

プロジェクト名(タイトル):

分子動力学計算と構造生物物理実験の協奏によるタンパク質構造ダイナミクスの理解

利用者氏名:

○新津 藍(1)、本橋 昌大(1)、若林 大貴(1)、渡邊 一樹(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

De novo 設計膜貫通ペプチドポアの構造変化メカニズム (担当:新津)

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

膜タンパク質の de novo 設計は、天然に観測されていない新しい生体材料分子を得る手段となると共に、膜タンパク質のフォールディングを司るアミノ酸配列-立体構造相関を知ることができる。本研究では膜タンパク質の最も基礎的な構造である α ヘリックスペプチドポアを対象とし、実験結果と合わせて動的構造変化を理解することを目的とする。これまでに de novo 設計した膜貫通 α ヘリックスペプチド (CCTM ペプチド) は、分析超遠心実験の結果から界面活性剤中で 5 量体を形成することが明らかとなっている。また一分子チャンネル電流測定実験と計算機を用いた構造モデリングの結果から、脂質二重膜中では 5 量体 Single Channel state と 10 量体以上のいくつかのサイズのポアを形成しステップ状の電流値を示す Multiple conductance state の 2 状態を電位依存的にとることが示唆されている。しかしながらこのようなポアの大きな構造変化がどのようなメカニズムで起こるかはわかっていなかった。そこで本プロジェクトでは、実験の時間・空間分解能では確認できないポアの構造と会合数変化を全原子分子動力学計算により分析した。これにより CCTM ペプチドのアミノ酸配列が脂質二重膜中でとりうる構造とそこに存在するペプチド間、ペプチド-脂質間相互作用を明らかにし、今後の α ヘリックスを基盤とした膜タンパク質の de novo 設計に資することを目指す。

2. 具体的な利用内容、計算方法

CCTM ペプチド 10 量体、15 量体、20 量体について conventional MD 計算を 1 マイクロ秒 \times 2 本、外部電場存在下での計算を 1 マイクロ秒ずつ実施した。脂質とペプチ

ドのダイナミクスを向上させるため、系の温度は 353K とした。ペプチドの初期構造は ISAMBARD を用いて作成した。力場は CHARMM36 を使い、実験条件と同様条件の脂質 DPhPC とイオン 1M KCl、水は TIP3P モデルを用い、ペプチドポアが脂質二重膜中に配置された計算ボックスを CHARMM-GUI を利用して作成した。MD 計算ソフトウェアは GENESIS を用いた。

3. 結果

10 量体モデルの MD 計算の結果、10 量体バレルは 2 つの親水性面をそれぞれ内側に向けた 2 つの小さなバレル構造に分割した。2 つの独立トラジェクトリにおいて同様の分割が観測された。そこでより大きなバレル構造でも同様な分割がおこるか確認するため、15 および 20 量体バレルでも同条件で計算を行った。その結果、それぞれ 2 回ずつの計算全てにおいて、4~8 本のペプチドバレルが分離する様子が観測された (図 1)。さらに実験と同様に膜電位が存在する条件で計算を行うため、外部電場を導入した計算を実施した。その結果、10, 15, 20 量体全てにおいて、+200 mV ではバレル構造は計算時間内では分割することなく、安定化された。この時、ペプチド α ヘリックスの膜に対する傾斜角度を見ると、+200 mV 膜電位下ではペプチドの傾斜角度が均一であるのに対し、電場がない条件、では角度がペプチドにより大きくばらつくことがわかった。これらの計算結果から、大きなバレル構造は膜電位によって安定化されること、実験で観測されたステップ状の電流変化はバレルの分割、およびおそらく融合によって実現されているモデルが示唆された。

