

平成 21 年 5 月 27 日現在

研究種目： 若手研究(B)

研究期間： 2007~2008

課題番号： 19740257

研究課題名(和文) 低分解能実験データに基づく蛋白質の動的構造モデリング

研究課題名(英文) Dynamic Structure of Protein to be Derived from the Solution Scattering Data

研究代表者

城地 保昌(JOTI YASUMASA)

東京大学・分子細胞生物学研究所・助教

研究者番号：30360415

研究成果の概要：

本研究は、計算機実験を援用して、溶液散乱データに含まれる蛋白質の動的構造情報を抽出することを目的とした。原子レベルの分子シミュレーション結果から、生体分子の中性子・X線溶液散乱データを計算し、通常の実験解析では無視される、原子揺らぎの情報が実験データに含まれていることが明らかになった。また、溶液中中性子散乱データの解析から、蛋白質表面水の動的物性が、通常の水と異なることが明らかになった。溶液散乱データから、真の蛋白質構造情報を抽出するためには、揺らぎを考慮した新しい溶液散乱データ解析法が必要である。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	0	1,800,000
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	450,000	3,750,000

研究分野： 数物系科学

科研費の分科・細目： 物理学・生物物理 化学物理

キーワード： 生物物理、分子シミュレーション、実験データ解析

1. 研究開始当初の背景

ナノメートルサイズの分子機械である蛋白質は、そのアミノ酸配列によって規定された固有の立体構造を形成する。蛋白質が担う分子機能を物理化学的に理解するには、まずその立体構造を解析することが不可欠である。蛋白質の立体構造を解析する手段としては、X線結晶解析とNMRが代表的である。これらは既に整備された解析法によって原子レベルの静的構造(実は平均構造)を与え、

構造-機能相関の解析に重要な役割を果たしてきた。しかし、X線結晶解析では蛋白質を結晶化しなければならない、NMRでは解析できる分子量に限界がある等、実用上の問題もある。一方で、分解能では妥協するが、機能発現状態の立体構造を解析することを目的とした実験も近年発展してきた。X線・中性子溶液散乱や電子顕微鏡等が代表的あり、分子間相互作用解析や超分子複合体解析等で成果を挙げている。特に溶液散乱は、測定

の簡便さと試料条件の汎用性から、広く利用されている。研究開始当初、溶液散乱データ解析では Svergun グループの独壇場であった。蛋白質を比較的少数の剛体球が集まった塊と捉え、実験データを解析するソフトウェア等を開発し(Svergun et. al. Rep. Prog. Phys. 2003)、多くの研究者が彼らのソフトウェアを用いて解析している。残念ながら日本は、実験データ解析法の発信に関して多くの場合立ち遅れているのが現状であった。

2. 研究の目的

蛋白質は、分子固有の立体構造を形成し、その構造を巧みに変化させることによって機能することが知られている。生体分子実験データは、固まった静的構造のみに依存するのではなく、絶えず形を変えている蛋白質の立体構造アンサンブルを反映している。特に溶液中では結晶中と比べて揺らぎが大きく、一般に行われているように静的構造モデルを用いて溶液散乱データを解析すると、実際とは異なる構造を決定する可能性がある。つまり、低分解能実験データによる機能解析のためには、原子レベルの立体構造ダイナミクスが低分解能実験データにどのように反映されるか明らかにし、その結果に基づき解析法を構築していくことが重要である。

生体分子の実験データを解析するのに、分子シミュレーションを含めた理論的方法との組み合わせが大きな寄与をすることができる。実際、X線結晶解析・NMRなどの実験解析技術において計算機実験が重要な役割を果たしてきている。研究代表者は、計算機実験を援用して X線結晶回折データや中性子散乱データから原子レベルの蛋白質動的構造を解析する研究を行ってきた(Joti et. al. Acta Crystallogr. D 2002, Joti. et. al. Physica B 2004)。溶液散乱データ解析法を構築するのにも、計算機実験を援用するのが有効である。本研究では、まず、計算機実験を援用して、溶液散乱データに含まれる蛋白質の原子揺らぎの寄与を明らかにすることを目的とした。その解析結果に基づき、蛋白質の動的構造をモデリングし、低分解能実験データの解析法を開発することを目指した。

