

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 24 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2011～2014

課題番号：23247027

研究課題名(和文) タンパク質複合体形成過程の分子シミュレーションによる遭遇複合体の役割の解明

研究課題名(英文) The role of the encounter complexes studied by molecular simulations of the protein complex formation processes.

研究代表者

木寺 詔紀 (Akinori, Kidera)

横浜市立大学・生命医科学研究科・教授

研究者番号：00186280

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 36,100,000円

研究成果の概要(和文)：タンパク質-タンパク質間相互作用は、多くの場合幅広い準安定状態を含む相互作用界面を持っているとされている。そのような相互作用の自由エネルギーランドスケープをBarnase/Barstar複合体とEIN/HPr複合体について水中の全原子網羅的サンプリングシミュレーションを用いて決定した。その結果、高々 μ モル程度の解離定数を持つタンパク質-タンパク質間相互作用における過渡的複合体は、相互作用形成経路上の準安定状態ではなく、平衡状態における極めて広い構造分布の準安定構造であり、それらは生状態の機能的構造の出現を一過性の過渡的なものとしていることが分かった。

研究成果の概要(英文)：Protein-protein interactions are characterized by the extensive interaction surfaces with a number of the metastable states. The free energy landscapes of such complex interactions were investigated for the complex systems of Barnase/Barstar and EIN/HPr by the exhaustive sampling simulations of their all-atom model in explicit solvents. The simulation results revealed that the encounter complexes of the protein complex with micro molar Kd should be understood as the metastable states in broad equilibrium distributions, but not as those appeared in the kinetic process of the complex formation. Those metastable states make the functional native structure more transient, or entropically unstable.

研究分野：計算生命科学

キーワード：タンパク質複合体 分子シミュレーション 遭遇複合体 マルチスケールモデル

1. 研究開始当初の背景

タンパク質が特異的認識によって複合体を形成する過程を理解することは、タンパク質の機能研究の最も重要な課題の一つであり、分光学的手法などを用いた多くの研究がなされてきた。これまでに、遭遇複合体 (encounter complex) の存在、速度定数への環境変数の影響など多くの知見が蓄積されてきている。その中で、分子シミュレーションは、間接的実験情報を統合し、拡散過程から結合までの過程を目に見える実像 (モデル) として表現することで、複合体形成過程の理解に大きな役割を果たしてきた。しかしながら、その複合体系は計算するには巨大であり、その過程は長時間にわたることから、全過程を通したシミュレーションを行うには、モデルの大幅な粗視化 (剛体の Brown 動力学、粗視化モデル) が不可避であったため、得られたシミュレーション結果の精度は著しく限定されていた。

計算精度が十分に高い水中の全原子モデルを用いながら、タンパク質複合体という巨大な系についてその時間スケールのギャップを埋めることを可能にするために我々は、研究開始以前に、Multiscale Enhanced Sampling (MSES) 法 (図 1) を提案してきた。この方法を用いた網羅的サンプリングをすることで、遭遇複合体の原子レベルでのあり方を示すことが可能であると考えた。

2. 研究の目的

タンパク質 - タンパク質複合体の形成過程を水中での全原子モデルに基づいた精密なシミュレーションを行う。これまで困難であったこの計算は、これまでに開発してきたマルチスケールシミュレーション法 (MSES 法) によって実現できる。計算対象は、まったく異なった結合状態の以下のふたつの複合体を選択する。

実験データが豊富にあり強固な結合をし

ている Barnase-Barstar 複合体

遭遇複合体が顕著に見られる弱い過渡的な結合を行う Enzyme I N-terminal domain (EIN) - Phosphocarrier protein (HPr) 複合体

これらのシミュレーションによってはじめて、遭遇複合体について、その分布、特異的複合体との自由エネルギー差とその成分 (静電相互作用、水和など) が評価可能となり、拡散過程から特異的複合体形成までの実像を明らかにすることができる。

