

Newsletter No.7
January 2022

2019–2023 年度 文部科学省科学研究費助成事業
Non-equilibrium-state molecular movies and their applications
高速分子動画法によるタンパク質非平衡状態構造解析と
分子制御への応用

目次	
領域代表より	2
イベント情報	3
これまでの領域活動	3
「高速分子動画」技術解説	4
ハイライト研究紹介	7
総括班よりお知らせ	9

あけましておめでとうございます。今年も新学術領域「高速分子動画」をよろしく申し上げます。去年は中間評価の年でプレッシャーがあったのですが、皆様のおかげで無事終了することができました（結果の詳細についてはまだ公表されていないので、ここで言及することは差し控えます）。今年新しい公募班の人たちが加わることもあり、領域のゴールに向けて積極的に進んでいきたいと思っております。

次の大きなイベントは5月12・13日にある横浜領域会議です。この2年間 COVID-19 で海外渡航が厳しく制限されていることもあり、国際学会参加の機会がほとんどありませんでした。これは特に伸び盛りの若手にとっては大きな問題だと思います。そこで、領域会議の機会に二日間の国際シンポジウムを開催することにしました。タイトルは“Molecular movies and beyond”で分子動画を核とした領域の今後の方向について議論しようというものです。カバーする分野として、高速分子動画を中心とした構造生物学、ケミカルバイオロジー、計算科学の三領域を選び、それぞれ四人ずつのスピーカーを集めています。また昼間は去年の領域会議でも行った、パラレルのショートトークセッションを行い領域内外の若手を中心とした交流を促そうと考えています。現時点ではハイブリッド方式の開催を目指しており、横浜理研での実ポスターセッションを行う可能性についても検討しているところです。2月中には詳細を専用のウェブページで公表できると思っておりますのでしばらくお待ちください。今年も一緒に「高速分子動画」を盛り上げていきましょう。



領域代表 岩田想（京都大学医学研究科）

Twitter
始めました

ホームページを2019年9月より立ち上げ、事務局で更新中。記事や情報を募集中！

【HP】 <http://www.molmovies.med.kyoto-u.ac.jp>

Twitterを2021年12月より開始。Facebookも継続中。

誰でも更新OKなので、希望者は事務局（mol_movie@mfour.med.kyoto-u.ac.jp）にご連絡ください。

【Twitter】 <https://twitter.com/MolMovies>

【Facebook】 <https://www.facebook.com/MolMovies/>



イベント情報

2022年5月12日(木)～13日(金) 令和4年度「高速分子動画」国際シンポジウム・領域会議(横浜, オンラインハイブリッド開催予定)

2021年8月以降の領域活動

2021年8月27日(水) 第19回総括班会議(Web)

2021年9月7日(火) 公募説明会(オンライン開催)

2021年9月21日(火) 第13回新学術「高速分子動画」オンラインセミナー(講演者:池口満徳先生・横浜市立大片山耕大先生・名古屋工業大)

2021年9月27日(月) 第20回総括班会議(Web)

2021年10月12日(火) 第14回新学術「高速分子動画」オンラインセミナー(講演者:小野純一先生・京都大,菅倫寛先生・岡山大)

2021年11月1日(月)～2日(火) 令和三年度「高速分子動画」シンポジウム(淡路夢舞台国際会議場, オンラインハイブリッド開催)

2021年11月1日(月) 第21回総括班会議(淡路夢舞台国際会議場)

2021年11月3日(水)～5日(金) 第94回日本生化学会大会・シンポジウム共催(オンライン開催)

2021年11月25日(木)～27日(土) 第59回日本生物物理学会年会・シンポジウム共催(オンライン開催)

2021年11月30日(火) 第15回新学術「高速分子動画」オンラインセミナー(講演者:櫻庭俊先生・量子研,下村拓史先生・生理研)

2021年12月14日(火) 第16回新学術「高速分子動画」オンラインセミナー(講演者:宮下治先生・理研,杉本宏先生・理研)

2021年12月16日(木)～21日(火) Pacificchem 2021(オンライン開催)

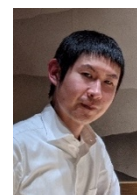
2021年12月21日(水) 第22回総括班会議(Web)

2022年1月7日(金)～9日(日) 第35回日本放射光学会年会・放射光科学合同シンポジウム(オンライン開催)

