

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 3 日現在

機関番号： 63903

研究種目： 挑戦的萌芽研究

研究期間： 2011～2012

課題番号： 23655020

研究課題名（和文）生体分子の構造変化に伴う状態遷移ダイナミックスの解析手法の開発とその応用

研究課題名（英文）Development of analytical method for structural change dynamics of biomolecules and its application

研究代表者

斉藤 真司（SAITO SHINJI）

分子科学研究所・理論・計算分子科学研究領域・教授

研究者番号： 70262847

研究成果の概要（和文）：

Canine Milk Lysozyme (CML) はカルシウム結合リゾチームファミリーに属するタンパク質であり、同じカルシウム結合リゾチームファミリーに属する γ -lactalbumin (γ -LA) と高い相同性をもつ。最近の実験により、CML の unfolding 経路はヤギ γ -LA (GLA) の経路とは異なることが明らかにされた。そこで、我々は CML と GLA の分子動力学計算を行い、これらのタンパク質の unfolding 経路の違いの起源を解析した。今回の結果から、CML と GLA の局所的な相互作用の有無が unfold 経路の違いを生み出していることを明らかにした。また、高次非線形分光法のアイデアに基づくタンパク質などの構造揺らぎを解析手法について検討を進めた。

研究成果の概要（英文）：

Canine milk lysozyme (CML) is a calcium binding protein belonging to the lysozyme family. Although CML and goat γ -lactalbumin (GLA) are highly homologous, it was found in recent experimental results that the unfolding pathway of CML is different from that of GLA. We examined the difference between the unfolding pathways of CML and GLA by performing all-atom molecular dynamics simulations. As a result, we found that the difference of the unfolding pathways is due to the presence of absence of local interactions in these proteins. In addition, we developed a novel method for the structure transitions based on third-order nonlinear spectroscopy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野： 化学

科研費の分科・細目： 基礎化学・物理化学

キーワード： 理論化学、凝縮系動力学

1. 研究開始当初の背景

生体分子の folding または unfolding 過程は、多様なコンフォメーションが関わる複雑かつ階層的構造変化過程である。それゆえ、様々な温度においてどのような状態が関わり、それらがどのような揺らぎを示すかという情報

が必要となる。しかし、原子モデルを利用した分子シミュレーションにおいて、生体分子の熱力学（どのような状態が関与しているか）に基づく構造変化過程の理論研究はこれまで殆ど行われていなかった。一方、我々は、高次非線形分光法や多時間相関関数を利用し、

液体や過冷却液体の揺らぎや運動さらに運動間のカップリング、不均一ダイナミックスの寿命の解析などを行ってきた。

2. 研究の目的

本研究では、平衡系のシミュレーションにより構造変化に関わりうる状態・揺らぎを解明し、非平衡シミュレーションと高次非線形分光法の経験を生かした解析手法を開発し、生体分子の状態遷移ダイナミックスの解明に挑む。

3. 研究の方法

Canine milk lysozyme (CML) および goat γ -lactalbumin (GLA) の unfolding 過程を解析するために、まず、298 K で安定な構造を作成した。温変性の unfolding の解析として、系の温度を 498 K に上げ、それぞれのタンパク質について 10 ns の分子シミュレーションを 30 回行い、これらのタンパク質の構造がどのように unfold していくかを解析した。また、熱変性という非平衡過程での構造を詳細に解析するために、298, 323, 343, 353, 363, 373, 393 K の各温度での平衡系の分子シミュレーションも行った。

生体分子のコンフォメーションダイナミックスの解析として、相関関数の逆ラプラス変換を作成した。さらに、その応用例として、Adenylate kinase の粗視化シミュレーションを行った。

4. 研究成果

本課題において、canine milk lysozyme (CML) および goat γ -lactalbumin (GLA) の unfolding 過程の違いを解析した。まず、298K における CML と GLA の構造の安定性について解析を行った。CML では B-helix と D-helix の間、A-helix と B-helix の間には安定な疎水性コンタクトが形成されている。CML において疎水性コンタクトを形成している残基が GLA では親水性残基となっており、CML に見られるような安定なコンタクトを形成しない。このように、二つのタンパク質のコンタクトの種類の違いにより、GLA よりも CML の方が安定な構造を取っていることが明らかとなった。

次に、熱変性シミュレーションにより CML と GLA の熱変性経路の違いを解析した。CML では ドメインが安定な疎水性コアを形成

しているために、まず ドメインが unfold する。一方、GLA では メインと同様に メインのコンタクトも失われていくことが明らかになった。また、今回のシミュレーションでは、カルシウムイオンの解離は見られなかったが、CML におけるカルシウムイオン結合部位を含むコンタクトは GLA のものよりも不安定であり、実験結果との対応関係が見られる。

