

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23370071

研究課題名(和文) 動的構造に基づく定量的な蛋白質間相互作用システムの計算・情報科学研究

研究課題名(英文) Quantitative computational and informatics studies on protein-protein interaction systems based on their dynamic structures

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) 15,200,000円、(間接経費) 4,560,000円

研究成果の概要(和文)：従来よりもはるかに高いサンプリング効率を発揮できるV-McMD法を新規に開発し、新規の非エバルト法による高速分子動力学計算プログラムと組み合わせることで周期系に応用し、結合によってアミノ酸側鎖や主鎖構造が変化する系での蛋白質の二量体形成を自由エネルギー地形の計算から解析し、その安定性の定量化を実現できた。一方、蛋白質の相互作用における界面に対してその部分構造と表面構造の類似性を網羅的に調べて分類し、フォールド構造の異なる蛋白質においても共有されているパッチを見出した。また、界面に共通に観測される構造モチーフを同定し、それらの組み合わせとしての複合モチーフが機能と良く対応していることを見出した。

研究成果の概要(英文)：We have newly developed the V-McMD method, performing much more effective enhanced sampling than before. This method has been combined with our new non-Ewald method for rapid molecular dynamics simulations for the periodic system, so that the quantitative analysis for the stability of the protein dimer formation was made based on the free energy landscape for the molecular system, where the backbone and the side-chain conformations change upon binding. In addition, the local structures and molecular surfaces of the protein interfaces were investigated exhaustively, and many common patches are found to be shared in proteins across the different folds. The common structural motifs were identified, and the composite motifs, which are defined as the combination of those structural motifs, correspond well with the molecular functions of proteins.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：構造・機能予測 分子シミュレーション 蛋白質 プロテオーム 蛋白質間相互作用

1. 研究開始当初の背景

ゲノム解析と構造生物学によって、生命を構築する単位である遺伝子とその情報の発現体である蛋白質の要素については既に膨大な遺伝情報と蛋白質の構造情報が国際的なデータベース上に蓄積されていた。また蛋白質間相互作用についても網羅的な解析が進み、蛋白質ネットワークをそのダイナミクスと伴に理解しようとする動的システム生物学が進められていたが、そこではネットワークはグラフ理論におけるノード(蛋白質)間を結ぶエッジ(相互作用)として数学的に抽象化され、相互作用の強さは単にパラメータとして与えられるだけであった。そこで、蛋白質の動的な物理的構造同士の関係として、原子レベルの分解能で蛋白質間相互作用を定量的にとらえることにより、分子レベルから細胞レベルへの階層を超えた理解が必要であった。すなわち、分子レベルから細胞レベルへの階層をつないで理解していくためには、蛋白質間相互作用の強さの化学物理的な定量化が必要とされていた。

2. 研究の目的

生命をシステムとして理解するシステム生物学的アプローチにより細胞内蛋白質のネットワークを解析する場合、構造的な蛋白質相互作用機序の研究が基盤となる。本研究の開始以前に、我々は分子表面の形状と静電位の相補性を指標とした独自の蛋白質-蛋白質複合体構造予測手法を開発し、蛋白質複合体モデルを構築する CAPRI 国際ブライント・コンテストにおいても多数の複合体構造予測に成功してきた。しかし、そこで開発したスコア関数は本質的に経験則に基づいており、多数の候補から正しい複合体構造を選択する能力は持つが、定量的な結合定数の推定はできない。

そこで、本研究においては、我々がそれまでに達成してきた蛋白質・低分子リガンド複合体の自由エネルギー計算の経験を発展させ、化学物理の原理に基づく新たなアルゴリズムと計算手法を拡張して、動的な蛋白質-蛋白質間相互作用における結合自由エネルギー、エントロピー等の熱力学諸量を高精度で定量化する一方、情報科学的アプローチによって網羅的なインタラクトームに適用しようとするを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 計算科学的アプローチ

それまでに開発した蛋白質-蛋白質複合体モデリング手法に、さらに側鎖と主鎖の柔軟性を加えて改良する。この複合体構造の安定性を定量的に解析するため、従来よりもさらに高いサンプリング効率が得られる工夫をした拡張アンサンブル計算のアルゴリズムを開発し、自由エネルギー地形を描いて蛋白質複合体形成における結合自由エネルギーを算出する。また、孤立系だけでなく周期系

