

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 5 月 15 日現在

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22629

研究課題名(和文) マルチドメイン蛋白質CCSの緻密に設計されたドメイン運動とその物理的起源の研究

研究課題名(英文) The elaborately designed domain motion of the multidomain protein CCS and its physical origin

研究代表者

清水 将裕 (Shimizu, Masahiro)

京都大学・複合原子力科学研究所・研究員

研究者番号：00879869

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：細胞内で酵素への銅イオン輸送を担うタンパク質CCSの分子運動と機能の関係を、理論計算及びX線小角散乱測定(試料にX線を照射しその散乱を計測する手法)の複合的アプローチによって研究した。CCSは複数の構造ドメインから成るが、銅イオン結合ドメインが銅イオンを獲得・保持するためには、銅イオンを結合しないドメインを含むドメイン間相互作用が重要であるとの結果を得た。本結果を得るために、理論計算・小角散乱データを統合する解析技術確立にも取り組んだ。報告者は理論計算によるマイクロ秒以上の分子運動がX線小角散乱測定に整合した場合に、それを現実の分子運動に近似するアイデアを考案し、その実現可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で提案した溶液散乱測定と理論計算による分子運動解析のアイデアは、今まで困難であった「X線結晶構造等の原子解像度データと、低解像度ながらも分子運動情報を含む小角散乱データを統合した生体分子ダイナミクス理解」への新規な道筋を与えている。加えて、この解析は他の実験データにも応用可能であり、様々な生体高分子実験データを統合し生体分子への理解を深めるための普遍的技術たりうることから、広く関連学術分野への波及効果が期待される。

研究成果の概要(英文)：Copper chaperone for superoxide dismutase (CCS) is a protein consisting of multiple structural domains, and responsible for intracellular copper ion transport to an enzyme. The relationship between function and molecular motion of CCS was studied by small-angle X-ray scattering and computational simulations. Our results suggested the significance of cooperation of all structural domain including a domain which does not bind copper ion for copper binding or holding of CCS. To obtain the result above, we also established a modeling method for visualizing possible behavior of a biomolecule which combines molecular dynamics simulation and small-angle scattering data. Our idea is that when a long-time molecular dynamics simulation of a biomolecules matches a small-angle scattering profile of the molecule, the simulation trajectory is regarded as a possible structural pool of that. Feasibility of the idea was confirmed for some proteins.

研究分野：生物物理学

キーワード：分子動力学シミュレーション 金属タンパク質 銅タンパク質 小角散乱法

1. 研究開始当初の背景

(1) 背景: 銅シャペロン CCS

銅イオンは様々な酵素の活性中心として機能するため、銅は細胞にとって必須の金属である。細胞内には銅シャペロンと呼ばれるタンパク質が存在し、細胞膜上の銅イオントランスポーターから銅イオンを受け取り、細胞内の酵素へと銅イオンを渡している [A Magistrato et al. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 58 (2019).]. Copper chaperone for superoxide dismutase (CCS) は銅シャペロンの一種であり、細胞膜でトランスポーターより銅イオンを受け取った後、細胞質に存在する不均化酵素 Cu, Zn-superoxide dismutase (SOD1) に銅イオンを渡す [PJ Schmidt, et al. *J. Biol. Chem.* 275 (2000).]. CCS はマルチドメインタンパク質であり、一分子の中に 3 つの構造単位 (ドメイン) が含まれる。それらは N 末端側から順にドメイン I、ドメイン II、ドメイン III と名付けられている (図 1) [PJ Schmidt et al. *J. Biol. Chem.* 274 (1999).].

まず、CCS のドメイン構造の観点からは、次の 3 点が重要となる。一つ目は、CCS は水溶液中でドメイン II 同士の結合を介して二量体を形成していることである。二つ目は、CCS のドメイン III が天然変性領域と呼ばれる、特定の折れたたみ構造を持たず絶えず構造が揺らいでいる領域であると考えられている点である。そして三つ目は、CCS のドメイン I と II が結合・解離を繰り返す可能性が近年の研究から示唆されている点である [FA Sala et al. *Plos. Biol.* 17 (2019).]. しかしながら後者 2 点に関し、「ドメイン III がどのような構造の間を揺らいでいるか?」の問いは未解決問題であり、また水溶液中でのドメイン I と II の解離・会合の実態も解明されていない。

