

機関番号：14603

研究種目：基盤研究(B)一般

研究期間：2008～2010

課題番号：20370062

研究課題名（和文） 蛋白質機能を支えるダイナミクスの解明

研究課題名（英文） Elucidation of protein dynamics as the control of protein function

研究代表者

片岡 幹雄 (KATAOKA MIKIO)

奈良先端科学技術大学院大学・物質創成科学研究科・教授

研究者番号：30150254

研究成果の概要（和文）：生理的条件下では折りたたまれていないが酵素活性を有する変異体を作製し、野生型とともに、様々な水和率のもとで中性子非干渉性散乱による蛋白質動力学的測定を行った。その結果、生理的条件下での蛋白質の動力学は、主に水和水に支配されているが、動力学の階層性は構造状態に依存することが明らかになった。また、水和水間の水素結合ネットワーク形成が蛋白質の機能に必須な動力学を制御していることが示された。

研究成果の概要（英文）：We succeeded to create an functionally active mutant without native structure under physiological condition. Using the mutant and wild type, neutron incoherent scattering experiments were performed under various hydration levels to reveal the protein dynamics required for function. Protein dynamics relevant for function is controlled by hydration water, and the hierarchical structures of protein dynamics are dependent on the conformational states. The essential property of hydration water is revealed to be the formation of hydrogen bond network between hydration water molecules.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	6,400,000	1,920,000	8,320,000
2009年度	5,200,000	1,560,000	6,760,000
2010年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
年度			
年度			
総計	15,800,000	4,740,000	20,540,000

研究分野：生物物理

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：中性子散乱、蛋白質動力学、誘導折り畳み、水和、動力学転移

## 1. 研究開始当初の背景

蛋白質は、構造変化を巧みに利用して機能を発現している。また、分子機械である蛋白質は、主として体温かつ水溶液環境で作動するため、常に熱揺らぎにさらされている。したがって、蛋白質は機能発現に必要な微小な制御された動きとランダムな熱揺らぎを識別していることになる。一分子測定から、蛋

白質は熱揺らぎを積極的に利用しているという主張もなされるようになってきていた。立体構造に基づく機能発現の分子機構を解明するためには、蛋白質の揺らぎの観測や解析等、蛋白質のダイナミクス解析が本質的である。しかし、ダイナミクスの有効な実験的手段が限られており、組織的な研究はあまりなされていないのが現状であった。中性子非弾性散乱は、ダイナミクス解析のための有力

な手段である。特に、理論的に指摘されている機能と密接に結びついた低エネルギーの運動の解明のためには、最も有力な方法である。非弾性散乱による蛋白質ダイナミクスの研究は、中性子源である原子炉や加速器が整備されている欧米の牙城であり続けていた。日本では、申請者のグループが唯一、本格的な研究を展開し世界に伍している状況であった。申請者は、研究開始までに、理論計算結果の実験的検証、低エネルギー領域のボソニックの起源の解明、折り畳みによるスペクトルの変化等、本申請研究を展開するための基盤を作り上げていた。

機能に結び付いた動力学を解明するためには、機能を持つ状態と持たない状態の動力学を比較研究する必要がある。一般に、蛋白質は機能を発現するために固有の天然構造を必要とし、変性状態すなわち構造が壊れた状態では機能を持たない。したがって、天然構造と変性構造の動力学を比較することが重要になる。蛋白質の変性は、昇温、pHの変化、あるいは変性剤の添加等溶媒条件を変えることで実現される。中性子散乱は、水素原子の熱揺らぎを通して動力学を観測する。昇温では熱揺らぎの比較そのものができず、pH変化や変性剤では散乱体(H)そのものの数が変わるので、蛋白質動力学の変化を正しく評価することは困難である。我々は、この研究のために、優れた変異体を作製していた。すなわち、生理的条件下では構造を取らないが酵素活性を有するという黄色ブドウ球菌核酸分解酵素(SNase)の変異体である。これを用いることにより、溶媒条件を変えずに、天然構造と変性構造の動力学を明らかにすることができるかと期待された。また、この変異体は基質が存在するとき、天然構造に折り畳まれる。したがって、SNaseの変異体は、機能発現に伴う動力学の変化や、基質により誘導される折り畳み機構を研究する上でも好適であると期待されていた。

