

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K00406

研究課題名(和文) 複雑な認識機構を有する生体分子間相互作用の解析手法の確立

研究課題名(英文) Providing a method for analyzing interaction between biomolecules having multiple recognition mechanisms

研究代表者

能登 香 (Ueno-Noto, Kaori)

北里大学・一般教育部・講師

研究者番号：20361818

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：複数箇所でリガンドを認識するような複雑な認識機能を有する生体分子機能を標的に創薬開発ができる手法の開発と応用を目的に、ヒト免疫不全ウイルス(HIV-1)表面の糖タンパク質に糖鎖を介して結合し、標的細胞への侵入を防ぐ一連の中和抗体を対象に計算化学の手法に基づいて研究を行った。中和抗体PGTの結合において重要な役割を担う糖鎖を特定し、糖鎖-糖鎖相互作用も抗体の結合に協同的に関与することや、PGT抗体間の糖鎖親和性の違いの要因を明らかにした。また、本研究で開発した生体内水分子を考慮したモデルによって、糖が関与する生体分子間相互作用を適切に再現できることを示した。

研究成果の概要(英文)：This study aims to provide a method for elucidating ligand binding of a biomolecule having multiple recognition mechanisms. Neutralizing antibodies 2G12 and PGT have shown to bind directly to the Human immunodeficiency virus-1 envelope glycoprotein via glycans on the glycoprotein. A model focused on the water molecules inside biomolecules was applied to glycan-antibody complexes and properly depicted the interaction between glycans and the antibody. Details of the interaction between the PGT128 antibody and the glycoprotein were analyzed based on quantum chemical calculations and molecular dynamics simulations using the crystal structures of the PGT128-glycoprotein complex. Two glycans played significant roles in the antibody-glycoprotein binding. Glycan-glycan interactions were also contributed to the binding. The glycan binding specificities of PGT antibodies were also theoretically compared, and obtained interaction energies agreed well with the experimental results.

研究分野：計算化学

キーワード：生体分子シミュレーション 抗体 糖鎖 分子間相互作用 ヒト免疫不全ウイルス

### 1. 研究開始当初の背景

近年、新規薬剤開発を目的として計算化学に基づいたシミュレーション研究が行われている。その実用化の一例として、インフルエンザ治療薬のオセルタミビル（商品名：タミフル）がある。この化合物は、インフルエンザウィルスが宿主細胞から出芽する際に必要な酵素ノイラミニダーゼの糖結合部位をブロックし、ウィルスが出芽できないようにする効果を持ち、ノイラミニダーゼの結晶構造 [1] をもとに計算化学の手法によって設計された。以来、多くの医薬品開発に同様の手法が使われている。

従来の創薬デザインは、ノイラミニダーゼのように、小さな窪み状の形をしている活性部位が「鍵穴」となり、その「鍵穴」にちょうど当てはまる大きさで、且つ「鍵」であるリガンドよりも強く結合する化合物を設計している。ところが、多くの生体分子では、その活性部位はもっと広くオープンな構造であったり、リガンド認識を一カ所ではなく複数箇所で行う場合がある。さらにリガンドが結合することで生体分子自身が構造変化を起こし、それが生体分子の機能を支配するヘモグロビンのようなタンパク質もある。酸素がヘモグロビンに結合すると、ヘモグロビンの構造が変化し、ヘモグロビンの他の結合部位の反応性が高まる。このような複雑な認識機構をもつ生体分子が創薬標的の場合、従来のシミュレーション方法による創薬設計は困難であり、複雑な認識機能を有する生体分子機能を標的に創薬開発ができる手法のニーズがある。

これまでの研究で、標的細胞へのヒト免疫不全ウィルス (HIV-1) の感染を阻止することができる中和抗体 2G12 や糖鎖に特異的に結合するタンパク質であるレクチンの糖リガンドにおける分子間相互作用を詳細に解析し、タンパク質の糖鎖認識に関する基礎的な知見を得た。この中和抗体 2G12 よりも HIV-1 との親和性が強い一連の中和抗体 (PGT121~128) が報告された [2]。PGT 抗体は HIV-1 の表面糖タンパク質 gp120 の、2G12 抗体の場合とは別の部位に存在する糖鎖を介して結合する。また、これら PGT 抗体間のアミノ酸配列の相同性は高いものの、糖鎖への親和性は抗体によって異なり特異性が存在することが実験的に示されている。それぞれの抗体や、抗体が糖タンパク質に結合する複合体の結晶構造は多く報告されており、PGT 抗体は複数の糖鎖と抗体の主鎖部分を介して糖タンパク質に結合することが明らかになっている。さらに抗体結合によって糖タンパク質自身の構造変化が起きることが示唆されている。この系を対象に、これまで行ってきた糖鎖が関与する生体分子の理論糖鎖化学研究を進展させ、複雑な認識機構をもつ抗体糖鎖認識機構の解明研究と生体内水分子に注目した解析方法の開発を行った。

