

平成 26 年 5 月 23 日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2013

課題番号：25540138

研究課題名(和文) タンパク質・糖鎖の低親和性複合体構造の予測

研究課題名(英文) Prediction of Protein-Glycan Structure Complex with Low Binding Affinity

研究代表者

杉田 有治 (Sugita, Yuji)

独立行政法人理化学研究所・杉田理論分子科学研究室・主任研究員

研究者番号：80311190

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、構造柔軟性を持つ糖鎖リガンドに着目し、計算機を用いた低親和性複合体の構造予測に必要な計算基盤を構築した。既存のCHARMM糖鎖力場に対して新たなCMAP補正を開発し、レプリカ交換アンブレラサンプリングを用いて実験的な糖鎖構造を良く再現することに成功した。レクチンと糖鎖複合体構造の初期モデリングを行い、今後の本計算に向けた予備的な知見を得た。

研究成果の概要(英文)：Protein-ligand interaction is essential for numerous biological functions. We focused on the binding of a flexible ligand as glycan and built a computational basis for the prediction of weakly bound protein-ligand complexes. We have developed the CMAP correction for glycans based on the original CHARMM force field and tested for small models using the replica-exchange umbrella sampling method. The results show that new CMAP correction gives better description of glycan conformations compared with the original CHARMM force field. We have also examined the N-glycan binding of OS9 lectin by using the conventional molecular dynamics simulation. The results show the importance of WW motif as suggested by the experiment, but imply the presence of other factors governing the binding affinity of OS9-glycan interactions. These outcomes are all relevant to develop the computational method for the prediction of weakly bound protein-ligand complex structures.

研究分野：情報学

科研費の分科・細目：情報学フロンティア・生命・健康・医療情報学

キーワード：分子シミュレーション 糖鎖複合体 自由エネルギー計算 分子認識 レクチンOS9

### 1. 研究開始当初の背景

タンパク質によるリガンド認識は、生物科学のみならず創薬化学においても中心的課題の1つである。リガンド認識については、古くからタンパク質を鍵穴、基質を鍵とみなす「鍵と鍵穴モデル」を用いて理解されてきた。このモデルはタンパク質と基質ともに剛体であると仮定しており、現実にはそぐわないものであるが、低分子化合物をリガンドとする分子認識機構を良く説明できる場合もある。しかし、近年、タンパク質や基質の構造柔軟性を取り入れた分子認識機構(適合融合モデルや構造選択モデルなど)が複数提案され、実験的にも理論的にも検証されつつある。糖鎖をリガンドとした場合、糖鎖は他の基質と比べ際立って高い柔軟性を持つため「複数鍵モデル」が提案されている。糖鎖は複数のコンフォーマーをとっており、その各々が別々の認識に用いられているというモデルである。我々は近年、このモデルを検証するため、溶液中の糖鎖構造の柔軟性を分子シミュレーションで検証し、NMR や質量分析などの実験と良く一致する結果を得た。しかし、このようなモデルに基づく複合体構造予測法はまだ確立されていない。また、構造解析が実現できる程度の高親和性基質認識構造の予測は可能であるが、低親和性複合体構造の予測は非常に困難である。

### 2. 研究の目的

原子レベルでの詳細な解析を行うためには、複合体の X 線結晶構造解析が有効であるが、糖鎖のような構造柔軟性を持つリガンド、低い親和性を持つリガンドなどの認識機構を X 線結晶構造解析で解明するのは困難である。本研究課題では、計算機を用いた新しいシミュレーション技法を開発して、親和性が低く、さらに構造に柔軟性のあるリガンド認識機構の解明を目指す。具体的には、研究対象をレクチン OS9 と低親和性糖鎖の複合体予測と分子認識機構に限定し、その予測法の開発と実際のシミュレーションを実施する。予測構造のみならず、糖鎖とタンパク質結合距離に対する自由エネルギー変化を記述することで、他の基質にも応用可能な一般的な手法を提案することを目的とする。

### 3. 研究の方法

レクチン OS9 にターゲットを絞り、このタンパク質が高親和性の糖鎖と低親和性の糖鎖を認識する分子機構を解明する。また、そのために必要な計算手法を独自に開発する。糖鎖のような構造柔軟性を持つ低親和性リガンドとの複合体構造を予測することは挑戦的課題であるが、ここでは3つのステップに分けて研究を行う。

(1) 糖鎖構造の溶液中でのシミュレーションにより糖鎖が本来持つ柔軟性と安定構造を予測する。

(2) 既に 2.1Å の解像度で得られた高親和性糖鎖との複合体構造のシミュレーションを行い、複合体構造中での糖鎖の安定性および高親和性糖鎖がレクチンに結合する分子機構を解明する。