3. 研究の方法

本研究では、まず、原子レベルの分子シミュレーション結果から、生体分子の中性子・X線溶液散乱データを計算するソフトウェアの開発を行った。このソフトウェアを用いて、ABC タンパク質 MalK(734 残基)、マルトース結合蛋白質(370 残基)、T4 リゾチーム(164 残基)の分子動力学(MD)計算結果から溶液散乱データを計算し、蛋白質の揺らぎが溶液散乱データにどのように反映されるか検討した。

次に、分子シミュレーション結果から中性子溶液非弾性散乱データを計算するソフトウェアの開発を行い、Staphylococcal Nuclease (SNase)蛋白質溶液の溶液非弾性散乱データの振舞を解析した。ここでは、実際の実験と対応させるため、水分子および蛋白質の交換可能な水素原子はすべて重水素に置換して計算を行った。溶液中中性子散乱データは、非干渉性散乱と干渉性散乱データの寄与に分離できる。さらに、非干渉性散乱は蛋白質と水の寄与に、干渉性散乱は蛋白質、水、蛋白質と水のカップリングの寄与に、それぞれ分離できる。SNase 蛋白質の MD 計算結果から計算した中性子溶液非弾性散乱データを、この5つの寄与に分離して解析した。また、参照として水のみ MD 計算を行い、同じく中性子溶液非弾性散乱データを解析した。

MD 計算は、汎用 MD 計算ソフトウェア AMBER9 を用いて行った。計算には、東京大学物性研究所の共同利用大型計算機および研究代表者が所属する研究室の PC クラスタを利用した。

4. 研究成果

本研究課題では、次の成果を得た。

(1) 構造変化に伴う中性子・X線溶液散乱データの変化の解析

ABC 蛋白質 MalK の ATP 結合構造(closed)、ADP 結合構造(semi-open)、基質がない状態(open)の MD 計算結果から、それぞれ中性子・X線溶液散乱プロファイル $I(q)$ を解析したところ(図1)、基質状態の違いによる分子の大きな構造変化が、 $q \sim 0.15 \text{ \AA}^{-1}$ 付近に現れることが明らかになった。また、静的構造から計算した散乱プロファイルと、構造アンサンブル(揺らぎを含む動的構造)から計算した散乱プロファイルを比較した結果、蛋白質の大きな揺らぎの情報が $0.2 < q < 1.0 \text{ \AA}^{-1}$ の散乱領域に含まれていることが明らかになった。

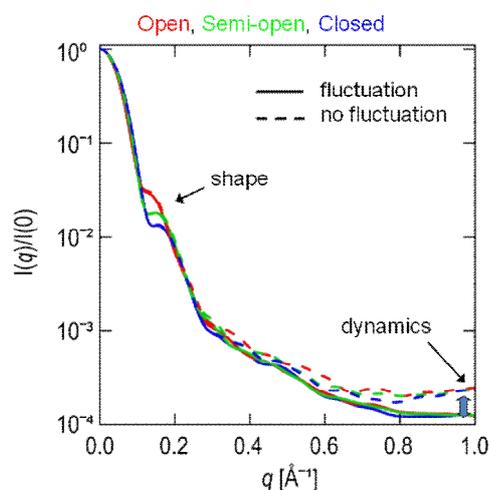


図1: ABC 蛋白質 MalK の構造変化に伴う中性子溶液散乱プロファイルの変化:

同様に、マルトース結合蛋白質の基質がない状態(open)と基質結合構造(closed)、およびT4 リゾチームの open 構造と closed 構造の MD 計算結果から、それぞれ中性子・X 線溶液散乱プロファイル $I(q)$ を解析した(図 2、図 3)。マルトース結合蛋白質、T4 リゾチーム共に、 $0.15 < q < 0.4 \text{ \AA}^{-1}$ 付近に構造変化に伴う、溶液散乱プロファイルの変化が観測された。蛋白質の揺らぎの効果も、MalK と比べて小さいながら $0.6 < q < 1.0 \text{ \AA}^{-1}$ 付近に観られた。溶液散乱プロファイルの広角側のデータには、蛋白質のより詳細な構造情報が含まれる。本解析結果は、この広角側データの解析には蛋白質の動的構造も考慮する必要があることを示す。

