

課題名(タイトル):

分子動力学シミュレーションを用いた生体分子の構造および反応機構の解明

利用者氏名:

杉田 有治(1)、○伊東 真吾(1)、大出 真央(1)、住谷 陽輔(1)、新津 藍(1)、森 貴治(1)、八木 清(1)
Hisham Dokainish(1)、Weitong Ren(1)、大滝 大樹(1,2)

理研における所属研究室名:

(1)理化学研究所 杉田理論分子科学研究室

(2)長崎大学 大学院医歯薬学総合研究科 分子標的医学研究センター

DFTB3/MM-US-MD を用いたトリプトファン合成酵素におけるアロステリーの解明

(担当:伊東)

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

トリプトファン合成酵素(TRPS)は、 α および β サブユニットの2量体からなる酵素複合体である(図1)。TRPS は、片側サブユニットの活性中心にリガンドが結合することにより、もう一方のサブユニットの酵素活性を変化させる“アロステリック効果”を有することが知られている。このようなアロステリーを持つ酵素の反応メカニズムは未だによく解明されておらず、その原理を解明することは生体内における複雑な酵素反応を理解するのに非常に有用である。

本研究は、TRPS の酵素反応メカニズムを解明することで複雑なアロステリック効果の解明を目指すものである。TRPS の α および β サブユニットは、各サブユニットへのリガンドの結合状態で Open および Closed の2状態の構造を持つことが知られている[M. F. Dunn, Arch. Biochem. Biophys., 2013]。まず手始めに、 α および β サブユニットの両方にリガンドが結合している状態において Open および Closed のどちらの構造がより安定であるのかを確かめるために、DFTB3/CHARMM36 レベルにおいて Umbrella Sampling 法を用いた自由エネルギー地形(FES)の解析を行った。また β サブユニットの構造変化には、 β Arg141 と β Asp305 の塩橋および周辺の水素結合ネットワークが重要でありことが実験より示唆されているため、塩橋の有無と β サブユニットの構造変化の相関についても解析を行った。

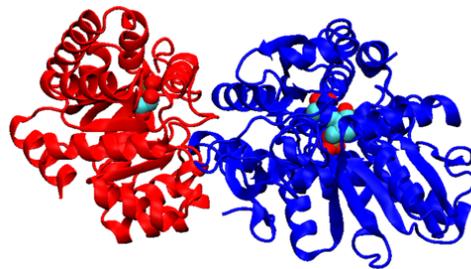


図1 TRPS の構造(PDBID:2J9X)

α サブユニット(赤色)と β サブユニット(青色)の2量体から形成される。

2. 具体的な利用内容、計算方法

α および β サブユニットにリガンドが結合している状態(PDBID: 2J9X)を初期条件とし、QM/MM レベルでの Umbrella Sampling による MD 計算を行った。QM 計算のレベルとして DFTB3-D3/3OB を、MM として CHARMM36 および CGenFF を用いた。また Umbrella Potential の CV として、塩橋を形成する β Arg141 と β Asp305 の N-O 間原子距離および β 141 と β Ser299 の N-O 間原子距離の線型結合を利用した。本計算後、MBAR による Reweight を用いることで、上記の CV と結晶構造を Reference とする RMSD を CV として加えた2次元の自由エネルギー地形を求めた。

3. 結果

本計算により得られた2次元 FES を図2に示す。得られた FES より、塩橋が形成されている時に β サブユニットは Closed 構造(RMSD=1.5~1.8 Å 付近)が安定であり、塩橋が崩壊している時には Open 構造(RMSD=2.4~2.7 Å 付近)を優位に形成していることがわかった。この結果から、 β サブユニットの構造変化と塩橋の有無には密接な関係性があることが示唆された。また、両サブユニットにリガンドが結合している状態では Closed 構造が Open 構造より安定であることも FES の解析により判明した。

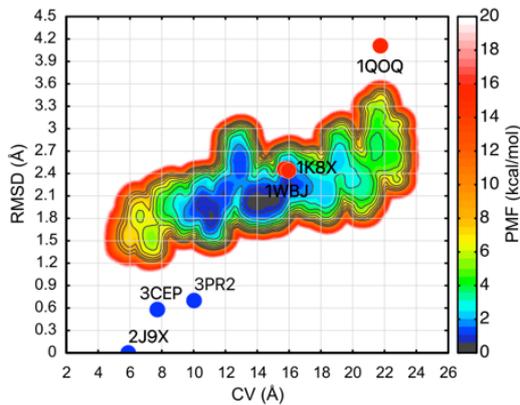


図2 塩橋の原子間距離および Closed 構造を reference とした RMSD を軸とする2次元自由エネルギー地形

青丸は Closed 構造を示す結晶構造の位置および PDBID、赤丸は Open 構造を示す結晶構造の位置および PDBID である。

4. まとめ

塩橋の有無と β サブユニットの構造変化に関係性があるという結果は、Dunn らが実験結果より予想していた構造変化のメカニズムと一致しており、彼らの主張を裏付けるものとなった。また、 β 側の構造変化と密接に関わっている塩橋およびその周辺の水素結合ネットワークを形成する残基群が TRPS のアロステリーに何かしらの重要な寄与をしていることが示唆された。今後の研究において、 α サブユニット側のリガンドの結合がどのようにこの塩橋周辺の水素結合ネットワークに影響を及ぼすのかということについて追求していきたいと考えている。

5. 今後の計画・展望

本計算は両サブユニットにリガンドが結合した状態でのみ FES を求めたが、今後アロステリーの解明のために両サブユニットにリガンドが結合していない状態 (Apo-state) および、片側にのみリガンドが結合している状態でも同様の計算を行う。 α 側のリガンド結合の有無がどのように β 側の重要残基に影響を及ぼすかということについて、より詳細に解析を行う予定である。最終的に TRPS のアロステリーがどのようなメカニズムにおいてなされているのかについて解明を目指す。

クライオ電子顕微鏡観察像からの蛋白質動態自由エネルギー地形推定の試み

(担当: 大出)

1. 本課題の研究の背景、目的

生命現象の素過程を担う蛋白質分子の多くは機能発現過程で構造変化を伴う。分子動力学(MD)計算によるシミュレーションは蛋白質の時空間動態の強力なイメージング手法だが、力場の精度や有限のシミュレーション時間などが理由で実際に系が取りうる構造の分布(自由エネルギー地形)を再現しない、という問題が発生しうる。自由エネルギー地形は系の準安定状態や動態経路の決定に用いるため、実験データに基づいた正しい地形の推定・検証は極めて重要である。従来このような目的には蛍光イメージングや核磁気共鳴分光法、X 線小角散乱法などのデータが用いられてきた。

