

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成30年 5月16日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14711

研究課題名(和文) 翻訳後修飾された蛋白質天然変性領域におけるマルチステリーの計算科学研究

研究課題名(英文) Computational study for multistery of intrinsic disordered region of proteins with post-translational modification

研究代表者

中村 春木 (Nakamura, Haruki)

大阪大学・たんぱく質研究所・教授

研究者番号：80134485

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：天然変性領域(IDR)において、特に翻訳後修飾された側鎖を持つIDRを、観測されたIDR情報を整理したデータベースIDEALから抽出し、蛋白質間相互作用に関連すると考えられるものを原論文にもあたりながら考察した。本研究では、転写因子Ets1の天然変性領域のSer-rich領域とEts1コアダメインのDNA結合領域との相互作用、およびヒトMyeloid leukemia factor 1の天然変性領域にある8残基のペプチド・フラグメントと14-3-3 蛋白質(YWHAЕ)との相互作用について、リン酸化状態と非リン酸化状態の双方に対する構造サンプリング計算とその結果の解析を行った。

研究成果の概要(英文)：The Intrinsic Disordered Regions (IDRs) of proteins with post-translational modification were examined using the IDR database, IDEAL, and their structural properties were analyzed by molecular simulations for the protein-protein interactions. Here, the interaction of Ser-rich region existing in the IDR of a transcription factor Ets1 and the DNA binding region in its core domain, and that of a peptide fragment having 8 amino acids in the IDR of human Myeloid leukemia factor 1 (MLF1) and the 14-3-3 protein were investigated respectively, with and without phosphorylated Ser residues.

In the both systems, the free energy landscapes were drawn after computations by enhanced structural sampling with our own molecular simulation algorithms.

Consequently, a few specific complex structures appeared in the systems with phosphorylated Ser residues. On the contrary, fuzzy properties were observed in the systems with non-modified Ser residues.

研究分野：生物物理学

キーワード：理論生物学 バイオインフォマティクス 蛋白質間相互作用 分子シミュレーション 天然変性

### 1. 研究開始当初の背景

1999年に H. J. Dyson & P. Wright によって蛋白質の天然変性領域 (IDR: Intrinsically Disordered Region) の存在が示されたことに端を発し、わずか15年ほどの間に西川 建, V. N. Uversky & A. K. Dunker, P. Tompa ら多くの研究者により IDR に関する精力的な研究がなされた。特にハブ蛋白質における多様かつ特異的なパートナー分子の認識機構における重要な Coupled folding and binding の役割が我々の情報科学的研究によっても見出された。J. D. Forman-Kay のグループは、リン酸化された天然変性領域がパートナー分子と複合体を形成する際、様々なリン酸化状態が複合体の安定性を変化させ信号伝達を制御していることを核磁気共鳴スペクトル (NMR) の観測によって見出したが、P. Tompa はこの現象に対し1対1の変化のアロステリーではなく1対多の変化としての「マルチステリー」を提唱した。

このマルチステリーの状態については、L. P. McIntosh らによって、Ets-1 転写因子の N 末端の天然変性領域が、2つのセリン残基のリン酸化状態によって自身の DNA 結合ドメインとの多様な相互作用形態を持つ「ファジー相互作用」であるとされた。これは、酵母の転写活性化因子 Gcn4 中の天然変性領域がコアクチベータに Coupled folding and binding する現象が、NMR 観測によって「ファジー相互作用」だとされた S. Hahn らの研究を念頭に置いたものとも考えられる。しかし、どちらの場合にも疎水性残基が特異的な位置に存在することでパートナー分子との親和性が顕著に増大することが観測されており、ファジーではなく特異的な相互作用の存在も示唆されている。この混乱を解くため、マルチステリーの実体の解明が望まれた。

### 2. 研究の目的

蛋白質の天然変性領域が関与する蛋白質間相互作用においては、翻訳後修飾にも依存して種々の多様な構造が引き起こされることから、アロステリーを拡張した概念として「マルチステリー」という用語が提唱され、その特徴として平均的描像による実験的知見から非特異的なファジー相互作用であると主張する研究発表がなされている。一方、生命現象の精緻な調節において非特異的相互作用が主要である、という主張に対しては疑問が残る。そこで本研究では、平均的描像だけでなく一分子毎の多様な構造の描像が得られる分子シミュレーションによる自由エネルギー地形解析によってこの混乱を整理し、「多様な構造に基づく種々の相互作用の存在確率が翻訳後修飾によって調整され特異性が生じる」という仮説を提示し証明することを目的とする。