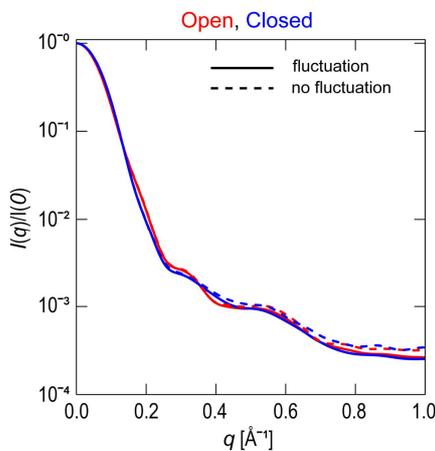


図 2：マルトース結合蛋白質の構造変化に伴う X 線溶液散乱プロファイルの変化

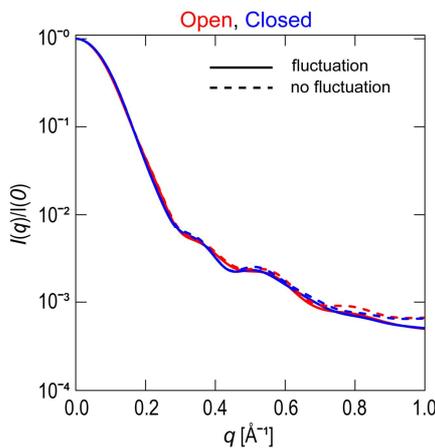


図 3：T4 リゾチームの構造変化に伴う X 線溶液散乱プロファイルの変化

通常の溶液散乱プロファイルの解析では、本研究でその重要性が明らかになった揺らぎの情報は無視される。溶液散乱データから、真の蛋白質構造情報を抽出するためには、揺らぎを考慮した新しい散乱プロファイル解析法が必要である。これらの解析結果を基に、

溶液散乱データから抽出すべき変数の検討を現在行っている。具体的には、原子レベルの分子シミュレーション結果から計算される溶液散乱データ $I(q)$ を記述するために、最低限必要なパラメータを選び、生体分子システムを粗視化する。特に、中性子溶液散乱データを解析する際には、水素原子の静的・動的構造情報を上手く取り込んで粗視化する必要があることを、現在までに明らかにした。これは、ほとんどの原子散乱長が正であるのに対して、軽水素の原子散乱長が負であるためである。

(2) 中性子溶液非弾性散乱データの解析

SNase 蛋白質の MD 結果から計算した中性子溶液非弾性散乱データを、「3. 研究の方法」で説明した 5 つの寄与に分離して解析したところ、次の結果を得た。

蛋白質と水のカップリングの寄与は、その性質上、正負両方の値をとり得、実際に $q \sim 1 \text{ \AA}^{-1}$ 付近と $q \sim 3 \text{ \AA}^{-1}$ 付近に負の値が観測されたが、その絶対値はそれほど大きくなかった。残りの 4 つの寄与は正の値しか取り得ない。4 つの中では、水からの干渉性散乱が支配的に寄与し、蛋白質の干渉性散乱は、ほとんど無視できるほど小さい。水と蛋白質の非干渉性散乱を比べると、水の非干渉性散乱が大きかった。これは、水の非干渉性散乱に寄与する重水素の散乱断面積が、蛋白質中の軽水素のものに比べて約 2 桁小さいことから考えると奇妙に思えるが、次の 2 つの理由による；(i) 溶液中では、水に含まれる重水素の数は、蛋白質中の軽水素に比べて 1 桁以上多い。(ii) 溶液中では、水分子の揺らぎの大きさは、蛋白質中の原子に比べて 2 桁以上大きいため、水の非干渉性散乱強度も大きくなる。

次に、実際の実験で、中性子溶液非弾性散乱データから、蛋白質のみからの散乱を抽出することを想定した解析を行った。つまり、蛋白質溶液の非弾性散乱データと水のみから計算した非弾性散乱データの差をとる。しかし、水分子の個数を考慮してこの引き算をしても、蛋白質からの非弾性散乱データのみを抽出するのは困難なことがわかった。前述の通り、蛋白質と水のカップリングの寄与の絶対値は小さい。詳細な解析の結果、蛋白質表面の水と水の性質(静的・動的構造)が bulk 水と異なることが、この困難の原因であることを明らかにした。この結果を基に、我々が以前行った実際の中性子散乱実験データを再検討したところ、実験データにも蛋白質水和水の効果が見られることが明らかになった。これは、当初の目的とは異なるものの、蛋白質表面水の物性(静的・動的性質)を溶液非弾性散乱実験により解析可能であることを示す、重要な成果である。

