

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：13901

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2010～2014

課題番号：22104009

研究課題名（和文）多自由度・大規模系における反応と構造空間探索

研究課題名（英文）Exploration of reactions and structural space in multi-degree-of-freedom and large-scale systems

研究代表者

倭 剛久（Yamato, Takahisa）

名古屋大学・理学（系）研究科（研究院）・准教授

研究者番号：90251587

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 44,700,000円

研究成果の概要（和文）：基準振動解析法を用いてリゾチームの圧縮率を計算し、分子進化に伴う圧縮率変化を調べた。また、緩和モード解析を用いてシニョリンの折りたたみ反応の反応座標を抽出した。分子動力学と時間分解X線結晶解析を用いて、ミオグロビンのリガンド移動機構を調べた。そして、COを分子内に配置する平均力ポテンシャルの3Dマップを得た。アミノ酸間の相互作用を解析する新たな手法を開発し、エネルギー交換ネットワークを用いて、アミノ酸間情報伝達を表現した。例として、単ドメインアロステリーを示すPDZ3ドメインの性質を解析した。フラグメント分子軌道法を用いて青色光受容体ファミリー蛋白質の活性部位形成機構を研究した。

研究成果の概要（英文）：Normal mode analysis was applied to lysozyme, calculated its compressibility and its change associated with the molecular evolution, while relaxation mode analysis was applied to chignolin and extracted reaction coordinates for folding/unfolding transitions. The ligand migration mechanism of myoglobin was studied by molecular dynamics simulation and time-resolved x-ray crystallography, and we obtained 3D maps of potential of mean force for placing carbon monoxide into the myoglobin molecule. A new method was proposed to analyze the residue-residue interactions, and the "crosstalk" among interacting residues was represented as a graph of energy exchange network. As an example, we analyzed the properties of a small globular domain, PDZ3, which is well known to exhibit single domain allostery. The active site formation mechanism of blue-light photoreceptor family proteins was investigated by in silico mutation and fragment molecular orbital calculations with electron correlations.

研究分野：生物物理学

キーワード：分子科学 計算物理 蛋白質 電子状態計算 分子シミュレーション

1. 研究開始当初の背景

生体内でタンパク質が機能するメカニズムの解明は、分子科学におけるもっとも重要な課題の一つである。生物は長い進化の過程で、優れた機能をナノスケールの分子構造に凝縮し、生命活動の営みに活用している。我が国の高度な計算機分子科学と物質構造実験学が協力し、分子レベルで生命現象にアプローチする意義は大きい。

我々は計算機分子科学、物質構造実験学の分野でそれぞれ実績を挙げている。タンパク質反応の特徴をとらえるには、まず、タンパク質の構造形成、熱揺らぎ、ダイナミクスを調べることが肝要になる。岡本らは拡張アンサンブルの手法を生体系に適用したパイオニアとして知られており、タンパク質の分子シミュレーションを効率的に実行する手法を開発した。レプリカ交換分子動力学法は多くの計算機プログラムに組み込まれ、世界中で広く用いられるようになった。複雑なエネルギー地形を持つタンパク質の折りたたみ反応や、構造空間の探索に有効なサンプリング手法を提供する。また、足立らは時間分解X線結晶解析法をもちいて、タンパク質の反応ダイナミクスを実験的に調べる手法を開拓している。高分解能でタンパク質の分子動画像をX線結晶解析により得るためのブレークスルーをもたらした。足立らの方法を活用することで、今後、タンパク質の反応過程を詳細に追跡できるようになるだろう。倭らはタンパク質のダイナミクスと反応を調べることで、機能発現のメカニズムを研究している。タンパク質分子の光反応ダイナミクスに関する報告がある。

これらの研究は各々の分野で高度に進化している。しかし、お互いに有機的に組み合わせることで、さらに有用な知見の発掘や有益な物質のデザインに活用できる可能性を秘めている。そこで、構造空間の探索、反応・ダイナミクス、および時間分解X線結晶解析、