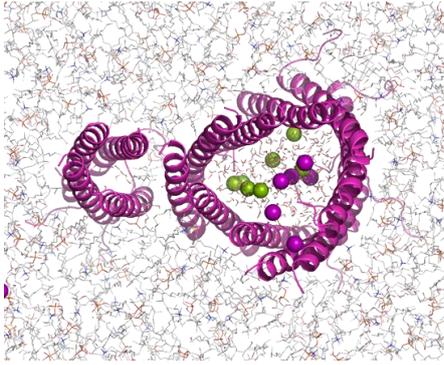


図1 15量体の1マイクロ秒後のスナップショット

4. まとめ

CCTM ペプチドポアの構造と会合数の変化のメカニズムを解明するため、外部電場あり、なしの条件下での全原子分子動力学計算を実施した。その結果から、膜電位によってペプチドポアが分割・融合するモデルを提案した。

5. 今後の計画・展望

今回得られた計算結果をもとにして、CCTM ペプチドポアの構造変化をアミノ酸配列の最適化により制御することができれば、新しい電位依存性ペプチドチャネルの開発に貢献できると期待される。今後はさらに CCTM ペプチドの膜結合から会合体形成までのフォールディング過程をシミュレーションにより予測することで、新しい膜ペプチドの *de novo* 設計指針を探索する。

F₁-ATPase の詳細な回転触媒機構の解明(担当:本橋)

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

F₀F₁-ATP 合成酵素の可溶性部分である F₁-ATPase (F₁) は、ATP 合成/加水分解と共役し、回転運動を行なう分子モーターである。六量体リング $\alpha_3\beta_3$ に回転子 γ サブユニットが突き刺さった構造をしており (図2)、ATP を1つ加水分解するのに伴い、 γ サブユニットが 120° 回転する機構をもつ。その一種である熱菌由来の F₁ (TF₁) は、120° ステップ回転が、80° と 40° のサブステップで構成されており、各サブステップ前のポーズは、それぞれ ATP 結合待ち状態、加水分解待ち状態と呼ばれる。これまで一分子回転計測を用いた実験が精力的に行われてきたが、2つ状態間の遷移過程に関する理解は未だ不完全である。

近年、クライオ電子顕微鏡法による構造解析で、TF₁ の ATP 結合待ち状態と加水分解待ち状態の構造が明らかとなった[Sobti et al., Nat Commun, 12(1), 4690 (2021)]。

そこで本研究は、ATP 結合待ち状態と加水分解待ち状態の構造を用いた分子動力学 (MD) 計算を実行し、ATP 結合待ち状態から加水分解待ち状態へ至る 80° 回転の詳細な回転メカニズムを明らかにすることを旨とする。

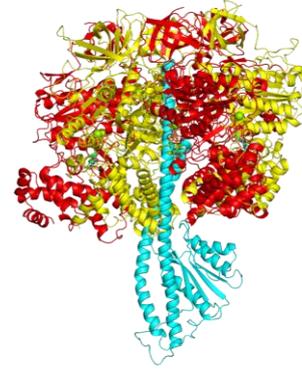


図2 F₁-ATPase の構造

α サブユニット(赤色)、 β サブユニット(黄色)、 γ サブユニット(水色)の $\alpha_3\beta_3\gamma$ 複合体で形成される。

2. 具体的な利用内容、計算方法

TF₁ の ATP 結合待ち構造 (PDBID: 7L1Q) と加水分解待ち構造 (PDBID: 7L1R) を初期構造とし、分子動力学ソフトウェア GENESIS を利用した MD 計算を行なった。タンパク質の力場には CHARMM36m を使用した。 γ サブユニットを 80° 回転させる $\alpha\beta$ サブユニットの構造変化はマイクロ秒からミリ秒の時間スケールのイベントであり、通常の conventional MD (cMD) の計算時間ではアクセスできない。そこで、指定した計算時間で強制的に構造変化を誘起する計算手法である Targeted MD (TMD) を用いて、トルク発生に関わるとされる $\alpha\beta$ サブユニットを構造変化させた。その後、 $\alpha\beta$ サブユニットに位置拘束を課した cMD を実行し、 $\alpha\beta$ サブユニットの構造と γ サブユニットの回転角度の関係を解析した。

