

プロジェクト名(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)、大滝 大樹(1)、新津 藍(1)、本橋 昌大(1)、森 貴治(1)、八木 清(1)、若林 大貴(1)、Haeri Im(1)、Weitong Ren(1)、Yaokun Lei(1)

理研における所属研究室名:

(1)理化学研究所 開拓研究本部 杉田理論分子科学研究室

反応経路探索および自由エネルギー地形解析によるトリプトファン合成酵素におけるトリプトファン合成過程の解明
(担当:伊東)

1. 本プロジェクトの研究の背景、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(TSase)は、 α および β サブユニットからなる酵素複合体であり、それぞれのサブユニットに活性中心を持つ(図1A)。 α サブユニットにおいてインドール-3-グリセロールリン酸(IGP)より α -reaction と呼ばれる反応を経てインドールを生成し、 β サブユニットでは生成されたインドールと L-セリン(L-Ser)を用いて β -reaction と呼ばれる2段階の反応により L-トリプトファン(Trp)を合成する[R. K. Ghosh et al., Frontiers, 2022]。本酵素において α (β)サブユニットへの酵素の結合が、 β

(α)サブユニットの構造変化を促し酵素活性を制御する、すなわちアロステリックな制御機構が存在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酵素反応の基礎的な理解を深めるためだけでなく、創薬の面からも長年研究されてきたが未だに解明されていない。

本研究は、TSase の α サブユニットにおける IGP またはそのアナログの結合が、 β サブユニットにおける β -reaction stage I の酵素活性を3-10 倍上昇させることに注目し、最小エネルギー経路探索(MEP)法および Umbrella Sampling (US)法を用いた分子動力学計算(MD)による自由エネルギー面の解析から、アロステリックな酵素反応制御機構を原子レベルでの解明を目指すものである。

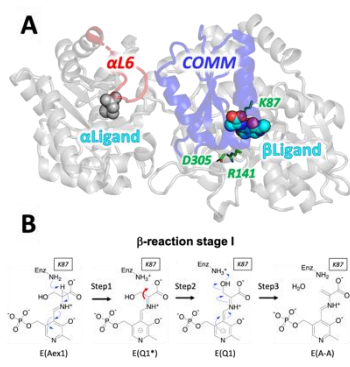


図 1. TSase の構造と酵素反応。(A) TSase の各サブユニットと活性中心。(B) β -reaction stage I のスキーム。

2. 具体的な利用内容、計算方法

β -reaction stage I は β サブユニットのリガンドが、L-Ser が結合した状態である external aldimine (E(Aex₁))から quinonoid intermediate 状態(Q1)を経て α -aminoacrylate (E(A-A))まで移行する反応である(図1B)。本計算において、初期構造としてリガンドの結合状態が α -リガンド| β -リガンド=Apo|E(Aex₁)である結晶構造(PDBID: 1KFJ)を用い、B3LYP-D3/cc-pVDZ レベルでの MEP 探索を行い β -reaction stage I の反応経路を同定した。また B3LYP-D3/aug-cc-pVDZ レベルでの US-MD 計算を 32 window を用いて 5ps/window 行うことにより、反応経路に沿う自由エネルギー(PMF)を解析した。

3. 結果

本計算により得られた PMF を図2A に示す。得られた PMF より、プロトン移動を伴う最初のステップが律速となることがわかった。これは報告されている実験結果と一致する。2段階目のステップにおいてリガンドの水酸基が180度回転することが知られているが、本計算で用いた Apo|E(Aex₁)の構造ではこの水酸基と β D305 が水素結合を形成し、スムーズに回転を行うことができないことが判明した(図2B)。結果として2段階目のステップが吸熱反応となった。IGP|E(Aex₁)を用いて行われた先行研究[C. S. S. Teixeira, et al., Chem. Cat. Cham., 2020]において、2段階目の反応は発熱反応であるとともに、 β D305 は β R141 と塩橋を形成していることが報告されている。このことから、 β D305 の結合先が TSase における β -reaction stage I の反応活性に深く関わっていると考えられる。

