

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25330358

研究課題名(和文)糖鎖立体構造の網羅的モデリングとデータベース開発

研究課題名(英文) Modeling and database development for complex glycans

研究代表者

李 秀栄 (Re, Suyong)

国立研究開発法人理化学研究所・杉田理論分子科学研究室・研究員

研究者番号：50390670

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：細胞表面には様々な糖鎖があり、とりわけ機能や疾患に特徴的な糖鎖を突き止めることは創薬の重要課題である。しかし、核酸やアミノ酸に比べて遥かに複雑な糖鎖構造を正確に決めるのは難しい。本研究では、これまで見分けることが出来なかった構造異性体を分離するイオン移動度質量分析法に着目し、分子動力学計算から実験データを予測する方法を開発した。10種類のピリジルアミノ化糖鎖に対して実験と良く一致する結果が得られ、フォールディング構造の違いで糖鎖異性体が分離されることを示した。今後、糖鎖構造の高速スクリーニングに向けて、データベース化を進める予定である。

研究成果の概要(英文)：Ion mobility mass spectrometry (IM-MS) is a technique capable of identifying the biomolecules based on their collision cross section (CCS). This technique allows us to separate carbohydrate isomers with subtle conformational differences, although the determinants of CCS remain elusive. In this project, we characterize the conformational ensembles of gas-phase N-glycans under the electrospray ionization condition using molecular dynamics simulations with enhanced sampling. We show that the separation of CCS between isomers reflects the folding features of N-glycans, which are determined both by the chemical compositions and protonation states. The presented physicochemical basis of CCS for N-glycans helps not only to interpret IM-MS measurements but also to predict the CCS of complex glycans.

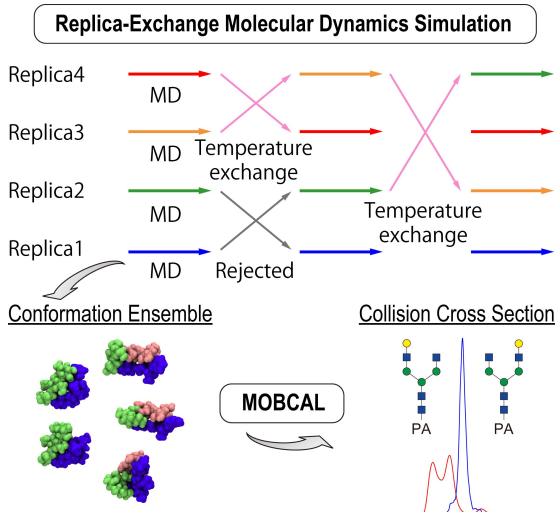
研究分野：計算化学

キーワード：分子動力学計算 レプリカ交換法 N型糖鎖 イオンモビリティ質量スペクトル 衝突断面積

1. 研究開始当初の背景

細胞表面には多様な糖鎖が存在し、細胞間のコミュニケーションや疾患に関係していると考えられている。糖鎖の機能研究が進むにつれ、機能や疾患に特徴的な糖鎖があることがわかり、とりわけ細胞表面の糖鎖構造を正確に決定する技術開発が急務となっている。糖鎖は、核酸やアミノ酸とは異なり分岐構造をもつ。さらに多くの回転異性体があり、糖鎖は核酸やアミノ酸に比べはるかに複雑な構造をしている。高い運動性も糖鎖の特徴であり、従来の構造生物学的手法（特に X 線結晶構造解析）による構造決定が極めて難しいとされる。イオン移動度質量分析 (IM-MS) は、気相中の標的イオンを質量と形状（衝突断面積、CCS）で分離する手法である。CCS はタンパク質のフォールディングや会合状態の変化を良く反映するため、複雑な構造変化を気相で詳しく調べるのに向いている。IM-MS を用いれば、これまで見分けることが出来なかった多様な糖鎖異性体を分けて調べることができ、細胞表面の糖鎖構造解析で飛躍的な精度向上が見込まれる。しかし、CCS が単一コンフォマーに由来するのか、それとも複数コンフォマーの情報を含んでいるのか、或いはイオン化が CCS (コンフォメーション) にどう影響するのかなど、CCS を決める物理化学的要因について明らかになっていることは少なく、実験データの解釈を難しくしている。

