

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24500363

研究課題名(和文) 生体分子内の水分子機能を考慮した生体分子間相互作用の解析手法の開発と応用

研究課題名(英文) Development of an analyzing method for the ligand-biomolecule interaction considering the function of water inside the biomolecules

研究代表者

能登 香 (Ueno-Noto, Kaori)

北里大学・一般教育部・講師

研究者番号：20361818

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：糖鎖を認識する生体分子の糖鎖リガンド結合における分子間相互作用の議論のため、生体分子内の水分子を考慮したモデルの開発及び応用研究を行った。糖結合タンパク質のHIV-1抗体2G12やレクチンのシグレック7に特徴的な認識機構を計算化学の手法を用いて明らかにした。生体内水分子を考慮した解析手法を2G12抗体の系に適用したところ、構造がよく似た中性の糖鎖リガンドの抗体への結合能の違いを記述できることを示した。

研究成果の概要(英文)：In this study, development of an analyzing method for the interaction between biomolecules and their ligands, considering the function of water inside the molecules were performed. The theoretical features of the glycan ligand-protein interactions in the HIV-1 antibody 2G12 as well as a lectin called Siglec-7 were clarified in detail by ab initio Fragment Molecular Orbital calculations and classical molecular dynamics simulations. The dynamics of the protein-ligand's complexes was shown to play an important role in the ligand recognition mechanism. Calculated interaction energies agreed well with the experimentally observed ligands' affinities. The water molecules inside the biomolecules stabilized the ligand's conformation and its binding site, which was notably observed in the system with neutral glycan ligands.

研究分野：計算化学

キーワード：生体内水分子 糖鎖 大規模量子化学計算 抗体 分子間相互作用 分子動力学シミュレーション HIV

1. 研究開始当初の背景

生体分子は互いに相互作用することで、生命現象を営む。体内の細胞表面は多様な糖鎖分子によって覆われていて、それらの糖鎖分子が他の生体分子と極めて高い特異性で結合し、細胞間・免疫系の認識において重要な役割を担うことが明らかになってきている。しかし、その相互作用は弱く実験的手法のみからは詳細な分子機構の解明が困難である。

生体分子における水分子は水素結合ネットワークを介して、DNA や糖鎖等とタンパク質間の分子認識、特異性、親和性において大きな影響を与える、という結果が数多く報告されている。しかし、水分子の効果を定量的に見積もることは実験的に困難で、その議論を網羅的に且つ系統的に行えるのは理論化学に基づくシミュレーションのみである。これまで生体分子における水分子は、その影響を溶媒効果として誘電体モデルで近似する方法や、水和水として水分子を露に取扱う手法によって議論されてきた。しかし、それらは水分子を生体分子の環境変化を表現するものであり、生体分子結晶構造内に見られる結晶水のような「生体分子内部に存在する水の生化学的機能」にまで及んで詳細に議論するものはなかった。生体分子内の水分子の座標の特定が困難であることがその要因の一つである。リガンド-タンパク質間の相互作用の議論のための、生体分子内の水分子まで考慮したモデルによる理論的薬物設計は、将来的な医薬品構築における鍵となると考えた。

本研究では、糖鎖を認識する生体分子である HIV-1 抗体 2G12 及びシグレック 7 というレクチンを対象にした。2G12 抗体はヒト免疫不全ウイルス(HIV-1)の表面糖タンパク質上に存在する高マンノース型糖鎖を広く認識・結合し、標的細胞への感染を阻止することができる中和抗体の一つとして注目されている。2G12 抗体のリガンド認識部位が特異的に認識すると考えられている D-マンノースよりも強い親和性を持つよく似た構造をもつ糖 (D-フルクトース) が報告され、抗 HIV-1 ワクチンの開発を目的として研究が進められている。2G12 抗体の糖鎖認識 (Fab) 領域と D-マンノースを含む各種糖鎖リガンドが結合している複合体の結晶構造が報告されているにも関わらず、2G12 抗体とそのリガンド間に働く相互作用の詳細は明らかになっていなかった。

また、シアル酸含有糖鎖を高い特異性で認識するレクチンであるシグレック 7 は免疫グロブリンスーパーファミリーに属し、腫瘍細胞等の排斥に重要なナチュラルキラー細胞上に発現する。シグレック 7 の細胞内ドメインには ITIM と呼ばれる抑制系モチーフがあり、正常細胞の障害を防ぐ抑制系レセプターとして作用すると考えられているが、その糖鎖リガンド認識の詳細は明らかになっていなかった。

