

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18515

研究課題名(和文) MD-NSE法による新規タンパク質ダイナミクス解析法の開発

研究課題名(英文) Development of new analysis of protein dynamics as studied by MD-NSE

研究代表者

井上 倫太郎 (Inoue, Rintaro)

京都大学・原子炉実験所・准教授

研究者番号：80563840

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)：蛋白質のドメイン運動は蛋白質が有する固有の機能に深く関与していると知られていたが、精度良くその運動を探知し更に解析する手法が確立していなかった。そこで、申請者は中性子スピンエコー法(NSE)とMDシミュレーションを組み合わせたMD-NSE法により蛋白質のドメイン運動の記述を試みた。NSE測定から得られた拡散定数のQ依存性(D(Q))をMDシミュレーションのtrajectoryから計算されたD(Q)と比較すると回転拡散のみならず、ドメイン運動に由来する運動の組み合わせで記述できた。更に、ドメイン運動を詳細に解析すると主にドメインの開閉に対応した運動であることが分かった。

研究成果の概要(英文)：It is known that protein domain motion is highly relevant to its intrinsic function, however the experimental method and analysis has not been well-established. In order to overcome such a situation, we tried to establish the method that can describe protein domain motion properly through the combination of neutron spin echo (NSE) and MD simulation, "MD-NSE". By comparing the Q dependence of diffusion coefficient (D(Q)) derived from NSE to that calculated from the trajectory of MD simulation, experimentally observed D(Q) was described by the combination of rotational diffusion and domain motion, nicely. In addition, it was revealed that domain motion from MD simulation mainly corresponded to the opening and closing of two domains from careful analysis on MD simulation results. Finally, we succeeded to describe the protein domain dynamics by newly developed MD-NSE method.

研究分野：生物物理

キーワード：中性子散乱 蛋白質 ダイナミクス

### 1. 研究開始当初の背景

蛋白質は一次構造から二次構造、三次構造、四次構造と階層的な構造を持つことが知られており、そのそれぞれの階層間での構造が密接に相関していると考えられている。蛋白質の階層構造性は静的な構造のみならず動的な性質、即ちダイナミクスにもあてはまり、ピコ秒スケールのメチル基ダイナミクスから活性に関与するようなミリ秒スケールにまで非常に広い時間スケールにまで及んでいる。近年では、それぞれの蛋白質が有する固有の機能の機構解明には上述した静的構造のみならずその空間スケールに応じたダイナミクスを正確に捕らえ、更に記述するかが重要である。しかしながら、静的構造解析に比べるとダイナミクスを虎エスための実験的手法、更に得られた実験結果に対する解析手法も十分には確立しているとはいえない状況である。

### 2. 研究の目的

蛋白質のダイナミクスの中で特にナノ秒~数十ナノ秒程度の時定数を有するダイナミクスであるドメイン運動は **locking motion**、**lid motion** 或いは **cleft opening motion** などが含まれる。それらの運動は酵素反応における特定の原子団の移動や転移反応の高効率化に強く関わっていると考えられている。つまり、タンパク質の機能及び機能発現に深く関わっているわけである。しかしながら、このドメイン運動を蛋白質の安定性に影響を及ぼすと考えられるラベリング無しに直接観測する方法は長らく開発されておらず、計算機シミュレーションなどによる予測のみがなされていた。つまり、ナノ秒~数十ナノ秒の時定数のダイナミクスは生物学的に未開拓な領域である。そのような状況を打開する一つの実験手法として中性子スピンエコー (NSE) 法が候補として挙げられる。偏極した中性子のスピンの偏極度の崩れから微少なエネルギー変化 (**energy transfer**) を探知でき、ナノ秒からサブマイクロ秒スケールのダイナミクスを測定できるほぼ唯一の測定手法と言える。特に、ラベリング無しで測定できるので蛋白質のドメインダイナミクスを調べるのに非常に適した手法であり 10 年ほど前から蛋白質を含む生体高分子にも適用され始めた。しかしながら、NSE から出てきた非常に限られたデータ (拡散定数の  $Q$  依存性 ( $D(Q)$ )) から如何にしてドメイン運動を抽出するか、そしてその抽出されたドメイン運動をどのように解析し同定するかに関してはまだまだ発展途上であり確固とした解析手順が無く、様々な仮定を考慮した上で漸く解析出来ている状況である。我々は出来るだけ仮定の少なく、更に非調和性、溶媒の寄与をきちんと加味して、蛋白質のドメイン運動の記述を試みるために NSE 法と全原子 MD シミュレーション法を組み合わせた MD-NSE 法の開発を進めた。

