



筑波大学



筑波大学・計算科学研究センター



筑波大学・TARA センター



大阪大学

平成 21 年 11 月 5 日

筑 波 大 学

## 「タンパク質と金属の共同による“常識破り”の新しい仕組みを発見」 — ナトリウム・ブリッジ —

筑波大学計算科学研究センター 物質生命研究部門 計算生命科学分野（大学院数理物質科学研究科物理学専攻）の館野 賢准教授らの研究グループは、大阪大学の松村 浩由准教授と共同で、タンパク質と金属が共同して行う、生物機能における新しい特徴的な仕組みを、筑波大学の超並列コンピュータ PACS-CSなどを駆使して、コンピュータ・シミュレーションによって解明しました。

この研究成果は、11月3日（火）付け〔日本時間4日（水）〕アメリカ化学会誌「ジャーナル・オブ・アメリカン・ケミカル・ソサイエティ」のオンライン版に掲載されました。

### 本研究成果のポイント

- 1) タンパク質を構成している「水に溶けやすい」アミノ酸と「水に溶けにくい」アミノ酸とは、通常、安定な結合をつくれませんが、これまでの常識でした（まさに水と油の関係！）。ところが、ナトリウム（金属）イオンを介することにより、その「常識を覆す構造」が、このたびのタンパク質（T1リパーゼ）において証明されました。
- 2) この「常識破り」の構造は、「水に溶けにくい」環状のアミノ酸（フェニルアラニン）の環（正確には芳香環）の上にナトリウム・イオンが結合し（図1）、さらに「水に溶けやすい」複数のアミノ酸が、そのナトリウム・イオンに結合することによって生じること（図3）がわかりました。

- 3) これまでは「水分子」などが、環状のアミノ酸の上に結合している例が、タンパク質内に頻繁に見出されてきましたが、本研究（T1 リパーゼ）では、（水分子ではなく）ナトリウム・イオンが環（芳香環）と結合していることを、コンピュータ・シミュレーションによって初めて証明しました。これは従来、タンパク質内には見出されたことのない、最初の例です。
- 4) ここで、こうした「常識破り」の結合は、タンパク質（T1 リパーゼ）の内部の固いコア領域に見出されました。しかも同時に、この結合の存在する場所は、この酵素の反応部位でもあります。以上によりこの結合は、タンパク質の立体構造（コア）の形成とその機能（はたらき）の両方において重要な役割を有することを示しています。本研究では、この特徴的な結合が、酵素反応に関与するその仕組みについても明らかになりました。
- 5) タンパク質内におけるこうした環（芳香環）とナトリウム・イオンとの結合については、これまでのコンピュータ・シミュレーションでは、（長時間にわたる「ダイナミクス」を含めた）計算を正確に行うことはできませんでした。そこでこのたびの研究においては、こうした計算を精密に行うための計算法を新たに開発し、それを応用することによって、前述の研究成果を得ることに初めて成功しました。本研究で開発されたこの計算法は、こうしたコンピュータ・シミュレーションを正確かつ精密に行うために、現在唯一のものであります。

#### ポイントのまとめ — ふたつの“世界初”

- 1) タンパク質内における「常識破り」の結合 — 「水に溶けやすい」アミノ酸と「水に溶けにくい」アミノ酸を、ナトリウム・イオンが「橋渡し」（架橋）して結びつける — ナトリウム・ブリッジを証明し、タンパク質コアの新しい構造単位を明らかにした。また、この結合が有する機能（はたらき）を、酵素反応との連関において明らかにした（酵素反応への間接的寄与）。
- 2) 環状構造（芳香環など）と金属イオンとのこうした結合については、これまで（長時間にわたる「ダイナミクス」を含めた）計算を正確に行う手段はなかった。本研究においては、そのための高精度な計算手法の開発を初めて実現した（現在、唯一の高精度な計算手法）。

## 研究の背景

### 1) 「環状構造をもつアミノ酸」と「金属イオン」との特徴的な結合の発見と問題点

タンパク質は「アミノ酸」とよばれる単位が連結してできており、すべての生物は20種類の基本的なアミノ酸を持っています。それらのアミノ酸は、個々に様々な性質を有しており、水に溶けやすいもの・溶けにくいものや、中には環（リング）状の形をもつアミノ酸もあります。その中で、「環状構造をもつアミノ酸」の環（芳香環）の上に、「プラスの電荷をもったアミノ酸」が結合した特徴的な立体構造が、従来よりタンパク質の立体構造の中に頻繁に見出されてきました。それらは、酵素による反応などの生物機能において、重要な役割を果たしていることが明らかになっています。

