

## 研究課題別評価

1 研究課題名: ミクロな化学反応過程がもたらすマクロなタンパク質機能発現の分子物理

2 研究者氏名: 林 重彦

3 研究のねらい:

タンパク質のミクロな分子相互作用の総体から如何にマクロな機能が立ち現れてくるのか? これはポスト・ポストゲノム時代に必ず立ちはだかる問題である。本研究では、分子シミュレーションの手法を軸に、このタンパク質機能発現におけるマルチスケールな現象の分子物理的解明を試みる。特に光受容タンパク質や分子モータータンパク質などに見られる化学反応過程がもたらす機能発現の分子機構に注目し、どのように局所的な化学反応が大域的なタンパク質及びタンパク質複合体の動きを伴う機能発現につながっていくかを明らかにする。またその際、分子シミュレーションの持つ可能性の一つである、タンパク質構造と生化学、分光学および一分子測定実験などの多様な実験的アプローチの間の橋渡しを特に意識して研究を進め、機能発現の分子機構の理解を目指す。

4 研究成果:

(1) ロドプシン光受容タンパク質の光活性化

ロドプシタンパク質はレチナールシッフ塩基分子を発色団として持つ光受容体である。そのファミリーの代表的なものに、視物質ロドプシン(Rh)がある。Rh は眼の網膜に存在し視覚機能を担っている。Rh は G タンパク質結合型受容体タンパク質ファミリーの一つでもあり、光受容により G タンパク質を結合・活性化し、視覚のシグナル過程をスタートさせる。また、高度好塩菌の紫膜中には、光駆動型のプロトンポンプであるバクテリオロドプシン(bR)が存在し、光-化学エネルギー変換を担っている。

これらのロドプシタンパク質機能発現の初期過程は、ポリエン構造を持つ発色団分子の光異性化である。この光異性化反応は、タンパク質中では溶液中のそれに比べて非常に高速であり高い選択性を持つ。この特徴は、高い光反応生成物の収率(0.6~0.7)を与え、光受容体に求められる高い感受性を可能にしている。この超高速反応の動力学を調べるために、これまでに多くの時間分解分光法による研究が行われてきた。本研究では、このようなタンパク質内の反応に特徴的な反応動力学を明らかにするために、Rh の初期過程に対して非経験的分子軌道法を用いたハイブリッド QM/MM ハミルトニアンに基づく多電子状態間の遷移を含む分子動力学(MD)計算によるアプローチにより時間分解分光シグナルの背後にある分子動力学を明らかにすることを目的とした(投稿準備中)。

まず、計算した 14 本のすべてのトラジェクトリにおいて、光異性化反応は $C_{11}=C_{12}$ 結合の周りの回転に対して起き、およそ 200 fs の内に電子励起状態から基底状態への遷移が完了していることが見出された。これは実験で観測されている高い選択性と反応速度を再現している。図 1 に、時間分解放射スペクトルに対応する、トラジェクトリに沿った $S_1$ と $S_0$ 状態のエネルギー差の時間発展を示す。光励起からエネルギー交差までの時間が 40~90 fs の短い時間領域に分布しており、強い熱雑音の環境中の反応にも関わらず、コヒーレントな反応動力学となっている。このような高速な反応動力学は、二つ以上の結合周りの回転が協調的に相関していることによる。また反応生成物の構造解析により、G タンパク質結合に重要であることが知られているヘリックスと反応直後から強く相互作用していることを見出した(論文投稿準備中)。

