

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 26 日現在

機関番号：82401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25891031

研究課題名(和文)結晶環境のタンパク質構造への影響のシミュレーションとデータベースによる定量的解析

研究課題名(英文)Effect of Crystal Environment on Protein Structures: Molecular Dynamics Simulations and Database Analysis

研究代表者

宮下 治 (Miyashita, Osamu)

独立行政法人理化学研究所・計算科学研究機構・上級研究員

研究者番号：10620528

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：結晶環境がタンパク質の構造と運動にどう影響するかについての普遍的な知見を得るために、分子動力学シミュレーションとデータベース解析を組み合わせた解析を行った。タンパク質Cyanovirin-NとBPTIについて、シミュレーションにより水溶液中での安定構造と運動状態を調べ、さらに、結晶環境を再現したシミュレーションも行い、比較することにより、結晶環境の影響を定量的に理解した。またその結果を、データベースに登録されている構造の分布に関する統計と比較することで、結晶作成環境がどのように構造に影響したかを調べた。これらの結果から結晶構造情報を活用する上で有益な知見を得ることができると考える。

研究成果の概要(英文)：Effects of crystal environment on the structure and dynamics of protein molecules were examined, by combining molecular dynamics simulations and statistical analysis of protein structure database. In particular, we studied cyanovirin-N and BPTI, for which multiple high-resolution X-ray structures are available. Molecular dynamics simulations were performed to obtain the conformational ensemble in solution. In addition, simulations of proteins in crystal environment were performed in comparison to examine the effect of crystal packing quantitatively. These data were then compared with the available protein X-ray structures to examine the effect of crystal formation conditions. A large number of available structures were analyzed to obtain statistics of crystal structures and compared against the conformational ensemble from simulations. These results provide valuable insight into the interpretation of X-ray structures to discuss protein dynamics and functions.

研究分野：計算機生物物理

キーワード：計算機生物物理 計算機構造生物 結晶構造 分子動力学シミュレーション データベース解析

1. 研究開始当初の背景

タンパク質など生体高分子の原子構造情報は、それらの機能を理解する上で重要な役割を果たしている。原子レベルの高解像度の構造情報は、現在、主にX線結晶構造解析法により得られている。しかし、得られる構造はあくまでも結晶化された生体分子の構造であり、自由度が高く柔軟な構造を持つタンパク質について、それがどれだけ機能を発現する水溶液中での構造と運動を正確にとらえているかには注意が必要である。

この問題は特に、ある特定のタンパク質について、いくつもの異なった構造がX線結晶解析法から得られているときに顕著になる。複数の構造があることは機能理解の助けになるが、逆に解析が困難になることもある。それぞれの構造が機能に関連した意味のある構造なのか、それとも無数にある構造の一つが結晶化の過程でたまたま選択されたものなのか、が明確に出来ないことがあるからである。さらには結晶化の過程で不自然な構造を取ってしまうこともありうる。

タンパク質結晶構造を生化学的議論の参考にする際には、こういった構造の揺らぎの可能性を考慮しなければいけないが、現状ではそれは単純な問題ではない。Bファクターは原子位置の揺らぎの程度を示すが、水溶液中での構造変化の大きさを示す物ではなく、また、広く使われている低温結晶構造解析ではその意味も不確かである。結晶化過程が構造に影響しうることは一般に認識されているが、具体的に定量的にどの程度影響しうるのかは把握されていない。結晶構造を正しく解釈するには結晶内での分子結合を定量的に理解することが必要である。

X線結晶構造解析から得られる構造を正しく解釈するためには、そのタンパク質が溶液中でどういった構造を取っており、さらにはどの様に運動しているかを知った上で、それらと結晶構造モデルを比較する必要がある。この目的に向かい、申請者は分子動力学シミュレーションを用いて研究を行ってきた。全原子シミュレーションは幅広く使われており、信頼性が高く、十分なサンプリングを行なうことにより、溶液中での運動と構造分布に関する詳しい情報を得ることができる。また、一般的に行なわれる水溶液中でのタンパク質のシミュレーションだけでなく、結晶化状態でのタンパク質の運動のシミュレーションも行なうことができる(図1)。水溶液中でのシミュレーションと結晶環境でのシミュレーションの比較をすることで、結晶環境がどのように運動と構造に影響を及ぼすかを明確にすることができる。

