

北尾 彰朗

東京大学・分子細胞生物学研究所・創生研究分野・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 20 年度は本研究課題の 2 年目にあたり、年度前半までにほぼ研究体制が整い研究を更に推進することができた。特にモデリングのコアとなる部分の開発が進んできた。

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、19 年度に開始したフローの精査および結合部位予測を継続するとともに、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を開始した。

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、粗視化・階層的シミュレーションによる構造変化予測、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)の研究開発を進めた。

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に基づいて、麻酔剤の膜結合に対する圧力効果、20 残基程度の膜蛋白質の脂質膜結合への支配因子の抽出、蛋白質への基質結合の不均一混合溶媒系溶媒和としての定式化とプログラム実装、凝縮相での還元電位の計算を行った。

モデル精密化・検証グループ(岐阜大学・桑田グループ)では、計算と実験の両面から分子間相互作用モデリングの検証とパラメーターの最適化を行う。これまで、蛋白質と低分子との相互作用実験、蛋白質コンフォメーション多様性に関する理論構築、蛋白質間相互作用の計算予測、及び蛋白質間相互作用の実験的解析を推進してきた。現在、リゾチームをモデル蛋白質として、量子化学計算、古典MD計算、及び Docking Simulation を行い、X 線回折や S P R 測定等の実験結果と比較している。また量子化学計算による、低分子化合物のポテンシャルエネルギー計算ツールを開発している。

2. 研究実施内容(文中にある参照番号は 4.(1)に対応する)

平成20年度は本研究課題の2年目にあたり、研究員の着任等、年度前半までにはほぼ研究体制が整い研究を更に推進することができた。またグループ間の連携もこれまでより更に深まってきた。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、まず、19年度に開始したフローの精査および結合部位予測を継続してきた。モデリングフローに関しては、蛋白質-蛋白質モデリングの場合に、与えられた立体構造に関して、(1)粗視化レベルでの網羅的ドッキング-(2)粗視化レベルでのフィルタリングによる確からしい候補構造の絞込み-(3)原子レベルでの精密化と作用解析、の3段階からなるモデリングフローを構築した。この中で20年度は鍵となる(2)に焦点を絞って手法開発を進めた。その結果、接触表面積をパラメータとするとこれまで(1)のドッキングスコアでうまくフィルタリングできないようなケースに関しても、上位の候補構造として拾い上げることができるようになってきた。昨年度から取り組んできた蛋白質-低分子複合体の結合部位予測に関しては、原子揺らぎと結合部位の関係を明らかにした(論文19)。また、蛋白質-蛋白質および蛋白質-低分子系に関し、それぞれ正解とドッキングで得られたデコイのセットを用意し、情報の粗視化モデリンググループによる結合自由エネルギー評価を実行するための準備を進めている。

今年度から新に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を開始した。ドメイン構造変化予測では各アミノ酸残基の代表原子をばねでつないで近似する粗視化モデルであるGaussian Network Model (GNM)やAnisotropic Network Model (ANM)などで得られる構造変化と蛋白質-蛋白質結合部位との関連について研究を開始した。またドメインよりも小さな構造変化も含んだ二面角遷移に由来する構造変化と複合体形成に関する情報収集をおこない、基礎データについて既にデータベース公開(<http://dynamics.iam.u-tokyo.ac.jp/DTA/>)するとともに論文発表した(論文20)。分散シミュレーションに関しては、超並列スーパーコンピュータの効率的な活用を目指し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、平衡状態での立体構造変化に関する自由エネルギー地形を決定する Multiple Markov Transition Matrices Method (MMMM)を開発した(未発行論文1)。現在までにペプチドまでで手法の検証が終了している。大規模シミュレーションによる作用解析では、べん毛繊維複合体構造形成の順序に関する問題を明らかにするとともに(論文1)、水和水が機能にかかわるような低振動モードに対して重大な影響を持つことを明らかにした(論文2)。

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、粗視化・階層的シミュレーションによる構造変化予測、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)の研究開発を進めた。