このように、測定方法、実験試料ともにオリジナルで、我々でなければできない研究環境が整っていた。

## 2. 研究の目的

本研究においては、我々の作製したSNase変異体を用いて、(a)水とダイナミクスの関係、および(b)構造形成とダイナミクスの関係を明らかにすることを目的とした。水和率を変化させたダイナミクスの測定から、機能を発現するために必要な水和状態を明らかにするとともに、水と水のダイナミクスと蛋白質のダイナミクスを分離して測定し、水溶液中での蛋白質固有の動的性質を明らかにする。生理的条件下で非天然構造にあるSNase変異

体と野生型の比較から、折り畳まれることにより獲得されるダイナミクスを明らかにする。研究目的を達成するために、中性子非弾性散乱の新しい測定技術、測定法、解析法の開発もあわせて行う。以上を通して、機能発現を支えるダイナミクスを折り畳み能に関連付けて明らかにするとともに、蛋白質固有のダイナミクスを解明し、ソフトマターに共通するダイナミクスと識別する。

## 3. 研究の方法

(1) 試料の調整。SNase野生型およびC端欠損変異体は、大腸菌に大量発現し、尿素法により精製した。精製した蛋白質は重水に溶かし、凍結乾燥を行った。重水への溶解、凍結乾燥を3回繰り返した。このようにして得た凍結乾燥試料の重水水和率を熱天秤により求めたところ、0.12 g D<sub>2</sub>O/g proteinであった。また、この試料をCaCl<sub>2</sub>, NaBr, KClの飽和重水溶液または塩を含まない重水で蒸気平衡にある雰囲気置き、室温で水和させた。熱天秤により評価した重水水和率は、それぞれ0.21, 0.30, 0.42, 0.62 g D<sub>2</sub>O/g proteinであった。このようにして得た水和率の異なる粉末試料を中性子散乱実験に供した。

(2) 中性子散乱実験。中性子散乱実験は、日本原子力研究開発機構東海研究所3号炉(JRR3)に設置されたHER、GP-TAS及びLTAS、ラウエランジュバン研究所(フランス)の中性子炉に設置されたIN10及びIN13の各分光器を用いて行った。高エネルギー加速器研究機構パルス中性子源(KENS)に設置されたLAM40で過去に計測したデータも援用した。IN10、IN13、HER、GP-TASのエネルギー分解能は、それぞれ1 μeV、10 μeV、100 μeV、1 meVである。実験は10Kから300Kまでの温度範囲で10度おきに行った。各温度での測定時間は分光器により30分から3時間であり、設定温度に到達後30分間平衡化した。

中性子散乱からは動的散乱因子 $S(q, \omega)$ を求められる。 $\omega=0$ の値は以下のガウス近似がなりたつ。

$$S(q, 0) = A \exp(-1/6 \langle u^2 \rangle q^2) \quad (1)$$

これにより、平均二乗変位 $\langle u^2 \rangle$ が、各温度で求められる。

(3) 水と水と蛋白質の動力学の分離。水と水の動力学と蛋白質の動力学を分離して測定するために、重水水和試料と軽水水和試料の両者を測定し、その差スペクトルを検出する方法を考案した。中性子非干渉性散乱の散乱長は、軽水素が80、重水素が2、炭素や酸素は0であるため、軽水素の寄与が圧倒的

ある。したがって、軽水水和試料の散乱関数と重水水和試料の散乱関数の差は、ほぼ水和水からの散乱関数とみなすことができる(図1)。散乱体の数が同一になるように試料調製し、また実験条件を完全にそろえるなど、注意深い実験が必要であるが、この方法により、水和水からの散乱と蛋白質の散乱を分離することができる。



図1. 軽水(青)水和水試料と重水(白)水和水試料の差は、水和水の情報を与える。白は散乱のないことを示す。

#### (4) MDシミュレーション

SNaseの結晶構造に対し、AMBER8を用いてMDシミュレーションを行った。結晶構造は1EY0を用いた。結晶格子に水和率0.11-0.56 g D<sub>2</sub>O/g proteinになるようにランダムに重水分子を配置させた。力場AMBER ff99と水モデルTIP3Pを用い、エネルギー極小化(2000 steps)、300K、1気圧への平衡化(2 ns)の後、4 nsのトラジェクトリを求めた。2.5 Å以内にある水分子が水素結合していると判断した。