これまで、様々な大きさレベルのタンパク質構造について調べた。対象としては一つのタンパク質について複数の結晶構造があるものを選び、シミュレーションからの構造分布と比較した。まず、Cyanovirin-Nの糖分

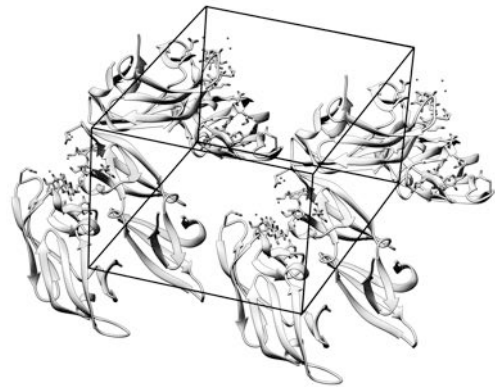


図1) Cyanovirin-N の結晶状態のシミュレーション。結晶条件に応じて境界を設定し、周期境界条件で行なう

子結合に関わるアミノ酸残基の配向についての結晶環境の影響を調べた (Vorontsov & Miyashita, *Biphys. J.*, 2009)。また、Luciferase の反応に関わる 20 残基ほどのループの結晶構造を水溶液中でのシミュレーションと比較した。結果、結晶構造が表しているのは、本来大きく運動しているループが結晶内分子相互作用により人工的に固定された状態であり、機能状態を的確には表していないことを明らかにした (Campbell & Miyashita, *Biphys. J.*, 2010)。さらに λ Cro タンパク質の結晶構造解析で観測された大きなドメイン構造変化をシミュレーションと比較することによりそれぞれの構造の安定性と機能的な位置付けを議論した (Ahlgstrom & Miyashita, *Biphys. J.*, 2011)。

これらのタンパク質について次のようなことが観測された。まず、結晶構造は、溶液中で最も安定な構造を表しているとは限らない。準安定な構造を反映している場合もある。さらに、結晶構造が溶液中では不安定である場合も観測された。こういった不安定構造は、結晶内分子結合の影響により人工的に安定化されていると考えられる。これらの結果は、観測される結晶構造は最安定状態とは限らず、タンパク質が取りうる無数の構造の中の一つが、結晶化過程で選択されるものであり、結晶構造がどういった機能状態に対応するかは、結晶が作られた過程などを慎重に吟味する必要があることを示している。

2. 研究の目的

これまで研究を行ったタンパク質については、観測されている部分構造の安定性や機能状態について理解を深めることができた。では一般的に結晶環境の構造への影響がどうなのかが当然の疑問である。しかし、興味があるタンパク質それぞれについてシミュレーションを行なうことは時間がかかりすぎてできない。構造を機能解析に利用しようとする研究者が容易に利用できる方法論が

必要である。

そこで、この研究では、より普遍的な結晶環境のタンパク質構造への影響について知見を得るために、水溶液中での運動と結晶構造の対応をさらに系統的にすべての残基について調べる。さらに、シミュレーションからの構造分布を、データベース上に多数の構造があるタンパク質の構造分布と比較する。また、結晶化条件がどのように構造に影響するかについても調査する。

この研究は、タンパク質について得られている結晶構造モデルが正しいかどうかを評価する物ではない。それらは結晶状態を正しく表している。ここで目指すのはそれらがその溶液中での構造からどれだけ異なっている可能性があるかを評価する手法である。また、一つの構造を見ても、部分部分によってより信頼性の高い場所もあれば低い場所もあると考えられる。この研究が目指すのは、結晶構造を機能解析に利用する際にそういった信頼性を評価・把握することの出来る手法の構築である。長期的には疎視化モデルなども利用して計算などを行い、多くのタンパク質について計算量を必要とせず短時間で解析を行なうことの出来る手法の確立を目指す。