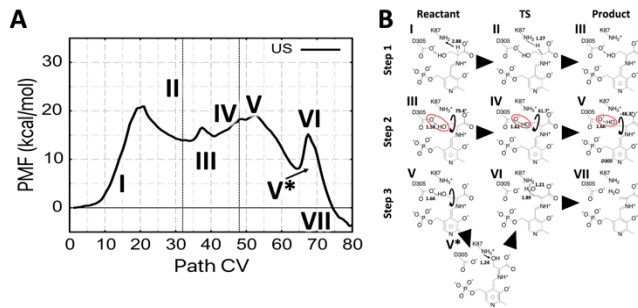


図2. TSase における β -reaction stage I の(A)PMF および (B)反応過程詳細

4. まとめ

先行研究との比較により、 α サブユニットへの IGP の結合が、 β D305 の結合先を β -リガンドの水酸基から β R141 へスイッチすることが示唆された。この結合先のスイッチにより、 β -リガンドの水酸基がスムーズに 180 度回転可能となり、3段階目の反応が進行することが判明した。TSase において、 α -リガンドの結合は離れた部位である β サブユニットにおけるローカルな構造変化を引き起こすと同時に、このような構造変化により酵素反応を制御しているということを突き止めた。

5. 今後の計画・展望

本研究により、 α -リガンドの結合が β D305 の結合先を変化させることが示唆されたが、 α サブユニットから離れた部位である β サブユニットまでどのようなアロステリックパスウェイを通じて構造変化を引き起こすのかまでは明らかにならなかった。次のステップとして、どのような経路で α -リガンドの結合情報が β サブユニットまで伝わるのか明らかにしたい。

Investigation of structural characteristics of Hero proteins using molecular dynamics simulations

(担当: Im, Niitsu)

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

Most proteins denature and aggregate under stress conditions, such as near-boiling temperatures, drying and freezing, and high salinity. In cells, molecular chaperones regulate protein folding and prevent aggregation or misfolding of client proteins, protecting proteins after such stress shocks. Recently, some of the intrinsically disordered proteins (IDPs) are also found to function as “molecular shields”. Heat-resistant obscure (Hero) proteins are identified

in Human and Drosophila, predicted to be IDPs, and remain soluble even after boiling at 95°C. In vivo experiments have demonstrated that Hero proteins protect proteins from denaturation under stress conditions. Hero proteins can also block the aggregation of several types of pathological proteins in cells and Drosophila strains modeling neurodegenerative diseases. These functions of the Hero protein as a “molecular shield” are unique and likely to be biologically significant. However, the molecular mechanism of their function is unknown.

In this project, we perform molecular dynamics (MD) simulations on all atoms to understand the properties of the Hero proteins and investigate and compare the structural and thermodynamic properties of the Hero proteins. Furthermore, we intend to demonstrate how the features of the amino acid sequence of Hero proteins relate to the properties of the disorderly structure, and the function of preventing denaturation and aggregation of client proteins.

2. Specific usage status of the system and calculation method

We performed all-atom MD simulations at 300K and 0.15M NaCl for Hero proteins. MD simulations were performed for six hero proteins (Hero7, 9, 11, 13, 20, and 45).

We employed the CHARMM36m force field for Hero proteins and TIP3P model for water. We used GENESIS to perform three independent MD simulations for 210 ns for each Hero protein, starting from the AlphaFold2 predicted structures.

3. Result

Fig 3 shows the initial structures of Hero proteins predicted by AlphaFold2. During the 210-ns MD simulations, the size of Hero proteins became more compact than the initial structures during MD simulations.

