

平成 23 年 5 月 31 日現在

研究種目：基盤研究（B）  
 研究期間：2007～2010  
 課題番号：19370062  
 研究課題名（和文） サブミリ秒領域で探る超異方的ダイナミクスとフラストレーションの  
 蛋白質機能への役割  
 研究課題名（英文） Roles of hyper-anisotropic dynamics and frustration on protein  
 function investigated in sub-msec order  
 研究代表者  
 北尾 彰朗（KITAO AKIO）  
 東京大学・分子細胞生物学研究所・准教授  
 研究者番号：30252422

研究成果の概要(和文)： 広い時空間で蛋白質分子機能の詳細な原理を解明するため、ナノからサブマイクロ秒領域のダイナミクスに注目し、分子シミュレーションを用いて機能と密接に結びつく蛋白質ダイナミクスを観察し、超異方性とフラストレーションという観点から研究を行った。超並列シミュレーションによって自由エネルギー地形を計算する手法や複雑な多次元ダイナミクスから有意に相関する自由度を抽出する手法を開発しこれを用いることで、蛋白質ダイナミクスの機能との相関を明らかにした。

研究成果の概要(英文)： To elucidate the detailed protein functional principle in broad time and space ranges, we focused on the dynamics of nano to sub-milli sec order, observed function relevant protein dynamics by molecular simulation, and studied the hyper anisotropy and frustration of the systems. We also have developed the methods to calculate free energy landscape from massive parallel simulations and to extract correlated motions in high dimensional dynamics and used them to investigate the relation between protein dynamics and function.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	5,200,000	1,560,000	6,760,000
2008 年度	3,300,000	990,000	4,290,000
2009 年度	2,900,000	870,000	3,770,000
2010 年度	2,600,000	780,000	3,380,000
総計	14,000,000	4,200,000	18,200,000

研究代表者の専門分野:生物物理学・情報生物学

科研費の分科・細目:生物科学・生物物理学

キーワード:①タンパク質②超異方性③動態④機能⑤フラストレーション

## 1. 研究開始当初の背景

ゲノム計画やタンパク 3000 などの網羅的プロジェクトが急速に進展していた研究開始当初、生命現象を維持・制御する主な担い手である様々な蛋白質分子の多様で精緻な機能のメカニズムの解明が益々重要性を増していた。蛋白質の分子メカニズムの解明は、生命現象の素過程の理解という基礎科学

として不可欠であり、また創薬や医療・食品などの直接的な利用に必須だけでなく、将来的には高度な自己構築メカニズムや高効率なエネルギー変換メカニズムを機能性ナノ分子の設計に応用することが期待されるなど、大きな発展の可能性を秘めた重要な課題であると考えられた。

蛋白質の分子機能の時間領域は、1 分子計

測等から観測される事象ではミリ秒～秒くらいである。しかし、分子機能の詳細なメカニズムを考えるとこのような描像は巨視的なもので微視的にはどうなのであるか。酵素反応を例にとると、機能が発揮されていく過程には、相互作用しあう分子同士が離合する際の律速となる拡散運動や緩和現象・分子認識とそれに伴う立体構造変化・電子状態が変化する化学反応の素過程等、空間的・時間的に様々な過程がある。分子機能全体を理解するためには秒からミリ秒オーダーで観測される事象の背後にあるそれぞれのステップを解明する必要があると考えた。

蛋白質などの高分子には様々な相互作用が絡み合っている。自由エネルギー最小の安定構造においてもエネルギー的に何らかのフラストレーションをもっており、これが多重エネルギー極小性の原因となっている。また、大きな立体構造変化が様々な蛋白質の機能と密接に結びついていることはよく知られている。蛋白質は数千から数万以上の自由度を持つが、我々はダイナミクスとエネルギー地形の解析から大多数が振幅の小さな振動的ゆらぎであり、他と比べ「超異方的」とも言える極少数の自由度が機能に結びつく大振幅な構造変化であることを明らかにした。超異方的自由度に対するエネルギー地形は多階層で多重の極小を持っており、フラストレーションが溜まっている。摂動を与えた場合のレスポンスは当然フラストレーションのある超異方的自由度を誘起すると予想されるので、我々はこのことが比較的微弱な外的要因で蛋白質機能を制御できる理由だとの着想に至った。