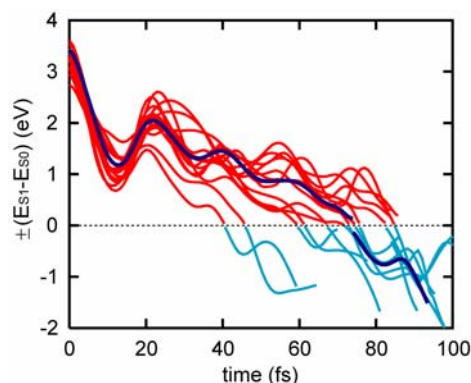


図 1  $S_1$ と $S_0$ 状態のエネルギー差の時間発展

さらに反応生成物の緩和過程のトラジェクトリを QM/MM-MD シミュレーションにより求め、その緩和過程に伴う光吸収エネルギーの変化を計算することにより、これまでのシミュレーション手法では困難であった超高速分光実験シグナルとの直接の比較を試みた。その結果、反応は 200 fs と数 ps の時定数を持つ二つの緩和で推移することを見出した。また後者の緩和では光吸収エネルギーの増加を伴っていることが見出された。これらの計算結果は、過渡吸収分光実験の知見と非常によく一致しており、得られたトラジェクトリの高い信頼性を示している。これまで、この二成分の緩和をめぐる中間状態の有無やその特徴が議論されてきたが、ここで得られたトラジェクトリの解析の結果、反応物生成は 200 fs までに動力学的な運動で完了し、そこで生じた熱の緩和が後者の光吸収エネルギーの増加を与えていることが見出された。このような動力学的な運動により、高い反応収率が可能となっている(論文投稿準備中)。

次に、bR において、初期過程である光異性化反応により発色団周辺のタンパク質環境の応答を分子レベルで解析した。bR は光駆動型プロトンポンプであり、光異性化に伴う発色団の構造変化により、吸収した光のエネルギーがどのような形でタンパク質に蓄えられているかを解明するのが、能動輸送の分子機構を理解する上で非常に重要である。本研究では、シミュレーションで得られた反応中間体モデルに対して振動解析を行うことにより、振動分光実験との対応を通して分子間相互作用の詳細を解析した。図 2 に光異性化反応前後のシッフ塩基周辺の構造と水及びシッフ塩基の O-D 及び N-D 伸縮振動の振動数を示す。計算された振動数は神取らの振動分光実験スペクトルを定性的に再現し、反応前では非常に振動数の低いモードが反応後には大幅に高振動数シフトしていることが見出された。これは、反応により水及びシッフ塩基の水素結合が大幅に弱められたことを意味している。さらなるエネルギー解析の結果より、このような水素結合の弱まりが、光エネルギー貯蓄に大きな役割を果たしていることが明らかにされた(Hayashi et al. 2004)。

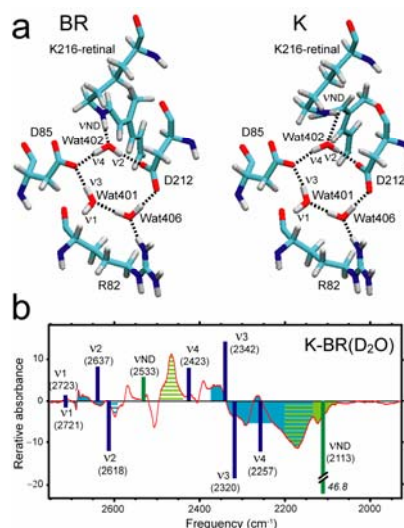


図 2 (a)bR の活性部位の反応前後の構造と(b)水及びシッフ塩基の振動数変化

## (2) DsbB ジスルフィド結合導入酵素によるジスルフィド結合生成とキノ還元の分子機構

最近、「生体分子の形と機能」さがけ研究者である稲葉らにより、DsbB ジスルフィド結合導入酵素のキノ還元過程の中間体において、キノ分子がピンク色に発色することが発見された。この発色現象は、キノ分子とジスルフィド結合交換に関わるシステイン残基の電子状態の顕著な変化を表していると考えられ、その理解はジスルフィド交換及びキノ分子の還元機能の分子機構に明解な知見を与えると期待される。そこで非経験的分子軌道法を用いて、稲葉らの生化学実験との密接な共同研究により、キノ発色をもたらす電子状態の解明とその機能に対する重要性を明らかにした(Inaba et al., 2006)。

