

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：14301
研究種目：基盤研究(A) (一般)
研究期間：2013～2016
課題番号：25251019
研究課題名(和文)多機能ドメイン蛋白質の構造可塑性と機能統合：構造からシステムへの理論研究

研究課題名(英文)Structural plasticity and functional integration of multi-functional and multi-domain proteins: From structures to systems

研究代表者
高田 彰二 (Takada, Shoji)
京都大学・理学研究科・教授

研究者番号：60304086
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 36,100,000円

研究成果の概要(和文)：DnaAを含む複製開始複合体について、粗い分子モデルを用いたシミュレーションによって複合体構造を組み立て、次に高精度分子モデルに焼き直した。これにより従来不可能であった多数のタンパク質とDNAを含む複製開始複合体のコンピューター内で構築することに成功した。コンピューターで構築した複製開始複合体は、両側にある2組のDnaA 5量体と、中央で孤立したDnaA単量体と3つの部分構造に分かれていた。生化学的実験を通して、この複製開始複合体の構造は、実験結果と高い整合性があることがわかった。今回の研究成果により、開始複合体の構造や働きを原子レベルに近い精度で詳しく知ることができるようになった。

研究成果の概要(英文)：For DNA replication ignition complex made of DnaA and others, we constructed a coarse-grained model first, which is reverse-mapped to obtain atomic structure of the complex for the first time. The constructed model is made of three sub-complexes. By biochemical experiments, it was shown to be consistent with the experimental data. This study revealed near-atomic structural model of the DNA replication initiation complex.

研究分野：生物物理

キーワード：タンパク質 p53 DnaA Ste5 シミュレーション

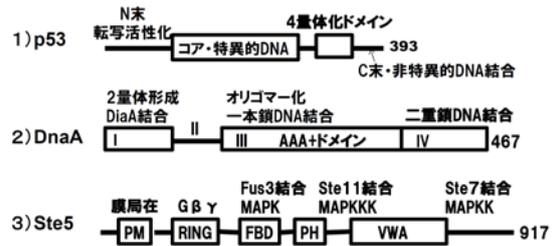
1. 研究開始当初の背景

背景：これまでの蛋白質構造機能研究は、しばしば一つの機能ドメインを切りだしその構造機能を精細に調べることで成果を挙げてきた。しかし、多くの蛋白質は複数の機能ドメインをもちその集合として働いている。その際、各ドメインの機能は、単純和としてではなく、生物学的な意味をもって統合されていると考えられる。しかし、蛋白質の複数の機能ドメインがいかに機能統合されているのかは、よく理解されていない。シグナル伝達の scaffold 蛋白質 Ste5 では、複数の入力シグナルに応答してドメイン間の構造がアロステリックに変化しそれが出力に決定的な役割を果たす(Lim ら, Cell 2009, Science 2011, 同 2012)。この例のように、多機能多ドメイン蛋白質におけるドメイン間の構造可塑性によって実現される機能統合を理解することは、蛋白質高次機能の新しい描像を与え、分子構造情報から細胞レベルのシステム生物学に切り込むための鍵を握るであろう。

研究動向及び位置づけ：多機能多ドメイン蛋白質において、しばしばドメイン間に存在するフレキシブルリンカーが研究を困難にしている。蛋白質全長の結晶構造解析はほぼ不可能である。X線溶液散乱、電子顕微鏡、一分子計測などからは限られた時空間情報しか得られない。その点で分子動力学 (MD) シミュレーションは柔らかい構造の動的な性質を調べるのに適しており、上記の実験と相補的に用いることで高い可能性をもつ。ただ、多機能多ドメイン蛋白質の構造変化について、その規模のために現時点で原子レベルの MD シミュレーション解析は困難である。高田らは 10 年以上にわたり、原子レベルよりも分解能を落とした粗視化モデルを独自に開発しており、本研究でもその粗視化モデルなどを適用することでこの問題を解決する。

