

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：14301

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2013～2017

課題番号：25104004

研究課題名(和文) 柔らかな分子がもたらす触媒活性の理解と設計

研究課題名(英文) Theoretical Analysis and Rational Design of Catalytic Activity of Flexible Molecules

研究代表者

林 重彦 (HAYASHI, Shigehiko)

京都大学・理学研究科・教授

研究者番号：70402758

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 39,100,000円

研究成果の概要(和文)：複雑分子系の有する柔軟性は、物質機能を構築する上で重要な特徴となっており、例えば生体機能においては、高い物質認識と化学反応触媒活性を通じた情報・エネルギー変換を可能にしている。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、生体分子や機能性有機分子集合体の分子機能における柔軟性の役割を明らかにした。更に、タンパク質系に関しては、変異体導入による構造変化を精度よく求めることにより、シグナル伝達タンパク質の腫瘍形成変異体の解析や光受容体タンパク質の色変異体の解析・設計を行った。

研究成果の概要(英文)：Conformational flexibility of complex molecular systems plays an essential role in their molecular functions. For example, conformational flexibility of biomolecules furnishes them with high molecular recognition and catalytic activity, allowing them to convert and mediate various information and energy forms necessary for biological activities. In the present study, we elucidated in atomic details the role of conformational flexibility in molecular functions of biological molecules and functional organic molecular assemblies by using a novel molecular simulation approach developed recently by us, QM/MM RWFE-SCF, which is capable of describing correlations between highly complex chemical reactions and large conformational changes of extended molecular systems. Furthermore, we carried out analysis of oncogenic mutants of a signaling protein complex and design of color variants of photo-receptor proteins with the QM/MM RWFE-SCF method.

研究分野：理論化学

キーワード：分子シミュレーション 量子化学計算 分子動力学法 ハイブリッド法 シグナル伝達タンパク質 光受容体タンパク質 機能性有機分子集合体

1. 研究開始当初の背景

複雑分子系の有する柔軟性は、物質機能を構築する上で重要な特徴となっており、例えば生体機能においては、高い物質認識と化学反応触媒活性を通じた情報・エネルギー変換を可能にしている。しかし、生体分子や自己組織化超分子の柔らかな大域的分子構造変化と化学反応などの局所的な化学的素過程の時間・空間スケールの大きな違いにより、機能発現をもたらすそれらの間の相関を直接観測することが困難であった。

我々のグループで開発された新規な分子シミュレーション手法であるハイブリッド QM/MM RWFE-SCF 法は、この困難を部分的に解決している。この手法では、従来の手法に比べて 100-10,000 倍長い酵素タンパク質構造緩和を考慮した化学反応性解析を可能にし、タンパク質に特徴的な遅い分子運動と酵素反応の相関を明らかにすることに成功した。

この成功は、分子シミュレーションによる分子機能研究に新たな可能性を開いている。まず、時間・空間スケールのミスマッチにより困難であった、酵素や超分子機能の化学的特性における分子の柔軟性の役割の理解であり、それは化学的機能分子の設計に新たな指針を導入する。次に、そのような新規分子機能の分子シミュレーションによる合理的設計である。本手法を用いることにより、化学的活性部位の高精度な記述を保ったまま、タンパク質や超分子複合体に対する十分な構造緩和シミュレーションを行えるため、アミノ酸変異や化学修飾を導入した新規機能性分子モデルの高精度な構築が可能となる。

2. 研究の目的

本研究課題では、これら方法論の発展と計算機の急速な進化により可能となった、分子機能における分子の柔らかさの理論的理解と、新規な柔らかい分子機能の合理的設計を行う。

我々がこれまでの研究で開発を進めている新規な分子シミュレーション法であるハイブリッド QM/MM RWFE-SCF 法を用いて、その困難を克服し、酵素分子や超分子の柔らかさがもたらす分子機能のメカニズムの理解を進めると共に、その知見に基づいた新規触媒活性を有する酵素分子や超分子の設計を行う。A01 班の高精度計測や A03 班の分子創成技術とのフィードバックループの形成により、電子伝達や光駆動膜チャネルなどのタンパク質や π 共役系包接複合体などの自己組織化超分子における分子の柔らかさの役割を解明し、更に、それらの分子や、我々がこれまでに取り組んできたタンパク質系に対して、新規な分子機能を付加する遺伝子工学・化学的改変の合理的設計を行う。これ

