慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	生体分子構造およびに生体分子間相互作用の安定化における水分子の役割の解明
Sub Title	Role of water molecules in biomolecular functions and interactions
Author	苣口, 友隆(Oroguchi, Tomotaka)
Publisher	
Publication year	2016
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2015.)
JaLC DOI	
Abstract	本研究では, 生命に不可欠な水が蛋白質の機能的運動にどのような役割を果たすかを明らかにするために, 分子動力学(MD)シミュレーションと構造解析実験を組み合わせながら, 酵素蛋白質グルタミン酸脱水素酵素(GDH)が基質を捉える運動と水和構造変化の相関を調べた。その結果, GDHの機能的運動がその表面での水分子の脱離・吸着で制御されていることを見出した。 さらに, X線結晶構造解析で観察された水和構造を原子レベルで再現する分子ポテンシャル関数の開発を行った。MDと量子化学計算を併用した計算から, 実験水和構造を再現するためには, 非共有電子対を露わに取り込んだポテンシャル関数が必要なことが明らかになった。 In this study, we investigated how changes in hydration structure microscopically correlate with large-amplitude motions of a multi-domain protein, glutamate dehydrogenase (GDH), through molecular dynamics simulation supported by structural analyses and biochemical experiments. The results show that 'wetting'/'drying' and 'adsorption'/'dissociation' of a few water molecules at an active-site cleft worked as a switch for the functional motions of GDH. Thus, this study demonstrates the importance of water molecules in understanding protein functions. In addition, we are now developing a new MD potential parameter set, which can account experimental hydration structures around protein surfaces. Our analyses using MD and quantum-chemistry calculation show that the potential parameter set, which explicitly consider loan pairs of polar atoms, is necessary to reproduce the hydration structures obtained by X-ray crystal structural analyses.
Notes	研究種目 : 若手研究(B) 研究期間 : 2014 ~ 2015 課題番号 : 26800227 研究分野 : 生物物理
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_26800227seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成　２８　年　　６　月　　３　日現在

機関番号：　３２６１２
研究種目：　若手研究(B)
研究期間：　2014～2015
課題番号：　２６８００２２７

研究課題名（和文）生体分子構造およびに生体分子間相互作用の安定化における水分子の役割の解明

研究課題名（英文）Role of water molecules in biomolecular functions and interactions

研究代表者
苣口　友隆（Tomotaka, Oroguchi）

慶應義塾大学・理工学部・講師

研究者番号：９０５８９８２１

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,000,000円

研究成果の概要（和文）：　本研究では、生命に不可欠な水が蛋白質の機能的運動にどのような役割を果たすかを明らかにするために、分子動力学(MD)シミュレーションと構造解析実験を組み合わせながら、酵素蛋白質グルタミン酸脱水素酵素(GDH)が基質を捉える運動と水和構造変化の相関を調べた。その結果、GDHの機能的運動がその表面での水分子の脱離・吸着で制御されていることを見出した。
　さらに、X線結晶構造解析で観察された水和構造を原子レベルで再現する分子ポテンシャル関数の開発を行った。MDと量子化学計算を併用した計算から、実験水和構造を再現するためには、非共有電子対を露わに取り込んだポテンシャル関数が必要なことが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated how changes in hydration structure microscopically correlate with large-amplitude motions of a multi-domain protein, glutamate dehydrogenase (GDH), through molecular dynamics simulation supported by structural analyses and biochemical experiments. The results show that ‘wetting’/’drying’ and ‘adsorption’/’dissociation’ of a few water molecules at an active-site cleft worked as a switch for the functional motions of GDH. Thus, this study demonstrates the importance of water molecules in understanding protein functions.
In addition, we are now developing a new MD potential parameter set, which can account experimental hydration structures around protein surfaces. Our analyses using MD and quantum-chemistry calculation show that the potential parameter set, which explicitly consider loan pairs of polar atoms, is necessary to reproduce the hydration structures obtained by X-ray crystal structural analyses.