3. 研究の方法

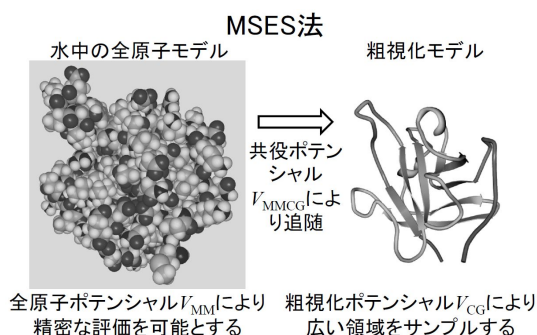
(1) Multiscale Enhanced Sampling (MSES) 法 (全原子モデル-粗視化モデル連成法; 図 1)

この方法では、計算機上に構築した水分子を含んだ全原子モデル (ポテンシャル V_{MM} ; 図 1) と自由度がはるかに低く十分に自由に動き回ることのできる粗視化モデル (ポテンシャル V_{CG}) のふたつを連成させる。共役は、ポテンシャル V_{MMCG} によって、全原子モデルの座標値と対応する粗視化モデルの座標値を調和バネで結ぶことによって実現する。これによって、粗視化モデルが広い空間のサンプリングを行い、粗視化モデルの自由度と共役した全原子モデルがその後を精密な力場で跡付けることになる。しかしこのままでは、 V_{MMCG} によるバイアスを含んだ結果になってしまう。そこで、ハミルトニアン交換法 (Hamiltonian Exchange: 少しずつ異なるポテンシャルを持つレプリカを多数計算機中に作り、その間をシミュレーションシステムが確率的に遷移することで、そのままでは計算しにくいでこぼこしたポテンシャル上での自由エネルギー地形を求めようとする方法; レプリカ交換法の一つ) を用いて、共役の強さを決める係数である k_{MMCG} が有限の値を持つレプリカから $k_{MMCG} = 0$ とするレプリカに接続することで、 V_{MMCG} によるバイアスを取り除く。

この方法がスケーラブル (巨大系に適用可能) であるのは、ハミルトニアン交換法における遷移を決定する Metropolis の判断基準に、全原子モデルのポテンシャル V_{MM} が現れず、共役ポテンシャル V_{MMCG} 、即ち共役する変数のみが現れることによる。全原子モデルの自由度の大きさによらず、粗視化自由度との共役変数の数を限定することができれば、 V_{MMCG} の変動空間の大きさを限定することができ、ハミルトニアン交換法による効率的な計算が可能となる。

ここで用いた粗視化モデルは、 $C\alpha$ 原子のみからなる弾性ネットワークモデル (Elastic Network Model) を用い、分子内と分子間でそれぞれ異なった、全原子モデルによる結果を再現するよう最適に決められた弾性パラメータを用いて構築した。

MSES 法について、十分なサンプリングを短時間に得るために、本研究では以下のふたつの方法を用いた。



$$V(\mathbf{r}_{MM}, \mathbf{r}_{CG}) = V_{MM}(\mathbf{r}_{MM}) + k_{CG} V_{CG}(\mathbf{r}_{CG}) + k_{MMCG} V_{MMCG}(\theta[\mathbf{r}_{MM}], \mathbf{r}_{CG})$$

図 1 MSES 法。粗視化モデルの影響は Hamiltonian Exchange 法で除去することで正しい全原子モデルの自由エネルギーを求めることができる。

それぞれの間に反発力を有する二つの粗視化モデルを全原子モデルにつなぐことで、サンプリング効率を上げる。これは Barnase-Barstar 複合体のような、有力な安定構造が大きな存在確率を与える場合に最も有効である。また、この方法でも計算を行い、ふたつで同じ結果を与えることを示し、正しいサンプリングができていないことを確認している。

粗視化モデルを高温で動かすことで、サンプリング効率を上げる。これは、粗視化モデルに大きな質量を与えることで、大きな慣性と著しく遅い運動にすることで、全原子モデルとの断熱分離 (Adiabatic Separation: ふたつの運動モードがふたつの周波数領域に分離して、両者の間に運動エネルギー移動が起こらない) が実現し、正しい全原子モデルのサンプリングが可能となる。これは、EIN-HPPr のような浅く広いエネルギー地形を持つような複合体において最も有効な方法となる。

