

令和 2 年 6 月 9 日現在

機関番号：32612

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K19209

研究課題名(和文)分子クラウディング環境下における生体分子の機能的構造揺らぎの解析

研究課題名(英文)Visualization of protein dynamics in molecular crowding environment

研究代表者

苮口 友隆(Oroguchi, Tomotaka)

慶應義塾大学・理工学部(矢上)・講師

研究者番号：90589821

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：細胞内環境は生体分子が混み合った分子クラウディング環境であり、近年、そのような環境下における蛋白質の機能は、従来用いられてきたin vitroの希薄溶液環境下のそれから大きな変調を受けることが指摘されている。分子クラウディング環境下における機能変調メカニズムを明らかにするためには、そのような環境下における蛋白質の構造揺らぎを可視化する必要が有るが、それを可能とする測定手法は存在しない。そこで、本研究においては、分子クラウディング環境下においても目的分子の構造情報のみを得る先端計測手法と、分子動力学シミュレーションを組み合わせた手法の開発を主に理論面から進めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

研究代表者はこれまで、溶液X線散乱と分子動力学(MD)シミュレーションを組み合わせたMD-SAXS法を開発することにより、溶液環境下における蛋白質の構造揺らぎを可視化し、その揺らぎが蛋白質の機能を制御していることを明らかにしてきた。しかしながら、分子クラウディング環境下で目的の生体分子についてのみ構造揺らぎの情報を得る手法は未だ存在せず、したがって、蛋白質機能がその環境下で変調を受ける機構は明らかになっていない。本研究は、分子クラウディング環境下での構造揺らぎ観察に初めて挑戦するものであり、構造機能相関の研究をin vitroからin vivoへ発展させる基盤となり得る。

研究成果の概要(英文)：The recent studies have shown that protein functions are modulated in molecular crowding environment such as intracellular environment. However, since there are no methods that can visualize protein dynamics in molecular crowding environment, the mechanism of how the environment modulates protein functions is unclear. In our previous studies, we have developed the MD-SAXS method that combines molecular dynamics simulation and solution X-ray scattering experiment, and the method enables us to visualize protein dynamics in dilute solution of in vitro. In this study, we are developing the method that visualizes protein dynamics in molecular crowding environment based on the MD-SAXS method.

研究分野：生物物理

キーワード：分子クラウディング 蛋白質ダイナミクス 分子動力学シミュレーション 溶液中性子散乱 溶液X線散乱

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

## 1. 研究開始当初の背景

研究代表者はこれまで、溶液 X 線散乱(SAXS)や原子間力顕微鏡(AFM)といった構造解析実験と、分子動力学(MD)シミュレーションを組み合わせた手法(MD-SAXS 法)を開発してきた。これにより、in vitro の溶液中にて蛋白質構造は柔らかく揺らいであり、さらに、その揺らぎが機能と深く相関することを明らかにしてきた(Oroguchii *et al.*, *Biophys. J.* (2009), *J. Chem. Phys.* (2011), *Chem. Phys. Lett.* (2012), *Sci. Rep.* (2016))。このように in vitro での溶液構造の研究により、希薄溶液環境において蛋白質構造がどのようにその機能を発現させているかが明らかになりつつあるが、一方で、実際に生体分子が機能を発揮する細胞内環境は体積の 30 %が生体分子によって混み合った環境(分子クラウディング環境)であり、これまでの大半の蛋白質研究が用いてきた希薄溶液環境とは大いに異なる。

近年、細胞内環境を模倣した分子クラウディング溶液を用いた生物化学実験により、分子クラウディング環境下での蛋白質機能は希薄溶液環境のそれから大きく変調を受けることが明らかにされつつある。したがって、細胞内環境における蛋白質機能を理解するためには、分子クラウディング環境下で蛋白質機能が変調を受けるメカニズムを明らかにする必要がある。そのためには、その環境下における蛋白質の構造揺らぎを可視化することが必須である。しかしながら、多数種の生体分子が含まれた分子クラウディング環境下で、測定対象の蛋白質分子の構造を可視化できる手法は未だに実現されていない。そこで本研究では、分子クラウディング環境下において測定対象の蛋白質分子の構造揺らぎを可視化することを目標として、研究代表者がこれまで開発してきた MD-SAXS 法を発展させ、分子クラウディング環境下における蛋白質分子の構造情報を得られる先端計測手法と MD シミュレーションを組み合わせた手法の開発を行ってきた。

