

「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

平成 21 年度は、蛋白質の構造変化が小さい場合を主なターゲットとして高精度な作用形態モデリングを達成すると共に、今後の課題となる構造変化を含む複合体モデリングの準備を進めてきた。今後はこれらの成果を展開し、いくつかの重要なターゲットについて応用研究を進める。

分子力場モデリンググループ(東大・北尾)では、全体のモデリングフローをデザインした。また、初期の粗視化ドッキングにおける候補構造の絞込みを高精度化する手法と低分子の結合部位予測法を開発した。更に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めることを示した。また作用メカニズムの解析用に自由エネルギー地形を計算できるマルチスケールシミュレーションを開発した。

空間的粗視化モデリンググループ(京大院理・高田)では、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)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拡張して、有限系の溶媒和自由エネルギー計算法の定式化とプログラム実装、小振幅のタンパク質構造変化の水和効果の支配因子の同定、および構造変化の少ないタンパク質複合体形成の自由エネルギー解析を行った。

モデル精密化・検証グループ(岐阜大学・桑田)では、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、及び計算機シミュレーションによる結合自由エネルギー解析、蛋白質間相互作用の計算、及び蛋白質間相互作用の実験的解析を推進した。リゾチームをモデル蛋白質として、量子化学計算(FMO計算)、古典MD(自由エネルギー計算)計算、及び Docking Simulation を行い、またX線回折、NMR、SPR、ITC 測定を行い、これらの結果を比較した。

## § 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、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、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、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

### § 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)

今年度までは、まず蛋白質立体構造が複合体形成時に大きな構造変化を起こさない剛体的なケースをターゲットとしてきた。これまでの剛体ドッキング法では正解が低いスコアになってしまうケースがしばしば見られることが問題であったが、我々はこれまで難しいと思われてきた複合体においても正解に近いデコイ構造を上位に持つてくることを可能にした(Guo & Kitao 投稿準備中)。また、松林による結合自由エネルギー計算を用いて更に候補構造を絞り込み、正しい複合体構造に近いデコイが選択できるかどうか検証を進めている(松林グループの項参照)。また蛋白質-低分子においてはリブチーム-NAG系をターゲットとして、桑田グループのドッキング結果を北尾グループでシミュレーションし、その結果を松林グループで解析している。またループ部位のモデリングを行う新しい手法を開発した<sup>16)</sup>。

作用解析シミュレーションでは、自由エネルギー地形を解析する手法を開発している。我々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手法を開発した<sup>7)</sup>。また、平衡状態の多数のシミュレーション結果をWHAM法で統合する手法の開発も進めている。

具体的なシステムとして、1つには、チトクロームC-チトクロームC酸化酵素複合体の複合体予測と作用解析を行った(Guo, et al., 投稿準備中)。また、細菌べん毛繊維蛋白質に関しては、複合体形成の前に起こるアンフォールディングのメカニズムについての提案を行い<sup>12)</sup> 更に輸送装置蛋白質の大規模揺らぎを明らかにし<sup>14)</sup>、グルタミン結合蛋白質については複合体形成に伴う大きな構造変化のメカニズムを明らかにした<sup>11)</sup>。

#### 「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)

1) 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研究では、これまでに開発したモデリングフローを元に、テスト計算を重ねて細部のチューニングを進めた。

2) 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、複合体形態の予測研究では、上のコンポーネントモデリングツールと階層的シミュレーションの併用によってフレキシブルフィッティング計算を目指して準備研究を行った。

3) 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)の研究では、空間粗視化モデルと原子レベルモデル、両者の利点を生かし欠点を補うことのできる新しいシミュレーションアルゴリズムを開発した。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<sup>4)</sup>。

#### 4) 階層的シミュレーションによる作用解析:

本年は、マルチスケールシミュレーションによって、HslUの作動原理を研究した<sup>9)</sup>。構造生物的に知られている二つの参照構造、オープン型(空孔の半径が大きい)とクローズド型、をもとに、基質蛋白質トランスロケーションが実現するか否かシミュレーションによって調べた。

#### 「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)

本研究の目的は、水和効果の解析であり、その目的のために、水と有機溶媒のダイナミクスの比較を行った。水素結合効果と排除体積効果を分離し、温度・密度への依存性を論じた<sup>6)</sup>。