3. 研究の方法

この研究では、結晶環境のタンパク質構造への影響についてのより普遍的な知見を得るために、水溶液中での運動と結晶構造の整合性をさらに系統的に調べる。さらに、シミュレーションの結果をデータベース解析と組み合わせ、結晶化条件がどのように構造に影響するかについても調査する。

(1) Cyanovirin-N の残基の構造と運動への結晶環境の影響

Cyanovirin-N の全ての残基について結晶環境の運動と構造への影響を調べる。Cyanovirin の結晶には二つ分子が含まれており、アミノ酸配列は同一であるが、結晶内での位置が異なるため、他の分子との相互作用の仕方が異なっている。そこで、通常の水溶液中でのシミュレーションと、結晶状態でのシミュレーションの構造サンプルの比較をし、次のような点について調べる。

① 結晶構造で観測されている残基の配向は、水溶液中で安定な配向にどの程度対応しているのかを調べる。残基の構造を rotamer state により表現し、それぞれのシミュレーションでの残基構造の分布を rotamer state のヒストグラムとして表す。そして、分布が結晶環境の影響でどのように変化するかと、結晶構造とどの程度一致するかを定量的に調べる。その評価には overlap coefficient

$$OC = \sum_{j=1}^N \min(p_j^S, p_j^C)$$

を計算する。ここで、 p_i は rotamer state i が取られた頻度を表し、 S と C は二つの分布をさす。

② 残基構造の分布ヒストグラムを解析することにより、結晶環境の運動への影響をエントロピーの変化

$$\Delta S_{conf} = -k_B \sum_{j=1}^N p_j \ln p_j$$

として見積もる。

③ さらに、結晶内相互作用が構造に影響をおよぼす範囲についても調べる。つまり、結晶内分子相互作用に係っている残基のみが影響されるのか、そうではなく他の残基も結晶環境に影響されるのかを把握するために、残基を結晶内相互作用を行っているものとそうでないものにグループ分けし、比較する。また、残基の種類別の解析も行う。

(2) BPTI のシミュレーションと PDB データの構造分布の比較

多数の結晶構造が知られているタンパク質について、それらの構造分布がどの程度水溶液中での運動を反映するかを調べるため、まず、BPTI について解析を行なう。BPTI (bovine pancreatic trypsin inhibitor) は 58 残基と小さく PDB には 80 以上の結晶構造が登録されている。これをつかって、残基の配向の統計を取り、それをシミュレーションからの配向分布と比較する。さらに、結晶構造データを結晶化条件により分割し比較対象とする。解像度の高い結晶構造と低い構造を分け、シミュレーションとの相関が違ってくるかを比較する。

4. 研究成果

(1) Cyanovirin-N 残基側鎖の構造への結晶環境の影響

Cyanovirin-N の通常の水溶液中でのシミュレーションを行いアミノ酸残基側鎖の動的分布を得た上で、PDB に登録されている X 線結晶解析で得られた構造と比較した。さらに、結晶状態でのシミュレーションも行い、分布がどのように変化するかを調べた。

結晶場の影響を評価するにあたり、構造への影響と運動への影響のそれぞれを考える必要がある。まず、最も多く分布する rotamer state と X 線結晶構造は比較的一致する (図 2, Gln6, 79)。これは、結晶構造が分子の最安定構造をほぼ反映していることを示している。

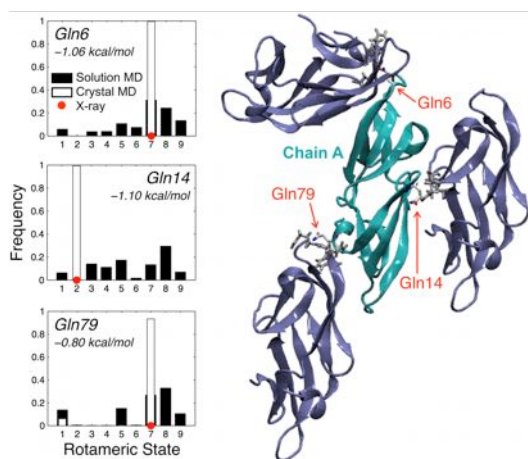


図2) Rotamer state の分布の比較の例とそれらの残基の位置。

一方で、一致しない場合も多く見られ (Gln14), それも結晶内相互作用がある残基だけにおこるとは限らないことを明らかにした。結晶状態のシミュレーションではより一致することから、これらの変化は結晶環境の影響であると考えられる。

