

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：32644

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2015

課題番号：21700333

研究課題名(和文)フラグメント分子軌道計算による糖鎖結合性生体高分子の分子認識解析

研究課題名(英文) Fragment molecular orbital studies for the carbohydrate-recognition of bio-molecules.

研究代表者

合田 祥子(日向寺祥子)(Aida-Hyugaji, Sachiko)

東海大学・情報教育センター・講師

研究者番号：70317824

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、構造未知であるヒト型単鎖抗体(5A3)と抗原(マンノトリオース：Man3)の間の相互作用について、バイオインフォマティクスおよび計算化学的手法を用いて精密に解析を行った。まずは、ホモロジーモデリングにより得られた多数のヒト単鎖抗体の3次元構造から絞り込んだ6構造と、141のMan3のコンフォーマーの間でInduced-Fitドッキングシミュレーションを実施した。得られた多数の複合体構造の中から絞り込んだ構造に対して、フラグメント分子軌道法(FMO法)による相互作用計算を実施し、抗原認識に關与する抗体のアミノ酸残基を予測することができた。

研究成果の概要(英文)：Antibodies are expected to be used as potential anticancer drugs. Recently, it is reported that recombinant antibody, 5A3 recognizes Man3. However, only amino acid sequences of 5A3 were already investigated.

In this study, fragment molecular orbital (FMO) calculations were performed to get insight into the mechanism of Man3-recognition of 5A3. Prior to the FMO calculations, 3D structures of the complex was investigated using induced-fit docking simulations between six structures of 5A3 and 141 conformers of Man3. Finally, amino acid residues of 5A3 contributing to Man3-recognition were proposed.

研究分野：計算生命化学

キーワード：分子軌道法 糖鎖 生体分子間相互作用

1. 研究開始当初の背景

近年、分子標的治療薬・抗体医薬開発の躍進や、生命第三の鎖である糖鎖への高い注目度を背景とし、重大な糖関連疾患医療への応用が期待される新規抗体デザインに有用な情報を取得することを目的とした研究に期待する声が増えてきている。

一方で、糖鎖構造を認識する抗体の報告例は数が少なく、それに関連した研究も多くはないのが事実である。

ところが、本研究の協力者グループにより、がんの診断に有用とされるマンノースが3糖連なったマンノトリオース (Man3) を認識する数少ないリコンビナント単鎖抗体 5A3 が作製され [引用文献]、その認識機構解明が今後の新規抗体デザインに大きな影響を与えることが期待されている。

本研究開始当初、5A3の構造に関する研究は一次配列解析にとどまっており、その3次元構造に基づいた機能解析が急がれる状態であった。

また、コンピュータ技術の大躍進という異なる背景をもとに、生体分子機能解析に対する精密な量子化学シミュレーションの応用事例報告が急激に増加している。その報告例の中にはフラグメント分子軌道法 (FMO法) という生体高分子をシミュレーションの対象と想定して開発された高速化手法によるものも多く含まれている。

このFMO法は計算が高速に実行できるのみならず、分子間相互作用、特にタンパク質間相互作用の解析に適した結果を出力することが可能である。

2. 研究の目的

本研究では、3次元構造未知であるヒト型リコンビナント単鎖抗体 5A3 と、5A3 により認識される糖鎖構造を持つ抗原 (マンノトリオース: Man3) の間の相互作用について、バイオインフォマティクスおよび計算化学的手法を用いて精密に解析を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 抗体の3次元構造予測

すでに解析されている5A3の1次配列情報をもとに、抗体の構造構築に特化したホモロジーモデリングを用いて3次元構造を構築することとした。得られた多数の構造は、モデリングのスコアや実験結果との照合により絞り込みを行った。

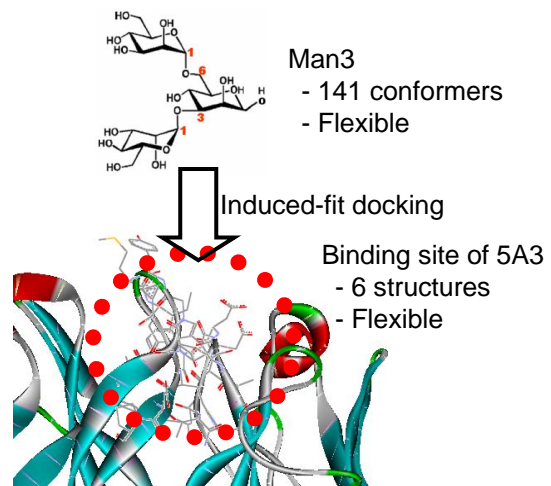
(2) 抗体-抗原複合体の3次元構造予測

(1) で絞り込んだ5A3の構造と、多配座

発生プログラムにより発生させたMan3の構造を用いて、抗体-抗原複合体構造の予測を行った。

5A3の活性部位は、多数の構造から絞り込んだ6構造、Man3は構造自由度が高いため141のコンフォーマーを用意し、6×141通りのInduced-fitを考慮したドッキングシミュレーションを実施した。