3. 結果

160 ns の TMD と 50 ns の cMD で得られた γ サブユニットの回転角度の時間変化を図 3 に示す。 γ サブユニットは、 $\alpha\beta$ サブユニットを構造変化に伴って一方向に約 80° 回転した。これは、実験で明らかとなった 80° サブステップの回転と一致する結果である。本計算では、さらに 80° の回転に 3 つの小さなステップが見られ、80° サブステップには、回転を駆動する $\alpha\beta$ サブユニットの 3 つの主要の構造変化が必要であることが示唆された。

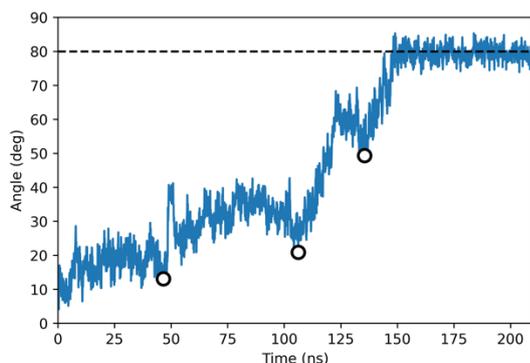


図3 γ サブユニットの回転角度

4. まとめ

TF₁の80°サブステップの詳細な回転メカニズムを明らかにするため、TMDで α β サブユニットをATP結合待ち構造から加水分解待ち構造へ構造変化させた。その結果、 γ サブユニットは、 α β サブユニットの構造変化に伴って、80°回転することがわかった。また、この回転には3つの小さなステップが見られたことから、サブステップを駆動する α β サブユニットの主要な構造変化が3つ存在すると考えられた。

5. 今後の計画・展望

本計算では、 α β サブユニットに加えて、結合する基質も拘束しているため、 α β サブユニットの構造変化を引き起こすATP加水分解反応素過程は特定できない。そこで、最小エネルギー経路を探索するString法を用いて、TMDの構造変化経路をより実態に近い経路に緩和させたのち、反応素過程と構造変化の関係について解析する。

グルタミン酸脱水素酵素における補酵素結合経路の解明 (担当:若林)

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

グルタミン酸脱水素酵素(GDH)は、同一構造のサブユニットで構成される六量体を形成している。各サブユニットは、六量体形成に寄与するドメイン、補酵素結合に関わるドメインと、その間に機能発現に関わる裂け目構造(活性クレフト)を持つ(図4)。GDHは活性クレフト内に補酵素のニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸(NADP)と基質のグルタミン酸を取り込むことによって、グルタミン酸を2-オキソグルタル酸へ変換する化学反応を触媒する。これまで、超高度好熱菌由来のGDHについて、水溶液中での分子動力学シミュレーションの結果から、補酵素や基質が存在しない水溶

液中では、活性クレフト内への部分的な水分子の脱吸着が活性クレフトの自発的な開閉運動を制御していることが解明されている。また、クライオ電子顕微鏡観察によりGDHが補酵素NADPと共存する条件では、NADPが活性クレフトへ結合する過程において、五つの準安定的な結合状態が存在することが明らかにされている。本研究では、観察実験のみでは解明が困難である、GDHとNADPの準安定結合状態の出現順序や状態間の遷移確率、および、補酵素存在下での活性クレフト内の水分子位置変化を、適切な力場を用いた分子動力学シミュレーションを用いて明らかにするとともに、GDHに対する補酵素の結合経路の解明を目指す。

