

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 15 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25840060

研究課題名(和文)全原子構造探索によるタンパク質相互作用過程の解析

研究課題名(英文)All-atom conformational sampling of protein-protein interaction

研究代表者

森次 圭(Moritsugu, Kei)

横浜市立大学・その他の研究科・その他

研究者番号：80599506

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：タンパク質相互作用はシグナル伝達や転写制御といった細胞内生命現象の素過程である。本研究では、タンパク質複合体形成過程の計算機シミュレーションに取り組み、実際の生理学的環境に沿った溶媒中での網羅的な全原子構造探索に成功した。統計力学に基づいた構造アンサンブルの解析の結果、nativeな側鎖相互作用形成や脱水和の過程を経つつdownhillなファネル状のエネルギー面を滑り降りることで複合体を形成する原子解像度の描像が得られた。また、常磁性緩和促進の実験で示唆された遷移中間体の構造を示し、静電相互作用を組み替えながら複合体構造を効率的に探索する過程を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Protein-protein interaction is an elementary process of biological phenomena in cell such as signal transduction and transcriptional regulation. In this study, computer simulations of protein complexes were performed, allowing all-atom conformational sampling of the protein-protein interaction processes in solution to be successfully achieved. Statistical-physics-based analyses of the derived structural ensembles yielded a picture of the interaction processes at atomistic level by way of native-interaction formation and desolvation along downhill-like funnel energy landscape. The structural ensemble related to encounter complexes observed from paramagnetic relaxation enhancement experiment was also shown, demonstrating a so-called target-search process leading to the native complex formation via exchanging electrostatic interactions between a pair of protein molecules.

研究分野：計算生物物理

キーワード：タンパク質相互作用 分子動力学シミュレーション 全原子空間探索 MSES法 barnase-barstar複合体
EIN-HPr複合体 常磁性緩和促進

1. 研究開始当初の背景

タンパク質などの生体分子は、他のタンパク質との特異的な複合体形成を伴う相互作用によりシグナル伝達や転写制御といった機能を発揮する。そのような「タンパク質相互作用」がダイナミックに制御・発現される分子メカニズムを解明することは、生命現象の素過程の物理化学的理解、さらに、構造に基づいた機能性分子の効率的な新規設計につながると言える。

近年、プロテオーム解析によりタンパク質間相互作用の検出が大規模に行われるようになり、BIND、DIP、HPID といったデータベースの構築も進んでいる。さらに、システムバイオロジーや細胞シミュレーションのような計算機手法により、代謝経路といった生命現象のシミュレーションも行われている。一方でタンパク質ネットワークの構成要素である一つ一つのタンパク質複合体については、従来から数多くの実験・計算的手法により解析が行われてきた。実験としては、NMR や X 線結晶解析による立体構造解析、示差走査型熱量計 (DSC) や等温滴定型熱量計 (ITC) による熱力学解析、ストップフロー法や Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) のような一分子計測による速度論解析があり、近年では、常磁性緩和促進 (PRE) 法による遷移中間体 (encounter complex) の解析や転移交差飽和 (TCS) 法・Saturation Transfer Difference (STD) 法などによる複合体境界面の決定も行われている。また、計算としては、タンパク質複合体の立体構造モデリングや結合自由エネルギー計算が挙げられる。

しかしながら、プロテオーム解析により得られた全タンパク質複合体に対して網羅的に解析を行うことは不可能に近い。そこで、タンパク質複合体形成の分子メカニズムを代表的なタンパク質複合体を用いて物理化学的に理解することが研究の第一段階となる。例えばタンパク質複合体のモデルとして数多くの実験・計算が行われている barnase-barster 複合体の研究では、静電相互作用によるまず非特異的に弱く結合した遷移中間体を形成したのちに脱水和過程や側鎖の緩和過程を経て複合体が形成されることが示唆されている。しかしながら実験では側鎖のパッキングや水和構造といった原子レベルでの動的構造を見ることは困難であり、また、現在までの計算機シミュレーションによる研究でも、(1) 構造モデルとしてタンパク質の粗視化された自由度を用いた、解像度の低い構造アンサンブルである点 (全原子モデルでの詳細なタンパク質間相互作用が表現できない)、(2) 溶媒条件など、実際の生理学的環境からかけ離れた大雑把に近似された条件下での構造である点 (水和効果が表現されない) に不満が残る。