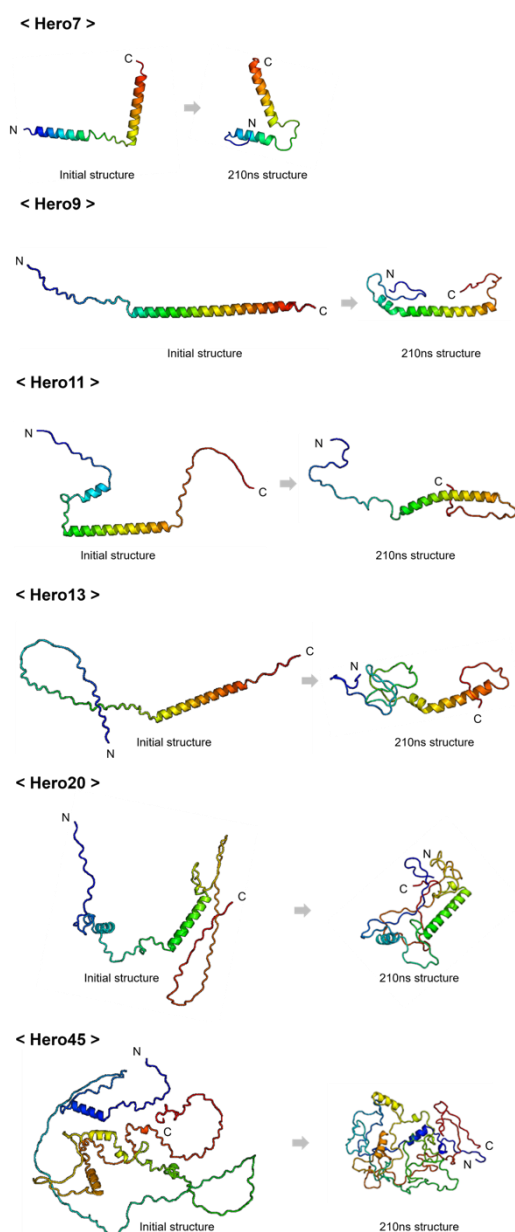


Figure 3. AlphaFold2 predicted structures and simulated structures for Hero proteins

Among the Hero proteins, the long helices in the center of the protein maintained relatively high helical contents during MD simulations. On the other hand, helices close to the N and C-terminal regions of the Hero proteins and small helices in the Hero proteins showed reduced during MD simulations. (Fig. 4) These results led us to consider that force-field dependency will be crucial for investigating IDPs like Hero proteins.

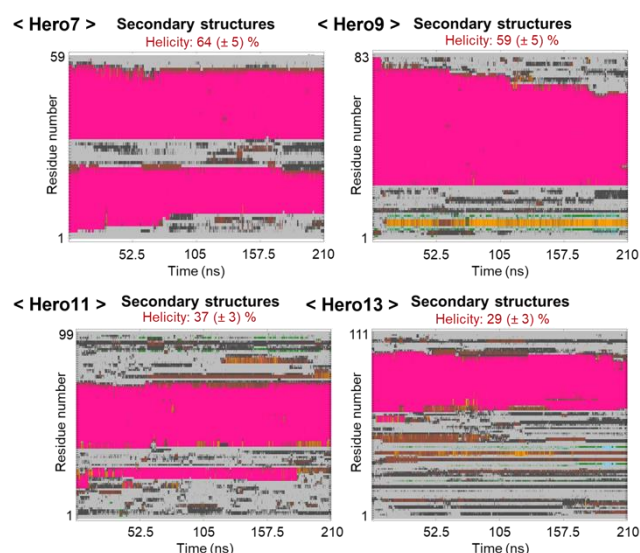


Figure 4. Changes in the secondary structure of each residue of hero proteins during MD simulations.

