

## 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 5 月 31 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22370058

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 mechanism of protein functions

研究代表者

林 重彦（HAYASHI SHIGEHICO）

京都大学・大学院理学研究科・准教授

研究者番号：70402758

研究成果の概要（和文）：タンパク質の分子機能発現の分子機構を明らかにするために、新規の分子シミュレーションの手法を開発し、酵素反応や大域的構造変化の理論的解析を行った。酵素反応経路解析に対して、タンパク質の構造熱揺らぎの効果を効率的に考慮することを可能にする QM/MM 自由エネルギー法（QM/MM RWFE-SCF 法）を開発した。その手法を用いた解析により、 $\alpha$  アミラーゼの酵素触媒活性に、近傍ループの大きな構造変化が重要であることを明らかにした。また、微生物型ロドプシンの色変異体の構造モデルを構築した。次に、タンパク質の大域的構造変化のシミュレーションのために、線形応答理論に基づく linear response path following 法を開発した。この手法をカルモジュリンのイオン結合に伴う大域的構造変化に適用し、非常に短時間の MD シミュレーションで、その構造変化を正確に予測することに成功した。

研究成果の概要（英文）： We have developed novel methodologies of molecular simulations to elucidate molecular mechanisms of protein functions. By the methodologies developed, we theoretically analyzed enzymatic reactions and global conformational changes of proteins. We developed a QM/MM free energy method (QM/MM RWFE-SCF) that enables one to very efficiently take into account protein structural fluctuation in analysis of enzymatic reaction paths. We revealed by the method that large conformational changes of an adjacent protein loop play a crucial role in enzymatic catalysis of  $\alpha$  amylase. The method was also applied to structural modeling of color variants of microbial rhodopsins. For simulations of large scale conformational changes of proteins, we developed the linear response path following method based on a linear response theory. We applied the method to simulations of large scale conformational changes of calmodulin upon ion bindings, and successfully predicted the conformational changes with very short MD calculations.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
2011 年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
2012 年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

研究分野：生物物理学・理論科学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：タンパク質機能・酵素反応・QM/MM 法・分子動力学法

## 1. 研究開始当初の背景

タンパク質の分子機能発現は、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。しかしながら、分子シミュレーションの様々な限界により、これらの分子過程の相関の知見を得ることが困難であった。

まず、局所的な分子過程が重要となるものに、酵素機能における化学反応が考えられる。酵素反応のシミュレーションにおいては、量子化学計算 (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 計算の高い計算コストにより、熱揺らぎの効果は無視して、通常量子化学計算で行われているようなポテンシャルエネルギー曲面上での安定及び遷移状態構造の探索に制限されていた。

また、タンパク質機能発現においては、リガンド結合や酵素反応によって引き起こされるリガンド結合部位における局所的な構造変化が、タンパク質の大規模で大域的な構造変化と相関している。そのような空間的スケールの異なる構造変化の相関に関するシミュレーション解析は、タンパク質の大規模な大域的構造変化の時間スケールがシミュレーションのそれに比べて非常に長いため困難であった。

## 2. 研究の目的

本研究では局所的な酵素反応及び大域的なタンパク質構造変化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、分子モーターなどのタンパク質に適用することにより、それらの機能発現の分子機構を解明することを目的とする。

## 3. 研究の方法

化学反応によって引き起こされるタンパク質活性部位の構造緩和の記述には、熱揺らぎの効果を適切に取り込むことが重要である。その目的のために、新規な QM/MM 自由エネルギー (QM/MM-FE) 法を開発する。この方法では、MM 分子力場を用いた MD 計算による MM 領域の構造サンプリングを行い、その MM 分布によって定義される自由エネルギー曲面上で QM 領域の反応経路探索を行う。

また、タンパク質の大域的構造変化のシミュレーションに対しては、構造変化経路上で線形応答理論によって予測される大域的構造変化を促進するバイアス力を用いる linear response path following (LRPF) 法を開発する。

バイアス力は小規模な大域的構造変化を起こす程度の弱いものを用い、それを sequential に線形応答理論により更新していくことにより、一連の小規模な構造変化の繋がりとして全体として線形領域を超えた大きな大域的構造変化を記述する。

