

研究報告書

「中性子散乱と計算機科学の融合による蛋白質のドメインダイナミクスの解析」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 26 年 10 月～平成 30 年 3 月

研究者: 中川 洋

1. 研究のねらい

原子レベルでの蛋白質の立体構造情報に基づいて、ターゲット分子との相互作用や蛋白質が触媒する化学反応を理解しその予測や制御につなげるためには、蛋白質の構造変化や揺らぎを調べる必要がある。構造生命科学においては、この構造の柔軟性をどのように解明するかが重要な課題となる。蛋白質の機能発現は、ドメイン間の相対的な揺らぎなど大きな構造変化とカップルしていることが多い。ナノメートルおよびナノ秒のスケールで変化するドメイン構造の揺らぎや構造変化は、分子動力学計算(MD 計算)による研究は多いが、熱平衡状態におけるこのようなドメインダイナミクスを時間軸・空間軸からとらえることは既存の実験的計測手法では難しい。中性子非弾性散乱法の一つである中性子スピネコー法(NSE)では、小角散乱プロファイルの時間相関関数に相当する中間散乱関数が求まるため、小角散乱データに対して直接的なダイナミクス情報を与えることができる。しかし、このような実験手法で分かる蛋白質の溶液中の動態は、大雑把な形状やドメインスケールの低分解能なものである。一方で、MD 計算では、原子分解能で構造ダイナミクスの情報が得られるが、ドメインの動きなどが現実の動きを反映しているかは、実験と合わせる必要がある。したがって、MD 計算によって発生させた分子の動きを、中性子散乱実験データに基づいて動きを制限・補正するなど、実験と計算機を組み合わせた方法は、新たな動的構造解析法として有効である。本研究では、複数のドメインからなるマルチドメイン蛋白質のドメイン間の相対的な運動を観測するために、NSEとMD計算による相関構造解析法の開発を目指した。そして、低分解能の中性子溶液散乱実験と原子分解能の結晶構造のふたつの実験情報を、シミュレーション技術によって橋渡しをし、複数のドメインが織り成す蛋白質のドメインダイナミクスを、原子レベルから構造全体までを見通せる広い空間分解能で解明するための、新たな相関構造解析法とすることをねらいとした。

2. 研究成果

(1) 概要

エリスロポエチン受容体(EPOR)と UDP-N-acetylmuramoylalanine--D-glutamate ligase (MurD)をターゲット蛋白質として、NSEとMD計算を融合した相関構造解析法を開発した。ターゲット蛋白質には、結晶構造解析など既存の構造生物学研究である程度研究は進んでいるものの、動的構造情報が不十分なために構造を基盤とした機能解析に未解明な点が残るものを選んだ。中性子散乱には他の計測手法に比べ多量の試料が必要であり、また限られたマシンタイムの中で研究を完結させる必要がある。そのため MD 計算で中性子散乱の意義や実験条件を精査するとともに、NSEの予備実験として溶液散乱実験で試料条件や実験条件を検討した。このような手順そのものが、今後NSEを活用するプロトコルとして提示できると考え

た。具体的には、次の2つのテーマを研究した。

研究テーマ A: EPOR と MurD について、MD 計算で NSE がカバーする時空間領域にドメイン運動が観測できることを示した。 EPOR では、エリスロポエチン(EPO)が結合したホモ 2 量体のドメイン運動、弱いアゴニスト EMP1 の結合に伴うドメイン運動の変化、サイトカイン受容体に共通して見られる WSAWS モチーフとドメイン運動との関係について解析し、これら構造生物学的に未解決な動的構造を NSE で解析する重要性を示した。また、3つのドメインからなる典型的なマルチドメイン蛋白質である MurD では、主成分解析(PCA 解析)によって機能制御の理解に重要な運動モードを特定し、その実験的観測に NSE が重要であることを示した。特に、機能発現に伴う構造変化の中間状態といえる ATP 結合状態は結晶構造が解かれておらず、3つの状態におけるドメイン運動を NSE と MD 計算によって原子分解能で議論するための解析基盤を構築した。