研究分野：　生物物理

キーワード：　生体分子　機能的構造揺らぎ　水和構造　水素結合ネットワーク　分子動力学シミュレーション

１．研究開始当初の背景

生物細胞体積の６～７割が水で占められることから類推できるように、生命の営みには『水』が不可欠である。生命が水を必要とする大きな要因として、生命活動の素過程を担う蛋白質分子が水環境において構造形成し機能することが挙げられる。研究代表者は、これまで分子動力学(MD)シミュレーションやＸ線回折・散乱実験等を併用した研究手法により、蛋白質分子と水の境界面の構造的特徴を探り、蛋白質表面では、水分子が水や氷とは異なる薄皮状の『水和構造』を形成して蛋白質の構造や機能に影響を持つことを示してきた。したがって、生命がなぜ水を必要とするかを明らかにするためには、生体分子の機能発揮において水和構造が果たす役割を明らかにする必要がある。

２．研究の目的

そこで本研究では、ナノメートルスケールの蛋白質分子の機能的運動に伴って、水和構造がどのように変化しているか、またその変化が機能的運動とどのように相関しているかを、分子動力学(MD)シミュレーションと構造実験を用いて明らかにすることを目的とした。

３．研究の方法

X 線構造解析で得た酵素蛋白質グルタミン酸脱水素酵素(GDH)の分子モデルを、約 20 nm 立方の仮想的な水に漬け、その中に含まれる水分子と酵素分子モデルを合わせて約 27 万の原子で構成された系に対して 200 ナノ秒の MD シミュレーションを行った。新しいトラジェクトリー解析方法を開発することで、GDH の機能的動きとそれに相関した水和構造の変化を詳しく解析した。

４．研究成果

MD シミュレーションにて観察された GDH の構造揺らぎは、原子間力顕微鏡で観察した構造分布と定量的に一致した。蛋白質表面での水和構造変化を水和水分布密度によって調べたところ、ドメインの運動が、結合部位周辺２カ所において、１ナノメートルに満たない窪みの中の水和構造変化に依存して発生していた(図 1)。例えば、一つ窪みでは、水２分子が、協奏的に離脱するナノスケールの『撥水』と、浸入する『濡れ』が頻繁に観察され、『撥水』の際には、生じた空隙を最小にするように２つのドメインが接近する運動が駆動されていた。『撥水性』を低下させる点突然変異を導入すると、酵素の機能が低下した。残りの水分子を吸着しやすい窪みでは、カラム状に配置された結合部位への水和水分子の吸着がドメインの動きを段階的に変化させる役割を担っていた。これらの結果から、水和構造の微細な変化が蛋白質の機能に関わる運動を制御していることを示した(発表論文 1)。