「高速分子動画」技術解説！

計算科学の手法について：大規模量子分子動力学法

小野 純一（京大・C01 公募班）



タンパク質などの生体分子が機能を発現する過程では、構造変化や化学反応が重要な役割を果たしている。その機能発現機構の詳細を解析する手法の一つとして、計算科学が有用な場合が多々ある。本記事では、生体分子のような大規模系での化学反応過程の解析に適した大規模量子分子動力学（quantum molecular dynamics: QMD）法を概説する。また、高速分子動画法と大規模 QMD 法を組み合わせることにより、光受容膜タンパク質の一種であるバクテリオロドプシン（bacteriorhodopsin: BR）における構造変化と共役したプロトン移動反応の微視的機構を解明した最近の理論研究[1]について紹介する。

大規模量子分子動力学法

プロトン移動、電荷移動、分極効果といった量子的な現象を適切に取り扱うためには、系の電子状態の変化を量子化学的手法によって記述する必要がある。系の電子状態が原子核の配置に対して即座に追従するという近似（Born–Oppenheimer 近似）のもとで、原子核の各瞬間配置に対して系の電子状態を量子化学的に解き、その結果求まるポテンシャルエネルギー曲面上での原子核の古典的運動を数値的に時間発展させる手法が QMD 法である。表 1 に代表的な QMD 法と古典分子動力学（classical molecular dynamics: CMD）法において計算可能な原子数と時間スケールについてまとめる。密度汎関数法（density functional theory: DFT）や、その半経験的手法である密度汎関数強束縛（density-functional tight-binding: DFTB）法に基づく QMD 法では、化学反応を取り扱うことが可能な反面、電子状態計算の高い計算コストのため空間スケールでは高々1,000 原子系、時間スケールでは最長サブナノ秒の現象しか取り扱うことができない。

一方、経験力場に基づく CMD 法では、電子状態計算の回避による大幅な計算コスト削減のため空間スケールでは最大 10 億原子系、時間スケールでは最長ミリ秒の現象を取り扱うことが可能な反面、化学反応を取り扱うことが困難である。

電子状態計算の計算コストを削減する線形スケールリング法（divide-and-conquer: DC）法と DFTB 法を組み合わせた DC-DFTB 法は、従来の QMD 法と CMD 法との間に存在する時空間スケールのギャップを埋める大規模 QMD 法として開発された[2]。本手法により、空間スケールでは最大 10 万原子系、時間スケールでは最長ナノ秒の化学反応を伴う現象を取り扱うことが可能になった（表 1）。

DC-DFTB法によって、QMD法で計算可能な時空間スケールが拡張され、生体分子系のような数万原子規模の全原子 QMD 計算が実現可能となったが、生体分子系においてマイクロ秒からミリ秒の時間スケールで起きる遅い構造変化や化学反応を取り扱うことは依然として困難である。そこで、遅い運動を人為的に促進する拡張サンプリング手法の一種であるメタダイナミクス（metadynamics: MetaD）法[3]を DC-DFTB 法と併用した。MetaD 法は、対象とする反応を特徴付ける変数（集団変数）を事前に設定した上で、集団変数によって定義される反発型のバイアスポテンシャルを順次印加し、状態間遷移を促進する手法である。MetaD 法では、加えたバイアスポテンシャルの情報より自由エネルギー解析を実行することができる[4]。

DC-DFTB-MetaD法により、大規模な生体分子系における遅い化学反応を解析するための基盤技術が確立された。本手法の有効性を実証するため、我々は微生物型ロドプシンの一種である BR のプロトン移動反応[5]に着目した。

表 1. 代表的な QMD 法と CMD 法において計算可能な原子数と時間スケール。

相互作用	QMD			CMD
	DFT	DFTB	DC-DFTB	経験力場
原子数	~10 ³	~10 ³	~10 ⁵	~10 ⁹
時間スケール	~10 ¹ ps	~10 ² ps	~10 ⁰ ns	~10 ⁰ ms
化学反応	OK	OK	OK	NG

バクテリオロドプシンのプロトン移動反応への応用

微生物型ロドプシンは、細菌、古細菌、真核微生物やウイルスなどの微生物中に存在する光受容膜タンパク質であり、膜貫通ヘリックス構造や発色団の結合様式（Schiff 塩基）など多くの共通点を持ちながら、イオンポンプ、イオンチャネル、走行性センサーや酵素といった多様な機能を発現する。特に、光開閉カチオンチャネル機能を有するチャネルロドプシン（ChR）

