1. 原子・分子の動きの可視化

X線溶液散乱と分子動力学シミュレーションで探る
タンパク質の構造揺らぎ

慶應義塾大学理工学部 物理学科 笠口友隆

横浜市立大学大学院生命医科学研究生命医科学専攻 池口満徳, 佐藤 衛

Tomotaka OROGUCHI, Mitsunori IKEGUCHI and Mamoru SATO: Protein Dynamics Investigated by Small-angle X-ray Scattering and Molecular Dynamics Simulations

The combination of small-angle X-ray solution scattering (SAXS) experiments and molecular dynamics (MD) simulations is now becoming a powerful tool to study protein dynamics in solution at an atomic resolution. We have developed a method called MD-SAXS, in which this combination is used with explicit evaluation of X-ray scattering from water molecules hydrating protein molecules. This method offers a link between low-resolution structural information from SAXS and the three-dimensional high-resolution structure. The study using MD-SAXS method revealed the importance of intrinsic dynamics of DNA-binding protein EcoO109I in its function.

1. はじめに

近年のタンパク質結晶構造解析の発展により、タンパク質の機能を原子レベルで詳細に理解できるようになってきた。それと同時に、溶液中ではタンパク質の立体構造は結晶構造からイメージされるような静的で硬いものではなく、軟らかく揺らいでおり、この軟らかさがタンパク質の機能発現に重要であることがわかってきた。¹⁾したがって、タンパク質の機能を真に理解するためには、溶液中でタンパク質の立体構造がどのように揺らいでいるかという情報が必要になる。

X線溶液散乱 (Small-angle X-ray Scattering: SAXS) は、任意の溶媒条件下におけるタンパク質の分子形態やその変化を解析する手法として古くから用いられてきたが、近年になり溶液散乱パターンから直接構造モデルを構築できる手法が開発され、低分解能ではあるがタンパク質複合体やマルチドメインタンパク質のような複雑な形態の溶液構造解析も可能となった。^{2,3)}一方で分子動力学 (MD) 法はニュートン運動方程式に従って原子の動きをシミュレーションする方法で、タンパク質の溶液中における動きを原子レベルで観察することができる。原子の動きを実験的に追跡することは困難なために MD シミュレーションはタンパク質機能の理解に必要不可欠な研究手段となっている。⁴⁾

このように、SAXS と MD シミュレーションはそれぞれ溶液中での動的な構造情報が得られる研究手法として注目されるようになったが、両手法を組み合わせることさ

らに重要な知見を得ることが期待される。著者らは MD シミュレーションから得られる多数の原子構造から溶媒和分子 (水和分子) の散乱を厳密に考慮して溶液散乱パターンを高速に計算する方法を開発することにより、MD シミュレーションと SAXS とを組み合わせるタンパク質の揺らぎを原子レベルで解析する手法 (MD-SAXS 法) を開発してきた。⁵⁻⁷⁾ 本稿では、MD-SAXS 法の原理と、MD-SAXS 法を使って明らかにされた大腸菌由来の制限酵素 EcoO109I の DNA 非結合状態の構造揺らぎの研究を通して MD-SAXS 法の有効性を紹介したい。

2. MD-SAXS 法

2.1 概要

SAXS からは、溶液中のタンパク質の分子量、大きさや形状などの構造情報が得られる。^{2,3)} 構造情報は原子レベルの詳細な構造情報が得られる X 線結晶構造解析に比べると少ないが、任意の溶媒、温度などの条件下でタンパク質の分子形態が観察できることから、結晶解析では取得困難な生理的条件下での構造情報が得られる。⁸⁾

タンパク質の電子密度は、溶媒の平均電子密度との差 (コントラスト) として散乱強度に寄与する。よって、平均電子密度 ρ_0 の溶媒中において、電子密度分布 $\rho(\mathbf{r})$ のタンパク質分子によって散乱角 2θ 方向に散乱される SAXS 強度は、

$$I(Q) = \left\langle \left\langle \frac{\int d^3\mathbf{r} \int d^3\mathbf{r}' (\rho(\mathbf{r}) - \rho_0)(\rho(\mathbf{r}') - \rho_0)}{\exp(-i\mathbf{Q} \cdot (\mathbf{r} - \mathbf{r}'))} \right\rangle \right\rangle_{\Omega_{\text{ENS}}} \quad (1)$$

図1 MD-SAXS法の流れ。(Flow chart of MD-SAXS methodology.) (a) MDシミュレーションで構造揺らぎのデータを得る。(b) MDシミュレーション中の各スナップショットからSAXSデータを理論的に計算し、その時間変化を得る。(c) 理論SAXSデータを集団平均し、(d) 実験で得られたSAXSデータと(e) 比較・検証することによって、(f) 実験SAXSデータに含まれるタンパク質の構造揺らぎの情報を抽出する。