コンポーネントであるバイオ分子の立体構造予測では、二つの小型蛋白質をテストケースとして、まず粗視化モデルで網羅的に構造探索を行いその自由エネルギー面を解析した(論文18)。さらに、その構造アンサンブル中の約20万構造の粗視化モデルから全原子モデルを再構築し短い

緩和シミュレーションを行なったのちに、その原子モデルによるエネルギー面と上記の粗視化モデルによるエネルギー面とを比較した(吉井ら生物物理学会 2008 年会ポスター発表)。粗視化モデルによる高速で広範な構造サンプリングと全原子モデルによる再評価は、シンプルだが非常に有益なマルチスケール計算手法であることが明らかになった。粗視化・階層的シミュレーションによる構造変化予測では、リガンド結合エネルギーを考慮に入れた動的なエネルギー地形理論に基づくシミュレーション法を提案し、それによってリガンド結合と共役した構造変化形態の予測を行った(論文 3)。

階層的シミュレーションについては、自己学習マルチスケール分子動力学シミュレーション(SLMS-MD)法を提案した(図1)。生体分子のマルチスケールシミュレーションにおいて、原子レベルと粗視化レベルとを多分解能レプリカ交換法でタイトに結合する戦略が期待されている。ここでの、現実的かつ大きな問題は、一般に精度のよい粗視化モデルが存在しないことにある。粗視化モデルが全く間違った構造領域をサンプリングしてしまえば、全原子モデルでそれを補って正しい物理量を得ることは不可能である。そこで、我々は、多分解能レプリカ交換法でシミュレ

ーションを行ないつつ、その結果から reweighting によって粗視化モデルのエネルギー関数を高精度化していくアルゴリズム=SLMS-MD を提案した。簡単な分子のテストでは SLMS-MD は従来の方法より高速なサンプリングを可能にした。(Li&Takada 論文投稿中)

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膨大な計算時間を必要とする。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。まず、昨年度に続いて、ドラッグの脂質膜結合を解析し(論文 5)、動的な不均一性がある場合の局所解析も行った(論文 8)。さらに、一般麻酔薬ハロタンを取り上げ、膜結合強度の圧力依存性を解析した。1 世紀にわたる謎である圧力拮抗作用の要因として、膜結合強度の圧力依存性はマイナーであることを明らかにした(論文 6)。次いで、20 残基程度の膜蛋白質であるグリコフォリン A の膜貫通ドメインを取り上げ、その脂質膜結合の自由エネルギー解析を行った。結合自由エネルギーを脂質膜との相互作用の寄与と水との相互作用の寄与に分割し、結合の支配因子の知見を得た。安定化自由エネルギーに対する水の寄与は1/3に上ることが見出され、膜表面にある親水部との強い相互作用が定量化された。さらに、蛋白質への基質結合の解析に進んだ。蛋白質への基質結合を、これまでに行ったミセル・脂質膜への分子結合と同様に、不均一混合溶媒系での溶媒和として定式化した。この過程で、少数極限で厳密となるように自由エネルギー汎関数を改善し、プログラム実装した。また、溶液系・生体分子系での

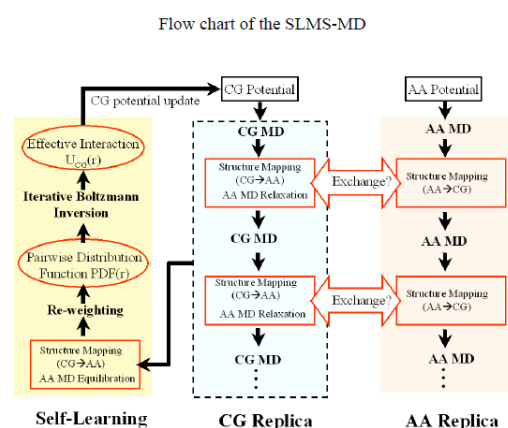


図 1

酸化還元過程の解析を行った。還元過程を、電子を「溶質」とし不均一混合溶媒系での溶媒和とみなし、ミセル・脂質膜・蛋白質への分子結合と統一的な計算手法を確立した(論文 4,7)。

