

## 柔らかいタンパク質の分子機能の理解と設計

(京大院理) 林 重彦

## Understanding and Design of Molecular Functions of Flexible Proteins

(Graduate School of Science, Kyoto University) Shigehiko Hayashi

タンパク質分子の機能においては、タンパク質分子の作る触媒場の中で活性化される化学反応、すなわち酵素化学反応が重要な役割を果たす。酵素の触媒活性は一般的に非常に高く、その触媒活性の制御を用いて様々な分子機能が発現する。最近、タンパク質分子に特徴的な遅く大きな構造熱揺らぎが、酵素の高い触媒活性重要であることが実験的に示唆されているが、直接的な証拠がなく大きな論争となっている。

そのような酵素活性の分子機構を分子シミュレーションにより探るために、近年、広く用いられ成功を収めている手法が、quantum mechanical/molecular mechanical (QM/MM) 法である。この方法は、分子軌道法や密度汎関数法などの量子化学的 (QM) 手法と、生体分子の分子シミュレーションで通常用いられている分子力場に基づく分子力学的 (MM) 手法をハイブリッドするものであり、化学反応に関わる領域を QM 法で取り扱う際に、そのまわりのタンパク質環境の影響を MM 法に基づき記述することにより、酵素反応活性に関わる触媒場を非常に効率良く考慮することを可能にする。我々は、QM/MM 法を用いて様々な機能に関わる酵素活性の分子機構を探ってきた [1]。

しかしながら、そのような QM/MM 法の成功の一方で、限界も明らかになってきた。最も大きな困難は、タンパク質分子に特徴的な遅く大きな構造熱揺らぎを考慮するための十分な統計サンプルが取れないことである。この問題を解決するために、我々は、新規な QM/MM 自由エネルギー法 (QM/MM RWFE-SCF 法) を開発した [2,3]。この手法では、分子動力学 (MD) シミュレーションよりサンプルされた MM 部分の構造分布により定義される自由エネルギー曲面上で、QM 法によって取り扱われる活性部位分子の最適自由エネルギー構造が決定される。我々の手法は、平均場近似と reweighting 法を組み合わせることにより、非常に高効率な計算を達成しており、量子化学で取り扱われる酵素反応過程におけるマイクロ秒に渡る時間スケールのタンパク質の遅く大きな構造変化を取り入れることを可能にしている。また、QM/MM RWFE-SCF 法は、新規機能を有する変異体タンパク質の設計に力を発揮する。変異体の設計・解析においては、変異導入によるタンパク質の構造変化を十分考慮する必要があるが、タンパク質の構造熱揺らぎによる緩和を十分考慮することが可能な本手法を用いることにより、より正確な変異体のモデリングが可能となる。本講演では、QM/MM RWFE-SCF 法の簡単な解説と共に、Ras-GAP G タンパク質の酵素反応解析への適用を通して見えてきたタンパク質の高い酵素活性における構造熱揺らぎの役割の解明、及び光操作で用いられるレチナール結合タンパク質の色変異体の設計についての最近の研究を紹介する。

**Ras-GAP G タンパク質複合体の酵素活性** Ras-GAP 複合体は、顕著な GTPase 活性を有する G タンパク質である。その酵素反応は、細胞増殖等の信号伝達経路におけるスイッチとして働き、酵

素活性が低下した変異体は腫瘍形成をもたらすことが知られており、酵素活性が生体機能に重要な役割を果たしている。最近の時間分解赤外分光実験で、この酵素反応の反応自由エネルギー障壁に対する非常に大きなエントロピーによる安定化の寄与が見出され、酵素反応に大きなタンパク質の構造変化が関与していることが示唆される。そこで、QM/MM RWFE-SCF 法を用いて、反応の始・終状態及び遷移状態の自由エネルギー最適化構造を求めた。その結果、反応の遷移状態生成に、複合体間が大きくずれる構造変化が相関していることを見出した。この大きな複合体間の構造変化は、反応活性中心における基質の反応遷移状態構造の安定化をもたらす水素結合形成と相関しており、酵素活性に大きな寄与を与えていることを示唆している。また、腫瘍形成に関わる変異体に対しても酵素反応性の解析を行い、その分子論的機構を明らかにした。

**レチナール結合タンパク質の色変異体設計** 光感受性イオン輸送体である微生物型ロドプシンは、神経科学における光操作のツールとして用いられている。光操作実験では、神経細胞にこの異種由来の微生物型ロドプシンを発現することにより、光照射を用いた詳細な神経細胞活動の制御が可能になる。微生物型ロドプシンは、レチナールシッフ塩基分子を発色団として有し、異なるタンパク質における発色団とタンパク質の相互作用の違いにより、吸収波長が大きく変化する。そのような吸収波長の可変性は、光操作実験において、二つの異なる吸収波長を有する光受容体を用いた同時操作／観測実験を可能にする。本研究では、ツールとして実際に用いられているいくつかの微生物の色変異体を理論的に設計し、大幅な吸収波長シフトを有する変異体の作成に成功した [4]。まず、少数の変異導入による大きな吸収波長シフトを達成するべく、これまで考慮されていなかった発色団の構造変化を引き起こす二～三箇所の変異を設計し、上記手法により変異モデル構造の精密化を行った。また、静電相互作用的に波長シフトを引き起こす既知の一箇所の変異を加え、三～四重変異体を設計した。神経細胞の不活性化に用いられる AR3、及び活性化に用いられる C1C2 に対して、それぞれ実験的検証を行ったところ、理論的設計を基本として、最大 100 nm の短波長シフトを有する色変異体を得た。これまでに実験で得られた点変異による色変異体の最大の吸収波長シフトは 50 nm であり、本研究ではこれまでの倍以上のシフトを有する変異体の設計に成功したことになる。更に、C1C2 の色変異体に対して X 線結晶構造解析を行ったところ、理論設計による構造モデルと同様な発色団分子の構造変化を観測した。また、C1C2 の色変異体は、マウスの脳スライス中で、より短波長の光を用いて活動電位を惹起出来ることが神経化学的実験により確認された。

また、水溶性タンパク質であるヒト細胞 II 型レチナール結合タンパク質 (hCRBP2) の色変異体の吸収スペクトルの波長シフトの分子機構に関する理論的研究を行った [5]。hCRBP2 は、最大 10 箇所の点変異導入で 200 nm にも渡る吸収波長極大のシフトが引き起こされる。この分子機構を明らかにするために、代表的な色変異体のタンパク質構造を QM/MM RWFE-SCF 法による自由エネルギー構造最適化を用いてモデリングし、吸収波長の計算を行った。その結果、200 nm の吸収波長シフトを再現し、その分子起源を原子論的に明らかにすることに成功した。特に、非常に長波長シフトする色変異体においては、タンパク質構造の柔軟性により、活性部位から遠く離れた変異導入による疎水性相互作用の変調がレチナール結合ポケットの形が変形を引き起こし、発色団のシッフ塩基周辺ポケットに存在する水分子を排除することにより、吸収波長極大を決定する静電環境に大きな変化が現れることを明らかにした。

Reference: [1] 林, CSJ カレントレビュー, 08, 第 17 章, 166 (2012). [2] Kosugi and Hayashi, *J. Chem. Theory Comput.* **8**, 322 (2012). [3] Kosugi and Hayashi, *J. Am. Chem. Soc.*, **134**, 7045 (2012). [4] Kato et al., *Nat. Commun.*, **6**, 7177 (2015). [5] Cheng et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **137**, 13362 (2015).