(2) Barnase-Barstar 複合体

初期構造は、複合体結晶構造 (PDB entry 1BRS) を用いた。約 11,000 個の水分子中に AMBER ff99SBildn 力場による全原子モデルを構築し、全系の大きさが 35,656 原子となる系を用意した。その系を用いて、周期境界条件の下、300K、1atm で 100ns のシミュレーションを行った。ふたつ用いる粗視化モデルは、同様に 300K で $C\alpha$ の質量を 10×10^3 として Langevin シミュレーションでサンプリングを行った。Hamiltonian Exchange では、12 個のレプリカを用意し、それぞれに異なった coupling 強度 k_{MMCG} を設定した (レプリカにあるふたつの k_{MMCG} は同じとした)。結果として、40 万原子を越える系のシミュレーションを行うこととなった。そして、その 12 レプリカからなる全系を、Metropolis 条件下で k_{MMCG} の値を 100ns の間交換することで、最

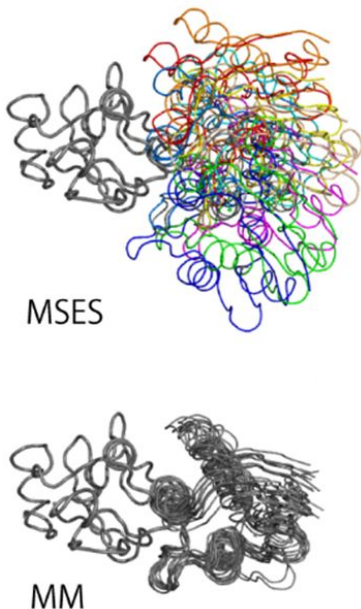


図2 シミュレーションの結果を barnase を重ねて barstar の構造アンサンブルとして表示した。MM は通常の 300K での水中での分子動力学計算の結果。

最終的に $k_{MMCG} = 0$ のレプリカの結果を得た。

(3) EIN-HPPr 複合体

初期構造は、複合体 NMR 構造 (PDB entry 3EZB(model28)) を用いた。14,291 個の水分子を入れた周期境界 box の中に AMBER ff99SBildn+NMR 力場による全原子モデルを構築し、全系の大きさが 62,358 原子になる系を用意した。その系を用いて、300K、1atm で 100ns のシミュレーションを行った。ここでは、粗視化モデルは $192 \times 10^3 K$ と高温にし、 $C\alpha$ の質量を 64×10^6 として Langevin シミュレーションによるサンプリングを行った。この質量によって、Adiabatic Separation が実現されている。Hamiltonian Exchange では、20 個のレプリカを用意し、それぞれに異なった coupling 強度 k_{MMCG} を設定した。結果として、120 万原子を越えるシミュレーション系となった。そして、その 20 レプリカからなる全系を、Metropolis 条件下で k_{MMCG} の値を 100ns の間交換することで、最終的に $k_{MMCG} = 0$ のレプリカの結果を得た。

4. 研究成果

(1) Barnase-Barstar 複合体

Barnase-Barstar 複合体は、核酸分解酵素-阻害タンパク質の複合体であり、タンパク質複合体での最大の結合強度 ($K_d = 10^{-14} M$)、最大の結合速度 ($k_{on} = 10^8 s^{-1} M^{-1}$) を持つもの

