

令和元年5月31日現在

機関番号：25403

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07325

研究課題名(和文) タンパク質構造形成の高次構造依存性の解明と高次構造依存型分子力場の開発

研究課題名(英文) Elucidation of dependence of secondary structure on the formation of protein structure and development of new forcefield incorporating effects of secondary structure

研究代表者

鷹野 優 (Takano, Yu)

広島市立大学・情報科学研究科・教授

研究者番号：30403017

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：タンパク質の機能発現の理解に必須である古典力学分子シミュレーション(MD)で用いられている分子力場の精度が不十分であるため、計算結果の信頼性には問題が残っている。本申請では、「アミノ酸主鎖の水素結合エネルギーには高次構造依存性がある」といった現象にもとづき、信頼性の高い量子化学計算を用いてタンパク質構造形成に重要である水素結合の高次構造依存性、特にヘリックス中では水素結合エネルギーが通常のペプチド基同士のものに比べて弱くなっていることを示した。またその起源が隣接するペプチド基による水素結合を作るC=O基やN-H基の脱分極効果に由来することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

タンパク質構造形成に重要であるアミノ酸主鎖の水素結合エネルギーには高次構造依存性が代表的な二次構造であるヘリックスに関して示され、その起源も明らかにした。この成果は、構造形成に関わる水素結合が二次構造の影響を受けているという力場の本質的な問題を顕わにし、二次構造にもとづく分子力場の開発の必要性を示した。今後、高次構造依存性をとりこんだ新たな力場により、これまで力場の問題のために到達できないと思われていたミリ秒から秒にわたる長時間MDによるタンパク質の動的構造の追跡にも挑戦することが可能となり、タンパク質構造予測等の計算の信頼性が向上し、タンパク質設計による新規機能性分子の創成も期待される。

研究成果の概要(英文)：The classical molecular dynamics simulation is important for the understanding of the protein functions. However, the accuracy of the molecular force field used in the simulation is insufficient. Since hydrogen bonds (H-bonds) in protein backbones are essential to form their characteristic three-dimensional structures based on their ordered secondary structures,  $\alpha$ -helices and  $\beta$ -sheets, H-bond interaction energies in  $\alpha$ -helices of short alanine peptides were systematically examined by precise DFT calculations in this project. Our computations showed that H-bond interaction energies in  $\alpha$ -helices were always significantly weaker than those in the minimal H-bond models, in which only H-bond donors and acceptors exist. We found that the reduced H-bond energy originated from the depolarizations of both the H-bond donor and acceptor groups, due to the repulsive interactions with the neighboring polar peptide groups in the  $\alpha$ -helix backbone.

研究分野：生物物理学

キーワード：水素結合 タンパク質 高次構造 構造形成 二次構造

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

タンパク質は、生命活動に必要な機能の発揮のため、進化の過程でその構造が最適化されている。また、それらの機能が有効に発揮されるように、相互作用する対象や環境に応じて構造を変える。このような複雑で動的なタンパク質を定量的に理解し構造や機能を予測する手段として、静的な構造を動的な構造へと翻訳する手段が必要となる。そのような中、タンパク質の分子動力学 (MD: Molecular Dynamics) シミュレーションは、構造生物学による静的構造からダイナミックな特性を理解する手法として広く利用されつつある。しかしながら、同時にこれらの MD シミュレーションで使わざるを得ない力場として高精度のものがない、という問題点がクローズアップされてきた。タンパク質の立体構造の階層性を鑑みるに、 $\alpha$ ヘリックスや $\beta$ シートなどの二次構造はそのような三次元構造を構成する重要な基本ブロックであり、その形成に必要な相互作用を定量的に見積もることこそが、タンパク質の三次元構造形成原理に必須であると考えた。そこでポリアラニンからなるモデルペプチドを用いて、代表的な二次構造である $\alpha$ ヘリックスと平行および反平行 $\beta$ シートの形成に関わる相互作用に対して、密度汎関数法 (B97D/6-31+G(d)) と分子力学法 (AMBER99-SB) との比較を行った。 $\alpha$ ヘリックスと $\beta$ シート形成に関わる水素結合の数と相互作用エネルギーとの関係から、 $\beta$ シートを形成する相互作用に関しては、分子力学法は密度汎関数法と同程度の結果を与えているものの、 $\alpha$ ヘリックスの形成に関しては、分子力学法は、密度汎関数法に比べて相互作用を過大評価していることが明らかとなった。このことは、構造形成にはたらく水素結合などの相互作用が二次構造の影響を受けており、二次構造にもとづく分子力場の改良の必要性を示唆している。