以下にその模式図を示す。



得られた膨大な複合体構造よりスコア上位の構造を選び出し、最終的には実験データとの整合性と視認によりさらに構造を絞り込んだ。

(3) 複合体の相互作用計算

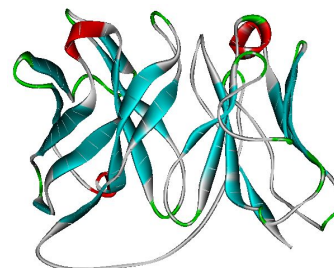
(2)の複合体構造に対し、フラグメント分子軌道計算を実行して精密な相互作用解析を行った。計算はFMO-MP2レベル、基底関数は6-31Gを採用した。

また、FMOの特徴でもある各フラグメント間の相互作用エネルギー値を得ることができるIFE (Inter-fragment interaction energy) 解析も行った。

4. 研究成果

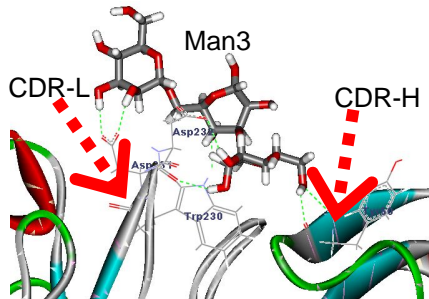
(1) 抗体の3次元構造予測

モデリングにより得られた5A3の3次元立体構造のひとつを以下に示す。



図の上下部に位置するループ部分に異なる構造を持つ抗体の3次元構造が数多く得られた。

(2) 抗体-抗原複合体の3次元構造予測 Induced-fit を考慮したドッキングの結果、2000を超える複合体の構造が得られた。ドッキングスコアの参照、実験結果との照合、そして最終的には視認により絞り込んだ3つの複合体構造のうちのひとつ(抗体-抗原相互作用領域)を以下に示す。



(3) 複合体の相互作用計算 フラグメント分子軌道計算によるIFIE解析の結果を以下に示す。Man ~ は、それぞれMan3中の3つのマンノースを意味する。

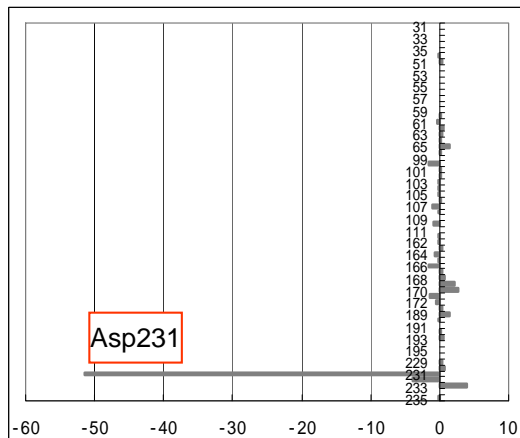


図: Man - 5 A 3 の各アミノ酸残基間の相互作用エネルギー

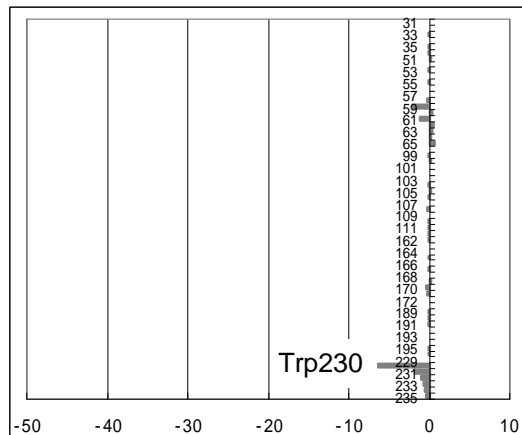


図: Man - 5 A 3 の各アミノ酸残基間の相互作用エネルギー

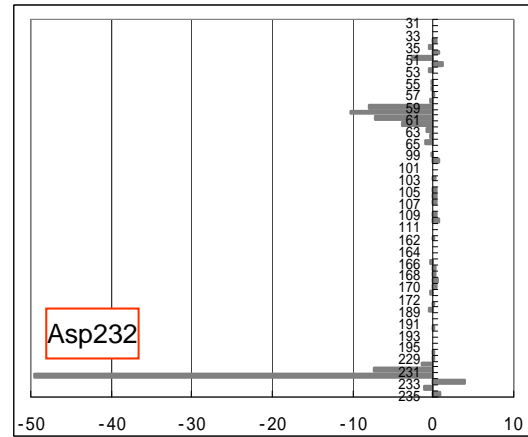


図: Man - 5 A 3 の各アミノ酸残基間の相互作用エネルギー

これらの結果から、5 A 3 の A s p 2 3 1 が M a n と、A s p 2 3 2 が M a n とそれぞれ強く相互作用することにより、5 A 3 によるマンノトリオース認識に大きく貢献することが示唆された。