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。

古典MD計算及び量子化学計算によるリゾチームと TriNAG との相互作用エネルギー解析では、ドッキングシミュレーションによって、Lysozyme に対する triNAG の結合モードが二つ得られた。しかし X 線結晶構造解析では、それとは異なるサイトの結合モードが得られた。我々は、3 つの結合モードに対して結合自由エネルギーの計算と、より精密な量子化学計算を揺らぎを含めて実施し、この原因を明らかにした(図 2)。

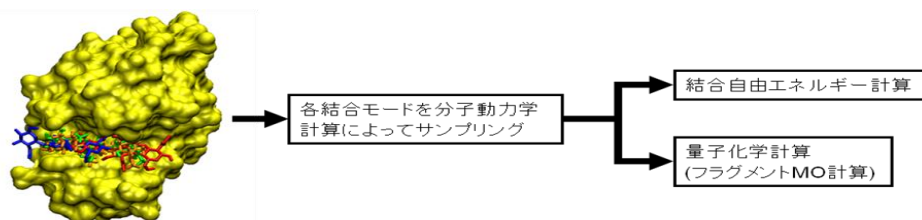


図 2

次に、ニワトリ卵白リゾチームと N-acetylglucosamine 三量体の結合にともなう熱力学量を表面プラズモンレゾナンス法を用いて見積もった。この手法は他の標的にも同様に利用可能であり、また、我々の進めている論理的創薬の標的に対しても有用であると考えられる。更にニワトリ卵白リゾチームの酵素活性部位をターゲットとして *in silico* スクリーニングを実施して低分子化合物を選出し購入した。その結果、既知の阻害剤である tri-N-acetylglucosamine(tri-NAG)よりも阻害能が高い化合物が 4 個同定された。

蛋白質との相互作用の実験(論文 9,10,11)では、ドッキング・シミュレーションに基づき、蛋白質と結合し、蛋白質の熱安定性を高める化合物(ケミカルシャペロン)の論理的探索手法を構築した。

蛋白質コンフォメーション多様性の理論構築(論文 12)では、蛋白質立体構造の多様性を理論的に基礎づけるために、数論を用いた熱力学関数を、半古典理論に基づき、構築した。また、蛋白質間相互作用の理論的予測(論文 13)では、T細胞レセプター(TCR)とHLAとの複合体立体構造の異常が、自己免疫疾患に関わることが知られているが、ドッキング計算により、両者の異常な相互作用を再現することに成功した。更に、蛋白質間相互作用の実験的解析(論文 14)を推進し、蛋白質が形成するアミロイドの構造を分光学的方法で調べた。また、密度汎関数法により、神経変性毒として作用するクプリゾンと相互作用する銅原子の電子状態を計算し、3価であることがわかった(文献 15)。プリオンタンパク質とのドッキングシミュレーションにより、新規の抗プリオン化合物を4種類見出した(文献 16)。プリオンのフォールディング時間を温度ジャンプにより計測し、それが7マイクロ秒という、タンパク質の中でも極めて速い反応であることを明らかにした(文献 17)。

3. 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、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

(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、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
- ・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

(3) 情報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、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、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

4. 研究成果の発表等

(1) 論文発表 (原著論文)

- 1 C-P. Chng and A. Kitao, Thermal Unfolding Simulations of Bacterial Flagellin: Insight into its Refolding before Assembly, *Biophys. J.* **94**, 3858-3871 (2008).
- 2 Y. Joti, H. Nakagawa, M. Kataoka and A. Kitao, Hydration effects on low-frequency protein dynamics observed in simulated neutron scattering spectra, *Biophys. J.* **94**, 4435-4443