ところが、「プラスの電荷をもつアミノ酸」の代わりに、「金属イオン」（やはりプラスの電荷をもつ）の場合には、化学における小分子では普通に見られるにも関わらず（図1参照）、タンパク質内部においてこれまでに発見された例は、わずかな例しか、ありませんでした。そうした中で、当研究チームのメンバである大阪大学の松村准教授らは、T1リパーゼとよばれるタンパク質（酵素）の立体構造において、「環状構造を有するアミノ酸」（フェニルアラニン）の環（芳香環）の上に、ナトリウム・イオンが結合していると考えられる、まったく新しい立体構造を発見しました（図3）。これは、環状構造アミノ酸（フェニルアラニン）とナトリウム・イオンが、タンパク質内で結合した構造として、最初の発見となった研究成果でした（2008年既報；後述の参考文献[2]）。

しかしながら、「環状アミノ酸の環の上に存在するのは、本当にナトリウム・イオンであるのか？」については、実験データを元に客観的かつ確実に証明することは困難でした。なぜなら、こうした場合通常は、（ナトリウム・イオンではなく）水分子が結合していることが多く、両者の違いを確実に証明することは非常に難しいためです。ましてや、環状アミノ酸とナトリウム・イオンとの結合が、どのような生物機能（はたらき）を有しているのかについては、まったく未知でした。

### 2) コンピュータ・シミュレーションにおける問題点

そこで本研究では、元来、重要な生物機能を有していると考えられる、こうした「環状（芳香環）アミノ酸とナトリウム・イオンとの結合」について、筑波大学のスーパーコンピュータ PACS-CSなどを駆使したコンピュータ・シミュレーションによって、詳しく解析することにしました。ところが、ここでまた困難な問題が生じました。それは、こうした環状アミノ

酸とナトリウム・イオンとの結合を、タンパク質の内部において（長時間にわたる「ダイナミクス」（運動性）を含めた）計算を正確に行うことのできる方法が、これまで存在しなかったのです。実際、精度を無視してそうした計算を行うと、環状アミノ酸とナトリウム・イオンとの結合や、タンパク質の立体構造自体が壊れてしまう結果となりました。そこで、当研究チームのメンバである筑波大学の舘野准教授らは、そうした計算を正確に実行するための新しい計算法を開発し、それを応用することによって、先のタンパク質（T1 リパーゼ）の正確なコンピュータ・シミュレーションを初めて実現しました。

以下で報告致します内容は、こうした新しい理論計算手法によって解析された研究成果です。

## 研究の内容

### 1) ナトリウム・ブリッジの証明

前述までのように本研究では、環状アミノ酸のひとつ（フェニルアラニン）の環（芳香環）の上に、ナトリウム（金属）イオンが結合した（図1）、タンパク質内の非常に特徴的な立体構造について調べました。これは先のように、T1 リパーゼとよばれるタンパク質（酵素）において見出され、コンピュータ・シミュレーションを用いてその詳しい解析を行った成果です。

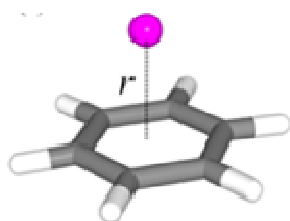


図1 ナトリウム・イオンが、環状構造をもつアミノ酸の環（リング）の上に結合して、非常に安定な構造を形成している様子。

本研究で解析したタンパク質（T1 リパーゼ）では、その内部の固い立体構造部分（コア）に、こうした構造の存在することを、コンピュータ・シミュレーションによって証明しました。

一般に、油は「水に溶けないもの」の代表ですが、生物にとって基本となる 20 種類のアミノ酸の中にも、油の性質をもった「水に溶けにくいもの」と「水に溶けやすいもの」とがあります。これらはまさに水と油の関係で、互いに混じらない（すなわち結合しにくい）のが通常です。実際、生体内では多くのタンパク質が水の中に存在するために、タンパク質の表