蛋白質構造解析法の一つであるクライオ電子顕微鏡法(cryoEM)は急速凍結による非晶質氷包埋蛋白質粒子像を電子線によって直接観測する手法である。一粒子ごとの観察像は投影像であり、また放射線損傷の低減を目的とした低照射線量のために極めて信号対雑音比(S/N 比)が悪い。そのため、様々な配向を向いた多数の粒子像から三次元構造を回復する(単粒子解析)。近年の検出器や自動測定装置の高度化により原子レベルの高分解能構造解析も可能になりつつある。

先に述べた通り cryoEM では急速凍結によって観察試料を作成するため、単粒子解析に供される蛋白質粒子像はその瞬間の構造揺らぎにトラップされて凍結されていると考えられる。従って、cryoEM 観察像を適切に処理することで試料蛋白質の自由エネルギー地形を実験的な推定が可能となる。このアイディアに基づいた cryoEM 観察像からの自由エネルギー地形解析が現在までに複数報告されている [Dashti *et al.*, *PNAS*, 2013; Haselbach *et al.*, *Cell*, 2018]。しかしながら、これら研究で用いられた手法は観察像の S/N 比が比較的良好な分子量数 MDa 規模の巨大複合体に対してのみ適用可能な手法であり、数百 kDa 程度の蛋白質に対する有効な解析手法は確立されていない。これはノイズな観察像同士の比較が理由であり、試料蛋白質の構造揺らぎを反映した適切な複数参照構造があれば数百 kDa 程度の蛋白質についても解析が可能になると期待される。担当者はこのような考えに基づき、MD 構造を参照構造とした cryoEM 観察像からの自由エネルギー地形推定法の開発を行っており、検証用参照構造作成のためにテスト試

料である超高度好熱菌由来グルタミン酸脱水素酵素 (GDH) の MD シミュレーションを行った。

2. 具体的な利用内容、計算方法

GDH 結晶構造(PDB ID: 1EUZ)を初期構造とし、欠損残基及び水素原子を加えて全原子モデルを作成した。水分子モデルには TIP3P、蛋白質力場には AMBER FF14SB を用い、当研究室で開発している分子動力学計算プログラム GENESIS を用いて 100 ナノ秒のシミュレーションを行った。

3. 結果

得られたトラジェクトリーを主成分分析によって解析したところ、GDH 構造揺らぎは 2 パターンの運動が支配的であった。GDH は NAD ドメインと Core ドメインと呼ばれる 2 つの安定なドメインで構成されるが、第一主成分はこれらドメイン間の開閉運動、第二主成分は開閉運動と直交する剪断運動であり、先行研究による報告 [Nakasako *et al.*, *Biochemistry* 2001; Oroguchi and Nakasako, *Sci. Rep.*, 2016] とよく一致する結果であった(図3)。今回のシミュレーションによって参照構造は十分にサンプリングできたと考えられる。

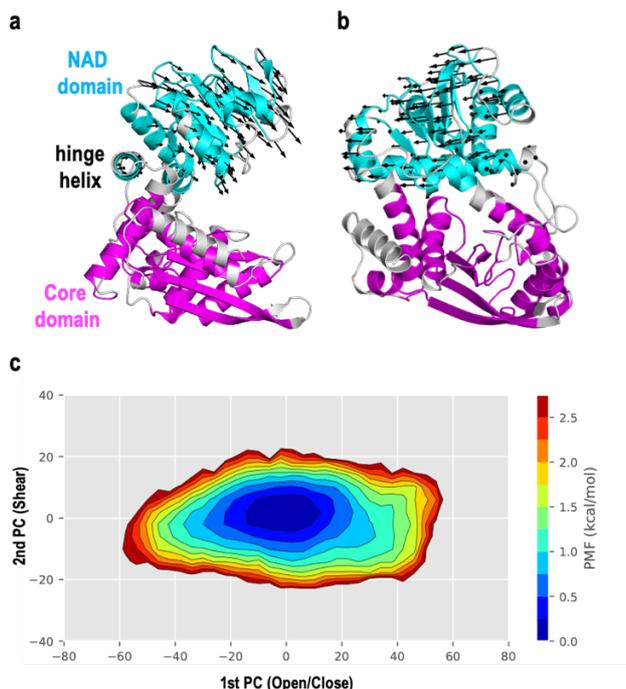


図3 GDH MD 計算結果

(a) GDH サブユニット構造と第一種成分固有ベクトル。(b) GDH サブユニット構造と第二種成分固有ベクトル。第一、第二主成分は互いに直交なため、GDH 構造は(a)から 90 度回転させたものを示している。(c) 第一、第二主成分への射影による GDH 構造揺らぎの自由エネルギー地形。

4. まとめ

cryoEM 観察像からの自由エネルギー地形推定法の検討に先駆け、参照構造作成のためにテスト試料である GDH の MD シミュレーションを行った。得られたトラジェクトリーは参照構造によく適したものであった。

5. 今後の計画・展望

現在は得られた MD 構造を利用し、提案する自由エネルギー地形推定法の開発に着手しており、今後も引き続き開発を継続する予定である。

非線型な手法を用いた蛋白質動態の次元削減

(担当:大出)

1. 本課題の研究の背景、目的

N 粒子から構成される蛋白質の自由度は $3N-6$ であり、蛋白質の動態は超高次元空間上に分布する関数として表現される。しかしながら、大抵の場合蛋白質の構造変化を支配する自由度は $3N-6$ よりもずっと少ない。例えば、本研究の担当者による別の課題で扱った蛋白質 GDH はたった 2 つの自由度でその構造変化をリーズナブルに説明可能である(図3)。従って、蛋白質動態を 2-3 次元に削減して表現することは動態の理解に極めて重要である。

蛋白質動態の次元削減手法には主成分分析(PCA)や time-lagged Independent Component Analysis (tICA)がよく用いられる。これらは計算コストが低い線形な手法でありながら多くの蛋白質の動態をよく記述できることが知られているものの、例えばフォールディング/アンフォールディングのような複雑な動態に対してはあまり有効でない。一方で、t-distributed Stochastic Neighborhood Embedding (t-SNE) に代表される非線型な手法は複雑な動態にも適用できると期待されるものの、非線型な手法では一般にデータ量に対して指数関数的に計算量が増加するため、数万から数十万のサンプリングされた構造を扱う MD 計算に対しては応用があまり現実的ではないという問題点があった。