も対象とし、さらに高速に計算が行えるように計算手法も改良する。

(2) 情報科学的アプローチ

蛋白質間相互作用における界面について、その部分構造と表面構造の類似性を網羅的に調べて分類し、その特徴を抽出する。一方、特に複数の蛋白質と同一の界面で相互作用するハブ蛋白質の相互作用面について、静的な特徴だけでなく動的な特徴を調べるため、弾性ネットワークモデルに基づく基準振動解析計算法を開発し、自己結合モードとリガンド結合モードへの分割や水和効果も取り込める新たなモデルによる解析を行う。

4. 研究成果

(1) 蛋白質複合体のモデル構築手法の開発

蛋白質の表面形状と静電ポテンシャルの相補性に基づくドッキング計算を高速に精度良く実施するプログラム・パイプライン surFit を開発してきた(文献2)が、その複合体モデル構築後の分子動力学計算による構造緩和により、天然の複合体構造の選別と界面近傍の水分子の位置の再現が確認できた。実際、CAPRI コンテスト(ターゲット47)において、20のグループが参加して Colicin E2 DNase-Im2 複合体に対し、その立体構造予測に加えて界面における水分子の位置を予測したが、我々のグループが最も良く水分子の位置を正確に予測できた(文献12)。

(2) V-McMD 法による定量的な複合体構造の解析・予測

従来のマルチカノニカル分子動力学法では、ある安定な状態に系がトラップされるとそこから抜け出すことが容易でなく、状態のサンプリングが必ずしも迅速に行えないという問題があった。そこで、仮想的な複数の系を考えてエネルギー空間での遷移を人工的に促進させるアルゴリズム V-McMD 法 (Virtual-system coupled McMD 法) を考案し、理論的に確立した(文献7)。この手法を、18残基からなるエンドセリン人工変異体ペプチド (KRCSCSSLMDKECVYFCH) が作るホモ二量体形成に適用した。まず図1のような直径 64 の水分子が充填した球状の孤立系の中央に単量体を置き、離れたところにもう一つの単量体を置いて初期状態とする。

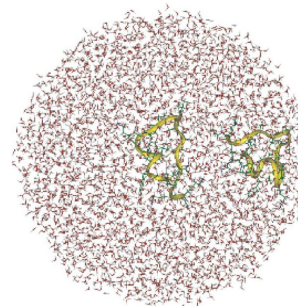


図1: エンドセリン人工変異体ペプチドの二量体形成シミュレーションの初期状態。水中の2つの単量体を黄色のリボンで表す。

この系に対して V-McMD 計算を行い、1次元の自由エネルギー地形(図2(a))および2次元の自由エネルギー地形(図2(b))を描いた。

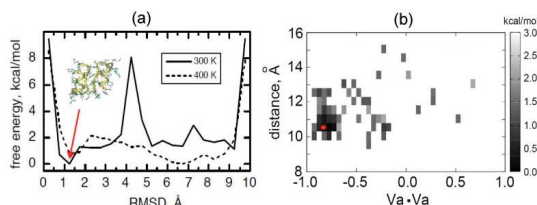


図2: エンドセリン人工変異体ペプチドの二量体形成の自由エネルギー地形。(a)1次元、(b)2次元の地形

図2(a)では、複合体の結晶構造として観測されているホモ二量体構造からのズレ(RMSD: root-mean-square-deviation)を横軸に示し、縦軸に自由エネルギーに対応するPMF(Potential of Mean Force)を示す。室温(300K)においてRMSDが小さい構造が最も自由エネルギーが小さくなる一方、400Kでは、RMSD=7ほどズレた構造が安定となった。さらに、図2(b)では、2つの分子の α -ヘリックス軸の単位方向ベクトル間の内積を横軸にとり、2つの分子の重心間の距離を縦軸にとって、灰色の濃淡によって自由エネルギー地形を描いている。赤点は結晶構造の場合の値であり、 α -ヘリックス同士が逆を向き重心が10.5程度離れているが、その周辺が自由エネルギーの低い状態となっていることが示されている。このように、二量体構造に対して安定な構造が得られただけでなく、その安定性を自由エネルギーの値として定量的に算出することができた。

