功した。

研究成果の概要(英文)：Protein functions are fulfilled by correlation among various phenomena on different spatial and temporal scales ranging from enzymatic reactions to global conformational changes of proteins. By using a novel molecular simulation approach developed recently by us, QM/MM RWFE-SCF, which is capable of describing such correlations of various phenomena on different scale, we succeeded in obtaining novel molecular mechanistic insights into enzymatic catalysis of Ras-GAP GTPase and its mutants, photoactivation process of rhodopsin visual receptor, and chemo-mechanical coupling of F1-ATPase molecular motor.

研究分野：生物物理学

キーワード：分子シミュレーション ハイブリッド法 タンパク質 酵素反応 シグナル伝達タンパク質 光受容体  
分子モーター

### 1. 研究開始当初の背景

近年、NMR 緩和分散測定や一分子観測実験により、タンパク質に特徴的な遅い揺らぎが酵素の高い化学反応触媒活性に重要な寄与をもたらしていることが示唆されている。また、多くのタンパク質分子機能はタンパク質構造の大域的な構造変化を伴い、それに相関する酵素活性の変化が機能を制御している。従って、その理解のためには、タンパク質の大域的構造変化と酵素活性の相関のメカニズムを明らかにしなければならないが、それらの空間的・時間的スケールの大きなギャップにより、原子レベルでの理解は未だ得られていない。

タンパク質の分子機能を制御するリガンド分子の結合や酵素反応は、結合部位での正確な分子認識によって引き起こされる。タンパク質との相互作用による化学反応触媒活性の解析のために、量子化学 (QM) と分子力学 (MM) 法を組み合わせた QM/MM 法が広く用いられているが、QM 法の高い計算コストにより、熱揺らぎの効果を無視したポテンシャルエネルギー上での解析や、非常に短時間の分子動力学 (MD) 計算による局所的揺らぎの効果の考慮しかされていない。

### 2. 研究の目的

タンパク質の分子機能発現は、リガンド小分子の結合や酵素反応からタンパク質の大域的構造変化に至る様々な空間的・時間的スケールを持った現象が互いに相関することにより達成されている。その分子過程は、詳細な分子間相互作用によってもたらされる正確な分子認識と、化学反応や熱揺らぎによって引き起こされるその分子認識のダイナミックな変化が織り成す複雑なプロセスである。本研究では局所的なリガンド結合や酵素反応と大域的なタンパク質構造変化の相関に関する新たな知見を得ることを可能にする分子シミュレーションの手法を開発し、分子モーターやロドプシンタンパク質の機能発現の分子機構や薬剤開発を目指したタンパク質-小分子結合の相互作用機構を解明することを目的とする。

### 3. 研究の方法

最近、我々のグループで開発された自由エネルギー構造最適化法である QM/MM-RWFE-SCF 法は、QM/MM 法によるタンパク質の構造変化のサンプリングの問題を部分的に解決している。この手法では、平均場近似と reweighting 統計平均法を導入し、QM 計算と MM 分子力場による MD サンプリングを完全に分離することにより、サブマイクロ秒にわたる遅いタンパク質構造揺らぎと酵素反応の相関を明らかにすることを可能にした。また、この手法は、酵素反応解析のみならず、タンパク質の pKa 変化やリガンド小分子との結合など、分子の電

子状態に基づく正確な相互作用の記述とタンパク質の大きな構造変化の考慮を両立しなければならない現象に適用が可能である。

### 4. 研究成果

**Ras-GAP シグナル伝達タンパク質複合体の柔らかな酵素活性** Ras-GAP タンパク質複合体は細胞分化の細胞内シグナル伝達に関わるタンパク質で、GTPase である Ras に GAP が結合することにより、Ras に ATP 分子が結合したシグナル活性状態を、ATP 加水分解反応を経て ADP 分子が結合した不活性状態に転化する。従って、Ras-GAP 複合体における ATP 加水分解酵素活性は、シグナル伝達のスイッチ機能に本質的な役割を果たしており、実際に、酵素活性を低下させる変異体は、腫瘍形成に寄与していることが知られている。最近、このタンパク質複合体の酵素活性の反応自由エネルギー障壁に大きなエントロピーによる安定化の寄与があることが実験的に観測された。これは、この酵素活性に、タンパク質の柔軟な構造変化が大きな寄与をしていることを示唆している。