本研究では、計算機手法を適用し、生理学的環境下でのタンパク質相互作用形成過程

の構造アンサンブルを原子レベルの解像度で得ることを目指す。従来の分子動力学シミュレーションでは、初期構造にトラップされて大域的なサンプリングがうまくいかない場合が多く、マルチカノニカル法や温度レプリカ交換法といった拡張アンサンブル法の導入が必須である。これらはタンパク質のフォールディング経路計算など幅広く用いられてきた手法であるが、自由度の大きな系、特に、溶媒をたくさん含んだ系への適用が困難であった。そこで、本研究代表者らが開発した新規の拡張アンサンブル法である Multi-Scale Enhanced Sampling (MSES) 法を適用する。この MSES 法では、全原子自由度モデル (MM) とタンパク質自由度を粗視化したモデル (CG) の両方の自由度でマルチスケールシミュレーションを実行し、高速かつ広範に動く CG モデルが MM をドライブすることにより高解像度な全原子構造を効率的に得ることができる。タンパク質複合体の全原子構造アンサンブルを計算することにより、原子レベルでの脱水和過程や側鎖の相互作用過程を直接観測することができ、タンパク質複合体が形成されるダイナミックな過程の物理化学的理解につながる。

2. 研究の目的

タンパク質相互作用はシグナル伝達や転写制御といった細胞内生命現象の素過程である。本研究では、常磁性緩和促進法などの新規構造解析技術と研究代表者らが新規に開発した全原子構造サンプリング計算法 (MSES 法) を組み合わせたタンパク質複合体形成過程の解析を行う。タンパク質複合体モデルとして多くの実験・計算が行われている barnase-barster 複合体と常磁性緩和促進法の実験データのある EIN-HPr 複合体に対して MSES 法を適用し、複合体形成における水素結合の形成とそれに伴う脱水和過程や側鎖相互作用の緩和過程、また、非特異的に結合した遷移中間体から複合体構造を効率的に探索するターゲットサーチ過程を原子レベルの解像度で明らかにする。

3. 研究の方法

タンパク質複合体モデルとして実験や計算で研究が進んでいる barnase-barster と常磁性緩和促進法 (PRE) の実験データのある EIN-HPr 複合体について溶液中全原子構造サンプリングを MSES 法により試みた。barnase-barster の研究では、複合体構造近傍の構造アンサンブルを計算し、複合体形成の最終段階における水素結合の形成とそれに伴う側鎖の緩和過程や脱水和過程を明らかにした。EIN-HPr 複合体の研究では、PRE データをもとに粗視化モデルを構築、マルチスケールな構造サンプリング手法である MSES 法と組み合わせることにより、溶液中の遷移中間体構造を原子解像度で決定した。また、遷移中間体から複合体構造に到達する自由

エネルギー面を計算し、遷移中間体で非特異的に結合した側鎖構造、また、複合体構造を探索するターゲットサーチ過程におけるタンパク質間の接触様式について解析を行った。

barnase-barster 複合体

初期構造モデルとして野生型 (PDB: 1BRS) の結晶構造を用い、溶媒水を陽に含んだモデル (約 3 万原子系) を構築した。全原子モデル力場としては AMBER ff99SBildn[5] を用いる。粗視化モデル (CG) の自由度としてはアミノ酸の C α 原子を考え、粗視化モデル力場としては、タンパク質内相互作用にはタンパク質の粗視化モデルでよく用いられる弾性ネットワークモデルを、二つのタンパク質間相互作用には複合体構造において最安定になるような Lennard Jones 型ポテンシャルを適用し、複合体構造近傍をゆるやかに遷移できるようなものを構築した。MM と CG 間の拘束としては、2 つのタンパク質表面の残基ペア間の距離が MM と CG で同じになるような拘束を与えた。MM と CG のばね強度を変えたテスト計算により、12 個のレプリカ計算により十分な構造サンプリングができることを確認した。1 レプリカに 16 コア (1 ノード) を用い、12 x 16 = 192 コアでのシミュレーションを 100 ns にかけて実行した。ハミルトニアンレプリカ交換 MSES シミュレーションの実行には、理化学研究所の自チームで独自に開発されたマルチスケールシミュレーションプログラム μ 2lib を用いた。