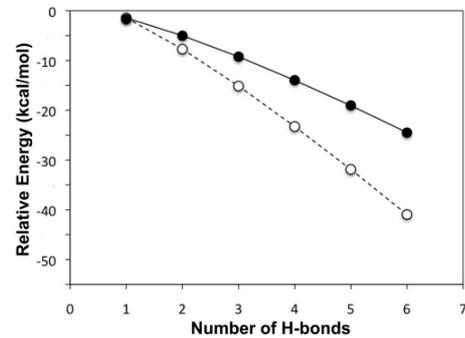


図 1: アラニン 3~8 残基のペプチドによる  $\alpha$ -ヘリックス構造の伸展構造からのエネルギー差  $\Delta E^{\text{REF}}$ 。B97D による量子化学計算結果 (黒丸) と、AMBER99-SB 古典力場による計算結果 (白丸と点線) とを示す。

### 2. 研究の目的

タンパク質の機能発現の理解には長時間の古典力学分子シミュレーションが今や必須なツールである。しかしながら、そこで用いられている分子力場の精度が不十分であるため計算結果の信頼性には問題が残っている。そこで、本申請では高精度の古典力学分子シミュレーションのため、これまでの我々の研究で明らかにした「アミノ酸主鎖の水素結合エネルギーには高次構造依存性がある」といった現象にもとづき、信頼性の高い量子化学計算を用いてタンパク質構造形成に重要である水素結合の高次構造依存性の起源を明らかにし、高次構造に依存する全く新規な力場関数とそのパラメータを開発するなど、第一原理計算による立体構造形成機序の解明を目的とする。

### 3. 研究の方法

$\alpha$ ヘリックスの水素結合エネルギーについて、図 2 に示す 3 つのモデルペプチドを用いて検討を行った。いずれもポリアラニンの N 末端をアセチル基 (Ace) で、C 末端をメチル基 (Nme) でキャップした分子 (Ace-{Ala}<sub>n</sub>-Nme、本研究では  $n = 3 \sim 8$ ) である。 $\alpha$ -helical structure モデル (AH モデル) はヘリックス全体を含むモデル、Single turn モデル (ST モデル) は 1 つの水素結合ペアを含む 3 残基のみのモデル、Minimal Hydrogen bond モデル (MH モデル) は水素結合ペアの最小単位のモデル (Ace-Nme  $\times 2$ ) となっている。各モデルペプチドの構造は、二面角を固定して構造最適化を行うことで作成した ( $\varphi = -57^\circ$ ,  $\psi = -47^\circ$ ,  $\omega = 180^\circ$ )。

水素結合エネルギーの評価には molecular tailoring approach (MTA) 法を用いた。MTA 法では、2 つの残基の間の相互作用エネルギー  $\Delta E^{\text{Hbond}}$  は以下の式で計算される:

$$\Delta E^{\text{Hbond}} = E(G_0) - E(G_1) - E(G_2) + E(G_{12}) \quad (\text{式 1})$$

ここで、 $E(G_0)$  は系全体のエネルギー、 $E(G_1)$  はアクセプターグループを除いたペプチドのエネルギー、 $E(G_2)$  はドナーグループを除いたペプチドのエネルギー、 $E(G_{12})$  はドナーおよびアクセプターの双方を除いたペプチドのエネルギーを表す。オリジナルの MTA 法では、 $E(G_0)$  はフラグメントの全ての可能な組み合わせから計算されるが、モデルペプチドの系全体のエネルギーとの差が 0.1

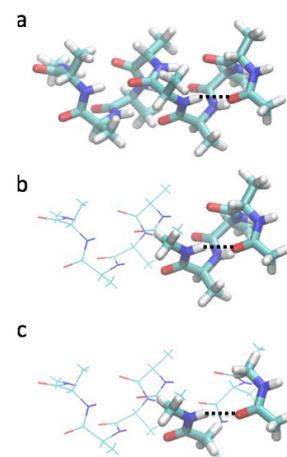


図 2:  $\alpha$ ヘリックスのモデル、Ace-Ala<sub>n</sub>-Nme ( $n = 8$ )。 (a) ヘリックス全体を含む AH モデル、 (b) 1 つの水素結合ペアを含む 3 残基のみの ST モデル、 (c) 水素結合ペアの最小単位の MH モデル

kcal/mol 未満と小さいため、本研究ではモデルペプチドの系全体のエネルギーを  $E(G_0)$  として用いた。また、以下の式 2 により Stabilization Energy (SE) も計算した。

$$\Delta E_{MH}^{SE} = E_{MH}^{N\&C} - (E_{MH}^N + E_{MH}^C) \quad (\text{式 2})$$