研究テーマ B: MurD について、動的光散乱(DLS)・X 線小角散乱(SAXS)・中性子小角散乱(SANS)を用いて、NSE の試料調製条件(必要な精製度・濃度・温度)の検討、溶液蛋白質の構造因子や流体力学的相互作用が NSE のデータ処理にどのように影響するかを検討を行い、NSE の実験条件を決定した。 そしてアポ状態、ATP 結合状態、基質結合状態の NSE から、それぞれのドメイン運動を観測し、PCA 解析で得られた運動モードとの対応関係を解析した。一連の解析から、ATP 結合に伴うドメイン運動と結合部位のアミノ酸側鎖との動きの相関を見出した。また MD 計算で MurD のドメインの一部の重水素化が NSE 解析に有効であることを示し、部分重水素化の試料調製を行った。EPOR については試料調製が進まずテーマ B は未実施である。

(2) 詳細

研究テーマ A: MD 計算による NSE の意義の確立

MD 計算によりドメイン運動の解析や中性子散乱プロファイルなどの計算を行うことで、ドメイン運動を NSE によって追求できることを実証し、NSE で得られる自己相関データの生物物理的な意義を確立することを目指した。

A-1: ドメイン運動を NSE によって追求できることの実証

結晶構造だけでは蛋白質機能を説明しきれないのであれば、結晶中では起こらない溶液中の構造変化が NSE でどのように検出できるかの検討は有効である。EPOR と MurD のそれぞれで、結晶状態と溶液状態を計算機の中で構築し、MD 計算を行った結果、結晶状態ではドメイン運動が結晶場の影響で著しく抑制されていることが分かった。さらに、NSE から得られる中間散乱関数 $I(Q,t)$ を計算すると、溶液状態ではドメイン運動に由来する $I(Q,t)$ の減少が見られ、NSE が溶液状態におけるドメイン運動の観測に有効であることを実証した。

また PCA 解析によりモード毎のドメイン運動の特徴を調べた結果、EPOR では細胞外ドメインの膜側にある 2 つのドメインが接近したり離れたりするような開閉運動と互いにねじれるようなドメイン運動を見出した。これらドメイン運動は、20~40 Å の距離相関で、ナノ秒の時間スケールでの揺らぎであり、NSE で十分に検出できる時空間領域に収まることを確認し、さらに NSE プロファイルから得られる見かけ上の拡散係数 $D(Q)$ の Q 依存性と実際のドメイン運動の対応関係を明らかにした。MurD では、D1 と D3 の間の距離が変化する開閉運動と D1-D2

に対して D3 が回転するねじれ運動が見られた(図 1 左)。どちらの運動モードも NSE の時空間領域に収まる一方で、ねじれ運動に関しては MurD の構造全体の概形に大きな変化をもたらさないため、NSE では鋭敏には捉えにくいことが予測された。

EPOR と MurD とともに、部分構造の小角散乱プロファイルや NSE を計算することで、NSE で見える運動のアサインには、部分構造の観測、すなわち部分重水素化試料による実験が有効であることを示した。

