

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：11301

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2010～2014

課題番号：22136005

研究課題名(和文)分子階層でのシミュレーション基盤技術研究

研究課題名(英文)Development of new simulation methods at the molecular layer

研究代表者

木下 賢吾(Kengo, Kinoshita)

東北大学・情報科学研究科・教授

研究者番号：60332293

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 48,200,000円

研究成果の概要(和文)：多くのシステムバイオロジー的アプローチでは、個々の機能分子が過度に抽象化され分子としての実体を失った情報としてしか扱われない。その結果、変異の影響や薬剤との相互作用等を論じることが困難になっている。そこで、本研究では他の階層とのつながりを意識しつつ、分子レベルでの計算基盤の構築を行った。具体的には、チャンネルタンパク質をターゲットとしたモデル構築手法の開発、長時間分子動力学シミュレーションの結果の解析手法の開発、変異体のシミュレーションプロトコルの開発を行った。

研究成果の概要(英文)：Systems-biology approaches often suffer from the description of molecular details, because atomic details are too much to be considered with whole systems at the same time. As a result, it becomes hard to consider molecular interactions with drugs and to evaluate the effect of genomic variations due to the individual differences. To overcome the difficulty, we have developed a few methods to consider the interaction between molecular level and an upper level of the different biological layers. More specifically, we develop a method of model building for channel proteins, a method to analyze long-time molecular dynamics simulation results, and a method to simulate the mutant proteins to evaluate the molecular function differences.

研究分野：生命情報科学

キーワード：イオンチャンネル 構造モデリング 分子動力学法 多階層シミュレーション

### 1. 研究開始当初の背景

これまでの分子生物学は要素還元主義的アプローチで数多くの要素を明らかにする研究を行ってきた。このようなアプローチは、ゲノム、トランスクリプトーム、プロテオーム、インタラクトームなど、生命現象のあらゆる階層で精力的に推し進められ、個々の階層で膨大なデータを蓄積してきた。その結果、**Molecular Biology of the Cell**に代表される生物学の教科書は版を重ねる毎に厚みを増し、昔のように少数の研究者が一冊の教科書を著す事すらきわめて困難な程、分野は細分化され統合的な理解が失われつつある。そこで、生命システムを統合的にとらえたアプローチとしてシステムバイオロジー的アプローチが必要になってきている。しかし、多くのシステムバイオロジー的アプローチでは、一気に全体を見ようとするあまり、個々の機能分子が高度に抽象化され、それらは分子としての実体を失った情報としてしか扱われない。その結果、従来の生物学的な知見との連携がうまくとれていないのが現状である。さらに、近年数多く明らかにされているタンパク質の立体構造情報を全く反映することができていないため、薬物の作用がどのように表現型へと至るかを理解するのが困難である。

以前、我々は特定領域研究に於いて「トランスポートソームを対象とした分子実体を伴った相互作用ネットワークの解析」として分子実体 (= 立体構造) を考慮した相互作用ネットワークの構築と解析を行ってきた。その研究では、トランスクリプトームの階層情報である遺伝子共発現情報を利用して「何が」相互作用するのかを明らかにする手法の開発を行い、インタラクトームの階層であるタンパク質相互作用に関して複合体の構造予測法の開発により「どのように」相互作用するのかを予測し、複合体情報 (= 分子実体) を伴った相互作用ネットワークの構築を行った。その結果、異なる階層の情報を統合した遺伝子共発現データベースとして **COXPRESdb**、及び複合体の予測手法として **SurfIt** の開発を行う事ができた。共発現データベースは、世界各国から 2014 年には年間 14 万のユニーク訪問を受けるデータベースに成長した。また **SurfIt** は、複合体の予測コンテスト **CAPRI** で、コンスタントに上位の成績をあげられるようになっており、世界的にもトップレベルの手法となっている。このように、先の特定領域で一定の成果を上げることが出来た。そこで本計画研究では、薬剤との相互作用を扱えるように「実体化」をさらに推し進め、統合的多階層生体機能学の分子階層をターゲットとすることにした。分子階層ではこれまで数多くなされているように、シミュレーションによる理解が強力な手段となる。そこで我々は、分子階層での新しいシミュレーション基盤技術の研究を計画するに至った。