このように残基レベルの構造でも、結晶環境の影響は複雑であり、創薬などの機能解析の際に結晶構造を利用する際は、このような構造変化の可能性を認識することが、重要であると考えられる。

(2) Cyanovirin-N 残基側鎖の運動への結晶環境の影響

結晶場の運動への影響を、エントロピーの変化を見積もることにより評価した(図3)。結晶化の際生じる分子相互作用の為に、結合領域に位置する残基の運動が制限され、エントロピーが減少することは、一般的に認識されているが、この研究でそういった影響は構造への影響の有る無しに関わらず起こることを示した。また、残基の種類を見ると、大きくエントロピーが減少している残基は、結晶内相互作用に関わる、glutamineが多い。しかし、興味深いことに、glutamic acid は相互作用があっても、エントロピーの変化は少ない傾向がある。

結晶内相互作用によるエントロピーの減少は、相互作用を弱める方向に寄与し、タンパク質の結晶化が難しい理由の一つとされている。そこで、Derewendaらは Surface Entropy Reduction 法を提案している (Derewenda, Acta Cryst D, 2011)。これは、タンパク質表面にある自由度の高い残基を自由度の低い残基により置き換え、結晶化の際の相互作用による残基の運動エントロピー減少を抑えることにより、タンパク質が結晶化しやすくなるようにするという手法である。この研究で用いた手法を活用して、結晶内分子相互作用による表面残基の自由エ

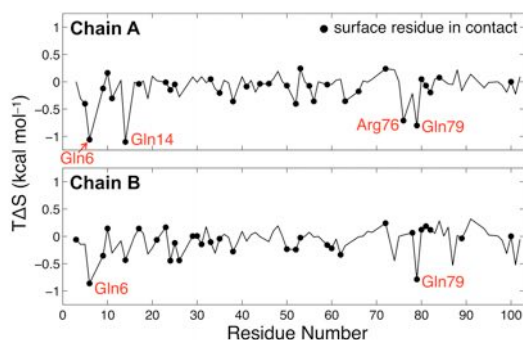


図3) 残基が水溶液中にある場合と結晶環境内にある場合とのエントロピーの変化。

ネルギー変化の詳細な情報を得ることにより、タンパク質の結晶化に結びつくより効率的なアミノ酸置き換えを提案する手法の開発につながると考える。

これらの結果を論文にまとめ、投稿する準備を行っている。

(3) BPTI の分子動力学シミュレーションから得られた水溶液中での rotamer state の分布と、PDB に登録されている BPTI の構造データからの分布を比較した。データベースで最もよく観測されている構造が MD から得られた安定構造と一致する度合いを、タンパク質上の残基の種類や場所、結晶内構造相互作用からの距離などで分類し、統計を取った。

この結果の興味深い点の一つは、多数の結晶構造があるとき、その構造の分布はどの程度水溶液中での分布と対応するのかということである。結晶構造は常に水溶液中での再安定構造を表していると考えられることが多いが、解析結果は、結晶構造の分布が、水溶液中での運動状態とある程度相関していることを示している。つまり、複数の結晶構造を比較参照することで、水溶液中での運動と機能に関する議論を行なうのに有益な情報を得られると考えられる。

また、構造を解像度の高いものと低いものに分けて比較したところ、解像度の低いもののほうが、水溶液中でのシミュレーションに一致することが示唆された。これは、温度などの結晶化条件の影響を反映していると考えられ、さらに研究を進めることで、結晶構造情報を活用する上で有益な知見を得ることができると考えられる。

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 1 件)

Effect of Crystal Packing on Protein Conformations and Dynamics, O. Miyashita, Large-scale biological simulations using supercomputers, 2015/04/02, 理化学研究所計算科学研究機構 (兵庫県・神戸市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

宮下 治 (MIYASHITA, Osamu)

理化学研究所・計算科学研究機構・上級研究員

研究者番号：10620528

(2)研究協力者

AHLSTROM, Logan