

「マルチスケール・マルチフィジックス現象の統合シミュレーション」
平成 19 年度採択研究代表者

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

本研究は、これまでの複合体構造予測の限界を打破し、より高精度で効率的なバイオ分子間相互作用形態モデリングを目指すものである。19 年度、分子力場モデリンググループ（東大分生研・北尾グループ）では、モデリング全体を可能とする最小限のフローをデザインと必要なモジュールの検討を行なった。また、結合部位予測の観点から、酵素－基質系に関して、蛋白質ダイナミクスと触媒部位との高い相関を明らかにした。更に既知の蛋白質－蛋白質複合体に関しては、静電相互作用が複合体配向の決定に統計的に有意に寄与していることを示した。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）では、コンポーネント構造モデリングおよび粗視化・階層的シミュレーションによる構造変化予測に取り組んだ。また、これまで開発してきた空間的粗視化シミュレーション手法を応用して、蛋白質の一部が大きく構造変化する可能性を予測する手法、および、複数レベルのモデルを組み合わせた階層的シミュレーション（多分解能レプリカ交換法等）の理論的検討を行った。情動的粗視化モデリンググループ（京大化研・松林グループ）の目的は、蛋白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なうことである。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一般化し、2000 原子程度の蛋白質の分子丸ごとの水和自由エネルギーの全原子型計算に適用した。また、ナノスケール不均一な生体モデル膜系への拡張を行い、膜－水分配係数の計算を可能とした。モデル精密化・検証グループ（岐阜大・桑田グループ）は、本プロジェクトでは、大規模な生体分子の分子間相互作用を精度良く・効率的に計算するため、研究・開発の基盤となる基礎データの収集に取り組んだ。また、実験的にプロテアーゼによる基質ペプチドの分解反応を正確に追跡できるシステムとして、高速液体クロマトグラフ質量分析計 (LC-MS) を用いたアッセイシステムを構築した。さらに標的タンパク質との複合体の原子座標を得るため、リゾチームと阻害剤との複合体 X 線結晶解析を行った。

2. 研究実施内容

(文中にある参照番号は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)

まず階層的モデリング全体の骨格を決定するモデリングフローを構築と精査を開始した。モデリングフローは全年度にわたって徐々に改良していく必要があると考えているので、本年度はモデリング全体を可能とする最小限のフローをデザインし、これに必要なモジュールの検討を行なった。

また、フローを実行するために必要なモジュールのひとつとして、結合部位予測の研究を開始した。まずその中でも比較的予測がしやすいと期待される蛋白質-低分子複合体に関して、情報生物学的な知見と形状という物理学的な知見を統合してモジュール開発を進めることを目指した。その結果、アミノ酸の組成の情報を無視し、蛋白質分子のC α 原子のみの形状情報を用いたネットワークモデルによるシミュレーションによって得られるダイナミクスを用いて、触媒部位を有意に予測できることが明らかになってきた。構造情報を更に粗視化した場合にもこれが成り立つことから、蛋白質の形状そのものが機能をかなり規定していることが示唆された。

また、蛋白質-蛋白質複合体の結合部位予測に関しては、まず情報生物学的解析を進め、複合体インターフェイスの位置や複合体形成時の構造変化に関する情報を集積し解析を開始した。その第1歩として蛋白質同士の結合過程において、正しい結合構造が決まるための主な要因として長距離相互作用が働いているという仮説を検証した。具体的には複合体構造が既知の蛋白質ペアを特定の距離に離してそれぞれ回転させた構造を生成し、各配向のポテンシャルエネルギーを計算した。これにより真の結合構造をそのまま離れた配向と、その他の配向のエネルギーの違いを測定できる。その結果から真の配向がエネルギー的・確率的に有利であるかどうかを検証し、さらに長距離での配向と関係のある蛋白質の静的性質を検討した。その結果、真の結合配向は長距離においてエネルギー的に最安定にはなっていないが、特に生理的な塩濃度下では多くのペアで確率的に有利になっていることを統計的に明らかにした。

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)

19年度は、モデリングフローのモジュールの中で、これまでの研究で準備が整っていた、コンポーネント構造モデリングについて、テスト計算を行い、フローへの適応性を検討した。