### 2. 研究の目的

複雑な生命現象の理解にはシミュレーションが有効なことが多いが、分子をあらわに考慮したシミュレーションでは、生理学的に興味深い生命現象の起こる時間スケールに到達する事は現実的でない。そこで生命現象の多階層性を考慮して、異なる階層でのシミュレーションを行い、ミクロな階層でのシミュレーション結果を1段階マクロなレベルのシミュレーションにフィードバックすることで、分子論的な理解とマクロなレベルの理解をつなぐことが必要である。そこで本研究では、生理学的に非常に重要だが立体構造情報に乏しく、分子論的なシミュレーションが十分になされていないヒトのチャネルタンパク質のモデル構築からスタートし、分子シミュレーション及び、一階層上のイオンの透過率の定量的計算までを行う基盤を確立し、薬剤やアミノ酸の点変異がイオンチャネルのマクロな機能に与える影響を明らかにする事をめざす。

そのために、まず、構造情報が少ない膜タンパク質の高精度モデリング手法の開発を行う。従来は、膜タンパク質であることを考慮せず水溶性タンパク質と同様の方法でホモロジーモデリングがなされていたが、定量的な解析には膜タンパク質であることをあらわに考慮したより精緻なモデル構築法が必要である。この際、特に我々の強みである構造の評価関数に注力し、新しいモデリング法を開発を行う。次に、これまでは単純な膜で行われていた膜タンパク質の分子動力学 (MD) シミュレーションを、生理条件に近い膜構造を再現した系でシミュレーションを行う。最終的には、変異などの影響を定量的にシミュレートし、上の階層の計算に必要な電流・電圧特性を計算する。それにより、分子階層での細かな違いが上の階層へ及ぼす影響を評価する基盤を構築する。

### 3. 研究の方法

まず既に構造が解かれているタンパク質として **Kv1.2** を対象として、長時間 MD (分子動力学法) で計算を行い、その結果を情報科学的に解析する新しい手法 (状態遷移グラフ解析) の開発を行った。この方法では、微視的な状態を定義し、その状態間の遷移率を求め、イオン透過の全体の様子を可視化することができる (図1)。

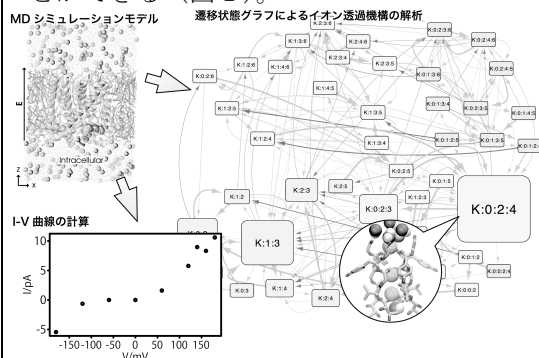


図1：遷移状態グラフによる解析

本プロジェクトのもう一つの重要な課題として、全てのヒトタンパク質の構造が解かれていない事を鑑み、モデル構造でのシミュレーションの実行とイオン透過率の計算のために、高精度モデリング手法の開発を行った。モデル構築に関しては、チャンネルタンパク質が疎水性の脂質二重層の中に極性を持つポアを埋め込まれている特殊性を考慮した配列アラインメントが要求される。また、構築したモデルの妥当性を検証するための評価関数も重要になってくる。これに対して我々は、タンパク質の原子レベル構造評価関数を構築した (Shirota et al, 2011)。

変異体シミュレーションに関しては、実験的にイオン透過が起こらなくなることで知られる Shaker W434F 変異体 (Kv1.2 では W366F に対応)、コンダクタンスが劇的に増加することで知られる Shaker P475D 変異体 (Kv1.2 では P407D に対応)、細胞外側の荷電残基 (アスパラギン酸) を非荷電性残基にした D352SD355S、D355S 変異体、およびそれらを組み合わせた変異体を用いて計算を行った。実験結果から W366F 変異体は C-type inactivation と呼ばれる不活性化が起こると考えられているが、詳細なメカニズムは未だ解明されていない。本研究ではイオン透過を観察するため、系全体に一樣な電場 (z 軸方向) をかけた。各シミュレーションは 60mV (selectivity filter 部分での換算値、0.04V/nm) の電圧をかけて 300 ナノ秒行った。野生型 (WT) および P407D 変異体については、I-V 特性を調べるために 0mV、30mV のシミュレーションも行った。