面には「水に溶けやすい」アミノ酸が、逆にタンパク質の内部には「水に溶けにくい」、すなわち、油の性質をもったアミノ酸が、多く存在します（図2）。これを水溶性のタンパク質と呼びます。

ところがこのたびの研究によって、タンパク質の内部に「水に溶けにくい」アミノ酸と「水に溶けやすい」アミノ酸とが、タンパク質内の固い立体構造（コア）を形成するために結合していることが明らかになりました（図3）。これら2種類のアミノ酸は、前述のように「水と油の関係」であり、通常は結合しにくく、安定な立体構造を形成することは難しいというのが常識です。ところが、その常識を破ったのが、前述のナトリウム・イオンと環状（芳香環）アミノ酸との結合でした。

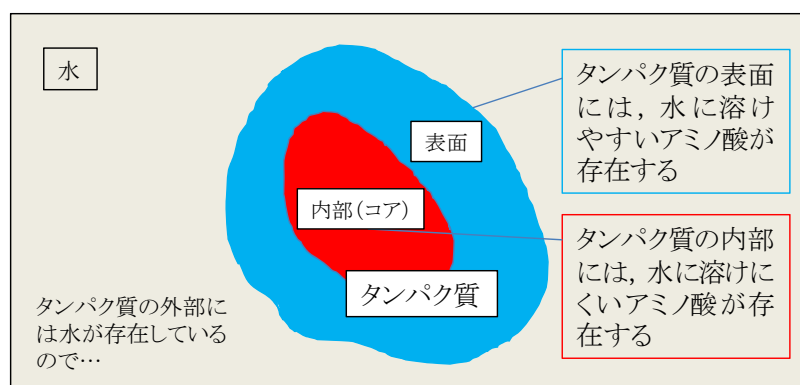


図2 タンパク質の立体構造の模式図。

一般に生体内では、タンパク質の外部に水が存在しているので、タンパク質表面には「水に溶けやすい」アミノ酸が、内部には「水に溶けにくい」アミノ酸が存在しています。こうしてタンパク質の内部は、「水に溶けにくい」(油の性質をもった)アミノ酸が、しっかりとした「固い」立体構造を形成して、その安定性を支えています。これはタンパク質の生物機能において、非常に重要です。

すなわち、環状アミノ酸のひとつ（フェニルアラニン）は、水に溶けにくいアミノ酸ですが、ナトリウム・イオンと、図1に示すような結合を形成することができます。そこで、そのナトリウム・イオンに「水に溶けやすい」アミノ酸がさらに結合することによって、ナトリウム・イオンを介して、「水に溶けにくい」環状アミノ酸（フェニルアラニン）と「水に溶

けやすい」アミノ酸とが結合します。すなわち、ナトリウム・イオンが、2種類のアミノ酸を「橋渡し」(架橋)することによって、元々は「仲の悪い」両者を結合させてしまうのです。それによって、タンパク質の内部で極めて安定な「コア」を形成することが可能であることが、このたびの研究によって証明されました。

前述のように、「水に溶けにくい」環状アミノ酸と「水に溶けやすい」アミノ酸とが安定な結合を形成することは、常識では考えられません。ところが生体は、ナトリウム・イオンを仲立ちにさせて、水と油の関係にある「仲の悪い」それら2種類のアミノ酸を、タンパク質内で安定に結合させてしまいます。生体は、この「常識破り」の結合によって、超安定なタンパク質の立体構造を形成させているのです。このようにして、T1リパーゼ内の「コア」構造の形成機構が明らかになりました。

