

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成30年6月12日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26410031

研究課題名(和文)糖鎖結合性タンパク質の分子認識/反応機構に関する分子基盤の構築

研究課題名(英文)Computational research for development of mechanistic principle in carbohydrate binding proteins: molecular recognition and catalytic mechanism

研究代表者

石田 豊和 (ISHIDA, TOYOKAZU)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・材料・化学領域・主任研究員

研究者番号：70443166

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)：タンパク質と糖鎖の分子認識/相互作用は様々な生体機能の発現において重要であるが、複雑な糖鎖構造を認識するレクチンの分子メカニズム、そして糖鎖を基質として反応する酵素反応機構に関しては、分子レベルの理解で依然として不明な点が多々残されている。

本課題では糖鎖認識系の一例としてノロウイルスキャプシドタンパク質を題材として、独自のQM/MM計算を基礎にした複合シミュレーション技術を適用することで、ターゲット糖鎖である血液型糖鎖抗原との糖鎖認識機構を詳細に解析して、血液型糖鎖との親和性を決める分子論的要因を理論計算から明らかにした。またバイオマス分解酵素と反応基質との相互作用解析も並行して実施した。

研究成果の概要(英文)：Carbohydrates in general play important roles in various aspects of biological functions from the molecular level to macro-scale biological phenomena. In these processes, the atomistic basis of carbohydrate function is considered to be a molecular interaction between complex carbohydrates and target proteins. In contrast to their importance in various biological functions, atomistic details of carbohydrate recognition remain elusive at present. To advance our knowledge of carbohydrate recognitions, we have proposed a hybrid computational modeling strategy which combines MD sampling and QM/MM calculations.

First, we applied our methodology to one important system, the virus infection process by the norovirus capsid protein. Based on hybrid modeling analysis, we discuss the molecular basis of carbohydrate recognition between the capsid protein domain and Lewis antigens. We also mention another enzymatic system that hydrolyzes carbohydrate chains in a biomass degrading process.

研究分野：理論化学、計算化学

キーワード：QM/MM計算 自由エネルギー計算 電子状態計算 分子動力学計算 糖鎖認識 レクチン キャプシドタンパク質 分子間相互作用

1. 研究開始当初の背景

(1) 細胞組織の認識、免疫や腫瘍の転移、ウイルス感染などマクロな生理現象の微視的メカニズムにおいては、タンパク質と糖鎖の相互作用がその本質であることが徐々に明らかにされている。糖鎖を特異的に認識して結合するタンパク質は一般にレクチンと呼ばれるが、分子レベルでの生物機能の多様性においてはレクチンと糖鎖との分子認識が基本となり、現在では糖鎖は、タンパク質や核酸に次ぐ第3の生命鎖として非常に重要な位置付けだと理解されている。しかしその一方、分子レベルでの糖鎖認識の理解は未だ十分には進んでおらず、その主たる要因は、糖鎖のとりうる多様で複雑な分子構造を決定することが一般には容易でなく、タンパク質と結合した糖鎖複合体の高分解能な構造解析が非常に困難なことにある。

(2) 近年の理論/計算化学研究の著しい進展により、タンパク質など生体高分子を対象とした計算化学研究の対象は規模的にも時間的にも大きく拡大しており、複雑なタンパク質複合体に対しても、生体環境をより適切に再現した分子モデルで大規模/長時間の計算が実行可能になってきた。しかしこのような状況でも、糖鎖複合体、糖タンパク質を対象としたシミュレーション研究は現状ではまだ限られており、より信頼性のある糖鎖用分子力場パラメータの構築や、複雑な糖鎖とタンパク質複合体構造のモデリング、糖鎖結合モードの予測など、計算科学による糖鎖生物学へのアプローチは現時点では発展途上である。

(3) 糖鎖複合体の高分解能構造解析は一般に困難とされており、また通常、糖鎖構造の解析にはNMR測定が主に利用される現状を考慮すると、信頼性のある分子モデリング/計算科学手法でレクチンと糖鎖の糖鎖結合モードを正しく記述して、各種実験データの解釈を可能とし、糖鎖認識におけるレクチンの特異性や親和性の傾向を正しく予測することは非常に重要であるが、技術的にも多くの問題を抱えた挑戦的な研究課題となっている。