粗視化モデルでのシミュレーションとしては、力場として Martini 力場を用いた。Martini 力場では重原子 4 個程度を 1 つの粒子で粗視化するため、各残基の側鎖は 1、2 個程度の粒子で表現される。この粗視化モデルをアンキリンに対して適用した。アンキリンは膜近辺に様々なタンパク質を集める足場としての役割を担うが、アンキリンが膜にとどまるメカニズムとしてシステイン残基が S-パルミトイル化されることが示唆されていた。そこで、S-パルミトイル化されたアンキリンと、パルミトイル基が結合していないアンキリンのシミュレーションを行い、比較することで、パルミトイル化の生理学的意味の検討を行った。粗視化シミュレーションに当たっては、S-パルミトイル化システインについては、通常のシステイン残基の側鎖の粒子を脂質のパルミトイル基に置き換えたものを使用した。また、タンパク質の全体構造 (3 次構造) はエラスティックネットワークモデルを用いて固定した。各シミュレーションは 1 マイクロ秒行い、初期構造におけるタンパク質の向きを変えて、パルミトイル化アンキリンの系では 100 本 (計 100 マイクロ秒)、非パルミトイル化アンキリンの系では 10 本 (計 10 マイクロ秒) のシミュレーションを行った。

#### 4. 研究成果

遷移状態グラフによる解析の結果、Kv1.2 のイオン透過のメカニズムがカリウムイオン濃度に応じてスイッチする現象を発見し報告している (Kasahara et al, 2013)。この方法では、微視的状态を定義する必要があるため、全ての膜タンパク質に応用可能では無いが、イオンチャンネルのように結合しているイオン数とその結合部位を状態にすることができる系では利用可能であり汎用性が高い。分子レベルの計算に関しては、他の階層でのシミュレーションとの連携のために、計算の高速化も非常に重要なステップである。これに対して我々は、MD の計算プロトコルの最適化を行い、144CPU コアの計算機で 1ns の計算を 0.5 時間で達成する事ができた。その結果、Kv1.2 に関しては、複数の電圧、複数のイオン濃度での計算を行い、合計 9.1  $\mu$  秒のシミュレーションを行う事ができ、実験値とも整合性の高い電流電圧曲線 (I-V 曲線) を得る事ができた。この曲線を利用することで、細胞階層のシミュレーションにつなぐ方向性を示す事ができた。

モデリングに関しては、ポアの構造を重視した配列アラインメント手法の開発の前段階として、ヒトのプロトンチャンネルである VSOP (Voltage sensor only protein) の構造モデリングを Na<sup>+</sup>チャンネルの電位感受性ドメインを鋳型として行った。その後、VSOP の構造が解析されたことを受けて、結晶構造解析の結果とモデルを比較しながらモデルの妥当性やプロトン透過メカニズムの検討を進めている (大阪大学岡村教授らとの共同研究)。

変異体シミュレーションに関しては、P407D 変異体で、WT に比べてコンダクタンスの増加が見られた。60mV でのイオン透過の様子を図 2 に示す。縦軸は z 軸、各線は各イオンの軌跡を表している。この結果から、P407D 変異体では Cavity へのイオンの侵入が律速にはならず、電圧にもほぼ依存しないことが観察された。