着想に至った経緯：高田らは過去数年、多

多機能・多ドメイン蛋白質の可塑性と機能統合：
3つのターゲットの機能ドメイン構成



機能性転写因子 p53 のシミュレーション機能解析を行ってきた。p53 は DNA 修復、細胞周期停止、アポトーシス誘導などに関連する転写を活性化する (高田, 檜崎 JACS2012)。面白いことに、p53 蛋白質は 2 つの DNA 結合ドメインをもつ。特異的配列への結合には第一の DNA 結合ドメインが使われる。一方、実験と高田らの計算は、非特異的 DNA 配列には第二の DNA 結合ドメインが主要な役割を果たすことを明らかにした。すなわち p53 は、非特異的と特異的 DNA 配列に対して、異なるドメインで DNA と結合し大きく異なる 4 次構造をとる。そのことは非特異的 DNA 上の探索効率を高めつつ、特異的 DNA に強く結合するために有利なのかもしれない。この研究で、細胞状況に応じて 4 次構造を変える多機能多ドメイン蛋白質の重要性を痛感した。多くの生命現象で活躍する蛋白質はまさに多機能多ドメイン蛋白質であり、その構造可塑性を通じた機能統合は、蛋白質機能理解の骨格をなすと考えるに至った。

2. 研究の目的

本研究の目的は、細胞生物学的に極めて重要な役割をもつ 3 つの多機能多ドメイン蛋白質システムをターゲットとして、リンカーなどの構造可塑性 (アロステリック効果) を通じてどのように複数の機能ドメインが相関し、機能統合を実現できるのか、理論的に明らかにすることである。 3 ターゲットとして、1) 多機能性転写因子 p53、2) 染色体複製開始因子 DnaA、3) MAP キナーゼ・シグナル伝達の scaffold 蛋白質 Ste5、を中心とするシステムを研究する。1, 2 については、実

験研究者と連携して研究を推進する。

3. 研究の方法

A) 3つのターゲット p53, DnaA, Ste5 各々について、高田が分子動力学 (MD) シミュレーション研究を進める。機能統合に重要なフレキシブルリンカー (の一部) の全原子 MD を行い、リンカーの構造情報を得る。これをマルチスケール技法によって粗視化モデルに反映させ、粗視化モデルで蛋白質全長およびその複合体の機能シミュレーションを行う。粗視化シミュレーションには、高田、検崎らが開発中のソフトウェア CafeMol を用いる。p53 については、全長 4 量体の非特異的 DNA 結合モードから特異的結合モードへの構造動態計算を行う。DnaA については、DnaA がまず大腸菌 *oriC* の二重鎖に結合し、その後二重鎖を開裂して一本鎖に結合するまでの構造動態計算を行う。B) p53, DnaA について、実験と比較検証を行う。C) これらの研究からのフィードバックとして、検崎と高田は、粗視化モデルの改良を行う。

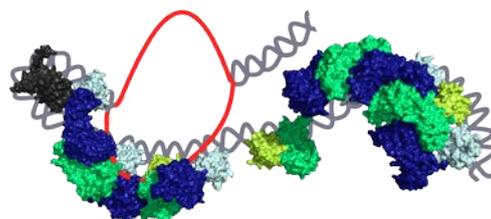
4. 研究成果

DnaA の研究については、複製開始複合体の構造をコンピューターシミュレーションする研究 (研究代表者・高田彰二・京都大学) と生化学的に実験解析する研究 (研究協力者・片山勉・九州大学) との連携で進めた。

まず生化学実験情報を参考にして粗い分子モデルを用いたシミュレーションによって複合体構造を組み立て、次にその構造をすべての原子を含む高精度分子モデルに焼き直した。最後に高精度のシミュレーションを続けることで、これまで不可能であった多数のタンパク質と DNA を含む複製開始複合体のコンピューター内で構築することに成功した。この手法は今回の研究を通して新規に開発したものである。

コンピューターで構築した複製開始複合体は、複製起点の DNA、11 個の DnaA タン

パク質 (図 1 で緑と青の分子はすべて DnaA。分子を区別するために交互に配色)、2 個 1 組の IHF タンパク質 (図 1 の黒) を含む。コンピューターで構築した複製開始複合体は、両側にある 2 組の DnaA 5 量体と、中央で孤立した DnaA 単量体と 3 つの部分構造に分かれていた。

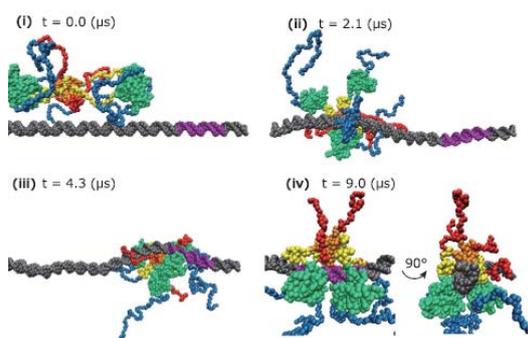


九州大学で行った生化学の実験を通して、コンピューターで構築した複製開始複合体の構造から予想される性質が、実験結果と高い整合性があることがわかった。生化学的な解析では精製した DnaA タンパク質や IHF タンパク質を複製起点の DNA と結合させて、開始複合体を試験管内で再構成して行った。