### 2. 研究の目的

本研究では複数部位でのリガンド認識やリガンド結合による構造変化を伴うような複雑な分子認識機構をもつ系として、HIV-1 における中和抗体の糖タンパク質への結合を対象に、抗体の抗原認識機構を解明すると同時に、これまで開発してきた生体内水分子を考慮した解析手法の応用および拡張を行い、この手法を確立することを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 生体分子内の水分子の機能を考慮した解析手法の開発

親水性のヒドロキシ(-OH)基を多くもつ糖に結合する中和抗体 2G12 の複合体結晶構造 (PDB ID: 10P3, 30AY) の内部空間に、水分子の位置を予測・配置したモデルを提案し、分子内水分子の存在の有無が、リガンドの結合能やタンパク質全体にどのように影響するかを古典分子動力学 (MD) シミュレーション及び MP2 レベルで電子相関を考慮した大規模量子化学計算であるフラグメント分子軌道法 (FMO) 法を用いて解析した。

#### (2) 複数部位でリガンド認識する機構の解明研究

HIV-1 の表面には、gp120 と gp41 で構成される外被糖タンパク質から成るサブユニットが三量体となって突出部を形成している。中和抗体 PGT128 は、外被糖タンパク質の gp120 部分の高マンノース型糖鎖を介して HIV-1 に結合する。この糖タンパク質と PGT128 抗体の複合体構造が本研究期間中に次々と発表された (図 1)。研究開始時は、PGT128 抗体が、糖タンパク質の一部である gp120 上の二つの糖鎖を介して結合する複合体構造 (PDB ID: 3TYG) が報告されていた。その後、16 個の糖鎖が結合する糖タンパク質全体 (gp120 と gp41) と PGT128 抗体の複合体構造 (PDB ID: 5C7K)、さらに糖タンパク質全体の三量体構造に結合する PGT128 抗体の複合体構造 (PDB ID: 5JSA) が報告された。

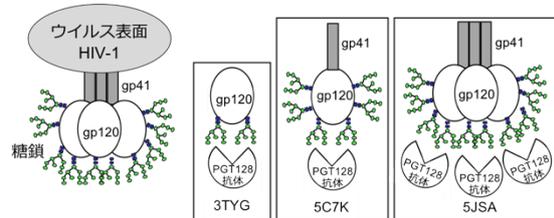


図 1. HIV-1 表面糖タンパク質に結合する中和抗体の複合体構造

本研究予算で購入した並列計算機を使用し、これらの構造を出発構造として、MD シミュレーションを PARM99, GLYCAM06 力場を用いてプログラム AMBER16 で行った。さらに時間変化におけるスナップショット構造における大規模量子化学計算 (FMO-MP2 法) を行い、抗体の抗原認識におけるタンパク質間、及び糖鎖部分での相互作用を詳細且つ定量的に解析した。また、この系に対して生体内水

分子を考慮したモデルを用いて、水分子の寄与を含めた糖鎖-抗体間の相互作用解析を行った。

### (3) PGT 抗体の糖鎖親和性比較研究

アミノ酸配列の相同性が高い一連の PGT 抗体は、各種糖鎖との親和性に違いが存在することが実験的に報告されており、抗体の抗原認識における特異性の要因を明らかにするために研究を行った。高マンノース型糖鎖と PGT122, 124, 127 及び PGT128 の四つの抗体の親和性実験から、PGT128 抗体との親和性が最も強く、次いで PGT127 抗体、PGT122 及び PGT124 抗体の順に糖鎖の親和性が弱くなることが示されている [3, 4]。これらの抗体と高マンノース型糖鎖との複合体結晶構造

(PDB ID: 4TVP, 5T3S, 3TWC, 3TV3) では、いずれの複合体でも糖鎖の二つの末端部が抗体のループ構造部分にはまっている構造であった。これらの結晶構造に対して MD シミュレーション及び大規模量子化学計算を行い、得られた相互作用エネルギーを親和性実験結果と比較した。

さらに、ガラクトースが末端に結合する三本鎖複合型糖鎖に対する親和性が PGT151 > PGT128 > PGT121 の順であることが実験的に明らかになっているので [5]、三本鎖複合型糖鎖と PGT151 抗体の結晶構造 (PDB ID: 4NUG) をもとに、この糖鎖と PGT121, PGT128 抗体の各複合体構造をドッキングシミュレーションにより作成し、上記と同様の手法で糖鎖-抗体間の相互作用解析を行い、実験結果と比較した。

