

平成 30 年 5 月 25 日現在

機関番号：63903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K17813

研究課題名(和文) タンパク質の動的構造と機能発現ダイナミクスの分子論的解明

研究課題名(英文) Molecular study of the heterogeneous dynamics behind structure and function in proteins

研究代表者

森 俊文 (MORI, Toshifumi)

分子科学研究所・理論・計算分子科学研究領域・助教

研究者番号：20732043

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：タンパク質は天然状態においても構造揺らぎを示す。近年、このようなタンパク質の動的な構造が、構造形成や機能発現に重要であることが実験から明らかになってきたが、一方でその分子論的起源は明らかでない。本研究では、分子動力学シミュレーションデータの遅い運動モードに着目した新たな解析法を開発することで、タンパク質のフォールディング過程でどのような構造揺らぎが起き、それが不均一な構造ダイナミクスを経てタンパク質構造が形成されるかを解明した。また、シアノバクテリアの概日リズムの制御に関わる時計タンパク質KaiCで起こる遅いATP加水分解反応の分子論的起源を秋山教授(分子研)らとともに明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Conformational fluctuations and structural transitions of proteins have become a key to understand the structure and function of proteins. Yet, the molecular origin of these heterogeneous dynamics remains largely elusive. In this project, we have conducted theoretical studies to reveal how protein dynamics play a role in protein folding and function regulation. First, we developed a theoretical framework to extract slow modes from molecular dynamics trajectories and studied the conformational changes of proteins during folding and function regulation. In particular, we revealed how different folding/unfolding transition pathways and misfolded states lead to heterogeneous dynamics in protein folding. Secondly, we studied the circadian oscillation in clock protein KaiC of cyanobacteria. As a collaboration with experimental groups, we revealed the molecular mechanism behind the slow ATP hydrolysis, which plays a key role in regulating the circadian oscillation period.

研究分野：物理化学、理論化学、生物物理

キーワード：構造変化ダイナミクス 自由エネルギー 分子シミュレーション タンパク質 酵素反応 フォールディング 時計タンパク質KaiC

## 1. 研究開始当初の背景

近年の一分子蛍光共鳴エネルギー移動法や NMR (特に緩和分散法) などの実験により、時間・空間的に高い分解能でのタンパク質を始めとする生体分子の観察が可能となってきたことで、タンパク質は天然状態やフォールディング過程において、複数の状態を持っていたり、大きく構造が揺らぐなど、従来考えられていたよりもずっとダイナミックな構造を持っていることが明らかになってきた。さらに、このようなタンパク質の動的構造が、酵素活性を始めとする機能の制御に大きく関わっていることが明らかになりつつある。一方で、タンパク質に関するこれまでの理論的研究では、自由エネルギー面のように静的・平均的構造に基づいた解析が主であり、タンパク質の構造揺らぎや状態間遷移の遍歴がどのように起きているかなど、ダイナミクスに注目した研究はほとんど行われていなかった。

また、近年の計算機の発展に伴い、マイクロ秒～サブミリ秒に及ぶ超長時間の全原子分子動力学シミュレーションが可能になりつつある。これらのシミュレーションからは、タンパク質のフォールディングやイオンチャネルの開閉など、タンパク質の構造揺らぎや構造形成、機能発現についての分子レベルでの詳細な過程が見られるようになってきているが、系の自由度の大きさに加え、ダイナミクスに基づいた解析の視点および手法が不足しているため、これらの構造変化の過程の分子論的描像は得られていないのが現状であった。

## 2. 研究の目的

本研究では、生体分子の構造揺らぎや状態間遷移といった構造遍歴がどのように起こることで、タンパク質のフォールディングや機能発現へとつながるかを、ダイナミクスの解析に基づいて明らかにすることを目的とする。特に、トラジェクトリデータから効率的に遅い構造変化の過程を抽出する手法を開発するとともに、長時間の全原子分子動力学シミュレーションのデータを用いて、状態遷移の各々のイベントを詳しく調べることで、従来の静的・平均的描像からは得られない、個別の反応過程の分子レベルでの知見を得ることを目指す。このような動的情報に基づいた手法の開発は、長時間のトラジェクトリが容易に計算可能となるであろう近い将来に向けて、今のうちに整備しておくべき重要な課題であると考えられる。

