

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：24405

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K03883

研究課題名(和文) タンパク質ダイナミクスの非マルコフ性：状態遷移の履歴に関わる構造起源を探る

研究課題名(英文) Uncovering structural origin relating to non-Markov protein dynamics

研究代表者

森次 圭 (Moritsugu, Kei)

大阪公立大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号：80599506

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：生体分子ダイナミクスの記述としてマルコフ状態モデルがよく適用されるが、そのような複雑な系でマルコフ性の仮定が担保されるのかは疑問である。本研究では、ダイナミクスに内在する非マルコフ性を定量化しその構造起因を解明することを目的とした。そのため、モデル系としてシニョリンを取り上げ、履歴付きマルコフモデルやランジュバンモデルといった運動モデルを構築し、包括的な考察を行った。更に、非マルコフ的な構造変化パスの生成する重み付きアンサンブル法の生体分子への適用を進め、プロリン異性化酵素Pin1による基質ペプチドの異性化やプロテアーゼへの基質の結合・解離シミュレーションといった応用研究を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

タンパク質やDNAといった生体分子の運動は極めて複雑であるが、そのなかで例えば構造変化シグナルを下流に伝えるといった分子機能を細胞内で発現する。つまり、立体構造情報に基づいて物理・化学的に合理的な原子レベルのモデルによって得られる機能発現過程の全体像から、認識の特異性決定因子の同定、アミノ酸変異の影響の理解などといった、それぞれの系の課題である薬剤設計、疾病の理解につながる情報を提供することができる。本研究では、そのようなダイナミクスの理解に直結する運動モデルの構築、更に、それを計算機上で再現する新規シミュレーション手法の開発に取り組んだ。

研究成果の概要(英文)：Markov state model has been used to describe the biomolecular dynamics, but the underlying Markovian assumption is still problematic for such complicated motions. In this study, we aimed at quantitatively analyzing such non-Markov contribution hidden in the dynamics and revealing its structural origin. To do this, we firstly studied the chignolin dynamics as a simplest model by directly simulating the folding events and constructed the dynamics models such as history-dependent Markov model and Langevin model. Secondly, we developed the simulation method, weighted ensemble, to generate the structural change paths that were not based on Markovian assumption, and applied the method to the isomerization of the substrate peptide via Pin1, a typical proline isomerization enzyme, and to the direct simulations of the substrate peptide association and dissociation on SARS-CoV-2 3CL protease.

研究分野：計算生物物理

キーワード：タンパク質 ダイナミクス 分子動力学シミュレーション マルコフ状態モデル 重み付きアンサンブル法 シニョリン Pin1 SARS-CoV-2 3CLプロテアーゼ

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

タンパク質や DNA といった生体分子は数万原子を超えるヘテロな重合体であり、その運動は極めて複雑であるが、そのなかで、例えば情報伝達分子(リガンド)の結合により立体構造を巧みに変化させ、細胞内での酵素反応を制御するといった分子機能を実現している。その仕組みを理解するには、構造解析で得られる始状態と終状態の立体構造にとどまらず、その間をダイナミックに変化する過程が重要になる。分子動力学(MD)シミュレーションといった計算手法での直接観測がダイナミクスの解析には有用であるが、既存の手法(brute-force MD)に代わる拡張法として近年では、実際的なタンパク質系(数100残基、水・脂質膜など含んだ生理学的環境下)に適用可能な構造探索法(metadynamics, MSES, gREST など)やキネティックスの計算手法(遷移パス理論、マイルストーンなど)が開発されてきた。なかでも、マルコフ状態モデル(MSM)は理論計算にとどまらず構造解析などの実験をサポートする補助的計算としても幅広く適用が進められているが、そもそも生体分子のような複雑な系でマルコフ性が担保されるのか、という疑問が挙げられる。その解決法として、パスがある状態に来た時に、それ以前にどの状態に最も近い過去に訪れたか、という非マルコフ的な履歴の「ラベル」を考慮する手法が提案され、マルコフ状態モデルでは過大評価された遷移レートが大幅に改善されることが Zuckerman らの小さなタンパク質系での研究により実証された(Suarez, JCTC 2014)。