(3) 非エバルト法(Zero-Multipole summation法)の生体分子系への応用

周期系の分子動力学計算を行う際に遠距離力である静電場の影響を高精度で計算できる方法として、系の電荷および電気多極子モーメントがゼロとなる中和条件を課す手法(Zero-Multipole summation法)を我々は開発してきた(文献4, 14)。この手法を不均一な膜蛋白質やDNA二重鎖に対して適用し、これらの生体分子系に対しては、特にZero-Dipole summation法が精度良い値を算出できることを確認した(文献6, 9)。また、この手法をGPUマシンで高速に計算するプログラムを開発してその性能を確認した(文献10)。このV-McMD法をZero-Dipole summationによる高速分子動力学計算プログラムと組み合わせることで周期系に応用し、結合によってアミノ酸側鎖や主鎖構造が変化する系に対するダイマー形成を自由エネルギー地形の計算から解析しその安定性解析を実現できた。実際、上記の18残基からなるエンドセリン人工変異体ペプチドに対して適用して自由エネルギー地形を描いたところ、やはり結晶構造に近い二量体が最も安定

構造であることが示された。

(4) リガンド結合部位の分子表面形状と静電位の網羅的類似性比較

蛋白質機能部位における分子表面の形状と静電位の分布に対し、そこに結合するリガンド分子との関連性を明らかにするため、分子表面を形成するパッチの形状や静電位の類似性を高速に探索する手法を開発した。その手法を用いて、リガンド低分子毎にパッチ間の網羅的な比較とクラスタリングを行い、代表的なパッチを選択した。次に、この代表パッチ間の網羅的な比較により、フォールド構造の異なる蛋白質においても共有されているパッチを見出してリガンドが結合する分子表面の多様性を明らかにした(文献8)。この代表パッチ構造は、分子表面の類似性検索を行うeF-seekツールに精度を保ったまま高速に検索できる手法として実装された。

(5) 蛋白質の相互作用面の網羅的な比較・分類による機能推定

蛋白質の相互作用と機能の関連を調べるために、蛋白質の低分子、蛋白質、および核酸との相互作用面を網羅的に比較・分類しそれぞれ数千個の頻出パターン(構造モチーフ)を同定し、それらの構造モチーフが特定のサブユニットに出現する組み合わせを複合モチーフと定義することにより、構造のパターンと蛋白質の生物学的機能の対応を調べた(図3)。その結果、複合モチーフは配列類似性や「生の」構造類似性よりもよく機能と対応していることが示された。さらに、同じ蛋白質が実験の条件によって異なる複合モチーフを持ちうることを利用して、原子レベルの構造情報から細胞内機能を視覚的に注釈付けできる可能性を示した(文献3)。

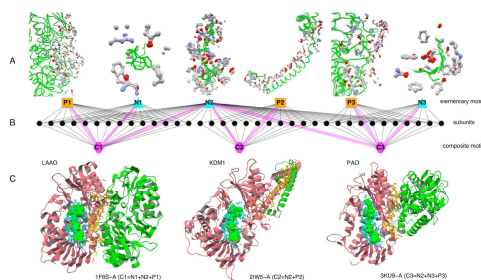


図3: 構造モチーフ(A)と複合モチーフ(C)。(B)は対応する個々のサブユニットを表す。

(6) ハブ蛋白質の蛋白質間相互作用界面の解析

一つの相互作用面を介して複数の異なる蛋白質と非同期的に相互作用するデートハブ蛋白質においては、複数の蛋白質との相互作用する面と特定の蛋白質のみと相互作用する面に分割できることを発見した(文献1)。また弾性ネットワークモデルを用いた基準振動解析により、基準振動の最低モードの回転軸が結合するリガンドの形と相関があり、リガンド分子の慣性モーメントの主軸とほ

ば平行となっていることを見出した(文献11)。

さらに、デートハブ蛋白質の結合様式の動的側面を詳細に調べるために、ユビキチンとその複合体(9種類)の基準振動解析を行い、得られた複合体の運動を、特異値分解を用いて自己結合モードとリガンド結合モードに分割して解析した。その結果、複合体中のユビキチン分子の運動はかなりの程度ユビキチン単量体の運動に含まれていること、リガンド結合モードは相互作用と無撞着であるが、自己結合モードは相互作用を弱める方向に働いていて、両者の絶妙なバランスによって多彩な複合体が形成されていることが明らかとなった(文献5)。