### 3. 研究の方法

- (1) 翻訳後修飾された側鎖を持つ IDR をデータベースから抽出する。
- (2) ファジー相互作用とされている系および上

記データベースからマルチステリーの存在が考えられる系を抽出し、効率的な構造サンプリングを行う分子シミュレーションを実施し、その自由エネルギー地形を描いて、各相互作用形態の存在確率を明らかにする。(3) 一般的な現象としてのマルチステリーについて、ファジー相互作用と特異的相互作用の存在を比較的に議論する。

### 4. 研究成果

天然変性領域 (IDR) において、特に翻訳後修飾された側鎖を持つ IDR を、観測された IDR 情報を整理したデータベース IDEAL (<http://idpl.force.cs.is.nagoya-u.ac.jp/IDEAL/>) から抽出し、蛋白質間相互作用に関連すると考えられるものを原論文にもあたりながら考察した。本研究では、転写因子 Ets1 の IDR の2つの Ser 残基を含む Ser-rich 領域 (SRR) と Ets1 コアドメインの DNA 結合領域との相互作用および、ヒト Myeloid leukemia factor 1 (MLF1) の IDR にある 8 残基のペプチド・フラグメントと 14-3-3ε 蛋白質 (YWHAE) との相互作用について、リン酸化状態と非リン酸化状態の双方に対する構造サンプリング計算とその結果の解析を行った。

(1) Ets1 の SRR を含む IDR (Arg279 から Pro300) と、DNA 結合を行う Lys301 から Glu441 によるコアドメインとの構造サンプリング計算 (マルチカノニカル分子動力学法: McMD) の結果による複合体形成を詳細に解析し、Ser282 と Ser285 がリン酸化されない状態と両方ともリン酸化された状態で、それらが構築する自由エネルギー地形が大きく異なることを見出した。すなわち、2つの Ser 残基がリン酸化されない状態では、この IDR と DNA 結合ヘリックスの直接の相互作用は多様でありファジー複合体とも言えるものが形成されていた。一方、2つの Ser 残基ともリン酸化された状態では、数少ない特異的な複合体が形成されており、特に最も安定な (population の多い) 複合体では、図1に示されるようにコアドメインの DNA 結合ヘリックス (緑) 上の塩基性アミノ酸側鎖と2つのリン酸基との塩橋に加えて、疎水性残基同士の相互作用が見られ、さらに IDR の主鎖 (紫) は短い 3<sub>10</sub>-ヘリックスを形成していた。

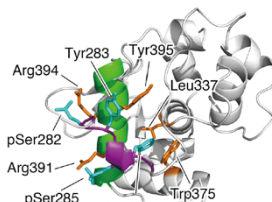


図1: 2つの Ser がリン酸化 (pSer282, 285) された状態での最安定な複合体

この複合体構造の実験的検証として、横浜市立大学大学院医学研究科の椎名政昭博士、緒方一博博士らによる種々の Ets1 変異体の発現と DNA との複合体形成が行われ、この特異的複合体構造の存在が強く示唆

された (Kasahara *et al.*, 2018)。

- (2) 14-3-3ε 蛋白質と IDR である 8 残基のペプチド・フラグメント (RSF(pS)EPFG: pS はリン

酸化された Ser を示す) の複合体構造の構造サンプリングを、新たに開発した VcMD (virtual-system coupled canonical MD) アルゴリズムを搭載した独自のプログラム myPresto/omegagene により、東工大の TSUBAME 3.0 上の GPGPU システムを利用して計算を行い、複合体形成に伴う自由エネルギー地形を描いた。上記(1)で用いた McMD 法においては、受容体側の蛋白質が高温域でのサンプリングにおいてその立体構造を壊す可能性があり、それを防ぐために人為的な距離拘束を加える必要があった。そのような拘束を入れずに高効率の構造探索を行うため、常温で計算が可能な新しいアルゴリズムである VcMD 法を、連携研究者の肥後順一特任教授 (阪大蛋白研) が考案した (Higo et al. 2017; Hayami et al. 2018)。この手法の適用により、14-3-3ε 蛋白質側には全く人為的な拘束を加えずに、ペプチド・フラグメントの結合/解離に伴う構造探索が実施できた。今回の計算では、VcMD に必要な反応座標として、14-3-3ε 蛋白質の重心とペプチド・フラグメントの重心の間の距離 ( $\lambda$ ) を考え、複合体と分離した状態との間の構造に対して高効率な探索を行った。その結果、リン酸化された Ser を持つペプチドフラグメントでは 14-3-3ε 蛋白質との結合が極めて強く、乖離するためには 10 kcal/mol 以上の自由エネルギーが必要とされた。一方、Ser がリン酸化されていない系においては結合状態と乖離状態では 2~3 kcal/mol 以下の自由エネルギー変化しか観測されず、極めて緩い結合であることが確認された (図 2)。さらに、結合/解離の途中でペプチド・フラグメント側の芳香族側鎖の 14-3-3ε 蛋白質との相互作用が重要な働きをしていることが示唆された。