## 4. 研究成果

(1) 変異体の溶液及び粉末構造評価。中性子実験では水和水粉末試料を用いるため、粉末試料の構造をCDにより評価した。その結果、野生型は天然構造を取る一方、変異体は溶液構造よりも壊れていないが、非天然構造を取ることが確認された。また、リガンドの有無による構造評価をΦ値解析を応用して行った結果、リガンドを結合した変異体は、リガンド結合部位の一部やヘリックス部分が大きく壊れていることがわかった。したがって、我々の作製した天然変性蛋白質モデル系は、非天然構造でリガンドを認識していることが確認できた。

(2) ボゾンピークの水和率依存性。図2に3つの異なる水和率の試料の3つの異なる温度での低エネルギー領域の非弾性散乱スペクトルを示す。100Kのスペクトルから水和によりボゾンピークが高エネルギー側にシフトしていることがわかる。これは、水和により蛋白質の弾性的性質は固くなることを示す。水和率が低くてもシフトが見られる。一方、300Kのスペクトルでは、高水和の試料の

み準弾性散乱が大きく観測され、乾燥試料や低水和試料ではボゾンピークが観測されている。室温では、水和により蛋白質が柔らかくなることを示すが、柔軟性をもたらす

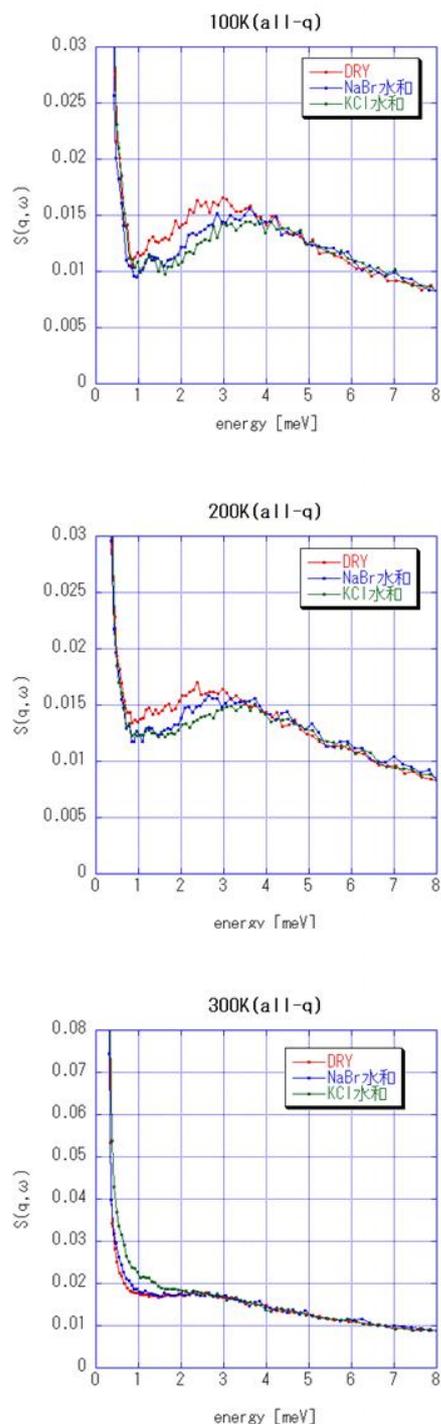


図2. 3つの異なる水和率の試料の非弾性散乱スペクトル(赤:乾燥試料(h=0.12)、青:低水和(h=0.29)、緑:高水和(h=0.44)。上から100K、200K、300Kの散乱スペクトル。水和率にはしきい値のあることを示唆する。

200Kのスペクトルは、100Kのスペクトルに近いが、低水和の試料のボソンピークの位置がわずかに低エネルギー側に来ている。これは、水和水が多くなるほど蛋白質をより固くすると考えられ、弾性的性質の変化にはしきい値がないことを示す。

また、図2を見ると高水和試料では、200Kと300Kの間で動力学転移が起きているが、乾燥試料並びに低水和試料では転移が起きていないことがわかる。動力学転移の水和率依存性をさらに詳細に調べた。