2. 研究の目的

(1) 糖鎖認識が重要な系としてウイルス感染の初期分子認識過程があるが、ここではその一例として、ノロウィルスキャプシドタンパク質とターゲットである血液型糖鎖との糖鎖認識を取り上げる。構造解析技術の進展から、近年複数のグループによりキャプシドタンパク質の糖鎖結合サイトと各種血液型糖鎖との立体構造モデルが報告されたが、既存の実験データからでは、複数存在する血液型糖鎖とキャプシドタンパク質の糖鎖認識において、その結合の親和性や特異性を決め

る分子論的な要因が全く明らかにはされていない。ルイス a、ルイス b、H 抗原などの血液型糖鎖は、基本構造に各種単糖が結合することでその構造に多様性が生まれるが、些細な構造変化が巨大なキャプシドタンパク質の糖鎖認識へ及ぼす分子認識能の微視的な起源は依然として不明で、創薬などへの応用から、ウイルス感染初期プロセスにおける分子メカニズムの解明は大きく期待されている。

(2) そこで現在公開されている各種の結晶構造モデルを利用して、自身がこれまで独自に開発した理論/計算手法を適用することで、キャプシドタンパク質の糖鎖認識の分子メカニズムを詳細に解析して、特に糖鎖結合に伴う自由エネルギー変化の観点から、糖鎖認識を支配する物理化学的な要因を明らかにすることを研究の目的とする。

3. 研究の方法

(1) ノロウィルスキャプシドタンパク質の初期構造に関しては、糖鎖結合サイトである P ドメインタンパク質構造だけに注目して、P ドメインタンパク質と血液型糖鎖複合体の X 線構造を出発点として計算に必要な分子モデルを構築した。今回の計算科学研究に関しては2段階で解析を進める方針とし、まず第1段階としては、天然型 P ドメインタンパク質とルイス b 糖鎖複合体の構造を基準として、糖鎖結合部位にアミノ酸変異を加えた場合の局所的なアミノ酸変異が糖鎖認識に及ぼす親和性と特異性変化の分子論的起源をシミュレーションから解析した。この際、計算手法の検証と実験結果との整合性を十分に検証して、続く第2段階として、天然型 P ドメインタンパク質と各種血液型糖鎖との結合親和性の差異を分子論的視点から解明する方針で研究を実施した。

(2) 糖鎖結合系でまず問題となるのは、そもそも糖鎖認識がどのような状態かを定義することであるが、本研究では「溶液環境下でキャプシドタンパク質がルイス b 糖鎖を結合した状態は、糖鎖結合を定義する自由エネルギー面上にて安定な領域にある構造集団」と定義する。そして溶媒和の強さを表す座標と糖鎖の構造変化を表す座標の2軸で定義される縮約された自由エネルギー面を導入することで、この2次元エネルギー面上で安定な糖鎖結合領域を定義して、自由エネルギー的に安定な領域内部で複雑な糖鎖構造をマッピングすることを試みる。そして糖鎖認識で一般に重要だと考えられる構造パラメータを解析して、糖鎖認識を特徴付ける構造因子を解明する。そして最後に、分子動力学計算による結合自由エネルギー変化を直接計算することで、キャプシドタンパク質とルイス b 糖鎖との相互作用を自由エネルギー変化から解析し、糖鎖認識の支配因子をエネ