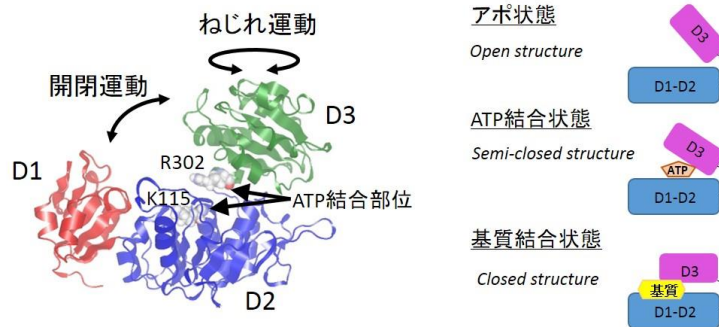


図1. MurDの構造とドメイン運動

A-2: NSE で得られる自己相関データの生物物理的な意義の確立

EPORでは結晶構造解析から2量体化が機能に必要なと考えられているが、ドメインの配向やその揺らぎも機能調節に寄与していると言われている。しかし、結晶構造解析のみならず既存の実験手法では動的構造の観測が困難であり、サイトカイン受容体の構造生物学において、このドメイン運動が未解明となっている。ここでは、サイトカイン受容体の保存配列である WSAWS モチーフと機能との関係に着目して MD 計算による解析を行った。このモチーフの変異体のドメイン運動の解析から、細胞膜側の2つのドメイン運動は、天然状態と比べると速くなるとともに互いに離れて揺らぐことが分かり、WSAWS モチーフはドメイン運動を適度に抑制することで2量体構造の安定性(構造の固さ)に寄与していることが分かった。またこのような揺らぎの変化は NSE の時空間領域内で変化するため、NSE による観測が MD 計算を実証するために有効であることを示した。これらの結果から、ドメインを構造単位とした複合体蛋白質の構造安定性と機能の解析に NSE が有効であることを示した。

MurD では PCA 解析の結果、ATP 結合状態はアポ状態と比べて D1 と D3 の距離が若干近くなり、また ATP 結合に伴ってねじれ運動が抑制されることが分かった。さらにこのねじれ運動と ATP 結合部位のアミノ酸(R302)の側鎖が連動して動いていることを見出した。したがって、この ATP 結合に伴うドメイン運動の変化を実験的に捉えることができれば、このモード解析を参照することで、原子分解能で活性部位の揺らぎの変化を予測することができることがわかった。また基質結合状態では D1 と D3 の距離がさらに近くなり、結晶構造と同様の構造になることが分かった。アポ状態、ATP 結合状態、基質結合状態の中で(図 1 右)、ATP 結合状態の結晶構造が解かれていないが、MD 計算からは ATP 結合状態は、D1 と D3 の距離はアポ状態と基質結合状態の中間状態にあると予測され、溶液構造とドメイン運動の実験的解析による実証の必要性が示された。

研究テーマ B: NSE と MD 計算による相関構造解析法の確立

MurD について、実験により NSE に向けた試料調製や実験条件の検討を行い、NSE の測定を行った。また、MD 計算によるモード解析を活用し、NSE データの解釈を行った。EPOR につ

いては試料調製が完了しなかったためテーマ B は実施できなかった。

B-1: X 線小角散乱(SAXS)による溶液構造解析

MD 計算と実験の一致度を確認するために、アポ状態、ATP 結合状態、基質結合状態の SAXS 実験を行い、MD 計算から計算される小角散乱プロファイルと比較した。その結果、両者のプロファイルの特徴は概ね良い一致を示し、平衡状態を MD で再現できていることから、実験データと MD 計算の融合解析が合理的に進められることを確認した。

B-2: NSE のための試料条件および実験条件の確立

動的光散乱(DLS)・X 線小角散乱(SAXS)・中性子小角散乱(SANS)を用いて、NSE の試料調製条件(必要な精製度・濃度・温度)の検討、溶液蛋白質の構造因子や流体力学的相互作用が NSE のデータ処理にどのように影響するかの検討を行い、NSE の実験条件を決定した。その結果、構造因子や流体力学的相互作用は～10mg/ml 以上の高濃度では影響が出るものの、ドメイン運動が寄与する Q 領域では解析へ影響が少なく、むしろできるだけ高濃度で NSE シグナルの統計を優先する方が現実的かつ効果的であることが分かった。また中性子散乱実験のため、合計～2g程度の MurD の大量発現・精製を行った。

部分重水素化に向けた検討を行った。具体的には、MurD の一部を切り出した部分ドメインでの溶液構造の安定性などを DLS や SAXS で確認した。D3 については精製量が若干少なくなるが、D1-D2 と D3 の SAXS 実験を行った結果、いずれも安定した溶液構造を取ることを確認した。ペプチドのライゲーション反応系構築に必要なペプチドリガーゼ発現系を構築した。部分重水素化に向けた本格的な実験はまだこれからである。