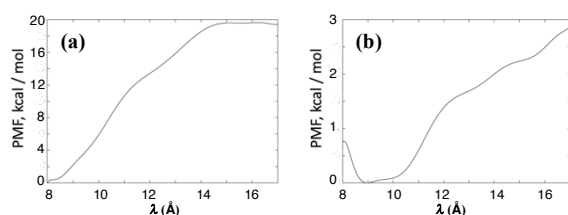


図 2: リン酸化された Ser (a) とリン酸化されていない Ser (b) を持つペプチド・フラグメントのそれぞれの重心と 14-3-3ε 蛋白質の重心間の距離 ( $\lambda$ ) を反応座標とした時の自由エネルギー地形 (PMF: Potential of Mean Force)。縦軸のスケールが大きく異なっており、(a) では極めて強くペプチドが 14-3-3ε 蛋白質に結合していることがわかる。

さらに、統合失調症病態に関与することが知られている Nuclear Distribution E Homolog 1 (NDE1) のリン酸化された IDR フラグメントの 14-3-3ε 蛋白質との結合モデルも構築し、Ser のリン酸化が 14-3-3ε 蛋白質との複合体構造の形成に重要であることが示唆された。

以上の研究から、当初の我々の仮説である「翻訳後修飾によって多様なファジー相互作用から特異的相互作用が選択され、生命機能が調整される」ことが強く示唆された。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

- ① Hiroshi Nishigami, Narutoshi Kamiya, Haruki Nakamura, Revisiting Antibody Modeling Assessment for CDR-H3 loop. Protein Engineering, Design and Selection, 査読有, 29, 2016, 477-184. DOI: 10.1093/protein/gzw028
- ② Junichi Higo, Kota Kasahara, Bhaskar Dasgupta, Haruki Nakamura, Enhancement of canonical sampling by virtual-state transitions. 査読有, J. Chem. Phys. 146, 2017, 044104, DOI: 10.1063/1.4974087
- ③ Kota Kasahara, Masaaki Shiina, Ikuo Fukuda, Kazuhiro Ogata, Haruki Nakamura, Molecular mechanisms of cooperative binding of transcription factors Runx1-CBFβ-Ets1 on the TCRα gene enhancer. 査読有, PLoS One, 12, 2017, e0172654, DOI:10.1371/journal.pone.0172654
- ④ Gert-Jan Bekker, Narutoshi Kamiya, Mitsugu Araki, Ikuo Fukuda, Yasushi Okuno, Haruki Nakamura, Accurate prediction of complex structure and affinity for a flexible protein receptor and its inhibitor. 査読有, J. Chem. Theory Comput. 13, 2017, 2389-2399, DOI: 10.1021/acs.jctc.6b01127
- ⑤ Junichi Higo, Kota Kasahara, Haruki Nakamura, Multi-dimensional virtual system introduced to enhance canonical sampling. 査読有, J. Chem. Phys. 147, 2017, 134102, DOI: 10.1063/1.4986129
- ⑥ Kota Kasahara, Masaaki Shiina, Junichi Higo, Kazuhiro Ogata, Haruki Nakamura, Phosphorylation of an intrinsically disordered region of Ets1 shifts a multi-modal interaction ensemble to an auto-inhibitory state. 査読有, Nucl. Acids Res. 46 (5), 2018, 2243-2251. DOI: 10.1093/nar/gkx1297

[学会発表] (計 17 件)