2. 研究の目的

本研究の目的は、生体分子のダイナミクスに内在する非マルコフ性を定量化しその構造起因を解明することである。そのため、非マルコフ的に構造変化するパスを効率的に生成する。第一の研究としては、折れ畳みタンパク質のモデルとして多数の対照研究が行われているシニョリンを取り上げ、長時間の brute-force MD により数多くの折れ畳みをシミュレートする。MD トラジェクトリからマルコフ状態モデルを計算し、直接計算されたフォールディング時定数と比較したうえで、構造に履歴ラベルを付加した非マルコフ的な解析での結果と比較する。また、反応座標を定義したうえで位置依存的な拡散係数を計算し、後述の重み付きアンサンブル法で計算される確率密度の時間発展を計算し手法の最適化を行う。もう一つの研究としては、より実際的なタンパク質系での構造変化パスの生成を目指し、Zuckerman のグループによって提案された重み付きアンサンブル(weighted ensemble, WE)法と呼ばれるパスサンプリングを近似した手法を適用する。WE 法では多数の粒子(コピー)を用い、それらに重みをつけて逐次的に計算しパスを延ばしてサンプリングしつつ、時定数の計算も同時に実現する。本研究では、生体分子への適用に必須なパラメタの最適化法を探りつつ、生体分子機能の解析といった応用研究にも取り組む。更に、大規模タンパク質系に対しマルコフ状態モデルを適用する研究も行う。シニョリンのようなモデル系では見られないような、非マルコフ的な効果を探りつつ、その構造基盤を明らかにすることを目指す。

3. 研究の方法

(1)シニョリンの長時間 brute-force MD によるダイナミクスの包括的解析

NMR の構造モデル(PDB: 1UAO)について、転移温度(~340 K)、及び、より遷移確率の低い常温(~300 K)で10マイクロ秒の長時間 MD を各3本計算し、水素結合様式がフォールド構造と異なるミスフォールド構造も含めた folding/unfolding 遷移をシミュレートした。フォールド構造からの RMSD や拡散マップといった反応座標によりフォールド構造とミスフォールド構造、アンフォールド構造を定義し、それらの遷移の時定数を MD トラジェクトリから直接計算した。また、残基間の C α 原子間の距離を features として tICA を計算し、モデルに必要なパラメタを精査しながら PyEMMA (<http://emma-project.org/>)によりマルコフ状態モデルを構築した。

(2)重み付きアンサンブル法によるタンパク質構造変化パスの生成

WE 法では、短時間 MD を多数・繰返し計算することで、タンパク質構造変化のパスとキネティックスを効率的に計算できる。本研究では、比較的大きな生体分子系への応用研究を目指し、シニョリンでの考察を踏まえたうえで計算に必要なパラメタの最適化を試みつつ、2つのタンパク質系について適用を進めた。①プロリン異性化酵素 Pin1 による基質ペプチドの異性化反応では、PDB: 2QA5 の cis 型結晶構造を初期モデルとし、初期モデルの cis から trans のシミュレーションを実施したのち、trans から cis の過程の計算も実施した。時定数計算のため、3回のランを独立に実施した。②新型コロナウイルス SARS-CoV-2 3CL プロテアーゼの研究では、ペプチド様阻害剤に模した基質ペプチドの結合・解離過程をシミュレートした。初期モデルとしては PDB: 6LU7 のリガンド複合体結晶構造を適用し、まず解離過程を計算したのち、得られた解離状態の構造から結合状態への計算を、各3回実施した。