(3) 同様の手法を低親和性糖鎖に適用し、高親和性糖鎖の計算結果、および、NMR などの実験結果と比較し、信頼できる予測法を確立する。

### 4. 研究成果

(1) 糖鎖の既存力場の検証と新たな CMAP 補正の開発

糖鎖が溶液中でとりうる立体構造分布の解明は、低親和性糖鎖の結合構造予測を実現するための前提となる。溶液中の糖鎖は単一構造ではなく幾つかのコンフォーマーとして存在することが知られており、それらがどのような形、割合で存在しているか(「柔軟性」)を正しく記述出来るか否かが計算精度の信頼性を大きく左右する。そこで、現在広く用いられている AMBER と CHARMM 力場を用いて溶液中の N 型複合型糖鎖の構造計算を行った。その結果、各力場を用いた計算から求まる平衡構造分布に顕著な違いが見られた。具体的には、1-6 グリコシド結合の回転配向(ゴーシュゴーシュ、ゴーシュトランスなどで表される)が大きく異なる。1-6 結合は他のグリコシド結合に比べ柔軟性が高いことが知られており、糖鎖の全体構造に最も大きな影響を与えると考えられる。そこで、近年精力的に開発が進められている CHARMM 力場に目し、1-6 結合の回転配向を表す 2 つのパラメタ(  $\omega$  と  $\psi$  )の改良を行った。本研究では、既存のパラメタ決定に比べてより現実的なモデル化合物を用いるとともに、タンパク質ペプチド結合の 2 面角パラメタを改良する際に用いられる CMAP 補正をグリコシド結合に応用することで既存力場の改良を試みた。CMAP 補正は、既存力場関数にグリッド補正を行い高精度量子化学計算のポテンシャル面を再現する補正である。本研究では、糖鎖 1-6 グリコシド結合に対する CMAP 補正を開発し、新たな CMAP 補正を用いて 2 糖、3 糖のモデル計算によりその精度を検証した。計算には、十分な構造探索を行うためにレプリカ交換分子動力学(REMD)法を用いた。新た

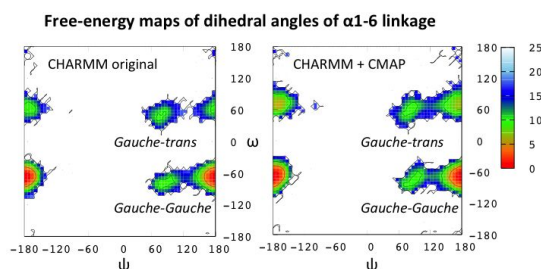


図 1 温度をパラメタとしたレプリカ交換分子動力学計算から求めた 1-6 結合の(  $\omega$  /  $\psi$  )分布。

なパラメータを用いた REMD 計算により求めた 1-6 結合の 2 面角 ( $\omega / \psi$ ) 分布は、既存力場の計算結果と比べ、実験値に近い配向分布となっており、力場精度の改善が見られた。しかし、その改善程度は当初の予想より小さく、さらなる検討を余儀なくされた。

## (2) 構造探索法の検証

糖鎖の構造柔軟性を正しく求めるためには、力場の精度とともに、十分な構造探索が必要である。我々は柔軟性の高い糖鎖構造を十分に探索するために、温度をパラメータとしたレプリカ交換分子動力学法 (REMD) を用いてきた。これまでの計算から、REMD 法を用いることで従来の分子動力学計算に比べ構造探索を飛躍的に向上することができるものの、グリコシド結合の回転の様に比較的大きなエネルギー障壁を伴う構造変化の探索を十分に行えていない可能性は否めない。そこで、1-6 結合の 2 つの二面角 ( $\omega / \psi$ ) をパラメータとしたレプリカ交換アンブレラサンプリング法 (REUS) を用いて 2 糖、3 糖の計算を行った。温度のみをパラメータとした REMD 計算の結果に比べ、REUS 計算では 1-6 結合の 2 面角 ( $\omega / \psi$ ) 空間が広く探索されており、既存力場を用いた計算結果と新たな CMAP 補正を用いたものとの違いも明白に見てとれる。以上の結果から、本研究で新たに開発した CMAP 補正を用いることで糖鎖構造の「柔軟性」を高い信頼性で計算できること、及び REUS 計算の様にグリコシド結合の回転に関する座標をパラメータとした拡張アンサンブル法を用いることで糖鎖構造の柔軟性を高い精度で計算できることがわかった。