ルギーレベルで明らかにすることを試みた。

4. 研究成果

(1) 計算解析の第一ステップとして、QM/MM 計算と分子動力学計算を組み合わせることで糖鎖認識を定義する自由エネルギー面を計算した。自身の先行研究により、糖鎖認識を特徴づける構造パラメータを一意的に選ぶことは困難であるので、糖鎖と環境(溶媒和したキャプシドタンパク質)との相互作用の強さを一種の集団座標で記述して、これと拮抗するパラメータとして糖鎖の内部自由度を表す指標である糖鎖内部エネルギーを別の反応座標として選択し、この2つの反応座標のバランスで糖鎖認識が決まるという計算分子モデルを考える。実際の計算では、数百 ns オーダーの分子動力学計算で得られたトラジェクトリーから数十万個の構造をサンプルして、これにQM/MM 計算を行ってエネルギー補正を加えることで、より信頼性の高いQM/MM 自由エネルギー面を構築することを試みる。しかし対象とする系の大きさ、サンプル数を考慮すると利用出来るQM 計算手法には限界があるために、まずは基底関数の影響を見るためにRHF/6-31G** と3-21Gレベルの計算を並行して実施し、今回特に重要となるQM 領域とMM 領域の静電相互作用の大きさを両者間で比較した。この結果を図1に示すが、静電相互作用が支配的な系においては3-21G レベルの計算でもQM/MM 相互作用の強さをよく再現することがわかるので、以後すべての計算はQM/MM RHF/3-21G として、数十万単位のサンプリング構造に対してQM/MM 計算を実行する方針とした。

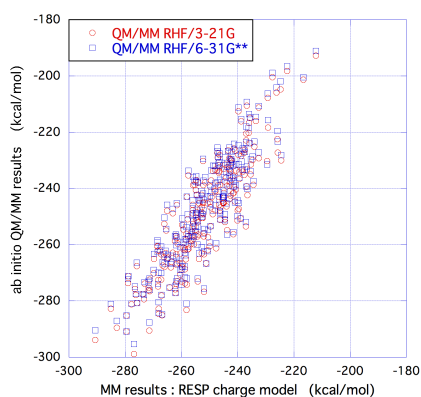


図1 QM/MM 計算によるQM-MM 静電相互作用エネルギーの基底関数依存性(青印: RHF/6-31G**, 赤印: RHF/3-21G)

(2) まず第1段階として、天然型キャプシドPドメインタンパク質とルイスb複合体に関して、上に定義した2つの反応座標によって記述される糖鎖結合を表す自由エネルギー面を計算して、自由エネルギー面上の各領域へ糖鎖構造をマップすることを行った。図

2に計算結果を示すが、ここで重要な点は、糖鎖結合構造は一つの固い分子構造で表現されるのではなく、自由エネルギー面上の安定領域で糖鎖が大きく揺らいだ構造の集団平均になっている点にあり、これはX線解析で観測される糖鎖構造は必ずしも生理環境下での構造を表すのではなく、実際には、多数の揺らいだ構造の集団平均として糖鎖認識は実現しているとの理解である。安定領域にマップされた糖鎖構造に対して、糖鎖結合において重要だとされる2つのパラメータ1) binding epitope (これは糖鎖の単糖とアミノ酸残基間との水素結合長で表現される)と2) bioactive conformation (これは糖鎖中のグリコシド結合の2面角分布で記述される)を解析したところ、水素結合長及び二面角ともに大きな幅を持って揺らいでいることが分かり、実験構造であるX線構造モデルで観測される分子パラメータは、このゆらぎの幅の中の妥当な一点(厳密でないが平均値に近い)であることは確認出来た。

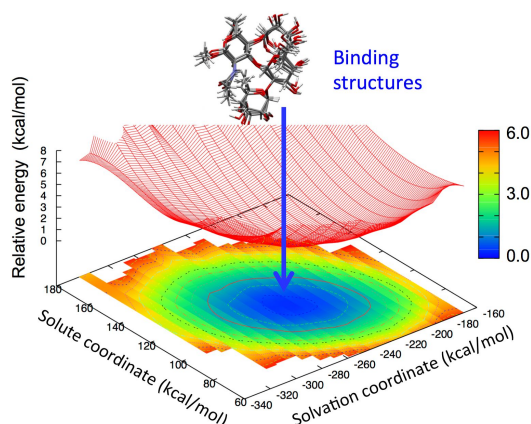


図2 天然型キャプシドPドメインタンパク質とルイスb糖鎖との結合自由エネルギー面表示

(3) 次に天然型キャプシドタンパク質が持つ糖鎖結合能力をアミノ酸残基単位の分解能で検証するために、糖鎖結合サイトの一部にアミノ酸変異(Gln389Asn)を加えたモデルを作成して同じ計算を繰り返し、天然型と変異型タンパク質で分子認識能の差異を検討した。両者で全く同様の手順でQM/MM 自由エネルギー面を評価したが、図3に示すように、この場合は両者で非常に似た自由エネルギー地形を再現して、この結果からでは構造的な視点でアミノ酸変異の何が親和性変化をもたらすのか明らかには出来なかった。また変異型でも自由エネルギー面上でマップされた構造群に対して、binding epitope と bioactive conformation の2パラメータを詳細に解析したが、多くは天然型タンパク質と非常に似た値を示し、やはり結合親和性の変化をタンパク質構造の差異に結論付けるのは困難であった。