までに、上記のいくつかの分子系において、既に実験・理論の共同研究が進んでおり、本課題研究は、複雑分子研究分野の発展を加速的に進めることが期待される。

3. 研究の方法

酵素・光受容体・電子伝達タンパク質など、その分子機能に複雑な電子状態変化とタンパク質の構造変化が関わるタンパク質系に対して、QM/MM RWFE-SCF 法を用いてその分子機能を解析する。

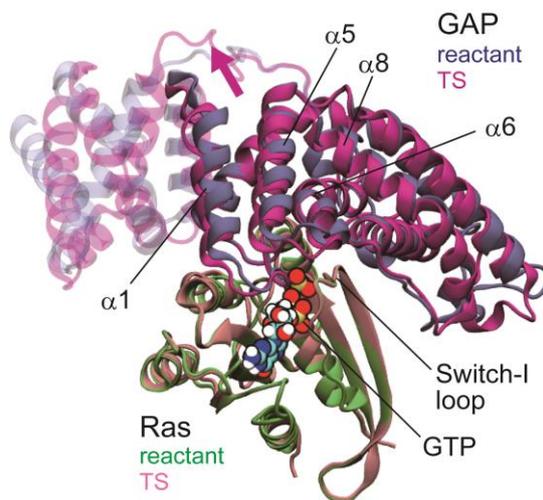
また、通常分子動力学 (MD) シミュレーションでは記述できない大規模な機能に関わるタンパク質構造変化をモデリングするために、バイアス力を付して機能的な構造変化を促進する linear response path following (LRPF) 法を開発し、膜輸送体タンパク質などに適用する。

更に、液体状態や自己組織化状態をとる新規な π 共役分子系に対して、分子力場を構築し MD シミュレーションを行うことにより、そのダイナミクスや光特性を解析する。

4. 研究成果

(1) 酵素活性におけるタンパク質分子の柔軟性の役割の解明

細胞内シグナル伝達に関わるタンパク質の酵素活性に関する研究を行った。まず、シグナル伝達のスイッチとして働く Ras-GAP タンパク質複合体の GTP 加水分解反応触媒活性に対して、長時間の MD シミュレーションに基づく QM/MM RWFE-SCF 法を用いた自由エネルギー構造最適化計算を行うことにより解析した (下図)。その結果、反応の遷移状態生成に、Ras-GAP 複合体の大規模な構造変化が相関していることを見出した。更に、Bennett acceptance ratio (BAR) 法により、反応の活性化エネルギーを解析し、上記の大規模な構造変化が酵素活性に大きな役割を果たしていることを明らかにした。また、反応触媒活性が低下する複数の腫瘍形成変異



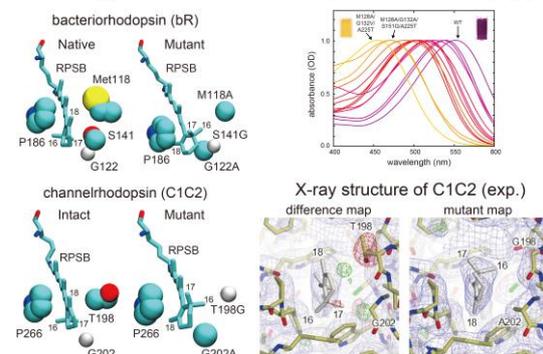
体に対しても反応機構を解析し、変異導入による反応遷移状態形成での構造変化の変調が触媒活性の低下を引き起こしていることを見出した。

更に、シグナル伝達を媒介する MEK タンパク質のリン酸化による ATPase 活性の発現の分子機構を、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解析した。その結果、MEK タンパク質がリン酸化を受けると、リン酸化部位の周辺の構造変化が活性部位へと伝播し、ATP に配位している Mg^{2+} イオンの配位構造を変調することにより、反応活性が著しく上昇することを明らかにした。

(2) レチナル光受容体タンパク質の色変異体の解析と設計、及び光活性化機構の解明

光遺伝学に用いられている光感受性イオン輸送膜タンパク質である AR3 及び ChR に対して、色変異体の設計を行った (下図)。QM/MM RWFE-SCF 法を用いて、光吸収を担う発色団分子の構造変化を引き起こす変異体を理論的に設計し、須藤ら (岡山大学) 及び濡木ら (東京大学) の生化学・電気生理学実験との共同研究により、その設計を検証した。その結果、最大で 100 nm の吸収シフトを引き起こす変異体の設計に成功した。また、

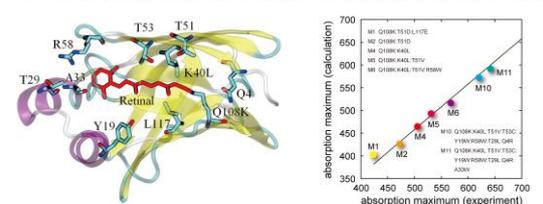
Theoretically predicted models Absorption spectra of AR3 (exp.)



