

北尾 彰朗

東京大学分子細胞生物学研究所・准教授

バイオ分子間相互作用形態の階層的モデリング

§1. 研究実施の概要

平成 22 年度は、蛋白質の構造変化が小さい場合での作用形態モデリングを更に高精度化・効率化すると共に、構造変化を取り扱うためのシミュレーション法の開発を進展させた。またコアターゲットと設定したがん抑制因子 p53 とインフルエンザウイルスを対象とする研究を展開した。

分子力場モデリンググループ(東大・北尾)では、構造変化に伴う自由エネルギー変化を計算するための並列・マルチスケールシミュレーションを開発し、いくつかの例で検証を行った。また松林グループと協力して結合自由エネルギー計算によって正しい複合体構造を絞り込む手法を、効率的に行うための条件を詳細に検討した。

空間的粗視化モデリンググループ(京大院理・高田)では、まず自己学習マルチスケール MD 法を β ヘアピンの構造形成に適用しその有効性を示した。次に、生体分子と水溶媒複合系のレプリカ交換法として変形版 REST 法を開発し、p53N 末端の天然変性領域を解析した。また、マルチスケール法により複合体形成時の構造変化予測のための AICG モデルを開発し、従来法より高精度な構造変化予測を達成し、これを用いてコアターゲットであるがん抑制遺伝子産物 p53 の N 末領域と DNA 結合ドメインにおける安定性解析を進めた。

情動的粗視化モデリンググループ(京大化研・松林)の目的は、タンパク質のようなナノスケール分子種に対する溶媒効果の自由エネルギー評価を定量的に行うことである。これまでに開発してきたエネルギー表示溶液理論のプログラムモジュールを自動化し、平衡ゆらぎでのタンパク質構造エネルギーと水和自由エネルギーの補償効果を見出し、水和の引力効果と斥力効果の特徴を抽出した。また、北尾グループと協力して、タンパク質複合体の全原子型構造解析を行った。

モデル精密化・検証グループ(岐阜大学・桑田)では、FMO 法を用い、ニワトリ卵白リゾチームと N-acetylglucosamine 三量体間の相互作用を、水和も考慮して解析した結果、モード1の相互作用エネルギーが、モード2よりも 6.17kcal/mol 安定であった。この値は、表面プラズモンレゾナ

ンス(SPR)法で得られた実験量に近く、エントロピー変化を正確に見積もることにより、十分、実用的な相互作用計算に耐えうるモデリングが可能となる、と予想される。また、モデリングを検証するための実験系として、新たに p53 の立体構造に基づく抗癌剤候補化合物、及び RNA ポリメラーゼの立体構造に基づく抗インフルエンザウイルス物質を見出した。

§2. 研究実施体制

(1)「分子力場モデリング」グループ

①研究分担グループ長:北尾 彰朗(東京大学分子細胞生物学研究所、准教授)

②研究項目

- ・モデリングフローの精査
- ・結合部位予測
- ・ドメイン構造変化予測
- ・分散シミュレーションによる複合体予測
- ・大規模シミュレーションによる作用解析
- ・研究の総括

(2)「空間的粗視化モデリング」グループ

①研究分担グループ長:高田 彰二(京都大学大学院理学研究科、准教授)

②研究項目

- ・複合体形成時に部分的な構造形成(あるいは変化)を伴う場合の複合体構造、複合体形態の予測
- ・階層的シミュレーション(多分解能レプリカ交換法など)による複合体予測
- ・階層シミュレーションによる相互作用解析

(3)「情動的粗視化モデリング」グループ

①研究分担グループ長:松林 伸幸(京都大学化学研究所、准教授)

②研究項目

- ・分子力場モデルでの溶媒効果評価
- ・分子力場モデルでの結合部位予測
- ・分子間相互作用 → 分布関数 → 自由エネルギーという解析フローの確立
- ・溶媒である水の役割の分子論的解明