Since Hero11 is known to suppress aggregation of TDP-43, a key protein in neurodegenerative diseases, we further extended the simulation of Hero11 up to 1 μ s. The central long helix kept unfolding to less than half of the initial length during the simulation in two independent trajectories. This suggests that the conventional MD simulation for 1 μ s is not sufficient to determine the secondary structural features of Hero11. We further performed the same 1 μ s - simulation for a Hero11 mutant of which all charged residues are replaced with Gly. This mutant was reported to lose the suppression activity against TDP-43 aggregation. Similarly, the mutant kept unfolding during the simulation. Thus, we combined these results with coarse-grained simulations of Hero11 enabling much longer and large-scale sampling (performed in other projects). As a result, a possible mechanism of TDP-43 condensation regulation by Hero11 has been proposed and the work has been accepted for publication in *Journal of American Chemical Society Au*.

4. Conclusion

In this project, we investigate the structural properties of Hero proteins by using all-atom MD simulations. We performed MD simulations for the Hero proteins using GENESIS. During MD

simulations, the helicity of Hero proteins is expected to be lower than the helicity predicted by AlphaFold2, and the terminal regions of the Hero proteins were disordered and exhibited interactions with other amino acids in the structure. A part of the simulation results led to propose a possible mechanism of a Hero protein suppressing aggregation of a client protein when combined with coarse-grained simulations performed on other projects.

5. Schedule and prospect for the future

We will compare the results using different force fields for more accurate confirmation of the helical stability of the Hero proteins. Furthermore, we will also analyze the thermodynamic properties to understand the structural properties of Hero proteins.

Investigation of lactate dehydrogenase (LDH) activity in the crowded environment

(担当: Ren)

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

Enzymes are biological catalysts that play a critical role in the metabolism of living organisms. Recent studies have shown that the cellular environment plays a crucial role in regulating enzyme activity. In particular, the crowded environment within cells, where macromolecules are densely packed together, has been shown to affect enzyme activity in a variety of ways. In addition, the recent discovery of liquid-like bio-condensates, which are non-membrane-bound organelles that form within cells and have liquid-like properties, has shed new light on the regulation of enzyme activity. L-lactate dehydrogenase (LDH) is an enzyme that plays a crucial role in the metabolism of cells by catalyzing the conversion of L-lactate to pyruvate. The enzyme is widely distributed in many organisms, including bacteria, fungi, and animals. LDH is a homotetrameric protein that undergoes conformational changes during its catalytic cycle. The open and closed conformations of LDH have been extensively

studied, as they play a critical role in the regulation of enzyme activity. In this project, we investigated the impact of crowding on the function of LDH, its structure, enzyme activity and the dynamics of its open and closed conformations which is essential for the development of drugs that target this enzyme.

2. Specific usage status of the system and calculation method

By using our in-house tool, we built the crowded system at an atomistic level, which includes one LDH protein and eight bovine serum albumins (BSAs). Two independent conventional all-atom simulation of LDH in the crowded protein solution are performed. For comparison, we also conducted atomistic MD simulation of LDH in the dilute solution. Meanwhile, we carried out QMMM calculation of the LDH-catalyzed reaction in both open and closed conformation. String method is applied to predict the minimum energy pathway of the reaction while the umbrella sampling method is used to obtain the free energy profiles along the minimum energy pathway.

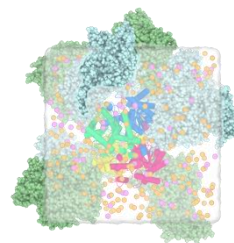


Figure 5. LDH in crowded protein solution. The crowder proteins are shown by sphere.

3. Result

Our atomistic MD simulations of LDH show that the closed conformation of the LDH is very unstable and goes very quick closed-to-open transition in dilute solution. While the presence of crowder in solution enhances the stability and life time of closed state significantly. In addition, the extreme flexibility of substrate(pyruvate) binding which is observed in the dilute solution is also dramatically suppressed in the very crowded environment. Our QMMM calculation of LDH-catalyzed reaction indicate that although the

minimum energy pathway of the reaction in open and closed state are very similar. The free energy barrier of the reaction in the closed state is much smaller than that in the open state.