上記の研究で弾性ネットワークモデルの弱点、すなわち水和の効果が含まれていないことによる表面原子の過剰な揺らぎ、が露呈した。この問題を解決するために、水和効果を現象論的に取り込んだ「コンタクト数拡散モデル」を提案し、それを用いて基準振動解析を行った。このモデルはもくろみ通り、表面残基の過剰な揺らぎが押さえられるだけでなく、分子動力学シミュレーションやアポ体とホ口体間の構造変化をも、従来モデルよりより良く再現できることが明らかになった(文献13)。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者および連携研究者には下線)

[雑誌論文](計24件)

1) Dasgupta B, Nakamura H, Kinjo AR, Distinct roles of overlapping and non-overlapping regions of hub protein interfaces in recognition of multiple partners. *J. mol. biol.* 査読有, 411, 713-727 (2011) DOI: 10.1016/j.jmb.2011.06.027

2) Fleishman S J, ..., Nakamura H et al. (97名中63番目), Community-wide assessment of protein-interface modeling suggests improvements to design methodology. *J. mol. biol.* 査読有, 414, 289-302 (2011) DOI: 10.1016/j.jmb.2011.09.031

3) Kinjo AR, Nakamura H, Composite structural motifs of binding sites for delineating biological functions of proteins. *PLoS ONE*, 査読有, 7, e31437 (2012) DOI: 10.1371/journal.pone.0031437

4) Fukuda I, Nakamura H, Non-Ewald methods: Theory and Applications to Molecular Systems. *Biophysical Reviews*, 査読有, 4, 161-170 (2012) DOI: 10.1007/s12551-012-0089-4

5) Dasgupta B, Nakamura H, Kinjo AR, Counterbalance of ligand- and self-coupled motions characterizes multispecificity of ubiquitin. *Protein Science*, 査読有, 22, 168-178 (2012) DOI: 10.1002/pro.2195

6) Kamiya N, Fukuda I, Nakamura H, Application of zero-dipole summation method to molecular dynamics simulations of a membrane protein system. *Chem. Phys. Lett.* 査読有, 568-569, 26-32 (2013) DOI: 10.1016/j.cplett.2013.03.014

7) Higo J, Umezawa K, Nakamura H, A virtual-system coupled multicanonical molecular dynamics simulation: Principles and applications to free-energy landscape of protein-protein interaction with an all-atom model in explicit solvent. *J. Chem. Phys.* 査読有, 138, 184106 (2013) DOI: 10.1063/1.4803468

8) Murakami Y, Kinoshita K, Kinjo AR, Nakamura H, Exhaustive comparison and classification of ligand-binding surfaces in proteins. *Protein Science*, 査読有, 22, 1379-1391 (2013) DOI: 10.1002/pro.2329

9) Arakawa T, Kamiya N, Nakamura H, Fukuda I, Molecular dynamics simulations of a double-stranded DNA in an explicit solvent model with zero-dipole summation method. *PLoS ONE*, 査読有, 8, e76606 (2013) DOI: 10.1371/journal.pone.0076606

10) Mashimo T, Fukunishi Y, Kamiya N, Takano Y, Fukuda I, Nakamura H, Molecular Dynamics Simulations Accelerated by GPU for Biological Macromolecules with a Non-Ewald Scheme for Electrostatic Interactions. *J. Chem. Theory Comput.*, 査読有, 9, 5599-5609 (2013) DOI: 10.1021/ct400342e

11) Dasgupta B, Nakamura H, Kinjo AR, Rigid-body motions of interacting proteins dominate multi-specific binding of Ubiquitin in a shape-dependent manner. *Proteins*, 査読有, 82, 77-89 (2014) DOI: 10.1002/prot.24371

12) Lensink MF, ... , Nakamura H, et al. (58名中32番目), Blind Prediction of Interfacial Water Positions in CAPRI. *Proteins*, 査読有, 82, 620-632 (2014) DOI: 10.1002/prot.24439

13) Dasgupta B, Kasahara K, Kamiya N, Nakamura H, Kinjo AR, Specific non-local interactions are not necessary for recovering native protein dynamics. *PLoS ONE*, 査読有, 9, e91347 (2014) DOI: 10.1371/journal.pone.0091347