2018 年に発表された非線型次元削減手法 UMAP [McInnes and Healy, *arXiv*, 2018] は t-SNE と同程度以上の性能を有しながら極めて高速に動作するという利点を持つ。そこで本課題では UMAP の蛋白質動態次元削減への応用可能性を検討するべく protein G B1 ドメイン及び src キナーゼ sh3 ドメインのフォールディング/アンフォールディング MD シミュレーションを行った。

2. 具体的な利用内容、計算方法

B1ドメインについては結晶構造(PDB ID: 1PGB)、sh3ドメインについてはNMR構造(PDB ID: 1SRL)を初期構造として、粗視化モデルを作成した。使用したモデルは B1ドメインが KB-Go モデル[Karanicolas and Brooks, *J. Mol. Biol.*, 2003]、sh3ドメインが AICG2+モデル[Li *et al.*, *PNAS*, 2014]である。それぞれ GENESIS を用いてフォールディング/アンフォールディングの臨界温度付近である 330 K, 342 K で 20-40 マイクロ秒のシミュレーションを行った。B1ドメインでの 330 K という温度は臨界温度よりも 20 K ほど低いが、これは実際のシミュレーションにおけるフォールディング/アンフォールディングの遷移効率に基づいて最適化した結果である。

3. 結果

B1ドメインについて UMAP による次元削減で得られた自由エネルギー地形を図4に示す。図の通り、フォールド状態、アンフォールド状態でははっきりと分離がされただけでなく、実際の構造変化において必ず経由する状態が両者の中間状態(赤丸で囲まれた領域)としてマッピングされた。また、図中の青丸で囲まれた領域は他の構造との相互遷移に比較的長い緩和時間を要する準安定状態である。PCA 並びに tICA による次元削減と比較してみると、PCA, tICA のどちらでもフォールド状態、アンフォールド状態を区別できた一方で、PCA では準安定状態、tICA では中間状態がうまく記述できなかった。従って UMAP は極めてよく動態を記述できたと言える。

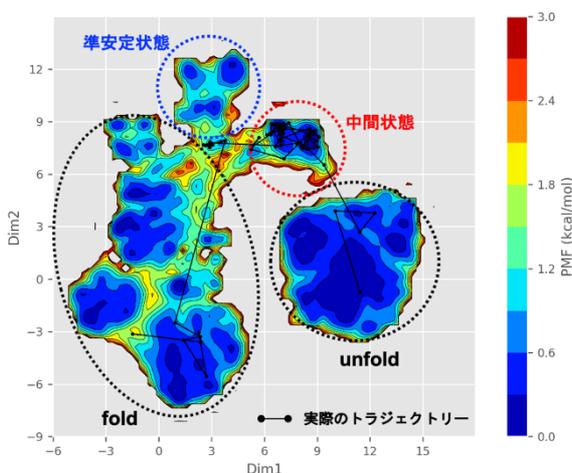


図4 UMAP による B1ドメイン自由エネルギー地形

図中の黒の折れ線は実際のアンフォールド→フォールドの構造変化を示したトラジェクトリーの射影である。

4. まとめ

粗視化モデルを用いて蛋白質のフォールディング/アンフォールディングシミュレーションを行い、得られたトラジェクトリーをUMAPによって解析した。UMAPでの次元削減により得られた自由エネルギー地形は protein G B1ドメインのフォールディング/アンフォールディング過程をよく説明できており、UMAPはMD計算で得られた蛋白質動態の解析に効果を発揮する手法であると期待される。本研究成果は RIKEN BDR Symposium 2021 にてポスター発表として報告する予定である。

5. 今後の計画・展望

Sh3ドメインについてもシミュレーションは完了しており、B1ドメインと同様に順次解析を行う予定である。また、上記2つの系に加えて、大規模な構造変化を示す蛋白質であるアデニル酸キナーゼ(ADK)についても今年度中に MD 計算を行い、UMAPによる解析と評価を行う。

逆浸透膜を構成する芳香族ポリアミドの分岐構造に関する理論的研究

(担当:住谷)

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

海水や汚染された水から純水を作るために逆浸透膜が利用されており、世界の水問題の解決に寄与する技術として注目されている。逆浸透膜による水ろ過では、汚水から膜方向へ圧力をかけることで水分子が分離される。この水ろ過の過程において、水分子だけを選択的に素早く透過できれば、効率の良い浄水が可能である。しかしながら、水分子の選択性と透過性は相反する性質であり、両立は困難である。そのため、これらの性質を併せもつ高性能な逆浸透膜の設計指針を得るために、水分子の透過過程における分子論的な理解が求められている。

そこで本研究では、当研究室で開発が進められている分子動力学計算プログラムパッケージ GENESIS を芳香族ポリアミド膜に適用した。芳香族ポリアミドは、逆浸透膜の構成材料としてよく用いられるポリマーの一つである。本研究では、主鎖からの分岐(枝分かれ)構造が異なる芳香族ポリマーをそれぞれ解析して比較し、分岐構造が与える影響を調べた。

本研究は、科学技術振興機構(JST)によるセンター・オ

ブ・イノベーション(COI)プログラムの一環として実施した。

2. 具体的な利用内容、計算方法

計算を始めるにあたり、高分子材料の理論解析でよく利用される DREIDING 力場を GENESIS に実装した。続いて、既報で開発された逆浸透膜のモデル[T. Kawakami, et al., Polym. J. 50, 327 (2018)]に基づき、水和した芳香族ポリアミドの系を作成した。図 5 (a)、(b)に、分岐構造をもつポリアミド (branched polyamide, BPA) の系と、分岐構造をもたないポリアミド(unbranched polyamide, UPA)の系をそれぞれ示す。

これらに対し、TIP3P 水分子モデルと DREIDING 力場を用いて、120 ナノ秒の分子動力学シミュレーションをそれぞれ行った。得られたトラジェクトリを用いて、膜の密度、膜中に存在する空孔のサイズ分布、および膜中の水分子の自己拡散係数を求めた。