近年、計算機を用いた分子シミュレーションでも新たな手法が開発され、生体分子の構造計算は急速に進歩している。私たちはこれまでの研究で、レプリカ交換分子動力学 (REMD) 法 (Sugita and Okamoto, Chem. Phys. Lett. 1999) を用いた糖鎖立体構造予測に取り組んできた。この手法は、温度の異なる複数のレプリカ (系のコピー) の分子動力学計算を並列・独立に実行し、ある頻度で隣接する温度を交換することで、定温の分子動力学計算では実現できない広い構造空間を効率良く探索する。タンパク質の立体構造予測では広



(図1) REMD シミュレーションによる CCS 計算

く用いられており、糖鎖にも有効と考えた。これまで、N 型糖鎖の溶液中のコンフォメーションに対して実験データと良く一致する結果を得ることに成功した。

2. 研究の目的

本研究課題では、REMD 法を用いた糖鎖構造計算の枠組みを利用し IM-MS データ (CCS) を立体構造分布から予測する方法を確立し応用 (図 1)、その結果をデータベース化し、細胞表面の糖鎖構造を高速にスクリーニングする技術基盤を構築することを目的とした。

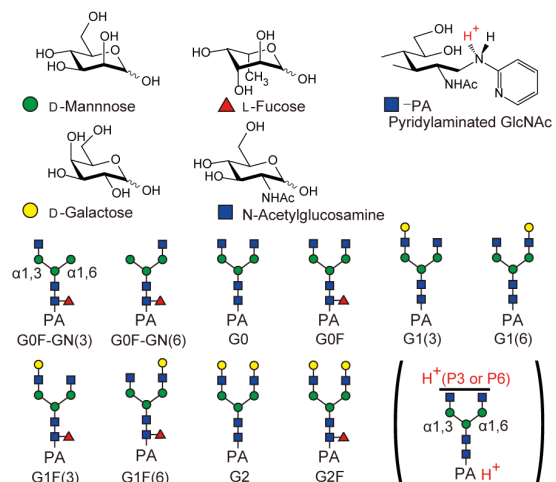
3. 研究の方法

高精度な予測を実現するために、実験に合うモデルを構築し、十分な構造探索を行った。計算モデルとしては、実験で扱われているイオン化糖鎖 (プロトン化ピリジルアミノ糖鎖 (PA-glycan + 2H⁺)) を厳密に再現したものを開発した。実験データが得られている 10 種類の PA 糖鎖を対象に、REMD 計算に基づいて CCS を予測した (図 2)。糖鎖は気相で安定な分子内水素結合を形成していると考えられる。水素結合の再配置を促進し十分な構造探索を行うために、REMD 計算には 16 レプリカ (温度範囲は 300K~1058K) を用いた。各糖鎖に対して全 0.8μs の計算を行った。REMD 計算は REIN (Miyashita et al. Int. J. Quantum Chem. 2015) を用いて行った。CCS 計算には Jarrold らが開発した MOBCAL (Mesleh et al. J. Phys. Chem. 1996) を用いた。従来は MD 計算から低エネルギー構造を幾つか求め CCS 計算を行い、実験値との比較から CCS に対応する立体構造を特定した。それに対して、本研究では立体構造アンサンブルに基づいて CCS を計算することで、実験がない場合でも CCS を予測することが出来る。

