

## VIII 生命物理グループ

准教授 舘野賢

助教 庄司光男

大学院生 (8名)

### 【1】 RNA・タンパク質複合体系 (アミノアシル tRNA 合成酵素、DNA メチル化酵素)

アミノアシル tRNA 合成酵素(aaRS)は実際の生命の持つ酵素であり、タンパク質生合成の過程で重要な役割を果たす。しかしながらその完全な立体構造は未だ解かれておらず、酵素反応機構も未だ明らかにされていない。われわれは aaRS の中でもアミノ酸の一種であるイソロイシンに特異的に反応活性を持つイソロイシル tRNA 合成酵素 (IleRS) に注目し、これまで立体構造が解かれていた低分解能全体構造と反応活性を持つドメインのみの高分解能立体構造を理論的に組み合わせて、IleRS 全体の全原子立体構造を構築することを試みた。

ホモロジーモデリングを行い、全体の立体構造に対してドメイン部分の立体構造を当てはめることでタンパク質の立体構造予測を行った。次に、その構造に対して分子動力学計算を行い、より適切な構造を構築した。

それにより IleRS におけるイソロイシン基質の分子認識機構について明らかにした。とくにこの酵素はアミノ酸の中からイソロイシン基質だけを認識する過程を担っており、この過程を解明できたことはタンパク質合成過程においてきわめて重要である。また、この立体構造を理論的に構築できたことで、より高精度な計算手法 (QM/MM 法等) を適用することがはじめて可能となり、より詳細な化学反応過程を探求できるようになったことも極めて大きな進展である。

一方、DNA メチル化酵素は DNA 分子内のシトシンやアデノシンをメチル化する酵素であり、バクテリアから哺乳類まで広く存在し、細胞分化や遺伝子制御などにおいて重要な役割を果たしている。Haemophilus haemolyticus が有する M.HhaI は、塩基配列 5'-GCGC-3' を特異的に認識し、5'側のシトシンの C5 炭素原子にメチル基を付加する。Bruce らによる理論的解析によれば、Glu119 からこのシトシンの N3 原子へのプロトン移動については、エネルギー障壁 (2.2 kcal/mol) およびプロトン移動前後のエネルギー変化 (-0.7 kcal/mol) が低く見積もられ、Glu119 は反応に寄与しないと報告された。ところが速度論的測定によれば、Glu119 の変異体の活性は著しく低下し、重要なアミノ酸残基であることが示唆されている。われわれは、これらの矛盾を解決するために

QM/MM 分子動力学計算を用い、Glu119 の機能的な役割を解析した。その結果、前述のプロトン移動における活性化エネルギー (8.1kcal/mol) と移動前後のエネルギー変化 (-2.2kcal/mol) は Bruce らの結果と著しく異なり、実験結果とよい一致をみた。HhaI DNA メチル化酵素特有の反応機構の詳細について解明を行った。

## 【2】タンパク質の DNA 認識とその電子構造の制御機構

生体内においては一般に、DNA の周囲に溶媒 (水分子) が存在するが、転写因子 (タンパク質) が DNA に結合すると、DNA の一部の塩基は、転写因子によって溶媒 (水) からマスクされる。溶媒が離れた (タンパク質が結合した) 塩基の分子軌道は、エネルギー順位が変化し、一般により不安定になることを見出した (その塩基内の分子軌道のエネルギーが上昇する)。そこでさらに、DNA の表面が溶媒に露出している面積 Solvent Accessible Surface Area (ASA) を計算し、溶媒と DNA との相互作用を定量化した結果、上記の分子軌道エネルギー順位の上昇との間に、密接な相関 (線形性) が存在することを初めて導いた。これは、DNA をリガンドとする酵素などの反応・機能のしくみを解析するなどの目的にも、新しい視点を提供するものである。

以上は、DNA-タンパク質複合体の全体を、ハイブリッド QM/MM 計算によって取り扱うことで初めて可能となった (同じ対象を、複数の異なる QM/MM スキームによって計算し、それらの電子構造を比較)。これらの解析は複合体全体の FullQM 計算や、一部分を取り出した QM 計算では不可能である。

