

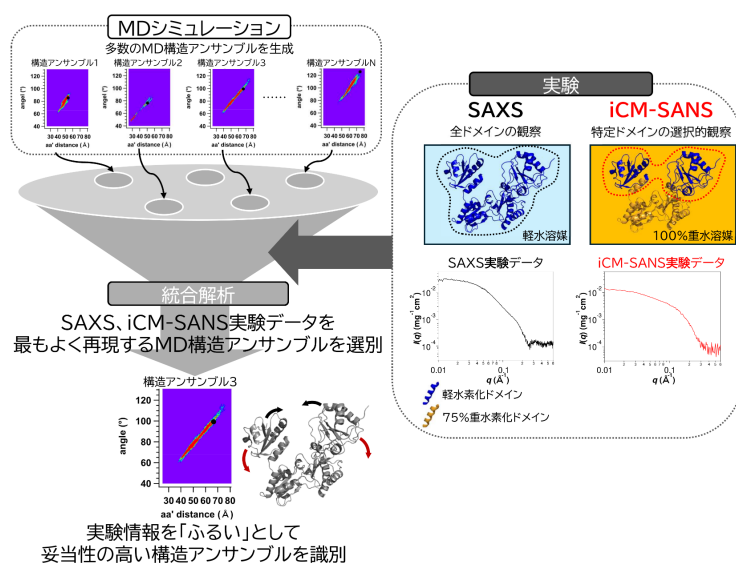
タンパク質の動く構造を読み解く

—中性子散乱と計算科学の統合解析—

概要

京都大学複合原子力科学研究所 奥田綾 准教授、井上倫太郎 同教授、黒川南 同助教、裏出令子 同特任教授、杉山正明 同教授らと大阪大学大学院薬学研究科、Institut Laue-Langevin (フランス)、Oak Ridge National Laboratory (米国) の国際共同研究グループは、複数の構造単位 (ドメイン) からなるマルチドメインタンパク質 (MDP) の動的構造を解析する新しい手法を開発しました。MDP はドメイン同士の相対的な位置関係を変えることで機能するため、その動的構造を理解することが機能解明に重要です。本研究では、区分重水素化試料と逆転コントラストマッチング中性子小角散乱 (iCM-SANS) 法を組み合わせ、タンパク質中の特定ドメインの配置を反映する情報を取得しました。さらにこの情報を X 線小角散乱 (SAXS) データおよび分子動力学 (MD) シミュレーションと統合することで、複数の MD シミュレーション由来の構造アンサンブルを適切に識別できることを実証しました。本手法は、MDP の動的構造解析を支える新たな基盤技術として、多様なタンパク質への応用が期待されます。

本研究成果は、2026 年 7 月 29 日に国際学術誌「*Journal of Applied Crystallography*」にオンライン掲載されました。



SAXS、iCM-SANS、MD シミュレーションを統合したタンパク質動的構造解析の概念図

(作成：奥田 綾)

1. 背景

タンパク質は生命活動を担う主要な分子であり、その機能は立体構造だけでなく、その立体構造が変化する「動的構造」と密接に関係しています。近年、この動的構造の理解が、生物学的機能の解明や創薬研究において重要であると考えられるようになってきました。特に、真核生物の多くのタンパク質は、複数の構造・機能単位（ドメイン）から構成されるマルチドメインタンパク質（MDP）^{※1}です。MDPでは、各ドメインが相対的な位置関係を変化させながら機能するため、その動的構造の解明が重要な課題となっています。しかしMDPが実際に機能を発現する溶液中では、複数の構造状態が共存しながら時間とともに移り変わるため、実験で得られる情報はそれらを平均化したものとなり、個々の構造状態を見分けることは容易ではありません。