と表される。ここで Q は $Q = |\mathbf{Q}| = 4\pi \sin \theta / \lambda$ (λ : X線の波長) で定義される散乱ベクトル長である。実験では照射野に多数のタンパク質分子 ($\sim 10^{15}$ 個) が存在し、入射X線に対してランダムな配向にあるため、散乱強度に対する配向立体角 Ω に対する平均操作 $\langle \rangle_{\Omega}$ により、観測されるSAXSのパターンは等方的になる。さらに、X線が照射される領域には膨大な数のタンパク質分子が存在することを考慮すると、さまざまなコンフォメーションを取りながら揺らいでいるタンパク質のSAXSデータは、配向立体角に対する平均に加えて、さまざまなコンフォメーションをもつタンパク質分子からの散乱を加算(集団平均: $\langle \rangle_{\text{ENS}}$)したものとなる。したがって、SAXSデータにはタンパク質の構造揺らぎの情報が含まれているが、その情報はこの集団平均によって隠されてしまう。

そこで、著者らは、MDシミュレーションを適用することで、SAXSデータに隠されたタンパク質の構造揺らぎの情報を原子レベルで抽出することを試みた。図1にMD-SAXS法の流れを示す。MD-SAXS法では、まずMDシミュレーションで得られた構造揺らぎのデータ(図1a)から、SAXSデータを理論的に計算(図1b)し、それらをすべて集団平均(図1c)する。集団平均された理論SAXSデータを、実験で得られたSAXSデータ(図1d)と比較・検証(図1e)することによって、実験SAXSデータに含まれるタンパク質の構造揺らぎの情報を抽出する(図1f)。

2.2 溶媒和分子からの散乱を正確に取り扱ったSAXSデータの計算方法

MD-SAXS法で注意すべき点は、MDシミュレーション中における各スナップショットの原子座標データから理論的にSAXSデータを計算するとき(図1b)、タンパク質分子表面の溶媒和分子(水和分子)からの散乱を正確に評価しなければいけないことである。低温結晶構造解析⁹⁾や

NMR¹⁰⁾などの実験から、タンパク質分子の表面・内部には特異的に吸着・分布している水分子群(水和殻)が存在することが示唆されている。例えば、後述する制限酵素EcoO109Iを例に挙げると、そのDNA結合状態の低温結晶構造解析¹¹⁾からは、分子表面に多数の水分子が吸着している様子(図2a)を観察することができる。このような低温結晶中で見出される水和殻が室温の溶液中においても常に形成され、溶媒領域に対して有意なコントラストを有して少なからずSAXS強度に寄与すると考えられる。

MDシミュレーションの利用は、このような溶液中のタンパク質分子からの散乱を溶媒和分子も含めて原子レベルで正確に取り扱うためにも非常に有効である。しかし、タンパク質溶液の大部分は、分子スケールから見れば無限に広い溶媒領域(バルク領域)で占められており、この領域からの散乱をMDシミュレーションで得ることは不可能である。そこで、著者らは次の2つの手順(図2b, c)を経ることでこの問題が解決することを示した。^{5,7)}すなわち、1つは(手順1)、計算においてもSAXS実験と同様に、タンパク質溶液と純溶媒の両方のMDシミュレーションを行い、タンパク質溶液の散乱データから純溶媒の散乱データを引算する。2つ目は(手順2)、散乱データをタンパク質分子と水和殻だけでなく、タンパク質分子による影響を受けていない溶媒領域についても計算する。

これら2つの手順の理論的根拠を述べる。今、図2bに示すように、タンパク質溶液の系を、タンパク質分子と水和殻の領域(領域V)およびバルク領域(領域B)に分ける。そうすると、この系のある瞬間の構造因子は、

$$\begin{aligned} \tilde{F}(Q) &= \int_V (\tilde{\rho}(\mathbf{r}) - \rho_0) \exp(-i\mathbf{Q} \cdot \mathbf{r}) d^3\mathbf{r} \\ &\quad + \int_B (\tilde{\rho}(\mathbf{r}) - \rho_0) \exp(-i\mathbf{Q} \cdot \mathbf{r}) d^3\mathbf{r} \\ &= \tilde{F}_V(Q) + \tilde{F}_B(Q) \end{aligned} \quad (2)$$

図2 MD-SAXS 法における溶液散乱パターンの計算方法の概要。(Schematic view of MD-SAXS algorithm.) (a) 制限酵素 EcoO109I の結晶構造と、その分子表面に見えている水と水分子。(b) 手順1、(c) 手順2。