B-3: NSE 実験およびモード解析に基づいた NSE データの解析

アメリカ国立標準技術研究所(NIST)の NSE 装置に実験申請を行い、「アポ状態と ATP 結合状態のドメイン運動の違い」、「この2状態と基質結合状態のドメイン運動の違い」の解析を行った。NSE の実験データは $I(Q,t)=\exp(-DQ^2)$ でフィッティングし、見かけ上の拡散係数 $D(Q)$ の Q 依存性からドメイン運動を解析した。その結果、アポ状態から ATP 結合に伴って全体としては $D(Q)$ に顕著な変化は見られなかったものの 0.14 \AA^{-1} あたりに $D(Q)$ の減少が見られた。 $D(Q)$ の減少は、何らかのドメイン運動の抑制が示唆される。アポ状態と ATP 結合状態の PCA 解析からは、この抑制されるドメイン運動はねじれ運動であると考えられるが、一方で、研究項目 A-1 での考察からはねじれ運動の NSE シグナルに対する寄与は小さいことが予測される。今後は、運動モードによって NSE シグナルに対する寄与の大きさや Q 依存性がどのように異なるかを解析することで、ATP 結合によって抑制される運動モードの実態を明らかにする。

また基質結合に伴い全体的に $D(Q)$ の減少が見られた。基質結合状態の試料調製では、溶液に基質を溶解させるために DMSO を添加している。DMSO の添加により溶媒の粘性が大きくなることで蛋白質全体の重心拡散運動は抑制されるが、拡散に対する粘性の影響であれば Q に依存しないため一定値で補正できる。しかし、粘性の違いを考慮しても変化が見られ、 $D(Q)$ はアポ状態や ATP 結合状態と比べて小さくなるためドメイン運動の抑制が実験的にも分かる。ここでも抑制されるドメイン運動のアサインを今後行う。

一般的な振動分光法ではサブ Å の微小な構造変化には鋭敏であるが、数 Å・数ナノ秒の時空間スケールのアミノ酸側鎖の溶液中での揺らぎを捉えることはかえって難しい。一般的に PCA 解析で得られる低次元モードは、アミノ酸配列依存的な揺らぎであることも特徴である。研究項目 A-2 では、例えば、ねじれ運動と ATP 結合部位のアミノ酸側鎖との動きの連動性を

見出している。したがって、ドメイン運動を NSE で実験的に捉えることができれば、ドメイン運動をプローブとして局所の構造変化を実験データに基づいて議論する道筋をつけることになる。

B-4: 基質結合状態の基質除去後の構造緩和～準安定構造とドメイン運動～

タイトにドメインが閉じた状態にある基質結合状態から、基質を取り除いた後の変化を MD 計算し、そのトラジェクトリーを PCA 軸にマッピングしたところ、アポ状態に至る過程で、準安定状態が見つかり、ATP 結合状態に対応することが分かった。このことは MurD の立体構造のエネルギー地形に ATP 結合状態の安定点が記述されていることを示唆するものである。また構造変化の過程では、開閉運動の PCA 軸において、構造が開く方への構造変化が見られるが、ねじれ運動はあまり生じない傾向にあることが分かった。

3. 今後の展開

PCA モード毎に中間散乱関数を計算し、NSE シグナル全体に対する各モードの寄与率を評価する。そして、本研究で目指す相関構造解析を確立させるためには、NSE データに基づいてドメイン運動をどの程度の精度で解析できるかを定量的に示すことが必要であると考えている。これまで報告のある NSE による蛋白質のドメイン運動の解析では、実験データのみの解析あるいは計算科学を利用した場合には基準振動解析が主体となっていた。本研究では、NSE データ解析における MD 計算の有効性を示せたため、引き続き MD 計算を積極的に活用した解析を進めていく。また MurD は NMR の PCS 解析の先行研究があり、この研究データをサポートできたため、今後、NMR などの手法も合わせた相関構造解析へつなげる。部分重水素化については、NMR などの技術を参考に中性子に利用可能な形で戦略を組み立て、確立させる。ここで目指す部分重水素化技術が確立すれば、中性子を用いた構造生物学研究に広く活用が期待できる。NSE のみならず汎用性という観点では中性子小角散乱への利用価値は非常に高いと考えており、その活用範囲は広がる。中性子・計算科学・NMR の専門家との共同研究を活性化させることで研究を進める。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