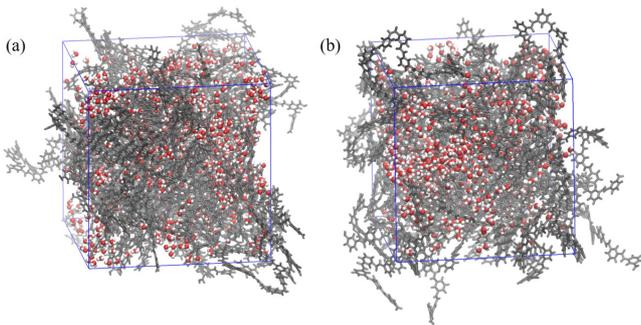


図5 (a) 分岐構造をもつ芳香族ポリアミド(BPA)の系。(b) 分岐構造をもたない芳香族ポリアミド(UPA)の系。

3. 結果

系中の含水量の増加に伴い、BPA と UPA の密度はいずれも減少した。BPA の密度は実験値とよく一致した。そして、UPA の密度は BPA よりも小さくなるという傾向が見られた。また、膜中の空孔のサイズ分布を求めたところ、含水量の増加に伴って、UPA の方が BPA よりも空孔サイズが大きくなった。このことから、分岐構造によって膜の密度と空孔サイズが制御されていることが示唆された。空孔サイズは膜中の透水過程における選択性に関与するといわれている。したがって、分岐構造の有無は不純物のろ過性能に寄与すると考えられる。

一方、両者の拡散係数についてはほとんど差が見られず、今回用いたポリアミドの分岐構造が水分子の透過性に与える影響は小さいことがわかった。

4. まとめ

GENESIS による分子動力学計算を用いて、逆浸透膜を構成する芳香族ポリアミドの分岐構造が与える影響を調べた。この結果、芳香族ポリアミドの分岐構造は、膜の密度と空孔サイズに大きな影響を与え、水分子の透過における選択性に寄与することが示唆された。

5. 今後の計画・展望

分子動力学計算は完了しており、ここまでの研究で得られたトラジェクトリをもとにさらなる解析を進める。具体的には、BPA と UPA の赤外差スペクトルを計算する。先行研究では、スペクトル中のアミド A バンドが透水性能と相関があることが示唆されている[D. Surblyls, et al., J. Memb. Sci. 596, 117705 (2020).]. そこで、分岐構造が与えるアミド A バンドへの影響と、透水性能との相関を調べる予定である。

人工設計ペプチドポアの会合過程の解明

(担当：新津)

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

チャンネルタンパク質は細胞膜内外のイオンや生物活性分子を輸送・伝達する重要な役割を持つ。膜タンパク質であるチャンネルタンパク質の折り畳みに関する研究は、高解像度の構造情報が少ないことに起因して、水溶性タンパク質に比べ遅れている。そこで我々は単純化されたタンパク質であるペプチド会合体を設計・合成し、その会合機構を調べることでこの問題に取り組むこととした。本課題では、膜貫通 α ヘリックスの脂質二重膜内での相互作用に焦点を当て、これまでに本課題担当者らが作製した膜中で自己会合しポアを形成する人工設計ペプチド 2 種(cWza ペプチド、CCTM ペプチド)の会合過程を分子動力学計算を用いて解明することを目指す。

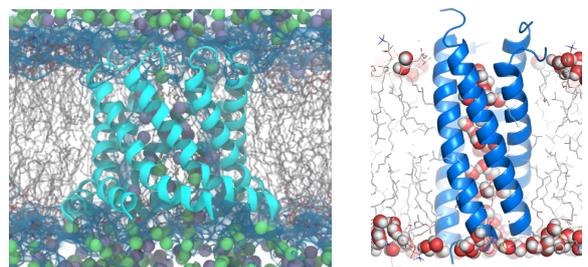


図6 cWza ペプチド 8 量体(左)と CCTM ペプチド 5 量体(右)の脂質二重膜中における構造モデル

cWza ペプチドは膜タンパク質 Wza から再設計されたペプチドであり、これまでの実験から、脂質二重膜中で非常に安定な筒型 8 量体を形成することが明らかになっている(図6)。そこで本課題では実験では直接観測できない動的なペプチドの構造変化、会合体形成を、分子動力学計算により解析することとした。CCTM ペプチドはアミノ酸配列を一から人工設計した(de novo 設計)ペプチドであり、これまでの実験で脂質二重膜中で筒形コイルドコイル構造をとることが明らかとなっている(図6)。さらに電気化学実験より、CCTM ペプチドは cWza ペプチドとは会合過程が異なることが示唆されている。本研究で対象とする cWza ペプチドは、天然の蛋白質ポアに匹敵する安定した会合体を形成する初めての例である。また CCTM ペプチドは天然に存在しない人工ペプチドポアを形成する。したがって上記の分子動力学計算による詳細な分析は、従来では得られなかった膜蛋白質の折り畳み機構、特に α ヘリックスの脂質二重膜中での会合に関する新たな知見を与えると期待される。

2. 具体的な利用内容、計算方法

cWza ペプチドについて、これまでに水中→膜結合に関する計算を実施した。 α ヘリックスペプチド 1 本を脂質二重膜に対して 4 種類の配向で配置した系を構築し、それぞれの系について 3 つの独立した全原子分子動力学計算を 300ns 実施した。計算効率を上げるため、膜には流動性を高めた HMMM モデルを用いた。

CCTM ペプチドについては、人工アミノ酸を含むペプチドの会合体モデルを脂質二重膜中に配置し、これを初期構造として全原子分子動力学計算を行って会合体モデル構造の最適化を行った。すべての計算は分子動力学計算プログラム GENESIS を用い、力場は CHARMM36、水モデルは TIP3P を用いた。

3. 結果

cWza ペプチドヘリックスは計 12 のトラジェクトリのうち 11 で HMMM 膜表面への結合を観測した。また結合した構造は図7に代表されるように疎水面を膜内部に、親水面を水相に向けて安定化することを確認できた。

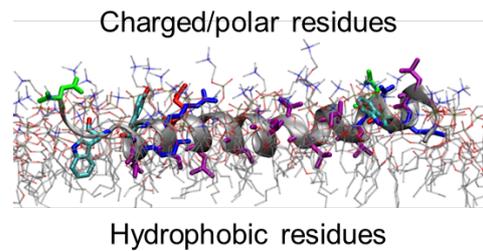


図7 膜表面に結合した cWza ペプチドの構造

疎水性残基の側鎖を紫、親水性残基の側鎖を緑(極性)、青(正)、赤(負)で示した。

CCTM ペプチドについて、分子動力学計算により最適化した 6 量体モデルと他の会合数のモデルを比較し、アミノ酸配列がペプチドの会合数に及ぼす影響について構造の幾何学的パラメータを検討した。このペプチド 6 量体では、ペプチドの傾きを大きくすることで、特にかさ高い人工アミノ酸の側鎖周辺のパッキングを安定化していることが示唆された。