本研究では、QM/MM RWFE-SCF 法を用いて、反応の自由エネルギープロファイルを調べることで、酵素反応の触媒活性機能におけるタンパク質の柔軟性の役割を明らかにすることを目的とした。計算は、QM 領域に反応部位の 76 原子を取り、その周りの水和したタンパク質の系 ~78,000 原子を MM 領域として取り扱った。系は周期境界条件で取り扱われ、長距離の静電相互作用は Ewald 法で考慮されている。QM 計算は B3LYP/6-31+G(d,p) 法で行い、基底関数数は 888 である。

自由エネルギー構造最適化は、反応の始状態に 877 ns、遷移状態に 457 ns の MD 計算を要した。これは、従来の計算と比較して 100 倍以上の長時間のシミュレーションである。その結果、反応始状態からの遷移状態生成に伴い、タンパク質複合体間の大きな構造変化が引き起こされることを見出した (図 1 左図)。この複合体間の大規模な構造変化

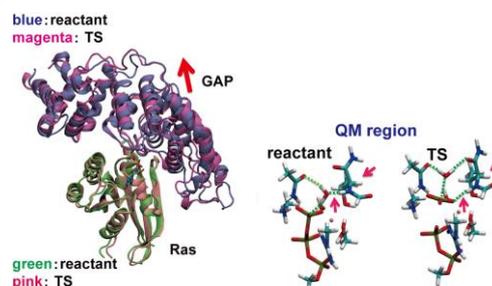


図 1 Ras-GAP タンパク質複合体の反応遷移状態生成に伴う大規模構造変化

は、結合部位での酵素活性を与える相互作用形成と相関している。三リン酸加水分解反応の遷移状態生成により生じた  $\gamma$  リン酸は、近傍の switch-I ループの主鎖のアミド基と水

素結合を形成し遷移状態が安定化される (図 1 右図)。その水素結合形成が、switch-I ループの構造変化を誘起し、それが switch-I ループに含まれる Pro34 と GAP に含まれる Leu902 のパッキングを変調し、最終的に複合体間の大規模な構造変化につながっている。更に、この構造変化に伴い、反応部位近傍に束縛されていた複数の水分子が bulk 環境へ排除されることを見出した。これは、反応遷移状態生成の安定化に束縛水分子の排除による並進・回転エントロピー利得の寄与があることを示している。

観測された複合体間の大規模な構造変化が、実際に酵素反応触媒活性に寄与しているかを調べるために、反応自由エネルギー障壁を計算した。自由エネルギー計算は、反応始状態と遷移状態の QM 構造の間を 40 分割で内挿する経路に対して、Bennet acceptance ratio 法を用いて行った。まず、リファレンスとして、反応自由エネルギー障壁を十分長い MD トラジェクトリ計算 (計 1  $\mu$ s) を行い求めた。その結果、反応障壁は 14.0 kcal/mol であり、実験値 15.9 kcal/mol と良い一致を見せた。一方、上記の大規模構造変化や水の排除を記述できないような短い MD トラジェクトリ (10 ns) から得られた反応障壁は、19.9 kcal/mol であり、上記リファレンスよりも 6 kcal/mol 程度高くなった。すなわち、本研究で見出されたタンパク質複合体の大規模構造変化は、反応触媒活性に大きな寄与を与えていることを明らかにした。

また、がん化変異として知られている Leu902 部位の変異体についても、反応触媒活性を調べた。Leu902 は、上記のように、反応遷移状態生成における大規模構造変化に関わっており、その変異は、反応障壁の変調をもたらすことが期待される。計算の結果、Leu902Ile 及び Leu902Phe の両者ともに、反応障壁が 3 kcal/mol 程度上昇し、反応触媒活性が減少することを見出した。従って、がん化変異にも、タンパク質の柔軟性がもたらす酵素活性が関与していることが示唆される。

**視物質ロドプシンの光活性化機構** 視物質ロドプシン (Rh) は 7 回膜貫通型構造を有する G タンパク質結合膜タンパク質受容体である。Rh は、発色団としてプロトン化シッフ塩基レチナール分子を結合しており、発色団分子の光異性化反応により開始される光サイクルの中で活性化される。これまでに多くの分光学的及び構造生物学的研究がなされているものの、その光活性化機構は未解決のままである。七田らの生化学実験では、光中間体である Lumi 状態において発色団分子の  $\beta$  イオン環部位の大きな動きが示唆されているが、一方、最近の x 線結晶構造解析では、そのような発色団分子の大きな構造変化は観測されていない。しかし、x 線結晶構造解析では、結晶パッキングにより、タンパク質の大きな動きが制限されている