## 【3】カチオン (プラスイオン) と $\pi$ 電子との相互作用

阪大のグループによって、2009 年タンパク質構造内部に、 $\pi$  電子と  $\text{Na}^+$  イオンとの結合が初めて見出されたが、( $\text{Na}^+$  イオンではなく) 水分子の結合である可能性が否定できなかった。我々は、阪大の研究者と共同で、見出された電子密度が  $\text{Na}^+$  イオンであることを示した。その後さらに、 $\text{Na}^+$  イオンを水に置き換えると、タンパク質構造が不安定になることも示し、その原因についても解明した。

このようなカチオン・ $\pi$  電子相互作用は、医薬品がタンパク質に結合する際など、一般に広く見られると考えられ、きわめて重要な相互作用である。しかしながら、その立体構造や相互作用についてはこれまで明らかにされていなかった。本研究ではその存在の証明と、新しい機能単位の発見、さらにその機能的な役割と仕組みについて解明できた為、極めて重要であると考えられる。

## 【4】ヘモグロビンの立体構造および水和構造の変化による酸素親和調節機構

ヘモグロビンは酸素濃度が高く CO<sub>2</sub> 濃度が低い肺(酸素の吸着)から、逆に、酸素濃度が低く CO<sub>2</sub> 濃度が高い組織(酸素の放出)へと酸素を運搬するタンパク質である。酸素の吸着と放出という異なる機能を一つのタンパク質で実現するためにヘモグロビンには酸素親和調節機能が備わっている。ヘモグロビンは 4 つのタンパク質(サブユニット)が会合した構造をとるが、このサブユニット間のコミュニケーションが酸素親和調節に重要であることが知られている。

タンパク質の構造と機能の研究の歴史の初期の段階におけるもっとも重要な研究は M. F. ペルツによるヘモグロビンの結晶構造の解明(1962年ノーベル化学賞)である。さらにペルツは酸素結合型と酸素非結合型ヘモグロビンの立体構造の違いから酸素親和調節機構を説明した(ペルツの機構, 1971年)。これはタンパク質の構造と機能の関係の最も代表的な例として浸透しており、生化学の教科書で必ず触れられるテーマでもある。

しかし、近年の実験でペルツの機構だけでは説明のつかない酸素親和調節が観測されるようになった。我々の研究の最終的な目的はヘモグロビンの酸素親和調節機構の謎を解明することである。

我々は古典力場による分子動力学計算を用いてこの問題にアプローチした。近年の計算機の性能の進歩は、より規模の大きい長時間のシミュレーションを可能にしたが、その一方で計算の精度はないがしろにされてきた。実際に、ヘモグロビンに対して行われた分子動力学計算では酸素非結合型が酸素結合型の構造に遷移するという多くの実験と矛盾する結果が報告されている。一方で、我々の計算の特徴は計算精度の向上を目指した点にある。

まず我々が行ったのは計算初期の水和構造の最適化である。タンパク質の分子動力学計算では通常、一分子を立方体の溶媒ボックスの中に埋めて、これを周期的境界条件でつなぐことで、実際の溶液中に近い状態を実現している。しかし、一般的な手法で溶媒水を配置するとヘモグロビンの場合、サブユニット間の空孔に十分な溶媒が配置されず結果として立方体の溶媒ボックスが欠けてしまうという問題があることが分かった。我々は初期の水和構造を最適化することによりこれを解決した。

また、分子動力学計算に用いる力場の評価を行い、ヘモグロビンの分子動力学計算に最も適切な力場を検証した。同時に従来いくつかの力場ではタンパク質中に一般に存在するグリシンのコンフォメーションを再現することが困難であることを示した。

こうした計算の精密化は我々に非常に重要な結果をもたらした。我々はヘモグロビンの水和構造の精密な解析を行い、結果としてサブユニット間の水を含んだ相互作用ネットワークを発見し、これに基づき全く新しい酸素親和調節機構を提案した。これは酸素の