の3つの研究を結集して生体内でタンパク質が機能するメカニズムを調べるという着想を得た。

2. 研究の目的

時間空間分解能の優れた実験手法と構造空間探索能の高い計算手法を併用して、多自由度・大規模系の構造形成・運動・および反応メカニズムにアプローチする。本課題では、典型的な多自由度・大規模系である生体高分子系に焦点をあて、分子シミュレーションと電子状態計算を活用して蛋白質の折りたたみ問題、複合体形成、および構造変化や機能発現機構を研究する。そして、時間分解X線結晶解析法による生体分子の動的情報とエネルギー計算を組み合わせ、分子科学的視点から生体分子が働くメカニズムを深く理解する。

まず、構造空間の効率的探索により、蛋白質の折りたたみ問題や構造変化による機能発現機構を研究する。構造空間の探索には拡張アンサンブル法を用いる。また、力場関数の精密化により折りたたみシミュレーションの信頼性を向上させる。膜蛋白質や蛋白質・リガンド複合体の構造形成機構に取り組み、並行して拡張アンサンブル法の開発も行う。

3. 研究の方法

時間分解X線結晶解析法による生体分子の動的情報とエネルギー計算を組み合わせ、分子科学的視点から生体分子が働くメカニズムを深く理解する。具体的には、筋肉組織中で酸素分子を貯蔵するタンパク質ミオグロビンの光解離反応を調べる。光解離実験では、分子内のヘムに結合したリガンドが光照射により解離してタンパク質内を移動し分子外部に放出されたり、もしくはヘムに再結合する。このリガンド移動の過程は生物物理学におけるもっとも伝統的な問題であるが、X線実験の分解能や電子計算機の能力の限界により、まだ未知の問題もある。本年度は、分子内の空洞間のボトルネック領域に焦点

をあてて、リガンドのタンパク質の相互作用自由エネルギーを計算機により求める。そして、タンパク質中の空洞の間を渡り歩くりガンドがどのようにタンパク質と相互作用しながら移動していくのかを実験・計算の両面から追及する。構造空間の効率的探索により、蛋白質の折りたたみ問題や構造変化による機能発現機構を研究する。

4. 研究成果

(1)我々はアナゴのロドプシンとその祖先型ロドプシンの立体構造をホモロジーモデリング法で予測し、長時間分子シミュレーションで統計アンサンブルを生成、さらに高精度の分子軌道法で吸収スペクトルを解析した。そして、吸収波長制御の分子機構をあきらかにした。アミノ酸変異の吸収波長に対する構造的な要因を同定するため、主成分分析法を拡張してもちいた。その結果、レチナールのボンド長交代と、カウンターイオン変位が重要な役割を果たしていることが見いだされた。

(2)酸素貯蔵タンパク質ミオグロビン中のガス分子移動機構を調べた。時間分解 X 線結晶解析とコンピューターシミュレーションを相補的に組み合わせた手法を開発した。そして、ガス分子をタンパク質分子内に配置するのに要する平均的なエネルギー(PMF)を求めることができた。さらに、3次元 PMFマップを解析し、ガス分子移動機構を明らかにした。

(3)タンパク質中の電子移動反応を調べた。分子内にフラビンを結合する青色光受容体タンパク質のファミリーは、紫外線損傷したDNAを修復する酵素を含んでいる。それらの酵素はDNA修復のため電子移動反応を活用する。その効率的な電子移動反応の機構を、分子動力学シミュレーションと電子状態計算を用いて調べた。その結果、電子移動反応にとって重要なアミノ酸残基を推定することができた。