EIN-HPr 複合体

初期構造としては、NMR の構造モデル (PDB: 3EZA) を用い、溶媒水を陽に含んだモデル (約 4 万原子系) を構築した。MM と CG のポテンシャル、また、MM と CG 間の拘束については barnase-barster 複合体と同様の力場を用いた。MM と CG のばね強度を変えた 20 個のハミルトニアンレプリカ交換 MSES シミュレーションを 100 ns 実行することにより、十分な全原子構造サンプリングを実現した。

4. 研究成果

barnase-barster 複合体

ハミルトニアンレプリカ交換 MSES 法を 100 ns にかけて実行することで、barnase-barster 複合体形成過程のサンプリングシミュレーションを実現した。得られた構造アンサンブルから自由エネルギー地形を計算した結果、平衡 MD より幅広い空間で構造がサンプルできたことを確認した (図 1)。

次に、複合体形成に沿った経路に注目し、複合体構造における原子コンタクト (native contact) を反応座標として自由エネルギー地形を計算したところ、2 つのタンパク質の相互作用が特定のパスを経ることなく downhill なファネル状のエネルギー面を滑り降りる

ことにより形成されることが示された (図 2)。また、相互作用形成過程でのタンパク質間の接触原子ペア数と水和水の数を計算したところ、複合体に近づくにつれて原子間相互作用が形成され、それに従い水和水が離れる脱水和が起こることがわかった (図 3)。

さらに、複合体界面での水素結合形成に注目した解析を行った。Native contact 数が大きな MSES の構造アンサンブルでは、結晶構造で形成されている 8 つの水素結合が再現されていた。8 つの水素結合は、結合様式から 2 つの局所的な界面を形成していると言える (図 4)。2 つの界面の形成過程を見ると、主鎖間の結合で形成される界面 2 が複合体形成を安定化するような補助的な役割を果たすのに対して、側鎖間の結合で形成される界面 1 が複合体形成に決定的であることが明らかになった (図 5)。界面 1 に関わるアミノ酸残基は 1 残基置換実験で自由エネルギー差 ($\Delta\Delta G$) が大きい、つまり、複合体形成における相互作用形成に必須であることが実験で示されており、シミュレーション結果とよく一致している。

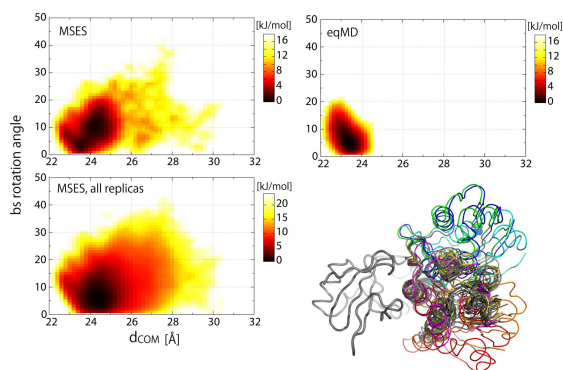


図 1: barnase-barster 複合体ハミルトニアンレプリカ交換 MSES 法で得られた自由エネルギー地形。2 タンパク質の重心間距離と barnase で固定したときの barstar の回転角を反応座標とした。平衡 MD (eqMD) の結果も示した。また、MSES 法で得られた代表構造 (カラー) と平衡 MD の代表構造 (黒) を右下図に示した。