- ① Haruki Nakamura, Computational Approaches to Coupled Folding and Binding in Protein-Protein Interactions (Keynote Lecture), The 11th International Symposium of the Protein Society of Thailand, 2016 年 8 月 3 日, 招待講演, Convention Center, Chulabhorn Research Institute, Bangkok, Thailand
- ② Haruki Nakamura, Computational Approaches to Protein Interactions, (Plenary Lecture), Japan-Slovenia JSPS Bilateral scientific exchange, 2016 年 8 月 17 日, 招待講演, Univ. Primorska, Koper, Slovenia,
- ③ Haruki Nakamura, Flexible docking between cyclin-dependent kinase 2 and its inhibitor using multicannonical MD, 第 54 回生物物理学会年会, 2016 年 11 月 25 日, つくば
- ④ 肥後順一, Oct4 の 2 つの DNA 結合サブドメインを結ぶ柔軟な linker 領域の自由エネルギー地形, 第 54 回日本生物物理学会年会, 2016 年 11 月 27 日, つくば
- ⑤ 中村春木, 分子シミュレーションに

おける静電相互作用計算法：零多重極子法の理論と実際，第 54 回日本生物物理学会年会，2016 年 11 月 26 日，つくば

⑥ Haruki Nakamura, Accurate Prediction of Complex Structure and Affinity for a Flexible Protein Receptor and its Inhibitor, Mini-Symposium at Astbury Centre, 2017 年 6 月 8 日，招待講演，Leeds University, Leeds, U.K.

⑦ 肥後順一，Oct4 の 2 つの DNA 結合サブドメインを結ぶ Linker 領域の構造多様性，第 17 回日本蛋白質科学会年会，2017 年 6 月 20-22 日，仙台国際会議場，仙台

⑧ Haruki Nakamura, Flexible Docking between cyclin-dependent kinase 2 and its inhibitor CS3 using multicanonical MD and thermodynamic integration simulations. 第 17 回日本蛋白質科学会年会，2017 年 6 月 20-22 日，仙台国際会議場，仙台

⑨ Haruki Nakamura, Complex structure and Affinity of CDK2 and Its Inhibitor using McMD and TI Simulations, 19th IUPAB congress, 2017 年 7 月 17-20 日，Edinburgh, U.K.

⑩ Ikuo Fukuda, Non-Ewald method for accurately and efficiently calculating electrostatic interactions in molecular simulations, Meeting for Conformational Ensembles from Experimental Data and Computer Simulations, 2017 年 8 月 25-29 日，Berlin, Germany

⑪ Haruki Nakamura, Accurate Prediction of Complex Structure and Affinity for a Flexible Protein Receptor and its Inhibitor, The Trilateral Workshop for Frontier Protein Studies, 2017 年 9 月 1 日，招待講演，National Center for Protein Science Shanghai, Shanghai, China

⑫ Haruki Nakamura, Flexible docking and affinity calculation between CDK2 and its inhibitor CS3 using multicanonical MD and thermodynamic integration, 第 55 回日本生物物理学会年会，2017 年 9 月 19-21 日，熊本大学，熊本

⑬ 肥後順一，Oct4 の 2 つの DNA 結合サブドメインを結ぶ Linker 領域の構造多様性，第 55 回日本生物物理学会年会，2017 年 9 月 19-21 日，熊本大学，熊本

⑭ Haruki Nakamura, Enhanced Sampling for Analysis and Prediction of Protein-Ligand Interactions, Seminar at Science for Life Laboratory, 2017 年 10 月 23 日，招待講演，Stockholm, Sweden

⑮ Haruki Nakamura, In-Silico Drug Development Using Data Science and Computational Chemistry, Kickoff Meeting (JSPS Symposium) for the ZIAM/GBB and ISIR/IPR Collaboration, 2017 年 10 月 27 日，招待講演，Groningen, Netherlands

⑯ Haruki Nakamura, Beyond Classical In-silico Drug Docking by Data Science and Molecular Simulation, The 15th Chinese Biophysics Congress, 2017 年 11 月 5 日，招待講演，Shanghai, China

⑰ Haruki Nakamura, Prediction of complex structure and affinity between cyclin-dependent kinase 2 and its inhibitor using multicanonical molecular dynamics and thermodynamic integration simulations, The 61st annual meeting of the Biophysical Society, 2018 年 2 月 11-15 日，New Orleans, U.S.A.

〔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〕

特になし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中村 春木 (NAKAMURA, Haruki)

大阪大学蛋白質研究所・教授

研究者番号：80134485

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

肥後 順一 (HIGO, Junichi)

大阪大学蛋白質研究所・特任教授

研究者番号：80265719

### (4) 研究協力者

なし