結合により一つのサブユニットに起きた変化が少しの構造の変化と上記のネットワークを介して全てのサブユニットに伝搬し酸素親和性を変化させるというもので、現状報告されているモデルと実験の矛盾を説明する唯一の分子機構である。

さらに、ここまでの研究で確立したヘモグロビンの分子動力学計算のスキームを用いて酸素結合型、酸素非結合型のヘモグロビンに対して長時間の分子動力学計算を行った。剛体モデルを用いた解析によると確かに酸素非結合型のサブユニットの配置は酸素結合型に近づくが、一方で溶液中の実験的に報告されている酸素非結合型の相互作用をよく保存していることが分かった。これは、上記の変化が、初期構造として用いた結晶構造が溶液構造へと緩和する遷移である可能性を示唆している。

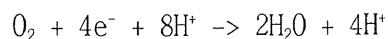
しかし、この構造が最終的な溶液構造なのか、あるいはまだ緩和の途中にあるのかは上記の計算から判断することは困難であり、さらなる大規模なサンプリングが必要である。この点を改善したうえで我々の提案する酸素親和調節機構はさらに検証されなければならない。そのためにはより精度の高い力場が必要になる。現状の生体高分子の力場はファンデルワールス相互作用、特に $\pi$ スタッキングの再現に問題を抱えている。これは二重らせんDNAの塩基の積み重なり等に見られる相互作用でDNAやタンパク質の安定性に寄与している相互作用である。

上記の問題を解決した上で大規模なサンプリングを行うための基礎として、より分子量が小さくサンプリング空間が限られた蛋白質 Trp-cage に対して折り畳みシミュレーションを行った。タンパク質の折り畳みとは、特定の立体構造を持たない一本のペリペプチド鎖を溶液中で存在する構造へと折り畳むことであり、最も再現が困難なシミュレーションの一つである。この計算では我々が開発したスタッキング相互作用の改良力場とレプリカ交換分子動力学法とを組み合わせ用いた。

結果として我々の手法により、従来の力場よりも高い精度で溶液構造を再現することに成功した。これはヘモグロビンも含めた他のタンパク質にも応用可能な手法であり、さらなる研究の発展が可能となった。

## 【5】タンパク質と遷移金属の複合体の有効ポテンシャル場の開発と応用

シトクロム c 酸化酵素(COX)は生体内で呼吸(Respiration)に関連し、ミトコンドリアで酸素を水に還元する反応を担っている。この反応は



であり、電子移動とプロトン移動がカップルする反応である。反応には8プロトンが関わっており、化学反応に4プロトンが消費され、内膜への輸送に4プロトンが用いられる。生成される内膜のプロトン濃度勾配は生体内エネルギー源として用いられるATPの

合成(ATPase)に使われる。一方で、電子移動については COX は Cytochrome c から電子 ( $e^-$ )をもらい、金属中心(CuA, heme a)を順に伝わって、反応中心である heme a<sub>3</sub>-CuB に移動する。

COX における反応機構を解明するには QM/MM 分子動力学法を行うことが必要であるが、そのためにはまずその分子力場を作成することが必要である。構成アミノ酸については既に汎用力場が存在するが、金属中心についての力場は存在しない。そのため、金属中心 (CuA) に対する力場生成を行う事から研究を始めた。

密度汎関数法(DFT)による CuA のポテンシャル曲面と一致するように以下のポテンシャル関数のパラメータを決定した。

$$U = \sum_{bonds} K_b (r - r_0)^n + \sum_{angles} K_a (\theta - \theta_0)^2 + \sum_{torsion} \frac{V_n}{2} [1 + \text{Cos}(n\phi - \gamma)] \\ + \sum_{i,j} \epsilon_{ij} \left[ \left( \frac{R_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - 2 \left( \frac{R_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \sum_{Coulomb} \frac{q_i q_j}{r_{ij}}$$