と表される。 $\tilde{\rho}(\mathbf{r})$ は系の瞬間的な電子密度を表し、積分 $\int_V$ は領域V内の積分を表す。 $\tilde{F}_V(Q)$ および $\tilde{F}_B(Q)$ はそれぞれ、領域V, Bからの構造因子である。すると、観察される散乱強度は、

$$I(Q) = I_{VV}(Q) + I_{BB}(Q) + I_{VB}(Q) + I_{BV}(Q) \quad (3)$$

となる。上式の右辺における各項は、

$$\begin{aligned} I_{\lambda\mu}(Q) &= \langle \tilde{I}_{\lambda\mu}(Q) \rangle_{\text{ENS}} = \left\langle \left\langle \tilde{F}_{\lambda\mu}(\mathbf{Q}) \tilde{F}_{\lambda\mu}^*(\mathbf{Q}) \right\rangle_{\Omega} \right\rangle_{\text{ENS}} \\ &= \left\langle \left\langle \int_{\lambda} d^3\mathbf{r} \int_{\mu} d^3\mathbf{r}' (\tilde{\rho}(\mathbf{r}) - \rho_0)(\tilde{\rho}(\mathbf{r}') - \rho_0) \exp(-i\mathbf{Q} \cdot (\mathbf{r} - \mathbf{r}')) \right\rangle_{\Omega} \right\rangle_{\text{ENS}} \\ &(\lambda, \mu = V, B) \end{aligned} \quad (4)$$

と表される。タンパク質分子からのSAXSデータは $I_{VV}(Q)$ であり、 $I_{BB}(Q)$, $I_{VB}(Q)$, $I_{BV}(Q)$ は、無限に広いバルク領域由来の散乱を表している。式(4)から、散乱強度の各項 $I_{\lambda\mu}(Q)$ は、電子密度揺らぎの相関関数をフーリエ変換したものとなっていることがわかる。

領域Bにおいては、タンパク質溶液と純溶媒では液体としての性質は変わらないため、溶媒の電子密度揺らぎの大きさはこれら2つの系で同じになる。したがって、 $I_{BB}(Q)$ に関しては、タンパク質溶液と純溶媒の系で値が等

しくなり、散乱データの引算(手順1, 図2b)によって消去され計算する必要がなくなる。

一方、水和殻における溶媒の電子密度分布はバルク領域と異なるため、 $I_{VB}(Q)$ および $I_{BV}(Q)$ は、タンパク質溶液と純溶媒の系で値が異なり、散乱データの引算によって消去することができなくなる。この問題は、領域Vとして、タンパク質分子と水和殻だけでなく、のり代として、タンパク質分子によって影響を受けていない純溶媒領域を含めた領域を設定する(手順2, 図2c)ことにより解決される。このような設定を行うと、領域Vに含まれた純溶媒領域における溶媒の電子密度揺らぎは、タンパク質溶液と純溶媒の系で同じになるため、 $I_{VB}(Q)$ および $I_{BV}(Q)$ の値はタンパク質溶液と純溶媒の2つの系で等しくなる。したがって、 $I_{BB}(Q)$ と同様に、 $I_{VB}(Q)$ と $I_{BV}(Q)$ はともに、手順1の散乱データの引算によって消去される。すなわち、手順1および2を行うことによって、解析に必要な $I_{VV}(Q)$ のみを計算すればよいことになり、無限に広がるバルク領域からの散乱の計算は行う必要がなくなる。

この方法を構造が硬い(=構造の揺らぎが小さい)数種類のタンパク質に適用してみたところ、 $I_{VV}(Q)$ の値の収束を得る(すなわち、 $I_{BB}(Q) + I_{VB}(Q) + I_{BV}(Q)$ の値が引算によって零になる)ためには、タンパク質分子の大きさより約5 Å程大きい計算領域が必要ことがわかった。このことは、水和殻の厚さが約5 Å程度であることを示している。

2.3 溶媒和分子からの散乱を正確に取り扱ったSAXSデータの高速計算法

次に、MD-SAXSデータを高速に計算する方法について述べる。今、あるスナップショットにおいて、計算領域V内にある原子数をN個、i番目の原子座標と原子散乱因子¹²⁾をそれぞれ $\tilde{\mathbf{r}}_i$ および $f_i(Q)$ と書くと、計算すべきMD-SAXS法の厳密な方程式は、