(3) 動力学転移の水和率依存性。様々な水和率試料に対し、(1)式に基づき平均二乗変位を各温度に対して求めた。その一例を図3に示す。乾燥試料、水和試料ともに、低温側では直線近似ができ、この傾きから平均の弾性定数が、乾燥試料 3.2 N/m、水和試料 3.6 N/mと求められ、水和により固くなることが裏付けられた。

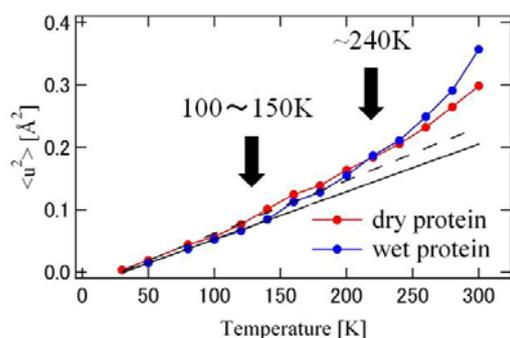


図3. 平均二乗変位の温度依存性。赤：乾燥試料 ( $h=0.12$ )、青：高水和試料 ( $h=0.44$ )。

脱水和、水和の両試料ともに130K近傍で、直線からのずれが見られ、ここに動力学転移のあることがわかる。この転移は水和に依存しない動力学性質の変化であり、メチル基の回転運動の活性化と考えられている。一方、水和試料でのみ240Kでさらにもう一つの動力学転移が起きていることが分かる。この動力学転移により、準弾性散乱が増加し、蛋白質が柔らかくなるのである。240K以上の平均二乗変位の増加率(直線の傾き)を様々な水和率に対して求めたものが図4の赤のプロットである。明らかに水和率が0.37以上でなければ動力学転移が引き起こされない。すなわち、動力学転移を起こすための水和率にしきい値があることが明確になった。

(4) 蛋白質動力学の構造状態依存性。平均二乗変位の温度依存性を、野生型と変異体について求めた。水和による強靱化は変異

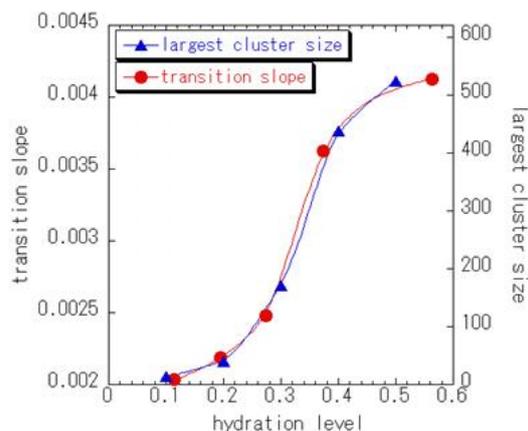


図4. 傾きの水和率依存性(赤)とMDシミュレーションにより得られた水和水の最大クラスターサイズ(青)。

体でも見られ、ポリペプチドの弾性的性質に共通する現象と考えられる。乾燥試料 ( $h=0.12$ ) では、150Kの転移以上での力場定数は野生型 0.48 N/m、変異体 0.34 N/mで、構造を取っている方が固い。しかし、水和するとどちらも240K転移が起きるが、240K以上の力場定数は、両者でほとんど変化がない。また、分解能の異なる分光器で動力学転移の様相を調べると、変異体では、エネルギーの高い運動も低い運動も一様に温度が上昇すればより活性化されるが、野生型では  $10 \mu\text{eV}$  と  $100 \mu\text{eV}$  とではほぼ等しく、活性化される運動に階層性のあることがわかった。これは構造形成により生じる構造の階層性に起因するものと考えられる。

(5) 動力学転移の水和率依存性の原因。図4に示された水和依存的動力学転移の活性化の原因を探るために、水和率を変えたSNase結晶のMDシミュレーションを行った。シミュレーションから得られた水和構造は、低水和の時は水和水が蛋白質表面にパッチ状にクラスターを作っているが、水和率0.37を超える水和率では、水和水が水素結合を通して蛋白質を取り囲むようになることが示された。図4に水和水クラスターの最大サイズの水和率依存性を青のプロットで示した。これは動力学転移の水和率依存性と一致している。さらに、これらの振る舞いは、 $20 \times 20$ のサイズの格子に対するパーコレーション転移モデルで合理的に説明できる(図5)。また、水和水のダイナミクスと蛋白質のダイナミクスを分離して測定し、パーコレーション転移以上の水和率の時、水和水の平均二乗変位は蛋白質の平均二乗変位よりも大きくなるが、転移以下では蛋白質の平均二乗変位と同程度であることが明らかになった。また、