通常の MD 計算では n=2 が使われるが、n=4 の自由度も必要となることが分かった。これにより力場の精度を著しく向上させることが出来た。本研究を用いれば、高精度な QM/MM 計算が可能となる為、プロトン移動過程や、酸素還元過程が解明できる。現在研究を進展させている。

## 【6】細胞のシグナル情報伝達の数学的モデル (分子数理モデル)

生体内の化学反応ネットワークシステムは Stiffness が厳しく、微分方程式を数値的に解くこと自体が困難である場合も多い。ましてや、その解の安定性の解析は極めて困難である。しかし、生物学的に重要であるのは、(その時間発展よりも) 定常状態である場合が多くある。そこで、微分方程式を(定常状態の)代数方程式に変換することによって、その安定性を詳細に解析するための、新しい手法を提案した。これを応用することによって、フィードバック・ループを含むシグナル情報伝達ネットワークを解析し、ガン化などに至る、生物機能の新しい分子機構を提案した。

## 【7】バイオ・インフォマティクス技術の開発と応用

現在、生命科学では、個々の遺伝子ごとではなく、「ゲノム全体の遺伝子機能情報を一度に解析する」実験手法が、飛躍的に発展中である。例えば、iPS 細胞の諸々の問題は、遺伝子発現ネットワークにその根源があり、実用化に向けた課題の解決が不可欠である。同様に、生命科学上の様々な課題に、こうした実験手法が応用されつつある。こ

のような最先端の技術の解析には、情報科学（多変量解析）が必須であり、生命科学との融合が不可欠となっている。

我々は転写因子が認識する DNA 塩基配列を、自動的かつ高精度に予測するパターン認識システム（塩基配列モチーフの同定システム）を開発することに成功した。本方法は発がん機構や iPS 細胞，再生医療技術へ応用することができるため、新たな統合的生命科学を拓けると考えている。

<論文>

1. Hagiwara Y, Kino H, Tateno M.: Modulation of electronic structures of bases through DNA recognition of protein. *J Phys Condens Matter*. 22(15), 152101(2010).
2. Hagiwara Y, Tateno M.: Recent advances in jointed quantum mechanics and molecular mechanics calculations of biological macromolecules: schemes and applications coupled to ab initio calculations. *J Phys Condens Matter*. 22(41), 413101(2010).

<学位論文>

なし

<講演>

1. Masaru Tateno, A Computational Study of Catalytic Mechanisms of a Protein-RNA Hybrid Enzyme, April 22-24, 2010 Shanghai, China.
2. 舘野 賢, タンパク質機能の理論解析, 蛋白質の機能－構造相関解明のための精密構造解析とその方法 ～水素原子から細胞まで, 2010/10/6-7, 大阪大学蛋白質研究所
3. Tatsunori Nishimura, Theoretical characterization of elementary reaction cycles exploiting the steepness of the stimulus/response curve, International Conference on Computational and Systems Biology: ICCSB, Hangzhou, China, 2010/10/22-24.
4. Masaru Tateno, Development and application of hybrid quantum mechanics (QM)/molecular mechanics (MM) molecular dynamics calculation system implemented on massively-parallel supercomputers by interfacing QM and MM engines International Conference on Computational and Systems Biology: ICCSB,

Hangzhou, China, 2010/10/22-24.

5. Masaru Tateno, Investigation of Functional Mechanisms of Biological Nano-machines Exploiting Computer Simulations from Dynamical Electronic Structure to Reaction Network System, Annual World Congress of Nanomedicine 2010, Oct 23-25, Beijing, China
6. MoonYoung Yang, Masaru Tateno, Computational investigation of catalytic mechanisms of HhaI DNA methyltransferase, BMB2010 (第 33 回日本分子生物学会年会 第 83 回日本生化学会大会 合同大会), 2010 年 12 月 7 日-12 月 10 日, 神戸.