## 2. 研究の目的

本研究は、細胞内環境という生体分子が混み合った環境においても、蛋白質の構造揺らぎを測定・解析できる手法の開発を目的としている。研究代表者はこれまで、SAXS や AFM といった構造解析実験と、MD シミュレーションを組み合わせた MD-SAXS 法を開発してきた。これにより、溶液中にて蛋白質構造は柔らかく揺らいであり、さらに、その揺らぎが機能と深く相関することを明らかにしてきた。しかしながら、これらの研究で用いてきた測定手法では、分子クラウディング環境下における蛋白質の構造揺らぎを解析することができない。そこで、ラベルした目的生体分子の構造のみを選択的に計測する中性子溶液散乱法 (SANS) 及び、電子-電子二重共鳴計測(DEER)といった先端計測手法と、MD シミュレーションを組み合わせて、分子クラウディング環境下における蛋白質の構造揺らぎを可視化する手法の開発を目的とした。

## 3. 研究の方法

本研究においては、分子クラウディング環境下における実験情報を再現する蛋白質の構造アンサンブルを MD シミュレーションで得ることによって、蛋白質の構造揺らぎを可視化する。これは、例えば蛋白質の構造座標を  $\mathbf{X}$  と表すと、確率密度分布関数  $p(\mathbf{X})$  を得る事に相当する。したがって、測定対象となる物理量を  $Y(\mathbf{X})$  とおくと、測定結果  $Y^{\text{EXP}}$  は、

$$Y^{\text{EXP}} = \int Y(\mathbf{X})p(\mathbf{X})d\mathbf{X}$$

となる。MD-SAXS 法では、MD シミュレーションによって  $p^{\text{MD}}(\mathbf{X})$  を得ると、それをを用いてシ測定量の計算結果  $Y^{\text{MD}}$  は、

$$Y^{\text{MD}} = \int Y(\mathbf{X})p^{\text{MD}}(\mathbf{X})d\mathbf{X}$$

によって得られる。測定量  $Y_i$  が  $N$  個あったとすると、MD シミュレーションによる実験再現性は、次のパラメータ

$$\chi^2 [p^{\text{MD}}(\mathbf{X})] = \sum_i^N \left[ \frac{\int Y_i(\mathbf{X})p^{\text{MD}}(\mathbf{X})d\mathbf{X} - Y_i^{\text{EXP}}}{\sigma_i^2} \right]^2$$

によって定量的に評価することができる。MD-SAXS 法では、何もバイアスを掛けない通常の MD ランを複数行い、低い  $\chi^2$  が得られた MD ランの  $p^{\text{MD}}(\mathbf{X})$  を採用していた。しかしながら、分子クラウディング環境の系は極めて多数の原子から構成されるため、水分子までを厳密に扱う全原子 MD によって実験再現性が高い  $p^{\text{MD}}(\mathbf{X})$  を得るのは計算コストの面から困難である。したがって、本研究では、(1)実験情報を取り込んでシミュレーションを行う事を可能にする MD 手法の開発、(2) 計算コストを下げた粗視化 MD シミュレーションから測定量を計算する手法の

開発、の 2 項目を進めた。

#### 4 . 研究成果

本研究において成果が得られた、もしくは進行中の研究項目は主に 4 つある。以下にそれぞれについて説明する。

##### (1) 実験情報を取り込んだ MD 手法の定式化

本研究項目では、機械学習の一つであるベイズ統計を用いて、実験情報を MD シミュレーションに取り込む計算方法を定式化し、現在はその方法の実装と検証を進めている。ベイズ統計の枠組みを用いると、実験データ  $Y_i^{\text{EXP}}$  ( $i = 1 \sim N$ ) が得られた際、構造アンサンブルのモデル  $p^{\text{calc}}(\mathbf{X})$  の確からしさである尤度は、MD で得られるアンサンブル  $p^{\text{MD}}(\mathbf{X})$  及び  $\chi^2$  を用いて、

$$P\left[p^{\text{calc}}(\mathbf{X})|Y_i^{\text{EXP}}\right] \propto \exp\left(-\theta \int p^{\text{calc}}(\mathbf{X}) \ln \frac{p^{\text{calc}}(\mathbf{X})}{p^{\text{MD}}(\mathbf{X})} d\mathbf{X} - \chi^2[p^{\text{calc}}(\mathbf{X})]/2\right)$$