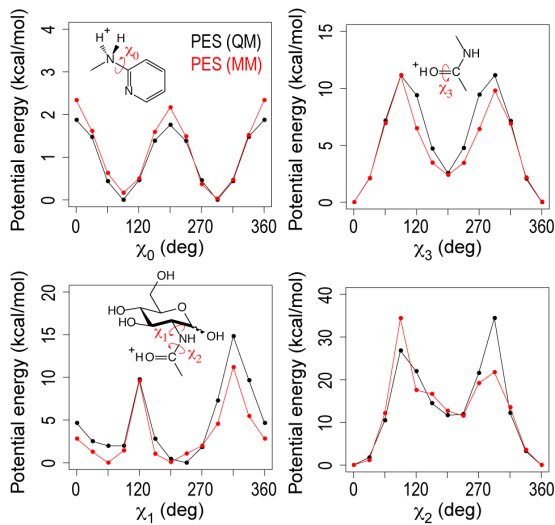
4. 研究成果

(1) イオン化 PA 糖鎖モデルと分子力場パラメータの開発

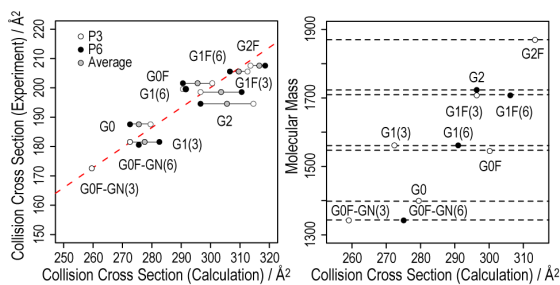
実験ではプロトン 2 つが付加したピリジ



(図2) 計算に用いたイオン化 PA 糖鎖



(図3) 新たに導入した分子力場パラメータの精度

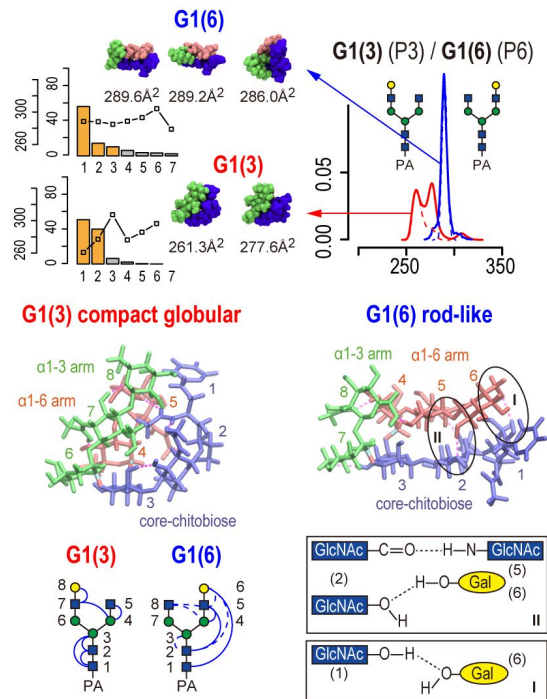


(図4) 計算した CCS と実験値との比較

ルアミノ糖鎖 (PA-glycan + 2H⁺) が用いられている。プロトン化の位置は実験的に知られていない。そのため、モデル化合物の量子化学計算からプロトン親和性を求め、その値をもとにピリジルアミノ基と α 1-3 鎖または α 1-6 鎖にプロトンが付加した二つのモデルを構築した。イオン化 PA 糖鎖の MD 計算に必要な分子力場パラメータは既存 CHARMM 力場をもとに新たに作成した。力場パラメータは量子化学の計算結果を再現するように決定した (図3)。

(2) ピリジルアミノ化糖鎖 10 種の CCS 計算
最初に、イオン化が CCS に与える影響を検討した (図4)。その結果、プロトン化状態 (α 1-3 鎖がプロトン化するか (図中の白丸) α 1-6 鎖がプロトン化するか (図中の黒丸)) によって CCS の値が大きく異なることがわかった (平均して 8.9 \AA^2)。また、実験値との比較からプロトン化状態を理論的に推定した結果、多くの場合で α 1-3 鎖がプロトン化していることも示唆された。プロトン化状態を仮定すると、計算結果は実験データと良い対応を示す。実験データに見られる異性体間の CCS 分離も良く再現されている (実験値: $7 \text{ \AA}^2 - 18 \text{ \AA}^2$ に対して計算値: $10 \text{ \AA}^2 - 19 \text{ \AA}^2$)。

(3) 立体構造アンサンブルの解析
次に、CCS の分布から構造アンサンブルを検定した (図5)。CCS 分布は比較的シャープであり、特定のコンフォマーからの寄与が支配的であると考えられる。クラスター解析



