

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. 研究実施体制

#### (1)「分子力場モデリング」グループ

①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)

#### 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主たる共同研究者:高田彰二 (京都大学大学院理学研究科、准教授)

#### ②研究項目

- ・コンポーネント構造モデリング
- ・大きな構造変化予測
- ・多分解能レプリカ法による複合体予測
- ・階層シミュレーションによる作用解析

#### (3)「情動的粗視化モデリング」グループ

①主たる共同研究者: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
- ・粗視化モデルでの溶媒効果評価

- ・大きな構造変化を伴う複合体形成の解析

#### (4)「モデル精密化・検証」グループ

①主たる共同研究者: 桑田一夫 (岐阜大学大学院連合創薬医療情報研究科、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

## §2. 研究実施内容

### (文中に番号がある場合は(3-1)に対応する)

本年度は、これまで開発してきたバイオ分子間相互作用形態の階層的モデリング手法を更に発展させると共に、多数のシステムに応用して研究を行った。また、これまで行ってきた共同研究を更に押し進め、いくつかのターゲットで顕著な成果が得られた。

分子力場モデリンググループでは、蛋白質-蛋白質複合体予測のための剛体ドッキングで生成された数万個程度の複合体立体構造(デコイ構造)をランキングして絞り込む手法 CyClus を開発した。この手法ではシリンダー型近似による複合体界面の高速クラスタリングを用いることでデコイの全探索を可能にした。これにより80%の成功率では候補構造数を従来法(ZDOCK)の5分の1に絞り込むことが可能になった(投稿準備中)。松林グループとの協力によって進めている結合自由エネルギー計算を用いた更なる候補構造を絞り込みでは、効率的に正解構造を選びだすためのアルゴリズムがほぼ完成した(投稿準備中)。昨年度より継続して開発してきたドッキング手法の応用として、コアターゲットであるタンパク質 p53 とアズリンとのドッキングシミュレーションと自由エネルギー評価を行い、相互作用部位の推定を行っている。これまで開発を進めてきたマルチスケールな自由エネルギー計算法、

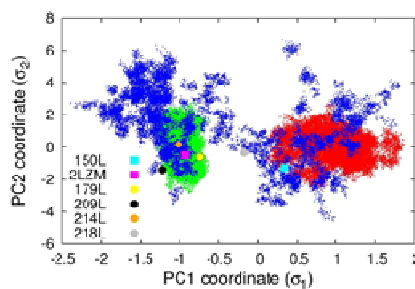


図1 TRSによる構造変化予測

MSFEL(Multiscale Free Energy Landscape analysis)を複数のシステムで用いた<sup>1,4)</sup>。また、タンパク質が他の分子と相互作用する際の構造変化を予測する手法として使える Transform and Relax Sampling (TRS) を開発しその有用性を示した(図1)<sup>2)</sup>。具体的なシステムの作用解析では、ウイルスの感染メカニズムの解明に大きな成果があった<sup>3)</sup>。

空間的粗視化モデリンググループでは、階層的シミュレーションによる複合体予測として、昨年度開発した AICG 法を改良して AICG2 法を開発するとともに、階層シミュレーションによる相互作用解析として、AICG 法を応用してコアターゲットである p53 の機能解析<sup>7,8)</sup>と安定化リガンド(化学

シャペロン)の設計、およびその他の相互作用解析<sup>5)</sup>に取り組んだ。昨年度開発した AICG 法は、配列に沿って非局所的な接触型相互作用については、エネルギー分割とゆらぎマッチングというマルチスケールアルゴリズムを適用して、精度のよい粗視化モデルを構成することに成功した。しかし、問題点は、配列に沿って局所的な相互作用が調和的で硬すぎるという点であった<sup>6)</sup>。この問題を克服するために AICG2 法では、タンパク質構造データベース情報に基づく一般的な統計ポテンシャルと、局所的な接触型ポテンシャルの組み合わせで、より非線形で柔らかい相互作用を導入した。新しい AICG2 法は、簡単な蛋白質のフォールディング反応などでテストしたところ、2次構造の大きなゆらぎを可能にし、従来の方法よりよい精度を有することが確かめられた。また、マルチドメインをもつアデニル酸キナーゼや結び目をもつ蛋白質のフォールディング研究においても、AICG2 法は実験とつじつまの合う機構を示した(Li, Terakawa, & Takada, 論文投稿中)。