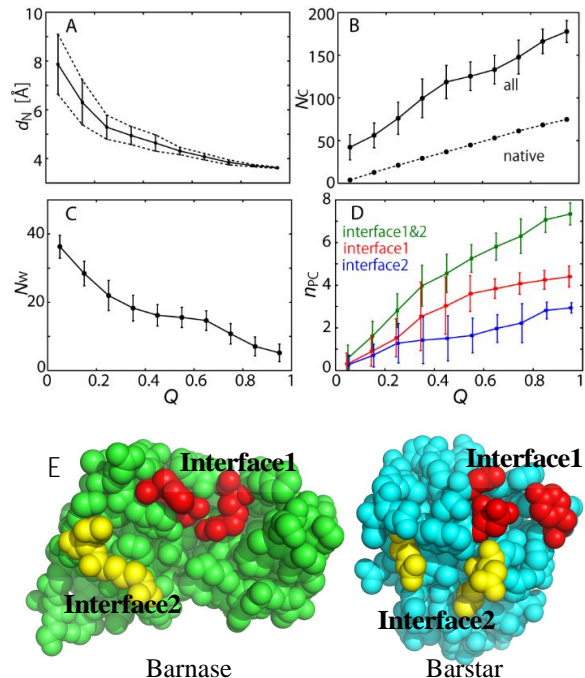


図3 Q 値 (生状態の原子間相互作用ができていない割合) で見たエネルギー地形。

A. 生状態からの平均分子間距離 d_N

B. 分子間コンタクトの数 N_C

C. 分子界面にある水和水の数 N_W

D. 界面をふたつに分けたときのそれぞれの極性コンタクトの数

E. ふたつの界面にある極性残基の位置: interface1(赤)、interface2(黄)

として知られている。そのような系におけるタンパク質 - タンパク質相互作用エネルギー地形を書くことに成功した。

図2に従来法とのサンプリング効率の違いを示した。このように、サンプリングはBarnaseの活性部位にBarstarが結合した生状態に止まらず、解離状態近傍にまで拡張されていることがわかる。

このエネルギー地形を解析した結果を図3に示す。様々な指標から見てくる結合過程は、中間安定状態を経ずに最安定結合構造に至るフォールディングで見られるファネル(Funnel)型を示している。また、極性コンタクトは主にふたつの界面、interface 1 と interface 2 からなり、それぞれについてもファネル型であることが分かる。このエネルギー地形の平坦さがこそが、著しく高速な結合速度の原因となっている。しかし、次に見るようにより過渡的な複合体は一般的により広くでこぼこしたエネルギー地形を示す。

(2) EIN-HPr 複合体

細菌における糖の取込に必要なリン酸化酵素である Enzyme I の N-terminal domain (EIN) と Phosphocarrier Protein (HPr) との複合体であり、解離定数は、 $K_d \sim 10 \mu\text{M}$ という過渡的複合体に典型的な大きな値を示す。またこの系では、NMR による Paramagnetic Relaxation Enhancement [PRE; 常磁性緩和促進: Mn^{2+} などの常磁性金属イオンを含んだ錯体をプローブとして、イオンとタンパク質原子の距離を測定する方法。常磁性イオンの不

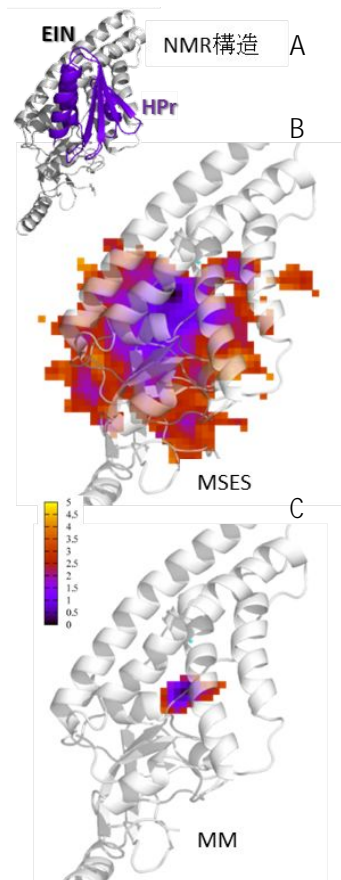


図4 A. NMR 構造 (3EZB)。EIN をグレイ、HPr を紫の cartoon で書いた。
B. MSES 法による HPr の重心位値の分布。
C. 通常分子動力学計算法による HPr の重心分布。

対電子が観測核種の核スピンに対して双極子間相互作用 (r^{-6}) により、スピン緩和時間に影響を与えることで、スペクトルが広幅化することを用いている] 実験が行われており、それと対比することで、計算の妥当性を議論することができる。

MSES 法によるシミュレーションの結果を図4に示す。HPrの重心分布が著しく広くEINの表面の多くの部分を覆っていることがわかり、通常シミュレーション法に比べたときの有意性が明瞭にわかる。