(4)高分子のシミュレーションの分野で、統計力学に基づいた緩和モード解析という方法が開発されている。緩和モード解析は、高分子の分野で開発された揺らぎの動的解析手法であり、主成分解析の動的拡張になっている。この解析方法は、緩和の遅いモードとそれに対応する緩和率を求めることができる。我々は、この手法を蛋白質系に導入することを試みた。いくつかの改良を行い、蛋白質系への導入に成功した。いくつかの極小状態が知られている5残基からなるペプチドの系で、これまでの、主成分解析の結果と比較することにより、この方法の有効性を調べた(A. Mitsutake, H. Iijima, and H. Takano, J. Chem. Phys.135, 164102 (15 pages) (2011).)。主成分解析は揺らぎに大きく寄与するモードから順に抜き出すことができ、緩和モード解析は緩和の遅いモードを抜き出すことができる。この系において、揺らぎは大きい緩和の早いモードが存在していることや、緩和モード解析から得られた緩和モードはより構造間の転移を明確に記述できることが分かった。

(5)拡張アンサンブル法を有限クラスター系に適用し、転移現象の研究を行った。数分子が集合して存在するクラスターは、クラスターサイズにより融点が変わることが知られている。近年、水クラスターの研究で、数十分子からなるクラスターの融点が分子数により変化することが実験で得られている。これまで、生体高分子系で開発してきた拡張アンサンブル法は比熱などの計算を決定するのに適しており、ここでは、まず単純粒子の粒子数6から18に関する比熱のピークを計算し、それぞれのクラスターの転移について調べた。拡張アンサンブル法をこれらの系に適用でき、転移温度を計算することに成功した。そして、結果から、粒子数によって転移の仕方が違い、その理由について考察を行った。ま

た、スリット型細孔に閉じ込められた単純液体の子駅相転移についても調べた。近年、ナノスケール細孔に閉じ込められた分子の実験が可能になってきており、これらの制限された系での分子の振るまいを分子レベルで研究することが重要になっている。スリットサイズを変えて、単純液体の固液相転移温度を決定することができた。

(6)タンパク質分子の力学的特徴を古典力場関数に基づいて解析するため、原子ごとのコーシー・ストレステンソルの数学的定式化を行った。さらに、そのための計算機プログラムをコードした。一般的な古典力場関数は、2体、3体、及び4体相互作用を含む。これらを全て2体相互作用に展開し、ストレステンソル計算可能な数式で表現した。そして、アラニン3量体について計算を完了した。

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 20 件)

Computational study on the roles of amino acid residues in the active site formation mechanism of blue-light photoreceptors. R. Sato, H. Kitoh-Nishioka, K. Ando, *T. Yamato, *Chem. Phys. Lett.* (in press)

A solvation free-energy functional: A reference modified density functional formalism. T. Sumi, A. Mitsutake, Y. Maruyama, *J. Comput. Chem.* (in press)

生体系のシミュレーションのサンプリング手法及び解析方法の開発, *光武亜代理, 日本物理学会誌, **70**, 194, (2015).

Liquid-solid and solid-solid phase transition of monolayer water: High-density rhombic monolayer ice. *T. Kaneko, J. Bai, K. Yasuoka, A. Mitsutake, and *X.C.Zeng, *J. Chem. Phys.* **140** 184507(7 pages), (2014).

多次元焼き戻し法の開発及び緩和モード

解析と WHAM 法の一般化による構造解析法の開発, *光武亜代理, 分子シミュレーション研究会会誌 "アンサンブル", **16** 1-6 (2014).

Combinatorial approach of molecular dynamics simulation and database analyses for the studies of protein structure and function. T. Yamato, *K. Yura, *Seikagaku*, **85** 646-655, (2013).

New computational approach to determine liquid-solid phase equilibria of water confined to slit nanopores. T. Kaneko, J. Bai, K. *Yasuoka, A. Mitsutake, *X.C.Zeng, *J. Chem. Theo. Compt.* **9** 3299-3310 (2013).

Effective sampling algorithms and analysis method for biomolecular simulations. A. Mitsutake, AIP Conf. Proc. **1518**: 4th Int. Symp. Slow Dynamics in Complex Systems, eds. M. Tokuyama & I. Oppenheim, AIP, Melville, pp. 598-601, (2013).