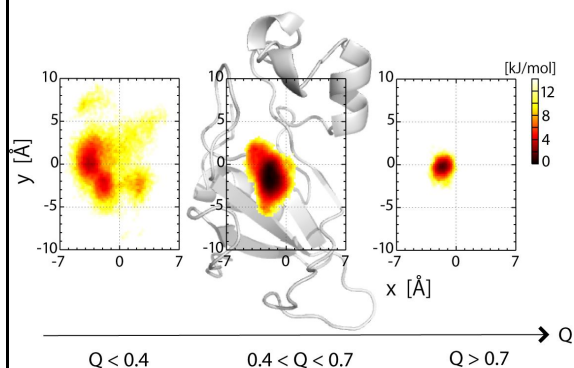


図 2: barnase-barster 複合体形成自由エネルギー地形の native contact (Q) 依存性。境界面における 2 タンパク質の接触面の重心分布を計算した。

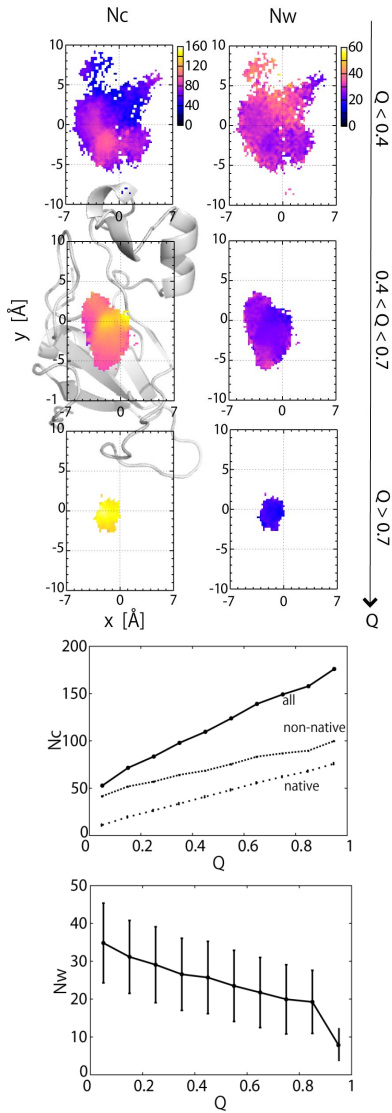


図 3: barnase-barstar 複合体形成における原子コンタクト数(N_C)と水和水の数 (N_W) の自由エネルギー地形。図 3 と同じ反応座標を用いた。 N_C と N_W の native contact 依存性も下図に示した。

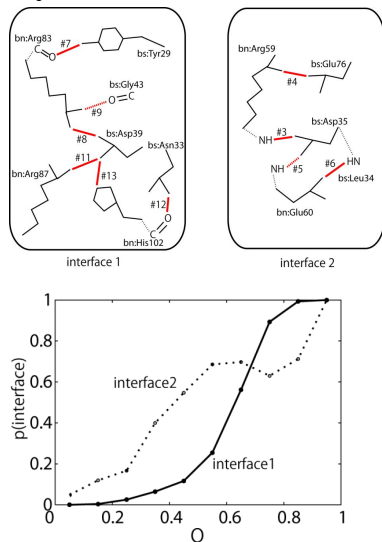


図 4: barnase-barstar 複合体の界面 1 と 2 における水素結合。下図は、界面 1 と 2 での水素結合形成確率の native contact 依存性。

EIN-HPPr 複合体

ハミルトニアンレプリカ交換 MSES 法を 100 ns 実行することにより、EIN-HPPr 複合体タンパク質複合体形成過程の全原子サンプリングシミュレーションを実現した。まず得られた構造アンサンブルが複数のプループを用いた PRE 実験のスペクトルを表現するかを調べたところ、一つの局所的な安定構造だけでは不十分であり、まさに MSES 法により得られた広範な構造アンサンブルが実験データの再現に必須であることが示された。このことは、EIN と HPPr の遭遇から特異的複合体形成までの過程が今研究のシミュレーションにより全原子レベルでよくサンプリングできたことを意味している。