ここで、 $E_{MH}^{N\&C}$  は MH モデル全体のエネルギーであり、 $E_{MH}^N$  および  $E_{MH}^C$  は、それぞれ N 末側、C 末側の片方のペプチドのみのエネルギーを表す。構造最適化およびエネルギー計算には密度汎関数法である B97D/6-31+G(d)法を用い、ソフトウェアは Gaussian09 を使用した。さらに、比較のために、分子力場による水素結合エネルギーの計算 (MM) も行った。分子力場には Amber99SB 力場を用いた。

#### 4. 研究成果

AH モデル、ST モデル、および MM の水素結合エネルギーを MH モデルの水素結合エネルギーに対してプロットした結果を図 3 に示す。AH モデル、ST モデル、MM とともに MH モデルの水素結合エネルギーとよく相関しており、相関係数はそれぞれ 0.885, 0.987, 0.975 だった。AH モデルおよび ST モデルにおける水素結合エネルギーが MH モデルと比べて高くなっているのは、隣接する残基との相互作用の影響と考えられる。MM のエネルギー値は MH モデルの値に近いことから、分子力場で計算された水素結合エネルギーは過大評価されていることが示唆された。また、SE 値も MH モデルの値と非常によく相関しており、N 末端を除いてそれらの差は一定の値 (0.93 kcal/mol) をとっていた。

分子力場は、 $\alpha$ ヘリックスに関して、量子化学計算に比べて相互作用を過大評価していること、フォールディングのシミュレーションでも、天然構造が $\beta$ ストランドになると知られているものが $\alpha$ ヘリックスになることを知られていたが、その原因に関しては長年明らかではなかった。本申請による研究の結果、 $\alpha$ ヘリックス内の水素結合エネルギーが通常のペプチド同士の水素結合エネルギーより弱くなっていること (図 3) それ隣接するペプチド基による水素結合を作る C=O 基や N-H 基の脱分極効果に由来することを明らかにすることができた。また、以上の結果は、構造形成に関わる水素結合などの静電相互作用が二次構造の影響を受けていることを示唆している。

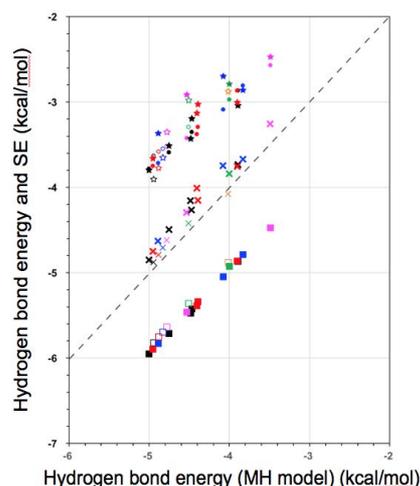


図 3: 水素結合エネルギーに関する MH モデルとの相関: AH モデル(★), SH モデル(●), MM(×), SE(■)。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 9 件)

- (1) H. X. Kondo, A. Kusaka, C. K. Kitakawa, J. Otani, S. Yamanaka, H. Nakamura, Y. Takano\*, "Hydrogen bond energies in  $\alpha$ -helical peptides revealed by precise DFT calculations and molecular tailoring approach", *J. Comput. Chem.* in press. DOI: 10.1002/jcc.25859
- (2) T. Saito\*, M. Fujiwara, Y. Takano, "Quantitative assessment of rPM6 for fluorine- and chlorine-containing metal complexes: Comparison with experimental, first-principles and other semiempirical results", *Molecules* **23**, 3332 (2018). DOI: 10.3390/molecules23123332
- (3) T. Saito\*, Y. Takano, "Transition state search using rPM6: iron- and manganese-catalyzed oxidation reactions as a test case", *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **91**, 1377–1389 (2018). DOI: 10.1246/bcsj.20180119
- (4) Y. Kanematsu\*, H. X. Kondo, Y. Imada, Y. Takano\*, *Chem. Phys. Lett.* **710**, 108–112 (2018). DOI: 10.1016/j.cplett.2018.08.071
- (5) T. Saito\*, Y. Takano, "rPM6 parameters for phosphorus and sulfur containing open-shell molecules", *Mol. Phys.* **116**, 602–610 (2018). DOI: 10.1080/00268976.2017.1377849
- (6) Y. Imada, H. Nakamura, Y. Takano\*, "Density functional study of porphyrin distortion effects on redox potential of heme", *J. Comput. Chem.* **39**, 143–150 (2018). DOI: 10.1002/jcc.25058
- (7) T. Saito\*, Y. Kitagawa, T. Kawakami, S. Yamanaka, M. Okumura, Y. Takano, "Assessment of semi-empirical molecular orbital calculations for describing magnetic interactions", *Polyhedron* **136**, 52–57 (2017). DOI: 10.1016/j.poly.2017.02.029
- (8) T. Saito\*, Y. Takano, "rPM6 parameters for manganese and application to transition state search for oxidation reactions of cyclohexene by manganese(IV)-oxo species", *Chem. Lett.* **46**, 1567–1569 (2017). DOI: 10.1246/cl.170687
- (9) T. Saito\*, Y. Kitagawa, Y. Takano, "Reparameterization of PM6 applied to organic diradical molecules", *J. Phys. Chem. A* **120**, 8750–8760 (2016). DOI: 10.1021/acs.jpca.6b08530