今回の研究成果により、開始複合体の構造や働きを原子レベルに近い精度で詳しく知ることができるようになった。これは染色体 DNA が複製するメカニズムを理解するために欠かせないものである。また、今回分かった開始複合体の構造や働きは、多くの生物に共通する基本的な生命原理である可能性もある。

p53 については、認識エレメントを含む 2 本鎖 DNA 上に全長 p53 の 4 量体分子を配置し、p53 が認識エレメントを探索する過程を、粗視化分子シミュレーションにより詳細解析した。まず、実験的には高精度で解明されていなかった全長 p53 の 4 量体が DNA に結合した 3 次元構造を、分子シミュレーションによって提案することが出来た。とくに、コアダメインが DNA 認識エレメントに特異結合すると、もうひとつの DNA 結合ドメインである C

末端ドメインはDNAからやや離れる。この全体構造は、p53が非特異的な配列に結合した構造とは全く異なるものであった。p53が、非特異的な配列上をスライディングするとき、認識エレメントを探して強く結合するときとで、まったく異なる全体構造をとることは、探索速度の高速化と探索後の安定な結合という、一見すると相いれない二つの要請を満足するために実現されていると推測できる。



p53のC末端領域には6か所のアセチル化サイトがあり、それらのアセチル化が転写活性に正に寄与することが示唆されているが、その作用機序は未知である。本研究で、6か所のアセチル化サイトすべてをアセチル化すると（正確には、アミノ酸の電荷をゼロにしているだけである）、p53の認識エレメント探索機構に劇的な変化がみられた。すなわち、アセチル化p53は、DNA上をスライディングすることがほとんど出来ず、主に3次元拡散によって認識エレメントに到達した。

課題タンパク質・DNA複合体の計算を通じて、粗視化分子シミュレーションは、他のシミュレーション法とは異なる長時間シミュレーションを可能にし、有用であったが、同時に改良すべき点もさまざまに見られた。高田と検崎（共同研究者）らは協力して、シミュレーション法の改良を続け、その改良をソフトウェアCafeMolに組込んだ。CafeMolは、高田らが独自に開発を続けている粗視化生体分子シミュレーションソフトウェアであり、従来の原子レベルの分子動力学シミュレ

ーションに比して、約100000 - 10000000倍の高速化を実現した（ただし、精度は落ちる）。現在、ソフトウェア（CafeMol 3.0）はウェブ上で（ソースコードとして）公開されており、国内外で利用が進みつつある。

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16件）

- ① Masahiro Shimizu, Yasunori Noguchi, Yukari Sakiyama, Hironori Kawakami, Tsutomu Katayama and Shoji Takada, Near-atomic structural model for bacterial DNA replication initiation complex and its functional insights, Proceedings of the National Academy of Sciences USA, vol.113 no.50, pp.E8021–E8030, DOI:10.1073/pnas.1609649113, 2016, 査読有
- ② Le Chang and Shoji Takada, Histone acetylation dependent energy landscapes in tri-nucleosome revealed by residue-resolved molecular simulations, Scientific Reports, 6: 34441, 13pages, DOI:10.1038/srep34441, 2016, 査読有
- ③ Cheng Tan, Tsuyoshi Terakawa, and Shoji Takada, Dynamic Coupling among Protein Binding, Sliding, and DNA Bending Revealed by Molecular Dynamics, J. Am. Chem. Soc., 138, pp.8512-8522, DOI:10.1021/jacs.6b03729, 2016, 査読有
- ④ Alexander Krah, and Shoji Takada, On the ATP binding site of the ϵ subunit from bacterial F-type ATP synthases, Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics, 1857: pp.332-340, DOI:10.1016/j.bbabi.2016.01.007, 2016, 査読有
- ⑤ Shoji Takada, Ryo Kanada, Cheng Tan, Tsuyoshi Terakawa, Wenfei Li, and Hiroo Kenzaki, Modeling Structural Dynamics of Biomolecular Complexes by Coarse-Grained Molecular Simulations, Acc. Chem. Res., 48 (12), pp.3026–3035, DOI:10.1021/acs.accounts.5b00338, 2015, 査読有
- ⑥ Tsuyoshi Terakawa and Shoji Takada, p53 dynamics upon response element recognition explored by molecular simulations, Scientific Reports, 5: 17107, 10pages, DOI:10.1038/srep17107, 2015, 査読有