(3)大規模タンパク質へのマルコフ状態モデルの適用と非マルコフ性の解析

アクチンフィラメント形成過程において、ATP 型アクチンから加水分解されたリン酸塩 Pi の解離がアクチンフィラメントの伸長制御といった観点から重要になる。本研究では、フィラメント状態を模したフラグミン結合アクチンのドメインクレフトから Pi が解離するダイナミックな過程をシミュレートした。初期モデルとしては、名古屋大学前田教授らにより解かれたフラグミン結合フィラメント型アクチン (PDB: 7W50, ADP とリン酸塩 Pi が結合したアクチン) の結晶構造を用いた。MSES 法により Pi の配置が異なる構造をサンプリングしたのち、初期構造として 500 個選択し、それぞれ 60 ns の MD シミュレーションを実行した。得られた Pi 解離過程の MD トラジェクトリについて、(1)と同様に PyEMMA によりマルコフ状態モデルを構築し、構造変化パスやキネティクスの解析を行った。また、対照系として、アクチン単体からの Pi 解離についても同様の解析を行い、アクチンの構造揺らぎが Pi 解離過程にどのように関わるかを考察した。

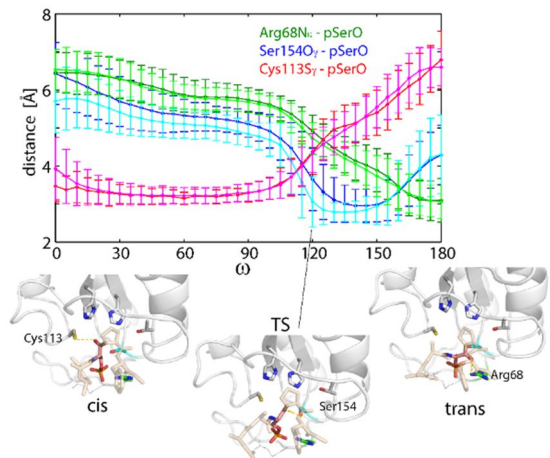
4. 研究成果

(1)シニョリンの長時間 brute-force MD によるダイナミクスの包括的解析

計算で得られた MD トラジェクトリから水素結合距離によりフォールド構造、ミスフォールド構造、アンフォールド構造を定義し、その遷移の時定数を計算したところ、同じ MD 力場パラメータを先行研究や実験値に近い値が得られた。しかしながら、マルコフ状態モデルから得られた時定数は 10 倍程度大きくなり、非マルコフ的な効果がシニョリンのような小さなモデル系でもあることが示された。次に、履歴を考慮した遷移行列での解析を行ったが、得られた時定数には大きな変化が見られなかった。次に、ランジュバンモデルに基づいた手法として、MD シミュレーションで生成された時系列構造データから位置依存拡散係数を計算し、WE 法でも計算される確率分布の時間変化を見積もることでタンパク質ダイナミクスを記述する手法を開発し適用したところ、シニョリン折れ畳みの時定数計算に改善が見られた。これらの結果は、もちろん反応座標などにも依存するが、タンパク質の運動モデルにより複雑なダイナミクスに潜む非マルコフ的な寄与が変わりうることを示唆している。

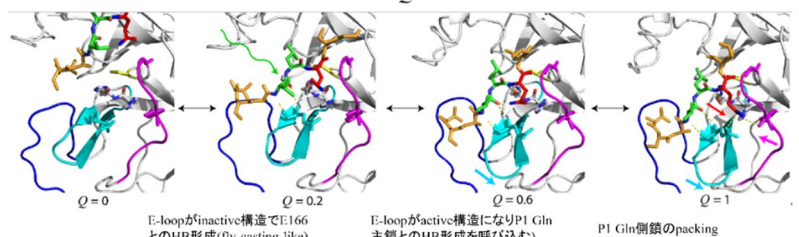
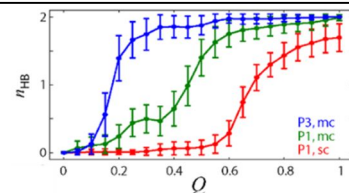
(2)重み付きアンサンブル法によるタンパク質構造変化パスの生成

①プロリン異性化酵素 Pin1 の研究では、WE 法により基質ペプチドの cis-trans 異性化に伴う Pin 構造変化のパスサンプリングを行った。cis から trans、trans から cis の両過程についてそれぞれ 3 本の計算を実施した結果、プロリン異性化の速度としてはマイクロ秒オーダーの時定数が得られたが、cis から trans のほうが trans から cis よりも速く、NMR 実験との一致を見出した。また、構造変化パスの詳細な解析を行い、遷移状態においてリン酸化セリンと Pin1 との水素結合をうまく橋渡しすることにより、Pin1 が基質ペプチドの cis-trans 異性化エネルギー障壁を下げていることを示した。これらの結果をまとめ、論文に投稿した (J. Chem. Theory Comput. 2021)



