

令和元年6月20日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04776

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 of Molecular functions of Proteins

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) 13,400,000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、LOV 光受容タンパク質、及びチャネルロドプシンの光活性化過程、更に HIV プロテアーゼの酵素反応の分子機構に関する新規の知見を得ることに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で扱っている光受容体タンパク質や酵素では、その顕著な分子機能において、光化学反応や酵素反応などの局所的な電子状態変化と大きなタンパク質分子の構造変化のスケールの異なる現象が関わっており、従来の理論的解析が困難であった。本研究では、新規の理論的手法により、その困難を解決し、原子レベルからの分子機構の解明に成功した。これにより、神経科学分野における新規なタンパク質ツールの開発や、HIV 感染の治療薬における薬剤耐性の問題の解決に向けての道が開かれた。

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 photo-activation processes of LOV photo-receptor and channelrhodopsin, and enzymatic catalysis of HIV protease.

研究分野：理論生物物理学

キーワード：分子シミュレーション 光受容体タンパク質 酵素反応 光遺伝学 QM/MM 法

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

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柔軟で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、タンパク質の柔軟な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理論的な解析のために、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。更に、MD 法においても、物理的限界によりマイクロ秒程度の現象しかシミュレーションできず、多くの分子機能が発現するミリ秒程度の時間スケールの現象の原子レベルからの解析が困難となっている。

2. 研究の目的

タンパク質の分子機能発現は、タンパク質や反応基質分子の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り、遠位での構造変化や変異導入により精密に制御される。本研究では、我々の開発した新規な分子シミュレーション手法を用いて、光遺伝学で用いられる光受容体の光-情報変換、酵素の変異による酵素反応活性の制御に関する分子機構を明らかにする。

3. 研究の方法

本研究では、我々のグループが独自に開発した自由エネルギー構造最適化法である QM/MM-RWFE-SCF 法を用いる (Hayashi et al., *Annu. Rev. Phys. Chem.*, 68, 135-154, 2017)。本手法は、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

(1) LOV 光受容体タンパク質の光活性化

LOV ドメインタンパク質は、光活性化により複雑なリガンド分子とタンパク質のシステイン (Cys48) 側鎖が共有結合を形成し、 $J\alpha$ と呼ばれるアルファヘリックスの遊離を伴う光活性化状態が生成する。本研究では LOV ドメインタンパク質に対して、QM/MM 自由エネルギー構造最適化法を用いた研究を行った。このような複雑なリガンド分子とタンパク質が共有結合を形成する系に対しては、精度の良い力場パラメータの決定が困難であり、一般的な分子力場法を用いた MD シミュレーションの実施が困難であり、光活性化における長い時間スケールのタンパク質構造変化の解析が困難である。一方、本研究で用いる QM/MM RWFE-SCF 法では、力場パラメータの決定をスキップできるため、非常に精度と効率の良い計算が可能となる。

本研究では、光活性化状態に対して QM/MM RWFE-SCF 法を用いて自由エネルギー構造最適化計算を行うことにより、光活性化をもたらすタンパク質の構造変化を解析した。計算は暗状態及びシステイン側鎖がリガンド分子と共有結合を形成した光活性化状態に対して行った。暗状態の自由エネルギー構造最適化計算では、リガンド分子やタンパク質構造の X 線結晶構造からの大きな構造変化は観測されなかった。一方、光活性化状態では、マイクロ秒の時間スケールで、リガンド分子近傍にある Gln111 の側鎖が大きく動き、生じた空隙への水分子の侵入を観測した。更に、そのリガンド分子近傍の構造変化と相関して、光活性化の際に遊離することが知られている $J\alpha$ ヘリックスの大きな構造変化を観測した (図 1)。この構造変化では、 $J\alpha$ ヘリックスの N 末端部分のアルファヘリックスが若干崩壊し、そこから繋がるループの疎水性側鎖と強固な疎水性コアを形成している。このアルファヘリックスの崩壊は、最近の時間分解赤外分光実験でも観測されており、本研究によりその現象とメカニズムを原子レベルから明らかにすることに成功した。