構造アンサンブルから自由エネルギー面を計算し解析を行った結果、EIN-HPPr 相互作用過程において、剛体的な HPPr の運動が EIN の接触面上の静電相互作用を仲立ちとした一次元的な動きとして記述されることがわかった (図 5)。つまり、遭遇から特異的複合体形成に至る過程が、比較的ゆるやかな自由エネルギー面に沿って静電相互作用のフレームをシフトさせつつ最適な相補的構造を探索する運動として説明できることを明らかにした (図 6)。またその過程において、原子間相互作用の形成に伴う脱水和や比較的柔軟な EIN の内部運動が重要な役割を果たすことが示唆された。

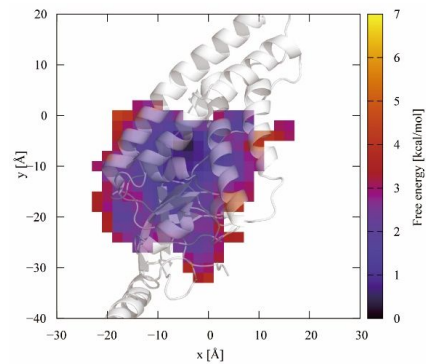


図 5: EIN-HPPr 複合体形成過程の自由エネルギー地形。EIN を固定したときの HPPr 分子の重心位置を計算した。

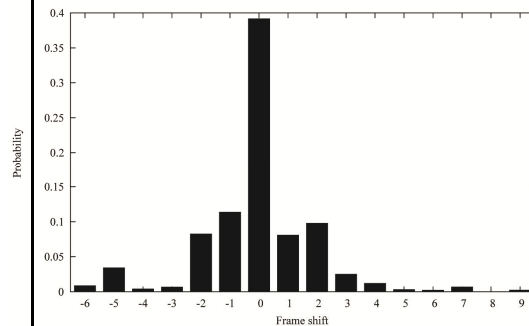


図 6: EIN-HPPr 複合体における静電相互作用のフレームに沿った確率分布。フレーム 0 は複合体構造を表す。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

Hiroshi Fujisaki, Motoyuki Shiga, Kei Moritsugu, Akinori Kidera, “Multiscale Enhanced Path Sampling Based on the Onsager-Machlup Action: Application to a Model Polymer”, Journal of Chemical Physics 139, 054117 (2013).

DOI: 10.1063/1.4817209

Kei Moritsugu, Tohru Terada, Akinori Kidera, “Multiscale Enhanced Sampling Driven by Multiple Coarse-grained Models”, Chemical Physics Letters 616–617, 20-24 (2014).

DOI: 10.1016/j.cplett.2014.10.009

Kei Moritsugu, Tohru Terada, Akinori Kidera, “Energy Landscape of All-atom Protein-protein Interactions Revealed by Multiscale Enhanced Sampling”, PLOS Computational Biology 10, e1003901 (2014).

DOI: 10.1371/journal.pcbi.1003901

森次 圭、「マルチスケール手法によるタンパク質全原子構造サンプリング」、分子シミュレーション研究会会誌 “アンサンプル” 16, 227-233 (2014).

DOI: なし

〔学会発表〕(計 4 件)

森次 圭、寺田 透、木寺 詔紀、「新規全原子構造探索法 (MSES) とその天然変性蛋白質への適用」、第 13 回蛋白質科学学会年会 (招待講演) 鳥取、2013 年 6 月

Kei Moritsugu, Tohru Terada, Akinori Kidera, “Ligand binding process at atomistic resolution revealed by multiscale enhanced sampling”, 第 52 回日本生物物理学会年会、札幌、2014 年 9 月

Kei Moritsugu, Tohru Terada, Akinori Kidera, “Energy Landscape of All-atom Protein-protein Interactions Revealed by Multiscale Enhanced Sampling”, NOSE30 シンポジウム、東京、2014 年 11 月

Satoshi Omori, Kei Moritsugu, Akinori Kidera, “Structural ensemble of protein encounter complexes revealed by multiscale enhanced sampling”, Biophysical Society 59th Annual Meeting、アメリカ、2015 年 2 月

〔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〕

該当しない

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

森次 圭 (MORITSUGU, Kei)

横浜市立大学大学院 生命医科学研究科

特任准教授

研究者番号: 80599506