(4)「モデル精密化・検証」グループ

①研究分担グループ長:桑田 一夫(岐阜大学人獣感染防御研究センター、教授)

②研究項目

- ・量子化学計算によるモデリング・パラメータの決定、改良
- ・表面プラズモン共鳴を用いた結合自由エネルギー、及びエンタルピーの実測
- ・NMR及びX線結晶解析を用いた複合体立体構造の決定
- ・実験結果との比較によるモデリングの検証、及び評価

§3. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(4-1)に対応する)

「分子力場モデリング」グループ(東大分生研・北尾グループ)

今年度は、昨年度に松林グループとの協力によって実証した、結合自由エネルギー計算を用いて候補構造を絞り込み、正しい複合体構造に近いデコイの選択する研究を更に押し進め、よりハイスループットに絞り込みの自由エネルギー計算を実行するための手順の確立を行った。複合体構造がわかっている複数のタンパク質-タンパク質複合体において、どのような計算手順をとれば効率的に正解構造を選び出せるかの検討を重ねている。また相互作用に伴うループ部位構造変化の予測・検証を行うための手法を開発した³⁾。

また、構造変化に伴う自由エネルギー変化を計算するためのマルチスケールシミュレーション法を開発し、これを複数のタンパク質系に応用した。具体的には、超並列スーパーコンピュータを効率的に活用するため完全に独立で非平衡な多数のシミュレーション結果を統合して、平衡状態の多数のシミュレーション結果を WHAM 法で統合する手法、MSFEL(Multiscale Free Energy Landscape analysis)を開発し、構造形成やドメイン運動に伴う自由エネルギー変化の検証に用いた¹⁶⁾。また、作用解析のために、モード間のカップリングを解析する独立部分空間解析の手法を開発し、ドメイン運動とカップルする局所的ゆらぎの検出に成功した¹⁰⁾。

開発してきたドッキング手法の応用としては、コアターゲットであるタンパク質 p53 と他のタンパク質ドメインのドッキングシミュレーションを行い、相互作用部位の推定を行っている。また DNA 修復酵素の1つ MutT に関して、核酸結合のメカニズムを明らかにした¹³⁾。

「空間的粗視化モデリング」グループ(京大院理・高田グループ)

・複合体形成時に部分的な構造形成(あるいは変化)を伴う場合の複合体構造、複合体形態の予測

昨年度までに開発した自己学習マルチスケールMD (SLMS-MD)法を、構造形成の問題に適用した。最初の適用例として、 β -ヘアピンモチーフ(シニョリン)のフォールディング過程のシミュレーションを行った。SLMS-MDの繰り返しによって全原子MDによる揺らぎ情報を反映すること、粗視化モデルが徐々にチューニングされていき、数回の繰り返しでシニョリンの自発的な構造形成を実現した。得られた粗視化ポテンシャルは、環境依存のポテンシャルになっており、高い特異性を示

した^{2),9)}。

コアターゲットであるがん抑制遺伝子p53のN末端は、転写活性化領域とよばれる機能上非常に重要な領域であるが、これは生理状態で変性している。しかしさまざまな活性化因子(たとえばMDM2)と結合して複合体になる際に構造形成を伴うモチーフが2つ(TAD1とTAD2)ある。我々は、タンパク質+水溶媒分子の系に有効に適用できる変形版REST法を提案し、TAD1の構造形成過程の構造サンプリングを行った。興味深いことに、p53 TAD1は予想どおり主に変性していたが、0.2%程度の確率で複合体形成時の構造に近いものをとることが分かった¹²⁾。

・階層的シミュレーション(多分解能レプリカ交換法など)による複合体予測

全原子MDのエネルギー分割法を利用して、マルチスケール手法によって原子相互作用に基づく粗視化モデル(AICGモデル)を開発した。AICG法では、各アミノ酸対がその対に含まれる原子対の(分割された)相互作用エネルギーに比例したポテンシャルをもつ。ポテンシャル関数のエネルギーバランスは、全原子MDによる揺らぎ情報を反映するようにチューニングされる。これにより、原子レベルの相互作用に直接立脚した粗視化モデルが構築された。AICG法によって、タンパク質揺らぎの平均値、アロステリックタンパク質の複合体形成時における構造変化予測において、従来法よりも有為に高い予測精度を達成した¹⁸⁾。