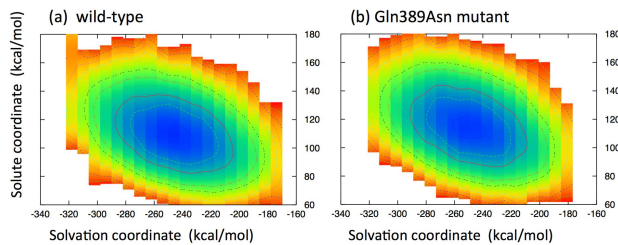


図3 天然型タンパク質(左)と変異型タンパク質(右)のQM/MM結合自由エネルギー面の比較

(4)そこでより直接的に糖鎖とタンパク質との相互作用を調べるため、古典分子動力学計算による結合自由エネルギー計算を天然型と変異型タンパク質のそれぞれに対して実行し、糖鎖結合サイトから糖鎖を引き抜く経路に関して仮想的熱力学サイクルを仮定することで、両者の結合自由エネルギー差を計算から求めた。特に今回、結合自由エネルギーを糖鎖とタンパク質との相互作用、及び糖鎖と溶媒との相互作用に2分割して、この値を天然型と変異型の2者で比較することで糖鎖結合の支配因子を詳しく調べた。その結果、結合サイトのアミノ酸を変異(Gln389Asn)させた場合、糖鎖とタンパク質との相互作用が変異型キャプシドでは大きく減少するものの、このエネルギーロスを補填する形で糖鎖と溶媒との相互作用が増強され、この結果として、変異型タンパク質ではごく微量な結合自由エネルギーの増加が認められ、ルイスb糖鎖との親和性が強くなることが明らかになった。

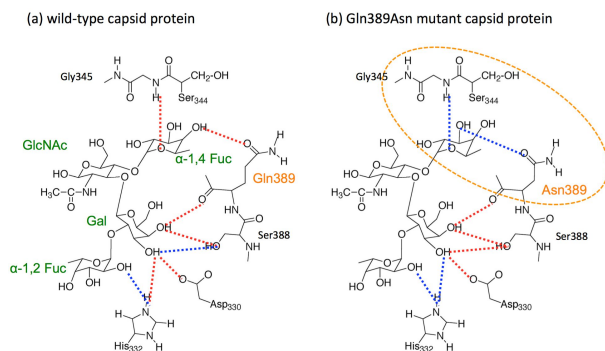


図4 天然型タンパク質(左)と変異型タンパク質(右)の糖鎖結合モード比較

Gln389Asn 変異が糖鎖との親和性を強くすることは実験からも示唆されていたが、結晶構造解析ではその分子論的な起源は不明のままであった。しかしその理由は本計算結果では当然であり、結合親和性を変化させたのはタンパク質との相互作用でなく溶媒との相互作用であって、糖鎖結合サイトのわずかな構造変化に起因した溶媒和の強さが、糖鎖結合を決めていることが明確な形で証明できた。図4には糖鎖結合サイトの模式図を示す

が、局所的なアミノ酸変異がキャプシドタンパク質表面の糖鎖結合ドメインに僅かな影響を及ぼし、結果としてタンパク質表面での水和の強さが変化することで、糖鎖認識の親和性/特異性が変化しうることを明らかにした。これが本計算化学研究で得られた重要な視点の一つである。

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 2 件)

石田豊和

“Computational analysis of carbohydrate recognition based on hybrid QM/MM modeling: a case study of norovirus capsid protein in complex with Lewis antigen”, PHYSICAL CHEMISTRY CHEMICAL PHYSICS, 査読あり (2018) 20 巻, p.4652-4665. DOI: 10.1039/C7CP07701G