(図5) CCS 分布とコンフォメーション

の結果もこのことを支持する。構造的には、コンパクトな球状 (compact globular) のものと棒状 (rod-like) のものとに分類することが出来る。CCS は常に後者が前者よりも大きな値を示す。異性体ペアに着目すると、 α 1-3 鎖が α 1-6 鎖より長いものが球状、逆のものは棒状の構造をとっている。G0 に Gal 残基が付加した G1(3)と G1(6)の水素結合解析を行った結果、棒状の構造では α 1-6 鎖とキトピオース間に高頻度で水素結合が形成されていることがわかった。 α 1, 6 結合は、柔軟性が高く折れ畳み易くなっていると考えられる。これらの結果は、分岐鎖を繋ぐ結合の柔軟性と分子内水素結合が CCS (コンフォメーション) を決める主要な因子であることを示す。

(4) まとめと今後の展望
本研究課題では、REMD 法を用いた糖鎖構造計算の枠組みを利用し IM-MS データ (CCS) を立体構造分布から予測する方法を確立した。10 種類のピリジルアミノ化糖鎖に対して実験と良く一致する結果が得られ、フォールディング構造の違いで糖鎖異性体が分離されることを示した。この結果は IM-MS 実験の解釈を助ける。さらに、新規な糖鎖に対しても実験にさきがけてスペクトルを予測することが出来る。今後、計算結果を増やし、それらをデータベース化することで、実験、計算、データベースが融合した構造決定の技術基盤を構築し、細胞表面糖鎖の高速スクリーニングを実現したい。

5. 主な発表論文等
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計4件)

Patel, D. S.; Re. S.; Wu, E. L.; Qi, Y.; Klebba, P. E.; Widmalm, G.; Yeom, M. S.; Sugita, Y.; Im, W. "Dynamics and Interactions of OmpF and LPS: Influence on Pore Accessibility and Ion Permeability." *Biophys. J.* (2016) **110**:930-938, 査読有, DOI:10.1016/j.bpj.2016.01.002

Miyashita, N.; Re. S.; Sugita, Y. "Rein: Replica-Exchange Interface for Simulating Protein Dynamics and Function." *Int. J. Quantum Chem.* (2015) **115**:325-332, 査読有, DOI: 10.1002/qua.24785

Re. S.; Nishima, W.; Tahara, T.; Sugita, Y. "Mosaic of Water Orientation Structures at a Neutral Zwitterionic Lipid/Water Interface Revealed by Molecular Dynamics Simulations." *J. Phys. Chem. Lett.* (2014) **5**:4343-4348, 査読有, DOI: 10.1021/jz502299m

Komuro, Y.; Re. S.; Kobayashi, C.; Muneyuki, E.; Sugita, Y. "Charmm Force-Fields with Modified Polyphosphate Parameters Allow Stable Simulation of the ATP-Bound Structure of Ca²⁺-ATPase." *J. Chem. Theory Comput.* (2014) **10**:4133-4142, 査読有, DOI: 10.1021/ct5004143

〔学会発表〕(計17件)

李秀栄「構造から機能へ：糖鎖科学における計算化学の挑戦」第38回日本分子生物学会年会・第88回日本生化学会大会合同大会(BMB2015)、2015年12月4日、神戸ポートアイランド(神戸、兵庫)(招待講演)

李秀栄「Quantitative functional analysis of membranes and membrane proteins using molecular dynamics simulation」第2回「京」を中核とするHPCIシステム利用研究課題成果報告会、2015年10月26日、日本科学未来館(晴海、東京)

李秀栄、Wang, P.-H.、優乙石、杉田有治「Modeling the MAPK/ERK pathway under crowding environment by the combined multi-scale simulations」Supercomputational Life Science 2015 (SCLS2015)、2015年10月20日、東京大学(本郷、東京)

李秀栄、二島渉、田原太平、杉田有治「Hydration structure at ceramide/water interface: A molecular dynamics simulation study」第53回日本生物物理学会年会、2015年9月13日、金沢大学(金沢、石川)

李秀栄、渡部茂久、二島渉、宗行英朗、山口芳樹、杉田有治「分子動力学シミュレーションによるN型糖鎖衝突断面積の計算」第34回日本糖質学会年会、2015年7月31日、東京大学(本郷、東京)