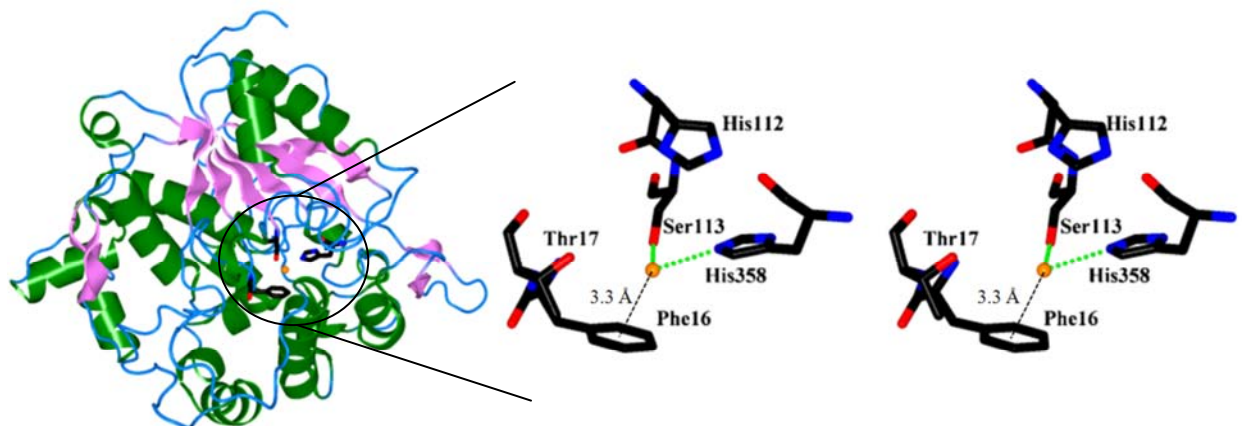


図3 T1リパーゼ(酵素)(左図)と、その酵素反応部位の立体構造(右図; ステレオ図)。

ナトリウム・イオンに3個のアミノ酸(Phe16, Ser113, His358)が結合しています。このうち、Phe16は環状の構造をもち、「水に溶けにくい」アミノ酸のひとつで、Ser113とHis358は、「水に溶けやすい」アミノ酸です。これら2種類のアミノ酸は、通常では結合することができないため、タンパク質内部に安定なコアを形成することはできません。ところが、ナトリウム・イオンと環状アミノ酸との結合(図1)により、上図の右図のように、「水に溶けにくい」アミノ酸(Phe16)と「水に溶けやすい」アミノ酸(Ser114, His358)とを架橋することによって結合し、安定な固い立体構造を形成することが見出されました。本研究において、これは「ナトリウム・ブリッジ」と名付けられました。

このように本研究は、通常は結合することの非常に難しい「水に溶けやすいアミノ酸」と「水に溶けにくいアミノ酸」とを、ナトリウム・イオンが「橋渡し」(架橋)することによって、逆にタンパク質の内部では、極めて安定な結合を創り出している仕組みを解明しました。これは同時に、T1 リパーゼ(酵素)の反応部位に存在し、その酵素反応において重要な役割を果たしていることもわかりました。そこでこの「常識破り」の立体構造 — 金属イオンとタンパク質の共同による巧妙かつ精妙な「知恵」 — は、本研究において「ナトリウム・ブリッジ」と名付けられ、タンパク質における新しい機能単位であることが明らかになりました。

## 2) 高精度な計算法の開発

本研究では、現在の実験技術の限界を乗り越えるために、コンピュータ・シミュレーションによる研究を推進しました。しかしこれまでは、図1の立体構造を含むタンパク質の場合には、その「ダイナミクス」(運動性)を含めた長時間にわたるコンピュータ・シミュレーションを高精度に行うことの可能な方法は、存在しませんでした。タンパク質のはたらきを調べるためには、その「ダイナミクス」を詳しく明らかにすることが不可欠なのです。しかし、「ナトリウム・ブリッジ」を含むタンパク質の運動性をこれまでの方法を用いて計算すると、その立体構造が壊れてしまいます。

そこで筑波大学・館野准教授らのグループは、「ナトリウム・ブリッジ」を正確に計算するための新しい計算法を開発しました。これは、以下のふたつのステップによりなっています。

第一は、量子力学 (*ab initio*) 計算によって、ナトリウム・ブリッジの様々な構造に対して、高精度なエネルギーの値を求めるステップです。例えば、図1の  $r$  をいろいろ変えて、それぞれの場合について量子力学計算を行います。しかもこのとき、通常量子力学計算(密度汎関数法=DFT法など)ではなく、より高度な計算法(CCSD(T)法など)を用いることによって、極めて正確なエネルギーを求めることが重要です。

しかしこうした計算には、スーパーコンピュータを用いたとしても、膨大な計算時間が必要となります。そのため、量子力学計算を用いて(通常DFT法などであっても)、「ナトリウム・ブリッジ」を含むタンパク質全体の「ダイナミクス」(運動性)を長時間(数ナノ秒)にわたって計算することは、現在のところ到底不可能です。