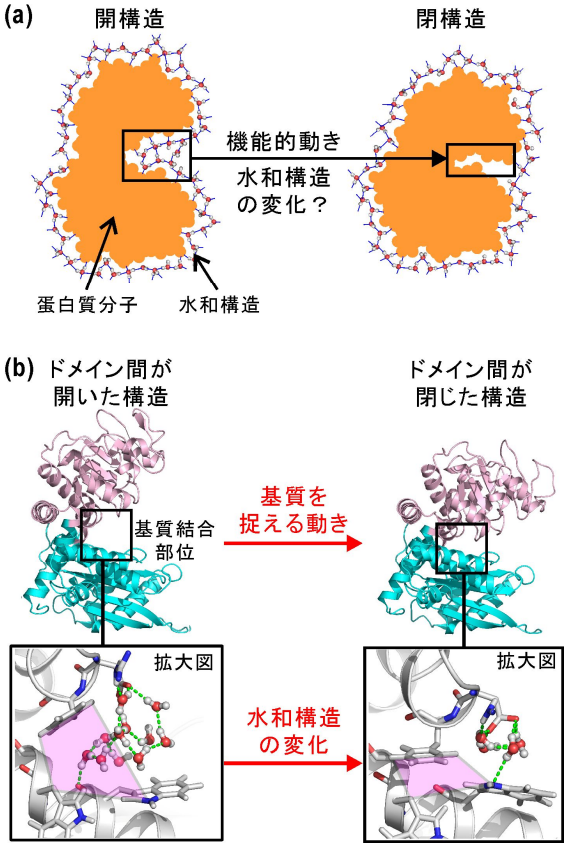

図 1. 酵素蛋白質の運動と、それに協奏した水和構造変化。(a) 蛋白質の運動に伴う水和構造変化の模式図、(b) 本研究で明らかにされた酵素蛋白質の機能的運動とそれを制御する水和構造変化の連鎖。

本研究成果は、従来は生体分子にとって単たる媒質と考えられてきた水が、生体分子との界面において積極的に生体分子の機能に関わることを、世界で初めて具体的に示したものである。今後、水和構造のより詳細な解析を行うことで、薬－蛋白質相互作用における水分子の役割を明確にして、創薬基盤技術の構築に貢献するとともに、生命と水の関わりを物理化学の言葉で理解することの助けになると考えている。

また実験で観察された水和構造を原子レベルで再現する分子ポテンシャル関数の開発を行った。MD と量子化学計算を併用した計算から、実験水和構造を再現するためには、非共有電子対を露わに取り込んだ分子ポテンシャル関数が必要なことを明らかにした(図 2)。また水分子の形を厳密に取り扱わない液体統計力学では、水分子の排除体積を正しく取り扱えないため、開発したポテンシャル関数でも水和構造が再現できないことも明らかにした。これらの研究成果については学術論文として投稿準備を行っている。

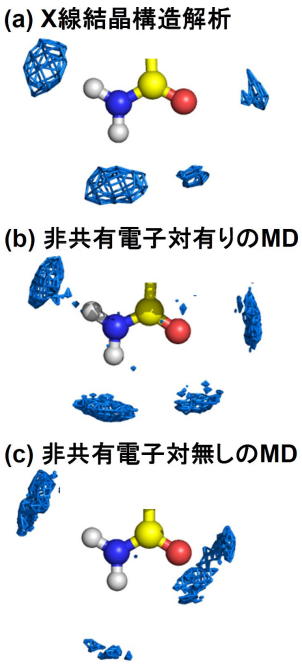

図 2. 水和構造(メッシュ)のポテンシャル関数依存性。グルタミン側鎖官能基の周辺を観察。

その他には、水溶液環境中における生体粒子の内部構造を可視化するために、新しい構造解析法であるコヒーレントX線回折顕微鏡法(CXDI)の開発に参加している。CXDI は短波長X線の高い透過性によって、電子顕微鏡等では観察できない μm サイズの生体粒子の内部を、数十 nm の分解能で可視化する新しい構造解析法である。研究代表者は高い輝度を持つ光源 XFEL と CXDI を組み合わせた手法 XFEL-CXDI の、装置開発及びに解析理論の開発に携わってきた。この手法により、1 μm 弱サイズの磁性細菌や葉緑体の内部構造を解像度約 70 nm で可視化することに成功した(図 3)(研究業績 2-8)。

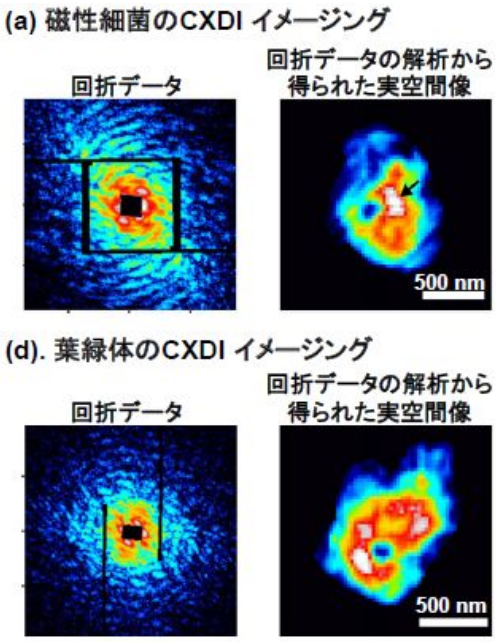

図 3. CXDI 法による水溶液環境下における生体粒子のイメージング

5．主な発表論文等
（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 8 件）

1. T. Oroguchi and M. Nakasako*
"Changes in hydration structure are necessary for collective motions of a multi-domain protein"
Scientific Reports, in press (2016).（査読有）