李秀栄、渡部茂久、二島渉、宗行英朗、山口芳樹、杉田有治「レプリカ交換分子動力学計算による糖鎖イオン移動度質量スペクトルの予測」第1回理化学研究所・産業技術総合研究所共同シンポジウム「ビッグデータとビッグシミュレーションによる生命医科

学の未来」、2015年6月29日、産業技術総合研究所臨海副都心センター(晴海、東京)

李秀栄、二島渉、田原太平、杉田有治「A mosaic of water orientation structures at a neutral zwitterion lipid/water interface revealed by molecular dynamics simulations」5th AICS International Symposium、2014年12月8日、理化学研究所計算科学研究機構(神戸、兵庫)

李秀栄、二島渉、田原太平、杉田有治「Structure and orientation of hydrating water molecules at phospholipid/water interface revealed by molecular dynamics simulation」第52回日本生物物理学会年会、2014年9月13日、札幌コンベンションセンター(札幌、北海道)

李秀栄、渡部茂久、二島渉、山口芳樹、杉田有治「レプリカ交換分子動力学計算を用いた糖鎖イオンモビリティ質量スペクトルの予測」第33回日本糖質学会年会、2014年8月10日、名古屋大学(名古屋、愛知)

李秀栄「計算機を用いた糖鎖立体構造予測～現状と展望」第3回コンピナトリアル科学研究推進体セミナー「糖鎖の構造と機能のシンポジウム」、2014年3月11日、東京工業大学(大岡山、東京)(招待講演)

11 李秀栄「Molecular dynamics simulations of glycans: Prediction of IM-MS spectra」理研・糖鎖インフォマティクス若手の会合同セミナー、2014年2月12日、理化学研究所(和光、埼玉)

12 李秀栄、二島渉、渡部茂久、杉田有治「REMD-based prediction of structure and function of glycans」新学術領域「動的秩序と機能」第2回国際シンポジウム、2014年1月12日、キャンパスプラザ京都(下京、京都)

13 渡部茂久、李秀栄、二島渉、宗行英朗、杉田有治「Conformational analysis of PA-glycans by replica-exchange molecular dynamics simulation.」3rd International Conference on Molecular Simulation (ICMS2013)、2013年11月18日、神戸国際会議場(神戸、兵庫)

14 李秀栄、二島渉、渡部茂久、杉田有治「Prediction of Structure and Dynamics of Glycans from Molecular Dynamics Simulations.」3rd International Conference on Molecular Simulation (ICMS2013)、2013年11月20日、神戸国際会議場(神戸、兵庫)

15 渡部茂久、李秀栄、宗行英朗、杉田有治「レプリカ交換分子動力学計算によるPA化糖鎖の立体構造解析」第51回日本生物物理学会年会、2013年10月30日、国立京都国際会館(左京、京都)

16 李秀栄、渡部茂久、二島渉、杉田有治「Revised CHARMM carbohydrate force field for improved description of conformational diversity of N-glycans」第51回日本生物物理学会年会、2013年10月30日、国立京都国際会館(左京、京都)

17 李秀栄、山口芳樹、杉田有治「糖鎖の化

学シフト計算と立体構造予測への応用」第7
回分子科学討論会、2013年9月27日、京都
テルサ（南、京都）

〔その他〕

（寄稿）

Re. S. “Meeting Report: Joint Seminar between
RIKEN and Glycoinformatics Young Scientist
Community.” *Trends in Glycoscience and
Glycotechnology* (2014) **26**:71-72.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

李 秀栄 (RE, Suyong)

国立研究開発法人理化学研究所・杉田理論

分子科学研究室・研究員

研究者番号：50390670

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

杉田 有治 (SUGITA, Yuji)

国立研究開発法人理化学研究所・杉田理論

分子科学研究室・主任研究員

研究者番号：80311190

山口 芳樹 (YAMAGUCHI, Yoshiki)

国立研究開発法人理化学研究所・糖鎖構造

生物学研究チーム・チームリーダー

研究者番号：90323451