- (2008).
- 3 K. Okazaki and S. Takada, Dynamic energy landscape view of coupled binding and protein conformational change: Induced-fit versus population-shift mechanisms, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **105**, 11182-11187 (2008)
 - 4 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**, 176-180 (2008).
 - 5 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**, 195107 (13 pages) (2008).
 - 6 P.-L. Chau, K.-M. Tu, K. K. Liang, S. L. Chan, and N. Matubayasi, Free-Energy Change of Inserting Halothane into Different Depths of a Hydrated DMPC Bilayer, *Chem. Phys. Lett.* **462**, 112-115 (2008).
 - 7 H. Takahashi, H. Ohno, R. Kishi, M. Nakano, and N. Matubayasi, Computation of the free energy change associated with one-electron reduction of coenzyme immersed in water: A novel approach within the framework of the quantum mechanical/molecular mechanical method combined with the theory of energy representation, *J. Chem. Phys.* **129**, 205103 (14 pages) (2008).
 - 8 K. Yoshida, N. Matubayasi, and M. Nakahara, Self-diffusion coefficients for water and organic solvents at high-temperatures along the coexistence curve, *J. Chem. Phys.* **129**, 214501 (9 pages) (2008).
 - 9 松本友治, 鎌足雄司, 武藤淳二(細川), 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—論理的アプローチによる創薬研究, *化学*, **63**, 40-44 (2008).
 - 10 桑田一夫, プリオン, 蛋白質・核酸・酵素, **53**(8)2008 年 6 月号増刊「キーワード: 蛋白質の一生
 - 11 桑田一夫, プリオン病治療薬の論理的開発をめざして—蛋白質のダイナミクス解析から構造変換制御物質の探索へ Rational drug discovery for prion diseases—, 蛋白質 核酸 酵素, **53**(6), 727-732(2008).
 - 12 桑田一夫, ダイナミクスと安定性が交叉する領域の熱力学—量子暗号熱力学とプリオン—, 熱測定, **35**(3), 140-147(2008.)
 - 13 Z. Kato, N. Joel, H. Stern, H. Nakamura, K. Kuwata, N. Kondo, L. Jack, Strominger. Positioning of autoimmune TCR-Ob.2F3 and TCR-Ob.3D1 on the MBP85-99/ HLA-DR2 complex, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, **105**, 15523-15528 (2008).
 - 14 K. Yamaguchi, T. Matsumoto, K. Kuwata, Critical Region for Amyloid Fibril Formation of Mouse Prion Protein: Unusual Amyloidogenic Properties of Helix 2 Peptide, *Biochemistry*, **47**(50), 13242-13251 (2008).
 - 15 N. Yamamoto and K. Kuwata. DFT studies on redox properties of copper-chelating cuprizone: Unusually high-valent copper (III) state. *Journal of Molecular Structure THEOCHEM* **895**:52-56 (2009)

- 16 J. Hosokawa - Muto, Y. O. Kamatari, H. K. Nakamura, K. Kuwata. A Variety of Anti-Prion Compounds Discovered through an in silico Screen Based on PrP^C Structure: A Correlation between Anti-Prion Activity and Binding Affinity: Antimicrobial Agents and Chemotherapy (AAC), 53(2) .765-771 (2009)
- 17 T. Matsumoto, T. Nakagawa, K. Kuwata. Cold destabilization and temperature jump of the murine prion protein mPrP (23-231).BBA_Proteins and Proteomics. 1794, 669-673 (2009).
- 18 N. Hori, G. Chikenji, R-S. Berry and S. Takada, Folding energy landscape and network dynamics of small globular proteins, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **106** 73-78, (2009)
- 19 L.-W. Yang, E. Eyal, I. Bahar and A. Kitao, Principal Component Analysis of Native Ensembles of Biomolecular Structures (PCA_NEST): Insights into Functional Dynamics, *Bioinformatics*, **25**(5), 606-614(2009).
- 20 W. Nishima, G. Qi, S. Hayward and A. Kitao, DTA: Dihedral transition analysis for characterization of the effects of large main-chain dihedral changes in proteins, *Bioinformatics*, **25**(5), 628-635(2009).

(2) 特許出願

平成 20 年度 国内特許出願件数 : 0 件 (CREST 研究期間累積件数 : 0 件)