次に、CCS のアミノ酸配列の観点からは、CCS 分子内で銅イオンを獲得・保持・譲与する領域の位置が重要となる。CCS は 2 つのシステインを有するモチーフを、ドメイン I とドメイン III にそれぞれひとつずつ有している。ただし銅 (I) イオンは 3 ないし 4 つのチオール基と配位結合を形成した状態も安定である。従って、「各々で 2 つずつチオール基を持つシステインモチーフがどのような組み合わせによって銅イオンを保持しているのか」という問題が提起される。CCS が二量体で存在することや、グルタチオン等のチオール基を有する別の生体分子による補助の可能性まで含めれば、これは非常に複雑な問題である。先行研究として、CCS は多量体を形成し、複数のドメイン III によって銅イオンを保持できることが既に報告されている [JP Stasser et al. *Biochemistry* 46 (2007).]. 従ってこの結合パターンが存在するのは間違いない。その一方で、CCS が SOD1 と 1:1 のヘテロ二量体を形成し [FA Sala et al. *Plos. Biol.* 17 (2019).], 銅イオンを譲渡する事実は、逆に CCS 分子内で銅イオンを保持できる可能性を支持している。あるいは、ドメイン III のみで銅イオン獲得・保持・譲渡が可能であれば、ドメイン I の銅イオン結合モチーフの存在意義への疑問も残る。以上のシステインによる銅イオン結合機構には、システインモチーフ同士の接近可能性が関係することから、CCS のドメイン配置に関する未解決問題ともつながっている。

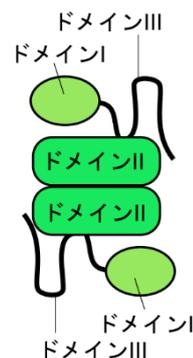


図1 CCS二量体の構造模式図

(2) 背景: 動的な生体高分子の構造解析

生体高分子の中にはナノスケール構造が絶えず変化している分子種が存在する。マルチドメインタンパク質 CCS もその一つであり、ドメイン I とドメイン II の位置関係は、両者をつなぐリンカー領域が揺らぐことにより常に変化すると考えられる。また先述の通りドメイン III は天然変性領域であると考えられるため、この領域も絶えず構造変化している。特に CCS ではナノスケール構造の揺らぎがシステインのチオール基を介した銅結合メカニズムに関与すると予想されるため、その分子運動の実態を解明することは重要である。こうしたタンパク質の構造揺らぎ情報を取得するための実験手法は複数存在しており、例えば、Förster 共鳴エネルギー移動、X 線小角散乱法等が挙げられるが、それらの実験データは原子解像度での分子構造変化を解き明かす情報量は持たない。そのため、古典力学に基づき分子の運動を可視化するコンピュータシミュレーションである、分子動力学シミュレーションを併用することで、実験データが示す分子運動を高解像度で解明する戦略が有効となりうる。

(3) 研究の動機

報告者は過去に分子動力学シミュレーションを用いることで生化学実験データの背後にある分子の挙動を解明した [M Shimizu, et al. *PNAS* 113 (2016).]ほか、高速原子間力顕微鏡で観察された生体分子のナノスケール運動の動作原理を、分子動力学シミュレーションを用いることで明らかにしてきた。溶液散乱測定に着目し、これまでの研究で身に着けたノウハウを生かし、小角散乱測定データが示すナノスケール分子運動を分子動力学シミュレーションによって解明する方法を確立し、それを用いることで CCS のダイナミクスを解明しようと考えた。

2. 研究の目的

以上の背景をふまえ、本研究では2つの研究目的を設定した。一つ目は、小角散乱プロファイルと分子動力学シミュレーションを駆使することで、生体分子のナノスケール運動を明らかにする実用的解析法を創出することである。そしてもう一つは、考案手法を用いることでCCSのナノスケール運動の実態を明らかにし、分子運動と銅イオン獲得・保持および譲渡活性との関係を明らかにすることである。