## 4. 研究成果

### (1) 新規な QM/MM-FE 法の開発

従来の QM/MM-FE 法の統計的収束性の困難を解決するために、reweighting に基づく MM 分布の更新と ESP 電荷演算子法を組み合わせた QM/MM RWFE-SCF 法を開発した。この手法では、MM 分布が完全であれば厳密な自由エネルギーを与える表式に基づき、与えられた MM 分布に対して consistent で一意な自由エネルギー最小構造を与えるため、より精度の良い高効率な反応経路解析が可能になる。また、ESP 電荷演算子法により、QM-MM 間の長距離クーロン相互作用の計算に Ewald 法を導入し、周期境界条件系に対して精度の良い記述が可能となった。また、これにより、QM/MM 計算と、MM 分布をサンプルする MD 計算が完全に分離され、MD 計算に高い計算効率を有する既存のプログラムパッケージを用いることが可能となるため、反応経路解析が大きく効率化され、非常に遅いタンパク質の構造変化を含む場合にも適用が可能となった。QM/MM 部分は、GAMESS プログラムパッケージに導入された。

### (2) $\alpha$ アミラーゼの酵素触媒活性におけるタンパク質構造変化の役割

新規に開発した QM/MM RWFE-SCF 法を、タンパク質の構造揺らぎが酵素活性に重要な役割を果たしていることが実験的に示唆されている  $\alpha$  アミラーゼの酵素反応解析に適用した。反応活性中心の基質及びタンパク質部分の 69 原子を QM 領域としている。QM 計算は DFT/B3LYP レベルで行い、基底関数は 6-31G\* を用いアニオン部分に diffuse 型軌道を加えている。基底関数数は 629 である。その周りのタンパク質は周期境界条件のシミュレーションボックス中に水和され、全系の原子数は 68,533 である。

$\alpha$  アミラーゼのグリコシド結合加水分解の前半段階の反応始状態、遷移状態、及び終状態の自由エネルギー構造最適化を行い、反応自由エネルギープロファイルを解析した。それらの構造最適化には、30 ns 程度の MD 計算を要しており、大きなタンパク質の構造変化が含まれている。図 1a に自由エネルギー最適化構造を示す。反応活性部位近傍のループ (L1 及び L2) 構造が、x 線結晶構造か

ら大きく変化していることがわかる。また、反応の遷移状態 (TS) において、L2 ループが反応活性部位に大きく接近していることを見出し、反応の遷移状態生成の際のタンパク質の大きな構造変化を原子レベルから捉えることに成功した。

このタンパク質の大きな構造変化の触媒活性への影響を明らかにするために、MD シミュレーションを用いた自由エネルギー計算により、反応活性化エネルギーを求めた。その際、L2 ループの構造変化を含まない短い MD 計算を比較のために行った (図 1b)。その結果、L2 ループの構造変化により、反応活性化エネルギーが大幅に減少することを見出した。すなわち、反応に伴うタンパク質の動きは、反応の遷移状態を大きく安定化することにより (図 1c)、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。

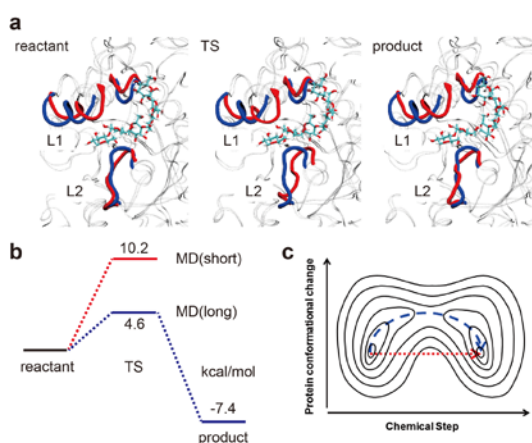


図 1: a  $\alpha$  アミラーゼのグリコシド結合加水分解の前半反応段階の自由エネルギー最適化構造 (赤) と x 線結晶構造 (青)。b 反応の自由エネルギープロファイル。長い MD 計算 (240 ns、青) と短い MD 計算 (4 ns、赤) によるプロファイルの比較。c 反応の自由エネルギー曲面の概念図。短い MD 計算の経路 (赤) と長い計算の経路 (青)。