稲葉らの変異体実験により、システイン残基とキノ分子のアルギニン分子を含む電荷移動錯体が示唆された。そこで、この推測される電荷移動錯体の発色電子状態を明らかにするために、非経験的分子軌道法を用いて、ベンゾキノ、チオレート及びアルギニン残基からなる電荷移動錯体分子モデルを構築した。得られた構造では、アルギニン残基により安定化されたチオレートアニオンがベンゾキノの  $\pi$  軌道と強く相互作用をしている。さらに、この分子モデルの電荷移動励起状態を MCQDPT 法により計算した。その結果、電荷移動励起エネルギーは実験で得られている吸収波長及び強い吸収強度を再現し、このような電荷移動錯体が中間状態の発色の分子起源となり得ることがわかった。

さらに、この電荷移動錯体からチオレートベンゾキノンに接近させることにより、安定な付加物複合体が形成されることがわかった。この付加物複合体生成過程では、チオレートアニオン上の電子がキノンの O 原子付近へ電子移動を起こし、その電子を安定化させるべくアルギニン残基も構造変化をしている。これらの結果より、図 3 のような DsbB のジスルフィド結合交換とキノ還元の効率的な反応モデルが提案される。二つのチオレートアニオンのみの反応では静電反発等の理由により困難であったジスルフィド結合生成が、キノン及びアルギニンとの電荷移動錯体や付加物複合体形成により効率的に触媒される。

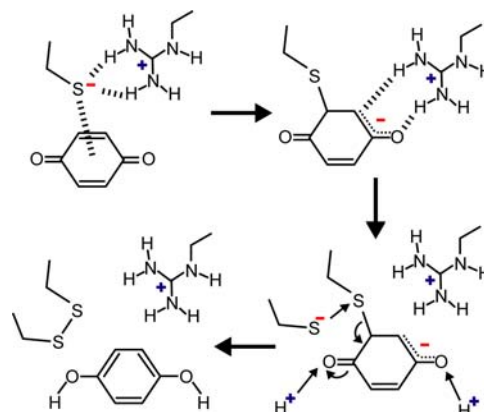


図 3 ジスルフィド結合交換及びキノン還元反応スキーム

### (3) F<sub>1</sub>-ATP合成酵素中のATP加水分解反応と化学-力学エネルギー変換の分子機構

F<sub>1</sub>-ATP 合成酵素は 3 つのβサブユニットにおける ATP の逐次的な加水分解によりγサブユニットの回転を引き起こすモータータンパク質であることが一分子測定実験により明らかになった。しかし、局所的な ATP 加水分解反応の化学エネルギーがどのように大域的なサブユニットの力学的エネルギーに変換されるかについては依然明かな理解が得られていない。そこで、QM/MM 法を用いて、F<sub>1</sub>-ATP 合成酵素中の ATP 加水分解反応の詳細を解析した(Dittrich et al., 2004)。

図 4(a)に計算により同定された反応遷移状態の構造を示す。特徴的なのは、γリン酸を求核攻撃する水分子に隣接する別の水分子がプロトンを受け取りH<sub>3</sub>O<sup>+</sup>となることにより、多中心の遷移状態となっていることである。このATP加水分解反応の反応性を、それぞれγサブユニットの回転前後に対応するATP及びADP結合部位において解析した。図 4 (b)に反応に伴うエネルギー変化を示す。ATP結合部位においては反応障壁が高く、また強い吸熱反応となった。これはγサブユニットの回転前ではATP加水分解反応は起こらないことを意味している。一方、ADP結合部位においては、アルギニン残基の相互作用(アルギニンフィンガー)により、反応障壁が下がり、またほぼ等エネルギー反応となった。この結果は、ATP加水分解反応がトリガーとなって回転運動が引き起こされるのではなく、他の空いている結合部位へのATP結合に起因するγサブユニットの回転によりATP加水分解反応が引き起こされ回転の一方向性を得る、という機構を示唆している。