〔学会発表〕(計 19 件)

・招待講演

- (1) 鷹野優, "コンピュータシミュレーションでタンパク質のはたらきを理解する", 日本薬学会

東海支部特別講演会, 名城大学, 2017 年 12 月 6 日

(2) 鷹野優, "コンピュータを使って金属タンパク質の活性サイトを観察・分類し、しくみを理解する", 大阪大学大学院理学研究科化学専攻・高分子学専攻 平成 29 年度第 2 回化学・高分子コロキウム講演会, 大阪大学, 2017 年 12 月 4 日

(3) Yu Takano, Yusuke Kanematsu, Yasuhiro Imada, "Elucidation of structure–function relationship of biological active sites by molecular simulation", 第 54 回日本生物物理学会年会, つくば国際会議場, 2016 年 11 月 25 日

・国際学会

(4) Naoki Tanabe, Ryo Kiribayashi, Hiroko X. Kondo, Daisuke Kuroda, Toru Saito, Jiro Kohda, Akimitsu Kugimiya, Yasuhisa Nakano, Kosuke Tsumoto, Yu Takano, "Molecular dynamics study of structural fluctuations in CDR-H3 of anti-HIV antibodies PG9 and PG16", The 59th Sanibel Symposium, The King and Prince Golf & Beach Resort, Georgia, Feb. 18, 2019 [poster]

(5) Naoki Tanabe, Ryo Kiribayashi, Hiroko X. Kondo, Daisuke Kuroda, Toru Saito, Jiro Kohda, Akimitsu Kugimiya, Yasuhisa Nakano, Kosuke Tsumoto, Yu Takano, "Molecular dynamics study of structural fluctuations in CDR-H3 of anti-HIV antibodies PG9 and PG16", Asian Biophysics Association Symposium in conjunction with the Australian Society for Biophysics Meeting (ABA-ASB), RMIT University, Melbourne, Dec. 3, 2018 [Poster]

(6) Ryo Kiribayashi, Hiroko X. Kondo, Daisuke Kuroda, Toru Saito, Jiro Kohda, Akimitsu Kugimiya, Yasuhisa Nakano, Yu Takano, "Molecular dynamics study of mutation effects on the neutralizing ability in CDR-H3 of an anti-HIV antibody PG16", Swedish-Japanese Workshop on Nano-Structure Science by Novel Light Sources, Lundmarksalen, Lund University, Lund, Oct. 2, 2017 [Poster]

(7) Ryo Kiribayashi, Hiroko X. Kondo, Daisuke Kuroda, Toru Saito, Jiro Kohda, Akimitsu Kugimiya, Yasuhisa Nakano, Yu Takano, "Molecular dynamics study of the structural stability of CDR-H3 of anti-HIV neutralizing antibody PG16", The 57th Sanibel Symposium, The King and Prince Golf & Beach Resort, Georgia, February 2017 [poster]

・国内学会

(8) 鷹野優, 草鹿あゆみ, 中村春木, "Molecular Tailoring Approach を用いた  $\alpha$  ヘリックスに働く相互作用の量子化学的解析", 第 16 回日本蛋白質科学会年会, 福岡国際会議場, 2016 年 6 月 8 日 [ポスター]