Atomic stress tensor analysis of proteins. T. Ishikura, T. Hatano, *T. Yamato, *Chem. Phys. Lett.* **539**, 144-150 (2012).

Ligand migration in myoglobin: A combined study of computer simulation and X-ray crystallography. T. Tsuduki, A. Tomita, S. Koshihara, S. Adachi, *T. Yamato, *J. Chem. Phys.* **136** 165101 (9 pages) (2012).

Multibaric-multithermal ensemble study of liquid-solid phase transition in Lennard-Jones particles. *T. Kaneko, A. Mitsutake, K. Yasuoka, *J. Phys. Soc. Jpn.* **81** SA014 (2012).

Principal component relaxation mode analysis of an all-atom molecular dynamics simulation of human lysozyme. T. Nagai, A. Mitsutake, H. Takano, *J. Phys. Soc. Jpn.* **82** 023803 (4 pages), (2013).

Nonneutral evolution of volume fluctuation in lysozymes revealed by normal-mode analysis of compressibility, S. Mimura, T. Yamato, T.

Kamiyama, *K. Gekko, *Biophys. Chem.* **161** 39-45, (2012).

Relaxation mode analysis of a peptide system: comparison with principal component analysis.

*A. Mitsutake, H. Iijima, *H. Takano, *J. Chem. Phys.* **135** 164102 (15 pages) (2011).

Size dependent phase changes in water clusters, T. Kaneko, T. Akimoto, *K. Yasuoka, A. Mitsutake, *C.Z. Xiao, *J. Chem. Theo, Comput.* **7** 3083–3087, (2011).

Multicanonical molecular dynamics simulation study of the liquid-solid and solid-solid transitions in Lennard-Jones clusters. T. Kaneko, K. Yasuoka, A. Mitsutake, X.C. Zeng, *Proc. 8th ASME/JSME Thermal Engineering Joint Conference*, T30089, Hawaii, USA. March, (2011).

Molecular mechanism of long-range synergetic color tuning between multiple amino acid residues in conger rhodopsin, H.C. Watanabe, Y. Mori, T. Tada, S. Yokoyama, *T. Yamato, *Biophysics (Oxf.)* **6** 67-78 (2010).

Multi-dimensional multicanonical algorithm, simulated tempering replica-exchange method and all that. A. Mitsutake, Y. Mori, Y. Okamoto, *Physics Procedia* **4** 89-105 (2010).

Proteins at work –Computational biopolymer science of energy, electron, proton transfer and ligand migration–, *T. Yamato, *Kobunshi Ronbunshu* **67** 179-186 (2010).

“多変数拡張アンサンブル法”, *光武垂代理, *分子シミュレーション研究会誌「アンサンブル」*, **12** 29–35 (2010).

[学会発表] (計 18 件)

“Energy exchange network model of proteins”, T. Yamato, *Pacificchem* 2015, Dec. 15–20, Honolulu, Hawaii, USA.

T. Yamato, Telluride Research Science Workshop, Protein Dynamics, Aug. 3–7, 2015,

Telluride, CO, USA.

“中性子散乱と計算化学の融合”, 光武垂代理, 中川洋, 第 2 回生物構造学研究会, Tokyo, Jpn. Mar. 26, 2015.

“Exploring free energy surfaces with generalized ensemble algorithms”, A. Mitsutake, *Nose30 International Symposium* 2014, Nov. 10, 2014, Tokyo, Jpn.

“Effective sampling algorithms and analysis methods for protein simulations”, A. Mitsutake, *The 14th KIAS Conference on Protein Structure and Function*, Sep. 19, 2014, KIAS, Korea.

“分子シミュレーションを用いた蛋白質系の緩和モード解析”, 光武垂代理, 第 13 回ソフトウェア研究会, Aug. 19, 2014, Tokyo, Jpn.