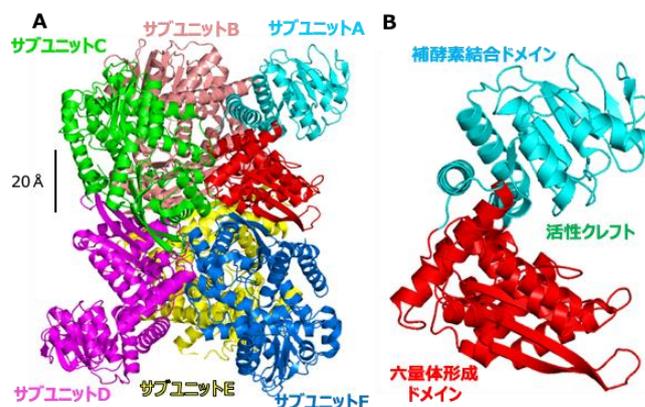


図4. 超高度好熱菌由来GDHの全体(PDB ID: 1EUZ)(A)とサブユニット(B)の構造

2. 具体的な利用内容、計算方法

最終的に実行を予定しているGDHとNADPの結合過程のシミュレーションの前段階として、NADP分子に適用する力場の評価を行った。具体的には、AMBERプログラムでよく使用されるGAFF2力場を用いて、水溶液中のNADP分子に、レプリカ交換分子動力学法を適用した。系の温度は300 Kから351.3 Kの範囲で振り分け、レプリカ数は20で、1マイクロ秒のシミュレーションを行った。

3. 結果

現在までに計算を終え、得られたトラジェクトリーから、NADPの最大分子長や代表的な結合の二面角などの詳細な時間変化について、解析を行っている。

4. まとめ

目的のGDHとNADPの結合過程のシミュレーションを行う準備として、NADPに適用する力場の検証を行った。充分

な構造をサンプリングするために、レプリカ交換分子動力学法を適用した。結果については、現在解析中である。

5. 今後の計画・展望

第一に、現在までに得られているトラジェクトリーの解析を進める。加えて、それと並行して、NADP 分子に対して、同様の条件で CHARMM 力場の検証を行う。その後、両者の結果を比較し、シミュレーション中出现する NADP の立体構造の頻度等から、適切な力場を選択し、GDH と NADP の結合過程シミュレーションの実行に移行する予定である。

HDM2 の天然変性領域 Lid の構造ダイナミクスの探索(担当:渡邊)

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

HDM2 はがん抑制遺伝子 p53 の働きを制御し、細胞内環境保持に重要な役割を担うタンパク質である。この機能に重要な HDM2 の N 末端ドメインは高い運動性(ダイナミクス)を有する末端の Lid と p53 結合サイトを含む Core の二つの領域からなる。これらの領域の相対的な位置関係の変化に伴って、HDM2 は p53 結合サイトが Lid で閉塞された”Closed state”と結合サイトが開放された”Open state”の二状態間で構造平衡を取ることが示唆されている(図 5、Showalter *et al.*, *JACS*, 2008)。一方で最近 HDM2 の N 末端アミノ基と共有結合を形成し、p53 を不可逆的に阻害する化合物の中で、希薄溶液中と細胞内とで異なる反応性を示すものが報告された(Ueda *et al.*, *JACS*, 2021)。このことから、HDM2 N 末端ドメインの構造平衡は希薄溶液中と細胞内では異なることが示唆される。希薄溶液中とは異なり、細胞内環境は分子が高密度に存在する”分子混雑環境”であり、着目分子の動態が変化することが知られている。本研究では、MD 計算により、分子混雑環境における HDM2 N 末端ドメインの Lid のダイナミクスや構造平衡を解明することを目指す。