さらに、298K から 398K までの様々な温度における CML の分子シミュレーションを行い、各温度での構造変化や揺らぎを解析した。323K では、ドメインの 3 本のストランドが unfold している。また、ベータシートと A、C、D ヘルックスとのコンタクトが壊れており、ベータシートが大きく揺らいでいる。一方、

ドメインのコンタクトは安定である。さらに温度が上がった 343、353、363 K では、ベータシートは完全に壊れて、天然構造とは大きく異なった構造をとる。ドメインとドメイン間のコンタクトが減少し、その結果、

ドメインとドメインの間に存在する Ca^{2+} 結合部位と C ヘルックス周辺の揺らぎが増加

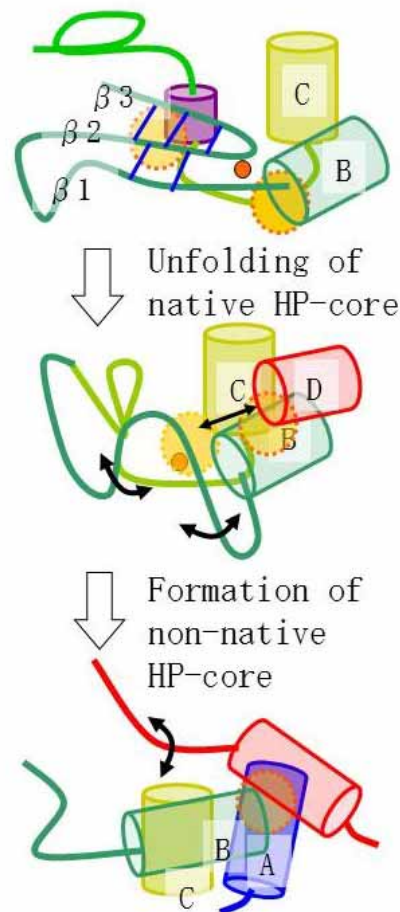


図 1. CML の unfolding 経路

する。373K以上では、DヘリックスがC末端まで伸び、天然構造にはない長いヘリックスが形成される。これは、熱変性シミュレーションでも見られた。さらに、Bヘリックスを核として、A、D、Eヘリックスがまとまった構造をとる。その結果、ドメインとドメインの接触は更に減少し、ドメインとドメインの間に存在するCa結合部位の揺らぎは更に増加する。

熱変性シミュレーションと各温度でのシミュレーションの結果を併せ、CMLのunfoldingの経路は図1のように示される。まず、ドメインのシートがunfoldし、そのためシートの関わる疎水性の接触が壊れる。その結果、ドメインは大きく揺らぐようになり、ドメインとの接触も喪失する。ドメインではDヘリックスがC末側に延長し、新しいヘリックスが生じる。その後、Bヘリックスを核として新しい疎水性接触を生成し、非天然状態の構造で安定化していることが分かった。

シグナル伝達、酵素活性など生体分子の機能発現には、生体分子のコンフォメーションの変化が関わっている。本課題では、粗視化シミュレーションを利用し、その相関関数の寿命解析から系がどのような時定数分布で揺らいでいるのか、3時間相関関数に基づく構造変化の寿命分布の時間変化により状態相関ダイナミクスの解析手法の確立を目指した。相関関数から構造変化の寿命を求める逆ラプラス変換のプログラムを作成し、液体系およびCMLのunfolding系でのテスト計算を行った。さらに、状態遷移ダイナミクスの解析として、Adenylate kinase (AKE)における構造揺らぎについて解析を進めている。AKEはATPとAMPから2つのADPを合成する反応を触媒するリン酸基転移酵素であり、3つのドメインによって形成されている。最近の一分子蛍光励起移動(single-molecule FRET)の解析から、基質が存在しない状態のAKEの天然および変性状態間に複数の中間状態があることが実験的に明らかにされた。そこで、我々は、AKEのアミノ酸配列の特異性と局所的な柔軟性を導入した非格子型郷モデルに基づいたマイクロ秒オーダーの粗視化シミュレーションを実行し、変性状態と天然状態の間に複数の中間状態が存在することを確かめた。現在、各状態の寿命を解析するとともに、それぞれの状態がそのように相

関しているかについても解析を進めている。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計9件)

S. Saito, Ohmine, and B. Bagchi, Frequency dependence of specific heat in supercooled liquid water and emergence of correlated dynamics, *J. Chem. Phys.*, 138, 094503 (2013). 査読有

S. Imoto, S. S. Xantheas, and S. Saito, Molecular origin of the difference in the HOH bend of the IR spectra between liquid water and ice, *J. Chem. Phys.*, 138, 054506 (2013). 査読有

