

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：14401

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2009～2013

課題番号：21113006

研究課題名(和文)計算科学による核内タンパク質天然変性状態の構造多型解析

研究課題名(英文)Analysis on the structural polymorphism of IDPs by computer simulation

研究代表者

肥後 順一(Higo, Junichi)

大阪大学・たんぱく質研究所・特任研究員

研究者番号：80265719

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 78,600,000円、(間接経費) 23,580,000円

研究成果の概要(和文)：天然変性蛋白質の「折れたたみとカップルした結合」の機構を、計算機実験によって解明した。計算対象(天然変性蛋白質とパートナー分子、およびそれを取り囲む多数の溶媒分子)を全原子モデルで表現し、効率的構造探索法であるマルチカノニカル分子動力学を行った。それにより、折れたたみとカップルした結合過程の詳細な自由エネルギー地形を可視化した。実験的に決定された複合体構造以外にも、短い寿命の多様な複合体構造の存在を示した。得られた自由エネルギー地形をより大きな観点から理解するために、粗視化モデルでのサンプリングを行った。複数の準安定な複合体の間の構造遷移を、競合性と協調性の概念から表現した。

研究成果の概要(英文)：Computer simulations were performed to physico-chemically understand the coupled folding and binding of intrinsically disordered proteins (IDPs). We expressed the system (IDP, its partner molecule, and solvent molecules) by an all-atom model, and an effective conformational sampling method, multicanonical molecular dynamics, was applied to the system. We visualized the fine structure of a free-energy landscape of the coupled folding and binding of the system. The free-energy landscape consisted of the native-like complex cluster and small non-native complex clusters, where free-energy barriers separated the clusters. Then, to understand the precise free-energy landscape from a more physical point of view, we used a coarse-grained model. The inter-cluster conformational transitions were explained by cooperative and competitive interactions in IDPs.

研究分野：新学術領域研究

科研費の分科・細目：研究領域提案型

キーワード：フォールディング ドッキング 自由エネルギー地形

### 1. 研究開始当初の背景

蛋白質は他者と相互作用することでその機能を発現するが、その相互作用はカギとカギ穴の機構で説明されてきた。しかし、天然変性蛋白質の発見で、従来とは大きく異なる機構の存在が明らかになった。天然変性蛋白質 (IDP) は、単体 (非活性) 状態では特定の立体構造を持たず変性している。一方、相互作用の対象と結合して複合体を形成するときは、特定の立体構造をとる。この特異な結合機構は、「折れたたみとカップルした結合 (coupled folding and binding)」と呼ばれ、蛋白質研究の新たな研究課題となった。とりわけ天然変性蛋白質は核内に多く、「折れたたみとカップルした結合」は単に風変わりな機構ということだけでなく、蛋白質研究において重要な課題となった。よって、この機構をシミュレーションに基づいて理論的かつ物理化学的に解明することは、新学術研究として時宜を得た課題であった。

### 2. 研究の目的

平成 20 年当時、天然変性蛋白質への理論的かつ物理科学的なアプローチは、粗視化モデル (蛋白質を単純化したモデル) を使うのが主流であった (この流れは平成 26 年現在でも変わっていない)。なぜなら「折れたたみとカップルした結合」は非常に複雑な機構であり、全原子モデル (蛋白質や溶媒分子を原子レベルで厳密に扱うモデル) では困難を伴うからである。したがって、全原子モデルのシミュレーションで十分な統計性を保ちつつ生体高分子系の構造変化を調べるのは、さらに難しいと考えられていた。

しかし、その困難に挑戦することが、天然変性蛋白質の研究分野を進めることになる。そこで我々は、「折れたたみとカップルした結合」機構の自由エネルギー地形を全原子モデルに立脚して求めることを研究目的とした。

### 3. 研究の方法

天然変性蛋白質とそのパートナー分子 (この分子も蛋白質分子ではあるが、生理的条件下では特定の立体構造を持つ) を互いに離れた位置に配置しておき、周囲を溶媒分子 (水分子とイオン) で満たす。また天然変性蛋白質は変性状態にしておく (図 1 の右パネル参照)。これら分子は原子から構成されるが、原子間相互作用は分子力場 (具体的には Amber force field) で決まる。分子シミュレーションを行うと天然変性蛋白質は構造を変えながら溶液中を漂い、パートナー分子と複合体を形成する。しかし、汎用的に使われる分子シミュレーション (カノニカル分子動力学法) では、実験的に決められた複合体 (すなわち、自由エネルギーが最も低い複合体) が得られることは非常にまれである。運良くそのような複合体が得られたとしても、統計性が不足しているのでその複合体の自