・階層シミュレーションによる相互作用解析

上記の全原子MDのエネルギー分割法による相互作用解析によって、多剤排出トランスポーターAcrBのホモ3量体複合体の単体間の相互作用を解析し、それに基づきAICGに似たマルチスケール法で粗視化モデルを構築した¹¹⁾。

コアターゲットであるがん抑制遺伝子 p53 のなかで、桑田グループの実験の標的である p53 DNA 結合ドメインの構造安定性解析を開始した。多数のがん患者の p53 遺伝子に見出される変異は p53 DNA 結合ドメインに集中している。変異部位は、直接 DNA に結合する界面だけでなく、それとは離れたループ領域にも散在する。これは DNA 結合ドメインの構造安定性の低下が原因と考えられる。落ちた安定性を向上することはドラッグ標的となりうる。上記のマルチスケール法、AICG モデルを適用して、p53 DNA 結合ドメインの構造安定性とドラッグ標的部位の探索を実行中である。

「情報的粗視化モデリング」グループ(京大化研・松林グループ)

本研究の目的は、水和自由エネルギーの分子論的解析である。現実系への展開を図る際には、定量的信頼性の評価が不可欠である。高精度の実験値が蓄積されているアミノ酸残基のアナログ分子を対象として、エネルギー表示法による自由エネルギー計算の精度を検証した⁵⁾。小分子の計算で化学精度が達成され、自由エネルギー摂動法などの MD 厳密手法の数十倍のスピードで、厳密法と遜色のない精度が得られることが分った。関連して、水と有機溶媒のダイナミクスの比較も、広い熱力学条件で行い、⁴⁾ 気液表面の扱いに拡張した¹⁹⁾。

タンパク質分子を対象としたとき、残基数 245・原子数 3577 までのサイズのタンパク質についての水和自由エネルギーの計算が可能であることが明らかになった⁶⁾。タンパク質分子の溶媒接触

表面積に基づく議論との比較によって、親水表面の中のイオン性表面と中性極性表面の果たす役割の違いを明らかにした。

シトクロム *c* 系の水和効果の解析を、前年度より継続して行った¹⁷⁾。堅いとされるシトクロム *c* 系でも、分子内エネルギーは 200 kcal/mol の範囲でゆらぐことが明らかになった。このエネルギーゆらぎは、電子移動に必要なエネルギーよりはるかに大きい。そして、分子内エネルギーのゆらぎが水和自由エネルギーのゆらぎによって、補償されることが見出された。タンパク質内エネルギーの大きなゆらぎが、水からくみ上げられていることを意味する。また、補償関係に基づく、タンパク質の多くの配座の検討をせずして、その安定性を議論できる。北尾グループとの協力によるタンパク質複合体の全原子型構造解析の速度向上につながった。

「モデル精密化・検証」グループ(岐阜大学・桑田グループ)

モデル精密化・検証グループ(岐阜大学・桑田グループ)では、下記の研究成果を得た。

現在 FMO 法を用い、種々の分子間相互作用モデリングを行っている^{1),7),8)}。FMO 法を用い、ニワトリ卵白リゾチームと N-acetylglucosamine 三量体間の相互作用を、水和も考慮して解析した結果、モード1の相互作用エネルギーが、モード2よりも 6.17kcal/mol 安定である、という結果が得られた。この値は、表面プラズモンレゾナンス (SPR) 法で得られた熱力学量 ($\Delta G = -6.45$ kcal/mol, $\Delta H = -9.10$ kcal/mol) に近い値であり、今後、北尾らと共同して、古典計算によりエントロピー変化を正確に見積もることにより、十分、実用的な相互作用計算に耐えうる、と期待される。また、FMO により詳細な相互作用プロフィールを解析した結果、ASP101 との相互作用が、モード1の安定化に大きく寄与していることが分かった。