“Energy flow and allosteric communication pathways in proteins: Computational study on the role of native inter-residue interactions”, T. Yamato, *Telluride Research Science Center Workshop, Thermal transport at the nanoscale*, June 25-29, 2013, Telluride CO, USA.

“Role of reorganizable interactions between native residue contacts in the allosteric communication in proteins: A computational study by the inter-residue energy conductivity analysis”, T. Yamato, Aug. 5–9, 2013, Telluride, CO, USA.

“Molecular mechanism of allosteric communication in proteins: Computational analysis of energy flow”, T. Yamato, *Large-scale molecular simulations in biology, chemistry, and physics*, *Satellite meeting of ICMS2013*, Nov. 6, Nagoya, Jpn.

“Reorganization of energy exchange network of amino acid residues and the protein allostery”, T. Yamato, *International Workshop on Computational Biomolecular Science*, Mar. 31–Apr. 1, 2014, Ontake, Jpn.

“多変数拡張アンサンブル法とその応用”,

光武亜代理, 計算統計物理学第4回研究会, Oct, 2013, Yamaguchi, Jpn.

“Effective sampling algorithms and analysis methods for protein simulations”, A. Mitsutake, 3rd International Conference on Molecular Simulation, Nov. 18–20, 2013, Kobe, Jpn.

“Ligand migration in myoglobin: A combined study of computer simulation and x-ray crystallography”, T. Yamato, T. Tsuduki, A. Tomita, S. Adachi, S. Koshihara, 4th France-Japan Joint Seminar, Imaging of spatiotemporal hierarchies in living cells – an overview of dynamics from molecules to cells –, Jan 6–11, 2013, Hyogo, Jpn.

“タンパク質中の電子、エネルギー、情報の流れ”, 倭 剛久, 生物物理化学研究会, Mar. 19, 2013, Nagoya, Jpn.

“蛋白質系の拡張アンサンブルシミュレーション”, 光武亜代理, 第24回 CAMM フォーラム本例会, June, 2011, Tokyo, Jpn.

“Development of effective sampling algorithm and analysis method for biomolecular simulations”, A. Mitsutake, 4th Japan-Korea Seminar on Biomolecular Sciences Experiments and Simulations, Jan. 9–11, 2012, Nara, Jpn.

“Exploring protein function using computational biophysics”, T. Yamato, 1st International Symposium, Center for Simulation Sciences, Feb. 16, Tokyo, Jpn.

“タンパク質の計算生物物理学：物質・エネルギー・情報の流れ”, 倭 剛久, 大阪大学蛋白質研究所セミナー「タンパク質科学の未来を語る：実験・理論研究者の対話」, Nov. 2011, Osaka, Jpn.

[図書] (計3件)

“第6章 活性部位の量子力学計算”, 倭 剛久, ゲノム系計算科学 (美宅・金田・笹井編) 共立出版, 東京, pp. 145–171 (総頁数235), (2013).

“Enhanced sampling algorithms”, A. Mitsutake, Y. Mori, Y. Okamoto, Biomolecular Simulations: Methods and Protocols, eds. L. Monticelli & E. Salonen, Hamana Press, New York, pp. 153-195, (2012)

“第6章 分子シミュレーション的な技法”, 倭 剛久, タンパク質機能解析のためのバイオインフォマティクス 藤博幸 編, 講談社, pp. 124–133, (2010).

[産業財産権]
出願状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

倭 剛久 (YAMATO, Takahisa)
名古屋大学・大学院理学研究科・准教授
研究者番号：90251587

(2) 研究分担者

光武 亜代理 (MITSUTAKE, Ayori)
慶應義塾大学・理工学部・講師
研究者番号：00338253

(3) 連携研究者

岡本 祐幸 (OKAMOTO, Yuko)
名古屋大学・大学院理学研究科・教授
研究者番号：70185487

足立 伸一 (ADACHI, Shinichi)
大学共同利用機関法人高エネルギー加速器研究機構・物質構造科学研究所・教授
研究者番号：60260220