が神経細胞の膜電位を光で制御する分子ツールとして初めて応用され、光遺伝学 (optogenetics) と呼ばれる新たな分野の創成につながった[6]。2021年には、網膜色素変性症により視力を失ったヒトの患者に対して ChR を用いた光遺伝学による治療法が施され、視力が一部回復することが実証された[7]。

代表的な微生物型ロドプシンである BR では、発色団の光異性化を始点とした光反応サイクル上で少なくとも 5 段階のプロトン移動が連鎖することにより、生体膜内外の能動的プロトン輸送が実現する (図 1)。その結果生じる生体膜内外のプロトン濃度勾配は ATP 合成反応の原動力となるため、BR は微生物中で光エネルギー変換の役割を担っており、人工の光エネルギー変換装置の分子ツールとしても近年応用されている [8]。

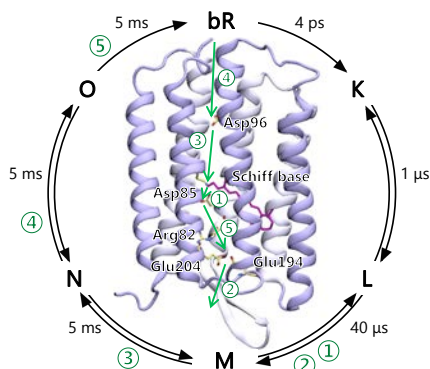


図 1. BR の結晶構造と光反応サイクル。

BR の 1 段階目のプロトン移動反応では、L 型から M 型中間体へと遷移する過程において、発色団のプロトン化 Schiff 塩基から Asp85 へとプロトンが移動する。これまで、BR の L 型中間体を対象とした複数の X 線結晶構造解析が報告されてきたが、X 線損傷の影響等により活性部位の水素結合ネットワークや内部水分子の有無に関して顕著な差異が生じていた。QMD 計算による反応機構の解析結果は初期位置として採用する結晶構造に大きく左右されるため、1 段階目のプロトン移動の反応機構を理論的に解析する上で、X 線損傷の影響を受けない結晶構造解析が望まれていた。

2016 年に SACLA の X 線自由電子レーザーによって BR の光反応サイクル中間体 13 点の分子動画が撮像された[9]。その結果、光照射に伴う BR および内部水分子の重原子位置の時間変化が初めて解明された。特に、L 型中間体において活性部位近傍に内部水分子 Wat452 が特異的に出現したことから、Wat452 が 1

段階目のプロトン移動に何らかの形で関与していることが示唆された。

BR の分子動画のうち、L 型中間体の結晶構造 (PDB ID: 5H2K) を初期位置として採用し、真空中での BR (気相モデル、約 3,800 原子) を量的に取り扱う DC-DFTB-MetaD 計算を複数回実行した。その結果、プロトン化 Schiff 塩基の脱プロトン化を始点として Wat452 を介さず Thr89 のみを経由して Asp85 ヘリレー形式 (Grotthuss 機構) でプロトンを輸送する経路 (Path 1)、プロトン化 Schiff 塩基の脱プロトン化を始点として Wat452 および Thr89 を介して Asp85 ヘリレー形式でプロトンを輸送する経路 (Path 2)、Wat452 の脱プロトン化を始点として Thr89 を介して Asp85 ヘリレー形式でプロトンを供与した後、Wat452 から生じた水酸化イオン中間体 (OH⁻) がプロトン化 Schiff 塩基からプロトンを受容することでプロトンを輸送する経路 (Path 3, 図 2) が存在することが明らかになった。Path 1 および Path 2 は分子動画登場以前の X 線結晶構造に基づく量子古典混合 (QM/MM) 計算により既に提唱されていた経路であるのに対し、Path 3 は全く新しい経路であった[1]。