3. 研究の方法

小角散乱測定は、SOD1とCCSに対して実施した。CCSに加えてSOD1の小角散乱測定を実施した理由は二つあり、一つ目は小角散乱と分子動力学計算を組み合わせた分子運動解析法の開発に際し、CCSのような複雑な系ではなく、初めはより単純な系を用いて解析法の実現可能性を評価しようと考えたことであり、二つ目はCCSの分子運動と機能の関係を解明するにあたり、銅イオンを輸送する相手であるSOD1の振る舞いを理解しておくことが有益であると考えたためである。本研究では試料にX線を照射し、その散乱強度を測定する手法であるX線小角散乱測定を両タンパク質に対して実施した。測定のためのタンパク質試料は大腸菌を用いて発現し、精製されたものを用いた。本研究ではX線小角散乱測定と分析超遠心を組み合わせたAUC-SAS法[K Morishima, et al, *Commun. Biol.* 3 (2020).]を採用した。この技法では散乱曲線に存在する目的成分(CCS二量体、SOD1二量体)以外の成分の寄与を推定し、それを除去することができる。分子動力学シミュレーションでは、小角散乱プロファイルより分子運動情報を適切に引き出せる条件を検討する目的で、全原子分子動力学シミュレーションに加え、複数の原子を一つの質点として取り扱う粗視化分子動力学シミュレーションを実施した。

4. 研究成果

(1) 小角散乱法と分子動力学シミュレーションを用いた分子運動解析法

タンパク質分子の動きを可視化する方法として、小角散乱プロファイルとシミュレーションデータから、タンパク質の自由エネルギーランドスケープ(分子構造集団)をモデリングすることを考えた。つまり、揺らぎを含めてどのような構造状態にどのくらいの確率で存在するか、安定状態間の経路にはどの程度安定に存在できるのか、といったことを明らかにする方法考案に取り組んだ。

SOD1をはじめ、複数の系を用いて解析手法の検討を行った結果、「長時間の分子動力学シミュレーションを実施し、その中から十分に長い時間領域で、かつ実測された小角散乱プロファイルを再現できるものを切り出す」アイデアに至った。この考えはいたってシンプルであるが、長時間のコンピュータシミュレーションを実施した結果が実験データに合致する場合に、それを実際の分子の姿であるとみなす考えは直感的にも妥当である。我々は本研究で考案したアイデアには3つの利点があることを見出した。まず、シミュレーションに係る計算コストが少なく済む点である。実験に合致する構造集団を厳密にモデリングするもっとも直接的かつ丁寧な方法は、シミュレーションパラメータを徹底的にチューニングしながら、平衡状態で、かつ実験データに合致するものを探索することである。しかしそれには非常に時間がかかり、多くの生体高分子系では非現実的である。それと比較すれば、パラメータを変更して再度シミュレーションを行うのではなく、既存のシミュレーションデータを利用し、実験に合致する領域を切り出すアプローチは大幅な計算時間短縮になる。次に、シミュレーションで現れる連続した時間領域を切り出す操作は、結果として得られた構造集団において分子構造が連続的に移り変わることを保証している。例えばCCSドメインIIIのようなふらふらと構造が移り変わる天然変性領域では、構造モデリングの際にこの条件を満たすことは必須であり、従ってこれも考案した方法の利点である。最後に、解が唯一とまらない点が挙げられる。大抵の分子シミュレーションは乱数が利用される過程が含まれているため、シミュレーションを行うごとに異なる結果となり、結果切り出した時間領域にもある程度のバリエーションが存在した。唯一解を同定できない点は一見デメリットに思えるが、これは生体分子の分子動力学計算力場が一般的に厳密に正確ではないことと、小角散乱データが含む情報量が多くないことを考慮すれば当然であるといえる。逆に、こうした状況で唯一解が出てしまうアルゴリズムには、誤答のみを提示してしまうリスクが存在する。つまり、ありうる分子構造集団の候補がいくつも現れる我々のアプローチは、実験と計算の統合的研究が失敗に終わるリスクを減らせる。解の候補をいくつか提示できれば、他の研究者とのディスカッションの中で解の吟味を行えるほか、次にどのような実験を行えばそれら解の候補を絞り込めるかの方針が立案可能である。それらの点で、ありうる分子構造集団の候補を複数提示する考え方は、実験と計算を組み合わせた融合研究において強力である。なお我々のアプローチでは、候補であるとはいえ、ありうる分子構造集団を提示することが可能であるという意味で、当初の目的を達成している。またいずれの候補構造集団にも共通する特性が見つければ、それは現実の分子の性質として提示することが可能である。

①国内外における位置づけとインパクト: 以上の3点から、我々の考案した解析手法は実験と計算を統合する方法としては、特に実用性に重点を置いた新規アプローチの位置づけとなる。本方法は数か月の単位で実験と計算による解釈・予測のサイクル通り実施可能とできるため、関連分野にインパクトを十分に与えるものである。実験研究と計算研究の統合の重要性は今後益々