パーコレーション転移以上の水和水の拡散定数は、パーコレーション転移以下の水和水の拡散定数より一桁大きくなっており、はるかに動きやすいが、バルクの水よりは二桁小さく、両者は明確に識別できることも明らかになった。すなわち、パーコレーション転移以下では、水素結合により蛋白質と強固に結合した水和水がほとんどであり、これらの水和水はアミノ酸の一部として同じように動く。しかし、パーコレーション転移以上では、蛋白質に強固に結合した水和水クラスター間を、蛋白質とは直接相互作用しない水分子が水素結合によりつなぎ合わせているという描像が描ける。水素結合ネットワークは、水素結合の組み替え、形成、消失を自由に繰り返すことにより、ネットワークを形成した水和水の方が動きやすく、また蛋白質の動力学を制御しているのであろうと考えている。以上の結果より、水和水のパーコレーション、すなわち水素結合を介した水和水のネットワーク形成が蛋白質の動力学転移を引き起こすために必須であると結論された。この議論をまとめた論文（主な発表論文の①）は、Award for JPSJ papers of editor's choice（編集委員の選ぶ注目すべき論文賞）に選ばれ、プレス発表された。

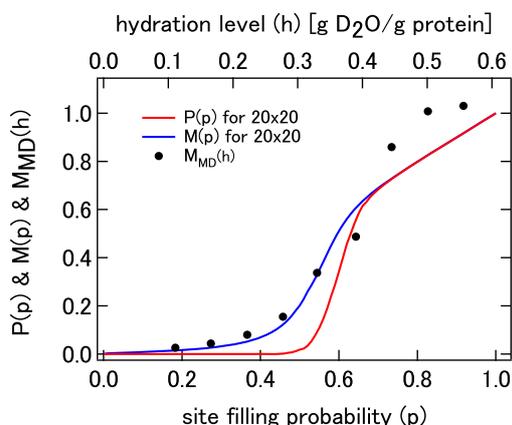


図 5. 20x20 正方格子のパーコレーション確率(赤)と占有格子サイズ(青)の格子占有率に対する変化。格子占有率は、水和率に対応し、水和水最大クラスターサイズ(●)は占有格子サイズに対応する。

(6) 今後の展開。蛋白質機能を支える動力学は、水和水の動力学により制御されていることが明らかになった。また、動力学の階層性は、構造形成により生まれることも示された。これらの結果は、蛋白質の環境適応の分子戦略の理解に大きく貢献すると期待される。また、高分子等ソフトマターの動力学と

機能の研究にも大いに貢献するものであり、実際高分子分野の産学の研究者から共同研究を提案されている。さらに、ネムリユスリカの幼虫のように乾燥耐性を有する生物の乾燥状態における生体分子の保護機構の理解に直結するであろう。これは食品保存や臓器保存等の応用面でも解決が求められる課題であるため、ネムリユスリカの幼虫に関する動力学の研究を開始しようとしているところである。

## 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 24 件)

- ① Hiroshi Nakagawa and Mikio Kataoka, Percolation of hydration water as a control of protein dynamics, *Journal of Physical Society of Japan*, 79 巻, 083801, 2010, 査読有
- ② Shingo Kato, Hironari Kamikubo, Satoshi Hirano, Yoichi Yamazaki and Mikio Kataoka. Non-local interaction responsible for the tertiary structural formation of Staphylococcal nuclease. *Biophysical Journal*, 98 巻, 678-786, 2010, 査読有
- ③ Hiroshi Nakagawa, Hironari Kamikubo and Mikio Kataoka, Effect of conformational states on protein dynamical transition, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1804 巻, 27-33, 2010, 査読有
- ④ Shigeo Yamaguchi, Hironari Kamikubo, Kazuo Kurihara, Ryota Kuroki, Nobuo Niimura, Nobutaka Shimizu, Yoichi Yamazaki and Mikio Kataoka, Low barrier hydrogen bond in photoactive yellow protein, *Proceedings of the National Academy of Science of USA*, 106 巻, 440-444, 2009, 査読有
- ⑤ Hiroshi Nakagawa, Yasumasa Joti, Akio Kitao and Mikio Kataoka, Hydration affects both harmonic and anharmonic nature of protein dynamics, *Biophysical Journal*, 95 巻, 2916-2923, 2008, 査読有
- ⑥ Yasumasa Joti, Hiroshi Nakagawa, Mikio Kataoka and Akio Kitao, Hydration effects on low-frequency protein dynamics observed in simulated neutron scattering spectra, *Biophysical Journal*, 94 巻, 4435-4443, 2008, 査読有