## 2. 研究の目的

広い時空間で蛋白質分子機能の詳細な原理を解明するため、これまで十分な知見が得られてこなかったナノからサブマイクロ秒領域のダイナミクスに注目し、分子シミュレーションを用いて機能と密接に結びつく蛋白質ダイナミクスを観察し、超異方性とフラストレーションという観点から具体的に下記のことを明らかにすることを研究目的とした。

(1)素過程観測：長時間分子シミュレーションによってサブマイクロ秒領域までの超異方的な蛋白質ダイナミクスの素過程を観測し、詳細な時系列解析からダイナミックなメカニズムを明らかにする。

(2)エネルギー地形解析：複数のサンプリング法による詳細な自由エネルギー解析によって蛋白質ダイナミクスを生み出すエネルギー地形を解明する。

(3)摂動の効果：ダイナミクスとエネルギー地形がシミュレーション上の設定・物理的環

境やアミノ酸変異などにどのように影響されるかを調べる。

(4)機能ダイナミクス相関：蛋白質のダイナミクスが分子機能発現の上でどのような役割を果たしているか、エネルギーフラストレーションの制御に注目して広い時間領域で明らかにする。

(5)新しい統合的描像：(1-4)の結果とこれまでの知見を総括して、サブマイクロ秒領域までの蛋白質ダイナミクスに関する統合的な物理描像を構築し、分子機能のメカニズムとの関係を明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1)素過程観測のためには長時間分子シミュレーションを行い、その解析を行う。

(2)エネルギー地形解析では、自由エネルギー解析を超並列計算で行う手法を開発し、蛋白質ダイナミクスを生み出すエネルギー地形を解明する。

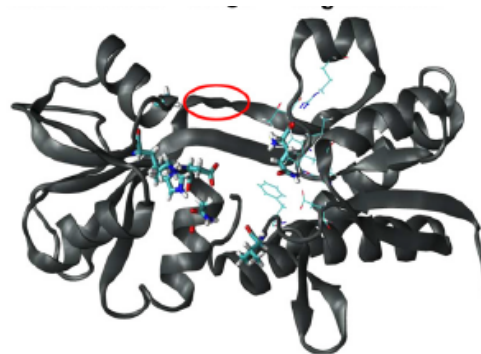
(3)摂動の効果では、アミノ酸変異などどのようにダイナミクスや自由エネルギー地形が影響されるかを調べる。

(4)機能ダイナミクス相関では、蛋白質のダイナミクスが分子機能発現の上でどのような役割を果たしているか、エネルギーフラストレーションの制御に注目して広い時間領域で明らかにする。

(5)新しい統合的描像では(1-4)の結果とこれまでの知見を総括する。

## 4. 研究成果

(1)素過程観測では、蛋白質GlnBP、FlhA cなどで超異方的な蛋白質ダイナミクスの素過程を観測し、詳細な時系列解析からダイナミックなメカニズムを解明することができた。蛋白質GlnBPの研究では、2つの独立のトラジェクトリにおいてグルガミンが結合した際の最初におこる2つのドメイン間にあるヒンジ部位の局所的な構造変化が更にそれに続くドメイン運動を誘引することを明らかにすることができた (Hannes & Kitao, 論文11)。