濡木ら (東京大学) の結晶構造解析により、理論的に設計した発色団分子の構造変化が起きていることが確認された。

次に、点変異導入により、吸収波長が 200 nm シフトする水溶性レチナル結合タンパク質である hCRBP II に対して、QM/MM RWFE-SCF 法による解析を行った (下図)。

Positions of mutations in hCRBP II color variants Comparison of absorption maxima

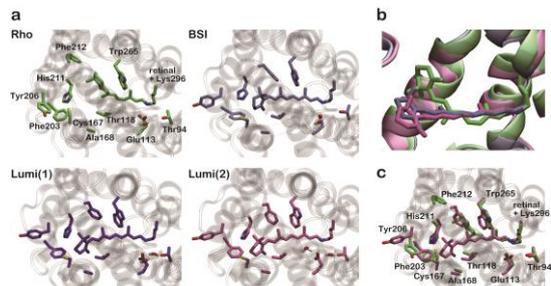


Exclusion of a water molecule producing a red-shift from M4 to M6



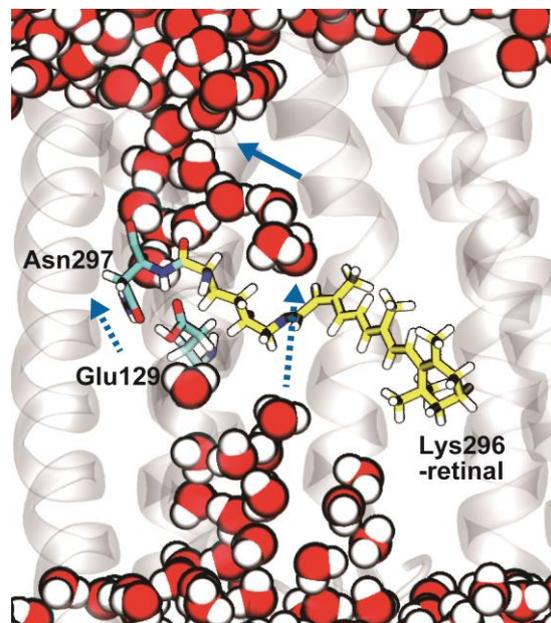
その結果、実験で観測されている 200 nm の吸収波長シフトを計算で再現することに成功し、そのシフトにはタンパク質の構造変化に伴う活性部位における水分子の配位構造の変化が大きな寄与をしていることを明らかにした。

次に、G タンパク質結合受容体である視物質ロドプシン (Rh) に対して、光活性化の分子機構を QM/MM RWFE-SCF 法により解析した (下図)。MD 計算により、光活性化構



造変化をシミュレートし、得られた中間状態の構造を QM/MM 自由エネルギー構造最適化計算により精密化した。更に、分光量を計算し実験値と比較することにより、中間状態の同定を行った。その結果、光活性化中間状態である BSI 及び Lumi 状態において、発色団分子の大きな構造変化が既に起きていることを明らかにした。

更に、ChR に対して、QM/MM RWFE-SCF 法を用いて、光活性化チャネル開状態の前駆体構造のモデリングを行った (下図)。その

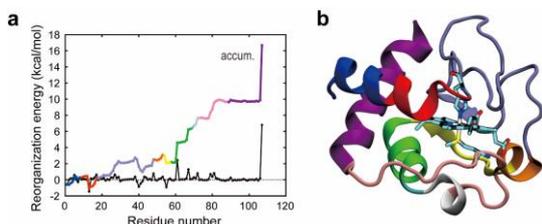


結果、これまで知られている類縁の微生物型ロドプシンの活性化構造とは顕著に異なる中間体構造が得られると共に、イオンチャネルの経路も明らかになった。

(3) 金属タンパク質の酸化還元過程の分子機構の解明

金属タンパク質の酸化還元過程では、複雑な

反応中心の電子状態変化とタンパク質環境の熱揺らぎに伴う再配向を統一的に考慮する必要がある。そこで、cytochrome c (cyt c) タンパク質の酸化還元過程を QM/MM RWFE-SCF 法で解析した(下図)。その結果、