ことが予想されるため、膜環境での解析が必要となる。

本研究では、光サイクルの初期状態 Rho 及び中間体である BSI 及び Lumi 状態に対して、QM/MM RWFE-SCF 法を用いたモデリングを行うことにより、光活性化の分子機構の解明を目的とした。発色団分子の光異性化反応とそれに続く緩和過程は、膜中のタンパク質系に対して MD 計算によりシミュレーションを行い、得られたモデルを、発色団分子及びシッフ塩基周辺の分子を QM 領域とした QM/MM RWFE-SCF 法を用いた自由エネルギー構造最適化計算により精密化し、さらに発色団の吸収波長及びプロトン化シッフ塩基の N-D 伸縮振動を計算し、実験で得られているそれらの分光量と比較することにより、モデルの検証を行った。

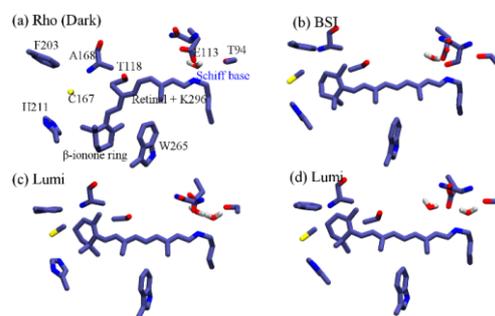


図 2 Rh の光サイクル中間状態の計算モデル

計算により得られた各状態のモデルを図 2 に示す。発色団分子は、Rho 状態では、11-cis 配置をとり屈曲しているが、光異性化後の BSI 及び Lumi 構造では all-trans 型で伸張した構造となっている。これに伴い、 $\beta$  イオン環は Helix IV に接近しており、七田らの生化学実験を良く説明している。従って、リガンド分子の構造変化に伴う結合ポケットの変化が、膜貫通ヘリックスの再配置を引き起こし、光活性化による G タンパク質の結合をもたらすことが示唆された。また、得られた光吸収波長は、BSI 状態での大きな短波長シフト及び Lumi 状態での小さな短波長シフトを良く再現している。更に、Lumi 状態生成における N-D 伸縮振動の高波数シフトも良く再現された。これらの分光学的量の良い再現は、本モデルの高い妥当性を示している。

**F<sub>1</sub>-ATPase 分子モーターの化学-力学変換** F<sub>1</sub>-ATPase は ATP 加水分解反応で生じるエネルギーにより駆動される分子モーターである。 $\alpha_3\beta_3$  サブユニットのヘテロ 6 量体リングで形成される軸受けに存在する 3 箇所の ATP 結合部位での ATP 結合、加水分解反応、及び ADP・リン酸解離に相関し、 $\gamma$  サブユニットが軸として回転する。最近の鈴木らの一分子実験により、ヒトの F<sub>1</sub>-ATPase では ATP 分子の加水分解反応の前に、50 Å 程離

れた遠位の結合部位におけるリン酸解離が生じ、15 度ほどの  $\gamma$  サブユニットの回転が誘起されることが見出された。一方、このような、遠位の結合部位でのリン酸解離と ATP 加水分解反応性の相関の分子機構に関する知見は全く得られていない。

本研究では、QM/MM RWFE-SCF 法を用いて、遠位の結合部位におけるリン酸の解離による  $\gamma$  サブユニットの回転誘起や ATP 加水分解反応性の制御の分子機構を解明することを目的とした。シミュレーション系は水溶液中のタンパク質で ~340,000 原子から構成されている。ATP 加水分解反応部位を QM 領域として取り扱い、B3LYP/6-31(+) $G^{**}$  法を用いて自由エネルギー構造最適化を行った。また、リン酸結合部位にリン酸を結合した系と結合していない系の両者に対して自由エネルギー構造最適化を行った。

まず、リン酸を結合していない系であるが、2.8  $\mu$ s の自由エネルギー構造最適化により、15 度程の顕著な  $\gamma$  サブユニットの回転を観測した (図 3)。これは、鈴木らの一分子実験に良く対応している。リン酸の解離により、リン酸結合部位の  $\alpha$  及び  $\beta$  サブユニットの境界が大きく開き、 $\gamma$  サブユニットの回転を伴う構造再配置が起きることが明らかになった。また、リン酸を結合した系では、1.3  $\mu$ s の自由エネルギー構造最適化により、ATP 加水分解反応部位において、ATP 分子からの求核攻撃を行う水分子や反応活性に重要なアルギニン分子の解離が観測された。これは、遠位のリン酸結合により、ATP 加水分解反応性が減少することを示唆しており、鈴木らの一分子実験の観測結果を良く説明している。現時点では、両者の系で自由エネルギー構造最適化計算の収束に至っていないが、今後継