由エネルギーまでは見積もることは出来ない。

そこで、我々は効率的構造探索法であるマルチカノニカル分子動力学法 (McMD 法) を系に適用した。詳細は省くが、この方法により、系のエネルギーは高エネルギー (高温に対応する) から低エネルギー (室温またはそれより低い温度に対応するように設定する) までの広いエネルギー領域を行き来するようになる。それにより、構造探索効率は大幅に増す。さらに我々は、構造探索効率を上げるために、様々な工夫を行ってきた (文献 2, 9)。

マルチカノニカル分子動力学法の優れた点は、高い構造探索効率だけでなく、シミュレーションの過程で得られた様々な構造クラスターの熱力学的安定性を議論できる点にある。言い換えると、各クラスターに自由エネルギー値を割り振ることができる。そこで、構造クラスター間の構造の違いを反映した何らかの構造空間を作ったとしよう (この空間は一見抽象的なものになることもある)。その空間の中に構造クラスターをマッピングするとき、その出現頻度をも加味すれば、自由エネルギー地形が可視化できる。

このようにして、いったん詳細な自由エネルギー地形が得られたら、今度は粗視化モデルを適用し、複雑な自由エネルギー地形の特徴を再現する因子を調べることもできる (文献 3, 4)。

### 4. 研究成果

全原子モデルとマルチカノニカル分子動力学法を用いて、天然変性蛋白質とそのパートナー分子の自由エネルギー地形を可視化した (文献 2, 6, 8)。一例として、神経特異的な転写制御因子 NRSF/REST とそのパートナー分子であるコリプレッサー mSin3 との間の折れたたみとカップルした結合の自由エネルギー地形を示す。図 1 の右パネルはシミュレーションの初期構造である。すなわち、実験で決定された複合体構造 (左パネル) とは全く異なる構造をシミュレーションの初期構造にした。なお、この文書では、実験的に得られた複合体構造を「天然の複合体構造」と呼ぶ。

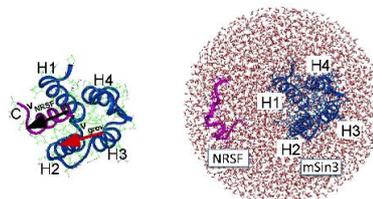


図 1: 左パネルは NMR で実験的に決定された複合体構造 (Nomura et al., *J. Mol. Biol.* **354**, 903–915, 2005)。右パネルはシミュレーションの初期構造。両方のパネルとも、天然変性蛋白質 NESF はマゼンタで、パートナー分子 mSin3 は青で表現した。右パネルで NRSF と mSin3 を取り囲むのは溶媒分子である。両パネルとも H1-H4 は

*mSin3* 中の4つのヘリックスを示す。左パネルの黒い矢印は、複合体中で *NRSF* がヘリックスを形成しているときのヘリックスの向きを示す。赤い矢印は、*mSin3* の4本のヘリックス H1-H4 が作るクレフトの向きを表す。

シミュレーションから得られた300 Kでの自由エネルギーを図2に示す。多様な複合体構造が得られたことが分かるが、300 Kで安定な複合体構造のほとんどは、*NRSF* が *mSin3* のクレフトにはまり込んでいる。一方、高温ではクレフト以外の部位に結合した *NRSF* や解離した *NRSF* が多く見られる。それら高温での構造は、統計重率の関係から300 Kでのアンサンブルには寄与しない。図2を大まかに眺めると、構造分布は三つの島(SC1-3)に分かれている。その境界を破線で表した。この破線の周辺は構造分布が低い領域であり、そこに分布する構造は比較的不安定であることを意味する。言い換えると、この破線は自由エネルギー障壁の位置を表す。

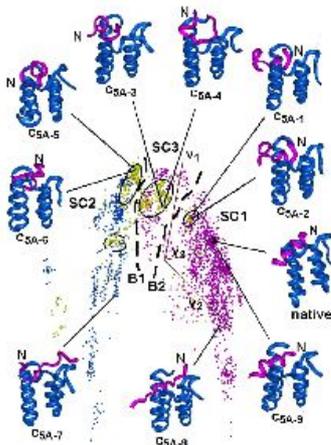


図2：300 Kでの構造分布（自由エネルギー地形）はじめにシミュレーションの軌跡から300 Kの構造アンサンブルを作成し、次にそのアンサンブルに主成分分析（principal component analysis; PCA）を適用した。そして最後に、アンサンブル中の構造を第一から第三までの主成分軸（ $v_1$ - $v_3$ ）に射影した。いくつかの構造を抜き出してその立体構造を示した。“native”は天然の複合体構造を表す。太い破線は、自由エネルギー障壁を表す。SC1-3は島に割り振った名前である。