溶液中のタンパク質の動的構造解析法として、近年、X線小角散乱（SAXS）法^{※2}と分子動力学（MD）シミュレーション^{※3}を組み合わせた手法が用いられています。しかし、MDPでは異なる構造集団であっても互いに似通ったSAXSプロファイルを示すことが少なくありません。そのため、MDシミュレーションから得られた複数の構造アンサンブル^{※4}が実験データを同程度に再現してしまい、どれが実際の状態を最もよく表しているのかを判断できないという問題がありました。これを解決するには、SAXSでは捉えられないドメイン配置の違いを反映した、相補的な実験情報が必要でした。

そこで注目されるのが中性子小角散乱（SANS）法です。中でも、逆転コントラストマッチング中性子小角散乱（iCM-SANS）法^{※5}では、75%重水素化したタンパク質を100%重水溶媒中で散乱的に不可視化できます。この性質を利用し、観測したいドメイン以外を重水素化した区分重水素化^{※6}試料を用いれば、残りの軽水素化した特定ドメインの散乱情報だけを取り出すことができ、SAXSでは得られないドメイン配置の違いを反映した実験情報が得られます。ただし、こうした区分重水素化試料の作製は容易ではなく、iCM-SANSによるMDPの構造解析に適した試料調製法は十分に確立されていませんでした。そのため、iCM-SANSで得られるドメイン選択的な情報が構造アンサンブルの識別に実際に有効かどうか、これまで実証されていませんでした。そこで本研究では、タンパク質ライゲーション技術^{※7}を用いて区分重水素化試料を作製し、iCM-SANS・SAXS・MDシミュレーションを統合することで、ドメイン選択的な実験情報が構造アンサンブルの識別に有効であることを実証しました。

2. 研究手法・成果

本研究では、小胞体でタンパク質の酸化的フォールディングに関与する4つのドメイン（**a**、**b**、**b'**、**a'**）からなるER-60をMDPのモデルとして用いました。これまで開発してきたタンパク質ライゲーション技術を用いて、中央の**bb'**ドメインのみを75%重水素化し、両端の**a**および**a'**ドメインは軽水素化した区分重水素化試料を作製しました。この試料に対しiCM-SANS測定を行うことで、重水素化した**bb'**ドメインを散乱的に不可視化し、空間的に離れた**a**ドメインと**a'**ドメインに由来する散乱情報を選択的に取得できます。これにより、ドメイン選択的な構造解析を実現しました。

さらに本研究では、サイズ排除クロマトグラフィー（SEC）とiCM-SANSを組み合わせたSEC-iCM-SANS測定を実施しました。SECで測定直前に凝集体などを除去することで、目的分子のみの散乱データを取得できます。あわせて、同一試料についてSAXS測定を行い、タンパク質全体の構造情報も取得しました。加えて、スーパーコンピュータ「富岳」を用いて複数のMDシミュレーションを行い、ER-60が取り得る多様な構造アンサンブルを得ました。各構造アンサンブルから理論散乱プロファイルを計算し、実験データと比較しました。SAXSデータだけでは複数の構造アンサンブルを見分けることが困難でしたが、iCM-SANSで得られたドメイン選択的な情報を統合することで、複数の構造アンサンブルをより信頼性高く識別できることを実証しました。

3. 波及効果、今後の予定

本研究で開発した手法は、今回用いた ER-60 に限らず、複数のドメインから構成される多様な MDP の構造ダイナミクス解析への応用が期待されます。また、タンパク質ライゲーション技術による区分重水素化試料の作製法は、今回用いた iCM-SANS に加え、今後さまざまな構造解析手法と組み合わせることで、タンパク質の特定領域を対象とした解析技術への展開が期待されます。一方で、区分重水素化試料の作製には高度な技術と手間を要するため、より簡便で汎用性の高い試料調製法の確立が今後の課題です。

近年の構造生物学では、タンパク質の静的な立体構造だけでなく、溶液中で揺らぐ構造集団と機能との関係を理解することが重要な課題となっています。本研究で構築した、中性子散乱と計算科学を融合した統合解析手法は、このような動的構造研究を支える新たな解析基盤となり、生命現象の理解に加え、創薬研究、バイオ医薬品開発におけるタンパク質の機能解明に貢献することが期待されます。

