

令和元年5月28日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K00415

研究課題名(和文)糖鎖立体構造アンサンブル予測のための新たな構造探索モデルの開発と応用

研究課題名(英文) Development and application of a conformational search model to predict three-dimensional structural ensembles of 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・生命機能科学研究センター・上級研究員

研究者番号：50390670

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：糖鎖は単糖が鎖状につながった生体分子で、生体内でタンパク質や脂質に結合し、細胞間の情報伝達やウイルス感染などの病気とも関わっている。一方、糖鎖は運動性が高く構造も複雑なため、糖鎖の機能や病気に関係する構造情報を得るのは非常に難しい。本課題では、効率の良い構造探索アルゴリズムであるレプリカ交換分子動力学法とメタダイナミクス法を組み合わせ、糖鎖の立体構造アンサンブル(柔軟な生体分子構造を表現する、複数の立体構造からなる構造モデル)を高い信頼性で予測する計算モデルを確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

DNAやRNA、タンパク質については、構造生物学的な研究により機能と構造との関係が次々と明らかになり、それらの理解・情報を用いて薬剤分子も設計されている。一方で、糖鎖の構造は柔らかく複雑であるため、機能に関係する構造情報を得るのが極めて難しい。本研究成果は、計算化学の手法を用いた糖鎖立体構造予測の強力な手段を提供するもので、糖鎖の構造・機能相関を解明する推進力となるとともに、新たな創薬ターゲットの創出にも繋がると期待する。

研究成果の概要(英文)：Glycan is a biomolecule in which monosaccharides are linked through glycosidic linkages. Glycans bind to proteins as well as lipids and are involved in a various biological process, and also relate to diseases such as viral infections. Three-dimensional structural information of glycans is essential for understanding and controlling glycans' functions. However, 3D-structures of glycans are difficult to be obtained by experiment due to the complexity and flexibility of their structures.

In this work, we present a powerful means to computationally predict 3D-structural ensembles (a structural model consisting of multiple three-dimensional structures that represent flexible biomolecular structures) of glycans. We show that, using a combined method of replica exchange molecular dynamics with metadynamics, it is possible to enhance the conformational sampling of glycans and to predict 3D-structural ensembles of N-glycans in high precision.

研究分野：計算化学、生物物理、バイオインフォマティクス、情報学

キーワード：糖鎖 立体構造アンサンブル 分子動力学シミュレーション レプリカ交換法 拡張アンサンブル法

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生体内のタンパク質の 50%以上が糖鎖修飾を受けている。膜タンパク質に至ってはその殆どに糖鎖が結合している。タンパク質や脂質に結合した糖鎖は、生体分子のもつ化学情報を飛躍的に増大させ、細胞の発生や分化、増殖、及び免疫応答といった幅広い生命現象で重要な役割を果たしていることがわかってきた。さらに、がんやウィルス感染といった重大疾患との関係も明らかになってきており、機能や疾患と関わる糖鎖構造の特定が求められている。糖鎖構造は、糖を繋ぐ多様なグリコシド結合により多くの回転異性体をもつ。さらに、核酸やアミノ酸とは異なり分岐構造をもつことで立体構造はさらに複雑・多様化する。この様な糖鎖構造固有の柔軟性や多様性が原因で、X 線結晶構造解析をはじめ従来の構造生物学的な解析は困難を極めている。NMR 分析やイオンモビリティ質量分析の技術的な進歩に伴い複雑な糖鎖構造の識別や定量解析が可能になってきたが、立体構造情報は極めて限定的な状況である。