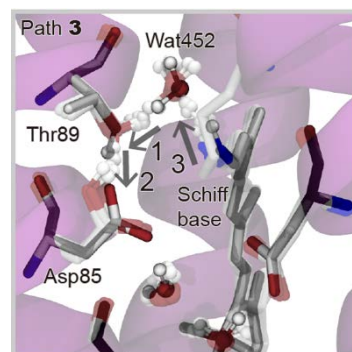


図 2. Path 3 のスナップショット。

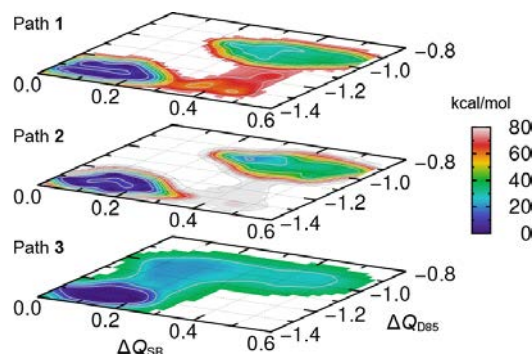


図 3. 各経路に対する 2 次元の自由エネルギー曲面。

各経路に対する2次元の自由エネルギー曲面を図3に示す。ここで、横軸および縦軸はそれぞれプロトン化 Schiff 塩基および Asp85 の電荷揺らぎに対応する反応座標であり、プロトン移動反応の進行に伴い値が増加するように定義した。Path 1 および Path 2 の自由エネルギー障壁は約 60 kcal/mol と非常に高いのに対し、Path 3 の障壁は約 30 kcal/mol と相対的に低い。したがって、BR の 1 段階目のプロトン移動反応は Path 3 で進行することが定性的に示された。BR の気相モデルに加え、脂質二重膜および水溶媒を含めたより実在系に近いモデル（約 10,000 原子）に対して最小エネルギー経路の解析を行ったところ、両方のモデルにおいて Path 3 の経路が得られた。また、脂質二重膜および水溶媒の効果により活性部位の水素結合ネットワークが収縮した結果、エネルギー障壁の値が約 6 kcal/mol 減少することが明らかになった[1]。このことから、脂質二重膜および水溶媒を含めたモデルに基づく DC-DFTB-MetaD 計算によって、Path 3 に対するより定量的な自由エネルギー解析結果が今後得られることが期待される。

高速分子動画法は、生体分子の機能発現過程における動的構造解析を実現する実験的手法として、構造生物学などの分野において技術革新を引き起こした。大規模 QMD 法は、高速分子動画法によって得られた構造情報を基に、化学反応を伴う生命現象に対する理解を深化させる役割を担っていると見える。今後、本領域内で高速分子動画法と大規模 QMD 法を組み合わせ

ることにより、BR 以外の様々な生体分子系において、化学反応が関与する機能発現機構の分子・原子・電子レベルでの解明が実現することを期待している。

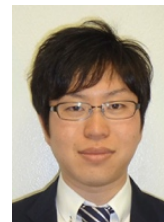
【参考文献】

1. J. Ono, M. Imai, Y. Nishimura, H. Nakai, *J. Phys. Chem. B*, **124**, 8524–8539 (2020).
2. H. Nishizawa, Y. Nishimura, M. Kobayashi, S. Irle, H. Nakai, *J. Comput. Chem.*, **37**, 1983–1992 (2016).
3. A. Barducci, G. Bussi, M. Parrinello, *Phys. Rev. Lett.*, **100**, 020603 (2008).
4. J. Ono, H. Nakai, *Chem. Phys. Lett.*, **751**, 137384 (2020).
5. O. P. Ernst, D. T. Lodowski, M. Elstner, P. Hegemann, L. S. Brown, H. Kandori, *Chem. Rev.*, **114**, 126–163 (2014).
6. E. S. Boyden, F. Zhang, E. Bamberg, G. Nagel, K. Deisseroth, *Nat. Neurosci.*, **8**, 1263–1268 (2005).
7. J.-A. Sahel, et al., *Nat. Med.*, **27**, 1223–1229 (2021).
8. Z. Chen, et al., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **58**, 4896–4900 (2019).
9. E. Nango, et al., *Science*, **354**, 1552–1557 (2016).