$$\begin{aligned} I(Q) &= \langle \tilde{I}_{VV}(Q) \rangle_{\text{MD}} \\ \tilde{I}_{VV}(Q) &= \left\langle \frac{\int_{\lambda} d^3\mathbf{r} \int_{\mu} d^3\mathbf{r}' (\tilde{\rho}(\mathbf{r}) - \rho_0 f_B(Q)) (\tilde{\rho}(\mathbf{r}') - \rho_0 f_B(Q))}{\exp(-i\mathbf{Q} \cdot (\mathbf{r} - \mathbf{r}'))} \right\rangle_{\Omega} \\ &= \sum_i^N \sum_j^N f_i(Q) f_j(Q) \langle \exp(-i\mathbf{Q} \cdot (\tilde{\mathbf{r}}_i - \tilde{\mathbf{r}}_j)) \rangle_{\Omega} \\ &\quad - 2\rho_0 f_B(Q) \sum_i^N f_i(Q) \int_V d^3\mathbf{r} \langle \exp(-i\mathbf{Q} \cdot (\mathbf{r} - \tilde{\mathbf{r}}_i)) \rangle_{\Omega} \\ &\quad + (\rho_0 f_B(Q))^2 \int_V d^3\mathbf{r} \int_V d^3\mathbf{r}' \langle \exp(-i\mathbf{Q} \cdot (\mathbf{r} - \mathbf{r}')) \rangle_{\Omega} \end{aligned} \quad (5)$$

と表される。ここで、 $\tilde{I}_{VV}(Q)$ は瞬間的なSAXS強度、すなわちMDシミュレーションにおける各スナップショットのSAXS強度に相当し、 $\langle \rangle_{\text{MD}}$ はMDで得られた全スナップショットに対する平均操作を表す。 $f_B(Q)$ は純溶媒の平均原子散乱因子である。式(5)の第1項の計算にはデバイ

公式を用いるのが一般的だが、われわれは計算の高速化のために多重展開；

$$\exp(-i\mathbf{Q}\cdot\mathbf{r}) = 4\pi \sum_{l=0}^{\infty} \sum_{m=-l}^l i^l j_l(Qr) Y_{lm}^*(\Omega_r) Y_{lm}(\Omega_Q) \quad (6)$$

を用いた。\$\Omega_r\$ および \$\Omega_Q\$ はそれぞれ位置ベクトル \$\mathbf{r}\$ と散乱ベクトル \$\mathbf{Q}\$ の立体角、\$j_l(x)\$ は球ベッセル関数、\$Y_{lm}(\Omega)\$ は球面調和関数を表す。さらに、式(5)の第2項および第3項の体積分は面積分に変換できて、計算負荷を減らすことができる。計算領域 \$V\$ としてタンパク質分子の重心を中心とした半径 \$R\$ の球を用い、\$\mathbf{r}-\mathbf{r}_i=\mathbf{s}_i\$、\$\mathbf{r}-\mathbf{r}'=\mathbf{s}'\$ と表すと、MD-SAXS 法において実際に計算される方程式は

$$\begin{aligned} \tilde{I}_{VV}(Q) = & 4\pi \sum_{l=0}^{\infty} \sum_{m=-l}^l \left| i^l \sum_{i=1}^N f_i(Q) j_l(Q\tilde{r}_i) Y_{lm}^*(\Omega_{\tilde{r}_i}) \right|^2 \\ & - 2\rho_0 f_B(Q) \cdot 4\pi R^3 \frac{j_1(QR)}{QR} \sum_i f_i(Q) j_0(Q\tilde{r}_i) \\ & + (\rho_0 f_B(Q))^2 \int_S d^2\mathbf{r} \int_S d^2\mathbf{r}' \left[\frac{(\mathbf{n}\cdot\mathbf{n}')}{Q^2} \cdot \frac{j_1(Qs')}{Qs'} \right. \\ & \quad \left. - \{(\mathbf{s}\cdot\mathbf{n}')(\mathbf{s}'\cdot\mathbf{n})\} \frac{j_2(Qs')}{(Qs')^2} \right] \end{aligned} \quad (7)$$

となる。\$S\$ は領域 \$V\$ を囲む閉曲面、ベクトル \$\mathbf{n}\$ は閉曲面上の微小面積要素 \$d^2\mathbf{r}\$ において領域 \$v\$ の外側に向いている法線ベクトルである。

式(7)においては、\$Q\tilde{r}_i\$ の大きさに準じて球ベッセル関数の計算は適当な次数で打ち切ることができるため、すべての原子ペアについて計算するデバイ公式よりも遥かに早くなる。また、さらなる計算の高速化のために、われわれはMD-SAXS法のプログラムを並列化した。これらの高速化の結果、\$N=50,000\$ 個の系に対して計算した場合、デバイ公式では計算時間が約2時間であったのに対し、120 CPUを用いると約2秒で計算できるようになった。

これまでの研究では、MDシミュレーションのデータからSAXSデータを計算した最長のシミュレーション時間は0.5 nsであったが、この時間ではタンパク質分子のすべての揺らぎを観察することができない^{13),14)} 一般にタンパク質分子の揺らぎを観察するためには100 ns以上の長時間のシミュレーションが必要であり、著者らが開発した高速計算によって世界で初めて構造揺らぎの効果をSAXSデータの評価に取り入れられるようになった。