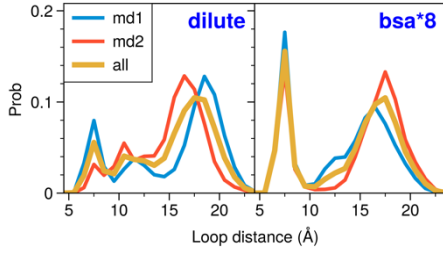


Figure 6. The histogram of the distance between the surface loops in dilute and crowded solution.

4. Conclusion

By combining all-atom MD simulation and QMMM calculation together, we explored the impact of crowding environment on the conformational dynamics and enzyme activity of LDH. We found that the highly crowded environment stabilizes the closed conformation of LDH. Meanwhile our QMMM calculation predict much lower energy barrier of the LDH-catalyzed reaction in the closed conformation. All these findings suggest us that the activity of LDH may be enhanced in the very crowded environment.

周期系に対する QM/MM 法の開発と分子動力学計算プログラム GENESIS/spdyn への実装

(担当: 八木)

1. 本プロジェクトの研究の背景、目的、関係するプロジェクトとの関係

我々は、これまで MD 計算プログラム GENESIS に QM/MM 法を開発してきた。QM/MM 法は、興味ある空間領域を高精度な量子化学 (QM) 計算で扱い、周囲環境を古典力場 (MM) で扱うハイブリッド法である。通常、QM 計算は孤立系で扱うため、これまで GENESIS の QM/MM 計算は QM 計算の設定に合わせ、孤立系で実行してきた。しかし、MD 計算は、ほとんどの場合、周期境界条件を課しているため、周期系から孤立系を抜き出す、などの操作が必要であった。本課題では、周期系で QM/MM 計算を実行するための方法を開発し、GENESIS/spdyn に実装した。

2. 具体的な利用内容、計算方法

QM/MM 法のハミルトニアンは以下の式で与えられる

$$\hat{H}^{QM/MM} = \hat{H}_e + V_c^{QM-MM} \quad (1)$$

\hat{H}_e と V_c^{QM-MM} は電子ハミルトニアンと QM 領域と MM 領域の静電相互作用である。

$$\hat{H}_e = -\frac{1}{2} \sum_{i=1} \nabla_i^2 + \sum_{i>j} \frac{1}{r_i - r_j} - \sum_{i,l} \frac{Z_l}{r_i - R_l} \quad (2)$$

$$V_c^{QM-MM} = -\frac{1}{2} \sum_{|m| \leq d} \sum_{a=1}^N \sum_{i=1}^{N_e} \frac{q_a}{r_i - R_a + mL} \quad (3)$$

ここで、 i, l は電子と原子核に対するインデックスで、 a は MM 原子に対するインデックス、 r_i, R_l, R_a はそれぞれの座標、 Z_l, q_a は核電荷と MM 原子電荷である。 m は周期セルセルの方向ベクトルであり、 L はシミュレーションボックスの長さである。QM 計算では以下の Schrödinger 方程式を解く、

$$\hat{H}^{QM/MM} \psi_e = E_e^{QM/MM} \psi_e \quad (4)$$

QM 計算により以下のエネルギーと

$$E_e^{QM/MM} = E_e^{QM} + E_e^{QM-MM} \quad (5)$$

$$E_e^{QM} = \langle \psi_e | \hat{H}_e | \psi_e \rangle \quad (6)$$

$$E_e^{QM-MM} = \langle \psi_e | V_c^{QM-MM} | \psi_e \rangle \quad (7)$$

QM 原子電荷 q_i が得られる。このとき、系全体のポテンシャルエネルギーは以下になる、

$$V = E_e^{QM} + \delta E_e^{QM-MM} + V_c + V_{vdW} + V_{bonded} \quad (8)$$

$$\delta E_e^{QM-MM} = E_e^{QM-MM}$$

$$-\frac{1}{2} \sum_{|m| \leq d} \sum_{i=1}^N \sum_{j \in QM} q_i q_j |R_{ij} + mL|^{-1} \quad (9)$$

$$V_c = \frac{1}{2} \sum_{m \in Z} \left(\sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N q_i q_j |R_{ij} + mL|^{-1} \right) \quad (10)$$