### (3) LRPF 法の開発とカルモジュリンの構造変化への適用

タンパク質のリガンド結合に伴う大域的な構造変化を MD 法を用いてシミュレートする LRPF 法を開発した。上記の様に、この手法では、線形応答理論によって予測されるバイアス力を付加することにより、大規模な構造変化を引き起こす。この時、問題となるのが、分散-共分散行列を用いた線形応答バイアス力の安定性である。分散-共分散行列は、線形を超える揺らぎがあった場合に、その効果が不安定な形で取り込まれてしまう。そこで、分散-共分散行列の構築の際に、

window を用いて線形を超える揺らぎを与える長時間の相関を消去することにより、安定なバイアス力の計算が可能となった。また、適度に調節されたバイアス力を用いた構造変化フェーズと構造緩和フェーズを繰り返すことにより、安定な構造変化シミュレーションのプロトコルを確立した。

開発された手法は、カルモジュリンの N 末端ドメイン (CaMn) のカルシウムイオン結合に伴う大規模構造変化に適用された。CaMn の構造変化の始状態と終状態の構造は NMR 測定により決定されているが、ここでは、終状態の構造は結果の検証にしか用いず、始状態を出発構造として、線形応答理論の摂動力として結合するイオンに働く平均力を取り、構造変化を予測した。図 2 に構造変化のシミュレーションにおける終状態に対する RMSD を示す。7 回のバイアス力を用いた構造変化を経て、NMR 測定で得られている終状態の構造に到達することに成功した。この構造変化は、実験的に、最大サブミリ秒で起こることが知られており、ここで開発した手法は、非常に短時間の MD シミュレーションで構造変化の予測に成功している。構造変化は、まず、イオン結合の認識が起こり、最後のカルボン酸のイオン結合の認識と相関して、タンパク質の大規模構造変化が引き起こされることが明らかになった。

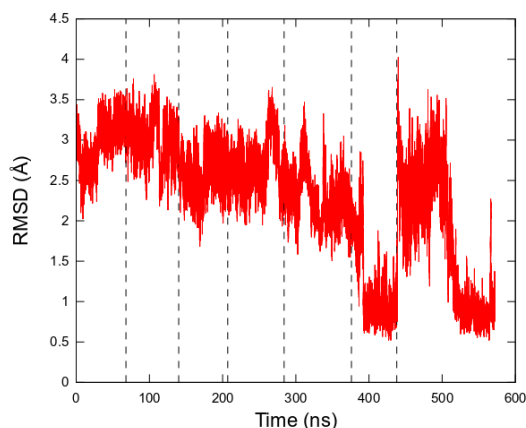


図 2: CaMn の LRPF 構造変化シミュレーションでの終状態に対する RMSD の時間変化。

### (4) 微生物型ロドプシンの色変異体の設計

QM/MM RWFE-SCF 法を用いて光駆動プロトンポンプ機能を有する微生物型ロドプシンであるバクテリオロドプシン (bR) の色変異体の設計を行った。名古屋大学の須藤らとの共同研究により、実験的に吸収波長の顕著な短波長シフトが見られる変異体に対し、短波長シフトを与える新規の構造モデルを自由エネルギー構造最適化により予測した。

図 3 に天然型及び色変異体の発色団であるレチナール分子の構造モデルを示す。天然型の場合、結合部位におけるタンパク質の立体障害により、 $\beta$  イオン環がポリエン鎖と同一平面上になっており、 $\pi$  共役が伸びているが、 $\beta$  イオン環周辺に変異を導入した色変異体では、 $\beta$  イオン環が回転し、 $\pi$  共役を縮めることにより、短波長シフトを引き起こすことを見出した。