近年、計算機を用いた分子シミュレーションは、新たな技術も多数開発され、DNA やタンパク質、脂質膜の構造生物学分野で有力な手段となっている。申請者らは、タンパク質の立体構造予測で広く用いられているレプリカ交換分子動力学法 (REMD 法)(Y. Sugita and Y. Okamoto, Chem. Phys. Lett. 1999) を一早く糖鎖の問題に適用し、溶液中での N 型複合型分岐糖鎖の立体構造分布、化学修飾による分布変化、重み付き NMR データ、イオンモビリティ質量分析データの予測基盤を構築してきた (S. Re et al. Biophys. J. 2011, W. Nishima et al. J. Phys. Chem. B 2012, S. Re et al. Biophys. Rev. 2012, Y. Yamaguchi et al. Rapid Commun. Mass Spectrom. 2012)。この手法では、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の探索を行う。糖鎖の立体構造計算を大きく前進させたが、新たな課題も見えてきた。糖鎖の回転異性体間を遷移するには高い活性化障壁を超えなければならず、それらを十分に探索するためには非常に高い温度、つまり多くのレプリカが必要となる。必要な計算資源は急激に増大し、計算の収束も非常に長い時間を要する。実際に生物機能や疾患と関係する複雑で大きな糖鎖を扱うためには、この問題の解決が必要不可欠な状況であった。

2. 研究の目的

本申請課題では、REMD 法とともに広く用いられているメタダイナミクス法 (MTD 法) に着目した。この手法は、ポテンシャル面上を探索する際に、辿った経路に次々とバイアスポテンシャルを埋めて行くことで活性化障壁を乗り越え、自由エネルギー面上の効率的な探索を行うものである。構造変化や化学反応を表す「反応座標」が明確な場合に極めて有効に働く。申請者らは、これまでの糖鎖構造計算で、(1)糖鎖の全体構造が分岐部分の局所的なグリコシド結合の配向(2つの回転角)と強く相関しており、(2)このグリコシド結合の回転が高い活性化障壁を伴うことを見出していた。そこで、局所的なグリコシド結合の回転を全体構造の変化を表す「反応座標」した MTD 法を導入し、複雑で大きな糖鎖へも応用可能な、高精度・高効率立体構造アンサンブル計算法の確立を目的とした。

3. 研究の方法

MTD 法と REMD 法を組み合わせた手法として、近年同研究室の Raimondas 博士らが開発したレプリカ状態交換 MTD 法 (RSE-MTD 法)(R. Galvelis and Y. Sugita, J. Comput. Chem. 2015) を用いた。この手法では、反応座標の異なる複数のレプリカに対してメタダイナミクスを並列・独立に実行し、ある頻度でバイアスポテンシャルを交換することで、広い構造空間を効率的に探索することが出来る。少ないレプリカ数で効率的な構造探索を可能にする利点がある。豊富な実験データ (X 線結晶構造データや NMR データ) が得られている 2 糖類を対象としたテスト計算を実施した後、典型的な N 型複合型分岐糖鎖の立体構造アンサンブル解析を実施した。新たな計算モデルの有効性について、他の構造探索法を用いた計算との比較のもとで検証した。すべての計算は、GENESIS プログラム (J. Jung et al. Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Mol. Sci. 2015, C. Kobayashi et al. J. Comput. Chem. 2017) を用いて行った。

4. 研究成果

(1) レプリカ状態交換 MTD 法 (RSE-MTD 法) を用いた N 型複合型分岐糖鎖の計算

溶液中の N 型複合型分岐糖鎖 (図 1a) を対象に、メタダイナミクス法 (MTD 法)、レプリカ交換 MD 法 (REMD 法)、レプリカ状態交換 MTD 法 (RSE-MTD 法) を用いた立体構造計算を実施し、構造探索効率を比較した。N 型複合型分岐糖鎖については、1,6-結合の角の回転に伴うエネルギー障壁が構造探索を妨げることがわかっている。MTD 法の計算