### 3. 研究の方法

大腸菌由来の制限酵素である EcoO109I に

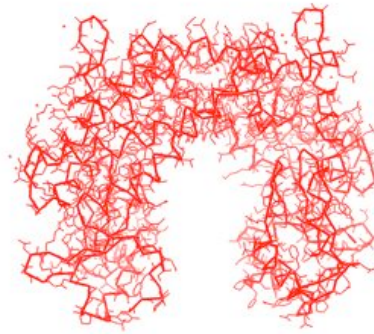


図 1 EcoO109I の結晶構造。

本申請で注目した (図 1 参照)。この蛋白質は外来の DNA の特定配列を認識し、二本鎖 DNA を切断するエンドヌクレアーゼである。EcoO109I は二つのドメインから形成されるホモダイマーを形成し、中央に位置する溝で DNA と結合するが報告されている。先行研究により結晶構造と溶液中の構造 (小角 X 線散乱により調べられた) が異なることが報告されており、その構造相違の起源がドメイン運動である可能性が示唆されたが、実測には至っていない。つまり、MD-NSE 法を適用するのに最適なサンプルと言える。

重水 buffer 中に 10 mg/ml の濃度に調整した EcoO109I を測定に用いた。NSE 測定には ILL の IN15 を使用した。更に、小角中性子散乱測定 (SANS)、動的散乱測定 (DLS) にはそれぞれ ILL の D22 及び ALV-5000 を用いた。全ての測定は 15 度で行ったが、この温度でも DNA を切断する即ち活性を有することは予備測定から確認済みである。全原子 MD シミュレーションは AMBER を用いて行い、190 ns までのトラジェクトリーを用いて解析に用いた。

### 4. 研究成果

#### (1) SANS 測定

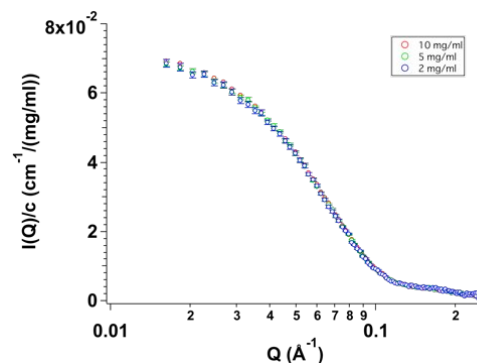


図 2 15 度における 2, 5, 10 mg/ml の濃度における SANS プロファイル。

通常の溶液散乱測定と比較して 10 mg/ml と比較的高濃度で測定を行ったが、その理由はNSE測定から十分な統計精度を得るためである。しかしながら、通常蛋白質濃度を上げると粒子間干渉や流体力学的相互作用など興味のある  $D(Q)$  に対して補正因子が増えるため詳細な構造解析を進める際の足かせとなる。図 2 に 2, 5, 10 mg/ml の濃度における Eco0109I から得られた SANS プロファイルを示すが、観測された  $Q$  範囲において濃度スケリングが成立し、更にサイズに対応する物理量である回転二乗半径 ( $R_g$ ) も濃度に依存せずに実験誤差範囲内で一定であった。この結果は 10 mg/ml の濃度においても粒子間干渉や流体力学的相互作用がほぼ無視できることを保証しており、NSE から評価できる  $D(Q)$  に対して補正を行わずに直接解析可能であることを担保している。