また、構造揺らぎと機能発現に関する研究として、シアノバクテリアの概日周期の制御に重要な時計タンパク質である KaiC について、ATP 加水分解反応や、ATP/ADP 結合状態およびリン酸化状態の変化に伴うタンパク質の構造変化を調べる。これにより、KaiC タ

ンパク質中で起こる ATP 加水分解反応の分子機構と、それが制御する概日リズムの詳細なメカニズムに関する解析を行う。

## 3. 研究の方法

長時間分子動力学シミュレーションのトラジェクトリデータは、系の自由度が多いため、多くの自由度の中からどのように重要な座標を抽出するかが重要な課題である。本研究では、トラジェクトリの時間情報に基づき、遅い構造変化に関わる座標を抽出する新たな手法を開発する。その手法を、分子動力学シミュレーション専用計算機 Anton によって生成された数百マイクロ秒長のトラジェクトリデータの解析へと適用することで、タンパク質のフォールディング/アンフォールディング遷移がどのように起きているかを詳細に調べる。また、タンパク質の野生型と変異体の差、および温度の違いなどで、フォールディング過程がどのように変化するかを比較し、タンパク質の多様なダイナミクスが、どのように構造形成に寄与しているかを明らかにする。

また、実験グループとの共同研究によって、時計タンパク質 KaiC の ATP, ADP 状態がことなる複数の結晶構造をもとに、分子動力学シミュレーションを行い、どのような構造および構造揺らぎが異なる状態で表れるかを調べる。それをもとに、ミオシンを始めとする他のモータータンパク質と比べてずっと遅い KaiC での ATP 加水分解反応が、どう安定的に維持され、またそれが概日リズムの制御につながるかなどについて、解析を行う。

## 4. 研究成果

本研究では、まずタンパク質のフォールディング過程の動的過程を明らかにするために、トラジェクトリデータから時間相関関数行列を用いて遅い運動のモードを抽出する新たな解析法 (dynamic component analysis 法) を提案した。この手法を用い、Anton によって生成された FiP35 WW domain (FiP35) タンパク質の 100 $\mu$ s の全原子分子動力学シミュレーションのトラジェクトリの解析を行い、特にフォールディング/アンフォールディング遷移がイベント毎にどの程度異なった時間スケールで起こっているかの解析を行った。その結果、遷移にかかる時間は数十ナノ秒～数百ナノ秒と大きく異なっていること、その原因として、複数の遷移経路や、ミスフォールド状態が存在していることを明らかにした[1]。

次に、同じく Anton によって生成された、Villin headpiece subdomain (HP35) に関する複数の 400 $\mu$ s のトラジェクトリを用いて、このトラジェクトリの解析から、反応経路の詳細と、さらに変異や温度変化がフォールディン

グノアンフォールディングの遷移過程にどのような影響を与えるか調べた。この結果、HP35でもFiP35と同様に複数の遷移経路やミスフォールド状態が存在しており、遷移にかかる時間は数十ナノ秒～数マイクロ秒と多岐にわたっていること、さらに温度の違いは遷移の反応経路に大きな影響を与えないが、変異体では、野生型とは異なった反応経路を主要なものとして利用していることを見出した[2]。これは、複数の反応経路を持つことで、変異などの変化に対しても、安定的にフォールディングを起こせるような構造になっていることを示唆している。

これらの結果は、FiP35やHP35といった小さなタンパク質であっても、フォールディング経路は多様であり、単一の反応経路と遷移状態に基づいた静的・平均的描像では、この本質を捉えきれないことを強く示唆している。本研究の成果は、今後より高解像度・高時間分解能が進むと見られる一分子計測などの実験手法によって確かめられることが期待されるが、同時に、タンパク質の一分子での不均一なダイナミクスの分子論的起源の一端を明らかにしたのものとして、その意義は大きいものとする。