がん抑制遺伝子 p53 の研究では、桑田グループとの共同で、p53 コア DNA 結合ドメインの構造安定性解析と、安定化リガンド(化学シャペロン)の設計に取り組んだ。ここで化学シャペロンとは、安定性の低い蛋白質に結合してその蛋白質を安定化するリガンドを指す。とくに、蛋白質の 2 か所を結合することによって大きな熱安定化が期待できるので、そのような化学シャペロンの設計を目指す。まず AICG 法を適用して p53 コアドメインのフォールディングシミュレーションを行い、自由エネルギー解析を行った。それに基づいて、どの部位とどの部位の対を結ぶ化学シャペロンが、p53 の熱安定性をもっとも上昇することができる

か、網羅的な解析を行った(図 2)。蛋白質全体のなかで、結ぶと安定化が著しいと期待されるアミノ酸対(図 2 で赤いスポット)を特定した。この部位を、次の安定化リガンド(化学シャペロン)設計のターゲット部位とした。これらターゲット部位に対して、ソフトウェア ICM を用いてインシリコランダムスクリーニングを行い、そのスコアから、候補リガンドを数十個見出した。スコアが最高のリガンドのドッキング構造を図 3 に示す。同様の計算を、プリオン蛋白質ドメインにも適用し、同様に化学シャペロンの候補リガンドを数十個求めた。これらについて、現在、桑田グループで検証実験を行っている。

情動的粗視化モデリンググループは、シトクロム *c* 系の溶媒効果の解析を前年度より継続して行い、尿素添加の共溶媒効果の分子論的解析に展開した。尿素によるタンパク質構造変化は、分散引力の強化によることを明らかにした。また、前年度に見出したタンパク質分子内エネ

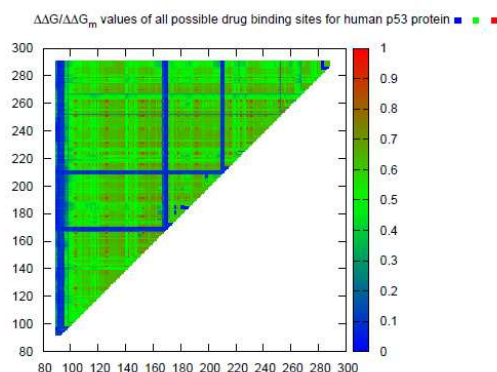


図 2 p53 を安定させると思われる部位

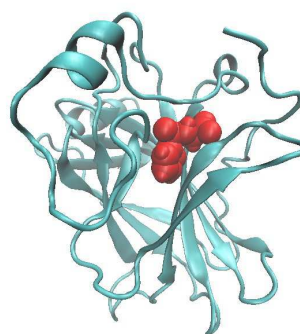


図 3 p53-リガンドのドッキング構造

ルギーのゆらぎと水和自由エネルギーゆらぎの補償関係が、スケールが全く異なる QM/MM 系における電子密度ゆらぎの場合にも成立することを示した<sup>9)</sup>。補償関係に基づいて、bovine trypsin と CMTI-1 squash inhibitor の複合体および RNase I SA と barstar の複合体を対象として、北尾グループと共同で複合体候補構造の評価を行うとともに、lysozyme と tri-NAG の結合自由エネルギーの解析を北尾グループ・桑田グループとの共同で行った。いずれの場合も、溶媒水をあらわに取り入れることで、正確な評価が可能になることを見出している。

膜タンパク質の埋め込まれた場が、しばしば曲率を持つ脂質膜であることに着目し、脂質膜曲率の効果の解析を開始した。脂質膜のダイナミクスは、膜内サイトによっては曲率に大きく依存することを示した<sup>10)</sup>。また、脂質膜の分子結合能は圧力とともに増大することを見出した<sup>11)</sup>。エネルギー分布関数を用いた厳密自由エネルギー計算の新規手法を提案した<sup>12)</sup>。エネルギー表示法では、溶質-溶媒間の 2 体相互作用エネルギーから近似汎関数を構成するが、厳密法では、溶質-溶媒間相互作用エネルギーの総和の分布関数を用いる。誤差論との組み合わせによって、極めて単純な表式でありながら、厳密自由エネルギー計算法の中で、最高の性能を示す手法が開発された。

モデル精密化・検証グループは、本年度、フラグメント分子軌道法(FMO)法の改良(RI-MP2 法によるエネルギー勾配計算<sup>21)</sup>)、及び実際の生体分子系への応用を行った。後者ではまず、リゾチームとトリナグの相互作用パラメーターをピアコア、及びX線結晶回折により実験的に明らかにした。次に、各種ドッキングシミュレーション、フラグメント分子軌道法(FMO)法、及び分子動力学法により、リゾチームとトリナグの相互作用エネルギーを評価した。その結果、ドッキングシミュレーションでは、ソフトの種類により得られた相互作用パラメーターが、まちまちであった。今回、我々が整備した、(1)統計力学的手法、(2)量子化学的手法<sup>21)</sup>、のいずれを用いても、X線回折、ピアコアの実験結果と矛盾しない結果が得られた。今後、これらを組み合わせることで、より精度の高いモデリング手法を設計することが可能となると考えられる。