・研究目的の達成状況:

MD 計算を活用した中性子散乱実験の検討は大きく進展があった。特に PCA 解析によるモード解析を活用したドメイン運動の分類は、NSE データを解釈する有効な手段となった。また活性部位の局所的なアミノ酸残基の揺らぎと連動したドメイン運動の抽出を行うことで、NSE データに生物物理的な意義を与えることができた。当初 EPOR の試料調製で時間が過ぎてしまった。MurD に切り替えてからの 1 年半の進捗を考えれば、もう少し早くに取りかかっていたら研究の達成度も変わっていたのではとも考えているが、EPOR の実験意義は明確になっているため、さきがけ期間後に再度チャレンジすることでこれまでの解析結果を活かしたい。NSE 実験に関する条件検討は十分に行えたこともあり、2度の海外実験では精度良いデータの取得に成功し、また機能を議論するために必要な条件での実験データも取得できたことは、限られたマシンタイムでNSEによる研究を今後進めていくための重要な方針を決定できたこと

えている。またモード毎の NSE の寄与の見積りは定性的な解析にとどまっており、NSE と MD 計算の真の融合解析には至っていない。今後、MurD の各状態のデータについて MD 計算結果を駆使しながら定量的に解析していくことが本研究課題を完結させるために必要と考えている。重水素化については、D2 ドメインのみの重水素化を目指したため、D1 と D2 の間と D2 と D3 の間の2箇所のライゲーションが必要であり、やや難易度の高い方法となった。まずは、ライゲーション箇所を 1 ヶ所に絞った部分重水素化で結果を出すことで、段階的に進めてもよかったかもしれないと反省している。

全体としては個々のテーマにおいては未達成の課題も残されているが、MD 計算から推定される蛋白質の動的構造の構築原理の知見に基づく中性子・計算機科学を融合した革新的技術シーズの創出の手掛かりをつかみ、中性子・計算機科学(および NMR の先行結果)をシームレスにつなげ、ドメインと局所が連動した階層構造ダイナミクスの普遍的原理の解明に一歩近づいたと考えている。

・研究の進め方(研究体制および研究費執行状況):

研究期間中に所属研究機関の大幅な組織変更があり、生命科学系のグループが別法人に移管されることになった。私は別法人には移動しなかったが、これは、中性子関連施設そのものは移管されなかったための判断であったが、その影響もあり、生化学に関する研究課題で大幅な停滞が生じた。新たに所属した研究グループで遺伝子組換え実験を含めた本研究に必要な生化学実験環境をゼロから構築するために、多少時間を要したが、経済的にもさきがけのサポートは大きく、結果的に良好な研究環境を構築することができ、研究期間後半では加速度的に進めることができた。また所属グループでは、実質的に独立した体制で研究を進めることができ、新たに実験補助員と2人体制で研究を進めた。実験補助員がいることで、学会などで現場を離れても、ルーティンワークとなる実験を中断する必要がなくなったのは大変助かった。ある程度自由に使える研究スペースが与えられたため、実験だけでなく計算機室の整備を行い、さきがけ研究をスムーズに行うための環境整備を行った。研究環境の移行期間において、蛋白質発現などの実験は組織内の別のグループの実験室をお借りできたことは非常にありがたかった。

上記に述べたように研究環境が一度全くのゼロにリセットされてしまったため、研究費執行は、基本的な生化学実験機器などを購入して研究を軌道に乗せた。また計算機環境の拡充により MD 計算が進展した。このように独立した研究環境が整ったことにより、結果的に以前より良好な研究環境を確保できた。その他、消耗品などの費用も含めて適切に執行された。

・研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果(今後の見込みを含む):

共通の目的意識を持った共同研究者、特に中性子生物学の研究者と密に連携をはかり、さきがけ研究期間の後半には、学会でのシンポジウムを提案したり、J-PARC での国際ワークショップを開催したりするなど、当該学術領域の活性化につながっている。本研究課題のような考え方が分野の活性化にもつながり、このような中性子科学における生命科学研究への具体的な波及効果も生まれている。