以上で述べてきた、溶媒和分子を厳密に取り扱う計算方法の数学的証明や、MD-SAXS法の方程式である式(7)の導出は、著者らの論文⁶⁾を参照されたい。また、球状に限らないさまざまな形状のタンパク質や、実験によって変わる溶媒条件などに対応するために、計算領域を球以外の形状に選択できるMD-SAXS法⁷⁾や、実験にて用いられた溶媒の塩強度によるSAXSデータへの影響を間接的に取り扱えるMD-SAXS法⁸⁾の開発も行われている。

3. MD-SAXS 法による制限酵素 EcoO109I の機能的構造揺らぎの解析

次に、MD-SAXS法の有効性を評価するために行った大腸菌由来の制限酵素EcoO109Iの揺らぎの解析例を紹介する。EcoO109Iは回文構造をもつDNA特定配列と結合し切断する。この酵素はすでにDNA非結合状態と結合状態の結晶構造(図3a, b)が決定¹¹⁾され、溶液中で同じサブユニットからなる2量体を形成して機能することが示されている。また、DNA非結合状態と結合状態を比較すると、DNA結合に際して2つのサブユニット間で大きな構造変化が起きることがわかった。DNA結合に伴い、各サブユニットがDNAを挟み込むように互いに閉じ(図3a)、また捻るように互いに反時計回りに回転する(図3b)。このような大きな構造変化を可能にするメカニズムを明らかにするために、DNA非結合状態のEcoO109Iの構造揺らぎをMD-SAXS法により調べた。

3.1 MD-SAXS 法により観察された制限酵素 EcoO109I の構造揺らぎと水和構造

DNA非結合状態のEcoO109Iに対して、298 K条件下で長時間(150 ns)の全原子MDシミュレーションを行った。図3cにMDシミュレーションにおけるEcoO109Iの

図3 大腸菌由来の制限酵素 EcoO109I の結晶構造と DNA 結合による構造変化。(Crystal structures of the open and closed forms of restriction endonuclease EcoO109I.) (a–b) EcoO109I の DNA 非結合型(緑色)と結合型(桃色)の結晶構造¹¹⁾の重ね合わせ。(b)は(a)の側面から見た構造を示す。(c) EcoO109I の MD シミュレーションの初期構造。緑色と紫色の構造は、ホモダイマーを形成している2つのサブユニットをそれぞれ表す。赤と白の点はそれぞれ、水分子の酸素原子と水素原子を示す。
編集部注：カラーの図はオンライン版を参照下さい。

スナップショットを系に含まれた水分子とともに示す。系は原子数 8,830 個の EcoO109I, 34,159 個の水分子から構成されている。タンパク質と水分子のポテンシャル関数には CHARMM22 力場¹⁵⁾ と TIP3P モデル¹⁶⁾ をそれぞれ用い, MD 計算にはプログラム MARBLE¹⁷⁾ を用いて行った。

MD シミュレーションから, EcoO109I の立体構造は DNA 非存在下で大きく揺らいでいることがわかった (図 4a)。得られた全スナップショット構造 (150,000 個) それぞれについて理論 SAXS データを前述の高速計算法で求めたところ, 立体構造の揺らぎに付随して, SAXS データの散乱曲線も揺らいでいることが観察された (図 4b, c)。そこで, 各スナップショットの MD-SAXS データすべてを加算し, 実験から得られた SAXS データと比較したところ, 両者は良く一致した (図 4d, e)。ここで注意すべきことは, MD シミュレーションの各スナップショットから求められた理論 SAXS データは実験の SAXS データと一致しな

いが, 集団平均をとると一致してくるということである。このことは, 図 1 で示した MD-SAXS 法の概要で述べた通り, 実験の SAXS データに含まれている構造集団の情報を抽出するためには, MD シミュレーションが有効であることを示している。

タンパク質分子の大きさが SAXS パターンに反映される極小角領域では, 次式のギニエ近似¹⁸⁾ が成立し, タンパク質分子の慣性半径 (Radius of Gyration: R_g) を求めることができる。

$$I(Q) \doteq I(0)\exp(-Q^2 R_g^2/3) \quad (QR_g < 1.3) \quad (8)$$

$I(0)$ は原点散乱強度であり, 詳細は省くが実験ではこの量の解析からタンパク質の分子量が求まる。極小角領域にて $I(Q)$ を Q^2 に対して対数プロットしたものをギニエプロット (Guinier Plot) と呼び, 式 (8) が示すように, その傾きから R_g を求めることができる。図 4c のギニエプロットが示すように, この極小角領域においても SAXS データは