4. まとめ

本課題を通して、cWza ペプチドの膜表面への結合様式を明らかにする為の十分なサンプリングが実施できた。また今後ペプチドの膜挿入過程の分子動力学計算を行うためのペプチドの初期構造を得た。

CCTM ペプチドについて、通常モデリングソフトでは扱えなかった人工アミノ酸を含んだ構造モデルの最適化を、分子動力学計算により行った。この結果をもとに、ペプチドのアミノ酸配列が構造に与える影響を幾何学的パラメータを通して解析した。

5. 今後の計画・展望

cWza ペプチドの計算で得られた初期構造をもとに、ペプチドが膜表面から膜内部に挿入する過程、またペプチドが会合する過程の分子動力学計算を引き続き行っていく予定である。CCTM ペプチドについては本課題での結果を含め論文投稿を準備している。また cWza と同様な計算を実施し、両者の会合過程を比較していくことで膜中での α ヘリックス相互作用に関する普遍的な知見を探索できると期待される。

タンパク質と蛍光プローブの結合状態に対する QM/MM 計算と分子設計 (担当: 八木)

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

蛍光イメージングは、標的タンパク質を蛍光ラベル化することで、その細胞内動態の直接観察を可能にする、生命科学研究に必要不可欠な手法である。最近、タグタンパク質-蛍光プローブが新たなラベル化手法として注目を集めている。しかし、その光機能制御にはまだ課題があり、タグタンパク質-蛍光プローブの相互作用と光化学過程に対する基礎的な理解が求められている。

QM/MM 法は、系の重要な領域を量子化学 (QM) 計算、その周囲環境を分子力場 (MM) で扱うマルチスケール法である。最近、我々は QM/MM 法を分子動力学 (MD) 計算プログラム GENESIS に実装し、生体分子に対する応用計算を実施した [J. Chem. Theory Comput. 15, 1924 (2019)]。本研究では、開発した QM/MM 法を用いて、タンパク質環境における蛍光プローブの物理化学的性質を理解し、特異な光機能性を有する蛍光プローブの分子設計に取り組む。

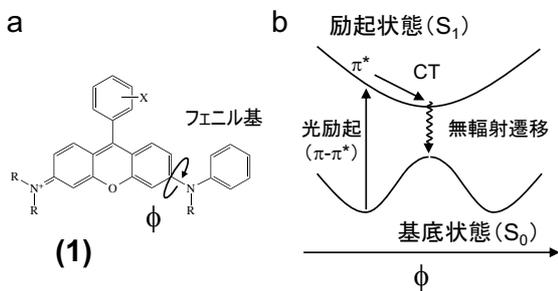


図8. (a)ローダミンの置換基にフェニル基を導入したフェニルローダミン。(b) フェニルローダミンの消光機構。

S_1 状態へ $\pi\pi^*$ 励起後、二面角 ϕ が回転し、電子状態が π^* 状態から分子内電荷移動 (CT) 状態へと変化するため、蛍光が失活する。

最近、共同研究者の花岡 (東大薬学) は、ローダミンの窒素原子にフェニル基を導入することで、ローダミンが蛍光性を失うことを見出した (図8)。その消光機構を量子化学計算により解析した結果、図8aに示す二面角の回転にともなう分子内電荷移動が原因であると分かった。このような現象は *twisted intramolecular charge transfer (TICT)* と呼ばれ、多くの分子で知られている。この結果は、TICT を制御することで、フェニルローダミンの発光・消光を制御できる可能性を示唆している。しかし、TICT は蛍光プローブとタンパク質

の相互作用に鋭敏で、その制御が極めて難しい

本課題では、蛍光プローブの物理化学的性質を理解し、タンパク質に結合することで消光状態から発光状態へスイッチする蛍光プローブを設計することを目的とする。本年度は、フェニルローダミンと Halotag タンパク質を対象とし、QM/MM 法によりその結合構造と電子励起状態ダイナミクスを計算した。

2. 具体的な利用内容、計算方法

2.1. 孤立系に対する計算

フェニルローダミン単分子に対し、電子基底状態と励起状態を求めた。最適化構造を始点とし、二面角 ϕ (図8) に対する電子基底状態と励起状態のポテンシャルエネルギー、および遷移双極子モーメントの変化を計算した。

2.2. 環境を考慮した計算

水中と Halotag タンパク質中にフェニルローダミンを用意し、まず古典 MD 計算により系を平衡化した。次に、その最終構造を始点とし、基底状態に対する QM/MM-MD 計算を実行し、最後に電子状態を S_1 状態へ垂直励起し、その後の構造変化を追跡した。平衡化 MD 計算は、水系で 2 ns、Halotag タンパク質系で 10 ns 行った。QM/MM-MD 計算は基底状態のトラジェクトリから 2 ps おきに構造を取り出し、励起状態計算を 1 ps (水中) あるいは 2 ps (Halotag タンパク質中) 実行した。

プログラムは GENESIS1.5 を使い、量子化学計算には Gaussian16 を用いた。フェニルローダミンの基底状態と励起状態は、それぞれ密度汎関数 (density functional theory: DFT) 法、及び時間依存密度汎関数法

(time-dependent DFT: TDDFT) 法により求めた。汎関数には B3LYP-D3, 基底関数には cc-pVDZ を用いた。

3. 結果

孤立系に対する計算結果を図9に示す。エネルギー変化 (図9左) から、基底状態 S_0 では二面角 ϕ が 0° または -180° が安定だが、励起状態 S_1 では二面角 ϕ が 90° が安定となることが分かる。また、振動子強度 (図9右) は、二面角 ϕ が $0 \rightarrow 90$ あるいは $-180 \rightarrow 90$ において急激に減衰し、 90° 付近ではほぼ強度を持たないことを示している。従って、フェニルローダミンは、 $S_0 \rightarrow S_1$ 励起に