2. A. Kobayashi, Y. Sekiguchi, Y. Takayama, T. Oroguchi, K. Shirahama, Y. Torizuka, M. Manoda, M. Nakasako* and M. Yamamoto*
"TAKASAGO-6 apparatus for cryogenic coherent X-ray diffraction imaging of biological non-crystalline particles using X-ray free electron laser at SACLA"
Review of Scientific Instruments, in press (2016).（査読有）

3. Y. Sekiguchi, T. Oroguchi and M. Nakasako *
"Classification and assessment of retrieved electron density maps in coherent X-ray diffraction imaging using multivariate analysis"
Journal of Synchrotron Radiation **23**, 312-323 (2015).（査読有）

4. T. Yoshidome, T. Oroguchi, M. Nakasako and M. Ikeguchi*
"Classification of projection images of proteins with structural polymorphism by manifold; A simulation study for X-ray free-electron laser diffraction imaging"
Physical Review E **92**, 032710 (13 pages) (2015).（査読有）

5. T. Oroguchi, Y. Sekiguchi, A. Kobayashi, Y. Masaki, A. Fukuda, S. Hashimoto, M. Nakasako*, Y. Ichikawa, H. Kurumizaka, M. Shimizu, Y. Inui, S. Matsunaga, T. Kato, K. Namba, K. Yamaguchi, K. Kuwata, H. Kameda, N. Fukui, Y. Kawata, T. Kameshima, Y. Takayama, K. Yonekura and M. Yamamoto
"Cryogenic coherent X-ray diffraction imaging for biological non-crystalline particles using the KOTOBUKI-1 diffraction apparatus at SACLA"
Journal of Physics B: Atomic Molecular and Optical Physics **48**, 184003 (11 pages) (2015).（査読有）

6. Y. Takayama, Y. Inui, Y. Sekiguchi, A. Kobayashi, T. Oroguchi, M. Yamamoto, S. Matsunaga and M. Nakasako*
"Coherent X-ray diffraction imaging of chloroplasta from Cyanidioschyzon merolae by using X-ray free electron laser"
Plant Cell Physiology **56**, 1272 (15 pages)

(2015).（査読有）

7 Y. Takayama, S. Maki-Yonekura, T. Oroguchi, M. Nakasako and K. Yonekura*
"Singnal enhancement and Patterson-search phasing for high-spatial-resolution coherent X-ray diffraction imaging of biological objects"
Scientific Reports **5**, 8074 (8 pages) (2015).
（査読有）

8. A. Kobayashi, Y. Sekiguchi, Y. Takayama, T. Oroguchi and M. Nakasako*
"Dark-field phase retrieval under the constraint of the Friedel symmetry in coherent X-ray diffraction imaging"
Optics Express **22**, 27892 (18 pages) (2014).
（査読有）

〔学会発表〕（計 2 件）
(国際会議での招待講演)
Tomotaka Oroguchi
"Nanoscale wetting and drying processes dominate protein functional motions"
TSRC Protein Dynamics Workshop, Telluride, USA, 5 August, 2015.

(国内学会・会議等での招待講演)
苣口友隆
"**蛋白質分子の機能的運動を制御するナノスケールの水和構造**"
第 53 回日本生物物理学会年会、金沢大学（石川県金沢市）、2015 年 9 月 16 日

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕
○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕
無し。

６．研究組織
(1)研究代表者
苣口 友隆（Tomotaka, Oroguchi）
慶應義塾大学・理工学部・講師
研究者番号：90589821