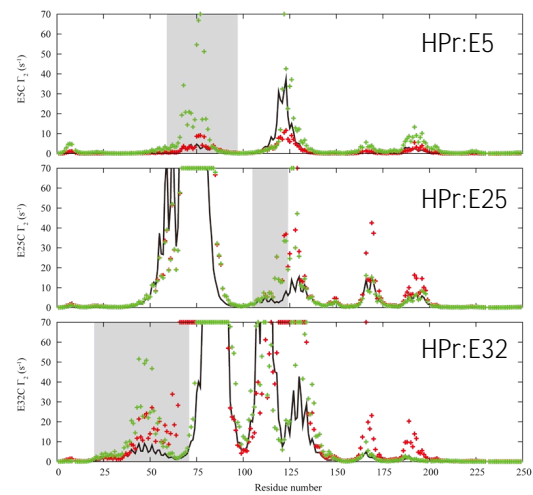


図5 Paramagnetic Relaxation Enhancement の大きさをシミュレートしたものを縦軸に、横軸はEINの残基番号をプロットしている。HPrの3つのGluをCysに変換して常磁性プローブを付けている。その影響をシミュレートしたものを点で記した。実線はNMR平均構造のもので、灰色の領域が実験で、平均構造では説明できない近接距離の情報が出ている構造部分。

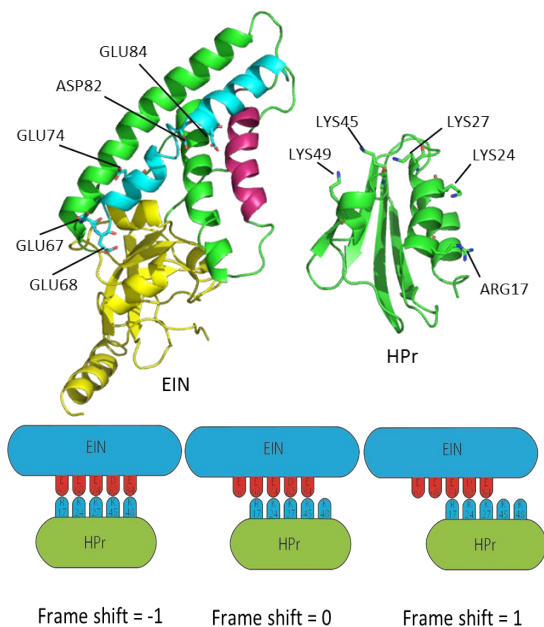


図6 塩橋の1次元掛替えによる構造分布の説明。

これらの分布は実験による PRE を定性的にはあるが再現する (図 5)。

この結果は、EIN の側鎖負電荷 (Glu と Asp) と HPr の正電荷 (Lys と Arg) の塩橋の掛け替えによる分布として説明できる (図 6)。

存在確率、塩橋の数、相互作用面の広さは、NMR 構造に対応する shift = 0 が最も大きく、HPr の NMR 構造からの回転角は最も小さく、NMR 構造の優位性を示している。しかしながら、その周辺の塩橋が掛け替えられた多くの準安定状態 = 遭遇複合体が、周辺に大きな確率で存在していることが明らかとなった。

以上のふたつの計算例から分かることは、遭遇複合体と呼ばれている生状態周辺の準安定構造は、過渡的に現れる複合体形成過程の動力学的なものというよりは、熱力学的なマイナーコンポーネントとしての準安定状態として幅広く存在しており、特にそれは EIN-HPr 複合体系で顕著に表れてきている。このような広い分布状態こそが、 μM 程度の K_d 値を与える相互作用の実像であろう。その