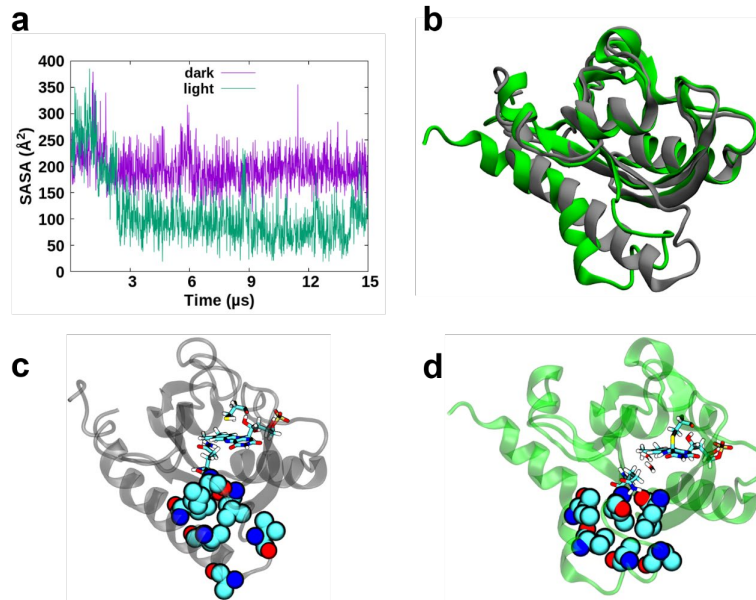


図 1 LOV タンパク質の光活性化構造変化。a 疎水性コアの solvent accessible surface area (SASA) の時間変化。b 暗状態の構造 (グレー) と光活性化状態の構造 (緑)。c 暗状態の疎水性側鎖の構造。d 光活性化状態の疎水性側鎖の構造

(2) チャネルロドプシンの光活性化機構

複雑な電子状態と分子構造を有するリガンド分子を結合する光受容体膜タンパク質であるチャネルロドプシンのキメラタンパク質である C1C2 に対して、QM/MM 自由エネルギー構造最適化計算を用いて、光活性化状態のモデリングを行った。C1C2 は、光遺伝学で用いられる光感受性イオンチャネルであり、リガンド分子であるレチナルプロトン化シッフ塩基 (RPSB) の光異性化反応によりイオンチャネルが開く。RPSB 分子は正電荷の共鳴構造を有するポリエン鎖からなり、その化学的状態や構造は非常に複雑であるため、高精度な MD シミュレーションが困難であった。そこで、QM/MM RWFE-SCF 法を用いて、光異性化後のリガンド分子とそれに相関するタンパク質光活性化の構造変化を解析した。

光活性化による構造変化を解析するために、暗状態、光異性化反応直後の P₁ 状態、更にその次に現れる RPSB 分子のプロトンが近傍のカルボン酸側鎖に移動した eP₂ 状態 (発色団は RSB 分子になる) に対して、QM/MM 構造最適化自由エネルギー計算により高精度な構造モデルを得た。シミュレーション系は、C1C2 の二量体を POPC 脂質の細胞膜と水環境に埋め込んだ周期境界条件の系である (図 2a)。自由エネルギー構造最適化計算に要した MD シミュレーション時間は、それぞれ 180 ns、150 ns、及び 126 ns である。図 2b にリガンド分子の自由エネルギー最適化構造を示す。リガンド分子の光異性化直後の P₁ 状態では、ポリエン鎖の立