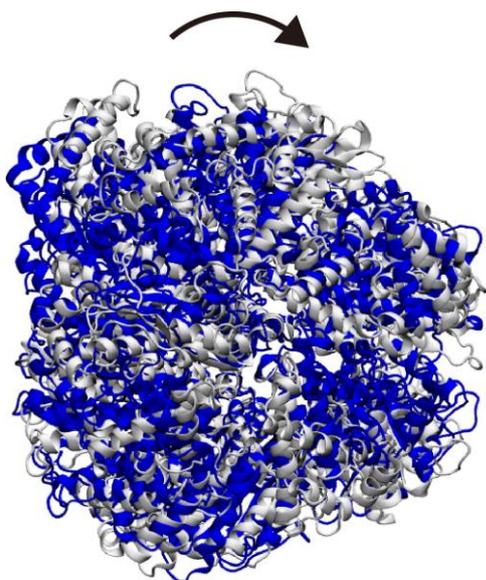


図 3  $F_1$ -ATPase のリン酸解離による  $\gamma$  サブユニットの回転。最適化前 (青) 及び最適化中 (白)。見やすさのため、 $\gamma$  サブユニットでフィットしており、6 量体リングの回転として表されている。

続して計算を行う予定である。

**QM/MM RWFE-SCF 法の改良** 更なる高精度化を目指して、二つの改良を行った。まず、これまでの手法では、MD 計算で MM 領域の構造サンプリングを行う際に、QM 領域を空間に固定していた。この方法は、非常に簡便な計算が可能であるが、MM 構造の緩和が遅くなるため、自由エネルギー構造最適化の収束が遅くなる問題があった。そこで、QM 領域を剛体で取り扱う手法を導入し、QM/MM インターフェース、及び MD サンプリングを行う Amber (GPU 版) 及び NAMD に導入した。これにより、例えば pKa 計算などでプロトン化状態が変化したときの側鎖の構造変化等が記述できるようになった。

また、精度の良い計算のためには、QM-MM 静電相互作用の改良も必要となる。これまでの QM/MM RWFE-SCF 法では、MD 計算による MM サンプリングが必要であり、conventional な分子力場に合わせるために、点電荷演算子を用いた静電相互作用表現を用いていたが、非共有電子対などによる空間に分極した静電ポテンシャルの記述に困難があった。そこで、点電荷演算子を四重極までの多極子演算子に拡張した。また、近距離での波動関数の拡がりによる遮蔽効果を考慮するために、指数関数の減衰項を付加した。改良された QM-MM 相互作用演算子を QM/MM RWFE-SCF 法に実装すると共に、MM 構造サンプリングを行う Amber (GPU 版) に多極子相互作用の計算を付加した。

図 4 に、QM 領域として取り扱ったリゾチームタンパク質の Glu35 周りの水分子の分布を表す。点電荷相互作用のみの場合に比べて、多極子相互作用を導入した計算によって得られた水分子の分布の方が、より構造化した分布が得られており、QM-MM 間の水素結合がより詳細に記述されていることが分かる。

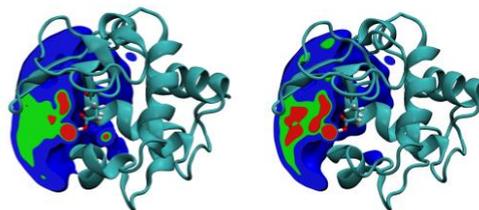


図 4 リゾチームの Glu35 周りの水の分布。点電荷相互作用 (左) と多極子相互作用 (右)。

これらの改良により、非経験的な QM/MM RWFE-SCF 法を用いた精度の良い薬剤分子とタンパク質の間の結合エネルギーの計算や、titratable な側鎖や基質分子に対する非経験的な pKa 計算への道が開けた。現在、このような計算アルゴリズムの開発を行っている。