## 4. 研究成果

### (1) シミュレーション手法の確立と応用

生体分子結晶内の水分子を含めたモデルを使ったシミュレーション方法を開発した (図 2)。この手法によって、HIV-1 中和抗体 2G12 の単糖 (D-マンノースと D-フルクトース) に対する結合能の違いの要因を明らかにすることができた。抗体複合体の内部空間内に水分子を発生させたモデルを適用した場合にのみ、抗体の単糖への結合能に関する実験結果を再現でき、その要因が生体内水分子の寄与の違いによって、リガンドの立体配座や結合する位置が変わり、それが両者の結合能の違いを引き起こすことを示した。結果を、二つの国際学会で発表すると共に、学術論文として発表し、掲載号の表紙に選ばれた (雑誌論文 1, 学会発表 1, 2)。

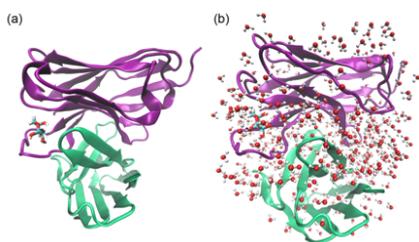


図 2. D-フルクトースに結合する中和抗体 2G12 複合体結晶構造 (a) 及び提案した生体内水分子を考慮したモデル (b)

### (2) 複数部位でリガンド認識する機構の解明研究

PGT 抗体の糖タンパク質認識に関する基礎的な知見を得るため、HIV-1 表面に存在する gp120 及び gp41 から成る糖タンパク質に、その中和抗体 (PGT128) が複数の糖鎖を介して結合する複合体の結晶構造 (PDB ID: 3TYG, 5C7K, 5JSA, 図 3) を出発構造として 50 ns の MD シミュレーションを行い、複合体の立体構造の変化を解析した。さらに MD シミュレーションの単位時間刻みのスナップショット構造に対し、大規模量子化学計算を行い、糖タンパク質-抗体間の相互作用を詳細に解析した。その結果、二つの糖鎖 (Asn301, Asn332 糖鎖) が抗体と糖タンパク質間を橋渡しするように結合し、大きな相互作用エネルギーで抗体との結合の安定化をもたらすことが明らかになった。特に Asn332 糖鎖は糖タンパク質-抗体複合体全体の構造安定性にも寄与していた。また、Asn262 糖鎖は、上記の Asn301 糖鎖と糖鎖同士で相互作用をしており、この糖鎖-糖鎖相互作用が協同的に抗体への結合に関与することが示された。出発構造の違いが相互作用どのように影響を与えるかを比較考察したところ、その影響はあまり無く、いずれの出発構造からも相互作用に関して同様の描像が得られた。さらに、生体内の水分子の影響を確認するため、水分子を露わに考慮したスナップショット構造を用いて大規模量子化学計算を行い、解析したところ、特に糖鎖-糖鎖間相互作用がより顕著になることが明らかになった。これらの結果について、国内外の学会で発表した。(学会発表 1, 4, 6~ 11)

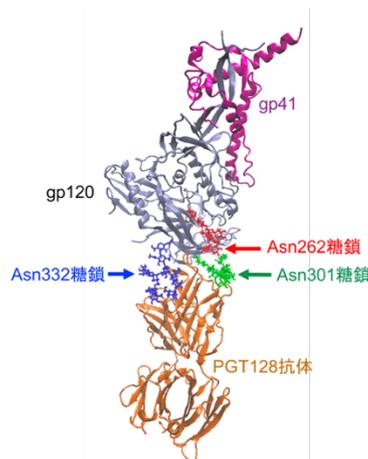


図 3. HIV-1 表面糖タンパク質に結合する中和抗体 PGT128 の複合体構造 (PDB ID: 5JSA)

### (3) PGT 抗体の糖鎖親和性比較研究

4 つの PGT 抗体 (PGT122, PGT124, PGT127, PGT128) と高 Man 型糖鎖の複合体結晶構造における抗体-糖鎖間の相互作用エネルギーを、大規模量子化学計算 (FMO-MP2 法) によって求めたところ、糖鎖親和性実験結果と良好一致が見られ、糖鎖末端部分が抗体との結合において重要であることが明らかになった。これらの複合体構造を出発として、それ

ぞれ 30ns の MD シミュレーションを行い、水分子や熱揺らぎを考慮した相互作用の時間変化を追跡した。その結果、どの抗体においても糖鎖は結合部位から離れることはなかったが、活性部位内での糖鎖構造の安定性に顕著な違いがあり、これは実験結果を支持するものであった。安定な糖鎖構造を保持するために重要な役割をするアミノ酸残基を特定するとともに、抗体の認識特異性を担うのは、末端ではない糖鎖部分の構造安定性であることを明らかにした。現在、これらの結果をまとめた学術論文を投稿中である。