また、光開閉カチオンチャネルであるチャネルロドプシンに対して、光吸収波長を制御する静電相互作用を解析した。

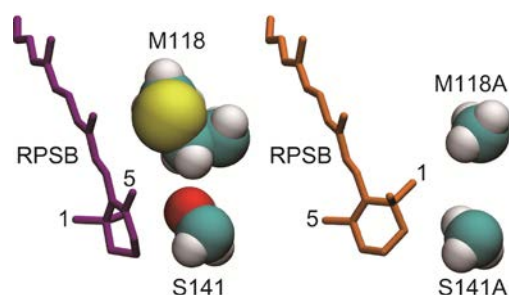


図 3: bR のレチナール発色団分子の構造。天然型 (左) と色変異体 (右)。

#### 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 9 件)

1. The reaction mechanism of Claisen rearrangement obtained by transition state spectroscopy and single direct-dynamics trajectory. Izumi Iwakura, Yu Kaneko, Shigehiko Hayashi, Atsushi Yabushita, and Takayoshi Kobayashi, *Molecules*, **18**, 1995-2004 (2013). 査読有り。
2. Structural and spectral characterizations of C1C2 channelrhodopsin and its mutants by molecular simulations. Motoshi Kamiya, Hideaki E. Kato, Ryuichiro Ishitani, Osamu Nureki, and Shigehiko Hayashi, *Chemical Physics Letters*, **556**, 266-271 (2013). 査読有り。
3. Molecular mechanism of ATP hydrolysis in  $F_1$ -ATPase revealed by molecular simulations and single molecule observations. Shigehiko Hayashi, Hiroshi Ueno, Abdul Rajjak Shaikh, Myco Umemura, Motoshi Kamiya, Yuko Ito, Mitsunori Ikeguchi,

Yoshihito Komoriya, Ryota Iino, and Hiroyuki Noji, *Journal of the American Chemical Society*, **134**, 8447-8454 (2012). 査読有り。

4. Crucial role of protein flexibility in formation of a stable reaction transition state in an  $\square$ -amylase catalysis. Takahiro Kosugi and Shigehiko Hayashi, *Journal of the American Chemical Society*, **134**, 7045-7055 (2012). 査読有り。
5. Crystal structure of the channelrhodopsin light-gated cation channel. Hideaki E. Kato, Feng Zhang, Ofer Yizhar, Charu Ramakrishnan, Tomohiro Nishizawa, Kunio Hirata, Jumpei Ito, Yusuke Aita, Tomoya Tsukazaki, Shigehiko Hayashi, Peter Hegemann, Andres D. Maturana, Ryuichiro Ishitani, Karl Deisseroth, and Osamu Nureki, *Nature*, **482**, 369-374 (2012). 査読有り。
6. QM/MM reweighting free energy SCF for geometry optimization on extensive free energy surface of enzymatic reaction. Takahiro Kosugi and Shigehiko Hayashi, *Journal of Chemical Theory and Computation*, **8**, 322-334 (2012). 査読有り。
7. A theoretical study on excited state double proton transfer reaction of a 7-azaindole dimer: an ab initio potential energy surface and its empirical valence bond model. Kohei Ando, Shigehiko Hayashi, and Shigeki Kato, *Physical Chemistry Chemical Physics*, **13**, 11118-11127 (2011). 査読有り。
8. Local entropy difference upon a substrate binding of a psychrophilic  $\square$ -amylase and a mesophilic homologue. Takahiro Kosugi and Shigehiko Hayashi, *Chemical Physics Letters*, **501**, 517-522 (2011). 査読有り。
9. Protein collective motions coupled to ligand migration in myoglobin. Yasutaka Nishihara, Shigeki Kato, and Shigehiko Hayashi, *Biophysical Journal*, **98**, 1649-1657 (2010). 査読有り。

[学会発表] (計 18 件)