パラメータを一切用いない非経験的アプローチで、cyt c の酸化還元電位を精度よく計算することに成功した。更に、その酸化還元電位にはタンパク質環境の再配向が大きく寄与することが見いだされ、反応中心の電子状態変化とタンパク質環境の熱揺らぎに伴う再配向の両者を精度よく求めることが重要であることが示された。また、再配向エネルギーの寄与を残基分割して解析したところ、シトクロム c 酸化酵素との相互作用面の残基の寄与が大きいことが示され、その結合により酸化還元電位が制御されることが示唆された。

(4) リガンド結合に伴う大規模タンパク質構造変化のシミュレーション手法の開発

線形応答理論に基づいた大規模タンパク質構造変化シミュレーション手法である LRPF 法を開発した。その手法では、リガンド結合を表す摂動力に対するタンパク質構造の線形応答を共分散行列から求め、その応答に比例するバイアス力を用いて構造変化の促進を行う。開発された手法を、カルシウム結合タンパク質であるカルモジュリンの N 末端ドメインに対して適用し、カルシウム結合に伴う大規模な構造変化を予測することが可能であることを示した。

更に、ADP/ATP 輸送体膜タンパク質に対して、実験で得られている inward facing 構造を出発点とした未知の outward facing 構造のモデリングを行った。その結果、非常に大規模な alternating access 的な構造変化を経て、非常に安定な outward facing 構造を見出した。また、その outward facing 構造は、実験的に示されているリガンド分子や薬剤分子を結合することができることを示された。

(5) π 共役系機能性分子集合体の構造とダイナミクスに関する解析

吉沢ら(東工大)により合成された、アントラセン骨格を有する両親媒性自己組織化分子の動的構造、及びその分子集合体がホストとなる拡張 π 共役分子の包摂過程について MD シミュレーションを用いて解析した。その結果、自己組織化分子集合体は複数の構造を有するクラスタを形成し、間欠的な構造遷

移を伴うことが示された。また、包摂過程においても、ホスト分子集合体は柔軟に構造遷移することが示され、このホスト分子が有する高いゲスト分子受容性の分子的起源を明らかにした。

また、中西ら(NIMS)が開発したピレン分子骨格とアルキル側鎖からなる分子集合体の液体ピレンに対して、そのレオロジーと光特性を MD シミュレーションにより解析した。その結果、アルキル側鎖の違いによる粘性及び蛍光スペクトルシフトの差の分子起源を明らかにした。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 16 件)

① Masahiro Yamashina, Munetaka Akita, Taisuke Hasegawa, Shigehiko Hayashi, and *Michito Yoshizawa “A polyaromatic nanocapsule as a sucrose receptor in water” *Sci. Adv.*, **3**, e1701126 (2017).

② Koichi Tamura and *Shigehiko Hayashi “Atomistic modeling of alternating access of a mitochondrial ADP/ATP membrane transporter with molecular simulations”, *PLOS ONE*, **12**, e0181489 (2017).

③ *Shigehiko Hayashi, Yoshihiro Uchida, Taisuke Hasegawa, Masahiro Higashi, Takahiro Kosugi, and Motoshi Kamiya. “QM/MM geometry optimization on extensive free-energy surfaces for examination of enzymatic reactions and design of novel functional properties of proteins” *Annu. Rev. Phys. Chem.*, **63**, 135-154 (2017).

④ Motoshi Kamiya, and *Shigehiko Hayashi “Photoactivation intermediates of a G-protein coupled receptor rhodopsin investigated by a hybrid molecular simulation” *J. Phys. Chem. B*, **121**, 3842-3852 (2017).

⑤ Takashi Tsukamoto, Kenji Mizutani, Taisuke Hasegawa, Megumi Takahashi, Naoya Honda, Naoki Hashimoto, Kazumi Shimono, Keitaro Yamashita, Masaki Yamamoto, Seiji Miyachi, Shin Takagi, Shigehiko Hayashi, *Takeshi Murata, and *Yuki Sudo, “X-ray crystallographic structure of thermophilic rhodopsin: implications for high thermal stability and optogenetic function”, *J. Biol. Chem.*, **291**, 12223-12232 (2016).