図 4 MD-SAXS 法により観察された制限酵素 EcoO109I の構造揺らぎ。 (Fluctuations of protein structure and SAXS data observed in 150-ns MD simulation of the open form of EcoO109I.) (a) 150-ns MD シミュレーションから, 10 ns ごとに抜き出したスナップショット (15 個) の重ね合わせ。 (b-c) 150-ns MD シミュレーションから得られた SAXS データの (b) 対数プロットと (c) ギニエプロット。水色の曲線は, (a) で表示されている各スナップショットの理論 SAXS データ (水色) を示し, 青色の曲線は, 全スナップショットの集団平均によって得られた理論 SAXS データを示す。 (d-e) 実験 SAXS データ (桃色) と理論 SAXS データの比較。青色曲線の定義は, (b-c) と同じ。 編集部注: カラーの図はオンライン版を参照下さい。

大きく揺らいでおり、このことは、EcoO109Iには全体構造が大きくなったり小さくなったりする運動があることを示している。一方、集団平均をとると、理論SAXSデータは実験データと良い一致を示し、それぞれのギニエプロットから得られた慣性半径 R_g は28.2 Åと 28.1 ± 0.3 Åであった。

また、理論SAXSデータから求めた慣性半径 R_g の時間変化(図5の水色の曲線)からEcoO109Iの全体構造の揺らぎを調べたところ、慣性半径は約100 ns周期で最大で約1.8 Åの変動を示した。この結果は、EcoO109Iの全体構造は約100 ns周期で大きく揺らいでいるが、その平均(図5の青色の直線)は実験値(図5の桃色の直線)と一致することを示している。

では、タンパク質の構造揺らぎがない場合は、MD-SAXS法の結果はどうなるのであろうか。この点を明らかにするためにEcoO109Iの構造が揺らがないMD、具体的には結晶構造の原子座標に拘束をかけ溶媒分子のみを動かすMDを行い、同様に理論SAXSデータから慣性半径の時間変化(図5の黄緑色の曲線)を求めた。その結果、図5が示すように、この拘束MDから求めた理論SAXSデータの揺らぎは小さく、集団平均の慣性半径(図5の緑色の直線、27.6 Å)は実験観測値(28.1 ± 0.3 Å)よりも有意に小さいことが明らかとなった。この結果は、溶液中におけるEcoO109Iの構造は、結晶構造よりも広がった構造をしており、構造揺らぎを考慮しないと実験のSAXSデータを説明できないことを示している。

次に、開発された溶媒和分子も含めたSAXSデータの

図5 MD-SAXSデータから求めた慣性半径の時間変化。(Time evolution of R_g estimated from Guinier plot of MD-SAXS data.) 150-ns MDシミュレーション(水色)とその平均値(青色)、溶媒分子だけを動かした20-ns MDシミュレーション(黄緑色)とその平均値(緑色)。黒色の曲線は150-ns MDシミュレーションにおける、溶媒分子を除いたタンパク質分子のみの慣性半径の時間変化を示す。桃色の直線は実験値を誤差の大きさとともに示している。
編集部注：カラーの図はオンライン版を参照下さい。

計算法の妥当性を評価するために、MDシミュレーションにおけるタンパク質分子のみから理論SAXSデータを計算し、その集団平均を実験のSAXSデータと比較した(図6a)。その結果、タンパク質分子のみからの理論SAXSデータは、全角度領域にわたって実験で得られた散乱曲線と一致しないことがわかった。また、このタンパク質分子のみの理論SAXSデータから求めた慣性半径の時間変化(図5の黒色の曲線)を観察すると、タンパク質分子と水和殻から求めた慣性半径(図5の水色の曲線)と比べて、常に2 Å小さな値となった。この差は、水和殻からの散乱による寄与であり、今までの知見と一致して、水和殻における電子密度はバルク領域よりも高くなっていることを示している。実際にMDシミュレーションの初期1 nsから計算した溶媒領域の平均電子密度を、バルク領域の平均電子密度 ρ_0 以上で表示すると、タンパク質分子表面には

図6 水和殻によるSAXSデータへの寄与。(Contribution of hydration shell structure to SAXS data.) (a) 実験(桃色)と、MDシミュレーションから水和構造を含めて計算された平均理論SAXSデータ(青色)。黒色の曲線は、MDシミュレーション中におけるタンパク質分子のみから計算された平均理論SAXSデータを示す。(b) EcoO109Iの分子表面に形成されている水和殻。緑色のリボン図はタンパク質分子を示す。青色のネットは、MDシミュレーションの初期1 nsから計算した溶媒領域の平均電子密度が、バルクの平均電子密度より大きかった領域を示す。
編集部注：カラーの図はオンライン版を参照下さい。

溶媒の平均電子密度より高い値を示す領域が現れ, タンパク質分子表面の近傍に部位特異的に非一様な電子密度分布が存在することがわかる (図 6b). 以上の結果は, 著者らが開発した方法によってタンパク質分子表面の水和殻の振る舞いが正確に解析できることを示している. タンパク質分子表面の水和殻はタンパク質の物性に深く関与しているので, MD-SAXS 法はタンパク質の構造揺らぎの研究だけでなく, 構造物性の研究にも利用できることが期待される.