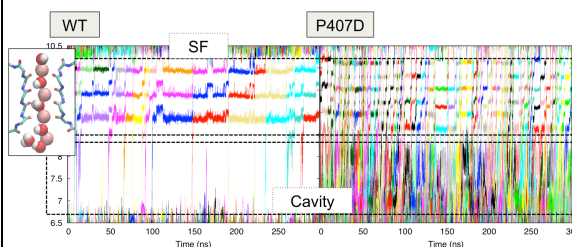


図 2 : イオン透過のトラジェクトリー

次に、W366F 変異体のシミュレーションではイオンの透過はほぼ抑制されていた。構造解析の結果、このイオン透過の抑制は SF の構造変化に起因することが示唆された。この現象は、持続時間は短いものの、WT や他の変異体でも観察された。また、W366F 変異体に P407D 変異を導入することでイオンの透過率の上昇が見られた。最後に、D352SD355S、D355S 変異体では、タンパク質付近 (細胞外



側) のカリウムイオン濃度が低下し、イオン透過機構に変化が見られた。更にこれらの変異体に P407D 変異を導入することで、細胞内外のイオン分布を変化させたときのイオン透過機構の変化も観察した。本研究結果は実験結果を再現してだけでなく、マクロな現象の原子レベルでの構造変化から説明する重要な知見である。(論文投稿準備中)

粗視化モデルによる長時間シミュレーションでは、大阪大学藤原先生との共同研究により、まだ公開されていないアンキリン G の構造を元にシミュレーションを行った。脂質修飾タンパク質アンキリン G は細胞膜上で S-パルミトイル化され、細胞膜にアンカーされることでイオンチャネルなどの足場として機能すると考えられている。その立体構造は明らかになったものの、細胞膜上での動態に関する知見は得られていない。そこで、粗視化分子動力学 (MD) シミュレーションを用いてパルミトイル化の役割や細胞膜との相互作用について考察した。その結果、パルミトイル化アンキリン、および非パルミトイル化アンキリン、どちらの系でも、従来の全原子 MD では再現が難しい時間スケールの現象として、タンパク質の細胞膜への接触現象を観察出来た (図 3)。

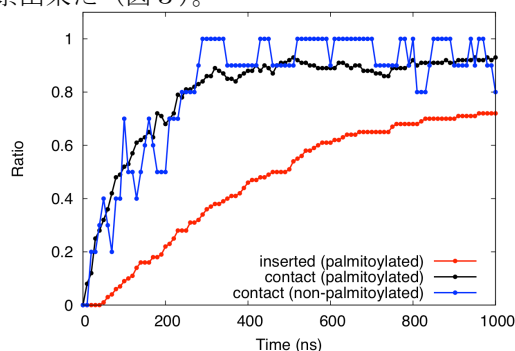


図 3 : 時間に対する接触率 (Ratio) の違い  
また、パルミトイル化アンキリンの系では、膜にパルミトイル基が挿入される現象をシミュレーションし、膜から離れなくなるためパルミトイル化が必須であること、及び非パルミトイル化アンキリンでは相互作用残基が定まらないのに対して、パルミトイル化アンキリンでは相互作用する残基が限られてくることわかった (結果に関しては論文準備中)。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 15 件)

1. Okamura Y, Aoki Y, Obayashi T, Tadaka S, Ito S1, Narise T, [Kinoshita K](#). COXPRESdb in 2015: coexpression database for animal species by DNA-microarray and RNAseq-based expression data with multiple quality assessment systems. *Nucleic Acids Res.* 43, D82-86, 2015 (査読有り)
2. Lensink MF et al, ([Kinoshita K](#), 57 名、30 番目), Blind prediction of interfacial