⑥ Koichi Tamura and *Shigehiko Hayashi “Role of bulk water environment in regulation of functional hydrogen-bond network in photoactive yellow protein” *J. Phys. Chem. B*, **119**, 15537-15549 (2015).

⑦ *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—存在の耐えられない複雑さ—”現代化学 2015年2月号, 25-27 (2015).

⑧ Cheng Cheng, Motoshi Kamiya, Yoshihiro Uchida, *Shigehiko Hayashi “Molecular mechanism of wide photoabsorption spectral shifts of color variants of human cellular retinol binding protein II” *J. Am. Chem. Soc.*, **137**, 13362-13370 (2015).

⑨ Mizuki Takemoto, Hideaki E. Kato, Michio Koyama, Jumpei Ito, Motoshi Kamiya, Shigehiko Hayashi, Andrés D. Maturana, Karl Deisseroth, *Ryuichiro Ishitani, *Osamu Nureki* “Molecular dynamics of channelrhodopsin at the early stages of channel opening” *PLoS ONE*, **10**, e0131094 (2015).

⑩ Koichi Tamura and *Shigehiko Hayashi “Linear response path following: a molecular dynamics method to simulate global conformational changes of protein upon ligand binding” *J. Chem. Theory and Comput.*, **11**, 2900-2917 (2015).

⑪ 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” *Nat. Commun.*, **6**, 7177 (2015).

⑫ 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” *J. Am. Chem. Soc.*, **137**, 3291-3299 (2015).

⑬ Ayako Yukawa, Ryota Iino, Rikiya Watanabe, Shigehiko Hayashi, and *Hiroyuki Noji “Key chemical factors of arginine finger catalysis of F₁-ATPase clarified by an unnatural amino acid mutation” *Biochemistry*, **54**, 472-480 (2015).

⑭ *Shigehiko Hayashi “Perspective: Silencing neurons with light” *Science*, **344**, 369-370 (2014).

⑮ Masahiro Higashi, Takahiro Kosugi, Shigehiko Hayashi, and *Shinji Saito “Theoretical study on excited states of bacteriochlorophyll a in solutions with density functional assessment” *J. Phys. Chem. B*, **118**, 10906-10918 (2014).

⑯ 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” *J. Am. Chem. Soc.*, **135**, 12976-12979 (2013).

[学会発表] (計 24 件)

① Shigehiko Hayashi (Invited) “Understanding and designing color variants of retinal binding proteins by molecular simulations” Telluride Science Research Center Workshop on “Protein Dynamics” (Telluride, USA, July 31 – August 4, 2017)

② Shigehiko Hayashi (Invited) “Understanding and designing color variants of retinal binding proteins by molecular simulations” 253rd American Chemical Society National Meeting (San Francisco, USA, April 2 – 6, 2017)

③ 林 重彦、吉沢道人 (招待) “超分子カプセルの分子内包能と動的挙動” 日本化学会第 97 春季年会 シンポジウム「複雑系のための分子科学—理論、計測、合成の連携で拓く柔らかな分子の新機能」 (2017年3月16日、日吉・神奈川)

④ Shigehiko Hayashi (Invited) "Crucial Role of Protein Flexibility in Enzymatic Catalysis" Japan-France-Spain Joint-Symposium on Theoretical and Computational Science of Complex Systems (Kyoto, Japan, October 26 - 28, 2016)

⑤ Shigehiko Hayashi (Invited) "Crucial Role of Protein Flexibility in Enzymatic Catalysis" The 16th KIAS Conference on Protein Structure and Function (Seoul, Korea, September 21 - 24, 2016)

⑥ 林 重彦 (招待) “柔らかいタンパク質の分子機能の理解と設計” 第 10 回分子科学討論会 (2016年9月13日、神戸・兵庫)

⑦ Shigehiko Hayashi (Invited) "Crucial Role of Protein Flexibility in Enzymatic Catalysis" IAS Focused Program on “Molecular Machines of Life: Simulations Meets Experiment” (Hong-Kong, China, May 23 - 27, 2016)

⑧ Shigehiko Hayashi (invited) “Understanding and designing color variants of retinal binding proteins by molecular simulations” Pacificchem2015 Symposium “Chemistry and Applications of Retinal Proteins: From Microbes to Humans” (Honolulu, USA, December 18-19, 2015)