シトクロム *c* 系の水和効果の解析を行った。これは、平衡ゆらぎに対応する。蛋白質の構造ゆらぎにともなって、蛋白質自身の分子内エネルギーと水和自由エネルギーが変化する。分子内エネルギーと水和自由エネルギーは補償関係にある。また、水和自由エネルギーのゆらぎは、蛋白質-水相互作用のゆらぎと良い相関を示した。蛋白質-水相互作用は、主に、水素結合などの引力によって決定される。つまり、平衡における水和自由エネルギーのゆらぎは、引力とよい相関があることを示す。排除体積効果のような斥力部分との相関がなかった。

基質結合系として 1PPE 系の解析を行った。まず、北尾グループが 1PPE 系の結合部位の候補を用意する。それらの候補について、松林グループが全原子型の自由エネルギー解析を行う。右図に示すように、レセプターと基質の直接相互作用、および、基質-水相互作用を計算した。結合部位は、これら2つの相互作用の和によって決定される。通常、蛋白質構造予測の「正解」とされる rmsd 2.5 Å の範囲で、正しく結合部位を予測している。水からの寄与は、レセプターと基質の直接相互作用に匹敵し、水の効果を正しく取り入れる

ことなしに、結合部位予測は難しいことも分る。水との相互作用が引力的に効く際は、親水基を水側に向けた配置になっており、レセプターとの相互作用が弱い。さらに、結合部位から水を追い出すことに相当する、排除体積効果も、引力相互作用に拮抗する。1つの効果だけで、水の作用を測れない。全原子型の自由エネルギー解析の必要性を示す結果である。

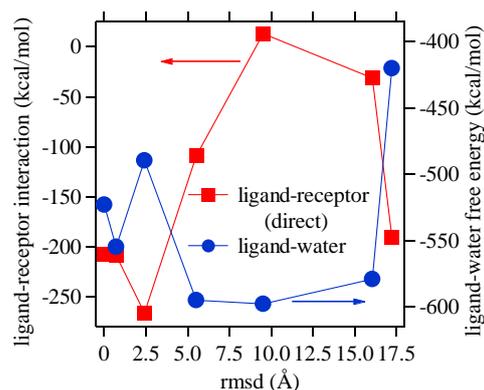


図 基質結合の自由エネルギーにおける基質-蛋白質の直接相互作用の寄与と基質-水の寄与

#### 「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。まず、FMO による計算結果を示す。ドッキングシミュレーションによると、3タイプのリゾチームとトリナグ分子の結合モードが考えられるが、そのうちの1つが結晶構造として実験的に観測されている。我々は、モデルを精密化するため、新たに量子化学(FMO)計算アルゴリズムを開発した<sup>1,3,5,13,15)</sup>。

3つの結合モードで実際にFMO計算を実行し、各モードにおけるリゾチームと triNAG 間の相互作用を解析した。その結果、実験的に観測されている構造が、タンパク-溶媒分子間の相互作用エネルギーを大きく稼ぎ、最も安定であるという結果が得られた。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 (SPR) 法と等温適定カロリメトリー (ITC) で測定した。SPR 測定と ITC 測定結果の差は、測定手法の違いによるものと推定されるが、 $\Delta G$  の差は比較的小さい。計算機シミュレーションでこのような結合の自由エネルギーを計算できるようになることが、今後の目標のひとつである。全原子モデル計算では、リガンドの結合により、天然立体構造が安定化されるという、著しい結果が得られている<sup>8)</sup>。

ドッキングシミュレーションの有効性を検証するために、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た *in silico* スクリーニングを行ってきた。我々は、計算結果を検証するため、種々の標的タンパク質に対し、化合物ライブラリに対してドッキングシミュレーションを実施して、化合物の蛋白質への結合能を順位付けし、上位の化合物を購入して、阻害能を評価する方法を開発した<sup>2,10)</sup>。リゾチームでは、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をヒットとすると、これまでに4個のヒットを得ているが、これらは溶解度が低かったために X線結晶構造解析や NMR 等による実験が困難だった。そこで、溶解度が高いヒット化合物を得ることを目標として、溶解度を考慮して、*in silico* スクリーニングを新規に実施した。今回、50 化合物を評価した結果、新たに5個ヒット化合物が同定された。そのうち2個の化合物は、これまで以上に高い阻害能を示した。シミュレーションズプラス社の予測ソフト (ADMET Predictor) によると、今回のヒット化合物は、前回よりも溶解度が高いと予測されている。今後は、複合体の結晶化および NMR 測定を試みる予定である。