プロリン異性化過程での基質ペプチドとの水素結合距離の変化 (上図) と代表構造 (下図)

②計算創薬への展開を目指し、新型コロナウイルス SARS-CoV-2 3CL プロテアーゼへの基質ペプチドの結合・解離過程についても WE 法の適用を試みた。網羅的なパスウェイ計算を実施し、パスウェイ上で鍵となる基質相互作用を見出すことにより、基質を模した薬剤化合物の効率的な設計につながる知見を得ることを目的とした。その結果、柔軟な基質ペプチドが結合・解離するパスを網羅的に探索することができ、基質結合が Chymotrypsin フォールドのクレフトに入り込むことから始まり、P3→P1 主鎖→P1 側鎖の順に結合が形成されること、また、配列特異性をもたらす P1 側鎖の結合が認識過程の最終段階

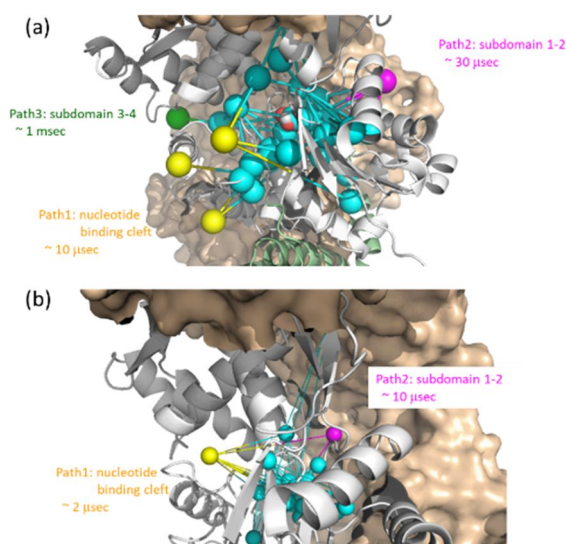


基質ペプチド結合過程での水素結合数の変化 (上図) と代表構造 (下図)

で起こることを見出した。これらの結果をまとめ、論文に投稿した(J. Chem. Inf. Modeling 2023)。

(3) 大規模タンパク質へのマルコフ状態モデルの適用と非マルコフ性の解析

フラグミンが結合したフィラメント様アクチンから Pi が解離する過程をシミュレートし、マルコフ状態モデルを構築してそのダイナミクスを解析した。その結果、Pi がドメイン開閉運動に関わるヌクレオチド結合 cleft を通るパスだけでなく、サブドメイン 1-2 および 3-4 間を通るパスも見出された。更に、マルコフ状態モデルによりキネティクスの解析を行い、ヌクレオチド結合 cleft を通るパスでは 10 マイクロ秒オーダーの速い遷移であるのに対し、比較的硬いサブドメイン 3-4 間を通るパスではミリ秒オーダーと 2 桁のオーダーで遅くなること明らかにした。更に、フィラメントでのアクチン間相互作用による寄与を考察するため、アクチン単体での結果と比較したところ、サブドメイン 1-2 と 3-4 の間にあるヌクレオチド結合 cleft が開閉する運動が大きくなること、その結果として、ヌクレオチド結合 cleft を通るパス(Path1)とともにサブドメインの間を貫通するようなパス(Path2)も見出されるがその時定数がアクチン単体では数倍大きくなる(解離が速い)ことが見出された(図4)。この結果は、フィラメント上でのアクチン ATP 型から ADP 型の遷移を調べた最近の実験が 2 つの時間オーダー(~10 ミリ秒の速い遷移と ~秒の遅い遷移)の構造変化を示すことに対応する、つまり、パス依存的に 2 つの異なる時定数を持つことを示すが、その時間スケールはマルコフ状態モデルによる計算では過大評価されており、非マルコフ的な効果を示唆している。