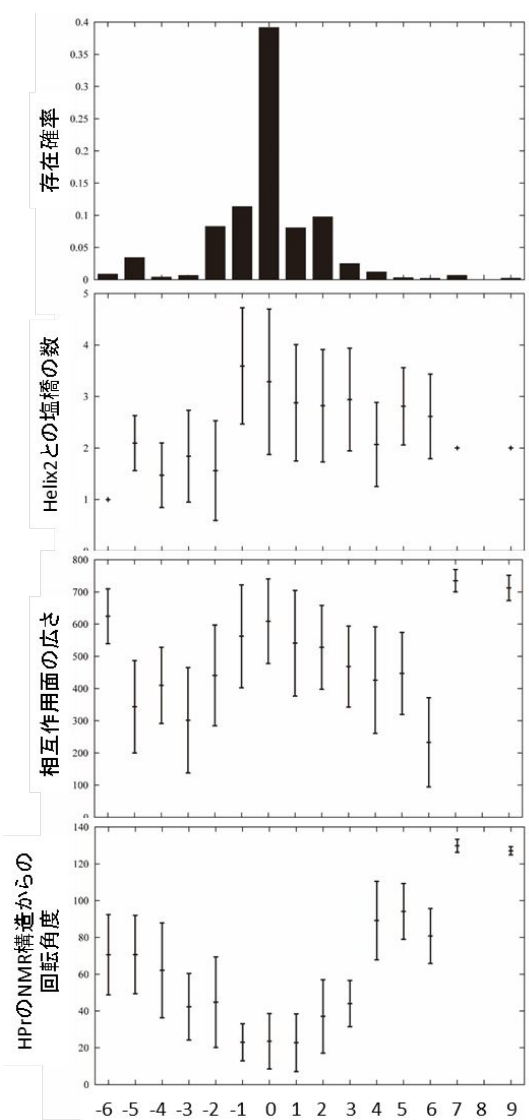


図 7 1次元塩橋結合座標上のランドスケープ。

中の機能的状態は最も高い確率で存在するものの、過渡的なものにすぎず、短時間で起こる酵素反応 (EIN-HPr の場合はリン酸転移反応) 後には、速やかに解離し得る相互作用構造を持っているものと考えられる。

5. 主な発表論文等 〔雑誌論文〕(計 11 件)

K. Moritsugu, T. Terada, and A. Kidera, Multiscale enhanced sampling driven by multiple coarse-grained models. *Chem. Phys. Lett.* 616–617, 20–24 (2014). DOI: 10.1016/j.cplett.2014.10.009

K. Moritsugu, T. Terada, and A. Kidera, Energy landscape of all-atom protein-protein interactions revealed by multiscale enhanced sampling. *PLOS Comput. Biol.* 10(10): e1003901 (2014). DOI: 10.1371/journal.pcbi.1003901

K. Moritsugu, A. Kidera, and J. Smith, Solvent friction effects propagate over the entire protein molecule through low-frequency collective modes. *J. Phys. Chem. B*, **118** (29), 8559–8565 (2014). DOI: 10.1021/jp503956m

R. Koike, M. Ota, and A. Kidera, Hierarchical description and extensive classification of protein structural changes by Motion Tree. *J. Mol. Biol.* 426 (3), 752–762 (2014). DOI: 10.1016/j.jmb.2013.10.034.

Y. Ida and A. Kidera, The conserved Arg241-Glu439 salt bridge determines flexibility of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor binding core in the ligand-free state. *Proteins* 81(10), 1699–1708 (2013). DOI: 10.1002/prot.24304

H. Fujisaki, M. Shiga, K. Moritsugu, and A. Kidera, Multiscale enhanced path sampling based on the Onsager-Machlup action: Application to a model polymer. *J. Chem. Phys.* 139 (5), 054117 1–9 (2013). DOI: 10.1063/1.4817209

Y. Matsunaga, R. Koike, M. Ota, J. R. H. Tame and A. Kidera, Influence of structural symmetry on protein dynamics. *PLOS ONE* 7 (11), e50011 1–11 (2012). DOI: 10.1371/journal.pone.0050011

K. Nishikata, M. Ikeguchi, and A. Kidera, Comparative simulations of the ground state and the M-intermediate state of sensory rhodopsin II-transducer complex with a HAMP domain model. *Biochemistry* 51 (30), 5958–5966 (2012).

DOI: 10.1021/bi300696b

Y. Matsunaga, H. Fujisaki, T. Terada, T. Furuta, K. Moritsugu, and A. Kidera, Minimum free energy path of ligand-induced transition in adenylate kinase. PLOS Computational Biology 8 (6), e1002555 1-12 (2012).

DOI: 10.1371/journal.pcbi.1002555

K. Moritsugu, T. Terada, and A. Kidera, Disorder-to-order transition of an intrinsically disordered protein sortase revealed by multiscale enhanced sampling. J. Am. Chem. Soc. 134 (16), 7094-7101 (2012).