⑨ Shigehiko Hayashi (speaker/organizer) “Crucial Role of Protein Flexibility in Enzymatic Catalysis” Pacificchem2015 Symposium “Interplay between Chemistry and Dynamics in Biomolecular Machines” (Honolulu, USA, December 16-17, 2015)

⑩ Shigehiko Hayashi (招待) “Role of Bound Water Molecules Inside Proteins in Their Functional Processes” 日本生物物理学会・シンポジウム “ポンプ、酵素、モーター、機能の鍵：pKa” (2015年9月14日、金沢・石川)

⑪ Shigehiko Hayashi (invited) “Crucial Role of Protein Flexibility in Enzymatic Catalysis” IUPAC-2015 45th World Chemistry Congress (Pusan, Korea, August 9-14, 2015)

⑫ 林 重彦 (招待) “柔らかいタンパク質の分子機能の理解と設計” 第12回 AMO 討論会 (2015年6月20日、東京)

⑬ Shigehiko Hayashi (invited) “Understanding and Design of Microbial Opsin-based Optogenetics Tools” Albany 2015: Conversation 19 (Albany, USA, Jun 9-13, 2015)

⑭ 林 重彦 (招待) “タンパク質の pKa 制御とプロトン能動輸送の分子機構” 分子研究会「膜タンパク質内部のプロトン透過を考える」 (2015年4月20日、岡崎・愛知)

⑮ 林 重彦 (招待) “柔らかいタンパク質の分子機能の理解と設計” 理研シンポジウム「生体分子系量子化学計算の最前線」 (2015年1月23日、和光・埼玉)

⑯ 林 重彦 (基調) “柔らかいタンパク質の分子機能の理解と設計” CBI 学会 2014 年大会 (2014年10月30日、東京)

⑰ Shigehiko Hayashi (invited) “Understanding and Designing Color Variants of Retinal Biding Proteins by Molecular Simulations” 16th International Conference on Retinal Proteins (Nagahama, Japan, October 5-10, 2014)

⑱ 林 重彦 (招待) “柔らかいタンパク質の分子機能の理解と設計” 第14回蛋白質科学会年会 公募型シンポジウム (2014年6月27日、横浜・神奈川)

⑲ Shigehiko Hayashi (invited) “Catalytic mechanism of NTPases” Tokyo ATPase Workshop (Tokyo, Japan, June 2-3, 2014)

⑳ Shigehiko Hayashi (invited) “Crucial Role of Protein Flexibility in Enzymatic Catalysis” Les Houches-TSRC Workshop on Protein Dynamics (Les Houches, France, May 18-23, 2014)

㉑ 林 重彦 (招待) “酵素機能における分子の柔らかさの役割” 日本化学会第94春季年会中長期テーマシンポジウム「複雑系のための分子科学—理論研究によるアプローチ」 (2014年3月27日、名古屋・愛知)

㉒ 林 重彦 (招待) “柔らかいタンパク質の分子機能の理解と設計” 自然科学研究機構 計算科学研究センタースーパーコンピュー

タワークショップ 2014「計算化学の最新の成果と展開」 (2014年1月21日、岡崎・愛知)

㉓ Shigehiko Hayashi (Invited) "Crucial Role of Protein Flexibility in Enzymatic Catalysis " CRC-EC Joint International Symposium on Chemical Theory for Complex Systems (Atlanta, USA, Jan. 9 - 10, 2014)

㉔ Shigehiko Hayashi (Invited) "Crucial Role of Protein Flexibility in Enzymatic Catalysis" 3rd International Conference on Molecular Simulation (Kobe, Japan, Nov. 18 - 20, 2013)

[図書] (計3件)

① 林 重彦 (分担執筆) “ハイブリッド分子シミュレーションによるロドプシン光受容体の分子機能の理解と設計” 医学のあゆみ - 第5土曜特集号「生命現象を覗く—革新的な構造生命科学が覗せてくれる世界」, **262**, 552-558 (2017)

② Klaus Schulten and Shigehiko Hayashi (分担執筆) “Quantum Biology of Retinal” Quantum Effects in Biology, Cambridge University Press, Chapt. 11, 237-263 (2014).

③ 林 重彦 (分担執筆) “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—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)

[産業財産権]

該当なし

[その他]

<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