

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26330331

研究課題名(和文) 遺伝性疾患における発現変異タンパク質の分子動力学シミュレーションによる評価

研究課題名(英文) Molecular dynamic simulation for evaluation of an impact of mutations in a genetic disease

研究代表者

椎名 政昭 (SHIINA, Masaaki)

横浜市立大学・医学部・助教

研究者番号：30347299

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：構造生物学を分子遺伝学に応用し、遺伝性疾患の発症機構を解明することを目指した。国内外の遺伝学研究室によって遺伝性疾患の原因として新たに同定された遺伝子変異がタンパク質構造に与える影響について、ホモロジーモデリングによる分子モデル構築や自由エネルギー計算などの静的な解析に加え、分子動力学計算(MD)による動的な解析により調べた。その結果、静的な解析だけでは捉えることができなかった、NUP107遺伝子の変異による分子構造への影響について、MDを併用することで明らかにし、遺伝学研究におけるMDの有用性を示した。

研究成果の概要(英文)：Rapid progress in structural biology and molecular genetics is obvious, yet their cooperation remains out of reach. Our aim is to develop in silico pipeline, which enables us to assess the impact of the mutations found by domestic and international genetics laboratories from the structural viewpoint. Specifically, we analyzed the mutations not only by static structural analysis such as homology modeling and free energy change calculation but also by dynamic analysis using molecular dynamics (MD) simulation. We showed that MD is a powerful tool to evaluate effects of gene mutations on protein structure and function.

研究分野：生化学、構造生物学

キーワード：分子動力学 構造生物学 分子遺伝学

1. 研究開始当初の背景

タンパク質や核酸の立体構造を解析する構造生物学と、疾患の原因となる遺伝子変異を探索する分子遺伝学は、ともに解析技術の発展や普及によって近年研究が加速した研究分野である。

構造生物学では、タンパク質や核酸の三次元構造は、X線結晶構造解析、核磁気共鳴法(NMR)および電子顕微鏡により実験的に決定され、蛋白質構造データバンク(PDB; Protein Data Bank)に登録される。放射光技術と結晶化技術の進歩に伴って、PDB登録数は加速度的に増加し、現在は7万を優に超えている。

一方、分子遺伝学では、遺伝性疾患を標的としたエクソーム解析において、次世代シーケンサーの登場によって解析が加速し、疾患の発症に関与する、エクソン領域における遺伝子変異が日々発見、同定されつつある。

この2つの研究分野は、これまで全く個別に発展してきており、両者の融合によって疾患の発症機構を分子構造レベルで理解するための研究体制は十分ではない。その理由として、分子構造を利用するためには、生体分子の構造そのものの理解に加え、計算科学的手法などの専門知識を必要とするため、分子遺伝学者が自ら参入するには障壁が高いことが挙げられる。そこで、構造生物学者の協力が必要となるが、ヒト遺伝学研究者の多くは医学部に在籍しており、理工系に多い構造生物学者の協力が得られにくい環境にあることが多い。

構造生物学を専門とする本研究室は、医学部に所属するため本学遺伝学教室との共同研究に取り組みやすい環境にあり、アミノ酸変異による立体構造への影響を多数解析してきた(Tsurusaki Y, et.al., *Nat Genet*, 2012など)。最近では、ハーバード大や西オーストラリア大の分子遺伝学研究グループとの共同研究にも取り組み、成果を上げている(Ravenscroft G, et.al., *Am J Hum Genet* 2013 Jul 11;93(1):6-18, Gupta V, et.al., *Am J Hum Genet* 2013 Dec 5;93(6):1108-1117)。

これらの解析の経験から、疾患の発症につながるアミノ酸変異において、タンパク質の折り畳みを阻害する、あるいは、タンパク質間相互作用を阻害することが容易に予想できる例がある一方で、変異の分子構造への影響を判断することが難しいケースもあることがわかってきた。後者を解析するためには、より精度の高い解析手法が必要であると考えられる。

我々がこれまでに確立した、アミノ酸変異をもつ分子構造を用いた評価パイプラインは、以下の如くである。まず、アミノ酸変異が認められたタンパク質の分子構造をPDBデータベースを利用して検索する。該当するタンパク質の立体構造がデータベース上に見つからない場合は、ホモロジー検索を行い、