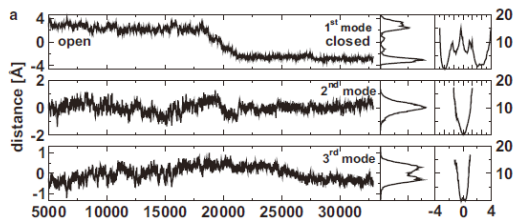


図 GlnBPの構造（前ページ）とリガンド結合によって誘引されるGlnBPのドメイン運動の時間経過（論文11）

また、FlhAcでは非常に大きなドメイン運動とこれに対するアミノ酸変異の効果を明らかにした（下記参照）。

(2)エネルギー地形解析では、自由エネルギー地形を計算する手法の開発を行い、これを用いて研究をおこなった。開発してきた超並列・分散型マルチスケールシミュレーションであるMSFEL法の開発が終わり、論文1報が報告済み(Harada & Kitao, 論文1)、1報が投稿中、3報が投稿準備中(すべてHarada & Kitao)となっている。この手法でははまず粗視化モデルで自由エネルギー地形を大雑把にサンプリングしてから、あらわに溶媒を含めた全原子シミュレーションで局所的な地形をサンプリングすることで高精度・高効率の計算をすることができる。MSFELにおいてシミュレーション時間の大半を占める全原子シミュレーションは、異なる構造空間を全く独立な多数のシミュレーションとして同時に実行できるので、次世代スパコンのような超系列計算機や分散した計算機を用いても効率よく計算できるアルゴリズムになっている。

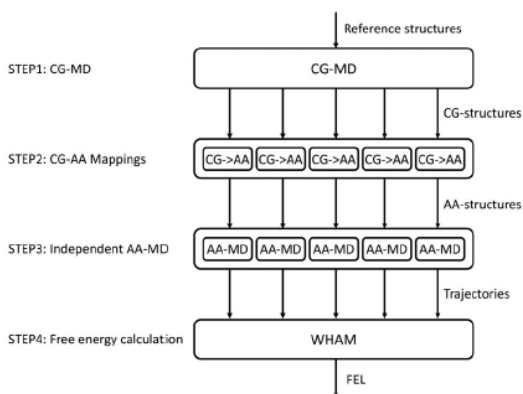


図 MSFELの計算手順を表したフローチャート(論文1)。

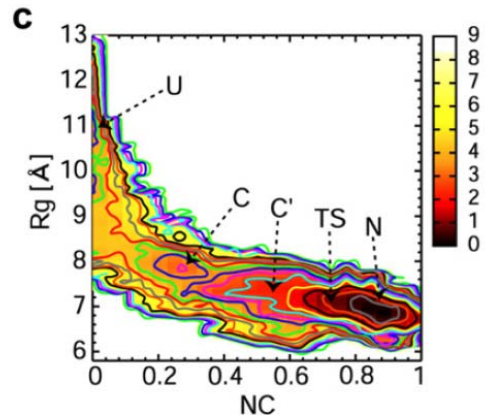
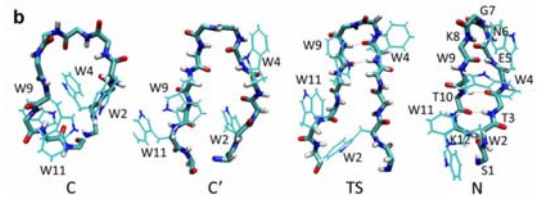


図 MSFELで計算したミニ蛋白質Tripzip2フォールディングの自由エネルギー地形といくつかの状態の代表構造(論文1)。

(3)摂動の効果では、FlhAc蛋白質の大規模ドメイン運動に関するアミノ酸変異の効果を明らかにすることができた(Saijo-Hamamoto, et al. 論文5)。また開発したMSFELを用いることでアミノ酸置換によるミニタンパク質の自由エネルギー地形の変化を明らかにし、フォールディング経路や安定構造の変化を詳細に解析することに成功した。