14) Fukuda I, Kamiya N, Nakamura H, The Zero-multipole summation method for estimating electrostatic interactions in molecular dynamics: analysis of the accuracy and application to liquid systems. *J. Chem. Phys.* 査読有, 140, 194307 (2014) DOI: 10.1063/1.4875693

[学会発表](計39件)

1) Nakamura H 「Intrinsically Disordered

Proteins and Development of Corresponding Drugs」CADD2011 (Plenary Lecture), 2011年12月5日, Penang, Malaysia (招待講演)

2) 中村 春木「蛋白質の自由エネルギー地形」スーパーコンピュータ・ワークショップ2012, 2012年1月25日, 自然科学研究機構・岡崎コンファレンスセンター(招待講演)

3) Nakamura H 「Prediction of protein-protein complex structures」International Conference on Biomolecular Forms and Functions, 2013年1月10日, Indian Institute of Science Bangalore, India (招待講演)

4) Nakamura H 「A new non-Ewald scheme: The zero-dipole summation method and its applications to molecular dynamics simulations for homogeneous and inhomogeneous biomolecular systems」National Symposium on Frontiers of Biophysics, Biotechnology & Bioinformatics and 37th Annual Meeting of Indian Biophysical Society, 2013年1月14日, University of Mumbai, India (招待講演)

5) Nakamura H 「Drug Development for a GPCR with in-silico screening」Nagoya symposium: Frontiers in Structural Physiology, 2013年1月24日, 名古屋大学豊田講堂(招待講演)

6) 中村 春木「生命科学における情報科学・計算科学」第6回三大学連携シンポジウム, 2013年2月22日, 神戸大学統合研究拠点(招待講演)

7) 金城 玲「Composite structural motifs of binding sites for delineating biological functions of proteins」第54回植物生理学会年会, 2013年3月21日, 岡山大学(招待講演)

8) Kinjo AR 「Composite structural motifs of binding sites for annotating functional differences」International Conference on Structural Genomics 2013, 2013年7月29日, 京王プラザホテル札幌(招待講演)

9) 中村 春木「ゲノム情報(1D)から蛋白質の動的構造情報(4D)へ」日本学術会議公開シンポジウム, 2013年9月17日, 日本学術会議講堂(東京)(招待講演)

10) 金城 玲「蛋白質の結合部位の構造パターンと生物学的機能を結ぶ」第6回定量生物学の会, 2013年11月24日, 大阪大学銀杏会館(招待講演)

11) Nakamura H 「New Approaches to Dynamic Properties of Proteins and their Applications to Drug Discover of GPCR」CADD'13, 2013年12月12日, Institut Teknologi Bandung, Bandung, Indonesia (招待講演)

12) Nakamura H 「New Approach to Electrostatic Properties of Proteins and

Protein-Protein Interactions」The 4th Asia Pacific Protein Association (APPA) Conference, 2014年5月18日, ICC Jeju, Korea (Plenary Lecture, 招待講演)

〔図書〕(計1件)

1) Kanamori E, Murakami Y, Sarmiento J, Liang S, Standley DM, Shirota M, Kinoshita K, Tsuchiya Y, Higo J, Nakamura H "Prediction of Protein-Protein Complex Structures" in Biomolecular Forms and Functions: A Celebration of 50 years of the Ramachandran Map(Eds. Manju Bansal & N. Srinivasan) World Scientific Publishing, 2013. pp. 160-172.

〔その他〕

ホームページ等

http://www.protein.osaka-u.ac.jp/rcsfp/pi/index_pi.html

6. 研究組織

(1)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

(2)研究分担者

金城 玲 (KINJO, Akira R.)
大阪大学・たんぱく質研究所・准教授
研究者番号: 30370117

(3)連携研究者

肥後 順一 (HIGO, Junichi)
大阪大学・たんぱく質研究所・特任研究員
研究者番号: 80265719

神谷 成敏 (KAMIYA, Narutoshi)
大阪大学・たんぱく質研究所・特任研究員
研究者番号: 80420462

米澤 康滋 (YONEZAWA, Yasushige)
近畿大学・先端技術総合研究所・教授
研究者番号: 40248753