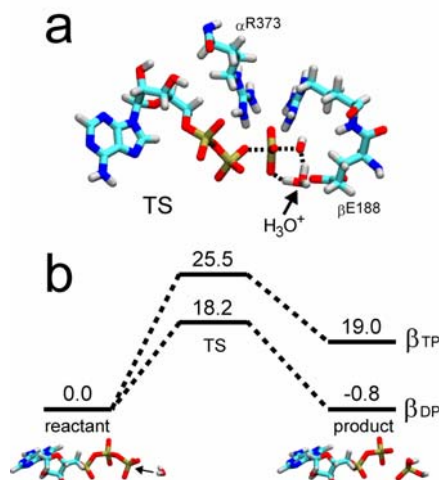


図 4 (a) 反応遷移状態構造と(b) 反応のエネルギープロファイル

### (4) ミオグロビン中の CO 分子解離経路の探索

タンパク質中のリガンド分子の局所的な化学反応は、タンパク質の構造変化と相関し、機能へと繋がっていく。従って、化学反応後の長時間にわたるタンパク質構造変化の解析は、機能の理解にとって重要である。しかし、現在の分子シミュレーションでは、200 残基程度の大きさのタンパク質の場合であっても 100 ns 程度のシミュレーションが限界である。そこで、長時間にわたる現象を記述する方法論の開発が必須となる。本研究ではその一つの試みとして、いわゆる adaptive biasing 法と conformational flooding 法を組み合わせた手法(AB/CF 法)を開発し、ミオグロビン中の CO 分子解離経路の探索に適用した(投稿準備中)。

CO 分子をヘム分子に結合したミオグロビンの光照射により CO 分子がタンパク質から解離することが知られているが、近年の研究により、CO 分子はタンパク質の外に出る前にヘムの近位側

のキャビティーに移動することが明らかになっている。しかしながら、その移動経路はわかっていない。また、移動の時定数は $\mu$ 秒に近く、分子シミュレーションで直接的にその移動を追うことができない。そこで、新たに開発したAB/CF法によりCO分子の移動を促進し移動経路を同定した。またこの手法では、得られた移動経路の自由エネルギーを三次元にマップすることが可能であり、移動のボトルネック領域が明快に同定される。同定されたボトルネック領域では、静的な結晶構造では明確な経路が見当たらず、熱揺らぎによるtransientな経路の開きが重要であることが示唆される。

#### (5) カルモジュリンのカルシウムイオン結合に伴う大域的構造変化

タンパク質の自発的な大域的構造変化の解析は、タンパク質機能発現の分子機構を理解する上で重要であるが、そのような構造変化の時定数は直接的な分子シミュレーションで追跡できる時間よりはるかに大きく、非常に困難な問題として残されている。我々は、タンパク質の大きな揺らぎの運動を加速する手法を開発し、カルモジュリンの大域的構造変化に適用している。現時点では、実験で得られているような構造変化に近いトラジェクトリサンプルが得られているものの、強い局所的相互作用によるトラップからの脱出に問題が残り、また再現性についても十分な確認がなされていないため、さらなる研究を進めている。

#### 5 自己評価:

本研究課題は、タンパク質機能における化学反応と大域的構造変化の分子機構の解明を目的として行われた。前者の化学反応の解析においては、我々の開発した手法の有用性が発揮され、分子シミュレーション研究の可能性を拡げることが出来たと考えている。特に、実験研究者との密接な連携により、個々のタンパク質機能の解明に向けて、理論・分子シミュレーションのアプローチによる確かな寄与が出来たと考えている。一方、大域的構造変化の解析に関しては、まだまだ途半ばである。F<sub>1</sub>-ATP合成酵素の研究のように、化学反応だけを見ることにより、化学反応と大域的構造変化に対するある程度の知見を得ることは可能であったが、構造変化そのものの詳細を分子シミュレーションから得る手法の開発は期間内には終了しなかった。この問題は、大域的な構造変化において、調和揺らぎを超えた動きの相関をどのように理解するか、というタンパク質ダイナミクスの本質的な問題を内包していると考えられる。解決に向けて更なる研究を進めていきたい。