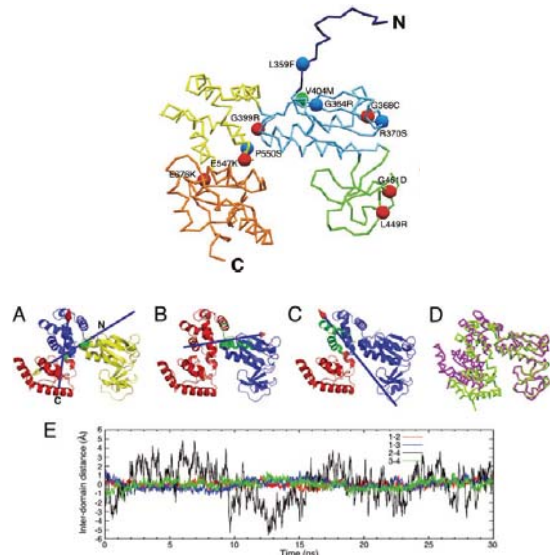


図 FlAcの変異部位（上）とドメイン運動とアミノ酸変異に大きく依存するドメイン運動の時間変化（論文5）

(4)機能ダイナミクス相関では、カップリングをよりシステムティックに解析するために、独立部分空間解析を用いて有意に相関を持つ集団座標を決定する手法を開発し、厳密な数学的な枠組みでダイナミクスのカップリングを解析できることを示した。従来法の主成分分析では、原子揺らぎの2次キュムラントに基づいてゆらぎの大きな集団座標を定義するが、微小な揺らぎが寄与する可能性があるカップリング解析には適さない。我々は白色化の利用と高次キュムラントへの着眼によって、ゆらぎの振幅に依存せずに集団座標上の運動相関を解析できることを示した(Sakuraba et al., 論文3)。この手法では、カップリングをよりシステムティックに解析するために、独立部分空間解析を用いて有意に相関を持つ集団座標を決定する手法を開発し、厳密な数学的な枠組みでダイナミクスのカップリングを解析できる。この論文はJCPのJournal CoverになりResearch highlightsにも選ばれるなど高く評価されている。

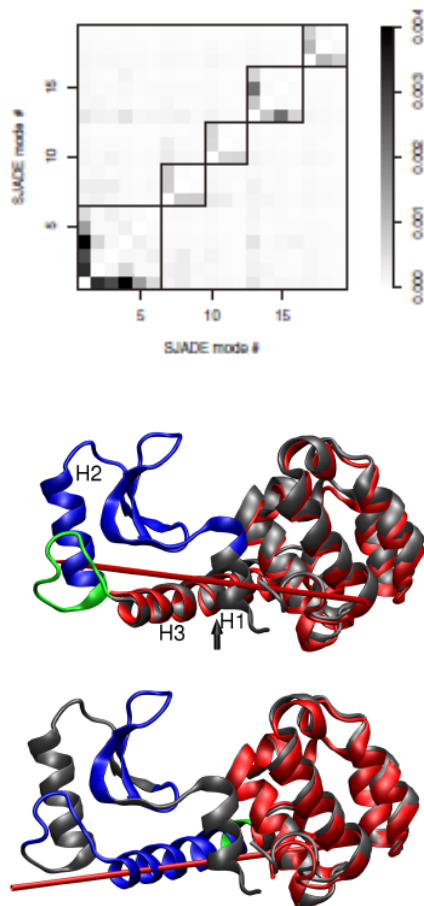


図 Independent Subspace Analysisで解析したモード間の相関の大きさと相関するタンパク質のダイナミクスが示すドメイン運動(論文3)。

(5) 上記の研究から得られた新しい統合的描像では、従来のInduced-fitやpre-existingモデルとは異なり、より複雑で相関したダイナミクスが蛋白質の機能を熱揺らぎの中で巧みに制御していることが明らかになった。本研究で開発してシミュレーション法や解析法が有用であることを実証することができた。