<引用文献>

Keiko Sakai, Yoshitaka Shimizu, Tomoki Chiba, Ayano Matsumoto-Takasaki, Yu Kusada, Wei Zhang, Munehiro Nakata, Naoya Kojima, Kazunori Toma, Atsushi Takayanagi, Nobuyoshi Shimizu, and Yoko Fujita-Yamaguchi, "Isolation and Characterization of Phage-Displayed Single Chain Antibodies Recognizing Nonreducing Terminal Mannose Residues. 1. A New Strategy for Generation of Anti-Carbohydrate Antibodies", *Biochemistry*, 2007, 46 (1), pp 253-262

Wei Zhang, Ayano Matsumoto-Takasaki, Yu Kusada, Hiroyuki Sakaue, Keiko Sakai, Munehiro Nakata, and Yoko Fujita-Yamaguchi, "Isolation and Characterization of Phage-Displayed Single Chain Antibodies Recognizing Nonreducing Terminal Mannose Residues. 2. Expression, Purification, and Characterization of Recombinant Single Chain Antibodies", *Biochemistry*, 2007, 46 (1), pp 263-270

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計1件)

C. Watanabe, K. Fukuzawa, S. Tanaka, S. Aida-Hyugaji, "Charge Clamps of

Lysines and Hydrogen Bonds Play Key Roles in the Mechanism to Fix Helix 12 in the Agonist and Antagonist Positions of Estrogen Receptor : Intramolecular Interactions Studied by the Ab Initio Fragment Molecular Orbital Method", J. Phys. Chem. B, 2014, 118 (19), pp 4993-5008

[学会発表](計8件)

合田(日向寺) 祥子, "計算化学的手法による生体高分子の機能解析", SJWS 例会 2011 (2011年12月18日, 東京)

Chiduru Watanabe, Hirofumi Watanabe, Shigenori Tanaka, Sachiko Aida-Hyugaji, "Relationship between Structural Fluctuation and Positions of Helix 12 in Ligand-dependent Nuclear Receptors Studied by Molecular Dynamics Simulation", 2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (Pacifichem2010) (2010年12月17日 Honolulu, U.S.A.)

Chiduru Watanabe, Kaori Fukuzawa, Shigenori Tanaka, Sachiko Aida-Hyugaji, "Molecular Interaction of Estrogen Receptor a in Fluctuating State Studied by Ab initio Fragment Molecular Orbital Method", CBI Annual Meeting 2010 (2010年9月15日 Tokyo)

Zhenxia Zhu, Sachiko Aida-Hyugaji, "Theoretical Analysis of Binding Affinity of Human Mannose-Binding Protein Carbohydrate Recognition Domain to Mannose", BioInfo2009 CBI-KSBSB Joint Conference (2009年11月4日 Busan)

Chiduru Watanabe, Sachiko Aida-Hyugaji, Kaori Fukuzawa, "Intramolecular Interaction of Human Estrogen Receptor Ligand Binding Domain with Different Helix12 Positions Studied by Ab initio Fragment Molecular Orbital Method", BioInfo2009 CBI-KSBSB Joint Conference (2009年11月4日 Busan)

合田(日向寺) 祥子, 渡邊 千鶴, 福澤 薫, "フラグメント分子軌道法によるエストロゲン受容体の分子内相互作用解析", 分子科学討論会 (2012年9月18日 東京)

渡邊 千鶴, 合田(日向寺) 祥子, 渡邊 博文, 田中 成典, "リガンドに依存した核内受容体の構造変化に対する線型応答理論による解析", 第65回日本物理学会年次大会 (2010年3月20日 岡山)

合田(日向寺) 祥子, 渡邊 千鶴, "フラグメント分子軌道計算による生体高分子の分子認識解析", 東海大学研究フォーラム 2010 (2010年3月5日 平塚)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

合田(日向寺) 祥子

(AIDA-HYUGAJI, Sachiko)

東海大学・情報教育センター・講師

研究者番号: 70317824