また、p53 の立体構造に基づく抗癌剤候補化合物の開発では、ドッキングシミュレーションによって得られたリード化合物の類縁体¹⁴⁾を作成し、さらに効果のある化合物を複数発見することができた。

さらに RNA ポリメラーゼの立体構造に基づき、抗インフルエンザ作用¹⁵⁾を有する物質をドッキングシミュレーションにより探索した結果、現在使用されている医薬品の中で新たに抗インフルエンザ作用¹⁵⁾のあるものが、複数見出された。

このような実験結果に基づき、さらに FMO 法と古典計算によるモデルの精密化とその検証を行うことが可能である、と考えられた。

§4. 成果発表等

(4-1) 原著論文発表

●論文詳細情報

1. Satoshi Endo, Toshiyuki Matsunaga, Kazuo Kuwata, Hai-Tao Zhao, Ossama El-Kabbani, Yukio Kitade and Akira Hara, "Chromene-3-carboxamide derivatives

- discovered from virtual screening as potent inhibitors of the tumour maker, AKR1B10”, *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, vol.18, No.7, pp.2485-2490, (2010/April) (DOI: 10.1016/j.bmc.2010.02.050)
2. Wenfei Li, Hiroaki Yoshii, Naoto Hori, Tomoshi Kameda and Shoji Takada, “Multiscale methods for protein folding simulations”, *Methods*, vol.52, No.1, pp.106-114, (2010/April) (DOI: 10.1016/j.ymeth.2010.04.014)
 3. Steven Hayward and Akio Kitao, “The Effect of End Constraints on Protein Loop Kinematics”, *Biophysical Journal*, vol.98, No.9, pp.1976-1985, (2010/May) (DOI: 10.1016/j.bpj.2010.01.017)
 4. Ken Yoshida, Nobuyuki Matubayasi, Yasuhiro Uosaki and Masaru Nakahara, “Scaled Polynomial Expression for Self-Diffusion Coefficients for Water, Benzene, and Cyclohexane over a Wide Range of Temperatures and Densities”, *Journal of Chemical and Engineering Data*, vol.55, No.8, pp. 2815-2823, (2010/May) (DOI: 10.1021/jc100206s)
 5. Yasuhito Karino, Maxim V. Fedorov and Nobuyuki Matubayasi, “End-point calculation of solvation free energy of amino-acid analogs by molecular theories of solution”, *Chemical Physics Letters*, vol.496, No.4-6, pp.351-355, (2010/Aug.) (DOI: 10.1016/j.cplett.2010.07.054)
 6. Hiroaki Saito, Nobuyuki Matubayasi, Kiyoshi Nishikawa and Hidemi Nagao, “Hydration property of globular proteins: An analysis of solvation free energy by energy representation method”, *Chemical Physics Letters*, vol.497, No.4-6, pp. 218-222, (2010/Sep.) (DOI: 10.1016/j.cplett.2010.08.008)
 7. Norifumi Yamamoto and Kazuo Kuwata, “Redox behaviors of the neurotoxic portion in human prion protein, HuPrP (106-126)”, *Chemical Physics Letters*, vol.498, No.1-3, pp.184-187, (2010/Aug.) (DOI: 10.1016/j.cplett.2010.08.041)
 8. Takeshi Ishikawa Norifumi Yamamoto and Kazuo Kuwata, “Partial energy gradient based on the fragment molecular orbital method: application to geometry optimization”, *Chemical Physics Letters*, vol.500, No.1-3, pp.149-154, (2010/Aug.) (DOI: 10.1016/j.cplett.2010.09.071)
 9. Wenfei Li and Shoji Takada, “Characterizing protein energy landscape by the self-learning multiscale simulations: Application to a designed beta-hairpin”, *Biophysical Journal*, vol.99, No.9, pp.3029-3037, (2010/Nov.) (DOI: 10.1016/j.bpj.2010.08.041)
 10. Shun Sakuraba, Yasumasa Joti and Akio Kitao, “Detecting coupled collective motions in protein by independent subspace analysis”, *Journal of Chemical Physics*, vol.133, No.18, pp.185102 (10pages), (2010/Nov.) (DOI: 10.1063/1.3498745)