V_{vdW} と V_{bonded} は MM 力場で与えられる van der Waals 項と結合項である。

実際には、式(4)を解く際に d を限定する、すなわち長距離クーロンを無視して QM 計算を実行する。一方、MM 計算では、QM 電荷と MM 電荷の相互作用を PME 法で扱うことで長距離の QM-MM 相互作用を考慮する。式(9)は QM 計算と MM 計算における QM-MM 相互作用の扱いの違いを吸収するための補正項である。なお、DFTB や GFnxTB 法などの Tight binding DFT 法では、QM-MM 間の相互作用は電荷で表されるため、式(9)の補正はキャンセルしゼロになる。

3. 結果

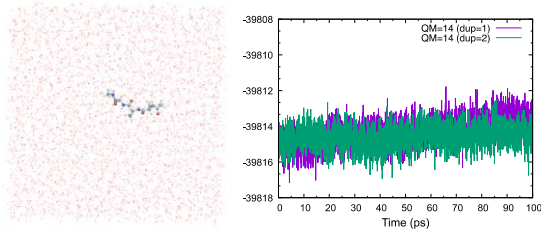


図 7. アラントリペプチドの系(左)と、DFTB3/MM の NVE-MD 計算により得られたエネルギーと時間のグラフ(右)。

考案した方法を GENESIS/spdyn に実装し、テスト計算を実行した。図 7 に NVE 条件による DFTB3/MM の MD 計算結果を示す。d=1 ではエネルギーがややドリフトしているが、d=2 へ増やすことによって、エネルギー保存がよくなることが分かる。

4. まとめ

周期系に対応する QM/MM 計算を開発し、GENESIS/spdyn へ実装した。アラントリペプチドへのテスト計算を実行し、QM 計算で考慮する MM 領域を大きくすることによりエネルギー保存が得られた。

5. 今後の計画・展望

現在、DFT 計算に対する拡張を実装している。また、タンパク質や酵素の系にも適用し、より多くのテスト計算を実行することを計画している。

2022 年度 利用研究成果リスト

【雑誌に受理された論文】

1. S. Ito, K. Yagi, and Y. Sugita, “Computational Analysis on the Allostery of Tryptophan Synthase: Relationship between α/β -Ligand Binding and Distal Domain Closure” *J. Phys. Chem. B* **126**, 3300-3308 (2022).
2. S. Ito, K. Yagi, and Y. Sugita, “Allosteric regulation of β -reaction stage I in tryptophan synthase upon the α -ligand binding” *J. Chem. Phys.*, in press.
3. Cheng Tan, Ai Niitsu, and Yuji Sugita “Highly Charged Proteins and Their Repulsive Interactions Antagonize Biomolecular Condensation” *J. Am. Chem. Soc.*, in press

【口頭発表】

1. 伊東真吾、八木清、杉田有治 “分子動力学計算によるトリプトファン合成酵素におけるアロステリック機構の解明”, 第 22 回日本蛋白質科学会年会, つくば, 2022 年 6 月.
2. Haeri Im, Ai Niitsu, Cheng Tan, and Yuji Sugita, "Structural Characteristics Investigation of Hero Peptides Using All-atom Molecular Dynamics Simulations", The 60th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, Hakodate, 2022.9.28-30.

【ポスター発表】

1. S. Ito, K. Yagi, and Y. Sugita, “Allosteric regulation mechanism of tryptophan synthesis in tryptophan synthase by free energy analysis”, 第 60 回日本生物物理学会年会, 函館, 2022 年 8 月.
2. 伊東真吾, “ABMD 法の GENESIS プログラムパッケージへの導入によるマルチスケールシミュレーションにおける自由エネルギー計算”, 第 36 回分子シミュレーション討論会, 2022 年 12 月.