## § 4. 成果発表等

### (4-1) 原著論文発表

#### ● 論文詳細情報

1. T. Ishikawa, T. Ishikura and K. Kuwata, "Theoretical study of the prion protein based on the fragment molecular orbital method", *J. Computational Chemistry*, V.30(16), P.2594-2601 (2009/Apr.) [DOI 10.1002/Jcc.21265]
2. T. Matsumoto, T. Nakagawa and K. Kuwata, "Cold destabilization and temperature jump of the murine prion protein mPrP (23-231)", *BBA-Proteins and Proteomics*, V.1794(4), P.669-673 (2009/Apr.) [DOI 10.1016/j.bbapap.2009.01.005]
3. T. Ishikawa and K. Kuwata, "Fragment molecular orbital calculation using the RI-MP2 method", *Chemical Physics Letters*, V.474(1-3), P.195-198 (2009/May.) [DOI 10.1016/j.cplett.2009.04.045]
4. W. Li and S. Takada, "Self-learning multiscale simulation for achieving high accuracy and high efficiency simultaneously", *J. Chemical Physics*, V.130(21), P.214108(1-6) (2009/Jun.) [DOI 10.1063/1.3146922]

5. N. Yamamoto and K. Kuwata, "Difference in redox behaviors between Copper-binding octarepeat and nonoctarepeat sites in prion protein", *J. Biol. Inorg. Chem.*, V.14, P.1209-1218 (2009/Jul.) [DOI 10.1007/s00775-009-0564-y]
6. K. Yoshida, N. Matubayasi, and M. Nakahara, "Self-diffusion coefficients for water and organic solvents in extremely low-density supercritical states", *J. Mol. Liq.*, V.147, P.96-101 (2009/Jul.) [DOI 10.1016/j.molliq.2008.10.006]
7. S. Sakuraba and A. Kitao, "Multiple Markov transition matrix method: Obtaining the stationary probability distribution from multiple simulations", *J. Comp. Chem.*, V.30(12), P.1850-1858 (2009/Sep.) [Doi 10.1002/Jcc.21186]
8. N. Yamamoto and K. Kuwata, "Regulating the conformation of prion protein through ligand binding", *J. Phys. Chem. B*, V.113(39), P.12853-12856 (2009/Sep.) [Doi 10.1021/Jp905572w]
9. N. Koga, T. Kameda, K. Okazaki and S. Takada, "Paddling mechanism for the substrate translocation by AAA+ motor revealed by multiscale molecular simulations", *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, V.106(43), P.18237-18242 (2009/Oct.) (\* These authors contributed equally to this work) [DOI 10.1073/pnas.0904756106]
10. Y. Okuda, H-K. Nakamura and K. Kuwata, "Novel anti-cancer compounds: structure-based discovery of chemical chaperons for p53", *Oncology reports*, V.22(4), P.739-744 (2009/Oct.) [Doi 10.3892/or\_00000495]
11. H-H. Loeffler and A. Kitao, "Collective Dynamics of Periplasmic Glutamine Binding Protein upon Domain Closure", *Biophys. J.*, V.97(9), P.2541-2549 (2009/Nov.) [DOI 10.1016/j.bpj.2009.08.019]
12. C-P. Chng and A. Kitao, "Mechanical unfolding of bacterial flagellar filament protein by molecular dynamics simulation", *J. Mol. Graph. Model.*, V28, P.548-554 (2010/Feb.) [DOI 10.1016/j.jmgm.2009.11.007]
13. T. Ishikawa, K. Kuwata, "Interaction analysis of the native structure of prion protein with quantum chemical calculations", *Journal of Chemical Theory and Computation*, V6(2), P538-547(2010/ Feb.) [Doi 10.1021/jcc.21265]
14. Y. Saijo-Hamamoto, K. Imada, T.Minamino, M. Kihara, M. Shimada, A.Kitao and K. Namba, "Structure of the cytoplasmic domain of FlhA and implication for flagellar type III protein export", *Mol. Microbiol.*, V76, P260-268(2010/ Feb.) [DOI 10.1111/j.1365-2958.2010.07097.x]
15. T. Ishikawa, K. Kuwata, "Acceleration of monomer self-consistent charge process in fragment molecular orbital method", *Chem-Bio Informatics Journal*, V10, P24-31(2010/Mar.) [doi:10.1273/cbij.10.24]
16. S. Hayward and A. Kitao, "The Effect of End Constraints on Protein Loop Kinematics", *Biophys. J.*, in press.