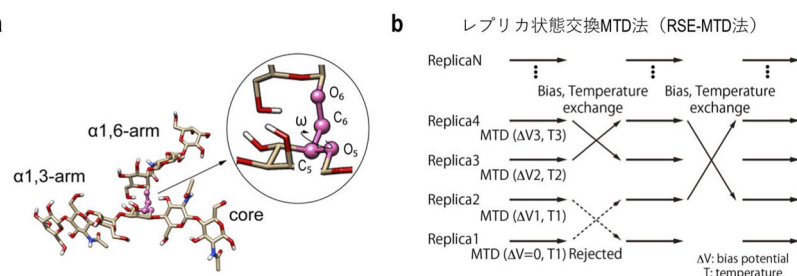


図 1 計算に用いた N 型糖鎖と RSE-MTD 法

では、この角にバイアスポテンシャルを加えた。REMD法の計算には、温度をパラメータとした64レプリカを用いた ($T = 300\text{-}497\text{ K}$)。両者を組み合わせたRSE-MTD法の計算には、温度の異なる64レプリカを用いた ($T = 300\text{-}497\text{ K}$)。その内1つのレプリカはバイアスポテンシャル無しで計算し、残りの63レプリカにはMTD法の計算と同様に角にバイアスポテンシャル

を加えた(図1b)。全ての計算を、異なる2つの初期構造(角の配座が gauche-gauche (s(gg))と gauche-trans (s(gt))から始め、収束性を検討した。図2に、3種類の手法を用いた計算から得られた角の時間変化を示す。MTD法を用いた計算では、バイアスポテンシャルを加えたことで、角の配座が十分に探索されているが、角以外の自由度を十分に探索することはできない。REMD法の計算では、レプリカ間で温度を交換することによって、全自由度の探索効率上がるが、角に関してはエネルギー障壁が高く十分な探索が行われていない。一方で、両者を組み合わせたRSE-MTD法の計算では、角はもちろん、他の自由度の構造探索も十分に行っていることを確認した。図3は3種類の計算から求めた自由エネルギープロファイルを示す。MTD法とREMD法を用いた計算では、初期構造によって自由エネルギープロファイルの形状に違いが見られる。例えば、MTD法のs(gg)のプロファイルに見られる $(\eta, \phi) = (-30^\circ, 120^\circ)$ の安定状態は、s(gt)のプロファイルには見られない。対照的に、RSE-MTD法の計算では、s(gg)とs(gt)の両プロファイルがほぼ一致しており、初期構造に依存することなく、構造探索が十分に行われたことを確認できる。RSE-MTD法については、300 Kでバイアスポテンシャルの異なる4レプリカを用いた計算スキームも検討した。その内1つのレプリカはバイアスポテンシャル無しで計算し、残りの3レプリカには角を含む3つの角度に異なるバイアスポテンシャルを加えた。前者の64レプリカを用いたRSE-MTD法の計算に比べ、構造探索の収束性は劣るものの、少ない計算

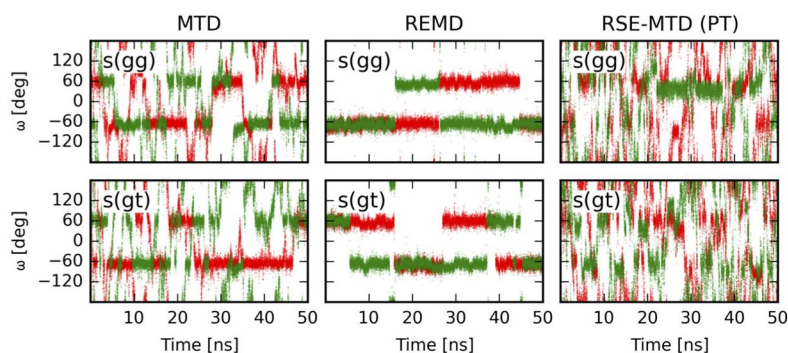


図2 計算から得られた角の時間変化

資源で妥当な結果が得られることを確認した。RSE-MTD法から得られた角の配座分布(gg:gt = 52:48)は、初期構造に依存せず、実験値(gg:gt = 65:35)とも良く一致する。以上の結果から、RSE-MTD法は複雑で大きな糖鎖へも応用可能な、高精度・高効率立体構造アンサンブル計算法として有効であると結論する。また、温度の異なるレプリカを用いたスキーム(64レプリカ)とバイアスポテンシャルの異なるレプリカを用いたスキーム(4レプリカ)を検討し、前者は高精度の結果を与えるのに対して、後者は低資源で妥当な結果を得るのに有効であることも示した。後者を用いれば、複雑で大きな糖鎖や糖タンパク質の計算も十分に可能である。