類似性の高い立体構造で代用する。この構造を基に、コンピューター上でアミノ酸変異を導入し、野生型および変異型タンパク質の自由エネルギー差を、FOLDXなどのソフトウェアを用いて計算し、タンパク質の安定性に対するアミノ酸変異による影響の指標とする。さらに、立体構造中にアミノ酸変異部位をマップし、二次構造や疎水性コア、活性中心や他のタンパク質との相互作用部位などの位置関係を調べ、定性的に考察する。しかし、この解析方法は静的な構造のみを評価しており、タンパク質の機能発現において極めて重要な分子構造の動的性質を考慮していない点に問題がある。この問題は、X線結晶構造からは分子構造の動的な性質についての情報が得られないことに起因している。分子構造の動的な情報はNMRによる緩和時間測定によって得られるが、測定までに手間と時間を要する上に、測定原理上、解析可能な分子量に上限があり、実際の解析に適用できるケースは極めて少ない。そこで、本研究では、分子の動的情報を得るための有効な方法の一つである分子動力学計算(MD)によるコンピューターシミュレーションを併せて用いることで、この問題に取り組む。

構造生物学も遺伝学も、技術革新により大量の情報を蓄積することに成功してきた。また、コンピューターの性能の劇的な向上により、従来は計算に長時間を要した動的な分子シミュレーションについても、今では一般の研究レベルで可能となりつつある。蓄積された膨大な情報をうまく融合して利用し、より有用な情報を引き出して現実の問題解決に役立てていく段階であると思われる。

2. 研究の目的

本研究は、エクソーム解析を行う遺伝学研究者が見出した遺伝子変異が分子構造に与える影響を評価するため、従来の静的分子構造解析に加え、MDシミュレーションを取り入れた解析パイプラインを整備し、疾患発症機構をより正確に理解することを目指す。

3. 研究の方法

遺伝性疾患の発症に関与する遺伝子変異によって引き起こされる変異タンパク質の機能不全について、静的および動的な分子構造の観点から解析する。その目的で、高性能ワークステーションを導入し、分子動力学(MD)シミュレーションを行う。

4. 研究成果

遺伝性疾患の原因として国内外の遺伝学研究者により新たに見出された分子変異について、ホモロジーモデリングによる分子モデル構築、自由エネルギー計算、および分子動力学計算(MD)を組み合わせた解析システムを併用して解析を行い、原著論文21報に報告した。

これらの解析では、遺伝子変異によって変

異型タンパク質の機能不全が引き起こされる機序を静的な分子構造の観点から説明することが可能なケースもあったが、変異型タンパク質の機能異常が実験的に確かめられているのにも関わらず、分子構造モデルを利用した自由エネルギー計算では、アミノ酸置換変異の影響を捉えることができない例も散見された。例えば、核膜孔複合体を構成するタンパク質の一つ NUP107 の遺伝子変異は、ステロイド抵抗性を示す小児期早期発症のネフローゼ症候群を引き起こす原因として同定された。変異型の NUP107 タンパク質は、既知の結合タンパク質である NUP133 との結合が障害されること、および核膜孔への局在が障害されることが *in vitro* の実験で解明されている。しかし、X線結晶構造上では、変異部位は NUP107 と NUP133 との相互作用部位とは離れた領域にあり、自由エネルギー計算でも変異の影響を捉えることはできなかった。そこで、同定された遺伝子変異が、タンパク質の動的な性質に影響を与えることで分子間相互作用を阻害している可能性を考え、これを検証するため、分子動力学計算 (MD) を用いて遺伝子変異が分子構造に与える影響をシミュレートした。具体的には、野生型および変異型タンパク質について、新たに導入したワークステーションを用いて、GROMACS および OPLS-(AAL)/L 力場による 30nsec の MD シミュレーションを行った。その結果、同定された NUP107 のアミノ酸置換変異が、分子構造上で変異部位とは離れた領域の分子の揺らぎを増大させることが推定された。揺らぎの増大が認められた分子領域は、NUP133 との相互作用領域に相当していた。このことから、新規に同定された NUP107 のアミノ酸変異は、変異部位とは離れた領域の分子のゆらぎを増大させ、遠隔からその分子間相互作用を弱めている可能性が示唆された。