### (2) DLS 測定

SANS 測定と同じ 10 mg/ml, 15 度で DLS 測定を行った。CONTIN 解析を行うと単分散性を保持する一山のピークのみが観測された (図 3 (a)参照)。更に、角度を変化させて  $Q$  を変化させて緩和時間の逆数である  $\Gamma$  の  $Q^2$  依存性から並進拡散定数 ( $D_t$ ) を評価した。その結

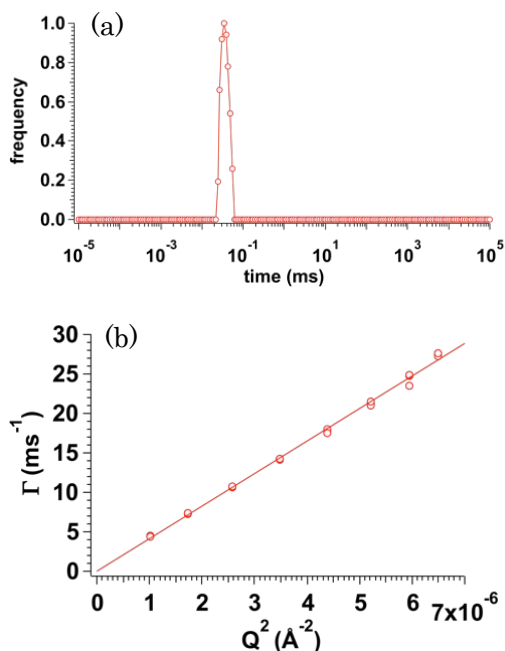


図 3 (a)  $2\theta = 90^\circ$  における緩和時間の頻度分布。(b)  $\Gamma$  の  $Q^2$  依存性。

果、10 mg/ml の濃度における 15 度の Eco0109I の  $D_t = 4.14 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$  と見積もられた。

### (3) NSE 測定

図 4 に  $Q = 0.042 \sim 0.23 \text{ \AA}^{-1}$  の  $Q$  範囲で得られた中間散乱関数 ( $I(Q, t) / I(Q, t=0)$ ) を示す。  $Q$  が大きくなるにつれてより短時間で中間散乱関数が decay する傾向が確認された。