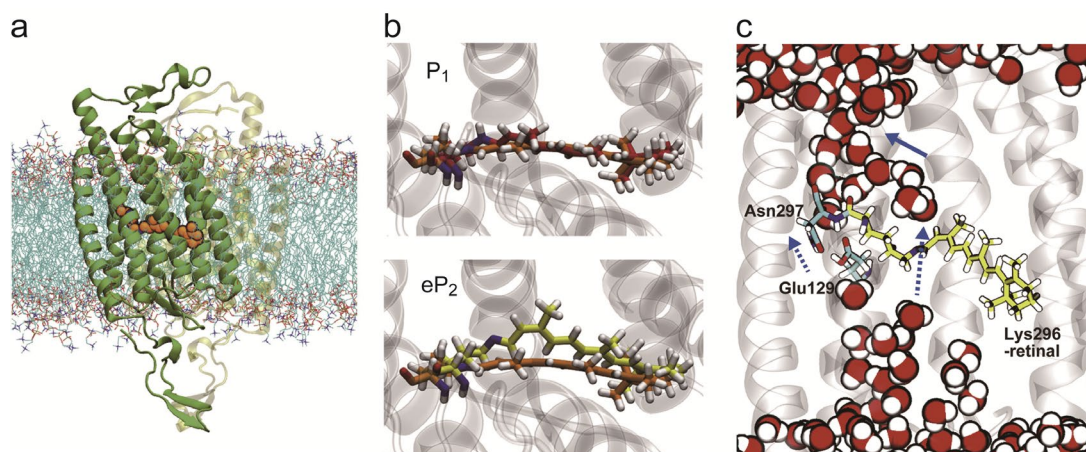


図 2 C1C2 の光活性化の構造変化。a シミュレーション系。b リガンド分子の構造変化。暗状態構造がオレンジ色で描かれている。c 提案された新たなイオンチャネル経路。

体配置がトランス体からシス体が変わるものの、プロトン化シッフ塩基付近が局所的に強く捻じれることにより、結合部位ポケットのなかでリガンド分子の全体の形が大きく変わらないことが分かった。一方、 eP_2 状態では、シッフ塩基付近の局所的な強い捻じれが解消し、その結果、分子全体が大きく横に倒れる構造変化をすることを見出した。この変化は、リガンド分子の脱プロトン化により正電荷の共鳴構造が消失し、シッフ塩基付近の捻じれが硬くなったことに起因する。更に、このリガンド分子の大きな構造変化に相関して、タンパク質の大きな構造変化が誘起され、チャンネルを形成すると思われる領域への水分子への侵入を観測した(図 2c)。これにより、これまで未知であったチャンネル経路に関しての理論予測を行うことに成功した。

(3) HIV プロテアーゼの触媒反応の分子機構

HIV プロテアーゼは変異導入による薬剤耐性が現れる。薬剤耐性の出現では、変異導入によっても酵素活性が低下しないことが必要となる。そこで、天然基質分子 (KARVLGAM 配列のペプチド鎖) に対するプロテアーゼ反応の解析を行った。まず、B3LYP-D3 汎関数を用いた QM/MM 自由エネルギー構造最適化計算により、反応始状態とジェミナルジオール型の反応活性中間状態の構造を明らかにした(図 3a)。更に、それらの状態間の自由エネルギー差を BAR 自由エネルギー摂動法により計算した。線形補間した 40 点の分割点に対して片道 $2 \mu s$ の両方向の自由エネルギー計算を行った(図 3b)。その結果、それぞれの状態の QM エネルギー差とタンパク質環境との相互作用に起因する自由エネルギー差の和で与えられる状態間のエネルギー差は 15.8 kcal/mol となった。実験で得られている反応活性化エネルギーが約 17 kcal/mol であり、活性中間状態の自由エネルギーより数 kcal/mol は大きいと予想されるため、活性中間状態の自由エネルギーは過大評価していると考えられる。そこで、QM エネルギーの汎関数依存性を検討した。孤立系での QM 領域に対して、様々な汎関数を用いた密度汎関数理論法により QM エネルギー差の計算を行うと共に、参照値として高精度の波動関数理論である CCSD(T) 法を用いた計算を行い、比較を行った。その結果、通常では余り例を見ない 10 kcal/mol を超える非常に顕著な汎関数依存性を見出した。上記の計算で用いた一般的に使用される B3LYP-D3 汎関数による計算では、CCSD(T) 計算に比べて 6.6 kcal/mol もの過大評価をしていることが分かった。