タンパク質のアミノ酸置換変異が、変異部位とは構造的に離れた分子領域に与える影響を予想することは、単にアミノ酸変異を結晶構造上にプロットしただけでは困難なことが多い。しかし、実験的な動的構造解析は、技術的な限界とコスト面での制約が大きく、多くの場合、実行困難である。MD シミュレーションであれば、計算機が使用できる環境と、基本的な計算技術さえ身につければ実行可能であり、NUP107 の遺伝子変異の解析例のように、変板型タンパク質の機能異常を実験レベルで証明している場合には特に、MD シミュレーションによる解析は、変異による機能破綻の分子機構を理解するうえで極めて有用であると思われる。

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 21 件)

A novel GFI1B mutation at the first zinc finger domain causes congenital macrothrombocytopenia. Uchiyama Y, Ogawa Y, Shiina M, Ogata K, Matsumoto N, (15 人中、4 番目), *British journal of haematology* doi: 10.1111/bjh.14710 (2017)

Molecular mechanisms of cooperative binding of transcription factors Runx1-CBF β -Ets1 on the TCR α gene enhancer. Kasahara K, Shiina M, Ogata K, (5 人中、2 番目), *PLoS one* 12, 査読有, e0172654 (2017). doi 10.1371/journal.pone.0172654

Biallelic mutations in the 3' exonuclease TOE1 cause pontocerebellar hypoplasia and uncover a role in snRNA processing. Lardelli RM, Schaffer AE, Matsumoto N, Shiina M, Ogata K, (59 人中、43 番目), *Nature genetics* 49, 査読有, 457-464 (2017). doi 10.1038/ng.3762

PARS2 and NARS2 mutations in infantile-onset neurodegenerative disorder. Mizuguchi T, Nakashima M, Shiina M, Ogata K, Matsumoto N, (17 人中、12 番目), *Journal of human genetics* 62, 査読有, 525-529 (2017). doi 10.1038/jhg.2016.163

Biallelic Mutations in MYPN, Encoding Myopalladin, Are Associated with Childhood-Onset, Slowly Progressive Nemaline Myopathy. Miyatake S, Mitsushashi S, Ogata K, Shiina M, Ogata K, Matsumoto N, (23 人中、12 番目), *American journal of human genetics* 100, 査読有, 169-178 (2017). doi 10.1016/j.ajhg.2016.11.017

The first report of Japanese patients with asparagine synthetase deficiency. Yamamoto T, Endo W, Shiina M, Ogata K, Matsumoto N, (14 人中、9 番目), *Brain & development* 39, 査読有, 236-242 (2017). doi 10.1016/j.braindev.2016.09.010

Distal arthrogryposis with variable clinical expression caused by *TNNI2* mutation. Čulić V, Miyake N, Shiina M, Ogata K, Matsumoto N, (9 人中、7 番目), *Human genome variation* 3, 査読有, 16035 (2016). doi 10.1038/hgv.2016.35

Biallelic TBCD Mutations Cause Early-Onset Neurodegenerative Encephalopathy. Miyake N, Fukai R, Shiina M, Ogata K, Matsumoto N, (33 人中、9 番目), *American journal of human genetics* 99, 査読有, 950-961 (2016). doi 10.1016/j.ajhg.2016.08.005

De novo DNMI mutations in two cases of epileptic encephalopathy. Nakashima M, Kouga T, Shiina M, Ogata K, Matsumoto N, (12 人中、4 番目), *Epilepsia* 57, 査読有, e18-23 (2016). doi 10.1111/epi.13257

A PLK4 mutation causing azoospermia in a man with Sertoli cell-only syndrome.

Miyamoto T, Bando Y, Shiina M, Ogata K, Matsumoto N, (11人中、8番目), *Andrology* 4, 査読有, 75-81 (2016). doi 10.1111/andr.12113

Phenotypic spectrum of GNAO1 variants: epileptic encephalopathy to involuntary movements with severe developmental delay. Saitsu H, Fukai R, Shiina M, Ogata K, Matsumoto N, (22人中、20番目), *European journal of human genetics : EJHG* 24, 査読有, 129-34 (2016). doi 10.1038/ejhg.2015.92

Identification of HOXD4 Mutations in Spinal Extradural Arachnoid Cyst. Ogura Y, Miyake N, Shiina M, Ogata K, Matsumoto N, (18人中、8番目), *PloS one* 10, 査読有, e0142126 (2015). doi 10.1371/journal.pone.0142126

Biallelic Mutations in Nuclear Pore Complex Subunit NUP107 Cause Early-Childhood-Onset Steroid-Resistant Nephrotic Syndrome. Miyake N, Tsukaguchi H, Shiina M, Ogata K, Matsumoto N, (29人中、6番目), *American journal of human genetics* 97, 査読有, 555-66 (2015). doi 10.1016/j.ajhg.2015.08.013