また、機能発現の分子機構に関する研究として、時計タンパク質 KaiC について、共同研究を行っている秋山教授(分子研)らの実験グループによって得られた N 末端部位の結晶構造をもとに、ATP 加水分解反応に関連した構造揺らぎの詳細を調べた。その結果、ATP 結合部位の近くに、特異的な *cis* 型のペプチド結合が見られ、これが加水分解反応に伴って *trans* 型に変化すること、さらに加水分解反応に必要な水分子が、反応の始状態において活性部位に到達しにくい構造になっていることなどを明らかにした[3]。これらの要因が組み合わさることで、他のモータータンパク質と比べて遅い ATP 加水分解反応が、KaiC では維持されていることが、本研究によって初めて分子レベルで示された。

#### <引用文献>

- [1] T. Mori, S. Saito, *J. Chem. Phys.* **142**, 135101 (7 pages) (2015)
- [2] T. Mori, S. Saito, *J. Phys. Chem. B* **120**, 11683-11691 (2016)
- [3] J. Abe et al., *Science* **349**, 319-322 (2015)

#### 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 8 件)

W. J. Glover, T. Mori, M. S. Schuurman, A. E. Boguslavskiy, O. Schalk, A. Stolow, T. J. Martinez, “Excited state non-adiabatic dynamics of the smallest polyene, trans

1,3-butadiene. II. Ab initio multiple spawning simulations”, *J. Chem. Phys.* **148**, 164303 (15 pages) (2018), DOI: 10.1063/1.5018130, 査読有

A. E. Boguslavskiy, O. Schalk, N. Gador, W. J. Glover, T. Mori, T. Schultz, M. S. Schuurman, T. J. Martinez, A. Stolow, “Excited state no-adiabatic dynamics of the smallest polyene, trans 1,3-butadiene. I. Time-resolved photoelectron-photoion coincidence spectroscopy”, *J. Chem. Phys.* **148**, 164302 (17 pages) (2018), DOI: 10.1063/1.5016452, 査読有

M. Kalathingal, T. Sumikama, T. Mori, S. Oiki, S. Saito, “Structure and dynamics of solvent molecules inside the polytheonamide B channel in different environments: a molecular dynamics study”, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **20**, 3334-3348 (2018), DOI: 10.1039/c7cp06299k, 査読有

P. Pongprayoon, T. Mori, “The critical role of dimer formation in monosaccharides binding to human serum albumin”, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **20**, 3249-3257 (2018), DOI: 10.1039/c7cp06324e, 査読有

S. Aono, T. Mori, S. Sakaki, “3D-RISM-MP2 Approach to Hydration Structure of Pt(II) and Pd(II) Complexes: Unusual H-Ahead Mode vs Usual O-Ahead One”, *J. Chem. Theor. Comput.* **13**, 1189-1206 (2016), DOI: 10.1021/acs.jctc.5b01137, 査読有

T. Mori, S. Saito, “Molecular Mechanism Behind the Fast Folding/Unfolding Transitions of Villin Headpiece Subdomain: Hierarchy and Heterogeneity”, *J. Phys. Chem. B* **120**, 11683-11691 (2016), DOI: 10.1021/acs.jpcc.6b08066, 査読有

J. Abe, T. B. Hiyama, A. Mukaiyama, S. Son, T. Mori, S. Saito, M. Osako, J. Wolanin, E. Yamashita, T. Kondo, S. Akiyama, “Atomic-scale origins of slowness in the cyanobacterial circadian clock”, *Science* **349**, 312-315 (2015), DOI: 10.1126/science.1261040, 査読有

T. Mori, S. Saito, “Dynamic heterogeneity in the folding/unfolding transitions of FiP35”, *J. Chem. Phys.* **142**, 135101 (7 pages) (2015), DOI: 10.1063/1.4916641, 査読有