図2で“native”と指示された複合体が天然の複合体（実験構造）の位置である。天然の複合体構造に近いところでは、それに類似した複合体が見られ、*NRSF* はヘリックスを形成していた。300 Kでの構造アンサンブルをクラスター解析してみると、最大クラスター（自由エネルギーが最も低いクラスター）が native を含んでいることが分かった（文献8）。したがって、シミュレーションは実験結果を再現している。また、三つの島はそれぞれいくつかのクラスターによって構成されていた（つまり島はスーパー・クラスター）。二つの自由エネルギー障壁は、*NRSF* が *mSin3* のクレフト内で向きを変える、または *NRSF* の両端の距離が大きく変化する動きに対応

する（詳細は文献8を参照）。

我々は、*NRSF* 単体のシミュレーション（*NRSF* だけが溶液中で揺らぐ）も行った。その結果、*NRSF* は多様な構造クラスター（例えば、ヘリックス、ヘアピン、ヘリックスとヘアピンの両者の混じってねじれた構造、伸びた構造など）の間を揺らいでいることが分かった。つまり、総体としては、*NRSF* 単体は変性状態にある。興味深いことに、単体状態の中で出現したほぼ全ての立体構造が、*mSin3* との複合体の中で見つかる。*NRSF* 単体のシミュレーションと *mSin3* 存在下でのシミュレーションの二つから、総合的に得られる自由エネルギー地形の模式図を図3に示す。

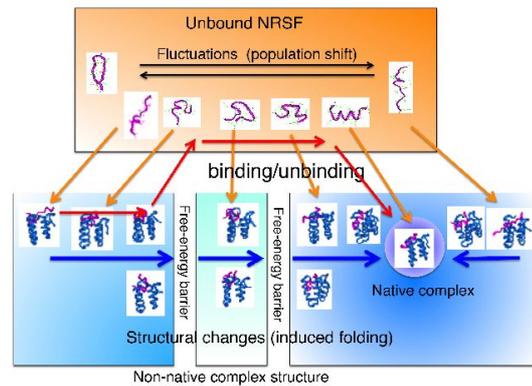


図3：*NRSF* と *mSin3* の間での「折れたたみとカップルした結合」の機構。橙色のブロックが単体状態の *NRSF* を表す。三つの青のブロックが *NRSF* と *mSin3* との複合体状態を表す。青のブロック間の隙間は自由エネルギー障壁を表す。天然の複合体構造は“Native complex”と記してある。単体状態の中での構造変化は黒の矢印で、複合体内での *NRSF* の構造変化は青の矢印で示してある。単体状態と複合体状態の間の移動は、橙色または赤色の矢印で示してある。

*NRSF* 単体は、溶液中で様々な構造の間を揺らいでいるが、*mSin3* の近くにある時はそのいずれの構造であってもとりあえず *mSin3* のクレフトへと結合していく。したがって多様な複合体構造が形成される。*NRSF* がどの構造をとって *mSin3* に結合するかで、複合体の自由エネルギー地形のどこに着地するかが決まる。天然の複合体構造から遠いところに着地した場合、天然の複合体構造へと構造変化する過程でいくつかの自由エネルギー障壁を超えなければならない。または、解離するかもしれない。

単体のいずれの構造であっても *mSin3* に結合するという結合機構は、*NRSF* が *mSin3* と結合するときの速度常数を増加させるように作用するだろう。しかし、形成された非天然型の複合体が *mSin2* から解離することなく天然の複合体構造にたどり着けるかどうかは、自由エネルギー障壁の高さに依存する。障壁が高すぎる場合には、最安定状態（すなわち天然の複合体構造）にたどり着くためには、再度解離する必要がでてくる。そうになると、*mSin3* に結合して最終的に天然の複合

体構造にたどり着ける NRSF の構造は限られてくる。こうなると、折れたたみとカップルした結合の機構は population shift 的になる。一方、障壁が低ければ、NRSF は解離することなく複合体内での構造変化のみで天然の副動態構造へとたどり着く。そうであれば、この機構は induced fit 的になる。今回のシミュレーションによる研究では、induced fit 型と population shift 型の両方が混じり合っていると推測される(詳細な議論は図書 1 を参照)。全原子モデルから得られる折れたたみとカップルした結合の機構はそれほど単純ではないようである。このように、複雑な構造変化の機構をそのまま得られるのが全原子モデルの利点である。

天然変性蛋白質を世界的に有名にしたのは pKID-KIX 系である(Radhakrishnan et al., *Cell*, **91**, 741-752, 1997)。天然変性蛋白質 pKID は、そのパートナー分子 KIX に結合するときヘリックスに折れたまる。我々はこの系についても全原子マルチカノニカル分子動力学を適用して自由エネルギー地形を可視化した(文献 7)。詳細な説明は省くが、ここでも複雑な自由エネルギー地形が得られた。しかし、pKID-KIX 系では population shift 型の機構の方が強いようである。