高まると考えられ、我々が提案したアイデアの重要性も高まってゆくと期待される。

②個々の分子の解析結果：SOD1 二量体

始めに単純なタンパク質系として SOD1 二量体の構造揺らぎをモデリングした。X 線小角散乱プロファイルに合致する構造揺らぎの候補を得ることができた。図 2 では構造揺らぎの中で現れる多数の構造の一部を、片方の SOD1 単量体を重ね合わせて示している（一方の単量体がマゼンタ・他方がゴールドで示してある）。この解析結果からは、二量体のインターフェースにはある程度の揺らぎが許されていることが考察される。

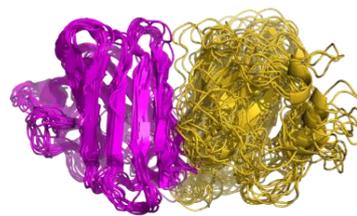


図2 SOD1二量体の可能な構造揺らぎの例

③個々の分子の解析結果：マルチドメインタンパク質 ER-60

SOD1 より複雑な構造で、CCS より単純なモデル系としてマルチドメインタンパク質 ER-60 に着目し、この分子を用いて考案手法を試験した。ER-60 は 4 つの構造ドメインを有しており、特に a ドメインと a' ドメインにはドメイン間のヒンジを介した運動があると考えられる（図 3。a ドメイン：青、b ドメイン：緑、b' ドメイン：黄色、a' ドメイン：赤）

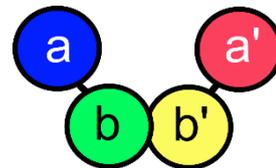


図3 ER-60の構造模式図

ER-60 の小角散乱プロファイル[A Okuda, et al. *Sci. Rep.* 11 (2021).]に合致する分子構造集団は多数得られ、そこには多様性が存在した。例えば図 4 には内 2 つの構造集団の a-a' ドメイン中心間距離のヒストグラムを示したが、両者では形状が大きく異なっている。興味深いことに ER-60 では a-a' ドメイン中心間距離と各散乱ベクトルでの散乱強度が線形に近い関係を有していた。こうした現象は分光測定における等吸収点の特性と同じものである（例えば 2 成分系の吸収スペクトルでは一方の成分の存在比が吸光度に比例する）。実際、構造集団を構成する個々の分子構造の理論散乱曲線を重ね合わせると、散乱強度がすべての構造でほぼ一致する点（散乱ベクトル）が現れた。こうした分子の構造アンサンブルモデリングの文脈においても、等吸収点を利用した構造集団の概観が可能であることを示す本結果は、予期せず得られた発見である。