より二面角 ϕ が変化し、それに伴い蛍光強度が著しく減衰する、TICT の典型例であることが分かった。

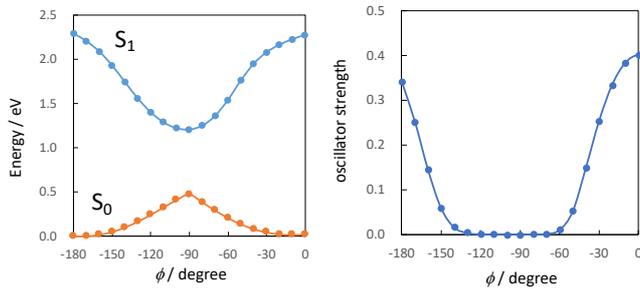


図9 フェニルローダミンの二面角 ϕ に対する基底状態 S_0 と励起状態 S_1 へのエネルギーと振動子強度の変化。

QM/MM-MD 計算の結果を図 10 に示す。水中では、フェニルローダミンを励起してから 1 ps 以内に二面角 ϕ が変化し、振動子強度がほぼゼロになるのに対し、Halotag タンパク質中では二面角 ϕ は $160 - 180^\circ$ に保たれ、振動子強度は $0.2 \sim 0.4$ の大きさを持っている。後者では、フェニルローダミン骨格がタンパク質表面と相互作用し、二面角 ϕ の変化が抑制される。そのため、タンパク質と結合することでフェニルローダミンの励起状態が長く振動子強度を保つことができる。この結果は、フェニルローダミンがタンパク質に結合したときのみ光る、有用な蛍光プローブとなりうることを示唆している。

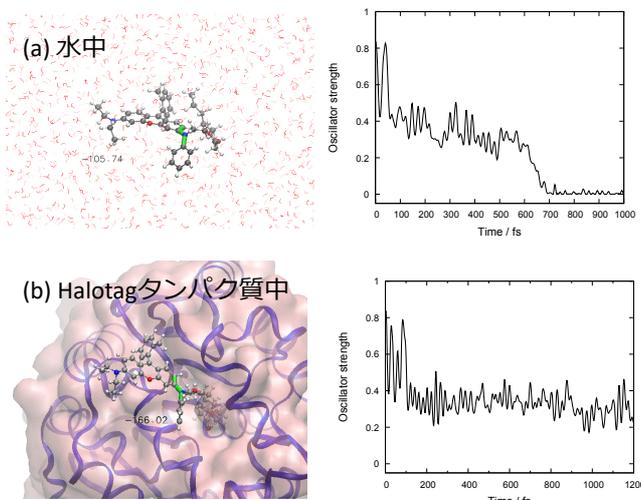


図10 (a)水中と(b)Halotag タンパク質中におけるフェニルローダミンの励起状態 MD 計算から得られたスナップショット構造(左)と、振動子強度の時間変化(右)。

4. まとめ

フェニルローダミン骨格を持つ蛍光プローブ分子の光化学特性を QM/MM 計算と分子動力学計算により明らかにした。フェニルローダミンは水中では TICT 機構により容易に消光するが、タンパク質と結合することで、キサントゲンとフェニル基の間の二面角 ϕ の変化が抑制され、蛍光発光が得られることを示した。本課題では、理研・杉田グループで開発した独自の分子動力学プログラム GENESIS を用いて実施された。

5. 今後の計画・展望

今後は、Halotag タンパク質以外のタンパク質を対象とし、フェニルローダミンの TICT 機構を利用することで、結合状態のみで発光するプローブ分子をデザインする。まず、SNAP-tag タンパク質をターゲットとし、さらに、リガンドにプローブ分子を付けることで、ターゲットとするタンパク質を直接可視化するプローブ分子のデザインに挑戦する。

Exploring Conformational Space of Multidomain Protein

(担当 : Dokainish)

1 Background and purpose of the project, relationship of the project with other projects

Multi-domain proteins play an essential role in many biological phenomena's including signaling, catalysis and substrate transportation. Wherein, the protein rigid domains undergo large structural changes which is difficult to study experimentally nor computationally.

In this project, we propose and demonstrate an enhances sampling technique (generalized replica exchange with solute tempering of selected surface charged residues (gREST_SSCR) that can be used to study large domain motions in multidomain proteins. The method is a subset of gREST method, wherein LJ and charge parameters of selected residues are used as solute region while maintaining the intra-domain stability.

We applied gREST_SSCR to study open to closed motion in ribose binding protein (RBP). RBP is a

small protein that plays a role in transporting ribose molecule into bacterial cytoplasm. By investigating the details of RBP motion, we also aimed to investigate the possibility of conformational selection or induced fit mechanism.

2 Specific usage status of the system and calculation method

Most of the calculations were performed by the end of the previous fiscal year. Wherein, 2 microsecond classical MD simulation of Apo and Holo form RBP was performed. In addition, a 500 ns gREST_SSCR simulation of the Apo form were performed using 12 replicas.

3 Result

In comparison to cMD, gREST_SSCR drastically enhanced domain motion (see figure 11) allowing for simulation of closed, intermediates and open states in the holo form. In Apo-form 500 ns, no closed conformation was observed in neither cMD nor gREST_SSCR, excluding the possibility of a single conformational selection mechanism. Simulation results shows the formation of transient salt bridges that facilitate the transition by stabilizing intermediate states.

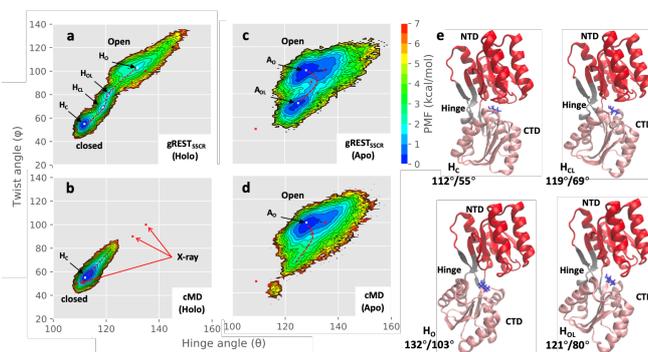


Figure11: Free energy landscape of Holo and Apo states RBP using gREST_SSCR (300 K) and cMD simulation. Representative structures of metastable states are also shown.

4 Conclusion

- We were able to demonstrate the effectiveness of our method in enhancing rigid domain motion.
- We revealed closed/open transition pathway in RBP, showing the formation of two intermediate states.
- We roll out the possibility of a sole conformational selection mechanism.
- We show that transient salt bridges are important for domain motion.

5 Schedule and prospect for the future

We are currently using our method to study domain motion in very large proteins including spike protein in SARS-Cov-2.