と表せる。パラメータ  $\theta$  は、実験情報をどれ程 MD に取り込むかを表すパラメータであり、0 から 1 までの値を取る。上式の尤度  $P$  を最大化する  $p^{\text{calc}}(\mathbf{X})$  を  $p^{\text{OPT}}(\mathbf{X})$  が、実験情報を取り入れた計算の構造アンサンブルとなる。詳細を省くが、 $p^{\text{OPT}}(\mathbf{X})$  は

$$p^{\text{OPT}}(\mathbf{X}) \propto p^{\text{MD}}(\mathbf{X}) \exp\left(-\sum_i \frac{Y_i(\mathbf{X}) \left[\int Y_i(\mathbf{X}) p^{\text{OPT}}(\mathbf{X}) d\mathbf{X} - Y_i^{\text{EXP}}\right]}{\theta \sigma_i^2}\right)$$

となる。上式は、指数関数の中をバイアスポテンシャルとして MD に取り入れると、実験情報をなるべく再現する構造アンサンブルが得られることを示している。ただし、バイアスポテンシャルとして導入すると蛋白質構造の立体配座を悪化させることが想定される。そこで、本研究では複数の MD ランを並行して流し、最適な MD ランを選択していくカスケード MD 法に上式を実装するため、バイアスポテンシャルの低下をモニタリングする評価関数によって MD ランを選択していく計算方法を開発した。現在は、開発した計算方法の検証を行うため、 $p^{\text{MD}}(\mathbf{X})$  を人工的に構築できる粗視化 MD に本計算方法を実装し、実験データを再現することが可能かどうかを調べている。

##### (2) 正しく蛋白質構造を取り扱える MD 力場の検証及び開発

研究項目(A)における手法において重要となる点は、そのために、正しく蛋白質構造を取り扱える MD 力場の検証及び開発を行った。

###### 実験の水和構造を再現する MD 力場の開発

MD-SAXS 法のもう一つの成果は、生体分子周りの水は一様な媒質として近似する従来の考え方では説明できない、分子表面の性質に依存した特異的な水和構造の形があることを明らかにしたことである(Oroguchii *et al.*, *Sci. Rep.* (2016))。このことは、生体分子間の相互作用は水和構造を介して行われることを示しており、したがって、その相互作用を理論的に厳密に取り扱えるようにするためには、実験データを再現できる厳密な水和構造を計算で得る必要がある。

本研究項目においては、水和構造の実験データとして低温 X 線結晶構造データベースから構築した実験水和構造を用いて、量子化学計算と MD 計算の併用によって得られる計算水和構造との比較を行った。これにより、理論計算において水和構造を正しく取り扱うためには、極性原子の非共有電子対を点電荷として導入した力場モデルが有効であることを明らかにした(Oroguchii *et al.*, *Sci. Rep.* (2017))。

###### 低温電子顕微鏡データを用いた MD 力場の信頼性評価

本研究項目においては、低温電子顕微鏡法(cryoEM)によって得られた溶液中の生体分子構造を参照として、MD 力場セットの信頼性評価を行った。cryoEM の構造情報は局所構造・全体構造の情報を共に含んでおり、MD シミュレーションにおける分子構造の評価に有用だと思われるが、低解像度・分子量の大きさ等の問題により、これまで用いられたことはなかった。本研究では、高解像度で得られた cryoEM データを用いた力場セットの評価を世界で初めて行った。その結果、AMBER ff15FB 力場が最も良く実験データを再現し、対して CHARMM 系の力場は