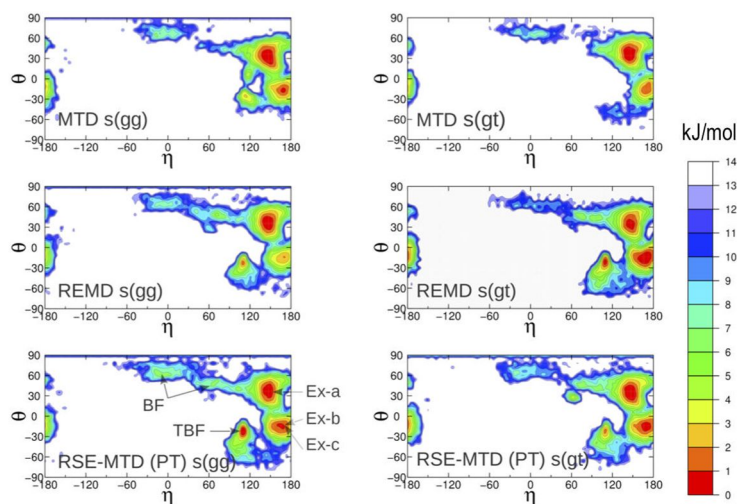


図3 自由エネルギープロファイル

(2) その他の手法を用いた糖鎖立体構造計算

糖鎖の立体構造探索を効率化しうる手法として、部分系のみでレプリカ交換を行う Replica-Exchange with Solute Tempering法 (REST法)(L. Wang et al. J. Phys. Chem. B 2011, P. Liu et al. Proc. Natl. Acad. Sci. 2005)やバイアスポテンシャルを加える Gaussian accelerated Molecular Dynamics法 (GaMD法)(Y. Miao et al. J. Chem. Theory Comput. 2015)を用いた計算も実施した。REST法については、REST法を一般化した generalized REST法 (gREST法)(M. Kamiya and Y. Sugita, J. Chem. Phys. 2018)を用いた。この方法の利点は、solute領域(部分系)を自由に定義できる点にあり、今回は、糖鎖の二面角エネルギー項を solute領域とした(4レプリカ、 $T = 300\text{-}915\text{ K}$)。GaMD法については、全体のポテンシャルエネルギーと二面角のポテンシャルエネルギーにブーストポテンシャルを加える dual-boost GaMD法を用いた。100 nsの間に起こる角の遷移回数を比較すると、通常のMD計算が0.2回なのに対して、GaMD法では2.1~2.6回、gREST法では3.6~3.7回と探索効率が大幅に向上することを確

認した。REMD法の6.3~6.9回に比べると効率は下がるものの、計算コストを大幅に軽減できるため、複雑で大きな糖鎖や糖タンパク質の計算に有用である。

(3) REMD法に基づいたドッキング計算

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課題の1つである。計算機を用いたドッキング計算は、認識機構を原子解像度で理解・予測する手段として広く用いられている。しかし、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構造柔軟性を示すため、タンパク質とリガンドの構造柔軟性を十分に取り込む必要があり、従来の鍵と鍵穴モデルに基づいた計算では信頼できる結果を得るのが難しい。本課題では、REMD法に基づいたタンパク質-リガンド結合計算も進め、今後、糖鎖-タンパク質受容体の結合計算に応用可能な計算モデルも確立した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計4件)

Suyong Re, Yoshiaki Yamaguchi, Yuji Sugita. Molecular dynamics of glycan. Trends in Glycoscience and Glycotechnology, 査読有, (印刷中)

Hiraku Oshima, Suyong Re, Masayoshi Sakakura, Hideo Takahashi, Yuji Sugita. Population Shift Mechanism for Partial Agonism of AMPA Receptor. Biophysical Journal, 査読有, 2019, 116, 57-68.