[学会発表] (計 88 件)

- ① Mikio Kataoka, Effect of hydration water on protein dynamics, The 4th Shanghai International Conference on Biophysics and Molecular Biology, 2010.8.10, Shanghai-Jiashan, China, 招待講演
- ② Mikio Kataoka, Effect of hydration on protein dynamics, Leopoldina-Symposium on the

Complexity Connecting Biomolecular Structure and Solvation Dynamics, 2010.5.26, Bochum, Germany, 招待講演

③ Mikio Kataoka, Mechanism of Induced Folding of Staphylococcal Nuclease: Implication to Natively Unfolding Protein, The 6th Asian Biophysics Association (ABA) Symposium, 2009.1.12, Hong Kong, China, 招待講演

④ Mikio Kataoka, Effect of hydration on the glass-like transition of protein, JSPS Japan-France Bilateral Joint Seminar 2008 "Frontiers of Glassy Physics", 2008.11.19, 京都, 招待講演

⑤ Mikio Kataoka, Protein Dynamics and Structure Studied by Neutron Scattering, Asia Science Seminar on "Frontier Science at High-Intensity Proton Accelerators" 2008.10.21, Beijing, China, 基調講演

⑥ Mikio Kataoka, Effect of hydration and conformational state on protein dynamics, Workshop on Biomolecular Dynamics and Protein-Water Interactions, 2008.9.25, Munich, Germany, 招待講演

[図書] (計 6 件)

① Mikio Kataoka and Hiroshi Nakagawa, Protein dynamics studied by neutron incoherent scattering, in "Neutrons in Soft Matter" (eds. by T. Imae, T. Kanaya, M. Furusaka and N. Torikai), John Wiley, 2011 年, pp. 517-538

② Mikio Kataoka and Hiroshi Nakagawa, Effect of hydration on protein dynamics in "Water, The Forgotten Biological Molecule" (eds. by Denis Le Bihan and Hidenao Fukuyama), Pan Stanford Publishing (Singapore), 2011 年, pp. 49-62

③ 片岡幹雄, 鍵と鍵穴か、誘導適合か — 天然変性蛋白質における認識・結合分子機構の検討, in 揺らぎと生体機能 (MedicalBio 10 月別冊, 寺嶋正秀監修), オーム社, 2010 年, pp. 27-31

④ M. Kataoka and H. Kamikubo, Structure of the photointermediate of photoactive yellow protein and the propagation mechanism of structural change, in "Water and Biomolecules" (eds. by K. Kuwajima, Y. Goto, F. Hirata, M. Kataoka and M. Terazima), Springer-Verlag (Berlin), 2009 年, pp. 137-148

⑤ 片岡幹雄, イエロープロテインと関連蛋白質, in 「光科学研究の最前線 2」編集委員会編, 強光子場科学研究懇談会, 光科学研究の最前線 2, 2009 年, p. 208

(1) 研究代表者

片岡 幹雄 (KATAOKA MIKIO)  
奈良先端科学技術大学院大学・物質創成科学研究科・教授  
研究者番号: 30150254

(2) 研究分担者

上久保 裕生 (KAMIBKUBO HIRONARI)  
奈良先端科学技術大学院大学・物質創成科学研究科・准教授  
研究者番号: 20311128

山崎 洋一 (YAMAZAKI YOICHI)  
奈良先端科学技術大学院大学・物質創成科学研究科・助教  
研究者番号: 40332770

(3) 連携研究者

中川 洋 (NAKAGAWA HIROSHI)  
日本原子力研究開発機構・量子ビーム応用研究部門・研究員  
研究者番号: 20379598