## 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 11 件)

- ① Koichi Tamura and Shigehiko Hayashi\*, Role of bulk water environment in regulation of functional hydrogen-bond network in photoactive yellow protein. *Journal of Physical Chemistry B*, **119**, 15537-15549 (2015).
- ② Cheng Cheng, Motoshi Kamiya, Yoshihiro Uchida, and Shigehiko Hayashi\*. Molecular mechanism of wide photoabsorption spectral shifts of color variants of human cellular retinol binding protein II. *Journal of the American Chemical Society*, **137**, 13362-13370 (2015).
- ③ Mizuki Takemoto, Hideaki E. Kato, Michio Koyama, Jumpei Ito, Motoshi Kamiya, Shigehiko Hayashi, Andrés D. Maturana, Karl Deisseroth, Ryuichiro Ishitani\*, and Osamu Nureki\*. Molecular dynamics of channelrhodopsin at the early stages of channel opening. *PLoS ONE*, **10**, e0131094 (2015).
- ④ Koichi Tamura and Shigehiko Hayashi\*. Linear response path following: a molecular dynamics method to simulate global conformational changes of protein upon ligand binding. *Journal of Chemical Theory and Computation*, **11**, 2900-2917 (2015).
- ⑤ Hideaki E. Kato, Motoshi Kamiya, Seiya Sugo, Jumpei Ito, Reiya Taniguchi, Ayaka Orito, Kunio Hirata, Ayumu Inutsuka, Akihiro Yamanaka, Andrés D. Maturana, Ryuichiro Ishitani, Yuki Sudo, Shigehiko Hayashi\*, and Osamu Nureki\*. Atomistic design of microbial opsin-based blue-shifted optogenetics tools. *Nature Communications*, **6**, 7177 (2015).
- ⑥ Keiichi Inoue, Takashi Tsukamoto, Kazumi Shimono, Yuto Suzuki, Seiji Miyauchi, Shigehiko Hayashi, Hideki Kandori, and Yuki Sudo\*. Converting a light-driven proton pump into a light-gated proton channel. *Journal of the American Chemical Society*, **137**, 3291-3299 (2015).
- ⑦ Ayako Yukawa, Ryota Iino, Rikiya Watanabe, Shigehiko Hayashi, and Hiroyuki Noji\*. Key chemical factors of arginine finger catalysis of F<sub>1</sub>-ATPase clarified by an unnatural amino acid mutation. *Biochemistry*, **54**, 472-480 (2015).
- ⑧ Masahiro Higashi\*, Takahiro Kosugi, Shigehiko Hayashi, and Shinji Saito\*. Theoretical study on excited states of bacteriochlorophyll *a* in solutions with

density functional assessment. *Journal of Physical Chemistry B*, **118**, 10906-10918 (2014).

- ⑨ Norifumi Kishi, Munetaka Akita, Motoshi Kamiya, Shigehiko Hayashi, Hsiu-Fu Hsu, and Michito Yoshizawa\*. Facile catch and release of fullerenes using a photoresponsive molecular tube. *Journal of the American Chemical Society*, **135**, 12976-12979 (2013).
- ⑩ Yuki Sudo\*, Ayako Okazaki, Hikaru Ono, Jin Yagasaki, Seiya Sugo, Motoshi Kamiya, Louisa Reissig, Keiichi Inoue, Kunio Ihara, Hideki Kandori, Shin Takagi and Shigehiko Hayashi, A blue-shifted light-driven proton pump for neural silencing. *Journal of Biological Chemistry*, **288**, 20624-20632 (2013).
- ⑪ Matthew J. McGrath\*, I.-F. Will Kuo, Shigehiko Hayashi, and Shoji Takada\*. Adenosine triphosphate hydrolysis mechanism in kinesin studied by combined quantum-mechanical/molecular-mechanical metadynamics simulations. *Journal of the American Chemical Society*, **135**, 8908-8919 (2013).

[学会発表] (計 21 件)

[図書] (計 5 件)

- ① 林重彦. 新しい酵素を理論的にデザインすることはできるのかー存在の耐えられない複雑さー. *現代化学* 2015 年 2 月号, 25-27 (2015).
- ② Klaus Schulten and Shigehiko Hayashi, *Quantum Biology of Retinal*, *Quantum Effects in Biology*, Cambridge University Press, Chapt. 11, 237-263 (2014).
- ③ 林重彦. ハイブリッド分子シミュレーションと実験研究の接点で見える生体分子機能のメカニズム. *化学フロンティア* 23 1 分子ナノバイオ計測ー分子から生命システムを探る革新的技術, 化学同人, 第 6 章, 89-98 (2014).
- ④ Shigehiko Hayashi\*. Perspective: Silencing neurons with light. *Science*, **344**, 369-370 (2014).
- ⑤ 林重彦. 生体分子系の量子化学. *DOJIN BIOSCIENCE 10 揺らぎ・ダイナミクスと生体機能ー物理化学的視点からみた生体分子*, 化学同人, 第 7.3 章, 121-133 (2013).

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://kuchem.kyoto-u.ac.jp/riron/>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

林 重彦 (HAYASHI, Shigehiko)

京都大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号： 70402758