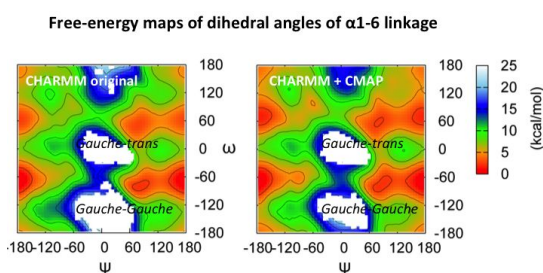


図 2 レプリカ交換アンブレラサンプリングを用いた計算から求めた 1-6 結合の ( $\omega / \psi$ ) 分布。

## (3) OS9 と糖鎖複合体構造解析

2.1 Å の解像度で得られた高親和性糖鎖との複合体構造を用いた分子動力学シミュレーションを行い、複合体構造中の糖鎖の安定性および結合様式を解析した。従来法を用いた計算結果は、高親和性糖鎖との複合体構造は非常に安定しており、実験で示唆された通り、2 つのトリプロファン (「WW モチーフ」) が糖鎖リガンドの安定化に重要な役割を果たしていることを支持する。低親和性糖鎖との複合体については、結晶構造がないため、高親和性糖鎖の結晶構造を用いたモデリングにより初期構造を作成した。低親和性糖鎖

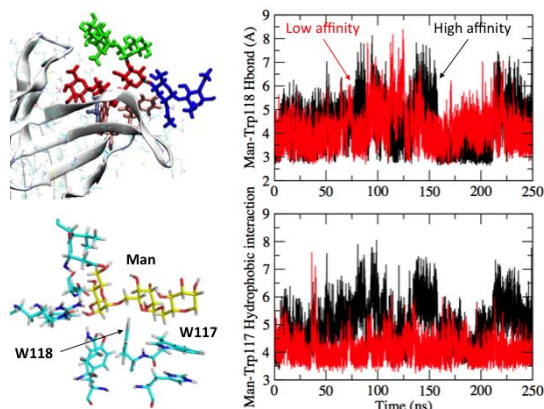


図 3 OS9-糖鎖複合体の結合構造と分子動力学計算から求めた糖鎖と「WW モチーフ」間相互作用の時間変化。

複合体の計算結果は、高親和性糖鎖のものに比べ、複合体中の糖鎖リガンドが大きくゆらいでいることを示唆する。計算から得られた構造のクラスタリング解析を行った結果、高親和性と低親和性糖鎖とで主な結合状態の構造が異なることもわかってきた。タンパク質-リガンド結合の解析に現在広く用いられる MMPBSA 法により結合エネルギーを求めた結果も実験結果と一致する。しかし、糖鎖認識で重要とされる「WW モチーフ」との相互作用は、むしろ低親和性構造で安定に保たれており、別の結合モードの寄与など、親和性の違いが他の要因によることを示唆する。

## (4) まとめと今後の展望

広く用いられている CHARMM 糖鎖力場に対して、新たな CMAP 補正を開発した。さらに、レプリカ交換アンブレラサンプリング法を用いたモデル糖鎖の計算により実験データを良く再現することもわかり、糖鎖複合体計算を高い信頼性で行う計算基盤が得られた。力場開発と構造探索法の検証に予想以上の時間を要した結果、当初計画した OS9 と糖鎖複合体構造の予測については、初期モデリングと従来法を用いた予備計算に留まった。従来法を用いた計算は、実験的に示唆された「WW モチーフ」を用いた糖鎖認識の重要性を支持するものの、親和性の違いが他の要因によることを示唆する。今後、複合体構造の本格的な計算を実施し、結晶構造とは異なる結合モードの寄与 NMR などの実験結果と比較し、信頼できる予測法の確立を目指す。

## 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 0 件)

〔学会発表〕(計 8 件)

李秀榮、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)

李秀栄、渡部茂久、二島涉、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(京都)

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(京都)

李秀栄、二島涉、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)

渡部茂久、李秀栄、二島涉、宗行英朗、杉田有治「Conformational analysis of PA-glycans by replica-exchange molecular dynamics simulation.」2013年11月18日(神戸)

李秀栄、二島涉、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(京都)

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(埼玉)

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回コンビ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)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉田有治 (SUGITA, Yuji)

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

(2) 研究分担者

李秀栄 (RE, Suyong)

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

(3) 連携研究者

山口芳樹 (YAMAGUCHI, Yoshiki)

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