- ⑦ Hiroo Kenzaki and Shoji Takada, Partial Unwrapping and Histone Tail Dynamics in Nucleosome Revealed by Coarse-Grained Molecular Simulations, PLoS Computational Biology, 11:e1004443,20pages, DOI:10.1371/journal.pcbi.1004443, 2015, 査読有
- ⑧ Tomohiro Tanaka, Naoto Hori, and Shoji Takada, How Co-translational Folding of Multi-domain Protein Is Affected by Elongation Schedule: Molecular Simulations, PLoS Computational Biology, 11(7):e1004356,20pages, <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1004356>, 2015, 査読有
- ⑨ Alexander Krah and Shoji Takada, On the Mg²⁺ binding site of the ε subunit from bacterial F-type ATP synthases, Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics, 1847(10),pp.1101-1112, DOI:10.1016/j.bbabi.2015.05.018,2015, 査読有
- ⑩ Junichi Ono, Shoji Takada and Shinji Saito, Couplings between hierarchical conformational dynamics from multi-time correlation functions and two-dimensional lifetime spectra: Application to adenylate kinase, Journal of Chemical Physics, 142: 212404, DOI:10.1063/1.4914328, 2015, 査読有
- ⑪ Koji Ono, Mashiho Ito, Shun Hirotab and Shoji Takada, Dimer domain swapping versus monomer folding in apo-myoglobin studied by molecular simulations, Phys. Chem. Chem. Phys., 17,pp.5006-5013,DOI:10.1039/c4cp05203j, 2015, 査読有
- ⑫ Tsuyoshi Terakawa, Junichi Higo, and Shoji Takada, Multi-scale ensemble modeling of modular proteins with intrinsically disordered linker regions: Application to p53, Biophysical Journal, 107, pp.721-729, DOI: 10.1016/j.bpj.2014.06.026, 2014, 査読有
- ⑬ Tsuyoshi Terakawa and Shoji Takada, RESPAC: Method to Determine Partial Charges in Coarse-Grained Protein Model and Its Application to DNA-Binding Proteins, Journal of Chemical Theory and Computation, 10 (2),pp.711-721,DOI: 10.1021/ct4007162, 2014, 査読有
- ⑭ Matthew J. McGrath, I-F. Will Kuo, Shigehiko Hayashi, and Shoji Takada, ATP hydrolysis mechanism in kinesin studied by combined quantum-mechanical molecular-mechanical metadynamics, Journal of the American Chemical Society, 135, pp.8908-8919, DOI: 10.1021/ja401540g, 2013, 査読有
- ⑮ Mashiho Ito, Takeaki Ozawa, and Shoji Takada, Folding Coupled with Assembly in Split Green Fluorescent Proteins Studied by Structure-Based Molecular Simulations, Journal of Physical Chemistry B, 117 (42), pp. 13212-13218,DOI: 10.1021/jp4032817, 2013, 査読有
- ⑯ Xin-Qiu Yao, Nobuhiro Kimura, Satoshi Murakami, and Shoji Takada, Drug Uptake Pathways of Multidrug Transporter AcrB Studied by Molecular Simulations and Site-Directed Mutagenesis Experiments, Journal of the American Chemical Society, 135 (20), pp.7474-7485, DOI: 10.1021/ja310548h, 2013, 査読有
- [学会発表] (計 17 件)
- ① Shoji Takada, Coarse-grained molecular simulations for giant protein-DNA complexes, American Physical Society Meeting, New Orleans March 2017, 2017/3/13-15, New Orleans (USA)
- ② Masahiro Shimizu, Yasunori Noguchi, Yukari Sakiyama, Hironori Kawakami, Tsutomu Katayama, Shoji Takada, NEAR-ATOMIC STRUCTURAL MODEL FOR BACTERIAL DNA REPLICATION INITIATION COMPLEX AND ITS FUNCTIONAL INSIGHTS., Biophysical Society 61st Annual Meeting, 2017/2/11-15, New Orleans (USA)
- ③ 検崎博生、高田彰二、リンカーDNAにより繋がっているダイヌクレオソーム構造のサンプリング、第54回日本生物物理学会年会、2016/11/25-27、つくば国際会議場 (つくば市)
- ④ Shoji Takada, Multiscale Modeling of Flexible Biomolecular Complex, 4th International Conference on Molecular Simulation (ICMS 2016), 2016/10/23-26, Shanghai (China)
- ⑤ Shoji Takada, Multiscale Modeling of Molecular Motors and Dynamic Protein-Nucleic Acid Complexes, Molecular Machines of Life: Simulation Meets Experiment, 2016/5/23-27, Hong Kong (China)
- ⑥ Shoji Takada, Structural insights into chromatin folding and transcriptional regulation, The International Chemical Congress of Pacific basin Societies 2015,