3.2 制限酵素 EcoO109I の機能発現に必要な立体構造の揺らぎ

では, MD-SAXS 法で観察された EcoO109I の立体構造揺らぎとはどのような運動で, その運動は DNA 結合に伴って起きる構造変化とどのような相関をもつのだろうか. このことを明らかにするために 150 ns の MD シミュレーションの結果に対して主成分解析¹⁹⁾を適用し, EcoO109I の揺らぎに大きく寄与している動きの成分とその方向を求めた. その結果, EcoO109I の揺らぎは 2 種類の大きな動きの成分 (第 1 主成分と第 2 主成分) でその揺らぎの約半分が記述され, 図 7a, b に示された 2 つの動きが EcoO109I の機能に深く関与していることが示唆された.

最も大きい主成分 (第 1 主成分) の動きの方向 (図 7a の赤色の矢印) は, 2 つのサブユニット間の開閉運動である. 開いた構造は閉じた構造よりも慣性半径が大きいので, この動きの方向への EcoO109I の動きは図 5 に示した慣性半径の時間変化と相関する (相関係数 = 0.74). また, この開閉運動に伴い, 2 つのサブユニットに挟まれた活性クレフ

トも開閉運動を行う (図 7c). よって, 第 1 主成分の開閉運動は, EcoO109I が DNA を活性クレフトに取り込むために必須な運動である. 実際, DNA 非結合型 EcoO109I の結晶構造では活性クレフトが狭く, このままでは DNA を取り込むことができない. それに対して, MD シミュレーションで 2 つのサブユニットが大きく開いた構造 (図 7c) では, 活性クレフトが十分に広く DNA を取り込むことができる.

一方, 第 2 主成分の動きの方向 (図 7b の赤色の矢印) は, 2 つのサブユニット間での反時計回りのねじれ運動であった. この動きは, DNA 結合に伴って 2 つのサブユニットが DNA を折り曲げるように互いに反時計まわりに回転する構造変化 (図 3b, および図 7b の水色の矢印) と強く相関する (相関係数 = 0.90). この高い相関は, EcoO109I の立体構造は, DNA と結合していなくても, DNA が結合したときに起こる構造変化の方向へ大きく揺らいでいるということを示している. この構造変化の方向へ特化された立体構造の柔軟性がゆえに, EcoO109I は DNA 結合時に効率良く構造変化して DNA を切断できるものと考えられる.

4. おわりに

以上, タンパク質の揺らぎ (ダイナミクス) 研究のために開発した MD-SAXS 法と, この方法を用いて原子レベルで明らかにされた制限酵素 EcoO109I の機能的構造揺らぎの解析について紹介してきた. 150 ns の MD シミュレーションを用いた MD-SAXS 法による解析では, 立体構造の揺らぎおよび水和殻からの散乱を厳密に考慮すると実験の

図 7 150-ns MD シミュレーションに対して適用した主成分解析の結果. (Principal component analysis for motions of EcoO109I.) (a) 第 1 主成分と (b) 第 2 主成分の動きの方向 (赤色の矢印). 青色の矢印は DNA 結合に伴う構造変化の方向を示す. (c–d) 150-ns MD シミュレーションにおいて, 2 つの主成分の方向に対して最も大きな動きをしていたときの構造. (c) 第 1 主成分と (d) 第 2 主成分. (b) と (d) はステレオビューで表示してある.

編集部注: カラーの図はオンライン版を参照下さい.

SAXS データをうまく説明できることがわかった。また、得られたEcoO109Iの構造揺らぎの解析から、タンパク質の機能に深くかわる揺らぎの情報が得られ、MD-SAXS法がタンパク質の構造と揺らぎの関連研究に非常に有効であることが示された。

今回はMDシミュレーションから得られた溶液散乱パターンと実験で得られた溶液散乱パターンが良く一致したケースを紹介したが、一致しない例も十分に有り得る。したがって、物理化学的にも無理のない構造アンサンブルを作製し、実験で得られる溶液散乱パターンに一致させるアルゴリズムを開発してMD-SAXS法の高度化を図ることが今後の課題であろう。さらに、著者らは天然変性タンパク質や天然変性領域をもつマルチドメインタンパク質といった非常に大きな揺らぎをもっている系においてもMD-SAXS法が利用できるような方法論の開発・高度化にも着手している。