#### 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](18件)

1. Ryuhei Harada and Akio Kitao, "Multi-scale free energy landscape calculation method by combination of coarse-grained and all-atom models", *Chemical Physics Letters*, 503(1-3), 145-152(2011) 査読有
2. Mariko Higuchi, Jumpei Fujii, Yoshiteru Yonetani, Akio Kitao and Nobuhiro Go, "Enhanced resolution of molecular recognition to distinguish structurally similar molecules by different conformational responses of a protein upon ligand binding", *Journal of Structural Biology*, 173, 20-28(2011) 査読有
3. Shun Sakuraba, Yasumasa Joti and Akio Kitao, "Detecting coupled collective motions in protein by independent subspace analysis", *Journal of Chemical Physics*, 133(18), 185102(1-10) (2010) 査読有
4. Steven Hayward and Akio Kitao, "The Effect of End Constraints on Protein Loop Kinematics", *Biophys. J.*, 98(9), 1976-1985(2010) 査読有
5. Yumiko Saijo-Hamamoto, Katsumi Imada, Tohru Minamino, May Kihara, Masafumi Shimada, Akio Kitao and Keiichi Namba, "Structure of the cytoplasmic domain of FlhA and implication for flagellar type III protein export", *Mol. Microbiol.*, 76(1), 260-268 (2010) 査読有
6. Choon-Peng Chng and Akio Kitao, "Mechanical unfolding of bacterial flagellar filament protein by molecular dynamics simulation", *J. Mol. Graph. Model.*, 28, 548-554 (2010) 査読有
7. Hannes H. Loeffler and Akio Kitao, "Collective Dynamics of Periplasmic Glutamine Binding Protein upon Domain Closure", *Biophys. J.*, Vol.97, p.2541-2549 (2009) 査読有
8. Shun Sakuraba and Akio Kitao, "Multiple Markov transition matrix method: Obtaining the stationary probability distribution from multiple simulations", *J. Comp. Chem.*, 30, 1850-1858 (2009) 査読有

9. Wataru Nishima, Guoying Qi, Steven Hayward and Akio Kitao, "DTA: Dihedral transition analysis for characterization of the effects of large main-chain dihedral changes in proteins", *Bioinformatics*, 25(5), 628-635 (2009) 査読有
10. Lee-Wei Yang, Eran Eyal, Ivet Bahar and Akio Kitao, "Principal Component Analysis of Native Ensembles of Biomolecular Structures (PCA\_NEST): Insights into Functional Dynamics", *Bioinformatics*, 25(5), 606-614 (2009) 査読有
11. Hiroshi Nakagawa, Yasumasa Joti, Akio Kitao and Mikio Kataoka, "Hydration affects both harmonic and anharmonic nature of protein dynamics", *Biophys. J.*, 95, 2916-2923 (2008) 査読有
12. 北尾彰朗, 今田勝巳, 難波啓一, "【総説】細菌べん毛繊維は分子間相互作用とフラストレーションを利用して超らせん構造の変化を制御する", *生物物理*, 40(1), 11-17 (2008)
13. Yasumasa Joti, Hiroshi Nakagawa, Mikio Kataoka, and Akio Kitao, "Hydration effects on low-frequency protein dynamics observed in simulated neutron scattering spectra", *Biophys. J.*, 94, 4435-4443 (2008) 査読有
14. Choon-Peng Chng and Akio Kitao, "Thermal Unfolding Simulations of Bacterial Flagellin: Insight into its Refolding before Assembly", *Biophys. J.*, 94, 3858-3871 (2008) 査読有
15. Yasumasa Joti, Hiroshi Nakagawa, Mikio Kataoka, and Akio Kitao, "Hydration-Dependent Protein Dynamics Revealed by Molecular Dynamics Simulation of Crystalline Staphylococcal Nuclease", *J. Phys. Chem. B*, 112, 3522-3528 (2008) 査読有
16. Lars Meinhold, Jeremy C. Smith, Akio Kitao and Ahmed H. Zewail, "Picosecond fluctuating protein energy landscape mapped by pressure-temperature molecular dynamics simulation Lars Meinhold. S", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104(44), 17261-17265 (2007) 査読有
17. Kazuhiro Takemura and Akio Kitao, "Effects of Water Model and Simulation Box Size on Protein Diffusional Motions", *J. Phys. Chem. B*, 111, 11870-11872 (2007) 査読有
18. Atsushi Tokuhisa, Yasumasa Joti, Hiroshi Nakagawa, Akio Kitao, Kaoru Shibata, Mikio Kataoka, "Non-Gaussian behavior of elastic incoherent neutron scattering profiles of proteins studied by molecular dynamics simulation", *Phys. Rev. E*, 75, 41912 (2007) 査読有

[学会発表] (138 件)

[その他]

ホームページ

<http://www.iam.u-tokyo.ac.jp/MolDes/>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

北尾 彰朗(KITAO AKIO)  
東京大学・分子細胞生物学研究所・准教授  
研究者番号:30252422

### (2)研究分担者

なし

### (3)連携研究者

なし