[学会発表](計 15 件)

T. Mori, S. Saito, “Deciphering the heterogeneous dynamics of proteins from the analysis of millisecond-long molecular dynamics simulations”, 第 55 回日本生物物理学会年会, 2017 年 9 月 19-21 日, 熊本大学

T. Mori, S. Saito, “Crucial role of enzyme dynamics in the catalytic reaction

mechanism of Pin1”, 第 55 回日本生物物理学会年会, 2017 年 9 月 19-21 日, 熊本大学

森 俊文, “Transition path sampling 法による酵素反応の遷移ダイナミクス解析”, 「レイイベントの計算科学」研究会, 2017 年 8 月 28-30 日, 熱海

T. Mori, S. Saito, “Essential role of non-stochasticity in the *cis-trans* isomerization reaction of Pin1”, 19th International Union for Pure and Applied Biophysics Congress and 11th European Biophysics Congress, 2017 年 7 月 16-20 日, Edinburgh, UK

森 俊文, 斉藤 真司, “プロリン異性化酵素 Pin1 における酵素反応の反応ダイナミクス”, 第 20 回理論化学討論会, 2017 年 5 月 16-18 日, 京都大学

森 俊文, “タンパク質のフォールディング過程と酵素反応の反応ダイナミクス”, 第 2 回計算分子科学の若手理論研究会, 2017 年 3 月 3-4 日, 金沢工業大学

T. Mori, S. Saito, “Static and Dynamic Roles of Proteins in Proline Isomerization Reactions”, Biophysical Society 61st Annual Meeting, 2017 年 2 月 11-15 日, New Orleans, LA, USA

T. Mori, S. Saito, “Molecular origin of heterogeneity and hierarchy behind protein folding”, 第 54 回日本生物物理学会年会, 2016 年 11 月 25-27 日, つくば国際会議場  
T. Mori, “Molecular mechanism of transition dynamics in protein folding”, Molecular Machines of Life: Simulation Meets Experiment, 2016 年 5 月 23-27 日, Hong Kong, China

T. Mori, S. Saito, “Dynamic heterogeneity and the role of non-native contacts in the protein folding/unfolding transitions”, Biophysical Society 60th Annual Meeting, 2016 年 2 月 27 日-3 月 2 日, Los Angeles, CA, USA

T. Mori, S. Saito, “Theoretical study of the dynamic heterogeneity in protein conformational dynamics”, PACIFICHEM 2015, 2015 年 12 月 15-20 日, Honolulu, HI, USA

森 俊文, “光化学反応の多状態遷移ダイナミクスと時間分解光電子スペクトル”, 「非断熱量子動力学とその周辺」研究会, 2015 年 9 月 20 日, 東京大学

森 俊文, 斉藤 真司, “タンパク質のフォールディング過程の動的多様性の理論的研究”, 第 9 回分子科学討論会, 東京工業大学, 2015 年 9 月 16-19 日

T. Mori, S. Saito, “Theoretical study of the dynamic protein folding/unfolding transition mechanisms”, 第 53 回生物物理学会年会, 2015 年 9 月 13-15 日, 金沢大学

T. Mori, S. Saito, “Theoretical study of the

dynamic heterogeneity in the protein folding/unfolding transitions”, 10th European Biophysics Congress, 2015 年 7 月 18-22 日, Dresden, Germany

〔その他〕

邦文総説

森 俊文, 斉藤 真司, “超長時間シミュレーションで見るタンパク質のフォールディング過程”, *生物物理* **57**, 030-032 (2017), 査読有

森 俊文, “光化学反応の多状態遷移ダイナミクスと時間分解光電子スペクトル”, *アンサンブル* **18**, 240-243 (2017), 査読無

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

森 俊文 (MORI, Toshifumi)

分子科学研究所・理論・計算分子科学研究領域・助教

研究者番号: 20732043