(9) 近藤寛子, 草鹿あゆみ, 中村 春木, 鷹野優, " $\alpha$ ヘリックス構造における相互作用エネルギーの理論解析", 第 32 回分子シミュレーション討論会, 産業技術総合研究所, 2018 年 11 月 29 日

(10) 田邊直己, 桐林遼, 近藤寛子, 黒田大祐, 齋藤徹, 香田次郎, 釘宮章光, 中野靖久, 鷹野優, "Molecular dynamics study of structural changes in CDR-H3 of anti-HIV antibodies PG9 and PG16", 第 56 回日本生物物理学会年会, 岡山大学, 2018 年 9 月 15 日 [ポスター]

(11) 田邊直己, 桐林遼, 近藤寛子, 黒田大祐, 齋藤徹, 香田次郎, 釘宮章光, 中野靖久, 鷹野優, "分子動力学法を用いた抗 HIV 中和抗体 PG9 と PG16 の構造変化の比較", 第 18 回日本蛋白質科学会年会, 朱鷺メッセ, 2018 年 6 月 27 日 [ポスター]

(12) 桐林遼, 近藤寛子, 黒田大祐, 齋藤徹, 香田次郎, 釘宮章光, 中野靖久, 鷹野優, "MD 法による抗 HIV 抗体 PG16 の CDR-H3 の変異における中和能への影響の解析", 2017 年日本化学会中国四国支部大会鳥取大会, 鳥取産業体育館・鳥取大学鳥取キャンパス, 2017 年 11 月 12 日 [口頭]

(13) Ryo Kiribayashi, Hiroko X. Kondo, Daisuke Kuroda, Toru Saito, Jiro Kohda, Akimitsu Kugimiya, Yasuhisa Nakano, Yu Takano, "Molecular dynamics study of a distant mutation effect on the neutralizing ability in CDR-H3 of an anti-HIV antibody PG16", 第 55 回日本生物物理学会年会, 熊本大学, 2017 年 9 月 20 日 [ポスター]

(14) 桐林遼, 近藤寛子, 黒田大祐, 齋藤徹, 香田次郎, 釘宮章光, 中野靖久, 鷹野優, "分子動力学シミュレーションによる抗 HIV 中和抗体 PG16 の CDR-H3 における構造剛性の解析", 第 17 回日本蛋白質科学会年会, 仙台国際センター, 2017 年 6 月 21 日 [ポスター]

(15) 桐林遼, 近藤寛子, 黒田大祐, 齋藤徹, 香田次郎, 釘宮章光, 中野靖久, 鷹野優, "MD シミュレーションによる抗 HIV 中和抗体 PG16 の CDR-H3 における構造揺らぎの解析", 日本化学会第 97 春季年会, 慶應義塾大学日吉キャンパス, 2017 年 3 月 17 日 [口頭]

(16) Ryo Kiribayashi, Hiroko X. Kondo, Daisuke Kuroda, Toru Saito, Jiro Kohda, Akimitsu Kugimiya, Yasuhisa Nakano, Yu Takano, "Molecular dynamics study of the structural rigidity of CDR-H3 of anti-HIV neutralizing antibody PG16", 第 54 回日本生物物理学会年会, つくば国際会議場, 2016 年 11 月 26 日

(17) 桐林遼, 近藤寛子, 黒田大祐, 齋藤徹, 香田次郎, 釘宮章光, 中野靖久, 鷹野優, "Molecular dynamics study of the structural rigidity of CDR-H3 of anti-HIV neutralizing antibody PG16", 2016 年日本化学会中国四国支部大会香川大会, 香川大学幸町キャンパス, 2016 年 11 月 5 日 [ポスター]

(18) 桐林遼, 近藤寛子, 黒田大祐, 香田次郎, 齋藤徹, 釘宮章光, 中野靖久, 津本浩平, 鷹野優, "分子動力学シミュレーションによる抗 HIV 中和抗体 PG16 の CDR-H3 の変異における構造への影響", 第 5 回生体分子科学研究会, 休暇村南阿蘇, 2018 年 3 月 6 日 [口頭]

(19) 鷹野優, "分子動力学法によるリパーゼのアシル化反応における四面体中間体のコンフォーメーション解析", 第 4 回生命分子科学研究会, 定山溪温泉鹿の湯, 2017 年 3 月 6 日 [ポスター]

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：中村 春木

ローマ字氏名：NAKAMURA Haruki

研究協力者氏名：齋藤 徹

ローマ字氏名：SAITO Toru

研究協力者氏名：近藤 寛子

ローマ字氏名：KONDO Hiroko

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。