また、これまで開発してきた空間的粗視化シミュレーション手法を応用して、蛋白質の一部が大きく構造変化する可能性を予測する手法の検討を行った。粗視化シミュレーションでこれまで行ってきたフラグメントアセンブリ法では、蛋白質の一部の構造変化を取り扱うのに不向きである。そこで、フラグメントアセンブリ法の利点を生かしつつ、より柔軟な構造変化を実現できると期待できる分子動力学シミュレーションの方法を採用すべき

であろう判断した。具体的なアルゴリズムについても検討を行った。

さらに、複数レベルのモデルを組み合わせた階層的シミュレーション（多分解能レプリカ交換法等）の理論的検討を行った。小型蛋白質 **protein G** を例にとって、粗視化シミュレーションによって得られた約 20 万構造集団の各構造を初期構造として、それぞれに対して全原子モデルを構築し、最適化および短時間の分子動力学シミュレーションによって構造緩和を行って、モデルのリファインメントのテストを行った。その結果、1) 粗視化シミュレーションで得られたほぼ全ての構造から、無理なく全原子モデル構築を構築できること、2) 得られた全原子初期構造から数十ピコ秒のシミュレーションで、初期の構造緩和が概ね終わること、3) この間に、個々の構造がより天然構造に近づくことはないこと、4) 粗視化モデルで天然構造と近い安定性を示したミスフォールド構造は、全原子モデルではずっと不安定化することなどが明らかになりつつある。

情動的粗視化モデリンググループ（京大化研・松林グループ）

このグループの研究目的は、溶媒効果の自由エネルギーの定量的解析である。蛋白質のようなナノスケール分子種の水和・溶媒和の自由エネルギーを、全原子型の力場から求めることは、通常のシミュレーションでは不可能と見てよい。松林グループでは、MD から得られる溶質-溶媒相互作用エネルギーの分布関数によって、溶媒和自由エネルギーを構成するスキーム（エネルギー表示法）を開発し、ナノスケール不均一系の自由エネルギー解析を行う。本年度は、このスキームを実現するための一般的プログラムモジュールを開発した。このプログラムによって、2000 原子程度からなる α ラクトアルブミンの水和自由エネルギーを計算した。計算値は 1500 kcal/mol 程度におよぶ大きなものであった。蛋白質配座を固定した場合、100 ps 程度の短時間 MD によって、計算誤差は 1 %程度となることも分かった。さらに、アンフォールディング経路に沿った、溶媒効果の自由エネルギー安定化が見出され、分子内効果との競合を定量的に明らかにした。また、DMPC 膜への小分子結合の自由エネルギー解析を行った（原著論文 1）。疎水性分子の場合、膜中で大きな自由エネルギー安定化が起きるが、膜内部では強い局在化の傾向が無いことを示した。SDS ミセルの場合には疎水性コアへの局在化を見出しており、DMPC 頭部がいくつかのメチルやメチレン基を結合し親水性が「中途半端」であることによって、疎水性コアでの局在度が DMPC の場合に弱くなることを明らかにした。さらに、膜系で確立した不均一系の自由エネルギー解析を拡張し、電子 1 個を溶質とみなす新定式化によって、溶液系・生体分子系での還元電位の計算を可能とした（原著論文 2）。

モデル精密化・検証グループ（岐阜大・桑田グループ）

① Ab initio 量子化学計算を用いた分子間相互作用の計算

ab initio 量子化学計算を用いた方法により、構造変化や錯体形成に伴う分子間相互作用の変化について定量的評価を行った。その結果、構造変化に伴って静電ポテンシャルマップが大きく変化しており、このような系における分極効果が著しいことが明らかとなった（図 1）。

したがって、古典力場モデルを用いて蛋白質・金属イオン複合体を扱う場合、構造変化に伴う分極効果を考慮するために、適切かつ迅速に部分電荷を修正する工夫が不可欠となる。現在、予備研究の結果を受けて、Rappeと Goddard が提唱した電荷平衡 (QEq) 法に基づいた新しい分極可能ポテンシャルの開発に取り組んでいるところである。

