

課題名(タイトル):

電子顕微鏡による単粒子解析

利用者氏名:

○竹本 千重(1), 横山 武司(1), 加茂 友美(1) 長内 隆(1), 津田 健吾(1)

理研における所属研究室名:

(1) 生命機能化学研究センター タンパク質機能・構造研究チーム

1. 本課題の研究の背景、目的、関係するプロジェクトとの関係

生命科学の分野において、生体高分子の複合体の高分解能構造情報を得ることは、それらの生理的機能や制御機構を知る上で重要である。クライオ電子顕微鏡解析は、NMR解析やX線結晶構造解析と並んで、そのための主要な手法のひとつである。近年、電子直接検出器の開発によって、著しく感度と分解能が向上し、試料調製からデータ収集において、飛躍的なハイスループット化が進んでいる。取得した2次元画像から3次元構造を得るためのプログラムも日進月歩で改良が進み、計算機自体の性能向上と共に、精度の高い構造を得るためのスキームの確立とアウトプットの迅速化が重要な課題となっている。また、実験的に得られた高分解能の立体構造情報は、分子シミュレーションに供して動的構造解析を行うことにより、細胞内の環境に近い状態での反応機構の予測や検証へと展開できるようになってきている。

今回は、HOKUSAIに実装されているプログラム AMBERを使って、DOCK (dedicator of cytokinesis) タンパク質と標的となる低分子量Gタンパク質の複合体の分子動力学計算を行った。DOCKは、11のファミリーに分類される哺乳類の低分子量Gタンパク質に対するGヌクレオチド交換因子(GEF)であり、細胞遊走や形態形成に関与している。ターゲットであるGタンパク質に対して、特異的あるいはマルチに認識することが報告されているが、その全ての組合せについて実験的な構造情報を得るのは困難な場合もある。そのような場合、既報の立体構造を元に、複合体の構造モデルを構築し、分子動力学計算を行うことで新たな知見が得られることが期待される。

2. 具体的な利用内容、計算方法

Dock7は、Cdc42 (Cell division control protein 42)とRac1 (RAS-related C3 botulinus toxin substrate 1)に対する多重特異性があることが知られている。X線結

晶構造解析により、ヒト由来Dock7-Cdc42複合体の立体構造を決定したが、Dock7-Rac1複合体の構造決定は困難であった。そこで、計算科学的手法によってCdc42とRac1に対するDock7の結合様式を解析し、その認識機構についての知見を得ることを試みた。

まず、X線結晶構造解析によって複合体構造が得られているDock7-Cdc42複合体(今回)とDock2-Rac1複合体の構造情報(PDB: 3B13)から、構造未知のDock7-Rac1複合体の構造モデルを構築した。次に、CUDA版のpmemdを用いて、Dock7-Cdc42複合体とDock7-Rac1複合体それぞれで分子動力学計算を行い、分子間相互作用について解析した。力場はff14SBを適用し、計算時間は500 ns、温度は310 Kとした。

3. 結果

結合面で近接するDock7の α -helixと基質の α -helixがなす角を解析した結果、Dock7-Rac1複合体では初期モデルから構造変化が見られ、Dock2-Rac1複合体の結晶構造で観測された角度に近づいた。この結果から、Dock7は立体構造が似ているCdc42とRac1の微妙な違いを認識し、それぞれの分子に適した構造変化を起こして結合することが示唆された。

4. まとめ

X線結晶構造解析の結果と共にMD計算の結果も合わせて論文を作成し、Structure誌に受理された。

5. 今後の計画・展望

計算科学的手法を駆使して、実験的な構造解析の手法によって得られた部分構造や類似分子の構造情報を統合的に利用することによって、巨大分子複合体の構造決定を行ったり、分子間相互作用についての新たな知見を得る試みは、今後も一層力を入れていきたい。

平成 30 年度 利用研究成果リスト

【雑誌に受理された論文】

Mutsuko Kukimoto-Niino, Kengo Tsuda, Kentaro Ihara, Chiemi Mishima-Tsumagari, Keiko Honda, Noboru Ohsawa, Mikako Shirouzu. "Structural basis for the dual substrate specificity of DOCK7 guanine nucleotide exchange factor." *Structure* (2019) in press.