石田豊和

“Computational modeling of carbohydrate recognition in protein complex”, AIP Conference Proceedings, 査読あり (2017) vol.1906, issue 1, 030021, <https://doi.org/10.1063/1.5012300>

[学会発表](計 13 件)

石田豊和

“Computational modeling of carbohydrate recognition in protein complex” Modeling Interactions in Biomolecules VIII (WATOC2017 SATELLITE), (依頼講演) 2017年9月7日, Park Hotel, Pilsen, Czech Republic

石田豊和

“Computational modeling of carbohydrate recognition in proteins” 13th International Conference of Computational Methods in Sciences and Engineering (ICCMSE 2017), (招待講演) 2017年4月22日, The MET Hotel, Thessaloniki, Greece

石田豊和

“Computational modeling of protein functions: molecular recognition and enzymatic catalysis”, 4th International symposium for Young Chemists on Stimuli-Responsive Chemical Species for the Creation of Functional Molecules, (招待講演)

2016年12月12日, 大阪大学 サントリーメモリアルホール(大阪、吹田キャンパス)

石田豊和、久保田智巳、白土東子
“Computational modeling of carbohydrate recognition in norovirus capsid protein with lewis antigen”, Pacificchem 2015 : International Chemical Congress of Pacific Basin Societies.
2015年12月17日、HAWAII Convention Center (ハワイ、ホノルル)

石田豊和、久保田智巳、白土東子
「ノロウイルスキャプシドタンパク質の糖鎖認識における糖鎖構造依存性」、第9回分子科学討論会 2015 東京、2015年9月19日、東工大 大岡山キャンパス(東京)

石田豊和、久保田智巳、白土東子
「ノロウイルスキャプシドタンパク質とルイス抗原との糖鎖認識: 計算科学による相互作用解析」、第15回日本蛋白質科学会年会、2015年6月25日、あわぎんホール(徳島市)

石田豊和、久保田智巳、白土東子
「ノロウイルスキャプシドタンパク質と血液型糖鎖抗原との糖鎖認識機構」、第18回理論化学討論会、2015年5月21日、大阪大学 大阪大学会館(大阪 豊中キャンパス)

石田豊和
“Computational modeling of protein functions: Probing protein environment in enzymatic catalysis”, International Workshop: Theoretical Chemistry on Functional Biomolecular Systems, (招待講演) 2015年2月10日、北海道大学 触媒化学研究センター(札幌)

石田豊和、藤橋雅宏
“Computational Modeling of Enzymatic Function: Effects of Substrate Distortion in ODCase Reaction”, 19th International Workshop on Quantum Systems in Chemistry, Physics and Biology (QSCP XIX), (招待講演) 2014年11月15日、Tamsui, Taipei, Taiwan

石田豊和
“Computational Modeling of Protein Functions: Probing Protein Environment in Enzymatic Catalysis”, (招待講演) 中央研究院 生物化学研究所セミナー、2014年11月13日、Academia Sinica, Taiwan

石田豊和
“Computational Modeling of Protein Functions: Probing Protein Environment in Enzymatic Catalysis”, WATOC 2014 Satellite Meeting on Large Condensed and Biological Systems, (招待講演) 2014年10月13日、Universidad de Concepción,

Concepción, Chile

石田豊和
“Probing protein environment in enzymatic processes: all-electron QM analysis combined with QM/MM modeling approach”, 10th Congress of the World Association of Theoretical and Computational Chemists (WATOC2014), (依頼講演) 2014年10月7日、Santiago, Chile

石田豊和、久保田智巳、白土東子
「ノロウイルスキャプシドタンパク質とルイス抗原との糖鎖認識機構」、第8回分子科学討論会 2014 東広島、2014年9月23日、広島大学 東広島キャンパス(東広島)

〔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〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者
石田 豊和 (ISHIDA, Toyokazu)
国立研究開発法人 産業技術総合研究所・
機能材料コンピュータショナルデザイン
研究センター・ 主任研究員

研究者番号: 70443166