再現性が低いことが明らかになった(*J. Phys. Chem. B*にて論文査読中)。

### (3) 粗視化 MD シミュレーションから SAXS データを計算する手法の開発

研究項目(A, B)では、全原子 MD を用いることを想定して開発を進めてきたが、分子クラウド環境の系は極めて多数の原子から構成されるため、計算コストの面から、(A)における手法を用いても実験データを再現する構造アンサンブルを得ることは困難であることが予想される。そこで、粗視化 MD の一つである *cafemol* のトラジェクトリーデータから SAXS データ及び中性子散乱(SANS)データを計算できる手法を開発した(Ekimoto *et al.*, *Biophys. Physcobiol.* (2019))。開発した手法を複数の球状蛋白質に対して適用したところ、実験データを再現できることが確認された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 M. Oide, T. Kato, T. Oroguchi, M. Nakasako	4. 巻 -
2. 論文標題 Energy landscape of domain motion in glutamate dehydrogenase deduced from cryo-electron microscopy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The FEBS Journal	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/febs.15224	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 A. Fukuda, T. Oroguchi, M. Nakasako	4. 巻 1864
2. 論文標題 Dipole-dipole interactions between tryptophan side chains and hydration water molecules dominate the observed dynamic Stokes shift of lysozyme	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects	6. 最初と最後の頁 2019
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbagen.2019.07.015	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 T. Ekimoto, Y. Kokabu, T. Oroguchi, M. Ikeguchi	4. 巻 16
2. 論文標題 Combination of coarse-grained molecular dynamics simulations and small-angle X-ray scattering experiments	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biophysics and Physicobiology	6. 最初と最後の頁 377-390
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2142/biophysico.16.0_377	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 M. Oide, K. Okajima, H. Nakagami, T. Kato, Y. Sekiguchi, T. Oroguchi, T. Hikima, M. Yamamoto and M. Nakasako	4. 巻 293
2. 論文標題 Blue-light excited LOV1 and LOV2 domains cooperatively regulate the kinase activity of full-length phototropin2 from Arabidopsis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 963-972
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA117.000324	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mao Oide, Yuki Sekiguchi, Asahi Fukuda, Koji Okajima, Tomotaka Oroguchi, Masayoshi Nakasako	4. 巻 25
2. 論文標題 Classification of ab initio models of proteins restored from small-angle X-ray scattering	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Synchrotron Radiation	6. 最初と最後の頁 1379-1388
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1107/S1600577518010342	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 T. Oroguchi and M. Nakasako	4. 巻 7
2. 論文標題 Influences of lone-pair electrons on directionality of hydrogen bonds formed by hydrophilic amino acids side chains in molecular dynamics simulation	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 15859
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-017-16203-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 荳口友隆、中迫雅由
2. 発表標題 Domain motion of Fv-fragment in antibody immunoglobulin G controls conformation of antigen-recognizing loop through hydration structure
3. 学会等名 第57回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 荳口友隆、中迫雅由
2. 発表標題 Domain motion of Fv-fragment in anti-dansyl immunoglobulin G controls conformation of its flexible antigen-binding region
3. 学会等名 第56回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 T. Oroguchi
2. 発表標題 Protein Structural Fluctuations Investigated by X-ray Solution Scattering and Molecular Dynamics Simulation
3. 学会等名 第55回日本生物物理学会年会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 T. Oroguchi
2. 発表標題 Protein conformational fluctuations and hydration structures investigated by the combination of MD simulations and X-ray experiments
3. 学会等名 TSRC Protein Dynamics Workshop（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 笠口友隆、大出真央、岡島公司、中迫雅由、引間孝明、山本雅貴
2. 発表標題 MDシミュレーションと溶液X線小角散乱で探る蛋白質の構造揺らぎ
3. 学会等名 第17回日本蛋白質科学会（招待講演）
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

蛋白質の構造形成や機能に重要な水素結合形成を、正しく取り扱える力場モデルを開発  
<https://www.keio.ac.jp/ja/press-releases/2017/11/21/28-37390/>

## 6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	杉山 正明  (Sugiyama Masaaki)  (10253395)	京都大学・原子炉研究所・教授    (14301)	
連携研究者	井上 倫太郎  (Inoue Rintaro)  (80563840)	京都大学・原子炉研究所・准教授    (14301)	
連携研究者	中村 敏和  (Nakamura Toshikazu)  (50245370)	分子科学研究所・大学共同利用機関等の部局等・准教授    (63903)	
連携研究者	浅田 瑞枝  (Asada Mizue)  (30782643)	分子科学研究所・大学共同利用機関等の部局等・特任助教    (63903)	