M. Higashi, S. Hirai, M. Banno, K. Ohta, S. Saito, and K. Tomimaga, Theoretical and experimental studies on vibrational energy relaxation of the CO stretching mode of acetone in alcohol solutions, *J. Phys. Chem. B*, 117, 4723-4731 (2013) (invited). 査読有

K. Kim and S. Saito, Multiple Length and Time Scales of Dynamic Heterogeneities in Model Glass-Forming Liquids: A Systematic Analysis of Multi-Point and Multi-Time Correlations, *J. Chem. Phys.*, Special Topic: Glass Transition, 138, 12A506 (2013) (invited). 査読有

T. Yagasaki and S. Saito, Fluctuations and Relaxation Dynamics of Liquid Water Revealed by Linear and Nonlinear Spectroscopy, *Annu. Rev. Phys. Chem.* 64, 55-75 (2013) (invited). 査読有

T. Yagasaki and S. Saito, Energy Relaxation of Intermolecular Motions in Supercooled Water and Ice: A Molecular Dynamics Study, *J. Chem. Phys.* 135, 244511 (2011). 査読有

J. Liu, W. H. Miller, G. S. Fanourgakis, S. S. Xantheas, S. Imoto, and S. Saito, Insights in Quantum Dynamical Effects in the Infrared Spectroscopy of Liquid Water from a Semiclassical Study with an Ab Initio-Based Flexible and Polarizable Force Field, *J. Chem. Phys.* 135, 244503 (14 pages) (2011). 査読有

M. Higashi and S. Saito, Direct Simulation of Excited-State Intra

molecular Proton Transfer and Vibrational Coherence of 10-Hydroxy benzo[h]quinoline in Solution, J. Phys. Chem. Letters 2, 2366-2371 (2011). 査読有

T. Yagasaki and S. Saito, A Novel Method for Analyzing Energy Relaxation in Condensed Phases Using Nonequilibrium Molecular Dynamics Simulations: Application to the Energy Relaxation of Intermolecular Motions in Liquid Water, J. Chem. Phys. 134, 184503 (9 pages) (2011). 査読有

[学会発表](計5件)

S. Saito, Dynamics of Liquid and Supercooled Water, Indo-Japan Bilateral Collaboration Seminar, Hyderabad, India, Nov. 21-22 (2012) (invited).

S. Saito, Relaxation and Fluctuation, 244th American Chemical Society National Meeting and Exposition, Philadelphia, USA, Aug. 19-22 (2012) (invited).

S. Saito, Chemical Reaction, Fluctuation, and Relaxation in Liquids, Marie Curie IRSES meeting on "1st International Workshop on Computer Simulations of Thermally Excited Molecules and Materials by First Principles", Nagoya, March 10-11 (2012) (invited).

S. Saito, Dynamics of liquid water: Energy relaxation and fluctuation, 4th Japan-Korea Seminar on "Biomolecular Sciences: Experiments and Simulations", Nara, Jan. 9-11 (2012) (invited).

S. Saito, 水の多次元分光法の理論計算 - 揺らぎ、緩和、物性 -、テラヘルツ分光法の最先端 V、日本分光学会テラヘルツ分光部会、パシフィコ横浜、Yokohama, Sept. 28-29 (2011) (invited).

[図書](計5件)

K. Ohta, J. Tayama, S. Saito, and K. Tomimaga, Solvation Dynamics of Vibrational State in Hydrogen-bonding Solvents: Vibrational Frequency Fluctuation Studied by Three-Pulse Infrared Photon Echo Method in

"Ultrafast Infrared Vibrational Spectroscopy", CRC press, 149-169 (2013).

斉藤真司、二次元赤外分光法の理論および水の分子間ダイナミックスの解析、日本赤外線学会、22-30 (2012).

斉藤真司、凝縮系の揺らぎ、緩和と分光法 (CSJ カレントレビュー 08 巨大分子系の計算化学) 化学同人、76-81 (2012).

大峯 巖、斉藤真司、松本正和、ミクロな水の性質: 揺らぎ、相転移、反応、応用物理 80, 0853-0861 (2011).

大峯 巖、斉藤真司、水の揺らぎと反応、化学と工業 64, 532 (2011).

[その他]

ホームページ等

http://dyna.ims.ac.jp/shinji/NewHP_Group/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

斉藤 真司 (SAITO SHINJI)

分子科学研究所・理論・計算分子科学研究領域・教授

研究者番号: 70262847

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

桑島 邦博 (KUWAJIMA KUNIHICO)

大学共同利用機関法人自然科学研究機構 (岡崎共通研究施設)・岡崎統合バイオサイエンスセンター・教授

研究者番号: 70091444