Novel compound heterozygous LIAS mutations cause glycine encephalopathy. Tsurusaki Y, Tanaka R, Shiina M, Ogata K, Matsumoto N, (11人中、5番目), *Journal of human genetics* 60, 査読有, 631-5 (2015). doi 10.1038/jhg.2015.72

Somatic Mutations in the MTOR gene cause focal cortical dysplasia type IIb. Nakashima M, Saitsu H, Shiina M, Ogata K, Matsumoto N, (20人中、7番目), *Annals of neurology* 78, 査読有, 375-86 (2015). doi 10.1002/ana.24444

Short-lasting unilateral neuralgiform headache attacks with ipsilateral facial flushing is a new variant of paroxysmal extreme pain disorder. Imai N, Miyake N, Shiina M, Ogata K, Matsumoto N, (9人中、7番目), *The journal of headache and pain* 16, 査読有, 519 (2015). doi 10.1186/s10194-015-0519-3

GRIN1 mutations cause encephalopathy with infantile-onset epilepsy, and hyperkinetic and stereotyped movement disorders. Ohba C, Shiina M, Ogata K, Matsumoto N, (21人中、2番目), *Epilepsia* 56, 査読有, 841-8 (2015). doi 10.1111/epi.12987

A novel allosteric mechanism on protein-DNA interactions underlying the phosphorylation-dependent regulation of Ets1 target gene expressions. Shiina M, Hamada K, Ogata K, (9人中、1番目), *Journal of molecular biology* 427, 査読有, 1655-69 (2015). doi 10.1016/j.jmb.2014.07.020

Late-onset spastic ataxia phenotype in a

patient with a homozygous DDHD2 mutation. Doi H, Ushiyama M, Shiina M, Ogata K, Matsumoto N, (17人中、5番目), *Scientific reports* 4, 査読有, 7132 (2014). doi 10.1038/srep07132

Crystallization of the Ets1-Runx1-CBF β -DNA complex formed on the TCR α gene enhancer. Shiina M, Hamada K, Ogata K, (7人中、1番目), *Acta crystallographica. Section F, Structural biology communications* 70, 査読有, 1380-4 (2014). doi 10.1107/S2053230X14018470

- 21 De novo SOX11 mutations cause Coffin-Siris syndrome. Tsurusaki Y, Koshimizu E, Shiina M, Ogata K, Matsumoto N, (20人中、6番目), *Nature communications* 5, 査読有, 4011 (2014). doi 10.1038/ncomms5011

〔学会発表〕(計 11 件)

Shiina M, Hamada K, Ogata K 他 Search for anti-leukemic drugs targeting the transcription factor Runx1 by INTEND, The 137th Annual Meeting of the Pharmaceutical Society of Japan, 3rd International Symposium for Medical Science, 2017年3月25日、仙台国際センター(宮城県仙台市)

Shiina M, Hamada K, Ogata K 他 Molecular behavior of a higher-order complex of multiple transcription factors on enhancer site upon phosphorylation, 6th International Conference on Structural Biology, 2016年8月22日、Hilton New Orleans Airport Hotel (New Orleans, USA)

Shiina M, Hamada K, Ogata K 他 Molecular mechanism for modulation of a multiple transcription factor complex formed on enhancer site upon phosphorylation, 5th International Conference and Exhibition on Metabolomics, 2016年05月18日、Hyatt Regency Osaka (Osaka, Japan)

Shiina M, Hamada K, Ogata K 他 Regulation of DNA binding of Ets1 by phosphorylation in an intrinsic disordered region, 第14回日本蛋白質科学会, 2014年6月25日、ワークピア横浜(神奈川県・横浜市)

〔図書〕(計 1 件)

椎名 政昭、緒方 一博 他、化学同人、見て分かる構造生物科学、2014、133-160

〔その他〕

ホームページ等

<http://www-user.yokohama-cu.ac.jp/~seika/index.html>

6 . 研究組織
(1)研究代表者

椎名 政昭 (SHIINA, Masaaki)
横浜市立大学・医学部・助教
研究者番号：30347299

(2)研究分担者

緒方 一博 (OGATA, Kazuhiro)
横浜市立大学・医学研究科・教授
研究者番号：90260330