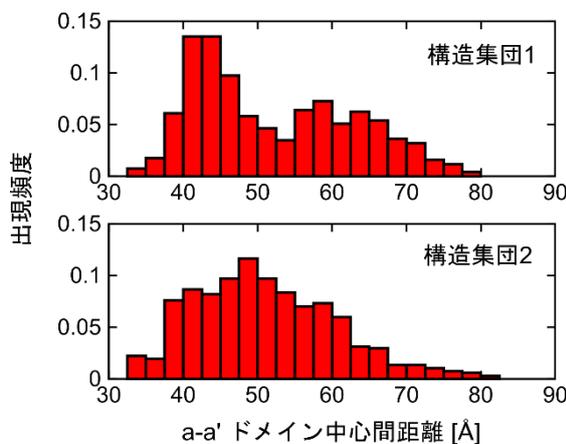


図4 考案手法で得られたER-60構造集団の差異

(2) 考案した分子運動解析法の CCS への適用

上述の分子運動解析法を CCS の X 線小角散乱プロファイル、及び CCS の分子動力学シミュレーションデータに適用したところ、多数の分子運動の候補が得られた。それらの間ではいくつか共通点がみられた。共通点の一つ目は、CCS ホモ二量体のドメイン III にそれぞれ存在するシステインモチーフ同士が接近する頻度が高く、それ以外の組み合わせ（ドメイン I のシステインモチーフとドメイン III のシステインモチーフ、あるいは 2 つのドメイン I のシステインモチーフ同士）の距離が接近する頻度が低かった点である。これは、CCS は複数のドメイン III によって銅イオンを結合する先行研究と整合している。共通点の二つ目は、天然変性領域であるドメイン III が高い頻度で既知の結晶構造[FA Sala et al. *Plos. Biol.* 17 (2019).]に類似の構造をとったことである。以上のように、本手法で得られた分子構造ダイナミクスは先行研究と良く整合していた。更にこの結果から、システインモチーフ同士の接近可能性がその物理的起源であることが示唆された。得られた分子運動をさらに調べたところ、2 つのドメイン III 同士の接近と、ドメイン I とドメイン II の会合が正に相関していた。このことは、ドメイン III による銅イオンの結合プロセスがドメイン I-II 領域の構造によって規定されることを示している。言い換えれば、CCS 機能である銅イオン結合には、銅結合システインモチーフを有さないドメイン II を含めたすべてのドメインが協働していることが明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Shimizu Masahiro, Okuda Aya, Morishima Ken, Inoue Rintaro, Sato Nobuhiro, Yunoki Yasuhiro, Urade Reiko, Sugiyama Masaaki	4. 巻 12
2. 論文標題 Extracting time series matching a small-angle X-ray scattering profile from trajectories of molecular dynamics simulations	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 9970
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-13982-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Yunoki Yasuhiro, Matsumoto Atsushi, Morishima Ken, Martel Anne, Porcar Lionel, Sato Nobuhiro, Yogo Rina, Tominaga Taiki, Inoue Rintaro, Yagi-Utsumi Maho, Okuda Aya, Shimizu Masahiro, Urade Reiko, Terauchi Kazuki, Kono Hidetoshi, Yagi Hirokazu, Kato Koichi, Sugiyama Masaaki	4. 巻 5
2. 論文標題 Overall structure of fully assembled cyanobacterial KaiABC circadian clock complex by an integrated experimental-computational approach	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 184
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-022-03143-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Okuda Aya, Shimizu Masahiro, Morishima Ken, Inoue Rintaro, Sato Nobuhiro, Urade Reiko, Sugiyama Masaaki	4. 巻 11
2. 論文標題 Solution structure of multi-domain protein ER-60 studied by aggregation-free SAXS and coarse-grained-MD simulation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 5655
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-85219-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Okuda Aya, Inoue Rintaro, Morishima Ken, Saio Tomohide, Yunoki Yasuhiro, Yagi-Utsumi Maho, Yagi Hirokazu, Shimizu Masahiro, Sato Nobuhiro, Urade Reiko, Kato Koichi, Sugiyama Masaaki	4. 巻 18
2. 論文標題 Deuteration Aiming for Neutron Scattering	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biophysics and Physicobiology	6. 最初と最後の頁 16 ~ 27
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2142/biophysico.bppb-v18.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Okuda Aya, Shimizu Masahiro, Inoue Rintaro, Urade Reiko, Sugiyama Masaaki	4. 巻 62
2. 論文標題 Efficient Multiple Domain Ligation for Proteins Using AsparaginyI Endopeptidase by Selection of Appropriate Ligation Sites Based on Steric Hindrance	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Angewandte Chemie International Edition	6. 最初と最後の頁 e202214412
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/anie.202214412	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4件(うち招待講演 1件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Shimizu Masahiro, Okuda Aya, Morishima Ken, Sato Nobuhiro, Inoue Rintaro, Urade Reiko, Sugiyama Masaaki
2. 発表標題 Dynamics of multi-domain protein ER-60 revealed by small angle X-ray scattering data and molecular dynamics simulations
3. 学会等名 25th Congress and General Assembly of the International Union of Crystallography (the XXV IUCr Congress) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 清水 将裕、奥田 綾、守島 健、柚木 康弘、佐藤 信浩、井上 倫太郎、裏出 令子、杉山 正明
2. 発表標題 X線小角散乱データと粗視化分子動力学計算に基づく生体分子の構造ダイナミクスの解明
3. 学会等名 第59回日本生物物理学会年会(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 清水 将裕、奥田 綾、守島 健、佐藤 信浩、井上 倫太郎、裏出 令子、杉山 正明
2. 発表標題 X線小角散乱データと分子動力学計算に基づくマルチドメインタンパク質ER-60の動態解析
3. 学会等名 2020年度量子ビームサイエンスフェスタ
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 清水 将裕、奥田 綾、守島 健、柚木 康弘、井上 倫太郎、佐藤 信浩、裏出 令子、杉山 正明
2. 発表標題 X線小角散乱プロフィールと粗視化分子動力学計算に基づく4ドメインタンパク質ER-60の構造研究
3. 学会等名 第二十二回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関