ハイライト研究紹介

細胞分裂を精密に光操作する技術の確立

松尾和哉 (京工繊大・A01 公募班)



2020 年度公募班の一員として、ケミカルバイオロジー技術（特に光化学を駆使した技術）の開発を行っている松尾 和哉です。2021 年 9 月までは北海道大学 電子科学研究所の所属でしたが、2021 年 10 月からは文部科学省の卓越研究員制度を利用し、京都工芸繊維大学 分子化学系にテニュアトラック助教として着任致しました（図 1）。本稿を書いている現在は、ようやく異動時のバタバタも一段落してきたところであり、心機一転、研究を推進していきたいと考えています。今後とも、みなさまの変わらぬご指導ご鞭撻のほど、よろしくお願い致します。

本稿では、これまでに、筆者が検討してきた細胞分裂を精密に光操作するための光薬理学的アプローチに関してご紹介させていただきます。

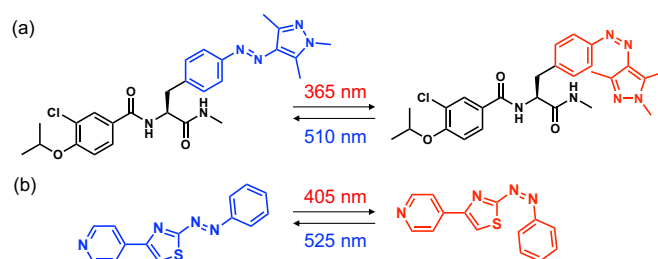
1 つの細胞が 2 つ以上の細胞へと分かれる細胞分裂の動的過程は、多種多様なタンパク質が高度に相互作用することで達成されます。細胞分裂の前中期において、複製された染色体を、赤道面へと移動させ、整列させるのが、モータータンパク質 CENP-E（Centromere-associated protein E）です。CENP-E は、ATP を加水分解して得られる化学エネルギーを、メカニカルな動きへと変換することで、紡錘体上を、染色体を担ぐようにして移動します。筆者らは、低分子の CENP-E 阻害剤に、arylazopyrazole という可逆的な *cis-trans* 光異性化反応を示すフォトクロミック分子を巧く組み込むことで、CENP-E の活性を可逆的に制御できる光制御型 CENP-E 阻害剤を開発することに成功しました（図 2a, *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, 142, 1763. *Org. Biomol. Chem.* **2021**, 19, 6979.）。



この光制御型 CENP-E 阻害剤を駆使することで、生細胞において、CENP-E 依存的な染色体の動きや配置を光で操作し、CENP-E の本質的な機能を明らかにすることにも成功しています。

また、モータータンパク質だけでなく、細胞質分裂に関与する ROCK（Rho-associated coiled-coil-containing protein kinase）というキナーゼにも着目し、この活性を可逆的に光制御できる arylazothiazole 型阻害剤を、最近報告しました（図 2b, *Chem. Commun.* **2021**, 57, 12500.）。ROCK は、広範な基質をリン酸化しますが、特に Rho（低分子量 GTP 結合タンパク質）依存的なアクチン系に深く関与することが知られています。実際に、開発した光制御型 ROCK 阻害剤を用いることで、細胞内に構築されたアクチンストレスファイバーの維持・崩壊を、光で制御することができました。

今後は、これまでに開発してきた細胞分裂関連タンパク質の光制御技術を駆使し、細胞分裂を精密に操作することで、細胞そのものの性質をエンジニアリングする新たな方法論を開拓することを目指しています。また、開発した光制御型リガンドが、各標的タンパク質とどのように結合し、解離するのかという、リガンド・標的タンパク質間の相互作用を、高速分子動画法によって理解することで、より効果的な薬剤を開発することも目指しています。



（左）図 1. メンターを務めてくださる小堀 哲生 教授の研究室の皆さんとの写真

（上）図 2. これまでに開発した光制御型阻害剤の例 (a) 光制御型 CENP-E 阻害剤、(b) 光制御型 ROCK 阻害剤

ハイライト研究紹介

嫌気下での高速分子動画撮影に向けて

當舎 武彦 (理研・A01 公募班)



私は学生の頃から金属酵素の反応機構に関する研究に取り組んできており、思い起こしてみると、常に嫌気下での実験に手を焼いてきたように思う。学生の頃は、一原子酸素添加酵素であるシトクロム P450 の研究を行っていた。本酵素は、活性中心のヘム鉄が還元された状態と酸素分子が反応することで開始されるため、反応を観測するためには、嫌気条件での実験が必要となる。留学中に対象としていた鉄貯蔵タンパク質フェリチンのH鎖は、活性部位において二価鉄と酸素分子が反応することで鉄の取り込みを行う。ここでも嫌気条件での実験が必要となったわけである。このように金属酵素の研究を行うためには、嫌気条件での実験をというのが常につきまとう。