11. Xin-Qiu Yao, Hiroo Kenzaki, Satoshi Murakami and Shoji Takada, "Drug export and allosteric coupling in a multidrug transporter revealed by molecular simulations", *Nature Communications*, vol.1, pp.117 (8 pages), (2010/Nov.) (DOI: 10.1038/ncomms1116)
12. Tsuyoshi Terakawa, Tomoshi Kameda and Shoji Takada, "On easy implementation of a variant of the replica exchange with solute tempering in GROMACS", *Journal of Computational Chemistry*, vol.32, No.7, pp.1228-1234, (2010/Nov.) (DOI: 10.1002/jcc.21703)
13. Mariko Higuchi, Jumpei Fujii, Yoshiteru Yonetani, Akio Kitao and Nobuhiro Go, "Enhanced resolution of molecular recognition to distinguish structurally similar molecules by different conformational responses of a protein upon ligand binding", *Journal of Structural Biology*, vol.173, No.1, pp.20-28, (2011/Jan.) (DOI: 10.1016/j.jsb.2010.09.022)
14. Tsutomu Kimura, Junji Hosokawa-Muto, Yuji O. Kamatari and Kazuo Kuwata, "Synthesis of GN8 derivatives and evaluation of their antiprion activity in TSE-infected cells", *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, vol.21, No.5, pp.1502-1507, (2011/Jan.) (DOI: 10.1016/j.bmcl.2010.12.132)
15. Tomohiko Urushisaki, Tomoaki Takemura, Shigemi Tazawa, Mayuko Fukuoka, Junji Hosokawa-Muto, Yoko Araki and Kazuo Kuwata, "Caffeoylquinic acids are major constituents with potent anti-influenza effects in Brazilian green Propolis water extract", *ECAM*, (in press), (2011/Jan.) (DOI: 10.1155/2011/254914)
16. Ryuhei Harada and Akio Kitao, "Multi-scale free energy landscape calculation method by combination of coarse-grained and all-atom models", *Chemical Physics Letters*, vol.503, No.1-3, pp.145-152, 2011 (DOI: 10.1016/j.cplett.2011.01.017)
17. Yasuhito Karino and Nobuyuki Matubayasi, "Communication: Free-Energy Analysis of Hydration Effect on Protein with Explicit Solvent: Equilibrium Fluctuation of Cytochrome c", *Journal of Chemical Physics (Communication)*, vol.134, No.4, pp.041105 (4 pages), (2011/Jan.) (DOI: 10.1063/1.3535560)
18. Wenfei Li, Peter G. Wolynes and Shoji Takada, "Frustration, specific sequence dependence, and nonlinearity in large-amplitude fluctuations of allosteric proteins", *PNAS*, vol.108, No.9, pp.3504-3509, (2011/Feb.) (DOI: 10.1073/pnas.1018983108)
19. Hideaki Takahashi, Kunihiro, Maruyama, Yasuhito Karino, Akihiro Morita, Masayoshi Nakano, Pavel Jungwirth, and Nobuyuki Matubayasi, "Energetic Origin of Proton Affinity to the Air/Water Interface", *The Journal of Physical Chemistry B*, (in press), 2011 (DOI: 10.1021/jp2015676)
20. Kei-ichi Okazaki and Shoji Takada, "Structural comparison of F1-ATPase:

Interplay among enzyme structures, catalysis, and rotations”, *Structure*, (in press), 2011 (DOI:)