4. 研究プロジェクトについて

関連研究機関

京都大学複合原子力科学研究所、大阪大学大学院薬学研究科、Institut Laue-Langevin (フランス)、Oak Ridge National Laboratory (米国)

研究助成

- ・日本医療研究開発機構 (AMED) 創薬等先端技術支援基盤プラットフォーム (BINDS): JP22ama121001j0001、JP25ama121030
- ・日本学術振興会 科学研究費助成事業 (JSPS KAKENHI): JP23K13882、JP19KK0071、JP24K09406
- ・科学技術振興機構 (JST) ACT-X: JPMJAX2426

<用語解説>

※1 マルチドメインタンパク質 (MDP)

複数の構造・機能単位 (ドメイン) から構成されるタンパク質。ドメイン間の相対配置やその変化が、機能発現に重要な役割を果たす。

※2 X 線小角散乱 (SAXS) 法

試料に X 線を照射し、その散乱パターンから分子全体の大きさや形状に関する情報を得る手法。タンパク質の場合は結晶を作製することなく、生理的環境に近い溶液中で構造情報を取得できる。

※3 分子動力学 (MD) シミュレーション

タンパク質を構成する原子の運動を物理法則に基づいて計算し、時間とともに変化するタンパク質の立体構造や構造ダイナミクスを原子レベルで再現するシミュレーション手法。

※4 構造アンサンブル

タンパク質が取り得る複数の立体構造の集合。

※5 逆転コントラストマッチング中性子小角散乱 (iCM-SANS) 法

中性子は軽水素 (H) と重水素 (D) を大きく異なるものとして"見る"。この性質を利用し、タンパク質を約 75%重水素化して 100%重水 (重水素の水) の溶媒に溶かすと、そのタンパク質は中性子からほとんど見えなくなる。観測したい部分を軽水素のまま残し、それ以外を重水素化して見えなくすることで、狙った部分だけを中性子で選択的に観測できる。

※6 区分重水素化

試料の特定の領域のみを選択的に重水素化する技術。本研究ではライゲーション技術を用いてタンパク質の区分重水素化試料を作製した。iCM-SANS と組み合わせることで、重水素化した部分を散乱的に不可視化し、軽水素化された目的領域に由来する散乱情報を選択的に取得できる。

※7 タンパク質ライゲーション技術

個別に調製したタンパク質断片を共有結合により連結し、一つのタンパク質として再構築する技術。本研究では、酵素反応を利用したタンパク質ライゲーション技術により、特定ドメインのみを重水素化した区分重水素化試料を作製した。

<研究者のコメント>

我々はこれまで解析が難しかった MDP の動的構造解析を可能にするため、試料調製技術と高精度のデータが得られるサイズ排除クロマトグラフィーを連結した SANS、SAXS、計算科学を組み合わせた解析手法の構築に挑みました。特に、区分重水素化試料の作製は大きな挑戦でしたが、その技術を基盤として、タンパク質の動的構造を解析する新たな道筋を示すことができました。今後、本手法をさまざまなタンパク質へ展開し、生命機能の理解につながる研究へ発展させたいと考えています。(奥田 綾)

<論文タイトルと著者>

タイトル: Integrated Analysis with iCM-SANS, SAXS and MD Simulations for Dynamics of Multi-domain Protein (iCM-SANS、SAXS、および MD シミュレーションの統合によるマルチドメインタンパク質ダイナミクスの解析)

著 者: Aya Okuda, Rintaro Inoue, Minami Kurokawa, Anne Martel, Lionel Porcar, Rikuto Osaki, Kaori Fukuzawa, Kevin L. Weiss, Sai Venkatesh Pingali, Reiko Urade and Masaaki Sugiyama

掲 載 誌: *Journal of Applied Crystallography*

DOI: 10.1107/S1600576726005832