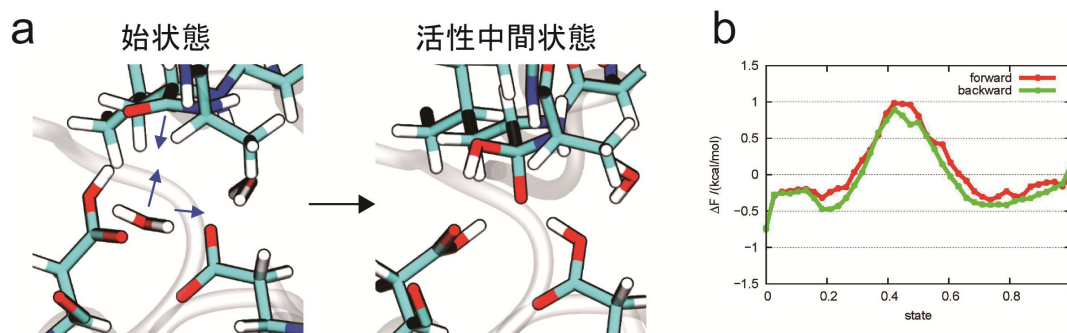


図 3 HIV プロテアーゼの酵素反応機構。a 反応始状態と活性中間状態の自由エネルギー最適化構造。b BAR 自由エネルギー摂動計算による反応始状態と活性中間状態間の自由エネルギー差における QM-MM 相互作用の寄与。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① An atomistic model of a precursor state of light-induced channel opening of channelrhodopsin. Cheng Cheng, Motoshi Kamiya, Mizuki Takemoto, Ryuichiro Ishitani, Osamu Nureki, Norio Yoshida*, and Shigehiko Hayashi*, *Biophysical Journal*, 査読有, 115, 2018, 1281-1291. DOI: 10.1016/j.bpj.2018.08.024
- ② Masahiro Yamashina, Munetaka Akita, Taisuke Hasegawa, Shigehiko Hayashi, and Michito Yoshizawa, A polyaromatic nanocapsule as a sucrose receptor in water. *Science Advances*, 査読有, 3, 2017, e1701126. DOI: 10.1126/sciadv.1701126.
- ③ Koichi Tamura and Shigehiko Hayashi, Atomistic modeling of alternating access of a mitochondrial ADP/ATP membrane transporter with molecular simulations. *PLOS ONE*, 査読有, 12, 2017, e0181489. DOI: 10.1371/journal.pone.0181489.

④林重彦, 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「生命現象を観る－革新的な構造生命科学が観せてくれる世界」, 査読無, 262, 2017, 552-558.

⑤Shigehiko 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., 査読無, 68, 2017, 135-154. DOI: 10.1146/annurev-physchem-052516-050827. An invited review.

⑥Motoshi Kamiya and Shigehiko Hayashi, Photoactivation intermediates of a G-protein coupled receptor rhodopsin investigated by a hybrid molecular simulation. Journal of Physical Chemistry B, 査読有, 121, 2017, 3842-3852. DOI: 10.1021/acs.jpccb.6b13050. An invited paper in Klaus Schulten Memorial Issue.

⑦Takashi Tsukamoto, Kenji Mizutani, Taisuke Hasegawa, Megumi Takahashi, Naoya Honda, Naoki Hashimoto, Kazumi Shimono, Keitaro Yamashita, Masaki Yamamoto, Seiji Miyauchi, Shin Takagi, Shigehiko Hayashi, Takeshi Murata, and Yuki Sudo, X-ray crystallographic structure of thermophilic rhodopsin: implications for high thermal stability and optogenetic function., Journal of Biological Chemistry, 査読有, 291, 2016, 12223-12232. DOI: 10.1074/jbc.M116.719815

[学会発表] (計 15 件)