天然変性蛋白質と一言で言っても、それぞれが個性を持っている。その個性を先験的に計算モデルに取り込むことなく、計算の結果として導けるのは全原子モデルの利点であろう。今回の研究では、折れたたみとカップルした結合の機構について、系ごとの個性を浮き彫りにした。この方向で研究を進めることで、天然変性蛋白質の分子認識機構の多様性を明らかにして、さらに天然変性のもう一つの重要な特徴である相互作用のハブ性(または、プロミスキャス性)を明らかにできると期待できる。

## 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 26 件)

1) Nie, Q.M., Togashi, A., Sasaki, T.N., Takano, M., Sasai, M., Terada, T.P. Coupling of Lever Arm Swing and Biased Brownian Motion in Actomyosin. *PLoS Comput Biol.* **10**, e1003552 (2014). DOI: 10.1371/journal.pcbi.1003552. 査読有。

2) Higo, J., Umezawa, K., Nakamura, H. A virtual-system coupled multicanonical molecular dynamics simulation: Principle and its application to free-energy landscape of protein-protein interaction with an all-atom model in explicit solvent. *J. Chem. Phys.* **138**, 184106 (2013). DOI: <http://dx.doi.org/10.1063/1.4803468>. 査読有。

3) Shirai, N.C., Kikuchi, M. Structural flexibility of intrinsically disordered proteins induces

stepwise target recognition. *J. Chem. Phys.* **139**, 225103 (2013). DOI: 10.1063/1.4838476. 査読有。

4) Matsushita, K., Kikuchi, M. Frustration-induced protein intrinsic disorder. *J. Chem. Phys.* **138**, 105101 (2013). DOI: <http://dx.doi.org/10.1063/1.4794781>. 査読有。

5) Higo, J., Nakamura, H. Virtual states introduced for overcoming entropic barriers in conformational space. *Biophysics* **8**, 139-144 (2012). DOI: 10.2142/biophysics.8.139. 査読有。

6) Higo, J., Ikebe, J., Kamiya, N., Nakamura, H. Enhanced and effective conformational sampling of protein molecular systems for their free energy landscapes. *Biophysical Rev.* **4**, 27-44 (2012). DOI: 10.1007/s12551-011-0063-6. 査読無。

7) Umezawa, K., Ikebe, J., Takano, M., Nakamura, H., Higo, J. Conformational Ensembles of an Intrinsically Disordered Protein pKID with and without a KIX Domain in Explicit Solvent Investigated by All-Atom Multicanonical Molecular Dynamics. *Biomolecules*, **2**, 104-121 (2012). DOI: 10.3390/biom2010104. 査読有。

8) Higo, J., Nishimura, Y., Nakamura, H. A Free-energy Landscape for Coupled Folding and Binding of an Intrinsically Disordered Protein in Explicit Solvent from Detailed All-atom Computations. *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 10448-10458 (2011). DOI: 10.1021/ja110338e. 査読有。

9) Ikebe, J., Umezawa, K., Kamiya, N., Sugihara, T., Yonezawa, Y., Takano, Y., Nakamura, H., Higo, J. Theory for Trivial Trajectory Parallelization of Multicanonical Molecular Dynamics and Application to a Polypeptide in Water. *J. Comput. Chem.*, **32**, 1286-1297 (2011). DOI: 10.1002/jcc.21710. 査読有。

10) Takano, M., Terada, T.P., Sasai, M. Unidirectional Brownian motion observed in an in silico single molecule experiment of an actomyosin motor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **107**, 7769-7774 (2010). DOI: 10.1073/pnas.0911830107. 査読有。

11) Morita, H., Takano, M. Residue network in protein native structure belongs to the universality class of a three-dimensional critical percolation cluster. *Phys. Rev. E* **79**, 020901(R) (2009). DOI: <http://dx.doi.org/10.1103/PhysRevE.79.020901>. 査読有。

[図書](計 2 件)

1) Higo, J., Umezawa, K. Free-energy landscape of Intrinsically disordered proteins investigated by all-atom multicanonical molecular dynamics, Chapter 14 in “*Protein Conformational Dynamics*” (Han, K., Zhang, X., and Yang, M. eds.). Springer. *Advances in Experimental Medicine and Biology* **805**, 331-351 (2014).

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://www.tsurumi.yokohama-cu.ac.jp/IDP/>

## 6．研究組織

### (1)研究代表者

肥後順一 (HIGO, Junichi)  
大阪大学・蛋白質研究所・特任研究員  
研究者番号：80265719

### (2)研究分担者

高野光則 (TAKANO, Mitsunori)  
早稲田大学・理工学術院・教授  
研究者番号：40313168

菊池誠 (KIKUCHI, Macoto)  
大阪大学・サイバーメディアセンター・  
教授  
研究者番号：50195210