シミュレーション法・解析法の開発と並行して、バイオ分子間相互作用形態の研究を行った。具体的にはリゾチーム、プリオン<sup>15,16,17,18,20)</sup>、TCR、p53、PA<sup>13)</sup>、PB2、AKBR10、ALK2、Fc・RI・など、多くの蛋白質をターゲットとして進めてきた。実験まで含めたテストケースとして選んだリゾチームや以下のようにコアターゲットであるインフルエンザウイルス<sup>13,14,19)</sup>の RNA ポリメラーゼ PA・PB2 とガン抑制因子 p53 以外に様々な系にも開発してきた手法をアプライできた。代表的な成果は、PA を標的として、既存薬剤の中から、抗インフルエンザウイルス作用を有する物質を *in silico* スクリーニングにより発見することが出来た。これらは、現存する抗インフルエンザウイルス薬(タミフル、リレンザ)とは作用機序が全く異なるため、ウイルスがタミフル・リレンザ耐性を獲得した時に、代替薬剤として使用できる可能性がある、と考えられる<sup>13)</sup>。また PB2 の大量精製が可能となったため、現在、PB2 を標的として、同様のスクリーニングを行っている。

### §3. 成果発表等

#### (3-1) 原著論文発表

##### ●論文詳細情報

1. Ryuhei Harada and Akio Kitao, “Exploring the Folding Free Energy Landscape of a  $\beta$ -Hairpin Miniprotein, Chignolin, Using Multiscale Free Energy Landscape Calculation Method”, *The Journal of Physical Chemistry B*, V115(27), pp8806-8812, 2011 (DOI: 10.1021/jp2008623)
2. Akio Kitao, “Transform and relax sampling for highly anisotropic systems: Application to protein domain motion and folding”, *The Journal of Chemical Physics*, V135(4), pp045101-045114, 2011 (DOI: 10.1063/1.3613676)
3. Wataru Nishima, Shuji Kanamaru, Fumio Arisaka and Akio Kitao, “Screw motion regulates multiple functions of T4 phage protein gp5 during cell puncturing”, *Journal of The American Chemical Society*, V133(34), pp13571-13576, 2011 (DOI: 10.1021/ja204451g)
4. Ryuhei Harada and Akio Kitao, “The fast-folding mechanism of villin headpiece subdomain studied by multi-scale distributed computing”, *Journal of Chemical Theory and Computation*, V8(1), pp290-299, 2012 (DOI: 10.1021/ct200363h)
5. Kei-ichi Okazaki and Shoji Takada, “Structural comparison of F1-ATPase: Interplay among enzyme structures, catalysis, and rotations”, *Structure*, vol.19, pp.588-598, 2011 (DOI: 10.1016/j.str.2011.01.013).
6. Hiroo Kenzaki, Nobuyasu Koga, Naoto Hori, Ryo Kanada, Wenfei Li, Kei-ichi Okazaki, Xin-Qiu Yao, and Shoji Takada, “CafeMol: A coarse-grained biomolecular simulator for simulating proteins at work”, *Journal of Chemical Theory and Computation*, 2011,7(6), pp.1979-1989, 2011 (DOI: 10.1021/ct2001045).
7. Tsuyoshi Terakawa and Shoji Takada, “Multiscale ensemble modeling of intrinsically disordered proteins: p53 N-terminal domain”, *Biophysical Journal*, vol.101, pp.1450-1458, 2011 (DOI: 10.1016/j.bpj.2011.08.003)
8. Yohei Murakami and Shoji Takada, “Rigor of cell fate decision by variable p53 pulses and roles of cooperative gene expression by p53”, *BIOPHYSICS*, Vol.8, pp.41-50, 2012 (DOI: 10.2142/biophysics. 8.41).
9. Nobuyuki Matubayasi and Hideaki Takahashi, “Free-energy analysis of the electron-density fluctuation in the quantum-mechanical/molecular-mechanical simulation combined with the theory of energy representation”, *Journal of Chemical Physics*, vol.136, No.4, pp.044505 (10 pages), 2012 (DOI: 10.1063/1.3677184)