そこで次は、高度な量子力学計算によって得られた正確なエネルギーの値を、より簡単な式によって再現することができるように、新しい「式」(エネルギー関数)を構成する段階です。すなわち、膨大な時間を要する高度な量子力学計算の結果を、「単純なエネルギーの式」

(effective potential) に焼き直す段階が、この第2のステップです。これによって、多くの時間を要する高度な量子力学計算を行うことなく、それと同等な計算精度を有するエネルギーの値を、極めて短時間で求めることができるようになります。

このように、極めて高精度なエネルギーを、計算量を増やすことなく求めることができる計算手法が、このたびの研究によって開発された新しい理論です。本研究では、これを応用することによって、前述のように「ナトリウム・ブリッジ」を証明し、さらにそのはたらきの仕組みを解明することができました。

### 3) 今後の展開

本研究で T1 リパーゼ内に見出された「ナトリウム・ブリッジ」は、小分子のモデル化学の分野ではよく知られたものでしたが、これまでタンパク質の内部には発見されていませんでした（世界初①）。「水に溶解しやすい」アミノ酸と「水に溶解にくい」アミノ酸とを強く結合させるといふ、タンパク質の立体構造における新しい機能単位（ストラテジ）は、今後タンパク質の人為的なデザインなどの分野においても、多大な影響をもたらすものと考えられます。例えば、特定の性質を有する薬剤（ドラッグ）をタンパク質に結合させるために、あらかじめ「ナトリウム・ブリッジ」をそのタンパク質に導入しておくことによって、効率的に薬剤を結合させるなどの応用が考えられます。実際、T1 リパーゼにおいては、この「ナトリウム・ブリッジ」のサイトに、「水に溶解にくい」物質が結合することによって、酵素反応が行われます。

また、一般に「環状物質と金属イオンとの結合」を、「ダイナミクス」を含めて正確に計算するための理論の開発は、長年にわたって試みられてきた重要な研究課題でした。量子力学計算を用いれば、エネルギーを計算することはできますが、それだけでは「ダイナミクス」を含めたコンピュータ・シミュレーションを行うことは不可能です。このたびの研究においては、「ナトリウム・ブリッジ」に代表される環状物質と金属イオンとの結合を、計算量を増やすことなく、タンパク質全体の「ダイナミクス」を含めて計算することが初めて可能になりました（世界初②）。これによって今後は、ナトリウム以外の様々な金属イオンと環状物質との結合も調べられるようになりました。

前述のように、タンパク質の中に「ナトリウム・ブリッジ」を新たに導入することによって、タンパク質と特定の性質を有する医薬品との結合を促進するなど、ドラッグ・デザインの分野に新たなストラテジをもたらすことも期待されています。そうした分野においては、



コンピュータ・シミュレーションの利用が既に広くもたらされているところでもあり、このたびの研究によって、「ナトリウム・ブリッジ」を含む分子設計も自由に可能となりました。これによって今後、コンピュータ・シミュレーションによる解析手法の地平を、飛躍的に拡張されることが期待されています。

## 参考文献

[1] Yohsuke Hagiwara, Hiroyoshi Matsumura, and Masaru Tateno: Functional roles of a structural element involving  $\text{Na}^+$ - $\pi$  interactions in the catalytic site of T1 lipase revealed by molecular dynamics simulations: *J. Ame. Chem. Soc.*, in press.

(今回のプレスリリースの対象となった論文)

[2] Hiroyoshi Matsumura, et al.: Novel cation- $\pi$  interaction revealed by crystal structure of thermoalkalophilic lipase: *Proteins* **70** (2008), 592-598.

(T1 リパーゼの立体構造の解明)

## 付記

本研究は、科学研究費補助金・特定領域研究「次世代量子シミュレータ・量子デザイン手法の開発」における公募研究「量子ハイブリッド分子動力学法による生体機能の量子デザイン」(平成 18 年 4 月～21 年 3 月)、科学研究費補助金・基盤研究 B「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」(平成 21 年 4 月～)、および筑波大学・TARA プロジェクト「電子ダイナミクスに基づく生体物質の機能構造および反応機構の構築原理」(平成 18 年 4 月～21 年 3 月)の一環として行われました。

## 発表者

国立大学法人筑波大学 計算科学研究センター 物質生命研究部門生命科学分野  
准教授 舘野 賢 (たての まさる)