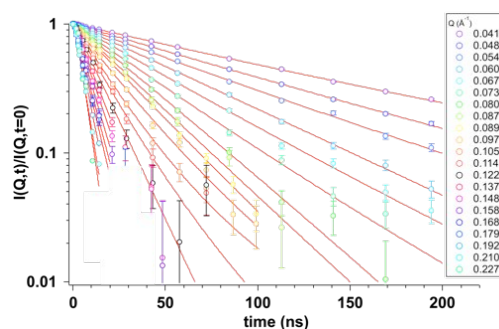


図 4 15°Cにおける中間散乱関数及びキュムラント解析による fit の結果。

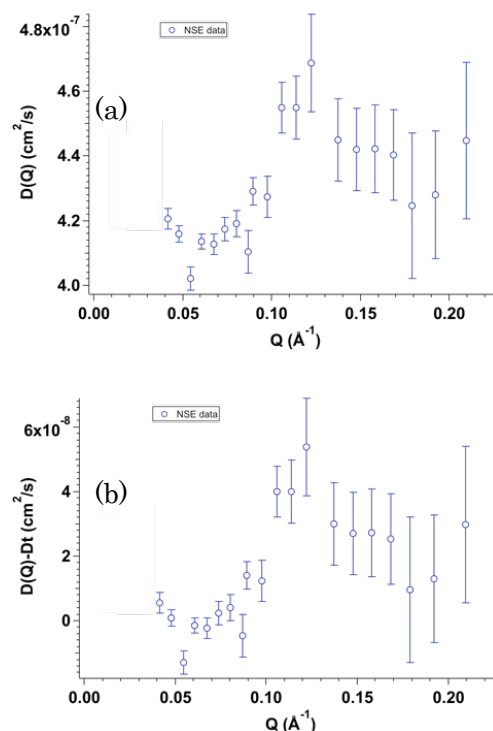


図 5 (a)  $D(Q)$  の  $Q$  依存性。(b)  $D(Q) - D_t$  の  $Q$  依存性。

この中間散乱関数に対して二次のモーメントまで考慮した式である ( $\exp(-Q^2 D(Q) t + 0.5 K_2 t^2)$ ) により fit を行い、  $D(Q)$  を評価した。全ての観測  $Q$  範囲でこの式によりうまく fit が出来たので  $D(Q)$  の  $Q$  依存性を図 5 に示す。 low  $Q$  領域においては  $D(Q)$  はほとんど  $Q$  依存性を示さなかったが、  $Q = 0.1 \text{ \AA}^{-1}$  以上では明確な  $Q$  依存性が見られた。興味深いことに low  $Q$  領域での  $D(Q)$  は DLS で測定した  $D_t$  の値と実験誤差範囲内でほぼ一致した。この結果は low  $Q$  領域におけるダイナミクスは並進拡散により支配されることを意味している。また、  $Q = 0.1 \text{ \AA}^{-1}$  以上では領域では並進拡散以外のダイナミクスが存在することを意味している。  $D_t$  は  $Q$  依存性を示さないことが知られているので図 5 の下図に  $D(Q)$  から  $D_t$  を差し引いた  $D(Q) - D_t$  の  $Q$  依存性をプロットし直したが、依然  $D(Q)$  の  $Q$  依存性

が確認された。この  $D(Q)-D_t$  の  $Q$  依存性を示す起源としては回転拡散と今回の研究で最も注目しているドメイン運動の二種類であると予想される。しかしながら、この段階においては本当に二種類の運動モードが観測されているのか？或いは両運動モードの寄与はどの程度かを実験データのみから見積もることは極めて困難であった。そこで、MD simulation から得られた結果と比較することでNSE測定から得られたデータの解釈を試みた。

#### (4) MD simulation との比較

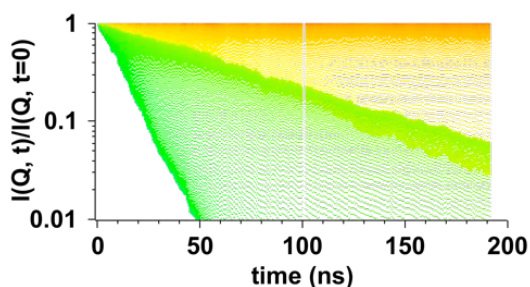


図 6 並進拡散の寄与を消した MD simulation の trajectory から計算された中間散乱関数。

MD simulation から得られた trajectory からNSE測定における観測量である中間散乱関数を数値的に計算した。ここで、特にEco0109Iの重心は動かないという拘束条件を課すことで並進拡散の寄与を取り除くことで図5の下図に対応する中間散乱関数を評価した。図6に  $Q=0.0005 \sim 0.30 \text{ \AA}^{-1}$  ( $0.001 \text{ \AA}^{-1}$  間隔) 範囲における trajectory から得た中間散乱関数の結果を示す。実測のデータ同様 High  $Q$  に行くにつれ中間散乱関数の decay が早くなる傾向が定性的に確認された。この

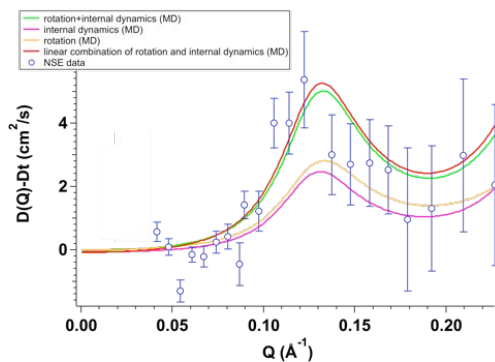


図 7 回転拡散及びドメイン運動 (緑色)、回転拡散 (黄色)、ドメイン運動 (桃色)、回転拡散とドメイン運動の足し合わせ (赤色) からの  $D(Q)$  の  $Q$  依存性。