DOI: 10.1016/j.bpj.2018.11.3122

Suyong Re, Shigehisa Watabe, Wataru Nishima, Eiro Muneyuki, Yoshiaki Yamaguchi, Alexander D. MacKerell Jr. and Yuji Sugita. Characterization of Conformational Ensembles of Protonated N-Glycans in the Gas-Phase. Scientific Reports, 査読有, 2018, 8, 1644.

DOI: 10.1038/s41598-018-20012-0

Raimondas Galvelis, Suyong Re, and Yuji Sugita. Enhanced Conformational Sampling of N-Glycans in Solution with Replica State Exchange Metadynamics. Journal of Chemical Theory and Computation, 査読有, 2017, 13, 1934-1942.

DOI: 10.1021/acs.jctc.7b00079

[学会発表](計13件)

李秀栄、レプリカ交換法を用いたタンパク質-リガンド結合計算、H30年度第2回近畿大学先端技術総合研究所高圧力蛋白質研究センターセミナー(招待講演)、2019年2月19日(和歌山)

Suyong Re, Hiraku Oshima, Kento Kasahara, Motoshi Kamiya, Yuji Sugita, Revealing Drug-Target Binding Pathway using Two-dimensional Replica-Exchange Molecular Dynamics Method, The 1st R-CCS International Symposium, 2019年2月15日~17日(神戸)

李秀栄、尾嶋拓、新津藍、杉田有治、拡張アンサンブル法に基づく細胞膜受容体・リガンド結合の自由エネルギー解析、第5回「京」を中核とするHPCIシステム利用研究課題成果報告会、2018年11月2日(東京)

李秀栄、ダイナミックドッキングによる結合親和性予測、CBI学会2018年大会(招待講演)、2018年10月9日~11日(東京)

李秀栄、尾嶋拓、神谷基司、杉田有治、Extensive molecular dynamics sampling characterizes ligand binding pathway to Src kinase、第56回日本生物物理学会年会、2018年9月16日~21日(岡山)

Suyong Re, Hiraku Oshima, Motoshi Kamiya, Yuji Sugita, REMD-based flexible docking, 日本化学会第98春季年会, 2018年3月20日~23日(千葉)

李秀栄、分子動力学シミュレーションによる生体分子機能モデリング、第1回近畿大学生物理工学部HPCシンポジウム(招待講演)、2018年3月18日(和歌山)

李秀栄、Flexible Docking using Replica-Exchange Molecular Dynamics Simulation、CBI学会2017年大会(招待講演)、2017年10月3日~5日(東京)

Suyong Re, Hiraku Oshima, Motoshi Kamiya, Yuji Sugita, Incorporation of protein flexibility into ligand binding simulation, 第55回日本生物物理学会年会, 2017年9月19日~21日(熊本)

李秀栄、レプリカ交換分子動力学法を用いたフレキシブルドッキング、第3回ポスト「京」重点課題1ワークショップ、2017年8月9日(東京)

李秀栄、渡部茂久、二島渉、宗行英朗、山口芳樹、杉田有治、イオンモビリティ質量分析における衝突断面積の物理化学的な決定因子、第36回日本糖質学会年会、2017年7月19日~21日(旭川)

李秀栄、グライコフォームを予測する革新的理論化学、第35回日本糖質学会年会(招待講演)、2016年9月1日~3日(高知)

李秀栄、杉田有治、Modeling flexible biomolecules by MD simulations with enhanced

sampling、RIKEN QBiC Retreat 2016、2016年6月20日～21日(淡路)

〔図書〕(計1件)

Yuji Sugita, Motoshi Kamiya, Hiraku Oshima, Suyong Re. Replica Exchange Methods for Biomolecular Simulations. Biomolecular Simulations: Methods and Protocols, Springer, (印刷中)

6. 研究組織

(1) 研究分担者

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：杉田 有治

ローマ字氏名：(Yuji SUGITA)

研究協力者氏名：山口 芳樹

ローマ字氏名：(Yoshiki YAMAGUCHI)

研究協力者氏名：ガルベリス ライモンダス

ローマ字氏名：(Raimondas GALVELIS)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。