なお、本研究は、横浜市立大学大学院の橋本 博博士および小田 隆博士との共同研究によるものであり、ご協力に感謝申し上げます。

文 献

- 1) M. Ikeguchi, J. Ueno, M. Sato and A. Kidera: *Phys. Rev. Lett.* **94**, 078102 (2005).
- 2) D. I. Svergun and M. H. J. Koch: *Q. Rev. Biophys.* **36**, 147 (2003).
- 3) C. D. Putnam, M. Hammel, G. L. Hura and J. A. Tainer: *Q. Rev. Biophys.* **40**, 191 (2007).
- 4) M. Karplus and J. A. McCammon: *Nat. Struct. Biol.* **9**, 646 (2002).
- 5) T. Oroguchi, H. Hashimoto, T. Shimizu, M. Sato and M. Ikeguchi: *Biophys. J.* **96**, 2808 (2009).
- 6) T. Oroguchi and M. Ikeguchi: *J. Chem. Phys.* **134**, 025102 (2011).
- 7) T. Oroguchi and M. Ikeguchi: *Chem. Phys. Lett.* **541**, 117 (2012).
- 8) O. Glatter and O. Kratky: *Small-Angle X-ray Scattering*, Academic Press, London, U.K. (1982).
- 9) M. Nakasako: *Philos. Trans. R. Soc. London B* **359**, 1191 (2004).
- 10) N. V. Nucci, M. S. Pometun and A. J. Wand: *Nat. Struct. Mol. Biol.* **18**, 245 (2011).
- 11) H. Hashimoto, T. Shimizu, T. Imasaki, M. Kato, N. Shichijo, K. Kita and M. Sato: *J. Biol. Chem.* **280**, 5605 (2005).
- 12) A. J. C. Wilson and E. Prince: *International Tables for Crystallography*, p.548, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands (1999).
- 13) Y. Seki, T. Tomizawa, N. N. Khechinashvili and K. Soda: *Biophys. Chem.* **95**, 235 (2002).
- 14) F. Merzel and J. C. Smith: *Acta Crystallogr. D* **58**, 242 (2002).

- 15) A. D. MacKerell, Jr., D. Bashford, M. Bellott, R. L. Dunbrack, Jr., J. D. Evanseck, M. J. Field, S. Fischer, J. Gao, H. Guo, S. Ha, et al.: *J. Phys. Chem. B* **102**, 3586 (1998).
- 16) W. L. Jorgensen, J. Chandrasekhar, J. D. Madura, R. W. Impey and M. L. Klein: *J. Chem. Phys.* **79**, 926 (1983).
- 17) M. Ikeguchi: *J. Comput. Chem.* **25**, 529 (2004).
- 18) A. Guinier and G. Fournet: *Small-angle Scattering of X-rays*, John Wiley & Sons, New York (1955).
- 19) A. Kitao, F. Hirata and N. Gō: *Chem. Phys.* **158**, 447 (1991).

プロフィール

壺口友隆 Tomotaka OROGUCHI
慶應義塾大学・理工学部・物理学科
Department of Physics, Faculty of Science and Technology, Keio University
〒223-8522 神奈川県横浜市港北区日吉3-14-1
3-14-1 Hiyoshi, Kohoku-ku, Yokohama, Kanagawa 223-8522, Japan
e-mail: oroguchi@phys.keio.ac.jp
最終学歴：東京大学大学院理工学系研究科物理学専攻 博士（理学）
専門分野：生物物理
現在の研究テーマ：タンパク質ダイナミクス・水和構造

池口満徳 Mitsunori IKEGUCHI
横浜市立大学大学院生命医科学研究科生命医科学専攻
Graduate School of Medical Life Science
〒230-0045 横浜市鶴見区末広町1-7-29
1-7-29 Suehiro-cho, Tsurumi-ku, Yokohama 230-0045, Japan
e-mail: ike@tsurumi.yokohama-cu.ac.jp
最終学歴：東京大学農学系研究科
専門分野：生物情報科学・分子シミュレーション

佐藤 衛 Mamoru SATO
横浜市立大学大学院生命医科学研究科生命医科学専攻
Graduate School of Medical Life Science
〒230-0045 横浜市鶴見区末広町1-7-29
1-7-29 Suehiro-cho, Tsurumi-ku, Yokohama 230-0045
e-mail: msato@tsurumi.yokohama-cu.ac.jp
最終学歴：大阪大学大学院工学研究科
専門分野：構造生物学、生物物理学
現在の研究テーマ：核内タンパク質の構造・揺らぎ・機能の解析