- water positions in CAPRI. *Proteins*, 82, 620-632, 2014 (査読有り)
3. Kasahara K, [Kinoshita K](#). GIANT: pattern analysis of molecular interactions in 3D structures of protein-small ligand complexes. *BMC Bioinformatics*, 14, 12, 2014 (査読有り)
4. Kasahara K, Shiota M, [Kinoshita K](#). Ion concentration-dependent ion conduction mechanism of a voltage-sensitive potassium channel. *PLoS One*, 8, e56342, 2013 (査読有り)
5. Obayashi T, Okamura Y, Ito S, Tadaka S, Aoki Y, Shiota M, [Kinoshita K](#). ATTED-II in 2014: evaluation of gene coexpression in agriculturally important plants. *Plant Cell Physiol*, 55, e6, 2014 (査読有り)
6. 笠原浩太, 城田松之, 木下賢吾, 分子動力学シミュレーションによるタンパク質動的構造の解明: 電位依存カリウムチャネルでの適用を例とし, *生化学*, 第 85 巻, 656-662, 2013 (査読有り)
7. Obayashi T, Okamura Y, Ito S, Tadaka S, Motoike I, [Kinoshita K](#). COXPRESdb: a database of comparative gene coexpression networks of eleven species for mammals, *Nucleic Acids Res*, 41, D1014-1020, 2013 (査読有り)
8. Kasahara K, Shiota M, [Kinoshita K](#). Comprehensive classification and diversity assessment of atomic contacts in protein-small ligand interactions. *J Chem Inf Model*, 53, 241-248, 2013 (査読有り)
9. Tsuchiya Y, [Kinoshita K](#), Endo S, Wako H, Dynamic features of homodimer interfaces calculated by normal-mode analysis. *Protein Sci.* 21, 1503-1513, 2012 (査読有り)
10. Shiota M, Ishida T, [Kinoshita K](#). Absolute quality evaluation of protein model structures using statistical potentials with respect to the native and reference states. *Proteins*. 79, 5, 1550-1563, 2011 (査読有り)
11. Obayashi T, [Kinoshita K](#). COXPRESdb: a database to compare gene coexpression in seven model animals. *Nucleic Acids Res.* 39, D1016-1022, 2011 (査読有り)
12. Patil A, Nakai K, [Kinoshita K](#). Assessing the utility of gene coexpression stability in combination with correlation in the analysis of protein-protein interaction networks, *BMC Genomics*, 12, S19, 2011 (査読有り)
13. Fleishman SJ et al, ([Kinoshita K](#), 94 名 61 番目), *Community-wide assessment of protein-interface modeling suggests improvements to design methodology.* *J Mol Biol.* 414, 289-302, 2011
14. Obayashi T, [Kinoshita K](#). Coexpression

landscape in ATTED-II: usage of gene list and gene network for various types of pathways. *J Plant Res.* 123, 311-319, 2010 (査読有り)

15. Kasahara K, Kinoshita K, Takagi T, *Ligand-binding site prediction of proteins based on known fragment-fragment interactions. *Bioinformatics.* 26, 12, 1493-1499, 2010 (査読有り)*

[主な学会発表] (計 6件)

1. 木下賢吾, タンパク質機能解析に向けた立体構造情報の活用基盤の構築, 第52回日本生物物理学会, 札幌コンベンションセンター (北海道), 2014年9月26日

2. 近藤寛子, 城田松之, 笠原浩太, 齊藤俊幸, 木下賢吾, Analysis of the ion permeation mechanism of Kv1.2 using the molecular dynamics simulations of a single point mutant, 第52回日本生物物理学会年会, 札幌コンベンションセンター (北海道), 2014年9月26日

3. 木下賢吾, 大規模ゲノム解析研究に必要なスパコン環境の構築, バイオスーパーコンピューティング東北2014, 2014年6月2日、東北大学 (宮城)

4. Kasahara K, Kinoshita K, GIANT: a web-server for analyzing protein-small ligand interactions based on statistically preferred patterns of atomic contacts, ISMB/ECCB 2013, July 22, 2013. Berlin, Germany

5. Kinoshita K, In-Silico Approach to Predict the Biological and Biochemical Functions of Uncharacterized Genes, NIH-Tohoku University-JSPS Symposium, May 10, 2013, Tohoku University

6. Murakami Y, Kanamori E, Sarmiento J, Liang S, Standley D.M, Shirota M, Kinoshita K, Tsuchiya Y, Nakamura H, An Automatic and Semi-automatic Approach for Predicting Protein-Protein Complex Structures, CAPRI Meeting 2013, 2013年4月17日, Utrecht, Portland

[その他]

ホームページ等

<http://bumble.hgc.jp>

<http://giant.hgc.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木下 賢吾 (KINOSHITA, KENGO)

東北大学・大学院情報科学研究科・教授

研究者番号: 60332293

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

無し