Unraveling the coupling between conformational changes and ligand-binding in ribose binding protein by MD simulations

(担当:Ren)

1 Background and purpose of the project, relationship of the project with other projects:

The cooperation between substrate association and protein conformational change is essential to the functions of protein in the cell. Dr. Dokainish Hisham in our lab has investigated the open-to-closed transition of ribose binding protein (RBP), a multi-domain protein delivering the ribose to the transporter, by enhanced sampling technique named gREST_SSCR. Multiple intermediate states were observed in the simulations. However, due to the restraint between ligand and protein used in the simulations, the relationship between ligand binding and intermediate states is still unclear. In this project, we aim to investigate the relationship between ligand binding and the intermediate states by conventional atomistic MD (cMD) simulations.

2 Specific usage status of the system and calculation method

We performed 10 independent cMD simulations starting from representative structures for each meta-stable state observed in the gREST_SSCR simulations. Each cMD simulation lasted 20 or 40ns according to the status of ligand-binding. The total simulations time was about 1,800 ns.

3 Result

Our cMD simulations indicated that from open to closed conformation, the affinity for ligand increases gradually. In the open and open-like state, ligand-binding is unstable. The bound ligand dissociates from the protein very quickly. Along with the domain closure, protein-ligand interaction is strengthened dramatically leading to the stable ligand binding in the closed-like state, which in turn induce further domain closure to the fully closed state. Structural analysis suggested that the protein-ligand interaction is tightly coupled with the local inter-domain interaction of RBP during the open-to-closed transition. The change of the hydration state of ligand-binding pocket along the conformational change suggested that ligand association expelled water molecules from the cleft region continuously. Further analysis showed the important role of indirect protein-ligand interaction mediated by water molecules in the very early stage of ligand binding.

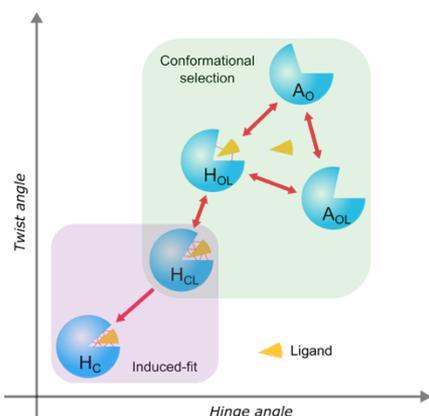


Figure 12. A possible mechanism for ligand-mediated conformational changes in RBP.

The structural changes in the boxes shown in pale

green and light pink are explained using the conformational selection and the induced fit, respectively.

4 Conclusion

- Both induce-fit and conformational selection play important role in the ligand-binding coupled conformational change of RBP (see Figure 12). In the absence of ligand, RBP goes through large-scale fluctuation between open and open-like conformations. The ligand selects the occasionally visited closed-like conformations which have high affinity, stabilizes the structure by strong protein-ligand interaction, and induces the subsequent conformational change to the fully closed state.
- The protein-ligand interaction is tightly coupled with the inter-domain interaction of RBP during the open-to-closed transition.

Water molecules play essential role in the ligand association. Especially, the water-bridged protein-ligand interaction is important in the very early stage of ligand binding.

分子認識に関わる生体分子の水素結合構造の解明 (担当:大滝, 八木)

1. 本課題の研究の背景、目的

分子の振動状態は、水素結合などの局所的な化学的環境に対し鋭敏である。そのため、同じ分子であっても分子内の水素結合パターンが異なれば振動分光法によって得られるスペクトルは大きく異なる。これを利用して、振動スペクトルと量子化学計算(調和振動解析)によって得られるスペクトルとの比較により、これまで多くの分子構造が決定されている。

近年、実験技術の進歩により、ポリペプチドをレーザーで非破壊的に蒸発させた後、極低温に冷却することで、安定構造の振動スペクトルを構造選択的かつ高分解能で取得することが可能になり、タンパク質の部分構造を決定する手法として注目を集めている。共同研究者の藤井ら(東工大)は、 β_2 -アドレナリン受容体におけるアドレナリン結合部位の水素結合構造の解明を目的として、この技術を利用した振動分光実験を行っている。藤井グループでは、アドレナリ

ン結合部に相当する 5 残基ペプチド SIVSF (S=セリン (Ser), I=イソロイシン (Ile), V=バリン (Val), F=フェニルアラニン (Phe)) を合成し、末端を変えた SIVSF 単体 (図 1.1) およびアドレナリンのプロトン付加体との複合体の振動スペクトルの取得に成功している。

一方、ポリペプチドのような分子の場合、(i) 構造が柔らかく膨大な数の準安定構造が存在するため、最安定構造の探索が難しい、(ii) 振動の非調和性が強い水素結合が分子内に多数存在するため、調和振動解析は信頼性が低い、などの理論計算側の問題が生じていた。我々は、レプリカ交換分子動力学法を用いた構造サンプリングと非調和振動状態計算を組み合わせた構造決定手法を考案・適用した。前年度までの HOKUSAI 利用課題などにより、SIVSF-NH₂ (図 13a), Ace-SIVSF-NH₂ (図 13b) (2 つ), Ace-SIVSF-NHMe (図 13c) (2 つのうち 1 つ) の構造決定に成功している。Ace-SIVSF-NHMe の残り 1 つについては構造の決定に至っていないが、約 40 個の候補構造について非調和振動計算を行い、数点のコンフォーマーについて実験スペクトルと類似したスペクトルを得た。

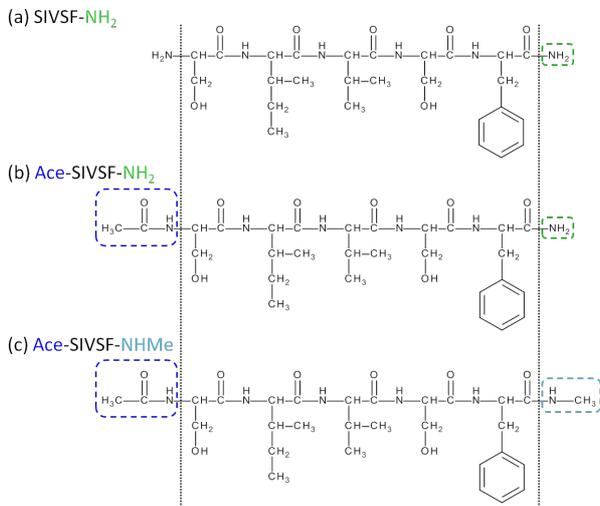


図 13. SIVSF の構造式. (a) 末端非修飾の SIVSF-NH₂, (b) N 末端のみを修飾した Ace-SIVSF-NH₂, (c) 両末端を修飾した Ace-SIVSF-NHMe.