マルコフ状態モデルにより得られたアクチンリン酸塩解離パスと時定数。肌色は PDB: 5OOE のアクチンフィラメント構造を示す。(a)フラグミン結合アクチン

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Moritsugu Kei, Ekimoto Toru, Ikeguchi Mitsunori, Kidera Akinori	4. 巻 63
2. 論文標題 Binding and Unbinding Pathways of Peptide Substrates on the SARS-CoV-2 3CL Protease	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Chemical Information and Modeling	6. 最初と最後の頁 240 ~ 250
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jcim.2c00946	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kanematsu Yusuke, Narita Akihiro, Oda Toshiro, Koike Ryotaro, Ota Motonori, Takano Yu, Moritsugu Kei, Fujiwara Ikuko, Tanaka Kotaro, Komatsu Hideyuki, Nagae Takayuki, Watanabe Nobuhisa, Iwasa Mitsusada, Ma?da Yuichiro, Takeda Shuichi	4. 巻 119
2. 論文標題 Structures and mechanisms of actin ATP hydrolysis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2122641119
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2122641119	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kidera Akinori, Moritsugu Kei, Ekimoto Toru, Ikeguchi Mitsunori	4. 巻 433
2. 論文標題 Allosteric Regulation of 3CL Protease of SARS-CoV-2 and SARS-CoV Observed in the Crystal Structure Ensemble	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 167324 ~ 167324
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jmb.2021.167324	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Moritsugu Kei	4. 巻 11
2. 論文標題 Multiscale Enhanced Sampling Using Machine Learning	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Life	6. 最初と最後の頁 1076 ~ 1076
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/life11101076	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kei Moritsugu, Norifumi Yamamoto, Yasushige Yonezawa, Shin-ichi Tate, and Hiroshi Fujisaki	4. 巻 17
2. 論文標題 Path ensembles for Pin1-catalyzed cis-trans isomerization of a substrate calculated by weighted ensemble simulations	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Chemical Theory and Computation	6. 最初と最後の頁 2522-2529
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jctc.0c01280	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kei Moritsugu, Koh Takeuchi, Narutoshi Kamiya, Junichi Higo, Isao Yasumatsu, Yoshifumi Fukunishi and Ikuo Fukuda	4. 巻 61
2. 論文標題 Flexibility and cell permeability of cyclic Ras-inhibitor peptides revealed by coupled Nose Hoover equation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Chemical Information and Modeling	6. 最初と最後の頁 1921-1930
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jcim.0c01427	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件 (うち招待講演 5件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 森次 圭
2. 発表標題 重み付きアンサンブル法によるプロテアーゼへの基質結合・解離シミュレーション
3. 学会等名 第3回 構造基盤創薬化学研究会 (招待講演)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 森次 圭
2. 発表標題 生体分子に向けたシミュレーション法の開発とその応用研究
3. 学会等名 スーパーコンピュータワークショップ2023 (招待講演)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 森次 圭
2. 発表標題 生体分子に向けたシミュレーション法の開発とその応用研究
3. 学会等名 スーパーコンピュータワークショップ2023 (招待講演)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 森次 圭
2. 発表標題 重み付きアンサンブル法によるプロテアーゼへの基質結合・解離シミュレーション
3. 学会等名 第3回 構造基盤創薬化学研究会 (招待講演)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 森次 圭
2. 発表標題 重み付きアンサンブル法と生体分子への応用
3. 学会等名 第3回生体分子シミュレーション・モデリング研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kei Moritsugu
2. 発表標題 Enhanced sampling methods targeting at large proteins
3. 学会等名 第59回日本生物物理学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kei Moritsugu
2. 発表標題 VAE-driven multiscale enhanced sampling
3. 学会等名 第59回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森次 圭、山本典史、米澤康滋、楯真一、藤崎 弘士
2. 発表標題 重み付きアンサンブル法によるPin1異性化のパスサンプリング
3. 学会等名 第58回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 森次 圭
2. 発表標題 Enhanced conformational sampling of cyclic peptide Cyclorasin by coupled Nose-Hoover equation
3. 学会等名 情報計算科学生物学会2020年大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------