#### 6 研究総括の見解:

さきがけ採択前に開発していたハイブリッド分子シミュレーション法を用いて、局所的な化学反応における電子状態の変化が、タンパク質の構造変化と機能発現を引き起こす様子の解析を行った研究であるが、本人評価の通り大域的な構造変化を解析する手法には至らなかった。光受容タンパク質などの化学反応解析では、従来シミュレーションより有用な手法であることを示したこと、および1期生の稲葉謙次研究者との領域内共同研究で、タンパク質ジスルフィド結合創生の基本化学原理を非経験的分子軌道法を用いて理論面から解明したことは評価できる。

#### 7 主な論文等:

発表論文 : 7 件

##### 主な発表論文

- (1) ATP hydrolysis in the b<sub>TP</sub> and b<sub>DP</sub> catalytic sites of F<sub>1</sub>-ATPase. Markus Dittrich, **Shigehiko Hayashi**, and Klaus Schulten. *Biophysical Journal*, 87:2954-2967, 2004.
- (2) Role of hydrogen-bond network in energy storage of bacteriorhodopsin's light driven proton pump revealed by ab initio normal mode analysis. **Shigehiko Hayashi**, Emad Tajkhorshid, Hideki Kandori, and Klaus Schulten. *Journal of the American Chemical Society (communication)*, 126:10516-10517, 2004.



- (3) Mechanism of color tuning in retinal proteins: SAC-CI and QM/MM study. Kazuhiro Fujimoto, Jun-ya Hasegawa, **Shigehiko Hayashi**, Shigeki Kato, and Hiroshi Nakatsuji. *Chemical Physics Letters*, 414:239–242, 2005.
- (4) Critical role of a thiolate-quinone charge transfer complex and its adduct form in *de novo* disulfide bond generation by DsbB. Kenji Inaba, Yoh-hei Takahashi, Koreaki Ito, and **Shigehiko Hayashi**. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA.*, 103:287–292, 2006.
- (5) Theoretical Studies on the Color-Tuning Mechanism in Retinal Proteins. Kazuhiro. Fujimoto, **Shigehiko Hayashi**, Jun-ya Hasegawa, and Hiroshi Nakatsuji. *Journal of Chemical Theory and Computation*. In press.

特許：なし。

受賞：なし。

招待講演：国際学会 7 件、国内学会 6 件

#### 主な招待講演

- (1) The 3<sup>rd</sup> Asian Conference on Ultrafast Phenomena (Beijing, China) 2004 年 3 月 18 日～19 日 **Shigehiko Hayashi**, Emad Tajkhorshid, and Klaus Schulten “Molecular dynamics simulation of bacteriorhodopsin’s photoisomerization using ab initio forces for the excited chromophore”
- (2) 11<sup>th</sup> International Conference on Retinal Proteins (Frauenchiemsee, Germany) 2004 年 6 月 20 日～24 日 **Shigehiko Hayashi**, Emad Tajkhorshid, and Klaus Schulten “Molecular dynamics simulation of bacteriorhodopsin’s photoisomerization using ab initio forces for the excited chromophore”
- (3) Pacifichem2005 Symposium “Photoisomerization Processes, Torsional Relaxation and the Hula-twist” (Honolulu, USA) 2005 年 12 月 15 日～20 日 **Shigehiko Hayashi** “Photoisomerization dynamics of retinal in rhodopsins studied by ab initio QM/MM MD simulations”
- (4) Theoretical Studies on Spectral Tuning and Photo-chemical Dynamics of Retinal Proteins (京都) 2006 年 5 月 27 日～ 29 日 **Shigehiko Hayashi** “Molecular Mechanism of the Primary Photochemical Reactions in Rhodopsin Photoreceptor Proteins”
- (5) 12<sup>th</sup> International Conference on Retinal Proteins (淡路) 2006 年 6 月 4 日～ 6 日 **Shigehiko Hayashi** “Theoretical Studies on Spectral Tuning and Photo-chemical Dynamics of Retinal Proteins”