<ポスター発表>

1. ○花岡 恭平、館野 賢、ヘモグロビンの溶媒構造の同定を目指した計算科学的解析、第 10 回日本蛋白質科学会年会, 2010 6/16, 札幌.
2. ○佐藤 皓允、萩原 陽介、館野 賢、イソロイシル tRNA 合成酵素 によるエディティング反応機構の計算科学的解析、第 10 回日本蛋白質科学会年会, 2010 6/16, 札幌.
3. ○館野 賢、松村 浩由、○萩原 陽介, The grid-based energy representation: a novel description of the potential field involving Na<sup>+</sup> - $\pi$  interaction、第 10 回日本蛋白質科学会年会, 2010 6/16, 札幌.
4. 萩原 陽介、Martin J. Field、濡木 理、○館野 賢、A hybrid ribozyme/protein catalyst : a computational investigation of editing mechanism of aminoacyl-tRNA synthetases、第 10 回日本蛋白質科学会年会, 2010 6/16, 札幌.
5. ○梁 文榮、萩原 陽介、館野 賢、HhaI DNA メチル化酵素の反応機構の計算科学的解析、第 10 回日本蛋白質科学会年会, 2010 6/16, 札幌.
6. ○カン ジョン、太田 雄大、萩原 陽介、西川 佳吾、山本 哲徳、長尾 秀実、館野 賢、タンパク質の遷移金属結合活性サイトにおける電子構造: QM/MM 計算による解析、第 10 回日本蛋白質科学会年会, 2010 6/16, 札幌.
7. ○MoonYoung Yang and Masaru Tateno, Computational investigation of catalytic mechanisms of HhaI DNA methyltransferase, HhaI DNA メチル化酵素 の反応機構の計算科学研究, 第 33 回日本分子生物学会年会 第 83 回日本生化学会大会 合同大会, 2010 年 12 月 7 日-10 日, 神戸.
8. ○MoonYoung Yang, Yohsuke Hagiwara, Masaru Tateno, Computational analysis of reaction mechanisms of HhaI DNA methyltransferase, HhaI DNA メチル化酵素 の

反応機構の計算科学的解析, 第48回日本生物物理学会年会, 2010年9月20日-22日, 東北大学.

9. ○A. Sato, Y. Hagiwara, M. Tateno: “Computational Investigation of Catalytic Mechanisms of Editing by isoleucyl-tRNA Synthetase”, 第48回日本生物物理学会年会、2010年9月20日-22日、東北大学.
10. ○Kyohei Hanaoka, Jiyoung Kang, Takashi Yonetani, and Masaru Tateno, Computational analysis of dynamical structures of Human adult hemoglobin, ヒトヘモグロビンにおける動的構造の計算科学的解析, 第48回日本生物物理学会年会, 2010年9月20日-22日, 東北大学.
11. ○Ryoh Nakaki, A novel computational system for identification of transcriptional regulation motifs in genome DNA base sequences, International Conference on Computational and Systems Biology: ICCSB, Hangzhou, China, 10/22-24.
12. ○Jiyoung Kang, Computational explorations of electronic and geometrical structure of heme a and heme a<sub>3</sub> in the bovine cytochrome c oxidase, International Conference on Computational and Systems Biology: ICCSB, Hangzhou, China, 10/22-24.
13. ○Masaru Tateno, Evaluation of efficiency of a novel algorithm for accurate estimation of metal-p interaction energy International Conference on Computational and Systems Biology: ICCSB, Hangzhou, China, 10/22-24.
14. ○Kyohei Hanaoka, Jiyoung Kang, Takashi Yonetani, and Masaru Tateno, Molecular dynamics simulation of human adult hemoglobin, ヒトヘモグロビンの分子動力学計算, 第33回日本分子生物学会年会 第83回日本生化学学会大会合同大会, 2010年12月7日-10日, 神戸.
15. ○A. Sato, M. Tateno: “Computational Exploration of Mechanisms of Editing Reaction by isoleucyl-tRNA Synthetase”, BMB2010(第33回日本分子生物学会年会 第83回日本生化学学会大会 合同大会), 2010年12月7日-10日, 神戸.

<外部資金>

館野賢 (代表)、生体反応の量子ハイブリッド分子動力学シミュレーション、基盤研究 (B), 2009-2011