さて、私の研究課題は、膜結合型一酸化窒素還元酵素(NOR)の反応機構の解明である。NOR は、ヘム鉄と非ヘム鉄からなる活性中心にて、NO を亜酸化窒素(N_2O)へと還元する ($2NO + 2H^+ + 2e^- \rightarrow N_2O + H_2O$)。これまで NOR の反応機構に関する多くの研究が行われてきたが、その解明には至っていない。反応中間体の寿命がミリ秒程度と短いために、その化学構造が未解明なためである。そこで、SACLAを用いた NOR の酵素反応の高速分子動画撮影ができれば、と考えたわけである。そのためには、どうやって NOR の反応を開始させるかを考える必要があるが、この点については、C01 班の久保先生、木村先生と共同研究を行ってきた照射により NO が発生するケージド NO を用いた系が利用できる。もう一つクリアしないとイケないのは、NOR の反応は還元型 NOR と NO が反応することで進行するので、嫌気条件を保つ必要がある点である。この問題を解決するために取り組んでいるのが酸素バリア性フィルムを使った実験である (図 1)。

酸素バリア性フィルムに注目したきっかけは、二つある。一つは、脂質キュービック相での結晶化用にフィルム状のプレートが市販されており、このフィルムが酸素分子を透過しなければ、嫌気条件を保ったまま結晶化および X 線回折実験が行えると考えたことである。もう一

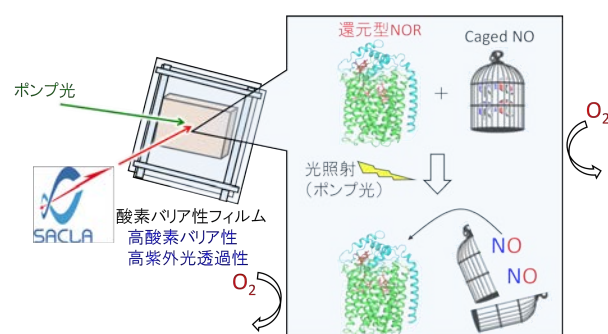


図 1. 酸素バリア性フィルムを用いた実験の概要。

つは、共同研究者である Diamond light source のグループがシリアル測定に用いている固定ターゲット型のチップにおいて、結晶の乾燥を防ぐためにフィルムで結晶を封じていたことである。このシリアル測定に酸素バリア性フィルムを用いれば、嫌気下での測定が可能となる。

酸素バリア性フィルムについて調べてみると、種々のフィルムが開発されていることがわかり興味深い。身近なところでは、食品の酸化による劣化を防ぐために、酸素バリア性フィルムが用いられている。いくつかのフィルムを検討した結果、エチレンとビニルアルコールの共重合体が非常に高い酸素バリア性を示すことがわかった。例えば、酸素分子と高い親和性を示す還元型のミオグロビンフィルム内に封じ込めると、一週間放置しても還元型を保つことができる。

このように、本課題では、酸素バリア性フィルムを用いて嫌気条件を保つことが可能となった。フィルムを使った NOR の結晶化および X 線回折実験にも取り組んでおり、構造解析が可能であることを確認できている。今後は、嫌気下でこのフィルムを用い、ケージド NO 存在下での還元型 NOR の結晶化を行い、反応中間体の構造を決定し、NOR の反応機構解明に決着をつけたい。また、本課題を通して得られた成果が他のメンバーの研究にも役立てられればと思っております。



総括班よりお知らせ

学術調査官

- ・ 田中 良和 東北大学・大学院生命科学研究科・教授
- ・ 鈴木 大介 信州大学・学術研究院繊維学系・准教授

総括班評価者

- ・ 上田 実 東北大学大学院生命科学研究科・教授
- ・ 中川 敦史 大阪大学蛋白質研究所・教授
- ・ 中村 春木 大阪大学蛋白質研究所・名誉教授
- ・ 松田 道行 京都大学大学院医学研究科・教授

総括班の役割分担

	担当者	項目
班長	岩田	研究全体方針、企画調整、共同研究調整
庶務・会計	岩田/南後	会議開催、書類とりまとめ、会計
広報	岩田/宮下	HP 作成、ニュースレター企画、facebook 企画
ワークショップ	清中/永野	ワークショップ企画、学会共催企画（国内）
渉外	久保/朴	海外派遣企画、海外招聘企画、国際会議企画（国外）
アウトリーチ	山本	SPring-8・KEK 併設企画、学会での展示企画