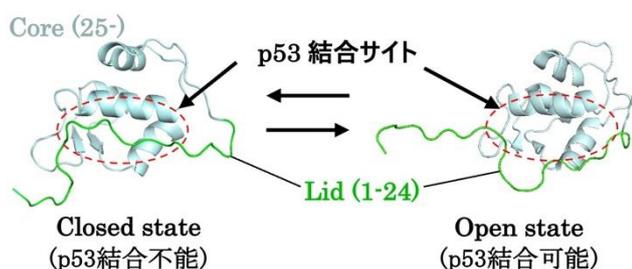


図 5 HDM2 の構造平衡 概念図

2. 具体的な利用内容、計算方法

Lid は非常に flexible な領域であることから、MD 計算の力場の選択は慎重に行う必要がある。そこで、本検討では初期構造として PDB ID: 1Z1M の Model 2 を使用し、力場としてそれぞれ AMBER ff19SB、AMBER ff99SBws-STQ (Tang W. *et al.*, *J. phys. Chem. B*, 2020)、CHARMM36m を使用した MD 計算を 1 μ s ずつ実施し、本系に用いる適切な力場の検討を行った。

3. 結果

計算結果と先行研究 (Uhrinova S. *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 2005) の NMR による測定から得られた原子間の距離情報である、NOE (Nuclear Overhauser effect) の比較を行い、Lid-Core 間の相対的な位置関係を最もよく再現できている力場を最適な力場とすることとした。複数の原子ペアの結果を比較したが、ここでは (I19 CD1 に結合する水素原子)-(H96 HB2 水素原子) の原子ペア (以下、該当原子ペアとする。) を例に説明する。MD 計算から得られた該当原子ペアの確率分布と先行研究の NOE の距離情報を比較したところ、NOE の上限値よりも小さい範囲で該当原子間距離が最も多く観測されたのは AMBER ff19SB であった(図 6)。この傾向は本研究で着目した他の Lid-Core の原子ペアにおいても同様で、AMBER ff19SB が最もよく実験結果を再現できていた。この結果から、今後の検討で用いる力場を AMBER ff19SB とすることとした。

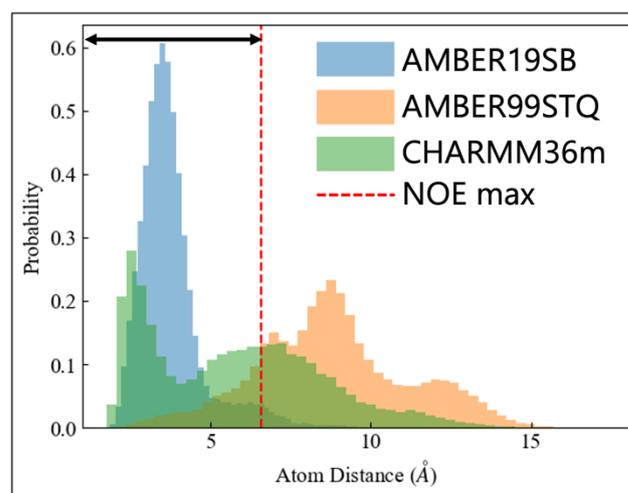


図 6 MD 計算により得られた該当原子ペアの原子間距離の確率分布と NOE の距離情報の比較

4. まとめ

HDM2 N 末端ドメインの Lid のダイナミクスを正確に検討するために、今後の検討で使用する力場の検討を行った。動的に変化する Lid-Core 間の相対的な位置関係を最もよく再現できているかどうかを判断基準に、MD 計算のトラジェクトリから得られた該当原子間距離の確率分布と先行研究の NMR の測定から得られた該当原子ペアの NOE の距離情報を比較した。その結果、AMBER ff19SB が最も実験結果を再現できており、この力場を今後の検討で用いることとした。

5. 今後の計画・展望

今後は Open, Closed の両 State を十分量サンプリングするために、拡張アンサンブル法を適用することを計画している。また、希薄溶液中に加えて Crowder を含む分子混雑環境下での検討を行うことで、HDM2 N 末端ドメインの構造平衡やダイナミクスの解明を目指す。

2022 年度 利用研究成果リスト

【口頭発表】

○新津藍、“膜貫通ペプチド会合体の de novo 設計と機能開拓に向けて” 第 17 回理研「バイオものづくり」シンポジウム, 2023 年 1 月 13 日