中性子散乱実験には、大量の試料が必要であることが構造生命科学の研究においてネックになることが当初より指摘されていた。NSE の情報はユニークであることから、他の手法では観測できない情報に焦点を絞って、如何に限られた実験情報から計算機によって構造生物学的に意味のある情報に変化するか、ということが今後も課題になると考えている。本研究課

題はまだ道半ばではあるが、学術的にはそのようなデメリットを凌駕するメリットがあることをある程度提示できたと考えている。構造生命科学が対象とする無数の生命現象や医学・薬学に関する諸問題をしらみつぶしに中性子で解析することは現実的ではない。今後は本研究課題のみならず、構造化学的に重要と考えられる典型的な問題解決の成功例をいくつか提示することで、蛋白質の動的構造の基本原理に迫り、いわゆる直接的に”役に立つ”研究というよりも、蛋白質科学の基礎的な学理の構築に貢献していくことが、構造生命科学において中性子科学が担う役割だと考えている。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

MD 計算を活用した中性子散乱実験の検討は大きく進展があった。構造生命科学さきがけ研究領域内部でのコラボの結果であり、コンベンショナルな中性子を扱って PCA 解析によるモード解析を活用したドメイン運動の分類は、NSE(中性子スピンエコー)データを解釈する有効な手段となった。また活性部位の局所的なアミノ酸の揺らぎと連動したドメイン運動の抽出を行うことで、NSE データに生物物理的な意義を与えることができたことは大きい。領域会議等での指摘を受けて生物試料を EPOR から MurD に切り替えてから大きく進捗した。NSE を用いたタンパク質のドメイン間ダイナミクスを対象とした本研究の目指す新たな研究手法の確立のためには、やはりターゲットがとても重要であることが再認識され、着実な成果と言える。SANS(中性子小角散乱)についても、少ない海外実験でのビームタイムのなかよく健闘し、今後の発展に希望の持てる段階まで仕上げる事ができたことは高く評価される。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. H. Seto, S. Itoh, T. Yokoo, H. Endo, K. Nakajima, K. Shibata, R. Kajimoto, O. Ohira-Kawamura, M. Nakamura, Y. Kawakita, H. Nakagawa, T. Yamada, Inelastic and quasi-elastic neutron scattering spectrometers in J-PARC, *Biochimica et Biophysica Acta*, (2017) 1861, 3651-3660.

(2) 特許出願

研究期間累積件数:0 件

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

主な招待講演

- ・中性子散乱と計算化学の融合、中川洋、光武垂代理、2015年3月26日、平成26年度第2回生物構造学研究会
- ・Protein dynamics and hydration studied by inelastic neutron scattering and molecular dynamics simulation, H. Nakagawa, 2nd Asia Oceania Conference on Neutron Scattering、Keynote lecture in the session on Biological Science and Technology
- ・Correlative dynamical analysis of bio-molecules – quasi-elastic neutron scattering and

computational analysis、Neutron Biology for Next Generation – starting at future –、講演者
兼オーガナイザー

- ・Analysis of protein domain dynamics by integrating of neutron scattering and computer science 第 55 回日本生物物理学学会年会、シンポジスト兼オーガナイザー

受賞

- ・日本中性子科学会第 12 回奨励賞（2014 年度）

総説

- ・中性子で展開される生命科学とその周辺のサイエンス、「加速器」13, 4, 214-219, 2017
- ・中性子散乱による生体分子の構造ダイナミクス研究、日本物理学会第 72 回年次大会
- ・M. Sugiyama, H. Nakagawa, R. Inoue, Y. Kawakita, Neutron Biology for Next Generation, JAEA-Review (2017) 24, 1-46.

アウトリーチ活動

- ・サイエンスカフェ「魅力度ランキング最下位ってホント！？～中性子で探る生命の謎から食文化まで、魅力いっぱいの茨城～」(2016 年 3 月 19 日、東海村産業・情報プラザ)