これまで理論化学の立場から生体分子間の相互作用を解明する研究を行ってきた。リンパ球表面抗原 CD38 が持つ酵素活性の糖鎖分子による阻害について、基質と糖鎖阻害剤の立体構造及び電子構造を量子化学計算により明らかにし、基質及び糖鎖阻害剤の電子状態が、実験的に得た酵素阻害の大きさと強く相関することを見出し、阻害効果の解明につながる基質認識機構を提案した。また、亜鉛フィンガータンパク質の変異による分子間相互作用の変化を解析し、実験結果と比較し、生化学的に興味深い知見を得ると共に、新規 DNA 結合タンパク質分子の理論的構築に繋がる結果を得た。このような生体分子を対象にしたこれまでの理論化学研究を進展させ、生体内水分子に注目した解析方法の開発及び糖鎖結合タンパク質における糖鎖認識機構の解明研究を行った。

2. 研究の目的

糖鎖が関与する生体分子の機能や働きを分子レベルで解明することは、複雑な生命現象の理解および創薬分野への応用において重要である。本研究は計算化学に基づいた糖結合タンパク質の糖鎖認識機構の解明研究のため、生体分子内水分子に焦点を当てた分子間相互作用解明のための理論モデルと方法論の構築を目指して研究を行った。

3. 研究の方法

はじめに生体分子内水分子を考慮せずに糖結合タンパク質における相互作用の解析研究を下記のとおり段階的に遂行した。

- (1) 「HIV-1 糖鎖認識抗体 2G12 の Fab 領域と、N 結合型糖鎖リガンド (Man₉GlcNAc₂) が結合している糖鎖-抗体複合体の結晶構造 (PDB: 10P5) には水分子の情報が欠落している。MP2 レベルで電子相関を考慮した大規模量子化学計算 (フラグメント分子軌道法 (FMO) 法) を用いて、この構造における糖鎖リガンドと抗体間の相互作用エネルギーを計算した。さらに相互作用エネルギーを静電、分極、交換反発、電荷移動相互作用等の成分に分割し、その詳細を解析した。
- (2) 次にレクチンの糖結合特異性のメカニズムを検証した。糖鎖リガンドとシグレック 7 の複合体結晶構造 (PDB ID: 2HRL) について、FMO-MP2 法による量子化学計算を行い、結合部位におけるタンパク質-糖鎖リガンド間の分子間相互作用を詳細に解析した。また、シグレック 7 の一部のアミノ酸残基を変異させた構造を作成し、古典分子動力学 (MD) シミュレーションを行い、各変異体と野生体のダイナミクスの違いとこれらリガンドの親和性実験結果を比較した。
- (3) D-マンノース及び D-フルクトースと 2G12 抗体の Fab 領域の複合体結晶構造 (PDB ID: 10P3, 30AY) における相互作用を

FMO-MP2 法による量子化学計算によって定量的に解析した。また、溶媒を誘電体モデルで考慮した量子化学計算(FMO-PCM 法)と古典 MD シミュレーションを行い、結合自由エネルギーを算出した。リガンド結合能の実験結果と比較し、その要因を解析した。

- (4) 分子内水分子の存在の有無が、リガンドの結合能や結合複合体にどのように影響するかを解析するため、生体分子内の水分子の機能を考慮した解析手法の開発を行った。方法(3)で対象にした二種の抗体-リガンド複合体について、分子内の水分子の位置を予測・配置した構造を作成した。水分子の情報をもつ 2G12 糖結合複合体構造と、水分子を考慮しないものを作成し、それぞれを出発構造として古典 MD シミュレーションを行い、複合体構造のダイナミクスの違いを解析した。さらにシミュレーションの各スナップショット構造について FMO-MP2 法による量子化学計算を行い、リガンドと抗体間の相互作用エネルギー解析を行った。

4. 研究成果

2012 及び 2013 年度は上述の研究手法

(1)~(3)を行った。

- (1) HIV-1 糖鎖認識抗体ヒト 2G12 と糖鎖リガンド (Man₉GlcNAc₂) 複合体の結晶構造におけるリガンド-抗体間の相互作用エネルギーの詳細を、大規模量子化学計算 (FMO-MP2/6-31G(d)) によって解析したところ、抗体のリガンド認識では、リガンドの特徴的な枝分かれ構造が重要で、ManD1、Man4 及び Man4' 部分が相互作用を主に担っていることを示した。これを学術論文として発表した (雑誌論文(1))。