ガラクトースで修飾された三本鎖複合型糖鎖に結合する PGT121, PGT128, PGT151 抗体の各複合体構造に対して大規模量子化学計算により糖鎖-抗体間の相互作用を求め、糖鎖結合実験結果と比較した。PGT151 の相互作用エネルギーが最も強く、糖鎖認識において重要な役割をしている抗体のアミノ酸残基を特定することができたものの、PGT121 と 128 抗体の糖鎖との相互作用エネルギーに関しては、実験結果を支持しなかった。ドッキングシミュレーションによって得た出発構造に改善の余地があるため、いくつかの候補構造について MD シミュレーションにより検討中である。(学会発表 5, 8)

#### <引用文献>

- ① Varghese, J. M. *et al.* *Nature* 303, 35, 1983.
- ② Walker, L. M. *et al.* *Nature* 477, 466, 2011.
- ③ Pancera, M. *et al.* *Nature*, 514, 7523, 455, 2014.
- ④ Steichen, J. M. *et al.* *Immunity*, 45 (3), 483, 2016.
- ⑤ Falkowska, E. *et al.*, *Immunity*, 40, 657, 2014.

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① K. Ueno-Noto, K. Takano “Water Molecules Inside Protein Structure Affect Binding of Monosaccharides with HIV-1 Antibody 2G12” 査読有, *J. Comp. Chem.* 2016, 37(26) 2431-2438. Cover Art, DOI:10.1002/jcc.24447.

[学会発表] (計 11 件)

##### (1) 国際学術会議

- ① K. Ueno-Noto “A theoretical study of the recognition of a neutralizing antibody to the HIV-1 envelope glycoprotein” World Association of Theoretical and Computational Chemists (WATOC 2017), ミュンヘン, ドイツ (Aug. 2017)
- ② K. Ueno-Noto, K. Takano “The effect of water molecules on the binding affinity of the ligands to the HIV-1

antibody 2G12” Theory and Applications of Computational Chemistry (TACC-2016), シアトル, アメリカ, (Aug. 2016)

- ③ K. Ueno-Noto, K. Takano “Affinity of HIV-1 antibody 2G12 with monosaccharides: a theoretical study based on explicit and implicit water models” The 2015 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (PACIFICHEM 2015), ホノルル, アメリカ, (Dec. 2015)

##### (2) 国内学術会議

- ④ K. Ueno-Noto “An application of an explicit water model to a glycoprotein-antibody complex” 日本化学会第 98 春季年会, 日本大学 (千葉県船橋市) 2018 年 3 月
- ⑤ 楠本美侑, 能登香, 鷹野景子 “フラグメント分子軌道法による HIV-1 認識 PGT 抗体と抗原糖鎖との間の相互作用解析” 第 11 回分子科学討論会, 東北大学 (宮城県仙台市) 2017 年 9 月
- ⑥ 能登香 “HIV-1 外被糖タンパク質における糖鎖-中和抗体間相互作用に関する理論的研究” 第 36 回日本糖質学会年会, 旭川市民文化会館 (北海道旭川市) 2017 年 7 月
- ⑦ K. Ueno-Noto “Theoretical study of the interaction between a neutralizing antibody and glycan ligands on the HIV-1 Envelope glycoprotein” 日本化学会第 97 春季年会, 慶應義塾大学 (神奈川県横浜市) 2017 年 3 月
- ⑧ M. Kusumoto, K. Noto, K. Takano “Interaction Analysis between HIV-1 and PGT antibodies by FMO calculation” 日本化学会第 97 春季年会, 慶應義塾大学 (神奈川県横浜市) 2017 年 3 月
- ⑨ 能登香 “大規模量子化学計算による HIV-1 表面糖タンパク質と中和抗体間の相互作用解析” 日本化学会第 96 春季年会, 同志社大学 (京都府京田辺市) 2016 年 3 月
- ⑩ 能登香 “複数箇所を抗原を認識する抗体における分子間相互作用に関する理論研究” 第 9 回分子科学討論会, 東京工業大学 (東京都目黒区) 2015 年 9 月
- ⑪ 能登香 “HIV-1 中和抗体 PGT と糖タンパク質 gp120 複合体における分子間相互作用の電子論的考察” 第 34 回日本糖質学会年会, 東京大学 (東京都文京区) 2015 年 8 月

[その他]

ホームページ: <https://www.kitasato-u.ac.jp/ippan/kagaku/noto.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

能登 香 (Ueno-Noto, Kaori)  
北里大学・一般教育部・講師  
研究者番号：20361818