MD simulation から計算された中間散乱関数を用いて  $D(Q)-D_t$  を評価し実測のデータとの比較を行った。(緑の実線参照) NSEの実測データ同様に low  $Q$  領域では  $Q$  依存性を示さなかったが  $Q=0.06 \text{ \AA}^{-1}$  で  $Q$  依存性を示しはじめ、 $Q=0.13 \text{ \AA}^{-1}$  付近でピークを示し、更に high  $Q$  では複雑な  $Q$  依存性が確認された。この並進拡散の寄与を除去して得られた trajectory を詳細に解析するとドメイン運動と回転運動のふたつのダイナミクスが含まれていることが明らかとなった。即ち、図5でNSEから実測された  $D(Q)-D_t$  は回転拡散とドメイン運動に由来すると言える。

次のステップとして回転、ドメイン運動の寄与がどの程度含まれているかを見積もるため図6の計算の元となった MD trajectory に対し、回転拡散の寄与のみからの MD trajectory 及びドメイン運動の寄与のみからなる MD trajectory を作成し、更に得られたそれぞれの trajectory から再度  $D(Q)$  を算出した。回転拡散、ドメイン運動由来の  $D(Q)$  をそれぞれ黄色、桃色の実線で示したが両運動モードが同程度含まれていることが見て取れる。更に各運動モードからの  $D(Q)$  を単純に足し合わせた  $D(Q)$  が赤の実線に対応するが、図6から得られる結果 (回転拡散とドメイン運動が混ざっている) と非常に良く一致した。このことは回転拡散及びドメイン運動を独立事象として扱っても近似的に成立することを示している。更に回転拡散、ドメイン運動の二つの運動が同程度の寄与であったことから実測のNSE測定でEco0109Iの内部運動であるドメイン運動を確実に捕らえていると言える。ドメイン運動のみの寄与からなる trajectory に注目すると主に二つのドメインの開閉に対応するような運動モードが観測された。上述したようにEco0109Iは外来のDNAを捕らえる機能を有しているので、このドメインの動きはDNAを捕らえて補足するというこの蛋白質の機能と深く関与していると示唆される。ドメイン運動の運動パターンの同定のために主成分解析の最終確認を行っている。

#### (5) Eco0109I の静的構造の温度依存性

Eco0109I は温度依存的に酵素活性が変化

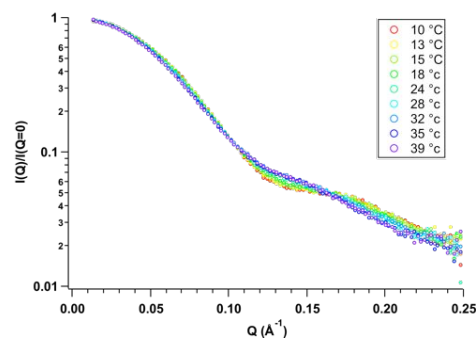


図 8 SANS プロファイルの温度変化。

することが予備測定により明らかとなっているが、この結果は温度変化に伴う構造変化も生じていると強く示唆される。そこで、10度から39度まで段階的に温度変化しながらSANS測定を行うと $R_g$ の増大のみならず、NSE測定でドメイン運動の寄与が最も強く観測された $Q=0.13 \text{ \AA}^{-1}$ 付近での明確な構造変化が確認された。このことは活性の温度上昇に伴う向上と強く相関していると考えられ、ドメイン運動がEco0109Iの機能を支配しているという考えを支持するものである。

#### (6) 展望

MD-NSE法により蛋白質のドメイン運動を捕らえることができる手法の開発に成功した。本手法を応用することにより数ns~サブマイクロ秒における蛋白質の内部運動の記述が可能になると考えられる。特に今回は10mg/mlと言うNSE測定においては比較的低濃度でシグナルを得ることが出来た点が過去の測定と比較するとアドバンテージになり、様々な複雑な構造を持つ生体高分子のダイナミクス記述に寄与すると強く期待できる。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 7件)