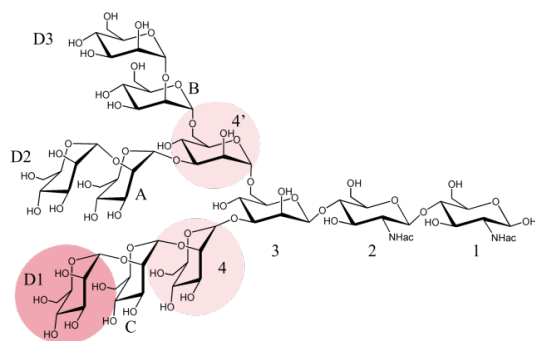


図 1. 2G12 抗体に結合する糖鎖リガンド構造

- (2) シグレック 7 と糖鎖リガンドの複合体の結晶構造について、FMO-MP2/6-31G(d) レベルの量子化学計算を行い、結合部位におけるシグレック 7-糖鎖リガンド間の分子間相互作用を詳細に解析したところ、リガンドの各部位が担う相互作用の顕著な違いが明らかになった。リガンドのシアル酸部分とその近傍に位置するシグレック 7 の塩基性アミノ酸残基間の静電相互作用がリガンド-タンパク質間の相互作用の大部分を占め、リガンドの中性糖鎖部位は分散相互作用によってシグレック 7 と結合しているこ

とが明らかになった。また、シグレック 7 変異体の構造ダイナミクスを、古典 MD シミュレーションを行い野生体と比較したところ、活性部位から離れた残基に変異導入した場合には、複合体全体の構造変化が非常に大きくなり、リガンド結合能が下がることが明らかになった。これは実験結果を支持するものであった。これらの結果を学術論文として発表した (雑誌論文(2))。

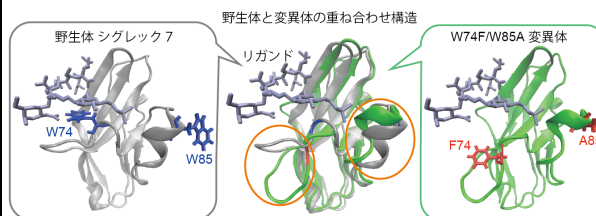


図 2. シグレック 7 の野生体と変異体の構造の違い

- (3) HIV-1 抗体 2G12 域と D-マンノース及び D-フルクトースとの複合体の結晶構造におけるリガンド-2G12 間の相互作用エネルギーを FMO-MP2/6-31G(d)法を用いて算出したが、2G12 が本来認識する D-マンノースよりも、D-フルクトースにより強く結合するという親和性比較実験結果を再現できなかった。そこで、溶媒を連続誘電体モデルで考慮する FMO/PCM 法による計算と MD シミュレーションを行い、自由エネルギーを見積もったところ、実験結果を定量的に再現できる事が明らかになった。またリガンドが D-フルクトースの場合、特に溶媒の影響を受けやすい事を示唆する結果が得られた。これらの結果を学術論文としてまとめた (雑誌論文(3))。

- (4) 上記の結果を踏まえ、2014 年度は研究方法(4)の生体内水分子が抗原-抗体間の相互作用に与える影響について研究を行った。Fab-2G12 と D-マンノース及び D-フルクトースとの複合体について、①水分子を考慮しない構造、②結晶構造のリガンド近傍 5 Å 内に存在する水分子だけ考慮した構造、③リガンド-抗体複合体の内部空間内に存在し得る水分子を発生させた構造の 3 種類を作成し、古典 MD シミュレーションにより複合体のダイナミクスを比較考察した。また、シミュレーションの各スナップショットでの糖-抗体間相互作用エネルギーを FMO-MP2/6-31G(d)法で算出した。その結果、③リガンド-抗体複合体の内部空間内に水分子を発生させた構造を使った場合にのみ、これらのリガンドの異なる抗体への結合能を示した実験結果を再現できることが明らかになった。D-フルクトースと D-マンノースでは生体内水分子からの影響が異なり、リガンドの立体配座や結合する位置が変わり、それが両者の結合能の違いを引き起こすことを示した。現在、これらの結果について投稿論文を執筆中である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計3件)

- (1) Y. Koyama, K. Ueno-Noto, K. Takano, “Affinity of HIV-1 antibody 2G12 with monosaccharides: a theoretical study based on explicit and implicit water models”, 査読有, *Comp. Biol. Chem.* 2014, 49 36-44. DOI: 10.1016/j.compbiolchem.2014.01.013
- (2) Y. Koyama, K. Ueno-Noto, K. Takano, “Interaction analysis of HIV-1 antibody 2G12 and Man₉GlcNAc₂ ligand: Theoretical calculations by fragment molecular orbital and MD methods”, 査読有, *Chem. Phys. Lett.* 2013, 578, 144-149. DOI:10.1016/j.cplett.2013.06.009
- (3) K. Ueno-Noto, S. Ise, K. Takano, “Chemical description of the interaction between glycan ligand and siglec-7 using ab initio fmo method and classical md simulation”, 査読有, *J. Theor. Comp. Chem.* 2013, 12(7), 1350060-1-1350060-23. DOI: 10.1142/S0219633613500600