10. Megumi Shintani, Ken Yoshida, Shun Sakuraba, Masaru Nakahara, and Nobuyuki Matubayasi, "NMR-NOE and MD Simulation Study on Phospholipid Membranes: Dependence on Membrane Diameter and Multiple Time Scale Dynamics", *The Journal of Physical Chemistry B*, vol.115, No.29, pp.9106-9115, 2011 (DOI: 10.1021/jp204051f)
11. Pak-Lee Chau, Kai Min Tu, Kuo Kan Liang, Ian Todorov, Steve Roser, Robert Barker, and Nobuyuki Matubayasi, "The effect of pressure on halothane binding to hydrated DMPC bilayers", *Molecular Physics*, vol.110, in press, 2012 (DOI: 10.1080/00268976.2012.659682)
12. Shun Sakuraba and Nobuyuki Matubayasi, "Distribution-function approach to free energy computation", *Journal of Chemical Physics*, vol.135, No.11, pp. 114108 (11 pages), 2011 (DOI: 10.1063/1.3637036)
13. Mayuko Fukuoka, Moeko Minakuchi, Atsushi Kawaguchi, Kyosuke Nagata, Yuji O. Kamatari, \*Kazuo Kuwata: Structure based discovery of anti-influenza virus A compounds among medicines. *BBA-General Subjects*, 1820(2):90-95, 2012 (DOI: 10.1016/j.bbagen.2011.11.003)
14. Tomoaki Takemura, Tomohiko Urushisaki, Mayuko Fukuoka, Junji Hosokawa-Muto, Taketoshi Hata, Yumiko Okuda, Sachie Hori, Shigemi Tazawa, Yoko Araki, and Kazuo Kuwata: 3,4-Dicaffeoylquinic Acid, a Major Constituent of Brazilian Propolis, Increases TRAIL Expression and Extends the Lifetimes of Mice Infected with the Influenza A Virus. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, Vol.2012 (2012), Article ID 946867, 7 pages, 2012 (DOI: 10.1155/2012/946867)
15. Keiichi Yamaguchi, Tomoharu Matsumoto, and Kazuo Kuwata: Proper calibration of ultrasonic power enabled the quantitative analysis of the ultrasonication-induced amyloid formation process. *Protein Science*, 21(1):38-49, 2011 (DOI: 10.1002/pro.755)
16. Sanghera N, Correia BE, Correia JR, Ludwig C, Agarwal S, Nakamura HK, Kuwata K, Samain E, Gill AC, Bonev BB, Pinheiro TJ: Deciphering the Molecular Details for the Binding of the Prion Protein to Main Ganglioside GM1 of Neuronal Membranes. *Chemistry & biology*, 18(11):1422-31, 2011 (DOI: 10.1016/j.chembiol.2011.08.016)
17. Tsutomu Kimura, Junji Hosokawa-Muto, Kenji Asami, Toshiaki Murai, \*Kazuo Kuwata: Synthesis of 9-substituted 2, 3, 4, 9- tetrahydro-1H-carbazole derivatives and evaluation of their anti-prion activity in TSE-infected cells. *Eur. J. Med. Chem*, 46(11):5675-5679, 2011 (DOI: 10.1016/j.ejmech.2011.08.039)

18. Junji-Hosokawa Muto, Tsutomu Kimura, Kazuo Kuwata: Respiratory and cardiovascular toxicity studies of a novel anti-prion compound, GN8, in rats and dogs, *Drug and Chemical Toxicology*. (DOI: 10.3109/01480545.2011.598533) (in press)
19. Tomohiko Urushisaki, Tomoaki Takemura, Shigemi Tazawa, Mayuko Fukuoka, JunjiHosokuwa-Muto, Yoko Araki, and Kazuo Kuwata: Caffeoylquinic Acids Are Major Constituents with Potent Anti-Influenza Effects in Brazilian Green Propolis Water Extract. *Hindawi Publishing Corporation Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, Vol.2011, Article ID254914, 7 Pages, 2011 (DOI: 10.1155/2011/254914)
20. Tsutomu Kimura, Junji Hosokawa-Muto, Yuji O.Kamatari, Kazuo Kuwata: Synthesis of GN8 derivatives and evaluation of their antiprion activity in TSE-infected cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 21(2011):1502-1507, 2011 (DOI: 10.1155/2011/254914)
21. Takeshi Ishikawa, Kazuo Kuwata: RI-MP2 Gradient Calculation of Large Molecules Using the Fragment Molecular Orbital Method, *J. Phys. Chem. Lett*, 3(3):375-379, 2011 (DOI: 10.1021/jz201697x)