DOI: 10.1021/ja3008402

T. Terada and A. Kidera, Comparative molecular dynamics simulations study of crystal environment effect on protein structure. J. Phys. Chem. B 116 (23), 6810-6818 (2012).

DOI: 10.1021/jp2125558

[学会発表] (計 14 件)

K. Moritsugu, T. Terada, A. Kidera, Ligand binding process at atomistic resolution revealed by multiscale enhanced sampling. 52 回日本生物物理学会年会, 2014/9/25-27, 札幌コンベンションセンター (札幌市).

大森聡、森次圭、木寺詔紀, 全原子モデル-粗視化モデルの連成シミュレーションによる蛋白質複合体形成過程の解析. 14 回日本蛋白質科学会年会, 2014/6/25-27, ワークピア横浜 (横浜市).

R. Koike, M. Ota, A. Kidera, Hierarchical description and extensive classification of protein structural changes by Motion Tree. 51 回日本生物物理学会年会, 2013/10/28-30, 京都国際会議場 (京都市).

K. Yamada, H. Kato, A. Kidera, The effects of substrate binding in ABC transporter: A simulation study. 51 回日本生物物理学会年会, 2013/10/28-30, 京都国際会議場 (京都市).

T. Yamane, R. Koike, M. Oota, S. Murakami, A. Kidera, M. Ikeguchi, Motion Tree analysis of the multidrug transporter AcrB. 51 回日本生物物理学会年会, 2013/10/28-30 日, 京都国際会議場 (京都市).

S. Omori, K. Moritsugu, A. Kidera, Structural ensemble of protein encounter complex revealed by Multiscale Essential Sampling. 51 回日本生物物理学会年会, 2013/10/28-10/30, 京都国際会議場 (京都市).

大森 聡、森次 圭、木寺詔紀, 全原子モデル-粗視化モデル連成法を用いた蛋白質

複合体形成過程の分子シミュレーション. 13 回日本蛋白質科学会年会, 2013/6/12-14, とりぎん文化会館 (鳥取市).

S. Fuchigami, M. Ikeguchi, A. Kidera, Molecular dynamics simulation study of Lys48-linked diubiquitin in compact conformation. 50 回日本生物物理学会年会, 2012/9/22-24, 名古屋大学 (名古屋市).

K. Moritsugu, T. Terada, A. Kidera, Multiscale enhanced sampling simulation of protein interaction. 50 回日本生物物理学会年会, 2012/9/22-24, 名古屋大学 (名古屋市).

H. Fujisaki, Y. Matsunaga, A. Kidera, Path sampling for small peptide systems using the Onsager-Machlup action method. 50 回日本生物物理学会年会, 2012/9/22-24, 名古屋大学 (名古屋市).

K. Nishikata, M. Ikeguchi, A. Kidera, Differences between the ground state and the Intermediate of Sensory Rhodopsin II-Transducer complex revealed by comparative simulations. 50 回日本生物物理学会年会, 2012/9/22-24, 名古屋大学 (名古屋市).

淵上壮太郎、池口満徳、木寺詔紀, K48 結合型ジユビキチンのマイクロ秒スケールの分子動力学シミュレーション. 12 回日本蛋白質科学会年会, 2012/6/12-14, 名古屋国際会議場 (名古屋市).

西方公郎、池口満徳、木寺詔紀, HAMP ドメインの分子モデルを結合した SRII-HtrII 複合体の比較シミュレーションにより示唆された基底状態と M 中間体の差異. 12 回日本蛋白質科学会年会, 2012/6/12-14, 名古屋国際会議場 (名古屋市).

K. Moritsugu, A. Kidera, Multiscale enhanced sampling simulation for protein-protein interactions. 49 回日本生物物理学会年会, 2011/9/16-19, 兵庫県立大学 (姫路市).

[図書] (計 1 件)

木寺詔紀 他、岩波書店、計算科学 4 計算と生命, 2012 53-111.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木寺 詔紀 (KIDERA, Akinori)

横浜市立大学・大学院生命医科学研究科・教授

研究者番号: 00186280