[学会発表] (計13件)

(1) 国際学会会議

- ① K. Ueno-Noto, K. Takano, “Physico-chemical analysis of the interaction between HIV-1 antibody 2G12 and its glycan ligand by molecular dynamics and large-scale quantum chemical calculations” Computational Science Workshop (CSW 2014), 2014年8月20日 エポカルつくば (茨城県つくば市), PA17
- ② K. Ueno-Noto, Y. Koyama, K. Takano, “Fragment molecular orbital and MD calculation study: Interaction analysis of HIV-1 antibody 2G12 and glycan Ligand” The Eighth Congress of the International Society for Theoretical Chemical Physics (ISTCP-VIII), 2013年8月29日 Budapest (Hungary), II-P50
- ③ K. Ueno-Noto, S. Ise, K. Takano, “A theoretical study of the interaction between a lectin called Siglec-7 and its glycan ligand in the immune system” The Eighth Congress of the International Society for Theoretical Chemical Physics (ISTCP-VIII), 2013年8月29日 Budapest (Hungary), II-P70

(2) 国内学会会議

- ④ 能登香 “分子動力学シミュレーションによる HIV-1 中和抗体 PGT と糖タンパク質 gp120 複合体のダイナミクス解析” 日本化学会第95春季年会, 2015年3月28日 日本大学船橋キャンパス (千葉県船橋市), 3PA-166

- ⑤ 能登香, 鷹野景子 “抗体-リガンド間相互作用における生体内水分子の役割” 第33回日本糖質学会年会, 2014年8月10日 名古屋大学東山キャンパス (愛知県名古屋市), P-002
- ⑥ 能登香 “抗体-リガンド間相互作用における生体内水分子の影響に関する理論的研究” 日本化学会第94春季年会, 2014年3月29日 名古屋大学東山キャンパス (愛知県名古屋市), 3PA-043
- ⑦ 能登香 “計算化学の手法による HIV-1 抗体 2G12 と糖鎖間相互作用解析” 理研・糖鎖インフォマティクス若手の会合同セミナー, 2014年2月26日 独立行政法人理化学研究所 大河内ホール (埼玉県和光市), 口頭発表6
- ⑧ 能登香, 小山裕佳, 鷹野景子 “HIV-1 抗体が糖鎖リガンドに結合している様子を生体分子シミュレーションで明らかにする” お茶の水女子大学 糖鎖科学教育研究センター 第6回公開シンポジウム, 2013年11月23日 お茶の水女子大学 (東京都文京区), P1
- ⑨ 能登香, 鷹野景子 “分子動力学法による糖鎖認識抗体-リガンド複合体のダイナミクス解析” 第32回日本糖質学会年会, 2013年8月6日 大阪国際交流センター (大阪府大阪市), P-069
- ⑩ 能登香, 小山裕佳, 鷹野景子 “HIV-1 糖鎖認識抗体 2G12 と糖鎖リガンド間相互作用の理論計算による解明” 日本化学会第93春季年会, 2013年3月22日 立命館大学びわこ・くさつキャンパス (滋賀県草津市), 1P099
- ⑪ 能登香, 小山裕佳, 鷹野景子 “Interaction Analysis of HIV-1 Antibody 2G12 and Glycans by Large-Scale Quantum Chemical Calculations based on FMO method” 第50回日本生物物理学会年会, 2012年9月24日 名古屋大学東山キャンパス (愛知県名古屋市), 3PT225
- ⑫ 能登香, 小山裕佳, 鷹野景子 “生体内水分子による溶媒効果を考慮した方法に基づく抗体-糖鎖間の相互作用解析” 第31回日本糖質学会年会, 2012年9月19日 鹿児島市市民文化ホール (鹿児島県鹿児島市), P-074
- ⑬ 小山裕佳, 能登香, 鷹野景子 “FMO 法および分子動力学法による理論研究: 抗体 2G12 と糖鎖間の相互作用解析” 第31回日本糖質学会年会, 2012年9月19日 鹿児島市市民文化ホール (鹿児島県鹿児島市), P-042

6. 研究組織

(1) 研究代表者

能登香 (Ueno-Noto, Kaori) 北里大学・一般教育部・講師 研究者番号: 20361818