1. 日本化学会第 93 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－複雑さと柔らかさ」(草津・滋賀) 2013 年 3 月 22 日～25 日 (発表日 22 日) 林 重彦 「分子シミュレーションから見た酵素の活性と柔らかさ」
2. Fifth Korea-Japan Seminars on Biomolecular Sciences: Experiments and Simulations (High1 resort, Korea) 2013 年 2 月 24 日～26 日 (発表日 26 日) Shigehiko Hayashi “Hybrid molecular simulations toward understanding enzymatic catalysis”
3. WIAS Top Runners’ Lecture Collection of Science 「物質化学におけるコンピュータ利用の最前線」(早稲田・東京) 2012 年 11 月 20 日 林 重彦 「ハイブリッド分子シミュレーションで探る酵素活性の分子機構」
4. Fifth International Symposium on Atomically Controlled Fabrication Technology (大阪) 2012 年 10 月 22 日～24 日 (発表日 24 日) Shigehiko Hayashi “Hybrid molecular simulations toward understanding enzymatic catalysis”
5. 第 4 回光操作研究会「動作原理の理解と行動制御への応用」(岡崎・愛知) 2012 年 9 月 27 日～28 日 (発表日 27 日) 林 重彦 「理論解析」の観点から」
6. 14<sup>th</sup> International Congress of Quantum Chemistry (Boulder, USA) 2012 年 6 月 25 日～30 日 (発表日 30 日) Shigehiko Hayashi “Hybrid molecular simulations toward understanding enzymatic catalysis”
7. 新学術領域研究「水を主役とした ATP エネルギー変換」第 4 回全体会議 (宮城・仙台) 2012 年 3 月 7 日～3 月 9 日 (発表日 8 日) 林 重彦 「ハイブリッド分子シミュレーションで探る酵素活性の分子機構」
8. The fifth Asian Pacific Conference of Theoretical and Computational Chemistry (Rotorua, New Zealand) 2011 年 12 月 9 日～13 日 (発表日 13 日) Shigehiko Hayashi “Chemical reaction dynamics in solution and enzymes: A tribute to the memory of Professor Shigeki Kato”
9. 大阪大学蛋白質研究所セミナー「蛋白質科学の未来を語る - 実験・理論研究者の対話 -」(大阪・豊中) 2011 年 11 月 21 日～22 日 (発表日 21 日) 林 重彦 「ハイブリッド分子シミュレーションで探る酵素活性の分子機構」
10. 分子研研究会「実験と理論による高次分子システムの機能発現の分子論的理解」(愛知・岡崎) 2011 年 11 月 1 日～2 日 (発表日 2 日) 林 重彦 「ハイブリッド分子シミュレーションで探る酵素反応の分子機構」
11. IMS Symposium on “Recent Developments of Spectroscopy and Spatial and Temporal Hierarchical Structures in Molecular Science” (愛知・岡崎) 2011 年 10 月 18 日 国内招待講演者 Shigehiko Hayashi “Hybrid molecular simulations toward understanding enzymatic catalysis”
12. 日本生物物理学会・シンポジウム “New approaches for probing biomolecular fluctuations” (兵庫・姫路) 2011 年 9 月 16 日～18 日 (発表日 17 日) Shigehiko Hayashi and Takahiro Koagi “Molecular mechanism of enzymatic reaction studied by the QM/MM reweighting free energy SCF method”
13. Fukui International Symposium for Theoretical Chemistry (京都) 2011 年 8 月 31 日～9 月 1 日 (発表日 9 月 1 日) 国内招待講演者 Shigehiko Hayashi “Hybrid molecular simulations toward understanding enzymatic catalysis”
14. Telluride Science Research Center Workshop on “Rise of the Machines: Integration of experiment, simulation and theory for a mechanistic understanding of biomolecular machines” (Telluride, Colorado) 2011 年 8 月 8 日～12 日 (発表日 9 日) Shigehiko Hayashi “Hybrid molecular simulations toward understanding enzymatic catalysis”
15. WATOC 2011 (Santiago de Compostela, Spain) 2011 年 7 月 17 日～22 日 (発表日 21 日) Shigehiko Hayashi “Molecular mechanisms of enzymatic catalysis in F<sub>1</sub>-ATPase and □-amylase”
16. 2011 Korea Japan Symposium on Molecular Science “New Visions for Spectroscopy & Computation: Temporal and Spatial Adventures of Molecular Science” (韓国・釜山) 2011 年 7 月 5 日～8 日 (発表日 6 日) Shigehiko

Hayashi “Hybrid molecular simulations toward understanding enzymatic catalysis”

(3)連携研究者

なし。

17. 文部科学省「革新的ハイパフォーマンス・コンピューティング・インフラ (HPCI) の構築」次世代スーパーコンピュータ戦略分野2「新物質・エネルギー創成」計算物質科学イニシアティブ (CMSI) 計算分子科学研究拠点 第1回研究会 (愛知・岡崎) 2011年2月4日～5日 (発表日5日) 林重彦 「生体機能の分子シミュレーション」
18. Pacifichem 2010 Symposium “Computational Quantum Chemistry: Theory and Interactions with Experiment” (Honolulu, USA) 2010年12月17日～19日 (発表日19日) Shigehiko Hayashi “Chemical reactions and molecular dynamics in functional processes of motor and photoreceptor proteins”

[図書] (計2件)

1. タンパク質の生物学的機能と化学反応. 林重彦, 岩波講座計算科学第4巻 計算と生命, 第3.3章, 98-112 (2012).
2. 酵素反応と生体分子機能の分子シミュレーション. 林重彦, CSJ カレントレヴュー・巨大分子系の計算化学, 08, 第17章, 166-171 (2012).

[その他]

ホームページ等

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

6. 研究組織

(1)研究代表者

林重彦 (HAYASHI SHIGEHICO)  
京都大学・大学院理学研究科・准教授  
研究者番号: 70402758

(2)研究分担者

なし。