①Shigehiko Hayashi, “Functional Molecular Dynamics of Photo-Receptor Proteins Revealed by a Hybrid Molecular Simulation Technique”, Indo-Japan mini-workshop “Frontiers in Molecular Spectroscopy: From Fundamentals to Applications in Chemistry and Biology” (神戸・兵庫) 2018年10月31日～11月1日 (発表日10月31日) 招待講演

②林重彦, 「柔らかな分子がもたらす分子機能の理解と設計」, 近畿化学協会コンピュータ化学部会 (第103回例会) 公開講演会「大規模シミュレーションによる機能発現の理解～分子領域からマクロ領域まで～ (大阪) 2018年10月26日 招待講演

③Shigehiko Hayashi, “Functional molecular dynamics of rhodopsins revealed by hybrid molecular simulations”, 18th International Conference on Retinal Proteins (Ontario, Canada) 2018年9月24日～29日 (発表日28日) 招待講演

④Shigehiko Hayashi, “Functional Molecular Dynamics of Photo-Receptor Proteins Revealed by a Hybrid Molecular Simulation Technique”, 日本生物物理学会・シンポジウム “マルチスケール・フィジクスで見えてくる生体高分子のダイナミクスと機能機序” (岡山) 2018年9月15日～17日 (発表日15日) 招待講演

⑤Shigehiko Hayashi, “Theoretical Understanding and Design of Molecular Functions of Proteins” 第912回分子研コロキウム (岡崎・愛知) 2017年12月15日 招待講演

⑥Shigehiko Hayashi, “Quantum Chemical Geometry Optimization on Extensive Free Energy Surfaces of Proteins” Recent Advances in Modelling in Rare Events (RARE2017) (Agra, India) 2017年12月7～9日 (発表日7日) 招待講演

⑦林重彦, 「柔らかいタンパク質の分子機能の理解と設計」, 第66回高分子討論会 シンポジウム「「柔らかな」生体および合成高分子系の解明と構築」(松山・愛媛) 2017年9月20～22日 (発表日22日) 招待講演

⑧Shigehiko Hayashi, “Atomistically deciphering functional processes of membrane transporter and receptor with molecular simulations” 日本生物物理学会・シンポジウム “いろんなスケールで働く膜タンパク質の作動原理：実験と理論の新展開” (熊本) 2017年9月19日～21日 (発表日19日) 招待講演

⑨Shigehiko Hayashi, “Understanding and designing color variants of retinal binding proteins by molecular simulations”, Telluride Science Research Center Workshop on “Protein Dynamics” (Telluride, USA) 2017年7月31日～8月4日 (発表日8月4日) 招待講演

⑩Shigehiko Hayashi, “Understanding and designing color variants of retinal binding proteins by molecular simulations” 253rd American Chemical Society National Meeting (San Francisco, USA) 2017年4月2日～6日 (発表日4日) 招待講演

⑪林重彦, 吉沢道人, 「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」(日吉・神奈川) 2017年3月16日～19日(発表日16日) 招待講演

⑫ Shigehiko Hayashi, “Crucial Role of Protein Flexibility in Enzymatic Catalysis” Japan-France-Spain Joint-Symposium on Theoretical and Computational Science of Complex Systems (京都) 2016年10月26日～28日(発表日27日) 招待講演

⑬ Shigehiko Hayashi, “Crucial Role of Protein Flexibility in Enzymatic Catalysis” The 16th KIAS Conference on Protein Structure and Function (ソウル・韓国) 2016年9月21日～24日(発表日24日) 招待講演

⑭ 林 重彦, 「柔らかいタンパク質の分子機能理解と設計」, 第10回分子科学討論会 招待講演 (神戸・兵庫) 2016年9月13日～15日(発表日13日) 招待講演

⑮ Shigehiko Hayashi, “Crucial Role of Protein Flexibility in Enzymatic Catalysis”, IAS Focused Program on “Molecular Machines of Life: Simulations Meets Experiment” (香港・中国) 2016年5月23日～27日(発表日24日) 招待講演

[図書] (計 0 件)

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

6. 研究組織

該当無し。

※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、研究者個人に帰属されます。