- 2015/12/15-16, Honolulu (USA)
- ⑦ 検崎博生、生体分子粗視化シミュレータ CafeMol と DNA/タンパク質複合体のシミュレーション、CBI 学会 2015 年大会、2015/10/27-29、タワーホール船堀（東京都）
- ⑧ 検崎博生、高田彰二、粗視化モデルによるダイヌクレオソーム間の相互作用とヒストンテイルの役割、第 53 回日本生物物理学会年会、2015/9/13-15、金沢大学角間キャンパス（金沢市）
- ⑨ Shoji Takada, Coarse-grained modeling of flexible biomolecular complexes, 2015 Shanghai Symposium on Frontiers in Computational Chemistry, 2015/8/24-26, Shanghai (China)
- ⑩ 検崎博生、高田彰二、Structural dynamics of nucleosome by coarse-grained model、The 4D NUCLEOME 2014、2014/12/17-20、安芸グランドホテル（広島県廿日市）
- ⑪ 検崎博生、高田彰二、粗視化シミュレーションによる多ヌクレオソーム系の構造サンプリング、第 52 回日本生物物理学会年会、2014/9/25-27、札幌コンベンションセンター（札幌市）
- ⑫ Shoji Takada, Knotted Structures in Refolding and Cotranslational Folding of Multi-domain Protein, Biophysical Society Thematic Meeting on "Significance of Knotted Structures for Function of Proteins and Nucleic Acids", 2014/9/17-20, Warsaw (Poland)
- ⑬ Shoji Takada, Coarse-Grained Modeling of Protein-DNA complexes, Workshop on "Coarse-graining as a Frontier of Statistical Mechanics", 2014/6/16-18, Santa Fe (USA)
- ⑭ Shoji Takada, Functional Dynamics of Disordered Regions in Multi-Domain Proteins, Gordon Research Conference "Protein Folding Dynamics", 2014/1/5-10, Texas (USA)
- ⑮ Shoji Takada, Structure of model chromatin and dynamics of transcription factors studied by coarse-grained simulations, 第 51 回日本生物物理学会年会、2013/10/28-30, 国立国際会議場（京都市）
- ⑯ Shoji Takada, Flexibility and specificity in protein-DNA complexes, International Symposium on Physical Principles and Underlying Mechanisms of Biomolecules and Materials, 2013/8/3-5, Beijing, China
- ⑰ Shoji Takada, Co-translational Folding Studied by Coarse-Grained Molecular Simulations, Membrane Protein Folding, Biophysical Society Meetings, 2013/5/19-22, Seoul (Korea)

〔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〕（計 3 件）

- ① ホームページ
2016 年 11 月 29 日九州大学
（染色体 DNA の複製開始複合体の精密構造が初めてみえるように-遺伝情報の継承を担う分子機構の解明-）
<https://www.kyushu-u.ac.jp/ja/researches/view/63>
- ② テレビ
2016 年 11 月 29 日
放送局：FBS（福岡放送）
番組名：NEWS めんたい Plus
- ③ ホームページ
2016 年 11 月 30 日京都大学
（染色体 DNA の複製開始複合体の精密構造が初めてみえるように-遺伝情報の継承を担う分子機構の解明-）
http://www.kyoto-u.ac.jp/ja/research/research_results/2016/161129_2.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高田 彰二 (TAKADA, Shoji)
京都大学・大学院理学研究科・教授
研究者番号：6 0 4 0 4 0 8 6

(2) 研究分担者

検崎 博生 (KENZAKI, Hiroo)
独立行政法人理化学研究所・情報基盤センター・研究員
研究者番号：2 0 4 0 2 4 6 4