これまでの計算では、計算コストの観点から取り扱う振動モードの数を全体の 261 から 80 に削減していた。そこで、本課題では 100 個の振動モードを扱い、より多くの振動モード間のカップリング効果を取り入れた非調和振動計算を行った。モード数に対するスペクトルの収束性を確認するとともに、Ace-SIVSF-NHMe の構造決定を行うことを目的とした。

2. 具体的な利用内容、計算方法

非調和振動計算は以下の手順で行われる。

1. 最適化構造に対し調和振動解析を実行する。
2. 基準振動に基づき 4 次テイラー展開ポテンシャル (QFF) を構築する。
3. QFF から非調和性が強い領域を判別し、その領域に対してグリッドポテンシャルを構築する。
4. 得られた非調和ポテンシャルを用いて、VQDPT2 法により振動状態計算を実行する。

本課題では手順 3 で用いるモード数を 80 から 100 に増やした。前年度までに行われた 80 モードの非調和計算の結果から、Ace-SIVSF-NHMe の 2 つの実験スペクトル (X, Y とする) とスペクトル形状が似ているコンフォーマーを 6 点選び出し、非調和振動計算を行った。比較のため、ポテンシャル計算のレベルは 80 モードのときと同様 B3LYP 汎関数と 6-31(++)G** 基底関数を用いた (diffuse 関数は窒素、酸素とそれらに結合している水素に適用した)。

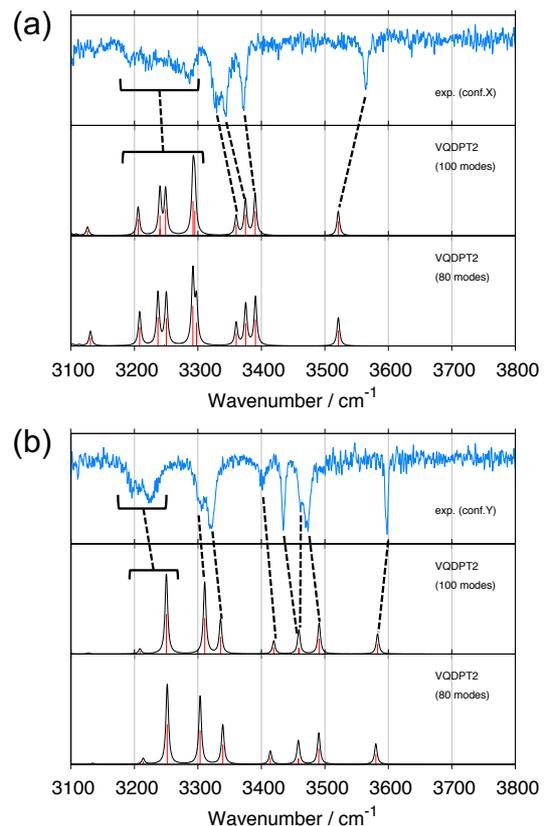


図 14. 実験スペクトル (a) X および (b) Y と非調和スペクトルの比較. それぞれにおいて上段は実験スペクトル, 中段は非調和スペクトル (100 モード使用), 下段は非調和スペクトル (80 モード使用)。

3. 結果

実験スペクトル X, Y, および, 実験スペクトルに最も似ているコンフォマーの 100 モード, 80 モードの非調和スペクトルを比較した図を図14に示す。80 モードの計算と 100 モードの計算では, (振動数の違いは多少あるが)ほぼ同じ形状のスペクトルが得られており, 使用する振動モード数に対して計算が収束していることが分かる。また, 非調和スペクトルは実験スペクトルと良く一致している。ピーク振動数の平均絶対誤差は 19.0 cm^{-1} (X), 15.0 cm^{-1} (Y)であり, 高精度で計算できている。このように, 提案手法により Ace-SIVSF-NHMe の構造決定に成功した。

4. まとめ

末端を修飾したペプチド Ace-SIVSF-NHMe のコンフォマーの構造決定を目的として非調和振動計算を行った。前年度までと異なり, 計算に使用するモード数を 80 から 100 に増やし, より多くの振動モード間のカップリング効果を取り入れた計算を行った。100 モードの非調和スペクトルは 80 モードの非調和スペクトルとよく似ており, 十分な数の振動モードを考慮できていることが分かった。非調和計算で得られたスペクトルは実験スペクトルと良く一致している。これにより, Ace-SIVSF-NHMe の構造を決定することに成功した。

5. 今後の計画・展望

本研究の成果については現在論文を執筆中である。できるだけ早く論文化するとともに, 他のペプチドやペプチド-リガンド複合体などのより複雑な系への応用を目指す。

2020 年度 利用研究成果リスト

【雑誌に受理された論文】

- [1] Dokainish, H. M. and Sugita Y. Exploring large domain motions in proteins using atomistic molecular dynamics with enhanced conformational sampling. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*(1), 270.
- [2] Marta Kulik, Takaharu Mori, and Yuji Sugita, “Multi-scale flexible fitting of proteins to cryo-EM density maps at medium resolution”, *Front. Mol. Biosci.* (in press).

【口頭発表】

- [1] Rational design of membrane-spanning alpha-helical peptide barrels
 - A. Niitsu, A. R. Thomson, A.J. Scott, J.T. Sengel, Y. Sugita, M.I. Wallace, H. Bayley, and D.N. Woolfson
 - 3S-1-4, 第 58 回日本生物物理学会年会, 2020 年 9 月, オンライン
- [2] (招待講演) 計算化学と振動分光の融合による高分子内分子動態解析法の開発と応用
 - 八木清, 2020 年 9 月, 第 69 回高分子討論会, 岩手大学 (オンライン).
- [3] (招待講演) 大規模 QM/MM 計算が拓く生命科学のフロンティア
 - 八木清, 2020 年 11 月, 第 1 回ピコバイオロジー研究会, 兵庫県立大学 (オンライン).
- [4] “高速クライオ電顕フィッティング法の開発と応用”
 - 森貴治, CBI 学会 2020 年大会 (オンライン) 2020/10/29

【ポスター発表】

- [1] Dimensionality reduction of macromolecular dynamics using UMAP
 - M. Oide, Y. Sugita, RIKEN BDR Symposium 2021, 2021 年 3 月, オンライン
- [2] What is the role of strong hydrogen bond network for the proton pump function in Rhodopsin?
 - 八木清, 2020 年 9 月, 奨励課題成果報告会・異分野交流の夕べ, 理化学研究所 (オンライン開催).