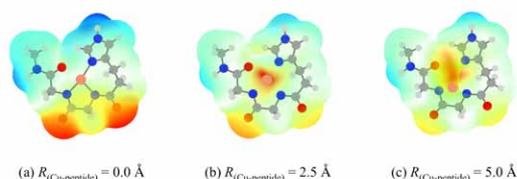
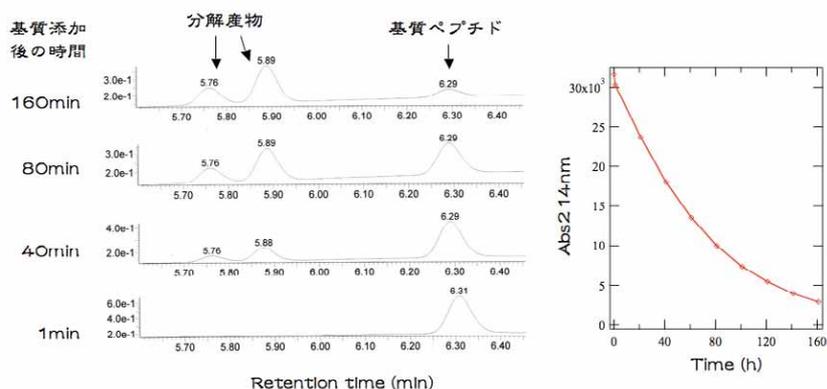


図1 Cu-His-Gly-Gly という銅・トリペプチドについて量子化学計算を行い、その結果をもとに electrostatic potential を作図した。

② プロテアーゼ阻害剤スクリーニングのためのアッセイ系の確立

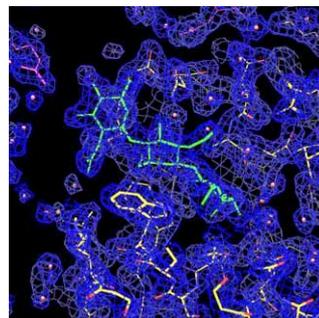
本システムを用い、セリンプロテアーゼの一種である α -chymotrypsin による基質ペプチド (Ala-Ala-Phe-CH₂Cl) の分解反応を観測した例を示す (図2)。

図2. α -chymotrypsin による基質ペプチドの分解反応。左図は、基質添加後のクロマトグラムの変化を示す。基質添加後、徐々に基質ペプチドが分解され分解産物が増えていく。右図は、基質ペプチドの吸収シグナルの経時変化を示す。



③ 複合体立体構造決定

分子間相互作用予測の出発点として、選抜された化合物と標的タンパク質との複合体の原子座標を得ることが重要である (原著論文 3)。我々は、リゾチームと阻害剤 tri-N-Acetylglucosamine (緑色) の複合体の結晶構造解析を行い、基質結合部に阻害剤の電子密度を確認した (図3 (右図))



3. 研究実施体制

(1)「北尾」グループ

① 研究分担グループ長:北尾 彰朗(東京大学、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

(2)「高田」グループ

① 研究分担グループ長:高田 彰二(京都大学、准教授)

② 研究項目

- ・複合体のコンポーネントである各バイオ分子の立体構造予測
- ・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

(3)「松林」グループ

① 研究分担グループ長:松林 伸幸(京都大学、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)「桑田」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

- ・本年度は、分子間相互作用モデリングの新たな体系化に向けた研究・開発の基礎となる基礎データを収集する。
- ・オンラインの立体構造情報データベースで単体構造と複合体構造が報告されている既知のタンパク質・リガンド複合体系を対象として、古典的な分子力場を用いた方法と、*ab initio* 量子化学計算を用いた方法で分子間相互作用の比較を行い、両者で得られた結果の比較・検討を行う。
- ・BIACORE を用いて、種々のタンパク質とリガンドとの結合定数やエンタルピーを実測し、計算結果と比較する。
- ・NMR 及び X 線結晶解析を用い、リゾチームとリガンドとの結合サイトや複合体構造を実測し、計算結果と比較する。

4. 研究成果の発表等

(1) 論文発表(原著論文)

- 1) N. Matubayasi, W. Shinoda, and M. Nakahara, "Free-energy analysis of the molecular binding into lipid membrane with the method of energy representation," *J. Chem. Phys.* **128** in press (2008)
- 2) H. Takahashi, H. Ohno, R. Kishi, M. Nakano and N. Matubayasi, "Computation of the Reduction Free Energy of Coenzyme in Aqueous Solution by the QM/MM-ER Method", *Chem. Phys. Lett.* **456**, in press (2008).
- 3) 松本友治, 鎌足雄司, 武藤(細川) 淳二, 中村寛則, 桑田 一夫: 構造ダイナミクスから生まれた抗プリオン化合物ー論理的アプローチによる創薬研究 化学 Vol.63, 40-44, 2008