- ① D.Kato, A.Osakabe, Y.Arimura, Y.Mizukami, N.Horikoshi, K.Saikusa, S.Akashi, Y.Nishimura, S.-Y. Park, J.Nogami, K.Maehara, Y.Ohkawa, A.Matsumoto, H.Kono, R.Inoue, M.Sugiyama, and H.Kurumizaka, Crystal structure of the overlapping dinucleosome composed of hexasome and octasome", *Science*, 356, 2017, 205-20, 査読有、DOI: 10.1126/science.aak9867.
- ② M. Sugiyama, H. Yagi, K. Ishii, L. Porcar, A. Martel, K. Oyama, M. Noda, Y. Yunoki, R. Murakami, R. Inoue, N. Sato, Y. Oba, K. Terauchi, S. Uchiyama, and K. Kato, "Structural characterization of the circadian clock protein complex composed of KaiB and KaiC by inverse contrast-matching small-angle neutron scattering", *Scientific Reports*, 6, 2016, 35567-1-6, 査読有、DOI: 10.1038/srep35567.
- ③ E. Hibino, R. Inoue, M. Sugiyama, J. Kuwahara, K. Matsuzaki, and M. Hoshino, "Interaction between intrinsically disordered regions in transcription factors Sp1 and TAF4", *Protein Science*, 25, 2016, 2006-2017. 査読有、DOI: 10.1002/pro.3013.

④ R. Inoue, T. Takata, N. Fujii, K. Ishii, S. Uchiyama, N. Sato, Y. Oba, K. Wood, K. Kato, N. Fujii, and M. Sugiyama, New insight into the dynamical system of  $\alpha$ B-crystallin oligomers, *Scientific Reports*, 6, 2016, 29208-1-6. 査読有、DOI: 10.1038/srep29208.

⑤ E. Chatani\*, R. Inoue\*, H. Imamura, M. Sugiyama, Mi. Kato, M. Yamamoto, K. Nishida, and T. Kanaya, Early aggregation preceding the nucleation of insulin amyloid fibrils as monitored by small angle X-ray scattering, *Scientific Reports*, 5, 2015, 15485-1-8. 査読有、DOI: 10.1038/srep15485.

⑥ N. Sato, A. Matsumiya, Y. Higashino, S. Funaki, Y. Kitao, Y. Oba, R. Inoue, F. Arisaka, M. Sugiyama, and R. Urade, Molecular assembly of wheat gliadins into nanostructures: A small-angle X-ray scattering study of gliadins in distilled water over a wide concentration range, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63, 2015, 8715-8721. 査読有、DOI: 10.1021/acs.jafc.5b02902.

⑦ M. Sugiyama, N. Horikoshi, Y. Suzuki, H. Taguchi, T. Kujirai, R. Inoue, Y. Oba, N. Sato, A. Martel, L. Porcar, and H. Kurumizaka, Solution structure of variant H2A.Z.1 nucleosome investigated by small-angle X-ray and neutron scatterings, *Biochemistry and Biophysics Reports*, 4, 2015, 28-32. 査読有、DOI: 10.1016/j.bbrep.2015.08.019.

[学会発表] (計 2件)

- ① R. Inoue, Inter-/Intra-dynamics of protein as studied by small-angle neutron scattering, Neutron Biology for Next Generation, Tokai, 2017/3/22.
- ② R. Inoue, T. Takata, N. Fujii, K. Ishii, S. Uchiyama, N. Sato, Y. Oba, K. Wood, K. Kato, N. Fujii and M. Sugiyama, Dynamic quaternary structure of alpha-crystallin, The 7<sup>th</sup> Japan-Taiwan joint meeting on neutron and X-ray scattering, Kumatori, 2016/3/12.

[その他]

<http://www.rrri.kyoto-u.ac.jp/PSlab/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

井上倫太郎 (INOUE, Rintaro)  
京都大学原子炉実験所・准教授  
研究者番号： 80563840