今後は、実際の実験から抽出できる蛋白質

表面水の物理量を、計算機シミュレーションを援用して明らかにしていく予定である。

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 6 件)

H. Nakagawa, Y. Joti, A. Kitao and M. Kataoka, Hydration affects both harmonic and anharmonic nature of protein dynamics, *Biophys. J.*, 95, 2916-2923, 2008, 査読有

Y. Joti, H. Nakagawa, M. Kataoka and A. Kitao, Hydration effect on low-frequency protein dynamics observed in simulated neutron scattering spectra, *Biophys. J.*, 94, 4435-4443, 2008, 査読有

Y. Joti, H. Nakagawa, M. Kataoka and A. Kitao, Hydration-dependent protein dynamics revealed by molecular dynamics simulation of crystalline Staphylococcal nuclease, *J. Phys. Chem. B*, 112, 3522-3528, 2008, 査読有

城地 保昌, 分子シミュレーションと中性子散乱で探る蛋白質ダイナミクスの水和依存性, 日本生物物理学会誌, 48, 342-344, 2008, 査読有

城地 保昌, 中迫 雅由, 難波 啓一, 非弾性散乱の生物への応用について, 日本結晶学会誌, 50, 78-82, 2008, 査読有

A. Tokuhisa, Y. Joti, H. Nakagawa, A. Kitao and M. Kataoka, Non-Gaussian behavior of elastic incoherent neutron scattering profiles of proteins studied by molecular dynamics simulation, *Phys. Rev. E*, 75, 041912, 2007, 査読有

[学会発表](計 9 件)

Y. Joti, H. Nakagawa, M. Kataoka and A. Kitao, Dynamics of Protein Hydration Water Studied from the Simulated Coherent Neutron Scattering Spectra, 特定領域研究「水と生体分子」成果取りまとめ公開シンポジウム&新学術領域研究「揺らぎと生体機能」第2回公開シンポジウム, 2009年3月17日, 岡崎カンファレンスセンター

城地 保昌, 北尾 彰朗, 分子動力学計算と溶液散乱の組み合わせで探る蛋白質の立体構造変化, 分子シミュレーションと溶液散乱で探る蛋白質の立体構造変化, 次世代ナノ統合シミュレーションソフトウェアの研究開発第3回公開シンポジウム, 2009年3月5日, 岡崎カンファレンスセンター

城地 保昌, 中川 洋, 片岡 幹雄, 北尾 彰

朗, 分子シミュレーションと中性子干渉性散乱による蛋白質表面における水の集団運動の観察, 日本物理学会 2008 年秋学会大会, 2008 年 9 月 22 日, 岩手大学上田キャンパス

城地 保昌, 北尾 彰朗, 分子シミュレーションと溶液散乱で探る蛋白質の立体構造変化, 第 46 回生物物理学会年会, 2008 年 12 月 5 日, 福岡国際会議場

城地 保昌, 北尾 彰朗, 分子シミュレーションと溶液散乱で探る蛋白質の立体構造変化, 第 8 回日本蛋白質科学会年会, 2008 年 6 月 10 日, タワーホール船堀

Y. Joti and A. Kitao, Molecular simulation study to examine the possibility of detecting protein conformational motions by coherent neutron scattering, The 1st International Conference of the Grand Challenge to Next-Generation Integrated Nanoscience, 2008 年 6 月 5 日, 国際研究交流大学村

城地 保昌, 北尾 彰朗, 分子シミュレーションと溶液散乱で探る蛋白質の立体構造変化, 次世代ナノ統合シミュレーションソフトウェアの研究開発第2回公開シンポジウム, 2008 年 3 月 5 日, 岡崎カンファレンスセンター

Y. Joti, H. Nakagawa, M. Kataoka and A. Kitao, Hydration effects on protein dynamics studied by molecular dynamics simulation of a crystalline protein, 5th Open Workshop for “Chemistry of Biological Processes Created by Water and Biomolecules”, 2008 年 1 月 25 日, 奈良県新公会堂

城地 保昌, 北尾 彰朗, 分子シミュレーションと中性子散乱で探る蛋白質の協奏的運動, 第 45 回生物物理学会年会, 2007 年 12 月 21 日, パシフィコ横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

城地 保昌 (JOTI YASUMASA)

東京大学・分子細胞生物学研究所・助教
研究者番号: 30360415

(2) 研究分担者

なし.

(3) 連携研究者

なし.